توانایی اکتینومیست‌ها در کنترل زیستی برخی قارچ‌های بیمارگر و نماتد مرکبات در شرایط آزمایشگاهی

سینا نوری‌زاده[1]، سالار جمالی[2*]، مرتضی گل‌محمدی[3] و حسن پدرام‌فر[4]

[1] دانشجوی کارشناسی ارشد گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

[2] استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

[3] استادیار پژوهش موسسه تحقیقات مرکبات کشور، رامسر

[4] مربی گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

*مسئول مکاتبه jamali@guilan.ac.ir

تاریخ دریافت: 91/12/23 تاریخ پذیرش: 92/10/05

چکیده

نماتد مرکبات، *Tylenchulus semipenetrans* ، دارای گسترش جهانی بوده و یکی از عوامل سرخشکیدگی در باغ‌های مرکبات محسوب می‌شود. آلودگی توأم نماتد و قارچ‌های بیمارگر، تأثیر مضاعفی بر رشد گیاه می‌گذارد. به‌منظور بررسی اثر اکتینومیست‌ها در کنترل نماتد و بیمارگرهای ثانویه، تعداد 30 نمونه خاک آلوده از فراریشه مرکبات شرق استان گیلان و غرب استان مازندران جمع‌آوری شدند. در نتیجه20 جدایه اکتینومیست با استفاده از کشت روی محیط-های انتخابی جداسازی و اثر آن‌ها در تفریخ تخم و مرگ‌ومیر لاروها مورد ارزیابی قرار گرفت. در آزمایشی دیگر، تاثیر اکتینومیست ها بر قارچ‌های بیماری‌زای *Fusarium oxysporum*، *Fusarium solani* ، *Penicilium digitatum* ، *Rhizoctonia solani*، *Pestaliopsis* spp و *Colletotrichum gloeosporioides* بررسی شد. در آزمون اول، هشت جدایه با توان کاهش میزان تفریخ تخم در مدت هفت روز و کشتن لاروها در طول چهار روز، از قابلیت آنتاگونیستی خوبی برخوردار بودند. در آزمون دوم، شش جدایه موفق به کنترل قارچ‌های بیمارگر موردمطالعه شدند. جدایه *Streptomyces* sp. IGM05 بیش‌ترین توانایی را در کنترل قارچ‌های بیمارگر نشان داد در حالیکه جدایه *Streptomyces* sp. IGM17 با کاهش تفریخ تخم به میزان 37/2 درصد و مرگ‌ومیر 52/4 درصدی لاروها، توانایی آنتاگونیستی بالایی در برابر نماتد بروز داد.

واژه‌های کلیدی: استرپتومایسس، آنتاگونیست، قارچ، *Tylenchulus semipenetrans*

مقدمه

مرکبات با سطح زیر کشت 8719469 هکتار و تولید 124414078 تن دومین محصول باغی مهم دنیا می-باشد. کشور ایران با سطح زیر کشت 239832 هکتار و تولید 4022256 تن، مقام هفتم جهان را داراست (بی نام 1389). نماتدهای انگل گیاهی سبب ایجاد خسارت و کاهش عملکرد در محصولات کشاورزی می‌شوند (کوریه و توماس 2006). نماتد مرکبات *Tylenchulus semipenetrans*، یکی از مهم‌ترین نماتدها به لحاظ میزان خسارت و انتشار است که باعث کاهش محصول و زوال تدریجی[1] مرکبات می‌گردد. این نماتد برای

[1] slow decline

اولین بار توسط هوجز[2] در سال 1912 روی ریشه پرتقال در کالیفرنیا مشاهده و گزارش شد. سپس در سال 1913 توسط کاب[3] معرفی و تشریح گردید (دانکن 2005). در ایران، اولین بار توسط سفریان و ایزدپناه (1347) روی مرکبات در ملاثانی اهواز مشاهده و در همان سال نیز به‌وسیله امیدوار از شیراز گزارش شد. علایم آلودگی نماتد بر اساس شرایط محیطی و نوع میزبان متفاوت است، میزان آلودگی هم‌زمان با حمله قارچ‌های بیمارگر و تنش‌های آبی تشدید می‌شود (دانکن 1999). به‌دلیل چسبیدن ذرات خاک به توده ژلاتینی تخم که توسط نماتد ماده ترشح می شود، ریشه‌های آلوده اندکی ضخیم‌تر و کثیف‌تر از ریشه‌های سالم به‌نظر می‌رسند. آستانه خسارت اقتصادی نماتد در مناطق مختلف متفاوت بوده و به عواملی مانند قدرت تهاجم نماتد، نوع خاک، پایه درخت، بیماری‌های دیگر و نحوه مدیریت باغ بستگی دارد (دانکن و کوهن 1990، وردجو و مک‌کنی 2004).

