دانش بیماری‌شناسی گیاهی (شاپای ا: ۶۲۹۰-۲۵۸۸، شاپای چ: ۹۲۷۰-۲۲۵۱)
سال دهم، جلد ۲، بهار و تابستان ۱۴۰۰
Plant Pathology Science (eISSN:2588-6290, pISSN:2251-9270)
Vol. 10(2), 2021

Research Article

Optimum substrate and carrier for *Purpureocillium lilacinum* and its effectiveness against *Meloidogyne javanica* on tomato

SAEID IMANI[1], SEYED MOHAMMAD REZA MOOSAVI[1]✉, RASOUL ZARE[2], TAHERE BASIRNIA[1]

1. Department of Plant Pathology, Marvdasht Branch, Islamic Azad University, Marvdasht, Iran, 2. Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Tehran, Iran.

Received: 11.20.2021 Accepted: 12.30.2021

Imani S, Moosavi SMR, Zare R, Basirnia T (2021) Optimum substrate and carrier for *Purpureocillium lilacinum* and its effectiveness against *Meloidogyne javanica* on tomato. Plant Pathology Science 10(2):50-64. Doi: 10.2982/PPS.10.2.50.

Abstract

Introduction: The soil-borne root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) causes heavy losses in tomato plants every year. Their management by chemical nematicides is difficult, expensive, and may also kill soil beneficial microorganisms, so other safer methods should be used to replace them. *Purpureocillium lilacinum* is an important biological control agent against root-knot and cyst nematodes. This study was carried out to determine the appropriate substrate and carrier of this fungus and its effect on these nematodes in tomatoes. **Material and Methods:** *P. lilacinum* was propagated *in vitro* on seeds of millet, corn, alfalfa, and clover substrates and their spore production was assessed 10, 20, and 30 days after inoculation. The survival of the fungal spores was then examined in talc, kaolin, and corn cob powder as carriers for 12 months. The effect of the fungus in the mentioned carriers against *Meloidogyne javanica* on tomato was investigated in the greenhouse by means of a completely randomized design experiment. **Results:** The highest number of spores in one gram of substrate was produced on millet seed on day 30. The highest number of survived spores was detected in the corncob powder carrier at all 12 months of the experiment. The fungus on corn cob powder was able to control *M. javanica* to 95% was similar to the nematicide Flopyram. This formulation also had a superior effect in establishing the fungus in the rhizosphere and on roots, suppressing the growth parameters of nematode and increasing plant growth. **Conclusion:** The fungus reproduced well on millet seeds and could last longer if formulated on corn cobs powder. Therefore, corn cobs powder can be a suitable base to produce an effective powdered product against *M. javanica*.

Keywords: Maize cobs, Millet, Root-knot nematode, Spore survival

✉Corresponding author: rmmoosavi@miau.ac.ir

مقاله پژوهشی

بستر و حامل بهینه برای *Purpureocillium lilacinum* و تأثیر آن بر *Meloidogyne javanica* روی گوجه‌فرنگی

سعید ایمانی[۱]، سید محمدرضا موسوی[۱]✉، رسول زارع[۲]، طاهره بصیرنیا[۱]
۱. گروه بیماری‌شناسی گیاهی، واحد مرودشت، دانشگاه آزاد اسلامی، مرودشت، ایران، ۲. موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۲۹ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۰۹

ایمانی س، موسوی س م ر، زارع ر، بصیرنیا ط (۱۴۰۰) بستر و حامل بهینه برای *Purpureocillium lilacinum* و تأثیر آن بر *Meloidogyne javanica* روی گوجه‌فرنگی. دانش بیماری‌شناسی گیاهی ۱۰(۲): ۶۴-۵۰. Doi: 10.2982/PPS.10.2.50.

چکیده

مقدمه: نماتد خاکزی مولد غده ریشه *Meloidogyne javanica* خسارت‌زیادی به گوجه‌فرنگی هر ساله وارد می‌کند. مدیریت آن با سم‌های شیمیایی اغلب دشوار و پرهزینه است و باعث از بین رفتن ریزجانداران مفید خاک می‌شود، بنابراین باید با روش بی‌خطر مبارزه زیستی جایگزین گردد. قارچ *Purpureocillium lilacinum* عامل مهم مبارزه زیستی با نماتدهای غده ریشه و سیستی است. این پژوهش، برای تعیین بستر و حامل مناسب این قارچ و تاثیر آن بر این نماتد در گوجه‌فرنگی اجرا شد. **مواد و روش‌ها:** قارچ روی بسترهای دانه‌های ارزن، ذرت، یونجه و شبدر در شرایط آزمایشگاهی کشت شد و هاگ‌دهی آن در سه بازه‌ی زمانی ۱۰، ۲۰ و ۳۰ روز مورد ارزیابی قرار گرفت. ماندگاری هاگ قارچ در سه حامل تالک، کائولن و پودر چوب بلال ذرت طی ۱۲ ماه بررسی شد. تاثیر قارچ در حامل‌های فوق بر *M. javanica* روی گوجه‌فرنگی در شرایط گلخانه در قالب طرح کاملا تصادفی آزمایش شد. **یافته‌ها:** قارچ روی بستر دانه‌ی ارزن ۳۰ روز پس از کشت، بیشترین میزان هاگ را در یک گرم بستر تولید کرد. همچنین روی پودر چوب بلال ذرت در طول ۱۲ ماه بیشترین ماندگاری هاگ را در یک گرم حامل داشت. قارچ فرموله شده در حامل پودر چوب بلال ذرت در شرایط گلخانه‌ای بالاترین توانایی مهار نماتد (۹۵٪) را داشت که از نظر آماری شبیه نماتدکش فلوپیرام بود. همچنین این فرمولاسیون در ماندگاری هاگ قارچ در خاک و روی ریشه و در پی آن کاهش شاخص‌های بیماری‌زایی نماتد و رشد بهتر گیاه موثرتر بود. **نتیجه‌گیری:** دانه‌ی ارزن بستری مناسب برای تکثیر قارچ می‌باشد و حامل پودر چوب بلال ذرت یک ماده‌ی مناسب جهت ماندگاری قارچ است و می‌تواند پایه‌ی یک فرمولاسیون مناسب جامد برای این قارچ در جهت مهارزیستی با نماتد*M. javanica* باشد.

