اثر بازدارندگی برخی جدایه‌های باکتری *Pseudomonas fluorescens* بر نماتد ریشه‌گرهی گوجه‌فرنگی، *Meloidogyne incognita*

لیلا جهانبازیان[۱]، محمد عبدالهی[۱]، حسام‌الدین رمضانی[۲]

۱- گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه یاسوج

۲- گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران

مسئول مکاتبات: محمد عبدالهی، پست الکترونیک: mdabdollahi@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۲/۰۷ ۳ (۱) ۳۳-۴۴ تاریخ پذیرش: ۹۴/۰۳/۲۰

چکیده

نماتد ریشه‌گرهی به لحاظ خسارتی که در سطح جهانی به گونه‌های مختلف گیاهی وارد می‌کند، از مهم‌ترین نماتدهای بیماری‌زا در گیاهان می‌باشد. به‌دلیل مضر بودن نماتدکش‌های شیمیایی برای سلامتی انسان و محیط زیست، تحقیقات برای پیدا کردن روش‌های جدید مدیریت جمعیت نماتدهای انگل گیاهی که با محیط سازگاری داشته باشد، اهمیت پیدا کرده است. این تحقیق با هدف بررسی اثر جدایه‌های مختلف باکتری *P. fluorescens* در مدیریت نماتد ریشه‌گرهی انجام شد. در این بررسی اثر ۹ جدایه باکتری *P. fluorescens* بر نماتد ریشه‌گرهی در آزمایشگاه و گلخانه مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که تمامی جدایه‌های مورد بررسی در آزمایشگاه باعث ایجاد مرگ و میر لارو سن دوم نماتد شدند، ولی میزان مرگ و میر در تیمارهای مختلف در سطح یک درصد اختلاف معنی‌دار داشت. هرچند که جدایه‌های مختلف از نظر خاصیت نماتدکشی دارای توانایی متفاوتی بودند. در گلخانه نیز اکثر جدایه‌های مورد بررسی گال‌زایی و تکثیر نماتد را کاهش دادند. از نظر کاهش فاکتور تولید مثل نماتد، جدایه‌های ۲ و ۱۶ که از خاک ناحیه‌ی ریزوسفر در شهرستان بویراحمد جداسازی شده بودند، نسبت به *P. fluorescens* CHA0 مؤثرتر بودند. تقریباً هیچ‌کدام از جدایه‌ها قادر به افزایش شاخص‌های رشدی گیاه در مقایسه با شاهد آلوده نبودند.

واژه‌های کلیدی: *Pseudomonas fluorescens*، بویراحمد، گوجه‌فرنگی، مهار زیستی، نماتد ریشه‌گرهی

مقدمه

گوجه‌فرنگی از سبزی‌های بسیار مهمی است که به‌علت داشتن انواع ویتامین‌ها، اسیدهای مفید، قند و املاح معدنی نقش مهمی در تغذیه و سلامت انسان دارد. میوه این گیاه دارای ویتامین‌های مختلف و عناصر معدنی فراوانی است که برای بدن انسان مفید می‌باشد و مصرف آن به‌صورت خام و به‌صورت سس، رب و یا پخته رواج دارد (Khoshkhoy *et al.*, 2010). نماتدهای ریشه‌گرهی، *Meloidogyne* spp. Goeldi, 1892 از شایع‌ترین بیماری‌هایی هستند که در جهان تولید محصولات کشاورزی را کاهش می‌دهند. تقریباً همه‌ی گیاهانی که در جهان، به‌عنوان منبع غذایی به‌شمار می‌روند، نسبت به‌این نماتد حساس می‌باشند و به‌طور میانگین خسارت آن به‌محصولات کشاورزی حدود پنج درصد می‌باشد، اما در کشورهای در حال توسعه میزان خسارت آن بیشتر است (Sasser & Carter, 1985). در گلخانه‌ها، کنترل این نماتد از طریق حرارت دادن خاک با بخار آب یا ضدعفونی آن با نماتدکش‌های تدخینی انجام می‌شود. در بعضی محصولات، ارقام مقاوم به‌نماتد ریشه‌گرهی در دسترس هستند. برخی عملیات زراعی نیز مانند رعایت تناوب کشت، آیش گذاشتن زمین، کشت گیاهان غیرحساس و برخی مواد افزودنی به‌خاک نیز در کاهش خسارت این نماتد مؤثر هستند (Agrios, 2005). این گونه اقدام‌ها نماتدهای موجود در خاک را کاملاً از بین نمی‌برند ولی جمعیت آن‌ها را کاهش می‌دهند (Elahinia, 2007). عواملی چون آگاهی از مضرات آفت‌کش‌های شیمیایی، مدت زمان لازم برای

توسعه‌ی ارقام مقاوم و فشار اقتصادی ناشی از استفاده از تناوب و روش‌های زراعی دیگر، موجب ایجاد انگیزه برای یافتن عوامل بیوکنترل مناسب شده است (Jatala, 1985).

