مقاله تحقیقی

بررسی تاثیر باکتری‌های *Pseudomonas flourescens*، *Stenotrophomonas* sp. و کلرکربوکسیلیک اسید بر نماتد ریشه‌گرهی (*Meloidogyne javanica*)

محمد هادی پور[۱]، حسین میرزایی نجفقلی[۲]، کورش عزیزی[۳]

۱، ۲، ۳– کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، استادیار، استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران.

مسئول مکاتبات: کورش عزیزی، ایمیل: azizi.ko@lu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۱۵ ۸۰–۶۷ (۲)۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۲۷

چکیده

گوجه‌فرنگی از مهمترین گیاهانی است که از نظر غذایی و اقتصادی در جایگاه مهمی قرار دارد. نماتدهای ریشه گرهی (*Meloidogyne* spp.) از مهم‌ترین بیمارگرهای گیاه گوجه‌فرنگی هستند که باعث کاهش حدود ۵ درصد تمام محصولات کشاورزی و خسارت۲۴–۳۸ درصدی بر روی گیاه گوجه‌فرنگی در سراسر جهان می‌شوند. با توجه به صدماتی که روش‌های شیمیایی بر محیط‌زیست و سلامت انسان دارند و پرهزینه بودن این روش‌ها، وجود یک راهکار جایگزین از جمله استفاده از باکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPR) برای مدیریت این نماتدها ضروری است. پس از بررسی ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی، نماتد جدا شده از مزارع آلوده *Meloidogyne javanica* شناسایی شد. در پژوهش حاضر بعد از جداسازی نماتد ریشه گرهی از مزارع آلوده، شناسایی و خالص‌سازی و تکثیر نماتد *M. javanica*، تاثیر دو باکتری *Pseudomonas flourescens*، *Stenotrophomonas* sp. strain LU1 در شرایط آزمایشگاهی و همچنین باکتری *P. fluorescens* و کلرکربوکسیلیک اسید به همراه نماتدکش نماتکس روی گیاه گوجه‌فرنگی و این نماتد در شرایط گلخانه‌ای مورد بررسی قرار گرفت. پس از کشت گلخانه‌ای گوجه‌فرنگی و انجام تلقیح، شاخص‌های رشدی و شاخص‌های بیماریزایی در قالب طرح کاملا تصادفی در ۴ تکرار، مورد بررسی و توسط نرم افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. بررسی‌های انجام شده در آزمایشگاه نشان داد که، در آزمون تفریخ تخم در شرایط آزمایشگاهی ۸ روز بعد از تلقیح، باکتری *P. fluorescens* با ۵۰٪ و باکتری *Stenotrophomonas* sp. strain LU1 با ۲۳٪ در کنترل تعداد تخم تفریخ شده موثر بودند. در تست مرگ و میر لاروها در شرایط آزمایشگاهی ۳ روز بعد از تلقیح، باکتری *P. fluorescens* قادر بود با۳۱٪ و باکتری *Stenotrophomonas* sp. strain LU1 با ۰/۸٪ در لاروها مرگ و میر ایجاد کنند. در شرایط گلخانه در آزمون شاخص‌های رشدی گیاه گوجه‌فرنگی شامل ارتفاع بوته و طول ریشه، وزن تر بوته و ریشه، وزن خشک بوته و ریشه، تیمارهای حاوی باکتری *P. fluorescens* با و بدون نماتد، در شاخص ارتفاع بوته به ترتیب ٪۱۴ و۳۰٪ در شاخص طول ریشه ۱۸٪ و ۳۱٪ در شاخص وزن تر بوته ۳۶٪ و ۵۰٪ در شاخص وزن خشک بوته ۲۳٪و ۴۰٪ تاثیر مثبت نسبت به شاهد با نماتد نشان دادند. در گلخانه در شاخص‌های بیماریزایی مربوط به تعداد لارو در ۱۰۰ سی سی خاک، تعداد گال در یک گرم ریشه، تعداد تخم در یک گرم ریشه تیمار حاوی باکتری*P. fluorescens* به ترتیب ۷۶٪، ۳۳٪، ۹۱٪ و تیمار حاوی کلرکربوکسیلیک اسید به ترتیب ۹۸٪ ،۹۸٪،۹۹٪ کنترل را نسبت به شاهد در شرایط گلخانه از خود نشان داد که در این تیمار میزان کنترل از نماتدکش مورد استفاده بیشتر ارزیابی شد. نتایج پژوهش حاضر نشان دهنده تاثیر مثبت باکتری *P. fluorescens* بر نماتد *M. javanica* در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای و همچنین کلرکربوکسیلیک اسید در شرایط گلخانه‌ای بود که با تحقیقات انجام

شده مطابقت داشت. لازم به ذکر است باکتری *Stenotrophomonas* sp. strain LU1 در شرایط آزمایشگاهی تاثیر مثبت اما اندکی از خود نشان داد.

واژه‌های کلیدی: آزمایشگاهی، تفریخ تخم، گلخانه‌ای، مرگ و میر، PGPR

مقدمه

گوجه‌فرنگی با نام علمی *Lycopersicum esculentum* Mill. از خانواده Solanaceae یکی از گیاهان مهم جالیزی بوده که به علت داشتن انواع ویتامین‌ها، کاروتن، اسیدهای مفید، قند و املاح معدنی نقش مهمی را در تغذیه و سلامت انسان ایفا می‌کند. این گیاه دارای سازگاری وسیع نسبت به شرایط اقلیمی و خاکی است وجزء محصولات تابستانه به شمار می‌آید (Cuartero & Fernandez munoz, 1999). براساس آمار فائو درسال ۲۰۱۶ میزان تولید گوجه‌فرنگی در سراسر جهان برابر با ۱۷۸۱۵۸۷۴۵ تن بوده است. در سال ۲۰۲۳ این میزان به عدد ۱۹۰۲۵۶۴۶۰ تن در سراسر جهان رسیده است. رتبه ایران بر اساس میزان تولید در سال ۲۰۲۳ رتبه ۱۱ بوده است. در ایران سالانه بیش از ۱۳۰ هزار هکتار گوجه‌فرنگی کشت می‌شود که بیش از ۷۵ درصد آن در فضای باز است (Ramezani *et al.*, 2012). یکی از بیماری‌های مهم گوجه‌فرنگی نماتد ریشه‌گرهی است که از طریق نماتدهای جنس *Meloidogyne* spp. ایجاد می‌شود. این نماتدها به عنوان یکی از موانع اصلی در تولید، باعث کاهش ۵ درصدی در تولید محصولات کشاورزی سرتاسر جهان می‌شود (Tanha *et al.*, 2018). نماتدهای ریشه‌گرهی انگل داخلی، ساکن و غیر مهاجر ریشه هستند. این نماتدها بیش از ۲۰۰۰ گونه گیاهی را آلوده کرده و در بافت ریشه سایت تغذیه‌ای ایجاد می‌کنند. نماتدهای مذکور می‌توانند ۳۸–۲۴ درصد خسارت را بر روی گیاه گوجه‌فرنگی ایجاد کنند. میزان این خسارت در کشت مداوم گوجه‌فرنگی بیشتر بوده و در صورت عدم کنترل می‌توانند باعث از بین رفتن کل محصول شوند (Javed *et al.*, 2007). گونه *M. javanica* سبب خسارت شدید در محصول گوجه‌فرنگی می‌شود. علاوه بر خسارت‌های مستقیم، در برهمکنش با عوامل قارچی ورتیسلیوم و فوزاریوم سبب خسارت بیشتر می‌شوند (Hosseini nejad, 2004). استفاده از نماتدکش‌ها،کاشت ارقام مقاوم، گیاهان آنتاگونیست، گیاهان تله، عدم کاشت پی در پی میزبان و کنترل بیولوژیک از جمله روش‌های مورد استفاده در کنترل این نماتدها به شمار می‌رود (Khalighi *et al.*, 2010). باکتری‌های محرک رشد علاوه بر افزایش شاخص‌های رشدی گیاهان سبب کاهش خسارت بیمارگرهای مختلف، بخصوص بیمارگرهای نماتدی می‌شوند .در ایران پژوهش های مختلفی با استفاده از ترکیبات کم خطر برای محیط زیست در کنترل نماتدهای مختلف انجام شده است (Azizi 2023; Bazgir *et al.*, 2024; Nasiri *et al.*, 2013). باکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPR) یا (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) با تولید یا رهاسازی متابولیت‌های ثانویه نظیر تنظیم‌گرها یا هورمون‌های رشدی و یا تسهیل جذب عناصر غذایی از محیط سبب رشد گیاهان می‌شود. همچنین از طریق تولید ترکیبات ضد میکروبی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها یا القای مقاومت سبب کاهش خسارت بیمارگرهای مختلف می‌شوند. مطالعه صدیقی و همکاران (۲۰۰۵) نشان داد که تلقیح ریشه گوجه‌فرنگی با باکتری *P. fluoresences* CHAO به علت تولید سیانید هیدروژن سبب کاهش نفوذ نماتد به داخل ریشه می‌شود (Siddiqui *et al.*, 2005). نتایج آزمایشات خان و همکاران (۲۰۱۲) نشان داد که سویه‌های مختلف سودوموناس از طریق سازوکارهای مختلف مانند تولید سیدروفور، سالیسیلیک اسید، سیانید هیدروژن و پروتئاز از توانایی نماتدکشی بالاتری نسبت به سایر سویه‌ها برخوردار هستند (Khan *et al.*, 2012). در پژوهش مجذوب و همکاران (2011) باکتری‌های فراریشه سبب افزایش رشد گیاه و کاهش شاخص‌های مربوط به نماتد *M. javanica* شدند. در این بررسی سویه *Pseudomonas fluorescens* CHAO سبب کاهش تعداد گال و فاکتور تولیدمثل نماتد گردید (Majzoub *et al.*, 2011). با توجه به اهمیت محصول گوجه‌فرنگی و خسارت

