

## کارایی باکتری‌های اندوفیت خیار در کنترل نماتد *Meloidogyne javanica* در شرایط آزمایشگاه و گلخانه

۱. فرخنده امینی؛ ۲. عصمت مهدیکhani مقدم\*؛ ۳. ساره بقائی راوری  
۱، ۲ و ۳. دانشجوی کارشناسی ارشد، استاد و دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد  
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۸/۱ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۱/۱۶)

### چکیده

در حال حاضر، نماتد ریشه‌گرهی *Meloidogyne javanica* به عنوان یک معضل مهم در گلخانه‌های خیار کشور مطرح است. در بررسی حاضر جهت کنترل بیولوژیک نماتد ریشه‌گرهی از باکتری‌های اندوفیت استفاده گردید. تعداد ۷۰ جدایه باکتری از ریشه خیار مزارع و گلخانه‌های استان خراسان رضوی جداسازی شدند. براساس نتایج آزمایشات سنجش‌زیستی، هفت جدایه که بیشترین درصد مرگ‌ومیر لارو سن‌دوم و عدم تفریح تخم نماتد *M. javanica* را نشان دادند، به عنوان جدایه منتخب، از نظر توانایی کاهش شاخص‌های بیماریزایی در گیاه خیار مورد بررسی قرار گرفتند. جدایه‌های Fm1، Em1 و Y15 به‌طور قابل توجهی در کاهش تعداد تخم، گال و لارو سن‌دوم در ریشه‌های خیار آلوده، مثبت ارزیابی شدند. پایین‌ترین شاخص گال، در کاربرد این سه جدایه در مقایسه با شاهد آلوده به نماتد، مشخص گردید. برپایه توالی‌یابی ناحیه 16S rDNA، دو جدایه منتخب Fm1 و Em1 در آزمون‌های گلخانه‌ای، متعلق به گونه *Pseudomonas rhodesiae* و جدایه Y15 متعلق به گونه *Acinetobacter* sp. می‌باشند. براساس نتایج بررسی حاضر، به نظر می‌رسد که جدایه‌های Em1 و Fm1 و Y15 گزینه‌های مناسبی جهت تحقیقات بیشتر در زمینه کنترل نماتد ریشه‌گرهی در شرایط طبیعی باشند.

کلیدواژگان: باکتری‌های اندوفیت، خیار، شاخص‌های بیماریزایی نماتد، نماتد ریشه‌گرهی.

## Efficiency of cucumber endophytic bacteria on *Meloidogyne javanica* control under lab and greenhouse conditions

Farkhondeh Amini<sup>1</sup>, Esmat Mahdikhani-Moghaddam<sup>2\*</sup> and Sareh Baghaee-Ravari<sup>3</sup>

1, 2, 3. M.Sc. Student, Professor and Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran  
(Received: Oct. 22, 2016 - Accepted: Feb. 4, 2017)

### ABSTRACT

Root-Knot nematode, *Meloidogyne javanica* is currently proposed as an important problem in the cucumber greenhouses of the country. In the present study, endophytic bacteria were evaluated to control the root-knot nematode. Seventy strains were isolated from cucumber roots, gathered from fields and greenhouses in Razavi Khorasan province. Based on the results of biological assays, seven representative strains showing the highest values of second instar larvae mortality and inhibition of egg hatching, were selected for greenhouse experiments. These bacterial strains were examined in terms of reduction of pathogenicity indexes and disease severity. Strains Fm1, Em1 and Y15 were evaluated significantly positive in reduction of egg, gall and second instar larvae number on infected cucumber roots. Moreover, the lowest level of gall index was obtained following the application of these strains compared to the control (only nematode). According to 16S rDNA gene sequencing, three selected strains associated to greenhouse trials belonged to *Pseudomonas rhodesiae* (Fm1 and Em1) and *Acinetobacter* sp. (Y15). Consequently, strains Fm1, Em1, and Y15 can be suggested as sufficient candidates in order to perform more studies on the root knot nematode repression in natural conditions.

**Keywords:** Cucumber, endophytic bacteria, nematode pathogenicity indexes, root knot nematode.

## تازه‌های تحقیق

کاربرد باکتری‌های اندوفیت به‌عنوان یکی از روش‌های کنترل زیستی می‌تواند نقش بسزایی در کاهش خسارت ناشی از نماتدهای ریشه‌گری در محصولات مختلف داشته باشد. بررسی حاضر اولین گزارش از معرفی گونه‌های *Pseudomonas rhodesiae* و *Acinetobacter* sp. جداسده از خیار، مؤثر در کاهش شاخص‌های بیماری‌زایی نماتد *Meloidogyne javanica* در شرایط گلخانه می‌باشد.

## مقدمه

خیار یکی از مهم‌ترین صیفی‌جات تحت‌کشت در ایران است که سطح زیرکشت قابل توجهی را به خود اختصاص داده است. در تمام طول سال در سطح مزارع و در گلخانه‌های مناطق مختلف ایران تولید و مصرف می‌گردد (Khosravi and Khisravi 2015). ایران بعد از چین و ترکیه مقام سوم تولید خیار را به خود اختصاص داده است (2013 Anonymous). در استان خراسان رضوی سطح زیر کشت خیار در اراضی آبی ۲۲۸۸ هکتار، میزان تولید حدود ۳۹ هزار تن و با عملکردی تقریباً ۱۷ هزار کیلوگرم در هکتار و تعداد ۱۹۹ گلخانه بوده است (2011 Anonymous). عملکرد این گیاه تحت تأثیر عوامل مختلف بیماری‌زا از جمله نماتدهای ریشه‌گری کاهش می‌یابد. خسارت نماتدهای ریشه‌گری در گیاهان مختلف، متفاوت گزارش شده است (Taba et al. 2007). باین‌حال، بیش از ۹۵ درصد خسارت‌های وارده به محصولات کشاورزی مربوط به گونه‌های *M. incognita*، *M. javanica*، *M. hapla* و *M. arenaria* می‌باشد (Damadzadeh 2007).

