مقاله تحقیقی

بررسی تأثیر *Bacillus subtilis* و کیتوزان در مهار زیستی نماتد مولد گره ریشه *Meloidogyne incognita* روی گوجه‌فرنگی

ابوالفضل یحیوی‌آزاد[۱]، آمنه حسینی‌خواه چوشلی[۲]، سیدسجاد سیدقاسمی[۳]

۱– دانشجوی دکتری بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.

۲– دانش‌آموخته دکتری بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات تهران، ایران.

۳– دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، مؤسسه آموزش عالی غیرانتفاعی دیلمان، لاهیجان، گیلان، ایران.

مسئول مکاتبات: ابوالفضل یحیوی‌آزاد، ایمیل: saeid.yahyavi1989@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۸/۱۱ ۱۰(۲)۱۵۳–۱۶۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۹/۰۵

چکیده

نماتد مولد گره ریشه (*Meloidogyne incognita*) از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای گیاهی گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum*)، بوده که در سراسر جهان و ازجمله ایران، خسارت اقتصادی ایجاد می‌کند. به‌منظور ارزیابی مهار زیستی این نماتد با استفاده از باکتری *Bacillus subtilis* و کیتوزان، پس از تکثیر نماتد روی رقم حساس گوجه‌فرنگی (Early Orbana Y) و تهیهٔ جمعیت خالص و انبوه این نماتد، گیاهان، با محلول سه در هزار پروبیو ۹۶ (حاوی باکتری *B. subtilis*) و کیتوپلاس (حاوی کیتوزان) آبیاری شدند. پس از گذشت ۴۵ روز از اعمال تیمارها، نهال‌ها از گلخانه به آزمایشگاه منتقل و شاخص‌های رشدی گیاه مانند وزن تر و خشک شاخساره، طول شاخساره، وزن تر و خشک ریشه و طول ریشه و هم‌چنین شاخص‌های بیماری‌زایی و رشد و نموی نماتد میانگین تعداد گال، تعداد توده تخم نماتد در ریشه، تعداد تخم نماتد در ریشه، تعداد لاروهای سن دوم در خاک و شاخص گال اندازه‌گیری شدند. نتایج نشان داد که استفاده از باکتری *B. subtilis* و کیتوزان، به‌تنهایی و یا در ترکیب با یکدیگر، سبب افزایش شاخص‌های رشدی گیاه و کاهش شاخص‌های بیماری‌زایی نماتد گردید. بنابراین بر اساس نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش می‌توان این‌گونه استنباط نمود که، استفاده از این ترکیبات به‌عنوان یکی از راهکارهای کارآمد در برنامه مدیریت تلفیقی نماتد گرهی ریشه در گوجه‌فرنگی، پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: گوجه‌فرنگی، مهار زیستی، نماتد مولد گره ریشه، کیتوزان، *Bacillus subtilis*

مقدمه

گوجه‌فرنگی با نام علمی (*Solanum lycopersicum* Linn.) از خانواده *Solanaceae* یکی از صیفی‌جات مهم در مناطق گرمسیری سراسر جهان و هم‌چنین یکی از مهم‌ترین محصولات صیفی در ایران است که با توجه به ارزش غذایی و اقتصادی بالا، این گیاه در خانواده بادمجانیان بعد از سیب‌زمینی، در رتبه دوم اهمیت قرار گرفته است (Behnamian & Masiha, 2002). نماتد مولد گره ریشه *Meloidogyne incognita*، دارای اهمیت اقتصادی زیادی بوده و گسترش و دامنهٔ میزبانی وسیعی دارد؛ به‌طوری‌که قادر است روی گونه‌های گیاهی مختلف، رشد و نمو داشته باشد (Lamberti *et al*., 2002). استفاده از ترکیبات شیمیایی مختلف از جمله؛ متیل بروماید، دازومت، کلروپیکرین، اتیلن دی بروماید (EDB) و غیره اگرچه در مواردی سبب کاهش جمعیت این نماتد شده، اما به‌دلیل هزینه‌های بالا، ماندگاری طولانی‌مدت در خاک و در نهایت، مخاطرات زیست‌محیطی، کاربرد آن‌ها محدود گردیده است (Dianli *et al*., 2019). در چند دههٔ اخیر،

بحث امکان مهار زیستی عوامل بیماری‌زای گیاهی با استفاده از عوامل آنتاگونیستی مورد توجه بسیاری از محققان قرار گرفته است (Sattar & Umar, 2011). به‌طور کلی، مهار زیستی نماتدها عبارت است از کاهش جمعیت آن‌ها در اثر فعالیت موجودات زنده از طریق دست‌ورزی طبیعت و یا وارد کردن دشمنان آن‌ها. میکروارگانیسم‌هایی که در ناحیه‌ی ریزوسفر گیاهان رشد می‌کنند، توانایی کاهش بیماری‌ها و افزایش میزان بازدهی گیاه میزبان در شرایط گلخانه را دارند (Hojjat Jalali & Ghasempour, 2006). میکروارگانیسم‌های مفیدی که اغلب در مهار زیستی نماتدهای انگل گیاهی استفاده می‌شوند، شامل قارچ‌های انگل تخم، قارچ‌های شکارچی نماتدها، قارچ‌های انگل داخلی، قارچ‌های ریشه، باکتری‌های ریشهٔ افزایش دهندهٔ رشد گیاه و باکتری‌های انگل اجباری می‌باشند (Sikora & Hoffman, 1992). باکتری *Bacillus* spp. به‌دلیل پراکنش گسترده، تحمل دماهای بالا، رشد سریع در محیط کشت مایع و تولید اسپور مقاوم، یکی از عوامل مهم در کنترل بیولوژیک بیمارگرهای گیاهی محسوب می‌شود (Mudawi & Idris, 2014). بر اساس مطالعات صورت گرفته، در بین گونه‌های مختلف جنس *Bacillus*، گونهٔ *Bacillus subtilis* از نظر توانایی تولید تعداد زیادی آنتی‌بیوتیک، متمایزتر از سایر گونه‌ها است و بیشتر پژوهش‌ها، مرتبط با این گونه می‌باشد. باکتری *B. subtilis* با ترشح متابولیت‌ها، آنتی‌بیوتیک‌ها، تولید هورمون‌های گیاهی (جیبرلین، سیتوکینین، آبسیزیک‌اسید و غیره)، بهبود جذب مواد معدنی و کنترل طیف وسیعی از بیماری‌های گیاهی به‌ویژه نماتدها، سبب افزایش عملکرد محصول می‌گردد (Bais *et al*., 2004; Kapilan & Thavaranjit, 2015). کیتوزان به‌عنوان یک ترکیب پوششی غیرسمی و زیست‌تخریب‌پذیر، علاوه بر دارا بودن خواص ضدقارچی، ضدباکتریایی و ضدویروسی، از بافت گیاهان در برابر حملات عوامل بیماری‌زا محافظت می‌نماید. از طرفی، افزودن کیتین و کیتوزان به خاک منجر به افزایش جمعیت میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کنندهٔ کیتین شده که موجب تجزیه‌ی کیتین موجود در پوستهٔ تخم نماتد، افزایش رشد گیاه، فعال کردن سیستم دفاعی گیاه و افزایش فعالیت آنزیم‌هایی مانند کیتیناز می‌گردد (Butista– Banos *et al*., 2004).