واژگان کلیدی: بقای هاگ، ارزن، چوب بلال ذرت، نماتد غده ریشه

✉ نویسنده مسول: rmmoosavi@miau.ac.ir

مقدمه Introduction

حداقل ۱۲٪ از غذای سالیانه تولید شده در سرتاسر دنیا توسط نماتدهای انگل گیاهی از بین می‌رود (Nicol et al. 2011)، که حدود نیمی از این خسارت (۵٪) مربوط به نماتدهای غده ریشه (Root-knot nematodes) می‌باشد (Agrios 2005, Karssen et al. 2013). این نماتدها یکی از مهمترین عوامل خسارت‌زای گیاهی در جهان هستند که باعث کاهش کمیت و کیفیت تولیدات گیاهی می‌شوند (Moens et al. 2009). در حال حاضر مدیریت این نماتدها عمدتاً به مبارزه شیمیایی وابسته است. به دلیل خطرات استفاده از سموم شیمیایی برای سلامت انسان و محیط زیست، محققان در پی دست‌یابی به راه‌های مناسب و کم خطر کنترل آن‌ها هستند. استراتژی جایگزین انتخاب شده باید بتواند بدون آسیب به محیط زیست، نماتد را در حد قابل قبولی کنترل کند (Moosavi and Minassian 2021). مبارزه زیستی به عنوان یکی از مقبول‌ترین روش‌های کنترل نماتدها در مبارزه تلفیقی آفات در نظر گرفته می‌شود (Moosavi 2020). اضافه کردن آنتاگونیست‌های مختلف از جمله قارچ‌ها به محیط خاک و ریزوسفر می‌تواند از خسارت‌های نماتدهای بیماری‌زای گیاهی بکاهد (Moosavi and Zare 2020).

قارچ *Purpureocillium lilacinum* (Thom) Luangsa-ard et al. یکی از مهمترین عوامل مهارکننده زیستی نماتدها محسوب می‌شود (Cumagun and Moosavi 2015). این قارچ به راسته Hypocreales و خانواده Ophiocordycipitaceae تعلق دارد و در مناطق جغرافیایی متفاوتی مشاهده شده است. این قارچ می‌تواند به صورت ساپروفیتی، انگلی روی میزبان و همچنین درون گیاهان زندگی کند (Moosavi and Zare 2020) و قادر به پارازیته کردن تمام مراحل زندگی نماتدهای غده ریشه بوده (Yang et al. 2015) و از تفریخ تخم آنها نیز جلوگیری می‌کند (Ahmad et al. 2019). این قارچ طی ۷-۵ روز تخم های نماتد غده ریشه را کلنیزه و نماتد ماده را پارازیته کرد (Khan et al. 2006) و همچنین باعث کاهش ۸۰ درصدی تفریخ تخم نماتد *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood شد (Isaac et al. 2021). سازوکارهای تعارضی که بر اساس آنها قارچ *P. lilacinum* می‌تواند نماتدهای غده ریشه را مهار کند به مقدار زیادی مشخص شده است (Moosavi and Zare 2020).

استفاده از قارچ‌ها در فرمولاسیون‌های مختلف ریشه‌ها را در برابر حمله و آسیب نماتدها مصون می‌کند. تاکنون فرمولاسیون‌های مختلفی از جمله گرانول و مایع و پودر و ... در قالب پوشش بذر یا اضافه کردن به خاک به‌کار برده شده است (Hernandez and Hidalgo-Diaz 2008). همچنین محققین از بسترهایی مانند دانه سورگوم، دانه گندم، ورمی کمپوست، دانه گشنیز و مواد ضایعاتی مانند فضولات دام جهت تکثیر و هاگزایی قارچ استفاده کرده‌اند (Gulsar Banu et al. 2006, Prabhu et al. 2008).

در این تحقیق امکان تولید انبوه یک جدایه از قارچ *P. lilacinum* روی بسترهای دانه ارزن، ذرت، یونجه و شبدر مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین میزان بقای این قارچ در سه حامل مختلف (تالک، کائولن و پودر چوب بلال ذرت) به مدت دوازده ماه در بازه‌های زمانی یک‌ماهه در دمای ۲۵ درجه سیلسیوس بررسی و سپس توانایی این قارچ در هر سه حامل برای مبارزه با نماتد غده ریشه *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood در شرایط گلخانه‌ای روی گیاه گوجه‌فرنگی آزمایش شد.

مواد و روش‌ها Materials and Methods

تعیین بستر و حامل مناسب قارچ *Purpureocillium lilacinum*

سویه قارچ *Purpureocillium lilacinum* مورد استفاده در این آزمایش با کد دسترسیIRAN 3022C از کلکسیون قارچ‌های زنده ایران، بخش رستنی‌ها، موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور تهیه شد. قارچ روی محیط کشت سیب‌زمینی، دکستروز و آگار (PDA, Difco) تکثیر و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس در تاریکی به مدت ۱۸ روز نگهداری شد. سوسپانسیون هاگ قارچ برای تکثیر در بسترهای مختلف کشت از طریق اضافه کردن ۳ میلی‌لیتر آب مقطر استریل حاوی توین ۸۰ (پلی سوربات ۰/۰۵٪) به محیط کشت PDA آماده شد (Silva et al. 2017). این سوسپانسیون از فیلتر واتمن نمره ۳ عبور داده شد و پس از آن هاگها توسط هموسیتومتر (Haemocytometer, Precicolor HBG, Lüutzellinden, Gießen, Germany) و به حجم رساندن سوسپانسیون هاگ، شمارش شد (Sokhandani et al. 2016). تکثیر جدایه قارچی روی چهار بستر دانه ارزن، دانه ذرت، دانه یونجه و دانه شبدر بررسی شد. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج تکرار برای هر تیمار انجام شد. جهت آماده‌سازی بسترهای جامد کشت، ۵۰ گرم از مواد مذکور به یک ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری اضافه شد و پس از رساندن رطوبت بستر به ۵۰ درصد، اتوکلاو شد. پس از اتوکلاو مقدار ده میلی لیتر از سوسپانسیون حاوی $۱۰^{۵} \times ۴$ هاگ قارچ به این محیط‌ها اضافه شد. ارلن‌ها در مدت زمان ۳۰ روز در دمای ۱±۲۵ درجه سیلسیوس در تاریکی در انکوباتور نگهداری شدند (Gulsar Banu et al. 2006, Prabhu et al. 2008). ظرف‌های شاهد فقط آب مقطر استریل دریافت کردند. جهت جلوگیری از متراکم شدن محیط‌های کشت و رشد یکنواخت قارچ، همگی ظرفها روزانه با دست تکان داده شدند. در مقاطع زمانی ۱۰، ۲۰ و ۳۰ روز پس از کشت، تعداد هاگهای تشکیل شده روی بستر هدف توسط لام هموسیتومتر شمرده شد (Sokhandani et al. 2016).

