نشریه کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی
دوره ۲، شماره ۱، بهار ۱۳۹۲ (۲۶-۱۷)

بررسی فعالیت آنتاگونیستی جدایه‌های *Bacillus* spp. در کنترل بیماری ریشه گرهی گوجه‌فرنگی

مریم رمضانی مقدم[۱]، عصمت مهدیخانی مقدم[۲]، ساره بقائی راوری[۳]* و حمید روحانی[۴]
۱، دانشجوی کارشناسی ارشد، ۲، دانشیار، ۳، استادیار و ۴، استاد گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

(تاریخ دریافت: ۹۱/۱۲/۲ - تاریخ تصویب: ۹۲/۵/۲۶)

چکیده

در این بررسی قابلیت آنتاگونیستی یکصد و پنجاه جدایه باکتریایی باسیلوس در مقابل نماتد *Meloidogyne javanica* با آزمون سنجش زیستی ارزیابی شد. تأثیر ترشحات حاصل از سوسپانسیون 1×10^{8} سلول در میلی‌لیتر هریک از جدایه‌ها روی تخم و لارو نماتد ریشه گرهی در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار بررسی شد. هشت سویه به‌عنوان جدایه‌های برتر برای مطالعات گلخانه‌ای انتخاب شدند که بیشترین درصد مرگ و میر لارو و تفریخ‌نشدن تخم را نشان دادند و نیز از نظر توانایی تولید آنزیم‌های پروتئاز، آلکالین پروتئاز و لیپاز مثبت ارزیابی شدند. بررسی‌های مورفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی نشان دادند که این سویه‌ها متعلق به گونه‌های *B. cereus* (Bag2.13، N2.2 و Ch1.2)، *B. licheniformis* (MA1.3، MA1.7) و *Bacillus* sp. (FT1.7، MD6.5 و MD 1.8) هستند. در بررسی‌های گلخانه‌ای مؤثرترین سویه‌ها، MD6.5 و Bag2.13 هستند. علائم ناشی از بیماری در گیاهان آلوده تیمارشده با این سویه‌ها به مقدار چشمگیری کاهش یافت. بررسی همبستگی به‌دست‌آمده بین قابلیت بیوکنترلی جدایه‌ها روی کنترل نماتد ریشه گرهی گوجه‌فرنگی در شرایط آزمایشگاه و گلخانه نشان داد که همبستگی قابل قبولی به میزان ۰/۵۲۴-، بین ترشحات باکتریایی و درصد تفریخ‌نشدن تخم نماتد *M. javanica* در آزمایشگاه و شاخص گال در گلخانه وجود دارد. این اولین گزارش از کاربرد جدایه‌های باسیلوس بومی در کنترل نماتد ریشه گرهی گوجه‌فرنگی در گلخانه است.

واژه های کلیدی: *Meloidogyne javanica*، باسیلوس، فراریشه، کنترل زیستی

مقدمه

نماتدها فراوان‌ترین جانوران پرسلولی در سطح زمین هستند. چند صد گونه از آن‌ها شناسایی شده‌اند که از گیاهان تغذیه کرده و بیماری‌های متنوعی را روی آن‌ها ایجاد می‌کنند (Sasser and Frackman 1987). نماتدهای انگل گیاهی سالیانه بیلیون‌ها دلار خسارت به محصولات مختلف در سرتاسر جهان وارد می‌کنند که بیشترین خسارت مربوط به نماتدهای ریشه گرهی جنس *Meloidogyne* است (Huang *et al*. 2009). این جنس انگل اجباری ریشه بیش از بیست هزار گونهٔ گیاهی علفی، چندساله، تک‌لپه و دولپه است و به‌عنوان یکی از بزرگ‌ترین عوامل محدودکنندهٔ تولیدات زراعی و باغی در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری شناخته می‌شود. پراکندگی جهانی، وسعت دامنه میزبانی و تعامل با سایر بیمارگرهای گیاهی در مجموعه‌های پیچیدهٔ بیماری‌زایی، این جنس را در زمرهٔ مهم‌ترین بیمارگرهای گیاهی تهدیدکنندهٔ منابع غذایی جهان قرار داده است (Pegard *et al*. 2004). تحقیقات، میزان خسارت ناشی از حملهٔ نماتدهای ریشه گرهی را وابسته به عوامل متعددی چون نوع رقم، شرایط آب و هوایی، نوع خاک و مهم‌تر از همه جمعیت نماتد در خاک می‌داند (Damadzadeh 2007). کنترل نماتد ریشه گرهی به واسطه عواملی چون دامنهٔ میزبانی وسیع، سرعت بالای تکثیر و کوتاه‌بودن سیکل

* نویسنده مسئول: ساره بقائی راوری تلفن: ۰۹۱۵۵۲۲۲۸۰۸ E-mail: s.baghaee@ferdowsi.um.ac.ir

