Journal of Microbial World
Volume 14, No. 2, August 2021

Original Article

Application of Soil-borne Streptomycetes for Biological Control against Fusarium Wilt of Cumin (Cuminum cyminum L) caused by Fusarium oxysporum fsp cumini

Mozhgan Golmoradi zadeh[1], Gholam Shahidi Bonjar[1], Sonia Aghighi[2], Mesam Soltani Nejad[3]

[1]Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. [2]Research Institute of Plant Production Technology, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. [3]Department of Crop protection, Ferdowsi university of Mashhad, Mashhad, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Cumin (Cuminum cyminum L.) is an annual plant belonging to Apiaceae family. One of the major diseases of cumin is Fusarium wilt caused by a soil-borne, vascular wilt pathogen Fusarium oxysporum f.sp. cumini which is a devastating disease that occurs in major cumin growing areas of the world; while plants reach to 0.5- 2.5 cm in height, they die as the result of the disease.

Materials & Methods: In the current research, 80 isolates of Streptomyces spp. isolated from the rhizosphere soil of Astragalus sp. and screened against Fusarium under laboratory condition.

Results: Three out of 80 isolates including M15, M26 and M80 revealed the highest antagonistic activity, hence, selected for further evaluation under greenhouse condition. After emergence of cumin seedlings, mortality and growth indices were compared between different treatments weekly and results were recorded. Plants were harvested after teen weeks and growth indices such as plant height and weight were recorded. The Streptomyces sp isolate No. M15 showed the strongest effects on plant growth and suppression of the wilt disease compared to control.

Conclusion: The present research is an attempt to control cumin *Fusarium* wilt disease using *Streptomyces* spp. The final goal of this research is to introduce an effective biological agent for managing *Fusarium* wilt disease under field condition.

Keywords: *Streptomyces*, Cumin, *Fusarium oxysporum* f.sp. *cumini*, *Fusarium* wilt disease, Biocontrol.

Received: 25 February 2021 Revised: 18 May 2021 Accepted: 5 August 2021

Correspondence to: Gholam Shahidi Bonjar

Tel: +98 9133420125

E-mail: shahidi@uk.ac.ir

Journal of Microbial World 2021, 14(2): 32-47

DOI: 10.30495/jmw.2021.690439

Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.

مجله دنیای میکروب‌ها
سال چهاردهم شماره دوم (پیاپی۴۷) تابستان ۱۴۰۰
صفحات ۴۷-۳۲

Original Article

کاربرد استرپتومیسس‌های خاکزاد جهت کنترل بیولوژیک بیماری پژمردگی آوندی زیره سبز بر اثر قارچ *Fusarium oxysporum f.sp. cumini*

مژگان گلمرادی زاده[۱]، غلامحسین شهیدی بنجار[۱*]، سونیا عقیقی[۲]، میثم سلطانی نژاد[۳]

۱بخش مهندسی گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران. [۲]پژوهشکده فناوری تولیدات گیاهی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران. [۳]گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: زیره سبز گیاهی یکساله از خانواده *Apiaceae* با نام علمی *Cumin cyminum* L. می‌باشد، از جمله مهم‌ترین مشکلات کاشت این گیاه دارویی، بیماری پژمردگی ناشی از قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *cumini* است، که در مناطق مهم زیره کاری دنیا وجود دارد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق از بین ۸۰ جدایه استرپتومیسس جداسازی شده از خاک ریزوسفر گیاه گون سه جدایه M15، M26 و M80 انتخاب شدند. به منظور بررسی بیشتر، آزمون‌های مختلف آنزیمی و فیزیولوژیکی روی جدایه‌های مذکور صورت پذیرفت. ارزیابی فعالیت آنتاگونیستی جدایه‌های منتخب تحت شرایط آزمایشگاه و گلخانه انجام پذیرفت.

یافته‌ها: پس از حدود ۱۰ هفته، رشد گیاهچه‌ها، مرگ ومیر و شاخص‌های رشد در بین تیمارهای مختلف مقایسه و نتایج ثبت گردید. نتایج بیانگر این بود که، استرپتومیسس جدایه M15 بیشترین تأثیر را بر رشد گیاه و سرکوب بیماری پژمردگی نسبت به تیمار شاهد نشان داد.

نتیجه‌گیری: پژوهش حاضر گامی در جهت کنترل بیماری پژمردگی فوزاریومی گیاه زیره سبز با استفاده از اکتینوباکتری‌ها است و هدف نهایی از ادامه این تحقیق در آینده، معرفی یک محصول زیستی مناسب برای کنترل این بیمارگر می‌باشد. 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 وبیماری‌های گیاهی اشاره نمود تا مخاطرات زیست محیطی روش‌های مبارزه بکارگیری بی رویه سموم شیمیایی به حداقل برسد.

واژگان کلیدی: استرپتومیسس، زیره **سبز**، *Fusarium oxysporum* f.sp. *cumini*، بیماری پژمردگی فوزاریومی، کنترل زیستی.

دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۱۲/۷ ویرایش مقاله: ۱۴۰۰/۲/۲۸ پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۵/۱۴

مقدمه

امروزه استفاده بیش از حد سموم برای تولید محصول بیشتر، در حالی گسترش یافته است که بقایای سموم در محصولات کشاورزی سبب بروز بیماری‌های خطرناک و شیوع عوارض مختلف در انسان شده است. این سموم علاوه بر اینکه جمعیت طبیعی میکروارگانیسم‌های خاک را تغییر می‌دهند، مقداری از آن نیز در محصولات گیاهی باقی می‌ماند و به انسان منتقل می‌شود (۱). همچنین آلودگی محیط زیست ناشی از استفاده

*) آدرس برای مکاتبه: گروه مهندسی گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر، کرمان، ایران.
تلفن: ...
پست الکترونیک: shahidi@uk.ac.ir

حقوق نویسندگان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد و تحت مجوز مالکیت خلاقانه (http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/) در فصلنامه دنیای میکروب‌ها منتشر شده است. هرگونه استفاده غیرتجاری فقط با استناد و ارجاع به اثر اصلی مجاز است.

بیش از حد از سموم شیمیایی و ایجاد ترس از سوی برخی مخالفان سموم، باعث ایجاد تغییرات چشمگیر در نگرش افراد نسبت به استفاده از سموم دفع آفات در کشاورزی شده است (۲). در نتیجه محققان تلاش خود را بر توسعه روش‌های جایگزین سموم شیمیایی برای کنترل آفات و بیماری‌ها متمرکز کرده‌اند. در این راستا تلفیق روش‌های مختلف به منظور پیشگیری، کاهش یا کنترل بیماری‌های گیاهی توصیه می‌گردد (۳). گیاه زیره سبز یکی از گیاهان حساس به بیماری‌های قارچی از جمله بیمارگر فوزاریوم می‌باشد. بیماری بوته میری زیره سبز که قارچ عامل آن F. oxysporum است، در اکثر مناطق زیره کاری کشور ایران شیوع دارد. قارچ بیمارگر و خاکزاد F. oxysporum موجب پژمردگی آوندی در طیف وسیعی از محصولات زراعی و باغی می‌شود، این بیماری مهم‌ترین بیماری قارچی زیره سبز محسوب می‌گردد و خسارات زیادی را به مزارع زیره سبز وارد می‌نماید (٤). از آنجا که عامل این بیماری خاکزاد بوده و کنترل بیماری‌های خاکزاد بسیار سخت و بیشتر متکی بر پیشگیری می‌باشد بنابراین، استفاده از قارچ‌کش‌ها نمی‌تواند به عنوان ابزار مناسبی جهت کنترل بیماری مطرح گردد و تقریباً می‌توان گفت که بهترین استراتژی جهت مدیریت این بیماری استفاده از ارقام مقاوم وکنترل بیولوژیک می‌باشد (۵). اکتینومیست‌ها، حائز ویژگی‌های خاصی هستند که موجب استفاده آن‌ها به عنوان عوامل کنترل بیولوژیک می‌شود، که این ویژگی‌ها عبارتند از: توانایی کلونیزه کردن سطوح گیاهی، آنتی‌بیوز علیه بیمارگرهای گیاهی، سنتز پروتین‌های خارج سلولی، تجزیه فیتوتوکسین‌ها، القاء مقاومت در گیاه میزبان و همچنین خاصیت محرک رشد گیاه یا PGPR(Plant Growth Promoting Rhizobacteria) نیز دارند (٦). استرپتومیسس‌ها همراه با سایر سویه‌های باکتریایی متعلق به اکتینومیست‌ها، خصوصیت‌های متنوعی دارند که به آن‌ها توانایی ویژه بعنوان عوامل بیوکنترل را می‌دهد (۷). این توانایی‌ها شامل کلونیزاسیون سطوح ریشه گیاه، آنتی‌بیوز علیه بیمارگرهای ریشه، سنتز آنزیم‌های خارج سلولی خاص و تجزیه توکسین‌های گیاهی هستند و همچنین استرپتومیسس‌ها به دلیل توانایی منحصر به فرد در تولید آنتی‌بیوتیک‌ها مشهور هستند (۸). گونه‌های Streptomyces منبع غنی از ترکیبات فعال زیستی به ویژه آنزیم‌ها و مهارکننده‌های آنزیمی هستند. حدود ۷۵٪ از آنتی‌بیوتیک‌های شناخته شده تجاری و دارویی مفید توسط Streptomyces spp. تولید می‌شوند و در بسیاری از منابع فعالیت مستقیم ضدقارچی گونه‌های استرپتومایسس گزارش شده است. فعالیت لیتیک این باکتری‌ها نیز به طور عمده در نتیجه تولیدآنزیم‌های هیدرولازی مانند کیتیناز و گلوکاناز است که این آنزیم‌ها توانایی تجزیه دیواره سلولی، ریسه‌ها و کلامیدوسپورها را دارند (۹). در این پژوهش جدایه‌هایی از استرپتومیسس‌های خاکزی جداسازی شده از ریزوسفر گون از مناطق مختلف استان کرمان نمونه برداری شده است و از جهت برخورداری ازخواص ضد قارچی علیه قارچ مولد بیماری پژمردگی زیره سبز، مورد غربالگری قرار گرفتند. جدایه‌هایی که در شرایط آزمایشگاهی فعالیت مهارکنندگی داشتند علیه قارچ مذکور انتخاب شده و جهت بررسی ماهیت، خواص مواد موثر، اثرات آنتاگونیستی و تاثیر بر شاخص‌های رشد گیاه مذکور مورد ارزیابی و جدایه‌های منتخب در شرایط گلخانه‌ای بررسی شدند.

