آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ۷۶، شماره ۲، اسفند ۱۳۸۷

جداسازی، شناسایی و ارزیابی فعالیت ضدقارچی تعدادی از اکتینومایست‌های ایرانی بر علیه سه قارچ بیماریزای گیاهی

Isolation, determination and evaluation of antifungal activity of some Iranian actinomycetes against three plant pathogenic fungi

جواد حامدی* و فاطمه محمدی‌پناه
دانشکده زیست شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران
(تاریخ دریافت: تیر ۱۳۸۶، تاریخ پذیرش: تیر ۱۳۸۷)

چکیده

تعداد ۲۷۰ جدایه اکتینومایست از خاک‌های مناطق مختلف استان‌های خوزستان، اصفهان، گیلان، هرمزگان، مازندران، تهران و آذربایجان غربی با استفاده از محیط‌های کشت اختصاصی جدا و خالص گردیدند. اثر بازدارندگی مایع خارج سلولی آن‌ها روی رشد سه قارچ *Aspergillus niger* و *Fusarium oxyosporum* و *Alternaria alternata* در محیط‌های کشت جامد با استفاده از روش لایه آگار (top agar layer method) مورد ارزیابی قرار گرفت. ۲۸ جدایه از آنها توانستند رشد کلنی حداقل یکی از سه قارچ را با هاله بازدارندگی رشدی با قطر بیش از ۲۰ میلی‌متر و ۵ جدایه از آنها رشد کلنی هر سه قارچ را با هاله بازدارندگی با قطر بیش از ۳۰ میلی‌متر کاهش دهند. در بین آنها جدایه ۳۵ با بازدارندگی رشد ٪۴۲–٪۱۰ علیه هر سه جدایه قارچ ، به عنوان فعالترین جدایه برای مطالعات بعدی در نظر گرفته شد. در مرحله بعدی اثر ۳ محیط پیش کشت (seeding media) و ۵ محیط تولید (fermentation media) روی تولید ترکیبات ضدقارچی به وسیله جدایه مزبور با استفاده از روش سیلندر (cylinder diffusion assay method) مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده بیشترین اثر بازدارندگی روی رشد هر

* Corresponding author: jhamedi@ut.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

سه قارچ در عصاره‌های فیلتر شده (culture filtrate) حاصل از محیط پیش کشت ۲ و محیط تولید هیکی ترزنر مشاهده شد. بنابراین این دو محیط کشت به ترتیب به عنوان مناسب‌ترین محیطهای کشت برای رشد جدایه (تهیه اینوکولوم) و تولید ماده ضدقارچ پیشنهاد می شود. مطالعات انجام شده روی خصوصیات مولکولی، مورفولوژیک و بیوشیمیایی جدایه مزبور نشان داد که این جدایه از نظر توالی نوکلئوتیدهای ژن ۱۶S rDNA دارای بیشترین خویشاوندی با گونه *Streptomyces cuspidosporus* DSM41425 می‌باشد، ولی اختلافات نسبتاً قابل توجه از نظر خصوصیات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی بین گونه ذکر شده و جدایه ۳۵، نشان دهنده این است که برای تعیین گونه جدایه مزبور نیاز به مطالعات بیشتری می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: اکتینومایست، استرپتومایسس، ترکیبات ضدقارچ، کنترل بیولوژیکی.

Abstract

270 actinomycetes were isolated from soils of various regions of Iran including Khuzestan, Esfahan, Gilan, Hormozgan, Mazandaran, Tehran and Azarbayejane Gharbi provinces using special media. Inhibition effects of their extracellular broth were assessed against *Fusarium oxyosporum, Aspergillus niger*, *Alternaria alternata* by top agar layer method. 28 isolates showed antifungal activity against at least one of the fungi tested with more than 20mm diameter of inhibition zone and 5 isolates had more than 30mm diameter of inhibition zone. Isolate #35 demonstrated 10%-42% growth inhibition against all of the fungi tested and selected for further investigations. The effect of 3 seeding and 5 fermentation media on production of antifungal compound by this strain was assessed by cylinder diffusion assay method. The results showed that culture filtrate obtained from seeding medium 2 and Hicky-Tresner fermentation medium had maximum inhibition activity against three tested fungi. So, these media are proposed as suitable media for growth of the strain (inoculum preparation) and production of antifungal agent, respectively. Studies on molecular, morphological and biochemical characteristic of this isolate and 16S rDNA gene nucleotide analysis showed that isolate #35 had maximum similarity to *Streptomyces cuspidosporus* DSM41425. But significant differences in morphological and biochemical characteristics between this species and isolate #35 showed that further investigations are needed for determination of its species.

Key words: Actinomycete, *Streptomyces*, antifungal agents, biological control.

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

روش متداول در مبارزه با بیماری‌های قارچی گیاهی استفاده از کنترل شیمیایی است. ولی به علت بروز مقاومت به قارچ‌کش‌ها و اثرات نامطلوب آفت‌کش‌های شیمیایی در محیط زیست توجه روزافزونی به استفاده از روش مبارزه بیولوژیکی معطوف شده است. در این رابطه اکتینومایست‌ها به عنوان یکی از اعضای اصلی فلور میکربی خاک، مورد توجه است. این باکتری‌ها با تولید آنتی‌بیوتیک یا از طریق انگل بودن برای قارچ‌ها نقش مهمی را در اندرکنش‌های رقابتی (Iznaga *et al*., 2004) و کنترل قارچ‌های بیماریزای خاکزاد ایفا می‌کنند (El-Tarabily *et al*., 2000). ترکیبات ضدقارچ تولید شده توسط این گروه از باکتری‌ها در صنعت کشاورزی برای محافظت گیاهان و محصولات، صنایع غذایی و تیمار چوب کاربرد دارد (Kim *et al*., 1999). گزارش‌های متعددی در ارتباط با اثر آنتاگونیستی اکتینومایست‌های جداسازی شده از خاک علیه قارچ‌های بیماریزای گیاهی منتشر شده است (Youssef *et al*., 2001, Crawford *et al*., 1993). تحقیقات نشان داده که فراوانی استرپتومایسس‌ها در ریشه های سالم گیاه موز (*Musa acuminata*) بیشتر از ریشه‌های پژمرده است (Cao *et al*., 2004). در همین رابطه آنتی‌بیوتیک‌هایی با فعالیت ضدقارچی از اکتینومایست‌ها جدا شده‌اند که از آن جمله می‌توان به بلاستیسیدین S که توسط *Streptomyces griseochromogene*، (Takeuchi *et al*., 1958) کاسوگامایسین توسط *Streptomyces kasugaensis* (Fukagawa *et al*., 1968)، پلی‌اکسین توسط *Streptomyces cacaoi* (Kiyoshi and Suhadolnik, 1976) و والیدامایسین که توسط *Streptomyces hygroscopicus* (Iwasa *et al*., 1971) تولید می‌شوند اشاره کرد که کاربرد زیادی برای کنترل بیماری‌های گیاهی دارند. همچنین Aghighi *et al*. (2004) اکتینومایست‌های مولد ترکیبات ضدقارچی بر علیه *Alternaria solani*، *Alternaria alternate*، *Fusarium solani*، *Phytophthora megasperma*، *Verticiliumdahliea* و *Saccharomyces cervisiaea* را از خاک‌های ایران جدا کردند. از سوی دیگر ژن‌های تولید ترکیبات ضدقارچی اکتینومایست‌ها برای مهندسی ژنتیک گیاهان به منظور افزایش تحمل آنها در برابر عوامل بیماریزای قارچی در نظر گرفته شده اند (Broglie *et al*., 1991). همچنین دیگر اکتینومایست‌ها به ویژه گونه‌های *Streptomyces* حاصلخیزی خاک را افزایش

