نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد 29، شماره 3، پاییز 1394، ص. 317-310

Journal of Plant Protection
Vol. 29, No. 3, Fall 2015, P. 310-317

اثرات آنتاگونیستی باکتری استرپتومایسس روی نماتد مولد گره ریشه کیوی

سمانه بشیری[1]- سالار جمالی[2*]- مرتضی گل محمدی[3]

تاریخ دریافت: 1392/07/23
تاریخ پذیرش: 1394/03/25

چکیده

به منظور بررسی تأثیر عوامل بیولوژیک در کنترل نماتد ریشه گرهی کیوی ، 100 جدایه باکتری از فراریشه درختان کیوی‌فروت شمال کشور جمع‌آوری شد. شناسایی باکتری‌های آنتاگونیست با استفاده از ویژگی‌های ریخت‌شناسی، بیوشیمیایی و مولکولی صورت گرفت. از 25 جدایه شناسایی شده به عنوان استرپتومایسس، 9 جدایه با کاهش تفریخ تخم در مدت هفت روز و مرگ و میر لاروها در مدت پنج روز، در شرایط آزمایشگاهی قابلیت آنتاگونیستی از خود نشان دادند. جدایه‌های *Streptomyces* sp3.، *Streptomyces* sp4.، *Streptomyces* sp5.، *Streptomyces* sp9. و *Streptomyces* sp12. به ترتیب با کاهش تفریخ تخم 16/29، 19/99، 27/11، 20/22 و 18/41 درصد و افزایش مرگ و میر لاروها به ترتیب 45، 33/3، 37/53، 35/01 و 37/50 درصد، بیشترین تأثیر را دارا بودند و جهت انجام آزمایش در شرایط گلخانه انتخاب شدند. جدایه‌های *Streptomyces* sp9. و *Streptomyces* sp4. در شرایط گلخانه به ترتیب با کاهش گال به میزان 65/35 و 64/56 درصد و در مقایسه با سم فنامیفوس 57/47 از عملکرد مطلوبی برخوردار بودند. با توجه به نتایج به‌دست آمده، باکتری استرپتومایسس می‌تواند به عنوان یکی از گزینه‌های تأثیر گذار در کنترل نماتد مولد گره ریشه مورد توجه قرار گیرد. این نخستین گزارش از کنترل زیستی نماتد ریشه گرهی کیوی به‌وسیله باکتری جنس استرپتومایسس است.

واژه‌های کلیدی: *Actinidia deliciosa*، کنترل زیستی، *Meliodogyne*، رایزوباکترها

مقدمه

ایران با سطح زیر کشت 9887 هکتار و تولید سالانه 217182 تن میوه کیوی، یکی از مهم‌ترین تولیدکنندگان کیوی در جهان محسوب می‌شود. استان‌های مازندران، گیلان و گلستان از جمله مناطق مناسب جهت کشت این محصول هستند (1). نماتد مولد گره ریشه (*Meloidogyne* spp.) سالانه به تنهایی موجب خسارت بیش از 100 میلیارد دلار به بخش کشاورزی می‌شود (20). چهار گونه اصلی این نماتد، شامل: *M. incognita*، *M. hapla*، *M. javanica* ، *M.arenaria* ازباغ‌های کیوی ایران گزارش شده و گونه *M. incognita* به عنوان گونه غالب و عامل اصلی محدودکننده توسعه کشت این محصول در مناطق شمالی کشور به شمار می‌رود (17). کاربرد نماتدکش‌های تدخینی هنوز یکی از راهبردهای اصلی جهت کنترل نماتدها می‌باشد. اگرچه نماتدکش‌های شیمیایی تأثیر سریعی در کنترل نماتد ها دارند ولی استفاده از آن‌ها در کشورهای توسعه یافته به دلیل مسائل زیست‌محیطی، منسوخ شده است (25). کاربرد روش‌های تلفیقی مانند کنترل زیستی می‌تواند جایگزینی مناسب برای کنترل شیمیایی نماتدهای انگل گیاهی محسوب شود زیرا فاقد خطرات زیست محیطی در زیست بوم‌های کشاورزی می‌باشد (8). کاربرد میکروارگانیسم‌های مفید خاک به ویژه باکتری‌ها، یکی از گزینه‌های مطرح در مدیریت صحیح این عوامل هستند. اکتینومیست‌ها از جمله باکتری‌های گرم مثبتی هستند که خاصیت نماتدکشی آن‌ها در چندین مورد به اثبات رسیده است (7). این گروه حدود 40 درصد از جمعیت باکتریایی را در محیط‌های خاکی تشکیل می‌دهند. اکتینومیست‌های مستقر در فراریشه گیاهان، ترکیباتی تولید می‌کنند که حدود 75 درصد از ترکیبات فعال زیستی را شامل می‌شوند (29). تعداد و نوع اکتینومیست‌های موجود در خاک تحت تأثیر موقعیت جغرافیایی و فاکتورهای مرتبط با خاک از جمله دما، بافت، اسیدیته، مواد آلی، رطوبت و هوادهی خاک و همچنین نوع کشت قرار می گیرد. صرفنظر از فراوانی اکتینومیست‌ها نسبت به سایر میکروارگانیسم‌های خاک، این گروه دارای جمعیت برتری از

