Journal of Vegetables Sciences, Autumn & Winter 2025, Vol 8, No 16(2), Pages 51-68

Ilam University

doi: 10.22034/iuvs.2023.2004068.1293 Article Type: Research Online ISSN: 2676-4822

Biological control of tomato root knot nematode (*Meloidogyne javanica*) by some antagonistic fungi

Mahnaz Rangrazan[1], Khadijeh Abbasi[2*], Mazdosht Giti[3]

1- M.Sc student of plant pathology, Department of plant protection, Faculty of agriculture, Ilam university, Ilam, Iran

2- Assistant professor of plant pathology, Department of plant protection, Faculty of agriculture, Ilam university, Ilam, Iran

3- Assistant professor of agriculture and natural resources research and education center of Hamedan, Hamedan, Iran

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

(**Received:** 06 June 2023 **Revise:** 28 June 2023 **Accepted:** 01 July 2023)

Extended Abstract

1. **Introduction:** The root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.), are considered one of the most important plant-damaging nematodes in the world. In the last two decades, with the increasing prohibition of nematicides, the development of biological control agents has become one of the urgent needs to reduce the damage caused by these nematodes. Considering the fresh consumption of tomato and the dangers caused by the residual chemical pesticides in this product and the adverse effects of toxins on human health and the environment, the use of biological control methods, especially nematode antagonist fungi, which can produce some destructive enzymes of nematodes can be considered as an alternative and suitable method to control this diseases. The present study was conducted to evaluate the antagonistic effect of some fungal isolates on the root-knot nematode *in vitro* and in greenhouse conditions. The evaluation was done *in vitro* as the ability to produce lipase enzyme and to calculate the percentage of parasitized eggs, also in greenhouse as the examination of tomato growth factors under the influence of fungal isolates on nematodes in pot The results *in vitro* conditions showed that *Trichoderma atroviride* had the highest amount of lipase enzyme production and also the highest number of parasitized eggs. In greenhouse too, *T. atroviride* isolate had the highest antagonistic effect on tomato root-knot nematode and was introduced as the most successful fungal isolate in reducing damage caused by *Meloidogyne javanica*.
2. **Materials and Methods:** To take samples of crops infected with nematodes, in May, June, and July 2019, plant and soil samples were taken from tomato farms and greenhouses in Kermanshah city. This study has tried to examine the antagonistic ability of seven isolates of five fungal genera including *Fusarium solani*, *F. oxysporum, F. equiseti, Paecilomyces* sp. *Trichoderma atroviride, Ulocladium dauci*, and *Alternaria alternata* on knot-producing nematode *in vitro* and in greenhouse conditions. The ability of the lipase enzyme production of fungal isolates was also evaluated. The lipase specific activity assay in seven isolates of various species of fungi obtained from infected knot-producing nematode over five 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 in a water-agar and the greenhouse by examining the growth factors of tomato 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 an evaluation of the interaction between fungi and eggs. The numbers of healthy and parasitized eggs were calculated after two weeks. The ability of the antagonistic fungi under greenhouse conditions was studied. To provide 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 disks with 5 mm diameter from selected isolates was added in 3 repetitions and was kept at 25 °C and dark conditions. To colonize all of the seeds and to avoid hanging 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 tomato in pot after 50 days. In every two conditions, data analysis ANOVA (Analysis of variance) was conducted using of the SAS software version 9.4 in a completely randomized design (CRD) with three replicates.
3. **Results and Discussion:** Analysis of variance of evaluation results *in vitro* and greenhouse conditions showed significant differences among isolates in 1% level. The results of the data *in vitro* conditions showed that *T. atroviride* had the highest amount of lipase enzyme production and the highest number of parasitized eggs in five consecutive days of measuring specific enzyme activity, while the lowest lipase

enzyme production and number of parasitized eggs were related to *U. dauci* and *A. alternata*. In greenhouse conditions, *T. atroviride* had the highest antagonistic effect against root-knot nematode, with 95%, 61.3%, 99.4%, 47.8% and 45.4% increase root length, fresh weight root, dry weight root, number of stem bifurcations and number of fruit compared to the control, respectively. Also the results showed a twofold increase in plant height, fresh weight shoot and dry weight shoot. There was 41.8% and 48.8% decrease in number of node and the number of eggs per plant, too.

4. **Conclusions:** Results showed there is direct relationship between an increase in plant yield and the addition of fungal isolates to the pot. The results of the antagonistic ability of fungal isolates *in vitro* and in greenhouse showed there is good correlation between the two conditions. So the results showed a positive effect of the fungal isolates in reducing nematode damage. Finally, based on all of the evaluations *T. atroviride* was reported as the most effective isolate ana *A. alternata* and *U. dauci* isolates as the least effective antagonist fungi.

Keywords: Antagonism, Enzyme, Fungal isolate, Lipase.

Citation: Rangrazan, M., Abbasi, K. & Giti, M. (2025). Biological control of tomato root knot nematode (*Meloidogyne javanica*) by some antagonistic fungi. *Journal of Vegetables Sciences*, 16(2), 51-68. doi: 10.22034/iuvs.2023.2004068.1293

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، سال۸ ، دوره ۱۶، شماره۲، پاییز و زمستان ۱۴۰۳، صفحات (۶۸-۵۱)

شاپا الکترونیکی: ۴۸۲۲-۲۶۷۶ نوع مقاله: پژوهشی doi: 10.22034/iuvs.2023.2004068.1293

مهار زیستی نماتد ریشه گرهی گوجه فرنگی (*Meloidogyne javanica*) به وسیله برخی قارچ‌های آنتاگونیست

مهناز رنگرزان[۱]، خدیجه عباسی[۲*]، مزدشت گیتی[۳]

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

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

۳- استادیار، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی همدان، همدان، ایران

*نویسنده مسئول: kh.abasi@ilam.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۱۶ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۴/۰۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۴/۱۰)

چکیده

نماتد عامل ریشه گرهی *Meloidogyne javanica* به عنوان یکی از مهم‌ترین نماتدهای مخرب گیاهی در سطح جهان محسوب می‌شود. به دلیل مضرات ناشی از مصرف سموم شیمیایی در سلامت انسان و محیط زیست، استفاده از روش‌های مهار زیستی خصوصاً قارچ‌های آنتاگونیست که توانایی تولید برخی از آنزیم‌های مخرب نماتدها را داشته باشند می‌تواند به عنوان روشی جایگزین و مناسب برای کنترل این بیماری در نظر گرفته شود. پژوهش حاضر با هدف ارزیابی اثر آنتاگونیستی برخی جدایه‌های قارچی روی نماتد ریشه گرهی گوجه فرنگی در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای انجام گرفت. ارزیابی در شرایط آزمایشگاه به صورت توانایی تولید آنزیم لیپاز و محاسبه درصد تخم پارازیته شده در تقابل نماتد بیمارگر- قارچ آنتاگونیست و همچنین در شرایط گلخانه به صورت بررسی فاکتورهای رشدی گوجه فرنگی شامل: صفات ریخت‌شناسی (طول ریشه، وزن‌تر و خشک ریشه، وزن‌تر و خشک اندام‌های هوایی، تعداد انشعابات ساقه، ارتفاع بوته)، صفات عملکردی (تعداد میوه و وزن میوه در بوته) و صفات تکثیری نماتد (شاخص گال نماتد و تعداد تخم در کیسه تخم) تحت تأثیر جدایه‌های قارچی انجام شد. نتایج داده‌ها در شرایط آزمایشگاه نشان داد گونه‌ی قارچی *Trichoderma atroviride* در پنج روز متوالی اندازه‌گیری فعالیت ویژه آنزیم، دارای بیشترین مقدار تولید آنزیم لیپاز و همچنین بیشترین تعداد تخم پارازیته شده و کمترین تولید آنزیم لیپاز و تعداد تخم پارازیته شده مربوط به جدایه‌های قارچی *Ulocladium dauci* و *Alternaria alternata* بود. در شرایط گلخانه نیز قارچ *T. atroviride* در قیاس‌با شاهد آلوده‌به ترتیب‌با افزایش ۹۵، ۶۱/۳ و ۹۹/۴ درصدی در طول ریشه، وزن تر و وزن خشک ریشه، با افزایش دو برابری در ارتفاع بوته نسبت به شاهد، افزایش دو برابری در وزن تر و خشک اندام‌های هوایی بوته و ۴۷/۸ درصد افزایش در تعداد ساقه، افزایش ۴۵/۴ درصدی در وزن میوه و افزایش دو برابری در تعداد میوه گوجه‌فرنگی نسبت به شاهد و همچنین به ترتیب با کاهش ۴۱/۸ و ۴۸/۸ درصد در جمعیت گال نماتد و تعداد تخم نماتد در بوته، دارای بالاترین اثر آنتاگونیستی علیه نماتد عامل ریشه گرهی بود و به عنوان موفق‌ترین جدایه‌ی قارچی و جدایه‌های *U. dauci* و *A. alternata* به‌عنوان کم اثرترین جدایه‌ها در کاهش خسارت ناشی از نماتد ریشه‌گرهی گوجه فرنگی معرفی می‌گردند.