Archive of SID

www.SID.ir

داده و علیه طیف وسیعی از عوامل بیماریزای گیاهی موجود در خاک فعالیت آنتاگونیستی دارند. گزارش‌های مختلفی در ارتباط با به کارگیری این باکتری‌ها در زمینه مبارزه با عوامل بیماریزای ریشه گیاه منتشر شده است (Bressan, 2003; Valois *et al*., 1996; Merriman *et al*., 1974). از جمله در استرالیا اکتینومایست‌هایی را از ریشه برنج جدا شد که قادر به کنترل قارچ مولد بیماری Take-All در گندم و کاهش اثرات این بیماری تا ٪۷۰ بودند (Coombs, 2002). هدف از این بررسی جداسازی و شناسایی قابلیت بیوکنترلی اکتینومایست‌های موجود در خاک‌های بعضی مناطق ایران به منظور استفاده از آن‌ها در کنترل بیولوژیک بوده است.

روش بررسی

سویه‌های قارچ مورد استفاده : قارچ‌های مورد استفاده در این تحقیق عبارت بودند از: *Fusarium oxyosporum* CBS.620.87 (PTCC 5115)، *Alternaria alternata* PTCC 5224 و *Aspergillus niger* ATCC16404 (PTCC 5011). این قارچ‌ها از جمله عوامل شایع بیماریزای گیاهی هستند و طیف میزبانی وسیعی دارند. قارچ‌های *Fusarium oxyosporum* عامل بیماری پژمردگی در بیش از یکصد گونه گیاهی، *Alternaria alternata* عامل بیماری ایجاد لکه، فساد و سوختگی بر روی بیش از ۳۵۰ گونه گیاهی و *Aspergillus niger* عامل بیماری کپک سیاه در برخی میوه‌ها و سبزی‌ها مانند انگور، گردو، بادام زمینی و پیاز هستند. این سویه‌ها به صورت ویال لیوفیلیزه از بانک‌های میکربی خریداری و به منظور استفاده در این پژوهش برای بررسی فعالیت ضدقارچی جدایه‌های اکتینومایست، در محیط کشت سیب زمینی- دکستروز آگار (PDA) کشت داده شده و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ روز نگهداری شدند. برای استفاده‌های طولانی این سویه‌ها به شکل ویال لیوفیلیزه حفظ شدند.

جمع‌آوری و آماده‌سازی نمونه‌های خاک: نمونه‌های خاک از عمق ۳ تا ۲۰ سانتی‌متری از سطح خاک جمع‌آوری شده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (نوع خاک استفاده شده در جدول ۳ آورده شده است). هر نمونه خاک به منظور آزاد شدن اسپورهای اکتینومایست متصل به ذرات خاک با کوبیدن به صورت پودر درآمد. سپس از الک با قطر منافذ ۲ میلیمتر عبور داده شد. نمونه‌های آماده شده خاک در ظروف پتری شیشه‌ای سترون ریخته

Archive of SID

www.SID.ir

شده و در معرض هوای آزمایشگاه به مدت ۷۲ ساعت خشک شدند (Yallop *et al*., 1997).

خالص‌سازی اکتینومایست‌ها از نمونه‌های خاک: به این منظور ابتدا رقت‌های 10^{-4} و 10^{-3} از نمونه خاک آماده شده و سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از هر رقت در محیط‌های گلیسرول-آرژینین آگار (El-Nakeeb & Lechevalier, 1963)، گلوکز- عصاره مخمر آگار (Agate & Bhat, 1963)، گلیسرول-کازئین آگار (Kuster & Williams, 1964)، عصاره خاک آگار (Waksman, 1957) و نشاسته-کازئین آگار (Kuster & Williams, 1964) کشت داده شدند و محیط‌های کشت به مدت ۲۱ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. به منظور جلوگیری از رشد قارچ‌ها روی محیط‌های کشت، به تمامی محیط‌های کشت، پس از اتوکلاو کردن، ۱۰۰ میکروگرم در لیتر آنتی‌بیوتیک سیکلوهگزیمید سترون شده با صافی ۰/۴۵ میکرومتر، اضافه شد. پس از ظهور کلنی‌های اکتینومایست، مقداری از هر کلنی به محیط کشت عصاره مالت-عصاره مخمر آگار انتقال داده شد و نهایتاً کشت خالص از جدایه‌ها تهیه شد. جدایه‌های دارای فعالیت ضد قارچی به صورت سوسپانسیون اسپور در ۲۰ درصد گلیسرول در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد و نیز به صورت لیوفیلیزه شده در ویال نگهداری شدند.

