علوم و تکنولوژی محیط زیست، دوره بیستم، شماره سه ، پاییز ۹۷

جداسازی، شناسایی و ارزیابی فعالیت اکتینوباکتری های مزارع گندم به منظور کنترل زیستی آفات قارچی

مجید گذری[۱]

ماریا محمدی زاده[۲]

محسن گذری*

M_gozari@yahoo.com

مریم رفعتی[٤]

تاریخ دریافت: ۹۴/۷/۱۷ **تاریخ پذیرش:۹۴/۱۰/۲۶**

چکیده

زمینه و هدف: امروزه آفت‌کش‌ها به‌منظورحفظ امنیت غذایی به‌طورگسترده‌ای درسراسرجهان مورداستفاده قرارمی‌گیرند. به دلیل اثرات نامطلوب و ماندگاری بالا، این ترکیبات ازآلاینده‌های مهم محیط‌زیست محسوب می‌شوند. روش‌های کنترل زیستی آفات به‌عنوان بهترین جایگزین برای آفت‌کش‌های شیمیایی به شمار می‌روند. این مطالعه باهدف جداسازی و شناسایی اکتینوباکتری های مولد ترکیبات ضد قارچی در مقابل قارچهای*Aspergillus niger* عامل آفت انباری گندم و *Bipolaris* sp. عامل پوسیدگی ریشه و طوقه از خاک مزارع گندم منطقه حاجی‌آباد استان هرمزگان انجام گردید.

روش بررسی: در این مطالعه نمونه‌برداری از ۳ مزرعه گندم انجام شد. برای جداسازی اکتینوباکتری ها از دو محیط کشت عصاره خاک آگار و نشاسته کازئین آگار استفاده شد. ارزیابی فعالیت ضد قارچی ایزوله ها با روش انتشار از چاهک انجام گردید. شناسایی ایزوله های مولد با استفاده از روشهای مورفولوژیک، بیوشیمیایی، فیزیولوژیک و ژنتیک صورت گرفت.

یافته‌ها: در کل حدود ۲۰۷ ایزوله اکتینوباکتری جداسازی گردید. نتایج بیانگر برتری محیط کشت عصاره خاک آگار با جداسازی ۱۲۵ ایزوله اکتینوباکتری بود. نتایج تیمار فیزیکی برتری تیمار حرارتی با جداسازی ۸۵ ایزوله اکتینوباکتری را نشان داد. بدنبال آن تیمار خشک‌کردن و تیمار اشعه فرا بنفش با جداسازی به ترتیب ۵۷ و ۴۴ ایزوله قرار گرفتند. ارزیابی فعالیت ضد قارچی در مورد ۱۰۰ ایزوله متمایز از لحاظ مورفولوژیک منجر به انتخاب ۲ ایزوله فعال در مقابل قارچهای بیماریزای *Aspergillus niger* و *Bipolaris* sp.

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد مدیریت محیط زیست ، دانشکده مهندسی منابع طبیعی ،دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بندرعباس، ایران

۲- استادیار، گروه مدیریت محیط زیست ،دانشکده مهندسی منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بندرعباس، ایران

۳- دکتری تخصصی میکروبیولوژی، بخش بیوتکنولوژی، پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی ایران *(مسوول مکاتبات)

۴- باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد تهران شمال ، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

گردید. شناسایی ایزوله های مولد بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیک، بیوشیمیایی و فیزیولوژیک تعلق ایزوله‌های مولد به جنس استرپتومایسس را نشان داد. نتایج حاصل از شناسایی ژنتیکی و تطابق توالی ژن 16s rRNA سویه‌های مولد و آنالیز فیلوژنتیک بیانگر ترادف ٪۹۹ درصدی سویه- *Streptomyces* sp. MG-۱۱ با *Streptomyces albus* و ترادف ٪۹۹ درصدی سویه ۲۱- *Streptomyces* sp. MG با *Streptomyces griseus* داشت.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج این پژوهش دو سویه ۱۱- *Streptomyces sp.* MG و ۲۱- *Streptomyces sp.* MG به‌عنوان کاندیداهای مناسب به منظور مطالعات کنترل زیستی بیماری‌های قارچی در مزارع گندم پیشنهاد می گردند.

واژه های کلیدی: کنترل زیستی، آفت انباری گندم،پوسیدگی ریشه و طوقه گندم، اکتینوباکتری ها

J.Env. Sci. Tech., Vol 20, No.3, Autumn, 2018

Isolation, identification and evaluation of the Actinobacteria derived from wheat farms to perform biological control of fungal *diseases*

Majid Gozari[1]
Maria Mohammadizadeh[2]
Mohsen Gozari[3]*
M_gozari@yahoo.com
Maryam Rafati [4]

Admission Date:January 16, 2016 Date Received: October 9, 2015

Abstract

Background and Objective: Nowadays pesticides are extensively used to protect food security worldwide. Due to their undesirable effects, they are considered as important environmental pollutants. Methods for pest biological control are enumerated as an alternative for chemical pesticide. This study was performed to isolate and identify the antifungal-compound-producing Actinobacteria against *Aspergillus niger* fungi (*stored* product *pest)* and *Bipolaris* sp. (responsible for root and crown rot disease) from wheat farms of Hajiabad region, Hormozgan province.

Methods*:* Three farming sites were sampled in this study. Actinobacteria were isolated by soil extract agar and starch casein agar media. Antifungal activities were evaluated by well diffusion agar method. Potent isolates were identified through morphological, physiological, biochemical, and genetic analysis.

Findings: Approximately a total number of 207 Actinobacteria isolates were isolated. From two isolation media, the soil extract agar yielded 125 isolates and exhibited more efficacy. Results of physical treatments showed that heat treatment could isolate 85 colonies and followed by desiccation and UV treatments by 57 and 46 colonies respectively. Evaluation of the antifungal activities of 100 morphologically distinct isolates revealed that only two isolates exhibited antifungal activity against *Aspergillus niger* and *Bipolaris* sp. Identification of potent isolates according to morphological, biochemical and physiological properties showed that these isolates belong to *Streptomyces* genus. Genetically, identification and phylogenetic analysis based on16srRNA gene revealed a high similarity between *Streptomyces* sp. MG-11 and *Streptomyces albus* (similarity: 99%) and between *Streptomyces* sp. MG-21 and *Streptomyces griseus* (similarity: 99%).

