جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله دانش گیاه‌پزشکی ایران
دوره ۴۲، شماره ۱، ۱۳۹۰ (۱۲۴-۱۱۳)

مطالعه نقش مؤثر برخی متابولیت‌های باکتری‌های سودوموناس فلورسنت در کنترل نماتود ریشه گرهی *Meloidogyne javanica* روی گوجه‌فرنگی

هادی گلزاری[۱]*، ناصر پنجه‌که[۲]، مسعود احمدزاده[۳]، محمد سالاری[۴] و ابراهیم صداقتی‌خروی[۵]
۱، ۳، دانش‌آموخته کارشناسی ارشد و دانشیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
۲، ۴، دانشیار و استادیار دانشگاه ادیمی زابل، ۵، استادیار دانشگاه ولی‌عصر(عج) رفسنجان، رفسنجان
(تاریخ دریافت: ۸۸/۷/۵ - تاریخ تصویب: ۸۹/۱۰/۸)

چکیده

یکی از توانایی‌های باکتری‌های فلورسنت سودوموناس ترشح متابولیت‌هایی از قبیل سیانید هیدروژن، پروتئاز، سالیسیلیک‌اسید و سیدروفور است که این مواد از رشد بیمارگرهای موجود در خاک جلوگیری می‌کنند. برای سنجش توانایی و میزان تولید این مواد توسط برخی استرین‌های موجود (*Pseudomonas fluorescens* و نیز *P. aeruginosa*)، یکسری آزمون‌ها انجام گرفت. در محیط کشت مربوط به هر آزمون، استرین‌های *P. aeruginosa* 7NSK2، UTPF92 و UTPF86 به ترتیب بیشترین میزان سیانید هیدروژن، پروتئاز و سالیسیلیک اسید را تولید کردند. استرین‌های مذکور، در آزمون آزمایشگاهی (اثر مستقیم سوسپانسیون باکتری علیه نماتود در تشتک‌های ۹۶ چاهک) عامل بیشترین میزان مرگ و میر لارو سن دوم (بیش از ۷۰٪) و عدم تفریخ تخم (بیش از ۶۰٪) نماتود بودند ($P\leq ۰/۰۱$). در آزمون گلخانه ای، نشاهای سه هفته ای گوجه‌فرنگی رقم ارلی اوربانا به گلدان‌های حاوی ۳۰۰ گرم خاک سترون انتقال داده شد و یک هفته بعد، یک میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری از استرین‌های مورد نظر به غلظت $۱/۹-۲/۱ \times ۱۰^{۹}$ CFU/ml در ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون ریخته شد و به خاک هر گلدان اضافه گردید. دو روز بعد از مایه‌زنی باکتری، اطراف هر نشاء ۲۰۰۰ لارو سن دوم نماتود *Meloidogyne javanica* اضافه شد. چهل و پنج روز بعد از مایه‌زنی نماتود، برخی از شاخص‌های رشد (وزن خشک ریشه و اندام هوایی، وزن تر اندام هوایی، طول ریشه و ساقه) و شاخص‌های بیماری (تعداد و قطر گره، جمعیت نماتود در خاک و ریشه و جمعیت اندوفیت باکتری) در نشاها اندازه‌گیری شدند. این تحقیق بر اساس طرح آماری کاملاً تصادفی با ۱۰ تیمار و پنج تکرار تنظیم شد. در ریشه‌های مایه‌زنی شده با استرین‌های *P. aeruginosa* 7NSK2 و UTPF86 نسبت به شاهد آلوده، بیشترین میزان رشد گیاه (۶۳٪ افزایش وزن خشک) و به ترتیب کمترین میزان نفوذ نماتود به ریشه (۵۵٪ کاهش) و کمترین تعداد گره (۵۳٪ کاهش) مشاهده شد ($P\leq ۰/۰۵$). استرین UTPF86 در مقایسه با سایر استرین‌های به کار رفته در آزمایش، بهترین کنترل‌کننده نماتود مذکور بود ($P\leq ۰/۰۵$).

واژه‌های کلیدی: باکتری‌های فلورسنت سودوموناس، نماتود ریشه گرهی، گوجه‌فرنگی، سالیسیلیک اسید، پروتئاز، سیانید هیدروژن.

* نویسنده مسئول: هادی گلزاری تلفن: ۰۹۱۳-۲۷۹۷۲۰۴ E-mail: hadigolzary@gmail.com

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

نماتودهای ریشه گرهی (*Meloidogyne* spp.) از جمله بیمارگرهای مهم گوجه‌فرنگی در سراسر دنیا محسوب می‌شوند. این نماتودها به بیش از ۲۰۰۰ گونه گیاهی آسیب می‌زنند به طوری که خسارت اقتصادی سالیانه آنها در حدود ۷۰ بیلیون دلار برآورد شده است (Sasser & Freckman, 1987). جنس *Pseudomonas* در میان ریزوباکتری‌های افزایش‌دهنده رشد گیاه از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Ahmadzadeh & Tehrani, 2009). از این جنس، گروه فلورسنت در ناحیه ریزوسفر، به‌طور مستقیم با تولید بعضی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاه به خصوص ایندول استیک اسید و نیز به صورت غیرمستقیم از طریق مکانیسم‌های متفاوتی از قبیل کنترل بیولوژیک بیمارگرها، کاهش جمعیت بیمارگر، القای مقاومت در گیاهان و غیره شرایط مساعدی برای رشد آنها فراهم می‌کنند (Anderson *et al.*, 1999; Jayakumar *et al.*, 2002; Kerry, 2000; Kloepper *et al.*, 1992; Kluepfel *et al.*, 1993; Siddiqui *et al.*, 2005; Spiegel *et al.*, 1991; Westcott & Kluepfel, 1993). تولید ترکیبات آنتی بیوتیک (Fravel, 1988)، سیدروفورهای نوع سودوباکتین[1] (Leong, 1986)، سیانید هیدروژن (Voisard *et al.*, 1989) و آنزیم پروتئاز (Keel *et al.*, 1989) از مهمترین مکانیسم‌های مؤثر در بیو کنترل عوامل بیماریزای گیاهان توسط این باکتری‌ها به شمار می‌روند (Keel *et al.*, 1989). مزیت این باکتری نسبت به سایر جنس‌های باکتریایی، این است که می‌توان آنها را به سهولت در قلمروهای اکولوژیک متفاوت پیدا کرد (Siddiqui & Shaukat, 2004). B33R اولین استرین سودوموناس است که ترکیبات کشنده تخم‌های نماتودهای انگل گیاهان (پیولوتئورین[2]، ۲،۴- دی استیل فلوروگلوسینول[3] و پیرولنیترین[4]) را تولید کرده است (Wechter *et al.*, 2001). طی تحقیقی ارتباط القای مقاومت سیستمیک در گوجه‌فرنگی آلوده به نماتود *M. javanica* بررسی و مشخص شد که مقاومت سیستمیک با انتقال سیگنال‌هایی هدایت می‌شود که این پدیده به تجمع سالیسیلیک اسید در ریشه‌ها بستگی ندارد (Siddiqui & Shaukat, 2004). نتایج یک بررسی نشان داده است که تولید سیانید هیدروژن استرین *P. fluorescens* CHAO در کنترل نماتود ریشه گرهی گوجه‌فرنگی *M. javanica* نقش مؤثر و مستقیم دارد (Siddiqui & Shaukat, 2006).

