Journal of Vegetables Sciences, Spring & Summer 2022, Vol 6, No 11(1), Pages 113-127

doi: 10.22034/iuvs.2022.553285.1204 Article Type: Research Online ISSN: 2676-4822

Antagonistic Evaluation of Some Fungal Isolates on Knot-Producing Nematode (*Meloidogyne javanica*) of Cucumber in Vitro and Greenhouse Conditions

Nasrin Piripour [1], Khadijeh Abbasi [2*] and Siamak Beigi [3]

1- M. Sc. Student, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran
2- Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran
3- Agriculture Jihad Organization, Ilam, Iran

***Corresponding author:** kh.abasi@ilam.ac.ir

(**Received:** 16 May 2022 **Revise:** 14 June 2022 **Accepted:** 14 June 2022)

Extended Abstract

1. Introduction: Plant parasitic nematodes cause important economic losses in agricultural crops. Knot-producing nematode, *Meloidogyne javanica* is the most destructive of many crops in the world. In order to control plant nematodes as one of the important plant pathogens, various methods such as, fallow and crop rotation, cultivation of resistant cultivars, biological control and chemical methods are used. Today, due to the excessive use of agricultural pesticides, the health of the consumer community and the environment are endangered. Because of the chitin and protein are as dominant compositions in middle layer of the eggshell, using of the chitinases and proteases produced as degrading enzymes in a wide range of the fungi is a good strategy for biological control of the on knot-producing nematode. The disintegration of nematode eggs can only be caused by enzymatic action. Activity of the fungal egg-parasites leads to immobility and death of the embryo and results in a reduction of nematode population density. Many natural enemies of plant parasitic nematodes occur that may be useful for biological control. These include pathogens, predators, competitors and antagonists of which 76% are fungi. The fungal antagonists have been most extensively studied and are considered the most applicable for biological control of nematodes. The use of biological agents to control of plant-parasitic nematodes is less effective compared with chemical method, but positive result of fungal agents has been encouraging. In this study has tried to be examined considerable ability of the various antagonistic fungi to control of *M. javanica* in vitro and greenhouse conditions.

2. Materials and Methods: In this study has tried to be examined antagonistic ability of seven isolates of five fungal genus including: *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium equiseti*, *Paecilomyces* sp., *Trichoderma atroviridae*, *Ulocladium dauci* and *Alternaria alternata* on knot-producing nematode in vitro and greenhouse conditions. The ability of the protease enzyme production of fungal isolates was also evaluated. The protease specific activity assay in 7 isolates of various species of fungi obtained from infected knot-producing nematode over 5 days of fungal growth (24, 48, 72, 96 and 120 h) was measured. Also evaluation was performed in vitro by calculating the percentage of parasitized eggs and larvae in water-agar and also in the greenhouse by examining the growth factors of cucumber under the antagonistic effect of fungal isolates on nematodes. The ability of antagonistic activity of the fungi on the eggs was evaluated in water-agar medium with evaluation of the interaction between fungi and eggs. The numbers of healthy and parasitized (dead) larvaes and eggs were calculated after two weeks. The ability of the antagonistic fungi under greenhouse conditions was done. To provide of fungal inoculum, 20g of soaked wheat seed were cast in bags with autoclave capability. Per every gram of casted seed, 2 ml distilled water were added and during 24 hours they autoclaved 3 times. Then to every of bag number of 4 fungi disk with 5 mm diameter from selected isolates was added in 3 repetitions and was kept in 25ºC and dark conditions. To colonization all of the seeds and to avoid of hang of them, every 48 hours interval the seeds in bags were mixed. After three weeks all of the seeds were infected with fungal isolates. The ability of the antagonistic fungi under greenhouse conditions was done by adding fungal inoculum and the numbers of 2000 eggs to each pot and evaluation of performance traits of cucumber in pot after 90 days.

In every two conditions, data analysis ANOVA (Analysis of variance) was conducted using of the SAS software version 9.4 in completely randomized design (CRD) with three replicates.

3. Results and Discussion: Analysis of variance of evaluation results in vitro and greenhouse conditions showed significant difference among isolates in 1% level. Results showed there is direct relation between increase in plant yield and add fungal isolates to the pot.

The results of antagonistic ability of fungal isolates in vitro and greenhouse showed there is good correlation between two conditions. So the results showed a positive effect of the fungal isolates in reducing nematode damages.

4. Conclusions: Finally, based on all of the evaluations *F. equiseti* isolate was reported as the most effective isolate an *F. oxysporum* isolate as the least effective antagonist fungus.

Keywords: Biological control, Enzymatic activity, Parasitism.

Citation: Piripour, N., Abbasi, K. & Beigi, S. (2022). Antagonistic evaluation of some fungal isolates on knot-producing nematode (Meloidogyne javanica) of cucumber in vitro and greenhouse conditions. Journal of Vegetables Sciences, 11(1), 113-127. doi: 10.22034/iuvs.2022.553285.1204

Copyrights:
Copyright for this article is retained by the author(s), with publication rights granted to Journal of Vegetables Sciences. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/ by/4.0).

دوفصلنامه علمی علوم سبزی‌ها، سال ۶، دوره ۱۱، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۴۰۱، صفحات (۱۲۷-۱۱۳)

شاپا الکترونیکی: ۴۸۲۲-۲۶۷۶ نوع مقاله: پژوهشی doi: 10.22034/iuvs.2022.553285.1204

ارزیابی آنتاگونیستی برخی جدایه‌های قارچی روی نماتد ریشه‌گرهی خیار (*Meloidogyne javanica*) در شرایط آزمایشگاه و گلخانه

نسرین پیری پور[۱]، خدیجه عباسی [۲]*، سیامک بیگی[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران

۲- استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران

۳- سازمان جهاد کشاورزی، ایلام، ایران

***نویسنده مسئول:** Kh.abasi@ilam.ac.ir

(**تاریخ دریافت:** ۱۴۰۱/۰۲/۲۶ **تاریخ بازنگری:** ۱۴۰۱/۰۳/۲۴ **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۱/۰۳/۲۴)

چکیده

نماتد عامل ریشه‌گرهی خیار *Meloidogyne javanica* یکی از مهم‌ترین عوامل خسارت‌زا به این محصول در سراسر جهان است. ارائه راه‌کارهای مدیریتی مناسب جهت کنترل این بیماری بسیار ضروری به نظر می‌رسد. با توجه به ترکیبات پوسته تخم در نماتدها و توانایی بسیاری از قارچ‌ها در تولید طیف وسیعی از آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره‌ی تخم، شناسایی قارچ‌های همراه نماتد و نقش آن‌ها در کنترل بیولوژیک نماتدها از جمله نماتدهای سیستی بسیار حائز اهمیت می‌باشد. در این پژوهش، ارزیابی آنتاگونیستی هفت جدایه از پنج جنس قارچی *Fusarium solani*، *Fusarium oxysporum*، *Fusarium equiseti*، *Paecilomyces sp.*، *Trichoderma atroviridae*، *Ulocladium dauci* و *Alternaria alternata* بر روی نماتد ریشه‌گرهی خیار در شرایط آزمایشگاه و گلخانه مورد مطالعه قرار گرفت. همچنین توانایی تولید آنزیم پروتئاز جدایه‌های قارچی مذکور ارزیابی گردید. ارزیابی در شرایط آزمایشگاه به صورت محاسبه درصد تخم و لارو پارازیته شده در محیط آب‌آگار و همچنین در شرایط گلخانه به صورت بررسی فاکتورهای رشدی خیار تحت تأثیر آنتاگونیستی جدایه‌های قارچی بر نماتد انجام شد. نتایج به دست آمده از شرایط آزمایشگاه و گلخانه تا حد زیادی همبستگی داشتند و هم‌دیگر را تأیید کردند. نتایج حاصل نشان‌دهنده اثر مثبت جدایه‌های مختلف قارچی در کاهش بیماری‌زایی و خسارت نماتد بود. در نهایت جدایه‌ی *F. equiseti* به عنوان مؤثرترین جدایه و جدایه‌ی *F. oxysporum* به عنوان کم اثرترین قارچ‌های آنتاگونیست گزارش شدند.

واژه‌های کلیدی: **پارازیته‌کنندگی، فعالیت آنزیمی، کنترل بیولوژیک.**

استناد: پیری پور, ن., عباسی, خ. و بیگی, س. (۱۴۰۱). ارزیابی آنتاگونیستی برخی جدایه‌های قارچی روی نماتد ریشه گرهی خیار (*Meloidogyne javanica*) در شرایط آزمایشگاه و گلخانه. *علوم سبزی‌ها*، ۱۱(۱)، ۱۲۷-۱۱۳.

