

ارزیابی توان استرپتومیست‌های ریزوسفر گوجه‌فرنگی در کنترل قارچ بیمارگر *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*

۱. محمد جواد زاهد؛ ۲. کیوان بهبودی*

۱ و ۲. دانشجوی کارشناسی ارشد و دانشیار، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۲/۱۰ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۵/۳۰)

چکیده

پوسیدگی ریشه و طوقه گوجه‌فرنگی با عامل *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* (FORL) یکی از بیماری‌های مهم خاکزاد گوجه‌فرنگی به حساب می‌آید. در این پژوهش ۷۴۰ جدایه اکتینوباکتری از مزارع گوجه‌فرنگی مناطق مختلف استان‌های فارس و البرز جمع‌آوری گردید. آزمون‌های آنزیمی انجام گرفته حاکی از تولید آنزیم پروتئاز و توانایی تولید سیدروفور در تمامی جدایه‌ها بود. محیط کشت فیلتر شده جدایه UTS49 به‌عنوان جدایه برتر با جمعیت $10^8 \times 3$ به میزان ۹۴ درصد از جوانه‌زنی اسپور قارچ بیمارگر جلوگیری کرد. بیشترین میزان تشکیل بیوفیلم باکتریایی مربوط به جدایه‌های UTS385، UTS10 و UTS49 بود. در بررسی‌های گلخانه‌ای جدایه UTS49 موجب کاهش علائم بیماری به میزان ۷۵ درصد شد. بررسی جمعیت جدایه UTS49 در ریزوسفر خیار و گوجه‌فرنگی، بیانگر توان این جدایه در کلنی‌زاسیون قوی و پایدار است. بر اساس آزمون‌های فوق جدایه UTS49 به‌عنوان بهترین جدایه در کنترل بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه گوجه‌فرنگی مشخص شد. با توجه به آزمون‌های بیوشیمیایی و توالی DNA 16s، این جدایه *Streptomyces carpaticus* شناسایی و معرفی گردید.

کلیدواژگان: پوسیدگی ریشه و طوقه، سیدروفور، بیوفیلم، خاکزاد.

Assessment of *Streptomyces* isolates of tomato rhizosphere for biocontrol of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*

Mohammad Javad Zahed¹ and Keyvan Behboodi^{2*}

1. M. Sc. Student and Associate Professor, Department of Plant Pathology, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

(Received: Apr. 30, 2017 - Accepted: Aug. 21, 2017)

ABSTRACT

Fusarium oxysporum f.sp. *radicis-lycopersici* (FORL) is a causal agent of tomato crown and root rot, a soil-borne disease of worldwide importance in commercial tomatoes. Actinobacteria, in general, and *Streptomyces*, in particular, are recognized as plant disease controllers and plant growth promoters due to their wide production of the secondary metabolite. In this study, 740 Actinobacteria isolates were gathered from different tomato farms throughout Fars and Alborz provinces. Enzymes production test, such as protein activity, production of siderophore, demonstrated a positive result for all isolates. The results also showed that the UTS49 cell-free culture in 3×10^8 concentration was able to prevent the fungal spore germination with the rate 94%. The results indicated that best biofilm was mostly formed by UTS385, UTS10 and UTS49 isolates. In greenhouse conditions, the results showed that UTS49 caused the reduction of the disease up to 25%, which was the most reduction rate of disease symptoms among the studied isolates. *S. carpaticus* UTS49 demonstrated a strong and stable impact on colonization of cucumber and tomato rhizosphere. According to the biochemical and 16S rDNA, *S. carpaticus* UTS49 was identified and introduced as the best one against to the pathogen.

Keywords: Crown and root rot, Biofilm, Siderophore, Soil-borne.

تازه‌های تحقیق

اکتینوباکتری *Streptomyces carpaticus* UTS 49 کارآمدترین جدایه معرفی شد. بررسی خواص آنتاگونیستی این جدایه در کنار توان کلنیزاسیون و استقرار و بقا در ریزوسفر گیاه، تحمل در برابر شرایط قلیایی و شوری (مقداری از خاک‌های ایران قلیایی و شور هستند)، *S. carpaticus* UTS 49 را به عنوان یک PGPRs مناسب برای کاربرد در بیوکنترل عوامل بیماری‌زا معرفی می‌کند.

مقدمه

قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* (FORL) عامل بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه گوجه‌فرنگی پس از اولین گزارش در ژاپن (Yamamoto et al. 1974) در سایر نقاط دنیا از جمله ایالات متحده، کانادا و قاره اروپا گزارش شد (Hartman and Felner 1991). این قارچ به‌عنوان یکی از بیماری‌های مهم خاکزاد سالانه موجب خسارت ۶۰ درصدی محصولات گلخانه‌ای و مزرعه‌ای گوجه‌فرنگی می‌شود (Igo et al. 1983). *F. oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* با تولید و ترشح آنزیم توماتیناز (Tomatinase) خود را از اثرات سوء آلفا توماتین (α -Tomatine) تولید شده توسط گیاه گوجه‌فرنگی که سد دفاع شیمیایی گیاه علیه قارچ است، مصون می‌دارد (Hartman and Felner 1991). جلوگیری از پراکنش این بیمارگر به واسطه‌ی تولید میکروکنیدی‌های قابل پراکنش در هوا بسیار سخت است (Rowe and Farley 1981). کاربرد آنزیم به‌عنوان یک قارچ‌کش با تأثیر مطلوب روی این بیماری معرفی شده است که به‌علت ایجاد ژنوتیپ‌های مقاوم، احتیاط در مصرف آن توصیه می‌شود. به‌علت تأثیرات نسبتاً کم کنترل شیمیایی و فقدان مقاومت به این بیمارگر در ارقام مهم تجاری گوجه‌فرنگی (Jarvis 1978) به نظر استفاده از روش‌های کنترل بیولوژیک در کنترل این بیماری امری ضروری به‌شمار می‌آید (Omar et al. 2006). میکروارگانیسم‌هایی که در ناحیه ریزوسفر زندگی می‌کنند گزینه‌ای مناسب برای استفاده در برنامه‌های کنترل بیولوژیکی هستند. ریزوسفر اولین خط دفاعی ریشه علیه بیمارگرهای خاکزی است (Weller 1998).

اکتینوباکتری‌ها توانایی تولید دامنه وسیعی از آنزیم‌های خارج سلولی را دارند که به آن‌ها قابلیت تجزیه بیوپلیمرهای گوناگون خاک را می‌دهد (Gonzalez et al. 2003). اولین بار چاین وونگ و همکاران (۱۹۹۸) هفتاد جدایه باکتریایی ریزوسفر گوجه‌فرنگی را برای یافتن خاصیت آنتاگونیستی علیه *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* بررسی کردند. تنها یک جدایه به‌صورت مؤثر هم توان کلنیزه‌کنندگی از خود نشان داد و هم یک عامل بیوکنترل قوی به‌حساب می‌آمد. جدایه PCL1391، به‌عنوان باکتری *Pseudomonas chlororaphis* شناسایی شد که خواص ضد قارچی قابل توجهی را از خود نشان داد. [®]Mycostop محصول تجاری از جدایه K61 باکتری *Streptomyces griseoviridis* است و [®]Actinovate نیز از جمله محصولات تجاری بیولوژیک از جنس استرپتومیسیت هست. کاربرد [®]Mycostop هر چند توانایی کنترل *Pythium Rhizoctonia solani* spp. (FOL) *F. oxysporum*، *Phytophthora* spp. و *Verticillium dahlia* f.sp. *lycopersici* را داشته اما ناشی از قارچ FORL از خود نشان نداده (Minuto and Spadaro 2006).

هدف از این پژوهش جداسازی و بررسی توان آنتاگونیستی استرپتومیسیت‌های ریزوسفری علیه بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه گوجه‌فرنگی در کنار بررسی توان تولید آنزیم‌ها، ترکیبات فرار و همچنین بررسی امکان کنترل بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه گوجه‌فرنگی به‌وسیله جدایه‌های اکتینوباکتری در شرایط گلخانه بوده است.