در سال‌های اخیر با توجه به مشکلات زیست محیطی ناشی از کاربرد نماتودکش‌ها، استفاده از روش‌های جایگزین جهت مدیریت نماتودها مطرح شده است (Barker & Koenning, 1998). به طور کلی هر یک از روش‌های کنترل دارای محدودیت‌هایی است از این رو روش‌های تلفیقی برای کنترل نماتودها منطقی به نظر می‌رسد (Klessig *et al.*, 2000). هدف اصلی این تحقیق مطالعه نقش مؤثر برخی متابولیت‌های باکتری‌های فلورسنت سودوموناس در کنترل نماتود ریشه گرهی *M. javanica* بوده است.

مواد و روش‌ها

جداسازی، تشخیص و تکثیر نماتود *M. javanica*

بوته‌های گوجه‌فرنگی آلوده به نماتود از بخش آلوئک شهرستان ورامین تهیه گردید. پس از شستشوی ریشه‌های آلوده به نماتود ریشه گرهی، گره‌های منفرد با توده تخم شفاف، انتخاب شدند. با استفاده از روش توده تخم منفرد[5] ابتدا توده تخم به آرامی از سطح ریشه جدا شده و در شیشه ساعتی حاوی آب مقطر قرار داده شد. سپس به کمک سوزن، پوست ریشه در محل توده تخم کنار زده شده و نماتود ماده از آن خارج گردید و در ظرف جداگانه حاوی آب مقطر قرار داده شد. پس از تهیه برش از کوتیکول انتهای بدن ماده و اندازه‌گیری سایر شاخص‌ها، گونه نماتود مشخص گردید (JEPSON, 1987). هر یک از توده های تخم جدا شده از ماده‌ها، جهت تکثیر در مجاورت ریشه یک نشاء جوان گوجه‌فرنگی رقم حساس ارلی اوربانا[6] در گلدان حاوی

1. Pseudobactin
2. Pyoluteorin
3. 2,4 - Diacetylphloroglucinol
4. Pyrrolnitrin
5. Single egg mass
6. *Early urbana*

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

خاک سترون قرار داده شد و گلدان‌ها در گلخانه در شرایط دمایی۱۹-۲۴ درجه سانتی‌گراد دمای شب و ۲۹-۳۳ درجه سانتی‌گراد دمای روز و با نور کافی نگهداری گردید.

تهیه مایه تلقیح نماتود *M. javanica*

جداسازی تخم‌ها از ریشه‌های آلوده به نماتود بر اساس روش Hussey & Barker (1973) صورت گرفت. ریشه‌های آلوده به قطعات یک تا دو سانتی‌متر بریده شدند. محلول هیپوکلریت‌سدیم با غلظت نیم تا یک درصد تهیه شد و قطعات به ظرفی حاوی ۲۰۰ میلی‌لیتر از این محلول اضافه شدند. ظرف به مدت ۱-۴ دقیقه به شدت تکان داده شد. سوسپانسیون حاصل به یک الک ۲۰۰ مش که در زیر آن الکی ۵۰۰ مش قرار گرفته بود، منتقل شد و محتویات درون الک ۵۰۰ مش به سرعت در معرض آب خنک قرار داده شدند و به طور کامل شستشو شدند تا بقایای هیپوکلریت برطرف شود. به این ترتیب توده ژلاتینی اطراف تخم‌ها حل شد و مخلوطی از تخم و لارو به دست آمد که جهت مایه‌زنی قابل استفاده بودند. برای مایه‌زنی هر گیاه، ۲۰۰۰ لارو سن دوم نماتود شمارش شد و مورد استفاده قرار گرفت.

جداسازی باکتری *P. fluorescens* از ریشه

قطعاتی از ریشه گیاهان گوجه‌فرنگی سالم و آلوده به نماتود ریشه گرهی از شهرستان‌های کرج و ورامین جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شد. پس از شستشو زیر جریان آب، ریشه هر منطقه به صورت جداگانه قطعه قطعه گردید و یک گرم از قطعات خرد شده به داخل لوله آزمایش حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون ریخته شد. رقت‌های مختلف به صورت مکرر در نه میلی‌لیتر آب مقطر سترون تهیه شد و از رقت‌های 10^{-2} و 10^{-3} به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر روی محیط کشت KB به وسیله میله شیشه‌ای L شکل پخش شد. پس از ۴۸ ساعت نگهداری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، کلنی‌هایی که از نظر شکل و رنگ تفاوت داشتند جهت کشت خالص روی محیط KB به روش Schaad *et al.* (2001) خالص‌سازی و تست‌های تشخیصی مربوطه انجام شدند.

بررسی تولید برخی متابولیت‌های مؤثر در ویژگی آنتاگونیستی سودوموناس‌های فلورسنت (*P. fluorescens, P. aeruginosa*) علیه *M. javanica*

برای اندازه‌گیری توانایی و میزان تولید برخی متابولیت‌های باکتری‌های فلورسنت سودوموناس و جهت غربال اولیه ۳۰ استرین از این باکتری‌ها یکسری آزمون‌ها انجام شد که توضیح آن در ادامه متن آمده است. یازده باکتری که در این تست‌ها (سیانیدهیدروژن، پروتئاز، سالیسیلیک اسید، لیپاز، سیدروفور و آمیلاز) سرگروه بودند جهت بررسی خاصیت نماتودکشی در آزمایشگاه انتخاب شدند (Siddiqui & Shaukat, 2004).

بررسی میزان تولید سیانید هیدروژن

این بررسی با استفاده از روش Alstrom (1987) انجام شد. در صورت تولید سیانید هیدروژن توسط باکتری‌های کشت شده در محیط KB، کاغذ صافی موجود در درب پتری (آغشته به محلول معرف شامل کربنات سدیم دو درصد و اسید پیکریک ۰/۵ درصد) از رنگ اولیه زرد به کرم، قهوه‌ای روشن، قهوه‌ای تیره و در نهایت به آجری تغییر رنگ می یابد.

بررسی میزان تولید پروتئاز

جهت این بررسی، از محیط کشت SMA[1] مطابق روش Maurhofer *et al.* (1995) استفاده شد. این محیط شامل ۱۵ گرم پودر شیر[2]، ۰/۵ گرم عصاره مخمر و ۱۷/۵ گرم آگار در یک لیتر آب بود. باکتری‌ها به صورت نقطه‌ای در پتری‌های حاوی محیط SMA کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. تشکیل یک هاله بی رنگ در اطراف کلنی باکتری‌ها نشانه فعالیت پروتئاز می‌باشد. با اندازه‌گیری قطر این هاله میزان تولید آنزیم مذکور بررسی شد.

بررسی میزان تولید سالیسیلیک اسید

برای این بررسی مطابق روش Meyer *et al.* (1992) پس از کشت باکتری‌ها در محیط TSB[3] به مدت ۴۸ ساعت، ۲۵۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون به محیط سوکسینات منتقل شد. این محیط شامل ۶ گرم فسفات

1. Skim milk agar
2. Skim milk
3. Tryptic soy broth

پتاسیم منو هیدروژنه[1]، ۳ گرم فسفات پتاسیم دی هیدروژنه[2]، ۱ گرم فسفات دی آمونیوم[3]، ۰/۲ گرم سولفات منگنز[4] و ۴ گرم سوکسینیک اسید[5] می‌باشد. مقدارpH این محیط باید به هفت برسد. پس از ۴۸ ساعت سوسپانسیون حاصل از محیط ذکر شده به مدت ۲۰ دقیقه به میزان ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد تا رسوب تشکیل شود، از محلول به دست آمده به عنوان منبع آنزیم استفاده شد. pH این محلول به دو رسانیده شد و سپس به نسبت ۱:۱ به آن کلروفرم افزوده شد و عصاره گیری صورت گرفت. پس از آن چهار میلی‌لیتر از نمونه عصاره گیری شده با چهار میلی‌لیتر آب مقطر و ۵۰ میکرولیتر کلرید آهن ۰/۲ مولار مخلوط شد. یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون حاصل برداشته شد و میزان سالیسیلیک تولید شده به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر با طول موج ۵۲۷ نانومتر اندازه‌گیری شد. میزان تولید سالیسیلیک اسید از طریق مقایسه عدد جذب نوری با منحنی استاندارد محاسبه شد.

