کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی
دوره۱۰، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۴۰۰ (۴۴-۳۱) مقاله پژوهشی
DOI: 10.22059/JBIOC.2022.334002.314

تعامل باکتری‌های *Bacillus subtilis*، *B. cereus* و *Pseudomonas fluorescens* CHA0 با نماتد مدل *Caenorhabditis elegans* و استفاده از این باکتری‌ها در کنترل نماتد *Meloidogyne javanica*

حدیث مصطفی نژاد[۱]، نوازاله صاحبانی*[۲]، سید محمد مهدی مرتضویان[۳]
۱. کارشناسی ارشد، گروه حشره شناسی و بیماری‌های گیاهی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، ایران
۲. دانشیار گروه حشره شناسی و بیماری‌های گیاهی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، ایران
۳. دانشیار گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۲۵ - تاریخ پذیرش:۱۴۰۱/۰۳/۲۴)

چکیده

در این تحقیق، تعامل باکتری‌های *Bacillus subtilis*، *B. cereus* و *Pseudomonas fluorescens* CHA0 با نماتد باکتری‌خوار *Caenorhabditis elegans* در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. امکان زنده‌مانی و تکثیر *C. elegans* روی پرگنه باکتری-های مذکور، امکان جذب و تغذیه *C. elegans* از باکتری‌ها، و نیز اثر ترکیبات فرار و آنتی بیوتیک‌های تولیدی باکتری‌ها بر *C. elegans* بررسی شد. کارایی این باکتری‌ها در کنترل نماتد *Meloidogyne javanica* با ارزیابی شاخص‌های تعداد گال و توده تخم در هر گیاه، قطر گال در هر گیاه و تعداد تخم در هر توده تخم بررسی شد و موثرترین باکتری جهت القا سیستم دفاعی گیاه مورد استفاده قرار گرفت. نتایج نشان داد که نماتد *C. elegans* قادر به زنده‌مانی و تکثیر بر روی پرگنه باکتری‌های *B. cereus* و *P. fluorescens* CHA0 نمی‌باشد. اگرچه نماتد *C. elegans* در شرایط عادی از *B. cereus* تغذیه نمی‌کند ولی در شرایط گرسنگی از آن تغذیه کرده ولی در نهایت منجر به مرگ نماتد گردید. ترکیبات فرار و آنتی بیوتیک‌های *B.cereus* و *P. fluorescens* CHA0 پس از یک یا دو روز موجب مرگ و میر ۱۰۰٪ لاروهای *C. elegans* شدند. تمامی باکتری‌های مذکور موجب کاهش معنی‌دار (p<۰/۰۵) شاخص‌های مربوط به بیماری‌زایی نماتد *M. javanica* شدند و بیشترین اثر کنترل کنندگی با استفاده از *P. fluorescens* CHA0 به دست آمد. بررسی‌های بیوشیمیایی نشان داد که استفاده از باکتری مذکور و نیز آلودگی گیاه به نماتد *M. javanica* موجب افزایش معنی‌دار (p<۰/۰۵) آنزیم کاتالاز در گیاه می‌گردد.

واژه های کلیدی: کنترل بیولوژیک ، نماتد مولد گره ریشه، کاتالاز.

Interaction of bacteria *Bacillus subtilis*, *B. cereus* and *Pseudomonas fluorescens* CHA0 with the model nematode, *Caenorhabditis elegans*, and use of these bacteria in biocontrol of *Meloidogyne javanica*

Hadis Mostafanezhad[1], Navazolah Sahebani*[2], Seyed Mohammad Mahdi Mortazavian[3]
1. Master of Science, Department of Entomology and Plant Pathology, College of Aburaihan, University of Tehran, Tehran, Iran
2. Associate Professor, Department of Entomology and Plant Pathology, College of Aburaihan, University of Tehran, Tehran, Iran
3. Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding Sciences, College of Aburaihan, University of Tehran, Tehran, Iran
(Received: Nov, 16, 2021- Accepted: Jun ,14, 2022)

Abstract

In this study, the interaction of *Bacillus subtils*, *B. cereus*, and *Pseudomonas fluorescens* CHA0 with the bacteriovorus nematode *Caenorhabditis elegans* was investigated in in-vitro condition. Possibilities of the survival and reproduction, the attraction and feeding of *C. elegans* on the bacteria, and the effect of volatile compounds and antibiotics of the bacteria on *C. elegans* were examined. The efficiency of the bacteria on controlling *Meloidogyne javanica* was studied by evaluating the number of galls and egg masses per plant, gall-diameter per plant, and the number of eggs per egg mass. Then, the most effective bacterium was used for the induction of plant defence responses. The results showed that *C. elegans* is not able to survive and reproduce on the colony of *B. cereus* and *P. fluorescens* CHA0. Although, in the normal condition, *C. elegans* did not feed on *B. cereus*, when the nematode was left hungry it started to eat the bacterium which, however, caused its death. Volatile compounds and antibiotics of *B. cereus* and *P. fluorescens* CHA0 caused 100% *C. elegans* larval mortality after 24 or 48 hours. All three bacteria caused a significant reduction ($p<0.05$) in all indicators of *M. javanica* pathogenicity while the highest efficacy in controlling the nematode was observed for *P. fluorescens* CHA0. Biochemical analyses showed that inoculating plants with *P. fluorescens* CHA0 and/or *M. javanica* caused a significant increase ($p<0.05$) of catalase in the plants.
Key words: Biological control, Root knot nematode, Catalase.

E-mail: sahebani@ut.ac.ir

مقدمه

با توجه به اثر مخرب سموم مورد استفاده در کشاورزی بر انسان و محیط زیست، در سال‌های اخیر، توجه ویژه‌ای به کاهش استفاده از این سموم شده است. یکی از روش‌های مطرح شده در جهت حرکت به سمت کشاورزی پایدار استفاده از عوامل کنترل کننده بیولوژیک می‌باشد. شناخت هر چه بیشتر این عوامل و نحوه تعامل آن‌ها با سایر موجودات حاضر در محیط زیست، به ما در بهینه‌سازی استفاده از این موجودات مفید کمک خواهد کرد. از جمله عوامل کنترل کننده بیولوژیک می‌توان به باکتری‌های *Bacillus subtilis*، *B. cereus* و *Pseudomonas fluorescens* CHA0 اشاره کرد که علیه طیف وسیعی از عوامل بیماری‌زای گیاهی از جمله نماتدهای مولد گره ریشه *Meloidogyne* spp. موثر هستند (Bavaresco *et al*. 2021, Liu *et al*. 2020, Hu *et al*. 2018, Hu *et al*. 2017, Siddiqui and Shaukat 2003). بررسی و مقایسه کارایی این باکتری‌ها و نحوه تعامل آن‌ها با نماتد مذکور و یا دیگر ارگانیزم‌های موجود در محیط طبیعی آن‌ها از جمله ارگانیزم‌هایی که به نظر فاقد تاثیر مستقیم بر بیمارگر مورد نظر می‌آیند، می‌تواند در افزایش دانش ما در بهبود استفاده از این باکتری-های مفید در کشاورزی پایدار کمک کند. نماتد *Caenorhabditis elegans* برای اولین بار در سال ۱۹۶۰ توسط پروفسور Sydney Brenner و همکارانش به عنوان یک جانور مدل برای مطالعات نوروفیزیولوژی به جامعه علمی معرفی شد (Sulston *et* Marx 2002 , *al*. 1983). این نماتد در حال حاضر به دلایل سهولت کشت و تکثیر در آزمایشگاه، شفافیت بدن و هرمافرودیت اختیاری بودن به عنوان یک مدل ایده‌آل برای مطالعات ژنتیکی، جنین شناسی، سرطان شناسی، مطالعات مرتبط با محیط زیست (آلودگی، تغییرات بیواکولوژیکی و غیره) و نماتدهای بیماری‌زای گیاهی و جانوری مورد استفاده قرار می‌گیرد به طوری که بسیاری از دستاوردهای علمی در زمینه‌های یادشده مرهون مطالعات انجام شده روی این نماتد می‌باشد (Britton and Murray Chamberlin 2010 , 2006, Johnson 2003).