واژه‌های کلیدی: آنتاگونیستی، آنزیم، جدایه قارچی، لیپاز.

استناد: رنگرزان، م.، عباسی، خ. و گیتی، م. (۱۴۰۳). مهار زیستی نماتد ریشه گرهی گوجه فرنگی (*Meloidogyne javanica*) به وسیله برخی قارچ‌های آنتاگونیست. *علوم سبزی‌ها*، ۱۶(۲)، ۶۸-۵۱.

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 بیمارگرهای مهم خاک هستند که اغلب محصولات گیاهی را مورد هجوم قرار می‌دهند (Piripour *et al.*, 2022). گوجه‌فرنگی یکی از محصولات گرمسیری مهم خانواده سیب‌زمینی در بیشتر مناطق دنیا می‌باشد (Azarmi, 2019). نماتد مولد گره ریشه *Meloidogyne* spp. یکی از مهم‌ترین نماتدهای انگل گیاهی از نظر خسارت به طیف وسیعی از محصولات کشاورزی از جمله گوجه‌فرنگی است (Jones *et al.*, 2013). پراکندگی جهانی، دامنه وسیع میزبانی و تعامل با سایر بیمارگرهای گیاهی، این نماتد را به عنوان یکی از عوامل مهم خسارت‌زا که تأمین غذای جهان را تهدید می‌کند مطرح کرده است (Castagnone-Sereno *et al.*, 2013). از بین نماتدهای عامل ریشه گرهی، گونه‌ی *M. javanica* دارای پراکنش جهانی است و در تمام مناطق دنیا وجود دارد. این نماتد دومین گونه معمول در جهان است که در ایران از نظر فراوانی و پراکندگی در درجه اول اهمیت قرار دارد (Mahdikhani Moghadam *et al.*, 2003). نماتدهای ریشه گرهی باعث ایجاد گال روی ریشه، ضعف، کاهش رشد و پژمردگی در اندام‌های هوایی می‌شوند. چهار گونه نماتد *Meloidogyne arenaria*، *M. hapla*، *M. incognita* و *M. javanica* از اهمیت بیشتری برخوردارند (Perry *et al.*, 2009). در کنترل نماتدهای انگل گیاهی، استفاده از ارقام مقاوم، روش‌های زراعی از جمله آیش، غرقاب، تناوب زراعی، گیاهان تله و همچنین استفاده از سموم شیمیایی مطرح است که در اغلب موارد بعضی از این روش‌های کنترل کارایی لازم را ندارد. به دلیل مضرات ناشی از مصرف سموم شیمیایی در سلامت انسان و محیط زیست، روش مناسب جایگزین برای این امر، کنترل به وسیله عوامل آنتاگونیستی مطرح شده است و از این روش به عنوان یک روش عملی و امیدبخش یاد می‌شود (Ahun Manesh, 2006). نماتدهای انگل گیاهی مورد هجوم بسیاری از دشمنان طبیعی قرار می‌گیرند که یکی از این عوامل زیستی، گونه‌های مختلف قارچ‌های آنتاگونیست هستند (Zhang *et al.*, 2020).

بررسی‌ها نشان داده که پوسته تخم نماتدهای ریشه‌گرهی شامل پروتئین، کیتین و لیپید می‌باشد.گونه‌های قارچ تریکودرما به علت دارا بودن آنزیم‌های هیدرولیز کننده کیتیناز، پروتئاز، لیپاز و ۱و۳ گلوکاناز قادر به تخریب پوسته تخم نماتد می‌باشند. در پژوهشی ۱۵ جدایه از پنج گونه از قارچ تریکودرما در رابطه با فعالیت‌های آنزیمی این قارچ برای مهار زیستی این نماتد روی گوجه فرنگی در گلخانه مورد بررسی قرار گرفتند که بیشترین ضریب همبستگی بین فعالیت آنزیم و فاکتور تولید مثل مربوط به دو آنزیم کیتیناز و پروتئاز و کمترین همبستگی مربوط به آنزیم لیپاز بود (Kavari, 2014). نتایج بررسی‌های Sohrabi و همکاران (2015) حاکی از آن بود که فعالیت آنزیم کیتیناز در گیاهان میکوریزی نسبت به شاهد بالاتر بود و دو هفته بعد از تلقیح به حداکثر میزان خود رسید. همچنین حداکثر فعالیت آنزیم در گیاهان تلقیح شده با قارچ میکوریز و نماتد ریشه گرهی، در روز چهارم بعد از مایه‌زنی نماتد مشاهده گردید. در مجموع نتایج نشان دهنده افزایش فعالیت آنزیم کیتیناز در ریشه گیاهان تیمار شده با قارچ میکوریز در مقایسه با گیاهان غیرمیکوریزی بود و حمله نماتد در حضور قارچ میکوریز افزایش بیشتری در فعالیت کیتیناز ایجاد کرد. بررسی‌های Badakhshan و همکاران (۲۰۱۷) نشان داد در تیمار ترکیبی *Trichoderma virens* و جدایه *Bacillus subtilis*، مرگ و میر لارو سن دو و عدم تفریخ تخم نماتد به ترتیب به میزان ۵ و ۱/۵ برابر نسبت به شاهد در شرایط آزمایشگاه افزایش یافت. نتایج بررسی‌های Abu Torabi و Naraghi (2016) در خصوص ارزیابی اثر آنتاگونیستی *Talaromyces flavus* و *Trichoderma harzianum* در کنترل نماتد ریشه‌گرهی (*Meloidogyne javanica*) روی گیاه گوجه‌فرنگی حاکی از آن بود که بین تیمارهای آزمایشی، کمترین تعداد تخم و جمعیت نماتد متعلق به

بوته‌های تیمار شده با ترکیب دو گونه قارچ آنتاگونیست بود که اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد آلوده در سطح احتمال پنج درصد نشان داد و به طور میانگین، جمعیت نماتد را تا ۸۰ درصد کاهش داد. در بررسی نقش هر یک از قارچ‌ها به‌تنهایی، *T. harzianum* و *T. flavus* به ترتیب، باعث ۷۸ و ۶۷ درصد کاهش جمعیت نماتد شدند. در پژوهش Albehadeli و همکاران (2019) تحت عنوان امکان مهار زیستی *M. javanica* با استفاده از قارچ *T. harzianum* تحت شرایط گلخانه نتایج نشان داد جدایه‌های قارچی مورد بررسی، شدت بیماری و تعداد گال در ریشه را کاهش می‌دهد.

با توجه به اینکه ترکیب غالب پوسته تخم در نماتدهای ریشه گرهی را پروتئین، کیتین و لیپید تشکیل می‌دهند و از آن‌جایی که آنزیم‌های تجزیه کننده این ترکیبات در دامنه وسیعی از موجودات از جمله قارچ¬ها وجود دارند. در این پژوهش تلاش شده پتانسیل قابل توجه لیپازهای قارچی و نقش آنتاگونیستی آن‌ها علیه نماتد عامل ریشه گرهی گوجه فرنگی مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

شناسایی گونه‌ی نماتد عامل ریشه‌گرهی

به منظور نمونه‌برداری از مزارع آلوده به نماتد، در ماه‌های اردیبهشت، خرداد و تیر ماه ۱۳۹۹ از مزارع و گلخانه‌های کشت گوجه‌فرنگی در سطح شهرستان کرمانشاه که مشکوک به آلودگی به نماتد بودند، نمونه‌های گیاهی و خاک آلوده به نماتد *Meloidogyne* spp. جمع‌آوری شد. پس از انتقال به آزمایشگاه، ریشه‌های آلوده با آب معمولی شسته شدند و پس از قطعه قطعه کردن ریشه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در آب قرار داده شدند. سپس کیسه‌های تخم چسبیده به گال‌های ریشه جمع آوری شدند و در میکروتیوب به دمای چهار درجه سلسیوس منتقل شدند. عملیات استخراج، کشتن و تثبیت نماتد از خاک با استفاده از روش De Grisse (1969) انجام گرفت. جهت دستیابی به نماتد ماده بالغ پس از شستشوی ریشه آلوده گوجه-فرنگی، جداسازی نماتد از سطح ریشه به کمک بینوکولر صورت گرفت. پس از جداسازی، شناسایی ماده‌ها بر اساس برش از شبکه کوتیکولی انتهای بدن نماتد ماده (Prennial pattern) صورت گرفت و با استفاده از کلید شناسایی Eisenback و Triantaphyllou (۱۹۸۱) و منابع مربوطه (Rusinque *et al.*, 2018) گونه‌ی جمعیت مورد مطالعه تشخیص داده شد. استخراج تخم نیز با استفاده از روش Huusey و Barker (1973) صورت گرفت

تهیه جدایه‌های قارچی

تعداد هفت جدایه از گونه‌های مختلف قارچی شامل: *Fusarium solani*، *Fusarium oxysporum* (IRAN 2830C)، *Paecilomyces* sp. (IRAN 2832C)، *equiseti*، *Trichoderma atroviride* (IRAN 2828C)، *Ulocladium dauci* (IRAN 2829C) و *Alternaria alternata* (IRAN 2833C) که کارایی مهار زیستی آن ها روی نماتد سیست طلایی سیب‌زمینی مورد بررسی قرار گرفته بود از کلکسیون قارچ‌های زنده ایران- مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی- بخش رستنی‌ها تهیه شد (Abbasi, 2017).

