گیاه پزشکی (مجله علمی کشاورزی)، جلد ۳۶ شماره ۱، بهار ۹۲

کنترل بیولوژیک نماتد مرکبات (*Tylenchulus semipenetrans*) با استفاده از قارچ های آنتاگونیست

معصومه چاووشی ثانی[۱]، سالار جمالی[۲]*، حسین طاهری[۳] و اکبر خداپرست[۴]

۱و ۴- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان

*۲- **نویسنده مسئوول**: استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان (jamali@guilan.ac.ir)

۳- مربی پژوهش موسسه تحقیقات مرکبات کشور، رامسر

تاریخ دریافت: ۹۰/۹/۵ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۱/۲۸

چکیده

به منظور شناسایی قارچ‌های آنتاگونیست نماتد مرکبات (*Tylenchulus semipenetrans*) نمونه‌برداری از خاک و ریشه درختان مرکبات دارای علایم در باغ‌های شرق گیلان و غرب مازندران انجام شد. لارو سن دوم نماتد از خاک و ماده و تخم از ریشه‌ها استخراج گردیدند. جهت جداسازی قارچ‌های آنتاگونیست، سوسپانسیون‌های ماده، تخم و همچنین لارو نماتد به طور جداگانه روی محیط کشت آب-آگار با افزودن آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین کشت شد. میسلیوم‌های توسعه یافته از لارو، تخم و نماتدهای ماده روی محیط کشت PDA تکثیر شده و مورد شناسایی قرار گرفتند. قارچ‌های شناسایی شده عبارتند از: *Fusarium solani, Cladosporium cladosporioides, F. oxysporum, Paecilomyces lilacinus,* و *Acremonium strictum* . جهت بررسی فعالیت آنتاگونیستی قارچ‌ها روی نماتد مرکبات در شرایط آزمایشگاهی، درصد تخم‌های پارازیت شده، درصد تفریخ تخم و درصد مرگ و میر لاروها ثبت گردید. نتایج نشان داد که تمامی قارچ‌های جداسازی شده قدرت پارازیت کردن تخم و لارو این نماتد را دارا می‌باشند. در این بین، قارچ‌های *Paecilomyces lilacinus* و *Acremonium strictum* به ترتیب با انگلی نمودن ۷۹/۱۱ و ۷۰/٦٦ درصد از تخم‌ها پس از پنج روز، موفق‌ترین گونه‌ها بودند. علاوه بر این، کاربرد قارچ*Acremonium strictum* با۴۸/۳۳ درصد بیشترین میزان مرگ و میر لاروها را به همراه داشت.

کلید واژه‌ها: نماتد مرکبات، *Tylenchulus semipenetrans*، ***قارچ‌های پارازیت***

مقدمه

نماتد مرکبات *Tylenchulus semipenetrans* Cobb, 1913 یکی از مهم‌ترین نماتدهای انگل گیاهی است که از گسترش وسیعی در سطح جهان برخوردار است. این نماتد اولین بار در سال۱۹۱۲ توسط Hodges از ریشه مرکبات از کالیفرنیا گزارش شد. سپس Cobb در سال ۱۹۱۴ سیکل زندگی، شکل نماتد و نحوه گسترش آن را مورد مطالعه قرار داد. این نماتد علاوه بر مرکبات به ریشه درختان زیتون، خرمالو، مو و یاس بنفش نیز حمله می‌کند (بریج و همکاران[۱]، ۲۰۰۵). نماتد مرکبات اولین بار در ایران توسط ایزد پناه و سفریان در سال ۱۳۴۷ از ملاثانی اهواز روی مرکبات گزارش گردید و در همان سال نیز به وسیله امیدوار از شیراز گزارش شد. بازدید باغ‌های مرکبات شمال ایران در سال‌های اخیر نشان داد که نماتد مرکبات *T. semipenetrans* در ۸۹ درصد از خاک‌ها و ریشه‌های

1- Bridge *et al.*

جمع‌آوری شده وجود دارد (تنهامعافی و دامادزاده[1]، ۲۰۰۷). نشانه‌های آلودگی به نماتد مرکبات روی اندام-های هوایی درختان مرکبات بیشتر در قسمت‌های فوقانی تاج ظاهر گشته و در این قسمت‌ها است که برگ‌ها ابتدا ریز شده و سپس به تدریج می‌ریزند. با گذشت زمان سرشاخه‌ها خشکیده و درنتیجه تاج فرم غیرعادی پیدا می‌کند. به طور کلی ضعف عمومی، کوچکی برگ‌ها و میوه‌ها و ریزش آنها از علائم بیماری به شمار می‌روند. این علائم اغلب شباهت زیادی با علائم بیماری‌های فیزیولوژیک از جمله بیماری‌های ناشی از کمبود مواد غذایی و یا بیماری‌های قارچی دارند. لذا با کنترل ریشه‌ها و مشاهده نماتد مستقر روی ریشه‌های فرعی مشخص می‌شود که علائم بیماری ناشی از وجود این نماتد است یا خیر (صدیقی[2]، ۱۹۷۴). در اغلب مطالعات انجام شده میزان کاهش محصول ناشی از خسارت نماتد را حدود ۱۰ تا ۳۰ درصد تخمین زده‌اند که این مقدار به عوامل مختلفی از جمله حساسیت پایه‌ها، شرایط آب و هوایی، خصوصیات خاک و حضور سایر پاتوژن‌ها بستگی دارد (وردجیو- لوکاس و همکاران[3]، ۲۰۰۹).

با عنایت به افزایش خطرات زیست محیطی نماتد-کش‌ها و اثرات سوء روی سلامتی انسان، استفاده از کنترل بیولوژیک به عنوان بخشی ازمدیریت تلفیقی نماتدها بیش از پیش مورد توجه قرار گرفته است. اولین بار در سال ۱۹۲۰ انگل‌ها و شکارگرهای نماتد به عنوان عوامل کنترل زیستی مورد استفاده قرار گرفت. شواهد ناشی از بررسی‌های متعددی که در بیش از پانزده سال گذشته صورت گرفته نشان می‌دهد که قارچ-های *Verticillium chlamydosporium, F. solani,* *F. oxysporum ,Cylindrocarpon destuctans* و *P. lilacinus* بیشترین آمار حمله به نماتدها و پارازیت تخم آن‌ها را به خود اختصاص داده اند. از مهمترین آنها می توان به موارد زیر اشاره کرد. اثرات عصاره کشت[4] چندین قارچ روی نماتد *Meloidogyne javanica* مورد مطالعه قرار گرفت و مشخص گردید قارچ‌های *Acremonium gluacus* و *Cylindrocarpon destructans* بیشترین درصد پارازیت تخم را دارا هستند (آقا و منتصر[5]، ۱۹۹۲). والتر و همکاران[6] (۱۹۹۳) قارچ‌های *Arthrobotrys dactyloides, A. oligospora, Dactylella cionapaga, P.lilacinus, Catenaria anguillulae* و *V. chlamydosporium* را از نماتد مولد غده جداسازی کردند. الیوارز و لوپز[7] (۲۰۰۲) کارایی قارچ های *Chlamydosporium* sp., *Verticillium lecanii* و *P. lilacinus* را به عنوان عامل بیوکنترل علیه نماتد *M. javanica* در شرایط آزمایشگاه مورد بررسی قرار دادند. در این بررسی، آلودگی تخم‌ها ۱۰۰-۷۰ درصد بیان شد. در شرایط آزمایشگاهی قارچ *Trichoderma harzianum* تفریخ تخم نماتد *M. javanica* را ۲۰ درصد کاهش داد (صاحبانی و هادوی[8]، ۲۰۰۸). بیش از ۳۰ جنس و ۸۰ گونه قارچ به عنوان پارازیت کننده نماتد *Meloidogyne* spp. در جهان شناسایی شده که *Monacrosporium* spp., *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *penicillium* spp. *Paecilumyces lilacinus, Pochonia Verticillium, chlamydosporia* *chlamydosporium* از جمله این قارچ‌ها هستند (چن و همکاران[9]، ۱۹۹۶؛ گودی و همکاران[10]، ۱۹۸۳؛ لی و همکاران[11]، ۱۹۹۴؛ روکوزو و همکاران[12]، ۱۹۹۳؛ وانگ و همکاران[13]، ۲۰۰۱) تاکنون قارچ‌های متعددی