محققان طی سالیان گذشته، میزان تأثیر کیتین را در کنترل نماتد مولد گره ریشه *M. incognita* در گوجه‌فرنگی مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که استفاده از کیتین، تأثیری روی وزن تر گیاه نداشته، اما شاخص گال نماتد را تا مقدار ۶۴٪ کاهش داد. آن‌ها، افزایش فعالیت باکتری‌های کیتینولیتیک و تولید آنزیم‌های کیتیناز ناشی از استفاده از کیتین را به‌عنوان عامل اصلی در کاهش آلودگی نماتد عنوان کردند (De–Jin *et al*., 2005). نتایج مطالعات (Melo *et al*., 2012) روی ریشه‌های گوجه‌فرنگی آلوده به *M. incognita* نشان داد که کیتوزان به‌عنوان یک القاکنندهٔ مقاومت عمل نموده و سبب تحریک بیوسنتز لیگنین در دیواره‌های سلولی و تولید کیتینازها، گلوکانازها و مولکول‌های اضافی درگیر در مسیرهای سیگنال‌دهی درون سلولی و در نتیجه فعال‌سازی پاسخ‌های دفاعی در گیاه می‌شود. استفاده از ورمی‌کمپوست کود گاوی غنی‌شده با کیتین در خاک آلوده به *M. incognita* در گوجه‌فرنگی، سبب کاهش قابل‌توجه فاکتور تولیدمثل نماتد مذکور گردید (Castro *et al*., 2011). طی تحقیقی، کنترل نماتد مولد گره ریشه را در سه گیاه بادمجان، گوجه‌فرنگی و نخود با استفاده از کیتین و قارچ آنتاگونیست *Paecilomyces lilacinus* در ریزوسفر بررسی و مشاهده شد که استفادهٔ ترکیبی از این موارد، نسبت به کاربرد هر یک به تنهایی، تأثیر بازدارندگی بیشتری دارد (Mittal *et al*., 1995). نتایج یک بررسی در ارتباط با کاربرد هم‌زمان قارچ *P. lilacinus* و کیتوزان علیه لاروهای سن دوم و تخم نماتد مولد گره ریشه *Meloidogyne javanica* نشان داد که کیتوزان علاوه بر کاهش بقاء لاروهای سن دوم و درصد تفریخ تخم‌های نماتد، حضور این ماده، عملکرد قارچ‌های آنتاگونیست نماتدها را افزایش داد (Giannakou *et al*., 2020). بر اساس مطالعات دیگری نشان داده شده که *Bacillus* sp. علاوه بر افزایش شاخص‌های رشدی گوجه‌فرنگی، تأثیر بازدارندگی مناسب و قابل‌توجهی روی میزان تفریخ تخم و

هم‌چنین کاهش تعداد گال‌های ناشی از نماتد *M. incognita* داشته است (Singh & Siddiqui, 2008). نتایج تحقیقات پیشین نشان داده که باکتری *B. subtilis* دو آنزیم پروتئاز و کیتیناز تولید می‌کند که دلیل اصلی خاصیت آنتاگونیستی این باکتری‌ها علیه نماتدهای مولد گره ریشه، به‌ویژه *M. incognita* می‌باشد (Lee *et al*., 2016). بر اساس (Mokbel *et al*., 2022) مشخص گردید که استفاده از *B. subtilis* منجر به کاهش قابل‌توجه تولیدمثل نماتد *M. incognita* و هم‌چنین افزایش شاخص‌های رشدی گیاه فلفل گردید. مطالعات پیشین نشان داد که استفاده از باکتری *Bacillus firmus* به‌تنهایی و یا در ترکیب با سم نماتدکش اکسامیل و باکتری *Pasteuria penetrans*، قادر به کنترل نماتد مولد گره ریشه می‌باشد (Giannakou *et al*., 2004). بر اساس مطالعات اخیر مشخص گردید که باکتری *B. subtilis* از طریق مهار تفریخ تخم و افزایش مرگ و میر لاروهای سن دوم نماتد *M. incognita*، کارائی بسیار خوبی در مهار این نماتد داشته است. این باکتری در صورت وجود کیتین در بستر، مقادیر بالای کیتیناز، کیتوزاناز و پروتئاز تولید می‌کند (Soliman *et al*., 2019). نتایج مطالعات (Elkelany *et al*., 2020) نشان داد که استفادهٔ هم‌زمان از ریزوباکترهای تقویت‌کنندهٔ رشد گیاه از قبیل؛ *B. subtilis* و هم‌چنین کیتوزان، علاوه بر کاهش جمعیت نماتد *M. incognita* در ریشه و خاک، تعداد گال و تعداد تودهٔ تخم، سبب افزایش شاخص‌های رشدی گیاه بادمجان شدند.

