

کارایی نماتد بیمارگر حشرات *Heterorhabditis bacteriophora* در کنترل زیستی نماتد گره ریشه *Meloidogyne javanica* در شرایط آزمایشگاهی

رحیمه غفارپور تیمورلویی¹، غلامرضا نیکنام^{2*} و محمود تورچی³

¹ دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

² دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

³ استاد به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

*مسئول مکاتبه: g_niknam@tabrizu.ac.ir

تاریخ پذیرش: 92/06/24

تاریخ دریافت: 91/12/06

چکیده

در سال‌های اخیر، کنترل زیستی نماتدهای بیمارگر گیاهی با استفاده از نماتدهای بیمارگر حشرات مورد توجه قرار گرفته است. این تحقیق تاثیر لاروهای آلوده‌کننده زنده و مرده نماتد بیمارگر حشرات *Heterorhabditis bacteriophora* در غلظت‌های 5، 10، 25، 50 و 100 لارو در هر میلی‌لیتر را به‌طور جداگانه و در ظرف‌های 24 چاهکی روی مرگ و میر لارو و تفریح تخم نماتد گره ریشه *Meloidogyne javanica* Treub در غلظت‌های 50 تخم، 50 لارو و مخلوط 50 تخم و لارو به ازای هر چاهک در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار داد. آزمایش با شش تیمار در قالب طرح کرت‌های خردشده در زمان و چهار تکرار برای هر تیمار انجام شد. کل آزمایش‌ها دو بار تکرار گردید. یادداشت‌برداری نتایج بعد از 48، 72، 96 و 120 ساعت نشان داد که تاثیر لارو زنده یا مرده نماتد بیمارگر حشرات در مرگ‌ومیر لاروهای سن دوم و تفریح تخم نماتد گره ریشه معنی‌دار است. بیش‌ترین مرگ‌ومیر در غلظت 100 لارو آلوده‌کننده در هر میلی‌لیتر و در 120 ساعت و بیش‌ترین بازدارندگی از تفریح تخم با غلظت 100 لارو آلوده‌کننده در هر میلی‌لیتر و در 48 ساعت مشاهده شد. در حالت مخلوط 50 تخم و لارو نماتد گره ریشه، تاثیر لاروهای زنده *H. bacteriophora* در مرگ‌ومیر لارو نماتد گره ریشه در بین زمان‌ها اختلاف معنی‌داری بروز نداد.

واژه‌های کلیدی: نماتد گره ریشه، نماتدهای بیمارگر حشرات، *Meloidogyne javanica* و *Heterorhabditis bacteriophora*

مقدمه

(فورست و کنت 1996، لويس و گریوال 2005). عامل اصلی مرگ حشرات در مدت حدود 48 ساعت، همین باکتری‌ها و متابولیت‌های آنها است. از سوی دیگر، در سال‌های اخیر تاثیر این نماتدها روی نماتدهای انگل گیاهی مطرح گردیده است. این ادعا اولین بار در سال 1986 در دو مطالعه جداگانه به اثبات رسید. در یکی از آنها کاربرد *Steinernema glaseri* جمعیت *Meloidogyne*

نماتدهای بیمارگر حشرات متعلق به دو جنس *Heterorhabditis* و *Steinernema* از مؤثرترین و مفیدترین عوامل کنترل زیستی حشرات می‌باشند (لويس و گریوال 2005). این نماتدها به‌ترتیب با باکتری‌های *Xenorhabdus* و *Photorhabdus* هم‌زیستی اجباری دارند و باکتری‌ها به وسیله نماتدها به‌داخل هموسل حشره حمل می‌شوند

Pratylenchus pratensis را کاهش داد. نیکزپیر و همکاران (2004) نیز کارآرایی دو گونه نماتد انگل حشره را در مقابل *Mesocriconema xenoplax* نشان دادند.

در ایران سابقه‌ای از این نوع بررسی‌ها که حاکی از تاثیر نماتدهای بیمارگر حشرات روی نماتدهای بیمارگر گیاهی از جمله نماتد گره ریشه باشد، وجود ندارد. به این دلیل، در مطالعه حاضر تاثیر لاروهای آلوده‌کننده زنده و مرده *H. bacteriophora* جداشده از استان آذربایجان شرقی، روی تفریح تخم و لارو سن دوم *M. javanica* در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

برای به‌دست آوردن و جداسازی نماتدهای بیمارگر حشرات، 30 نمونه خاک از عمق 20-30 سانتی‌متری خاک‌های باغ‌های اطراف گوگان، سردرود و باسمنج در استان آذربایجان شرقی جمع‌آوری گردید. نمونه‌های خاک با لاروهای سن آخر شب پره موم‌خوار *Galleria mellonella* تله‌گذاری شدند (وودرینگ و کایا 1988). نماتدها با استفاده از تله وایت (1927) و طی هشت تا 13 روز از لاشه‌های حشره آلوده به نماتد انگل حشره موجود در نمونه خاک، استحصال و جمع‌آوری گردیدند. برای تعیین گونه نماتد انگل حشره از مجموع صفات ریخت‌شناختی و ریخت‌سنجی و با استفاده از منابع در-دسترس از جمله آدامز و نگاین (2002) و هانت (2007) استفاده شد.

جمعیت اولیه نماتد گره ریشه با نمونه‌برداری از گیاهان خیار گلخانه‌ای آلوده به این نماتد از منطقه خسروشاه به‌دست آمد. نماتد گره ریشه با استفاده از تککیسه تخم روی گوجه‌فرنگی رقم سوپر استرین ب تکثیر گردید. به‌منظور تهیه مایه‌زاد نماتد گره ریشه، کیسه‌های ژلاتینی حاوی تخم در محلول هیپوکلریت سدیم نیم درصد به‌مدت دو تا سه دقیقه نگه‌داری و بعد از تجزیه ماده ژلاتینی کیسه تخم، تخم‌ها آزاد و با عبور از الک 500 مش جمع‌آوری شدند. برای تفریح، تخم‌ها در

javanica را روی گوجه‌فرنگی کاهش داد (بیرد و بیرد 1986). در مطالعه دیگر، ایشی‌باشی و کندو (1986) مشاهده کردند که استفاده از *Steinernema glaseri* و *Steinernema feltiae* در خاک استریل یا کمپوست پوست درختان، تعداد نماتدهای انگل گیاهی را تقلیل داد ولی موجب افزایش نماتدهای میکروب‌خوار گردید. از آن تاریخ به‌بعد، گزارش‌های متعددی نشان می‌دهند که نماتدهای انگل حشرات می‌توانند جمعیت نماتدهای بیمار-گر گیاهی را کاهش دهند (ایشی‌باشی و کندو 1987، ایشی‌باشی و چوی 1991، اسمیت‌لی و همکاران 1992، گوگ و همکاران 1994، گریوال و همکاران 1997، پری و همکاران 1998، لویس و گریوال 2005 و فریرا و همکاران 2011).

