



## Evaluation of Some Beneficial *Streptomyces* Isolates for Reducing Pathogenicity Indices in the Tomato - *Meloidogyne javanica* Pathosystem

M. Ashnaei<sup>1</sup>, E. Mahdikhani-Moghadam<sup>1\*</sup>, S. Baghaee-Ravari<sup>1\*</sup>

1- Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

(\* - Corresponding author's Email: [mahdikhani-e@um.ac.ir](mailto:mahdikhani-e@um.ac.ir); [s.baghaee@um.ac.ir](mailto:s.baghaee@um.ac.ir) )

Received: 09-09-2025

Revised: 09-12-2025

Accepted: 24-12-2025

Available Online: 22-06-2026

### How to cite this article:

Ashnaei, M., Mahdikhani-Moghadam, E., & Baghaee-Ravari, S. (2026). Evaluation of some beneficial *Streptomyces* isolates for reducing pathogenicity indices in the Tomato (*Meloidogyne javanica*) pathosystem. *Iranian Plant Protection Research*, 40(2), 579-592. (In Persian). <https://doi.org/10.22067/Jpp.2025.65326.1252>

### Introduction

The root-knot nematode has proliferated significantly because of its ease of transmission through infected seedlings and contaminated soil. Species of the genus *Meloidogyne* are highly destructive due to their rapid reproduction rate and broad host range, making their control particularly challenging. Given the risks and limitations associated with chemical control, alternative management strategies have attracted increasing attention. Nowadays, the use of chemical pesticides for controlling plant diseases is recommended to be combined with biocontrol agents. Bioactive compounds derived from *Streptomyces* exhibit a wide spectrum of chemical diversity and have been shown to cause mortality of second-stage juveniles (J2), reduce egg hatching, decrease nematode populations in soil, and mitigate pathogenicity indices of root-knot nematodes. Moreover, the previous research also revealed that the metabolites produced by *Streptomyces* species are effective in controlling root-knot nematodes and improving plant growth indices.

### Materials and Methods

*Streptomyces* isolates were obtained from the soils of healthy tomato (*Meloidogyne javanica*) and eggplant plants in Khorasan Razavi province. The biocontrol potential of these isolates against root-knot nematodes was first assessed under *in vitro* conditions. The hatching rate of eggs was assessed at 24, 48, 72, and 120 hours. Additionally, larval mortality was evaluated at three-time intervals including 24, 48, and 72 hours. Their growth-promoting features consisting of auxin, ACC deaminase production, phosphate solubilization) and antagonistic properties (siderophores and chitinase) were also evaluated in the laboratory assays. The most effective biocontrol isolates were subsequently tested in greenhouse experiments to determine their impact on reducing pathogenicity indices of *Meloidogyne javanica* and improving tomato growth parameters. All tests were conducted twice with a minimum of three replicates. For statistical analysis, one-way analysis of variance (ANOVA) was employed. Means were compared using Duncan's multiple range test, and values at the five percent level were considered statistically significant. Molecular identification of the selected biocontrol isolates was performed based on 16S rDNA sequencing, and phylogenetic analysis was carried out to assess their relatedness to reference strains. The phylogenetic tree was constructed with a bootstrap value of 1000 replicates using the neighbor-joining method.



Authors retain the copyright. This is an open access article distributed under Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0)

<https://doi.org/10.22067/Jpp.2025.65326.1252>

## Results and Discussion

In vitro bioassays revealed that among the 18 *Streptomyces* isolates tested, strains BAD, ANA, and S116 caused the greatest reduction in egg hatching and second-stage juvenile mortality compared with the nematode-infected control. The BAD isolate, obtained from the soil of eggplant in Bojan–Neyshabur, exhibited significantly higher levels of phosphate solubilization (1.43 mm), indole-3-acetic acid production ( $36.4 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), and ACC deaminase activity ( $1.38 \mu\text{mol mL}^{-1}$ ) than the uninoculated control and other isolates. In laboratory tests, after 72 hours, isolates S116 and BAD inhibited egg hatching by 37.1% and 38.5%, respectively, compared to the nematode control. Larval mortality rates for these two isolates reached 100% and 65.67%, respectively. Based on laboratory results, including their effects on nematode suppression, plant growth-promoting traits, and chitinase activity, five isolates (BAD, ANA, GHR, S104, and S116) were selected for greenhouse evaluation. Under greenhouse conditions, In the treatment of nematode + isolate BAD, the number of galls and egg masses on the roots decreased by 19.6% and 35.4%, respectively, compared to the control. The number of larvae in the pot soil of this treatment was estimated to be half that of the control pot. Individually and in the presence of the nematode, isolate BAD positively influenced the growth parameters of tomato plants compared to both healthy and infected controls. In the nematode + BAD isolate treatment, the fresh weight of the shoot and root increased by 21.4% and 27.5%, respectively, compared to the nematode-infected control. Furthermore, the shoot and root length in the individual BAD isolate treatment showed the highest values of 46.50 cm and 16.30 cm, respectively, compared to the healthy control. Although this difference was not statistically significant at the five percent level compared to the ANA isolate, an increase in shoot length (43%) and root length (17.9%) was observed in plants infected with nematodes in the presence of the BAD isolate compared to the infected control. Phylogenetic analysis based on 16S rDNA sequencing revealed that isolate BAD clustered together with *S. carpaticus* and *S. harbinensis* within the same group.

## Conclusion

Based on the nematicidal activity of isolate BAD under laboratory conditions, its ability to produce plant growth-promoting metabolites, and its effectiveness in enhancing tomato growth parameters while reducing nematode pathogenicity indices (egg masses, galls, and J2 populations) in greenhouse experiments, isolate BAD appears to be the most effective biocontrol candidate. It represents a promising option for further field evaluations and potential use in integrated management of root-knot nematodes.

**Keywords:** Actinomycetes, Nematicidal activity, Root-knot nematode, 16s rDNA

## بررسی توان تعدادی از جدایه‌های استرپتومایسس در کاهش شاخص‌های بیماری‌زایی در

*Meloidogyne javanica*-پاتوسیستم گوجه‌فرنگی

مهناز آشنائی - عصمت مهدیخانی مقدم\* - ساره بقائی راوری\*

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۶/۱۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۰/۰۳

## چکیده

نماتدهای ریشه‌گرهی به‌عنوان انگل اجباری گیاهان، دارای پراکنش وسیعی می‌باشند. ترکیبات زیستی فعال مشتق‌شده از گونه‌های *Streptomyces* طیف وسیعی از تنوع شیمیایی را نشان می‌دهند و خاصیت نماتدکشی دارند. در این تحقیق، تأثیر ۱۸ جدایه *Streptomyces* در شرایط آزمایشگاهی بر کاهش تفریح تخم و مرگومیر لارو نماتد *Meloidogyne javanica* بررسی شد. برخی ویژگی‌های مهار زیستی و ارتقاء رشدی گیاه، در جدایه‌های باکتری نیز ارزیابی گردید. بعد از ۷۲ ساعت، کاهش تفریح تخم در دو جدایه S116 و BAD به‌ترتیب ۳۷/۱ و ۳۸/۵ درصد نسبت به شاهد نماتد برآورد شد. مرگومیر لاروها در دو جدایه ذکرشده به‌میزان ۱۰۰ و ۶۵/۶۷ درصد رسید. در شرایط گلخانه، کارایی پنج جدایه منتخب آنتاگونیست با توان تولید سیدروفور، اکسین، کیتیناز، ACC دامیناز و نیز حلالیت فسفات، بر کاهش شاخص‌های بیماری‌زایی نماتد ریشه‌گرهی بررسی شد. در تیمار نماتد + جدایه BAD، تعداد گال و کیسه تخم در ریشه به‌ترتیب به‌میزان ۱۹/۶ و ۳۵/۴ درصد نسبت به شاهد کاهش یافت. تعداد لاروها در خاک گلدان این تیمار نصف خاک گلدان شاهد برآورد شد. جدایه BAD به‌صورت انفرادی و در حضور نماتد، در ارتقاء شاخص‌های رشدی گیاه گوجه‌فرنگی (*Meloidogyne javanica*) در مقایسه با شاهد سالم و آلوده تأثیر داشت. در تیمار نماتد + جدایه BAD، وزن تر اندام‌هوایی و ریشه در مقایسه با شاهد آلوده به نماتد به‌ترتیب به‌میزان ۲۱/۴ و ۲۷/۵ درصد افزایش نشان داد. آنالیز تبارزایی ژن 16S rDNA، جدایه‌های BAD را مابین گونه‌های *S. olivaceus* و *S. carpaticus* قرار داد. براساس نتایج مطالعه حاضر، جدایه BAD به‌عنوان جدایه مؤثر در زیست‌مهارگری نماتد در گلخانه مطرح و گزینه مناسبی جهت بررسی‌های بیشتر مزرعه‌ای و مهار تلفیقی نماتد ریشه‌گرهی می‌باشد که تحت نام FUM-BAD *Streptomyces* sp. جهت پژوهش‌های آینده در کلکسیون بخش بیماری‌شناسی دانشگاه فردوسی مشهد نگهداری می‌شود.

