

Isolation and molecular identification of melon (*Cucumis melo*) rhizosphere inhabitant Actinomycetes with plant growth promoting activity under biotic stress caused by *Macrophomina phaseolina*

Ruhangiz Rostami Mehrueiyeh

MSc graduate, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. Email: ruhanros72@gmail.com

Gholam Hosein Shahidi Bonjar

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

Sonia Aghighi

*Corresponding author. Assistant Professor, Research and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. Email: aghighis@uk.ac.ir

Akram Sadeghi

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

Abstract

Objective

Melon charcoal rot is one of the most important diseases that significantly reduces the yield of melon (*Cucumis melo* L.). The main objectives of this study were: isolation of actinomycetes from the rhizospheric soil of different melon cultivation regions located in the Kerman and Sistan and Baluchestan provinces of Iran; investigating the antagonistic effects of actinomycetes against melon black stem or charcoal rot disease; evaluation of siderophore production by isolates *in vitro*; identification of potential isolate by PCR, and investigating their biocontrol efficacy against *Macrophomina phaseolina* in melon under greenhouse condition.

Materials and methods

Eighty actinomycete isolates were isolated from the soil of selected different melon cultivation areas and their antifungal activity against *Macrophomina phaseolina* was investigated. Potential

isolates were evaluated for biological activities. Moreover, the efficacy of selected actinobacteria in order to biocontrol charcoal rot disease was investigated under greenhouse condition.

Results

Three actinomycete isolates (R1.6, R5.52 and R5.56) were revealed the highest inhibition zone size against *Macrophomina phaseolina* and selected for further investigations. All three isolates were able to colonize melon roots, produce extracellular enzymes and control disease in the greenhouse. The actinomycete isolate R5.56 was identified by sequence analysis of small ribosomal RNA subunit (*16S rRNA*) and based on the results this isolate had the highest similarity (98%) with *Streptomyces* species.

Conclusions

Biological control of plant pathogens, unlike the application of chemical pesticides, does not work quickly, but in successful cases, has more long-lasting effects compare to chemical pesticides. Biological control should be mentioned as a key component of the integrated pests and plant diseases management system approaches to minimize the environmental side effects and risks as the consequences of over usage of chemicals. This study is a prelude to further studies such as the use of these antagonists against *Macrophomina phaseolina* in the field, which must be done for at least three years.

Keywords: Actinomycete, Antifungal activity, Plant growth promotion, *Cucumis melo*, melon charcoal rot disease, *Macrophomina phaseolina*.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Rostami Mehruieyeh R, Shahidi Bonjar GH, Aghighi S, Sadeghi A (2021) Isolation and molecular identification of melon (*Cucumis melo*) rhizosphere inhabitant Actinomycetes with plant growth promoting activity under biotic stress caused by *Macrophomina phaseolina*. *Agricultural Biotechnology Journal* 13 (2), 21-44.

Agricultural Biotechnology Journal 13 (2), 21-44

DOI: 10.22103/jab.2021.17109.1288

Received: May 5, 2021.

Accepted: May 30, 2021.



Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

جداسازی و شناسایی مولکولی اکتینومیست‌های ریز و سفر گیاه خربزه (*Cucumis melo*) با هدف بررسی اثرات محرک رشدی گیاه تحت شرایط تنش زیستی ناشی از قارچ *Macrophomina phaseolina*

روح انگیز رستمی مهری

دانش‌آموخته مقطع کارشناسی ارشد، بخش مهندسی گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.
رایانامه: ruhanros72@gmail.com

غلامحسین شهیدی بنجار

استاد تمام، بخش مهندسی گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران. رایانامه: shahidi@uk.ac.ir

سونیا عقیقی

* نویسنده مسئول: استادیار، پژوهشکده فناوری تولیدات گیاهی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران. رایانامه: aghighis@uk.ac.ir

اکرم صادقی

استادیار، بخش بیوتکنولوژی میکروبی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. aksadeghi@abrii.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۳/۰۹

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۱۵

چکیده

هدف: بیماری ساق‌سیاه خربزه از مهمترین بیماری‌هایی است که به میزان قابل توجهی باعث کاهش محصول خربزه می‌شود. اهداف این پژوهش جداسازی اکتینومیست‌ها از خاک مناطق مختلف کشت خربزه در استان‌های کرمان و سیستان و بلوچستان، بررسی اثرات کنترل زیستی اکتینومیست‌های مذکور علیه بیماری ساق‌سیاه یا پوسیدگی ذغالی خربزه، ارزیابی تولید سیدروفور توسط جدایه‌ها در شرایط آزمایشگاهی، شناسایی مولکولی و سنجش اثر محرک رشدی جدایه‌های منتخب روی گیاه خربزه و ارزیابی کنترل‌کنندگی قارچ بیمارگر توسط این جدایه‌ها در شرایط گلخانه‌ای بود.

مواد و روش‌ها: هشتاد جدایه اکتینومیست از خاک مناطق مختلف کشت خربزه جدا شد و فعالیت ضد قارچی آن‌ها در برابر عامل بیمارگر مورد بررسی قرار گرفت. جدایه‌های فعال آنتاگونیست از نظر فعالیت‌های زیستی مورد بررسی قرار گرفتند. در مرحله بعدی، کنترل زیستی بیماری ساق‌سیاه خربزه توسط جدایه‌های منتخب در محیط گلخانه بررسی شد. **نتایج:** یافته‌ها و نتایج پژوهش.

نتایج: در نهایت سه جدایه (R1.6, R5.52, R5.56) بر اساس بیشترین هاله ممانعت از رشد قارچ به عنوان برترین جدایه‌های اکتینومیست انتخاب شدند. این سه جدایه قادر به کلنیزه کردن ریشه خربزه، تولید برخی از آنزیم‌های خارج سلولی و کنترل بیماری در گلخانه بودند. جدایه R5.56 بر اساس آنالیز توالی زیرواحد کوچک RNA ریپوزومی (16S rRNA) شناسایی و بر اساس نتایج حاصل این جدایه دارای بالاترین شباهت (۹۸٪) با گونه‌های *استرپتومایسس* است.

نتیجه‌گیری: کنترل زیستی عوامل بیمارگر گیاهی، برعکس بکارگیری سموم شیمیایی، به سرعت اثر نمی‌کند ولی در موارد موفق، مبارزه بیولوژیک اثرات ماندگارتری نسبت به سموم شیمیایی دارد. کنترل بیولوژیک بایستی به عنوان یک مولفه کلیدی از رویکردهای سیستم مدیریت تلفیقی آفات و بیماری‌های گیاهی اشاره نمود تا مخاطرات زیست محیطی روشهای مبارزه بکارگیری بی‌رویه سموم شیمیایی به حداقل برسد. این مطالعه مقدمه‌ای است بر انجام آزمایشات تکمیلی مانند کاربرد آنتاگونیست‌های مذکور علیه بیمارگر فوق در شرایط مزرعه که باید در مدت زمان حداقل سه سال انجام گردد.

کلیدواژه‌ها: اکتینومیست، فعالیت ضد قارچی، محرک رشد گیاهی، *Cucumis melo*، بیماری ساق سیاه خربزه، *Macrophomina phaseolina*.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: رستمی مهر وئی روح انگیز، شهیدی بنجار غلامحسین، عقیقی سونیا، صادقی اکرم (۱۴۰۰) جداسازی و شناسایی مولکولی اکتینومیست‌های ریز و سفر گیاه خربزه (*Cucumis melo*) با هدف بررسی اثرات محرک رشدی گیاه تحت شرایط تنش زیستی ناشی از قارچ *Macrophomina phaseolina*. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۳(۲)، ۴۴-۲۱.



Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مقدمه

خربزه با نام علمی *Cucumis melo* L. یکی از گونه‌های مهم و اقتصادی صیفی‌جات و از محصولات با ارزش در اکثر کشورهای جهان است (McCreight et al. 1993). خربزه از مهمترین گیاهان جالیزی مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری دنیا

محسوب می‌شود که از مهمترین بیماری‌های آن ساق سیاه خربزه است که عامل آن قارچ بیمارگر گیاهی خاک برد *Macrophomina phaseolina* می‌باشد. قارچ مزبور به میزان قابل توجهی باعث کاهش محصول خربزه گردیده و به دلیل سیاه شدن قسمت‌های آلوده بافت میزبان، ساق سیاه نامیده می‌شود. این بیماری در سراسر دنیا دارای اهمیت اقتصادی زیادی می‌باشد (Shahriari & Torabi 2013). بیماری ساق سیاه روی میزبان‌های دیگر عموماً به پوسیدگی ذغالی معروف است (Bahadori 2010). مناطق انتشار این بیمارگر در ایران نیز وسیع بوده، تقریباً در تمام خاک‌های خشک ایران کم و بیش وجود دارد و حتی گاهی باعث خسارت ۱۰۰ درصدی خربزه در برخی مناطق گرمسیر ایران شده است (Shahriari & Etebarian 2002). این بیماری به آوندهای چوبی صدمه زده و باعث کاهش محصول می‌شود علاوه بر خربزه به خیار، هندوانه، طالبی، حبوبات، دانه‌های روغنی و سبزی‌های مختلف نیز خسارت می‌زند و مناطق انتشار آن در ایران عبارتست از اصفهان، نطنز، کرمان، مشهد، ایوانکی، یزد، ساوه، تبریز، اهواز، برازجان (Kheiri et al. 2009). قارچ عامل بیماری به صورت ریزسختینه‌های سیاه رنگ در خاک و روی بقایای گیاهی زنده می‌ماند. این ساختارهای مقاوم تا چند سال در خاک بقا می‌یابند (Ghayedi et al. 2012). در خربزه بارزترین علامت این بیماری قهوه‌ای و سیاه شدن ساقه است که ابتدا به صورت لکه‌ای در نزدیکی طوقه گیاه یا روی ساقه ظاهر می‌شود. این لکه ابتدا زیتونی رنگ و سپس با گذشت زمان کدر شده و سرانجام قهوه‌ای و سیاه رنگ می‌گردد و تا وقتی که تمام طوقه را فرا نگرفته گیاه به خوبی رشد و نمو می‌کند (Kheiri et al. 2009).

