

تأثیر چندین جدایه قارچ آنتاگونیست در کنترل زیستی نماتود مولد زخم ریشه چای (*Pratylenchus loosi*)ابوالفضل یحیوی آزاد^۱، علی سراجی^{۲*}، علی اکبر حجت جلالی^۳ و صنم صفایی چائی کار^۴

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران.
۲. استادیار پژوهشی بیماری‌شناسی گیاهی - نماتودشناسی، پژوهشکده چای، موسسه تحقیقات علوم باغبانی؛ سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، لاهیجان، گیلان، ایران.
۳. استادیار بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران.
۴. استادیار پژوهشی اصلاح نباتات، پژوهشکده چای، موسسه تحقیقات علوم باغبانی؛ سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، لاهیجان، گیلان، ایران
(تاریخ دریافت: ۹۶/۰۴/۱۴ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۲/۲۷)

چکیده

در حال حاضر، مدیریت مبارزه با نماتود مولد زخم ریشه‌ی چای (*Pratylenchus loosi*)، با تکیه بر راهکارهای کنترل زیستی، از اولویت‌های پژوهشی در محصول چای به حساب می‌آید. در این پژوهش، پس از نمونه‌برداری از خاک و ریشه درختچه‌های چای در بهار و تابستان ۱۳۹۲ در مناطق چای‌کاری استان‌های گیلان و مازندران؛ قارچ‌ها از خاک ناحیه فراریشه چای جداسازی شدند. قارچ‌های مورد آزمایش شامل *Paecilomyces lilacinus* (T1) و *P. lilacinus* (N1, N3) و *Clonostachys rosea* *Fusarium culmorum* و *Acremonium strictum* بودند. پس از شناسایی و خالص‌سازی جدایه‌ها و انجام آزمایش‌های مربوط به آنتاگونیستی در شرایط آزمایشگاهی (محیط کشت مایع زاپک داکس ۳/۳۴ درصد و مالت ۱/۵ درصد)، نتایج نشان داد در محیط کشت مایع زاپک داکس، قارچ *P. lilacinus* (T1) پس از ۷۲ ساعت، موجب غیرفعال شدن ۵۲/۰۱ درصد از لاروهای *P. loosi* گردید و همین جدایه تأثیر معنی‌داری روی مرگ و میر بالغین از خود نشان نداد. در محیط کشت مایع مالت، قارچ *P. lilacinus* (T1) پس از ۷۲ ساعت، ۳۲/۴۱ درصد از لاروها و ۳۰/۵۴ درصد از بالغین *P. loosi* را غیرفعال نمود. در شرایط گلدان، آزمایش‌های آنتاگونیستی در سه حالت مایه‌زنی قارچ و نماتود هم‌زمان، مایه‌زنی قارچ و دو هفته بعد مایه‌زنی نماتود و مایه‌زنی نماتود و دو هفته بعد مایه‌زنی قارچ، انجام شد. نتایج نشان داد که قارچ *C. rosea* در صورتی که دو هفته قبل از نماتود مایه‌زنی شود، می‌تواند در شاخص‌های وزن کل نهال، وزن تر ریشه، حجم ریشه و جمعیت نماتود در ریشه و خاک تأثیر قابل توجهی از خود نشان دهد و بیشترین تأثیر را در مقایسه با سایر جدایه‌ها دارد.

واژه‌های کلیدی: چای، قارچ‌های آنتاگونیست، کنترل زیستی، *Pratylenchus loosi***The effect of several antagonistic fungi isolate on biological control of tea root lesion nematode (*Pratylenchus loosi*)**Aboufzali Yahyavi Azad¹, Ali Seraji^{2*}, Ali Akbar Hojjat Jalali³ and Sanam Safaei Chaeikar⁴

1. Graduated Master of Plant Pathology, Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, Razi University, Kermanshah, Iran. 2. Assistant Professor of Plant Pathology-Nematology, Tea Research Center, Horticultural Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Lahijan, Gilan, Iran. 3. Assistant Professor of Plant Pathology, Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, Razi University, Kermanshah, Iran. 4. Assistant Professor of Plant Breeding, Tea Research Center, Horticultural Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Lahijan, Gilan, Iran.

(Received: July 5, 2017- Accepted: March 18, 2018)

ABSTRACT

Control of tea root lesion nematode (*Pratylenchus loosi*) at present relying on biological control strategy is considered as a research priority in tea product. In this research, after sampling the soil and root from tea bushes in spring and summer of 2013 in tea gardens of Gilan and Mazandaran provinces, fungi were isolated from the soil of tea root area. After identification and purifying the isolates, equivalence tests *in vitro* conditions were conducted (Czapek_Dox 34.3% and 1.5% malts). Results after 72 hours in Czapek_Dox liquid culture, *P. lilacinus* (T1), inactivated 52.1% of *P. loosi* juvenile and the same isolate showed no significant effect on adult mortality. In malt culture medium, the fungus *P. lilacinus* (T1) inactivated 32.41% of juvenile and 30.45% of the adult *P. loosi* after 72 hours. In pot condition, equivalence tests were conducted in three modes of simultaneous fungus and nematode inoculation, fungi inoculation and two weeks later nematode inoculation and nematode inoculation and two weeks later fungi inoculation. The results showed that if *C. rosea* fungus inoculated two weeks before nematode inoculation, it could show considerable effect on some indices, such as: total seedling weight, root fresh weight, root thickness and nematode population in root and soil as compared with other strains.

Keywords: Antagonistic Fungus, Biological Control, *Pratylenchus loosi*, Tea.

* Corresponding author E-mail: aliseraji_a1975@yahoo.com

تازه‌های تحقیق

این مطالعه نخستین تحقیق در ارتباط با کنترل زیستی نماتود مولد زخم ریشه چای (*Pratylenchus loosi*) با استفاده از قارچ‌های هم‌ستیز در ایران و جهان می‌باشد که در پژوهشکده چای کشور واقع در استان گیلان و شهرستان لاهیجان صورت گرفت. در این پژوهش نخستین بار تاثیر قابل توجه قارچ *Paecilomyces lilacinus* بر کنترل نماتود مذکور مشاهده و گزارش شد.

مقدمه

چای با نام علمی *Camellia sinensis* Kuntze (Syn: *Camellia thea*) به‌عنوان یک محصول دائمی که به‌صورت تک‌کشتی کاشته می‌شود، یک ریزاقلیم با ثبات است و محیط غذایی یکنواختی برای آفات و بیماری‌ها ایجاد می‌کند. از بین عوامل بیماری‌زا، قارچ‌ها و نماتودها مهم‌ترین عواملی هستند که باعث وارد کردن خسارت به گیاه چای می‌شوند. تاکنون بیش از ۶۰ گونه قارچ (Willson 1999) و بیش از ۵۲ گونه نماتود از روی چای در دنیا گزارش شده است (Mirghasemi et al. 2014). در کشور ایران در سال‌های اخیر، نماتود مولد زخم ریشه‌ی چای (*Pratylenchus loosi* Loof, 1960)، به‌عنوان بیماری کلیدی و خسارت‌زای چای به‌حساب آمده و باعث ایجاد خسارت شدید به درختچه‌های چای شده است؛ به‌طوری که میزان رشد گیاهان آلوده شدیداً کاهش یافته و به‌علت عدم توانایی ایجاد شاخه و برگ جدید، میزان محصول افت شدید داشته است (Seraji et al. 2007). در حال حاضر، از مجموع ۳۲ هزار هکتار باغ چای در شمال کشور، بیش از ۲۰۰۰۰ هکتار آن آلوده به این نماتود انگل می‌باشند (Bagheri and Seraji 2012). استفاده از ترکیبات شیمیایی اگرچه در مواردی سبب کاهش جمعیت نماتودهای این گروه شده است؛ اما هیچ‌یک از این ترکیبات نتوانسته نماتودهای انگل این گروه را کاملاً کنترل نماید. در چند دهه اخیر، بحث امکان کنترل زیستی عوامل بیماری‌زای گیاهی با استفاده از قارچ‌های آنتاگونیست مورد توجه بسیاری از محققان قرار گرفته است (Sattar et al. 2011). قارچ‌های آنتاگونیست نماتودها از اهمیت خاصی در بین موجودات

میکروسکوپی کنترل‌کننده زیستی نماتودهای انگل گیاهی برخوردار هستند (Hojjat Jalali and Ghasempour 2006). تحقیقات صورت گرفته نشان داد که در محیط کشت مایع Gliotoxin-fermentation، سویه قارچ *Fusarium oxysporum* 162، پس از گذشت ۲۴ ساعت، باعث غیرفعال شدن تعداد زیادی از نماتودهای انگل غیرمهاجر داخلی نظیر *H. schachtii*، *M. arenaria*، *M. incognita* و *M. javanica* گردید.