زندگی و وجود نماتدهای ماده با قابلیت تولید تخم فراوان، دشوار است (Natarajan *et al*. 2006). هرچند کاربرد سموم شیمیایی به‌عنوان رایج‌ترین روش کنترلی برای کاهش جمعیت گونه‌های بیمارگر مؤثر است، اختصاصی عمل نمی‌کند و در طولانی‌مدت مثمر ثمر نیست (Taba *et al*. 2007). اختصاصی عمل‌نکردن و نیز مشکلات زیستی کاربرد نماتدکش‌های شیمیایی بر محیط زیست و سلامت انسان، تحقیقات را به سمت استفاده از عوامل کنترل بیولوژیک به‌عنوان راهکاری مناسب و ایمن پیش برده است. مطالعات و بررسی‌های گسترده‌ای دربارهٔ رایزوباکتری‌های فراریشه انجام شده است و نتایج حاصل، تأثیرپذیری بالای جدایه‌های جنس باسیلوس را در کنترل نماتدهای پارازیت گیاهی نشان می‌دهد (Siddiqui and Mahmoud 1999). استفاده از گونه‌های *Bacillus amyloliquefaciens*، *B. cereus*، *B. licheniformis*، *B. megaterium*، *B. mycoides* و *B. pumilus* به‌عنوان عوامل کنترل بیولوژیک، نشان دادند که این گونه‌ها به‌طور مؤثری می‌توانند نماتدهای متعلق به جنس‌های *Meloidogyne* و *Heterodera* را کنترل کنند (Gardener *et al*. 2004). مطالعات بعدی ناگش و همکاران در سال ۲۰۰۵ ، بر اهمیت استفاده از جنس باسیلوس تأکید دوباره دارند. بر این اساس کشت فیلترشدهٔ سوسپانسیون باکتری *Bacillus cereus*، تفریخ تخم نماتد را به میزان نود درصد کاهش می‌دهد و در مرگ و میر لاروها تأثیر قابل توجهی نیز دارد (Nagesh *et al*. 2005). نحوهٔ تأثیر عوامل کنترل زیستی علیه نماتدهای گیاهی، نشان‌دهندهٔ دخالت آنزیم‌های خارج سلولی باکتری در این پدیده است و از آن به‌عنوان فاکتور بیماریزایی مؤثر در نفوذ باکتری به داخل کوتیکول نماتد یاد شده است (Huang *et al*. 2005a,b). دو پروتئاز قلیایی و خنثی بیماریزا به ترتیب به نام‌های Bace 16 وBae 16 از گونه‌ی *B. nematocida* خالص‌سازی و کلون شده است. مقایسهٔ بین پروتئین‌های Bace 16 و Bae 16 نشان داد که پروتئاز قلیایی با فعالیت شدید نماتدکشی در ارتباط است (Niu *et al*. 2006a, b). علاوه بر فعالیت نماتدکشی ژن *Bace* 16، عواملی چون پپتیدهای سمی، متابولیت‌ها و سایر پروتئازهای بیماریزا در فعالیت نماتدکشی باکتری دخالت دارند (Niu *et al*. 2007). در ایران بررسی‌های محدودی دربارهٔ قدرت کنترل زیستی باکتری‌های فراریشه علیه نماتد ریشه گرهی انجام شده است. کاربرد توأم سه باکتری *Pantoea* sp.، *Bacillus subtilis* و *Pseudomonas fluorescens* روی نماتد *Meloidogyne javanica* در گیاه گوجه‌فرنگی دو رقم Super Amelia و Royal نسبت به استفاده از آن‌ها به‌طور جداگانه و یا در ترکیب‌های دو تایی، اثر بیشتری در افزایش شاخص‌های رویشی گیاه و کاهش شاخص‌های مربوط به نماتد داشت (Majzoob *et al*. 2010). همچنین، کاربرد تلفیقی باکتری *Bacillus cereus* و سالیسیلیک اسید علیه نماتد ریشه گرهی *M. javanica* به‌صورت تیمار خاک پیش از آلودگی گیاه به نماتد، موجب کاهش معنی‌دار تعداد گال و تودهٔ تخم شد (Siahpoosh 2010). با توجه به کم‌بودن مطالعات داخلی دربارهٔ نقش کنترل زیستی گونه‌های باسیلوس در کاهش بیماری ریشه گرهی و با هدف دستیابی به جدایه‌های برتر بومی، تحقیق حاضر به شناسایی باکتری‌های جنس باسیلوس فراریشه گوجه‌فرنگی و توانایی آن‌ها در کنترل بیماری ریشه گرهی در شرایط آزمایشگاه و نیز گلخانه روی رقم گوجه‌فرنگی غالب منطقه (موبیل) پرداخته است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و استخراج نماتد ریشه گرهی گوجه‌فرنگی

در بررسی‌های قبلی عامل ریشه گرهی گوجه‌فرنگی در خراسان رضوی، گونهٔ *Meloidogyne javanica* مشخص شد (Sadeghi *et al*. 2010). بر این اساس نمونه‌برداری از مزارع آلوده روستای باغون‌آباد و فریزی از توابع شهرستان مشهد با توجه به علائم، انجام شد. ابتدا خاک اطراف گیاه برای به‌دست‌آوردن ریشه‌های حاوی تخم و ماده‌های بالغ تا عمق بیست سانتی‌متری کنار زده شد و ریشهٔ جداشده به کیسهٔ پلاستیکی منتقل شد.

تکثیر نماتد ریشه گرهی

به منظور تکثیر و نگه‌داری طولانی‌مدت نماتد *Meloidogyne javanica*، از نشاهای گوجه‌فرنگی رقم

اورلی اربانا وی اف (Early urbana VF) در شرایط کنترل‌شدهٔ گلخانه استفاده شد. سوسپانسیون تخم نماتد تهیه‌شده در آزمایشگاه با استفاده از پیپت پاستور سترون به داخل چندین حفرهٔ تعبیه‌شدهٔ مجاور یک نشا گوجه‌فرنگی ریخته شد. گلدان‌ها حاوی دو کیلوگرم خاک سترون شامل خاک زراعی، خاک برگ و ماسه (۱:۱:۲) و نشاها در مرحلهٔ چهار الی شش برگی بودند. بعد از گذشت شصت الی نود روز، نماتد به‌خوبی روی ریشه‌ها مستقر شدند و ریشه‌های آلوده نیز برای تشخیص و تکثیر مجدد، به آزمایشگاه انتقال یافت.

جداسازی باکتری جنس باسیلوس از منطقهٔ فراریشه گوجه‌فرنگی

نمونه‌هایی از گیاه و خاک اطراف ریشه، از مزارع گوجه‌فرنگی استان خراسان رضوی جمع‌آوری شد. خالص‌سازی جنس باسیلوس به روش شاد و همکاران (Schaad *et al.* 2001) انجام شد. یک گرم خاک فراریشه در ده میلی‌لیتر آب مقطر سترون به مدت سی دقیقه، شیک شد. سوسپانسیون حاصله پس از عبور از کاغذ صافی، به مدت ده دقیقه در حمام آب گرم هشتاد درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از تهیه سری رقت، 100µl از سوسپانسیون باکتری روی محیط آگار غذایی (Nutrient Agar) به‌صورت چمنی پخش و در سی درجهٔ سانتی‌گراد انکوبه شد. بعد از دو الی سه روز، کلونی‌های متفاوت با استفاده از محیط آگار غذایی خالص‌سازی مجدد شدند. جدایه‌های خالص‌شده برای آزمایش‌های بعدی در آب مقطر سترون در دمای چهار درجهٔ سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

