پژوهش های کاربردی در خشک میوه ها
Journal Of Applied Researches In NUTS

Isolation and study of some physiological behaviors of some actinobacterial isolates from pistachio rhizosphere with antagonistic properties against *Phytophthora drechsleri*

Azadeh Rezaizadeh[1], Saeedeh Habibi[1*], TaktamAtai Salami[1]

[1]Departmwnt of Plant Protection, Shahid Bahonar University, Kerman, Iran

*Corresponding author:

s.habibi@mail.uk.ac.ir

Recieved:2024/11/20 Accepted:2025/2/17

Abstract

Crown and root rot disease caused by different species of Phytophtera is one of the most important pistachio diseases. Although various methods have been recommended for the management of this disease, biological control has been considered as an environmentally compatible method. In this research, the antagonistic effect of 3 bacterial strains isolated from the soils of Rafsanjan city on *Phytophthora drechsleri* was investigated in laboratory conditions. Isolates 216, 217, 226 showed the highest inhibition halo with 7.5 and 5.5 mm, respectively. and hydrogen cyanide, the ability to colonize the root and a number of other tests were performed. Finally, the effect of these isolates in the control of the pathogenic oomycetes was measured in the pistachio plant laboratory conditions, and the results were indicative of the control of pathogenic damage in the target traits by these isolates. It is hoped that the selected isolates of this test will be monitored by other researchers and according to their appropriate potential, they will advance to the stages of commercialization or the use of suitable genes for the production of disease-resistant transgenic plants.

Key words: Actinomycete, Biological control, Gummosis, *Phytophthora drechsleri,* Pistachio.

Published by Islamic Azad University, Rafsanjan .This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0) License
/http://creativecommons.org/licenses/by/4.0

پژوهش های کاربردی در خشک میوه ها
Journal Of Applied Researches In NUTS

جداسازی و مطالعه بعضی رفتارهای فیزیولوژیکی چند جدایه اکتینوباکتری از ریزوسفر پسته با خاصیت آنتاگونیستی علیه *Phytophthora drechsleri*

آزاده رضایی زاده[۱]، سعیده حبیبی[۱*]، تکتم عطایی سلامی[۱]

[۱]گروه گیاه پزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

[*]نویسنده مسئول:

s.habibi@mail.uk.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۸/۳۰ تاریخ پذیرش :۲۹/ ۱۱ /۱۴۰۳

چکیده

بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه (گموز) ناشی از گونه‌های مختلف فایتوفتورا یکی از مهم‌ترین بیماری‌های پسته می‌باشد. گرچه روش‌های مختلفی برای مدیریت این بیماری توصیه شده ولی کنترل بیولوژیک به عنوان یک روش سازگار با محیط زیست مورد توجه قرارگرفته است. در این تحقیق تأثیر آنتاگونیستی سه استرین باکتریایی جداسازی شده از خاک‌های شهرستان رفسنجان بر *Phytophthora drechsleri* در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. جدایه های ۲۱۶، ۲۱۷ و ۲۲۶ بیش ترین میزان هاله بازدارندگی را به ترتیب با ۷،۵، ۵/۵ میلی‌متر نشان دادند. جهت درک بهتری از مکانیسم کنترل صورت گرفته توسط این جدایه ها، آزمایش های فیزیولوژیک متعددی از جمله آزمون های آنزیمی، آزمون تولید مواد فرار و سیانید هیدروژن ، توانایی کلونیزه کردن ریشه و تعداد دیگری آزمون انجام پذیرفت. در نهایت اثر این جدایه ها در کنترل اوومیست بیمارگر روی گیاه پسته در شرایط آزمایشگاهی مورد سنجش قرار گرفت و نتایج حاکی از کنترل خسارات بیمارگر در صفات مورد نظر توسط این جدایه ها بود. امید بر آن است که جدایه های منتخب این آزمون توسط محققان دیگر مورد پایش قرار گرفته و با توجه به پتانسیل مناسب آن‌ها تا مراحل تجاری سازی و یا استفاده از ژن های مناسب جهت تولیدگیاهان تراریخته مقاوم به بیمارگر، پیش بروند.

واژگان کلیدی: اکتینومیست، پسته، کنترل بیولوژیک، گموز، *Phytophthora drechsleri*

انتشار این مقاله به صورت دسترسی آزاد با گواهی CC BY-NC ۴.۰ صورت گرفته است.

