مقاله تحقیقی

استفاده از *Trichoderma harzianum* و *Bacillus subtilis* در مهار زیستی نماتد ریشه گرهی *Meloidogyne incognita* در گیاه توتون

مرضیه شازده احمدی [۱]، سید افشین سجادی [۲]

۱– محقق، بخش بیوتکنولوژی، بخش تحقیقات بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات و آموزش توتون تیرتاش، بهشهر، مازندران، ایران.
۲– محقق، بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش توتون تیرتاش، بهشهر، مازندران، ایران.
مسئول مکاتبات: مرضیه شازده احمدی، ایمیل: Noshinshazdeahmadi@Yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۷/۱۶ ۱۱(۲) ۱–۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۸/۱۹

چکیده

توتون، یکی از گیاهان مهم زراعی و صنعتی است که در اقتصاد و درآمد کشورهای تولیدکننده نقش مهمی دارد. نماتد ریشه گرهی از مهم‌ترین نماتدهای انگل گیاهی با دامنه وسیع میزبانی می‌باشند. با توجه به خطرات سموم شیمیایی، استفاده از روش‌های جایگزین، از جمله مهار زیستی در مبارزه با این بیماری ضروری به نظر می‌رسد. در این پژوهش، اثر دو مهارگر *Trichoderma harzianum* و *Bacillus subtilis* به طور انفرادی و هچنین به طور تلفیقی، علیه نماتد *Meloidogyne incognita* روی گیاه توتون در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۴ تیمار و ۴ تکرار در شرایط گلخانه در مرکز تحقیقات و آموزش توتون تیرتاش بررسی گردید. گیاهچه‌های توتون رقم K326، در مرحله ۴ تا ۵ برگی، با غلظت 10^{6} Spore/mL از قارچ و 10^{8} CFU/mL از باکتری، در دو زمان و با دو روش مختلف، اعمال تیمار شدند. حدود دوماه پس از مایه زنی با ۲۰۰۰ تخم و لارو سن دوم نماتد، صفات شاخص گال، تعداد توده تخم، متوسط تخم در هر توده، فاکتور تولید مثل، جمعیت نماتد در خاک و ریشه و درصد کنترل نماتد بررسی و یادداشت‌برداری گردید. طبق نتایج تجزیه واریانس، تمام شاخص‌های مربوط به نماتد در سطح یک درصد اختلاف معنی‌دار نشان دادند ($P\leq 0.01$). در همه صفات مورد بررسی، پس از تیمار شاهد سالم (نماتدکش ولوم پرایم)، تیمار اثر تلفیقی قارچ *T. harzianum* به اضافه باکتری *B. subtilis* روی نماتد، هم‌زمان با نشاکاری (با غلظت ۱۰ در هزار) و ۱۰ روز پس از نشاکاری (به میزان ۵۰ mL پای هر بوته)، به عنوان مؤثرترین تیمار علیه نماتد *M. incognita* در گیاه توتون شناخته شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌های حاصله از این تحقیق، نشان داد که زمان‌های اعمال تیمار مهارگرها، دارای اختلاف معنی‌دار با یکدیگر هستند ($P\leq 0.01$). به طور کلی، تأثیر کاربرد تلفیقی مهارگرها در طی دو مرحله (هم‌زمان با نشاکاری + ۱۰ روز پس از نشاکاری)، از کاربرد انفرادی آن‌ها در طی یک مرحله بیشتر بود. رویکرد مبتنی بر استفاده از مهارگرها درمهار زیستی امیدوارکننده به نظر می‌رسد، زیرا می‌تواند به کاهش میزان استفاده از مواد شیمیایی و تثبیت تغییرات اکولوژیکی کمک می‌کند.

واژه‌های کلیدی: نماتد ریشه‌گرهی، مهارگر، مهار زیستی، *Nicotiana tabacum*

مقدمه

با توجه به اهمیت اقتصادی گیاه توتون (*Nicotiana tabacum* L.) و نقشی که در بالا بردن درآمد سرانه ایفا می‌نماید، توجه به بالا بردن کمیت و کیفیت آن حائز اهمیت بسیار می‌باشد. توتون، مانند سایر محصولات زراعی، مورد هجوم بسیاری از عوامل بیماری‌زا قرار می‌گیرد که نماتد ریشه گرهی، از عوامل مهم محدود کننده کشت توتون در تمام مناطق توتون خیز دنیا می‌باشد. نماتدهای ریشه‌گرهی به دلیل نحوه خسارت و دامنه میزبانی وسیع از نظر اقتصادی از مهم‌ترین نماتدهای پارازیت گیاهی در سطح جهان می‌باشند

که به طیف وسیعی از گیاهان حمله نموده و سالیانه خسارات جبران ناپذیری را در سراسر جهان به محصولات مختلف وارد می‌سازند. پراکندگی جهانی، وسعت دامنه میزبانی و تعامل با سایر بیمارگرهای گیاهی، آن‌ها را به‌عنوان یکی از پنج عامل درجه اول بیماری‌زا و در رده مهم‌ترین بیمارگرهای گیاهی، که تولید گیاهان را تهدید می‌کنند، قرار داده است (Lucas, 1975). نماتدهای ریشه‌گرهی (*Meloidogyne* spp.)، انگل اجباری و داخلی ریشه، غیر مهاجر یا ساکن و پرگون‌خوار بوده و بیش از ۲۰۰۰ گونه گیاهی را مورد حمله قرار داده و موجب کاهش کمیت و کیفیت محصولات مختلف در سراسر جهان می‌گردند. خسارتی که نماتدهای ریشه گرهی ایجاد می‌کنند، عبارت‌اند از ضعیف کردن ریشه‌ها و جلوگیری از رشد آنها، تولید گال‌ها و برجستگی‌هایی روی ریشه که نه تنها مواد غذایی گیاه را می‌گیرند، بلکه موجب تغییر سیستم آوندی و اختلال در انتقال مواد غذایی از خاک نیز می‌گردند. با توسعه گال‌ها، ریشه متورم و گره گره شده و حالت بافت سرطانی را نشان می‌دهند. تغییرات ایجاد شده شامل تعداد، اندازه و نوع گال و در مواردی بازدارندگی از رشد ریشه‌های فرعی و یا عدم گسترش ریشه‌های موئین در اطراف ناحیه آلوده است. میزان خسارت ناشی از نماتدهای ریشه‌گرهی به عوامل متعددی ازجمله نوع رقم، شرایط آب و هوایی، نوع خاک و مهم‌تر از همه به جمعیت نماتد در خاک بستگی دارد. میزان آستانه خسارت اقتصادی نماتدهای مولد گره ریشه در محصولات مختلف ۰/۵ تا ۱/۱ تخم در یک سانتی‌متر مکعب خاک تعیین شده است (Sikora & Fernandez, 2005).

