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

رحیمه غفارپور تیمورلویی[1]، غلامرضا نیکنام[2*] و محمود تورچی[3]

[1] دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیماری شناسی‌گیاهی، 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 دریافت: 91/12/06 تاریخ پذیرش: 92/06/24

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* Poinar در غلظت‌های 5، 10، 25، 50 و 100 لارو در هر میلی‌لیتر را به‌طور جداگانه و در ظرف‌های 24 چاهکی روی مرگ ومیر لارو وتفریخ 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 و120 ساعت نشان داد که تاثیر لارو زنده یا مرده نماتد بیمارگر حشرات در مرگ‌ومیر لاروهای سن دوم و تفریخ تخم نماتد گره ریشه معنی‌دار است. بیش‌ترین مرگ‌ومیر در غلظت100 لارو آلوده‌کننده در هر میلی‌لیتر و در 120ساعت و بیش‌ترین بازدارندگی از تفریخ 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

نماتدهای بیمارگر حشرات متعلق به دو جنس *Steinernema* و *Heterorhabditis* از مؤثرترین ومفیدترین عوامل کنترل زیستی حشرات می‌باشند (لویس و گریوال 2005). این نماتدها به‌ترتیب با باکتری‌های *Xenorhabdus* و*Photorhabdus*، هم‌زیستی اجباری دارند و باکتری‌ها به‌وسیله نماتدها به‌داخل هموسل حشره حمل می‌شوند (فورست و کنت 1996، لویس 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*

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 2005و فریرا و همکاران 2011).

چرخه‌های زندگی نماتدهای انگل حشرات (*Steinernema* و*Heterorhabditis*) 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 این‌حال چندین بررسی به تاثیر این نماتدها روی نماتدهای گره ریشه اختصاص یافته است (گریوال و همکاران 1999، فالون و همکاران2002، پرز و لویس 2002 و2004، مولینا و همکاران 2007، خان و همکاران 2010و فریرا و همکاران 2011).

نفوذ نماتد *Meloidogyne javanica* به گیاه درشرایط آزمایشگاه و گلخانه توسط *Steinernema feltiae*، *S. riobravae* و *Heterorhabditis indica* کاهش یافت (فالون و همکاران 2002). فریرا و همکاران (2011) تاثیرLPP7 *Heterorhabditis baujardi* روی نشوونمای جنین و لاروهای سن دوم تفریخ‌نشده *Meloidogyne javanica* را بررسی و نشان دادند که *H. baujardi* LPP7 روی جنین‌زایی تاثیری نداشته ولی تفریخ لاروهای سن دوم را به‌تاخیر می‌اندازد. درباره نماتدهای دیگر،اسمیت-لی و همکاران (1992) نشان دادند که *Heterorhabditis bacteriophora* جمعیت *Tylenchorhynchus* spp. و *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 تفریخ 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 30-20 سانتی‌متری خاک‌های باغ‌های اطراف گوگان، سردرود و باسمنج در استان آذربایجان‌شرقی 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 روزاز 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 سوپراسترین‌ب 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 تفریخ، تخم‌ها در

آب استریل و داخل انکوباتور با دمای 1±28 درجه سانتی‌گراد نگه‌داری گردیدند. لاروهای سن دوم تفریخ‌شده 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 و100 لارو در هر میلی‌لیتر آب مقطر استریل و نماتد گره ریشه در غلظت‌های 50 تخم، 50 لارو و 50 لارو وتخم 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 به‌مدت 25 دقیقه قرار داده شدند تا کشته شوند (جگدال و گریوال 2008).

بعداز 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 به‌عنوان مرده محسوب می‌گردید.

تجزیه آماری داده‌ها بعد از تصحیح با فرمول آبوت[1]، با استفاده از نرم‌افزار SAS و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن، t-جفتی و t-ستیودنت انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج تاثیرغلظت‌های مختلف لاروهای آلوده‌کننده زنده ومرده نماتد بیمارگر حشرات روی تفریخ تخم و مرگ‌ومیر لاروهای سن دوم *M. javanica* در چهار زمان در آزمایشگاه به‌شرح زیر به‌دست آمد.

