برهمکنش نماتود ریشه‌گرهی *Meloidogyne javanica* و باکتری مولد گال طوقه، *Rhizobium vitis*، در سه پایه‌ی بادام*

شهرزاد فتحی[۱] و علی‌اکبر فدایی تهرانی[۱]**

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۷/۱۲؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱/۲۱)

چکیده

باکتری مولد گال طوقه، *Rhizobium vitis* و نماتود ریشه‌گرهی *Meloidogyne javanica* در خاک‌های اکثر مناطق ایران، به ویژه باغات میوه، گسترش و شیوع روزافزونی دارند. به منظور بررسی برهمکنش نماتود ریشه گرهی و باکتری عامل گال طوقه در روی پایه‌های وارداتی GF677 و GN15 بادام و پایه هیبرید هلو × بادام شورابی (تولید شده در استان چهارمحال و بختیاری)، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در حضور و غیاب هر یک از دو بیمارگر، در شرایط گلخانه انجام شد. مایه‌زنی با ۳۰۰۰ تخم و لارو نماتود بر کیلوگرم خاک پس از استقرار پایه‌های ریشه‌دار منتقل شده به گلدان‌های آزمایشی و مایه‌زنی با باکتری به نسبت یک درصد حجم به وزن با سوسپانسیون 10^8 cfu/ml سه هفته بعد از مایه‌زنی نماتود صورت گرفت و سطوح صفر نماتود و باکتری به عنوان شاهدهای آزمایش منظور گردیدند. سه ماه بعد از آخرین مایه‌زنی، شاخص‌های رشدی گیاه، نماتود و بیماری‌زایی باکتری مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که به جز پایه‌ی GN15، سایر پایه‌های مورد بررسی به نماتود حساس می‌باشند. در مقابل، پایه‌ی GN15 نسبت به باکتری مولد گال طوقه بسیار حساس بود. حضور نماتود فقط در پایه‌ی GN15 تاثیر معنی‌دار بر بیماری‌زایی باکتری داشت. میزان این افزایش در مقایسه با شاهد ۲۳/۳٪ بود. همچنین حضور باکتری موجب افزایش شاخص‌های نماتود در سایر پایه‌ها به جز پایه‌ی GN15 نشد.

کلیدواژه: بادام، تعامل، سرطان طوقه، *Meloidogyne javanica*

---

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

** مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: ma_fadaei@yahoo.com

۱. به ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد و دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد

Interaction between the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* and the crown gall bacterium, *Rhizobium vitis*, in three almond rootstocks*

SH. Fathi[1] and A.A. Fadaei Tehrani[1]**

(Received: 4.10.2014; Accepted: 9.4.2016)

Abstract

Incidence of the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* and the crown gall bacterium, *Rhizobium vitis*, are increasing in different regions of Iran. In order to evaluate the response of different almond rootstocks to interaction of the root-knot nematode and the crown gall bacterium, three rootstocks *viz.* GN15, GF677 and Hybrid of peach×Shoorabi almond, inoculated with *M. javanica* and *R. vitis* in a factorial experiment with completely randomized design under greenhouse condition. Almond rootstocks were transferred to the main pots, and then the pots were inoculated by 9000 eggs and second stage juveniles of the nematode per pot. Three weeks after inoculation, the rootstocks were inoculated with a suspension of 10^8 of bacterial cells at the rate of 1% (V/W). Three month after the last inoculation, the growth indices of plant and nematode as well as pathogenicity indices of the bacterium were measured. The results showed that except GN15, other rootstocks were susceptible to nematode. The rootstock GN15 was susceptible to *R. vitis*. As a result, nematode infection predisposed GN15 to bacterial infection, but bacterial infection had no effect on nematode indices.

Keywords: Almond, Bacterial pathogenicity, *Meloidogyne javanica*

---

* A part of M.Sc. thesis of the first author submitted to College of Agriculture Sharekord University, Sharekord, Iran..

** Corresponding author's E-mail: ma_fadaei@yahoo.com

1. Former M.Sc. student and Associate Professor of Plant Pathology, respectively, College of Agriculture Sharekord University, Sharekord, Iran.

مقدمه

بر اساس آمار موجود، حدود ۱/۵ میلیون تن بادام در جهان تولید می‌شود و ایران با تولید سالانه حدود ۲۳۸ هزار تن، مقام سوم جهان بعد از آمریکا و اسپانیا را به خود اختصاص داده است (Anonymous 2009). با توجه به اهمیت اقتصادی بادام، مطالعه عوامل محدودکننده‌ی رشد آن و ارائه راهکارهای مناسب برای افزایش رشد و عملکرد این گیاه ضروری است. عوامل بیماری‌زای گیاهی شامل قارچ‌ها، باکتری‌ها، ویروس‌ها و نماتودها همه ساله خسارت زیادی به تولید این محصول وارد می‌سازند و نماتودهای ریشه‌گرهی (*Meloidogyne* spp.) از مهم‌ترین آنها محسوب می‌شوند. انتشار جهانی، دامنه‌ی وسیع میزبانی و تعامل با سایر بیمارگرهای گیاهی در بیماری‌های مرکب این گروه از نماتودها را در رده‌ی مهم‌ترین بیمارگرهای گیاهی قرار داده است (Karssen & Moens 2006). هر چند بیش از ۹۰ گونه از این جنس در دنیا معرفی شده است، ولی بیش از ۹۵ درصد خسارت‌های وارده به محصولات زراعی مربوط به گونه‌های *M. hapla*، *M. javanica*، *M. incognita* و *M. arenaria* می‌باشد (Damadzadeh 2007). یکی از گونه‌های شایع این جنس *Meloidogyn javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949 است که بعد از *M. incognita* دومین گونه‌ی مهم نماتود ریشه‌گرهی در جهان و مهمترین گونه‌ی این جنس در ایران می‌باشد (Damadzadeh 2007).

