کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی
دورهٔ ۸، شمارهٔ ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۸ (۱۲۶-۱۱۳)
DOI: 10.22059/jbioc.2019.281475.264

ارزیابی اثر آنتاگونیستی استرپتومایسس‌های ریزوسفر گندم در بیوکنترل پوسیدگی معمولی ریشه ناشی از *Bipolaris sorokiniana*

رسول اکبرپور[۱]، کیوان بهبودی*[۲]
۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.
۲. دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۲/۳۱- تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰٤/۱۷)

چکیده

پوسیدگی معمولی ریشه و طوقه گندم با عامل ***Bipolaris sorokiniana*** از مهم‌ترین بیماری‌های گندم در جهان است. در این مطالعه ٦۰ جدایه استرپتومایسس از ریزوسفر گندم جداسازی و به روش کشت متقابل در شرایط آزمایشگاه غربال شدند. جدایه‌های **UTS22**، **UTS3** و **UTS4** با ٤٦/٦، ٤٥/٦ و ٤۲ درصد بیشترین میزان ممانعت را از رشد میسلیوم بیمارگر نشان دادند. اغلب جدایه‌های مورد بررسی به فعالیت‌های فیزیولوژیکی و آنزیمی نظیر کلنیزاسیون، تثبیت نیتروژن، حلالیت فسفات، آنزیم پروتئاز و کیتیناز نتیجه مثبت نشان دادند. به ترتیب جدایه‌های **UTS3**، **UTS18** و **UTS4** با ٦۷/۹٦، ٦۱/۳ و ٥٤/٦۳ درصد بیشترین میزان ممانعت را با تولید متابولیت‌های فرار از رشد میسلیوم بیمارگر نشان دادند. بررسی‌های گلخانه‌ای در قالب طرح کامل تصادفی با استفاده از روش پوشش‌دار کردن بذر گندم با غلظت **CFU/ml** $۱۰^{۸}$ سوسپانسیون جدایه‌های برتر انجام شد. بر اساس نتایج، جدایه **UTS22** با ٥٥/٦ درصد بیشترین میزان کنترل بیماری را نشان داد و همچنین باعث افزایش معنی‌دار شاخص‌های رشد گندم در مقایسه با تیمار شاهد سالم شد. با توجه به نتایج شناسایی مولکولی بر اساس توالی **16S rDNA**، جدایه **UTS22** متعلق به گونه ***Streptomyces fulvissimus*** بوده و به عنوان جدایه برتر در کنترل بیولوژیک ***B . sorokiniana*** معرفی می‌شود.

واژه‌های کلیدی: گندم، کنترل بیولوژیک، ***Bipolaris sorokiniana***، استرپتومایسس، کلنیزاسیون.

Evaluation of the antagonistic effect of wheat rhizosphere *Streptomyces* on biocontrol of common root rot caused by *Bipolaris sorokiniana*

Rasoul Akbarpour [1], Keivan Behboudi * [2]
1. MSC. Student, Department of Plant Protection, University of Tehran, Karaj, Iran.
2. Associate Professor, Department of Plant Protection, University of Tehran, Karaj, Iran.
(Received: May 21, 2019 - Accepted: July 8, 2019)

ABSTRACT

Common root and crown rot of wheat caused by *Bipolaris sorokiniana* is one of the most important diseases of wheat in the world. In this study, 60 isolates of *Streptomyces* were isolated from wheat rhizosphere and screened in laboratory condition using dual culture. UTS22, UTS3 and UTS4 isolates showed maximum inhibition with 46.6, 45.6 and 42% respectively. Most of the isolates had positive reaction for physiological and enzymatic activities such as colonization, nitrogen fixation, phosphate solubility, protease and chitinase. UTS3, UTS18 and UTS4 isolates showed the highest inhibition levels of pathogenic mycelial growth by producing metabolites with 67.96, 61.3 and 54.63% respectively. Greenhouse studies carried out in a completely randomized design with wheat seed coat method with 10^8 CFU/ml concentrations of supernatant isolates. Based on the results, the UTS22 isolate showed the highest disease control with 55.6% and also wheat growth indices increased significantly compared to healthy control treatment. Molecular identification based on the sequence of 16S showed, the UTS22 isolate belongs to *Streptomyces fulvissimus*. UTS22 is introduced as a superior isolate in biological control of *B. sorokiniana*.

Keywords: Wheat, Biological control, *Bipolaris sorokiniana*, *Streptomyces*, Colonization.

* Corresponding author E-mail: behbodi@ut.ac.ir

مقدمه

گندم فراوان‌ترین محصول کشت شده در جهان است و غذای اصلی بسیاری از کشورها را تشکیل می‌دهد (Delcour and Hoseney 2010). هر ساله میزان قابل توجهی از این محصول در مزرعه و انبار در اثر عوامل مختلف از جمله بیماری‌ها از بین می‌رود. حدود ۲۰۰ نوع بیماری از گندم گزارش شده که قارچ‌ها مهم‌ترین گروه از عوامل بیماری‌زای گندم می‌باشند (Wiese 1987). پوسیدگی معمولی ریشه و لکه‌برگی ناشی از قارچ *B. sorokiniana* (Sacc.) Shoem در روسیه برای اولین بار در سال ۱۹۸۰ به عنوان یکی از مهم‌ترین بیماری‌های گندم گزارش شده است. این بیماری هر ساله باعث خسارت شدید به محصولات گندم و جو در مناطق گرم و مرطوب جهان می‌شود (Gupta *et al.* 2018).

در سال‌های اخیر به دلیل استفاده از ارقام مقاوم به زنگ، این بیماری به عنوان یکی از مهم‌ترین عامل محدودکننده تولید گندم در مناطق مختلف آسیا تبدیل شده است. در کشورهایی مانند پاکستان، هند و آسیای مرکزی به وسعت ۱۲ میلیون هکتار مشاهده شده و از نظر جهانی وسعت آلودگی مزارع کشت گندم به این بیماری حدود ۲۵ میلیون هکتار می‌باشد (Acharya *et al.* 2011). کشاورزی پایدار برای کنترل بیماری‌های گیاهی نیاز به روش‌هایی دارد که سازگار با شرایط اکولوژیکی بوده و وابستگی کمی به محصولات شیمیایی مصنوعی داشته باشد. کنترل بیولوژیک به عنوان یک روش ایمن برای کنترل پاتوژن‌های گیاهی در نظر گرفته شده است (Ling *et al.* 2010). در واقع کنترل بیولوژیک باعث تعادل اکوسیستم‌های کشاورزی شده و میزبان را در برابر خسارت‌های قابل توجه که توسط پاتوژن‌ها ایجاد می‌شود حفظ می‌کند (Junior *et al.* 2000). ریزوباکترها از جمله اکتینومیست‌ها به عنوان میکروارگانیسم‌های بالقوه کنترل بیولوژیک در برابر بیماری‌های گیاهی می‌باشند (Zhang *et al.* 2014). این میکروارگانیسم‌ها نقش‌های مهمی در ریزوسفر گیاهان با ترشح طیف گسترده‌ای از متابولیت‌های ضد میکروبی دارند که باعث جلوگیری از رشد پاتوژن‌های ریشه می‌شوند (Oliveira *et al.* 2010). علاوه بر پتانسیل کنترل بیولوژیک، این میکروارگانیسم‌ها به عنوان عوامل بهبود دهنده رشد گیاه نیز شناخته شده‌اند. طی بررسی‌های انجام گرفته، نشان داده شده که استفاده از باکتری *Streptomyces spiralis* در خیار باعث افزایش رشد محصول می‌شود (Gopalakrishnan *et al.* 2014).