بررسی فعالیت ضدقارچی جدایه‌های اکتینومایست روی قارچ‌های مورد نظر: اثر جدایه‌های خالص شده اکتینومایست علیه سه قارچ بیماریزای گیاهی *Fusarium oxyosporum* CBS.620.87 و *Alternaria alternata* PTCC 5224 و *Aspergillus niger* ATCC16404 با استفاده از روش top agar layer method مورد ارزیابی قرار گرفت. کشت‌هایی از قارچ‌ها روی محیط سیب زمینی-دکستروز آگار تهیه شده و به شرح زیر استفاده شد. ابتدا جدایه‌های اکتینومایست به صورت نقطه‌ای روی محیط کشت هیکی-ترزنر آگار کشت داده شده و به مدت ۱۰ روز در ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بعد از این مدت سطح ظروف پتری با لایه‌ای از محیط کشت سابورو دکستروز آگار ۰/۶ درصد حاوی تراکم تقریبی $1/5 \times 10^{8}$ اسپور در هر میلی‌لیتر از کشت ۴۸ ساعته قارچ‌های مورد بررسی روی محیط کشت PDA پوشانیده شد. سپس ظروف پتری در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شدند. پس از طی این مدت، در صورت مشاهده هاله بازدارندگی رشد قارچ‌های مورد بررسی، قطر هاله‌ها با کولیس با دقت ۰/۱ میلی‌متر اندازه گیری و به صورت درصد بازدارندگی گزارش شد (Fguira *et al*.,

Archive of SID

www.SID.ir

2005). برای محاسبه درصد بازدارندگی از فرمول زیر استفاده شد (Amal Raj *et al.*,2003):

(۱۰۰mm) قطر پلیت/ [۱۰۰ × (۱۰۰mm) قطر پلیت – قطر هاله بازدارندگی] = درصد بازدارندگی

لازم به ذکر است که داده‌های حاصل میانگین ۲ آزمایش و هر آزمایش شامل ۳ تکرار بوده (جمعاً ۶ تکرار) که پس از انحراف معیار بین داده‌ها درج شده است.

محیط‌های پیش کشت و تولید مناسب برای تولید ترکیبات ضدقارچی: تأثیر نوع محیط پیش کشت (seeding media) و محیط تولید یا تخمیر (fermentation media) در میزان تولید ترکیبات ضد قارچ توسط جدایه اکتینومایست منتخب با استفاده از سه نوع محیط پیش کشت به کار رفته برای تولید آنتی‌بیوتیک‌های مختلف شامل محیط‌های پیش کشت (1) Wink, 2002، Reading & Cole, 1977 (2) و Hamedi *et al*., 2004 (3) (جدول۱) و پنج نوع محیط تولید که در آن متابولیت‌های ثانویه تولید می‌شود (Wink, 2002) (جدول۲) مورد بررسی قرار گرفت. لازم به ذکر است که با توجه به ناشناخته بودن نوع ترکیب ضدقارچ، محیط‌های فوق از بین محیط‌های متداول در تولید آنتی‌بیوتیک‌ها انتخاب شده است. به این منظور ۲ میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپور جدایه اکتینومایست منتخب (جدایه ۳۵) به ۸۰ میلی‌لیتر از محیط‌های پیش کشت در فلاسک ۱۰۰۰ میلی‌لیتر تلقیح و فلاسک‌های پیش کشت در شیکر انکوباتور ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤٢ ساعت با سرعت گردش ۲۰۰ دور در دقیقه نگهداری شدند. سپس از محیط پیش کشت نمونه‌برداری انجام شد و با مشاهده هیف‌های پراکنده و در حال تکثیر و عدم حضور اسپور، ۱ میلی‌لیتر از محیط پیش کشت به ۲۰ میلی‌لیتر از هر یک از ۵ محیط تولید در فلاسک‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری تلقیح شد. فلاسک‌های دارای محیط تولید در شیکر انکوباتور ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت هفت روز با سرعت گردش ۲۰۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. در پایان فرایند، فعالیت ضدقارچی در فلاسک های دارای محیط تولید به روش انتشار در سیلندر سنجیده شد. هر تیمار شامل ۲ بچ و هر بچ شامل ۳ تکرار (جمعاً ۶ تکرار) بود.

سنجش میزان تولید ترکیبات ضدقارچی در محیط‌های مایع: برای ارزیابی میزان تولید ترکیبات ضدقارچی از روش انتشار از سیلندر (cylinder-Diffusion method) استفاده شد. به این منظور مقدار ۲۵ میلی‌لیتر محیط سابورو دکستروز آگار استریل در ظروف پتری شیشه‌ای

Archive of SID

www.SID.ir

استریل ریخته شد. ۰/۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون قارچ‌های مورد بررسی با تراکم تقریبی $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ اسپور در هر میلی‌لیتر در سطح ظروف پتری شیشه‌ای بخوبی گسترانیده شد. سپس روی سطح هر ظرف پتری شش سیلندر استیل استریل با ارتفاع ۱۰ میلی‌متر، قطر داخلی ۶ میلی‌متر و قطر خارجی ۸ میلی‌متر قرار داده شد. در هر سیلندر مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از مایع محیط کشت تولید صاف شده به وسیله فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر ریخته شد. ظروف پتری به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و پس از آن قطر هاله‌های بازدارندگی در اطراف سیلندرها به وسیله کولیس با دقت ۰/۱ میلی‌متر اندازه‌گیری شده و میانگین دو تکرار در مورد هر نمونه ثبت شد.

بررسی ویژگی‌های مورفولوژیک و بیوشیمیایی جدایه ۳۵ : برای مشاهده شکل صحیح هیف‌ها بویژه میسلیوم هوایی و آرایش زنجیره اسپوری، از روش‌های کشت روی لام و روش لام مایل بر روی محیط ISP2 استفاده شد (Kawato & Shinobu, 1959). ویژگی‌های کشتی و تولید رنگیزه روی محیط‌های استاندارد International Streptomyces Project (ISP) بررسی شد (Shirling & Gottlieb, 1966). بررسی توانایی استفاده از منابع کربن و نیتروژن مختلف، فعالیت‌های تجزیه‌ای و آنزیمی و بررسی رشد در pH ، دما و غلظت‌های مختلف سدیم کلرید بر اساس روش استاندارد انجام گرفت (Williams *et al*., 1983).