با توجه به اهمیت گیاه گوجه‌فرنگی به‌عنوان یک محصول مهم اقتصادی و هم‌چنین با عنایت به اثرات زیان‌بار استفاده از سموم شیمیایی برای انسان و محیط زیست و هزینه‌های بالای استفاده از آن، در حال حاضر استفاده از عوامل مهار زیستی و القاکننده‌های سیستم دفاعی گیاه به‌عنوان روشی سالم و جایگزین روش‌های شیمیایی، در چارچوب مدیریت تلفیقی نماتدهای انگل گیاهی موردتوجه بسیاری از پژوهشگران قرار گرفته است. هدف از انجام این تحقیق، بررسی تأثیر باکتری *B. subtilis* و کیتوزان جهت مهار زیستی نماتد *M. incognita* در گوجه‌فرنگی و نیز بررسی تلفیق هر دو ترکیب و در نهایت، معرفی تیمار برتر جهت انجام مطالعات بعدی و نیل به اهداف کاربردی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

الف) شناسایی و تهیهٔ جمعیت خالص و انبوه نماتد مولد گره ریشه *M. incognita*

به‌منظور تهیهٔ جمعیت خالص نماتد مذکور، یک کیسه تخم از ریشهٔ گوجه‌فرنگی آلوده به نماتد که قبلا شناسایی و تعیین گونه گردیده بود، جدا و در مجاورت ریشهٔ یک گیاهچه چهار برگی گوجه‌فرنگی رقم ارلی اوربانا وای (Early Urbana Y) در گلدان حاوی خاک سترون قرار داده شد. پس از گذشت دو ماه، تخم نماتد از ریشه‌های آلوده با استفاده از هیپوکلریت‌سدیم پنج درصد استخراج گردید (Hussy & Baker, 1973). جهت تعیین گونهٔ نماتد، از انتهای بدن نماتد ماده به‌روش Taylor & Netscher (1974) برش تهیه و مشخصات شکل‌شناسی آن مورد بررسی قرار گرفت.

ب) تهیهٔ مایه تلقیح

باکتری *B. subtilis* به‌صورت مایع حاوی اسپورهای باکتری، از شرکت فناوران زیستی طبیعت‌گرا (بایوران) با نام تجاری پروبیو ۹۶ فراهم شد. هم‌چنین کیتوزان برای انجام آزمایش، از شرکت کیمیا سبزآور به‌صورت ترکیب تجاری کیتوپلاس تهیه گردید.

ج) آزمایشات گلخانه‌ای

پس از رسیدن گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی به مرحله چهار برگی، به‌منظور تلقیح نماتد در اطراف طوقه گیاه، به ازای هر کیلوگرم خاک، حدود ۲۰۰۰ عدد تخم و لارو سن دوم با ایجاد چهار حفره به عمق تقریبی سه سانتی‌متر و به‌دنبال آن تزریق سوسپانسیون باکتری و کیتوزان با غلظت سه در هزار در پای ریشهٔ گیاهچه‌ها انجام شد. گلدان‌ها در شرایط گلخانه با دمای حدود ۲۷–۲۵ درجه سلسیوس نگه‌داری و به‌طور مرتب آبیاری صورت گرفت. این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با هشت تیمار (شاهد سالم، کاربرد

کیتوزان به‌تنهایی در گیاه سالم، کاربرد باکتری *B. subtilis* به‌تنهایی در گیاه سالم، کابرد ترکیب کیتوزان و *B. subtilis* در گیاه سالم، شاهد آلوده به *M. incognita*، کاربرد کیتوزان به‌تنهایی در گیاه آلوده به نماتد، کاربرد باکتری *B. subtilis* به‌تنهایی در گیاه آلوده به نماتد، کابرد ترکیب کیتوزان و *B. subtilis* در گیاه آلوده به نماتد) در چهار تکرار انجام شد. پس از گذشت ۴۵ روز از اعمال تیمارها، گلدان‌ها به آزمایشگاه منتقل و شاخص‌های رشدی گیاه (وزن تر شاخساره، وزن خشک شاخساره، طول شاخساره، وزن تر ریشه، وزن خشک ریشه و طول ریشه) و شاخص‌های بیماری‌زایی نماتد (میانگین تعداد گال، تعداد توده تخم نماتد در ریشه، تعداد تخم نماتد در ریشه، تعداد لاروهای سن دوم در خاک و شاخص گال) اندازه‌گیری شدند. تخم نماتد با روش (Hussey & Barker, 1973) و لاروهای سن دوم با استفاده از روش (Jenkins, 1964) استخراج و شمارش گردید. هم‌چنین شاخص گال، به‌روش پیشنهادی (Marley & Hillocks, 1996) بر اساس تعداد گال‌ها در یک گرم از ریشه تعیین شد.

د) تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

به‌منظور تجزیه و تحلیل داده‌های آماری برای شاخص‌های مورد مطالعه از لحاظ نرمال بودن و منحنی توزیع یکنواختی واریانس، از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۴ استفاده گردید. به‌منظور مقایسه میانگین‌ها داده‌ها، از آزمون توکی در سطح احتمال پنج درصد و هم‌چنین برای رسم جداول و گراف‌ها به‌ترتیب از نرم‌افزارهای WORD و EXCEL استفاده شد.

نتایج

الف) شناسایی گونهٔ نماتد ریشه گرهی

پس از جداسازی و استخراج نماتد مولد گره ریشه، بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی نماتد ماده و با استفاده از کلید شناسایی Eisenback (1985) گونه نماتد، *M. incognita* تشخیص داده شد.