برای تهیه حامل، بستر انتخاب شده حاوی قارچ، به مدت ۱۸ ساعت در معرض هوای اتاق، خشک و با استفاده از مخلوط کن در شرایط استریل پودر شد (Gulsar Banu et al. 2006). ماده حمل کننده (تالک، کائولن و پودر چوب بلال ذرت) به مدت سه روز با استفاده از سینی‌های فلزی در آون با دمای ۷۰ درجه سیلسیوس قرار داده و سپس مقدار ۲۵ گرم از بستر حاوی قارچ، با ۷۵ گرم پودر حامل با استفاده از هاون چینی استریل مخلوط شده و درون کیسه‌های پلی‌اتیلن مقاوم در برابر عبور هوا و در دمای ۲۵ درجه سیلسیوس نگهداری شدند. مدت زمان بقای هاگهای این قارچ در یک گرم حامل برای مدت دوازده ماه با فواصل زمانی یک ماه در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج تکرار برای هر تیمار مورد بررسی قرار گرفت. جهت چسبیدن مواد به هم به ازای هر ۱۰۰ گرم فرمولاسیون‌ها، مقدار یک میلی لیتر HCl ۰/۰۵ نرمال و ۰/۵ گرم کربوکسی متیل سلولز (1% w/w) اضافه شد (Prabhu et al. 2008).

آزمایش تأثیر *Purpureocillium lilacinum* بر نماتد *M. javanica* در شرایط گلخانه

زادمایه مورد نیاز از ریشه‌های گوجه‌فرنگی (رقم Early-Urbana) آلوده به *M. javanica* از گلخانه

آموزشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت تهیه شد. گونه این نماتد قبلاً مشخص شده و جمعیت مورد نیاز از طریق تکثیر یک توده تخم روی گیاه گوجه‌فرنگی به دست آمد. ریشه‌های آلوده از خاک خارج شده و زیر آب جاری شسته شدند تا گل و لای چسبیده به آن جدا شود. سپس ریشه‌های حاوی کیسه تخم به قطعات کوچک تقسیم شده و همراه با محلول هیپوکلریت سدیم ۱٪ به مدت ۴۰ ثانیه در مخلوط کن با سرعت متوسط خرد شد (Nico et al. 2004). سپس محتویات مخلوط کن از الک ۲۰۰ مش که در زیر آن الک ۵۰۰ مش قرار دارد عبور داده شده و با آب شسته شد. محتوای سطح الک ۵۰۰ مش با آب شسته و در بشر جمع آوری شد (Hussy and Baker 1973). تعداد تخم‌ها به کمک لام شمارش سه بار شمرده و میانگین شمارش‌ها محاسبه و در نظر گرفته شد.

برای این آزمایش از گلدان‌های ۳ کیلوگرمی استوانه‌ای شکل به ارتفاع ۲۰ سانتی متر و قطر ۱۳ سانتی متر استفاده شد. درون گلدان از مخلوط خاک استریلیزه شده با گرما و ماسه به نسبت (۱:۲) پر شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج تکرار انجام شد و دوبار پشت سر هم تکرار گردید. تیمارهای آزمایش شامل جدایه قارچ *P. lilacinum* روی حامل‌های متفاوت (تالک، کائولن پودر چوب بلال ذرت) بود. یک شاهد منفی که در آن فقط نماتد به گلدان‌ها اضافه شد و نماتدکش فلوپیرام (ولوم پرایم، شرکت بایر، آلمان) به عنوان شاهد مثبت برای این آزمایش در نظر گرفته شد. مقداری از حامل‌های مختلف با سن ۱۲ ماهه که حاوی تعداد $۱۰^{۶}$ × ۸۰ هاگ قارچ بود روی سطح خاک گلدان‌ها ریخته شده و تا عمق ۵ سانتی متری با خاک مخلوط شد. پس از آن بذر گیاه گوجه‌فرنگی رقم ارلی اوربانا کاشته شد و در مرحله ۴-۲ برگی مقدار ۶۰۰۰ عدد از تخم و لارو نماتد *M. javanica* اطراف طوقه گیاهان تمام تیمارها مایه زنی شد (De Leij and Kerry 1991). نماتدکش شیمیایی سه روز قبل از تلقیح گیاه با نماتد با دوز معادل ۶۲۵ میلی لیتر در هر هکتار (۸ میکرولیتر به ازای هر گلدان ۳ کیلوگرمی) همراه آب آبیاری به گلدان اضافه شد.

تمام گلدان‌ها در شرایط گلخانه در دمای ۲ ± ۲۸ درجه سیلسیوس و رطوبت نسبی ۶۰٪ نگهداری و دو بار در هفته آبیاری شدند. پس از ۱۳ هفته گیاهان برداشت و وزن‌تر قسمت‌های هوایی و ریشه و وزن محصول اندازه گیری شد. برای بررسی توانایی کلنیزه کردن خاک و سطح ریشه‌ها توسط جدایه قارچ، در انتهای آزمایش با استفاده از یک چوب پنبه سوراخ کن با قطر ۵ میلی‌متر از هر تکرار سه نمونه تهیه شد و پس از آماده سازی سری رقت، تعداد واحدهای تشکیل دهنده کلنی (CFU) خاک روی محیط کشت انتخابی و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس در تاریکی مشخص شد (Moosavi and Ghani 2019). ریشه‌های هر تیمار را به قطعات کوچک تقسیم کرده و پس از مخلوط کردن، به صورت تصادفی مقدار یک گرم ریشه که با محلول هیپوکلریت سدیم ٪ ۰/۴ استریل شده را برداشته و به کمک هاون و دسته استریل له نموده، ریشه له شده در ۹ میلی‌لیتر آب مقطر سترون ریخته شده و روی دستگاه همزن مگنت دار (stirrer) به مدت یک دقیقه با سرعت ۹۰۰۰ دور در دقیقه زده شد. سپس از آن سری رقت تهیه و تعداد واحدهای تشکیل دهنده کلنی روی محیط کشت روی محیط کشت انتخابی به روش ذکر شده تعیین شد (Singh et al. 2013). به منظور تعیین درصد تخم‌های آلوده، از هر تکرار تعداد ۱۰ عدد