باکتری مولد گال طوقه (*Rhizobium vitis*) یکی دیگر از عوامل بیماری‌زا کاهش‌دهنده‌ی تولید بادام در جهان است. *R. vitis* به طور ویژه باعث تراوش الکترولیت‌ها در گیاه و لکه‌های نکروتیک در ریشه‌ی گیاه می‌شود (Burr *et al.* 1998). *R. vitis* در سیستم آوندی گیاه حضور داشته و از طریق اندام‌های رویشی منتقل می‌شود (Tolba & Zaki 2011). گونه‌های مختلف جنس *Rhizobium* معمولا به عنوان باکتری‌های خاکزاد شناخته شده‌اند و بیش از ۹۰ خانواده‌ی مختلف گیاهی از جمله درختان میوه، خشکبار، گیاهان زینتی و رونده (گل رز، شمشاد، داوودی و کوکب) را آلوده می‌کنند (Schaad *et al.* 2001). در اثر آلودگی گیاه به استرین‌های آگروباکتریوم، سلول‌ها بیش از حد تکثیر شده و منجر به تشکیل گال می‌گردد. گال طوقه به دلیل کاهش سیستم توسعه‌ی ریشه یا اختلال در جریان آوندی گیاهان، از رشد گیاهان بالغ جلوگیری می‌کند. ضررهای مالی ناشی از گال طوقه و ریشه، میلیون‌ها دلار در سال تخمین زده شده است (Schaad *et al.* 2001). این بیماری عمدتاً در نهالستان‌ها مهم است زیرا گیاهان آلوده غیر قابل فروش می‌شوند (Shahabi Mahmad Abadi *et al.* 2011).

وجود تعامل و برهمکنش بین نماتودهای ریشه‌گرهی و بسیاری از بیمارگرها از جمله باکتری‌ها به اثبات رسیده است. برد و همکاران (Bird *et al.* 2003) برهم‌کنش نماتود ریشه‌گرهی با ریزوباکترهای خاک را نشان دادند. یکی از نکات مهم در مورد توسعه بیماری گال طوقه، افزایش میزان انتقال و گسترش باکتری در حضور ناقلینی همچون لارو حشرات و نماتودها می‌باشد (Moore & Cooksey 1981). روبیو و همکاران (Rubio-Cabetas *et al.* 2001) با بررسی برهم‌کنش نماتود ریشه‌گرهی و باکتری مولد گال طوقه در پایه‌های حساس آلو به این نتیجه رسیدند که حضور نماتود ریشه‌گرهی منجر به افزایش تعداد گال باکتری می‌شود. آنها علت احتمالی این افزایش را، ایجاد زخم توسط نماتود و تسریع نفوذ باکتری و ایجاد بیماری توسط آن ذکر کردند.

توان زندگی ساپروفیتی باکتری در خاک و اندام‌های

گیاه و انتقال آن از طریق سیستم آوندی، امکان حضور باکتری در تمام بافت‌های گیاه را محتمل می‌سازد (Mahmudzade & Davoodi 2007). به همین دلیل احتمال انتقال آلودگی باکتریایی در گیاه بادام توسط پایه و یا پیوندک‌های آلوده وجود دارد. علی‌رغم تلاش‌های فراوانی که جهت کنترل نماتود ریشه گرهی و باکتری عامل گال طوقه انجام شده است، هنوز روش قاطعی برای کنترل کامل و یا کاهش قابل قبول خسارت آنها به دست نیامده است. به همین علت بررسی عکس‌العمل ارقام مختلف پایه در مقابل حضور انفرادی و هم‌زمان دو بیمارگر از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در این بررسی حساسیت سه رقم پایه‌ی مختلف بادام به نماتود و باکتری مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش‌های بررسی

جداسازی و شناسایی باکتری مولد گال

برای جداسازی باکتری عامل گال طوقه، در فصول بهار و پاییز سال‌های ۱۳۹۱ و ۱۳۹۲ تعدادی نمونه از شاخه‌ها و طوقه‌های با علائم آلودگی به این بیماری، از باغات انگور شهرستان شهرکرد جمع‌آوری گردید. در آزمایشگاه، بافت گال‌ها با محلول ۱٪ هیپوکلریت سدیم به مدت ۱۰ تا ۲۰ دقیقه ضدعفونی سطحی شدند. نمونه‌ها پس از شستشو با آب مقطر استریل، به قطعات کوچک با ابعاد حدود یک سانتی‌متر مربع تقسیم و در هاون چینی له شدند. سوسپانسیون‌های به دست آمده به لوله‌های حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون منتقل و به مدت ۱۰ دقیقه توسط دستگاه شیکر تکان داده شدند. مقدار ۲۰ تا ۴۰ میکرولیتر از هر سوسپانسیون به صورت چمنی روی محیط کشت NA کشت گردید. تشتک‌های پتری به مدت ۲۴-۷۲ ساعت در داخل انکوباتور با دمای ۲۰ درجه سلسیوس نگهداری و به طور روزانه مورد بازدید قرار گرفتند (Ashrafi & Hasanzadeh 2010). خالص‌سازی باکتری از تک کلنی‌های با ظاهر کلنی‌های شرح داده شده برای این گونه انجام گرفت و در نهایت دو جدایه باکتری که ریخت‌شناسی کلنی آنها مشابه کلنی‌های شرح داده شده برای گونه *R. vitis* بود برای انجام آزمایشات بیماری‌زایی روی گوجه‌فرنگی و آفتابگردان و آزمایشات بیوشیمیایی کلیدی جهت تشخیص گونه باکتری انتخاب گردید.