زیاد این بیمارگر، استفاده از روش‌های کنترل زیستی برای مدیریت این بیمارگر ضروری می‌باشد.

مواد و روش

جداسازی، شناسایی، خالص سازی و تکثیر نماتد ریشه گرهی

از گیاهان گوجه‌فرنگی آلوده به نماتد مولد غده در مزارع آلوده، جمعیت‌هایی از نماتد ریشه‌گرهی جداسازی و تهیه گردید. بعد از تک‌کیسه کردن به منظور خالص‌سازی جمعیت نماتد در گیاه گوجه‌فرنگی رقم URBANA EARLY که حساس به نماتد مذکور است جمعیت خالص نماتد ریشه‌گرهی به منظور آزمایشات مختلف استفاده شد. به این منظور ریشه‌های آلوده به آزمایشگاه منتقل گردید. برای به دست آوردن یک جمعیت خالص از هر نمونه، ریشه‌های حاوی گره درون پتری حاوی آب مقطر قرار داده شدند و زیر استریومیکروسکوپ از هر نمونه یک کیسه تخم بزرگ که حاوی تخم بیشتری بود انتخاب گردید و این کیسه تخم با پنس به آرامی از ریشه جدا و هر توده تخم به طور جداگانه درون ویال حاوی آب مقطر قرار داده شد. توده ژلاتینی با استفاده از محلول هیپوکلریت سدیم۵/. درصد به مدت ۴۵ ثانیه از بین رفت و تخم‌های حاصل با آب مقطر سترون شستشو و به گلخانه انتقال داده شدند(Hussey & Barker, 1973). در گلخانه با ایجاد چند حفره در کنار ریشه گیاه گوجه‌فرنگی سوسپانسیون تخم نماتد در مجاورت ریشه‌های این گیاه قرار داده شد. با گذشت ۹۰ روز از مایه‌زنی نشاهای گوجه‌فرنگی با سوسپانسیون تخم نماتد، ریشه آلوده گیاهان برای تشخیص و تکثیر مجدد نماتد آماده گردیدند. به منظور شناسایی نماتد ریشه‌گرهی محل گره‌ها را در زیر استریومیکروسکوپ، با کمک اسکالپل شکافته و نماتد موجود در زیر کیسه تخم به آرامی جدا شد. پس از تهیه و بررسی اسلاید میکروسکوپی از شبکه کوتیکولی انتهای بدن ماده‌های بالغ، بررسی لاروها و نماتد نر توسط میکروسکوپ انجام شد. سپس مشخصات ریخت شناسی و ریخت سنجی بررسی و شناسایی گونه‌ی نماتد با استفاده از کلیدهای رایج صورت گرفت (Vrain 1977; Badakhshan *et al*., 2017; Merillon & Ramawat, 2012).

تهیه و تکثیر باکتری

باکتری‌های موردنظر از کلکسیون گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان تهیه گردید. این باکتری‌ها بر روی محیط کشت نوترینت آگار کشت شدند. از بین باکتری‌های مورد نظر باکتری *P. fluorescens* که در تست‌های آزمایشگاهی نسبت به باکتری *Stenoterophemonas* sp. strain LU1 اثر بهتری از خود نشان داد به همراه کلرکربوکسیلیک اسید که در برخی از منابع اثر ضد نماتدی آن بیان شده است (Azizi 2023) در تست‌های گلخانه‌ای مورد استفاده قرار گرفت.

جدول ۱– مشخصات جدایه‌های باکتریایی مورد استفاده از کلکسیون گروه گیاه پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان

Table 1. Characteristics of bacterial isolates used in the collection of the Department of Plant protection Faculty of Agriculture, Lorestan University

Code	The name of the bacteria	protease	citinase	sidrophore	phosphate	Indole	Biofilm
P.f	*P. fluorescens*	+	+	+	+	+	+
4.A.1.1	*Stenoterophemonas* sp. strain LU1	+	+	+	+	+	+

کشت گیاهان و اعمال تیمارها

این مطالعه گلدانی در قالب طرح پایه کاملا تصادفی با ۴ تکرار اجرا شد. که در مجموع۳۲ گلدان در نظر گرفته شد. ابتدا نشاءهای گوجه‌فرنگی در گلدان‌های سفالی یک کیلوگرمی حاوی خاک زراعی ضدعفونی شده، کوکوپیت و ماسه به نسبت ۱:۲:۲ کشت شدند. گلدان‌ها به صورت یکسان با مخلوط خاکی پر شدند. برای رعایت یکنواختی مواد آزمایشی در تکرارها و تیمارهای مختلف نشاءهای انتخاب شده از نظر اندازه تا حد امکان یکسان در نظر گرفته شدند. زمانی که گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی در مرحله ۶–۷ برگی بودند به هر گلدان مخلوط ۲۵۰۰ تخم و لارو سن دو (Abo–Elyousr *et al.*, 2010). و همچنین بعد از حدود ۲۰ روز به هر گلدان۲۰ سی سی باکتری با غلظت 10^8cfu/ml اضاف شد. در این ازمایش به منظور بررسی خاصیت نماتدکشی و همچنین امکان مقایسه تیمارهای حاوی باکتری، نماتدکش (Nematex) شرکت پرتونار (دوز توصیه شده شرکت) و همچنین کلرکربوکسیلیک اسید به میزان ۱درصد مورد استفاده قرار گرفت. بعد از گذشت حدود ۹۰ روز از کشت، تیمارها به ترتیب برای بررسی شاخص‌های مد نظر به آزمایشگاه منتقل شدند. تیمارهای تعیین شده به شرح زیر بودند: ۱–(گوجه‌فرنگی بدون نماتد و بدون باکتری(شاهد)) ۲–(گوجه‌فرنگی+ باکتری) ۳–(گوجه‌فرنگی+ نماتد). ۴–(گوجه‌فرنگی+ نماتد + باکتری) ۵–(گوجه‌فرنگی+ نماتد + کلرکربوکسیلیک اسید) ۶–(گوجه‌فرنگی+ کلرکربوکسیلیک اسید) ۷–(گوجه‌فرنگی + نماتد+ نماتدکش) ۸–(گوجه + نماتدکش).

