

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 رفتی^۴

تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۰/۲۶

تاریخ دریافت: ۹۴/۷/۱۷

چکیده

زمینه و هدف: امروزه آفت‌کش‌ها به منظور حفظ امنیت غذایی به طور گسترده‌ای در سراسر جهان مورد استفاده قرار می‌گیرند. به دلیل اثرات نامطلوب و ماندگاری بالا، این ترکیبات از آلاینده‌های مهم محیط‌زیست محسوب می‌شوند. روش‌های کنترل زیستی آفات به عنوان بهترین جایگزین برای آفت‌کش‌های شیمیایی به شمار می‌روند. این مطالعه با هدف جداسازی و شناسایی اکتینوباکتری‌های 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 اکتینوباکتری‌ها از دو محیط کشت عصاره خاک آگار و نشاسته کازئین آگار استفاده شد. ارزیابی فعالیت ضد قارچی ایزوله‌ها با روش انتشار از چاهک انجام گردید. شناسایی ایزوله‌های 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 ویژگی های مورفولوژیک، بیوشیمیایی و فیزیولوژیک تعلق ایزوله های مولد به جنس استرپتومایسس را نشان داد. نتایج حاصل از شناسایی ژنتیکی و تطابق توالی ژن 16s rRNA سویه های 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.

نتیجه گیری: بر اساس نتایج این پژوهش دو سویه ۱۱- *Streptomyces sp.* MG و ۲۱- *Streptomyces sp.* MG به عنوان کاندیداهای مناسب به منظور مطالعات کنترل زیستی بیماری های قارچی در مزارع گندم پیشنهاد می گردند.

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

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

Majid Gozari¹

Maria Mohammadizadeh²

Mohsen Gozari^{3*}

M_gozari@yahoo.com

Maryam Rafati⁴

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 on 16srRNA 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 در کشاورزی بدون توجه به مخاطرات زیست‌محیطی سبب آلودگی محیط‌زیست به ویژه منابع آبی می‌گردد. پساب‌های کشاورزی از مضرترین منابع آلاینده محیط‌زیست می‌باشند (۲) اثرات مخرب و شدید آفت‌کش‌های شیمیایی بر محیط‌زیست از قبیل کاهش تنوع زیستی اکوسیستم‌ها، درخطر قرار دادن گونه‌های در معرض انقراض و اثرات کشنده بر حیات وحش و پرندگان، به کارگیری آن‌ها را مخاطره‌آمیزی می‌سازد (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 حال توسعه اهمیت روزافزونی یافته است (۶). قارچ *Aspergillus niger* یکی از آفات انباری گندم می‌باشد. این قارچ با رشد روی گندم سم اکراتوکسین A را تولید می‌نماید که به‌عنوان آلاینده دانه‌های حبوبات و غلات مانند گندم و جوشناخته‌شده و در مهره‌داران و گیاهان مسمومیت حاد ایجاد می‌نماید (۷). قارچ *Bipolaris* sp. عامل بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه گندم می‌باشد. خسارت این بیماری در کشورهای مختلف متغیر گزارش شده است. در برزیل ۹ تا ۲۳ درصد (۸)، در استرالیا ۶ تا ۴۴ درصد (۹) و در کانادا ۳۰ تا ۳۵ درصد (۱۰)، خسارت ایجاد نموده است. در ایران خسارت سالیانه بیماری پوسیدگی ریشه گندم ۳ تا ۱۲/۵ درصد گزارش شده 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 اکتینوباکتری‌ها به‌عنوان بخش مهمی از فلور میکروبی خاک و رسوبات دریایی در زمینه‌های مختلف مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (۱۳، ۱۴). این باکتری‌ها با مکانیسم‌های مختلف از قبیل تولید آنتی‌بیوتیک نقش مهمی را در میان‌کنش‌های رقابتی و کنترل قارچ‌های بیماری‌زای خاک زاد ایفا می‌نمایند (۱۵). در یک پژوهش Wan و همکارانش در سال ۲۰۰۸ یک ترکیب ضد قارچی فرار را از باکتری *platensis* *Streptomyces* 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 از باکتری‌های *Pseudomonas fluorescens* Mkb ۱۵۸ و *frederiksbergensis* Mkb ۲۴۹، شدت علائم بیماری فوزاریوم در 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- میکروارگانیزم‌های مورد استفاده در تحقیق: در این پژوهش سویه‌های قارچی PTCC ۵۰۵۷ *A. niger* عامل بیماری آفت انباری گندم و PTCC ۵۲۲۵ *Bipolaris* sp. مورد استفاده قرار گرفتند.