مواد و روش

نمونه‌برداری و جداسازی اکتینوباکتری‌ها از ریزوسفر گیاهان سالم گوجه‌فرنگی از مزارع استان‌های فارس طی ماه‌های خرداد و تیر سال ۱۳۹۴ جمع‌آوری شدند. به‌منظور تهیه جدایه‌های *Streptomyces*، نمونه‌هایی از خاک اطراف گیاهان بالغ و سالم تهیه شد. در مزارع مورد بررسی، حداقل دو تا سه سال پی‌پی گوجه‌فرنگی به‌صورت کشت تک محصولی کشت شده بود. جداسازی

میکروتیتروپلیت^۱ انجام پذیرفت (Winn et al. 2014). ظرف‌های ارلن به مدت ۹۶ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس، روی شیکر با سرعت چرخش ۱۰۰ دور در دقیقه قرار گرفتند و پس از آن، جمعیت هر اکتینوباکتری برابر با 1×10^5 CFU/ml کلنی در میلی‌لیتر تنظیم گردید. سپس ۲۵۰ میکرولیتر از هر جدایه اکتینوباکتری با جمعیت مشخص به چاهک‌های میکروپلیت اضافه شد. برای هر اکتینوباکتری ۶ تکرار در نظر گرفته شد و محیط، Tryptone Soy Broth سترون به‌عنوان شاهد منفی مورد استفاده قرار گرفت (میکروپلیت ۹۶ چاهکی، از جنس پلی استیرن و ظرفیت هر چاهک، ۳۰۰ میکرولیتر است). سطح پلیت پوشیده شد و به مدت ۹۶ ساعت داخل انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سلسیوس قرار گرفت. پس از گذشت ۹۶ ساعت، سوسپانسیون میکروبی از چاهک‌ها خارج و هر چاهک سه مرتبه توسط ۳۰۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژیک سترون شسته شد. بعد از خشک شدن، پلیت به مدت پنج دقیقه توسط ۲۵۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۲ درصد، رنگ آمیزی شد. سپس رنگ اضافی پلیت به کمک آب استریل شسته شد. سنجش کمی تولید بیوفیلیم، به وسیله اضافه کردن ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک ۰.۳٪ به هر چاهک صورت گرفت و جذب نوری در حلال رنگی، در طول موج ۴۹۲ نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر^۲ خوانده شد.

تأثیر جدایه‌های اکتینوباکتری بر جوانه‌زنی اسپور قارچ

FORL

با توجه به روش هو و همکاران (۲۰۱۳) تأثیر ضد قارچی عصاره اکتینوباکتریها درون پلیت‌های الیزا در حجم نهایی ۲۰۰ میکرولیتر بررسی شد. ۱۸۰ میکرولیتر از سوسپانسیون شامل 1×10^5 از اسپور قارچ در هر میلی‌لیتر در محیط سیب زمینی-دکستروز فاقد آگار درون هر چاهک ریخته شد و ۲۰ میکرولیتر از عصاره اکتینوباکتریها در غلظت 10^8 (CFU/ml) به آن اضافه گردید. پلیت‌ها درون انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سلسیوس قرار داده شد. جهت شمارش اسپورهای جوانه‌زده از میکروسکوپ نوری استفاده گردید. پس از

با روش نولان و همکاران (۱۹۸۸) با خشک کردن خاک ریزوسفر برای یک هفته در دمای محیط و اضافه کردن یک درصد کرینات کلسیم به خاک و کشت غلظت‌های مختلف روی محیط نشاسته کازئین آگار (Starch Casein Agar-SCA) صورت پذیرفت. برای شناسایی *Streptomyces* ویژگی‌های رشدی، شکل و رنگ پرگنه در کنار مورفولوژی مد نظر قرار گرفت (Sabaratnam and Traquair 2002, Oliveira et al. 2016, Schaad 2001).

بررسی‌های آزمایشگاهی ویژگی‌های آنتاگونیستی جدایه‌های اکتینوباکتری

به‌منظور انتخاب جدایه‌های مناسب از بین جدایه‌های اکتینوباکتری، این مرحله اجرا شد. برای بررسی توان ممانعت‌کنندگی از رشد پرگنه قارچ بیمارگر از روش کشت توأم روی محیط سیب‌زمینی دکستروز آگار (Potato-dextrose agar-PDA) استفاده گردید (Quecine et al. 2008). با استفاده از روش سو و همکاران (۱۹۹۷) محلول کیتین کلئیدال تهیه گردید و به‌میزان ۰/۴ درصد به محیط آگار ۱/۵ درصدی شد. هیدرولز کیتین کلئیدال موجب ایجاد هاله می‌شود که نشان دهنده تولید آنزیم کیتیناز است. به‌منظور بررسی تولید آنزیم پروتئاز توسط اکتینوباکتری‌ها از محیط اسکیم میلک آگار (Skim Milk Agar (SMA)) استفاده گردید (Bajaj and Sharma 2011). بررسی فعالیت قارچ‌کشی و قارچ‌ایستایی جدایه‌های اکتینوباکتری با استفاده از آزمون آنتی‌بیوگرام به روش دیسک آگار علیه FORL انجام و پس از ۱۲۰ ساعت در ۲۸ درجه سلسیوس، ایجاد هاله ممانعت از رشد بررسی گردید. دیسک‌هایی به قطر ۵ میلی‌متر از ناحیه هاله ممانعت برداشته و به تشتک‌های پتری محتوی محیط کشت PDA منتقل گردید. رشد قارچ نشان‌دهنده قارچ‌ایستایی و عدم رشد آن نشان‌دهنده قارچ‌کشی جدایه خواهد بود. تولید سیدروفور به روش الکساندر و زوبرر (۱۹۹۱) مورد ارزیابی قرار گرفت.

تشکیل بیوفیلیم توسط جدایه‌های اکتینوباکتری

مقایسه کمی تشکیل بیوفیلیم با استفاده از روش

1. Microtitr plate
2. ELISA reader

شناسایی اکتینوباکتری‌ها

شناسایی باکتری‌ها با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و شناسایی توالی نوکلئوتیدی ژن 16S rDNA صورت گرفت. کلنی باکتری‌ها روی محیط SCA برای مشاهده مرفولوژی و رنگدانه کشت داده شدند. مشاهده میسلیم‌های هوایی، زنجیره‌های اسپوری، رنگ کلونی‌ها و رنگدانه‌های تولید شده توسط آن‌ها روی محیط کشت YEM مورد بررسی قرار گرفتند (Schaad *et al.* 2001). از پرایمرهای StrepB و StrepF با ترادف‌های 5'-ACG TGT GCA GCC CAA GAC A-3' StrepB: 5'-ACA AGC CCT GGA AAC GGG و 3'-GT-3' برای شناسایی جنس *Streptomyces* استفاده شد. در استخراج DNA ژنومی از نمونه‌های اکتینوباکتری از روش CTAB استفاده گردید (Lu *et al.* 2016). واکنش PCR شامل دمای °C ۹۵ به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ چرخه واسرشت در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگر به مدت ۱ دقیقه در ۵۷ درجه سلسیوس، توسعه آغازگر در دمای °C ۷۲ به مدت ۲ دقیقه و مرحله بسط نهایی در دمای °C ۷۲ به مدت ۶ دقیقه بود. برای ارزیابی توالی‌های نوکلئوتیدی متعلق به جدایه‌های مورد بررسی و ترسیم تبارنمای فیلوژنتیکی آن‌ها، از نرم‌افزار (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) MEGA6 تحت سیستم عامل ویندوز استفاده شد (Tamura *et al.* 2013). برای ارزیابی توالی‌ها گروه خارجی مناسب انتخاب گردید. در نهایت برای تجزیه و تحلیل داده‌ها و ارزیابی توالی نوکلئوتیدی نواحی ژنی جدایه‌های مختلف و ترسیم تبار نمای آن‌ها از دو روش Maximum-Neighbor-joining (Nei and Kumar 2000) و (Saitou and Nei 1987) استفاده گردید.

