آفات و بیماریهای گیاهی
جلد ۶۴، شماره‌های ۱ و ۲، بهمن ۱۳۷۵

بررسی اثر قارچ *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson در کنترل بیولوژیکی نماتد گره ریشه *Meloidogyne javanica* (Neal) Chitwood

Effect of *Paecilomyces lilacinus* (Thom) samson on biological control of *Meloidogyne javanica* (Neal) Chitwood on tomato

صدیقه فاطمی
موسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی

چکیده

تاثیر *P. Lilacinus* قارچ پارازیت نماتدها روی کنترل نماتد گره ریشه *M. javanica* در شرایط آزمایشگاهی، گلخانه ای و مزرعه روی گوجه فرنگی مورد بررسی قرار گرفت. ایزوله قارچ که از لارو حشره Aleurodidae جدا شده بود توانست در روی آگار ۱۰۰٪ ماده ژلاتینی حاوی تخم و حدود ۹۳٪ تخم های درون ماده ژلاتینی را آلوده نماید. تخمهای پارازیت شده همه در مراحل جنینی بوده و تخم‌های محتوی لارو سن یک و یا لاروهای سن دو توسط قارچ مزبور پارازیته نشدند. در آزمایش گلدانی تعداد توده تخم در روی ریشه و جمعیت نماتد در ریشه با افزودن قارچ کاهش نیافته و تقریبا همانند تیمار دارای نماتد بود. افزودن ۹×۱۰^{۶} اسپور در گرم خاک استریل اثر معنی داری در کاهش ایندکس گال و افزایش وزن گیاه در تیمار دارای نماتد به اضافه قارچ در مقایسه با تیمار نماتد ایجاد ننمود. در آزمایش میکروپلات، افزودن $۵/۲\times۱۰^{۶}$ اسپور در گرم خاک استریل دارای نماتد نتوانست وزن اندامهای هوایی و محصول میوه را در حد معنی‌دار بهبود بخشد. ایندکس گال هر دو تیمار دارای نماتد و نماتد و قارچ مانند هم بوده و جمعیت نماتد در ریشه و در خاک تیمار دارای قارچ و نماتد، اگرچه معنی‌دار نبوده، ولی کمتر از تیمار نماتد بدون قارچ بود.

مقدمه

میزان خسارت نماتدهای *Meloidogyne* و سایر نماتدها در دنیا ۵٪ تخمین زده شده است و این میزان در صورتی است که پراکندگی جمعیت نماتدها در همه جا یکسان فرض شود، در

این مقاله براساس گزارش نهایی طرح مصوب بررسی کنترل بیولوژیکی نماتد مولد غده ریشه *M. javanica* توسط قارچ *P. lilacinus* به شماره ۷۵۶-۷۱-۱۱-۱۰۷ تهیه گردیده است.

حالیکه عملا اینطور نبوده و بیشترین ضرر را (۲۵ تا ۵۰٪) مزارع کوچک کشورهای در حال رشد تحمل میکنند (Taylor & Sasser 1978).

در ایران گزارش دقیقی در مورد میزان خسارت نماتدها منتشر نشده است. پراکندگی گونه‌های جنس *Meloidogyne* از جمله *M. javanica* بر روی سبزیجات، گوجه‌فرنگی و درختان میوه از استانهای مختلف کشور گزارش گردیده است (*امیدوار*، ۱۳۴۷، *اخیانی* و همکاران، ۱۳۶۲).

در سالهای اخیر توجه زیادی به کاربرد عوامل مفید در استراتژی مدیریت کنترل نماتدها معطوف شده است زیرا استفاده از نماتدکشها نه تنها گران تمام میشود (Jatala *et al* 1979)، بلکه باقیمانده بعضی از سموم مانند aldicarb و fensulfothion نیز برای انسان و محیط زیست خطرناک میباشند (Webster, 1972). از طرفی یک روش به تنهایی نمیتواند اغلب گونه‌های مستقر در خاک راکنترل نماید.

قارچهای آنتاگونیست نماتدها اگرچه از قرن گذشته شناخته شده اند، گونه های کمی بعنوان عوامل موثر در کنترل بیولوژیکی نماتدهای گیاهی معرفی شده اند. مشکلات تکنیکی در کشت مصنوعی بعضی از این قارچها و دشوار بودن ارزیابی دقیق اثر آنتاگونیستی آنها بر روی نماتدهای مورد نظر در محیط پیچیده خاک روند تحقیقات را روی این عوامل مفید کند نموده است (Barron, 1977 Mankau, 1980). کشف قارچهای پارازیت تخم نماتدهای گیاهی نسبتا جدید میباشد (Jatala, 1985). گزارشات امیدوار کننده بسیاری دال بر وجود میزان قابل ملاحظه ماده ها و تخمهای پارازیت شده *Heterodera* spp در اروپا و ایالات متحده وجود دارد (Willcox & Tribe, 1974; Kerry, 1974, 1980; Kerry & Crump,1977; Morgan-Jones & Rodrigues-kabana, 1981 Nigh *et al* ., 1980). گروهی دیگر از نماتدهای پارازیت گیاهی که میتوانند مورد حمله قارچها قرار گیرند نماتدهای گره ریشه، جنس *Meloidogyne* میباشند که احتمالا بیش از سایر نماتدها در سرتاسر جهان پراکنده هستند (Sasser 1977).

مادهای *Meloidogyne* spp. تخمهای خود را بصورت دسته متراکمی که توسط ماده ژلاتینی احاطه میشود تولید مینمایند و چنانچه ماده ها و توده های تخم در سطح ریشه نمایان گردند در معرض تهدید دشمنان طبیعی، عمدتا قارچها قرار میگیرند (Kerry & Mullen, 1981).

