ارزیابی بیماری زایی جدایه‌های مختلف قارچ *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* روی نماتود گره ریشه (*Meloidogyne javanica*) در شرایط آزمایشگاهی

سید محمدرضا موسوی[1]، صدیقه فاطمی[2]، رسول زارع[3] و حمیدرضا زمانی زاده[4]

چکیده

مبارزه بیولوژیکی یکی از بی‌خطرترین روش‌های کاهش جمعیت آفات و بیماری‌های گیاهی است و کوشش‌های فراوانی جهت معرفی این عوامل علیه نماتودها صورت گرفته است. یکی از امیدبخش ترین عوامل کنترل‌کننده، قارچ *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* می‌باشد که توان بالایی در کاهش جمعیت نماتودهای مولد غده و سیستی دارد. طی سال‌های ۱۳۸۳ تا ۱۳۸۵ تعداد ۱۲۸ نمونه از خاک‌های آلوده به نماتود سیستی چغندرقند و ۱۸ نمونه خاک آلوده به نماتود مولد غده از شهرستان‌های مختلف استان فارس جمع‌آوری گردید. جهت جداسازی قارچ، از یک محیط انتخابی بر پایه CMA و محیط میگو- آگار استفاده شد. آزمون بیماری‌زایی روی ۱۳ جدایه‌ی مربوط به ایران و جهان انجام گرفت و تعداد تخم‌های آلوده‌ی نابالغ، آلوده‌ی بالغ، تخم‌های خالی، تخم‌های سالم نابالغ و تخم‌های سالم بالغ ثبت گردید. تمام جدایه‌ها توانایی کلنیزه کردن تخم نماتود *Meloidogyne javanica* را داشتند که درصد پارازیته کردن تخم بین ۳۹/۸۵٪ تا ۹۰/۱۷٪ متغیر بود. بر اساس تجزیه و تحلیل آماری، بین جدایه‌ها از نظر توانایی پارازیته کردن تخم نماتود در سطح یک درصد اختلاف معنی‌دار وجود داشت که با آزمون توکی در سه گروه آماری قرار گرفتند. تعداد ۱۰ جدایه نیز توانایی اندکی در پارازیته کردن تخم‌های بالغ داشتند و بین درصد کل تخم‌های آلوده و لاروهای تفریخ شده نیز رابطه پایداری مشاهده نگردید.

واژه‌های کلیدی: نماتود مولد غده، قارچ، بیماری‌زایی، کنترل بیولوژیکی

تاریخ دریافت مقاله: ۸۶/۲/۲۰ تاریخ پذیرش: ۸۶/۷/۱۴

۱ - دانشجوی دکتری دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه بیماری‌شناسی گیاهی rmmoosavi@yahoo.com

۲ – مؤسسه‌ی تحقیقات گیاهپزشکی کشور، بخش نماتودشناسی

۳ - مؤسسه‌ی تحقیقات گیاهپزشکی کشور، بخش رستنی‌ها

٤- دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه بیماری‌شناسی گیاهی

مقدمه و بررسی منابع

نماتودهای گره ریشه[1] در تمام نقاط جهان، خصوصاً در مناطق گرم با زمستان‌های کوتاه و در اکثر گلخانه‌ها دیده شده‌اند. این انگل به بیش از دو هزار گونه ی مختلف گیاهی که تقریباً شامل تمام گونه‌های زراعی می‌باشد حمله کرده و حدود ۵٪ از تولیدات کشاورزی دنیا را نابود می‌کند (۲). حدود ۸۰ گونه برای این جنس در سراسر دنیا توسط محققین گزارش شده است که از میان آن‌ها چهار گونه‌ی *M. javanica*، *M.incognita*، *M. hapla* و *M. arenaria* به عنوان گونه‌های اقتصادی مطرح هستند (۳۸). هر چهار گونه‌ی اقتصادی مذکور از ایران نیز گزارش شده‌اند که گونه *Meloidogyne javanica* از پراکنش و گسترش بیشتری برخوردار است. نماتود مولد غده از استان‌های آذربایجان شرقی و غربی، اصفهان، بوشهر، تهران، خراسان، خوزستان، سیستان و بلوچستان، فارس، کرمان، کرمانشاه، گیلان، مرکزی، هرمزگان و همدان گزارش شده است (۱) که بیان‌گر پراکنش گسترده و اهمیت زیاد آن‌ها می‌باشد. در حال حاضر اساس کنترل این نماتودها را کاربرد نماتودکش‌های تدخینی و آلی فسفره که در خاک به‌کار برده می‌شوند، تشکیل می‌دهد (۳۶). با توجه به محدود شدن کاربرد سموم تدخینی خاک به دلیل سمیت بالا (۲۸) و ملاحظات زیست محیطی و ظهور مقاومت در نماتودها نسبت به سموم مصرفی (۱۱) می‌بایست به دنبال راه‌های جایگزین مناسب بود. از روش‌های جایگزین کاربرد سم می‌توان به تناوب زراعی، کشت بدون خاک، گیاهان مقاوم، اضافه کردن مواد آلی به خاک، استفاده از دشمنان طبیعی نماتود و بخاردهی خاک اشاره کرد (۳٤). با توجه به محدودیت سایر روش‌ها، به‌نظر می‌رسد تلفیق کنترل بیولوژیکی با سایر روش‌ها بهترین راه کنترل نماتودها باشد (۳۱). روش‌های بیولوژیکی در کاهش جمعیت آفات و بیماری‌های گیاهی از جایگاه ویژه‌ای برخوردارند و فعالیت آنتاگونیستی موجودات مختلفی علیه نماتودها نشان داده شده است (۳۲،۱۳) که در بین آن‌ها قارچ‌ها بیشترین مقالات تحقیقی را به خود اختصاص داده‌اند (۱۸،۱۷،۳۰،۳).