همچنین حدود ۶۵ درصد لاروها و بالغین نماتودهای انگل مهاجر داخلی از جمله *Radopholus similis* و *P. zeae* تحت تأثیر متابولیت‌های ثانویه این قارچ، غیرفعال شدند (Hallmann and Sikora 1996). با تولید متابولیت‌های کشنده در محیط کشت مایع (Penipratynolene, 6-methoxy – carbonylpicolinic acid and 2,6-Penicillium pyridinedicarboxylic acid) توسط *Penicillium bibliaiae*، بیش از ۷۷ درصد نماتودهای *P. penetrans* کشته شدند. به‌طور مشابه چهار جدایه از *Streptomyces* spp. دارای خاصیت نماتودکشی علیه *P. penetrans* می‌باشند (Walker et al. 1966). بررسی ریشه‌های سیب‌زمینی آلوده به *P. penetrans*، در حضور قارچ *Hirsutella rhossiliensis*، نشان می‌دهد که تعداد نماتودها به میزان ۲۵ درصد کاهش یافته است (Timper and Brodie 1994). گزارش کاسترو و همکارانش نشان می‌دهد که قارچ *Arthrobotrys musiformis* حدود ۳۰ درصد از جمعیت *Pratylenchus brachyurus* را کنترل می‌نماید (Castro et al. 2000). در ضمن میزان خسارت ناشی از *P. penetrans* در هویج، با مایه‌زنی *Glomus* sp. به‌میزان ۴۹ درصد کاهش یافته است (Talavera et al. 2001). بررسی دیگری نشان می‌دهد که قارچ‌های *P. lilacinus* باعث کاهش جمعیت نماتودهای جنس *Pratylenchus* در ذرت و *P. coffee* در نخود شده است (Gapasin 1995). Tiyaqi and Shamim 2004 قارچ‌های غیر نماتودخوار نظیر *Trichoderma harzianum* و *Clonostachys rosea* به سبب داشتن پروتئاز سرین باعث مرگ و میر نماتودها می‌شوند. مطالعات صورت گرفته روی کنترل *Pratylenchus coffee* با استفاده از قارچ *Glomus*

شده از هر باغ به آزمایشگاه گیاه پزشکی پژوهشکده چای کشور (واقع در لاهیجان) منتقل و تا زمان استفاده در دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شدند (Seraji 2007).

جداسازی قارچ های آنتاگونیست از خاک و شناسایی آنها

به منظور جداسازی قارچ های آنتاگونیست از خاک، از دو روش استفاده گردید. در روش اول، یک گرم خاک با یکصد میلی لیتر آب مقطر سترون مخلوط و با استفاده از دستگاه شیکر دورانی با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه به مدت پانزده تا بیست دقیقه به خوبی مخلوط شدند. سپس رقت های 10^{-1} تا 10^{-5} تهیه و یک میلی لیتر از هر رقت روی محیط کشت عصاره سیب زمینی دکستروز (PDA) آگار پخش شد. به منظور جلوگیری از رشد باکتری ها در محیط های کشت، اسید لاکتیک پنجاه درصد به میزان شصت قطره در یک لیتر اضافه گردید (Carling and Sumner 1992).

در روش دوم، با کشت نماتودهای انگلی شده به وسیله قارچ، قارچ های مورد نظر جداسازی شدند. جهت جداسازی قارچ از تخم، لاروها و بالغین نماتود *P. loosi*، از محیط کشت آب آگار (WA) یک درصد همراه با سولفات استرپتومایسین (پنجاه میلی گرم در لیتر) استفاده شد (Chavoshi et al. 2014). به منظور کشت و شناسایی قارچ ها، از محیط کشت های مختلفی از جمله سیب زمینی دکستروز آگار، آب آگار، عصاره مالت آگار، عصاره آرد ذرت آگار و برگ گل میخک آگار استفاده گردید (Sullivan and White 2000). به منظور خالص سازی قارچ های رشد یافته روی محیط کشت PDA، از روش تک اسپور کردن استفاده شد. پس از رشد اسپورها روی محیط، با تهیه نمودن اسلاید میکروسکوپی اقدام به شناسایی گونه گردید. ویژگی های ظاهری مورد توجه در مورد فوزاریوم ها شامل شکل ماکرو و میکرو کنیدی، شکل سلول انتهایی و پایه ماکرو کنیدی، وجود یا عدم وجود کلامیدوسپور، نوع فیالیید (مونوفیالیید یا پلی فیالیید)، وجود یا عدم وجود زنجیره میکرو کنیدی و سرهای دروغین، رنگ پرگنه قارچ (به ویژه سطح زیرین) و نرخ رشد پرگنه می باشد. برای شناسایی قارچ های

intraradices در موز، نشان داد که این قارچ می تواند جمعیت نماتود را به میزان پنج تا ۱۲ درصد کاهش دهد (Elsen et al. 2008). در جدیدترین مطالعات صورت گرفته روی کنترل نماتود *P. penetrans* در گوجه فرنگی با استفاده از قارچ ریشه *Glomus mosseae*، دیده شده که تعداد نماتودهای ماده و همچنین میزان تولید مثل آنها در ریشه های همراه با قارچ، در مقایسه با ریشه های فاقد قارچ *G. mosseae*، کمتر بوده است (Vos et al. 2012). قارچ *Fusarium oxysporum* می تواند با ایجاد تغییرات فیزیولوژیکی در بافت ریشه و یا از طریق کلنیزه کردن سلول های تغذیه ای، به نماتود *Pratylenchus zae* خسارت وارد کند. بر اساس مطالعات صورت گرفته در شرایط گلخانه ای، نماتود مولد زخم ریشه چای (*P. loosi*) با سه جنس قارچ ساکن ریشه (*Sclerotium* و *Fusarium Rhizoctonia*) در شرایط ایران در تعامل بوده و اثرات متقابل بین این قارچ ها و نماتود مذکور از نوع تشدید کننده می باشد (Nassaj Hosseini 2003). در مورد میکروفلور قارچی وابسته به نماتود مولد زخم ریشه چای به عنوان عوامل آنتاگونیست و استفاده از آنها در کنترل زیستی نماتود در ایران تاکنون مطالعاتی صورت نگرفته است. به همین منظور، در این پژوهش سعی شد که روی جنبه های مختلف کنترل زیستی این نماتود از قبیل جداسازی و شناسایی قارچ های آنتاگونیست موجود در ناحیه فراریشه چای، بررسی میزان کنترل این نماتود در شرایط آزمایشگاهی و گلدان و در نهایت کاربرد این قارچ ها در شرایط گلخانه برای تعیین قارچ کارا تر به منظور معرفی آنتاگونیست برتر، مطالعاتی صورت گیرد.

مواد و روش ها

نمونه برداری

به منظور جداسازی عوامل قارچی آنتاگونیست نماتود مولد زخم ریشه چای، تعداد ۹۱ نمونه خاک از مناطق مختلف چای کاری استان گیلان شامل شهرستان های رشت، لاهیجان، سیاهکل، لنگرود (مرکزی، کومله و اطاقور)، املش، رودسر، شفت و فومن در فصل های بهار و پاییز سال ۱۳۹۲ به صورت تصادفی و بر اساس اصول نمونه برداری، جمع آوری گردید. نمونه های خاک تهیه

شیکر دورانی با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه و در انکوباتور با دمای ۲۶ درجه سلسیوس قرار گرفت. بعد از آن با استفاده از دو لایه فیلتر استریل، محیط‌های کشت مایع ارلن‌ها، صاف شدند. سپس برای تکمیل سترون و حذف کامل بقایای قارچ‌ها و اسپور آن‌ها، دو بار از فیلترهای میکروبیولوژیک ۰/۴۵ میکرومتری استفاده گردید. پیش از آزمایش، pH محیط زاپک داکس پنج و محیط مالت در ۵/۲ تنظیم شد. به منظور بررسی تاثیر عصاره‌های کشت جدایه‌های قارچی روی فعالیت *P. loosi* از رقت ۱/۵ درصد برای محیط مالت و ۳/۳۴ درصد برای محیط زاپک داکس استفاده گردید. همچنین آب مقطر سترون و محیط کشت بدون مایه قارچ به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. این آزمایش در تشتک‌های استریل یک‌بار مصرف به قطر شش سانتی‌متر حاوی شش میلی‌لیتر از عصاره‌های قارچی و یکصد عدد نماتود ضدعفونی شده شامل نماتودهای نر، ماده و لاروهای *P. loosi* از پرگنه خالص، انجام پذیرفت. سپس نمونه‌ها در انکوباتور با دمای ۲۲ درجه سلسیوس نگهداری شدند. درصد بی‌حرکتی نماتودها بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با شمارش نماتودهای غیرفعال شده، تعیین گردید (Hallmann and Sikora 1996).