ارزیابی فعالیت آنتاگونیستی جدایه‌های قارچی در شرایط آزمایشگاه

جهت بررسی تأثیر عصاره محیط کشت القا کننده لیپاز بر میزان کاهش تفریخ تخم نماتد در آزمایشگاه، ۱۵ میلی لیتر از سوسپانسیون حاوی ۱۰۰ عدد تخم نماتد و ۳۰ میلی لیتر محلول عصاره محیط کشت حاصل از کشت هر کدام از جدایه ها روی محیط مایع القا کننده لیپاز درون تشتک پتری ریخته و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس (دمای بهینه ی فعالیت آنزیم) قرار داده شد و نهایتاً تعداد تخم پارازیته شده ارزیابی گردید. در نمونه‌های شاهد، از آب مقطر سترون به جای عصاره‌ی آنزیمی استفاده شد. آزمایش در سه تکرار برای هر جدایه‌ی قارچی و نمونه شاهد (دارای لارو

سن دو نماتد و فاقد هرگونه قارچ) در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت و میانگین داده‌ها با استفاده از

ارزیابی فعالیت آنتاگونیستی جدایه‌های قارچی در شرایط گلخانه

به منظور تعیین فعالیت آنتاگونیستی هفت جدایه‌ی قارچی مذکور علیه نماتد ریشه‌گرهی گوجه‌فرنگی، آزمایشی در شرایط گلخانه به صورت طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه تحقیقاتی سازمان جهاد کشاورزی استان کرمانشاه انجام شد. تیمارهای آزمایش هشت تیمار شامل هفت جدایه‌ی قارچی و تیمار شاهد (دارای لارو سن دو نماتد و فاقد هرگونه قارچ) بودند. این بررسی با آغشته‌سازی خاک و ریشه گوجه‌فرنگی با نماتد بیمارگر و قارچ‌های آنتاگونیست انجام گرفت.

برای تکثیر جدایه‌های قارچی، مقدار ۲۰ گرم بذر گندم خیس خورده در درون نایلون قابل اتوکلاو ریخته شد و به ازاء هر گرم بذر، دو میلی لیتر آب مقطر افزوده شده و سه بار طی مدت ۴۸ ساعت اتوکلاو شدند. سپس به هر نایلون، تعداد چهار دیسک قارچی به قطر پنج میلی‌متر از جدایه‌های منتخب در سه تکرار اضافه گردید و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی نگهداری شدند. جهت کلونیزه شدن همه بذور و همچنین جلوگیری از به‌هم چسبیدن آن‌ها به فاصله ۴۸ ساعت یک بار اقدام به‌هم زدن نایلون‌های حاوی بذور گردید. در نهایت پس از گذشت سه هفته، کلیه بذور توسط جدایه های قارچی آلوده شده و آماده استفاده در گلدان جهت آزمون گلخانه گردیدند.

برای کاشت از بذر گوجه‌فرنگی محلی کرمانشاه که از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه تهیه شده بود استفاده شد. بذور گوجه‌فرنگی در گلدان پلاستیکی دو کیلویی با زهکش مناسب با قطر دهانه ۱۷۰ میلی‌متر که با مخلوطی از رس و ماسه سترون و خاک‌برگ به نسبت ۱:۱:۲ پر شده بود کشت گردید. خاک مورد نظر را ابتدا غربال کرده و سپس با استفاده از اتوکلاو سترون گردید. در مرحله نشاء (سه تا چهار برگی)، جهت مایه‌زنی جدایه‌های قارچی آنتاگونیست به بوته‌ها، مایه تلقیح قارچ به میزان ده آزمون دانکن، در سطح احتمال پنج درصد با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.4 مورد مقایسه قرار گرفتند.

درصد به خاک سطحی گلدان‌ها افزوده و با آن‌ها مخلوط گردید. بعد از گذشت ده روز، سوسپانسیونی از تخم نماتد تهیه و در هر گلدان به ازای هر کیلوگرم ۱۰۰۰ تخم نماتد استفاده شد. به این صورت که در فاصله دو سانتی¬متری طوقه‌ی هر بوته، سه سوراخ با فواصل یکسان از یکدیگر به عمق پنج سانتی‌متر ایجاد و با استفاده از یک پیپت شیشه‌ای، سوسپانسیون تخم نماتد به داخل سوراخ‌های ایجاد شده در گلدان‌ها اضافه گردید و آبیاری به طور مرتب صورت گرفت.

پس از گذشت ۵۰ روز از مایه زنی نماتد به بوته‌های گوجه فرنگی، اندازه‌گیری شاخص¬های بیماری‌زایی نماتد شامل شاخص گال و تعداد تخم درون هر کیسه تخم در ۱۰۰ گرم خاک اطراف ریشه به روش Sasser (۱۹۸۹) تعیین گردید. همچنین صفات ریخت شناسی ریشه شامل طول ریشه برحسب سانتی‌متر، وزن تر و خشک ریشه بر حسب گرم در بوته، صفات ریخت‌شناسی اندام‌های هوایی شامل ارتفاع بوته بر حسب سانتی‌متر، وزن تر و خشک اندام‌های هوایی بر حسب گرم در بوته، تعداد انشعابات ساقه، همچنین صفات عملکردی گوجه‌فرنگی شامل تعداد میوه در بوته و وزن میوه بر حسب گرم در بوته در تیمارهای مربوطه مورد ارزیابی قرار گرفت. برای اندازه‌گیری طول ریشه و ارتفاع بوته از خط کش اندازه‌گیری و برای وزن تر و خشک ریشه و وزن تر و خشک اندام‌های هوایی و همچنین وزن میوه از ترازوی دیجیتال مدل MH-639 با دقت ۰/۰۱ گرم استفاده شد. در این مدت گلدان‌ها در دمای ۲±۲۸ درجه سلسیوس و حداقل هشت ساعت نوری در روز قرار گرفتند.

در همه‌ی تیمارها، تأثیر مثبت تیمارهای قارچی آنتاگونیست بر بیماری ریشه گرهی گوجه‌فرنگی به صورت محاسبه درصد افزایش صفات رشدی و عملکردی بوته گوجه‌فرنگی و کاهش شاخص‌های تکثیری نماتد در حضور قارچ‌های آنتاگونیست در

قیاس با شـــاهد آلوده به نماتد بیمارگر نیز انجام شـــد. همچنین همبســـتگی بین صـــفات ریخت‌شـــناســـی گوجه‌فرنگی با همدیگر و همبســـتگی بین صـــفات تکثیری نماتد بیمارگر با صفات عملکردی گوجه فرنگی مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. هر کدام از آزمایش‌ها در سه تکرار و بر پایه‌ی طرح کاملاً تصادفی انجام گردید. تجزیه واریانس داده‌ها با اســـتفاده از نرم‌افزار SAS 9.4 و مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

بررسی فعالیت آنزیم لیپاز در جدایه‌های قارچی

تولید و القا آنزیم

به منظور القای تولید آنزیم لیپاز توسط جدایه‌های قارچی، از محیط کشت اصلاح شده Reese (1976) به همراه دو درصد روغن زیتون استفاده گردید. محیط مورد نظر شامل دو گرم KH2PO4، 4/1 گرم (NH4)2SO4، 3/0 گرم MgSO4.7H2O، ۰/۳ گرم CaCl2 و ۰/۳ گرم اوره می‌باشد. ۳۰۰ میلی لیتر از محیط کشت مورد نظر درون ارلن‌های شیشه ای یک لیتری ریخته شد و سپس اتوکلاو گردید. پس از سرد شدن محیط کشت های مذکور، به هر یک از ارلن‌ها ۲×۱۰^{۶} اسپور در میلی لیتر از هر جدایه قارچی مایه‌زنی گردید و در نهایت ارلن‌های مورد نظر به مدت ۹۶ ساعت روی شیکر انکوباتوردار مدل KS 4000 ic control آلمان با سرعت ۱۵۰ دور بر دقیقه و در دمای ۱±۲۹ سلسیوس قرار داده شد. پس از گذشت ۹۶ ساعت، محیط کشت مورد نظر به درون لوله های سانتریفیوژ سترون منتقل شده و به مدت ده دقیقه با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس فاز رویی را برداشته و با استفاده از کاغذ واتمن شماره یک صاف و از آن جهت استفاده به عنوان منبع آنزیم در سنجش آنزیمی استفاده شد. محلول آنزیمی تا زمان استفاده جهت سنجش آنزیمی، در دمای منفی ۲۰ درجه سلسیوس نگه‌داری گردید.