مدیریت نماتدهای ریشه‌گرهی، به دلیل دامنه وسیع میزبانی، دوره کوتاه چرخه زندگی، تولید مثل زیاد و نیز انگل داخلی بودن، دشوار می‌باشد. در حال حاضر، با توجه به مشکلات ناشی از کاربرد مواد شیمیایی و اثرات سوء سموم بر سلامت انسان و محیط زیست، استفاده از روش‌های جایگزین و ایمن از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد. یکی از این روش‌ها که اخیراً بسیار مورد توجه محققان قرار گرفته است، مهار زیستی نماتدها با استفاده از مهارگرها، مانند میکروارگانیسم‌ها (قارچ‌ها، باکتری‌ها و ...) می‌باشد (Sahebani & Hadavi, 2008). استفاده از گونه‌های قارچ *Trichoderma* و باکتری *Bacillus* می‌تواند گزینه مناسبی در مهار زیستی بیمارگرهای خاکزی به ویژه نماتدها با هدف کاهش میزان خسارت بیماری باشد. گونه‌های مختلف قارچ *Trichoderma* آزادزی هستند که تقریبا در تمام زیستگاه‌های متنوع وجود دارند و در محیط‌های ریشه، خاک و اندام‌های هوایی گیاه در تعامل با میکروارگانیسم‌های مختلف دیگر به سر می‌برند. کلونیزاسیون ریشه گیاه توسط گونه‌های قارچ *Trichoderma*، مقاومت گیاه را به تنش‌های محیطی افزایش می‌دهد و اغلب، باعث افزایش رشد و توسعه ریشه‌ها، جذب عناصر غذایی و افزایش عملکرد محصول می‌گردد. قارچ *Trichoderma harzianum* ساز وکارهای مختلفی، از جمله تأثیر مستقیم بر نماتدها و تخم آن‌ها دارد و عامل مهمی جهت بیوکنترل *Meloidogyne* sp. به شمار می‌رود. گونه *T.harzianum* از طریق تجمع متابولیت‌ها در خاک و فعالیت مهارگری، حرکت نماتد را به سمت ریشه کند کرده و قارچ، فرصت کلونیزه کردن و جلوگیری از نفوذ نماتد به ریشه را پیدا می‌کند. مطالعه ارتباط متقابل بین میسلیوم قارچ *T. harzianum* و میسلیوم چندین قارچ، به ویژه قارچ‌های پاتوژن گیاهی، مؤید قدرت بالای پارازیتیسم این قارچ می‌باشد. این قارچ قادر به ترشح آنزیم‌های خارج سلولی بتاگلوکوناز و کیتیناز به داخل محیط خاک بوده و کیتین موجود در دیواره سلولی قارچ‌ها را لیز نموده و بدین طریق، آن‌ها را پارازیته می‌کند (Harman *et al*., 2004).

تأثیر کاربرد تلفیقی و جداگانه ورمی‌کمپوست و قارچ *T. harzianum*، در مهار نماتد *Meloidogyne javanica* در گوجه‌فرنگی را بررسی گردید. نتایج نشان داد که استفاده تلفیقی از این دو عامل توانسته تا ۷۸ درصد در کنترل نماتد مذکور اثرگذار باشد (Heydari & Olya, 2016). در بررسی اثر غلظت‌های مختلف سوسپانسیون اسپور قارچ *T. harzianum* روی کنترل نماتد ریشه‌گرهی گوجه‌فرنگی (*Meloidogyne javanica*) در شرایط آزمایشگاه و گلخانه، غلظت 10^6 spore/mL از آن را به عنوان مؤثرترین غلظت

در کاهش قطر گال و توده تخم نماتد (*M. Javanica*) معرفی کردند (Sahebani & Hadavi, 2008). فعالیت بیوکنترلی قارچ *T. harzianum* BI را علیه *M. javanica* و توانایی آن در القاء سیستم دفاعی گیاه گوجه‌فرنگی در آزمایشگاه و گلخانه بررسی شد. برای این منظور، ریشه گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی در گلدان، توسط سوسپانسیون با غلظت 10^6 spore/mL از قارچ *T. harzianum* اعمال تیمار شدند. نتایج نشان داد که این جدایه از قارچ *T. harzianum* علاوه بر کاهش شدت بیماری، تعداد گال و افزایش درصد مرگ و میر لاروها، موجب تحریک مقاومت القایی و آنزیم‌ها در گیاه گردید (Naserinasab *et al*., 2011). قارچ *T. harzianum* BI در غلظت مؤثر 10^6 spore/mL به عنوان عامل کنترل‌کننده نماتد مولد ریشه گوجه‌فرنگی (*Meloidogyne javanica*) در شرایط کنترل شده گلخانه‌ای عمل کرده و این قارچ، به عنوان القا کننده و سنتز کننده ترکیبات دفاعی از جمله فنل کل بوده و موجب تحریک نظام دفاعی گیاه نیز می‌شود (Maleki Ziarati *et al*., 2009). در پژوهشی، مشخص شد که گیاهان گوجه‌فرنگی که با جدایه قارچ *T. harzianum* T–203 تیمار شده و در خاک‌های آلوده به نماتد مولد گره ریشه (*M. javanica*) کشت شده بودند، رشدشان افزایش یافته و گال‌های ریشه در مقایسه با شاهد (بدون قارچ) کاهش یافت (Sharon *et al*., 2001). کاربرد گونه *T. harzianum* علیه نماتد *M. enterolobii* حاکی از آنست که این قارچ، با تولید ترکیبات شیمیایی و تحریک برخی از مکانیسم‌های دفاعی در گیاه گوآوا، مانع نفوذ و توسعه نماتد به داخل ریشه می‌شود (Jindapunnapat *et al*., 2013).

بررسی‌های گسترده‌ای درباره رایزوباکتری‌های فراریشه انجام شده است و نتایج حاصل، تأثیرپذیری بالای جدایه‌های جنس *Bacillus* spp. را در کنترل نماتدهای پارازیت گیاهی نشان می‌دهد. باکتری‌های مهارگر جنس *Bacillus* spp. با تولید آنزیم‌های هیدرولتیک مانند گلوکوناز، پروتئاز و آنتی بیوتیک، فعالیت بازدارندگی بسیار خوبی علیه قارچ‌ها و نماتدها دارند. بررسی‌ها حاکی از آنست که باکتری گونه *Bacillus subtitis* از طریق مکانیسم‌های مختلفی مانند پارازیتیسم مستقیم، تولید آنزیم‌های خارج سلولی و هورمون‌های گیاهی، تحریک واکنش‌های دفاعی میزبان و تولید متابولیت‌های سمی، علیه نماتدهای ریشه‌گرهی (*Meloidogyne* spp.) مؤثر می‌باشد. این باکتری‌ها از جمله باکتری‌های تولید کننده اسپور هستند که باعث تحریک رشد گیاه و القای سیستم ایمنی گیاه شده و با تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی نفوذ و گسترش پاتوژن را در میزبان محدود می‌کنند (Singh & Siddiqui, 2010).

کاربرد تلفیقی چند عامل مهارگر، موجب استفاده توأم از چند ساز و کار متفاوت علیه بیمارگر شده و می‌تواند فعالیت بیوکنترلی بیشتری را در طیف گسترده‌تری انجام داده و یک مشابه سازی از شرایط طبیعی فراهم کند. این عوامل ممکن است اثر بیوکنترلی یکدیگر را کاهش و یا افزایش دهند که اطلاع از این موضوع برای پیش بینی کارآیی آن‌ها در تلفیق با یکدیگر لازم است (Meyer & Roberts, 2002).

تاکنون، مطالعات متعددی در زمینه کنترل بیولوژیک نماتدهای انگل گیاهان به ویژه جنس *Meloidogyne* از طریق کاربرد تلفیقی مهارگرها صورت گرفته است. نتایج حاصل از یک پژوهش نشان داد که کاربرد باکتری *B. subtilis* و قارچ *P. aecilomyces Lilacinus* به تنهایی و یا در ترکیب با همدیگر، باعث افزایش پارامترهای رشدی گیاه و کاهش شاخص‌های آلودگی نماتد *M. incognita* می‌گردد، اما ترکیب دو عامل مهارگر، تأثیر بیشتری نسبت به کاربرد تنهایی هر کدام از عوامل دارد (Meyer & Roberts, 2002).

