

Evaluating the Effects of Soil-Borne *Streptomyces* spp. on Tomato Growth Indices under Biotic Stress Condition Caused by *Phytophthora nicotianae*

Reyhaneh Mijani

Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran, reyhanehijani@gmail.com

Gholam Hosein Shahidi Bonjar

Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran, shahidi@uk.ac.ir

Sonia Aghighi*

Research and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran, aghighis@uk.ac.ir

Akram Sadeghi

Assistant Professor of Molecular Genetics. Department of Microbial Biotechnology. Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII).
Agricultural Research, Education and Extension
Organization (AREEO), Karaj, Iran, aksadeghi@abrii.ac.ir

Abstract

Introduction: *Phytophthora nicotianae* is a destructive plant pathogen with a worldwide distribution that causes root, fruit, leaf, and crown rot. *Phytophthora* species are the main reason for various diseases in a wide range of plant species including vegetables. Symptoms include fruit, stem, crown, and root rot. They lead to plant host death and in most cases, the economic losses caused by *P. nicotianae* are very high due to the diversity of the host range and its damage, therefore, controlling this pathogen is a constant challenge.

Materials and methods: In order to biologically control the disease, three *Streptomyces* isolates including M6, M8, and M215 were selected from a large number of soil-inhabitant actinomycetes isolated from Kerman province, which showed effective anti-Oomycete activity against *P. nicotianae*. To better understand the inhibitory mechanism of these isolates, *in vitro* dual-culture assay, plant growth promotion, and pathogen control effects were investigated through the application of antagonists under laboratory and greenhouse conditions. Molecular identification of the most promising isolate was also achieved.

Results: The antagonistic activity of three isolates including M8, M6, and M215 against *P. nicotianae* in tomato plants (super chef variety) was evaluated. Among all, based on the statistical analysis under both laboratory and glasshouse conditions, the M8 isolate had an inhibitory effect on the crown and root rot of tomato. The comparison of the effects of antagonists on the tomato plant yield indices revealed that M8 isolate had the greatest effect on increasing the growth indices of the tomato plant (super chef cultivar) including plant height, the number of flowers, shoot, and root dry weight. The M8 isolate was identified by the sequence analysis of a small ribosomal RNA subunit (16S rRNA). Based on the results of the present study, *Streptomyces venetus* CMU-AB225T strain had the highest similarity (96.08%) with the M8 isolate.

Discussion and conclusion: The results showed that M8 isolate can be considered as a beneficial microorganism to produce some useful biofertilizers and bioactive materials to control tomato crown and root rot biologically. Some biocontrol agents such as *T. harzianum* and *T. asperellum* within composts can be effective in reducing the symptoms of *Ph. nicotianae*

* Corresponding author

Received: August 12, 2020 / **Accepted:** December 15, 2020

in pepper seedlings. The production of any product based on the *S. venetus* (M8) requires fulfilling further research steps such as the interaction of the bacterium with other beneficial soil microorganisms and its impact on the population of beneficial soil microbes, evaluation of the antimicrobial activity of M8 against other plant pathogenic fungi, fungal-like microorganisms and bacteria. Moreover, biosafety considerations and measures have to be investigated.

Key words: *Streptomyces*, *Phytophthora nicotianae*, Anti-Oomycete Activity, Tomato

فصلنامه علمی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها (نوع مقاله پژوهشی)

سال دهم، شماره ۳۸، تابستان ۱۴۰۰، صفحه ۵۷ - ۷۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۵/۲۲ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۹/۲۵

doi: 10.22108/BJM.2020.124279.1316

ارزیابی تأثیر استرپتومایسس‌های خاک‌برد بر شاخص‌های رشدی گیاه گوجه‌فرنگی در شرایط تنش زیستی ناشی از شبه‌قارچ *Phytophthora nicotianae*

ریحانه میجانی: کارشناس ارشد رشته گیاه‌پزشکی، بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران، revhanemijani@gmail.com
غلامحسین شهیدی بنجار: استاد بیماری‌شناسی گیاهی، بخش مهندسی گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران، shahidi@uk.ac.ir
سونیا عقیقه‌سی: استادیار گروه فیزیولوژی گیاهی، پژوهشکده فناوری تولیدات گیاهی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران، aghighis@uk.ac.ir
اکرم صادقی: عضو هیات علمی بخش بیوتکنولوژی میکروبی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران، aksadeghi@abrii.ac.ir

چکیده

مقدمه: شبه‌قارچ *Phytophthora nicotianae* (Breda de Haan) بیمارگر گیاهی ویرانگر با انتشار جهانی است که سبب پوسیدگی ریشه، میوه، برگ و طوقه گیاه می‌شود. این میکروارگانیسم یکی از مخرب‌ترین اوومیسیت‌های بیمارگر گیاهی به شمار می‌رود. گونه‌های فیتوفتورا به‌عنوان عامل بیماری‌های مختلف در تعداد زیادی از گیاهان صیفی و جالیز شناخته شده‌اند که در اثر حمله به گیاه، علائمی مانند مرگ گیاهچه، سوختگی اندام‌های هوایی و پوسیدگی میوه، ساقه، طوقه و ریشه ایجاد می‌کنند و در بیشتر موارد نیز منجر به مرگ میزبان می‌شوند. زیان‌های اقتصادی ناشی از *P. nicotianae* به دلیل تنوع میزبان و خسارت‌های زیست‌محیطی آن بسیار زیاد است؛ ازاین‌رو، کنترل این بیمارگر یک چالش مداوم محسوب می‌شود.

مواد و روش‌ها: به منظور کنترل بیولوژیک بیماری مزبور، از بین تعداد زیادی از اکتینومیسیت‌های خاکری جداشده از استان کرمان سه جدایه M6، M8 و M215 انتخاب شدند که فعالیت ضداوومیسیتی مؤثری علیه *P. nicotianae* نشان دادند. برای درک بهتر مکانیسم‌های بازدارندگی این جدایه‌ها، آزمون کشت متقابل در شرایط آزمایشگاهی، اثر محرک رشدی و کنترل‌کنندگی بیمارگر از طریق کاربرد جدایه‌های آنتاگونیست در شرایط گلخانه‌ای و شناسایی مولکولی آنتاگونیست منتخب با اعمال بهترین اثر مهارکنندگی بر بیماری در گیاه گوجه‌فرنگی رقم Super Chef انجام شد.

نتایج: سه جدایه M6، M8 و M215 جداشده از خاک به منظور ارزیابی فعالیت آنتاگونیستی علیه بیمارگر *P. nicotianae* در گیاه گوجه‌فرنگی ارزیابی شدند. از بین آنها جدایه M8 در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای پس از آنالیز آماری، اثر مهارکنندگی بر بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه گوجه‌فرنگی اعمال کرد. مقایسه عملکرد جدایه‌های ارزیابی‌شده در شرایط گلخانه‌ای نشان داد جدایه M8 بیشترین تأثیر را در افزایش شاخص‌های رشد گیاه گوجه‌فرنگی رقم Super Chef شامل ارتفاع بوته، تعداد گل، وزن خشک اندام هوایی و وزن خشک ریشه داشت. جدایه مزبور براساس آنالیز توالی زیرواحد کوچک RNA ریپوزومی (16S rRNA)، شناسایی و براساس نتایج حاصل سوئیچ شاخص *Streptomyces venetus* CMU-AB225^T بالاترین شباهت (۹۶/۰۸ درصد) را با جدایه M8 داشت.

