نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۵، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۰، ص. ۳۱۰-۳۰۳

Journal of Plant Protection
Vol. 35, No. 3, Fall 2021, P. 303-310

مقاله پژوهشی

ارزیابی کارایی میکروارگانیسم‌های موثر (EM®) علیه نماتد ریشه‌گرهی (*Meloidogyne javanica*) در گیاه گوجه‌فرنگی

حبیب‌اله چاره‌گانی[1*]- سعید مهدی[2]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۱۰
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۲/۳۱

چکیده

نماتدهای موجود در جنس *Meloidogyne* spp. به دلیل انتشار جغرافیایی گسترده، دامنه میزبانی وسیع و ایجاد خسارت شدید در گیاهان به عنوان خطرناکترین نماتدهای انگل گیاهی مطرح می‌باشند. به دلیل آثار منفی استفاده از سموم نماتدکش بر سلامت انسان و محیط زیست، توسعه سایر روش‌های مدیریتی برای نماتدهای انگل گیاهی ضروری می‌باشد. مهار زیستی یکی از گزینه‌های مورد توجه برای کنترل این نماتدهای به جای سموم شیمیایی می‌باشد. در مطالعه حاضر، در شرایط گلخانه تأثیر غلظت‌های مختلف از ترکیب تجاری EM® (میکروارگانیسم‌های موثر) به تنهایی و EM® + عصاره برگ گیاه گل‌جعفری (*Tagetes erecta*) مخلوط شده با نسبت مساوی، روی گیاه گوجه‌فرنگی برای کنترل نماتد *M. javanica* بررسی شدند. گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی در مرحله چهار برگی با یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون تخم نماتد *M. javanica* حاوی ۶۰۰۰ تخم مایه‌زنی شدند. هم‌زمان با مایه‌زنی نماتد و به روش خیساندن خاک، گیاهچه‌ها با ۵۰ میلی‌لیتر EM® و EM® + عصاره برگ گیاه گل‌جعفری در غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد تیمار شدند. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج تکرار انجام پذیرفت. نتایج پس از ۶۰ روز نشان داد که خیساندن خاک گیاهان سالم و آلوده با EM® به تنهایی و EM® + عصاره برگ گیاه گل‌جعفری باعث بهبود شاخص‌های رویشی گیاه می‌شود. تعداد تخم، گال و کیسه تخم در ریشه و فاکتور تولیدمثل نماتد در گیاهان تیمار شده با مخلوط EM® + عصاره برگ گیاه گل‌جعفری در غلظت ۲۰ ٪ به عنوان بهترین تیمار، به ترتیب ۲۸، ۴۰، ۳۷ و ۲۷ درصد نسبت به گیاهان شاهد کاهش یافت.

واژه‌های کلیدی: شاخص‌های جمعیتی نماتد، شاخص‌های رویشی گیاه، عصاره برگ گل‌جعفری، گلخانه، مهار زیستی

مقدمه

بیش از ۴۱۰۰ گونه از نماتدهای بیماری‌زای گیاهی وجود دارد که به‌صورت بالقوه تقریباً به تمام محصولات کشاورزی آسیب می‌رسانند (۲۴). میزان کاهش محصول در اثر خسارت نماتدهای انگل گیاهی در ۴۰ محصول عمده کشاورزی به‌طور متوسط ۱۲/۳ درصد از محصول تولید شده می‌باشد که ارزش اقتصادی آن بالغ بر ۱۰۰ میلیارد دلار در سراسر جهان است (۱۵). اعضای جنس *Meloidogyne* spp. (Goeldi, 1987) به عنوان خطرناک‌ترین نماتدهای انگل گیاهی، باعث کاهش قابل توجه محصول مخصوصاً در گیاه گوجه‌فرنگی در مناطق استوایی و نیمه‌استوایی می‌شوند (۷). مدیریت نماتدهای انگل گیاهی بسیار دشوار می‌باشد (۴). به‌طور سنتی، استفاده از سموم نماتدکش روش اصلی کنترل نماتدهای انگل گیاهی می‌باشد اما با توجه به ایجاد خطرات زیست محیطی و همچنین عدم ماندگاری طولانی مدت این سموم در خاک، یافتن روش‌های کم خطر و ماندگارتر برای کنترل نماتدهای انگل گیاهی و تلفیق این روش‌های برای افزایش کارایی آن‌ها در مهار نماتدها الزامی می‌باشد (۱۱). یافتن ترکیبات آلی با منشأ گیاهی با خواص نماتدکشی به عنوان یک روش ایمن در مدیریت نماتدهای انگل گیاهی مورد توجه محققان فراوانی بوده است. خواص نماتدکشی برخی گیاهان از جمله گیاه چریش با نام علمی *Azadirachta indica* A. Juss. (۸) و گیاه گل‌جعفری، اعضای جنس *Tagetes* spp. (۲۶) در مطالعات فراوانی به اثبات رسیده است. همچنین در سال‌های اخیر خاصیت نماتدکشی گونه‌های مختلف گیاهی مورد ارزیابی قرار گرفته و نتایج قابل قبولی به دست

۱ و ۲- به‌ترتیب استادیار و دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج
(*- نویسنده مسئول: (Email: H.charehgani@yu.ac.ir
DOI: 10.22067/JPP.2021.67213.0

آمده است (۹، ۱۹، ۲۲ و ۲۷). مهار زیستی نیز از جمله روش‌های طبیعی برای مهار و کاهش خسارت نماتدهای ریشه‌گرهی می‌باشد (۲۱). کودهای زیستی زیادی در بازار و به صورت تجاری وجود دارند که باعث افزایش رشد گیاهان و میزان محصول آن‌ها می‌شوند (۲۹). یکی از کودهای زیستی که اخیراً مورد توجه محققان قرار گرفته است، محصولی معرفی شده در ژاپن توسط پروفسور Teruo Higa (۱۰)، معروف به "میکروارگانیسم‌های موثر (Effective microorganisms (EM))" می‌باشد. ترکیبات دقیق این کود زیستی که ترکیبی از حدود ۸۰ میکروارگانیسم مختلف می‌باشد تاکنون فاش نشده است (۱۰). EM شامل ترکیبی از میکروارگانیسم‌هایی می‌باشد که به‌طور طبیعی در خاک‌های حاصلخیز زندگی و در افزایش میزان محصول گیاهان موثر می‌باشند (۲۰).

هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر ۱) غلظت‌های مختلف EM® و ۲) غلظت‌های مختلف EM® در ترکیب با عصاره آبی برگ گیاه گل‌جعفری بر گیاه گوجه‌فرنگی سالم و آلوده به نماتد *M. javanica* در شرایط گلخانه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه و خالص‌سازی نماتد

به منظور تهیه‌ی نماتد، ریشه آلوده به نماتدهای ریشه‌گرهی از گلخانه‌های شهر یاسوج تهیه و خالص‌سازی با استفاده از روش تک توده تخم[1] انجام شد. گونه نماتد با استفاده از نقوش کوتیکولی ناحیه‌ی پیرامون مخرج نماتد ماده و با استفاده از کلیدهای رایج شناسایی، مشخص گردید (۱۳). به منظور تهیه جمعیت کافی از گونه *M. javanica*، نماتد روی ریشه گوجه‌فرنگی رقم Early-Urbana (حساس به نماتدهای ریشه‌گرهی) به طور مکرر تکثیر شد (۱۲).

تهیه EM® و عصاره برگ گل‌جعفری

به منظور تهیه‌ی عصاره گیاهی، برگ گیاه گل‌جعفری (*Tagetes erecta* L.) از بوستان‌های شهر شیراز تهیه شد. پس از شستن برگ‌ها به مدت ۱۴ روز در سایه خشک و با استفاده از آسیاب برقی به پودر تبدیل شدند. به منظور عصاره‌گیری، ۱۰ گرم پودر برگ درون ارلن شیشه‌ای حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق (۲۵ درجه سلسیوس) با استفاده از دستگاه هم‌زن افقی با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه مخلوط شد. سپس با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره یک، عصاره از بقایای برگ جدا و در ظرف تیره در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد (۱). میکروارگانیسم‌های موثر مورد استفاده در این آزمایش به صورت مایع در ظروف پلاستیکی به صورت تجاری (EM®) از شرکت امکان‌پذیر پارس (شیراز، ایران) تهیه شد. به منظور مخلوط نمودن عصاره گیاهی با EM® تجاری، حجم مساوی از EM® و عصاره گیاهی با یکدیگر مخلوط و در ظرف تیره در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد.

مطالعات گلخانه‌ای

آزمایش به صورت فاکتوریل با دو فاکتور غلظت‌های EM و نماتد در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج تکرار برای هر تیمار در شرایط گلخانه (دمای ۴±۲۷ درجه سلسیوس، ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) انجام شد. بذور گوجه‌فرنگی رقم Early-Urbana در گلدان‌های پلاستیکی ۱/۵ کیلوگرمی حاوی خاک مزرعه و کود دامی (به نسبت ۲ به ۱) سترون شده با بخار آب داغ (یک ساعت در دمای ۱۲۱ درجهٔ سلسیوس و فشار یک اتمسفر) کشت و به طور منظم آبیاری شدند. گیاهچه‌ها در مرحله چهار برگی به دو گروه تقسیم شدند. گروه اول با یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون تخم نماتد *M. javanica* حاوی ۶۰۰۰ تخم (۴ تخم در گرم خاک) مایه‌زنی شدند. برای این منظور سه حفره به عمق یک سانتی‌متر در خاک اطراف گیاهچه‌ها ایجاد و سوسپانسیون تخم نماتد درون حفره‌ها ریخته و بلافاصله با خاک پر شدند. گیاهچه‌ها در گروه دوم مایه‌زنی نشدند. هم‌زمان با مایه‌زنی نماتد و به روش خیساندن خاک[2]، هر دو گروه گیاهچه‌ها با ۵۰ میلی‌لیتر برای هر گلدان از ترکیبات مورد بررسی تیمار شدند. تیمارهای مورد بررسی شامل:

۱) شاهد
۲) EM در غلظت ۵ ٪
۳) EM در غلظت ۱۰ ٪
۴) EM در غلظت ۱۵ ٪
۵) EM در غلظت ۲۰ ٪
۶) EM + عصاره گل‌جعفری در غلظت ۵ ٪
۷) EM + عصاره گل‌جعفری در غلظت ۱۰ ٪
۸) EM + عصاره گل‌جعفری در غلظت ۱۵ ٪
۹) EM + عصاره گل‌جعفری در غلظت ۲۰ ٪

بودند. برداشت گیاهان ۶۰ روز پس از مایه‌زنی انجام و شاخص‌های رویشی گیاه شامل طول، وزن تر و خشک شاخساره و شاخص‌های جمعیتی نماتد شامل تعداد تخم گال و کیسه‌تخم در ریشه و تعداد لارو سن دوم در خاک مورد ارزیابی قرار گرفت. تخم نماتد با استفاده از روش هوسی و بارکر (۱۲) انجام شد. برای این منظور ریشه گیاه آلوده از اندام هوایی گیاه جدا، شسته و به قطعات کوچک تقسیم و کاملاً مخلوط شد. سپس یک گرم از ریشه داخل