امروزه عوامل شیمیایی مناسبی که بتواند گیاه را از صدمه بیمارگر به صورت کامل حفظ نماید شناسایی نشده و از سوی دیگر استفاده از عوامل شیمیایی توصیه شده به دلیل آسیب‌پذیری میزبان در تمامی مراحل رشدی خود در برابر بیمارگر در شرایط مزرعه‌ای کافی نیستند (Bach et al. 2016). عبارت کنترل زیستی نسبتاً خاص است و همیشه به محرک‌ها و القاگرهای رشد اشاره نمی‌کند. جدا کردن بحث افزایش رشد گیاه از کنترل زیستی در سیستم‌های کشاورزی امری مشکل است و از طرفی ممکن است یک میکروارگانیسم از نظر هر دو صفت سودمند باشد. از مصادیق بهبود رشد گیاه می‌توان به افزایش جوانه‌زنی، رشد ریشه، وزن شاخه و ریشه، میزان دانه، محتوای کلروفیل، تحمل به خشکی، کاهش تنش ناشی از شوری، تحمل نسبت به تنش‌های زیستی و تأخیر در روند پیری اشاره کرد (Aksoy et al. 2016; Hatami et al. 2020; Türkkkan et al. 2020).

اکتینومیست‌ها ویژگی‌هایی دارند که آنها را به عنوان عوامل کنترل زیستی علیه قارچ‌های خاکزاد بیمارگر گیاهی مفید می‌سازد. این ویژگی‌ها شامل تولید انواع مختلف متابولیت‌های ثانویه و دارای ارزش تجاری مانند آنزیم‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد. نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که کاربرد اکتینومیست‌ها به ویژه گونه‌های مختلف جنس *استرپتومیسس* باعث افزایش رشد محصولات نیز می‌شوند (El-Tarabily 2008). طی تحقیقی آزمایشگاهی که توسط رشاد و همکاران انجام شد *استرپتومیسس* ها (*Streptomyces*) از نمونه خاک جداسازی و فعالیت ضد میکروبی آنها مورد آزمایش قرار گرفت (Rashad et al. 2015). اکتینومیست‌ها، حائز ویژگی‌های خاصی هستند که موجب استفاده از آنها به عنوان عوامل کنترل زیستی می‌شود. این ویژگی‌ها عبارتند از: توانایی کلنیزه کردن

سطوح گیاهی، آنتی‌بیوز علیه بیمارگرهای گیاهی، سنتز پروتئین‌های خارج سلولی، تجزیه فیتوتوکسین‌ها، القاء مقاومت در گیاه میزبان و همچنین خاصیت تحریک رشد گیاهان (Gopalakrishnan et al. 2014).

طبقه‌بندی استرپتومایسس‌ها بر اساس خصوصیات فنوتیپی، اسیدهای چرب، پروتئین‌ها، هیبریداسیون DNA-DNA و بررسی توالی ژن *16S rRNA* توسط محققان متعددی انجام شده است. طبقه‌بندی بر اساس توالی *16S rRNA* روشی قدرتمند و کارآمد برای مشخص نمودن روابط خویشاوندی ارگانیسیم‌های پروکاریوتی است و به منظور تسهیل شناسایی افتراقی بین گونه‌های استرپتومایسس استفاده شده است (Sadeghi et al. 2014). استفاده از سایر نقاط ژنوم مانند توالی‌های ITS (نواحی جدا کننده رونویسی شده داخلی) *16S-23S rDNA* به واسطه تنوع بیشتر جهت پی بردن به روابط خویشاوندی بین برخی از ارگانیسیم‌ها کاربرد دارد. مطالعات تکمیلی نشان داده است که ITS اگر چه مارکر خوبی جهت تعیین روابط خویشاوندی باکتری‌های گرم منفی و قارچ‌ها است اما در مورد باکتری‌های گرم مثبت به ویژه استرپتومایسس‌ها کاربرد ندارد (Song et al. 2004).

اهداف اصلی این پژوهش عبارتند از: جداسازی اکتینومیست‌ها از خاک مناطق مختلف کشت خربزه در جنوب استان کرمان و استان سیستان و بلوچستان، بررسی اثرات آنتاگونیستی اکتینومیست‌های مذکور علیه قارچ مولد بیماری ساق سیاه خربزه، ارزیابی تولید سیدروفور توسط جدایه‌ها در شرایط آزمایشگاهی، شناسایی مولکولی جدایه آنتاگونیست بالقوه، سنجش اثر محرک رشدی جدایه‌های منتخب روی گیاه خربزه و ارزیابی کنترل‌کنندگی قارچ بیمارگر توسط این جدایه‌ها در شرایط گلخانه‌ای.

مواد و روش‌ها

تهیه بذور خربزه و قارچ بیمارگر: جدایه قارچ بیمارگر (*Macrophomina phaseolina* (IRAN 114 AC) از مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور و بذور گیاه خربزه (*Cucumis melo*) کولتیوار خاتونی از مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کرمان تهیه شد. کولتیوار خاتونی یکی از کولتیوارهایی هست که در مناطق وسیعی از ایران بیشترین سطح کشت را دارد. اگر چه عملکرد این کولتیوار زیاد است اما به بیماری ساق سیاه خربزه حساس است.

نمونه‌برداری و جداسازی اکتینومیست‌ها: از خاک ریز و سفر ریشه گیاه خربزه، در چند منطقه مختلف از استان‌های کرمان، سیستان و بلوچستان نمونه برداری انجام شد. ابتدا ده سانتیمتر از سطح خاک کنار زده شد و از عمق ۱۰-۱۵ سانتیمتری خاک ۵۰۰ گرم جمع‌آوری شد. نمونه‌های خاک به مدت دو روز در سایه قرار داده شد تا به خوبی خشک شود. پس از اطمینان از خشک شدن خاک‌ها، هر نمونه به صورت جداگانه با استفاده از غربال دو مش الک شد تا بافتی نرم و یکنواخت حاصل شود. سپس با تهیه رقت‌های متوالی و کشت نمونه خاک روی محیط کشت CGA (Casein Glycerin Agar) (جدول ۱)، اکتینومیست‌ها جداسازی شدند. به این صورت که ده گرم از نمونه خاک وزن شده با ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل مخلوط شد، سپس مخلوط حاصل به مدت نیم ساعت روی دستگاه هم‌زن هم زده شد. از قسمت رویی سوسپانسیون یک میلی‌لیتر برداشته و به ۹ میلی‌لیتر آب

مقطر استریل اضافه شد و رقت 10^{-2} بدست آمد. به همین روش سوسپانسیون خاک با رقت‌های 10^{-3} ، 10^{-4} ، 10^{-5} و 10^{-6} تهیه شد و از هر رقت یک میلی لیتر کف پتری ریخته و سپس محیط کشت (CGA) Casein Glycerin Agar در حال سرد شدن به آن اضافه گردید. پس از گذشت ۷ تا ۱۰ روز در سطح محیط کشت پرگنه‌های متفاوتی از اکتینومیست‌ها و باکتری‌ها ظاهر شد. از هر پرگنه اکتینومیست، کشت خطی روی پتری دیش‌های حاوی CGA تهیه و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید (Soltani Nejad et al. 2016).

جدول ۱. ترکیبات محیط کشت Casein Glycerin Agar (Kuster and Williams 1964).

Table 1. Casein Glycerin Agar medium ingredients (Kuster and Williams 1964).

Ingredients	Amount
Casein	0.3 gr
KNO ₃	2.0 gr
NaCl	2.0 gr
K ₂ HPO ₄	2.0 gr
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.05 gr
CaCO ₃	0.02 gr
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.01 gr
Glycerol	10 gr
Agar	18.0 gr
Distilled water	1.0 L
pH	7.0 to 7.2

آزمون ضدقارچی: برای تعیین توانایی جدایه‌های اکتینومیست در ممانعت از رشد قارچ بیمارگر و انتخاب جدایه‌های برتر، از روش دیسک‌گذاری استفاده شد. به این ترتیب که ابتدا قارچ به صورت چمنی روی محیط PDA کشت و سپس دیسک شش میلی‌متری از هر یک از ۸۰ جدایه اکتینومیست جدا شده از ریزوسفر خربزه روی آن قرار داده شد. نمونه شاهد، محیط کشت بدون اکتینومیست بود. پتری دیش‌ها در انکوباتور در شرایط تاریکی و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. این آزمایش در ۳ تکرار انجام گرفت. پس از ۷ روز، میزان فعالیت آنتاگونیستی باکتری‌ها براساس قطر هاله ممانعت از رشد سنجیده شد (Soltanzadeh et al. 2016).

بررسی توانایی جدایه‌های اکتینومیست در کلنیزه کردن ریشه: ابتدا بذور خربزه شسته و استریل شد، سپس در محلول حاوی 10^{-6} از اسپورهای اکتینومیست به مدت دو دقیقه قرار گرفت. برای جذب آب اضافی، بذور خربزه به مدت ۱۰ دقیقه روی کاغذ صافی استریل قرار گرفته و سپس بر سطح محیط آب آگار کشت شدند. پس از رشد بذور، از قسمت انتهایی ریشه‌ها نمونه‌برداری شد. نمونه‌ها بر روی پتری دیش حاوی CGA قرار داده شدند.

