آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ۸۲، شماره ۲، اسفند ۱۳۹۳

استفاده از تعامل نماتد *Caenorhabditis elegans*، قارچ *Arthrobotrys oligospora* و باکتری *Bacillus subtilis* در کنترل نماتد *Meloidogyne javanica*

حدیث مصطفی‌نژاد و نوازاله صاحبانی✉
گروه بیماری‌شناسی گیاهی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران
(تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۹۲؛ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۹۳)

چکیده

در این تحقیق از تعامل نماتد *Caenorhabditis elegans*، قارچ *Arthrobotrys oligospora* و باکتری *Bacillus subtilis* در کنترل نماتد مولد گره ریشه *Meloidogyne javanica* استفاده شد. باکتری مذکور جهت تحریک سیستم دفاعی گیاه در بدو تیمار و به عنوان غذای نماتد *C. elegans* و نماتد *C. elegans* به منظور افزایش تولید تله استفاده شد. قارچ *A. oligospora* پس از ۷۲ ساعت موجب مرگ و میر ۷۷٪ لاروهای نماتد *M. javanica* گردید، و تاثیر تولید پروتئاز خارج سلولی آن (دو واحد) در مقایسه با شاهد نیز ارزیابی گردید. گرچه تمامی تیمارهای اعمال شده موجب کاهش معنی‌دار تعداد گال و توده تخم در هر گیاه در مقایسه با شاهد شدند، کمترین این شاخص‌ها در تیمار *C. elegans+B. subtilis+ A. oligospora* علیه نماتد *M. javanica* مشاهده شد. بررسی تأثیر ترکیبات فرار، غیر فرار و درصد بازدارندگی از رشد باکتری *B. subtilis* بر علیه *A. oligospora* در تست تقابل نیز نشان داد که تأثیر ترکیبات غیر فرار (آنتی‌بیوتیک) به مراتب بیشتر از دیگر مواد بازدارنده بود.

واژه‌های کلیدی: کنترل بیولوژیک، *Arthrobotrys oligospora*، *Bacillus subtilis*، *Caenorhabditis elegans*.

Use of *Caenorhabditis elegans*, *Arthrobotrys oligospora* and *Bacillus subtilis* interaction in control of *Meloidogyne javanica*

H. MOSTAFANEZHAD and N. SAHEBANI✉
Department of Plant Pathology, College of Aboureihan, University of Tehran

Abstract

Caenorhabditis elegans, *Arthrobotrys oligospora* and *Bacillus subtilis* interaction were studied to control root knot nematode, *Meloidogyne javanica. B. subtilis* used for inducing of plant defense system at the initiation of treatment and as the *C. elegans* consumption. *C. elegans* also used in order to induce the production of traps. *A. oligospora* caused 77% larval mortality, after 72 hours. Extracellular protease production was evaluated 2 units in compared to control. All treatments significantly reduced the number of knots and egg masses per plant in compared to control, but the minimum level of these indexes observed in treatment of *B. subtilis+C. elegans+A. oligospora* against *M. javanica*. The effects of volatile, non volatile compounds and growth inhibition percentage of *B. subtilis* against *A. oligospora* showed that non volatile compounds (antibiotics) were more effective than other tested inhibition mechanisms.

Key words: Biological control, *Arthrobotrys oligospora, Bacillus subtilis, Caenorhabditis elegans.*

✉ **Corresponding author: n_sahebani@yahoo.com**

مقدمه

طیف وسیع میکرو و ماکروارگانیزم‌های خاک و پتانسیل هر کدام در تعامل با دیگر موجودات ساکن خاک سبب پیچیدگی اکولوژیکی این‌گونه خاک‌ها به ویژه خاک‌های غنی از مواد آلی مانند خاک‌های زراعی شده است، به طوری که به اعتقاد بسیاری از اکولوژیست‌ها این محیط یک مجموعه زنده اکولوژیکی می‌باشد. در یک اکوسیستم متعادل، افزایش احتمالی جمعیت خارج از تعادل هر جزء آن تحت تأثیر شدید دیگر اجزاء اکوسیستم قرار گرفته و متعادل خواهد شد. تعامل عوامل بیوکنترل مورد استفاده در خاک با سایر ارگانیزم‌های خاکزی به دلیل اثرات مستقیم و غیر مستقیم آن‌ها بر یکدیگر و بالتبع تأثیر بر کارایی آن‌ها، از اهمیت زیادی برخوردار است. ترکیب ارگانیزم‌های مختلف اعم از نماتدها، حشرات و دیگر موجودات ساکن خاک تأثیر کاملاً متفاوتی بر بقاء، سازگاری و میزان تأثیر عوامل بیوکنترل مورد استفاده خواهد داشت که بدون در نظر گرفتن این تنوع و ترکیب جمعیتی آن‌ها حصول یک نتیجه قابل قبول صرفاً بر اساس بررسی‌های آزمایشگاهی و حتی گلخانه‌ای امکان پذیر نخواهد بود. به دیگر سخن آن چه لازمه موفقیت در استفاده از عوامل بیوکنترل علیه عوامل بیماری زا خصوصاً در محیط خاک می‌باشد، شناخت کافی از تمام ویژگی‌های عامل بیوکنترل از جمله دینامیک جمعیتی آن، پتانسیل رقابت با دیگر موجودات مجاور، چگونگی شرایط سخت گذرانی و مکانیسم تأثیر آن بر بیمارگر و نیز شناخت ویژگی‌های بیمارگر و شرایط محیطی و در نهایت تعامل بین این‌ها می‌باشد. برخی از گونه‌های جنس *Bacillus* Cohn 1872 در کنترل بیولوژیک علیه آفات و عوامل بیماری‌زای گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرند. این سوش باکتری از عوامل کنترل کننده بیولوژیک مورد استفاده علیه طیف وسیعی از عوامل بیماری‌زای گیاهی می‌باشد (Ehrenberg, 1835). تأثیر عصاره کشت چند آنتاگونیست نماتد *Meloidogyne incognita* Chitwood, 1949 از جمله *B. subtilis* بر تفریخ تخم و مرگ و میر لاروهای این نماتد مطالعه شده است (Satyandra and Chaubey, 2007). آن‌ها نشان دادند که عصاره کشت این باکتری حدود ۸۷٪ از تفریخ تخم نماتد جلوگیری کرده و ۴۸٪ مرگ و میر لاروهای سن دوم نماتد را به همراه دارد. تولید پروتئاز خارج سلولی، یکی از مکانیزم‌های آنتاگونیستی گونه‌های مختلف *Bacillus* (Lian *et al.*, 2007) و *Brevibacillus* (Shida *et al.*, 1996) علیه نماتدها می‌باشد. پروتئین موجود در کوتیکول نماتد محرک ترشح این آنزیم توسط باکتری است. قارچ‌های نماتدخوار[1] شامل طیف وسیعی از قارچ‌های مرتبط با نماتدها بوده که به اشکال مختلفی نماتدها را مورد حمله قرار می‌دهند. *Arthrobotrys oligospora* Fresen, 1850 یکی از قدیمی‌ترین قارچ‌های شناخته شده در این خصوص است که در حال حاضر به صورت محصولات مختلف تجاری به طور وسیع مورد استفاده قرار می‌گیرد و گزارشات متعددی مبنی بر کارایی این قارچ در کنترل نماتدهای مولد گره ریشه وجود دارد (Duponnois *et al.*, 1995, Kumar and Singh, 2006). میزان تولید تله به وسیله‌ی تعدادی از قارچ‌های ایجاد کننده تله تحت تأثیر نماتد *Caenorhabditis elegans* Maupas 1900 بررسی شده است (Xie *et al.*, 2010). آن‌ها نشان دادند که بیشترین درصد تله‌های تولید شده توسط *A. oligospora*، به ترتیب در محیط‌های حاوی لارو سن چهارم، سوم، دوم و اول *C. elegans* تولید شده است، به طوری که اختلاف تعداد تله‌ها در محیط حاوی لارو سن چهارم و اول معنی‌دار ($p \leq 0.001$) بود. آن‌ها همچنین نشان دادند که گونه *A. oligospora* بیش از ۹۲٪ لاروهای سن اول، سوم و چهارم نماتد را به دام می‌اندازد، اما درصد به دام اندازی لاروهای سن دوم کمتر است.