حق چاپ:

حق چاپ برای نویسنده (گان) این مقاله محفوظ است. بر اساس قوانین انتشارات با دسترسی آزاد، تمام مطالعات چاپ شده در این مجله به‌صورت آزاد در وب سایت مجله برای عموم بدون پرداخت هزینه قابل‌دسترس است.

مقدمه

نماتدهای انگل گیاهی از عوامل بیماری‌زای مهم در خاک هستند و اغلب محصولات گیاهی مورد حمله این عوامل بیماری‌زا قرار می‌گیرند. نماتد ریشه‌گرهی (*Meloidogyne* sp.) یکی از مخرب‌ترین نماتدهای انگل گیاهی است که در تمام نقاط جهان یافت می‌شود. مشخص‌ترین نشانه‌ی این بیماری در قسمت زیرزمینی گیاه به وجود می‌آید. بر روی ریشه گیاه آلوده، گال‌های گره مانندی ایجاد می‌شود که به ریشه ظاهری گرز مانند و خشن می‌دهد. علائم ایجاد شده بر اندام‌های هوایی به دلیل تأثیری است که نماتد بر جذب آب و مواد غذایی به وسیله ریشه و انتقال آن‌ها به سمت بالای گیاه می‌گذارد. گسترش وسیع این نماتدها در مناطق گرمسیر، نیمه‌گرمسیر و معتدل و حضور آن‌ها هم در مزرعه و هم در گلخانه، باعث شده این نماتد به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای گیاهی مطرح باشد (Fabiyi, 2021).

به‌طورکلی کنترل بیماری‌های خاک‌زاد بسیار مشکل است و از بین بردن آن‌ها توسط روش‌های شیمیایی بسیار هزینه‌بر و خطرناک است (Saifullah. & Naqibullah Khan, 2014). تا چند سال اخیر کاربرد آفت‌کش‌های شیمیایی رایج‌ترین روش در مدیریت این بیمارگر بوده است، اما در حال حاضر بر اساس توافقات بین‌المللی استفاده از نماتدکش‌های شیمیایی در بعضی از کشورها به دلایلی از قبیل اثرات مخرب آن‌ها بر روی محیط زیست، سرطان‌زایی در انسان، ماندگاری در خاک و آلودگی آب‌های زیرزمینی و قیمت بالای بیشتر نماتدکش‌ها ممنوع شده است (Bamisile *et al.*, 2021). به دلیل مضرات ذکر شده محققان این امر به دنبال دست‌یابی به راه‌های مناسب برای مهار نماتدها هستند که روش مناسب برای این امر کنترل به وسیله عوامل آنتاگونیستی مطرح شده و از آن به عنوان یک روش عملی و امیدبخش یاد می‌شود (Liu *et al.*, 2008; Sharon *et al.*, 2009).

دشمنان طبیعی زیادی نماتدهای انگل گیاهی را مورد هجوم قرار داده و جمعیت آن‌ها را کاهش می‌دهند. یکی از این عوامل زیستی گونه‌های مختلف قارچ های آنتاگونیست می‌باشد. در مجموع بیشتر از ۷۰ درصد از دشمنان طبیعی گزارش شده از نماتدها را قارچ‌ها تشکیل می‌دهند (Zhang *et al.*, 2020). از بین قارچ‌های آنتاگونیست نماتد، گونه‌های جنس *تریکودرما* ظرفیت کنترل زیستی بالایی دارند و تولید آنزیم‌های تخریب‌گر مانند کیتیناز، گلوکاناز و پروتئاز به عنوان مهم‌ترین مکانیسم برای فعالیت‌های بیوکنترلی در این قارچ جهت کنترل نماتدهای انگل گیاهی مطرح شده است (Safari Motlagh & Samimi, 2013). دو گونه قارچی *Trichoderma harzianum* و *T. lignorom* در کاهش آلودگی ناشی از نماتد *M. javanica* دارای اهمیت است (Harman *et al.*, 2004). در مطالعه‌ای جهت بهتر کردن عملکرد قارچ *P. chlamydosporia* در کنترل نماتدهای انگل گیاهی نقش آنزیم‌های خارج سلولی از جمله پروتئاز و کیتیناز را در آلودگی تخم نماتدها مهم عنوان کردند (Manzanilla-Lopez *et al.*, 2013). همچنین در بررسی‌های انجام شده توسط Santos و همکاران (۲۰۱۳) بیولوژی و فعالیت آنزیمی *Pochonia chlamydosporia* جدا شده از نماتدهای سیستی سیب‌زمینی و ریشه‌گرهی مورد مطالعه قرار گرفته و پروتئازها و کیتینازهای خاصی را از این قارچ جداکردند. در مطالعه‌ی دیگری که Ruanpanun و همکاران (۲۰۱۰) روی قارچ‌های جدا شده از نماتد *M. incognita* انجام دادند، از بین ۶۷ جدایه قارچی مورد بررسی، گونه‌های غالب متعلق به قارچ‌های *Penicillium*(۳۷/۳درصد) و *Fusarium* (۳۲/۸ درصد) بودند. همچنین Singh و Mathur (۲۰۱۰) اثر چندین گونه قارچی جدا شده از تخم‌های نماتد ریشه گرهی گونه *M. incognita* در شرایط آزمایشگاهی را ارزیابی کردند و مشاهده کردند قارچ‌های *Fusarium oxysporum* و *F. solani* سبب مرگ و میر لاروهای نماتد و ممانعت از تفریخ تخم می‌شوند.

بنابراین با توجه به اهمیت محصول خیار و سطح زیر کشت بالای آن در کشور ما و نظر به ساختار تخم

نماتدها، همچنین این‌که پروتئازها به عنوان آنزیم‌های تجزیه‌کننده پروتئین در دامنه وسیعی از قارچ‌ها وجود دارند، در این پژوهش تلاش شده توانایی قابل توجه این آنزیم‌ها در قارچ‌های آنتاگونیست جهت فعالیت بیوکنترلی علیه نماتد ریشه‌گرهی خیار مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

شناسایی و تهیه جمعیت خالص نماتد ریشه‌گرهی

جهت تهیه و تکثیر جمعیت خالص نماتد ریشه‌گرهی (*Meloidogyne javanica*)، از روش تلقیح یک کیسه تخم سالم نماتد به رقم خیار محلی استفاده شد. برای این کار بذور خیار در گلدان‌های یک کیلوگرمی پلاستیکی حاوی ۹۰۰ گرم خاک سترون شامل ترکیب ماسه، خاک رس و خاکبرگ به نسبت‌های ۲:۱:۱ کشت داده شدند و بعد از گذشت چند روز که بذور ریشه تولید کردند تک کیسه تخم نماتد به ناحیه نزدیک بذر اضافه گردید و آبیاری مرتب گلدان انجام شد. لازم به ذکر است در هر مرحله آبیاری از آب جمع شده در ظرف زیر گلدان برای آبیاری مجدد استفاده گردید. پس از گذشت دو ماه کیسه تخم‌های جدید تولید شده از ریشه‌های آلوده استخراج شد. شناسایی گونه‌ی نماتد جدا شده از ریشه بر اساس مشخصات ریخت‌شناسی و همچنین تهیه برش از ناحیه پیرامون مخرج نماتد ماده و همچنین خصوصیات نماتد نر و لارو سن دوم صورت گرفت.

تهیه جدایه‌های قارچی

هفت جدایه از گونه‌های مختلف قارچی شامل: *Fusarium solani* (IRAN 2830C)، *Fusarium oxysporum* (IRAN 2832C)، *Paecilomyces equiseti* sp. (IRAN 2828C)، *Trichoderma atroviridae* (IRAN 2829C)، *Ulocladium dauci* (IRAN 2833C) و *Alternaria alternata* (IRAN 2835C) که پتانسیل بیوکنترلی آن‌ها و فعالیت آنزیم کیتیناز در آن‌ها مورد بررسی قرار گرفته بود از کلکسیون قارچ‌های زنده ایران- مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی تهیه شد (Abbasi, 2017).

سنجش فعالیت آنزیم پروتئاز در جدایه‌های قارچی

تولید و القا آنزیم

جهت القای تولید پروتئاز در محیط کشت از محیط کشت TLE طبق روش De Marco و Felix (۲۰۰۲) همراه با۵ درصد کازئین استفاده شد. ۳۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت فوق درون ارلن‌های یک لیتری ریخته شد و اتوکلاو گردیدند. به هر کدام از ارلن‌ها ۲×۱۰^{۷} اسپور از هر جدایه‌ی قارچی تلقیح شد و ارلن‌ها به مدت ۷۲ ساعت روی شیکر انکوباتور با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از گذشت ۷۲ ساعت، محیط کشت مورد نظر به درون لوله‌های سانتریفیوژ سترون منتقل گردید و به مدت ده دقیقه با دور ۸۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. سپس فاز رویی برداشته و با استفاده از کاغذ واتمن شماره یک صاف گردیدند و از آن‌ها جهت استفاده به عنوان محلول آنزیم در سنجش آنزیمی استفاده شد.