سنجش فعالیت ویژه آنزیم

در این سنجش، جهت رسم منحنی استاندارد از غلظت های مختلف اولئیک اسید (۰/۱ تا یک میلی‌لیتر از اولئیک اسید ۲۵ میلی‌مولار) استفاده شد. ترکیب واکنش جهت سنجش آنزیمی لیپاز شامل پنج میلی لیتر بنزن، یک میلی‌لیتر معرف استات مس پنج درصد، ۰/۳ میلی‌لیتر از امولسیون پنج درصد روغن زیتون و تریتون ۱۰۰ در بافر ۵۰ میلی‌مولار سدیم فسفات به همراه یک میلی‌لیتر از عصاره آنزیمی به دست آمده از مرحله قبل می‌باشد. ترکیب مورد نظر به مدت ده دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد و در نهایت واکنش با سانتریفیوژ با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت پنج دقیقه متوقف گردید. پس از آن میزان جذب برای هر نمونه با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۱۰ نانومتر اندازه گیری شد. در نمونه‌ی شاهد از آب مقطر سترون به‌جای 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 (1976) برای تمام جدایه‌ها تعیین گردید.

آزمایش در سه تکرار برای هر جدایه در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت و میانگین داده‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.4 مقایسه شدند. قبل از انجام تجزیه واریانس، نرمال بودن توزیع داده‌ها به کمک آزمون‌های شاپیرو-والک مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج و بحث

شناسایی گونه نماتد

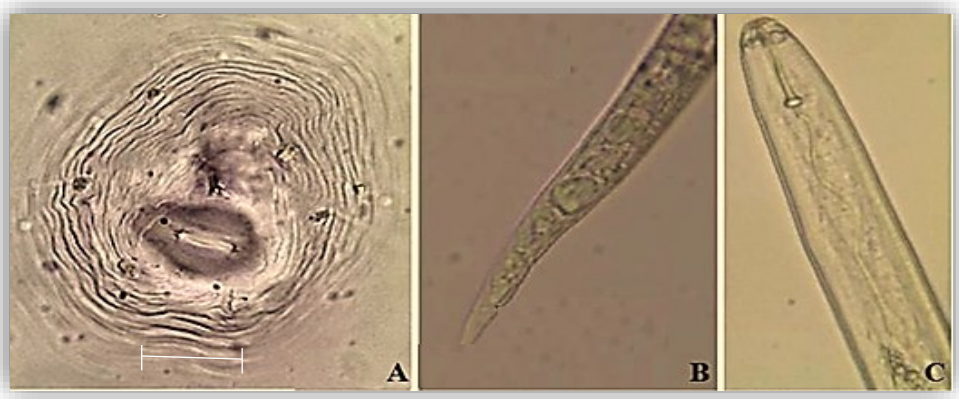
با بررسی خصوصیات ریخت‌شناسی لارو سن دو، نر و ماده نماتد، جمعیت مورد مطالعه گونه *M. javanica* تشخیص داده شد.

ماده: ماده های بالغ گرد تا گلابی شکل، گردن مشخص، شیری رنگ، سر هم‌طراز با بدن با کلاهک مشخص، شبکه کوتیکولی سر با رشد متوسط، استایلت باریک و قسمت مخروطی آن به طرف پشتی خمیده می باشد.

گره های استایلت تقریباً گرد و با طول ۱/۲ تا ۲/۲ و عرض ۳ تا ۳/۶ میکرومتر، حباب میانی مری بزرگ، گرد تا بیضی شکل و دارای دریچه هلالی شکل بزرگ با طول ۱۴ تا ۱۵/۵ و عرض ۸/۵ تا ده میکرومتر در مرکز، فرج و مخرج نزدیک به هم و در انتهای بدن، شبکه کوتیکولی انتهای بدن گرد تا بیضی شکل کمان پشتی گرد و باریک تا کمی بلند شیارها موج دار تا صاف، ممتد یا شکسته، انتهای دم غالباً مشخص و خطوط سطوح جانبی بدن به طور مشخص شبکه کوتیکولی انتهای بدن را به دو قسمت پشتی و شکمی تقسیم می‌کنند و فاسمیدها کمی بالاتر از مخرج و در طرفین آن قرار دارند. پوست دارای شیارهای عرضی، منفذ دفعی ترشحی جلوتر از حباب میانی مری و غالباً بعد از انتهای استایلت قرار دارد. دستگاه تناسلی دارای دو لوله جنسی در هم پیچیده که به طرف جلوی بدن کشیده شده است.

لارو سن دو: کرمی شکل با بدنی کوچک و باریک که پس از تثبیت شدن به صورت کشیده یا کمی خمیده در می‌آیند پوست با شیارهای عرضی ظریف و سطوح جانبی با چهار شیار طولی، سر هم‌طراز بدن، استایلت باریک به طول ۹ تا ۱۲ میکرومتر، گره‌های استایلت گرد، دم مخروطی شکل و انتهای آن به طور ظریفی گرد شده با طول ۴۷ تا ۵۱ میکرومتر و هیالین به طول ۹-۱۳ میکرومتر است (شکل ۱).

نر: نماتد نر کرمی شکل به طول ۸۹۰ تا ۱۲۷۰ میکرومتر، دارای شبکه کوتیکولی سر قوی و استایلت رشد کرده به طور ۲۵-۲۷ میکرومتر و همچنین دم کوتاه و گرد بوده و آلت نرینگی در انتهای آن واقع شده است.



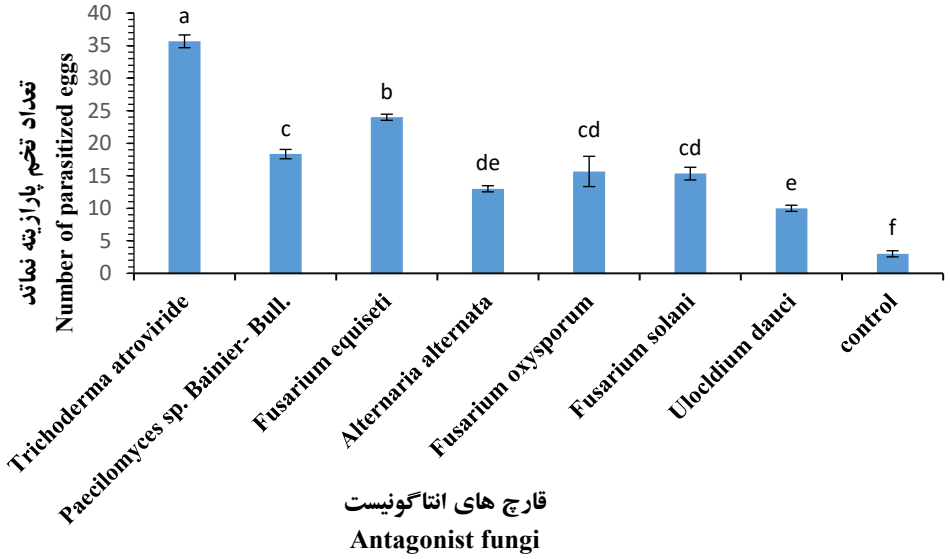
شکل ۱- نمایی از نماتد ریشه‌گرهی (*M. javanica*) در گوجه فرنگی (A: انتهای بدن سیست، B: دم لارو سن دو، C: سر و استایلت لارو سن دو)

Figure 1- The root knot nematode (*M. javanica*) in tomato, A:Perineal pattern, B: Tail of nematode, C: Head and stylet of nematode (10 micrometer scale)

ارزیابی اثر آنتاگونیستی جدایه‌های قارچی علیه نماتد 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 محاسبه شد. همه‌ی جدایه‌ها دارای قدرت پارازیته‌کنندگی بودند. بیشترین تعداد تخم پارازیته شده مربوط به قارچ *T. atroviride* (۳۵/۶۷ عدد) و بعد از شاهد قارچ‌های *U. dauci* (۱۰ عدد) و *A. alternata* (۱۲ عدد) پائین‌ترین تعداد تخم پارازیته شده را داشتند (شکل ۲).

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 لیپازی توسط قارچ‌های مزبور دانست.



