

مقاله تحقیقی

مهار زیستی نماتد ریشه گرهی گوجه فرنگی (*M. incognita*) با استفاده از باکتری های آنتاگونیستهادی رهاننده^۱، عزت اله صداقت فر^۲

۱- استادیار، گروه گیاه پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد رشت، گیلان، ایران.

۲- استادیار، گروه گیاه پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اراک، مرکزی، ایران.

مسئول مکاتبات: هادی رهاننده، ایمیل: Rahanandeh20@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۴/۳۱

۶۵-۵۱ (۱) ۱۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۱/۰۶

چکیده

نماتدهای ریشه گرهی *Meloidogyne spp.* یکی از مهم ترین نماتدهای بیماری زای گیاهی از نظر اقتصادی است که باعث کاهش شدید عملکرد و کیفیت در محصولات کشاورزی می شوند. استفاده از عوامل کنترل بیولوژیکی یک رویکرد ایمن و موثر زیست سازگار برای کنترل نماتد گرهی ریشه است. امروزه مهارزیستی نماتدهای ریشه گرهی با هدف کاهش اثرات خطرناک سموم شیمیایی از جمله تهدید سلامت بشر و آلودگی محیط زیست یک اولویت به شمار می رود. یکی از عوامل مؤثر در مهار زیستی این نماتدها، باکتری های آنتاگونیست هستند. در این تحقیق چهار ایزوله باکتریایی *Bacillus subtilis*، *Bacillus velezensis*، *Pseudomonas fluorescens* و *Bacillus megaterium* جهت کنترل نماتد ریشه گرهی گوجه فرنگی در شرایط آزمایشگاه و گلخانه ارزیابی گردید. در شرایط آزمایشگاهی فاکتورهای تاثیر باکتری در مرگ و میر نماتد، تولید آنزیم پروتئاز، شناسایی نوع آنزیم پروتئاز، تاثیر گذاری این آنزیم روی نماتد و همچنین زمان، شرایط دمایی و pH لازم برای تولید مناسب آنزیم پروتئاز و در شرایط گلخانه شاخص های آلودگی به نماتد شامل تعداد گال، توده تخم، جمعیت لارو و تخم در هر گرم ریشه، تعداد لاروهای سن دوم در صد گرم خاک و نرخ تولید مثل و فاکتورهای ارتفاع، وزن خشک و تر اندام هوایی، طول ریشه، وزن تر ریشه، وزن خشک ریشه و حجم ریشه گیاه گوجه فرنگی مورد ارزیابی قرار گرفتند. بررسی گلخانه ای در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام گردید. دو باکتری *B. subtilis* و *P. fluorescens* بیشترین تاثیر را بر مرگ و میر لاروها به ترتیب با ۸۸/۱۲ و ۷۸/۹۳ درصد داشتند. در میزان تولید آنزیم پروتئاز دو باکتری *B. subtilis* و *P. fluorescens* به ترتیب با ایجاد هاله با عرض ۱۳ و ۱۱/۵ میلی متر بزرگترین هاله را ایجاد کردند. در ایزوله باکتریایی *B. subtilis* سه مشخصه مختلف برای تولید پروتئاز مورد بررسی قرار گرفت. ایزوله باکتریایی مذکور در pH ۸، دمای ۳۲ درجه سلسیوس و با گذشت ۱۲ ساعت پس از تلقیح روی محیط کشت ذکر شده، بیشترین میزان آنزیم را تولید کرد. در ایزوله باکتریایی *P. fluorescens* تحت شرایط بهینه pH ۷/۲، دمای ۲۶ درجه سلسیوس و با گذشت ۷۲ ساعت بعد از تلقیح محیط کشت بیشترین میزان تولید آنزیم را نشان داد. آنزیم پروتئاز تولیدی از این دو باکتری *B. subtilis* و *P. fluorescens* به ترتیب در بازه زمانی مشخص به ترتیب باعث ۱۰۰ و ۸۸/۸۶ درصد مرگ لارو سن دو نماتد شدند. EDTA باعث جلوگیری از فعالیت آنزیم پروتئاز گردید. این دو باکتری در تمامی فاکتورهای گلخانه باعث تاثیر مثبت روی فاکتورهای زراعی به نسبت شاهد آلوده شدند و باعث کاهش فاکتورهای بیماری زای نماتد گردیدند. نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از این دو باکتری می تواند در کنترل نماتد مورد توجه قرار گیرد.

واژه های کلیدی: آنتاگونیست، *Bacillus subtilis*، *Pseudomonas fluorescens*، شاخص های زیستی، پروتئاز

مقدمه

تولید تقریباً $10^6 \times 161$ میلیون تن کشت می شود. آفریقا و

گوجه فرنگی (*Solanum lycopersicum*) متعلق به آسیا بیش از ۸۰ درصد از مساحت جهانی کشت خانواده Solanaceae است و در بیش از 5×10^6 هکتار با

مبرم به کشف جایگزین‌های ایمن و موثر برای کنترل نماتد ریشه‌گرهی وجود دارد. کنترل بیولوژیک به عنوان یک جایگزین سازگار با محیط زیست برای کنترل پاتوژن‌های مختلف ناشی از خاک، از جمله نماتدهای ریشه‌گرهی می‌باشد (Mhatre et al., 2019; Lahlali et al., 2022). میکروارگانیزم‌های متعددی از جمله قارچ‌ها، باکتری‌ها و اکتینومیست‌ها به عنوان عوامل بالقوه کنترل زیستی برای مدیریت کارآمد این نماتد در بسیاری از محصولات، به ویژه سبزیجات شناسایی شده‌اند (Shahid et al., 2022; Wang et al., 2022). جنس‌های مختلفی همانند *Bacillus* و *Pseudomonas*‌ها از خاک، بافت میزبان-گیاه، نماتد، تخم و کیست آن‌ها جدا شده است (Meyer, 2003). مجموعه‌ای از فعل و انفعالات پیچیده بین باکتری‌ها، نماتدها، گیاهان و محیط برای کنترل جمعیت نماتدهای بیماری‌زای گیاهی لازم می‌باشد (Kerry, 2000). بررسی جمعیت و مکانیسم‌های اثر باکتری‌ها برای توسعه استراتژی‌های کنترل بیولوژیک بسیار مفید می‌باشد (Tian et al., 2007). باکتری‌های هوازی گرم مثبت تشکیل دهنده اندوسپور عمدتاً *Bacillus* spp. و باکتری گرم منفی *Pseudomonas* spp. از جمله جمعیت‌های غالب در ریزوسفراند که قادر به کنترل نماتدها هستند. باکتری‌ها با مکانیسم‌های مختلف از جمله توکسین‌ها، آنزیم‌ها و ترکیبات متابولیک روی نماتدها تاثیر می‌گذارند (Siddiqui & Mahmood, 1999). هدف از این تحقیق بررسی اثر و مکانیسم کنترل‌کنندگی باکتری‌های آنتاگونیست علیه نماتد مولد ریشه‌گرهی (*M. incognita*) در گوجه‌فرنگی و همچنین اثر کاربرد آن‌ها روی صفات رویشی گیاه گوجه‌فرنگی در شرایط آزمایشگاه و گلخانه بود.

