نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۱، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۶، ص. ۳۲۱-۳۱۲

Journal of Plant Protection
Vol. 31, No. 2, Summer 2017, P. 312-321

ارزیابی آنتاگونیستی برخی جدایه‌های قارچی روی نماتد سیست طلایی سیب‌زمینی (*Globodera rostochiensis*) در شرایط آزمایشگاه و گلخانه در استان همدان

خدیجه عباسی[۱]–دوستمراد ظفری[۲]*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۸/۱۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۲/۰۱

چکیده

با توجه به اهمیت بالای سیب‌زمینی در استان همدان به عنوان قطب تولید سیب‌زمینی بذری و خوراکی در ایران و این‌که نماتد *Globodera rostochiensis* یکی از مخرب‌ترین و خسارت‌زاترین بیماری‌هایی است که این محصول را مورد هجوم قرار می‌دهد ارائه راه‌کارهای مدیریتی مناسب جهت کنترل این بیماری بسیار ضروری به نظر می‌رسد. در این تحقیق، ارزیابی آنتاگونیستی ۳۴ جدایه از ۱۱ جنس قارچی جدا شده از نماتد سیست طلایی موجود در مزارع آلوده‌ی سیب‌زمینی استان همدان در شرایط آزمایشگاه و گلخانه مورد بررسی قرار گرفت. ارزیابی در شرایط آزمایشگاه به صورت اندازه‌گیری قطر هاله در محیط کیتین آگار و محاسبه درصد تخم و لارو پارازیته شده در محیط آب‌آگار و همچنین در شرایط گلخانه به صورت بررسی فاکتورهای رشدی سیب‌زمینی تحت تأثیر آنتاگونیستی جدایه‌های قارچی بر نماتد، انجام شد. نتایج به دست آمده از شرایط آزمایشگاه و گلخانه تا حد زیادی همبستگی داشتند و هم‌دیگر را تأیید کردند. نتایج حاصل نشان‌دهنده اثر مثبت جدایه‌های مختلف قارچیدرکاهش بیماری‌زایی و خسارت نماتد بود.در نهایت جدایه‌های برتر، جدایه۱۵۱ (*Beauveriabassiana*)، ۱۵۲(*Lecanicilliummuscarium*)،۱۵۳ (*Paecilomyces lilacinus*)و ۱۵۴(*Trichoderma atroviridae*)به عنوان مؤثرترین و قوی‌ترین قارچ‌های آنتاگونیست در کنترل این نماتد انتخاب شدند.

واژه‌های کلیدی: پارازیته‌کنندگی، صفات عملکردی، کنترل بیولوژیک، کیتین‌آگار

مقدمه

سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum*) یکی از محصولات مهم کشاورزی است که به عنوان منبع غذایی انسان‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد و از نظر اهمیت بعد از گندم، برنج، ذرت و جو پنجمین محصول مهم در جهان محسوب می‌شود (۲۴). ایران سومین کشور تولیدکننده‌ی سیب‌زمینی درآسیا است که میزان تولید آن در سال ۱۳۹۳ حدود پنج میلیون تن برآورد شده است. استان همدان با ۲۱/۳ درصد از تولید سیب‌زمینی کشور، مقام اول در تولید این محصول را به خود اختصاص داده است (۲). نماتد سیست طلایی سیب‌زمینی *Globoderarostochiensis*(Wollenweber, 1959; Behrens, 1975)
به‌عنوان مخرب‌ترین و خسارت‌زاترین عامل بیماری‌زای این محصول در دنیا محسوب می‌گردد که می‌تواند تا ۱۰۰ درصد باعث خسارت شود و تاکنون از مناطق سیب‌زمینی‌کاری۶۵ کشور دنیا گزارش شده است، این عامل بیماری‌زا تا چند سال گذشته جزء لیست بیمارگرهای قرنطینه بوده و در ایران وجود نداشت اما متأسفانه چند سال قبل وجود آن در مزارع استان همدان گزارش شد (۶) و در مدت کوتاهی در کل مناطق کشت بهاره‌ی استان پراکنده شده و خسارت زیادی وارد کرده است.تا چند سال اخیر کاربرد سموم شیمیایی یکی از روش‌های قابل اطمینان در مدیریت این بیماری بوده است (۱۵) امادر حال حاضر بر اساس توافقات بین‌المللی، استفاده از نماتدکش‌های شیمیایی در بعضی از کشورها به دلایلی از قبیل اثرات مخرب آن‌ها روی انسان و محیط زیست، کاهش نسبت C/N در خاک، ماندگاری در خاک و در نتیجه آلودگی آب‌های زیرزمینی و قیمت بالای بیشتر نماتدکش‌های مؤثر ممنوع شده است و همچنین در کشورهای توسعه یافته عدم دسترسی به آن‌ها و کاهش تأثیر آن‌ها به سبب استفاده مداوم از این ترکیبات منجر به این تصمیم شده است (۵). به دلیل مضرات ذکر شده محققان به دنبال دست‌یابی به راه‌های مناسب برای مهار نماتدها هستند که روش مناسب برای این امر، کنترل به وسیله عوامل آنتاگونیستی مطرح شده است و از این روش به عنوان یک روش عملی و امیدبخش یاد می‌شود (۸ و ۲۰).

۱- دانشجوی دکتری گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا همدان
۲- دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا همدان
(*- نویسنده مسئول: Email: Zafari_d@yahoo.com)
DOI: 10.22067/jpp.v0i0.59117