1 و 2- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان
(*- نویسنده مسئول: (Email: Jamali@guilan.ac.ir)
3- استادیار مرکز تحقیقات مرکبات کشور، رامسر

استرپتومایسس‌های[1] متحمل به شرایط اسیدی هستند (5). یکی از مکانیسم‌های تاثیر باکتری‌های استرپتومایسس تولید آنتی بیوتیک‌ها می‌باشد. از جمله این موارد می‌توان به آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین، تتراسایکیلین، سیکلوهگزامید و سایر متابولیت‌های ثانویه اشاره کرد (18). برخی از استرپتومایسس‌ها به دلیل تولید متابولیت‌های کشنده، جهت کنترل نماتدهای انگل گیاهی استفاده می‌شوند (23). برطبق گزارش النقدی و یوسف، آبامکتین که متعلق به گروه آورمکتین است، از تولیدات تخمیری *Streptomyces avermitilis* بدست آمده و برای کنترل نماتد *M. incognita* در باقلا به‌کار می‌رود (10). هم‌چنین این ترکیب قادر به کنترل نماتد *Rotylenchulus reniformis* نیز می‌باشد (11). گونه‌هایی از *Streptomyces* با تثبیت نیتروژن، حلالیت مواد معدنی و تولید سیدروفور یا هورمون‌های گیاهی سبب افزایش رشد گیاه می‌شوند (7). توانایی تولید متابولیت‌های ثانویه متنوع، میزان رشد سریع، کلونیزه کردن نیمه‌انتخابی بستر رشد و قابلیت دستکاری ژنتیکی، این گروه را جهت تلقیح خاک مناسب ساخته است. علاوه‌براین، توانایی تشکیل اسپورهای مقام به خشکی جهت انتشار، پایداری و نوع فرمولاسیون، آنها را به عنوان عامل کنترل بیولوژیک موفق مطرح می‌سازد (2). هدف از انجام این تحقیق، بررسی و ارزیابی توان اکتینومیست‌های جدا شده از خاک‌های مناطق کاشت کیوی فروت در کنترل نماتد *Meloidogyne* spp. در شرایط آزمایشگاه و گلخانه بود.

مواد و روش‌ها

تعداد100 نمونه خاک از باغ‌های کیوی موجود در استان‌های شمالی کشور طی سال‌های 1390-1389 جمع‌آوری گردید. نمونه‌برداری پس از کنار زدن 3 سانتیمتر خاک سطحی و تا عمق 20 سانتی‌متری از مناطق ریزوسفر ریشه انجام شد. پس از ثبت مشخصات، نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل و در دمای اتاق به مدت 4 روز خشک شد تا از رشد قارچ‌های ساپروفیت در محیط کشت جلوگیری شود. مقدار یک گرم از هر نمونه در 100 میلی‌لیتر آب مقطر استریل سوسپانسیون و به مدت 30 دقیقه با سرعت 200 دور در دقیقه در دمای اتاق روی شیکر قرار گرفت. از محلول حاصل سری رقت 10^{-2} تا 10^{-5} تهیه شد. سپس 100 میکرولیتر از هر رقت در 3 تکرار روی محیط مخصوص کشت باکتری های استرپتومایسس شامل گلیسرول اسپاژین آگار[2] و کازیین نیترات نشاسته آگار[3] کشت داده و در دمای 28 درجه سانتی‌گراد به مدت 4 تا 7 روز نگهداری شدند (4). به هر یک از محیط‌های کشت جهت جلوگیری از آلودگی قارچی و باکتریایی، بعد از اتوکلاو نمودن، 2/5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک ریفامپیسین اضافه شد. پس از 7 روز پرگنه‌هایی با ظاهر خشک، پودری و رنگی انتخاب و جهت خالص‌سازی روی محیط کشت جدید استفاده شدند. کشت‌های خالص بعد از تکمیل دوره رشدی جهت مراحل بعدی آزمایش، در دمای 4 درجه سانتیگراد در یخچال نگه‌داری شدند. شناسایی پرگنه‌های مربوط به جنس استرپتومایسس از نظر ریخت‌شناسی و فیزیولوژیکی انجام شد (27). ریخت‌شناسی پرگنه با کشت جدایه‌های خالص شده روی محیط کشت آردجو آگار[4] بررسی شد، به این صورت که تشتک‌های پتری حاوی جدایه به مدت 21 روز در دمای 28 درجه سانتیگراد نگهداری شدند. سپس از سطح پرگنه‌ها مقطع‌گیری و زیر میکروسکوپ نوری مشاهده گردید. رنگ آن‌ها نیز به روش پراسر تشخیص داده شد (21). آزمون‌های مختلف بیوشیمیایی شامل: هیدرولیز کازئین، هیدرولیز نشاسته، هیدرولیز اوره، تحمل شوری و تحمل دما و غیره نیز انجام گرفت (24). به منظور تأیید مولکولی جنس جدایه‌های به‌دست‌آمده، PCR توسط پرایمرهای انتخابی اختصاصی SP1-F و SP2-R مربوط به ناحیه 16s rRNA انجام شد. حجم محلول واکنش PCR شامل: 0/2 مولار dNTP، 1/25 میکرولیتر MgCl2، 1/5 واحد Taq DNA Polymerase، 0/2میلی‌مولار از هر کدام از پرایمرها، 2/5 میکرولیتر بافر (10X) PCR بود. مستقیماً از پرگنه خالص باکتری به مقدار کم، با خلال دندان استریل برداشته و به‌آرامی به واکنش PCR اضافه گردید وحجم واکنش با آب دیونیزه شده به 25 میکرولیتر رسانده (31). تکثیر به کمک دستگاه ترموسایکلر (MJ Research, PTC- 200) و با برنامه واسرشت سازی اولیه 94 درجه سانتی‌گراد به مدت 2 دقیقه، واسرشت سازی ثانویه 94 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 ثانیه ، اتصال آغازگر 50 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 ثانیه، تکثیر قطعه 72 درجه سانتی‌گراد به مدت 2 دقیقه ، واسرشت سازی نهایی 72 درجه سانتی‌گراد به مدت 7 دقیقه انجام شد (19). محصول PCR روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شدند. رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید انجام و باندهای حاصل مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