جنس *Pseudomonas* یکی از مهم‌ترین باکتری‌های گرم منفی در کنترل بیولوژیک محسوب می‌شود. باکتری *P. fluorescens* از باکتری‌هایی است که در ناحیه‌ی فراریشه‌ی گیاهان مستقر شده و باعث افزایش رشد گیاهان می‌شوند و دارای اثر آنتاگونیستی بر نماتدهای انگل گیاهی نظیر نماتد ریشه‌گرهی می‌باشد (Almaghrabi *et al.*, 2013). نتایج تحقیق باقری و همکاران نشان داد که غلظت‌های مختلفی از سویه UTPF5 باکتری *P. fuorescens* تأثیر معنی‌داری در حرکت و دفع لاروهای *M. javanica* از ناحیه‌ی ریشه دارد (Bagheri *et al.*, 2014). عصاره‌ی این باکتری تقریباً باعث مرگ ۱۰۰ درصدی لاروها بعد از ۲۴ ساعت و ممانعت کامل از تفریخ تخم نماتدها شد. باکتری *P. fluorescens* CHA0 به‌روش محلول‌پاشی اندام‌های هوایی گوجه‌فرنگی، باعث القای مقاومت سیستمیک علیه *M. javanica* می‌شود. این باکتری باعث القای آنزیم دفاعی پراکسیداز به‌طور سیستمیک در کل گیاه، از جمله ریشه شده و بدین طریق مانع از فعالیت نماتد ریشه‌گرهی می‌شود (Mokhtari *et al.*, 2009). Siddiqui *et al.* (2005) طی بررسی‌هایی عنوان کردند که پروتئاز خارج سلولی این باکتری در بیوکنترل نماتد ریشه‌گرهی *M. incognita* در گوجه‌فرنگی و سویا مؤثر است. این باکتری با تولید سیانید هیدروژن نیز اثر بازدارندگی بر نماتد ریشه‌گرهی *M. javanica* دارد (Siddiqui *et al.*, 2006). براساس مطالعه ایشان، سیانید هیدروژن باعث ایجاد مرگ و میر در لارو سن دوم و بازدارندگی از تفریخ تخم نماتد می‌شود ولی در القای مقاومت سیستمیک نقشی ندارد. باکتری *P. fluorescens* با القای آنزیم‌هایی مثل پراکسیداز، پلی‌فنل‌اکسیداز و فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز در گوجه‌فرنگی موجب القای مقاومت سیستمیک در گیاه علیه نماتد ریشه‌گرهی می‌شود (Sankari *et al.*, 2012). با توجه به تحقیقات صورت گرفته در مورد اثر باکتری *P. fluorescens* بر نماتدها، جدایه‌های مختلف این باکتری که از خاک‌های شهرستان بویراحمد جداسازی شده بود بر نماتد ریشه‌گرهی گوجه فرنگی در آزمایشگاه و گلخانه مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه جمعیت نماتد

از مزارع و گلخانه‌های آلوده به نماتد ریشه‌گرهی در یاسوج و سی‌سخت، از شهرستان‌های استان کهگیلویه و بویراحمد و از دزفول در استان خوزستان نمونه‌برداری شد. ریشه‌های آلوده با جریان ملایم آب شستشو داده شدند. پس از قطعه قطعه کردن ریشه‌ها، با استفاده از استریومیکروسکوپ از هرکدام از ریشه‌های آلوده چندین نماتد ماده جدا گردیده و از ناحیه شبکه‌ی کوتیکولی انتهای بدن آن‌ها اسلاید میکروسکوپی تهیه و بررسی گردید. سپس از توده تخم همان نماتدها جهت خالص‌سازی و تکثیر نماتدها استفاده شد. خالص‌سازی نماتد با استفاده از روش تک توده تخم انجام گردید. پس از خالص‌سازی نماتدها، برای اطمینان از شناسایی گونه‌ی مورد نظر، مجدداً از برش انتهایی بدن آن‌ها اسلاید میکروسکوپی تهیه گردید و خصوصیات ریخت‌شناسی آن‌ها بررسی گردید. برای استخراج تخم‌های نماتد، ریشه‌های آلوده شسته و قطعه قطعه شدند. چند میلی‌لیتر محلول یک درصد هیپوکلریت سدیم به‌ریشه‌های حاوی کیسه تخم درون مخلوط‌کن اضافه و به‌مدت ۳۰ ثانیه با سرعت متوسط خرد گردید. در مرحله بعد مخلوط را از الک ۱۰۰ مش که در زیر آن الک ۵۰۰ مش قرار داشت، عبور داده و با آب شسته شد. پس از چند بار شستشو با آب، قطعات ریشه و بقایای گیاهی به‌وسیله‌ی الک ۱۰۰ مش جدا شد و تخم‌ها روی الک ۵۰۰ مش باقی ماندند. محتوای سطح الک با آب شسته و در بشر جمع‌آوری گردید (Hussay & Barker, 1973). برای تهیه‌ی لارو سن دوم نماتد یک کاغذ صافی بر روی توری فلزی قرار داده شد و درون یک تشتک پتری گذاشته شد. سپس سوسپانسیون تخم نماتد روی کاغذ صافی و در تشتک پتری آب مقطر ریخته شد و در انکوباتور با دمای حدود ۲۷ درجه‌ی سلسیوس به‌مدت ۴ تا ۵ روز نگهداری شدند. به‌این ترتیب

تخم‌ها روی کاغذ صافی مرطوب تفریخ شده و لاروهای سن دوم نماتد پس از عبور از کاغذ صافی در کف تشتک پتری قرار گرفتند (Vrain, 1977).

تهیه‌ی باکتری *P. fluorescens*

دو جدایه از باکتری *P. fluorescens* از آزمایشگاه بیماری‌شناسی گیاهی دانشگاه تربیت مدرس و جدایه‌ی *P. fluorescens* CHA0 از آزمایشگاه گیاه‌پزشکی دانشگاه شیراز تهیه گردید و تعدادی از جدایه‌های این باکتری از خاک‌های مزارع و گلخانه‌های شهرستان بویراحمد جداسازی گردید. به‌منظور به‌دست آوردن باکتری *P. fluorescens*، در بهار و تابستان ۱۳۹۱، از خاک منطقه ریشه‌ی گیاهان مختلف در روستاهایی از شهرستان بویراحمد نمونه‌برداری انجام شد. جداسازی باکتری از خاک، به‌روش رقیق‌سازی سوسپانسیون خاک و کشت روی محیط King's B انجام شد (Aneja, 2001). برای شناسایی باکتری آزمون‌های گرم به‌روش Suslow *et al.* (1982)، رشد هوازی و بی‌هوازی (O\F) به‌روش Hugh & Leifson (1953)، آرژنین دهیدرولاز به‌روش Thornley (1960)، فوق حساسیت روی توتون به‌روش Klement *et al.* (1964)، کاتالاز، تولید رنگ فلورسنت، تولید لوان، لهانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی و ذوب ژلاتین به‌روش Schaad *et al.* (2001)، انجام شد.