القاء سیستم دفاعی گیاهان به وسیله عوامل آنتاگونیست از جمله گونه‌های مختلف جنس *Bacillus* توسط بسیاری از محققان اثبات شده است (Chen *et al.*, 2010, Chithrashree *et al.*, 2011, Shanmugam and Kanoujia, 2011). کاربرد ترکیب

۱– Nematophagous fungi

روش‌های مختلف مدیریت عوامل بیماری‌زای گیاهی استراتژی مفیدی است که توجه محققان را به خود معطوف داشته است. در تحقیقات متعددی نشان داده شده است که کاربرد توام این روش‌ها راندمان بالاتری نسبت به کاربرد هرکدام به تنهایی داشته است، به عنوان مثال Yousefi *et al.* (2012) نشان دادند که کاهش شدت بیماری پوسیدگی ساقه و ریشه خیار با عامل *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* Vakal. 1996 با استفاده تلفیقی از باکتری *B. subtilis* به همراه القاء کننده سالیسیلیک اسید بیشتر از زمانی است که این عوامل به تنهایی مورد استفاده قرار می‌گیرند. استفاده تلفیقی از قارچ *A. oligospora* و سالیسیلیک اسید در کنترل نماتد *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949 به مراتب مؤثرتر از کاربرد هر کدام از این عوامل به تنهایی می‌باشد (Mostafanezhad *et al.*, 2013). استفاده توأم تعدادی از قارچ‌های آنتاگونیست نماتد *M. incognita* با تعدادی باکتری‌های موجود در ریزوسفر ریشه گیاه از جمله *B. subtilis* نیز به کار گرفته شد (Siddiqui and Akhtar, 2009). آن‌ها بیشترین کاهش نماتد را در استفاده توأم آنتاگونیست‌های *Aspergillus niger* CA Tiegh. 1867 و *B. subtilis* یافتند. تعامل استرین‌های مختلف قارچ‌های جنس *Arthrobotrys* روی نماتد آزادزی *Panagrellus* Thorne, 1938 در شرایط *in vitro* مطالعه شده است (Gomes *et al.*, 2001). گونه‌ها و استرین‌های مختلف این قارچ پتانسیل متفاوت صیادی این نماتد را داشتند و موفق‌ترین آن‌ها، استرین A183 از گونه *A. oligospora* بوده است.

هدف این تحقیق استفاده توأم از آنتاگونیست‌های *A. oligospora* و *B. subtilis* علیه نماتد مولد گره ریشه *M. javanica* می‌باشد که در آن از ویژگی‌های کنترل کنندگی بیولوژیک آن‌ها در محیط ریزوسفر و محیط خاک و تحریک کنندگی اثبات شده باکتری *B. subtilis* در گیاه گوجه‌فرنگی (Zehnder *et al.*, 2000, Araujo and Menezes, 2009; Chowdappa *et al.*, 2012) استفاده شد. علاوه بر این با وارد کردن نماتد *C. elegans* در این سیستم از یک طرف از ویژگی آن در افزایش تعداد تله قارچ *A. oligospora* استفاده شد و از طرف دیگر باکتری نیز به عنوان منبع غذایی آن عمل نموده و موجب بقاء آن در محیط گردید.

روش بررسی

باکتری *Bacillus subtilis* : از کلکسیون گروه گیاهپزشکی پردیس ابوریحان دانشگاه تهران دریافت و پس از تک کلونی نمودن با استفاده از محیط کشت Nutrient Agar (NA) تکثیر و مورد استفاده قرار گرفت.

نماتد *Caenorhabditis elegans*: از کلکسیون گروه گیاهپزشکی پردیس ابوریحان دانشگاه تهران دریافت و تکثیر آن به کمک محیط کشت Nematode Growth Medium (NGM) کشت شده با باکتری *Bacillus subtilis* انجام شد.