بحث و نتیجه‌گیری: امید است بتوان از سوئیچ *S. venetus* M8 در کودهای زیستی و تولید ترکیبات بازدارنده زیستی برای بیوکنترل بیمارگرهای گیاهی استفاده کرد. در این خصوص، در تحقیقاتی گزارش شده است که استفاده از عوامل مختلف کنترل زیستی مانند *Trichoderma harzianum* و *T. asperellum* در کمپوست غنی‌شده می‌تواند برای کاهش علائم *P. nicotianae* در نهال‌های فلفل مؤثر باشد. در این راستا، تولید محصول بر پایه باکتری *S. M8* مستلزم انجام تحقیقات فراتری است؛ ازجمله برهمکنش باکتری مزبور با سایر میکروارگانیسم‌های مفید خاکری و عدم تأثیر منفی در جمعیت میکروب‌های مفید خاک، بررسی دامنه فعالیت ضد میکروبی باکتری علیه سایر قارچ‌ها و باکتری‌های بیمارگر گیاهی و ملاحظات ایمنی زیستی.

واژه‌های کلیدی: استرپتومایسس، *Phytophthora nicotianae*، فعالیت ضداوومیسیتی، گوجه‌فرنگی

* نویسنده مسئول مکاتبات

Copyright©2021, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

گوجه‌فرنگی، با نام علمی *Solanum lycopersicum* متعلق به تیره *Solanaceae* است. سال‌های زیادی این گیاه به صورت زینتی در اروپا کشت می‌شد. در اواخر قرن هجدهم به عنوان گیاهی با مصرف خوراکی شناخته شد (۱). گوجه‌فرنگی پس از سیب‌زمینی، بین سبزیجات از نظر اقتصادی مقام دوم را در جهان دارد (۲). قارچ *Phytophthora nicotianae* (Breda de Haan) بیمارگر گیاهی ویرانگر با گسترش جهانی است که سبب پوسیدگی ریشه، میوه، برگ و طوقه می‌شود (۳) و براساس اهمیت علمی و اقتصادی در لیست ۱۰ اوومیسست بیمارگر مهم قرار گرفته است (۴). این بیمارگر باعث کاهش رشد، زردشدن برگ‌ها، شانکر ساقه، کاهش عملکرد و مرگ گیاهان آسیب‌دیده می‌شود. همچنین، پوسیدگی ساقه و ریشه و در نتیجه، بروز نشانه‌های کمبود آب در گیاهانی مانند گوجه‌فرنگی، تنباکو، آووکادو، پنبه و برخی از گیاهان زینتی و درختان را سبب می‌شود (۵). این بیمارگر روی میوه گوجه‌فرنگی علائم موسوم به پوسیدگی چشم آهوایی ایجاد می‌کند که به صورت حلقه‌های موجی سبز روشن و سبز تیره یا قهوه‌ای مشاهده می‌شود. این علائم، نقاط آب سوخت‌هایی‌اند که در نزدیکی انتهای محل گلگاه یا در محل تماس مستقیم میوه‌ها با خاک ظاهر می‌شوند (۶). مدیریت بیماری‌های ناشی از قارچ‌ها و شبه‌قارچ‌های خاک‌برد از طریق روش‌های شیمیایی و زراعی مشکل است و به هزینه زیادی نیاز دارد. همچنین، به کارگیری سموم شیمیایی موجب برهم خوردن تنوع میکروبی خاک می‌شود و اثرات مخرب زیست‌محیطی به

همراه دارد؛ بنابراین، در تحقیق ارائه‌شده، هدف نهایی ما دستیابی به کشاورزی پایدار از طریق به کارگیری استرپتومایسس‌های آنتاگونیست جداشده از خاک بر شاخص‌های رشدی گیاه گوجه‌فرنگی در شرایط تنش زیستی ایجادشده توسط شبه‌قارچ خاک‌برد *P. nicotianae* است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و جداسازی اکتینومیسست‌ها: نمونه‌برداری از خاک منطقه ریزوسفر گیاهچه گوجه‌فرنگی و سیب‌زمینی از مزارع شهرستان‌های جیرفت و ماهان و مزارع یونجه دانشگاه شهید باهنر کرمان انجام گرفت. برای نمونه‌برداری، حدود ۱۰ سانتی‌متر از سطح رویی خاک کنار زده و مقداری خاک (۱۰۰ گرم) از اطراف ریشه گوجه‌فرنگی، سیب‌زمینی و یونجه برای انجام مراحل بعدی به آزمایشگاه منتقل شد. نمونه‌ها به مدت سه الی چهار روز در معرض هوای خشک قرار داده و پس از خشک‌شدن در پاکت‌های کاغذی با درج تاریخ و محل جمع‌آوری، در دمای محیط نگهداری شدند. هنگام استفاده، ۱۰ گرم از هر نمونه خاک به ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون اضافه شد. مخلوط حاصل با آهن‌ربا به مدت نیم ساعت روی دستگاه همزن به خوبی مخلوط شد. سپس یک میلی‌لیتر از فاز رویی به ۹ میلی‌لیتر آب مقطر سترون اضافه و سری رقت 10^{-2} تا 10^{-6} تهیه شد. یک میلی‌لیتر از هر کدام از رقت‌های حاصل در کف تشتک‌های پتری سترون ریخته شد و مقدار ۲۵-۲۰ میلی‌لیتر از محیط کشت Casein Glycerol Agar مذاب با دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد به آنها اضافه و

به آرامی مخلوط شد. نمونه ها در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. این آزمایش در سه تکرار انجام (۷) و پس از گذشت ۱۰-۷ روز روی محیط کشت پرکنه های اکتینومیسست ها و باکتری ها ظاهر شدند (۸).

آزمون بیماری زایی در شرایط آزمایشگاهی: به منظور ارزیابی بیماری زایی شبه قارچ فیتوفتورا (تهیه شده از کلکسیون واحد حفظ نباتات، سازمان جهاد کشاورزی استان کرمان) روی بذور گوجه فرنگی، ابتدا عامل بیمارگر به صورت پلاگ گذاری (قطر هر پلاگ ۶ میلی متر) روی کاغذ صافی سترون قرار گرفت و سپس روی محیط آرد ذرت آگار CMA^۱ کشت داده شد. پس از گذشت ۷-۵ روز ریشه های اوومیسست روی کاغذ صافی مشاهده شدند. بذور گوجه فرنگی سترون شده با هیپوکلریت سدیم ۲ درصد روی کاغذ صافی های آغشته به اوومیسست قرار گرفتند و سپس روی محیط آب - آگار قرار داده شدند. علائم بیماری پس از ۷ روز ثبت شد.

آزمون کشت متقابل و ارزیابی فعالیت ضداوومیسستی باکتری ها: به منظور تعیین توانایی جدایه های اکتینومیسست در ممانعت از رشد اوومیسست بیمارگر و انتخاب جدایه برتر، ابتدا عامل بیمارگر به صورت چمنی روی محیط CMA کشت شد. سپس یک دیسک ۶ میلی متری از کشت ۱۰-۷ روزه ۷۰ جدایه اکتینومیسست جدا شده روی آن قرار داده شد. نمونه شاهد، محیط کشت فاقد باکتری در نظر گرفته شد. تشک های پتری به مدت ۵ روز در انکوباتور و در شرایط تاریکی و دمای ۲۸ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. میزان فعالیت ضداوومیسستی براساس قطر هاله ممانعت از رشد بیمارگر سنجیده شد.

