تأثیر آنتاگونیستی گونه‌های *Fusarium* spp. همراه با نماتد ماده و توده‌ی تخم روی *Meloidogyne javanica* در شرایط آزمایشگاهی

رقیه کارخانه[۱]، مهیار شیخ‌الاسلامی[۲]، علی‌اکبر حجت جلالی[۳]

۱- گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه کردستان

۲- بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی کرمانشاه، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

۳- گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه رازی

مسئول مکاتبات: مهیار شیخ‌الاسلامی، پست الکترونیک: Email: m1sheikh@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۰/۱۷ ۳ (۱) ۷۳-۸۱ تاریخ پذیرش: ۹۴/۶/۲۱

چکیده

به منظور بررسی تأثیر آنتاگونیستی قارچ‌های همراه نماتد ماده‌ی بالغ و توده‌ی تخم *Meloidogyne javanica*، آزمایش‌هایی درگلخانه‌های پرورش گوجه‌فرنگی و خیار در استان کرمانشاه طی سال‌های ۱۳۸۹- ۱۳۸۸ انجام شد. در بین قارچ‌های جدا شده ۴۹ جدایه از جنس *Fusarium* وجود داشت که گونه‌های *F. chlamydosporum, F. oxysporum, F. proliferatum, F. solani, F. tricinctum* و *F. verticillioides* شناسایی شدند. برای دستیابی به جمعیت خالص نماتد، اقدام به تلقیح تک توده تخم نماتد (single egg mass) پای گیاهچه‌ی خیار شد. پس از تکثیر نماتد، آزمایش در شرایط آزمایشگاهی و در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار برای هر تیمار صورت گرفت. پارامترهای مورد ارزیابی در این بررسی شامل، درصد انگلی کردن تخم‌ها، تفریخ تخم و مرگ و میر لاروهای سن دوم (J2) نماتد بود. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که در بین تیمارهای مورد بررسی گونه‌های *F. solani, F. chlamydosporum* و *F. oxysporum* از نظر تأثیر در پارازیتسم تخم‌ها، گونه‌ی *F. solani* در ممانعت از تفریخ تخم و تمام گونه‌های فوزاریوم در ایجاد مرگ و میر لارو سن دوم نماتد تأثیر معنی‌داری داشتند. براساس نتایج به‌دست آمده *F. solani* به‌دلیل قابلیت آنتاگونیستی بهتر و فراوانی بیشتر در جداسازی‌ها نسبت به سایر گونه‌ها ارجحیت داشت.

واژه‌های کلیدی: کنترل بیولوژیک، نماتد ریشه گرهی، دشمنان طبیعی، قارچ آنتاگونیست

مقدمه

یکی از عوامل محدود کننده‌ی اصلی در کشت‌های گلخانه‌ای فعالیت نماتدهای مولد گره (*Meloidogyne* spp.) است. دشمنان طبیعی زیادی به این نماتدها در خاک حمله کرده و جمعیت آن‌ها را کاهش می‌دهند. در مجموع، قارچ‌ها ۷۶٪ از کل دشمنان طبیعی گزارش شده نماتدها را شامل می‌شوند (Brown & Kerry, 1987).

در سال ۱۸۵۵ برکلی در انگلیس برای اولین‌بار نماتدهایی که باعث تشکیل این گال‌ها برروی ریشه‌ی خیار می‌شد را توصیف نمود (Hussey & Barker, 1973). در ایران قوام‌الدین شریف در سال ۱۳۳۵ برای اولین‌بار نماتد ریشه‌ی گرهی را از روی ریشه‌های گوجه‌فرنگی در باغ فلاحت قصرشیرین با نام *Heterodera marioni* گزارش نموده است (Barooti, 1987). استرلینگ و مانکائو (Stirling & Mankau, 1977) قارچ‌های *Dactylella oviparasitica, Fusarium solani, Aspergillus* sp. *M.ellipsosporum, Mucor* sp., *Rhizoctonia solani, Trichoderma* sp. را از توده‌ی تخم نماتدهای ریشه‌گرهی (*Meloidogyne* spp.) جدا نمودند. گودوی و همکاران (Godoy *et al.*, 1983) قارچ‌های *F. oxysporum, F. chlamydosporum,* و *Paecilomyces lilacinus* را از تخم‌های نماتد ریشه‌ی گرهی گونه‌ی *M. arenaria* جداسازی و شناسایی نمودند.