بررسی جمعیت اکتینوباکتری در ریزوسفر

مطابق روش یان و همکاران (۲۰۰۳)، ابتدا برای ردیابی و بررسی دینامیک جمعیت اقدام به تهیه موتانت مقاوم به آنتی‌بیوتیک ریفامپیسین تا غلظت ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر شد. به منظور بررسی جمعیت اکتینوباکتری در ریزوسفر، بذور گوجه‌فرنگی و خیار پس از ضدعفونی شدن، به مدت ۳۰ دقیقه در سوسپانسیون CFU/ml

مشاهده جوانه‌زنی کامل تمام اسپورها در چاهک‌های شاهد که فاقد عصاره اکتینوباکتری‌ها هستند میزان ممانعت با شمارش تعداد اسپورهای جوانه‌زده بررسی و مقایسه شد. همچنین در زمان‌های مختلف میزان جذب در ۶۰۰ نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر خوانده شد.

بررسی‌های گلخانه‌ای قدرت آنتاگونیستی جدایه‌های اکتینوباکتری

اکتینوباکتری‌ها در محیط کشت مایع SCB کشت شدند و در شیکر انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سلسیوس و ۱۰۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. سوسپانسیون باکتری با جمعیت 10^8 CFU/ml تهیه گردید و جهت بررسی توان کنترل بیولوژیک مورد استفاده قرار گرفت (Gopalakrishnan *et al.* 2014). رقم Rio Grande (گوجه فرنگی گلخانه‌ای غیر هیبرید شرکت Canion) به‌عنوان رقم حساس در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. خاک مورد استفاده در این آزمایش شامل نسبت ۳:۲:۲ از خاک برگ، کود دامی و خاک مزرعه‌ای تهیه شد. خاک مورد نیاز، قبل از استفاده و ریختن داخل گلدان‌ها با استفاده از اتوکلاو دو بار استریل شد. پس از اینکه برگ‌های گیاهان کاملاً گسترش پیدا کرد و در مرحله چهاربرگی، سوسپانسیون 10^8 CFU/ml جدایه‌های اکتینوباکتری تهیه و به مدت سه دقیقه ریشه گیاهان درون این سوسپانسیون قرار گرفت. سپس سوسپانسیونی شامل 1×10^8 اسپور در هر میلی‌لیتر از قارچ *F. oxysporum* f.sp. *radisic lycopersici* تهیه شده و ریشه‌ها به‌صورت غوطه‌ور کردن^۱ مایه‌زنی شدند. دمای گلخانه، 20 ± 5 درجه سلسیوس تنظیم گردید. گیاهان پس از ۴۰ روز برای مشاهده علائم بررسی شدند (Hibar *et al.* 2005, Nirmaladevi *et al.* 2016). گلدان‌ها پس از مایه‌زنی در فواصل دو روزه بازدید و از نظر شدت علائم بر اساس مقیاس ترتیبی زیر برگرفته از هراتاس-گونزالز و همکاران (۱۹۹۹) نمره دهی شدند. طول ساقه، ریشه در کنار وزن خشک و تر آن‌ها اندازه‌گیری و مورد بررسی قرار گرفت.

مقایسه میزان تشکیل بیوفیلیم

نتایج آزمون بیوفیلیم (شکل ۲) تفاوت معنی‌داری بین جدایه‌ها را نشان داد. در مورد ایزوله‌های UTS385، UTS10 و UTS49 که به ترتیب بیشترین میزان بیوفیلیم را داشتند، مشاهده شد. جدایه UTS385 بیشترین میزان بیوفیلیم را با ۸/۲ و دو جدایه UTS13 و UTS49 تقریباً به یک اندازه بیوفیلیم تشکیل داده‌اند. این رتبه بندی بر اساس میزان جذب نوری در طول موج ۴۹۲ نانومتر است (شکل ۷-ب).

تأثیر جدایه‌های اکتینوباکتری بر جوانه‌زنی اسپور قارچ

F. oxysporum f.sp. radices-lycopersici

محیط کشت فیلتر شده UTS49 پس از ۱۲ ساعت به میزان ۹۴٪ از جوانه اسپورها ممانعت کرد (شکل ۳). همچنین مطابق شکل ۴ پس از زمان‌های ۱، ۳، ۶ و ۱۲ ساعت علاوه بر شمارش با کمک لام هموسیستمتر و میکروسکوپ نوری، توسط دستگاه در طول موج ۶۰۰ نانومتر (nm) خوانش انجام شد که ارتباط مستقیمی بین خوانش انجام شده و جوانه‌زنی اسپور وجود داشت.

بررسی گلخانه‌ای

در استفاده از جدایه‌های اکتینوباکتری به‌طور قابل توجهی کاهش علائم بیماری ناشی از قارچ بیمارگر *Fusarium oxysporum f.sp. radices-lycopersici* در مقایسه با شاهد مثبت (بیمارگر به تنهایی) مشاهده شد. تمامی گیاهان شاهد آلوده به بیمارگر پس از گذشت ۴۰ روز به‌طور کامل از بین رفتند و اثبات بیماری‌زایی و شناسایی عامل بیمارگر از بافت آلوده انجام شد. در جدایه UTS49 کاهش ۷۵ درصدی در علائم بیماری در مقایسه با مقدار شاهد مثبت مشاهده شد (بیمارگر به تنهایی: ۱۰۰ درصد). در تیمارهای مایه‌زنی شده با قارچ بیمارگر و اکتینوباکتری توام با هم بر اساس مقایسه میانگین‌ها جدایه UTS49 و UTS307 با بیشترین مقادیر میانگین به ترتیب ۳۴/۵ و ۳۲/۶ سانتی‌متر بیشترین طول ساقه را داشتند و نسبت به شاهد دارای تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد آزمون توکی بودند. در تیمارهای تأثیر اکتینوباکتری بر ویژگی‌های رشدی گیاه جدایه UTS19 با ۳۶ سانتی‌متر رشد و با ۴۴ درصد

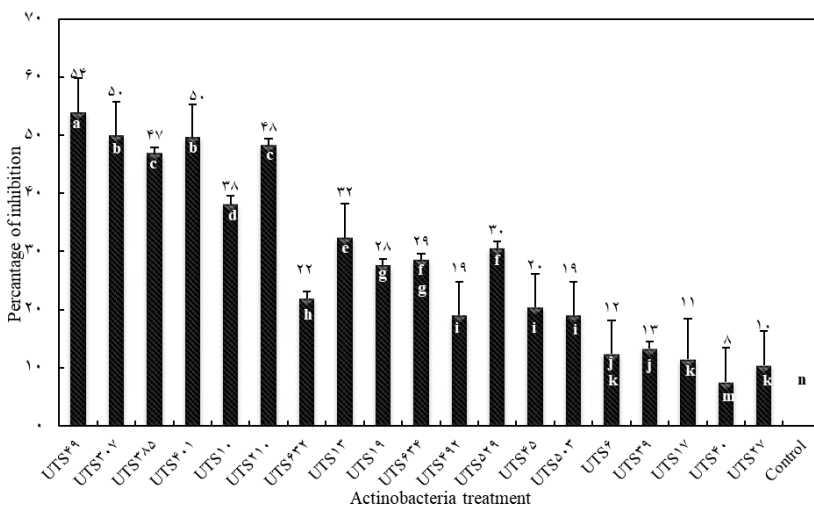
^۸ اکتینوباکتری روی شیکر با دور آرام (۷۰ دور در دقیقه و دمای ۲۷ °C) قرار گرفتند. سپس بذور درون شیشه‌های آزمایشگاهی مخزن‌دار حاوی خاک استریل کاشته شدند. نمونه‌گیری از ریشه‌ها در مراحل دو برگ کوتیلدون، دو برگ حقیقی و چهار برگ حقیقی انجام شد و مقدار جمعیت باکتری روی ریشه در این زمان‌ها با کشت در محیط انتخابی (محیط SCA حاوی آنتی‌بیوتیک ری‌فامپیسین^۱ با غلظت ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به‌دست آمد.