اغلب مکانیسم‌های عمل این میکروارگانیسم‌ها عبارت از پارازیتیسم قارچ‌های بیمارگر، تولید آنزیم‌های لیزکننده دیواره سلولی، رقابت با پاتوژن، تولید آنتی‌بیوتیک و سیدوروفور است (Gangwar *et al.* 2014). تلاش‌های جهانی برای جستجوی محصولات بیولوژیک حاصل از میکروارگانیسم‌های مفید برای حفاظت محصولات کشاورزی به طور قابل توجهی پیشرفت داشته و اکتینومیست‌ها به ویژه گونه‌های جنس استرپتومایسس به نظر می‌رسد نماینده مناسبی از میکروارگانیسم‌های خاک در جهت کنترل بیماری‌های گیاهی باشند.

چندین محصول تجاری از اکتینومیست‌ها تولید شده و برای حفاظت از محصولات کشاورزی و رشد گیاهان در دسترس هستند (Palaniyandi *et al.* 2013). کاسوگامایسین محصول تجاری بیولوژیک است که توسط گونه *S. kasugaensis* تولید شده و به عنوان آنتی‌بیوتیک ضد قارچی و باکتریایی به بازار عرضه می‌شود. این آنتی‌بیوتیک با ممانعت از سنتز پروتئین قارچ بیمارگر عامل بلاست برنج باعث کنترل آن می‌شود (Ja 2003).

مطالعه حاضر با هدف ارزیابی اثر آنتاگونیستی استرپتومایسس‌های ریزوسفر گندم در کنترل بیولوژیک قارچ *B. sorokiniana* در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای بوده است.

مواد و روش

تهیه جدایه *Bipolaris sorokiniana*

در این بررسی قارچ *B. sorokiniana* از آزمایشگاه بیماری‌شناسی گیاهی دانشگاه تهران تهیه شد که قبلاً بیماری‌زایی آن اثبات شده بود.

نمونه‌برداری و جداسازی جدایه‌های استرپتومایسس از ریزوسفر گیاه گندم

از ریزوسفر گیاهان گندم سالم و آلوده به بیماری مزارع گندم چهار شهرستان ماکو، پلدشت، شوط و بازرگان متعلق به استان آذربایجان غربی در ماه‌های اردیبهشت و خرداد ۱۳۹۷ چندین نمونه خاک به صورت تصادفی نمونه‌برداری شد و نمونه‌های خاک هر مزرعه پس از انتقال به آزمایشگاه به مدت یک هفته خشک شدند. غلظت‌های مختلفی از سوسپانسیون خاک به روش سری رقت تهیه و روی محیط کشت SCA (Starch Casein Agar) موجود در تشتک‌های پتری پخش شد (این محیط کشت شامل ۱۰ گرم نشاسته، ۰/۳ گرم کازئین، ۲ گرم Nacl، ۰/۰۱ گرم $FeSO_4.\ 7H_2O$، ۰/۰۵ گرم $MgSO_4.\ 7H_2O$، ۲ گرم KNO_3، ۰/۰۲ گرم $CaCO_3$، ۲ گرم K_2HPO_4 و ۱۵ گرم آگار در ۱ لیتر آب مقطر است). تشتک‌های پتری برای رشد جدایه‌های استرپتومایسس به مدت ۷ روز در دمای ۲۸ درجه سلسیوس درون انکوباتور نگهداری شدند. شناسایی اولیه جدایه‌های استرپتومایسس بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی (رنگ کلونی، نحوه جدا شدن کلونی و مشاهده میسلیوم‌های هوایی) انجام و از محیط کشت جداسازی شدند (Jog *et al*. 2014).

بررسی قدرت آنتاگونیستی جدایه‌های استرپتومایسس در ممانعت از رشد *B. sorokiniana*

این بررسی در شرایط آزمایشگاهی به منظور انتخاب جدایه‌های برتر در ممانعت از رشد بیمارگر با استفاده از روش کشت

متقابل[1] درون تشتک پتری انجام شد. ابتدا سوسپانسیونی با جمعیت 10^8 CFU/ml جدایه‌های باکتری تهیه گردید و به صورت خطی روی محیط کشت PDA+SCA (Potato Dextrose Agar) با فاصله ۱ سانتی‌متر از لبه تشتک پتری کشت شد. هم-زمان یک قرص به قطر ۵ میلی‌متر از حاشیه کشت چهار روزه میسلیوم بیمارگر در طرف مقابل جدایه باکتری و با فاصله ۱ سانتی‌متری از لبه تشتک پتری قرار داده شد. ۳ تشتک پتری حاوی قرص میسلیوم بیمارگر بدون حضور جدایه‌های استرپتومایسس به عنوان شاهد استفاده شد. تشتک‌ها به مدت ۱۰ روز در دمای ۲۸ درجه سلسیوس درون انکوباتور نگهداری شدند. درصد ممانعت از رشد شعاعی بیمارگر توسط جدایه‌های ممانعت‌کننده با استفاده از رابطه (۱) محاسبه شد.

رابطه ۱) $PIRG\ (\%) = [(R1 - R2)/R1] \times 100$

PIRG = درصد ممانعت از رشد شعاعی بیمارگر، R1 =رشد شعاعی بیمارگر در تیمار شاهد و R2 = رشد شعاعی بیمارگر در حضور آنتاگونیست (Monteiro *et al*. 2017). این بررسی در قالب طرح کامل تصادفی با ۱۱ تیمار و ۳ تکرار انجام گردید.

بررسی تاثیر متابولیت‌های فرار ضد قارچی جدایه‌های استرپتومایسس علیه *B. sorokiniana*

برای این منظور ابتدا سوسپانسیونی با جمعیت 10^8 CFU/ml جدایه‌های ممانعت‌کننده از رشد بیمارگر تهیه و به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به درون تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت SCA اضافه و پخش گردید. تشتک‌ها به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۷ درجه سلسیوس درون انکوباتور نگهداری شدند. بعد از سپری شدن این مدت، یک قرص به قطر ۵ میلی‌متر از حاشیه کشت پنج روزه میسلیوم بیمارگر در مرکز تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت PDA قرار داده شد. در شرایط سترون هود تشتک‌های پتری حاوی قارچ بیمارگر روی تشتک‌های پتری حاوی جدایه‌های استرپتومایسس به طور وارونه قرار گرفتند و به مدت ۱۰ روز در دمای ۲۷ درجه سلسیوس درون انکوباتور نگهداری شدند. در این بررسی در محیط کشت شاهد به جای استفاده از سوسپانسیون باکتری از ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر سترون استفاده شد. درصد ممانعت از رشد بیمارگر با استفاده از رابطه (۲) محاسبه شد.

رابطه (۲) $A = (B - C)/B \times 100$

1. Dual culture

A = درصد ممانعت از رشد بیمارگر، B = قطر رشد پرگنه شاهد و C = قطر رشد پرگنه تیمار (Kraus and Loper 1992). این بررسی در قالب طرح کامل تصادفی با ۷ تیمار و ۳ تکرار انجام گردید.

بررسی انحلال فسفات معدنی جدایه‌های استرپتومایسس

برای این منظور از محیط کشت (Sperber) استفاده شد. پس از تهیه محیط کشت، جدایه‌های باکتری به صورت نقطه‌ای در تشتک‌های پتری حاوی محیط مذکور کشت و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۷ درجه سلسیوس درون انکوباتور نگهداری شدند. بعد از سپری شدن این مدت، تشکیل هاله شفاف اطراف کلونی باکتری نشان دهنده توانایی حلالیت فسفات است (Sperber 1958).

