شناسایی مولکولی و بررسی برخی خصوصیات فیزیولوژیکی سویه‌های استرپتومایسس علیه شبه قارچ *Phytophthora nicotianae* مولد بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه گیاه فلفل دلمه‌ای (*Capsicum annuum L.*)

فاطمه حسن خانی[۱]، غلامحسین شهیدی بنجار[۲]، سونیا عقیقی[۳]*

[۱]دانشجوی کارشناسی ارشد رشته بیماری شناسی گیاهی، بخش مهندسی گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان
[۲]استاد تمام رشته بیماری شناسی گیاهی، بخش مهندسی گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان
[۳] * استادیار رشته بیماری شناسی گیاهی، پژوهشکده فناوری تولیدات گیاهی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ۲۳۳۵۲۵۲۵۳۹
*نویسنده مسئول: aghighis@uk.ac.ir

چکیده

گونه‌های *Streptomyces* و متابولیت‌های آن‌ها به‌عنوان عوامل مؤثری برای کنترل عوامل بیمارگرگیاهی مختلف قارچی و باکتریایی محسوب می‌شوند. در این پژوهش ابتدا از طریق نمونه‌برداری خاک منطقه ریشه درختان جنگل قائم‌شهر کرمان شامل درختان کاج، توت و عرعر ۶۰ جدایه استرپتومایسس به‌دست‌آمده و خالص‌سازی گردیدند. سپس فعالیت ضد شبه قارچی این جدایه ها علیه عامل پوسیدگی ریشه و طوقه فلفل *Phytophthora nicotianae* موردبررسی قرار گرفت که سه جدایه H1، H8 و H24 فعالیت بازدارندگی در شرایط آزمایشگاهی اعمال نمودند. آزمایش‌ها فراتری شامل اثبات بیماری‌زایی روی میوه گیاه فلفل دلمه‌ای، بررسی آزمون رشد در حضور کلرید سدیم، بررسی تولید آنزیم‌های خارج سلولی (لیپاز، آمیلاز و کیتیناز) جدایه های مذکور انجام گرفت. نتایج این پژوهش نشان داد که شبه قارچ *P. nicotianae* بعد از ۷ روز کاملاً میوه فلفل را آلوده نمود و هر سه جدایه H1، H8، H24 هاله شفاف ایجاد کرده و توانایی تولید آنزیم کیتیناز و لیپاز و آمیلاز را دارا می‌باشند و جدایه H1 در کلرید سدیم ۵٪ رشد خوبی داشت ولی جدایه های H8 و H24 رشد ضعیفی داشتند. همچنین جدایه H1 در حضور کلریدسدیم ۷٪ رشد نسبتاً خوبی داشت. جدایه های مزبور بر اساس آنالیز توالی زیر واحد کوچک RNA ریبوزومی (16S rDNA) شناسایی و بر اساس نتایج حاصل، این جدایه ها همگی متعلق به گونه‌های استرپتومایسس بوده و سویه H1 بیشترین همپوشانی را با *Streptomyces labedae* (99/1 درصد) داشت. آماده‌سازی آزمایش گلخانه‌ای تحقیق مزبور در دست انجام می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های خارج سلولی، *Capsicum annuum*, Phytophthora nicotianae ،Streptomyc

مقدمه

کنترل بیولوژیک به مدیریت غیر شیمیایی عوامل بیمارگر گیاهی از طریق کاهش اثرات مضر یک بیمار گراز طریق کاربرد دیگر موجودات زنده اطلاق می‌گردد (Cook & Baker, 1983). گونه‌های استرپتومایسس و متابولیت‌های آن‌ها به‌عنوان عوامل کارآمدی برای کنترل بیمارگرهای گیاهی مختلف قارچی و باکتریایی محسوب می‌شوند. تولید آنتی‌بیوتیک‌ها و ترکیبات آلی فرار از ویژگی‌های منحصربه‌فرد این میکروارگانیسم‌ها بوده و توسعه آنها در قالب کود و سموم طبیعی می‌تواند سبب کاهش مصرف ترکیبات مضر شیمیایی در سیستم‌های کشاورزی اعم از گلخانه یا مزرعه گردد. علاوه بر این، توانایی آن‌ها برای افزایش شاخص‌های رشدی و عملکرد گونه‌های گیاهی در تعدادی از محصولات زراعی و باغی نشان داده‌شده است (Vurukonda *et al.* 2018). *Phytophthora nicotianae* بیمارگر گیاهی ویرانگر با توزیع جهانی است که سبب پوسیدگی طوقه و ریشه، میوه و برگ می‌شود. زیان‌های اقتصادی ناشی از *P. nicotianae* به دلیل تنوع میزبان بسیار زیاد بوده و مدیریت آن به دلیل ماهیت خاک بردی، یک چالش محسوب می‌گردد و بر اساس اهمیت خسارت اقتصادی به محصولات باغی در سطح ایران و جهان، در لیست ده اوومیست بیمارگر مهم قرارگرفته است (میجانی و همکاران، ۱۳۹۹). هدف این مقاله ارزیابی خاصیت ضد شبه قارچی جدایه های استرپتومایسس علیه شبه قارچ مزبور و بررسی برخی خصوصیات فیزیولوژیکی و شناسایی مولکولی آنها می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و جداسازی استرپتومایسس ها: از خاک ناحیه ریشه درختان کاج، توت، عرعر منطقه جنگل قائم واقع در شهر کرمان نمونه‌برداری انجام و حدوداً ۵۰۰ گرم خاک جمع‌آوری شد. بعد از خشک شدن نمونه‌ها، خاک هر نمونه به‌صورت جداگانه الک شد تا بافتی نرم و یکنواخت حاصل گردد و روی محیط CGA (Casein Glycerin Agar)استرپتومایسس ها جداسازی شدند. پس از گذشت ۵ تا ۷ روز روی محیط کشت پرگنه های متفاوتی از استرپتومایسس ها ظاهر گردید. از هر پرگنه، کشت چمنی روی پلیت های حاوی CGAتهیه و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند (سلطانی نژاد و همکاران، ۱۳۹۲).