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

نتایج مقایسه تاثیر لاروهای زنده ومرده *H. bacteriophora* روی مرگ‌ومیرلاروهای سن دوم *M. javanica* باآزمونt-جفتی نشان‌داد که در هر دو حالت زنده ومرده بین تیمارهای مختلف از نظر تاثیر لاروهای آلوده‌کننده نماتد روی مرگ‌ومیر لاروهای سن دوم *M. javanica* درسطح احتمال یک‌درصد تفاوت معنی‌داری وجود دارد.

نتایج تجزیه واریانس آزمایش تاثیرلاروهای آلوده‌کننده زنده ومرده نماتد بیمارگرحشرات روی مرگ‌ومیر لاروهای سن دوم *M. Javanica* درجدول1 ارائه شده است.

لاروهای زنده ومرده *H. bacteriophora* درغلظت‌های 100 و پنج لارو آلوده‌کننده در میلی‌لیتر به ترتیب بیش-ترین 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 ومرده درزمان‌های مختلف روی مرگ‌ومیر لاروهای سن دوم *M. javanica* نیزنشان داد که با افزایش زمان، مرگ‌ومیر لاروها

[1]Abbott's formula

افـزایش مـی‌یابـد (شـکل 2). درمـورد لاروهـای مـرده *H.bacteriophora* بین 48 و 72 ساعت تفـاوت معنـی‌داری وجود نداشت. کم‌ترین و بیش‌ترین مرگ‌ومیر بـه ترتیـب در 48 و 120 سـاعت بعـد از مایـه‌زنـی رخ داد (شـکل2). جگدال و گریوال (2008) گزارش نمودند کـه متناسـب بـا افزایش غلظت لاروهای مرده، مرگ‌ومیر *Aphelenchoides fragariae* چهـــار و هشـــت روز بعـــد از تیمـــار بـــا *Steinernema carpocapsae* بـه‌طـور معنـی‌داری افـزایش یافت. آن‌ها هم‌چنین مشاهده نمودند کـه دوزهـای خیلـی بالاتر (10000 و 100000 لارو آلوده‌کننده در هر چاهک) در مدت زمان کـم‌تـری بعـد از تیمـار باعـث مـرگ‌ومیـر بیش‌تری نسبت به شاهد گردیدند.

برای علت مرگ‌ومیر لاروهای نماتـدهای انگـل گیـاهی در اثر کاربرد نماتدهای انگل حشرات، توجیه‌های مختلفی ارائه شده است و احتمال دارد که بیش از یـک سـازوکار در این تاثیر دخیل باشد. گریوال و همکاران (1999)، هیو و همکـاران (1999) و جگـدال و همکـاران (2002) مـواد اللوکمیکال 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 نفـوذ *M. javanica* مشاهده نموده و اظهار کردند که کاربرد این نماتدها باعث ممانعت درازمـدت از تولیـدمثل نماتـد گـره ریشه نمی‌شود.

تاثیر لاروهای آلوده‌کننـده زنـده ومـرده *H. bacteriophora* روی تفریخ تخم *M. javanica*

نتایج آزمایش با لاروهای زنده و مرده *H. bacteriophora* در بازدارندگی از تفریخ تخم *M. javanica* بـا آزمـونt-- جفتی نشـان داد کـه تفـاوت معنـی‌داری بـین اسـتفاده از لاروهای زنده و مرده *H. bacteriophora* وجود نـدارد. بـا این حال، درحالت مرده تاثیرروی بازدارنـدگی از تفـریخ تخم ازنظرعددی بیش‌تر بود. یافته‌های مولینا و همکاران (2007) و نیز لویس و همکاران (2001) نشـان دادنـد کـه تفریخ تخم و تعداد گال در نماتد گره ریشـه تحـت تـاثیر EPNs کاهش معنی‌داری پیدا می‌کند و آن‌ها احتمال دادنـد که مواد مقـاوم بـه حـرارت در بـاکتری‌هـای هـم‌زیسـت نماتدهای انگل حشـرات مثـل توکسـین‌هـا و یـا ترکیبـات حاصل از نماتد انگل حشرات بازدارنده تفریخ تخـم مـی-باشند.