بررسی تثبیت نیتروژن جدایه‌های استرپتومایسس

برای این منظور از محیط کشت NFB (Nitrogen Free Bromothymol) استفاده شد. پس از تهیه محیط کشت، جدایه‌های باکتری به صورت نقطه‌ای در تشتک‌های پتری حاوی محیط مذکور کشت و به مدت ۱۲۰ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس درون انکوباتور نگهداری شدند. در این بررسی سه تشتک پتری حاوی محیط کشت مذکور بدون جدایه باکتری به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. تغییر رنگ محیط پس از کشت باکتری از سبز به آبی نشان دهنده تثبیت نیتروژن است (Baldani and Döbereiner 1980).

بررسی تولید آنزیم کیتیناز جدایه‌های استرپتومایسس

ابتدا محلول کیتین کلوئیدال به میزان ۰/۴ درصد به محیط کشت آگار ۱/۵ درصد اضافه شد. پس از تهیه محیط کشت، جدایه‌های باکتری به صورت نقطه-ای در تشتک‌های پتری حاوی محیط مذکور کشت و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس درون انکوباتور نگهداری شدند. بعد از سپری شدن این مدت، محیط کشت مورد نظر با محلول لوگول رنگ-آمیزی شد و مشاهده هاله شفاف اطراف کلونی باکتری نشان دهنده تولید آنزیم کیتیناز بود (Buzzini and Martini 2002).

بررسی تولید آنزیم پروتئاز جدایه‌های استرپتومایسس

برای این منظور از محیط کشت اسکیم میلک آگار (SMA) استفاده شد. پس از تهیه محیط کشت، جدایه‌های باکتری به صورت نقطه‌ای در تشتک‌های پتری حاوی محیط مذکور کشت و به مدت ۱۲۰ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس درون انکوباتور نگهداری شدند. بعد از سپری شدن این مدت، تشکیل هاله بی‌رنگ اطراف کلونی باکتری نشان دهنده تولید آنزیم پروتئاز بود (Brizzio *et al*. 2007).

بررسی توانایی کلنیزاسیون ریشه گندم توسط جدایه‌های استرپتومایسس

این بررسی با استفاده از محیط کشت WA (Water Agar) ۰/۶ درصد درون لوله‌های آزمایشی سترون انجام شد. ابتدا سوسپانسیونی با جمعیت CFU/ml 10^8 جدایه‌های باکتری تهیه گردید. بذرهای گندم به تعداد کافی با محلول هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به مدت ۵ دقیقه ضدعفونی شدند و سپس در داخل سوسپانسیون جدایه‌های مورد نظر به مدت ۴۵ دقیقه درون شیکر انکوباتور با دور آرام ۵۰ دور در دقیقه و دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شدند. از هر بذر یک عدد درون لوله‌های آزمایشی حاوی محیط کشت مذکور قرار گرفت و سپس لوله‌های آزمایشی به مدت ۸ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس درون انکوباتور تحت ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت خاموشی قرار گرفتند. برای شاهد از لوله‌های آزمایش حاوی محیط مذکور و بذرهای ضدعفونی شده بدون تیمار با سوسپانسیون باکتری استفاده شد. بعد از سپری شدن این مدت، گیاهچه‌های رشد کرده از محیط کشت خارج و ریشه‌های گیاه به قطعات ۲ تا ۳ سانتی‌متری

تقسیم شدند و به مدت نیم ساعت در ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون قرار گرفتند. از سوسپانسیون مورد نظر سری رقت تهیه شد و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از رقت $۱۰^{-۶}$ در محیط کشت SCA پخش نموده و تشتک‌ها به مدت ۱۲۰ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس درون انکوباتور نگهداری شدند. بعد از سپری شدن این مدت، کلونی‌های رشد یافته شمارش شدند (Queiroz *et al.* 2006). این آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی با ۷ تیمار و ۳ تکرار انجام شد.

بررسی‌های گلخانه‌ای

بررسی‌های گلخانه‌ای در اسفند ۱۳۹۷ به منظور تاثیر سه جدایه UTS3، UTS4 و UTS22 در کنترل بیولوژیک بیماری پوسیدگی ریشه و شاخص‌های رشدی گیاه گندم، در گلخانه گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه تهران انجام شد. تیمارهای مورد استفاده عبارت بودند از: ۱) کاشت بذرهای پوشش‌دار نشده با جدایه‌های استرپتومایسس (شاهد مثبت). ۲) کاشت بذرهای پوشش‌دار شده با جدایه‌های استرپتومایسس ۳) کاشت بذرهای پوشش‌دار نشده با جدایه‌های استرپتومایسس و اضافه کردن مایه تلقیح بیمارگر به خاک (شاهد منفی). ۴) کاشت بذرهای پوشش‌دار شده با جدایه‌های استرپتومایسس و اضافه کردن مایه تلقیح بیمارگر به خاک (Monteiro *et al.* 2017). جهت تهیه مایه تلقیح بیمارگر، در داخل ارلن مایر ۱۰۰ گرم بذر گندم ریخته شد و دو بار به فاصله ۲۴ ساعت اتوکلاو گردید. ۴ قرص به قطر ۵ میلی‌متر از حاشیه کشت تازه میسلیوم بیمارگر به ارلن مایر اضافه و به مدت ۲۸ روز در دمای ۲۶ درجه سلسیوس درون انکوباتور نگهداری گردید (Wildermuch and Mc Namara 1987). در این بررسی رقم کویر گندم به عنوان رقم حساس از بانک بذر گروه زراعت کشاورزی دانشگاه تهران تهیه و استفاده شد. خاک مورد استفاده به ترتیب به نسبت ۱:۱:۲ از کود حیوانی، ماسه و خاک تهیه و دو بار با اتوکلاو سترون گردید. سوسپانسیونی با جمعیت $۱۰^{۸}$ CFU/ml جدایه‌های مورد نظر تهیه و بذرهای گندم ضدعفونی شده به مدت ۴۵ دقیقه برای پوشش دار شدن درون سوسپانسیون نگهداری شدند (Singh and Mehrota 1980). در تیمارهای ۳ و ۴ مایه تلقیح بیمارگر به نسبت وزنی ۵ درصد با خاک گلدان مخلوط شد. پس از آماده شدن گلدان‌ها، ۵ عدد بذر در هر گلدان کاشته و گلدان‌ها به گلخانه با دمای ۴±۲۵ درجه سلسیوس منتقل و هر ۲ تا ۳ روز یکبار آبیاری شدند. پس از ۶ هفته ارزیابی شاخص‌های رشد گیاه و شدت بیماری‌زایی ریشه انجام شد. پس از شستن ریشه‌ها، میان‌گره زیر طوقه هر گیاه بر طبق لکه موجود برای تعیین درصد پوسیدگی ریشه بر اساس سیستم توصیفی (رابطه ۳) درجه‌بندی شدند (Ledingham *et al.* 1973). سپس محاسبه درصد آلودگی ریشه و کنترل بیماری طبق رابطه‌هایی (۴و۵) که توسط تین لاین توصیف شده انجام گردید (Tinlin 1977). این بررسی در قالب طرح کامل تصادفی با ۸ تیمار و ۳ تکرار انجام گردید.

رابطه ۳) ۱= صفر (بدون لکه)، ۲= کم (لکه‌های سیاه تا ۲۵ درصد سطح میان‌گره زیر طوقه را پوشانده باشند)، ۵= متوسط (لکه‌های وسیعی ۲۵ تا ۵۰ درصد میان‌گره زیر طوقه را پوشانده باشند)، ۱۰= شدید (لکه‌های وسیعی بیش از ۵۰٪ سطح میان‌گره زیر طوقه را پوشانده باشند).

