تأثیر لاروهای آلوده‌کننده زنده و مرده نماتود بیمارگر حشرات، *Steinernema feltiae*، روی لارو و تخم نماتود ریشه‌گرهی *Meloidogyne javanica* *

EFFECTS OF LIVE AND DEAD INFECTIVE LARVAE OF ENTOMOPATHOGENIC NEMATODE, *Steinernema feltiae* ON SECOND STAGE JUVENILES AND EGGS OF ROOT-KNOT NEMATODE *Meloidogyne javanica*

رحیمه غفارپور تیمورلویی[۱]، غلامرضا نیکنام[۱]** و محمود تورچی[۲]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۸/۱۵؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۶/۲۲)

چکیده

نماتودهای بیمارگر حشرات به عنوان عوامل کنترل زیستی حشرات شناخته شده‌اند ولی در سال‌های اخیر تأثیر آنها بر روی نماتودهای بیمارگر گیاهی نیز مورد بررسی قرار گرفته است. در این تحقیق تأثیر لاروهای آلوده‌کننده گونه *Steinernema feltiae* به دو صورت زنده و مرده در غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ لارو در هر میلی‌لیتر، به طور جداگانه و در ظرف‌های ۲۴ چاهکی علیه نماتود ریشه‌گرهی *Meloidogyne javanica* در غلظت‌های ۵۰ تخم، ۵۰ لارو و مخلوط ۵۰ تخم و لارو به ازای هر چاهک، مورد مطالعه قرار گرفت. آزمایش در قالب طرح کرت‌های خردشده در زمان انجام و یادداشت‌برداری داده‌ها بعد از ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت صورت گرفت. آزمایش در دو نوبت تکرار گردید. نتایج نشان داد که زنده یا مرده بودن لارو این نماتود بیمارگر حشرات از نظر تأثیر روی مرگ‌ومیر لاروهای سن دوم و تفریخ تخم نماتود ریشه‌گرهی تفاوت معنی‌داری دارند. ولی در تأثیر روی مرگ‌ومیر لاروهای سن دوم و تفریخ تخم در حالت مخلوط ۵۰ تخم و لارو نماتود ریشه‌گرهی، تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید. لاروهای زنده و مرده به ترتیب باعث حدود ۳۸ و ۳۲ درصد مرگ‌ومیر لاروهای سن دوم نماتود ریشه‌گرهی شده و ۳۳ و ۳۷ درصد بازدارندگی از تفریخ تخم نشان دادند. در آزمایش مخلوط تخم و لارو سن دوم هم، لاروهای زنده و مرده نماتود بیمارگر حشرات به ترتیب موجب ۳۱ و ۳۳ درصد مرگ‌ومیر لاروهای سن دوم نماتود ریشه‌گرهی و ۳۳ و ۳۴ درصد ممانعت از تفریخ گردید. به طور کلی، میزان مرگ‌ومیر لاروهای سن دوم نماتود ریشه گرهی و تفریخ تخم متناسب با افزایش زمان در تیمارها به ترتیب افزایش و کاهش نشان داد.

واژه‌های کلیدی: کنترل زیستی، نماتود علیه نماتود

---

*: بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول، ارائه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

**: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: g_niknam@tabrizu.ac.ir

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
۲. استاد به نژادی و بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

مقدمه

به طور معمول برای کنترل نماتودهای ریشه‌گرهی از تناوب زراعی، ارقام مقاوم و مواد شیمیایی استفاده می‌گردد. روش‌های دیگری مثل استفاده از دشمنان طبیعی و ترکیبات زیستی شامل عصاره گونه‌های گیاهی با ویژگی نماتودکشی (Chitwood 2002)، تولیدات میکروبی (Abuzar & Akhtar 2010) و نماتودهای بیمارگر حشرات (Ishibashi & Kondo 1986) به عنوان راه‌های کاهش مصرف ترکیبات شیمیایی نماتودکش علیه این نماتودها به‌کار می‌روند.

دو جنس *Steinernema* و *Heterorhabditis* به عنوان نماتودهای بیمارگر حشرات، دارای گونه‌های متعددی هستند که در سراسر جهان برای کنترل حشرات مورد مطالعه قرار گرفته و استفاده می‌شوند. گرایش زیاد به این دو جنس از نماتودهای بیمارگر حشرات منعکس‌کننده توان بالای کنترل زیستی و سهولت پرورش و امکان تولید انبوه آنهاست (Lewis & Grewal 2005).

رابطه آنتاگونیستی نماتودهای بیمارگر حشرات روی نماتودهای بیمارگر گیاهی اولین بار در سال ۱۹۸۶ مورد مطالعه قرار گرفت. بیشتر مطالعه‌های گلخانه‌ای، رابطه آنتاگونیستی بین نماتودهای بیمارگر حشرات و گونه‌های *Meloidogyne javanica* Treub, 1885 و *M. incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949 و یا هر دو را بررسی کرده‌اند (Lewis & Grewal 2005 و Bird & Bird 1986). بیرد و بیرد (Bird & Bird 1986) اولین محققانی بودند که با کاربرد *Steinernema glaseri* (Steiner, 1929) در کشت گلخانه‌ای گوجه‌فرنگی، بازدارندگی آن را روی *M. javanica* نشان دادند. مقادیر کاربرد *S. glaseri* در این مطالعه خیلی زیاد بود. در آزمایش اول، *S. glaseri* با غلظت ۲×۱۰^{۵} لارو آلوده‌کننده به ازای هر گیاه به صورت روزانه در پنج روز به‌کار برده شد که منجر به کاهش ۲/۵ برابری در تعداد توده تخم *M. javanica* به ازای هر گیاه گردید. در آزمایش دوم که *S. glaseri* با غلظت ۵×۱۰^{۶} لارو آلوده‌کننده به ازای هر گیاه مورد استفاده قرار گرفت، توده‌های تخم *M. javanica* به ازای هر گرم ریشه شش برابر کاهش یافت و هم‌چنین وزن تر شاخسار و ریشه‌ها به‌طور معنی‌داری افزایش نشان دادند. در مطالعه هم‌زمان دیگری، *ایشیباشی و کندو* (Ishibashi & Kondo 1986) با کاربرد *Steinernema feltiae* و *S. glaseri* در خاک غیرسترون و دارای کمپوست، تراکم جمعیت نماتودهای بیمارگر گیاهی از قبیل نماتودهای ریشه کل ، حلقوی و فنری را کاهش دادند.

با توجه به اهمیت تولید سبزی و صیفی به خصوص گوجه‌فرنگی در شرایط گلخانه‌ای و مزرعه‌ای، میزان خسارت اقتصادی *M. javanica* به این محصول در جهان و ایران، مقاومت نماتود ریشه‌گرهی در برابر نماتودکش‌ها و نیز هزینه‌بر و مشکل بودن کنترل شیمیایی آن و الودگی محیط زیست، روی‌کردهای جدیدی در مدیریت این نماتود مورد نیاز می باشند. بنابراین، استفاده از روش‌های کنترل زیستی که در برنامه مدیریت تلفیقی این نماتود مؤثر گردند، ضروری به نظر می‌رسد. با توجه به تمام ویژگی‌های مثبت نماتودهای بیمارگر حشرات به عنوان عوامل کنترل زیستی حشرات، نداشتن اثرهای نامطلوب زیست محیطی و نیز کارایی بالای آنها در کنترل نماتودهای بیمارگر گیاهی، می‌توان آنها را به عنوان گزینه

مناسب برای کاهش مصرف سموم شیمیایی و به عنوان جزئی از برنامه مدیریت تلفیقی آفات و نماتودهای بیمارگر گیاهی منظور نمود.