چرخه‌های زندگی نماتدهای انگل حشرات (*Heterorhabditis* و *Steinernema*) و نماتدهای گره ریشه به‌طور کامل از هم متفاوت است و هیچ ارتباط مشخصی به‌غیر از زیست‌گاه مشترک (خاک) لاروهای آلوده‌کننده آن‌ها و میزبان‌های مربوط وجود ندارد. با این حال چندین بررسی به تاثیر این نماتدها روی نماتدهای گره ریشه اختصاص یافته است (گریوال و همکاران 1999، فالون و همکاران 2002، پرز و لویس 2002 و 2004، مولینا و همکاران 2007، خان و همکاران 2010 و فریرا و همکاران 2011).

نفوذ نماتد *Meloidogyne javanica* به گیاه در شرایط آزمایشگاه و گلخانه توسط *S. Steinernema feltiae*، *riobravae* و *Heterorhabditis indica* کاهش یافت (فالون و همکاران 2002). فریرا و همکاران (2011) تاثیر *Heterorhabditis baujardi* LPP7 روی نشوونمای جنین و لاروهای سن دوم تفریح‌نشده *Meloidogyne javanica* را بررسی و نشان دادند که *H. baujardi* LPP7 روی جنین‌زایی تاثیری نداشته ولی تفریح لاروهای سن دوم را به‌تاخیر می‌اندازد. درباره نماتدهای دیگر، اسمیت-لی و همکاران (1992) نشان دادند که *Heterorhabditis bacteriophora* جمعیت *Tylenchorhynchus* spp.

تجزیه آماری داده‌ها بعد از تصحیح با فرمول آبت¹، با استفاده از نرم‌افزار SAS و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن، t-جفتی و t-ستیودنت انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج تاثیر غلظت‌های مختلف لاروهای آلوده‌کننده زنده و مرده نماتد بیمارگر حشرات روی تفریح تخم و مرگ‌ومیر لاروهای سن دوم *M. javanica* در چهار زمان در آزمایشگاه به شرح زیر به دست آمد.

H. تاثیر لاروهای آلوده‌کننده زنده و مرده *bacteriophora* روی مرگ‌ومیر لاروهای سن دوم *M. javanica*

نتایج مقایسه تاثیر لاروهای زنده و مرده *bacteriophora* روی مرگ‌ومیر لاروهای سن دوم *M. javanica* با آزمون t-جفتی نشان داد که در هر دو حالت زنده و مرده بین تیمارهای مختلف از نظر تاثیر لاروهای آلوده‌کننده نماتد روی مرگ‌ومیر لاروهای سن دوم *M. javanica* در سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی‌داری وجود دارد.

نتایج تجزیه واریانس آزمایش تاثیر لاروهای آلوده‌کننده زنده و مرده نماتد بیمارگر حشرات روی مرگ‌ومیر لاروهای سن دوم *M. Javanica* در جدول 1 ارائه شده است.

لاروهای زنده و مرده *H. bacteriophora* در غلظت‌های 100 و پنج لارو آلوده‌کننده در میلی‌لیتر به ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین تاثیر را داشتند (شکل 1). در استفاده از لاروهای زنده *H. bacteriophora* تفاوت معنی‌داری بین غلظت‌های پنج و 10 و نیز پنج و شاهد مشاهده نگردید (شکل 1). نتایج تاثیر لاروهای زنده و مرده در زمان‌های مختلف روی مرگ‌ومیر لاروهای سن دوم *M. javanica* نیز نشان داد که با افزایش زمان، مرگ‌ومیر لاروها

آب استریل و داخل انکوباتور با دمای 28 ± 1 درجه سانتی‌گراد نگه‌داری گردیدند. لاروهای سن دوم تفریح‌شده جمع‌آوری و غلظت‌های مورد نیاز تخم و لارو برای انجام آزمایش تهیه شدند.

لارو آلوده‌کننده نماتد بیمارگر حشرات (زنده و مرده) در غلظت‌های 5، 10، 25، 50 و 100 لارو در هر میلی‌لیتر آب مقطر استریل و نماتد گره ریشه در غلظت‌های 50 تخم، 50 لارو و 50 لارو و تخم در کمتر از یک میلی‌لیتر تهیه شدند. برای تهیه نماتدهای بیمارگر حشرات مرده، بعد از تعیین غلظت‌های بالا، سوسپانسیون لاروهای آلوده‌کننده نماتد بیمارگر حشرات در اتوکلاو با دمای 121 درجه سانتی‌گراد و فشار 1/2 اتمسفر به مدت 25 دقیقه قرار داده شدند تا کشته شوند (جگدال و گریوال 2008).

بعد از آماده‌سازی، غلظت‌های نماتد بیمارگر حشرات (زنده و مرده) در داخل حجم آب استریل کمتر از یک میلی‌لیتر به هر چاهک از پلیت‌های 24 چاهکی مخصوص کشت بافت ریخته شدند. نماتد گره ریشه نیز به تفکیک در غلظت‌های 50 تخم، 50 لارو و 50 تخم و لارو، به هر چاهک اضافه گردیدند و در نهایت حجم سوسپانسیون داخل هر چاهک به یک میلی‌لیتر رسید. نتایج بعد از 48، 72، 96 و 120 ساعت، یادداشت‌برداری شدند. این آزمایش در قالب طرح کرت‌های خردشده در زمان با چهار تکرار برای هر تیمار طراحی و کل آزمایش‌ها دو بار تکرار گردید.

سوسپانسیون حاوی لاروهای سن دوم نماتد گره ریشه که از هر چاهک برای شمارش لاروهای مرده برداشت می‌شد، جهت تایید این‌که نماتدها بی‌حرکت بوده یا مرده‌اند، مدت حداقل 24 ساعت در شرایط آزمایشگاهی نگه‌داری گردید، سپس با ایجاد جریان در اطراف آن و نیز زدن چند ضربه ملایم به نماتد، در صورتی‌که واکنشی نشان نمی‌داد به عنوان مرده محسوب می‌گردید.