1- Tanha Maafi & Damadzadeh
2 - Siddiqui
3 - Verdejo-Lucas *et al.*

4 - Culture filtrate
5 - Agha & Montasser
6 - Walter *et al.*
7 - Olivares & Lopez
8 - Sahebani & Hadavi
9 - Chen et al.
10 - Goodey *et al.*
11 - Li *et al.*
12 - Roccuzzo *et al.*
13 - Wang *et al.*

در ارتباط با نماتد مرکبات مورد شناسایی قرار گرفته‌اند. قارچ‌های *Paecilomyces lilacinus, Fusarium solani, F. oxysporum, Verticillium fungicola, Talaromyces cyanescens, Cylindrocarpon cylindroids, Chaetomium robustum, Arthrobotrys oligospora, Acremonium strictum, Engyodontium album, Myrothecium verrucaria, Emericella rugulosa,* و *Tarracomyces gigaspora* از روی تخم، ماده و لارو سن دوم نماتد مرکبات شناسایی شده اند (وردجیو- لوکاس و همکاران[1]، ۲۰۰۹). پاشا و همکاران[2] (۱۹۸۸) در هندوستان، ۱۷ گونه قارچ از خاک و ریشه‌های درختان لیمو آلوده به نماتد مرکبات جدا کردند. قارچ‌های *P. lilacinus, Dactylella ellipsospora, Arthrobotrys oligospora, Verticillium chlamydosporium. P. marquandii* از توده تخم‌های نماتد مرکبات در فلوریدا جدا شده‌اند (والتر و کاپلان[3]، ۱۹۹۰). مانی و همکاران[4] (۱۹۸۹) رشد قارچ *P. lilacinus* را روی بسترهای مختلف گندم، ارزن، سورگوم و برنج مورد بررسی قرار داده و گزارش کردند که جمعیت *T. semipenetrans* با افزایش سطوح اینوکلوم این قارچ به طور قابل توجهی کاهش می‌یابد.*P. lilacinus* از فراوان‌ترین گونه‌های قارچ است که از تخم‌ها، ماده‌ها و لاروهای سن دوم نماتد مرکبات در اسپانیا جدا شده است (جین و همکاران[5]، ۲۰۰۵). گاسپارد و مانکائو[6] (۱۹۸۶) قارچ‌های نماتدخوار را از ۴۳ باغ مرکبات در کالیفرنیا جداسازی کردند و دریافتند که جمعیت این قارچ‌ها در باغات آلوده به *T. semipenetrans* بیشتر از باغات بدون آلودگی است. این نماتد از انگل های نیمه داخلی است و بنابراین، کنترل شیمیایی آن بسیار مشکل است .علی رغم آن که یکی از روش های کنترل آن ضدعفونی خاک قبل از کاشت مرکبات است، ولی توصیه شده است که در خاک های آلوده به این نماتد پایه های مقاومی مثل نارنج سه برگ[7] کشت شود (وردجیو و مک‌کنری[8]، ۲۰۰۴). در ایران، تنها معافی و همکاران[9] (۲۰۰۰) مقاومت پایه های متداول مرکبات شمال ایران را نسبت به نماتد مرکبات مورد ارزیابی قرار دادند و نتیجه گرفتند که نارنج سه برگ و سیتروملو با داشتن کمترین میزان جمعیت نماتدی روی ریشه نسبت به سایر ارقام مقاومت بیشتری دارند. ایازپور و همکاران[10] (۲۰۱۰) در استان فارس اثرات عصاره برگ‌های *Allium sativum, Brassica campestris, Capsicum frutescents, Glycyrrhiza glabra, Datura innoxia Chenopodium botrys,* و *Foeniculum vulgar* روی رشد گیاه وکنترل نماتد مرکبات را مورد ارزیابی قرار دادند. میزان جمعیت نماتد مرکبات در نهال‌های تیمار شده با عصاره *A. sativum, C. frutescents* و*F. vulgar* درمقایسه با تیمار شاهد کاهش یافت.

در راستای تحقق اهداف کشاورزی پایدار و در نظر گرفتن کنترل بیولوژیک به عنوان یکی از اجزای غیر قابل انکار در مدیریت تلفیقی نماتدها، تحقیق حاضر به منظور شناسایی و بررسی قابلیت قارچ‌های آنتاگونیست در کنترل نماتد مرکبات در استان‌های گیلان و مازندران انجام گرفت.

مواد و روش ها

نمونه‌برداری

طی ماه‌های تیر تا آذر سال ۱۳۸۹ نمونه‌برداری از باغ‌های مرکبات شرق گیلان و غرب مازندران صورت گرفت. نمونه‌ها از شهرهای لنگرود، رودسر، کلاچای، چابکسر، رامسر، تنکابن، عباس‌آباد، سلمان شهر، چالوس و توابع آن‌ها جمع آوری شد. نمونه‌برداری به روش

1 - Verdejo-Lucas *et al.*
2 - Pasha *et al.*
3 - Walter & Kaplan
4 - Mani *et al.*
5 - Gene *et al.*
6 - Gaspard & Mankau
7 - *Poncirus trifoliate*
8 - Verdego & Mckenry
9 - Tanha Maafi *et al.*
10 - Ayazpour *et al.*

انتخابی و با توجه به بروز علایم مشخص بیماری ذکر شده در مقدمه انجام گرفت. از هر باغ ۵ درخت انتخاب و از هر درخت ۳ نمونه گرفته شد. نمونه‌های هر درخت مخلوط و حدود یک کیلوگرم از آنها به عنوان نماینده، به آزمایشگاه انتقال یافت.