در ایران سابقه‌ای از این نوع بررسی‌ها که حاکی از تأثیر نماتودهای بیمارگر حشرات علیه نماتودهای بیمارگر گیاهی از جمله نماتود ریشه‌گرهی باشد، وجود ندارد. *صلاحی اردکانی و همکاران* (Salahi Ardakani *et al.* 2008) تأثیر جمعیت‌های مختلف *Heterorhabditis indica* Poinar, Karunaka & Daviid, 1992 در کنترل *M. incognita* و هم‌چنین اثر آنها روی شاخص‌های رشدی گیاه گوجه‌فرنگی در شرایط گلخانه، شامل وزن تر و خشک ریشه و قسمت‌های هوایی گیاه، طول ریشه و ساقه و هم‌چنین تعداد و شاخص بروز گال روی ریشه و جمعیت نهایی نماتود ریشه‌گرهی را در کشور هندوستان مطالعه نمودند. در این بررسی، داده‌ها ۴۵ روز بعد از نشاء گوجه‌فرنگی و مایه‌زنی هم‌زمان نماتودها ثبت شده بود.

به منظور شروع این نوع تحقیقات در ایران، در بررسی حاضر تأثیر *S. feltiae* جدا شده از منطقه، در شرایط آزمایشگاهی روی *M. javanica* مورد بررسی قرار گرفت تا زمینه برای مطالعه‌های گلخانه‌ای و مزرعه‌ای این نماتودها روی نماتود ریشه‌گرهی فراهم شود.

روش بررسی

تهیه و تکثیر نماتود ریشه‌گرهی

جمعیت اولیه نماتود ریشه‌گرهی از گیاهان خیار گلخانه‌های آلوده به این نماتود از منطقه خسروشهر در استان آذربایجان شرقی به دست آمد. ریشه‌های آلوده به نماتود ریشه‌گرهی، به قطعات کوچک بریده شده و به داخل گلدان‌هایی که دارای خاک زراعی و ماسه سترون به نسبت ۱:۲ بودند، مایه‌زنی شدند. نشاهای گوجه‌فرنگی رقم سوپراسترین‌ب که قبلاً در خاک سترون با همان نسبت گفته شده کاشته شده بودند، در مرحله پنج-شش برگی به منظور تکثیر نماتود به گلدان‌ها انتقال یافته و به مدت حدود دو ماه در شرایط گلخانه‌ای با دمای ۲۵ ±۲ °C و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگه‌داری شدند.

نحوه تهیه جمعیت نماتود ریشه‌گرهی

ریشه‌های آلوده گیاهان گوجه‌فرنگی تکثیری چند روز قبل از انجام آزمایش، به آزمایشگاه منتقل و پس از شستن، کیسه‌های تخم موجود در ریشه‌ها زیر استرئومیکروسکوپ به آرامی جداسازی و به داخل تشتک - پتری سترون منتقل شدند. کیسه‌های ژلاتینی حاوی تخم‌ها، در محلول هیپوکلریت‌سدیم ۰/۵% به مدت دو تا سه دقیقه نگه‌داری و بعد از حل شدن ماده ژلاتینی، تخم‌ها آزاد شده و زیر شیر آب از الک ۵۰۰ مش عبور داده شده و جمع‌آوری گردیدند. این تخم‌ها به داخل تشتک‌های پتری سترون حاوی آب مقطر سترون انتقال یافته و داخل انکوباتور با دمای ۱°C ± ۲۹ نگه‌داری شدند. پس از یک تا دو روز، اکثر تخم‌ها تفریخ و لاروهای سن دوم در داخل آب شناور شدند. غلظت‌های مورد نیاز تخم و لارو برای انجام آزمایش‌ها از این سوسپانسیون تهیه گردید.

پرورش شب‌پره موم‌خوار ***Galleria mellonella*** **L. 1758**

این حشره در آزمایشگاه نماتودشناسی دانشگاه تبریز به طور مستمر تکثیر و نگه‌داری می‌شود. برای پرورش آن از روش تغییر یافته *پوینار* (Poinar 1975) استفاده شد. ترکیب غذایی پرورش این حشره حاوی ۱۲۰۰ گرم آرد، ۱۵۰ گرم مخمر، ۱۲۰ گرم موم خالص رنده شده، ۶۰۰ گرم عسل و ۵۰۰ میلی‌لیتر گلیسیرین می‌باشد. از ظروف

پلاستیکی مستطیلی به ابعاد ۱۹/۳×۱۴/۳×۳/۶ سانتی‌متر که درپوش آن با توری پوشانده شده بود، برای پرورش حشره استفاده گردید. برای تکثیر این حشره، پنج تا ده جفت حشره بالغ به نسبت ۱:۱ در ظروف پلاستیکی با مشخصات بالا قرار داده شدند. در کف این ظروف، کاغذی که به صورت بادبزنی درست شده بود، برای تخم‌گذاری حشره قرار داده شد. تخم‌های گذاشته شده جمع‌آوری و به محیط غذایی دیگر منتقل شدند. بعد از تفریخ تخم‌ها، لاروها از غذای موجود در ظروف استفاده کرده و با افزایش سن لاروی غذای جدید به ظروف پرورش حشرات اضافه شد. برای ادامه نسل اجازه داده شد تا تعدادی از لاروها به شفیره و سپس به حشره کامل تبدیل گردند. پرورش این حشره در دمای ۲°C ± ۲۵ و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در واحد گلخانه تحقیقاتی گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه تبریز انجام گرفت. برای جلوگیری از آلودگی محیط گلخانه، ظروف پرورش حشره در داخل قفس نگه‌داری گردیدند.

استخراج، کشت و نگه‌داری نماتودهای بیمارگر حشرات

برای جمع‌آوری و جداسازی نماتودهای بیمارگر حشرات احتمالی، چندین نمونه‌برداری از عمق ۲۰-۳۰ سانتی‌متری خاک‌های مناطق اطراف گوگان، سردرود و خلعت‌پوشان در اطراف تبریز انجام شد. نمونه‌های خاک به آزمایشگاه منتقل شده و در ظروف شیشه‌ای مکعبی شکل به ابعاد ۱۹/۳×۱۴/۳×۳/۶ قرار گرفتند. بعد از ریختن خاک به ارتفاع یک تا دو سانتی‌متر به داخل آن ظروف، پنج تا هفت لارو سن آخر *G. mellonella* در سطح خاک قرار گرفت و دوباره همان مقدار خاک به روی آن افزوده شد. در مجموع در هر ظرف شیشه‌ای ۱۵ تا ۲۰ لارو سن آخر *G. mellonella* در خاک نمونه طعمه‌گذاری شدند. در برخی موارد نیز شرطی کردن قبلی لاروهای طعمه‌گذاری شده برای غیرفعال نمودن غدد تولید تار به منظور جلوگیری از ایجاد پیله انجام شد، بدین صورت که لاروهای سن آخر *Galleria* به مدت ۱۵ ثانیه در آب ۵۶°C و سپس به مدت ۳۰ ثانیه در زیر آب سرد قرار گرفتند (Woodring & Kaya 1988). هر ۲۴ ساعت یک‌بار به مدت دو تا ۱۰ روز برای مشاهده احتمال آلوده شدن لاروهای حشره به نماتودهای بیمارگر حشرات و نیز از بین بردن پیله‌های تشکیل شده در اطراف لاروها، خاک داخل ظروف روی یک کاغذ تمیز ریخته شده و در صورت مشاهده آلودگی احتمالی لاروها به نماتودهای بیمارگر حشرات اقدام‌های بعدی انجام گرفت. نماتودهای بیمارگر حشرات موجب مرگ و تغییر رنگ لاروهای *Galleria* می‌شوند. لاروهای آلوده به گونه‌های جنس *Steinernema* به رنگ زرد تا خاکستری در می‌آیند.