دشمنان طبیعی زیادی نماتدهای انگل گیاهی را مورد حمله قرار می‌دهند و جمعیت آن‌ها را کاهش می‌دهند. این عوامل شامل بیمارگرها، شکارچیان، رقابت کنندگان و آنتاگونیست‌ها هستند. در مجموع، ۷۶ درصد از دشمنان طبیعی گزارش شده از نماتدها را قارچ‌ها تشکیل می‌دهند(۳) که غالب قارچ‌های انگل داخلی نماتدها و انگل تخم آن‌ها مربوط به خانواده *Clavicipitaceae* و آنامورف‌های وابسته به آن‌ها می‌باشند (۷). قارچ‌های آنتاگونیست و نقش آن‌ها در کنترل بیولوژیک نماتدها از جمله نماتدهای سیستی، توسط محققین متعددی مطالعه شده است. طی مطالعه‌ای توسط توبین و همکاران (۲۲) اثر گونه‌ی قارچی *Pochonia chlamydosporia* بر نرخ تکثیر نماتدهای سیستی سیب‌زمینی بررسی شد و این قارچ به عنوان عامل بیوکنترل با شایستگی بالا جهت کنترل این نماتدها معرفی گردید. همچنین در مطالعه‌ای که توسط لوپز لیما و همکاران (۹) صورت گرفت کاهش ۸۹ درصدی جمعیت نماتد سیست طلایی سیب‌زمینی با استفاده از قارچ *Paecilomycessp.* مشاهده شد. از بین قارچ‌های همراه نماتد، گونه‌های تریکودرما نیز ظرفیت بیوکنترلی بالایی دارند و تولید آنزیم‌های هیدرولیزکننده مانند کیتیناز، گلوکاناز و پروتئاز به عنوان مهم‌ترین مکانیسم برای فعالیت‌های بیوکنترلی در این قارچ جهت کنترل نماتدهای انگل گیاهی به ویژه نماتدهای سیستی مطرح می‌باشد (۱۴ و ۱۹). سیفاله و توماس (۱۶) اثر متقابل بین گونه*Trichodermaharzianum* و نماتد سیست طلایی‌سیب‌زمینی در شرایط آزمایشگاه را گزارش کردند و بیان داشتند که قارچ به کمک ظشفعالیت آنزیمی در سیست و تخم داخل آن نفوذ کرده وسبب مرگ لاروها می‌شود. در بررسی‌های انجام شده توسط داکمن (۴) مشاهده شد که گونه‌ی*Verticillium suchlasporium* ۹۰ درصد تخم‌های *G. rostochiensis* را پس از ده روز پارازیته می‌کند و این امر ناشی از فعالیت آنزیم‌های پروتئاز و کیتیناز تولید شده توسط قارچ مذکور می‌باشد. در مطالعه‌ای که توسط تیکونو و همکاران (۲۱) انجام گرفت تیمار تخم‌های *G. Pallida* با کیتیناز CHI43از قارچ *V.suchlasporium* باعث ایجاد زخم‌هایی روی تخم شد و اضافه کردن سرین پروتئاز P32 سبب گسترش این حالت به سطح بیشتری از تخم گردید، ایشان نتیجه گرفتند هر دو آنزیم در فرآیند بیماری‌زایی نماتد نقش دارند. مانزانیلا لوپز و همکاران (۱۲) در مطالعه‌ای تحت عنوان پیشرفت‌ها و چالش‌های موجود جهت بهتر کردن عملکرد قارچ *P. chlamydosporia* در کنترل نماتدهای انگل گیاهی، نقش آنزیم‌های خارج سلولی از جمله پروتئاز و کیتیناز را در آلودگی تخم نماتدها مهم عنوان کردند. همچنین در مطالعه‌ی انجام شده توسط سانتوس و همکاران (۱۷) بیولوژی، پارامترهای رشد و فعالیت آنزیمی *P.chlamydosporia* جدا شده از نماتدهای سیست سیب‌زمینی و ریشه گره‌ای مورد بررسی قرار گرفته و پروتئازها و کیتینازهای خاصی را از این قارچ جداکردند. مورتون و همکاران (۱۳) در مروری جامع بر آلودگی نماتدهای انگل گیاهی توسط قارچ‌های نماتدخوار، کاربرد بیولوژی مولکولی را جهت درک فرآیندهای آلودگی و بهبود بخشیدن به کنترل بیولوژیک مهم عنوان کردند و سیفاله و نقیب‌اله خان (۱۵) با استفاده از میکروسکوپ الکترونی اسکانینگ با حرارت پایین (LTSEM) شروع آلودگی و نفوذ قارچ *T. harzianum* به دیواره سیست و داخل تخم نماتد *G. rostochiensis* را مشاهده و بررسی کردند.مهدی‌خانی مقدم و روحانی (۱۱) اثرجدایه‌هاییازقارچ-های *T.harzianum* و *T. Virens* و باکتری*Bacillus subtilis* در کنترل بیولوژیکی نماتد سیستی چغندرقند در شرایط مزرعه را بررسی کردند که نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد قارچ*T. virens VM1* اثر قابل توجهی در کنترل نماتد سیستی چغندرقند دارد. همچنین مهدی‌خانی و همکاران (۱۰) به منظور کنترل نماتد سیستی چغندرقند اثر ده جدایه از قارچ تریکودرما متعلق به دو گونه *T.harzianum*و *T. virens* را طی دو سال در آزمایشگاه و گلخانه روی تخم و سیست نماتد مورد بررسی قرار دادند که نتایج حاکی از کاهش ۷۶/۶۸ و ۷۲/۶۵ درصدی آلودگی نماتد در خاک توسط دو جدایه *T. harzianum Bi* و *T. virens VM1* بوده است.

بنابراین با توجه به این‌که پلی‌مر کیتین، ترکیب غالب لایه میانی پوسته تخم نماتد می‌باشد و از آن‌جایی که کیتینازها به عنوان آنزیم‌های تجزیه کننده کیتین در دامنه وسیعی از موجودات از جمله قارچ‌ها وجود دارند در این پژوهش تلاش شده پتانسیل قابل توجه این آنزیم‌ها در قارچ‌های آنتاگونیست جهت کنترل نماتد سیست طلایی سیب‌زمینی مورد بررسی قرار گیرد. کنترل بیولوژیک نماتدهای انگل گیاهی با استفاده از عوامل آنتاگونیست در ایران نسبتاً جوان بوده و حدوداً از دو دهه اخیر آغاز شده و ضروری است تا با حمایت سیاست‌گزاران بخش کشاورزی، پژوهش‌های مرتبط با این حوزه تقویت شود.

مواد و روش‌ها

ارزیابیتوان تولید آنزیم کیتیناز در محیط کشت کیتین‌آگار

توانایی۳۴ جدایه‌ی قارچی(جدول ۱) جدا شده از نماتد سیست طلایی سیب‌زمینی،جمع‌آوری شده از مزارع آلوده‌ی سیب‌زمینی استان همدان،در تولید آنزیم کیتیناز در محیط آب‌آگار دارای ۰/۵ درصد کیتینکلوئیدیکه کیتین به عنوان تنها منبع کربنی مورد استفاده قارچ قرار می‌گیرد، بررسی شد. برای تهیه کیتینکلوئیدی،بعنوان منبع کربن در محیط کشت(سوبسترا)، ۱۰۰میلی‌لیتر اسید فسفریک ۸۵ درصد به ده گرم پودر کیتینافزوده شد و مخلوط حاصل به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴°C نگهداری گردید. به مخلوط فوق، آب اضافه شده و با پارچه پنیر صاف گردید. برای حذف کامل اسید، مراحل

افزودن آب و صاف کردن آن، چندین بار تکرار شد. ماده خمیری شکل حاصل خشک و پودر شده و در محیط کشت استفاده گردید(۱۸). یک دیسک پنج میلی‌متری از حاشیه کشت پنج روزه قارچ در مرکز تشتک قرار داده شد و تشتک‌ها به مدت پنج روز در دمای ۲۵°C نگهداری شدند. پس از پنج روز،تواناییتولید آنزیم کیتینازدر جدایه‌ها با اندازه‌گیری هاله شفاف در اطراف پرگنه قارچارزیابی شد (۱).

بررسیاثر آنتاگونیستی جدایه‌های قارچی علیه *G. rostochiensis* در شرایط آزمایشگاه

جهت بررسی اثر آنتاگونیستی۳۴ جدایه‌ی قارچی مورد نظر(جدول ۱)روی سیست و تخم نماتد، سیست‌های نماتد گونه *G. Rostochiensis* پس از ضدعفونی سطحی باهیپوکلریت سدیم۰/۵ درصد به مدت سه دقیقه و چندین بار شستشو با آب مقطر سترون در دسته‌های ده‌تایی، به فاصله پنج سانتی‌متری از یک دیسک با قطر پنجمیلی‌متر از کشت پنج روزه قارچها در محیط آب‌آگار سترون قرار داده شدند و به انکوباتور با دمای ۲۵°C منتقل گردیدند. پس از گذشت دو هفته درصد تخم‌ها و لاروهای سالم و پارازیته شده محاسبه شد. آزمایش در سه تکرار برای هر جدایه و سه تکرار برای نمونه شاهد که دارای سیست و فاقد هر گونه قارچی بود در قالب طرح کاملاً تصادفیانجام گرفت و میانگین داده‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد با نرم‌افزار SAS نسخه ۹ مقایسه شدند.