اثر تلفیقی *T. harzianum* BI و *Pseudomonas fluroescens* باعث افزایش معنی‌دار مرگ و میر لاروهای نماتد *M. javanica* نسبت به کاربرد هر کدام از عوامل به تنهایی می‌گردد (Mokhtari *et al*., 2014). همچنین، کاربرد توأم سه باکتری *B. subtilis*، Pantoea sp. و *P. fluorescens* روی نماتد *M. javanica* در گیاه گوجه¬فرنگی، نسبت به استفاده از آن‌ها به طور تنهایی (مجزا) و یا در ترکیب‌های دوتایی، اثر بیشتری در افزایش

شاخص‌های رویشی گیاه و کاهش شاخص‌های مربوط به نماتد دارد (Majzoob *et al*., 2010).

در بررسی کنترل شیمیایی نماتد ریشه‌گرهی توتون (*M. incognita*) در مزارع توتون استان گلستان، گزارش شد که تیمار نماتدکش شیمیایی ولوم پرایم به میزان یک لیتر در هکتار، در زمان‌های همزمان به اضافه یک ماه بعد از نشاکاری نسبت به سایر تیمارها در کاهش جمعیت این نماتد، برتری داشته است (Sajjadi *et al*., 2017). هدف از انجام پژوهش حاضر، بررسی اثر هر یک از این دو مهارگر به صورت انفرادی (مجزا) و همچنین اثر تلفیقی آن‌ها روی فاکتورهای بیماری‌زایی نماتد ریشه‌گرهی توتون (*M. incognita*) در شرایط گلخانه بوده است.

مواد و روش‌ها

شناسایی و تهیه جمعیت خالص از نماتد *Meloidogtne incognita*

نمونه‌های گیاهی آلوده به نماتد ریشه‌گرهی *M. incognita* از مزارع توتون در روستاهای اطراف گرگان جمع‌آوری شدند. کشت انبوه و خالص نماتد از طریق تک کیسه تخم (single egg mass) فراهم شد. نشاءهای توتون رقم k326 در گلدان‌های یک کیلوگرمی حاوی خاک مزرعه، پرلیت و کوکوپیت به نسبت (۲ : ۱ : ۱) استریل شده با اتوکلاو پرورش یافت. سوسپانسیون تخم به طور جداگانه، توسط پیپت به داخل حفره‌هایی به عمق سه تا پنج سانتیمتر در مجاورت نشاءهای توتون رقم k326 در مرحله ۴ تا ۵ برگی مایه‌زنی گردید. پس از گذشت ۶۰ روز جمعیت خالص نماتد تکثیر و تا حصول جمعیت مورد نظر، تکثیر به طور متوالی انجام شد (Hussey & Barker, 1973). به منظور شناسایی نماتد ریشه‌گرهی، محل گره‌ها در زیر بینوکولار، با کمک اسکالپل شکافته و نماتد موجود در زیر کیسه تخم به آرامی جدا گردید. پس از تهیه اسلاید میکروسکوپی از شبکه کوتیکولی انتهای بدن ماده‌های بالغ، مشخصات مورفولوژیک و مورفومتریک نماتد با استفاده از میکروسکوپ بررسی و شناسایی گونه نماتد با استفاده از روش (Jepson, 1987) صورت گرفت.

تهیه جدایه‌های قارچ *T. harzianum* و باکتری *Bacillus subtilis*

یک گونه از قارچ تریکودرما شامل (BI) *T. harzianum* و یک گونه از باکتری باسیلوس شامل (Bs) *B. subtilis* از کلکسیون بخش بیماری‌شناسی گیاهی پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران به صورت خالص تهیه شدند. پس از تک اسپور کردن قارچ و تک کلون کردن باکتری، به ترتیب بر روی محیط کشت‌های Potato Dexterose agar (PDA) و Nutrient Agar (NA) تکثیر و نگه‌داری شدند.

تهیه مایه تلقیح قارچ *T. harzianum* و باکتری *B. subtilis*

برای تهیه مایه تلقیح قارچ، با ریختن آب مقطر استریل روی سطح کلونی قارچ و به هم زدن آن با انتهای خمیده لوله شیشه‌ای، سوسپانسیونی از اسپور و میسلیوم قارچ به دست آمد که پس از عبور دادن از چند لایه پارچه ململ، میسلیوم آن جدا گردید. سپس، برای به دست آوردن غلظت مورد نظر از لام گلبول شمار استفاده شد. جهت انجام آزمایشات گلخانه‌ای، سوسپانسیون اسپوری از قارچ با غلظت ۱ × ۱۰^{۶} Spore/mL تهیه گردید (Naserinasab *et al*., 2012). برای تهیه مایه تلقیح باکتری، پس از کشت آن در محیط مایع NB، به مدت ۴۸ ساعت روی شیکر با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه در دمای اتاق، جداسازی سلول‌های باکتری با سانتریفیوژ انجام گرفت و بعد از سانتریفیوژ، مایع رویی از کاغذ صافی شماره یک واتمن عبور داده شد. جهت انجام آزمایشات گلخانه‌ای، باکتری‌های جمع شده در ته فالکون در آب مقطر استریل سوسپانسیون شدند. غلظت مایه تلقیح باکتری نیز توسط دستگاه اسپکتروفتومتر به میزان ۱۰^{۸} CFU/mL تعیین شد (Badakhshan *et al*., 2015).

بررسی اثر قارچ *T. harzianum* و باکتری *B. subtilis* روی نماتد ریشه‌گرهی توتون در شرایط گلخانه

جهت انجام آزمایشات گلخانه‌ای، نشاکاری با گیاه توتون رقم K326، در گلدان‌های یک کیلوگرمی و حاوی خاک استریل مخلوطی از خاک زراعی، پرلیت و ماسه به نسبت (۲ : ۱ : ۱) صورت گرفت. پس از تهیه غلظت‌های قارچ *T.*

harzianum (۱۰^{۶}Spore/mL) و باکتری *B. Subtilis* (۱۰ ^{۸} CFU/mL) طبق مراحل قبل، گیاهچه‌های توتون رقم K326 در مرحله ۴ تا ۵ برگی در تیمارهای انفرادی (مجزا) و تلفیقی، در دو زمان و به دو روش، (همزمان با نشاکاری به روش غوطه‌ور کردن ریشه (Root dip) در سوسپانسیون با دو مقدار (۵ و ۱۰ در هزار) به مدت ۱۵ دقیقه و ۱۰ روز بعد از نشاکاری به روش خیساندن خاک پای بوته (Soil drench) به میزان ۵۰ میلی‌لیتر به ازای هر گلدان، اعمال تیمار شدند. بعد از گذشت یک هفته از انتقال نشاها به گلدان، در اطراف طوقه هر بوته، دو سوراخ به عمق ۵ سانتی‌متر ایجاد و جهت تلقیح و مایه زنی، به هر گلدان، ۲۰۰۰ عدد تخم و لارو سن دوم نماتد *M. incognita* اضافه گردید.

آزمایشات گلخانه‌ای در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۴ تیمار و ۴ تکرار، طبق جدول ۱، در گلخانه تحقیقاتی بخش گیاه‌پزشکی مرکز تحقیقات و آموزش توتون تیرتاش در شرایط کنترل شده با دمای ۲ ± ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت ۵ ± ۶۵ درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی اجرا گردید.