تهیه غلظت‌های مختلف نماتود بیمارگر حشرات (زنده و مرده) و نماتود ریشه‌گرهی (تخم و لارو)

برای بررسی آزمایشگاهی، نماتودهای بیمارگر حشرات در غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ لارو آلوده‌کننده در هر میلی‌لیتر آب مقطر سترون و نماتود ریشه‌گرهی در غلظت‌های ۵۰ تخم، ۵۰ لارو و ۵۰ تخم و لارو در کمتر از یک میلی‌لیتر تهیه شدند و برای تأمین نماتودهای بیمارگر حشرات مرده، بعد از تعیین غلظت‌های بالا، لاروهای سن سوم نماتودهای بیمارگر حشرات در اتوکلاو و در دمای ۱۲۱°C و فشار ۱/۲ اتمسفر به مدت ۲۵ دقیقه قرار داده شدند (Jagdale & Grewal 2008).

بعد از آماده‌سازی، نماتودهای بیمارگر حشرات (زنده و مرده) در غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ لارو سن سوم در مقداری کمتر از یک میلی‌لیتر آب مقطر سترون در هر چاهک از ظرف‌های ۲۴ چاهکی مخصوص کشت بافت ریخته شدند. نماتود ریشه‌گرهی به تفکیک در غلظت‌های ۵۰ تخم، ۵۰ لارو و ۵۰ تخم و لارو به هر چاهک اضافه شد و در نهایت حجم سوسپانسیون داخل هر چاهک به یک میلی‌لیتر رسید. به منظور بررسی میزان مرگ‌ومیر لاروها و تفریخ تخم، نتایج بعد از ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت، یادداشت‌برداری شدند. برای هر غلظت و زمان، از چهار چاهک به عنوان چهار تکرار، استفاده و کل آزمایش در دو نوبت تکرار شد. این آزمایش در قالب طرح کرت‌های خرد شده در زمان انجام گردید. تجزیه آماری داده‌ها، با استفاده از نرم‌افزار SAS و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن، t-جفتی و t-ستیودنت انجام شد.

نتایج و بحث

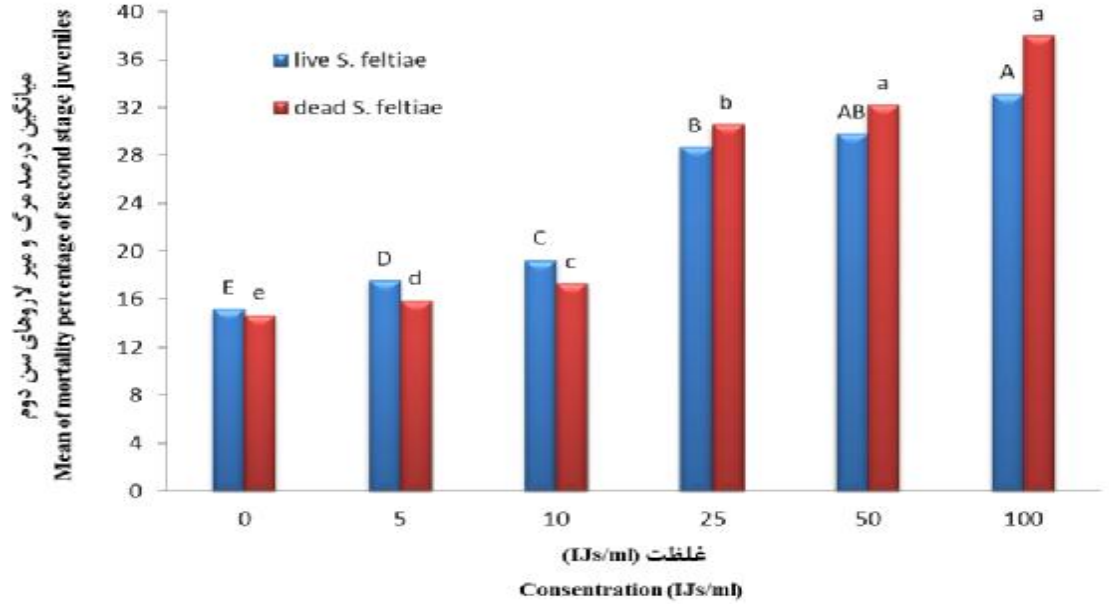
تأثیر لاروهای آلوده‌کننده زنده و مرده *S. feltiae* روی مرگ‌ومیر لاروهای سن دوم *M. javanica*

نتایج مقایسه تأثیر لاروهای زنده و مرده روی مرگ‌ومیر لاروهای سن دوم *M. javanica* با آزمون t- جفتی نشان داد که بین تأثیر لاروهای زنده و مرده نماتود *S. feltiae* روی مرگ‌ومیر لاروهای نماتد ریشه‌گرهی در سطح احتمال ۵% تفاوت معنی‌داری وجود دارد. نتایج تجزیه واریانس آزمایش تأثیر لاروهای آلوده‌کننده زنده و مرده نماتود بیمارگر حشرات روی مرگ‌ومیر لاروهای سن دوم *M. javanica* در جدول ۱ ارائه شده است. نتایج حاکی از آن است که لاروهای زنده و مرده *S. feltiae* بیشترین تأثیر را در غلظت ۱۰۰ لارو آلوده‌کننده در میلی‌لیتر و کمترین تأثیر را در غلظت پنج لارو آلوده‌کننده در میلی‌لیتر داشتند (شکل ۱). نتایج تأثیر لاروهای زنده و مرده در زمان‌های مختلف روی مرگ‌ومیر لاروهای سن دوم *M. javanica* نیز نشان داد که با افزایش زمان، مرگ‌ومیر لاروها افزایش می‌یابد. اگرچه در مورد لاروهای زنده و مرده *S. feltiae* بین ۴۸ و ۷۲ ساعت تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. کمترین و بیشترین مرگ‌ومیر به ترتیب در ۴۸ و ۱۲۰ ساعت بعد از مایه‌زنی رخ داد (شکل ۳).