¹Abbott's formula

نتایج آزمایش با لاروهای زنده و مرده *H. bacteriophora* در بازدارندگی از تفریح تخم *M. javanica* با آزمون t-- جفتی نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین استفاده از لاروهای زنده و مرده *H. bacteriophora* وجود ندارد. با این حال، درحالت مرده تاثیرروی بازدارندگی از تفریح تخم از نظر عددی بیش‌تر بود. یافته‌های مولینا و همکاران (2007) و نیز لویس و همکاران (2001) نشان دادند که تفریح تخم و تعداد گال در نماتد گره ریشه تحت تاثیر EPNs کاهش معنی‌داری پیدا می‌کند و آن‌ها احتمال دادند که مواد مقاوم به حرارت در باکتری‌های هم‌زیست نماتدهای انگل حشرات مثل توکسین‌ها و یا ترکیبات حاصل از نماتد انگل حشرات بازدارنده تفریح تخم می‌باشند.

نتایج تجزیه واریانس تاثیر غلظت و زمان مایه‌زنی لاروهای زنده و مرده *H. bacteriophora* در بازدارندگی از تفریح تخم *M. javanica* در جدول 1 نشان داده شده است.

نتایج حاکی از آن است که در حالت زنده، همه غلظت‌های *H. bacteriophora* و در حالت مرده، غلظت بیش‌تر از 10 به‌طور معنی‌داری موجب بازدارندگی تفریح تخم نماتد گره ریشه شدند. در هر دو حالت زنده و مرده بیش‌ترین تاثیر در غلظت 100 و کم‌ترین تاثیر در غلظت پنج یا 10 مشاهده شد (شکل 3). فریرا و همکاران (2011) گزارش کرده‌اند که متابولیت‌های LPP7 *H. baujardi* و *P. luminescens* منجر به کاهش مقاومت تخم و تاخیر در تفریح تخم *Meloidogyne mayaguensis* گردیدند ولی در جنین‌زایی تاثیری نداشتند.

افزایش می‌یابد (شکل 2). در مورد لاروهای مرده *H. bacteriophora* بین 48 و 72 ساعت تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. کم‌ترین و بیش‌ترین مرگ‌ومیر به ترتیب در 48 و 120 ساعت بعد از مایه‌زنی رخ داد (شکل 2). جگدال و گریوال (2008) گزارش نمودند که متناسب با افزایش غلظت لاروهای مرده، مرگ‌ومیر *Aphelenchoides fragariae* چهار و هشت روز بعد از تیمار با *Steinernema carpocapsae* به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. آن‌ها هم‌چنین مشاهده نمودند که دوزهای خیلی بالاتر (10000 و 100000 لارو آلوده‌کننده در هر چاهک) در مدت زمان کم‌تری بعد از تیمار باعث مرگ‌ومیر بیش‌تری نسبت به شاهد گردیدند.

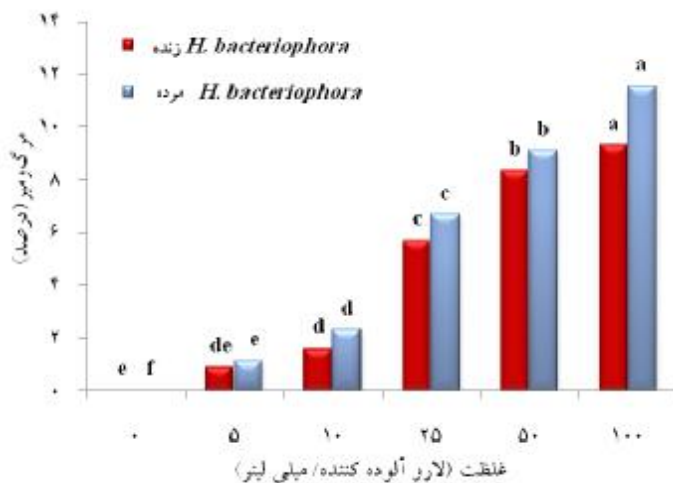
برای علت مرگ‌ومیر لاروهای نماتدهای انگل گیاهی در اثر کاربرد نماتدهای انگل حشرات، توجیه‌های مختلفی ارائه شده است و احتمال دارد که بیش از یک سازوکار در این تاثیر دخیل باشد. گریوال و همکاران (1999)، هیو و همکاران (1999) و جگدال و همکاران (2002) مواد اللوکیکال تولیدشده به وسیله لاروهای آلوده‌کننده مرده و زنده را برای نماتدهای انگل گیاهی سمی و یا دورکننده دانسته‌اند. فالون و همکاران (2002) در کاربرد *S. feltiae*، *S. riobravae* و *H. indica* کاهش کوتاه‌مدتی در نرخ نفوذ *M. javanica* مشاهده نموده و اظهار کردند که کاربرد این نماتدها باعث ممانعت درازمدت از تولیدمثل نماتد گره ریشه نمی‌شود.

تاثیر لاروهای آلوده‌کننده زنده و مرده *H. bacteriophora* روی تفریح تخم *M. javanica*

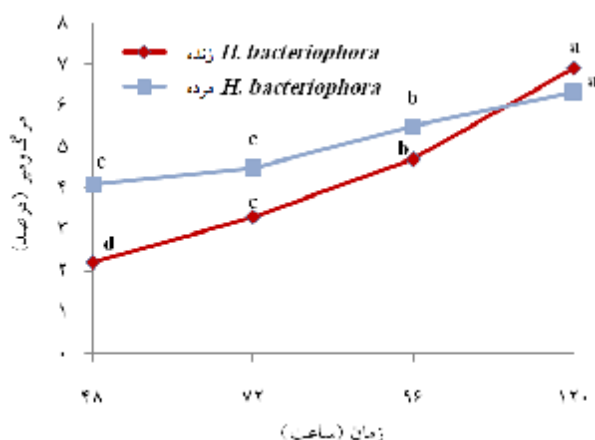
جدول 1- تجزیه واریانس تاثیر غلظت و زمان مایه زنی لاروهای زنده و مرده *Heterorhabditis bacteriophora* در مرگ و میر لاروهای سن دوم و تفریح تخم *Meloidogyne javanica*

میانگین مربعات				درجه آزادی	منابع تغییر
تخم تفریح نشده		مرگ و میر لاروسن دوم			
<i>H. bacteriophora</i> زنده	<i>H. bacteriophora</i> مرده	<i>H. bacteriophora</i> زنده	<i>H. bacteriophora</i> مرده		
3/76 ^{ns}	11/26 ^{ns}	0/21 ^{ns}	0/07 ^{ns}	1	تکرار
1438/31**	2125/4**	128/73**	175/63**	5	غلظت
1/005 ^{ns}	0/81 ^{ns}	0/21 ^{ns}	0/08 ^{ns}	5	خطای اصلی
121/69**	178/64**	50/96**	11/94**	3	زمان
23/55**	27/9**	5/17**	4/83**	15	زمان×غلظت
1/02	1/02	0/26	0/17	18	خطای فرعی
7/26	6/33	11/97	8/17		ضریب تغییرات (درصد)