استخراج تخم و لارو نماتد

جهت استخراج تخم نماتد از روش هوسی و بارکر (13) استفاده شد. جهت جلوگیری از آلودگی قارچی و باکتریایی، تخم‌ها با استفاده از 50 میلی‌گرم در لیتر تتراسایکلین و0/044 گرم بر لیتر سولفات استرپتومایسین ضدعفونی شد. روش سینی[5] و الک و سانتریفوژ (15) جهت استخراج لارو به‌کارگرفته شد. شناسایی گونه نماتد با استفاده از

1- Streptomyces
2- CGA Medium
3- SCA Medium
4- OMA Medium
5- Tray

بررسی برش شبکه کوتیکولی انتهای بدن نماتد ماده[1]، لاروهای سن دوم نماتد و به کمک منابع معتبر انجام گرفت (9).

ارزیابی جدایه‌هادر شرایط آزمایشگاه

بیست و پنج جدایه اکتینومیست علیه نماتد مولد گره در شرایط آزمایشگاه و به روش سان و همکاران (28) با اندکی تغییر به کار گرفته شد. به‌منظور بررسی میزان ممانعت از تفریخ تخم، جدایه‌های مورد نظر روی محیط پی دی آ [2] کشت و به مدت 5 تا 10 روز در دمای 25°C نگه‌داری شدند. یک دیسک 5 میلی‌متری از حاشیه پرگنه برداشته و به لوله‌های آزمایش 15 میلی‌لیتری حاوی 5 میلی‌لیتر توین 20[3] استریل 0/05 درصد منتقل شد. لوله‌ها به مدت 1 دقیقه به شدت تکان داده شدند تا اسپورها از سطح دیسک جدا و در محلول پخش شوند. تراکم اسپور با استفاده از لام هموسیتومتر[4] به 10^5 در هر میلی-لیتر رسانده شد. 50 میکرولیتر از سوسپانسیون تخم (حاوی 300 تخم) به تشتک پتری 5 سانتی‌متری حاوی یک میلی‌لیتر سوسپانسیون اسپور اضافه گردید. برای تیمار شاهد از توین 20 استریل 0/05 درصد فاقد اسپور استفاده شد. تشتک پتری‌ها در دمای 25 درجه سانتی‌گراد به مدت 7 روز نگه‌داری و به طور روزانه میزان تفریخ تخم بررسی گردید. در طرح کاملاً تصادفی برای هر نمونه 4 تکرار در نظر گرفته شد. درصد تفریخ تخم به‌وسیله شمارش کل تخم‌ها و لاروها زیر میکروسکوپ نوری و برطبق فرمول (100 × تعداد تخم‌ها و لاروها/ تعداد لاروها = درصد تفریخ تخم) انجام گرفت.

جهت ارزیابی مرگ و میر لاروها نیز از روش ذکر شده استفاده شد. در این بخش، از 50 میکرولیتر سوسپانسیون لارو (حاوی 100 لارو فعال و تازه تفریخ شده از تخم‌های استریل شده) استفاده شد. تشتک‌های پتری در دمای 25 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 روز نگهداری شدند و میزان مرگ و میر لاروها به طور روزانه بررسی گردید. برای هر نمونه 4 تکرار در نظر گرفته شد. لاروهایی که فاقد حرکت بوده و هم‌چنین لاروهای بدشکلی که به وسیله سوزن نیز تغییر حالت ندادند، به عنوان لارو مرده شمارش گردید. درصد میزان مرگ و میر لاروها به‌وسیله شمارش کل لاروهای زنده و مرده زیر میکروسکوپ نوری و برطبق فرمول (100× تعداد کل لاروها /تعداد لاروهای مرده =درصد مرگ و میر لاروها) محاسبه شد.