C. elegans نماتدی خاکزی است و به طور معمول در خاک‌های غنی از مواد آلی یافت می‌شود. طبیعت باکتری‌خوار بودن این نماتد ایجاب می‌کند تا در ارتباط متقابل با تعداد زیادی از باکتری‌های خاکزی باشد. تاکنون تعامل این نماتد با تعداد زیادی از باکتری‌ها مورد بررسی قرار گرفته است که از آن جمله می‌توان به گونه‌های مختلف جنس *Bacillus* اشاره کرد.

لابرکی و دورکین نشان دادند که فاز رویشی باکتری‌های *B. subtilis* و *B. cereus* توسط نماتد *C. elegans* مورد تغذیه قرار می‌گیرند و در حالی که باکتری *B. subtilis* کاملا توسط نماتد هضم می‌شود، باکتری *B. cereus* در روده نماتد هضم نشده و در نهایت نیز سبب فلج شدن نماتد می‌گردد (Laaberki and Dworkin 2008). لاوز و همکاران نشان دادند که نماتد *C. elegans* نسبت به نژادهای مختلف باکتری *P. auroginosa* پاسخ‌های جذب شدن متفاوتی نشان می‌دهد به طوری که به سمت نژادهای PAk1 یا PA01 این باکتری جذب شده و از آن‌ها به عنوان منبع غذائی تغذیه می‌نماید ولی نسبت به نژاد PA14 این باکتری پاسخ کاملا متضاد نشان داده و نه تنها به سمت آن جذب نشده بلکه برای نماتد کشنده نیز می-باشد (Laws *et al*. 2006).

نماتدهای مولد گره ریشه *Meloidogyne* spp. از مهمترین نماتدهای پارازیت گیاهی بوده و بسیاری از گیاهان زراعی مورد حمله این نماتدها قرار می‌گیرند (Topalović *et al*. 2022). باوارسکو و همکاران نشان دادند که استفاده از باکتری *B. subtilis* علیه نماتد *M. incognita* در گیاه گوجه فرنگی و در شرایط گلخانه موجب کاهش جمعیت نماتد مذکور در خاک و نیز کاهش تعداد تخم‌های نماتد روی ریشه می‌گردد (Bavaresco *et al*. 2021). لیو و همکاران نشان دادند که استفاده از باکتری *B. cereus* علیه نماتد *M. incognita* موجب کاهش معنی‌دار شاخص گال نماتد در گیاه گوجه فرنگی می‌گردد (Liu *et al*. 2020). مختاری نیز نشان داد که استفاده از باکتری *P. fluorescens* CHA0 علیه نماتد *M. javanica* در گیاه

گوجه فرنگی موجب کاهش معنی‌دار (p<۰/۰۵) تعداد گال و توده تخم در مقایسه با گیاه شاهد می‌گردد (Mokhtari 2007). بسیاری از باکتری های مورد استفاده در کنترل بیولوژیک نماتدهای بیماری‌زای گیاهی علاوه بر تاثیر مستقیم بر نماتدها، موجب القا مقاومت و تولید ترکیبات دفاعی درگیاه میزبان نیز می‌گردند. عمران‌زاده نشان داد که استفاده از باکتری های *B. cereus* و *P. fluorescens* CHA0 علیه نماتد *M. javanica* در گیاه خیار، موجب افزایش معنی‌دار (p<۰/۰۵) آنزیم کاتالاز در این گیاه می‌شود (Omranzadeh 2008). کاتالاز آنزیمی آنتی اکسیدان است و نقش مهمی در پاسخ‌های دفاعی گیاه ایفا می‌کند (Huang *et al*. 2021). هدف از انجام این تحقیق بررسی کیفیت تعامل نماتد مدل *C. elegans* با باکتری‌های *B. subtilis*، *B. cereus* و *P. fluorescens* CHA0 در شرایط آزمایشگاه می‌باشد. به علاوه کارایی باکتری‌های مذکور درکنترل بیولوژیک نماتد مولد گره ریشه *M. javanica* به صورت استفاده از آن‌ها قبل یا بعد از آلودگی گیاه گوجه فرنگی به نماتد در شرایط گلخانه نیز بررسی و مورد مقایسه قرار گرفت و نقش موثرترین باکتری در کنترل نماتد *M. javanica* جهت بررسی تغییرات آنزیم کاتالاز در گیاه گوجه فرنگی ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

باکتری‌های *Bacillus subtilis* ، *Bacillus cereus* و *Pseudomonas fluorescens* CHA0

این باکتری‌ها از کلکسیون گروه گیاهپزشکی پردیس ابوریحان دانشگاه تهران دریافت و پس از تک کلونی نمودن با استفاده از محیط کشت (NA) Nutrient Agar تکثیر گردیدند. به منظور انجام آزمایشات گلخانه‌ای، از غلظت‌های (cfu/ml) $۱۰^{۹}$سوسپانسیون باکتری‌های مذکور استفاده شد (Yussefi *et al*. 2011, Omranzadeh 2008).

نماتد *Caenorhabditis elegans*

این نماتد از کلکسیون گروه گیاهپزشکی پردیس ابوریحان دانشگاه تهران دریافت و تکثیر آن به کمک محیط کشت Nematode Growth Medium (NGM) کشت شده با باکتری *B. subtilis* انجام شد.

لاروهای سن دوم نماتد *Meloidogyne javanica*

ریشه‌های آلوده از مزارع گوجه فرنگی آلوده به نماتد مولد گره ریشه شهرستان ورامین (استان تهران) تهیه و پس از تهیه توده تخم منفرد، روی گوجه فرنگی رقم ارلی اوربانا وای تکثیر گردید. استخراج تخم و تهیه لارو سن دوم با استفاده از روش هوسی و بارکر انجام گرفت (Hussey and Barker 1973) و با استفاده از خصوصیات ریخت شناسی و ریخت سنجی، گونه نماتد مشخص گردید (Eisenback 1985).

تهیه گیاهچه‌های گوجه فرنگی

بذور گوجه فرنگی رقم کالجی ان ۳ توسط هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت ۳ دقیقه ضدعفونی شد، سپس در گلدان‌های دو لیتری حاوی خاک سترون شامل حجم مساوی از خاک مزرعه، ماسه و کود برگ کشت گردید. گیاهچه‌ها در گلخانه در شرایط ۱۶ ساعت نور و هشت ساعت تاریکی و در دمای ۵±۲۵ درجه سانتی‌گراد پرورش داده شدند و در مرحله‌ی شش برگی، مورد استفاده قرار گرفتند.

بررسی قدرت زنده‌مانی و امکان تکثیر نماتد *C. elegans* روی محیط حاوی باکتری‌های *B. subtilis*، *B. cereus* و *P. fluorescens* CHA0

در این آزمایش ابتدا باکتری‌های *B. subtilis*، *B. cereus* و*P. fluorescens* CHA0 به طور جداگانه در ظروف کشت حاوی محیط (PDA) Potato Dextrose Agar به عنوان تیمارهای آزمایش کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت جمعیت ۳±۲۰ نماتد (شامل مراحل مختلف لاروی و نماتد بالغ) به ازاء هر ظرف کشت، به آن‌ها اضافه شد. سپس به مدت یک هفته به طور روزانه زنده بودن نماتدها و تکثیر احتمالی آن‌ها بررسی گردید.