استخراج DNA ژنومی: ۲۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون کشت ۳ روزه باکتری در محیط CGA مایع به مدت ۳ دقیقه در rpm ۳۰۰۰ یا دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی، حذف و به رسوب حاصل ۴۰۰ میکرولیتر آب مقطر سترون اضافه شد. به سوسپانسیون حاصل ۴۰۰ میکرولیتر بافر استخراج ۲X (۵۰ میلی مولار Tris-HCl، ۲۵ میلی مولار EDTA، ۱ درصد SDS و ۱۰ µg/ml پروتیناز K) اضافه شد. نمونه ها به مدت ۳ ساعت در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. سپس ۴۰۰ میکرولیتر از آمونیوم استات ۷/۵ مولار به هر لوله، اضافه و به مدت ۲ تا ۳ دقیقه تکان داده شد. بعد از این مرحله، لوله ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس ۷۵۰ میکرولیتر از رانشین به لوله جدید منتقل شد و ۷۵۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد به آن، اضافه و با دست تکان داده شد. نمونه ها به مدت یک شب در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد قرار گرفتند. سپس نمونه ها به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۲۵۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شدند و رسوب حاصل با ۷۵۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد دو بار شسته و در دمای ۵۶ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه خشک شد. رسوب حاصل در ۲۰ میکرولیتر آب مقطر سترون، حل و یک شب در ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. نمونه ها برای نگهداری طولانی مدت به فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد منتقل شدند (۹).

بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده: برای تعیین کمیت DNA از دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد. غلظت DNA موجود در هر نمونه برحسب نانو گرم

تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی و رسم تبارنما: توالی حاصل برای تعیین درصد شباهت اولیه با سایر توالی‌های موجود در بانک داده NCBI استفاده شد. درنهایت، برای تعیین میزان شباهت توالی ژنومی 16S rRNA جدایه با سایر باکتری‌ها براساس میزان تشابه جفت‌باز از بانک داده EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net>) استفاده شد. پس از هم‌ترازی توالی‌ها با استفاده از الگوریتم CLUSTAL W از نرم‌افزار MEGA5 (روش Neighbor-joining) برای رسم درخت فیلوژنی استفاده شد. بررسی بوت استرپ (Bootstrap) به منظور ارزیابی پایداری ضرایب همبستگی بر پایه ۱۰۰۰ بار نمونه‌گیری تصادفی انجام شد (۱۱). از سویه شاخص باکتری *Actinomadura madurae* به عنوان نمونه غیرخویشاوند استفاده شد که از جنس‌های نزدیک *Streptomyces* است.

مطالعات گلخانه‌ای: به منظور اطمینان از فعالیت آنتاگونیستی جدایه‌های اکتینومیست علیه شبه‌قارچ *P. nicotianae* عامل پوسیدگی طوقه و ریشه در گیاه گوجه‌فرنگی، آزمایش در شرایط گلخانه به شرح ذیل انجام گرفت. این آزمون در قالب فاکتوریل و در سه تکرار برای سه جدایه (M6، M8 و M215) با تیمارهای زیر انجام شد: ۱- شاهد (گیاه بدون مایه‌زنی با شبه‌قارچ *P. nicotianae* و باکتری‌های آنتاگونیست)، ۲- اوومیست بیمارگر (*P. nicotianae*)، ۳- جدایه M8، ۴- جدایه M6، ۵- جدایه M215، ۶- اوومیست بیمارگر و جدایه M8، ۷- اوومیست بیمارگر و جدایه M215 و ۸- اوومیست بیمارگر و جدایه M6.

DNA موجود در هر میکرولیتر محلول (ng/μl) توسط دستگاه گزارش شد. همچنین با استفاده از دستگاه نسبت DNA استخراج شده به پروتئین (در دو طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر) تخمین زده شد. برای اطمینان از کیفیت DNA استخراج شده از روش الکتروفورز ژل آگارز استفاده شد.

انجام واکنش PCR: شناسایی باکتری منتخب براساس آنالیز توالی زیرواحد کوچک RNA ریپوزومی (16S rRNA) و با استفاده از آغازگرهای PAF (5'- (AGAGTTTGATCCTGGCTCAGA-3' و PAR (5'- AAGTCGTAACAAGGTAGCCGT-3') انجام شد (۱۰). برای انجام PCR از مخلوط Master mix آماده با نام تجاری Amplicon در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر استفاده شد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر ساخت شرکت Bio-Rad با شرایط دمایی به شرح زیر انجام شد؛ ۵ دقیقه واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و در ادامه، ۳۵ چرخه شامل واسرشت‌سازی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، بسط در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه و درنهایت، بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه.

توالی‌یابی محصولات تکثیرشده: پس از مشاهده قطعه تکثیرشده مدنظر (حدود ۱۵۰۰ bp) روی ژل آگارز و مقایسه با نشانگر اندازه DNA با نام تجاری (Gene Ruler™ DNA Ladder Mix)، محصول حاصل برای توالی‌یابی از طریق شرکت ژن فناوری‌ان تهران به شرکت ماکروژن کره جنوبی فرستاده شد.

شد. خاک مایه زنی شده بین دو لایه مخلوط بستر قرار گرفت و به خوبی مخلوط شد. در تیمار بیمارگر، ۱۰۰ گرم از مخلوط بستر با ۲۰ میلی لیتر سوسپانسیون بیمارگر مخلوط (مایه زنی) شد. خاک مایه زنی شده بین دو لایه مخلوط بستر قرار گرفت و به خوبی مخلوط شد. در تیمار مخلوط باکتری و بیمارگر، ۲۰ میلی لیتر سوسپانسیون بیمارگر و ۲۰ میلی لیتر سوسپانسیون باکتری با هم مخلوط و به ۱۰۰ گرم مخلوط بستر اضافه شدند. خاک مایه زنی شده بین دو لایه مخلوط بستر قرار گرفت و به خوبی مخلوط شد. چهار عدد بذر گوجه فرنگی ضد عفونی شده در عمق یک سانتی متری خاک هر گلدان کاشته شدند. برای هر تیمار چهار گلدان و هر گلدان به عنوان یک تکرار در نظر گرفته شد. آبیاری گلدان ها با آب مقطر سترون انجام شد (۸). نود روز پس از کشت بذرها تعداد برگ، طول گیاه، وزن خشک اندام های هوایی و ریشه و تعداد گل بررسی و ثبت شدند.

تجزیه و تحلیل آماری نتایج: تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار SAS نسخه ۹/۱ انجام گرفت. سطح معنی داری آزمون ها برابر ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. برای آنالیز توصیفی متغیرها، میانگین و انحراف معیار گزارش شده است. برای بررسی معنی دار بودن تفاوت بین میانگین های متغیرهای با توزیع نرمال از جدول آنالیز واریانس و برای بررسی تفاوت بین میانگین تیمارهای مختلف از آزمون دانکن استفاده شد.

نتایج

اثبات بیماری زایی عامل بیمارگر در شرایط آزمایشگاه: پس از ۱۵ روز بذرها آغشته به عامل

ضد عفونی سطحی بذرها گوجه فرنگی: برای اطمینان از حذف آلودگی های موجود روی سطح، بذرها گوجه فرنگی به مدت ۳۰ ثانیه در هیپوکلریت سدیم دو درصد قرار گرفتند و سپس برای حذف هیپوکلریت سدیم، بذور دو بار و هر مرتبه به مدت دو دقیقه در آب مقطر سترون شسته شدند.