مواد و روش‌ها

الف) تهیه جدایه خالص قارچ Fusarium oxysporum f.sp. cumini و اثبات بیماریزایی: جدایه خالص قارچ F.oxysporum f.sp. cumini (IRAN54C) از مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور تهیه گردید. به منظور رشد و تکثیر جدایه از محیط کشت PDA (Potato Dextrose Agar) مرک آلمان استفاده گردید. به مقدار مورد نیاز از محیط PDA با آب مقطر مخلوط و به منظور بدست آمدن مایعی یکنواخت روی هیتر قرار گرفت. پس از آن به منظور استریل کردن، محیط کشت در دمای 121° C و فشار یک و نیم اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو گردید و در تشتک‌های پتری استریل توزیع و پس از ۲٤ ساعت قارچ به صورت چمنی روی محیط کشت سترون شده کشت داده شد. همچنین برای نگهداری طولانی مدت

قارچ، محیط کشت PDA در لوله‌های آزمایش به صورت شیب دار تهیه و قارچ در آن مایه‌زنی گردید، پس از سه روز و رشد مناسب، لوله‌ها به دمای 4°C در یخچال انتقال یافتند. جهت اثبات بیماری‌زایی قارچ بر روی بذور زیره، ابتدا بذرها در هیپوکلریت سدیم دو درصد به مدت ۳۰ الی ۵۰ ثانیه قرار گرفتند، سپس دو بار و هر بار به مدت دو دقیقه در آب مقطر استریل شستشو داده شدند. متعاقباً روی کاغذ صافی استریل که داخل تشتک‌های پتری استریل قرار گرفته و با آب مقطر استریل خیس شده بودند قرار داده شدند، و تا زمان جوانه‌زنی نگهداری گردیدند. در این فاصله زمانی بین ضدعفونی کردن بذرها و جوانه‌زنی آن‌ها، قارچ به صورت چمنی روی کاغذ صافی استریل که روی محیط PDA قرار گرفته، کشت گردید. پس از گذشت پنج الی هفت روز، کاغذ صافی آلوده به قارچ بیمارگر به صورت برعکس روی محیط آب‌آگار قرار گرفت، سپس پنج الی شش عدد بذر جوانه زده روی کاغذ صافی آلوده به قارچ قرار گرفتند. از قرار دادن بذرها روی کاغذ صافی استریل و فاقد اسپورهای قارچ به عنوان تیمار شاهد استفاده شد. تیمارها در دمای مناسب تا زمان ظهور علائم بیماری، نگهداری و شدت بیماری‌زایی نسبت به شاهد به صورت چشمی ارزیابی گشت (۵).

ب) نمونه‌برداری، جداسازی و کشت استرپتومیسس: برای بدست آوردن استرپتومیسس‌های خاکزی از خاک ریزوسفر گیاه گون مناطق مختلف استان کرمان شامل: رفسنجان، بافت، بزنجان و رابر نمونه‌برداری انجام گرفت. بدین منظور ده سانتی‌متر سطح رویی خاک کنار زده شد، و از عمق ۱۰ تا ۲۰ سانتی‌متری خاک نزدیک ریشه گیاهان، حدود ۵۰۰ گرم خاک در پاکت‌های کاغذی نمونه‌برداری گردید. پس از آن نمونه‌ها به مدت یک هفته در معرض هوای خشک قرار گرفتند، سپس از هر نمونه، ده گرم خاک وزن شده و با ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل مخلوط شد، مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه روی شیکر دوار ۱۳۰ دور بر دقیقه (rpm) قرار داده شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه به حال ساکن رها گردید، از فاز رویی یک میلی‌لیتر برداشته و در نه میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه گردید و رقت ۲-۱۰ بدست آمد. به همین روش سوسپانسیون خاک با رقت‌های ۳-۱۰، ٤-۱۰، ۵-۱۰ و ٦-۱۰ تهیه شدند (۱۰). محیط کشت انتخابی برای رشد استرپتومیسس‌ها، محیط کشت کازئین-گلیسیرین-آگار (CGA) است. یک میلی‌لیتر از رقت‌های حاصل از مرحله قبل را در کف تشتک‌های پتری استریل ریخته و مقداری محیط کشت CGA مذاب با دمای 45C° به آن‌ها اضافه گردید و نمونه‌ها در دمای 28C° انکوبه شدند. پس از گذشت ۷ تا ۱۰ روز روی محیط کشت پرگنه‌های متفاوتی از استرپتومیسس، قارچ و باکتری ظاهر شد. از هر پرگنه استرپتومیسس، کشت خطی روی تشتک‌های پتری حاوی CGA تهیه شد.

ج) آزمون کشت متقابل جهت تعیین فعالیت ضدقارچی: جهت تعیین توانایی جدایه‌های استرپتومیسس در ممانعت از رشد قارچ بیمارگر و انتخاب جدایه مناسب، روش کشت متقابل صورت پذیرفت، این آزمون در سه تکرار انجام شد و میانگین قطر ناحیه ممانعت از رشد (Inhibition zone) هر کدام از جدایه‌ها ثبت گردید. در این آزمون ابتدا قارچ به صورت چمنی روی محیط کشت PDA کشت شد. سپس ازجدایه‌های استرپتومیسس خالص رشد یافته روی محیط CGA که به مدت پنج الی شش روز در دمای 28C° گرماگذاری شده بودند، دیسک‌های شش میلی‌متری جدا و روی آن قرار داده شدند. به عنوان شاهد دیسک PDA عاری از میکروب استفاده گشت. این نمونه‌ها در دمای 28C° گرماگذاری و بر اساس قطر ناحیه ممانعت از رشد جدایه‌های فعال انتخاب گردیدند (۱۱). پس از اجرای آزمون‌های آنتی‌بیوگرام و مشخص شدن فعالیت جدایه‌های استرپتومیسس علیه قارچ بیمارگر جدایه‌های فعال مذکور، به صورت کشت‌های خالص درون لوله آزمایش حاوی محیط کشت تهیه و پس از رشد تحت دمای 28C°، در دمای 4 C° نگهداری شدند تا در زمان لازم از این کشت‌ها، به عنوان منبع کشت مجدد استفاده گردد.

د) کشت در محیط مایع و ترسیم منحنی تولید ماده مؤثر: به‌منظور تهیه کشت مایع جدایه‌های استرپتومیسس، به ازای هر جدایه ۲۰۰ میلی‌لیتر محیط CG مایع تهیه و سترون گردید، به

هر فلاسک حاوی محیط چهار دیسک شش میلی‌متری از جدایه انتقال داده و روی شیکر انکوباتوردار (با دور 120 rpm و دمای 28°C) قرار داده شدند. از روز اول به مدت ۲۵ روز، روزانه ۵/۱ میلی‌لیتر از نمونه‌ها به میکروتیوب‌های استریل انتقال داده شد. نمونه‌ها تا پایان دوره در یخچال نگهداری شدند. در پایان هر ۱۲ روز، برای هر نمونه در سه تکرار، آزمون زیستی به روش چاهک علیه قارچ انجام گرفت. به عنوان شاهد از CG با دیسک عاری از هر جدایه‌ای استفاده شد. پتری‌ها تا زمان رشد کامل قارچ در دمای 28°C گرماگذاری شدند، سپس قطر هاله ممانعت از رشد سنجیده شد، و منحنی تولید ماده موثر برای هر جدایه فعال، رسم گردید (۱۲).