میزان خسارت این نماتد بین 10 تا 30 درصد برآورد شده است (دانکن و کوهن 1990). این نکته حکایت از توان بالقوه نماتد در ایجاد خسارت داشته و لزوم توجه به کنترل آن را روشن می‌سازد. استفاده از نماتدکش‌ها با مشکلاتی چون ناپایداری آن‌ها در محیط همراه است. هم‌چنین در اثر استفاده طولانی‌مدت از این مواد، جمعیت‌های مقاومی از نماتدها ظهور یافته و تعداد آن‌ها به‌سرعت افزایش پیدا می‌کند (جاتالا 1986). علاوه بر این، آثار زیان‌بار استفاده از سموم و تأثیرات آن‌ها بر محیط زیست، سلامتی انسان و دیگر جانوران را نباید از نظر دور داشت. بنابراین استفاده از روش‌های جای‌گزین مناسب در کنترل تلفیقی قابل طرح و بررسی است (اندرسون و لافورزا 1992، موئنز و همکاران 2004، گاون و همکاران 2005). میکروارگانیزم‌های رشدیافته در فراریشه گیاه به‌عنوان اولین سدهای دفاعی عمل نموده و گزینه مطلوبی جهت کنترل زیستی محسوب می‌شوند. باکتری‌ها توان بالایی جهت مدیریت نماتدهای انگل گیاهی در شرایط آزمایشگاه و گلخانه از خود نشان داده‌اند (سیکورا و همکاران 2007). آگاهی درمورد باکتری‌های آنتاگونیست نماتدها و بررسی سازوکار فعالیت آن‌ها، منجر به معرفی جدایه‌هایی با توانایی آنتاگونیستی بالا شده و نتایج خوبی را به همراه داشته است (تیان و همکاران 2007). اکتینومیست‌ها گروهی از باکتری‌های گرم مثبت هستند که از ویژگی-های ریخت‌شناختی و عملکردی متنوعی برخوردار بوده و دارای تولیدات متابولیکی مختلفی از جمله آنزیم‌های هیدرولیتیک (تجزیه‌کننده دیواره سلولی قارچ‌ها) و آنتی-بیوتیک‌ها هستند (تاکیساوا و همکاران 1993). اکثر آن‌ها به جنس *Streptomyces* تعلق دارند. گونه‌های مختلف این جنس از توانایی بالایی در کنترل نماتدهای انگل گیاهی برخوردارند (دیکلو و همکاران 1993، ساماک و کیندل 2001، سان و همکاران 2006). برهم‌کنش برخی قارچ‌های بیماری‌زا و نماتد در تشدید خسارت وارده به مرکبات، امکان به‌کارگیری اکتینومیست‌ها در کنترل زیستی آن‌ها را جذاب‌تر می‌سازد (پاول 1971). تعدادی از اکتینومیست‌ها برای کنترل سایر عوامل خسارت‌زا از جمله قارچ‌های بیمارگر گیاهی نیز به‌کار گرفته شده اند (پراباواتی و همکاران 2006، یو و همکاران 2008). هدف از انجام این تحقیق، جداسازی و شناسایی اکتینومیست‌های موجود در فراریشه درختان مرکبات و بررسی اثر آن‌ها در کنترل نماتد و قارچ‌های بیماری‌زای این محصول در شرق گیلان و غرب مازندران می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری

طی ماه‌های مختلف سال 1389، نمونه‌ها از عمق 30 تا 40 سانتی‌متری خاک چهار نقطه از ناحیه سایه‌انداز هر درخت انتخاب و پس از مخلوط کردن آن‌ها، تعداد 30 نمونه خاک با وزن تقریبی یک‌ونیم کیلوگرم همراه

[2] Hodges
[3] Cobb

با ریشه مربوطه از باغ‌های مرکبات شرق گیلان (لنگرود، چابکسر، چایخانسر و رحیم‌آباد) و غرب مازندران (عباس‌آباد، کاظم‌آباد، سلمان‌شهر، کتالم، نیاسته، چالوس ، رامسر و جنت‌رودبار) جمع‌آوری گردید.

جداسازی اکتینومیست‌ها

جهت جداسازی اکتینومیست‌ها، ابتدا هر نمونه خاک به‌مدت یک روز در دمای 28 درجه سانتی‌گراد خشک گردید. سپس 10 میلی‌لیتر آب مقطر استریل به یک گرم نمونه افزوده شده و رقت‌های مختلفی با غلظت های 10^4، 10^3 و 10^5 واحد تشکیل‌دهنده کلنی (CFU) بر گرم خاک تهیه گردید. جدایه‌ها روی محیط سی‌جی-ای[4] (کازیین 0/3 گرم، نیترات‌پتاسیم 2 گرم، سولفات منیزیم 0/05 گرم، دی‌پتاسیم‌هیدروژن‌فسفات 2 گرم، کربنات‌کلسیم 0/02 گرم، سولفات‌آهن 0/01 گرم، آگار 20 گرم که بعد از حل‌کردن در یک لیتر آب مقطر و گرم‌کردن، 10 سی‌سی گلیسرول به آن اضافه می‌شود، pH= 7) کشت شدند. به‌منظور حذف قارچ‌های پوده-رست، بعد از اتوکلاوکردن محیط فوق در دمای 50 درجه سانتی‌گراد، آنتی‌بیوتیک ریفامپسین با غلظت 0/2 گرم در لیتر به محیط‌کشت اضافه گردید. پرگنه‌ها در زیر بینوکلر مورد بررسی قرارگرفتند. آن‌هایی که دارای میسیلیوم هوایی و ظاهر سفید گچی یا رنگ‌های دیگر بودند، انتخاب و جهت تهیه کشت خالص، تجدید کشت شدند (سان و همکاران 2006).

