مهارزیستی نماتد ریشه‌گرهی (*Meloidogyne javanica*) با استفاده از جدایه‌های قارچ *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* در گوجه فرنگی

فاطمه مختاری دستنایی[1] و مجید اولیا[2*]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد

۲- * **نویسنده مسوول:** دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، (Olia100@yahoo.com)

تاریخ دریافت: ۹۲/۰۶/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۴/۰۵/۰۵

چکیده

امروزه مهارزیستی عوامل مختلف بیماری‌زای گیاهی از جمله نماتدها به طور وسیع مورد مطالعه قرار گرفته است. یکی از امید بخش‌ترین عوامل کنترل کننده، قارچ *Pochonia chlamydosporia* می‌باشد که توان بالایی در کاهش جمعیت نماتدهای ریشه گرهی و سیستی دارد. در این بررسی، اثر چهار جدایه از قارچ *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* روی نماتد ریشه گرهی *Meloidogyne javanica* در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه ای مورد بررسی واقع شد. در مطالعات آزمایشگاهی اثر فیلتره حاصل از کشت قارچ‌ها روی نماتد ریشه‌گرهی *Meloidogyne javanica* در سه زمان ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت پس از کاربرد غلظت صد در صد، 10^{-1} و 10^{-2} رقت از ترکیبات مذکور و پارازیتیسم توده تخم در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی واقع شد. در شرایط گلخانه‌ای تاثیر جدایه‌های مختلف قارچ *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* روی فاکتورهای رشدی گیاه گوجه فرنگی و جمعیت نماتد ریشه گرهی مورد آزمون قرار گرفت. مقایسه میانگین های شاخص‌های رشدی و آلودگی گیاه گوجه فرنگی بر اساس آزمون LSD صورت گرفت. نتایج مطالعات آزمایشگاهی نشان داد که هر ٤ جدایه نسبت به شاهد اثر نماتدکشی داشته و مانع تفریخ تخم نماتد شدند و تمام جدایه‌ها توانایی کلونیزه کردن تخم نماتد *M. javanica* را داشتند. بر اساس آنالیز آماری در هر سه آزمون انجام شده جدایه‌های IRAN 1131C و IRAN 504C نسبت به دو جدایه‌ی دیگر موثرتر بودند. بر اساس مطالعات گلخانه ای هم مشخص شد، جدایه‌ها باعث توقف رشد نماتد روی گیاه شدند و درصد تکثیر نماتد نسبت به شاهد کاهش یافت به طوریکه در مقایسه با شاهد اختلاف آماری ۵٪ را نشان داد وکمترین آلودگی گیاه گوجه‌فرنگی مربوط به گیاهان تیمار شده با جدایه‌های IRAN 504C و HAMEDAN بود.

کلید واژه‌ها: مهارزیستی، *P. chlamydosporia var. chlamydosporia*، *Meloidogyne javanica*، نماتد ریشه گرهی گوجه فرنگی

مقدمه

گوجه فرنگی از سبزیجات مهم محسوب میگردد و در طی قرن گذشته با تولید سالانه حدود ۵۰ میلیون تن، یکی از پرمصرف‌ترین سبزی‌ها محسوب می‌گردد (بهنامیان و مسیحا[1]، ۲۰۰۲). تولید این سبزی از طرف عوامل بیمارگر گیاهی همچون نماتدها با محدودیتهای قابل توجهی روبرو شده است. چند صد گونه از نماتدها شناخته شده که ازگیاهان زنده تغذیه می کنند و به این ترتیب باعث بیماریهای گیاهی متنوعی در سطح جهان می شوند. یکی از نماتدهای مهمی که ریشه گوجه فرنگی و بسیاری دیگر از سبزیجات را مورد حمله قرار می‌دهد، نماتد ریشه گرهی (*Meloidogyne* spp.)

1- Behnamian & Masiha

است. نماتدهای ریشه‌گرهی[1] بیمارگرهای بیوتروف اجباری و انگل داخلی غیر مهاجر یا ساکن هستند که باعث تغییرات ساختمانی و فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی، بروز اختلالات در گیاه میزبان و کاهش رشد آن می‌شوند. تا کنون بیش از ۹۰ گونه از این جنس در دنیا معرفی شده است ولیکن بیش از ۹۵ درصد خسارت‌های وارده به محصولات زراعی به وسیله گونه‌های *Meloidogyne incognita*، *M. javanica*، *M. hapla* و *M. arenaria* می‌باشد و در میان این گونه‌ها دو گونه‌ی *M. javanica* و *M. incognita* از بقیه متداول‌تر می‌باشند (اخیانی و همکاران[2]، ۱۹۸۶). روش‌های فیزیکی، زراعی و کنترل شیمیائی از جمله روش‌های مدیریت این گروه از نماتدها به شمار می‌روند که هدف اصلی این روشها رساندن جمعیت نماتد به زیر حد آستانه اقتصادی است (الهی‌نیا، ۱۳۸۴). علی‌رغم تنوع روش‌های کنترل، به دلیل محدودیت‌هایی که هر یک از روش‌های مذکور دارند، هیچ یک روش قاطع و موثری برای کنترل محسوب نمی‌شوند. از روش‌هایی که در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته است، استفاده از مهارزیستی می‌باشد. مهارزیستی می‌تواند به عنوان روش جایگزین و یا در تکمیل شیوه‌های دیگر مبارزه مورد استفاده قرار گیرد که در این زمینه از باکتری‌ها و قارچ‌های زیادی استفاده شده است (استرلینگ و وست[3]، ۱۹۹۱). قارچ *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare & W. Gams (2001) یکی از قارچ‌های هیپر پارازیت برای کنترل نماتدهای پارازیت گیاهی می‌باشد (کری و همکاران[4]، ۱۹۸۴). این قارچ به عنوان انگل چندین نماتد مهم اقتصادی از جنس‌های *Meloidogyne*، *Heterodera* و *Globodera* شناخته شده است (کری، ۱۹۹۰) و به عنوان یک ابزار مدیریتی برای نماتدها در کوبا و هند مورد استفاده قرار می‌گیرد (هرناندز و هیدالگو دیاز[5]، ۲۰۰۸). این قارچ دارای انتشار جهانی بوده (زارع و گامز[6]، ۲۰۰۴) و در ایران از نماتد سیست چغندرقند و خاک مزرعه‌ی گوجه فرنگی آلوده به نماتد ریشه‌گرهی (فاطمی و همکاران[7]، ۱۹۹۹) جدا شده است و در ریزوسفر می‌تواند ریشه‌های گیاه میزبان را کلونیزه کرده و گیاه میزبان را در برابر پاتوژن‌های خاکزی محافظت کند (لوپز لیورکا و همکاران[8]، ۲۰۰۲؛ ماسیا وسینته و همکاران[9]، ۲۰۰۹).

اولین گزارش از کاهش تعداد نماتدها توسط این قارچ در سال ۱۹۷۴ منتشر شد (ویلکوکس و تریب[10]، ۱۹۷۴). مهارزیستی یک جدایه از قارچ *Pochonia chlamydosporia var. chlamydosporia* در برابر *Heterodera schachtii* توسط آیت اللهی و همکاران[11] (۲۰۰۸) در شرایط آزمایشگاهی انجام شد و در نهایت مشخص شد که تخم‌های داخل سیست و ماده‌ها تا حد زیادی توسط قارچ کلونیزه گشتند. اثر سمی فیلتره کشت قارچ *Pochonia* نیز بر نماتدهای ساکن و تخم‌های آنها در تحقیقات مختلفی گزارش شده است. نتایج آزمایش‌هایی که توسط زرین و همکاران[12] (۱۹۹۹) و قریشی و همکاران[13] (۲۰۱۲) در به کار بردن فیلتره‌ی کشت قارچ *P. chlamydosporia* بر نماتدهای ریشه گرهی انجام گرفت بیانگر قابلیت کنترل نماتد ریشه گرهی توسط فیلتره‌ی کشت قارچ می‌باشد. یانگ و همکاران[14] (۲۰۱۲) مهارزیستی را با چند جدایه از همین قارچ علیه *M. javanica* در شرایط گلخانه‌ای به کار گرفتند و در نتیجه مشاهده کردند که تعداد تخم و تعداد لارو J_2 در این آزمایش کاهش پیدا کرد. در یک پژوهش موسوی و همکاران[15] (۲۰۱۰) چند جدایه از *P.chlamydosporia* را علیه *M. javanica* به کار

1- Root-knot nematode
2-Akhiani *et al.*
3- Stirling & West
4- Kerry *et al.*
5- Hernández & Hidalgo-Díaz

6- Zare & Gams
7- Fatemy *et al.*
8- Lopez-Llorca *et al.*
9- Macia- Vicente *et al.*
10- Wilcox&Tribe
11- Ayatollahy *et al.*
12- Zareen *et al.*
13- Qureshi *et al.*
14- Yang *et al.*
15- Moosavi *et al.*

گرفتند و اثر مهارزیستی آنها را در گلخانه مورد بررسی قرار دادند و جدایه‌های IRAN 1212C، IRAN 1129C و IRAN 1119C هر چند اثر برابری نداشتند ولی از موثرترین جدایه‌ها در این آزمایش شناخته شدند که حدودا ۹۰٪ نماتد را کنترل کردند.

گزارش‌هایی نیز مبنی بر افزایش فاکتورهای رشدی گیاه مورد تیمار موجود است، به طوری که عبدالرحیم و همکاران[1] (۲۰۰۵)، قارچ *P. chlamydosporia* را علیه نماتد *M. incognita* در گیاه نخود به کار بردند و مشاهده کردند این قارچ نماتدکش، رشد ریشه و شاخه گیاه را افزایش داد. موسوی و همکاران (۲۰۱۰) نیزگزارش کردند که کاربرد جدایه‌های مختلف این قارچ در خاک باعث تفاوت در وزن اندام-های هوایی و ریشه شد. بر اساس گزارش دهاوان و سینگ[2] (۲۰۱۱) نیز کاربرد قارچ *P.chlamydosporia* علیه نماتدها روی گیاه بامیه باعث افزایش پارامترهای رشدی گیاهان (طول شاخه، وزن تر شاخه و طول ریشه) نسبت به شاهد شد. از اینرو قارچ *P. chlamydosporia* به عنوان عامل مهار-زیستی در برابر گونه‌های نماتدهای ریشه گرهی و سیست به کار می‌رود (کری و جافی[3]، ۱۹۹۷).