بررسی میزان تولید لیپاز

براساس روش Schaad *et al.* (2001) محیطی شامل ۱۰ گرم پپتون، ۵ گرم کلرور سدیم، ۰/۱گرم کلرور کلسیم، ۱۵ گرم آگار و یک لیتر آب تهیه گردید. ۱۰ میلی‌لیتر توئین ۸۰[6] را جداگانه اتوکلاو کرده و به محیط در حال سرد شدن افزوده شد. باکتری در محیط حاصل به صورت نقطه‌ای کشت شد و پس از چند روز قطر هاله رسوبی در اطراف محل رشد باکتری اندازه‌گیری شد.

بررسی میزان تولید سیدروفور

در این بررسی طبق روش Schwyn & Neilands (1987) از محیط آبی رنگ CAS[7] استفاده شد. در صورتی که باکتری تولید سیدروفور کند، باعث تغییر رنگ محیط مذکور از آبی به نارنجی می‌شود. این پدیده در اثر خروج آهن از محیط CAS می‌باشد. قطر هاله ایجاد شده در اطراف کلنی‌های باکتری بعد از ۴۸ الی ۷۲ ساعت اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری کمی تولید سیدروفور بر اساس روش Alecxander & Enrique (2007) از محیط CAS استفاده شد. پس از تهیه محیط مذکور، ۱۲ میکرولیتر باکتری به روش نقطه‌گذاری روی سطح محیط مایه‌زنی شد و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. توانایی تولید سیدروفور از روی تغییر رنگ از آبی به نارنجی و با اندازه‌گیری هاله تشکیل شده در اطراف کلنی باکتری در فواصل زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت ارزیابی شد. لازم به ذکر است که ارزیابی سیدروفور با روش CASAD و همچنین با دستگاه اسپکتروفتومتر انجام گرفت.

بررسی میزان تولید آمیلاز

بر اساس روش Schaad *et al.* (2001) به محیط کشت آگار محلول ۰/۲ درصد نشاسته افزوده شد. باکتری به صورت نقطه ای کشت گردید. پس از چند روز با ریختن محلول لوگول[8] (ید در یدید پتاسیم) در صورتی که باکتری نشاسته را هیدرولیز کرده باشد هاله بی‌رنگی در اطراف محل رشد باکتری ایجاد می‌شود. با اندازه‌گیری قطر هاله میزان تولید آنزیم آمیلاز به دست آمد.

تعیین خصوصیت نماتود کشی ۱۱ استرین باکتری فلورسنت سودوموناس در آزمایشگاه

طبق روش Siddiqui & Shaukat (2004) استرین‌های باکتریایی در محیط کشت KB مایع کشت گردید و پس از ۴۸ ساعت (در دمای ۲±۲۸ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۲۰ دقیقه به میزان ۲۸۰۰ دور در دقیقه دو دفعه سانتریفیوژ شد و از سوسپانسیون باکتری به غلظت 2×10^{9} CFU/ml برای بیوکنترل استفاده شد. به منظور تعیین خصوصیت نماتود کشی برخی استرین‌های باکتری، یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون لارو سن دوم نماتود به غلظت ۴۵ ± ۶N/ml (۱۰۰±۶N/ml تخم نماتود) با دو میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری به چاهک‌های تشتک ۹۶ جداره منتقل شد (لاروها با هیپوکلریت سدیم ضدعفونی سطحی شدند). در تیمار شاهد لاروها و تخم‌ها در یک میلی‌لیتر آب مقطر سترون ریخته شدند. هر تیمار چهار تکرار داشت و تشتک در

1. K_2HPO_4
2. KH_2PO_4
3. $(NH_4)_2SO_4$
4. $MgSO_4.7H_2O$
5. Succinic acid
6. Tween 80
7. Chrome azurol-S
8. Lugol

انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. بعد از ۴۸ ساعت با استفاده از سوزن باریک و بیناکولر نور از زیر (بزرگنمایی×10) لاروهای مرده (بی‌حرکت) و تعداد تخم‌های تفریخ نشده شمارش شدند.

کنترل نماتود *M. javanica* توسط یک استرین باکتری *P. aeruginosa* و سه استرین *P. fluorescens* در گلخانه

بر اساس روش Siddiqui & Shaukat (2004) نشاهای سه هفته‌ای گوجه‌فرنگی (رقم ارلی اوربانا)[1] به گلدان‌های با قطر هشت سانتی‌متر محتوی ۳۰۰ گرم خاک لومی شنی سترون انتقال داده شدند و در گلخانه (۱۹-۲۴درجه سانتی‌گراد دمای شب و ۲۹-۳۳ درجه سانتی‌گراد دمای روز) نگهداری شدند. یک هفته بعد، برای تیمار کردن باکتری یک میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری از استرین‌های مورد نظر به غلظت $1/9\text{-}2/1\times10^{9}$CFU/ml در ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون ریخته شد و به خاک هر گلدان اضافه گردید. برای گیاهان شاهد، ۳۰ میلی‌لیتر از محلول رینگر[2] با رقت ۱ به ۴ استفاده شد. دو روز بعد از مایه‌زنی باکتری از طریق ایجاد سه گودال اطراف هر نشاء ۲۰۰۰ لارو سن دوم نماتود به خاک هر گلدان اضافه شد. چهل و پنج روز بعد از مایه‌زنی نماتود، ریشه‌های گوجه‌فرنگی شسته شد و سپس طول و وزن تر اندام‌های هوایی و ریشه اندازه‌گیری شد. آنگاه با استفاده از بیناکولر تعداد و قطر گره‌های سیستم ریشه‌ای محاسبه شد. در ادامه با استفاده از روش Siddiqui *et al.* (2003) میزان نفوذ نماتود به ریشه تخمین زده شد. پس از آن ریشه‌ها و اندام‌های هوایی خشک شدند (به مدت یک هفته در دمای اتاق) و وزن خشک آنها محاسبه شد (Siddiqui & Shaukat, 2004).

در این مطالعه ۱۰ تیمار گلخانه ای شامل چهار تیمار آلوده به نماتود و باکتری و چهار تیمار آلوده به باکتری تنها و یک تیمار شاهد آلوده به نماتود و یک تیمار شاهد سالم با پنج تکرار برای هر تیمار در قالب طرح کاملاً تصادفی بررسی شد.