شکل ۲- اثر جدایه‌های قارچی روی تعداد تخم‌های پارازیته شده نماتد ریشه گرهی (*M. javanica*) در شرایط آزمایشگاه

Figure 2- The fungal effect on the number of parasitized eggs of root-knot nematode (*M. javanica*) *in vitro*

ارزیابی اثر آنتاگونیستی جدایه‌های قارچی علیه نماتد در شرایط گلخانه

در شرایط گلخانه، ۵۰ روز پس از آلوده‌سازی بوته گوجه‌فرنگی و تقابل قارچ آنتاگونیست- نماتد بیمارگر، صفات ریخت‌شناسی (شامل: طول ریشه، وزن‌تر و خشک ریشه در بوته، ارتفاع بوته، وزن تر و خشک اندام-های هوایی در بوته، تعداد انشعابات ساقه) و صفات عملکردی گوجه‌فرنگی (شامل: تعداد میوه در بوته و وزن میوه در بوته) و صفات تکثیری نماتد (شامل: شاخص تعداد گال نماتد در گلدان و تعداد تخم در هر کیسه تخم) مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج حاصل نشان داد تمام جدایه‌های قارچی مورد آزمون در قیاس با شاهد که فقط دارای لارو سن دو نماتد و فاقد هر گونه قارچ آنتاگونیست بود در تقابل با بیمارگر، توانایی افزایش طول ریشه در گوجه فرنگی را داشتند. جدایه‌های *Fusarium equiseti* و *T. atroviride* به ترتیب با طول ۱۶/۵۳ و ۱۵/۰۷ سانتی‌متر بیشترین و جدایه‌های *A. alternata* و *U. dauci* به ترتیب با طول ۸/۰۱ و ۸/۱۰ سانتی‌متر کمترین افزایش را در طول ریشه نشان دادند. میزان طول ریشه در شاهد آلوده به نماتد ۷/۷۳ سانتی‌متر بود در حالی‌که جدایه‌های *F. equiseti* و *T. atroviride* به ترتیب به میزان تقریباً یک و نیم برابر و ۹۵ درصد باعث افزایش طول ریشه شدند (جدول ۱).

در صفات وزن تر و خشک ریشه، تمام جدایه‌ها در قیاس با شاهد در تقابل با بیمارگر باعث افزایش وزن تر و خشک ریشه شدند. جدایه *T. atroviride* (به ترتیب ۱۲/۱۸، ۳/۳۹ گرم در بوته) بیشترین و جدایه‌های *A. alternata* (به ترتیب ۷/۸۵، ۱/۹۵ گرم در بوته) و *U. dauci*(به ترتیب ۷/۸۰، ۱/۹۳ گرم در بوته) کمترین افزایش را در وزن تر و خشک ریشه داشتند. میزان وزن تر و خشک ریشه در شاهد آلوده ۷/۵۵ و ۱/۷۲ گرم در بوته بود در حالی‌که با کاربرد جدایه‌ی *T. atroviride* به ترتیب ۶۱/۳ و ۹۹/۴ درصد افزایش در وزن تر و خشک ریشه مشاهده شد (جدول ۱).

در صفت ارتفاع بوته، تمام جدایه‌های مورد آزمون در قیاس با شاهد در تقابل با بیمارگر توانایی افزایش ارتفاع بوته را داشتند. جدایه *T. atroviride* (۳۹/۳۸ سانتی‌متر) بیشترین و جدایه *A. alternata* (۱۶/۷۰ سانتی‌متر) کمترین افزایش را در ارتفاع بوته نشان دادند. ارتفاع بوته در شاهد به میزان ۱۲/۲۰ سانتی‌متر اندازه‌گیری شد در صورتی‌که کاربرد جدایه آنتاگونیست *T. atroviride* باعث افزایش دو برابری در ارتفاع بوته گوجه‌فرنگی نسبت به شاهد آلوده گردید (جدول ۲).

جدول ۱-مقایسه میانگین اثر جدایه‌های قارچی روی صفات ریخت‌شناسی ریشه گوجه‌فرنگی آلوده به نماتد *M. javanica*

Table 1- Mean comparison of fungal effect on isolates based on morphological features of tomato root inoculated with *M. javanica*

جدایه‌های قارچی Fungal isolates	طول ریشه Root length (cm)	وزن تر ریشه Fresh weight root (g)	وزن خشک ریشه Dry weight root (g)
Trichoderma atroviride	15.07^{ab}	12.18^{a}	3.39^{a}
Paecilomyces sp.	14.35^{ab}	11.35^{a}	3.12^{a}
Fusarium equiseti	16.53^{a}	11.57^{a}	3.19^{a}
Alternaria alternata	8.01^{c}	7.85^{b}	1.95^{b}
Fusarium oxysporum	8.89^{c}	7.56^{b}	1.84^{b}
Fusarium solani	13.46^{b}	12.10^{a}	3.33^{a}
Ulocldium dauci	8.10^{c}	7.80^{b}	1.93^{b}
شاهد	7.73^{c}	7.55^{b}	1.70^{b}

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 روی صفات ریخت‌شناسی اندام‌های هوایی گوجه‌فرنگی آلوده به نماتد *M. javanica*

Tabl 2- Mean comparison of fungal effect on isolates based on morphological features of tomato upper parts inoculated with *M. javanica*

جدایه‌های قارچی Fungal isolates	ارتفاع بوته Plant height (cm)	وزن تر اندام هوایی Fresh weight shoot (g)	وزن خشک اندام هوایی Dry weight shoot (g)	تعداد انشعابات ساقه Number of stem bifurcations
Trichoderma atroviride	39.38^{a}	217.98^{a}	43.60^{a}	2.97^{ab}
Paecilomyces sp.	27.30^{c}	164.13^{b}	32.83^{c}	4^{a}
Fusarium equiseti	33.74^{b}	227.33^{a}	46.30^{a}	2.56^{b}
Alternaria alternata	16.70^{d}	97.98^{c}	19.60^{d}	2.11^{b}
Fusarium oxysporum	18.60^{d}	109.42^{c}	21.88^{d}	2.2^{b}
Fusarium solani	18.14^{d}	106.69^{c}	21.34^{d}	2^{b}
Ulocldium dauci	32.33^{b}	98.70^{c}	19.80^{d}	2^{b}
شاهد	12.20^{e}	68.33^{d}	14.33^{e}	2.01^{b}

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

در تیمارهای وزن تر و خشک اندام‌های هوایی و تعداد انشعابات ساقه، همه‌ی جدایه‌ها در تقابل با بیمارگر باعث افزایش وزن تر و خشک اندام‌های هوایی و تعداد انشعابات ساقه شدند. جدایه‌های *T. atroviride* (به ترتیب ۲۱۷/۹۸، ۴۳/۶۰ گرم در بوته) و *F. equiseti* (به ترتیب ۲۲۷/۳۳، ۴۶/۳۰ گرم در بوته) بیشترین و جدایه‌های *U. dauci* (به ترتیب ۹۸/۷۰، ۱۹/۸۰گرم در بوته) و *A. alternata* (به ترتیب ۹۷/۹۸، ۱۹/۶۰ گرم در بوته) کمترین افزایش را در وزن تر و خشک اندام‌های هوایی داشتند. در تیمار شاهد، وزن تر اندام‌های هوایی ۶۸/۳۳ گرم در بوته بود که در حضور جدایه‌های *T. atroviride* و

F. equiseti به میزان دو برابر افزایش یافت. وزن خشک اندام‌های هوایی در بوته‌ی آلوده شاهد به میزان ۱۴/۳۳ گرم بود در صورتی‌که با کاربرد جدایه‌های آنتاگونیست *T. atroviride* و *F. equiseti* نیز به میزان دو برابر افزایش نسبت به شاهد آلوده مشاهده شد. تعداد انشعابات ساقه نیز روند مشابهی را نشان داد (جدول ۲).

در صفات عملکردی گوجه‌فرنگی نیز، تمام جدایه‌های مورد آزمون در قیاس با شاهد در تقابل با بیمارگر توانایی افزایش تعداد میوه و وزن میوه در بوته را داشتند. جدایه‌های *T. atroviride* (۴/۹۲ عدد) و *F. equiseti* (۵/۲۵ عدد) دارای بیشترین تعداد میوه در گلدان بودند و همچنین جدایه *T. atroviride* (۱۶۱) باعث بیشترین مقدار افزایش وزن میوه در مقایسه با شاهد شد. تعداد میوه و وزن میوه در شاهد (گوجه‌فرنگی آلوده به نماتد) به ترتیب به میزان ۲/۱۸ عدد و ۱۱۰/۷۰ گرم اندازه‌گیری شدند که تعداد میوه در بوته در حضور جدایه‌های *T. atroviride* و *F. equiseti* به میزان یک و نیم برابر افزایش یافت و کاربرد جدایه¬ی *T. atroviride* باعث افزایش ۴۵/۴ درصدی در وزن میوه گوجه‌فرنگی شد (جدول ۳).