تأثیر لاروهای آلوده‌کننده زنده و مرده *S. feltiae* روی تفریخ تخم *M. javanica*

نتایج آزمایش با لاروهای زنده و مرده *S. feltiae* در بازدارندگی از تفریخ تخم *M. javanica* با آزمون t-جفتی نشان داد که تفاوت بین تأثیر لاروهای زنده و مرده *S. feltiae* در سطح احتمال ۱% معنی‌دار است. با این حال، در حالت زنده تأثیر روی بازدارندگی از تفریخ تخم از نظر عددی بیشتر بود. نتایج تجزیه واریانس تأثیر غلظت و زمان مایه‌زنی لاروهای زنده و مرده *S. feltiae* روی بازدارندگی از تفریخ تخم *M. javanica* در جدول ۱ نشان داده شده است. نتایج بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین غلظت‌ها، زمان‌ها و اثر متقابل این دو می‌باشد. بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف لاروهای زنده و مرده نماتود بیمارگر حشرات روی بازدارندگی از تفریخ تخم نشان داد که لاروهای زنده و مرده *S. feltiae* در غلظت ۱۰ به بالا به‌طور معنی‌داری موجب بازدارندگی تفریخ تخم نماتود ریشه‌گرهی شدند. در هر دو حالت (زنده و مرده) بیشترین تأثیر در غلظت ۱۰۰ و کمترین تأثیر در غلظت پنج یا ۱۰ مشاهده شد (شکل ۲). نتایج تأثیر لاروهای زنده و مرده نماتود بیمارگر حشرات در زمان‌های مختلف روی تفریخ تخم *M. javanica* حاکی است که بین زمان‌های مختلف،

تفاوت معنی‌داری وجود دارد و با افزایش زمان، تفریخ تخم نیز افزایش یافته است (شکل۴). بازدارندگی تفریخ تخم نماتود ریشه‌گرهی با گذشت زمان کاهش یافت به‌طوری‌که بیشترین بازدارندگی تفریخ تخم بعد از ۴۸ ساعت و کمترین بازدارندگی در ۱۲۰ ساعت رخ داده است.



شکل ۱. تأثیر غلظت‌های مختلف لاروهای زنده و مرده *Steinernema feltiae* روی مرگ‌ومیر لاروهای سن دوم *Meloidogyne javanica*

Fig. 1. The effect of different concentrations of live and dead larvae of *Steinernema feltiae* on mortality of second stage juveniles of *Meloidogyne javanica*

جدول ۱. تجزیه واریانس تأثیر غلظت و زمان مایه‌زنی لاروهای زنده و مرده *Steinernema feltiae* روی مرگ‌ومیر لاروهای سن دوم و تفریخ تخم *Meloidogyne javanica*

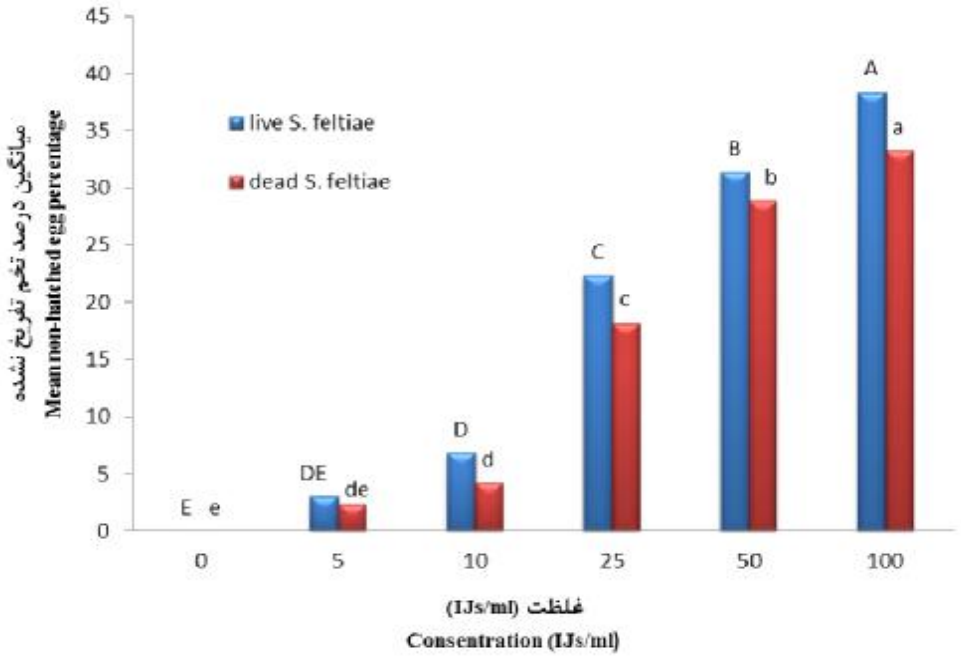
Table 1. Variance analysis of the effect of concentration and incubation time of live and dead larvae of *Steinernema feltiae* on mortality of second stage juveniles and egg hatching of *Meloidogyne javanica*

Sources of variation	منابع تغییر	درجه آزادی Df	میانگین مربعات MS			
			مرگ‌ومیر لارو سن دوم Mortality of second stage juvenile		تخم تفریخ نشده Non-hatched egg	
			dead *S. feltiae*	live *S. feltiae*	dead *S. feltiae*	live *S. feltiae*
Replication	تکرار	1	0.34 ^{ns}	0.009 ^{ns}	11.14 ^{ns}	1.76 ^{ns}
Concentration	غلظت	5	64.37**	23.9**	1810.3**	1927.8**
Major Error	خطای اصلی	5	0.05 ^{ns}	0.15 ^{ns}	1.54 ^{ns}	4.84**
Time	زمان	3	4.19**	7.98**	8.44**	31.28**
Time×Concentration	زمان×غلظت	15	0.66**	0.62**	12.47**	11.74**
Minor Error	خطای فرعی	18	0.11	0.09	1.68	2.6

CV (%)	ضریب تغییرات (%)	9.86	11.22	9.006	10.001

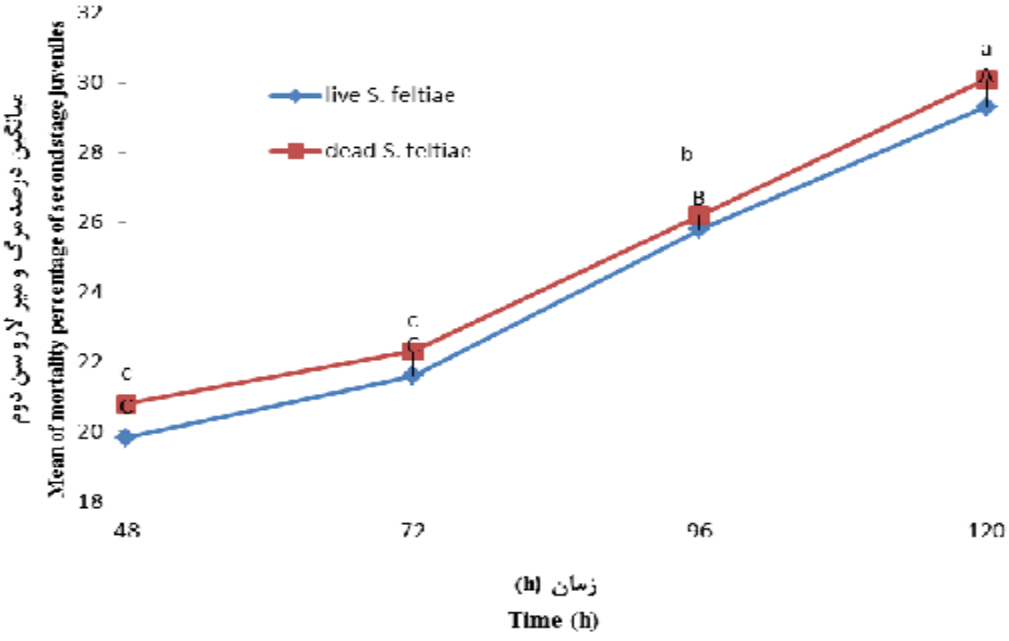
ns و **: به‌ترتیب، غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۱%

