بررسی کاربرد تلفیقی جدایه‌هایی از قارچ‌های میکوریز آربوسکولار و باکتری‌های محرک رشد گیاهی در کنترل نماتد ریشه‌گرهی *Meloidogyne javanica* در گوجه‌فرنگی در شرایط گلخانه*

فاطمه سهرابی[۱]، مهیار شیخ الاسلامی[۲]**، رامین حیدری[۳]، سعید رضائی[۴] و روح‌الله شریفی[۵]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۷/۳؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۷)

چکیده

جهت ارزیابی کاربرد توأم جدایه‌هایی از قارچ‌های میکوریز آربوسکولار و باکتری‌های محرک رشد گیاهی در کنترل نماتد ریشه‌گرهی *Meloidogyne javanica* ، از قارچ‌های میکوریز آربوسکولار *Glomus mosseae* و *G. versiforme* و جدایه‌هایی از باکتری‌های محرک رشد گیاهی *Pseudomonas fluorescens*، *Pseudomonas striata*، *Bacillus subtilis* و *Paenibacillus polymyxa* استفاده گردید. بدین منظور پس از اطمینان از کلنیزاسیون ریشه‌ها توسط قارچ‌های میکوریز و باکتری‌های محرک رشد گیاهی آزمایشی با ۱۵ تیمار و چهار تکرار در شرایط گلخانه انجام شد. نتایج نشان داد که قارچ‌های میکوریز آربوسکولار و باکتری‌های محرک رشد گیاهی باعث افزایش رشد بخش‌های مختلف گیاه و همچنین کاهش شاخص‌های آلودگی نماتد ریشه‌گرهی شدند. همچنین کاربرد تلفیقی این عوامل، نسبت به کاربرد جداگانه هریک از آن‌ها تأثیر بیشتری در کنترل نماتد داشت. نتایج نشان دهنده توانایی بیشتر باکتری *P. polymyxa* نسبت به دیگر عوامل مورد بررسی در کنترل نماتد بود. در این حالت این باکتری توانست به میزان ۵۲٪ سبب کاهش تعداد تخم در توده تخم نسبت به تیمار شاهد نماتد گردد. همچنین کاربرد تلفیقی قارچ میکوریز *G. mosseae* و باکتری *P. polymyxa* بیشترین تأثیر را در کاهش شاخص‌های آلودگی به نماتد ریشه-گرهی داشت به طوری که جمعیت لارو سن دوم را در خاک به میزان ۵۹٪ کاهش داد.

کلیدواژه: بیوکنترل، کشاورزی ارگانیک، مدیریت تلفیقی، نماتد ریشه‌گرهی

---

* محل انجام تحقیق: مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی کرمانشاه، مقاله مستخرج از پایان نامه دکترای تخصصی به راهنمایی آقایان دکتر مهیار شیخ الاسلامی و دکتر رامین حیدری.

** مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: m1sheikh@yahoo.com

۱. دانشجوی دکترای بیماری شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی. واحد علوم و تحقیقات تهران.

۲. استادیار پژوهشی، بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی کرمانشاه.

۳. دانشیار گروه گیاهپزشکی دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی. دانشگاه تهران.

۴. استادیار گروه بیماری شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران.

۵. استادیار گروه گیاهپزشکی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه رازی. کرمانشاه.

Study on combined application of arbuscular mycorrhizal fungi isolates and plant growth promoting rhizobacteria in controlling root-knot nematode *Meloidogyne javanica* in tomato under greenhouse conditions

F. Sohrabi[1], M. Sheikholeslami[2*], R. Heydari[3], S. Rezaee[4], and R. Sharifi[5]

(Received: 25.9.2017; Accepted: 26.2.2018)

Abstract

Efficiency of the application of two species from arbuscular mycorrhizal fungi, *Glomus mosseae* and *G. versiforme*, and four plant growth promoting Rhizobacteria *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas striata*, *Bacillus subtilis* and *Paenibacillus polymyxa* on the control of root-knot nematode, *Meloidogyne javanica*, was studied. Based on our results arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria stimulated the growth of tomato plants and also reduced the severity of the disease caused by *M. javanica*. Combined application of the tested biocontrol agents was more effective than their single usage. *P. polymyxa* was more efficient in controlling *M. javanica* than other implemented biological agents so that this bacterium could decrease egg number in the egg mass of *M. javanica* as 52% compared with nematode alone control treatment. Likewise, the combined application of *G. mosseae* and *P. polymyxa* had the best effect to suppress nematode, so that in this treatment J_2 population decreased as 59% compared with nematode alone treatment.

Keywords: biocontrol, integrated management, organic agriculture, root-knot nematode

*Corresponding author's E-mail: m1sheikh@yahoo.com

1. PhD student of plant pathology. College of agriculture. Science and Research Unit of Islamic Azad University. Tehran, Iran.
2. Assistant Prof. for Plant Protection Research Department, Kermanshah Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Kermanshah, Iran.
3. Associate Prof. for plant pathology, Plant Protection Dep., Faculty of Science and Agricultural Engineering. University of Tehran. Karaj. Iran.
4. Assistant Prof. for plant pathology, College of agriculture. Science and Research Unit of Islamic Azad University. Tehran, Iran.
5. Assistant Prof. for plant pathology, plant protection Dep., Agricultural and Natural Resources Campus, Faculty of Agriculture. Razi University. Kermanshah. Iran.

مقدمه

نماتدهای انگل گیاهی به ویژه نماتدهای ریشه‌گرهی (*Meloidogyne* spp.) به عنوان یکی از گروه‌های مهم عوامل بیماری‌زا، موضوع بسیاری از پژوهش‌های علمی در سال‌های اخیر بوده‌اند. در ایران تاکنون چندین گونه از این نماتدها گزارش شده است که بیشترین شیوع را گونه *M. javanica* دارد (Alijani *et al.* 2015). خسارت بالای این نماتدها و اهمیت محصول، موجب شده است که تلاش زیادی برای مهار این بیمارگرها صورت گیرد (Richard & Emilio 2005). با توجه به روند رو به افزایش تخریب منابع آب، خاک و محیط زیست در اثر کاربرد بی‌رویه مواد شیمیایی در کشاورزی و آلودگی‌های زیست محیطی (Avis *et al.* 2008) ، در سال‌های اخیر استفاده از روش‌های جایگزین و یا حداقل استفاده‌ی متناوب از آن‌ها مورد توجه قرار گرفته است (Roberts *et al.* 2013). برای غلبه بر این مشکلات، پژوهشگران برای دست‌یابی به راه کارهای مناسب مدیریتی، تحقیقات خود را متوجه استفاده از عوامل بیوکنترل کرده‌اند (Sharon *et al.* 2001) و با توجه به جهت‌گیری‌های سیستم‌های جدید کشاورزی و تأکید بر کشاورزی ارگانیک، استفاده از عوامل بیوکنترل در مدیریت بیماری‌های گیاهی جایگاه بسیار مهمی را پیدا کرده است (Ahmadzadeh 2013).