جدول ۱– تیمارهای مورد بررسی، غلظت‌ها، زمان و روش مصرف آن‌ها علیه نماتد ریشه‌گرهی در توتون.

Table 1. Treatments, concentrations, time, and methods of use against *Meloidogyne incognita* in tobacco.

Row	Treatments	concentrations	Time	Method
1	*T. harzianum*	5/1000	Simultaneously at planting	Root dip
2	*T. harzianum*	10/1000	Simultaneously at planting	Root dip
3	*T. harzianum*	5/1000	Simultaneously & 10 days after planting	Root dip & Soil drench
4	*T. harzianum*	10/1000	Simultaneously & 10 days after planting	Root dip & Soil drench
5	*B. subtilis*	5/1000	Simultaneously with planting	Root dip
6	*B. subtilis*	10/1000	Simultaneously with planting	Root dip
7	*B. subtilis*	5/1000	Simultaneously & 10 days after planting	Root dip & Soil drench
8	*B. subtilis*	10/1000	Simultaneously & 10 days after planting	Root dip & Soil drench
9	*T. harzianum* + *B. subtilis*	5/1000	Simultaneously with planting	Root dip
10	*T. harzianum* + *B. subtilis*	10/1000	Simultaneously with planting	Root dip
11	*T. harzianum* + *B. subtilis*	5/1000	Simultaneously & 10 days after planting	Root dip & Soil drench
12	*T. harzianum* + *B. subtilis*	10/1000 per thousand	Simultaneously & 10 days after planting	Root dip & Soil drench
13	control (Velume prime®)	1 L/ha	Simultaneously & 10 days after planting	Soil drench
14	Contaminated control (infected soil with *Meloidogyne incognita*)			

حدود دو ماه (۶۰ روز)، پس از مایه‌زنی گیاهچه‌ها با نماتد، ریشه‌ها به آرامی از خاک خارج، شستشو و ارزیابی از ریشه‌ها و استخراج نماتد از خاک با استفاده از روش جنکینز (Jenkins, 1964) و ریشه با روش کولن و دهرد Herde, (Coolen & D، 1972) انجام شد. با اسلاید شمارش، تعداد نماتد خاک و ریشه شمارش گردید. ارزیابی تیمارها، براساس صفات شاخص گال، تعداد توده تخم، متوسط تخم در هر توده، تعداد جمعیت لارو سن دو در خاک، تعداد جمعیت تخم و لارو در ریشه، فاکتور تولیدمثل و محاسبه درصد کنترل نماتد در هریک از تیمارها انجام شد (Sajjadi *et al*., 2017). شمارش تعداد توده تخم موجود روی ریشه هر گیاه به طور دقیق، طبق روش (Hussey & Barker, 1973) انجام شد. محاسبه فاکتور تولیدمثل (RF)، طبق فرمول RF= Pf/Pi و بر طبق روش (Canto–Saenz, 1983) انجام گرفت که در آن RF فاکتور تولیدمثل، Pf جمعیت نهایی، Pi جمعیت اولیه نماتد (۲۰۰۰ تخم و لارو سن دوم نماتد) بوده است. به منظور شمارش نماتدهای داخل بافت ریشه، یک گرم ریشه به کمک محلول اسید فوشین ۰/۱ درصد رنگ آمیزی و با استفاده از استریومیکروسکوپ مورد شمارش قرار گرفته و جمعیت نهایی در ریشه ثبت شد

(Hussey &d Jassen, 2002). جهت تعیین تعداد نماتدهای موجود در ۱۰۰ گرم خاک، نماتدها با استفاده از روش (Jenkins, 1964) استخراج و شمارش شدند. شاخص گال به صورت ۰ تا ۱۰ بر طبق روش (Zeck *et al*., 1971) ارزیابی گردید (جدول ۲).

درصد کنترل نماتد ریشه‌گرهی در انتهای فصل طبق فرمول زیر محاسبه گردید (Ameri *et al*., 2004):

$$\text{درصد کنترل} = \frac{\text{فاکتور تولیدمثل در تیمار} - \text{فاکتور تولیدمثل در شاهد}}{\text{فاکتور تولیدمثل در شاهد}} \times 100$$

جدول ۲– رتبه‌دهی شاخص گال طبق روش Zeck (1971)

Table 2. Gall index ranking according to Zeck, 1971.

Grade	Type of Symptoms
0	Absence of gall.
1	(1–10)% of root infection with nematode gall.
2	(11–20)% of root infection.
3	(21– 30)% of root infection.
4	(31– 40)% of root infection.
5	(41– 50)% of root infection.
6	(51– 60)% of root infection.
7	(61–70)% of root infection.
8	(71–80)% of root infection.
9	(81–90)% of root infection.
10	More than 90% of root infection.

تجزیه و تحلیل آماری

آزمایشات در قالب طرح کاملا تصادفی با ۱۴ تیمار و۴ تکرار در شرایط گلخانه به مرحله اجرا درآمد. داده‌های حاصله پس از وارد کردن در نرم افزار اکسل، توسط نرم افزار SAS ver. 9.1 مورد تجزیه و تحلیل و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) انجام گرفت. نمودار بای‌پلات، توسط نرم‌افزار XLSTAT. 2016 رسم گردید.

نتایج

تشخیص گونه نماتد

با بررسی نقوش کوتیکولی ناحیه انتهای بدن نماتد ماده (Perineal pattern)، گونه نماتد مورد مطالعه، *Meloidogyne incognita* تشخیص داده شد (Jepson, 1987).

تأثیر تیمارهای مهارگر روی نماتد *M. incognita*

نتایج بررسی تأثیر *T. harzianum* و *B. subtilis* علیه نماتد ریشه‌گرهی (*M. incognita*) در گیاه توتون، نشان داد که بین تیمارهای مختلف از نظر همه صفات مورد بررسی، اختلاف معنی‌دار آماری در سطح یک درصد وجود داشت (جدول ۳).

نتایج مقایسه میانگین بررسی تأثیر مهارگرها علیه نماتد ریشه‌گرهی در گیاه توتون، نشان داد که در مورد صفت شاخص گال، تیمارهای نماتدکش شیمیایی با شاخص گال ریشه برابر ۱ و بعد از آن، تیمار اثر تلفیقی قارچ *T. harzianum* + باکتری *B. subtilis* روی نماتد، هم‌زمان با نشاکاری (با غلظت ۱۰ در هزار) و ۱۰ روز پس از نشاکاری (با غلظت ۱۰ در هزار)، با شاخص گال ریشه برابر ۲ دارای کمترین میزان گال ریشه بوده و نسبت به سایر تیمارها برتری داشتند. تیمار شاهد آلوده دارای بالاترین شاخص گال ریشه (عدد ۱۰) و در بالاترین گروه آماری a قرار گرفت.

جدول ۳– تجزیه واریانس بررسی تأثیر مهارگرها روی شاخص‌های بیماری‌زایی نماتد ریشه‌گرهی توتون (*Meloidogyne incognita*) تحت شرایط گلخانه.

Table 3. Analysis of variance of the effect of antagonistic agents on pathogenicity indices of root–knot nematode on tobacco (*Meloidogyne incognita*) under greenhouse conditions.