تهیه‌ی جمعیت نماتود ریشه‌گرهی و تعیین گونه آن

جهت تهیه جمیعت نماتود ریشه‌گرهی، تعدادی نمونه‌ی ریشه‌ی بادام همراه با خاک اطراف آنها از باغات با آلودگی به نماتود در شهرکرد جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل گردید. پس از شستشو، ریشه‌ها تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه سلسیوس در یخچال نگهداری شدند. به منظور تهیه و تکثیر جمعیت خالص از گونه مورد نظر نماتود، ریشه‌های با علائم گال پس از شستشو در زیر میکروسکوپ تشریح بررسی و چندین توده تخم جدا و هر یک جداگانه به ظروف شیشه ساعتی حاوی آب مقطر منتقل گردیدند. هر تک توده تخم در نزدیکی ریشه‌ی یک نشاء گوجه‌فرنگی ۲ تا ۴ برگی رقم حساس Rutgers قرار داده شد. نشاهای مایه‌زنی شده به مدت ۶۰ روز در شرایط مساعد گلخانه با دمای ۲۵- ۲۸ درجه سلسیوس و ۱۴ ساعت روشنایی با آبیاری مناسب نگهداری شدند تا جمعیت خالص مورد نیاز فراهم گردد. از این گیاهان در تکثیرهای بعدی نیز استفاده شد (Sahraneshin 2013). برای تعیین گونه از خصوصیات ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی ماده‌های بالغ و لاروهای سن دوم نماتود استفاده شد. به این منظور تعدادی برش از شبکه کوتیکولی انتهای بدن ماده به روش *تایلور و نتسچر* (Tylor &

Netscher 1974) تهیه گردید. تعدادی از لاروهای سن دوم نیز به روش *ساوتی* (Southey 1986) تثبیت و از آنها اسلایدهای دائمی تهیه گردید.

ارزیابی عکس‌العمل ارقام بادام به نماتود ریشه‌گرهی (*Meloidogyne javanica*) و باکتری مولد گال طوقه (*Rhizobium vitis*)

برای انجام آزمایش پایه‌های GF677 و GN15، همچنین هیبرید محلی هلو × بادام شورابی۲ به صورت قلمه‌های ریشه‌دار شده (فاقد هرگونه آلودگی) از یک مرکز تولید پایه‌های رویشی بادام واقع در منطقه سامان استان چهارمحال و بختیاری تهیه گردید و به گلدان‌های اصلی چهار کیلوگرمی منتقل شد. آزمایش به صورت فاکتوریل (فاکتورها شامل نوع پایه‌ی بادام در سه سطح، نماتود و باکتری هرکدام در دو سطح) و در قالب طرح کاملاً تصادفی در حضور هم‌زمان دو بیمارگر، و حضور و عدم حضور هر یک آنها در شرایط گلخانه انجام شد. بعد از اطمینان از استقرار کامل گیاه، به هر تکرار از تیمارهای دریافت‌کننده با پیپت تعداد ۳۰۰۰ تخم و لارو سن دو نماتود/کیلوگرم خاک در نزدیکی ریشه‌ی بادام اضافه گردید. سه هفته بعد از مایه‌زنی نماتود، سوسپانسیون باکتری با غلظت 10^8cfu/ml توسط دستگاه اسپکتروفتومتر تهیه و به نسبت ۱٪ حجم به وزن به خاک تیمارهای دریافت‌کننده‌ی دو بیمارگر اضافه شد. بعد از مایه زنی با باکتری، نهال‌ها به مدت سه ماه در گلخانه با دمای ۲۸-۲۵ درجه سلسیوس و نور حدود ۱۴-۱۳ ساعت نگهداری شدند. ارزیابی نتایج با استفاده از شاخص‌های نماتود (شامل تعداد گال، تعداد توده تخم در یک گرم ریشه، تعداد تخم در هر توده تخم، جمعیت لارو سن دوم درون خاک و فاکتور تولیدمثل)، همچنین شاخص‌های باکتری شامل اندازه، حجم و محل تشکیل گال ناشی از باکتری و شاخص‌های رشدی گیاه (وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی، طول ریشه و ارتفاع اندام هوایی) انجام شد. جهت تعیین شاخص‌های نماتود، پس از شمارش تعداد گال و کیسه تخم در گرم ریشه، کیسه‌های تخم به کمک سوزن ظریفی از گال‌های ریشه جدا و به تشتک‌های پتری شمارش منتقل گردید. برای جداسازی توده‌ی تخم و از بین رفتن توده ژلاتینی اطراف آن به مدت ۳۰ ثانیه در محلول هیپوکلریت سدیم ۵٪ قرار داده شدند. سپس با اضافه کردن چند قطره آب در سطح تشتک پخش و تعداد تخم در زیر میکروسکوپ تشریح شمارش گردید. به منظور کاهش خطا، شمارش تعداد گال و کیسه تخم در سه نمونه یک گرمی تصادفی و تعداد تخم در هر توده تخم، در ده توده تخم شمارش و میانگین آنها معیار مقایسات قرار گرفت (Sahraneshin 2013). برای مقایسه جمعیت لارو سن دوم، تعداد لارو در ۱۰۰ گرم خاک گلدان شمارش و معیار مقایسه قرار گرفت. به این منظور استخراج لارو سن دوم از خاک به روش جنکینز (Jenkins 1964) و با استفاده از الک و سانتریفیوژ انجام شد. برای مقایسه شدت بیماری‌زایی باکتری از شمارش تعداد گال و برآورد حجم و وزن گال‌های باکتریایی استفاده شد (Goodman *et al.* 1993). تجزیه و تحلیل داده‌ها به کمک نرم‌افزار آماری SAS و مقایسه میانگین با نرم‌افزار MSTATC و با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۵٪ صورت گرفت.