Discussion and Conclusions: Results of this study suggest that *Streptomyces sp.* MG-11 *and Streptomyces* sp. MG-21 can be considered as appropriate candidates for biological control studies against the selected fungal diseases in wheat farms.

Keywords: Biological Control, *Stored* Product *Pests*, Root and Crown Rot of Wheat, Actinobacteria

1- M.Sc. in Environmental Management, Department of Environmental Management, Bandar Abbas Branch, Islamic Azad University, Bandar Abbas, Iran
2- Assistant Professor, Department of Environmental Management, Bandar Abbas Branch, Islamic Azad University, Bandar Abbas, Iran
3- Department Biotechnology, Persian Gulf and Oman Sea Ecological Research Institute, Iranian Fisheries Research Organization, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO)-Bandar Abbas-Iran* (Corresponding Author)
4- Young Researchers and Elite Club, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

مقدمه

علیرغم کاربرد گسترده روش‌های کنترل شیمیایی برای مقابله با بیماری‌های قارچی در کشاورزی، اثرات نامطلوب آن‌ها مانند بروز مقاومت به قارچ‌کش‌های شیمیایی و آلودگی محیط‌زیست توجه روزافزونی را به استفاده از راهکار مبارزه بیولوژیک معطوف نموده است(۱). استفاده بی‌رویه از آفت‌کش‌ها درکشاورزی بدون توجه به مخاطرات زیست‌محیطی سبب آلودگی محیط‌زیست به ویژه منابع‌آبی‌می‌گردد. پساب‌های‌کشاورزی ازمضرترین منابع‌آلاینده محیط‌زیست می‌باشند(۲) اثرات مخرب و شدید آفت‌کش‌های شیمیایی‌برمحیط‌زیست از قبیل کاهش تنوع زیستی اکوسیستم‌ها،درخطر قرار دادن گونه‌های در معرض انقراض و اثرات کشنده بر حیات‌وحش و پرندگان،به کارگیری آن‌ها را مخاطره‌آمیزمی‌سازد(۳). مطالعات اخیر بیانگر قرارگیری ۶۲ گونه پرنده درخطر انقراض به دلیل استفاده از آفت‌کش‌ها در کشور کانادا و نیز کاهش ۴ درصدی پرندگان زمین‌های کشاورزی در امریکا می‌باشد(۴). فرآورده‌های کنترل زیستی عملکرد موفقیت‌آمیزی در راستای حفاظت از اکوسیستم‌های طبیعی و توسعه برنامه‌های بازسازی محیط‌زیست در سراسر جهان ایفا می‌کنند(۵). از میان روش‌های کنترل زیستی آفات، عوامل کنترل میکروبی با کاربردی مشابه آفت‌کش‌های شیمیایی از بهترین جایگزین‌ها می‌باشند. کنترل میکروبی آفات در کشورهای در حال‌توسعه اهمیت روزافزونی یافته است(۶). قارچ *Aspergillus niger* یکی ازآفات انباری گندم می‌باشد.این قارچ با رشد روی گندم سم اکراتوکسینA را تولید می‌نماید که به‌عنوان آلاینده دانه‌های حبوبات وغلات مانندگندم و جوشناخته‌شده و در مهره‌داران وگیاهان مسمومیت حاد ایجاد می‌نماید(۷). قارچ *Bipolaris* sp. عامل بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه گندم می‌باشد. خسارت این بیماری درکشورهای مختلف متغیرگزارش‌شده است. در برزیل ۹ تا ۲۳ درصد(۸) ،دراسترالیا ۶ تا۴۴ درصد (۹) و درکانادا ۳۰تا۳۵ درصد(۱۰)، خسارت ایجاد نموده است. درایران خسارت سالیانه بیماری پوسیدگی ریشه گندم۳ تا ۱۲/۵ درصد گزارش‌شده است (۱۱). اساس رسیدن به توسعه عوامل کنترل میکروبی آفات، جداسازی و شناسایی سویه‌های مؤثر و مناسب در مقابل آفات است (۱۲). در این زمینه اکتینوباکتری ها به‌عنوان بخش مهمی از فلور میکروبی خاک و رسوبات دریایی در زمینه های مختلف مورد مطالعه قرارگرفته‌اند (۱۴،۱۳). این باکتری‌ها با مکانیسم های مختلف از قبیل تولید آنتی‌بیوتیک نقش مهمی را در میان-کنش‌های رقابتی و کنترل قارچ‌های بیماری‌زای خاک زاد ایفا می نمایند(۱۵). در یک پژوهشWan و همکارانش در سال ۲۰۰۸ یک ترکیب ضد قارچی فرار را ازباکتری*Streptomyces platensis* تولید نمودند(۱۶).Coombs و همکارانش در سال ۲۰۰۴ بیان کردند که اکتینوباکتری‌های اندوفیت دارای قابلیت کنترل زیستی بیماری‌های قارچی گندم می‌باشند (۱۷). Doohan و khan در سال ۲۰۰۹ موفق شدند با استفاده ازباکتری‌های *Pseudomonas fluorescens* سویه‌های Mkb۲۴۹، Mkb ۱۵۸ و *frederiksbergensis Pseudomonas* سویه ۲۰۲، شدت علایم بیماری فوزاریوم سنبله گندم که توسط قارچ *Fusarium culmorum* در گندم و جو ایجاد شده بود را کاهش دهند. این مطالعه با هدف جداسازی و شناسایی قابلیت کنترل زیستی اکتینوباکتری‌های موجود در خاک‌های مزارع گندم منطقه حاجی‌آباد استان هرمزگان به منظور مقابله با قارچ‌های*A. niger* و *Bipolaris* sp. انجام گردید (۱۸)

مواد و روش‌ها

۱- میکروارگانیسم‌های مورداستفاده درتحقیق: در این پژوهش سویه‌های قارچی *A. niger* عامل بیماری آفت انباری گندم و PTCC۱۵۰۵۷ : *Bipolaris* sp. PTCC ۵۲۲۵ مورداستفاده قرارگرفتند.