1- Single egg mass

2- Soil drenching

مخلوط‌کن حاوی هیپوکلریت سدیم ۰/۵٪ به مدت ۴۰ ثانیه مخلوط گردید. سپس محتویات مخلوط‌کن روی الک ۱۰۰ مش که در زیر آن الک ۵۰۰ مش بود، ریخته شد. تخم نماتد از الک ۱۰۰ مش به راحتی عبور کرد و درون الک ۵۰۰ مش جمع‌آوری شد، بقایای گیاهی و تفاله‌های اضافی درون الک ۱۰۰ مش جمع و حذف گردید. سپس به منظور حذف بقایای هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد، محتویات الک ۵۰۰ مش بلافاصله با آب شسته و به داخل بشر منتقل شد. بعد از این‌که نماتدها استخراج شد، سوسپانسیون تخم نماتد درون بشری به حجم مشخص تهیه گردید و به کمک پیپت هم زده شد تا ترکیب یکنواخت شود. سپس به کمک میکرو پیپت مقدار ۱۰۰۰ میکرولیتر از ترکیب مورد نظر درون تشتک پتری ریخته و تعداد تخم نماتد با استفاده از دستگاه استرئومیکروسکوپ (40 X) شمارش شد. در نهایت با ضرب نمودن تعداد تخم شمارش شده در حجم کل سوسپانسیون، تعداد تخم استخراج شده در گرم ریشه تعیین گردید و به وزن کل ریشه تعمیم داده شد (۲). تعداد گال و کیسه‌تخم در ریشه با استفاده از روش تیلور و ساسر (۳۲) انجام شد. برای این منظور یک گرم از ریشه‌های هر تیمار با محلول اسید فوشین ۰/۱ ٪ رنگ‌آمیزی و با استفاده از دستگاه استرئومیکروسکوپ (40 X)، تعداد گال و توده تخم به صورت جداگانه شمارش و برای کل ریشه محاسبه گردید. تعداد لارو سن دوم در خاک با استفاده از روش وایتهد و همینگ (۳۴) مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور یک سبد پلاستیکی درون یک سینی قرار داده و روی آن یک لایه دستمال کاغذی پهن و ۱۰۰ گرم خاک گلدان که به طور کامل مخلوط شده بود به آرامی به صورت یک لایه نازک روی دستمال کاغذی ریخته شد. سپس آب درون سینی ریخته تا سطح آب به لایه‌ی دستمال کاغذی رسید و خاک به حالت مرطوب درآمد. پس از گذشت ۴۸ ساعت سبد پلاستیکی حاوی خاک به آرامی برداشته و آب درون سینی، روی الک ۵۰۰ مش ریخته شد، سپس لاروهای استخراج شده روی الک ۵۰۰ مش با آب‌فشان شسته و در یک تشتک پتری جمع‌آوری و با استفاده از دستگاه استرئومیکروسکوپ (40 X) تعداد لارو سن دوم نماتد ریشه‌گرهی شمارش و سپس به کل خاک موجود در گلدان تعمیم و محاسبه گردید. در نهایت فاکتور تولیدمثل نماتد با استفاده از فرمول ۱ تعیین گردید (۳۲).

$$\text{فاکتور تولیدمثل} = \frac{\text{جمعیت نهایی نماتد}}{\text{جمعیت اولیه نماتد}} = \text{تعداد نماتد در خاک و ریشه}$$

فرمول ۱

محاسبات آماری

آزمایش به صورت فاکتوریل با دو فاکتور غلظت‌های EM و نماتد در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج تکرار برای هر تیمار انجام شد. داده‌های مربوط به شاخص‌های جمعیتی نماتد به روش آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) و داده‌های مربوط به شاخص‌های رویشی گیاه به روش آنالیز واریانس دو طرفه (Two-Way ANOVA) با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS 9.1 و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از روش حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح یک درصد انجام شد.

نتایج

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تعداد تخم و گال در ریشه و فاکتور تولیدمثل نماتد در تمام تیمارها به طور معنی‌داری از گیاهان شاهد کمتر بود. کمترین تعداد تخم و کیسه‌تخم در ریشه و فاکتور تولیدمثل نماتد در گیاهان تیمار شده با مخلوط EM و عصاره برگ گیاه گل‌جعفری در غلظت ۲۰ ٪ مشاهده شد که تنها با گیاهان تیمار شده با مخلوط EM و عصاره برگ گیاه گل‌جعفری در غلظت ۱۵ ٪ اختلاف معنی‌دار نداشت. کمترین تعداد گال در ریشه در گیاهان تیمار شده با مخلوط EM و عصاره برگ گیاه گل‌جعفری در غلظت ۲۰ ٪ مشاهده شد که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت (جدول ۱).