NS و ** به ترتیب، غیرمعنی دار و معنی دار در سطح احتمال یک درصد

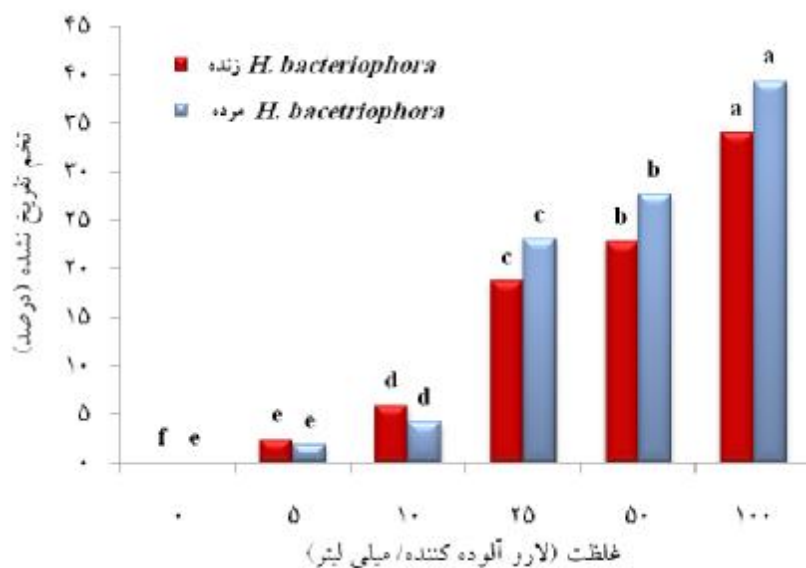


شکل 1- تاثیر غلظت های مختلف لاروهای زنده و مرده *Heterorhabditis bacteriophora* در مرگ و میر لاروهای سن دوم *Meloidogyne javanica*

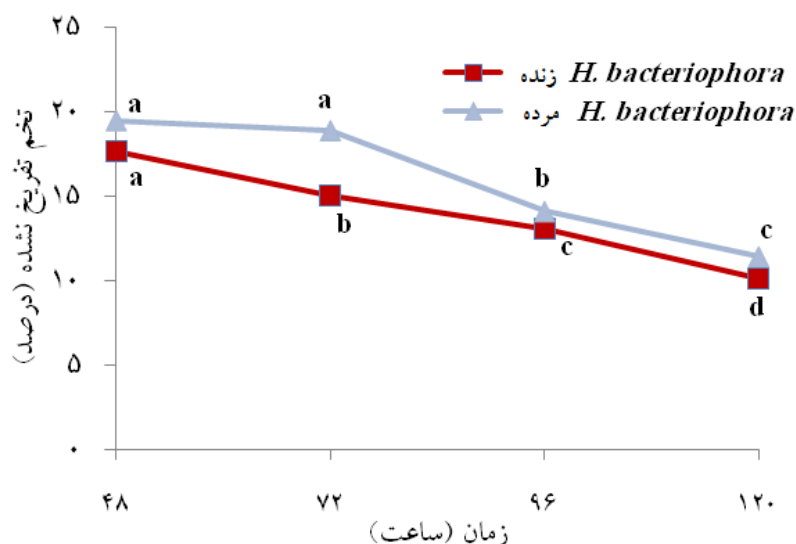


شکل 2- تاثیر لاروهای زنده و مرده *Heterorhabditis bacteriophora* در زمان‌های مختلف در مرگ و میر لاروهای سن دوم *Meloidogyne javanica* مرده *H. bacteriophora* بین زمان‌های 48 و 72 ساعت تفاوت معنی‌داری نبود و بعد از 72 ساعت افزایش قابل ملاحظه‌ای در تفریح تخم مشاهده شد (شکل 4). احتمال می‌رود مواد موثر در بازدارندگی تفریح تخم متناسب با گذر زمان کارایی خود را از دست می‌دهند. در طبیعت نیز عوامل زنده و غیرزنده ممکن است روی مواد محرک تفریح تاثیر گذاشته و رفته‌رفته چه از نظر زمانی و چه از نظر مکانی اثر ترکیبیات را به حداقل برسانند.

نتایج تاثیر لاروهای زنده و مرده نماتد بیمارگر حشرات در زمان‌های مختلف روی تفریح تخم *M. javanica* نشان داد که بین زمان‌های مختلف، تفاوت معنی‌داری وجود دارد و با افزایش زمان، تفریح تخم نیز افزایش یافته است (شکل 4). بازدارندگی تفریح تخم نماتد گره ریشه با گذشت زمان کاهش یافت به طوری که بیش-ترین بازدارندگی تفریح تخم بعد از 48 ساعت و کم‌ترین بازدارندگی بعد از 120 ساعت رخ داد. در مورد لاروهای



شکل 3- تاثیر غلظت‌های مختلف لاروهای زنده و مرده *Heterorhabditis bacteriophora* در تفریح تخم *Meloidogyne javanica*



شکل 4- تاثیر لاروهای زنده و مرده *Heterorhabditis bacteriophora* در زمان‌های مختلف در تفریح تخم *Meloidogyne javanica*

تفاوتی نشان ندادند (شکل 5). همه غلظت‌های لاروهای مرده *H. bacteriophora* با شاهد و نیز بین خودشان اختلاف معنی‌داری روی مرگومیر لاروهای نماتد گره ریشه بروز دادند (شکل 5). در بررسی جگال و گریوال (2008) نیز لاروهای آلوده‌کننده مرده *S. carpocapsae* تاثیر بیشتری روی مرگومیر مراحل مختلف زندگی *Aphelenchoides fragariae* نشان دادند ولی لاروهای زنده موثر نبودند. گریوال و همکاران (1999) نیز در نتایج خود بیان کرده‌اند که EPNs مرده نفوذ *M. incognita* به ریشه را کاهش داد ولی افراد زنده کاهشی در آلودگی توسط این نماتد به وجود نیاوردند. مولینا و همکاران (2007) هم تاثیر لاروهای مرده نماتدهای انگل حشرات را وقتی که روی مخلوط تخم و لاروهای سن دوم نماتد گره ریشه استفاده گردید، در کاهش آلودگی نشان دادند. با توجه به تفاوتی که بین تاثیر لاروهای مرده و زنده گزارش گردیده است، می‌توان گفت که برهم‌کنش رفتاری مثل حرکت یا میزبان‌یابی یا پیام‌های شیمیایی خود نماتد انگل حشره باعث کاهش جمعیت نماتدهای انگل گیاهی نمی‌شود و نقش باکتری هم‌زیست نماتدهای انگل حشرات در این تاثیر غیرقابل انکار است.