انتخاب جدایه‌های برتر باسیلوس در آزمون سنجش زیستی در شرایط آزمایشگاه

قابلیت آنتاگونیستی یکصد و پنجاه جدایه به‌دست‌آمده از ریزوسفر گوجه‌فرنگی به روش سری رقت، در آزمون سنجش زیستی در شرایط آزمایشگاه به روش لیان و همکاران (Lian *et al.* 2007) با اندکی تغییر، ارزیابی شد. از کشت بیست و چهار ساعتهٔ باکتری، سوسپانسیون با غلظت ۱۰۸ cfu/ml از هر جدایه باکتری در دو مرحله به مدت ده دقیقه در چهار هزار دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و بعد از هر بار سانتریفیوژ، مایع رویی از کاغذ صافی شمارهٔ یک واتمن عبور داده شد. از توده‌های تخم تکثیرشده در شرایط گلخانه پس از ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم یک درصد و شست‌وشو با آب مقطر استریل در شرایط آزمایشگاه استفاده شد. تعدادی تخم نیز به‌طور جداگانه در پتری حاوی آب مقطر استریل و پوشیده‌شده با دستمال کاغذی به مدت دو روز در انکوباتور قرار گرفت تا از لاروهای تفریخ‌شده، در آزمون سنجش زیستی استفاده شود. ترشحات باکتریایی هر جدایه به‌طور جداگانه روی لارو و تخم نماتد *M. javanica* ارزیابی شد. این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام و از آب مقطر سترون به‌عنوان شاهد استفاده شد. میکروتیوب‌های حاوی ترشحات باکتریایی و لارو و تخم نماتد به‌صورت جداگانه در دمای بیست و هشت درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفتند و بعد از بیست و چهار و چهل و هشت ساعت، درصد مرگ و میر لارو و بعد از صد و بیست ساعت، درصد تفریخ تخم ارزیابی شد. جدایه‌هایی که بیشترین درصد مرگ و میر لاروها و تفریخ‌نشدن تخم را نشان دادند به‌عنوان جدایه برتر انتخاب و در مراحل بعد استفاده شدند.

شناسایی جدایه‌های برتر

جدایه‌های انتخابی براساس خصوصیات مورفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی توصیه‌شده در دستورالعمل برگی (Logan and De Vos 2006) شناسایی شدند.

ارزیابی آنزیمی جدایه‌های برتر

در این خصوص اثرات نماتدکشی آنزیم‌های پروتئاز، آلکالین پروتئاز و لیپاز روی نماتد ریشه گرهی بررسی شد.

تولید پروتئاز

با توجه به نقش پروتئاز به‌عنوان یکی از مکانیسم‌های کنترل بیولوژیک، تولید این آنزیم براساس روش خضری و همکاران (Khezri *et al.* 2011) در جدایه‌های برتر ارزیابی شد. جدایه‌های باکتریایی به‌صورت لکه‌ای روی محیط Skim milk (سدیم آزید۰۲ /۰٪، شیر کم چربی ۲٪ و آگار ۲٪) کشت شدند. تشکیل هالهٔ بی‌رنگ در اطراف کلونی باکتری بعد از یک تا دو روز، نشانهٔ فعالیت پروتئاز است.

تولید پروتئاز قلیایی

تولید این آنزیم براساس روش شاد و همکاران (Schaad *et al.* 2001) در محیط کشت حاوی پانزده گرم آگار، یک دهم درصد گلوکز، دو دهم درصد پپتون، پنج دهم درصد عصارهٔ مخمر، یک درصد فسفات دی پتاسیم، دو صدم درصد سولفات منیزیم و بیست درصد کربنات سدیم (pH:10) در جدایه‌های باکتری بررسی شد. رؤیت هالهٔ بی‌رنگ در اطراف کلونی باکتری بعد از چهل و هشت ساعت حاکی از فعالیت این آنزیم در جدایه مربوطه است.

تولید لیپاز

این آزمایش به روش شاد و همکاران (Schaad *et al.* 2001) برای اثبات وجود آنزیم لیپاز و توانایی باکتری در هیدرولیز چربی به اسیدهای چرب انجام شد. باکتری‌ها در محیط کشت حاوی ده گرم پپتون، پنج گرم نمک طعام، یک دهم گرم کلرید کلسیم، پانزده گرم آگار و دو درصد توئین هشتاد به‌صورت لکه‌ای کشت و در دمای سی درجهٔ سانتی‌گراد انکوبه شدند. بودن یا نبودن هالهٔ کدر در اطراف کلونی باکتری بعد از چهل و هشت ساعت بررسی شد.

بررسی قابلیت بیوکنترل جدایه‌های برتر روی نماتد ریشه گرهی گوجه‌فرنگی در شرایط گلخانه

برای تهیهٔ مایهٔ تلقیح باسیلوس از روش Siddiqui and Shaukat 2004)) با اندکی تغییر استفاده شد. در این روش نشاهای سه هفته‌ای گوجه‌فرنگی رقم موبیل به گلدان‌های پلاستیکی به قطر پانزده سانتی‌متر منتقل شدند. خاک گلدان مخلوطی از خاک زراعی، خاک برگ و ماسه(۱:۲:۲) انتخاب شد.

کشت مایع سه روزه جدایه‌های باکتریایی با غلظت 10^8cfu/ml تهیه و به میزان ۱۵ ml به خاک اطراف گیاهچه‌ها اضافه شد. دو روز بعد از تیمار گیاهان با باکتری، بیست هزار لارو سن دو *M. javanica* به داخل سه حفره تعبیه‌شده اطراف هر گیاهچه افزوده شد. قابلیت کنترل‌کنندگی جدایه‌ها پس از چهل و پنج روز از زمان تلقیح نماتد، براساس شاخص‌های تعداد گال، تعداد تودهٔ تخم، وزن تر ریشه، وزن تر ساقه، وزن خشک ریشه و وزن خشک ساقه تعیین شد. شمارش تعداد گال و تودهٔ تخم موجود در ریشه براساس سیستم پیشنهادی تایلور و ساسر (Tylor and Sasser 1978) انجام شد. توده‌های تخم از طریق فروبردن در محلول اسید فوشین چهار دهم درصد به مدت بیست دقیقه رنگ‌آمیزی و شمارش شدند. در این روش شدت گال ریشه براساس شاخص ۵- ۰(۰: بدون گال، ۱ : ۲-۱گال، ۲: ۱۰-۳گال،۳ : ۳۰-۱۱گال،۴ : ۱۰۰-۳۱ گال و ۵: بیش از ۱۰۰گال) ارزیابی شد. آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با چهارده تیمار شامل یک جدایه باکتریایی، تلفیق دو جدایه MD1.8 و N2.2، شاهد منفی (بدون نماتد و باکتری)، شاهد مثبت (دارای نماتد و بدون باکتری) و تیمار نماتدکش راگبی (یک گرم سم گرانول ۱۰٪) در چهار تکرار اجرا شد. دو جدایه *B.thuringensis* 1838 (کلکسیون باکتری‌های صنعتی) و *B. subtilis* (کلکسیون دانشگاه فردوسی مشهد) به‌عنوان باکتری‌های مشخص در آزمون گلخانه‌ای نیز لحاظ شدند.