ظاهرا اولین قارچ پارازیتی که در ارتباط با تخمهای *Meloidogyne* یافت گردیده *Dactylella oviparasitica* Stirling & Mankau بوده است. بنظر میرسد که قارچ توانسته جمعیت‌های *Meloidogyne* spp. را در باغات هلو درکالیفرنیا تا زیر آستانه خسارت اقتصادی کنترل نماید. (Stirling *et al.*, 1979; Stirling & Mankau, 1978 a).

یکی دیگر از قارچهایی که جنس ماده و تخم نماتدها را آلوده مینماید *P. lilacinus* (Thom) Samson میباشد. این قارچ حدود ۹۰-۷۰٪ تخمهای

Globodera pallida (Stone) Behrens و *M. incognita acrita* (Kofoid & White) Chitwood را در ریشه سیب‌زمینی در پرو آلوده نمود (Jatala *et al; 1979*). این قارچ در خاکهای بازدارنده (suppressive) آلوده به *Meloidogyne* یافت شده است (Kerry *et al;* 1982 & Jatala *et al;* 1979). اضافه کردن *P. lilacinus* به میکروپلات آلوده به *M. incognita* جمعیت نهایی را بطور معنی داری کاهش داده و موجب افزایش محصول گوجه فرنگی گردیده است (Cabanillas *et al,* 1989). آزمایشات انجام شده در مزارع آلوده در کشورهای مختلف کارآئی و قابلیت تطابق *P. lilacinus* را در کنترل گونه‌های *Meloidogyne* تحت شرایط مختلف محیطی و در خاک نشان داده‌اند (Jatala, 1985). بهرحال گزارشات در زمینه کارائی این قارچ ضد و نقیض میباشند.

در ایران تحقیقات در زمینه روشهای مناسب کنترل نماتدها و بخصوص کنترل بیولوژیکی نسبتا جوان و محدود میباشند. در تنها گزارش موجود قارچ *P. lilacinus* در شرایط *in vitro* اغلب توده‌های تخم نماتد *M. javanica* را پارازیته نموده است (*علوی و تیموری* ۱۳۶۶). اخیراً این قارچ از سیست‌های نماتد *Heterodera schachtii* در ایران جداگردیده است (*حجت جلالی و کاسمن* ۱۹۷۴).

هدف از مطالعه حاضر ارزیابی توانائی قارچ *P. lilacinus* در پارازیته نمودن تخم و لارو نماتد *M. javanica* و کارائی آن در کنترل جمعیت نماتد در خاک میباشد. بهمین منظور اثر قارچ بر روی نماتد در شرایط آزمایشگاه *(in vitro)*، گلخانه و میکروپلات بر روی گوجه فرنگی بررسی شد و میزان تخم و لارو پارازیته شده، تغییر جمعیت نماتد، خسارت گیاه و بقای قارچ در خاک مشخص گردید.

روش بررسی

:P. lilacinus

ایزوله قارچ از CMI انگلستان (کد 145823) که در ابتدا از لارو حشره‌ای از خانواده *Aleurodidae* جداگردیده بود بر روی محیط PDA (Potato Dextrose Agar) کشت گردیده و در ۵°C+ نگهداری گردید. هنگام استفاده، در شرایط استریل، از لبه در حال رشد قارچ توسط سوزن استریل قطعه‌ای برداشته و پس از انتقال به محیط PDA در درجه حرارت ۲۵°C قرار داده شد.

کشت خالص:

جهت خالص نمودن قارچ، در شرایط استریل پس از ۱۰ روز مقداری از محیط کشت حاوی قارچ برداشته، بداخل بشر حاوی ۲۰ml آب مقطر استریل منتقل نموده و ۳ رقت از آن تهیه گردید. از هر سه رقت مقدار ۰/۵ml به پتری دیش های ۹ سانتیمتری حاوی آب آگار ۱/۵٪ منتقل نموده و پس از ۲۴ ساعت با کمک استریو میکروسکوپ اسپورهای جوانه زده را تعیین نموده و جداگانه به پتریهای حاوی PDA منتقل و در ۲۵°C نگهداری گردیدند.

بررسی محیط کشت مناسب قارچ:

جهت مقایسه تاثیر محیط کشت های مختلف بر میزان اسپورزائی و رشد قارچ، دو محیط کشت CMA (corn meal agar) و PDA مورد استفاده قرار گرفتند. از لبه در حال رشد ۱۶ روزه قارچ بر روی PDA و CMA، ۲ دیسک ۵ میلی متری توسط چوب پنبه سوراخ کن برداشته و در لوله‌های کوچک سانتریفیوژ همراه ۱ml آب مقطر استریل قرار داده و در ۶۵۰۰ دور بمدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس از بهم زدن محتویات هر لوله یک میلی لیتر از محلولهای فوق را به هموسیتومتر منتقل نموده و در زیر میکرسکوپ بزرگنمائی ۴۰۰× تعداد اسپورها شمارش گردید. قارچ بطور یکسان بر روی دو محیط کشت رشد نموده ولی رنگ آن بر روی CMA بسیار کم رنگ و دارای ضخامت کمتری نیز بود. میزان اسپورزائی تحت تاثیر محیط کشت فرق داشته و بر روی CMA حدود ۴×۱۰^{۶} و PDA حدود $۳/۸\times۱۰^{۷}$ اسپور برآورد گردید. با توجه به نتایج این بررسی و گزارش منابع از محیط PDA در آزمایشات استفاده گردید.

