مجله دانش گیاه‌پزشکی ایران
دوره ۴۳، شماره ۲، ۱۳۹۱ (۳۳۲-۳۲۳)

بیوکنترل نماتد *Meloidogyn javanica* مولد غده ریشه زیتون در شرایط گلخانه با استفاده از سودوموناس‌های فلورسنت

سعیده خلیقی[۱] و غلام خداکرمیان[۲*]
۱، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد دانشگاه تربیت مدرس تهران، ۲، دانشیار، دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا همدان
(تاریخ دریافت: ۹۰/۷/۳۰- تاریخ تصویب: ۹۱/۹/۲۹)

چکیده

از باغات زیتون استان‌های گلستان، گیلان، زنجان و قم نمونه‌های خاک اطراف ریشه گردآوری شد. از نمونه‌های خاک، استرین‌های *Pseudomonas* روی محیط کشت King's B جداشد. ویژگی‌های مهم فنوتیپی استرین‌های باکتری با روش‌های استاندارد باکتری‌شناسی بررسی شد. تولیداکسیداز، رنگ فلورسنت، رشد در چهار درجه سلسیوس و آرژنین-دی‌هیدرولاز، در همه استرین‌ها مثبت بود. استرین‌های مورد بررسی توانایی ایجاد واکنش فوق حساسیت در توتون، تولید لوان روی محیط آگار غذایی دارای ۵٪ سوکروز و فعالیت پکتولیتیکی روی حلقه‌های سیب‌زمینی را نداشتند. بیشتر استرین‌ها توانستند ژلاتین را ذوب نموده و نیترات رااحیاء کنند. بامقایسه ویژگی‌های فنوتیپی بیشتراسترین‌های بررسی شده *P. fluorescens* و تعدادی نیز *P. putida* تشخیص داده شدند. توانایی نماتدکشی مایع فیلتر شده استرین‌ها روی لاروهای تازه تفریخ شده نماتد *Meloidogyn javanica* در شرایط آزمایشگاه ارزیابی شد. آنالیز داده‌ها نشان داد که استرین‌ها تفاوت معنی‌دار دارند و موجب مرگ و میر لاروهای سن دوم از ۱۳/۳۳ تا ۱۰۰ درصد شدند. اثر تعدادی از استرین‌ها به همراه نماتدکش فنامیفوس (Fenamiphos) بر تعداد لارو، نماتد بالغ و تخم در ریشه نهال‌های زیتون در شرایط گلخانه بررسی شد. تعداد لارو و نماتد بالغ تولید شده در ریشه نهال‌های زیتون در تیمارهای به کار برده شده تفاوت معنی دار داشت. بیشترین تعداد لارو و نماتد بالغ در ریشه گیاهان کنترل و کمترین در ریشه گیاهان تیمار شده با نماتدکش فنامیفوس و پس از آن استرین‌های CHAO و ۲۰۸ تولید شد. تعداد کل تخم تشکیل شده در تیمارهای بررسی شده تفاوت معنی‌دار داشت. بیشترین تعداد تخم نماتد در ریشه گیاهان کنترل و کمترین در ریشه گیاهان تیمار شده با استرین CHAO و پس از آن استرین ۹۹ تشکیل شد. تعدادی از استرین‌ها روی تشکیل تخم نماتد موثرتر از فنامیفوسس بودند. این نخستین گزارش از کنترل بیولوژیک نماتد گره‌زای ریشه زیتون به وسیله باکتری‌های آنتاگونیست سودوموناس فلورسنس است.

واژه های کلیدی: بیوکنترل نماتد، *Psedomonas fluorescens*، *Pseudomonas putida* ، گال ریشه زیتون، فنامیفوس

مقدمه

در جهان بیش از هشت میلیون هکتار زمین زیر کشت زیتون وجود دارد. این گیاه همیشه سبز برای کشت در شرایط خشک و نیمه خشک مناسب بوده و برای مصرف روغن و میوه کنسروی پرورش می‌یابد (Fernandez-Escobar *et al.*, 1999). یکی از عوامل زیان‌آور درختان میوه از جمله زیتون، نماتدهای مولد غده ریشه و مولد زخم ریشه هستند. در

* نویسنده مسئول: غلام خداکرمیان تلفن: ۰۹۱۲۴۸۰۸۱۷۲ E-mail: Khodakaramian@yahoo.com

مناطق زیتون‌کاری نماتدهای *Meloidogyne* spp.، *Pratylenchus* spp.، *Heterodera mediterranea* و *Helicotylenchus* spp. *Criconemella xenoplax* گزارش شده‌اند (Castillo *et al.*, 2000 and 2003). از نماتدهای مولدغده ریشه که به درختان زیتون آسیب می‌رسانند می‌توان *Meloidogyne arenaria*، *M. incognita* و *M javanica* را نام برد. میزان خسارت *M . javanica* روی زیتون ۵۲ درصد تعیین شده است (Lamberti and Lamberti and Baines , 1969; Lownsbery, 1968). در ایران نماتدهای *M. javanica*، *Tylenchulus semipenetrans* و *Xiphinema pachtaicum* از زیتون منطقه گیلان گزارش شده‌اند (Barooti and Alavi 1994).