با توجه به میزان خسارت ناشی از نماتدهای ریشه‌گری، کنترل آنها امری اجتناب‌ناپذیر است. در دهه‌های اخیر استفاده از ترکیبات شیمیایی در کنترل بیماری‌های گیاهی در کشورهای مختلف با توجه به آگاهی از تأثیرات سوء آنها، روند رو به کاهش داشته و استفاده از میکروارگانیسم‌ها به‌عنوان عوامل بیوکنترل مورد توجه قرار گرفته است (Sharon et al. 2001). یک گروه از میکروارگانیسم‌ها، باکتری‌های اندوفیت مفید موجود در بافت‌های گیاهی می‌باشند (Sturz and Kimpinski 2004). باکتری‌های اندوفیت در

فعالیت‌هایی چون آماده‌سازی موادغذایی برای گیاه، تولید متابولیت‌های ثانویه تحریک‌کننده رشد گیاه، افزایش جذب مواد مغذی به‌طور مستقیم و به‌واسطه رقابت با بیمارگرها از طریق تولید آنتی‌بیوتیک و مواد ضد میکروبی به‌طور غیرمستقیم، روی رشد گیاهان تأثیرگذار هستند (Sardi et al. 1992, Compant et al. 2005). باکتری‌های اندوفیت همان بافت‌هایی از ریشه گیاه را که نماتدهای بیمارگر داخلی ثابت اشغال کرده‌اند، کلنیزه می‌کند. بنابراین، این ارتباط باکتری‌های اندوفیت با نماتد، در طول چرخه زندگی نماتد، باعث می‌شود که این باکتری‌ها عوامل مناسبی برای راهکار بیوکنترل باشند (Sikora et al. 1992).

بیشتر مطالعات نشان می‌دهند که جنس‌های متنوع باکتری‌های اندوفیت شامل *Bacillus*، *Pseudomonas*، *Serratia* و *Enterobacter* باعث کاهش خسارت ناشی از نماتدهای مختلف از جمله گونه‌های *Meloidogyne* از طریق ایجاد تغییرات در ساختار و جمعیت میکروبی خاک و دستیابی به خاک بازدارنده می‌شوند (Vetrivelkai et al. 2010). بر اساس بررسی‌های مختلف، باکتری‌های اندوفیت *Brevundimonas vesicularis*، *Burkholderia*، *Phyllobacterium rubiaceae*، *cepacia*، *Pantoea agglomerans*، *P. fluorescens aeruginosa* و *Cedecea davisae* در گیاهان پنبه، خیار، سویا، لوبیا، فلفل، سیب زمینی و گوجه‌فرنگی، جمعیت نماتد *M. incognita* را به‌طرز قابل توجهی کاهش داده‌اند (Vetrivelkai et al. 2010). کاربرد باکتری اندوفیت *Bacillus megaterium* نیز منجر به کاهش بیش از ۴۰ درصدی نفوذ و تشکیل گال نماتد *M. graminicola* در ریشه‌های برنج در مقایسه با ریشه‌های شاهد می‌گردد (Padgham and Sikora 2007). همچنین فعالیت نماتدکشی *Pseudomonas* spp. روی لاروهای سن‌دوم *M. javanica* و *M. incognita* در شرایط آزمایشگاه و گلخانه به‌اثبات رسیده است (Siddiqui and Shaukat 2003). گونه‌های مختلف *Pseudomonas* جمعیت نماتدهای *M. incognita* و *R. similis* را در فلفل سیاه به‌طور معنی‌داری کنترل نمودند (Aravind et al. 2009).

در سال ۱۳۹۳ صورت گرفت. ضدعفونی ریشه‌ها و خالص‌سازی باکتری‌های اندوفیت طبق منابع موجود انجام پذیرفت (Hallmann et al. 1997, Pradeepa and Jenifer 2013). بدین منظور، ریشه‌های شستشو شده به قطعات کوچک تقسیم، و در الکل ۷۰ درصد به مدت ۵ دقیقه و سپس در هیپوکلریت سدیم ۰/۹ درصد به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی گردید. پس از سه بار شستشو با آب مقطر استریل و خشک شدن نمونه‌ها زیر هود میکروبی، قطعات ۰/۵ سانتی‌متری تهیه و در محیط TSA (Tryptic Soy Agar) کشت گردید. پتری‌ها به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ °C انکوبه گردیدند. جدایه‌های رشدیافته، پس از تک‌کلون‌نمودن داخل آب مقطر استریل در شرایط یخچال نگهداری شدند.

#### بررسی‌های آزمایشگاهی

قابلیت آنتاگونیستی جدایه‌ها با شکل‌شناسی کلونی و منطقه جغرافیایی مختلف، در آزمون سنجش زیستی در شرایط آزمایشگاه به روش گاناسان و گنانامانیکام (Ganesan and Gnanamanickam 1987) با اندکی تغییر مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین‌منظور، کشت تازه باکتری در محیط مایع لوریا برتانی (LB) مایه‌زنی و به مدت ۴۸ ساعت در ۱۳۰ دور در دقیقه در دمای ۲۸ °C لرزانده شد. سوسپانسیون باکتری با غلظت  $10^8$  cfu/ml برای هر جدایه باکتری تهیه و ترشحات باکتریایی از سلول‌های باکتری توسط سانتریفیوژ جدا گردید. مایع رویی حاوی ترشحات باکتریایی مربوط به هر جدایه به‌طور جداگانه روی لارو سن‌دوم و تخم نماتد *M. javanica* در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار ارزیابی شدند. از محیط LB حاوی لارو سن‌دوم و تخم نماتد بدون ترشحات باکتریایی به عنوان شاهد استفاده گردید. میکروتیوب‌های حاوی ترشحات باکتریایی به همراه لارو و تخم نماتد به‌صورت جداگانه در دمای ۲۸ °C قرار گرفتند و بعد از ۴۸ و ۱۲۰ ساعت، به ترتیب درصد مرگ‌ومیر لارو و تفریح تخم، مورد سنجش قرار گرفت. جدایه‌هایی که بیشترین درصد مرگ‌ومیر لارو و عدم تفریح تخم را نشان دادند، به‌عنوان جدایه منتخب برای بررسی‌های تکمیلی انتخاب گردیدند.