نتایج

بر اساس روش کشت متقابل در تشتک، ۷۴۰ جدایه به‌دست آمده از ریزوسفر، علیه قارچ فوزاریوم پوسیدگی طوقه و ریشه گوجه‌فرنگی مورد مطالعه قرار گرفتند. از بین ایزوله‌های اکتینوباکتری دارای فعالیت ضدقارچی، ۱۹ جدایه دارای بیشترین میزان ممانعت‌کنندگی از پرگنه قارچ بودند. در بین تمام جدایه‌ها جدایه UTS49 با ۵۴ درصد جلوگیری از رشد قارچ بیشترین کنترل درون تشتک پتری را از خود نشان داد (شکل ۷-ا). نتایج حاصل از ارزیابی فعالیت آنتاگونیستی جدایه‌های اکتینوباکتری منتخب علیه قارچ مورد مطالعه، حاکی از فعالیت قارچ‌کشی در دو جدایه UTS401 و UTS49 بود. سایر جدایه‌ها خاصیت قارچ‌ایستایی را علیه این بیمارگر نشان دادند. فعالیت پروتئولیتیک جدایه‌های اکتینوباکتری با ظهور هاله شفاف در اطراف کلونی‌های در حال رشد، که نشان‌دهنده توان این جدایه‌ها در هیدرولیز سوبسترای کازئین بود، مشخص گردید. همه جدایه توانایی تولید آنزیم پروتئاز را داشتند. وجود هاله شفاف نشان‌دهنده تجزیه کیتین-کلوئیدال موجود در این محیط و در نتیجه فعالیت کیتینازی این جدایه‌ها است. به‌جز جدایه‌های UTS49، UTS45، UTS210 و UTS10 بقیه توانایی تولید آنزیم کیتیناز را نشان دادند. بر اساس تشکیل هاله نارنجی و هاله تولید سیدروفور روی محیط CAS، تمامی جدایه‌ها توان تولید سیدروفور را داشتند (شکل ۷-ب). تمامی جدایه‌ها توانایی رشد روی محیط حداقلی آب-آگار را دارا بودند.

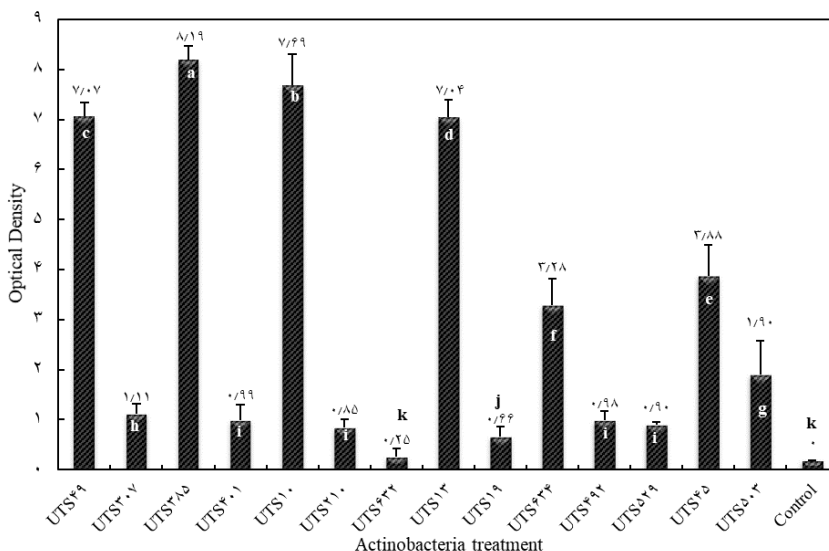
میانگین به‌ترتیب با ۲/۶، ۲/۴ و ۲/۴ گرم و تیمار UTS45 و UTS632 به‌ترتیب با ۱/۵ و ۱/۸۵ گرم کمترین میانگین‌ها را روی صفت وزن خشک بوته در تیمار توام باکتری و قارچ به خود اختصاص دادند.

افزایش رشد در کنار جدایه UTS49 با ۱۰ سانتی‌متر رشد بیشتر از شاهد سالم و ۴۰٪ رشد بیشتر نسبت به شاهد بیشترین حد تأثیر بر رشد گیاه را داشتند. تیمار با جدایه‌های UTS307، UTS385 و بالاترین



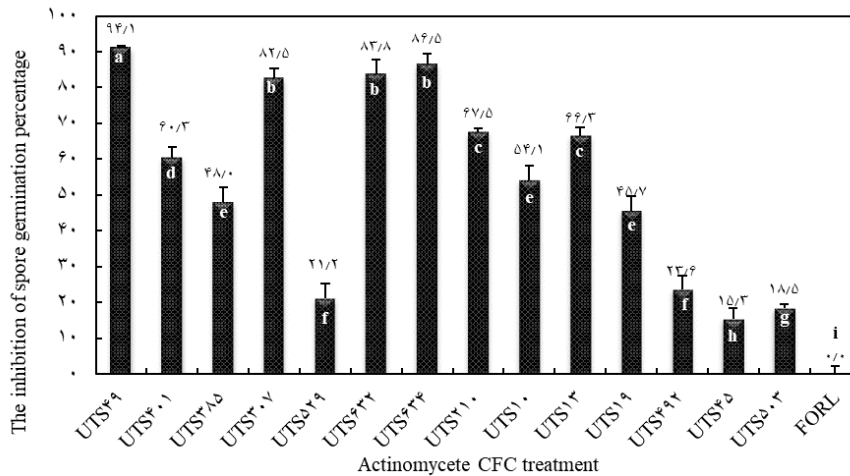
شکل ۱. بازدارندگی جدایه‌های اکتینوباکتری از رشد قارچ FORL روی محیط سیب‌زمینی دکستروز-آگار. تجزیه واریانس تیمارهای مختلف به‌طور جداگانه انجام شد و میانگین‌ها در تیمارهای مختلف با استفاده از آزمون توکی مورد مقایسه قرار گرفتند ($P < 0.01$). ستون‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند از نظر آماری با هم اختلاف معنی‌دار ندارند.

Figure 1. Inhibition of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radices lycopersici* by Actinobacter strains. The data represent mean values of three independent measurements. Number within each column followed by the same letter are not significantly different at $P < 0.01$ according to tokey's test. Data are means and standard deviation of three replicates. Error bars represent the standard deviation.



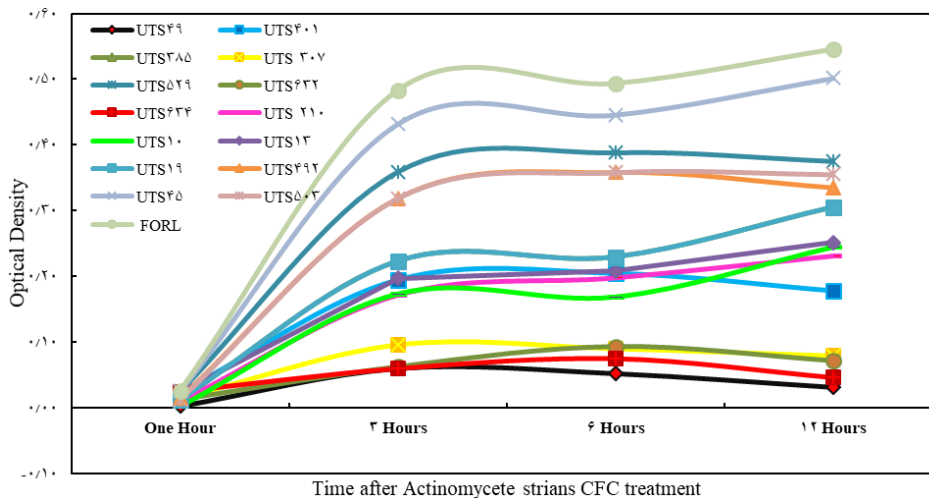
شکل ۲. خوانش جذب نوری میکروپلیت جهت ارزیابی شکل‌گیری بیوفیلم جدایه‌های اکتینوباکتری. تجزیه واریانس تیمارهای مختلف به‌طور جداگانه انجام شد و میانگین‌ها در تیمارهای مختلف با استفاده از آزمون توکی مورد مقایسه قرار گرفتند ($P < 0.01$). ستون‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند از نظر آماری با هم اختلاف معنی‌دار ندارند.

Figure 2. OD₄₉₂ reading from microtiter plate assay of biofilm formation by Actinobacters strains. The data represent mean values of three independent measurements. Bars with the same letter are not significantly different at $P < 0.01$ according to tokey's test. Data are means and standard deviation of three replicates. Error bars represent the standard deviation.



شکل ۳. درصد بازدارندگی محیط کشت فیلتر شده باکتری بر جوانه‌زنی اسپور قارچ به صورت شمارش توسط میکروسکوپ نوری پس از ۱۲ ساعت. تجزیه واریانس تیمارهای مختلف به‌طور جداگانه انجام شد و میانگین‌ها در تیمارهای مختلف با استفاده از آزمون توکی مورد مقایسه قرار گرفتند ($P < 0.01$). ستون‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند از نظر آماری با هم اختلاف معنی‌دار ندارند.