بررسی فعالیت آنزیم

جهت ارزیابی فعالیت آنزیم پروتئاز از معرف فولین به کمک روش De Marco و Felix (۲۰۰۲) با اندکی تغییرات استفاده شد. این معرف با تیروزین آزاد شده ناشی از فعالیت آنزیم پروتئاز واکنش داده و سبب تولید رنگ قابل اندازه‌گیری توسط دستگاه اسپکتروفتومتر می‌شود که شدت این رنگ ارتباط مستقیم با میزان فعالیت پروتئاز دارد. میزان فعالیت آنزیمی برای جدایه‌ها در پنج روز متوالی از رشد جدایه‌ها در طول موج ۶۶۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر ارزیابی شد. در نمونه‌ی شاهد از آب مقطر سترون بجای عصاره آنزیمی استفاده گردید. جهت محاسبه فعالیت ویژه آنزیم و تعمیم فعالیت آنزیم به میلی‌گرم پروتئین موجود در عصاره، میزان پروتئین کل موجود در نمونه‌ها به روش Bradford (۱۹۷۶) برای تمام جدایه‌ها تعیین گردید.

آزمایش در سه تکرار برای هر جدایه در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت و مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد با استفاده از نرم‌افزار SAS ۹/۴ انجام شد. قبل از انجام تجزیه واریانس، نرمال بودن توزیع داده‌ها به کمک آزمون‌های شاپیرو-والک مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی اثر آنتاگونیستی جدایه‌های قارچی علیه نماتد در شرایط آزمایشگاه

جهت بررسی تأثیر عصاره محیط کشت القاکننده پروتئاز بر میزان کاهش تفریخ تخم نماتد در آزمایشگاه، ۱۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون حاوی ۱۰۰ عدد تخم نماتد به ۳۵ میلی‌لیتر محلول عصاره محیط کشت القایی جدایه-های قارچی اضافه گردید و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد (دمای بهینه فعالیت آنزیم) نگهداری شد. در نمونه‌ی شاهد، از آب مقطر سترون به جای عصاره آنزیمی استفاده گردید.

آزمایش در سه تکرار برای هر جدایه و سه تکرار برای نمونه شاهد در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت و میانگین داده‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد با نرم‌افزار SAS ۹/۴ مقایسه شدند.

بررسی اثرآنتاگونیستی جدایه‌های قارچی علیه نماتد در شرایط گلخانه

به منظور تعیین فعالیت آنتاگونیستی هفت جدایه‌ی قارچی مذکور علیه نماتد ریشه‌گرهی خیار، آزمایشی در شرایط گلخانه به صورت طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه ایلام انجام شد. تیمارهای آزمایش هشت تیمار شامل هفت جدایه قارچی و تیمار شاهد (خیار با نماتد و بدون قارچ) بودند.

برای تکثیر جدایه‌های قارچی مقدار ۲۰ گرم بذر گندم خیس خورده در درون پلاستیک قابل اتوکلاو ریخته شد و به ازاء هر گرم بذر دو میلی‌لیتر آب مقطر افزوده شد و سه بار به فاصله ۴۸ ساعت اتوکلاو شدند. سپس به هر پلاستیک تعداد چهار دیسک قارچی به قطر پنج میلی‌متر از جدایه‌های منتخب در سه تکرار اضافه گردید و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شرایط تاریکی نگهداری شدند. جهت کلونیزه‌شدن همه بذور و همچنین جلوگیری از بهم چسبیدن آن‌ها به فاصله ۴۸ ساعت یک‌بار اقدام به بهم‌زدن پلاستیک‌های حاوی بذور گردید. در نهایت پس از گذشت سه هفته کلیه بذور توسط جدایه‌های قارچی آلوده شده و آماده استفاده در گلدان گردیدند.

برای کاشت خیار از بذور خیار محلی که از مرکز جهاد کشاورزی ایلام تهیه شده بود استفاده شد. بذور مورد استفاده در هر گلدان (گلدان‌های یک کیلویی با زهکش مناسب) که با مخلوطی از رس و ماسه استریل به نسبت ۲:۱ پر شده بود کشت گردید. خاک مورد نظر را ابتدا غربال کرده و سپس با استفاده از اتوکلاو سترون گردید.

جهت تلقیح جدایه‌های قارچی به خاک گلدان‌ها درون هر گلدان یک گیاهچه خیار چهار برگی قرار داده شد. ده روز پس از تلقیح قارچ به خاک، سوسپانسیونی از تخم نماتد تهیه و در هر گلدان به ازای هر کیلوگرم ۲۰۰۰ تخم نماتد با ایجاد دو الی سه حفره با فواصل یکسان از یکدیگر با عمق پنج سانتی‌متری در فاصله دو سانتی‌متری طوقه با استفاده از یک پیپت شیشه‌ای، سوسپانسیون تخم نماتد به داخل سوراخ‌های ایجاد شده در گلدان‌ها اضافه گردید. در روزهای اول درجه حرارت در دامنه ۳۰ الی ۳۵ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد و آبیاری به طور مرتب صورت گرفت.

دو ماه پس از تلقیح، اقدام به ارزیابی فاکتورهای تولیدمثل نماتد و فاکتورهای رشدی و عملکردی گیاه شامل وزن تر و خشک اندام هوایی، وزن تر و خشک ریشه، طول ریشه و طول ساقه و شاخص‌های مربوط به تولیدمثل و تکثیر نماتد شامل تعداد گال در یک گرم ریشه، تعداد کیسه تخم در گرم ریشه مورد بررسی قرار گرفت. فاکتور تولیدمثلی نماتد نیز بر مبنای جمعیت نهایی نماتد و تعداد نماتدهای تلقیح شده، مورد ارزیابی قرار گرفت.

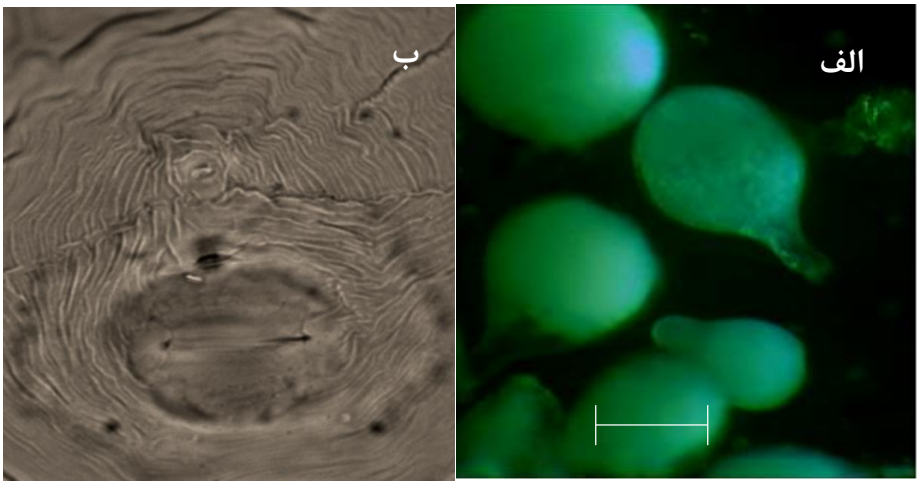
تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نسخه ۹/۴

نرم‌افزار SAS و آزمون مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

نتایج و بحث

شناسایی گونه نماتد بر اساس صفات ریخت‌شناسی

با بررسی مشخصات ریخت‌شناسی ماده‌ها و لاروهای سن دوم و استفاده از کلیدهای شناسایی معتبر و منابع موجود، جدایه‌های نماتد به‌دست آمده، گونه (*Meloidogyne javanica* Treub, 1885) شناسایی و تأیید گردید (EPPO, 2013). ماده‌ها گلابی‌شکل و فاقد برآمدگی پشتی هستند. طول استایلت ۱۸-۱۴ میکرومتر، گره‌ها تخم‌مرغی شکل و در یک راستا قرار دارند. نقوش انتهای بدن (Perineal pattern) گرد (شکل ۱) و با قوس پشتی ضعیف و دارای شیارهای صاف است. خطوط جانبی وجود ندارد و یا بسیار ضعیف است. دُم دارای یک انحنای مشخص است. شش غده تک‌سلولی بزرگ در قسمت پشتی بدن تولید کیسه ژلاتینی را بر عهده دارند که از مخرج خارج می‌شود و حاوی تعداد زیادی تخم می‌باشد. در نرها ناحیه لب در یک راستا نیست. معمولاً لب‌های جانبی وجود ندارد و صفحه لب‌ها بلند نیست. طول استایلت ۲۴-۱۹ میکرومتر است و گره‌ها در یک راستا و گرد هستند. طول بدن در لارو سن دوم ۵۶۰-۴۰۰ میکرومتر و همی‌زونید در قسمت جلویی یا مجاور سوراخ ترشحی قرار دارد. طول دم ۶۰-۴۷ میکرومتر است و ناحیه شفاف بلند به طول ۱۸-۹ میکرومتر و نوک گرد وجود دارد.