تعیین حداقل غلظت بازدارنده از رشد (MIC: minimum inhibitory concentration) و تعیین دمای

غیر فعال کننده ماده مؤثر (TIP: thermal inactivation point): برای به دست آوردن حداقل غلظت بازدارنده از رشد، ۲۰ میلی گرم از عصاره خام خشک گردیده هر جدایه (Konishi et al. 1991; Shafii Bafti et al. 2005)، در یک میلی لیتر حلال دی متیل سولفوکساید و متانول، با نسبت حجمی ۱:۱، اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه ورتکس شد. سپس یازده رقت متوالی ۱۰۰، ۸۰، ۴۰، ۲۰، ۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵، ۰/۶۲۵، ۰/۳۱۲، ۰/۱۵۶ میلی گرم بر میلی لیتر تهیه شد و بر روی آن‌ها آزمون زیستی به روش چاهک در سه تکرار، انجام شد (Sadeghian et al. 2016).

برای تعیین دمای غیر فعال کننده ماده مؤثر، به ازای هر جدایه فعال اکتینومیست، نه لوله آزمایش در نظر گرفته شد و در هر لوله از جدایه‌های R1.6 و R5.52 به ترتیب نسبت ۲۰ و ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر و جدایه R5.56 به نسبت ۴۰ میلی گرم بر میلی لیتر از عصاره خام در آب مقطر استریل حل شد. لوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم در دماهای ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۶۰، ۱۴۰، ۱۲۰، ۱۰۰ و ۱۸۰ درجه سلسیوس قرار گرفته و بلافاصله به مخزن یخ خرد شده به منظور کاهش دما منتقل شدند. برای دماهای بالای ۱۰۰ درجه سلسیوس از روغن آفتابگردان داغ استفاده گردید. تیمار شاهد شامل نمونه گرما ندیده بود که در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شده بود. آزمون زیستی به روش چاهک در سه تکرار انجام و قطر هاله ممانعت از رشد سنجیده شد. این عمل تا دمایی انجام گرفت که هیچ هاله ممانعت از رشدی دیده نشد (Kalantar Zadeh, et al. 2005; Shafii, et al. 2005).

آزمون بررسی تولید سیانید هیدروژن (HCN): این آزمون باهدف توانایی جدایه‌های مورد بررسی در تولید سیانید

هیدروژن انجام گرفت. ابتدا جدایه‌های اکتینومیست فعال روی محیط کشت CGA به صورت چمنی کشت و پس از نگهداری در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد به مدت سه الی چهار روز و رشد مناسب جدایه‌ها، محلول معرف (شامل کربنات سدیم دو درصد و اسید پیکریک ۰/۵ درصد) آماده گردید. سپس تعدادی کاغذ صافی به محلول معرف مورد نظر آغشته و در قسمت درب تشتک یک کاغذ صافی آغشته به محلول معرف قرار داده شد. یک تشتک پتری نیز، به عنوان شاهد نوع اول بدون باکتری و یک تشتک پتری دارای باکتری کشت گردید و کاغذ صافی معمولی به عنوان شاهد نوع دوم در نظر گرفته شد. تشتک‌های پتری توسط نوار پارافیلیم مسدود گردید تا از خروج هرگونه متابولیت فرار و گازی از جمله سیانید هیدروژن، جلوگیری به عمل آید. این ظروف به صورت واژگون، به مدت پنج الی هفت روز درون انکوباتور قرار داده شدند. در صورت تولید سیانید هیدروژن توسط باکتری‌ها، کاغذ صافی آغشته به محلول معرف از رنگ اولیه زرد به کرم، قهوه ای روشن، قهوه ای تیره و نهایتاً آجری تغییر رنگ می‌یابد (Davelos et al. 2004).

آزمون بررسی تولید سیدروفور: این آزمون بر اساس روش اصلاح شده الکساندر و با استفاده از محیط CAS-agar

انجام شد (Alexander and Zuberer 1991).

استخراج ماده وراثتی (DNA): دویست و پنجاه میکرولیتر سوسپانسیون باکتری در ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت سه دقیقه سانتریفیوژ گردید. مایع رویی حذف شد و به رسوب حاصل ۴۰۰ میکرولیتر آب مقطر سترون اضافه گردید. به سوسپانسیون حاصل ۴۰۰ میکرولیتر بافر استخراج ۲X (۵۰ میلی‌مولار Tris-HCl، ۲۵ میلی‌مولار EDTA، یک درصد SDS و ۱۰ μg/ml پروتیناز K) اضافه شد. نمونه‌ها به مدت سه ساعت در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. سپس ۴۰۰ میکرولیتر از آمونیوم استات ۷/۵ مولار به هر لوله اضافه و به مدت دو تا سه دقیقه تکان داده شد. بعد از این مرحله لوله‌ها به مدت ده دقیقه در ۱۲۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. ۷۵۰ میکرولیتر از روشین به لوله جدید منتقل و ۷۵۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد به آن اضافه و بوسیله دست تکان داده شد. نمونه‌ها به مدت یک شب در دمای ۲۰- تا ۳۰- درجه سانتیگراد قرار گرفتند. پس از این مدت نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۲۵۰۰ دور در دقیقه در دمای چهار درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شدند و رسوب حاصل با ۷۵۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد دو بار شسته و در دمای ۵۶ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه خشک شد. رسوب حاصل در ۲۰ میکرولیتر آب مقطر سترون حل شد و یک شب در چهار درجه سانتیگراد نگهداری شد. برای نگهداری طولانی مدت نمونه‌ها به فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد منتقل شدند (Kieser et al. 2000).

انجام واکنش PCR: شناسایی باکتری‌های منتخب بر اساس آنالیز توالی زیرواحد کوچک RNA ریوزومی (16S rRNA) و با استفاده از آغازگرهای PAF (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAGA-3') و PAR (-5' AAGTCGTAACAAGGTAGCCGT-3') انجام شد (Blanco et al. 2002). 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: پنج 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، طولیل شدن در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۹۰ ثانیه و در نهایت طولیل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ده دقیقه انجام شد (Kim et al. 2006).

توالی‌یابی محصولات تکثیر شده: پس از مشاهده قطعه تکثیر شده مورد نظر (حدود ۱۵۰۰ bp) از روی ژنوم جدایه مورد بررسی بر روی ژل آگارز و مقایسه آن با نشانگر اندازه DNA با نام تجاری (Gene Ruler™ DNA Ladder Mix)، محصول حاصل از طریق شرکت ژن فناوران تهران برای توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کشور کره جنوبی ارسال گردید.

تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی و رسم تبارنما: توالی حاصل پس از بررسی توسط نرم‌افزار DNASTAR جهت تعیین درصد همولوژی اولیه با سایر توالی‌های موجود در بانک داده NCBI استفاده شد. در نهایت برای تعیین میزان همولوژی توالی ژنومی 16S rRNA جدایه با سایر باکتری‌ها بر اساس میزان تشابه جفت باز 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) جهت رسم درخت فیلوژنی استفاده شد. بررسی بوت استراپ (Bootstrap) جهت ارزیابی پایداری ضرایب هم بستگی بر پایه ۱۰۰۰ بار نمونه‌گیری تصادفی انجام شد (Tamura et al. 2011). از توالی باکتری *Actinomadura madurae* DSM 43067^T به عنوان توالی خارج از گروه استفاده گردید.

مطالعات گلخانه‌ای: به منظور اطمینان از اثربازدارندگی جدایه‌های اکتینومیست بر قارچ بیمارگر عامل پوسیدگی ذغالی در

گیاه خربزه، آزمایش در شرایط گلخانه انجام گرفت. این آزمون در قالب فاکتوریل و در سه تکرار برای هر سه جدایه (R 1.6, R 5.52, R 5.56) با تیمارهای شاهد، قارچ بیمارگر، اکتینومیست آنتاگونیست جدایه R 1.6، اکتینومیست آنتاگونیست جدایه R5.52، اکتینومیست آنتاگونیست جدایه R5.56، قارچ بیمارگر و اکتینومیست آنتاگونیست (Mp+R1.6)، قارچ بیمارگر و اکتینومیست آنتاگونیست (Mp+R5.52)، قارچ بیمارگر و اکتینومیست آنتاگونیست (Mp+R5.56) انجام شد. برای اطمینان از حذف آلودگی-های موجود روی سطح، بذره‌های خربزه به مدت ۳۰ ثانیه در هیپوکلریت سدیم دو درصد قرار گرفتند. برای حذف هیپوکلریت سدیم دو بار شستشو با آب مقطر استریل انجام شد. سپس بذرها روی دستمال کاغذی قرار داده شد تا رطوبت آنها کاملاً گرفته شود.