شناسایی اکتینومیست‌ها

به‌منظور شناسایی سریع اکتینومیست‌ها از روش کلنی- پی‌سی‌آر[5] استفاده شد. این روش با اندکی تفاوت، شبیه به روش پی‌سی‌آر اما سریع‌تر از آن عمل می‌کند (درویشی هرزویلی و همکاران 1385). در این روش، به جای استخراج دی‌ان‌ای و استفاده از دی‌ان‌ای خالص برای آزمون پی‌سی‌آر به‌صورت مستقیم، مقدار بسیار کمی از باکتری استفاده شد. بدین‌ترتیب که یک قطعه از پرگنه رشدیافته به لوله‌های اپندورف 1/5 میلی‌لیتری حاوی آب مقطر استریل منتقل گردید. سپس در زیر لوپ در آب مقطر له شده و ورتکس گردید. ترکیب حاصل در واکنش پی‌سی‌آر، مورد استفاده قرار گرفت.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم 15 میکرولیتر شامل پنج میکرولیتر بافر واکنش[6] از شرکت فرمنتاز، پنج میکرولیتر آب استریل ، 10 پیکومول از هر آغازگر و سه میکرولیتر سوسپانسیون باکتری با استفاده از دستگاه ترموسایکلر پس از بهینه‌سازی، طبق برنامه زیر صورت گرفت (شین پارک و همکاران 2006): واسرشت‌سازی اولیه در دمای 94 درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه، 35 چرخه به‌ترتیب با دمای واسرشت 94 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 ثانیه، دمای چسبیدن 50 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 ثانیه، دمای تکثیر 72 درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه و در انتها تکثیر نهایی در دمای 72 درجه سانتی‌گراد به مدت هفت دقیقه انجام شد. پرایمرهای اختصاصی sp1 و sp2 ناحیه 16s rRNA با توالی‌های 5′- ACAAGCCCTGGAAACGGGGT -3′ (forward) و 5′- CACCAGGAATTCCGATCT -3′ (reverse) مورد استفاده قرار گرفت. محصولات پی‌سی‌آر، توسط الکتروفورز با ژل 0/1 درصد آگاروز بررسی شدند.

سنجش فعالیت آنتاگونیستی روی نماتد

تخم نماتد از ریشه‌های آلوده استخراج (بزویجن 2006) و سوسپانسیون حاصل با سولفات‌مس (0/1 درصد) به مدت 30 دقیقه و سولفات‌استرپتومایسین (0/2 درصد) به مدت 24 ساعت ضدعفونی گردید. بعد از انجام هر مرحله ضدعفونی، تخم‌ها سه بار با آب مقطر استریل روی الک 500 مش اتوکلاوشده، شست‌و-

[4] CGA
[5] Colony-PCR
[6] Master mix

شو داده شدند. به‌منظور انجام این آزمون، از 20 جدایه اکتینومیست که در مرحله قبل خالص شده بودند، استفاده گردید. طبق روش سان و همکاران (2006)، اکتینومیست‌های کشت‌شده روی محیط سی‌جی‌ای، به مدت هفت روز در انکوباتور نگهداری شدند. توده‌ای 0/5 میلی‌متری از حاشیه هر پرگنه به درون لوله‌های حاوی پنج میلی‌لیتر توین هشتاد 0/05 درصد استریل، منتقل گردید. لوله‌ها به مدت یک دقیقه به‌شدت تکان داده شدند تا سوسپانسیون یکنواختی از اسپور تهیه شود. غلظت اسپور 10^6 در یک میلی‌لیتر تنظیم گردید. آزمون‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار انجام شد. 40 میکرولیتر از سوسپانسیون یکنواخت تخم (حاوی 250 تا 300 تخم) در داخل هر پتری ریخته شد. سپس یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپور حاوی توین هشتاد 0/05 درصد افزوده گردید. به شاهد نیز توین فاقد اسپور اضافه شد. پتری‌ها به مدت هفت روز در دمای اتاق نگه‌داری شده و اطلاعات لازم شامل میزان مرگ‌ومیر لارو و تفریخ تخم به‌صورت روزانه و از فرمول زیر محاسبه شد (سان و همکاران 2006):

(کل‌تخم‌ها) / (لاروهای تفریخ شده) = میزان تفریخ تخم‌ها

(کل لاروها)/ (لاروهای مرده)= مرگ‌ومیر لاروها

سنجش فعالیت آنتاگونیستی روی قارچ‌های بیمارگر

گونه‌های *Rhizoctonia solani*، *Fusarium solani*، *Colletotrichum gloeosporioides*، *Pestaliopsis* spp و *Penicilium digitatum* به‌عنوان قارچ‌های بیماری‌زای مهم مرکبات از کلکسیون موسسه تحقیقات مرکبات کشور دریافت گردید. قارچ‌ها روی محیط پی‌دی‌ای کشت و در انکوباتور 25 درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. قطعه پنج میلی‌متری از حاشیه پرگنه هفت‌روزه قارچ، در مرکز پتری حاوی محیط کشت قرار گرفت، سپس به فاصله دوسانتی‌متری از حاشیه پتری، دو قطعه پنج میلی‌متری از اکتینومیست هفت‌روزه، در مقابل قارچ قرار داده شد. پتری‌ها به مدت 10 روز در دمای 28 درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند (خامنا و همکاران 2009). میزان رشد قارچ‌ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

(100×رشد شاهد) / (رشد تیمار – رشد شاهد)

داده‌های حاصل با استفاده از نرم افزارSAS تجزیه شدند. مقایسه میانگین‌ها با آزمون چنددامنه‌ای دانکن انجام گرفت.