ارزیابی جدایه‌ها در شرایط گلخانه

جدایه‌هایی که در شرایط آزمایشگاه بیشترین تأثیر را داشتند، جهت انجام آزمایش در گلخانه انتخاب شدند. جهت انجام آزمون هریک از 5 جدایه به مدت 3-4 روز روی محیط کازیین نیترات نشاسته آگار رشد نمودند. سپس یک تک پرگنه از هر جدایه در داخل فلاسک ارلن‌مایر 250 میلی لیتری حاوی 50 میلی‌لیتر از محیط مایع عصاره مخمر و مالت[5] تلقیح شد. ارلن‌ها به مدت 5 روز در دمای اتاق و با سرعت 220 دور در دقیقه روی شیکر قرار گرفتند. پس از گذشت 5 روز، تمامی سویه‌ها در این محیط رشد کردند و سوسپانسیون کدری حاصل گردید. سوسپانسیون حاصل به مدت 10 دقیقه با سرعت 11000 دور در دقیقه سانتریفوژ و به رسوب به جامانده 100 میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه گردید. تراکم اسپور به‌مانند شرایط آزمایشگاهی به 10^5 اسپور در هر میلی‌لیتر رسانده شد. سوسپانسیون تهیه‌شده به طور کامل با خاک استریل به میزان 50 میلی‌لیتر برای هر گیاه مخلوط گردید. بعد از گذشت 4 روز هر نهال 6 ماهه کیوی رقم هایوارد به یک گلدان به حجم 30 سانتی‌مترمکعب حاوی خاک استریل (خاک شنی لومی 1:1) منتقل شد. بعد از 7 تا 10 روز از انتقال نهال‌ها، گلدان‌ها به وسیله‌ی لاروهای سن دوم فعال و ضد عفونی شده به میزان 50 میلی‌لیتر در هر گلدان (هر یک میلی‌لیتر حاوی 40 لارو یا در کل 2000 لارو سن دوم) تلقیح شدند. برای هر تیمار 4 تکرار در نظر گرفته و آزمون با استفاده از طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. گلدان‌های تلقیح شده به مدت 2 ماه در دمای 30 درجه سانتی‌گراد در گلخانه نگهداری و در طول این مدت آبیاری به طور منظم انجام گرفت. بعد از گذشت 2 ماه نهال‌ها جهت شمارش تعداد گال و کیسه تخم و همچنین توزین وزن تر ریشه مطابق روش شارما و همکاران(26) جمع‌آوری و به آزمایشگاه انتقال داده شدند. تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم‌افزار آماری SAS با درصد خطای 5 درصد به وسیله آزمون چنددامنه‌ای دانکن انجام گرفت.

نتایج

در این مطالعه از 100 جدایه مورد مطالعه، 25 جدایه به عنوان استرپتومایسس جداسازی و شناسایی شد. در این بین، تنها 9 جدایه قادر به کنترل نماتد مولد گره در شرایط آزمایشگاهی بودند (جدول 1).

جدایه‌های *Streptomyces* sp3.، *Streptomyces* sp4.، *Streptomyces* sp5.، *Streptomyces* sp9. و *Streptomyces* sp12. به ترتیب با کاهش تفریخ تخم 16/29، 19/99، 27/11، 20/22 و 18/41 درصد و افزایش مرگ و میر لاروها به ترتیب 33/30،45، 37/53، 35/01 و 37/50 درصد، بیشترین تأثیر دارا بودند و جهت انجام آزمایش در شرایط گلخانه انتخاب شدند. این جدایه‌ها

1- Prennial pattern
2- Potato Dextrose Agar(PDA)
3- Tween 20
4- Hemocytometer
5- Yeast Malt Extract

در گلخانه نیز به خوبی عمل کرده، به طوری‌که جدایه‌های *Streptomyces* sp9. و *Streptomyces* sp4. به ترتیب با کاهش گال به میزان 65/35 و 64/56 درصد و کاهش درصد کیسه تخم به میزان87/23 درصد در مقایسه با نماتدکش با 57/47 درصد کاهش گال و 84/25 کاهش درصد کیسه تخم عملکرد بهتری داشتند (جدول 2).

این 5 جدایه برای شناسایی قطعی انتخاب گردیدند. خصوصیات بیوشیمیایی بررسی شده در جدول 3 آورده شده است. نمایی از پرگنه برخی از جدایه‌ها در شکل 1 آمده است.

جهت حصول اطمینان از شناسایی جدایه ها، از روش مولکولی نیز استفاده شد. بعد از رنگ‌آمیزی ژل آگاروز با اتیدیوم بروماید، باندهای حاصله مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. نتایج به‌دست آمده نشان داد که هر 5 جدایه قادر به تکثیر باند اختصاصی درناحیه 500bp بوده و جنس استرپتومایسس تشخیص داده شدند (شکل 2).