هدف از این پژوهش، بررسی توان مهارزیستی چهار جدایه از قارچ *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* بر علیه نماتد ریشه‌گرهی *Meloidogyne javanica* در آزمایشگاه و گلخانه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

شناسایی و تهیه زاد مایه نماتد ریشه‌گرهی *M. javanica*

جهت تهیه جمعیت خالص نماتد، از ریشه‌ی گوجه فرنگی‌های آلوده به نماتد ریشه‌گرهی جمع‌آوری شده از استان اصفهان، یک تک توده تخم[4] جدا و در مجاورت ریشه یک گیاهچه چهار برگی گوجه فرنگی رقم فلات در شرایط گلخانه قرار داده شد. بعد از گذشت ۶۰ روز، استخراج نماتد از ریشه های آلوده با استفاده از هیپو کلریدسدیم ۱/۵٪ به روش هوسی و بیکر[5] (۱۹۷۳) انجام گردید. جهت شناسایی نماتد از روش ریخت شناسی و مولکولی استفاده گردید. به همین منظور، از انتهای بدن ده عدد نماتد ماده به روش تیلور و نتسچر[6] (۱۹۷۴) برش تهیه و مشخصات آن بررسی گردید. هم چنین از خصوصیات ریخت شناسی و ریخت سنجی لارو سن دوم نیز استفاده شد. شناسایی گونه با استفاده از روش مولکولی طبق روش زیلسترا و همکاران[7] (۲۰۰۰) انجام شد.

ارزیابی آزمایشگاهی اثر چهار جدایه قارچ *P. chlamydosporia* روی نماتد ریشه‌گرهی *M. javanica*

بررسی اثر فیلتره کشت چهار جدایه‌ی قارچ *P. chlamydosporia* روی تفریخ تخم‌های نماتد ریشه‌گرهی *M. javanica*

دوایری با قطر یک سانتیمتر از حاشیه رشد فعال جدایه‌های قارچی در داخل ظرف حاوی محیط کشت مایع ، عصاره سیب زمینی-دکستروز PDB تلقیح، و به مدت ۱۴ روز در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند و سپس محیط کشت مایع PDB از کاغذ صافی Whatmam شماره یک سترون عبور داده شد، تا فیلتره کشت قارچ استاندارد (S) به دست آید. سپس با افزودن میزان لازم آب مقطر سترون غلظت‌های 10^{-1} و 10^{-2} از فیلتره کشت تهیه گردید و از آب مقطر سترون با غلظت صفر به عنوان شاهد استفاده شد. غلظت‌های مختلف فیلتره و شاهد به داخل پتری‌های سترون منتقل و به هر پتری ۱۵۰ عدد تخم

1- Abd El-Raheem *et al.*
2- Dhawan & Singh
3- Kerry & Jaffee

4- egg mass
5- Hussey & Baker
6- Tylor & Netscher
7- Zijlstra *et al.*

نماتد ریشه گرهی اضافه گردید و بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تفریخ تخم نماتد بررسی شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملا تصادفی در ۴ تکرار اجرا گردید. سپس به کمک نرم افزار SAS با استفاده از آزمون Fisher's LSD داده‌ها آنالیز شدند و اثر جدایه‌ها با توجه به غلظت‌های مورد استفاده و زمان مورد مقایسه قرار گرفتند.

بررسی اثر نماتدکشی فیلتره کشت چهار جدایه‌ی قارچ *P. chlamydosporia* روی مرگ و میر لارو سن دوم نماتد ریشه‌گرهی

غلظت‌های مختلف فیلتره کشت قارچ‌ها طبق روش قبل تهیه گردید و سپس ۱۵۰ لارو سن دو (J_2) جهت بررسی در هر پتری و در ۴ تکرار در نظر گرفته شد. بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تعداد لاروهای مرده مشاهده شده ثبت شد. داده‌های حاصل به صورت فاکتوریل در پایه کاملا تصادفی آنالیز گردید.

تعیین درصد انگلی شدن تخم‌های موجود در توده‌های تخم توسط چهار جدایه‌ی قارچ *P. chlamydosporia*

به منظور بررسی توانایی انگلی کردن تخم‌های موجود در توده‌های تخم به وسیله قارچ‌ها از روش فاطمی و همکاران (۱۹۹۹) استفاده شد. به این صورت که در شرایط استریل به مرکز هر ظرف پتری حاوی محیط PDA، پلاگ‌های ۵ میلیمتری از اینوکلوم قارچی که از حاشیه‌ی قارچ در حال رشد گرفته شده بود، اضافه شد و حاشیه‌ی قارچ در حال رشد گرفته شده بود، اضافه شد و در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از پوشیده شدن سطح پتری از ریسه‌های قارچ به هر پتری ۴ توده تخم استریل با فاصله اضافه شد. به پتری‌های PDA شاهد نیز که فاقد قارچ بودند نیز به همان میزان توده تخم اضافه شد. پتری‌ها به مدت ۱۴ روز در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند و پس از گذشت این زمان در شرایط استریل توده‌های تخم به محیط‌های WA انتقال و به مدت ۷ روز نگهداری شدند. ابتدا کلونیزه شدن توده‌های تخم بررسی شد، سپس با برش توده‌های تخم در محلول لاکتوفنل در کاتن بلو و تهیه اسلاید، تخم‌های انگلی شده بررسی گردیدند. این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی در ۴ تکرار انجام شد.

آزمون گلخانه‌ای

تهیه زاد مایه قارچ و نماتد و افزودن به خاک گلدان‌ها

برای تهیه زاد مایه قارچ از محیط کشت دانه جو با نسبت وزنی یک درصد در خاک استفاده شد. ابتدا ۱۵۰ گرم دانه جو درون فلاسک‌هایی به حجم ۵۰۰ میلی‌لیتر قرار داده شدند. پس از شستشو با آب مقطر، ۱۵ میلی-لیترآب مقطر به هر فلاسک اضافه شد و درب فلاسک‌ها بسته شد. فلاسک‌ها درون اتوکلاو با دمای ۱۲۱°C و فشار یک اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه سترون شدند و قبل از استفاده در درجه حرارت اتاق خنک شدند. هر فلاسک با یک جدایه‌ی مختلف از *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (جدول۱) تلقیح شد بدین صورت که در اتاق کشت سترون پلاگ ۵ میلیمتری از اینوکلوم قارچی رشد کرده روی محیط PDA به هر فلاسک اضافه و با پنبه‌ی استریل بسته شد. فلاسک‌ها به مدت ۴ هفته در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفتند و هر پنج روز برای رشد یکنواخت‌تر، تکان داده شدند (دی لج و همکاران[1]،۱۹۹۳). سپس بیست گرم مایه قارچ رشد یافته (۱٪ وزنی خاک) روی دانه‌ی جو با دوکیلوگرم خاک سترون شده مخلوط شد (موسوی و همکاران، ۲۰۱۰) و داخل یک گلدان پلاستیکی (قطر ۱۳ و ارتفاع ۲۰ سانتی متر) ریخته شد. سپس یک نشا ۲۰ روزه گوجه فرنگی واریته فلات درون گلدان قرار داده شد و در شرایط گلخانه با دمای ۲۵-۲۰ °C نگهداری و به طور مرتب آبیاری صورت گرفت. پس از گذشت ۱۰ روز از آغاز تیمار به هر گلدان ۶۰۰۰ تخم و لارو سن دو(J_2) *M. javanica* تلقیح گردید. در طول آزمایش در نمونه‌های شاهد از آب مقطر استفاده شد.

1- De Leij *et al.*

جدول ۱- فهرست منشا جدایه‌های *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*

جدایه	دریافت شده از	منشا
HAMEDAN	دانشگاه همدان	ایران
IRAN 676C	موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور	ایران، مشهد
IRAN 1131C	موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور	آلمان
IRAN 504C	موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور	برزیل

شرایط نگه‌داری، تیمارها و شاخص‌های اندازه-گیری شده

گلدان‌ها به مدت ۶۰ روز در شرایط گلخانه با دمای ۲۰ تا ۲۵°C، رطوبت نسبی ۶۰-۸۰ درصد و دوره نوری (۱۳ ساعت روشنایی؛ ۱۱ ساعت تاریکی) نگهداری و آبیاری منظم یک روز در میان انجام شد. هر واحد آزمایشی، یک گلدان حاوی دو کیلوگرم خاک سترون بود. تیمار-های آزمایش اثر قارچ‌ها روی شاخص‌های رشدی گیاه شامل پنج تیمار بودند: شاهد (بدون هیچ گونه تیمار) و چهار جدایه قارچی مورد استفاده، آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی در چهار تکرار اجرا گردید. آزمایش اثر جدایه‌های قارچ روی نماتد ریشه‌گرهی شامل شش تیمار: شاهد بدون تیمار، شاهد دارای نماتد و چهار جدایه قارچی به همراه نماتد بودند. این آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی و در چهار تکرار اجرا شد. ارزیابی اثر جدایه‌های قارچ‌ها روی نماتد ریشه‌گرهی در شرایط گلخانه‌ای، به کمک اندازه‌گیری شاخص‌های رشدی گیاه (از جمله وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی، طول ریشه و اندام هوایی) و شاخص‌های آلودگی به نماتد (از جمله تعداد گال، شاخص گال، تعداد توده تخم، تعداد تخم داخل هر توده تخم و تعداد لارو سن دوم در ۲۰۰ گرم خاک) تعیین گردید. شاخص گال به روش جوناتان و همکاران[1] (۲۰۰۰) و بر اساس سیستم درجه بندی صفر تا پنج محاسبه شد. در نهایت شاخص تولید مثل (RF) یا نسبت جمعیت نهایی (مجموع لارو-های داخل خاک به همراه تمامی تخم‌های نماتد موجود روی ریشه) به جمعیت اولیه و درصد تکثیر (Mr %) یا نسبت جمعیت نهایی هر تیمار به جمعیت نهایی تیمار نماتد تعیین گردید (استونبریک[2]، ۱۹۶۶). کلیه داده‌ها توسط نرم افزار آماری SAS 9.2 آنالیز شدند. جدول تجزیه واریانس ترسیم و مقایسه میانگین‌ها با آزمون LSD در سطح احتمال ۵٪ انجام شد.