برای تشخیص قطعی گونه‌ی *P. flourescens*، از آغازگرهای اختصاصی در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) استفاده شد. DNA باکتری به‌روش جوشاندن استخراج شد. آغازگرهای اختصاصی 16SPSEF (5-TGCATTCAAAACTGACTG-3) و 16SPSER (5-AATCACACCGTGGTAACCG-3) برای تکثیر قطعه ۸۵۰ جفت بازی از ژنوم باکتری مورد استفاده قرار گرفت. مخلوط واکنش PCR، در حجم ۵۰ میکرولیتر و شامل ۵ میکرولیتر DNA الگوی باکتری، ۵ میکرولیتر بافر PCR 10x، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$، ۱ میکرولیتر dntps 10mM، ۱ میکرولیتر از هر یک از آغازگرها ، ۰/۵ میکرولیتر Taq DNA polymerase ۲/۵ واحد و ۳۵ میکرولیتر آب مقطر تزریقی بود. برنامه حرارتی PCR شامل واسرشت‌سازی اولیه (۹۴ درجه‌ی سلسیوس به‌مدت ۵ دقیقه) و سپس یک برنامه‌ی ۳۰ چرخه‌ای، شامل واسرشت‌سازی (۱ دقیقه در ۹۴ درجه‌ی سلسیوس)، اتصال آغازگر (۱ دقیقه در ۵۵ درجه‌ی سلسیوس)، تکثیر قطعه (۲ دقیقه در ۷۲ درجه‌ی سلسیوس) و در پایان یک چرخه ۲ دقیقه‌ای با دمای ۷۲ درجه‌ی سلسیوس در نظر گرفته شد. بعد از تکثیر DNA الکتروفورز با ژل آگارز ۱٪ ، در ۱۰۰ ولت انجام شد (Scarpellini *et al.*, 2004).

بررسی اثر جدایه‌های مختلف *P. fluorescens* بر نماتد ریشه‌گرهی در آزمایشگاه

دو میلی‌لیتر از سوسپانسیون colony forming unit/ml 10^8 از هر جدایه باکتری به حدود ۱۰۰ لارو سن دوم تازه تفریخ شده نماتد اضافه و از آب مقطر استریل به‌عنوان شاهد استفاده و در دمای حدود ۲۷ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شد. تعداد لاروهای مرده پس از ۴۸ ساعت با استریومیکروسکوپ شمارش و میزان مرگ و میر به‌صورت درصد تعیین گردید (Ashoub & Amara, 2010). این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۰ تیمار در چهار تکرار انجام شد.

بررسی اثر جدایه‌های مختلف *P. fluorescens* بر نماتد ریشه‌گرهی در گلخانه

برای آزمایش گلخانه‌ای گوجه‌فرنگی رقم ارلی اربانا استفاده شد، زیرا یک رقم حساس نسبت به نماتد ریشه‌گرهی می‌باشد (Khodaei Arbat *et al.*, 2009). ابتدا بذرهای گوجه‌فرنگی به‌وسیله‌ی وایتکس ۱۰ درصد (حاوی پنج درصد هیپوکلریت سدیم) و به‌مدت یک دقیقه ضدعفونی سطحی شد و پس از شستشوی بذرها با آب مقطر استریل، در گلدان‌های حاوی خاک الک شده (شامل هوموس، خاک مزرعه و ماسه با نسبت ۱:۱:۲ و پاستوریزه شده با عبور بخار آب به‌مدت یک ساعت) کشت گردیدند. گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی در مرحله‌ی چهار برگی به گلدان‌های اصلی حاوی یک کیلوگرم خاک استریل انتقال داده شدند. سه روز بعد، هر کدام از گلدان‌ها با ۲۰۰۰ لارو سن دوم نماتد تلقیح شد. در همان زمان ۲۰ میلی‌لیتر از هر سوسپانسیون باکتری (10^8 colony forming unit /ml)

بـه خـاک اطـراف ریشـه‌ی گیـاه‌هـان اضـافه شـد (Abo-Elyousr *et al.*, 2010).

گلدان‌ها به‌مدت دو ماه پس از مایه‌زنی نماتد در گلخانه با دمای حدود ۲۸-۲۷ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند. میزان آب‌دهی به‌گیاهچه‌های مورد آزمایش به‌اندازه‌ی مصرف روزانه هر گیاهچه بود. برای بررسی نتایج آزمایش، شاخص‌های رشدی گیاه شامل طول ساقه، طول ریشه، وزن تر ریشه و اندام‌های هوایی، وزن خشک ریشه و اندام‌های هوایی و شاخص‌های تولید مثل نماتد شامل تعداد گال، توده تخم، تخم و لارو در یک گرم ریشه و تعداد لارو سن دوم در ۲۰۰ گرم خاک تعیین و در نهایت با تقسیم جمعیت نهایی نماتد بر جمعیت اولیه، فاکتور تولید مثل محاسبه شد. برای شمارش گال و توده تخم رنگ‌آمیزی ریشه با ائوزین‌یلو انجام شد. ریشه‌ها کاملاً شسته شدند و سپس ۳۰ دقیقه در محلول ائوزین‌یلو (حاوی ۰/۱ گرم ائوزین یلو در یک لیتر آب مقطر) نگهداری شدند و بعد از آن جهت خارج شدن رنگ اضافی شسته شدند (Jacquet *et al.*, 2005).

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های به‌دست آمده با نرم‌افزار SPSS 20 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و تجزیه‌ی واریانس بر اساس آنالیز یک طرفه و مقایسه میانگین براساس آزمون دانکن انجام شد.