مواد و روش‌ها

شناسایی و تهیه جمعیت نماتد

ریشه‌گرهی *M. incognita*

جهت تهیه جمعیت خالص نماتد، یک کیسه تخم از ریشه گوجه‌فرنگی آلوده جدا و در مجاورت ریشه یک

گوجه‌فرنگی را با حدود ۷۰ درصد تولید جهانی تشکیل می‌دهند (Fao, 2010). آفات و بیماری‌های زیادی وجود دارد که به کیفیت و کمیت تولید گوجه‌فرنگی آسیب می‌رساند و نماتدهای انگلی گیاهی یکی از آن‌ها می‌باشد. نماتدها یک محدودیت مهم در تامین امنیت غذایی جهانی هستند (Nicol et al., 2011). نماتدهای ریشه‌گرهی (*Meloidogyne* spp.) مهمترین نماتدهای انگلی گیاهی از نظر اقتصادی هستند که سالانه حداقل ۱۰۰ میلیارد دلار خسارت وارد می‌کنند (Elling, 2013). این نماتدها می‌توانند به بیش از ۵۰۰۰ گونه محصولات به ویژه سبزیجات آسیب بزنند و باعث کاهش عملکرد چشم‌گیر، عمدتاً در کشاورزی مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری شوند (Sikora & Fernandez, 2005; Blok et al., 2008). چرخه زندگی بسیار کوتاه، ظرفیت تولیدمثلی بالایی دارند و عمدتاً به ریشه گیاهان در حال رشد حمله می‌کنند. علاوه بر این، آلودگی نماتد ریشه‌گرهی، در ترکیب با سایر پاتوژن‌های قارچی و باکتریایی در خاک، می‌تواند باعث آسیب ثانویه به ریشه‌های میزبان شود که باعث تشدید خسارت محصول می‌شود (Junz et al., 2013). در چین، نماتدهای ریشه‌گرهی همچنین به دلیل کشت متراکم، تک‌کشتی و حفظ یک ریزاقليم پایدار به یک عامل محدودکننده عملکرد در کشاورزی تبدیل شده‌اند (Jin et al., 2017). مدیریت نماتدها دشوارتر از سایر آفات است زیرا نماتدها بیشتر در خاک زندگی می‌کنند و معمولاً به قسمت‌های زیرزمینی گیاهان حمله می‌کنند. روش کنترل معمول برای نماتد ریشه‌گرهی استفاده از سموم شیمیایی و ارقام مقاوم می‌باشد (Giannakou & Anastasiadis, 2005; Jordan, 2018). با این حال، اصلاح ارقام مقاوم نیازمند روش‌های طولانی و نیروی انسانی متخصص و زیاد است و منابع ژنتیکی محدودی برای ایجاد مقاومت در برابر نماتد ریشه‌گرهی وجود دارد (Davies & Elling, 2015). استفاده مکرر و بیش از حد از نماتدکش‌های شیمیایی خطر سمیت بالا برای انسان و اکوسیستم‌های خاکی را دارند که منجر به محدودیت‌های شدید یا ممنوعیت‌های کامل می‌شود (Aktar et al., 2009; Coyne et al., 2018). بنابراین، نیاز

انکوباتور نگهداری شدند. ایجاد هاله شفاف نشان دهنده تولید آنزیم پروتئاز بود که قطر آن اندازه گیری و در نظر گرفته شد (Folasade et al., 2005).

بررسی فاکتورهای مختلف در تولید آنزیم پروتئاز توسط باکتری

ابتدا باکتری روی محیط کشت NA کشت داده شد. سپس یک لوپ از آن برای تکثیر باکتری به محیط کشت NB انتقال داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای 26°C روی انکوباتور شیکردار دورانی با سرعت ۱۷۰ rpm قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت به نسبت حجمی ۱٪ از این محیط کشت برای تلقیح به محیط کشت حداقل نمک (MS) شامل $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (0.02%)، KH_2PO_4 (0.2%)، K_2HPO_4 (0.7%) و $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.1%)، گلیسرول به میزان ۰/۴ درصد به عنوان منبع کربنی اضافه شد. برای منبع پروتئین پیتون ۰/۵٪ استفاده و pH محیط روی ۷/۲، ۸ و ۸/۵ تنظیم شد. دمای انکوباتور شیکر دار روی ۲۸، ۲۶، ۲۴ سلسیوس تنظیم و ۷۲ ساعت نگهداری شد (Liao & McCallus, 1998).

سنجش فعالیت آنزیم

باکتری های رشد کرده در محیط فوق به وسیله سانتریفیوژ ($10400 \times g$ و ۲۰ دقیقه) رسوب داده شدند و محلول رویی برای سنجش فعالیت آنزیم استفاده شد. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنزیمی بدست آمده به ۱۵۰ میکرولیتر محلول کازئین ۱٪ تهیه شده در بافر تریس حاوی غلظت مشخصی از کلرید کلسیم، اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شد. سپس ۲۵۰ میکرولیتر محلول تری کلرواستیک اسید ۱۰٪ ($\text{Trichloroacetic acid}$) به مخلوط واکنش اضافه گردید تا واکنش متوقف شده و همچنین کازئین های هیدرولیز نشده باقیمانده، رسوب کند. پس از گذشت ۳۰ دقیقه در دمای چهار درجه سلسیوس، مخلوط واکنش را در $14000 \times g$ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ کرده و جذب ۲۸۰ نانومتر محلول رویی بعنوان معیاری از فعالیت آنزیمی در نظر گرفته شد. مخلوط

گیاهچه چهار برگی گوجه فرنگی رقم فلات در گلدان حاوی خاک سترون قرار داده شد. پس از گذشت دو ماه، تخم نماتد از ریشه های آلوده با استفاده از هیپوکلرید سدیم پنج درصد استخراج شد (Hussy & Baker, 1973) برای تعیین گونه نماتد، از انتهای بدن نماتد ماده به روش (Eisenback et al., 1981) برش تهیه و مشخصات ریختی آن بررسی گردید.

تهیه باکتری

چهار ایزوله باکتریایی *Bacillus subtilis*، *Bacillus velezensis*، *Pseudomonas fluorescens* و *megaterium* از موسسه تحقیقات آب و خاک تهران تهیه گردید و روی محیط کشت NA (Nutrient Agar)، به صورت مخطط کشت گردید. تک کلنی های خالص، مجدداً به صورت چمنی بر سطح محیط مذکور پرورش داده شدند. سوسپانسیون غلیظی از هر ایزوله باکتریایی، در محلول فسفات نمکی در دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شد (Liao & Shollenberger, 2003).

بررسی اثر ایزوله باکتریایی های مختلف بر نماتد ریشه گری در آزمایشگاه

دو میلی لیتر از سوسپانسیون 10^8 CFU/ml از هر ایزوله باکتریایی به حدود ۱۰۰ لارو سن دو تازه تفریخ شده نماتد اضافه و آب مقطر استریل به عنوان شاهد استفاده و در دمای ۲۷ درجه سلسیوس نگهداری شدند. تعداد لاروهای مرده پس از ۴۸ ساعت شمارش و میزان مرگ و میر به صورت درصد تعیین شد (Ashoub & Amara, 2010). این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تیمار و سه تکرار انجام شد.

بررسی مکانیسم های بازدارندگی استرین های باکتریایی آنتاگونیست نماتد مولد ریشه گری

بررسی تولید آنزیم پروتئاز توسط باکتری ها

محیط کشت حاوی پنج درصد شیر بدون چربی با ۱/۵ درصد آگار تهیه شد. باکتری ها بصورت نقطه ای روی آن کشت و در دمای ۲۷ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت در

پروتئازی مشخص می‌گردد، برای انجام این بررسی روش Lidija et al. (2010) با کمی اصلاحات انجام گرفت، محلول آنزیم مورد نظر را در بافر تریس ۵۰ mM با pH ۸ رقیق کرده و سپس بازدارنده به میزان ۵ mM بر محلول آنزیم افزوده شده و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شد. سپس فعالیت آنزیم توسط اسپکتوفتومتر در طول موج ۲۸۰nm به روش گفته شده مورد سنجش قرار گرفت. پس از بررسی تاثیر بازدارنده روی غیر فعال‌سازی آنزیم مورد نظر طبق روش ذکر شده در بالا، جهت تعیین تاثیرگذاری این ترکیب روی نماتد عامل بیماری به کار گرفته شد.