جدول ۱- محیط‌های پیش کشت مورد بررسی برای رشد جدایه ۳۵ (g/l)

Table 1- Seeding media used for the growth of isolate 35 (g/l)

پیش کشت ۱ **Seeding 1**	پیش کشت ۲ **Seeding 2**	پیش کشت ۳ **Seeding 3**
Malt extract 10.0	Peptone 10.0	Soya meal 40.0
Yeast extract 4.0	Malt extract 10.0	Glucose 5.0
Glucose 4.0	Glycerol 10.0	Glycerol 10.0
pH 7	pH 7	$(NH_4)_2 SO_4$ 2.5
		$(NH_4)_2HPO_4$ 0.6
		$CaCO_3$ 8.0
		pH 7

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲- محیط‌های تولید مورد بررسی برای تولید ترکیبات ضدقارچی توسط جدایه ۳۵ (g/l)

Table 2- Fermentation media used for antifungal compounds production by the isolate 35 (g/l)

محیط نشاسته اصلاح شده Modified Starch medium	محیط نشاسته Starch medium	محیط هیکی-ترزنر Hickey-Tresner medium	محیط گلیسرول Glycerol medium	محیط گلیسرول-آرد سویا Glycerol-Soy meal medium
Starch 20	Starch 30	Dextrin 10	Glycerol 30	Glycerol 15
Rape seed oil 10	Soya meal 15	Malt extract 1	Casein peptone 2	Soya meal 10
Soya meal 15	Corn steep liquor 5	Yeast extract 1	NaCl 1	NaCl5
Corn steep liquor 5	Yeast extract 2	Trypton 2	K_2HPO_4 1	$CaCO_3$ 1
K_2HPO_4 0.5	Trace element solution 1ml	$CoCl_2$ 0.02	$MgSO_4.7H_2O$ 0.5	$CoCl_2.7H_2O$ 0.001
$MgSO_4.7H_2O$ 0.25	pH 7	pH 7.2	Trace element solution 5ml	pH 7
Trace element solution 1ml			pH 6.8	
pH 7				

www.SID.ir

تاکسونومی شیمیایی: شناسایی ایزومر اسید دی آمینو پایمیلیک (DAP) موجود در دیواره سلولی و شناسایی نوع مونوساکاریدهای موجود در عصاره هیدرولیز شده سلول با استفاده از روش Staneck & Roberts (1974) انجام شد. بیومس جدایه ۳۵ به دست آمده در محیط Brain Heart Infusion (BHI) broth (Staneck & Roberts, 1974) با سانتریفوژ جدا شده و پس از شستشو با اتانول ۹۵ درصد خشک گردید. بیومس حاصل در مجاورت با اسید کلریدریک ۶ نرمال و در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت هیدرولیز شد. مایع حاصل فیلتر و تغلیظ گردید و بر روی پلیت سلولزی TLC قرار داده شد. فرآیند تفکیک به کمک سیستم حلالی متانول-آب مقطر- اسید کلریدریک ۶ نرمال -پیریدین (۸۰:۲۶:۴:۱۰) انجام گرفت. برای مشاهده لکه‌ها، صفحه پلیت با محلول ۰/۲ درصد نین هیدرین در استون اسپری شد. با مقایسه R_f لکه‌ها، نوع ایزومر اسید دی آمینو پایمیلیک موجود در دیواره سلولی مشخص گردید.

به منظور شناسایی نوع مونوساکاریدهای موجود در عصاره هیدرولیز شده سلول بیوماس تهیه شده به کمک اسید سولفوریک ۱ نرمال هیدرولیز شد. بیوماس هیدرولیز شده با استفاده از فریزدرایر خشک شد. سپس نمونه در ۳۰۰ میکرولیتر آب مقطر حل و مقدار مناسب در پلیت TLC قرار داده شد. فرآیند تفکیک به کمک سیستم حلال n بوتانول- آب مقطر- پیریدین-تولوئن (۶:۴:۶:۱) انجام گرفت. صفحه پلیت با محلول آنیلین فتالات اسپری و سپس به مدت ۴ دقیقه تحت دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. با مقایسه R_f لکه‌ها، نوع قندهای موجود در دیواره سلولی مشخص گردید.

شناسایی توالی نوکلئوتیدی ۱۶S rDNA: استخراج DNA به وسیله کیت استخراج DNA ژنومی سیگما (امریکا) بر اساس جذب اختصاصی DNA توسط بستر جامد از جنس سیلیکا انجام گرفت و بررسی میزان خلوص و غلظت DNA با روش اسپکتروفتومتری انجام شد. برای تکثیر ژن ۱۶S rDNA از پرایمرهای عمومی تغییر یافته 9F (5' -AAG AGT TTG ATC ATG GCT CAG -3') و پرایمر 1541R (5'- AGG AGG TGA TCC AAC CGC A -3') استفاده شد (Farelly *et al*., 1995 و Suzuki & Giovanni, 1996). بررسی محصول PCR با استفاده از ژل آگارز ۰/۸ درصد با جریان ۷v/cm به مدت ۴۵ دقیقه انجام گرفت. خالص‌سازی توالی تکثیر

Archive of SID

www.SID.ir

شده با استفاده از کیت خالص‌سازی DNA شرکت کیاژن (آلمان) و بر اساس جذب اختصاصی DNA به بستر جامد سیلیکا و شستشوی ناخالصی‌ها انجام شد. محصول خالص واکنش PCR با روش اتوماتیک سنجر با استفاده از روش دی‌دئوکسی‌نوکلئوتیدهای فلورسانت (3130XL Genetic Analyzer, ABI, America) تعیین توالی شد.

آنالیز فیلوژنتیک: مقایسه توالی ۱۶S rDNA جدایه ۳۵ با توالی‌های موجود در پایگاه اطلاعات ژنومی GenBank/DDBJ/EMBL با استفاده از نرم افزار Blast انجام شد. درخت فیلوژنی پس از مرتب کردن توالی نوکلئوتیدی ژن ۱۶S rDNA با گونه های نزدیک به جدایه ۳۵ در جنس *Streptomyces* در نرم افزار Clustal X با استفاده از نرم افزار (Kumar *et al*., 2004) Mega version 3 رسم شد. بررسی اعتبار شاخه‌های درخت با استفاده از نرم افزار Bootstrap analysis (Felsenstein, 1985) صورت گرفت.

نتیجه و بحث

ارزیابی فعالیت ضدقارچی جدایه های اکتینومایست: از میان ۲۷۰ جدایه اکتینومایست جداسازی شده از خاک پس از غربال‌گری اولیه برای تولید ترکیبات ضدقارچ با استفاده از محیط جامد، ۲۸ جدایه هاله بازدارندگی با قطر بیش از ۲۰ میلی‌متر علیه حداقل یکی از قارچ‌ها نشان دادند و ۵ جدایه هاله بازدارندگی رشد با قطر بیش از ۳۰ میلی‌متر علیه تمامی قارچ‌های مورد بررسی نشان دادند. نتایج فعالیت ضدقارچی ۵ جدایه برتر به صورت درصد بازدارندگی در جدول ۳ نشان داده شده است. در نهایت جدایه ۳۵ با بازدارندگی رشد برابر با ٪۴۲–٪۱۰ علیه هر سه جدایه قارچ مورد بررسی جهت مطالعات بعدی انتخاب شد.