چگونگی رشد قارچ بر روی غلات:

در این آزمایش میزان تولید اسپور قارچ بروی گندم وذرت مقایسه گردید. مقدار ۱۰۰g از هر کدام را در ارلن های ۵۰۰ میلی لیتری حاوی آب مقطر بمدت ۱۲ ساعت خیسانده و پس از دور ریختن آب اضافی و مسدود نمودن دهانه ارلن ها با پنبه و ورقه آلومینیومی در ۲ روز متوالی در فشار ۱۵ Psi و حرارت ۱۲۱°C بمدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو گردیدند. پتری PDA حاوی قارچ ۱۰ روزه را توسط آب مقطر استریل شستشو داده و پس از به حجم رساندن محلول، تعداد آنها شمارش گردید. در شرایط استریل، 5ml سوسپانسیون حاوی ۳×۱۰^{۸} اسپور را به ارلن های حاوی گندم و ذرت اضافه نموده و ارلن های غلات بدون قارچ نیز به عنوان کنترل درنظر گرفته شد. همه ارلن ها در درجه حرارت ۲۵°C بمدت ۲۰ روز نگهداری شده و گاهگاهی تکان داده میشدند تا انتشار قارچ یکنواخت صورت گیرد. پس از این مدت ۵۰g از هر تیمار را توسط آسیاب پودر نموده و پس از اضافه کردن ۵۰ml آب مقطربه ۱g از غلات توسط بهم زن مغناطیسی بمدت ۱۵ دقیقه سوسپانسیون فوق را مخلوط نموده و تعداد اسپور در ۱ml آن شمارش گردید. میزان اسپور تولید شده بر روی ذرت $۱/۷\times۱۰^{۷}$ و گندم $۱/۸۸\times۱۰^{۸}$ برآورد گردید. در آزمایشات گلدانی و میکروپلات از گندم جهت ازدیاد قارچ استفاده گردید.

اینوکولوم قارچ:

جهت آزمایشات گلدانی و میکروپلات، ۱۵۰g دانه گندم عاری از هرگونه آفت کش را باضافه ۳۰۰ml آب در ارلن های ۵۰۰ میلی لیتری بمدت ۱۲ ساعت خیسانده و پس از خارج نمودن آب اضافی دهانه ارلن ها توسط پنبه و ورقه آلومینیوم مسدود و در دو روز متوالی بمدت ۲۰ دقیقه در ۱۲۱°C اتوکلاو گردیدند (Dube & Smart, 1987 & Cabanillas & Baker, 1989). پس از سرد شدن ارلن ها، ۲ دیسک ۷ میلی متری از لبه در حال رشد قارچ روی محیط PDA برداشته و به هر ارلن اضافه گردید، یک ارلن نیز حاوی گندم بدون قارچ بعنوان کنترل در نظر گرفته شد. ارلن‌ها

بمدت ۱۰ روز در انکوباتور ۲۵°C در تاریکی قرار داده شدند. جهت انتشار یکنواخت قارچ ارلن‌ها روزی یکبار تکان داده میشدند. پس از خاتمه انکوباسیون تعداد اسپور بکمک هموسیتومتر و بزرگنمائی ۴۰۰× میکرسکپ شمارش گردید.

اندازه گیری اسپورها:

دیسکهائی بقطر 5mm از لبه در حال رشد ۱۶ روزه قارچ بر روی محیط PDA برداشته و به لوله‌های سانتریفیوژ حاوی 1ml آب مقطر اضافه نموده و بمدت ۵ دقیقه در دور ۶۵۰۰ سانتریفیوژ گردیدند. یک قطره حاوی اسپور را به لام منتقل نموده و بکمک بزرگنمائی ۴۰۰× میکرسکپ طول و عرض ۱۰۰ اسپور تعیین و این عمل سه بار تکرار گردید.

اینوکولوم *M. javanica*:

جمعیت نماتد حاصل از یک توده تخم بر روی گوجه فرنگی (*Lycopersicon esculentum* Mill.) کولیتوار Rutgers در گلخانه پرورش داده شد. در هنگام نیاز پس از خارج نمودن ریشه‌ها از خاک و شستشو با آب، به قطعات کوچک تر تقسیم گردیده و سپس بیک ظرف دردار حاوی ۲۰۰ میلی لیتر هیپوکلریت سدیم Naocl (وایتکس تجارتی) منتقل گردیده و بمدت ۴ دقیقه بشدت تکان داده شدند. محتویات را بلافاصله به الک های ۲۰۰ مش و ۱۰ میکرون منتقل نموده و چند بار با آب جاری شستشو داده شدند (Jepson,1987). محتویات روی الک ۱۰μ را به حجم رسانده و بکمک اسلاید شمارش و با بزرگنمائی ۱۰× میکرسکپ جمعیت نماتد در 2ml شمارش و این عمل سه بار تکرار گردید. 10ml از سوسپانسیون فوق حاوی ۱۰۰۰۰ تخم و لارو را در سه سوراخ ایجاد شده در اطراف ریشه نشاهای ۳ هفته ای گوجه فرنگی اضافه نموده و در گلخانه بمدت ۷۰-۶۰ روز نگهداری شدند. پس از این مدت ریشه ها از خاک خارج و طبق روش ذکر شده تخم و لارو را جدا نموده و در آزمایشات گلدانی و میکروپلات مورد استفاده قرار گرفتند.

اثر درجه حرارت روی رشد قارچ:

توسط چوب پنبه سوراخ کن استریل دیسک‌های ۵ میلی متری از لبه درحال رشد کشت ۱۰ روزه *P. lilacinus* روی محیط PDA برداشته و در مرکز پتریهای ۹ سانتیمتری حاوی 20ml محیط PDA قرار داده شدند. هر تیمار به تعداد ۵ تکرار در درجه حرارتهای ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۳۵°C قرار داده شدند. پس از ۱۰ روز میزان رشد کلنی در طول دو قطر عمود بر هم با کمک استریو میکرسکوپ تعیین گردید (Kerry *et al*, 1986). طرح آماری بلوکهای خرد شده (split-plot) در این آزمایش پیاده گردید.

