پژوهش‌های کاربردی در گیاه‌پزشکی ۱۱ (۲): ۱۰۰-۹۱ (۱۴۰۱)- مقاله پژوهشی
Journal of Applied Research in Plant Protection 11(2): 91-100 (2022)-Research Article

DOI: https://dx.doi.org/10.22034/arpp.2021.14926

کنترل زیستی نماتد ریشه مرکبات و نماتد ریشه‌گرهی در میزبان‌های لیموترش و کیوی با استفاده از جدایه‌های *Streptomyces*

مرتضی گل محمدی[۱]✉، سینا نوری‌زاده[۲]، سیده نجمه بنی‌هاشمیان[۳]

[۱]پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج‌کشاورزی، رامسر، ایران. [۲] گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران. [۳] گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت. ایران.
✉mgolm2009@gmail.com

دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۲۵ بازنگری: ۱۳۹۹/۱۲/۲۲ پذیرش: ۱۴۰۰/۸/۱۴

چکیده

به‌منظور بررسی تأثیر استرپتومایسس‌ها در کنترل زیستی *Tylenchulus semipenetrans* در لیموترش (*Citrus aurantifolia*) و *Meloidogyne incognita* در کیوی (*Actinidia deliciosa*)، نمونه‌برداری از خاک و ریشه در باغ‌های مرکبات مازندران، گیلان و گلستان انجام شد. در شرایط آزمایشگاهی، ۹ جدایه استرپتومایسس با کاهش تفریخ تخم و مرگ میر لاروهای نماتد مرکبات و ریشه‌گرهی، از توان آنتاگونیستی خوبی برخوردار بودند. جدایه‌های *Streptomyces* sp. (D, E, G, H و C) که در شرایط آزمایشگاهی بیشترین توان کنترلی را داشتند، در گلخانه مورد بررسی قرار گرفتند. از بین جدایه‌های مورد بررسی، جدایه‌های *Streptomyces* sp. (D و G) در شرایط گلخانه به ترتیب با کاهش تعداد نماتد ماده به میزان ۸۶/۸۱ و ۷۷/۶۵ درصد در مقایسه با نماتدکش فنـامیفوس ۶۴/۴۷ درصد، بیشترین تأثیر را در کنترل نماتد مرکبات نشان دادند. همچنین این دو جدایه به ترتیب با کاهش تعداد گال به میزان ۶۷/۷۸ و ۷۱/۱۵ درصد نسبت به نماتدکش فنامیفوس ۵۰/۹۳ درصد و کاهش تعداد کیسه تخم به میزان ۸۶/۵۴ درصد در مقایسه با نماتدکش فنامیفوس ۶۸/۹۰ درصد، در کاهش جمعیت نماتد ریشه‌گرهی در شرایط گلخانه از عملکرد خوبی برخوردار بودند.

کلمات کلیدی: آنتاگونیست، شناسایی مولکولی، *Tylenchulus semipenetrans*، *Meloidogyne incognita*، شرایط گلخانه

Biological control of citrus root nematode and root knot nematode in acid lime and kiwifruit hosts using *Streptomyces* isolates

Morteza Golmohammadi[1]✉, Sina Noorizadeh[2], Seyedeh Najmeh Banihashemian[3]

Received: 13 February 2021 Revised: 12 March 2021 Accepted: 5 November 2021

[1]*Citrus and Subtropical Fruits Research Center, Horticultural Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Ramsar, Iran.* [2]*Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.* [3]*Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Guilan, Rasht, Iran.* ✉mgolm2009@gmail.com

Abstract

To evaluate the effects of *Streptomyces* bacteria on biocontrol of *Tylenchulus semipenetrans* in *Citrus aurantifolia* and *Meloidogyne incognita* in *Actinidia deliciosa*, samples were collected from the rhizosphere of citrus and kiwifruit trees in Mazandaran, Guilan, and Golestan provinces. *In vitro*, 9 Streptomyces isolates showed good antagonistic potential and reduced the rate of egg hatching and larval mortality of citrus nematode and root-knot nematode. Isolates of *Streptomyces* sp. (C, D, E, G, and H) which had high control ability in vitro were examined in the greenhouse. Among the isolates studied, isolates D and G in greenhouse conditions showed the greatest effect on the control of citrus nematodes by reducing the number of female nematodes by 86.81% and 77.65% compared with the fenamiphos 64.47% Also, these two isolates decreased galls by 67.78% and 71.15% compared with the fenamiphos 50.93% and reduced the number of egg masses by 86.54% ccompared with the phenamiphus 68.90%, had good performance in root-knot nematode control.

Keywords: Antagonist, Greenhouse Conditions, Molecular Identification, *Meloidogyne incognita*, *Tylenchulus semipenetrans*

How to cite:

Golmohammadi M, Noorizadeh S, Banihashemian SN, 2022. Biological control of citrus root nematode and root knot nematode in acid lime and kiwifruit hosts using *Streptomyces* isolates. *Journal of Applied Research in Plant Protection* 11 (2): 91–100.

