مقاله تحقیقی

مهار زیستی نماتد ریشه گرهی کیوی (*Meloidogyne incognita*) با استفاده از باکتری¬های پروبیوتیک

سیده نگین میرقاسمی[۱]، اعظم طاهری[۱]، پژمان خدایگان[۲]، سالار جمالی[۱]

۱–دانشجوی دکتری، مربی، دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، گیلان، ایران.
۲– دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر رفسنجان، رفسنجان، ایران.
مسئول مکاتبات: سالار جمالی، ایمیل: jamali@guilan.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۱۱ ۱۱(۱)۳۵–۴۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۱۹

چکیده

نماتدهای ریشه گرهی (*Meloidogyne* spp.) از مهمترین نماتدهای خسارتزا در بین نماتدهای انگل گیاهی بوده و خسارت قابل توجهی به محصولات کشاورزی وارد می‌نمایند. باکتری‌های پروبیوتیک، با اثرگذاری مستقیم بر بیمارگرها و القای مقاومت و تحریک رشد گیاهان، ازکارایی بالایی جهت کنترل بیماری‌های گیاهی برخوردارند. در این تحقیق، از سه گونه پروبیوتیک *Pseudomonas chlororaphis* RO1، *Bacillus subtilis* RO9 و *Bacillus subtilis* RO8 جهت کنترل نماتد ریشه گرهی کیوی در شرایط آزمایشگاه،گلخانه و باغ استفاده گردید. شاخص‌های آلودگی به نماتد شامل تعداد گال، توده تخم، جمعیت لارو و تخم در هر گرم ریشه، تعداد لاروهای سن دوم در صد گرم خاک و فاکتور تولیدمثل مورد ارزیابی قرار گرفتند. بررسی گلخانه‌ای در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۱ تیمار و سه تکرار برای هر مرحله و آزمایش باغی در قالب بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تیمار و سه تکرار در باغ کیوی واقع در منطقه پاشاکی از توابع شهرستان سیاهکل اجرا شد. جمعیت نماتدها در خاک و ریشه قبل از اعمال تیمارها و در پایان تحقیق مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تمامی تیمارها در کنترل شاخص‌های آلودگی به نماتد موفق عمل نموده و با تیمار شاهد دارای اختلاف معنی‌دار بودند. در شرایط آزمایشگاهی، باکتری *B. subtilis* RO9 با ایجاد ۴۸/۸ درصد مرگ و میر در لاروها ، بیشترین تأثیر را از خود نشان داد. همچنین در شرایط گلخانه، کاربرد مجدد باکتری‌های*B. subtilis* RO9 و *P. chlororaphis* RO1 منجر به کاهش چشمگیری در تعداد گال، توده تخم و جمعیت لارو سن دوم نماتد در خاک و همچنین جمعیت تخم و لارو نماتد در ریشه گردید. نتایج آزمایش باغی نشان داد که بعد از نماتدکش راگبی، باکتری *B. subtilis* RO9 (۴۱/۲٪) در کاهش جمعیت تخم و لارو در ریشه موثرتر از باکتری *P. chlororaphis* RO1 (۳۱/۱٪) بوده است. باکتری *P. chlororaphis* RO1 در کاهش جمعیت لاروهای سن دوم در خاک و تعداد گال در ریشه (۳۲/۳٪، ۴۷/۳ ٪)، بعد از نماتدکش راگبی، بهترین اثر را داشت. در کاهش فاکتور تولید مثل، هر دو جدایه باکتری (۰/۶۴ و ۰/۷) با تفاوت کمی نسبت به نماتدکش راگبی (۰/۴۱)، عملکرد مطلوبی از خود نشان دادند. در مراحل آزمایشگاهی و گلخانه‌ای، اثر تیمار تلفیقی (کاربرد توأم دو باکتری RO1 و RO9) نسبت به کاربرد هر یک از آنها به تنهایی، روی شاخص‌های بیماری‌زایی نماتد قابل توجه نبود. نتایج این پژوهش نشان داد که استفاده از باکتری‌های پروبیوتیک *P. chlororaphis* RO1 و *B .s subtilis* RO9 در دو نوبت کاربرد می‌تواند در کنترل نماتد مورد توجه قرار گرفته و جا دارد که اثر باکتری روی خسارت نماتد و شاخص‌های عملکرد گیاه بررسی شود.

واژه‌های کلیدی: پروبیوتیک، *Pseudomonas chlororaphis, Bacillus subtilis*، شاخص‌های زیستی، نماتد ریشه گرهی

مقدمه

ایران با تولید سالانه ۲۱۷۱۸۲ تن میوه کیوی، یکی از مهمترین تولیدکنندگان در جهان محسوب می‌شود. سطح زیر کشت کیوی در استان‌های مازندران، گیلان و گلستان به ترتیب ۶۸۰۹، ۶۱۱۳ و ۱۰۲ هکتار می‌باشد (Anonymous, 2011). یکی از نماتدهای مهم این محصول، نماتد ریشه گرهی (Root–knot nematodes) است که باعث ایجاد خسارت قابل توجه در کشت آن می‌شود. در ایران، اولین بار در سال ۱۳۵۸ آلودگی کیوی به نماتد ریشه گرهی *Meloidogyne* spp. گزارش گردید. تنهامعافی و مهدویان چهار گونه مهم این جنس شامل *M. javanica*، *M. incognita*، *M. arenaria* و *M. hapla* را از باغ‌های کیوی مازندران و گیلان گزارش و گونه (Kofoid & White 1919). *M. incognita* را به‌عنوان گونه غالب معرفی نمودند (Tanhamaafi & Mahdavian, 1997). به‌دلیل آثار زودهنگام کاربرد سموم شیمیایی، کشاورزان مقادیر بالایی از آنها را جهت مهار بیماری‌های گیاهی به کار می‌برند. استفاده مداوم از سموم نماتدکش، سبب بروز مشکلاتی مانند مقاوم شدن نماتد هدف و از بین بردن میکروارگانیسم‌های مفید خاک می‌شود. علاوه بر آن، آلودگی سفره‌های آب زیرزمینی و محیط زیست و به تبع آن مسمومیت انسان و حیوانات را در پی دارد (Bent *et al.*, 2008). مبحث مهار زیستی و امکان استفاده از عوامل آنتاگونیست برای کنترل عوامل بیماری‌زای گیاهی، مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است (Sattar & Umar, 2011). به‌طور کلی مهارزیستی به معنی کاهش جمعیت نماتدها با وارد کردن دشمنان آنها یا دست‌ورزی در طبیعت، از طریق زیاد کردن فعالیت دیگر موجودات زنده می‌باشد (Hojjat Jalali & Ghasempour, 2006: Yahyavi Azad *et al.*, 2023). به همین دلیل مهار زیستی و کاربرد بهینه آن، مورد استقبال بیماری شناسان گیاهی واقع شده است.