Figure 3. The inhibition of spore germination activity of Cell Free Culture of *Actinobacteria* strains on agar media against FORL. The data represent mean values of three independent measurements. Bars with the same letter are not significantly different at $P < 0.01$ according to tokey's test. Data are means and standard deviation of three replicates. Error bars represent the standard deviation.



شکل ۴. جلوگیری از جوانه‌زنی اسپور قارچ فوزاریوم توسط محیط کشت فیلتر شده جدایه‌های اکتینوباکتری در زمان‌های مختلف بر اساس خوانش دز طول موج ۶۰۰ نانومتر (nm).

Figure 4. The OD₆₀₀ reading from inhibition of spore germination activity of Cell Free Culture of *Actinobacteria* strains microtiter plate assay in different period time

بررسی جمعیت جدایه UTS49 روی ریزوسفر گوجه‌فرنگی و خیار
 هنگامی که بذور با جمعیت 1×10^8 CFU/ml مایه‌زنی شدند، پس از یک هفته جمعیت در ریزوسفر هر دو گیاه سیر نزولی داشت. ولی جمعیت روی ریزوسفر خیار در مرحله دو برگ کوتیلدونی بیشتر از مرحله دو برگ کوتیلدونی گوجه‌فرنگی بود. با توجه به شکل ۵ ملاحظه

با توجه به اطلاعات فوق شامل میزان ممانعت از رشد پرگنه قارچ، تولید آنزیم و متابولیت‌های مؤثر و مفید، بیوفیلم، تأثیر بر رشد در شرایط گلخانه، تأثیر بر جوانه‌زنی اسپور قارچی و سایر موارد جدایه UTS49 به‌عنوان مفیدترین و مؤثرترین جدایه برگزیده و جهت بررسی توان ماندگاری و تثبیت جمعیت در ریزوسفر مورد آزمون قرار گرفت.

بانک اطلاعاتی NCBI اخذ شده بود، مورد ارزیابی و بلاست قرار گرفت و با میزان ۱۰۰ درصد تشابه در جدایه UTS49 با سویه *S. carpaticus* NR043821 تشخیص داده شد. مطالعات فیلوژنتیکی و ترسیم درخت فیلوژنتیکی تکاملی مشخص کرد که جدایه UTS49 با ۱۴۳۸ نوکلئوتید به میزان ۱۰۰ درصد حمایت اعتبارسنجی با سویه *S. carpaticus* DQ442494 قرابت فیلوژنتیکی نشان داد.

شد این کاهش جمعیت در ریزوسفر گوجه‌فرنگی با شدت بیشتری نسبت به ریزوسفر خیار صورت گرفت و در نهایت در مرحله دو برگ حقیقی هر دو گیاه، جمعیت در هر دو ریزوسفر به 10^4 CFU/ml رسید و تا مرحله چهار برگ حقیقی ثابت ماند.

شناسایی مولکولی

توالی جدایه‌های مورد نظر با چندین توالی مشابه که از

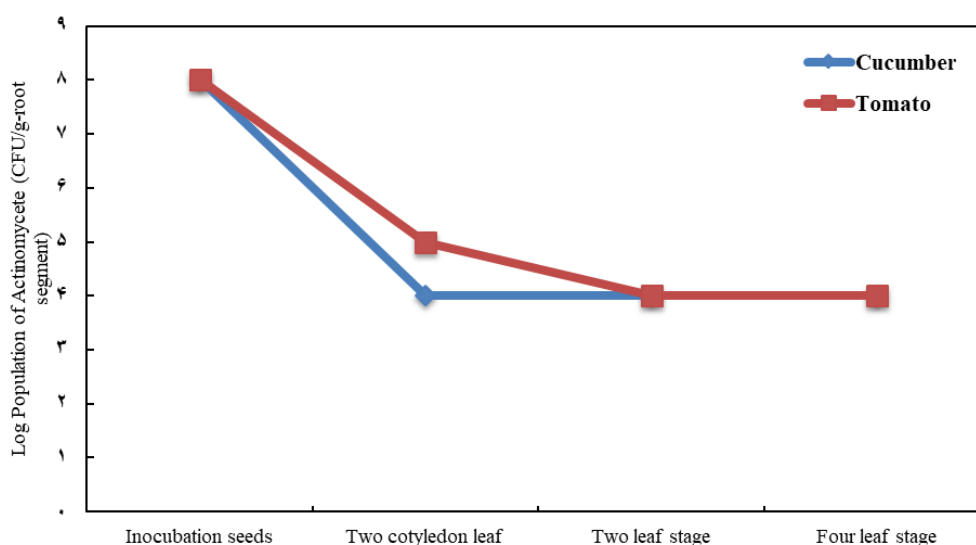
جدول ۱. مقایسه میانگین اثرات تیمارهای صورت گرفته با جدایه‌های اکتینوباکتری و قارچ بیمارگر روی شدت علائم بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه و صفات رشدی بوته‌های گوجه‌فرنگی با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای توکی

Table 1. Effect of Actinobacteria strains on disease severity of tomato crown and root rot and growth parameters of tomato seedling. means was calculated from five independent observations

Actinobacteria isolate	Percentage of severity	aerial organs Wet weight	Shoot length	Root length	Root dry weight	Whole dry weight
UTS49	25 a	20.13 a	34.53 a	29.13 a	0.9 a	3.05 a
UTS307	30 b	17.23 b	32.63 b	25.23 b	0.66 b	2.60 b
UTS385	40 d	15.9 d	25.3 f	19.9 f	0.5 e	2.29 f
UTS401	30 b	16.2 d	28.1 c	21.2 d	0.62 c	2.44 d
UTS10	35 c	16.8 b	29.3 c	23.8 c	0.65 b	2.54 c
UTS210	55 f	14.6 f	22 i	17.7 h	0.33 g	1.97 h
UTS632	35 c	16.5 c	23.6 h	18.5 g	0.46 f	2.31 e
UTS13	45 e	15.2 e	23.5 h	20.2 e	0.6 c	2.31 e
UTS19	40 d	16.57 c	24.6 f	19.3 f	0.51 e	2.37 e
UTS634	45 e	16.2 d	27.4 d	19.6 f	0.55 d	2.37 e
UTS632	40 d	13.82 g	20.22 g	15.4 i	0.26 h	1.81 i
UTS529	35 c	13.3 h	23.7 h	20.3 e	0.61 c	2.10 g
UTS45	55 f	12.2 i	19.1 k	14.3 j	0.13 i	1.50 j
UTS503	75 g	13.3 h	18.4 k	13.7 k	0.09 j	1.58 k
Control	0 h	15.6 e	26.7 d	20.2 e	0.63 c	0.63 l

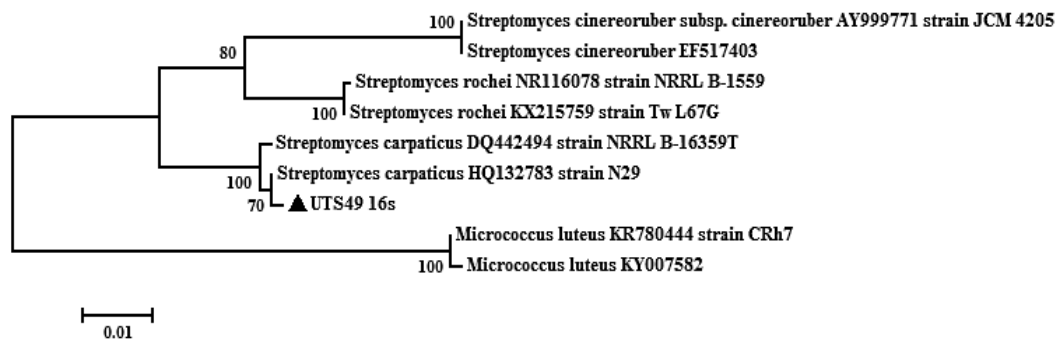
میانگین‌هایی با حروف مشابه (در یک ستون) فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ می‌باشند.