قارچ‌های میکوریز آربوسکولار (Arbuscular Mycorrhizal Fungi, AMF)از جمله عواملی هستند که سبب کاهش بیماری‌های مختلف گیاهی شده و به طور مستقیم و یا غیرمستقیم می‌توانند روی جمعیت نماتد ریشه‌گرهی اثر بگذارند (Linderman 2000 ; Barea *et al.* 2002). قارچ‌های میکوریز در طبیعت در تأمین نیازهای آبی و تغذیه‌ای گیاهان نقش مؤثری دارند و با افزایش جذب فسفر، آب و مواد معدنی سبب افزایش رشد و سلامتی گیاه و همچنین مقاومت در برابر بیماری‌های گیاهی می‌گردند (Rai 2001). یکی دیگر از عوامل زیستی که به منظور افزایش رشد گیاهان و کنترل نماتد ریشه‌گرهی مورد توجه قرار گرفته است کاربرد باکتری‌های افزایش دهنده رشد گیاه (Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR) می‌باشد. این باکتری‌ها شامل سویه‌هایی هستند که حداقل دو ویژگی از سه ویژگی کلنیزاسیون، تحریک رشد و کنترل زیستی را دارا می‌باشند (Weller *et al.* 2002 ; Lucy *et al.* 2004).

با توجه به این که عوامل متعددی فعالیت میکرو-ارگانیسم‌های بیوکنترل را تحت تأثیر قرار می‌دهند، ممکن است که یک عامل بیوکنترل منفرد رشد یافته در شرایط فیزیکی و شیمیایی مناسب در محیط پیچیده جدید کارایی خود را از دست بدهد و یا در خاک‌هایی با شرایط محیطی گوناگون، فعالیت‌های مختلفی داشته باشند. یک راه حل برای غلبه بر بی‌ثباتی در رفتار و فعالیت میکروارگانیسم-های بیوکنترل در شرایط آزمایشگاه و مزرعه، استفاده از مخلوطی از عوامل بیوکنترل به جای کاربرد انفرادی آن-هاست (Ahmadzadeh 2013). با توجه به قابلیت بالای کاربرد عوامل بیولوژیک در کنترل بیماری‌های گیاهی به ویژه کاربرد تلفیقی این عوامل (Varma 2008)، کماکان اطلاعات محدودی در این زمینه وجود دارد. جایزم-وگا و همکاران (۲۰۰۷) در طی تحقیقی تأثیر کاربرد تلفیقی قارچ‌های میکوریز آربوسکولار *G. mosseae* و *G. manihotis* و ریزوباکترهای محرک رشد *Bacillus* spp. را روی پاپایای آلوده به نماتد ریشه‌گرهی *M. incognita* مطالعه کردند. نتایج این بررسی نشان داد که قارچ‌های میکوریز سبب توسعه رشد گیاه پاپایای آلوده به نماتد می-گردد که کاربرد باکتری‌های PGPR می‌تواند سبب تشدید

ایـن تـأثیر گـردد (Jaizme-vega *et al.* 2007). در یـک تحقیق تـأثیر قـارچ میکـوریز *G. aggregatum* و بـاکتری *Bacillus coagulans* و ورمی کمپوست در کنتـرل نماتـد ریشه‌گرهـی *M. incognita* در گیـاه گوجـه‌فرنگـی مـورد مطالعه قرار گرفت. نتایج بررسی نشان داد که کاربرد تـوأم قـارچ میکـوریز، بـاکتری محـرک رشـد گیـاهی و ورمـی کمپوست، سبب کاهش شـاخص‌هـای رشـدی مربـوط بـه نماتد ریشه‌گرهی می‌گردد (Serfoji *et al.* 2010). همچنین در یک آزمایش گلخانه‌ای نشان داده شد که کاربرد قـارچ-هـای آنتاگونیسـت *Aspergillus niger* و *Penicillium chrysogenum*، باکتری‌های محرک رشد *Bacillus subtilis* 7612 و 4684 *Burkholderia cepacia*، قـارچ‌هـای میکـوریز آبوسـکولار *G. intraradices* و *Gigaspora margarita* به صورت کاربرد انفرادی و یا در ترکیب باهم سبب افزایش شاخص‌هـای رشـدی گیـاه گوجـه‌فرنگـی و همچنـین کـاهش شـاخص‌هـای نماتـد گردیـده اسـت (Siddiqui and Sayeed Akhtar 2009). مطالعه روابط بین قـارچ‌هـای میکـوریز آربوسـکولار *G. mosseae* و *G. versiforme* با ریزوباکترهای محرک رشد *Bacillus* sp. و *P. polymyxa* نشـان داده اسـت کـه اگرچـه قـارچ‌هـای میکوریز و باکتری‌هـای PGPR دارای پتانسـیل بیـوکنترلی نماتد ریشـه‌گرهـی *M. incognita* در گیـاه گوجـه‌فرنگـی هستند ولی کاربرد ترکیبـی ایـن میکروارگانیسـم‌هـا سـبب کنترل بهتر نماتد ریشه‌گرهی می‌شود، به طوری که قـارچ-های میکوریز و باکتری‌های PGPR سبب تحریک یکدیگر شـده و در نتیجـه باعـث کـاهش رشـد نماتـد مـی‌گردنـد (Runjin *et al.* 2012).

با توجه به اطلاعات انـدک در مـورد نقـش بیـوکنترلی عوامل زنده به صورت تلفیقی، هدف از این تحقیق بررسی مقایسـه‌ی تعامـل جدایـه‌هـایی از قـارچ‌هـای میکـوریز آربوسکولار و باکتری‌های محرک رشد گیاهی (PGPR) در کاهش خسارت نماتد ریشه‌گرهی بود.

مواد و روش‌های بررسی

شناسـایی و تهیـه جمعیـت نماتـد ریشـه‌گرهـی *M. javanica*

به منظور تهیه جمعیـت نماتـد ریشـه گرهـی، در ابتـدا تعدادی نمونه خاک و ریشه آلوده از مـزارع گوجـه‌فرنگـی جمع‌آوری گردید. در آزمایشـگاه بـا مشـاهده ریشـه‌هـای شسـته شـده در زیـر میکروسـکوپ تشـریح، تـک تـوده تخم‌هایی از گال‌های ریشه انتخاب و جهت تکثیـر و تهیـه جمعیت خالص نماتد در نزدیکی ریشه نشـاءهای گوجـه-فرنگی دوتا چهار برگـی رقـم حسـاس ارلـی اوربانـا وای (Early Urbana Y) قرار داده شـدند. نشـاءهای مایـه‌زنـی شده به مدت ۶۰ روز در شرایط مساعد گلخانه (دمای ۳۲-۱۸ درجه سانتی‌گراد) جهت تکثیر نماتد نگهـداری شـدند .برای تعیین گونه جمعیت خـالص تهیـه شـده، نماتـدهای ماده تولیدکننده توده‌های تخم با سوزن از گال‌هـا خـارج و جهت شناسایی از انتهـای بـدن آن‌هـا بـرش تهیـه گردیـد. سپس الگوی شبکه کوتیکولی انتهای بدن جهـت شناسـایی مورد بررسـی قـرار گرفـت (Taylor & Netscher 1974). همچنین از مشخصات ریخت‌شناسی و ریخت‌سـنجی ایـن ماده‌ها و لاروهای سن دوم برای تکمیل شناسـایی اسـتفاده گردید. استخراج نماتـد از بافـت‌هـای آلـوده بـرای انجـام آزمایش‌ها، به روش هوسی و جنسن (Hussey & Janssen 2002) و استخراج نماتد از خـاک بـه روش (De Grisse 1969)انجام شـد. همچنـین فـاکتور تولیـد مثـل از طریـق فرمول $Rf = \frac{Pf}{Pi}$ که در آن Rf برابر فاکتور تولید مثل، Pf برابر جمعیت نهایی (تعداد کل تخم‌ها و لاروهای موجـود در ریشه گیاه و خاک گلـدان) و Pi جمعیـت اولیـه نماتـد

(جمعیت ۵۰۰۰ تخم و لارو نماتد در این آزمایش) است، محاسبه گردید (Oostenbrink 1966).