ه) تعیین دمای غیر فعال کننده ماده مؤثر: جهت تعیین دمای غیرفعال کننده ماده موثر TIP (Thermal Inactivation Point) به ازای هر جدایه فعال استرپتومیسس، نه لوله آزمایش در نظر گرفته شد. در هر لوله عصاره خام هر یک از جدایه‌های استرپتومیسس در آب مقطر استریل حل گردید. لوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم در دماهای ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰، ۱۲۰، ۱۴۰، ۱۶۰ و ۱۸۰ درجه سلسیوس قرار گرفته و بلافاصله به مخزن یخ خرد شده، به‌منظور کاهش دما انتقال یافتند، برای دماهای بالای 100 °C از روغن آفتابگردان استفاده گردید. تیمار شاهد، نمونه گرما ندیده و در دمای 25 °C نگهداری شده بود. آزمون زیستی به روش چاهک در سه تکرار انجام شده و قطر هاله ممانعت شونده، سنجیده شد. این عمل تا دمایی انجام گرفت که هیچ هاله ممانعت از رشدی دیده نشد (۱۳و۱۴).

و) تعیین حداقل غلظت بازدارنده از رشد: برای بدست آوردن حداقل غلظت بازدارنده از رشد MIC، ۲۰ میلی‌گرم از عصاره خام هر جدایه در یک میلی‌لیتر حلال دی‌متیل سولفوکساید و متانول، با نسبت حجمی ۱:۱، حل شده و به مدت ده دقیقه مخلوط شدند. سپس از این استوک، هشت رقت متوالی ۲۰، ۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵، ۰/۶۲۵، ۰/۳۱۲ و ۰/۱۵۶ mg/ml تهیه شده و بر روی آن‌ها آزمون زیستی به روش چاهک، در سه تکرار انجام شد (۱۵).

ز) بررسی فعالیت قارچ‌کشی و قارچ‌ایستایی: هدف از انجام این آزمون، بررسی اثر قارچ‌کشی یا قارچ‌ایستایی هریک از جدایه‌های استرپتومیسس می‌باشد. برای انجام این آزمایش، ابتدا قارچ به صورت چمنی روی محیط کشت PDA کشت داده شد، سپس دیسک‌های شش میلی‌متری استرپتومیسس‌ها روی آن قرار داده شد، پس از تشکیل هاله ممانعت، دیسک‌هایی از ناحیه شفاف هاله ممانعت برداشته و به تشتک‌های پتری محتوی محیط کشت PDA منتقل گردید. در صورتی که قارچ بتواند رشد کند، نشان ازفعالیت قارچ‌ایستایی جدایه مورد نظر دارد و در صورتی که نتواند رشد کند، نشان از فعالیت قارچ‌کشی جدایه مورد نظر دارد (۱۵).

ح) آزمون‌های آنزیمی:

۱) آزمون کاتالاز: آنزیم کاتالاز مترشحه از باکتری‌ها، پراکسید هیدروژن را به آب و اکسیژن تجزیه می‌نماید، که به صورت حباب‌هایی روی جدایه‌ها دیده می‌شوند. به منظور بررسی این توانایی در استرپتومیسس‌های منتخب، ابتدا در لوله‌های حاوی CGA به صورت شیب‌دار، جدایه‌های استرپتومیسس را کشت داده و پس از رشد مناسب جدایه‌های استرپتومیسس میزان نیم میلی‌لیتر از پراکسیدهیدروژن ده درصد به هر جدایه اضافه گردید، و خارج شدن حباب‌های گاز اکسیژن مورد بررسی قرار گرفت (۱۶).

۲) آزمون متیل رد: برخی باکتری‌ها برای تولید انرژی از گلوکز استفاده می‌کنند، که فراورده حاصله، اسید می‌باشد. جهت بررسی این توانایی ابتدا محیط کشت مایع Methyl Red and Vogues- Proskauer Test(MRVP) که شامل پپتون، گلوکز و بافر فسفات است، تهیه و داخل لوله‌ها توزیع و اتوکلاو گردید. روز بعد جدایه‌های اکتینومیست، در محیط کشت مایع آماده شده، مایه‌زنی و بمدت ۲۴ ساعت در دمای 28 °C نگهداری شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت، به ازای هر میلی‌لیتر از محیط کشت یک قطره متیل رد اضافه گردید. در صورت تولید اسید، معرف موجود در محیط به رنگ قرمز در می‌آید (۱۶).

۳) آزمون مصرف سیترات: برخی میکروارگانیسم‌ها می‌توانند از سیترات به عنوان منبع کربن استفاده کنند، به منظور سنجش این

توانایی از محیط کشت سیمون سیترات استفاده می‌شود، که شامل سیترات به عنوان تنها منبع کربن، املاح آمونیوم به عنوان منبع ازت و معرف بروموتیمول بلو می‌باشد، که در اثر تغییر اسیدیته محیط به قلیایی، محیط به رنگ آبی تغییر می‌کند. استرپتومیسس‌هایی که توانایی مصرف سیترات را داشته باشند، توسط آنزیم سیترات پرمه‌آز، سیترات را به داخل سلول منتقل و به اگزالواستیک اسید و استات تبدیل می‌کنند، که اگزالواستیک حاصله به اسید پیرویک و دی‌اکسیدکربن تجزیه می‌شود. گاز دی‌اکسیدکربن با یون سدیم و آب ترکیب شده و کربنات سدیم تولید می‌شود، که سبب قلیایی شدن محیط و تبدیل رنگ سبز محیط به آبی می‌شود. ابتدا محیط کشت سمون سیترات در لوله آزمایش سترون، به صورت اسلنت تهیه شده، سپس جدایه‌های استرپتومیسس مورد نظر در اسلنت‌ها مایه‌زنی شده و در دمای28°C به مدت هفت روز گرماگذاری گشتند. به منظور مشاهده تغییرات تا پایان مدت مقرر هر ۲٤ ساعت یکبار مورد بررسی قرار گرفتند (۱٦).

٤) آزمون فعالیت کیتینازی: در این آزمون از محیط حداقل که حاوی ۰/٤٪ کیتین کلوئیدال و ۱/۵ ٪ آگار، به منظور شناسایی جدایه‌های اکتینومیست دارای فعالیت کیتینازی استفاده گردید. در این محیط، کیتین به عنوان تنها منبع کربن استفاده شد، و در دمای 121 °C به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو و پس از آن، محیط به تشتک‌های پتری استریل منتقل گشت، و سپس جدایه‌های استرپتومیسس به صورت نقطه‌ای روی محیط، کشت گردید. جدایه‌های دارای فعالیت کیتینازی، از طریق هیدرولیز کیتین و تشکیل هاله شفاف در اطراف کلنی‌هایشان، قابل تشخیص خواهند بود (۱۷).

۵) آزمون فعالیت پروتئازی: محیط کشت حداقلی حاوی یک گرم گلوکز، سه گرم کازئین، دو گرم کلریدکلسیم، ۱۵ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر تهیه و اتوکلاو گردید. سپس درتشتک‌های پتری سترون توزیع شد و پس از گذشت ۲٤ ساعت، دیسک‌های استرپتومیسس، مشابه بخش قبل به این محیط منتقل شد. پس از گذشت سه الی چهار روز، در صورت هیدرولیز کازئین و خاصیت پروتئولیتیکی، تشکیل هاله شفاف در اطراف دیسک‌ها قابل مشاهده خواهد بود (۱۸).

٦) آزمون فعالیت لیپازی: برای سنجش ترشح آنزیم لیپاز توسط جدایه‌های فعال از محیط کشت شامل: ده گرم پپتون، پنج گرم کلرورسدیم، ۰/۱گرم کلرورکلسیم، ۱۵ گرم آگار و یک لیتر آب مقطر استفاده شد، که پس از استریل شدن به آن ده میلی‌لیتر توین ۸۰ (Tween 80) استریل اضافه شده و در تشتک‌های پتری ریخته شد. بعد از سپری شدن ۲٤ ساعت و حصول اطمینان از آلوده نبودن محیط، جدایه‌های باکتری به صورت جداگانه روی تشتک‌های حاوی محیط کشت تهیه شده به صورت نقطه‌ای کشت داده شدند. پس از گذشت هفت روز، ایجاد هاله رسوبی در اطراف محل رشد باکتری، نشان دهنده هیدرولیز توین و فعالیت لیپازی جدایه‌ها می‌باشد (۱۹).

۷) آزمون فعالیت آمیلازی: از این آزمون جهت سنجش تولید آنزیم آمیلاز و توانایی تجزیه نشاسته استفاده گردید. بدین منظور محیط کشت CGA بدون کازئین و حاوی ۱٪ نشاسته تهیه و پس از گذشت ۲٤ ساعت، به صورت نقطه‌ای استرپتومیسس‌ها در آن کشت شدند.