S.O.V	df	Mean of Square (MS)							
		Gall index	The No. of egg masses	Average egg in mass	Reproduction factor (RF)	Mortality (%)	The No. of nematode in the soil	The No. of nematode in the root	Root Weight (gr)
Treatment	13	18.83**	1212.49**	1692.06**	128.59**	1718.69**	12907967**	385017857**	21417012**
Error	42	0.09	3.42	16.22	0.48	7.93	327381	946429	415603
CV		7.08	3.49	0.80	4.47	5.52	13.75	3.60	7.12

** : معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

**: Significant at 1% probability level

از نظر صفت تعداد توده تخم، تیمار نماتدکش شیمیایی با کمترین تعداد توده تخم روی ریشه، نسبت به سایر تیمارها برتر بوده و پس از آن، تیمار اثر تلفیقی قارچ *T. harzianum* + باکتری *B. subtilis* روی نماتد، هم‌زمان با نشاکاری (با غلظت ۱۰ در هزار) و ۱۰ روز پس از نشاکاری (با غلظت ۱۰ در هزار)، قرار گرفت. تیمار شاهد آلوده دارای بیشترین تعداد توده تخم شمارش شده بوده است. از نظر متوسط تعداد تخم موجود در هر توده تخم، تیمار نماتدکش شیمیایی، دارای کمترین میزان بوده و پس از آن، تیمار اثر تلفیقی قارچ *T. harzianum* + باکتری *B. subtilis* روی نماتد، هم‌زمان با نشاکاری (با غلظت ۱۰ در هزار) و ۱۰ روز پس از نشاکاری (با غلظت ۱۰ در هزار)، قرار گرفت. تیمار شاهد آلوده، دارای بیشترین میزان متوسط تعداد تخم در هر توده بوده است.

نتایج مرتبط با محاسبه فاکتور تولیدمثلی (RF) نشان داد که تیمار نماتدکش شیمیایی، کمترین میزان فاکتور تولیدمثلی را داشته و پس از آن، تیمار اثر تلفیقی قارچ *T. harzianum* + باکتری *B. subtilis* روی نماتد، هم‌زمان با نشاکاری (با غلظت ۱۰ در هزار) و ۱۰ روز پس از نشاکاری (با غلظت ۱۰ در هزار)، قرار گرفت. تیمار شاهد آلوده با بالاترین میزان RF، در بالاترین گروه آماری a قرار گرفت.

از نظر درصد کنترل نماتد، تیمار نماتدکش شیمیایی با ۸۶/۵ درصد، دارای بالاترین درصد کنترل بوده و پس از آن تیمار ۱۲ با ۷۶/۷۵ درصد، دارای بالاترین درصد کنترل نسبت به سایر تیمارهای این تحقیق بودند. تیمار شاهد آلوده، هیچ گونه اثر کنترل‌کنندگی روی جمعیت نماتد ریشه گرهی توتون نداشته است. از نظر صفت جمعیت نماتد در خاک و ریشه، تیمار نماتدکش شیمیایی، دارای کمترین میزان بوده و پس از آن، تیمار اثر تلفیقی قارچ *T. harzianum* + باکتری *B. subtilis* روی نماتد، هم‌زمان با نشاکاری (با غلظت ۱۰ در هزار) و ۱۰ روز پس از نشاکاری (با غلظت ۱۰ در هزار)، قرار گرفت. تیمار شاهد آلوده دارای بیشترین میزان این صفت، بوده و در بالاترین گروه آماری a قرار گرفت (جدول ۴).

تجزیه بای پلات بررسی تأثیر *T. harzianum* و *B. subtilis* علیه نماتد ریشه‌گرهی توتون در نمودار ۱ را نشان داده شده است. بر اساس این نمودار، صفات متوسط تعداد تخم، شاخص گال، فاکتور تولید مثل، جمعیت نماتد در ریشه و تعداد توده تخم که نزدیک به همدیگر قرار گرفته‌اند، همبستگی بالاتری با همدیگر داشته و شاخص کلی فعالیت نماتد را نشان می‌دهند.

جدول ۴– مقایسه میانگین بررسی تأثیر مهارگرها روی شاخص‌های بیماری‌زایی نماتد ریشه‌گرهی توتون (*Meloidogyne incognita*) تحت شرایط گلخانه.

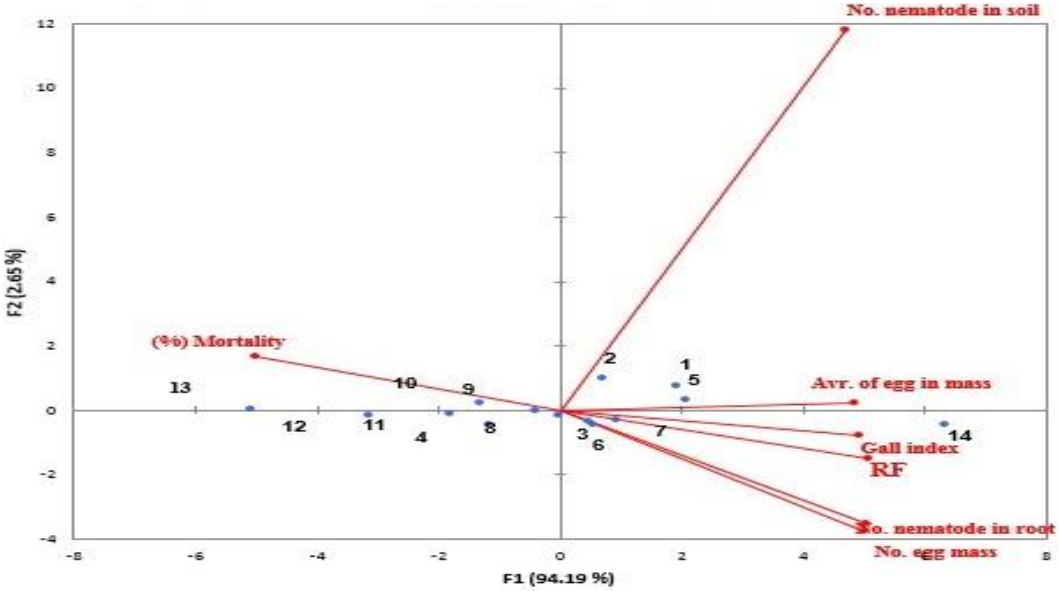
Table 4. Average comparison of the effect of antagonistic agents on pathogenicity indices of root–knot nematode on tobacco (*Meloidogyne incognita*) under greenhouse conditions.

Treatment	Gall index	Reproduction factor (RF)	No. of J2 / soil (1 kg)	No. of nematode in the whole root	Mortality (%)	No. of egg mass	No. of egg in egg mass	Root Fresh Weight (gr)
1	6 b	19 b	6500 b	31500 b	39.25 i	60 bc	520 c	15.8 b
2	4 c	17 c	6250 b	27750 d	43.75 gh	54.75 fg	505 d	12.54 c
3	4 c	17 c	4000 c	30000 c	47.5 h	59.5 bcd	503.75 de	14.21 b
4	3 d	13.25 f	2750 ef	23750 f	57.25 de	48 h	495 f	7.82 h
5	6 b	18.75 b	5750 b	32750 b	36.32 i	61.5 b	530 b	7.95 g
6	4 c	16.75 cd	3750 cd	29750 c	43.75 h	58 cde	515 c	9.55 f
7	6 b	17 c	4000 c	30000 c	52.5 fg	57 def	520 c	10.06 ef
8	4 c	16 d	4000 c	28000 d	57.5 ef	56 ef	500 def	10.25 e
9	4 c	15 e	4000 c	26000 e	60.75 d	52.25 g	498.75 ef	10.29 e
10	4 c	12.75 fg	3750 cd	21750 g	67.5 c	44.75 i	487.5 g	11.72 d
11	3 d	12.25 g	3000 de	21500 g	70.75 c	44.25 i	483.75 gh	12.14 c
12	2 e	9 h	2000 f	16000 h	76.75 b	33 j	480 h	14.91 b
13	1 f	4.25 i	1000 g	7500 i	86.5 a	16 k	465 i	18.32 a
14	10 a	29.5 a	7500 a	51500 a	0 j	95.25 a	540 a	7.05 i

میانگین‌هایی که دارای حروف مشابه هستند، در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

Averages with the same letters do not differ significantly at the 1% probability level.