گونه‌هایی که در جنس *Pochonia* قرار می‌گیرند عمدتاً انگل نماتودهای ساکن مثل نماتود گره ریشه و نماتودهای سیستی[1] می‌باشند (٤۲ و ۱۰). مطالعات بسیاری روی *P. chlamydosporia* به عنوان انگل اختیاری نماتودهای سیستی و مولد غده صورت گرفته است (۱۸ و ۱۹). این قارچ به عنوان عامل زوال طبیعی جمعیت نماتود سیست غلات شناخته شده است (۲۱). سترون کردن نسبی خاک با فرمالدهید ۳۸٪ باعث از بین رفتن جمعیت قارچ و در پی آن افزایش جمعیت نماتود می‌گردد (۱٦). در آزمایش‌های صورت گرفته در کشور انگلستان نشان داده شد که قارچ در خاک‌های لومی-آهکی و خاک‌های آلی تکثیر پیدا می‌کند و حداقل سه ماه پس از کاربرد در خاک باقی می‌ماند، اما توانایی جدایه‌ها از نظر بقا و تکثیر در خاک‌های مختلف (۳۷،۲۲،۷) و بیماری‌زایی (۱۲، ۱۸) به شدت با یکدیگر متفاوت است. اولین تلاش جهت کاربرد سوسپانسیون

1- *Meloidogyne* spp

1- *Heterodera* spp

کنیدیوم *P. chlamydosporia* در مزارع آلوده به نماتود موفق نبود (٤١)، اما آزمایش‌های متعدد بعدی جهت استفاده از این قارچ به عنوان عامل کنترل بیولوژیکی نماتود گره ریشه و نماتودهای سیستی با موفقیت‌های بیشتری همراه بود (٥، ٢٠، ٢٦، ١٩). جدایه‌های مختلف این قارچ از نظر بیماری زایی، توانایی اشغال سطح ریشه (١٨) و تولید دیکتیوکلامیدوسپور (٤٢) با یکدیگر متفاوتند که این ویژگی‌ها جهت استفاده از جدایه‌های مختلف به‌عنوان عامل کنترل بیولوژیکی بسیار مهم است. این قارچ‌ها به جز اپرسوریوم، اندام‌های آلوده کننده‌ی تخصص یافته‌ای ایجاد نمی‌کنند و می‌توانند در غیاب نماتودها در خاک باقی مانده و تکثیر شوند (٤٠). این گونه هم چنین دارای فعالیت پادزیستی (٢٩)، تولید آنزیم‌های پروتئیناز (VCP1)، کیتیناز (CHI43) و کلاژناز می‌باشد (١١). این قارچ دارای انتشار جهانی بوده (٤٢) و در ایران از نماتود سیست چغندرقند (مشهد) (٧) و خاک مزرعه‌ی گوجه‌فرنگی آلوده به نماتود مولد غده (فسا) جدا شده است. در این آزمایش ابتدا جهت جداسازی جدایه‌های بومی قارچ که احتمالاً تطابق بیشتری با اقلیم ایران دارند، از استان فارس نمونه‌برداری گردید و سپس١٣ جدایه‌ی ایرانی و خارجی جهت مقایسه‌ی توانایی بیماری‌زایی و تعیین بهترین جدایه از نظر توانایی پارازیته کردن تخم نماتود مولد گره ریشه با یکدیگر مقایسه شدند.