استخراج و شناسایی نماتد

نماتدها با استفاده از روش الک و سانتریفوژ (جنکینز[1]، ۱۹۶۴) از خاک استخراج شدند. برای استخراج نماتد ماده و تخم نماتد مرکبات، از روش مخلوط‌کن و سانتریفوژ[2] استفاده شد. در این روش ابتدا مقدار یک گرم از ریشه‌های آلوده جمع‌آوری شده به دقت با آب شسته و با مخلوط‌کن به قطعات ۲-۱ سانتی-متری تقسیم شدند. سپس قطعات ریشه به ظرفی درب‌دار که محتوی ۱۵۰ تا ۲۰۰ میلی‌لیتر محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد بود، منتقل گردید. ظرف را برای مدت ۴-۳ دقیقه به شدت تکان داده تا ماتریکس ژلاتینی نماتد ماده حل شده و تخم‌ها از توده تخم رهاسازی شوند. پس از گذشت این زمان سوسپانسیون از الک ۱۰۰ مش (۱۵۰ میکرومتر) و ۵۰۰ مش (۲۵ میکرومتر) عبور داده شد. الک ۱۰۰ مش به منظور جمع‌آوری ضایعات و قطعات ریشه استفاده گردید. محتویات سطح الک ۵۰۰ مش به کمک آب مقطر استریل شستشو و به یک بشر انتقال داده شد. به منظور افزایش بازدهی، عبور از الک ۵۰۰ مش برای جمع‌آوری تخم ها چندین بار تکرار شد (هوسی و بارکر[3]، ۱۹۷۳). سپس سوسپانسیون تخم درون درون لوله‌های سانتریفوژ ریخته و پودر کائولین (۸ گرم در هر لیتر) به آن اضافه شد. نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۸۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. برای محلول شکر نیز از همین سرعت به مدت ۴ دقیقه استفاده شد. محتویات لوله‌های سانتریفوژ را روی الک ۵۰۰ مش ریخته و سطح الک را با آب مقطر استریل شستشو داده وماده‌ها و تخم‌ها جمع‌آوری شدند (گرکو و دادابو[4]، ۱۹۹۰). برای شناسایی نماتد مرکبات از کلیدهای گودی[5] (۱۹۶۳) و کروزلی و همکاران[6] (۱۹۹۸) استفاده استفاده شد.

جداسازی و شناسایی قارچ‌های پارازیت نماتد

جهت جداسازی قارچ از لارو، تخم و ماده نماتد مرکبات از محیط کشت WA[7] یک درصد همراه با سولفات استرپتومایسین (۵۰ میلی‌گرم در لیتر) استفاده شد. بدین منظور پس از اتوکلاو نمودن محیط کشت WA, سولفات استرپتومایسین به مقدار ذکر شده در زیر هود میکروبیولوژیک به محیط کشت اضافه گردید. مقدار ۲-۰/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون تخم استخراج شده به روش ذکر شده به پتری دیش محتوی محیط کشت منتقل و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۷-۳ روز نگهداری شد. سوسپانسیون لارو نیز به محیط کشت انتقال داده شد. پس از گذشت زمان ذکر شده، پتری‌ها در زیر بینوکولار مورد بررسی قرار گرفتند. ماده‌های بالغ و نابالغ، تخم‌ها و نماتدهای آلوده که قارچ همراه آنها رشد کرده بود، به محیط کشت PDA[8] انتقال یافتند. به به منظور خالص سازی قارچ‌های رشد یافته روی محیط PDA، از روش تک اسپور کردن استفاده شد. پس از رشد اسپورها روی محیط، با تهیه نمودن اسلاید میکروسکوپی اقدام به شناسایی گونه مورد نظر گردید. جهت شناسایی گونه‌های فوزاریوم از محیط کشت های PDA, WA, KCLA و CLA استفاده گردید. ویژگی‌های ظاهری مورد توجه در مورد فوزاریوم‌ها شامل شکل ماکرو و میکروکنیدی، شکل سلول انتهایی و پایه‌ی ماکروکنیدی، وجود یا عدم وجود کلامیدوسپور، نوع فیالید (منوفیالید یا پلی‌فیالید) وجود یا عدم وجود زنجیره‌ی میکروکنیدی و سرهای دروغین، رنگ پرگنه

1 - Jenkins
2 -Blender centrifugal flotation method
3 - Hussey & Barker
4 - Greco & D'Addabbo
5 - Goodey
6 - Crozzoli *et al.*
7 - Water agar
8 - potato dextrose agar

قارچ (به ویژه از سطح زیرین) و نرخ رشد پرگنه می-باشد. برای شناسایی قارچ‌های دیگر، صفاتی چون رنگ کلنی، شکل اسپور، نوع فیالید، مسیلیوم، نوع کنیدیوفر و سلول کنیدیوم‌زا مورد بررسی قرار گرفت.

آزمون آنتاگونیستی در شرایط آزمایشگاه

جهت انجام آزمون آنتاگونیستی تخم‌های استخراج شده از ریشه‌های آلوده طبق روش ذکر شده، در سولفات مس ۰/۱ درصد به مدت ۳۰ دقیقه و سولفات استرپتومایسین ۰/۲ درصد به مدت ۱ ساعت ضدعفونی شدند. پس از هر مرحله، تخمها ۷ بار با آب مقطر استریل روی الک ۵۰۰ مش اتوکلاو شده، شستشو داده شدند.

برای تهیه‌ی مایه تلقیح قارچ‌های جدا شده از لارو، تخم و نماتد ماده *T. semipenetrans*، به صورت زیر عمل شد. برای هر قارچ مورد آزمایش یک قطعه از کشت ۵ روزه‌ی قارچ روی PDA (به قطر ۵ میلی‌متر) از پرگنه برداشته و به یک لوله سانتریفوژ استریل ۱۵ میلی-لیتری محتوی ۵ میلی‌لیتر توین[1] ۸۰ نیم درصد استریل انتقال یافت. لوله‌ها برای جداشدن و یکنواختی اسپورها به مدت ۱ دقیقه توسط شیکر تکان داده شدند. تعداد اسپورها با استفاده از یک لام شمارش در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ۴۰ شمارش و به غلظت 10^5 اسپور در هر میلی‌لیتر رسانیده شد. ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاوی تقریبا ۳۰۰ تخم نماتد درون پتری‌ها ریخته و به آن‌ها ۱ میلی لیتر سوسپانسیون اسپور قارچ به غلظت 10^5 اضافه شد. پتری‌ها در دمای ۲۵درجه سانتی-گراد نگهداری شدند و پس از گذشت ۵ روز درصد تخم‌های پارازیت شده و درصد تفریخ تخم (تعداد لارو/تعداد لارو+ تخم×۱۰۰) محاسبه گردید. هر قارچ به عنوان یک تیمار و با ۴ تکرار در نظر گرفته شد. این آزمون در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. در تیمار شاهد به جای سوسپانسیون اسپور قارچ از آب مقطر استریل استفاده گردید. برای بدست آوردن درصد تخم-های پارازیت شده، ۱۰۰ عدد تخم را به صورت تصادفی شمرده و تعداد تخم‌های آلوده و غیر آلوده تعیین و در نهایت درصد آلودگی مشخص شد. به منظور بررسی اثرات قارچ‌ها روی لارو سن دوم، تعداد تقریبا ۱۵۰ عدد لارو تازه تفریخ شده در هر پتری قرار داده شد. سوسپانسیون اسپور قارچ با غلظت 10^5 به لاروها اضافه گردید. تیمارها در فواصل زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفته و تعداد لاروهای مرده در این فواصل زمانی ثبت شدند. لاروهای مرده به صورت بدشکل، بی حرکت و کلونیز شده توسط قارچ بودند که با استفاده از سوزن بررسی شدند. درصد مرگ و میر لارو (تعداد لارو مرده/ تعدادلاروکل × ۱۰۰) محاسبه گردید.