نتایج و بحث

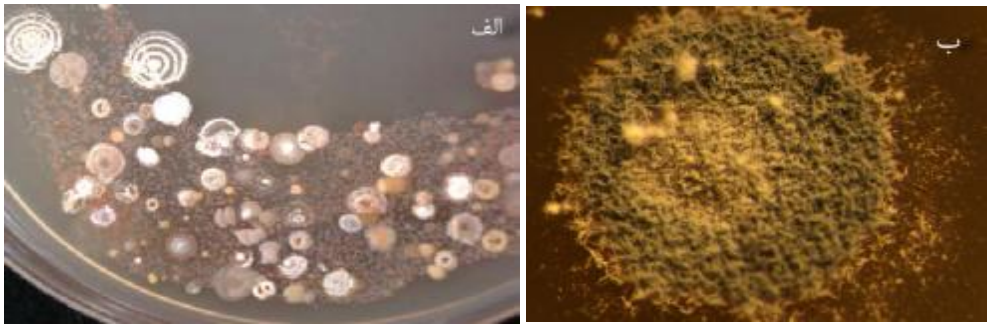
شناسایی اکتینومیست‌ها

شناسایی ابتدایی اکتینومیست‌ها از روی ریخت-شناسی، بر پایه نوع و رنگ پرگنه، تولید میسیلیوم هوایی و آزمون گرم صورت پذیرفت. این گروه، باکتری‌های گرم مثبتی بودند که تولید میسیلیوم‌های هوایی با رنگ‌های متنوع نمودند (شکل‌های 1 و 2).

یازده جدایه دارای توانایی بالا برای شناسایی با روش کلنی- پی‌سی‌آر، انتخاب شدند. در این بین، جدایه های *Streptomyces* IGM05، *Streptomyces* IGM06، *Streptomyces* IGM07، *Streptomyces* IGM09، *Streptomyces* IGM15 و *Streptomyces* IGM17 مورد شناسایی قرار گرفتند (شکل3). باندهای تشکیل‌شده با پرایمرهای اختصاصی استرپتومایسس‌ها پس از رنگ-آمیزی ژل مشاهده گردیدند. باندهای اختصاصی، محصول پی‌سی‌آر، خالص‌سازی و توالی‌یابی گردید. با انجام مقایسه نتایج توالی‌یابی در بانک ژن و انجام Blast، جنس استرپتومایسس تایید شد.

فعالیت آنتاگونیستی روی نماتد

نتایج نشان داد که از بیست جدایه مورد استفاده، هشت جدایه دارای قدرت بالاتری در جلوگیری از تفریخ تخم بودند. در بین این هشت جدایه، جدایه‌های *Streptomyces* sp. IGM07 و *Streptomyces* sp. IGM06 به‌ترتیب با کاهش تفریخ تخم به 18/7 و 19/9 درصد، بالاترین میزان فعالیت آنتاگونیستی را از خود نشان



شکل 1- اکتینومیست‌های کشت‌شده روی محیط سی‌جی‌ای. (الف) پرگنه‌های رشدیافته روی محیط کشت سی‌جی‌ای و (ب) میسلیوم‌های هوایی تولید-شده

جدول1- میزان فعالیت آنتاگونیستی اکتینومیست‌ها روی لارو و تخم نماتد مرکبات

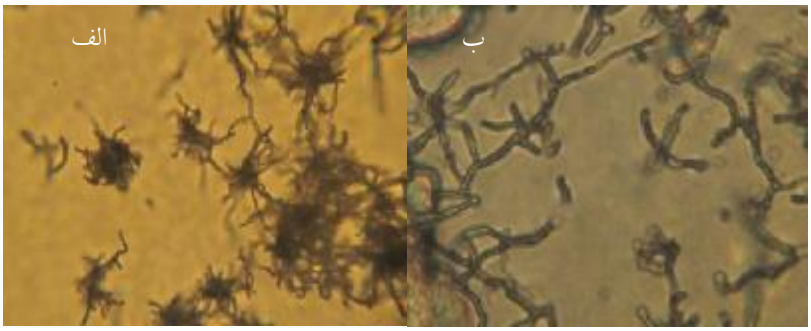
رده	جدایه	درصد تفریخ تخم(درصد) (7روز)	درصد مرگ‌ومیر لاروها (درصد) (4 روز)
Streptomyces	IGM-07	$18/7_{fg}$	$23/1_{b}$
Streptomyces	IGM-06	$19/9_{fg}$	$15/2_{bcdef}$
Non-Streptomyces	IGM-08	$25/2_{efg}$	$14/9_{bcdef}$
Streptomyces	IGM-09	$26/2_{efg}$	$38/6_{a}$
Streptomyces	IGM-18	$27/4_{defg}$	$9/8_{cdefg}$
Non-Streptomyces	IGM-13	$28/4_{defg}$	$20/7_{bc}$
Non-Streptomyces	IGM-02	$30/9_{def}$	$8/8_{efg}$
Non-Streptomyces	IGM-16	$36/2_{defg}$	$23/3_{b}$
Streptomyces	IGM-17	$37/2_{bcde}$	52_{a}
شاهد		82_{a}	$3/2_{g}$

مقادیر با حروف مشابه، اختلاف معنی‌دار ندارند (مقایسه میانگین به روش دانکن در سطح احتمال پنج درصد)

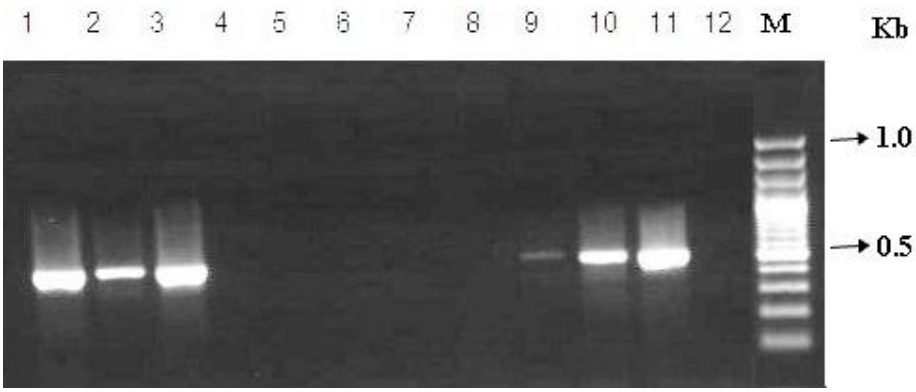
جدول 2- میزان فعالیت آنتاگونیستی اکتینومیست‌ها روی قارچ‌های بیمارگر مهم مرکبات