زرین و همکاران (Zareen *et al.*, 2000) ۲۸ جدایه‌ی

قارچی که به ۱۶ جنس متعلق بودند را از تمام مراحل زیستی (توده تخم ، تخم، نوزادان و نماتد ماده بالغ) نماتدهای ریشه‌گرهی (*Meloidogyne* spp.) از کشور پاکستان جداسازی و شناسایی کردند که این قارچ‌ها شامل *Aspergillus flavus, A. fumigatus, A. nidulans, A. tamari, A. niger, Aspergillus* sp. *Acremonium butyric, Alternaria alternata, Arthrobotrys* sp., *Catenaria* sp. *Cephalosporium* sp., *Cladosporium cladosporoides, Cladosporium* sp., *Cunnighamella elegance, Curvularia lunata, Fusarium oxysporum, F. pallidoroseum, F. solani, Fusarium* sp., *Paecilomyces lilacinus, P. varioti, Penicillium* sp., *Rhizoctonia solani, Ulocladium atrum, Verticillium chlamydosporium* و نیز چندین قارچ عقیم بودند.

سانکارانار یانان و همکاران (Sankaranarayanan *et al.*, 2002) قارچ‌های *P. lilacinus, F. oxysporum, F. sporotrichioides, Phoma glomerata* و *Trichoderma viride* را از تخم‌های نماتد ریشه‌ی گرهی گونه‌ی *M. incognita* جداسازی نموده‌اند. ابراهیم و همکاران (Ibrahim *et al.*, 2009) چندین قارچ از تخم و نوزاد نماتد ریشه‌ی گرهی گونه‌ی *M. incognita* از روی گوجه‌فرنگی جداسازی نمودند که شامل قارچ‌های *Aspergillus* spp., *F. oxysporum, Paecilomyces lilacinus, Rhizoctonia solani, Verticillium chlamydosporium,* بودند. تأثیر کنترلی قارچ‌ها سبب کاهش قابل توجه گال‌ها شده به طوری که مایه زنی ریشه‌ی گوجه فرنگی با *F. oxysporum* سبب کاهش درصد گال‌ها به میزان ۷/۹۲ درصد نسبت به گیاه شاهد بدون قارچ شده است.

در بررسی دیگری که رونپانون و همکاران (Ruanpanun *et al.*, 2010) روی قارچ‌های جداسازی شده از نماتد ریشه‌ی گرهی *M. incognita* انجام داده‌اند، از ۶۷ جدایه قارچی گونه‌های غالب *Penicillium* spp. (۳۷/۳٪) و *Fusarium* spp.(۳۲/۸٪) بودند. گونه‌های فوزاریوم (*Fusarium* spp.) بیشترین تأثیر را روی کاهش تفریخ تخم (کمتر از ۲۵٪) داشته و موجب بیش از ۷۰٪ مرگ و میر نوزادان شدند. همچنین سینگ و ماتور (Singh & Mathur, 2010) اثر گونه‌های قارچی جداسازی شده از تخم های نماتد ریشه گرهی گونه *M. incognita* را در شرایط آزمایشگاهی ارزیابی نمودند. در بررسی فوق قارچ‌های *F. chlamydosporum, F. dimarum, F. oxysporum ,F. solani* سبب ممانعت از تفریخ تخم و مرگ و میر نوزادان نماتد شدند. گونه‌های فوزاریوم در اکثر خاک های زراعی مناطق مختلف کشور حضور دارند و با توجه به تأثیر مناسب آنها در کنترل نماتدها آگاهی از میزان پارازیتیسم آنها بر روی نماتد ریشه گرهی از اهمیت ویژه ای برخوردار است. هدف از تحقیق حاضر بررسی تأثیر گونه‌های *Fusarium* spp. در کنترل نماتد *M. javanica* در شرایط کنترل شده بود.

مواد و روش‌ها

۱- نمونه برداری

طی سال‌های ۸۹-۱۳۸۸ برای جداسازی قارچ‌های بیمارگر، از شش گلخانه‌ی گوجه‌فرنگی و خیار آلوده به نماتد مولد گره ریشه در استان کرمانشاه تعداد۷۲ نمونه جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل گردید و این نمونه‌ها در دمای بین چهار تا هشت درجه‌ی سلسیوس درون یخچال نگهداری شدند.

۲- استخراج نماتد

عملیات استخراج نماتد از خاک و ریشه‌ها به روش تکمیل شده دگریسه (De Grisse, 1969) انجام شد. جهت دستیابی به نماتد ماده بالغ، پس از شستشوی ریشه آلوده خیار جداسازی نماتد از سطح ریشه به کمک بینوکولر انجام گردید. پس از جداسازی ماده ها ، برش از شبکه کوتیکولی انتهای بدن ماده‌ها (Perennial pattern) تهیه گردید.