مقدمه

مرکبات و کیوی یکی از محصولات مهم تجاری دنیا و از محصولات مهم باغی شمال کشور هستند که استان‌های مازندران، گیلان و گلستان از جمله مناطق مناسب جهت کشت این محصولات می‌باشند (FAO 2020). لذا مدیریت بیماری‌ها و آفات آنها از اهمیت خاصی برخوردار است. نماتدهای انگل گیاهی باعث کاهش عملکرد و ایجاد خسارت در محصولات کشاورزی در جهان می‌شوند (Caillaud *et al*. 2008). نماتد ریشه مرکبات، *Tylenchulus semipenetrans* (Cobb, 1913) از جمله نماتدهای مهم ریشه درختان مرکبات است که در دنیا گسترش داشته و باعث سرخشکیدگی، زوال تدریجی درختان و کاهش محصول می‌شود. Tanha Maafi (1994) در ایران به بررسی دامنه انتشار، میزان آلودگی، دامنه میزبانی، نوسانات جمعیت در ماه‌های مختلف سال، درصد آلودگی درختان یک باغ و همچنین زیست‌شناسی انگل در شرایط گلخانه‌ای نماتد مرکبات در استان مازندران پرداخت و گزارش نمود که ۸۹ درصد باغ‌های مرکبات شمال کشور به این نماتد آلوده هستند و باعث ایجاد خسارت می‌شوند. از نماتدهای مهم و خسارت‌زای کیوی، گونه‌های مختلف نماتد ریشه‌گرهی (*Meloidogyne* spp.) است که باعث ایجاد گره در ریشه، پژمردگی برگ‌ها و خسارت در درختان جوان و نهالستان‌ها می‌شود. چهار گونه اصلی این نماتد، *M. incognita* (Kofoid & White 1919) Chitwood 1949، *M. javanica* (Treub 1885) Chitwood 1949، *M. arenaria* Chitwood 1949 (Neal 1889) و *M. hapla* Chitwood 1949 می‌باشند که در بین آنها گونه *M. incognita* گونه غالب در مناطق شمالی کشور به شمار می‌رود (Akyazi & Felek 2013). Tanha Maafi & Mahdavian (1997) به بررسی گونه‌های نماتد ریشه‌گرهی در باغ‌های کیوی شمال کشور پرداختند و گزارش کردند که این نماتد به طور وسیعی در باغ‌های کیوی رودسر، رامسر، تنکابن، چالوس، نوشهر و ساری گسترش دارند.

استفاده از سموم شیمیایی به دلیل قیمت بالا، ناپایداری در محیط، مقاوم شدن نماتدها در اثر استفاده طولانی مدت این مواد و اثرات سوء روی محیط زیست و سلامتی انسان و دیگر جانوران، با مشکل همراه است. بنابراین، علاوه بر اینکه با ایجاد سیستم نظارت و گواهی نهال، بایستی از انتشار نماتد به مناطق جدید پیشگیری گردد (Mohammad alian *et al*. 2018)، کنترل زیستی نیز با استفاده از میکروارگانیسم‌های مفید خاک و فراریشه گیاه به‌ویژه باکتری‌ها می‌تواند جایگزینی مناسب برای کنترل نماتدهای انگل گیاهی محسوب شود (Dong & Zhang 2006; Mahfouz *et al*. 2018).

اکتینومیست‌ها به ویژه استرپتومایسس‌ها به دلیل تولیدات متابولیکی مختلف از جمله آنزیم‌های هیدرولیتیک و آنتی‌بیوتیک‌ها مانند استرپتومایسین، سیکلوهگزامید، تتراسایکیلین و سایر متابولیت‌های ثانویه جزء آنتاگونیست‌های مهم عوامل بیماری‌زا به شمار می‌روند (Dimkpa *et al*. 2008; Evangelista-Martinez 2014). گونه‌های جنس استرپتومایسس به عنوان عوامل کنترل زیستی بیمارگرهای گیاهی مانند قارچ، باکتری و نماتد استفاده شده‌اند (Sowndhararajan & Kang 2012; Evangelista-Martinez 2014). تحقیقات انجام شده نشان می‌دهد کاربرد استرپتومایسس‌ها علاوه بر کاهش خسارت عوامل بیماری‌زا، باعث افزایش رشد گیاهان نیز می‌شوند (De Jesus Sousa & Olivares 2016; Vurukonda *et al*. 2018). Noorizadeh *et al*. (2013) بیان نمودند که جدایه *Streptomyces* sp. IGM17 به میزان ۵۲/۴ و ۳۷/۲ درصد به ترتیب باعث مرگ و میر لاروها و کاهش تفریخ تخم نماتد مرکبات شدند. Sharma *et al*. (2020) به تأثیر متابولیت‌های تولید شده توسط *S. hydrogenans* DH-16 در کنترل نماتد ریشه‌گرهی و بهبود شاخص‌های رشدی گیاه اشاره کردند. Chen *et al*. (2000) گزارش کردند که باکتری *Streptomyces* sp. قادر به کاهش تشکیل گال و کیسه تخم نماتد ریشه‌گرهی در کاهو می‌شود. Kim *et al*. (2011) استرین *S. sampsonii* KK1024 را به عنوان یکی از عوامل موفق در کنترل زیستی معرفی کردند. همچنین استرین *S. avermitilis* Manp سبب کاهش تفریخ تخم به میزان ۳۳/۱ درصد و افزایش میزان مرگ و میر لارو به میزان ۸۲ درصد می‌شود (Samac & Kindel 2001). در گزارشی دیگر اشاره شده است که استرپتومایسس‌ها قادر به کاهش تفریخ تخم و افزایش مرگ و میر لاروهای نماتد ریشه‌گرهی شده و دو سویه از استرپتومایسس استفاده شده باعث کاهش گال به میزان ۶۵/۳۵ و ۶۴/۵۶ درصد شدند که از عملکرد خوبی برخوردار بودند (Bashiri *et al. 2015*). همچنین، Sharma *et al*. (2020) با کاربرد *S. antibioticus* strain M7 در مقابل نماتد ریشه‌گرهی به این نتیجه رسیدند که *S. antibioticus* به عنوان یک نماتدکش ایمن برای کنترل این نماتد و افزایش عملکرد در گیاه می‌باشد.