اثر بیماریزائی قارچ در شرایط *in vitro*:

دیسک های ۵ میلی متری از لبه در حال رشد ۷ روزه قارچ بر روی PDA به مرکز پتریهای ۵ سانتی‌متری حاوی 10ml آب آگار ۰/۸٪ منتقل گردیده و پتریها در آنکوباتور ۲۰°C در تاریکی نگهداری گردیدند (Irving & Kerry, 1986). در شرایط استریل توده های تخم نماتد پس از

ضدعفونی با Naocl ۱٪ بمدت یک دقیقه و ۳ بار شستشو با آب مقطر استریل به تعداد ۴ عدد در هر پتری و در ۴ تکرار با کمک استریو میکرسکپ در فاصله یک سانتیمتری از دیسک مرکزی قرار داده شدند. چهار عدد پتری کنترل نیز هر کدام حاوی ۴ توده تخم بوده که در مرکز توسط دیسکهای PDA فاقد قارچ تلقیح گردیدند. ضمنا ۵ توده تخم توسط بزرگنمائی ۴۰۰× میکرسکوپ بررسی گردید، تا از عدم وجود هر گونه پارازیت مطمئن گردیم. پتریها در ۲۵°C بمدت ۱۸ روز در تاریکی نگهداری گردیدند. پس از خاتمه آزمایش، هر توده تخم به یک بشر ۱۰۰ میلی لیتری حاوی ۵۰ml هیپوکلریت سدیم ۱٪ منتقل گردیده و توسط هم زن معناطیسی بمدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۷ بهم زده شد، تخم ها بر روی الک ۱۰μ جمع‌آوری شده و ۳ بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند و در زیر میکرسکپ با بزرگنمائی ۴۰۰، درصد تخمهای پارازیت شده و سالم تعیین گردید (Freire & Bridge, 1985). جهت شمارش لاروهای تفریخ شده، محیط آگار هر پتری را در ۱۰۰ml آب مقطر توسط مخلوط کن خرد نموده، محتویات را از الک ۸۵۰μ عبور داده و لاروها روی الک ۱۰μ جمع‌آوری گردیدند. پس از به حجم رساندن سوسپانسیون حاوی لارو، توسط اسلاید شمارش و با استفاده از بزرگنمائی ۱۰× میکرسکپ عمل شمارش تکرار گردید (فاطمی، منتشر نشده).

آزمایش گلدانی:

گلدانهای پلاستیکی بقطر ۱۶cm با ۱۰۰۰g خاک استریل (خاک: ماسه: خاک برگ به نسبت ۱:۱:$\frac{۱}{۳}$ و pH=۷/۵) پر گردیدند. دو گرم گندم حاوی $۸/۹۶\times۱۰^{۸}$ اسپور قارچ ابتدا با ۲۰g ماسه مرطوب مخلوط نموده و سپس به خاک گلدان تیمارهای حاوی قارچ اضافه و مخلوط گردید. در همه گلدانها یک نشای ۱۸ روزه گوجه فرنگی واریته Rutgers کاشته شد، پس از ۱۰ روز ۵ml سوسپانسیون حاوی ۲۴۰۰ عدد تخم و لارو نماتد در ۳ سوراخ ایجاد شده در اطراف ریشه تیمارهای دارای نماتد اضافه گردید. گلدانهای کنترل فقط ۵ml آب مقطر دریافت کردند. تیمارها شامل نماتد، نماتد و قارچ، قارچ و کنترل عاری از نماتد و قارچ در ۵ تکرار بصورت طرح کاملا تصادفی در گلخانه ۳۰°C-۱۶ بمدت ۴۵ روز قرار داده شدند. کلیه تیمارها بطور هفتگی کود NPK (۲۰:۱۵:۱۵) دریافت نموده و برحسب نیاز آبیاری گردیدند.

آزمایش میکروپلات:

هر واحد آزمایش بصورت یک سطل پلاستیکی بابعاد ۳۰×۳۰cm (ارتفاع ×قطر) در نظر گرفته شد. در کف سطل ها سوراخهائی ایجاد نموده، ابتدا یک لایه ریگ، یک لایه ماسه استریل و سپس خاک استریل با مشخصات آزمایش گلدانی اضافه گردید، سطل‌ها بفاصله ۱۰۰cm از همدیگر تا لبه در خاک مزرعه فرو برده شدند. در تیمارهای دارای *P. lilacinus* ۳۰g گندم آلوده به $۷/۸۳\times۱۰^{۱۰}$ اسپور کاملا با خاک هر پلات مخلوط گردید و سپس یک نشای ۶ هفته‌ای گوجه فرنگی واریته Rutgers در هر پلات کاشته شد. پس از گذشت ۱۵ روز و استقرار بوته‌ها، ۱۰ml سوسپانسیون حاوی ۶۰۰۰ تخم ولارو نماتد در ۳ سوراخ ایجاد شده در اطراف ریشه گیاهان

بخاک تیمارهای دارای نماتد افزوده گردید و تیمارهای کنترل فقط ۱۰ml آب مقطر دریافت نمودند. تیمارها شامل نماتد، قارچ، نماتد و قارچ و کنترل بدون قارچ و نماتد بصورت طرح بلوکهای کامل تصادفی در ۴ تکرار قرار داده شدند و پس از ۶۰ روز در ۳۸°c-۱۶ برداشت صورت گرفت. در هر هفته به کلیه تیمارها کود NPK بمقادیر توصیه شده اضافه نموده و پلاتها برحسب نیاز آبیاری گردیدند. درجه حرارت هوا روزانه یادداشت گردیده و گوجه های تازه رسیده بمحض جداشدن از ساقه توزین میگردیدند.