جنس *Streptomyces* تاکنون بزرگترین جنس مولد آنتی‌بیوتیک در جهان میکربی بوده است. اگرچه توانایی تولید آنتی‌بیوتیک در این جنس اولین بار توسط Waksman *et al*. (1942) مشخص شده است و بیش از ٦٠ درصد آنتی‌بیوتیک‌های کشف شده تاکنون و نیز اغلب آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در کشاورزی از گونه‌های *Streptomyces* به دست آمده‌اند. ولی مطالعات انجام شده با استفاده از مدل‌سازی‌های ریاضی نشان می‌دهد که توانایی حدود ۹۹ درصد از گونه‌های *Streptomyces* با پتانسیل تولید آنتی‌بیوتیک هنوز تعیین نشده است. بسیاری

Archive of SID

www.SID.ir

از آنتی‌بیوتیک‌های جدید شناخته شده در سال‌های اخیر همچنان از گونه‌های جنس *Streptomyces* به دست آمده‌اند. نتایج کنونی در مورد وجود ترکیبات ضدقارچی در جدایه ۳۵ نیز می‌تواند با توجه به تأثیر بر گونه‌های قارچی مهم از نظر کشاورزی مهم باشد.

انتخاب محیط پیش کشت و محیط تولید تولید ترکیب ضدقارچ: داده‌های ارائه شده در جدول ۳ بازتاب دقیقی از توانایی تولید ترکیبات ضدقارچی توسط جدایه‌های اکتینومایست نیست، زیرا در روش سنجش فعالیت ضدمیکربی بر روی محیط جامد، قطر هاله مهار رشد مشاهده شده علاوه بر میزان و فعالیت ترکیبات ضدقارچی تولید شده توسط جدایه‌های اکتینومایست به میزان زیادی تحت تاثیر میزان قطبیت مولکول، انتشار ترکیب ضدقارچی در آگار و نیز عوامل دیگری از جمله میزان اینوکولوم تلقیح شده است. از سوی دیگر ترکیبات محیط پیش کشت و یا تولید نیز می تواند در میزان تولید ترکیبات ضدمیکربی اثر داشته باشد. به این منظور برای ارزیابی دقیق‌تر توانایی تولید ترکیبات ضدقارچی توسط جدایه ۳۵ ، تأثیر ۳ محیط پیش کشت و ۵ محیط تولید متداول برای اکتینومایست‌ها بر تولید این ترکیبات ارزیابی شده و نتایج حاصل در شکل ۱ نشان داده شده است. همانگونه که مشاهده می‌شود در محیط پیش کشت (۲)، که دارای گلیسرول، عصاره مالت و پپتون به عنوان ترکیبات اصلی بوده است و محیط تولید هیکی-ترزنر که دارای دکسترین و ترپیتون به عنوان ترکیبات اصلی است بیشترین میزان ترکیب ضدقارچ مشاهده شد.

محیط‌های ذکر شده برای تأمین مقدار زیاد ماده ضد قارچ در مراحل بعدی جهت استخراج ترکیب فعال با ویژگی ضدقارچی انتخاب شدند. ترکیب ضدقارچ تولید شده توسط جدایه ۳۵ در تمامی محیط‌های بررسی شده تولید شد. محیط پیش کشت شماره ۲ همراه با محیط تولید هیکی-ترزنر را می‌توان برای دست یابی به غلظت بالای ترکیب فعال این جدایه برای استخراج ترکیب فعال به کار برد. تلاش برای تعیین ویژگی‌های عملکردی و فیزیکوشیمیایی ترکیب ضدقارچ تولیدی توسط این جدایه گام بعدی خواهد بود.

ویژگی‌های مورفولوژیک و فیزیولوژیک جدایه ۳۵ : این جدایه دارای میسلیوم هوایی فراوان و بسیار منشعب است. میسلیوم هوایی این جدایه دارای آرایش فنری شکل بوده و به تعداد زیادی اجسام اسپوری تقسیم می‌شود. جدایه ۳۵ روی تمام محیط‌های ISP مورد بررسی

Archive of SID

www.SID.ir

رشد خوب داشته و اسپور تشکیل می‌دهد. قطر اسپور بین ۰/۷–۰/۵ µm و طول آن ۲–۱/۵ µm است. این جدایه فاقد توانایی تولید رنگیزه محلول در آب و رنگیزه ملانوئید است.

جدایه ۳۵ قادر به رشد در دماهای ۱۰ و ۴۰ درجه سانتیگراد نبوده و دارای رشد بهینه‌ای در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد است. نیز این جدایه قادر به رشد در محدوده pH ۱۱–۵ و غلظت درصد از ۲/۵–۰ NaCl است. این جدایه قادر به استفاده از بسیاری ترکیبات به عنوان تنها منبع کربن و نیتروژن است و توانمندی بالا در استفاده از طیف وسیعی از ترکیبات به عنوان منبع کربن و نیتروژن دارد (جدول ٤).

شناسایی ترکیبات دیواره سلولی: اسید دی آمینو پایمیلیک (DAP) در دیواره سلولی اکتینومایست ۳۵ از نوع ایزومر L است. ضمناً اسیدآمینه گلایسین به عنوان اسید امینه شاخص در دیواره سلولی تعیین گردید. عصاره هیدرولیز شده دیواره سلولی فاقد هرگونه مونوساکارید شاخص بوده و بنابراین می‌توان از این نظر جدایه ۳۵ را دارای نوع C الگوی قندهای دیواره سلولی دانست. جدایه ۳۵ با توجه به مورفولوژی میسلیوم هوایی منشعب و آرایش فنری شکل اسپورها، دارا بودن ایزومر L اسید دی آمینو پایمیلیک (DAP) در دیواره سلول و الگوی مونوساکاریدهای سلولی از نوع C در جنس *Streptomyces* شناخته شد.