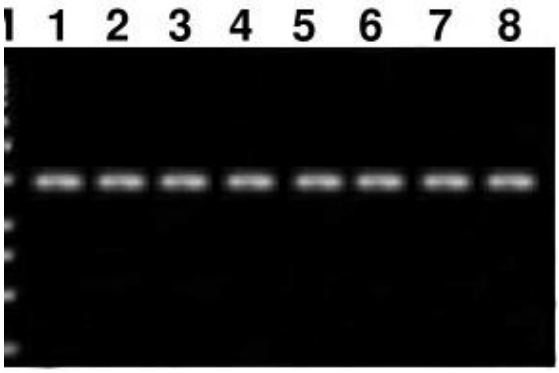
نتایج و بحث

از ۷۶ جدایه‌ی باکتری جداسازی و خالص‌سازی شده خاک ناحیه‌ی ریزوسفر گیاهان مختلف، ۲۱ جدایه گرم مثبت و ۵۵ جدایه گرم منفی بودند. برای تعیین گونه‌ی *P. fluorescens* آزمون‌های بیوشیمیایی افتراقی انجام شد و تشخیص نهایی به‌وسیله‌ی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگر اختصاصی صورت گرفت (شکل ۱) و در نهایت اثر بیوکنترلی هشت جدایه متعلق به‌گونه‌ی *P. fluorescens*، بر نماتد ریشه‌گرهی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۱- جدایه‌های باکتری *P. fluorescens* مورد بررسی در آزمایش تأثیر باکتری بر نماتد *Meloidogyne incognita*.

Table 1. Different isolates of *Pseudomonas fluorescens*, were tested against *Meloidogyne incognita*.

Isolate	Source
B2	Tomato field, Servak
B16	Corn field, Servak
B52	Tomato glasshouse, Mohammad Abad
B55	Mung bean field, Dehbaraftab
B56	Mung bean field, Dehbaraftab
B75	Mung bean field, Dehbaraftab
P. fluorescens (1)	Supplied by Tarbiat Modares University
P. fluorescens (2)	Supplied by Tarbiat Modares University
P. fluorescens CHA0	Supplied by Shiraz University

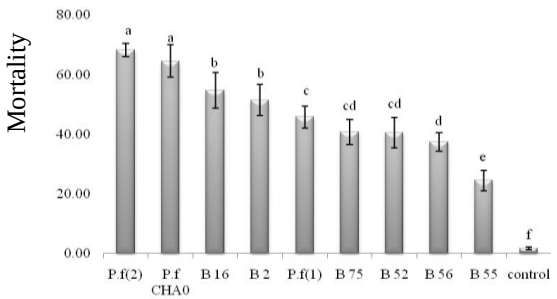


شکل ۱- تکثیر باند ۸۴۸ جفت بازی با استفاده از آغازگر اختصاصی 16SPSEflu F و 16SPSE R از جدایه‌های باکتری *Pseudomonas fluorescens* در ژل آگارز یک درصد. M. مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی؛ 1. جدایه (1) *P. fluorescens*؛ 2. جدایه ۱۶؛ 3. جدایه ۵۶؛ 4. جدایه۷۵؛ 5. جدایه ۲؛ 6. جدایه ۵۵؛ 7. جدایه ۵۲؛ 8. جدایه (2) *P. fluorescens*.

Fig. 1. DNA fingerprinting pattern of isolates of *Pseudomonas fluorescens* generated by specific primers 16SPSEflu F and 16SPSE R. M: Marker (100bp); 1: *P. fluorescens*. (1); 2: B16; 3: B56; 4: B75; 5: B2; 6: B55; 7: B52; 8: *P. fluorescens* (2).

نتایج بررسی‌های آزمایشگاهی

در تجزیه‌ی واریانس، تیمار جدایه‌های مختلف باکتری بر مرگ و میر لارو سن دوم نماتد، در سطح ۱ درصد معنی‌دار شدند (جدول ۳). مقایسه‌ی میانگین‌ها طبق آزمون دانکن در شکل ۲ آمده است. همه‌ی جدایه‌های *P. fluorescens* مورد بررسی در آزمایشگاه باعث مرگ و میر لارو سن دوم نماتد شدند. ولی اثر جدایه‌های مختلف یکسان نبود. جدایه‌ی شماره ۲ بیشترین مرگ و میر و جدایه ۵۵ کم‌ترین مرگ و میر را باعث شدند (شکل ۲). مشابه چنین نتایجی در تحقیق Jonathan *et al.* (2006) نیز مشاهده شده است. آن‌ها اثر ۲۴ جدایه *P. fluorescens* را بر مرگ و میر نماتد *M. incognita* بررسی کردند و تعدادی از جدایه‌ها مرگ و میر بیشتری ایجاد کردند. Mohamed *et al.* (2009) نیز با بررسی اثر این باکتری بر نماتد ریشه‌گرهی، مشاهده کردند که توانایی زیادی در ایجاد مرگ و میر لاروها دارند. سودوموناس‌های فلورسنت متابولیت‌های سمی زیادی نظیر فنازین، ایندول، فنیل‌پیرول و پترین تولید می‌کنند (Ashoub & Amara, 2010).



شکل ۲- اثر جدایه‌های مختلف باکتری *Pseudomonas fluorescens* بر مرگ و میر لارو سن دوم نماتد ریشه‌گرهی. (خطوط روی ستون‌ها نشان‌دهنده‌ی انحراف استاندارد و حروف مشابه لاتین نشان‌دهنده‌ی عدم تفاوت معنی‌دار در سطح پنج درصد می‌باشد).

Fig. 2. Effect of different isolates of *Pseudomonas fluorescens* on mortality of J2s of *Meloidogyne incognita*. (Bars on graph are standard errors; columns by dissimilar letters are significantly different from each other at 5% probability level).

جدول ۲- خصوصیات مرفولوژیکی، فیزیولوژیکی و شیمیایی جدایه‌های باکتری *Pseudomonas fluorescens*.

Table 2. Morphological, physiological and biochemical characteristics of different isolates of *Pseudomonas fluorescens*.