در ایران، تحقیقات معدودی در زمینه امکان استفاده از باکتری‌های اندوفیت به‌منظور کنترل بیولوژیک نماتدها صورت گرفته است. در یک بررسی، تأثیر آنتاگونیستی تعدادی از جدایه‌های باکتریایی اندوفیت در میزان تفریح تخم نماتد ریشه‌گرهی *M. incognita* در گیاه گوجه‌فرنگی مشخص نمود که تمام غلظت‌های سوسپانسیون باکتریایی به درجات مختلف، سبب کاهش تفریح تخم نماتد در مقایسه با شاهد در سطح احتمال یک درصد می‌شوند (Pormehr et al. 2014). با توجه به اهمیت نماتدهای ریشه‌گرهی و ضرورت به‌کارگیری روش‌های کنترلی دوستدار طبیعت، هدف از این تحقیق، بررسی و شناسایی باکتری‌های اندوفیت ریشه خیار، سنجش زیستی جدایه‌های نماینده باکتریایی بر میزان مرگ‌ومیر لارو سن‌دوم و عدم تفریح تخم نماتد ریشه‌گرهی در آزمایشگاه و ارزیابی تأثیر جدایه‌های باکتریایی منتخب بر شاخص‌های بیماری‌زایی نماتد و میزان خسارت در شرایط گلخانه می‌باشد.

#### مواد و روش‌ها

##### جداسازی، شناسایی و تکثیر نماتد ریشه‌گرهی

نمونه‌های آلوده به نماتد از گلخانه‌های خیار اطراف شهرستان کاشمر در سال ۱۳۹۳ جمع‌آوری گردید. پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه، خاک اطراف ریشه‌ها با احتیاط در جریان ملایم آب شست‌وشو و ریشه‌های آلوده جهت تعیین گونه نماتد مورد بررسی قرار گرفتند. در زیر بینو کولر، محل گره‌ها 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، توسط میکروسکوپ الیمپوس BH2، مشخصات مورفولوژیک و مورفومتریک بررسی و شناسایی گونه نماتد با استفاده از کلید چیسون (Jepson 1987) صورت پذیرفت. خالص‌سازی و تکثیر بر روی گوجه‌فرنگی رقم ارلی‌اورباناوی‌اف در گلخانه به مدت ۶۰ روز انجام گرفت (Hussey and Barket 1973).

##### جداسازی باکتری‌های اندوفیت از ریشه خیار

به منظور جداسازی باکتری‌های اندوفیت، نمونه‌برداری از ریشه خیار از مزارع و گلخانه‌های استان خراسان رضوی

### آزمون گلخانه‌ای

برای تهیه مایه تلقیح باکتری از روش صدیقی و همکاران (Siddiqui *et al.* 2006) با اندکی تغییر استفاده شد. نشاهای سه‌هفته‌ای خیار رقم نگین به گلدان‌های پلاستیکی به قطر ۱۵ سانتی‌متر با مخلوطی از خاک زراعی و ماسه (۱:۱) منتقل شدند. از کشت مایع دو روزه جدایه‌های باکتریایی در محیط LB، سوسپانسیون با غلظت  $10^8$  cfu/ml تهیه و به میزان ۱۵ ml به خاک اطراف گیاهچه‌ها تلقیح شد. یک هفته پس از مایه‌زنی گیاهان، تعداد ۲۰۰۰ لارو سن دوم نماتد *M. javanica* به داخل سه حفره تعبیه‌شده اطراف هر گیاهچه افزوده شد. قابلیت کنترل‌کنندگی جدایه‌ها پس از ۴۵ روز از زمان تلقیح نماتد، بر اساس شاخص‌های تعداد گال، تعداد توده تخم و لارو ارزیابی گردید. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۶ تیمار شامل هفت جدایه باکتریایی (بدون نماتد و دارای نماتد)، شاهد منفی (بدون نماتد و باکتری)، شاهد مثبت (دارای نماتد و بدون باکتری) در ۳ تکرار اجرا گردید. شدت گال ریشه بر اساس شاخص کوزنبری و همکاران (Quesenberry *et al.* 1989) تعیین گردید. برای تعیین تعداد لارو سن دوم، ۱۰۰ گرم خاک اطراف ریشه به مدت ۴۸ ساعت هوادهی شد و سپس، تعداد لارو پس از پروسه استخراج، شمارش گردید.

### شناسایی مولکولی جدایه‌های منتخب باکتری‌های اندوفیت

استخراج DNA ژنومی جدایه‌های باکتری با استفاده از روش سامبروک و همکاران (Sambrook *et al.* 1989) انجام شد. دو آغازگر 1492r (5'- TAC GGY TAC CTT ) و 27f (3'- GTT ACG ACT T ) و 27f (5'- AGA GTT TGA ) و TCM TGG CTC AG (3'- 16S) برای تکثیر ناحیه rDNA استفاده گردید (Weisburg *et al.* 1991). واکنش در دستگاه ترموسایکلر (Biometra, Germany) با برنامه حرارتی واسرشت‌سازی اولیه در  $94^{\circ}\text{C}$  به مدت ۴ دقیقه، پس از آن ۳۰ سیکل شامل  $94^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱ دقیقه،  $60^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱ دقیقه،  $72^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱/۵ دقیقه و بسط نهایی در  $72^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱۰ دقیقه انجام پذیرفت (Garbeva *et al.* 2001). فرآورده‌های PCR روی ژل آگارز یک‌درصد الکتروفورز شدند. اندازه مارکر مورد استفاده در آزمون، ۳ kb

### تجزیه و تحلیل آماری و فیلوژنی

داده‌های به‌دست‌آمده در آزمون‌های سنجش‌زیستی و گلخانه‌ای در نرم‌افزار SPSS v.22 با استفاده از آزمون دانکن با درصد احتمال ۵٪ تجزیه و تحلیل شدند. به‌منظور تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک و رسم شجره، ردیف‌کردن توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار Clustal x v. 1.83 (Thompson *et al.* 1994) انجام شد. تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی با روش Maximum likelihood (Tamura *et al.* 2007) MEGA. V.6 به‌وسیله نرم‌افزار همراه با ۱۰۰۰ تکرار Bootstrap ارزیابی گردید.