مواد و روش‌ها

جداسازی قارچ

طی سال‌های ١٣٨٣ تا ١٣٨٥ تعداد ١٢٨ نمونه ی خاک از مزارع چغندرقند، شلغم، کلم و تربچه آلوده به نماتود *Heterodera schachtii* و ١٨ نمونه‌ی خاک آلوده به نماتود مولد غده از مزارع مختلف استان فارس (مرودشت، شیراز، اقلید، کوار، فسا، نیریز، استهبان و آباده) جمع‌آوری گردید. جهت جداسازی قارچ، از محیط نیمه انتخابی بر پایه آرد ذرت آگار استفاده گردید (٢٢). علاوه بر محیط فوق، با توجه به توانایی قارچ جهت هضم کیتین از محیط میگو- آگار نیز استفاده گردید (٣٣). جهت تهیه یک لیتر از این محیط ٣ گرم پودر پوسته ی میگو، ١٧ گرم آگار، ٣٧/٥ میلی گرم کاربندازیم، ٣٧/٥ میلی گرم تیابندازول، ١٧/٥ میلی گرم کلرید سدیم، ٣ میلی‌لیتر تریتون ایکس - ١٠٠ و ١٥٠ قسمت در میلیون از هر کدام از پادزیست‌های سولفات استرپتومایسین و پنی‌سیلین استفاده گردید.

مقدار ٢٠٠ گرم خاک از هر نمونه‌ی جمع‌آوری شده، از الک‌های ٨٥٠ و ٢٥٠ میکرومتری عبور داده شده و سیست‌های آن به کمک استریومیکروسکوپ به صورت دستی جدا گردید (٢٣). تعدادی از این سیست‌ها در محیط مرطوب روی کاغذ صافی قرار داده شد و پس از ٤٨ ساعت، ریسه‌های رشد کرده توسط سوزن شیشه‌ای گرفته شده و به محیط آرد ذرت-آگار منتقل گردید. سه عدد سیست که پوسته‌ی آن‌ها سالم بود نیز در یک قطره آب مقطر استریل خرد شد و سوسپانسیون تخم (حاوی حدود ١٠٠ تخم) روی محیط نیمه انتخابی ذکر شده و محیط میگو- آگار ریخته شد.

در این آزمایش علاوه بر نمونه‌های جدا شده از ایران، از جدایه‌های موجود در مجموعه‌ی مرکز قارچ‌شناسی هلند نیز استفاده گردید (جدول١). جدایه‌ها تا قبل از انجام آزمون بیماری‌زایی طبق روش توصیه شده توسط

جدول۱- فهرست محل و میزبان‌های جدایه‌های ***Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia***

محل	جدا شده از	جدایه
سوئد	*Heterodera avenae*	IRAN **456** C = CBS 600.88
برزیل	تخم حلزون (Mollusca)	IRAN **504** C = CBS 101244
برزیل	خاک	IRAN **544** C = CBS 429.64
آلمان	خاک مزرعه کلزا	IRAN **1131** C = CBS 103.65
انگلستان	?	IRAN **1135** C = CBS 102066
گینه	خاک	IRAN **1140** C = CBS 594.66
ایران، مشهد	*Heterodera schachtii*	IRAN **676 C** = CBS 113566
ایران، مشهد	*Heterodera schachtii*	IRAN **1119** C
ایران، مشهد	*Heterodera schachtii*	IRAN **1120** C
ایران، مشهد	*Heterodera schachtii*	IRAN **1121** C
ایران، مشهد	*Heterodera schachtii*	IRAN **1122** C
ایران، مشهد	*Heterodera schachtii*	IRAN **1123** C
ایران، فسا	خاک آلوده به *M. javanica*	**PCC/6**

کری و همکاران (۱۹۸٦) روی محیط CMA و دمای ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند (۱۵).

تهیه‌ی مایه‌ی تلقیح نماتود

برای تهیه‌ی مایه‌ی تلقیح کافی از نماتود *M. javanica* جهت آزمایش‌ها، رقم حساس گوجه فرنگی Early-Urbana در خاک آلوده به این نماتود کشت گردید. هشت هفته بعد، اندام‌های هوایی جدا گردیده، ریشه‌ها از خاک خارج شده و به آرامی شسته شدند و توده تخم‌ها با پنس و به کمک استریومیکروسکوپ جمع‌آوری گردیدند (۲۷). توده‌های تخم عاری از آلودگی با روش تغییر یافته‌ی وردجولوکاس (۱۹۹۵) تهیه گردید (۳۵). توده تخم‌ها ابتدا به مدت ۱۵ دقیقه در محلول ۰/۵٪ از هر کدام از سموم بنومیل، PCNB و متالاکسیل- مانکوزب قرار داده شده و به آرامی تکان داده شدند. سپس توده تخم‌ها ۱۵ بار با آب مقطر استریل شسته شده و به محلول ۰/۵٪ هیپوکلریت سدیم منتقل گردیدند. پس از ٤ دقیقه، محلول مذکور با آب مقطر استریل ۲۰ بار رقیق شده و پس از ۳۰ دقیقه، توده تخم‌های رسوب کرده انتخاب شدند. توده‌های تخم به مدت یک ساعت در محلول باکتری‌کش حاوی ٤۰۰۰ قسمت در میلیون از هر یک از پادزیست‌های سولفات استرپتومایسین و پنی‌سیلین قرار گرفته و سه بار با آب مقطر استریل شسته شدند. سپس توده تخم‌ها در شرایط سترون به ظروف پتری ۹ سانتی‌متری حاوی

محیط سیب زمینی- دکستروز- آگار منتقل گردیدند و پس از ٤٨ ساعت نگهداری در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد، توده تخم های سالم جهت آزمون بیماری‌زایی انتخاب شدند.