بررسی میزان جذب نماتد *C. elegans* به سمت پرگنه باکتری‌های *B. subtilis*، *B. cereus* و *P. fluorescens* CHA0

در این آزمایش، ابتدا در ظروف کشت حاوی محیط کشت PDA باکتری‌های *B. cereus* و *P. fluorescens* CHA0 به طور جداگانه به عنوان تیمارهای آزمایش در مقابل باکتری *B. subtilis* کشت داده شدند. نحوه کشت بدین صورت بود که پرگنه هر باکتری در یک نیمه از ظرف کشت به صورت کمانی به فاصله ۲ سانتی متر از مرکز ظرف کشت رشد نماید. پس از ۲۴ ساعت رشد باکتری ها در انکوباتور (۲۶ درجه سانتی گراد و تاریکی)، جمعیت ۳±۱۰ نماتد به ازاء هر ظرف کشت در نقطه مرکزی هر ظرف کشت قرار داده شد و بلافاصله با استفاده از بینوکولار تعداد نماتدهایی که به سمت هر پرگنه باکتری حرکت می‌نمود شمارش شد. در این آزمایش همچنین وارد شدن نماتد به داخل پرگنه باکتری، امکان تغییر در رفتار حرکتی نماتد در پرگنه باکتری و امکان خارج شدن نماتد از پرگنه و رفتن به سمت پرگنه باکتری مخالف نیز بررسی شد. این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با ۴ تکرار انجام گرفت. آزمایش مشابه دیگری در کنار آزمایش فوق انجام شد با این تفاوت که بعد از کشت باکتری، پس از ۲۴ ساعت جمعیت ۵۰ نماتد به ازاء هر ظرف کشت در نقطه مرکزی هر ظرف کشت قرار داده شد و پس از ۲۴ ساعت تعداد نماتدهای مستقر در هر پرگنه باکتری شمارش گردید. این آزمایش نیز در قالب طرح کاملا تصادفی با ۴ تکرار انجام گرفت.

بررسی امکان تغذیه نماتد از باکتری‌های *B. cereus* و *P. fluorescens* CHA0

در این آزمایش ابتدا جمعیتی از نماتد از روی محیط کشت جمع آوری و پس از چندین بار شستشو با آب مقطر استریل در نهایت در یک ظرف حاوی آب مقطر استریل نگهداری شدند. پس از سه روز نگهداری در انکوباتور (۲۶ درجه سانتی گراد و تاریکی)، که روده نماتد به طور قابل توجهی از مواد غذائی (باکتری) عاری شد، تعداد ۳±۲۰ نماتد (به ازاء هر ظرف کشت) در ظروف کشت PDA حاوی باکتری‌های *B. cereus* و *P. fluorescens* CHA0 به طور جداگانه اضافه و مجددا در انکوباتور با شرایط ذکر شده قرار داده شد. پس از ۲ و ۲۴ ساعت اسلاید های میکروسکوپی از نماتدها تهیه و امکان تغذیه از باکتری با مشاهده روده آن‌ها بررسی شد.

بررسی اثر ترکیبات فرار باکتری‌های *B. cereus* و *P. fluorescens* CHA0 بر نماتد *C. elegans*

این آزمون بر اساس روش لیلبرو انجام شد (Lillbro 2005). دو لوپ از کشت ۲۴ ساعته باکتری‌های مورد نظر در روی محیط کشت PDA به طور جداگانه کاملا پخش شد. ظروف کشت به مدت دو روز در انکوباتور در دمای ۱± ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون لاروهای نماتد *C.elegans* که حاوی ۵±۱۰۰ لارو بود در ظروف کشت دیگری که حاوی محیط کشت Water (WA) agar ۳٪ بود اضافه گردید. سپس در شرایط استریل تشتک‌های ظروف کشت حاوی باکتری رشد یافته و نماتد روی هم قرار داده شدند و لبه آن‌ها به کمک پارافیلم کاملا پوشانیده شد. برای شاهد به جای باکتری از آب مقطر استریل فاقد باکتری استفاده شد. ظروف کشت در انکوباتور در دمای ۱±۲۵ درجه‌ی سانتی گراد قرار داده شدند و پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت درصد نماتدهای مرده با مشاهده در زیر بینوکولر شمارش گردید. این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با ۴ تکرار انجام گردید.

بررسی اثر آنتی بیوتیک‌های خارج سلولی باکتری‌های *B. cereus* و *P. fluorescens* CHA0 بر نماتد *C. elegans*

این آزمون طبق روش کراس و لوپر انجام گرفت (Kraus and Loper 1992). باکتری‌های مورد نظر روی محیط کشت PDA به صورت یکنواخت کشت داده شدند. سپس پتری‌ها درون انکوباتور در دمای ۱°C ± ۲۵ به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. بعد از این مدت در شرایط استریل زیر هود پرگنه‌های

باکتری با کمک آب مقطر استریل و پنبه استریل از روی محیط پاک شدند. سپس پتری‌ها وارونه شده و یک پنبه آغشته به کلروفرم در درون پتری قرار داده شد تا باقی مانده‌های باکتری نیز در معرض بخار کلروفرم قرار گرفته و کاملا کشته شوند. بعد از ۳۰ دقیقه درب پتری‌ها را در شرایط استریل باز کرده تا بخار کلروفرم کاملا خارج شود. سپس ۲۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون نماتد که حاوی ۵±۱۰۰ لارو نماتد بود در این پتری‌ها قرار داده شدند. در پتری شاهد باکتری کشت داده نشده بود اما سایر مراحل مانند آنچه که ذکر شد انجام گردید. پتری‌ها در انکوباتور در دمای ۱± ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت درصد نماتدهای مرده در زیر بینوکولر شمارش گردید. این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با ۴ تکرار انجام شد.

بیوکنترل نماتد *M. javanica* توسط باکتری‌های *B. subtilis*، *B. cereus* و *P. fluorescens CHA0* در گلخانه

گیاهچه‌های گوجه فرنگی کاشته شده در گلدان های دو لیتری، در مرحله‌ی شش برگی توسط حدود ۲۰۰۰ لارو فعال سن دوم نماتد (به ازاء هر گلدان) مایه زنی شدند. تیمار گیاهان با باکتری به صورت اضافه کردن ۲۵ میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری با غلظت 10^{9} (cfu/ml)، ۲۴ ساعت (یک روز) قبل یا بعد از مایه‌زنی گیاهان با نماتد *M. javanica* صورت گرفت. تیمارها شامل: ۱- گیاهان مایه زنی شده با *M. javanica* (شاهد آلوده)، ۲- گیاهان مایه زنی شده با *B. subtilis* یک روز قبل از مایه‌زنی با *M. javanica*، ۳- گیاهان مایه زنی شده با *B. subtilis* یک روز بعد از مایه‌زنی با *M. javanica*، ۴- گیاهان مایه زنی شده با *B. cereus* یک روز قبل از مایه‌زنی با *M. javanica*، ۵- گیاهان مایه زنی شده با *B. cereus* یک روز بعد از مایه‌زنی با *M. javanica*، ۶- گیاهان مایه زنی شده با *P. fluorescens* CHA0 یک روز قبل از مایه‌زنی با *M. javanica*، ۷- گیاهان مایه زنی شده با *P. fluorescens* CHA0 یک روز بعد از مایه‌زنی با *M. javanica*.

پنجاه روز پس از مایه زنی با نماتد، گیاهچه‌ها به منظور سنجش متوسط قطر بزرگترین گال‌ها، تعداد گال و توده تخم به ازاء هر گیاه و نیز تعداد تخم‌های درون هر توده تخم به آزمایشگاه منتقل شدند.

قطر گال‌ها به کمک کولیس اندازه‌گیری شد. شمارش تعداد گال و توده تخم به ازاء هر گیاه نیز به کمک بینوکولر انجام شد. به منظور محاسبه تعداد تخم‌های درون هر توده تخم، ابتدا تخم‌های مربوط به هر توده تخم به طور جداگانه با روش هوسی و بارکر استخراج شده (Hussy and Barker 1973) سپس با استفاده از پتری شمارش تعداد تخم در یک توده تخم مشخص گردید. آزمایش با هفت تیمار و پنج تکرار، در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد.

کاشت و مایه‌زنی گیاه با باکتری *P. fluorescens* CHA0 و نماتد *M. javanica* به منظور انجام آزمایشات بیوشیمیایی

کاشت گیاه و مایه‌زنی آن‌ها با نماتد *M. javanica* و باکتری *P. fluorescens* CHA0 به همان ترتیبی که در بخش قبل ذکر شد صورت گرفت. تیمارها در این بررسی شامل: ۱- گیاهان مایه زنی شده با آب مقطر استریل (شاهد غیر آلوده)، ۲- گیاهان مایه زنی شده با *M. javanica* (شاهد آلوده)، ۳- گیاهان مایه زنی شده با *P. fluorescens* CHA0 و۴- گیاهان مایه زنی شده با *P. fluorescens* CHA0 یک روز قبل از مایه-زنی با *M. javanica* بودند. ۲۴ ساعت پس از مایه‌زنی گیاهان با *M. javanica* نمونه برداری از ریشه گیاهان به مدت هفت روز انجام شد. این آزمایش به آرایش فاکتوریل ۷×۴ بر پایه طرح کاملاً تصادفی و با چهار تکرار انجام شد.