تاثیر غلظت‌های مختلف لاروهای آلوده‌کننده زنده و مرده *H. bacteriophora* روی مرگومیر لاروهای سن دوم *M. javanica* در آزمایش مخلوط تخم و لارو نتایج مقایسه تاثیر لاروهای زنده و مرده *H. bacteriophora* بر مرگومیر لاروهای سن دوم نماتد گره ریشه در مخلوط تخم و لارو با آزمون آ-جفتی نشان داد بین لاروهای زنده و مرده *H. bacteriophora* در سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی‌دار وجود دارد. نتایج تجزیه واریانس تاثیر غلظت‌های مختلف لاروهای زنده و مرده *H. bacteriophora* روی مرگومیر لاروهای سن دوم *M. javanica* در چهار زمان در آزمایش مخلوط تخم و لارو در جدول 2 ارائه شده است. چنان‌که مشاهده می‌شود تاثیر غلظت و زمان به غیر از زمان مایه‌زنی لاروهای زنده *H. bacteriophora* روی مرگومیر لاروهای سن دوم *M. javanica* در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. بین غلظت‌های 25، 50 و 100 لاروهای زنده *H. bacteriophora* اختلاف معنی‌داری به دست نیامد. ولی هر سه غلظت با شاهد تفاوت معنی‌داری داشتند. هم‌چنین غلظت‌های پنج و 10 روی مرگومیر لاروهای نماتد گره ریشه تاثیری نداشته و با شاهد

وجود ندارد ولی لاروهای مرده این نماتد پس از 120 ساعت بیشترین مرگومیر را به همراه دارد.

تاثیر غلظت‌های مختلف لاروهای آلوده‌کننده زنده و مرده *H. bacteriophora* روی تفریخ تخم *M. javanica* در آزمایش مخلوط تخم و لارو

نتایج مقایسه تاثیر لاروهای نماتد بیمارگر حشرات به صورت زنده و مرده به روش آزمون t-جفتی نشان داد که زنده و مرده *H. bacteriophora* در بازدارندگی از تفریخ تخم تفاوت معنی‌داری با یکدیگر دارند.

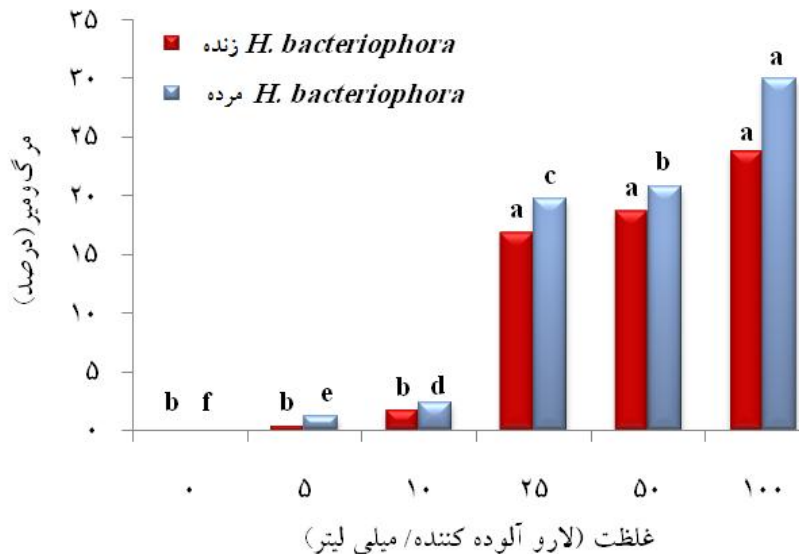
نتایج تجزیه واریانس آزمایش تاثیر نماتد بیمارگر حشرات (زنده و مرده) روی مخلوط تخم و لارو نماتد گر ریشه در قالب طرح کرت‌های خردشده در زمان در جدول 2 ارائه شده است. بین غلظت‌ها و زمان‌ها اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد مشاهده می‌شود.

نتایج مقایسه میانگین در چهار زمان نشان داد که تاثیر لاروهای زنده و مرده بیمارگر حشرات روی مرگومیر لاروهای سن دوم نماتد گر ریشه با گذشت زمان افزایش می‌یابد (شکل 6). اما در مورد لاروهای زنده *H. bacteriophora* بین زمان‌های 48، 72، 96 و 120 اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (شکل 6). براساس نتایج آزمایش مخلوط تخم و لارو می‌توان گفت که لاروهای زنده و مرده *H. bacteriophora* روی مرگومیر لارو سن دوم نماتد گر ریشه موثر هستند. تاثیر لاروهای زنده *H. bacteriophora* با غلظت 25، تفاوت معنی‌داری با غلظت‌های 50 و 100 آن نداشت. ولی *H. bacteriophora* مرده بیشترین تاثیر را در غلظت 100 بروز داد. این نتایج نشان می‌دهند که گونه فوق در حالت زنده با غلظت پایین‌تر تاثیری مشابه غلظت‌های بالاتر دارد. همچنین بررسی زمان روی مرگومیر نشان داد که در لاروهای زنده *H. bacteriophora* بین زمان‌ها اختلاف معنی‌داری

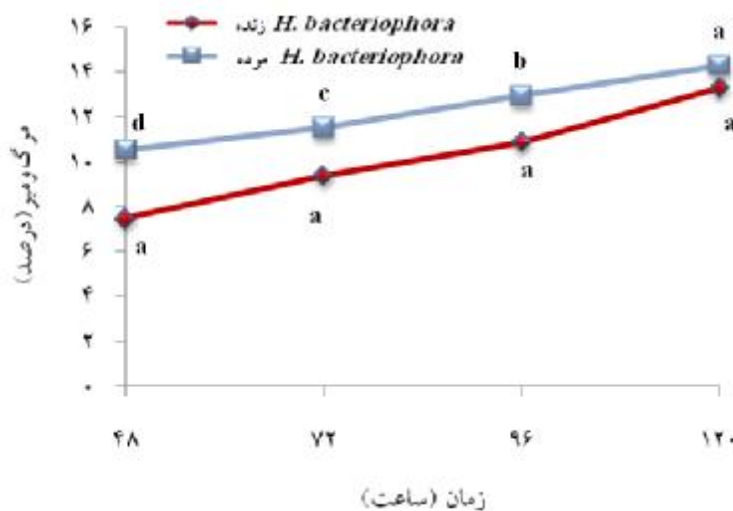
جدول 2 - تجزیه واریانس تاثیر غلظت و زمان مایه‌زنی لاروهای زنده و مرده *Heterorhabditis bacteriophora* در مرگومیر لاروهای سن دوم و تفریخ تخم *Meloidogyne javanica* در آزمایش مخلوط تخم و لارو