/http://creativecommons.org/licenses/by/4.0

مقدمه

کشور ایران از نظرسطح زیرکشت و میزان تولید پسته، مقام اول جهان را دارا است و ۵۳ درصد از سطح زیرکشت و۴۷ درصد از میزان تولید جهانی را در سال ۲۰۱۲ به خود اختصاص داده است. بر اساس آخرین گزارش سازمان خوار و بارجهانی، ایران با بیش از۴۷۰ هزار تن بیش ترین تولید پسته را به خود اختصاص داده است و در رتبه اول قراردارد. همچنین در سال ۲۰۱۵ نیز کشور ایران بیشترین تولید پسته را در جهان داشته است (Nuts and Dried Fruits, 2016; Moradi et al., 2015). سطح زیر کشت پسته کشور در سال ۱۳۹۴ از حدود ۲/۶۸ میلیون هکتارسطح باغات کشور (اعم از غیربارور و بارور) حدود ۷۸۵ هزار هکتار معادل ۲۹/۳٪ به میوه های خشک اختصاص داشته که از این مقدار ۸۲/۹۲٪ بارور و ۱۷/۸ ٪مربوط به سطح غیربارور بوده است. سطح پسته از درصد کل میوه های خشک ۵۲/۲٪ بوده است. استان کرمان با ۷۲/۶٪ با تولید میوه های خشک کشور مقام اول را دارا است و چهار استان فارس و خراسان رضوی، یزد، همدان به ترتیب با ۱۱/۱٪، ۱۰/۵، ۷/۲ و ۵/۷ درصد مقام‌های بعدی سطح تولید میوه خشک را به خود اختصاص داده اند. میزان تولید پسته‌ی کشور حدود ۲۶۱/۷۷۹ تن می‌باشد که استان کرمان با ۶۴ درصد تولید پسته‌ی کشور در جایگاه نخست قرار گرفته است (Amar nameh, 2015). مغز پسته به عنوان یکی از خوراکی‌های مطبوع و نیروبخش از زمان‌های دور مورد استفاده انسان قرار گرفته و بعدها در ترکیب خوراکی‌هایی مانند انواع شکلات، بستنی، کیک، شیرینی و غیره وارد شده است. امروزه پسته به عنوان یک آجیل مطبوع و خوشمزه جزء فرهنگ مصرفی بسیاری از ملل قرارگرفته است. از پسته به عنوان آجیلی خون ساز یاد شده است (Abrishami, 1994). به علاوه پسته مقدار فراوانی آهن قابل جذب درخون دارد و نیز در تقویت حافظه مؤثر است. مغز پسته دارای۲۰درصد پروتئین خالص و بیش از۵۰ درصد روغن مایع است. ویتامین‌ها و میزان کارتنوئید و املاح معدنی پسته نیز قابل توجه است. پسته دارای پروتئین، کربوهیدرات و روغن و همچنین منبع عالی فیبرهای غذایی می‌باشد (Mohammadpour et al., 2007).

بطور کلی عوامل مختلفی هم چون آفات، بیماری ها، کمبود آب، شوری و فقر خاک و عوامل طبیعی مختلف مثل سرمازدگی، گرمای شدید و غیره در هر سال زراعی موجب کاهش تولید محصول پسته می شوند. بیماری پوسیدگی فیتوفتورایی طوقه و ریشه پسته (گموز) که توسط گونه‌های مختلف قارچ فیتوفتورا ایجاد می‌شود در ایران و در برخی از نقاط دنیا دارای اهمیت اقتصادی است (Ogawa and English, 1991). طبق گزارش Mohammadi and Haqdel, 2010) میزان درصد مرگ و میر درختان در اثر بیماری فایتوفتورا در برخی باغ های منطقه رفسنجان را تا ۱۱٪ و به طور متوسط ۲/۷٪برآورد کرده اند.(SaberiRiseh et al. (2004 ، گونه‌های *P. citrophthora*، *P. megasperma* ، *P. drechsleri* و *P.cryptogea* را از باغات مختلف پسته در رفسنجان گزارش دادند که در این میان *P. drechsleri* به عنوان گونه‌ی غالب در مناطق مختلف رفسنجان معرفی گردید (SaberiRiseh et al., 2004). بنابراین برای بررسی اثر بازدارندگی اکتینوباکتری ها روی بیماری گموز،گونه *P. drechsleri* انتخاب شد.

مواد و روش ها

جداسازی و کشت اکتینومیست ها

به منظور یافتن عوامل کنترل بیولوژیک موثر علیه بیمارگر، از بین حدود ۱۰۰ جدایه اکتینومیست جدا شده از خاک ریزوسفر درختان پسته باغات قایمیه رفسنجان با مشخصات جغرافیایی ۳۰/۴۸۸۳۳۷ ۵۶/۰۴۸۴۹۰ و همچنین از کاهگل باغ شاهزاده ماهان کرمان با مشخصات جغرافیایی ۳۰/۰۱۷۹۳۱ ۵۷/۲۷۹۱۶۵ ، آزمون های سنجش فعالیت ضد بیمارگری انجام گرفت. نمونه های خاک به مدت ۷ تا ۱۰ روز در معرض هوا، خشک گردیده و سپس از الک با مش ۰/۸ میلی متری عبور داده شدند و تا زمان جداسازی و کشت در پاکت های کاغذی در دمای محیط (۲۵درجه سلسیوس) با درج تاریخ و محل نمونه برداری تا زمان کشت و جداسازی نگهداری گردیدند. به منظور کشت خاک، ۱۰ گرم از نمونه وزن شده با ۹۰ میلی لیتر آب مقطر استریل مخلوط گشت و سپس به مدت ۳۰ دقیقه روی شیکر دوار ۱۳۰ دور بر دقیقه (rpm) قرار داده شد، به مدت ۱۰ دقیقه به حال ساکن رها و از فاز رویی ۱ میلی لیتر برداشته و در ۹ میلی لیتر آب مقطر استریل اضافه گردید و رقت 10^{-2}