شکل ۱- الف) نماتد گونه ی *M. javanica*: ماده‌ها ب) نقوش کوتیکولی انتهای بدن. (اسکیل‌بار ۱۰ میکرومتر)

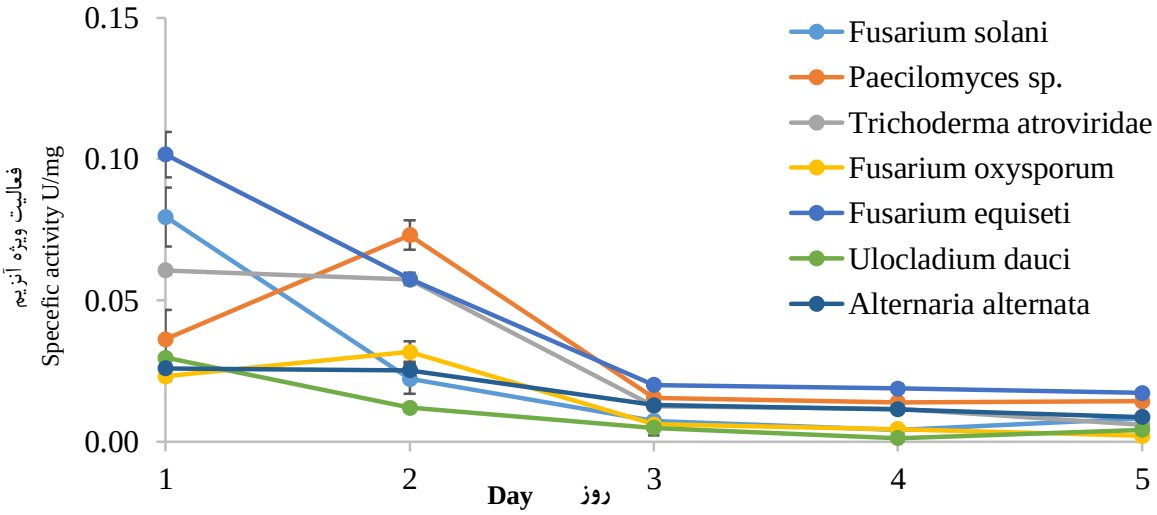
Figure 1- A: *M. javanica*: Females, B: Perineal pattern. (10 micrometer scale)

فعالیت آنزیمی

فعالیت ویژه آنزیم برای هفت جدایه‌ی مذکور به صورت میلی‌گرم تیروزین آزاد شده در دقیقه به ازای یک میلی‌گرم پروتئین کل موجود در عصاره در پنج روز متوالی در سه تکرار تعیین شد. تمام جدایه‌ها دارای فعالیت پروتئازی بودند و تمام جدایه‌ها در روز پنجم نسبت به روز اول سنجش دارای روند کاهشی در فعالیت ویژه آنزیم بودند (شکل ۲).

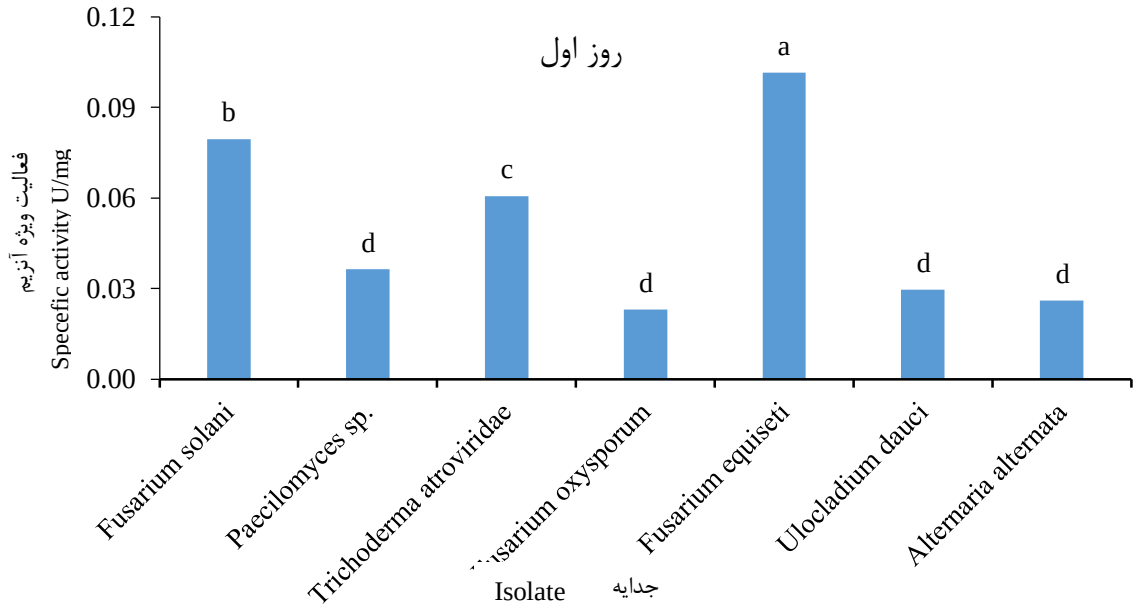
بیشترین و کمترین فعالیت ویژه آنزیم در روز اول به ترتیب در جدایه‌ی *F. equiseti* (۰/۱ واحد بر میلی‌گرم) و جدایه‌ی *F. oxysporum* (۰/۰۲۲ واحد بر میلی‌گرم) به دست آمد (شکل ۳). در روز دوم نیز بیشترین فعالیت ویژه آنزیم به مقدار ۰/۰۸ واحد بر میلی‌گرم در جدایه *Paecilomyces* sp. و کمترین فعالیت ویژه آنزیم به مقدار ۰/۰۱ واحد بر میلی‌گرم در جدایه *U. dauci* مشاهده گردید (شکل ۴). در روز سوم

بیشترین میزان فعالیت ویژه آنزیم مربوط به جدایه‌ی *F. equiseti* و کمترین میزان فعالیت ویژه آنزیم مربوط به *U. dauci* به دست آمد (شکل ۵). در طی روزهای چهارم و پنجم فعالیت ویژه آنزیم در همه جدایه‌ها دارای مقدار تقریباً ثابت و کمتر از روزهای اول تا سوم بود. بنابراین بیشترین میزان فعالیت ویژه آنزیم در روز اول و مربوط به جدایه *F. equiseti* و کمترین میزان فعالیت ویژه آنزیم مربوط به جدایه *U. dauci* در روز چهارم به مقدار تقریبی صفر بود (شکل‌های ۶ و ۷).



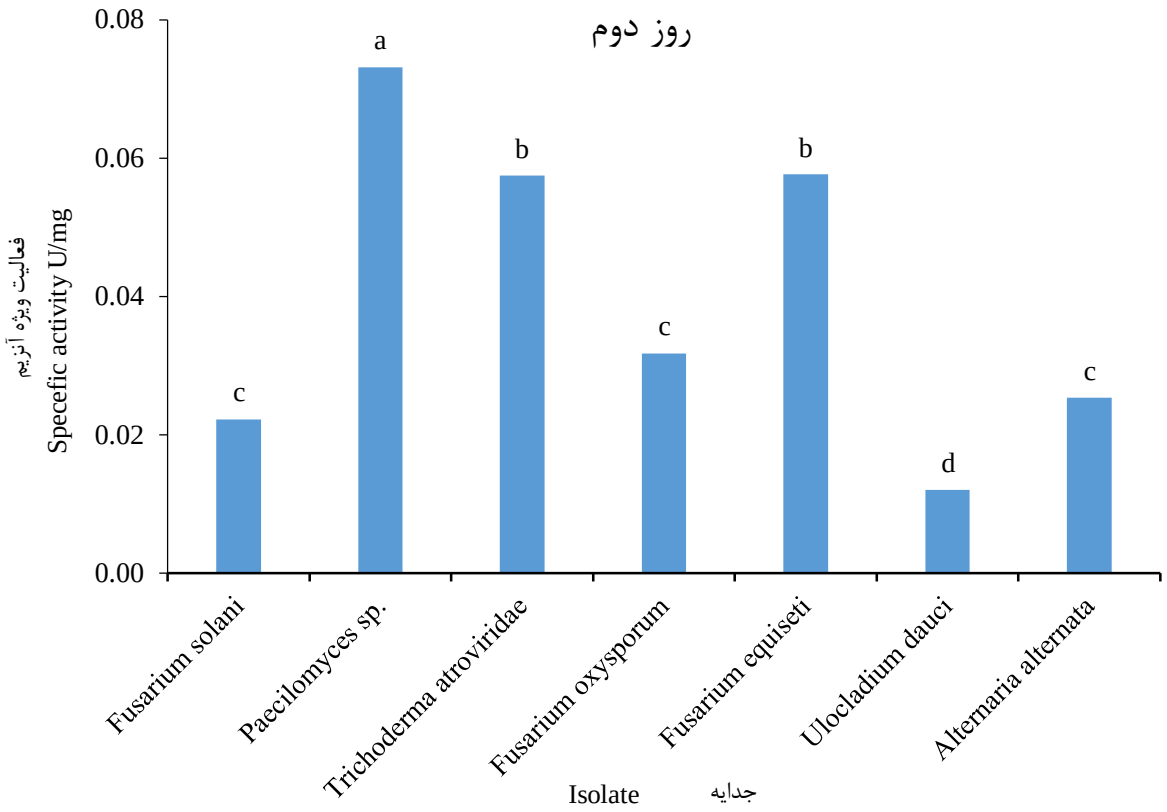
شکل ۲- مقایسه میانگین فعالیت ویژه آنزیم پروتئاز جدایه‌های قارچی در روزهای مختلف