با توجه به اینکه کشور ایران با شرایط اقلیمی متفاوت دارای گونه‌های متنوعی از استرپتومایسس‌ها می‌باشد، امکان بررسی

خواص کنترلی آنها در بیماری‌های مختلف گیاهان می‌تواند اساس یکی از شیوه‌های مدیریتی محسوب شود. بنابراین در این مطالعه به‌منظور بررسی کنترل زیستی نماتدهای مرکبات و ریشه‌گرهی در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه از جدایه‌های مختلف استرپتومایسس استفاده شد.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری

نمونه‌برداری از ریشه در پاییز و زمستان سال ۱۳۹۷ از استان‌های گیلان، مازندران و گلستان، از باغ‌های مرکبات و کیوی دارای علایم آلودگی به نماتد مرکبات و نماتد ریشه‌گرهی و نیز فاقد علایم ظاهری بیماری انجام شد. از هر باغ پنج درخت انتخاب شد و نمونه‌برداری از عمق ۱۰ تا ۳۰ سانتی‌متری ریزوسفر ریشه هر درخت انجام و پس از مخلوط کردن، یک نمونه با وزن تقریبی ۵۰۰ گرم همراه با ریشه مربوطه جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها پس از کدگذاری به آزمایشگاه منتقل و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

جداسازی جدایه‌های استرپتومایسس از فرا ریشه مرکبات و کیوی

جهت جداسازی جدایه‌های استرپتومایسس از خاک باغ‌های مرکبات و کیوی، از محیط کشت کازئین گلیسرول آگار (Casein Glycerin Agar, CGA) یک محیط کشت نیمه اختصاصی و غنی شده برای جداسازی استرپتومایسس، استفاده شد. محیط کشت کازئین گلیسرول آگار شامل (نیترات‌پتاسیم ۲ گرم، کازیین ۰/۳ گرم، سولفات منیزیم ۰/۰۵ گرم، کربنات‌کلسیم ۰/۰۲ گرم، دی‌پتاسیم‌هیدروژن‌فسفات ۲ گرم، سولفات آهن ۰/۰۱ گرم، آگار ۲۰ گرم و ۱۰ سی‌سی گلیسرول) می‌باشد. ۱۰ گرم از هر نمونه در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل روی شیکر با سرعت ۱۰۰ دور دقیقه به مدت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. سپس رقت‌های مختلفی با غلظت‌های 10^{2} تا 10^{5} تهیه شد. سوسپانسیون‌های حاصله روی محیط کشت کازئین گلیسرول آگار کشت و به مدت هفت روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Cochrane 1961). پرگنه‌های رشد یافته باکتری به منظور ارزیابی اولیه در زیر بینوکولر مورد بررسی قرار گرفتند. پرگنه‌هایی با ظاهر خشک، پودری، سفید گچی و رنگی و دارای میسیلیوم هوایی، انتخاب و جهت تهیه کشت خالص، دوباره کشت شدند (Sun *et al.* 2006).

شناسایی مولکولی جدایه‌های استرپتومایسس

برای تأیید مولکولی از روش کلونی - پی سی آر استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با جفت آغازگر اختصاصی ناحیه 16s rRNA (SPP-R و SPP-F) با توالی‌های Forward (5´ ACAAGCCCTGGAAACGGGGT3´) و Reverse (5´CACCAGGAATTCCGATCT3´) انجام شد (Oka *et al.* 2009). محصولات تکثیر شده روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شدند.

استخراج، رنگ آمیزی و شناسایی نماتد مرکبات و نماتد ریشه‌گرهی کیوی

برای استخراج تخم نماتدهای مرکبات و ریشه‌گرهی از روش سانتریفیوژ (Van Bezooijen 2006) استفاده شد. تخم‌های استخراج شده پنج تا هفت روز در دمای ۲۵-۲۷ درجه سانتی-گراد به منظور تهیه لاروهای سن دوم، نگهداری شدند. همچنین رنگ‌آمیزی نماتد در ریشه طبق روش (Bybd *et al.* 1983) انجام شد. برای شناسایی نماتد مرکبات، قسمت‌های اصلی بدن نماتد ماده بالغ نظیر قسمت ابتدایی بدن، محل ولوا و مخرج و ساختار انتهای بدن (Crozzoli *et al.* 1998) و برای شناسایی نماتد ریشه‌گرهی، شبکه کوتیکولی انتهای بدن نماتد ماده (Perineal pattern) (Eisenback & Triantaphyllou 1991) مورد بررسی قرار گرفت.

شناسایی مولکولی نماتد ریشه‌گرهی کیوی

جهت تأیید جمعیت غالب نماتد ریشه‌گرهی کیوی در مناطق مورد مطالعه، روش مولکولی نیز به‌کار گرفته شد. جهت استخراج DNA نماتد از روش (Swain *et al.* 1995) استفاده و واکنش زنجیره‌ای پلی مراز با آغازگرهای اختصاصی *M. incognita*، Forward (5´GGGATGTGTAAATGCTCCTG3´) و Reverse (5´CCCGCTACACCCTCAACTTC3´) انجام شد (Randing *et al.* 2002).

تأثیر آزمایشگاهی باکتری‌های گروه استرپتومایسس بر لارو و تخم نماتد مرکبات و نماتد ریشه‌گرهی کیوی

تخم نماتدها با سولفات مس و استرپتومایسین ضدعفونی شدند (Norizadeh *et al.* 2013; Bashiri *et al.* 2015). به منظور انجام این آزمون، پس از کشت و خالص‌سازی جدایه‌های

اکتینومیست، جدایه‌هایی که از نظر رنگ کلنی متفاوت بودند، برای تست‌های آزمایشگاهی طبق روش (Sun *et al*. 2006) استفاده شدند. برای این کار از غلظت CFU/mL ۱۰^۶ با استفاده از لام شمارش (هموسایتومتر) استفاده شد. پس از شمارش، اسپورها به طور جداگانه به هر کدام از لاروها و تخم‌های نماتدهای مرکبات و ریشه‌گرهی اضافه و به مدت پنج تا هفت روز در دمای اتاق نگهداری شدند. اطلاعات لازم شامل میزان درصد تفریخ شدن تخم‌ها و مرگ و میر لاروها ثبت شد (Sun *et al*. 2006).