نتایج و بحث

شناسایی نماتد ریشه‌گرهی

با بررسی خصوصیات ریخت شناسی و ریخت سنجی نماتد ماده و لارو سن دوم و استفاده از کلید شناسایی ایسنباک و تریانتافیلو[3] (۱۹۹۱) گونه نماتد *M. javanica* شناسایی گردید، که با روش مولکولی نیز تایید شد.

نتایج آزمون‌های آزمایشگاهی-ارزیابی اثر چهار جدایه قارچ *P. chlamydosporia* روی نماتد ریشه‌گرهی *M. javanica*

اثر فیلتره‌ی کشت جدایه‌های قارچ *P. chlamydosporia* روی تفریخ تخم نماتد

نتایج حاصل از بررسی میزان تفریخ تخم‌های نماتد در حضور فیلتره کشت جدایه‌های قارچ نشان داد اثر زمان و غلظت در سطح احتمال یک درصد ($p \leq 0.01$) و اثر

1 - Jonathan *et al.*

2 - Oostenbrink

3- Eisenback & Triantaphyllo

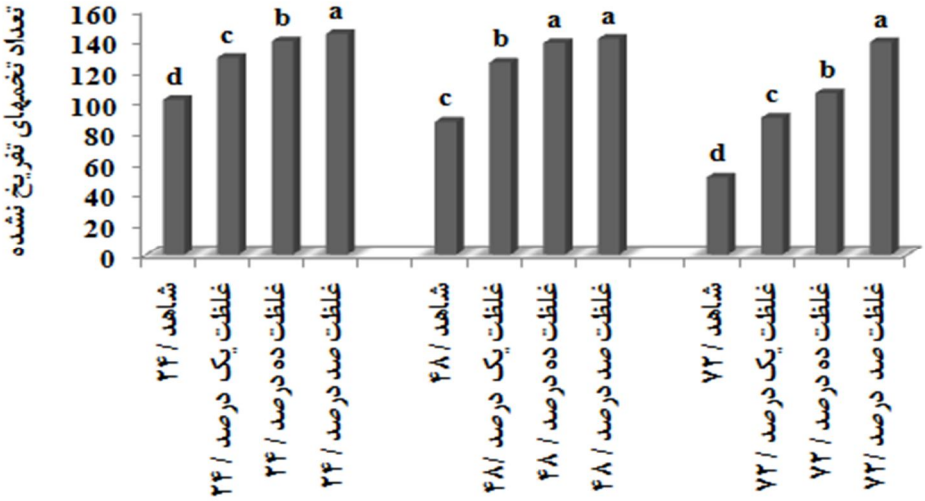
جدایه‌ی قارچ در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار ($p \leq 0.05$) بود؛ و از بین اثرات متقابل این عوامل تنها اثر متقابل غلظت × زمان در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار ($p \leq 0.01$) بود (جدول ۲).

نتایج ارزیابی عدم تفریخ تخم نماتد در پتری‌های حاوی فیلتره‌ی جدایه‌های مختلف قارچ در مقایسه با شاهد با توجه شکل ۱ نشان داد که بیشترین اثر بر عدم تفریخ تخم نماتد در غلظت استاندارد (صد در صد) و در زمان ۲۴ ساعت اول بود، بعد از آن بیشترین اثر در ۲۴ ساعت دوم در غلظت استاندارد، ۲۴ساعت سوم در غلظت استاندارد و در ۲۴ ساعت اول در غلظت 10^{-1} بود. با توجه به شکل (۱) با گذشت زمان خاصیت فیلتره کشت با غلظت‌های 10^{-1} و 10^{-2} کمتر شد اما فیلتره‌ی استاندارد در زمان ۷۲ ساعت، هم‌چنان خاصیت عدم تفریخ تخم را دارا بود.

جدول ۲- آنالیز واریانس تاثیر سه فاکتور فیلتره حاصل از کشت جدایه‌های قارچ، غلظت و زمان بر ممانعت از تفریخ تخم و مرگ و میر لارو سن دو نماتد *M. javanica* در شرایط آزمایشگاه.

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات ممانعت از تفریخ تخم نماتد	میانگین مربعات[1] مرگ و میر لارو سن دو
جدایه‌ی قارچ	۳	۱۸۳/۴۲۳۶۱*	۴۳۸۴/۷۸۳۰**
زمان	۲	۲۰۱۸۱/۸۵۹۳۸**	۳۵۸۷/۵۶۷۷**
غلظت	۳	۳۲۷۰۸/۷۵۶۹۴**	۵۷۴۱۹/۰۴۶۹**
زمان× نوع جدایه	۶	۸/۶۱۶۳۲ns	۱۰۴/۴۰۸۰**
غلظت× نوع جدایه	۹	۴۸/۹۷۴۵۴ns	۴۰۳۸/۰۸۸۵**
غلظت× زمان	۶	۱۹۰۸/۶۹۹۶۵**	۲۵۰۷/۷۵۵۲**
غلظت×زمان×نوع جدایه	۱۸	۴۲/۵۲۱۴۱ns	۱۰۲/۸۷۳۳**
خطا	۱۴۱	۴۴/۲۰۹۱	۱۷/۲۱۵۰
%CV		۵/۷۳۶۵۲۴	۲۰/۲۹۶۲۳

[1]*نشان‌دهنده‌ی اختلاف آماری در سطح پنج درصد می‌باشد. ** نشان‌دهنده‌ی اختلاف آماری در سطح یک درصد می‌باشد. ns اختلاف معنادار وجود ندارد.



شکل ۱- مقایسه میانگین میزان تفریخ تخم نماتد *M. javanica* تحت تاثیر فاکتور زمان و غلظت فیلتره حاصل از کشت جدایه‌های قارچ در شرایط آزمایشگاه (زمان‌های ۲٤، ٤٨ و ۷۲ ساعت به صورت مستقل از هم آنالیز شدند).

اثر فیلتره کشت چهار جدایه از قارچ *P. chlamydosporia* روی مرگ و میر لارو سن دو (J_2) نماتد ریشه‌گرهی *M. javanica*

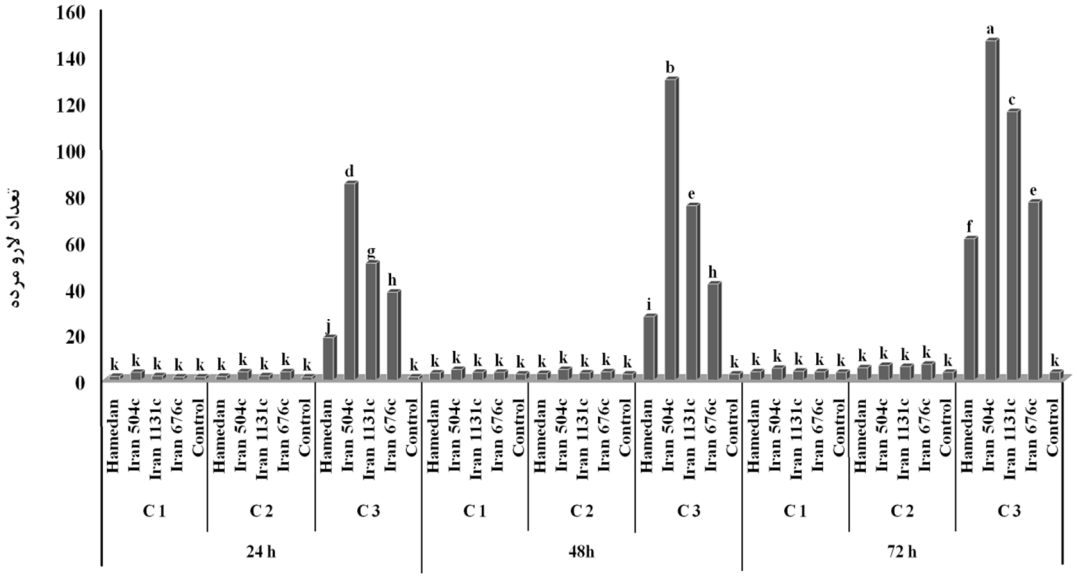
طبق جدول ۲ میانگین درصد مر گ ومیرلارو سن دوم نماتد ریشه گرهی *M. javanica* در اثر فیلتره کشت جدایه های مختلف قارچ ها، با آب مقطر، تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد ($p \leq 0.01$) داشت. با توجه به شکل ۲، خاصیت نماتد کشی فیلتره‌ی کشت قارچ‌ها تنها مربوط به غلظت استاندارد بود و با کاهش غلظت (غلظت‌های 10^{-1} و 10^{-2}) اثر نماتد-کشی فیلتره‌ها از بین رفت به طوری که اثر جدایه‌ها بر مرگ و میر لارو سن دو اختلاف معنی‌داری با شاهد نداشت. در زمان ۲۴ ساعت اول موثرترین جدایه IRAN 504C بود. پس از گذشت ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب جدایه‌های IRAN 504C، IRAN 1131C، IRAN 676C و HAMEDAN موثر بودند.

کوتیکول نماتد به عنوان یک لایه‌ی غیرسلولی به وسیله هیپودرم تولید شده و عموما از پروتئین‌هایی شامل کراتین، کولاژن و رشته‌هایی که به صورت اریب قرار دارند، تشکیل شده است. کولاژن ساختار پایه‌ای است، بنابراین تجزیه‌ی موثر آن در کوتیکول برای پارازیته نمودن نماتدهای بالغ، کاملا ضروری است (هانگ و همکاران[1]،۲۰۰۴). قارچ جهت عبور از دیواره تخم باید توانایی عبور از پوسته‌ی تازه تشکیل شده‌ی بدن نماتد را نیز داشته باشد و احتمالا جدایه‌ها با توجه به میزان پروتئاز، کیتیناز و کولاژناز تولیدی خود می‌توانند از پوسته‌ی تخم و سپس از پوسته‌ی نماتد عبور کنند.