استخراج پروتئین و ارزیابی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاه

به منظور استخراج پروتئین از گیاه، یک گرم از بافت ریشه در هاون چینی با استفاده از ازت مایع کوبیده و پودر شد. سپس یک میلی‌لیتر بافر نمونه فسفات سدیم ۱۰ میلی‌مولار با pH ۶ به آن اضافه و مخلوط

گردید. مخلوط حاصل به میکروتیوب‌های دو میلی-لیتری منتقل و در g ۱۲۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ^{o}C ۴ سانتریفوژ شد و سپس مایع رویی جهت انجام آزمایشات مورد استفاده قرار گرفت (Sahebani and Hadavi 2008). ارزیابی میزان کل پروتئین قابل حل در عصاره با استفاده از روش برادفورد (Bradford 1976) شرح داده شده توسط عمران زاده انجام شد (Omranzadeh 2008). پروتئین استاندارد مورد استفاده آلبومین سرم گاوی فراکسیون پنج بود.

به منظور ارزیابی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاه، سه میلی لیتر بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی‌مول (pH ۷) با مقداری از عصاره ریشه گیاه که حاوی ۳۰ میکروگرم پروتئین بود مخلوط شد. دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۴۰ نانومتر به کمک این مخلوط صفر گردید. سپس ۳۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن به مخلوط اضافه و تغییرات جذب نور با فواصل ۱۰ ثانیه، به مدت یک دقیقه اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم کاتالاز به صورت تغییرات جذب نور در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد (Omranzadeh 2008).

آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS 9.0 انجام شد و میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی در سطح احتمال پنج درصد مورد مقایسه قرار گرفتند. برای رسم شکل‌ها از نرم افزار Excel 2003 استفاده شد.

نتایج

بررسی قدرت زنده مانی و امکان تکثیر نماتد *C. elegans* روی محیط حاوی باکتری‌های *B. subtilis*، *B. cereus* و *P. fluorescens* CHA0

در این آزمایش، نماتد *C. elegans* بلافاصله پس از انتقال به محیط حاوی باکتری *B. subtilis* شروع به تغذیه نموده و پس از یک روز جمعیت آن با روند قابل توجهی افزایش نشان داد. در روز دوم، تمام سطح محیط کشت مملو از جمعیت نماتد گردید. روند افزایش جمعیت نماتد تا روز هفتم همچنان ادامه داشت به طوری که در این روز نماتدها به دلیل کمبود فضا از دیواره ظروف کشت صعود نموده و خود را به قطرات ریز آب در زیر درب ظرف کشت رساندند (اتفاقی که در این نماتد معمول می‌باشد). در ارتباط با باکتری *B. cereus*، نماتد تا دو روز بدون تکثیر بر روی محیط کشت در حرکت بود و مسیر حرکت آن‌ها در پرگنه باکتری قابل مشاهده بود. در این مدت هیچگونه تخمگذاری و تکثیر نماتد مشاهده نگردید. از روز سوم به بعد مرگ و میر در این نماتدها دیده شد که به علت عدم تغذیه از باکتری بود. مشاهده این نماتدها تا روز هفتم نیز ادامه داشت که نشان از مرگ و میر تقریبا تمام نماتدهای موجود داشت. با این وجود، پس از هفت روز حدود ۱-۲ نماتد در بین آن‌ها همچنان زنده بودند. در ارتباط با باکتری *P. fluorescens* CHA0 بلافاصله پس از انتقال نماتدها به داخل ظروف کشت حاوی این باکتری، نماتدها پس از چند دقیقه بدون تحرک شدند. این نماتدها تا قریب یک ساعت نیز زنده بودند و با اشاره سوزن کشت به آن‌ها حرکت جزئی نشان می‌دادند ولی بعد از آن به تدریج دچار مرگ و میر شدند.

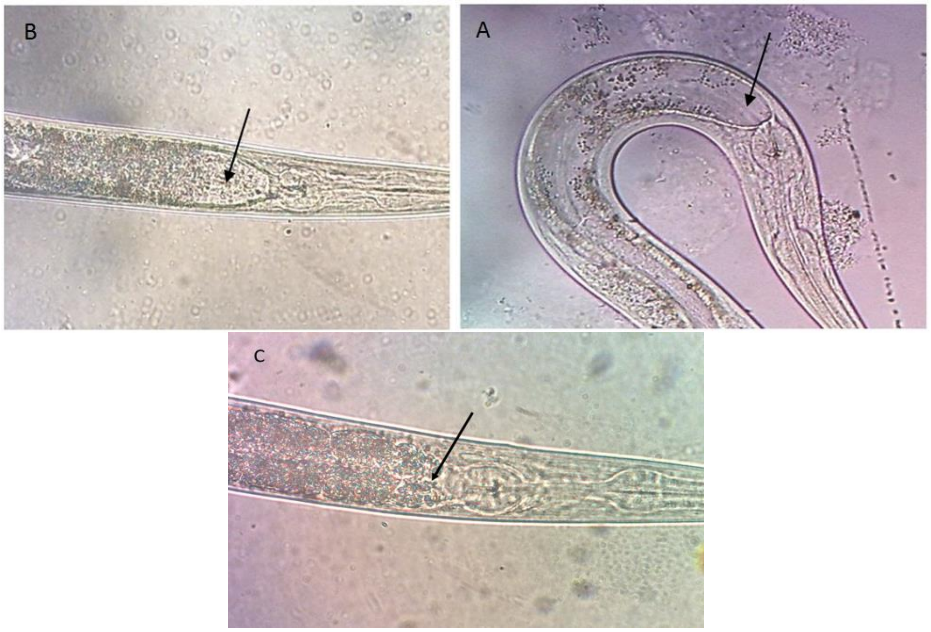
بررسی میزان جذب نماتد *C. elegans* به سمت پرگنه باکتری‌های *B. subtilis*، *B. cereus* و *P. fluorescens* CHA0

در این آزمایش در ظروف کشت حاوی باکتری‌های *B. subtilis* و *B. cereus*، نماتدها به تساوی به سمت پرگنه‌های هر دو باکتری جذب شده و پس از تماس با پرگنه باکتری‌ها نیز به داخل آن‌ها وارد شدند با این تفاوت که در پرگنه باکتری *B. subtilis* بلافاصله مستقر شده و شروع به تغذیه نمودند ولی در پرگنه باکتری *B. cereus* پس از وارد شدن بدون تغذیه، شروع به حرکت و خروج از آن نمودند. ردیابی مسیر حرکت نماتد در پرگنه باکتری *B. cereus* گویای حرکت زیاد این نماتد در پرگنه این باکتری بود. در روز دوم تمام نماتدهای موجود در پرگنه باکتری *B. cereus* این پرگنه را ترک کرده و پس از پیدا نمودن پرگنه باکتری مجاور در آن مستقر شده و شروع به

تغذیه و تکثیر نمودند. رفتار حرکتی نماتد (حرکت سینوسی نماتد) در هر دو پرگنه باکتری طبیعی و بدون تفاوت بود. در ظروف کشت حاوی باکتری‌های *B. subtilis* و*P. fluorescens* CHA0 نماتدها در ابتدا به سمت پرگنه‌های هر دو باکتری جذب شدند ولی تمام نماتدهایی که به سمت پرگنه باکتری *B. subtilis* حرکت کرده بودند به داخل آن وارد شده و شروع به تغذیه نمودند و تکثیر نماتد در روز دوم به بعد نیز مشاهده شد. نماتدهایی که به سمت پرگنه باکتری *P. fluorescens* CHA0 حرکت می‌کردند قبل از تماس با پرگنه باکتری با فاصله‌ای که با احتمال بالا بستگی به میزان نشت ترکیبات دور کننده نماتد در محیط کشت دارد، برگشته و مسیر مخالف را ادامه دادند به طوری که هیچ کدام از نماتدها وارد پرگنه این باکتری نشدند. مشاهده این ظروف در روز دوم نشان داد که تمام نماتدها سرانجام وارد پرگنه باکتری *B. subtilis* شده و در آن‌جا تغذیه و تکثیر نمودند.