رابطه ۴)

$$\text{درصد آلودگی ریشه} = \frac{\sum(\text{میزان پوسیدگی} \times \text{تعداد گیاهان در هر گروه})}{\text{تعداد کل گیاهان}} \times ۱۰۰$$

رابطه ۵)

$$\text{درصد کنترل بیماری} = \frac{\sum(\text{شدت بیماری در تیمار شاهد} - \text{شدت بیماری در تیمار اعمال شده})}{\text{شدت بیماری در تیمار شاهد}} \times ۱۰۰$$

آنالیز

داده‌های به دست آمده از بررسی‌های آزمایشگاهی و گلخانه‌ای، با استفاده از نرم افزار SAS (Version 9.4) تجزیه و تحلیل آماری شدند و مقایسه میانگین داده‌ها توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۱درصد انجام شد.

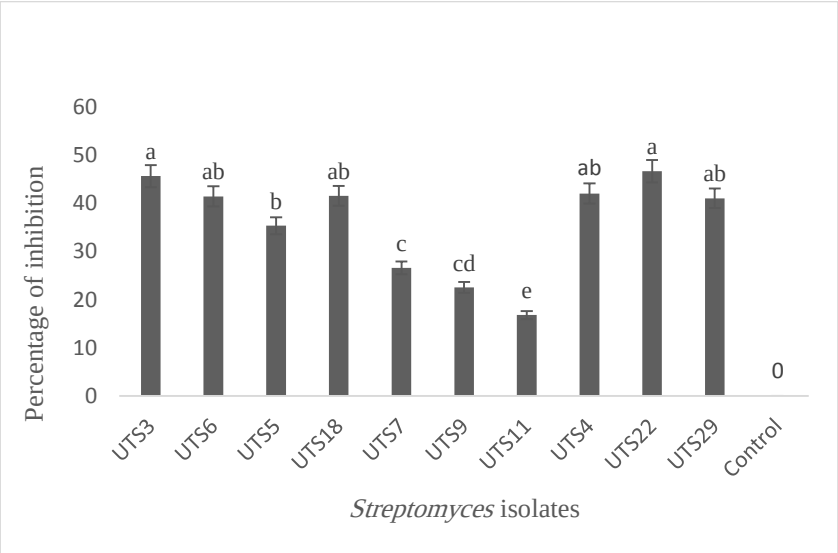
شناسایی جدایه‌های استرپتومایسس

شناسایی با استفاده از روش‌های ریخت‌شناسی و مولکولی انجام شد. در روش ریخت‌شناسی جهت مشاهده میسلیوم هوایی و نحوه رشد کلونی باکتری‌ها، جدایه‌های باکتری روی محیط کشت SCA مورد بررسی قرار گرفتند (Khayat maher 2012). بر اساس نتایج آزمایشگاهی و گلخانه‌ای جدایه UTS22 به عنوان جدایه برتر جهت شناسایی مولکولی انتخاب گردید. شناسایی بر اساس توالی 16S rDNA باکتری انجام شد. ابتدا DNA باکتری با استفاده از روش CTAB استخراج گردید (Kreuze 1999). جهت تکثیر توالی از واکنش PCR استفاده شد و آغازگرهای مورد استفاده 27f با ترادف 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3' و 1492r با ترادف 5'-CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT-3' بودند. برای تفکیک قطعه تکثیر یافته از ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد (Eden 1991).

نتایج

بررسی قدرت آنتاگونیستی جدایه‌های استرپتومایسس در شرایط آزمایشگاه

۶۰ جدایه به دست آمده از ریزوسفر گندم، براساس روش کشت متقابل برای ممانعت از رشد میسلیوم *B. sorokiniana* درون تشتک پتری مورد بررسی قرار گرفتند. از بین جدایه‌های مورد نظر ۱۰ جدایه توانایی ممانعت از رشد را نشان دادند (شکل ۱). جدایه‌های UTS22 و UTS3 به ترتیب با ۴۶/۶ و ۴۵/۶ درصد بیشترین میزان ممانعت را نشان دادند (شکل ۲). ۶ جدایه UTS3، UTS4، UTS6، UTS18، UTS22 و UTS29 برای بررسی‌های آزمایشگاهی انتخاب شدند.



شکل ۱. مقایسه میانگین درصد ممانعت‌کنندگی جدایه‌های استرپتومایسس از رشد *B. sorokiniana* روی محیط کشت با استفاده از آزمون

چند دامنه‌ای دانکن ($P \leq 0.01$). از نظر آماری ستون‌های دارای حرف مشترک با هم اختلاف معنی‌دار ندارند.

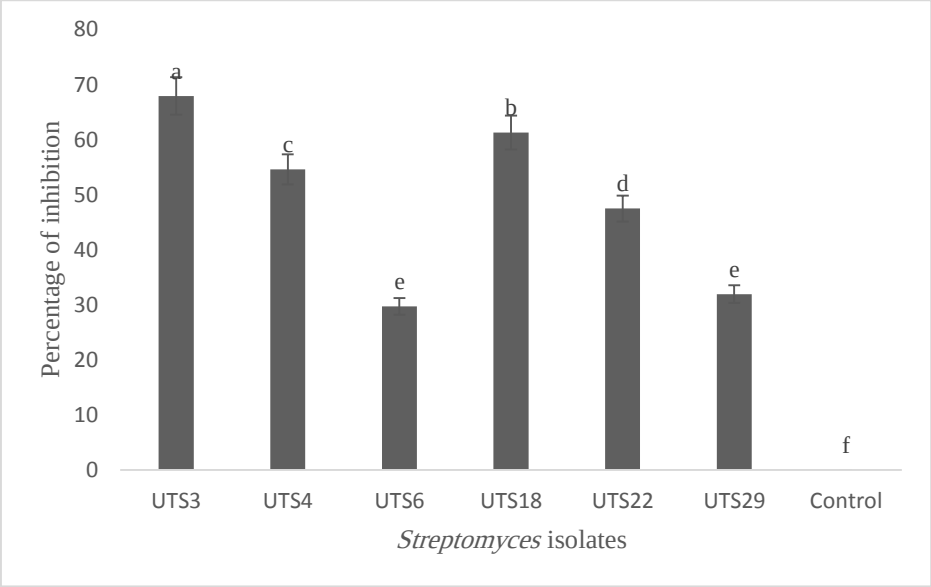
Figure 1. Comparison of the mean inhibitory percent of *streptomyces* isolates from growth of *B. sorokiniana* on the medium using Duncan's multidimensional test ($P \leq 0.01$). There is no significant difference in terms of the number of common-pillar columns.

شکل ۲. تاثیر ممانعت‌کنندگی جدایه UTS22 از رشد شعاعی میسلیوم *B. sorokiniana* به روش کشت متقابل.

Figure 2. The inhibitory effect of isolate UTS22 on radial growth of *B. sorokiniana* by dual culture method.

بررسی تاثیر متابولیت‌های فرار ضد قارچی جدایه‌های استرپتومایسس

این بررسی نشان داد که جدایه‌های استرپتومایسس توانایی تولید متابولیت‌های ضد قارچی را دارند. بر اساس نتایج، به ترتیب جدایه‌های UTS3، UTS18، UTS4، UTS22، UTS29 و UTS6 با ۶۷/۹۶، ۶۱/۳، ۵۴/۶۳، ۴۷/۵، ۳۱/۹۶ و ۲۹/۷۳ درصد بیشترین میزان ممانعت را با تولید متابولیت‌های از رشد میسلیوم بیمارگر نشان دادند (شکل ۳).