صفت جمعیت نماتد در خاک، همبستگی با سایر صفات نشان نداد و نمی‌تواند به عنوان شاخص مناسبی مد نظر قرار گیرد. برای انتخاب تیمارها، تیمارهایی که به صفت درصد کنترل نزدیک‌تر هستند و از شاخص کلی فعالیت نماتد دورتر می‌باشند، تیمارهای مناسب می‌باشند. بر همین اساس، تیمارهای نماتدکش شیمیایی ولوم پرایم® و پس از آن، تیمار اثر تلفیقی قارچ *T. harzianum* + باکتری *B. subtilis* روی نماتد، هم‌زمان با نشاکاری (با غلظت ۱۰ در هزار) و ۱۰ روز پس از نشاکاری برتر بودند.



نمودار ۱– تجزیه بای پلات بررسی تأثیر مهارگرها روی شاخص‌های بیماری‌زایی نماتد ریشه‌گرهی توتون (*Meloidogyne incognita*) تحت شرایط گلخانه.

Chart 1. The Biplot analysis of the effect of antagonistic agents on pathogenicity indices of root–knot nematode on tobacco (*Meloidogyne incognita*) under greenhouse conditions.

شکل ۱– ریشه توتون با نمره گال ۲

Fig. 1– Tobacco root with gall score 2

شکل ۲– ریشه توتون با نمره گال ۴

Fig. 2– Tobacco root with gall score 4

شکل ۳– ریشه توتون با نمره گال ۶

Fig. 3– Tobacco root with gall score 1

شکل ۴– ریشه توتون با نمره گال ۱، در شاهد سالم

Fig. 4. Tobacco root with gall score 1, healthy control

شکل ۵– ریشه توتون با نمره گال ۳

Fig. 5. Tobacco root with gall score 3

شکل ۶– ریشه توتون با نمره گال ۱۰، در شاهد آلوده

Fig. 6. Tobacco root with gall score 10, contamined control

بحث

در بین روش‌های کنترل علیه نماتدهای ریشه‌گرهی، مهار زیستی با داشتن مزایای فراوان همچون، نداشتن اثرات سوء روی انسان و سایر موجودات، سازگار بودن با طبیعت و محیط زیست، از جایگاه ویژه‌ای برخوردار می‌باشد. از طریق مهار زیستی در مدیریت تلفیقی، می‌توان با کاربرد کمتر سموم و ماندگاری پایین آن‌ها در خاک، کمک شایانی به کاهش آلودگی‌ها نمود (Silva *et al*., 2017). کنترل زیستی عوامل بیماری‌زای گیاهی و نماتدها با استفاده از میکروارگانیسم‌های مهارگر، به ویژه قارچ *T. harzianum* و باکتری *B. subtilis* به اثبات رسیده است. این عوامل، سبب تغییر الگوهای ترشحی ریشه و اثر روی مراحلی از زندگی نماتد که وابسته به این ترشحات هستند، خواهند شد. همچنین، با تولید متابولیت‌های ثانویه مانند آنتی بیوتیک‌ها و القای مقاومت، مانع حیات نماتدها شده و موجب حفظ بقاء محصول می‌گردند (Mokhtari *et al*., 2014).

مهارگرها با مکانیسم‌های مختلفی موجب کنترل و کاهش بیماری می‌شوند. این عوامل با ایجاد رقابت غذایی، خواص مایکوپارازیتیسمی، تولید آنتی‌بیوتیک ها، القای مقاومت در گیاه و هیدرولیز آنزیمی با عوامل بیماری‌زا مقابله کرده، مانع حیات نماتدها شده، آن‌ها را پارازیته کرده و نفوذ آن‌ها را در گیاه محدود کرده و می‌توانند افزایش سلامتی گیاه را در

پی داشته باشند (Sahebani & Hadavi, 2008). احتمالا فعالیت نماتدکشی مهارگرها در تحقیق حاضر، ناشی از مکانیسم القای مقاومت در گیاه باشد.

بر اساس نتایج حاصل از تحقیق حاضر، هر دو مهارگر *T. harzianum* و *B. subtilis* می‌توانند در کاهش شاخص‌های بیماری‌زایی نماتد *M. incognita* مؤثر باشند. تیمارهایی که به صورت اثر تلفیقی قارچ به اضافه باکتری در گلدان‌های آلوده به نماتد استفاده گردید، نسبت به کاربرد انفرادی(مجزا) هر کدام از این مهارگرها، کارایی بیشتری در کاهش فاکتورهای بیماری‌زایی نماتد مانند تعداد تخم، گال و جمعیت لارو در خاک، نشان دادند، که با نتایج حاصل از تحقیق Badakhshan *et al*. (2015) و Mokhtari *et al*. (2014) مطابقت داشت.