بررسی امکان تغذیه نماتد از باکتری‌های *B. cereus* و*P. fluorescens* CHA0

بررسی‌هایی که دو ساعت بعد از قرار دادن نماتدهای گرسنه *C. elegans* روی محیط‌های PDA حاوی باکتری‌های *B. cereus* و *P. fluorescens* CHA0 انجام شد نشان داد که در روده نماتدهای قرار گرفته روی محیط حاوی باکتری *B. cereus* میزان کمی باکتری قابل مشاهده است، اما در خصوص نماتدهای قرار گرفته در محیط حاوی باکتری *P. fluorescens* CHA0 هیچ گونه باکتری در روده این نماتدها مشاهده نشد. پس از ۲۴ ساعت در روده نماتدهای قرار گرفته روی محیط حاوی باکتری *B. cereus* به میزان قابل توجهی باکتری وجود داشت ولی تعدادی از این نماتدها مرده و بقیه نیز ضعیف شده بودند، اما نماتدهایی که بر روی محیط حاوی باکتری *P. fluorescens* CHA0 قرار گرفته بودند بعد از ۲۴ ساعت به علت عدم تغذیه و نامناسب بودن محیط، مرده یا توسط باکتری تجزیه شده بودند (شکل ۱).



شکل ۱. بررسی امکان تغذیه نماتد *C. elegans* از باکتری‌های *P. fluorescens* CHA0 (A)، *B. cereus* (B) و *B. subtilis* (C) ۲۴ ساعت پس از قرار گرفتن بر روی محیط‌های حاوی این باکتری‌ها. پیکان‌ها نشان دهنده روده خالی از باکتری *P. fluorescens* CHA0 و روده حاوی باکتری *B. cereus* و *B. subtilis* می‌باشد.

Figure 1. *C. elegans* feeding possibility on *P. fluorescens* CHA0 and *B. cereus*, 24 hours after exposure to the bacteria. The arrows indicate the nematode intestine empty of *P. fluorescens* CHA0 (A) and the nematode intestine full of *B. cereus* (B) and *B. Subtilis* (C).

بررسی میزان مرگ و میر نماتد *C. elegans* در اثر ترکیبات فرار باکتری‌های *B. cereus* و *P. fluorescens* CHA0

بررسی اثر ترکیبات فرار ۲۴ ساعت بعد از انجام این آزمایش نشان داد که در خصوص باکتری *B. cereus* تمامی نماتدها زنده بودند ولی در مورد *P. fluorescens* CHA0 ۳۹٪ مرگ و میر مشاهده شد.

در حالی که ۴۸ ساعت بعد از انجام آزمایش تاثیر ترکیبات فرار حاصل از *B. cereus* و *P. fluorescens* CHA0 موجب ۱۰۰٪ مرگ و میر نماتدها شدند و این در حالی است که تمامی نماتدهای شاهد زنده بودند.

بررسی میزان مرگ و میر نماتد *C. elegans* در اثر آنتی بیوتیک‌های خارج سلولی باکتری‌های *B. cereus* و *P. fluorescens* CHA0

در بررسی اثر آنتی بیوتیک‌های قابل نشت در آگار ۲۴ ساعت بعد از انجام این آزمایش در خصوص باکتری *B. cereus* تمامی نماتدها مرده بودند ولی در مورد *P. fluorescens* CHA0 ۷۸٪ مرگ و میر مشاهده شد. ۴۸ ساعت بعد از انجام آزمایش تاثیر آنتی بیوتیک‌های قابل نشت در آگار حاصل از *B. cereus* و *P. fluorescens* CHA0 موجب ۱۰۰٪ مرگ و میر لاروها شدند در حالی که تمامی نماتدهای شاهد زنده بودند (جدول ۱).

جدول ۱. درصد مرگ و میر نماتد در اثر ترکیبات فرار و آنتی بیوتیک‌های خارج سلولی باکتری‌های *B. cereus* و *P. fluorescens* CHA0.

Table 1. Percentage of nematode mortality due to volatile compounds and extracellular antibiotics of *B. cereus* and *P. fluorescens* CHA0.

Treatment	Percentag of dead nematodes due to bacteria antibiotics		Percentag of dead nematodes due to volatile compounds	
	After 24 hours	After 48 hours	After 24 hours	After 48 hours
Control	0 a	0 a	0 a	0 a
B. cereus	100 c	100 b	0 a	100 b
P. fluorescens CHA0	78 b	100 b	39 b	100 b

حروف غیر مشابه در ستون‌ها نشان دهنده اختلاف معنی‌دار (p<۰/۰۵) بر اساس آزمون چند دامنه ای دانکن می‌باشد.

Different letters in the columns shows significant difference (p<0.05) based on Duncan's multiple range test.

بیوکنترل نماتد *M. javanica* توسط باکتری‌های *B. subtilis*، *B. cereus* و *P. fluorescens CHA0* در گلخانه

نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که تمامی شاخص‌های مورد ارزیابی در همگی تیمارها، دارای اختلاف معنی‌دار (p<۰/۰۵) با شاهد (گیاهان مایه‌زنی شده با *M. javanica*) می‌باشند. در هیچ کدام از تیمارهای آزمایش تفاوت معنی‌داری بین تیمار گیاه با باکتری یک روز قبل یا بعد از مایه‌زنی گیاه با *M. javanica* مشاهده نشد اگرچه مایه‌زنی گیاه با باکتری‌های مذکور یک روز قبل از مایه‌زنی گیاهان با نماتد *M. javanica* اثر بهتری در کاهش شاخص‌های مربوط به بیماری‌زایی نماتد *M. javanica* داشت. در تیمار گیاهان توسط باکتری‌های *B. subtilis* و *B. cereus*، تفاوت معنی‌داری در کاهش شاخص‌های بیماری‌زایی نماتد مشاهده نگردید. بیشترین کاهش در شاخص‌های مربوط به بیماری‌زایی *M. javanica* در گیاهان تیمار شده با *P. fluorescens* CHA0 مشاهده شد (جدول ۲) به همین علت این باکتری جهت القا سیستم دفاعی گیاه و بررسی بیوشیمیایی آنزیم کاتالاز در گیاه انتخاب گردید.

ارزیابی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاه گوجه فرنگی مایه‌زنی شده با باکتری *P. fluorescens* CHA0 و نماتد *M. javanica*

بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاهانی که با باکتری *P. fluorescens* CHA0 و نماتد *M. javanica* مایه‌زنی شده بودند مشاهده شد. فعالیت آنزیم کاتالاز در این گیاهان از روز اول نمونه برداری اختلاف معنی-داری (p<۰/۰۵) با گیاه شاهد داشت و در روز سوم به

بیشترین میزان فعالیت خود که حدود شش برابر بیشتر از فعالیت این آنزیم در گیاه شاهد بود، رسید. فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاهان مایه‌زنی شده با باکتری *P. fluorescens* CHA0 از روز سوم به بعد رفته رفته کاهش یافت اما تا روز هفتم دارای اختلاف معنی‌دار (p<۰/۰۵) با شاهد بود. گیاهان مایه‌زنی شده با نماتد *M. javanica* نیز افزایش اندکی در فعالیت آنزیم کاتالاز نشان دادند هر چند این افزایش در روزهای اول، دوم، ششم و هفتم اختلاف معنی‌داری با شاهد نداشت (شکل ۲).