تشتک‌های پتری به مدت سه روز در دمای28°C گرماگذاری شدند، سپس روی پتری‌ها ده میلی‌لیتر محلول لوگول (ید) ریخته شد. ید با نشاسته واکنش داده و رنگ آبی ایجاد می‌کند. در نتیجه، قسمت‌هایی که نشاسته تجزیه شده است، هاله بی‌رنگی بجا می‌ماند (۱٦).

۸) آزمون تولید سیانید هیدروژن: ابتدا جدایه‌های استرپتومیسس در پتری‌های حاوی CGA به صورت چمنی کشت شده و به مدت سه الی چهار روز در دمای مناسب نگهداری شدند. سپس جهت تولید گیرنده گاز سیانید هیدروژن، یک کاغذ صافی به محلول معرف شامل کربنات سدیم ۲٪ و اسید پیکریک ۰/۵٪ آغشته گردید و در درب تشتک حاوی جدایه‌های منتخب قرار داده شد. جهت جلوگیری از خروج گاز، تشتک‌های پتری توسط نوار پارافیلم مسدود شدند آنگاه به صورت واژگون به مدت چهار الی پنج روز در انکوباتور نگهداری شدند. در صورت تولید گاز سیانید هیدروژن توسط جدایه‌ها، کاغذ صافی آغشته به معرف، از رنگ زرد به رنگ

قهوه‌ای روشن، قهوه‌ای تیره و نهایتاً آجری تغییر رنگ می‌دهد (۲۰).

ط) بررسی خاصیت فرار بودن ماده موثر ضدقارچی: ابتدا جدایه‌های فعال استرپتومیسس، روی محیط کشت CGA به صورت چمنی کشت گردید و به مدت سه الی چهار روز در دمای 28 °C گرماگذاری گشتند. پس از گذشت مدت معین و رشد جدایه‌های استرپتومیسس، قارچ نیز روی تشتک‌های پتری حاوی PDA به صورت چمنی کشت داده شدند، سپس با برداشتن درب تشتک‌های پتری کشت استرپتومیسس و قارچ، دهانه دو تشتک حاوی کشت قارچ و جدایه استرپتومیسس را بر روی هم قرار داده، و اطرافشان با پارافیلم پوشانده شد تا از خروج متابولیت‌های فرار استرپتومیسس جلوگیری گردد، و در دمای 28 °C به مدت پنج الی هفت روز نگهداری گردید. در صورتی که ماده موثر ضد قارچی فرار باشد، از رشد قارچ جلوگیری می‌نماید (۱۵).

ی) آزمون حساسیت به کلروفرم: هدف از انجام این آزمون تعیین ماهیت ماده موثر جدایه‌های استرپتومیسس می‌باشد. در صورتی که ماده فعال یک ایزوله ماهیت آنزیمی (پروتینی) داشته باشد، با قرار گرفتن در معرض کلروفرم پروتین از بین رفته، و ماده موثر اثر خود را از دست می‌دهد، اما در صورتی که بعد از قرار گرفتن جدایه‌ای در معرض کلروفرم باز هم خاصیت ضد میکروبی در آن مشاهده شود، نشان از ماهیت غیرپروتینی ماده فعال آن جدایه دارد. در این آزمایش، پرگنه‌های استرپتومیسسی، به صورت نقطه‌ای روی محیط کشت CGA کشت داده شدند، و پس از نگهداری به مدت سه الی پنج روز در دمای 28 °C، تشتک‌های پتری در شرایط استریل، به صورت وارونه و به مدت سه ساعت روی شیشه ساعتی که حاوی مقدار پنج میلی‌لیترکلروفرم بود، قرار داده شدند. پس از گذشت مدت زمان مقرر به هر تشتک پتری، آگار یک درصد با دمای 45°C، به میزانی که یک لایه نازک سطح کلونی‌های اکتینومیستی را فرا گیرد، اضافه شد. بعد از ۲۴ ساعت، قارچ به صورت چمنی روی آگار کشت و نمونه‌ها به مدت پنج الی هفت روز در دمای 28°C نگهداری شدند (۲۰).

ک) بررسی تحمل شوری و فشار اسمزی: محیط کشت مورد استفاده در این آزمون، نوترینت گلوکزآگار (Nutrient Glucose Agar) NGA به اضافه ۲٪ کلریدسدیم (NaCl) بود، جهت تهیه محیط کشت نوترینت گلوکز آگار، گلوکز یک درصد و نوترینت آگار چهار درصد به صورت جداگانه وزن و با هم مخلوط و NaCl دو درصد نیز به آن افزوده شد، پس از شفاف و یک دست شدن محیط کشت، در لول‌ها توزیع شده، و در دمای 120°C و فشار ۱/۵ اتمسفر، به مدت ۲۵ دقیقه استریل گشتند، سپس لوله‌ها در سطح شیب‌دار قرار گرفته تا به صورت اسلنت درآیند. به عنوان شاهد، از محیط کشت CGA معمولی جهت کشت جدایه‌ها استفاده شد. جدایه‌ها به صورت جداگانه در لوله‌ها مایه‌زنی و در دمای 28°C تا زمان رشد کامل نمونه‌های شاهد نگهداری گردیدند. درصورتی که جدایه‌ها در تیمارهای حاوی نمک رشد کنند، نشان دهنده توانایی آن‌ها در تحمل فشار اسمزی است (۲۱).

ل) مطالعات گلخانه‌ای: برای تولید مایه تلقیح قارچ، ابتدا در فلاسک‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری ۱۰۰ گرم از بذور ارزن ریخته شد، و سپس روی ارزن‌ها تا جایی که پنج تا هشت سانتی‌متر آب روی آن‌ها قرار گیرد، آب اضافه گردید. پس از گذشت یک شب، آب فلاسک‌ها خارج گردید، و درب هر کدام با پنبه و فویل آلومینیوم پوشانده شد.

فلاسک‌ها سه مرتبه (در سه روز متوالی) و هر بار به مدت ۳۰ تا ۴۵ دقیقه در اتوکلاو (دمای 121 °C و فشار ۱/۵ اتمسفر) سترون شدند. سپس در شرایط سترون در هر فلاسک پنج دیسک میسلیومی به قطر شش میلی‌متر از قارچ قرار گرفت، و در دمای 25 °C به مدت سه الی چهار هفته نگهداری شدند. یک فلاسک بدون قارچ، حاوی ارزن استریل به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. برای کلونیزه شدن کامل بذور ارزن فلاسک‌ها هر روز با دست تکان داده شدند (۲۲).

برای تهیه سوسپانسیون جدایه‌های استرپتومیسس، ابتدا جدایه‌های فعال روی محیط CGA داخل تشتک پتری کشت داده شدند و به مدت هفت روز در دمای 28°C نگهداری شدند. سپس ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به هر تشتک پتری اضافه،

و سطح کلونی‌ها با یک میله L شکل استریل کاملاً خراش داده شد تا سوسپانسیونی از اسپور بدست آید (۱۵). برای اطمینان از حذف آلودگی‌های موجود روی سطح، بذور زیره سبز به مدت ۳۰ ثانیه در هیپوکلریت سدیم ۲٪ قرار گرفته و سپس برای حذف هیپوکلریت دو بار، و هر بار به مدت دو دقیقه در آب مقطر استریل شسته شدند. پس از آن در ظروف استریل حاوی کمی آب مقطر در دمای ۲۵ °C و نور کافی به مدت یک شبانه روز نگهداری شده، و بذور جوانه زده جهت کشت آماده شدند. به‌منظور اطمینان از اثر جدایه‌های استرپتومیسس بر جدایه قارچ بیمارگر در حضور گیاه زیره سبز، آزمایشی در شرایط گلخانه انجام گرفت.

این آزمون در قالب فاکتوریل و در سه تکرار برای هر سه جدایه (M15، M26 و M80) با تیمارهای زیر انجام گرفت: شاهد (فاقد قارچ بیمارگر و استرپتومیسس آنتاگونیست)، قارچ بیمارگر (F. oxysporum f.sp.cumini)، استرپتومیسس آنتاگونیست جدایه M15، استرپتومیسس آنتاگونیست جدایه M26، استرپتومیسس آنتاگونیست جدایه M80، قارچ بیمارگر و استرپتومیسس آنتاگونیست (F. oxysporum+M15)، قارچ بیمارگر و استرپتومیسس آنتاگونیست (F. oxysporum+M26)، قارچ بیمارگر و استرپتومیسس آنتاگونیست (F. oxysporum+M80). در تهیه خاک گلدان‌ها از شن شسته و خاک برگ (با نسبت وزنی۱:۳) استریل استفاده گردید. مایه تلقیح قارچ F. oxysporum f.sp. cumini به نسبت ۰/۵٪ وزنی خاک (پنج گرم ارزن کلونیزه شده توسط قارچ در یک کیلو خاک) مورد استفاده قرار گرفت.