لاروهای سن دوم نماتد *Meloidogyne javanica* : ریشه‌های آلوده از مزارع گوجه فرنگی آلوده به نماتد مولد گره ریشه شهرستان ورامین (استان تهران) تهیه و پس از تهیه توده تخم منفرد، نماتد روی گوجه فرنگی رقم ارلی اوربانا وای[1] تکثیر گردید. استخراج تخم و تهیه لارو سن دوم با استفاده از روش Hussey and Barker (1973) انجام گرفت و با استفاده از خصوصیات ریخت شناسی و ریخت سنجی و نیز مشخصات الگوی انتهای بدن نماتدهای ماده، گونه نماتد مشخص گردید (Eisenback, 1985).

قارچ *Arthrobotrys oligospora*: از کلکسیون گروه گیاهپزشکی پردیس ابوریحان دانشگاه تهران تهیه و به روش اسپور منفرد روی محیط کشت آب آگار[2] ۲٪ خالص سازی شد.

اثر ترکیبات فرار باکتری *B. subtilis* روی درصد بازدارندگی رشد قارچ *A. oligospora* : این آزمون بر اساس روش Fiddaman and Rossall (1993)، در دمای ۲۵±۱°C انجام

۱- Early Urbana Y
۲- Water Agar (WA)

شد. پس از پر شدن ظروف کشت شاهد توسط ریسه‌های قارچ، درصد کاهش رشد میسلیوم قارچ با استفاده از فرمول ارائه شده توسط Etebarian *et al.* (2005) محاسبه گردید.

اثر ترکیبات خارج سلولی قابل نشت در آگار باکتری *B. subtilis* روی درصد بازدارندگی رشد قارچ *A. oligospora*: این آزمون طبق روش Weller (1988) انجام گرفت. باکتری *B. subtilis* روی محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار[1] به صورت یکنواخت کشت داده شد. سپس ظروف کشت در انکوباتور در دمای ۲۵±۱°C به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. بعد از این مدت در شرایط سترون زیر هود کلونی‌های باکتری با کمک آب مقطر سترون و پنبه سترون از روی محیط پاک شدند. سپس ظروف کشت وارونه شده و یک پنبه آغشته به کلروفرم در درون ظروف کشت قرار داده شد تا باقی مانده‌های باکتری نیز در معرض بخار کلروفرم قرار گرفته و کاملاً کشته شوند. بعد از ۳۰ دقیقه درب ظروف کشت را در شرایط سترون باز کرده تا بخار کلروفرم کاملاً خارج شود. در مرکز این ظروف کشت پلاکی از کشت پنج روزه قارچ مورد نظر به قطر پنج میلی‌متر قرار داده شد و ظروف کشت در انکوباتور در دمای ۲۵±۱°C قرار داده شدند. برای شاهد از محیط کشت PDA فاقد باکتری استفاده گردید. پس از پر شدن ظروف کشت شاهد توسط ریسه‌های قارچ، درصد کاهش رشد میسلیوم قارچ با استفاده از فرمول ارائه شده توسط Etebarian *et al.* (2005) محاسبه گردید.

بررسی درصد بازدارندگی باکتری *B. subtilis* بر قارچ *A. oligospora*: این آزمون بر اساس روش به کار رفته توسط Dennis and Webster (1971) انجام گرفت. در هر ظرف کشت (PDA)، به کمک لوپ سترون باکتری مورد نظر کشت داده شد و بعد از ۲۴ ساعت در فاصله یک سانتی‌متری از لبه ظرف کشت یک پلاک از محیط کشت پنج روزه قارچ قرار داده شد. ظروف کشت در دمای ۲۵±۱°C درون انکوباتور قرار داده شدند. پس از این که در تیمار شاهد پرگنه قارچ به وسط ظرف کشت رسید، قطر پرگنه قارچ در ظروف شاهد و تیمار اندازه‌گیری شد و مساحت آن‌ها محاسبه گردید. در تیمار شاهد از محیط فاقد باکتری استفاده گردید. در نهایت درصد کاهش رشد میسلیوم قارچ با استفاده از فرمول ارائه شده توسط Etebarian *et al.* (2005) محاسبه گردید.

بررسی اثر مستقیم قارچ *A. oligospora* بر مرگ و میر نماتد *M. javanica*: در این آزمایش از کشت هشت روزه قارچ روی محیط WA استفاده شد. به هر ظرف کشت (نه سانتی‌متر) ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون لاروهای تازه تفریخ شده و سترون نماتد با جمعیتی حدود ۵±۱۰۰ لارو سن دوم اضافه گردید. ظروف کشت در دمای ۲۵±۱°C نگهداری شد و پس از گذشت ۷۲ ساعت تعداد لاروهای مرده با کمک استرئومیکروسکوپ شمارش و درصد مرگ و میر لاروها با استفاده از فرمول Abbott (1925) محاسبه گردید. ظروف کشت فاقد قارچ به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند.

این آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام گردید و داده‌های حاصل با استفاده از نرم افزار آماری SAS 9.0 مورد ارزیابی قرار گرفت. میانگین تیمار و شاهد با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن ارزیابی شد.

بررسی امکان افزایش تولید تله در قارچ *A. oligospora* به وسیله نماتد *C. elegans*: از پرگنه ۱۴ روزه قارچ رشد یافته روی محیط PDA یک پلاک با قطر پنج میلی‌متر در وسط ظروف کشت حاوی محیط WA قرار داده و جهت رشد در انکوباتور (۲۵±۱°C) قرار داده شدند. پس از یک هفته ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون نماتد که حاوی پنجاه عدد لارو بود به هر ظرف کشت اضافه شد. این ظروف در انکوباتور (۲۵±۱°C) قرار داده شدند و پس از ۲۴ ساعت تعداد تله‌های موجود مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور از هر ظرف کشت سه پلاک یک سانتیمتر مربعی از مرکز، بخش میانی و کناری محیط کشت WA جدا شده و روی لام شیشه ای قرار گرفت. سپس با لنز ×۴۰ میکروسکوپ تعداد تله‌ها در هر یک

۱- Potato Dextrose Agar (PDA)

از این قطعات شمارش شد. ظروف کشت فاقد نماتد به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام شد. مقایسه میانگین داده‌ها بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد و با استفاده از نرم افزار SAS انجام شد.