بررسی اثر ایزوله باکتریایی‌ها بر نماتد ریشه‌گرهی در گلخانه

نشاهای چهار برگگی گوجه‌فرنگی به گلخانه منتقل گردید. از باکتری‌های کشت شده روی محیط کشت NB، سوسپانسیون با غلظت 10^8 سلول باکتری در هر میلی‌لیتر تهیه شد. سپس ۵۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری در پای هر نشا اضافه گردید. ابتدا چهار سوراخ به عمق پنج سانتی‌متر در اطراف ریشه نشا گوجه‌فرنگی ایجاد، سپس ۵۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری در آن‌ها تزریق و روی سوراخ‌ها پوشانده شد. پس از گذشت ۷ روز جهت استقرار و تکثیر شدن باکتری‌ها در خاک، سوسپانسیون حاوی ۲۰۰۰ لارو سن دوم نماتد به خاک افزوده شد. نشاها در شرایط گلخانه با رطوبت نسبی ۶۰ تا ۹۰ درصد و دمای ۲۵-۲۷ درجه سلسیوس نگهداری شدند. دو ماه پس از اعمال تیمارهای آزمایشی، ریشه‌ها از خاک خارج و وزن خشک و تر ریشه، ارتفاع توزین و اندازه‌گیری شد. جهت بررسی شاخص‌های بیماری‌زایی، ریشه‌های خارج شده شستشو داده شدند. سپس به قطعه‌های دو سانتیمتری تقسیم و به طور تصادفی میزان یک گرم از ریشه‌های آلوده جدا و رنگ آمیزی شدند. تعداد گال‌ها، توده تخم و جمعیت تخم و لارو در یک گرم ریشه توسط شمارش شد. جهت استخراج لارو سن دوم نماتد از خاک، از روش سینی وایت هد استفاده شد (Whitehead & Hemming, 1965). استخراج تخم، به

مشابهی با این تفاوت که TCA ۱۰٪ ابتدا به محلول سوبسترا افزوده شده و سپس محلول آنزیمی را به آن می‌افزاییم، بعنوان شاهد در نظر گرفته شد (Pazhang et al., 2006).

تغلیظ آنزیم

باکتری‌های رشد داده شده به مدت ۷۲ ساعت ابتدا توسط سانتریفیوژ ۴۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه رسوب داده شدند. سپس محلول رویی حاصل در داخل انکوباتور شیکردار در دمای چهار درجه سلسیوس قرار داده شد و نمک آمونیوم سولفات با غلظت نهایی ۵۰ درصد به عصاره باکتری اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در این شرایط قرار داده شد. سپس این محلول توسط سانتریفیوژ یخچال‌دار در ۱۴۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد که رسوب حاصل حاوی آنزیم تغلیظ شده بود (Lidija et al., 2010). این روش علاوه بر تغلیظ موجب حذف قسمتی از ناخالصی‌های مخلوط می‌شود رسوب حاصل برای آزمایشات بعدی در فریزر ۲۰- سلسیوس نگهداری شد.

تاثیرگذاری پروتئاز تغلیظ شده روی نماتدهای عامل ریشه‌گرهی

بعد از تغلیظ پروتئاز به روش بالا جهت تعیین تاثیرگذاری و اثبات موثر بودن این ترکیب روی نماتد عامل بیماری، ۱۰۰ میکرولیتر از این ترکیب را روی یک سی‌سی، حاوی ۵۰ عدد نماتد سالم در یک تیوب پنج سی سی ریخته شد و در دمای ۲۷-۲۵ °C قرار داده شد. جهت به دست آوردن بهترین زمان تاثیرگذاری پروتئاز، تیوب‌ها، بین ۱۲-۱ ساعت و برای هر ساعت یک تیوب بررسی و تلفات نماتد شمارش شد. برای شاهد به جای پروتئاز از آب مقطر استریل و آمونیوم سولفات ۱۰٪ به صورت جداگانه استفاده شد. آزمایش در سه تکرار انجام شد.

بررسی تاثیر بازدارنده‌های آنزیم پروتئاز

برای این منظور از بازدارنده Ethylene Diamine (EDTA) Tetra Acetic acid استفاده شد که این ماده فعالیت آنزیم متالوپروتئاز را مهار می‌کند. که به این ترتیب گروه

(perennial pattern) به همراه ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی نماتد ماده و لارو سن دوم با استفاده از کلید شناسایی (Eisenback et al., 1981) گونه نماتد، *M. incognita* تشخیص داده شد.

مطالعات آزمایشگاهی

تأثیر باکتری‌های مورد مطالعه روی ۱۰۰ عدد لارو سن دوم نماتد تازه تفریخ شده، انجام گرفت. نتایج آزمون نشان داد که بین تیمارها اختلاف معنی داری در سطح احتمال یک درصد وجود دارد. در این بین، باکتری *P. fluorescens* و *B. subtilis* بیشترین تأثیر را بر مرگ و میر لاروها داشتند به گونه‌ای که بالاترین میانگین مرگ و میر لاروها به ترتیب با ۸۸/۱۲ و ۷۸/۹۳ درصد را به خود اختصاص دادند. بعد از آن سایر تیمارهای باکتریایی با اختلاف معنی دار در سه زمان مذکور، در سطح آماری مجزا با شاهد قرار گرفتند (نمودار ۱).

روش هوسی و بارکر انجام گردید (Hussey & Barker, 1973) و تخم و لارو استخراج شده شمارش شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام و برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد.

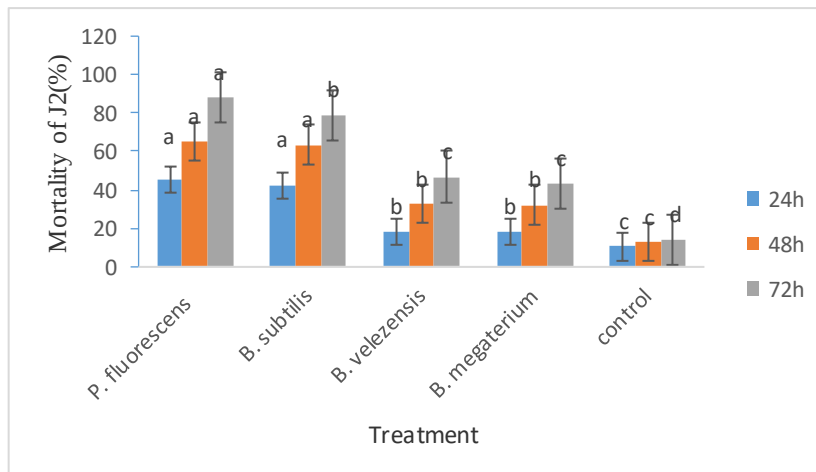
تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

به منظور تجزیه و تحلیل داده‌های آماری برای شاخص‌های مورد مطالعه از لحاظ نرمال بودن و منحنی توزیع یکنواختی واریانس، از نرم افزار SAS نسخه ۹/۴ استفاده گردید. به منظور مقایسه میانگین داده‌ها، از آزمون توکی در سطح احتمال پنج درصد و همچنین برای رسم جداول و گراف‌ها به ترتیب از نرم افزارهای WORD و EXCEL استفاده شد.

نتایج

شناسایی گونه نماتد ریشه گرهی

پس از جداسازی و استخراج نماتد مولد ریشه گرهی، بر اساس برش شبکه کوتیکولی انتهای بدن نماتد ماده



نمودار ۱ - تأثیر باکتری‌های بر درصد مرگ و میر لاروها در شرایط آزمایشگاه. تیمارهای دارای حروف یکسان، فاقد اختلاف معنی دار با یکدیگر هستند ($p < 0.01$)

Fig. 1. The effects of bacteria on the mortality percent of nematode juveniles in laboratory conditions. Treatments with the similar letters have no significant difference ($p < 0.01$).