بدست آمد. به همین روش سوسپانسیون خاک با رقت های 10^{-3}، 10^{-4}، 10^{-5} و 10^{-6} تهیه گردید(Lee and Hwang, 2002; Saadoun et al., 1999 and 1998). از محیط کشت کازئین-گلیسیرین-آگار (CGA) به عنوان محیط کشت نیمه انتخابی اکتینوباکتری ها استفاده شد (Kuster and Williams, 1964;Dhingra and Sinclair, 1995). پس از تهیه محیط کشت و قبل از توزیع در تشتک های پتری، یک میلی لیتر از رقت های خاک 10^{-3}، 10^{-4}، 10^{-5} و 10^{-6} در کف تشتک های پتری ریخته شد و سپس میزان ۲۰ تا ۲۵ میلی لیتر از محیط کشت با دمای حدود ۴۵ درجه سانتیگراد به آن ها اضافه گردید و به آرامی مخلوط گشت. نمونه ها در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. این آزمایش در ۳ تکرار انجام گردید (Saadoun et al., 1998; Saadoun and gharaibeh, 2002) پس از گذشت ۷ تا ۱۰ روز، پرگنه های اکتینوباکتری‌ها ظاهر شدند. از هر پرگنه کشت خطی روی تشتک های پتری حاوی CGA تهیه و در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد انکوبه گشت. هم چنین برای نگهداری طولانی مدت از هرکدام از پرگنه ها در لوله آزمایش حاوی CGA شیب دار نیز نمونه ای تهیه شد که پس از اطمینان از خالص بودن نمونه ها به دمای ۴ درجه سانتیگراد انتقال یافتند (Shahidi Bonjar, 2004)

تهیه کشت *Phytophthora drechsleri* و اثبات بیماری‌زایی روی ریشه چه پسته

گونه خالص اومیست *Ph. drechsleri* از کلکسیون پژوهشکده پسته رفسنجان تهیه شد.

اثبات بیماری زایی

بذرهای پسته (رقم بادامی ریز زرندی) جهت ضد عفونی، به مدت ۳۰ ثانیه در هیپوکلوریت سدیم ۲٪ قرار داده و سپس ۲ بار به مدت ۲ دقیقه در آب مقطر استریل شست و شو داده شدند. این بذرها در پتری های حاوی آب آگار (۳٪) تا زمان جوانه زنی نگهداری شدند. به منظور تهیه مایه تلقیح، *Ph. drechsleri* در روی تشتک پتری حاوی CMA، به صورت چمنی کشت و سپس روی آن ها کاغذ صافی استریل قرار داده شد. پس از سه تا پنج روز کاغذ صافی آلوده به فایتوفتورا به پتری دیش حاوی آب آگار منتقل شد و بذر های جوانه زده روی آن قرار گرفتند. به عنوان تیمار شاهد، بذر ها روی کاغذ صافی استریل (کاغذ های صافی را داخل فویل آلومینیوم گذاشته سپس درون آون در دمای ۱۲۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه استریل شدند) منتقل شدند. تیمارها در نور و دمای مناسب تا زمان ظهور علائم بیماری که شامل پوسیدگی طوقه و ریشه بود، نگهداری و میزان خسارت نسبت به شاهد به صورت چشمی ارزیابی گشت. این آزمایش در سه تکرار انجام گرفت (Deghat, 2012). از کشت جوان بیمارگر یک دیسک با قطر ۶ میلی متر برداشته و در مرکز پتری دیش حاوی CMA قرار داده شد. سپس از جدایه های استرپتومایسس خالص کشت داده شده روی (CGAکازئین، گلیسرول، آگار) که به مدت ۶ تا ۸ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد انکوبه شده بودند دیسک‌های ۶ میلی متری جدا شده و در فاصله ۳ سانتی متری از دیسک بیمارگر قرار داده شدند. به عنوان شاهد دیسکCGA عاری از میکروب قرار داده شد. این نمونه ها در دمای ۲۸ درجه سلسیوس انکوبه شدند و بر اساس قطر ناحیه ممانعت از رشد، جدایه های فعال انتخاب گردیدند. در نهایت سه جدایه که در شرایط آزمایشگاهی فعالیت مهارکنندگی از رشد مناسبی داشتند، انتخاب شده (جدایه های۲۱۷ و۲۱۶ و۲۲۶) و جهت بررسی ماهیت و خواص مواد موثر مورد بررسی قرار گرفتند.

تعیین ویژگی های مورفولوژیکی جدایه های فعال آنتاگونیست

به منظور بررسی مورفولوژیکی سطح اسپور ها، از میکروسکوپ الکترونی نوع اسکنینگ استفاده گردید.