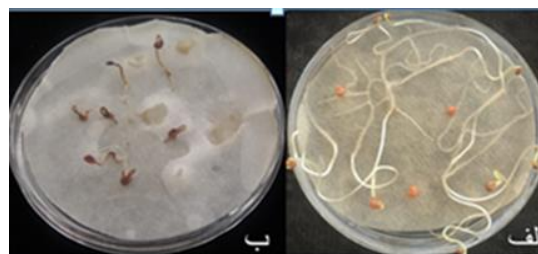
تهیه اینوکولوم *P. nicotianae* و سوسپانسیون جدایه های فعال اکتینومیسیت: برای تولید اینوکولوم، ابتدا شبه قارچ فیتوفتورا روی محیط CMA به صورت پلاگ گذاری، کشت و به مدت ۷ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد نگهداری شد. پس از رشد فیتوفتورا روی محیط کشت، با اضافه کردن ۲۰ میلی لیتر آب مقطر سترون به هر تشتک، فیتوفتورا از روی سطح محیط کشت خراش داده و برای انجام مراحل بعدی استفاده شد. برای تهیه سوسپانسیون جدایه های استرپتومایسس منتخب، ابتدا جدایه های فعال روی محیط CGA داخل تشتک پتری، کشت و به مدت ۵ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. سپس ۲۰ میلی لیتر آب مقطر سترون به هر تشتک پتری، اضافه و سطح پرگنه ها با یک لوله L شکل سترون کاملاً خراش داده شد تا سوسپانسیونی از اسپور و میسلیم حاصل شود. بذرها ضد عفونی شده گوجه فرنگی در گلدان های حاوی مخلوط بستر (شن بادی سترون شسته شده، کوکوپیت و پیت ماس به نسبت وزنی ۲:۱:۱) کشت شدند. مایه زنی خاک همزمان با کاشت بذر و به صورت ساندویچی انجام شد. در گلدان های شاهد، مخلوط بستر بدون هر گونه مایه زنی با اوومیسیت بیمارگر و یا باکتری آنتاگونیست ریخته شد. برای تیمار باکتری، ۱۰۰ گرم از مخلوط بستر با ۲۰ میلی لیتر سوسپانسیون باکتری مایه زنی

مراحل بعدی فقط سه جدایه M6، M8 و M215 انتخاب شدند که بیشترین هاله ممانعت‌کنندگی از رشد اوومیسست بیمارگر را داشتند (شکل ۲).

شناسایی مولکولی جدایه منتخب: قطعه تکثیرشده از روی ژن *16S rRNA* روی ژل آگارز مشاهده شد. با استفاده از نشانگر استاندارد، طول این قطعه کمتر از ۱۵۰۰ جفت‌باز بود که با طول محاسبه‌شده براساس توالی ژنومی (۱۴۰۳ جفت‌باز) مطابقت داشت (شکل ۳).

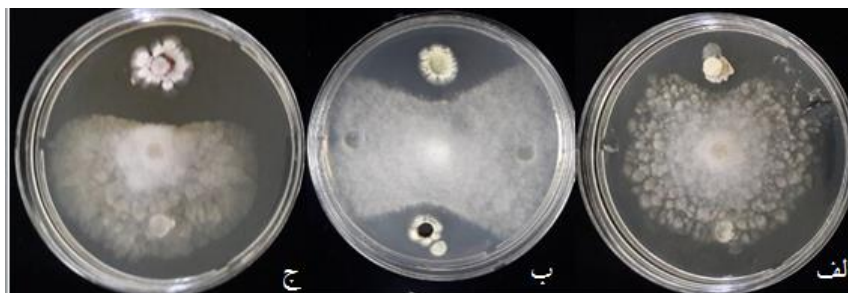
تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنی براساس ژن *16S rRNA*: با استفاده از جفت پرایمر معرفی‌شده، یک قطعه به طول ۱۴۰۳ جفت‌باز از روی ژن *16S rRNA* تکثیر شد. توالی این قطعه با کد MT071745 در بانک اطلاعات NCBI ثبت شد. بررسی اولیه براساس بلاست این توالی، قرابت ۱۰۰ درصدی جدایه M8 با دیگر اعضای جنس *Streptomyces* را نشان داد. براساس نتایج حاصل سوئی شاخص *S. venetus* CMU-AB225^T بالاترین شباهت (۹۶/۰۸ درصد) را با این جدایه داشت. درخت خویشاوندی یا تبارنما (درخت فیلوژنی) با استفاده از این توالی و توالی‌های اخذشده از بانک ژن رسم شد (شکل ۴).

بیمارگر، علائم بیماری را نشان دادند. علائم بیماری شامل کلونیزه کردن جوانه‌ها و نکروز آنها توسط اوومیسست بیمارگر بود که درنهایت، موجب مرگ گیاهچه‌ها شد. بذره‌ای شاهد به طور مناسب جوانه زدند و رشد کردند (شکل ۱).



شکل ۱- اثبات بیماری‌زایی *Phytophthora nicotianae* روی گیاهچه گوجه‌فرنگی رقم Super Chef در شرایط آزمایشگاه. الف) تشک حاوی گیاهچه‌های سالم (شاهد) ب) تشک حاوی گیاهچه‌های حاصل از بذره‌ای مایه‌زنی‌شده با قارچ بیمارگر

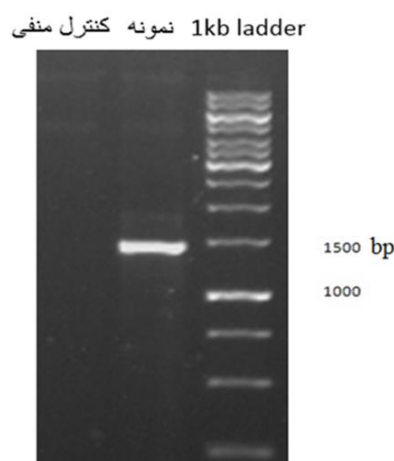
آزمون کشت متقابل و ارزیابی فعالیت ضداوومیسستی باکتری‌ها: تمام جدایه‌های باکتری خالص‌شده در آزمون زیستی به روش کشت متقابل ارزیابی شدند و میزان فعالیت ضداوومیسستی آنها با اندازه‌گیری میزان هاله ممانعت از رشد بررسی شد. از بین جدایه‌ها ۱۵ جدایه قادر به ممانعت از رشد بیمارگر بودند؛ اما درنهایت، برای