**: significantly different at P≤0.01 level. ns: Not significantly different.



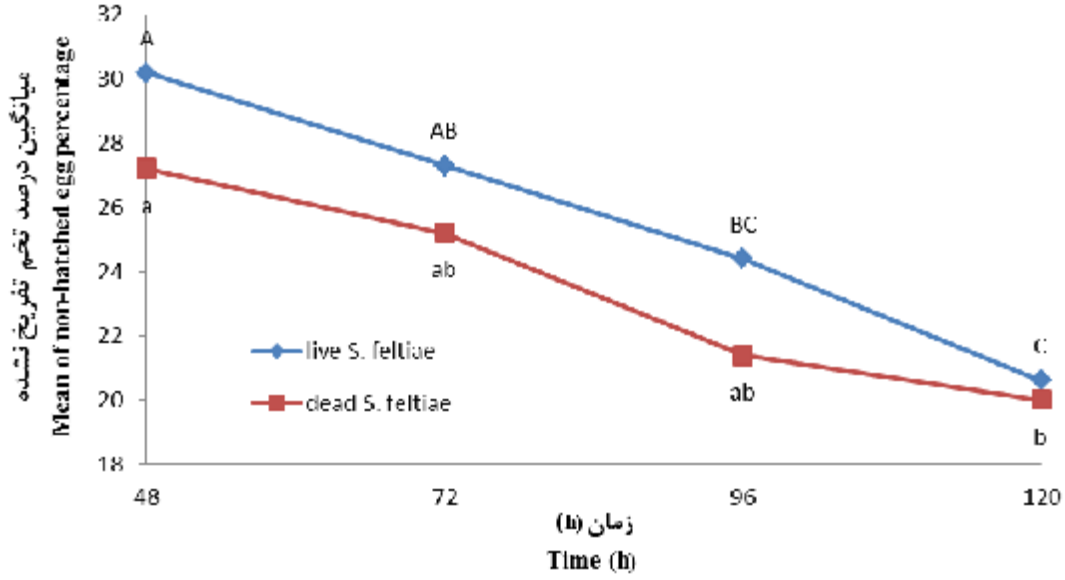
شکل ۲. تأثیر غلظت‌های مختلف لاروهای زنده و مرده *Steinernema feltiae* روی تفریخ تخم *Meloidogyne javanica*

Fig. 2. The effect of different concentrations of live and dead larvae of *Steinernema feltiae* on egg hatching of *Meloidogyne javanica*



شکل ۳. تأثیر لاروهای زنده و مرده *Steinernema feltiae* در زمان‌های مختلف روی مرگ‌ومیر لاروهای سن دوم *Meloidogyne javanica*

Fig. 3. The effect of live and dead larvae of *Steinernema feltiae* on mortality of second stage juveniles of *Meloidogyne javanica* at different incubation time intervals



شکل ۴. تأثیر لاروهای زنده و مرده *Steinernema feltiae* در زمان‌های مختلف روی تفریخ تخم *Meloidogyne javanica*

Fig. 4. The effect of live and dead larvae of *Steinernema feltiae* on egg hatching of *Meloidogyne javanica* at different incubation time intervals

تأثیر غلظت‌های مختلف لاروهای آلوده‌کننده زنده و مرده *S. feltiae* روی مرگ‌ومیر لاروهای سن دوم *M. javanica* در آزمایش مخلوط تخم و لارو

نتایج مقایسه تأثیر لاروهای زنده و مرده *S. feltiae* بر مرگ‌ومیر لاروهای سن دوم نماتود ریشه‌گرهی در مخلوط تخم و لارو با آزمون t–جفتی نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین لاروهای زنده و مرده *S. feltiae* وجود ندارد. نتایج تجزیه واریانس تأثیر غلظت‌های مختلف لاروهای زنده و مرده *S. feltiae* روی مرگ‌ومیر لاروهای سن دوم *M. javanica* در چهار زمان در آزمایش مخلوط تخم و لارو در جدول ۲ ارائه شده است. با افزایش غلظت از ۲۵ به ۵۰ و ۱۰۰ تأثیر افزوده شده ولی بین غلظت‌های پنج و ۱۰ لاروهای زنده *S. feltiae* تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد با این‌حال بین آنها و شاهد اختلاف معنی‌داری وجود داشت (شکل ۵). لاروهای مرده *S. feltiae* تفاوت معنی‌داری بین غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰ نشان ندادند. بنابراین، لاروهای این نماتود در حالت مرده در غلظت کمتری مؤثر است. نتایج مقایسه میانگین در چهار زمان نشان داد که تأثیر لاروهای زنده و مرده نماتود بیمارگر حشرات روی مرگ‌ومیر لاروهای سن دوم نماتود ریشه گرهی با گذشت زمان افزایش می‌یابد (شکل ۷). بین همه زمان‌ها در استفاده از لاروهای زنده و مرده *S. feltiae* این تفاوت معنی‌دار بود. بر اساس نتایج آزمایش مخلوط تخم و لارو نماتود ریشه‌گرهی می‌توان گفت که لاروهای زنده و مرده *S. feltiae* روی مرگ‌ومیر لارو سن دوم نماتود ریشه‌گرهی در مخلوط تخم و لارو مؤثر هستند.

تأثیر غلظت‌های مختلف لاروهای آلوده‌کننده *S. feltiae* زنده و مرده روی تفریخ تخم *M. javanica* در آزمایش مخلوط تخم و لارو

مقایسه نتایج تأثیر لاروها به صورت زنده و مرده به روش آزمون t–جفتی نشان داد که زنده و مرده *S. feltiae* در

جدول ۲. تجزیه واریانس تأثیر غلظت و زمان مایه‌زنی لاروهای زنده و مرده *Steinernema feltiae* روی مرگ‌ومیر لاروهای سن دوم و تفریخ تخم *Meloidogyne javanica* در آزمایش مخلوط تخم و لارو

Table 2. Variance analysis of the effect of concentration and inoculation time of live and dead larvae of *Steinernema feltiae* on mortality of second stage juveniles and egg hatching of *Meloidogyne javanica* in the experiment with mixture of eggs and larvae

Sources of variation	منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات MS			
			مرگ‌ومیر لارو سن دوم Mortality of second stage juvenile		تخم تفریخ نشده Non-hatched egg	
		Df	dead *S. feltiae*	live *S. feltiae*	dead *S. feltiae*	live *S. feltiae*
Replication	تکرار	1	1.71 ns	0.02 ns	6.23 ns	0.02 ns
Concentration	غلظت	5	520.95**	583.85**	578.29**	535.56**
Major Error	خطای اصلی	5	0.33 ns	0.09 ns	0.35 ns	0.09 ns
Time	زمان	3	53.06**	41.84**	129.88**	123.58**
Time×Concentration	زمان×غلظت	15	17.15**	11.76**	10.43**	9.27**
Minor Error	خطای فرعی	18	0.18	0.29	0.90	0.147
CV (%)	ضریب تغییرات (%)		6.34	7.64	10.83	4.3