مایه‌زنی خاک همزمان با کاشت بذور زیره به صورت ساندویچی انجام شد. ابتدا سه گلدان به عنوان شاهد در نظر گرفته شد، و بدون هیچ گونه باکتری آنتاگونیست یا قارچ بیمارگری در خاک استریل شده بذور زیره کشت شدند. در مرحله‌ی بعد، برای تهیه تیمار باکتری‌های آنتاگونیست مقداری از خاک گلدان‌ها با جدایه‌های اکتینومیست به صورت جداگانه مایه‌زنی گردید و بین دو لایه‌ی خاک سالم گلدان (خاک سالم + خاک مایه زنی شده با سوسپانسیون جدایه اکتینومیست+ خاک سالم) قرار گرفت، بدین صورت که لایه وسطی خاک سه گلدان با سوسپانسیون جدایه اکتینومیست M15، سه گلدان با جدایه اکتینومیست M26 و سه گلدان با جدایه اکتینومیست M80 مایه‌زنی گشت و به طور کامل هم زده شد، تا به طور کامل آغشته به جدایه اکتینومیست مربوطه شود، و در نهایت بذور زیره سبز در عمق یک سانتی‌متری خاک کاشته شد. سپس برای کاشت تیمار قارچ بیمارگر+ باکتری آنتاگونیست، مقدار مشخصی از قارچ بیمارگر که از سه هفته قبل در فلاسک‌های ارزن رشد کرده بودند را با مقداری خاک ترکیب کرده و جدایه استرپتومیسس نیز به طور جداگانه با خاک مخلوط گشت وبه صورت ساندویچی (خاک سالم+ خاک مایه‌زنی شده با سوسپانسیون جدایه استرپتومیسس + خاک مایه زنی شده با سوسپانسیون قارچ بیمارگر + خاک سالم) قرار گرفت سپس بذور زیره کاشته شد، برای کاشت تیمار قارچ بیمارگر، نیز مقداری از ارزن مایه‌زنی شده با فوزاریوم را با خاک مخلوط کرده، و در وسط دو لایه خاک سالم ریخته و کشت زیره انجام شد.

آبیاری تمام گلدان‌ها با آب مقطر استریل و تقریباً هر سه روز یکبار انجام گرفت. کشت گیاه اواخر شهریور ماه با دمای کنترل شده ۲۵ ±۲ °C در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید باهنر کرمان انجام گرفت. پس از انجام مراحل مزبور گیاهچه‌ها به منظور مشاهده وضعیت رشد و ظهور بیماری به صورت هفتگی بررسی گردیدند. همچنین یک ماه بعد از رشد گیاهچه‌ها، هر ۱۰ روز یکبار، مقدار کمی کود مایع (حاوی نیتروژن، فسفر، پتاسیم) به گلدان‌ها اضافه گردید. این آزمایش در مدت زمان ۷۵ روز انجام گرفت، و پس از این مدت گیاهان از گلدان‌ها به طور کامل خارج و شاخص‌های مختلف رشدی مورد ارزیابی قرار گرفت (۲۲).

م) اندازه‌گیری شاخص‌های رشد (ارتفاع، وزن تر، میزان مرگ و میر گیاهان): ارتفاع گیاه از جوانه انتهایی تا انتهای ریشه برحسب سانتی‌متر اندازه‌گیری شد. بدین منظور پس از خارج نمودن کلیه بوته‌ها از خاک و شستن ریشه با آب، هر کدام جداگانه در پاکت‌های کاغذی که قبلاً وزن شده بود قرار

گرفتند، از تفاضل وزن هر یک با وزن پاکت خالی مربوطه وزن تر گیاه اندازه‌گیری شد (۱۵).

نسبت مرگ و میر گیاهان بر اساس تعداد گیاهان تلف شده نسبت به تعداد گیاهان جوانه زده در هر تیمار شمارش و ثبت گشت.

ن) تجزیه آماری نتایج: تجزیه واریانس داده‌ها براساس طرح کامل تصادفی و همچنین مقایسه تیمارها توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن با استفاده از نرم افزار SPSS انجام و رسم نمودار توسط نرم افزار Excel Microsoft Office 2013 انجام گردید.

یافته‌ها

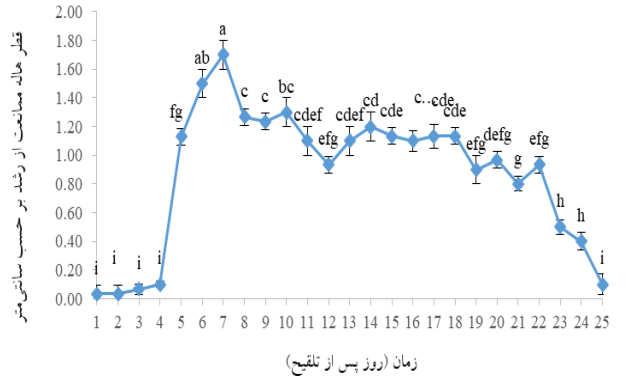
الف) اثبات بیماری‌زایی قارچ عامل بیماری روی جوانه ی گیاه زیره: در شرایط آزمایشگاهی در حالی که بذور تیمار شاهد به طور مناسب رشد کردند، بذوری که در تماس با قارچ عامل بیمارگر قرار گرفتند علائم بیماری را بروز دادند. قارچ، بذور، ریشه و طوقه گیاهچه را کلونیزه کرده، باعث پژمردگی گیاهچه‌ها و حتی عدم رشد گیاهچه شد.

ب) غربالگری جدایه‌های استرپتومیسس به منظور تعیین فعالیت ضد قارچی: تمامی ۸۰ جدایه خالص شده، در آزمون‌های زیستی بررسی فعالیت ضد قارچی آن‌ها از طریق سنجش میزان هاله ممانعت از رشد Growth inhibition zone سنجیده شد. طی آزمون‌های کشت متقابل و دیسک گذاری و اندازه‌گیری هاله ممانعت از رشد، مشخص گردید که جدایه‌های M15، M26 و M80 با داشتن بیشترین هاله ممانعت از رشد، بیشترین فعالیت ضد قارچی را دارا هستند، این سه جدایه برای انجام آزمون‌های بعدی انتخاب شدند.

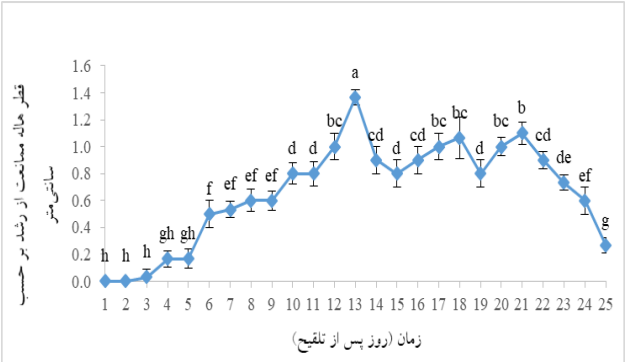
پس از انتخاب جدایه‌های استرپتومیسس مناسب در کنترل قارچ F.oxysporum f.sp. Cumini از طریق آزمون زیستی، این جدایه‌ها در محیط کشت CGA درون لوله آزمایش مایه‌زنی شده و پس از رشد در دمای 4 °C نگهداری گردیدند.

ج) کشت در محیط مایع و ترسیم منحنی تولید ماده موثر: جدایه‌های استرپتومیسس M15، M80 و M15 در محیط CG مایع کشت داده شده و از روز اول تا روز بیست و پنجم از کشت آن‌ها نمونه برداری انجام شد.

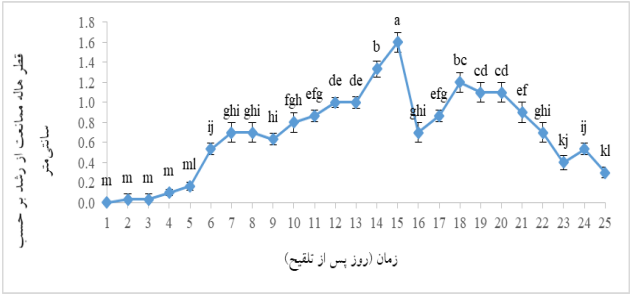
در پایان دوره، با نمونه‌های موجود آزمون زیستی به روش چاهک انجام شده و اثر بازدارندگی عصاره‌ها در تاریخ‌های مختلف سنجیده و منحنی آن ترسیم شد. داده‌ها حاکی از آن بودند که حداکثر بازدارندگی از رشد قارچ F.oxysporum f.sp. cumini برای جدایه M15 در روز هفتم، برای جدایه M80 در روز سیزدهم و در جدایه M15، در روز پازدهم ثبت گردید (شکل ۱ تا ۳).



شکل ۱: منحنی روند تولید ماده موثره استرپتومیسس جدایه M15 در کشت مایع، طی ۲۵ روز متوالی روی شیکر دوار در 120 rpm به روش آزمون زیستی نشت چاهک، علیه قارچ *Fusarium oxysporum*. از نظر آماری، روزهای دارای حروف مشترک، تفاوت معنی‌داری با هم ندارند ($p<0.01$).