۲- نمونه‌برداری

ازبین سایت‌های کشت گندم منطقه حاجی‌آباداستان هرمزگان سه سایت و درهرسایت ۵ ایستگاه انتخاب شد ونمونه خاک با استفاده از مدل زیگزاگی و به‌صورت تصادفی جمع‌آوری گردید(

1. Persian Type Culture Collection

۱۹). نمونه‌های خاک از بخش‌های مختلف خاک شامل ریزوسفر و عمق۰ تا ۳۰ سانتی‌متری از سطح خاک جمع‌آوری و پس از انتقال به ظروف شیشه‌ای استریل به آزمایشگاه منتقل شدند.

۳- جداسازی و خالص‌سازی اکتینوباکتری‌ها

برای افزایش جداسازی اکتینوباکتری‌ها پیش تیمارهای فیزیکی مختلف شامل تیمارهای حرارتی، خشک‌کردن در هواو تیمار پرتو فرابنفش بر روی نمونه‌ها انجام شد.نمونه‌های تیمار شده با استفاده از روش رقت متوالی تا رقت ۰/۰۰۱رقیق‌سازی و با روش پخش کردن در سطح محیط‌های کشت نشاسته کازیین آگار وعصاره خاک آگار به میزان۲۰۰µl کشت داده شدند. محیط‌های کشت تلقیح شده به مدت ۴ هفته در دمای ۲۸C° درجه سانتی‌گراد گرماگذاری گردیدند(۲۰).

۴- بررسی فعالیت ضدقارچی جدایه های اکتینوباکتری

فعالیت جدایه های خالص‌شده اکتینوباکتری‌ها علیه قارچ‌های*A. niger* و .*Bipolaris* sp با استفاده از روش انتشار از چاهک مورد بررسی قرار گرفت. از محیط کشت‌های HTB[1](بر اساس فرمول (DSMZ[2] وISPII (تهیه شده از شرکت Hi media) برای ارزیابی تولید ترکیب ضدمیکروبی توسط ایزوله‌های اکتینوباکتری استفاده شد. به هرکدام از محیط‌های کشت سوسپانسیون اسپوری با رقت 10^7 بر میلی‌لیتر به میزان ۵ درصد حجم محیط کشت تلقیح گردید. سپس محیط‌های تلقیح شده در انکوباتور شیکردار در دمای ۲۸C° به مدت ۵ روز با دور۲۲۰ دور بر دقیقه گرماگذاری گردیدند. پس از اتمام دوره گرماگذاری، نمونه‌گیری از محیط‌های کشت حاوی باکتری انجام شد. نمونه‌ها به درون میکروتیوب ریخته شدند و پس از سانتریفیوژ با دور g۴۰۰۰ به مدت۲۰دقیقه مایع رویی برداشته شد. ۱۰۰ میکرولیتر از مایع رویی هر یک از ایزوله‌ها به درون چاهک‌های تعبیه‌شده (به قطر ۴mm) در محیط سیب زمینی دکستروز آگار تلقیح شده با قارچ بیماری‌زای موردنظر با حجم ۲۵ میلی‌لیتر اضافه گردید و قطر هاله ممانعت از رشد ایجادشده پس از ۴ روز مورد بررسی قرار گرفت(۲۱).

۵- شناسایی سویه‌های مولدترکیبات ضد قارچی

خصوصیات مورفولوژیک سویه‌ها با استفاده از تصاویر میکروسکوپی بررسی گردید(۲۲). خصوصیات بیوشیمیایی ایزوله‌های مولد منتخب با استفاده از محیط‌های کشت های ISP از نظر مصرف منابع مختلف کربن و نیتروژن و نیز خصوصیات فیزیولوژیک از قبیل تولید آنزیم های مختلف مورد بررسی قرار گرفتند(۲۳). به‌منظور شناسایی ژنتیکی سویه‌ها با DNA آن‌ها با استفاده از روش CTAB استخراج گردید. به دنبال آن ژن 16srRNAسویه‌ها با استفاده ازپرایمر های۹fو R ۱۵۴۱تکثیرشده و بعد از خالص‌سازی به منظور تعیین توالی به همراه 5 µl پرایمر (برای هر نمونه)، به شرکت Promega ارسال شد. پس از تعیین توالی نوکلئوتیدی ژن 16srRNA مربوط به ایزوله‌های موردنظر، توالی‌های به‌دست‌آمده با توالی‌های موجود در بانک ژن مورد آنالیز قرار گرفت (۲۴).

۶- آنالیز فیلوژنتیک و ثبت ژن

به منظور اطمینان از صحت تعیین توالی ژن16s rRNA سویه‌های منتخب از نرم افزار DNA base 4.10 استفاده شد. به دنبال آن توالی های آنالیز شده در مقابل توالی‌های ژن16s rRNA سایر گونه‌های موجود در بانک ژن NCBI بوسیله نرم افزار Megablast مورد مطابقت قرار گرفت. ثبت ژن توالی های بدست آمده بوسیله نرم‌افزار Banklt در بانک ژنNCBI انجام شد و پس از اعتبار سنجی از سوی NCBI توالی های مورد نظر با شماره‌های دستیابی KJ028023 و KJ028024ثبت گردید. آنالیز فیلوژنتیک سویه های منتخب با استفاده از نرم افزار MEGA6 انجام شد.