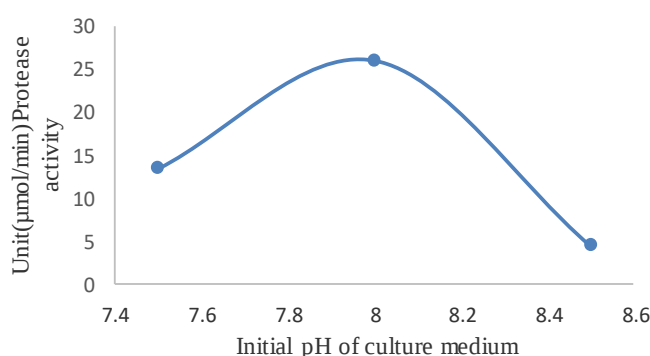
بررسی تولید آنزیم پروتئاز

در ابتدا برای بررسی وجود یا عدم وجود تولید پروتئاز بوسیله باکتری های آنتاگونیست آزمون پروتئاز انجام شد. هر ۴ ایزوله باکتریایی تولید پروتئاز کردند اما میزان هاله تشکیل شده در آنها متفاوت بوده است. میزان هاله در ایزوله باکتریایی های *B. velezensis*، *B. subtilis*، *P. fluorescens* و *B. megaterium* به ترتیب با ۱۳، ۱۱/۵، ۶/۵ و ۵/۳ میلی متر مشاهده گردید. بر اساس دو آزمایش بالا دو باکتری *B. subtilis* و *P. fluorescens* برای ادامه تحقیق استفاده شد.

شرایط مناسب برای تولید آنزیم پروتئاز توسط

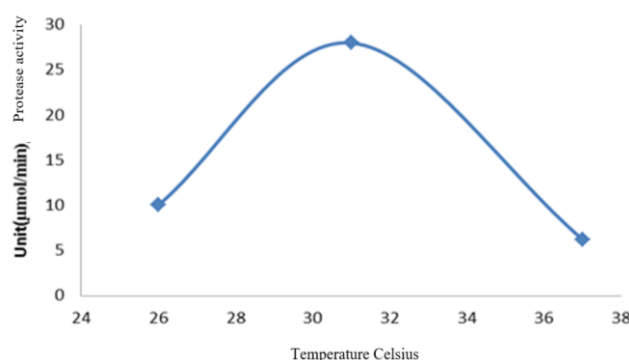
باکتری های منتخب

در ایزوله باکتریایی *B. subtilis* سه فاکتور مختلف در میزان فعالیت آنزیمی (یا میزان تولید پروتئاز) مورد بررسی قرار گرفت. ایزوله باکتریایی مذکور در PH ۸، دمای ۳۲ درجه سلسیوس و با گذشت ۱۲ ساعت پس از تلقیح روی محیط کشت ذکر شده، بیشترین میزان آنزیم را تولید کرد (نمودار ۲، ۳ و ۴).



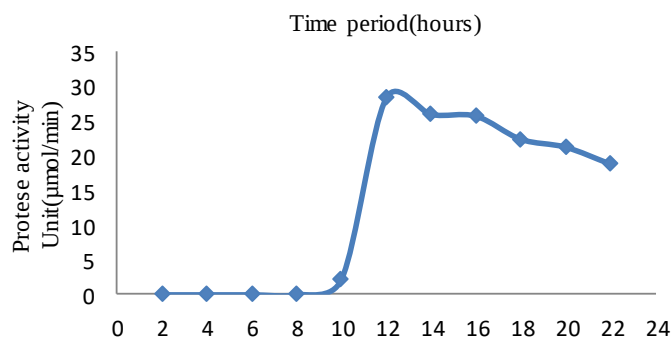
شکل ۲- تاثیر pH اولیه محیط کشت در تولید آنزیم پروتئاز توسط ایزوله باکتریایی *Bacillus subtilis*

Fig. 2. Effect of initial pH of the culture medium on protease enzyme production by *Bacillus subtilis* strain



شکل ۳- تاثیر دما در تولید آنزیم پروتئاز توسط ایزوله باکتریایی *Bacillus subtilis*

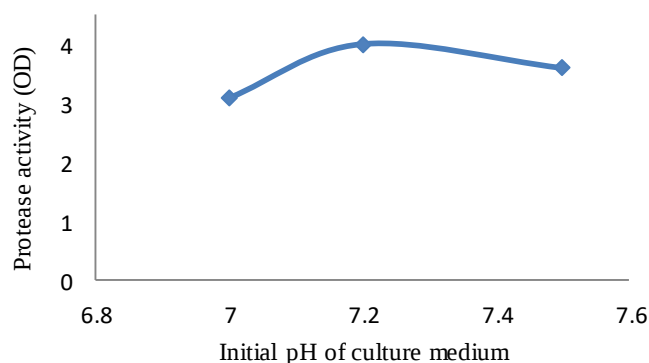
Fig. 3. Effect of temperature on protease enzyme production by *Bacillus subtilis* strain



شکل ۴- تاثیر دوره زمانی در تولید آنزیم پروتئاز توسط ایزوله باکتریایی *Bacillus subtilis* در دمای ۳۲ درجه سلسیوس

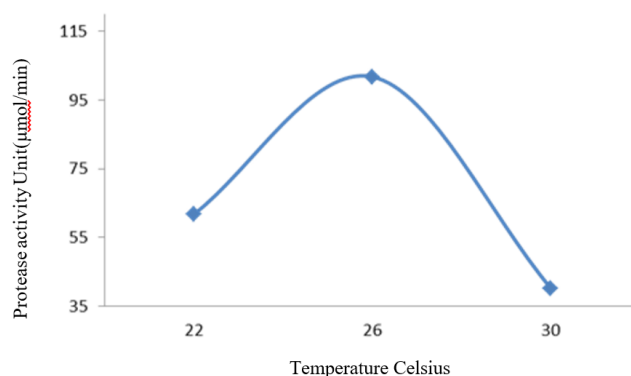
Fig. 4. Effect of time period on protease enzyme production by *Bacillus subtilis* strain at 32°C

در ایزوله باکتریایی *P. fluorescens* تحت شرایط بهینه ۷/۲ از تلقیح محیط کشت بیشترین میزان تولید آنزیم را نشان داد
pH، دمای ۲۶ درجه سلسیوس و با گذشت ۷۲ ساعت بعد (نمودار ۵، ۶، ۷).



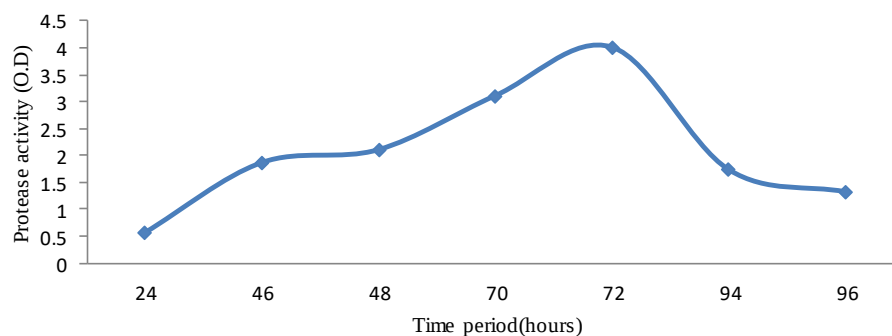
شکل ۵- تاثیر pH اولیه محیط کشت در تولید آنزیم پروتئاز توسط ایزوله باکتریایی *Pseudomonas fluorescens*

Fig. 5. Effect of initial pH of the culture medium on protease enzyme production by *Pseudomonas fluorescens* strain



نمودار ۶- تاثیر دما در تولید آنزیم پروتئاز توسط ایزوله باکتریایی *Pseudomonas fluorescens*

Fig. 6. Effect of temperature on protease enzyme production by *Pseudomonas fluorescens* strain



نمودار ۷- تاثیر دوره زمانی در تولید آنزیم پروتئاز توسط ایزوله باکتریایی *P. fluorescens*

Fig.7. Effect of time period on protease enzyme production by *P. fluorescens* strain

تاثیرگذاری پروتئاز روی نماتد

ساعت به میزان ۸۸/۸۶ درصد باعث مرگ و میر نماتدها گردید. در این بررسی از سولفات آمونیوم ۱۰٪ و آب مقطر به عنوان شاهد منفی استفاده شد (جدول ۱).