بازدارندگی (%)							
Pestaliopsis spp.	*Fusarium solani*	*Fusarium oxysporum*	*Rhizoctonia solani*	*Colletotrichum gloeosporioides*	*Penicillium digitatum*	جدایه	رده
54_{ed}	$45/7_{ghij}$	$57/1_{cd}$	$53/3_{def}$	$58/3_{cd}$	$60/2_{cd}$	IGM05	Streptomyces
$46/3_{ghij}$	$11/3t_{uvwxyz}$	$47/7_{fgh}$	$24/3_{p}$	$59/2_{cd}$	$55/1_{ed}$	IGM09	Streptomyces
$38/7_{klm}$	$22/7_{qp}$	$40/3_{bjklm}$	20/7pqrs	$63/3_{bc}$	$69/1_{ab}$	IGM08	Non-Streptomyces
$34/7_{mn}$	$25/3_{op}$	$35/7_{mn}$	5/3abcdfgz	$57/7_{cd}$	$73/7_{a}$	IGM18	Streptomyces
$34/7_{mn}$	$4/5_{bcdfg}$	$41/7_{jkli}$	$24/3_{p}$	$47/1_{ghi}$	$55/1_{ed}$	IGM15	Streptomyces
$31/1_{on}$	$3/7_{abcdfgxyz}$	$38/3_{klm}$	$9/3_{cdabcduvwx}$	$46/7_{ghij}$	$38/3_{klm}$	IGM06	Streptomyces
$30/3_{on}$	$13/2_{tuvw}$	$41/1_{jklm}$	$13/3_{tuvw}$	$59/3_{cd}$	$73/3_{a}$	IGM07	Streptomyces

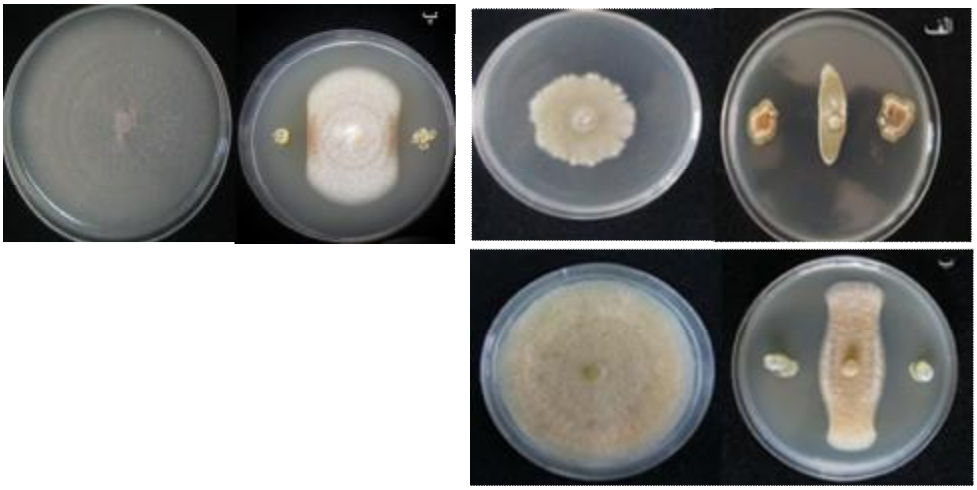
مقادیر با حروف مشابه، اختلاف معنی‌دار ندارند (مقایسه میانگین به روش دانکن در سطح احتمال پنج درصد)



شکل 2- الف و ب: میسیلیوم‌های هوایی تولیدشده توسط جدایه *Streptomyces* sp. IGM07



شکل 3- قطعات دی‌ان‌ای تکثیرشده به‌روش پی‌سی‌آر با جفت‌پرایمرهای اختصاصی sp1 و sp2 در ژل آگارز یک‌درصد و تأیید جنس *Streptomyces*. چاهک M: نشانگر با اندازه 1kb. چاهک‌های 1، 2، 3، 9، 10 و 11 به ترتیب جدایه‌های *Streptomyces* IGM05، *Streptomyces* IGM06، *Streptomyces* IGM07، *Streptomyces* IGM09، *Streptomyces* IGM15 و *Streptomyces* IGM17 12: شاهد منفی



شکل 4- تاثیر جدایه‌های مختلف *Streptomyces* بر قارچ‌های بیمارگرگیاهی. پتری‌های سمت چپ هر تصویر قارچ و پتری‌های سمت راست آن پرگنه قارچ در مرکز به‌همراه دو قطعه *Streptomyces* قرارگرفته در حاشیه. (الف) تأثیر جدایه *Streptomyces* sp. IGM18 روی قارچ *Penicillium digitatum*. (ب) تاثیر جدایه *Streptomyces* sp. IGM08 روی *Colletotrichum* sp.. (پ) تاثیر جدایه *Streptomyces* sp. IGM05 روی قارچ *Fusarium solani*