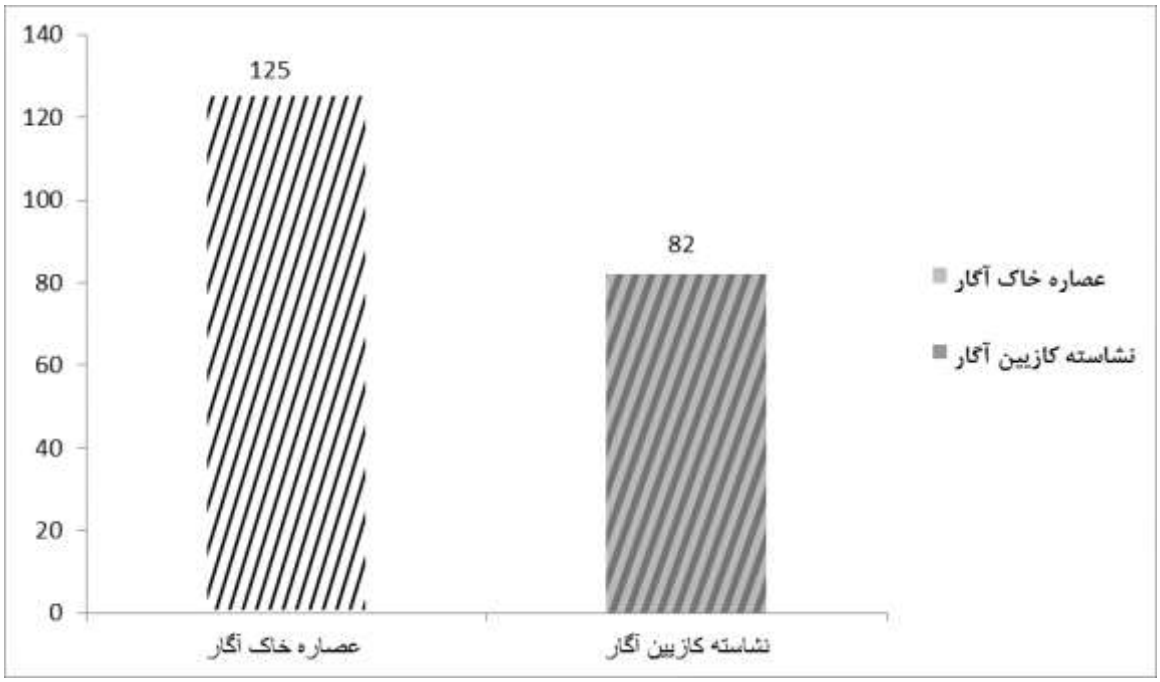
نتایج

۱- جداسازی اکتینوباکتری‌ها از نمونه‌های جمع‌آوری‌شده

به دنبال مرحله جداسازی با استفاده از ۲ محیط کشت جداسازی مختلف حدود ۲۰۷ جدایه اکتینوباکتری بدست آمد. محیط کشت عصاره خاک آگار با جداسازی ۱۲۵ کلونی اکتینوباکتری بیشترین تعداد کلونی جداشده را به خود

1- HickeyTresner broth
2- German Collection of Microorganisms and Cell Culture
3- International Streptomyces Project II

اختصاص داد و به دنبال آن محیط کشت نشاسته کازیین آگار ۸۲ جدایه اکتینوباکتری را جدا نمود(شکل ۱).

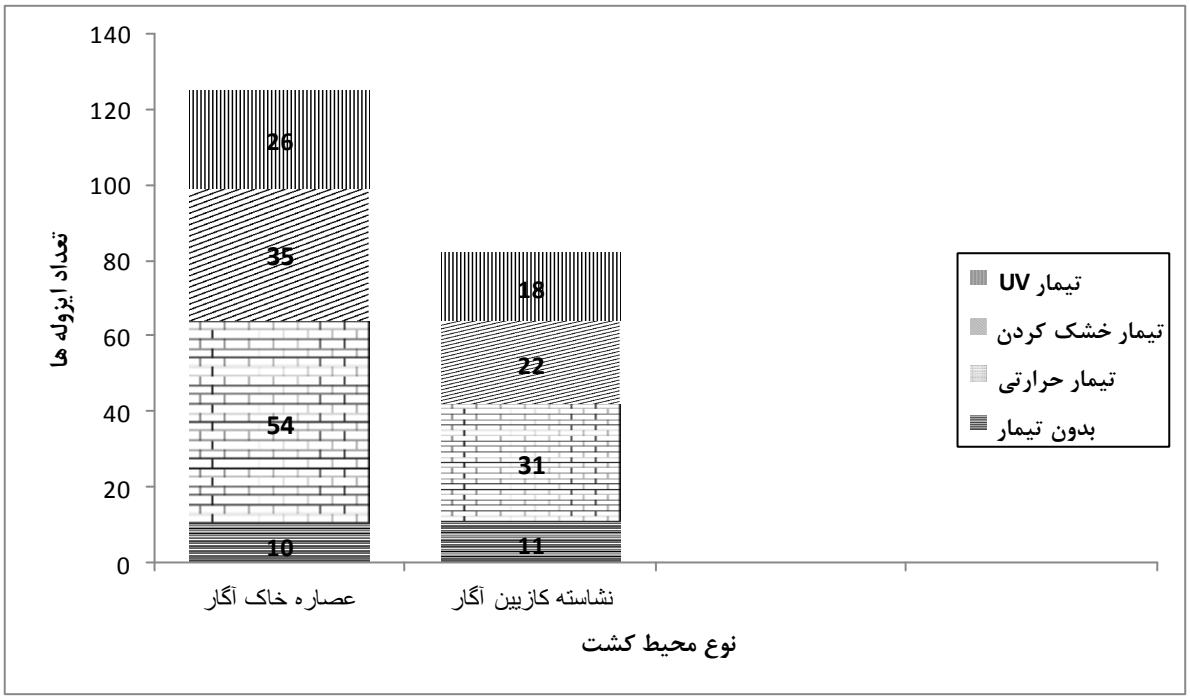


شکل۱- جداسازی اکتینوباکتریها در دو محیط کشت مختلف

Figure1. Isolation of actinobacteria in two different culture media

۲- بررسی اثر تیمارهای انجام‌شده بر جداسازی اکتینوباکتری‌ها

تیمار حرارتی با جداسازی ۸۵ جدایه اکتینوباکتری به‌عنوان بهترین تیمار ارزیابی شد و پس‌ازآن به ترتیب تیمار خشک‌کردن با جداسازی ۵۷ جدایه و تیمار پرتوفرابنفش با جداسازی ۴۴ جدایه قرار گرفتند. هم چنین از نمونه بدون تیمار نیز کشت شد که درمجموع ۲۱ کلونی جداسازی گردید(شکل ۲).