تهیه زادمایه قارچ میکوریز آربوسکولار

در این پژوهش از دو گونه قارچ میکوریز آربوسکولار *Glomus mosseae* Gerdemann & Trapp و *Glomus versiforme* (Karsten) Berch (تهیه شده از شرکت زیست فناور توران) استفاده گردید. جهت تکثیر قارچ‌های مذکور از روش کشت گلدانی تله (Trap Culture) با استفاده از شبدرسفید (*Trifolium subterraneum* L.) استفاده شد (Roserwarne *et al.* 1997). پس از کشت بذرهای مذکور در گلدان‌های حاوی زادمایه خالص قارچ میکوریز به نسبت ۱۰٪ در ماسه سترون، گلدان‌ها جهت تکثیر به مدت چهار ماه در شرایط گلخانه (دمای ۳۲-۱۸ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند. طی این مدت از محلول‌های غذایی مکمل (هوگلند) جهت تغذیه گیاهان استفاده شد (Rezaee Danesh *et al.* 2007). قبل از برداشت زادمایه، به منظور ایجاد تنش برای تحریک قارچ به اسپورزایی بیشتر، بخش‌های هوایی و سبز گیاهان قطع و گلدان‌ها به مدت یک ماه در شرایط خشک (بدون آبیاری) نگهداری شدند (Menge *et al.* 1984). به منظور اطمینان از خلوص قارچ‌ها و کلنیزه شدن ریشه‌ها، رنگ‌آمیزی ریشه‌های گیاهی انجام (Phillips & Hayman 1974) و بررسی میکروسکوپی جهت مشاهده اندام‌های مختلف قارچ (وزیکول، آربوسکول و اسپور) صورت گرفت. همچنین به جهت تعیین فراوانی جمعیت اسپور قارچ‌های میکوریز در نمونه‌های خاک اقدام به شمارش اسپورها شد. بدین منظور ۱۰۰ گرم از نمونه خاک هر تیمار انتخاب و با استفاده از روش استاندارد شستشو توسط الک و سانتریفیوژ در محلول سوکروز ۵۵٪ اسپورها جدا و در زیر بینوکولار شمارش گردید (Jenkins 1964).

تهیه زادمایه باکتری‌های PGPR

به منظور تهیه سوسپانسیون باکتری، از جدایه‌های باکتری‌های PGPR شامل باکتری‌های *Pseudomonas fluorescens* (Flugge) Migula (333-S) (تهیه شده از گروه گیاهپزشکی پردیس کشاورزی دانشگاه تهران)، *Pseudomonas striata* Chester (NCIM 2847) *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn (MCC 0067)، *Paenibacillus polymyxa* (Prazmowski) Ash et al. و (NCIM 2188) (تهیه شده از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی کرمانشاه) استفاده شد. زادمایه جدایه‌های باکتری در محیط نوترینت براث و در دمای ۳۰- ۲۸ درجه سانتی‌گراد در شیکر انکوباتور ۱۲۰ دور در دقیقه به مدت ۴۸ ساعت تهیه گردید. سوسپانسیون نهایی باکتری با غلظت حداقل 10^8 سلول باکتری در هر میلی لیتر با متیل سلولز ۲٪ (جهت بقا و دوام باکتری در خاک) آماده شد (Suslow & Schroth 1982).

بررسی کاربرد تلفیقی جدایه‌های قارچ‌های میکوریز آربوسکولار و باکتری‌های PGPR در کنترل نماتد ریشه‌گرهی *M. javanica*

به منظور بررسی تعامل جدایه‌های قارچ‌های میکوریز آربوسکولار و باکتری‌های PGPR مورد مطالعه روی کنترل نماتد ریشه گرهی، آزمایشی با ۱۵ تیمار و چهار تکرار به صورت طرح کاملاً تصادفی انجام شد. قارچ میکوریز با سه سطح (بدون قارچ میکوریز ، قارچ *G. mosseae* و قارچ *G. versiforme*) ، باکتری PGPR با پنج سطح (بدون باکتری ، باکتری *P. fluorescens*، باکتری *P. striata* ، *B. subtilis* و باکتری *P. polymyxa*) و نماتد ریشه‌گرهی (*M. javanica*) با دو سطح (جمعیت صفر و ۵۰۰۰ تخم و

لارو در کیلوگرم بستر گیاه) تیمارهای مورد بررسی در این آزمایش بودند. ابتدا بذور گوجه‌فرنگی رقم فلات درون خاک سترون کشت گردید. سپس نشاءهای یکنواخت چهار برگی به گلدان‌های حاوی حدود یک و نیم کیلوگرم مخلوط خاک و ماسه (به نسبت ۲:۱) سترون منتقل گردید. به طوری که ۱۰٪ بستر تیمارهای حاوی قارچ‌های میکوریز را زادمایه قارچ (۲۵-۲۰ اسپور در هر گرم) تشکیل می‌داد. در زمان انتقال نشاء تیمارهای مرتبط، با یک میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری (10^8 سلول باکتری در هر میلی لیتر) آغشته شدند. پس از گذشت یک ماه، جمعیت تقریبی ۵۰۰۰ تخم و لارو سن دوم نماتد به تیمارها اضافه گردید (Hussey & Barker 1973). گلدان‌ها در گلخانه به مدت ۶۰ روز در دمای ۱۸-۳۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای تأمین مواد غذایی مورد نیاز گیاهان از مکمل غذایی (هوگلند) استفاده شد. در پایان آزمایش شاخص‌های رشد و نموی مربوط به گیاه و نماتد اندازه‌گیری و به کمک نرم افزار SAS 9.4 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. مقایسه میانگین تیمارها در تمام حالات توسط آزمون محافظت شده LSD و در سطح ۱٪ صورت گرفت.

نتایج و بحث

شناسایی گونه نماتد ریشه‌گرهی و بررسی تکثیر قارچ-های میکوریز آربوسکولار

مشاهده الگوی شبکه کوتیکولی انتهای بدن نماتد ماده و نتایج حاصل از بررسی ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی نماتدهای ماده و لاروهای سن دوم و مقایسه‌ی آن‌ها با شرح گونه‌های مختلف جنس *Meloidogyne*، نشان داد که گونه نماتد، *M. javanica* می‌باشد. همچنین رنگ‌آمیزی و بررسی میکروسکوپی نمونه ریشه‌های شبدر و مشاهده اندام‌های مختلف قارچ‌های میکوریز شامل اسپور، وزیکول، آربوسکول، هیف‌های درون ریشه‌ای و اپرسوریوم حاکی از کلنیزاسیون ریشه‌ها و تکثیر مناسب گونه‌های قارچی به عنوان زادمایه بود.