شکل ۳. مقایسه میانگین درصد ممانعت‌کنندگی متابولیت‌های فرار جدایه‌های استرپتومایسس از رشد میسلیوم *B. sorokiniana* روی محیط کشت با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن ($P \leq 0.01$). از نظر آمار ستون‌های دارای حرف مشترک با هم اختلاف معنی‌دار ندارند.

Figure 3. Comparison of the mean percent of inhibitory metabolites of *Streptomyces* isolates from growth of *B. sorokiniana* on the medium using Duncan's multiple range test ($P \leq 0.01$). There is no significant difference in terms of the number of common-pillar columns.

بررسی انحلال فسفات معدنی

در این بررسی ایجاد هاله شفاف در اطراف کلونی باکتری نشان دهنده حلالیت فسفات توسط جدایه‌های مورد نظر بود. در این بررسی سه جدایه UTS4، UTS6 و UTS22 توانایی این فعالیت را نشان دادند. میانگین قطر هاله شفاف ایجاد شده توسط جدایه‌های مورد نظر به ترتیب برابر با ۲/۳، ۲ و ۱/۸ سانتی‌متر بود.

بررسی توانایی تثبیت نیتروژن

در این بررسی بعد از کشت باکتری و سپری شدن مدت زمان معین، تغییر رنگ محیط از سبز به آبی نشان دهنده تثبیت نیتروژن توسط جدایه‌های مورد نظر بود. جدایه‌های UTS22، UTS18، UTS3 و

UTS6 توانایی تغییر رنگ محیط و تثبیت نیتروژن را نشان دادند. محیط کشت جدایه‌هایی که این فعالیت را نشان ندادند بدون تغییر رنگ باقی ماند.

بررسی تولید آنزیم کیتیناز

در این بررسی بعد از مدت زمان تعیین شده کشت باکتری، محلول لوگول به محیط کشت اضافه شد. وجود هاله شفاف اطراف کلونی باکتری نشان دهنده تجزیه کیتین موجود در محیط و در نتیجه فعالیت کیتینازی بود. در این بررسی۶ جدایه مورد نظر توانستند فعالیت کیتینازی نشان دهند. میانگین قطر هاله شفاف ایجاد شده توسط جدایه‌های UTS3، UTS22، UTS4، UTS18، UTS6 و UTS29 به ترتیب برابر با ۲/۵، ۲/۳، ۲/۲، ۱/۵، ۱/۳ و ۱ سانتی‌متر بود.

بررسی تولید آنزیم پروتئاز

در این بررسی ۶ جدایه مورد نظر قادر به تولید این آنزیم بودند که با ظهور هاله شفاف در اطراف کلونی-های در حال رشد مشخص گردید.

بررسی توانایی کلنیزاسیون ریشه گندم

این بررسی که از روی تعداد کلونی‌های رشد یافته روی محیط کشت انجام گرفت، به ترتیب جدایه‌های UTS22، UTS3، UTS4، UTS18، UTS29، UTS6 با $۲/۶\times۱۰^{۷}$، $۱/۹\times۱۰^{۷}$، $۱/۶\times۱۰^{۷}$، ۱×۱۰^{۷}، $۰/۸\times۱۰^{۷}$ و $۰/۷\times۱۰^{۷}$ کلونی رشد یافته روی محیط کشت، بیشترین میزان کلنیزاسیون را نشان دادند. بر اساس مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از آزمون دانکن ($P\leq 0.01$)، جدایه‌های UTS6، UTS29 از نظر آمار اختلاف معنی‌دار نشان ندادند و جدایه UTS22 نسبت به همه جدایه‌ها اختلاف معنی‌دار نشان داد.

بررسی‌های گلخانه‌ای

پس از گذشت ۶ هفته بعد از کاشت، تاثیر تیمارها روی شاخص‌های رشد گیاه و شدت بیماری‌زایی مورد ارزیابی قرار گرفت. در تیمار استفاده از جدایه‌های استرپتومایسس توام با بیمارگر، به ترتیب جدایه‌های UTS22، UTS3 و UTS4 با ۵۵/۶، ۳۰/۱ و ۷/۳۳ درصد بیشترین میزان کنترل بیماری را در مقایسه با شاهد منفی (بیمارگر به تنهایی) نشان دادند. گیاهان شاهد منفی با میانگین ۸۶/۳۳ درصد در قسمت ریشه علائم بیماری را از خود نشان دادند و شناسایی عامل بیمارگر از بافت‌های آلوده جهت اثبات بیماری‌زایی انجام شد. همچنین در تیمار شاهد مثبت سلامت کامل ریشه قابل ملاحظه بود.

مقایسه میانگین شاخص‌های رشد گیاهان حاصل از بذرهای تیمار شده با جدایه‌های استرپتومایسس به تنهایی یا توام با بیمارگر نشان دادند که این جدایه‌ها شاخص‌های رشد گیاه را افزایش می‌دهند (شکل ۴). بر اساس مقایسه میانگین‌ها، گیاهان حاصل از بذرهای تیمار شده با جدایه UTS22 با ۲۸/۵ سانتی‌متر طول اندام هوایی، ۱۰/۸۶ سانتی‌متر طول ریشه، ۰/۳۷۶ گرم وزن تر اندام هوایی و ۰/۰۴۴ گرم وزن تر ریشه بیشترین افزایش رشد شاخص‌های گیاه را نشان دادند و با شاهد منفی و مثبت دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد آزمون دانکن بودند. همچنین در تیمار توام با بیمارگر، جدایه UTS22 نسبت به جدایه‌های دیگر باعث افزایش رشد شاخص‌های مذکور گیاه گندم شد و با شاهد منفی دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد آزمون دانکن بود (جدول ۱). در این بررسی جدایه UTS22 به عنوان برترین جدایه بهبود دهنده رشد شاخص‌های گیاه گندم و کنترل بیماری مشخص گردید.

شناسایی مولکولی

توالی تکثیر یافته ۱۵۰۰ جفت بازی 16S rDNA جدایه مورد نظر با چندین توالی مشابه که از بانک اطلاعاتی NCBI اخذ شده بود، مورد ارزیابی فیلوژنتیکی قرار گرفت. ترسیم درخت فیلوژنتیکی با روش Maximum likelihood انجام و مشخص گردید که جدایه UTS22 به میزان ۱۰۰ درصد حمایت اعتبارسنجی با جدایه‌های گونه *Streptomyces fulvissimus* قرابت فیلوژنتیکی دارد (شکل۳).

شکل ۴. شکل سمت راست مربوط به شدت بیماریزایی *B. sorokiniana* (۴ گیاه سمت راست، گیاهان شاهد مثبت و ۴ گیاه سمت چپ، گیاهان شاهد منفی) است. شکل سمت چپ مربوط به تاثیر جدایه های استرپتومایسس و بیمارگر روی شاخص‌های رشد گندم (از راست به چپ به ترتیب گیاهان تیمار شده با جدایه UTS4، UTS3، UTS22، شاهد مثبت و شاهد منفی) است.

Figure 4. The right shape is related to the pathogenicity of *B. sorokiniana* (the right plant, the positive control plants and the 4 left plants, the negative control plants). The left image is related to the effect of *streptomyces* isolates and pathogen on wheat growth indices (from right to left, respectively, plants treated with UTS4, UTS3, UTS22, positive control and negative control).

جدول ۱. مقایسه میانگین تیمارهای اعمال شده با جدایه‌های UTS3، UTS4 و UTS22 و قارچ بیمارگر *B. sorokiniana* روی صفات رشدی گیاه‌چه‌های گندم و شدت بیماری با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن ($P\leq 0.01$). از نظر آمار حروف مشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار نیستند.