شکل۲-تأثیر تیمارهای فیزیکی بر جداسازی اکتینوباکتری‌ها در محیط‌های کشت مختلف

Figure 2. Effect of physical treatment on isolation of actinobacteria in different culture media

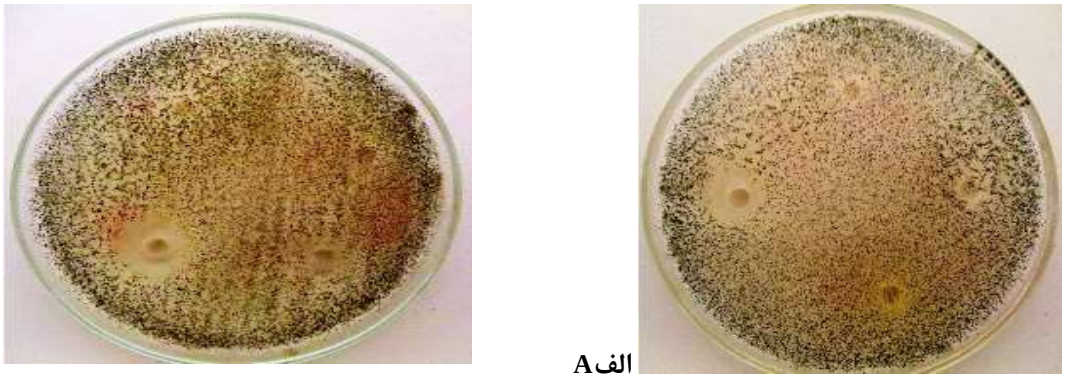
۳- ارزیابی فعالیت ضد قارچی اکتینوباکتری های جداشده در مقابل *A. niger* و *Bipolaris* sp.

مقایسه تولید ترکیبات ضدقارچی در ۲ محیط کشت مایع HTBو ISP II broth پس از مدت ۵ روز از کشت باکتری بیانگر تولید میزان بیشتر ترکیبات ضد قارچی در محیط HTB بود. (جدول ۱، شکل ۳).

جدول۱- ارزیابی فعالیت ضد قارچی اکتینوباکتری‌های جداشده

Table 1. Evaluation of antifungal activity of isolated actinobacteria

شماره ایزوله	محیط کشت	قطر هاله ممانعت از رشد(mm)	
		A. niger	*Bipolaris* sp.
MG-11	HTB	۱۲	۱۵
	ISP II	-	۱۰
MG-21	HTB	۱۲	۱۴
	ISP II	-	-



شکل ۳- ارزیابی فعالیت ضد قارچی سویه های مولد پس از ۴ روز از کشت قارچ الف. MG- 11 ب. MG- 21

Figure 3. Evaluation of antifungal activity of putative strains after 4 days. A. MG-11 B. MG-21

۴- شناسایی اکتینوباکتری‌های مولد ترکیب ضد قارچی

شناسایی مورفولوژیک اکتینوباکتری‌های مولد جداشده شامل شکل ماکروسکوپی و میکروسکوپی، رنگ مسیلیوم های رویشی و هوایی و خصوصیات رشدی شامل میزان رشد و تولید اسپور در محیط‌های مختلف ویژگی‌های مورفولوژیک و جدایه های مولد MG-11وMG-21 به ترتیب درشکل(۲)، جدول(۲و ۳) نشان داده شد. خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیولوژیک جدایه های مولد از قبیل مصرف منابع کربن و نیتروژن و تولید آنزیم‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت(جدول ۴). این نتایج تعلق سویه‌های مولد به جنس *Streptomyces* را نشان داد.

شناسایی ژنتیکی سویه‌های مولد پس از استخراج DNA ژنومی وتکثیر ژن 16s rRNAسویه‌های مولدمنجر به تولید محصولی با وزن۱۵۰۰bp گردید (شکل ۵). نتایج حاصل ازتطابق توالی بدست آمده از سویه‌های مولد با سویه‌های موجود در بانک اطلاعاتی نوکلئوتیدها درNCBI[1] بیانگر همولوژی ۹۹ درصدی سویه‌هایMG-11 با *Streptomyces albus* و MG-21 با *Streptomyces griseus* بود.

1- National Center for Biotechnology Information

الف

ب

شکل ۴- ویژگی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی سویه های مولد الف. MG- 11 ب. MG- 21

Figure 4. Macroscopic and Microscopic features of putative strains A. MG-11 B. MG-21

جدول۲- شناسایی بیوشیمیایی و فیزیولوژیک سویه های مولد

Table 2. Biochemical and physiological identification of potent strains

Utilization of	MG-11	MG-21	Enzyme	MG-11	MG-21
glucose	+	+	Gelatin	+	+
Fructose	-	+	Citrate	+	-
Xylose	-	+	Urease	+	-
Arabinose	-	+	Arginine	+	+
Rhamnose	-	-	VP	+	+
Sucrose	+	-	Indol	-	-
Raffinose	-	-	H2S	-	-
Mannose	-	-	Hemolysis	-	-
Maltose	+	+			

جدول ۳- رنگ میسلیوم های هوایی و رویشی سویه های مولد در محیط‌های مختلف

Table 3. color of aerial and vegetative mycelium of putative strains in different culture media

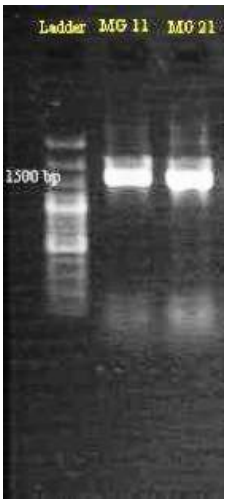
محیط کشت	رنگ میسلیوم	ISP II	ISP III	ISP IV	ISP V
MG-11	رویشی	زرد	زرد	کرم	کرم
	هوایی	خاکستری	زرد	کرم	زرد
MG-21	رویشی	زرد	زرد	زرد	زرد
	هوایی	سفید	سفید	سفید	سفید

جدول ۴- ویژگی‌های رشدی سویه های مولد در محیط‌های مختلف

Table 4. Growth features of putative strains in different culture media

	مشخصه	MG-11	MG-21
ISP II	رشد	G	G
	تولید اسپور	G	G
ISP III	رشد	I	I
	تولید اسپور	I	I
ISP IV	رشد	G	I
	تولید اسپور	I	I
ISP V	رشد	I	I
	تولید اسپور	I	I
ISP VI	رشد	I	I
	تولید اسپور	N	N
ISP VII	رشد	I	I
	تولید اسپور	I	N
CDA	رشد	I	I
	تولید اسپور	G	I
BA	رشد	G	G
	تولید اسپور	G	G
NA	رشد	G	I
	تولید اسپور	N	N