مایه‌زنی نماتود و جدایه‌های قارچی آنتاگونیست در گلدان

پس از تهیه نهال‌های مناسب و مطلوب ۱۲ تا ۱۸ ماهه کلون امیدبخش ۱۰۰ چای و خاک مناسب نهال‌کاری (Seraji 2007) اقدام به انجام آزمایش‌های گلخانه‌ای گردید. پس از رشد کامل نهال‌های چای و اطمینان از تثبیت نهال‌ها در گلدان، نماتودها را به روش وایت‌هد از ریشه استخراج کرده و پس از ضدعفونی با استرپتومایسین ۰/۲ درصد، تعداد یک نماتود به ازای هر گرم خاک گلدان (نماتود زنده، فعال و عاری از هرگونه آلودگی قارچی و باکتریایی)، در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر با سرنگ سترون به چاله‌های ایجاد شده به عمق پنج سانتی‌متر در اطراف ریشه چای تزریق شد و نیز از اسپورهای پرگنه پنج تا هفت روزه (به میزان ۱۰^۶) جدایه قارچ‌های آنتاگونیست روی محیط کشت PDA، استفاده گردید. بدین منظور با استفاده از لام هموسیتومتر، ۱۰^۶

دیگر، صفاتی چون؛ رنگ کلونی، شکل اسپور، نوع فیالید، میسلیم، نوع کنیدیوفور و سلول کنیدیوم‌زا مورد بررسی قرار گرفت. پس از جداسازی و خالص‌سازی، شناسایی قارچ‌ها با استفاده از کلیدهای تاکسونومیکی معتبر صورت گرفت.

استخراج نماتودها، شمارش و ضدعفونی آن‌ها

با توجه به این‌که برای انجام آزمون‌های مربوط به کنترل زیستی نیاز به نماتودهای زنده و فعال می‌باشد، از روش استخراج سینی (Whitehead and Hemming 1965) به منظور استخراج نماتودها از خاک و ریشه استفاده گردید. دمای بهینه در این روش برای استخراج نماتودها ۲۰ تا ۲۵ درجه سلسیوس است (Gowen and Edmunds 1973). به منظور شمارش جمعیت نماتود مولد زخم ریشه چای، از اسلاید شمارش نماتودها استفاده گردید (Seraji 2007). به منظور ضدعفونی نماتودها، نماتودهای استخراج شده از ریشه با جمعیت بسیار بالا (بالای هزار نماتود در یک گرم ریشه)؛ بلافاصله پس از استخراج، با استفاده از محلول استرپتومایسین دوهزار قسمت در میلیون (پی‌پی‌ام) به مدت ۲۴ ساعت ضدعفونی شد. پس از سه بار آب‌کشی به وسیله آب مقطر سترون، از این نماتودها برای بررسی آزمون اولیه در آزمایشگاه استفاده گردید (Pinochet et al. 1995).

بررسی تاثیر آنتاگونیستی جدایه‌های قارچی روی لاروها و بالغین *P. loosi* در محیط‌های کشت مایع

مالت ۱/۵ درصد و زاپک داکس ۳/۳۴ درصد

پس از تهیه هر یک از محیط کشت‌ها بر اساس روش (Dhingra and Sinclair 1986) در ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتر حاوی یکصد میلی‌لیتر از محیط مایع ۱/۵ درصد مالت و ۳/۳۴ درصد زاپک داکس، یک پولک به قطر نیم سانتی‌متر از کشت هفت روزه قارچ آنتاگونیست روی محیط کشت PDA، برداشته و به درون ارلن حاوی محیط کشت مایع با رقت مورد نظر اضافه گردید. برای هر جدایه نیز سه تکرار و سه ارلن دارای یکصد میلی‌لیتر محیط کشت مایع بدون پولک جدایه قارچ‌ها نیز به عنوان شاهد منظور شد. سپس کشت‌ها به مدت سه هفته روی

احتمال یک درصد و در شرایط گلخانه با توجه به بالا بودن تعداد تیمارها، از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک درصد استفاده شد.

نتایج و بحث

پس از جداسازی نماتود از خاک و ریشه و بررسی خصوصیات ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی بالغین، با استفاده از کلیدهای شناسایی موجود، به تشخیص گونه نماتود اقدام گردید. با استفاده از شرح گونه ارایه شده توسط کاستیلو و وولاس در ۲۰۰۷؛ جمعیت مورد مطالعه با گونه *P. loosi* مطابقت نشان داد. مطالعات ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی نشان داد که مشخصات غیر از مطابقت با کلید شناسایی گونه، با توصیف گونه ارائه شده توسط محققان مختلف (Tanhamoafi 1992, Seraji 2007, Mirghasemi et al. 2014) کاملاً مطابقت دارد و لذا نماتود مورد بررسی، گونه *P. loosi* تشخیص داده شد. پس از جمع‌آوری اطلاعات لازم در ارتباط با قارچ‌های آنتاگونیست و با استفاده از منابع معتبر علمی (Barnet and Hunter 1998, Samson 1974 و Leslie and Summerell 2006)، قارچ‌های جداسازی شده، شناسایی گردیدند. این قارچ‌ها شامل سه جدایه *Paecilomyces lilacinus* (N1, N3) و یک جدایه *Fusarium culmorum* بودند. علاوه بر این چهار جدایه، از دو جدایه آماده دیگر شامل *Acremonium strictum* و *Clonostachys rosea* به منظور اجرای آزمون آنتاگونیستی استفاده گردید.

بر اساس جدول تجزیه واریانس داده‌ها، در محیط کشت مایع مالت ۱/۵ درصد، میزان غیرفعال شدن لاروهای نماتودها تنها در زمان ۷۲ ساعت و میزان غیرفعال شدن بالغین نماتودها پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت در سطح احتمال یک درصد، اختلاف آماری معنی‌داری از خود نشان دادند. در سایر تیمارها (غیرفعال شدن لاروها پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت و غیرفعال شدن بالغین پس از ۲۴ ساعت) اختلاف آماری معنی‌داری ملاحظه نگردید (جدول ۲). پس از گذشت ۷۲ ساعت از اعمال تیمارها، جدایه *Paecilomyces lilacinus* (T1) با میانگین ۳۲/۴۱ درصد، باعث مرگ و میر لاروهای *P. loosi* در محیط کشت مالت ۱/۵ درصد گردید.

اسپور قارچ شمارش و به هر گلدان، تزریق شد. در این برهم‌کنش برای آزمون گلخانه‌ای، تیمارهای مختلفی شامل تیمار فقط قارچ، تیمار قارچ و نماتود، تیمار فقط نماتود و تیمارهای شاهد بدون قارچ و نماتود استفاده شد. تیمار قارچ و نماتود، خود در سه حالت مورد بررسی قرار گرفت. بدین ترتیب که در حالت اول ابتدا نماتود و دو هفته‌ی بعد قارچ؛ در حالت دوم، ابتدا قارچ و دو هفته بعد نماتود و در حالت سوم، قارچ و نماتود به‌طور هم‌زمان مایه‌زنی شدند. برای هر تیمار، پنج تکرار در نظر گرفته شد و به مدت چهار ماه و نیم در شرایط گلخانه مورد بررسی قرار گرفتند (Baker et al. 1984, Nassaj Hosseini 2003).