نتایج مربوط به شاخص‌های رویشی گیاه نشان داد که در ارتباط با گیاهان سالم، طول شاخساره گیاهان تیمار شده با مخلوط EM و عصاره برگ گیاه گل‌جعفری در غلظت ۲۰ ٪ بیشترین میزان بود که تنها با گیاهان تیمار شده با مخلوط EM و عصاره برگ گیاه گل‌جعفری در غلظت ۱۵ ٪ و گیاهان تیمار شده با EM در غلظت ۲۰ ٪ اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد. در ارتباط با گیاهان آلوده، طول شاخساره گیاهان تیمار شده با مخلوط EM و عصاره برگ گیاه گل‌جعفری در غلظت ۲۰ ٪ بیشترین میزان بود که تنها با گیاهان تیمار شده با EM در غلظت ۲۰ ٪ اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد. در ارتباط با گیاهان سالم، وزن تر شاخساره در گیاهان تیمار شده با مخلوط EM و عصاره برگ گیاه گل‌جعفری در غلظت ۲۰ ٪ به طور معنی‌داری از سایر تیمارها بیشتر بود. در ارتباط با گیاهان آلوده، وزن تر شاخساره گیاهان تیمار شده با مخلوط EM و عصاره برگ گیاه گل‌جعفری در غلظت ۲۰ ٪ بیشترین میزان بود که تنها با گیاهان تیمار شده با مخلوط EM و عصاره برگ گیاه گل‌جعفری در غلظت ۱۵ ٪ و گیاهان تیمار شده با EM در غلظت ۲۰ ٪ اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد. در ارتباط با گیاهان سالم و آلوده، بیشترین میزان وزن خشک شاخساره در گیاهان تیمار شده با EM در غلظت ۲۰ ٪ مشاهده شد که تنها با گیاهان شاهد خود اختلاف معنی‌دار داشتند. بیشترین میزان وزن تر ریشه در گیاهان آلوده به نماتد تیمار شده با مخلوط EM و عصاره برگ گیاه گل‌جعفری در غلظت ۲۰ ٪ مشاهده شد که تنها با گیاهان تیمار شده با مخلوط EM و عصاره برگ گیاه گل‌جعفری در غلظت ۱۵ ٪ اختلاف معنی‌دار نداشتند (جدول ۲).

جدول ۱- تأثیر غلظت‌های مختلف میکروارگانیسم‌های موثر (EM®) و مخلوطی از نسبت مساوی از (EM®) + عصاره برگ گیاه گل‌جعفری (marigold) بر تعداد تخم، گال و توده تخم در ریشه، تعداد لارو سن دوم (J2s) در گلدان و فاکتور تولیدمثل در گوجه‌فرنگی آلوده به نماتد ریشه‌گرهی *Meloidogyne javanica*

Table 1- The effect of different concentrations of effective microorganisms (EM®) and a mixture of equal amount of EM®+ marigold leaf extract on the number of eggs, galls and egg masses per root, reproduction factor and number of second stage juveniles (J2s) in the pot of tomato plants inoculated with *Meloidogyne javanica*

Treatments تیمارها	Nematode indices شاخص‌های نماتدی				
	Number of eggs/root تعداد تخم/ریشه	Number of galls/root تعداد گال/ریشه	Number of egg masses/root تعداد توده تخم/ریشه	Number of J2s/pot تعداد لارو سن دوم/گلدان	Reproduction factor فاکتور تولیدمثل
Control	51357 ± 1623 a	1004 ± 66.64 a	407 ± 22.78 a	470 ± 0.21 b	6.96 ± 0.21 a
EM® 5%	49327 ± 600 b	925 ± 17.75 b	388 ± 15.43 a	554 ± 0.08 a	6.71 ± 0.08 b
EM® 10%	47002 ± 653 c	878 ± 23.22 c	346 ± 13.73 b	365 ± 0.08 d	6.36 ± 0.08 c
EM® 15%	45488 ± 766 d	767 ± 19.67 d	302 ± 7.63 c	420 ± 0.10 c	6.16 ± 0.10 d
EM® 20%	39387 ± 1623 f	637 ± 19 ef	257 ± 14 d	441 ± 0.07 bc	5.34 ± 0.07 f
EM® + marigold 5%	47565 ± 1623 c	927 ± 21 b	352 ± 20 b	557 ± 0.16 a	6.44 ± 0.10 c
EM® + marigold 10%	43012 ± 1227 e	839 ± 21 c	307 ± 15 c	554 ± 0.11 a	5.85 ± 0.16 e
EM® + marigold 15%	37852 ± 853 g	674 ± 15 e	272 ± 13 d	547 ± 0.1 a	5.15 ± 0.1 g
EM® + marigold 20%	37095 ± 748 g	605 ± 16 f	256 ± 17 d	470 ± 0.22 b	5.05 ± 0.09 g

اعداد میانگین پنج تکرار ± خطای استاندارد آورده شده است. حروف مشابه لاتین نشان دهنده‌ی عدم تفاوت معنی‌دار بین تیمارها در سطح احتمال ۱ درصد می‌باشد.

Data are means of five replicates ± standard error. Values followed by the same letters in each column are not significantly different ($P \leq 0.01$).