آنالیز آماری

داده‌های به‌دست‌آمده در آزمون‌های سنجش زیستی و گلخانه‌ای با نرم‌افزارSPSS v.17 با درصد احتمال پنج صدم، تجزیه و تحلیل شدند؛ خطای استاندارد برای هر آزمایش نیز لحاظ شد.

نتایج و بحث

جداسازی و شکل‌شناسی جدایه‌های فراریشه گوجه‌فرنگی

از ناحیهٔ فراریشه گوجه‌فرنگی در مزارع مختلف استان خراسان رضوی، یکصد و پنجاه جدایه باکتری گرم مثبت بعد از تیمار گرما جداسازی شد. باکتری‌های خالص‌شده به‌صورت پرگنه‌های کروی یا نامنظم با ظاهری تخت، نرم و گاهی قطره‌ای در اندازه‌های متفاوت و حاشیه‌های صاف، نامنظم و در بعضی موارد منشعب در محیط کشت دیده شدند.

رنگ پرگنه‌های باکتری از سفید چرک تا کرم ـ خاکستری متغیر بود و در تعداد کمی از جدایه‌ها رنگدانه‌ی قهوه‌ای مایل به سیاه در اطراف پرگنه باکتری در محیط آگار غذایی مشاهده شد.

انتخاب جدایه‌های برتر براساس آزمون سنجش زیستی و شناسایی آن‌ها

بعد از آزمون سنجش زیستی در شرایط آزمایشگاه و ارزیابی تأثیر ترشحات جدایه‌های باکتریایی روی لارو و تخم نماتد *M. javanica* و براساس تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها (جدول ۱)، تعداد بیست جدایه برای آزمون‌های بررسی آنزیمی انتخاب شدند. شناسایی جدایه‌های انتخابی با استفاده از آزمون‌های تفکیکی و براساس روش‌های استاندارد باکتری‌شناسی (Logan and De Vos 2006, Schaad *et al.* 2001) انجام شد. در مجموع براساس خصوصیات فیزیولوژیکی، مورفولوژیکی و بیوشیمیایی، جدایه‌های انتخابی به گونه‌های *B.cereus*، *B.megaterium*، *B.badius*، *B.licheniformis* و *Bacillus* sp. (جدول۲) تعلق داشتند.

همهٔ این باکتری‌ها میله‌ای شکل،گرم مثبت، کاتالاز مثبت و دارای اندوسپور بیضوی بودند و اسپورانژیوم متورم نداشتند.

جدول ۱. میانگین درصد مرگ و میر لارو و عدم تفریخ تخم نماتد براثر جدایه‌های باکتری انتخابی در شرایط آزمایشگاه بعد از چهل و هشت ساعت

جدایه باکتریایی	مرگ و میر لارو (٪)	عدم تفریخ تخم(٪)	جدایه باکتریایی	مرگ و میر لارو (٪)	عدم تفریخ تخم (٪)
MD1.2	ab۹۷,۳۳٪	bc۹۲٪	MD6.5	a۹۹,۳۳٪	e۷۱,۳۳٪
Bag2.13	cdefg۷۸٪	ab۹۴,۳۳٪	Bag2.8	c۸۴,۶۷٪	ef۶۹٪
N2.2	ab۹۸٪	a۹۸,۳۳٪	Bag2.12a	b۹۱,۳۳٪	g۶۲٪
MD5.5	cde۸۳٪	h۴۷,۶۷٪	MA2.8	ab۹۲,۶۷٪	i۴۱٪
Ch1.2	a۹۹,۳۳٪	h۴۷,۳۳٪	MF2.5	g۷۱,۶۷٪	ef۶۷,۶۹٪
Bag2.8	efg۷۶,۳۳٪	fg۶۵,۶۷٪	MA1.7	ab۹۷,۳۳٪	ab۹۷,۶۷٪
FT1.7	cdef۸۱,۳۳٪	d۷۸,۶۷٪	MF1.g4	defg۷۷,۳۳٪	ab۹۵٪
MD5.2	ab۹۴٪	ab۹۷,۶۷٪	MA2.	cd۸۳,۶۷٪	fg۶۷..۶۴٪
MD1.8	fg۷۴,۶۷٪	c۸۸٪	MD1.7	fg۷۴,۶۷٪	ab۹۴,۳۳٪
MA1.3	fg۷۴,۶۷٪	fg۶۴,۶۷٪	Gol2.1	efg۷۶,۳۳٪	c۸۷,۳۳٪

داده‌ها، میانگین سه تکرار برای هر جدایه هستند. حروف مشابه روی میانگین‌ها در هر ستون بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ بین آن‌ها است.