نتایج و بحث

خصوصیات فنوتیپی و بیوشیمیایی جدایه‌های باکتری

از کشت نمونه‌های آلوده، چندین جدایه باکتری به دست آمد که پس از خالص‌سازی با توجه به

جدول ۱. خصوصیات فنوتیپی جدایه‌های *Rhizobium*، جدا شده از درختان مو.

Table 1. Phonotypical characteristics of *Rhizobium* strains, isolated from grapevine.

Test	Isolate 1	Isolate 2	*R. radiobacter* Control
Gram reaction	-	-	-
YDC pigment	Yellow	Yellow	Yellow
Fluorescent pigment	-	-	-
O/F	O	O	O
Catalase	+	+	+
Gelatin hydrolyses	-	-	-
Utilization of:			
Malonic Acid	+	+	-
L-Tartaric Acid	+	+	-
Motility at pH 7	-	-	+
Pectolytic at pH 4.5	+	+	-

+: Positive reaction or growth; -: Negative reaction or growth

ریخت‌شناسی و رنگ کلنی‌ها تنها دو جدایه برای آزمایشات بیوشیمیایی و بیماری‌زایی مورد استفاده قرار گرفتند. با توجه به واکنش منفی به رنگ‌آمیزی گرم، رنگ زرد لعابی کلنی، ناتوانی در هضم ژلاتین، رشد در شرایط هوازی اجباری و نتایج آزمایشات بیماری‌زای جدایه‌ها متعلق به جنس *Rhizobium* تشخیص داده شدند. نتایج حاصل از آزمون‌های بیوشیمیایی (جدول ۱) نشان‌دهنده تشابه خصوصیات بیوشیمیایی جدایه‌ها با شرح گونه *R. vitis* بود. به علت تفاوت در استفاده از مالونیک اسید و تارتاریک اسید، هیدرولیز پکتات و حرکت در اسیدیته خنثی با شاهد (گونه *R. radiobacter*) جدایه‌های مورد بررسی با گونه *R. vitis* مطابقت داشتند (Schaad *et al.* 2001).

آزمون اثبات بیماری‌زایی

با مایه‌زنی جدایه‌های مورد بررسی بر روی گیاه گوجه‌فرنگی در شرایط گلخانه، پس از سه هفته، گال‌های مشخصی در محل تزریق تشکیل شد (شکل ۱). کشت مجدد گال‌های تشکیل شده روی محیط کشت منجر به جداسازی و رشد باکتری با کلنی‌های مشابه با عامل مایه‌زنی شده گردید. دو هفته پس از مایه‌زنی دیسک‌های هویج با جدایه‌های مورد بررسی، در محل مایه‌زنی بافت کالوس ظاهر گردید و پس از شش هفته حالت تومور به خود گرفت و کاملاً از بافت‌های دیگر متمایز بود.

شناسایی گونه‌ی نماتود

الگوی شبکه کوتیکولی انتهای بدن ماده در برش‌های تهیه شده به صورت گرد تا کمی بیضوی با شیارهای ظریف، موج‌دار و مجزا از هم، مشاهده شد. انحنای نسبتاً کم کمان پشتی و شیارهای مشخص جانبی در الگوی شبکه کوتیکولی انتهای بدن نماتود ماده‌ی بالغ و مشخصات استایلت، با متوسط طول ۱۶ میکرومتر و دارای گره‌های متمایز، بلند و متقاطع، با شرح اصلی گونه *Meloidogyne javanica* در کلید شناسایی جپسون (Jepson 1987) تطابق نشان داد. همچنین میانگین فاصله فرج تا مخرج ۱۷ میکرومتر و طول شکاف فرج، کمان پشتی و شبکه کوتیکولی نمونه‌های مورد بررسی به ترتیب ۲۵/۱، ۴۱/۲ و ۱۰۰ میکرومتر به دست آمد که با شرح گونه مذکور تطابق داشت.