1. *Early urbana*
2. Ringer suspension

تعیین میزان نفوذ نماتود به ریشه

به منظور تعیین میزان نفوذ نماتود، با استفاده از روش Siddiqui *et al.* (2003) یکی از قطعات ریشه تازه به قطعات کوچک تقسیم شد. قطعات بعد از وزن کردن مجدد در یک پارچه ململ قرار داده شدند و به مدت ۳-۵ دقیقه در اسید فوشین با اسید لاکتیک ۰/۲۵ درصد در حال جوش گذاشته شد. سپس به منظور حذف رنگ اضافه قطعات ریشه در زیر شیر آب شسته شدند و به مدت ۴۵ ثانیه در یک آسیاب الکتریکی له شدند. مواد له شده در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب ریخته شد و سوسپانسیون تهیه شد و به کمک بیناکولار نور از زیر (بزرگنمایی×60) نماتودهای ماده و لارو *M. javanica* در پنج نمونه پنج میلی‌لیتری شمارش شدند.

ارزیابی جمعیت اندوفیت باکتری

طبق روش Siddiqui *et al.* (2003) ریشه‌های تازه به مدت یک دقیقه با هیپو کلریت کلسیم[3] ۱٪ ضدعفونی سطحی شدند و با آب مقطر استریل دو دفعه شسته شدند. بافت ریشه در ۱۰ میلی‌لیتر محلول سولفات منگنز[4] ۰/۱ مولار به همراه توئین ۲۰[5] (۰/۰۲ درصد) ریخته شد. سپس ۱۰ رقت پی در پی از سوسپانسیون تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های مختلف به محیط KB اضافه شد. بعد از ۴۸ ساعت با استفاده از دستگاه کلونی شمار شمارش کلنی‌ها انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری

در مورد تعیین جمعیت باکتری‌ها داده‌ها با استفاده از فرمول Log (X+1) نرمال شد و اعداد حاصل تجزیه و تحلیل گردید. تجزیه و تحلیل داده‌های آزمایش با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS (V9.1) و به روش Proc anova انجام گردید. میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵٪ مقایسه شد.

نتایج

آزمون‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی جهت غربال اولیه ۳۰ استرین باکتری فلورسنت سودوموناس

برای اندازه‌گیری توانایی و میزان تولید مواد

3. $Ca(OCl)_2$
4. $MgSO_4$
5. Tween 20

آنتاگونیستی توسط باکتری‌های فلورسنت سودوموناس و جهت غربال اولیه ۳۰ استرین باکتری یکسری آزمون‌ها انجام شد که نتایج ۱۱ استرین برتر آن در جدول صفحه بعد آمده است. طبق نتایج به دست آمده استرین‌های *P. aeruginosa* 7NSK2، UTPF92 و UTPF86 به ترتیب بیشترین میزان سیانید هیدروژن، پروتئاز و سالیسیلیک اسید را تولید کردند (جدول ۱).

کنترل نماتود توسط ۱۱ استرین باکتری فلورسنت سودوموناس

کاهش تفریخ تخم‌های نماتود

دو استرین باکتری UTPF92 و *P. aeruginosa* 7NSK2 بیشترین کاهش تفریخ تخم‌های نماتود را باعث شدند (جدول۲). میزان کاهش تفریخ تخم‌های نماتود در اثر دو استرین نسبت به هم معنی‌دار نبود ولی نسبت به سایر استرین‌ها در سطح یک درصد تفاوت معنی‌داری داشتند. میزان کاهش تفریخ تخم‌های نماتود همان طوری که در جدول ۲ نشان داده شده است از ۳۰ تا ۶۹ درصد متغیر بود. بیشترین کاهش تفریخ تخم مربوط به استرین UTPF92 و کمترین آن مربوط به استرین UTPF10 بود.

مرگ و میر لاروهای سن دوم نماتود

میزان مرگ و میر لارو سن دوم از ۴۱/۳۱ تا ۷۷/۸۹ درصد متغیر بود (جدول ۲). بیشترین مرگ و میر لارو سن دوم مربوط به استرین 7NSK2 و کمترین مربوط به

جدول ۱- نتایج آزمون‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی ۱۱ استرین فلورسنت سودوموناس

استرین باکتری	سیانید هیدروژن (درجه تغییر رنگ کاغذ معرف)	پروتئاز (میلی‌متر قطر هاله)	سالیسیلیک اسید (عدد جذب نوری)	لیپاز (میلی‌متر قطر هاله)	سیدروفور (cas) (میلی‌متر قطر هاله)	آمیلاز (میلی‌متر قطر هاله)	سیدروفور (Abs 400nm) (عدد جذب نوری)	سیدروفور (casad) (میلی‌متر قطر هاله)
*UTPF2	۳	۲	۰/۰۴۳	-	۱۶/۵	۸	۱/۰۳۷	۱۰
UTPF10	۱	۸	۰/۰۰	۴	۲۵	۷	۱/۸۰۹	-
UTPF30	-	۹	۰/۱۹۸	۱۲	-	۱۹	۰/۸۴۱	-
UTPF45	-	۸	۰/۰۰۳	۱۰	۲۱	۱۸	۰/۰۲۶	۱۲
UTPF59	۱	۷	۰/۱۲۲	۸	۱۹	۵	۰/۶۰۵	۱۰
UTPF86	۲	۲	۰/۲۸۷	-	۱۵/۵	۱۳	۰/۸۵۵	۱۲
UTPF88	۲	۸	۰/۱۹۷	۴	۱۶	۷	۱/۰۹۸	-
UTPF92	-	۹	۰/۰۴۹	۱۸	۲۵	۴	۰/۴۸۳	-
UTPF93	۴	۷	۰/۱۲۵	-	۲۱/۵	-	۰/۷۵۲	۱۲
*7NSK2	۳	۵	۰/۰۲۲	-	۱۸	۶	۲/۴۰۴	۱۵
UTPF96	۲	۴	۰/۰۴۲	۱۲	۱۶	-	۱/۰۱۷	۹

UTPF نشان‌دهنده استرین‌باکتری *P. fluorescen* دانشگاه تهران است. 7NSK2 نشان‌دهنده استرین باکتری *P. aeruginosa* است.

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر ۱۱ استرین باکتری روی نماتود ریشه گرهی در آزمایشگاه (سطح یک درصد)

استرین باکتری	درصد عدم تفریخ تخم	درصد مرگ و میر لارو	استرین باکتری	درصد عدم تفریخ تخم	درصد مرگ و میر لارو
UTPF92	۶۹/۴±۲/۲a	۷۲/۳±۲/۳ab	UTPF93	۳۴/۹±۳/۴d	۵۰/۰±۱/۹de
7NSK2	۶۸/۶±۴/۸a	۷۷/۹±۷/۳a	UTPF45	۳۴/۴±۲/۶d	۴۹/۱±de۲/۱
UTPF96	۵۹/۳±۲/۳b	۶۰/۵±۲/۶c	UTPF30	۳۳/۱±۲/۵d	۵۴/۹±۲dc
UTPF2	۴۶/۴±۳/۱c	۵۸/۹±۱/۳c	UTPF59	۳۱/۳±۶/۱d	۴۱/۳±۲/۵f
UTPF88	۴۵/۹±۶/۸c	۵۴/۸±۲/۶dc	UTPF10	۳۰/۱±۳/۹d	۴۴/۴±۲/۸ef
UTPF86	۴۴/۴±۶/۷c	۷۰/۹±۲/۴b	شاهد	۶/۱±۱/۸e	۸/۹±۲/۶g
*CV	۸/۳	۵/۱	CV	۸/۳	۵/۱

حروف غیرمشترک نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار استرین‌های باکتری است.