Those sharing the same letter are not significantly different base on tokey at $P < 0.05$.

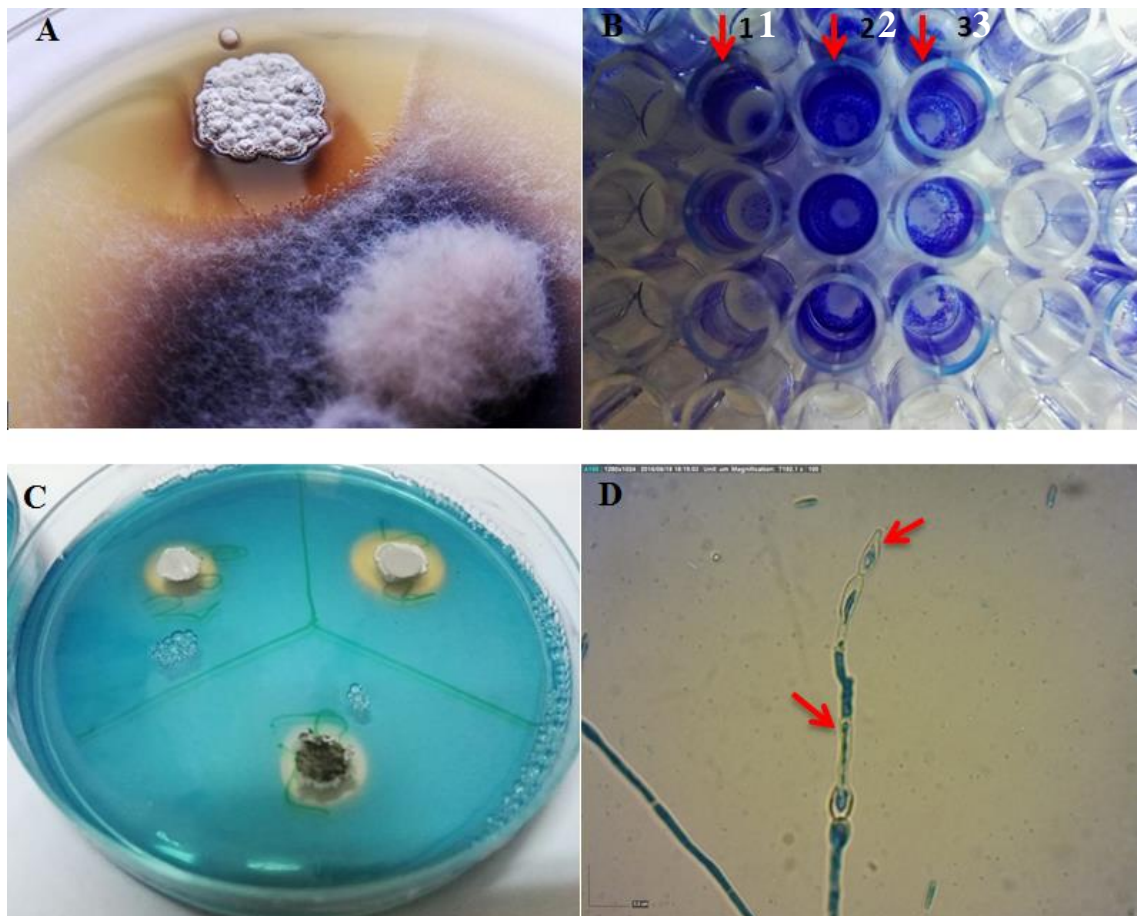


شکل ۵. مقایسه الگوی تغییرات جمعیت اکتینوباکتری UTS49 در ریزوسفر گوجه‌فرنگی و خیار پس از آغشته سازی بذر به باکتری تا مرحله چهار برگ حقیقی.

Figure 5. Dynamic of population of UTS49 in tomato and cucumber rhizosphere.



شکل ۶. درخت فیلوژنتیکی استنباط شده از ناحیه 16s rDNA برای جدایه UTS49 با روش maximum parsimony. اعداد بالای هر شاخه حمایت اعتبار سنجی بالاتر از ۵۰٪ را نشان می‌دهد. گونه *Micrococcus luteus* به‌عنوان خارج گروه در نظر گرفته شد. Figure 6. phylogenetic tree derived from maximum parsimony analysis of the 16s rDNA genes from UTS49 isolate. Branch points supported bootstrap value over 50%. *Micrococcus luteus* used as the out group.



شکل ۷. (A) آزمون کشت متقابل برای بررسی تأثیر ممانعت از رشد پرگنه قارچی FORL توسط جدایه *S. carpaticus* UTS49. (B) تشکیل بیوفیلم توسط جدایه‌های اکتینوباکتری. (۱) UTS634، (۲) UTS385، (۳) UTS49. (C) تولید سیدروفور روی محیط آگار CAS. (D) تصویر میکروسکوپی تأثیر محیط کشت فیلتر شده *S. carpaticus* UTS49 روی مورفولوژی هیف قارچ FORL (تورم نوک هیف و نازک شدن هیف).

Figure 7. A) Dual culture assay for *in vitro* inhibition of mycelia growth of *F. oxysporum* f. sp. *radices lycopersici* by *S. carpaticus* UTS49. FORL were cultured on potato dextrose agar paltes. B) Bioilm formation by *Actinobacteria* strains: 1) UTS634, 2) UTS385, 3) UTS49. C) Siderophore production in chrome azural S agar paltes after thee days. D) Light microscopy observation on effect of various cell filtrate culture from *S. carpaticus* UTS49 on hyphal morphology of FORL (swollen hyphal tip).

بحث

در خاک‌هایی که گونه‌های *Streptomyces* به حد مطلوبی پراکنده‌اند، معمولاً قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی کمتر رشد می‌کنند که این امر به خاطر ترشح آنتی‌بیوتیک‌ها علیه قارچ‌هاست (Williams et al. 1983). قارچ FORL عامل پوسیدگی طوقه و ریشه، عامل یکی از پر اهمیت‌ترین بیماری‌های خاکزاد گوجه‌فرنگی در مزارع و گلخانه‌ها به‌شمار می‌آید (Kim et al. 2001). این قارچ دامنه گسترده‌تری از میزبان‌ها نسبت به *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* دارد و روی ۱۲ جنس ایجاد بیماری می‌کند (Jarvis and Shoemaker 1987). لذا با توجه به خسارت قارچ مذکور و عدم کنترل آسان آن توسط روش‌های شیمیایی و زراعی، اثر آنتاگونیستی چندین جدایه اکتینوباکتری روی آن بررسی شد. ۷۴۰ جدایه اکتینوباکتری از ریزوسفر گیاه گوجه‌فرنگی به‌دست آمد که بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی از یکدیگر متمایز بودند. از بین ایزوله‌های اکتینوباکتری دارای فعالیت ضدقارچی، ۱۹ جدایه توانایی بازدارندگی از رشد پرگنه قارچ بیمارگر را داشتند. در بین جدایه‌های مورد مطالعه، جدایه UTS49 بیشترین کنترل درون تشک پتری از خود نشان داد. مارتینز (۲۰۱۴) از میان ۱۵۱ اکتینوباکتری که از خاک‌های مکزیک جداسازی کرده بود، نشان داد که ۶ جدایه فعالیت بازدارندگی بالایی در برابر بیمارگرهای مختلف گیاهی دارند که تقریباً ۳/۹۷ درصد از جدایه‌ها توان بازدارندگی داشتند، از این رو با نتایج به‌دست آمده از تحقیق حاصل که تقریباً ۲ درصد از جدایه‌ها توان بازدارندگی داشته‌اند تشابه قابل ملاحظه‌ای دارد. ال-ابیاد و همکاران حدود ۳۷ گونه *Streptomyces* جدا شده از خاک مصر را برای انتخاب سویه‌ای که تأثیر آنتاگونیستی بیشتری علیه بیمارگرهای گوجه‌فرنگی *F. oxysporum* f.sp. *Pseudomonas*، *V. alba-atrum*، *lycopersici*، *Clavibacter* و *Alternaria solani solanacerum* *michiganensis* subsp. *michiganensis* دارد، غربالگری کردند که از بین آن‌ها *S. pulcher* علیه قارچ و باکتری، *S. canescens* علیه قارچ و *S. citreofluorescens* علیه باکتری، به‌عنوان فعال‌ترین آنتاگونیست‌ها شناسایی شدند. *S. rochei* ACTA1551 قدرت بالایی در جلوگیری از رشد میسلیم *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* نشان داد و

کاربرد آن در شرایط گلخانه‌ای مانع از آلودگی گیاهان توسط قارچ بیمارگر شد (Kanini et al. 2013). از این رو کاربرد اکتینوباکتری‌های جنس *Streptomyces* توانایی خوبی در کنترل عوامل بیمارگر گیاهی داشته‌اند که تحقیق حاضر نیز تاییدی بر این موضوع بود. ۲۷/۰۲ درصد جدایه‌ها خالص شده توانایی تولید آنزیم کیتیناز را روی محیط از خود نشان دادند. ۶۸/۴۲٪ از اکتینوباکتری‌های تولیدکننده کیتیناز توانایی کنترل را در شرایط آزمایشگاهی نشان دادند.