میکروارگانیسم‌های استقرار یافته در فراریشه به‌عنوان یکی از اولین سدهای دفاعی گیاه عمل نموده و گزینه مطلوبی جهت مهار زیستی محسوب می‌شوند (Weller, 1988). قارچ‌ها و باکتری‌ها دو گروه بزرگ از این میکروارگانیسم‌ها هستند. در این میان، برخی باکتری‌ها نظیر جنس‌های *Bacillus*، *Pseudomonas* و *Pasteuria*، پتانسیل بالایی در مهار زیستی از خود نشان داده‌اند (Meyer, 2003; Manikanda *et al.*, 2010; Joseph *et al.*, 2007). باکتری‌ها بیشترین میکروارگانیسم‌های خاک را تشکیل می‌دهند که از نظر توده زیستی در برخی از مکان‌ها، نسبت به قارچ‌ها از فراوانی کمتری برخوردارند (Meyer, 2003) ولی دارای طیف اثر وسیع‌تری نسبت به قارچ‌ها، در برابر عوامل بیماری‌زای گیاهی می‌باشند. این موجودات پتانسیل بالایی جهت مدیریت نماتدهای انگل گیاهی در شرایط آزمایشگاه و گلخانه از خود نشان داده‌اند (Sikora *et al*, 2007). باکتری‌های افزایش دهنده رشد گیاه می‌توانند به‌صورت مستقیم یا غیرمستقیم از طریق تثبیت ازت، تولید هورمون، افزایش دسترسی به عناصر غذایی، تولید سیدروفورها، رقابت بر سر غذا و مکان، کاهش اثر تنش‌های محیط تولید، متابولیت‌های ثانویه، توکسین و یا القای مقاومت سیستمیک، موجب کنترل نماتدها شوند (Mhatre *et al.*, 2019; Compant *et al*., 2005; Majzoob *et al.*, 2012).

مطالعات نشان داد که استرین 06 باکتری *P. chlororaphis* تا ۶۶/۰۸ درصد مانع از تشکیل گال نماتد *M. hapla* می‌شود (Lee *et al*., 2011). تأثیر پنج جدایه از باکتری *Bacillus* spp. بر نماتد *M. javanica* در سویا مورد بررسی قرار داده شد و مشخص گردید که جدایه‌های مختلف باعث مرگ و میر ۵۰ تا ۱۰۰ درصدی لاروهای سن دوم در شرایط آزمایشگاهی شده و در شرایط گلخانه سبب تقلیل تعداد گال و توده تخم نماتدگردیدند (Chinheya *et al.*, 2017). تحقیقات درمورد باکتری *Pseudomonas fluorescence* نشان داد که این باکتری تأثیر بسزایی درکاهش تفریخ تخم و تعداد گال نماتد داشته و میزان تأثیر آن از *Bacillus* sp. بیشتر است (Ashoub & Amara, 2010). باکتری *B. firmus* قادر به کاهش ۵۴ تا ۶۵ درصدی تشکیل کیسه تخم نماتد ریشه گرهی گوجه فرنگی می‌باشد (Terefe *et al*., 2009). نتایج تأثیر باکتری *B. megaterium* روی نماتد *M. graminicola* نشان داد که این باکتری قادر به کاهش تشکیل گال روی گیاه برنج

است(Padgham & Sikora, 2007). باکتری *Bacillus* sp. باعث جلوگیری از تشکیل گال روی ریشه گوجه فرنگی شده (Kokalis & Dickson, 2003) و باکتری *B.thurigensis* موجب کاهش تشکیل گال و تخم نماتد ریشه گرهی *M. hapla* روی کاهو می‌شود (Chen *et al*, 2000).

با توجه به اهمیت گیاه کیوی به‌عنوان یک محصول مهم صادراتی و تأثیر سوءکنترل شیمیایی روی محیط زیست و سلامت انسان، در حال حاضر استفاده از عوامل مهار زیستی به‌عنوان روشی بی‌خطر و دوستدار محیط زیست می‌تواند به عنوان بخشی از مدیریت تلفیقی نماتدها و در راستای تحقق کشاورزی پایدار، مدنظر قرار گیرد. در این تحقیق، تأثیر سه جدایه از باکتری‌های پروبیوتیک در مقایسه با نماتدکش راگبی روی نماتد ریشه گرهی کیوی *(M. incognita)*، در شرایط گلخانه و باغ بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

۱– نمونه برداری، استخراج، رنگ‌آمیزی، شناسایی گونه غالب نماتد ریشه گرهی کیوی

نمونه برداری از خاک و ریشه درختان آلوده کیوی به نماتد ریشه گرهی، در فصول بهار و تابستان از استان گیلان انجام شد. پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه، جهت استخراج لارو از خاک، از روش سینی وایت هد استفاده شد (Whitehead & Hemming, 1965). همچنین برای استخراج تخم، از روش هوسی و بارکر استفاده گردید (Hussey & Barker, 1973).

۲– تکثیر نماتد

جهت کسب جمعیت لازم از نماتد، ابتدا نمونه‌های آلوده به نماتد جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل گردید. کشت انبوه و خالص نماتد از طریق تک کیسه تخم (single egg mass) روی گوجه فرنگی رقم حساس ارلی اوربانا انجام شد. بذرهای گوجه فرنگی در گلدان‌های پلاستیکی به قطر ۱۲ سانتی‌متر، حاوی خاک استریل دارای نسبت مساوی خاک مزرعه، ماسه و کود سترون شده با دستگاه اتوکلاو، کشت شدند. در مرحله چهار برگی گیاهچه‌ها، مایه‌زنی گوجه‌فرنگی به‌روش تک کیسه تخم انجام شد. ریشه‌های آلوده در آزمایشگاه شست و شو داده شدند و خاک اطراف آنها برداشته شد. در مرحله‌ی بعد با روش تک کیسه تخم، کیسه‌های تخم به وسیله اسکالپل در زیر بینوکولار جداسازی و به‌طور مجزا هر کدام در پتری حاوی آب مقطر قرار گرفتند. سپس در گلخانه هر توده تخم در سوراخ‌هایی به عمق سه تا پنج سانتیمتر در نزدیک ریشه نشاء گوجه فرنگی قرار گرفت (Hartman & Sasser, 1985) و در شرایط گلخانه (دمای ۲۵–۲۷ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۶۰ تا ۹۰ درصد) نگهداری شدند. نماتدهای تکثیر شده به این روش، در مراحل بعدی تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند.

۳– رنگ‌آمیزی نماتد در ریشه

ریشه‌های جمع آوری شده به آرامی شسته و به قطعات یک تا دو سانتی‌متری برش داده شدند. سپس داخل لوله آزمایش با محلول لاکتوفنل اسید فوشین به مدت یک دقیقه روی چراغ الکی حرارت داده شدند (Bybd *et al.*, 1983). ریشه‌ها پس از سرد شدن در زیر بینوکولار، مورد بررسی قرار گرفتند. ماده رنگ آمیزی شامل فنل خالص ۲۰ گرم، اسید لاکتیک ۲۰ گرم، گلیسیرین ۴۰ گرم، آب مقطر ۲۰ میلی‌لیتر و محلول اسید فوشین ۵ میلی‌لیتر، تهیه شد (Southey, 1970).