شاهد، آب مقطر سترون می‌باشد. اعداد به صورت درصد بیان شده است.

CV ضریب پراکندگی داده‌هاست.

استرین باکتری UTPF59 بود.

تأثیر باکتری در شاخص‌های رشدی گیاهان آلوده به نماتود

شاخص‌های رشد

طول ریشه گیاهان تلقیح شده با استرین‌های *P. aeruginosa* 7NSK2 و UTPF86 در سطح پنج درصد تفاوت معنی‌داری داشت و به ترتیب ۱۴ و ۱۵ درصد افزایش رشد را به همراه داشت (جدول ۳). از این نظر گیاهان تیمار شده با باکتری و نماتود نسبت به یکدیگر تفاوت معنی‌دار نداشتند (P≤۰/۰۵) اما تفاوتشان نسبت به شاهد آلوده معنی‌دار بود (P ≤۰/۰۵).

اثر استرین‌های *P. aeruginosa* 7NSK2 و UTPF86 در افزایش ارتفاع نسبت به شاهد آلوده به ترتیب ۳۱ و ۴۱ درصد بود. طول اندام هوایی گیاهان تیمار شده با باکتری در سطح پنج درصد تفاوت معنی‌داری نداشت. استرین‌های باکتری 7NSK2 و UTPF96 به ترتیب بیشترین (۲۱٪) و کمترین (۷٪) اثر را در طول اندام هوایی داشتند (جدول ۳). تفاوت گیاهان تیمار شده با نماتود و باکتری در سطح پنج درصد معنی‌دار نبود (P ≤۰/۰۵) ولی تفاوتشان نسبت به شاهد آلوده معنی‌دار بود (P ≤۰/۰۵). اثر این استرین‌ها در افزایش طول اندام‌های هوایی ۲۶ تا ۳۲ درصد بود. 7NSK2 بیشترین اثر و UTPF96 کمترین اثر را داشت. تفاوت استرین‌های باکتری از نظر وزن مرطوب اندام هوایی در سطح پنج درصد معنی‌داری نبود. افزایش وزن مرطوب از ۴ تا ۲۹ درصد متغیر بود که استرین 7NSK2 در وزن تر اندام‌های هوایی بیشترین تأثیر را داشت. از این نظر تفاوت گیاهان تیمار شده با باکتری و نماتود نسبت به شاهد آلوده معنی‌داری بود (P ≤۰/۰۵). استرین باکتری UTPF86 نسبت به شاهد آلوده بیشترین اثر را داشت. سایر باکتری‌ها در مقابل نماتود، نسبت به شاهد آلوده ۲۰ تا ۵۴ درصد افزایش وزن تر گیاه را به همراه داشتند. استرین 7NSK2 و UTPF86 در افزایش وزن خشک اندام هوایی گیاه بیشترین اثر را داشتند که نسبت به شاهد سالم در سطح پنج درصد تفاوت معنی‌داری داشتند. در بین گیاهان آلوده به نماتود و باکتری، استرین باکتری UTPFM86 بیشترین اثر را روی افزایش وزن خشک اندام‌های هوایی داشت. سایر تیمارها نسبت به شاهد آلوده ۱۶ تا ۵۲ درصد افزایش وزن خشک اندام هوایی را باعث شدند. اثر استرین‌های باکتری در افزایش وزن خشک ریشه نسبت به ریشه فاقد تیمار باکتری و نماتود ۴ تا ۲۴ درصد بود که نسبت به شاهد سالم در سطح پنج درصد تفاوت معنی‌داری داشتند. باکتری 7NSK2 بیشترین اثر را روی وزن خشک ریشه داشت. استرین‌های باکتری به همراه نماتود نسبت به شاهد آلوده ۲۵ تا ۶۳ درصد افزایش وزن خشک ریشه را به همراه داشتند. استرین باکتری UTPF86 نسبت به شاهد آلوده بیشترین اثر را روی وزن خشک ریشه داشت. خسارت وارد شده به ریشه شاهد سالم نسبت به شاهد آلوده ۶۳ درصد بود (جدول۳).

جدول ۳- میزان تأثیر باکتری‌های سودوموناس فلورسنت در شاخص‌های رشدی گیاهان آلوده به نماتود

استرین باکتری	طول ریشه (سانتی‌متر)	طول ساقه (سانتی‌متر)	وزن تر اندام‌های هوایی (گرم)	وزن خشک اندام‌های هوایی (گرم)	وزن خشک ریشه (گرم)
7NSK2	۲۸/۳±۳/۱a	۲۰/۵±۳/۲a	۴/۴۸±۰/۹a	۰/۴۴±۰/۰۵a	۰/۴۱±۰/۰۱a
UTPF86	۲۸/۳±۳/۶a	۱۷/۸±۱/۸bc	۴/۲۹±۰/۸ab	۰/۴۲±۰/۱۰ab	۰/۴۰±۰/۰۲a
UTPF92	۲۰/۷±۲/۴b	۱۹/۴±۲/۶ab	۳/۷±۰/۶bc	۰/۳۷±۰/۱۰bc	۰/۳۵±۰/۰۴ab
UTPF96	۲۱/۹±۳/۸b	۱۷/۷±۱/۳bc	۳/۳±۰/۸cd	۰/۳۴±۰/۰۵c	۰/۳۱±۰/۰۲b
*Control	۲۴/۳±۳/۲b	۱۶/۵±۲/۶c	۳/۲±۰/۸cd	۰/۳۳±۰/۰۵cd	۰/۳۰±۰/۰۸b
UTPFM86	۱۳/۲±۲/۸c	۱۲/۷±۳/۲d	۲/۶±۰/۲de	۰/۲۶±۰/۰۳de	۰/۲۴±۰/۰۲c
7NSK2M	۱۳/۷± ۳c	۱۲/۳±۲/۵d	۲/۰۷±۰/۶ef	۰/۲۲±۰/۰۵ef	۰/۲۰±۰/۰۱cd
UTPFM92	۱۲/۴±۳/۲c	۱۱/۴±۱/۴d	۱/۹±۱fg	۰/۱۸±۰/۰۴fg	۰/۱۵±۰/۰۲de
UTPFM96	۱۱/۷±۲/۸c	۱۱/۸±۲d	۱/۵±۰/۳fg	۰/۱۴±۰/۰۲g	۰/۱۲±۰/۰۱e
*M	۸/۱±۲/۹d	۸/۴±۱/۴e	۱/۲±۰/۳m	۰/۱۲±۰/۰۲g	۰/۰۹±۰/۰۲e
CV	۱۳/۶	۱۱/۲	۱۲/۴	۱۳/۷	۹/۱

حروف غیرمشترک نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار تیمارها در سطح پنج درصد است. شاهد، گیاه سالم بدون نماتود و باکتری می‌باشد.

M گیاه آلوده به نماتود *Meloidogyne javanica* است

شاخص‌های بیماری

اثر تمام استرین‌ها در کاهش تعداد گره نسبت به شاهد آلوده به نماتود در سطح پنج درصد تفاوت معنی‌داری داشت. استرین UTPF86 نسبت به شاهد آلوده تعداد گره را ۵۳ درصد کاهش داد و بیشترین اثر را داشت. بقیه تیمارها تعداد گره را ۴۰ تا ۴۸ درصد کاهش دادند (جدول ۴). کاهش قطر گره ناشی از جمعیت باکتری در ریزوسفر از ۱/۷ تا ۳/۹ متغیر بود. بیشترین جمعیت مربوط به استرین UTPF86 و کمترین جمعیت مربوط به UTPF96 بود.