### نتایج

#### شناسایی و تکثیر نماتد

پس از تهیه اسلایدهای میکروسکوپی، براساس مشخصات مورفولوژیک (آناتومی شبکه کوتیکولی انتهای بدن ماده‌های بالغ از جمله وجود یا عدم وجود خطوط جانبی، وجود شیار بین خطوط جانبی، ارتفاع کمان پشتی و شکل آن، وجود نقاطی در ناحیه دم، شکل شیارها و تشکیل بال یا عدم تشکیل بال) و مورفومتریک (طول و عرض بدن ماده‌های بالغ، طول استایلت، فاصله بین فرج و مخرج، و در لاروهای سن دوم طول بدن، طول استایلت، فاصله محل ریزش غده پشتی مری از زیرگره‌های استایلت، طول مری، طول دم و طول هیالین) و با استفاده از کلید شناسایی جیبسون (۱۹۸۷)، گونه *M. javanica* در ریشه‌های آلوده خیار تشخیص داده شد. تکثیر و نگهداری طولانی‌مدت نماتد *M. javanica* بر روی ریشه‌های گوجه‌فرنگی رقم اورلی‌اربانووی‌اف با موفقیت انجام پذیرفت.

#### جداسازی و شکل‌شناسی جدایه‌های اندوفیت ریشه خیار

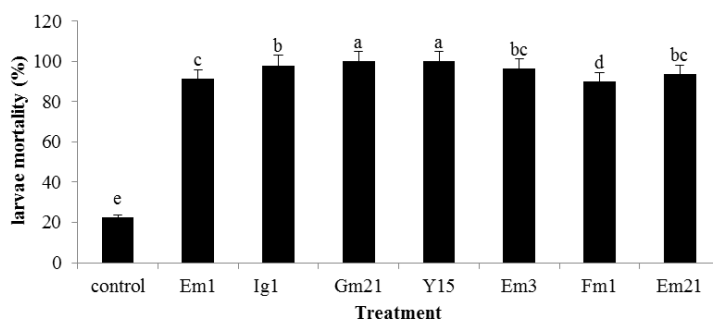
از ناحیه ریشه گیاه خیار مزارع و گلخانه‌های استان خراسان رضوی (مشهد، قوچان، کاشمر و نیشابور) تعداد

وجود دارد. در بین این جدایه‌ها، جدایه‌های Gm21 و Y15 با ۱۰۰ درصد کنترل‌کنندگی، بیشترین درصد مرگ‌ومیر لارو سن دوم بعد از ۴۸ ساعت را باعث شدند و در گروه آماری a قرار گرفتند و متعاقب آن، جدایه Ig1 با ۹۸ درصد در گروه آماری بعدی قرار گرفت. جدایه Fm1 با ۹۰ درصد باردارندگی، کمترین درصد مرگ‌ومیر را در بین جدایه‌های موردآزمون به خود اختصاص داد (شکل ۱). بر اساس نتایج آزمون زیست‌سنجی، ۷ جدایه باکتری منتخب برای ارزیابی‌های بعدی انتخاب گردیدند. مقایسه میانگین‌های مربوط به درصد عدم تفریح تخم نشان داد که بین تمام جدایه‌های باکتری با شاهد اختلاف معنی‌داری در سطح ۱ درصد وجود دارد؛ در حالی‌که بین جدایه‌های مورد آزمایش از لحاظ آماری اختلافی وجود ندارد و همه جدایه‌ها در یک گروه قرار می‌گیرند (شکل ۲).

۷۰ جدایه باکتری اندوفیت بر روی محیط TSA جداسازی گردید. باکتری‌های خالص شده به صورت کلونی‌های کروی با ظاهری صاف و لعاب‌دار در اندازه‌های مختلف حدود ۰/۵-۳mm و حاشیه‌هایی صاف در محیط کشت دیده شدند. رنگ پرگنه‌های باکتری از کرم تا سبز-زرد و صورتی متغیر بود. در تعدادی رنگدانه قهوه‌ای در وسط پرگنه باکتری مشاهده گردید.

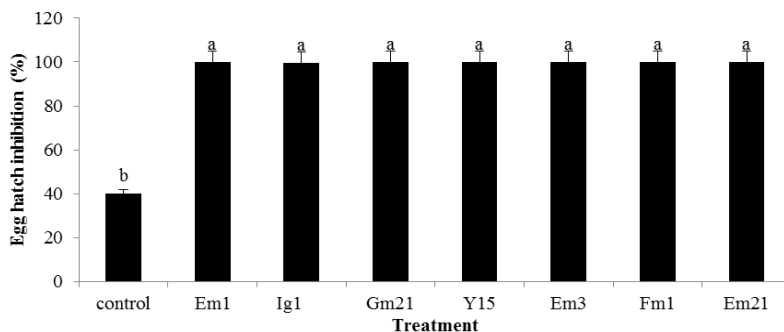
#### سنجش زیستی جدایه‌های باکتریایی روی نماتد ریشه‌گرهی در شرایط آزمایشگاه

تجزیه آماری بین جدایه‌های باکتریایی در ارتباط با درصد مرگ‌ومیر لارو سن دوم بعد از گذشت ۴۸ ساعت نشان داد که همه جدایه‌ها قادر به کنترل نماتد ریشه‌گرهی در شرایط آزمایشگاه هستند و با شاهد (محیط LB)، اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد



شکل ۱. تأثیر جدایه‌های نماینده باکتریایی اندوفیت ریشه خیار بر مرگ‌ومیر لارو سن دوم نماتد ریشه‌گرهی *M. javanica* بعد از گذشت ۴۸ ساعت در شرایط آزمایشگاه

Figure 1. Effect of selective endophytic bacterial strains obtained from cucumber root on *M. javanica* larval mortality after 48 h under lab conditions

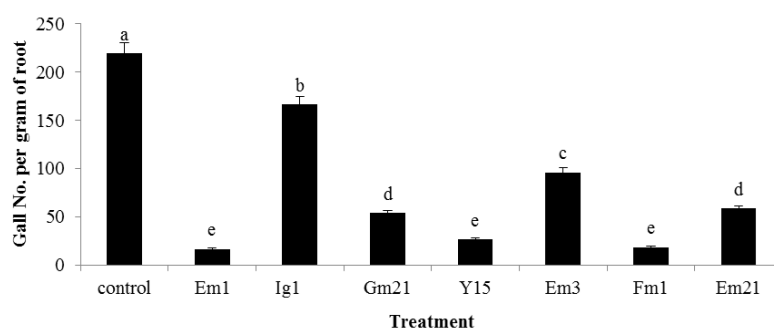


شکل ۲. تأثیر جدایه‌های نماینده باکتریایی اندوفیت ریشه خیار بر عدم تفریح تخم نماتد ریشه‌گرهی *M. javanica* بعد از گذشت ۱۲۰ ساعت در شرایط آزمایشگاه

Figure 2. Effect of selective endophytic bacterial strains obtained from cucumber root on *M. javanica* egg hatch inhibition after 120 h under lab conditions

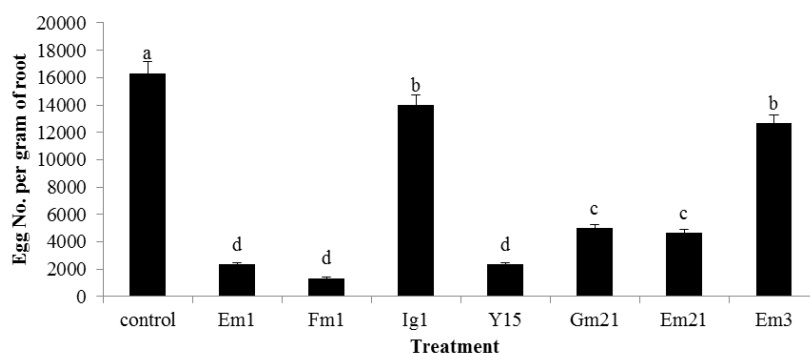
بیماری در خاک‌های تیمار شده با جدایه‌های باکتریایی است. گروه‌بندی جدایه‌ها حاکی از وجود اختلافات معنی‌دار بین جدایه‌های باکتریایی و شاهد می‌باشد. بر اساس نتایج، در جدایه‌های Em1، Fm1 و Y15 پس از گذشت ۴۵ روز از انجام آزمایش، کمترین تعداد گال ریشه و توده تخم، در تکرارهای مربوطه مشاهده شد که از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند. سه جدایه مذکور بهترین اثر کنترل‌کنندگی را روی نماتد ریشه‌گرهی در شرایط گلخانه نشان دادند (شکل‌های ۳ و ۴).

قابلیت بیوکنترل جدایه‌های منتخب باکتریایی اندوفیت خیار روی نماتد ریشه‌گرهی در شرایط گلخانه جدایه‌های منتخب باکتریایی در آزمون آزمایشگاهی، از لحاظ کاهش بیماری ریشه‌گرهی در شرایط کنترل‌شده گلخانه روی گیاه خیار رقم نگین مورد بررسی قرار گرفتند. جدایه‌ها از نظر کاهش شاخص‌های بیماری‌زایی نماتد ریشه‌گرهی تفاوت معنی‌داری را در سطح یک درصد نشان دادند. نتایج آزمون گلخانه‌ای در مورد جدایه‌های مختلف، بیان‌کننده کاهش میزان شاخص‌های



شکل ۳. تأثیر جدایه‌های نماینده باکتری‌های اندوفیت بر تعداد گال ایجاد شده در ریشه‌های خیار آلوده به نماتد ریشه‌گرهی *M. javanica* بعد از گذشت ۴۵ روز در شرایط گلخانه

Figure 3. Effect of selective endophytic bacterial strains on gall numbers formed on cucumber roots infected by *M. javanica* after 45 days under lab conditions

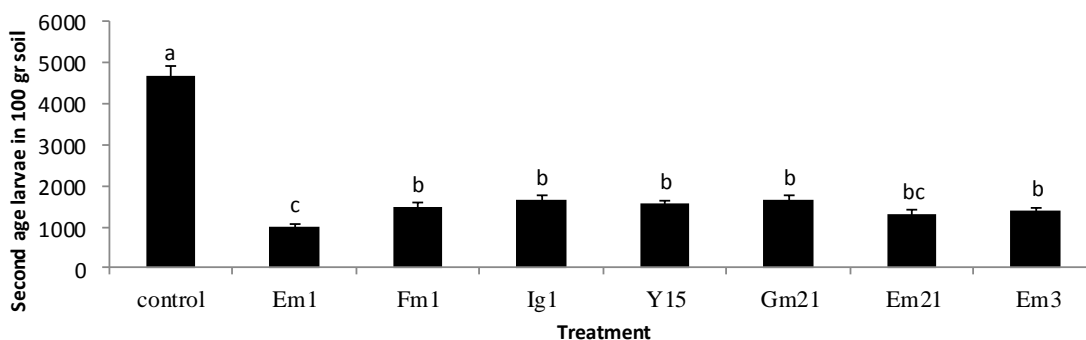


شکل ۴. تأثیر جدایه‌های نماینده باکتری‌های اندوفیت بر تعداد تخم تولید شده در ریشه‌های خیار آلوده به نماتد ریشه‌گرهی *M. javanica* بعد از گذشت ۴۵ روز در شرایط گلخانه

Figure 4. Effect of selective endophytic bacterial strains on egg numbers formed on cucumber roots infected by *M. javanica* after 45 days under lab conditions

بررسی، تعداد لارو سن‌دوم در ۱۰۰ گرم خاک، تفاوت معنی‌داری را در سطح ۵ درصد نشان دادند. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که شاهد آلوده دارای بیشترین تعداد لارو سن‌دوم در خاک بوده و تمام جدایه‌های باکتری از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند (شکل ۵).