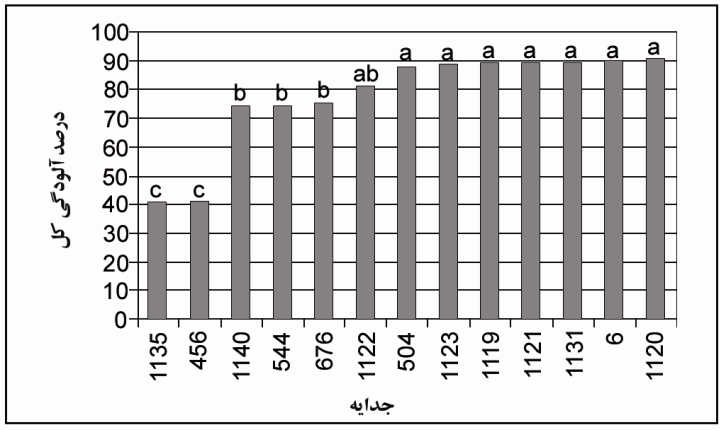
آزمون بیماری‌زایی

جهت انجام آزمون بیماری‌زایی در محیط آزمایشگاهی، ابتدا محیط آب- آگار ۰/۸٪ حاوی ۱۵۰ قسمت در میلیون از هر کدام از پادزیست‌های سولفات استرپتومایسین و پنی‌سیلین تهیه گردید. سپس تحت شرایط سترون، به مرکز هر ظرف پتری یک دیسک ۰/۵ میلی‌متری از اینوکولوم قارچی که از حاشیه‌ی قارچ در حال رشد روی CMA گرفته شده بود، اضافه شد و در دمای ۲۳ °C در تاریکی نگهداری شدند. در ظرف پتری شاهد، دیسک بدون قارچ CMA قرار داده شد. پس از دو هفته، سه توده تخم با فاصله‌ی دو میلی‌متر از دیسک مرکزی، روی قارچ در حال رشد در سه تکرار قرار داده شد. ظروف پتری به مدت سه هفته در دمای ۲±۲۳ °C نگهداری شدند. در نهایت هر توده تخم در یک قطره NaOCl یک درصد روی لام شیشه‌ای سترون خرد شدند تا تخم‌ها آزاد شوند. تخم‌ها با بزرگ‌نمایی ٤۰ و ۱۰۰ برابر میکروسکوپ نوری بررسی شده و تعداد تخم‌های آلوده و سالم و مراحل تکاملی آن ها ثبت گردید (۸، ۵، ۳۹). تعداد لاروهای تفریخ شده نیز به کمک استریومیکروسکوپ شمارش شد (٦). تخم‌های آلوده سه بار با آب مقطر استریل شسته شده، روی محیط آب آگار ۱/۵ درصد حاوی ۱۰۰ قسمت در میلیون از هر کدام از پادزیست‌های سولفات استرپتومایسین و پنی‌سیلین ریخته شده و در دمای ۲۵ °C نگهداری شدند. تخم‌ها هر روز بررسی شده و قارچ‌های رشد کرده از آن‌ها در شرایط سترون به محیط CMAی حاوی ۳۰۰ میلی‌گرم سولفات استرپتومایسین در هر لیتر منتقل شده و شناسایی آن‌ها مورد تأیید قرار گرفت.

نتایج و بحث

ریسه ی تمام جدایه‌های آزمایش شده توانایی کلنیزه کردن تخم نماتود *M. javanica* را داشتند. تعداد ۱۳ جدایه از *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* در این آزمایش مورد بررسی قرار گرفتند که درصد کل پارازیته کردن تخم (شامل تخم‌های بالغ و نابالغ) آن ها بین ۹۰/۱۷٪ تا ۳۹/۸۵٪ متغیر بود (نمودار۱).