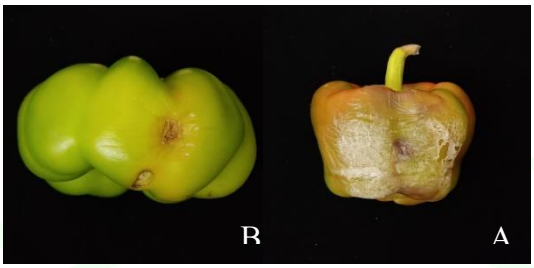
اثبات بیماری‌زایی روی میوه: با استفاده از روشی به نام تله میوه اثبات بیماری‌زایی انجام شد. در ابتدا میوه‌های فلفل با اتانل ۷۰٪ ضدعفونی و زخم سطحی روی میوه ایجاد گردید، سپس پلاگ به قطر ۶ میلی‌متر از حاشیه پرگنه کشت ۷ روزه فیتوفتورا روی زخم قرار داده شد و روی آن توسط پارافیلم پوشانده گردید. بعد از سه روز شبه قارچ روی میوه فلفل شروع به رشد نمود و بعد از ۷ روز شبه قارچ کاملاً میوه فلفل را آلوده نمود. از میوه آلوده مجدداً شبه قارچ بیمارگر روی محیط کشت CMA جداسازی و هویت آن تائید گردید. آزمون رشد در حضور کلرید سدیم: برای انجام این آزمون که میزان رشد در مقادیر مختلف NaCl موردبررسی قرار می‌گیرد، محیط کشت CGAحاوی ۵٪، ۷٪ و ۱۰٪ کلرید سدیم تهیه‌شده و جدایه های استرپتومایسس روی آن کشت گردید و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند (سلطانی نژاد و همکاران، ۱۳۹۲). آزمون فعالیت لیپازی: برای سنجش ترشح آنزیم لیپاز توسط جدایه‌های فعال استرپتومایسس از محیط کشتی شامل ۱۰ گرم پپتون، ۵ گرم کلرورسدیم، ۰/۱ گرم کلرورکلسیم، ۱۵ گرم آگار و ۱ لیتر آب مقطر استفاده شد که پس از استریل شدن به این محیط که در حال سرد شدن است ۱۰ میلی‌لیتر توین ۸۰ استریل اضافه‌شده و در تشتک پتری ریخته شد. پس از ۲۴ ساعت، دیسکی به قطر شش میلی‌متر از کشت‌های ۵ تا ۷ روزه جدایه‌های فعال به محیط مذکور منتقل گردید یا جدایه ها به‌صورت نقطه‌ای روی محیط کشت، کشت داده شدند. در صورت ترشح آنزیم لیپاز، هاله رسوبی در اطراف محل رشد باکتری دیده می‌شود که نشان‌دهنده هیدرولیز شدن توین است (Sierra, 1957).

آزمون فعالیت آمیلازی: از این آزمون جهت سنجش تولید آنزیم آمیلاز و توانایی تجزیه نشاسته استفاده گردید، بدین منظور محیط کشت CGA بدون کازئین و حاوی ۱٪ نشاسته تهیه و پس از گذشت ۲۴ ساعت، به‌صورت نقطه‌ای استرپتومایسس ها کشت شدند. این تشتک‌های پتری به مدت سه روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس روی پتری‌ها ۱۰ میلی‌لیتر محلول لوگول ریخته شد. ید با نشاسته واکنش داده و رنگ آبی ایجاد می‌کند و قسمت‌هایی که نشاسته تجزیه‌شده‌اند، هاله بی‌رنگی بجا می‌ماند (MacFaddin, 2000).