دو جدایه UTS401 و UTS49 خاصیت قارچ‌کشی داشتند. در سال ۲۰۰۲ تأثیر اکتینوباکتری *S. violaceusniger* G10 را روی قارچ پاتوزن *F. oxysporum* f.sp. *cubense* race 4 بررسی شد. مشاهدات میکروسکوپی نشان داد که در ناحیه ممانعت از رشد کلنی میسلیم قارچ لیزش‌دگی و مرگ سلول‌های قارچی رخ داده است. همچنین در محیط مایع اثبات شد که اکتینوباکتری ذکر شده تأثیرات متورم شدن میسلیم، بدشکلی انشعابات هیفی و ممانعت از جوانه‌زنی اسپور به خوبی معلوم گردید (Getha et al. 2002). در این تحقیق مشاهدات میکروسکوپی انجام گرفته تأثیرات تورمی، بدشکلی و ممانعت از جوانه‌زنی اسپور را در کنار خاصیت قارچ‌کشی، تحت تأثیر باکتری استرپتومیست و به‌ویژه جدایه UTS49 و UTS401 به‌خوبی نشان داد (شکل ۷-D). فعالیت تجزیه‌کنندگی *Streptomyces*ها به‌طور عمده در نتیجه آنزیم‌های هیدرولاز مانند کیتیناز و گلوکوناز است (Enomoto 2001). از آنجایی که دیواره سلولی قارچی، حاوی فیبرهای کیتینی و گلوکانی است که در ماتریکسی از پروتئین قرار گرفته‌اند، پروتئازها نقش قابل توجهی در تجزیه این دیواره ایفا می‌کنند (Gohel et al. 2006).

نتایج نشان داد که تمامی جدایه‌ها توان تولید سیدروفور داشتند. گیاهان و باکتری‌ها از سیستم‌های مختلفی برای کسب آهن از محیط پیرامون خود استفاده می‌کنند. در این سیستم‌ها اغلب مولکول‌های سیدروفور برای به‌دست آوردن مولکول‌های آهن به‌کار می‌برند که توانایی پیوستگی بالایی با آهن دارند (Saha et al. 2016). باکتری‌های *Streptomyces* تولیدکننده سیدروفورهای تیپ هیدروکسامات هستند (Tokala et

bikiniensis به‌عنوان عامل ممانعت‌کننده قارچ فوزاریوم معرفی کردند. در این تحقیق دیده شد که عصاره مایع این باکتری تغییراتی در شکل ظاهری هیف قارچی *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* را سبب می‌شود. همچنین این عصاره به میزان قابل توجهی از جوانه‌زنی اسپور قارچ بیمارگر ممانعت به‌عمل آورده است. از این رو نتایج این تحقیق با پژوهش‌های قبلی هم‌راستا می‌باشد. باید در نظر داشت که تمامی غربالگری‌های آزمایشگاهی، تنها امکان انتخاب اولیه سویه‌های مناسب بیوکنترل را فراهم می‌آورند.

سابراتام و تراکوپر در سال ۲۰۰۲ ایزوله‌هایی از جنس استریپتومیست را از ریزوسفر گوجه‌فرنگی جدا کردند و گزارش دادند که موجب کاهش علائم ناشی از قارچ پاتوژن *R. solani* در شرایط گلدانی و هیدروپونیک گلخانه‌ای شده‌اند (Sabaratnam and Traquair 2002). بررسی‌های گلخانه‌ای نشان از هرگونه تأثیر منفی جدایه‌های برتر و متابولیت‌های آن‌ها بر گیاه دارد. در تیمارهای مایه‌زنی شده با قارچ بیمارگر و اکتینوباکتری توام، بر اساس مقایسه میانگین‌ها در مجموع جدایه UTS49 با بیشترین مقادیر میانگین بیشترین افزایش شاخص‌های رشدی را داشت. بین افزایش وزن گیاه و افزایش طول ریشه و اندام هوایی نیز همبستگی دیده شد. در این تحقیق طی غربال جدایه‌های اکتینوباکتری جدا شده از ریزوسفر و پس از بررسی‌های متعدد، جدایه اکتینوباکتری *S. carpaticus* UTS 49 به‌عنوان مؤثرترین، مفیدترین و کارآمدترین جدایه معرفی و مورد بررسی قرار گرفت. بررسی ویژگی‌های آنتاگونیستی، *S. carpaticus* UTS49 را به‌عنوان گزینه‌ای مناسب جهت کنترل عوامل بیماری‌زای گیاهی معرفی می‌کند.

al. 2002). سویه‌های بیوکنترل کلنیزه‌کننده ریشه، با جدا کردن آهن از کنار بیمارگرهای مهاجم، مانع از حمله آن‌ها شده و ریشه را کلنیزه می‌نمایند. سویه WYEC108 *S. lydicus* میکوپارازیت بیمارگرهای قارچی ریشه بوده و توانایی تولید متابولیت‌های ضد قارچی در ریزوسفر را دارد. این سویه در غیاب بیمارگرهای قارچی عملکردی مانند باکتری‌های PGPB از خود بروز می‌دهد؛ که ناشی از توانایی این سویه در تولید سیدروفورهای تیپ هیدرکسامات یا دیگر متابولیت‌های افزایش‌دهنده رشد در ریزوسفر است (Doubou et al. 2001). ایزوله‌های UTS385، UTS10، UTS13 و UTS49 به‌ترتیب بیشترین میزان بیوفیلم را داشتند. مشخصاً بین کنترل قارچ بیمارگر و میزان تشکیل بیوفیلم اکثر جدایه‌ها رابطه مستقیم وجود دارد. یان و کرافورد (۱۹۹۵)، نشان دادند که سویه *S. lydicus* WYEC108 با توانایی تولید آنتی‌بیوتیک‌های ضد قارچی و کیتیناز خارج سلولی و از بین بردن اسپورهای در حال جوانه‌زنی *Phythium ultimum* و تخریب دیواره سلولی ریشه‌های قارچ به‌عنوان یک عامل بالقوه جهت کنترل پوسیدگی پی‌تیومی بذر و ریشه مطرح شد. جدایه UTS49 با ۹۴٪ بازدارندگی از جوانه‌زنی اسپور بیشترین تأثیر را بر جلوگیری از جوانه‌زنی اسپور از خود نشان داد. لو و همکاران (۲۰۱۶) باکتری *S. rimosus* M527 که راه جداسازی نمودند که دامنه وسیعی از مواد ضد قارچی تولید نمی‌کرد اما ممانعت خیلی بالایی از جوانه‌زنی اسپور *F. oxysporum* f.sp. *cucumerinum* از خود نشان داد. این موضوع اهمیت تأثیر عامل کنترل‌کننده بر جلوگیری از تکثیر و تولیدمثل قارچ و همچنین رابطه بین ممانعت از تکثیر قارچ بیمارگر و شیوع بیماری را نشان می‌دهد. ژاو و همکاران (۲۰۱۲) اکتینوباکتری *S.*

REFERENCES

- Alexander DB, Zuberer DA (1991) Use of chrome azurols reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of Soils* 12 (1): 39-45.
- Arya R, Sharma KA (2016) Bioremediation of carbendazim, a benzimidazole fungicide using *Brevibacillus borstelensis* and *Streptomyces albogriseolus* together. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 17 (2): 185-189.
- Bajaj BK, Sharma P (2011) An alkali-thermotolerant extracellular protease from a newly isolated *Streptomyces* sp. DP2. *New Biotechnology* 28 (6): 725-732.