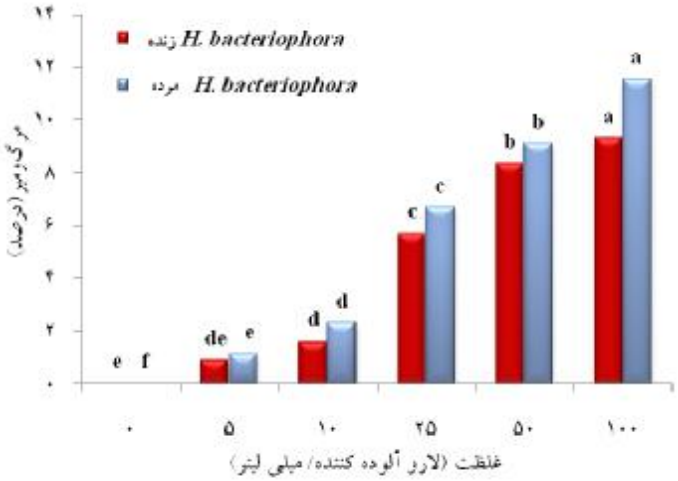
نتایج تجزیه واریانس تاثیرغلظت وزمـان مایـه‌زنـی لاروهای زنـده ومـرده *H. bacteriophora* در بازدارنـدگی ازتفـریخ تخـم *M. javanica* درجـدول 1 نشـانداده شـده است.

نتایج حاکی از آن است که در حالت زنده، همه غلظت‌های *H. bacteriophora* و در حالت مرده، غلظت بیش‌تـر از 10 به‌طور معنی‌داری موجب بازدارندگی تفـریخ تخـم نماتـد گره ریشه شـدند. درهردوحالت زنده ومرده بیـش‌تـرین تاثیر در غلظـت100 و کم‌ترین تاثیر در غلظت پنج یـا 10 مشاهده شد (شکل3). فریرا و همکـاران (2011) گـزارش کـرده‌انـد کـه متابولیـت‌هـای LPP7 *H. baujardi* و *P. luminescens* منجر به کاهش مقاومـت تخـم و تـاخیر در تفریخ تخـم *Meloidogyne mayaguensis* گردیدنـد ولـی در جنین‌زایی تاثیری نداشتند.

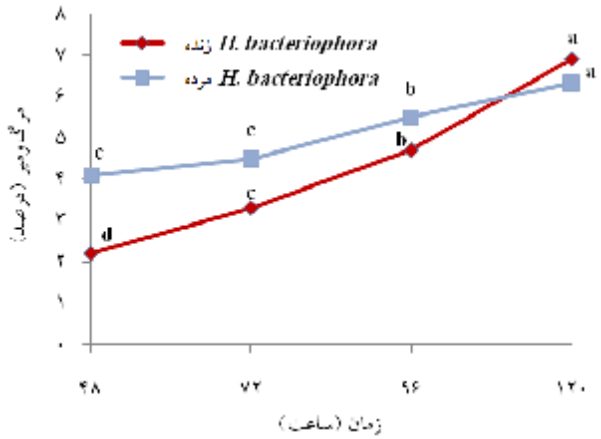
جدول 1- تجزیه واریانس تاثیرغلظت و زمان مایه‌زنی لاروهای زنده و مرده *Heterorhabditis bacteriophora* درمرگ‌ومیر لاروهای سن دوم وتفریخ تخم *Meloidogyne javanica*