جدول1- میزان تأثیر جدایه‌ها بر مرگ و میر لاروها و جلوگیری از تفریخ تخم نماتد مولد گره ریشه کیوی در شرایط آزمایشگاه

Table 1- The effect of isolates on mortality of larvae and prevent of hatching kiwi root knot nematode in vitro.

تیمار باکتری (Bacterial treatment)	درصد تفریخ تخم در 7 روز (Hatching in 7 days)	درصد مرگ و میر لاروها بعد از 5 روز (Larval death after 5 days)
Streptomyces sp1.	29.83d	10.42g
Streptomyces sp2.	28.50e	14.28f
Streptomyces sp3.	16.29i	45a
Streptomyces sp4.	19.99g	33.30d
Streptomyces sp5.	27.1f	37.53b
Streptomyces sp7.	37.78c	18.52e
Streptomyces sp9.	20.22g	35.01c
Streptomyces sp12.	18.41h	37.50b
Streptomyces sp20.	40.23b	8.72h
شاهد (Negative control)	84.36a	4.3i

اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار ($P<0.05$) نمی‌باشند

Numbers followed by the same letter are not significantly differentns ($P<0.05$)

2- میزان تأثیر جدایه‌ها بر نماتد ریشه گرهی کیوی در شرایط گلخانه

Table 1- The effect of isolates on kiwi root knot nematode in greenhouse

تیمار باکتری (Bacterial treatment)	وزن تر ریشه (Fresh weight of root)	تعداد گال (Number of gall)	درصد کاهش گال (Decrease precentage of gall)	تعداد کیسه تخم (Number of egg mass)	درصد کاهش کیسه تخم (Decrease precentage of egg mass)	شاخص کیسه تخم / گال (Index of egg mass/ gall)
Streptomyces sp3.	19.76c	36c	57.47	12.33b	84.25	6 / 4
Streptomyces sp4.	20.42c	30cd	64.56	10b	87.23	5 / 3
Streptomyces sp5.	17.81d	45b	46.84	16b	79.57	6 / 4
Streptomyces sp9.	21.33b	29.33d	65.35	10b	87.23	5 / 3
Streptomyces sp12.	20.14c	38bc	55.11	12.33b	84.25	6 / 4
گیاه آلوده به نماتد (Infected plant with nematode)	11.44e	84.66a	-	78.33a	-	8 / 8
نماتدکش فنامیفوس (Fenamiphos)	19.76c	36cd	57.47	12.33b	84.25	6 / 4
گیاه غیرآلوده (Uninfected plant)	24.22a	0e	0	0c	-	1 / 1

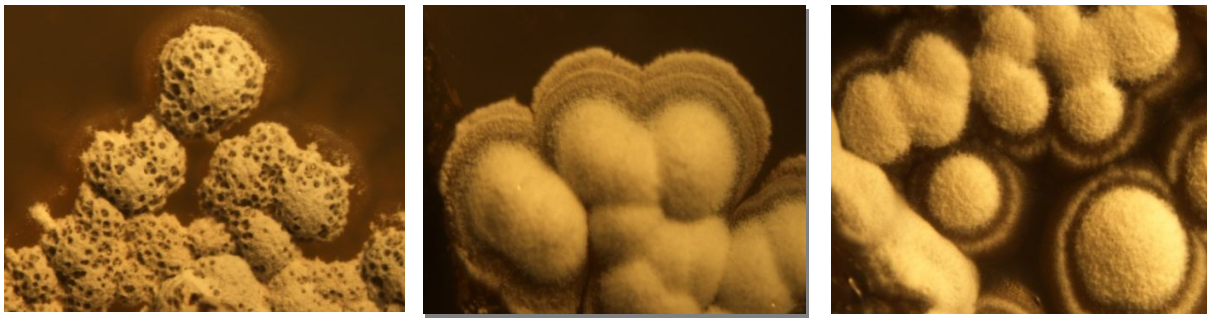
شاخص گال و کیسه تخم: 1: فاقد گال و کیسه تخم، 2: 1-5، 3: 6-10، 4: 11-20، 5: ۲۱-۳۰، 6: 31-50، 7: 51-70، 8: 71-100 و 9: بیشتر از 100 . اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار ($P<0.05$) نمی‌باشند

Gall index; Egg mass index: 1 = no galls or egg masses, 2 = 1-5, 3 = 6-10, 4 = 11-20, 5 = 21-30, 6 = 31-50, 7 = 51-70, 8=71-100 and 9 >100 galls or egg masses / plant (32). Numbers followed by the same letter are not significantly differentns($P<0.05$).