۳- محیط کشت‌های مورد استفاده

محیط کشت‌های مورد استفاده شامل محیط کشت برگ میخک آگار (CLA) (Carnation Leaf Agar)، محیط کشت آرد ذرت- آگار (CMA) (Corn Meal Agar)، محیط کشت سیب زمینی- دکستروز- آگار (PDA) (Potato Dextrose Agar) ، محیط کشت سیب زمینی- هویج- آگار (PCA) (Potato Carrot Agar)،

محیط کشت آب– آگار(WA) (Water Agar) و محیط کشت آب آگار + کلرید پتاسیم (WA+KCl) بودند (Dhingra & Sinclair, 1986).

٤- جداسازی قارچ‌ها

٤-۱- جداسازی قارچ‌ها از نماتدهای ماده‌ی بالغ ریشه گرهی

پس از استخراج، نماتدهای ماده با محلول یک درصد هیپوکلریت سدیم یا الکل اتیلیک ۷۰درصد به مدت یک تا سه دقیقه ضد عفونی سطحی و پس از شستشو با آب مقطر سترون، تعداد سه عدد نماتد ماده روی محیط‌های کشت WA ۰/۸ درصد یا CMA و PCA گذاشته شدند. برای جلوگیری از رشد باکتری‌ها، از هر کدام از آنتی بیوتیک‌های سولفات استرپتومایسین و کلرامفنیکل به میزان ppm ۱۰۰ به محیط‌های کشت مورد نظر اضافه گردید. ظروف تشتک نه سانتی‌متری در انکوباتور با دمای ۲۵-۲۰ درجه‌ی سلسیوس نگهداری و به‌طور روزانه کنترل شدند. قارچ‌های رشد یافته از نماتدها به محیط‌های کشت جدید منتقل و خالص‌سازی شدند (Rizvi & Shameel, 2006).

٤-۲- جداسازی قارچ‌ها از تخم‌های نماتد ریشه گرهی

پس از جداسازی توده تخم از سطح ریشه، ضدعفونی توسط محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت دو دقیقه انجام شد. پس از شستشو با آب مقطر استریل مقدار ۱-۰/۵ میلی لیتر از سوسپانسیون تخم توسط پی‌پت سترون برداشته شده و در سطح ظروف تشتک حاوی محیط کشت آب–آگار پخش گردیدند. این تشتک‌ها در انکوباتور با دمای حدود ۱±۲۵ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شده و به‌طور مرتب مورد بررسی قرار گرفتند. قارچ‌های رشد یافته از آن‌ها به محیط‌های کشت جدید منتقل و خالص سازی شدند (Rizvi & Shameel, 2006).

٤-۳- شناسایی جدایه‌های *Fusarium* spp.

شناسایی گونه‌های فوزاریوم بر اساس رنگ کلنی و سرعت رشد، مشخصات ماکروکنیدیوم‌ها، آرایش و شکل میکروکنیدیوم ها، اندازه و شکل فیالید و کلامیدوسپور با استفاده از کلیدها و منابع علمی موجود صورت گرفت (Booth, 1971; Nelson *et al*., 1983; Gerlach & Nirenberg, 1982; Leslie & Summerell, 2006).

۵-آزمون بررسی تأثیر آنتاگونیستی جدایه‌های قارچ در کنترل نماتد مولد گره ریشه

۵-۱- خالص سازی و تکثیر نماتد:

جهت خالص سازی و دستیابی به جمعیت نماتد، پس از جداسازی توده‌های تخم از سطح ریشه آلوده خیار، نمونه‌ها توسط محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد به مدت سه دقیقه ضدعفونی و سپس با آب مقطر سترون شستشو شدند. پای نشاء ۴ برگی خیار رقم Super dominans یک توده تخم تلقیح گردید و پس از گذشت دو ماه جمعیت نماتد تکثیر یافت. دمای اتاقک رشد بین ۳۵-۲۵ درجه‌ی سلسیوس و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی بود. برای تکثیر انبوه و خالص نماتد کیسه‌های تخم مربوط به یک گیاه مجدداً با روش فوق الذکر روی گیاهان متعدد خیار مایه‌زنی شدند.

۵-۲- استخراج تخم نماتد از ریشه آلوده

جهت جداسازی توده تخم از ریشه‌ی آلوده، پس از شستشوی ریشه، آن‌ها را به قطعات ۲-۱ سانتی‌متری خرد نموده سپس حدود ۵۰ گرم از ریشه به همراه ۱۰۰ میلی‌لیتر آب معمولی داخل محفظه‌ی همزن برقی قرار داده شدند. بعد از اضافه کردن ۵۰۰ میلی لیتر هیپو کلریت سدیم نیم درصد به داخل ظرف همزن، بلافاصله با دور زیاد همزن در حدود ۳۰ ثانیه ریشه‌ها کاملاً مخلوط گردیدند. بعد از این مرحله بلافاصله مواد داخل همزن از الک ۱۵۰ میکرونی که بر روی یک الک ۳۶ میکرونی تعبیه شده، عبور داده و سریعاً با جریان آب شستشو تا هیپوکلریت سدیم آن حذف گردد. استخراج تخم از ریشه به روش سانتریفیوژ انجام وجمعیت تخم مورد نیاز جهت انجام آزمایش توسط لام شمارش، تعیین گردید. بعد از این مرحله تخم‌ها در یخچال در دمای چهار درجه‌ی سلسیوس برای جلوگیری از تفریخ شدن آن‌ها نگهداری شدند (Hussey & Barker, 1973).