ایزوله باکتریایی *P. fluorescent* بعد از گذشت هشت ساعت از تلقیح آنزیم به میزان ۱۰۰ درصد باعث مرگ و میر نماتدها گردید. ایزوله باکتریایی *B. subtilis* بعد از ۱۲

جدول ۱- درصد مرگ و میر لاروهای نماتد ریشه‌گرهی متاثر از آنزیم پروتئاز باکتری‌های منتخب آنتاگونیست

Table 1. Percentage of mortality of root-knot nematode larvae affected by protease enzymes of selected antagonist bacte

Sterile distilled water	10% Ammonium sulfate	<i>B. subtilis</i>	<i>P. fluorescent</i>	Bacterial strain Hours
Mortality rate of nematode larvae				
5	5	61.91±0.81	80.09±0.17	2
5	5	76.78±0.72	89.23±0.07	4
8	8	86.91±0.75	94.36±0.22	6
8	8	86.92±0.2	100	8
8	8	88.26±0.25	100	10
8	8	88.86±0.5	100	12

تعیین نوع آنزیم پروتئاز

تمامی شاخص‌های مورد بررسی تعداد گال در کل ریشه، تعداد کیسه تخم در کل ریشه، تعداد تخم نماتد در یک گرم ریشه، جمعیت لاروسن دوم در ۱۰۰ گرم خاک، تعداد تخم موجود در کیسه تخم و شاخص گال (Gall index)، در سطح احتمال یک درصد، اختلاف آماری معنی‌داری بین تیمارها و شاهد آلوده وجود داشت. مقایسه جدول میانگین داده‌ها مشخص نمود که استفاده از دو باکتری *P. fluorescent* و *B. subtilis* در کاهش تعداد گال در کل ریشه، تعداد کیسه تخم در کل ریشه، تعداد تخم در یک

در تاثیر بازدارنده EDTA روی آنزیم تولید شده مشاهده شد که این ترکیب باعث غیر فعال شدن آنزیم و عدم تاثیر عصاره حاصل از باکتری روی نماتد گردید این بازدارنده و آب به عنوان شاهد منفی استفاده شدند (جدول ۲).

تاثیر باکتریایی آنتاگونیست بر شاخص‌های بیماری‌زایی نماتد در شرایط گلخانه

گرم ریشه از نظر آماری تاثیر یکسان (یا مشابهی) داشتند. در تخم موجود در کیسه تخم *P. fluorescent* به ترتیب با دو فاکتور تعداد لارو سن دوم در ۱۰۰ گرم خاک و تعداد ۹۶۹/۶ و ۳۸۸/۲ کنترل کنندگی بیشتری داشت (جدول ۳).

جدول ۲- درصد مرگ و میر لاروهای نماتد متاثر از آنزیم پروتئاز و باز دارنده EDTA بعد از گذشت ۱۲ ساعت از زمان تلقیح

Table 2. Percentage of mortality of nematode larvae affected by protease enzyme and EDTA inhibitor after 12 hours from inoculation

Mortality rate of nematode larvae	Bacterial strain
12.34±0.81	<i>P. fluorescent</i> +EDTA
11.68±0.21	<i>B. subtilis</i> +EDTA
100	<i>P. fluorescent</i>
88±0.68	<i>B. subtilis</i>
8±0.71	Sterile distilled water

جدول ۳- مقایسه میانگین تاثیر تیمارهای آزمایشی روی شاخص های بیماری زائی نماتد *M. incognita* روی گیاه گوجه فرنگی در شرایط گلخانه

Table 3. Comparison of the average effect of experimental treatments on the pathogenicity indices of *M. incognita* nematode on tomato plants under greenhouse conditions

Indicators to be tested						Treatment
(Gall index)	Reduction eggs in egg mass	Reduction of juveniles (J2s)100 g/soil (%)	Number of eggs per gram of root	The number of egg mass in the whole root	Number of galls in the whole root	
3 ^a	1108.8 ^a	2837.2 ^a	63 ^a	275.8 ^a	125.2 ^a	Inoculated control
2 ^b	388.2 ^c	969.6 ^c	33.4 ^b	75.4 ^b	66.8 ^b	<i>P. fluorescent</i> + Nematode
2 ^b	420.8 ^b	1350.4 ^b	34.6 ^b	77.4 ^b	58.2 ^b	<i>B. subtilis</i> + Nematode

بر اساس آزمون توکی (Tukey)، میانگین ها با حروف مشابه در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی داری ندارند.

According to the Tukey test, means with the same letters are not significantly different at the 1% probability level.

وزن تر اندام هوایی و وزن خشک اندام هوایی دو باکتری بر اساس نتایج آماری پایین تر از شاهد سالم و بالاتر از شاهد آلوده قرار گرفتند در فاکتور زراعی وزن تر ریشه و وزن خشک ریشه *P. fluorescent* به ترتیب با ۱۹/۲ و ۴/۱۲ بالاتر از *B. subtilis* و شاهد آلوده و پایین از شاهد سالم قرار گرفت (جدول ۴).

تاثیر باکتریایی آنتاگونیست بر شاخص های مورفولوژیکی، زراعی گیاه در شرایط گلخانه

در این تحقیق مشاهده گردید دو باکتری مورد بررسی همه فاکتورهای زراعی را نسبت به شاهد آلوده افزایش داده و از این نظر در گروه آماری بالاتری نسبت به شاهد آلوده قرار دادند. در تیمار باکتری *P. fluorescent* طول و حجم ریشه با شاهد سالم در یک گروه آماری قرار گرفت. ارتفاع بوته،

جدول ۴- مقایسه میانگین تاثیر تیمارهای آزمایشی روی شاخص‌های رشدی گیاه گوجه‌فرنگی در شرایط گلخانه

Table 4. Comparison of the average effect of experimental treatments on tomato plant growth indices under greenhouse conditions

Indicators tested							Treatment
Root mass (cm ³)	Root dry weigh (g)	Root fresh weigh (g)	Root length (cm)	Stem dry weigh (g)	Stem fresh weigh (g)	Stem length (cm)	
33.2 ^a	4.44 ^a	22.4 ^a	20.6 ^a	7.52 ^a	37.6 ^a	48 ^a	Control
16.2 ^d	1.52 ^d	8 ^d	8.4 ^b	4.54 ^c	25 ^b	29.2 ^c	Inoculated control
36 ^a	4.12 ^b	19.2 ^b	20.4 ^a	6.56 ^b	33.4 ^a	42.4 ^b	<i>P. fluorescens</i>
31 ^b	3.62 ^c	14.8 ^c	20.4 ^a	6.4 ^b	32.6 ^a	41.2 ^b	<i>B. subtilis</i>

بحث

را ایجاد کردند مورد بررسی قرار گرفتند. باکتری‌ها قادر به تولید پروتئاز خارج سلولی بودند و قادر به تجزیه و لیز کردن کوتیکول و محتویات داخل بدن نماتد هستند. تولید پروتئاز خارج سلولی بوسیله *P. fluorescens* M114 قبلاً گزارش شده بود (Adams et al., 1994). استرین *Pseudomonas fluorescens* CHA0 همانند دیگر استرین‌های سودوموناس‌ها تولید متابولیت‌هایی چون 2,4-diacetylphloroglucinol، hydrogen cyanide و pyoluteorin می‌کردند که نقش مهمی در کنترل بیولوژیک دارند. سنتز این مواد بستگی به جمعیت عوامل آنتاگونیستی و شرایط محیطی دارد (Siddiqui et al., 2007). ایزوله باکتریایی *P. fluorescens* در دمای ۲۶ درجه سلسیوس و pH ۷/۲ پس از گذشت ۷۲ از تلقیح محیط کشت قادر به تولید بیشترین آنزیم پروتئازی بود. دمای مناسب رشد برای سودوموناس‌ها ۲۷ درجه سلسیوس می‌باشد. بیشترین تولید پروتئاز هم در همین دما رخ می‌دهد. در دمای ۳۱ درجه سلسیوس میزان تولید به میزان ۵۰٪ کاهش می‌یابد و معمولاً در دمای ۳۲ درجه سلسیوس تولید آنزیم متوقف می‌شود (McKellar & Cholette, 1987). با این وجود در زمینه مکانیسم‌های تنظیمی دما توسط باکتری اطلاعات کمی وجود دارد. نتایج بعضی تحقیقات نشان داده است که ایزوله باکتریایی *P. fluorescens* LS107d2 در دمای ۲۹ درجه سلسیوس تولید پروتئاز می‌کند. دمای بهینه برای رشد این باکتری ۲۵ درجه سلسیوس است که نشان می‌دهد در دمای کمی