میانگین مربعات				درجه آزادی	منابع تغییر
تخم تفریخ نشده		مرگومیر لارو سن دوم			
<i>H. bacteriophora</i> زنده	<i>H. bacteriophora</i> مرده	<i>H. bacteriophora</i> زنده	<i>H. bacteriophora</i> مرده		
72/2 ^{ns}	0/24 ^{ns}	141/65 ^{ns}	0/1 ^{ns}	1	تکرار
321/49**	273/08**	916/88**	1307/6**	5	غلظت
7/11 ^{ns}	0/13 ^{ns}	32/96 ^{ns}	0/07 ^{ns}	5	خطای اصلی
109/99**	40/75**	71/84 ^{ns}	32/19**	3	زمان
13/02 ^{ns}	3/47**	25/12 ^{ns}	58/75**	15	زمان×غلظت
8/28	0/19	25/36	0/16	18	خطای فرعی
42/12	7/27	48/95	3/3		ضریب تغییرات (درصد)

ns و ** به ترتیب، غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد



شکل 5- تاثیر غلظت‌های مختلف لاروهای زنده و مرده *Heterorhabditis bacteriophora* در مرگ‌ومیر لاروهای سن دوم *Meloidogyne javanica* در آزمایش مخلوط تخم و لارو



شکل 6- تاثیر لاروهای زنده و مرده *Heterorhabditis bacteriophora* در زمان‌های مختلف در مرگ‌ومیر لاروهای سن دوم *Meloidogyne javanica* در آزمایش مخلوط تخم و لارو

بروز نداد، یعنی غلظت پنج لارو مرده *H. bacteriophora* تاثیری در بازماندگی از تفریح تخم نماتد گره ریشه نداشت (شکل 7). این امر بدیهی به نظر می‌رسد و افزایش غلظت تاثیر بهتری خواهد داشت.

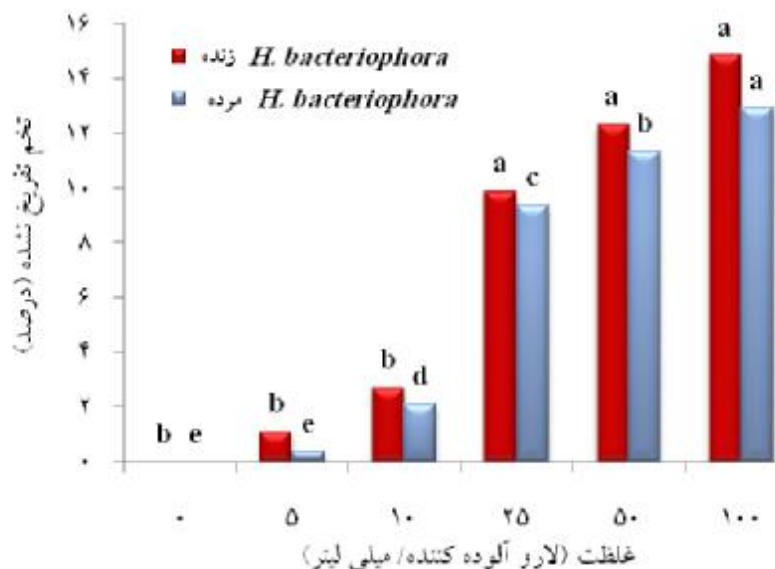
لاروهای زنده *H. bacteriophora* در سه غلظت 25، 50 و 100 نسبت به هم و همچنین دو غلظت پنج، 10 و شاهد با هم دیگر تفاوت معنی‌داری نداشتند. لاروهای مرده *H. bacteriophora* در غلظت پنج و شاهد تفاوت معنی‌داری

باشد و این مساله منجر به کاهش گال در گیاه نیز می‌شود.

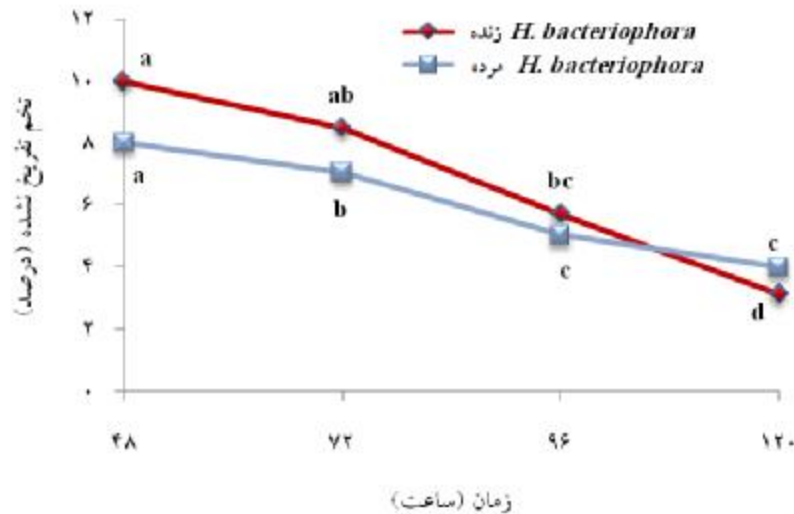
مقایسه داده‌های حاصل از مجموع بررسی‌های صورت گرفته در مورد بازدارندگی نماتدهای انگل حشرات روی نماتدهای انگل گیاهی با چالش زیادی روبه‌رو است زیرا روش‌های کاربرد، دفعات استفاده، مقدار دوز استفاده‌شده، گونه نماتد انگل حشرات و انگل گیاهی و چرخه زندگی آن‌ها، سامانه‌های کشت، نوع خاک و روش‌های اندازه‌گیری نتایج در تحقیق‌های انجام شده، متفاوت بوده است (لوپس و گریوال 2005).

با این حال، بررسی‌های آزمایشگاهی قبل از کاربرد این نماتدها در گلخانه یا مزرعه برای به‌دست آوردن غلظت موثر و نیز تفاوت در زنده یا مرده بودن نماتد انگل حشره روی نماتد انگل گیاهی هدف و زمان مفید موثر-بودن، ضروری می‌باشد.