ارزیابی آزمون گلخانه و ثبت داده‌های تیمارهای آزمایشی

چهار ماه و نیم پس از تاریخ مایه‌زنی، شاخص‌های بیماری‌زایی، مورفولوژیکی زراعی و زیست‌شناختی نماتود انگل بررسی گردید. شاخص‌های بیماری‌زایی شامل جمعیت نماتود در ۲۵۰ گرم خاک، جمعیت نماتود در یک گرم ریشه و شاخص‌های مورفولوژیکی زراعی نهال‌ها شامل ارتفاع نهال (از محل طوقه تا انتها)، وزن کل نهال، وزن تر شاخساره، وزن تر ریشه، وزن خشک شاخساره، حجم ریشه و در نهایت شاخص‌های بیولوژیکی نماتودها از قبیل میزان لیز شدن، بدشکل شدن و چروکیدگی شدن اندازه‌گیری شد. به منظور بررسی جمعیت نماتودها در یک گرم ریشه، از روش کولن و دهرد استفاده گردید (Coolen and d' Herde 1972). همچنین برای به دست آوردن جمعیت نماتود در خاک، ۲۵۰ گرم خاک را وزن کرده و به روش وایت‌هد، نماتودهای آن استخراج شدند.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

این آزمایش بر پایه طرح آماری کاملاً تصادفی صورت گرفت. به منظور تجزیه و تحلیل داده‌های آماری برای شاخص‌های مورد مطالعه از لحاظ نرمال بودن و منحنی توزیع یکنواختی واریانس، از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ استفاده گردید. به منظور مقایسه میانگین‌ها در داده‌های مربوط به شرایط آزمایشگاهی، از آزمون LSD در سطح

بازه‌های زمانی، اختلاف آماری معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود داشته است (جدول ۲). پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، جدایه *P. lilacinus* (T1) به ترتیب با میانگین ۴۱/۸۴، ۴۵/۸۹ و ۵۲/۰۱ درصد بیشترین میزان غیرفعال شدن لاروها را از خود نشان داد و اختلاف آماری معنی‌داری با شاهد داشت. همچنین قارچ *P. lilacinus* (N1) در تمامی بازه‌های زمانی اثر کشندگی قابل توجهی داشته و اختلاف آماری معنی‌داری با *P. lilacinus* (T1) نداشت. سایر جدایه‌ها در مقایسه با شاهد تفاوت آماری معنی‌داری از خود به نمایش نگذاشتند. از سویی دیگر، هیچ‌یک از جدایه‌ها اثری در میزان غیرفعال نمودن بالغین در این محیط کشت از خود نشان ندادند (جدول ۳).

همچنین در این بازه زمانی قارچ *A. strictum* هم با میانگین ۲۰/۷۶ درصد مرگ‌ومیر لاروها، تاثیر قابل توجهی از خود نشان داد. در این محیط، پس از گذشت ۴۸ و ۷۲ ساعت، بیشترین درصد غیرفعال شدن بالغین نماتودها مربوط به *P. lilacinus* (T1) به ترتیب با میانگین ۲۲/۳۲ و ۳۰/۵۴ درصد بود که از لحاظ آماری هم تفاوت معنی‌داری با شاهد از خود نشان داد. پس از آن *A. strictum* به ترتیب با میانگین ۱۲/۰۷ و ۱۷/۰۶ درصد، اختلاف آماری معنی‌داری با شاهد از خود نشان داد. سایر تیمارها با شاهد اختلاف آماری معنی‌داری نداشتند (جدول ۳).

در محیط کشت مایع زاپک داکس ۳/۳۴ درصد، نتایج نشان داد که در میزان غیرفعال شدن لاروهای نماتود مورد بحث، در میان تیمارها در بین تمامی

جدول ۱- راهنمای مربوط به کدهای مورد استفاده در تفسیر آزمایش‌های گلخانه‌ای

Table 1- Guide to the codes used in interpreting greenhouse experiments

کد	نوع مایه‌زنی	کد	نوع مایه‌زنی
شاهد سالم	تیمار بدون نماتود و قارچ	N	فقط نماتود
F ₁	فقط قارچ <i>Fusarium culmurom</i>	A ₁ ○	فقط قارچ <i>Acremonium strictum</i>
F ₂	ابتدا قارچ <i>Fusarium culmurom</i> و دوهفته بعد نماتود	A ₂	ابتدا قارچ <i>Acremonium strictum</i> و دوهفته بعد نماتود
F ₃	ابتدا نماتود، دو هفته بعد قارچ <i>Fusarium culmurom</i>	A ₃	ابتدا نماتود و دو هفته بعد قارچ <i>Acremonium strictum</i>
F ₄	قارچ <i>Fusarium culmurom</i> و نماتود هم‌زمان	A ₄	قارچ <i>Acremonium strictum</i> و نماتود هم‌زمان
C ₁	فقط قارچ <i>Clonostachys rosea</i>	M ₁	فقط قارچ <i>Paecilomyces lilacinus</i> (N1)
C ₂	ابتدا قارچ <i>Clonostachys rosea</i> و دوهفته بعد نماتود	M ₂	ابتدا قارچ <i>Paecilomyces lilacinus</i> (N1) و دوهفته بعد نماتود
C ₃	ابتدا نماتود، دو هفته بعد قارچ <i>Clonostachys rosea</i>	M ₃	ابتدا نماتود، دو هفته بعد قارچ <i>Paecilomyces lilacinus</i> (N1)
C ₄	قارچ <i>Clonostachys rosea</i> و نماتود هم‌زمان	M ₄	قارچ <i>Paecilomyces lilacinus</i> (N1) و نماتود هم‌زمان
P ₁	فقط قارچ <i>Paecilomyces lilacinus</i> (N3)	V ₁	فقط قارچ <i>Paecilomyces lilacinus</i> (T1)
P ₂	ابتدا قارچ <i>Paecilomyces lilacinus</i> (N3) و دوهفته بعد نماتود	V ₂	ابتدا قارچ <i>Paecilomyces lilacinus</i> (T1) و دوهفته بعد نماتود
P ₃	ابتدا نماتود، دو هفته بعد قارچ <i>Paecilomyces lilacinus</i> (N3)	V ₃	ابتدا نماتود، دو هفته بعد قارچ <i>Paecilomyces lilacinus</i> (T1)
P ₄	قارچ <i>Paecilomyces lilacinus</i> (N3) و نماتود هم‌زمان	V ₄	قارچ <i>Paecilomyces lilacinus</i> (T1) و نماتود هم‌زمان

جدول ۲- تجزیه واریانس تاثیر عصاره شش جدایه قارچ آنتاگونیست در محیط کشت مایع مالت ۱/۵ درصد و زاپک داکس ۳/۳۴

درصد روی غیرفعال شدن لاروها و بالغین نماتود مولد زخم ریشه چای (*P. loosi*)

Table 2- Variance analysis of the six antagonistic fungi isolate effects on inactivation of juveniles and adults of tea root lesion nematode (*P. loosi*) in Malt 1.5% and Czapek-Dox 3.34% culture

Sources of Variance	df	Mean of Square (MS) (Malt 1.5%)						Mean of Square (MS) (Czapek-Dox 3.34%)					
		Percent of inactivated juveniles			Percent of inactivated adults			Percent of inactivated juveniles			Percent of inactivated adult		
		24 Hours	48 Hours	72 Hours	24 Hours	48 Hours	72 Hours	24 Hours	48 Hours	72 Hours	24 Hours	48 Hours	72 Hours
Treatment	6	1.29 ^{ns}	2.65 ^{ns}	164.28 ^{**}	1.26 ^{ns}	50.22 ^{**}	139.73 ^{**}	382.4 ^{**}	455.65 ^{**}	605.61 ^{**}	3.17 ^{ns}	3.66 ^{ns}	6.37 ^{ns}
Error	14	2.89	2.92	10.76	1	1.57	2.35	4.1	8.3	0.22	2.25	3.04	3.75
Total	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CV	-	15.15	13.96	19.19	9.14	9.58	9.81	10.9	14.05	17.6	12.08	13.19	13.7

ns و ** به ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

ns and **: non-significant and significant at 1% probability level, respectively

جدول ۳- مقایسه میانگین تاثیر عصاره شش جدایه قارچ آنتاگونیست در محیط کشت مایع مالت ۱/۵ درصد و زاپک داکس ۳/۳۴ درصد روی غیرفعال شدن لاروها و بالغین نماتود مولد زخم ریشه چای (*P. loosi*)

Table 3- Comparison means of the six antagonistic fungi isolate effects on inactivation of juveniles and adults of tea root lesion nematode (*P. loosi*) in Malt 1.5% and Czapek-Dox 3.34% culture