استخراج لارو و تخم نماتد

برای استخراج لارو نماتد از خاک از روش سینی و الک(روش وایت هد و همینگ) استفاده شد. برای استخراج تخم نماتد از روش هوسی و بارکر(۱۹۷۳) و Blender centrifugal استفاده شد (Whitehead & Hemming, 1965).

تعیین مقدار نفوذ نماتد به ریشه

یک ماه بعد از تلقیح، ریشه‌ها بیرون آورده شده و به آرامی خاک اطراف آنها جدا گردید و به منظور مشاهده لارو درون بافت ریشه با استفاده از روش اسیدفوشین–لاکتوفنول، رنگ‌آمیزی شدند (Bagheri *et al.*, 2015).

بررسی تاثیر سویه‌های باکتری بر تفریخ تخم

حدود ۱۰۰ تخم نماتد در سه تکرار داخل تشتک پتری ریخته شد. تخم‌ها یک ساعت پس از استخراج مورد آزمون قرار گرفتند. سپس ۱ سی‌سی از سوسپانسیون 10^8 cfu/ml هر یک از باکتری‌ها به ۱ سی‌سی آب مقطر سترون حاوی تخم‌ها اضافه گردید. برای تعیین غلظت دقیق باکتری‌ها از دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد. در تشتک شاهد از آب مقطر سترون استفاده شد. تشتک‌های پتری در دمای ۲±۲۷ درجه سانتی‌گراد در داخل انکوباتور نگهداری شده و پس از گذشت ۳، ۵ و ۷ روز تعداد لاروهای سن دوم و تعداد تخم‌های تفریخ نشده شمارش گردید (Majzoub *et al.*, 2011).

بررسی تاثیر سویه‌های باکتریایی بر مرگ و میر لارو سن دوم

یک سی‌سی از سوسپانسیون10^8 cfu/ml از هر سویه باکتری به داخل تشتک‌های پتری حاوی ۱ سی‌سی آب مقطر به همراه ۱۰۰ لارو سن دوم تازه تفریخ شده نماتد ریخته شد. برای هر سویه باکتری ۴ تکرار در نظر گرفته شد. تشتک‌ها در دمای ۲±۲۷ درجه سانتی‌گرد در داخل انکوباتور نگهداری شدند. پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، تعداد لاروهای مرده با استفاده از میکروسکوپ شمارش شده و درصد مرگ و میر لاروها مشخص گردید (Majzoub *et al.*, 2011).

بررسی تاثیر جدایه‌های مختلف باکتری بر نماتد ریشه‌گرهی در گلخانه

گلدان‌ها به مدت سه ماه پس از مایه زنی نماتد در گلخانه با دمای حدود ۲۸–۲۷ درجه سلسیوس نگهداری شدند. میزان

آبدهی به گیاهچه‌های مورد آزمایش به اندازه مصرف روزانه هر گیاهچه بود. برای بررسی نتایج آزمایش، شاخص‌های رشدی گیاه شامل طول ساقه، طول ریشه، وزن تر ریشه و اندام‌های هوایی، وزن خشک ریشه و اندام‌های هوایی و شاخص‌های بیماری زایی نماتد شامل تعداد گال، تخم در یک گرم ریشه و تعداد لارو سن دوم در ۱۰۰ سی‌سی خاک تعیین شد.

نتایج و بحث

نماتد ماده

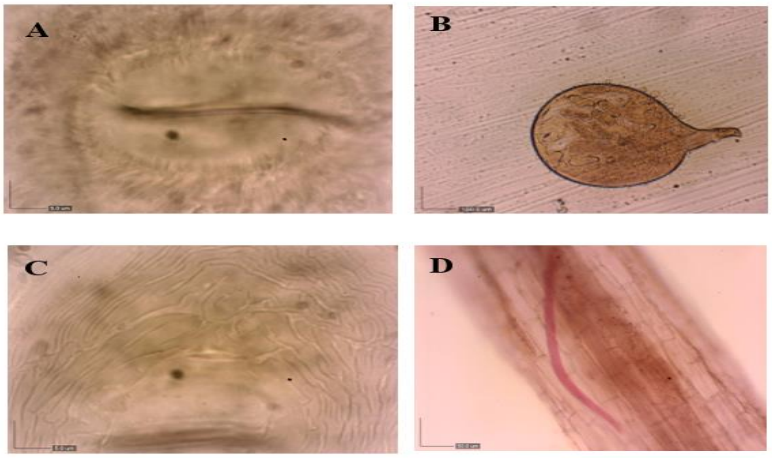
بر اساس خصوصیات نماتدهای نر، لارو و انتهای بدن ماده، گونه نماتد به عنوان *M. javanica* شناسایی شد (جدول ۲). در این گونه نسبت به سایر گونه‌ها در سطوح جانبی انتهای بدن نماتد ماده دو خط موازی به صورت کاملا واضح شبکه کوتیکولی را به دو قسمت شکمی و پشتی تقسیم می‌کنند و خطوط جانبی تا فاصله زیادی از دم قابل مشاهده هستند.

مشخصات لارو و نرو ماده نماتد مولد گره جهت شناسایی

جدول ۲– مشخصات ریخت‌سنجی نماتد ماده، نر و لارو سن دوم گونه *M. javanica* جمع‌آوری شده از مزارع آلوده گوجه‌فرنگی (اندازه ها بر حسب میکرمتر می‌باشد)

Table 1. Morphometric data of females, male and second stage juveniles of *M. javanica* population, collected (all measurements are in µm).

Character\Source	Females	Males	J_2
N	2	1	3
L	659 ± 13(650–688)	1210	403± 3(400–405)
a	1.3	38.4	34.4± 0.4(34–34.7)
C	–	–	9.4± 0.6(8.8–10.1)
c'	–	–	4.9± 0.9(4.3–6)
Stylet	15.2 ± 0.1 (15.1–15.3)	20	11.2 ± 1.5(10.2–12.9)
Conus	7.9 ± 0.1(7.9–8)	10.3	6.8 ± 0.4(6.4–7.2)
Median bulb	50.8 ± 1.2 (50–51.7)	25.3	51.2 ± 1.6(49.4–52.5)
Tail length	–	–	38.5 ± 7.8(30–45.3)
Body width	509± 2(508–511)	31.5	11.7 ± 0.2(11.5–11.9)
Vulval body width	22.5 ± 1.5 (20–26)	–	–
Spicule	–	25	–
Hyaline	–	–	3.7 ± 1.2(2.8–5)
Anal body width	–	25.2	7.8± 0.9(7.1–8.9)
Head–anus	659± 12.8(650–668)	–	364.3± 10.1(354.5–374.8)
Median bulb height	40.9± 0.8(40.3–41.4)	25.3	13.3± 0.8(12.5–14.1)
Median bulb width	39.9± 0.2(39.8–40.1)	11.8	8± 0.3(7.8–8.3)



شکل ۱– اجزا مختلف نماتد ماده A: روزنه تناسلی – B: نماتد ماده – C: ناحیه اثر انگشتی – D: ردیابی لارو در ریشه

Fig. 1. Different components of the female nematode A: vulva–B: Female nematode–C: Perineal pattern–D: Tracking larvae in roots