ب) بررسی تأثیر باکتری *B. subtilis* و کیتوزان بر شاخص‌های رشدی گوجه‌فرنگی

در مطالعات گلخانه‌ای، بر اساس جدول تجزیه واریانس داده‌ها، مشخص شد که بین تأثیر باکتری *B. subtilis* و کیتوزان بر روی نماتد *M. incognita* و شاخص‌های رشدی گوجه‌فرنگی، در تمامی شاخص‌ها در سطح احتمال یک درصد، اختلاف آماری معنی‌داری وجود دارد (جدول ۱). در شاخص وزن تر شاخساره، استفاده از باکتری *B. subtilis* به‌تنهایی و یا در ترکیب با کیتوزان، روی گیاه سالم به‌ترتیب با میانگین ۵۴۸/۶۱ و ۳۵۸/۲۸ گرم، بیشترین تأثیر را داشته و در گیاه آلوده به *M. incognita* هم، کاربرد هم‌زمان *B. subtilis* و کیتوزان، با میانگین ۴۲۸/۶۸ گرم بالاترین عملکرد را از خود نشان داد. بیشترین مقدار وزن خشک شاخساره با میانگین ۶۶/۴۲ گرم، مربوط به تیمار استفاده هم‌زمان از کیتوزان و باکتری *B. subtilis* در گیاه سالم بود. در میان تیمارهای آلوده به نماتد نیز مشاهده شد که استفاده از باکتری *B. subtilis* به‌تنهایی و یا در ترکیب با کیتوزان، به‌ترتیب با میانگین ۴۴/۴۳ و ۴۵/۰۹ گرم، بهترین نتایج را در خصوص وزن خشک شاخساره گوجه‌فرنگی ارائه داد. بیشترین طول شاخساره در تیمار استفاده هم‌زمان از کیتوزان و باکتری *B. subtilis* در گیاه سالم با میانگین ۱۲۲/۲۵ سانتی‌متر حاصل گردید. هم‌چنین، مشخص شد که هر سه تیمار کیتوزان به‌تنهایی، باکتری *B. subtilis* به‌تنهایی و یا کاربرد هم‌زمان کیتوزان و *B. subtilis* موجب افزایش معنی‌دار طول شاخساره گوجه‌فرنگی سالم نسبت به گیاه شاهد آلوده به نماتد شد، اما هیچ تفاوت معنی‌داری بین این سه تیمار مشاهده نگردید (جدول ۲). بیشترین وزن تر ریشه‌ی گوجه‌فرنگی با میانگین ۸۱/۶۷ گرم مربوط به تیمار استفاده از باکتری *B. subtilis* در گیاه سالم و میانگین ۷۲/۶۸ گرم در استفاده هم‌زمان از کیتوزان و باکتری *B. subtilis* در گیاه آلوده به نماتد به‌دست آمد. هم‌چنین در تیمارهای آلوده به نماتد نیز مشاهده شد که استفاده از کیتوزان و باکتری *B. subtilis* به‌تنهایی یا در کاربرد هم‌زمان با یکدیگر، اختلاف آماری معنی‌داری نسبت به شاهد آلوده به نماتد داشته و عملکرد خوب و مناسبی از

خود نشان دادند. نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین مقدار وزن خشک ریشه در گیاه سالم، مربوط به تیمار استفاده از *B. subtilis* به‌تنهایی و یا در ترکیب با کیتوزان به‌ترتیب با میانگین ۳۸/۴۲ و ۳۷/۶ گرم بود. از سویی دیگر، در گیاه آلوده به نماتد، کاربرد هم‌زمان کیتوزان و باکتری *B. subtilis* با میانگین وزن خشک ۳۴/۸۸ گرم، بالاترین مقدار این شاخص را به خود اختصاص داد. بر اساس نتایج مقایسه میانگین داده‌ها در شاخص طول ریشه، مشخص گردید که بالاترین مقدار طول ریشه گوجه‌فرنگی مربوط به تیمار استفاده از باکتری *B. subtilis* به‌تنهایی و یا در ترکیب با کیتوزان به‌ترتیب با میانگین ۳۶/۷۵ و ۳۵/۵ سانتی‌متر در گیاه سالم است. هم‌چنین نتایج مربوط به مقایسه گیاهان آلوده به نماتد نیز نشان داد که استفاده از کیتوزان و باکتری *B. subtilis* در ترکیب با یکدیگر، به‌طور معنی‌داری موجب افزایش طول ریشه نسبت به گیاهان آلوده به نماتدی شد که از این ترکیبات روی آن‌ها استفاده نشده بود (جدول ۲).

جدول ۱– تجزیه واریانس شاخص‌های رشدی گوجه‌فرنگی آلوده به *M. incognita* تیمار شده با پروبیو ۹۶ و کیتوپلاس

Table 1. Analysis of variance of Growth indices of tomato infected with *M. incognita* treated with Probio 96 and Kitoplas

Sources of Variance	df	Mean of Square (MS)					
		Fresh shoot weight (gr)	Dry shoot weight (gr)	Height shoot (cm)	Fresh root weight (gr)	Dry root weight (gr)	Length root (cm)
Treatment	7	95043.54**	760.85**	1576.34**	1134.34**	248.34**	236.94**
Error	24	238.6	41.81	61.31	18.61	3.63	8.86
Total	31	–	–	–	–	–	–
F Value	–	40.77	18.7	26.35	63.89	31.47	27.9
CV	–	12.98	15.76	9.16	7.35	6.87	11.57

** معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

** Significant at 1% probability level

جدول ۲– مقایسه میانگین شاخص‌های رشدی گوجه‌فرنگی آلوده به *M. incognita* تیمار شده با پروبیو ۹۶ و کیتوپلاس

Table 2. Comparison of means of Growth indices of tomato infected with *M. incognita* treated with Probio 96 and Kitoplas

Treatments	Fresh shoot weight (gr)	Dry shoot weight (gr)	Height shoot (cm)	Fresh root weight (gr)	Dry root weight (gr)	Length root (cm)
Control	246.34 ^{cd}	33.97 ^{bcd}	72.25 ^{c}	53.84 ^{de}	21.38 ^{cd}	19.25 ^{de}
Chitosan	359.85 ^{bc}	45.73 ^{bc}	81.5 ^{bc}	60.86 ^{cd}	23.95 ^{cd}	23.75 ^{cd}
B. subtilis	548.61 ^{a}	48.19 ^{b}	98.75 ^{b}	81.67 ^{a}	38.42 ^{a}	36.75 ^{a}
Control + *B. subtilis*+Nematode	358.28 ^{bc}	66.42 ^{a}	122.25 ^{a}	67.52 ^{bc}	37.6 ^{a}	35.5 ^{ab}
Chitosan+Nematode	294.55 ^{c}	31.53 ^{cd}	84.75 ^{bc}	47.8 ^{e}	24.17 ^{bc}	22.5 ^{cd}
B. subtilis+Nematode	315.21 ^{bc}	44.43 ^{bc}	84.5 ^{bc}	57.74 ^{cd}	27.79 ^{bc}	22.75 ^{cd}
Chitosan+ *B. subtilis*+Nematode	428.68 ^{b}	45.09 ^{bc}	85.75 ^{bc}	72.68 ^{ab}	34.88 ^{a}	28.75 ^{bc}
Nematode	176.57 ^{d}	19.98 ^{d}	53.25 ^{d}	26.5 ^{f}	18.34 ^{d}	14.25 ^{e}