نتایج و بحث

پس از جداسازی نماتد از خاک و ریشه و بررسی خصوصیات ریخت شناسی و ریخت سنجی ماده و لارو سن دوم نماتد، با استفاده از کلید های شناسایی موجود، به تشخیص گونه نماتد اقدام گردید. با استفاده از شرح گونه ارایه شده توسط گودی[2] (۱۹۶۳) و کروزولی و همکاران[3] (۱۹۹۸) جمعیت مورد مطالعه با گونه *T. semipenetrans* مطابقت کامل نشان داد (شکل۱). بخش پشتی بدن ماده‌ها متورم و به صورت کیسه‌ای کشیده و بیرون از ریشه اما بخش جلویی بدن متنوع و درون ریشه گیاه بین سلول‌های کوتیکول قرار می‌گیرد. ماده‌های بالغ متورم و ماده‌های نابالغ و جوان کرمی شکل می‌باشند. ماده‌ها دارای یک تخمدان مارپیچی همراه با کیسه ذخیره اسپرم، تخم‌ها بیضوی شکل، در رحم منفرد بوده و بعد در یک توده ژلاتینی قرار گرفته و از بدن خارج می‌شوند. فرج نزدیک به انتهای بدن و دارای یک شکاف مشخص است. یکی از ویژگی های اصلی این جنس قرار گرفتن منفذ دفعی- ترشحی در قسمت عقبی

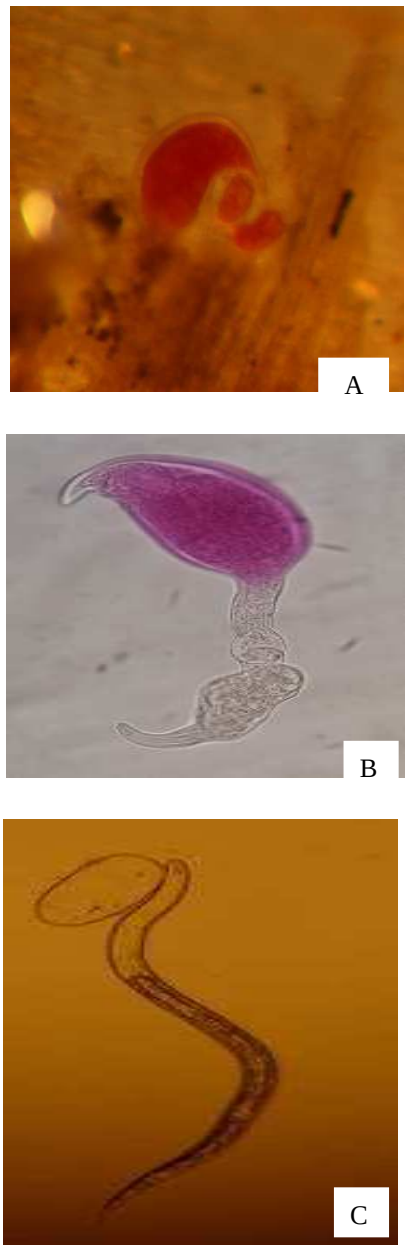
1- Tween

2 - Goodey
3 - Crozzoli *et al.*

بدن می‌باشد. کوتیکول بخش جلویی بدن حلقه حلقه، ولی بخش متورم صاف و بسیار نازک می‌باشد .محل ریزش غده پشتی مری به اندازه طول استایلت از گره استایلت فاصله دارد. شبکه کوتیکولی سر قوی و سر متصل با بدن، استایلت توسعه یافته همراه با گره‌های انتها گرد و بزرگ است. لوله اولیه مری استوانه‌ای و به خوبی پهن شده، حباب میانی نیز کروی است. دم دارای زائده انتهایی[1] است. نرها دارای بدن کرمی شکل، استایلت باریک و مری تحلیل رفته هستند. پرده بورسا وجود ندارد و انتهای دم به خوبی گرد شده است.

پس از خالص‌سازی و تهیه اسلاید، قارچ‌های آنتاگونیست با استفاده از منابع معتبر علمی، از جمله کلیدهای شناسایی فوزاریوم نلسون و همکاران[2] (۱۹۸۳)، بوث[3] (۱۹۷۱)، سامسون[4] (۱۹۷۴) و دامش و همکاران[5] (۲۰۰۷) شناسایی گردیدند. در نهایت گونه‌های *F. oxysporum, P. lilacinus, C.cladosporioides, F. solani* و *A. strictum* از لارو، تخم و نماتد ماده جداسازی شدند. مشخصات مربوط به این گونه ها در جدول ۱ آورده شده است.

از آنجایی که تخم‌های نماتد مرکبات در یک ماده ژلاتینی محصور بوده و فاقد پوشش حفاظتی نماتدهای سیستی می‌باشند، انتظار بر این است که نسبت به تخم‌های سیست بیشتر در معرض حمله عوامل زیستی از جمله قارچ‌ها قرار گیرند. قارچ‌های آنتاگونیست، نماتدهای زنده و در حال حرکت را مورد حمله قرار داده و بخش-های آلوده کننده خود را به درون کوتیکول نماتد وارد می‌کنند در حالی که میکرو ارگانیسم‌های ثانویه از طریق حفره دهانی[6]، روزنه‌ی دفعی[7]، سوراخ تناسلی[8] و مخرج[9] مخرج[9] به بدن نماتدهای در حال مرگ نفوذ می‌کنند (مانکائو[10]، ۱۹۸۰).



شکل ۱- A. نماتد ماده *T. semipenetrans* همراه با توده ژلاتینی تخم در حال تغذیه از ریشه (بزرگنمایی ۲۰ برابر)؛ B. نماتد ماده *T. semipenetrans* (بزرگنمایی ۱۰۰ برابر)؛ C . لارو سن دوم و پوسته خالی تخم نماتد (۴۰برابر)

1- Projection
2-Nelson *et al.*
3-Booth
4-Samson
5-Domsch *et al.*
6-Buccal cavity
7-Excretory pore
8-Vulva
9-Anus
10- Mankau

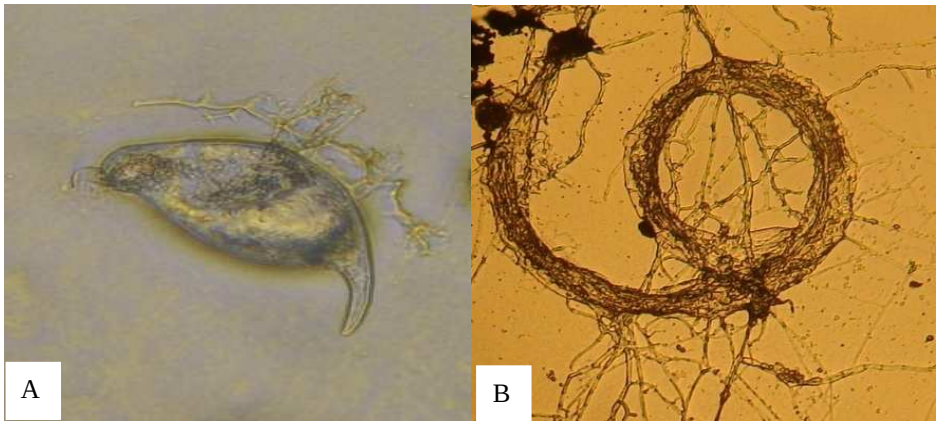
جدول ۱- قارچ‌های آنتاگونیست جداسازی شده از مناطق نمونه‌برداری