تعداد ۱۹ جنس نماتد انگل بیرونی و سه جنس نماتد انگل درونی و یک جنس نماتد انگل نیمه درونی نیز از باغ‌ها و نهالستان‌های زیتون مازندران، گیلان، زنجان، گرگان، فارس، قزوین و کرمانشاه گزارش شده‌اند (Hosseininejad *et al.*, 1997). گونه‌های *M. incognita* ، *M. javanica*، *M. hapla* و *M. arenaria* به دلیل پراکنش زیاد و دارا بودن دامنه میزبانی گسترده، از نظر کشاورزی در درجه اول اهمیت قرار دارند. روش‌های کنترل نماتدها شامل استفاده از نماتدکش‌ها، کشت ارقام مقاوم، کشت گیاهان تله، ریشه‌کنی میزبان و کنترل بیولوژیک است (Sikora, 1992). دو گروه عمده باکتری‌های پارازیت و رایزوباکتری‌های غیر پارازیت توانایی کنترل نماتدها را دارند (Siddiqui and Ehteshamul- Mahmood ,1999; Siddiqui and Haque, 2000; Siddiqui *et al* 2006). باکتری‌های وابسته به جنس‌های *Agrobacterium*، *Alcaligenes*، *Bacillus*، *Clostridium*، *Desulfovibrio*، *Pseudomonas*، *Serratia* و *Streptomyces* علیه نماتدها بازدارنده هستند (Schroth and Hancock , 1982, Rodriguez - Kabana and Morgan Jones , 1987, Siddiqui *et al* 2006). باکتری *Pasteuria penetrans* تعداد نماتدها را با پارازیتسیم ماده‌های بالغ و لاروها کاهش می‌دهد(Stirling and Wachtel, 1990). شاید اثر نماتدکشی این باکتری‌ها به خاطر آنتی‌بیوتیک‌های ترشح شده توسط آن‌ها باشد. کاربرد این باکتری‌ها همراه با سایر میکروارگانیسم‌ها، مانند باکترهای گره‌زای ریشه، میکوریزای آرباسکولار، قارچ ساپروفیت و فرصت طلب، باعث افت چشمگیر جمعیت نماتد شده است (Siddiqui and Mahmood, 1999; Siddiqui *et al* 2006). سودوموناده‌ای فلورسنت روی دامنه گسترده‌ای از عوامل بیماری‌های گیاهی اثر بازدارندگی دارند. این باکتری‌ها دارای مکانیسم‌های گوناگون بازدارندگی هستند (Dulep Kumar and Dubf, 1992; Honglin and Riggs,2000). در ارتباط با مکانیسم بازدارندگی سودوموناده‌ای فلورسنت علیه نماتدها اطلاعات کمی در دست است. گزارش‌هایی وجود دارد که این باکتری‌ها با تولید متابولیت‌هایی چون آورمکتین‌ها، و الینومایسین‌ها و سیانید هیدروژن تأثیر بازدارندگی دارند (Neipp and Becker, 1999; Siddiqui *et al* 2006). ترکیباتی مانند فنازین ۱- کربوکسیلیک- اسید، ۲و۴ دی استیل فلوروگلوسینول (DAPG) اووماسین A، پیولوترین(PLT) و پیرولنیترین توسط سودوموناده‌ای فلورسنت ترشح شده و در بازدارندگی نماتدها نقش دارند. یکی از ترکیبات آنتی‌بیوتیکی مهم ۲ و ۴ دی استیل فلوروگلوسینول تولید شده توسط استرین‌های سودوموناده‌ای فلورسنت است که یک فاکتور کلیدی در فعالیت بیوکنترلی *Pseudomonas fluorescens* است (Notz *et al.*, 2001). این باکتری‌ها با تولید DAPG، باعث کاهش تحرک لاروها، افزایش مرگ و میر آن‌ها و افزایش تفریخ تخم‌های نماتدهای سیست سیب‌زمینی می‌شوند. وقتی تفریخ تخم‌ها دور از ریشه‌های میزبان رخ دهد لاروها از گرسنگی می‌میرند(Kluepfel *et al.*, 2002). تولید سیانید هیدروژن، آمونیم، سولفید هیدروژن واسیدهای چرب فرار از سایر مکانیسم‌های بازدارندگی سودوموناس‌های فلورسنت است. این متابولیت سمی روی تخم‌گذاری و تولید مثل نماتد تاثیر گذاشته و سبب کاهش جمعیت نماتدها می‌شوند. (Westcott and Kluepfel, 1993; Neipp and Becker 1999; Kluepfel *et al.*, 2002; Siddiqui *et al* 2006). به طور کلی کنترل بیمارگرهای خاک بسیار سخت و پرهزینه است. کاربرد نماتدکش‌ها به دلیل مشکلات زیست محیطی، مسائل اقتصادی و سخت بودن کاربرد آن‌ها در باغات از جمله درختان زیتون ، روش مناسبی نیست. تاکنون هیچ گزارشی از

کنترل بیولوژیک نماتد گره‌زای ریشه روی زیتون به وسیله باکتری‌های آنتاگونیست ارایه نشده است. استفاده از باکتری‌های سودوموناس فلورسنت آنتاگونیست نماتدها و سازگار با فراریشه گیاهان روشی کم‌هزینه و از نظر زیست محیطی بی‌خطراست و این پژوهش در همین راستا انجام شده است.