Antagonistic Fungi	Malt 1.5%						Czapek-Dox 3.34%					
	Means of inactivated juveniles			Means of inactivated adults			Means of inactivated juveniles			Means of inactivated adults		
	24 Hours	48 Hours	72 Hours	24 Hours	48 Hours	72 Hours	24 Hours	48 Hours	72 Hours	24 Hours	48 Hours	72 Hours
<i>Paecilomyces lilacinus</i> (T1)	11.01 ^a	12.08 ^a	32.41 ^a	11.51 ^a	22.32 ^a	30.54 ^a	41.84 ^a	45.89 ^a	52.01 ^a	13.38 ^{ab}	14.09 ^{ab}	15.98 ^a
<i>Paecilomyces lilacinus</i> (N1)	11.11 ^a	11.6 ^a	11.6 ^c	10 ^a	11.37 ^b	21.08 ^c	25.08 ^b	27.63 ^b	31.05 ^b	22.26 ^{ab}	13.95 ^{ab}	15.35 ^{ab}
<i>Paecilomyces lilacinus</i> (N3)	11.44 ^a	12.43 ^a	12.98 ^c	11.3 ^a	11.76 ^b	12.25 ^c	13.36 ^c	14.9 ^c	14.9 ^c	11.92 ^{ab}	12.52 ^{ab}	12.93 ^{ab}
<i>Fusarium culmorum</i>	11.53 ^a	13.89 ^a	14.16 ^c	11.17 ^a	11.86 ^b	12.42 ^c	13.07 ^c	14.1 ^c	17.19 ^c	11.84 ^{ab}	12.49 ^{ab}	13.55 ^{ab}
<i>Acremonium strictum</i>	12.15 ^a	12.15 ^a	20.76 ^b	11.27 ^a	12.07 ^b	17.06 ^b	12.99 ^c	13.84 ^c	17.13 ^c	14.25 ^a	14.79 ^a	15.56 ^{ab}
<i>Clonostachys rosea</i>	11.38 ^a	12.46 ^a	15.24 ^{bc}	11.31 ^a	11.72 ^b	13.57 ^c	12.45 ^c	14.69 ^c	15.16 ^c	11.91 ^{ab}	13.09 ^{ab}	13.28 ^{ab}
Control	10 ^a	11.11 ^a	12.47 ^c	10 ^a	10.64 ^b	11.58 ^c	11.17 ^c	12.43 ^c	12.52 ^c	11.33 ^b	11.63 ^b	12.31 ^b
LSD	2.98	2.99	5.74	1.75	2.2	2.68	3.54	5.04	4.94	2.62	3.05	3.39

بر اساس آزمون LSD، میانگین‌ها با حروف مشابه در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

Means with similar letters are not significantly different at the 1% probability level using LSD test.

مایه‌زنی شده‌اند، نوعی اثر تشدیدکنندگی در این شاخص مشاهده گردیده و وزن کل نهال در این تیمارها کمتر از تیمار مایه‌زنی شده با نماتود به تنهایی می‌باشد. در شاخص وزن تر شاخساره، تیمار P₂ با میانگین ۵۹/۸ گرم پس از تیمار شاهد سالم بیشترین وزن تر شاخساره را به خود اختصاص داد و بهترین تیمار بود. از طرفی، تیمار F₄ با میانگین ۲۴/۲ گرم، کمترین میزان وزن تر شاخساره را دارا بود و باز هم نوعی اثر تشدیدکنندگی از خود نشان داد (جدول ۵). در شاخص وزن خشک شاخساره، تیمار P₃ با میانگین ۲۱/۳۳ گرم، بیشترین میزان وزن خشک را دارا بود و بهترین تیمار پس از تیمار شاهد سالم به شمار آمد؛ اما کمترین میزان وزن خشک شاخساره باز هم متعلق به تیمار F₄ با میانگین ۱۰/۰۲ گرم می‌باشد و اثر تشدیدکنندگی تکرار گردید (جدول ۵). در ارتباط با وزن تر ریشه، بیشترین میزان این شاخص متعلق به تیمار C₂ با میانگین ۴۹/۶ گرم و کمترین میزان وزن تر ریشه متعلق به تیمار F₄ با میانگین ۲۰/۲ گرم می‌باشد و اثر تشدیدکننده داشت. از طرف دیگر، در ارتباط با شاخص حجم ریشه، تیمار P₂

در مطالعات گلخانه‌ای، بر اساس جدول تجزیه واریانس داده‌ها، بین تأثیر جدایه قارچ‌های آنتاگونیست و نماتود مولد زخم ریشه چای (*P. loosi*) در تمامی شاخص‌ها در سطح احتمال یک درصد، اختلاف معنی‌داری وجود دارد (جدول ۴). بر این اساس، در میان تیمارهای مایه‌زنی شده با نماتود *P. loosi*، تیمار A₂ با میانگین ۲۴/۲ سانتی‌متر، پس از تیمار شاهد سالم، بیشترین ارتفاع نهال را نشان داد. کمترین ارتفاع نهال هم مربوط به تیمار N با میانگین ۲/۴ سانتی‌متر می‌باشد (جدول ۵). بنابراین، می‌توان استنباط نمود که در این شاخص، قارچ *A. strictum* در حالتی که دو هفته قبل از مایه‌زنی نماتود در خاک وجود داشته باشد، می‌تواند اثرات مضر ناشی از *P. loosi* را در شاخص ارتفاع نهال چای کاهش دهد. در میان تیمارهای مایه‌زنی شده با نماتود، بیشترین وزن کل نهال چای پس از تیمار شاهد سالم، مربوط به تیمار C₂ به میزان ۱۰۶ گرم می‌باشد. همچنین کمترین میزان وزن کل نهال، در تیمار F₄ به میزان ۴۴/۴ گرم ملاحظه گردید (جدول ۵). به نظر می‌رسد در تیمارهایی که نماتود و قارچ به‌طور هم‌زمان

گرم خاک، در تیمار C₂ با میانگین ۷۹/۴ عدد کمترین و در تیمار V₂ با میانگین ۷۳۹/۶ عدد پس از تیمار شاهد آلوده به نماتود، بیشترین بود (جدول ۵). در شاخص‌های وزن کل نهال، وزن تر شاخساره، حجم ریشه، وزن تر ریشه و جمعیت نماتود در خاک و ریشه، تیمار C₂ موثرترین تیمار می‌باشد. همچنین در شاخص ارتفاع نهال چای، مایه‌زنی جدایه *A. strictum* دو هفته قبل از نماتود و در شاخص وزن تر و وزن خشک شاخساره، تیمار P₂ بهترین تیمارها بودند.

میانگین ۳۹ سانتی‌متر مکعب در کنار تیمار C₂ با میانگین ۳۶ سانتی‌متر مکعب جزء بهترین تیمارها به شمار می‌آیند. مشابه شاخص‌های قبلی، تیمار F₄ با میانگین ۱۵ سانتی‌متر مکعب، ضعیف‌ترین جدایه بوده و اثری از خود نشان نداد (جدول ۵). در شاخص میزان جمعیت نماتود در ریشه، تیمار C₂ با میانگین ۵۲ عدد نماتود در یک گرم ریشه کمترین میزان جمعیت و تیمار V₂ با میانگین ۴۹۳/۴ عدد نماتود در یک گرم ریشه، جمعیت را دارا بودند. میزان جمعیت نماتود در ۲۵۰

جدول ۴- تجزیه واریانس شاخص‌های مرفولوژیکی زراعی نهال‌های چای تحت تاثیر شش جدایه قارچ آنتاگونیست و نماتود مولد زخم ریشه چای (*P. loosi*)

Table 4- Analysis of variance of morphological indices of tea seedlings under the influence of six isolates of antagonistic fungi and tea root lesion nematode (*P. loosi*)

Sources of Variance	df	Mean of Square (MS)							
		High (cm)	Total weight (gr)	Fresh shoot weight (gr)	Dry shoot weight (gr)	Fresh root weight (gr)	Root volume (cm ³)	Population in root	Population in soil
Treatment	25	3.45**	2227**	570.04**	71.02**	4.24**	3.35**	294.74**	450.42**
Error	104	0.55	427.18	131.58	19.751	0.73	0.6	8.31	11.62
Total	129								
CV	-	23.94	25.56	25.56	26.03	14.54	14.73	25.33	24.47

** : significant at 1% probability level

** معنی دار در سطح احتمال یک درصد

جدول ۵- مقایسه میانگین تیمارهای آزمایشی در اثر شش جدایه قارچ آنتاگونیست و نماتود مولد زخم ریشه چای (*P. loosi*) در شرایط گلخانه

Table 5- Mean comparison of experimental treatments of six antagonistic fungal isolates and tea root lesion nematode (*P. loosi*) in greenhouse condition