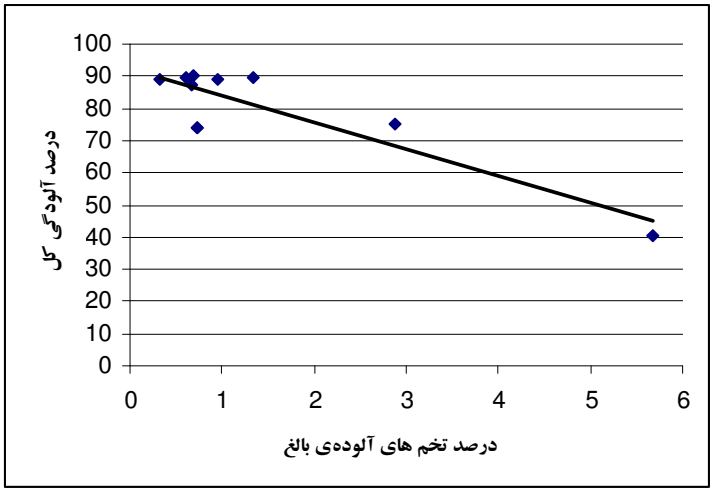
تجزیه واریانس دو طرفه نتایج نشان داد که بین جدایه‌ها از نظر توانایی پارازیته کردن تخم نماتود در سطح یک درصد اختلاف معنی‌داری وجود دارد (جدول۲). آزمون توکی این جدایه‌ها را در سه گروه با اختلاف معنی‌دار قرار داد (نمودار۱).



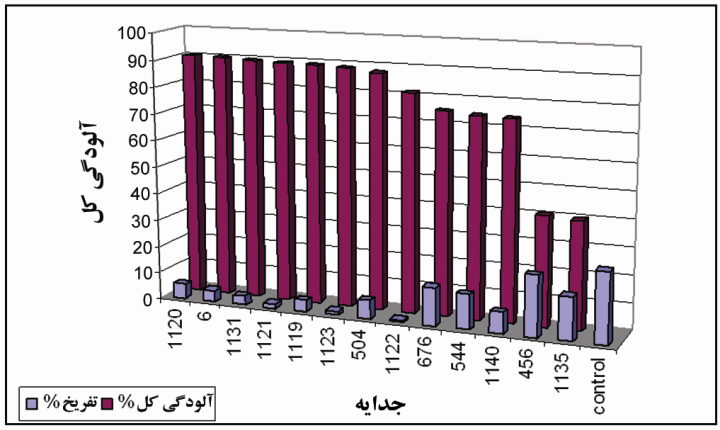
نمودار۱- مقایسه بیماری‌زایی جدایه‌ها در پارازیته کردن تخم‌های نماتود گره ریشه

جدول۲- تجزیه واریانس دو طرفه‌ی مقایسه‌ی درصد توانایی پارازیته کردن تخم نماتود بین جدایه‌های آزمایش شده

	مجذور مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F	P
درون گروهی	۳۳۹٤۳/۷٦۷	۱۲	۲۸۲۸/٦٤۷	٦۸/۱۵۰	۰/۰۰۰۱
بین گروهی	٤۱۹۲/۱۰۳	۱۰۱	٤۱/۵۰٦		
کل	۳۸۱۳۵/۸۷۰	۱۱۳			



نمودار۲- مقایسه درصد پارازیته شدن تخم‌های بالغ و درصد کل آلودگی



نمودار۳- مقایسه درصد آلودگی کل تخم‌ها و درصد تفریخ لاروها

تعداد ۱۰ جدایه توانایی آلوده کردن تخم‌های بالغ را داشتند که در مقایسه با درصد آلودگی تخم‌های نابالغ بسیار کم‌تر بود. دامنه‌ی درصد پارازیته کردن تخم‌های بالغ بین ۰/۳۳٪ تا ۵/٦۸٪ متغیر بود. نکته جالب توجه این که درصد پارازیته کردن تخم‌های بالغ و کل با یکدیگر نسبت معکوس داشته و بیشترین درصد پارازیته کردن تخم‌های بالغ مربوط به جدایه‌ای است که کم‌ترین درصد کل کلنیزه کردن تخم را دارد (نمودار۲).

در این آزمایش درصد کل تخم‌های آلوده با لاروهای تفریخ شده نیز مقایسه و هیچ رابطه‌ی پایداری بین آن‌ها مشاهده نگردید (نمودار۳).

P. chlamydosporia var. *chlamydosporia*

متداول‌ترین گونه‌ی قارچ مرتبط با نماتودهای ساکن است (٤۲). این قارچ به‌عنوان انگل تخم نماتودهای بزرگ‌تر مثل *Ascaris lumbricoides* نیز گزارش شده است (۲٤). بیشتر جدایه‌های به‌کار رفته در این تحقیق نیز از تخم نماتودهای خانواده‌ی Heteroderidae جدا گردیدند. نفوذ قارچ به درون تخم به‌صورت مکانیکی و آنزیمی می‌باشد. آنزیم‌های خارج سلولی (عمدتاً پروتئاز، کیتیناز و کولاژناز) از جمله عوامل بیماری‌زایی قارچ محسوب می‌شوند. این آنزیم‌ها جهت هضم دیواره‌ی تخم ضروری می‌باشند و قارچ‌هایی که آنزیم بیشتری تولید می‌کنند، از بیماری‌زایی بیشتری نیز برخوردارند (۱۱). بازدارندگی این قارچ از تکثیر نماتودهای سیستی و مولد غده در مقالات متعددی گزارش گردیده است (۲۵،٤،۹،۵،۳). توانایی جدایه‌های این قارچ، حتی آن‌هایی که از یک نمونه‌ی خاک جدا گردیده‌اند از نظر توانایی پارازیته کردن تخم نماتودها در محیط کشت آزمایشگاهی و گلخانه متفاوت است (۱۲،۱٤،۱۸). جدایه‌ها در کل در سه گروه متفاوت قرار گرفتند که از نظر توان بیماری‌زایی با یکدیگر بسیار متفاوت بودند (حداکثر ۹۰/۱۷٪ و حداقل ۳۹/۸۵٪). بالاترین درصد بیماری‌زایی مربوط به جدایه‌ی شماره‌ی ۱۱۲۰ مشهد بود. این جدایه به همراه شش جدایه دیگر از کشورهای ایران (مشهد و فسا)، آلمان و برزیل از نظر بیماری‌زایی در یک گروه قرار گرفته و حدود ۸۹٪ از تخم‌ها را آلوده نمودند (نمودار۱). جدایه‌ی ایرانی شماره ۱۱۲۲