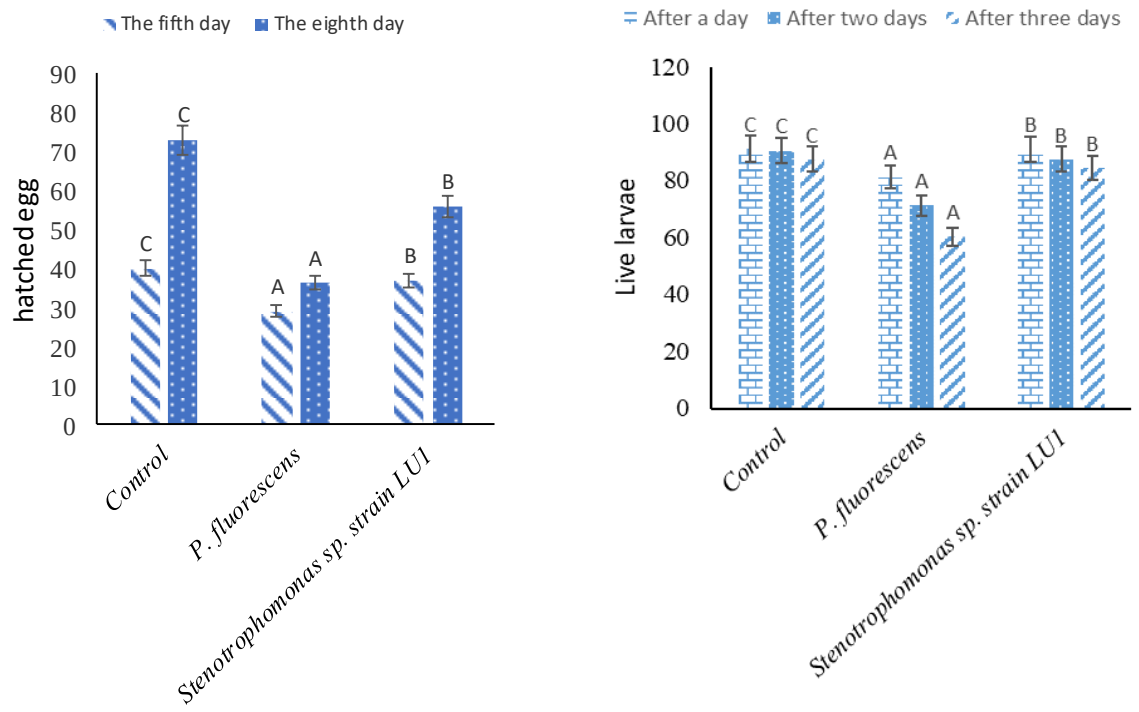
نتایج شاخص‌های مورد بررسی در آزمایشگاه

شاخص تعداد تخم تفریخ شده

این شاخص در بازه‌های زمانی ۳، ۵ و ۸ روز مورد بررسی قرار گرفت. در روز سوم تخم تفریخ شده‌ای مشاهده نشد. با توجه به مقایسه میانگین‌ها در شکل(۲) بیشترین میزان ممانعت از تفریخ تخم در روز پنجم و هشتم در تیمار (*P. fluorescens*) به ترتیب با ۲۹ و ۳۶تخم تفریخ شده (به ترتیب ۲۷٪ و ۵۰٪ درصد کاهش تفریخ تخم نسبت به شاهد در همان زمان‌ها) و کمترین ممانعت از تفریخ تخم در روز پنجم و هشتم مربوط به تیمار(شاهد) به میزان ۴۰ و ۷۳ تخم تفریخ شده و سپس در تیمار (*Stenotrophomonas* sp. strain LU1) به ترتیب به میزان ۳۷ و ۵۶ تخم تفریخ شده (به ترتیب ۷٪ و۲۳٪ درصد کاهش تفریخ تخم نسبت به شاهد در همان زمان‌ها) می‌باشد.

شاخص تعداد لارو زنده

با توجه به مقایسه میانگین‌ها در شکل (۲) بیشترین مرگ و میر لارو در۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت در تیمار(*P. fluorescens*) به ترتیب به میزان۸۱، ۷۱، ۶۰ لارو زنده (به ترتیب ۱۲٪و ۲۱٪ و۳۱٪ درصد کاهش لارو زنده نسبت به شاهد در همان زمان‌های ذکر شده) و کمترین میزان مرگ و میر لارو در زمان‌های مذکور مربوط به تیمار(شاهد) به ترتیب به میزان ۹۱/۲۵، ۹۰/۵، ۸۷/۵ لارو زنده و سپس در تیمار (*Stenotrophomonas* sp. strain LU1) به ترتیب به میزان۹۱، ۸۸، ۸۵ لارو زنده (به ترتیب ۰/۳٪و ۰/۸٪و ۰/۸٪ درصد کاهش نسبت به شاهد در همان زمان های ذکر شده) می‌باشد.



شکل ۲– تاثیر تیمارهای مختلف بر تفریخ تخم و مرگ و میر لاور سن دوم در شرایط آزمایشگاهی(ستون‌هایی که دارای حروف مشترک هستند، بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵٪ با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ندارند).

Fig. 2. The effect of different treatments on the number of live larvae in laboratory conditions (The columns that have common letters are not significantly different from each other based on the LSD test at the 5% probability level)

نتایج شاخص‌های مورد بررسی در گلخانه

شاخص‌های رشدی گیاه

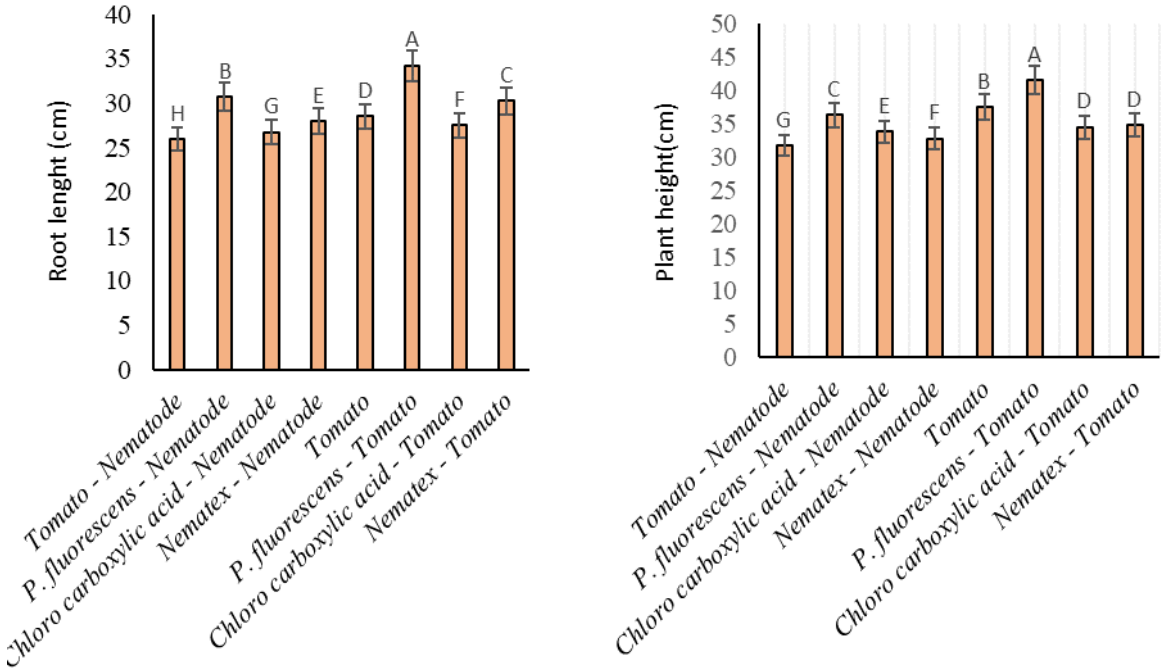
در آزمون های گلخانه‌ای، از باکتری *P. fluorescens* که با توجه به شکل (۲) بیشترین تاثیر را در آزمون‌های آزمایشگاهی از خود نشان داد به همراه کلرکربوکسیلیک اسید و نماتدکش نماتکس استفاده شد. سپس شاخص‌های مختلف رشدی گیاه و شاخص‌های بیماری‌زایی نماتد مورد بررسی قرار گرفت.