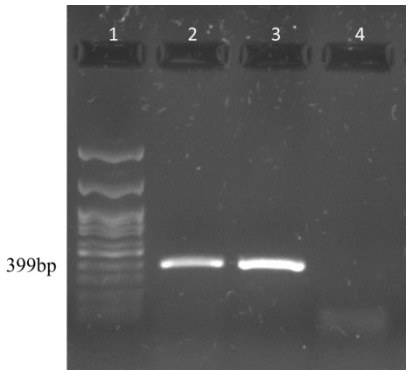
آزمایش‌های گلخانه‌ای

بذر کیوی و لیموترش در گلدان‌های حاوی ۱/۵ کیلوگرم خاک استریل کشت شدند. آبیاری به طور مرتب انجام و نهال‌ها به مدت شش ماه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در گلخانه پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه گرمسیری نگه‌داری شدند. در این مرحله از جدایه‌هایی که توان آنتاگونیستی بالایی در شرایط آزمایشگاهی داشتند (C، D، E، G و H) استفاده شد. ۱۰ میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری با رقت CFU/mL ۱۰^۶ به اطراف ریشه کیوی و لیموترش تزریق شد. پس از هفت روز (جهت تثبیت باکتری‌ها در خاک و کلنیزه کردن ریشه)، حدود ۱۵۰۰ لارو سن دوم نماتد ریشه‌گرهی به خاک اطراف ریشه کیوی و همچنین حدود ۴۰۰۰ لارو و تخم (۱۵۰۰ لارو سن دوم و ۲۵۰۰ تخم) به خاک اطراف ریشه لیموترش اضافه شد. پس از دو ماه ریشه‌ها از خاک خارج و پس از رنگ آمیزی، تعداد نماتد ماده مرکبات در یک گرم ریشه و همچنین تعداد گال و کیسه تخم نماتد ریشه‌گرهی در یک گرم ریشه شمارش شد. نحوه انجام آزمون به شیوه کاملا تصادفی انجام و برای هر تیمار چهار تکرار در نظر گرفته شد. به منظور مقایسه پتانسیل کنترل جدایه‌های آنتاگونیست با نماتدکش، یک ماه پس از افزودن لارو و تخم نماتدها به نهال‌های مرکبات و کیوی، به میزان دو گرم در هر گلدان (حاوی ۱/۵ کیلوگرم خاک) فنامیفوس (نماکور® G۱۰) استفاده شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌های حاصل از بررسی‌های آزمایشگاهی و گلخانه‌ای در قالب طرح کاملا تصادفی و با استفاده از نرم افزار SAS 9.1 انجام شد.

نتایج و بحث

شناسایی مولکولی نماتد ریشه‌گرهی

در بررسی ریخت‌شناسی صورت گرفته، گونه غالب نماتد ریشه‌گرهی در کیوی، *M. incognita* بود. در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز انجام شده با جفت آغازگر اختصاصی (Inc-K14-F و Inc-K14-R) از نمونه‌های نماتد ریشه‌گرهی مورد بررسی، باندهای به اندازه ۳۹۹ جفت باز مشاهده شد که تأیید کننده *M. incognita* می‌باشد (شکل ۱).

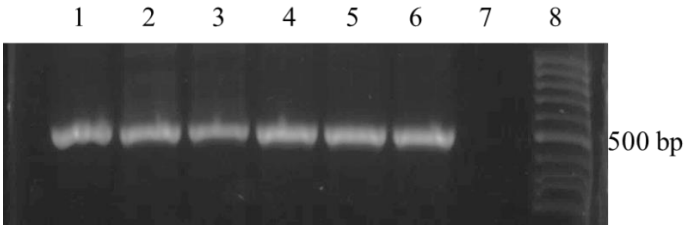


شکل ۱. قطعات تکثیر شده با جفت آغازگر اختصاصی (Inc-K14-F وInc-K14-R). چاهک‌ها به ترتیب: **۱.** نشانگر ۱۰۰ جفت باز (سیناکلون)، **۲ و ۳.** نمونه‌های جمع آوری شده، **۴.** کنترل منفی.

Figure 1. Amplified fragments with specific primer pairs (Inc-K14-F and Inc-K14-R). lanes: **1.** Marker 100 base pair (Sinaclon), **2 and 3.** Collected samples, **4.** Negative control.

شناسایی و تأیید مولکولی جدایه‌های استرپتومایسس

با انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با جفت آغازگرهای اختصاصی استرپتومایسس SPP-r و SPP-f، جدایه‌های مورد بررسی، به عنوان جنس استرپتومایسس شناسایی شدند. شکل ۲ نتایج واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با جفت آغازگر اختصاصی SPP را نشان می‌دهد (شکل ۲).



شکل ۲. قطعات تکثیر شده با جفت آغازگر اختصاصی SPP. **چاهک‌های ۱ تا ۶.** به ترتیب جدایه‌های ۵، ۸، ۹، G، D و C، **۷.** کنترل منفی و **۸.** نشانگر ۱۰۰ جفت باز (سیناکلون).

Figure 2. Amplified fragments with specific primer pairs SPP. **lanes: 1-6.** Isolates (5, 8, 9, G, D and C) respectively. **7.** Negative control, and **8.** Marker 100 base pair (Sinaclon).

تأثیر جدایه‌های استرپتومایسس بر لارو و تخم نماتد مرکبات و نماتد ریشه‌گرهی در شرایط آزمایشگاهی