واژه‌های کلیدی: اکتینومیست‌ها، فعالیت نماتدکشی، نماتد ریشه‌گرهی، 16S rDNA

## مقدمه

خاک بستگی دارد (Damadzadeh, 2006). گونه‌های جنس *Meloidogyne* به‌دلیل نرخ تکثیر بالا و دامنه میزبانی گسترده، از جمله آفات بسیار مخرب کشاورزی محسوب می‌شوند و مهار آن‌ها به روش‌های مرسوم دشوار است (Sharma et al., 2019). نماتدکش‌های شیمیایی به‌دلیل سرعت عمل بالا و نتایج مطلوب مدیریت نماتدها، بسیار مورد پسند هستند. با توجه به خطرات و مشکلات ناشی از کنترل شیمیایی، استفاده از سایر روش‌ها به‌عنوان جایگزین مورد توجه است و از این میان & کاربرد ریزسازواره‌های<sup>۲</sup> بازدارنده زیستی<sup>۳</sup> علیه عوامل بیماری‌زا بیشتر از سایر روش‌ها نظر

نماتدهای ریشه‌گرهی *Meloidogyne* spp. از مهم‌ترین عوامل خسارت‌زای گوجه‌فرنگی (*Meloidogyne javanica*) محسوب می‌شوند و سالانه زیان اقتصادی سنگینی در سطح جهان ایجاد می‌کنند که برآوردها میزان آن را حدود ۱۷۳ میلیارد دلار گزارش کرده‌اند (Radwan et al., 2024). شدت خسارت واردشده توسط این نماتدها به مجموعه‌ای از عوامل از جمله رقم گیاه میزبان، شرایط اقلیمی، نوع و بافت خاک و از همه مهم‌تر، تراکم جمعیت نماتد در

۱- گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران  
(\*)- نویسنده مسئول: (Email: [mahdikhani-e@um.ac.ir](mailto:mahdikhani-e@um.ac.ir))

[s.baghaee@um.ac.ir](mailto:s.baghaee@um.ac.ir)

<https://doi.org/10.22067/Jpp.2025.65326.1252>

2- Microorganisms

3- Antagonist

متابولیت‌ها با نفوذ به داخل تخم، تکمیل جنین‌زایی یا توانایی لاروها برای خارج شدن از تخم را مختل می‌کنند (Atif et al., 2023). با وجود دامنه وسیع تولیدات ضد میکروبی و بازدارندگی جدایه‌های *Streptomyces*، در داخل کشور تنها در مطالعه منظم و همکاران (Monazam et al., 2022)، اثرگذاری دو جدایه SH20 و SH8 از جنس *Streptomyces* بر کاهش شاخص‌های تولیدمثلی نماتد *M. incognita* گوجه‌فرنگی گزارش شده است. مطالعه حاضر با هدف بررسی تأثیر جدایه‌های برتر بازدارنده زیستی *Streptomyces* به‌دست‌آمده از خاک بوته‌های سالم گوجه‌فرنگی و بادنجان استان خراسان رضوی بر کاهش شاخص‌های بیماری‌زایی نماتد *M. javanica* و بهبود شاخص‌های رشدی گیاه گوجه‌فرنگی انجام شده است.

## مواد و روش‌ها

### تهیه و تکثیر جمعیت خالص از نماتد ریشه‌گرهی

ریشه‌های آلوده به نماتد ریشه‌گرهی در سال ۱۳۹۸ از مزارع گوجه‌فرنگی روستای بوژان شهرستان نیشابور جمع‌آوری شدند. ریشه‌های حاوی گره بررسی و از هر نمونه یک کیسه تخم انتخاب و با کمک محلول سدیم هیپوکلریت ۵٪ درصد ماده ژلاتینی حل و تخم‌های آزاد پس از شست‌وشو با آب مقطر سترون به گیاهچه‌های ۲-۴ برگی گیاه گوجه‌فرنگی رقم موبیل اضافه گردید. گلدان‌ها در دمای ۲۶ تا ۲۸ درجه سلسیوس، به مدت ۶۰ روز در گلخانه نگهداری شدند. جمعیت نهایی نماتد ریشه‌گرهی مورد استفاده در این پژوهش بعد از گذشت مدت زمان ذکرشده، از گلدان‌های آلوده استخراج گردید. برای شناسایی گونه نماتد، از شبکه کوتیکولی انتهای بدن ماده<sup>۲</sup> برش میکروسکوپی تهیه و شناسایی انجام گرفت (Jepson, 1987). استخراج تخم و لارو سن دوم از ریشه به‌روش هوسی و بارکر (Hussey & Barker, 1973) انجام شد.

### تهیه جدایه‌های باکتری *Streptomyces*

تعداد نه جدایه باکتری *Streptomyces* از کلکسیون بخش بیماری‌شناسی دانشگاه فردوسی مشهد به‌صورت خالص تهیه و روی محیط عصاره مخمر، مالت آگار (YMEA) کشت و نگهداری شدند. همچنین تعداد نه جدایه *Streptomyces* پس از جداسازی از ۲۰ نمونه خاک مزارع گوجه‌فرنگی و بادنجان از استان خراسان رضوی، خالص‌سازی شده و برای آزمایش‌ها مورد استفاده قرار گرفتند. جهت جداسازی جدایه‌های *Streptomyces* از خاک مزارع

محققان را به خود جلب کرده است (Kavari et al., 2015). ریزسازواره‌های ناحیه فراریشه<sup>۱</sup> به‌خصوص گونه‌های باکتریایی به‌عنوان بازدارنده در برابر بیمارگرهای نماتدی ریشه عمل می‌کنند (Ali et al., 2024). اکتینوباکترها از جمله باکتری‌های گرم مثبتی هستند که خاصیت نماتدکشی آن‌ها به اثبات رسیده است. این گروه حدود ۴۰ درصد از جمعیت باکتریایی خاک را تشکیل می‌دهند (Mohammadi Fesharaki et al., 2018). جنس *Streptomyces* از اکتینوباکترها علاوه بر داشتن جمعیت بالا در خاک، قادر به تحمل شرایط اسیدی نیز می‌باشد. ترکیبات زیستی فعال مشتق‌شده از *Streptomyces*‌ها طیف وسیعی از تنوع شیمیایی را نشان می‌دهند و شامل پپتیدهای حلقوی و خطی، تریپتوئیدها، ماکرولاکتام‌ها، ماکرولیدها، گلیکوزیدها، پلی‌آروماتیک‌ها و پلی‌کتیدهای خطی هستند (Lacey & Rutledge, 2022).

*Streptomyces*‌های بازدارنده به‌خاطر توانایی تولید متابولیت‌های مؤثر در برابر *Meloidogyne* شناخته شده‌اند. جدایه S1 از گونه *S. roche* دارای توان تولید کیتیناز، بازدارندگی قابل توجهی در برابر *M. incognita* نشان داد و نیز ویژگی‌های رشدی گیاه بادنجان (*Solanum melongena* L.) را ارتقاء داد (Atif et al., 2023). ویژگی نماتدکشی رونشین سوسپانسیون جدایه *S. nigrescens* KA-1 به‌میزان ۹۱/۳ درصد برآورد شد و تعداد کیسه تخم نماتد *M. incognita* را در ریشه فلفل قرمز (*Capsicum annuum* L) کاهش داد (Park et al., 2023).

بررسی قابلیت نماتدکشی جدایه M7 از گونه *S. antibioticus* در شرایط گلخانه، کاهش ۵۰ تا ۶۲ درصدی گال ریشه و ۵۳ تا ۷۶ درصدی توده تخم *M. incognita* را نشان داد (Sharma et al., 2019). متابولیت‌های تولیدی توسط جدایه M7 به‌نام اکتینومایسین‌های X2، V و D شناسایی شدند. پتانسیل نماتدکشی مایع رونشین جدایه‌های بومی ATHUBA 220 *S. monomycini* و ATHUBA438 *S. colombiensis* به‌دست‌آمده از خاک‌های یونان علیه دو نماتد بیمارگر گیاهی *M. incognita* و *M. javanica* در شرایط آزمایشگاه و گلخانه بررسی و تأیید شد (Meidani et al., 2020). اثر نماتدکشی متابولیت‌های *S. hydrogenous* جدایه DH16 در برابر نماتد *M. incognita* به‌طور قابل توجهی باعث کاهش تفریح تخم (تقریباً ۱۰۰ درصد) و مرگ‌ومیر لارو سن دوم (بیش از ۹۵ درصد) بعد از ۹۶ ساعت شد (Kaur et al., 2016). این جدایه به‌عنوان نماتدکشی ایمن باعث بهبود رشد گیاه نیز می‌شود. متابولیت‌های باکتریایی و ترکیبات سمی دیگر موجود در این

نمونه، سه تکرار در نظر گرفته شد. لاروهای که پس از ۲۴ ساعت قرارگیری در آب مقطر سترون، فاقد حرکت بوده و با سرسوزنی تغییر حالت ندادند، به‌عنوان لارو مرده شمارش شدند. درصد میزان مرگ و میر لاروها به‌وسیله شمارش کل لاروهای زنده و مرده زیر میکروسکوپ نوری و طبق معادله ۲ محاسبه شد.