بررسی آنزیم پروتئاز خارج سلولی تولید شده توسط *A. oligospora*: این آزمایش با روش ارائه شده توسط Kumari and Panda (1992) در دمای ۲۵±۱°C انجام شد. در این روش، فعالیت پروتئولیتیک پروتئاز قارچ بر اساس هیدرولیز کازئین ارزیابی گردید. یک واحد آنزیم به عنوان مقداری از آنزیم که تغییرات جذب برابر ۰/۲ را در ۲۰ دقیقه سبب می‌شود، تعریف شد.

بررسی تعامل باکتری *B. subtilis*، نماتد *C. elegans* و قارچ *A. oligospora*: بذور گوجه فرنگی رقم کالجی ان ۳[1] به مدت پنج دقیقه توسط هیپوکلریت سدیم یک درصد ضدعفونی شدند. این بذور پس از شست و شو با آب مقطر سترون، در گلدان‌های یک کیلوگرمی حاوی خاک سترون (شامل حجم مساوی از خاک مزرعه، ماسه و کود برگ) کشت گردید و در شرایط مساعد گلخانه (۱۶ ساعت نور و هشت ساعت تاریکی، دمای ۲۷±۵°C) پرورش داده شدند. این گیاهچه‌ها در مرحله شش برگی توسط ۲۰ میلی‌لیتر باکتری *B. subtilis* با غلظت 10^9 cfu/ml (خاک اطراف طوقه گیاه)، ۲۰ میلی‌لیتر قارچ *A. oligospora* با غلظت 10^6 spore/ ml و جمعیت ۲۰۰۰ لارو و نماتد بالغ *C. elegans* (کل خاک) مایه زنی شدند. سه روز بعد جمعیت ۲۰۰۰ لارو سن دوم *M. javanica* به ازاء هر گیاه مایه زنی شد. بر اساس اهداف در نظر گرفته شده در این آزمایش تیمارهای زیر جهت مقایسه لحاظ گردید:

نماتد *M. javanica* + قارچ *A. oligospora*، نماتد *M. javanica* به عنوان شاهد، گیاه سالم برای مقایسه شاخص‌های رشدی گیاه، باکتری *B. subtilis* برای تعیین افزایش رشد گیاه، باکتری *B. subtilis*+ نماتد *C. elegans* + نماتد *M. javanica*، باکتری *B. subtilis*+ نماتد *C. elegans* + نماتد *M. javanica* + قارچ *A. oligospora*، باکتری *B. subtilis* + نماتد *M. javanica*.

پنجاه روز پس از مایه زنی نماتد *M. javanica*، گیاهچه‌ها بر اساس شاخص‌های تعداد گال و تعداد توده تخم به ازاء هر گیاه، وزن تر ریشه و اندام‌های هوایی گیاه مورد بررسی قرار گرفتند. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج تکرار انجام شد.

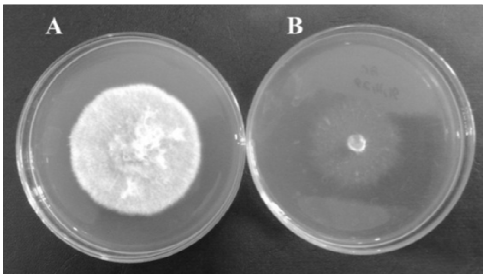
نتیجه و بحث

بررسی درصد بازدارندگی از رشد قارچ *A. oligospora* در اثر ترکیبات فرار، آنتی بیوتیک‌های خارج سلولی قابل نشت در آگار باکتری *B. subtilis* و تست تقابل: تأثیر معنی‌دار ترکیبات فرار و غیرفرار و تست تقابل باکتری به صورت درصد بازدارندگی رشد قارچ *A. oligospora* در جدول ۱ خلاصه شده است. نتایج نشان داد که از بین مکانیزم‌های مختلف در این جدول تأثیر ترکیبات قابل نشت در آگار (آنتی بیوتیک) اختلاف موجود به مراتب بیشتر از دیگر مکانیزم‌ها بود. به علاوه مشخص گردید که در بررسی ترکیبات فرار باکتری *B. subtilis* بر رشد *A. oligospora*، علاوه بر کاهش رشد میسلیومی قارچ، کاهش قابل توجه حجم توده میسلیومی قارچ نیز در معرض گازهای فرار رخ می‌دهد (شکل ۱).

بررسی اثر مستقیم قارچ *A. oligospora* بر مرگ و میر نماتد *M. javanica*: قارچ *A. oligospora* پس از ۷۲ ساعت موجب مرگ و میر ۷۷٪ لاروهای سن دوم *M. javanica* در مقایسه با شاهد گردید. جدایه‌ی ORS 18692 S5 از قارچ *A. oligospora* پس از دو روز موجب به دام اندازی ۹۷٪ از لاروهای سن دوم نماتد *M. mayaguensis* Rammah and Hirschmann, 1988 گردید (Duponnois *et al.*, 1995). این قارچ در بهینه ۲۸°C و به مدت ۹۶ ساعت قریب ۸۶٪ لاروهای

۱- *CALJ*-N3

نماتـد *M. incognita* را بـه دام انداختـه اسـت (Nagesh *et al*., 2005). از آنجایی که این قـارچ دارای پتانسـیل بـالای بـه دام اندازی و پارازیته کردن نماتدهای مولد گره ریشه می‌باشد، در نظر گرفتن این ارگانیزم در مدیریت تلفیقی این نماتدها منجـر به نتایج قابل توجهی خواهد شد.