مواد و روش‌ها

روش تهیه نمونه‌و سواسازی باکتری‌های آنتاگونیست

از تعداد ۱۲۰ نمونه از خاک ریزوسفر درختان زیتون استان‌های گلستان، گیلان (منطقه رودبار) زنجان و قم نمونه‌هایی به صورت ضربدری با فواصل نسبتاً مساوی گردآوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. برای جداسازی باکتری‌های سودوموناس‌های فلورسنت یک گرم خاک از هر نمونه در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل حاوی یک درصد پپتون سوسپانسیون شد. پس از تهیه سری رقت، از سوسپانسیون تهیه شده روی محیط کشت King's B مخطط گردید. نمونه‌های کشت شده به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۲ درجه سلسیوس نگهداری و باکتری‌های مولد رنگ فلورسنت تا خلوص نهایی روی محیط فوق کشت شدند.

تکثیر *Meloidogyn javanica*

برای تکثیر نماتد از نشای گوجه فرنگی رقم Rutgers استفاده شد. پس از شستشوی ریشه‌های دارای علایم غده ریشه با آب، کیسه‌های تخم نماتد در زیر بینوکولر با اسکالپل جدا و در آب مقطر به گلخانه منتقل شدند. تخم‌های استخراج شده روی کاغذ صافی قرار داده و سپس در الک ۵۰۰ mesh ریخته شد. الک در یک تشتک پتری حاوی مقداری آب مقطر سترون که با سطح زیرین الک در تماس بود در انکوباتور ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری گردید. تخم‌های نماتد روی کاغذ صافی تفریخ شده و لاروهای سن دوم پس از عبور از کاغذ صافی در پتری دیش زیر آن جمع آوری و برای آزمایشات مختلف استفاده گردیدند. برای شمارش لاروها از لام شمارش استفاده شد. برای شناسایی نماتدهای ماده از انتهای بدن آن‌ها Perineal pattern تهیه و از محلول اسید فوشین – لاکتوفنل برای رنگ‌آمیزی استفاده شد.

انتخاب استرین‌های باکتری بازدارنده *Meloidogyn javanica*

لاروهای سن دوم (J_2) تازه تفریخ شده نماتد،در سوسپانسیونی حاوی ۵۰ میلی‌گرم تتراسایکلین در لیتر،۰/۰۴۴ گرم استرپتومایسین در لیتر و ۰/۰۵۲ گرم کلرامفنیکل در لیتر به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه ضدعفونی و سپس در آب مقطر سترون قرار داده شدند. برای تهیه زادمایه استرین‌های باکتریایی، محیط King's B مایع تهیه شد و سپس استرین‌ها در این محیط کشت و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گرادروی شیکر(۱۵۰ rpm) به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند. پس از سانتریفوژ کردن عصاره نمونه‌های باکتری فیلتر شد. به یک میلی‌لیتر از عصاره فیلتر شده باکتری تعداد ۴۰-۳۰ لارو تازه تفریخ شده سترون اضافه و در دمای اتاق به مدت ۲۴ ساعت نگهداری و سپس لاروهای مرده شمارش شد. درصد مرگ و میر لاروها در مقایسه با شاهد از فرمول $IP= C-T/C \times 100$ که در آن IP درصد مرگ ومیر، C تعداد لاروهای زنده در تیمار کنترل (آب مقطر سترون) و T تعداد لاروهای زنده در سایر تیمارها بود محاسبه گردید. برای تیمار کنترل از آب مقطر سترون استفاده شد. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. پس از آنالیز داده‌ها توسط نرم‌افزار MSTAT هفت استرین باکتری برای آزمایشات گلخانه-ای از گروه‌های آماری با فعالیت بالا، متوسط و ضعیف در شرایط آزمایشگاه انتخاب شدند.

بررسی ویژگی استرین‌های سودوموناس بازدارنده *Meloidogyn javanica*

از استرین باکتریایی گردآوری شده ۲۵ استرین بر مبنای بررسی ویژگی‌های بازدارندگی نماتد در شرایط آزمایشگاه انتخاب شدند. آزمون‌های فنوتیپی این استرین‌ها باروش‌های استاندارد زیر بررسی شد:

آزمون حساسیت به KOH ٪ ۳ به روش Suslow *et al.*, (1982)، آزمون هوازی، بی هوازی بـــودن (O/F) به روش Hough and Leifson (1953)، آزمون اکسیداز به روش Kovacs (1956)، آزمون فوق حساسیت در توتون به روش Klement *et al.*, (1964)، آزمون‌های تولید لوان روی محیط کشت سوکروز ۵٪ و احیای نیترات به روش(Lilliott *et al.*, (1984، آزمون‌های لهاندن سیب‌زمینی، رشد در دمای چهار و ۴۱ درجه

سانتی‌گراد و تولید رنگ فلورسنت روی محیط کشت King's B به روش Schaad (1988) ، هیدرولیز آژرنین به روش Thornley (1960) و هیدرولیز نشاسته به روش گراهام Graham (1967) انجام شد. آزمون‌های لستیناز و ذوب ژلاتین به روش Macfaddin (1980) انجام شد.

برای بررسی استفاده استرین‌های باکتری از کربوهیدرات‌ها، اسیدهای آمینه و اسیدهای آلی از محیط پایه Ayer *et al.*, (1969) استفاده شد. غلظت نهایی این مواد به میزان ۰/۳ - ۰/۲ درصدبود و آگارز به میزان ٪۱/۲ اضافه شد. نتیجه این آزمایش تا ۲۵ روز پس از کشت بررسی گردید.