شکل ۲: منحنی روند تولید ماده موثره جدایه .M26 در کشت مایع طی ۲۵ روز متوالی روی شیکر دوار در 120 rpm به روش آزمون زیستی نشت چاهک، علیه قارچ *Fusarium oxysporum* از نظر آماری، روزهای دارای حروف مشترک، تفاوت معنی‌داری با هم ندارند ($p<0.01$)



شکل ۳: منحنی روند تولید ماده موثره استرپتومیسس جدایه M80. در کشت مایع، طی ۲۵ روز متوالی روی شیکر دوار در 120 RPM به روش آزمون زیستی نشت چاهک، علیه قارچ *Fusarium oxysporum*. از نظر آماری، روزهای دارای حروف مشترک، تفاوت معنی‌داری با هم ندارند ($p<0.01$).

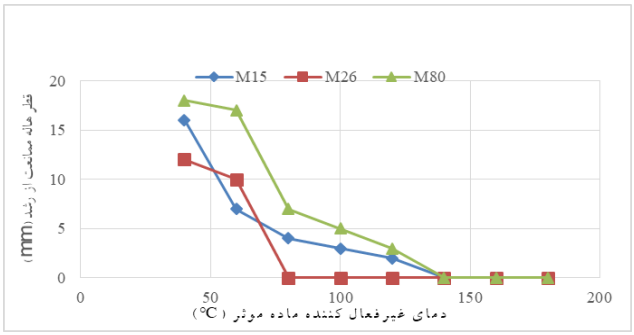
د) تعیین دمای غیر فعال کننده ماده مؤثر (TIP): پس از اعمال دماهای مختلف به عصاره‌های حاوی ماده موثر جدایه‌های استرپتومیسس و انجام آزمون زیستی چاهک، میزان هاله ممانعت از رشد اندازه‌گیری شد. دما ۱۴۰ °C غیرفعال کننده ماده مؤثر جدایه‌های M15 و M80 بود، در حالیکه این دما برای جدایه M26، ۸۰°C بود (شکل ٤).

ه) تعیین حداقل غلظت بازدارنده از رشد (MIC): نتایج این آزمون بیانگر این بود که، MIC (Minimum Inihibitory Concent) برای جدایه‌های استرپتومیسس M26، M15 و M80 به ترتیب ۲/۵، ۱/۲۵ و ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود.

و) آزمون‌های فیزیولوژیکی و آنزیمی: نتایج آزمون‌های فیزیولوژیک انجام شده بر روی سه جدایه استرپتومیسس منتخب در جدول ۱ نشان داده شد.

ز) مطالعات گلخانه‌ای: مطالعات گلخانه‌ای در اواخر شهریور ماه و به مدت ۷۵ روز تحت دمای کنترل شده ۲۵±۲ °C در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید باهنر کرمان انجام گرفت، مرگ و میر پس از تولید گیاهچه و شاخص‌های رشد در بین تیمارهای مختلف با یکدیگر مقایسه شد و توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن و با استفاده از نرم افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (شکل ۵ و ٦).

ح) ارزیابی شاخص‌های رشدی: مقایسه میانگین اثر تیمارهای مختلف بر روی ارتفاع گیاهان، وزن تر گیاه و تعداد مرگ میر در تیمارهای مختلف در اشکال ٦-۸ آمده است. مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام

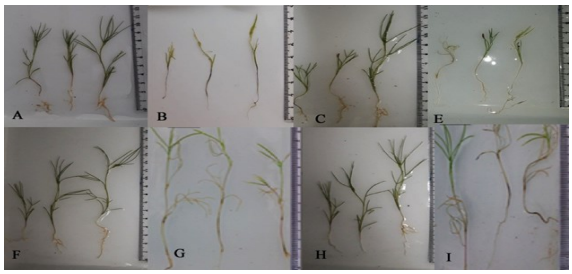


شکل ٤: قطر هاله ممانعت از رشد، پس از تیمار عصاره خام جدایه‌های استرپتومیسس آنتاگونیست در دماهای مختلف.

جدول ۱: خلاصه نتایج آزمون‌های فیزیولوژیکی و تولی آنزیم انجام شده بر سه جدایه استرپتومیسس منتخب.

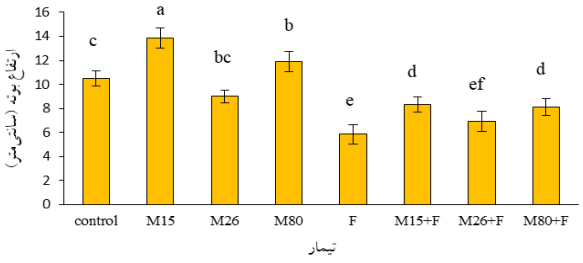
آزمون‌های انجام شده	جدایه M15	جدایه M26	جدایه M80
MIC	2.5mg/ml	1.25mg/ml	20mg/ml
TIP قطر هاله ممانعت از رشد قارچ (cm)	140 °C 1.8	80 °C 1.4	140 °C 1.6
حساسیت به کلروفرم	–	+	–
توانایی قارچ‌کشی	+	–	+
تولید مواد فرار	–	–	–
تولید سیانید هیدروژن	–	–	–
تحمل فشار اسمزی	+	+	+
فعالیت لیپازی	+	+	+
فعالیت پروتئازی	+	+	+
فعالیت آمیلازی	+	+	+
فعالیت کیتینازی	+	+	–
تجزیه ژلاتین	–	+	+
مصرف سیترات	+	+	+
آزمون کاتالاز	+	+	–
آزمون متیل رد	–	–	–

گرفت. نتایج حاکی از آن است، که در شاخص ارتفاع بوته‌ها، تیمار جدایه M15 و M80 بهترین عملکرد را در بین تیمارها از خود به نمایش گذاشت، در حالی که تیمار *F.oxysporum* f.sp. *cumini* نسبت به کل تیمارها در پایین‌ترین سطح آماری قرار داشت و تیمار جدایه M26 موجب کاهش معنی دار ارتفاع بوته زیره سبز شد. نتایج در وزن تر گیاه بدین شکل بود که تیمار M15 و M80 بهترین عملکرد و تیمار

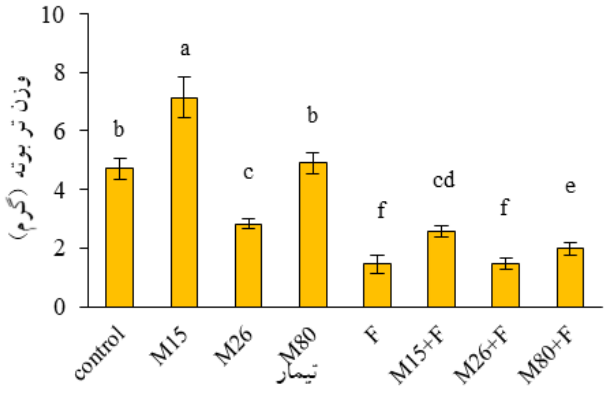


شکل ۵: نتایج بررسی اثر تیمارهای مورد بررسی بر ارتفاع گیاه زیره سبز ۴۵ روز پس از آغاز آزمایش. الف: تیمار شاهد. ب: تیمار مایه‌زنی شده با قارچ *Fusarium oxysporum*. پ: تیمار مایه‌زنی شده با استرپتومیسس جدایه M26. ت: تیمار قارچ *F.oxysporum* + استرپتومیسس جدایه M26. ث: تیمار مایه‌زنی شده با استرپتومیسس جدایه M15. ج: تیمار قارچ *F.oxysporum* + استرپتومیسس جدایه M15. چ: تیمار مایه‌زنی شده با استرپتومیسس جدایه M80. ح: تیمار قارچ *F.oxysporum* + استرپتومیسس جدایه M80.

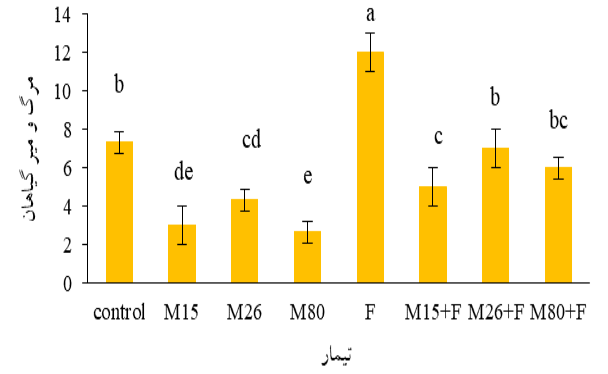
F.oxysporum f.sp. *cumini* در پایین‌ترین سطح معنی‌داری قرار گرفت، همچنین نتایج ارزیابی میزان مرگ و میر در تیمارها بیانگر این بود، که تیمار حاوی جدایه‌های استرپتومیسس M15، M80 و سپس M26 کمترین میزان مرگ و میر را دارا بوده در حالی که تیمار *F.oxysporum* f.sp. *cumini* نسبت به کلیه تیمارها بالاترین آمار مرگ و میر را داشت.