بیشترین جمعیت باکتری ریزوسفر مربوط به استرین 7NSK2 بود. در بین تیمارهای آلوده به نماتود و باکتری، دو استرین UTPF92 و UTPF96 حالت اندوفیت نداشتند. دو تیمار UTPFM86 و 7NSK2M حالت اندوفیت داشتند که جمعیت اندوفیت بودن تیمار UTPFM86 نسبت به 7NSK2M بیشتر بود و تفاوت آنها در سطح پنج درصد معنی‌دار بود. جمعیت اندوفیت بودن از ۰/۹ تا ۲/۸ متغییر بود (جدول ۴).

استرین باکتری UTPF86 نسبت به شاهد آلوده به نماتود، در سطح پنج درصد تفاوت معنی‌داری داشت. اثر استرین‌ها در کاهش قطر گره از ۳۸ تا ۶۱ درصد متغیر بود. در این مورد استرین باکتری UTPF86 بیشترین اثر را داشت. اثر تمام استرین‌ها در میزان نفوذ نماتود به ریشه نسبت به شاهد آلوده تفاوت معنی‌داری داشت. اثر استرین‌ها در کاهش نفوذ نماتود به گیاه از ۳۴ تا ۵۵ درصد متغیر بود. در این مورد استرین باکتری *P. aeruginosa* 7NSK2 بیشترین اثر را داشت. تفاوت تمام استرین‌ها در کاهش جمعیت نماتود خاک گلدان نسبت به شاهد آلوده در سطح پنج درصد معنی‌دار بود. اثر تیمارها در کاهش جمعیت نماتود در خاک از ۳۵ تا ۵۳ درصد متغییر بود. باکتری *P. aeruginosa* 7NSK2 در کاهش جمعیت نماتود بیشترین تأثیر را داشت. تفاوت جمعیت باکتری در خاک تمام گلدان‌ها در سطح پنج درصد معنی‌دار نبود. میزان جمعیت باکتری از ۴/۹ تا ۷/۷ متغیر بود. برای تجزیه آماری داده‌ها به فرمول Log (x+1) منتقل شدند. بیشترین جمعیت مربوط به استرین 7NSK2 بود و کمترین جمعیت مربوط به UTF96 بود. در بین گیاهان آلوده به نماتود و باکتری، تیمار UTPF86 بیشترین جمعیت را داشت. تفاوت جمعیت باکتری ریزوسفر تمام گلدان‌ها در سطح پنج درصد معنی‌دار نبود.

بحث

باکتری‌های فلورسنت سودوموناس با تولید چندین متابولیت ثانویه از قبیل سیانید هیدروژن، پروتئاز، سالیسیلیک اسید، سیدروفور، ۴،۲- دی استیل فلوروگلوسینول و غیره لاروهای *M. javanica* را کنترل می‌کنند (Cronin *et al*., 1997; Cox *et al*., 1981; Huang *et al*., 2005; Morton *et al*., 2004; Tian *et al*., 2007). در این تحقیق در محیط کشت استرین‌های باکتری *P. aeruginosa* 7NSK2 و UTPF86 حضور سیانید هیدروژن ثابت شد. این ترکیب کاغذ پیکریت را از رنگ زرد به قهوه‌ای مایل به قرمز تبدیل کرده و از طرفی عامل بیشترین درصد مرگ و میر لارو نماتود و عدم تفریخ تخم نماتود در آزمون آزمایشگاهی بود. به نظر می‌رسد بین سیانید هیدروژن تولید شده توسط

جدول ۴- مقایسه میانگین کنترل نماتود ریشه گرهی توسط چهار استرین باکتری در گلخانه

استرین باکتری	تعداد گره	قطر گره‌های متوسط (میلی‌متر)	جمعیت نماتود در خاک	میزان نفوذ نماتود به ریشه	جمعیت اندوفیت استرین‌های باکتری
*UTPFM96	۱۰۰±۱۱b	b۰/۶±۴/۱۲	b۲۲±۱۴۹	۱۱۸±۳۰bc	-
UTPFM92	۹۲±۱۰bc	c۰/۴±۲/۶	bc۲۴±۱۲۸	۱۲۹±۳۹b	-
*7NSK2M	۸۵±۱۲dc	۲/۵±۰/۵c	d۲۱±۹۲	۹۲±۲۶c	۳/۷۷±۰/۵a
UTPFM86	۷۸±۵d	۱/۹۶±۰/۴d	cd۲۶±۱۰۲	۹۵±۲۴c	۱/۹۴±۰/۴b
*M	a۱۱±۱۶۶	a۰/۶±۶/۹۴	a۱۶±۲۰۳	۲۰۵±۱۷a	-
CV	۷/۵	۱۰/۲		۹/۸	۱۲/۴

M گیاه آلوده به نماتود *Meloidogyne javanica* است. UTPFM گیاه آلوده به نماتود و باکتری است.

7NSK2 نشان‌دهنده استرین‌باکتری *P. aeruginosa* است.

باکتری و میزان مرگ‌ومیر نماتود در شرایط آزمایشگاهی یک رابطه مستقیم وجود داشته باشد (جدول۲). لازم به ذکر است میزان جمعیت نماتود در خاک و ریزوسفر تیمار 7NSK2M پایین‌تر از سایر تیمارها بود که احتمالاً به علت تولید فراوان ترکیب فرار سیانید هیدروژن در خاک می‌باشد. Gallagher & Manoil (2001) نیز پی بردند که تولید سیانید هیدروژن توسط باکتری به عنوان یک فاکتور اختصاصی و اولیه است که مسئول کشتن نماتود می‌باشد (Siddiqui et al., 2003). استرین 7NSK2 نسبت به UTPF86 در تست‌های آزمایشگاهی سیانید هیدروژن بیشتری تولید کرد (جدول۱) و از طرفی خاصیت نماتود کشی آن نیز بیشتر بود (جدول۲). همچنین قابل توجه است که میزان نفوذ نماتود به ریشه‌های مایه‌زنی شده با استرین 7NSK2 کمتر از سایر استرین‌ها بود. Siddiqui & Shaukat (2006) نیز نقش تولید سیانید هیدروژن حاصل از استرین *P. fluorescens* CHA0 در مقابل نماتود ریشه گرهی گوجه‌فرنگی *M. javanica* را مطالعه کردند و به این نتیجه رسیدند که در ریشه‌های مایه‌زنی شده با نماتود و باکتری، کاهش میزان نفوذ نماتود با تولید سیانید هیدروژن رابطه مستقیم دارد. علاوه بر سیانید هیدروژن مکانیسم‌های دیگری نظیر تغییر ترشحات ریشه که جذب نماتود را کاهش می‌دهد، افزایش مکانیسم دفاعی میزبان که منجر به مقاومت سیستمیک و یا انسداد محل‌های نفوذ نماتود می‌شود (محل انشعاب ریشه‌های فرعی، زخم و ...) و به دنبال آن افزایش تعداد سلول‌های باکتری در ریزوسفر و ریشه‌ها باعث کاهش حمله و تکثیر نماتود ریشه گرهی می‌شود. جداسازی و تعیین خاصیت سیانید هیدروژن پتانسیل بیوسنتز این ماده را به وسیله باکتری‌های فلورسنت سودوموناس در بازدارندگی نماتود ریشه گرهی نقش دارد را تأیید می‌کند (Siddiqui *et al.*, 2003). نتایج نشان می‌دهد که استرین‌های تولیدکننده سیانید هیدروژن با دور کردن عوامل بیمارگر جمعیت آنها در ریزوسفر را کاهش می‌دهند و در پی آن شرایط مساعد برای رشد گیاه را فراهم می‌کنند. لازم به ذکر است که یافته‌های آزمایش‌ها نیز این امر را تأیید می‌کند (Alecxander & Enrique, 2007; Sikora & Hoffmann-Hergarten, 1993).