بر اساس آزمون توکی، میانگین‌ها با حروف مشابه در هر ستون در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی‌داری ندارند

According to Tukey test, means with similar letters in each column were not statistically different at 5% probability level

ج) بررسی تأثیر باکتری *B. subtilis* و کیتوزان بر شاخص‌های بیماری‌زایی *M. incognita* در گوجه‌فرنگی

بر اساس جدول تجزیه واریانس داده‌ها، بین تیمامی تیمارها در سطح احتمال یک درصد، اختلاف آماری معنی‌داری وجود دارد (جدول ۳). مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که در ارتباط با شاخص تعداد گال نماتد، استفاده از باکتری *B. subtilis* به‌تنهایی و یا در ترکیب با کیتوزان به مراتب تأثیر بیشتری نسبت به سایر تیمارها داشت. در شاخص توده تخم نماتد در ریشه گوجه‌فرنگی آلوده به نماتد *M. incognita*، هر سه تیمار مورد آزمایش (استفاده از باکتری *B. subtilis* و کیتوزان به‌تنهایی یا در ترکیب با یکدیگر) موجب کاهش توده تخم نماتد در ریشه گوجه‌فرنگی شده و هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری بین این سه تیمار مشاهده نگردید. در دو شاخص تعداد تخم نماتد در یک گرم ریشهٔ گوجه‌فرنگی آلوده به نماتد *M. incognita* و تعداد لاروهای سن دوم نماتد در ۱۰۰ گرم خاک مشخص گردید که تفاوت معنی‌داری بین هر سه تیمار استفاده از کیتوزان و باکتری *B. subtilis* به‌تنهایی و در ترکیب با یکدیگر وجود نداشت. به‌عبارتی می‌توان این‌گونه اظهار داشت که تمامی تیمارها تأثیر قابل‌قبولی از خود نشان دادند. در ارتباط با شاخص گال نماتد (Gall Index)، بهترین عملکرد را تیمار حاوی استفاده ترکیبی از *B. subtilis* و کیتوزان داشته، به‌طوری‌که با سایر تیمارها، اختلاف معنی‌داری نشان دادند (جدول ۴).

جدول ۳– تجزیه واریانس شاخص‌های بیماری‌زایی نماتد *M. incognita* در گوجه‌فرنگی تحت تأثیر *B. subtilis* و کیتوزان

Table 3. Analysis of variance of pathogenicity indices of *M. incognita* on tomato under the influence of *B. subtilis* and Chitosan

Sources of Variance	df	Mean of Square (MS)				
		The number of galls	Egg mass	The number of egg (in 1gr root)	Larvae population (in 100 gr soil)	Gall Index
Treatment	3	622.83**	572.25**	28147098.73**	712563.06**	8.19**
Error	12	4.29	5.42	831108.44	3591.31	0.75
Total	15	–	–	–	–	–
F Value		159.02	113.75	33.77	19.91	177.74
CV	–	11.51	15.91	20.87	20.80	8.51

** معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

** Significant at 1% probability level

جدول ۴– مقایسه میانگین شاخص‌های بیماری‌زایی نماتد *M. incognita* در گوجه‌فرنگی تحت تأثیر *B. subtilis* و کیتوزان

Table 4. Comparison of means of Pathogenicity indices of *M. incognita* on tomato under the influence of *B. subtilis* and Chitosan

Treatments	The number of galls	Egg mass	The number of egg (in 1gr root)	Larvae population (in 100 gr soil)	Gall Index
Chitosan+Nematode	16 ^{b}	10 ^{b}	3068.5 ^{b}	235.8 ^{b}	3 ^{b}
B. subtilis+Nematode	13 ^{bc}	8.25 ^{b}	3031.3 ^{b}	211.5 ^{b}	3 ^{b}
Chitosan+ *B. subtilis*+Nematode	9 ^{c}	7.5 ^{b}	3055.75 ^{b}	207 ^{b}	2 ^{c}
Nematode	36 ^{a}	32.5 ^{a}	8347.3 ^{a}	487.5 ^{a}	4 ^{a}

بر اساس آزمون توکی، میانگین‌ها با حروف مشابه در هر ستون در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی‌داری ندارند

According to Tukey test, means with similar letters in each column were not statistically different at 5% probability level