بررسی اثر آنتاگونیستی جدایه‌های قارچی علیه نماتد *G. rostochiensis* در شرایط گلخانه

به منظور تعیین فعالیت آنتاگونیستی۳۴ جدایه‌ی قارچی (جدول ۱) علیه نماتد سیست طلایی سیب‌زمینی، آزمایشی در شرایطگلخانه به صورت طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان انجام شد. تیمارهای آزمایش ۳۶ تیمار شامل ۳۴ جدایه قارچی (جدول ۱)، تیمار شاهد (سیب‌زمینی بدون نماتد و قارچ) و تیمار شاهد (سیب‌زمینی با نماتد و بدون قارچ) بودند.

برای تکثیر جدایه‌های قارچی مقدار ۲۰ گرم بذر گندم خیس خورده در دروننایلون قابل اتوکلاو ریخته شد و به ازاء هر گرم بذر دو میلی‌لیتر آب مقطر افزوده شد و سه بار به فاصله ۴۸ ساعت اتوکلاو شدند. سپس به هر نایلون تعداد چهار دیسک قارچی به قطر پنج میلی‌متر از جدایه‌های منتخب در سه تکرار اضافه گردید و در دمای ۲۵°C و شرایط تاریکی نگهداری شدند. جهت کلونیزه شدن همه بذور و همچنین جلوگیری از بهم چسبیدن آن‌ها به فاصله ۴۸ ساعت یک بار اقدام به بهم زدن نایلون‌های حاوی بذور گردید. در نهایت پس از گذشت سه هفته کلیه بذور توسط جدایه‌های قارچی آلوده شده و آماده استفاده در گلدان گردیدند.

برای کاشت سیب‌زمینیاز غده‌های سیب‌زمینی رقم مارفونا که از مرکز تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی شهرستان همدان تهیه شده بود و دارای اندازه‌ی تقریباً یکسان و عاری از آلودگی بودند استفاده شد. غده‌های سیب‌زمینی به تعداد یک عدد در هر گلدان (گلدان‌های پنج کیلویی با زهکش مناسب) که با مخلوطی از رس و ماسه استریل به نسبت ۲:۱ پر شده بود کشت گردید. خاک مورد نظر را ابتدا غربال کرده و سپس با استفاده از اتوکلاو سترون گردید.

جدول ۱- جدایه‌های قارچی مورد استفاده جهت ارزیابی فعالیت آنتاگونیستی.

Table 1. The names of 34 fungal isolates used to assessment of antagonistic activity

شماره جدایه Isolate No	جنس و گونه Genus and species	شماره جدایه Isolate No	جنس و گونه Genus and species
6	*Candida parapsilosis*	83	*Fusarium oxysporum*
8	*Fusarium equiseti*	93	*Candida sp.*
11	*Plectosphaerella cucumerina*	97	*Fusarium oxysporum*
12	*Fusarium oxysporum*	109	*Fusarium solani*
14	*Fusarium solani*	111	*Candida parapsilosis*
18	*Fusarium solani*	113	*Fusarium oxysporum*
19	*Candida parapsilosis*	123	*Fusarium oxysporum*
27	*Alternaria alternata*	129	*Fusarium equiseti*
30	*Alternaria alternata*	140	*Candida parapsilosis*
40	*Plectosphaerella cucumerina*	141	*Chaetomium sp.*
49	*Cylindrocarpon sp.*	144	*Candida parapsilosis*
52	*Ulocldium dauci*	145	*Fusarium oxysporum*
56	*Fusarium equiseti*	147	*Fusarium oxysporum*
62	*Fusarium solani*	151	*Beauveria bassiana*
63	*Fusarium solani*	152	*Lecanicillium muscarium*
66	*Fusarium equiseti*	153	*Paecilomyces sp.*
76	*Candida parapsilosis*	154	*Trichoderma atroviridae*

در هنگام کاشت، برای آلوده‌سازی سیب‌زمینی با نماتد، در همه تیمارها به جز تیمار شاهد (سیب‌زمینی بدون نماتد و قارچ) تعداد ۱۰۰ عدد سیست به خاک زیر غده‌ها اضافه گردید. همچنین در این مرحله، جدایه‌های مختلف قارچی بر اساس هر تیمار به خاک زیر غده اضافه گردید. در نهایت خاک با اینوکلوم تهیه شده‌ی ۳۴ جدایه قارچی آغشته گردید.

رشد سیب‌زمینی در گلخانه در طی ۹۰ روز با طول دوره روشنایی ۱۲-۱۰ساعت صورت گرفت. در پایان دوره۹۰ روزه گیاهان از سطح خاک برداشت گردیدند و فاکتورهای رشدی سیب‌زمینیشامل: طول و وزن خشک ریشه، ارتفاع بوته، وزن خشک اندام‌های هوایی، تعداد و وزن غده اندازه‌گیری گردید. علاوه بر این، تعداد سیست در ۱۰۰ گرم از خاک هر گلدان نیز تعیین شد.

تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹و آزمون مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصدانجام شد.

نتایج و بحث

نتایج آزمایش‌هاحاکی از توانایی فعالیت آنتاگونیستی در همه جدایه‌هابود.

نتایج بررسی‌ها در شرایط آزمایشگاه

سی و چهار جدایه‌ی مورد مطالعه در این تحقیق جهت بررسی تولید آنزیم کیتیناز در محیط کشت کیتین‌آگار کشت شدند و فعالیت آنزیم کیتیناز به صورت هاله‌ای شفاف در اطراف پرگنه‌ی قارچ‌ها مشاهده و اندازه‌گیری شد (شکل ۲). همه‌ی جدایه‌های مورد بررسی توان تولید آنزیم کیتیناز و تجزیه و استفاده از کیتین را داشتند. نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان دهنده تفاوت بسیار معنی‌داریدر سطح احتمال یک درصد بین هاله‌ی تشکیل شده در جدایه‌های مختلف قارچی در محیط کیتین‌آگار بود (جدول ۲).

مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که قطر هاله‌ی تشکیل شده در جدایه‌ی شماره ۱۵۳ (*P.lilacinus*) نسبت به سایر جدایه‌ها بیشتر وجدایه‌ی شماره ۶ (*C. parapsilosis*) کمترین قطر هاله را دارا بود که بزرگتر بودن اندازه‌ی قطر هاله در محیط تشتک نشان‌دهنده‌ی فعالیت کیتینازی بالا می‌باشد (شکل ۱)(۱).