تأثیر قارچ‌های میکوریز آربوسکولار و باکتری‌های محرک رشد گیاهی (PGPR) روی شاخص‌های رشد و نموی گیاه

نتایج مقایسه میانگین ارتفاع گیاهان بین تیمارهای مختلف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای آزمایش بود. گیاهان مایه‌زنی شده با نماتد به تنهایی، با کم‌ترین میانگین رشد، با دیگر تیمارها اختلاف معنی‌دار نشان دادند. بنابراین می‌توان گفت که حضور قارچ‌های میکوریز آربوسکولار و باکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPR) باعث کاهش اثر نماتد بر رشد گیاه گردیده است. در بین تیمارهای آلوده به نماتد و دارای قارچ میکوریز، تیمار مایه‌زنی شده با قارچ *G. mosseae* و در بین تیمارهای باکتری، تیمار مایه‌زنی شده با باکتری *P. polymyxa* بیشترین میانگین ارتفاع بوته را نشان دادند (جدول ۱). نتایج این بررسی مطابق با دیگر نتایج تحقیقات انجام شده در این زمینه است (Waceke *et al.* 2001 ; Castillo *et al.* 2006 ; Rumbos *et al.* 2009). همچنین باکتری‌های محرک رشد گیاهی (PGPR) می‌توانند از طریق تغییر در ساختار ریشه منجر به افزایش سطح ریشه و در نتیجه افزایش جذب آب و مواد غذایی شوند (Somers *et al.* 2004). این نتایج در حالی بود که گیاهان آلوده به نماتد در حضور توأم قارچ‌های میکوریز و باکتری‌های محرک رشد گیاهی (PGPR) نسبت به حضور منفرد هر یک از عوامل بیوکنترل بیشترین ارتفاع بوته را نشان دادند. تیمار آلوده به نماتد در حضور توأم قارچ *G. mosseae* و

جدول ۱. مقایسه میانگین شاخص‌های رشدی گوجه‌فرنگی در تیمارهای مختلف مایه‌زنی شده با قارچ‌های میکوریز آربوسکولار، باکتری‌های محرک رشد گیاهی (PGPR) و نماتد ریشه‌گرهی *Meloidogyne javanica* در شرایط گلخانه

Table 1. Mean comparison of tomato growth parameters in different treatments inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi, plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and root-knot nematode *Meloidogyne javanica* under greenhouse conditions

Treatment	Shoot length (cm)	Shoot fresh weight (g)	Shoot dry weight (g)	Root length (cm)	Root fresh weight (g)	Root dry weight (g)
M. j	61.00 d	42.50 e	10.25 d	11.00 b	69.00d efg	20.50 abc
M. j + G. m	89.25 abc	61.00b cd	21.25 abc	21.25 a	47.50 hij	22.00 abc
M .j + G. v	88.00 c	45.75 ed	15.50 cd	18.00 a	39.00 j	15.25 c
M. j +P.f	91.00 abc	71.00 abc	19.25 abc	20.00 a	58.75 ghi	23.25 ab
M. j +P. s	71.00 d	57.00 cde	16.00 bcd	19.50 a	45.25 ji	16.00 bc
M. j +B. s	93.50 abc	78.50 a	19.00 abc	19.00 a	62.25 fgh	22.00 abc
M. j +P. p	92.00 abc	76.00ab	19.25 abc	20.25 a	77.00 cdef	22.75 abc
M. j + G. m + P.f	101.50 ab	81.50 a	23.00 a	22.25 a	74.75 cdef	25.00 a
M. j + G. m + P.s	92.00 abc	77.00 a	19.50 abc	19.25 a	67.75 defg	22.00 abc
M. j + G. m + B. s	97.00 abc	81.50 a	21.75 ab	23.25 a	90.50 bc	22.00 abc
M. j + G. m +P. p	102.00 a	79.25 a	21.75 ab	22.75 a	107.25 a	27.50 a
M. j + G. v +P.f	90.25 abc	82.00 a	22.50 a	21.25 a	64.00 efg	24.50 a
M. j + G. v + P.s	96.00 abc	74.75 ab	17.25 abc	20.75 a	79.00 cde	19.75 abc
M. j + G. v + B. s	88.50 bc	75.00ab	21.00 abc	20.00 a	81.75 cd	22.00 abc
M. j + G. v +P. p	96.00 abc	78.75 a	22.50 a	23.25 a	102.50 ab	24.00 a

M. j : Meloidogyne javanica
G. m : Glomus mosseae
G. v : Glomus versiforme
P. f: Pseudomonas fluorescens
P. s : Pseudomonas striata
B. s : Bacillus subtilis
P. p: Paenibacillus polymyxa

با استفاده از آزمون LSD میانگین‌های با حروف مشابه در سطح ۱٪ تفاوت معنی‌داری ندارند ، هر تیمار نیز میانگین چهار تکرار می‌باشد.

Values followed by the same letter are not significantly different using LSD test ($P \leq 0.01$, n= 4)

باکتری *P. polymyxa* بیشترین میانگین ارتفاع گیاهان را نسبت به دیگر تیمارها نشان داد، به طوری که حضور توأم این قارچ و باکتری سبب افزایش میانگین ارتفاع گیاهان به میزان ۴۰٪ نسبت به تیمار نماتد به تنهایی شدند (جدول ۱). مطالعه ترکیب قارچ‌های میکوریز آربوسکولار *G. mosseae*، *G. intraradices*، *G. aggregatum* و *G. etunicatum* با باکتری‌های *Pseudomonas* sp. در ذرت نشان داد که ترکیب قارچ‌های میکوریز و باکتری‌های سودوموناس سبب افزایش معنی‌داری در رشد گیاهان ذرت می‌گردد (Faten *et al.* 2015). موقعیت‌هایی وجود دارد که دو موجود وقتی در کنار یکدیگر قرار می‌گیرند به هم سود می‌رسانند. بعضی از باکتری‌ها سبب افزایش و تقویت فعالیت میکوریزها روی ریشه گیاهان می‌شوند که به این‌ها باکتری‌های کمک کننده میکوریز (Mycorrhiza Helper Bacteria, MHB) اطلاق می‌شود. از طرف دیگر قارچ‌های میکوریز به طور متقابل بر فعالیت باکتری تأثیر دارند (Ahmadzadeh 2013). نتایج بررسی کاربرد ترکیب قارچ میکوریز *G. intraradices* و باکتری *Rhizobium tropici* روی لوبیا نشان داد که کاربرد ترکیبی قارچ میکوریز و باکتری ریزوبیوم به طور معنی‌داری سبب افزایش شاخص‌های رشدی لوبیا می‌گردد (Fatma *et al.* 2012).