بحث

نتایج بیانگر این امر بود که وزن تر، وزن خشک و طول شاخساره در گیاهان آلوده به نماتد، به‌طور معنی‌داری کمتر از گیاهان سالم بود. در واقع، چنین استنباط می‌شود که آلودگی ریشه‌ی گیاه گوجه‌فرنگی به نماتدهای مولد گره ریشه مانند *M. incognita* می‌تواند موجب اختلال در جذب و انتقال آب و مواد غذایی به بخش‌های فتوسنتزکننده و در نتیجه، کاهش حجم اندام‌های هوایی گیاه و کاهش وزن تر و خشک شاخساره شود. این نتایج مشابه نتایج به‌دست آمده توسط محققان پیشین مبنی بر تأثیر نماتد در کاهش رشد طولی گیاه است (Berg & Taylor, 2008). در ارتباط با افزایش وزن تر، وزن خشک و طول شاخساره در تیمارهای کاربرد هم‌زمان می‌توان این‌گونه استنباط نمود که در تیمارهایی که از باکتری *B. subtilis* و کیتوزان استفاده شده بود، رشد بهتر و طول بیشتر بوته ناشی از این بوده که باکتری *B. subtilis* سبب افزایش رشد و اندازه طول بوته شده و کیتوزان نقش تکمیل‌کننده را داشته است. از طرف دیگر، می‌توان نتیجه گرفت ترکیب باکتری *B. subtilis* و کیتوزان از طریق بازدارندگی تخم‌های نماتد، موجب کاهش میزان خسارت نماتد در گیاه شده است. نتایج به‌دست آمده در پژوهش حاضر، مشابه نتایج (Elkelany *et al*., 2020) بود که بیان کردند استفاده از باکتری *B. subtilis* سبب افزایش ارتفاع ساقه گیاه، وزن تر و خشک شاخساره و تعداد برگ گیاه بادمجان می‌شود. هم‌چنین، این پژوهشگران در تحقیقات خود، اثر مثبت کیتوزان بر شاخص‌های رشدی بادمجان را گزارش نمودند که مطابق نتایج به‌دست آمده در پژوهش حاضر بود. هم‌چنین، نتایج پژوهش حاضر، در تطابق با نتایج گزارش شده توسط Khalil & Badawy, (2012) بود که به توانایی کیتوزان در تحریک، تولید ترکیبات دفاعی، متابولیت‌های ثانویه، بیان ژن‌هایی که در تولید آنزیم‌های این متابولیت‌ها نقش دارند و هم‌چنین القاء مقاومت سیستمیک در گیاه و تعدیل خواص بیولوژیکی و فیزیکی خاک اشاره کردند که باعث بهبود شاخص‌های رشدی گیاه مانند طول و وزن اندام‌های هوایی گیاه می‌شود. محققان با بررسی کاربرد کیتوزان در مدیریت نماتدهای مولد گره ریشه بیان کردند که استفاده از کیتوزان موجب افزایش رشد گیاه، یعنی طول گیاه، وزن تر و خشک، باروری گرده و عملکرد گیاه و هم‌چنین برخی از پارامترهای بیوشیمیایی مانند کلروفیل، مقدار کاروتنوئید و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گیاه بادمجان شد (Ashif *et al*., 2017). مطالعات پیشین نشان داده که ایجاد خسارت به ریشه توسط نماتد مولد گره ریشه *M. incognita* باعث می‌شود که گیاه در پی جبران خسارت وارده به خود، ریشه‌های مویین بیشتری تولید کرده و در نتیجه، سبب افزایش وزن ریشه گیاه می‌گردد. از سوی دیگر، نتایج به‌دست آمده در پژوهش‌های پیشین نشان داده که استفاده از باکتری *B. subtilis* باعث افزایش طول ریشه گیاه بادمجان شده که این افزایش طول ریشه به نوبه خود سبب افزایش جذب مواد معدنی و به‌دنبال آن تولید و تنظیم هورمون‌های گیاهی منجر به افزایش زیست‌توده می‌گردد (Elkelany *et al*., 2020) که با نتایج به‌دست آمده در پژوهش حاضر، مطابقت دارد. مطالعات مشابه تحقیق حاضر نشان داده که باکتری *B. subtilis* در خاک اطراف ریشه‌ی گیاهان زنده مانده و می‌تواند با ترشح مواد تقویت‌کننده‌ی رشد گیاه سبب بهبود شاخص‌های رشدی شده و علاوه بر آن، موجب سرکوب میکروارگانیسم‌های بیمارگر در اطراف ریشه‌ی گیاه می‌گردد (Tian *et al*., 2007; Lugtenberg & Kamilova, 2009). پژوهشگران مختلفی بیان کردند که ترکیبات هورمونی ترشح‌شده از باکتری‌های *Bacillus amyloliquefaciens* و *B. subtilis* (برخی مواد افزایش‌دهنده رشد گیاهی مانند جیبرلین و اندول استیک اسید) اثر چشمگیری در فعالیت‌های رشدی گیاه دارد؛ زیرا ترکیبات رشدی، نقش مهمی در مقاومت گیاه در برابر عوامل بیماری‌زای ریشه به‌ویژه نماتدهای مولد گره ریشه *Meloidogyne* spp. داشته و باعث می‌شود که ریشه‌های آسیب دیده به سرعت توسط ریشه‌های جدید جایگزین و بدین ترتیب انشعابات فرعی ریشه افزایش می‌یابد (Reva *et al*., 2004). از سوی دیگر، نتایج به‌دست آمده در این پژوهش، مشابه نتایج مطالعات پیشین، به توانایی کیتوزان در تحریک و تولید ترکیبات دفاعی و تعدیل خواص

بیولوژیکی و فیزیکی خاک اشاره کردند که به دنبال آن، بهبود شاخص‌های رشدی گیاه مانند افزایش طول و وزن ریشه و ساقه به‌دست خواهد آمد (Khalil & Badawy, 2012; El–Sayed & Mahdy, 2015).

نتایج به‌دست آمده در تحقیق حاضر، در ارتباط با شاخص‌های بیماری‌زایی نماتد مولد گره ریشه *M. incognita*، مشابه نتایج گزارش شده توسط Elkelany *et al.*, 2020) بود که بیان کردند بیشترین میزان کاهش جمعیت در لاروهای سن دوم نماتد، تعداد گال در بوته، تعداد توده تخم در ریشه و تعداد تخم موجود در توده تخم، زمانی به‌دست آمد که خاک با باکتری *B. subtilis* تیمار شده بود. در تحقیق دیگری مشخص شده است که باکتری *B. subtilis* موجب مهار تفریخ تخم و افزایش مرگ و میر لاروهای سن دوم نماتد *M. incognita* می‌شود (Soliman *et al.*, 2019) که نتایج پژوهش حاضر هم این موضوع را تأیید می‌نماید. تاکنون محققان مختلفی، تأثیر قابل توجه *Bacillus* spp. را روی نماتدهای انگل گیاهی گزارش کرده‌اند و اظهار داشتند که باکتری *B. subtilis* لیپوپپتیدهای حلقوی سورفاکتین و ایتورین را تولید می‌کند که نقش مهمی در افزایش درصد مرگ و میر لاروهای نماتد دارند (Kavitha *et al.*, 2012; Engelbrecht *et al.*, 2018). هم‌چنین، در این پژوهش مشخص شد که استفاده از کیتوزان به‌همراه باکتری *B. subtilis* به‌طور معنی‌داری موجب کاهش تعداد گال و شاخص گال می‌گردد. این نتایج مشابه نتایج گزارش‌شده توسط Elkelany *et al.*, 2020) بود که بیان کردند کیتوزان موجب کاهش شدید تعداد گال‌های ریشه در مقایسه با شاهد شد. مشابه نتایج حاضر، محققان بیان کردند که استفاده از مخلوط کیتین، جدایه‌های قارچ *Trichoderma* spp. و باکتری *Bacillus* spp. سبب کاهش تفریخ تخم نماتد مولد گره ریشه در گیاه کلم گردید (Loganathan *et al.*, 2010). محققان به این نتیجه رسیده‌اند که استفاده از ترکیبات طبیعی یا شیمیایی مانند کیتوزان از طریق القاء مقاومت، اثرات بازدارندگی روی نماتدهای بیمارگر گیاهی دارد. این القاء مقاومت، به‌صورت بهبود سیستم دفاعی گیاه علیه نماتد می‌باشد که پس از تحریک گیاه توسط القاءکننده، اتفاق می‌افتد. این نوع مقاومت اکتسابی اثر طولانی‌مدت داشته و گاهی تا پایان عمر گیاه پایدار باقی می‌ماند (Yedidia *et al.*, 2000).