ns و **: به ترتیب، غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۱%

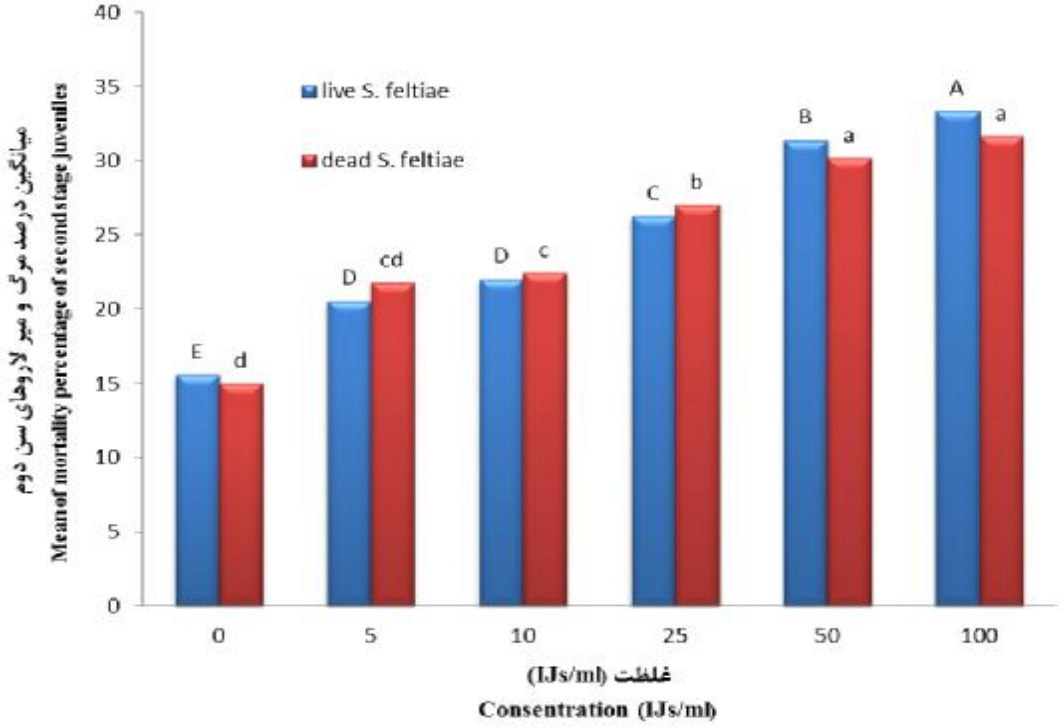
**: significantly different, at P≤0.01 level.
ns: Not significantly different.

بازدارندگی از تفریخ تخم در مخلوط تخم و لارو تفاوت معنی‌داری باهم ندارند. نتایج تجزیه واریانس آزمایش تأثیر نماتودهای بیمارگر حشرات (زنده و مرده) روی مخلوط تخم و لارو نماتود ریشه‌گرهی در قالب طرح کرت‌های خرد شده در زمان در جدول ۲ ارائه شده است. بین غلظت‌ها و زمان‌ها اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱% دیده می‌شود. لاروهای آلوده‌کننده زنده و مرده *S. feltiae* با غلظت ۱۰۰ بیش‌ترین تأثیر را روی بازدارندگی از تفریخ تخم داشت. به غیر از غلظت پنج

لارو مرده *S. feltiae* که تفاوت معنی‌داری با شاهد نشان نداد و تأثیری در بازدارندگی از تفریخ تخم نماتود ریشه‌گرهی نداشت، بقیه غلظت‌های *S. feltiae* (زنده و مرده) با یک‌دیگر و شاهد تفاوت معنی‌داری نشان دادند (شکل ۶). نتایج هم‌چنین نشان دادند که *S. feltiae* زنده در چهار زمان مورد بررسی تفاوت معنی‌داری با یکدیگر دارند (شکل ۸). لاروهای مرده *S. feltiae* بین زمان‌های ۴۸ و ۷۲ و نیز بین زمان‌های ۹۶ و ۱۲۰ تفاوت معنی‌داری

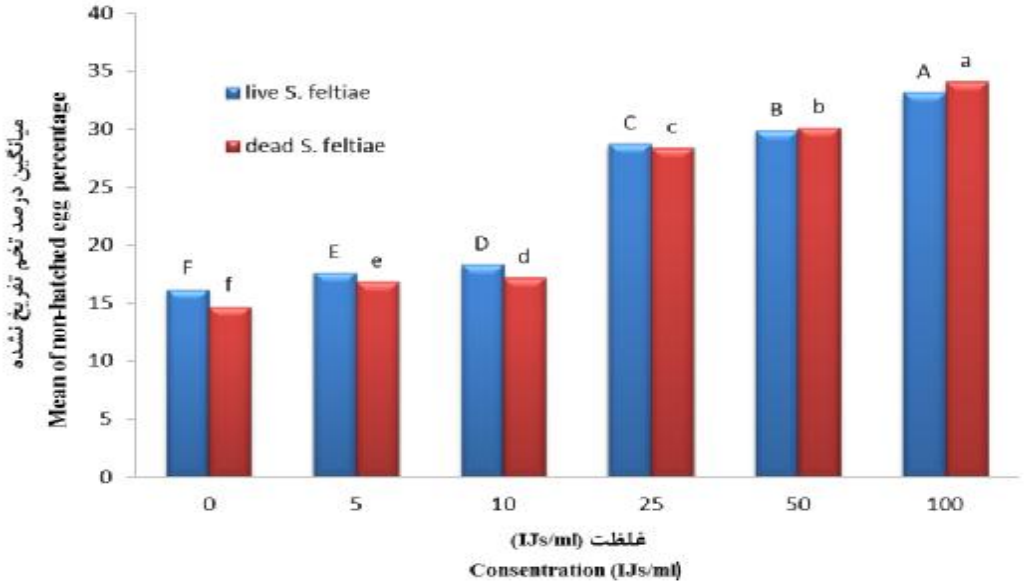
نشان نداد. در حالت زنده و مرده با گذشت زمان میزان تأثیر نماتودها در بازدارندگی از تفریخ تخم کاهش یافت.

تأثیر نماتودهای بیمارگر حشرات روی نماتودهای بیمارگر گیاهی می‌تواند ناشی از چند عامل باشد. شواهد اخیر نشان داده است که اثرات بازدارندگی، با تولید مواد آللوشیمیایی نماتودهای بیمارگر حشرات و باکتری‌های همزیست آن‌ها مرتبط است. خاصیت نماتودکشی متابولیت‌های باکتری همزیست *Steinernema* یعنی گونه‌های *Xenorhabdus* در چندین مطالعه آزمایشگاهی و