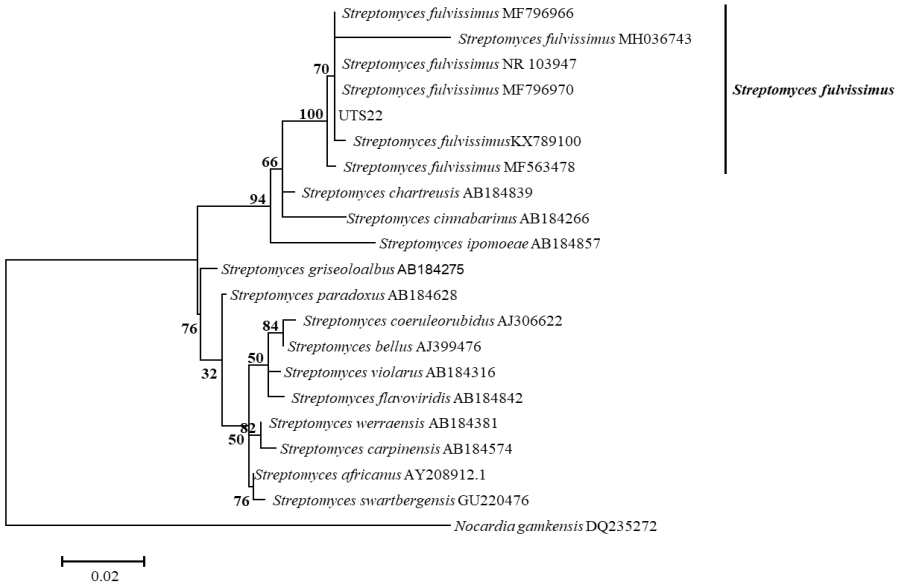
Table 1. Comparison of mean treatments applied to UTS3, UTS4 and UTS22 isolates and pathogenic fungi, *B. sorokiniana*, on growth traits of wheat seedlings and disease severity by using Duncan's multiple range test ($P \leq 0.01$). In terms of the statistics of the same letters, the difference is not significant.

Treatment	Disease severity (%)	Shoot length (cm)	Root length (cm)	Total length (cm)	Shoot fresh weight (g)	Root fresh weight (g)	Total fresh weight (g)
UTS22	0	28.5 a	10.86 a	39.6 a	0.376 a	0.04 a	0.421a
UTS3	0	24.73 b	6.96 b	31.7 b	0.25 b	0.026 b	0.276 b
UTS4	0	23.43 bc	4.76 d	28.2 c	0.231 c	0.024 b	0.231 c
UTS22+P*	38.3	19.63 c	6.04 c	25.7 d	0.165 d	0.015 c	0.179 d
UTS3+P	60.3	14.56 d	4.46 d	19.03 e	0.122e	0.013 cd	0.135 e
UTS4+P	80	12.73 e	1.4 e	14.43 f	0.103 e	0.009 ed	0.112 e
Control	0	22.06 c	4.4 d	26.46 cd	0.21c	0.017 c	0.227 c
Pathogen	86.3	12.06 e	1.4 e	13.46 f	0.083 f	0.007 e	0.09 f

* Pathogen

** اعداد، میانگین ۳ تکرار را نشان می‌دهند و حروف غیر مشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۱٪ ($P\leq 0.01$) می‌باشند.

** The numbers, have a mean of 3 repetitions, and dissimilar words indicate a significant difference at 1% level ($P\leq 0.01$).



شکل ۳. ترسیم درخت فیلوژنتیکی گونه متعلق به جنس استرپتومایسس بر اساس توالی 16S rDNA با استفاده از روش Maximum likelihood. اعداد روی شاخه‌ها حمایت اعتبارسنجی را نشان می‌دهند. گونه *Nocardia gamkensis* به عنوان Outgroup در نظر گرفته شد.

Figure 3. Drawing of phylogenetic tree of *Streptomyces* genus based on 16S rDNA sequence using Maximum Likelihood method. The numbers on the branches show validation support. *Nocardia gamkensis* was selected as outgroup.

بحث

گندم از مهم‌ترین گیاهان زراعی به شمار می‌آید و سالانه بخش قابل توجهی از این محصول در نقاط مختلف جهان توسط بیمارگرهای مختلف از بین می‌رود. در این میان قارچ‌های بیمارگر به خصوص عوامل ایجادکننده پوسیدگی ریشه و طوقه از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند. یکی از عوامل ایجادکننده پوسیدگی ریشه و طوقه گندم قارچ بیمارگر *B. sorokiniana* بوده که بسته به مناطق خسارت آن متفاوت است (Wiese 1987). کنترل شیمیایی بیماری‌هایی که توسط عوامل قارچی خاکزاد ایجاد می‌شوند، عمدتاً مشکل، گاهی غیر ممکن و مستلزم هزینه زیاد است (Raza *et al*. 2013). کنترل بیولوژیک یک جایگزین موثر و پایدار برای کنترل بیماری در گیاهان است. کاربرد ریزوباکترها از جمله اکتینومیست‌ها در خاک و سطح گیاه می‌تواند جایگزین مناسب و بی‌خطر در جهت کنترل بیماری‌های گیاهی باشد (Patten and Glick 2010). ریزوباکترها با تولید متابولیت‌های مختلف می‌توانند سبب القای مقاومت سیستمیک در گیاه و بالا بردن سطوح دفاعی گیاه در زمان حمله بیمارگرها شوند (Pieterse *et al*. 2009). لذا با توجه به خسارت قارچ بیمارگر *B. sorokiniana* و عدم کنترل آسان آن توسط روش‌های شیمیایی، در این بررسی به ارزیابی اثر آنتاگونیستی جدایه‌های استرپتومایسس ریزوسفر گندم روی این قارچ بیمارگر پرداختیم تا در نهایت به جدایه‌های برتر برسیم. طی غربال ۶۰ جدایه استرپتومایسس جدا شده در شرایط آزمایشگاهی، به ترتیب جدایه‌های UTS22، UTS3، UTS4، UTS18، UTS6 و UTS29 با ۴۶/۶، ۴۵/۶، ۴۲، ۴۱/۵، ۴۱/۴ و ۴۰ درصد بیشترین میزان ممانعت را از رشد میسلیوم بیمارگر نشان دادند. مونتیرو و همکاران در شرایط آزمایشگاه با استفاده از روش کشت متقابل نشان دادند که جدایه‌های R18(6) و 6(4) باکتری استرپتومایسس به ترتیب با ۳۳/۷ و۴۴/۶ درصد مانع از رشد شعاعی میسلیوم *B. sorokinina* شدند که نتایج ما با این بررسی کاملاً مطابقت داشت (Monteiro *et al*. 2017). در بررسی تولید متابولیت فرار جدایه‌های مورد نظر، جدایه‌های UTS3، UTS18