بحث

لزوم توسعه کشاورزی پایدار محققان را بر آن داشته که به دنبال روش‌های کم کردن مصرف سموم آفت‌کش و کودهای شیمیایی باشند (۱۸). استفاده از میکروارگانیسم‌های موثر در رشد[1] به عنوان کود یا آفت‌کش‌های زیستی به دلیل توانایی بالقوه در تثبیت زیستی نیتروژن (۱۴)، فراهم کردن عناصر غذایی برای گیاه (۱۶) و عامل بازدارنده بیمارگرهای گیاهی (۵) از راهکارهای مهم در اجرای کشاورزی پایدار می‌باشند. در این مطالعه نقش ترکیب تجاری "میکروارگانیسم‌های موثر" بر گوجه‌فرنگی سالم و آلوده به نماتد *M. javanica* در شرایط گلخانه بررسی شد. میکروارگانیسم‌های غالب در EM باکتری‌های فتوسنتز کننده می‌باشند. مطالعات نشان داده که این باکتری‌ها به صورت هم‌افزایی با سایر میکروارگانیسم‌ها در خاک موجب تأمین نیاز غذایی گیاهان شده و همچنین باعث کاهش بروز بیمارگرهای گیاهی می‌شوند (۶). EM با اکوسیستم خاک- گیاه تعامل داشته و موجب بازداری عوامل بیمارگر گیاهی، افزایش در دسترس بودن عناصر غذایی برای گیاه، حفظ تعادل میکروبی و اکولوژیکی خاک، افزایش راندمان فتوسنتزی و تثبت زیستی نیتروژن می‌شود (۳۱). تاکنون نقش EM در کنترل نماتدهای ریشه‌گرهی بررسی نشده اما تأثیر موثر این ترکیبات در کاهش خسارت سایر عوامل بیماری‌زای گیاهی به اثبات رسیده است. در مطالعه‌ای مشخص شد که تیمار گیاهان سیب‌زمینی در مزرعه با EM، باعث کاهش شدت بیماری‌زایی قارچ *Phytophthora infestans* و افزایش میزان محصول می‌شود. همچنین مشخص شد که استفاده هم‌زمان از EM و کود سبز (سبوس و برگ برنج) آثار مثبت بیشتری در مقایسه با تیمار EM به تنهایی دارد (۳۵). نتایج این تحقیق با نتایج مطالعه حاضر که استفاده از EM و تلفیق EM با عصاره گیاهی باعث کاهش خسارت نماتد و بهبود شاخص‌های رویشی گیاه شد در یک راستا می‌باشند. مشخص شده که EM با افزایش تجمع ذرات خاک موجب خشک شدن سریعتر سطح خاک می‌شوند. خشک شدن لایه‌های بالایی خاک باعث تأخیر در جوانه‌زنی اسپور قارچ‌ها می‌شود همچنین با افزایش رقابت با قارچ‌ها برای کسب عناصر موجود در خاک و تولید ترکیبات آنتی‌بیوتیک باعث کاهش جمعیت قارچ‌های بیمارگر گیاهی می‌شوند.

1- Plant growth-promoting microorganisms

جدول ۲- تأثیر غلظت‌های مختلف میکروارگانیسم‌های موثر (EM®) و مخلوطی از نسبت مساوی از (EM®) + عصاره برگ گیاه گل‌جعفری (marigold) بر شاخص‌های رویشی گیاه گوجه‌فرنگی سالم و آلوده به نماتد ریشه‌گرهی *Meloidogyne javanica*

Table 2- The effect of different concentrations of effective microorganisms (EM®) and a mixture of equal amount of EM®+ marigold leaf extract on plant growth indices of non-inoculated and inoculated tomato plants with *Meloidogyne javanica*

Treatments تیمارها	Nematode نماتد	Growth parameters شاخص‌های رویشی			
		Shoot length (cm) طول شاخساره (سانتی‌متر)	Shoot fresh weight (g) وزن تر شاخساره (گرم)	Shoot dry weight (g) وزن خشک شاخساره (گرم)	Root fresh weight (g) وزن تر ریشه (گرم)
Control	Non-inoculated	42.5 ± 4.43 gh	26.25 ± 1.25 jk	7.08 ± 0.42 c-f	8.59 ± 0.22 ef
EM® 5%		46.5 ± 4.65 fg	29.56 ± 1.19 hi	7.73 ± 0.31 abc	9.02 ± 0.35 cde
EM® 10%		51.75 ± 5.37 de	33.5 ± 1.73 efg	7.94 ± 0.89 a	9.25 ± 0.84 bcd
EM® 15%		53.5 ± 3.5 d	34.61 ± 2.44 def	8.01 ± 0.38 a	9.51 ± 0.40 bc
EM® 20%		59 ± 2.94 abc	bc 38.74 ± 3.09	8.16 ± 0.49 a	9.59 ± 0.29 b
EM® + marigold 5%		53 ± 2.94 d	31.75 ± 1.70 fgh	7.52 ± 0.14 a-e	8.42 ± 0.41 f
EM® + marigold 10%		56 ± 0.81 bcd	37.35 ± 1.89 bcd	7.58 ± 0.31 a-d	8.69 ± 0.45 ef
EM® + marigold 15%		59.25 ± 2.98 ab	b 39.88 ± 1.22	7.81 ± 0.34 ab	8.64 ± 0.39 ef
EM® + marigold 20%		63.75 ± 2.5 a	43.24 ± 2.61 a	7.96 ± 0.35 a	8.91 ± 0.12 def
Control	Inoculated	39 ± 3.16 h	25 ± 1.41 k	6.14 ± 0.28 g	9.29 ± 0.20 bcd
EM® 5%		44 ± 3.74 gh	27.5 ± 2.38 ijk	6.47 ± 0.25 fg	9.36 ± 0.23 bcd
EM® 10%		47.5 ± 5.8 efg	31 ± 1.82 gh	6.61 ± 0.80 fg	9.37 ± 0.22 bcd
EM® 15%		51.5 ± 2.38 def	31.5 ± 2.08 gh	6.83 ± 0.65 efg	9.72 ± 0.31 b
EM® 20%		56.25 ± 5.05 bcd	34.5 ± 1.73 def	7 ± 0.31 def	9.7 ± 0.39 b
EM® + marigold 5%		47 ± 0.81 efg	29 ± 2.45 hij	6.83 ± 1.10 efg	9.37 ± 0.38 bcd
EM® + marigold 10%		51.25 ± 3.30 def	32.7 ± 1.99 fg	6.89 ± 0.23 def	9.28 ± 0.19 bcd
EM® + marigold 15%		54 ± 1.63 cd	34.5 ± 1.29 def	7.08 ± 0.28 c-f	10.28 ± 0.25 a
EM® + marigold 20%		59.5 ± 4.04 ab	36.16 ± 2.66 cde	7.17 ± 0.25 b-f	10.48 ± 0.35 a

اعداد میانگین پنج تکرار ± خطای استاندارد آورده شده است. حروف مشابه لاتین نشان دهنده‌ی عدم تفاوت معنی‌دار بین تیمارها در سطح احتمال ۱ درصد می‌باشد.