محل نمونه‌برداری	مرحله زیستی نماتد	قارچ‌های آنتاگونیست
چابکسر	لارو، ماده و تخم	*F.solani, F. oxysporum, A. strictum, C. cladosporioides*
کلاچای	لارو	*F. solani, F. oxysporum, A. strictum*
رودسر	لارو، ماده	*P. lilacinus, F. oxysporum, C. cladosporioides*
لنگرود	لارو، ماده وتخم	*F. solani, F. oxysporum, A. strictum*
رامسر- سادات شهر	تخم	*C. cladosporioides, F.solani, F. oxysporum*
رامسر	لارو، ماده و تخم	*P. lilacinus, F. solani, F. oxysporum, A. strictum, C. cladosporioides*
تنکابن	لارو و تخم	*C. cladosporioides, F. solani, F.oxysporum*
سلمان‌شهر	ماده و تخم	*F. solani, F. oxysporum, C. cladosporioides*
عباس‌آباد	لارو، ماده، تخم	*P. lilacinus, A. strictum*
چالوس	لارو، ماده، تخم	*F. oxysporum, F. solani, A. strictum, P. lilacinus,C. cladosporioides*
نوشهر	لارو، ماده، تخم	*P. lilacinus, F. solani, F. oxysporum*

عصاره صاف شده قارچ *Acremonium strictum* جداسازی شده از *Heterodera glycines* اثر ممانعت کننده‌ای روی تفریخ تخم نماتد مذکور و *M. incognita* داشته است (میر و همکاران[1]، ۲۰۰۴). بررسی ۳۲ مزرعه چغندر در کالیفرنیا نشان داد که ۲۰-۱۰ درصد تخم‌های نماتد *H. schachtii* آلوده به قارچ *F. oxysporum* و *A. strictum* بودند. به جز در ۵ مزرعه که بیش از ۴۰ درصد تخم‌ها آلوده شده بودند (نایق و همکاران[2]، ۱۹۸۰).

نتایج مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن در سطح ۱٪ نشان داد که همه قارچ‌های جداسازی شده از این نماتد موفق به پارازیته کردن تخم‌ها و کشتن لاروها شدند. اگرچه درصد پارازیت کردن تخم و درصد مرگ و میر لارو در آن‌ها متفاوت بود، اما همه تیمارها با شاهد تفاوت معنی‌داری در سطح یک درصد نشان دادند. نتایج حاصل از بررسی تاثیر قارچ‌ها بر تفریخ تخم و نیز مرگ و میر لاروها نشان داد که بین تیمارها اختلاف معنی‌دار وجود داشت (جدول ۲ و ۳). بیشترین درصد تخم‌های پارازیت شده توسط قارچ *P. lilacinus* و کمترین آن متعلق به قارچ *C. cladosporioides* بود. بعد از *P. lilacinus* ، قارچ *A. strictum* نیز درصد بالایی از تخم‌ها را انگلی کرده بود و با *F. solani* در یک گروه آماری قرار گرفت (شکل۳). *F.oxysporum* نیز ۶۲/۹۸ درصد تخم‌ها را پارازیت کرد. در رابطه با درصد تفریخ تخم، اگرچه *C. cladosporioides* بیشترین درصد تفریخ تخم را دارا بود، اما از نظر آماری با قارچ‌های *A. strictum* و *F. oxysporum* در یک گروه قرار گرفت. قارچ‌های *F. solani* و *P. lilacinus* در گروه سوم قرار گرفتند. به لحاظ درصد تفریخ تخم، تمامی تیمارها با شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند. بیشترین ممانعت از تفریخ تخم در تیمار با قارچ *P. lilacinus* مشاهده شد. در حالی که ۸۵/۸۲ درصد تخم‌ها در تیمار شاهد تبدیل به لارو سن دوم گردیدند.

1 - Meyer *et al.*
2 - Nigh *et al.*



شکل ۲- A- نماتد ماده *T. semipenetrans* پارازیت شده توسط قارچ *F.solani*، (۵۰ برابر)؛ B- نماتد آلوده به قارچ *P. lilacinus* (۲۰۰ برابر)

جدول ۲- تاثیر قارچ‌های مختلف روی درصد انگلی شدن و تفریخ تخم نماتد *Tylenchulus semipenetrans*

	درصد تخم‌های پارازیت شده	درصد تفریخ تخم
*Acremonium strictum**	۷۰/۶۶b	۵۲/۲۳bc
Cladosporium cladosporioides	۱۷/۱۶d	۶۴/۴۴ b
Fusarium oxysporum	۶۲/۹۸c	۴۷/۸۲ bc
Fusarium solani	۶۴/۹۱bc	۴۴/۳۱ c
Paecilomyces lilacinus	۷۹/۱۱a	۳۵/۱۵ c
Control	صفر e	۸۵/۸۲ a

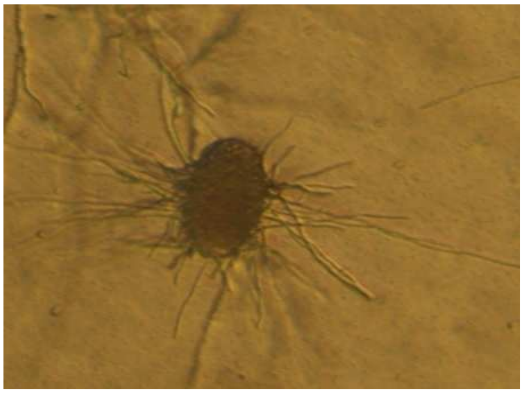
در هر ستون اعدادی که در کنار آن ها حروف مشابه درج شده، در سطح ۱ درصد اختلاف معنی داری با یکدیگر ندارند.

* قارچ های ذکر شده در این آزمون، به ترتیب با شماره های ردیابی ۲۱، ۲۳، ۱۵، ۲۲ و ۲۰ در کلکسیون قارچهای زنده دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان نگهداری می شوند.

جدول ۳- تاثیر قارچ‌های مختلف روی درصد مرگ و میر لارو در نماتد *Tylenchulus semipenetrans*

	Juvenile mortality (%)		
	۲٤ ساعت	٤۸ ساعت	۷۲ ساعت
Acremonium strictum	۶/۳۲±۰/۰۲a	۲۳/۴۷± ۰/۰۳a	۴۴/۶۹± ۰/۰۳a
Cladosporium cladosporioide	۳/۴۹±۰/۰۱b	۱۱/۵۱± ۰/۰۲ab	۲۳/۵۵± ۰/۰۴c
Fusarium oxysporum	۵/۵۳± ۰/۰۲ab	۱۵/۷۸± ۰/۰۱ab	۳۱/۹۱±۰/۰۲bc
Fusarium solani	۷/۳۸± ۰/۰۲a	۱۹/۹۷± ۰/۰۴ab	۳۵/۷۳± ۰/۰۸b
Paecilomyces lilacinus	۶/۴۸ ±۰/۰۲a	۱۸/۴۸± ۰/۰۶ab	۳۸/۳۲± ۰/۰۶b
Control	۰۰/۰۰±۰/۰۰c	۰۰/۰۰± ۰/۰۰c	۸/۹۰± ۰/۰۱d

در هر ستون اعدادی که در کنار آن ها حروف مشابه درج شده، در سطح ۱ ٪ اختلاف معنی داری با یکدیگر ندارند.