شکل ۱. ظهور علائم گال روی ساقه‌ی گوجه‌فرنگی (سمت چپ) و تشکیل کالوس بر روی دیسک‌های هویج (سمت راست) سه هفته پس از مایه‌زنی با باکتری *Rhizobium vitis*.

Fig 1. Gall formation on tomato stem (left) and callus formation on carrot discs (right), three weeks after inoculation with the bacterium, *Rhizobium vitis*.

در بررسی لاروهای سن دوم نماتود، سر صاف و هم‌سطح با بدن و استایلت نیز با گره‌های مشخص و متمایز مشاهده شد. بلندی دو میکرومتری ناحیه سر، میانگین ۵۳۵ میکرومتری طول بدن، طول ۱۱ میکرومتری استایلت، طول ۵۲ میکرومتری دم و طول ۱۳ میکرومتری بخش روشن دم، فاصله ۸۷ میکرومتری سر از منفذ ترشحی، حداکثر قطر ۱۲ میکرومتری بدن و فاصله ۲۰ میکرومتری منفذ ترشحی از ابتدای بدن از جمله خصوصیات ریخت‌سنجی لاروهای سن دوم نماتود مورد بررسی بودند که با کلید شناسایی جپسون (Jepson 1987) مطابقت نشان دادند و مؤید تعلق نماتود مورد بررسی به گونه *M. Javanica* بود.

شاخص‌های رشدی گیاه

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۲) شاخص‌های رشدی گیاه نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای مختلف بود. به عبارت دیگر حضور هر یک از بیمارگرها به تنهایی در مقایسه با حضور هم‌زمان آنها و یا گیاهان شاهد (بدون بیمارگر) باعث درجات متفاوتی از رشد روی نهال‌های مورد آزمایش گردید. مقایسه میانگین شاخص‌های رشدی (جدول ۳) نیز بیانگر تفاوت معنی‌دار بیشتر شاخص‌ها بین تیمارهای مختلف بود. به این صورت که نماتود و باکتری هر کدام به تنهایی باعث ایجاد کاهش در ارتفاع و وزن اندام هوایی نسبت به شاهد شدند. در پایه‌های GN15 و GF677 حضور هم‌زمان دو بیمارگر باعث افزایش وزن تر و خشک و طول اندام هوایی شد. در پایه‌ی GN15 آلودگی به باکتری و در پایه‌ی GF677 آلودگی به نماتود منجر به افزایش وزن تر و خشک ریشه نسبت به شاهد شد. در حالی‌که مقاومت پایه‌ی GN15 به نماتود و پایه‌ی GF677 به باکتری، افزایش معنی‌دار در وزن تر و خشک ریشه ایجاد نکرد، زیرا در این تیمارها هیچ یک از بیمارگرها قادر به تشکیل گال نشدند.

شاخص‌های نماتود

تجزیه واریانس و مقایسه میانگین شاخص‌های رشد و نموی نماتود نیز مؤید وجود اختلاف معنی‌دار در بسیاری از شاخص‌های مذکور در تیمارهای مختلف بود (جدول‌های ۴ و ۵). این شاخص‌ها شامل تعداد گال ناشی از فعالیت نماتود، تعداد توده‌ی تخم، تعداد تخم و لارو در

جدول ۲. تجزیه واریانس شاخص‌های رشدی پایه‌های بادام آلوده به نماتود ریشه‌گرهی *Meloidogyne javanica* و باکتری مولد گال طوقه، *Rhizobium vitis*.

Table 2. Analysis variance of growth indices of almond rootstocks infected by the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* and the crown gall bacterium, *Rhizobium vitis*.

Sources of variation	df	MS (Mean Square)				
		Shoot length (cm)	Shoot fresh weight (g)	Shoot dry weight (g)	Root fresh weight (g)	Root dry weight (g)
Rootstock	2	439.5^{*}	$62.6^{n.s}$	64.3^{*}	$47.5^{n.s}$	14.0^{*}
Nematode	1	81.7^{*}	$248.6^{n.s}$	$13.7^{n.s}$	$1.5^{n.s}$	$4.7^{n.s}$
Bacterium	1	$72.2^{n.s}$	$3.7^{n.s}$	$32.3^{n.s}$	231.4^{*}	187.6^{*}
Rootstock-nematode	2	$199.8^{n.s}$	671.6^{*}	174.6^{*}	191.9^{*}	19.2^{*}
Rootstock-bacterium	2	681.0^{*}	412.8^{*}	109.5^{*}	195.9^{*}	$7.7^{n.s}$
Nematode-bacterium	1	2483.3^{*}	322.7^{*}	334.6^{*}	170.4^{*}	26.4^{*}
Rootstock-nematode-bacterium	2	$133.4^{n.s}$	588.9^{*}	117.1^{*}	188.1^{*}	15.0^{*}
Error	24	28.2	26.6	10.3	22.4	2.4

*: Significant at the 0.05 level; n.s.: not significant

جدول ۳. مقایسه میانگین شاخص‌های رشدی پایه‌های بادام آلوده به نماتود ریشه‌گرهی *Meloidogyne javanica* و باکتری مولد گال طوقه، *Rhizobium vitis*.

Table 3. Mean comparison of growth indices of almond rootstocks, infected by the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* and the crown gall bacterium, *Rhizobium vitis*.