Data are means of five replicates ± standard error. Values followed by the same letters in each column are not significantly different ($P \leq 0.01$).

همچنین کنترل قارچ‌های بیمارگر *Rhizoctonia solani*، *Fusarium* spp.، *Pythium* spp.، *Phytophthora* spp. و *Sclerotium rolfsi* در خاک‌های تیمار شده با EM مشاهده شده است. دلیل این امر تغییر در ساختار و محیط خاک می‌باشد که باعث افزایش هوادهی و خشک شدن خاک می‌شوند (۳۳). این مکانیسم‌ها نیز می‌توانند دلیلی بر کاهش جمعیت نماتد *M. javanica* در مطالعه حاضر باشند. در مطالعه‌ای مشخص شد که کاربرد EM در خاک باعث کاهش pH خاک می‌شود. دلیل این کاهش به دلیل تولید ترکیبات ارگانیک اسید (organic acids) از جمله هیومیک اسید، آمینواسید، گلیسین و سیستئین می‌باشد. این ترکیبات در طی فرایند معدنی‌سازی ترکیبات آلی توسط موجودات هتروتروف و تثبیت نیتروژن توسط موجودات اتوتروف تولید می‌شوند (۲۸). مطالعات مختلف نقش ترکیبات ارگانیک اسید از جمله هیومیک اسید در کاهش جمعیت و خسارت نماتدهای ریشه‌گرهی را به اثبات رسانده است (۳۰ و ۳۶).

در مطالعه‌ای مشخص شد که استفاده از EM باعث رشد زودرس میوه و رشد ریشه گیاه گوجه‌فرنگی می‌شود (۲۳) که این نتیجه با نتایج مطالعه حاضر مبنی بر افزایش وزن تر ریشه گوجه‌فرنگی همسو می‌باشد. افزایش حجم ریشه باعث افزایش شاخص‌های طول، وزن تر و خشک شاخساره گیاه می‌شود. EM اثر مواد آلی را به عنوان کود

افزایش می‌دهد که این دلیلی بر تأثیر بیشتر EM در ترکیب با عصاره گیاه گل جعفری در مطالعه حاضر می‌باشد. ترکیب EM همراه با کـود سبز (*Gliricidia sepium*) موجب افـزایش معنـی‌دار شـاخص‌هـای رویشی گوجه‌فرنگی در مقایسه با کودهای شیمیایی شد (۱۷). کـاربرد EM باعث افزایش معنی‌دار میزان فتوسـنتز و رشـد و عملکـرد گیـاه می‌شود (۳). همچنین مشخص شده که EM باعث افـزایش مقاومـت گیاه به تنش خشکی، افزایش معدنی شدن کربن، بهبود ساختار خـاک و رشد و توسعه ریشه در خاک می‌شود که همه این موارد باعث رشد و نمو بهینه گیاه و افزایش مقاومت در برابر بیمارگرهای گیاهی می‌شوند (۲۵). در مطالعه حاضر مشخص شد که مخلوط EM® + عصاره برگ گیاه گل‌جعفری در غلظت ۲۰ ٪ در مقایسه با سایر تیمارها به عنـوان بهترین تیمار در کاهش جمعیت نماتد *M. javanica* می‌باشد. با توجه به نتایج حاصل، بررسی نقش EM در کاهش خسارت نماتدهای انگل گیاهی به عنوان روشی ایمن و کارا به منظور برقراری کشاورزی پایدار در سطح گلخانه و مزرعه توصیه می‌گردد.