شکل ۷: نمودار مقایسه میانگین طول بوته، تیمارهای به کار رفته در مطالعات گلخانه‌ای و ارزیابی اثر جدایه‌های استرپتومیسس M15، M26، M80 و قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *cumini* روی گیاه زیره سبز در شرایط گلخانه. تیمارهای با حروف مشترک از نظر آماری تفاوتی ندارند (P<0.01). Control: تیمار شاهد (فاقد هر گونه میکروارگانیسم)، M15: تیمار حاوی جدایه M15، M26: تیمار حاوی جدایه M26، M80: تیمار حاوی جدایه M80، Fo: تیمار حاوی مایه تلقیح قارچ بیمارگر *F. oxysporum*، Fo+M15: تیمار حاوی مایه تلقیح قارچ بیمارگر و جدایه M15، Fo+M26: تیمار حاوی مایه تلقیح قارچ بیمارگر و جدایه M26 و Fo+M80: تیمار حاوی مایه تلقیح قارچ بیمارگر و جدایه M80.



شکل ۶: نمودار مقایسه میانگین وزن تر تیمارهای به کار رفته در مطالعات گلخانه‌ای و ارزیابی اثر جدایه‌های استرپتومیسس M15، M26، M80 و قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *cumini* روی گیاه زیره سبز در شرایط گلخانه. تیمارهای با حروف مشترک از نظر آماری تفاوتی ندارند (P<0.01). Control: تیمار شاهد (فاقد هر گونه میکروارگانیسم)، M15: تیمار حاوی جدایه M15، M26: تیمارحاوی جدایه M26، M80: تیمار حاوی جدایه M80، Fo: تیمار حاوی مایه تلقیح قارچ بیمارگر *F. oxysporum*، Fo+M15: تیمار حاوی مایه تلقیح قارچ بیمارگر و جدایه M15، Fo+M26: تیمار حاوی مایه تلقیح قارچ بیمارگر و جدایه M26 و Fo+M80: تیمار حاوی مایه تلقیح قارچ بیمارگر و جدایه M80.



شکل ۸: نمودار مقایسه میانگین مرگ و میر گیاهان در تیمارهای به کار رفته مطالعات گلخانه‌ای و ارزیابی اثر جدایه‌های استرپتومیسس M15، M26، M80 و قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *cumini* روی گیاه زیره سبز در شرایط گلخانه. تیمارهای با حروف مشترک از نظر آماری تفاوتی ندارند (P<0.01). Control: تیمار شاهد (فاقد هر گونه میکروارگانیسم)، M15: تیمار حاوی جدایه M15، M26: تیمار حاوی جدایه M26، M80: تیمار حاوی جدایه M80، Fo: تیمار حاوی مایه تلقیح قارچ بیمارگر *F. oxysporum*، Fo+M15: تیمار حاوی مایه تلقیح قارچ بیمارگر و جدایه M15، Fo+M26: تیمار حاوی مایه تلقیح قارچ بیمارگر و جدایه M26 و Fo+M80: تیمار حاوی مایه تلقیح قارچ بیمارگر و جدایه M80.

بحث

در این پژوهش تلاش گردید تا جدایه‌هایی از استرپتومیسس‌های خاکزی جداسازی نموده و از حیث برخورداری از اثرات آنتاگونیستی علیه قارچ مولد بیماری پژمردگی زیره سبز، مورد ارزیابی و غربالگری قرار گیرد. جهت یافتن عوامل کنترل بیولوژیک مؤثر علیه قارچ *F.* f.sp. *cumini* *oxysporum* عامل پژمردگی گیاه زیره سبز، از بین حدود ۸۰ جدایه استرپتومیسس جداسازی شده از خاک مناطق مختلف استان کرمان، آزمون سنجش فعالیت ضدقارچی انجام گرفت. در نهایت سه جدایه که در شرایط آزمایشگاهی فعالیت مهارکنندگی مناسبی از رشد قارچ داشتند، انتخاب شد و جهت بررسی ماهیت و خواص مواد موثر مورد بررسی قرار گرفتند. در آزمایشی که تولید سیانید هیدروژن مورد سنجش قرار گرفت، نتایج در هر سه مورد منفی بود. سیانید هیدروژن یکی از مهمترین متابولیت‌هایی است که در فرآیند آنتاگونیستی توسط عوامل بیوکنترل تولید می‌شود. این متابولیت که مختل‌کننده تنفس و همچنین کلاته‌کننده فلزات می‌باشد، توسط بسیاری از باکتری‌ها از جمله سودوموناس‌ها تولید می‌گردد. اگر چه این ماده درکنترل قارچ موثر است، اما باعث کاهش میزان رشد و عملکرد گیاهان می‌شود در نتیجه عدم توانایی در تولید این ماده ویژگی تقریباً مناسبی تلقی می‌شود (۲۳). در آزمون دیگری جهت رسیدن به جواب این سوال که آیا تمامی فعالیت‌های جدایه‌ها به تولید آنزیم‌محدود می‌شود یا خیر نمونه‌ها در آزمون حساسیت به کلروفرم قرار داده شدند، که در دو جدایه M15 و M80 پس از تخریب آنزیم‌ها و یا پروتین‌ها توسط کلروفرم، همچنان قادر به کنترل بیمارگر قارچی بودند. اما جدایه M26 قدرت کنترل‌کنندگی خود را از دست داد، که این نشان می‌دهد احتمالاً ماده مؤثر موجود در جدایه M26 ماهیت پروتینی (آنزیمی) دارد. این یافته‌ها، موید مطالعه انجام شده توسط Davelos و همکاران پیرامون بررسی کمیت و کیفیت آنتی‌بیوتیک‌های تولید شده به وسیله اکتینومیست‌ها است که نشان داده شد جدایه‌های فعالی که با ترشح آنتی‌بیوتیک از رشد قارچ جلوگیری می‌کردند پس از قرارگیری در معرض کلروفرم ماهیت ضدقارچی خود را حفظ کردند، اما جدایه‌های دارای فعالیت آنزیمی، پس از تیمار با کلروفرم قادر به کنترل قارچ و ایجاد هاله ممانعت از رشد نبودند (۲۰). در آزمون سنجش حداقل غلظت بازدارنده، MIC برای جدایه‌های M15، M26 و M80 به ترتیب ۲/۵، ۱/۲۵ و ۲۰ mg/ml به دست آمد. طی تحقیقی حداقل غلظت بازدارنده از رشد یک متابولیت فعال جدا شده از گونه‌های استرپتومایسس، علیه چهار باکتری گرم مثبت و گرم منفی بین ٦٤-۳۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش شد (۲٤). از آنجایی که جدایه‌های بررسی شده در این تحقیق، در غلظت‌های پایین‌تری قادر به کنترل قارچ می‌باشند، می‌توان نتیجه گرفت که احتمالا از نظر آنتاگونیستی اثر بسیار خوبی در کنترل بیمارگر مورد مطالعه دارا باشند.

نتیجه نهایی بررسی آماری آزمایشات گلخانه‌ای بیوکنترل *F. oxysporum* نشان داد که، ابتدا جدایه M15 از لحاظ صفاتی مانند: طول بوته و وزن تر بوته با اختلاف معنی دار از دیگر جدایه‌ها بهتر است، سپس جدایه M80 از لحاظ صفات فوق بهتر بود. جدایه M26 موجب کاهش وزن تر بوته و ارتفاع گیاه نسبت به تیمار شاهد شد، اما میزان مرگ و میر گیاهان را نسبت به تیمار بیمارگر و شاهد کاهش داد. همچنین نتایج این تحقیق نشان داد علی رغم اینکه برخی از گونه-های جنس *Streptomyces* با تولید آنتی بیوتیک‌ها و متابولیت‌های مختلف به عنوان عوامل بیوکنترل محسوب می‌شوند، برخی از گونه‌ها نیز بر رشد گیاه اثر منفی دارند به عنوان مثال جدایه M26 که باعث کاهش رشد گیاهان در این تحقیق گردید و نمی‌واند به عنوان عامل بیوکنترل مورد استفاده قرار گیرد، هر چند که در شرایط *In vitro* تاثیر آنتاگونیستی بر قارچ بیمارگر نشان داد، اما میتوان ترکیب ضد میکروبی آن را استخراج نمود. باید توجه داشت که برخی از این میکروارگانیسم‌ها با تولید ترکیباتی از جمله phthoxazolins، phosphinothricin، gougerotin وغیره از رشد گیاه یا میکروب جلوگیری می‌کنند، از جمله این عوامل می‌توان به گونه *Streptomyces arenae* اشاره کردکه با داشتن خاصیت آللوپاتیکی سبب جلوگیری از رشد گیاهچه‌های شلغم به میزان ٦۰/۷ درصد وگیاهچه‌های سوروف به میزان ٦۱/۳

درصد می‌شود (۲۵). همچنین مشخص شده است که گونه *Streptomyces anulatus* با تولید ترکیب endophenazines A-D اثر herbicide روی خزه (*Lemna minor*) دارد (۲۶). همچنین در این رابطه Venkatachalam و همکاران نیز پژوهشی انجام دادند، و طی آن اثر چندین جدایه جداسازی شده از خاک را روی جوانه زنی بذور ذرت، تربچه، لوبیا سیاه و علف *Bromus lyticus* مورد ارزیابی قرار دادند. بررسی اثر جدایه‌های مذکور روی جوانه زنی بذور نامبرده مشخص کرد که *Streptomyces gibosonni* و *S.grieseoleutus* سبب القا و تحریک جوانه زنی در بذور تربچه، لوبیا و ذرت شدند. در حالی که *S.viridochromogenes* و *S.clavifer* سبب بازدارندگی از جوانه-زنی بذور تربچه، ذرت، لوبیا و علف *Bromus lyticus* شدند. در ادامه تاثیر جدایه‌هایی که دارای بازدارندگی از جوانه‌زنی بذر بودند، روی رشد باکتری *Bacillus subtilis* سنجیده شد و با تشکیل هاله عدم رشد باکتری، مشخص شد این جدایه‌ها روی رشد باکتری هم اثر منفی دارند. بررسی‌ها نشان داد ترکیبی که مسئول بازدارندگی از جوانه‌زنی بذور و رشد باکتری در این آزمایش بود، ماده phosphinothricin می‌باشد (۲۷).