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

Ns و**به‌ترتیب، غیرمعنی‌دار و معنی‌دار درسطح احتمال یک درصد

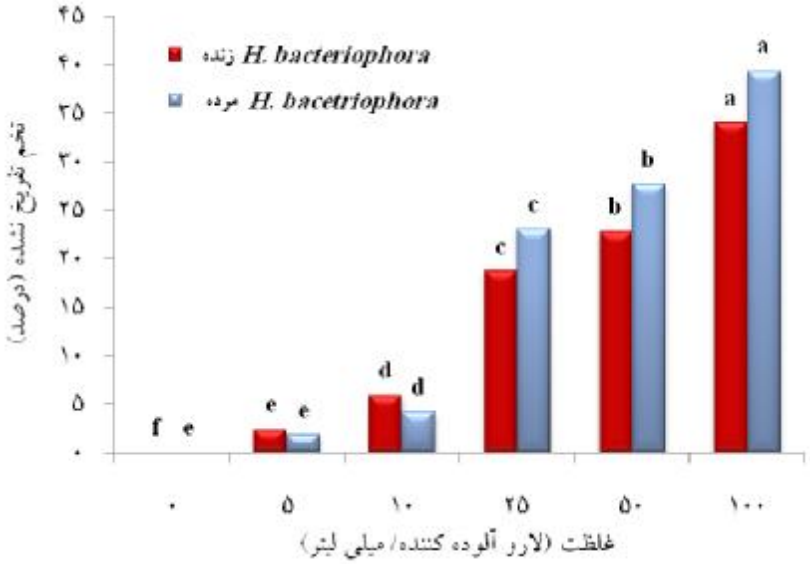


شکل1- تاثیر غلظت‌های مختلف لاروهای زنده و مرده *Heterorhabditis bacteriophora* در مرگ و میر لاروهای سن دوم *Meloidogyne javanica*

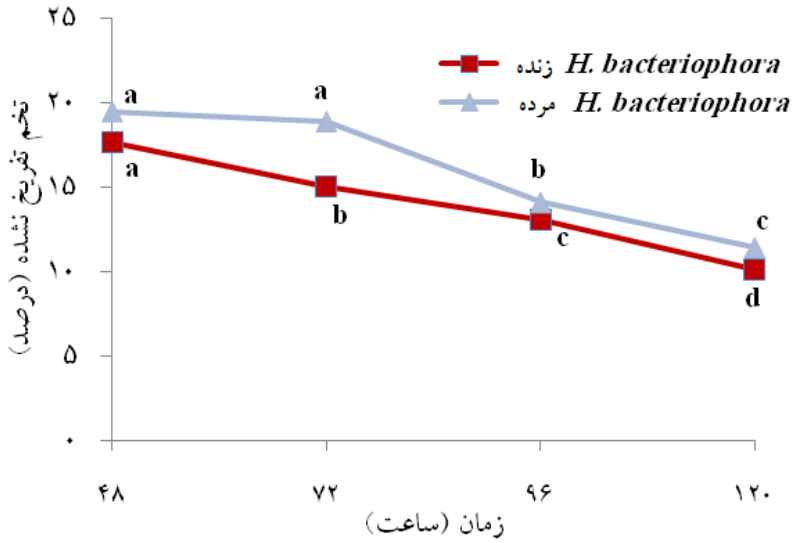


شکل 2- تاثیر لاروهای زنده و مرده ***Heterorhabditis bacteriophora*** در زمان‌های مختلف در مرگ‌ومیر لاروهای سن دوم ***Meloidogyne javanica***