منابع

1. Alikarami M., Charehgani H., and Abdollahi M. 2017. Nematicidal activity of some plant extracts on root-knot nematode on tomato (*Solanum lycopersicum*) *in vitro* and *in vivo* conditions. Iranian Journal of Plant Protection Science 48(2): 317-326. (In Persian with English abstract)
2. Ansari S., Charehgani H., and Ghaderi R. 2019. Resistance of ten common medicinal plants to the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. Hellenic Plant Protection Journal 12: 6-11.
3. Chantal K., Xiaohou S., Weimu W., and Basil T.I.O. 2010. Effects of effective microorganisms on yield and quality of vegetable cabbage comparatively to nitrogen and phosphorus fertilizers. Pakistan Journal of Nutrition 9: 1039-1042.
4. Chapuis-Lardy L., Diakhate S., Djigal D., BA A.O., Dick R.P. Sembene P.M., and Masse D. 2015. Potential of sahelian native shrub materials to suppress the spiral nematode *Helicotylenchus dihystera.* Journal of Nematology 47(3): 214-217.
5. Compant S., Duffy B., Nowak J., Clement C., and Barka E.A. 2005. Use of plant growth promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. Applied and Environmental Microbiology 71: 4951-4959.
6. Condor A.F., Gonzalez P., and Lakre C. 2007. Effective microorganisms: Myth or reality? The Peruvian Journal of Biology 14: 315-319.
7. Dehghanian S.Z., Abdollahi M., Charehgani H., and Niazi A. 2020. Combined application of salicylic acid and *Pseudomonas fluorescens* CHA0 on the expression of *PR1* gene and control of *Meloidogyne javanica* in tomato. Biological Control 141: 104134. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104134.
8. Dourado D.P., de Oliveira Lima F.S., and Muraishi C.T. 2013. Nematicidal activity *in vitro* and *in vivo* of neem oil on *Meloidogyne incognita*. Brazilian Journal of Applied Technology for Agricultural Science 6(1): 63-68.
9. Hashemi S., Abdollahi M., and Charehgani H. 2017. Inhibitory effect of *Quercus brantii* L. extract on *Meloidogyne javanica*, the causal agent of root-knot disease, in tomato plants. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 33(1): 39-50. (In Persian with English abstract)
10. Higa T. 1991. Effective microorganisms: a biotechnology for mankind. p. 8–14. In J.F. Parr, S.B. Hornick and C.E. Whitman (eds.). First International Conference on Kyusei Nature Farming. Washington, DC, USA.
11. Huang W.K., Cui J.K., Liu S.M., Kong L.A., Wu Q.S., Peng H., He W.T., Sun J.H., and Peng D.L. 2016. Testing various biocontrol agents against the root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in cucumber plants identifies a combination of *Syncephalastrum racemosum* and *Paecilomyces lilacinus* as being most effective. Boilogical Control 92: 31-37.
12. Hussey R.S., and Barker K.R. 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. Plant Disease Reporter 57: 1025-1028.
13. Jepson S.B. 1987. Identification of root knot nematodes. Cambrian News Ltd. CABI, Wallingford, UK.
14. Kennedy I.R., Choudhury A., and Kecskes M.L., 2004. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? Soil Biology and Biochemistry 36: 1229-1244.
15. Khan I.A., Sayed M., Shaukat S.S., and Handoo Z.A. 2008. Efficacy of four plant extracts on nematodes associated with papaya in Sindh, Pakistan. Nematologia Mediterranea 36(1): 93-98.
16. Khan M.S., Zaidi A., and Wani P.A. 2007. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture: a review. Agronomy for Sustainable Development 27: 29-43.
17. Marambe B., and Sangakkara U.R. 1996. Effect of EM on weed populations, weed growth and Ttomato production in Kyusei nature farming. http://www.futuretechtoday.net/em/index2.htm 6.htmlnt growth.
18. Mayer J., Scheid S., Widmer F., Fliessbach A., and Oberholzer H.R. 2010. How effective are 'Effective microorganisms® (EM)'? Results from a field study in temperate climate. Applied Soil Ecology 46: 230-239.

19. Moazezikho A., Charehgani H., Abdollahi M., and Rezaei R. 2020. The evidence for inhibitory effect of *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and aqueous extracts of *Datura stramonium* and *Myrtus communis* on tomato plants infected with *Meloidogyne javanica* (Tylenchida: Heteroderidae). Egyptian Journal of Biological Pest Control 30: 15. https://doi.org/10.1186/s41938-020-00217-0
20. Mohan B. 2008. Evaluation of organic growth promoters on yield of dryland vegetable crops in India. Journal of Organic Systems 3: 23-36.
21. Mosahaneh L., Charehgani H., Abdollahi M., and Rezaei R. 2020. Biological control agents in the management of different initial population densities of *Meloidogyne javanica* in tomato. Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica 55(2): 161-170.
22. Mozafaryan S., Abdollahi M., and Charehgani H. 2017. Inhibitory effects of *Prangos ferulacea* and *Satureja hortensis* on root knot nematode, *Meloidogyne javanica*. Iranian Journal of Plant Pathology 52(4): 445-464. (In Persian with English abstract)
23. Ncube L., Minkeni P.N.S., and Brutsch O. 2011. Agronomic suitability of effective microorganisms for tomato production. African Journal of Agricultural Research 6: 650-654.
24. Nicol J.M., Turner S.J., and Coyne D.L. 2011. Current nematode threats to world agriculture. p. 21-43. In J. Jones, G. Gheysen, and C. Fenoll (eds.). Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions. Springer, Berlin.
25. Olle M. 2020. Review: Bokashi technology as a promising technology for crop production in Europe, The Journal of Horticultural Science and Biotechnology DOI:10.1080/14620316.2020.1810140.
26. Osman H.A., El-Gindi A.Y., Taha H.S., El-Kazzaz A.A., Youssef M.M.A., Ameen H.H., and Lashein A.M. 2008. Biological control of root-knot nematode *Meloidogyne incoginita* and evaluation of the nematicidal effects of *Tagetes erecta* tissue culture under laboratory and greenhouse conditions. Egyptian Journal of Phytopathology 35(1-2): 33-44.
27. Rafiee F., Charehgani H., and Abdollahi M. 2019. Evaluation of burdock and mountain almond leaf extracts against *Meloidogyne javanica* on tomato. Archives of Phytopathology and Plant Protection 52(11-12): 1035-1047.
28. Sarwar G., Naseem A.R., and Mujeeb F. 2009. Efficiency of various organic materials for improving chemical characteristics of normal soil. Pakistan Journal of Botany 40(5): 2107-2113.
29. Schenck zu Schweinsberg-Mickan M., and Müller T. 2009. Impact of effective microorganisms and other biofertilizers on soil microbial characteristics, organic-matter decomposition, and plant growth. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 172(5): 704-712.
30. Seenivasan N., and Senthilnathan S. 2017. Effect of humic acid on *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood infecting banana (*Musa* spp.). International Journal of Pest Management 64(2): 110-118.
31. Subadiyasa N.N. 1997. Effective microorganisms (EM) technology: its potential and prospect in Indonesia. Majalah Ilmiah Fakultas Pertanian Universitas Udayana 16: 45-51.
32. Taylor A.L., and Sasser J.N., 1978. Biology, identification, and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). Raleigh, North Carolina, US.
33. Tokeshi H., Alves M.C., Sanches A.B., and Harada D.Y. 2010. Effective microorganisms for controlling the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* in Lettuce. http://emrojapan.com/emdb/content/12.
34. Whitehead A.G., and Hemming J.R. 1965. A comparison of some quantitative methods of extracting small vermiform nematodes from soil. Annals of Applied Biology 55: 25-38.
35. Wijesinghe D., and Sangakkara R. 2014. Successful potato production in nature farming with effective microorganisms – A case study. p. 995-997. In G. Rahmann and U. Aksoy (eds.). Proceedings of the 4th ISOFAR Scientific Conference. 'Building Organic Bridges', at the Organic World Congress. Istanbul, Turkey.
36. Yass S.T.A., Ammar A., Aish A.A., Al-Sandooq D.L.E., and Mostafa M.M. 2020. Activity of humic acid against root knot nemaodes on tomato. Plant Archives 20(Supplement 1): 1-3.