آزمون زیستی In Vitro جهت تعیین توانایی فعالیت آنتاگونیست

جهت تعیین توانایی جدایه های اکتینومیست در ممانعت از رشد بیمارگر و انتخاب جدایه مناسب از روش کشت متقابل استفاده شد. در این آزمون از کشت جوان فایتوفتورا یک دیسک با قطر ۶ میلی متر برداشته و در مرکز پتری دیش حاوی CMA قرار داده شد. سپس از جدایه های اکتینومیست خالص کشت داده شده روی CGA که به مدت ۶ تا ۸ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد انکوبه شده بودند دیسک‌های

۶ میلی متری جدا شده و در فاصله ۳ سانتی متری از دیسک قارچی قرار داده شدند. به عنوان شاهد دیسک CGA عاری از میکروب قرار داده شد. این نمونه ها در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد انکوبه شدند و بر اساس قطر ناحیه ممانعت از رشد، جدایه های فعال انتخاب گردیدند (Sinclair and Dhingra, 1995).

بررسی تولیدآنزیم های خارج سلولی

یکی از روش‌های عوامل آنتاگونیست در کنترل بیولوژیک، ترشح آنزیم های خارج سلولی مختلف می باشد که موجب از بین رفتن دیواره سلولی قارچ‌ها می شوند. کیتینازها، گلوکانازها، لیپازها و پروتئازها ازجمله این آنزیم ها هستند که در اکثر موارد، خاصیت هم افزایی دارند (Haran et al., 1996).

بررسی توانایی کلونیزه کردن ریشه چه پسته توسط جدایه های اکتینومیست

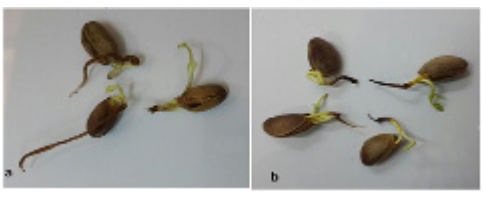
یکی از روش های اکتینومیست ها به عنوان عامل آنتاگونیست در ایجاد مقاومت، کلونیزه کردن ریشه ها می‌باشد که بدلیل اشغال کردن آشیانه اکولوژیک عوامل بیمارگر خاک زاد باعث کاهش خسارت و یا کنترل آن می‌گردند. به منظور بررسی این توانایی ابتدا بذر های پسته شسته و استریل گشت، سپس در محلول حاوی 10^{-6} اسپورهای اکتینومیست به مدت ۲ دقیقه قرار گرفتند. این بذر ها روی کاغذ صافی استریل قرار گرفته روی محیط آب آگار رشد داده شدند. پس از رشد بذرها از قسمت انتهایی ریشه ها نمونه برداری شده و روی پتری دیش حاوی CGA کشت گردید. در صورت رشد اکتینومیست ها، نشان دهنده توانایی آن ها در کلونیزه کردن ریشه ها می باشد (Maghoolet al., 2013). جدایه هایی که بیش ترین میزان بازدارندگی را داشتند از از جنبه های ذیل مورد بررسی قرار گرفتند:تعیین حداقل غلظت بازدارنده از رشد (MIC)، بررسی خاصیت فرار بودن ماده مؤثر ضد فایتوفتورایی، بررسی فعالیت قارچ‌کشی یا قارچ ایستایی (ShahidiBonjar and Karimi Nick, 2004)، تعیین دمای غیر فعال کننده ماده مؤثر (TIP)(KalantarZadeh et al., 2005; ShafiiBaftii et al., 2005) ، آزمون حساسیت به کلروفرم (Daveloset al., 2004)، بررسی حساسیت جدایه های اکتینومیست به آنتی بیوتیک های تجاری (Gulve and Deshmukh, 2011).

بررسی تولیدآنزیم های خارج سلولی

یکی از روش های عوامل آنتاگونیست در کنترل بیولوژیک، ترشح آنزیم های خارج سلولی مختلف می باشد که موجب از بین رفتن دیواره سلولی قارچ ها می شوند. کیتینازها، گلوکانازها، لیپازها و پروتئازها ازجمله این آنزیم ها هستند که در اکثر موارد، خاصیت هم افزایی دارند (Haran et al., 1996).

نتایج

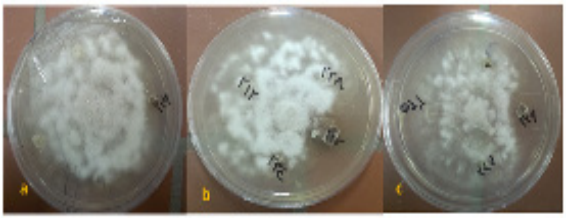
در شرایطی که بذرهای تیمار شاهد رشد مناسبی داشتند، بذرها و گیاهچه های در تعامل با فایتوفتورا علائم بیماری را نشان دادند. بیمارگر بذرها، ریشه و طوقه گیاهچه ها را کلونیزه کرده، باعث نکروز و نازک شدن طوقه ها و پژمردگی گیاهچه‌ها شد (شکل ۱).



شکل ۱- اثبات بیماری زایی *Phytophthora drechsleri* روی بذر پسته، اشکال به ترتیبa شاهد و b گیاهچه نکروز شده با بیمارگر.