در بررسی اثر متقابل پلاگ قارچی با سیست نماتد نیز همه‌ی جدایه‌ها دارای قدرت پارازیته‌کنندگی بودند. نتایج آزمایش اختلاف بسیار معنی‌داریرا در سطح احتمال ۰/۱ درصد بین جدایه‌های مورد آزمون از نظر پارازیته کردن تخم نماتد و مرگ و میر لاروها نشان داد (جدول ۳). بر اساس نتایج به دست آمده از مقایسه میانگین داده‌ها، جدایه‌ی شماره ۱۵۲(*L. muscarium*) دارای بیشترین قدرت پارازیته‌کنندگی و در واقع بیشترین تعداد تخم و لارو مرده بود و تیمار شاهد که فاقد قارچ آنتاگونیست و فقط دارای سیست در محیط آب‌آگار بود کمترین تعداد تخم و لارو مرده را داشت. همچنین علاوه بر تیمار شاهد، جدایه‌ی شماره ۶۲ (*F. solani*) کمترین قدرت پارازیته‌کنندگی را دارا بود (شکل ۳). در این بررسی مشخص شد تمام جدایه‌های قارچی مورد آزمون کم و بیش قادرند سیست‌ها و تخم‌های نماتد را کلونیزه کنند (شکل ۴) این خصوصیت را به احتمال زیاد می‌توان به توانایی ترشح آنزیم‌های کیتینازی و پروتئازی توسط قارچ‌های مزبور نسبت داد. نتایج به‌دست آمده از این آزمایش با نتایج مطالعه‌ی سیف‌اله و توماس (۱۳) که اثر متقابل بین گونه *T. harzianum* و نماتد سیست طلایی سیب‌زمینی در شرایط آزمایشگاه را بررسی و بیان داشتند قارچ تریکودرما سیست‌های نماتد را کلونیزه کرده و با نفوذ به درون تخم‌های داخل سیست باعث مرگ لاروها می‌شود، مطابقت داشت.

نتایج آزمایش گلخانه‌ای

در شرایط گلخانه نیز همه‌ی جدایه‌های مورد بررسی دارای فعالیت آنتاگونیستی بودند.نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تأثیر جدایه‌های مختلف قارچی بر صفات اندازه‌گیری شده سیب‌زمینی درسطح احتمال آماری ۰/۱ درصد و تعداد سیست در هر گلدان در سطح یک درصدمعنی‌دار گردید (جدول ۴).

مقایسه میانگین صفات ارزیابی شده سیب‌زمینی نشان دادر تمام صفت‌های عملکردی اندازه‌گیری شده در بوته‌ی سیب‌زمینی تیمار جدایه‌های شماره ۱۵۴(*T.atroviridae*) و ۱۵۱(*B.bassiana*) دارای بیشترین مقدارها بودند و به عنوان برترین جدایه‌های آنتاگونیست در شرایط گلخانه شناخته شده و جدایه‌های۵۶ (*F. equiseti*)و ۱۲(*F. oxysporum*) با کمترین مقدارهای اندازه‌گیری شده در تمام صفات عملکردی ضعیف‌ترین قارچ‌های آنتاگونیست در شرایط گلخانه معرفیمی‌گردند (جدول ۵).

لازم به ذکر است که در ارتباط با تمام صفات، تیمار شاهدیکه فقط دارای سیست نماتد و فاقد قارچ آنتاگونیست بود کمترین مقادیر عملکردی را در همه‌ی صفت‌ها دارا بود و تیمار شاهدی که صرفاً در آن گلدان سیب‌زمینی بدون حضور نماتد و قارچ کشت شده بود بیشترین مقادیر عملکردی بوته را به خود اختصاص داد.

جمعیت سیست در هر گلدان در حضور قارچ‌های آنتاگونیست کاهش یافت،جدایه‌ی شماره ۶۳ (*F. solani*) بیشترینو جدایه‌ی ۱۱۳(*F. oxysporum*) کمترین تعداد سیست را در ۱۰۰ گرم خاک دارا بودند (شکل ۵).

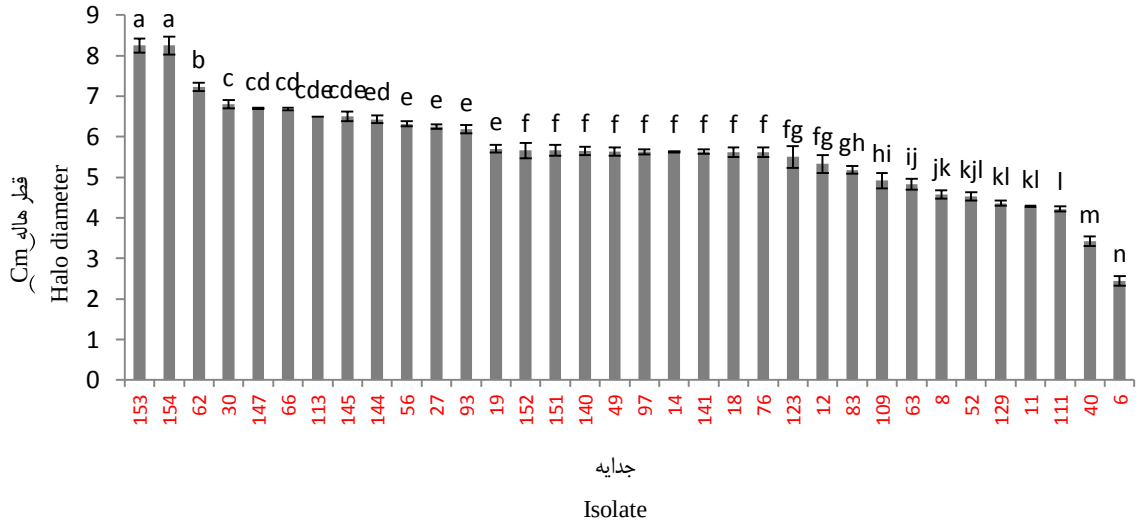
جدول ۲-تجزیه واریانس (میانگین مربعات) ارزیابی توان تولید آنزیم کیتیناز در ۳٤ جدایه‌ی قارچی در محیط کشت کیتین‌آگار

Table 2- Variance analysis (mean of squares) of chitinase enzyme production ability evaluation for 34 fungal isolates in chitin-agar medium

منابع تغییرات Sources of variations	درجه آزادی Degree of freedom	قطر هاله Halo diameter
جدایه Iisolate	33	4.33**
خطا Error	68	0.04
ضریب تغییرات (درصد) Coefficient of variations (percent)	-	3.43

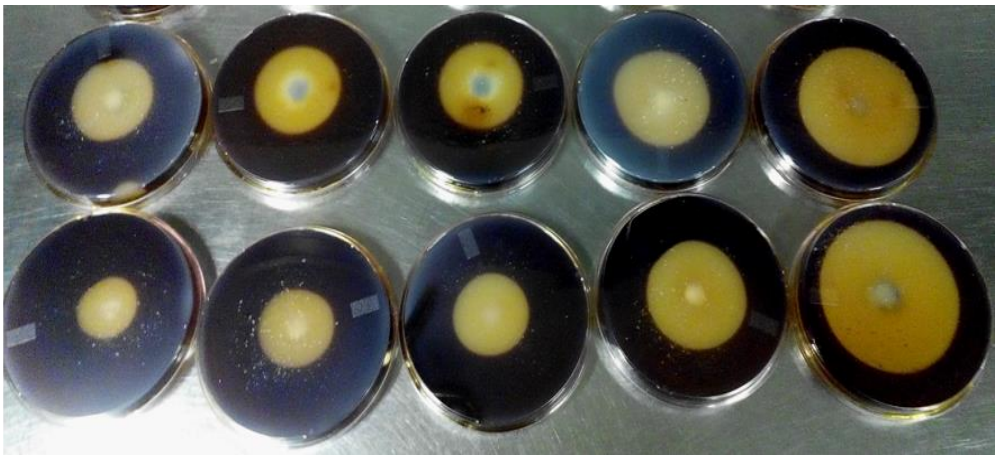
**: معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد.