یکی از اثرات عمده نماتد ریشه‌گرهی روی ریشه، ایجاد ساختارهای سلولی موسوم به سلول‌های غول‌آسا می‌باشد. سلول‌های غول‌آسا قسمت زیادی از مواد غذایی تولید شده توسط گیاه را در اختیار نماتد می‌گذارند و کل سیستم ریشه را با ضعف مواد غذایی روبرو می‌سازند. در نتیجه رشد ریشه مختل شده و به این ترتیب باعث کوتاهی ریشه‌ها در گیاهان آلوده به نماتد می‌گردد (Berg & Tylor 2008). با این وجود در این بررسی نتایج مقایسه میانگین طول ریشه نیز تقریباً روندی مشابه با مقایسات ارتفاع گیاهان نشان داد. به طوری که مقایسه میانگین طول ریشه بین تیمارهای مختلف نشان‌دهنده توسعه بیشتر ریشه در تیمارهای دارای نماتد کلنیزه شده با قارچ‌های میکوریز آربوسکولار و باکتری‌های محرک رشد گیاهی (PGPR) نسبت به تیمار دارای نماتد به تنهایی بود که این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار بود. علیرغم عدم تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای آلوده به نماتد مایه‌زنی شده با قارچ‌ها و باکتری‌های محرک رشد (PGPR)، ولی ریشه تیمارهای دارای قارچ میکوریز دارای رشد بیشتری نسبت به ریشه تیمارهای دارای باکتری بودند. اگرچه حضور قارچ های میکوریز و باکتری‌ها به صورت کاربرد منفرد سبب کاهش خسارت نماتد و همچنین افزایش میانگین رشد ریشه شدند، اما کاربرد تلفیقی این عوامل بیوکنترل تأثیر بیشتری در این افزایش رشد ریشه نشان داد. به طوری که تیمار آلوده به نماتد در حضور توأم قارچ *G. mosseae* و باکتری *B. subtilis* و همچنین تیمار مایه‌زنی شده با قارچ *G. versiforme* و باکتری *P. polymyxa* در ترکیب با هم بیشترین میانگین رشد ریشه را نشان دادند (جدول ۱). اثرات مثبت تلفیق‌های مختلف از آنتاگونیست‌ها در مقایسه با کاربرد انفرادی آن‌ها نتیجه‌ای از حالت تجمعی یا هم افزایی عمل آن‌هاست. اثرات قارچ‌های میکوریز روی باکتری‌های PGPR شامل تأمین انرژی لازم برای انتقال کربن به باکتری از راه هیف، تغییر pH به نفع باکتری، رقابت برای تأمین مواد غذایی، تولید ترکیبات مضر یا محرک برای باکتری‌ها، تحریک رشد ریشه، تغییر تراوشات ریشه، تغییر بافت خاک و اثرات این قارچ‌ها روی باکتری-های اندوفیت قارچ و بیمارگرهای گیاهی می‌باشد. هم-چنین اثرات باکتری‌های PGPR روی قارچ‌های میکوریز شامل کمک به فرایند تشخیص بین قارچ اندومیکوریز و ریشه گیاه میزبان، اثر بر افزایش رشد قارچ، اثر بر افزایش جوانه‌زنی قارچ و بهبود ساختار شیمیایی خاک می‌باشد (Ahmadzadeh 2013). نتایج یک بررسی مشخص نمود که بقای باکتری *P. fluorescens* BBc6R8 به طور چشمگیری بر اثر وجود قارچ میکوریز *Laccaria bicolor* S238N افزایش یافته است. باکتری به هیف قارچ می-چسبد و تشکیل ساختاری شبیه بیوفیلم می‌دهد. هم‌چنین قارچ *G. mosseae* بقای *P. fluorescens* 92rk را در ریزوسفر گوجه‌فرنگی افزایش می‌دهد Ahmadzadeh (2013).

نتایج مقایسه میانگین داده‌های حاصل از اندازه‌گیری وزن تر اندام‌های هوایی در گیاهان مایه‌زنی شده با نماتد به تنهایی نسبت به دیگر گیاهان در سطوح آماری معنی‌دار بود. تیمار آلوده به نماتد دارای قارچ *G. mosseae* به تنهایی، نسبت به تیمار دارای *G. versiforme* تأثیر بیشتری در افزایش وزن تر اندام هوایی داشت ولی این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود (جدول ۱). شرینی‌واسا و همکاران (۲۰۰۶) با مطالعه روابط متقابل بین قارچ‌های میکوریز آربوسکولار *G. fasciculatum* و نماتد ریشه-گرهی *M. incognita* و اثرات آن‌ها در رشد و بازده گوجه‌فرنگی نشان دادند که مایه‌زنی گیاه گوجه با *G. fasciculatum* سبب افزایش رشد، جذب فسفر و بازده

گوجه‌فرنگی و هم‌چنین افزایش وزن تر اندام هوایی در مقایسه با گیاهان غیر میکوریزایی می‌گردد (Shreenivasa *et al.* 2006). حضور باکتری‌های محرک رشد (PGPR) در گیاهان آلوده به نماتد باعث به حداقل رساندن کاهش وزن تر اندام هوایی در این تیمارها شد که از این نظر باکتری *B. subtilis* بیشترین تأثیر را در کاهش خسارت نماتد داشت، به طوری که به میزان ۴۵٪ افزایش وزن تر اندام هوایی را نسبت به تیمار نماتد به تنهایی نشان داد. این در حالی بود که در تیمار دارای باکتری *P. striata* کمترین میانگین رشدی مشاهده شد. کاربرد ترکیبی قارچ *G. versiforme* و باکتری *P. fluorescens* در گیاهان آلوده به نماتد بیشترین تأثیر را در افزایش وزن تر اندام‌های هوایی داشت (جدول ۱).

نتایج مقایسه میانگین وزن خشک اندام‌های هوایی نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمار مایه‌زنی شده با نماتد به تنهایی نسبت به دیگر تیمارها بود. اگرچه بین تیمارهای دارای باکتری از این نظر اختلاف معنی‌دار وجود نداشت ولی کاربرد منفرد باکتری‌های *P. fluorescens* و *B. subtilis* بیشترین تأثیر را در افزایش وزن خشک ریشه داشتند. این نتایج در حالی بود که کاربرد تلفیقی قارچ‌های میکوریز و باکتری‌های (PGPR) سبب به حداقل رساندن کاهش وزن خشک اندام‌های هوایی در گیاهان آلوده به نماتد شد. حضور ترکیبی قارچ *G. mosseae* و باکتری *P. fluorescens* بیشترین تأثیر را در افزایش وزن خشک اندام هوایی داشت، به طوری که سبب افزایش وزن خشک اندام هوایی به میزان ۵۴٪ نسبت به تیمار نماتد به تنهایی شدند. همچنین کاربرد تلفیقی قارچ میکوریز *G. versiforme* با باکتری *P. polymyxa* نیز تأثیر زیادی در کاهش خسارت نماتد نسبت به کاربرد جداگانه هر یک از عوامل بیوکنترل به تنهایی داشت (جدول ۱).

نتایج وزن تازه ریشه در گیاهان نشان دهنده تأثیر مثبت قارچ‌های میکوریز و باکتری‌های (PGPR) در کاهش خسارت نماتد و افزایش رشد گیاه گوجه‌فرنگی می‌باشد. تیمارهای مایه‌زنی شده با باکتری‌ها افزایش بیشتری در وزن تازه ریشه نسبت به تیمارهای میکوریزی نشان دادند، به طوری که باکتری *P. polymyxa* اثر قابل توجهی بر افزایش وزن تازه ریشه داشت. در طی یک بررسی مشخص شد که مایه‌زنی گیاهان آرابیدوبسیس با باکتری محرک رشد *P. polymyxa* سبب افزایش جذب آهن از خاک و توسعه سیستم ریشه‌ای و در نتیجه افزایش رشد و عملکرد گیاه از طریق مکانیسم‌های مختلف می‌گردد (Zhou *et al.* 2016). این نتایج در حالی است که در بررسی حاضر، وزن تازه ریشه در گیاهان مایه‌زنی شده با نماتد *M. javanica* به تنهایی نیز افزایش وزن را نشان داد که به دلیل تشکیل گال فراوان در ریشه این تیمار بود. نتایج مطالعات نشان داده است که همزمان با ورود لارو سن دوم نماتد ریشه‌گرهی در ریشه، آنزیم پروتئاز ترشح می‌گردد که سبب شکستن پروتئین‌های گیاه میزبان به اسیدهای آمینه می‌شود. تمرکز اسید آمینه به خصوص تریپتوفان که پیش نیاز تولید ایندول استیک اسید است موجب تجمع اکسین و عدم تعادل هورمونی در محل تغذیه‌ای نماتد می‌گردد. در این مکان به جای رشد طولی سلول‌های پارانشیمی پوست، رشد عرضی اتفاق می‌افتد و موجب هیپرتروفی و ایجاد گال در محل ورود لارو سن دوم می‌شود. بنابراین افزایش وزن تازه ریشه در اثر حمله نماتد ریشه‌گرهی به دلیل تشکیل گال می‌باشد (Oyekanmi *et al.* 2007). همچنین با توجه به تأثیر زیاد باکتری‌های محرک رشد گیاهی و قارچ‌های میکوریز در افزایش رشد گیاه و کاهش خسارت نماتد، در تعدادی از تیمارها، شاهد افزایش خیلی چشمگیر رشد و به مراتب