(۲) درصد مرگ و میر لاروها = تعداد لاروهای مرده/تعداد کل لاروها  $\times 100$

### بررسی برخی ویژگی‌های مهار زیستی و ارتقاء رشدی در

#### جدایه‌های *Streptomyces*

برای بررسی توانایی باکتری‌ها در تولید ایندول استیک اسید (IAA) از کشت ۲۴ ساعته هر جدایه در محیط NB حاوی آل-تریپتوفان (۲ و ۵ میلی گرم در میلی لیتر) استفاده شد. تغییر رنگ معرف به صورتی تا قرمز به‌عنوان توانایی جدایه‌های مورد مطالعه در تولید IAA در نظر گرفته شد (Patten & Glick, 2002). برای بررسی کیفی توانایی جدایه‌های مختلف در حلالیت فسفات از روش پیکووسکایا (Pikovskaya, 1948) استفاده گردید. در این روش، باکتری‌ها در تشتک‌های پتری حاوی محیط پیکووسکایا<sup>۳</sup> آگار غنی شده با تری کلسیم فسفات کشت و به مدت سه روز در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شدند. بعد از این مدت، تشتک‌های پتری مورد بررسی قرار گرفتند و تشکیل هاله شفاف در اطراف هر کلنی به‌عنوان نتیجه مثبت ارزیابی گردید. به‌منظور تخمین کمی توانایی انحلال فسفات از روش اسپربر (Sperber, 1958) با اندکی تغییرات استفاده شد. میزان فعالیت ACC دامیناز به‌روش پرنروز و گلیک (Penrose & Glick, 2003) و از طریق اندازه‌گیری مقدار آلفاکتوبوتیرات تولیدشده در عصاره باکتری تعیین گردید. توانایی جدایه‌ها در تولید سیدروفور در محیط کشت CAS آگار (Schwyn & Neillands, 1987) و با بررسی تغییر رنگ محیط از آبی به نارنجی مورد ارزیابی قرار گرفت. تولید آنزیم کیتیناز نیز به‌روش موریسی و بلیکلی (Murthy & Bleakley, 2012) بررسی شد.

#### کارآیی جدایه‌های *Streptomyces* منتخب در شرایط گلخانه

براساس آزمایش‌های انجام گرفته (از نظر شاخص‌های مهارزیستی و افزایش‌دهنده رشد گیاه)، پنج جدایه کارآتر، برای آزمون گلخانه‌ای انتخاب شدند. جهت انجام آزمون هر یک از پنج جدایه به مدت ۳-۴ روز روی محیط کازئین نیترات نشاسته آگار رشد نمودند. سپس یک تک کلونی از هر جدایه در داخل ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۵۰

گوجه‌فرنگی و بادنجان، از محیط کشت نشاسته کازئین آگار (Starch Casein Agar, SCA) (دارای ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر نیستاتین<sup>۱</sup> و ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر در اسیدنالیدیکسیک<sup>۲</sup>) استفاده شد. مقدار ۱۰ گرم از هر نمونه خاک خشک شده به مدت یک هفته در دمای اتاق، به ۹۰ میلی لیتر آب مقطر سترون اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه روی شیکر قرار داده شد. از سوسپانسیون حاصل سری رقت‌های مختلف تهیه و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت در سه تکرار روی محیط کشت ذکر شده در بالا، پخش و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت هفت روز نگهداری گردید. پرگنه‌های رشد یافته با ظاهر خشک، پودری، سفید گچی و رنگی و دارای میسلیم انتخاب و جهت تهیه کشت خالص، با کشت پنج ضلعی روی محیط YMEA بازکشت شدند (Conn et al., 1998).

### ارزیابی جدایه‌های *Streptomyces* بر تخم و لارو نماتد

#### ریشه‌گرهی در شرایط آزمایشگاه

تعداد ۱۸ جدایه *Streptomyces* علیه نماتد ریشه‌گرهی در شرایط آزمایشگاه به‌روش سان و همکاران (Sun et al., 2006) با اندکی تغییرات مورد ارزیابی قرار گرفتند. به‌منظور بررسی میزان ممانعت از تفریح تخم، جدایه‌های مورد نظر روی محیط YMEA کشت و به مدت ۵ تا ۱۰ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. یک دیسک پنج میلی‌متری از حاشیه پرگنه باکتری برداشته و به لوله‌های آزمایش ۱۵ میلی‌متری حاوی پنج میلی‌متری توبین ۲۰ سترون با غلظت ۰/۰۵ درصد منتقل شد. لوله‌ها به مدت یک دقیقه به‌شدت تکان داده شدند تا اسپورها از سطح دیسک جدا و در محلول پخش شوند. ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون توده تخم (حاوی ۳۰۰ تخم) به پتری حاوی یک میلی لیتر سوسپانسیون اسپور اضافه گردید. برای شاهد از توبین ۲۰ سترون ۰/۰۵ درصد فاقد اسپور استفاده شد. میزان تفرخ تخم بعد از ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۱۲۰ ساعت نگهداری پتری‌ها در دمای ۲۵ درجه سلسیوس بررسی گردید. برای هر نمونه، سه تکرار در نظر گرفته شد. درصد تفرخ تخم به‌وسیله شمارش کل تخم‌ها زیر میکروسکوپ نوری و طبق معادله ۱ انجام گرفت.

(۱) درصد تفریح تخم = تعداد تخم‌های تفریح شده/کل تخم‌ها  $\times 100$

جهت ارزیابی مرگ و میر لاروها از روش ذکر شده در بالا استفاده شد. در اینجا از ۵۰ میکرولیتر سوسپانسیون لارو (حاوی ۱۰۰ لارو فعال و تازه تفریح شده از تخم) استفاده گردید. پتری‌ها در دمای ۲۵ درجه سلسیوس بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بررسی شدند. برای هر

1- Nystatin

2- Nalidixic acid

3- Pikovskaya's medium

(*et al.*, 1991). واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با برنامه واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه آغاز، با ۳۵ چرخه شامل واسرشت ثانویه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱/۵ دقیقه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲/۵ دقیقه ادامه یافت و در نهایت با یک چرخه گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه خاتمه یافت. پنج میکرولیتر از محصول PCR روی ژل آگاروز یک درصد به همراه ۰/۱ درصد گرین ویوور بارگزاری و به مدت ۲۵ دقیقه در ولتاژ ۸۵ ولت، الکتروفورز شد و عکس‌برداری به وسیله دستگاه ژل داک انجام گرفت. ۲۰ میکرولیتر از محصول PCR جهت خالص‌سازی و تعیین توالی نوکلئوتیدی به شرکت پیشگام (تهران، ایران) ارسال شد.

### توالی‌یابی و بررسی روابط تبارزایی

جدایه‌های منتخب باکتری که در شرایط آزمایشگاه و گلخانه بیشترین اثر مهارکنندگی نماتد را داشته و هم‌زمان دارای برخی ویژگی‌های افزایش دهنده رشد گیاه بودند، برای توالی‌یابی ارسال شدند. ویرایش توالی‌ها توسط نرم‌افزار BioEdit انجام گردید. توالی‌های به‌دست‌آمده با توالی‌های موجود در بانک اطلاعات ژنتیکی (GenBank) با جست‌وجوی بلاست (<http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) مقایسه شدند. هم‌ردیف‌سازی توالی‌ها در بخش Clustal W با استفاده از نرم‌افزار Mega11 انجام پذیرفت. از توالی‌های ثبت‌شده در بانک ژن مربوط به جدایه‌های مرجع برای مقایسه‌های تبارزایی استفاده شد. درخت تبارزایی با درجه اعتبارسنجی<sup>۱</sup> هزار تکرار و به‌روش نزدیک‌ترین همسایه<sup>۲</sup> رسم گردید.

### نتایج

#### شناسایی گونه نماتد ریشه‌گرهی

با بررسی خصوصیات ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی نماتد ماده و استفاده از کلید شناسایی چپسون (*Jepson*, 1987) گونه نماتد *Meloidogyne javanica* تعیین گردید.