٤– تکثیر باکتری‌های پروبیوتیک

٤–۱– کشت اولیه، بررسی خلوص و نگهداری سویه‌ها

جدایه‌های باکتری‌های پروبیوتیک *Pseudomonas chlororaphis* RO1 جداسازی شده از فراریشه گندم، *Bacillus subtilis* RO8 و *Bacillus subtilis* RO9 جداسازی شده از فراریشه انگور، از کلکسیون شرکت ریشه گستر ویرا تهیه و روی محیط کشت Nutrient Agar (NA)، به صورت مخطط کشت گردید. تک کلنی‌های خالص،

مجدداً به صورت چمنی بر سطح محیط مذکور پرورش داده شدند. سوسپانسیون غلیظی از هر سویه، در محلول فسفات نمکی در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد (Liao & Shollenberger, 2003).

٤-۲- تهیه مایه تلقیح با جمعیت مناسب

سویه‌ها در محیط کشت مایع (۰/۵ گرم عصاره گوشت گاو، ۱ گرم پپتون، ۰/۵ گرم کلرید سدیم در یک لیتر) کشت و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس روی شیکر با ۱۳۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. به‌منظور تعیین جمعیت، یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری به ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل افزوده شد و سری رقت تهیه گردید. ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های مختلف روی محیط کشت NA، کشت داده شدند. پتری‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس قرار گرفتند. سپس شمارش کلنی انجام و جمعیت باکتری محاسبه گردید (Schaad *et al*., 2001).

٥- تأثیر باکتری‌ها بر لارو نماتد در شرایط آزمایشگاهی

باکتری‌های مورد مطالعه، به روش ذکر شده کشت داده شدند. سپس سوسپانسیونی از آنها تهیه و یک میلی لیتر از آن به پتری دیش‌های حاوی ۸۰ لارو سن دوم نماتد (استخراج شده از خاک آلوده باغ کیوی) که حجم آن‌ها نیز با آب مقطر استریل به یک میلی‌لیتر رسیده بود، اضافه شد. پتری‌ها در دمای ۲۷–۲۶ درجه سلسیوس نگه‌داری و بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، تعداد لاروهای مرده شمارش گردید. جهت محاسبه درصد مرگ و میر لاروها از فرمول زیر استفاده شد:

۱۰۰× لاروهای زنده اولیه/ لاروهای مرده =مرگ و میر لاروها

٦- تأثیر جدایه‌های پروبیوتیک روی نماتد در شرایط گلخانه و باغ

نهال کیوی رقم هایوارد یکساله با گواهی سلامت آفات و بیماری‌های گیاهی تهیه و استفاده شد. نهال‌ها به گلخانه آموزشی دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان منتقل گردید. از باکتری‌های پروبیوتیک کشت شده روی محیط کشت NA، سوسپانسیون تهیه شد. برای باکتری *chlororaphis P.*RO1، جذب نوری (OD = Optical Density) روی ۰/۸ (معادل با غلظت 10^8 سلول در هر میلی‌لیتر) برای باکتری‌های *Bacillus*، OD روی ۱ (معادل با غلظت 10^8 سلول در هر میلی‌لیتر) تنظیم شد. سپس ۵۰ میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری در پای هر نهال اضافه گردید. ابتدا ۴ سوراخ به عمق ۵ سانتی‌متر در اطراف ریشه کیوی ایجاد، سپس سوسپانسیون باکتری در آنها تزریق و روی سوراخ‌ها پوشانده شد. پس از گذشت ۷ روز جهت استقرار و تکثیر شدن باکتری‌ها در خاک، سپس سوسپانسیون لارو حاوی ۳۰۰۰ لارو سن دوم نماتد مانند روش فوق به خاک افزوده شد. برای تیمارهای دو نوبت کاربرد، ۱۴ روز بعد از تلقیح اولیه باکتری، تزریق بار دوم اجرا گردید. نهال‌ها در شرایط گلخانه با رطوبت نسبی ۶۰ تا ۹۰ درصد و دمای ۲۵–۲۷ درجه سلسیوس نگهداری شدند. دو ماه پس از اعمال تیمارهای آزمایشی، ریشه‌ها از خاک خارج و وزن خشک و تر ریشه توزین شد. جهت بررسی شاخص‌های بیماری‌زایی، ریشه‌های خارج شده شستشو داده شدند. سپس به قطعه‌های دو سانتیمتری تقسیم و به‌طور تصادفی میزان یک گرم از ریشه‌های آلوده جدا و رنگ آمیزی شدند. تعداد گال‌ها، توده تخم و جمعیت تخم و لارو در یک گرم ریشه توسط استریومیکروسکوپ شمارش شد. جهت استخراج لارو سن دوم نماتد از خاک، از روش سینی وایت هد استفاده شد (Whitehead & Hemming, 1965). استخراج تخم، به روش هوسی و بارکر انجام گردید (Hussey & Barker, 1973). تخم و لارو استخراج شده شمارش و فاکتور تولید مثل (*Rf*) از تقسیم جمعیت نهایی به جمعیت اولیه (*Pf/Pi*) محاسبه شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام و برای هر تیمار ۳ تکرار در نظر گرفته شد.

جهت انجام آزمون باغی، سویه‌های برتر در آزمایشات گلخانه مورد استفاده قرار گرفتند. جهت مقایسه کارایی جدایه‌های باکتری با ترکیبات شیمیایی، تیمار نماتدکش راگبی نیز در نظر گرفته شد.

برای بررسی اثر باکتری‌های پروبیوتیک روی نماتد در شرایط باغ، ابتدا باغ کیوی با درختان پنج ساله آلوده به نماتد

ریشه گرهی در روستای پاشاکی از توابع شهرستان سیاهکل انتخاب و از عمق ۳۰–۵ سانتی‌متری فراریشه درختان نمونه‌برداری از خاک و ریشه صورت گرفت. پس از ثبت مشخصات، نمونه‌ها به آزمایشگاه نماتد شناسی دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان منتقل شدند. جمعیت نماتدها در خاک و ریشه قبل از اعمال تیمارها و همچنین در پایان تحقیق بعد از سه ماه مورد بررسی قرار گرفتند. این آزمون در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی، با ۴ تکرار به مرحله اجرا درآمد. داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار SAS 9.2 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مقایسه میانگین‌ها، به کمک آزمون توکی در سطح پنج درصد انجام شد.