دادند. ولی در زمینه مرگ‌ومیر لاروها ضعیف عمل کردند. جدایه *Streptomyces* sp. IGM17 تنها جدایه‌ای است که هم به‌خوبی از تفریخ تخم جلوگیری نمود (37/2 درصد) و هم باعث مرگ‌ومیر لاروها تا 52 درصد گردید (جدول 1). نتایج تحقیقات مشابه در این زمینه، تأییدکننده اثر مثبت اکتینومیست‌ها در کنترل-زیستی نماتد مرکبات است. در بین عوامل آنتاگونیست نماتد مرکبات در فلوریدا، *Streptomyces* sp. به‌عنوان عامل آلوده‌کننده توده تخم نماتد گزارش شده است (والتر و کاپلان 1990). استفاده از مواد اصلاحی حاوی *Streptomyces saraceticus* سبب کاهش نسبت آلودگی و جمعیت *Tylenchulus semipenetrans* در درختان مرکبات شده است (سای و وو 2005). هم‌چنین درمطالعه‌ای که به‌منظور بررسی اثر ترکیب آبامکتین حاصل از گونه *Streptomyces avermitilis* روی این نماتد در دو فصل متوالی و با سطوح مختلف مایه‌زنی انجام گرفت، تمامی تیمارها سبب کاهش جمعیت نماتد گردیده-اند. درصد کاهش جمعیت نماتد با افزایش سطح کاربرد آبامکتین همبستگی مثبت نشان داده است (النقدی و همکاران 2010).

فعالیت آنتاگونیستی روی قارچ‌های بیمارگر

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، هفت جدایه از بیست جدایه، با درصد نسبتاً بالا قارچ‌های بیمارگر را کنترل کردند (جدول2). جدایه *Streptomyces* sp. IMG05 تنها جدایه‌ای بود که توانست با درصد بالا تمام قارچ‌های بیمارگر را کنترل کند. ولی در زمره جدایه‌های با درصد بالای تأثیر روی لارو و تخم نماتد مرکبات قرار نگرفت. جدایه‌های *Streptomyces* sp. IGM18 و *Streptomyces* sp. IGM07 به‌ترتیب با 73/7 و 73/3 درصد بیش‌ترین میزان بازدارندگی رشد را روی قارچ بیمارگر *Pencillium digitatum* باعث شدند. از بین هشت اکتینومیستی که اثر آنتاگونیستی روی لارو و تخم نماتد مرکبات داشتند، شش جدایه قادر بودند ترکیبات ضد قارچی تولید کنند (شکل4). جدایه‌های *Streptomyces* sp. IGM06, *Streptomyces* sp. IGM07, *Streptomyces* sp. IGM09 که در زمره جدایه‌های با درصد بالای پارازیت

نماتد قرار گرفتند، عملکرد موفقی در کنترل همه قارچ-های بیمارگر داشتند. نتایج حاصل از این آزمون با آزمایش‌های ساماک و کیندل (2001) مطابقت دارد که گزارش کردند برخی از جدایه‌های *Streptomyces* علاوه بر کنترل بیماری جرب سیب‌زمینی، جمعیت نماتد زخم را نیز کاهش می‌دهند. هم‌چنین نتایج به‌دست‌آمده با تحقیق انجام‌شده در آلمان نیز مشابهت نشان می‌دهد. طوری‌که جدایه‌هایی از *Streptomyces* قادر بودند در حد قابل‌قبولی بیمارگرهای خاک‌زاد مانند *Verticillium dahliae, Rhizoctonia solani* و *Meloidogyne incognita* را کنترل کنند (کرشل و همکاران 2002). با عنایت به این‌که قارچ‌های مورداستفاده در این پژوهش از جمله *Fusarium solani, Fusarium oxysporum* و *Colletotrichum gloeosporioides* به‌عنوان عوامل سرخشکیدگی مرکبات در شمال کشور شناخته شده‌اند (طاهری و ارشاد 1384)، نتایج به‌دست‌آمده می‌تواند در جهت کنترل زیستی این عوامل امیدبخش باشد. هم‌چنین جدایه‌ای از *Streptomyces* توانسته کنترل زیستی موفقی روی قارچ‌های بیمارگر عامل بیماری بلاست و شیت-بلایت برنج نشان دهد (پراباواتی و همکاران 2006). علاوه براین، ترکیبات آنتی‌بوتیک حاصل از گونه *Streptomyces rimosus* خاصیت ضدقارچی مطلوبی در برابر قارچ‌های بیمارگر دارد (یو و همکاران 2008). گزارش‌هایی در مورد برهم‌کنش بین نماتد مرکبات و قارچ *Fusarium solani* وجود دارد (پاول 1971). درصد پوسیدگی ریشه مرکبات آلوده به این قارچ در صورتی-که مورد هجوم نماتد مرکبات قرار گیرد، به میزان قابل توجهی تشدید خواهد شد (اوبانون و همکاران 1967، محمدی و حسابو 2005) بنابراین توجه به این نکته مهم است که فعال‌شدن میکروارگانیزم‌های انگل نماتد در مواجهه با بیمارگرهای دیگر نظیر قارچ‌ها، کارایی کنترل‌زیستی را افزایش داده و کنترل هم‌زمان آن‌ها می تواند به میزان قابل‌توجهی از خسارت به محصول بکاهد. قارچ‌های پارازیت‌کننده و تله‌گذار بیش‌ترین میکروارگانیزم‌های کنترل‌کننده نماتد مرکبات بوده‌اند. اما باکتری‌ها نیز به‌صورت مستقیم و غیرمستقیم با چسبیدن به نماتد و تولید توکسین یا اخلال در تراوه-های ریشه بر جمعیت نماتدها تأثیرگذار هستند (جین و همکاران 2005). شناسایی بیشتر باکتری‌های آنتاگونیست از طریق کشت خاک فراریشه گیاه آلوده امکان‌پذیر می‌باشد که این کار مستلزم صرف حوصله و وقت زیاد است و شاید یکی از دلایل توجه بیشتر به قارچ‌ها در کنترل زیستی همین مسئله باشد. البته توجه به این نکته حائز اهمیت است که قارچ‌های کنترل‌کننده نماتد تنها روی نماتدها تأثیرگذار بوده و بر قارچ‌های بیمارگر ثانویه اثری ندارند (ساماک و کیندل 2001). ولی باکتری‌ها و به‌ویژه اکتینومیست‌ها، دارای طیف وسیع رابطه انگلی بوده و علاوه بر نماتدهای انگل گیاهی روی قارچ‌های بیمارگر نیز تاثیر بسیار خوبی از خود نشان می‌دهند و این نقطه قوت آن‌ها در بحث کنترل زیستی محسوب می‌شود. انتخاب جدایه مناسب از باکتری، از نکات مهم اولیه است. اگر جدایه مورد بررسی از خاک‌های بازدارنده انتخاب شود، شانس موفقیت در گزینش آن بالا خواهد رفت. این نکته در مورد جدایه‌های مورد استفاده در این تحقیق صدق می-کند، چراکه اکثر جدایه‌های با توان آنتاگونیستی بالا از مناطقی جدا شد که درختان آن منطقه دارای کمترین میزان بیماری بودند. در برخی موارد، جدایه بومی یک منطقه می‌تواند اثری به مراتب بیش‌تر و پایدارتر نسبت به سایر جدایه‌ها در کنترل داشته باشد. اگرچه کنترل زیستی از توانایی بالایی در مدیریت نماتدهای انگل گیاهی برخوردار است، اما هنوز به‌طور معمول گسترش نیافته است. شاید یکی از دلایل اصلی و مهم آن را بتوان مقایسه نتایج حاصل از کاربرد نماتدکش‌ها عنوان کرد.