#### تأثیر جدایه‌های *Streptomyces* بر تخم و لارو نماتد

##### ریشه‌گرهی در شرایط آزمایشگاهی

مطابق شکل ۱-الف، کارایی بازدارندگی ۱۸ جدایه

میلی‌لیتر از محیط مایع عصاره مخمر و مالت (YME) تلقیح شد. ارلن‌ها به مدت پنج روز در دمای اتاق با سرعت ۲۲۰ دور در دقیقه روی شیکر قرار گرفتند. سوسپانسیون حاصل به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۱۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و به رسوب به‌جامانده ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون اضافه گردید. ۵۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون با خاک سترون (به‌نسبت ۱:۱۰:۲، خاک، ماسه و خاک‌برگ) مخلوط و پس از چهار روز گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی رقم موویل به گلدان‌هایی دو کیلویی منتقل شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۲ تیمار و سه تکرار شامل: ۱- شاهد سالم (تنها خاک سترون)، ۲- شاهد آلوده به نماتد، ۳- نماتد + جدایه BAD، ۴- نماتد + جدایه ANA، ۵- نماتد + جدایه GHR، ۶- نماتد + جدایه S116، ۷- نماتد + جدایه S104، ۸- جدایه BAD، ۹- جدایه ANA، ۱۰- جدایه GHR، ۱۱- جدایه S116 و ۱۲- جدایه S140 انجام شد. یک هفته بعد از انتقال نهال‌ها، گلدان‌ها به‌وسیله ۲۰۰۰ لارو سن دو نماتد تلقیح گردید. پس از گذشت ۶۰ روز از نگهداری گلدان‌ها در گلخانه با دمای  $25 \pm 4$  درجه سلسیوس، نهال‌ها با ریشه از گلدان خارج شده و شمارش تعداد گال و توده تخم در ریشه و تعداد لارو سن دو در خاک انجام شد. شمارش تعداد توده تخم با استفاده از روش هوسی و بارکر (*Hussey & Barker*, 1973) انجام گرفت. برای تعیین لارو سن دوم، ۲۰۰ گرم خاک اطراف ریشه در آزمون گلخانه برداشت شده و پس از استخراج، تعداد لاروها شمارش گردید (*Whithead & Hemming*, 1965) شاخص‌های رشدی گیاه گوجه‌فرنگی شامل طول ریشه و ساقه، وزن تر ریشه و ساقه مورد بررسی قرار گرفت. برای اندازه‌گیری وزن خشک ریشه و ساقه، بافت مورد نظر به مدت سه روز در دمای ۶۰ درجه سلسیوس قرار گرفت و سپس وزن آن ثبت شد.

### تجزیه و تحلیل آماری

همه آزمایش‌ها دو بار و حداقل با سه بار تکرار انجام شد. از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) برای تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) استفاده گردید. میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن مقایسه شد و مقادیر پنج درصد از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

#### شناسایی مولکولی جدایه‌های باکتری منتخب

بدین منظور، استخراج DNA باکتری با استفاده از کیت استخراج DNA باکتری‌های گرم مثبت شرکت سیناکلون (تهران) انجام شد. از جفت آغازگر اختصاصی fD1/rD1 با توالی رفت (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') و برگشت (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') استفاده گردید (*Weisburg*

1- Bootstrap

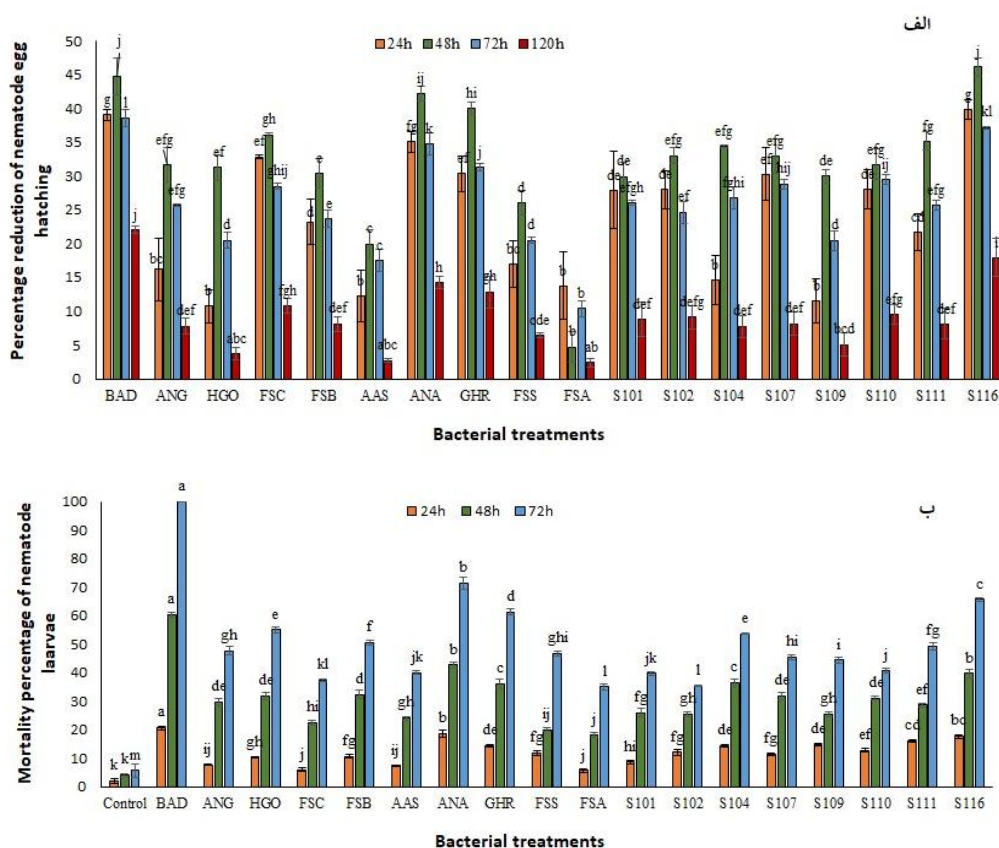
2- Neighbor-Joining



به‌میزان ۱۷/۹ و ۲۲ درصد نسبت به شاهد، بیشترین تأثیر را نشان دادند (شکل ۱-الف).

بیشترین درصد مرگ‌ومیر لاروها بعد از ۲۴ ساعت، در جدایه‌های BAD، ANA و S116 به‌ترتیب با ۲۰/۶۷، ۱۸/۶۷ و ۱۷/۶۷ درصد به دست آمد. در زمان ۴۸ ساعت بعد از آزمون، این درصدها به ۳۳/۶۰، ۴۲/۶۷ و ۳۹/۶۷ تغییر یافتند. بعد از گذشت ۷۲ ساعت، ۲۲ درصد جدایه‌ها موجب مرگ‌ومیر بالای ۶۰ درصد لاروها شدند و در نهایت مرگ‌ومیر لاروها پس از سه روز در جدایه‌های BAD، ANA و S116 به ۱۰۰، ۷۱/۳۳ و ۶۵/۶۷ درصد رسید. در همه زمان‌های مورد بررسی، تیمار BAD بهترین عملکرد را از نظر مرگ‌ومیر لارو نماد نشان داد (شکل ۱-ب).

*Streptomyces* بر تخم و لارو نماد در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد. بعد از ۲۴ ساعت، جدایه‌های S116 و BAD به‌ترتیب با تفریخ تخم به‌میزان ۲۵/۶۷ و ۲۶ درصد، بیشترین تأثیر را از نظر آماری بر کاهش تفریخ تخم نسبت به شاهد نماد (تفریخ تخم ۴۲/۷ درصد) نشان دادند (به‌ترتیب کاهش تفریخ تخم ۳۹/۸ و ۳۹ درصدی). جدایه‌های ANA و GHR در اولیت‌های بعدی درصد کاهش تفریخ تخم نماد قرار گرفتند. بعد از ۷۲ ساعت، درصد تفریخ تخم در دو جدایه S116 و BAD به‌ترتیب به‌میزان ۶۰/۳ و ۵۹ درصد در مقایسه با شاهد نماد (۹۶ درصد) ثبت شد. بر این اساس، درصد کاهش تفریخ تخم در این دو جدایه به‌ترتیب ۳۷/۱ و ۳۸/۵ درصد نسبت به شاهد نماد برآورد گردید. همچنین با گذشت ۱۲۰ ساعت، جدایه‌های S116 و BAD به‌طور معنی‌داری با کاهش درصد تفریخ تخم



شکل ۱- الف) درصد کاهش تفریخ تخم نماد ریشه‌گرهی *Meloidogyne javanica* تیمار شده با جدایه‌های مختلف باکتری *Streptomyces* sp. در آزمایشگاه بعد از ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۱۲۰ ساعت. ب) درصد مرگ‌ومیر لاروها بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت. نتایج، میانگینی از سه تکرار بوده و ارور بارها نشان‌دهنده خطای استاندارد از میانگین هستند (SE). حروف متفاوت، اختلاف معنی‌داری را برای هر تیمار نشان می‌دهند که با آنالیز واریانس (ANOVA) و آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح پنج درصد محاسبه شده‌اند.

Figure 1- a) Reduction in hatching percentage of root-knot nematode eggs of *Meloidogyne javanica* treated with different isolates of *Streptomyces* sp. in the laboratory after 24, 48, 72 and 120 h. b) Larval mortality percentage after 24, 48 and 72 h. Results are the average of three replicates and error bars indicate standard error of the mean (SE). Different letters indicate significant differences for each treatment, calculated by analysis of variance (ANOVA) and Duncan's multiple range test at the 5% level.