در گروهی متفاوت قرار گرفت. این در حالی است که جدایه‌ی ایرانی شماره ٦٧٦ به همراه جدایه‌های ٥٤٤ از برزیل و ١١٤٠ از گینه در گروهی دیگر با متوسط کنترل کنندگی ٧٤٪ قرار گرفتند. این بدین معنی است که تمامی جدایه‌های به‌دست آمده از یک منطقه‌ی جغرافیایی لزوما نرخ بیماری‌زایی یکسانی ندارند. این یافته با نتایج به‌دست آمده توسط سایر پژوهشگران انطباق دارد (١٢،١٤،١٨). جدایه‌های ٤٥٦ و ١١٣٥ کم ترین میزان کنترل را دارا بودند. با توجه به تنوع زیاد بیماری‌زایی در همین تعداد اندک جدایه‌ی استفاده شده در این مطالعه، احتمال می‌رود که در صورت جمع‌آوری جدایه‌های بیشتر از اقلیم‌های متنوع ایران و آزمایش آن‌ها در یک برنامه وسیع‌تر پژوهشی، جدایه‌هایی با توانمندی بالاتر کنترل بیولوژیکی به‌دست آید. عوامل زیادی می‌توانند باعث این تفاوت‌ها گردند که توانایی و میزان تولید آنزیم‌های موثر در تجزیه‌ی دیواره تخم، نرخ رشد و دمای بهینه‌ی رشد از آن جمله است.

از میان ١٣ جدایه‌ی آزمایش شده فقط ١٠ جدایه توانایی (به مقدار کم) آلوده کردن تخم‌های بالغ را داشتند که نه تنها ارتباط مستقیمی با درصد کل آلودگی نداشت، بلکه تقریباً ارتباط آن‌ها معکوس بود (نمودار٢). کوتیکول نماتود به‌عنوان یک لایه‌ی غیرسلولی به‌وسیله هیپودرم تولید شده و عموماً از پروتئین‌هایی شامل کراتین، کولاژن و رشته‌هایی که به صورت اریب قرار دارند، تشکیل شده است. کولاژن ساختار پایه‌ای است، بنابراین تجزیه‌ی مؤثر آن در کوتیکول برای آلودگی نماتودهای بالغ، کاملاً ضروری است (١١). قارچ جهت پارازیته کردن تخم‌های بالغ، علاوه بر توانایی عبور از دیواره تخم باید توانایی عبور از پوسته‌ی تازه تشکیل شده‌ی بدن نماتود را نیز داشته باشد و احتمالاً جدایه‌ها با توجه به میزان پروتئاز، کیتیناز و کولاژناز تولیدی خود می‌توانند از پوسته‌ی تخم و سپس از پوسته‌ی نماتود عبور کنند.

در نمودار٣ درصد آلودگی کل تخم‌ها و درصد تفریخ لاروها مقایسه شده‌اند. انتظار می‌رود با افزایش درصد کل تخم‌های آلوده، تعداد لاروهای تفریخ شده کمتر شود، اما با توجه به نمودار٣ نمی‌توان چنین رابطه‌ای را مشاهده نمود. شاید علت این پدیده را بتوان در سن متفاوت تخم‌های درون توده‌ی تخم و توانایی جدایه‌ها در پارازیته کردن تخم بالغ جستجو کرد. بدین معنی که اگر تخم نماتود در زمان تماس با قارچ از حالت جنینی خارج شده باشد احتمال آلوده شدن آن به شدت کاهش یافته و بالطبع درصد تفریخ افزایش می‌یابد. یافتن روش‌های سریع‌تر به‌عنوان جایگزین آزمون‌های زمان‌بر بیماری‌زایی می‌تواند به مقدار زیادی در زمان کل به‌کار رفته جهت غربالگری جدایه‌های برتر صرفه جویی نماید. بدین‌منظور مقایسه روش‌های مولکولی مبتنی بر PCR (مانند AFLP، RAPD و مطالعه‌ی توالی ژن‌های تولید آنزیم مانند CHI43 و PR1) ممکن است راه دستیابی به جدایه‌های برتر را کوتاه‌تر نماید.