کمترین شاخص شدت گال (۳) برای جدایه‌های Em1، Fm1 و Y15 و بیشترین (۵) برای شاهد آلوده به نماتد ثبت گردید. همچنین قابلیت کنترلی جدایه‌های نماینده باکتریایی اندوفیت روی مرگومیر لارو سن‌دوم موجود در ۱۰۰ گرم خاک بررسی و تجزیه و تحلیل شد. طبق این

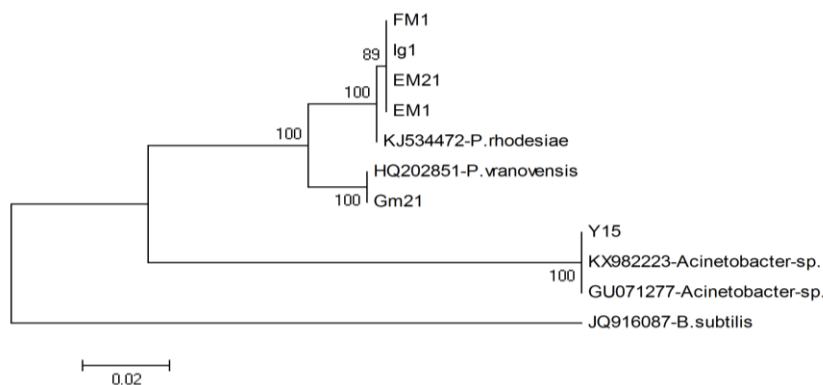


شکل ۵. تأثیر جدایه‌های نماینده باکتری‌های اندوفیت بر تعداد لارو سن دوم تولید شده در ۱۰۰ گرم خاک خیار آلوده به نماتد ریشه‌گرهی *M. javanica* بعد از گذشت ۴۵ روز در شرایط گلخانه

Figure 5. Effect of selective endophytic bacterial strains on larvae numbers formed on cucumber roots infected by *M. javanica* after 45 days under lab conditions

توالی‌یابی، جدایه‌های Em1، Ig1، Em21 و Fm1 متعلق به گونه *Pseudomonas rhodesiae* جدایه Gm21 متعلق به گونه *P. vranovensis* و جدایه Y15 متعلق به گونه *Acinetobacter* sp. می‌باشند (شکل ۶). جدایه‌های Em1 و Y15 به ترتیب با شماره دسترسی KX851803 و KX851804 در NCBI ثبت گردیدند.

شناسایی جدایه‌های نماینده براساس توالی‌یابی ناحیه rDNA 16S متعاقب آزمون‌های گلخانه‌ای، ارزیابی قابلیت کنترل‌کنندگی نماتد ریشه‌گرهی توسط باکتری‌های اندوفیت، در مجموع ۶ جدایه منتخب برای توالی‌یابی ناحیه rDNA 16S انتخاب شدند. بر اساس نتایج



شکل ۶. درخت فیلوژنتیک ترسیم‌شده برای جدایه‌های باکتریایی اندوفیت منتخب به روش Maximum Likelihood و ۱۰۰۰ بار تکرار. جدایه *Bacillus subtilis*- JQ916087 به عنوان outgroup در درخت استفاده گردید.

Figure 6. Phylogenetic tree of selective endophytic bacterial strains using Maximum Likelihood method and 1000 bootstraps. *Bacillus subtilis*- JQ916087 was used as an out-group in the tree.

هیدرولازها، کیتینازها و گلوکانازها و القای مقاومت سیستمیک باعث کنترل عوامل بیماری‌گر می‌گردند (Rashid et al. 2012).

بر اساس نتایج تحقیق حاضر، باکتری‌های اندوفیت توانایی بالایی در کنترل نماتد ریشه‌گرهی در شرایط آزمایشگاه و گلخانه دارند. اثر بازدارندگی جدایه‌ها، روی لارو سن دوم نماتد در آزمون سنجش‌زیستی بین ۹۰ تا

## بحث

استفاده از روش‌های کنترل زیستی به جای کاربرد سموم شیمیایی، عوارض زیست‌محیطی کمتری به دنبال خواهد داشت. در میان عوامل بیوکنترل، تأثیر باکتری‌های اندوفیت در کنترل نماتد ریشه‌گرهی در محصولات مختلف مورد توجه همگان است. باکتری‌های اندوفیت با تولید آنتی‌بیوتیک، تولید آنزیم لیتیک مثل

سودوموناس‌های فلورسنت می‌باشند و نسبت به تنش‌های مختلف زیست محیطی بسیار مقاوم هستند و می‌توان آنها را برای کنترل طبیعی استفاده نمود (Vyas et al. 2009). گزارش‌های اندکی در مورد ویژگی کنترل‌کنندگی گونه *P. rhodesiae* در برابر بیمارگرهای گیاهی وجود دارد. به عنوان مثال، گونه مذکور باعث کاهش بیماری شانکر ساقه گوجه‌فرنگی ناشی از *Botrytis cinerea* و بیماری خال‌زدگی باکتریایی گوجه‌فرنگی ناشی از *Pseudomonas syringae* گردیده است (Romero et al. 2015).