Treatments	Rootstocks	Root		Shoot		
		Fresh weight (g)	Dry weight (g)	Fresh weight (g)	Dry weight (g)	Length (cm)
Control	GN15	12.5^{bc}	3.7^{d}	23.8^{bc}	7.8^{ef}	63.8^{bc}
	GF677	5.2e	1.2^{e}	32.8^{b}	13.9^{bc}	69.3^{ab}
	Hybrid[1]	23.0^{a}	5.6^{c}	52.3^{a}	24.8^{a}	78.6^{a}
Nematode	GN15	10.5^{cd}	3.4^{d}	17.4^{c}	6.1^{f}	53.6^{cde}
	GF677	7.2^{de}	1.7^{e}	17.4^{c}	9.7^{de}	32.3^{g}
	Hybrid	8.7^{cde}	2.5^{de}	16.4^{c}	8.7^{def}	44.6^{ef}
Bacterium	GN15	22.7^{a}	10.1^{a}	31.4^{b}	15.0^{b}	62.6^{bc}
	GF677	9.5^{cde}	3.5^{d}	12.5^{c}	7.1^{ef}	53.0^{cde}
	Hybrid	10.7^{cd}	5.4^{c}	21.2^{bc}	11.8^{cd}	38.7^{fg}
Nematode-bacterium	GN15	17.0^{b}	8.1^{b}	22.5^{bc}	11.5^{cd}	70.3^{ab}
	GF677	24.9^{a}	10.3^{a}	49.5^{a}	22.3^{a}	56.3^{cd}
	Hybrid	12.8^{bc}	8.0^{b}	19.3^{c}	11.7^{cd}	45.3^{def}

۱- پایه حاصل از تلاقی هلو و بادام شورابی

1- Hybrid of peach×Shoorabi almond

⁂: Means with the same letters in each column are not significantly different at 5% level according to LSD test.

خاک و فاکتور تولید مثل است. بیشترین تعداد گال، کیسه تخم و لارو سن دوم و بالاترین میزان فاکتور تولید مثل در رقم GF677 مشاهده گردید. در پایه GN15 علیرغم وجود تعداد بسیار اندک گال، کیسه تخم، تخم و لارو سن دوم وجود نداشت.

شاخص‌های بیماری‌زایی باکتری

تجزیه واریانس و مقایسه‌ی میانگین تیمارها،

جدول ٤. تجزیه واریانس شاخص‌های نماتود در پایه‌های بادام آلوده به نماتود ریشه‌گرهی *Meloidogyne javanica* و باکتری مولد گال طوقه، *Rhizobium vitis*.

Table 4. Analysis variance of nematode indices in almond rootstocks infected by the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* and the crown gall bacterium, *Rhizobium vitis.*

Sources of Variation	df	MS (Mean Square)				
		Galls/gram of root	Egg masses/ gram of root	Eggs/egg mass	Larvae / 100 g of soil	Reproduction factor (RF)
Rootstock	2	2393.3*	220.1*	1467.1*	310.3*	0.89*
Nematode	1	14681.3*	1201.7*	3885.4*	4624.0*	2.51*
Bacterium	1	1865.2*	69.4n.s	658.7*	1495.1*	0.00 n.s
Rootstock-nematode	2	2293.3*	220.1*	1467.1*	310.3*	0.89*
Rootstock-bacterium	2	1502.0*	115.5*	880.4*	85.4*	0.02 n.s
Nematode-bacterium	1	1806.2*	69.4n.s	658.7*	1495.1*	0.00 n.s
Rootstock-nematode-bacterium	2	1502.0*	115.5*	880.4*	85.4*	0.02 n.s
Error	24	132.7	18.1	50.55	5.02	0.07

*:Significant at the 0.05 level; n.s :not significant

جدول ٥. مقایسه میانگین شاخص‌های نماتود روی پایه‌های بادام آلوده به نماتود ریشه‌گرهی *Meloidogyne javanica* و باکتری مولد گال طوقه، *Rhizobium vitis*.

Table 5. Mean comparisons of nematode indices in almond rootstocks infected by the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* and the crown gall bacterium, *Rhizobium vitis.*

Treatment	Rootstock	Galls/gram of root	Egg masses/gram of root	Eggs/egg mass	Larvae/100g soil	Reproduction factor (Rf)
Nematode	GN15	2.6e	0.0d	0.0c	0.0e	0.00b
	GF677	67.6b	18.3b	73.3a	14.6d	1.18a
	Hybrid	93.3a	24.6a	14.6b	14.6d	0.38b
Nematode-bacterium	GN15	14.3d	3.6cd	3.3c	25.3c	0.20b
	GF677	47.6c	17.6b	16.6b	51.3a	1.10a
	Hybrid	16.6d	5.0c	16.6b	30.0b	0.29b

*: Means with the same letters in each column are not significantly different at 5% level according to LSD test.

نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار در شاخص‌های مورد بررسی (تعداد، وزن و حجم گال ناشی از فعالیت باکتری) بود (جدول‌های ۶ و۷). به عبارت دیگر درجات متفاوتی از شاخص‌های بیماری‌زایی باکتری در ارقام و تیمارهای مختلف قابل مشاهده بود. بیشترین و بزرگ‌ترین گال روی پایه‌ی GN15 مشاهده شد. بر این اساس، حساس‌ترین پایه به باکتری مورد بررسی GN15 بود. همچنین حضور نماتود منجر به افزایش شاخص‌های بیماری‌زایی باکتری گردید.