توده تخم نماتد به صورت تصادفی انتخاب و توانایی جدایه قارچ در آلوده کردن نماتد بررسی گردید. هر توده تخم در یک قطره هیپوکلریت سدیم یک درصد که روی لام آزمایشگاهی گذاشته شده بود، قرار گرفت و با فشار لامل خرد شد تا تخم‌ها آزاد شود. تخم‌های آلوده بر اساس نفوذ ریسه به درونشان تشخیص داده شدند. با استفاده از میکروسکوپ با بزرگ نمایی 40× و 100× تعداد تخم‌های آلوده و سالم توسط ثبت و درصد آلودگی بر اساس تقسیم تعداد تخم‌های آلوده به تعداد کل تخم‌های هر توده تخم محاسبه شد (Fatemy 2005). برای اطمینان از این که آلودگی تخم‌ها توسط قارچ مورد نظر صورت گرفته است، تخم‌های آلوده سه بار با آب مقطر استریل شسته شد و روی محیط کشت سیب‌زمینی، دکستروز و آگار (PDA) (Singh et al. 2013) قرار داده شدند و پس از بررسی روزانه و مشاهده رشد قارچ در شرایط سترون، قارچ رشد کرده شناسایی و تأیید شد. تعداد تخم‌های موجود در سیستم ریشه طبق روش گفته شده شمارش شد. تعداد غده‌های روی ریشه شمارش و شاخص گره ریشه‌ها بلافاصله پس از برداشت بر اساس مقیاس صفر تا ۱۰ مشخص شد که در آن شاخص صفر، بیانگر سیستم ریشه‌ای کامل و سالم و شاخص ۱۰ بیانگر گال زدگی کل ریشه‌ها هستند (Sikora and Fernandez 2005). خاک هر گلدان به صورت کامل مخلوط شد و ۲۵۰ گرم از آن انتخاب و نماتدهای آن به روش Jenkins استخراج و جمعیت لاروهای سن ۲ برآورد شد (Jenkins 1964). در نهایت تعداد کل تخم‌های سالم و لاروهای سن ۲ ریشه و خاک با یکدیگر جمع و جمعیت کل نماتد در هر گلدان محاسبه شد. همچنین فاکتور تولید مثل (Pf/Pi) از محاسبه نسبت جمعیت نهایی تخم و لارو سالم در هر گلدان به جمعیت اولیه تلقیح شده به خاک (۶۰۰۰ عدد تخم و لارو) به دست آمد. جهت تعیین درصد کنترل هر جدایه، تعداد تخم‌ها و لاروهای سن دوم در هر گرم خاک شاهد حاوی نماتد به تنهایی (X) از تعداد تخم‌های سالم و لاروهای سن دوم در هر گرم خاک هر تیمار (Y) کم شده و پس از تقسیم بر تعداد تخم‌ها و لاروهای سن دوم در هر گرم خاک شاهد حاوی نماتد (X) در عدد ۱۰۰ ضرب شد (De Leij and Kerry 1991). درصد کنترل نشان دهنده کاهش تعداد تخم‌های سالم و لاروهای سن دوم هر تیمار نسبت به شاهد است. این کاهش ممکن است در اثر پارازیته شدن تخم‌ها توسط قارچ یا کاهش تعداد تخم‌های هر توده تخم به دلایل مختلف باشد (Abbott 1925).

$$\text{Control efficacy}=\frac{X-Y}{X}\times 100$$

تمام آزمایش‌ها دو بار پشت سر هم تکرار شدند. ازآنجا که نتایج از یک روند مشابه پیروی می‌کردند داده‌ها با هم مخلوط شده و سپس مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. از برنامه آماری SPSS 16 برای انجام عملیات آماری استفاده شد. پس از بررسی داده‌های به دست آمده از نظر یکنواختی و نرمال بودن، توانایی تکثیرقارچها روی بسترهای مورد نظر، میزان بقای قارچ در حامل‌های مختلف درمدت دوازده ماه و نیز توانایی قارچ و حامل‌های مختلف در شرایط گلخانه‌ای در کنترل نماتد، تجزیه و تحلیل آماری (ANOVA) انجام و اختلافات بین میانگین‌ها توسط آزمون توکی در سطح ۵٪ متمایز شد.

یافته‌ها Results

بستر مناسب هاگدهی قارچ *Purpureocillium lilacinum*

از چهار بستر جامد مورد استفاده در این آزمایش، قارچ *P. lilacinum* بیشترین تعداد هاگ را روی بستر دانه ارزن در بازه زمانی ۱۰، ۲۰ و ۳۰ روزه بعد از کشت تولید کرد. این قارچ روی بسترهای دانه یونجه و دانه شبدر در تمامی بازه‌های زمانی کمترین میزان هاگ را تولید کرد (جدول ۱).

حامل مناسب برای ماندگاری هاگهای قارچ

بین میانگین ماندگاری هاگ قارچ در سه حامل پودر چوب بلال ذرت، تالک و کائولن در دماهای مختلف در طول دوازده ماه اختلاف معنی‌دار وجود داشت. هاگ قارچ در حامل پودر چوب بلال ذرت ماندگاری بیشتری را نسبت به دو حامل تالک و کائولن داشت. حامل کائولن در رتبه دوم قرار گرفت و حامل تالک کمترین میزان ماندگاری هاگ را در طول بازه زمانی ۱۲ ماهه داشت (جدول ۲). همچنین بین روند ماندگاری هاگ قارچ در هر حامل بین ماه‌های مختلف نیز اختلاف معنی‌داری وجود داشت (شکل ۱).

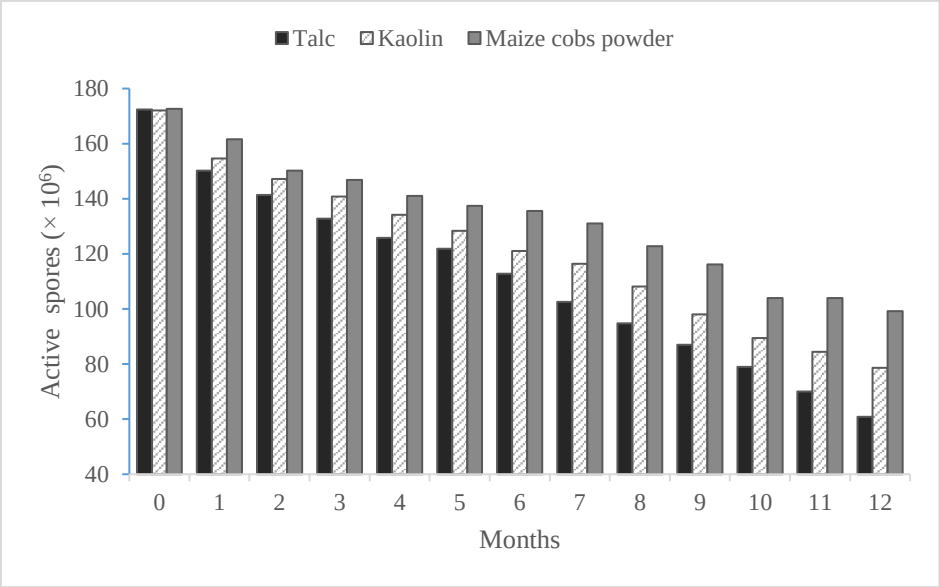
جدول ۱. تعداد هاگهای تولید شده *Purpureocillium lilacinum* روی یک گرم از چهار بستر کشت در سه زمان مختلف*.