Test	Isolates of *Pseudomonas fluorescens*							
	B2	B16	B52	B55	B56	B75	*P. fluorescens* 1	*P. fluorescens* 2
Gram	G^-	G^-	G^-	G^-	G^-	G^-	G^-	G^-
Oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+
Fluorescent pigmentation	+	+	+	+	+	+	+	+
HR on tobacco leaves	–	–	–	–	–	–	–	–
Arginine dehydrogenase	+	+	+	+	+	+	+	+
Levan	–	–	+	–	+	+	–	–
O/F	Obligate aerobe	Obligate aerobe	Obligate aerobe	Obligate aerobe	Obligate aerobe	Obligate aerobe	Obligate aerobe	Obligate aerobe
Gelatin dehydrogenase	+	+	+	+	+	+	+	+
Potato rotting	–	–	–	–	–	–	–	–

جدول ۳- تجزیه‌ی واریانس بررسی اثر جدایه‌های مختلف باکتری *P. fluorescens* بر مرگ و میر لارو سن دوم نماتد *Meloidogyne incognita*.

Table 3. Analysis of variance of mortality effects of different isolates of *Pseudomonas fluorescens* on J2s of *Meloidogyne incognita*.

Sources of variance	df	Mean squares
Treatment	9	1512.47**
Error	30	17.41
CV%	-	10.07

** معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد می‌باشد.

** Significant at 1% probability level of 1%

نتایج بررسی‌های گلخانه‌ای

در تجزیه‌ی واریانس، تیمار جدایه‌های مختلف باکتری بر شاخص‌های تولید مثل نماتد در گلخانه در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۴). در گلخانه، به‌جز جدایه‌ی ۵۵ بقیه جدایه‌های مورد بررسی باکتری *P. fluorescens*، تا حدودی از گال‌زایی و تکثیر نماتد جلوگیری کردند (جدول ۵). این جدایه در آزمایشگاه نیز نسبت به جدایه‌های دیگر، اثر نماتدکشی کمتری داشت. اثر بازدارندگی *P. fluorescens* بر نماتد ریشه‌گرهی، *M. incognita* روی برنج (Jonathan *et al.*, 2006)، *M. javanica* روی گوجه‌فرنگی (Khalighi *et al.*, 2010)، *M. javanica* روی خیار (Majzoob *et al.*, 2012)، *M. javanica* روی زیتون (Khalighi & Khodakaramia., 2012)، *M. incognita* روی بادمجان (Ashoub & Amara, 2010)، *M. incognita* روی گوجه‌فرنگی و موز (Jonathan *et al.*, 2000) گزارش شده‌است.

جدول ۴- تجزیه‌ی واریانس اثر سویه‌های مختلف *Pseudomonas fluorescens* بر شاخص‌های تولیدمثل نماتد *Meloidogyne incognita*.

Table 4. Analysis of variance of nematode-related factors of infected tomato by *Meloidogyne incognita*, treated with different isolates of *Pseudomonas fluorescens*.

Sources of variance	df	Mean squares				
		Gall/g root	Eggmass/g root	J2/g soil	Egg/g root	RF
Treatment	9	1463.08**	591.22**	10.96**	2325127.10**	82.26**
Error	39	26.33	12.12	0.45	29561.54	0.97
CV%	-	17.07	12.01	10.62	14.54	10.17

** Significant at 1% probability level of .

** معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد می‌باشد

جدول ۵- مقایسه‌ی میانگین اثر سویه‌های مختلف *Pseudomonas fluorescens* برشاخص‌های تولیدمثل نماتد *Meloidogyne incognita* در گلخانه (n=4).

Table 5. Comparison mean of nematode-related factors of infected tomato by *Meloidogyne incognita*, treated with different isolates of *Pseudomonas fluorescens* (n=4).

Treatments	nematode-related factors				
	Gall/g root	Eggmass/g root	J2/g soil	Egg/g root	RF
Nematode	43.25 c	32.25 a	5.37 a	1667.90 b	13.28 a
P. fluorescens (1)+Nematode	22.25 d	3.75 cd	3.04 cd	128.62 efg	2.13 cd
P. fluorescens (2)+Nematode	20.75 d	9.25 bc	2.98 d	361.50 cde	2.98 cd
CHA0+Nematode	19.25 d	7.50 bc	4.07 bc	269.25 defg	3.61 c
B2+Nematode	19.75 d	1.00 d	3.35 cd	35.90 fg	1.97 d
B16+Nematode	23.00 d	1.75 d	1.78 e	86.63 fg	1.50 d
B52+Nematode	42.25 c	7.50 bc	4.85 ab	294.50 def	3.61 c
B55+Nematode	52.25 b	36.75 a	2.58 de	2470.30 a	13.59 a
B56+Nematode	17.75 d	7.75 bc	2.33 de	170.93 cd	3.51 c
B75+Nematode	61.00 a	13.00 b	3.41 cd	608.00 c	5.35 b

* حروف مشابه لاتین در هر ستون، نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین تیمارها در سطح احتمال ۵٪ می‌باشد.

* Means followed by dissimilar letters in a column are significantly different from each other at 5% probability level

Siddiqui & Shaukat (2003) بیان داشتند که آنتی‌بیوتیک ۲و۴-دی‌استیل‌فلوروگلوسینول که توسط این باکتری تولید می‌شود، عاملی برای القای مقاومت سیستمیک علیه نماتد ریشه‌گرهی در گوجه‌فرنگی است. مختاری و همکاران مشاهده نمودند که باکتری *P. fluorescens* CHA0 باعث القای آنزیم دفاعی پراکسیداز به‌طور سیستمیک در کل گیاه از جمله ریشه‌ی گوجه‌فرنگی شده، در نتیجه فعالیت نماتد ریشه‌گرهی کاهش می‌یابد (Mokhtari *et al.*, 2009).