جنس باکتریایی *Acinetobacter* اولین بار از ریشه‌های گوجه‌فرنگی و موز جدا گردید (Oliveira et al. 2009). این گونه، در شرایط آزمایشگاه بیش از ۹۰ درصد باعث مرگ‌ومیر لارو سن‌دوم نماتد ریشه‌گرهی گونه *M. javanica* و در شرایط گلخانه به روش تلقیح بذر، در محدوده ۴۳ تا ۷۳ درصد موجب کاهش تعداد گال و تخم در هر گرم از ریشه‌های گوجه‌فرنگی آلوده به نماتد می‌گردد (Oliveira et al. 2009). همچنین، سایر بررسی‌ها حاکی از اثرات کنترلی خوب این گونه باکتریایی روی نماتد ریشه‌گرهی *M. incognita* نیز دارد (Pinho et al. 2009).

بر اساس منابع موجود، این اولین گزارش از ویژگی ضدنماتدی گونه‌های *P. rhodesiae*، *P. vranovensis* و *Acinetobacter sp.* در ایران می‌باشد. فاکتورهای مختلفی بر توان یک عامل بیوکنترل تأثیرگذار است و نمی‌توان با اطمینان از موفق بودن یک عامل بیوکنترل در مراحل مقدماتی صحبت نمود. بر اساس نتایج بررسی حاضر، به نظر می‌رسد جدایه‌های Em1 و Fm1 (*Acinetobacter sp.*) Y15 و (*P. rhodesiae*) گزینده‌های مناسبی جهت تحقیقات بیشتر در زمینه سرکوب نماتد ریشه‌گرهی در شرایط طبیعی باشند.

### سپاسگزاری

از دانشگاه فردوسی مشهد جهت تامین منابع مالی این پروژه، تشکر و قدردانی می‌گردد.

۱۰۰ درصد متغیر است که با نتایج سایر محققین مطابقت دارد (Oliveira et al. 2009, Pinho et al. 2009). از میان جدایه‌های مورد بررسی، سه جدایه Em1، Fm1 و Y15 در شرایط گلخانه باعث کاهش شاخص‌های بیماری و سرکوب جمعیت نماتد گردیدند. متعاقب تیمار جدایه‌های باکتریایی اندوفیت منتخب در شرایط گلخانه، تعداد گال در ریشه، و نیز تعداد تخم و لارو سن‌دوم نماتد در ریشه‌های خیار آلوده به نماتد به‌طور قابل‌توجهی نسبت به شاهد آلوده کاهش پیدا نمود.

اکثر جدایه‌هایی که در آزمایشگاه توانایی بیوکنترلی بالایی را نشان دادند، در گلخانه نیز کارایی مناسبی در کنترل نماتد ریشه‌گرهی داشتند؛ ولی در تعدادی از جدایه‌ها بین توانایی آزمایشگاهی و گلخانه مغایرت وجود دارد که با نتایج سایر محققان مطابقت دارد (Vettrivelkai et al. 2010). این تفاوت‌ها می‌تواند به واسطه غیرفعال شدن متابولیت‌های مترشحه از این باکتری‌ها در خاک و یا خارج شدن آنها به واسطه آبیاری از گلدان‌ها باشد؛ در صورتیکه در آزمایشگاه تولید این مواد در یک محیط بسته و محدود صورت می‌گیرد و غلظت این مواد به‌سرعت بالا می‌رود (Abdolghafar and Abolsayed 1997).

باکتری‌ها به منظور کاهش خسارت ناشی از نماتدها، تمهیدات متفاوتی دارند. به‌طور مثال، سودوموناس‌ها با استفاده از مکانیسم‌های متعددی مثل تولید سیدروفور (Sullivan and Gara 1992) سیانید هیدروژن (Owen and Zler 2001)، ترشح آنزیم‌های خارج سلولی مانند کیتیناز، بتا و ۱ گلوکاناز (Nagarajkumar et al. 2004)، پروتئاز و لیپاز (Keel and Defago 1997)، رقابت برای مواد غذایی و اشغال جایگاه‌های میکروبی، القای مقاومت سیستمیک در گیاهان و از همه مهمتر، تولید آنتی‌بیوتیک‌های متعدد (Raaijmakers and Weller 2001)، قادر به کنترل عوامل بیمارگرگیاهی و تحریک مقاومت گیاه می‌باشند (Hass and Defago 2005).

گونه‌های *P. rhodesiae* و *P. vranovensis* جزو

### REFERENCES

- Abdolghafar NY, Abolsayed WM (1997) Biological control of soft rot of potato fluorescent pseudomonads. Arab Universities Journal of Agricultural Science, 5: 419-431
- Anonymous (2011) Economic affair and programming adjunct. Khorasan Razavi Agricultural Jahad Organization. (in Persian)