Table 1. The numbers of spores produced by *Purpureocillium lilacinum* on one gram of four substrates at three different incubation periods*.

Substrate	Mean number of spore ($\times 10^6$) per gram of substrate [1]								
	10 day			20 day			30 day		
Millet seed	A	90.8	c	A	100.2	b	A	110.4	a
Maize seed	B	70.6	c	B	80.8	b	B	90.6	a
Alfalfa seed	C	39.6	c	C	50.2	b	C	60.4	a
Clover seed	C	40	c	C	50	b	C	60.2	a

*حرفهای بزرگ متفاوت در هر ستون، اختلاف آماری بین هاگ تولید شده قارچ در بسترهای مختلف و زمان‌های یکسان پس از شروع آزمایش (گروه‌بندی عمودی) و حرفهای کوچک متفاوت در هر ردیف، اختلاف آماری بین هاگهای تولیدی روی یک بستر کشت طی بازه‌های زمانی مختلف (گروه‌بندی افقی) را نشان می‌دهند.

*The different uppercase letters in each column indicate statistical differences between spores produced on different substrates at similar time spans from the beginning of the experiment (vertical grouping) and different lowercase letters in each row indicate differences between spores produced during different times on the same substrate (horizontal grouping).



شکل ۱. ماندگاری هاگ *Purpureocillium lilacinum* در یک گرم از سه حامل در طول ماه‌های مختلف در دمای ۲۵ درجه سلسیوس.

Figure 1. Spore's survival of *Purpureocillium lilacinum* in three carriers during different months at 25 °C in one gram carrier.

جدول ۲. ماندگاری هاگ *Purpureocillium lilacinum* در سه حامل مختلف در طی دوره دوازده ماهه.

Table 2. Viability of *Purpureocillium lilacinum* in three different carriers during a period of 12 months.

Carrier	Mean number of spore per gram carrier (×10^6) [1]					
	0 [2]	1	2	3	4	5
Talc	172.4 A	150.2 C	141.4 C	132.8 C	125.8 C	121.8 C
Kaolin	172 A	154.6 B	147.2 B	140.8 B	134.2 B	128.4 B
Maize cobs powder	172.6 A	161.6 A	150.2 A	146.8 A	141 A	137.4 A
	Mean number of spore per gram carrier (×10^6) [1]					
	6	7	8	9	10	11	12
Talc	112.8 C	102.6 C	94.8 C	87 C	79 C	70 C	60.8 C
Kaolin	121 B	116.4 B	108.2 B	98 B	89.4 B	84.4 B	78.6 B
Maize cobs powder	135.6 A	131 A	122.8 A	116.2 A	104 A	104 A	99.2 A

۱. تیمارهایی که در هر ستون (ماه پس از شروع آزمایش)، حرفهای انگلیسی متفاوتی دارند از نظر آماری با هم متفاوت هستند.۲. منظور از ماه صفر، ابتدای شروع آزمایش است.

1.Treatment in each column (themonth after the start time of theexperiment) who do not share any common letter are statistically different. 2. Month 0 refers to the beginning of the experiment.

تأثیر *Purpureocillium lilacinum* بر نماتد *M. javanica* در شرایط گلخانه

یافته‌ها نشان داد که قارچ *P. lilacinum* در حامل پودر چوب بلال ذرت نسبت به دو حامل تالک و کائولن، موجب کاهش بیشتر تعداد غده، شاخص گال، تعداد تخم روی ریشه، لارو سن دو و فاکتور تولید مثل نماتد در خاک و ریشه شده و بالاترین درصد کنترل نماتد (۹۵ درصد) را داشته است که بیش از دو برابر از درصد کنترل نماتد هنگامی که قارچ روی حامل تالک قرار داشت (۴۰٪)، بود. توانایی این تیمار (قارچ در حامل پودر چوب بلال) در کنترل نماتد در حد تیمار نماتدکش شیمیایی بود. تیمار قارچ *P. lilacinum* در حامل تالک کمترین تأثیر را در کاهش شاخص‌های رشدی نماتد در انتهای آزمایش داشت (جدول ۳). در انتهای آزمایش، جمعیت قارچ در خاک اطراف ریشه و روی ریشه هنگامی که حامل آن پودر چوب بلال ذرت بود به‌ترتیب ۲ و ۴ برابر بیشتر از تیماری بود که در آن حامل قارچ پودر تالک بود. تیمار قارچ *P. lilacinum* در حامل پودر چوب بلال ذرت به همراه شاهد مثبت، بالاترین وزن اندام هوایی، محصول و کمترین وزن ریشه را داشته است (جدول ۴). همچنین تیمار شاهد منفی و پس از آن تیمار قارچ *P. lilacinum* در حامل تالک کمترین میزان وزن اندام هوایی، محصول و بالاترین وزن ریشه را داشتند (شکل ۲).

بحث Discussion

موفقیت یک ترکیب نماتدکش زیستی جهت کاربرد در برنامه‌های مدیریتی بسته به نوع قارچ، میزان آلوده کنندگی، امکان تولید انبوه آسان و ارزانی بستر تولید آن بستگی دارد. یکی از موارد محدود کننده کاربرد نماتدکش‌های زیستی، پایدار نبودن تأثیر آنها به دلیل کیفیت پایین، نزول سریع پروپاگول‌های

جدول ۳. مقایسه پارامترهای رشدی نماتد *Meloidogyne javanica* در گلدان‌های گوجه‌فرنگی حاوی قارچ *Purpureocillium lilacinum* روی سه حامل مختلف ۱۳ هفته پس از آلوده شدن با نماتد*.

Table 3. Comparison the *Meloidogyne javanica* growth parameters in tomato pots containing *Purpureocillium lilacinum* on three different carrier 13 weeks after inoculation with nematode*.