## بررسی برخی ویژگی‌های محرک رشد گیاهی جدایه‌ها و بررسی تولید کیتیناز در آزمایشگاه

جدایه‌های *Streptomyces* از نظر اثرگذاری بر شاخص‌های رشد گیاه و تولید کیتیناز، با یکدیگر مقایسه شدند. تولید IAA در جدایه BAD به‌طور معنی‌داری بیشتر از سایر باکتری‌ها بود (۳۶/۴) میکروگرم بر میلی‌لیتر) و جدایه ANA با میزان تولید ۳۳/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، در رده بعدی قرار گرفت. نتایج تولید سیدروفور نشان دادند که جدایه‌های S104 و ANG به‌ترتیب با قطر هاله نارنجی ۹ و ۸/۳۳ میلی‌متر، بیشترین میزان را داشتند. بررسی کیفی حلالیت فسفات مشخص نمود که جدایه‌های BAD و GHR به‌ترتیب با مقادیر ۱/۴۳ و ۱/۲ میلی‌متر بیشترین بودند و اختلاف معنی‌داری

نسبت به هم داشتند. ارزیابی کمی این ویژگی نشان داد که جدایه BAD به‌طور معنی‌داری بیشتر از سایر جدایه‌ها و با مقدار ۸۳/۶۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر، فسفات را حل نمود (جدول ۱). بررسی میزان تولید آنزیم ACC دامیناز نشان داد که جدایه BAD با میزان ۱/۳۸ میکرومول بر میلی‌لیتر به‌طور معنی‌داری بیشتر از سایر جدایه‌ها بود و باکتری‌های S116، GHR، S109 و S104 به‌ترتیب در رده‌های بعدی قرار گرفتند. آنزیم کیتیناز نیز در بین جدایه‌ها متغیر بود، به‌طوری‌که BAD بیشترین میزان تولید ۱/۳۰ میلی‌متر را نشان داد و جدایه ANA و GHR در رده‌های بعدی قرار گرفتند (جدول ۱).

جدول ۱- ارزیابی برخی شاخص‌های مهارزیستی و ارتقاء رشد گیاه در جدایه‌های *Streptomyces* مفید

Table 1- Evaluation of some biocontrol and growth promoting factors in beneficial *Streptomyces* isolates

| Treatments | Indole acetic acid ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) | Phosphate solubility (cm)(qualitative) | Phosphate solubility ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) (quantitative) | ACC deaminase (cm) | Siderophore (cm)   | chitinase (cm)      |
|------------|----------------------------------------------|----------------------------------------|---------------------------------------------------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| BAD        | 36.4 <sup>a</sup>                            | 1.43 <sup>a</sup>                      | 83.66 <sup>a</sup>                                            | 1.38 <sup>a</sup>  | 7 <sup>cd</sup>    | 1.3 <sup>a</sup>    |
| ANG        | 13.96 <sup>ij</sup>                          | 1.13 <sup>bc</sup>                     | 68.66 <sup>b</sup>                                            | 0.56 <sup>fg</sup> | 8.33 <sup>ab</sup> | 0.82 <sup>de</sup>  |
| HGO        | 23.76 <sup>de</sup>                          | 0.93 <sup>def</sup>                    | 59 <sup>def</sup>                                             | 0.51 <sup>gh</sup> | 5 <sup>f</sup>     | 0.72 <sup>fg</sup>  |
| FSC        | 21.96 <sup>ef</sup>                          | 1 <sup>cde</sup>                       | 55.66 <sup>fg</sup>                                           | 0.42 <sup>i</sup>  | 5 <sup>f</sup>     | 0.55 <sup>ij</sup>  |
| FSB        | 23.9 <sup>de</sup>                           | 0.63 <sup>hi</sup>                     | 51 <sup>gh</sup>                                              | 0.63 <sup>ef</sup> | 6.33 <sup>de</sup> | 0.73 <sup>efg</sup> |
| AAS        | 21.63 <sup>ef</sup>                          | 0.26 <sup>k</sup>                      | 44 <sup>i</sup>                                               | 0.7 <sup>de</sup>  | 8 <sup>b</sup>     | 0.59 <sup>i</sup>   |
| ANA        | 33.5 <sup>b</sup>                            | 1.06 <sup>bcd</sup>                    | 65.66 <sup>bc</sup>                                           | 0.93 <sup>b</sup>  | 4 <sup>g</sup>     | 1.13 <sup>b</sup>   |
| GHR        | 28.43 <sup>c</sup>                           | 1.2 <sup>b</sup>                       | 60 <sup>def</sup>                                             | 0.89 <sup>b</sup>  | 8 <sup>b</sup>     | 0.93 <sup>c</sup>   |
| FSS        | 11.56 <sup>j</sup>                           | 0.9 <sup>def</sup>                     | 48.66 <sup>h</sup>                                            | 0.69 <sup>de</sup> | 5 <sup>f</sup>     | 0.69 <sup>gh</sup>  |
| FSA        | 15 <sup>hi</sup>                             | 0.53 <sup>ij</sup>                     | 40.33 <sup>i</sup>                                            | 0.57 <sup>fg</sup> | 8 <sup>b</sup>     | 0.44 <sup>k</sup>   |
| S101       | 20 <sup>f</sup>                              | 0.26 <sup>k</sup>                      | 41.33 <sup>i</sup>                                            | 0.46 <sup>hi</sup> | 6 <sup>e</sup>     | 0.55 <sup>ij</sup>  |
| S102       | 19.4 <sup>fg</sup>                           | 0.26 <sup>k</sup>                      | 52.33 <sup>gh</sup>                                           | 0.68 <sup>e</sup>  | 6.33 <sup>de</sup> | 0.48 <sup>jk</sup>  |
| S104       | 23.56 <sup>de</sup>                          | 1.13 <sup>bc</sup>                     | 63.66 <sup>bcd</sup>                                          | 0.86 <sup>b</sup>  | 9 <sup>a</sup>     | 0.63 <sup>hi</sup>  |
| S107       | 12.13 <sup>j</sup>                           | 0.7 <sup>gh</sup>                      | 52.33 <sup>gh</sup>                                           | 0.77 <sup>cd</sup> | 7.66 <sup>bc</sup> | 0.79 <sup>hi</sup>  |
| S109       | 15 <sup>hi</sup>                             | 0.8 <sup>fg</sup>                      | 68 <sup>b</sup>                                               | 0.87 <sup>b</sup>  | 3 <sup>h</sup>     | 0.58 <sup>i</sup>   |
| S110       | 17.33 <sup>gh</sup>                          | 0.46 <sup>j</sup>                      | 61.66 <sup>cde</sup>                                          | 0.63 <sup>ef</sup> | 2 <sup>i</sup>     | 0.45 <sup>k</sup>   |
| S111       | 25.2 <sup>d</sup>                            | 1.03 <sup>bcde</sup>                   | 57.33 <sup>ef</sup>                                           | 0.85 <sup>bc</sup> | 5 <sup>f</sup>     | 0.92 <sup>c</sup>   |
| S116       | 30.73 <sup>c</sup>                           | 0.86 <sup>ef</sup>                     | 66.66 <sup>b</sup>                                            | 0.93 <sup>b</sup>  | 6.33 <sup>de</sup> | 0.86 <sup>cd</sup>  |

میانگین‌های دارای حروف مشترک بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

Averages with common letters are not significantly different based on Duncan's multi-range test at the 5% probability level

## تأثیر جدایه‌های *Streptomyces* بر شاخص‌های بیماری‌زایی نماتد ریشه‌گرهی در شرایط گلخانه

جدایه‌هایی که در شرایط آزمایشگاهی بیشترین تأثیر را بر کاهش تفریح تخم و مرگ‌ومیر لاروها داشتند و نیز توانایی تولید کیتیناز و برخی شاخص‌های محرک رشد گیاه را نشان دادند، جهت بررسی در شرایط گلخانه انتخاب شدند (BAD، GHR، ANA، S104 و S116). نتایج مقایسه میانگین شاخص‌های بیماری‌زایی نماتد ریشه‌گرهی در سطح پنج درصد نشان داد که در تیمار نماتد + جدایه

BAD، تعداد گال و کیسه تخم در ریشه به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد کاهش یافت (به‌ترتیب ۱۹/۶ و ۳۵/۴ درصد). تعداد لاروها در خاک گلدان این تیمار نصف تعداد لاروها در خاک گلدان شاهد اندازه گیری شد (۵۰ درصد کاهش). در رابطه با تعداد تخم در داخل توده تخم، اثر جدایه باکتریایی S104 با کاهش ۱۲/۶۰ درصدی نسبت به شاهد آلوده، بیشتر از اثر جدایه BAD (۸/۲۸ درصد) می‌باشد (جدول ۲).