شـکل ۱- رشـد و حجـم تـوده میسـلیومی قـارچ *Arthrobotrys oligospora* در شـاهد (A) و در معـرض گازهـای فـرار بـاکتری (B) *Bacillus subtilis*

Fig. 1. Fungal growth rate and mass volume of *Arthrobotrys oligospora* in control (A) and exposed to *Bacillus subtilis* volatile gases (B)

بررسی امکان افزایش تولید تله در قارچ *A. oligospora* به وسیله نماتد *C. elegans*: تعداد تله تولید شـده بـه وسـیله قارچ در ظروف کشت تیمار ۱۶۷ تله بـه ازاء هـر سـانتی‌متـر مربع، دارای اختلاف معنی‌دار بـا شـاهد (۷۶ تلـه بـه ازاء هـر سانتی‌متر مربع) بود (شـکل ۲). (نماتـد *C. elegans* در محـیط *in vitro* موجب افزایش تعداد تله در قارچ‌های مختلف تولیـد کننده این گونه ساختارها از جنس‌ها و گونه‌های مختلف شده است (Xie *et al*., 2010). با توجه به این که مهـم‌تـرین ابـزار و مکانیزم کنترل کننـدگی ایـن قـارچ تولیـد تلـه‌هـای شـبکه‌ای می‌باشد، بنابراین افزایش تعداد تله به معنای افزایش کـارایی و راندمان کنتـرل کننـدگی آن بـوده و در ایـن تحقیـق از نماتـد *C. elegans* به عنوان محرک تولید تله بهره گرفته شد.

بررسی آنزیم پروتئاز خارج سلولی تولید شده توسـط *A. oligospora*: نتـایج نشـان داد کـه قـارچ *A. oligospora* در محیط کشت مایع حاوی کازئین دارای فعالیـت پروتئـولیتیکی می‌باشد و تولید پروتئاز خارج سلولی آن، ۲ واحد در مقایسـه با شاهد نشان داده شد. تولید پروتئاز خارج سلولی توسط این قارچ توسط محققان دیگر نیز گزارش شده است (Tunlid and Jansson, 1991; Park *et al*., 2002).

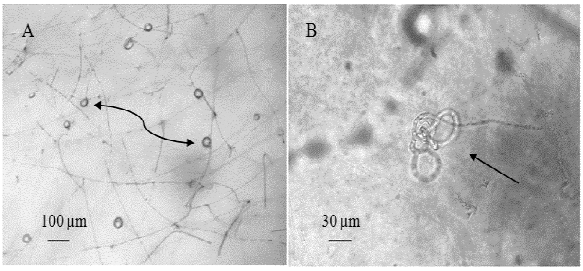
جدول ۱- درصد بازدارندگی از رشد قارچ *Arthrobotrys oligospora* در اثر ترکیبات فرار، غیر فرار باکتری *Bacillus subtilis* و تست تقابل قارچ و باکتری

Table 1. Percentage of growth inhibition of *Arthrobotrys oligospora* in efficiency of volatile, non volatile compounds of *Bacillus subtilis* and dual culture test of these

نوع آزمایش Experiment	مساحت پرگنه قارچ (cm^2) Fungal colony area (cm^2) شاهد (قارچ) Control (fungus)	قارچ-باکتری Fungus-bacterium	درصد بازدارندگی رشد قارچ Percentage of growth inhibition of fungud
تست تقابل Dual culture test	15.9 [a]	9.07 [b]	42.95
اثر گاز فرار Antifungal volatile test	63.58 [a]	44.16 [b]	30.54
اثر ترکیبات غیر فرار Compounds test non volatile Antifungal	63.58 [a]	0.78 [b]	98.77

هر عدد میانگین چهار تکرار بوده و میانگین‌هایی که در هر ردیف بر اساس آزمون دانکن ($p \leq 0.05$) دارای اختلاف معنی‌دار با یکدیگر هستند با حروف مختلف مشخص شده‌اند.

Each value is the mean of four replicates. The means followed by different letters in the same rows are significantly different ($p \leq 0.05$, Duncan).



شکل ۲- تله‌های تولید شده توسط قارچ *Arthrobotrys oligospora* در ظروف مایه زنی شده با نماتد *Caenorhabditis elegans* (A) و شاهد (B)

Fig. 2. Traps produced by *Arthrobotrys oligospora* in plates inoculated with *Caenorhabditis elegans* (A) and control (B)

بررسی تعامل باکتری *B. subtilis*، نماتد *C. elegans* و قارچ *A. oligospora* و تأثیر آن‌ها بر بیماری‌زایی نماتد

M. javanica : نتایج بررسی‌های گلخانه‌ای نشان داد که تمامی تیمارهای اعمال شده موجب کاهش معنی‌دار ($p\leq0.05$) تعداد گال و تعداد توده تخم در هر گیاه در مقایسه با شاهد می‌گردند. کمترین تعداد گال و تعداد توده تخم در هر گیاه در تیمار *A. oligospora +M. javanica +C. elegans+B. subtilis* مشاهده شد. نتایج نشان داد که وزن تر ریشه در تمامی تیمارها به صورت معنی‌داری ($p\leq0.05$) بیشتر از تیمار گیاه سالم می‌باشد. در خصوص وزن تر اندام‌های هوایی در تمامی تیمارها اختلاف معنی‌داری ($p\leq0.05$) با تیمار شاهد (گیاهان تیمار شده با *M. javanica*) وجود داشته و بیشترین وزن تر اندام‌های هوایی در تیمار *B. subtilis* مشاهده گردید (جدول ۲).