Treatments	Knot Number	Knot Index	Egg/ (g Root)	J2/ (g Soil)	Pf/Pi	Control efficacy
Talc	112.2 B	6.1 B	3094.8 B	61.6 B	36.7 B	40.1 C
Kaolin	69.6 C	4.1 C	1949.8 C	36.3 C	19.3 C	68.5 B
Maize cobs powder	11.6 D	1.2 D	271.8 D	5.6 D	2.8 D	95 A
Negative check (Nematod alone)	151.8 A	8.5 A	4221.4 A	86.6 A	61.5 A	-
Positive check Fluopyram	11.6 D	1.2 D	244.8 D	6 D	2.9 D	95.3A

*در ستون‌های عمودی، تیمارهایی که حرفهای انگلیسی متفاوتی دارند از نظر آماری با هم متفاوت هستند.

*In each column, the treatments that do not share any common letter are statistically different.

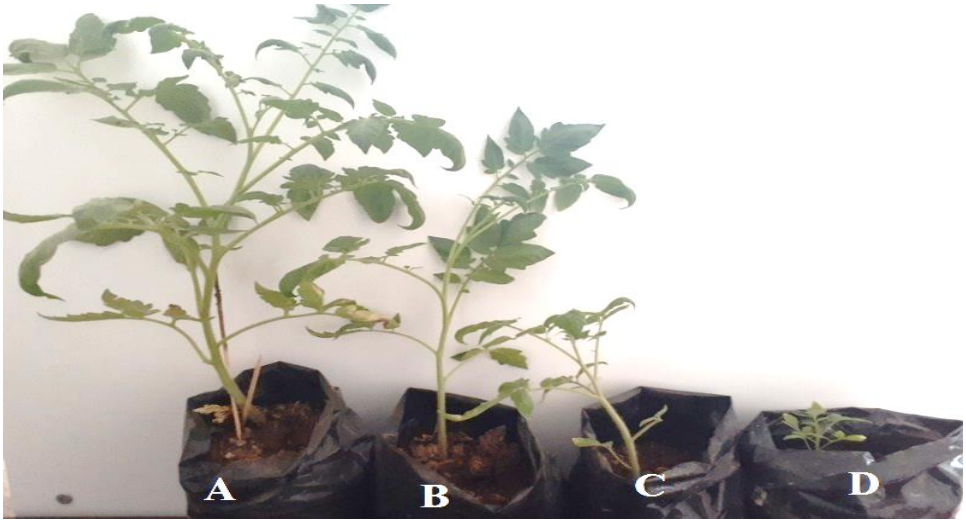
جدول ۴. مقایسه شاخص‌های رشدی گیاه گوجه‌فرنگی، درصد آلودگی تخم نماتد و توانایی استقرار قارچ *Purpureocillium lilacinum* در یک گرم خاک و ریشه در گلدان‌های گوجه‌فرنگی ۱۳ هفته پس از آلوده شدن با *Meloidogyne javanica*⁎.

Table 4. Comparison the tomato growth indices, nematode's egg infection percent and establishment ability of *Purpureocillium lilacinum* in one gram of soil and roots of tomato plants in pots 13 weeks after inoculation with *Meloidogyne javanica**.

Treatments	Root Weight (g)	Shoot Weight (g)	Fruit Weight(g)	Infected Egg (%)	CFU (g Root) **	CFU (g Soil) **
Talc	17 B	30.6 C	17.8 C	31.2 C	3.3 C	47.4 C
Kaolin	9.6 C	37.8 B	111.8 B	62.4 B	8.5 B	73.6 B
Maize cobs powder	4.6 D	54.8 A	291.6 A	92 A	13.9 A	102.6 A
Negative check (Nematode alone)	26 A	20 D	0 C	-	-	-
Positive check Fluopyram	4.4 D	55.4 A	292 A	-	-	-

⁎در ستون‌های عمودی، تیمارهایی که حروف انگلیسی متفاوتی دارند از نظر آماری با هم متفاوت هستند. ⁎⁎تعداد واحدهای تشکیل دهنده کلنی قارچ روی خاک و ریشه باید در 10^6 ضرب شود.

*In each column, the treatments that do not share any common letter are statistically different. **The number of fungal colony-forming units (CFU) in the soil and on roots should be multiplied by 10^6.



شکل ۲. تأثیر قارچ *Purpureocillium lilacinum* در حامل‌های مختلف بر رشد گیاه گوجه‌فرنگی در شرایط گلخانه، ۶۰ روز پس از مایه زنی نماتد *M. javanica*. A- قارچ در حامل پودر بلال ذرت B- قارچ در حامل کائولن C- قارچ در حامل تالک D- شاهد منفی نماتد به تنهایی.

Figure 2. Effect *of Purpureocillium lilacinum* in different carriers on growth of tomato plant under greenhouse conditions, 60 days after inoculation with nematode. A- Fungus in Maize cobs powder, B- Fungus in Kaolin, C- Fungus in Talc, D- Negative check.

آنها در طول دوره انبارداری و بعد از استفاده در خاک و عدم پایداری در برابر شرایط نامساعد محیطی است (Moosavi and Askary 2015). تاکنون از بسترهای متعددی مانند بسترهای جامد آلی برای تولید انبوه عوامل کنترل کننده بیولوژیک استفاده شده است. بسترهایی مانند دانه‌های سورگوم، بقایای محصولات زراعی و ضایعات کشاورزی مانند ملاس چغندرقند و نیشکر، ضایعات میگو، کیک‌های روغنی مانند نارگیل، چریش و کنجد از این دسته بسترها می‌باشند که در این میان، دانه سورگوم به میزان قابل توجهی باعث افزایش فرایند هاگزایی قارچ *P. lilacinum* شده است (Verma et al. 2004, Gulsar Banu et al. 2006). در تحقیق حاضر، بستر دانه ارزن بستر مناسب‌تری نسبت به سایر بسترها برای هاگزایی قارچ *P. lilacinum* بود. از آنجاکه نوع بستر مورد استفاده، محیط تغذیه‌ای و شرایط فیزیکی بر تعداد، نوع، ثبات و بقای هاگ قارچ تأثیر زیادی می‌گذارند، انتخاب صحیح این عوامل در تکثیر و فرایند هاگزایی قارچ بسیار مهم می‌باشد. بسترهایی مانند دانه ارزن با نسبت بالای سطح به حجم و فضای کافی بین دانه بندی از نظر هوادهی و تشکیل کنیدی ایده‌ال هستند (Schisler et al. 1991, Hadapad and Zebits 2006). از طرفی دانه ارزن حاوی مواد مغذی مانند پروتئین و لیپید می‌باشد که در روند هاگزایی قارچ تأثیر دارد. میکروارگانیسم‌هایی که توانایی زندگی ساپروفیتی دارند از کربن به عنوان منبع انرژی و از ازت برای ساخت ساختارهای سلولی استفاده می‌کنند. نسبت کربن به نیتروژن یکی از فاکتورهای مهم است که در صورت مناسب بودن (C:N ratio 10:1) می‌تواند تولید هاگ را تا ۳۰ برابر افزایش دهد (Gulsar Banu et al. 2006). میزان کربن و نسبت C: N مناسب بسترهای غلات بر عملکرد و کیفیت هاگها از جمله هاگزایی و بیماری زایی تأثیر می‌گذارد. بسترهای غلات مانند دانه سورگوم و دانه ارزن هم ارزان هستند و هم به وفور در دسترس هستند و در تحقیقات قبلی نیز در روند هاگزایی قارچ *Paecilomyces fumosoroseus* (Wise) Brown and Smith مؤثر بوده‌اند (Sahayaraj and Namasivayam 2008, Gulsar Banu et al. 2006).