۲- نمونه برداری

از بین سایت‌های کشت گندم منطقه حاجی‌آباد استان هرمزگان سه سایت و در هر سایت ۵ ایستگاه انتخاب شد و نمونه خاک با استفاده از مدل زیگزاگی و به‌صورت تصادفی جمع‌آوری گردید)

قطر هاله ممانعت از رشد ایجاد شده پس از ۴ روز مورد بررسی قرار گرفت (۲۱).

۵- شناسایی سویه‌های مولد ترکیبات ضد قارچی

خصوصیات مورفولوژیک سویه‌ها با استفاده از تصاویر میکروسکوپی بررسی گردید (۲۲). خصوصیات بیوشیمیایی ایزوله‌های مولد منتخب با استفاده از محیط‌های کشت‌های ISP از نظر مصرف منابع مختلف کربن و نیتروژن و نیز خصوصیات فیزیولوژیک از قبیل تولید آنزیم‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفتند (۲۳). به منظور شناسایی ژنتیکی سویه‌ها با DNA آن‌ها با استفاده از روش CTAB استخراج گردید. به دنبال آن ژن 16srRNA سویه‌ها با استفاده از پرایمر های 9f و R 1541 تکثیر شده و بعد از خالص‌سازی به منظور تعیین توالی با همراه 5 μl پرایمر (برای هر نمونه)، به شرکت Promega ارسال شد. پس از تعیین توالی نوکلئوتیدی ژن 16srRNA مربوط به ایزوله‌های مورد نظر، توالی‌های به دست آمده با توالی‌های موجود در بانک ژن مورد آنالیز قرار گرفت (۲۴).

۶- آنالیز فیلوژنتیک و ثبت ژن

به منظور اطمینان از صحت تعیین توالی ژن 16s rRNA سویه‌های منتخب از نرم افزار 4.10 DNA base استفاده شد. به دنبال آن توالی‌های آنالیز شده در مقابل توالی‌های ژن 16s rRNA سایر گونه‌های موجود در بانک ژن NCBI بوسیله نرم افزار Megablast مورد مطابقت قرار گرفت. ثبت ژن توالی‌های بدست آمده بوسیله نرم افزار BankIt در بانک ژن NCBI انجام شد و پس از اعتبار سنجی از سوی NCBI توالی‌های مورد نظر با شماره‌های دستیابی KJ028023 و KJ028024 ثبت گردید. آنالیز فیلوژنتیک سویه‌های منتخب با استفاده از نرم افزار MEGA6 انجام شد.

نتایج

۱- جداسازی اکتینوباکتری‌ها از نمونه‌های جمع‌آوری شده 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 جدا شده را به خود

۱۹). نمونه‌های خاک از بخش‌های مختلف خاک شامل ریزوسفر و عمق ۰ 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 هوا و تیمار پرتو فرابنفش بر روی نمونه‌ها انجام شد. نمونه‌های تیمار شده با استفاده از روش رقت متوالی تا رقت ۰/۰۰۱ رقیق‌سازی و با روش پخش کردن در سطح محیط‌های کشت نشاسته کازبین آگار و عصاره خاک آگار به میزان ۲۰۰ μl کشت داده شدند. محیط‌های کشت تلقیح شده به مدت ۴ هفته در دمای ۲۸°C درجه سانتی‌گراد گرماگذاری گردیدند (۲۰).