۵-۳- بررسی تأثیر آنتاگونیستی

قارچ‌های مورد نظر روی محیط کشت PDA در دمای

۲۵ درجه‌ی سلسیوس به‌مدت هفت روز کشت داده شدند. از حاشیه پرگنه قارچ‌های رشد یافته قسمتی جدا و به لوله‌های پلاستیکی سترون سانتریفیوژ ۱/۵میلی‌لیتری حاوی توین ۸۰ (Tween 80)، نیم درصد سترون انتقال داده شد. لوله‌ها را روی شیکر به‌مدت یک دقیقه به‌شدت تکان داده تا اسپورها معلق شوند. غلظت اسپورها به‌وسیله‌ی گلوبول شمار (Haemacytometer)، به‌میزان 10^5 اسپور بر میلی‌لیتر تعیین شد. پس از استخراج و ضدعفونی توده تخم‌ها و همچنین شمارش آن‌ها، ۰/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون تخم که حاوی ۲۰±۲۵۰ عدد تخم بوده را به داخل ظروف استریل ۲۴ چاهکی مورد استفاده در آزمایش الایزا (Elisa strip plate) که هر یک حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپور قارچ بوده، اضافه گردید. پس از گذاشتن درپوش، ظروف مورد نظر در دمای ۱±۲۵ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند. برای مقایسه تأثیر سوسپانسیون اسپور، از آب مقطر سترون به‌عنوان شاهد استفاده شد.

محاسبه درصد انگلی شدن تخم‌های نماتد ریشه گرهی، درصد تفریخ تخم و نیز مرگ و میر نوزادان سن دوم نماتد ریشه گرهی پس از هفت روز، به‌وسیله شمارش تخم‌ها، نوزادان زنده و نیز نوزادان مرده، براساس فرمول‌های زیر انجام گردید.

$$\text{درصد تخم های انگلی شده} = \frac{\text{تعداد تخم های انگلی شده}}{\text{کل تخم ها}} \times ۱۰۰$$

$$\text{درصد تفریخ تخم} = \frac{\text{نوزادان}}{\text{نوزادان + تخم های تفریخ نشده}} \times ۱۰۰$$

$$\text{درصد مرگ و میر نوزادان} = \frac{\text{تعداد نوزادان مرده}}{\text{کل نوزادان}} \times ۱۰۰$$

تخم‌های انگلی شده از طریق ریسه‌های قارچ که نفوذ کرده و اطراف آن را نیز فرا گرفته بود، شناسایی و شمارش شدند. نوزادانی که بد شکل و یا سیخ شده و بی‌حرکت بودند، مرده تلقی شدندکه به آسانی با استریومیکروسکوپ قابل تشخیص بودند. تأثیر انگلی کردن این قارچ‌ها بر نماتد ریشه‌گرهی با محاسبه کلی تخم‌ها و نوزادان با استفاده از سه تکرار آزمایش گردید (Rizvi & Shameel, 2006; Sun *et al*., 2006). پس از بررسی نمونه‌ها توسط استریو میکروسکوپ، داده‌های مربوط به هر تکرار در هر تیمار ثبت گردید و این داده‌ها در یک طرح کاملاً تصادفی توسط نرم افزار SAS نسخه 9.1 مورد تجزیه‌ی آماری قرارگرفتند.

نتایج

۱-شناسایی گونه نماتد

براساس مشخصات شبکه کوتیکولی انتهای بدن ماده‌ها (Perennial pattern) و خصوصیات شکل شناسی نوزادان سن دوم و نماتد نر، گونه مورد آزمایش با استفاده از کلید شناسایی (Nickle, 1991) به‌عنوان *M. javanica* تشخیص داده شد.

۲-گونه‌های .*Fusarium* spp جدا شده از توده تخم و ماده‌های نماتد *M. javanica*

در نتیجه این بررسی ۴۹ جدایه از .*Fusarium* spp از توده تخم و ماده‌های نماتد *M. javanica* به‌دست آمدکه شرح آن‌ها در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱- گونه‌های فوزاریوم جدا شده، تعداد جدایه‌ها و محل جمع‌آوری آن‌ها.