چن و دیکسون[2] (۲۰۰۴) بیان داشتند که قارچ *P. chlamydosporia* آنزیم‌هایی تولید می‌کند که باعث از بین رفتن نماتد و تخم آن می‌شود. بر اساس مطالعات عده‌ای از محققان در مورد این قارچ، شواهدی مبنی بر تولید آنزیم کیتیناز CHI43 توسط قارچ *P. chlamydosporia* مشاهده شد (لوپزلیورکا و روبرتسون[3]، ۱۹۹۲؛ تیخونو و همکاران[4]، ۲۰۰۲؛ خان و همکاران[5]، ۲۰۰۴) و این آنزیم به عنوان فاکتور نماتدکش معرفی شده است (تیخونو و همکاران، ۲۰۰۲). طبق گزارش سجرز و همکاران[6] (۱۹۹۹)، قارچ *P. chlamydosporia* پروتئاز نیز ترشح می‌کند که این آنزیم پروتئین‌های پوسته‌ی تخم نماتد *M. incognita* را هیدرولیز می‌کند. گوراتاری و همکاران[7] (۲۰۰۸) نیز بیان داشتند که آنزیم‌های پروتئاز و کیتیناز دارای رابطه مستقیم با مرگ و میر لارو سن دو (J_2) می‌باشند، این آنزیم‌های تولید شده توسط قارچ *P. chlamydosporia* در اضمحلال دیواره تخم نماتد که حاوی سه ترکیب پروتئنی، کیتینی و لیپیدی است، موثر می‌باشند و قارچ‌هایی که آنزیم بیشتری تولید می‌کنند، از بیماریزایی بیشتری نیز برخوردار هستند (هانگ و همکاران، ۲۰۰۴). پس کنترل موفق بیماری ریشه گرهی توسط این قارچ را می‌توان ناشی از وجود آنزیم هایی مانند پروتئاز، کیتیناز و کولاژناز در این نوع قارچ دانست.

در این مطالعه جدایه‌ی شماره‌ی ۵۰۴ موثرترین جدایه‌ی این آزمایش بود که بعد از ۲۴ ساعت حدود ۵۶٪، بعد از ۴۸ ساعت حدود ۹۶٪ و بعد از ۷۲ ساعت تمام لاروها را از بین برد. نتایج حاصل از این تحقیق با نتایج آزمایش‌های قریشی وهمکاران و زرین و همکاران مطابقت دارد. درآزمایش‌ها قریشی و همکاران (۲۰۱۲) با کاربرد فیلتره‌ی استاندارد این قارچ بر مرگ و میر لاروسن دو نماتد *M. javanica* ، بعد از۲۴ ساعت حدود ۳۳٪ لاروها از بین رفتند و بعد از ۴۸ ساعت حدود ۷۳٪ از لاروها از بین رفتند. میزان اختلافی که مشاهده می‌شود را می‌توان به دلیل تفاوت اثر جدایه‌های مختلف قارچ دانست.

1- Huang *et al.*
2- Chen & Dickson
3- Lopez-Liorca & Robertson
4- Tikhonov *et al.*
5- Khan *et al*.
6- Segers *et al.*
7- Goratari *et al.*



غلظتهای مورد استفاده بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت

C1= غلظت 10^{-2}، C2 = غلظت 10^{-1} و C3 = غلظت استاندارد

اعداد میانگین چهار تکرار هر تیمار می باشند.

اعداد واجد یک حروف مشابه بر اساس آزمون LSD اختلاف معنی‌دار ندارند

شکل ۲- تاثیر غلظت‌های مختلف فیلتره حاصل از کشت جدایه‌های قارچ *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* بر مرگ و میر لارو سن دو نماتد *M. javanica* در شرایط آزمایشگاهی.

در تحقیقاتی که زرین و همکاران[۲] (۱۹۹۹) انجام دادند مشاهده کردند که وقتی غلظت ۱۰۰٪ از فیلتره قارچ *P. chlamydosporia* بر علیه نماتد ریشه گرهی *M. javanica* در گیاه بامیه به کار رفت تعدادگال، تعداد توده تخم و حدود ۷۰/۲۱٪ جمعیت نهایی لارو در خاک کاهش یافت.

اثر چهار جدایه *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* روی انگلی شدن تخم‌های نماتد *M. javanica*

۱) اثر روی توده تخم: کلیه توده‌های تخم توسط تمامی جدایه‌های قارچ مورد مطالعه، انگلی شدند و تمامی توده‌های تخم به وسیله میسلیوم‌های این قارچ احاطه شده و کلونیزه گشتند.

۲) اثر قارچ‌ها روی انگلی شدن تخم‌های موجود در توده‌های تخم: نتایج حاصل از بررسی میزان تخم‌های کلونیزه شده در حضور جدایه‌های قارچ مذکور نشان داد بین چهارجدایه‌ی مورد استفاده در آزمایش در مقایسه با شاهد تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد ($p \leq 0.01$) وجودداشت (جدول ۳). بر اساس آنالیز آماری انجام شده چهار جدایه‌ی *P. chlamydosporia* در دو گروه آماری قرار گرفتند. چهار جدایه‌ی موجود در آزمایش توانایی آلوده کردن تخم‌های نماتد را داشتند که درصد آلودگی بین ۸۹/۸۱ و ۷۴/۱۸ متغیر بود (شکل۳). جدایه‌ها در کل در دو گروه متفاوت آماری قرار گرفتند که بالاترین درصد کلونیزه کردن تخم نماتد مربوط به جدایه‌ی شماره‌ی ۱۱۳۱ از آلمان بود (IRAN 1131C) که این جدایه به همراه جدایه‌ی شماره‌ی ۵۰۴ از برزیل (IRAN 504C) در یک گروه قرار گرفته و حدود ۸۸٪ از تخم‌ها را آلوده نمودند.

جدول ۳- تجزیه واریانس درصد انگلی شدن تخم های محصور درتوده‌های تخم توسط چهار جدایه از قارچ *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات[1]
جدایه‌ی قارچی	۴	۵۳۵۳/۴۹۱۹**
خطا	۴۴	۲۰۶/۶۸۴۹۳

CV=۱۸/۳۷۰۹۷

*نشان‌دهنده‌ی اختلاف آماری در سطح یک درصد می‌باشد

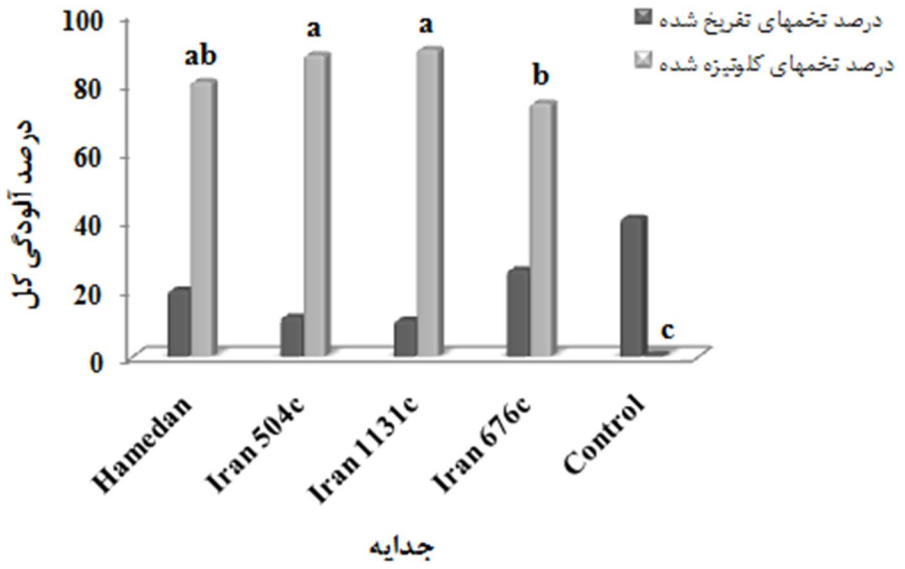
بعد از این دو جدایه، جدایه‌ی ایرانی همدان (HAMEDAN) قرار گرفت که با دو جدایه‌ی قبل اختلاف معنی‌داری نداشت. جدایه‌ی ایرانی (مشهد) شماره ۶۷۶ (IRAN 676C) در گروهی دیگر با متوسط کنترل کنندگی ۷۴٪ قرار گرفت. در این آزمایش درصد کل تخم‌های آلوده با لاروهای تفریخ شده نیز مقایسه شد که همانطور که انتظار می‌رفت با توجه به شکل ۳ با افزایش درصد کل تخم‌های آلوده، تعداد لاروهای تفریخ شده کمتر شد.

گونه *P. chlamydosporia* دارای فعالیت پادزیستی (سجرز و همکاران، ۱۹۹۹)، و تولید آنزیم‌های پروتئیناز (VCP1)، کیتیناز (CHI43) و کلاژناز می‌باشد و تخم نماتدها را پارازیته می کند و ماده‌های نماتد را توسط هیفی که تولید می‌کند غیر متحرک می‌کند و هم‌چنین می‌تواند ریزوسفر را کلونیزه کند که این کار باعث می‌شود توده‌ی تخم به آسانی کلونیزه شود (دی لج و کری[1]، ۱۹۹۱).

بسیاری از محققان در گزارشات خود به اثر مهار قارچ *P. chlamydosporia* اشاره کردند به طوریکه ویلکوکس و تریب (۱۹۷۴)، بورسنال وتریب[2] (۱۹۷۴) و تریب[3] (۱۹۷۹) قارچ *P. chlamydosporia* را به عنوان عمده‌ترین پارازیته کننده‌ی تخم و سیست نماتد *Heterodera schachtii* در تعدادی از کشورهای اروپایی گزارش کردند. به گزارش دهاوان و سینگ (۲۰۱۱)، قارچ *P. chlamydosporia* یکی از قارچ‌های پارازیت کننده‌ی تخم نماتد *M. incognita* می‌باشد که در آزمایش‌ها صورت گرفته توسط آنها حدود ۹۶٪ تخم‌ها پارازیته شد و حتی کلامیدوسپورها داخل تخم‌ها مشاهده شدند. در آزمایش‌هایی که توسط اولیور برنابئو و لوپز لیورکا[4] در سال ۲۰۰۲ انجام گرفت، میزان پارازیته شدن تخم نماتد *M. Javanica* ۷۰-۱۰۰٪ و میزان نفوذ هیف به داخل تخم ۳۵-۴۰٪ توسط بیشتر استرین‌های آزمایش شده تشخیص داده شد. در مطالعات ما نیز حدود ۸۰ درصد تخم‌های نماتد *M. Javanica* توسط چهار جدایه قارچ پارازیته شدند و هم‌چنین هیف‌های به داخل تخم نفوذکرده نیز مشاهده شد.