و UTS4 به ترتیب با ۶۷/۹۶، ۶۱/۳ و ۵۴/۶۳ درصد بیشترین میزان ممانعت را از رشد میسلیوم بیمارگر نشان دادند. متابولیت‌های فرار، محصولات بیوسنتزی خاصی هستند که از متابولیت‌های اولیه مشتق شده‌اند و عمدتاً در گیاهان و میکروارگانیسم‌ها یافت می‌شوند. تاکنون هزاران متابولیت ثانویه فعال از میکروارگانیسم-ها گزارش شده که حدود هزار نوع از این متابولیت‌ها با خاصیت‌های مختلف توسط اکتینومیست‌ها تولید می‌شوند (Olano *et al*. 2008). در بررسی توانایی انحلال فسفات معدنی توسط جدایه‌های مورد نظر، سه جدایه UTS4، UTS6 و UTS22 این توانایی را نشان دادند. فسفر یکی از عناصر غذایی مهم برای رشد گیاهان می‌باشد که کمبود آن عامل مهمی در تولید محصولات کشاورزی بوده و در خاک فرم حلال آن فراوانی کمی داشته و به دو شکل آلی و معدنی یافت می‌شود. از اکتینومیست‌های پروبیوتیک گیاهی به ویژه جنس استرپتومایسس و میکرومونوسپورا گزارش شده که خاصیت حلالیت فسفات دارند و باعث بهبود رشد گیاه در خاک می‌شوند (Hamdali *et al*. 2008). در بررسی توانایی تثبیت نیتروژن، ۴ جدایه مورد آزمایش این توانایی را نشان دادند. یکی از مهم‌ترین راه‌های فراهم کردن نیتروژن برای گیاهانی مانند گندم که فواید زیادی از نظر اقتصادی دارند، از طریق همزیستی گیاه با باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن می‌باشد (Kennedy *et al*. 1997). نیتروژن مهم‌ترین عنصر مورد نیاز گیاهان برای رشد رویشی است. در سال‌های اخیر به دلیل افزایش قیمت جهانی کودهای نیتروژن-دار و مشکلاتی مانند تصعید نیتروژن، آبشویی و تجمع نیترات، بهره‌گیری از تثبیت بیولوژیک نیتروژن که سابقه‌ای بیش از چندین ساله دارد مجدداً با اهمیت بیشتری در کشاورزی پایدار مطرح شده است (Ibanez *et al*. 2008). طی بررسی‌های انجام گرفته، نشان داده شده که جدایه‌های R18(6) و R(6) باکتری استرپتومایسس توانایی تثبیت نیتروژن را دارند و می-توانند باعث افزایش رشد رویشی گندم شوند (Monteiro *et al*. 2017). در بررسی تولید آنزیم کیتیناز، همه جدایه‌های مورد آزمایش توانایی تولید این آنزیم را نشان دادند. از جمله ویژگی شاخص باکتری‌های استرپتومایسس که آن‌ها را برای کنترل برخی از عوامل خسارت‌زای گیاهی مناسب نموده، ترشح آنزیم کیتیناز است. به گونه‌ای که این باکتری‌ها با تولید این آنزیم، تجزیه‌کننده اصلی کیتین و عامل اصلی برگرداندن این ماده سخت به چرخه طبیعت هستند (Deshpand 1986). کیتین به عنوان ماده اصلی تشکیل دهنده در دیواره سلولی قارچ‌ها وجود دارد. به نظر می‌رسد که کیتیناز تولیدی باکتری‌های استرپتومایسس، آنزیم هیدرولیتیک مهمی در لیز کردن دیواره سلولی قارچ است (Nguyen *et al*. 2012). در بررسی تولید آنزیم پروتئاز، همه جدایه‌های مورد آزمایش توانایی تولید این آنزیم را نشان دادند. این آنزیم دیواره سلولی قارچ‌هایی‌که حاوی فیبرهای کیتینی و گلوکانی قرار گرفته در ماتریکسی از پروتئین باشند را تجزیه می‌کند (Harran *et al*. 1996). در واقع این باکتری‌ها طی اسپورزایی، آنزیم‌های خارج سلولی و آنتی‌بیوتیک را به عنوان متابولیت ثانویه ترشح می-کنند و برهم‌کنش استرپتومایسس‌ها با بیمارگرهای قارچی معمولاً مربوط به ترشح آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی مانند سلولاز، همی‌سلولاز، کیتیناز، گلوکاناز، آمیلاز و پروتئاز است (Chater 2010). در بررسی توانایی کلنیزاسیون ریشه گیاه در داخل لوله-های آزمایشگاهی، جدایه‌های UTS3 و UTS22 بیشترین میزان کلنیزاسیون را نشان دادند. بررسی‌های انجام گرفته، نشان داده است که جدایه‌های باکتریایی که ریشه را بیشتر کلنیزه کنند کنترل بهتری از بیماری را نشان می‌دهند. به عبارتی باکتری‌های آنتاگونیست باید قادر به کلنیزاسیون قسمت‌های مختلفی از ریزوسفر گیاه باشند تا بتوانند در فرآیندهایی از قبیل افزایش رشد گیاه و کنترل بیولوژیک موفق نقش موثری ایفا کنند (Queiroz *et al*. 2006). با توجه به ممانعت‌کنندگی بیشتر جدایه-های UTS22، UTS4 و UTS3 از رشد میسلیوم بیمارگر و نتایج مثبت به اغلب فعالیت‌های آنزیمی و فیزیولوژیکی در شرایط آزمایشگاهی، این جدایه‌ها برای بررسی‌های گلخانه‌ای انتخاب شدند. گیاهان

گندم حاصل از بذرهای تیمار شده با سه جدایه UTS22، UTS4 و UTS3 نسبت به تیمارهای شاهد مثبت و منفی درجات مختلفی از شاخص‌های رشدی را نشان دادند. در بررسی میزان شدت بیماری، کاهش قابل توجهی از شیوع بیماری در شرایط گلخانه توسط جدایه UTS22 با ۳۸/۳ درصد در قسمت ریشه مشاهده شد. بررسی‌های انجام گرفته، نشان داده که گیاهان گندم حاصل از بذرهای تیمار شده با دو جدایه R18(6) و 6(4) باکتری استرپتومایسس بیشترین میزان کنترل بیماری را با میانگین ۵۷ درصد علیه قارچ بیمارگر *B. sorokiniana* داشتند (Monteiro *et al*. 2017). نتایج اندازه‌گیری شاخص‌های رشد گیاه گندم، بیانگر افزایش قابل توجه به ویژه در طول ریشه گیاهان حاصل از بذرهای تیمار شده با جدایه UTS22 بود. طی بررسی‌های انجام گرفته، مشخص شده است زمانی که بذرهای گیاه گندم با جدایه‌های اکتینومیست تیمار می‌شوند، در گیاهان تیمار شده تعداد ریشه‌های جانبی، وزن تر و خشک، طول اندام هوایی و ریشه نسبت به شاهد افزایش پیدا می‌کنند (Jog *et al*. 2014). تولید اکسین توسط جدایه‌های باکتری به عنوان مهم‌ترین هورمون افزایش دهنده عملکرد در قسمت ریشه گیاهان شناخته شده که باعث افزایش رشد طولی ریشه و وزن خشک ریشه می‌شود (Khamna *et al*. 2009). بررسی‌های قبلی نشان داده است که گونه‌های مختلف استرپتومایسس (*S. rimosus* و *S. rochei*) جدا شده از ریزوسفر گیاه گوجه‌فرنگی می‌توانند با تولید اکسین، رشد گیاه را با افزایش جوانه‌زنی، طول ریشه و وزن خشک ریشه افزایش دهند (El-Tarabily 2008).

REFERENCES

Acharya K, Dutta AK, Pradhan P (2011) *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem: the most destructive wheat fungal pathogen in the warmer areas. Australian Journal of Crop Science 5(9): 1064–1071.

Baldani VLD, Döbereiner J (1980) Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. Soil biology and biochemistry 12(4): 433-439.

Brizzio S, Turchetti B, De Garcia V, Libkind D, Buzzini P, Van Broock M (2007) Extracellular enzymatic activities of basidiomycetous yeasts isolated from glacial and subglacial waters of northwest Patagonia (Argentina). Canadian Journal of Microbiology 53(4): 519-525.