جدول ۲- تعامل *Bacillus subtilis*، *Caenorhabditis elegans* و *Arthrobotrys oligospora* علیه *Meloidogyne javanica*

Table 2- Interaction between *Caenorhabditis elegans*, *Arthrobotrys oligospora* and *Bacillus subtilis* against *Meloidogyne javanica.*

تیمار Treatment	تعداد گال به ازاء هر گیاه Number of galls per plant	تعداد توده تخم به ازاء هر گیاه Number of egg masses per plant	وزن تر ریشه (گرم) Fresh root weight (g)	وزن تر اندام‌های هوایی (گرم) Fresh foliage weight (g)
B+C+M+Ar	39.0 [d]	20.1 [d]	10.9 [ab]	43.0 [b]
B+ C+M	151.0 [b]	120.2 [b]	11.1 [ab]	41.0 [bc]
M+Ar	69.6 [c]	54.4 [c]	10.2 [bc]	32.7 [d]
B+M	162.1 [b]	125.0 [b]	10.7 [ab]	39.0 [c]
M	286.4 [a]	229.2 [a]	11.6 [ab]	26.1 [e]
B	–	–	11.9 [a]	46.1 [a]
H	–	–	9.0 [c]	40.2 [bc]

هر عدد میانگین پنج تکرار بوده و میانگین‌هایی که در هر ستون بر اساس آزمون دانکن ($p\leq0.05$) دارای اختلاف معنی‌دار با یکدیگر هستند با حروف مختلف مشخص شده‌اند.Ar: *A. oligospora*، B: *B. subtilis*، C: *C. elegans*، M: *M. javanica* ، H: گیاهان تیمار شده با آب مقطر سترون.

Each value is the mean of 5 replicates. The means followed by different letters in the same column are significantly different ($p\leq0.05$, Duncan). Ar: *A. oligospora*, B: *B. subtilis*, C: *C. elegans, M: M. javanica,* H: Plants treated with distilled water.

استفاده توام از روش‌های مختلف مدیریتی عوامل بیماری‌زای گیاهی به ویژه روش‌های بی‌خطر[1] از استراتژی‌های جدید مورد توجه محققان می‌باشد. با این وجود این نکته قابل توجه است که هر دو یا چند روشی قابل ترکیب با یکدیگر نمی‌باشند و در این میان آگاهی کامل از پتانسیل هر کدام و امکان استفاده توأم از آن‌ها ضامن به‌دست آوردن نتایج بهتر از هر کدام به تنهایی می‌باشد. در این تحقیق از دو آنتاگونیست *A. oligospora* و *B. subtilis* که پتانسیل کنترل کنندگی هر کدام از آن‌ها علیه نماتدهای مختلف بیماری‌زای گیاهی به ویژه نماتدهای مولد گره ریشه اثبات شده است به صورت توأم استفاده شده است.

اگرچه *A. oligospora* نیز قادر به تحریک سیستم دفاعی گیاه می‌باشد (Jamshidnejad, 2012)، ولی در این تحقیق به

۱- Safe

واسطه تولید تله‌های شبکه‌ای در این قارچ از توانایی مستقیم کنترل کنندگی آن بهره گرفته شده است. استفاده از نماتد *C. elegans* نیز در این تحقیق به منظور افزایش تولید تله در قارچ *A. oligospora* می‌باشد. به علاوه Migunova and Byzov (2005) نتیجه گرفتند که نماتدهای باکتری خوار *C. elegans* تشکیل اسپور قارچ *A. oligospora* را افزایش می‌دهند که این تعامل قارچ با نماتد کمک می‌کند که قارچ به طور موثرتری سیکل زندگی خود را در خاک کامل کند. تغذیه نماتد *C. elegans* از باکتری *B. subtilis* ممکن است در ابتدا منفی به نظر آید ولی با توجه به این که باکتری عمدتاً جهت تحریک سیستم دفاعی گیاه بوده که در ابتدای افزودن به خاک انجام می‌شود و از طرف دیگر این نماتد نیز قادر به حذف کامل باکتری از محیط نمی‌باشد، استفاده توام از این سه ارگانیزم علیه نماتد *M. javanica* را ابتکاری مفید نشان می‌دهد. فاز رویشی این باکتری توسط نماتد *C. elegans* مورد تغذیه قرار می‌گیرد و کاملاً توسط نماتد هضم می‌شود، ولی اندوسپورهای آن بدون هضم از دستگاه گوارش نماتد خارج می‌شود (Laaberkia and Dworkin, 2008) . از دیگر مکانیزم‌های بیوکنترلی عوامل بیولوژیک القاء سیستم دفاعی گیاهان می‌باشد. مکانیزمی که بنا به عقیده اغلب محققان از جمله مفیدترین روش‌های مدیریت عوامل بیماری‌زای گیاهی می‌باشد. در این تحقیق از توانایی القاء سیستم دفاعی گیاه توسط *B. subtilis* به عنوان یکی از الیسیتورهای معروف و مفید بهره گرفته شده است. نتایج بررسی‌های گلخانه‌ای نشان می‌دهد که این باکتری به تنهایی نیز شاخص‌های بیماری‌زایی نماتد را کاهش داده است. همراهی این باکتری با نماتد *C. elegans* منجر به کاهش بیشتر این شاخص شده است که در جای خود نیاز به تعمق و تحقیق بیشتر دارد. علاوه بر این باکتری مذکور به عنوان یک رایزوباکتر افزایش دهنده رشد گیاه (Mena-Violante and Olalde-Portugal, 2007; Park *et al*., 2013) می‌تواند موجب بهینه شدن رشد گیاه گردد (جدول ۲). پروتئاز خارج سلولی تجزیه کننده کوتیکول نماتدها (Apr19) از دیگر ابزارهای این باکتری در بیوکنترل نماتدها می‌باشد (Lian *et al*., 2007). مایه زنی اولیه گیاهان با این باکتری در این تحقیق به منظور القاء اولیه سیستم دفاعی گیاه می‌باشد ولی با وجود نماتد باکتری خوار *C. elegans* امکان کاهش جمعیت این باکتری وجود داشت. انتخاب وجود باکتری در خاک یا بقاء نماتد *C. elegans* برای افزایش تولید تله توسط قارچ از جمله گزینه‌هایی بودند که محققان این تحقیق با توجه به کارایی بسیار بالای تله‌های قارچ گزینه دوم را انتخاب نمودند. از طرف دیگر باکتری نیز هیچوقت به طور کامل از خاک حذف نمی‌شود. وجود پوشش مقاوم به لیزوزایم دستگاه گوارش نماتد منجر به عدم هضم اندوسپور و خروج سالم آن از دستگاه گوارش نماتد می‌شود (Laaberkia and Dworkin, 2008). از طرف دیگر تحرک نماتد در خاک نیز سبب انتشار باکتری در محیط خاک می‌گردد. در یک نگاه اجمالی ممکن است تأثیر ترکیبات فرار و غیر فرار *B. subtilis* بر *A. oligospora* از موارد منفی این تحقیق به نظر آید ولی آن چه نویسندگان این تحقیق را بر آن داشت که از این تعامل (ترکیب) علیه نماتد بیمارگر استفاده نمایند این بود که از مناطق مختلف خاک در جهت جلوگیری از دسترسی نماتد بیمارگر به گیاه استفاده نمایند و از باکتری به عنوان یک سد در منطقه ریزوسفر و استفاده از *A. oligospora* در تمام قسمت‌های خاک جهت تولید تله استفاده شد.