Archive of SID

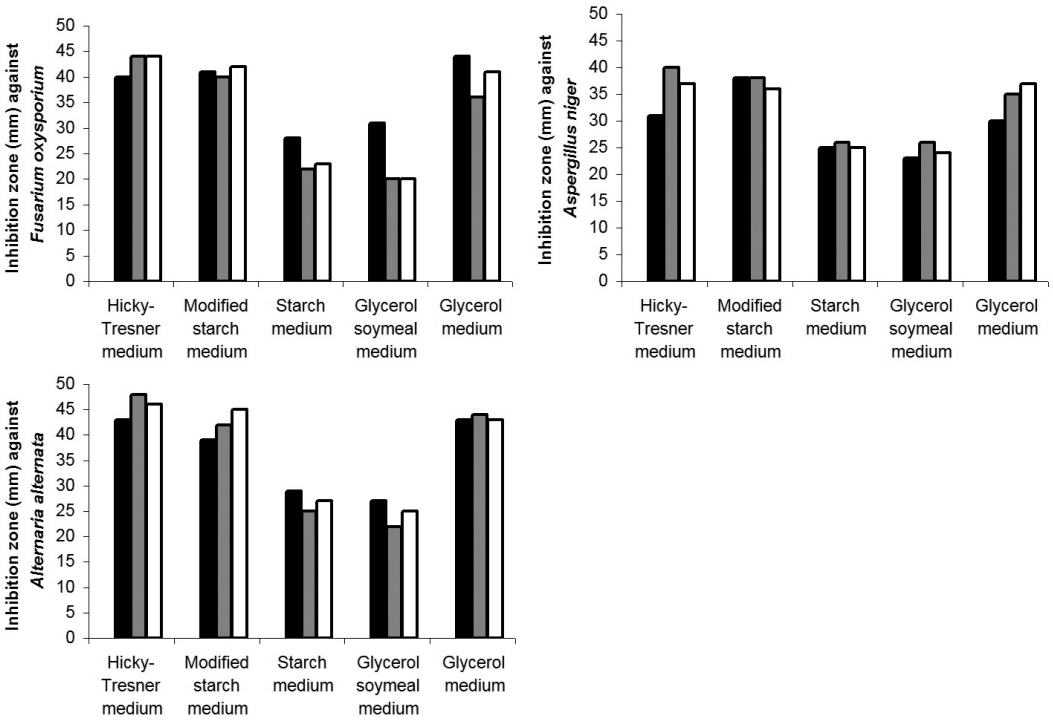
www.SID.ir

جدول ۳- مشخصات ۵ جدایه برتر و درصد بازدارندگی آنها روی قطر کلنی سه قارچ مورد بررسی روی محیط های جامد. میزان انحراف معیار داده ها به صورت ± در جدول آورده شده است. (**درصد بازدارندگی = [قطر هاله بازدارندگی – قطر پلیت (100mm)] × ۱۰۰/ قطر پلیت (100mm)**)

Table 3- Characteristics of 5 selected isolates of actinomycetes and their effect on the colony diameter of studied fungi on solid media. Percent of Inhibition = [diameter of inhibition zone – diameter of the plate (100mm)] ×100/ diameter of the plate (100mm)

جدایه Isolates	محیط جداسازی Isolation media	pH خاک Soil pH	نوع خاک Soil type	محل جداسازی Isolation region	درصد بازدارندگی Percent of inhibition		
					Alternaria alternata	*Fusarium oxyosporum*	*Aspergillus niger*
146	glycerol-casein agar	8.06	Rhizospherical, Forest	Esfahan, Ardestan	30± 0.56	44± 0.71	54± 0.49
89	starch-casein agar	7.67	Rhizospherical, Sandy	Khuzestan, Mahshahr	50± 0.70	48± 0.39	56± 0.70
35	starch-casein agar	8.09	Rhizospherical, Forest	Esfahan, Ahmadabad	29±0.58	42± 0.44	10± 0.41
163	starch-casein agar	8.09	Rhizospherical, Forest	Esfahan, Ahmadabad	30± 0.42	24± 0.33	54± 0.62
62	glycerol-casein agar	7.93	Non rhizospherical, Sandy	Khuzestan, Jarrahi	58± 0.37	58± 0.45	42± 0.38

www.SID.ir



شکل ۱- میزان فعالیت ضدقارچی جدایه ۳۵ در محیط‌های پیش کشت و محیط‌های تولید مختلف بر حسب قطر هاله بازدارندگی (mm)، محیط پیش کشت ۱ (■)، محیط پیش کشت ۲ (▩) و محیط پیش کشت ۳ (□)

Figure 1- Antifungal activity of the isolate 35 in different seeding media: 1 (■), medium 2 (▩), medium 3 (□) and fermentation media (mm)