** Significant at 1 % probability level.



شکل ۱- مقایسه میانگین ارزیابیتوان تولید آنزیم کیتیناز در ۳٤ جدایه‌ی قارچیدر محیط کشت کیتین‌آگار

Figure 1- Mean comparison of chitinase enzyme production ability evaluation for 34 fungal isolates in chitin-agar medium



شکل ۲- تفاوت قطر هاله تشکیل شده ده جدایه مختلف قارچی در محیط کشت کیتین‌آگار به عنوان نمونه

Figure 2- Halo diameter difference of ten fungal isolates in chitin-agar medium as sample

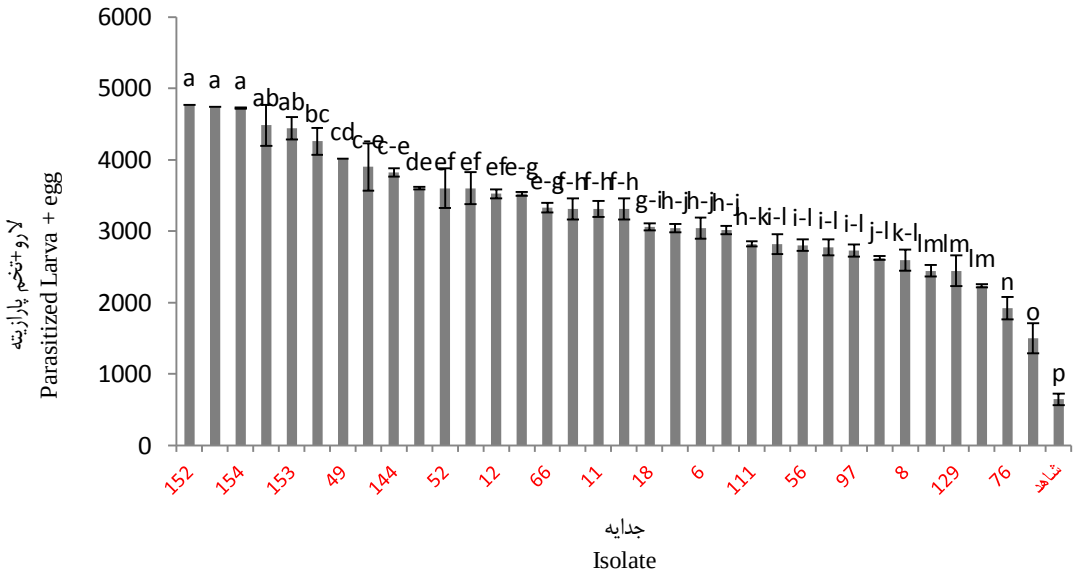
جدول ۳-تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثر ۳٤ جدایه‌ی قارچی علیه *G. rostochiensis* در شرایط آزمایشگاه.

Table 3- Variance analysis (mean squares) of effect of 34 fungal isolates against *G. rostochiensis* in vitro.

منابع تغییرات Sources of variations	درجه آزادی Degree of freedom	لارو پارازیته Parasitized larva	تخم پارازیته Parasitized egg	لارو+تخم پارازیته Parasitized Larva +egg
جدایه Iisolate	34	130278***	1738287***	2517128***
خطا Error	70	13596	41400	57876
ضریب تغییرات (درصد) Coefficient of variations (percent)	-	15.93	8.18	7.47

***: معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۱ درصد.

***: Significant at 0.1 % probability leve



شکل ۳- مقایسه میانگین اثر ۳٤ جدایه‌ی قارچی علیه *G. rostochiensis* در شرایط آزمایشگاه

Figure 3- Mean comparison of effect of 34 fungal isolates against *G. rostochiensis* in vitro

شکل ٤- تخم‌ها و لاروهای پارازیته شده توسط جدایه‌ی ۱۵٤ (*T. atroviridae*) در محیط آب‌آگار

Figure 4- Parasitized eggs and larvaes by *T. atroviridae*in water-agar medium

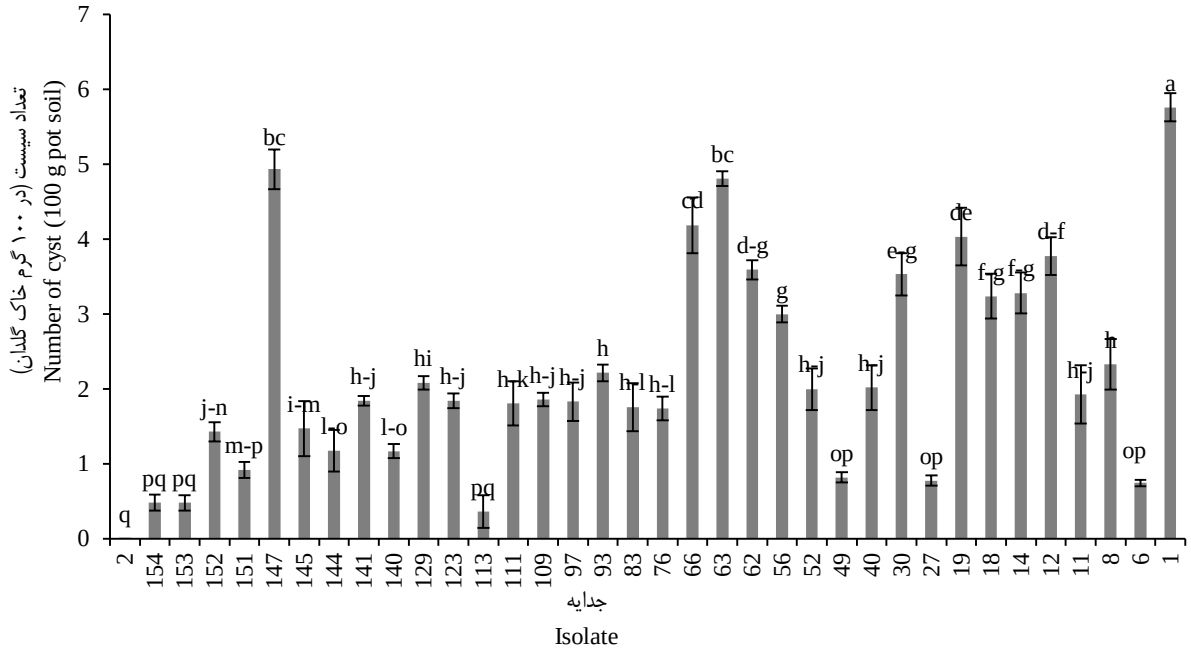
جدول ٤- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثر ۳٤ جدایه‌ی قارچی آنتاگونیست *G. rostochiensis* روی صفات مورفولوژیکی بوته‌ی سیب‌زمینی