تهیه اینوکولوم قارچ *M. phaseolina* برای تولید اینوکولوم قارچ بیمارگر، ابتدا قارچ روی محیط کشت PDA به

صورت چمنی کشت شد. پتری دیش‌ها به مدت پنج روز در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شدند. پس از رشد قارچ روی محیط کشت، با اضافه کردن مقداری آب مقطر استریل به هر پتری دیش، قارچ از روی سطح محیط کشت خراش داده شد و جهت انجام مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت. تهیه اینوکولوم جدایه‌های اکتینومیست: به منظور تهیه سوسپانسیون جدایه‌های اکتینومیست، جدایه‌های فعال روی محیط کشت CGA داخل پتری دیش کشت شد. پتری دیش‌ها به مدت پنج روز در دمای ۲۸°C نگهداری شدند. سپس ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به هر پتری دیش اضافه و سطح کلونی‌ها با یک لوله شیشه‌ای L شکل استریل کاملاً خراش داده شد تا سوسپانسیونی از اسپور بدست آید. کشت گیاهچه‌ها و مایه‌زنی: از ماسه شسته شده به عنوان خاک گلدان استفاده شد. بذور خربزه مشهدی (۵ بذر) در عمق یک سانتی‌متری خاک کاشته شد. مایه‌زنی خاک هم‌زمان با کاشت بذور خربزه انجام شد. ابتدا چهار گلدان به عنوان شاهد در نظر گرفته و کنار گذاشته شد. برای این گلدان‌ها مایه‌زنی با قارچ بیمارگر و جدایه‌های اکتینومیست انجام نشد. در مرحله‌ی بعد مقداری ماسه شسته شده با جدایه‌های اکتینومیست مایه‌زنی شد. ماسه مایه‌زنی شده با جدایه اکتینومیست بین دو لایه‌ی ماسه هر گلدان (ماسه + ماسه مایه‌زنی شده با سوسپانسیون جدایه اکتینومیست + ماسه) قرار گرفت. برای تیمار قارچ بیمارگر، چهار گلدان در نظر گرفته شد. مقداری از ماسه با سوسپانسیون تهیه شده از یک پتری دیش قارچ بیمارگر مخلوط و هم زده شد تا خاک کاملاً آغشته به مایه تلقیح قارچ شود. سپس این ماسه در لایه وسط بین دو لایه ماسه (ماسه + ماسه مایه‌زنی شده با سوسپانسیون قارچ بیمارگر + ماسه) در گلدان قرار گرفت. برای تهیه تیمارهای باکتری + قارچ، سوسپانسیون تهیه شده از یک پتری دیش قارچ بیمارگر و یک جدایه اکتینومیست با هم مخلوط و به ماسه اضافه و خوب هم زده شد. از این مخلوط به عنوان لایه وسطی بین دو لایه از ماسه (ماسه + ماسه مایه‌زنی شده با سوسپانسیون قارچ بیمارگر و سوسپانسیون اکتینومیست + ماسه) قرار گرفت. آبیاری

گلدان‌ها با آب مقطر استریل انجام گردید (Soltanzadeh 2016) اندازه‌گیری شاخص‌های رشد: ارزیابی تأثیر جدایه‌ها بر رشد اندام‌های گیاه شامل شاخص‌های طول ساقه و ریشه، وزن خشک اندام‌های هوایی و ریشه، مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS نسخه ۹/۱ انجام پذیرفت. سطح معنی‌داری آزمون‌ها برابر ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. برای آنالیز توصیفی متغیرها، میانگین و انحراف معیار گزارش شده است. به منظور بررسی معنی‌دار بودن تفاوت بین میانگین‌های متغیرهای با توزیع نرمال از جدول آنالیز واریانس و برای بررسی تفاوت بین میانگین تیمارهای مختلف از آزمون دانکن استفاده گردید.

نتایج و بحث

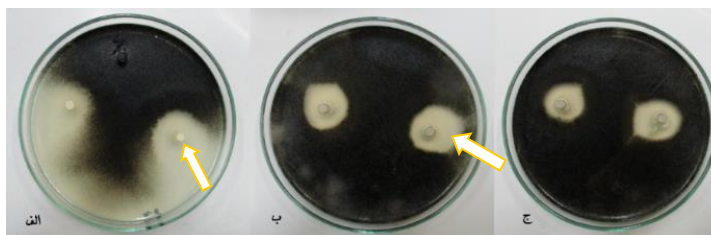
جداسازی اکتینومیست از خاک: در این تحقیق، حدود ۸۰ جدایه اکتینومیست خاک برد از خاک ریزوسفر خربزه مناطق

نمونه‌برداری شده جداسازی گردید.

آزمون ضدقارچی: تمام جدایه‌ها در آزمون زیستی مورد ارزیابی قرار گرفت و میزان فعالیت ضدقارچی آن‌ها با اندازه‌گیری

میزان هاله ممانعت از رشد بررسی شد. از بین تمام جدایه‌ها، ۴۶ جدایه قادر به ممانعت از رشد قارچ بیمارگر بودند و از بین آن‌ها به ترتیب سه جدایه اکتینومیست R1.6، R5.52 و R5.56 به عنوان برترین جدایه‌ها بر اساس بیشترین هاله ممانعت ایجاد شده

شناسایی گردیدند (شکل ۱).



شکل ۱. نتایج فعالیت ضدقارچی سه جدایه اکتینومیست فعال علیه قارچ *Macrophomina phaseolina* با

بیشترین قدرت ممانعت‌کنندگی نسبت به سایر جدایه‌ها. الف) جدایه R1.6 ب) جدایه R5.52 ج) جدایه R5.56

Figure 1. Antifungal activity of three isolates of actinomycetes against *Macrophomina phaseolina* revealing the highest inhibition zone compared with other tested isolates. From left to right: left: R1.6 isolate, middle: R5.52 and right: R5.56.

توانایی جدایه‌های اکتینومیست در کلونیزه کردن ریشه: نتایج حاکی از رشد و توانایی کلنیزه کردن ریشه‌ها توسط

سه جدایه‌ی R1.6، R5.52، R5.56 بود. در واقع رشد اکتینومیست‌ها، نشان دهنده توانایی آن‌ها در کلنیزه کردن ریشه‌ها است

(شکل ۲).



شکل ۲. بررسی توانایی کلونیزه کردن ریشه جوانه خریزه توسط جدایه‌های اکتینومیست. هر سه جدایه R1.6, R5.52, R5.56 توانایی کلونیزه کردن ریشه را داشتند. الف) نمونه حاصل از کشت ریشه گیاهچه تیمار شده با جدایه R1.6 ب) نمونه حاصل از کشت ریشه گیاهچه تیمار شده با جدایه R5.52 ج) نمونه حاصل از کشت ریشه گیاهچه تیمار شده با جدایه R5.56

Figure 2. Evaluation of melon germinated roots by selected actinomycetes isolates. All tested antagonists including R1.6, R5.52 and R5.56 showed colonization ability. From left to right: left: root treatment by R1.6 isolate, middle: root treatment by R5.52 and right: root treatment by R5.56.

ارزیابی حداقل غلظت بازدارنده از رشد و تعیین دمای غیرفعال شدن ماده مؤثر: حداقل غلظت بازدارنده از رشد (MIC) برای جدایه‌های R1.6، R5.52 و R5.56 به ترتیب ۲/۵، ۲/۵ و ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. به جز دماهای ۴۰، ۶۰ و ۸۰ درجه سانتیگراد، بقیه دماهای بررسی شده ماده مؤثر جدایه اکتینومیست R5.56 را غیرفعال کردند. در حالیکه فقط دمای ۱۸۰ درجه سانتیگراد ماده مؤثر جدایه‌های اکتینومیست R1.6 و R5.52 را غیرفعال کرد.

بررسی تولید سیانید هیدروژن (HCN): در هیچ یک از جدایه‌های اکتینومیست R1.6، R5.52 و R5.56 تغییر رنگی مبنی بر تولید سیانید هیدروژن در مقایسه با شاهد ظاهر نشد.

توانایی تولید سیدروفور: در اطراف هر سه جدایه اکتینومیست R1.6، R5.52، R5.56 هاله نارنجی رنگی ایجاد گردید که نشان‌دهنده تولید سیدروفور توسط جدایه‌های آنتاگونیست می‌باشد.

مطالعات گلخانه‌ای: پس از مایه‌زنی خاک هر گلدان با قارچ بیماریزا و جدایه‌های اکتینومیست، به مرور زمان خسارت قارچ بیمارگر به گیاهان قابل مشاهده بود و تعدادی از گیاهان نیز دچار زوال شده و از بین رفتند (اشکال ۳ الی ۵).

در مطالعات گلخانه‌ای، نتایج بررسی‌های آماری نشان داد که بر اساس اختلاف معنی‌دار تیمار R5.56 با تیمارهای *M. phaseolina* + R1.6، *M. phaseolina* + R5.56 و همچنین اختلاف معنی‌دار تیمار R1.6 و Control با تیمارهای *M. phaseolina* + R5.56 و *M. phaseolina* + R1.6، R5.52 و R5.56 و تیمار Control نسبت به سایر تیمارها، ارتفاع ساقه بیشتر است. بیشترین طول ریشه مربوط به تیمارهای حاوی

جدایه‌های اکتینومیست است و حتی تیمارهای حاوی $M. phaseolina + R1.6$ و $M. phaseolina + R5.52$ نسبت به تیمار $M. phaseolina$ دارای افزایش طول ریشه هستند. تیمار $M. phaseolina$ کمترین و تیمار $R5.56$ بیشترین وزن خشک قسمت‌های هوایی را دارد و سپس تیمارهای $R1.6$ و $R5.52$ وزن خشک بیشتری نسبت به سایر تیمارها دارند. تیمار $R5.56$ دارای بیشترین وزن خشک ریشه و تیمار $M. phaseolina$ دارای کمترین وزن خشک ریشه است. تیمارهای $M. phaseolina + R1.6$ ، $M. phaseolina + R5.52$ و $M. phaseolina + R5.56$ وزن خشک ریشه بیشتری نسبت به تیمار $M. phaseolina$ دارند که این نشان‌دهنده اثر مثبت محرک رشدی تیمارهای فوق بر روی ریشه و افزایش وزن خشک ریشه و کاهش خسارت ناشی از قارچ بیمارگر است (اشکال ۶ الی ۹). میانگین مرگ و میر در $M. phaseolina$ نسبت به سایر تیمارها بیشتر بود (شکل ۱۰). در تحقیقی که Ghayedi et al. (2012) روی آلودگی ارقام مختلف لوبیا (*Phaseolus vulgaris*) به عامل بیماری زوال گیاهچه‌های لوبیا در استان کهگیلویه و بویر احمد انجام دادند به این نتیجه رسیدند که بر اساس تجزیه واریانس داده‌ها، درصد آلودگی بوته‌ها به قارچ $M. phaseolina$ و مقایسه میانگین درصد کلنیزاسیون طوقه و ریشه‌ی ارقام مختلف لوبیا به قارچ مذکور در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود که بیانگر اختلاف ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از نظر تحمل به بیماری پوسیدگی زغالی می‌باشد.