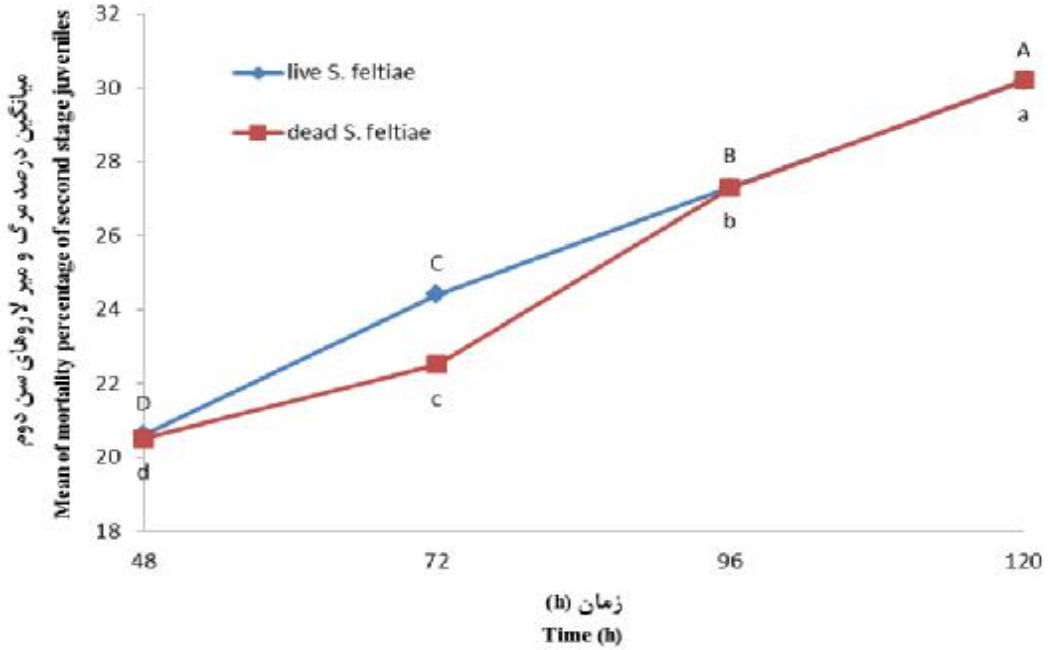
شکل ۵ . تأثیر غلظت‌های مختلف لاروهای زنده و مرده *Steinernema feltiae* روی مرگ‌ومیر لاروهای سن دوم *Meloidogyne javanica* در آزمایش مخلوط تخم و لارو

Fig. 5. The effect of different concentrations of live and dead larvae of *Steinernema feltiae* on mortality of second stage juveniles of *Meloidogyne javanica* in the experiment with egg and juvenile mixture



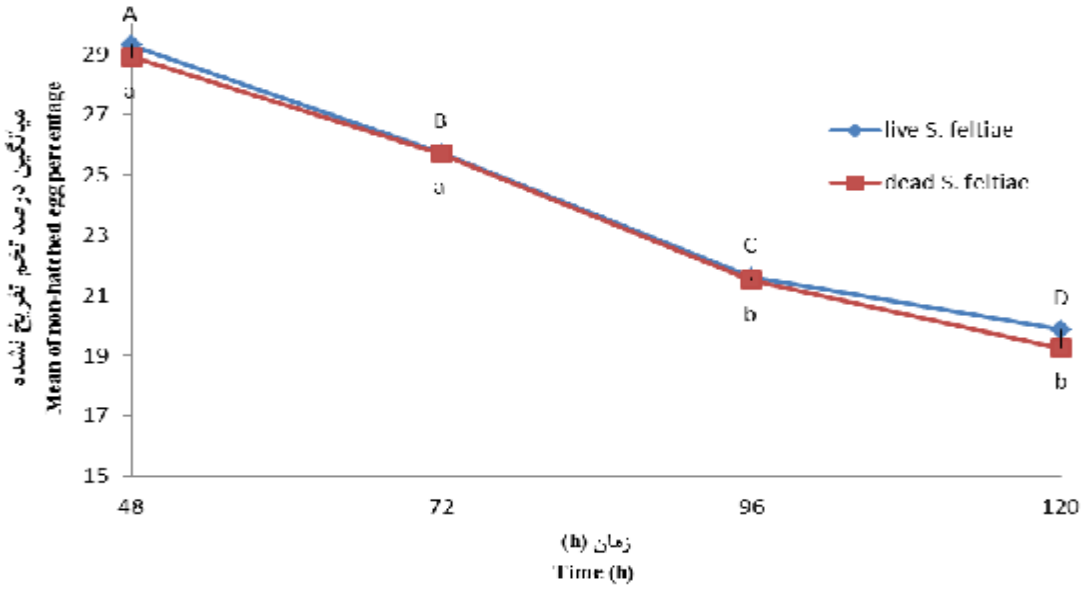
شکل ٦. تأثیر غلظت‌های مختلف لاروهای زنده و مرده *Steinernema feltiae* روی تفریخ تخم *Meloidogyne javanica* در آزمایش مخلوط تخم و لارو

Fig. 6. The effect of different concentrations of live and dead larvae of *Steinernema feltiae* on egg hatching of *Meloidogyne javanica* in the experiment with egg and juvenile mixture.



شکل۷. تأثیر لاروهای زنده و مرده *Steinernema feltiae* در زمان‌های مختلف روی مرگ‌ومیر لاروهای سن دوم *Meloidogyne javanica* در آزمایش مخلوط تخم و لارو

Fig. 7. The effect of live and dead larvae of *Steinernema feltiae* on mortality of second stage juveniles of *Meloidogyne javanica* at different incubation times in the experiment with eggs and juveniles mixture



شکل ۸. تأثیر لاروهای زنده و مرده *Steinernema feltiae* در زمان‌های مختلف روی تفریخ تخم *Meloidogyne javanica* در آزمایش مخلوط تخم و لارو

Fig. 8. The effect of live and dead larvae of *Steinernema feltiae* on egg hatching of *Meloidogyne javanica* at different incubation times in the experiment with egg and larva mixture

گلخانه‌ای اثبات شده است (Jagdale & Grewal 2008). نماتودهای مرده به تنهایی و نیز تولیدات آنها و هم‌چنین باکتری‌های هم‌زیست و تولیدات آنها در بازدارندگی از نماتودهای بیمارگر گیاهی مؤثر هستند. این‌که نماتودهای مرده نیز تأثیری مشابه به نماتودهای زنده دارند شاید به محتوی لاشه مرده نماتودها یا مواد تجزیه شده از لاشه و یا خود باکتری‌های هم‌زیست و در نهایت مواد حاصل از تجزیه باکتری‌ها مرتبط باشد. یک احتمال دیگر نیز وجود متابولیت‌های سمی علیه لاروهای نماتودهای بیمارگر گیاهی در باکتری‌های هم‌زیست که مقاوم به حرارت اتوکلاو می‌باشند، است. با این‌حال چگونگی دوام و پایداری اثر بازدارندگی نماتودهای بیمارگر حشرات روی نماتودهای بیمارگر گیاهی نیازمند بررسی‌های بیشتر و وسیع‌تر می‌باشد.

گریوال و همکاران (Grewal *et al*. 1999) نشان دادند که نماتودهای بیمارگر حشرات و باکتری‌های هم‌زیست آنها (*Xenorhabdus* sp.)، *S. feltiae* (*Xenorhabdus bovienii*) و *S. carpocapsae* (*Xenorhabdus nematophilus*) موجب بازدارندگی از *M. incognita* شدند. گونه‌های *Xenorhabdus* برای *M. incognita* سمی بوده و موجب مرگ‌ومیر ۹۸ تا ۱۰۰ درصد لاروهای *M. incognita* در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گردید. هم‌چنین این باکتری‌ها، تفریخ تخم *M. incognita* را در مقایسه با شاهد به تأخیر انداختند و کاهش معنی‌داری را در بازدارندگی تفریخ تخم *M. incognita* نشان دادند. از موادی که در بازدارندگی دخیل بودند می‌توان به اسید بوریک، نیتروژن آمونیاکی و هیدروکسید آمونیاک اشاره نمود. نتایج این تحقیق با نتایج *گریوال و همکاران* (Grewal *et al*. 1999) مبنی بر تأثیر بیشتر *S. feltiae* در بازدارندگی از تفریخ تخم مطابقت

دارد. هم‌خوانی دیگر این است که آنها گزارش کردند که نماتودهای بیمارگر حشرات مرده نیز روی نماتودهای بیمارگر گیاهی در شرایط آزمایشگاهی حالت بازدارندگی نشان می‌دهند و این نتایج در شرایط مزرعه‌ای نیز صادق است. اهمیت این یافته‌ها و استفاده از نماتودهای بیمارگر حشرات مرده به فائق آمدن بر مشکلات فرمولاسیون، ذخیره و حمل و نقل در کاربرد زنده این نماتودها کمک می‌کند.