Table 4- Variance analysis (mean squares) of effect of 34 antagononistic fungal isolates of *G. rostochiensis* on morphological charactristics of potato

منابع تغییرات Sources of variations	درجه آزادی Degree of freedom	طول ریشه Root length	وزن خشک ریشه Dry weight root	ارتفاع بوته Plant height	وزن خشک اندام‌های هوایی Dry weight shoot	تعداد غده Number of tuber	عملکرد غده Tuber yield	تعداد سیست در صد گرم خاک گلدان Number of cyst in 100g soil
جدایه Iisolate	35	21.46***	1.98***	73.44***	359.18***	8.12***	1784***	5.57**
خطا Error	72	1.41	0.05	5.64	6.44	0.42	198	0.15
ضریب تغییرات (درصد) Coefficient of variations (percent)	–	8.89	9.25	13.11	10.48	12.30	5.82	17.61

*** و **: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۱ درصد و یک درصد

***, **: Significant at 0.1 % and 1 % probability levels, respectively



شکل ٥- مقایسه میانگین اثر ۳٤ جدایه‌ی قارچی آنتاگونیست *G. rostochiensis* روی جمعیت سیست نماتد در گلخانه، جدایه ۱: شاهد (سیب‌زمینی دارای نماتد و فاقد قارچ)، جدایه ۲: شاهد (سیب‌زمینی فاقد نماتد و قارچ)

Figure 5- Mean comparison of effect of 34 antagonistic fungal isolates of *G. rostochiensis* on cyst nematode population in greenhouse isolate1: control (potato with nemathode and without fungus), isolate 2: control (potato without nemathode and fungus)

بین عملکرد غده سیب‌زمینیبا تعداد سیست،همبستگی منفی و معنی‌داری وجود داشت به طوری که با افزایش تعداد سیست، عملکرد غده سیب‌زمینی کاهش یافت (شکل ۶).

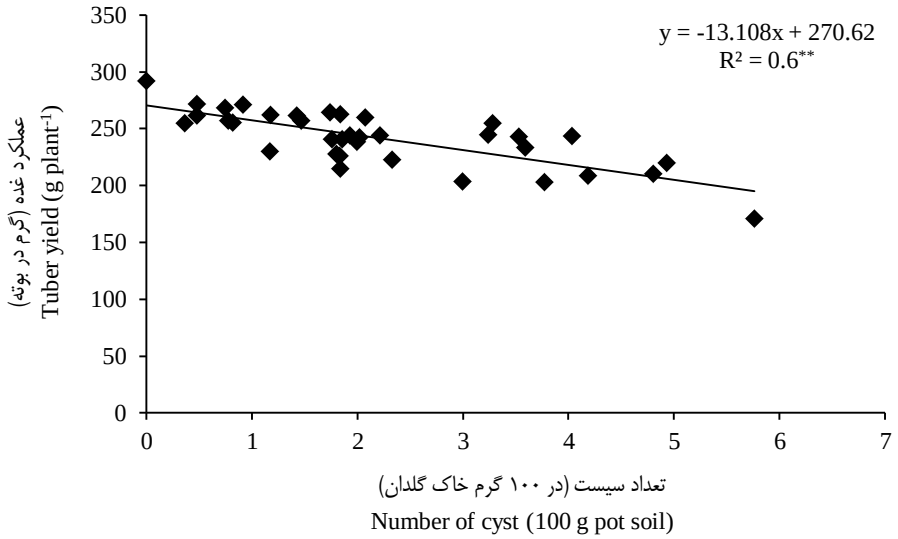
هرچند که بررسی‌های آزمایشگاهی روش مناسبی برای شناسایی مقدماتی میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست محسوب می‌شود ولی بر اساس نتایج آزمایشگاه به طور کامل نمی‌توان مفید بودن یک آنتاگونیست را تعیین کرد زیرا در آزمایشگاه عموماً اثر یک آنتاگونیست مستقیماً در تقابل با عامل بیماری روی یک محیط غذایی است، در

حالی‌که اثر میکروارگانیسم‌ها در محیط طبیعی تحت تأثیر عوامل زیادی نظیر دما، اسیدیته، رطوبت، بافت خاک و رفتار سایر میکروارگانیسم‌ها می‌باشد. مثلاً ممکن است یک جدایه‌ی آنتاگونیست در شرایط آزمایشگاه رویبیمارگر بسیار مؤثر باشد اما در محیط طبیعی نتواند موفق عمل کند. به همین علت ۳۴ جدایه‌ی منتخب علاوه بر آزمایشگاه در شرایط گلخانه نیز بررسی شدند. نتایج قارچ‌های آنتاگونیست روی فاکتورهای رشدی سیب‌زمینی در گلخانه نشان داد که در حضور همه‌ی این قارچ‌ها در مقایسه با شاهد میزان بیماری کاهش می‌یابدو نتایج حاصل با نتایج به‌دست آمده از بررسی‌های ویندهام و همکاران (۲۳) و شارون و همکاران (۱۹) مطابقت داشت.

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج به دست آمده در این پژوهش می‌توان نتیجه گرفت که از بین ۳۴ جدایه قارچی جدا شده از نماتد سیست طلایی سیب‌زمینی در استان همدان، چهار جدایه‌ی ۱۵۱ (*B. bassiana*)، ۱۵۲(*L. muscarium*)، ۱۵۳ (*P. lilacinus*) و ۱۵۴ (*T. atroviridae*) توانستند در کنترل سیست نماتد بسیار موفق عمل کنند و به عنوان جدایه‌های بومی برتر و موفق آنتاگونیست در کنترل نماتد سیست طلایی سیب‌زمینی در استان همدان معرفی می‌شوند.

با توجه به این‌که سیب‌زمینی در استان همدان به عنوان قطب تولید سیب‌زمینی بذری و خوراکی در ایران از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد و این‌که نماتد *G. rostochiensis* یکی از مخرب‌ترین و خسارت‌زاترین بیماری‌هایی است که این محصول را مورد هجوم قرار می‌دهد و ازطرفی هدف کشاورزان منطقه تولید محصول با کیفیت مرغوب و عملکرد بالا می‌باشد استفاده از روش‌های مدیریتی مناسب جهت کنترل این نماتد بسیار ضروری به نظر می‌رسد و به دلایلی از قبیل اثرات مخرب نماتدکش‌ها روی انسان و محیط زیست، استفاده از عوامل بیوکنترل به عنوان روش جایگزین سموم شیمیایی یک راهبرد کاربردی و امیدبخش پیش‌روی کشاورزی این منطقه می‌باشد. بنابراین می‌توان از جدایه‌های بومی معرفی شده در این پژوهش به عنوان عوامل کنترل بیولوژیک مؤثر و موفق، فرمولاسیون مناسبی روی بستر مناسب از قبیل دانه گندم یا آرد ذرت تهیه و میزان کارآیی آن‌ها و درصد کنترل بیماری در شرایط گلخانه‌ای با دوزهای مختلف فرم تجاری و سطوح مختلف آلودگی خاک روی چند رقم تجاری و رایج سیب‌زمینی انجام و به صورت فرمول‌های تجاری کارا جهت کنترل نماتد مخرب *G. rostochiensis* ارائه داد.