اثر جدایه‌های مختلف باکتری در بازدارندگی از ایجاد گال و تکثیر نماتد به‌یک میزان نبود و دارای تفاوت معنی‌دار با یکدیگر بودند. جدایه‌های ۷۵ و ۵۵ نه تنها تأثیری بر ایجاد گال توسط نماتد ریشه‌گرهی نداشتند بلکه در تیمار استفاده از این جدایه‌ها افزایش گال نسبت به شاهد وجود دارد. در مورد جدایه ۵۲ نیز تعداد نسبت به شاهد کاهش نداشته است ولی بقیه جدایه‌ها میزان گال را در مقایسه با شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش دادند. البته تفاوت در توفیق جدایه‌های مختلف در کاهش گال‌زایی نماتد قبلاً هم گزارش شده است و توجیه‌پذیر است (Almaghrabi *et al.*, 2013). به‌جز جدایه ۵۵، بقیه جدایه‌ها میزان توده تخم نماتد را کاهش دادند که از این نظر جدایه‌های ۲، ۱۶ و *P. fluorescens* (1) از بقیه مؤثرتر بودند. باکتری جدایه ۱۶ بیشتر از بقیه جدایه‌ها موجب کاهش تعداد لارو سن دوم نماتد در خاک شد و جدایه‌های ۲ و ۱۶ میزان تخم موجود در ریشه را بیشتر از بقیه جدایه‌ها کاهش دادند و در نهایت، همه‌ی جدایه‌های مورد بررسی به‌جز جدایه ۵۵ قادر به کاهش فاکتور تولید مثل نماتد بودند. از این نظر جدایه‌های ۲، ۱۶ و *P. fluorescens* (1) از بقیه‌ی جدایه‌ها مؤثرتر بودند و جدایه‌های دیگر در رتبه‌های بعد از آن‌ها قرار گرفتند (جدول ۵). هم‌چنین مشاهده شد که میزان تأثیر جدایه‌ها در آزمایشگاه و گلخانه به‌یک نسبت نبود. به‌عبارت دیگر جدایه‌هایی که در آزمایشگاه اثر نماتدکشی بیشتری داشتند، در گلخانه الزاماً بیشترین تأثیر را نداشتند. این تفاوت می‌تواند به‌دلیل پیچیده‌تر بودن شرایط خاک نسبت به آزمایشگاه و سازگاری بهتر برخی جدایه‌ها در ناحیه فراریشه و در نتیجه فعالیت بهتر آن‌ها باشد (Tian & Riggs, 2000).

در این بررسی، از نظر طول ساقه فقط بین تیمارهای جدایه‌های ۵۶ و ۷۵ با تیمار نماتد تفاوت وجود داشت. در تیمارهای ۵۲ و *P. fluorescens* (1) نیز افزایش در طول ریشه در مقایسه با شاهد مشاهده گردید از نظر وزن تر و خشک اندام‌های هوایی بین تیمارهای باکتری و نماتد تفاوتی دیده نشد ولی در مقایسه با شاهد، وزن خشک اندام هوایی در کاربرد جدایه‌های ۵۲ و *P. fluorescens* (1) به‌طور معنی‌داری دچار کاهش شد، در حالی‌که با شاهد گیاه سالم همگی جدایه‌ها دارای اختلاف معنی‌دار بودند. هیچ‌کدام از باکتری‌ها نیز قادر به افزایش وزن ریشه نبوده‌اند (جدول ۶).

مشابه چنین نتایجی توسط خلیقی و همکاران نیز دیده شده است. آن‌ها نیز مشاهده کردند که جدایه‌های مختلف باکتری *P. fluorescens* با وجود این‌که گال‌زایی و تکثیر نماتد ریشه‌گرهی را در گوجه‌فرنگی کاهش می‌دهند، ولی تغییری در رشد گیاه ایجاد نمی‌کنند (Khalighi *et al.*, 2010). Siddiqui & Shaukat (2003) نیز اثر سویه‌های *P. fluorescens* CHA0 و *P. fluorescens*/pME3424 را که دارای توانایی بیشتری در تولید آنتی‌بیوتیک DAPG هستند، بر نماتد *M. javanica* در گوجه‌فرنگی بررسی کردند. آن‌ها مشاهده نمودند که *P. fluorescens* CHA0 در مقایسه با گیاه آلوده به نماتد و بدون عامل بیوکنترل رشد گیاه را تغییر نمی‌دهد و *P. fluorescens*/pME3424 وزن تر شاخساره گوجه‌فرنگی را کاهش داد، در حالی که وزن ریشه تغییر نکرد.

با توجه به‌این مطالعات، در این بررسی اثر باکتری جدایه *P. fluorescens* CHA0 بر گیاه گوجه‌فرنگی بدون حضور بیمارگر نیز مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده گردید که در تیمار باکتری جدایه *P. fluorescens* CHA0 بدون نماتد، وزن تر و خشک اندام‌های هوایی نسبت به شاهد کاهش یافته است و با تیمار مایه‌زنی شده با نماتد به‌تنهایی تفاوتی ندارد. کاهش وزن تر اندام‌های هوایی توسط برخی جدایه‌های *P. fluorescens* توسط Ashoub & Amara (2010) نیز گزارش شده است. سویه CHA0، ۲و۴-دی‌استیل‌فلوروگلوسینول تولید می‌کند

که می‌تواند اثر ضد قارچی، ضد باکتریایی و یا اثر سمی بر گیاه داشته باشد (Keel *et al.*, 1992). Maurhofer *et al.* (1995)، اثر *P. fluorescens* بر بیماری *Pythium ultimum* در گیاهان شاهی، خیار و ذرت شیرین را مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها اثر بازدارندگی این باکتری را مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های پیولوتئورین و ۲و۴-دی‌استیل‌فلوروگلوسینول دانستند. براساس تحقیق ایشان، اگرچه افزایش تولید آنتی‌بیوتیک ممکن است باعث افزایش بازدارندگی بیماری شود، ولی این امکان وجود دارد که بر گیاه نیز اثر سمی داشته باشند. با توجه به‌مطالب ذکر شده، احتمالاً گیاه گوجه‌فرنگی نسبت به ترشحات باکتری *P. fluorescens* حساس می‌باشد و جهت استفاده از این باکتری به‌عنوان عامل بیوکنترل بر روی گوجه‌فرنگی مطالعات بیشتری جهت اطمینان از عدم خسارت به خود گیاه ضروری است.

جدول ۶- تجزیه‌ی واریانس اثر سویه‌های مختلف *Pseudomonas fluorescens* بر شاخص‌های رشدی گیاه در گلخانه.

Table 6. Analysis of variance of growth parameters of infected tomato by *Meloidogyne incognita*, treated with different isolates of *Pseudomonas fluorescens* in greenhouse conditions.