در آزمایشات گلخانه‌ای، در صورتی که *C. elegans* وجود نداشت احتمال بالا رفتن جمعیت *B. subtilis* در محیط خاک وجود داشت ولی با توجه به تغذیه شدید این نماتد از باکتری *B. subtilis*، به احتمال زیاد در نهایت از نظر جمعیتی بین این

عوامل (*A. oligospora*، *C. elegans* و *B. subtilis*) تعادل ایجاد می‌شود و احتمال ایجاد جمعیتی بسیار بالا از باکتری که برای قارچ محدود کننده باشد بعید به نظر می‌رسد. از طرف دیگر محیط خاک محیطی بسته نیست و احتمال کاهش غلظت ترکیبات فرار از طریق خروج از سطح خاک و نیز آنتی بیوتیک‌های ناشی از باکتری توسط آبیاری وجود دارد و احتمالاً این عوامل موجب کاهش اثر سوء باکتری بر قارچ می‌شوند. بنابراین این قارچ قسمت‌های مختلف خاک را کلونیزه نموده و با ایجاد تله موجب کاهش جمعیت نماتد بیمارگر می‌گردد.

استفاده توام از استراتژی‌های مدیریتی عوامل بیماری‌زای گیاهی به منظور افزایش راندمان کنترل بیمارگر، از جمله موضوعات مورد علاقه محققان در سال‌های اخیر می‌باشد. در این میان ترکیب دو یا چند عامل بیوکنترل (Duponnois *et al.*, 1997)، ترکیب رایزوباکترها و میکورایزها (Jaizme-Vega *et al.*, 2006)، ترکیب عوامل بیوکنترل با اصلاح کننده‌های خاک (Singh *et al.*, 2012) و ترکیب دو استراتژی کنترل بیولوژیک و تحریک سیستم دفاعی گیاه (Naserinasab *et al.*, 2012) در بین تحقیقات مختلف نتایج مفید و قابل توجهی را ارائه نموده است. نتایج این تحقیق گویای این نکته است که بهینه سازی و ارتقاء راندمان هر کدام از این استراتژی‌ها به کمک دیگر ارگانیزم‌ها و یا تکنیک‌های مختلف می‌تواند نتایج بالاتری را در مدیریت بیمارگرهای گیاهی عاید سازد. بسیاری از این تکنیک‌ها می‌تواند بسیار ساده ولی دارای تأثیر چشم گیر باشد.

References

ABBOTT, W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide, Journal of Economic Entomology, No. 18: 265-267.

ARAUJO, F. F. D. and D. MENEZES, 2009. Induction of resistance in tomato by biotic (*Bacillus subtilis*) and abiotic (Acibenzolar-S-Methyl) inducers, Summa Phytopathologica, No. 35: 169-172.

CHEN, F., M. WANG, Y. ZHENG, J. LUO, X. YANG and X. WANG, 2010. Quantitative changes of plant defense enzymes and phytohormone in biocontrol of cucumber Fusarium wilt by *Bacillus subtilis* B579, World Journal of Microbiology and Biotechnology, No. 26: 675-684.

CHITHRASHRE, E., A. C. UDAY, S. CHANDRA NAYAKA, M. S. REDDY and C. SRINIVAS, 2011. Plant growth-promoting rhizobacteria mediate induced systemic resistance in rice against bacterial leaf blight caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, Biological Control, No. 59: 114-122.

CHOWDAPPA, P., S. MOHAN KUMAR, M. JYOTHI LAKSHMI and K. UPRETI, 2012. Growth stimulation and induction of systemic resistance in tomato against early and late blight by *Bacillus subtilis* OTPB1 or *Trichoderma harzianum* OTPB3, Biological Control, No. 65: 109-117.

DENNIS, C. and J. WEBSTER, 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma* III. Hyphal interaction, Trans. Br. Mycological Society, No. 57: 363-369.

DUPONNOIS, R., T. MATEILLE and M. GUEYE, 1995. Biological characteristics and effects of two strains of *Arthrobotrys oligospora* from Senegal on *Meloidogyne* species parasitizing tomato plants, Biocontrol Science and Technology, No. 5:517-526.

DUPONNOIS, R., A. M. BA and T. MATEILLE, 1998. Effects of some rhizosphere bacteria for the biocontrol of nematodes of the genus Meloidogyne with *Arthrobotrys oligospora*, Fundamental and Applied Nematology, No. 21: 157-163.

EISENBACK, J. D. 1985. Diagnostic characters useful in the identification of the four most common species of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp). 95-112 In: An advanced treaties on *Meloidogyne*. Vol 1: Biology and control. (Eds). Sasser, J. N. and Carter, C. C. Raleigh, U.S.A, North Carolina State University, Graphics.

ETEBARIAN, H. R., P. L. SHOLBERG, K. C. EASTWELL and R. J. SAYLER, 2005. Biological control of apple blue mold with *Pseudomonas fluorescens*, Canadian Journal of Microbiology, No. 51:591-598.

FIDDAMAN, P. J. and S. ROSSALL, 1993. The production of antifungal volatile by *Bacillus subtilis*, Journal of Applied Bacteriology, No. 74: 119–126.

GOMES, A., R. VASCONCELLOS, M. RAMOS, M. GUIMARÃES, A. YATSUDA and M. VIEIRA-BRESSAN, 2001. In vitro interaction of Brazilian strains of the nematode-trapping fungi *Arthrobotrys* spp. on *Panagrellus* sp. and *Cooperia punctata*, Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, No. 96: 861-864.