Journal of Plant Protection
Vol. 35, No. 3, Fall 2021, P. 303-310

نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۵، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۰، ص. ۳۱۰-۳۰۳

Evaluation of Effective Microorganisms (EM®) against Root-Knot Nematode (*Meloidogyne javanica*) in Tomato

H. Charehgani[1]*- S. Mahdi[2]

Received: 30-12-2020
Accepted: 21-05-2021

Introduction: Plant-parasitic nematodes cause significant yield losses in a wide range of crops. Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) are the most important plant-parasitic nematodes, because they widely distributed all around the world and have wide host range. Chemical nematicide is one of the primary means of control for plant-parasitic nematodes. Due to negative impact of synthetic nematicides, it will be necessary to develop other management strategies for plant-parasitic nematodes which are safe for the environment and humans. Latest interest in organic farming lead to substitution for conventional nematicides by low-risk compounds such as natural products derived from plants. Also, biological control is an interesting option to control these nematodes. Effective microorganisms (EM®) consist of a mixture of live cultures of microorganisms such as photosynthetic bacteria, which they are reported to reduce the incidence of pathogenic microorganisms.

Materials and Methods: In the present study, the aerial parts of the marigold (*Tagetes erecta*) were collected from Shiraz, Iran. Marigold leaves dried in shade and finely grinded using an electric grinder and a stock solution (10% w/v) was prepared. Seeds of tomato (cv. Early-Urbana) were sown in plastic pots containing 1500 g of a sterilized mixture of farm soil (sandy loam soil) and cow manure. The pots were kept under greenhouse conditions with 16:8 h light to dark photoperiod and 27 ± 4 °C. Four-leaf stage seedlings were soil-drenched (50 ml per plant) with EM® or a mixture of equal amount of EM®+ marigold leaf extract at the rate of 5, 10, 15 and 20% and simultaneously inoculated with a suspension of *M. javanica* (6000 eggs per pot). The experiment was carried out in a completely randomized design with five replications. Sixty days after nematode inoculation, plants were harvested and the vegetative indices including shoots length, shoot fresh and dry weight and root fresh weight and the nematode population indices including the number of eggs as described by Hussey and Barker (1973), number of galls and egg masses per root system as described by Taylor and Sasser (1978) and the number of second stage juveniles (J2s) in the pot were recorded. Finally, the reproduction factor calculated as described by Sasser and Taylor (1978). Data were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) for plant growth parameters and two-way ANOVA for nematode population indices using SAS 9.1 program (Statistical Analysis System Institute Inc., USA). Treatment means were compared using least significance differences (LSD) at $p<0.01$.

Results and Discussion: Results showed that soil drenching of EM® and EM®+ marigold leaf extract increased the plant growth parameters on inoculated and non-inoculated plants as compared to control. The treatment with EM®+ marigold leaf extract at the rate of 20% was the most effective treatment and increased shoot length, shoot fresh weight and shoot dry weight of non-inoculated plants by 33, 39 and 11% respectively, as compared to non-inoculated control plants. In the case of inoculated plants, shoot length, shoot fresh weight, shoot dry weight and root fresh weight of treated plats with EM®+ marigold leaf extract at the rate of 20% were 34, 31, 15 and 11% higher than inoculated control plants. The number of eggs and egg masses per root system and the reproduction factor were significantly reduced in treated plants with EM®+ marigold leaf extract at the rate of 15 and 20%. EM®+ marigold leaf extract at the rate of 20% reduced the number of eggs, galls, egg masses per root system and the reproduction factor by 28, 40, 37 and 27% respectively, as compared to control. The lowest numbers of egg masses were observed in the root system of tomato plants treated with EM®+ marigold leaf extract at the rate of 20%. It had significant difference than other treatments, except EM® at the rate of 20%. These data for the first time in Iran, suggest that EM® might have utility in controlling root-knot nematodes. A mixture of EM® and marigold leaf extract was more effective than alone application of EM® for control of *M. javanica*. Findings from this study, suggest that a mixture of equal amount of EM® and marigold leaf extract at the rate of 20% reduced *M. javanica* reproduction rates in tomato plants grown in greenhouse.

Keywords: Biological control, Greenhouse, Marigold leaf extract, Nematode indices, Plant growth indices

1 and 2- Assistant Professor and M.Sc. Student of Plant Protection, College of Agriculture, Yasouj University, Yasouj, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: H.charehgani@yu.ac.ir)
DOI: 10.22067/JPP.2021.67213.0