غربالگری جدایه های اکتینومیست جهت انتخاب آنتاگونیست

تمامی جدایه های جدا شده در آزمون‌های زیستی شرکت داده شده و فعالیت آن ها علیه فایتوفتورا با سنجش میزان هاله ممانعت از رشد سنجیده شد. از بین جدایه های جدا شده از خاک سه جدایه شامل ۲۱۶، ۲۱۷ و ۲۲۶بر روی فایتوفتورا بیشترین میزان کنترل کنندگی را داشتند که برای انجام آزمایش های بعدی انتخاب شدند (شکل ۲).



شکل ۲- نتایج آزمون زیستی جهت انتخاب جدایه های اکتینومیست فعال مناسب علیه *Phytophthora drechsleri* اشکال a، b و c به ترتیب جدایه های۲۱۶،۲۱۷و ۲۲۶ می باشند.

بررسی توانایی کلونیزه کردن ریشه چه پسته توسط جدایه های اکتینومیست

از چند نقطه از ریشه چه پسته که با سوسپانسیونی از اکتینومیست ها باغلظت $1/5 \times 10^6$ cfu/mLبه صورت جداگانه تیمار شده بودند، قطعاتی جدا شده و در محیط کشتCGA به صورت خطی کشت شدند. نتایج حاکی از رشد و توانایی کلونیزه کردن جدایه ی ۲۱۶ بودند .

بررسی اثر جدایه ۲۲۶ اکتینومیست بر روی رشد ریشه چه پسته در شرایطIn Vitro

پس از گذشت ۲-۳ روز و بررسی های چشمی مشخص شد که جدایه اکتینومیست۲۲۶، سبب افزایش رشد و بهبود کیفیت گیاهچه ها نسبت به تیمار شاهد شد (شکل۳).

شکل۳- نتایج بررسی ظاهری اثر جدایه های اکتینومیست بر روی رشد ریشه چه های پسته در مقایسه با شاهد. a- تیمار شاهد. b- جدایه ۲۲۶. جدایه اکتینومیست سبب افزایش رشد و بهبود کیفیت گیاهچه ها نسبت به تیمار شاهد شدند. این نتایج فقط به صورت چشمی مورد مشاهده قرار گرفت و بررسی آماری در آن ها به عمل نیامد.

تعیین حداقل غلظت بازدارنده از رشد(MIC)

MIC برای جدایه۲۱۶، ۰/۱۵۶ میلیگرم بر میلی لیتر بود.

تعیین دمای غیر فعال کننده ماده مؤثر (TIP)

پس از اعمال دماهی مختلف به عصاره های حاوی ماده مؤثر جدایه های اکتینومیست و انجام آزمون زیستی چاهک، میزان هاله ممانعت از رشد اندازه گیری شد و در دماهای تست شده هیچکدام از دماها غیر فعال کننده ماده موثر نبودند (جدول ۱).

جدول ۱- قطر هاله ممانعت از رشد پس از تیمار عصاره خام جدایه ۲۲۶ اکتینومیست آنتاگونیست در دماهای مختلف

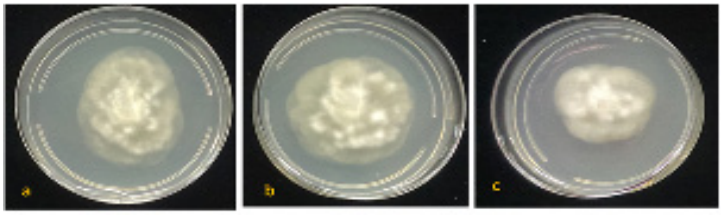
دما(c)	قطر هاله ممانعت از جدایه ۲۲۶ (mm)
۴۰	۲/۳
۶۰	۷/۱
۸۰	۱/۱
۹۰	۵/۱
۱۰۰	۵/۰
۱۲۰	۵/۰
۱۴۰	۵/۰
۱۶۰	۳/۰

بررسی خاصیت فرار بودن ماده مؤثر علیه فایتوفتورا

سرعت رشد فایتوفتورا در هر سه تیمار نسبت به تیمار شاهد یکسان بود .

بررسی فعالیت قارچ کشی و یاقارچ ایستایی

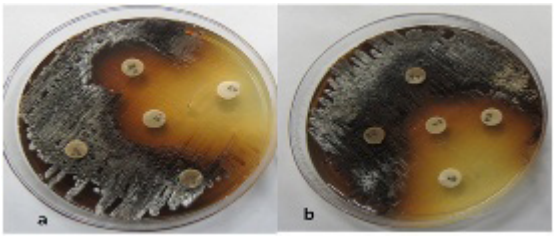
رشد فایتوفتورا از دیسک های منتقل شده به محیط کشت هر سه تیماردیده شد، که نشان دهنده فعالیت قارچ ایستایی می باشد (شکل ۴).