به طورکلی، نتایج این تحقیق نشان داد برخی از جدایه‌های استرپتومایسس متعلق به مناطق مرکبات‌خیز شمال کشور تأثیر مطلوبی در کنترل زیستی نماتد و قارچ‌های بیمارگر مرکبات در شرایط آزمایشگاهی

داشتند. بدیهی است انجام بررسی‌های بیشتر در شرایط گلخانه و باغ، می‌تواند تکمیل کننده تحقیق حاضر باشد.

سپاس‌گزاری

از مؤسسه تحقیقات مرکبات کشور به دلیل حمایت از انجام این تحقیق تشکر و قدردانی می گردد.

منابع

بی نام، 1389. آمارنامه کشاورزی ایران. اداره کل آمار و اطلاعات وزارت کشاورزی.

درویشی هرزویلی ف، حجتی ز و متولی باشی م، 1385. جداسازی و تأیید مولکولی سریع استرپتومایسس‌های تولید-کننده آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین. مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی – درمانی شهید صدوقی یزد. جلد چهارم، شماره 2، صفحه‌های 51 تا 55.

سفریان ع و ایزدپناه ک، 1347. پراکندگی نماتد مرکبات (*Tylenchulus semipenetrans*) و نقش آن در زوال درختان مرکبات جنوب ایران. صفحه‌های 40 و 41 خلاصه مقالات اولین کنگره گیاه‌پزشکی ایران، کرج.

طاهری ح و ارشاد ج، 1384. معرفی عوامل قارچی سرخشکیدگی مرکبات در غرب استان مازندران و شرق گیلان. صفحه 121 خلاصه مقاله‌های اولین همایش ملی مرکبات ایران، تهران.

Anderson J and Lafuerza A, 1992. Microbiological aspects of accelerated pesticide degradation. Pp. 184-192. Proceeding of International Symposium of Environmental Aspects of Pesticide Microbiology. Swedish University of Agriculture Science, Uppsala.

Bezooijen JV, 2006. Methodes and techniques for nematology.Wageningen Press.

Corrie HS and Thomas HB, 2006. Plant growth and population dynamics. Pp. 275-301 In: Perry RN and Moens M (eds.) Plant Nematology. Wallingford UK, CAB International.

Dicklow MB, Acosta N and Zuckerman BM, 1993. A novel *Streptomyces* species for controlling plant parasitic nematodes. Chemical Ecology 19: 159-173.

Duncan LW, 1999. Nematode diseases of citrus. Pp. 136-148 In: Timmer, LW and LW Duncan (eds.) Citrus health management. St Paul, MN, APS Press.

Duncan LW, 2005. Nematode parasites of citrus. Pp. 437- 467 In: Luc M, Sikora RA and Bridge J (eds.) Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture. Wallingford, UK, CAB International.

Duncan LW and Cohn E, 1990. Nematode parasites of citrus. Pp. 321-346 In: Luc M Sikora RA and Bridge J (eds.) Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture. Wallingford, UK, CAB International.

El-Nagdi WMA, Youssef MMA and Hafez OM, 2010. Effects of commercial formulations of *Bacillus thuringiensis* and *Streptomyces avermitilis* on *Tylenchulus semipenetrans* and on nutrition status, yield and fruit quality of mandarin. Nematologia Mediterranea 38: 147-157.

Gene J, Verdejo LS, Stchigel AM, Sorribas FJ and Guarro J, 2005. Microbial parasites associated with *Tylenchulus semipenetrans* in citrus orchards of Catalonia, Spain. Biocontrol Science and Technology 15: 721-731.

Gowen SR, Queneherve P and Fogain R, 2005. Nematode parasites of bananas and plantains. Pp. 611-643 In: Luc M Sikora RA and Bridge J (eds.) Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture. Wallingford, UK, CAB International.

Jatala P, 1986. Biological control of plant parasitic nematodes. Annual Reviews of Phytopathology 24: 453–489.