HUSSEY, R. and BARKER, K. 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique, Plant Disease Report, No. 57: 1025-1028.

JAIZME-VEGA, M. D. C., A. S. RODRÍGUEZ-ROMERO, and L. A. BARROSO NÚÑEZ, 2006. Effect of the combined inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting rhizobacteria on papaya (*Carica papaya* L.) infected with the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*, Fruits. No. 61: 151-162.

JAMSHIDNEJAD, V. 2012. Comparative study of *Arthrobotrys oligospora* ,*Trichoderma harzianum* and *Paecilomyces lilacinus* as biological control agents of root knot nematode (*Meloidogyne javanica*) in tomato and some their biocontrol mechanisms. M.Sc. theisis. University of Tehran, Tehran, Iran.

KUMAR, D. and K. SINGH, 2006. Assessment of predacity and efficacy of *Arthrobotrys dactyloides* for biological control of root knot disease of tomato, Journal of Phytopathology, No. 154: 1-5.

KUMARI, J. A. and T. PANDA, 1992. Studies on critical analysis of factors influencing improved production of protoplasts from *Trichoderma reesei* mycelium, Enzyme and Microbial Technology, No. 14: 241-248.

LAABERKI, M. and J. DWORKIN, 2008. Death and survival of spore-forming bacteria in the *Caenorhabditis elegans* intestine, Symbiosis, No. 46: 95-100.

LIAN, L., B. TIAN, R. XIONG, M. ZHU, J. XU and K. ZHANG, 2007. Proteases from *Bacillus*: a new insight into the mechanism of action for rhizobacterial suppression of nematode populations, Letters in Applied Microbiology, No. 45: 262-269.

MENA-VIOLANTE, H. G. and V. OLALDE-PORTUGAL, 2007. Alteration of tomato fruit quality by root inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): *Bacillus subtilis* BEB-13bs, Scientia Horticulturae, No. 113: 103-106.

MIGUNOVA, V. D. and B. A. BYZOV, 2005. Determinants of trophic modes of the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora* interacting with bacterivorous nematode *Caenorhabditis elegans*, Pedobiologia, No. 49:101-108.

MOSTAFANEZHAD, H., N. SAHEBANI and S. NOURINEJHAD ZARGHANI, 2013. Control of root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) with combination of *Arthrobotrys oligospora* and salicylic acid and study of some plant defense responses, Biocontrol Science and Technology, No. 24: 203-215.

NAGESH, M., S. HUSSAINI, B. CHIDANANDASWAMY, and S. BISWAS, 2005. Isolation, in vitro characterization and predaceous activity of an Indian isolate of the fungus, *Arthrobotrys oligospora* on the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, Nematologia Mediterranea, No. 33: 179-183.

NASERINASAB, F., N. SAHEBANI and H. R. ETEBARIAN, 2012. Biological control of root knot nematode of tomato *Meloidogyne javanica* with *Trichoderma harzianum* BI and salicylic acid in greenhouse and an investigation of their effect on induction of phenolic compounds and total flavonoids on tomato. Iranian Journal of Plant Protection Science, No. 1: 121-131. (in Persian with English summary).

PARK, J., W. GAMS, M. SCHOLLER, E. GHISALBERTI

of charcoal rot of cowpea and wilt of cumin, Phytopathologia Mediterranea, No. 51: 307-316.

TUNLID, A. and S. JANSSON, 1991. Proteases and their involvement in the infection and immobilization of nematodes by the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora*. Applied and Environmental Microbiology, No. 57: 2868-2872.

WELLER, D. M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. Annual Review of Phytopathology, No. 26: 379–407.

XIE, H., F. AMINUZZAMAN, L. XU, Y. LAI, F. LI and X. LIU, 2010. Trap induction and trapping in eight nematode-trapping fungi (*Orbiliaceae*) as affected by juvenile stage of *Caenorhabditis elegans*, Mycopathologia, No. 169: 467-473.

YOUSEFI, H., N. SAHEBANI, L. FARAVARDEH and V. MAHDAVI, 2012. Application of a Combination of Salicylic acid and *Bacillus subtilis* to Control Cucumber Root and Stem Rot, Caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum*, and Evaluation of Phenylalanine Ammonia Lyase Activity, Iranian Journal of Plant Protection Sciences, No. 2: 339-351.

ZEHNDER, G. W., C. YAO, J. F. MURPHY, E. R.SIKORA, and J. W. KLOEPPER, 2000. Induction of resistance in tomato against cucumber mosaic cucumovirus by plant growth-promoting rhizobacteria, Biocontrol, No. 45: 127-137.

and K. SIVASITHAMPARAM, 2002. Orbiliaceous nematode-trapping fungi and related species in Western Australia and their biological activities, Australasian Mycologist, No. 21: 45-52.

PARK, K., J. W. PARK, S. W. LEE and K. BALARAJU, 2013. Disease suppression and growth promotion in cucumbers induced by integrating PGPR agent *Bacillus subtilis* strain B4 and chemical elicitor ASM, Crop Protection, No. 54: 199-205.

SATYANDRA, K. and A. K. CHAUBEY, 2007. Effect of culture filtrates of *Bacillus subtilis* and *Aspergillus fumigatus* on hatching and mortality of juveniles of *Meloidogyne incognita*, Journal of Experimental *Zoology,* No. 10: 461-463.

SHANMUGAM, V. and N. KANOUJIA, 2011. Biological management of vascular wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycospersici* by plant growth-promoting rhizobacterial mixture, Biological Control, No. 57:85-93.

SIDDIQUI, Z. A. and M. S. AKHTAR, 2009. Effects of antagonistic fungi, plant growth-promoting rhizobacteria, and arbuscular mycorrhizal fungi alone and in combination on the reproduction of *Meloidogyne incognita* and growth of tomato, Journal of General Plant Pathology, No. 75: 144-153.

SINGH, V., R. MAWAR and S. LODHA, 2012. Combined effects of biocontrol agents and soil amendments on soil microbial populations, plant growth and incidence