تخمین جمعیت نماتد درخاک و ریشه:

در هنگام برداشت پس از قطع اندامهای هوائی، وزن ساقه، برگ و میوه یادداشت گردید. ریشه ها را شسته، آب اضافی آنها را خشک نموده، پس از توزین به قطعات کوچکتر خرد نموده و سپس تعداد گال، توده تخم و تخم و لارو در ۱g نمونه تعیین گردید. از هر ریشه ۱۰ توده تخم بطور تصادفی انتخاب گردیده و تعداد تخمهای آلوده، سالم، بالغ و لاروها برآورد گردید (Leij *et al*, 1993). ایندکس گال ریشه براساس جدول ۱۰۰-۰ محاسبه گردید (Taylor & Sasser 1978). ۰= فاقد گال یا توده تخم، ۱=۲-۱، ۲=۱۰-۳، ۳=۳۰-۱۱، ۴=۱۰۰-۳۰، ۵=۱۰۰<.

خاک هر گلدان و واحد آزمایشی پس از خارج نمودن بوته ها کاملا مخلوط گردید و یک نمونه ۲۵۰ گرمی خاک با استفاده از الک ها و شربت قند سانتریفیوژ گردیده و جمعیت J2 تعیین گردید (Jenkins, 1964).

تخمین جمعیت قارچ در خاک:

پس از پایان آزمایشات، خاک تیمارهای دارای *P. lilacinus* کاملا مخلوط گردیده از هر تیمار یک نمونه فرعی ۲۰ گرمی همراه ۲۰۰ml آب مقطر یونیزه بمدت ۵ دقیقه با دست بهم زده شد. یک گرم نمونه فرعی از هر محلول به ۹ml آب مقطر یونیزه اضافه و رقتهای مختلف تهیه گردید. سپس ۱ml از محلولهای فوق را به پتریهای استریل خالی منتقل نموده و حدود ۱۵ml محلول نیمه انتخابی جهت *P. lilacinus* به هر پتری دیش اضافه گردید (Mitchel *et al*, 1987). پتریها را بآرامی تکان داده تا نمونه بخوبی در محیط کشت پخش گردد، قبل از شمارش کلنی ها پتریها بمدت یک هفته در انکوباتور ۲۵°c قرار داده شدند. محیط نیمه انتخابی شامل Nacl= 10g; Benomyl=50mg/l; Pentachloronitrobenzen=50mg/1; PDA=39g; Deionized water=1000ml; Streptomycine sulphate=100mg/l; Chlorotetracycline=100mg/l بود. مواد فوق را در آب مقطر یونیزه حل نموده و مدت ۲۰ دقیقه در ۱۵ psi توکلاو گردیدند، پس از کاهش درجه حرارت ظرف حاوی محیط کشت به ۵۰-۴۵°c، آنتی بیوتیکها اضافه گردیدند.

نتیجه و بحث:

P. lilacinus:

قطر کلنی‌ها در روی محیط PDA پس از ۱۰ روز در ۲۵°c حدود ۴/۲cm بود. رنگ کلنی در ابتدا سفید و پس از تشکیل اسپورها شرابی رنگ و سپس ارغوانی تیره شد. دیواره هیف های رویشی صاف و بیرنگ، طول کنیدیوفورها ۶۰۰-۴۰۰μ و در قسمت پائین معمولا ناصاف و به رنگ زرد یا ارغوانی کم رنگ و دارای انشعابات Verticillate بودند. این انشعابات به ۴-۲ فیالید ختم می‌گردیدند. کنیدیها بصورت زنجیری تشکیل شده و به شکل بیضوی یا دوکی با دیواره صاف تا کمی ناصاف، بیرنگ و در حالت توده برنگ ارغوانی و بابعاد ۲/۱μ×۳/۰۵ بودند.

اثر درجه حرارت روی رشد قارچ:

درجه حرارت اثرات متفاوتی در رشد *P. lilacinus* نشان داد (p=۰/۰۱). ماکزیمم رشد قارچ بین ۲۰ تا ۲۵°c مشاهده گردید. با افزایش درجه حرارت، رشد کلنی قارچ نیز رو به افزایش نهاده و در ۲۵°c-۲۰ نزدیک به ۲ برابر آن در ۱۵°c رسید. در حرارتهای بیش از ۲۵°c رشد قارچ رو به کاهش نهاده چنانکه در ۳۰°c میزان آن تقریبا $\frac{1}{2}$ رشد آن در ۲۵°c بوده و در ۳۵°c رشد قابل ملاحظه‌ای در طول مدت آزمایش اندازه گیری نگردید. بطور کلی طیف حرارتی مناسب این ایزوله قارچ بین ۲۰ تا ۳۰ درجه سانتیگراد برآورد گردید.

آزمایش *in vitro*:

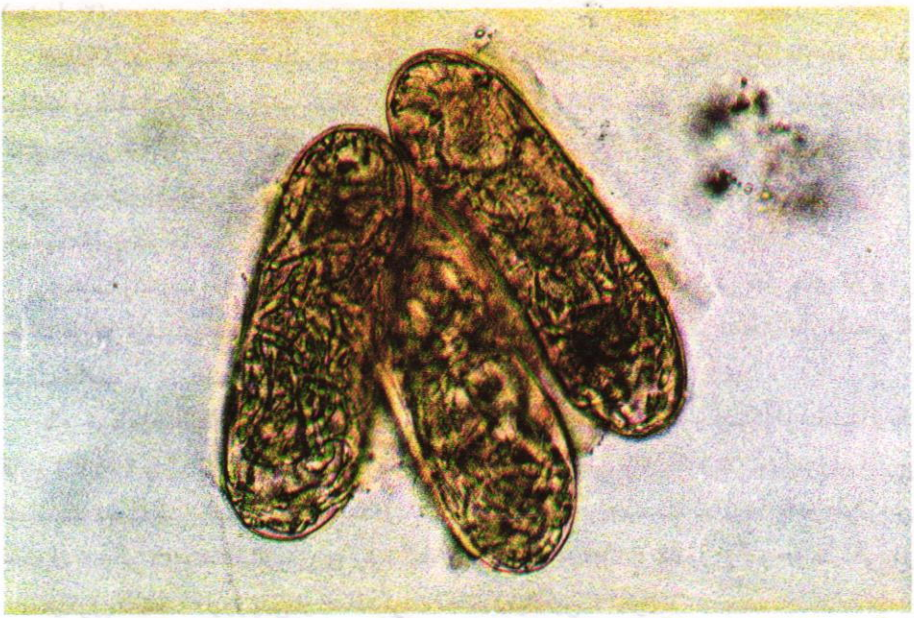
P. lilacinus توانائی قابل توجهی در آلوده نمودن تخمهای *M. javanica* در روی آگار از خود نشان داد (شکل ۱)، حدود ۹۳/۸٪ تخمها در توده های تخم توسط قارچ پارازیته شده بودند و قارچ توانست از تفریخ لاروهای نماتد در مقایسه با کنترل جلوگیری نماید. کلیه تخمهای پارازیت شده در مراحل اولیه جنینی بوده و تخم دارای لارو (تخم بالغ) و یا لاروی که توسط قارچ آلوده شده باشد مشاهده نگردید، میسلیومهای قارچ در داخل تخمهای پارازیت شده با بزرگنمائی ۴۰۰× بخوبی دیده میشدند و بسته به طول مدت تماس، محتویات داخل تخم قسمتی و یا تماما توسط میسلیوم جایگزین شده بودند.

آزمایش گلدانی:

تفاوت معنی داری بین وزن گیاه و ایندکس گال تیمارهای دارای نماتد تنها و نماتد باضافه قارچ مشاهده نگردید (P=0.05) (جدول ۱). وزن کل گیاه در تیمار کنترل بدون نماتد و قارچ بیش از سایر تیمارها بوده و در تیمار قارچ باضافه نماتد مقداری کمتر از تیمار نماتد تنها بود. تعداد توده تخم تولید شده روی ریشه هر دو تیمار و نیز جمعیت شمارش شده در ریشه تیمار دارای قارچ و نماتد فرقی با تیمار نماتد تنها نداشت و تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید. وزن اندامهای هوائی نیز در هر دو تیمار نماتد و نماتد و قارچ مانند هم بودند (P<0.05).

آزمایش میکروپلات:

در آزمایش مزرعه ای ایندکس گال در تیمار دارای نماتد مشابه تیمار نماتد و قارچ بود (P=0.05). تعداد توده های تخم روی ریشه، جمعیت تخم ولارو در ریشه و در خاک تیمار دارای نماتد و قارچ کمتر از تیمار نماتد بوده هر چند این تفاوتها از نظر آماری معنی‌دار نبودند



شکل ۱- تخم پارازیت شده *M. javanica* توسط *P. lilacinus* روی آگار (×400)، نابودی و جایگزینی جنین توسط میسلیومهای قارچ.

Fig. 1. Infection of *M. javanica* egg by *P. lilacinus* on agar (×400), destruction and replacement of embryo by the hypha mass.

جدول ۱- اثر *P. lilacinus* بر روی رشد گیاه و جمعیت *M. javanica* روی گوجه‌فرنگی در گلدان ۴۵ روز پس از اضافه کردن نماتد (میانگین ۵ تکرار).

Table. 1. Effect of *P. lilacinus* on plant growth and population of *M. javanica* on tomato plants in pot, 45 days after inoculation with nematode (n=5).

تیمارها Treatments	وزن تربرگها Top F.W.*g.	وزن تر ریشه RootF.W.g.	وزن کل گیاه Total plant Wt.g.	توده‌تخم در ریشه Egg mass /Root	ایندکس گال Gall index	جمعیت نماتددر ریشه Nem/Root
نماتد Nem.	6.3	0.74	6.1	133.8	4.8	1472
نماتد و قارچ Nem.&P.lil.	4.2	0.53	4.8	126.4	4.8	2090
قارچ P.lil	4.8	0.54	5.4	-	-	-
شاهد Control	7.9	9.80	8.8	-	-	-

F. W. = Fresh Weight

(جدول ۲).

اضافه کردن *P. lilacinus* تاثیری در وزن اندامهای هوائی و میوه در تیمار دارای قارچ و نماتد نداشته و تفاوت معنی داری بین تیمار مذکور و تیمار دارای نماتد مشاهده نگردید. وزن ریشه در کنترل عاری از قارچ و نماتد کمتر از سایر تیمارها بوده و وزن کل گیاه در دو تیمار نماتد و نماتد و قارچ شبیه هم وکمتر از سایر تیمارها برآورد گردید.

جمعیت قارچ در خاک:

به سبب رشد سریع قارچهای ساپروفیت در پتریهای محیط کشت شمارش کلنی‌های قارچ در خاک هر دو آزمایش گلدانی و میکروپلات با دشواری مواجه گردید و در نتیجه آمار دقیقی به دست نیامد.

با وجود درصد بالای پارازیتیسم در روی آگار، استریل بودن خاک و اینوکولوم نسبتا زیاد قارچ (۹×۱۰^{۶} و ۵×۱۰^{۶} اسپور در گرم خاک آزمایش گلدانی و میکروپلات) ایزوله قارچ نتوانست تحت شرایط این آزمایشات در خاک مستقر شده و جمعیت نماتدها را در طول این

جدول ۲- اثر *P. lilacinus* بر روی رشد گیاه و جمعیت *M. javanica* روی گوجه فرنگی در میکروپلات، ۶۰ روز پس از اضافه کردن نماتد (میانگین ۴ تکرار).