آزمایش‌های گلخانه‌ای

زاد مایه باکتری‌های بازدارنده نماتد *M. javanica* به روش زیر تهیه شد. باکتری‌ها روی محیط King's B کشت و در ۲۸-۲۶ درجه سلسیوس تا ۲۴ ساعت نگهداری شدند. به هر تشتک پتری حاوی باکتری رشد کرده ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون اضافه و سوسپانسیون تهیه شد. جذب نوری سوسپانسیون‌های تهیه شده در طول موج ۶۰۰ نانومتر به OD۰/۱ با اسپکتروفتومتر تنظیم شد.

نهال‌های زیتون رقم زرد به مدت نیم ساعت در سوسپانسیون باکتری قرار داده شدند. سپس نهال‌ها در گلدان‌های با گنجایش ۱۰ کیلوگرم خاک پاستوریزه که به ازای هر ۳۵۰ گرم خاک ۳/۵ میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری اضافه شده بود، کاشته شدند و در گل‌خانه با دمای (۲ ±) ۲۶ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. پس از یک هفته به ازای هر نهال ۷۰۰۰ لارو فعال نماتد *M. javanica* اضافه شد. در این بررسی تعداد هفت استرین باکتری *P. fluorescens* به همراه استرین CHAO و نماتد کش فنامیفوس (Fenamiphos) با غلظت چهار پی پی ام که هنگام کاشت نهال‌ها به خاک اضافه شد، به کار رفت. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد.

پس از گذشت ۶۰ روز تعداد تخم و لارو در ریزوسفر و ریشه به روش Jenkins (1964) استخراج و شمارش شد. داده‌های به دست آمده در قالب طرح مربوطه با استفاده از نرم‌افزار MSTAT آنالیز گردید. میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن مقایسه گردید.

نتایج و بحث

باکتری‌های سودوموناس فلورسنت از ریزوسفر درختان زیتون جدا شدند. تجزیه واریانس و گروه‌بندی این باکتری‌ها بر مبنای بازدارندگی علیه *M. javanica* در شرایط آزمایشگاه به ترتیب در جداول یک و دو نوشته شده است (جداول ۱ و ۲). به دلیل کثرت استرین‌ها نام استرین‌های دارای فعالیت یکسان از نظر آماری نوشته نشده است.

جدول۱- تجزیه واریانس بازدارندگی لاروهای سن دوم نماتد مولد غده ریشه *Meloidogyn javanica* به وسیله استرین‌های سودوموناس فلورسنت در شرایط آزمایشگاه

منبع تغییرات	درجه‌آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	Fs
تیمار	۵۹	۹/۸۴۷	۰/۱۶۷	۰***
خطا	۱۲۰	۴/۶۴۴	۰/۰۳۹	
کل	۱۷۹	۱۴/۴۹۱		

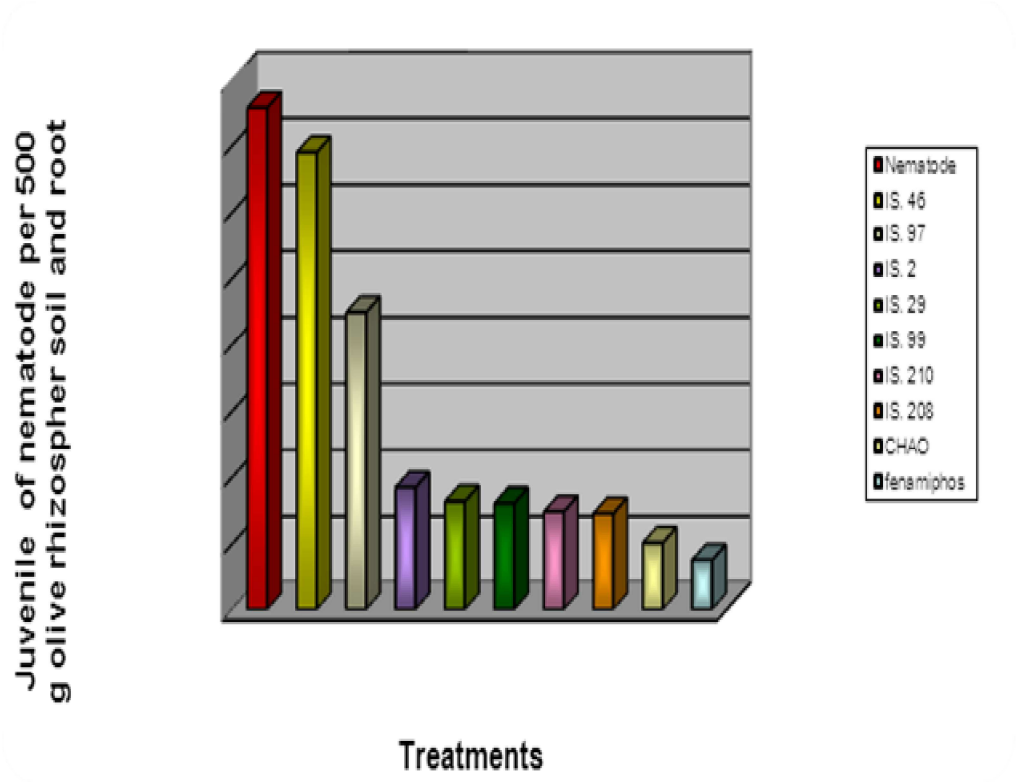
*** معنی دار است.