شکل۳- تخم نماتد *T. semipenetrans* پارازیت شده توسط *A.strictum* در شرایط آزمایشگاه (۵۰ برابر)

نتایج نشان داد تیمار شاهد پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت هیچ‌گونه مرگ و میری نداشته ولی پس از ۷۲ ساعت، ۸/۹ درصد از لاروها از بین رفتند (جدول ۳). پس از گذشت ۲۴ ساعت، سه تیمار *A. strictum*، *F. solani* و *P. lilacinus* در یک گروه قرار گرفتند و قارچ *C. cladosporioides* با کمترین تعداد لارو مرده، در گروه دوم قرار گرفت. پس از ۴۸ ساعت بیشترین درصد مرگ و میر لارو در تیمار قارچ *A. strictum* مشاهده شد و چهار تیمار قارچی باقی مانده با نتایج نزدیک به هم در گروه آماری مجزا قرار گرفتند. پس از ۷۲ ساعت بیشترین درصد مرگ و میر لارو متعلق به قارچ *A. strictum* بود. درصد مرگ و میر لارو در قارچ *P. lilacinus* بیشتر از قارچ‌های *F. solani* و *F. oxysporum* بود اما هر سه قارچ در یک گروه آماری قرار گرفتند. کمترین درصد مرگ و میر لارو در قارچ *C. cladosporioides* مشاهده شد و این میزان که با قارچ *F. oxysporum* اختلاف معنی داری نشان نداد، در یک گروه قرار گرفت. نتایج ارائه شده در جدول ۳ نشان می‌دهد قارچ *A. strictum* نسبت به سایر تیمارها بیشترین میانگین مرگ و میر لارو را دارا می‌باشد. هم‌چنین قارچ‌های *P. lilacinus, F. solani,* و *F. oxysporum* نیز درصد بالایی از میانگین مرگ و میر لارو را به خود اختصاص داده اند. نتایج این تحقیق نشان داد که قارچ *P. lilacinus* نسبت به سایر قارچ‌های جداسازی شده درصد بیشتری از تخم‌ها را پارازیت نموده و درصد مرگ و میر لارو در این قارچ بالاست. بنابراین یک پارازیت قوی تخم نماتد محسوب شده و باعث کاهش قابل توجه در جمعیت نسل‌های بعدی می‌شود. این قارچ می‌تواند گزینه مناسبی برای کنترل بیولوژیک به حساب آید. از سوی دیگر میزان مرگ و میر بالای لاروها، در تیمار با قارچ *A. strictum* مشاهده شد و حکایت از توان بالقوه این قارچ در کاهش جمعیت لاروها دارد.

طی بازدیدهای انجام شده از باغهای مرکبات شرق گیلان و غرب مازندران نماتد مرکبات *T. semipenetrans* در ۹۰ درصد از باغهای نمونه‌برداری شده مشاهده گردید. این نتایج موید یافته‌های سایر تحقیقات مبنی بر پراکندگی وسیع این نماتد در باغهای مرکبات شمال کشور است از جمله این موارد می‌توان به گزارش آلودگی ۸۹ درصدی خاک‌ها و ریشه‌های جمع‌آوری شده از باغ‌های مرکبات شمال کشور اشاره کرد (تنهامعافی و دامادزاده[1]، ۲۰۰۷). بررسی های انجام شده در شهرستان جهرم بیانگر گسترش وسیع این نماتد در باغات مرکبات بوده و تمامی باغات نمونه برداری

1- Tanha Maafi & Damadzadeh

شده و حدود ۸۵ درصد درختان مورد بررسی آلوده به نماتد مرکبات بوده اند (ایازپور و قناعتیان[1]، ۲۰۰۴).

طی این تحقیق، قارچ‌های *F. solani, A. C. cladosporioides, strictum, F. oxysporum,* و *P. lilacinus* از نماتد مرکبات جداسازی شد. این قارچ‌ها در بسیاری از مطالعات صورت گرفته در جهان به عنوان مهمترین قارچ‌های آنتاگونیست نماتدها محسوب می‌شوند. از جمله مهمترین این قارچ‌ها، *P. lilacinus* می‌باشد، که از فراوان‌ترین گونه‌هایی است که از تخم‌ها، ماده‌ها و لاروهای سن دوم نماتد مرکبات در اسپانیا جدا شده است (جین و همکاران[2]، ۲۰۰۵). مواد آلی کلونیز شده توسط قارچ *P. lilacinus* جمعیت نماتد*T. semipenetrans* را در مرکبات کاهش داده است (جاتالا[3]، ۱۹۸۶). طی تحقیقی در هندوستان قارچ *P. lilacinus* روی نماتد *T. semipenetrans* مورد مطالعه قرار گرفت و مشاهده گردید بیشترین کاهش در جمعیت نماتد زمانی حاصل می‌شود که ۸ گرم قارچ در هر کیلوگرم خاک استفاده شود (مذنور و همکاران[4]، ۲۰۰۲). ازهر اقبال[5] (۲۰۰۳) اثر *P. lilacinus* و زمان تلقیح آن را روی نماتد *T. semipenetrans* مورد بررسی قرار داد و مشخص نمود زمانی که قارچ ۲۰ روز قبل از تلقیح نماتد به تیمار اضافه شود، تعداد نماتد ماده در یک سانتی‌متر ریشه به میزان ۲۶/۶۹ درصد کاهش نشان می‌دهد.

نتایج حاصل از بررسی تاثیر قارچ‌های جداسازی شده روی تفریخ تخم و مرگ و میر نماتد مرکبات در این تحقیق نشان داد موفق‌ترین آن‌ها در جهت کنترل نماتد مرکبات *P. lilacinus* و *A. strictum* بودند، قارچ *P. lilacinus* با پارازیت کردن ۷۹ درصد از تخم‌ها، بهترین نتیجه را به خود اختصاص داد. *C. cladosporioides* اگرچه قادر به پارازیت کردن تخم‌ها بود، ولی اثر کمتری در این رابطه نسبت به سایر تیمارها داشت و در گروه آماری نزدیک به تیمار شاهد قرار گرفت. آزمایشی جهت بررسی اثرات ۱۲۰ ایزوله از قارچ روی درصد پارازیت تخم، تفریخ تخم و مرگ و میر لارو نماتد *M. hapla* توسط سان و همکاران[6] (۲۰۰۶) در چین صورت گرفت. این مطالعات نشان داد پنج ایزوله از *Acremonium* spp. شش ایزوله از *Fusarium* spp. ۳۰ ایزوله از *P. lilacinus* دو ایزوله از *Penicilium* spp. توانستند ۱۰۰ درصد تخم‌ها را پارازیت کنند. درصد تفریخ تخم در سه ایزوله از *P. lilacinus* دو ایزوله از *Penicilium* sp. یک ایزوله از *Gliocladium roseum* کمتر از ۱۰ درصد محاسبه گردید و بیش از نیمی از ایزوله‌ها قادر به کشتن لاروها بودند.