بدون رشد یا تولید اسپور :N رشد یا تولید اسپورمتوسط :I رشد یا تولید اسپور خوب :G

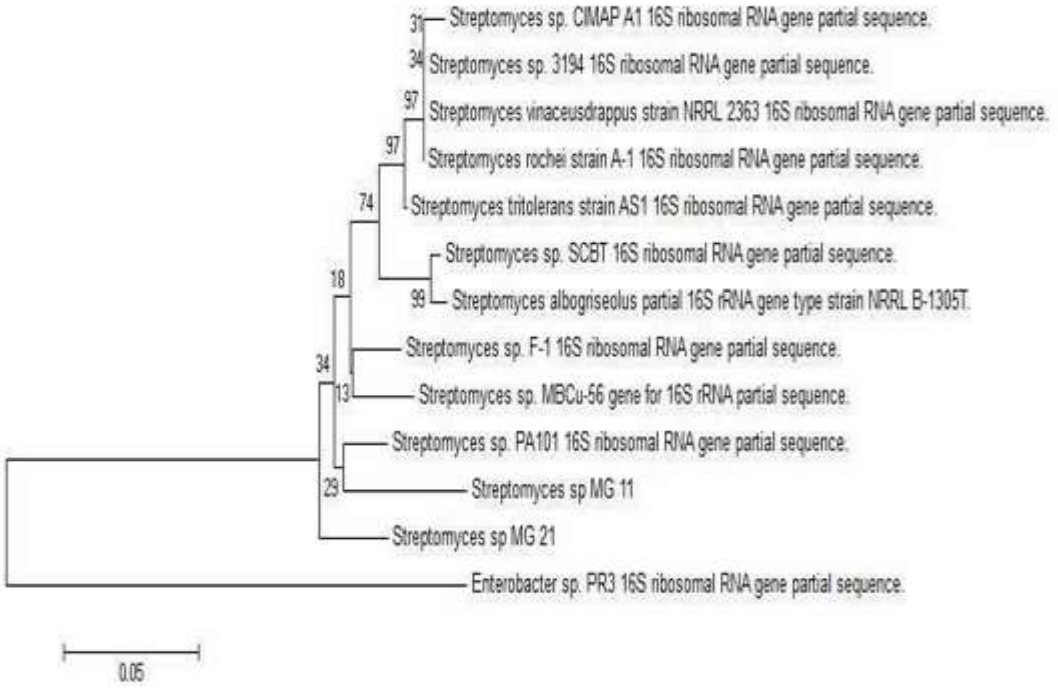


شکل ۵- الکترفورز ژن16s rRNAتکثیرشده در واکنش PCR برای سویه‌های مولد ترکیب ضد قارچی. درچاهک اول(سمت چپ ژل)نشان گر وزنی100bpDNA Ladderبارگذاری شده است.

Figure 5. 16s rRNA gene electrophoresis amplified in PCR reaction from antifungal producing strains. First well was loaded by 100bpDNA Ladder

۵- آنالیز فیلوژنتیک سویه‌های مولد ترکیب ضد قارچی

آنالیز فیلوژنتیک توالی ژن 16s rRNAسویه‌های مولد جداشده با نزدیک‌ترین سویه‌ها شناسایی‌شده با استفاده از نرم‌افزار MEGA 6 بیانگر قرارگیری سویه‌هایMG-11 با *Streptomyces albus* و MG -21 با *Streptomyces griseus* در دو خوشه جداگانه بود(شکل ۶).