اگرچه تحقیقات و مطالعاتی مبنی بر بکارگیری انفرادی این مهارگرها در کنترل نماتدهای ریشه‌گرهی گزارش شده است (Chin, 2013; Jindapumnapat *et al*., 2013; Singh & Siddiqui, 2010; Ramezani–Moghaddam *et al*., 2013)، اما اکثر پژوهش‌های انجام شده در این زمینه، دلالت بر اثر تقویتی کاربرد تلفیقی و توأم عوامل بیوکنترل دارند. به طور مثال، استفاده از باکتری‌های *B. subtilis* و *P. fluorescens* در ترکیب با همدیگر در کاهش جمعیت نماتد *M. incognita* و بهبود پارامترهای رشدی گیاه مؤثر بوده است (Munshid *et al*., 2013). همچنین، باکتری *P. fluorescens* در ترکیب با قارچ *T. viride* باعث کاهش جمعیت نماتد *M. incognita* می‌گردد (Muthulakshmi *et al*., 2010). کاربرد توأم و هم زمان دو گونه از قارچ تریکودرما به نام‌های *T. harzianum* و *T. viridae* به همراه دو جدایه از باکتری *Bacillus subtilis* در کنترل نماتد ریشه‌گرهی گوجه‌فرنگی (*M. javanica*)، موجب کاهش ۶۸، ۵۷/۵ و ۳۸/۳ درصدی به ترتیب در تعداد گال، تخم و لارو سن دوم نسبت به شاهد گردید (Badakhshan *et al*., 2015). در تحقیق حاضر نیز مشخص شد که تیمار اثر تلفیقی قارچ *T. harzianum* + باکتری *B. subtilis* روی نماتد، هم‌زمان با نشاکاری (با غلظت ۱۰ در هزار) و ۱۰ روز پس از نشاکاری (به میزان ۵۰ mL پای هر بوته)، بعد از تیمار نماتدکش شیمیایی ولوم پرایم، دارای بیشترین تأثیر روی نماتد ریشه‌گرهی توتون (*M. incognita*) بوده است. اثر تلفیقی *Trichoderma virens* و *Glomus mosseae* در کنترل نماتد *M. javaniva*، منجر به کاهش تعداد گال ریشه، تعداد توده تخم در هر گرم ریشه و تعداد لارو سن دوم نماتد در هر گلدان می‌گردد (Miraki *et al*., 2013). همچنین، کاربرد توأم سه باکتری *Pantoea* sp.، *B. subtilis* و *P. fluroscence* روی نماتد *M. javanica* در گیاه گوجه‌فرنگی نسبت به استفاده از آن‌ها به طور جداگانه و یا در ترکیب‌های دوتایی، اثر بیشتری در افزایش شاخص‌های رویشی گیاه و کاهش شاخص‌های مربوط به نماتد دارد (Majzoob *et al*., 2010).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌های حاصله از این تحقیق، نشان داد که زمان‌های اعمال تیمار مهارگرها، دارای اختلاف معنی‌دار با یکدیگر هستند ($P< 0.01$). کاربرد تلفیقی مهارگرهای *B. subtilis* + *T. harzianum* در خاک، در طی دو زمان (هم زمان با نشاکاری + ۱۰ روز پس از نشاکاری)، همه صفات مرتبط با شاخص‌های بیماری‌زایی نماتد ریشه‌گرهی توتون، شامل شاخص گال، تعداد توده تخم، متوسط تخم در هر توده، فاکتور تولیدمثل (RF)، درصد کنترل، تعداد جمعیت نماتد در خاک و تعداد جمعیت نماتد در ریشه را کاهش داد. به طور کلی، تأثیر کاربرد تلفیقی مهارگرها در طی دو مرحله (هم‌زمان با نشاکاری + ۱۰ روز پس از نشاکاری)، از کاربرد انفرادی آن‌ها در طی یک مرحله بیشتر بود. در پژوهش انجام شده توسط (Jamali *et al*., 2022) مبنی بر اثر باکتری‌های *Pseudomonas* و *Streptomyces* علیه نماتد ریشه‌گرهی (*M. incognita*) در گوجه¬فرنگی، تحت شرایط گلخانه نیز این امر به اثبات رسید و گزارش شد که زمان‌های مصرف باکتری‌ها علیه نماتد *M. incognita* در گوجه‌فرنگی، دارای اختلاف معنی‌دار با یکدیگر هستند. مصرف باکتری‌ها در خاک، در تمام مراحل (قبل از کاشت، زمان کشت گیاهچه و گل‌دهی)، موجب کاهش در تعداد گال در ریشه، تعداد توده تخم در گرم ریشه، تعداد لارو سن دوم در ۱۰۰ گرم

خاک، در مقایسه با مصرف انفرادی آن‌ها در یک زمان گردید (Jamali *et al*., 2022).

این نکته، حاکی از نقش استمرار عوامل مهار زیستی در کنترل موفق نماتدها دارد. حضور گسترده و تقویت جمعیت این عوامل، باعث کاهش جمعیت عامل خسارت‌زا و کاهش خسارت وارده به گیاه میزبان خواهد شد (Jamali *et al*., 2022). البته امکان عملی نمودن این روش با توجه به محدودیت‌ها، نکته‌ای است که باید مد نظر قرار گیرد. با این حال، هر چه تعداد دفعات کاربرد این عوامل بیشتر باشد، به همان نسبت، پایداری عامل مهار زیستی در محیط، بیشتر و درصد کنترل نیز افزایش خواهد یافت. کاربرد به موقع عوامل بازدارنده نماتدهای ریشه‌گرهی، از نتایج مطلوبی در کنترل آن برخوردار خواهند بود. از سازوکارهای دخیل در کنترل نماتدها توسط باکتری‌ها، می‌توان به تولید ترکیباتی جهت بهبود مقاومت، تولید مواد سمی نماتدکش، تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده و آنتی بیوتیک‌ها اشاره کرد (Forghani & Hajihassani, 2020).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که مهارگرهای مورد استفاده توانستند میزان آلودگی *M. incognita* در گیاه توتون را کاهش دهند. در همه شاخص‌های بیماری‌زایی مورد بررسی، بیشترین تأثیر در استفاده از نماتدکش شیمیایی ولوم پرایم® مشاهده شد و پس از آن، تیمار اثر تلفیقی قارچ *T. harzianum* + باکتری *B. subtilis* روی نماتد، هم‌زمان با نشاکاری (با غلظت ۱۰ در هزار) و ۱۰ روز پس از نشاکاری (به میزان ۵۰ mL پای هر گلدان)، دارای بیشترین تأثیر در بین عوامل بیوکنترل علیه نماتد *M. incognita* در گیاه توتون بوده است. انجام آزمایشات فوق در مزارع توتون دارای آلودگی طبیعی به نماتد ریشه‌گرهی می‌تواند منجر به نتایج قطعی‌تری برای پیشبرد تحقیقات در آینده باشد.

سپاسگزاری

این پژوهش، از نظر مالی و اجرایی توسط مرکز تحقیقات و آموزش توتون تیرتاش حمایت گردید. از زحمات همکاران محترم بخش گیاه‌پزشکی و بخش بیوتکنولوژی این مرکز تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

Ameri, M., Kheiri, M., Damadzadeh, M. & Rahimian, H. 2004. An Evaluation of the efficacy of *Pasteuria penetrans* for control of *Meloidogyne javanica*. Iranian Journal of Plant Pathology, 40(1–2): 1–14 .

Baruti, sh. & Alavi, A. 1374. Plant nematodology (principles and nematodes of Iran's parasite and quarantine). Publications of the Research Institute of Pests and Plant Diseases, 278 pages.

Badakhshan, M., Mehdikhani Moghadam, A., Baghai Ravari, S. & Rouhani, H. 2015. Combined use of two species of *Trichoderma* and *Bacillus subtitis* in controlling (*Meloidogyne javanica*) in tomato. Journal of Plant Pests and Diseases, 84(2): 278–269.

Canto–saenz, M. 1983. The nature of resistance to *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood. In: C.C. Carter (Ed.). In: Proceedings of the third research & planning conference on root–knot nematodes, Meloidogyne spp. International Meloidogyne Project. Lima, Peru, 6(1): 160–165.

Chin Ann, Y. 2013. Screening for nematicidal activities of *Bacillus* species against root knot nematode (*Meloidogyne incognita*). American Journal of Experimental Agriculture, 3(4): 794–805.

Coolen, J. & D, Herde, C.J. 1972. A Method for the Quantitative extraction of nematodes form plant tissue. 9220 Merelbeke Belgium, 77 pp.

Forghani F. & Hajihassani A. 2020. Recent advances in the development of environmentally benign treatments to control root–knot nematodes. Frontiers in Plant Science,11, 1125. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01125

Harman, G.E., C.R. Howell, A. Viterbo, I. & Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews, 2(4): 43–56.

Heydari, F. & Olya, M. 2016. Investigating the separate and combined use of *Trichoderma harzianum* and vermicompost in biological control of tomato root–knot nematode (Meloidogyne javanica) in greenhouse conditions. Journal of applied research in herbal medicine, 6(3): 1–12.

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.

Hussey, R.S. & Janssen, G.J.W. 2002. Root–knot nematodes: Meloidogyne species. In Starr J.L. Cook R. & Bridge J. (Eds.), Plant resistance to parasitic nematodes. Wallingford, UK, CAB International, 14(1): 43–70.

Jamali, S., Monazam, K. & Alimi, M. 2022. Efficacy of Pseudomonas and Streptomyces strains on control of root knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in tomato under greenhouse conditions. Iranian Journal of Nematology, 1(1): 118–127.