جدول ۲. شناسایی جدایه‌های باکتریایی براساس آزمون‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی

ویژگی	MD12	BAG213	N22	MD55	CH12	BAG28	FT17	MD52	MD18	MA13	MD65	BAG21	BAG212a	MA28	MF25	MA17	MF1.g4	MA24	MD17	GOL21
قطر سلول >۱mM	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
اسپورها مدور	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
اسپورانژیوم بادکرده	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
کاتالاز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
رشد بی‌هوازی	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-
رشد هوازی	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-
تحرک	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
متیل رد	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
تولید اسید از: زایلوز	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+
مانیتول	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+
هیدرولیز ژلاتین	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
هیدرولیز نشاسته	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+
استفاده از سیترات	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+
لستیناز	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
رشد در pH=5.7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
رشد در نمک ۵٪	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
رشد در نمک۷٪	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
رشددر دمای ۴۰°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
رشددر دمای ۵۰°C	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-

ارزیابی تولید پروتئاز، پروتئاز قلیایی ولیپاز در جدایه‌های انتخابی باسیلوس

در بررسی‌های انجام‌شده تمامی جدایه‌های انتخابی می‌توانستند پروتئاز و لیپاز تولید کنند. در حالی که، فعالیت جدایه‌های Bag213، MD1.2، FT1.7، MA2.8، MF1.g4 و MD1.7 در محیط پروتئاز قلیایی منفی بود (جدول ۳). پس از ارزیابی فعالیت آنزیمی جدایه‌های انتخابی باسیلوس، هشت جدایهٔ برتر براساس قطر هالهٔ

تولیدی در آزمون‌های آنزیمی و درصد مرگ و میر لارو و ممانعت از تفریخ تخم نماتد (جدول ۱) برای آزمون‌های گلخانه‌ای انتخاب شدند.

جدول ۳. گروه‌بندی جدایه‌های باکتریایی براساس میزان تولید آنزیم پروتئاز، آلکالین پروتئاز و لیپاز

جدایه باکتریایی	آنزیم پروتئاز	آنزیم پروتئاز قلیایی	آنزیم لیپاز	جدایه باکتریایی	آنزیم پروتئاز	آنزیم پروتئاز قلیایی	آنزیم لیپاز
MD1.2	+	_	++	Bag2.1	++	++	+
Bag2.13	+	_	+	Bag2.12a	++	++	+
N2.2	++	++	+	MA2.8	+++	_	++
MD5.5	+++	+++	+	MF2.5	++	+	+
Ch1.2	+++	+++	+	MA1.7	++	+++	++
Bag2.8	++	++	+	MF1.g4	+++	_	++
FT1.7	++	_	++	MA2.4	++	+++	+
MD5.2	++	++	+	MD1.7	++	_	+
MD1.8	+++	+++	++	gol2.1	++	+	+
MA1.3	++	+++	++	MD6.5	+++	++	++

علائم +، ++ و +++ به ترتیب نشان‌دهندهٔ تولید آنزیم به میزان ضعیف، متوسط و بسیار خوب در محیط کشت مربوطه است.

قابلیت بیوکنترل جدایه‌های برتر جنس *Bacillus* روی نماتد ریشه گرهی گوجه‌فرنگی در شرایط گلخانه

جدایه‌های باکتریایی برتر انتخاب‌شده در مرحلهٔ قبل از لحاظ کاهش بیماری ریشه گرهی گوجه‌فرنگی و نیز تقلیل جمعیت نماتدی در شرایط کنترل‌شده گلخانه روی رقم موبیل آزمایش شدند. جدایه‌ها از نظر توانایی کنترل زیستی نماتد ریشه گرهی تفاوت معنی‌داری را در سطح پنج درصد نشان دادند. نتایج آزمون گلخانه‌ای در مورد جدایه‌های مختلف بیان‌کنندهٔ کاهش میزان شاخص بیماری در خاک‌های تیمارشده با جدایه‌های باکتریایی است (جدول ۴). گروه‌بندی تیمارها حاکی از اختلافات معنی‌دار بین برخی تیمارها و شاهد است.

براساس نتایج، در جدایه‌های MA1.7،MD1.8، FT1.7 و MD6.5 پس از گذشت چهل و پنج روز از انجام آزمایش، هیچ گال و نماتدی در تکرارهای مربوطه مشاهده نشد (شکل ۱). جدایه‌های مذکور بهترین اثر کنترل‌کنندگی را روی نماتد ریشه گرهی گوجه‌فرنگی در شرایط گلخانه نشان دادند. بررسی تأثیر جدایه‌های فوق روی فاکتورهای رشدی گیاه گوجه‌فرنگی در حضور بیمارگر *M. javanica* نشان داد که بیشترین وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی مربوط به چهار جدایه مذکور است و تفاوت معنی‌داری بین فاکتورهای رشدی گیاهان تیمارشده با جدایه‌های باکتریایی در مقایسه با شاهد مثبت مشاهده شد (جدول ۴).

جدول ۴. تأثیر جدایه‌های برتر باسیلوس بر کاهش بیماری ریشه گرهی و بررسی شاخص های بیوکترلی در شرایط آزمایشگاه و گلخانه

تعداد توده تخم	شاخص گال	تعداد گال	طول ساقه (cm)	طول ریشه(cm)	وزن خشک ساقه(g)	وزن خشک ریشه(g)	وزن تر ساقه (g)	وزن تر ریشه(g)	تیمار
a۹۵	۴	a۹۸/۶۷	ef۲۵/۶۷	f۲۲/۶۷	g۱/۲۳	d۰/۸۲	g۱۰/۳۳	efg۱۱/۵۷	شاهد آلوده
g۰	۰	e۰	bc۳۲	bc۳۴	bcd۴	a۲/۸	b۳۱	def۱۲/۵۸	شاهد سالم
c۱۱	۳	c۱۵/۶۷	ef۲۶/۶۷	de۲۸	ef۲/۶۴	c۱/۴۲	e۱۵/۰۷	efg۱۱/۲	B. thuringensis
cd۹/۳۳	۳	c۱۶	cde۲۹	def۲۶/۳۳	fg۲	c۱/۷۳	f۱۲/۱۷	fg۱۱/۰۷	B. subtilis
de۷	۳	c۱۸/۳۳	ef۲۶/۶۷	ef۲۳	cde۳/۴۳	bc۲/۰۷	d۱۶/۹	de۱۳/۱	نماتد کش راگبی
ef۵/۳۳	۳	cd۱۴	fg۲۵/۳۳	bcd۳۰/۶۷	b۴/۴۷	a۳/۰۳	b۳۰/۵	cd۱۴/۴۳	MA1.3
g۰/۶۷	۲	e۳/۳۳	ef۲۶/۳۳	cd۳۰	ef۲/۶۳	c۱/۴۳	d۱۷/۸۳	efg۱۲/۴۳	FT1.7
ef۴/۳۳	۲	d۱۰/۳۳	b۳۲/۶۷	bcd۳۰/۶۷	b۴/۹	c۱/۷	c۲۱/۲۳	cd۱۴/۴۳	N2.2
g۰/۳۳	۱	e۱/۶۷	g۲۲/۳۳	cd۲۹/۳۳	de۳/۲۷	c۱/۸۵	d۱۸/۸۳	bc۱۵/۰۳	MA1.7
g۰	۰	e۰	bcd۳۰/۳۳	cd۲۹	e۳/۰۳	c۱/۷۷	d۱۸/۵۷	bc۱۵/۱۷	MD6.5
g۰	۱	e۰/۶۷	bcd۳۰/۶۷	a۴۱	bc۴/۳	a۳	b۲۹/۵۳	a۱۸/۳۷	Md1.8
b۱۵/۳۳	۳	b۲۶	def۲۸/۳۳	f۲۲	ef۲/۹۲	c۱/۸۳	c۲۲/۲۳	g۱۰/۶۳	Ch1.2
g۰	۰	e۰	bcd۳۰/۶۷	cd۳۰/۳۳	ef۲/۹	c۱/۷۷	d۱۷/۹	bc۱۵/۳۳	Bag2.13
fg۳/۳۳	۲	d۹/۶۷	a۳۷	b۳۵/۶۷	a۶/۹	ab۲/۵۷	a۳۶/۵۷	b۱۶/۴۷	Md1.8 + N2.2