بحث

از تعدادی از گیاهان آلوده به گال طوقه، یک باکتری گرم منفی، میله‌ای، اکسیداز و کاتالاز مثبت جدا شد که براساس آزمون‌های استاندارد باکتری شناسی به عنوان *Rhizobium vitis* تشخیص داده شد. گال‌ها روی میزبان های دیگر مثل رز و بادام نیز مشاهده شد. ولی تنها آزمون های بیوشیمیایی روی نمونه های جدا شده از انگور انجام شد (Shahabi Mohammadabadi *et al.* 2012). شهابی محمدآبادی و همکاران نیز اکثر جدایه‌های بدست آمده از

جدول ٦. تجزیه واریانس شاخص‌های بیماری‌زایی باکتری مولد گال طوقه، *Rhizobium vitis* در تیمارهای مختلف

Table 6. Analysis variance of pathogenicity indices of *Rhizobium vitis* in different treatments.

Sources of Variation	df	MS (Mean Square)		
		Galls/plant	Gall weight /plant (g)	Gall volume /plant (cm^3)
Rootstock	2	6.25^{*}	103.0^{*}	42.8^{*}
Nematode	1	$0.0^{n.s}$	$0.0^{n.s}$	$0.0^{n.s}$
Bacterium	1	9.0^{*}	171.2^{*}	74.0^{*}
Rootstock-Nematode	2	$0.0^{n.s}$	$0.0^{n.s}$	$0.0^{n.s}$
Rootstock-Bacterium	2	6.3^{*}	103.0^{*}	42.8^{*}
Nematode-Bacterium	1	$0.0^{n.s}$	$0.0^{n.s}$	$0.0^{n.s}$
Rootstock-Nematode-Bacterium	2	$0.3^{n.s}$	$2.2^{n.s}$	$1.4^{n.s}$
Error	24.0	0.2	25.3	8.1

*:Significant at the 0.05 level; n.s :not significant

جدول ۷. مقایسه میانگین شاخص‌های بیماری‌زایی باکتری عامل گال طوقه روی پایه‌های بادام آلوده به نماتود ریشه‌گرهی *Meloidogyne javanica* و باکتری *Rhizobium vitis*.

Table 7. Mean comparisons of pathogenicity indices of crown gall pathogen on roots of almond rootstocks infected by the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* and the crown gall bacterium, *Rhizobium vitis*..

Treatment	Rootstock	Galls No./plant	Gall weight/plant (g)	Gall volume/plant (cm^3)
Bacterium	GN15	2.3^{b}	6.8^{a}	11.1^{a}
	GF677	0.3^{c}	1.9^{b}	3.3^{ab}
	Hybrid	0.3^{c}	0.7^{b}	0.6^{b}
Nematode-bacterium	GN15	3.0^{a}	7.5^{a}	11.0^{a}
	GF677	0.0^{c}	0.0^{b}	0.0^{b}
	Hybrid	0.0^{c}	0.0^{b}	0.0^{b}

Means with the same letters in each column are not significantly different at 5% level according to LSD test.

مو در استان‌های فارس کهکیلویه و بویراحمد را متعلق به این گونه تشخیص داده‌اند.

مایه‌زنی هر یک از بیمارگرها (باکتری عامل گال طوقه و نماتود ریشه‌گرهی) به تنهایی، باعث کاهش شاخص‌های رشدی گیاهان مورد تیمار شدند. علت این کاهش وزن را می‌توان به اختلال در جذب و انتقال آب و مواد غذایی از طریق ریشه به بخش‌های فوقانی و فتوسنتزکننده و در نتیجه کم رشدی اندام‌های هوایی گیاه نسبت داد. کاهش کمتر وزن تر و خشک و طول اندام هوایی در پایه GN15 و یا حتی افزایش شاخص‌های مذکور در پایه GF677 در حضور هم‌زمان دو بیمارگر می‌تواند به دلیل واکنش متفاوت پایه‌ها به تولید و یا تحریک ترشح هورمون اکسین توسط هر دو بیمارگر باشد که نهایتا منجر به تحریک رشد گیاه می‌گردد (Schaad *et al.* 2001, Perry *et al.* 2009). این موضوع در پایه GF677 که یکی از هیبریدهای هلو و بادام با گسترش وسیع است، مشهودتر بود. زیرا به دلیل رشد خوب و سیستم ریشه توسعه یافته، در پایه مذکور سیتوکینین بیشتری در ریشه تولید و به اندام‌های هوایی منتقل می شود. همچنین به دلیل بیشتر بودن تعداد و اندازه آوندهای چوبی، ضریب هدایت آبی ریشه‌های آن بالاتر است. (Herreros 2004). در پایه‌ی هیبرید (رقم محلی هلو × بادام شورابی ۱) که تحمل بیشتری در مقایسه با پایه‌ی GF677 نسبت به نماتود ریشه‌گرهی مشاهده شد، حضور هم‌زمان نماتود و باکتری منجر به کاهش شدید رشد

گردید. به نظر می‌رسد این پایه در مقایسه با دو پایه اصلاح شده دیگر (GN15, GF677) به دلیل آنکه تنها بر اساس تحمل به نماتود انتخاب شده است قادر به تحمل حضور هم‌زمان دو بیمارگر نمی‌باشد. به عبارت دیگر احتمالاً باکتری باعث شکسته شدن مقاومت به نماتود شده است.