افزایش وزن تر ریشه بودیم که این نتیجه نشان دهنده تأثیر مثبت کاربرد تلفیقی قارچ‌های میکوریز و باکتری‌های محرک رشد در کاهش خسارت نماتد و افزایش رشد ریشه می‌باشد. به طوری که کاربرد ترکیبی قارچ‌های میکوریز با باکتری *P. polymyxa* نسبت به کاربرد جداگانه هر یک از عوامل تأثیر زیادی در کاهش خسارت نماتد داشت. گیاهان مایه‌زنی شده با باکتری *P. polymyxa* و قارچ *G. versiforme* به میزان ۶۱٪ افزایش وزن تر ریشه را نسبت به تیمار قارچ *G. versiforme* به تنهایی نشان دادند (جدول ۱). این نتایج در مورد وزن خشک ریشه نیز مشابه بود. تجزیه و تحلیل داده‌های مربوط به وزن خشک ریشه نشان‌دهنده تأثیر بیشتر کاربرد تلفیقی قارچ‌های میکوریز و باکتری‌ها نسبت به کاربرد جداگانه آن‌ها بود. حضور قارچ‌ها و باکتری‌ها سبب بهبود و افزایش رشد گیاهان در این تیمارها شد (جدول ۱).

تأثیر قارچ‌های میکوریز آربوسکولار و باکتری‌های محرک رشد گیاهی (PGPR) در کاهش آلودگی گیاه گوجه‌فرنگی آلوده به نماتد

بررسی تأثیر قارچ‌های میکوریز آربوسکولار و باکتری-های محرک رشد گیاهی (PGPR) بر شاخص‌های رشد و نموی نماتد نشان دهنده اثر عوامل مورد بررسی بر شاخص‌های مذکور بود. میانگین تعداد گال در ریشه گیاهان مایه‌زنی شده با نماتد به تنهایی در مقایسه با گیاهان مایه‌زنی شده با دیگرعوامل بیوکنترل تفاوت معنی‌دار نشان داد. از این نظر اگرچه بین دو گونه قارچ میکوریز تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ولی گونه *G. mosseae* تأثیر بیشتری در کاهش تعداد گال داشت. همچنین جدایه باکتری *P. fluorescens* بیشترین تأثیر را در کاهش آلودگی نماتد و همچنین تعداد گال در ریشه گیاهان داشت. این در حالی بود که دو جدایه باکتریایی *P. polymyxa* و *B. subtilis* با نرخ مشابهی سبب کاهش تعداد گال در ریشه گیاهان آلوده به نماتد شدند. تیمار آلوده به نماتد مایه‌زنی شده با قارچ *G. mosseae* و باکتری *P. polymyxa* به صورت کاربرد توام، کمترین میانگین تعداد گال در ریشه را نشان داد (جدول ۲).

ترشحات ریشه در تفریخ تخم برخی ازنماتدها، جلب آنها به سمت ریشه، تشخیص میزبان و نفوذ به ریشه مؤثراست. باکتری‌های محرک رشد که در فراریشه گیاهان زندگی می‌کنند قادر به تغییر الگوهای ترشحی ریشه هستند و بنابراین روی مراحلی از زندگی نماتد که وابسته به این ترشحات است، نیز تأثیر می‌گذارند (Ahmadzadeh 2013). در این بررسی حضور قارچ‌های میکوریز و باکتری‌ها در گیاهان، در تیمارهای تلقیح‌شده با نماتد باعث کاهش تعداد توده تخم در سیستم ریشه شد. همچنین تعداد تخم‌های داخل هر توده تخم در گیاهان مایه‌زنی شده با نماتد به تنهایی نسبت به گیاهان مایه‌زنی شده با قارچ میکوریز و باکتری دارای اختلاف معنی‌دار بود. باکتری *P. polymyxa* توانست به میزان ۵۲٪ سبب کاهش تعداد تخم در توده تخم نسبت به تیمار شاهد نماتد گردد. کاربرد ترکیبی قارچ *G. mosseae* و باکتری *B. subtilis* و همچنین ترکیب قارچ *G. versiforme* و باکتری *P. fluorescens* در گیاهان آلوده به نماتد به طور مساوی بیشترین کاهش تعداد تخم در داخل هر توده تخم را نشان دادند (جدول ۲). یکی از مکانیسم‌های عمل باکتری *P. fluorescens* علیه بیمارگرهای گیاهی از جمله نماتد ریشه‌گرهی ایجاد مقاومت سیستمیک القائی یا (Induced Systemic Resistance , ISR) در گیاه میزبان می‌باشد. این مقاومت القاء شده باعث ایجاد موانع مکانیکی در دیواره سلولی و همچنین باعث ایجاد تغییرات فیزیولوژیکی و

جدول ۲. مقایسه میانگین شاخص رشد و نموی نماتد ریشه‌گرهی *Meloidogyne javanica* در گوجه‌فرنگی‌های مایه‌زنی شده با قارچ‌های میکوریز آربوسکولار و باکتری‌های محرک رشد گیاهی (PGPR) در شرایط گلخانه

Table 2. Mean comparison of growth and developmental indices of root-knot nematode *Meloidogyne javanica* on tomatoes inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) under greenhouse conditions

Treatment	No. gall/1g root	No. egg mass/1g root	No. eggs/egg mass	No. J2 n/100g soil	Reproduction factor (RF)
M. j	27.25 a	29.75 a	260.00 a	268.00 a	112.15 a
M. j + G. m	15.25 bc	14.75 bc	131.00 d	129.50 bc	18.77 b
M .j + G. v	16.50 b	17.75 b	178.00 bc	129.00 bc	26.08 b
M. j +P.f	13.75 bc	15.75 bc	131.00 d	136.00 bc	24.94 b
M. j +P. s	16.25 b	18.00 b	201.00 b	153.00 b	33.20 b
M. j +B. s	14.50 bc	15.25 bc	128.00 d	129.50 bc	24.69 b
M. j +P. p	14.50 bc	14.75 bc	123.50 d	129.50 bc	28.51 b
M. j + G. m+P.f	12.00 bc	12.00 c	119.00 d	120.25 bc	21.75 b
M. j + G. m+ P.s	14.75 bc	14.00 bc	120.75 d	136.00 bc	23.20 b
M. j + G. m+ B. s	11.75 bc	14.50bc	112.50 d	118.75 bc	29.58 b
M. j + G. m+P. p	10.50 c	13.75 bc	119.00 d	107.50 c	35.28 b
M. j + G. v+P.f	13.5 bc	15.75 bc	112.50 d	131.00 bc	23.00 b
M. j + G. v+ P.s	13.00 bc	17.00 b	144.50 cd	141.25 bc	39.05 b
M. j + G. v+ B. s	15.00 bc	13.75 bc	120.75 d	126.00 bc	27.63 b
M. j + G. v+P. p	12.75 bc	14.00 bc	130.00 d	118.75 bc	37.57 b

M. j : Meloidogyne javanica
G. m : Glomus mosseae
G. v : Glomus versiforme
P. f : Pseudomonas fluorescens
P. s : Pseudomonas striata
B. s : Bacillus subtilis
P. p: Paenibacillus polymyxa

با استفاده از آزمون LSD میانگین‌های با حروف مشابه در سطح ۱٪ تفاوت معنی‌داری ندارند ، هر تیمار نیز میانگین چهار تکرار می‌باشد.