شکل ۳- بوته‌های گلدانی خربزه رقم مشهدی تیمار شده با: الف) قارچ *Macrophomina phaseolina* (ب) شاهد منفی (گیاه سالم) ج) جدایه اکتینومیست $R1.6$ (د) قارچ *Macrophomina phaseolina* + جدایه اکتینومیست $R1.6$.

Figure 3. Melon (Mashhad variety) potted plants treated with: (from left to right), *Macrophomina phaseolina*; Control plant; R1.6 actinomycete isolate; *Macrophomina phaseolina* plus R1.6 actinomycete isolate.



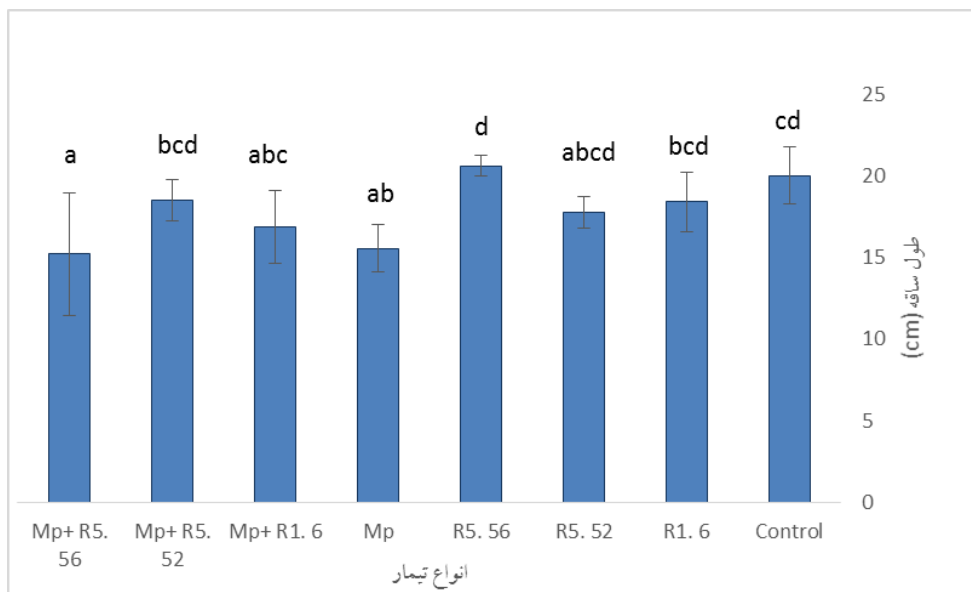
شکل ۴- بوته‌های گلدانی خربزه رقم مشهدی تیمار شده با: الف) قارچ *Macrophomina phaseolina* (ب) شاهد منفی (گیاه سالم) ج) جدایه اکتینومیست R5.52 (د) قارچ *Macrophomina phaseolina* + جدایه اکتینومیست R5.52.

Figure 4. Melon (Mashhad variety) potted plants treated with: (from left to right), *Macrophomina phaseolina*; Control plant; R5.52 actinomyce isolate; *Macrophomina phaseolina* plus R5.52 actinomyce isolate.



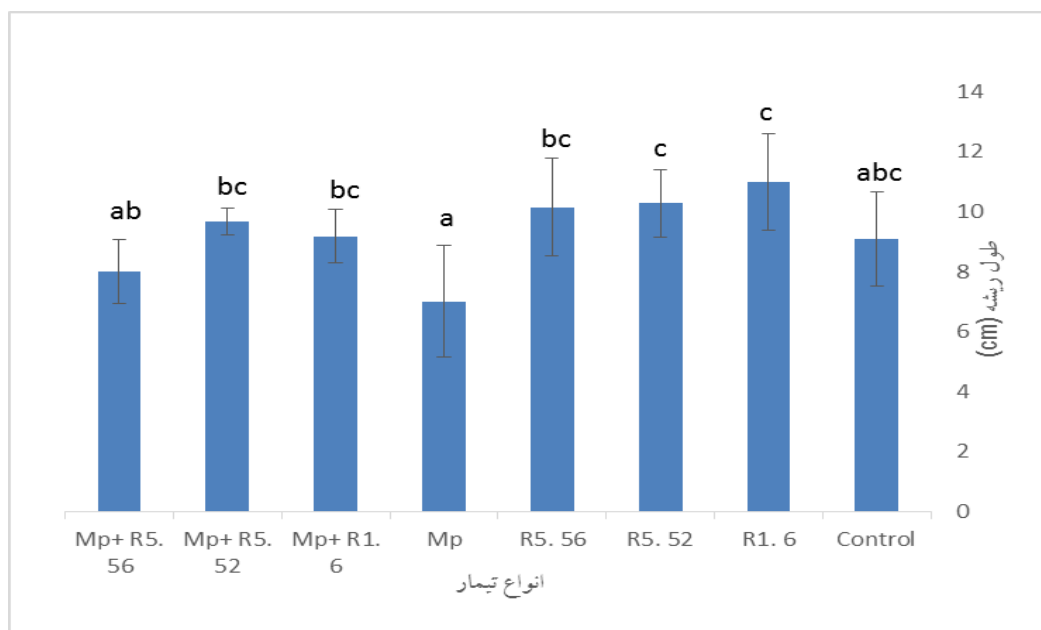
شکل ۵- بوته‌های گلدانی خربزه رقم مشهدی تیمار شده با: الف) قارچ *Macrophomina phaseolina* (ب) شاهد منفی (گیاه سالم) ج) جدایه اکتینومیست R5.56 (د) قارچ *Macrophomina phaseolina* + جدایه اکتینومیست R5.56.

Figure 5. Melon (Mashhad variety) potted plants treated with: (from left to right), *Macrophomina phaseolina*; Control plant; R5.56 actinomyce isolate; *Macrophomina phaseolina* plus R5.56 actinomyce isolate.



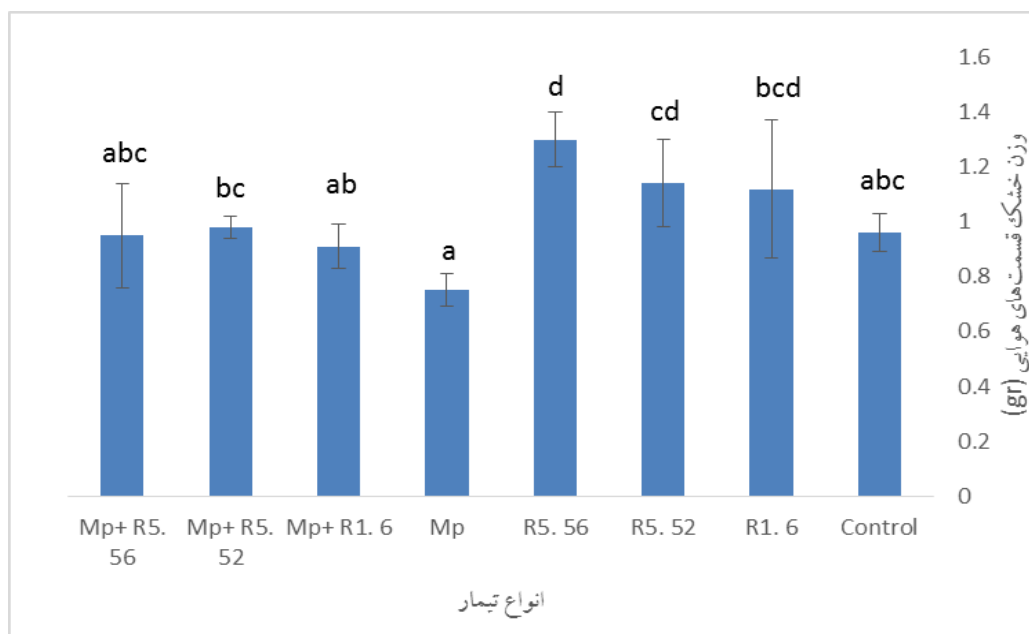
شکل ۶- مقایسه میانگین طول ساقه گیاهان خربزه، ۸۰ روز پس از مایه زنی توسط جدایه‌های اکتینومیست R5.56 و R5.52، R1.6 و قارچ *M. phaseolina* (Mp) در مطالعات گلخانه‌ای. سطح معنی‌داری آزمون‌ها برابر ۰/۰۵ است. مقادیر با حروف مشترک از نظر آماری تفاوتی ندارند. Control: تیمارهای شاهد فاقد هر گونه میکروارگانیسم، R1.6: تیمارهای حاوی جدایه اکتینومیست R1.6، R5.52: تیمارهای حاوی جدایه اکتینومیست R5.52، R5.56: تیمارهای حاوی جدایه اکتینومیست R5.56، Mp: تیمار حاوی مایه تلقیح قارچ بیماری‌گر *M. phaseolina*، Mp+R1.6: تیمار حاوی مایه تلقیح قارچ بیماری‌گر و جدایه اکتینومیست R1.6، Mp+R5.52: تیمار حاوی مایه تلقیح قارچ بیماری‌گر و جدایه اکتینومیست R5.52، Mp+R5.56: تیمار حاوی مایه تلقیح قارچ بیماری‌گر و جدایه اکتینومیست R5.56.