۳۰ جدایه استرپتومایسس که از لحاظ ریخت‌شناسی متفاوت بودند (رنگ کلنی، اندازه و تولید میسیلیوم هوایی) برای ارزیابی کنترل نماتد مرکبات و ریشه‌گرهی در شرایط آزمایشگاهی استفاده شدند. از میان ۳۰ جدایه مورد بررسی، هشت جدایه توانایی نسبتا بالایی در کاهش جمعیت نماتد مرکبات داشتند (جدول ۱). جدایه‌های H و C با کاهش تفریخ تخم نماتد مرکبات به میزان ۶۹/۸۷ و ۶۷/۳۶ درصد و همچنین در زمینه مرگ و میر لاروها به میزان ۶۵/۳۳ و ۵۷/۳۳ درصد و جدایه G و D با کاهش تفریخ تخم به میزان ۵۴/۸۱ و ۵۳/۹۷ درصد و مرگ و میر لاروها به میزان ۵۹/۳۳ و ۷۴/۳۳ درصد بیشترین تاثیر را داشتند. علاوه بر این، پنج جدایه (C، D، E، G و H)، در مرگ و میر لاروها و جلوگیری از تفریخ تخم نماتد ریشه‌گرهی موثر بودند. به‌طوریکه جدایه‌های C و H با کاهش تفریخ تخم نماتد ریشه‌گرهی به میزان ۸۴/۳۷ و ۸۰/۴۶ درصد و همچنین در زمینه مرگ و میر لاروها به میزان ۷۱/۶۷ و ۵۶/۳۳ درصد بیشترین تأثیر را داشتند. علاوه بر این، جدایه‌های G، D و E با کاهش تفریخ تخم به میزان ۷۴/۶۰، ۸۲/۰۳ و ۷۴/۶۰ درصد و مرگ و میر لاروها به میزان ۵۶/۳۳، ۶۷/۶۷ و ۵۴/۶۷ درصد بهترین تأثیر داشتند (جدول ۱).

جدول ۱. تأثیر باکتری‌های آنتاگونیست بر مرگ و میر لاروها و جلوگیری از تفریخ تخم *Tylenchulus semipenetrans* در مرکبات و *Meloidogyne incognita* در کیوی در شرایط آزمایشگاهی.

Table 1. The effect of bacterial antagonist on mortality of larvae and prevent of hatching *Tylenchulus semipenetrans* on citrus and *Meloidogyne incognita* on kiwifruit in vitro.

Bacteria	Isolate	Hatching (%) in 7 days		Larval (%) mortality in 5 days	
		T. semipenetrans	*M. incognita*	*T. semipenetrans*	*M. incognita*
Stereptomyces sp.	A	26.67 cd	27 d	51.67 cd	41.67 c
Stereptomyces sp.	B	17.33 e	25.67 d	52 cd	43 c
Stereptomyces sp.	C	26 cd	13.33 f	57.33 bc	71.67 a
Stereptomyces sp.	D	36.67 b	15.33 f	74.33 a	67.67 a
Stereptomyces sp.	E	16.67 e	21.67 e	55.33 c	54.67 b
Stereptomyces sp.	F	29.67 c	31.67 c	51.67 cd	43 c
Stereptomyces sp.	G	36 b	21.67 e	59.33 bc	56.33 b
Stereptomyces sp.	H	24 d	16.67 f	65.33 b	56.33 b
Stereptomyces sp.	I	23 d	38.67 b	45.67 d	37.67 c
Control		79.67 a	85.33 a	3.333 e	4.66 d
Mean of square		991.04**	1325.36**	1059.02**	1066.03**
LSD		0.798	0.689	1.527	0.985

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

بررسی تأثیر جدایه‌های آنتاگونیست بر نماتد مرکبات در شرایط گلخانه

از بین جدایه‌های بررسی شده، جدایه‌های C، D، G و H که در شرایط آزمایشگاهی از خود بیشترین تأثیر را داشتند، برای آزمون گلخانه‌ای انتخاب شدند. نتایج آزمایش نشان دهنده این است که جدایه‌های G و D در شرایط گلخانه بیشترین تأثیر را از خود نشان دادند که جدایه D با کاهش تعداد نماتد ماده به ۱۲ عدد بیشترین تأثیر را داشت که میزان مرگ و میر لاروها هم در این جدایه در شرایط آزمایشگاهی از دیگر جدایه‌ها بالاتر بود (جدول ۲). با مقایسه تیمار نماتدکش با جدایه‌های G و D در شرایط گلخانه نتیجه گرفته می‌شود که تیمار جدایه‌های فوق با کاهش تعداد نماتد ماده در گرم ریشه به ترتیب ۷۷/۶۵ و ۸۶/۸۱ در مقایسه با تیمار نماتدکش ۶۴/۴۷ درصد، بهترین عملکرد را داشتند.

جدول ۲. تأثیر باکتری‌های آنتاگونیست بر تعداد نماتد ماده مرکبات در شرایط گلخانه.

Table 2. The effect of bacterial antagonist on the number of females of citrus nematode in greenhouse.

Bacteria	Isolate	The number of female nematode per gram of root
Stereptomyces sp.	C	35.33 bc
Stereptomyces sp.	D	12 e
Stereptomyces sp.	G	20.33 d
Stereptomyces sp.	H	38.33 b
Fenamiphos		32.33 c
Control		91 a
Mean of square		2912.18**
LSD		3.002

Numbers followed by the same letter are not significantly different (P < 0.05).

تأثیر جدایه‌های استرپتومایسس تعداد گال و کیسه تخم نماتد ریشه‌گرهی در شرایط گلخانه

جدایه‌های C، D، E، G و H که در شرایط آزمایشگاهی از خود بیشترین تأثیر را داشتند، برای آزمون گلخانه‌ای انتخاب شدند. نتایج آزمایش نشان دهنده این است که جدایه‌های D و G در شرایط گلخانه به ترتیب با کاهش تعداد گال به میزان ۶۷/۷۸ و ۷۱/۱۵ درصد نسبت به نماتدکش فنامیفوس ۵۰/۹۳ درصد و کاهش تعداد کیسه تخم به میزان ۸۶/۵۴ درصد در مقایسه با نماتدکش فنامیفوس ۶۸/۹ درصد، از عملکرد بالایی برخوردار بودند (جدول ۳).

جدول ۳. تأثیر جدایه‌های آنتاگونیست بر تعداد گال و کیسه تخم نماتد *Meloidogyne incognita* در ریشه کیوی در شرایط گلخانه.

Table 3. The effect of antagonist isolates on the number of galls and egg masses of *Meloidogyne incognita* nematode in kiwifruit root in greenhouse.