در شاخص ارتفاع گیاه گوجه‌فرنگی با توجه به مقایسه میانگین‌ها در شکل(۳) بیشترین ارتفاع بوته در تیمارهای سالم و آلوده به ترتیب در تیمار (بدون نماتد – *P. fluorescens*) به میزان ۳۰٪ و تیمار (نماتد – *P. fluorescens*) به میزان۱۴٪ نسبت به شاهد با نماتد افزایش داشت و کمترین ارتفاع بوته در تیما شاهد با نماتد اندازه‌گیری شد. همچنین در شاخص طول ریشه شکل(۳) بیشترین طول ریشه در تیمارهای سالم و آلوده به ترتیب در تیمار(بدون نماتد – *P. fluorescens*) به میزان۳۱٪ و تیمار (نماتد – *P. fluorescens*) به میزان ۱۸٪ نسبت به شاهد با نماتد افزایش داشت و کمترین طول ریشه در تیمار شاهد با نماتد اندازه‌گیری شد.

در شاخص وزن تر بوته با توجه به مقایسه میانگین‌ها در شکل(۴) بیشترین وزن تر بوته بترتیب در تیمار شاهد بدون نماتد، تیمار بدون نماتد + *P. fluorescens* (به میزان ۵۰٪ افزایش نسبت به شاهد با نماتد)، تیمارها بدون نماتد + نماتدکش، تیمار نماتد + نماتدکش، تیمار نماتد + *P. fluorescens* (به میزان۳۶٪ نسبت به شاهد با نماتد) و کمترین وزن تر بوته در تیمار شاهد با نماتد مشاهده شد.

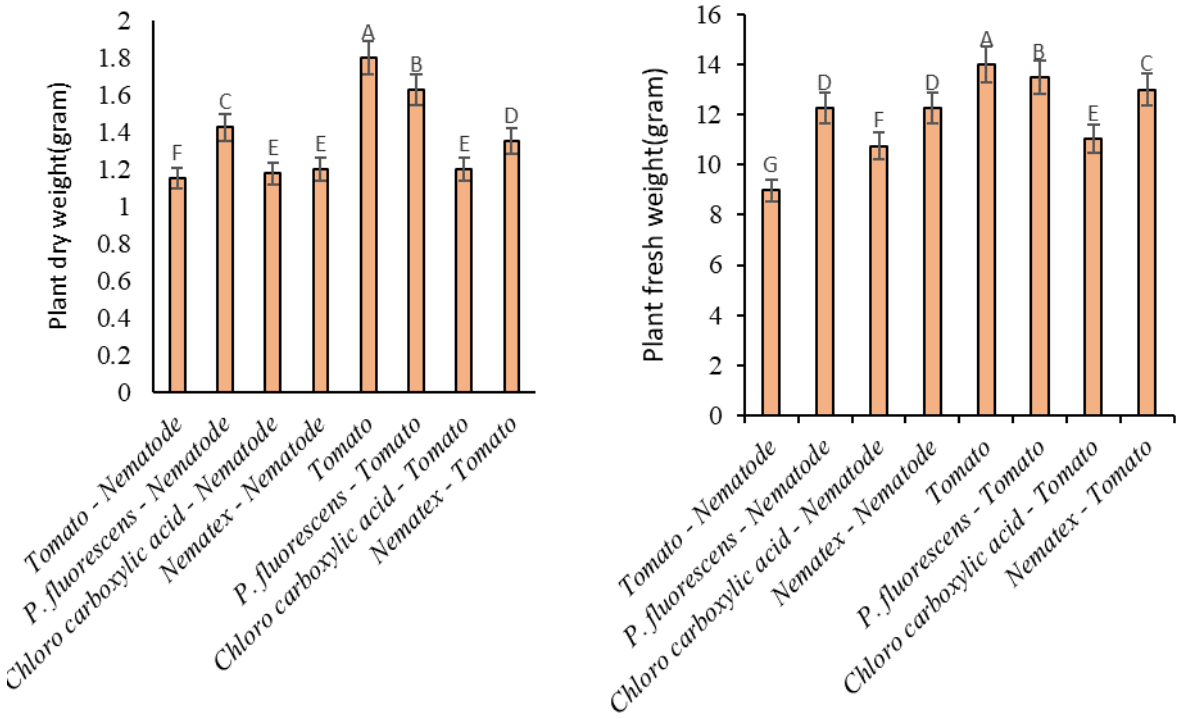
همچنین در شاخص وزن خشک بوته با توجه به مقایسه میانگین‌ها در شکل (۴) بیشترین وزن خشک بوته بترتیب در تیمارها بدون نماتد ، تیمار بدون نماتد + *P. fluorescens* (افزایش به میزان ۴۰٪ نسبت به شاهد با نماتد)، تیمار نماتد + *P. fluorescens* (افزایش به میزان ۲۳٪ نسبت به شاهد با نماتد) و کمترین وزن خشک بوته در تیمار شاهد با نماتد اندازه‌گیری شد.

در شاخص وزن تر و خشک ریشه که به علت حضور نماتد در داخل بافت ریشه و ایجاد گره معیار مناسبی برای سنجش عملکرد نیست با توجه به مقایسه میانگین‌ها در شکل(۵) بیشترین وزن تر ریشه در تیمار شاهد با نماتد و کمترین وزن تر ریشه در تیمار بدون نماتد – کلر کربوکسیلیک اسید اندازه‌گیری شد.



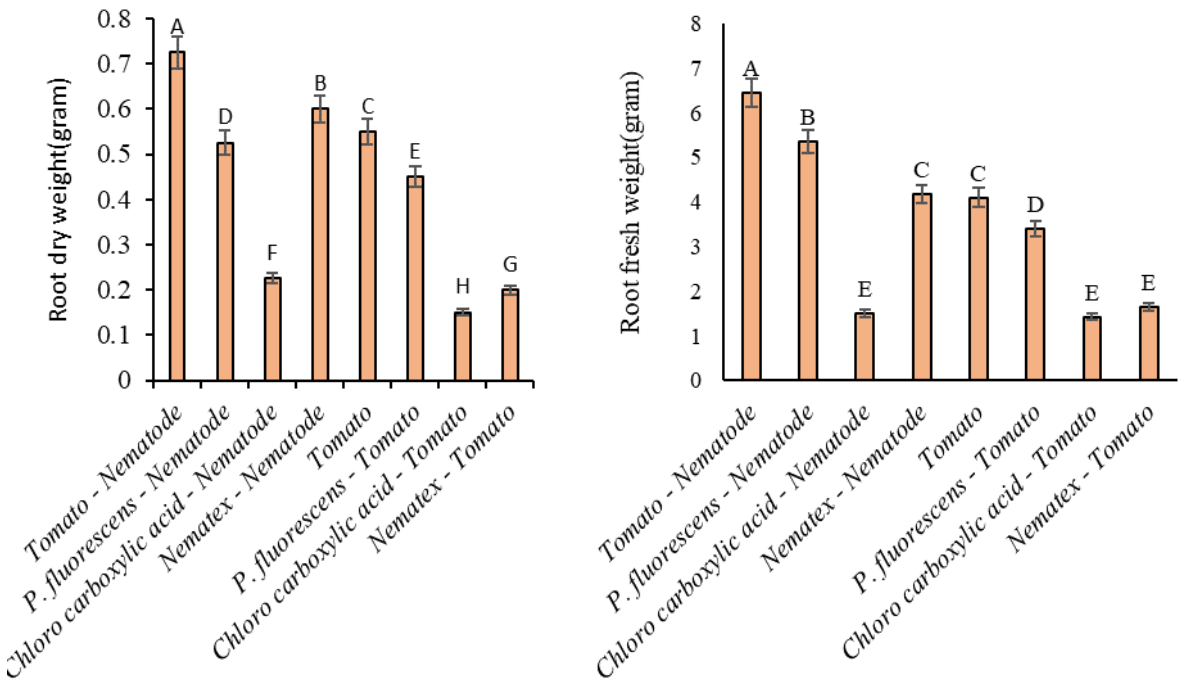
شکل۳– تاثیر تیمارهای مختلف برارتفاع اندام هوایی و طول ریشه گیاه گوجه‌فرنگی در شرایط گلخانه (ستون‌هایی که دارای حروف مشترک هستند، براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵٪ با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ندارند).