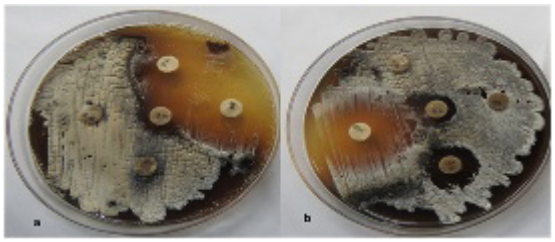
شکل۴- نتایج حاصل از آزمون تعیین فعالیت قارچ کشی/ قارچ ایستایی، نشان دهنده فعالیت قارچ ایستایی در هر سه جدایه می باشد. اشکال a، b و c به ترتیب جدایه های ۲۱۶، ۲۱۷ و ۲۲۶می باشند.

بررسی حساسیت جدایه های اکتینومیست به آنتی بیوتیک های تجاری

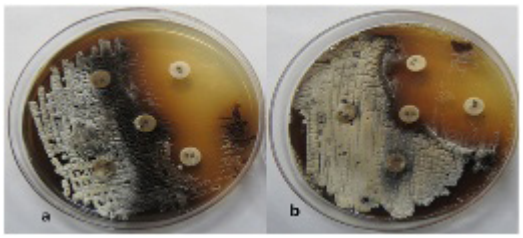
جدایه های اکتینومیست نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف رفتار متفاوتی نشان دادندکه درشکل ۵-۷ نشان داده شده است.



شکل۵- بررسی حساسیت اکتینومیست جدایه ۲۱۶ به آنتی بیوتیک های تجاریa- حاوی دیسک‌های آنتی بیوتیک اریترومایسینE، سفیکسیمCFM، جنتامایسینGM، استرپتومایسینS ، سولفامتوکسازولSXT، b- حاوی دیسک های آنتی-بیوتیک، تتراسیکلینTE، کانامایسینK، پنیسیلینP، سفالوتینCF.



شکل۶- بررسی حساسیت اکتینومیست جدایه ۲۱۷ به آنتی بیوتیک های تجاری.a- حاوی دیسک های آنتی بیوتیک پنیسیلینP، اریترومایسینE، تتراسیکلینTE، کانامایسینK، سفالوتینCF. b- حاوی دیسک های آنتی بیوتیک سولفامتوکسازول SXT، استرپتومایسینS، جنتامایسینGM، سفیکسیمCFM.



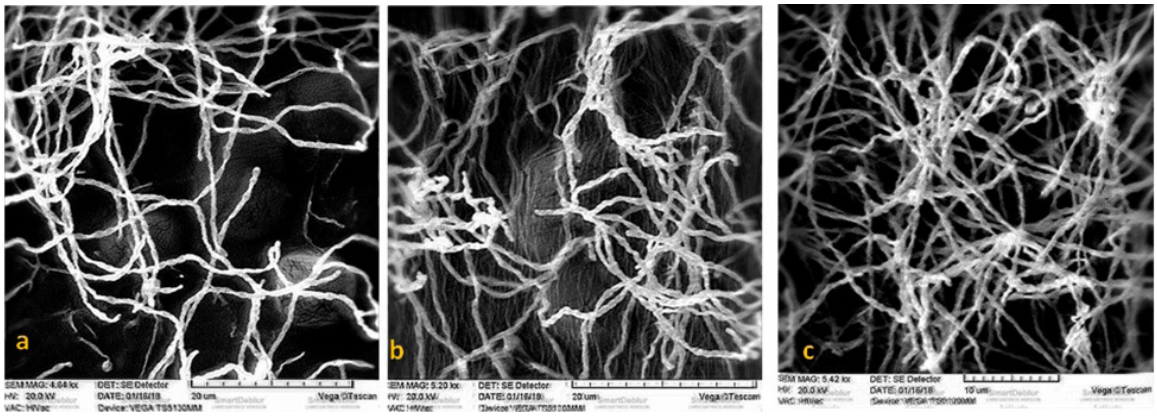
شکل۷- بررسی حساسیت اکتینومیست جدایه ۲۲۶ به آنتی بیوتیک‌های تجاری.a- حاوی دیسک های آنتی بیوتیک سفالوتینCF، پنیسیلینP ، تتراسیکلینTE، کانامایسینK. b- حاوی دیسک های آنتی بیوتیک سفیکسیمCFM، ، استرپتومایسین S، اریترومایسینE، جنتامایسینGM. سولفامتوکسازولSXT.

بررسی تولید آنزیم های خارج سلولی

مشاهدات نشان دهنده تنوع بین تولیدات آنزیمی اکتینومیست جدایه می باشد.

الکترومیکروگراف میکروسکوپ الکترونی

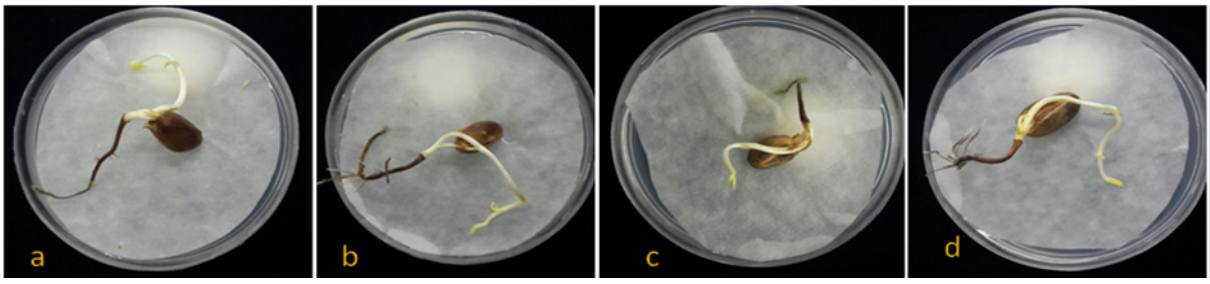
در الکترومیکروگراف میکروسکوپ الکترونی زنجیره اسپورها و توپولوژی سطح استرپتومایسس ها مشخص است (شکل۸).