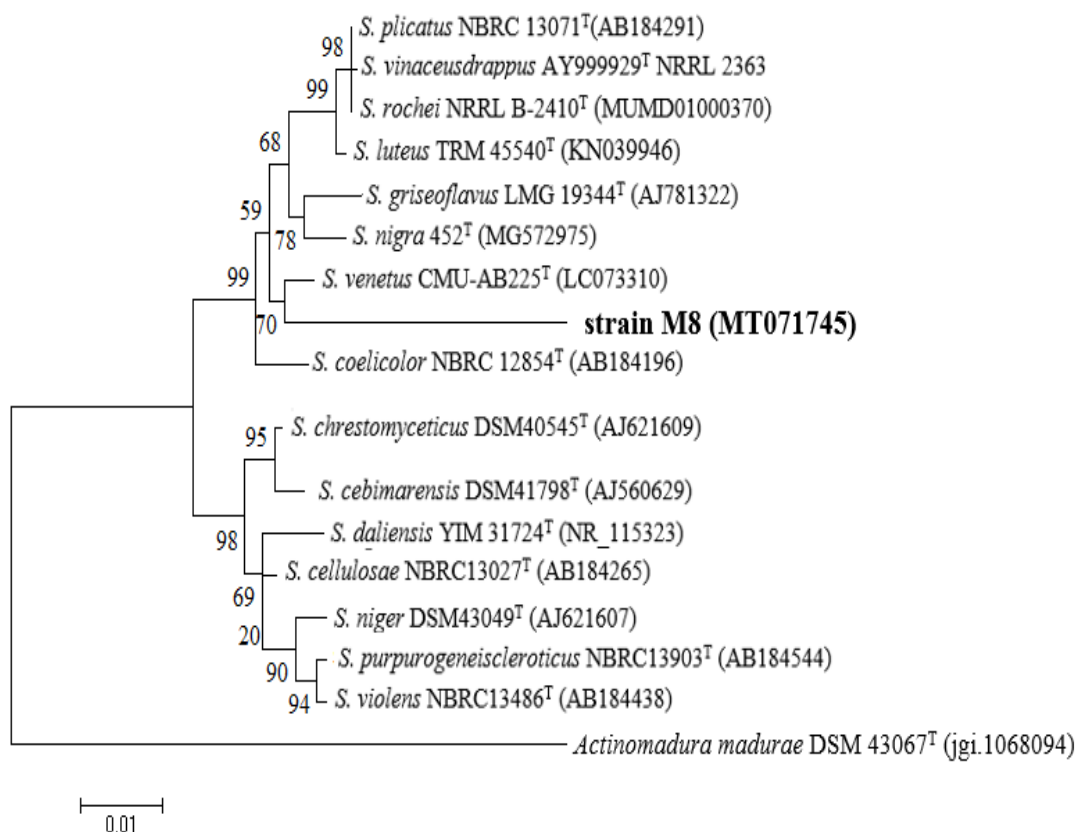
شکل ۲- نتایج فعالیت ضداوومیسستی سه جدایه اکتینومیسست فعال علیه بیمارگر *P. nicotianae* الف) اکتینومیسست جدایه M6، ب) اکتینومیسست جدایه M215 و ج) اکتینومیسست جدایه M8

اثبات بیماری‌زایی عامل بیمارگر در شرایط گلخانه:

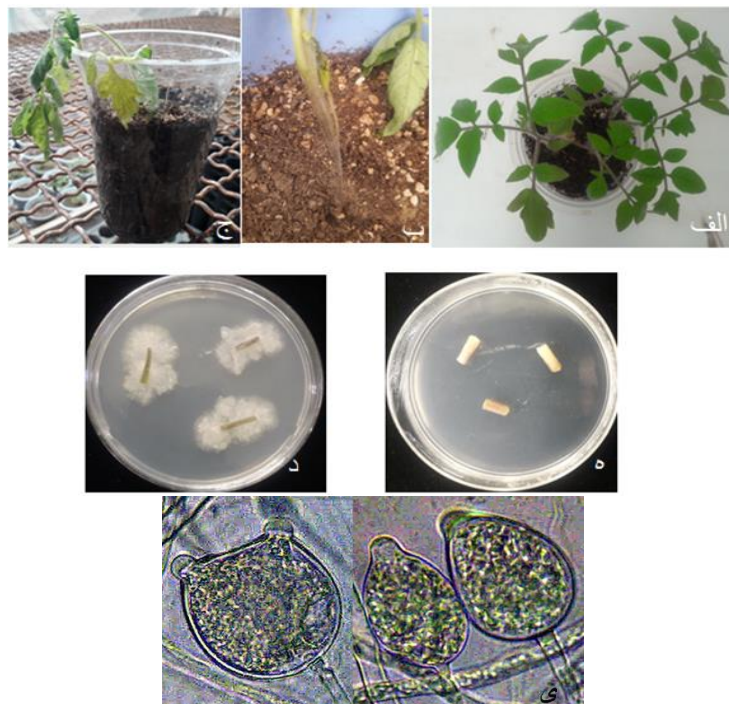
دو هفته بعد از مایه‌زنی خاک با شبه‌قارچ فیتوفتورا، بوته‌های گوجه‌فرنگی علائم پژمردگی و پوسیدگی طوقه در مقایسه با گیاهچه‌های سالم شاهد بروز دادند (شکل ۵). منطقه بالای طوقه شامل ساقه گیاهچه‌ها، علائم نکروز و کلونیزه شدن توسط *P. nicotianae* را نشان داد و بعد از کشت از مناطق نکروزه روی محیط کشت آب آگار *P. nicotianae* خالص‌سازی و شناسایی شد.



شکل ۳- باند ۱۴۰۳ جفت‌بازی حاصل تکثیر ژن 16S rRNA روی ژل آگارز



شکل ۴- درخت خویشاوندی سویه *S. venetus* M8 براساس توالی ژن 16S rRNA. درخت با استفاده از نرم‌افزار MEGA 5 و روش neighbor-joining رسم شده است. Accession number هر توالی در پرانتز آورده شده است. توالی مربوط به *Actinomadura madurae* DSM 43067^T به عنوان outgroup استفاده شد. مقادیر Bootstrap براساس ۱۰۰۰ تغییر شکل مجدد محاسبه و در نقاط انشعاب نشان داده شده‌اند.



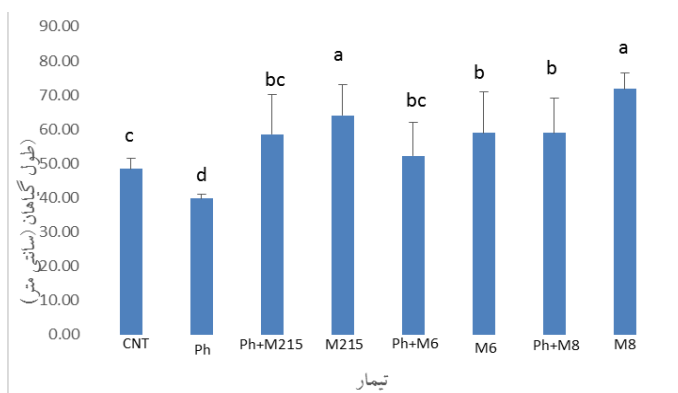
شکل ۵- آزمون بیماری‌زایی در شرایط گلخانه. الف) گیاهان گوجه‌فرنگی سالم و بدون علائم بیماری، ب) ساقه آلوده به اوومیسیت بیمارگر، ج) گیاه تیمار شده با اوومیسیت و دارای علائم بیماری، د) تشکیل ریشه‌های اوومیسیت در اطراف قطعات ساقه گیاه آلوده به عامل بیمارگر روی محیط آب - آگار بعد از ۳ روز، ه) قطعات ساقه سالم روی محیط آب - آگار و ی) تصویر میکروسکوپی اسپورانژیوم‌های واجد ۲ پاپیل و یک پاپیل *P. nicotianae*

معنی‌داری بیشتر از تیمار آلوده‌شده و بدون باکتری است. تیمار با هریک از سه باکتری موجب افزایش تعداد برگ در مقایسه با شاهد شد و اختلاف معنی‌داری بین باکتری‌ها وجود نداشت؛ اما تأثیر جدایه‌های M8 و M215 بر گیاه آلوده با بیمارگر بیش از جدایه M6 بود (شکل ۷).

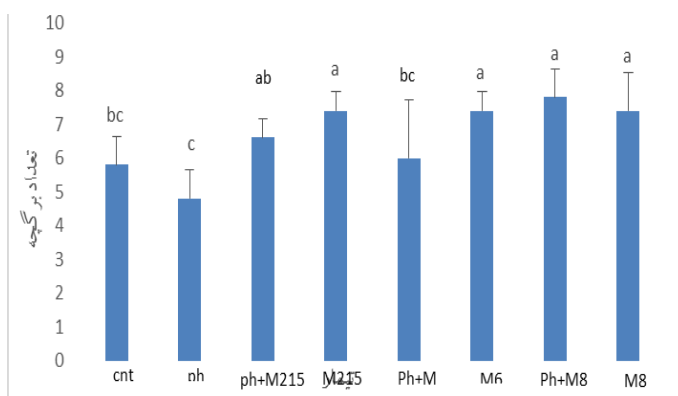
خروجی حاصل از آزمون دانکن روی میانگین تعداد گل هر بوته نشان داد عامل بیمارگر بر کاهش تعداد گل تأثیر معنی‌داری داشت. دو جدایه M6 و M8 در مقایسه با تیمار pH اثر منفی عامل بیمارگر را به‌طور معنی‌داری کاهش دادند و موجب افزایش معنی‌دار تعداد گل شدند (شکل ۸).