قابل توجه است که استرین UTPF92 در تست‌های آزمایشگاهی بیشترین میزان آنزیم پروتئاز را تولید کرد و از طرفی عامل بیشترین درصد عدم تفریخ تخم بود. Siddiqui *et al.* (2005) نیز به این نتیجه رسیدند پروتئاز خارج سلولی استرین *P. fluorecens* CHA0، یک فاکتور مؤثر در کنترل نماتود ریشه گرهی *M. incognita* است. نتایج Siddiqui *et al.* (2003) نیز نشان می‌دهد که آنزیم پروتئاز در جلوگیری از تفریخ تخم و مرگ و میر لاروها مؤثر می‌باشد. به طور خلاصه این یافته‌ها نشان می‌دهد که آنزیم پروتئاز استرین‌های UTPF92 و 7NSK2 به طور مستقیم یا غیرمستقیم در بیوکنترل نماتود *M. javanica* نقش دارد. نقش پروتئاز در کنترل نماتودها کمتر توصیف شده است. گزارشات حاضر حاکی از آن است که فقدان پروتئاز فعالیت کنترل‌کنندگی باکتری‌های فلورسنت سودوموناس در مقابل نماتود ریشه گرهی را کاهش می‌دهد (Siddiqui *et al.*, 2005). به نظر می‌رسد پروتئاز و ۲،۴- دی استیل فلوروگلوسینول تکمیل و تشدید کننده فعالیت هم دیگر هستند و در حضور هر دو متابولیت، کنترل بیولوژیک عوامل بیماریزا مؤثرتر می‌باشد (Alecxander & Enrique, 2007; Duenne *et al.*, 2000).

لازم به ذکر است که میزان نفوذ نماتود به ریشه گیاهان تیمار شده با استرین UTPF86 بیشتر از 7NSK2 بود ولی تعداد گره ایجاد شده در ریشه‌های مایه‌زنی شده با UTPF86 کمتر بود (جدول۴) که این امر احتمالاً به علت تولید فراوان سالیسیلیک اسید توسط باکتری UTPF86 می‌باشد با این توضیح که ترکیبات فرار سیانید هیدروژن استرین 7NSK2 خاصیت دور کنندگی دارد و از نفوذ نماتود جلوگیری می‌کند ولی استرین UTPF86 این متابولیت را به میزان کمتری تولید کرده و پس از نفوذ نماتود با القای مقاومت در گیاه، از تکمیل سیکل نماتود جلوگیری می‌کند (جدول۱). Klessig *et al.* (2000) نیز پی برد سالیسیلیک اسید بعد از حمله بیمارگر در شرایط بحرانی در تحریک سیستم دفاعی گیاه نقش مشخصی ایفا می‌کند (Siddiqui & Shaukat, 2004). البته القاء مقاومت سیستمیک به وسیله سودوموناس‌های فلورسنت در مقابل نماتود ریشه گرهی، از مسیر مستقل

سالیسیلیک اسید انجام می‌شود و به میزان تجمع سالیسیلیک اسید در ریشه بستگی ندارد (Siddiqui & Shaukat, 2004). تزریق سالیسیلیک اسید به ساقه‌ها، اسپری آنها به تمام گیاه یا کاربرد در سیستم ریشه‌ای، القاءکننده سیستم مقاومت گیاه می‌باشد (Voisard *et al*., 1989). لازم به ذکر است که القای مقاومت در مقابل بیمارگرها به تولید سالیسیلیک اسید و تولید و تجمع جاسمونیک اسید، پروتئین عوامل بیمارگر و آنزیم‌هایی مثل کاتالاز و پراکسیداز بستگی دارد و سالیسیلیک اسید و جسمونیک اسید مهارکننده ترکیباتی هستند که ژن‌های دفاعی گیاه را فعال می‌کنند (Jagdale *et al*., 2009).

می‌توان عنوان کرد که با توجه به اثر استرین UTPF86 روی درصد بالای مرگ‌ومیر نماتود (جدول۲)، افزایش رشد گیاه گوجه‌فرنگی (جدول۳) و کاهش تعداد و قطر گره (جدول۴) نماتود، عملکرد این استرین در کنترل نماتود ریشه گرهی در گلخانه بهتر از سایر استرین‌ها بود (P≤۰/۰۵). این امر به نقش مؤثر متابولیت‌های این استرین، مثل سیانید هیدروژن، پروتئاز و سیدروفور و بیشتر از همه سالیسیلیک اسید برمی‌گردد (لازم به ذکر است با توجه به جدول ۱ این استرین نسبت به سایر استرین‌ها، بیشترین میزان سالیسیلیک اسید را تولید نمود). عملکرد سالیسیلیک اسید در القای مقاومت در ریشه‌های لوبیا چشم بلبلی در مقابل *M. incognita* نیز شناخته شده است (Nandi *et al*., 2002). بر اساس نتایج حاضر به نظر می‌رسد که مقاومت سیستمیک القاء شده به وسیله فلورسنت سودوموناداس‌ها در مقابل نماتود ریشه گرهی، از طریق مسیر مستقل سالیسیلیک اسید انجام می‌شود (Siddiqui & Shaukat, 2004).

نتیجه‌گیری کلی

استرین باکتریایی UTPF86 در تست‌های آزمایشگاهی بیشترین میزان سالیسیلیک اسید را تولید کرد و در آزمایشات گلخانه ای بهترین کنترل‌کننده نماتود *M. javanica* بود (P≤۰/۰۵).

سپاسگزاری

اعتبار این طرح از محل گرنت شماره ۷۱۱۰۰۲۴/۱/۰۳ معاونت پژوهشی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران تأمین شده است.

REFERENCES

1. Ahmadzadeh, M. & Sharifi Tehrani, A. S. (2009). Evaluation of fluorescent pseudomonads for plant growth promotion, antifungal activity against *Rhizoctonia solani* on common bean, and biocontrol potential. *Biological Control*, 48, 101-107.
2. Alecxander, J. & Enrique, L. (2007). Secondary metabolites help biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0 to escape protozoan grazing APPL. *Environmental Microbiology*, 10, 7083-7090.
3. Alstrom, S. (1987). Factors associated with detrimental effects of rhizobacteria on plant growth. *Plant Soil*, 102, 3-9.
4. Anderson, J. M., Preston, J. F., Dichson, D. W, Hewlett, T. E., Williams, N. & Maruniak, J. E. (1999). Phylogenetic analysis of *Pasteuria penetrans* by 16S rRNA gene cloning and sequencing. *Journal of Nematology*, 31, 319-325.
5. Barker, K. R. & Koenning, S. R. (1998). Developing sustainable systems for nematode management. *Phytopathology*, 36, 165-205.
6. Cox, G. N., Kusch, M. & Edgar, R. S. (1981). Cuticle of *Caenorhabditis elegans*: its isolation and partial characterization. *Journal of Cell Biology*, 90, 7-17.
7. &URQLQ ' 0 RHQQH/ RFFR] <) HQWRQ $ ' XQQH & ' RZ QQ ' 1 2 ¶ DD) 5 RQHR 4-diacetylphloroglucinol in the interaction of the biocontrol *Pseudomonas* strain F113 with the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 1357-1361.
8. Duenne, C., Moenne, Y., Bruiju, F. J. & Gara, F. (2000). Over production of an inducible extracellular serine protease improves biological control of *Pythium ultimum* by *Stenotrophomonas maltophilia* strain W81. *Microbiology*, 146, 2069-2078.
9. Fravel, D. R. (1988). Role of antibiosis in the biocontrol of plant disease. *Annual Review Phytopathology*, 26, 75-91.
10. Gallagher, L. A. & Manoil, C. (2001). *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 kills *Caenorhabditis elegans* by cyanide poisoning. *Journal of Bacteriology*, 183, 6207-6214.
11. Huang, X. W., Tian, B. Y., Niu, Q. H., Yang, J. K., Zhang, L. M. & Zhang, K. Q. (2005). An