۴- بررسی فعالیت ضدقارچی جدایه‌های اکتینوباکتری

فعالیت جدایه‌های خالص‌شده اکتینوباکتری‌ها علیه قارچ‌های *A. niger* و *Bipolaris* sp. با استفاده از روش انتشار از چاهک مورد بررسی قرار گرفت. از محیط کشت‌های HTB^۱ (بر اساس فرمول DSMZ^۲) و ISP II^۱ (تهیه شده از شرکت Hi media) برای ارزیابی تولید ترکیب ضد میکروبی توسط ایزوله‌های اکتینوباکتری استفاده شد. به هر کدام از محیط‌های کشت سوسپانسیون اسپوری با رقت ۱۰^۷ بر میلی‌لیتر به میزان ۵ درصد حجم محیط کشت تلقیح گردید. سپس محیط‌های تلقیح شده در انکوباتور شیکردار در دمای ۲۸°C به مدت ۵ روز با دور ۲۲۰ 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 ۴۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه مایع رویی برداشته شد. ۱۰۰ میکرولیتر از مایع رویی هر یک از ایزوله‌ها به درون چاهک‌های تعبیه شده (به قطر ۴mm) در محیط سیب زمینی دکستروز آگار تلقیح شده با قارچ بیماری‌زای مورد نظر با حجم ۲۵ میلی‌لیتر اضافه گردید و

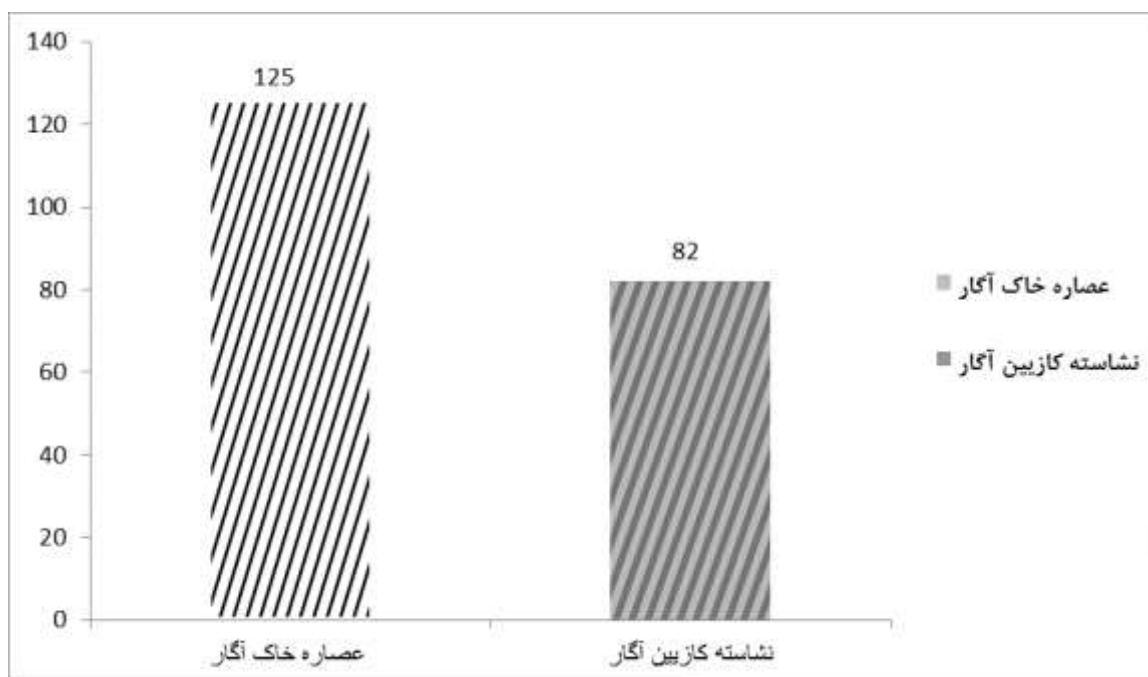
1- Hickey-Tresner broth

2- German Collection of Microorganisms and Cell Culture

3- International Streptomyces Project II

۸۲ جدایه اکتینوباکتری را جدا نمود (شکل ۱).