Khamna S, Yokota A and Lumyong S, 2009. Actinomycetes isolated from medicinal plant rhizosphere soils: diversity and screening of antifungal compounds, indole-3-acetic acid and siderophore production. World Journal of Microbiology and Biotechnology 25: 649–655.

Krechel A, Faupel A, Johannes H, Ulrich A. and Berg G, 2002. Potato associated bacteria and their antagonistic potential towards plant-parasitic fungi and the plant parasitic nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) chitwood. Canadian Journal of Microbiology 48: 772–786.

Moens T, Araya M, Swennen R and Waele D, 2004. Enhanced biodegradation of nematicides after repetitive applications and its effect on root and yield parameters in commercial banana plantations. Biology and Fertility of Soils 39: 407-414.

Mohamedy RSR and Hasabo AH, 2005. Response of some citrus rootstocks to infection with *Fusarium solani* and citrus nematode *Tylenchulus semipenetrans* under greenhouse conditions. Egypt Phytopathology 33: 11-25.

O'Bannon JH, Leathers CR and ReynoLds HW, 1967. Interactions of *Tylenchulus semipenetrans* and *Fusarium* species on rough lemon. Phytopathology 57: 14-17.

Prabavathy VR, Mathivanan N and Murugesan K, 2006. Control of blast and sheath blight diseases of rice using antifungal metabolites produced by *Streptomyces* PM5. Biological Control 39: 313-319.

Powell NT, 1971. Interactions between nematodes and fungi in disease complexes. Annual Reviews of Phytopathology 9: 253-274.

Samac DA and Kindel L, 2001. Suppression of the root-lesion nematode (*Pratylenchus penetrans*) in alfalfa (*Medicago sativa*) by *Streptomyces* spp. Plant Soil 235: 35-44.

Shin Park H, John J and Kilbane LL, 2006. Rapid detection and high-resolution discrimination of the genus *Streptomyces* based on 16S–23S rDNA spacer region and denaturing gradient gel electrophoresis. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 33: 289-297.

Sikora RA, Schafer K and Dababat A, 2007. Modes of action associated with microbially induced in planta suppression of plant-parasitic nematodes. Australasian Plant Pathology 36: 124-134.

Sun MH, Gao L, Shi YX, Li BJ and Liu XZ, 2006. Fungi and actinomycetes associated with *Meloidogyne* spp. eggs and females in China and their biocontrol potential. Journal of Invertebrate Pathology 93: 22–28.

Takisawa M, Colwell R and Hill RT, 1993. Isolation and diversity of actinomycetes in the Chesapeake Bay. Applied and Environmental Microbiology 59: 997–1002.

Tian B, Yang J and KQ Zhang, 2007. Bacteria used in the biological control of plant-parasitic nematodes: populations, mechanisms of action, and future prospects. FEMS Microbiological Ecology 61: 197-213.

Tsay TT and Wu WS, 2005. Evaluating the efficacy of organic amendments with *Streptomyces saraceticus* on controlling plant-parasitic nematodes. Journal of Nematology 37 (3): 400.

Verdejo LS and McKenry MV, 2004. Management of the citrus nematode *Tylenchulus semipenetrans* in citrus. Nematology 36(4): 424–432.

Walter DE and Kaplan DT, 1990. Antagonists of plant parasitic nematodes in Florida citrus. Journal of Nematology 22: 567-573.

Yu J, Liu Q, Liu X, Sun Q, Yan J, Qi X and Fan S, 2008. Effect of liquid culture requirements on antifungal antibiotic production by *Streptomyces rimosus* MY02. Bioresource Technology 99: 2087–2091.

Potential of Actinomycetes in Biological Control of Citrus Nematode and Some Pathogenic Fungi in in vitro condition

S Noorizadeh[1], S Jamali [2]*, M Golmohammadi [3] and H Pedramfar [4]

[1]MSc Student, Dept of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
[2]Assistant Professor, Dept of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
[3]Assistant Researcher, Iran Citrus Research Institute, Ramsar, Iran
[4] Lecturer, Dept of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
*Corresponding author: jamali@guilan.ac.ir

Received: 13 Mar 2013 Accepted: 26 Dec 2013

Abstract

Citrus nematode, *Tylenchulus semipenetrans* has worldwide distribution and is one of the causal agents of dieback disease in citrus orchards. The infection by the nematode in association with secondary fungal pathogens affects plant growth adversely. In order to evaluate antagonistic effects of actinomycetes in control of the nematode and secondary pathogens, 30 infested soil samples were collected from rhizosphere of citrus trees in east of Guilan and west of Mazandaran provinces, Iran. As a result, 20 strains of actinomycetes were isolated using selective culture media and their effects on egg hatching and juvenile mortality of the nematode were evaluated. In another experiment, actinomycetes efficacy on plant pathogenic fungi including *Fusarium oxysporum, Fusarium solani, Penicilium digitatum, Rhizoctonia solani, Pestaliopsis* spp. *Colletotrichum gleosporeides* were also tested. The results of the first experiment revealed that eight actinomycets isolates having good antagonistic capacity, reduced egg hatching during seven days and caused juvenile mortality in four days. In the second experiment, six isolates showed the ability of control against plant pathogenic fungi. *Streptomyces* sp. IGM05 strain had the maximum ability in control of the plant pathogenic fungi while *Streptomyces* sp. IGM17 reduced egg hatching rate up to 37.2% and juvenile mortality rate to 52.4% and exhibited the highest potential of antagonism.

Keywords: Antagonist, Fungi, *Streptomyces, Tylenchulus semipenetrans*