تیمارهای تکثیری نماتد بیمارگر شامل جمعیت گال در هر گلدان و تعداد تخم در هر کیسه تخم در حضور همه‌ی قارچ‌های آنتاگونیست کاهش یافت، جدایه *T. atroviride* (۲۰۵، ۲/۳۳) کمترین و جدایه‌های *A. alternata* (۳۰۶/۳۳، ۳/۶۷) و *U. dauci* (۲۹۰/۳، ۳/۳۳) بیشترین تعداد گال و تعداد تخم در هر کیسه تخم را در ۱۰۰ گرم خاک دارا بودند. در تیمار شاهد آلوده به نماتد، جمعیت گال در هر گلدان و تعداد تخم در هر کیسه تخم به ترتیب به طور میانگین ۴۰۰ و ۴ عدد محاسبه شد در صورتی که کاربرد قارچ *T. atroviride* به ترتیب به میزان ۴۱/۸ و ۴۸/۸ درصد باعث کاهش تعداد گال در گلدان و تعداد تخم در کیسه تخم شد (جدول ۴).

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر جدایه‌های قارچی روی صفات عملکردی گوجه‌فرنگی آلوده به نماتد *M. javanica*

Table 3 - Mean comparison of fungal effect on isolates based on yield features of tomato inoculated with *M. javanica*

جدایه‌های قارچی Fungal isolates	تعداد میوه Number of fruits	وزن میوه Fruit weight (g)
Trichoderma atroviride	4.92[a]	161[a]
Paecilomyces sp.	4.54[a]	134.67[b]
Fusarium equiseti	5.25[a]	137.33[b]
Alternaria alternata	2.69[b]	123.96[b]
Fusarium oxysporum	2.75[b]	121.30[b]
Fusarium solani	2.95[b]	126[b]
Ulocldium dauci	2.80[b]	128[b]
شاهد	2.18[c]	110.70[c]

* میانگین‌هایی که در هر ستون دارای حروف مشترک هستند با هم اختلاف معنی‌دار ندارند.

Means followed by the same letters in each column are not significantly different according to Duncan,s multiple range test ($p \leq 0.05$).

جدول ۴- مقایسه میانگین اثر جدایه‌های قارچی روی صفات تکثیری نماتد در ریشه گوجه‌فرنگی آلوده به نماتد *M. javanica*

Table 4 - Mean comparison of fungal effect isolates based on nematode population in tomato root inoculated with *M. javanica*

جدایه‌های قارچی Fungal isolates	تعداد گال نماتد Number of nodes	تعداد تخم در هر کیسه تخم Number of eggs
Trichoderma atroviride	2.33^{cd}	205^{c}
Paecilomyces sp.	3^{bc}	230^{bc}
Fusarium equiseti	2.30^{cd}	213.30^{bc}
Alternaria alternata	3.67^{ab}	306.33^{b}
Fusarium oxysporum	3^{bc}	244^{bc}
Fusarium solani	3^{bc}	258.67^{bc}
Ulocldium dauci	3.33^{ab}	290.30^{bc}
شاهد	4^{a}	400^{a}

* میانگین‌هایی که در هر ستون دارای حروف مشترک هستند با هم اختلاف معنی‌دار ندارند.

Means followed by the same letters in each column are not significantly different according to Duncan,s multiple range test ($p \leq 0.05$).

نتایج حاصل از همبستگی صفات ریخت‌شناسی گوجه‌فرنگی نشان داد بین وزن خشک ریشه، وزن تر ریشه و طول ریشه همبستگی مثبت و معنی‌داری مشاهده گردید. تعداد انشعابات ساقه با تعداد میوه در سطح احتمال یک درصد همبستگی معنی‌داری داشت. بین وزن خشک و تر اندام‌های هوایی، ارتفاع بوته، تعداد میوه و وزن میوه همبستگی مثبت و معنی‌داری مشاهده شد. این نتایج قابل انتظار بود زیرا اثر قارچ¬های آنتاگونیست علیه نماتد از طریق پارازیته کردن تخم و مرگ و میر لاروهای نماتد و در نتیجه افزایش فاکتورهای رشدی گیاه بوده که در نهایت بوته گوجه‌فرنگی عملکرد بالایی خواهد داشت (جدول ۵).

جدول ۵- همبستگی بین صفات ریخت‌شناسی گوجه‌فرنگی

Table 5 - Correlation between morphological features of tomato

صفات Features	وزن خشک ریشه Dry weight root (g) (X1)	وزن تر ریشه Fresh weight root (g) (X2)	طول ریشه Root length (cm) (X3)	تعداد انشعابات ساقه Number of stem bifurcations (X4)	وزن خشک اندام هوایی Dry weight shoot (g) (X5)	وزن تر اندام هوایی Fresh weight shoot (g) (X6)	ارتفاع بوته Plant height (cm) (X7)	تعداد میوه Number of fruits (X8)	وزن میوه Fruit weight (g) (X9)
x1	1								
x2	0.998**	1							
x3	0.955**	0.951**	1						
x4	0.556^{ns}	0.544^{ns}	0.606^{ns}	1					
x5	0.763*	0.746*	0.885**	0.591^{ns}	1				
x6	0.769*	0.751*	0.886**	0.599^{ns}	1**	1			
x7	0.572^{ns}	0.544^{ns}	0.628^{ns}	0.458^{ns}	0.813*	0.819*	1		
x8	0.8^{ns}	0.784*	0.91**	0.709*	0.982**	0.983**	0.804*	1	
x9	0.733*	0.712*	0.723*	0.541^{ns}	0.846**	0.857**	0.878**	0.827*	1

نتایج نشان داد بین تعداد گال نماتد و تعداد تخم در هر کیسه تخم با صفات عملکردی گوجه‌فرنگی (تعداد میوه و وزن میوه) همبستگی منفی و معنی‌داری وجود دارد. یعنی هر چه تعداد گال یا تعداد تخم نماتد بیشتر باشد تعداد میوه و وزن میوه گوجه‌فرنگی کاهش می یابد. با توجه به وجود همبستگی منفی و معنی‌دار بین عملکرد بوته‌ی گوجه فرنگی با تعداد گال و تخم نماتد در گلدان، نتیجه‌ای قابل پیش‌بینی از تقابل قارچ‌های آنتاگونیست و نماتد بیمارگر به دست آمد. انتظار بر این بود که تحت تأثیر جدایه‌های قارچی علیه نماتد به صورت کاهش تعداد گال و تخم‌های فعال در گلدان و جلوگیری از تکثیر و تولیدمثل نماتد، تعداد و وزن میوه به عنوان شاخص‌های عملکردی مهم گیاه میزبان افزایش یابند که این نتیجه در آزمایش انجام گرفته در شرایط گلخانه حاصل شد (جدول ۶).

جدول ۶- همبستگی بین صفات تکثیری نماتد با تعداد و وزن میوه گوجه‌فرنگی

Table 6 - Correlation between reproductive features of nematode with the number and weight of tomato fruit

صفات Features	تعداد میوه Number of fruits	وزن میوه Fruit weight (g)
تعداد گال نماتد Number of nodes	-0.868**	-0.817*
تعداد تخم در هر کیسه تخم Number of eggs	-0.795*	-0.772*

در شرایط گلخانه همه‌ی جدایه‌های مورد بررسی دارای فعالیت آنتاگونیستی بودند. مقایسه میانگین صفات ارزیابی شده در بوته‌ی گوجه‌فرنگی نشان داد در تمام صفت‌های ریخت‌شناسی و عملکردی اندازه‌گیری شده، تیمار جدایه *T. atroviride* دارای بیشترین مقدارها بود و به عنوان برترین جدایه‌ی آنتاگونیست در شرایط گلخانه شناخته شد. لازم به ذکر است که در تمام صفات ریخت¬شناسی و عملکردی گوجه¬فرنگی، تیمار شاهد (دارای لارو سن دو نماتد و فاقد قارچ آنتاگونیست) کمترین مقدارها و در صفات تعداد گال و تعداد تخم در گلدان بیشترین مقدارها را دارا بود. به طور کلی می¬توان گفت کلونیزاسیون ریشه توسط برخی جدایه‌های قارچی باعث افزایش رشد و توسعه ریشه و تولید محصول بیشتر، مقاومت به استرس‌های غیرزیستی و افزایش بازده استفاده از مواد مغذی خاک می‌شود (Sharon *et al.*, 2007).