Treatment	High (cm)	Total weight (gr)	Fresh shoot weight (gr)	Dry shoot weight (gr)	Fresh root weight (gr)	Root volume (cm ³)	Population in root	Population in soil
Control	24.8 ^a	115.2 ^a	61.6 ^a	22.72 ^a	55.6 ^a	42.8 ^a	0 ^a	0 ^a
V ₁	11.4 ^{a-e}	112 ^{ab}	61 ^a	22.64 ^a	51 ^{abc}	40 ^{ab}	-	-
M ₁	5.6 ^{c-g}	71 ^{c-h}	41 ^{a-e}	15.55 ^{a-i}	30 ^{b-h}	31 ^{a-e}	-	-
C ₁	14 ^{a-d}	107.4 ^{abc}	56.6 ^{ab}	21.31 ^{ab}	50.8 ^{a-d}	43 ^a	-	-
A ₁	13 ^{a-d}	85.6 ^{a-g}	47.6 ^{a-d}	19.09 ^{a-e}	38 ^{a-g}	36.6 ^{abc}	-	-
P ₁	10.2 ^{b-i}	114 ^a	59.6 ^a	52.4 ^{ab}	52.4 ^{ab}	39 ^{ab}	-	-
F ₂	14.4 ^{abc}	92.4 ^{a-e}	55.6 ^{ab}	19.72 ^{a-e}	45.8 ^{a-d}	35.8 ^{abc}	361 ^{f-g}	538 ^{i-k}
C ₂	11.4 ^{fg}	106 ^{abc}	54.4 ^{ab}	20.68 ^{abc}	49.6 ^{a-d}	36 ^{abc}	52 ^a	79.4 ^a
A ₃	9 ^{b-g}	73.4 ^{c-h}	42 ^{a-e}	15.11 ^{a-i}	31.4 ^{d-h}	24 ^{b-i}	75.8 ^{ab}	114.2 ^a
A ₄	7.4 ^{b-g}	56.4 ^{gh}	31.6 ^{de}	11.7 ^{del}	24.8 ^{e-h}	18 ^{del}	73.8 ^{abc}	110.8 ^{ab}
P ₄	6.4 ^{b-g}	54 ^{gh}	32.6 ^{de}	12.22 ^{e-i}	21.4 ^{gh}	21 ^{c-i}	117 ^{a-d}	177 ^{abc}
M ₂	15.6 ^{ab}	60.2 ^{e-h}	36.8 ^{b-e}	14.09 ^{a-i}	23.4 ^{f-h}	23 ^{b-i}	130.8 ^{a-e}	195.8 ^{a-d}
V ₃	11.8 ^{a-e}	50.8 ^{gh}	29.6 ^{de}	11.07 ^{ei}	21.2 ^{gh}	21 ^{c-i}	190.4 ^{b-i}	287 ^{b-e}
A ₂	24.2 ^a	64.6 ^{d-h}	40.2 ^{a-e}	15.76 ^{a-i}	24.4 ^{e-h}	16.6 ^{ei}	206.4 ^{c-g}	307.8 ^{c-i}
M ₄	3.6 ^g	73.2 ^{b-h}	42.8 ^{a-e}	17.07 ^{a-i}	30.8 ^{b-h}	28 ^{a-i}	237.8 ^{d-g}	256 ^{c-g}
V ₄	5.2 ^{c-g}	58.2 ^{gh}	34.2 ^{b-e}	13.58 ^{a-i}	24 ^{e-h}	19 ^{del}	249.6 ^{d-h}	374.4 ^{c-h}
P ₂	12.8 ^{a-d}	104.2 ^{a-e}	59.8 ^a	20.25 ^{a-d}	44.4 ^{a-d}	39 ^{ab}	249.8 ^{d-i}	370.2 ^{c-h}
C ₃	13.2 ^{a-d}	91.2 ^{a-g}	46.8 ^{a-d}	21.26 ^{ab}	44.4 ^{a-d}	36 ^{abc}	266.4 ^{d-i}	401.6 ^{d-i}
C ₄	3.8 ^g	79 ^h	41.2 ^{a-e}	16.23 ^{a-i}	30.2 ^{b-h}	23 ^{b-i}	273.4 ^{e-i}	413.8 ^{d-i}
M ₃	5.4 ^{c-g}	93.2 ^{a-i}	47.2 ^{a-d}	18.74 ^{a-i}	46.2 ^{a-d}	35 ^{abc}	294.2 ^{f-i}	442.4 ^{e-i}
F ₁	15.4 ^{ab}	89.2 ^{a-g}	47.4 ^{a-d}	17.18 ^{a-i}	41.8 ^{a-i}	27 ^{a-i}	-	-
F ₃	4.8 ^{d-g}	72.6 ^{b-h}	40.8 ^{a-e}	15.34 ^{a-i}	31.8 ^{b-h}	22 ^{b-i}	386.8 ^{g-j}	610.6 ^{g-k}
F ₄	4.8 ^{d-g}	44.4 ^b	24.2 ^e	10.02 ⁱ	20.2 ^{b-h}	15 ⁱ	415.4 ^{h-j}	617.8 ^{h-k}
P ₃	8 ^{b-g}	91.6 ^{a-g}	56.8 ^{ab}	21.33 ^{ab}	34.8 ^{a-h}	32 ^{a-d}	432.2 ^j	644.2 ^{h-k}
V ₂	10.4 ^{b-i}	75.2 ^{a-h}	42.2 ^{a-e}	15.76 ^{a-i}	33 ^{b-h}	19 ^{del}	493.4 ⁱ	739.6 ^{h-k}
N	2.4 ^h	65.24 ^{d-h}	35.53 ^{b-e}	13.93 ^{a-i}	29.7 ^{d-h}	23.2 ^{b-i}	758.16 ^j	874 ^k

بر اساس آزمون دانکن، میانگین‌ها با حروف مشابه در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

Means with similar letters are not significantly different at the 1% probability level using Duncan test.

در محیط کشت مایع، قارچ *Fusarium oxysporum* strain 162، پس از گذشت ۲۴ ساعت، باعث غیرفعال شدن تعداد بسیار زیادی از نماتودهای انگل ثابت داخلی نظیر *M. incognita*، *M. arenaria*، *H. schachtii* و *M. javanica* گردید. همچنین حدود ۶۵ درصد لاروها و بالغین نماتودهای انگل مهاجر داخلی از جمله *Pratylenchus zeae* و *Radopholus similis* تحت تأثیر متابولیت های ثانویه این قارچ، غیرفعال شدند (Hallmann and Sikora 1996). ضمناً عصاره قارچ اندوفیت *Fusarium oxysporum* در شرایط آزمایشگاهی روی نماتودهای انگل گیاهی *Pratylenchus goodeyi*، *Helicotylenchus multicinctus* و *Radopholus similis* اثرات نماتودکشی مناسبی داشته است (Van Dessel et al. 2011). نتایج تحقیقات این مطالعه، پژوهش های گذشته را تایید نمی کند و گویا اینکه این قارچ روی *P. loosi* تاثیر متفاوتی در مقایسه با سایر نماتودها دارد.

در آزمایش های گلخانه ای بر اساس تحقیقات مشابه، مطالعات گرابلی و همکاران نشان می دهد که متابولیت ثانویه به نام کلونوستاکی دیول توسط قارچ *Clonostachys cylindrospora* تولید می شود که تاثیرات نماتودکشی روی *Helicotylenchus cortortus* دارد (Grabley et al. 1993)؛ همان طور که در این تحقیق هم مشخص شده بود که قارچ *C. rosea* موثرتر از سایر جدایه ها بوده و احتمالاً به دلیل تولید همین ماده سمی می باشد. هم چنین تحقیقات دانگ و همکاران نشان داد که مواد استخراج شده از قارچ *C. rosea* اثرات نماتودکشی بسیار شدید علیه چندین گونه از نماتودهای آزاد و انگلی از قبیل *Caenorhabditis elegans*، *Bursaphelenchus* و *Panagrellus redivivus* از خود نشان می دهد (Dong et al. 2004). با توجه به قابلیت بالای این قارچ در کاهش میزان خسارت ناشی از *P. loosi*، می توان از این گونه قارچی در سطح گسترده ای به منظور کنترل زیستی نماتود مورد بحث استفاده نمود. هم چنین تیمار P_2 در دو شاخص وزن تر شاخساره و حجم ریشه تاثیر قابل توجهی از خود نشان داد و جزء تیمارهای برتر تحقیق بود. بر اساس مطالعات گذشته مشخص شده که قارچ های *P.*

در آزمایش های مربوط به تأثیر عصاره های قارچ های آنتاگونیست در محیط کشت مایع زاپک داکس، مشخص گردید که بیشترین میزان غیرفعال شدن و مرگومیر لاروهای *P. loosi* مربوط به قارچ *P. lilacinus* (T1) بوده که پس از گذشت ۷۲ ساعت، ۵۲/۰۱ درصد از لاروها را تلف نمود. پس از آن، جدایه *P. lilacinus* (N1) به میزان ۳۱/۰۵ درصد باعث غیرفعال شدن لاروهای *P. loosi* شد (جدول ۳). در محیط کشت مایع مالت، قارچ *P. lilacinus* (T1) پس از ۷۲ ساعت، ۳۲/۴۱ درصد از لاروها و ۳۰/۵۴ درصد از بالغین *P. loosi* را غیرفعال و از بین برد. پس از آن، قارچ *A. strictum* باعث غیرفعال شدن ۲۰/۷۶ درصد از لاروها و ۱۷/۰۶ درصد از بالغین *P. loosi* گردید. در محیط کشت مایع مالت، قارچ *P. lilacinus* (N1) یکی از ضعیف ترین جدایه ها بوده که هیچ گونه تأثیری روی غیرفعال شدن لاروها و بالغین *P. loosi* از خود نشان نداد.