نتایج تاثیر لاروهای زنده و مرده نماتد بیمارگر حشرات در زمان‌های مختلف روی تفریخ تخم *M. javanica* نشان داد که بین زمان‌های مختلف، تفاوت معنی‌داری وجود دارد و با افزایش زمان، تفریخ تخم نیز افزایش یافته است (شکل 4). بازدارندگی تفریخ تخم نماتد گره ریشه با گذشت زمان کاهش یافت به‌طوری‌که بیش‌ترین بازدارندگی تفریخ تخم بعد از 48 ساعت و کم‌ترین بازدارندگی بعد از 120 ساعت رخ داد. در مورد لاروهای مرده *H. bacteriophora* بین زمان‌های 48 و 72 ساعت تفاوت معنی‌داری نبود و بعد از 72 ساعت افزایش قابل ملاحظه‌ای در تفریخ تخم مشاهده شد (شکل 4). احتمال می‌رود مواد موثر در بازدارندگی تفریخ تخم متناسب با گذر زمان کارایی خود را از دست می‌دهند. در طبیعت نیز عوامل زنده و غیرزنده ممکن است روی مواد محرک تفریخ تاثیر گذاشته و رفته‌رفته چه از نظر زمانی و چه از نظر مکانی اثر ترکیبات را به حداقل برسانند.



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



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

تاثیرغلظت‌های مختلف لاروهای آلوده‌کننده زنده و مرده *H. bacteriophora* روی مرگ‌ومیر لاروهای سن دوم *M. javanica* درآزمایش مخلوط تخم و لارو

نتایج مقایسه تاثیرلاروهای زنده ومرده *H. bacteriophora* بر مرگ‌ومیر لاروهای سن دوم نماتد گره ریشه در مخلوط تخم و لارو با آزمونt–جفتی نشان داد بین لاروهای زنده ومرده *H. bacteriophora* در سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی‌دار وجود دارد.

نتایج تجزیه واریانس تاثیر غلظت‌های مختلف لاروهای زنده ومرده *H. bacteriophora* روی مرگ‌ومیر لاروهای سن دوم *M. javanica* در چهار زمان در آزمایش مخلوط تخم ولارو درجدول2 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 به‌دست نیامد. ولی هر سه غلظت با شاهد تفاوت معنی-داری داشتند. هم‌چنین غلظت‌های پنج و 10 روی مرگ-ومیر لاروهای نماتد گره ریشه تاثیری نداشته و با شاهد تفاوتی نشان ندادند (شکل5). 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 جگدال 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 وقتی‌که 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.

نتایج مقایسه میانگین در چهار زمان نشان داد که تاثیر لاروهای زنده و مرده بیمارگر حشرات روی مرگ‌ومیر لاروهای سن دوم نماتد گره 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 (شکل6). براساس نتایج آزمایش مخلوط تخم و لارو می‌توان گفت که لاروهای زنده و مرده *H. bacteriophora* روی مرگ‌ومیر لارو سن دوم نماتد گره ریشه موثر هستند. تاثیر لاروهای زنده *H. bacteriophora* با غلظت 25، تفاوت معنی‌داری با غلظت-های 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 وجود ندارد ولی لاروهای مرده این نماتد پس از120 ساعت بیش‌ترین مرگ‌ومیر را به همراه دارد.

تاثیر غلظت‌های مختلف لاروهای آلوده‌کننده زنده ومرده *H. bacteriophora* روی تفریخ تخم *M. javanica* درآزمایش مخلوط تخم و لارو