Fig. 3. The effect of different treatments on tomato plant shoot height and root length in the greenhouse conditions (The columns that have common letters are not significantly different from each other based on the LSD test at the 5% probability level).



شکل ۴– تاثیر تیمارهای مختلف بر وزن تر و خشک اندام هوایی گیاه گوجه‌فرنگی در شرایط گلخانه(ستون‌هایی که دارای حروف مشترک هستند، براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵٪ با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ندارند).

Fig. 4. The effect of different treatments on the fresh and dry weight of shoot plants in greenhouse conditions (The columns that have common letters are not significantly different from each other based on the LSD test at the 5% probability level)



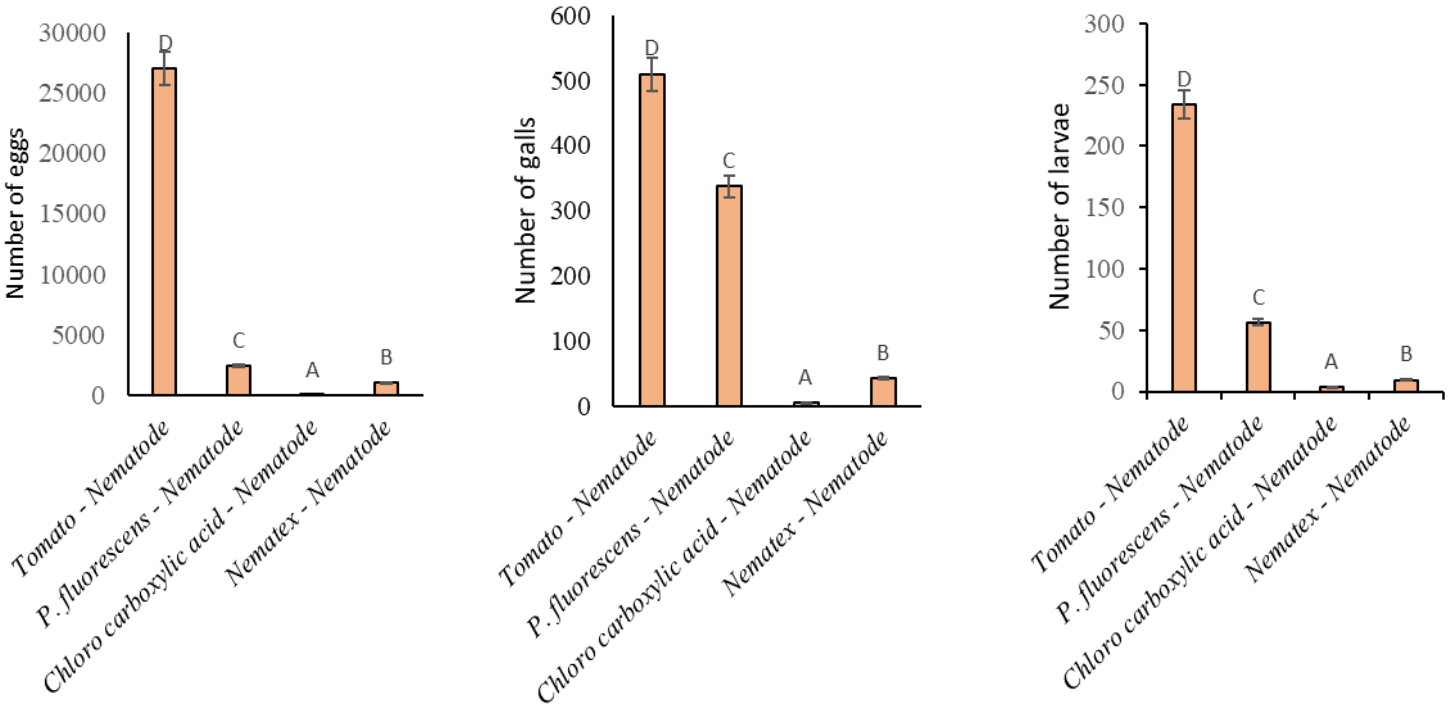
شکل ۵– تاثیر تیمارهای مختلف بر وزن تر و خشک ریشه گیاه گوجه‌فرنگی در شرایط گلخانه(ستون‌هایی که دارای حروف مشترک هستند، براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵٪ با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ندارند).

Fig. 5. The effect of different treatments on the fresh and dry weight of plants roots in greenhouse conditions (The columns that have common letters are not significantly different from each other based on the LSD test at the 5% probability level)

شاخص‌های مربوط به نماتد اندازه گیری شده در گلخانه

در شاخص تعداد لارو در ۱۰۰ سی‌سی خاک با توجه به مقایسه میانگین‌ها در شکل (۶) کمترین تعداد لارو در ۱۰۰ سی‌سی خاک به ترتیب در تیمار نماتد + کلرکربوکسیلیک اسید به میزان ۹۸٪ کاهش نسبت به شاهد با نماتد، تیمار نماتد + نماتدکش به میزان ۹۶٪ کاهش نسبت به شاهد با نماتد، تیمار نماتد + *P. fluorescens* به میزان۷۶٪ کاهش نسبت به شاهد با نماتد و بیشترین تعداد لارو در تیمار شاهد با نماتد مشاهده شد. همچنین در شاخص تعداد گال در یک گرم شکل(۶) کمترین تعداد گال در یک گرم ریشه به ترتیب در تیمار نماتد + کلرکربوکسیلیک اسید به میزان ۹۸٪ کاهش نسبت به شاهد با نماتد، در تیمار نماتد + نماتدکش به میزان۹۱٪ کاهش نسبت به شاهد با نماتد، تیمار نماتد + *P. fluorescens* به میزان ۳۳٪ کاهش نسبت به شاهد با نماتد و بیشترین تعداد گال در یک گرم ریشه در تیمار شاهد با نماتد) مشاهده شد.

در شاخص تعداد تخم در یک گرم ریشه با توجه به مقایسه میانگین‌ها در شکل(۶) کمترین تعداد تخم در یک گرم ریشه به ترتیب در تیمار نماتد + کلرکربوکسیلیک اسید به میزان ۹۹٪ کاهش نسبت به شاهد با نماتد، تیمار نماتد + نماتدکش به میزان ۹۶٪ کاهش نسبت به شاهد با نماتد، تیمار نماتد + *P. fluorescens* به میزان ۹۱٪ کاهش نسبت به شاهد با نماتد و بیشترین تعداد تخم در یک گرم ریشه در تیمار شاهد با نماتد مشاهده شد.



شکل ۶– تاثیر تیمارهای مختلف بر تعداد لارو در صد سی‌سی خاک، تعداد گال و تعداد تخم در گرم ریشه گیاه گوجه‌فرنگی در شرایط گلخانه(ستون‌هایی که دارای حروف مشترک هستند، براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵٪ با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ندارند).