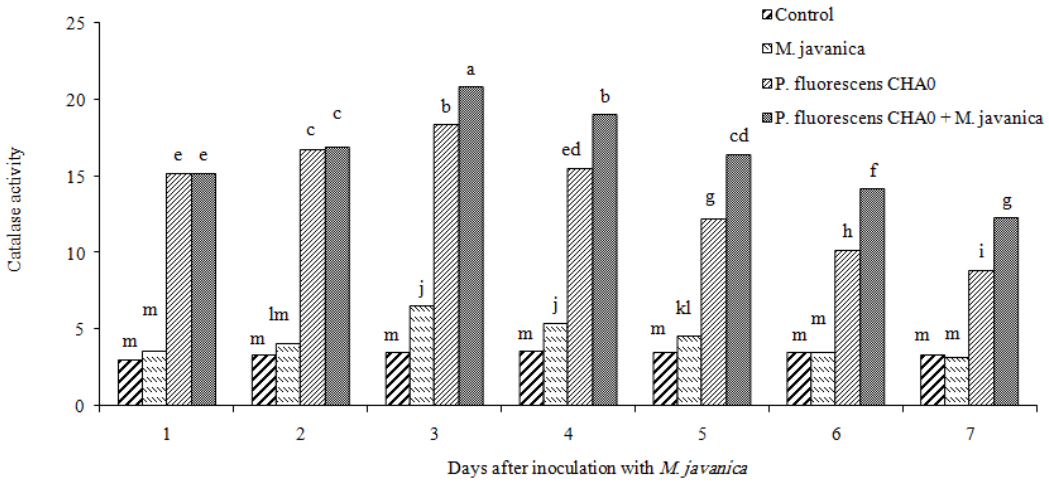
جدول ۲. استفاده از باکتری‌های *B. subtilis*، *B. cereus* و *P. fluorescens* CHA0 در کنترل نماتد *M. javanica* در گلخانه.

Table 2. Using *B. subtilis*, *B. cereus* and *P. fluorescens* CHA0 to control *M. javanica* in greenhouse.

Treatment	No. galls per plant	Gall diameter (mm)	No. egg-mass per plant	No. egg per egg-mass
Control (*M. javanica*)	292±51 a	2.7 ±0.4 a	221±26 a	205±23 a
B. subtilis before nematode	140±20 bc	1.6 ±0.3 b	92±16 bc	115±20 b
B. cereus before nematode	126±21 bc	1.5 ±0.3 b	86±16 bc	105±20 bc
P. fluorescens CHA0 before nematode	80±16 c	1.4 ±0.3 b	59±9 c	72±13 c
B. subtilis after nematode	156±44 b	1.8 ±0.3 b	100±24 b	120±12 b
B. cereus after nematode	142±26 b	1.6 ±0.3 b	96±16 b	110±21 b
P. fluorescens CHA0 after nematode	97±12 bc	1.5 ±0.1 b	78±13 bc	69±20 c

هر عدد میانگین پنج تکرار می‌باشد. میانگین‌هایی که در هر ستون بر اساس آزمون دانکن دارای اختلاف معنی‌دار (p<۰/۰۵) می‌باشند، با حروف مختلف نشان داده شده‌اند. اعداد نوشته شده پس از علامت ± نشان دهنده انحراف معیار می‌باشند. غلظت (cfu/ml) ۱۰ ^۹ باکتری‌های *B. subtilis*، *B. cereus* و *P. fluorescens* CHA0 یک روز قبل یا بعد از مایه‌زنی ریشه گیاهان گوجه فرنگی با نماتد *M. javanica* مورد استفاده قرار گرفتند. Control: گیاهان مایه زنی شده با نماتد *M. javanica*

Each value is the mean of 5 replicates. The means followed by different letters in the same column are significantly different (p <0.05) based on Duncan's test. The numbers written after ± indicate the standard deviation. Concentration 10^9 (cfu / ml) of *B. subtilis*, *B. cereus* and *P. fluorescens* CHA0 were used one day before or after inoculation of tomato roots with *M. javanica*. Control: inoculated plants with *M. javanica*



شکل ۲. تاثیر باکتری *P. fluorescens* CHA0 و نماتد *M. javanica* بر فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاه گوجه فرنگی. مایه‌زنی گیاهان با باکتری، یک روز پیش از مایه‌زنی گیاهان با نماتد صورت گرفت. ستون‌هایی که با حروف یکسان نشان داده شده‌اند بر اساس آزمون دانکن، در سطح احتمال ۵٪ فاقد اختلاف معنی‌دار می‌باشند. شاهد: گیاهان تیمار شده با آب مقطر استریل.

Figure 2. Effect of *P. fluorescens* CHA0 and *M. javanica* on catalase activity in tomato plant. Bacterial inoculation of plants was performed one day before nematode inoculation. Columns with the same letters have no significant difference (p <0.05) based on Duncan's test. Control: plants treated with sterile distilled water.

بحث

باکتری‌ها یکی از موثرترین عوامل کنترل کننده بیولوژیک بیمارگرهای گیاهی از جمله نماتدها محسوب می‌شوند. تعامل بین این دو گروه از میکروارگانیسم‌های موجود در خاک، تعاملی دوطرفه است. به عنوان مثال، نماتدهای باکتری خوار (Bacteriovorous nematodes) متعلق به زیر راسته *Rhabditina* قادر به تغذیه از برخی باکتری‌ها می‌باشند. در این میان، باکتری‌های فاقد مواد دور کننده نماتدها یا فاقد اندام‌های مقاوم در برابر هضم در دستگاه گوارشی نماتدها، از آسیب پذیری بیشتری برخوردارند. در این تحقیق، تعامل چند باکتری معروف در کنترل بیولوژیک بسیاری از عوامل بیماری‌زای گیاهی شامل *B. subtilis*، *B. cereus* و *P. fluorescens* CHA0 با نماتد *C. elegans* به عنوان یکی از معروف‌ترین نماتدهای میکروب خوار در اغلب خاک‌های زراعی و غیر زراعی مورد بررسی قرار گرفته است. به علاوه اثر بیوکنترلی این باکتری‌ها در کنترل نماتد مولد گره ریشه *M. javanica* در گلخانه بررسی و موثرترین باکتری جهت مطالعه القا سیستم دفاعی گیاه مورد مطالعه قرار گرفته است.

نتایج حاصل از مطالعات حاضر نشان می‌دهد که بین دو گونه باکتری *Bacillus* تفاوت قابل توجهی در تمایل نماتد به تغذیه از آن‌ها وجود دارد. گونه *B. subtilis* با وجود شباهت‌های زیاد با گونه *B. cereus* از لحاظ گرم، تولید اندوسپور و غیره به خوبی مورد تغذیه نماتد قرار گرفت، در حالی‌که نماتد تمایلی به تغذیه از گونه *B. cereus* نشان نداد.

لابرکی و دورکین نیز نتایج مشابهی را در بررسی‌هایی که بر روی گونه‌های باکتری *Bacillus* انجام دادند به دست آوردند. آن‌ها اظهار داشتند که دو گونه *B. thuringiensis* و *B. cereus* به واسطه تولید مواد سمی باعث کشته شدن نماتد مذکور می‌شوند در حالی‌که گونه *B. subtilis* فاقد این توانائی برای کشتن نماتد می‌باشد. آن‌ها همچنین نشان دادند که اندوسپور این باکتری‌ها در دستگاه گوارش نماتد هضم نمی‌شود و چنین به نظر می‌رسد که علی‌رغم تغذیه شدید از این باکتری ولی به دلیل تولید اندوسپور کماکان می‌تواند از باکتری‌های ساکن در ریزوسفر گیاه باشد(Laaberki and Dworkin 2008).

در تحقیق حاضر دو گونه از باکتری *Bacillus* شامل *B. cereus* و *B. subtilis* با باکتری *P. fluorescens* CHA0 مورد استفاده قرار گرفت که گونه آخر با وجود عدم تولید اندوسپور، ولی به واسطه تولید ترکیبات خارج سلولی بسیار سمی برای نماتد اجازه تغذیه نماتد را نمی‌دهد. در تحقیق حاضر، تفاوت بین عدم تغذیه نماتد از این باکتری و باکتری گونه *B. cereus* در این است که نماتد *C. elegans* بدون اختلاف معنی‌دار وارد پرگنه *B. cereus* می‌شود که این نشان می‌دهد که احتمالا عدم تغذیه نماتد از این باکتری به دلیل ترکیبات خارج سلولی کشنده برای نماتد نیست بلکه یا دارای ترکیبات داخل سلولی نامناسب برای نماتد است یا اینکه این باکتری فاقد مطلوبیت غذائی برای نماتد می‌باشد، اگرچه این دلایل در این تحقیق مورد آزمایش قرارنگرفته است. ولی در خصوص باکتری *P. fluorescens* CHA0 نماتد تا محدوده‌ای اطراف پرگنه این باکتری فرار می‌نماید که نشان دهنده خاصیت دورکنندگی یا سمی بودن این ترکیبات برای نماتد می‌باشد. لاوز و همکاران تمایل جذب و تغذیه این نماتد را به پرگنه باکتری *Pseudomonas auroginosa* نژاد PA14 که بیماری‌زای این نماتد نیز می‌باشد، مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها نشان دادند که این باکتری به دلیل ترشحات خارج سلولی دور کننده نماتد، موجب دور شدن این نماتد از پرگنه باکتری می‌گردد (Laws *et al*. 2006).