نماتدهای موجود در خاک توسط تعدادی از باکتری‌ها و قارچ‌های خاکری آلوده می‌شوند (Haas et al., 2003). این باکتری‌ها می‌توانند به کوتیکول نماتدها نفوذ کرده، آنها را آلوده کنند و باعث کشتن آنها شوند (Huang et al., 2005). در این تحقیق چهار ایزوله باکتریایی، سه گونه *Bacillus* و یک *P. fluorescens* استفاده شد. *P. fluorescens* و *B. subtilis* به ترتیب با ۸۸/۱۲ و ۷۸/۹۳ درصد بیشترین میزان مرگ و میر لارو سن دوم نماتد ریشه‌گرهی شدند. طبق منابع دیگر، ... *Bacillus* توانست در شرایط آزمایشگاهی نماتد *P. redivivus* را بعد از ۸۴ ساعت به میزان ۸۵ درصد نابود نماید (QiuHong et al., 2006) و نیز *B. subtilis* در شرایط آزمایشگاه توانسته بود میزان مرگ و میر *Meloidogyne* spp. را تا حد ۵۰٪ افزایش دهد. نتایج دیگر روی *M. javanica* گیاه زیتون نشان داده بود هشت ایزوله باکتریایی *P. fluorescens* قادر بودند بیش از ۵۰ درصد از نماتد عامل بیماری را در شرایط آزمایشگاهی کنترل کنند. در تحقیق دیگری خاصیت نماتدکشی *P. fluorescens* بر لارو سن دوم *M. javanica* نیز در شرایط آزمایشگاه و گلخانه به اثبات رسیده است (Siddiqui et al., 2007). تمامی ایزوله باکتریایی باکتریایی‌های مورد آزمایش در محیط آگار-کازئین قادر به تجزیه کازئین بودند که نشان دهنده تولید آنزیم پروتئاز بود. جهت آزمایشات بعدی دو ایزوله باکتریایی *P. fluorescens* و *B. subtilis* که بیشترین هاله

بیشتر از دمای بهینه رشد این باکتری به حداکثر تولید پروتئاز خود می‌رسد. نتایج این تحقیق با نتایج تحقیقات پیش از این همخوانی داشت. پروتئاز تولید شده در ایزوله باکتریایی این تحقیق و بررسی‌های مشابه از گروه متالوپروتئازها می‌باشد (Siddiqui et al., 2005). ایزوله باکتریایی *Bacillus subtilis* بیشترین تولید آنزیم را در دمای ۳۲، pH هشت و بعد از گذشت ۱۲ ساعت داشته است. (Al-Shehri et al., 2004) گزارش کرده‌اند که تولید پروتئاز به وسیله *B. licheniformis* در pH هشت، در ۵۰ سلسیوس به بیشترین فعالیت آنزیمی خود می‌رسد. برای شناسایی بهترین تولیدکنندگان پروتئاز از ایزوله باکتریایی‌های مختلف باکتریایی چون *Staphylococcus* *B. subtilis*، *B. cereus*، *B. megaterium*، *epidermidis* استفاده شده بود که تولید پروتئاز خارج سلولی روی محیط کشت آگار- کازئین می‌کردند. ایزوله باکتریایی *B. subtilis* EFRL 01 به عنوان ایزوله باکتریایی برتر انتخاب شد چون بیشترین میزان تولید پروتئاز را در دمای ۳۷ درجه سلسیوس بعد از ۶ ساعت از تلقیح محیط کشت حاوی گلوکز ۱٪ داشت (Alagarsamy et al., 2005). بررسی روی میزان تاثیرگذاری این دو ایزوله باکتریایی *P. fluorescens* و *B. subtilis* بر میزان مرگ و میر نماتد عامل بیماری نشان داد که ایزوله باکتریایی *P. fluorescens* بعد از گذشت هشت ساعت از زمان تلقیح آنزیم روی نماتد عامل بیماری موجب مرگ و میر نماتد در حد ۱۰۰٪ شدند. در مورد ایزوله باکتریایی *B. subtilis* این میزان بعد از گذشت ۱۲ ساعت به ۸۸/۸۶٪ رسید. در تحقیقی دو ایزوله باکتریایی *Bacillus sp.* B16 و *B. laterosporus* G4 دارای قدرت تولید آنزیم پروتئاز می‌باشند که خاصیت تجزیه‌کنندگی کوتیکول نماتد ریشه‌گرهی را دارند. استرین‌های مختلف باسیلوس که روی نماتد *Panagrellus redivivus* اثر داده شده بودند بعد از ۱۰ ساعت به میزان ۹۰-۱۰۰ درصد باعث مرگ و میر نماتدها شدند. مکانیسم اصلی تاثیرگذاری این باکتری‌ها آنزیم پروتئاز بوده است. باکتری باسیلوس بعد از دو ساعت ۸۰ درصد نماتد غده را

کشت و بعد از ۱۲ ساعت باعث مضمحل شدن تمامی نماتدها گردید. پروتئاز تولید شده توسط ایزوله باکتریایی‌های AJ-3 و Rh3 به ترتیب ۲۵ الی ۵۳ درصد مرگ و میر را در لاروهای نماتد ریشه‌گرهی گوجه‌فرنگی بعد از ۴۸ ساعت از مدت تلقیح نشان داده‌اند (Tariq et al., 2011). استرین *P. fluorescens* CHA0 قابلیت کنترل نماتد ریشه‌گرهی را در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه داشت. با حذف ژن تولیدکننده پروتئاز از این استرین توانایی این باکتری در کنترل نماتد ریشه‌گرهی شدیداً کاهش یافت (Siddiqui et al., 2005). مهارکننده EDTA تقریباً بطور کامل فعالیت پروتئازهای تولیدی توسط دو باکتری مورد مطالعه را مهار نمود. تاثیر این مهار کننده روی آنزیم‌ها نشان‌دهنده تعلق آن‌ها به گروه متالوپروتئاز می‌باشد.

در تحقیقات بشیری و همکاران مشاهده شد که باکتری‌های آنتاگونیست میزان کنترل‌کنندگی آن‌ها در شرایط آزمایشگاه و گلخانه متفاوت بود (Bashiri et al., 2012). در تحقیق حاضر نسبت کنترل‌کنندگی باکتری‌ها در آزمایشگاه و گلخانه به یک نسبت تغییر نمود. ایزوله باکتریایی *B. subtilis* تمامی فاکتورهای زراعی گوجه‌فرنگی را نسبت به شاهد آلوده افزایش داد. این باکتری در فاکتورهای طول ریشه و وزن تر اندام هوایی با شاهد سالم در یک گروه آماری قرار گرفتند. تاثیرگذاری این باکتری نسبت به *P. fluorescens* در بعضی از نتایج پایین تر بود که شاید به دلیل تفاوت در مکانیسم‌های مهارکنندگی آن باشد. در تحقیقی روی گیاه لوبیا چشم بلبلی و در راستای کنترل نماتد *M. javanica* توسط گونه‌های باسیلوس مشاهده شد که طول ساقه، طول ریشه، وزن ساقه و ریشه تحت تاثیر باکتری‌های آنتاگونیست نسبت به تیمار شاهد آلوده به نماتد افزایش پیدا کردند (Dawar et al., 2008). در استرین‌های *P. Fluorescens* نیز تمامی مکانیسم‌های ذکر شده و همچنین تولید سیدروفور به عنوان عوامل تحریک رشد گیاه عنوان شده‌اند (Weller, 1988). در بررسی انجام شده روی لوبیا نشان داده شد که تمام خصوصیات مرفولوژی گیاه نسبت به تیمار شاهد آلوده در

جمعیت نماتد و کاهش آلودگی عامل بیماری‌زا شدند (Siddiqui et al., 2005). در تحقیقی که اثر دو باکتری *B. subtilis* و *P. fluorescens* روی لویا چشم بلبلی در کنترل نماتد غده بررسی شد، این دو باکتری حدود ۷۰ درصد کنترل‌کنندگی در خاک گلدان داشتند (Abd-El-Khair et al., 2019).