جدول ۲- تأثیر جدایه‌های *Streptomyces* بر شاخص‌های بیماری‌زایی نماتد ریشه‌گرهی (*Meloidogyne javanica*) در شرایط گلخانهTable 2- Effect of *Streptomyces* isolates on root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) pathogenicity indices under greenhouse conditions

| Isolates | Number of galls/root | Number of egg mass/ root | Number of egg/root    | Number of eggs in the egg mass | Number of J2 200 g <sup>-1</sup> soil |
|----------|----------------------|--------------------------|-----------------------|--------------------------------|---------------------------------------|
| PC       | 208 a*               | 102.66 a                 | 48301.66 a            | 470.66 a                       | 3134.33 <sup>a</sup>                  |
| BAD + N  | 167.33 d             | 66.33 f                  | 28633.33 e            | 431.66 bc                      | 1548.67 c                             |
| ANA + N  | 176.66 c             | 74 d                     | 32920 cd              | 444.66 ab                      | 1758.33 d                             |
| GHR + N  | 186.33 b             | 86.66 b                  | 39497 <sup>b</sup>    | 455.66 ab                      | 2144.67 c                             |
| S104 + N | 184.33 b             | 83.66 c                  | 34410 c               | 411.33 c                       | 2328.33 b                             |
| S116 + N | 178.66 c             | 71.33 e                  | 31903.33 <sup>d</sup> | 447 ab                         | 1845.67 d                             |

PC: شاهد آلوده. نتایج میانگینی از سه تکرار هستند.

\* حروف متفاوت بعد از میانگین، نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار هستند که با آنالیز واریانس (ANOVA) و آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح پنج درصد محاسبه شده‌اند.

میانگین‌های دارای حروف مشترک بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی داری ندارند.

PC: positive control. Results are the average of three replicates.

\* Different letters after the mean indicate significant differences, calculated by analysis of variance (ANOVA) and Duncan's multiple range test at the 5% level. Averages with common letters are not significantly different based on Duncan's multi-range test at the 5% probability level.

تأثیر جدایه‌های *Streptomyces* منتخب بر شاخص‌های

## رشدی گوجه‌فرنگی در گلخانه

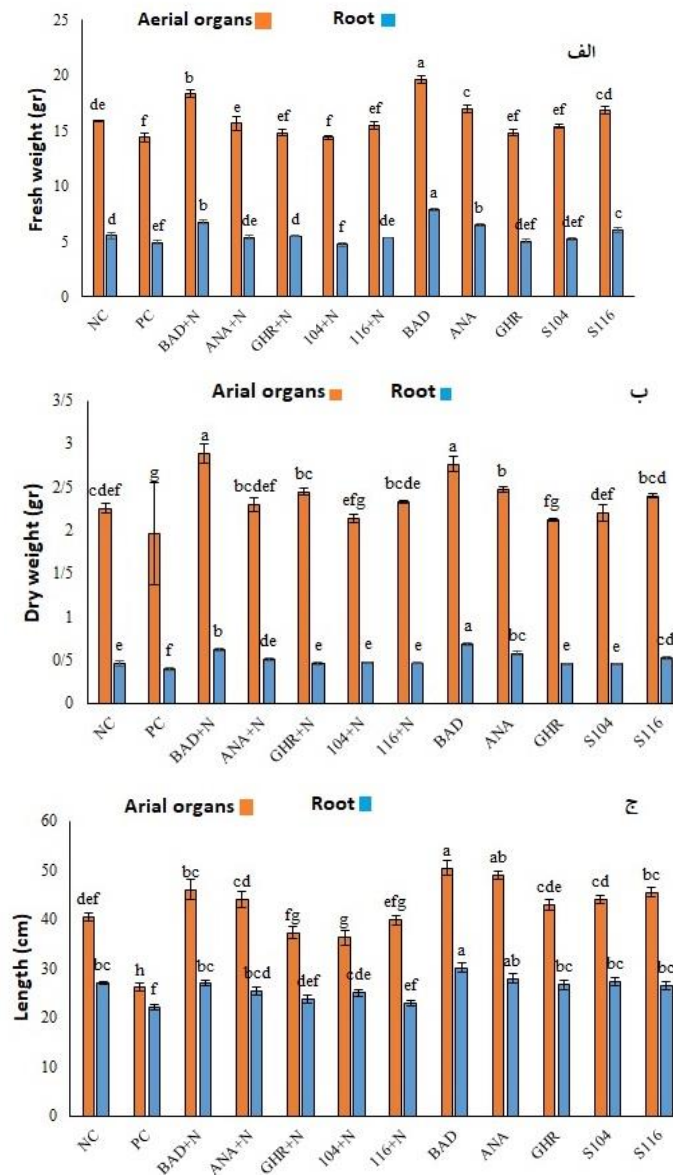
در تیمار انفرادی جدایه BAD، وزن تر اندام هوایی و ریشه به‌ترتیب ۱۹/۶۷ و ۷/۹ گرم اندازه‌گیری شد که نسبت به شاهد سالم (به‌ترتیب ۱۵/۹ و ۵/۵۳ گرم) افزایش معنی‌داری نشان داد (به‌ترتیب ۱۹/۱۶ و ۲۶ درصد افزایش) و موجب بهبود رشد گیاه گردید. در تیمار ترکیبی جدایه BAD به همراه نماتد نیز وزن تر اندام هوایی و ریشه در مقایسه با شاهد آلوده به نماتد (به‌ترتیب ۱۴/۴ و ۴/۹ گرم) به‌ترتیب به‌میزان ۲۱/۴ و ۲۷/۵ درصد افزایش نشان داد (شکل ۲- الف). نتایج مربوط به وزن خشک اندام هوایی و ریشه در تیمارهای مختلف نشان داد که کاربرد جدایه BAD در حضور نماتد، درصد افزایش وزن خشک اندام هوایی و ریشه را به‌ترتیب به‌میزان ۳۲/۱۷ و ۳۴/۴ درصد نسبت به شاهد آلوده به نماتد نشان داد (شکل ۲- ب). همچنین طول اندام هوایی و ریشه در تیمار انفرادی جدایه BAD بیشترین مقدار را به‌ترتیب با ۵۰/۴۶ و ۳۰/۱۶ سانتی‌متر در مقایسه با شاهد سالم (به‌ترتیب ۴۰/۵ و ۲۷/۱ سانتی‌متر) نشان داد (شکل ۲- ج). اگرچه این اختلاف از نظر آماری در سطح پنج درصد در مقایسه با جدایه ANA معنی‌دار نبود، اما در گیاهان آلوده به نماتد در حضور جدایه BAD افزایش طول اندام هوایی (۴۳ درصد) و ریشه (۱۷/۹ درصد) نسبت به

شاهد آلوده مشاهده شد (شکل ۳).

شناسایی جدایه‌های *Streptomyces* مفید بازدارنده نماتد

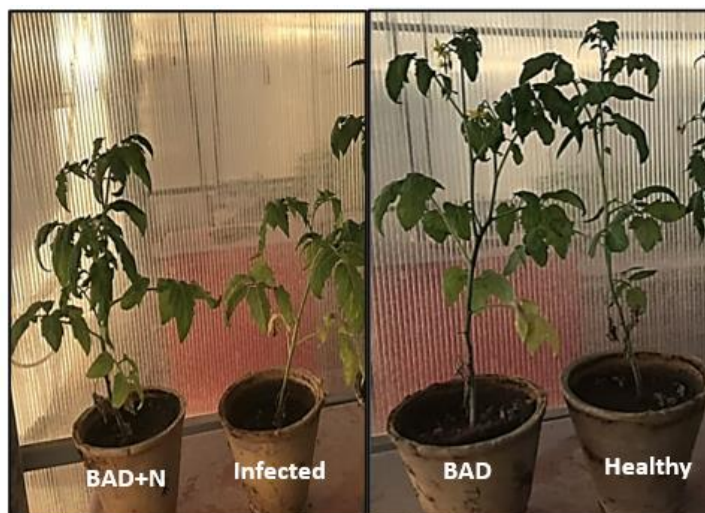
## ریشه‌گرهی

با انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی fD1/rD1، قطعه‌ای به‌طول تقریباً ۱۵۰۰ جفت باز تکثیر گردید. چهار نمونه جهت توالی‌یابی به شرکت پیشگام (ایران) ارسال شد. براساس درخت تبارزایی ترسیم‌شده با ۱۰۰۰ تکرار (شکل ۴)، جدایه‌های ۱۱۶ و GHR در کنار گونه‌های *S. harbinensis* و *S. carpaticus* در یک گروه قرار گرفتند. دو جدایه ذکرشده در بررسی بلاست به‌ترتیب ۹۹/۲۷ و ۹۹ درصد شباهت با جدایه‌های گونه‌های *S. harbinensis* و *S. carpaticus* نشان دادند. با وجود شباهت ۹۸/۸۱ درصدی جدایه BAD با جدایه استاندارد *S. olivaceus*، در درخت تبارزایی، این جدایه مابین گونه‌های *S. carpaticus* و *S. olivaceus* قرار گرفت. شناسایی دقیق گونه این جدایه، نیازمند بررسی تکمیلی ژن‌های خانه‌دار مرتبط با جنس است. جدایه Ana (شباهت ۹۹ درصد) نیز با جدایه‌های گونه *S. rochei* در یک گروه جداگانه قرار گرفت و به گونه *S. rochei* تعلق داشت.