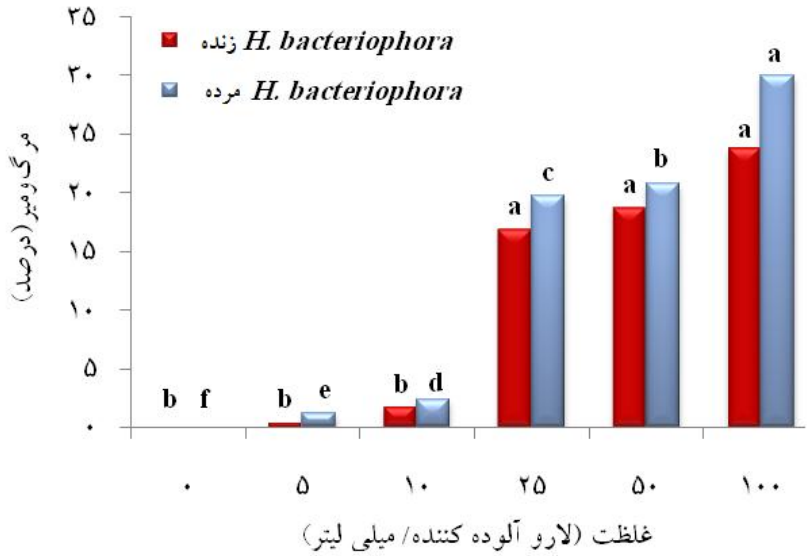
نتایج مقایسه تاثیر لاروهای نماتد بیمارگر حشرات به صورت زنده و مرده به‌روش آزمونt–جفتی نشان داد که زنده و مرده *H. bacteriophora* در بازدارندگی از تفریخ تخم تفاوت معنی‌داری با یکدیگر دارند.

نتایج تجزیه واریانس آزمایش تاثیرنماتد بیمارگرحشرات (زنده ومرده) روی مخلوط تخم و لارو نماتد گره ریشه درقالب طرح کرت‌های خردشده درزمان درجدول2 ارائه شده است. بین غلظت‌ها و زمان‌ها اختلاف معنی‌داری درسطح احتمال یک‌درصد مشاهده می‌شود.

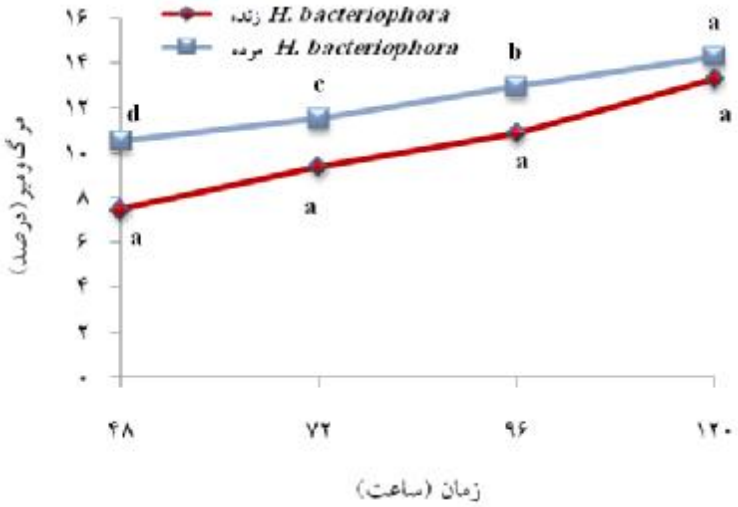
جدول 2 - تجزیه واریانس تاثیر غلظت و زمان مایه‌زنی لاروهای زنده و مرده *Heterorhabditis bacteriophora* در مرگ‌ومیر لاروهای سن دوم و تفریخ تخم *Meloidogyne javanica* در آزمایش مخلوط تخم و لارو