هو و همکاران (Hu *et al*. 1999) گزارش کردند که تولید متابولیت‌های ثانویه (۳-۵ دی هیدروکسی، ۴-ایزوپروپول استیلبین) در غلظت بالا توسط نماتودهای بیمارگر حشرات برای نماتودهای بیمارگر گیاهی سمی است. هم‌چنین آمونیاک تولید شده توسط باکتری‌های هم‌زیست نماتودهای بیمارگر حشرات برای نماتودهای بیمارگر گیاهی کشنده است. *جاگدیل و همکاران* (Jagdale *et al*. 2002) اثر لاروهای آلوده‌کننده زنده و مرده (کشته شده با گرما) گونه *Steinernema carpocapsae* روی نماتودهای خاک اطراف گیاه شمشاد را بررسی کردند. هر دو حالت زنده و مرده *S. carpocapsae* به طور یکسان مؤثر بودند و موجب کاهش ۵۰% کل جمعیت نماتودهای بیمارگر گیاهی نسبت به شاهد در ۱۵ و ۳۰ روز بعد از مصرف آنها شدند. جمعیت *Criconemella*، *Hoplolaimus*، *Longidorus*، *Tylenchorhynchus* و *Pratylenchus* به طور معنی‌داری نسبت به شاهد کاهش یافت. جمعیت *Tylenchus* با استفاده از *S. carpocapsae* مرده به طور معنی‌داری کم شد ولی جمعیت *Aphelenchoides* تحت تأثیر قرار نگرفت. لاروهای زنده *S. carpocapsae*، جمعیت *Tylenchus* و *Aphelenchoides* را کاهش نداد. نتیجه آزمایش با لارو مرده این نماتودهای بیمارگر حشرات نشان داد که نماتودهای مرده به تنهایی یا در ترکیب با باکتری‌های هم‌زیست آثار بازدارندگی دارند. این یافته‌ها پیشنهاد می‌کند که مواد آللوشیمیایی تولید شده به وسیله نماتودهای زنده و مرده و یا باکتری‌های هم‌زیست آنها علیه نماتودهای بیمارگر گیاهی عمل می‌کنند. به علاوه نتایج نشان داد که لاروهای آلوده‌کننده زنده و مرده نماتود بیمارگر حشرات *S. carpocapsae*، کل جمعیت‌های نماتودهای بیمارگر گیاهی را کاهش داد. *مولینا و همکاران* (Molina *et al*. 2007) کاربرد لاروهای زنده و مرده *H. bacteriophora*، *Heterorhabditis baujardi*، *S. feltiae* و *S. carpocapsae* به میزان ۲۵ لارو آلوده‌کننده در هر سانتی‌متر مربع روی ۳۵۰ تخم *Meloidogyne mayaguensis* در گیاه گوجه‌فرنگی و در دماهای ۲۵/۶ و ۲۲/۳ درجه سانتی‌گراد را آزمایش کردند. نتایج آنها نشان داد که تأثیر لاروهای آلوده‌کننده نماتودهای بیمارگر حشرات روی مراحل مختلف زندگی نماتودهای بیمارگر گیاهی متفاوت است ولی مرحله تخم بیش‌تر تحت تأثیر قرار می‌گیرد. هم‌چنین نشان داده شد که دما روی رفتار نماتودهای بیمارگر حشرات و حتی تخم و لارو سن دوم *M. mayaguensis* تأثیر می‌گذارد. باکتری‌های هم‌زیست نماتودها ترکیباتی از جمله لیپوپلی‌ساکارید تولید می‌کنند که برای نماتودهای بیمارگر گیاهی کشنده است. *جاگدیل و گریوال* (Jagdale & Grewal 2008) در بررسی تأثیر لاروهای زنده و مرده *S. carpocapsae* روی *Aphelenchoides fragariae* در سوسپانسیون آبی نشان دادند که لاروهای آلوده‌کننده مرده *S. carpocapsae* موجب مرگ‌ومیر *A. fragariae* در سوسپانسیون آبی می‌شود و زنده این نماتود تأثیری در مرگ‌ومیر آن ندارد.

نتایج این بررسی با نتایج تحقیقات قبلی مبنی بر بازدارندگی نماتودهای بیمارگر گیاهی با استفاده از نماتودهای بیمارگر حشرات زنده (Bird & Bird 1986، Ishibashi & Kondo 1986، Ishibashi & Choi 1991، Smitley *et al*. 1992، Grewal *et al*. 1997، Grewal *et al*. 1999، Hu *et al*. 1999، Somasekhar & Grewal 2002، Lewis *et al*. 2001 و Molina *et al*. 2007) و نماتودهای بیمارگر حشرات مرده (Jagdale *et al*. 2002، Grewal *et al*. 1999) مطابقت دارد ولی با نتایج *جاگدیل و گریوال* (Jagdale & Grewal 2008) متفاوت است.

این نماتود بیمارگر حشرات در حالت زنده و مرده در مرگ‌ومیر لاروهای سن دوم و بازدارندگی تفریخ تخم *M. javanica* مؤثر است ولی این تأثیر برای مراحل مختلف زندگی نماتود بیمارگر گیاهی متفاوت است و از علل این تأثیر می‌توان به ماهیت نماتودکشی متابولیت‌های گونه‌های *Xenorhabdus* هم‌زیست گونه‌های *Steinernema* اشاره کرد (Grewal *et al*. 1999، Hu *et al*. 1999 و Samaliev *et al*. 2000). عصاره‌های بدون باکتری گونه‌های *Xenorhabdus* روی لاروهای *M. javanica* حالت سمی دارند و از تفریخ تخم *M. javanica* جلوگیری می‌کنند (Grewal *et al*. 1999، Hu *et al*. 1999)، که دلیل بر تأثیر باکتری‌های هم‌زیست نماتودهای بیمارگر حشرات روی نماتودهای بیمارگر گیاهی است. هم‌چنین، تفاوت در آثار بازدارندگی بین گونه‌های نماتودهای بیمارگر حشرات روی نماتودهای بیمارگر گیاهی را می‌توان مرتبط با تفاوت در باکتری‌های هم‌زیست و متابولیت‌های سمی آنها دانست.

نتایج بررسی‌های متعدد هم‌چنین نشان می‌دهد که دما، رفتار و فیزیولوژی گونه نماتود بیمارگر حشرات و بیمارگر گیاهی، در تأثیر نماتودهای بیمارگر حشرات روی نماتودهای بیمارگر گیاهی نقش دارد. با توجه به آزمایش‌های قبلی و آزمایش حاضر می‌توان گفت که نماتودهای بیمارگر حشرات می‌توانند نماتودهای بیمارگر گیاهی را کنترل کنند و امکان دارد که از نماتودهای بیمارگر حشرات زنده و مرده به عنوان عامل کنترل زیستی در مقابل *M. javanica* بهره برد.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (140-139) متن انگلیسی مراجعه شود.