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که دو باکتری *B. subtilis* و *P. fluorescens* توانایی کنترل‌کنندگی مناسبی روی نماتد گرهی ریشه دارند و باعث افزایش فاکتورهای زراعی می‌شوند که نشان‌دهنده کنترل‌کنندگی و محرک رشد بودن این دو باکتری می‌باشد. بر اساس نتایج حاصل آنزیم پروتئاز در ارتباط با این دو باکتری فاکتور بسیار مهمی در کنترل‌کنندگی آنها می‌باشد.

سپاسگزاری

در پایان نگارنده از همکاری صمیمانه دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت در حمایت از تحقیق صمیمانه تشکر می‌نماید.

مقایسه تیمار باکتری (*P. fluorescens*) افزایش پیدا نمود. در تحقیق حاضر تمام فاکتورهای زراعی نسبت به شاهد آلوده در سطح بالاتری قرار گرفت و در فاکتورهای وزن تر اندام هوایی، طول ریشه و حجم ریشه در کنار شاهد قرار گرفتند که نشان از مکانیسم‌های موثر در کنترل نماتد و فاکتورهای محرک رشد در این باکتری داشت. باکتری‌های *B. subtilis* و *Pseudomonas* روی نماتد غده کاهش باعث افزایش وزن ریشه و ساقه نسبت به تیمار آلوده نماتد شدند اما میزان آنها کمتر از شاهد سالم بود (Prakob et al., 2009). Hanna et al. (1999) اظهار نظر کردند که اضافه کردن *P. fluorescens* به خاک آلوده به نماتد غده در محصول گوجه‌فرنگی باعث کاهش تعداد و حجم غده‌ها می‌شود. *P. fluorescens* باعث کاهش نفوذ نماتد به گیاه میزبان می‌شوند. منظم و همکاران در بررسی تاثیر *P. fluorescens* روی نماتد ریشه‌گرهی گوجه‌فرنگی به این نتیجه رسیدند که این باکتری بیشترین کنترل‌کنندگی را روی شاخص‌های آلودگی گال ریشه، تخم در هر گرم ریشه و لارو سن دوم داشته است (Monazami et al., 2022). باز در این رابطه تیمار گیاه ماش با باکتری *B. subtilis* در شرایط گلخانه و مزرعه نشان داده بود که باعث کاهش

References

- Abd-El-Khair, H., El-Nagdi, W.M.A., Youssef, M.M.A., A. Abd-Elgawad, M.M.M. & Dawood, M.G. 2019. Protective effect of *Bacillus subtilis*, *B. pumilus*, and *Pseudomonas fluorescens* isolates against root knot nematode *Meloidogyne incognita* on cowpea. Bulletin of the National Research Centre. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0108-8>.
- Adams, R.E. & Eichenmuller, J.J. 1963. A bacterial infection of *Xiphinema americanum* Phytopathology, 53: 745 (Abst).
- Alagarsamy, S., S. Chandran. S., George, S., Carlos, RS. & Ashok, P. 2005. Production and partial purification of a natural metalloprotease by Fungal mixed substrate fermentation. Food Technol. Biotechnol, 43(4): 313–319.
- Alshehri, A.M.M. & Yasser, S. 2004. Production of protease produced by *Bacillus licheniformis* isolated from Tihamet Aseer, Saudi Arabia. Pak. J. Biol.Sci., 7(9): 163–135.
- Ashoub, A. & Amara, H. 2010. Biocontrol activity of some bacterial genera against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. Journal of American Science, 6(10): 321–328.
- Bashiri, S., Jamali, S., Golmohammadi, M. & Tanhamaafi, Z. 2012. Effect of antagonistic bacteria on kiwifruit rhizosphere in control of root knot nematode (*Meloidogyne* spp.). University of Guilan. The thesis of master. (In Persian with English Summary).
- Blok, V.C., Jones, J.T., Phillips, M.S., & Trudgill, D.L. 2008. Parasitism genes and host range disparities in biotrophic nematodes: the conundrum of polyphagy versus specialisation. BioEssays, 30: 249–259. doi: 10.1002/bies. 20717.
- Davies, L.J. & Elling, A.A. 2015. Resistance genes against plant-parasitic nematodes: a durable control strategy? Nematology 17, 249–263. doi: 10.1163/15685411-00002877.
- Dawar, S., Tariq, M. & Zakim, M.J. 2008. Application of *Bacillus* species in control of *Meloidogyne javanica* (treub) chitwood on cowpea and mash bean. Pak. J. Bot., 40(1): 439–444.

- Eisenback, J.D., Hirschmann, H., Sasser, J.N. & Triantaphyllou, A.C. 1981. A guide to the four most common species of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.), with a pictorial key, p. 52.
- Elling, A.A. 2013. Major emerging problems with minor *Meloidogyne* species. *Hypopathology*, 103: 1092–1102. doi: 10.1094/PHYTO-01-13-0019-RVW
- Folasade, M., Olajuyigbe, J.O. & Ajele, E. 2005. Production dynamics of extracellular protease from *Bacillus* species. *African Journal of Biotechnology*, 4(8): 776–779.
- Food and Agriculture Organization (FAO). 2010. Plant genetic resource for food and agriculture. Rome, Italy, Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Giannakou, I.O. & Anastasiadis, I. 2005. Evaluation of chemical strategies as alternatives to methyl bromide for the control of root-knot nematodes in greenhouse cultivated crops. *Crop Prot.*, 24: 499–506. doi: 10.1016/j.cropro.2004.09.007.
- Hanna, A.I., Riad, F.W. & Tawfik, A.E. 1999. Efficacy of antagonistic rhizobacteria on the control of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* in tomato plants. *Egyptian J. Agriculture Research*, 77(4): 1467–1476.
- Haas, D. & Keel, C. 2003. Regulation of antibiotic production in rootcolonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 41: 117–153.
- Huang, X.W., Tian, B.Y., Niu, Q.H., Yang, J.K., Zhang, L.M. & Zhang, K.Q. 2005. An extracellular protease from *Brevibacillus laterosporus* G4 without parasporal crystal can serve as a pathogenic factor in infection of nematodes. *Res. Microbiol*, 156: 719–727.
- Hussey, R. & Barker, K. 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. *Plant Disease Report*, 57: 1025–1028.
- Kerry, B.R. 2000. Rhizosphere interactions and exploitation of microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes. *Annu. Rev. Phytopathol*, 38: 423–441
- Jin, N., Chen, Y.P., Liu, Q. & Jian, H. 2022. Research progresses in occurrence, diagnoses, pathogenic mechanisms and integrated management of vegetable root knot nematodes in China. *J. Plant. Dis. Protect.* 49, 424–438. doi: 10.13802/j. cnki. zwbhxb.2022.2022828
- Jin, N., Xue, H., Li, W.J., Wang, X.Y., Liu, Q., Liu, S.S. 2017. Field evaluation of streptomyces rubrogriseus hdz-9-47 for biocontrol of *Meloidogyne incognita* on tomato. *J. Integr. Agr.* 16, 1347–1357. doi: 10.1016/S2095-3119(16) 61553-8.
- Jordan, S. 2018. Yield to the resistance: the impact of nematode resistant varieties on alfalfa yield. *Nat. Resour. Model.* 31: e12150. doi: 10.1111/NRM.12150.
- Lahlali, R., Ezrari, S., Radouane, N., Kenfaoui, J., Esmael, Q. & El Hamss, H. 2022. Biological control of plant pathogens: a global perspective. *Microorganisms* 10:596. doi: 10.3390/microorganisms10030596.
- Liao, C.H. & Shollenberger, L.M. 2003. Survivability and long-term preservation of bacteria in water and in phosphate-buffered saline. *Letters in Applied Microbiology*, 37(1): 47–50.
- Liao, C.H. & McCallus, D.E. 1998. Biochemical and genetic characterisation of an extracellular protease from *Pseudomonas fluorescens* CY091. *Appl Environ Microbiol*, 64: 914–921.
- Lidija, I.Z., Gordana, G.C. & K. Ivanka, K. 2010. Isolation and partial characterization of protease from *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. *J. Serb. Chem. Soc*, 75(8): 1041–1052.
- McKellar, R.C. & Cholette, H. 1987. Effect of temperature shifts on extracellular proteinase-species mRNA pools in *Pseudomonas fluorescens* B52. *Appl Environ Microbiol*, 53: 1973–1976.
- Meyer, S.L.F. 2003. United States Department of Agriculture – Agricultural Research Service research programs on microbes for management of plant-parasitic nematodes. *Pest Manag Sci*, 59: 665–670
- Mhatre, P.H., Karthik, C., Kadirvelu, K., Divya, K.L. & Shanmuganathan, R. 2019. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a potential alternative tool for nematodes bio-control. *Biocatal. Agr. Biotech*, 17: 119–128. doi: 10.1016/j. bcab.2018.11.009.
- Monazam, K., Jamali, S. & Alimi, M. 2022. Efficacy of *Pseudomonas* and *Streptomyces* strains on control of root knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in tomato under greenhouse conditions. *Iranian Journal of Nematology / Vol. 1 / No. 1 / 2022 / 118–127*. (In Persian with English Summary).
- Nicol, J.M., Turner, S.J., Coyne, D.L., Den Nijs, L., Hockland, S. & Maafi, Z.T. 2011. Current nematode threats to world agriculture. In: Jones, J.T., Gheysen, G. & Fenoll, C. (Eds). *Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions*. Heidelberg, Germany, Springer, 21–44.
- Prakob, W., Nguen-Hom, J., Jaimasit, P., Silapapongpri, S., Thanunchai, J. & Chaisuk, P. 2009. Biological control of lettuce root-knot disease by the used of *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* and *Paecilomyces lilacinus*. *Journal of Agricultural Technology*, 5(1): 179–191
- Pazhang, M., Khajeh, K., Ranjbar, B. & Hosseinkhani, S. 2006. Effects of water-miscible solvents and polyhydroxy compounds on the structure and enzymatic activity of thermolysin. *J. Biotechnol.*, 127: 45–53.
- QiuHong, N., Xiaowei, H., Baoyu, T., Jinkui, Y.L. Jiang, Y., Lin, Z. & Z. Keqin, Z. 2006. *Bacillus* sp. B16 kills nematodes with a serine protease identified as a pathogenic factor. *Appl Microbiol Biotechnol*, 69: 722–730.