بر اساس تحقیقات پیشین، اثرات سمی عصاره کشت قارچ ها روی نماتودهای کرمی شکل و تخم آن ها برای قارچ های متعددی از جمله گونه های *Paecilomyces*، *Trichoderma*، *Aspergillus*، *Fusarium*، *Verticillium* و *Myrothecium* گزارش شده است (Morton et al. 2004, Chen and Dickson 2004). بر اساس مطالعات گذشته، قارچ *Paecilomyces lilacinus* با تولید متابولیت های ثانویه سمی در محیط کشت مایع مالت، باعث مرگومیر ۱۰۰ درصد از لاروهای سن دوم *M. arenaria* گردیده بود. این در حالی بود که تنها ۲۰ ساعت پس از اضافه نمودن نماتودها به این محیط، چنین اتفاقی رخ داد. همچنین مشخص شد که افزایش میزان تولید این متابولیت ها با تغییر میزان pH محیط، رابطه ای عکس دارد (Cayrol et al. 1989). در این مطالعه هم قارچ *P. lilacinus* تاثیر قابل توجهی در میزان غیرفعال شدن نماتودها از خود نشان داد که نتایج تحقیقات مشابه را تایید می نماید. همچنین در این محیط، قارچ *F. cumorum*، یکی از ضعیف ترین جدایه ها بوده و تأثیری روی غیرفعال شدن لاروها و بالغین *P. loosi* نشان نداد؛ در حالی که بر اساس مطالعات قبلی،

مرگ و میر نماتود مرکبات (*Tylenchulus semipenetrans*) در شرایط گلخانه گردید. همچنین نتایج نشان داد که ارتباط مثبتی بین مرگ و میر نماتود و زمان مایه‌زنی قارچ وجود دارد (Chavooshi *et al.* 2014). در ارتباط با قارچ *F. culmorum* می‌توان این قارچ را ضعیف‌ترین جدایه معرفی نمود و شاید بتوان گفت که این قارچ در صورتی که هم‌زمان با نماتود مایه‌زنی شود، در برخی شاخسارها از قبیل؛ وزن کل نهال، وزن تر شاخساره، وزن خشک شاخساره، وزن تر ریشه و حجم ریشه خسارت ناشی از *P. loosi* را تشدید می‌نماید. به نظر می‌رسد حضور هم‌زمان قارچ و نماتود ممکن است باعث رقابت بر سر دستیابی به مواد غذایی و فضای ریشه شده و نماتودها توانسته‌اند فضای بیشتری را اشغال نموده و خسارت بیشتری وارد کرده و در نهایت نهال‌ها بیش‌تر تضعیف شده‌اند. بر اساس مطالعات قبلی مشخص شده در صورتی که قارچ *Fusarium pallidoroseum* دو هفته پس از مایه‌زنی *Pratylenchus loosi* به نهال‌های جای اضافه شود، باعث افزایش بیماری می‌گردد که این مسأله بیانگر این است که حضور نماتود در ریشه، زمینه را برای حمله قارچ به گیاه فراهم کرده و باعث تشدید شدن بیماری می‌گردد؛ در نتیجه، توانایی قارچ برای نفوذ به ریشه بیشتر شده و یا تغییر فیزیولوژیکی ناشی از تأثیر نماتود، ریشه‌چای را مستعد پذیرش قارچ مذکور نموده است (Khan 1993, Nassaj Hosseini 2003).

به‌طور کلی از نتایج این تحقیق می‌توان استنباط کرد که در شرایط آزمایشگاهی جدایه *P. lilacinus* (T1) در محیط کشت مایع مالت ۱/۵ درصد و زاپک داکس ۳/۳۴ درصد باعث درصد قابل توجهی مرگ و میر نماتودها شده و آن‌ها را غیرفعال نموده‌است. در شرایط گلخانه، قارچ *C. rosea* نسبت به بقیه قارچ‌ها و در مقایسه با سایر جدایه‌های آنتاگونیست برای کنترل نماتود مولد زخم ریشه چای (*P. loosi*) در نهال‌های چای مناسب‌تر بودند. در پایان پیشنهاد داده می‌شود که نمونه برداری‌های مجدد از خاک ناحیه ریزوسفر و خود ریشه چای به‌منظور جداسازی دیگر قارچ‌های آنتاگونیست و نیز قارچ‌های اندوفیت انجام شود و همچنین کارایی جدایه قارچ‌های آنتاگونیست دیگر در

lilacinus باعث کاهش جمعیت نماتودهای جنس *Pratylenchus* در ذرت و *P. coffee* در نخود شده و با افزایش این قارچ‌ها، جمعیت نماتود، کاهش یافته است (Tiyagi and Shamim 2004). نتایج این بررسی نشان می‌دهد که در دو شاخص وزن تر شاخساره و حجم ریشه، قارچ *P. lilacinus* به‌میزان قابل توجهی خسارت ناشی از این نماتود را کاهش داده و موفق عمل نموده است. در تحقیقات مشابه دیگر، استفاده از قارچ *P. lilacinus* در شرایط گلخانه‌ای موجب کاهش تعداد لاروهای سن دوم و تخم‌های نماتود ریشه‌گری (*Meloidogyne spp.*) گردید که در این تحقیق هم نتایج مشابه به‌دست آمد (Anastasiadis *et al.* 2008). با عنایت به نتایج این آزمایش در کارایی ضعیف جدایه *P. lilacinus* می‌توان این‌گونه استنباط نمود که احتمالاً این قارچ به‌خوبی نتوانسته در خاک مستقر شود و یا تحت تأثیر عواملی مانند بافت خاک، رطوبت و یا شرایط دیگر فیزیوشیمیایی خاک که برای گیرایی و رشد نهال جای مناسب است، کارایی مؤثر خود را از دست داده باشد. از طرفی، با توجه به مهاجر بودن نماتودهای مولد زخم ریشه و جابه‌جایی دائمی آن‌ها از ریشه به داخل خاک و برعکس، نمی‌توان کارایی ضعیف این قارچ را تنها ناشی از ضعف جدایه دانست و باید مهاجر بودن نماتود را هم در نظر گرفت. در ارتباط با قارچ *Acremonium strictum* در صورتی که این قارچ دو هفته قبل از نماتود به خاک اضافه شود، سبب افزایش ارتفاع نهال شده و تفاوت معنی‌داری با نهال‌های آلوده به نماتود به تنهایی نشان می‌دهد؛ اما در سایر شاخص‌ها تأثیر قابل توجهی از خود نشان نداده است. بر اساس گزارش‌های موجود، قارچ‌های آنتاگونیست می‌توانند منابع غذایی گونه‌های نماتود انگل گیاهی را از بین ببرند و قارچ‌هایی که در تجزیه بقایای گیاهی دخالت دارند، در نزدیکی نماتودهای آزاد زندگی می‌نمایند. تعداد زیادی از قارچ‌های نماتودخوار دارای مرحله پوده‌زیستی بوده و در رقابت با سایر میکروفولور ساپروفیت خاک، می‌توانند روی فعالیت آن‌ها و نیز تأثیر آن‌ها به‌عنوان کنترل زیستی اثرگذار باشند (Hojjat Jalali and Ghasempour 2006). بر اساس مطالعات صورت گرفته توسط چاووشی و همکاران، قارچ *A. strictum* به‌میزان قابل توجهی باعث

مسئول و کارکنان آزمایشگاه گیاه پزشکی گروه پژوهشی فناوری و مدیریت تولید پژوهشکده، کمال تشکر و قدردانی را داشته و برای این عزیزان آرزوی سلامتی و موفقیت روزافزون از درگاه ایزد منان خواستارند. همچنین از دکتر علی اکبر خداپرست (دانشیار قارچ شناسی دانشگاه گیلان) و دکتر صمد جمالی (استادیار بیماری شناسی گیاهی دانشگاه رازی کرمانشاه) که در تهیه جدایه های قارچی همکاری لازم را داشتند، نهایت سپاسگزاری را دارند.

شرایط گلخانه و شاخص های محیطی مؤثر در بقای جدایه های قارچی آنتاگونیست بررسی گردد. همچنین کاربرد این قارچ ها با میزان راندمان بالا می تواند مفید واقع گردد.