ارزیابی تأثیر عامل بیمارگر و جدایه‌های باکتری بر شاخص‌های رشد گیاه در شرایط گلخانه: نتایج نشان دادند عامل بیمارگر موجب کاهش معنی‌دار طول گیاه شد. تیمار با باکتری نه تنها از کاهش طول گیاه آلوده‌شده با اوومیسیت جلوگیری کرد، بلکه در تیمار با جدایه M8 افزایش طول در مقایسه با کنترل آلوده‌نشده نیز مشاهده شد. تفاوت معنی‌داری بین جدایه‌های باکتری همراه با عامل بیمارگر وجود نداشت؛ اما تأثیر جدایه M8 بیشتر از دو جدایه دیگر بود (شکل ۶).

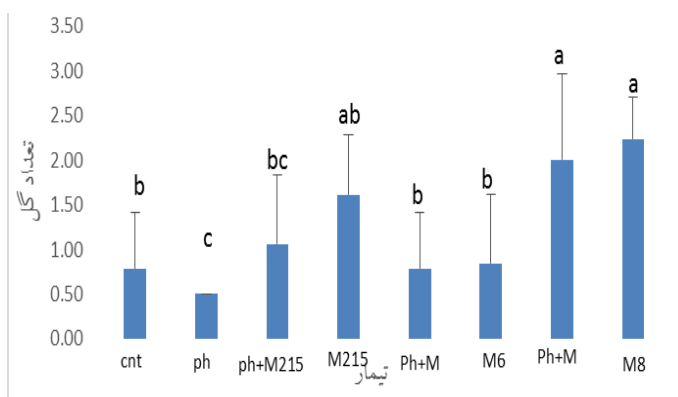
نتایج حاصل از آزمون دانکن روی میانگین تعداد برگ یک بوته نشان دادند تعداد برگ در تیمارهای M6، M8 و M215 آلوده‌شده با عامل بیمارگر به‌طور



شکل ۶- نمودار مقایسه میانگین طول گیاه برحسب سانی متر، ۹۰ روز پس از کشت بذر گوجه فرنگی در شرایط گلخانه. شاهد، فاقد هرگونه میکروارگانیزم (Cnt)، تیمار حاوی مایه تلقیح اوومیسیت بیمارگر (ph)، M6، M8 و M215 جدایه های باکتری. حروف مشابه تفاوت های غیرمعنی دار مطابق دامنه دانکن را نشان می دهند ($P < 0.05$)



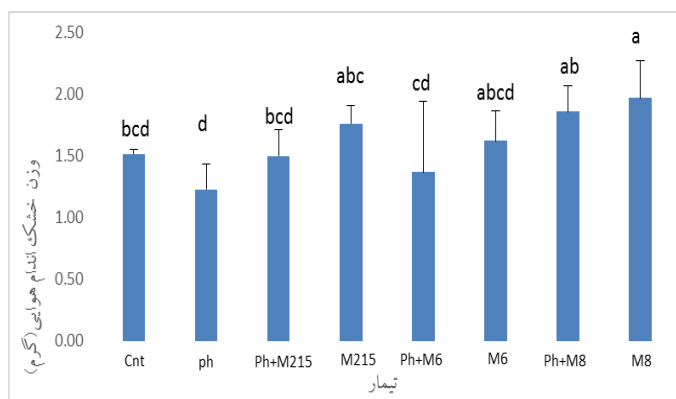
شکل ۷- نمودار مقایسه میانگین تعداد برگ ۹۰ روز پس از کشت بذر گوجه فرنگی در شرایط گلخانه. شاهد، فاقد هرگونه میکروارگانیزم (Cnt)، تیمار حاوی مایه تلقیح اوومیسیت بیمارگر (ph)، M6، M8 و M215 جدایه های باکتری. حروف مشابه تفاوت های غیرمعنی دار مطابق دامنه دانکن را نشان می دهند ($P < 0.05$)



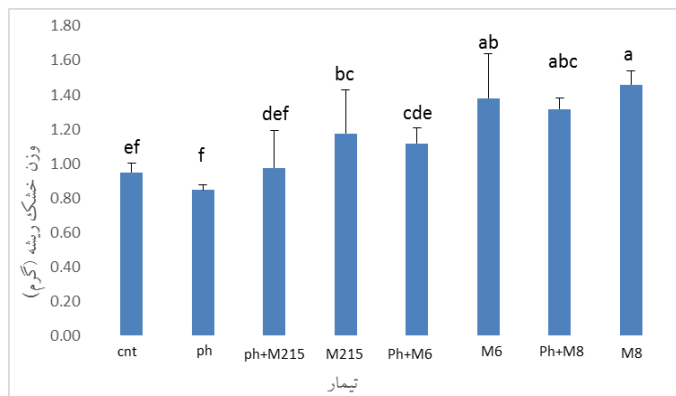
شکل ۸- نمودار مقایسه میانگین تعداد گل ۹۰ روز پس از کشت بذر گوجه فرنگی در شرایط گلخانه. شاهد، فاقد هرگونه میکروارگانیزم (Cnt)، تیمار حاوی مایه تلقیح اوومیسیت بیمارگر (ph)، M6، M8 و M215 جدایه های باکتری. حروف مشابه تفاوت های غیرمعنی دار مطابق دامنه دانکن را نشان می دهند ($P < 0.05$)

جدایه M6 و M8 موجب افزایش معنی‌دار وزن خشک ریشه در مقایسه با شاهد و عامل بیمارگر شدند. تأثیر این دو جدایه تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشت. تأثیر جدایه M215 بر افزایش وزن خشک ریشه در مقایسه با شاهد و جدایه M8 معنی‌دار بود؛ اما تفاوتی با جدایه M6 نداشت (شکل ۱۰).

عامل بیمارگر موجب کاهش وزن خشک اندام هوایی شد؛ اما این تأثیر معنی‌دار نبود. تنها جدایه M8 در صورت حضور و عدم حضور عامل بیمارگر موجب افزایش معنی‌دار وزن خشک اندام هوایی گیاه در مقایسه با شاهد و تیمار حاوی اوومیسیت شد (شکل ۹). تأثیر عامل بیمارگر بر وزن خشک ریشه همانند وزن خشک اندام هوایی معنی‌دار نبود. در این شرایط دو



شکل ۹- نمودار مقایسه میانگین وزن خشک اندام هوایی ۹۰ روز پس از کشت بذر گوجه‌فرنگی در شرایط گلخانه. شاهد، فاقد هر گونه میکروارگانیسم (Cnt)، تیمار حاوی مایه تلقیح اوومیسیت بیمارگر (ph)، M6، M8 و جدایه‌های باکتری. حروف مشابه تفاوت‌های غیرمعنی‌دار مطابق دامنه دانکن را نشان می‌دهند ($P < 0.05$)



شکل ۱۰- نمودار مقایسه میانگین وزن خشک ریشه ۹۰ روز پس از کشت بذر گوجه‌فرنگی در شرایط گلخانه. شاهد، فاقد هر گونه میکروارگانیسم (Cnt)، تیمار حاوی مایه تلقیح اوومیسیت بیمارگر (ph)، M6، M8 و جدایه‌های باکتری. حروف مشابه تفاوت‌های غیرمعنی‌دار مطابق دامنه دانکن را نشان می‌دهند ($P < 0.05$)

مقایسه عملکرد جدایه های ارزیابی شده نشان داد جدایه M8 بیشترین تأثیر را در افزایش شاخص های رشد گیاه گوجه فرنگی رقم Super Chef داشت و بعد از آن به ترتیب جدایه های M215 و M6 قرار گرفتند (جدول ۱).