شکل ٦- رابطه رگرسیونی بین تعداد سیست در ۱۰۰ گرم خاک گلدان و عملکرد غده‌ی سیب‌زمینی
Figure 6- Regression relationship between number of cyst (100 g pot soil) and tuber yield (g plant^{-1})

جدول ۵–مقایسه میانگین اثر ۳٤ جدایه‌ی قارچی آنتاگونیست *G. rostochiensis* روی صفات مورفولوژیکی بوته‌ی سیب‌زمینی

Table 5-Mean comparison of effect of 34 antagonistic fungal isolates of *G. rostochiensis* on morphological charactristics of potato

جدایه Isolate	طول ریشه (سانتی‌متر) Root length (Cm)	وزن خشک ریشه (گرم در بوته) Dry weight root (g plant^{-1})	ارتفاع بوته (سانتی‌متر) Plant height (Cm)	وزن خشک اندام‌های هوایی (گرم در بوته) Dry weight shoot (g plant^{-1})	تعداد غده (غده در بوته) Number of tuber (Tuber in plant^{-1})	عملکرد غده (گرم در بوته) Tuber yield (g plant^{-1})
شاهد سیب‌زمینی Control, potato	19.30±0.28^{a}	5±0.11^{a}	29.33±1.45^{a}	50.24±2.91^{a}	9.33±0.33^{a}	292.10±10.53^{a}
154	15.44±0.39^{cd}	4.16±0.25^{b}	22.67±2.33^{b-e}	48.47±0.73^{a}	7.67±0.58^{b}	271.60±11.60^{ab}
153	15.12±0.56^{cd}	2.99±0.10^{ef}	22.33±1.86^{b-e}	40.89±0.81^{b}	7±0.33^{b-d}	261.43±8.30^{b-d}
152	15.09±0.94^{cd}	2.62±0.10^{f-h}	22.33±2.73^{b-e}	30.05±0.55^{d-f}	6.67±0.33^{b-e}	261.77±5.04^{b-d}
151	17.45±0.31^{ab}	3.76±0.02^{c}	25.33±1^{b}	46.74±0.06^{a}	7.33±0^{bc}	271.10±4.20^{ab}
147	10.12±0.35^{mn}	1.82±0.04^{m-o}	17±0.33^{i-l}	14.64±1.73^{l-o}	4±0.33^{j-l}	220.01±3.72^{h-k}
145	15.30±0.07^{cd}	2.82±0.06^{e-g}	20.33±0^{c-i}	28.56±1.02^{d-g}	6.33±0.33^{c-f}	256.80±3.50^{b-e}
144	14.78±0.02^{c-e}	2.36±0.10^{h-k}	20±0^{c-i}	30.48±0.91^{d-f}	6.67±0.33^{b-e}	262.30±9.81^{b-d}
141	10.84±0.39^{k-n}	2.06±0.05^{k-m}	15±1.67^{k-o}	18.20±1.45^{kl}	4.33±0.33^{i-l}	230.08±5.77g-j
140	16.01±0.13^{bc}	3.41±0.02^{cd}	23.33±1.53^{b-d}	31.76±2.18^{d}	7.33±0.33^{bc}	262.73±10.15^{b-d}
129	14.46±0.93^{c-f}	2.64±0.09^{f-h}	22±1.45^{b-f}	27.70±1.13^{d-h}	5.67±0.33^{e-h}	259.60±3.34^{b-e}
123	10.78±0.04^{k-n}	1.61±0.16^{o}	12.67±1.67^{m-o}	13.57±4.13^{m-o}	3.67±0.33^{kl}	214.47±11.86^{i-k}
113	14.39±0.19^{c-f}	2.47±0.34^{g-j}	21.67±1.53^{ab}	25.56±0.38^{g-i}	6.67±0.33^{b-e}	254.93±5.78^{b-f}
111	10.29±0.84^{l-n}	2 ±0.03^{k-n}	17±1.33^{i-l}	17.25±0.95^{k-m}	4.33±0.33^{i-l}	227.53±6.84^{g-j}
109	12.29±0.15^{g-k}	2.11±0.30^{j-m}	16.33±1.20^{j-m}	20.71±0.58^{jk}	4.67±0.58^{h-k}	240.44±11.84^{d-h}
97	10.32±0.91^{l-n}	2.06±0.09^{k-m}	16.33±0.58^{j-m}	14.68±2.39^{l-n}	4±0.33^{j-l}	225.81±2.64^{g-k}
93	14.08±1.18^{c-h}	2.81±0.35^{e-g}	22±1.45^{b-f}	26.71±0.67^{f-i}	5.33±0.33^{f-i}	243.98±9.08^{c-g}
83	12.58±0.81^{f-k}	2.12±0.06^{j-m}	17.67±1.86^{h-k}	21.31±1.92^{jk}	4.67±0.33^{h-k}	240.77±4.05^{d-h}
76	17.44±1.22^{ab}	3.47±0.04^{cd}	23.67±0.88^{bc}	36.74±0.76^{c}	7.33±0.33^{bc}	264.10±0.22^{bc}
66	10.15±0.60^{mn}	1.83±0.02^{mn}	11.33±1.45^{o}	10.92±1.36^{no}	3.67±0.33^{kl}	208.36±3.17^{jk}
63	10.65±0.98^{k-n}	1.65±0.04^{no}	12.67±1.67^{m-o}	12.99±0.26^{no}	3.33±0^{lm}	210.33±3.33^{jk}
62	13.01±0.78^{e-j}	1.91±0.07^{m-l}	16.67±0.88^{i-l}	20.50±1.22^{jk}	5±0.33^{g-j}	233.33±1.54^{f-i}
56	12.17±0.82^{h-l}	1.57±0.15^{o}	11.33±0.88^{o}	10.61±0.94^{no}	3.33±0.33^{lm}	203.23±12.80^{k}
52	11.77±0.26^{j-m}	2.09±0.04^{k-m}	15.33±1.20^{k-n}	٥19.21±0.56^{k}	4.33±0.58^{i-l}	238.32±12.50^{e-h}
49	14.40±0.45^{c-f}	2.54±0.06^{g-i}	20.33±1.45^{c-i}	31.23±0.10^{de}	6±0^{d-g}	255.10±0.21^{b-f}
40	14.19±0.42^{c-g}	2.10±0.09^{j-m}	15.33±1^{k-n}	20.17±1.49^{jk}	5±0.33^{g-j}	242.30±13.12^{c-h}
30	12±0.25^{i-m}	2.22±0.02^{i-l}	18±1.67^{g-k}	23.65±1.04^{h-j}	4.67±0.33^{h-k}	242.83±14.52^{c-h}
27	14.49±1.28^{c-f}	2.31±0.04^{h-k}	23.33±1.20^{bcd}	28.04±2.64^{d-g}	6.33±0.33^{c-f}	257.03±12.98^{b-e}
19	13.83±0.74^{c-h}	1.82±0.09^{m-o}	18.33±1.67^{f-k}	23.43±1.45^{ij}	4.67±0.67^{h-k}	243.69±1.26^{c-g}
18	15.14±0.30^{cd}	3.16±0.10^{de}	13.33±0.33^{l-o}	27.35±1.83^{e-i}	5.67±0.33^{e-h}	244.64±10.72^{c-g}
14	14.37±0.54^{c-f}	2.55±0.17^{g-i}	19.67±0.88^{d-j}	12.73±0.09^{no}	5.67±0.33^{e-h}	254.80±1.87^{b-f}
12	9.28±0.21^{n}	1.77±0.03^{m-o}	11.67±0.67^{no}	10.55±1.57^{o}	2.33±0^{mn}	202.89±2.58^{k}
11	14.09±0.70^{c-h}	2.30±0.13^{h-k}	19.33±2.08^{e-i}	28.02±0.71^{d-g}	5±0.58^{g-j}	243.77±8.42^{c-g}
8	10.16±0.04^{mn}	1.85±0.14^{mn}	12±1.33^{no}	14.25±1.44^{l-o}	4±0.33^{j-l}	222.91±13.43^{g-k}
6	17.41±11.1ab	3.66±0.08^{c}	21.33±0.67^{c-h}	28.42±0.20^{d-g}	7.33±0.67^{bc}	268.40±3.93^{b}
شاهد نماتد Control, nematode	7.10±0.10^{o}	1.05±0.03^{p}	80±0.15^{p}.4	5.67±0.33^{p}	1.67±0.33^{n}	171.04±1^{l}