extracellular protease from *Brevibacillus laterosporus* G4 without parasporal crystal can serve as a pathogenic factor in infection of nematodes. *Resistance Microbiology*, 156, 719-727.

12. Hussey, R. S. & Barker, K. R. (1973). A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. *Plant Disease Report*, 57, 1025-1028.
13. Jagdale, G. B., Kamoun, S. & Grewal, P. S. (2009). Entomopathogenic nematodes induce components of systemic resistance in plants. Biochemical and molecular evidence. *Biology*, 10, 1016-1024.
14. Jayakumar, J., Ramakrishnan, S. & Rajendran, G. (2002). Bio-control of reniform nematode, *Rotylenchulus reniformis* through fluorescent Pseudomonads. *Pesttology*, 26, 45-46.
15. JEPSON, S. B. (1987). *Identification of root-knot nematodes (Meloidogyne species)*. United Kingdom: CABI publishing, Wallingford.
16. Keel, C., Koller, R. & Defago, G. (1997). Plant growth-promoting rhizobacteria. In: Proceedings of *the 2th International Workshop on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*. Interlaken, Switzerland & Mechanistic Studies, Switzerland. pp. 172-175.
17. Kerry, B. R. (2000). Rhizosphere intractions and the exploitation of microbial agents for the biological FRQWURO RI SODQW±SDUDVLWLF QHP DWRGHV *Phytopathology*, 38, 423-441.
18. Klessig, D. F., Durner, J., Noad, R., Navarre, D. A., Wendehenne, D., Kumar, D., Zhou, J. M., Shah, J., Zhang, S., Kachroo, P., Trifa, Y., Pontier, D., Lam, E. & Silva, H. (2000). Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. In: Proceedings of *the 16th National Academic Sciences*, USA. 8849-8855. pp.
19. Kloepper, J. W., Rodriguez-Kabana, R., Mcinroy, J. A. &Young, R. W. (1992). Rhizosphere bacteria antagonistic to soybean cyst (*Heterodera glycines*) and root-knot (*Meloidogyne incognita*) nematodes: identification by fatty acid analysis and frequency of biological control activity. *Plant Soil*, 139, 75-84.
20. Kluepfel, D. A., Mclnnis, T. M. & Zehr, E. (1993). Involvement of rootcolonizing bacteria in peach orchard soils suppressive to the nematode *Criconemella xenoplax*. *Phytopathology*, 83, 1240-1245.
21. Leong, J. (1986). Their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. *Annual Review Phytopathology*, 24, 187-209.
22. Maurhofer, M., Keel, C. & Defago, G. (1995). Infuence of Plant species on disease suppression by *Pseudomonas fuorescens* strain CHA0 with enhanced production. *Plant Pathology*, 44, 40-50.
23. Meyer, J. M., Azelvandre, P. & Georges, C. (1992). Iron metabolism in Pseudomonads: salicylic acid, siderophore of *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Biology Factors*, 4, 23-27.
24. Morton, C. O., Hirsch, P. R. & Kerry, B. R. (2004). Infection of plant parasitic nematodes by QHP DWRGHV SKDJRXV IXQJL ± D UHYLHZ RI WKH DSSOLFDWLRQ RI P RROHFXODU EIROR\ WR XQGHUVWDQG LQIHFWLRQ processes and to improve biological control. *Nematology*, 6, 161-170.
25. Nandi, B., Sukual, N. C., Banerjee, N., Sengupta, S., Das, P. & Babu, P. S. (2002). Salicylic acid enhances resistance in cowpea against *Meloidogyne incognita*. *Phytopathology*, 41, 39-44.
26. Sasser, J. N. & Freckman, D. W. (1987). A world perpective on nematology: the role of the society. *Nematology*, 1, 7-14.
27. Schaad, N. W., Joenes, J. B. & Chun, W. (2001) *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. (3rd ed.). APS Press.
28. Schwyn, B. & Neilands, J. B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analysis Biochemistry*, 160, 47-56.
29. Siddiqui, I. A. & Shaukat, S. S. (2004). Systemic resistance in tomato induced by biocontrol bacteria against the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* is independent of salicylic acid production. *Journal of Phytopathology*, 152, 48-54.
30. Siddiqui, I. A., Haas, D. & Heeb, S. (2005). Extracellular protease of *Pseudomonas fluorescens* CHA0, a biocontrol factor with activity against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Applied and Enviromental Microbiology*, 71, 5646-5649.
31. Siddiqui, I. A., Shaukat, S. S., Ghazala, H. K. & Nasima, I. A. (2003). Suppresion of *Meloidogyne javanica* by *Psuedomonas aeruginosa* IE-6S+ in tomato: the influence of NaCl, oxygen and iron levels. *Soil Boilogy & Biochemistry*, 35, 1625-1634.
32. Siddiqui, I. A. & Shaukat, S. S. (2006). Role of cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* CAH0 in the suppression of root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* in tomato. *Microbiology & Biotechnology*, 22, 641-650.
33. Sikora, R. A. & Hoffmann-Hergarten, S. (1993). Biological control of plant parasitic nematodes with plant-health promoting rhizobacteria. ACS Symposium Series. *Biology &Technology*, 3, 166-172.
34. Spiegel, Y., Cohn, E., Galper, S., Sharon, E. & Chet, I. (1991). Evaluation of a newly isolated bacterium, *Pseudomonas chitinolytica* sp. nov., for controlling the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Biocontrol Sciences Technology*, 1, 115-125.
35. Tian, B., Yang, J. & Zhang, K. Q. (2007). Bacteria used in the biological control of plant-parasitic nematodes: populations, mechanisms of action, and future prospects. FEMS, *Microbiology Ecology*, 61,

197-213.
36. Voisard, C., Keel, C., Hass, D. & Defago, G. (1989). Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps supperss block root rot of tobacco under genobiotic condition. *European Journal of Molecular Biology*, 8, 351-358.
37. Wechter, W. P., Glandorf, D. C. M., Derrick, W. C., Leverentz, B. & Kluepfel, D. A. (2001). Identification of genetic loci in a rhizosphere-inhabiting, species of *Pseudomonas* involved in expression of a phytoparasitic nematode ovicidal factor. *Soil Biology & Biochemistry*, 33, 1749-1758.
38. Westcott, S. W. & Kluepfel, D. A. (1993). Inhibition of *Criconemella xenoplax* egg hatch by *Pseudomonas aureofaciens*. *Phytopathology*, 83, 1245-1249.