منابع

۱- باروتی، ش. و ا. علوی. ۱۳۷٤. نماتودشناسی گیاهی، اصول و نماتودهای قرنطینه‌ی ایران. انتشارات مؤلفین، ۲۷۸ صفحه.

2- Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology (5th ed.). Academic Press. New York, 922 pp.

3- Bhardwaj P. and P. C. Trivedi. 1996. Biological control of *Heterodera avenae* on wheat using different inoculum levels of *Verticillium chlamydosporium*. Annals of Plant Protection Science 4: 111-114.

4- De Leij, F. A. A. M., B. R. Kerry and J. A. Dennehy. 1993. *Verticillium chlamydosporium* as a biological control agent for *Meloidogyne incognita* and *M. hapla* in pot and microplot tests. Nematologica 39: 115-126.

5- De Leij, F. A. A. M., and B. R. Kerry. 1991. The nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* as a potential biological control agent for *Meloidogyne arenaria*. Revue de Nématologie 14: 157–64.

6- Fatemy, S. 1998. Antagonistic activity of *Paecillomyces fumosoroseus* against *Meloidogyne javanica* and *Heterodera schachtii*. Iranian Journal of Plant Pathology 34: 67-75.

7- Fatemy, S., R. Ahmadian-Yazdi, A. Parvizy, M. Ahmadi, M. Pakniat, S. Barooti, M. Askari, and J. Ershad. 1999. Fungal parasites of cysts of *Hetrodera schachtii* in Iran. Pakistani Journal of Nematology 17(1): 61-66.

8- Fatemy, S., F. Saeidi-naeini and A. Alizadeh. 2005. In vitro screening of fungi for parasitism against sugar beet cyst nematode *Hetrodera schachtii*. Nematologia Mediteranea 33: 185-190.

9- Freire, F. C. O. and J. Bridge. 1985. Parasitism of eggs, females and juveniles of *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* and *Verticillium chlamydosporium*. Fitopatology Brasilian 10: 577-596.

10- Gams, W. and R. Zare. 2003. A taxonomic review of the *Clavicipitaceous* anamorphs parasitizing nematodes and other microinvertebrates. pp.17-73. In: White J.F.Jr., Bacon C.W., Hywel-Jones N. L., and Spatafora J.W.(eds.), Clavicipitalean Fungi. Evolutionary Biology, Chemistry, Biocontrol, and Cultural Impact Marcell-Dekker, New York, Basel, US.

11- Huang, X., N. Zhao and K. Zhang. 2004. Extracellular enzymes serving as virulence factors in nematophagous fungi involved in infection of the host. Research in Microbiology 155: 811-816.

12- Irving, F. and B. R. Kerry. 1986. Variation between strains of the nematophagous fungus, *Verticillium chlamydosporium* Goddard. II. Factors affecting parasitism of cyst nematode eggs. Nematologica 32: 474-485.

13- Jaffee, B.A. 1992. Population biology and biological control of nematodes. Canadian Journal of Microbiology 38: 359-364.

14- Kerry, B. R. 1990. An assessment of progress toward microbial control of plant-parasitic nematodes. Annuls of Applied Nematolology 22: 621-631.

15- Kerry, B. R., F. Irving and J. C. Hornsey. 1986. Variation between strains of the nematophagous fungus, *Verticillium chlamydosporium* Goddard. I. Factors affecting growth in vitro. Nematologica 32: 461-473.

16- Kerry, B. R. and B. A. Jaffee. 1997. Fungi as biological control agents for plant-parasitic nematodes. pp 201–218. In: Wicklow D. T., and Soderstrom B. (eds.), The Mycota IV. environmental and microbial relationships. Berlin: Springer-Verlag.