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

ns و**به‌ترتیب، غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد



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



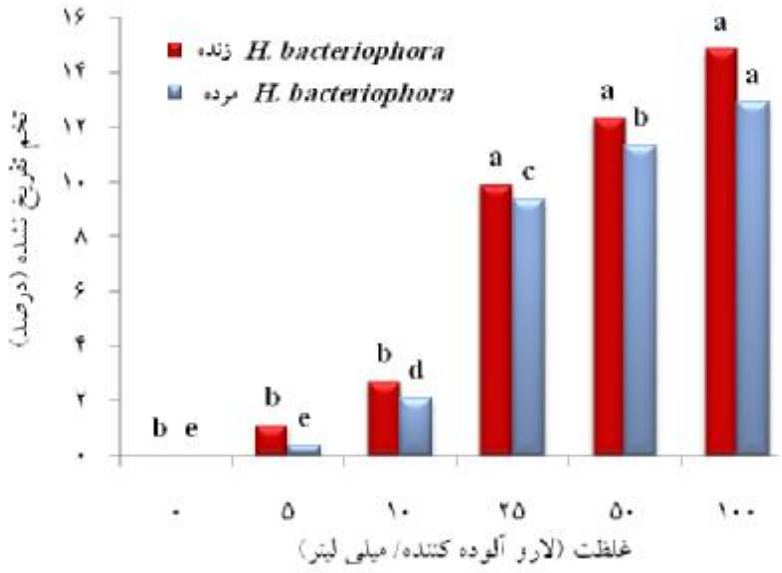
شکل 6- تاثیر لاروهای زنده ومرده ***Heterorhabditis bacteriophora*** در زمان‌های مختلف در مرگ‌ومیر لاروهای سن دوم ***Meloidogyne javanica*** در آزمایش مخلوط تخم و لارو

لاروهای زنده *H. bacteriophora* در سه غلظت 25،50 و 100 نسبت به‌هم و هم‌چنین دو غلظت پنج، 10 و شاهد با هم‌دیگر تفاوت معنی‌داری نداشتند. لاروهای مرده *H. bacteriophora* در غلظت پنج و شاهد تفاوت معنی‌داری بروز نداد، یعنی غلظت پنج لارو مرده *H. bacteriophora* تاثیری در بازدانگی از تفریخ تخم نماتد گره ریشه نداشت (شکل 7). این امر بدیهی به‌نظر می‌رسد و افزایش غلظت تاثیر بهتری خواهد داشت.

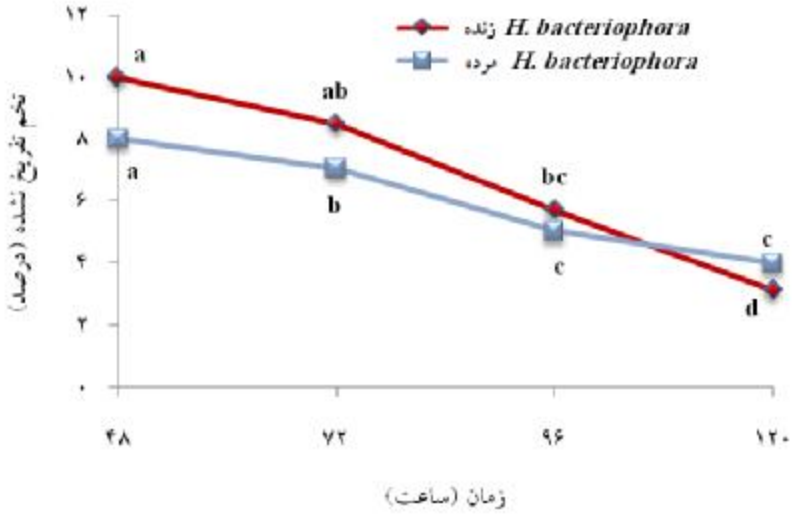
نتایج هم‌چنین نشان دادند که*H. bacteriophora* مرده در سه زمان از چهار زمان مورد بررسی با یک‌دیگر تفاوت معنی‌داری دارند. کاربرد لاروهای زنده *H. bacteriophora* بین زمان‌های 48 و 72، 72 و 96 و 96 و 120 تفاوت معنی‌داری نشان نداد (شکل 8). غلظت 100 لارو مرده *H. bacteriophora* و غلظت‌های 50 و 100 لارو زنده *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 زمان‌های 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 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 (لویس و گریوال2005).