- Deepika L, Kannabiran K.** (2009) Isolation and characterization of antagonistic *Actinomyces* from marine soil. *Journal of Microbial and Biochemical Technology* 65 (33): 19-29.
- Doubou CL, Hamby SMK, Crawford DL, Beaulieu C** (2001) *Actinomyces*, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth. *Phytoprotection* 82 (3): 85-102.
- El-Abyad MS, El-Sayed MA, El-Shanshoury AR, El-Sabbagh SM** (1993) Towards the biological control of fungal and bacterial diseases of tomato using antagonistic *Streptomyces* spp. *Plant and Soil* 149 (2): 185-195.
- Enomoto Y, Shiomi K, Matsumoto A, Takahashi Y, Iwai Y, Harder A, Omura S** (2001) Isolation of a new antibiotic oligomycin G produced by *Streptomyces* sp. WK-6150. *The Journal of Antibiotics* 54 (3): 308-313.
- Getha K, Vikineswary S** (2002) Antagonistic effects of *Streptomyces violaceusniger* strain G10 on *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* race 4: indirect evidence for the role of antibiosis in the antagonistic process. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 28 (6): 303-310.
- Gohel V, Singh A, Vimal M, Ashwini P, Chhatpar HS** (2006) Review-bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms. *Annual Review of Phytopathology* 9 (1): 66-79.
- Gonzalez-Franco CA, Robles-Hernandez RY** (2009) *Actinomyces* as biological control agents of phytopathogenic fungi. *Tecnociencia Chihuahua* 3 (2): 64-73.
- Gopalakrishnan S, Srinivas V, Vidya MS, Rathore A** (2013) Plant growth-promoting activities of *Streptomyces* spp. In sorghum and rice. *Springer plus* 2 (1): 12.
- Gopalakrishnan S, Vadlamudi S, Bandikinda P, Sathya A, Vijayabharathi R, Rupela O, Varshney RK** (2014) Evaluation of *Streptomyces* strains isolated from herbal vermicompost for their plant growth-promotion traits in rice. *Microbiological Research* 169 (1): 40-48.
- Hartman JR, Fletcher JT** (1991) *Fusarium* crown and root rot of tomatoes in the UK. *Plant Pathology* 40 (1): 85-92.
- Hibar K, Daami-Remadi M, Khiareddine H, El Mahjoub M** (2005) Effet inhibiteur in vitro et in vivo du *Trichoderma harzianum* Sur *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Biotechnologie Agronomie, Société et Environnement* 9 (3): 163-171.
- Hin-A-Woeng TF, Bloemberg GV, van der Bij AJ, van der Drift KM, Schripsema J, Kroon B, De Bruijn FJ** (1998) Biocontrol by phenazine-1-carboxamide-producing *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 of tomato root rot caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11 (11): 1069-1077.
- Hsu SC, Lockwood JL** (1975) Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of *Actinomyces* in water and soil. *Applied Microbiology* 29 (3): 422-426.
- Hu HQ, Li XS, He H** (2010) Characterization of an antimicrobial material from a newly isolated *Bacillus amyloliquefaciens* from mangrove for biocontrol of *Capsicum* bacterial wilt. *Biological Control* 54 (3): 359-365.
- Hu L, Wang D, Liu L, Chen J, Xue Y, Shi Z** (2013) Ca²⁺ efflux is involved in cinnamaldehyde-induced growth inhibition of *Phytophthora capsici*. *Plos one* 8 (10): 76-0264.
- Igo N** (1983) Survey of greenhouse management practices in Essex County, Ontario, in relation to *Fusarium* foot and root rot of tomato. *Plant Disease* 67 (1): 36-79.
- Jarvis WR, Shoemaker RA** (1978) Taxonomic status of *Fusarium oxysporum* causing foot and root rot of tomato. *Phytopathology* 39 (2): 213-222.
- Kanini GS, Katsifas EA, Savvides AL, Karagouni AD** (2013) *Streptomyces rochei* ACTA1551, an indigenous Greek isolate studied as a potential biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Biomedical Research International* 2013(1): 56-75.
- Kim JT, Park IH, Hahm YI, Yu SH** (2001) Crown and root rot of greenhouse tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in Korea. *The Plant Pathology Journal* 17 (5): 290-294.
- Lu D, Ma Z, Xu X, Yu X** (2016) Isolation and identification of biocontrol agent *Streptomyces rimosus* M527 against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. *Journal of Basic Microbiology* 60 (2): 271-280.
- Martinez-Viveros O, Jorquera MA, Crowley DE, Gajardo GMLM, Mora ML** (2010) Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *Journal of Soil science and Plant Nutrition* 10 (3): 293-319.
- Minuto A, Spadaro D, Garibaldi A, Gullino ML** (2006) Control of soilborne pathogens of tomato using a commercial formulation of *Streptomyces griseoviridis* and solarization. *Crop Protection* 25 (5), 468-475.
- Nei M, Kumar S** (2000). *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University. Press New York United State.
- Nirmaladevi D, Venkataramana M, Srivastava RK, Uppalapati SR, Gupta VK, Yli-Mattila T, Chandra NS** (2016) Molecular phylogeny, pathogenicity and toxigenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Scientific Reports* 6 (1): 423-436.

- Nolan RD, Cross TS** (1988) Isolation and screening of *Actinomyces*. *Actinomyces in Biotechnology* 1-32.
- Oliveira MD, Varanda CMR, Félix MRF** (2016) Induced resistance during the interaction pathogen x plant and the use of resistance inducers. *Phytochemistry Letters* 15 (1): 152-158.
- Quecine MC, Araujo WL, Marcon J, Gai CS., Azevedo JL, Pizzirani-Kleiner AA** (2008) Chitinolytic activity of endophytic *Streptomyces* and potential for biocontrol. *Letters in Applied Microbiology* 47 (6): 486-491.
- Rowe RC, Farley JD** (1981) Strategies for controlling *Fusarium* crown and root rot in greenhouse tomatoes. *Plant Disease* 65 (2): 107-112.
- Sabaratham S, Traquair JA** (2002) Formulation of a *Streptomyces* biocontrol agent for the suppression of *Rhizoctonia* damping-off in tomato transplants. *Biological Control* 23 (3): 245-253.
- Saha M, Sarkar S, Sarkar B, Sharma BK, Bhattacharjee S, Tribedi P** (2016) Microbial siderophores and their potential applications: a review. *Environmental Science and Pollution Research* 23 (5): 3984-3999.
- Saitou N, Nei M** (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4 (4): 406-425.
- Schaad NW** (2001) Initial identification of common genera. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. APS Press. 373 pp.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S** (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30(12): 2725-2729.
- Tokala RK, Strap JL, Jung CM, Crawford DL, Salove MH, Deobald LA, Morra MJ** (2002) Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). *Applied and Environmental Microbiology* 68 (5): 2161-2171.
- Weller DM** (1988) Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 26 (1): 379-407.
- Williams ST, Goodfellow M, Alderson G, Wellington EMH, Sneath PHA, Sackin MJ** (1983) Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *Microbiology* 129 (6): 1743-1813.
- Winn M, Casey E, Habimana O, Murphy CD** (2014) Characteristics of *Streptomyces griseus* biofilms in continuous flow tubular reactors. *FEMS Microbiology Letters* 352 (2): 157-164.
- Yamamoto I, Komada H, Kinyasu K, Saito M, Ezuka A** (1974) A new race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* inducing root rot of tomato. *Plant Protection Society* 81 (1): 284-287.
- Yan Z, Reddy MS, Kloepper JW** (2003) Survival and colonization of Rhizobacteria in a tomato transplant system. *Canadian Journal of Microbiology* 49 (6): 383-389.
- Yuan WM, Crawford DL** (1995) Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. *Applied and Environmental Microbiology* 61 (8): 3119-3128.
- Zhao S, Du CM, Tian CY** (2012) Suppression of *Fusarium oxysporum* and induced resistance of plants involved in the biocontrol of Cucumber *Fusarium* Wilt by *Streptomyces bikiniensis* HD-087. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28 (9): 2919-2927.