Figure 2- Mean comparison of the protease specific activity of fungal isolates in various days



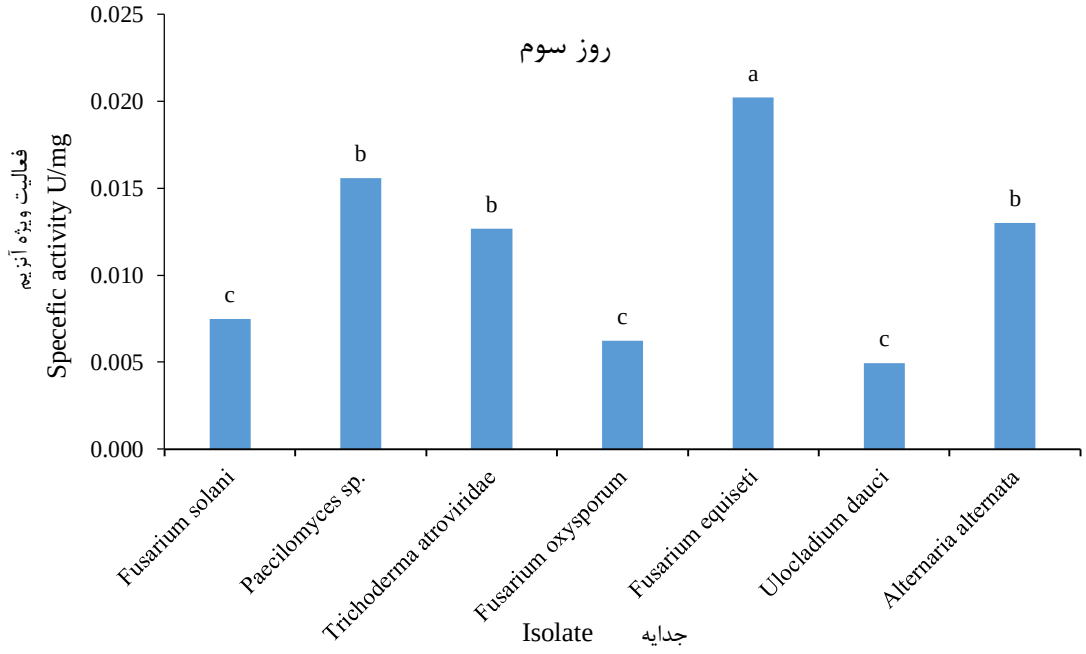
شکل ۳- فعالیت ویژه آنزیم پروتئاز در روز اول رشد قارچ

Figure 3- Protease specific activity of fungal isolates in first day of fungal growth



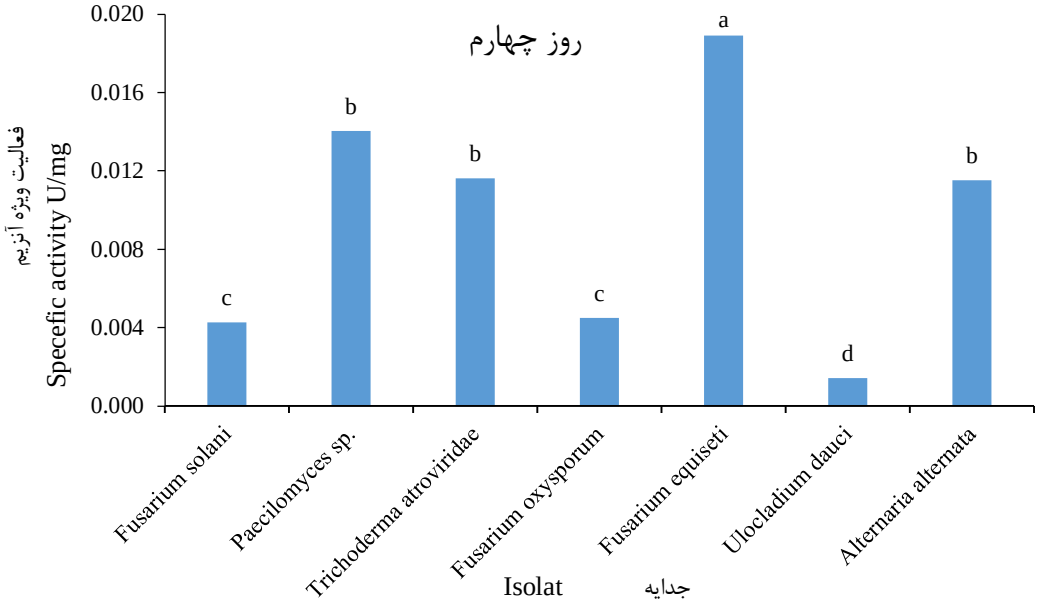
شکل ۴- فعالیت ویژه آنزیم پروتئاز در روز دوم رشد قارچ

Figure 4- Protease specific activity of fungal isolates in second day of fungal growth



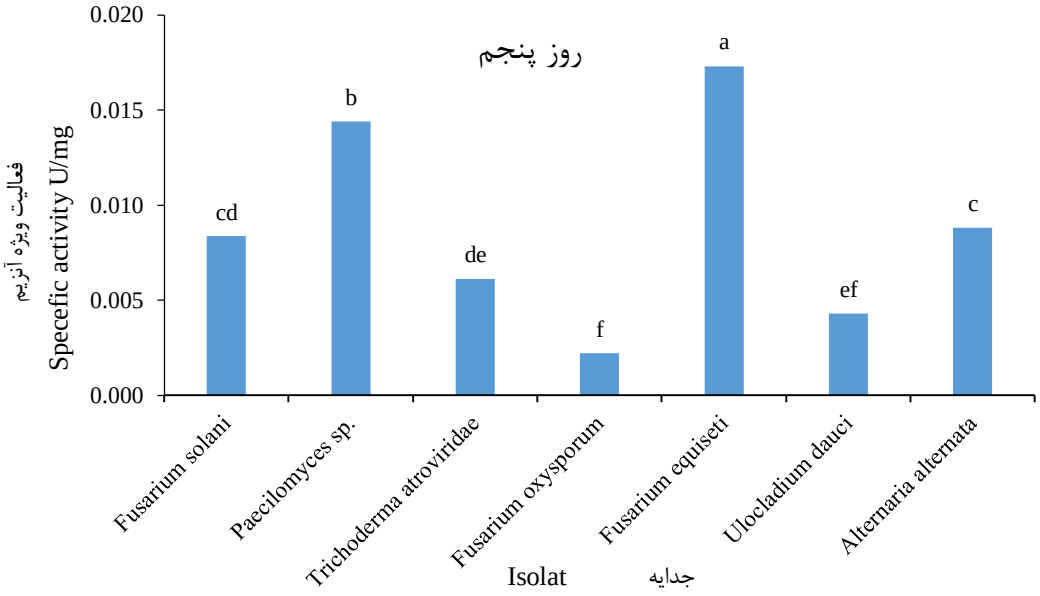
شکل ۵- فعالیت ویژه آنزیم پروتئاز در روز سوم رشد قارچ

Figure 5- Protease specific activity of fungal isolates in third day of fungal growth



شکل ۶- فعالیت ویژه آنزیم پروتئاز در روز چهارم رشد قارچ

Figure 6- Protease specific activity of fungal isolates in fourth day of fungal growth