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون، بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

Means followed by the same letters in each column are not significantly different according to Duncan's multiple range test ($p \leq 0.05$).

منابع

1- Agrawal T., and Kotasthane A.S. 2012. Chitinolytic assay of indigenous *Trichoderma* isolates collected from different geographical locations of Chhattisgarh in Central India. Springer Plus, 1(73):1-10.

2- Ahmadi K., Gholizadeh H., Ebadzadeh H., Hosseinpour R. Hatami F., Fazli B., Kazemian A., and Rafiei M. 2015. Agricultural crops statistics. Ministry of Agriculture, Department of Planning and Economy, Center for Information and Communication Technology, 1:158.(in Persian)

3- Brown R. H., and Kerry B.R. 1987. Principles and practices of nematode control in crops. Academic press. New York.
4- Dackman C. 1990. Fungal Parasites of the Potato Cyst Nematode *Globodera rostochiensis*: Isolation and Reinfection. Journal of Nematology, 22(4):594-597.
5- Dong J. Y. Zhao Z. X. Cai L. Liu S. Q. Zhang H. R. Duan M. and Zhang K.Q. 2004. Nematicidal effect of fresh water fungal cultures against the pine-nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. Fungal Diversity, 15:125–135.
6- Gitty M. Tanha maafi Z. Arjmandian A. and Pishevar S. 2011. Occurrence of potato golden cyst nematode in Iran and its distribution in Hamadan province. Agricultural Biolotechnology, 10(1):53-61.(in Persian with English abstract)
7- Khezri Nezhad N. Niknam G. Ghoosta Y. and Parvizi R. 2004. Evaluation of the biodiversity of nematodes in sugar beet fields and natural infection of sugar beet cyst nematode with antagonistic fungi in West Azerbaijan province, Urmia university master's thesis. p 185.(in Persian with English abstract)
8- Liu t. Wang L. Duan Y. X. and Wang X. 2008. Nematicidal activity of culture filtrate of *Beavaria bassiana* against *Meloidogyne hapla.* World Journal of Microbiology and Biotechnology, 24:113-118.
9- López-Lima D. Sánchez-Nava P. Carrión G. and Núñez-Sánchez A.E. 2013. 89 % reduction of a potato cyst nematode population using biological control and rotation. Agronomy for Sustainable Development, 33:425–431.
10- Mahdikhani Moghadam E. Rouhani H. and Falahi Rastgar M. 2009. Biological control of sugar beet cyst forming nematode with *Trichoderma* under in vitro and green house condition.Water and Soil Science (Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources), 13(48): 301–313.
11- Mahdikhani Moghadam E. and Rouhani H. 2012. Effect of isolates of *Trichodermaharzianum*, *T. virens* and *Bacillus subtilis* for controlling *Heterodera schachtii* in field conditions. Journal of Plant Protection,26(1):75–81.
12- Manzanilla-Lopez R. H., Esteves I. Fintti-Sialer M. M. Hirsch P. R. Ward E. Devonshire J. and Hidalgo-Diaz L. 2013. *Pochonia chlamydosporia*: Advances and challenges to improveIts performance as a biological control agent of sedentary endo-parasitic nematodes. Journal of Nematology, 45(1):1–7.
13- Morton C. O. Hisch P. R. and Kerry B.R. 2004. Infection of plant parasitic nematodes by nematoghagous fungi – a review of the application of molecular biology to understand infection processes and to improve biological control. Nematology, 6(2):161-170.
14- Safari Motlagh M. R. and Samimi Z. 2013. Evaluation of *Trichoderma* spp. as biological agents in some of plant pathogens. Annals of Biological Research, 4(3):173-179.
15- Saifullah. and Naqibullah khan. 2014. Low temperature scanning electron microscopic studies on the interaction of *Globodera rostochiensis* woll and *Trichoderma harzianum* rifai. Pakistan Journal of Botany, 46(1):357-361.
16- Saifullah. and Thomas B.J. 1996. Studies on the parasitism of *Globodera rostochiensis*by *Trichoderma harzianum* using low temperature scaning electron microscopy. International Journal of Nematology, 6:117-122.
17- Santos M. C., Esteves I. Kerry B. and Abrantes I. 2013. Biology, growth parameters and enzymatic activity of *Pochonia chlamydosporia* isolates from potato cyst and root-knot nematodes. Nematology, 15:493-504.
18- Seyedasli N. Zamani M. Motallebi M. and Harighi M.J. 2004. The study of chitinase production in *Trichoderma* fungus. Iran Biology, 17(3):227-246.(in Persian)
19- Sharon E. Bar-Eyal M. Chet I. Herrera E. Strella A. Klelfeld O. and Splege Y. 2001. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*by *Trichoderma harzianum*. Phytopathology, 91:687-693.
20- Sharon E., Chet I., and Spiegel Y. 2009. Improved attachment and parasitism of *Trichoderma* on *Meloidogyne javanica* in vitro. European Jornal of Plant Pathology, 123:291-299.
21- Tikhonov V. E., Lopez-Llorca L.V., Salinas J., and Jansson H.B. 2002. Purification and characterization of chitinases from the nematophagous fungi *Verticillium chlamydosporium* and *V. suchlasporium.* Fungal Genetics and Biology, 35:67-78.
22- Tobin J. D., Haydock P. J., Hare M. C., Woods S. R., and Crump D.H. 2008. Effect of the fungus *Pochonia chlamydosporia* and fosthiazate on the multiplication rate of potato cyst nematodes (*Globodera pallid* and *G. rostochiensis*) in potato crops grown under UK field conditions. Biological Control, 46:194–201.
23- Windham G. L., Windham M. T., and Williams W.P. 1989. Effects of *Trichoderma* spp. on maize growth and *Meloidogynearenaria* reproduction. Plant Disease 73:493-495.
24- Zarghani A., Fatemi S., and Mahdian S. 2014. Evaluation of the pathogenicity of golden nematode *Globodera rostochiensis* on potato. Plant Protection (Journal of Agriculture), 37(4):11-21.(in Persian)