www.SID.ir

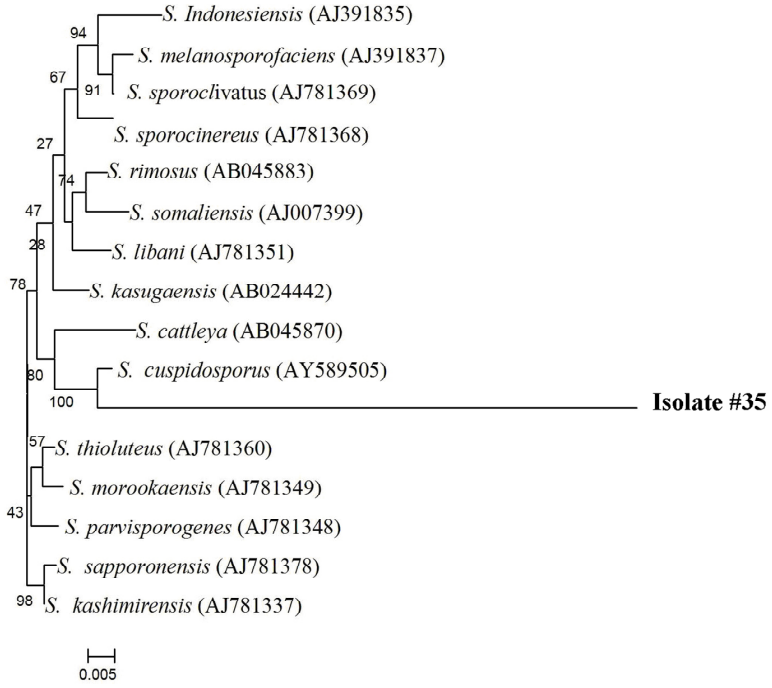
جدول ٤- ویژگی‌های بیوشیمیایی جدایه ۳۵

Table 4- Biochemical Characteristics of isolate 35

۳۵ واکنش جدایه **Strain 35**	ویژگی ها **Characteristics**	۳۵ واکنش جدایه **Strain 35**	ویژگی ها **Characteristics**
مصرف منبع کربن **Carbon utilization**		**توانایی تجزیه** **Degradation ability**	
+	Xylose	+	Casein
+	Fructose	+	Starch
+	Galactose	−	Adenine
+	Rhamnose	−	Urea
+	Sucrose	+	DNA
+	Maltose	−	Pectin
+	Lactose	+	Tween 80
+	Rafinose	+	Tween 85
+	Arabinose	**مصرف منبع نیتروژن** **Nitrogen utilization**	
+	Sorbitol	+	Valin
+	Mannose	+	Sodium nitrate
+	Gluconate	+	Argenine
+	Pyrovate	+	Histidine
+	Citrate	+	Threonine
+	Propionate	+	Asparagine
+	Acetate	+	Phenylalanine
+	Lactate	+	Cycstein
−	Oxalate	+	Methionine
+	Inoline	+	Proline
+	Inositol	+	Tyrosine
+	Adonitol	+	Tryptophane
+	Esculin	فعالیت آنزیمی **Enzyme activity**	
+	Salicin	−	Nitrate reduction
+	Ribose		

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۳- دندروگرام ۱۶S rDNA موقعیت فیلوژنتیک جدایه ۳۵ و اعضای مرتبط در جنس *Streptomyces*را نشان می‌دهد. اعداد ذکر شده در بخش انشعاب، نشانگر درصد نمونه‌گیری Bootstrap از ۱۰۰۰ نمونه است.

Fig. 3- Dendrogram of phylogenetic position of isolate 35 and related *Streptomyces* species. Numbers at nodes indicate percentages of bootstrap samplings, derived from 1000 re-samplings

آنالیز فیلوژنتیک توالی نوکلئوتیدی ژن ۱۶S rRNA جدایه ۳۵ با گونه‌های نزدیک در جنس *Streptomyces*: در شکل ۳ میزان قرابت جدایه ۳۵ با گونه‌های نزدیک در جنس *Streptomyces* نشان داده شده است. آنالیز توالی نوکلئوتیدی ژن ۱۶S rDNA این جدایه ۹۷/۸۸ درصد تشابه نوکلئوتیدی با گونه *Streptomyces cuspidosporus* DSM41425 را مشخص ساخت. همچنین این جدایه بیشترین خویشاوندی را در درخت فیلوژنتیک با گونه DSM41425

Archive
www.SID.ir

Streptomyces cuspidosporus نشان می‌دهد. جدایه ۳۵ برخلاف این جدایه با رنگ میسلیوم هوایی و توده اسپوری خاکستری رنگ دارای رنگ سفید بوده و فاقد توانایی تولید پیگمان محلول در آب است. با توجه به تفاوت‌های فنوتیپی و ژنوتیپی این جدایه مولد ترکیب ضدقارچ قوی می‌تواند گونه‌ای جدید از جنس *Streptomyces* باشد*.

منابع

AGATE, A. D. and J. V. BHAT, 1963. A method for the preferential isolation of actinomycetes from soils, Antoine van Leeuwenhoek, 29: 297-304.

AGHIGHI, S., G. H. SHAHIDI BONJAR, R. RAWASHDEH, S. BATAYNEH and I. SAADOUN, 2004. First Report of Antifungal Spectra of Activity of Iranian Actinomycetes Strains Against *Alternaria solani*, *Alternaria alternate*, *Fusarium solani*, *Phytophthora megasperma*, *Verticillium dahliae* and *Saccharomyces cerevisiae*, Asian Journal of Plant Sciences, 3: 463-471.

AMAL RAJ, A., R. RAGHUNATHAN, M. R. SRIDEVIKUMARIB and N. RAMANB, 2003. Synthesis, Antimicrobial and Antifungal Activity of a New Class of Spiro Pyrrolidines, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 11: 407-419.

BRESSAN, W. 2003. Biological control of maize seed pathogenic fungi by use of actinomycetes, BioControl, 48: 233-240.

BROGLIE, K., I. CHET, M. HOLLIDAY, R. CRESSMAN, P. H. BIDDLE, G. KNOWLTON, C. J. MAUVAIS and R. BROGLIE, 1991. Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*, Science, 254: 1194-119.

CAO, L., Z. QIU, X. DAI, H. TAN, Y. LIN and S. ZHOUL, 2004. Isolation of Endophytic Actinomycetes From Roots and Leaves of Banana (*Musa Acuminata*) Plants and Their Activities Against *Fusarium oxysporum*. sp. Cubense, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 20: 501-504.

COOMBS, J. T. 2002. ScienceNow! The national science forum, 20-22 August.

* **نشانی نگارندگان:** دکتر جواد حامدی و مهندس فاطمه محمدی‌پناه، آزمایشگاه بیوتکنولوژی میکربی، بخش میکروبیولوژی، دانشکده زیست شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، صندوق پستی ۶۴۵۵-۱۴۱۵۵، تهران، ایران.

Archive of SID

www.SID.ir

(www.abc.net.au/science/news).

CRAWFORD, D. L., J. M. LYNCH, J. M. WHIPPS and M. A. OUSLEY, 1993. Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. Applied and Enviromental Microbiology, 59: 3899-3905.

El-NAKEEB, M. A. and H. A. LECHEVALIER, 1963. Selective isolation of aerobic actinomycetes, Applied Microbiology, 11: 75-77.

EL-TARABILY, K. A. S., G. E. J. HARDY, K. SIVASITHAMPARAM, A. M., HUSSEIN and D. I. KURTBOKE, 1997. The potential for the biological control of cavity-spot disease of carrots, caused by *Pythium coloratum*, by streptomycete and non-streptomycete actinomycetes. New Phytologist, 137: 495–507.

El-TARABILY, K. A., M. H. SOLIMAN, A. H. NASSAR, H. A. Al-HASSANI, K. SIVASITHAMPARAM, F. MCKENNA and G. E. St J. HARDY, 2000. Biological control of *Sclerotinia* minor using a chitinolytic bacterium and actinomycetes, Plant Pathology, 49: 573-583.

FARELLY, V., F. A. RAINLEY and E. STACKEBRANDT, 1995. Effect of genome size and *rrn* gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species, Applied and Enviromental Microbiology, 61: 2798-2801.

FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution, 39:783-791.

FGUIRA, L. F. B., S. FOTSO, R. B. AMEUR-MEHDI, L. MELLOULI and H. LAATSCH, 2005. Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated *Streptomyces* sp. strain US80, Research in Microbiology, 156: 341-347.