Fig. 6. The effect of different treatments on the number of larvae per 100 cc of soil, gall and egg per gram of root in tomato plant greenhouse conditions (The columns that have common letters are not significantly different from each other based on the LSD test at the 5% probability level)

بحث و نتیجه‌گیری

کنترل زیستی یکی از روش‌های مهم در مدیریت عوامل بیمارگر گیاهی است که با توجه به مزایای زیاد آن مورد استفاده قرار می‌گیرد در این پژوهش در بخش آزمایشگاهی تاثیر دو باکتری *P. fluorescens* و *Stenotrophomonas* sp.strain LU1 بر نماتد ریشه گرهی مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج نشان‌دهنده تاثیر مثبت این دو باکتری با درصدهای مختلف در کنترل لارو و تخم نماتد مولد گره می‌باشد. در پژوهش حاضر باکتری *P. fluorescens* بهترین کارایی را در کاهش میزان مرگ و میر لارو و کاهش تفریخ تخم نماتد نشان داد که در تست گلخانه‌ای به همراه کلرکربوکسیلیک اسید و نماتدکش مورد استفاده قرار گرفت. در بررسی گلخانه‌ای تیمارهای *P. fluorescens* با نماتد و بدون نماتد به ترتیب با ۳۶/۲۵ سانتی‌متر و ۴۱/۵ سانتی‌متر در ارتفاع بوته و ۳۰/۷۵ سانتی‌متر و ۳۴/۲۵ سانتی‌متر در طول ریشه بیشترین تاثیر را نسبت به همه تیمارها از خود نشان دادند. در شاخص وزن تر بوته، تیمارهای *P. fluorescens* با نماتد و بدون نماتد به ترتیب ۳۶٪ و ۵۰٪ افزایش وزن را نسبت به شاهد با نماتد از خود نشان دادند. در وزن خشک بوته تیمارهای *P. fluorescens* با نماتد و بدون نماتد به ترتیب ۲۳٪ و ۴۰٪ افزایش وزن را نسبت به شاهد با نماتد از خود نشان دادند. در شاخص‌های بیماریزایی مربوط به لارو، گال و تخم، تیمار حاوی باکتری *P. fluorescens* به ترتیب به میزان ۷۶٪ و ۳۳٪ و ۹۱٪ کاهش نسبت به شاهد با نماتد، تاثیر مثبت از خود نشان داد، که در شاخص تعداد لارو در ۱۰۰ سی سی خاک لارو سن دو

نماتد موجود در گلدان‌های تلقیح شده با باکتری *P. fluorescens* به میزان۷۶ درصد کاهش نسبت به گلدان شاهد با نماتد را نشان دادند که با تحقیقات صدیقی و شوکت مطابقت دارد (Siddiqui & Shaukat, 2003). نتایج پژوهش حاضر بر روی باکتری *P. fluorescens* در افزایش شاخص‌های رشدی و کنترل شاخص‌های بیماریزایی با نتایج تحقیقات منظم و همکاران (۲۰۲۲) در بررسی اثر باکتری سودوموناس بر روی نماتد مولد گره و تحقیقات باقری و همکاران (۲۰۱۵) در ارزیابی ویژگی‌های مولکولی و زیستی باکتری *P. fluorescens* UTPF5 بر روی نماتد ریشه گرهی در گیاه گوجه‌فرنگی و همچنین تحقیقات گلزاری و همکاران(۲۰۱۱) در مطالعه نقش موثر برخی متابولیت‌های باکتری‌های سودوموناس فلورسنت در کنترل نماتد ریشه گرهی و تحقیقات سهرابی و همکاران(۲۰۱۶) در کنترل نماتد مذکور با استفاده از باکتری‌های محرک رشد مطابقت دارد (Golzari *et al.*, 2011; Monazam *et al.*, 2022; Bagheri *et al.*, 2015; Sohrabi *et al.*, 2016) لازم به ذکر است در این پژوهش با کنترل ۹۸٪ تعداد لارو در ۱۰۰ سی سی خاک، ۹۸٪ کنترل گال و ۹۹٪ کنترل تعداد تخم در یک گرم ریشه مشخص شد که تاثیر تیمار(نماتد – کلرکربوکسیلیک اسید) از تیمار(نماتد – نماتدکش) بیشتر است که با نتایج تحقیقات دشتی پور و همکارانش(۲۰۱۶) در بررسی تاثیر اسید سالیسیلیک بر روی نماتد مولد گره و همچنین تحقیقات ناصری نصب و همکارانش(۲۰۱۱) در بررسی اثر تلفیقی سالیسیلیک اسید و قارچ *Trichoderma harzianum* بر مقاومت گیاه گوجه‌فرنگی علیه نماتد مولد گره مطابقت دارد ولی به علت شرایط رشدی مختلف گیاهان و نیاز آنها به محیط‌های اسیدی یا بازی و حالت سوزندگی این اسید در استفاده از آن رعایت احتیاط نیاز است (Naserinasab *et al.*, 2011; Dashtipour *et al.*, 2016). یافته‌های این پژوهش نشان داد که باکتری *P. fluorescens* به عنوان یک گزینه مهم در کنترل بیماری ناشی از نماتد ریشه گرهی در گوجه‌فرنگی محسوب می‌گردد. این باکتری علاوه بر کاهش شاخص‌های بیمارگری نماتد، سبب افزایش در شاخص‌های رشدی گوجه‌فرنگی شد. در تیمارهای حاوی کلرکربوکسیلیک اسیدکنترل نماتد، بهتر از نماتدکش بود.

سپاسگزاری

نویسندگان از دانشگاه لرستان به جهت تامین شرایط انجام این پژوهش قدردانی می‌نمایند.

References

Abo–Elyousr, K.A., Khan, Z., E–Morsi Award M. & Abedel–Moneim, M.F. 2010. Evaluation of plant extracts and *Pseudomonas* spp. For control of root–knot nematode, *Meloidogyne incognita* on tomato. Nematropica, 40(2): 289–299.

Azizi, K. 2023. Effect of wood vinegar, chloro carboxylic acid and sodium dioctyl sulfosuccinate against *Pratylenchoides ritteri* on chickpea. Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture), 45(4): 77–82.

Badakhshan, M., Mahdikhani Moghadam, E., Baghaee Ravari, S. & Rouhani, H. 2017. The combined use of two species of *Trichoderma* and *Bacillus subtilis* in the control of tomato root–knot nematode (*Meloidogyne javanica*). *Plant Pests and Diseases*, 85(2): 269–278 (In Persian with English summary).

Bagheri, N., Ahmadzadeh, M., Afsharmanesh, H., Saberbaghban, Z. & Mohammadzadeh Kashani, M. 2015. Evaluation of molecular and biological characteristics of *Pseudomonas fluorescens* UTPF5 biocontrol agent of *Meloidogyne javanica* on tomato. Cellular and Molecular Researches (Iranian Journal of Biology), 29(1): 15–32. (In Persian)

Bazgir, M., Mirzaei Najafgholi, H., Azizi, K., Rouhani, N. & Alymanesh, M. 2024. The effect of plant growth–promoting bacteria on Cereal cyst nematode (*Heterodera avenae*) under laboratory and greenhouse conditions. Biocontrol in Plant Protection, 11(1): 83–96

Cuartero, J., & Fernández–Munoz, R. (1999) Tomato and Salinity. Scientia Horticulturae, 78: 83–125.