شکل ۲- تأثیر جدایه‌های غیربیماریزای *Streptomyces* بر (الف) وزن تر و (ب) وزن خشک اندام هوایی و ریشه (گرم)، (ج) طول اندام هوایی و ریشه (سانتی‌متر) گیاه گوجه‌فرنگی به تنهایی و در حضور نماتد ریشه‌گرهی (*Meloidogyne javanica*) در شرایط گلخانه. NC: شاهد سالم و PC: شاهد آلوده. نتایج میانگینی از سه تکرار و ارور بارها نشان‌دهنده خطای استاندارد از میانگین هستند (SE). حروف متفاوت، اختلاف معنی‌داری را برای هر تیمار نشان می‌دهند که با آنالیز واریانس (ANOVA) و آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد محاسبه شده‌اند.

Figure 2- The effect of non-pathogenic *Streptomyces* isolates on a) fresh weight and b) dry weight of aerial parts and roots (gr), c) length of aerial parts and roots (cm) of tomato plants, both alone and in the presence of the root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) under greenhouse conditions. NC: healthy control and PC: infected control. Results are averages of three replicates and error bars indicate standard error of the mean (SE). Different letters indicate significant differences for each treatment, calculated by analysis of variance (ANOVA) and Duncan's multiple range test at the 5% level.



شکل ۳- تیمار جدایه *Streptomyces* sp. BAD به صورت انفرادی و در تعامل با نماتد *Meloidogyne javanica* در میزان گوجه‌فرنگی در مقایسه با شاهد سالم (آب مقطر سترون) و آلوده به نماتد (N)

Figure 3- The treatment of the *Streptomyces* sp. BAD isolate obtained from eggplant, both individually and in interaction with the nematode *Meloidogyne javanica* on the tomato host, was compared with the healthy control (sterile distilled water) and the nematode-infected control (N)

## بحث

اکتینومیستها، به‌ویژه گونه‌های جنس *Streptomyces*، نقش‌های متنوعی در تعاملات زیستی با سایر ارگانیسم‌ها ایفا و به‌عنوان عوامل مهم مهارزیستی شناخته می‌شوند (Atif et al., 2023). این گروه از باکتری‌ها، با تولید متابولیت ثانویه، آنتی‌بیوتیک، هورمون، آنزیم، رقابت بر سر مواد غذایی، تأثیر مثبت بر رشد گیاهان، تحریک مقاومت القایی و اختلال در ترشحات ریشه بر جمعیت عوامل بیماری‌زای مختلف از جمله نماتدها اثر می‌گذارند (Elshafei et al., 2010).

در این تحقیق، از بین جدایه‌های *Streptomyces* بازدارنده نماتد ریشه‌گرهی گوجه‌فرنگی، جدایه BAD (جداشده از خاک مزرعه بادنجان، بوژان-نیشابور)، بیشترین اثر مهارکنندگی را بر نماتد ریشه‌گرهی گوجه‌فرنگی داشت. کاهش معنی‌دار تفریح تخم و مرگ‌ومیر لاروهای نماتد در شرایط آزمایشگاهی، بیانگر توان بالای این جدایه در مهار عامل بیماری‌زا می‌باشد. جدایه BAD دارای بیشترین میزان حلالیت فسفات (۱/۴۳ میلی‌متر)، تولید اکسین (۳۶/۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و آنزیم ACC دآمیناز (۱/۳۸ میکرومول بر میلی‌لیتر) در مقایسه با شاهد بدون باکتری و دیگر جدایه‌های مورد بررسی بود.

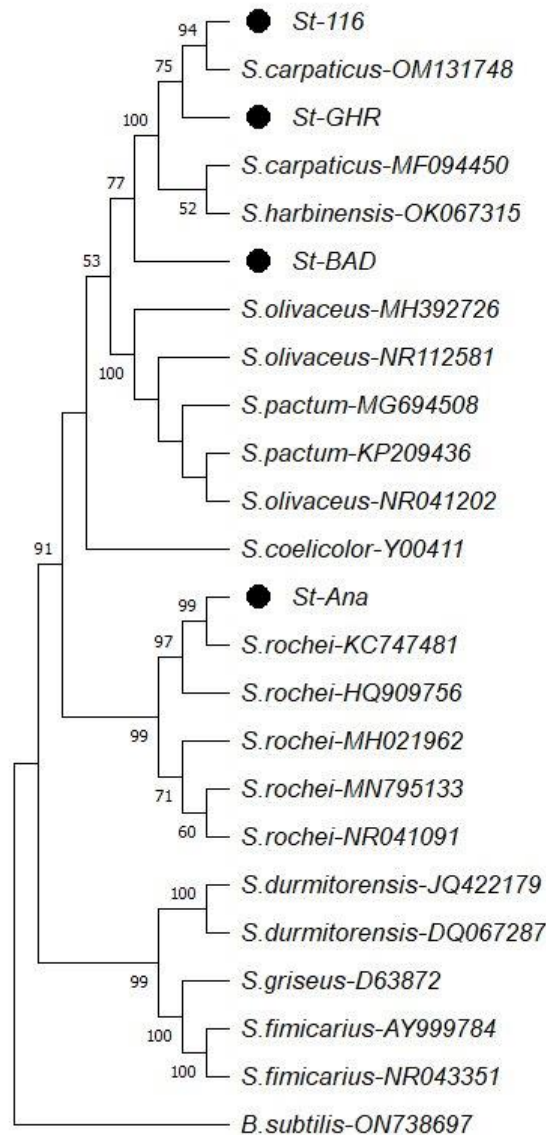
تمام جدایه‌های انتخابی مورد استفاده در بخش گلخانه از توانایی لازم در کاهش تعداد گال و کیسه‌تخم نماتد *Meloidogyne javanica* برخوردار بودند. با اعمال جدایه BAD، تعداد لارو سن دوم در ۲۰۰ گرم خاک مورد آزمایش، در مقایسه با شاهد آلوده به میزان ۵۰ درصد کاهش نشان دادند. کاهش معنی‌دار تعداد گال، کیسه‌تخم و

لارو سن دوم در تیمار ذکرشده نسبت به شاهد آلوده، نشان‌دهنده پایداری اثر مهارزیستی این جدایه در محیط واقعی تر رشد گیاه است. بررسی‌های مختلف در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه، در ارتباط با اثرات نماتدکشی جدایه‌های گونه‌های مختلف جنس *Streptomyces* تأکید دارند (Meidani et al., 2020) که با نتیجه مطالعه حاضر مطابقت دارد. فرونولین<sup>۱</sup> تولیدی جدایه *Streptomyces roseovercillatus* CMU-MH021 اثرات کشنده بر لارو نماتد *M. incognita* داشته است (Ruanpanun et al., 2011). در سال ۲۰۱۵ بشیری و همکاران (Bashiri et al., 2015) جدایه‌های Sp4 و Sp9 از *Streptomyces* را معرفی کردند که باعث کاهش میزان گال به‌ترتیب به‌میزان ۶۵/۳۵ و ۴۴/۵۶ در کیوی (*Actinidia deliciosa*) شدند.

براساس یافته‌های مطالعه حاضر، جدایه BAD نه‌تنها در مهار جمعیت نماتد مؤثر بود، بلکه موجب بهبود شاخص‌های رشدی گیاه گوجه‌فرنگی از جمله افزایش طول و وزن تر و خشک اندام‌های هوایی و ریشه شد. این نتایج نشان‌دهنده کارکرد دوگانه این جدایه در مهار عامل بیماری‌زا و تحریک رشد گیاه است. تأثیر مثبت این جدایه احتمالاً به تولید متابولیت‌های ثانویه‌ای مانند اکسین و آنزیم ACC دآمیناز مربوط می‌شود که نقش مهمی در بهبود رشد ریشه و افزایش مقاومت گیاه در برابر تنش‌های زیستی دارند. تولید ریشه سبب رشد اندام‌های هوایی و در نتیجه افزایش مقاومت گیاه در برابر حمله عوامل بیماری‌زا از جمله نماتد می‌شود. تأثیر جدایه‌های

(2019) مطابقت دارد. نقش مهارکنندگی و افزایش رشد گیاه به واسطه به کارگیری گونه *Streptomyces jietaisiensis* در گیاه فلفل (Ruanpanun & Nimnoi, 2020)، با نتایج مطالعه حاضر نیز هم خوانی دارد.