شکل ۶. آنالیز فیلوژنتیک سویه‌های مولد ترکیب ضد قارچی

Figure 6. Phylogenetic analysis of antifungal producing strains

بحث و نتیجه‌گیری

امروزه یافتن سویه‌های بومی مولد ترکیبات ضد میکروبی به منظور کنترل زیستی آفات کشاورزی مورد توجه قرارگرفته و نمونه‌های تجاری‌سازی شده آن‌ها به عنوان ابزاری جدید در خدمت مدیریت محیط زیستی آفات در بازار موجود می‌باشد (۲۵). در این مطالعه به منظور دستیابی به سویه های بومی کنترل کننده آفات قارچی مورد نظر نمونه برداری از خاک مزارع گندم انجام شد. استفاده از سویه های بومی کارایی میدانی فرآیند کنترل زیستی را ارتقا بخشیده و شانس یافتن گزینه های موفق را افزایش می‌دهد. براساس نتایج ارایه شده بیشترین کلونی اکتینوباکتری با استفاده از محیط کشت عصاره خاک آگار بدست آمد. پس از آن محیط کشت نشاسته کازیین آگار تعداد ۸۵ جدایه را جداسازی نمود. این تفاوت در میزان جداسازی اکتینوباکتری‌ها به دلیل فرمولاسیون محیط کشت عصاره خاک آگار است که دارای ترکیبات مشابه خاک می‌باشد. درحالی‌که محیط کشت نشاسته کازیین آگار دارای منبع کربن نشاسته بوده که یک هیدروکربن به نسبت پیچیده است و میکروارگانیسم‌های دارای آنزیم آمیلاز می‌توانند آن را مصرف کنند. منبع نیتروژن این محیط کشت نیترات پتاسیم و کازئین است که نیازهای یک میکروارگانیسم را برطرف می‌کنند(۲۶). در همین راستا Hamaki و همکاران در سال ۲۰۰۵ گزارش نمودند که محیط کشت عصاره خاک آگار به‌عنوان محیط مناسبی برای جداسازی اکتینوباکتری‌های جدید می‌باشد. آن‌ها موفق به جداسازی گونه‌های جدید اکتینوباکتری‌های *Bradyrhizobium* گردیدند(۲۷). در زمینه استفاده از تیمارهای حرارتی و نقش آنها در افزایش کارایی جداسازی گونه های اکتینوباکتری‌ها مطالعات متعددی انجام شده است(۲۸). در مطالعه حاضر تیمار حرارتی با جداسازی ۸۵ جدایه اکتینوباکتری بهترین نتیجه را ارایه نمود و سپس تیمار خشک‌کردن با ۵۷ جدایه و تیمار پرتو فرابنفش با جداسازی ۴۴ جدایه در رده‌های بعدی قرار گرفتند .کارایی جداسازی تیمار حرارتی احتمالاً به دلیل حذف قارچ‌های مزوفیل افزایش یافت. رشد نسبتا سریع‌تر قارچ های مزوفیل در محیط کشت جداسازی باعث آلودگی و نیز کمبود مواد مغذی مورد نیاز برای رشد اکتینوباکتری‌ها شد. تیمار خشک‌کردن عموماً باکتری‌های گرم منفی را از بین برد و پرتو فرابنفش باکتری‌های حساس به UV را حذف نمود(۲۹). در کل حدود ۲۰۷ جدایه بدست آمد که با توجه به مطالعات مرفولوژیک تعداد ۱۰۰ جدایه متمایز برای ارزیابی فعالیت ضد قارچی انتخاب گردید. مقایسه تولید ترکیبات ضد قارچی در ۲ محیط کشت مایعHTB و ISP II broth بیانگر میزان تولید بیشتر جدایه های مولد در محیط HTB داشت. این نتیجه می‌تواند به دلیل استفاده از عناصر کمیاب مانند کلرید کبالت و محتوای پروتئین بالاتر محیط ^{HTB} نسبت بهISPII باشد زیرا کبالت بخشی از ساختار ویتامین B_{12} است که به‌عنوان یک کوآنزیم نقش مهمی در فرایندهای متیلاسیون و واکنش‌های بازآرایی اسکلت کربن آنتی‌بیوتیک‌ها دارد(۳۰). با توجه به نتایج، آنتی‌بیوتیک تولیدشده توسط سویه‌های*Streptomyces sp.* MG-11 و MG-21 *Streptomyces sp.*تأثیر بیشتری بر قارچ *Bipolaris* sp. نسبت به *A. niger* داشت. این اثر می‌تواند به علت تفاوت الگوی حساسیت به آنتی‌بیوتیک به دلیل تفاوت های ساختاری و فیزیولوژیک قارچ‌های مورد بررسی باشد. در همین زمینه Compant و همکاران نشان دادند سویه‌های*Streptomyces* با تولید آنزیم ۱-β و ۳-گلوکاناز دیواره سلولی قارچ پاتوژن *F. oxysporum* را تجزیه می‌نماید و اثر کنترلی خود را ایفا می‌کند(۳۱).در مطالعه دیگریShimizu و همکارانش گزارش دادند از میان 178 ایزوله اکتینوباکتری ۱۱ سویه قادر به تولید ترکیبات ضد قارچی در مقابل قارچ *Colletotrichum* عامل آنتراکنوز خیار بودند (۳۲). شناسایی جدایه های مولد در مطالعه حاضر با استفاده از روش‌های چند مرحله‌ای شامل مطالعات میکروسکوپی و ماکروسکوپی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیک بیانگر تعلق باکتری‌های جداشده به جنس *Streptomyces*بود. شناسایی ژنتیکی سویه‌های جداشده با روش تکثیر ژن 16s rRNA نشان دهنده ترادف ۹۹ درصد سویه *Streptomyces* sp. MG-11 با باکتری*S. album* و ترادف ۹۹ درصدی سویه*Streptomyces* sp. MG -21 با باکتری *S. griseus* بود. در این زمینه Someya و همکاران

در مطالعه ای فعالیت ضد قارچی یک سویه کاندیدای کنترل زیستی را در مقابل قارچ های بیماریزای *R. solani* و *F. oxysporum* نشان دادند. نتایج آزمون های شناسایی نشان داد این سویه به گونه *Serratia marcescens* تعلق داشت(۳۳). در مطالعه دیگری Amein و همکارانش در سال ۲۰۰۸ یک سویه باکتری بومی *Pseudomonas fluorescens* را شناسایی نمودند که در شرایط میدانی به طور قابل ملاحظه ای موجب رشد و افزایش محصول گندم گردید. (۳۴). آنالیز فیلوژنتیک سویه‌های مولد ترکیب ضد قارچی و مقایسه آن‌ها با سایر سویه‌های مطالعه شده نشان داد که سویه *Streptomyces* sp. MG-11 با سویه *Streptomyces spectabilis* CMU-PA101 که از گونه پاندانوس از تایلند جداشده بود در یک خوشه قرار می‌گیرد (۳۵). سویه *Streptomyces* sp. MG-21 ازلحاظ تکاملی زودتر از سایر گونه‌های مورد بررسی انشقاق یافته است. در این پژوهش قابلیت کنترل زیستی دو سویه *Streptomyces* جداشده از مزارع گندم استان هرمزگان در فاز آزمایشگاهی تأیید گردیدکه می‌تواند گامی مؤثر در جهت دستیابی به سویه‌های کنترل‌کننده بیماری‌های قارچی با قابلیت تجاری‌سازی باشد. با توجه به بومی بودن سویه‌های *Streptomyces* sp. MG-11 و *Streptomyces* sp. -21 MG سازش‌های اکولوژیک را با محیط خود یافته‌اند و بهترین گزینه برای مدیریت محیط زیستی بیماری‌های قارچی گندم در منطقه می‌باشند. به‌کارگیری نتایج حاصل از این تحقیق می‌تواند استراتژی جدیدی برای کاهش مصرف سموم و آلاینده‌های شیمیایی در مزارع گندم و درنتیجه کاهش آلودگی‌های محیط‌زیست را مطرح نماید و ابزاری جدید در جهت کنترل زیستی در اختیار برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات به‌عنوان بخشی از مدیریت محیط‌زیست قرار دهد.

Reference

1. Council, E.S.R., 2008. Biological Alternatives to Chemical Pesticides. Science Daily. In http://www.sciencedaily.com/releases/2008/10/081008065841.htm.
2. Braden, J.B. and J.S. Shortle, 2013. “Agricultural Sources of Water Pollution,” In Encyclopedia of Energy, Natural Resource and Environmental Economics, Ed. J. Shogren, Chap. 111. Elsevier, Amsterdam. pp.81-85.
3. Wasim Aktar, Md., Sengupta, Dwaipayan., Chowdhury Ashim., 2009. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. Interdisciplinary Toxicology.2 (1): 1–12.
4. Weber, C., 2008.For the Consideration of Biodiversity in Plant Protection Legislation. pp. 15.
5. Van Driesche, R.G, Carruthers, R.I, Center, T., Hoddle, M.S., Hough-Goldstein, J,. Morin, L. Smith, L,. Wagner, D.L., Blossey, B., et al.2010. Classical biological control for the protection of natural ecosystems. PSIS/Entomology, University of Massachusetts, Fernald Hall, Amherst, MA 01003, USA. Biological Control54 .2010. S2–S33.
6. El-Bendary, M.A., 2006. *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* biopesticides production. Journal of Basic Microbiology. 46, 158–170.
7. EPA, 1997. *Aspergillus niger* Final Assessment, Risk, see information in:http: www.epa.gov/biotech_rule/pubs/fra/fra006.htm.extension systems.39 5.
8. Diehl Y.A., Tinline R.D., Kochhann R.A., Shipton P.Y., and Rovira A.D. 1982. The effect of fallow periodson common root rot of wheat in Rio

Grande do sul, Brazil. Phytopathology. 72: 1279-1301.