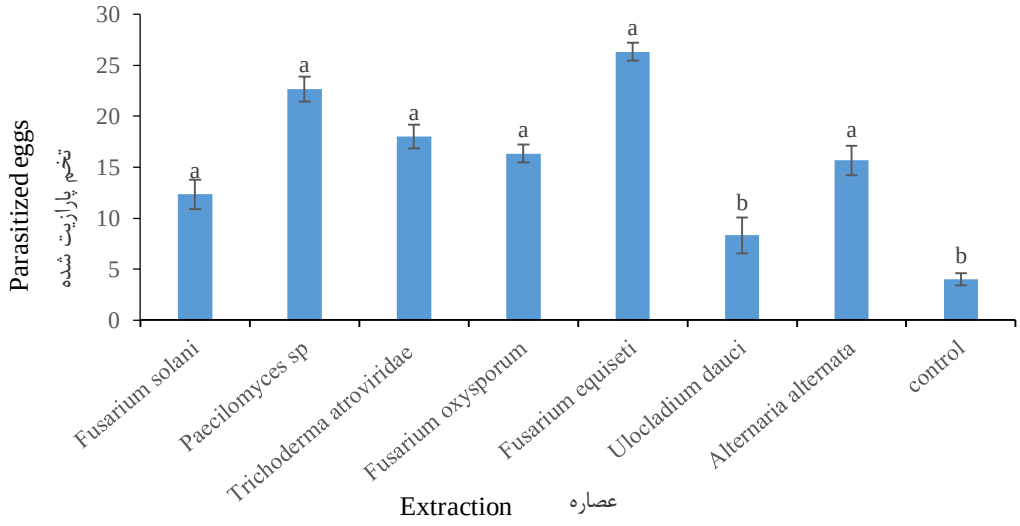
شکل ۷- فعالیت ویژه آنزیم پروتئاز در روز پنجم رشد قارچ

Figure 7- Protease specific activity of fungal isolates in fifth day of fungal growth

نتایج بررسی‌های فعالیت آنتاگونیستی جدایه‌های قارچی در شرایط آزمایشگاه

توانایی فعالیت آنتاگونیستی هفت جدایه‌ی قارچی با بررسی اثر متقابل عصاره قارچی با تخم نماتد در شرایط آزمایشگاه انجام گردید و پس از ۷۲ ساعت، تعداد تخم پارازیته شده (لارو مرده) محاسبه شد. همه‌ی جدایه‌ها دارای قدرت پارازیته‌کنندگی بودند. تولید آنزیم‌های مختلف از جمله پروتئاز توسط برخی جدایه‌های قارچی باتوجه به اهمیت ساختاری پروتئین در حفظ ساختمان تخم نماتدها، باعث کاهش توسعه و ثبات تخم‌ها می‌شود (Benitez *et al.*, 2004). تغییر در نفوذپذیری پوسته تخم نماتدها می‌تواند به مرگ جنین، مهار تفریخ تخم و

کاهش جمعیت نماتد منجر شود (Siddiqui & Shaukat 2003). در مطالعه‌ی Sahebani و Hadavi (۲۰۰۸)، میزان توانایی تولید آنزیم‌ها از جمله پروتئاز قارچی با میزان کاهش تفریخ تخم نماتد دارای ارتباط مثبت بود. براساس نتایج به دست آمده از مقایسه میانگین داده‌ها، جدایه‌ی *F. equiseti* دارای بیشترین قدرت پارازیته‌کنندگی و در واقع بیشترین تعداد تخم پارازیته شده بود و تیمار شاهد که فاقد قارچ آنتاگونیست و فقط دارای تخم نماتد در محیط کشت WA بود کمترین تعداد تخم مرده را داشت. همچنین علاوه بر تیمار شاهد جدایه‌ی *U. dauci* دارای کمترین قدرت پارازیته‌کنندگی بود (شکل ۸). در این بررسی مشخص شد تمام جدایه‌های قارچی مورد آزمون قادرند تخم‌های نماتد را پارازیته کنند. این خصوصیت را به احتمال زیاد می‌توان مرتبط با توانایی ترشح آنزیم‌های پروتئازی توسط قارچ‌های فوق دانست.



شکل ۸- اثر جدایه‌های قارچی علیه *M. javanica* در شرایط آزمایشگاه

Figure 8- The effect of fungal isolates against *M. javanica* in vitro

نتایج بررسی‌های آنتاگونیستی جدایه‌های قارچی در شرایط گلخانه

در پایان دوره ۹۰ روزه رشد نشاء خیار در شرایط گلخانه در حضور متقابل بیمارگر و آنتاگونیست‌ها، فاکتورهای رشدی خیار شامل طول ریشه، وزن تر و خشک ریشه، ارتفاع بوته، تعداد انشعابات ساقه، وزن تر و خشک اندام‌های هوایی، تعداد میوه و وزن میوه اندازه‌گیری گردید. همچنین در این بررسی شاخص‌های تولیدمثلی نماتد شامل تعداد گال، تعداد کیسه تخم و تعداد تخم در گلدان ارزیابی شد. کلونیزاسیون ریشه توسط برخی جدایه‌های قارچی باعث افزایش رشد و توسعه ریشه و تولید محصول، مقاومت به استرس‌های غیرزیستی و افزایش بازده استفاده از مواد مغذی خاک می‌شود (Sharon *et al.*, 2007).

نتایج حاصل نشان داد تمام جدایه‌های مورد آزمون در قیاس با شاهدی که فقط دارای تخم نماتد و فاقد قارچ آنتاگونیست بود در تقابل با بیمارگر توانایی افزایش طول ریشه را داشتند. جدایه *F. equiseti* بیشترین و جدایه *F. solani* کمترین افزایش را در طول ریشه نشان دادند. تمام جدایه‌ها در قیاس با شاهدی که فقط دارای تخم نماتد و فاقد قارچ آنتاگونیست بود در تقابل با بیمارگر باعث افزایش وزن تر و خشک ریشه شدند. جدایه *F. equiseti* بیشترین و جدایه *U. dauci* کمترین افزایش را در وزن تر و خشک ریشه داشتند (جدول ۱). میزان کاهش وزن تر ریشه در شاهد آلوده به تخم نماتد در مقایسه با تیمار شاهد خیار سالم (فاقد

تخم و قارچ)، ۶۳/۳۵ درصد بود در حالی‌که با کاربرد جدایه *F. equiseti* به طور میانگین ۹/۶۱ درصد بود. همچنین وجود تخم نماتد باعث کاهش ۷۹/۰۵ درصدی وزن خشک ریشه خیار در مقایسه با تیمار شاهد خیار سالم (فاقد تخم و قارچ) شد در صورتی‌که در حضور جدایه قارچی *F. equiseti* این میزان ۱۶/۶۷ درصد بود.

تمام جدایه‌های مورد آزمون در قیاس با شاهدی که فقط دارای تخم نماتد و فاقد قارچ آنتاگونیست بود در تقابل با بیمارگر توانایی افزایش ارتفاع بوته را دا شتند. جدایه *F. equiseti* بیشترین و جدایه *F. oxysporum* کمترین افزایش را در ارتفاع بوته نشان دادند. تمام جدایه‌ها در قیاس با شاهدی که فقط دارای تخم نماتد و فاقد قارچ آنتاگونیست بود در تقابل با بیمارگر باعث افزایش تعداد انشعابات ساقه، وزن تر و خشک اندام های هوایی شدند. جدایه *F. equiseti* بیشترین و جدایه *F. oxysporum* کمترین افزایش را هر سه تیمار ذکر شده دا شتند (جدول ۲). در شاهد دارای تخم نماتد و فاقد قارچ آنتاگونیست، وزن تر ساقه ۷۶/۴۵ درصد کاهش یافت که در حضور جدایه *F. equiseti* میزان کاهش وزن تر ساقه ۱۸/۸۵ درصد بود. وزن خشک ساقه در حضور نماتد به میزان ۶۸/۲۲ درصد کاهش یافت در صورتیکه میزان کاهش با کاربرد جدایه‌های ۳۱/۴۱ و ۱۴/۸۵ درصد بود. تعداد ساقه نیز روند مشابهی را نشان داد و به میزان ۶۰/۶۶ در صد با آلوده شدن به نماتد کاهش نشان داد در صورتی‌که جدایه‌ی *F. equiseti* باعث مهار کامل خسارت نماتد روی صفت تعداد انشعابات ساقه شد و از کاهش تعداد انشعابات ساقه جلوگیری نمود.