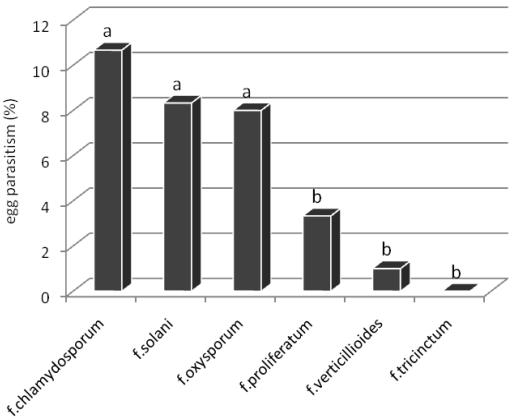
Table 1. *Fusarium* species, number of isolates and location of collecting.

Fusarium species	No. of isolates	Location
Fusarium chlamydosporum	6	Ghasre shirin & Kermanshah
Fusarium oxysporum	11	Ghasre shirin, Kermanshah & Bisotun
Fusarium proliferatum	5	Ghasre shirin & Kermanshah
Fusarium solani	17	Ghasre shirin, Kermanshah & Bisotun
Fusarium tricinctum	5	Ghasre shirin
Fusarium verticillioides	5	Ghasre shirin, Kermanshah

۳- نتایج آزمایش بررسی تأثیر آنتاگونیستی گونه‌های .*Fusarium* spp:

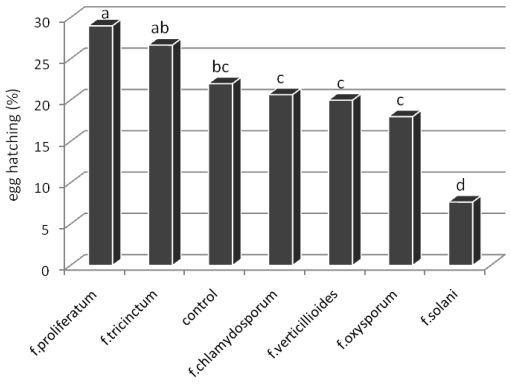
نتایج نشان داد اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد بین انگلی شدن تخم‌ها به‌وسیله‌ی گونه‌های مختلف قارچ

وجود دارد. براساس آزمون مقایسه‌ای دانکن، گونه‌های مختلف فوزاریوم در دو گروه مجزا قرار گرفتند. به‌طوری‌که گونه‌های *F. solani, F. chlamydosporum* و *F. oxysporum* به‌ترتیب ۱۰/۶۶۷، ۸/۳۳۳ و ۸ درصد توانایی انگلی کردن تخم‌ها را داشتند اما اختلاف آن‌ها با یکدیگر معنی‌دار نبود. همچنین سه گونه *F. proliferatum, F. verticillioides* و *F. tricinctum* به‌ترتیب ۳/۳۳۳، یک و صفر درصد تخم‌ها را انگلی کردند و در گروهی مجزا قرارگرفتند (شکل ۱). در مورد تأثیر گونه‌ها در تفریخ تخم‌ها اختلاف در سطح یک درصد معنی‌دار بود. گونه‌های *F. tricinctum*، *F. chlamydosporum*، *F. verticillioides* و *F. oxysporum* از این نظر با شاهد اختلاف معنی‌دار نداشتند. اما گونه *F. proliferatum* با ۲۹ درصد سبب افزایش معنی‌دار در سطح آماری یک درصد در تفریخ تخم‌ها و گونه *F. solani* با ۷/۶۶ درصد سبب کاهش معنی‌دار در تفریخ تخم‌ها گردید (شکل ۲). در مورد تأثیر گونه‌های فوزاریوم، درصد مرگ و میر لاروهای نماتد بر اثر فعالیت گونه‌های مورد آزمایش با شاهد، در سطح یک درصد معنی‌دار بود، ولی تفاوت معنی‌داری میان آن‌ها وجود نداشت (شکل ۳).



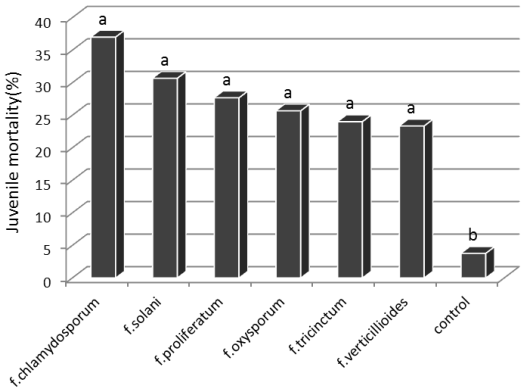
شکل ۱- مقایسه‌ی درصد انگلی شدن تخم‌های *M. javanica* به‌وسیله‌ی گونه‌های *Fusarium* spp. در شرایط آزمایشگاهی.