آزمون فعالیت کیتینازی: در این آزمون از محیط حداقل که حاوی ۰/۴ درصد کیتین کلوئیدال و ۱/۵ درصد آگار، به‌منظور شناسایی جدایه‌های استرپتومایسس دارای فعالیت کیتینازی، استفاده شد. در این محیط، کیتین به‌عنوان تنها منبع کربن استفاده شد. این محیط در دمای ۱۲۱°C به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شد. پس‌ازآن، محیط به تشتک‌های پتری استریل منتقل شد و بعد از انجماد، جدایه‌های اکتینومیست به‌صورت نقطه‌ای روی محیط آماده‌شده کشت شد. جدایه‌های استرپتومایسس دارای فعالیت کیتینازی، از طریق هیدرولیز کیتین و تشکیل هاله شفاف در اطراف پرگنه ها، قابل‌تشخیص خواهند بود (Hsu & Lockwood, 1975).

نتایج و بحث

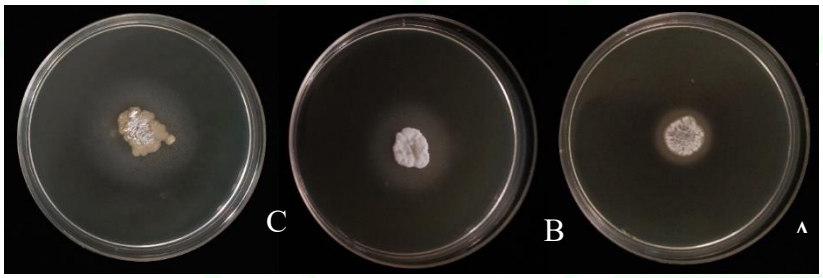
اثبات بیماری‌زایی روی میوه: بعد از سه روز شبه قارچ روی میوه فلفل شروع به رشد نمود و بعد از ۷ روز این شبه قارچ کاملاً میوه فلفل را منهدم کرد (شکل ۱).



شکل ۱. آزمون اثبات بیماری‌زایی شبه قارچ *Phytophthora nicotianae* روی میوه فلفل دلمه‌ای: A: تیمار شبه قارچ B: تیمار شاهد.

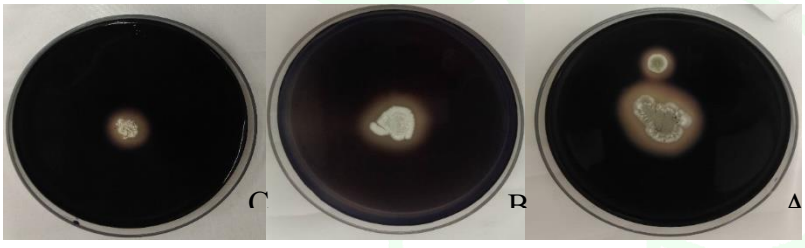
آزمون رشد در حضور کلرید سدیم: جدایه H1 در غلظت ۵٪ رشد خوبی داشت و جدایه های H8 و H24 رشد ضعیفی داشتند، در غلظت ۷٪ جدایه H1 رشد نسبتاً خوبی داشت و جدایه های H1 و H24 رشد نداشتند، هر سه جدایه در غلظت ۱۰٪ رشدی نداشتند.

آزمون فعالیت لیپازی: هر سه استرپتومایسس جدایه H1، H8 و H24 آنزیم لیپاز را ترشح می‌کنند و به میزان مشابه نسبت به هم لیپید موجود در محیط کشت را تجزیه کردند (شکل ۲).



شکل ۲. آزمون فعالیت لیپازی. هر سه جدایه استرپتومایسس فعالیت لیپازی دارند. A: جدایه H1 ، B: جدایه H8، C: جدایه H24.

آزمون فعالیت آمیلازی: پس از رشد پرگنه‌ها و اضافه شدن لوگول به محیط آن‌ها در هر سه جدایه استرپتومایسس H1، H8 و H24 هاله بی‌رنگی دیده شد که نشان‌دهنده فعالیت آمیلازی و تجزیه نشاسته محیط است (شکل ۳).