شکل۸- الکترومیکروگراف میکروسکوپ الکترونی نگاره (Scanjng Electron Microgroscop) از استرپتومایسس های جدایه هایa ،۲۱۶ b، ۲۱۷ ،۲۲۶c.زنجیره اسپورها و توپولوژی سطح آن‌ها در مرکز عکس نشان داده شده است.

مطالعات In Vitro

پس از جوانه زدن بذر های پسته وقرار دادن در پتری دیش حاویWA ۱٪ ، بذرهای حاصل با قارچ و اکتینومیست مایه کوبی شدند، به مرور زمان خسارت قارچ بیمارگر به گیاهان قابل مشاهده بود و تعدادی از بذرها دچار زوال شده و از بین رفتند. علائم مذکور در شکل ۹ قابل ملاحظه است.



شکل۹- به ترتیب، a- شاهد، b-اکتینومیست جدایه ۲۲۶،c- فایتوفتورا، d- بیمارگر+جدایه ۲۲۶

بحث و نتیجه گیری

در سال‌های اخیر پژوهش‌های زیادی در زمینه مبارزه بیولوژیک با بیماری‌های گیاهی صورت پذیرفته است. جنس *Streptomyces* به عنوان یکی از غالب‌ترین میکروفلورهای هوازی ریزوسفر در بسیاری از گیاهان معرفی می‌گردد (Al-Quwaie, 2024). چندین خصوصیت دارند که به آن‌ها توانایی عمل به عنوان عوامل بیوکنترل در ریزوسفر را می دهد؛ سویه های مختلف آن با تولید هورمون‌های مختلف، فراهم آوردن عناصر غذایی و کلونیزه کردن ریشه، آنتی بیوز علیه بیمارگرهای خاک زاد گیاهی، سنتز آنزیم های خارج سلولی خاص و تجزیه توکسین های گیاهی حائز اهمیت هستند و سبب افزایش معنی‌داری در رشد و محصولات گیاهی می‌شوند (Gill and Warren, 1988). در این مطالعه، تلاش شد تا جدایه هایی از اکتینومیست های خاکزی را جداسازی نموده و از حیث برخورداری از اثرات آنتاگونیستی علیه *Phytophthora drechsleri* که مولد بیماری گموز پسته است، مورد ارزیابی و غربالگری قرار گیرند. پس از جداسازی ۳۰ توده خاک ،۲۵۶ جدایه که از نظرشکل پرگنه متفاوت بودند، خالص سازی شد. یافته های این تحقیق نشان داد که تنها ۳ جدایه از میان بیش از ۲۵۶ جدایه خالص سازی شده، دارای ترکیبات علیه بیمارگر مذکور می‌باشند. فعالیت آنتاگونیستی این جدایه ها، مبین اهمیت و توان بالقوه آن‌ها برای بررسی های بیشتر، پیرامون کاربرد به عنوان عوامل بیوکنترل است. هر چند، باید در نظر داشت که تمامی جداسازی آزمایشگاهی از جمله پژوهش حاضر، تنها امکان انتخاب اولیه کاندیدهای مناسب بیوکنترل را فراهم می آورند. به منظور بررسی مکانیسم‌های درگیر در پدیده آنتاگونیستی، تولید آنزیم‌های خارج سلولی مختلف مثل لیپاز، پروتاز، آمیلاز، ژلاتین و کازیین توسط جدایه های فعال بررسی شد. نتایج نشان داد که این جدایه ها، از حیث تولید این آنزیم‌ها بسیار توانمند هستند. در آزمون سنجش حداقل غلظت بازدارنده، MIC برای جدایه ۲۲۶، ۰/۱۵۶ میلی گرم بر میلی لیتر بدست آمد که می توان نتیجه گرفت که احتمالا از نظر آنتاگونیستی، اثر بسیار خوبی در کنترل بیمارگر مورد مطالعه دارا باشد. در ادامه برای بررسی اثر متابولیت های ثانویه جدایه ها بر دیواره و غشا سلولی، آزمون های متعددی صورت گرفت که نشان دهنده ترشح آنزیم های تجزیه کننده لیپیدها و نشاسته و پروتئین ها در هر سه جدایه ۲۱۶، ۲۱۷ و۲۲۶ می بود. هم چنین دو جدایه۲۱۷، ۲۲۶ قادر به تجزیه سیترات جهت مصرف بودند، اما هیچ یک قادر به مصرف گلوکز به عنوان تنها منبع کربن نبودند. در بررسی توانایی کلنیزاسیون ریشه، جدایه ۲۲۶ توانایی کلنیزاسیون ریشه را در شرایط آزمایشگاه داشت. جدایه ۲۲۶ که از ریزوسفر پسته جدا شده بود، با سوسپانسیون اکتینومیست پوشانده شد و افزایش رشد ریشه چه به صورت چشمی مورد ارزیابی قرار گرفت که نشان دهنده افزایش رشد ریشه چه در مقایسه با تیمار شاهد بود. این تحقیقات باعث حفظ سلامت محیط زیست شده و از آنجایی که کشاورزی ارگانیک به عنوان یک سیستم مدیریت اکوسیستم شناخته می شود که از هیچ ماده غیرطبیعی برای رشد و کشت محصولات استفاده نمی کند، از اصول عمده در کشاورزی ارگانیک و در کشاورزی پایدار نیز است (Carrié et al. 2024). در مجموع، تحقیق انجام شده گام اولیه در جهت اهداف فوق بوده و امید است محققین دیگر در پیشبرد اهداف دراز مدت این مطالعه نقش مؤثری ایفا نمایند.