تمامی قارچ‌های جداسازی شده در تحقیق حاضر روی نماتد مرکبات اثر آنتاگونیستی داشته و از نظر تفریخ تخم و مرگ و میر لاروها با شاهد تفاوت معنی‌داری نشان دادند. مرگ و میر لاروها در فواصل ۲۴ و ۴۸ ساعت تقریبا کم بود در حالی که پس از ۷۲ ساعت مرگ و میر لارو افزایش یافت. شاید بتوان گفت دلیل کم بودن مرگ و میر لارو در این مقاطع زمانی به علت طولانی بودن فرایند نفوذ قارچ و شروع آلودگی لاروها باشد. طبق تحقیقات انجام شده، اسپور قارچ‌ها برای نفوذ به بدن نماتد سازگاری قابل توجهی یافته‌اند. اسپورهای بسیاری از گونه‌ها خاصیت چسبندگی ویژه‌ای داشته و بلافاصله به کوتیکول نماتدهای در حال حرکت می‌چسبند. در این حالت، قطعات آلوده کننده خود را به درون کوتیکول نماتد زنده وارد می‌کنند (دیویدسون و بارون[7]، ۱۹۷۳). جیان و همکاران[8] (۱۹۹۱) گزارش کردند که عصاره کشت قارچ *P. lilacinus* و

1 - Ayazpour & Ghanaatian
2 - Gene *et al.*
3 - Jatala
4 - Maznoor *et al.*
5 - Azhar Iqbal
6- Sun *et al*.
7 - Davidson & Barron
8 - Djian *et al.*

Trichoderma longibrachiatum محتوی اسید استیک است که اثر کشندگی روی لارو سن دوم نماتد دارد همچنین متابولیت‌های سمی تولید شده توسط قارچ‌ها روی سیستم عصبی و گیرنده‌های حسی نماتد تاثیر گذار است (کایرول و همکاران[1]، ۱۹۸۹).

بررسی های آزمایشگاهی نشان داد که کلونیزاسیون تخم‌های نماتد توسط *P. lilacinus* عموماً در نتیجه‌ی نفوذ ساده ریسه‌های منفرد صورت می‌گیرد (مورگان-جونز و همکاران[2]، ۱۹۸۴).

در اثر آلودگی به قارچ، لایه‌های چربی و کیتین پوسته تخم‌ها گسیخته شده، به طوری که پوسته‌ی تخم نمی‌تواند حفاظتی برای تکامل نوزادان فراهم آورد. در نهایت تمام محتویات تخم از بین می‌رود. عامل نماتد-کش در *lilacinus p.* به تولید توکسین سرین[3] نسبت داده شده، گونه‌هایی از *Aspergillus ,Penicillium, Fusarium ,Trichoderma,* و *Paecilomyces* شناخته شده‌اند که تولید توکسین و آنتی‌بیوتیک‌هایی مثل aflatoxin, fusaric acid viridian, vermicillin, penicillin و lilacanin می‌کنند (فوسکا و ومک[4]، ۱۹۷۹؛ میکامی و همکاران[5]، ۱۹۸۹). ۱۹۸۹). اگرچه برخی گونه‌ها در رابطه با نماتد به طور اختصاصی عمل می‌کنند اما از نظر بوم‌شناسی همه‌ی آن-ها پوده‌زی بوده و رابطه آن‌ها با نماتدها عمدتا به صورت ارتباط فرصت طلبانه است. چنین گونه‌هایی به طور قابل توجهی تحت تأثیر حضور و یا تراکم نماتدها قرار نمی-گیرند (نیکولای و سیکورا[6]، ۱۹۸۸). روش های کنترل بیولوژیک ممکن است در مقایسه با روش‌های کنترل شیمیایی، از کارایی پایین‌تری برخوردار باشند، اما باید در نظر داشت که عوامل کنترل بیولوژیک به شرط سازگاری، از دوام بیشتری در اعمال اثر برخوردار بوده و به حفظ تنوع زیستی کمک می‌کنند. در ضمن موانع موجود در زمینه‌های تجاری سازی عوامل بیولوژیک ،باعث جلوگیری از تولید انبوه آنها گردیده است. به نظر می‌رسد که عدم استفاده وسیع از عوامل بیولوژیک انعکاس دهنده این واقعیت است که اقدامات کافی در زمینه شناسایی، آزمودن و بهینه‌سازی کاربرد آنها صورت نگرفته است. با این حال استفاده از آنها در کنترل تلفیقی نماتدها، از نکاتی است که همواره مد نظر متخصصین امر قرار دارد.

---

1 - Cayrol *et al.*
2 - Morgan-Jones *et al.*
3 - Serin
4 - Fuska & Vemec
5 - Mikami *et al.*
6 - Nicolay & Sikora

منابع

1. Agha, M.S., and Montasser, S.A. 1992. Fungal parasites of *Meloidogyne javanica* eggs and their role for biological control. Egypt Journal of Science, 7(6): 237-251.

2. Ayazpour, K., and Ghanaatian, A. 2004. Determination of root parasite nematodes of citrus in Jahrom (Fars province, Iran). Final Research Project, 28 p.

3. Ayazpour, k., Hasanzadeh, H., and Arabzadegan, M.S. 2010. Evaluation of the control of citrus nematode (*Tylenchulus semipenetrans*) by leaf extracts of many plants and their effects on plant growth. African Journal of Agricultural Research, 5(14): 1876-1880.

4. Azhar Iqbal, M. 2003. Ecology, biology and integrated control of citrus nematode (*Tylenchulus semipenetrans* Cobb) the cause of slow decline in the Punjab, Pakistan. M.Sc. Thesis, submitted to University of Agriculture Faisalabad, Pakestan, 201 p.

5. Bridge, J., Luc, M., and Sikora, R. 2005. Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. 2nd ed., CAB international, 871 p.

6. Booth, C. 1971. The Genus *Fusarium*. Commonwelth Mycological Institute Kew, Survey, England, 237 p.

7. Cayrol, J.C., Djian, C., and Pijarowski, L. 1989. Study of nematicidal properties of the culture filtrate of the nematophagous fungus *paecilomyces lilacinus*. Journal of Nematology, 12: 331-336.

8. Chen, S.Y., Dickson, D.W., and Whitty, E.B. 1996. Fungi associated with egg masses of *Meloidogyne incognita* and *M. javanica* in a Florida tobacco. Journal of Nematropica, 26: 153-157.

9. Crozzoli, R., Lamberti, f., Greco, N., and Rivas, D. 1998. Nematodes fitoparasiticos associados con los citricos en Venezuela. Nematology Medicae, 26: 31-58.

10. Davidson, J.G.N., and Barron, G.L. 1973. Nematophagous fungi: Haptoglossa. Canadian Botanical Journal, 51: 1317-1323.

11. Djian, C., Pijarowski, L., Ponchet, M., Aprin, N., and Favre-Bonvin, J. 1991. Acetic acid: A selective nematicidal metabolite from culture filterates of *Paecilomyces lilacinus* and *Trichoderma longibrachiatum*. Journal of Nematologica, 37: 101-102.