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



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 تفریخ تخم *Meloidogyne javanica* در آزمایش مخلوط تخم و لارو

چنان‌که ق بلا ذکر گردید، نتایج مطالعه‌های قبلی نشان می‌دهند که اثرات بازدارندگی نماتدهای بیمارگرحشرات، حداقل تا حدی به تولید مواد آللوشیمیایی و متابولیت‌های با ماهیت نماتدکشی که توسط باکتری‌های هم‌زیست این نماتدها تولید می‌شود، مرتبط است (گریوال و همکاران 1999، هو و همکاران 1999، ساماليف و همکاران 2000و فریرا و همکاران 2011). این مواد آللوشیمیایی حتی با کشته‌شدن نماتد در اثر حرارت و یا لهیده‌شدن 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 لیپوپلی‌ساکارید 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 استیلبین) با غلظت بالا در لاشه‌های آلوده به نماتد بیمارگر حشرات کاهش معنی-داری در تفریخ تخم *M. incognita* دارند. هم‌چنین آمونیاک تولیدشده توسط باکتری‌های هم‌زیست نماتدهای بیمارگر حشرات برای نماتدهای بیمارگر گیاهی کشنده و موجب مرگ‌ومیر لاروهای سن دوم *M. incognita* شد (گریوال و همکاران 1999، هو و همکاران 1999 و شاپیرو و همکاران2006). با عنایت به چندین گزارش مبنی بر بیشتربودن تاثیر نماتدهای مرده نسبت به نماتدهای زنده (گریوال و همکاران 1999، جگدال وهمکاران 2002، جگدال و گریوال 2008، خان و همکاران،2010)، می‌توان اظهار نمود که شاید محتوی لاشه مرده نماتدها، مواد تجزیه‌شده 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 به‌منظور فائق‌آمدن بر مشکلات فرموله‌کردن، ذخیره و حمل‌ونقل در کاربرد زنده این نماتدها بهره برد.

به‌طور کلی، با توجه به آزمایش‌های قبلی و آزمایش حاضر می‌توان گفت نماتدهای بیمارگر حشرات در حالت زنده و مرده در مرگ‌ومیر لاروهای سن دوم و بازدارندگی تفریخ تخم *M. javanica* موثرمی‌باشند و این تاثیر درمراحل 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

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

منابع

Adams BJ and Nguyen KB, 2002. Toxonomy and systematyics.pp.1-34In: Gaugler, R. (ed.), Entomopathogenic nematology. New York. CABI.

BirdA 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 *Meloidogynejavanica*. Annals of Applied Biology 124 (Suppl): 135-143.

Fallon DJ, Kaya HK, Gaucler 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 (Rhabiditina) 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 Microbiology60: 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, LiJ and Webster JM, 1999. Nematicidal metabolites produced by *Photorhabdus luminescens,* bacterial symbiont of entomopathogenic nematodes. Nematology1: 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 ChoiDR, 1991. Biological control of soil pests by mixed application of entomopathogenic and fungivorous nematodes. Journal of Nematology 23: 175-181.

IshibashiN 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 GrewalPS, 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 Control24: 42-49.

Jagdale GB andGrewal 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 *Meloidogyneincognita* 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*.Incognita. Biological Control 21:55-62.

MolinaJP, Dolinski C, Souza RM and Lewis EE, 2007. Effect of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhaditidae) on *Meloidogyne mayaguensis* Rammah and Hirschemann (Tylenchida: Meloidogynidae) infection in tomato plants. Journal of Nematology39: 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, HagueNGM 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.

SmitleyDR, Wander FW, and BirdGW, 1992. Influence of irrigation and *Heterorahbditis bacteriophora* on plant–parasitic nematodes in truf. Journal of Nematology 24: 637-641.

White G F, 1927. A method for obtaining infective nematode larvae.Science 66: 302-303.

WoodringJL, 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* asBiological Control of Root Knot Nematode *Meloidogyne javanica*Under Laboratory Conditions

R Ghaffarpoor Teimurloii[1], G Niknam*[2] and M Toorchi[3]

[1]Former MSc. Student of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[2]Associate Professor, Dept of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[3]Professor, 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* Poinarwith 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*