در مجموع نتایج این بررسی نشان داد که پایه‌ی GN15 با داشتن کمترین میزان گال ناشی از فعالیت نماتود و بیشترین تعداد گال باکتریایی، حساس‌ترین پایه به باکتری مولد گال طوقه و مقاوم‌ترین پایه به نماتود ریشه گرهی، می‌باشد. نکته‌ی مهم در این بررسی وجود اختلاف معنی‌دار بین حضور و عدم حضور نماتود در افزایش بیماری‌زایی باکتری بود. به این‌صورت که حضور نماتود منجر به افزایش قدرت بیماری‌زایی باکتری در پایه‌ی GN15 شد. علت این امر را می‌توان به ایجاد زخم در ریشه‌ی گیاه توسط نماتود و فراهم شدن شرایط مساعد اولیه برای جذب باکتری و بیماری‌زایی آن نسبت داد.

درحالی‌که حضور نماتود تاثیر معنی‌دار بر شاخص‌های بیمارزایی باکتری در پایه‌های GF677 و هیبرید نداشت. در مورد اثر باکتری روی بیمارزایی نماتود مشاهده شد که علی‌رغم مقاومت نسبی پایه‌ی GN15 به نماتود، حضور باکتری باعث تشدید شاخص‌های نماتود شد. یکی از دلایل این امر را می‌توان فراهم شدن شرایط فیزیولوژیکی مناسب برای نماتود، در اثر فعالیت باکتری دانست. به عبارت دیگر حساسیت بالای این پایه به باکتری عامل گال طوقه منجر به ضعیف شدن سیستم ایمنی گیاه پس از حمله‌ی باکتری می‌گردد، که در این شرایط نماتود میزبان مناسبی برای تغذیه خواهد داشت. شایان ذکر است نتایج به دست آمده حاصل برهمکنش بیمارگرها و گیاه طی دوره‌ی سه ماهه است و در صورتی که این تعامل مدت بیشتری به طول انجامد احتمال تغییر نتایج و تاثیر بیشتر بیمارگرها بر شاخص‌های رشدی گیاه وجود دارد.

منابع

Anonymous. 2009. Faostat. Http://www.faostat.org

Ashrafi J. and Hasanzadeh N. 2010. Antibacterial effects of savory essential oil and two copper compounds in control of grape crown gall. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants. 26(1): 1-12. (In Persian with English summary).

Bird D. M., Opperman C. H. and Davies K. G. 2003. Interactions between bacteria and plant-parasitic nematodes: Now and then**.** International Journal of Parasitology 33: 1269-1276.

Damadzadeh M. 2007. Nematology in agriculture. Publication of Andishehgostar. 42-45. (In Persian).

Herreros A. 2004. Agronomic evalution of six new peach and nectarine rootstock for Chile. Santiago. Chile.

Jenkins W. R. 1964. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. Plant Disease Reporter 48: 692.

Jepson S. B. 1987. Identification of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). CAB. Farnham Royal, UK. 265 p.

Mahmoudzadeh H. and Davoodi A. 2007. Isolation of crown gall agent and effect of thermo-chemotherapy treatments on its elimination from grapevine cuttings. Iranian Journal of Plant Pathology 43: 144-146 [410-428]. (In Persian).

Moore L. W. 2015. Crown gall disease of nursery crops. Pacific Northwest Plant Disease Management Handbook, Oregon State University.

Karssen G. and Moens M. 2006. Root knot nematodes, pp. 59-90. In: R. N. Perry and M. Moens (Eds). Plant nematology. CABI Head Office, Wallingford, UK.

Perry R. N., Moens M. and Starr J. L. 2009. Root-knot nematodes. CABI North American office.

Rubioe-Cabetas M.-J., Minot J.-C. and Esmenjaud D. 2001. Interaction of root-knot nematodes (RKN) and the Bacterium *Agrobacterium tumefaciens* in roots of *Prunus cerasifera*: evidence of the protective of the *Ma* RKN resistance genes against expression of crown gall symptoms. European Journal of Plant Pathology 107(4): 433-441.

Sahraneshin M. 2013. Reaction of some almond rootstock and cultivars to root-knot nematode (*Meloidogyne javanica)*. M.Sc. Thesis submitted to Shahrekord University Iran.

Schaad N.W. Jones J. B. and Chun W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria, 3rd edition. American Phytopathology Society. USA. 373 p.

Shahabi Mohamad Abadi M., Taqavi S. M. and Javaheri M. 2012. Phenotypic and genotypic characteristics of *Agrobacterium* isolates from different hosts in Fars and Kohgiluye and Boyerahmad provinces. Iranian Journal of Plant Pathology 48: 113-115 [329-341]. (In Persian with English abstract).

Southey J. F. 1986. Laboratory methods for work with plant and soil nematodes. 6th edition. Ministry of Agriculture Fisheries and Food. Her majesty's stationary office. London. 202 p.

Taylor D. P. and Netscher C. 1974. An improved technique for preparing perineal patterns of *Meloidogyne* spp. Nematologica 20: 268-269.

Tolba I. H. and Zaki M. F. 2011. Characterization of *Agrobacterium vitis* isolates obtained from galled grapevine plants in Egypt. Annals of Agricultural Science 56: 113-119..