- Shahid, M., Gowen, S.R. & Burhan, M. 2022. Studies on the possible role of plant host on the development of root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* and *Pasteuria penetrans* as affected by different harvesting dates. *Plant Prot.* 6, 133–141. doi: 10.33804/pp.006.02.4207.
- Siddiqui, Z.A. & Mahmood, I. 1999. Role of bacteria in the management of plant parasitic nematodes: a review. *Bioresource Technol.* 69: 167–179.
- Siddiqui, I.A., Haas, D. & Heeb, S. 2005. Extracellular protease of *Pseudomonas fluorescens* CHA0, a biocontrol factor with activity against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Appl Environ Microbiol.* 71: 5646–5649.
- Siddiqui, I.A. Shaukat, S.S. Sheikh, I.H. & Khan, S. 2007. Role of cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in the suppression of root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* in tomato. *World J. Microbiology and Biotechnology*, 22(6): 641–650.
- Sikora, R.A. & Hoffmann-Hergarten, S. 1993. Biological control of plant parasitic nematodes with plant-health promoting rhizobacteria. *Biologically based technology* (Lumsden PD & Vaughn JL, eds), pp. 166–172. ACS Symposium series, USA.
- Tariq, J.A., Haq, M.i., Hafeez, F.Y., Sahi, S.T. & Khan, M.M. 2011. Potential of rhizobacteria for the biocontrol Of *Meloidogyne javanica*. *Pak. J. Agri., Agril. Engg, Vet. Sci.*, 27(1): 66–72
- Tian, B.Y., Yang, J.K., Lian, L.H., Wang, C.Y. & Zhang, K.Q. 2007. Role of neutral protease from *Brevibacillus laterosporus* in pathogenesis of nematode. *Appl Microbiol Biotechnol.* 74: 372–380.
- Wang, D., Wang, J., Su, P., Dai, J., Tan, X. & Zhang, D. 2022. Effects of dazomet combined with *Rhodopsesudomonas palustris* PSB-06 on root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* infecting ginger and soil microorganisms' diversity. *Front. Microbiol.* 13:1021445. doi: 10.3389/fmicb.2022.1021445.
- Weller, D.M. 1988. Biological control of soil-born plant pathogen in the rhizosphere with Bacteria. *Annual Review of Phytopathol.* 26: 379–407.
- Whitehead, A.G. & Hemming, J.R. 1965. A comparison of some quantitative methods of extracting small vermiform nematodes from soil. *Annual Applied Biology*, 55: 25–38.

Biological control of tomato root-knot nematode (*M. incognita*) using antagonist bacteria**Hadi Rahanandeh¹, Ezzatullah Sadaqat Far²**

1-Assistant Professor, Plant Pathology, Department, Islamic Azad University, Rasht Branch, Gilan, Iran.

2-Assistant Professor Plant Pathology, Department, Islamic Azad University, Arak branch, Markazi, Iran.

Corresponding author: Hadi Rahanandeh, email: Rahanandeh20@yahoo.com

Received: Jan., 25, 2025

12(1) 51–65

Accepted: Jul., 22, 2025

Abstract

Root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp., are one of the most economically important plant pathogenic nematodes that cause severe yield and quality reduction in agricultural products. The use of biological control agents is a safe and environmentally effective approach to control root-knot nematodes. Today, biological control of root-knot nematodes is considered a priority with the aim of reducing the dangerous effects of chemical toxins, including threats to human health and environmental pollution. One of the effective agents in biological control is bacteria. In this study, four species and four isolates of *Bacillus subtilis*, *Bacillus velezensis*, *Bacillus megaterium* and *Pseudomonas fluorescens* were used to control tomato root-knot nematodes under laboratory and greenhouse conditions. In laboratory conditions, the factors affecting bacteria on nematode mortality, protease enzyme production, temperature conditions, pH, time required for proper protease enzyme production, identification of the type of protease enzyme, the effect of this enzyme on nematode, and in greenhouse conditions, nematode infection indices including the number of galls, egg mass, larval and egg population per gram of root, the number of second-instar larvae per gram of soil, and the reproduction factor and the factors of height, dry and fresh weight of shoots, root length, fresh root weight, dry root weight, and mass volume were evaluated. A greenhouse study was conducted in a completely randomized design with three replications. Two bacteria *B. subtilis* and *P. fluorescens* had the greatest effect on larval mortality with 78.93 and 88.12 percent, respectively. In terms of protease enzyme production, two bacteria *B. subtilis* and *P. fluorescens* created the largest halo with 11.5 and 13 mm, respectively. In the *B. subtilis* strain, three different characteristics for protease production were investigated. The mentioned strain produced the highest amount of enzyme at pH 8, temperature 32°C and 12 hours after inoculation on the mentioned culture medium. The *P. fluorescens* strain showed the highest amount of enzyme production under optimal conditions of pH 7.2, temperature 26°C and 72 hours after inoculation of the culture medium. The protease enzyme produced by these two bacteria *B. subtilis* and *P. fluorescens* caused the death of the second-instar nematode larvae by 86.88% and 100% respectively in a certain time interval. EDTA prevented the activity of the protease enzyme. These two bacteria had a positive effect on agronomic factors in all greenhouse factors compared to the infected control and reduced the pathogenic factors of the nematode. The results of this study showed that the use of these two bacteria can be considered in nematode control.

Keywords: Antagonist, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, Bioindicators, Protease