با توجه به سه آزمون انجام شده جدایه‌های IRAN 504C و IRAN 1131C بهترین اثر را نشان دادند و بنابراین به عنوان بهترین جدایه در شرایط آزمایشگاه شناخته شدند.

1- De Leij & Kerry
2- Bursnall & Tribe
3- Tribe
4- Olivares-Bernabeu & Lopez-Liorca



شکل ۳- مقایسه درصد آلودگی تخم‌ها و درصد تفریخ لارو

نتایج آزمون‌های گلخانه‌ای تاثیر جدایه‌های مختلف قارچ *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* بر فاکتورهای رشد گیاه میزبان

جدول تجزیه واریانس اثر جدایه‌های قارچی مورده استفاده بر شاخص‌های رشدی گیاه میزبان نشان داد که اثر تیمار واجد و فاقد نماتد بر طول ساقه، وزن تر ریشه و وزن خشک ریشه در سطح احتمال یک درصد ($p \leq 0.01$) و بر وزن خشک ساقه و طول ریشه در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار ($p \leq 0.05$) بود (جدول ۴)؛ اثر جدایه قارچ بر طول ساقه و وزن خشک ساقه در سطح احتمال یک درصد ($p \leq 0.01$) و بر وزن تر ساقه، طول ریشه، وزن تر ریشه و وزن خشک ریشه در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار ($p \leq 0.05$) بود و هم‌چنین اثر جدایه قارچی* وجودیاعدم وجود نماتد بر طول ساقه، وزن تر ریشه و وزن خشک ریشه در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار ($p \leq 0.05$) بود (جدول ۴).

کمترین شاخص‌های رشدی گیاه میزبان در تمام گروه‌ها (شاخص‌های رشدی اندام هوایی و زیرزمینی) مربوط به گیاه آلوده به نماتد و تیمار نشده بود. گیاهان دارای تیمار نماتد همراه جدایه‌های قارچ شماره ۵۰۴، ۱۱۳۱ و جدایه همدان تقریبا میزان رشد یکسانی را نشان دادند و تنها از بین این چهار جدایه، جدایه‌ی شماره ۶۷۶ عملکرد کمتری داشت. ریشه‌ی گیاهان آلوده به نماتد از وزن بیشتری برخوردار بودند که در این مورد بعد از تیمار تنها نماتد، تیمارجدایه‌ی شماره‌ی ۶۷۶ بیشترین وزن ریشه را نشان داد.

لاروهای سن دوم نماتد ریشه‌گرهی پس از ورود پروتئاز ترشح می‌کنند که باعث شکستن پروتئین‌های گیاه میزبان به اسیدهای آمینه می‌شوند. تجمع اسیدهای آمینه به خصوص تریپتوفان که پیش نیاز تولید ایندول استیک اسید است، موجب افزایش اکسین و عدم تعادل هورمونی در محل تغذیه‌ای نماتد و ایجاد گال یا غده در محل ورود لارو مرحله دوم (J_2) می‌گردد (عسگریان[1]، ۲۰۰۷). هم‌چنین افزایش ریشه‌های فرعی (واکنش میزبان نسبت به وجود نماتد) توسط نماتد ریشه‌گرهی، عامل افزایش وزن در ریشه تیمارهای آلوده است. هورمون اکسین باعث القای ریشه‌زایی می‌شود و پس از ریشه‌زایی در صورت باقی ماندن در ریشه مانع از رشد ریشه می‌شود. نماتد ریشه‌گرهی دائما باعث تحریک تولید اکسین می‌شود، در نتیجه همیشه در ریشه اکسین وجود دارد.

1- Askarian

جدول ٤- آنالیز واریانس اثر جدایه‌های مختلف قارچ *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* بر شاخص های رشدی گیاه گوجه فرنگی آلوده به *M. javanica*.

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات[1]					
		طول‌ساقه (cm)	وزن‌ترساقه (g)	وزن‌خشک ساقه (g)	طول‌ریشه (cm)	وزن‌تر‌ریشه (g)	وزن‌خشک-ریشه(g)
تیماروجدوفاقدنماتد	۱	۱۵۳۴/۵۸**	۹۹/۶۸^{ns}	۱۴/۱۸*	۱۸۴/۳۲*	۶۵۸/۴۸**	۲۵/۱۰**
جدایه قارچی	۴	۵۹۷/۷۳**	۳۰۶/۲۰*	۲۷/۲۹**	۸۵/۹۳*	۶۸/۹۰*	۲/۳۹*
جدایه قارچی*وجودیاعدم وجود نماتد	۴	۱۴۰/۹۳*	۳۹/۲۱^{ns}	۱/۴۹^{ns}	۱۲/۰۷^{ns}	۸۶/۱۳*	۳/۸۵*
خطای آزمایش	۴۰	۵۳/۳۶	۱۰۳/۲۶	۲/۰۳	۲۰/۱۶	۳۳/۹۹	۰/۸۱
کل	۴۹						
%CV		۱۱/۴۶	۱۱/۷۹	۱۶/۳۲	۱۶/۷۳	۱۴/۹۰	۱۷/۶۹

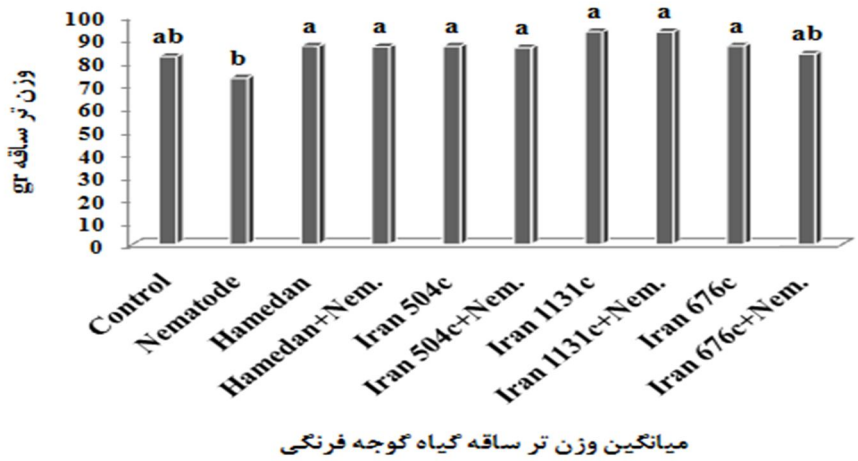
[1]*نشان‌دهنده‌ی اختلاف آماری در سطح پنج درصد می‌باشد.

** نشان‌دهنده‌ی اختلاف آماری در سطح یک درصد می‌باشد.

ns اختلاف معنادار وجود ندارد.

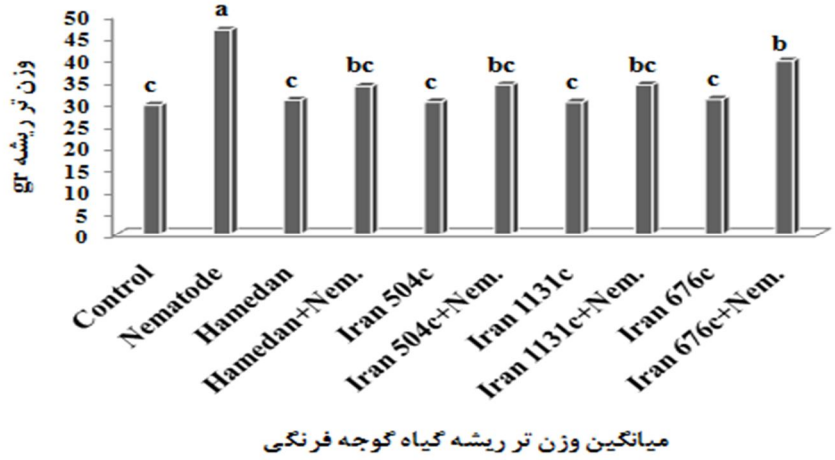
بنابراین طول ریشه‌های آلوده به نماتد نسبت به ریشه‌های سالم کوتاه‌تر است. هم‌چنین کاهش رشد ریشه را می‌توان به اختلالات ایجاد شده در نوک ریشه نسبت داد. به این ترتیب که نماتد ریشه‌گرهی با حمله به نوک ریشه باعث توقف رشد طولی در قسمت‌های مورد حمله گردیده و گیاه را به تولید ریشه‌های فرعی تحریک می‌کند. ولی با تشکیل ریشه‌های فرعی نماتد به نوک آنها نیز حمله می‌کند و از رشد آنها ممانعت می‌کند و به این ترتیب باعث کوتاهی ریشه‌ها در ارقام آلوده می‌گردد. به دلیل کاهش طول ریشه جذب مواد غذایی نیز کمتر می‌شود. از طرف دیگر بخشی از مواد غذایی که توسط ریشه جذب شده توسط نماتدها و قسمتی هم توسط سلول‌های غول‌آسا مصرف می‌شود. وزن تر و طول شاخساره به دلیل کاهش جذب مواد غذایی و کاهش میانگره‌ها در تیمارهای آلوده کاهش یافت. با بررسی شاخص‌های رشدی اندام هوایی و زیرزمینی گیاه گوجه‌فرنگی در حضور و عدم حضور نماتد می‌توان مشاهده کرد که در بعضی موارد شاخص‌های رشدی گیاهان آلوده به نماتد و تیمار شده نسبت به گیاه سالم بیشتر بود که این موضوع نشان می‌دهد نه تنها فاکتورهای رشدی گیاه میزبان در حضور بیمارگر حفظ شده است بلکه روند صعودی نیز داشته است. علاوه بر آن مقایسه دو گروه تیمار شده‌ی واجد و فاقد نماتد نیز نشان داده حضور نماتد در بعضی موارد با عدم حضور آن همپوشانی داشته و در مواردی نیز سبب تاثیر منفی در شاخص رشدی گیاه میزبان شده است. در تحقیق حاضر استفاده از جدایه‌های قارچ بویژه جدایه‌های شماره‌ی ۵۰۴ و شماره‌ی ۱۱۳۱ سبب افزایش وزن خشک و تر اندام هوایی و افزایش ارتفاع گیاه میزبان شد. بررسی شاخص وزن تر ساقه گیاه میزبان نشان داد در بین تیمارهای فاقد نماتد، چهار جدایه‌ی موجود در آزمایش (جدایه‌ی مربوط به همدان، جدایه‌ی شماره‌ی ۱۱۳۱ ، جدایه‌ی شماره‌ی ۵۰۴ و جدایه‌ی شماره‌ی ۶۷۶) در یک گروه آماری قرار گرفتند. در تیمارهای واجد نماتد نیز