اختصاص داد و به دنبال آن محیط کشت نشاسته کازیین آگار



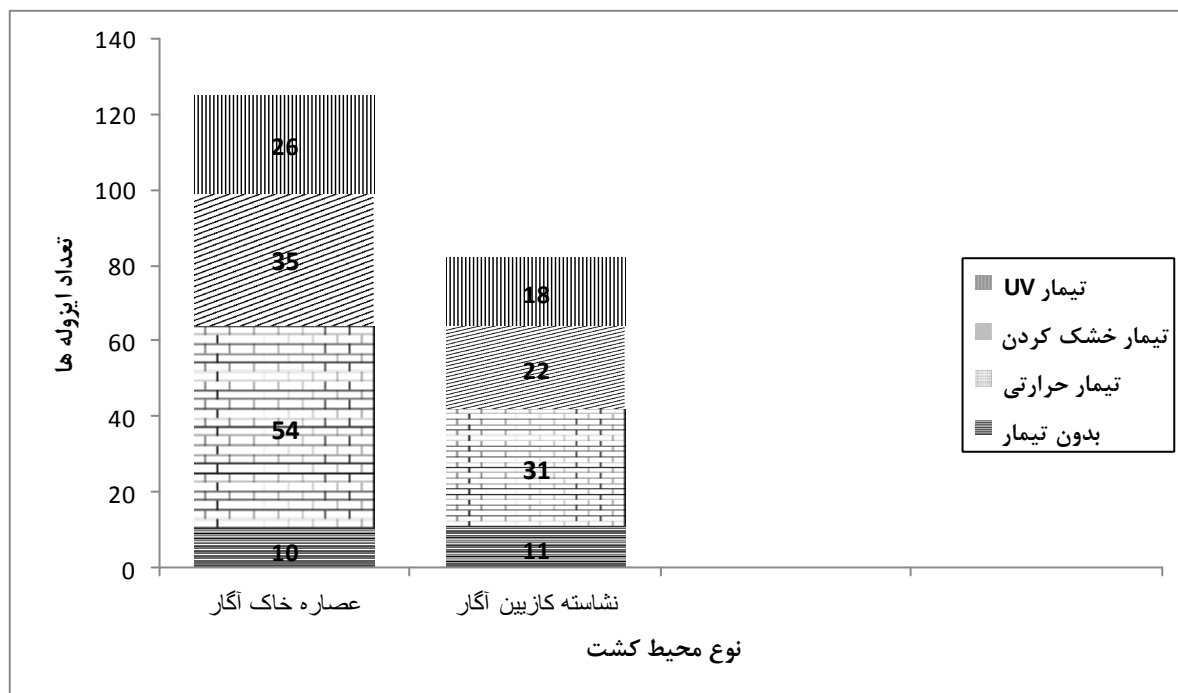
شکل ۱- جداسازی اکتینوباکتریها در دو محیط کشت مختلف

Figure 1. Isolation of actinobacteria in two different culture media

خشک کردن با جداسازی ۵۷ جدایه و تیمار پرتوفرا بنفش با جداسازی ۴۴ جدایه قرار گرفتند. هم چنین از نمونه بدون تیمار نیز کشت شد که در مجموع ۲۱ کلونی جداسازی گردید (شکل ۲).

۲- بررسی اثر تیمارهای انجام شده بر جداسازی اکتینوباکتریها

تیمار حرارتی با جداسازی ۸۵ جدایه اکتینوباکتری به عنوان بهترین تیمار ارزیابی شد و پس از آن به ترتیب تیمار



شکل ۲- تأثیر تیمارهای فیزیکی بر جداسازی اکتینوباکتری‌ها در محیط‌های کشت مختلف

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

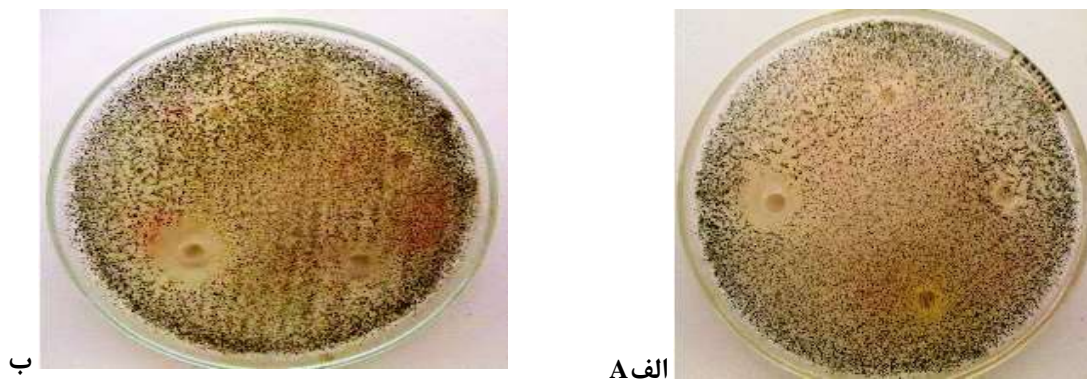
بیانگر تولید میزان بیشتر ترکیبات ضد قارچی در محیط HTB بود. (جدول ۱، شکل ۳).