Table. 2. Effect of *P. lilacinus* on plant growth and population of *M. javanica* in tomato in microplot 60 days after inoculation with nematode (n=4).

تیمارها	وزن تر برگها	وزن تر ریشه	وزن ترمیوه	وزن کل گیاه	توده تخم	ایندکس گال	جمعیت نماتد در ریشه	جمعیت نماتد در ۲۵۰ گرم خاک
Treatments	Top	Root F.W.	Fruit F.W.*	Total plant Wt.	Egg mass /Root	Gall index	Nem/Root	Nem/ 250g soil
	g.	g.	g.	g.	g.			
Nem	189.5	45.3	291.3	526.0	3227.8	5	4131.5	3260
نماتد و قارچ Nem&P.lil	181.5	49.6	295.3	526.4	1059.9	5	1812.5	1510
قارچ P.lil	200.7	50.9	335.7	587.3	-	-	-	-
شاهد Control	200.0	35.5	386.6	622.1	-	-	-	-

F. W. = Fresh Weight

دانه گندم آلوده به *P. lilacinus* جمعیت *M. incognita* را بطور چشمگیری کاهش داده اند (Cabanillas & Barker, 1989 Jatala, 1986).

استفاده از *P. lilacinus* در کنترل بیولوژیکی بر این فرض بنا شده است که افزایش اینوکولوم موجب افزایش پارازیتیسم خواهد گردید، هر چند که نتایج در این زمینه ضد و نقیض میباشند. گاسپارد و همکاران (Gaspard *et al*, 1990). در آزمایشات خود زمانیکه اینوکولوم قارچ *Verticillium chlamydosporium* را افزایش دادند تاثیر بیشتری در کاهش جمعیت *M. incognita* مشاهده ننمودند، در صورتیکه *کابانیلاس و بارکر* (Cabanillas & Barke, 1989). با افزودن ۱۰ و ۲۰ گرم دانه گندم آلوده به *P. lilacinus* علیه *M. incognita* بترتیب ۳ و ۴ برابر افزایش محصول گوجه فرنگی داشته اند.

طبق بعضی گزارشات، زمان استفاده از قارچ در کنترل بیولوژیکی نماتدها بی‌تاثیر نمی‌باشد چنانکه موثرترین کنترل جمعیت نماتد زمانی اتفاق افتاد که *P. lilacinus* ۱۰ روز قبل و نیز همزمان با نشای گوجه فرنگی به خاک اضافه گردیده است (Cabanillas & Barker, 1989). در آزمایش ما قارچ همزمان با نشای گوجه فرنگی بخاک اضافه گردیده بود.

در روی آگار حدود ۹۳٪ تخم‌ها توسط قارچ آلوده شده بودند این میزان در آزمایشات دیگران وقتیکه از نماتد *M. incognita* استفاده شده است حدود ۵۲/۵٪ و ۵۰٪ بوده است (Gaspard *et al*, 1990 & Freire & Bridge, 1985). در آزمایش ما *P. lilacinus* فقط تخم های نابالغ (فاقد لارو) را پارازیته نمود. ظاهرا تخمهای بالغ در مقایسه باتخمهای نابالغ نسبت به نفوذ قارچ مقاوم تر میباشند (Morgan-Jones & Rodrigues-Kabana, 1985). اگرچه کیتین قسمت اعظم پوسته تخم نماتد راتشکیل میدهد (Lee & Atkinson, 1976)، کوتیکول لارو فاقد آن بوده وشاید کمبود آنزیم های مناسب در *P. lilacinus* باعث شود تا قارچ با سرعت کمتری بداخل کوتیکول لارو نفوذ نماید (Jatala, 1986). نفوذ قارچ به کوتیکول تخم توسط اعمال مکانیکی، آنزیمی و یا هر دو صورت میگیرد. در هر دو صورت در محل تماس انتهای میسلیوم متورم گردیده و فشار وارده باضافه فعالیتهای آنزیمی از قبیل تولید آنزیم کیتیناز باعث شکافتن کوتیکول و نفوذ قارچ بداخل آن میگردد. میسلیوم قارچ بسرعت رشد نموده، تا زمانیکه توده زنده قارچ (biomass) جانشین محتویات داخل تخم گردد (Jatala, 1986).

اختلاف در میزان پارازیتیسم از مشخصات رایج ایزوله های مختلف قارچهای خاکزی میباشد. اختلافاتی که در نتایج این مطالعه و کار دیگران مشاهده شده است ممکن است بدلیل مختلف بودن ایزوله‌های قارچ و نماتد باشد. قارچ *V. chlamydosporium* مخلوطی از گونه‌های مختلف بوده و همین عامل ممکن است دلیل اصلی اختلافات مشاهده شده در ایزوله های این قارچ بحساب آید (Bursnall & Tribe, 1974). تفاوتهای قابل توجهی در میزان رشد و پارازیتیسم در بین ایزوله های مختلف همین قارچ در شرایط *in vitro* بر روی نماتد سیست گندم گزارش گردیده است (Kerry *et al*, 1986). اختلاف در گونه های مختلف نماتد و جمعیت های یک گونه

نیز میتواند قدرت پارازیتیسم قارچ را تحت تاثیر قرار دهد چنانکه تخمهای *H. schachtii* نسبت به نفوذ *V. chlamydosporium* مقاوم تر از تخمهای *H. avenae* بودند (Irving & Kerry, 1986).