جدول3- خصوصیات بیوشیمیایی جدایه های استرپتومایسس انتخاب شده برای آزمون گلخانه

Table 3- Biochemical characteristics of selected Streptomyces isolates for greenhouse test

ویژگی‌های بیوشیمیایی (Biochemical characteristic)	3	4	5	9	12
آزمون کاتالاز (Catalase test)	+	+	+	+	+
آزمون اکسیداز (Oxidase test)	-	-	-	-	+
هیدرولیزنشاسته (Starch Hydrolysis)	+	+	+	+	+
هیدرولیز ژلاتین (Gelatin Hydrolysis)	+	-	-	+	-
آزمون احیای نیترات (Nitrate reduction)	+	-	-	-	+
اوره آز (Urease)	-	+	-	+	+
رشد دردمای 28 درجه سانتیگراد (Growth in 28˚C)	+	+	+	+	+
رشد در دمای 37 درجه سانتیگراد (Growth in 37˚C)	+	+	+	+	+
رشد در دمای 50 درجه سانتیگراد (Growth in 50˚C)	+	-	-	-	-
رنگ روی پرگنه (روی محیط کازیین نیترات نشاسته آگار) (Color on colony in SCA Medium)	خاکستری (Gray)	سفید (White)	خاکستری روشن (Light gray)	کرم (Cream)	قرمز (Red)
رنگ پشت پرگنه (روی محیط کازیین نیترات نشاسته آگار) (Color behind colony in SCA Medium)	مغز پسته‌ای (Pistachio)	خردلی (Mustard)	خردلی (Mustard)	کرم (Cream)	قرمز (Red)
رنگ روی پرگنه (روی محیط آرد جو آگار) (Color on colony in OMA Medium)	خاکستری روشن (Light gray)	خاکستری تیره (Dark gray)	خاکستری تیره (Dark gray)	شیری (Milky)	صورتی روشن (Light pink)
رنگ پشت پرگنه (روی محیط آرد جو آگار) (Color behind colony in OMA Medium)	خردلی (Mustard)	مغز پسته‌ای (Pistachio)	خاکستری روشن (Light gray)	زرد تیره (Dark yellow)	صورتی تیره (Drak pink)
رشد در نمک 5 و 6% (Growth in 5 and 6% salt)	+	+	+	+	+

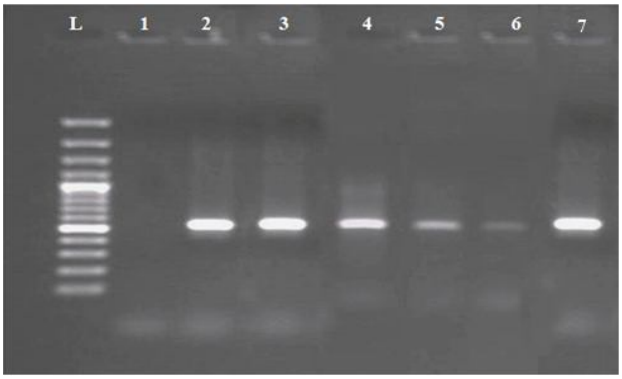


شکل 1- نمایی از پرگنه‌های استرپتومایسس‌های مورد بررسی (عکس اصلی)

Figure 1- View of Streptomyces colonies tested (Photo Gallery)

بحث

کیوی یکی از محصولات باغی مهم در شمال کشور محسوب می‌شود که در چند سال اخیر سطح زیر کشت و میزان تولید آن رشد قابل توجهی داشته است. در بین عوامل بیماریزای تهدید کننده کشت این محصول، نماتد ریشه گرهی به‌دلیل انتقال از طریق نهال و خاک آلوده به راحتی گسترش یافته و کنترل آن از اهمیت خاصی برخوردار است. از جمله میکروارگانیسم‌های مفید در کنترل زیستی این نماتد، باکتری‌های آنتاگونیست می‌باشد. نتایج نشان داد که جدایه‌های *Streptomyces* sp9. و *Streptomyces* sp4. دارای بیشترین تأثیر در کنترل نماتد مولد ریشه گرهی کیوی در شرایط گلخانه بودند. این نتایج با یافته‌های سایر محققین در این زمینه مطابقت نشان می‌دهد.



شکل2- قطعات تکثیرشده به روش PCR با جفت پرایمر اختصاصی sp1 و sp2 در ژل آگاروز 1 درصد. چاهک‌های 1-7 به‌ترتیب از چپ به راست: کنترل منفی، کنترل مثبت و جدایه 3، 4 ،5 ،9 و12 اکتینومیست. L نشانگر با اندازه bp 100.

Figure 2- Agarose gels showing products of polymerase chain reaction (PCR) performed with following primer sets: sp1/ sp2. 100bp Plus DNA marker, lane 1) water(negative control), lane 2) *Streptomyces sp.* (positive control), lane 3) isolate 3, lane 4) isolate 4, lane5) isolate5, lane6) isolate 9 and lane7) isolate12