- Anonymous** (2013) Statistical yearbook of the food and agriculture organization of the United Nations. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- Aravind R, Eapen SJ, Kumar AA, Ramana KV** (2009) Isolation and evaluation of endophytic bacteria against plant parasitic nematodes infesting black pepper (*Piper nigrum* L.). *Indian Journal of Nematology* 39: 211-217.
- Compant S, Reiter B, Sessitsch A, Nowak J, Clement C, Ait Barka E** (2005) Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 1685-1693.
- Damadzadeh M** (2007) Nematology in Agriculture. Andishe Gostar Publisher, Esfahan. 199pp. (in Persian)
- Ganesan P, Gnanamanickam SS** (1987) Biological control of *Sclerotium rolfsii* sacc. in peanut by inoculation with *Pseudomonas fluorescens*, *Soil Biology and Biochemistry* 19(1): 35-38.
- Garbeva P, van Overbeek LS, van Vuurde JW, van Elsas JD** (2001) Analysis of endophytic bacterial communities of potato by plating and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of 16S rDNA based PCR fragments. *Microbial Ecology* 41: 369-383.
- Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Mahaffee WF, Kloepper JW** (1997) Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology* 43: 895-914.
- Hallmann J, Quadt-Hallmann, Miller WG, Sikora RA, Lindow SE** (2001) Endophytic colonization of plants by the biocontrol agent *Rhizobium etli* G12 in relation to *Meloidogyne incognita* infection. *Phytopathology* 91: 415-422.
- Hass D, Defago W** (2005) Biological control of soil-borne-pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology* 3: 307-319.
- Hussey RS, Barker KR** (1973) A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. *Plant Disease Reporter* 57: 1025-1028.
- Jepson SB** (1987) Identification of root-knot Nematode (*Meloidogyne*) species. CAB International , Wallingford, UK, 265pp.
- Keel C, Defago G** (1997) Interactions between beneficial soil bacteria and root pathogens: mechanisms and ecological impact. In: Gange AC, Brown VK, (eds.). *Multitrophic interactions in terrestrial system*. Oxford: Blackwell Science.
- Khosravi M, Khosravi K** (2015) Complete and illustrated guide of greenhouse cucumber growing. Amozesh and Tarvij Publisher, 193pp. (in Persian)
- Munif A, Hallmann J, Sikora RA** (2001) Induced systemic resistance of selected endophytic bacteria against *Meloidogyne incognita* on tomato. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences* 66: 663-669.
- Nagarajkumar M, Bhashkaran R, Velazhahan R** (2004) Involvement of secondary metabolites and extracellular lytic enzymes produced by *Pseudomonas fluorescens* in inhibition of *Rhizoctonia solani* , the rice, sheath blight pathogen. *Journal of Microbiology* 159:73-81.
- Oliveira ASD, Campos VP, Silva JRC, Oliveira MS, Souza RMD** (2009) Effect of endophytic bacteria on *Meloidogyne javanica* and inoculation methods in tomato. *Nematologia Brasileira* 33: 45-53.
- Owen A, Zlor R** (2001) Effect of cyanogenic rhizobacteria on the growth of velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) and Corn (*Zea mays*) in autoclaved soil and the influence of supplemented glycine. *Journal of Soil Biochemistry* 33: 801-809.
- Padgham JL, Sikora RA** (2007) Biological control potential and modes of action of *Bacillus megaterium* against *Meloidogyne graminicola* on rice. *Journal of Crop Protection* 26: 971-977.
- Pinho RSC, Campos VP, Souza RMD, Silva JRC, Oliveira MS, Pimentel GCS, Costa LSAS** (2009) Effect of endophytic bacteria on the control of *Meloidogyne incognita* and their capacity of root colonization of tomato. *Nematologia Brasileira* 33: 54-60.
- Pormehr S, Shirzad A, Khakvar R, Moslehi Sh, Hamidzadeh A** (2014) Study the efficacy of some endophytic bacteria strains on *Meloidogyne incognita* egg hatch. In: 21th Iranian Plant Protection Congress, Orumia, Iran. (in Persian)
- Pradeepa V, Jennifer M** (2013) Screening and characterization of endophytic bacteria isolated from *Tabernaemontana divaricata* plant for cytokinin production. *Advanced Biotechnology* 13: 12-17.
- Quesenberry KH, Baltensperger DD, Dunn RA, Wilcox CJ, Hardy SR** (1989) Selection for tolerance to root-knot nematodes in red clover. *Crop Science* 29: 62-65.
- Raaijmakers JM, Weller DM** (2001) Exploiting genotypic diversity of 2, 4-diacetyl phloroglucinol producing *Pseudomonas* spp. characterization of superior root-colonizing *P. fluorescens* strain Q8r1-96. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 2545-2554.
- Rashid Sh, Charles TC, Glick BR** (2012) Isolation and characterization of new plant growth-promoting bacterial endophytes. *Applied Soil Ecology* 61: 217-224.

- Romero FM, Marina M, Pieckenstein FL** (2015) Novel components of leaf bacterial communities of field-grown tomato plants and their potential for plant growth promotion and bio control of tomato diseases. *Research in Microbiology* 43: 1-12.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> ed. Gold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sardi R, Saracchi M, Quaroni S, Petrolini B, Borgonovi GE, Merli S** (1992) Isolation of endophytic *Streptomyces* strains from surface disinfested roots. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 2691- 2693.
- Sharon E, Bar-Eyal M, Chet I, Herrera-Esterella A, Keleifeld O, Spiegel Y** (2001) Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. Plant parasitic in subtropical and tropical agriculture. CAB International, 91: 687-693.
- Siddiqui IA, Shaikat SS** (2003) Impact of biocontrol *Pseudomonas fluorescens* CHAO and its genetically modified (GM) derivatives on penetration of *Meloidogyne javanica* in mungbean roots. *Nematology Mediterranean* 31: 43-45.
- Siddiqui IA, Shaikat SS, Sheikh IH, Khan A** (2006) Role of cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* CHAO in the suppression of root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* in tomato. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 22: 641-650.
- Sikora RA** (1992) Management of the antagonistic potential in agricultural ecosystem for the biological control of plant parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology* 30: 245-270.
- Sturz AV, Kimpinski J** (2004) Endoroot bacteria derived from marigolds (*Tagetes* spp.) can decrease soil population densities of root-lesion nematodes in the potato root zone. *Plant Soil* 262: 241-249.
- Sullivan ODJ, Gara OF** (1992) Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogen. *Journal of Microbiology* 56: 662-676.
- Taba S, Sawada J, Moromizato ZI** (2007) Nematicidal activity of Okinawa island plants on the root-knot nematode (Kofoid and White) Chitwood. *Plant Soil* 303: 207-216.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S** (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ** (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.
- Vetrivelkai P, Sivakumar M, Jonathan EI** (2010) Bio-control potential of entophytic bacteria on *Meloidogyne incognita* and its effect on plant growth in bhendi. *Journal of Biopesticides* 3: 452-457.
- Vyas P, Rahi P, Gulati A** (2009) Stress tolerance and genetic variability of phosphate-solubilizing fluorescent *Pseudomonas* from the cold deserts of the trans-Himalayas. *Microbial Ecology* 58: 425-434.
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ** (1991) 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173: 697-703.