FOURATI-BEN FGUIRA, L., S. FOTSO, R. BEN AMEUR-MEHDI, L. MELLOULI, and H. LAATSCH, 2005. Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated *Streptomyces* sp. strain US80, Research in Microbiology, 156: 341-347.

FUKAGAWA, Y., T. SAWA, I. HOMMA, 1968. Studies on biosynthesis of kasugamycin. V. Biosynthesis of the amidine group. Journal of Antibiotics, 21, 410-412.

HAMAKI, T., M. SUZUKI, R. FUDOU, Y. JOJIMA, T. KAJIURA, A. TABUCHI, K. SEN and H. SHIBAI, 2005. Isolation of novel bacteria and actinomycetes using soil extract agar medium, Journal of Bioscience and Bioengineering, 99, 5: 485-492.

HAMEDI, J., F. MALEKZADEH and A. E. SAGHAFI-NIA, 2004. Enhancing of

Archive of SID

www.SID.ir

erythromycin production by *Saccharopolyspora erythraea* with common and uncommon oils, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 10: 447-456.

HICKEY R. J., TRESNER H. D., 1952. A cobalt-containing medium for sporulation of *Streptomyces* species, Journal of Bacteriology, 64: 891-892.

IWASA, T., E. HIGASHIDE, H. YAMAMOTO, and M. SHIBATA, 1971. Studies on validamycins, new antibiotics. II. Production and biological properties of validamycins A and B. Journal of Antibiotics 24: 107- 113.

IZNAGA, Y., M. LEMUS, L. GONZALEZ, L. GARMENDIA, L. NADAL and C. VALLIN, 2004. Antifungal activity of actinomycetes from Cuban soils, Phytotherapy Research, 18: 494-496.

KAWATO, N. and R. SHINOBU, 1959. On *Streptomyces herbaricolor* sp. nov., supplement: a single technique for microscopical observation, Mem Osaka Univ Lib Arts Educ B 8, 114-119.

KIM, B. S., S. S. MOON, B. K. HWANG, 1999. Isolation, identification, and antifungal activity of a macrolide antibiotic, oligomycin A, produced by *Streptomyces libani*, Canadian Journal of Botany , 77: 850-858.

KIYOSHI, I. and R. J. SUHADOLNIK, 1976. The biosynthesis of natural and unnatural polyoxins by *Streptomyces cacaoi*, Archives of Biochemistry and Biophysics, 173: 141-153.

KUMAR, S., K. TAMURA, M. NEI, 2004. Mega 3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. Briefings in Bioinformatics, 5, 150-163.

KUSTER, E. and S. T. WILLIAMS, 1964. Selection of media for isolation of streptomycetes, Nature, 202: 928.

MERRIMAN, P. R., R. D. PRICE, J. F., KOLLMORGEN, T. PIGGOTT and E. H. RIDGE, 1974. Effect of seed inoculation with *Bacillus subtilis* and *Streptomyces griseus* on the growth of cereals and carrots, Australian Journal of Agricultural Research, 25: 219.

OKAMI, Y. and K. HOTTA, 1988. Search and discovery of new antibiotics, p. 39, In M. Goodfellow, S. T. Williams, and M. Mordarski (eds.), Actinomycetes in Biotechnology. Academic Press, London.

READING, C. and M. COLE, 1977. Clavulanic acid: a β-lactam from *Streptomyces clavuligerus*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 11: 852-857.

Archive of SID

www.SID.ir

SHIRLING, E. B. and D. GOTTLIEB, 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species, International Journal of Systematic Bacteriology 16: 313- 340.

STANECK, J. L. and G. D. ROBERTS, 1974. Simplified approach to the identification of aerobic actinomycetes by Thin-layer chromatography, Applied Microbiology, 28: 226-23.

SUZUKI, M. T. and S. J. GIOVANNI, 1996. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR, Applied Environmental Microbiology, 62: 625–630.

TAKEUCHI, S., K. HIRAYAMA, K. UEDA, H. SAKAI, H. YONEHARA, 1958. Blasticidin S, a new antibiotic, Journal of Antibiotics, 11: 1±5.

TANAKA, Y. T. and S. OMURA, 1993. Agroactive compounds of microbial origin, Annual Review of Microbiology , 47: 57–87.

VALOIS, D., K. FAYAD, T. BARASUBIYE, M. GARON, C. DERY, R. BRZEZINSKI, and C. BEAULIEU, 1996. Glucanolytic actinomycetes antagonistic to *Phytophthora fragariae* var. rubi, the causal agent of raspberry root rot, Applied and Environmental Microbiology, 62: 1630-1635.

WAKSMAN, S. A. 1957. Species concept among the actinomycetes with special reference to the genus *Streptornyces*, Bacteriology Review, 21: 1-29.

WARD, D. M., R. WELLER, and M. M. BATESTON, 1990. 16S rRNA sequence reveals numerous uncultured microorganisms in a natural community, Nature, 345: 63–65.

WATVE, M. G., R. TICKOO, M. M. JOG and B. D. BHOLE, 2001. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? , Archives of Microbiology, 177: 86–90.

WILLIAMS, S. T., M. GOODFELLOW, G. ALDERSON, E. M. H. WELLINGTON, P. H. A. SNEATH and M. J. SACKIN, 1983. Numerical classification of *Streptomyces* and related taxa, Journal of General Microbiology, 129: 1743-1813.

WINK, J. 2002. The Actinomycetales, An order in the class of Actinobacteria important to the pharmaceutical industry- Electronic manual, Aventis Pharma., Deutschland Gmbh.

YALLOP, C. A., C. EDWARDS, and S. T. WILLIAMS, 1997. Isolation and growth physiology of novel Thermoactinomycetes, Journal of Applied Microbiology, 83: 685-692.

YOUSSEF, Y. A., K. A. EL-TARABILY and A. M. HUSSEIN, 2001. *Plectosporium tabacinum* Root Rot Disease of White Lupine (*Lupinus termis* Forsk.) and its Biological

Archive of SID

www.SID.ir

Control by Streptomyces Species, Journal of Phytopathology, 149: 29-33.

Address of the authers: Dr. J. HAMEDI and Eng. F. MOHAMMADIPANAH, Microbial Biotechnology Laboratory, Department of Microbiology, School of Biology, College of Science, University of Tehran, P. O. Box 14155-6455, Tehran, Iran.

Archive of SID

www.SID.ir