سپاسگزاری

با عنایت به این مهم که تحقیق حاضر در پژوهشکده چای کشور صورت پذیرفته است؛ نگارندگان بر خود لازم می دانند که از مدیران محترم پژوهشکده چای به ویژه

REFERENCES

- Anastasiadis IA, Giannakou IQ, Prophetou-Athanasidou DA, Gowen SR** (2008) The combined effect of the application of a biocontrol agent *Paecilomyces lilacinus*, with various practices for the control of root-knot nematodes. *Crop Protection* (27): 352-361.
- Baker E, Elad Y, Chet I** (1984) The controlled experiment in the scientific method with special emphasis on biological control. *Phytopathology* (74): 1019-1021.
- Bagheri M, Seraji A** (2012) Control of tea root lesion nematode, *Pratylenchus loosi*, by manure, dolomite and rugbi in greenhouse. In: Proceeding of the twentieth Congress of Iranian Plant Protection, 26-29 August, Shiraz, Iran, 689. (in persian).
- Carling LE, Sumner DR** (1992) *Rhizoctonia*. In: L. L., Singleton; J. D. Mihail and C. M., Rush (eds.), *Methods for research on soil borne phytopathogenic fungi*. APS Press, USA.
- Castillo P, Vovlas N** (2007) *Pratylenchus* (Nematoda: *Pratylenchidae*): Diagnosis, biology, pathogenicity and management. *Nematology Monographs and Perspectives* (6): 1-530.
- Castro JMC, Lima RD, Ferraz S, Neves JCL** (2000) Capacidade de predação de *Arthrobotrys musiformis* a fitonematoides. *Phytopathologica* (26): 58-62.
- Cayrol JC, Djian C, Pijarowski L** (1989) Study of the nematicidal properties of the culture filtrate of nematophagous fungus *Paecilomyces lilacinus*. *Nematology* 12 (4): 331-336.
- Chavooshi Sani M, Jamali S, Taheri H, Khodaparast A** (2014) Biological control of nematode citrus (*Tylenchulus semipenetrans*) with antagonistic fungi. *Plant Protection (Journal of Agriculture)* 36 (1): 75-89. (in persian).
- Chen S, Dickson WD** (2004). Biological control of nematodes by fungal antagonists. In: Chen, Z. X., Chen, S. Y. and Dickson, D. W (eds) *Nematology: Advances and perspectives*, Vol II, nematode management and utilization. CABI Publishing, Cambridge.
- Coolen WA, d' Herd CJ** (1972) A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. *Ghent Agriculture, Belgium*, 77p.
- Dhingra OD, Sinclair JB** (1986) *Basic plant pathology methods*, CRC Press, Boca Raton, Florida, Pp., 354.
- Elsen A, Gervacio D, Swennen R, Waele D** (2008) AMF- induced biocontrol against plant parasitic nematodes in *Musa* sp.: a systemic effect. *Mycorrhiza* (18): 251-256.
- Gapasin RM** (1995) Evaluacion de *Paecilomyces lilacinus* (Thom) samson para el control de *Pratylenchus* sp. in maize. *Biocontrol* 35-39.
- Gowen SR, Edmunds JE** (1973) An evaluation of some simple extraction techniques and the use of hydrogen peroxide for estimating nematode populations in banana roots. *Plant Disease Reporter* (57): 678-681.
- Grabley S, Hammann P, Thiericke R, Wink J, Philipps S, Zeck A** (1993) Secondary metabolites by chemical screening. 21 Clonostachydiol, a novel anthelmintic macrodiolide from the fungus *Clonostachys cylindrospora*. *Journal of Antibiotics* (46): 343-345.
- Hallmann J, Sikora RA** (1996) Toxicity of fungal endophyte secondary metabolites to plant parasitic nematodes and soil-borne plant pathogenic fungi. *European Journal of Plant pathology* (102): 155-162.
- Hojjat Jalali AA, Ghasempour H** (2006) *Biological control of plant parasitic nematodes, progress, problems and perspectives* (Compilation: Graham, R Sterking). Razi University of Kermanshah Publication, First Edition, 350p. (in persian).
- Khan MW** (1993) *Nematode interaction*. London. St Edmundsbury Press. Great British.
- Leslie FJ, Summerell AB** (2006) *The Fusarium laboratory manual*. Blackwell Publishing Asia, Carlton, Victoria, Australia 388p.

- Loof PAA** (1960) Taxonomic studies on the genus *Pratylenchus* (Nematoda). *Plant Ziekten* (66): 29-90.
- Mirghasemi SN, Seraji A, Jamali S, Hosseinikhah Choshali A** (2014) Reported some new species of plant parasitic nematodes from rhizosphere of tea plantation in Iran. *International Journal of Biosciences* 9(5): 37-46.
- Morton CO, Hirsch PR, Kerry BR** (2004) Infection of plant parasitic nematodes by nematophagous fungi – a review of the application of molecular biology to understand infection processes and to improve biological control. *Nematology* (6): 161-170.
- Moosavi MR, Zare R** (2012) Fungi as biological control agents of plant-parasitic nematodes, 67-107. In: Merrillon, J.M. & Ramawat, K.G. (eds.), *Plant Defense: Biological control, progress in biological control*.
- Nassaj Hosseini M** (2003) Study of interaction between four species of root and tea root lesion nematode. M. Sc. Thesis, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran. (in persian).
- Pinochet J, Calvet C, Camprubi A, Fernandez C** (1995) Interaction between the root-lesion nematode *Pratylenchus vulnus* and the mycorrhizal association of *Glomus intraradices* and santa lucia 64 cherry rootstock. *Plant and Soil* (170): 323-329.
- Samson RA** (1974) *Paecilomyces* and some allied *Hyphomycetes*. *Studies in Mycology* (6): 1-119.
- Sattar QAM, Umar DM** (2011) Optimization of cultural conditions for protease production by *Bacillus subtilis* EFRL 01. *African Journal of Biotechnology* 10(26): 5173-5181.
- Seraji A, Pourjam E, Tanhamaafi Z, Safaei N** (2007) Biology and population dynamics of tea root lesion nematode (*Pratylenchus loosi*) in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology* 43(1): 98-115.
- Seraji A** (2007) Biology and population dynamics of tea root lesion nematode (*Pratylenchus loosi*) in Iran and the possibility of its loss assessment on the host using epidemiological models. PhD Thesis, Tarbiat Modarres University, Tehran, 208p. (in persian).
- Sullivan RF, White JF** (2000) *Phoma glomerata* as a mycoparasite of powdery mildew. *Applied and Environmental Microbiology* (66): 425-427.
- Talavera M, Kenji Itou K, Mizukubo T** (2001) Reduction of nematode damage by root colonization with arbuscular mycorrhiza (*Glomus* spp.) in tomato- *Meloidogyne incognita* (Tylenchida: *Meloidogynidae*) and carrot- *Pratylenchus penetrans* (Tylenchida: *Pratylenchide*) pathosystems. *Applied Entomology* (36): 387-392.
- Tanhamaafi Z** (1992) Report of root lesion nematode *Pratylenchus loosi* from the tea seeding imported from Japan. *Iranian Journal of Plant Pests and Disease* (60): 93-94. (in persian).
- Tiyagi SA, Shamim A** (2004) Biological control of plant parasitic nematodes associated with chickpea using oil cakes and *Paecilomyces lilacinus*. *Indian Journal of Nematology* (34): 44-48.
- Timper P, Brodie BB** (1994) Effect of *Hirsutella rhossiliensis* on infection of potato by *Pratylenchus penetrans*. *Journal of Nematology* 26(3): 304-307.
- Van Dessel P, Coyne, Dubois T, De Waele D, Franco J** (2011) *In vitro* nematicidal effect of endophytic *Fusarium oxysporum* against *Radopholus similis*, *Pratylenchus goodeyi* and *Helicotylenchus multicinctus*. *Nematropica* (41): 154–160.
- Vos CM, Tesfahun AN, Panis B, De Waele D, Elsen A** (2012) Arbuscular mycorrhizal fungi induce systemic resistance in tomato against the sedentary nematode *Meloidogyne incognita* and the migratory nematode *Pratylenchus penetrans*. *Applied Soil Ecology* (61): 1-6.
- Walker JT, Specht CH, Bekker JF** (1966) Nematocidal activity to *Pratylenchus penetrans* by culture fluid from actinomycetes and bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* (12): 347-351.
- Whitehead AG, Heming JR** (1965) A comparison of some quantitative methods of extracting small vermiform nematodes from soil. *Animal Applied* (55):25- 38.
- Willson KC, Clifford MN** (1999) *Tea, cultivation to consumption*. Chapman and Hall, London, UK., 768p.