به‌طور کلی نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که باکتری *B. subtilis* به‌تنهایی و یا در ترکیب با کیتوزان، قادر به تقویت ویژگی‌های رشدی گیاه و تضعیف خصوصیات زیستی نماتد مولد گره ریشه در گوجه‌فرنگی است. بهترین تأثیر در استفاده هم‌زمان از کیتوزان و باکتری *B. subtilis* روی گیاه آلوده به نماتد مشاهده شد. رویکرد مبتنی بر استفاده از باکتری‌ها و عوامل القاءکننده مقاومت، می‌تواند یک راهکار امیدبخش در مهار زیستی نماتدهای مولد گره ریشه *Meloidogyne* spp. به‌شمار رود، زیرا به کاهش میزان استفاده از سموم شیمیایی کمک می‌کند.

سپاسگزاری

در پایان، نگارندگان این مقاله از همکاری صمیمانهٔ مدیران و کارکنان شرکت فناوری زیستی طبیعت‌گرا (بایوران)، شرکت کیمیاسبزآور و کلینیک گیاه‌پزشکی سبزینه واقع در شهرستان سیاهکل که در اجرای این پژوهش نهایت همکاری را داشته و از هیچ کمکی دریغ ننمودند، کمال تشکر و قدردانی را دارند.

References

Asif, M., Ahmad, F., Tariq, M., Khan, A., Ansari, T., Khan, F. & Siddiqui, A.M. 2017. Potential of chitosan alone and in combination with agricultural wastes against the root–knot nematode, *Meloidogyne incognita* infesting egg plant. Journal of Plant Protection Research, 57(3): 1–8.

Bais, H.P., Fall, R. & Vivanco, J.M. 2004. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. Plant Physiology, 134: 307–319.

Behnamian, M. & Masiha, S. 2002. Tomato (*Lycopersicon esculentum*). Setoudeh Publication, Tabriz, Iran, 110 pages.

Berg, R.H. & Taylor, C.G. 2008. Cell biology of plant nematode parasitism. Heidelberg, Germany.

Butista–Banos, S., Hernandez–Lopez, M. & Bosquez–Molina, E. 2004. Growth inhibition of selected fungi by chitosan and plant extracts. Mexican Journal of Phytopathology, 22: 178–186.

Castro, L., Flores, L. & Uribe, L. 2011. Effect of vermicompost by quitina sobre in control of *Meloidogyne incognita* on tomate. Agronomía Costarricense, 35(2): 21–32.

De–Jin, R., Suh, J.W., Park, R.D., Kim, Y.W., Krishnan, H.B. & Kim, K.Y. 2005. Effect of chitin compost and broth on biological control of *Meloidogyne incognita* on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Nematology, 7(1): 125–132.

Dianli, Z., Xiaoxue, J., Zhen, M., Wenzhe, Q. & Kang, Q. 2019. Effects of fumigation with 1,3–dichloropropene on soil enzyme activities and microbial communities in continuous–cropping soil. Ecotoxicology and Environmental Safety, 169: 730–736.

Eisenback, J.D. 1985. Detailed morphology and anatomy of second–stage juveniles, males and females of the genus *Meloidogyne* (root knot nematode). In: Sasser, J.N. and Carter, C.C. (eds) An Advanced Treatise on *Meloidogyne*. Volume I. Biology and Control. A cooperative publication of the Department of Plant Pathology and the United States Agency for International Development, North Carolina State University Graphics, Raleigh, North Carolina, 47–77.

Elkelany, U.S., El–Mougy, N.S. & Abdel–Kader, M.M. 2020. Management of root–knot nematode *Meloidogyne incognita* of egg plant using some growth–promoting rhizobacteria and chitosan under greenhouse conditions. Egyptian Journal of Biological Pest Control, 30: 134.

El–Sayed, S.M. & Mahdy, M.E. 2015. Effect of chitosan on root–knot nematode, *Meloidogyne javanica* on tomato plants. International Journal of Chemtech Research, 7: 1985–1992.

Engelbrecht, G., Horak, I., Peet, J., van Rensburg, J. & Claassens, S. 2018. *Bacillus*–based bionematicides: Development, modes of action and commercialization. Biocontrol Science and Technology, 28(7): 629–653.

Giannakou, I.O., Karpouzas, D.G. & Prophetou–Athanasiadou, D. 2004. A novel non–chemical nematicide for the control of root–knot nematodes. Applied Soil Ecology, 26: 69–79.

Giannakou, I.O., Tasoula, V., Tsafara, P., Varimpopi, M. & Antoniou, P. 2020. Efficacy of *Purpureocillium lilacinum* in combination with chitosan for the control of *Meloidogyne javanica*. Biocontrol Science and Technology, 30(8): 1–14.

Hojjat Jalali, A.A. & Ghasempour, H. 2006. Biological control of plant parasitic nematodes, progress, problems and perspectives (Compilation: Graham, R Stirlling). Razi University of Kermanshah Publication, First Edition, 350p. (In Persian with English Summary).

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

Jenkins, W.R. 1964. A rapid centrifugel flotation technique for separating nematodes from soil. Plant Diseases, 48: 692.

Kapilan, R. & Thavaranjit, A. 2015. Promotion of vegetable seed germination by soil borne bacteria. Archives of Applied Science Research, 7(8): 17–20.

Kavitha, P.G., Jonathan, E.I. & Nakkeeran, S. 2012. Effects of crude antibiotic of *Bacillus subtilis* on hatching of eggs and mortality of juveniles of *Meloidogyne incognita*. Nematologia Mediterranea, 40: 203–206.