*Streptomyces* منتخب و به‌ویژه تیمار انفرادی و ترکیبی جدایه BAD با نماتد ریشه‌گرهی *Meloidogyne javanica* موجب ارتقاء شاخص‌های رشدی میزبان گوجه‌فرنگی گردید. نتایج ما با یافته‌های سایر محققان (Rashad et al., 2015; Sharma et al.,



شکل ۴- درخت فیلوژنتیکی ترسیم‌شده براساس بخشی از توالی ژن 16S rDNA جدایه‌های *Streptomyces* بازدارنده (دایره توپر) علیه نماتد ریشه‌گرهی گوجه‌فرنگی. درخت به‌روش نزدیک‌ترین همسایه و با ۱۰۰۰ تکرار رسم شده است.

**Figure 4- Phylogenetic tree constructed based on the 16S rDNA sequences of inhibitory *Streptomyces* isolates (solid circles) against tomato root-knot nematodes. The tree was generated using the neighbor-joining method with 1000 bootstrap replications**

توان افزایش شاخص‌های رشدی گوجه‌فرنگی و کاهش شاخص‌های بیماری‌زایی نماتد (تعداد کیسه تخم، تعداد گال و لارو سن دو) در شرایط گلخانه، به نظر می‌رسد که جدایه BAD به‌عنوان مؤثرترین

## نتیجه‌گیری

براساس ویژگی‌های نماتدکشی جدایه *Streptomyces* sp.- BAD در شرایط آزمایشگاه، میزان تولید محرک‌های رشد گیاهی،

FUM-BAD جهت پژوهش‌های آینده در کلکسیون بخش بیماری‌شناسی دانشگاه فردوسی مشهد نگهداری می‌شود.

جدایه در زیست مهارگری نماتد در گلخانه مطرح است و گزینه مناسبی جهت بررسی‌های بیشتر مزرعه‌ای و مهار تلفیقی نماتد ریشه‌گرهی می‌باشد. این جدایه تحت نام *Streptomyces* sp.

## References

- Atif, Amr., Elzamrik, F., Mohamed, G., Al-Quwaie, D., Ashkan, M., Alqahtani, F., Abdullah M, Ebtihal., Alomran, M., Alharbi, N., Tarabity, K& Abdelbasit, H (2023). Biological control of the root-knot nematode (*Meloidogyne Incognita*) on eggplants with various chitinase-producing streptomyces strains. *European Journal of Plant Pathology*, 167(3), 371-94. <https://doi.org/10.1007/s10658-023-02718-8>.
- Bashiri, Samaneh., Jamali, S & Golmohammadi, M. (2015). Antagonistic Effects of streptomyces bacteria on kiwi root-knot nematode. *Plant Protection*, 29(3), 310-17. (In Persian)
- Conn, Kur., Leci, E., Kritzman, G., & Lazarovits, G. (1998). A quantitative method for determining soil populations of *Streptomyces* and differentiating potential potato scab-inducing strains. *Plant Disease*, 82(6), 631-38. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.6.631>.
- Damadzadeh, M. (2006). Nematology in Agriculture. Andishe Gostar, Esfahan, Iran. 208 p.
- Elshafei, Abdalla AH., Abdel-Aziz, M. S., Ahmed, A., & Abdalla, A. H. (2010). Optimizing some factors affecting alkaline protease production by a marine bacterium *Streptomyces Albidoflavus*. *African Journal of Biotechnology*, 6, 125-42.
- Hussey, RS., & Barker, K. R. (1973). A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* species, including a new technique. *Plant Disease Reporter*, 57, 16.
- Jepson, S. B. (1987). Identification Root-Knot Nematodes (*Meloidogyne* Species). CAB International. United Kingdom. 537 p.
- Kaur, Talwinder., Jasrotia, S., Ohri, P., & Manhas, R. K. (2016). Evaluation of *in vitro* and *in vivo* nematocidal potential of a multifunctional *Streptomyces*, *Streptomyces Hydrogenans* strain DH16 against *Meloidogyne Incognita*. *Microbiological Research*, 192, 247-252. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.07.009>.
- Kavari, Mojtaba., Mahdikhani-Moghaddam, E. & Rouhani, H. (2015). Investigation of chitinase enzyme production by several isolates of *Trichoderma* fungus and its effect on biological control of tomato root-knot nematode *Meloidogyne Javanica*. *Journal of Plant Protection*, 29(1), 123-33. (In Persian)
- Lacey, H. J., & Rutledge, P. J. (2022). Recently discovered secondary metabolites from *Streptomyces* species. *Molecules*, 27(3), 887. <https://doi.org/10.3390/molecules27030887>.
- Meidani, Christianna., Savvidis, A., Lampropoulou, E., Sagia, A., Kalsifas, E., Monokrousos, N., Hatzinikolaou, D., Karagouni, A., Giannoutsou, E., Adamkis, I & Ntalli, N. (2020). The nematocidal potential of bioactive *Streptomyces* strains isolated from Greek Rhizosphere soils tested on *Arabidopsis* plants of varying susceptibility to *Meloidogyne* spp. *Plants*, 9(6), 1-17. <https://doi.org/10.3390/plants9060699>.
- Mohammadi Fesharaki, N., Behboudi, K. & Heydari, R. (2018). Effect of some solid nutrient state substrates on sporulation of *Streptomyces Carpaticus* UTS49 and control of *Meloidogyne Javanica* in tomatoes. *Applied Entomology and Phytopathology*, 86(1), 51-60. (In Persian).
- Monazam, K., Jamali, S., & Alimi, M. (2022). Efficacy of *Pseudomonas* and *Streptomyces* strains on control of root knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in tomato under greenhouse conditions. *Iranian Journal of Nematology*, 1(1), 118-127. (In Persian). <https://doi.org/10.22034/ijon.2022.549312.1016>
- Murthy, N, & Bleakley, B. (2012). Simplified method of preparing colloidal chitin used for screening of chitinase-producing microorganisms. *International Journal of Microbiology*, 10(2), 1-5.
- Park, Eun- Jae., Jang, H. J., Park, J. Y., Yang, Y. K., Kim, M. J. & Park, C. S., Lee, S., Yun, B. S., Lee, S. J., Lee, S. W., & Rho, M. C. (2023). Efficacy evaluation of *Streptomyces nigrescens* KA-1 against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Biological Control*, 179, 105150. <https://doi.org/10.1016/j.bioco ntrol.2023.105150>.
- Patten, C. L. & Glick, B. R. (2002). Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8), 3795-3801. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.8.3795-3801.2002>
- Penrose, D. M., & Glick, B. R. (2003). Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiology of Plants*, 118(1), 10-15. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2003.00086.x>.
- Pikovskaya, R. I. (1948). Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya*, 17, 362-70.
- Radwan, Wafaa, H., Abdelhafez, A., Mahgoub, E. & Zayed, M. (2024). *Streptomyces avermitilis* MICNEMA2022: A new biorational strain for producing abamectin as an integrated nematode management



agent. *BMC Microbiology*, 24(1), 58-62. <https://doi.org/10.1186/s12866-024-03466-3>.

Rashad, Ferial ., Hayam, M ., Ayatollah, S . & , M. (2015). Isolation and characterization of multifunctional *Streptomyces* species with antimicrobial , nematicidal and phytohormone activities from marine environments in Egypt. *Microbiological Research*, 175, 34-47. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.03.002>.

Ruanpanun, Pornthip. & Nimnoi, P. (2020). Evaluation on the efficiency and persistence of *Streptomyces Jietaisiensis* strain A034 in controlling root knot disease and promoting plant growth in the plant-parasitic nematode infested soils. *Biological Control*, 144. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104221>.

Ruanpanun, Pornthip., Hartmut, L., Nuchanart, T. & Saisamorn, L. (2011). Nematicidal activity of fervenulin isolated from a nematicidal actinomycete, *Streptomyces* Sp. CMU-MH021, on *Meloidogyne incognita*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(6), 1373-80. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0588-z>.

Schwyn, B. & Neilands, J. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160(1), 47-56. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9)

Sharma, Manish., Shivam, J., Puja, O. & Rajesh, K. M. (2019). Nematicidal potential of *Streptomyces antibioticus* strain M7 against *Meloidogyne Incognita*. *AMB Express*, 9(1), 1-8. doi: <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0894-2>.

Sperber, J. I. (1958). The incidence of apatitesolubilizing organisms in the rhizosphere and soil. *Australian Journal of Agricultural Research*, 9, 778-81. <https://doi.org/10.1071/ar9580778>

Sun, Maiu., Gao, L., Shi, Y. X., Li, B. J. & Liu, X. Z. (2006). Fungi and actinomycetes associated with *Meloidogyne* spp. Eggs and females in China and their biocontrol potentia. *Journal of Invertebrate Pathology*, 93, 22-28. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2006.03.006>.

Weisburg, Win., Barns, S. M., Pelletier, D. A. & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697-703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>

Whithead, Alex. & Hemming, J. R. (1965). A comparison of some quantitative methods of extracting small vermiform nematodes from soil. *Annals of Applied Biology*, 55, 25-38. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1965.tb07864.x>.