Values followed by the same letter are not significantly different using LSD test (P≤0.01, n= 4)

واکنش‌های بیوشیمیایی در میزبان علیه بیمارگر می‌شود (Siddiqui *et al.* 2006). همچنین باکتری‌های *Bacillus*-قادر به تولید متابولیت‌های القاء کننده مقاومت می‌باشند. سیگنال‌ها به صورت سیستمیک در گیاه منتقل شده و در بیان ژن‌ها تغییراتی ایجاد می‌نمایند. القاء مقاومت توسط باکتری *Bacillus* به علت وجود ترکیباتی نظیر سالیسلیک اسید، جاسمونیک اسید، ژن‌های تنظیم کننده NPR1، افزایش فعالیت پراکسیداز، تولید آنزیم کیتیناز و آنزیم بتا ۱و۳ گلوکاناز می باشد (Kloepper *et al.* 1980). مطالعات انجام شده نشان داده است که پروتئازها به عنوان فاکتورهای بیماریزایی علیه نماتدها عمل می‌کنند (Tian *et al.* 2007). در یک بررسی دو پروتئاز serine protease Bace 16 و neutral protease Bae 16 از باکتری *Bacillus nematocida* خالص‌سازی و کلون شدند. مقایسه‌ی بین پروتئین‌های Bace 16 و Bae 16 نشان داد که پروتئاز سرین با فعالیت شدید نماتدکشی در ارتباط است. همچنین نقصان تفریخ تخم می‌تواند ناشی از تحریک سیستم دفاعی گیاه توسط قارچ میکوریز آربوسکولار و تولید کیتینازهای گیاهی باشد. به دلیل آن که تشکیل لایه کیتینی در تخم نماتد لازمه توسعه و تکامل آن است، کیتینازهای مذکور می‌توانند با از بین بردن این لایه‌ها در توسعه و تفریخ تخم اختلال ایجاد کنند. این نتایج با

نتایج مطالعات اخیر که نشان‌دهنده توانایی بالای قارچ‌های میکوریز در کنترل نماتد ریشه‌گرهی می‌باشد مطابقت دارد (Sohrabi *et al.* 2012).

نتایج این بررسی نشان داد که متوسط جمعیت لارو سن دوم در بستر تیمارهای همراه با نماتد به تنهایی در مقایسه با تیمارهای دارای قارچ‌های میکوریز و باکتری‌ها دارای اختلاف معنی‌دار هستند. حضور قارچ‌های میکوریز و باکتری‌ها به ویژه در ترکیب با هم، باعث کاهش میانگین جمعیت لارو سن دوم در بستر گیاهان میکوریزی شد. این در حالی بود که گیاهان آلوده به نماتد مایه‌زنی شده با قارچ‌های میکوریز و باکتری *P. striata* نسبت به دیگر تیمارها ضعیف عمل کرده و کمترین کاهش تعداد لارو سن دوم را نشان دادند (جدول ۲). در یک پژوهش کاربرد جدایه‌هایی از باکتری‌های محرک رشد شامل پنج جدایه از *P. fluorescens* و جدایه‌هایی از *P. putida* ، *B. subtilis*، *B. brevis* و *Serratia* sp. همراه با جدایه *P. fluorescens* CHA0 سبب کاهش تفریخ تخم نماتد ریشه‌گرهی *M. incognita* به میزان ۳۵ تا ۴۸ درصد و افزایش مرگ و میر لارو سن دوم به میزان ۳۲/۲ تا ۴۸/۸ درصد شد (Behzadi Amin *et al.* 2014). در تحقیق حاضر بررسی فاکتور تولید مثل که شاخص مهمی در برآورد میزان خسارت نماتد می‌باشد نشان داد که بین تیمار مایه‌زنی شده با نماتد به تنهایی با دیگر تیمارهای مایه‌زنی شده با عوامل بیوکنترل اختلاف بسیار معنی‌داری وجود دارد (جدول ۲).

نتایج حاصل از آزمایش‌های گلخانه‌ای نشان داد که کاربرد تلفیقی هریک این عوامل بیوکنترل نسبت به کاربرد منفرد آن‌ها تأثیر بیشتری در کاهش بیماری‌زایی و خسارت نماتد دارد. به طوری که تیمار آلوده به نماتد دارای قارچ میکوریز *G. mosseae* و باکتری *P. polymyxa* به صورت توأم، بیشترین تأثیر را در کاهش شاخص‌های مربوط به نماتد در بین تمام تیمارها داشت. کاربرد تلفیقی این قارچ و باکتری جمعیت لارو سن دوم را در خاک به میزان ۵۹٪ کاهش داد. این در حالی بود که گیاهان آلوده به نماتد مایه‌زنی شده با قارچ *G. versiforme* و باکتری *P. striata* به صورت ترکیبی، ضعیف‌ترین تیمار در افزایش رشد گیاهان و کاهش خسارت نماتد بود. بنابراین به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که قارچ میکوریز *G. mosseae* نسبت به گونه *G. versiforme* توانایی بیشتری در تلفیق با جدایه‌های باکتریایی در افزایش رشد گیاه و کاهش خسارت نماتد دارد.

اگرچه کنترل بیولوژیک نماتدها با استفاده از میکروارگانیسم‌های ریزوسفر می‌تواند نویدبخش کاهش مصرف سموم باشد اما این نوع کنترل در شرایط عملی ممکن است با مشکلاتی روبه رو گردد. به طوری که به دلیل وجود جمعیت‌های متنوع میکروبی در خاک، ایجاد یک میکروفلور جدید مشکل است. در بین عوامل کنترل بیولوژیکی آن‌هایی که می‌توانند همزمان با نماتدها بر روی ریشه فعالیت کنند مورد تأیید بیشتری قرار دارند. قارچ‌های میکوریز آربوسکولار (AMF) و باکتری‌های محرک رشد گیاهی(PGPR) و نماتدهای ریشه‌گرهی دارای یک وجه اشتراک بسیار مهم هستند که توانایی آن‌ها در همراه بودن با ریشه تعداد عمده‌ای از گونه‌های گیاهی است، در حالی که سایر بیوتروف‌ها به طور عمده دامنه میزبانی محدودی دارند. بنابراین با توجه به نتایج حاصل از این بررسی، کاربرد تلفیقی قارچ‌های میکوریز آربوسکولار (AMF) و باکتری‌های محرک رشد (PGPR) مورد بررسی می‌تواند به عنوان روشی مطلوب در کنترل بیولوژیکی نماتدها در تحقیقات بعدی مورد استفاده قرار گیرد که در صورت موفقیت گام مؤثری در جهت کاهش مصرف سموم و کمک به توسعه کشاورزی پایدار برداشته خواهد شد.

پیشنهاد می‌گردد به منظور دسترسی به نتایج قطعی‌تر، توانایی این جدایه‌ها در شرایط طبیعی و روی محصولات دیگر نیز برآورد گردد و فرمولاسیون مناسبی از آن‌ها با عملکرد بالا جهت استفاده در برنامه مدیریت تلفیقی بیماری‌ها تهیه شود.

منابع

Ahmadzadeh M. 2013. Biological control of plant diseases (plant probiotic bacteria). Tehran University Press and Publishing. Tehran. Iran. 490 p. (In Farsi)

Alijani Z., Olia M., Sharifnabi B. and Jaimand K. 2015. Effect of different inoculum densities of root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* on progress of disease and production of secondary compounds in pot marigold, *Calendula officinalis*. Plant pathology 51 (2): 215- 228.

Avis T. J., Gravel V., Antoun H. and Tweddell R. J. 2008. Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. Soil Biology and Biochemistry 40(7): 1733-1740.

Barea J. M., Azcon R. and Azcon-Anguilar C. 2002. Mycorrhizospher interactions to improve plant fitness and soil quality. Antonie Van Leeuwenhoek 81: 342-351.