تیمار جدایه‌های *Paecilomyces* sp. و *U. dauci* به ترتیب دارای بیشترین و کمترین تعداد میوه در گلدان بودند و جدایه *Paecilomyces* sp. باعث بیشترین مقدار افزایش وزن میوه در مقایسه با شاهد دارای تخم نماتد و فاقد قارچ آنتاگونیست شد و جدایه *F. oxysporum* کمترین مقدار افزایش را در وزن میوه نشان داد (جدول ۳). تعداد میوه و وزن میوه در آلودگی با نماتد به ترتیب به میزان ۸۲/۱۴ و ۴۱/۴۴ درصد کاهش یافتند که کاربرد جدایه‌های *Paecilomyces* sp. و *F. equiseti* به ترتیب میزان کاهش خسارت تعداد میوه را به ۱۷/۸۵ و ۲۱/۴۲ درصد و وزن میوه را به ۷/۰۱ درصد رساندند.

در شرایط گلخانه نیز همه‌ی جدایه‌های مورد بررسی دارای فعالیت آنتاگونیستی بودند. مقایسه میانگین صفات ارزیابی شده خیار نشان داد در تمام صفت‌های عملکردی اندازه‌گیری شده در بوته‌ی خیار تیمار جدایه *F. equiseti* دارای بیشترین مقدارها بود و به عنوان برترین جدایه‌های آنتاگونیست در شرایط گلخانه شناخته شد. لازم به ذکر است که در ارتباط با تمام صفات، تیمار شاهد که فقط دارای تخم نماتد و فاقد قارچ آنتاگونیست بود کمترین مقادیر عملکردی را در همه‌ی صفت‌ها دارا بود.

جمعیت گال در هر گلدان در حضور قارچ‌های آنتاگونیست کاهش یافت، جدایه *F. equiseti* کمترین و جدایه *U. dauci* بیشترین تعداد گال، تعداد کیسه تخم و تعداد تخم را در ۱۰۰ گرم خاک دارا بودند (جدول ۴). بین عملکرد میوه خیار با تعداد گال همبستگی منفی وجود داشت به طوری‌که با افزایش تعداد گال، وزن میوه کاهش یافت.

هرچند که بررسی‌های آزمایشگاهی روش مناسبی برای شناسایی مقدماتی میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست محسوب می‌شود ولی بر اساس نتایج آزمایشگاه به طور کامل نمی‌توان مفید بودن یک آنتاگونیست را تعیین کرد، زیرا در آزمایشگاه عموماً اثر یک آنتاگونیست مستقیماً در تقابل با عامل بیماری روی یک محیط غذایی است، در حالی‌که اثر میکروارگانیسم-ها در محیط طبیعی تحت تأثیر عوامل زیادی نظیر دما، اسیدیته، رطوبت، بافت خاک و رفتار سایر میکروارگانیسم‌ها می‌باشد. مثلاً ممکن است یک جدایه-ی آنتاگونیست در شرایط آزمایشگاه روی بیمارگر بسیار مؤثر باشد اما در محیط طبیعی نتواند موفق عمل کند. به همین علت هفت جدایه‌ی منتخب علاوه بر آزمایشگاه در شرایط گلخانه نیز بررسی شدند. نتایج قارچ‌های

آنتاگونیست روی فاکتورهای رشدی خیار در گلخانه نشان داد که در حضور همه‌ی این قارچ‌ها در مقایسه با شاهد میزان بیماری کاهش می‌یابد که Sharon و همکاران (۲۰۰۱) نیز در مطالعات خود به همین نتایج اشاره داشته‌اند. همچنین نتایج بررسی‌های گلخانه در این پژوهش با مطالعه‌ی Abd-Elgawad و Kabeil (۲۰۱۲) که شاخص‌های رشدی در دو کولتیوار گوجه‌فرنگی (Alisa و Super Strain B) آلوده به نماتد *M. javanica* کمتر از گیاه آلوده به نماتد تلقیح شده با جدایه‌های قارچی از جمله *T. atroviridae* و شاهد بود، همسو می‌باشد. همچنین نتایج حاصل از این مطالعه با بررسی‌های Affokpon و همکاران (۲۰۱۱) که توانایی گونه‌های مختلف قارچ *Trichoderma* را روی سبزیجات آلوده به نماتد ریشه‌گرهی را ارزیابی کردند مطابقت داشت. در آن بررسی گیاهان شاهد فاقد قارچ نسبت به گیاهان تیمارشده با جدایه‌های مختلف قارچی دارای وزن ریشه کمتری بودند که نشان‌دهنده قدرت تحریک رشد ریشه توسط برخی جدایه‌های قارچی می‌باشد که مشابه همین نتایج در پژوهش حاضر نیز حاصل شد.

جدول ۱– مقایسه میانگین اثر جدایه‌های قارچی علیه *M. javanica* بر روی صفات مورفولوژی ریشه‌ی خیار

Table 1- Mean comparison of effect of fungal isolates of *M. javanica* on morphological charactristics of cucumber root

جدایه Isolate	طول ریشه Root length (cm)	وزن تر ریشه Fresh weight root (g)	وزن خشک ریشه Dry weight root (g)
Fusarium solani	$8.67^{de}\pm1.33$	$0.90^{cd}\pm0.07$	$0.083^{c}\pm0.007$
Fusarium oxysporum	$10.33^{cd}\pm1.45$	$0.80^{cd}\pm0.11$	$0.087^{c}\pm0.007$
Ulocladium dauci	$9.00^{de}\pm0.58$	$0.68^{d}\pm0.07$	$0.027^{c}\pm0.003$
Alternaria alternata	$13.00^{bc}\pm1.15$	$1.47^{b}\pm0.12$	$0.17^{b}\pm0.021$
Fusarium equiseti	$17.33^{a}\pm0.88$	$2.25^{a}\pm0.24$	$0.547^{a}\pm0.035$
Paecilomyces sp.	$15.33^{ab}\pm0.33$	$1.89^{a}\pm0.11$	$0.537^{a}\pm0.045$
Trichoderma atroviridae	$11.67^{cd}\pm1.2$	$1.21^{bc}\pm0.21$	$0.493^{a}\pm0.041$
Control	$6.00^{e}\pm0.58$	$0.13^{e}\pm0.06$	$0.004^{c}\pm0.001$

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون بر اساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری باهم ندارند.

Means followed by the same letters in each column are not significantly different according to Duncan's multiple range test ($p\leq0.05$).

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر جدایه‌های قارچی علیه *M. javanica* بر روی صفات مورفولوژی اندام‌های هوایی خیار

Table 2- Mean comparison of effect of fungal isolates of *M. javanica* on morphological charactristics of aerial organsof cucumber

جدایه Isolate	ارتفاع بوته Plant height (cm)	تعداد انشعابات ساقه Number of stem bifurcations	وزن تر اندام هوایی Fresh weight shoot (g)	وزن خشک اندام هوایی Dry weight shoot (g)
Fusarium solani	$13.20^{c}\pm0.72$	$7.33^{ab}\pm0.88$	$4.37^{cd}\pm0.43$	$1.04^{d}\pm0.02$
Fusarium oxysporum	$8.10^{d}\pm0.92$	$6.33^{ab}\pm0.33$	$3.64^{de}\pm0.17$	$0.85^{d}\pm0.16$
Ulocladium dauci	$5.50^{e}\pm0.35$	$6.00^{b}\pm0.58$	$3.06^{e}\pm0.23$	$0.44^{e}\pm0.04$
Alternaria alternata	$12.37^{c}\pm1.27$	$7.00^{ab}\pm0.58$	$5.36^{bc}\pm0.29$	$1.14^{cd}\pm0.06$
Fusarium equiseti	$19.17^{a}\pm0.94$	$8.33^{a}\pm0.33$	$7.92^{a}\pm0.41$	$1.87^{a}\pm0.22$
Paecilomyces sp.	$16.10^{b}\pm0.96$	$8.33^{a}\pm0.67$	$8.74^{a}\pm0.59$	$1.66^{ab}\pm0.01$
Trichoderma atroviridae	$14.20^{bc}\pm0.64$	$6.33^{ab}\pm0.88$	$5.80^{b}\pm0.65$	$1.44^{bc}\pm0.1$
Control	$4.74^{e}\pm0.17$	$7.33^{ab}\pm0.88$	$4.37^{cd}\pm0.43$	$0.10^{f}\pm0.01$

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون بر اساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری باهم ندارند.

Means followed by the same letters in each column are not significantly different according to Duncan's multiple range test ($p\leq0.05$).

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر جدایه‌های قارچی علیه *M. javanica* بر روی عملکرد میوه‌ی خیار

Table 3- Mean comparison of effect of fungal isolates of *M. javanica* on yield of cucumber

جدایه Isolate	تعداد میوه Number of fruits	وزن میوه Fruit weight (g)
Fusarium solani	$3.00^{cd}\pm0.58$	$3.59^{ab}\pm0.31$
Fusarium oxysporum	$2.33^{d}\pm0.33$	$1.99^{c}\pm0.14$
Ulocladium dauci	$1.67^{d}\pm0.33$	$2.08^{c}\pm0.14$
Alternaria alternata	$4.00^{c}\pm0.58$	$3.43^{b}\pm0.12$
Fusarium equiseti	$8.00^{a}\pm0.58$	$4.16^{a}\pm0.32$
Paecilomyces sp.	$6.33^{b}\pm0.67$	$4.48^{b}\pm0.29$
Trichoderma atroviridae	$4.33^{c}\pm0.33$	$3.42^{b}\pm0.17$
Control	$0^{e}\pm0$	$0^{d}\pm0$

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری با هم ندارند.