جدایه‌ی مربوط به همدان، جدایه‌ی شماره‌ی۱۱۳۱ و جدایه‌ی شماره‌ی ۵۰۴ در یک گروه آماری قرار گرفتند و موثرتر واقع شدند (شکل ۴). مقایسه‌ی صورت گرفته بر وزن تر ریشه نشان‌دهندهٔ افزایش وزن ریشه‌های آلوده نسبت به ریشه‌های سالم بود که در این حالت جدایه‌ی شماره‌ی ۶۷۶ همراه نماتد بعد از شاهد دارای بیشترین میانگین وزن تر بود و بعد از آن جدایه‌های شماره‌ی ۱۱۳۱، ۵۰۴ و همدان در یک سطح قرار گرفتند (شکل ۵). بررسی شاخص وزن خشک ساقه نشان داد که به جز جدایه‌ی شماره‌ی ۶۷۶ در حضور نماتد بین بقیه‌ی جدایه‌ها در حضور و غیاب نماتد تفاوت معنی دار وجود نداشت (شکل ۶). تحلیل داده‌های مربوط به شاخص وزن خشک ریشه گیاه میزبان نیز نشان‌دهنده‌ی بالابودن میانگین جدایه‌ی شماره‌ی ۶۷۶ نسبت به دیگر جدایه‌ها بود (شکل ۷). موثرترین جدایه‌ها بر طول ساقه جدایه‌های شماره‌ی ۱۱۳۱ و ۵۰۴ فاقد نماتد بودند و پس از آن بقیه جدایه‌های دارا و فاقد نماتد در یک گروه آماری قرار گرفتند که نسبت به شاهد نماتد اختلاف معنی‌دار داشتند (شکل ۸). در شاخص رشدی طول ریشه در تیمارهای فاقد نماتد جدایه‌های شماره‌ی ۱۱۳۱، شماره‌ی ۵۰۴ و جدایه‌ی مربوط به همدان در یک گروه آماری قرار گرفتند و موثرتر شناخته شدند و در بین تیمارهای دارای نماتد نیز بیشترین اثر مربوط به همین سه جدایه بوده است (شکل ۹). بنابراین استفاده از این قارچ علاوه بر کنترل نماتد ریشه‌گرهی، در بهبود رشد گیاه گوجه‌فرنگی موثر واقع شد که این یافته با نتایج آزمایش‌ها موسوی و همکاران (۲۰۱۰) مطابقت دارد.



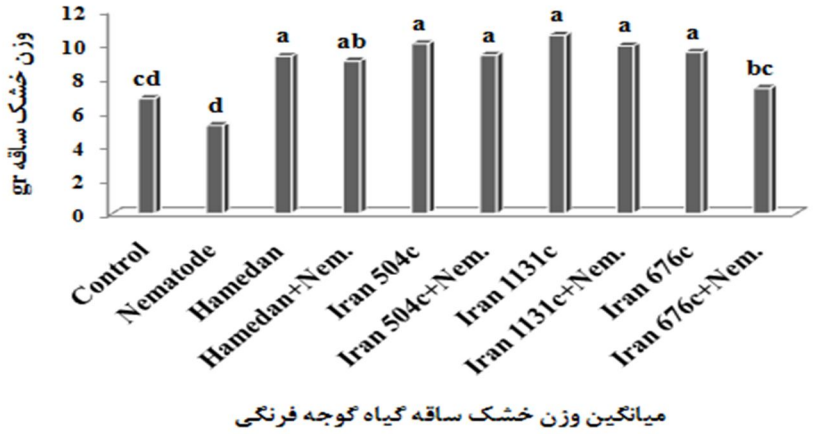
شکل ٤- تاثیر٤ جدایه از قارچ *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* بر وزن تر ساقه گیاه گوجه فرنگی

ستون واجد حداقل یک حرف مشابه بر اساس آزمون LSD تفاوت معنی‌دار ندارند



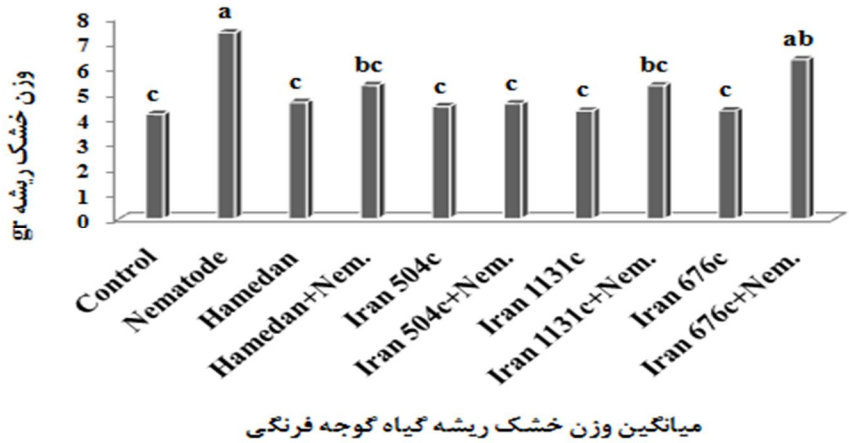
شکل ۵- تاثیر٤ جدایه از قارچ *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* بر وزن تر ریشه گیاه گوجه فرنگی

ستون واجد حداقل یک حرف مشابه بر اساس آزمون LSD تفاوت معنی‌دار ندارند



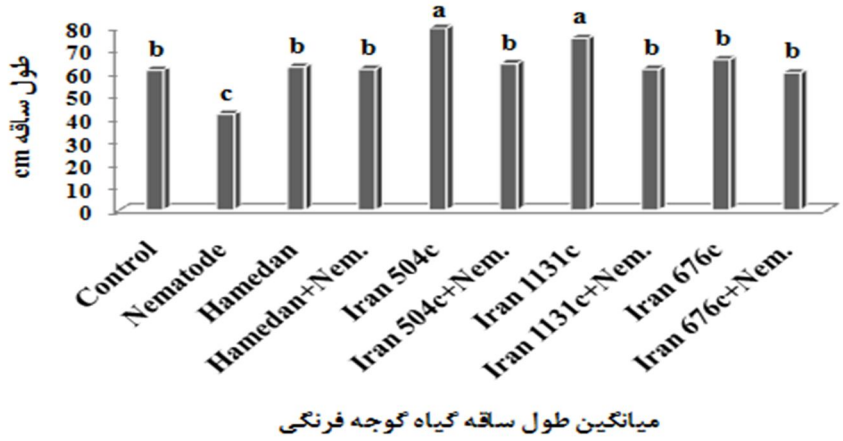
شکل ٦- تاثیر٤ جدایه از قارچ *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* بر وزن خشک ساقه گیاه گوجه فرنگی

ستون واجد حداقل یک حرف مشابه بر اساس آزمون LSD تفاوت معنی‌دار ندارند



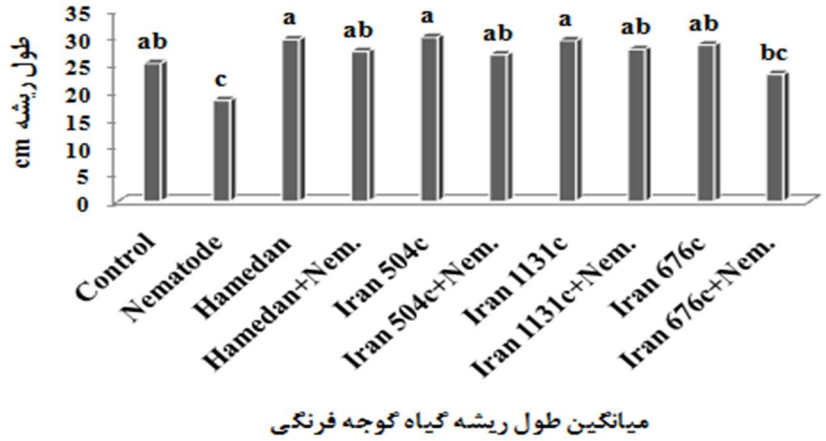
شکل ۷- تاثیر٤ جدایه از قارچ *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* بر وزن خشک ریشه گیاه گوجه فرنگی

ستون واجد حداقل یک حرف مشابه بر اساس آزمون LSD تفاوت معنی‌دار ندارند



شکل ۸- تاثیر٤ جدایه از قارچ *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* بر طول ساقه گیاه گوجه فرنگی

ستون واجد حداقل یک حرف مشابه بر اساس آزمون LSD تفاوت معنی‌دار ندارند



شکل ۹- تاثیر٤ جدایه از قارچ *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* بر طول ریشه گیاه گوجه فرنگی

ستون واجد حداقل یک حرف مشابه بر اساس آزمون LSD تفاوت معنی‌دار ندارند

اثر جدایه‌های قارچی بر شاخص‌های آلودگی به نماتد ریشه گرهی *M. javanica* در گوجه فرنگی

اثر نتایج جدول تجزیه واریانس (جدول ۵) نشان داد اثر تیمارهای مختلف بر همه‌ی شاخص‌های آلودگی نماتد در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار ($p \leq 0.01$) بود. و با توجه به شاخص‌های آلودگی *M. javanica* می‌توان گفت جدایه‌های شماره ۵۰۴ و همدان در بین تیمارها موثرتر بودند و علی‌رغم اینکه در بعضی شاخص‌های رشدی نماتد ریشه‌گرهی از نظر آماری با سایر تیمارها هم‌گروه می‌باشند اما در گروهای مختلف (تعداد گال در یک گرم از ریشه، شاخص گال و کنترل جمعیت لارو سن دو (J_2)) تاثیر خود را حفظ نموده‌اند. تعداد توده تخم در یک گرم ریشه و تعداد تخم در توده تخم در بین تیمارها از نظر آماری تقریبا پراکندگی یکنواختی داشته و جز جدایه‌ی شماره‌ی ۶۷۶ تاثیر سایر جدایه‌ها بر تعداد توده تخم یکسان بوده است و جدایه‌ی شماره‌ی ۶۷۶ بعد از شاهد دارای بیشترین میانگین بود (جدول۶). با توجه به این نتایج با اضافه کردن جدایه‌های قارچ *P. chlamydosporia* var.

chlamydosporia (شماره‌ی ۵۰۴، ۱۱۳۱ و همدان) به خاک، نماتد کمترین شاخص‌های آلودگی را نشان‌داد و تیمار گیاهان با جدایه‌ی شماره‌ی۶۷۶ بیشترین شاخص آلودگی را نشان داد.