Fig. 1. Comparison of egg parasite percentage of *M. javanica* by *Fusarium* spp. *in vitro*.



شکل ۲- مقایسه‌ی درصد تفریخ تخم‌های *M. javanica* به‌وسیله‌ی گونه‌های *Fusarium* spp. با شاهد آب مقطر سترون در شرایط آزمایشگاهی.

Fig. 2. Comparison of egg hatching percentage of *M. javanica* by *Fusarium* spp. with control (d.w.) *in vitro*.



شکل ۳- مقایسه‌ی درصد مرگ و میر لارو سن دوم نماتد *M. javanica* به‌وسیله‌ی گونه‌های مختلف *Fusarium* spp. با شاهد آب مقطر سترون در شرایط آزمایشگاهی.

Fig. 3. Comparison of J_2 mortality percentage of *M. javanica* by *Fusarium* spp. with control (d.w.) *in vitro.*

بحث

در منابع مختلف گونه‌های فوزاریوم به‌عنوان عوامل آنتاگونیستی نماتدها معرفی شده‌اند. در این تحقیق *F. chlamydosporum* برای انگلی کردن تخم‌ها و مرگ لاروهای *M. javanica* بیشترین تأثیر را داشت. سینگ و ماتور (Singh & Mathur, 2010) تأثیر *F. chlamydosporum* را در انگلی کردن تخم‌های نماتد ریشه گرهی گونه‌ی

M. incognita در شرایط آزمایشگاهی مشاهده نموده‌اند. *F. chlamydosporum* از سیب‌زمینی توسط حیدریان و همکاران (۲۰۰۰) و از گندم توسط درویش‌نیا و همکاران (۱۹۹۸) گزارش شده است، اما گزارش آن از روی نماتدها از جمله نماتد ریشه‌گرهی در ایران جدید است (Darvishnia *et al.*, 1998).

از نظر قابلیت تأثیر آنتاگونیستی، *F. oxysporum* در این تحقیق توانایی نسبتاً مناسبی را در مقایسه با سایر گونه‌های فوزاریوم داشت. گودوی و همکاران (۱۹۸۳) *F. oxysporum* را از تخم‌های نماتد ریشه گرهی گونه *M. arenaria* جداسازی و شناسایی نمودند (Godoy *et al.*, 1983). همچنین مورگان جونز و همکاران (۱۹۸۴) این گونه را از تخم‌های نماتد ریشه‌گرهی گونه *M. incognita* گزارش کرده‌اند (Morgan-Jones *et al.*, 1984). *F. oxysporum* در ایران توسط فاطمی و همکاران (Fatemy *et al.*, 1999) از روی تخم و نیز خضری نژاد و همکاران (Khezrinejad *et al.*, 2006) از تخم، ماده و سیست‌های نماتد *H. schachtii* از ارومیه، خوی، میاندوآب و سلماس گزارش شده است. *F. oxysporum* از میزبان‌های متعددی در ایران گزارش شده است (Ershad, 2009) اما گزارش آن از نماتدهای ریشه گرهی در ایران جدید است.

در تحقیق حاضر گونه‌ی *F. solani* براساس هر سه پارامتر اندازه‌گیری شده در مجموع بهترین عملکرد را در فعالیت آنتاگونیستی بر علیه نماتد *M. javanica* داشت. فاطمی و همکاران (Fatemy *et al.*, 2005) این قارچ را از نماتد سیستی چغندرقند (*H. schachtii*) جداسازی و شناسایی نموده‌اند و براساس تحقیق انجام شده توسط آن‌ها این قارچ ۲۵ تا ۳۶ درصد تخم‌ها را در محیط کشت آب آگار انگلی نموده است اما میزان انگلی کردن تخم‌ها توسط *F. solani* در این تحقیق ۸/۳۳ درصد بود. براساس نتایج احمدی و همکاران (۱۳۷۷) این گونه ۶۸/۶۷ درصد جمعیت نهایی نماتد سیستی چغندرقند گونه *H. schachtii* را در مقایسه با تیمار شاهد (نماتد به تنهایی) کاهش داده است (Ahmadi *et al.*, 1998). *F. solani* در ایران توسط خضری نژاد و همکاران (Khezrinejad *et al.*, 2006) از تخم، ماده و سیست‌های جوان و بالغ *H. schachtii* از ارومیه، نقده، میاندوآب و مهاباد و توسط سعیدی نائینی و همکاران (Saeidi-Naeini *et al.*, 2002) از تخم و لاروهای سن دوم نماتد سیستی چغندرقند (*H. schachtii*) جداسازی و گزارش شده است. علاوه بر این *F. solani* تا به حال از میزبان‌های گیاهی متعددی در ایران گزارش شده‌است (Ershad, 2009) اما گزارش آن از *Meloidogyne* spp. برای ایران جدید است. *F. tricinctum* اولین بار در ایران توسط روحی‌بخش و ارشاد (۱۹۹۵) از برگ مرکبات گزارش شد (Roohibakhsh & Ershad, 1995). اما گزارش آن از روی نماتد ریشه‌گرهی از ایران و در دنیا تازگی دارد. *Fusarium verticillioides* از محصولات زراعی مختلف نظیر سیب‌زمینی گزارش شده است (Sharifi *et al.*, 2004) اما گزارش این گونه از روی نماتدها از جمله نماتد ریشه‌گرهی از ایران جدید است.