گروه بندی براساس آزمون دانکن در سطح ۵٪. ستون‌های دارای حروف مشترک بدون اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ ٪ هستند.

بحث

جایگزینی روش‌های کنترل بیولوژیک به جای کاربرد سموم شیمیایی عوارض زیست‌محیطی کمتر و فواید اقتصادی زیادتری به همراه دارند. در میان عوامل بیوکنترل مستقر در ناحیهٔ فراریشه، تأثیر جدایه‌های جنس باسیلوس در کنترل بیماری ریشه گرهی در

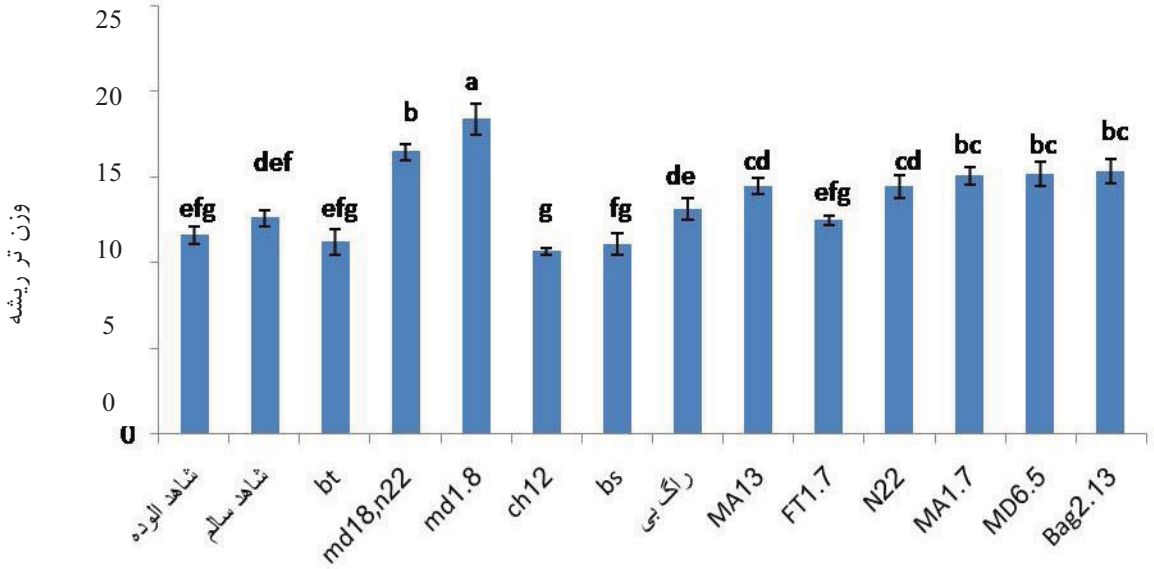
محصولات مختلف مورد توجه قرار گرفته است. فاکتورهای مهمی چون آنزیم‌ها، متابولیت‌ها و مواد سمی تولیدشده از گونه‌های جنس باسیلوس در کنترل نماتدها مؤثر شناخته شده‌اند. از میان یکصد و پنجاه جدایه باسیلوس مورد بررسی، جدایه‌هایی که بیشترین درصد مرگ و میر لارو و تفریخ‌نشدن تخم را داشتند، توانایی بسیار بالایی را در کاهش بیماری ریشه گرهی نیز در شرایط گلخانه‌ای روی رقم موبیل نشان دادند. علاوه بر داده‌های مربوط به سنجش زیستی، نتایج آزمون‌های آنزیمی نیز ارجحیت جدایه‌های برتر را نسبت به سایر جدایه‌ها تصدیق کرد. جدایه‌های انتخاب‌شده در آزمون‌های سنجش زیستی و آنزیمی از نظر شاخص گال نیز بررسی شدند. جدایه‌های MD6.5 و Bag2.13 از نظر کاهش میزان شاخص بیماری در گلخانه نیز کارایی بالایی نشان دادند و بررسی ریشه‌های آلوده تیمارشده با این سویه‌ها حاکی از توانایی بالای آن‌ها در کنترل علائم بیماری ریشه گرهی بود (شکل ۱). بر این اساس ارتباط آماری جامع و کامل بین مکانیسم‌های مطالعه‌شده در آزمایشگاه و قابلیت بیوکنترلی جدایه‌ها در گلخانه برقرار شد.