Figure 6. Comparison of melon plants average height 80 days post inoculation with actinomycete isolates R1.6, R5.52, R5.56 and *Macrophomina phaseolina* in greenhouse studies. Significance level was equal to 0.05. Control: without any treatment; R1.6: treatments received actinomycete isolate R1.6; R5.52: treatments received actinomycete isolate R5.52; R5.56: treatments received actinomycete isolate R5.56; Mp: treatments received pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*; Mp+ R1.6: R1.6: treatments received *M. phaseolina* and actinomycete isolate R1.6; Mp+ R5.52: treatments received *M. phaseolina* and actinomycete isolate R5.52; Mp+ R5.56: treatments received *M. phaseolina* and actinomycete isolate R5.56.



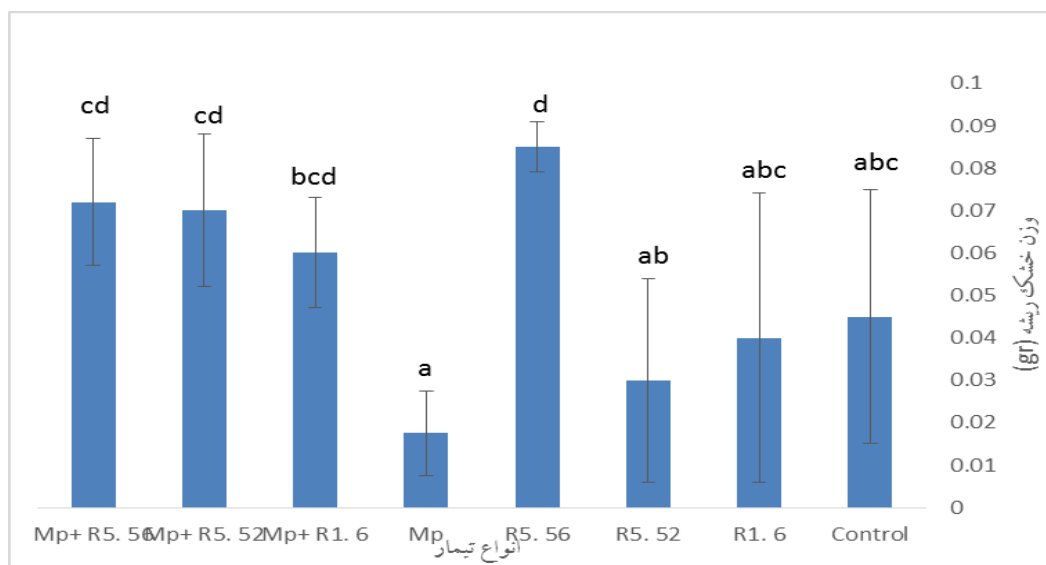
شکل ۷- مقایسه میانگین طول ریشه گیاهان خربزه، ۸۰ روز پس از مایه زنی توسط جدایه‌های اکتینومیست R5.52، R5.56، R1.6 و قارچ *M. phaseolina* در مطالعات گلخانه‌ای. سطح معنی‌داری آزمون‌ها برابر ۰/۰۵+ است. مقادیر با حروف مشترک از نظر آماری تفاوتی ندارند. Control: تیمارهای شاهد فاقد هر گونه میکروارگانیسم، R1.6: تیمارهای حاوی جدایه اکتینومیست R1.6، R5.52: تیمارهای حاوی جدایه اکتینومیست R5.52، R5.56: تیمارهای حاوی جدایه اکتینومیست R5.56، MP: تیمار حاوی مایه تلقیح قارچ بیماری‌گر *M. phaseolina*، MP+R1.6: تیمار حاوی مایه تلقیح قارچ بیماری‌گر و جدایه اکتینومیست R1.6، MP+R5.52: تیمار حاوی مایه تلقیح قارچ بیماری‌گر و جدایه اکتینومیست R5.52، MP+R5.56: تیمار حاوی مایه تلقیح قارچ بیماری‌گر و جدایه اکتینومیست R5.56.

Figure 7. Comparison of melon plants root length average 80 days post inoculation with actinomycete isolates R1.6, R5.52, R5.56 and *Macrophomina phaseolina* in greenhouse studies. Significance level was equal to 0.05. Control: without any treatment; R1.6: treatments received actinomycete isolate R1.6; R5.52: treatments received actinomycete isolate R5.52; R5.56: treatments received actinomycete isolate R5.56; Mp: treatments received pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*; Mp+ R1.6: treatments received *M. phaseolina* and actinomycete isolate R1.6; Mp+ R5.52: treatments received *M. phaseolina* and actinomycete isolate R5.52; Mp+ R5.56: treatments received *M. phaseolina* and actinomycete isolate R5.56.



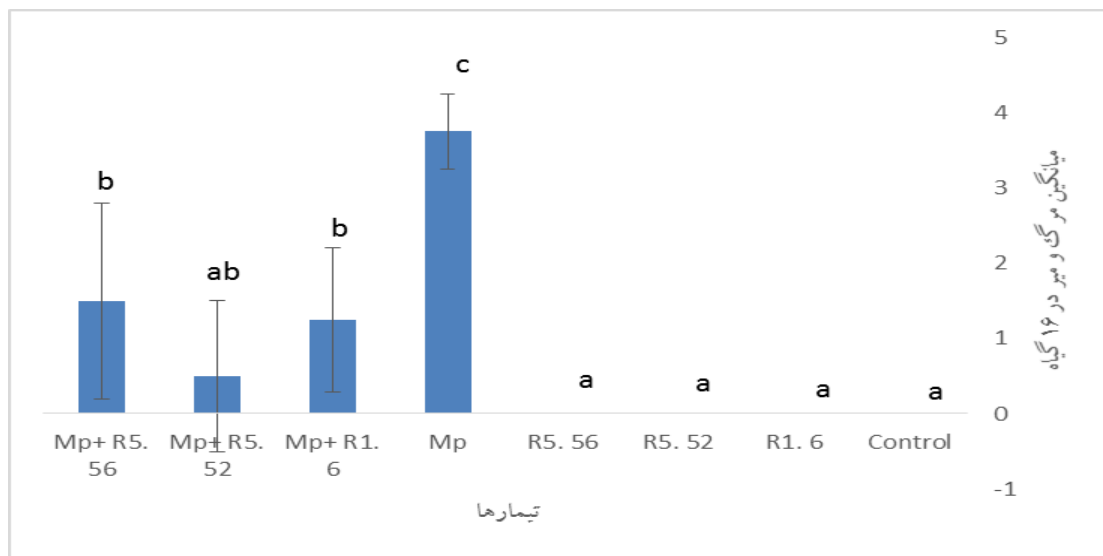
شکل ۸. مقایسه میانگین وزن خشک قسمت‌های هوایی گیاهان خریزه، ۸۰ روز پس از مایه‌زنی توسط جدایه‌های اکتینومیست R1.6، R5.52 و R5.56 و قارچ *M. phaseolina* در مطالعات گلخانه‌ای. سطح معنی‌داری آزمون‌ها برابر ۰/۰۵ است. مقادیر با حروف مشترک از نظر آماری تفاوتی ندارند. Control: تیمارهای شاهد فاقد هر گونه میکروارگانیسم، R1.6: تیمارهای حاوی جدایه اکتینومیست R1.6، R5.52: تیمارهای حاوی جدایه اکتینومیست R5.52، R5.56: تیمارهای حاوی جدایه اکتینومیست R5.56، MP: تیمار حاوی مایه تلقیح قارچ بیمارگر *M. phaseolina*، MP+R1.6: تیمار حاوی مایه تلقیح قارچ بیمارگر و جدایه اکتینومیست R1.6، MP+R5.52: تیمار حاوی مایه تلقیح قارچ بیمارگر و جدایه اکتینومیست R5.52، MP+R5.56: تیمار حاوی مایه تلقیح قارچ بیمارگر و جدایه اکتینومیست R5.56.

Figure 8. Comparison of melon plants foliage dry weight average 80 days post inoculation with actinomycete isolates R1.6, R5.52, R5.56 and *Macrophomina phaseolina* in greenhouse studies. Significance level was equal to 0.05. Control: without any treatment; R1.6: treatments received actinomycete isolate R1.6; R5.52: treatments received actinomycete isolate R5.52; R5.56: treatments received actinomycete isolate R5.56; Mp: treatments received pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*; Mp+ R1.6: treatments received *M. phaseolina* and actinomycete isolate R1.6; Mp+ R5.52: treatments received *M. phaseolina* and actinomycete isolate R5.52; Mp+ R5.56: treatments received *M. phaseolina* and actinomycete isolate R5.56.



شکل ۹- مقایسه میانگین وزن خشک ریشه گیاهان خربزه ، ۸۰ روز پس از مایه‌زنی توسط جدایه‌های اکتینومیست R5.56 و R5.52، R1.6 و قارچ *M. phaseolina* در مطالعات گلخانه‌ای. سطح معنی‌داری آزمون‌ها برابر ۰/۰۵ است. مقادیر با حروف مشترک از نظر آماری تفاوتی ندارند. Control: تیمارهای شاهد فاقد هر گونه میکروارگانیسم، R1.6: تیمارهای حاوی جدایه اکتینومیست R1.6، R5.52: تیمارهای حاوی جدایه اکتینومیست R5.52، R5.56: تیمارهای حاوی جدایه اکتینومیست R5.56، MP: تیمار حاوی مایه تلقیح قارچ بیمارگر *M. phaseolina*، MP+R1.6: تیمار حاوی مایه تلقیح قارچ بیمارگر و جدایه اکتینومیست R1.6، MP+R5.52: تیمار حاوی مایه تلقیح قارچ بیمارگر و جدایه اکتینومیست R5.52، MP+R5.56: تیمار حاوی مایه تلقیح قارچ بیمارگر و جدایه اکتینومیست.