Means followed by the same letters in each column are not significantly different according to Duncan·s multiple range test ($p\leq0.05$).

جدول ۴- مقایسه میانگین اثر جدایه‌های قارچی بر روی جمعیت نماتد *M. javanica* خیار در گلخانه

Table 4- Mean comparison of effect of fungal isolates of *M. javanica* of nematode population in greenhouse of cucumber

جدایه Isolate	تعداد گال Number of nodes	تعداد کیسه تخم Number of egg bags	تعداد تخم Number of eggs
Fusarium solani	$10.00^{bc}\pm1.53$	$4.67^{bc}\pm0.67$	$279.00^{c}\pm13.05$
Fusarium oxysporum	$9.70^{bc}\pm0.33$	$5.00^{b}\pm0.58$	$291.00^{c}\pm11.5$
Ulocladium dauci	$12.00^{ab}\pm0.58$	$6.67^{ab}\pm1.2$	$366.70^{b}\pm4.41$
Alternaria alternata	$10.30^{bc}\pm0.88$	$5.67^{b}\pm0.67$	$297.00^{c}\pm4.51$
Fusarium equiseti	$1.70^{e}\pm0.33$	$1.00^{e}\pm0$	$53.30^{f}\pm8.11$
Paecilomyces sp.	$4.30^{d}\pm0.33$	$2.00^{de}\pm0$	$95.70^{e}\pm3.76$
Trichoderma atroviridae	$8.30^{c}\pm0.33$	$3.00^{cd}\pm0.58$	$248.30^{d}\pm9.17$
Control	$14.00^{a}\pm0.58$	$444.00^{a}\pm17.01$	468.00^{a}

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون بر اساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری باهم ندارند.

Means followed by the same letters in each column are not significantly different according to Duncan·s multiple range test ($p\leq0.05$).

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج به د ست آمده در این پژوهش می‌توان نتیجه گرفت که هر هفت جدایه‌ی قارچی مورد برر سی توانستند در کنترل نماتد ریشه گرهی خیار بسیار موفق عمل کنند و به‌عنوان جدا یه های برتر و موفق آنتاگونیست در کنترل نماتد ریشه گرهی معرفی می‌شوند.

برای کنترل نماتد ریشه گرهی از روش‌هایی مانند تناوب زراعی، استفاده از ارقام مقاوم و کاربرد نماتدکش‌ها استفاده می‌شود، اما استفاده از این روش‌ها در مواردی بسیار پرهزینه و بدون کارایی کافی است. استفاده از سموم نماتدکش نیز به دلیل مضر بودن برای سلامتی انسان و ایجاد آلودگی محیط زیست محدود شده است. مدت زمانی که برای توسعه ارقام مقاوم لازم است و فشار اقتصادی که باعث محدودیت در استفاده از تناوب و روش‌های زراعی دیگر است، موجب انگیزه برای یافتن عوامل بیوکنترل مناسب شده است. مهار زیستی این نماتد توسط قارچ‌های بیوکنترل می‌تواند به عنوان روش جایگزین کنترل شیمیایی مورد استفاده قرار گیرد. بنابراین می‌توان از جدایه‌های معرفی شده در این پژوهش به عنوان عوامل کنترل بیولوژیک مؤثر و موفق، فرمولاسیون مناسبی روی بسترهای مناسب از قبیل دانه گندم یا آرد ذرت تهیه کرد و به صورت فرمول‌های تجاری کارا جهت کنترل نماتد *Meloidogyne javanica* ارائه داد.

References

- Abbasi, Kh. (2017). Evaluation of some enzymatic mechanisms of the fungi involved in biological control on golden cyst nematode attacking potato in Hamedan. Thesis submitted to the University of Bu Ali Sina for the degree of Ph.D in Faculty of Agriculture. 166p. (In Farsi).
- Abd-Elgawad, M. M., & Kabeil, S. S. (2012). Biological control of *Meloidogyne incognita* by *Trichoderma harzianum* and *Serratia marcescens* and their related enzymatic changes in tomato roots. *African Journal of Biotechnology*, 11, 16247-16252.
- Affokpon, A., Coyne, D. L., Htay, C. C., Agbèdè, R. D., Lawouin, L., & Coosemans, J. (2011). Biocontrol potential of native *Trichoderma* isolates against root-knot nematodes in West African vegetable production systems. *Soil Biology and Biochemistry*, 43, 600-608.
- Bamisile, B. S., Akutse, K. S., Siddiqui, J. A., & Xu, Y. (2021). Model application of entomopathogenic fungi as alternatives to chemical pesticides: Prospects, challenges, and insights for next-generation sustainable agriculture. *Frontiers in Plant Science*, 12.
- Benitez, T., Rincon, A. M., Limon, M. C. & Codon, A. C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7, 249–260.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemestry*. 72, 248-254.
- De Marco, J. L., & Felix, C. R. (2002). Characterization of a protease produced by a *Trichoderma harzianum* isolate which controls cocoa plant witches broom disease. BMC biochemistry, 3, 1-7.
- EPPO. (2013). Diagnostic protocols for regulated pests, Globodera rostochiensis and Globodera pallida. *EPPO Bulletin*, 43, 119-138.
- Fabiyi, O. A. (2021). Evaluation of Plant Materials as Root-Knot Nematode (*Meloidogyne incognita*) Suppressant in Okra (Abelmuscous esculentus). *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 86, 51-56.
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews*, 2, 43-56.
- Liu, t., Wang, L., Duan, Y. X., & Wang, X. (2008). Nematicidal activity of culture filtrate of *Beavaria bassiana* against *Meloidogyne hapla*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 113-118.
- Manzanilla-Lopez, R. H., Esteves, I., Fintti-Sialer, M. M., Hirsch, P. R., Ward, E., Devonshire, J., & Hidalgo-Diaz, L. (2013). *Pochonia chlamydosporia*: Advances and challenges to improve its performance as a biological control agent of sedentary endo-parasitic nematodes. *Journal of Nematology, 45*, 1-7.
- Ruanpanun, P., Tangchitsomkid, N., Hyde, K. D., & Lumyong, S. (2010). Actinomycetes and fungi isolated from plant-parasitic nematode infested soils: screening of the effective biocontrol potential, indole-3-acetic acid and siderophore production. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 26, 1569-1578.
- Safari Motlagh, M. R., & Samimi, Z. (2013). Evaluation of *Trichoderma* spp. as biological agents in some of plant pathogens. *Annals of Biological Research, 4*, 173-179.
- Saifullah. & Naqibullah Khan. (2014). Low temperature scanning electron microscopic studies on the interaction of *Globodera rostochiensis* woll and *Trichoderma harzianum* rifai. *Pakistan Journal of Botany*, 46, 357-361.
- Sahebani, N., & Hadavi, N. (2008) Biological control of the root knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. *Soil Biology*

and Biochemistry, 40, 2016-2020.
- Santos, M. C., Esteves, I., Kerry, B., & Abrantes, I. (2013). Biology, growth parameters and enzymatic activity of *Pochonia chlamydosporia* isolates from potato cyst and root-knot nematodes. *Nematology*, 15, 493-504.
- Siddiqui, I. A., & Shaukat, S. S., (2003). Combination of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pochonia chlamydosporia* for control of root – infection fungi in tomato. *Phytopathology*, 151, 215-222.
- Singh, S. & Mathur, N. (2010). In vitro studies of antagonistic fungi against the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Biocontrol Science and Technology*, 20, 275-282.
- Sharon, E., Chet, I., Viterbo, A., Bar-Eyal, M., Nagan, H., Samuels, G. J. (2007).Parasitism of *Trichoderma* on *Meloidogyne javanica* and role of the gelatinous matrix. *European Journal of Plant Pathology*, 118, 247-258.
- Sharon, E., Chet, I., & Spiegel, Y. (2009). Improved attachment and parasitism of *Trichoderma* on *Meloidogyne javanica* in vitro. *European Jornal of Plant Pathology*, 123, 291-299.
- Zhang, Y., Li, S., Li, H., Wang, R., Zhang, K. Q., & Xu, J. (2020). Fungi–nematode interactions: Diversity, ecology, and biocontrol prospects in agriculture. Journal of Fungi, 6, 206
-