جدول ۱- تأثیر جدایه های M6، M8 و M215 در ارتقای شاخص های رشد شامل ارتفاع گیاه، تعداد برگ، تعداد گل، وزن بوته و وزن ریشه گیاه

جدایه	گوجه فرنگی				
	% افزایش ارتفاع گیاه	% افزایش تعداد برگ	% افزایش تعداد گل	% افزایش وزن خشک اندام هوایی	% افزایش وزن خشک ریشه
M8	۴۸	۲۸	۱۸۷	۳۰	۵۴
M215	۳۲	۲۸	۱۰۶	۱۵	۴۵
M6	۲۴	۲۸	۹	۷	۴۷

بحث و نتیجه گیری

در این تحقیق به منظور غربال گری استرپتومایسس های جدید برای بیو کنترل اوومیسست *P. nicotianae*، چندین نمونه خاک از اطراف استان کرمان (ماهان و جیرفت) و مزرعه یونجه دانشگاه شهید باهنر کرمان جمع آوری شد و حدود ۲۰۰ جدایه اکتینومیسست خالص به دست آمد. به منظور ارزیابی فعالیت ضداوومیسستی این جدایه ها، آزمون زیستی به روش دیسک گذاری و کشت متقابل انجام شد و در نهایت، سه جدایه با کدهای M8، M215 و M6 با داشتن حداکثر هاله ممانعت از رشد در شرایط آزمایشگاهی، برای انجام آزمایش های بعدی انتخاب شدند. از بین این سه جدایه، M8 بیشترین اثر بازدارندگی از رشد هیف ها در شرایط *in vitro* را داشت و بعد از آن به ترتیب جدایه M215 و M6 قرار داشتند. در مقایسه با تحقیق حاضر، لی و همکاران^۲ (۲۲)، ۲۳۹ جدایه اکتینومیسست از ۲۹ نمونه خاک جدا کردند که ۴۸ مورد آن در برابر *P. nicotianae* اثرات آنتاگونیستی بروز دادند. براساس ویژگی های مورفولوژی و فیزیولوژی - بیوشیمی، آنتاگونیست ها به عنوان استرپتومایسس (۴۱) جدایه، ۹۷/۹۲ درصد و *Nocardia* (یک جدایه)

دانشمندان معتقدند بقایای سموم و کودهای شیمیایی در محصولات کشاورزی می تواند سبب بروز بیماری های خطرناک و شیوع عوارض مختلف در انسان و موجودات زنده شود. این سموم علاوه بر اینکه جمعیت طبیعی میکروارگانیسم های خاک را تغییر می دهند، مقداری از آنها در محصولات گیاهی باقی می ماند که به انسان منتقل می شوند؛ بنابراین، روش های مبارزه شیمیایی باید با احتیاط و به عنوان آخرین ابزار و راهکار در مدیریت آفات و بیماری های گیاهی استفاده شوند. کنترل بیولوژیک، برعکس مبارزه با سموم شیمیایی، به سرعت اثر نمی کند؛ اما در موارد موفق، مبارزه بیولوژیک اثرات ماندگارتری نسبت به سموم شیمیایی دارد. طی ۱۲۰ سال گذشته، حدود ۲۰۰۰ عامل غیرمستقیم کنترل شده در برابر آفات زیستی در ۱۹۶ کشور با مشکلات زیست محیطی چشمگیر ایجاد شده است. کنترل بیولوژیک یک مؤلفه کلیدی از رویکردهای سیستم مدیریت آفات و بیماری های گیاهی است (۱۲).

شناسایی شدند. سه جدایه اکتینومیست که فعالیت آنتاگونیستی بیشتری در کشت متقابل نشان دادند، برای مراحل بعدی انتخاب شدند. نتایج آنها نشان دادند متوسط درصد بازدارندگی ۵۹/۸۰ درصد است که بیشترین میزان بازدارندگی ۷۵/۶۹ درصد مربوط به جدایه A27-12 و کمترین میزان بازدارندگی ۵۰ درصد مربوط به جدایه A30-19 بود و هر دو تفاوت معنی‌داری داشتند؛ درحالی که نتایج آزمایش گلخانه‌ای اثرات متفاوتی را نشان دادند. بیشترین تأثیر آنتاگونیستی را جدایه A30-19 ۷۸/۷۹ درصد اعمال کرد و دو باکتری دیگر شامل A36-15 و A27-12 به ترتیب ۶۷/۹۵ درصد و ۵۷/۴۱ درصد اعمال کردند. در صورتی که در تحقیق حاضر نتایج بررسی فعالیت آنتاگونیستی جدایه‌های باکتری منتخب در شرایط آزمایشگاهی با شرایط گلخانه‌ای مطابقت داشتند. همچنین در تحقیقات دیگری، سویه‌های استرپتومایسس در کنترل زیستی گیاهچه میری خیار ناشی از شبه‌قارچ *P. capsici* نتایج مشابه تحقیق حاضر از قبیل کنترل بیماری و اثرات محرک رشد اما در شرایط نامساعد محیطی بروز دادند (۲۳).

در مطالعات گلخانه‌ای تحقیق حاضر، شاخص‌های رشدی گیاهان گوجه‌فرنگی بررسی و آنالیز آماری شد. نتایج بررسی‌های آماری ثابت کرد از نظر طول گیاه بین جدایه‌های اکتینومیست، بیشترین مربوط به جدایه M8 و بعد از آن به ترتیب جدایه M215 و M6 است. با توجه به نتایج از نظر طول گیاهان، بین تیمارهای M8 + P. *nicotianae* با *P. nicotianae* اختلاف معنی‌دار وجود داشت. همچنین، بین تیمار M8 با تیمار M215 + P. *nicotianae* اختلاف معنی‌داری وجود دارد؛ در صورتی

که بین تیمارهای M8 + P. *nicotianae*، M6، P. *nicotianae* و M215 + P. *nicotianae* اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. از نظر تعداد برگچه، بین تیمارهای استرپتومایسس، بیشترین مقدار مربوط به جدایه M215 و بعد از آن به ترتیب مربوط به جدایه M8 و M6 است. نتایج حاصل از آزمون دانکن روی میانگین تعداد برگچه‌ها نشان می‌دهند بین تیمارهای M8، M6 و M215 + P. *nicotianae* با تیمار *P. nicotianae* اختلاف معنی‌داری وجود دارد. علاوه بر این، بین تیمار M6 با M6 + P. *nicotianae* اختلاف معنی‌دار وجود دارد. در صورتی که بین تیمارهای M6، M8، M215، M8 + P. *nicotianae* و M215 + P. *nicotianae* اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. خروجی آزمون دانکن روی وزن خشک ریشه نشان می‌دهد وزن خشک تیمارهای M8، M8 + P. *nicotianae*، M6 و M215 نسبت به سایر تیمارها بیشتر است و وزن خشک ریشه در جدایه‌های دارای اکتینومیست نسبت به جدایه‌های دارای اوومیست بیشتر بوده است. این نتایج نشان‌دهنده اثر مثبت محرک رشدی تیمارهای بالا روی افزایش وزن خشک ریشه و کاهش خسارت ناشی از اوومیست بیمارگر است. کمترین وزن ریشه مربوط به تیمار حاوی *Ph. nicotianae* بود. بین تیمارهای M8، M8 + *Ph. nicotianae* و *Ph. nicotianae* اختلاف معنی‌دار وجود داشت. همچنین بین تیمارهای M6، M6 + *Ph. nicotianae* و *Ph. nicotianae* اختلاف معنی‌دار وجود داشت. در تحقیقات دیاس و همکاران^۳ (۲۴) و کوردووز و همکاران^۴ (۲۵)، نقش مؤثر جدایه‌های استرپتومایسس در تولید ترکیبات آلی فرار، سیدروفور، تنظیم آنزیم‌های

2008; 40 (9): 2217-2224.