جدول ۲- گروه‌بندی استرین‌های سودوموناس فلورسنت بر مبنای بازدارندگی لاروهای سن دوم نماتد مولد غده ریشه *Meloidogyn javanica* در شرایط آزمایشگاه

شماره استرین	محل گردآوری	مرگ و میر(٪)	گروه-آماری	شماره استرین	محل گردآوری	مرگ و میر(٪)	گروه-آماری
IS.29	گیلان	۱۰۰	a	IS.407	قم	۴۶/۶۷	ij
IS. 34	گیلان	۹۶/۶۷	ab	IS.36	گیلان	۴۵/۳۳	j
IS. 204	گلستان	۹۳/۳۳	b	IS.83	گیلان	۴۵	j
IS.210	گلستان	۸۷/۶۷	bc	IS.500	قم	۴۱/۶۷	jk
IS.203	گلستان	۸۳/۳۳	c	IS.83	گیلان	۴۰	k
IS.108	گیلان	۸۰	cd	IS.31	گیلان	۳۹/۳۳	k
IS.46	گیلان	۷۶/۶۷	d	IS.37	گیلان	۳۷/۶۷	k
IS.13	گیلان	۷۳/۳۳	e	IS.78	گیلان	۳۵/۳۳	kl
IS.406	قم	۶۸/۳۳	ef	IS.2	گیلان	۳۰	l
IS.48	گیلان	۶۶/۶۷	f	IS.24	گیلان	۲۸/۶۷	l
IS.99	گیلان	۶۳/۳۳	fg	IS.52	گیلان	۲۸/۳۳	l
IS.69	گیلان	۶۰	fg	IS.205	گلستان	۲۰	m
IS.12	گیلان	۵۶/۶۷	h	IS.409	قم	۱۸/۳۳	m
IS.307	زنجان	۵۳/۳۳	h	IS.204	گلستان	۱۶/۶۷	mn
IS.23	گیلان	۵۰	i	IS.206	گلستان	۱۳/۳۳	n
IS.400	زنجان	۴۹/۶۷	i	کنترل		۰	o

استرین‌های بازدارنده *M. javanica* در شرایط آزمایشگاه انتخاب شدند. نتایج بررسی برخی ویژگی‌های فنوتیپی نماینده‌های این استرین‌ها در جدول سه نوشته شده است. ویژگی‌های احیاءنیترات، اکسیداز، تولید رنگ فلورسنت روی محیط کشت King's B، آرژنین دی‌هیدرولاز و رشد در چهار درجه سانتی‌گراد، دراسترین‌های مورد بررسی مثبت بود. ایجاد واکنش فوق‌حساسیت در توتون، تولید لوان روی محیط آگار غذایی دارای ۵٪ ساکارز و فعالیت پکتولیتیکی روی حلقه‌های سیب‌زمینی منفی بود. جز یک گروه همه استرین‌ها ژلاتین را هیدرولیز نمودند (جدول ۳). بامقایسه ویژگی‌های فنوتیپی استرین‌های بررسی شده با ویژگی‌های ارایه شده توسط Fahy and Persley , 1983; Stanier *et al*; 1966; Bossis *et al*; 2000 و Schaad, 2001 بیشتراسترین‌ها *P. fluorescens* و تعدادی نیز *P. putida* تشخیص داده شدند. شاید فراوانی بیشتر *P. fluorescens* به دلیل سازگاری و آدابته شدن آن با منطقه فراریشه زیتون باشد.

گزارش‌های زیادی در مورد فراوانی و موفقیت بیشتر عوامل بیوکنترل سازگار با ریزوسفر گیاهان وجود دارد (Kluepfel *et al.*, 2002). گروه‌بندی استرین‌های سودوموناس بازدارنده نماتد *M. javanica* در شرایط آزمایشگاه نشان داد که دارای تفاوت معنی‌دار هستند. این استرین‌ها موجب مرگ و میر لاروهای سن دوم از ۱۳/۳۳ تا ۱۰۰ درصد شدند (جدول ۲ و شکل ۱).



شکل ۱- بازدارندگی استرین‌های سودوموناس فلورسنت و سم فنامیفوس علیه نماتد *Meloidogyne javanica* مولد گره ریشه نهال‌های زیتون

گروه‌بندی این استرین‌ها وجود گروه‌های زیادی را در میان آن‌ها نشان داد (جدول ۲). توانایی فعالیت آنتاگونیستی موثر باکتری *P. aeruginosa* علیه نماتدهای مولد گره ریشه در شرایط آزمایشگاه و گل‌خانه گزارش شده است. فعالیت آنتاگونیستی این باکتری به دلیل وجود ترکیبات نماتدکش مانند پروتئیناز یا گلیکوپروتیئناز است (Ali *et al.*, 2002). ویژگی نماتدکشی *P. fluorescens* علیه لاروهای سن دوم *M. javanica* در شرایط آزمایشگاه و گلخانه بررسی شده‌است (Siddiqui and Shaukat, 2002). باکتری *P. fluorescens* (Fll3) با تولید diacetylphloroylucinol سبب افزایش تفریخ تخم‌ها و مرگ لاروهای سن دوم نماتد سیست سیب‌زمینی (*Globodera roschiensis*) شده‌است (Cronin *et al.*, 1997). تعداد لارو و نماتد بالغ تولید شده در ریشه و ریزوسفر نهال‌های زیتون در تیمارهای به کار برده شده تفاوت معنی‌دار داشت (شکل ۱ و جدول ۴). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیشترین تعداد لارو و نماتد بالغ، در ریزوسفر و ریشه گیاهان کنترل و کمترین در ریزوسفر و ریشه گیاهان تیمار شده با سم فنامیفوس و پس از آن استرین‌های CHAO و ۲۰۸ تولید شد (شکل ۱).