همچنین به‌منظور محاسبه درصد کاهش جمعیت نماتدها در تعداد گال، تعداد توده تخم و جمعیت تخم و لارو در یک گرم ریشه، تعداد لارو سن دوم در صد گرم خاک از فرمول ابوت استفاده گردید.

داده شاخص در تیمار – داده = فرمول ابوت (Abbot)

100× داده شاخص درشاهد منفی/شاخص در شاهد منفی

نتایج

۱– شناسایی نماتد ریشه گرهی

جهت شناسایی نمونه‌های نماتد ریشه گرهی استخراج شده، از برش شبکه کوتیکولی انتهای بدن نماتد ماده (prennial pattern) به همراه مشخصات ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی لاروهای سن دوم استفاده شد (Eisenback *et al.*, 1981). گونه مورد آزمون در این پژوهش، *M. incognita* تشخیص داده شد.

۲– آزمون آزمایشگاهی

تأثیر باکتری‌های مورد مطالعه بر روی ۸۰ عدد لارو سن دوم نماتد تازه تفریخ شده، انجام گرفت. نتایج آزمون اول نشان داد که بین تیمارها اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد وجود دارد (جدول ۱). در این بین، باکتری *B. subtilis* RO9 بیشترین تأثیر را بر مرگ و میر لاروها داشت به گونه‌ای که بالاترین میانگین مرگ و میر لاروها با ۴۸/۸ درصد را به خود اختصاص داد. بعد از آن سایر تیمارهای باکتریایی با اختلاف معنی‌دار در سه زمان مذکور، در سطح آماری مجزا قرار گرفتند (نمودار ۱).

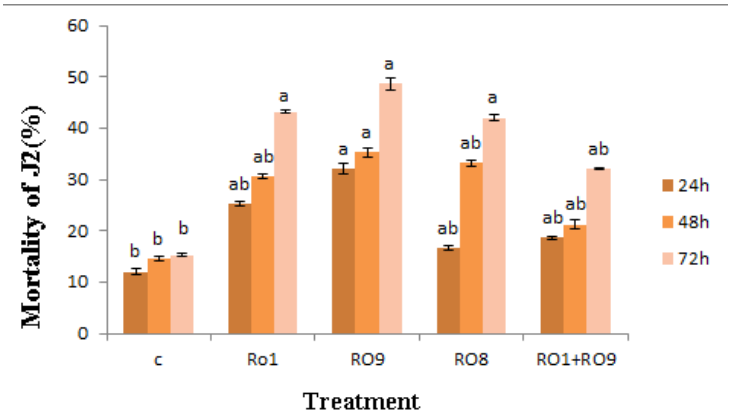
جدول ۱– جدول تجزیه واریانس درصد مرگ و میر لاروهای نماتد *M. incognita* در برابر استرین‌های باکتری بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در شرایط آزمایشگاه.

Table 1. Analysis of variance of the mortality percentage of *M. incognita* juveniles exposed to bacterial strains for 24, 48 and 72 h in vitro tests in petri dishes.

Sources of Variance	Df	Mean of Square (MS)		
		Mortality percentage of juveniles (J2) in 24 hours	Mortality percentage of juveniles (J2) in 48 hours	Mortality percentage of juveniles (J2) in 72 hours
Treatment	4	45.9 *	57.6*	129*
Error	10	10	13.7	126
Total	14	–	–	–
F Value	–	4.59	4.19	10.3
CV		30	27.3	19.5

* Significant at 5% probability level

*معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد



نمودار۱ – تأثیر باکتری‌های پروبیوتیک بر درصد مرگ و میر لاروها در شرایط آزمایشگاه. تیمارهای دارای حروف یکسان، فاقد اختلاف معنی‌دار با یکدیگر هستند ($p<0.05$).

Fig. 1. The effects of probiotic bacteria on the mortality percent of nematode juveniles in laboratory conditions. Treatments with the similar letters have no significant difference ($p<0.05$).

۳– تأثیر جدایه‌های باکتری‌های پروبیوتیک روی نماتد ریشه گرهی کیوی در شرایط گلخانه

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مورد آزمون در این مرحله نشان داد که تیمارهای مورد آزمایش در سطح احتمال آماری پنج درصد، اختلاف معنی‌داری با هم دارند (جدول ۳). مقایسه جدول میانگین داده‌ها مشخص نمود که استفاده از باکتری *P. chlororaphis* RO1 در دو نوبت کاربرد، بیشترین اثر را در کاهش تعداد گال در هر گرم ریشه، تعداد توده تخم و جمعیت لاروها در صد گرم خاک به ترتیب با میانگین مقادیر (۸۹/۶، ۵۴/۳ و۲۱۶۶) نسبت به سایر تیمارها داشته و اختلاف معنی‌داری با شاهد منفی نشان داده است (جدول ۲). بررسی شاخص فاکتور تولید مثل و تعداد لارو و تخم در یک گرم ریشه در تیمارهای مختلف حاکی از آن بود که تمامی آنها با شاهد منفی تفاوت معنی داری دارند و تیمار باکتری *B. subtilis* RO9 در دو نوبت کاربرد، بیشترین تاثیر را درکاهش تعداد تخم و لارو در یک گرم از ریشه و فاکتور تولید مثل با میانگین مقادیر (۴۸۳ و۰/۸۲) داشته است. بنابراین در کاهش جمعیت لاروهای نماتد در خاک باکتری *P. chlororaphis* RO1 و در کاهش جمعیت لارو و تخم نماتد در ریشه باکتری *B. subtilis* RO9 بیشترین تأثیر را داشته‌اند (جدول ۲).

همچنین نتایج آزمایشات گلخانه‌ای نشان داد که جدایه باکتری *P. chlororaphis* RO1 در دو نوبت کاربرد باعث کاهش ۵۳/۹ درصد تشکیل گال در یک گرم ریشه در مقایسه با شاهد شده و باکتری RO9 دارای ۴۶/۹ درصد بازدارندگی در تشکیل گال در ریشه بود. علاوه بر این، هر سه جدایه باکتری RO1, RO9 و RO8 در دو نوبت کاربرد باعث کاهش جمعیت لارو سن دوم نماتد درخاک به ترتیب ۶۲/۲، ۵۸/۵ و ۵۹/۴ درصدی در مقایسه با شاهد شدند. در کاهش جمعیت تخم و لارو در ریشه دو باکتری RO9 و RO1 به‌ترتیب باعث کاهش ۸۸ و ۸۷ درصدی نسبت به شاهد شده و عملکرد مطلوبی داشتند.

جدول ۲– مقایسه میانگین شاخص‌های بیماری‌زایی نماتد *M. incognita* در کیوی تحت تأثیرباکتری‌های پروبیوتیک در گلخانه

Table 2. Comparison of means of pathogenicity indices of *M. incognita* on kiwi under greenhouse conditions.