Figure 9. Comparison of melon plants roots dry weight average 80 days post inoculation with actinomycete isolates R1.6, R5.52, R5.56 and *Macrophomina phaseolina* in greenhouse studies. Significance level was equal to 0.05. Control: without any treatment; R1.6: treatments received actinomycete isolate R1.6; R5.52: treatments received actinomycete isolate R5.52; R5.56: treatments received actinomycete isolate R5.56; Mp: treatments received pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*; Mp+ R1.6: treatments received *M. phaseolina* and actinomycete isolate R1.6; Mp+ R5.52: treatments received *M. phaseolina* and actinomycete isolate R5.52; Mp+ R5.56: treatments received *M. phaseolina* and actinomycete isolate R5.56.

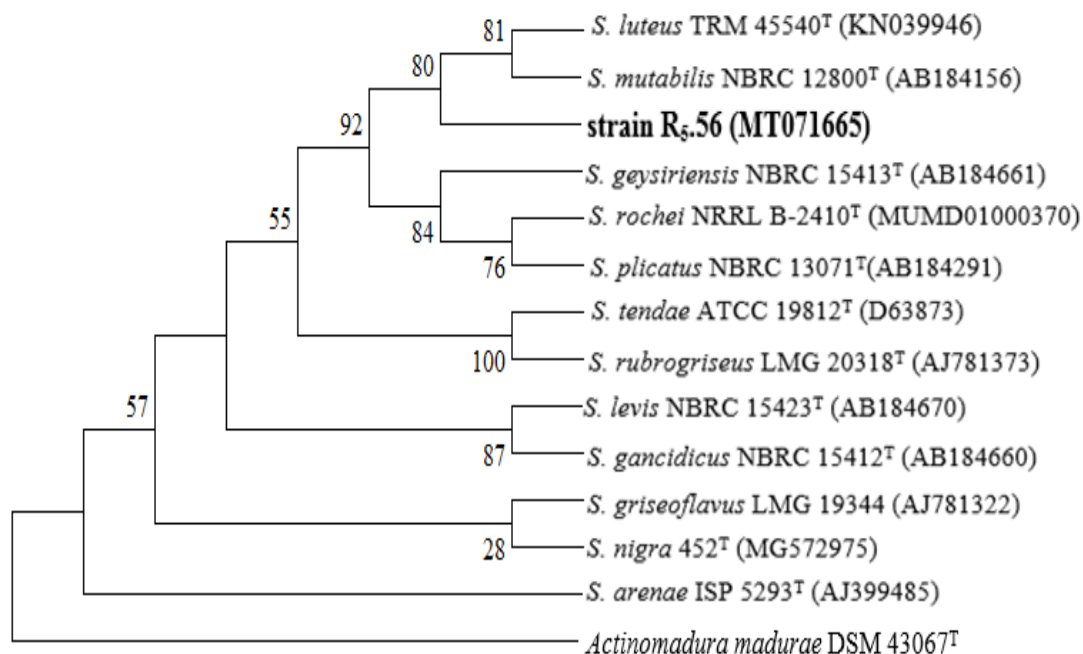


شکل ۱۰- مقایسه میانگین مرگ و میر گیاهان خربزه ۸۰ روز پس از مایه‌زنی توسط جدایه‌های اکتینومیست R5.56 و R5.52، R1.6 و قارچ *M. phaseolina* در مطالعات گلخانه‌ای. سطح معنی‌داری آزمون‌ها برابر ۰/۰۵+ است. مقادیر با حروف مشترک از نظر آماری تفاوتی ندارند. Control: تیمارهای شاهد فاقد هر گونه میکروارگانیسم، R1.6: تیمارهای حاوی جدایه اکتینومیست R5.52، R1.6: تیمارهای حاوی جدایه اکتینومیست R5.56، R5.52: تیمارهای حاوی جدایه اکتینومیست R5.56، MP: تیمار حاوی مایه تلقیح قارچ بیماری‌گر *M. phaseolina*، MP+R1.6: تیمار حاوی مایه تلقیح قارچ بیماری‌گر و جدایه اکتینومیست R1.6، MP+R5.52: تیمار حاوی مایه تلقیح قارچ بیماری‌گر و جدایه اکتینومیست R5.52، R5.56: تیمار حاوی مایه تلقیح قارچ بیماری‌گر و جدایه اکتینومیست R5.56.

Figure 10. Comparison of melon plants mortality rate average 80 days post inoculation with actinomycete isolates R1.6, R5.52, R5.56 and *Macrophomina phaseolina* in greenhouse studies. Significance level was equal to 0.05. Control: without any treatment; R1.6: treatments received actinomycete isolate R1.6; R5.52: treatments received actinomycete isolate R5.52; R5.56: treatments received actinomycete isolate R5.56; Mp: treatments received pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*; Mp+ R1.6: treatments received *M. phaseolina* and actinomycete isolate R1.6; Mp+ R5.52: treatments received *M. phaseolina* and actinomycete isolate R5.52; Mp+ R5.56: treatments received *M. phaseolina* and actinomycete isolate R5.56.

شناسایی مولکولی و تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنی: محصول حاصل از تکثیر ناحیه 16S rRNA جدایه R5.56 روی ژل آگارز یک درصد ارزیابی شد. یک قطعه DNA تکثیر شده به طول حدود ۱۵۰۰ جفت باز مشاهده شد. بررسی اولیه بر اساس

بلاست این توالی، قرابت ۹۸ درصدی جدایه مورد نظر را با اعضای جنس *Streptomyces* نشان داد. توالی ژن 16S rRNA با کد MT071665 در بانک اطلاعات NCBI برای جدایه مذکور ثبت شد. ترسیم تبارنما (درخت فیلوژنتیکی) با استفاده از توالی‌های نوکلئوتیدی متعلق به جدایه مورد بررسی و توالی‌های اخذ شده از بانک ژن انجام شد. درخت فیلوژنتیکی با استفاده از توالی ژن 16S rRNA برای جدایه R5.56 ترسیم شد (شکل ۱۱).



شکل ۱۱. درخت فیلوژنتیکی جدایه R5.56 بر اساس توالی ژن 16S rRNA. درخت با استفاده از نرم افزار 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 توالی خارج گروه استفاده شد. مقادیر اعتبارسنجی بر اساس ۱۰۰۰ تکرار محاسبه و در نقاط انشعاب نشان داده شده است.

Figure 11. Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of R5.56 isolate. Tree was illustrated by using MEGA 5 software and neighbor-joining method. Accession numbers of the sequences are given in parentheses. *Actinomadura madurae* DSM sequences used as outgroup taxon. Bootstrap values are based on 1000 resampling and shown at the branching points.

بر اساس درخت فیلوژنتیک رسم شده جدایه R5.56 با دو گونه *S. mutabilis* و *S. luteus* در یک کلاد قرار گرفت. اخیراً *S. luteus* که از نظر توالی ژن 16S rRNA شباهتی ۹۹/۸۷ درصدی با *S. mutabilis* دارد به عنوان یک گونه جدید معرفی شده است (Luo et al., 2017). جدایه R5.56 بیشترین شباهت (۹۹/۸۴) را بر اساس بلاست در پایگاه داده EzBioCloud با *S. luteus* نشان داد. هرچند شباهت با *S. mutabilis* نیز دقیقاً به همین میزان بود اما انطباق توالی تکثیر شده با *S. luteus* در حدود ۰/۴ درصد بیشتر بود. بیوکنترل سوختگی گیاهچه گندم که بوسیله عامل بیمارگر *Fusarium culmorum* ایجاد می شود توسط یک سویه از *S. mutabilis* گزارش شده است. این باکتری همچنین موجب افزایش رشد گیاه گردید (Toumatia et al.,).

2016). بر اساس جستجوهای انجام شده توسط نویسندگان این مقاله گزارشی از بیوکنترل بیماری ساق سیاه خربزه توسط این دو گونه مشاهده نشده است. هر چند بیوکنترل بلایت فیتوفتورایی فلفل دلمه‌ای توسط سویه‌هایی از هر دو گونه اخیراً گزارش شده است (Abbasi et al., 2021).

کاربرد گونه‌های *استریتومایسس* به منظور کنترل بیمارگر *Phytophthora capsici*، عامل ایجاد کننده بیماری مرگ گیاهچه خیار، گیاهی دیگر از خانواده Cucurbitaceae گزارش شده است (Abbasi et al., 2020). مطابق با نتایج این مطالعه، تولید آنزیم‌های هضم‌کننده دیواره عامل بیمارگر از جمله صفات مرتبط با خصوصیات آنتاگونیستی جدایه‌های مورد مطالعه توسط این پژوهشگران بود. با توجه به امکان تولید و فرمولاسیون مقرون به صرفه *استریتومایسس* ها (Karimi and Sadeghi, 2015) به نظر می‌رسد به زودی راه این باکتری‌های مفید به عنوان کود و سم زیستی به بازار محصولات کشاورزی ایران باز خواهد شد.

نتیجه‌گیری: فعالیت مستقیم ضدقارچی گونه‌های جنس *استریتومایسس* قبلاً گزارش شده است و به عنوان عوامل آنتاگونیست بالقوه به منظور کنترل زیستی بیماری‌های قارچی و تقویت دفاع گیاهان در برابر قارچ‌ها به شمار می‌روند. این تحقیق که بر روی فعالیت آنتاگونیستی سه جدایه اکتینومیست (R1.6، R5.52، R5.56) علیه قارچ بیمارگر خاک برد *M. phaseolina* در گیاه خربزه انجام شد، در واقع مقدمه‌ای است بر انجام آزمایشات تکمیلی مانند کاربرد آنتاگونیست‌های مذکور علیه بیمارگر فوق در شرایط مزرعه و با استفاده از طرح‌های آماری که باید در مدت زمان حداقل سه سال انجام گردد. در صورت تطابق نتایج حاضر با شرایط مزرعه می‌توان جدایه‌های اکتینومیست موجود را به عنوان عوامل کنترل زیستی معرفی کرد. پس از آن بایستی امنیت این جدایه‌ها از نظر تاثیر بر محیط زیست (جمعیت میکروبی مفید خاک)، تاثیر بر رشد گیاه و همچنین تاثیرات احتمالی آن‌ها در چرخه زیستی مواد غذایی با تاکید بر مصرف کننده اصلی که انسان است مورد توجه قرار گیرد.