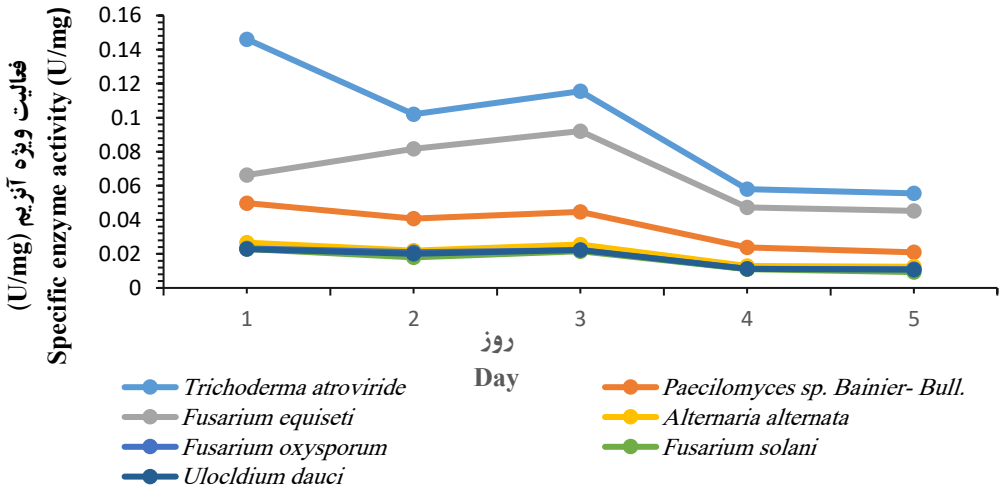
نتایج اثر تیمارهای قارچی آنتاگونیست روی فاکتورهای ریخت‌شناسی گوجه‌فرنگی در گلخانه نشان داد که در حضور همه‌ی این قارچ‌ها در مقایسه با شاهد میزان بیماری کاهش می‌یابد که نتایج بررسی‌های گلخانه در این پژوهش با مطالعه‌ی Abd-Elgawad و Kabeil (2012) همسو بود. در بررسی‌های ایشان، شاخص‌های رشدی اندازه‌گیری شده در دو رقم گوجه‌فرنگی (Alisa و Super Strain B) آلوده به بیماری ریشه گرهی (*M. javanica*) کمتر از گیاه آلوده تلقیح شده با جدایه‌های قارچی آنتاگونیست *T. atroviride* بود و در حضور قارچ آنتاگونیست مذکور میزان بیماری ریشه گرهی گوجه فرنگی کاهش یافت.

همچنین نتایج حاصل از این مطالعه با بررسی‌های Affokpon و همکاران (2011) که توانایی گونه‌های مختلف قارچ *Trichoderma* را روی سبزیجات آلوده به نماتد ریشه گرهی ارزیابی کردند مطابقت داشت. در بررسی ایشان گیاهان شاهد آلوده نسبت به گیاهان تیمار شده با جدایه‌های مختلف قارچی آنتاگونیست دارای وزن ریشه کمتری بودند که نشان‌دهنده قدرت تحریک رشد ریشه توسط برخی جدایه‌های قارچی بود که عین همین نتایج در پژوهش حاضر نیز حاصل شد.

در بررسی حاضر، نتایج آزمایش‌های گلخانه‌ای، یافته‌های بخش آزمایشگاهی را تا حد زیادی تأیید کرد. در شرایط آزمایشگاه، تیمار قارچی *T. atroviride* باعث مرگ تعداد زیادی از تخم‌های نماتد بیمارگر شد و دارای بیشترین تعداد تخم پارازیته شده نماتد بود و در شرایط گلخانه نیز، در همه‌ی صفات ریخت‌شناسی و عملکردی گوجه‌فرنگی در این بررسی، بهترین جدایه در افزایش و بهبود این صفات نیز قارچ *T. atroviride* بوده است. از طرفی نتایج مربوط به کاهش تکثیر نماتد، حاکی از آن بود که قارچ *T. atroviride* همچنان بهترین عملکرد را در کاهش تعداد گال در گلدان و تعداد تخم‌های درون هر کیسه تخم داشته است که این نتایج با بررسی‌های Sharon و همکاران (2007) مطابقت داشت. به طور کلی نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که جدایه‌های مختلف قارچی مورد استفاده در این بررسی، در حضور نماتد ریشه‌گرهی در گوجه‌فرنگی، قادر به کاهش خسارات ناشی از این بیماری در گلخانه می‌باشند. بر اساس این نتایج میزان کنترل‌کنندگی در هر جدایه قارچی متفاوت می‌باشد. با وجود آن‌که فاکتورهای متفاوتی بر توانایی یک عامل آنتاگونیست تأثیرگذار است و نمی‌توان با اطمینان بالا از موفق و یا ناموفق بودن یک عامل مهار زیستی صحبت کرد، اما با استناد به یافته‌های بررسی حاضر می‌توان گفت گونه‌ی *T. atroviride* موفق‌ترین جدایه‌ی مورد استفاده در این بررسی در کاهش خسارت ناشی از نماتد ریشه‌گرهی بوده است.

فعالیت ویژه آنزیم

فعالیت ویژه آنزیم برای هفت جدایه‌ی مذکور به صورت میلی‌گرم اولئیک اسید 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 لیپازی بودند و تمام جدایه¬ها در روز اول بیشترین مقدار آنزیم تولیدی را داشته‌اند که این مقدار در روز دوم کم شده سپس حالت نوسانی به خود گرفته تا در روز چهارم و پنجم تقریبا روند ثابتی پیدا کرده است (شکل ۳).



شکل ۳ – فعالیت ویژه آنزیم لیپاز جدایه‌های قارچی در روزهای مختلف

Figure ۳- Lipase specific activity of fungal isolates in various days

بیشترین و کمترین فعالیت ویژه آنزیم در روز اول به ترتیب در جدایه‌ی *T. atroviride* (۰/۱۴۶ واحد بر میلی‌گرم) و جدایه‌ی *U. dauci* (۰/۰۲۲ واحد بر میلی‌گرم) به دست آمد. در روز دوم نیز بیشترین فعالیت ویژه آنزیم به مقدار ۰/۱۰۲ واحد بر میلی‌گرم در جدایه *T. atroviride* و کمترین فعالیت ویژه آنزیم در جدایه*U. dauci* مشاهده گردید. در روز سوم بیشترین میزان فعالیت ویژه آنزیم مربوط به جدایه‌ی *T. atroviride* (۰/۱۱۶ واحد بر میلی‌گرم) و کمترین میزان فعالیت ویژه آنزیم مربوط به*U. dauci* به دست آمد. در طی روزهای چهارم و پنجم فعالیت ویژه آنزیم در همه جدایه¬ها دارای مقدار تقریباً ثابت و کمتر از روزهای اول تا سوم بود و بیشترین مقدار فعالیت ویژه در روزهای چهارم و پنجم نیز مربوط به قارچ *T. atroviride* با مقادیر به ترتیب ۰/۰۵۸ و ۰/۰۵۵ واحد بر میلی‌گرم بود.

در طی دو دهه گذشته با ممنوعیت فزاینده نماتدکش‌ها، توسعه عوامل مهار زیستی به یکی از نیازهای فوری جهت کاهش خسارات ناشی از نماتدهای ریشه‌گرهی تبدیل شده است (Ijani *et al.*, 2000; Torto *et al.*, 2018). در میان روش‌های مختلف کنترل، اخیراً استفاده از روش‌های مهار زیستی در مدیریت نماتدهای انگل گیاهی، توجه نماتدشناسان را به خود جلب کرده است. حال در بین روش‌های مهار زیستی ، استفاده از قارچ‌های آنتاگونیست نماتدها و متابولیت‌های آن‌ها (مانند آنزیم‌های مخرب نماتدها از جمله پروتئازها، لیپازها و کیتینازها)، از روش‌هایی‌است که در دهه‌های اخیر توجه بسیاری از محققان را به خود معطوف نموده است (Kavari, 2014; Abbasi, 2017; Soleimani *et al.*, 2020).

عموماً لایه خارجی نماتد، که همان کوتیکول نماتدهاست اولین لایه آسیب پذیر نماتد است که مرکز توجه نماتدشناسان جهت کنترل آن‌هاست. بر حسب ترکیبات مختلف کوتیکول، برخی از آنزیم‌های تولیدی قارچ‌ها روی این لایه تأثیرگذارند. ترکیبات پوسته تخم متشکل از یک لایه خارجی ویتلین و یک لایه میانی کیتین و یک لایه لیپید است که در قسمت داخلی پوست قرار دارد. لایه داخلی از چربی تشکیل شده وحاوی تعدادی غشاء لیپوپروتئینی است و پس از لایه میانی که اصلی ترین لایه (کیتین) نیز می‌باشد قرار گرفته است (Abbasi, 2017). در نماتد ریشه گرهی لایه ویتلین، شامل ترکیبات لیپوپروتئینی است و ضخامت کمی دارد و سپس لایه ضخیم میانی که شامل کیتین و پروتئین است قرار دارد در کل ترکیبات پوسته نماتد و تخم، ۵۰ درصد پروتئین، ۳۰ درصد کیتین و ۲۰ درصد ترکیبات لیپیدی را شامل می‌شوند (Kavari, 2014). طی بررسی محققان در این زمینه، پروتئازها، کیتینازها، لیپازها و سایر آنزیم‌های تجزیه کننده که به راحتی و به وفور توسط آنتاگونیست‌های قارچی ترشح می‌شوند، قابلیت ازبین بردن کوتیکول و پوسته تخم نماتدها را دارند (Ye *et al.*, 2019).