Treatments	The number of galls	Egg mass	The number of eggs and juveniles (J2) (in 1gr root)	Juveniles (J2) population (in 100 gr soil)	Reproduction factor
Control	194.6[a]	99.6 [a]	16700 [a]	1166[a]	5.95 [a]
RO1	122.6[bc]	65 [ab]	2333.3[c]	600[bc]	0.97 [e]
RO9	143.3 [b]	73.5 [ab]	7233.3 [b]	600 [bc]	2.61 [c]
RO8	136.6 [b]	68.5 [ab]	7833.3 [b]	720 [bc]	2.85 [b]
RO1+RO9	103 [bc]	66.6 [ab]	8000 [b]	993 [ab]	2.99 [b]
RO1–2 times	89.6 [c]	54.3 [b]	2166.6 [c]	440 [c]	0.86 [e]
RO9–2 times	103.3 [bc]	67.3 [ab]	2000 [c]	483 [c]	0.82 [e]
RO8–2 times	105 [bc]	58.3 [b]	2366.6 [c]	473 [c]	0.94 [e]
RO1+RO9,2 times	115 [bc]	69 [ab]	3233.3 [c]	506 [bc]	1.24 [d]

جدول۳– جدول تجزیه واریانس تأثیر سویه‌های باکتری روی شاخص‌های بیماری‌زایی نماتد ریشه گرهی کیوی تحت شرایط گلخانه.

Table 3. Analysis of variance of the effect of bacterial strains on pathogenicity indices of root–knot nematodes on kiwi under greenhouse conditions.

Sources of Variance	df	Mean of Square (MS)				
		The number of galls	Egg mass (g/root)	The number of eggs and juveniles (J2) (g/root)	Juveniles (J2) population (100 g/soil)	Reproduction factor
Treatment	8	3001.56*	292.31*	71342314.8*	180059.259*	8.447*
Error	18	250.8	108.62	186296.3	22451.85	0.00263
Total	26	–	–	–	–	–
F Value	–	11.9	2.6	382.95	8	3207
CV	–	12.7	15.3	7.538	22.7	4.95521

* معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد

* Significant at 5% probability level

٤– تأثیر جدایه‌های باکتری‌های پروبیوتیک روی نماتد ریشه گرهی کیوی در شرایط باغ

نتایج حاصل از تجزیه واریانس تأثیر جدایه‌های باکتری بر درصد کاهش شاخص‌های بیماری‌زایی نماتد ریشه گرهی *M. incognita* در این مرحله نشان داد که تیمارهای مورد آزمایش در سطح احتمال آماری پنج درصد، اختلاف معنی‌داری با هم دارند (جدول ۵).

نتایج درصدکاهش داده‌های مورد آزمایش نشان داد که کمترین درصد کاهش تعداد لارو سن دوم بعد از نماتدکش راگبی با۵۹/۲ مربوط به تیمار با باکتری *P. chlororaphis* RO1 در دو نوبت کاربرد با ۳۲/۳ درصد می‌باشد و بعد از آن باکتری *B. subtilis* RO9 با ۲۹/۷ درصد کاهش قرار دارد. هرچند تفاوت دو تیمار در کاهش تعداد لارو سن دوم بسیار کم بوده و از لحاظ آماری در یک سطح آماری قرار گرفتند (جدول ۴). در شاخص تعداد گال در ریشه بعد از نماتدکش راگبی با کاهش ۵۴/۸ درصد باکتری *P. chlororaphis* RO1 در دو نوبت کاربرد با ۴۷/۳ درصد کاهش بیشترین اثر را در کاهش تعداد گال در هر گرم ریشه نسبت به سایر تیمارها داشته و اختلاف معنی‌داری با شاهد منفی نشان داد. در شاخص تعداد تخم و لارو در هر گرم ریشه، کمترین کاهش بعد از تیمار با نماتدکش راگبی با ۵۶/۹ درصد مربوط است به کاربرد باکتری *B. subtilis*

RO9 در دو نوبت کاربرد با کاهش ۴۱/۲ درصد و پس از آن تیمار با باکتری *P. chlororaphis* RO1 در دو نوبت کاربرد با کاهش ۳۱/۱ درصد. کمترین فاکتور تولید مثلی بعد از تیمار با نماتدکش راگبی با ۰/۴۱ درصد مربوط است به تیمار با باکتری *B. subtilis* RO9 در دو نوبت کاربرد با ۰/۶۴ درصد و تیمار باکتری *P. chlororaphis* RO1 در دو نوبت کاربرد ۰/۷ درصدکه از لحاظ آماری در یک گروه قرار می‌گیرند (جدول ۴).

جدول ۴– تأثیر جدایه‌های باکتری بر درصد کاهش شاخص‌های بیماری‌زایی نماتد ریشه گرهی *M. incognita* در شرایط باغ

Table 4. The effect of bacterial strains on the percentage of reduction of pathogenicity indices of *M. incognita* on kiwifruit in field.

Treatments	Reduction of gall (%)	Reduction of juveniles (J2s)(100 g/soil) (%)	Reduction of juveniles (J2s) and eggs (g/root) (%)	Reduction of reproduction factor (%)
Control	4.7[b]	11.9[c]	4.5[d]	1.07[a]
RO1–2 times	47.3[ab]	32.3[b]	31.1[c]	0.7[b]
RO9–2 times	35.4[ab]	29.7[b]	41.2[b]	0.64[b]
Rugby	54.8[a]	59.2[a]	56.9[a]	0.41[c]

جدول ۵ – جدول تجزیه واریانس تأثیر سویه‌های باکتری روی کاهش درصد شاخص‌های بیماری‌زایی نماتد ریشه گرهی در شرایط باغ.

Table 5. Analysis of variance of the effect of bacterial strains on the percentage of reduction of pathogenicity indices of root–knot nematodes on kiwi in field.

Sources of Variance	df	Mean of Square (MS)			
		Reduction of gall	Reduction of juveniles (J2s) (100 g/soil)	Reduction of juveniles (J2s) and eggs (g/root) (%)	Reproduction factor
Treatment	3	1460.3*	1155.6*	1453.5.*	0.21*
Error	8	0.01*	0.005*	0.01*	0.0025*
Total	11	–	–	–	–
F Value	–	146037	21011	145359	84.9
CV	–	0.28	0.7	0.29	7.1

* معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد

* Significant at 5% probability level

بحث

نتایج بدست آمده در تحقیق حاضر نشان داد که تمامی تیمارهای استفاده شده، در راستای کاهش شاخص‌های آلودگی نماتد ریشه گرهی مؤثر عمل نمودند. اگرچه میزان این اثرگذاری در تیمارها و کاربردهای مختلف باکتری‌های *B. subtilis* و *P. chlororaphis* متفاوت بوده است.