Bacteria	Isolate	Number of galls	Number of egg mass
Stereptomyces sp.	C	31.67 d	12.67 c
Stereptomyces sp.	D	28.67 de	10.67 c
Stereptomyces sp.	E	44.33 b	14 c
Stereptomyces sp.	G	25.67 e	10.67 c
Stereptomyces sp.	H	35.67 c	13.67 c
Fenamiphos		43.67 b	24.67 b
Control (Untreated)		89 a	79.33 a
Mean of square		1876.11**	1402.77**
LSD		0.812	0.921

*Numbers followed by the same letter are not significantly different (P < 0.05).

نماتدهای انگل گیاهی یکی از خطرهای جدی محصولات گیاهی در جهان می‌باشند. استفاده از عوامل کنترل زیستی به‌عنوان یک سیستم مدیریتی دوستدار محیط زیست در کاهش خسارت این نماتدها نقش مهمی دارد (Mahfouz *et al*. 2018). امروزه، کاربرد سموم شیمیایی در کنترل بیماری‌های گیاهی به‌دلیل هزینه بالا، خطرات زیست محیطی و خطرات روی سلامت انسان و جانوران کاهش یافته و کاربرد تلفیقی عوامل کنترل زیستی مورد توجه قرار گرفته است (Sharon *et al*. 2001; Vetrivelkalai *et al*. 2019).

اکتینومیست‌ها، به ویژه گروه استرپتومایسس، مقدار زیادی متابولیت ثانویه فعال تولید می‌کنند که می‌توانند به عنوان عوامل کنترل زیستی مورد استفاده قرار بگیرند (Ruanpanun *et al*. 2011; Law *et al*. 2017). به عنوان مثال، بسیاری از متابولیت‌های ثانویه‌ای مانند fervenulin، avermectin، nemadectin actinomycins، milbemycin، carbazomycins، macrocyclic lactones، angumycinones، fungichromin B و SH2 که به ترتیب از جدایه‌های *Streptomyces* sp. CMU-MH021، *S. avermitilis* G8-17، *S. micro* avus neau3، *S. antibioticus* M7، *S. bingchenggensis* BCJ60، *S. avermitilis* NEAU1069، *Streptomyces* sp. CMU-JT005، *Streptomyces* sp. P294، *Streptoverticillium albireticuli* HA10002 و *S. hydrogenans* DH16 که دارای خاصیت نماتدکشی هستند در مطالعات بسیاری گزارش شده است (Ruanpanun *et al*. 2011; Zeng *et al*. 2013; Huang *et al*. 2015; Su *et al*. 2016; Sharma *et al*. 2019; Li *et al*. 2020). بنابراین با توجه به اثرات آنتاگونیستی استرپتومایسس‌ها در مقابل نماتدها، در این تحقیق به کاربرد آنتاگونیستی جدایه‌های استرپتومایسس در کنترل نماتد مرکبات و نماتد ریشه‌گرهی کیوی پرداخته شد و این نتیجه به دست آمد که برخی از جدایه‌های آنتاگونیست حتی بهتر از نماتدکش تأثیرگذار بوده‌اند که با نتایج گزارش‌های (EL-Sherif & Ismail 2009) مطابقت داشت. گزارش‌هایی از توان آنتاگونیستی باکتری‌های مختلف روی عوامل بیماری‌زا مانند نماتدها انجام شده است. اکتینومیست‌ها دارای توانایی پارازیتیسم خوبی هستند که در محیط‌های خاکی اطراف ریزوسفر ریشه یافت می‌شوند (Hastuti *et al*. 2012). با توجه به آنچه گفته شد این باکتری‌ها با تولید متابولیت‌های ثانویه، آنتی‌بیوتیک، شبه هورمون‌ها، توکسین، آنزیم، رقابت برای مواد غذایی، تأثیر مثبت بر رشد گیاهان، تحریک مقاومت القایی و اخلال در ترشحات ریشه بر روی جمعیت نماتدها و عوامل بیماری‌زای مختلف گیاهی مانند قارچ‌ها و باکتری‌ها نقش به سزایی دارند (Elshafei *et al*. 2010). گزارش شده است که *S. avermitilis* به میزان ۹۷ تا ۱۰۰ درصد باعث مرگ و میر لاروهای نماتد *M. incognita* می‌شود (Fask & Starr 2006). نتایج تحقیقات مشابه، تأیید کننده اثر مثبت استرپتومایسس‌ها در کنترل نماتد مرکبات و ریشه‌گرهی کیوی است. در تحقیق مشابهی که در سال ۲۰۱۵ انجام گردید دو جدایه (sp4 و sp9) *Streptomyces* sp. در شرایط گلخانه به ترتیب با کاهش گال به میزان ۳۵/۶۵ و ۵۶/۶۴ درصد و در مقایسه با سم فنامیفوس ۴۷/۵۷ درصد از عملکرد مطلوبی برخوردار بودند (Bashiri *et al*. 2015). همچنین گزارشی مبنی بر توانایی آنتاگونیستی بالای جدایه *Streptomyces* sp. IGM17 در کاهش تفریخ تخم به میزان ۲/۳۷ درصد و مرگ و میر ۴/۵۲ درصدی لاروها، در برابر نماتد مرکبات وجود دارد (Noorizadeh *et al*. 2013).

Ibrahim Dina *et al*. (2019) گزارش کردند که *S. graseius* به میزان ۸۰٪ باعث مرگ و میر لاروهای سن دو نماتد مرکبات شدند. در واقع حمله باکتری به مرحله لاروی نماتد، باعث تأخیر در آلودگی ریشه مرکبات شده است. Walter & Kaplan (1990) در گزارشی *Streptomyces* sp. را به عنوان عامل آنتاگونیست نماتد مرکبات در فلوریدا بیان نمودند. استرپتومایسس‌ها گروه مهمی از باکتری‌های خاک محسوب می‌شوند که به بهبود ساختار جامعه میکروبی خاک کمک می‌کنند (Olanrewaju & Babalola 2019). درواقع سویه‌های مختلف استرپتومایسس قادر به تولید متابولیت‌های فعال زیستی هستند که می‌توانند چرخه زیستی را مهار کرده یا حتی نماتدها را از بین ببرند (Tarkka *et al*. 2008). همچنین بیان شده است که *Streptomyces* spp. می‌تواند با سایر اقدامات کنترلی در مدیریت تلفیقی ترکیب شود و نقش مهمی در کنترل نماتدها داشته باشد (Na *et al*. 2017). *S. colombiensis* ATHUBA 438 و *S. monomycini* ATHUBA 220 فعالیت نماتدکشی قوی در برابر *M. javanica* به ترتیب به میزان ۱۰۰ و ۹۳/۸ درصد و برای *M. incognita* به میزان ۹۳/۷ درصد، نشان دادند (Meidani *et al*. 2019).