از دیگر دست‌آوردهای آزمایشات حاضر این است که حرکت نماتد در پرگنه باکتری *B. cereus* موجبات مرگ آن را فراهم نکرده است به طوری که نماتد پس از خارج شدن از پرگنه این باکتری در صورتی که خود را به غذای مطلوب مانند باکتری گونه *B. subtilis* برساند قادر به ادامه رشد و تکثیر خواهد بود، بنابراین کشنده بودن گونه *B. cereus* برای نماتد ناشی از تغذیه اجباری از این باکتری و اثر نامناسب ترکیبات فرار و یا آنتی بیوتیک‌های باکتری بر نماتد باشد. قرار

دادن نماتد در پرگنه باکتری *P. fluorescens* CHA0 به دلیل ترشح ترکیبات خارج سلولی کشنده برای نماتد در زمانی کوتاه پس از انتقال موجبات مرگ نماتد را فراهم می‌آورد و احتمالا نماتد در این مدت کوتاه فرصت یا شرایط تغذیه کردن را نداشته است.

رمانوسکی و همکاران با قرار دادن نماتد *C. elegans* در پرگنه‌های باکتری *P. fluorescens* CHA0 رشد یافته در محیط کشت‌های مختلف نشان دادند که این باکتری می‌تواند موجب فلج (paralysis) شدن نماتد مذکور شده و بسته به نوع محیط کشت باکتریائی، که می‌تواند سبب القاء تولید یا عدم تولید توکسین توسط باکتری باشد مرگ سریع یا کند نماتد را موجب شود (Romanowski *et al*. 2011). در تحقیق حاضر، با قرار دادن نماتد *C. elegans* در پرگنه باکتری *B. cereus* علی‌رغم نامناسب بودن باکتری برای تغذیه نماتد، نماتد به دلیل گرسنگی از آن تغذیه نموده است ولی کشته شدن نماتد در اثر این تغذیه می‌تواند به دلیل تولید ترکیبات کشنده نماتد به صورت داخل سلولی باشد. لابرکی و دورکین نیز وجود پیکره باکتری *B. cereus* در روده نماتد را نشان دادند (Laaberki and Dworkin 2008). تنوع گونه‌ای باکتری در ریزوسفر گیاهان مختلف، توکسیژن بودن یا غیر توکسیژن بودن، ترکیبات خارج سلولی یا داخل سلولی، تولید اندوسپور یا عدم تولید آن و سرعت تکثیر باکتری در محیط خاک یا ریزوسفر از جمله تنوعی است که می‌تواند در ارتباط با گیاهان مختلف وجود داشته باشد. ولی هرکدام از این تفاوت‌ها به اشکال مختلف همراه با امتیازاتی برای گونه باکتری مربوطه می‌باشد به طوری که قادر به رقابت و بقاء در محیط اکولوژیکی خود باشد.

بررسی کارایی باکتری‌های *Bacillus subtilis*، *B. cereus* و*P. fluorescens* CHA0 در کنترل نماتد *M. javanica* درگلخانه نشان داد که همگی این باکتری‌ها قادر به کنترل موثر نماتد مذکور می‌باشند. توانایی این باکتری‌ها در تولید متابولیت‌هایی با خاصیت نماتدکشی (Yin *et al*., 2021, Siddiqui and Shaukat 2003)، قابلیت کلونیزه کردن ریشه (Singh Hu *et al*. 20172020 ,) و توانایی در القا سیستم دفاعی گیاه (Pršić and Ongena 2020 ,Hu *et al*. 2018) همگی از عوامل موثر در موفقیت این باکتری‌ها در کنترل نماتدهای مولد گره ریشه هستند.

بیشترین کاهش در شاخص‌های مربوط به بیماری‌زایی نماتد در اثر استفاده از باکتری *P. fluorescens* CHA0 مشاهده شد، باکتری که بیشترین اثر منفی را بر نماتد مدل *C. elegance* نشان داده بود. داس و همکاران نشان دادند که قرار گرفتن لاروهای سن دوم نماتد *M. javanica* در معرض غلظت ۲۵ درصدی فیلتره‌ی کشت باکتری‌های *B. subtilis* و *P. fluorescens* پس از سه روز موجب مرگ و میر ۱۰۰ درصد لاروها می‌شود. به علاوه بررسی آن‌ها نشان داد که قرار گرفتن تخم‌های نماتد *M. javanica* در معرض غلظت ۲۵ درصدی فیلتره‌ی کشت باکتری‌های مذکور به مدت یک هفتهT مانع از تفریخ ۱۰۰ درصد تخم‌ها می‌شوند. آن‌ها پیشنهاد کردند که این نتایج نشان دهنده تولید مواد نماتدکش توسط باکتری‌های *B. subtilis* و *P. fluorescens* بوده لذا می‌توان از این باکتری‌ها جهت تولید نماتدکش‌های بیولوژیک بهره برد (Das et al. 2021). دشتی پور نشان داد که استفاده از باکتری *B. subtilis* دو روز قبل از مایه‌زنی گیاهان با نماتد *M. javanica* موجب کاهش معنی‌دار (p<۰/۰۵) قطر گال، تعداد گال و توده تخم در گیاه گوجه فرنگی می‌گردد. به علاوه، مشخص شد که اضافه کردن باکتری *B. subtilis* به خاک، موجب القا سیستم دفاعی گیاه و افزایش معنی-دار (p<۰/۰۵) سطح برخی آنزیم‌های موثر در دفاع گیاه علیه نماتد می‌گردد (Dashtipour 2013). ین و همکاران نشان دادند که استفاده از استرین Bc-cm103 باکتری *B. cereus* به منظور کنترل نماتد *M. incognita* موجب کاهش ۴۶٪ گال روی ریشه‌های گیاه خیار می‌گردد. آن‌ها با استفاده از فاز سخت میکرو اکسترکشن طیف‌سنجی جرمی کروماتوگرافی گازی (solid-phase microextraction gas chromatography–mass spectrometry) نشان دادند که این باکتری تولید ترکیبات فراری مانند آلکان‌ها،

استرها و سولفیدها می‌نماید (Yin *et al*. 2021). در میان این ترکیبات فرار، دی متیل دی سولفید (dimethyl disulfide) و اس متیل استر بوتانتیویک اسید (S-methyl ester butanethioic acid) اثر نماتدکشی دارند. مساهانه و همکاران نشان دادند که هنگامی که تراکم نماتد *M. javanica* در خاک دو تخم به ازای هر سانتی متر مکعب خاک باشد، استفاده از باکتری *P. fluorescens* CHA0 در خاک موجب کاهش ۳۳٪ فاکتور تولید مثل نماتد می‌گردد (Mosahaneh *et al*. 2021). عمران زاده نیز نشان داد که استفاده از این باکتری موجب القا سیستم دفاعی گیاه خیار علیه نماتد *M. javanica* و افزایش سنتز آنزیم‌هایی چون پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز می‌گردد (Omranzadeh 2008). او نشان داد که استفاده از این باکتری موجب افزایش بیش از سه برابری فعالیت آنزیم کاتالاز در مقایسه با شاهد می‌گردد. در تحقیق حاضر، نیز افزایش شش برابری فعالیت آنزیم کاتالاز در روز سوم نمونه برداری در ریشه گیاهان مایه‌زنی شده با باکتری *P. fluorescens* (CHA0) مشاهده شد. آنزیم کاتالاز از جمله آنزیم‌هایی است که به تنهایی می‌تواند گویای سرنوشت برخی پاسخ‌های دفاعی گیاهان به ویژه گونه‌های مختلف اکسیژن‌های فعال باشد. افزایش این آنزیم در اثر فعالیت نماتد به منظور برطرف سازی اثرات سوء H_2O_2 (به عنوان یکی از مهمترین گونه‌های اکسیژن‌های فعال) بر ساختارهای آناتومیکی بیرونی و درونی نماتد می‌باشد. همچنین روند تغییرات این آنزیم می‌تواند گویای تغییرات کمی دیگر اکسیژن‌های فعال از جمله آنیون سوپراکسید نیز باشد که پس از ساخته شدن آن طی فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسمیوتاز به H_2O_2 تبدیل می‌گردد. لذا فعالیت آنزیم کاتالاز به جهت برطرف سازی پراکسید هیدرژن تناسب مستقیمی با میزان ساخت آنیون سوپراکسید و میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسمیوتاز دارد. بنابراین اگرچه در این تحقیق تنها به اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز اکتفا شده است ولی نتایج این فعالیت، نشان دهنده میزان ساخته شدن H_2O_2، آنیون سوپر اکسید و فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسمیوتاز نیز می باشد.