نتایج آزمایشات گلخانه‌ای و باغی نشان داد که باکتری *P. chlororaphis* RO1 موجب کاهش جمعیت لاروهای نماتد در خاک شده و در کاهش جمعیت لارو و تخم در ریشه باکتری *B. subtilis* RO9 مؤثرتر بوده است و این امرمی‌تواند ناشی از مکانیزم‌های اثر مختلف در دو جدایه از باکتری‌های مورد مطالعه باشد. در مورد کاهش خسارت ناشی از نماتد توسط باکتری‌ها، سازوکارهای متفاوتی وجود دارد. به‌عنوان مثال، باکتری *B. subtilis* با القای مقاومت سیستمیک یا افزایش تحمل میزبان نسبت به بیماری، عمل می‌کند (Kokalis–Burelle and Samac 2003). علاوه بر این، باکتری *B. subtilis* توکسین bulbiformin تولید می‌کند که مانع از فعالیت نماتدهای انگل گیاهی می‌شود

(Khan & Tarannum 1999; Majzoob *et al.*, 2012). باکتری *B. subtilis* لیپوپپتیدهای حلقوی سورفاکتین و ایتورین را تولید می‌کند که نقش مهمی در افزایش درصد مرگ و میر لاروهای نماتد دارد (Kavitha *et al.*, 2012; Engelbrecht *et al.*, 2018). همچنین این باکتری با جلوگیری از تفریخ تخم، موجب کاهش جمعیت لاروهای سن دوم نماتد *M. incognita* میشود (Soliman *et al.*, 2019). باکتری‌های افزایش دهنده رشد گیاه با تجمع در منطقه فراریشه حفاظت قابل توجهی را در مقابل نماتدهای انگل گیاهی به وجود می‌آورند (Kim & Misaghi 1996). باکتری *P. chlororaphis* می‌تواند به‌عنوان یک عامل مهار زیستی در برابر بیمارگرهای مختلف، از طریق تولید آنتی بیوتیک‌های فنازین عمل کند (Nam *et al.*, 2018). در مراحل آزمایشگاهی و گلخانه‌ای بر خلاف انتظار، تیمار تلفیقی و کاربرد توأم دو باکتری RO1 و RO9 نسبت به کاربرد هر یک از آنها به تنهایی، روی شاخص‌های بیماری‌زایی نماتد مؤثرتر واقع نشد. بنابراین کاربرد توأم این دو باکتری در شرایط باغ اجرا نگردید. این موضوع می‌تواند ناشی از اثرات هم‌ستیزی دو سویه بر هم باشد (Maciag *et al.*, 2023). نتایج تحقیق حاضر با آزمایشات انجام شده توسط سایر پژوهشگران مشابهت نشان داد. این نتیجه با نتایج لی و همکاران که بیان داشتند استرین 06 باکتری *Pseudomonas chlororaphis*، دارای ۶۶/۰۸ درصد بازدارندگی در تشکیل گال است، مطابقت دارد (Lee *et al.*, 2011). تحقیقات بشیری و همکاران روی تأثیر باکتری‌های آنتاگونیست فراریشه کیوی‌فروت در کنترل نماتد ریشه گرهی (*Meloidogyne* spp.) نشان داد که جدایه‌های *Streptomyces* spp. و *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *Aeurofaciens* بیشترین تأثیر را در شرایط گلخانه، بر شاخص‌های آلودگی نماتد ریشه گرهی داشته و جنس *Bacillus* spp. که در شرایط آزمایشگاه دارای بیشترین اثر بود، در شرایط گلخانه، از تأثیر کمتری برخوردار بوده است (Bashiri *et al.*, 2012). در تحقیق حاضر، این تقلیل مشاهده نشد و جدایه‌هایی که در شرایط آزمایشگاه عملکرد مطلوبی داشتند، در شرایط گلخانه نیز موفق عمل نمودند.

منظم و همکاران بررسی اثر دو باکتری *Pseudomonas fluorescence* و *Streptomyces* spp. در برابر نماتد ریشه گرهی *M. incognita* در گوجه فرنگی را مورد بررسی قرار دادند و نتایج تحقیق آن‌ها نشان داد که بعد از تیمار نماتدکش، بیشترین کاهش شاخص‌های آلودگی مربوط به باکتری *P. fluorescence* GU5 با میانگین ۱۲۷گال در ریشه، ۶۷ تخم در گرم ریشه و ۱۶ لارو سن دوم در ۱۰۰ گرم خاک در زمان قبل از کاشت، می‌باشد (Monazam *et al.*, 2022). عبدالخیر و همکاران طی بررسی اثر باکتری‌های *Bacillus subtilis*، *B. pumilus* و *Pseudomonas fluorescence* در لوبیا چشم بلبلی علیه نماتد ریشه گرهی *M. incognita*، گزارش دادند که باکتری *Bacillus subtilis* (Bs2) قادر به کاهش ۸۲ درصدی فاکتور تولید مثل شده، همچنین کربوفوران (۱۰درصد) بیشترین میانگین کاهش (۷۶/۵ درصد) از نظر تعداد جمعیت لارو سن دوم در خاک در مقایسه با شاهد تیمار نشده داشته است (Abd–El–Khair *et al.*, 2019). Chinheya و همکاران تأثیر پنج جدایه از باکتری *Bacillus* spp. را بر نماتد *Meloidogyne javanica* در سویا مورد بررسی قرار دادند و نتایج نشان داد که جدایه‌های مختلف باعث مرگ و میر ۵۰ تا ۱۰۰ درصدی لاروهای سن دوم این نماتد در شرایط آزمایشگاهی و در شرایط گلخانه سبب تقلیل تعداد گال و توده تخم نماتد گردیدند (Chinheya *et al.*, 2017). Ashoub و Arama در سال ۲۰۱۰ در تحقیقات خود به این نتیجه رسیدند که *Pseudomonas fluorescence* دارای تأثیر بسزایی بر تفریخ تخم و کاهش تعداد گال نماتد است. همچنین ثابت کردند که میزان تأثیر آن از باکتری *Bacillus* sp. بیشتر است (Ashoub & Arama, 2010). باکتری *B. firmus* قادر به کاهش ۵۴ تا ۶۵ درصدی تشکیل کیسه تخم نماتد ریشه گرهی گوجه فرنگی می‌باشد (Terefe *et al.*, 2009). نتایج تأثیر باکتری *B. megaterium* روی نماتد *M. graminicola* نشان داد که این باکتری قادر به کاهش

تشکیل گال روی گیاه برنج است (Padgham & Sikora, 2007). باکتری *Bacillus* sp. باعث جلوگیری از تشکیل گال روی ریشه گوجه‌فرنگی می‌شود (Kokalis & Dickson, 2003) و باکتری *B. thurigensis* موجب کاهش تشکیل گال و تخم نماتد ریشه گرهی *M. hapla* روی کاهو می‌باشد (Chen *et al*, 2000). استمرار و دفعات کاربرد عوامل زیستی، نقش مهمی در کنترل موفق نماتدها دارد و این به‌دلیل حضور گسترده و تقویت جمعیت عوامل مهارکننده زیستی است که باعث کاهش جمعیت عامل خسارت‌زا و تقلیل خسارت وارده به گیاه میزبان خواهد شد(Alizadeh *et al*., 2020; Monazam *et al*., 2022). بنابراین، هر چه دفعات کاربرد بیشتر باشد، به همان نسبت پایداری عامل در محیط بیشتر شده و به تبع آن، درصد کنترل افزایش خواهد یافت. نتایج کسب شده در تحقیق حاضر نیز مؤید این حقیقت است، به گونه‌ای که کاهش شاخص‌های بیماری‌زایی نماتد با دو نوبت کاربرد باکتری‌ها، حکایت از کسب نتایج مطلوبتر داشته است.