9. Piccinni G., Shriver J.M., and Rush C.M. 2001. Relationship among seed size, planting date, and common root rot in hard red winter wheat. Plant Dis. 85: 973-976.
10. Ledingham. R. J, Atkinson. T.G.: Horricks. J.S.: Mills. J. T, Pienini. LJ and Tinline.R.D., 1973. Wheat losses due to common root rot in the Prairie provinces of Canada. 1 969-7 1. Can. Plant Dis. Surv. 53: 1 1 3-22.
11. Mansouri, B. 2003, Damage due to Karnal bunt disease in wheat commercial varieties, 23rd Iranian Plant Protection Congress, Razi University, Kermanshah, Iran. (In Persian)
12. Berdy, J .2005, Bioactive Microbial metabolite, Journal of Antibiotics,58:493-496.
13. Gozari M, Mortazavi M, Bahador N, Tamadoni Jahromi S, Rabbaniha M. Isolation and screening of antibacterial and enzyme producing marine actinobacteria to approach probiotics against some pathogenic vibrios in shrimp *Litopenaeus vannamei*. IJFS. 2016; 15 (2):630-644.
14. Gozari M, Mortazavi M, Karimzadeh R, Ebrahimi M, Dehghani R. Isolation, Identification and Evaluation of antimicrobial activity of Actinomycetes from marine sediments of Persian Gulf (Hormozgan Province). ISFJ. 2017; 25 (1):81-93.
15. Iznaga, Y., Lemus, M., González, L., Garmendía, L., Nadal, L. and Vallín, C. 2004. Antifungal activity of actinomycetes from cuban soils. Phytotherapy Research., 18, 494-496.
16. Wan, M.G., Li, G.Q., Zhang, J.B., Jiang, D.H., Huang, H.C., 2008. Effect of volatile substances of *Streptomyces platensis* F-1 on control of plant fungal diseases. Biological Control 46, 552–559.
17. Coombs JT, Michelsen PP, Franco CMM, 2004. Evaluation of entophytic *actinobacteria* as antagonists of *Gaeumannomyces graminis* var. tritici in wheat. Biological control 29:359–366.
18. Khan M. R,. Doohan. F. M. 2009. Bacterium-mediated control of Fusarium head blight disease ofwheat and barley and associated mycotoxin contamination of grain, University College Dublin, Belfield, Biological Control 48 .42–47.
19. Carter M.R., Gregorich E.G,2008. Soil Sampling and Methods of Analysis. CRC Press Taylor & Francis Group.34p
20. .Hayakawa M, Sadakata T†, Kajiura T, Nonomura H, 1991. New methods for the highly selective isolation of *Micromonospora* and *Microbispora* from soil, Journal of Fermentation and Bioengineering 72: 5, 320–326.
21. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds.), 2006. The Prokaryotes, vol.3. Springer, New York, pp. 652–668.
22. Shirling, E. B. & Gottlieb, D., 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology16, 313–340.

23. Williams, S. T. Goodfellow, M. Alderson, G. Wellington, E. M. H. Sneath, P. H. A. and Sackin, M. J.,1983. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera**.** *Journal* of *general microbiology*, 129, 1743–1813.
24. Kieser, T, Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F., and Hopwood, D.A, 2000. Practical *Streptomyces* Genetics. Norwich: The John Innes Foundation.
25. Fravel, D.R., 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. Annual. Rev. Phytopathology. 43, 337–359.
26. Moat, Albert G., John W. Foster, and Michael P. 2003.Spector, eds. Microbial physiology. Wiley. Com.
27. *Hamaki, T.*, Suzuki *M*, fudou R, jojima Y, kajiura T, tabuchi A, sen Kand shibai H, 2005. Isolation of novel bacteria and *actinomycetes* using Soil Axtract Agar medium, Journal of Bioscience and Bioengineering, 99, 5: 485-492.
28. Goodfellow M**.** 2010. Selective Isolation of *Actinobacteria*, In *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology, Third Edition*. ASM Press, Washington, DC, p 13-27.
29. Hayakawa M, Sadakata T†, Kajiura T, Nonomura H, 1991. New methods for the highly selective isolation of *Micromonospora* and *Microbispora* from soil, Journal of Fermentation and Bioengineering 72: 5, 320–326
30. Tsueng G, Sing Lam K, 2009. Effect of cobalt and vitamin B12 on the production of salinosporamides by Salinispora tropica. The Journal of antibiotics, Tokyo. Apr;62(4):213-6.
31. Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C. and Ait Barka, E, 2005. Useof plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. Applied and Environmental Microbiology. 71:4951–4959.
32. Masafumi, Shimizu., Sachiko, Yazawa., Yusuke, Ushijima., 2009, A promising strain of endophytic *Streptomyces* sp. for biological control of cucumber anthracnose, The Phytopathological Society of Japan and Springer, J Gen Plant Pathol ,75:27–36.
33. Someya N, Kataoka N, Komagata T, Hirayae K, Hibi T, Akutsu K., 2000.Biological control of cyclamen soilborme disedses by *Serratia marcescens* strain B2. *Plant Dis* 84:334–340.
34. Amein T, Omer Z, Welch C., 2008. Application and evaluation of *Pseudomonas* strains for biocontrol of wheat seedling blight. *Crop Prot* 27:532–536
35. Khamna S, Yokaota A, Peberdy FJ, Aiumyong S., 2009. Antifungal activity of *Streptomyces* spp. isolated from rhizosphere of Thai medicinal plants. International Journal of Integrative Biology; 6:143-147