اثر جدایه‌های قارچی بر گسترش آلودگی به نماتد ریشه‌گرهی *M. javanica*

گیاهان تیمار شده با جدایه‌های مختلف قارچ *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* دارای نماتد، در مقایسه با تیمار فقط نماتد کمترین جمعیت نهایی نماتد، شاخص تولید مثل و درصد تکثیر را نشان دادند (جدول ۸، شکل ۱۱)، به طوریکه آنالیز واریانس حاصل از بررسی تاثیر این جدایه‌ها بر گسترش آلودگی *M. javanica* (جدول ۷) در گیاه گوجه‌فرنگی نشان دهنده‌ی تفاوت معنی دار تیمارها در سطح احتمال یک درصد ($p \leq 0.01$) در مقایسه با شاهد بود. جمعیت نماتد در شرایط گلخانه تا حدود ۸۰٪ توسط این جدایه‌های قارچ مهار گردید، که تفاوت آنان با شاهد در سطح یک درصد معنی‌دار بوده (شکل۱۰) و میزان تکثیر نماتد با اضافه شدن این جدایه‌ها به خاک به طور قابل توجهی کاهش پیدا کرد (شکل ۱۱). با بررسی فاکتور درصد کنترل نماتد که تمامی تیمارها را از نظر جمعیت نهایی با شاهد مقایسه می‌کند،تاثیر بسزای این جدایه‌ها بر کنترل جمعیت نماتد مشخص می‌گردد.

جدول ۵- آنالیز واریانس اثر جدایه‌های مختلف قارچ *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* بر شاخص‌های آلودگی *M. javanica* درگوجه‌فرنگی.

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات[1]				
		جمعیت (J_2) در ۲۰۰ گرم خاک	شاخص گال	تعداد گال در یک گرم از ریشه	تعداد کیسه تخم در یک گرم از ریشه	تعدادتخم در هرکیسه تخم
تیمار	۴	۶۲۷۸۵/۶۴**	۰/۴۸۲۸**	۵۰۸/۳۴**	۴۹۷/۵۴**	۱۷۶۸/۱۶**
خطای آزمایش	۲۰	۵۸۰/۷۴	۰/۰۰۸۶	۹/۴۱	۱۲/۶۴	۵۲/۸۱
کل	۲۴					
%CV		۱۶ /۲۴	۲/۴۴	۱۰/۳۱	۱۳/۰۵	۱۰/۷۶

[1]*نشان‌دهنده‌ی اختلاف آماری در سطح یک درصد می‌باشد.

جدول ٦- مقایسه میانگین (± SE) تاثیر جدایه‌های مختلف قارچ *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* بر شاخص‌های نماتد ریشه گرهی *M. javanica* در گیاه گوجه فرنگی

تیمار	تعداد گال در یک گرم ریشه	شاخص گال[1]	تعداد توده تخم در یک گرم ریشه	تعداد تخم داخل هر توده تخم	جمعیت لارو سن دوم(J_2) در ۲۰۰ گرم خاک
Nematode	۴۴/۴±۱/۷۸^{a}	۴/۱۸±۰/۰۲^{a}	۴۳/۴± ۱/۹۷^{a}	۱۰۰/۶±۲/۹۹^{a}	۳۴۶/۴±۱۱/۵۸^{a}
hamedan+ Nem.	۲۰/۲±۰/۱۸^{d}	۳/۴۶±۰/۰۱^{d}	۲۱/۸± ۱/۵۱^{c}	۵۶/۴±۲/۲۹^{b}	۸۲/۶±۲/۹۲^{c}
Iran 504c+ Nem.	۲۲/۴± /۹۲^{cd}	۳/۵۷±۰/۰۵^{d}	۱۸/۴±۱/۲۵^{c}	۵۵/۴±۵/۴۱^{b}	۸۷/۲± ۱/۸۰^{c}
Iran 1131c+ Nem.	۲۶/۲±۱/۰۴^{c}	۳/۷۶±۰/۰۵^{c}	۲۲/۶±۰/۶۷^{c}	۶۱/۸±۲/۲۰^{b}	۹۸/۴±۴/۲۹^{bc}
Iran 676c+ Nem.	۳۵/۶± ۱/۷۳^{b}	۴/۰۵±۰/۰۳^{b}	۳۰ ± ۱/۶۲^{b}	۶۳/۴±۰/۸۳^{b}	۱۲۷/۲±۱۵/۵۴^{b}

اعداد، میانگین ±استاندار ارور چهار تکرار هر تیمار می‌باشند.

اعداد دارای حروف مشابه در هر ستون بر اساس آزمون LSD دارای اختلاف معنی دار نیستند

[1] شاخص گال صفر= عدم وجود گال، ۱= ۱-۲ گال، ۳= ۱۱-۳۰ گال، ۴= ۳۱-۱۰۰ گال، ۵= بیش از ۱۰۰ گال در سیستم ریشه

جدول ۷- آنالیز واریانس اثر جدایه‌های مختلف قارچ *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* بر شاخص های جمعیتی *M. javanica* در گوجه‌فرنگی.

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات[1]			
		جمعیت نهایی نماتد(PF)	شاخص تولید مثل نماتد(RF)	درصد تکثیر نماتد (%Mr)	درصد کنترل نماتد (%NC)
تیمار	۴	۲۵۴۹۳۱۹۷۷۶۱ **	۷۰۸/۱۶ **	۵۹۷۹/۴۳ **	۵۹۷۹/۴۳ **
خطای آزمایش	۲۰	۱۹۱۷۱۶۴۶۱/۵۶	۵ / ۳۲	۳۰/۹۸	۳۰/۹۸
کل	۲۴				
%CV		۱۶/۸۷	۱۶ /۸۷	۱۴/۰۱	۹/۲۳

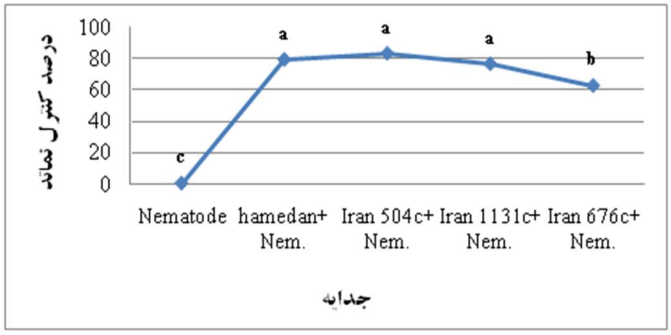
[1]** نشان‌دهنده‌ی اختلاف آماری در سطح یک درصد می‌باشد.

جدول ۸- مقایسه میانگین (± SE) شاخص‌های جمعیتی *M. javanica* تحت تاثیر جدایه‌های مختلف قارچ *P. chlamydosporia chlamydosporia* var. در گوجه فرنگی.

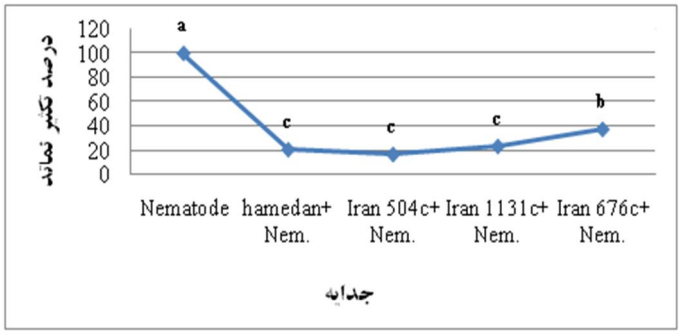
تیمار	جمعیت‌نهایی (PF)	شاخص تولیدمثل (RF)
Nematode	۲۰۶۴۹۸ ± ۶۰۵۴/۹۶[a]	۳۴/۴۱ ± ۱/۰۱[a]
hamedan+ Nem.	۴۲۸۷۳ ± ۵۴۴۱/۳۲[c]	۷/۱۴± ۰/۹۱[c]
Iran 504c+ Nem.	۳۴۸۲۲ ± ۳۴۲۴/۰۷۷[c]	۵/۸ ± ۰/۵۷[c]
Iran 1131c+ Nem.	۴۸۵۷۵ ± ۲۳۹۱/۷۹[c]	۸/۰۹ ± ۰/۴۰[c]
Iran 676c+ Nem.	۷۷۴۳۶ ± ۷۰۴۷/۰۹[b]	۱۲/۹۰ ± ۱/۱۷[b]

اعداد، میانگین ± استاندار ارور چهار تکرار هر تیمار می‌باشند.

اعداد دارای حروف مشابه در هر ستون بر اساس آزمون LSD درای اختلاف معنی دار نیستند.



شکل ۱۰- تاثیر ٤ جدایه از قارچ *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* بر کنترل نماتد



شکل ۱۱- **تاثیر ٤ جدایه از قارچ *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* بر درصد تکثیر نماتد**

طبق نتایج به دست آمده از این تحقیق جدایه‌ی شماره‌ی ۵۰۴ با اثر کنترل کنندگی ۸۳/۱۴٪ موثرترین جدایه در شرایط گلخانه شناخته شد و بعد از آن به ترتیب با درصد کنترل کنندگی ۷۹/۲۴٪ و ۷۶/۴۸٪ جدایه‌ی همدان و جدایه‌ی شماره‌ی ۱۱۳۱ بودند که با جدایه‌ی قبل در یک گروه آماری قرار گرفتند و در آخرهم جدایه‌ی شماره‌ی ۶۷۶ با درصد کنترل کنندگی ۶۲/۵۰٪ قرار داشت که علی‌رغم تفاوت معنی‌دار با شاهد بیشترین شاخص آلودگی را نشان داده است. نتایج سایر محققان در زمینه‌ی مهارزیستی نشان دهنده‌ی کاهش جمعیت نماتد بعد از استفاده از این قارچ بوده است، که با نتایج حاصل از این تحقیق همسو بوده است.