- (7) Saadoun I, Gharaibeh R. The *Streptomyces* flora of Jordan and its' potential as a source of antibiotics active against antibiotic-resistant Gram-negative bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2002; 18 (5): 465-470.
- (8) Zaeifi M, Shahidi Bonjar GH, Negarestani MR. Investigation of antagonistic effects of soil-inhabitant actinomycetes against *Rhizoctonia solani* in rapeseed. 3rd Symposium of national student-scientific societies of Agriculture and Natural Resources, Tehran: Agriculture and Natural Resources Campus; 2015.
- (9) Sadeghi A, Soltani BM, Salehi Jouzani G, Karimi E, Khayam Nekouei M, Sadeghizadeh M. Taxonomic study of a salt tolerant *Streptomyces* sp. strain C-2012 and the effect of salt and ectoine on lon expression level. *Microbiological Research* 2014; 169 (2-3): 232-238.
- (10) Blanco MM, Gibello A, Vela AI, Moreno MA, Domínguez L, Fernandez-Garayzabal JF. PCR detection and PFGE DNA macro restriction analyses of clinical isolates of *Pseudomonas anguilliseptica* from winter disease outbreaks in sea bream *Sparus aurata*. *Diseases of Aquatic Organisms* 2002; 50 (1): 19-27.
- (11) Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 2011; 28 (10): 2731-2739.
- (12) Sarwar A, Latif Z, Zhang S, Zhu J, Zechel DL, Bechthold A. Biological control of potato common scab with rare Isatropolone C compound produced by plant growth promoting *Streptomyces* A1RT. *Frontiers in Microbiology* 2018; 9: 1-10.

مؤثر در رشد گیاه و تأثیر مثبت بر شاخص های رشدی گیاه و آنتاگونیسم میکروبی در آزمایشات متعددی تأیید شده است. برآورد کلی نتایج این تحقیق در راستای سایر تحقیقات مرتبط انجام شده توسط محققان در سطح ملی و بین المللی نشان می دهدند جدایه های استرپتومایسس، انتخاب مناسبی برای بهبود عملکرد گونه های گیاهی در شرایط تنش ناشی از شبه قارچ ها و قارچ های بیمارگر گیاهی خاکبرد محسوب می شوند.

References

- (1) Peyvast Gh. *Growing vegetables*. Tehran: Daneshpazir publisher; 2005.
- (2) Mazaheri-Tehrani MS, Mortazavi HR, Ghandi A. *Tomato: production and processing*. Mashhad: Marz-danesh publisher, Ferdows University of Mashhad; 2007.
- (3) Erwin DC, Ribeiro OK. *Phytophthora diseases worldwide*. USA: American Phytopathological Society (APS Press); 1996.
- (4) Kamoun S, Furzer O, Jones JD, Judelson HS, Ali GS, Dalio RJ, et al. The top 10 oomycete pathogens in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology* 2015; 16 (4): 413-434.
- (5) Grote D, Claussen W. Severity of root rot on tomato plants caused by *Phytophthora nicotianae* under nutrient-and light-stress conditions. *Plant Pathology* 2001; 50 (6): 702- 707.
- (6) Lioussanne L, Jolicoeur M, St-Arnaud M. Mycorrhizal colonization with *Glomus intraradices* and development stage of transformed tomato roots significantly modify the chemotactic response of zoospores of the pathogen *Phytophthora nicotianae*. *Soil Biology and Biochemistry*

- (13) Panabieres F, Ali GS, Allagui MB, Dalio RJ, Gudmestad NC, Marie-Line KUHN, et al. *Phytophthora nicotianae* diseases worldwide: new knowledge of a pathogen. *Phytopathologia Mediterranea* 2016; 55(1): 20-40
- (14) Barka E, Vatsa P, Sanchez L, Gaveau-Vaillant N, Jacquard C, Klenk HP. The Actinobacteria: taxonomy, physiology and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2016; 80: 1-43.
- (15) Karuppiah V, Sun W, Li Z. Natural products of Actinobacteria derived from marine organisms. *Studies in Natural Products Chemistry* 2016; 48: 417-446.
- (16) Qin S, Li J, Chen HH, Zhao GZ, Zhu WY, Jiang CL, Li WJ. Isolation, diversity, and antimicrobial activity of rare actinobacteria from medicinal plants of tropical rain forests in Xishuangbanna, China. *Applied and Environmental Microbiology* 2009; 75(19): 6176-6186.
- (17) Welbaum G, Sturz AV, Dong Z, Nowak J. Fertilizing soil microorganisms to improve productivity of agroecosystems. *Critical Reviews in Plant Sciences* 2004; 23:175-193.
- (18) Gomes RC, Semedo LTAS, Soares RMA, Alviano CS, Linhares LF, Coelho RR. Chitinolytic activity of actinomycetes from a cerrado soil and their potential in biocontrol. *Letters in Applied Microbiology* 2000; 30(2): 146-150.
- (19) Petrosyan P, García-Varela M, Luz-Madrigal A. *Streptomyces mexicanus* sp, a xylanolytic micro-organism isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2003; 53(1): 269-273.
- (20) Ramesh S, Mathivanan N. Screening of marine actinomycetes isolated from the bay of Bengal, India for antimicrobial activity and industrial enzymes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2009; 25(12): 2103-2111.
- (21) Franco-Correa M, Quintana A, Duque C, Suarez C, Rodríguez MX, Barea JM. Evaluation of actinomycete strains for key traits related with plant growth and Mycorrhiza helping activities. *Applied Soil Ecology: a Section of Agriculture, Ecosystems and Environment* 2010; 45(3): 209-217.
- (22) Lee JY, Hwang BK. Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. *Canadian Journal of Microbiology* 2002; 48 (5): 407-417.
- (23) Abbasi S, Sadeghi A, Safaie N. Biocontrol of cucumber damping-off by *Streptomyces* strains producing siderophore and cellulose under extreme condition. *Biological Journal of Microorganism* 2020; 9 (33): 1-13.
- (24) Dias MP, Bastos MS, Xavier VB, Cassel E, Astarita LV, Santarém ER. Plant growth and resistance promoted by *Streptomyces* spp. in tomato. *Plant Physiology and Biochemistry* 2017; 118: 479-493.
- (25) Cordovez V, Carrion VJ, Etalo DW, Mumm R, Zhu H, van Wezel GP, et al. Diversity and functions of volatile organic compounds produced by *Streptomyces* from a disease-suppressive soil. *Frontiers in Microbiology* 2015; 6: 1-13.

¹- Corn Meal Agar

²- Lee et al

³- Dias et al

⁴- Cordovez et al.