نتایج هم‌چنین نشان دادند که *H. bacteriophora* مرده در سه زمان از چهار زمان مورد بررسی با یکدیگر تفاوت معنی‌داری دارند. کاربرد لاروهای زنده *H. bacteriophora* بین زمان‌های 48 و 72، 72 و 96 و 96 و 120 تفاوت معنی‌داری نشان نداد (شکل 8). غلظت 100 لارو مرده *H. bacteriophora* و غلظت‌های 50 و 100 لارو زنده *H. bacteriophora* بیش‌ترین بازدارندگی را در تفریخ تخم داشتند (شکل 7). در حالت زنده و مرده با گذشت زمان میزان تاثیر نماتدها در بازدارندگی از تفریخ تخم کاهش یافت. هرچند در مورد لاروهای مرده زمان-های 96 و 120 ساعت تفاوت معنی‌داری نداشتند. مولینا و همکاران (2007) نیز در زیست‌سنجی با مخلوط تخم و لارو سن دوم نماتد گره ریشه در مقایسه با زیست‌سنجی فقط روی لاروهای سن دوم این نماتد نشان دادند که اصلی‌ترین تاثیر ممکن است روی تخم



شکل 7- تاثیر غلظت‌های مختلف لاروهای زنده و مرده *Heterorhabditis bacteriophora* روی تفریخ تخم *Meloidogyne javanica* در آزمایش مخلوط تخم و لارو



شکل 8- تاثیر لاروهای زنده و مرده *Heterorhabditis bacteriophora* در زمان‌های مختلف روی تفریح تخم *Meloidogyne javanica* در آزمایش مخلوط تخم و لارو

کشنده و موجب مرگ و میر لاروهای سن دوم *M. incognita* شد (گریوال و همکاران 1999، هو و همکاران 1999 و شاپیرو و همکاران 2006). با عنایت به چندین گزارش مبنی بر بیشتر بودن تاثیر نماتدهای مرده نسبت به نماتدهای زنده (گریوال و همکاران 1999، جگدال و همکاران 2002، جگدال و گریوال 2008، خان و همکاران 2010)، می‌توان اظهار نمود که شاید محتوی لاشه مرده نماتدها، مواد تجزیه شده از لاشه و یا خود باکتری‌های هم‌زیست و در نهایت مواد حاصل از تجزیه باکتری‌ها توجیه‌کننده این تفاوت باشد. از این دست‌آوردها می‌توان در استفاده از نماتدهای بیمارگر حشرات مرده به منظور فائق آمدن بر مشکلات فرموله کردن، ذخیره و حمل و نقل در کاربرد زنده این نماتدها بهره برد.

به طور کلی، با توجه به آزمایش‌های قبلی و آزمایش حاضر می‌توان گفت نماتدهای بیمارگر حشرات در حالت زنده و مرده در مرگ و میر لاروهای سن دوم و بازدارندگی تفریح تخم *M. javanica* موثر می‌باشند و این تاثیر در مراحل مختلف زندگی نماتد بیمارگر گیاهی متفاوت است. دما، رفتار و فیزیولوژی گونه نماتد بیمارگر حشرات و بیمارگر گیاهی، در تاثیر نماتدهای بیمارگر حشرات روی نماتدهای بیمارگر گیاهی نقش

چنان‌که ق بلا زکر گردید، نتایج مطالعه‌های قبلی نشان می‌دهند که اثرات بازدارندگی نماتدهای بیمارگر حشرات، حداقل تا حدی به تولید مواد آلوشیمیایی و متابولیت‌های با ماهیت نماتدکشی که توسط باکتری‌های هم‌زیست این نماتدها تولید می‌شود، مرتبط است (گریوال و همکاران 1999، هو و همکاران 1999، سامالیف و همکاران 2000 و فریرا و همکاران 2011). این مواد آلوشیمیایی حتی با کشته شدن نماتد در اثر حرارت و یا لهیده شدن آن از بین نمی‌رود. بنابراین، تاثیر نماتدهای بیمارگر حشره به بر-هم‌کنش رفتاری دشمنان طبیعی و یا رقابت بین نماتدهای بیمارگر حشرات و نماتدهای بیمارگر گیاهی مربوط نیست و بیشتر متابولیتی می‌باشد (جگدال و گریوال 2008). باکتری‌های هم‌زیست نماتدها ترکیباتی از جمله لیپوپلی ساکارید تولید می‌کنند که برای نماتدهای بیمارگر گیاهی سمی هستند. هو و همکاران (1999) گزارش کردند که تولید متابولیت‌های ثانویه (3-5 دی هیدروکسی، 4-ایزوپروپول استیلین) با غلظت بالا در لاشه‌های آلوده به نماتد بیمارگر حشرات کاهش معنی-داری در تفریح تخم *M. incognita* دارند. هم‌چنین آمونیاک تولید شده توسط باکتری‌های هم‌زیست نماتدهای بیمارگر حشرات برای نماتدهای بیمارگر گیاهی

دارند. می‌توان از نماتدهای بیمارگر حشرات زنده و مرده به‌عنوان عامل کنترل زیستی در مقابل *M. javanica* در شرایط گلخانه‌ای و مزرعه‌ای بهره‌برد. برهم‌کنش نماتدهای بیمارگر حشرات و نماتدهای بیمارگر گیاهی، سازوکار ایجاد مرگ‌ومیر یا بازدارندگی تفریح و تفاوت تاثیر مرده و زنده نماتدهای بیمارگر حشرات می‌تواند زمینه تحقیقات در آینده باشد.