قابل ذکر است هدف از مهار نماتد نزدیک شدن به حد آستانه اقتصادی خسارت نماتد بوده، که می‌توان نتیجه گرفت جدایه‌های IRAN 504C، IRAN 1131C ، IRAN 676C و HAMEDAN تا حدی ما را در شرایط گلخانه‌ای در رسیدن به این مقصود نزدیک کرده‌اند. با ادامه تحقیقات می‌توان کارایی این جدایه ها را در کنترل جمعیت نماتد ریشه‌گرهی در شرایط مزرعه‌ای نیز بررسی نمود.

سپاس‌گزاری

بدین‌وسیله از آقای دکتر زارع، استاد پژوهش موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور وآقای دکتر موسوی، استادیار گروه گیاهپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت که جدایه‌های قارچ را جهت انجام این پژوهش در اختیار ما قرار دادند، تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

۱. الهی‌نیا، س.ع. ۱۳۸۴. بیماری‌های گیاهان زراعی و روش‌های مبارزه با آنها. انتشارات دانشگاه گیلان، ۵۴۵ ص.

2. Abd El-Raheem, R.S., Samir, A.S., Yehia, A.G.M., and Doaa, M.K. 2005. Evaluation of *Pochonia chlamydosporia*, *Paecilomyces lilacinus* and *Arthrobotrys dactyloide* as biocontrol agents for *Meloidogyne incognita* under green house condition. Pakistan Journal of Biological Sciences, 8(11): 1511-1516.

3. Akhiani, A., Mojtahedi, H., and Naderi, A. 1986. The hosts of root knot nematode in Iran. Proc. 8th Plant Protec. Cong, Isfahan, Iran, pp. 134 (Abst.).

4. Askarian, H. 2007. Genetic diversity of various populations of root knot nematode (*Meloidogyne* sp.) on Pistachio trees using host differential test and molecular marker in Kerman province. MSc. Thesis, Submitted to Isfahan University of Technology, Iran.

5. Ayatollahy, E., Fatemy, S., and Etebarian, H.R. 2008. Potential for biological control of *Heterodera schachtii* by *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* on sugar beet. Biocontrol Science and Technology, 1-2: 157-167.

6. Behnamian, M., and Masiha, S. 2002. Tomato *(Lycopersicon esculentum*). Tabriz Setoudeh Publication.

7. Bursnall, L.A., and Tribe, H.T. 1974. Fungal parasitism in cysts of *Heterodera.* II.Egg parasites of *H.schachtii.* Transactions of the British Mycological Society, 62: 595-601.

8. Chen, S.Y., and Dickson, D.W. 2004. Biological control of nematodes by fungal antagonists. In Chen, Z. X, Chen, S. Y., and Dickson, D. W., (eds.), Nematology, Advances and Perspectives-Vol. 2. Nematode management and utilization. CABI Publishing, Wallingford, UK. pp: 979-1039.

9. De Leij, F. A. A. M., and Kerry, B.R. 1991. The nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* as a potential biological control agent for *Meloidogyne arenaria*. Revue de Nématologie, 14: 157–64.

10. De Leij, F.A.A.M., Kerry, B.R., and Dennehy, J.A. 1993. *Verticillium chlamydosporium* as a biological control agent for *Meloidogyne incognita* and *M. hapla* in pot and microplot tests. Nematologica, 39: 115-126.

11. Dhawan, S.C., and Singh, S. 2011. Biomanagement of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* by egg parasitic fungus, (*Pochonia chlamydosporia*) on Okra. Vegetable Science, 38(2): 128-134.

12. Eisenback, J.D., and Triantaphyllo, H.H. 1991. Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species and races. In W. R. Nickle (Ed), Manual of agricultural nematology. Marcel Dekker, New York, USA. pp: 191-274.

13. Fatemy, S., Ahmadian-Yazdi, R., Parvizy, A., Ahmadi, M., Pakniat, M., Barooti, S., Askari, M., and Ershad, J. 1999. Fungal parasites of cysts of *Hetrodera schachtii* in Iran. Pakistani Journal of Nematology, 17(1): 61-66.

14. Goratari, M.C., Galarza, B.C., Cazaue, M.C., and Hours, R.A. 2008. Comparsion of the biological properties of two strains of *Paecilomyces lilacinus* associated to their antagonistic effect onto *Toxocara canis* eggs. Malasian Journal of Microbiology, 4: 35-41.

15. Hernández, M.A., and Hidalgo-Díaz, L. 2008. KlamiC®: Bionematicida agrícola producido a partir del hongo *Pochonia chlamydosporia* var. *Catenulata*. Revista de Protection Vegetal, 23: 131-134.

16. Huang, X., Zhao, N., and Zhang, K. 2004. Extracellular enzymes serving as virulence factors in nematophagous fungi involved in infection of the host. Research in Microbiology, 155: 811-816**.**

17. Hussey, R.S., and Baker, K.R. 1973. A comparision of method of collecting inculation for *Meloidogyne* spp. including a new technique. Plant Disease, 57: 1025-1028.

18. Jonathan, E.I., Arulmozhiyan, R., Muthsamy, S., and Manuel, W. 2000. Field application of *Paecilomyces lilacinus* for the control of *Meloidogyne incognita* on betelvine and piper brlte. Nematol Mediate, 28: 131-133.

19. Kerry, B. R., Simon, A., and Rovira, A. D. 1984. Observations on the introduction of *Verticillium chlamydosporium* and other parasitic fungi into soil for control of the cereal cyst-nematode *Heterodera avenae*. Annals of Applied Biology, 105: 509–516.

20. Kerry, B.R. 1990. An assessment of progress toward microbial control of plant-parasitic nematodes. Annals of Applied Nematolology, 22: 621-631.

21. Kerry, B.R., and Jaffee, B.A 1997. Fungi as biological control agents for plant-parasitic nematodes. In Wicklow, D.T., and Soderstrom B., (eds.), The Mycota IV. environmental and microbial relationships. Berlin: Springer-Verlag. pp: 203-218.

22. Khan, A., Williams, K.L., and Nevalainen, H.K.M. 2004. Effects of *Paecilomyces lilacinus* protease and chitinase on the eggshell structures and hatching of *Meloidogyne javanica* juveniles. Biological Control, 31: 346–352.

23. Lopez-Llorca, L.V., and Robertson, W.M. 1992. Immumocytochemical localization of a 32-kDa protease from the nematophagous fungus *Verticillium suchlasporium* in infected nematode eggs. Experimental Mycology, 16: 261–267.

24. Lopez-Llorca, L.V., Olivares-Bernabeu, C., Salinas, J., Jansson, H.B., and Kolattukudy, P.E. 2002. Pre-penetration events in fungal parasitism of nematode eggs. Mycological Research, 106: 499–506.

25. Maciá-Vicente, J.G., Jansson, H.B., Talbot, N.J., and Lopez-Llorca, L.V. 2009. Real-time PCR quantification and live-cell imaging of endophytic colonization of barley (*Hordeum vulgare*) roots by *Fusarium equiseti* and *Pochonia chlamydosporia***.** New Phytologist, 182: 213–228.

26. Moosavi, M.R., Zare, R., Zamanizadeh, H.R., and Fatemy, S. 2010. Pathogenicity of *Pochonia* species on eggs of *Meloidogyne javanica*. Invertebrate Pathology, 104: 125-133.

27. Olivares-Bernabeu, C.M., and Lopez-Liorca, L.V. 2002. Fungal egg-parasites of plant-parasitic nematodes from Spanish soils. Revista Iberoamericana de Micologia, 19: 104-110.

28. Oostenbrink, M. 1966. Major characteristics of the relation between nematodes and plants. Meded. Landbouwhogech. Wageningen, 66: 1-46.

29. Qureshi, SH.A., Viqar sultana, R., Ara, J., and Haque, S.E. 2012. Nematicidal potential of culture filtrates of soil fungi associated with rhizospheres and Rhizoplane of cultivated and wild plants. Pakistan Journal of Botany, 44(3): 1041-1046.

30. Segers, R., Butt, T.M., Kerry, B.R., and Peberdy, J.F. 1994. The nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* produces a chymoelastaselike protease which hydrolyses host nematode proteins in situ. Microbiology, 140: 2715–2723.

31. Segers, R., Butt, T.M., Carder, J.H., Keen, J.N., Kerry, B.R., and Peberdy, J.F. 1999. The subtilisins of fungal pathogens of insects, nematodes and plants: distribution and variation. Mycological Research, 103: 395-402.

32. Stirling, G.R., and West, L.M. 1991. Fungal parasites of root-knot nematode eggs from tropical and subtropical regions of Australia. Australasian Plant Pathology, 20: 149-154.

33. Tikhonov, V.E., Lopez-Llorca, L.V., Salinas, J., and Jansson, H.B. 2002. Purification and characterization of chitinases from the nematophagous fungi *Verticillium chlamydosporium* and *V. suchlasporium*. Fungal Genetics and Biology, 35: 67–78.

34. Tribe, H.T. 1979. Extent of disease in populations of *Heterodera* with special reference to *Heterodera schachtii*. Annals of Applied Biology, 92: 61–72.

35. Tylor, D.P., and Netscher, C. 1974. An improved technique for preparing pernieal patterns of *Meloidogyne* spp. Nematologica, 20: 268-269.

36. Wilcox J. and Tribe H.T. 1974. Fungal parasitism in cysts of *Heterodera.* I. Preliminary investigations. Transactions of the British Mycological Society, 62: 585-594.

37. Yang, J., Loffredo, A., Borneman, J., and Becker, J. 2012. Biocontrol efficacy among strains of *Pochonia chlamydosporia* obtained from a root-Knot nematode suppressive soil. Nematology, 44: 67-71.

38. Zare, R., and Gams, W. 2004. A monograph of *Verticillium* section Prostrata. Rostaniha (Botanical Journal of Iran), 3: 1-188

39. Zareen, A., Zaki, M.J., and Ghaffar, A. 1999. Effect of culture filtrate of fungi in the control of *Meloidogyne javanica*, root-knot nematodes on Okra and Broad bean. Pakistan Jornal of Biological Sciences, 2(4): 1441-1444.

40. Zijlstra C. Donkers-Venne D.T.H. M. and Fargette M. 2000. Identification of *Meloidogyne incognita, M. javanica* and *M. arenaria* using sequence characterized amplified region (SCAR) based PCR assays. Nematology, 2: 847-853.