Sources of variance	df	Mean squares					
		Stem length (cm)	Root length (cm)	Stem fresh weigh (g)	Stem dry weigh (g)	Root fresh weigh (g)	Root dry weigh (g)
Treatments	11	58.02^{ns}	113.48**	38.15**	2.53**	13.07**	0.35**
Error	47	38.15	17.74	12.39	0.56	2.54	1.71
CV%	-	12.72	10.04	11.72	12.59	15.48	9.53

^{ns}و** به‌ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد می‌باشند.

^{ns} , **: Non significant and significant at 1% probability level respectively.

جدول ۷- مقایسه‌ی میانگین اثر جدایه‌های مختلف *Pseudomonas fluorescens* بر شاخص‌های رشدی گیاه در گلخانه (n=4).

Table 7. Comparison mean of growth parameters of infected tomato by *Meloidogyne incognita*, treated with different isolates of *Pseudomonas fluorescens* in greenhouse conditions (n=4).

Treatments	Growth parameters					
	Stem length (cm)	Root length (cm)	Stem fresh weigh (g)	Stem dry weigh (g)	Root fresh weigh (g)	Root dry weigh (g)
Uninoculated control	49.50 ab	28.00 d	34.85 a	6.50 a	13.24 a	2.09 a
Inoculated control	46.00 b	27.25 d	28.97 bc	5.27 b	12.38 a	1.73 ab
CHA0 (uninoculated)	55 ab	27.75 d	25.38 bc	4.63 bc	10.63 a	1.86 ab
CHA0 (inoculated)	47.00 b	35.00 bc	28.49 bc	4.59 bc	10.92 a	1.59 ab
B2	51.75 ab	29.75 cd	25.55 bc	4.24 bc	11.06 a	1.77 ab
B16	52.00 ab	28.75 cd	27.91 bc	4.58 bc	11.19 a	1.69 ab
B52	46.25 b	44.25 a	23.10 c	3.37 c	7.07 b	1.39 bc
B55	51.25 ab	29.25 cd	27.71 bc	4.15 bc	10.98 a	1.40 bc
B56	58.25 a	33.00 bcd	24.45. bc	4.04 bc	10.77 a	1.99 a
B75	53.75 a	28.75 cd	29.19 b	4.54 bc	10.61 a	1.57 abc
P. fluorescens (1)	51.00 ab	39.25 ab	24.63 bc	3.96 c	8.13 b	1.36 bc
P. fluorescens (2)	55.25 ab	28.75 cd	27.30 bc	3.90 c	8.00 b	1.04 c

* حروف مشابه لاتین در هر ستون، نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین تیمارها در سطح احتمال ۵٪ می‌باشد.

* Means followed by dissimilar letters in a column are significantly different from each other at 5% probability level.

سپاسگزاری

این مقاله به‌عنوان بخشی از پایان نامه‌ی کارشناسی ارشد نگارنده اول تحت راهنمایی نگارنده دوم و با همکاری نگارنده سوم ارائه شده است. لازم است از مسئولین محترم دانشگاه یاسوج به‌لحاظ فراهم ساختن امکانات مالی و پژوهشی و جناب آقای دکتر اصغر نقی‌ها جهت مشاوره در شناسایی مولکولی باکتری قدردانی گردد. از هیئت تحریریه و بررسی کنندگان مقاله که در بهبود کیفی مقاله نقش بی‌بدیلی داشته‌اند، متشکریم.

References

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

Agrios, G.N. 2005. Plant Pathology, Fifth Edition. San Diego, CA: Elsevier Academic Press, 922 pp.

Almaghrabi, O.A., Massoud, S.I. & Abdelmoneim, T.S. 2013. Influence of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on tomato plant growth and nematode reproduction under greenhouse conditions. Saudi Journal of Biological Sciences, 20: 57-61.

Aneja, K.R., 2001. Experiments in Microbiology, Plant Pathology, Tissue Culture and Mushroom Production Technology. New Age International Limited Publishers, 3nd ed. New Delhi, India.

Ashoub, A.H. & Amara, M.T. 2010. Biocontrol activity of some bacterial genera against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. Journal of American Science, 6(10): 321-328.

Bagheri, N., Ahmadzadeh, M. & Heydari, R. 2014. Effects of *Pseudomonas fluorescens* strain UTPF5 on the mobility, mortality and hatching of root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 47(6): 744-752.

Elahinia, A. 2007. Vegetable and Cucurbit Diseases and Their Control. 2nd Ed. Guilan University Press, Rasht, Iran. 582 pp.

Hugh, R. & Leifson, E. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram negative bacteria. Journal Bacteriology, 66: 24-26.

Hussay, R.S. & Barker, K.R. 1973. A compression of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. Plant Disease Reporter, 57: 1025-1028.

Jacquet, M., Bongiovanni, M., Martinez, M., Verschave, P., Wajnberg, E. & Castagnone-Sereno, P. 2005. Variation in resistance to the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in tomato genotypes bearing the *Mi* gene. Plant Pathology, 54: 93- 99.

Jatala, P. 1985. Biological control of nematodes. pp. 303-308. In: Sasser, J.N. & Carter, C.C. (eds.), An Advanced Treatise on *Meloidogyne*, Volume I: Biology and Control. North Carolina State University.

Jonathan, E.I., Barker, K.R., Abdel-Alim, F.F., Vrain, T.C. & Dickson, D.W. 2000. Biological control of *Meloidogyne incognita* on tomato and banana with rhizoobacteria, Actinomycetes and *Pasteuria penetrans*. Nematropica, 30: 231-240.

Jonathan, E.I., Sandeep, A., Cannayane, I. & Umamaheswari. R. 2006. Bioefficacy of *Pseudomonas fluorescens* on *Meloidogyne incognita* in banana. Nematologia Mediterranea, 34: 19-25.