Behzadi Amin R., Kargar Bideh 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(1): 53-68.

Berg R. H. and Tylor C. G. 2008. Cell biology of plant nematode parasitism. Heidelberg. Germany. 273 p.

Castillo P., Nico A. I., Azcon-Aguilar C., Del Rio Rincon C., Calvet C. and Jimenez-Diaz R. M. 2006. Protection of olive planting stocks against parasitism of root-knot nematodes by arbuscular mycorrhizal fungi. Journal of Plant Pathology 55: 705-713.

De Grisse A. 1969. Accounting dish for nematodes excluding border effect. Nematologica 9: 162.

Faten D., Rupali D. and Wusirika R. 2015. Mycorrhiza and PGPB modulate maize biomass, nutrient uptake and metabolic pathways in maize grown in mining-impacted soil. Plant Physiology and Biochemistry 97: 390-399.

Fatma T., Mustapha T. and Jean-Jacques D. 2012. Combined inoculation with *Glomus intraradices* and *Rhizobium tropici* CIAT899 increases phosphorus use efficiency for symbiotic nitrogen fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Saudi Journal of Biological Sciences 19: 157–163.

Hussey R. S. and Barker K. R. 1973. Comparison of methods for collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. Plant Disease Reporter 57: 1025–1028.

Hussey R. S. and Janssen G. S. W. 2002. Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species. In: Starr J. L. Cook R. and Bridge J. Plant resistance to parasitic nematodes. CAB International PP: 69-77.

Jaizme-Vega M. C., Tenoury P., Pinochet J. and Jaumot M. 2007. Interactions between the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* and *Glomus mosseae* in banana. Plant and soil 197: 27-35.

Jenkins W. R. 1964. A rapid centrifugal technique for separating nematodes from soil. Plant Disease Reporter 48: 672-693.

Kloepper J. W., Leong J., Teintze M. and Schroth M. N. 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth promoting rhizobacteria. Nature 286: 885-886.

Linderman R. G. 2000. Effects of mycorrhizas on plant tolerance to disease. Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function pp 345-367.

Lucy M., Reed E. and Glick B. R. 2004. Application of free living plant growth-promoting rhizobacteria. Antonie van Leeuwenhoek 86: 1-25.

Menge J. A., Powell C. L. and Bagyaraj D. P. 1984. Inoculum production. In: C. L. Powell and D. P. Bagyaraj (Eds.). VA Mycorrhiza. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, USA pp:187-199.

Oostenbrink M. 1966. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. Mededelingen Landbouwhogeschool Wageningen: 66(4) 1- 46.

Oyekanmi E. O., Coyneb D. L., Fagadea O. E. and Osonubia O. 2007. Improving root-knot nematode management on two soybean genotypes through the application of *Bradyrhizobium japonicum, Trichoderma pseudokoningii* and *Glomus mosseae* in full factorial combinations. Crop Protection 26: 1006–1012.

Phillips J. M. and Hayman D. S. 1974. Improved procedures clearing root and staining parasitic and vesicular

arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infections. Transaction of British Mycological Society 55: 158-161.

Rai M. K. 2001. Current advances in mycorrhization in micropropagation *In vitro*. Cellular Developmental Biology Plant 37:158-167.

Rezaee Danesh Y., Mohammadi Goltapeh A., Alizadeh A. and Varma A. 2007. Studies on taxonomy and in vitro culturing possibility soybean and alfalfa-associated arbuscular mycorrhizas in Iran. Ph.D thesis. Plant protection Department, Faculty of agriculture.Tarbiat Modarres university 346 p.

Richard A. and Emilio C. 2005. Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. CABI 319 p.

Roberts D. P., Lohrke S. M., Meyer S. L. F., Buyer J. S., Bowerrs J. H., Baker C. J., Li W., Souza J. T., Lewis J. A. and Chung S. 2005. Biocontrol agents applied individually and in combination for suppression of soil borne diseases of cucumber. Crop Protection 24(2): 141-155.

Roserwarne G. M., Barker S. J. and Smith S. E. 1997. Production of near-synchronous fungal colonization in tomato for developmental and molecular analyses of mycorrhiza. Mycological Research 101: 966–970.

Rumbos C., Reimann S., Kiewnick S. and Richard A. 2009. Interactions of *Paecilomyces lilacinus* strain 251 with the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*: Implications for *Meloidogyne incognita* control on tomato. Biocontrol Science and Technology 16 (9): 981-986.

Runjin L., Mei D., Xia W., Min L. and Xingzhong L. 2012. Suppression of the root-knot nematode [*Meloidogyne incognita* (Kofoid& White) Chitwood] on tomato by dual inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting rhizobacteria. Mycorrhiza 22:289–296.

Serfoji P., Rajeshkumar S. and Selvaraj T. 2010. Management of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* on tomato cv Pusa Ruby by using vermicompost, AM fungus, *Glomus aggregatum* and mycorrhiza helper bacterium, *Bacillus coagulans*. International Journal of Agricultural Technology 6(1): 37-45.

Sharon E., Bar-Eyal M., Chet I., Herrera-Esterella A., Keleifeld O. and Spiegel Y. 2001. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. Plant parasitic in subtropical and tropical agriculture. CABI 91(7): 687-693.

Shreenivasa K. R., Krishnappa K., Ravichandra N. G. 2006. Interaction Effects of Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Glomus fasciculatum* and Root-Knot Nematode, *Meloidogyne incognita* on Growth and Phosphorous Uptake of Tomato. Karnataka Journal of Agricultural Sciences 20: 57 - 61.

Siddiqui I. A., Shaukat S. S., Sheikh I. H. and Khan A. 2006. Role of cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in the suppression of root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* in tomato. World Journal of Microbiology and Biotechnology 22: 641-650.

Siddiqui Z. A. and Sayeed Akhtar M. 2009. Effects of antagonistic fungi, plant growth-promoting rhizobacteria, and arbuscular mycorrhizal fungi alone and in combination on the reproduction of *Meloidogyne incognita* and growth of tomato. Journal of General Plant Pathology 75:144–153.

Sohrabi F., Fadaei-Tehrani A. A. and Rezaee Danesh Y. 2012. Study on the chitinase changes in interaction of arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus mosseae*) and root-knot nematode *(Meloidogyne javanica)* on tomato. Journal of Plant Protection (29) 3: 349 -356.

Somers E., Vanderleyden J. and Srinivasan M. 2004. Rhizosphere bacterial signaling: a love parade beneath our feet. Critical Reviews in Microbiology 304: 205-240.

Suslow T. V. and Schroth M. N. 1982. Rhizobacteria on sugar beets: effects of seed application and root colonization on yield. Phytopathology 72:199-206.

Taylor D. P. and Netscher C. 1974. An improved technique for preparing perineal patterns of *Meloidogyne* spp. Nematologica 20: 268-269.

Tian B., Yang J. and Zhang K. Q. 2007. Bacteria used in the biological control of plant-parasitic nematodes: populations, mechanisms of action, and future prospects. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology 61:197–213.

Varma A. 2008. Mycorrhiza. Springer Verlag Pub. USA 798 p.

Waceke J. V., Waudo S. V. and Sikora R. 2001. Suppression of *Meloidogyne hapla* by arbuscular mycorrhizal fungi on pyrethrum in Kenya. Pest Management Science 47:135-140.

Zhou L., Yuen G., Wang Y., Wei L. and Ji G. 2016. Evaluation of bacterial biological control agents for control of root-knot nematode disease on tomato. Crop Protection 84 *:* 8-13.