گزارش‌های زیادی در مورد کنترل نماتدهای پارازیت گیاهی توسط باکتری‌های مختلف به ویژه باکتری‌های جنس سودوموناس وجود دارد. معمولاً سازگاری با منطقه فراریشه یک فاکتور کلیدی برای موفقیت عوامل

آنتاگونیست پاتوژن‌های ریشه است (Honglin and Riggs 2000; Ali *et al*., 2002; Jacq and Fortune 1979; Siddiqui and Mahmood 1999; Siddiqui *et al*., 2000, 2003 and 2006).

جدول۳- برخی ویژگی‌های فنوتیپی استرین‌های *Pseudomonas* بازدارنده *Meloidogyn javanica* جداشده از فراریشه زیتون

آزمون	واکنش	آزمون	واکنش
تولید اسید از: ال- آرابینوز	+	فنیل استات	V
دی گالاکتوز	+	نیکوتینات	V
دی زایلوز	+	اکسیداز	+
ساکاروز	+	تولید لوان	–
تر هالوز	V	لسیتیناز	+
سوربیتول	V	آرژنین دی‌هیدرولاز	+
ژرانیول	V	احیاءنیترات	+
آدونیتول	V	ذوب ژلاتین	+
اتانل	V	رشد در ۴ درجه	+
استقاده از: دی آلانین	-	رشد ۴۱ درجه	V
ال–تارتاریک اسید	+	رنگ فلورسنت	+
آزالات	–	لهاندن سیب‌زمینی	–
بوتیل آمین	V	فوق حساسیت روی توتون	–
بوتیرات	V	رنگ غیر فلورسنت	–
والرات	V		

+ : ۸۰٪ یا بیشتر از ۸۰٪ استرین‌ها واکنش مثبت نشان دادند، – : ۸۰٪ یا بیشتر از ۸۰٪ استرین‌ها واکنش منفی نشان دادند و V: بین ٪۷۹-۲۱ استرین‌ها واکنش مثبت نشان دادند.

جدول ۴- تجزیه واریانس اثراسترین‌های سودوموناس فلورسنت و نماتدکش فنامیفوس بر تعداد تخم*Meloidogyne javanica* مولد گره ریشه نهال‌های زیتون

منبع تغییرات	درجه‌آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	Fs
تیمار	۹	۶۰۱۵۱۶۳۴/۱	۶۶۸۳۵۱۴/۹	۰***
خطا	۲۰	۱۲۶۳۶۳۳/۳	۶۳۱۸۱/۶	
کل	۲۹	۶۱۴۱۵۲۶۷/۵		

*** تفاوت معنی‌دار است.

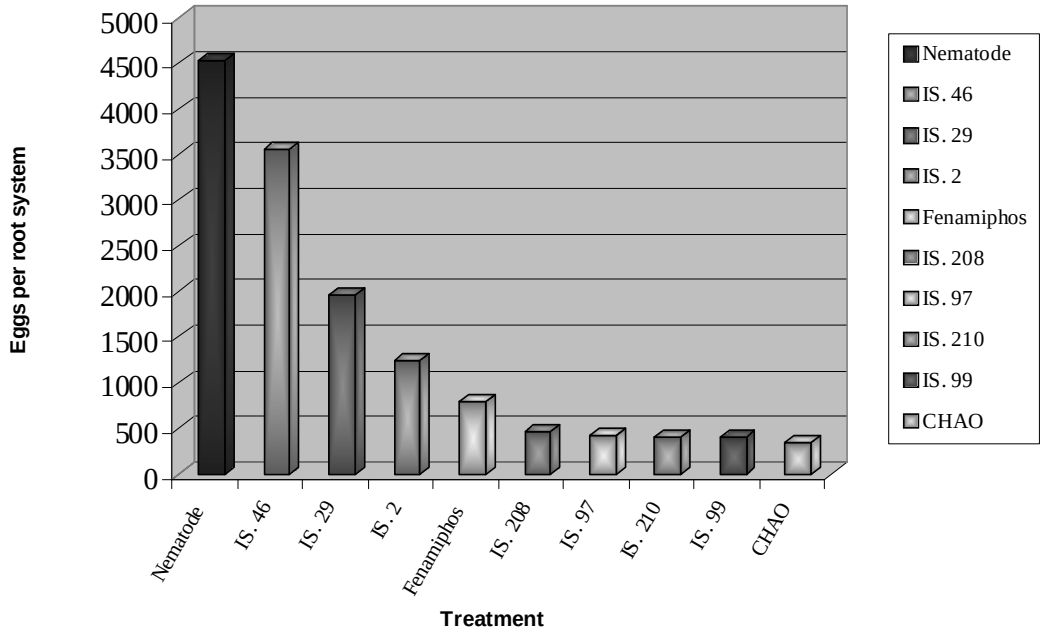
تعداد تخم نماتد تشکیل شده در ریشه و ریزوسفر نهال‌های زیتون در تیمارهای بررسی شده تفاوت معنی‌دار نشان داد (شکل ۲ و جدول ۴).

مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیشترین تعداد تخم نماتد در ریشه و ریزوسفر گیاهان کنترل و کمترین در ریشه و ریزوسفر نهال‌های آغشته شده با استرین CHAO و پس از آن استرین ۹۹ تشکیل شد.

باکتری‌های بازدارنده نماتدها با مکانیسم‌های مختلف از ادامه یا تکمیل سیکل زندگی آن‌ها در مراحل مختلف زندگی جلوگیری می‌کنند (Siddiqui and Mahmood 1999).

ازجمله آنزیم‌های گلیکوپروتیئناز توانایی کشتن نماتدها را دارند (Ali *et al*., 2002). استرین *P. fluorescens* CHAO با ترشح سیانید هیدروژن

از فعالیت نماتدها جلوگیری می‌کند (Siddiqui *et al.*, 2006). هریک از این فاکتورهای بازدارندگی دارای سهم ویژه در کنترل نماتدها هستند.



شکل ۲-اثراسترین‌های سودوموناس‌های فلورسنت و نماتدکش فنامیفوس بر تعداد تخم *Meloidogyne javanica* مولد گره ریشه نهال‌های زیتون

مقاومت سیستمیک القاء شده به وسیله باکتری‌های ریزوسفر یکی دیگر از مکانیسم‌های مقاومت گیاهان در برابر نماتدهای پارازیت ریشه است. مقاومت سیستمیک ایجاد شده به وسیله استرین CHAO *P. fluorescens* به متابولیت ثانویه 2,4-diacetylphloroglucinol نسبت داده شده است (Siddiqui and Shaukat 2003). این نوع از مقاومت در اثر استرین CHAO *P. fluorescens* در موارد دیگر نیز گزارش شده است (Siddiqui *et al.*, 2006). در این بررسی اثر بازدارندگی استرین‌های به کاررفته در شرایط آزمایشگاه و گلخانه دارای تفاوت معنی‌دار بود. از آنجا که شرایط خاک بسیار پیچیده‌تر از شرایط آزمایشگاه بوده و به ویژه ترشحات ریشه گیاه نقش بالایی در برهم‌کنش میزبان و پاتوژن و نیز سایر عوامل میکروفلور اطراف ریشه دارد لذا بین نتایج به دست آمده در آزمایشگاه و گلخانه همیشه هم‌خوانی کامل وجود ندارد. هر باکتری با ترشح مواد بازدارنده علیه مرحله خاصی از زندگی نماتد موثر است چرا که تخم، لارو و نماتد بالغ در شرایط خاک ممکن است به طور هم‌زمان وجود داشته باشند (Bird 1974). استقرار بهتر در ناحیه فراریشه و سازگاری بیشتر با این ناحیه یکی از دلایل بسیار مهم تفاوت‌میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست برای تاثیر فعالیت آنتاگونیستی آن‌ها است. (Honglin, and Riggs 2000; Ali *et al*., 2002; Jacq and Fortune 1979; Siddiqui *et al.*, 2000, 2003). این اولین گزارش کنترل نماتد *M. javanica* مولد گره در ریشه زیتون توسط باکتری‌های جنس سودوموناس فلورسنت کننده است.

REFERENCES

1. Barooti, Sh., and Alavi, A. 1994. *Plant nematology, the principles and pathogen nematodes and Iran quarantine*. Golden Press, 278p. (In Persian)
2. Abad, P., Rosso, M. Favery, B. (2002). Pathogenicity factors of *Meloidogine* and host plant response.