Keel, Ch., Schnider, U., Maurhofer, M., Voisard, Ch., Laville, J., Burger, U., Wirthner, Ph., Haas. D. & Defago, G. 1992. Suppression of root disease by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: Importance of the bacterial secondary metabolite 2, 4-diacetylphloroglucinol. Molecular plant-Microbe Interaction, 5(1): 4-13.

Khalighi S. & Khodakaramian G. 2010. Biocontrol of *Meloidogyne javanica* inducing olive root-knot under green-house conditions and by use of *Fluorescent Pseudomonads*. Iranian Journal of Plant Protection Science, 43(2): 323-332.

Khalighi S., Khodakaramian G., Tanha-Maafi Z., Hossaini S.A. & Ghasemi A. 2010. Inhibition of gall formation of *Meloidogyne javanica* on tomato using fluorescent pseudomonads under green-house condition. Applied Entomology and Phytopathology, 78(2): 177-198.

Khodaei Arbat, A., Taheri, A.H. Pahlevani, M.H. & Niknam, GH. R. 2009. Evaluation of tomato cultivars resistance to root-knot nematode (*Meloidogyne javanica* Chitwood, 1949). Journal of Plant Production, 16(1): 45-55.

Khoshkhoy, M., Sheibani, B., Rohani, E. & Tafazzoli, E. 2010. Principles of Horticulture. Shiraz University Press, Shiraz, Iran, 596 pp.

Klement, Z., Farkas, G.L. & Lovrekovich, L. 1964. Hypersensitivity reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. Phytopathology, 54: 474-477.

Majzoob, Sh., Kargar, A., Hamzehzarghani, H., Taghavi, M. & Charegani, H. 2012. The effect of the rhizobacteria on root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) on cucumber under greenhouse condition. Iranian Journal of Plant Pathology, 48: 69-84.

Maurhofer, M., Keel, C., Haas, D. & Défago, G. 1995. Influence of plant species on disease suppression by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 with enhanced antibiotic production. Plant Pathology, 44: 40–50.

Mohamed, Z.K., El-Sayed, S.A., Radwan, T.E.E. & Abd El-Wahab G.S. 2009. Potency evaluation of *Serratia marcescens* and *Pseudomonas fluorescens* as biocontrol agents for root-knot nematodes in Egypt. Journal of Applied Sciences Research, 4(1): 93-102.

Mokhtari, S., Sahebani, N. & Etebarian, H.R. 2009. Study on biological control and systemic induction of peroxidase enzyme activity in tomato plant infected with root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) by Pseudomonas fluorescens CHA0 antagonist. Journal of Agriculture, 11(1): 151-161.

Sasser, J.N. & Carter, C.C. 1985. Overview of the international *Meloidogyne* project 1975-1984. pp. 19-24. In: Sasser, J.N. & Carter, C.C. (eds.), An Advanced Treatise on *Meloidogyne*, Volume I: Biology and Control. North Carolina State University.

Sankari, M.K., Jonathan, E.I., Devrajan, K. & Raguchander, T. 2012. *Pseudomonas fluorescens* induced systemic resistance in tomato against *Meloidogyne incognita*. Indian Journal of Nematology, 42(1): 5-10.

Scarpellini, M., Franzetti, L. & Galli, A. 2004. Development of PCR assay to identify *Pseudomonas fluorescens* and its biotype. FEMS Microbiology Letters, 236: 257-260.

Schaad, N.W., Jones, J.B. & Chun, W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3nd edition. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA.

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*. Applied and Environmental Microbiology, 71(9): 5646-5649.

Siddiqui, I.A. & Shaukat, S.S. 2003. Suppression of root-knot disease by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in tomato: importance of bacterial secondary metabolite, 2, 4-diacetylpholoroglucinol. Soil Biology and Biochemistry, 35(12): 1615-1623.

Siddiqui, I.A., Shaukat, S.S., Sheikh, I.H. & Khan, A. 2006. Role of cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in the suppression of root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* in tomato. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 22: 641-650.

Suslow, T.V., Schroth, M.N. & Isaka, M. 1982. Application of rapid method for gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. Phytopathology, 72: 917 -918.

Tian, H., Riggs & R.D. 2000. Effects of rhizobacteria on soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*. Journal of Nematology, 32(1): 377- 388.

Thornley, M.J. 1960. The differentiation of *Pseudomonas* from other gram negative bacteria on the basis of arginine metabolism. Journal of Applied Bacteriology, 23: 37-52.

Vrain, T.C. 1977. A Technique for the collection of larvae of *Meloidogyne* spp. and a comparison of eggs and larvae as inocula. Journal of Nematology, 9(3): 249-251.

Inhibitory effects of some isolates of *Pseudomonas fluorescens* on tomato root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*

Leila Jahanbazian[1], Mohammad Abdollahi [1], Hesamedin Ramezani[2]

1. Department of Plant Protection, College of Agriculture, Yasouj University, Yasouj, Iran

2. Department of Agriculture, Payame Noor University, Tehran, Iran

Corresponding author: Mohammad Abdollahi, email: mdabdollahi@gmail.com

Received: Feb., 26, 2015 2 (2) 33-44 Accepted: June, 10, 2015

Abstract

Root-knot nematode is one of the most important nematodes world wide, due to its damage on different species of plant. With concern to human health and environmental hazards of chemical nematicides, research to introduce new methods for management of nematode population is important. The objective of this study was to evaluate the effect of different strains of *P. fluorescens* in control of root-knot nematode. In this study, inhibitory effects of 9 strains of this bacterium were evaluated *in vitro* and under greenhouse conditions. Although the strains cause mortality in second stage juveniles *in vitro*, the mortality levels were significantly different in treatments. On the other hand, the tested strains had different levels of nematicidal potential. In the greenhouse conditions, more strains reduced knots formation and nematode reproduction. The strains 2 and 16 which were isolated from rhizosphere soils in Boyerahmad region were more effective than *P. fluorescens* CHA0, which reduced reproduction rate of the nematode significantly. According to the results none of the bacterial strains could increase the plant growth factors of tomato as compared to the control.

Keywords: Boyerahmad, Biocontrol, *Pseudomonas fluorescens*, Root-knot nematode, Tomato