گونه‌های مختلف *Streptomyces* توانایی قابل قبولی در کنترل نماتـدهای انگـل گیـاهی دارنـد بـه نحـوی کـه *Streptomyces costaricanus* در شرایط گلخانه قادر به کنترل نماتـد *incognita*. *M* بوده است (6). تمام جدایه‌های استفاده شده در بخـش گلخانـه از توانایی لازم در کاهش گال و کیسه تخم نماتد برخـوردار بودنـد. بـه طریق مشابه، چن و همکاران در آزمایشات خود به این نتیجه رسیدند که باکتری.*Streptomyces* sp قادر به کاهش تشکیل گـال و تخـم نماتد مولد غده روی کاهو مـی‌باشـد (3). ایـن جدایـه‌هـا در شـرایط آزمایشگاه نیـز سـبب مـرگ و میـر و کـاهش تفـریخ تخـم شـدند. متابولیـــت‌هـــای تولیدشـــده بـــه وســـیلهٔ *Streptomyces avermitilis*،*S.costaricanus* ، *S.griseus* ، *S .lavendulae* ، *S. saraceticus* سبب مرگ و میر لاروها و کاهش تفریخ تخم در نماتد مولد غده شده‌اند (30). کیم و همکاران (16) استرین *Streptomyces sampsonii* KK1024 را به عنوان یکی از عوامل موفـق در کنتـرل زیستی معرفی کردند. تأثیر جدایه‌ها بر وزن ریشه نیز قابل توجه بوده است. تولید ریشه سبب رشد اندام‌هـای هـوایی و در نتیجـه افـزایش مقاومت گیاه در برابر حمله عوامل بیماری‌زا از جمله نماتدها می‌شود. امروزه آبامکتین تولید شده از استرپتومایسس به نام آویکتـا[1] تجـاری سازی شده و جهت تیمار بذرهای کتان و سبزیجات علیه نماتـدهای انگل گیاهی با دامنه میزبانی وسیع استفاده می‌شود. این ماده در مسیر ریشه‌چه‌های در حال رشد در بذرهای تیمار شـده حرکـت کـرده و از گیاهان جوان در برابر آلودگی به نماتد محافظت می‌کند (12). جدایه *Streptomyces* sp3. سبب کاهش تفـریخ تخـم بـه میـزان 16/29 درصد و افزایش مرگ و میر لارو به میزان 45 درصد در مقایسـه بـا شاهد (84/36 درصد تفریخ تخم و4/3 درصد مرگ و میر لارو) گردید. نتایج به‌دست آمده مؤید تحقیق انجام شده به‌وسیله جایاکومـار روی جدایه Manp *Streptomyces avermitilis* مـی‌باشـد. ایـن جدایـه سبب کاهش میزان تفریخ تخم به 15/73درصد و افزایش میزان مرگ و میر لارو به 68/58 درصد شده است (14). هم‌چنین، روآن پانون و همکارانش در تحقیقات خـود بـه ایـن نتیجـه رسـیدند کـه جدایـه *Streptomyces* sp. CMU-MH021 سبب کاهش تفریخ تخـم بـه میزان 33/1 درصد و افزایش مـرگ و میـر بـه میـزان 82 درصـد در مقایسه با شاهد (به ترتیب با میزان 79/6 و 3/6 درصد تفریخ تخم و مرگ و میر لارو) می‌شود (22). نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که باکتری استرپتومایسس می‌تواند به عنوان یکـی از بـاکتری‌هـای آنتاگونیست در جهت کنترل زیستی نماتد مولد غده مورد استفاده قرار گیرد. بدین منظور پیشنهاد می‌شود ضمن تعیین گونـه، بررسـی‌هـای تکمیلی از جمله مشخص کردن ساز وکار عمل بـاکتری و اسـتخراج آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر در کنترل و هم‌چنین ارزیابی درصد کنترل نماتد مولد گره ریشه در شرایط باغ صورت گیرد.

منابع

1- Anonymous. 2011. Agriculture data collection, Ministry of Agriculture. Planning and Economic Assistance, Office of Statistics and Information Technology. Tehran. Iran.