17- Kerry, B. R. 1989. Fungi as biological control agents for plant parasitic nematodes. pp 153–170. In: Whipps, J.M. and Lumsden R. D. (eds.), Biotechnology of fungi for improving plant growth. Cambridge, UK., Cambridge University Press.
18- Kerry, B. R. 2000. Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes. Annual Review of Phytopathology 38: 423-441.
19- Kerry, B. R. 2001. Exploitation of the nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* Goddard for the biological control of root-knot nematodes (Meloidogyne spp.). pp 155-167. In: But, T.M., Jackson C. W. and Magan N.(eds.), Fungi as biological agents. progress, problems and potential Wallingford, CABI publishing.
20- Kerry, B. R., and K. Evans. 1996. New strategies for the management of plant parasitic nematodes. pp 134–152. In: Hall R. (ed.), Managing soilborne plant pathogens APS Press.
21- Kerry, B.R., D.H. Crump, and L.A. Mullen.1982. Natural control of the cereal cyst nematode, *Heterodera avenae* Woll. by soil fungi at three sites. Crop Prot 1: 99–109.
22- Kerry, B.R., I.A. Kirkwood. F.A.A.M. De Leij, J. Barba, M.B. Leijdens, and P.C. Brookes. 1993. Growth and survival of *Verticillium chlamydosporium* Goddard، a parasite of nematodes in soil. Biocontrol and Science Technology 3: 355–365.
23- Kim, D.J. and R.D. Riggs. 1995. Portable cyst extractor: detecting cyst nematodes in the fields. Journal of Nematology 27: 125-126.
24- Lysek, H. and D. Krajci. 1987. Penetration of ovicidal fungus *Verticillium chlamydosporium* through the *Ascaris lumbricoides* egg-shells. Folia Parasitol 34: 57–60، 1987.
25- Morgan-Jones, G., G. Godoy and R. Rodriguez-Kabana.1981. *Verticillium chlamydosporium*, fungal parasite of *Meloidogyne arenaria* females. Nematropica 11: 115-119.
26-Morgan-Jones, G., J.F.Jr. White and R. Rodriguez-Kabana. 1983. Phytonematode pathology: ultrastructural studies: 1. Parasitism of *Meloidogyne arenaria* eggs by *Verticillium chlamydosporium*. Nematropica 13:245–260.
27-Noe, J. 2004. Pathogenicity and isolation of plant parasitic nematodes. pp 61-74. In: Trigiano R. N., Windham M.T., and Windham A.S. (eds.), Plant pathology concepts and laboratory exercises. CRC Press.
28-Roberts, P.A. 1993. The future of nematology: integration of new and improved managemaent strategies. Journal of nematology 25: 383-394.
29-Segers, R., T.M. Butt, J.H. Carder, J.N. Keen, B.R. Kerry, and J.F. Peberdy. 1999. The subtilisins of fungal pathogens of insects, nematodes and plants: distribution and variation. Mycological Research 103: 395-402.
30-Siddiqui, Z.A., and I. Mahmood. 1996. Biological control of plant parasiting nematodes by fungi: a review. Bioresource Technology 58: 229-239.
31-Sorribas, F.J., C. Ornat, M. Galeano, and S. Verdego-Lucas. 2003. Evaluation of a native and introduced isolate of *Pochonia chlamydosporia* against *Meloidogyne javanica*. Biocontrol Science and Technology 13(8): 707-714.
32-Stirling, G.R. 1991. Biological Control of Plant Parasitic Nematodes. CAB International, Wallingford, UK, pp. 281.
33-Tikhonov, V. E., L.V. Lopez-Llorca, J. Salinas, and H.B. Jansson. 2002. Purification and characterization of chitinases from the nematophagous fungi *Verticillium chlamydosporium* and V. suchlasporium. Fungal Genetics and Biology 35: 67–78.

34-Verdejo-Lucas, S. 1999. Nematodes. pp: 61-68. In: Albajes R., Gullino, M.L., Van Lanteren J.C. and Elad Y. (eds.), Integrated pest and disease management in greenhouse crops. Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Academic.
35-Verdejo-Lucas, S. 1995. Dual culture: nematodes. In: Sing R.P. and Sing, U.S. (eds.), Molecular. Methods in plant pathology. CRC Press, 301-312 pp.
36-Verdejo-Lucas, S., F.J. Sorribas, C. Ornat, and M. Galeano. 2003. Evaluation *Pochonia chlamydosporia* in a double-cropping system of lettuce ad tomato in plastic house infested with *Meloidogyne javanica*. Plant Pathology 52:521-528.
37-Viaene, N.M. and G.S. Abawi. 2000. *Hirsutella rhossiliensis* and *Verticillium chlamydosporium* as biocontrol agents of the root-knot nematode *Meloidogyne hapla* on lettuce. J. Nematol. 32:85–100.
38-Walia, R.K. and H.K. Bajaj. 2003. Textbook on introductory plant nematology. Vinayak Press, New Delhi, 227pp.
39-Wang, K., R.D. Riggs, and D. Crippen. 2005. Isolation, selection, and efficacy of *Pochonia chlamydosporia* for control of *Rotylenchulus reniformis* on cotton. Phytopathology 95:890-893.
40-Wang, K.H. and R. McSorley. 2003. Nematophagous fungi. University of Florida, Department of Entomology and Nematology. http://agroecology.ifas.ufl.edu/ nematophagous %20fungi/ Beneficial%20Soil%20fungi.htm.
41-Willcox, J. and H.T. Tribe. 1974. Fungal parasitism in cysts of Heterodera. 1. Preliminary investigations. Trans British Mycological Society 62: 585–594.
42-Zare, R. and W. Gams. 2004. A monograph of *Verticillium* section Prostrata. Rostaniha (Botanical Journal of Iran) 3: 188pp.