سپا سگزاری: از پژوهشکده فناوری تولیدات گیاهی و معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید باهنر کرمان به خاطر حمایت‌های مالی و معنوی در راستای اجرای تحقیق حاضر قدردانی می‌گردد.

منابع

- اعتباریان حسن رضا (۱۳۸۱) بیماری‌های سبزی و صیفی و روشهای مبارزه با آنها. انتشارات دانشگاه تهران. ص ۶۰۰
- بهادری جهرمی م (۱۳۸۹) بررسی امکان مبارزه بیولوژیک با *Macrophomina phaseolina* عامل بیماری ساق سیاه خربزه توسط گونه‌های تریکودرما. پایان‌نامه جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته بیماری‌شناسی گیاهی. دانشگاه شهید چمران اهواز.
- حاتمی نرگس، بازگیر عیدی، صداقتی ابراهیم، درویش نیا مصطفی (۱۳۹۹) مطالعه ی مورفولوژیکی و فیلوژنتیکی قارچهای میکوریز آربوسکولار همزیست با ریشه ی برخی گیاهان دارویی استان کرمان، مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱۲، ۲۳-۴۴.

خیری عباس، اعتباریان حسن رضا، روستایی علی، خداکریمیان غلام، امینیان حشمت‌اله (۱۳۸۸) بررسی امکان کنترل بیولوژیک بیماری ساق سیاه خربزه با استفاده از جدایه *Pseudomonas fluorescens*، مجله کشاورزی، ۱۱ (۱)، ۳۵-۴۶.

قایدی سمانه، عبداللهی محمد و فریبا قادری (۱۳۹۱) شناسایی عامل بیماری زوال گیاهچه های لوبیا در استان کهگیلویه و بویراحمد و واکنش ارقام مختلف لوبیا (*Phaseolus vulgaris*) به آن. پژوهش‌های حبوبات ایران، ۳، ۱۱۹-۱۲۶.

References

- Abbasi S, Sadeghi A, Safaie N (2020) Biocontrol of Cucumber Damping-off by Streptomyces Strains Producing Siderophore and Cellulase under Extreme Condition. Biol J Microorganism 9, 1-13.
- Abbasi S, Spor A, Sadeghi A, Safaie N (2021). *Streptomyces* strains modulate dynamics of soil bacterial communities and their efficacy in disease suppression caused by *Phytophthora capsici*. Sci Rep 11, 9317.
- Aksoy SC, Uzel A, Bedir E (2016) Cytosine-type nucleosides from marine-derived *Streptomyces rochei* 06CM016. J Antibiot 69, 51-56.
- Alexander DB, Zuberer DA (1991) Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. Biol Fert Soil 12, 39-45.
- Bach E, Seger GDS, Fernandes GC et al. (2016) Evaluation of biological control and rhizosphere competence of plant growth promoting bacteria. Appl Soil Ecol 99,141-149.
- Bahadori Jahromi M (2010) Evaluation of the possible biocontrol of Melon charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina* by *Trichoderma* species. Thesis for fulfilment of MSc degree in Plant Pathology. Shahid Chamran University of Ahvaz (In Persian).
- Bakker AW, Schippers B (1987) Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* SPP-Mediated Plant Growth- Stimulation. Soil Biol Biochem 19, 451- 457.
- Blanco MM, Gibello A, Vela AI et al. (2002) PCR detection and PFGE DNA macro restriction analyses of clinical isolates of *Pseudomonas anguilliseptica* from winter disease outbreaks in sea bream *Sparus aurata*. Dis Aquat Organ. 50, 19-27
- Davelos AL, Kinkel LL, Samac DA (2004) Spatial variation in frequency and intensity of antibiotic interactions among Streptomyces from prairie soil. Appl Environ Microbiol 70, 1051-1058.
- El-Tarabily KA (2008) Promotion of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plant growth by rhizosphere competent 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-producing *Streptomyces* actinomycetes. Plant Soil 308,161-174.

- Etebarian HR (2002) Diseases of vegetables and management, University of Tehran. 600 pp (In Persian).
- Ghayedi S, Abdollahi M, Ghaderi F (2012) Identification of Charcoal rot disease of bean seedlings in Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad province and evaluation of partial resistance of common bean (*Phaseolus vulgaris*) cultivars. Iran J Pulse Res 3, 119-126 (In Persian).
- Gopalakrishnan S, Vadlamudi S, Bandikinda P, et al. (2014) Evaluation of *Streptomyces* strains isolated from herbal vermicompost for their plant growth promotion traits in rice. Microbiol Res 169, 40-48.
- Hatami N, Bazgir E, Sedaghati E, Darvishnia M (2020) Isolation and study of morphology and phylogeny of arbuscular mycorrhizal fungi coexisting with the roots of some medicinal plants in Kerman province. Agric Biotechnol J 12, 23-44 (In Persian).
- Kalantar Zadeh M, Shahidi Bonjar GH, Rashid Farrokhi P et al (2005). Biological control of *Streptomyces scabies* and *S. acidiscabies*, the major causal agents of potato common scab in Iran by use of *Streptomyces*. 4th Iranian National Biotechnology Congress, Mahan, Iran.
- Karimi E, Sadeghi A (2015). Study on optimum growth condition and designing formulation for increasing shelf life of *Streptomyces rimosus* strain C-2012 as biocontrol agent. Biol J Microorganisms 4, 109-122.
- Kheiri A, Etebarian HR, Roustae A et al. (2009) Study of possibility of biological control of charcoal rot on melon (*Macrophomina phaseolina*) by *Pseudomonas fluorescens* isolates. J Agric 11, 35-46 (In Persian).
- Kieser T, Mervyn JB, Buttner MJ et al. (2000) Practical *Streptomyces* Genetics. John Innes Foundation, John Innes Centre. Norwich Research Park, Colney, Norwich, England.
- Kim H, Lee SC, and Hwang BK (2006) *Streptomyces cheonanensis* sp. Nov., a novel *Streptomyces* with antifungal activity. Int J Syst Evol Microbiol 56, 471-475.
- Konishi M, Ohkuma H, Matsumoto K et al. (1991). Dynemicins, new antibiotics with the 1, 5-diyne-3-ene and anthraquinone subunit. I. Production, isolation and physico-chemical properties. J Antibiot 44, 1300-1305.
- Kuster E, Williams ST (1964). Selection of media for isolation of *Streptomyces*. Nature 202, 928-929.
- Luo XX, Kai L, Wang Y, et al. (2017). *Streptomyces luteus* sp. nov., an actinomycete isolated from soil. Int J Syst Evol Microbiol 67, 543-547.
- McCreight JD, Staub JE, Koppar NM et al. (1993) Indo-US *Cucumis* germplasm expedition. HortScience 28, 492.
- Rashad FM, Abd El-Nasser NH, Dawoud IE et al. (2015) Isolation and Characterization of Antibiotic / Antitumor Producing *Streptomyces*. Res J Pharm Biol Chem Sci 6, 1917-1929.

- Sadeghi A, Soltani BM, Jouzani GS et al. (2014) Taxonomic study of a salt tolerant *Streptomyces* sp. strain C-2012 and the effect of salt and ectoine on lon expression level. *Microbiol Res*, 169: 232-238.
- Sadeghian M, Shahidi Bonjar GH, Sharifi-sirchi GhR (2016) Post harvest biological control of apple bitter rot by soil-borne Actinomycetes and molecular identification of the active antagonist. *Postharvest Biol Technol* 112, 46-54.
- Shafii Baftii S, Shahidi Bonjar GH, Aghighi S et al. (2005). Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*, the causal agent of root rot disease of greenhouse cucurbits in Kerman Province of Iran. *Am J Biochem Biotechnol* 1, 22-26.
- Shahriari D, Torabi M (2013) Response of Iranian local and improved genotypes of melon and musk melon to charcoal rot disease caused by *Macrophomina phaseolina*. *Agricultural and Natural Resources Research Center of Tehran, Varamin, Iran*, 165-176.
- Soltani Nejad M, Shahidi Bonjar GH, Khatami M et al. (2016) *In vitro* and *in vivo* antifungal properties of silver nanoparticles against *Rhizoctonia solani*, a common agent of rice sheath blight disease. *IET Nanobiotechnol* 3, 236-240.
- Soltanzadeh M, Soltani Nejad M, Shahidi Bonjar GH (2016) Application of Soil-borne Actinomycetes for Biological Control against *Fusarium Wilt* of Chickpea (*Cicer arietinum*) caused by *Fusarium solani* fsp *pisi*. *J Phytopathol* 164, 967-978.
- Song J, Lee SC, Kang JW et al. (2004) Phylogenetic analysis of *Streptomyces* spp. isolated from potato scab lesions in Korea on the basis of 16S rRNA gene and 16S–23S rDNA internally transcribed spacer sequences. *Int J Syst Evol Microbiol*, 54: 203-209.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N et al. (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28, 2731-2739.
- Toumatia O, Compant S, Yekkour A, et al. (2016). Biocontrol and plant growth promoting properties of *Streptomyces mutabilis* strain IA1 isolated from a Saharan soil on wheat seedlings and visualization of its niches of colonization. *S Afr J Bot* 105, 234-239.
- Türkkan M, Benli Hİ, Yılmaz Ö et al. (2020). First report of charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina* on kiwifruit in Turkey. *J Plant Pathol* 102, 535.