کاربرد به‌موقع عوامل زیستی بازدارنده، نتایج مطلوب کنترل نماتد را در پی خواهد داشت. تولید ترکیبات مؤثر جهت بهبود مقاومت، تولید مواد سمی با خاصیت نماتدکشی، تولید آنزیم‌های تجزیه کننده و آنتی بیوتیک‌ها، از سازوکارهای دخیل در کنترل نماتدها توسط باکتری‌ها محسوب می‌شود (Forghani & Hajihassani 2020). همچنین مصرف زود هنگام عامل کنترل کننده به دلیل استقرار بهتر، سبب برتری نسبی آن، در مقایسه با کاربرد در سایر مراحل خواهد بود. چشم انداز مبتنی بر استفاده از باکتری‌ها در کنترل زیستی نماتدها، به‌دلیل الزام درحذف تدریجی ترکیبات شیمیایی و تثبیت اکولوژیکی محیط زیست، از آینده امیدوارکننده‌ای برخوردار است (Migunova & Sasanelli 2021).

سپاسگزاری

نگارندگان مراتب تشکر خود را از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (بنیاد ملی علم ایران) و شرکت دانش سبز ماهان (گروه تولیدی ماتیلدا) به جهت حمایت‌های مالی انجام شده در طول تحقیق و شرکت ریشه گستر ویرا به جهت در اختیار قرار دادن سویه‌های باکتریایی اعلام می‌دارند.

References

Anonymous. 2011. Agriculture data collection, Ministry of Agriculture. Planning and Economic Assistance, Office of Statistics and Information Technology, Tehran, Iran.

Abd–El–Khair, H., El–Nagdi, W.M.A., Youssef, M.M.A., A. Abd–Elgawad, M.M.M. & Dawood, M.G. 2019. Protective effect of *Bacillus subtilis*, *B. pumilus*, and *Pseudomonas fluorescens* isolates against root knot nematode *Meloidogyne incognita* on cowpea. Bulletin of the National Research Centre. https://doi.org/10.1186/s42269–019–0108–8.

Alizadeh, M., Vasebi, Y. & Safaie, N. 2020. Microbial antagonists against plant pathogens in Iran: A review. Open Agriculture 5(1): 404–440.

Ashoub, A. & Amara, H. 2010. Biocontrol activity of some bacterial genera against root–knot nematode, *Meloidogyne incognita*. Journal of American Science, 6(10): 321–328.

Bashiri, S., Jamali, S., Golmohammadi, M. & Tanhamaafi, Z. 2012. Effect of antagonistic bacteria on kiwifruit rhizosphere in control of root knot nematode (*Meloidogyne* spp.). University of Guilan. The thesis of master. (In Persian with English Summary).

Bent, E., Loffredo, A., McKenry, M.V. Becker, J.O. & Borneman, J. 2008. Detection and investigation of soil biological activity against *Meloidogyne incognita*. Journal of Nematology, 40(2): 109–118.

Bybd, D.W., Kirkpatrick, T. & Barker, K.R. 1983. An improved technique forclearing and staining plant tissues for detection of nematodes. Nematology, 15(1): 142–143.

Chen, J., Abawi G.S. & Zuckerman, B.M. 2000. Efficacy of *Bacillus thurigensis*, *Paecilomyces marquandii*, and *Streptomyces costaricanus* with and without organic amendments against *Meloidogyne hapla* infecting lettuce. Nematology, 32: 70–77

Chinheya, C.C., Yobo, K. S. & Laing, M.D. 2017. Biological control of the root knot nematode, *Meloidogyne javanica* (Chitwood) using Bacillus isolates, on soybean. Biological Control, 109: 37–41.

Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C. & Barka E.A. 2005. Use of Plant Growth–Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. Applied and Environmental Microbiology, 71: 4951–4959. https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.4951–4959.

Eisenback, J.D., Hirschmann, H., Sasser, J.N. & Triantaphyllou, A.C. 1981. A guide to the four most common species of root–knot nematodes (*Meloidogyne* spp.), with a pictorial key, p. 52.

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.

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.

Hartman, K.M. & Sasser, J.N. 1985. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal–pattern morphology. pp. 69–77. *In*: K. R. Barker, C.C. Carter and J.N. Sasser (eds.), An Advanced Treatise on *Meloidogyne*. Vol. 2, Methodology. North Carolina State University, Graphics.

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.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.

Joseph, B., Patra, R.R. & Lawrence, R. 2007. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). International Journal of Plant Production, 1(2): 141–151.

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.

Khan, M.R. & Tarannum, Z.1999. Effects of field application of various microorganisms on *Meloidogyne incognita* on tomato. Nematologia Mediterranea, 2: 7233–238.

Kim, H. &. Misaghi, I.J. 1996. Biocontrol Performance of Two Isolates of *Pseudomonas fluorescens* in Modified Soil Atmospheres. Phytopathology, 86: 1238–1241. DOI: 10.1094/Phyto–86–1238.

Kokalis–Burelle, N. & Samac, D.A. 2003. Use of gram–positive bacteria as biological control agents for plant parasitic nematodes. J. Nematol, 35: 347–348 (Abstr.).

Kokalis–Burelle, N. & Dickson, D.W. 2003. Effect of soil fumigants and BioYeildTM on root–knot nematode incidence and yield of tomato. In Proceedings of international research conference on methyl bromide: alternatives and emissions reductions. SaN Diego. pp 50.51– 50–53.

Lee, J.H., Ma, K.C., Juko, S., Kang, B.R., Kim, S. & Kim, Y.C. 2011. Nematicidal activity of a nonpathogenic biocontrol bacterium *Pseudomonas chlororaphis* 06. Current Microbiology, 62(3): 746–751.

Liao, C.H. & Shollenberger, L.M. 2003. Survivability and long–term preservation of bacteria in water and in phosphate–buffered saline. Letters in Applied Microbiology, 37(1): 47–50.

Maciag, T., Kozieł, E., Rusin, P., Otulak–Kozieł, K., Jafra, S. & Czajkowski, R. 2023. Microbial Consortia for Plant Protection against Diseases: More than the Sum of Its Parts.International Journal of Molecular Sciences, 24: 12227. https://doi.org/10.3390/ijms241512227

Majzoob, S.H., Karegar Bideh, A. Taghavi, M. & Hamzeh Zarghani, H.A. 2012. Evaluation of rhizobacteria for antagonistic activity against root–knot nematode, *Meloidogyne javanica* on cucumber, under greenhouse condition. Iranian Journal of Plant Pathology, 48:69–84.