حامل بر پایه چوب بلال ذرت نسبت به تالک و کائولن توانایی قابل توجهی در بقا هاگ قارچ در مدت زمان دوازده ماه داشت. در مطالعات دیگر هم کارایی این حامل در ماندگاری و تکثیر سایر میکروارگانیسم‌ها اثبات شده است. پودر چوب بلال از لحاظ میزان کربن و نسبت C: N مناسب است که در ماندگاری هاگ قارچ *Pochonia chlamydospores* (Goddard) Zare & W. Gams بسیار تاثیرگذار بود (Luambano et al. 2019). همچنین جاذبه الکترواستاتیکی آن در حد صفر بوده و به هنگام به کارگیری به عنوان حامل در بسیاری از فرمولاسیون‌ها، مخلوط حاصله بسیار یکنواخت شده و به مرور زمان از جداشدن عناصر مخلوط (Demixing) آن جلوگیری می‌نماید (Luambano et al. 2019). این ویژگی‌ها به همراه فراوانی این حامل در ایران و قیمت به صرفه سبب شده است تا در مقایسه با سایر حامل‌ها از جایگاه مطلوب‌تری برخوردار گردد و بتوان از این حامل در تهیه فرمولاسیون پودری استفاده کرد.

معمولاً گیاهان در واکنش به حضور نماتد و برای کاهش خسارت و جبران آن، ریشه‌های جدید تولید می‌کنند. از طرف دیگر در اثر آلودگی با نماتد *M. javanica* روی ریشه گیاه میزبان غده‌هایی تشکیل

می‌شود که باعث افزایش وزن ریشه می‌شود. هر چه جمعیت نماتد روی ریشه بیشتر باشد، وزن اندام های هوایی بیشتر کاهش می‌یابد (Perry et al. 2002). حضور نماتد روی ریشه باعث خسارت به گیاه می‌شود و اثر خود را به صورت کاهش رشد (طول و وزن) نشان می‌دهد. هر چه صدمه وارده به گیاه بیشتر باشد، میزان کاهش رشد نیز بیشتر است (Abad et al. 2009). همین وضعیت در آزمایش حاضر نیز مشاهده شد. در تیمارهایی که با حامل پودر چوب بلال ذرت و قارچ *P. lilacinum* مایه زنی شده بودند، ریشه‌ها در حالت مطلوب و نرمال بودند و نسبت به شاهد منفی غده بسیار کمتری داشته و وزن اندام هوایی و محصول بیشتری داشتند. به نظر می‌رسد دلیل این امر کنترل آلودگی نماتد توسط قارچ *P. lilacinum* باشد. آزمایشات گلخانه‌ای در این تحقیق نشان داد که تیمار قارچ در حامل پودر چوب بلال ذرت با توجه به پارامترهای رشدی گیاه و شاخص‌های آلودگی نماتد در حد نماتدکش شیمیایی (شاهد مثبت) توانایی کنترل نماتد را داشته است. حامل پودر چوب بلال در تمام تیمارها کمترین میزان آلودگی نماتدی و بالاترین میزان رشد شاخص‌های رویشی گیاهی را نسبت به بقیه تیمارها داشت. همچنین بالاترین میزان استقرار در ریشه و ریزوسفر را نسبت به بقیه تیمارها داشت. به نظر می‌رسد این حامل در بقا و تکثیر هاگ قارچ توانایی زیادی دارد.

نتیجه‌گیری Conclusion

یافته‌های این آزمایش نشان می‌دهند که بسترهای دانه ارزن و دانه ذرت نسبت به دو بستر دیگر از نظر ماندگاری و هاگدهی *P. lilacinum* کارایی بهتری دارند. از سوی دیگر مانایی قارچ در سه حامل تالک، کائولن و پودر چوب بلال ذرت در یک بازه زمانی یکساله با فواصل زمانی یک ماهه بررسی شد و مشخص گردید که هاگها در حامل پودر چوب بلال ذرت، ماندگاری بیشتری دارند. قارچ فرموله شده در هر سه حامل، در شرایط گلخانه روی گیاه گوجه‌فرنگی و علیه جدایه بومی نماتد غده ریشه (*M. javanica*) باعث کاهش میزان آلودگی به نماتد، استقرار قارچ در خاک و بهبود شاخصهای رویشی گیاه شد. قارچ فرموله شده روی پودر چوب بلال ذرت در حد نماتدکش شیمیایی فلوپیرام نماتد را مهار کرد؛ بنابراین می‌توان از موادی بر پایه دانه ارزن و ذرت برای ایجاد بستری مناسب جهت تکثیر و هاگزایی قارچ متعارض *P. lilacinum* استفاده کرد. همچنین می‌توان از قارچ *P. lilacinum* و حامل پودر چوب بلال ذرت برای تولید یک محصول تجاری مفید و کارا در مدیریت نماتدهای غده ریشه استفاده کرد.

منابع References

Abad P, Castagnone-Sereno P, Rosso MN, de Almeida Engler J, Favery B (2009) Invasion, Feeding and Development. Pp. 163–181. In: RN Perry, M Moens, JL Starr (eds.). Root-Knot Nematodes. CABI Publishing, Waligford, UK.

Abbott WS (1925) A method of computing the effectiveness of an insecticide. Journal of Economic of Entomology 18:265–276.

Agrios GN (2005) Plant Pathology. 5th (ed.). Academic Press, The Netherlands, 922p.

Ahmad RZ, Sidi BB, Endrawati D, Ekawasti F, Chaerani C (2019) *Paecilomyces lilacinus* and *P. variotii* as a predator of nematode and trematode eggs. Earth and Environmental Science 299:012056.

Cumagun CJR, Moosavi MR (2015) Significance of Biocontrol Agents of Phytonematodes. Pp. 50–78. In: TH Askary, PRP Martinelli (eds.). Biocontrol Agents of Phytonematodes. CABI Publishing, Wallingford, UK.