Dashtipour, S., Sahibani, N. & Aminian, H. 2016. Application Effect of *Bacillus subtilis* and salicylic acid on the tomato plants against *Fusarium oxysporoum* f.sp. *lycopersici* and *Meloidogyne javanica*. Applied research in plant protection, 6(4): 1–10. (In Persian)

Golzari, H., Panjeh kh, N., Ahmadzadeh, M., Salari, M. & Sadaghati Kharavi, I. 2011. Studying the effective role of some metabolites of *Pseudomonas fluorescent* bacteria in controlling the root–knot nematode *Meloidogyne javanica* on tomato. Iranian journal of plant protection science (Agricultural Sciences of Iran), 42(1): 113–124. (In Persian)

Hosseini Nejad, A. 2004. The effect of neem derivatives, *Azadirachta indica*, to root–knot nematod, *Meloidogyne javanica*, in tomato. Journal of Plant Pests and Diseases. 72(1): 69–89. (In Persian)

Hussey, RS. & Barker, KR. 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. *Plant Disease Reporter*, 57: 1025–1028.

Javed, N., Gowen, S. R., Inam–ul–Haq, M. & Anwar, S. A. 2007. Protective and curative effect of neem (Azadirachta indica) formulations on the development of root–knot nematode *Meloidogyne javanica* in roots of tomato plants. Crop Protection, 26: 530–534.

Khalighi, S., Khodakarmian, G., Tanhamaafi, Z., Hosseininejad, S. & Ghasemi, A. 2010. Inhibition of gall formation *Meloidogyne javanica* on tomato using *fluorescent pseudomonas* under greenhouse conditions. Plant Pests and Diseases, 78(2 (serial 91)), 177–198. (In Persian with English summary)

Khan, A,. Shaukat, S. S., Islam, S. & Khan, A. 2012. Evaluation of *Fluorescent Pseudomonad* isolates for their activity against some plantparasitic nematodes. American–Eurasian. J. Agric. and Environ. Sci, 12 (11): 1496–1506.

Majzoub, S., Kargrbideh, A., Taghvi, S. & Hamze Zarghani, H. 2011. Investigating the effect of paraphytic bacteria on root–knot nematode (*Meloidogyne javanica*) on cucumber under greenhouse conditions. Plant diseases, 48(1), 69–84. (In Persian)

Merillon, J.M., & Ramawat, K.G. (eds) 2012. Plant defence: Biological control, Progress in Biological Control 12. Dordrecht, Springer Science Business Media, pp:67–107.

Monazam, K., Jamali, S. & Alimi, M. 2022. Effect of *Pseudomonas* and *Streptomyces* bacteria in controlling root knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in tomato under greenhouse conditions. Iran Nematodology, 1(1): 118–127. (In Persian with English summmary)

Naseri Nasab, F., Sahibani, N. & Etebarian, H. 2011. Investigating the combined effect of salicylic acid and the fungus *Trichoderma harzianum BI* on the resistance of tomato plants against the root knot nematode *Meloidogyne javanica*. (Plant Protection) Iranian Plant Protection Research, 25(4), 417–425. (In Persian)

Nasiri, M., Azizi, K., Hamzehzarghani, H. & Ghaderi, R. 2013. Studies on the nematicidal activity of stinging nettle (*Urtica dioica*) on plant parasitic nematodes, Archives Of Phytopathology and Plant Protection, 47(5): 591–599.

Ramezani, B., and Mahdikhani Moghadam, E. & Rouhani, H. 2012. Evaluation of the resistance of some tomato cultivars to the root knot nematode (Meloidogyne javanica) in greenhouse conditions. Quarterly Journal of Plant Protection Studies, 27(3): 285–276. (In Persian with English summmary)

Siddiqui, I., A. & Shaukat, S. 2003. "Suppression of root–knot disease by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in tomato: Importance of bacterial secondary metaboliite 2,4–diacetylphloroglucinol". Soil Biology and Biochemistry, 35: 1615–1623.

Siddiqui, I. A., Hass, D. & Heeb, S. 2005. "Extracellular protease of *Pseudomonas fluorescens CHA0*, a biocontrol factor with activity against root–knot nematode, *Meloidogyne incognita*". Applied and Environmental Microbiology, 71: 5646–5649.

Sohrabi, F., Sheikholeslami, M., Heydari, R., Rezaee, S. & Sharifi, R. 2016. Study on combined application of arbuscular mycorrhizal fungi isolates and plant growthpromoting rhizobacteria in controlling the root–knot nematode *Meloidogyne javanica* in tomato under greenhouse conditions. Plant diseases, 53(4): 449–462. (In Persian with English summary)

Tanha, S., Bayat, F. & Jamali, H. 2018. Evaluation of tomato cultivars to root– knot nematode *Meloidogjan javanica.* Iranian Journal of Agricultural Plant Sciences (Agricultural Sciences of Iran), 50(1): 97–106. (In Persian with English summary)

Whitehead, A.G., & Hemming, J.R. 1965. A comparison of some quantitative methods of extracting small vermiform nematodes from soil. Annual Applied Biology, 55(1): 25–38.

Effect of *Pseudomonas flourescens*, *Stenotrophomonas* sp. and chloro carboxylic acid on the root–knot nematode (*Meloidogyne javanica*)

Mohammad Hadipoor[1], Hossein Mirzaei Najafgholi[2], Kourosh Azizi[3]

1., 2., 3. Msc.in Plant Pathology, Assistant Professor, Assistant Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran.
Corresponding author: Kourosh Azizi, email: azizi.ko@lu.ac.ir

Received: Jan., 4, 2025 11(2) 67–80 Accepted: Feb., 15, 2025

Abstract

Tomato is one of the most important plants in the world. Knot–root nematodes (*Meloidogyne* spp.) are one of the main pathogens of tomato plants, which cause a decrease of about five percent in crops worldwide and damage of 24–38 percent on tomato plants. Considering the high cost of chemical methods and the damage they have on the environment and human health, it is necessary to have an alternative solution, including the use of growth–promoting bacteria (PGPR) to manage these nematodes. After examining the morphology and morphometry, the nematode isolated from infected fields was identified *as M. javanica*. In the current study, after isolation of knot– root nematode from infected fields, identification and purification and propagation of nematode, the effect of two bacteria, *Pseudomonas flourescens*, *Stenotrophomonas* sp. strain LU1 in laboratory conditions, also as *P. fluorescens* bacteria and chloro carboxylic acid along with nematicides on tomato plants and this nematode in greenhouse conditions were investigated. After tomato greenhouse cultivation and inoculation, in the form of a completely random design in 4 replications, Data were analyzed by SAS software. Investigations carried out in the laboratory showed that, in the egg hatching test in laboratory conditions 8 days after inoculation, *P. fluorescens* bacteria with 50% and *Stenotrophomonas* sp. strain LU1 bacteria with 23% were effective in controlling the number of hatched eggs. In the test of the number of live larvae in laboratory conditions 3 days after inoculation, *P. fluorescens* bacteria was able to kill 31% and *Stenotrophomonas* sp. strain LU1 with 0.8% mortality in larvae. In greenhouse conditions, in the test of growth indicators of tomato plants, including plant height and root length, plant and root fresh weight, plant and root dry weight, treatments containing *P. fluorescens* bacteria with and without nematodes, in the plant height index respectively 14% and 30% in the root length index 18% and 31% in the plant fresh weight index 36% and 50% in the plant dry weight index, 23% and 40% they showed a positive effect compared to control with nematodes. In the greenhouse, in the pathogenicity indicators related to the number of larvae in 100 cc of soil, the number of galls in one gram of root, the number of eggs in one gram of root, the treatment containing *P. fluorescens* bacteria was 76%, 33%, and 91%, respectively, and the treatment containing chloro carboxylic acid. 98%, 98%, and 99% showed control compared to the control, respectively, and in this treatment, the control rate of the nematicide used was more evaluated. The results of the present study showed the positive effect of *P. fluorescens* bacteria on the nematode *M. javanica* in laboratory and greenhouse conditions, as well as chloro carboxylic acid in greenhouse conditions, which was consistent with the conducted research. It should be noted that *Stenotrophomonas* sp. strain LU1 showed a positive but little effect in laboratory conditions.

Keywords: Egg hatching, greenhouse, laboratory, mortality, PGPR.