پیش‌تر، فعالیت آنزیم کیتیناز در قارچ‌های مورد بررسی در این پژوهش و اثرات آن‌ها علیه نماتد سیست طلایی سیب‌زمینی در شرایط آزمایشگاه و گلخانه مورد بررسی قرار گرفته است (Abbasi, 2017). اما تا به حال آزمایش‌های مربوط به تولید آنزیم لیپاز توسط این قارچ‌ها و اثرات آن‌ها در کنترل نماتد ریشه‌گرهی گوجه‌فرنگی ارزیابی نشده است. در این آزمایش به نظر می‌رسد لایه ویتلین که حاوی لیپید بوده تحت تأثیر آنزیم لیپاز قارچی مورد استفاده در این پژوهش قرار گرفته است و برخی از صفات تکثیری نماتد را در بررسی حاضر تحت تأثیر قرار داده است. نتایج حاضر در ارتباط با مقادیر آنزیم لیپاز تولیدی و فعالیت ویژه آنزیمی توسط قارچ‌های مورد استفاده در این بررسی نشان داد، در بین هفت جدایه قارچی که از گونه‌های مختلف قارچی بودند، تیمار *T. atroviride* به عنوان قوی‌ترین جدایه در تولید آنزیم لیپاز در این بررسی شناخته شد و جدایه‌ی *U. dauci* کمترین فعالیت آنزیمی را نشان داد. در طی زمان پنج روز از اندازه‌گیری فعالیت آنزیم مشخص شد در قارچ‌های مورد مطالعه در این بررسی

فعالیت آنزیم رفته رفته کاهش پیدا کرد. یکی از دلایل این تفاوت فاحش را می‌توان به مقایسه قارچ‌ها از گونه‌های مختلف دانست، شاید اگر همگی این قارچ‌ها سویه‌های مختلف یک گونه قارچی بودند نتایج روند دیگری را نشان می‌داد. نتایج این بررسی نشان داد نوع لیپاز خارج سلولی تولید شده توسط قارچ‌های مورد استفاده در این پژوهش، تا حدودی سازگاری لازم را با لیپیدهای موجود در پوسته تخم نماتد داشته است و همین امر موجب شده تا شاهد کنترل تخم نماتد در بررسی درون آزمایشگاهی و گلخانه‌ای توسط این قارچ‌ها باشیم. با تمامی این تفاسیر نتایج Kavari (2014)، تأثیری کمی از آنزیم لیپاز خارج سلولی سویه‌های مختلف قارچ تریکودرما بر تخم نماتد را نشان داد و این امر را به ناسازگار بودن لیپاز تولید ی این سویه‌ها با نماتد دانست.

نتیجه‌گیری کلی

بر اساس نتایج به دست آمده در این پژوهش می‌توان نتیجه گرفت که هر هفت جدایه‌ی قارچی مورد بررسی توانستند در کنترل نماتد ریشه گرهی گوجه‌فرنگی بسیار موفق عمل کنند و به‌عنوان جدایه‌های موفق آنتاگونیست در کنترل نماتد ریشه گرهی معرفی می‌شوند. بر اساس تمامی ارزیابی‌ها در شرایط آزمایشگاه و گلخانه، از بین هفت جدایه‌ی قارچی، جدایه‌ی قارچی *T. atroviride* به‌عنوان مؤثرترین جدایه و جدایه‌های *U. dauci* و *A. alternata* به‌عنوان کم‌اثرترین قارچ-های آنتاگونیست علیه نماتد ریشه گرهی گوجه‌فرنگی (*M. javanica*) گزارش شدند.

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 Persian).

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. https://doi.org/10.5897/AJB12.233

Abu Torabi, A. & Naraghi, L. (2016). Biological control of root knot nematode, *Meloidogyne javanica* in tomato using *Talaromyces flavus* and *Trichoderma harzianum* fungi in greenhouse conditions. *Biocontrol in Plant Protection*, 4(2), 1-9. (In Persian). https://doi.org/10.22092/bcpp.2017.112885

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. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.11.029

Ahun Manesh, A. (2006). Principles of combating plant diseases (fourth edition). *Publishing Center of Isfahan University of Technology*. (In Persian).

Albehadeli, Y., Mamarabadi, M. & Mahdikhani, E. (2019). Possibility of the biocontrol of *Meloidogyne javanica* using the fungus *Trichoderma harzianum* under greenhouse condition. *Plant Archives*, 19(1), 47-51.

Azarmi, R. (2019). Effect of light intensity and salicylic acid interaction on some physiological characteristics, yield and fruit quality of tomato (*Solanum lycopersicum*). *Journal of Vegetables Sciences,* 3(5), 11-22. https://doi.org/10.22034/iuvs.2019.36540

Badakhshan, M., Mahdikhani Moghadam, A., Baghai Raori, S. & Rohani, H. (۲۰۱۷). The combined use of two species of *Trichoderma* spp. and *Bacillus subtilis* in the control of tomato root knot nematode (*Meloidogyne javanica*). *Journal of Plant Pests and Diseases,* 84(2), 269-278. (In Persian).

https://doi.org/10.22092/jaep.2017.108181

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. https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3

Castagnone-Sereno, P., Danchin, E. G., Perfus-Barbeoch, L. & Abad, P. (2013). Diversity and evolution of root-knot nematodes, genus *Meloidogyne*: new insights from the genomic era. *Annual Review of phytopathology*, 51, 203-220. https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102300

De Grisse, A. T. (1969). Redescription ou modifications de quelques techniques utilisées dans l'étude des nématodes phytoparasitaires. *Mededelinyen Rijksfakulteit,* 34, 351-369.

Eisenback, J. D., Hrischmann, H., Sasser, J. N. & Triantaphyllou, A. C. (1981). A guide to the four most common species of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.), with a pictorial key (p. 48). State University, Depto of Plant Pathology.

Huusey, R. S., & Barker, K. R. (1973). A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. *Plant Diseases Reporter*, 57, 1025-1028.

Ijani, A. S. M., Mabagala, R. B. & Nchimbi-Msolla, S. (2000). Efficacy of different control methods applied separately and in combination in managing root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in common beans. *European Journal of Plant Pathology*, 106, 1-10. https://doi.org/10.1023/A:1008788805581

Jones, J. T., Haegeman, A., Danchin, E. G., Gaur, H. S., Helder, J., Jones, M. G. ... & Perry, R. N. (2013). Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology,* 14(9), 946-961 https://doi.org/10.1111/mpp.12057

Kavari, M. (2014). Investigating the relationship between the enzyme's ability of several isolates from *Trichoderma* fungi with biocontrol ability of this fungus against tomato root knot nematodes. *Master's Thesis.* (In Persian).

Mahdikhani Moghadam, E., Khairi, A., Mohammadi, M., Ishtiaki, H. (2003). Introduction of three new species of the genus *Meloidogyne* for Iran. Journal of Plant Diseases. 39, 189-211. (In Persian).

Perry, R. N., Moens, M., & Starr, J. L. (Eds.). (2009). Root-knot nematodes (Vol. 488). *Wallingford: CABI.*

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. https://doi.org/10.22034/iuvs.2022.553285.1204

Reese, E. T. (1976). History of the cellulase program at the U.S. Army Natick Development Center, *Biotechnology and Bioengineering Symposium* 6, 9-24.

Rusinque, L., Inácio, M. L., Mota, M., & Nóbrega, F. (2018). Morphological, biochemical and molecular characterisation of *Meloidogyne javanica*, from North Portugal, in tomato. *Revista de Ciências Agrárias*, 41(1), 193-198. https://doi.org/10.19084/RCA17078

Sasser, J. N. (1989). Plant parasitic nematodes: the farmer's hidden enemy. *Crop Protection*. 115pp.

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. https://doi.org/10.1007/s10658-007-9140-x

Sohrabi, F., Fadaei Tehrani, A. A. & Rezaei Danesh, Y. (2015). Investigating the changes of chitinase enzyme in the interaction of arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and root knot nematode (*Meloidogyne javanica*) in tomato. *Journal of Plant Protection,*

29(3), 349-356. (In Persian). https://doi.org/10.22067/jpp.v29i3.31791

Soleimani, A., Mahdikhani Moghadam, A. & Rouhani, H. (2020). Comparative investigation of lipase and chitinase enzyme production of fungi isolated from sugar beet cyst nematode in laboratory conditions. *Journal of Plant Protection* (Agricultural Sciences and Industries). 34(1), 1-13. (In Persian). https://doi.org/10.22067/jpp.v34i1.63886

Torto, B., Cortada, L., Murungi, L. K., Haukeland, S. & Coyne, D. L. (2018). Management of cyst and root knot nematodes: a chemical ecology perspective. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 66(33), 8672-8678. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b01940

Ye, W., Robbins, R. T. & Kirkpatrick, T. (2019). Molecular characterization of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) from Arkansas, USA. *Scientific reports,* 9(1), 15680. https://doi.org/10.1038/s41598-019-52118-4

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*, 4(6), 206. https://doi.org/10.3390/jof6040206