۳- ارزیابی فعالیت ضد قارچی اکتینوباکتری‌های جداساده در مقابل *A. niger* و *Bipolaris sp.* مقایسه تولید ترکیبات ضدقارچی در ۲ محیط کشت مایع HTB و ISP II broth پس از مدت ۵ روز از کشت باکتری

جدول ۱- ارزیابی فعالیت ضد قارچی اکتینوباکتری‌های جداساده

Table 1. Evaluation of antifungal activity of isolated actinobacteria

قطر هاله ممانعت از رشد (mm)		محیط کشت	شماره ایزوله
<i>Bipolaris sp.</i>	<i>A. niger</i>		
۱۵	۱۲	HTB	MG-11
۱۰	-	ISP II	
۱۴	۱۲	HTB	MG-21
-	-	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 اکتینوباکتری های مولد ترکیب ضد قارچی

شناسایی مورفولوژیک اکتینوباکتری های مولد جدا شده شامل شکل ماکروسکوپی و میکروسکوپی، رنگ مسلیوم های رویشی و هوایی و خصوصیات رشدی شامل میزان رشد و تولید اسپور در محیط های مختلف ویژگی های مورفولوژیک و جدایه های مولد MG-11 و MG-21 به ترتیب در شکل (۲)، جدول (۲ و ۳) نشان داده شد. خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیولوژیک جدایه های مولد از قبیل مصرف منابع کربن و نیتروژن و تولید آنزیم های مختلف مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۴). این نتایج تعلق سویه های مولد به جنس *Streptomyces* را نشان داد.

شناسایی ژنتیکی سویه های مولد پس از استخراج DNA ژنومی و تکثیر ژن 16S rRNA سویه های مولد منجر به تولید محصولی با وزن ۱۵۰۰bp گردید (شکل ۵). نتایج حاصل از تطابق توالی بدست آمده از سویه های مولد با سویه های موجود در بانک اطلاعاتی نوکلئوتیدها در NCBI بیانگر همولوژی ۹۹ درصدی سویه های MG-11 با *Streptomyces albus* و MG-21 با *Streptomyces griseus* بود.



شکل ۴- ویژگی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی سویه‌های مولد الف. MG- 11 ب. MG- 21
Figure 4. Macroscopic and Microscopic features of putative strains A. MG-11 B. MG-21

جدول ۲- شناسایی بیوشیمیایی و فیزیولوژیک سویه‌های 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	-	-	H ₂ S	-	-
Mannose	-	-	Hemolysis	-	-
Maltose	+	+			

جدول ۳- رنگ میسلیم های هوایی و رویشی سوبه های مولد در محیط های مختلف

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

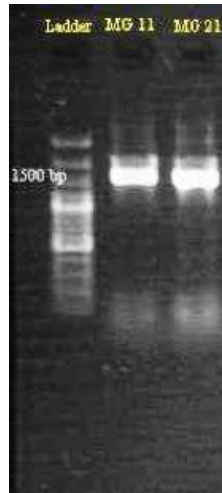
ISP V	ISP IV	ISP III	ISP II	رنگ میسلیم	محیط کشت
کرم	کرم	زرد	زرد	رویشی	MG-11
زرد	کرم	زرد	خاکستری	هوایی	
زرد	زرد	زرد	زرد	رویشی	MG-21
سفید	سفید	سفید	سفید	هوایی	