منابع

- Adams BJ and Nguyen KB, 2002. Taxonomy and systematics. pp.1-34 In: Gaugler, R. (ed.), Entomopathogenic nematology. New York. CABI.
- Bird A and Bird J, 1986. Observations on the use of insect parasitic nematodes as a means of biological control of root-knot nematodes. *International Journal for Parasitology* 10: 511-516.
- Gouge DH, Otto AA, Schirocki A and Hague NGM, 1994. Effects of steinernematids on the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Annals of Applied Biology* 124 (Suppl): 135-143.
- Fallon DJ, Kaya HK, Gaucier R and Sipes BS, 2002. Effect of entomopathogenic nematodes on *Meloidogyne javanica* on tomatoes and soybeans. *Journal of Nematology* 34: 239-245.
- Ferreira Tde F, Souza RM and Dolinski C, 2011. Assessing the influence of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis baujardi* LPP7 (Rhabditina) on embryogenesis and hatching of the plant-parasitic nematode *Meloidogyne mayaguensis* (Tylenchina). *Journal of Invertebrate Pathology* 107: 164-167.
- Forst S and Keneth N, 1996. Molecular biology of the symbiotic-pathogenic bacteria *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* spp. *American Society for Microbiology* 60: 21-43.
- Grewal PS, Lewis EE and Venkatachari S, 1999. Allelopathy: a possible mechanism of suppression of plant-parasitic nematodes by entomopathogenic nematodes. *Journal of Nematology* 1: 735-743.
- Grewal PS, Martin WR, Miller RW and Lewis EE, 1997. Suppression of plant-parasitic nematode populations in turfgrass by application of entomopathogenic nematodes. *Biocontrol Science and Technology* 7: 393-399.
- Hu KJ, Li J and Webster JM, 1999. Nematicidal metabolites produced by *Photorhabdus luminescens*, bacterial symbiont of entomopathogenic nematodes. *Nematology* 1: 457-469.
- Hunt DJ, 2007. Overview of taxonomy and systematics. Pp.27-57. In: Nguyen KB and Hunt DJ (eds.) Entomopathogenic nematodes: Systematic, phylogeny and bacterial symbionts. *Nematology Monographs and Perspectives Vol. 5*. Brill Leiden, The Netherlands.
- Ishibashi N and Choi DR, 1991. Biological control of soil pests by mixed application of entomopathogenic and fungivorous nematodes. *Journal of Nematology* 23: 175-181.
- Ishibashi N and Kondo E, 1986. *Steinernema feltiae* (DD-136) and *S. glaseri*: persistence in soil and bark compost and their influence on native nematodes. *Journal of Nematology* 18: 310-316.
- Ishibashi N and Kondo E, 1987. Dynamics of the entomogenous nematode *Steinernema feltiae* applied to soil with and without nematicide treatment. *Journal of Nematology* 19: 404-412.
- Jagdale GB, Somasekhar N and Grewal PS, 2002. Suppression of plant-parasitic nematodes by application of live and dead infective juveniles of an entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae*, on boxwood (*Buxus* spp.). *Biological Control* 24: 42-49.

- Jagdale GB and Grewal PS, 2008. Influence of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* infected host cadavers or their extract on the foliar nematode *Aphelenchoides fragariae* on *Hosta* in the greenhouse and laboratory. *Biological Control* 44: 13-23.
- Khan SA, Javed N, Kamran M and Atif HM, 2010. Suppression of *Meloidogyne incognita* by live and dead entomopathogenic nematodes in tomato. *Pakistan Journal of Nematology* 28: 135-141.
- Lewis EE and Grewal PS, 2005. Interactions with plant parasitic nematodes. Pp. 349-360 In: Grewal PS, Ehlers RU and Shapiro-Ilan DI (eds.) *Nematodes as biocontrol agents*. CABI Publishing.
- Lewis EE, Grewal PS and Sardanelli S, 2001. Interaction between *Steinernema feltiae* – *Xenorhabdus bovienii* insect pathogen complex and root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Biological Control* 21:55-62.
- Molina JP, Dolinski C, Souza RM and Lewis EE, 2007. Effect of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) on *Meloidogyne mayaguensis* Rammah and Hirschmann (Tylenchida: Meloidogynidae) infection in tomato plants. *Journal of Nematology* 39: 338-342.
- Nyczepir AP, Shapiro-Ilan DL, Lewis LL and Hando ZA, 2004. Effect of entomopathogenic nematodes on *Mesocriconema xenoplax* populations in peach and pecan. *Journal of Nematology* 36:181-185.
- Perez EE and Lewis EE, 2004. Suppression of *Meloidogyne incognita* and *Meloidogyne hapla* with entomopathogenic nematodes on greenhouse peanuts and tomatoes. *Biological Control* 30: 336-341.
- Perez EE and Lewis EE, 2002. Use of entomopathogenic nematodes to suppress *Meloidogyne incognita* on greenhouse tomatoes. *Journal of Nematology* 34:171–174.
- Perry RN, Hominick WM, Beane J and Briscoe B, 1998. Effect of entomopathogenic nematodes, *Steinernema feltiae* and *S. carpocapsae*, on the potato cyst nematode, *Globodera rostochiensis*, in pot trials. *Biocontrol Science and Technology* 8:175–180.
- Samaliev Hy, Andreoglou FI, Elawad SA, Hague NGM and Gowen SR, 2000. The nematicidal effect of the bacteria *Pseudomonas oryzihabitans* and *Xenorhabdus nematophilus* on the *Meloidogyne javanica*. *Journal of Nematology* 2: 507-514.
- Shapiro-Ilan DI, Nyczepir AP and Lewis EE, 2006. Entomopathogenic nematodes and bacteria applications for control of the pecan root-knot nematode, *Meloidogyne pratityla*, in the greenhouse. *Journal of Nematology* 38: 445-449.
- Smitley DR, Wander FW, and Bird GW, 1992. Influence of irrigation and *Heterorhabditis bacteriophora* on plant-parasitic nematodes in turf. *Journal of Nematology* 24: 637-641.
- White G F, 1927. A method for obtaining infective nematode larvae. *Science* 66: 302-303.
- Woodring JL, Kaya HK, 1988. Steinernematid and heterorhabditid nematodes: A handbook of biology and techniques. Southern Cooperative Series Bulletin 331. Arkansas Agricultural Experiment Station, Fayetteville, Arkansas Pp. 1-39.

Efficacy of Entomopathogenic Nematode *Heterorhabditis bacteriophora* as Biological Control of Root Knot Nematode *Meloidogyne javanica* Under Laboratory Conditions

R Ghaffarpour Teimurloii¹, G Niknam*² and M Toorchi³

¹Former MSc. Student of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

²Associate Professor, Dept of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

³Professor, Dept of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

*Corresponding Author: g_niknam@tabrizu.ac.ir

Received: 24 Feb 2013

Accepted: 15 Sep 2013

Abstract

Antagonism of entomopathogenic nematodes (EPNs) on plant – parasitic nematodes (PPNs) has gained interest over the recent years. Therefore, the efficacy of live and dead infective juveniles of entomopathogenic nematode, *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar with concentrations of 5, 10, 25, 50 and 100 IJs/ml in 24 well plates was evaluated on egg hatching inhibition and second stage juveniles (J2) mortality of the root knot nematode *Meloidogyne javanica* Treub in concentrations of 50 eggs, 50 larvae and a combination of 50 eggs and larvae. The experimental design was split plot with six treatments and four replications. The whole experiments were replicated twice. The data recorded after 48, 72, 96 and 120 hours showed that both live and dead entomopathogenic nematodes have significant difference on root knot second stage juveniles (J2) mortality and egg hatching inhibition. The highest mortality was achieved in 100 IJs/ml and after 120 hours and the most inhibition of hatching in concentration of 100 IJs/ml and after 48 hours. Concerning the mixture of 50 eggs and larvae, the results indicated that the effect of live juveniles of *H. bacteriophora* on second stage juveniles (J2) mortality have no significant difference among the various time treatments.

Keywords: Entomopathogenic nematodes, Root knot nematode, *Heterorhabditis bacteriophora*, *Meloidogyne javanica*