در مورد تأثیر گونه‌های مختلف فوزاریوم بر تفریخ تخم‌ها در مورد دو گونه *F. proliferatum* و *F. tricinctum* سبب افزایش در تفریخ تخم‌ها شدند که یک پدیده‌ی غیرمعمول به‌شمار می‌رود، لذا این آزمایش مجدداً تکرار شد اما در بار دوم هم همین نتیجه به‌دست آمد. با توجه به این‌که در منابع مختلف همواره از تأثیر گونه‌های فوزاریوم در کاهش تفریخ تخم سخن به‌میان آمده است این پدیده نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد. در نتیجه‌گیری کلی اگرچه همه گونه‌های فوزاریوم مورد آزمایش در این تحقیق تأثیر آنتاگونیستی روی نماتد گونه‌ی *M. javanica* داشتند، اما در مجموع تأثیر سه گونه‌ی *F. chlamydosporum*، *F. solani* و *F. oxysporum* و به ویژه *F. solani* بهتر از سه گونه‌ی دیگر بود.

سپاسگزاری

نگارندگان از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی کرمانشاه به‌دلیل در اختیار نهادن امکانات و وسایل تحقیق سپاسگزاری می‌کنند.

References

Ahmadi, A.R., Sharifi-tehrani, A., Kheiri, A. & Hejaroude, Gh.A. 1998. Isolation of *Paecilomyces* spp. and *Fusarium solani* from *Heterodera schachtii* and their efficacy in biocontrol of the nematode eggs *in vitro*. Iranian Journal of Plant Pathology, 34(3,4): 56-59. (In Persian with English summary).

Barooti, S. 1987. A list of plant pathogenic nematodes of Iran up to 1986. Plant Pest and Diseases Research Institute of Iran, 40pp (In Persian).

Booth, C. 1971. The Genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institiue, 237 pp.

Brown, R.H. & Kerry, B.R. 1987. Principles and Practices of Nematode Control in Crops. Academic press, NewYork, 447 pp.

Darvishnia, M., Alizadeh, A. & Mohammadi Goltapeh, E. 1998. Fusarium species and other fungi associated with crown and root rot of wheat in Lorestan Province. 13th Iran. Plant Protection Congress, Karaj, P. 20.

Dhingra, O.D. & Sinclair, J.B. 1986. Basic Plant pathology Methods. CRS perss, 355 pp.

De Grisse, A.T. 1969. Redescription et modification de quelques techniques utilisées dans l'étude des nematodes phytoparasitaires. Mededelingen van de Rijksfa, Gent, 34: 351-369.

Ershad, D. 2009. Fungi of Iran. Agricultural Research, Education & Extension Organization. 531 pp.

Fatemy, S., Ahmadian-Yazdi, A., Parvizy, R., Ahmadi, A., Pakniat, M., Barooti, M., Askari, M. & Ershad, D. 1999. Fungal parasites of *Heterodera schachtii* in Iran. Pakistan Journal of Nematology, 17(1): 61-66.

Fatemy, S., Saeidi-Naeini, F. & Alizadeh, A. 2005. *In vitro* screening of fungi for parasitism against sugar beet cyst nematode *Heterodera schschtii*. Nematologia Mediterranea, 33: 185-190.

Gerlach, W. & Nirenberg, H. 1982. The Genus Fusarium a Pictorial Atlas. Paul Parey, Berlin and Hamburg. Kommissionsverlag. 406 pp.

Godoy, G., Rodriguez-Kabana, R. & Morgan-Jones, G. 1983. Fungal parasites of *Meloidogyne arenaria* eggs in an Alabama soil. Nematropica, 13: 201–213.

Heidarian, A., Karimi Roozbehani, A.R. & Ershad, D. 2000. The fungal diseases of potato in Chahar Mahal Province. 14th Iran. Plant Protection Congress, Isfahan, P. 306.

Hussey, R.S. & Barker, K.R. 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. Plant Disease Reporter, 57: 1025-1028.