جدول ۴- ویژگی های رشدی سوبه های مولد در محیط های مختلف

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

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

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

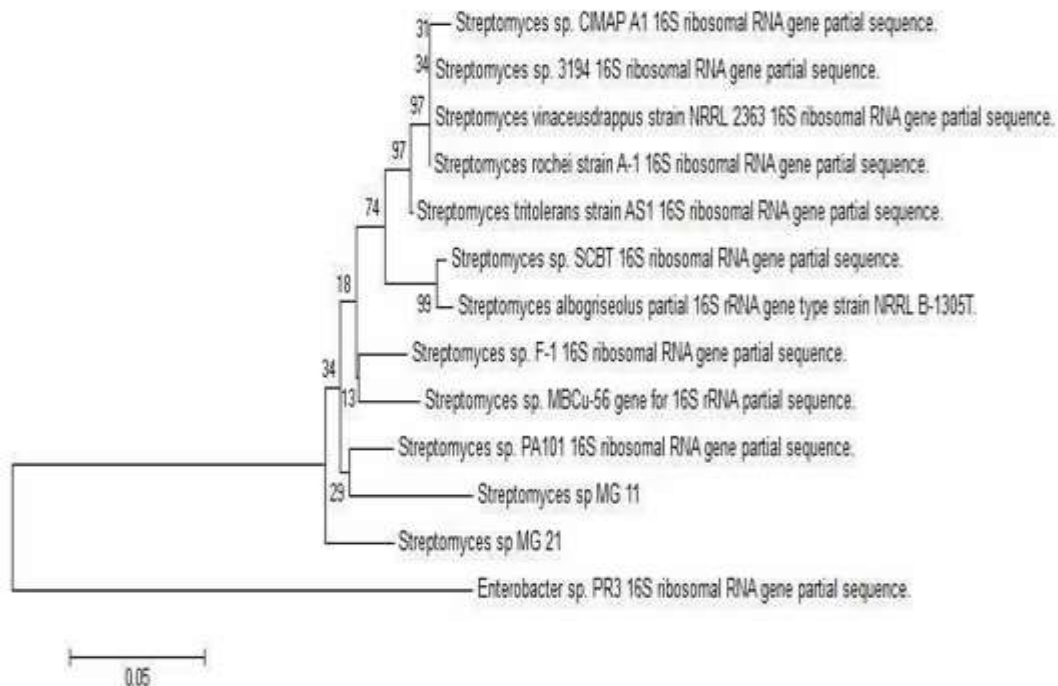


شکل ۵- الکتروفورز ژن 16s rRNA تکثیر شده در واکنش PCR برای سویه‌های مولد ترکیب ضد قارچی. در چاهک اول (سمت چپ ژل) نشان گر وزنی 100bp DNA Ladder بارگذاری شده است.

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

نرم افزار MEGA 6 بیانگر قرارگیری سویه‌های MG-11 با *Streptomyces albus* و MG-21 با *Streptomyces griseus* در دو خوشه جداگانه بود (شکل ۶).

۵- آنالیز فیلوژنتیک سویه‌های مولد ترکیب ضد قارچی آنالیز فیلوژنتیک توالی ژن 16s rRNA سویه‌های مولد جداسده با نزدیک‌ترین سویه‌ها شناسایی شده با استفاده از