نتیجه‌گیری

اگرچه این تحقیق در شرایط آزمایشگاهی صورت پذیرفته، اما لازم هست که آنتاگونیست‌های جداسازی شده در تحقیقات مرتبط با این پژوهش در شرایط مزرعه نیز صورت پذیرد. نتایج این تحقیق می‌تواند گام‌های محکمی در آینده در جهت کاربرد این آنتاگونیست‌ها در مزرعه باشد و از این نظر در جهت کنترل بیماری‌های قارچی زیره، نوآورانه می‌باشد. در حال حاضر ما از مکانیسم اثر مولکولی دقیق این آنتاگونیست‌ها علیه بیمارگر اطلاعاتی نداریم اما تولید آنزیم‌های خارج سلولی نظیر آمیلاز، پروتئاز و لیپاز می‌تواند خواص ضد قارچی آنتاگونیست‌های مذکور را علیه بیمارگر تشدید کند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از دانشگاه شهید باهنر کرمان جهت فراهم کردن امکانات آزمایش تشکر می‌کنند.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند.

تعارض در منافع

وجود ندارد.

References

1. SOLTANI NEJAD, M .S., SHAHIDI BONJAR,G.H.,. KHATAMI, M., AMINI, A. and AGHIGHI, S. 2017. In vitro and In vivo antifungal properties of silver nanoparticles against Rhizoctonia Solani, a common agent of rice sheath blight disease. IET Nanobiotechnol. 11(3), pp. 236 – 240.

2. BAKER, B.P., GREEN, T.A., and LOKER, A.J. 2020. Biological control and integrated Pest Management in Organic and Conventional Systems. Biol. Control. 140, pp. 104095

3. DA SILVA, R. R. 2019. Agricultural enzymes, phosphatases, peptidases, and sulfatases and the expectations for sustainable agriculture. J. Agric. Food Chem.. 67(16), pp. 4395-4396.

4. LODHA, S., and Mawar, R. 2014. Cumin wilt management: A Review. J. Spices. Aroma. Crop. 23(2),pp. 145-155.

5. SOLTANZADEH, M., SOLTANI NEJAD, M., and SHAHIDI BONJAR, G.H. 2016. Application of soil-borne Actinomycetes for biological control against Fusarium wilt of Chickpea (Cicer Arietinum) caused by fusarium solani fsp Pisi. J. Phytopathol. 2016, 164, (11-12), pp. 967-978.

6. AMARESAN, N., KUMAR, K., NAIK, J. H., BAPATLA, K. G., and MISHRA, R. K. 2018. Streptomyces in plant growth promotion: mechanisms and role. In New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering .pp. 125-135). Elsevier.

7. XIA, H., ZHAN, X., MAO, X. M., and LI, Y. Q. 2020. The regulatory cascades of antibiotic production in Streptomyces. World J. Microbiol. Biotechnol. 36 (1),pp. 1-9.

8. TORABI, A., SHAHIDI BONJAR, G.H., ABDOLSHAHI, RPOURNAMDARI, M., SAADOUN, I., BARKA, E.A., 2019. Biological control of Paecilomyces formosus, the causal agent of dieback and canker diseases of pistachio by two strains of Streptomyces misionensis. Biol. Control. 137, pp. 104029.

9. USHA, R., and KINGSLEY, A. B. A. 2018. Streptomyces Sps-A promising source of antimicrobial agent. J. Anal. Pharmaceutic. Res. 7(3), pp. 323-328..

10. LEE, J. Y., and HWANG, B. K. 2002. Diversity of antifungal Actinomycetes in various vegetative soils of Korea. Can. J. Microbiol. 48(5), pp. 407-417.

11. SINCLAIR, J. B., and Dhingra, O. D. 1995. Basic plant pathology methods. CRC press: USA. pp: 287-296, 390-391.

12. KONISHI, M., OHCUMA, H., MATSUMOTO, K., SAITOH, K., MIAYAKI, T., OKI, T., and Kawaguchi, H. 1991. Dynemicins, new antibiotics with the 1, 5-diyn-3-ene and anthraquinone subunit. I. Production, isolation and physico-chemical properties. The Journal of Antibiotics. 44(12), pp. 1300-1305.

13. XUE, L., XUE Q, CHEN,. Q, LIN,. C, SHEN, G., ZHAO, J. 2013. Isolation and evaluation of rhizosphere Actinomycetes with potential application for biocontrol of Verticillium wilt of cotton. Crop Protec. 43, pp. 231–240.

14. KALANTARZADEH, M., SHAHIDI BONJAR, G. H., RASHID FAROKHI, P., GHASEMI, A., AGHIGHI, S., and MAHDAVI, M. J. 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.

15. SHAHIDI BONJAR, G. H., and KARIMI NIK, A. 2004. Antibacterial activity of some medicinal plants of Iran against Pseudomonas aeruginosa and P. fluorescens. Asian J. Plant Sci. 3,pp. 61-64.

16. MAC FADDIN, J. 2000. Biochemical tests for identification of medical bacteria. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 303-309.

17. HSU, S. C., and LOCKWOOD, J. L. 1975. Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of Actinomycetes in water and soil. Appl. Microbiol. 29(3), pp. 422-426.

18.DUNNED, C., MOENNE-LOCCOZ, Y., DE BRUIJN, F. J., and GARA, O. 2000. Overpro-duction of an inducible extracellular serine protease improves biological control of Pythium ultimum by Stenotrophomonas maltophilia strain W81. Microbiology. 146. pp.2069–2078.

19. SIERRA, G. 1957. A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. Antonie van Leeuwenhoek, 23(1),pp. 15-22.

20. DAVELOS, A. L., KINKEL, L. L., and Samac, D. A. 2004. Spatial variation in frequency and intensity of antibiotic interactions among Streptomycetes from prairie soil. Appl. Environ. Microbiol. 70(2), pp.1051-1058.

21. JORJANDI, M., SHAHIDI BONJAR, G.H, BAGHIZADEH, A., SIRCHI,G.R, MASSUMI, H., BANIASADI, F., AGHIGHI, S,. FAROKHI, P. 2009. Biocontrol of Botrytis allii Munn the causal agent of neck rot, the post harvest disease in onion, by use of a new Iranian isolate of Streptomyces. Am. J. Agric. Biol. Sci. 4(72). pp.–78.

22. WESTERLUND, F,V,J., CAMPBELL, R.N., KIMBLE KA,. 1974. Fungal root rots and wilt of chickpea in California. Phytopathology. 64, pp. 432–436.

23. WEI, G., KLOEPPER, J. W., and TUZUN , S. 1991. Induction of systemic resistance of cucumber to Colletotrichum orbiculare by selected strains of plant growth-promoting rhizobacteria. Phytopathology. 81(11), PP.1508-1512.

24. SULTAN, M. Z., KHATUNE, N. A., SATHI, Z. S., BHUIYANB, S. A. M. D., SADIK, G. M., CHOUDURY, M. A., and Rahman, M. A. A. 2002. In vitro antibacterial activity of an active metabolite isolated from Streptomyces species. Biotechnology Research, 1(2), 100-106.

25.SONG, M. S., SALMENA, L., and PANDOLFI, P. P. 2012. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 13(5), pp. 283-296.

26. GEBHARDT, K., SCHIMANA, J., KRASTEL, P., DETTNER, K.,RHENHEIMER, J., ZEECK, A., and FIEDLER, H. P. 2002. Endophenazines AD, new phenazine antibiotics from the Arthropod associated endosymbiont Streptomyces anulatus. The Journal of antibiotics. 55 (9).pp. 794-800.

27. VENKATACHALAM, P., RONALD, J., and SMBATH, K. 2010. Effect of soil Streptomyces on seed germination. Int. J. Pharmacol. Biol. Sci. 1(4) pp.155.