De Leij FAAM, Kerry BR (1991) The nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* as a potential biological control agent for *Meloidogyne arenaria*. Revue de Nematologie 14:157–164.

Fatemy S, Saeidi-Naeini F, Alizadeh A (2005) In vitro screening of fungi for parasitism against sugar beet cyst nematode *Hetrodera schachtii*. Nematologia Mediterranea 33:185–190.

Gulsar Banu J, Iyer R, Gunasekaran M (2006) Mass multiplication and formulation of nematophagous fungus, *Paecilomyces lilacinus*. International Journal of Nematology 16:145–152.

Hadapad AB, Zebita CP (2006) Mass production, survival and evaluation of solid substrate inocula of *Beauveria brongniartii* (Saccardo) Petch against *Holotrichia serrata* (Coleoptera: Scarabaeidae). Communications in Agricultural and Applied Biological Scince 71:433–441.

Hernandez MA, Hidalgo-Díaz L (2008) KlamiC: Bionematicida agrícola producido a partir del hongo *Pochonia chlamydosporia var. catenulata*. Revista de Protección Vegetal 23:131–134.

Hussy RS, Barker K (1973) A comparison of methods collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. Plant Disease 57:1025–1028.

Isaac GS, El-Deriny MM, Taha RG (2021). Efficacy of *Purpureocillium lilacinum* AUMC 10149 as biocontrol agent against root-knot nematode *Meloidogyne incognita* infecting tomato plant. Brazilian Journal of Biology 84:e253451.

Jenkins WR (1964) A rapid centrifugal-flotataion technique for separating nematode from soil. Plant Disease 48:692–1964.

Karssen G, Wesemael W, Moens M (2013) Root-knot Nematodes. Pp. 73–109. In: RN Perry, M Moens (eds.). Plant Nematology. CABI Publishing, Wallingford, UK.

Khan A, Williams KL, Nevalainen HKM (2006) Infection of plant-parasitic nematodes by *Paecilomyces lilacinus* and *Monacrosporium lysipagum*. Biological Control 51:659–678.

Luambano ND, Manzanilla-López RH, Powers SJ, Wanhoji JW, Narla RD (2019) Screening of locally available organic materials as substrates for production of *Pochonia chlamydosporia* in Kenya. Biological Control 133:18–25.

Moens M, Perry RN, Starr JL (2009) *Meloidogyne* Species – A Diverse Group of Novel and Important Plant Parasites. Pp.1–17. In: RN Perry, M Moens, JL Starr (eds.). Root-Knot Nematodes. CABI Publishing, Wallingford, UK.

Moosavi MR (2020) Efficacy of Microbial Biocontrol Agents in Integration with other Managing Methods against Phytonematodes. Pp. 229–258. In: RA Ansari, R Rizvi,

I Mahmood (eds.). Management of Phytonematodes–Recent Advances and Future Challenges. Springer, Singapore.

Moosavi MR, Askary TH (2015) Nematophagous Fungi Commercialization. Pp. 187–202. In: TH Askary, PRP Martinelli (eds.). Biocontrol Agents of Phytonematodes. CABI Publishing, Wallingford, UK.

Moosavi MR, Ghani M (2019) The optimal concentrations of *Purpureocillium lilacinum* and jasmonic acid in controlling *Meloidogyne javanica* on tomato. Archives of Phytopatology and Plant Protection 52:582–600.

Moosavi MR, Minassian V (2021) Microbial Biopecticides – Opportunities and Challenges. Pp.535–550. In: J Karimi, H Madadi (eds.). Biological Control of Insect Pests in Iran, A Review of Fundamental and Applied Aspects. Springer, Cham, Switzerland.

Moosavi MR, Zare R (2020) Fungi as Biological Control Agents of Plant-Parasitic Nematodes. Pp. 333–384. In: JM Merillon, KG Ramawat (eds.) Plant Defence: Biological Control. Progress in Biological Control 22. Springer, Cham.

Nico AI, Jimenz RM, Castillo P (2004) Control of root knot nematodes by composted agroindustrial wastes in potting mixtures. Crop Protection 23:581–587.

Nicol JM, Turner SJ, Coyne DL, den Nijs L, Hockland S Maafi T (2011) Current Nematode Threats to World Agriculture. Pp. 21–43. In: JT Jones, G Gheysen, C Fenoll (eds.). Genomics and Molecular Genetics of Plant Nematode Interactions. Springer, Dordrecht, the Netherlands.

Perry RN (2002) Hatching. Pp.147–169. In: LD Lee (ed.). the Biology of Nematodes, Taylor and Francis, London.

Prabhu S, Kumar S, Subramanian S (2008) Mass production and commercial formulation of *Paecilomyces lilacinus*. Indian Journal of Nematology 38:131-133.

Sahayaraj K, Namasivayam SKR (2008) Mass production of entomopathogenic fungi using agricultural products and by products. African Journal of Biotechnology 7:1907–1910.

Schisler DA, Jackson MA, Bothast RJ (1991) Influence of nutrition during conidiation of *Colletotrichum truncatum* on conidial germination and efficacy in inciting disease in Sesbania exaltata. Phytopathology 81:458–461.

Sikora RA, Fernandez E (2005) Nematode Parasites of Vegetables. Pp. 319–392. In: M Luc, RA Sikora, J Bridge (eds.). Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture. CABI Publishing, Wallingford, UK.

Silva SD, Carneiro SA, RAMDG, Faria M, Souza DA, Monnerat RG, Lopez RB (2017) Evaluation of *Pochonia chlamydosporia* and *Purpureocillium lilacinum* for suppression of *Meloidogyne enterolobii* on tomato and banana. Journal of Nematology 49:77–85.

Singh S, Pandey RK, Goswami BK (2013) Bio-control activity of *Purpureocillium lilacinum* strains in managing root-knot disease of tomato caused by *Meloidogyne incognita*. Biological control Scince and Technology 23:1469–1489.

Sokhandani Z, Moosavi SMR, Basirnia T (2016) Optimum level s of *Trichoderma longibrachiatum* concentration and cadusafos dose in controlling *Meloidogyne javanica* on zucchini plants. Journal of Nematology 48:54–63.

Verma AC, Singh HK, Khan A (2004) Evaluation of substrates for mass multiplication of *Paecilomyces lilacinus*. Annals of Plant Protection Sciences 12:459–460.

Yang F, Abdelnabby H, Xiao Y (2015) The role of a phospholipase (PLD) in virulence of *Purpureocillium lilacinum* (*Paecilomyces lilacinum*). Microbial Pathogenesis 85:11-20.