Nematology, 4(5), 611-614.
3. Ali, N. I., Siddiqui, I. A., Shaukat, S. Sh., Zaki, M. J. (2002). Nematicidal activity of some strains of Pseudomonas spp. *Soil Biology and Biochemistry*. 34, 1051-1058.
4. Bird, A. F. (1974). Plant response to root-knot nematode. *Annual Review of Phytopathology*. 15, 69-874.
5. Bossis, E., Lemanceau, P., Latour, X. and Gardan, L. (2000). The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomie*, 20, 50-63.
6. Castillo, P., Rapoport, H. F. and Jimenez- Diaz, R. M. (2000). Parasitic nematodes associated with olive in countries bordering the mediterranean Proceeding of the *4th International Symposium on Olive Growing.* 2, 857-860.
7. Castillo, P., Vavlas S. Subbotin and Troccoli A. (2003). A new root- Knot nematode, Meloidogyne baetica n. sp. (Nematoda: Heteroderidae), parsitizing wild olive in southern Spain. *Phytopathology*, 93, 1093- 1102.
8. Cronin, D. Moenne-Loccoz, Y. Dunne, C. and O'Gara F. (1997).Inhibition of egg hatch of the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* by chtinas-producing bacteria. *European Journal of plant Pathology.* 103,433-440.
9. Dulep Kumar B. S. and Dube H. C. (1992). Seed Bacterization with a Fluorescent Pseudomonads for enhance plant growth, yield and disease coutrol. *Soil Biology and Biochemistry*, 24, 539- 542.
10. Fahy, P. C. and Persley, G. J. (1983). *Plant bacterial disease. a diagnostic guide*. Academic Press, Australia, 393 pp.
11. Fernandez- Escobar, R., Moreno, R., and Garica- Creus, M. (1999). Seasonal changes of mineral nutrients in olive leaves during the alternate- bearing cycle. *Sientia Horticulturea*, 82, 25-45.
12. Jenkins W.R. 1964. A rapid centrifugal flotation technique for extracting nematodes from soil. *Plant Disease. Reporter*. 48:692.
13. Graham D. C. and Hodgkiss, W. 1967. Identification of gram negative,yellow pigmented, fermentative bacteria isolated from plants and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 30, 175 - 189.
14. Hosseininejad, S.A., Tanhamafi, Z., and Barooti, S. 1997. Nematodes associated with olive trees (*Olea europaea*) in Iran. *Pest and Plant Pathology*, 65, 46-53.(In Persian)
15. Honglin, T and Riggs, R. D. (2000). Effects of rhizobacteria on soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*. *Journal of Nematology*, 32 (1), 377- 388.
16. Jacq. V. A., Fortune, R., (1979). Biological control of rice nematodes using sulphate reducing bacteria. *Review of Nematology*, 2, 41-50.
17. Klement, Z., Farkas, G. L. and Lovrekovich, H. 1964. Hypersensitivity reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. *Phytopathology*, 54, 474 - 477.
18. Kluepfel D. A., Nyczepir A. P., Lawrence. J. E., Wechter W. P. and Everenez B. (2002). Biological control of the phytoparasitic nematode *Mesocriconema xenoplax* on peach trees. *Journal of Nematology*, 34(2), 120-123.
19. Kovacs, N. 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature*, 178: 703.
20. Lamberti, F. and Baines R. C. (1969). Pathogeneaty of four species of Meloidogyne on three varaieties of olive trees. *Journal of Nematology*, 1(2), 111-116.
21. Lamberti, F. and Lownsbery B. F. (1968). Olive varieties differ in reaction to the root- knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Phytopathologia Mediterranea*. 7, 48-50
22. Lelliott, R. A., Billing, E. and Hayward, A. C. (1966). A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic *Pseudomonas*. *Journal of Applied Bacteriology*, 29, 470-489.
23. Neipp, P. W. and Becker J. O. (1999). Evaluation of biocontrol activity of rhizbacteria from beta vulgan's against *Heterodera schachtii*. *Journal of Nematology*, 31 (1), 54- 61.
24. Notz, R., Maurhofer, M., Schnider- Keel, U., Duffy, B., Haas, D., and Defago, G. (2001). Biotic factors affecting expression of the 2, 4- diacetyle phloroglucinol genephla in *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain CHAO in the rhizosphere. *Phytopathology*, 91, 873- 881.
25. Rodriguez- Kabana, R. M Morgan Jones, G., (1987). Biological control of nematodes. Soil amendments and microbial antagonists. *Plant and Soil*, 100, 237- 247.
26. Schaad, N. W., Jones, J. B. and Chun, W (2001). *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. Third ed. APS Press, Minnesota, 373 pp.
27. Schroth, M. N., Hancock, J. G., (1982). Disease suppressive soil and root colonizing bacteria. *Science*, 216, 1276- 1381.
28. Siddiqui, Z. A. and Mahmood, I. (1999). Role of bacteria in the management of plant parasitic nematodes: A review: *Bioresours Technology*, 69, 167- 179.
29. Siddiqui, I. A., and Ehteshamul- Haque, S. (2000). Use of *Pseudomonas aeruginosa* for the control of root rot- root knot disease complex in tomato. *Nematologica Meditreanea*, 28, 189- 192.
30. Siddiqui, I. A., and Shaukat S. S. (2003). Impact of biocontrol *Pseudomanas fluorescens* CHAO and its

genetically modified (GM) derivatives on penetration of *Meloidogyne javanica* in mungbean roots. *Nematologica Meditreanea*, 31, 43-45.

31. Siddiqui I. A., Shaukat S. S., and Hamid M. (2003). Suppression of *Meloidogyne incognita* by *Psendomonas fluorescence* strain CHAO its genetically modified derivatives: I. The influence of oxygen. *Nematologica Meditreanea*, 31, 105- 109.
32. Siddiqui, I. A., Shaukat, S. S., Sheikh, I. H. and 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 Microbiolog and Biotechnology*, 22, 641–650.
33. Sikora R. A. and Hoffman- Hergarten S. (1992). Importance of plant Health- promoting rhizobacteria for the control of soil- borne fungal diseases and plant parasitic nematodes. *Arabian Journal of Plant Protection*, 10 , 48- 53.
34. Stanier, R. Y., palleroni, N. J. and Doudoroff, M. (1966). The aerobic pseudemonads, ataxonomy study. *Journal of General Microbiology*, 43, 159- 271.
35. Stirling, G. R., Wachtel, M. F. (1990). Mass production of *Bacillus penetrans* for the biological control of root- knot nematodes. *Nematology*, 26, 208- 312.
36. Suslow, T. U., Schroth, M. N. and Isaka, M. (1982). Application of rapid method for gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. *Phytopathology*, 72, 917 - 918.
37. Thornley, M. J. (1960). The differentiation of *Pseudomonas* from other bacteria on the basis of arginine metabolism. *Journal* of Applied Bacteriology, 23, 37 52.
38. Westcott, S. W. and Kluepfel, D. A. (1993). Inhibition of *Criconemella xenoplax* egg hatch by *Pseudomonas aureofaciens*. *Phytopathology*, 83, 1245- 1249.