نتیجه گیری کلی

استفاده از عوامل کنترل کننده بیولوژیک یکی از روش‌های سودمند، مکمل و در مواردی جایگزین برای سموم مورد استفاده در کشاورزی می باشد. آنچه از نقطه نظر استفاده از عوامل بیوکنترل در کنترل بیولوژیک بیمارگرهای گیاهی اهمیت دارد این است که در شرایط طبیعی، همواره ترکیبی از موجودات مختلف پیرامون گیاه وجود دارند و برخی از این موجودات در تعامل مستقیم یا غیر مستقیم با بیمارگر و حتی عوامل بیوکنترل می باشند. نادیده گرفتن این موجودات می تواند بر حصول میزان اثر گذاری عوامل بیوکنترل بر بیمارگر تاثیر منفی یا حتی مثبت بگذارد. در نظر گرفتن این تنوع و ترکیب جمعیتی پیرامون گیاه و بررسی اثر متقابل این آنها بر یکدیگر نیز از جمله ملزومات مورد مداقه در استفاده از عوامل بیوکنترل در محیط طبیعی می باشد.

REFERENCES

Bavaresco LG, Guaberto LM, Araujo FF (2021) Interaction of *Bacillus subtilis* with resistant and susceptible tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in the control of *Meloidogyne incognita*. Archives of Phytopathology and Plant Protection 54: 359-374.

Britton C, Murray L (2006) Using *Caenorhabditis elegans* for functional analysis of genes of parasitic nematodes. International Journal for Parasitology 36: 651-659.

Chamberlin HM (2010) *C. elegans* select. Nature Methods 7:693-695.

Das S, Wadud MA, Khokon MAR (2021) Functional evaluation of culture filtrates of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* on the mortality and hatching of *Meloidogyne javanica*. Saudi Journal of Biological Sciences 28: 1318-1323.

Dashtipour S (2013) Use of salicylic acid and *Bacillus subtilis* for control of root knot nematode *Meloidogyne javanica* and wilt fungi *Fusarium oxysporoum* f.sp. *lycopersici* in tomato plant. M.Sc., University of Tehran, Tehran, Iran (In Persian)

Eisenback, JD (1985) Diagnostic characters useful in the identification of the four most common species of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp), *In*: Sasser JN and Carter CC (eds.) An advanced treaties on *Meloidogyne*. USA: North Carolina State University. pp. 95-112.

Hu HJ, Chen YL, Wang YF, Tang YY, Chen SL, Yan SZ (2017) Endophytic *Bacillus cereus* effectively controls *Meloidogyne incognita* on tomato plants through rapid rhizosphere occupation and repellent action. Plant Disease 101: 448-455.

Hu H, Wang C, Li X, Tang Y, Wang Y, Chen S, Yan S (2018) RNA-Seq identification of candidate defense genes targeted by endophytic *Bacillus cereus* mediated induced systemic resistance against *Meloidogyne incognita* in tomato. Pest Management Science 74: 2793-2805.

Huang Z, Lu J, Liu R, Wang P, Hu Y, Fang A, Yang Y, Qing L, Bi C, Yu Y (2021) SsCat2 encodes a catalase that is critical for the antioxidant response, QoI fungicide sensitivity, and pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum*. Fungal Genetics and Biology 149: 103530.

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

Johnson TE (2003) Advantages and disadvantages of *Caenorhabditis elegans* for aging research. Experimental Gerontology 38: 1329-1332.

Kraus J, Loper JE (1992) Lack of evidence for a role of antifungal metabolite production by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 in biological control of *Pythium* damping-off of cucumber. Phytopathology 82: 264-271.

Laaberki MH, Dworkin J (2008) Death and survival of spore-forming bacteria in the *Caenorhabditis elegans* intestine. Symbiosis 46: 95-100

Lamberti F, Taylor CE (1979) Root-knot nematodes (*Meloidogyne* species), systematics, biology and control. Paper presented *In*: International conference on *Meloidogyne* spp., 17-28 Oct.; Bari, Italy.

Laws TR, Atkins HS, Atkins TP, Titball RW (2006) The pathogen *Pseudomonas aeruginosa* negatively affects the attraction response of the nematode *Caenorhabditis elegans* to bacteria. Microbial Pathogenesis 40: 293-297.

Lillbro, M (2005) Biocontrol of *Penicillium roqueforti* on grain-acomparison of mode of action of several yeast species. M.Sc., Swedish University of Agricultural Sciences, Sweden.

Liu G, Lin X, Xu S, Liu G, Liu F, Mu W (2020) Screening, identification and application of soil bacteria with nematicidal activity against root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) on tomato. Pest Management Science 76: 2217-2224.

Marx J (2002) Tiny worm takes a star turn. Science 298: 526

Mokhtari S (2007) Biological control of root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) by *Pseudomonas fluorescens* and *Trichoderma harzianum.* M.Sc., University of Tehran, Tehran, Iran (In Persian)

Mosahaneh L, Charehgani H, Abdollahi M, Rezaei R (2021) Biological control agents in the management of different initial population densities of *Meloidogyne javanica* in tomato. Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica 55: 151-159.

Omranzadeh F (2008) Induction of resistance to the root knot nematode (*Meloidogyne javanica*) in cucumber (*Cucumis sativus*) by some chemical and microbial inducer. M.Sc., University of Tehran, Tehran, Iran (In Persian)

Pršić J, Ongena M (2020) Elicitors of plant immunity triggered by beneficial bacteria. Frontiers in Plant Science 11: 594530.

Romanowski A, Migliori ML, Valverde C, Golombek DA (2011) Circadian variation in *Pseudomonas fluorescens* (CHA0) mediated paralysis of *Caenorhabditis elegans*. Microbial pathogenesis 50: 23-30.

Siddiqui IA, Shaukat SS (2003) Suppression of root-knot disease by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in tomato: importance of bacterial secondary metabolite, 2, 4-diacetylpholoroglucinol. Soil Biology and Biochemistry 35: 1615-1623.

Singh HK (2020) Current research and innovations in plant pathology. AkiNik, India.

Sohlenius B (1980) Abundance, biomass and contribution to energy flow by soil nematodes in terrestrial ecosystems. Oikos 34: 186-194.

Sulston JE, Schierenberg E, White JG, Thomson JN (1983) The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. Developmental Biology 100: 64-119.

Topalović O, Santos SS, Heuer H, Nesme J, Kanfra X, Hallmann J, Sørensen SJ, Vestergård M (2022) Deciphering bacteria associated with a pre-parasitic stage of the root-knot nematode *Meloidogyne hapla* in nemato-suppressive and nemato-conducive soils. Applied Soil Ecology. 172:104344.

Yin N, Liu R, Zhao JL, Khan RAA, Li Y, Ling J, Liu W, Yang YH, Xie BY, Mao ZC (2021) Volatile organic compounds of *Bacillus cereus* strain bc-cm103 exhibit fumigation activity against *Meloidogyne incognita*. Plant Disease 105: 904-911.

Yousefi H, Sahebani N, Faravardeh L and Mahdavi V (2011) Application of a combination of salicylic acid and *Bacillus subtilis* to control cucumber root and stem rot, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*, and evaluation of phenylalanine ammonia lyase activity. Iranian Journal of Plant Protection Science 42: 339-351. (In Persian.