12. Domsch, K.H., Gams, W., and Anderson, T.H. 2007. Compendium of Soil Fungi. 2nd ed. IHW-Verlag, Eching, Germany, 672 p.

13. Fuska, J., and Vemec, P. 1979. Vermistatin, an antibiotic with cytoxic effects produced from *penicillium vermiculatum*. Journal of Biologica (Bratislava), 34: 735-740.

14. Gaspard, j.T., and Mankau, R. 1986. Nematophagous fungi associated with *Tylenchulus semipenetrans* and citrus rhizosphere. Journal of Nematologica, 32(3): 359-363.

15. Gene, J., Verdejo-Lucas, S., Stchigel, A.S., Sorriba, F.J., and Guarro, J. 2005. Microbial parasites associated with *Tylenchulus semipenetrans* in citrus orchards of Catalonia, Spain. Biocontrol Science and Technology, 15(7): 721-731.

16. Godoy, G., Rodriguez-Kabana, R., and Morgan-Jones, G. 1983. Fungal parasites of *Meloidogyne arenaria* eggs in an Alabama soil. A mycological survey and green house studies. Journal of Nematropica, 13: 201–213.

17. Goodey, J.B. 1963. Soil and freshwater nematodes. John Wiley & Sons inc., 389 p.

18. Greco, N., D'Addabbo, T. 1990. Efficient procedure for extracting *Tylenchulus semipenetrans* from citrus roots. Journal of Nematology, 22: 590-593.

19. Hussey, R.S., and Barker, K.R. 1973. A comparison of methods collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. Plant Disease Reporter, 57: 1025-1028.

20. Jatala, P. 1986. Biological control of plant parasitic nematodes. Journal of Phytopathology, 24: 89-453.

21. Jenkins, W.R. 1964. A rapid centrifugal- flotation technique for separating nematodes from soil. Plant Disease Reporter, 48: 692.

22. Li, T.F., Lel, L.P., and Yang, M. 1994. Isolation and identification of natural enemies fungi of tobacco root-knot nematodes. Journal of Chinese Tobacco, 1: 22-24.

23. Mani, A., Murthy, I.R., and Prasad, P.K. 1989. Growth of *Paecilomyces lilacinus* on natural substrates and its efficacy against citrus nematode *Tylenchulus semipenetrans*. Journal of Biological Control, 3: 59-61.

24. Mankau, R. 1980. Biocontrol fungi as nematode control agents. Journal of Nematology, 12(4): 244-252.

25. Maznoor, S., Sinha, A.K., and Bora, B.C. 2002. Management of citrus nematode, *Tylenchulus semipenetrans*, on khasi mandarin, by *Paecilomyces lilacinus.* Indian Journal of Nematology, 32(2): 153-155.

26. Meyer, S.L.F., Huettel, R.N., Liu, X.Z., Humber, R.A., Juba, J., and Nito, J.K. 2004. Activity of fungal culture filtrates against soybean cyst nematode and root knot nematode egg hatch and juvenile mortility. Journal of Nematology, 6: 23-32.

27. Mikami, Y., Yazawa, K., Fukushima, K., Aria, T., Udagawa, S., and Samson, R.A. 1989. Paecilotoxin production in clinical or terrestrial isolates of *Paecilomyces lilacinus* strains. Journal of Mycopathologia, 108: 195-199.

28. Morgan-Jones, G., White, J.F., and Rodriguez-Kabana, R. 1984. Phytonematode pathology ultrastructural studies. Parasitism of *Meloidogyne arenaria* eggs and larvae by *Paecilomyces lilacinus*. Journal of Nematropica, 14: 57-71.

29. Nelson, P., Toussoun, T.A., and Marasas, W.F.O. 1983. *Fusarium* Species an illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press University Park and London, 250 p .

30. Nigh, E.A., Thomason, I.J., and Van Gundy, S.D. 1980. Identification and distribution of fungal parasites of *Heterodera schachtii* eggs in California. Journal of Phytopathology, 70: 884-889.

31. Nicolay, R., and Sikora, R.A. 1988. Improved techniques for the detection of nematophagous fungi and their activity against target nematodes. Journal of Nematology, 11: 16-115.

32. Olivares-Bernabeu, C., and Lopez-Lorca, L.V. 2002. Fungal egg-parasites of plant-parasitic nematodes from Spanish soils. Revista Lberoamericana Mycologia., 19(2): 104-110.

33. Pasha, M.J., Zaidi, S.B.I., Khan, M.W., and Siddiqui, Z.A. 1988. An observation on slow decline of lemon trees (*Citrus lemon*) and associated fungi in Aligarh area. Indian Journal of Plant pathology, 6(1): 28-30.

34. Roccuzzo, G., Ciancio, A., and Bonsignora, R. 1993. Population density and soil antagonists of *Meloidogyne hapla* infecting kiwi in southern Italy. Fundamental and Applied Nematology, 16: 151-154.

35. Sahebani, N., and Hadavi, N. 2008. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum.* Journal of Soil Biology & Biochemistry, 40: 2016-2020.

36. Samson, R.A. 1974. *Paecilomyces* and some allied hyphomycetes. Studies in Mycology, 6: 1-119.

37. Siddiqui, M.R. 1974. *Tylenchulus semipenetrans*. C. I. H. Description of Plant-Parasitic Nematodes. Commonwealth Institute of Parasitology. C.A.B. International, 4 p.

38. Sun, M.H., Gao, L., Shi, Y.X., Li, B.J., and Liu, X.Z. 2006. Fungi and actinomycetes associated with *Meloidogyne* spp. eggs and females in China and their biocontrol potential. Journal of Invertebrate Pathology, 93: 22-28.

39. Tanha Maafi, Z., Ebrahimi, Z., and Anvari, F. 2000. Evaluation of the resistance of some citrus rootstocks to *Tylenchulus semipenetrans* in Mazandaran province. Iranian Journal of Plant Pathology, 36: 189-196.

40. Tanha Maafi, Z., and Damadzadeh, M. 2007. Incidence and control of the citrus nematode, *Tylenchulus semipenetran*s Cobb, in north of Iran. Journal of Nematology, 10(1): 113-122.

41. Verdego-Lucas, S., and Mckenry, M.V. 2004. Managment of the citrus nematode *Tylenchulus semipenetrans*. Journal of Nematology, 36: 424-432.

42. Verdejo-Lucas, S., Viera, A., Stchigel, A.M., and Sorriba, F.J. 2009. Screening culture filtrates of fungi for activity against *Tylenchulus semipenetrans*. Spanish Journal of Agricultural Research, 7(4):896-904.

43. Walter, D.E., and Kaplan, D.T. 1990. Antagonists of plant parasitic nematode in Florida citrus. Journal of Nematology, 22: 567-573.

44. Walter, D.E., Kaplan, D.T., and Davis, L. 1993. Colonization of greenhouse nematode cultures by nematophagous mites and fungi. Supplement to Journal of Nematology, 25(4): 789-794.

45. Wang, L.F., Yang, B.J., and Li, C.D. 2001. Investigation of parasitic fungi on root knot nematodes in East China. Journal of Mycosystema, 20: 264-267.