Manikanda, R., Saravanakumar, D. Rajendran, L. Raguchander, T. & Samiyappan, R. 2010. Standardization of liquid formulation of *Pseudomonas fluorescens* Pf1 for its efficacy against Fusarium wilt of tomato. Biological control, 54: 83–89.

Meyer, S.L.F. 2003. Management of plant parasitic nematodes. Pest Management science, 59: 665–670.

Mhatre, P.H., Karthik, C., Kadirvelu, K., Divya, K.L., Venkatasalam, E.P., Srinivasan, S., Shanmuganathan, R. 2019. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a potential alternative tool for nematodes bio–control. Biocatal Agri Biotechnol, 17: 119–128. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.11.009.

Migunova, V.D. & Sasanelli, N. 2021. Bacteria as biocontrol tool against phytoparasitic nematodes. Plants, 10(2): 389. https://doi.org/10.3390/plants1002.0389.

Monazam, K. Jamali, S. & 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 / Vol. 1 / No. 1 / 2022 / 118–127. (In Persian with English Summary).

Nam, H.S., Anderson, A.J. & Kim, Y.C. 2018. Biocontrol Efficacy of Formulated *Pseudomonas chlororaphis* O6 against Plant Diseases and Root–Knot Nematodes. The Plant Pathology Journal, 34(3): 241–249. https://doi.org/10.5423/PPJ.NT.12.2017.0264.

Padgham, J. & Sikora, R.A. 2007. Biological control potential and modes of action of *Bacillus megaterium* against *Meloidogyne graminicola* on rice. Crop Protection, 26: 971–977.

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.

Schaad, N.W., Jones, J.B. & Chun, W. 2001. Laboratory guid for identification of plant pathogenic bacteria (Third edition). APS Press. 373 pp.

Sikora, R.A., Schafer, K. & Dababat, A.A. 2007. Modes of action associated with microbial Induced in planta suppression of plant–parasitic nematodes. Australasian Plant Pathology, 36: 124–134.

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.

Southey, J.F. 1970. Laboratory methods for work with plant and soil nematodes. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. London, 72pp.

Tanhamaafi, Z. & Mahdavian, S.I. 1997. Identification of species and races of Root–knot Nematode (*Meloidogyne* spp.) on kiwi and effect of *M. incognita* on kiwi seedling. Pests and Plant Diseases of Iran, 65: 1–11. (In Persian with English Summary).

Terefe, M., Tefera, T. & Sakhuja, P.K. 2009. Effect of a formulation of *Bacillus firmus* on root knot nematode *Meloidogyne incognita* infestation and the growth of tomato plants in the greenhouse and nursery. Journal Invertebrate Pathology, 100: 94–99.

Weller, D.M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. Annual Review Phytopathology, 26: 279–407.

Whitehead, A.G. & Hemming, J.R. 1965. A comparison of some quantitative methods of extracting small vermiform nematodes from soil. Annual Applied Biology, 55: 25–38.

Yahyavi Azad, A., Hosseinikhah Choshali, A. & Seyyed Ghasemi, S.S. 2023. Effect of *Bacillus subtilis* and chitosan in Biological Control of Root–knot Nematode, *Meloidogyne incognita* on Tomato. Biocontrol in Plant 163 Protection, 10(2): 153-163. (In Persian with English Summary).

Biological control of the root–knot nematode (*Meloidogyne incognita)* in kiwifruit using probiotic bacteria

Seyedeh Negin Mirghasemi[1], Aazam Taheri[1], Pejman Khodaygan[2], Salar Jamali[1]

1. Ph.D. Student, Instructor, Associate Professor, Department of Plant Protection, School of Agriculture. University of Guilan, Rasht, Guilan, Iran.
2. Associate Professor, Department of Plant Protection. Vali–E–Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran.
Corresponding author: Salar Jamali, email: jamali@guilan.ac.ir

Received: Jan., 01, 2024 11(1) 35–47 Accepted: Mar., 09, 2024

Abstract

Root knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) are one of the most damaging nematodes among plant parasitic nematodes and cause significant damage to agricultural products. Probiotic bacteria, by having a direct effect on the pathogen, inducing plant resistance and stimulating plant growth, have shown high efficiency in controlling plant diseases. In this study, three species probiotic bacteria *Pseudomonas chlororaphis* RO1, *Bacillus subtilis* RO9, and *Bacillus subtilis* RO8 were used to control root–knot nematodes under laboratory, greenhouse, and kiwifruit orchard conditions. The nematode infection indices including gall number, egg mass number per gram of root, population of juveniles and eggs per gram of root, number of second–stage juveniles per 100 grams of soil, and the reproduction factor were evaluated. In the laboratory conditions, this investigation was carried out in a completely randomized design with 11 treatments and three replicates for each stage, while the field experiment was conducted in complete randomized blocks with four treatments and three replicates in a kiwifruit orchard located in the Pashaki region of Siahkal and the population of nematodes in the soil and roots was investigated before applying the treatments and also at the end of the research. The results showed that all treatments were successful in controlling nematode infection indices and significantly differed from the control treatment. So, they caused the reduction of nematode infection indices in all the investigated indicators. In the laboratory conditions, bacteria *Bacillus subtilis* RO9 showed the highest impact, with an increase in larval mortality rate (48.8%) compared to the control. Additionally, in the greenhouse conditions, the reapplication of, *B. subtilis* RO9 and *P. chlororaphis* RO1 bacteria led to a significant decrease in the number of galls, egg mass, and population of second–stage juveniles in the soil, as well as the population of eggs and juveniles in the roots. The field experiment results indicated that after Rugby nematicide, the *B. subtilis* RO9 bacteria (41.2%) was more effective than the *P. chlororaphis* RO1 bacteria (31.1%) in reducing 'eggs and juveniles' population in the roots. *P. chlororaphis* RO1 bacteria had the best effect in reducing the population of second–stage juveniles in the soil and the number of galls in the root (32.3%, 47.3%), after Rugby nematicide. Both bacterial strains showed very favorable performance in reducing the reproduction factor with (0.64 and 0.7), with little difference compared to the chemical nematicide Rugby (0.41). In different stages of the experiment (laboratory and greenhouse), the combined treatment (simultaneous application of both bacteria RO1 and RO9) was not significantly effective in nematode disease indices compared to the individual application of these bacteria. Therefore, the results indicated that the use of probiotic bacteria *P. chlororaphis* RO1 and *B. subtilis* RO9 at two times can control the nematode and it is worthwhile to investigate the effect of bacteria on nematode damage and plant performance indicators.

Keywords: probiotic, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas chlororaphis*, biological indices, root–knot nematode