بنابراین، ارزیابی جدایه‌های استرپتومایسس جهت کنترل نماتدهای مرکبات و ریشه‌گرهی به عنوان عوامل خسارت‌زای مهم در مرکبات و کیوی، بسیار ارزشمند می‌باشد. با توجه به نتایج به دست آمده در این پژوهش، می‌توان استرپتومایسس‌ها را یکی از عوامل آنتاگونیست امیدبخش در کنترل نماتدهای

مرکبات و ریشه‌گرهی به ترتیب در میزبان‌های لیموترش و کیوی در نظر گرفت، بنابراین پیشنهاد می‌شود در آینده با پژوهش‌های بیشتر روی جدایه‌های به دست آمده، همچنین کاربرد آن‌ها در سطح وسیع‌تر مزرعه‌ای با در نظر گرفتن محدودیت‌های محیطی و در صورت امکان تجاری سازی آن‌ها بتوان گام‌های مهمی را در مهار زیستی نماتدهای موصوف با استفاده از این جدایه‌ها برداشت.

سپاسگزاری

از پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری به دلیل پشتیبانی مالی این تحقیق سپاسگزاری می‌شود.

References

Akyazi F, Felek AF, 2013. Molecular identification of root-knot nematode *Meloidogyne incognita* from kiwifruit orchards in Ordu province, Turkey. *Turkish Journal of Entomology* 37 (4): 449–456.

Bashiri S, Jamali S, Golmohammadi M, 2015. Antagonistic Activities of *Streptomyces* against Root Knot Nematode of Kiwifruit. *Journal of Plant Protection* 29 (3): 310–317.

Bybd DW, Kirkpatrick T, Barker KR, 1983. An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. *Nematology* 15 (1): 142–143.

Caillaud MC, Dubreuil G, Quentin M, Perfus-Barbeoch L, Lecomte P, Engler JDA, Abadp-Rosso MN, Favery B, 2008. Root-knot nematodes manipulate plant cell functions during a compatible interaction. *Plant Physiology* 165: 104–113.

Chen J, Abawi GS, Zuckerman BM, 2000. Efficacy of *Bacillus thuringiensis*, *Paecilomyces marquandii*, and *Streptomyces costaricanus* with and without organic amendments against *Meloidogyne hapla* infecting lettuce. *Nematology* 32: 70–77.

Cochrane VW, 1961. Physiology of Actinomycetes. *Annual Review Microbiology* 15: 1–26.

Crozzoli R, Lamberti f, Greco N, Rivas D, 1998. Nematodes fitoparasiticos associados con los citricos en Venezuela. *Nematologia Mediterranea* 26: 31–58.

De Jesus Sousa JA, Olivares FL, 2016. Plant growth promotion by *streptomyces*: ecophysiology, mechanisms and applications. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* 3: 24.

Dimkpa C, Svatos A, Merten D, Büchel G, 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.

Dong LQ, Zhang KQ, 2006. Microbial control of plant-parasitic nematodes: a five-party interaction. *Plant Soil* 288: 31–45.

Eisenback JD, Triantaphyllou HH, 1991. Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species and races. In: Nickle WR (ed). *Manual of Agricultural Nematology*. Marcel Dekker, Inc., USA. Pp. 191–274.

Elshafei H, Abdel-Aziz MS, Ahmed A, Abdalla AH, 2010. Optimizing some factors affecting alkaline protease production by a marine bacterium *Streptomyces albidoflavus*. *African Journal of Biotechnology* 6: 125–142.

EL-Sherif AG, Ismail AFA, 2009. Integrated management of *Meloidogyne incognita* infecting soybean by certain organic amendments, *Bacillus thuringiensis*, *Trichoderma harzianum* and Oxamyl with reference to npk and total chlorophyll statuus. *Plant Pathology* 8 (4): 159–164.

Evangelista-Martínez Z, 2014. Isolation and characterization of soil *Streptomyces* species as potential biological control agents against fungal plant pathogens. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 30: 1639–1647.

Faske TR, Starr JL, 2006. Sensitivity of *Meloidogyne incognita* and *Rotylenchulus reniformis* to abamectin. *Journal of Nematology* 38: 240–244.

FAO, FAOSTAT, Production, 2020. http://www.Fao.org

Hastuti RD, Yulin L, Rasti S, Antonius S, 2012. Capability of Streptomyces spp. in controlling bacterial leaf blight disease in rice plants. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* 7 (2): 217–223.

Huang J, Chen AL, Zhang H, 2015. Gene replacement for the generation of designed novel avermectin derivatives with enhanced acaricidal and nematicidal activities. *Applied Environmental Microbiology* 81 (16): 5326–5334.

Ibrahim D, Ali A, Metwaly H, 2019. Bio-management of citrus nematode, *Tylenchulus semipenetrans* and dry root rot fungi, *Fusarium solani* under laboratory and field conditions. *Egyptian Journal of Agronematology* 18 (2): 118–128.

Kim SS, Kang SI, Kim JS, Lee YS, Hong SH, Naing KW, Kim KY, 2011. Biological control of root-knot nematode by *Streptomyces sampsonii* KK1024. *Korean Journal of Soil Science and Fertilizer* 44 (6): 1150–1157.