1- Avicta

2- Benimeli C.S., Castro G.R., Chaile A.P., and Amoroso M.J. 2007. Lindane uptake and degradation by aquatic *Streptomyces* sp. strain M7. Journal of International Biodeterioration and Biodegradation, 59:148-155.
3- Chen J., Abawi G.S., and Zuckerman B.M. 2000. Efficacy of *Bacillus thurigensis*, *Paecilomyces marquandii*, and *Streptomyces costaricanus* with and without organic amendments against *Meloidogyne hapla* infecting lettuce. Journal of Nematology, 32:70-77.
4- Cochrane V.W. 1961. Physiology of Actinomycetes. Annual Review Microbiology, 15:1-26.
5- Davies F.L., and Williams S.T. 1970. The occurrence and distribution of actinomycetes in a pine forest soil. Soil Biochemistry, 2:227-238.
6- Dicklow M.B., Acosta N., and Zuckerman B.M. 1993. A novel *Streptomyces* species for controlling plant-parasitic nematodes. Journal of Chemical Ecology, 19:159-173.
7- Dimkpa C., Svatoš A., Merten D., Büchel G., and Kothe E. 2008. Hydroxamate siderophores produced by *Streptomyces acidiscabies* E13 bind nickel and promote growth in cowpea (*Vigna munguiculata* L.) under nickel stress. Canadian Journal of Microbiology, 54:163-172.
8- Dong L.Q., and Zhang K.Q. 2006. Microbial control of plant-parasitic nematodes: a five-party interaction. Plant Soil, 288:31-45.
9- Eisenback J.D., Hirschmann H., Sasser J.N., and Triantaphyllou A.C. 1981. A guide to the four most common species of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.),with a pictorial key.
10- El-Nagdi W.M.A., and Youssef M.M.A. 2004. Soaking faba bean seed in some bio-agents as prophylactic treatment for controlling *Meloidogyne incognita* root–knot nematode infection. Journal of Pest Science, 77:75-78.
11- Faske T.R., and Starr J.L. 2006. Sensitivity of *Meloidogyne incognita* and *Rotylenchulus reniformis* to abamectin. Journal of Nematology, 38:240-244.
12- Hallmann J., Hallmann A., Miller W.G., Sikora R., and Lindow S.E. 2001. Endophytic coloniza-tion of plants by the biocontrol agent *Rhizobium etli* G12 in relation to *Meloidogyne incognita* infestation. Phytopathology, 91:415-422.
13- Hussey R.S., and Barker K.R. 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. Plant Disease Reporter, 57:1025-1028.
14- Jayakumar J. 2009. *Streptomyces avermitilis* as a biopesticide for the management of root knot nematode, *Meloidogyne incognita* in tomato. karnataka journal of agricultural science, 22:564-566.
15- Jenkins W.R. 1964. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. Plant Disease Reporter, 48:692.
16- Kim S., Kang S., Kim J., Lee Y., and Hong S. 2011. Biological control of root-kont nematode by *Streptomyces sampsonii* KK1024. Korean Journal of Soil Science Fertility, 44:1150-1157.
17- Maafi, Z. T. and Mahdavian, E. 1997. Species and physiological races of root knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) on kiwifruit and the effect of *M. incognita* on kiwifruit seedlings. Iranian Journal of Applied Enthomology and Phytopathology, 65:1-11. (in Persian with English abstract)
18- Malkawi H.I., Saadoun I., Moumani F.A., and Meqdam M.M. 1999. Use of rapid PCR fingerprinting to detect genetic diversity of soil *Streptomyces* isolates. New Microbiology, 22:53-58.
19- Oka Y., Shuker S., and Tkachi N. 2009. Nematicidal efficacy of MCW-2, a new nematicide of the fluoroalkenyl group, against the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. Pest Management Science, 65:1082-1089.
20- Prauser H. 1964. Aptness and application of colour codes for exact description of colours of streptomycetes. Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie, 4:95-98.
21- Ruanpanun P., Tangchitsomkid N., Hyde K.D., and Lumyong S. 2011. Actinomycetes and fungi isolated from plant-parasitic nematode infested soils: screening of the effective biocontrol potential, indole-3- acetic acid and siderophore production. World Journal of Microbiology Biotechnology, 27:1373-1380.
22- Samac D.A., and Kindel L.L. 2001. Suppression of the root-lesion nematode (*Pratylenchus penetrans*) in alfalfa (*Medicago sativa*) by *Streptomyces* spp. Plant Soil, 235:35-44.
23- Schaad N.W., Jones J.B., and Chun W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3nd Ed. APS Press.
24- Schneider S.M., Rosskopf E.N., Leesch J.G., Chellemi D.O., Bull C.T., and Mazzola M. 2003. Research on alternatives to methyl bromide: preplant and post-harvest. Pest Management Science, 59: 814-826.
25- Sharma R.D. 1994. *Bacillus thuringiensis*, A biocontrol agent of *Meloidogyne incognita* on barley. Nematologia Brasileira, 18:79-84.
26- Shirling E.B., and Gottlieb D. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. International Journal of Systematic Bacteriology, 16:313-340.
27- Sun M.H., Li G., Shi Y.X., Li B.J., and Liu X.Z. 2006. Fungi and actinomycetes associated with *Meloidogyne* spp. eggs and females in China and their biocontrol potential. Journal Invertebrate Pathology, 93:22-28.
28- Suzuki S., Yamamoto K., Okuda T., Nishio M., Nakanishi N., and Komatsubara S. 2000. Selective isolation and distribution of *Actinomadura rugatobispora* strains in soil. Actinomycetologica, 14:27-33.
29- Takatsu T., Horiuchi N., Ishikawa M., Wanibuchi K., Moriguchi T., and Takahashi S. 2003. A novel nematocide

from *Streptomyces lavendulae* SANK 64297. Journal of Antibiotics, 56:306-309.
30- Tsuchizaki N., Hamada M., and Hotta K. 2001. Rapid characterization by colony direct PCR of distribution specificity in *Streptomyces* of *kan* gene encoding a specific aminoglycoside-3-*N*-acetyltransferase. Actinomycetologica, 15:23-29.
31- Zeck W.M. 1971. A Rating Scheme for Field Evaluation of Root-knot Nematode Infestations. Pflanzenschutz-Nachrichten. Bayer AG, 24:141-144.