Jepson, S.B. 1987. Identification of root–knot nematodes. Wallingford, UK, CAB International.

Jenkins, W.R. 1964. A rapid centrifugal flotation technique for extracting nematodes from soil. Plant Disease Reporter, 48(3): 675–692.

Jindapunnapat, K., Chinnasri, B. & wankiae, S.K. 2013. Biological control of root–knot nematodes (Meloidogyne enterolobii) in guava by the Fungus *Trichoderma harzianum*. Journal of Developments in Sustainable Agriculture, 8(2): 110–118.

Lucas, G.B. 1975. Disease of Tobacco,3rd edition, biological consulting Associates, Releight, North carolina. 621pp.

Maleki Ziarati, H., Raushiti, A., Sahibani, N., Prafiyan, H.R. & Aminian, H. 2009. Investigating the possibility of biological control of Meloidogyne javanica in tomato by *Trichoderma harzianum* fungus in the greenhouse and quantitative changes of phenolic compounds in the plant. Journal of seedling and seed agriculture, 25(3): 272–259.

Majzoob, S.H., Kargar Bideh, A. & Zarghani, H.A. 2010. Effect of Pseudomonas fluorescens CHAO, *Bacillus subtilis* and *Pantoea* sp. In the control of Meloidogyne javanica on cucumber (Super Amelia and Royal). In: 19th Iranian Plant Protection Congress, Tehran, Iran 533. (In Persian with English summary).

Munshid, H., S. Simon, A. & Lal, A. 2013. Antagonistic potential of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* on *Meloidogyne incognita* of green onion (*Allium fistulosum*). International Journal of Botany and Research, 3(4): 15–22.

Muthulakshmi, M., Devrayar, K. & Jonathan, E.I. 2010. Biocontrol of root–knot nematode, *Meloidogyne incognita* (Kofeid and White) Chitarod in mulberry. Journal of Bio pesticide, 3: 479–482.

Meyer, S.L. & Roberts, D.P. 2002. Combinations of biocontrol agents for management of plant–parasitic nematodes and soilborne plant–pathogenic fungi. Journal of Nematology, 34(3): 1– 8.

Miraki, K., Abdollahim M. & Tallayi, F. 2013. Effect of *Trichoderma virens* and Glomus mosseae in controlling root knot nematode (*Meloidogyne javanica*) in tomato. Biological Control of Pests and Plant Diseases, 2(1): 9–16.

Mokhtari, S., Sahebani, N. & Etebarian, H.R. 2014. Biological control of *Meloidogyne javanica* by two against antagonists *Trichoderma harzianum* BI and Pseudomonas fluorescens CHAO in tomato plant. Biological Control of Pests and Plant Diseases, 3(2): 117–126.

Naseri Nesab, F., Sahibani, N. & Pradayian, H.R. 2012. Studying the effect of the antagonist fungus *Trichoderma harzianum* BI on the induction of defense response of tomato plant against root knot nematode (*Meloidogyne javanica*). Plant Disease Research Quarterly, 1(4): 1–12.

Ramezani Moghadam, M., Mehdikhani Moghadam, A., Baghai Raori, S. & Rouhani, H. 2013. Investigating the antagonistic activity of *Bacillus* spp. In the control of tomato root–knot nematode. Journal of Biological Control of Pests and Plant Diseases, 2(1): 17–26.

Sajjadi, A., Najafi, M.R., Hosseini, A., Hosseininejad, A., Masoudi, A.A. & Safar, F. 2017. Management of root knot nematode in tobacco fields of Golestan province. Research report of Tirtash Research and Education Center.

Sahebani, N. & Hadavi, N. 2008. Biological control of the root– knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. Soil Biology & Biochemistry, 40(1): 2016–2020.

Sharon, E., Bar–Eyal, M., Chet, I. Herrera–Estrella, A., Kleifeld, O. & Spiegel, Y. 2001. Biological control of the root– knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. Phytopathology, 91(2): 687–693.

Sikora, R.A. & Fernandez, E. 2005. Nematode parasites of vegetables. In: Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. Luc, M., Sikora. R. A. and Bridge, J. (Editors), 2nd edition, CABI Wallingford, UK.

Silva, O.J.D., Santana, M.V., Freire, L.L., Silva Ferreira, B.D. & Rocha, M.R. 2017. Biological agents in the management of Meloidogyne incognita in tomato. 47(10): 1–7

Singh, P. & Siddiqui, Z.A. 2010. Biocontrol of root–knot nematode Meloidogyne incognita by the isolates of *Bacillus* on tomato. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 43(1): 552–561.

Williamson, V.M. & Hussay, R.S. 1996. Nematode Pathogenesis and Resistance in Plant. The Plant Cell, 8(2): 1735– 1745 .

Zeck, W.M. 1971. A rating scheme for field evaluation of root knot nematode infestations. Pflanzenschutz–Nachrichten. Bayer AG. 24(1): 141–144.

The use of *Trichoderma harzianum* and *Bacillus subtilis* in biological control of root–knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in tobacco

Marziyeh Shazde ahmadi[1], Afshin Sajjadi[2]

1. Researcher, Biotechnology research department, Tirtash Tobacco Research and Education center, Behshahr, Mazandaran, Iran.
2. Researcher, Plant Protection research department, Tirtash Tobacco Research and Education center, Behshahr, Mazandaran, Iran.
Corresponding author: Marziyeh shazde ahmadi, email: Noshinshazdeahmadi@Yahoo.com

Received: Oct., 07, 2024 11(2) 1–13 Accepted: Nov., 09, 2024

Abstract

Tobacco is one of the important agricultural and industrial plants that plays an important role in the economy and income of producing countries. Root–knot nematodes are one of the most important plant parasitic nematodes with a wide host range. Considering the dangers of chemical poisons, it seems necessary to use alternative methods, including biological control, in the fight against this disease. In this research, the effect of two antagonists, *Trichoderma harzianum* and *Bacillus subtilis*, individually and also combined effect, against the root– knot nematode (*Meloidogyne incognita*) on tobacco plants was investigated in a completely randomized design with 14 treatments and 4 replications in greenhouse conditions. Tobacco seedlings, K326 variety at the 4–5 leaf stage, were treated with a concentration of 10^6 Spore/mL of *T. harzianum* and 10^8 CFU/mL of *B. subtilis*, at two times and with two different methods. About two months after inoculation with 2000 eggs and larvae of the second instar nematode, nematode virulence factors such as gall index, number of egg mass, average egg per mass, reproductive factor (RF), nematode population in soil and root and percentage of nematode control were investigated and recorded. According to the results of analysis of variance, all the indicators related to nematodes showed a significant difference at the level of one percent ($P\leq 0.01$). In all studied traits, after the treatment of control (Volume Prime® chemical nematicide), the combined effect of *T. harzianum* + *B. subtilis* against the nematode, at the same time as inoculation (at a concentration of 10 per thousand) and 10 days after Inoculation (with a concentration of 50 mL) was recognized as the most effective treatment. The statistical analysis of the data obtained from this research showed that the antagonist treatment times have significant differences with each other ($P\leq 0.01$). In general, the effect of combined application of antagonists during two stages (simultaneous with transplanting + 10 days after transplanting) was greater than their individual application during one stage. The approach based on the use of antagonists in biological control seems promising, because it helps to reduce the amount of chemical substances used and stabilize ecological changes.

Keywords: root–knot nematode, antagonist, biocontrol, *Nicotiana tabacum*.