Kaur T, Jasrotia S, Ohri P, 2016. Evaluation of in vitro and in vivo nematicidal potential of a multifunctional streptomycete, *Streptomyces hydrogenans* strain DH16 against *Meloidogyne incognita*. *Microbiology Research* 192: 247–252.

Law JW, Ser HL, Khan TM, 2017. The Potential of *Streptomyces* as biocontrol agents against the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae* (*Pyricularia oryzae*). *Front Microbiology* 8:3.

Li JS, Qi H, Zhang SY, 2020. Two new milbemycin derivatives from a genetically engineered strain *Streptomyces bingchenggensis*. *Journal* of A*sian Natural Products Research* 1–6.

Mahfouz MM, Abd-Elgawad A, Tarique H, 2018. Fungal and bacterial nematicides in integrated nematode management strategies. *Abd-Elgawad and Askary Egyptian Journal of Biological Pest Control* 28: 74.

Meidani C, Ntalli NG, Giannoutsou E, Adamakis ID, 2019. Cell wall modifications in giant cells induced by the plant parasitic nematode *Meloidogyne incognita* in wild-type (Col-0) and the fra2 *Arabidopsis thaliana* katanin mutant. *International journal of molecular sciences* 20 (21): 5465.

Mohammad Alian Y, Banihashemian SN, Golmohammadi M, Banihashemian SM, Bashiri S, 2018. Evaluation of the Tolerance of Some Citrus Rootstocks to Citrus Nematode in Greenhouse (*Tylenchulus semipenetrans*). *Journal of Plant Protection* 31 (4): 700–705.

Na JIN, Hui XUE, LI WJ, Wang XY, Qian LIU, Liu, SS, Pei LIU, Zhao JL, Heng JIAN, 2017. Field evaluation of *Streptomyces rubrogriseus* HDZ-9-47 for biocontrol of *Meloidogyne incognita* on tomato. *Journal of integrative agriculture* 16 (6): 1347–1357.

Noorizadeh S, Jamali S, Golmohammadi M, Pedramfar H, 2013. Potential of Actinomycetes in Biological Control of Citrus Nematode and Some Pathogenic Fungi in in vitro condition. *Journal of Applied Research in Plant Protection* 2 (1).

Oka Y, Shuker S, 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.

Olanrewaju O.S. Babalola OO, 2019. *Streptomyces*: Implications and interactions in plant growth promotion. *Applied Microbiology and Biotechnology* 103: 1179–1188.

Paulus C, Rebets Y, Tokovenko B, 2017. New natural products identifiedby combined genomics-metabolomics pro ling of marine *Streptomyces* sp. MP131-18. *Science Reports* 7 (1): 1-11.

Randing O, Bongiovanni M, Carneiro RMDG, Castagnone-Sereno Ph, 2002. Genetic diversity of root-knot nematodes from Brazil and development of SCAR markers specific for the coffee-damaging species. *Genome* 45: 862–870.

Ruanpanun P, Laatsch H, Tangchitsomkid N, 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): 1373–1380.

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

Sharma M, Jasrotia S, Ohri P, Manhas RK, 2019. Nematicidal potential of *Streptomyces antibioticus* strain M7 against *Meloidogyne incognita*. *AMB Express* 9 (1): 1–8.

Sharma N, Khanna K, Kumari Manhas R, Bhardwaj R, Ohri P, Alkahtani J, Alwahibi M, Ahmad P, 2020. Insights into the Role of *Streptomyces hydrogenans* as the plant growth promoter, photosynthetic pigment enhancer and biocontrol agent against *Meloidogyne incognita* in *Solanum lycopersicum* seedlings. *Plants* 9 (9): 1109.

Sharon E, Bar-Eyal M, Chet I, Herrera-Esterella A, Keleifeld O, Spiegel Y, 2001. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. Plant parasitic in subtropical and tropical agriculture. *Phytopathology* 91: 687–693.

Sowndhararajan K, Kang SC, 2012. In vitro antagonistic potential of *Streptomyces* sp.AM-S1 against plant and human pathogens. *Journal of Agricultural Chemistry and Environment* 1: 41–47.

Su H, Shao H, Zhang K, 2016. Antibacterial metabolites from the Actinomycete *Streptomyces* sp. P294. *Journal of Microbiology* 54 (2): 131–135.

Sun MH, Gao L, Shi YX, Li BJ, 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.

Swain S, Sahoo P, Mohapatra T, Ganguly A, Kaushal K, 1995. A simple and easy method for rapid extraction of nemathode DNA for RAPD analysis. *Indian Journal of Nemathology* 25: 225–227.

Tanha Maafi Z, 1994. Investigation of citrus nematode (*Tylenchulus semipenetrans*). *Final report.* Mazandaran, 13 pp.

Tanha Maafi Z, Mahdavian SA, 1997. Identification of species and races of (*Meloidogyne* spp.) on kiwifruit and effect of *M. incognita* on kiwifruit. *Applied Entomology and Phytopathology* 1: 1–11.

Tarkka M, Hampp R, 2008. Secondary metabolites of soil streptomycetes in biotic interactions. InSecondary metabolites in soil ecology (pp. 107–126). Springer, Berlin, Heidelberg.

Van Bezooijen J, 2006. Methods and techniques for nematology, Wageningen. Pp. 30-50.

Vetrivelkalai P, 2019. Evaluation of Endophytic Bacterial Isolates against Root Knot Nematode, Meloidogyne incognita in Tomato under Glasshouse Condition. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 8 (1): 2584–2589.

Vurukonda SSKP, Giovanardi D, Stefani E, 2018. Plant growth promoting and biocontrol activity of *Streptomyces* spp. as endophytes. *International journal of molecular sciences* 19 (4): 952.

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

Zeng Q, Huang H, Zhu J, 2013. A new nematicidal compound produced by *Streptomyces albogriseolus* HA10002. *antonie van leeuwenhoek journal* 103 (5): 1107–1111.

This is an open access article under the CC BY NC license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/)