Ibrahim G.H., Al-Rehiayani, S.M. & Bellal, M.M. 2009. Use of biocontrol fungi, *Bacillus thuringiensis* and organic soil amendment to control root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in tomato and eggplant, Mansoura University Journal of Agricultural Sciences, 34 (11): 10761–10770.

Khezrinejad, N., Ghosta, Y. & Niknam, Gh. 2006. Fungi associated with sugar beet cyst nematode from fields of W. Azarbaijan. Rostaniha, 7(2): 149-161. (In Persian with English summary).

Leslie, J.F. & Summerell, B.A. 2006. The Fusarium Laboratory Manual. Blackwell Publishing Asia, First edition, 388 pp.

Morgan-Jones, G., White, J.F. & Rodrigues-Kabana, R. 1984. Fungal parasites of *Meloidogyne incognita* in an Alabama soybean field soil. Nematropica, 14: 93-96.

Nelson, P.E., Tousson, T.A. & Marasas, W.F. O. 1983. Fusarium Species, an Illustrated Manual for Identification. The Pennsylvania State University Press, University Park, 193 pp.

Nickle, W.R. 1991. Manual of Agricultural Nematology. Marcel Dekker, New York, 1035 pp.

Rizvi, M.N. & Shameel, M. 2006. *In vitro* nematicidal activities of sea weed extracts from Karachi coast. Pakistan Journal of Botany, 38(4): 1245-1248.

Roohibakhsh, A. & Ershad, D. 1995. Isolation of six Fusarium species from citrus leaf spots in Western region of Mazandaran Province. 12th Iranian Plant Protection Congress, Rasht, P. 234.

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.

Sankaranarayanan, C., Hussaini, S.S., Kumar, P.S. & Rangeswaran, R. 2002. Parasitism of *Meloidogyne incognita* eggs by *Fusarium oxysporum* and other fungi. Indian Journal of Nematology, 32 (1): 33-36.

Sharifi, K., Zare, R., Zamanizadeh, H. & Karimi Roozbehani, A.R. 2004. Investigation on the role of *Fusarium solani* in dry rot of potato tubers. 16th Iranian Plant Protection Congress, Tabriz. P. 208.

Singh, S. & Mathur, N. 2010. *In vitro* studies of antagonistic fungi against the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. Biocontrol Science and Technology, 20(3): 275-282.

Stirling, G.R. & Mankau, R. 1977. Parasitism of *Meloidogyne* eggs by a new fungal parasite. Journal of Nematology, 10(3): 236-240.

Sun, M.H., Gao, L., Shi, Y.X., Li, B.J. & Lio, X.Z. 2006. Fungi and actinomycetes associated with *Meloidogyne* spp. eggs and females in China and their biocontrol potential. Journal of Invertebrate Pathology, 93: 22-28.

Zareen, A., Siddiqui, I.A. & Javad Zaki, M. 2000. Fungal parasites of root-knot nematodes. Pakistan Journal of Biological Science, 3(31): 478-480.

Antagonistic effects of *Fusarium* spp. associated with females and egg masses on *Meloidogyne javanica* in laboratory conditions

Roghaye Karkhaneh[1], Mahyar Sheikholeslami[2], Ali Akbar Hojat-Jalali[3]

1. Department of Plant Protection, College of Agriculture, University of Kordestan, Iran

2. Department of Plant Protection, Agricultural and Natural Resources Research Center of Kermanshah, Iran

3. Department of Plant Protection, College of Agriculture, University of Razi, Kermanshah, Iran

Corresponding author: M. Sheikholeslami, email: m1sheikh@yahoo.com

Received: Jan., 07, 2014 3 (1) 73-81 Accepted: Sep., 12, 2015

Abstract

In order to investigate the antagonistic effects of the fungi associated with adult females and egg masses of *Meloidogyne javanica* in tomato and cucumber grown in greenhouses of Kermanshah province, research experiments were performed in 2009-2010. Among isolated fungi there were 49 isolates of *Fusarium* spp. from which *F. chlamydosporum, F. oxysporum, F. proliferatum, F. solani, F. tricinctum* and *F. verticillioides* were identified. For purification and propagation of the nematode, single egg masses of adult females were inoculated on the roots of cucumber seedlings in the growth chamber. After nematode propagation, pathogenicity experiments were carried out in transparent plastic trays with a completely randomized design. Antagonistic effects of these fungal species were investigated on *M. javanica* through parameters including parasitized eggs percent, hatching eggs percent and juvenile (J_2) mortality. *F. chlamydosporum, F. solani* and *F. oxysporum* had the highest ability to parasitizing the eggs. *F. solani* for its effect on preventing egg hatching and all Fusariums isolates for their effects on juvenile mortality had significant difference. In conclusion, *F. solani* had the highest antagonistic effects over others and also had the most abundance.

Keywords: biological control, root knot nematode, natural enemies, antagonistic fungi