Buzzini P, Martini A (2002) Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. Journal of Applied Microbiology 93(6): 1020-1025.

Chater KF, Biro S, Lee KJ, Palmer T, Schrempf H (2010) The complex extracellular biology of *Streptomyces*. FEMS Microbiology Reviews 34(2): 171-198.

Delcour J, Hoseney RC (2010) Principles of cereal science and technology authors provide insight into the current state of cereal processing. Cereal Foods World 55(1): 21-22.

Deshpande M (1986) Enzymatic degradation of chitin and its biological applications. Journal of Scientific and Industrial Research 45(6): 273- 281.

Eden PA, Schmidt TM, Blakemore RP, Pace NR (1991) Phylogenetic analysis of *Aquaspirillum magnetotacticum* using polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA-specific DNA. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 41(2): 324-325.

El-Tarabily KA (2008) Promotion of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plant growth by rhizosphere competent 1-aminocyclopropane-1-carboxylic aciddeaminase-producing streptomycete actinomyc. Plant and Soil 308(1-2): 161-178.

Gangwar M, Dogra S, Gupta UP, Kharwar RN (2014) Diversity and biopotential of endophytic actinomycetes from three medicinal plants in India. African Journal of Microbiology Research 8(2): 184-191.

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.

Gupta PK, Chand R, Vasistha N, Pandey SP, Kumar U, Mishra VK, Joshi AK (2018) Spot blotch disease of wheat: the current status of research on genetics and breeding. Plant pathology 67(3): 508-531.

Hamdali H, Bouizgarne B, Hafidi M, Lebrihi A, Virolle MJ, Ouhdouch Y (2008) Screening for rock phosphate solubilizing actinomycetes from Moroccan phosphate mines. Applied Soil Ecology 38(1): 12-19.

Haran S, Schickler H, Chet I (1996) Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. Microbiology 142(9): 2321-2331.

Ibanez F, Taurian T, Angelini J, Tonelli ML, Fabra A (2008) Rhizobia phylogenetically related to common bean symbionts *Rhizobium giardinii* and *Rhizobium tropici* isolated from peanut nodules in Central Argentina. Soil Biology and Biochemistry 40(2): 537-539.

Ja G (2003) Candicidin biosynthesis in *Streptomyces griseus.* Applied and Environmental Microbiology 60(3): 633-642.

Jog R, Pandya M, Nareshkumar G, Rajkumar S (2014) Mechanism of phosphate solubilization and antifungal activity of *Streptomyces* spp. isolated from wheat roots and rhizosphere their application in improving plant growth. Microbiology 160(4): 778-788

Júnior AG, dos Santos ÁF, Auer CG (2000) Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. Floresta 30(1-2): 155-166.

Kennedy IR, Pereg-Gerk L, Wood C, Deaker R, Gilchrist K, Katupitiya S (1997) Biological nitrogen fixation in non-leguminous field crops: facilitating the evolution of an effective association between *Azospirillum* and wheat. Plant and Soil 194(1-2): 65-79.

Khamna S, Yokota A, Lumyong S (2009) Actinomycetes isolated from medicinal plant rhizosphere soils: diversity and screening of antifungal compounds, indole-3-acetic acid and siderophore production. World Journal of Microbiology and Biotechnology 25(4): 649-655.

Khayat maher R, Amoozegar MA, Seyyedmahdi SH, Hamedi J, Naghavi MR, Foroozanfar F, Latifi AM (2012) Isolation and screening of phytotoxin producing actinomycetes and determination of phytotoxin effect spectrum of selected strains. Biological Journal of Microorganism 1(2): 1- 22.

Kraus L, Loper JE (1992) Lack of evidence for a role of antifungal metabolite production by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 in biological control of *Pythium* damping-off of cucumber. Phytopathology 82(3): 264-271.

Kreuze JF, Suomalainen S, Paulin L, Valkonen JP (1999) Phylogenetic analysis of 16S rRNA genes and PCR analysis of the nec1 gene from *Streptomyces* spp. causing common scab, pitted scab, and netted scab in Finland. Phytopathology 89(6): 462-469.

Ledingham RJ, Atkinson TG, Horricks JS, Mils JT, Piening LJ, Tinline RD (1973) Wheat losses due to common root rot in the prairies provinces of Canada 1969-1971. Canadian Plant Disease 53(3): 113-122.

Ling N, Xue C, Huang Q, Yang X, Xu Y, Shen Q (2010) Development of a mode of application of bioorganic fertilizer for improving the biocontrol efficacy to Fusarium wilt. Biocontrol 55(5): 673-683.

Monteiro P, Borba MP, Van Der Sand ST (2017) Evaluation of the antifungal activity of *Streptomyces* sp. on *Bipolaris sorokiniana* and the growth promotion of wheat plants. Journal of Agricultural Science 9(12): 229-240.

Nguyen XH, Naing KW, LeeYS, Tindwa H, Lee GH, Jeong BK, Ro HM, Kim SJ, Jung WJ, Kim KY (2012) Biocontrol potential of *Streptomyces griseus* H7602 against root rot disease (*Phytophthora capsici*) in pepper. The Plant Pathology Journal 28(3): 282-289.

Olano C, Lombo F, Mendez C, Salas JA (2008) Improving production of bioactive secondary metabolites in actinomycetes by metabolic engineering. Metabolic Engineering 10(5): 281-292.

Oliveira MF, da Silva MG, Van Der Sand ST (2010) Anti-phytopathogen potential of endophytic actinobacteria isolated from tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) in southern Brazil, and characterization of *Streptomyces* sp. R18 (6), a potential biocontrol agent. Research in Microbiology 161(7): 565-572.

Palaniyandi SA, Yang SH, Zhang L, Suh JW (2013) Effects of actinobacteria on plant disease suppression and growth promotion. Applied Microbiology and Biotechnology 97(22): 9621-9636.

Patten CL, Glick BR (2002) Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. Applied and Environmental Microbiology 68(8): 3795-3801.

Pieterse CM, Leon-Reyes A, Van derent S, Van Wees SC (2009) Networking by small-molecule hormones in plant immunity. Nature Chemical Biology 5(5): 308-316.

Queiroz BPVD, Aguilar-Vildoso CI, Melo IS (2006) Visualização in vitro da colonização de raízes por rizobactérias. Summa Phytopathologica 32(1): 95-97.

Raza W, Faheem M, Yousaf S, Rajer FU, Yamin M (2013) Volatile and nonvolatile antifungal compounds produced by *Trichoderma harzianum* SQR-T037 suppressed the growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. Science Letter 1(1): 21-24.

Singh PJ, Mehrotra RS (1980) Biological control of *Rhizoctonia bataticola* on gram by coating seed

with *Bacillus* and *Streptomyces* spp. and their influence on plant growth. Plant and Soil 56(3): 475-483.

Sperber JI (1958) The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. Australian Journal of Agricultural Research 9(6): 778-781.

Tinline RD (1977) Multiple infections of subcrown internodes of wheat (*Triticum aestivum*) by common root rot fungi. Canadian Journal of Botany 55(1): 30-34.

Wiese MV (1987) Compendium of wheat diseases. American Phytopathological Society. APS Press.122pp.

Wildermuth GB, McNamara RB (1987) Susceptibility of winter and summer crops to root and crown infection by *Bipolaris sorokiniana*. Plant pathology 36(4): 481-491.

Zhang J, Wang JD, Liu CX, Yuan JH, Wang XJ, Xiang WS (2014) A new prenylated indole derivative from endophytic actinobacteria *Streptomyces* sp. neau-D50. Natural Product Research 28(7): 431-437.