MD6.5 شاهدآلوده شاهد سالم

شکل ۱. کاهش میزان شاخص بیماری در جدایه برتر MD6.5 در مقایسه با شاهد سالم و الوده

آنالیز آماری انجام‌شده با نرم‌افزار SPSS v.17 نشان داد که دو جدایهٔ نام‌برده شده علاوه بر کاهش شاخص بیماری، روی فاکتورهای رشدی نیز تأثیر بسزایی داشتند و آنالیزهای انجام‌شده نیز مؤید این مطلب است. جدایه‌های MA1.7، FT1.7، N2.2 و Bt نیز در کاهش شدت بیماری ریشه گرهی گوجه‌فرنگی در آزمایشگاه اثرگذار بودند و در سطح بعدی نسبت به چهار جدایه برتر بومی (MD1.8،MA1.7، FT1.7 و MD6) قرار گرفتند. آزمون سنجش زیستی در مورد این چهار جدایه نیز نتایج گلخانه‌ای را تأیید کرد. سایر جدایه‌های مورد بررسی کنترل چشمگیری را ارائه ندادند. بررسی اثرات رشدی جدایه‌ها روی اندام هوایی و سیستم ریشه‌ای گیاه گوجه‌فرنگی حاکی از آن بود که جدایه‌های برتر علاوه بر توانایی بالای بیوکنترلی در شرایط آزمایشگاه و گلخانه، روی فاکتورهای رشدی گیاه نیز بسیار مؤثرند. در این مطالعه، علاوه بر تأثیر جدایه‌های باکتریایی به‌طور جداگانه روی کنترل بیماری، در آزمونی اثر ترکیب دو جدایهٔ باکتریایی MD1.8 و N2.2 بر کنترل نماتد و ارزیابی فاکتورهای رشدی گیاه بررسی شد. نتایج حاصل از آنالیزهای انجام‌شده بیانگر این بود که ترکیب این دو جدایه در مقایسه با هر یک از جدایه‌های MD1.8 و N2.2 به‌طور جداگانه موجب افزایش وزن تر و خشک و طول ساقه شد؛ ولی جدایه MD1.8 در مقایسه با تیمار ترکیبی MD1.8 و N2.2 و جدایهٔ تک N2.2، توانایی بالاتری در کنترل نماتد ریشه گرهی داشت (جدول ۴). بررسی تأثیر نماتدکش راگبی در مقایسه با جدایه‌های منتخب باکتریایی نشان داد که تمام جدایه‌ها به جز جدایهٔ Ch1.2 نسبت به این نماتدکش تأثیر بیشتری در

کنترل نماتد ریشه گرهی داشتند و همچنین، اثرات رشدی این جدایه‌ها روی گیاه گوجه‌فرنگی بسیار بیشتر از نماتدکش راگبی بود. با توجه به شکل ۲ جدایه‌های MD6.5، MD1.8، MD1.8 و N2.2، MA1.7، و Bag2.13 بیشترین تأثیر را روی وزن تر ریشه داشتند و در گروه‌های آماری a، b و bc قرار گرفتند.



شکل ۲. مقایسه جدایه‌های برتر بومی باسیلوس با شاهد سالم و آلوده در افزایش وزن تر ریشه در بیماری ریشه گرهی گوجه‌فرنگی در شرایط گلخانه

ترکیبات رشدی می‌توانند نقش مهمی در متحمل‌کردن گیاه به بیماری‌های ریشه داشته باشند، زیرا باعث می‌شوند ریشه‌های آسیب‌دیده به سرعت با ریشه‌های جدید جایگزین شوند و خسارت بیماری را کاهش دهند. در این رابطه مقایسهٔ طول ریشهٔ گیاهان آلوده تیمارشده با باکتری، با شاهد منفی مؤید مطلب ذکر شده است (جدول ۴). بررسی همبستگی به‌دست‌آمده بین قابلیت بیوکنترلی جدایه‌ها روی کنترل نماتد ریشه گرهی گوجه‌فرنگی در شرایط آزمایشگاه و گلخانه نشان داد که همبستگی قابل قبولی به میزان ۰/۵۲۴- بین ترشحات باکتریایی و درصد تفریخ‌نشدن تخم نماتد *M. javanica* در آزمایشگاه و شاخص گال در گلخانه وجود دارد. همچنین، همبستگی بالا و معنی‌داری به میزان ۰/۶۵۴- بین شاخص رشدی جدایه‌ها روی وزن ریشه و شاخص گال آن‌ها در شرایط گلخانه مشاهده شد. نتایج حاصل از این پژوهش با یافته‌های دیگر محققین مطابقت دارد. جدایه‌های مختلف *B. thuringiensis* جمعیت نماتدهای *M. javanica* و *M. incognita* را به میزان چشمگیری پایین می‌آورد (Zukerman *et al* 1993). همچنین، بررسی‌ها حاکی از وجود رابطهٔ مثبت بین جمعیت‌های نماتدی و غلظت‌های مختلف باکتری Bt است (Esmail and Fadel 1999). بررسی‌های کنترل زیستی دیگر با گونه‌های *B. cereus* (Nagesh *et al.* 2005)، *Bacillus* sp. (Huang *et al.* 2005a) و *B. nematocida* (Niu *et al.* 2006)، مؤید اثرگذاری آنزیم‌های مختلف باکتریایی به‌ویژه پروتئازها در کاهش فعالیت نماتدها و کنترل آن‌ها است. یافته‌های این مطالعه نیز نتایج مطالعات انجام‌شده در دنیا مبنی بر قابلیت گونه‌های جنس باسیلوس در کنترل نماتد ریشه گرهی را تأیید می‌کند، این اولین گزارش از کاربرد جدایه‌های باسیلوس بومی در کنترل بیماری نماتد ریشه گرهی گوجه‌فرنگی در کشور است.

پیشنهاد می‌شود مطالعات بیشتر در مزرعه انجام شود و توانایی‌های جدایه‌های ذکرشده در شرایط طبیعی نیز برآورد شود و با توجه به نتایج حاصل، فرمولاسیون‌های مناسب از جدایه‌هایی تهیه شود که عملکرد بالایی را نشان داده‌اند.

REFERENCE

Butt TM, Jackson C, Magan N (2001) Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential. CABI Publishing, Oxon, UK, pp. 1–8.

Damadzadeh M (2006) Nematology in agriculture. 1ed. Andishe-Gostar, Esfehan. (In Persian)

Gardener BBM (2004) Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in agricultural systems. Phytopathology 94: 1252–125.

Huang X, Niu Q, Zhou W, Zhang K (2005a) *Bacillus nematocida* sp. nov., a novel bacterial strain with nematotoxic activity isolated from soil in Yunnan, China. Systematic and Applied Microbiology 28: 323–327.