منابع

1. Abrishmi, M.H. 1994. Iranian pistachio (historical knowledge). Academic publishing center. 669 P. (In Persian)
2. Agricultural Statistics for 2018-19: Crops (Volume 1), Statistics and Information Technology Office, Deputy for Planning and Economics, Ministry of Agricultural Jihad (in Persian).
3. Al-Quwaie, D.A. 2024. The role of Streptomyces species in controlling plant diseases: a comprehensive review. Australasian Plant Pathology, 53(1): 1-14.
4. Carrié, R., Smith, H.G. and Ekroos, J. 2024. Sensitivity to agricultural inputs and dispersal limitation determine the response of arable plants to time since transition to organic farming. Journal of Applied Ecology, 61 (6): 1227-1242.
5. Dhingra, O.D. and Sinclair, J.B. 1995. Basic plant pathology methods'. CRC Press: USA, pp: 287- 296, 390- 391.
6. Gill, P.R. and Warren, G.J. 1988. An iron –antagonized fungistatic agent that is not required for iron assimilation from a fluorescent rhizosphere pseudomonad. Journal of Bacteriology, 170: 163-170.
7. Gulve R.M. and Deshmukh, A.M. 2011. Enzymatic activity of actinomycetes isolated from marine sediments. Recent Research in Science and Technology, 3: 80-83.
8. Haghdel, M. 2005. Harmful nematodes of pistachio. Ministry of Agriculture, Agriculture research and Education Organization. Iran Pistachio Researc Institute 34. 24 p. (In Persian)
9. KalantarZadeh, M and ShahidiBonjar, G.H and Rashid Farrokhi, P and Ghasemi, A. 2005. Biological Control of *Streptomyces scabies* and *S. acidiscabies*, the Major Causal Agents of Potato Common Scab in Iran by Use of Streptomyces Antagonists, 04th National Biotechnology Congress of Iran, Kerman.
10. Meghni, N. and Shahidi Banjar, G.H. 2012. Evaluation of Streptomyces isolated from the soils of Erzuyeh, Bardsir, Sirjan and Kerman cities in the biological control of Fusariosis disease of crown and root of wheat. Thesis for obtaining a master's degree in the field of plant pathology, Shahid Bahonar University, Kerman. 73 p. (In Persian).
11. Mohammadi, A.H. and Haqdel, M. 2010. Strategic Document of Iran Pistachio Research, Republic Publishing House, first edition, seventh section, 371-419. (In Persian)
12. Mohammadpour, V., Mosavian, M.T.H. and Etemadi, A. 2007. Determination of effective diffusivity and activation energy of shelled pistachio by fluidized bed dryer. Iranian food science and technology research journal, 2: 1-12.
13. Ogawa, J.M. and English, H. 1991. Diseases of temperate zone tree fruit and nut crop. University of California, Division of Agriculture and Natural Resources. 461 p.

14. Saadoun, I., Al-Momani, F. and Elbetieha, A. 1999. Genetic determinants of active antibiotic-producing soil Streptomycetes. The New Microbiologica, 22 (3): 233-239.

15. SaberiRiseh, R. Hajiegharari, B. Rohani, H. and Sharifi Tehrani, A. 2004. Effect of inoculums density and substrate type on survival of *Phytophthora drechsleri* in pistachio orchards, Rafsanjan. 50th International symposium on crop protection (Ghent Belgium). 167 p.

16. Saberi-Riseh, R., Sharifi-Tehrani, A., Khezri, M., Ahmadzadeh, M. and Nikkhah, M.J. 2006. Study on biocontrol of *Phytophthora citrophthora*, the causal agent of pistachio gummosis. Acta Horticulture (ISHS), 726: 627-630.

17. ShahidiBonjar, G.H., Fooladi, M.H. Mahdavi, M.J. and Shahghasi, A. 2004. Broadspectrim, a novel antibacterial from *Streptomyces* sp. Biotechnology, 3: 126-130.

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