Khalil, M.S. & Badawy, M.E. I. 2012. Nematicidal activity of a biopolymer chitosan at different molecular weights against root–knot nematode, *Meloidogyne incognita*. Plant Protection Science, 48: 170–178.

Lamberti, F., Sasoneli, N., Daddabbo, T., Ambrico, A. & Schiavone, D. 2002. Relationship between plant parasitic nematods and *Verticillium dahliae* in olive. ISHS Acta Horticulture. 5–6.

Lee, Y., Cho, J., Moon, J. & Kim, K. 2016. Identification of 2–methylbutyric acid as a nematicidal netabolite, and biocontrol and biofertilization potentials of *Bacillus pumilus* L1. Korean Journal of Soil and Fertilizer, 49: 401–408.

Loganathan, M., Sible, G.V., Maruthasalam, S., Saravanakumar, D., Raguchander, T., Sivakumar, M. & Samiyappan, R. 2010. *Trichoderma* and chitin mixture based bioformulation for the management of head rot (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) deBary)–root–knot (*Meloidogyne incognita* Kofoid and White; Chitwood) complex diseases of cabbage. Archives of Phytopathology and Plant Protection 43(10): 1011–1024.

Lugtenberg, B. & Kamilova, F. 2009. Plant growth promoting rhizobacteria. Annual Review of Microbiology, 63: 541–556.

Marley, P.S. & Hillocks, R.J. 1996. Effect of root–knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) on *Fusarium* wilt in pigeonpea (*Cajanus cajan*). Crop Protection Research Unit, Department of Agriculture, University of Reading, Earley Gate, Reading RG6 2AT, UK, 46(3): 15–20.

Melo, T.A., Serra, I.M.R.S., Silva, G.S.S. & Sousa, R.M.S. 2012. natural products applied to the management of *Meloidogyne incognita* in tomato plants. Summa Phytopathologica, 38(3): 223–227.

Mittal, N., Saxena, G. & Mukerji, K. G. 1995. Integrated control of root knot disease in three crop plants using chitin and *Paecilomyces lilacinus*. Crop Protection, 14: 647–651.

Mokbel, A.A., Abd El–Hameed, H.K.A., Massoud, H.M., Elsayed, T.S.M., Sherif, N.A. M., Helal, N.H.S. & El–Saedy, M.A.M. 2022. Impact of *Bacillus subtilis*, *Trichoderma* spp. and the Bioproduct Top Perfect on *Meloidogyne incognita* infecting pepper plants. Alexandria Journal of Agricultural Sciences, 67(3): 175–181.

Mudawi, H.I. & Idris, M.O. 2014. The efficacy of *Trichoderma* spp. and *Bacillus* isolates in the control of chickpea wilt pathogens. Agriculture, Forestry, and Fisheries, 3(5): 346–351.

Reva, O.N., Dixelius, C., Meijer, J. & Priest, F.G. 2004. Taxonomic characterization and plant colonizing abilities of some bacteria related to *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. FEMS Microbiology Ecology, 48(2): 249–259.

Sattar, Q.A. & Umar, D.M. 2011. Optimization of cultural conditions for protease production by *Bacillus subtilis* EFRL 01. African Journal of Biotechnology, 10(26): 5173–5181.

Sikora, R.A. & Hoffman, H.S. 1992. Importance of plant Health – promoting rhizobacteria for the control of soil – borne fungal disease and plant parasitic nematodes. Arabian Journal plant protection, 10: 48–53.

Singh, P. & Siddiqui, Z.A. 2008. Biocontrol of root–knot nematode *Meloidogyne incognita* by the isolates of *Bacillus* on tomato. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 43(14):1423–1434.

Soliman, G.M., Ameen, H.H., Abdel–Aziz, S. M. & El–Sayed, G.M. 2019. In vitro evaluation of some isolated bacteria against the plant parasite nematode *Meloidogyne incognita*. Bulletin of the National Research Centre, 43: 171.

Tian, B., Yang, J. & Zhang, K.Q. 2007. Bacteria used in the biological control of plant parasitic nematodes: populations, mechanisms of action, and future prospects. FEMS Microbiology Ecology, 61(2): 197–213.

Effect of *Bacillus subtilis* and chitosan in Biological Control of Root–knot Nematode, *Meloidogyne incognita* on Tomato

Aboulfazl Yahyavi Azad [1], Ameneh Hosseinikhah Choshali [2], Seyyed Sajjad Seyyed Ghasemi [3]

1. Ph. D. Student in Plant Pathology, University of Zanjan, Zanjan, Iran.
2. Ph. D Graduate of Plant Pathology, Islamic Azad University, Research Science Unit, Tehran, Iran.
3. Master Degree of Plant Pathology, Deylaman Institute of Higher Education, Lahijan, Guilan, Iran.

Corresponding author: Aboulfazl Yahyavi Azad, email: saeid.yahyavi1989@gmail.com

Received: Nov., 02, 2023 10(2) 153–163 Accepted: Nov., 26, 2023

Abstract

The root–knot nematode (*Meloidogyne incognita*) on tomato (*Solanum lycopersicum* Linn.) is one of the most important plant pathogens, causing economic damage worldwide and in Iran. In order to biologically control this nematode, after nematode multiplication on the susceptible tomato variety (Early Orbana Y) and obtaining a pure and abundant nematode population, the plants were irrigated with a solution of 3 per thousand Probi 96 (containing *Bacillus subtilis*) and Chitoplus (containing chitosan). After 45 days of applying the treatments, the seedlings were transferred from the greenhouse to the laboratory, and growth indices such as fresh and dry shoot weight, shoot length, fresh and dry root weight, root length. Also, disease indices such as the average number of galls, the number of nematode egg masses in the root, the number of nematode eggs in the root, the number of second–stage juveniles in the soil, and the gall index were measured. The results showed that the use of *B. subtilis* and chitosan, either alone or in combination, led to an increase in plant growth indices and a reduction in nematode pathogenicity indices. Therefore, based on the results obtained in this study, it can be concluded that the use of these compounds is suggested as one of the effective strategies in an integrated management program for root–knot nematodes in tomatoes.

Keywords: Tomato, Biological Control, Root Knot Nematode, Chitosan, *Bacillus subtilis*