شکل ۶. آنالیز فیلوژنتیک سویه‌های مولد ترکیب ضد قارچی

Figure 6. Phylogenetic analysis of antifungal producing strains

بحث و نتیجه‌گیری

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 مایع HTB و ISP II broth بیانگر میزان تولید بیشتر جدایه‌های مولد در محیط HTB داشت. این نتیجه می‌تواند به دلیل استفاده از عناصر کمیاب مانند کلرید کبالت و محتوای پروتئین بالاتر محیط HTB نسبت به ISP II باشد زیرا کبالت بخشی از ساختار ویتامین B₁₂ است که به‌عنوان یک کوآنزیم نقش مهمی در فرایندهای میتلاسیون و واکنش‌های بازآرایی اسکلت کربن آنتی‌بیوتیک‌ها دارد (۳۰). با توجه به نتایج، آنتی‌بیوتیک تولیدشده توسط سویه‌های *Streptomyces sp.* MG-11 و MG-21 *Bipolaris sp.* تأثیر بیشتری بر قارچ نسبت به *A. niger* داشت. این اثر می‌تواند به علت تفاوت الگوی حساسیت به آنتی‌بیوتیک به دلیل تفاوت‌های ساختاری و فیزیولوژیک قارچ‌های مورد بررسی باشد. در همین زمینه Compant و همکاران نشان دادند سویه‌های *Streptomyces* با تولید آنزیم β -۱ و ۳-گلوکاناز دیواره سلولی قارچ پاتوژن *F. oxysporum* را تجزیه می‌نماید و اثر کنترلی خود را ایفا می‌کند (۳۱). در مطالعه دیگری Shimizu و همکارانش گزارش دادند از میان ۱۷۸ ایزوله اکتینوباکتری ۱۱ سویه قادر به تولید ترکیبات ضد قارچی در مقابل قارچ *Colletotrichum* عامل آنتراکنوز خیار بودند (۳۲). شناسایی جدایه‌های مولد در مطالعه حاضر با استفاده از روش‌های چند مرحله‌ای شامل مطالعات میکروسکوپی و ماکروسکوپی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیک بیانگر تعلق باکتری‌های جدادشده به جنس *Streptomyces* بود. شناسایی ژنتیکی سویه‌های جدادشده 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

امروزه یافتن سویه‌های بومی مولد ترکیبات ضد میکروبی به منظور کنترل زیستی آفات کشاورزی مورد توجه قرار گرفته 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 سویه‌های بومی کنترل‌کننده آفات قارچی مورد نظر نمونه برداری از خاک مزارع گندم انجام شد. استفاده از سویه‌های بومی کارایی میدانی فرآیند کنترل زیستی را ارتقا بخشیده و شانس یافتن گزینه‌های 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 کازبین 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. در حالی که محیط کشت نشاسته کازبین آگار دارای منبع کربن نشاسته بوده که یک هیدروکربن به نسبت پیچیده است و میکروارگانسیم‌های دارای آنزیم آمیلاز می‌توانند آن را مصرف کنند. منبع نیتروژن این محیط کشت نترات پتاسیم و کازبین است که نیازهای یک میکروارگانسیم 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 گونه‌های 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 نسبتاً سریع‌تر قارچ‌های مزوفیل در محیط کشت جداسازی باعث آلودگی و نیز کمبود مواد مغذی مورد نیاز برای

- 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 Control 54. 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

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 سویه های مولد ترکیب ضد قارچی و مقایسه آن ها با سایر سویه های مطالعه شده نشان داد که سویه *Streptomyces* sp. MG-11 با سویه *Streptomyces spectabilis* CMU-PA101 که از گونه پاندانوس از تایلند جداسازی شده بود در یک خوشه قرار می گیرد (۳۵). سویه *Streptomyces* sp. MG-21 از لحاظ تکاملی زودتر از سایر گونه های مورد بررسی انشقاق یافته است. در این پژوهش قابلیت کنترل زیستی دو سویه *Streptomyces* جداسازی شده از مزارع گندم استان هرمزگان در فاز آزمایشگاهی تأیید گردید که می تواند گامی مؤثر در جهت دستیابی به سویه های کنترل کننده بیماری های قارچی با قابلیت تجاری سازی باشد. با توجه به بومی بودن سویه های *Streptomyces* sp. MG-11 و *Streptomyces* sp. -21 از سویه های اکولوژیک را با محیط خود یافته اند و بهترین گزینه برای مدیریت محیط زیستی بیماری های قارچی گندم در منطقه می باشند. به کارگیری نتایج حاصل از این تحقیق می تواند استراتژی جدیدی برای کاهش مصرف سموم و آلاینده های شیمیایی در مزارع گندم و در نتیجه کاهش آلودگی های محیط زیست را مطرح نماید و ابزاری جدید در جهت کنترل زیستی در اختیار برنامه های مدیریت تلفیقی آفات به عنوان بخشی از مدیریت محیط زیست قرار دهد.

Reference

1. Council, E.S.R., 2008. Biological Alternatives to Chemical Pesticides.

- actinomycetes from cuban soils. *Phytherapy 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 of wheat 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 Microbiology* 16, 313-340.
- 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

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. Use of 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 soilborne diseases by *Serratia marcescens* strain B2. *Plant Dis* 84:334–340.
34. Ameen 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
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 Aextract 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