ظاهرا میزان نفوذ *P. lilacinus* در تخم نماتدها تا اندازه ای به پیچیدگی ساختمان پوسته تخم بستگی دارد. پوسته تخم از سه لایه نازک بیرونی Vitelline، میانی ضخیم کیتینی و داخلی لیپید تشکیل گردیده است و ممکن است نسبت آنها در نماتدهای مختلف فرق داشته باشد چنانکه *P. lilacinus* با سرعت بیشتری به تخمهای *Meloidogyne* نفوذ نموده تا تخمهای *Globodera* و *Nacobbus* (Jatala, 1986).

نتایج این پژوهش نشان داد که *P. lilacinus* با اینکه قادر به آلوده نمودن ۹۳٪ تخمهای نماتد در محیط مصنوعی شد، نتوانست در خاک جمعیت نماتدها را کاهش دهد، در آزمایش فرر (Freire & Bridge, 1985) نیز با اینکه ۵۲/۵٪ تخم ها در توده های تخم *M. incognita* درمحیط آگار دار توسط *P. lilacinus* پارازیته شده بودند در خاک این میزان به ۱۵٪ کاهش یافت، همچنین ۳ ایزوله *V. chlamydosporium* تخمهای *M. arenaria* را روی آگار پارازیته نموده ولی در خاک فقط یکی از آنها علیه نماتدها موثر واقع شد، دیگر اینکه ایزوله ای که قادر به استقرار در سطح ریشه بود توانست جمعیت نماتد را کاهش دهد واین ایزوله در ابتدا از تخمهای نماتد گره ریشه جدا گردیده بود (Lee & Kerry, 1991). ایزوله مورد استفاده در آزمایش ما از لارو حشره *Aleurodidae* جدا شده است. واضح است که شرایط محیطی در محیط کشت مصنوعی بسیار متفاوت ازمحیط پیچیده خاک میباشد، فقدان هر گونه رقیب و یا جایگزین دیگر بعنوان منبع غذایی در محیط کشت ممکن است *P. lilacinus* را مجبور به مصرف تخمهای نماتد بعنوان تنها ذخیره غذایی موجودکرده باشد. با این همه *P. lilacinus* در محیط طبیعی نیز در حالی یافت شده است که تعداد قابل توجهی از تخمهای نماتدها را پارازیته نموده و تمایل آن به مصرف تخمهای بی‌مهرگان بـاثبات رسـیده است. (Bursnall & Tribe, 1974; Lysec, 1978; Morgan-Jones *et al.*, 1981; Kerry, 1981; Kerry *et al.*, 1982; Morgan-Jones & Rodrigues-Kabana, 1984).

P. lilacinus در طیف های حرارتی بین ۳۰°c-۱۵ رشد نسبتا خوبی داشته و درجه حرارت مناسب آن بسته به نوع ایزوله بین ۳۰°c-۲۰ میباشد. ظاهرا نیازهای حرارتی اپتیم قارچ همانند میزبان نماتد خود بوده و انتظار میرود که قابلیت تطابق آن در pH های مختلف خاک (Jatala, 1986) قدرت رقابت آن را در برابر سایر میکروارگانیسم‌های خاک افزایش دهد. ایزوله قارچ در آزمایش ما رشد مناسبی در طیف های حرارتی ذکر شده داشته و pH خاک نیز بنظر مناسب میرسید. احتمال دارد که ایزوله مزبور قدرت رقابت شدیدی نداشته و یا باصطلاح Virulent strain نبوده و نتوانسته خود را در طول مدت آزمایش در ریزوسفر مستقر نماید. شاید اگر ایزوله مزبور تماس طولانی تری با خاک می‌داشت و اضافه کردن آن بخاک چند ماه قبل از آزمایش صورت میگرفت در آنصورت فرصت کافی جهت ازدیاد و استقرار پیدا مینمود.

P. lilacinus در محیط کشت انتخابی بکار رفته، رشد بسیار کند و آهسته ای داشت هر چند که ایزوله های دیگر قارچ بر روی این محیط بخوبی رشد کرده‌اند، از طرفی تخمین جمعیت قارچ براساس شمارش کلنی ها روی محیط انتخابی ممکن است منحرف کننده باشد و نمایانگر وضعیت فیزیولوژیکی آن نباشند زیرا ایزوله های مختلف یک قارچ ممکن است بطور یکسان روی محیط انتخابی رشد ننمایند (Kerry *et al.*, 1993). احتمال دارد که در مورد این ایزوله بنومیل اثر بازدارنده ای داشته باشد (Mertens & Stirling, 1993 & Gaspard *et al.*, 1990).

بطور کلی شرایط این آزمایش اختلاف چندانی با شرایط آزمایشات انجام شده توسط دیگران نداشته است و نتایج ضد ونقیض که در میزان کنترل جمعیت نماتد توسط *P. lilacinus* دیده میشود بدون شک ناشی از تفاوتهایی است که در ایزوله قارچ، گونه نماتد، ترکیب فیزیکی، شیمیائی و توده زنده خاک (biomass) ممکن است وجود داشته باشد و همین اختلافات منجر به نتایج متفاوتی شده است که در گزارشات دیگران نیز دیده میشود (Ley *et al.*, 1982; Noe & Sasser, 1984 & Dickson & Mitchell, 1985).

سپاسگزاری

بدینوسیله از همکاری بی‌شائبه آقای دکتر داروغه در فراهم نمودن قارچ از انگلستان تشکر و سپاسگزاری میگردد.

نشانی نگارنده: دکتر صدیقه فاطمی، بخش نماتولوژی، موسسه تحقیقات آفات وبیماریهای گیاهی: صندوق پستی ۱۴۵۴-۱۹۳۹۵، تهران.