Huang X, Tian B, Niu Q, Yang J, Zhang L, Zhang K (2005b) An extracellular protease from *Brevibacillus laterosporus* G4 without parasporal crystal serve as pathogenetic factor in the infection against nematodes. Research Microbiology 156:719–727.

Huang Y, Xu C, Ma L, Zhang K, Duan C, Mo, M (2009) Characterization of volatiles produced from *Bacillus megaterium* YFM3.25 and their nematicidal activity against *Meloidogyne incognita* European Journal of Plant Pathology 26: 417-422.

Ismail AE, Fadel M (1999) Field application of three local isolates of *Bacillus thuringiensis* for controlling the citrus nematode, *Tylenchus semipenetrans* Egyptian Journal of Biological Pest Control 9: 21-27.

Javed N, El-Hassan S, Gowen S, Pemproke B, Inam-ul-Hap M (2008) The potential of combining *Pasteuria penetrans* and neem (*Azadirachta indica*) formulation as a management system for root-knot nematodes on tomato. European Journal of Plant Pathology 12:53–60.

Keshavarzi M, Khogand S, Abdollahi H, Zargar K (2006) Isolation, differentiation and identification of local *Bacillus thuringiensis* strains. *In:* 17th Iranian Plant Protection Congress, University of Bu-Ali Sina, Hamadan, Iran. 481. (In Persian)

Khezri M, Ahmadzadeh M, Salehi-jouzani Gh, Behboudi K, Ahangaran A, Mousivand M, Rahimian H (2011) Characterization of some biofilm-forming *Bacillus subtilis* strains and evaluation of their biocontrol potential against *Fusarium culmorum* Plant Pathology 93: 373-382 (In Persian)

Khezri S, Ahmadzadeh Gh, Salehi Jouzani K, Rahimian H (2010) A study on the effect of sugars and amino acids secreted from wheat root on biofilm formation of *Bacillus subtilis .In:* 19th Iranian Plant Protection Congress, Tehran, Iran 417. (In Persian)

Lian LH, Tian BY, Xiong R, Zhu MZ, Xu J, Zhang KQ (2007) Proteases from Bacillus: a new insight into the mechanism of action for rhizobacterial suppression of nematode populations. Letters in Applied Microbiology. 45:262-269.

Logan NA, De Vos P (2006) *Bacillus* Cohn 1872, 174AL, In: De Vos P *et al*. (ed.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2ed, Vol. 3. Springer Pub. pp. 21-128.

Majzoob SH, Karegar Bideh A, Zarghani HA (2010) Effect of *Pseudomonas fluorescens* CHAO, *Bacillus subtilis* and *Pantoea* sp. in the control of *Meloidogyne javanica* on cucumber (Super Amelia and Royal). *In:* 19th Iranian Plant Protection Congress, Tehran, Iran 533. (In Persian)

Nagesh M, Asokan R, Mohan KS (2005) Partial characterization of novel nematicidal toxins from *Bacillus cereus* Frankland 1887 and their effect on root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* (Kofoid &White) Chitwood Journal of Biological Control 19:65-69.

Natarajan N, Cork A, Boomathi N, Pandi R, Velavan S, Dahkshnamoorthy G (2006) Cold aqueous extracts of African marigold, *Tagetas erecta* for control tomato root knot nematode, *Meloidogyne incognita*. Crop Protection 25: 1210-1213.

Niu Q, Huang X, Tian B, Yang J, Liu J, Zhang L, Zhang K (2006a) *Bacillus* sp. B16 kills nematodes with a serine protease identified as a pathogenic factor. Applied Microbiology and Biotechnology. 69:722–730.

Niu Q, Huang X, Zhang L, Lian L, Li Y, Li J, Yang J, Zhang K (2007) Functional identification of the gene bace16 from nematophagous bacterium *Bacillus nematocida.* Applied Microbiology and Biotechnology. 75:141–148

Niu Q, Huang X, Zhang L, Li Y, Li J, Yang J, Zhang K (2006b) A neutral protease from *Bacillus nematocida*, another potential virulence factor in the infection against nematodes. Archives of Microbiology. 185:439–448.

Pegard A, Brizzard G, Fazari A, Soucaze O, Abad P, Djian-Caporalino C (2004) Histological characterization of resistance to different root-knot nematode species related phenolics accumulation in *Capsium annuum*. Phytopathology 95: 158-165.

Sadeghi Z E, Mahdikhani Moghaddam E, Azizi M (2010) Evaluation of Nematicidal Effect of essential oils from some medicinal plants against the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* in laboratory

condition. Journal of Plant Protection 24: 62-68 (In Persian).

Sasser JN, Freckman DW (1987) A world perspective on nematology: the role of the society. In: Veech, JA, Dickson DW (ed.), Vistas on Nematology, Society of Nematologists, Hyatsville. pp. 7–14.

Schaad NW, Jones JB, Chum W (2001) Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3rd ed. The American Phytopathology Society Press, St. Paul, Minnesota, USA.

Siahpoush S, Sahebani N, Aminian H (2010) Effect of integration of *Bacillus cereus* and salicylic acid against *Meloidogyne javanica* on cucumber. *In:* 19th Iranian Plant Protection Congress, Tehran, Iran 638. (In Persian)

Siddiqui A, Shaukat S (2004) Systemic resistance in tomato induced by biocontrol bacteria against theagainst the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* is independent of salicylic acid production. Phytopathology 152: 48-54.

Siddiqui ZA, Mahmood I (1999) Role of bacteria in the management of plant parasitic nematodes: a review. Bioresource Technology 69: 167–179.

Taba S, Sawada J, Moromizato Z I (2007) Nematicidal activity of Okinawa island plants on the root-knot nematode (Kofoid and White) Chitwood. Plant and Soil 303: 207-216.

Tylor AL, Sasser JN (1978) Biology, identification and control of root-knot nematode, *Meloidogyne* species. North Carolina State University Graphics, Raleigh. NC. 111pp.

Zukerman BM, Dicklow MB, Acosta N (1993) A strain of *Bacillus thuringiensis* for the control of plant-parasitic nematodes. Biocontrol Science and Technology 3: 41-46.