شکل ۳. آزمون فعالیت آمیلازی هر سه جدایه استرپتومایسس فعالیت آمیلازی دارند. A: جدایه H1 B: جدایه H8:C جدایه H24

آزمون فعالیت کیتینازی: در هر سه جدایه H1، H8 و H24 هاله شفاف مشاهده شد که نشان‌دهنده تجزیه کیتین توسط این جدایه ها می‌باشد. شناسایی مولکولی جدایه های آنتاگونیست بر اساس تجزیه‌وتحلیل‌های فیلوژنی بر اساس ژن 16S rDNA: نتایج تجزیه‌وتحلیل بیوانفورماتیک استرپتومایسس جدایه H1 نشان داد که بیشترین همپوشانی (۹۹/۱ درصد قرابت) را با *Streptomyces labedae* دارد.

نتیجه‌گیری

امید بر آن است که جدایه منتخب این تحقیق در بررسی‌های فراتری مورد پایش قرارگرفته و با توجه به پتانسیل مناسب آنها تا مراحل تجاری‌سازی، تولید کودهای زیستی، بهبود شاخص‌های رشدی و عملکرد محصولات کشاورزی و تولید ترکیبات بازدارنده زیستی جهت بیوکنترل عوامل بیمارگر گیاهی پیش بروند. توجه ویژه به توسعه کودها و سموم زیستی در قالب توسعه هدفمند تحقیقات و تجاری‌سازی این قبیل محصولات، منجر به تعدیل کاربری کودها و سموم شیمیایی در گلخانه‌ها، مزارع و باغات خواهد گردید.

منابع

سلطانی نژاد، م.، شهیدی بنجار، غ. ح. ، ذوالعلی، ج. ۱۳۹۲. مطالعه اثرات آنتاگونیستی و بررسی مولکولی اکتینومیست های خاکزی گیلان علیه قارچ *Rhizoctonia solani* AG1 عامل شیت بلایت برنج. پایان‌نامه جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه شهید باهنر کرمان ، ص: ۸۰.

میجانی، ر.، شهیدی بنجار، غ. ح. ، عقیقی، س.، صادقی، ا.، ۱۳۹۹، ارزیابی تأثیر استرپتومیسس‌های خاک‌برد بر شاخص های رشدی گیاه گوجه فرنگی تحت شرایط تنش زیستی ناشی از شبه قارچ *Phytophthora nicotianae*. زیست شناسی میکروارگانیسم ها، doi: 10.22108/bjm.2020.124279.1316

Cook, R. J., & Baker, K. F. (1983). The nature and practice of biological control of plant pathogens. American Phytopathological Society, 539.

Hsu, S. C., & Lockwood, J. L. (1975). Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil. Applied microbiology, *29:* 422-42

MacFaddin, J. (2000). Biochemical tests for identification of medical bacteria. *Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins*, 303-309.

Sierra, G. (1957). A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. Antonie van Leeuwenhoek, 23: 15-22.

Vurukonda, S. S. K. P., Giovanardi, D., & Stefani, E. (2018). Plant growth promoting and biocontrol activity of Streptomyces spp. as endophytes. International Journal of Molecular Sciences, 19: 952.

Molecular Identification and Investigation on some Physiological Properties of *Streptomyces* Strains against *Phytophthora nicotianae* Causing Crown and Root Rot of Bell Pepper (*Capsicum annuum* L.)

Fatemeh HassanKhani[1], Gholam Hossein Shahidi Benjar[2], Sonia Aghighi[3]*

1MSc Student, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

2 Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

3*Assistant Professor, Research and Technology Institute of Plant Production (RTIPP), Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. 09352505978

Corresponding Author: aghighis@uk.ac.ir

Abstract

Streptomyces species and their metabolites are considered as effective factors for controlling various fungal and bacterial plant pathogens. In this study, 60 *Streptomyces* isolates were isolated and purified by soil sampling from root regions of different trees such as pine and mulberry located in Ghaem forest, Kerman, Iran. Antifungal activity of these isolates against *Phytophthora nicotianae* was carried out and three isolates including H1, H8 and H24 revealed inhibitory activity, *in vitro*. Further tests including pathogenicity of *P. nicotianae* on bell pepper fruit, *Streptomyces* species growth test in the presence of Sodium Chloride at 5 and 7%, production of extracellular enzymes (lipase, amylase and chitinase) by H1, H8 and H24 were performed. Results of this study showed that the fungus-like *P. nicotianae* completely infected the pepper fruit, 7 days post inoculation. All three antagonists were able to produce enzymes chitinase, lipase and amylase. H1 isolate in the presence of sodium chloride (5%) had a good growth whereas isolates H8 and H24 had weak growth. H1 isolate also had a relatively good growth in the presence of Sodium Chloride 7%. These isolates were identified based on sequence analysis of small ribosomal RNA subunit (16S rDNA) and based on the results, these isolates all belonged to *Streptomyces* species and H1 strain had the highest similarity with *Streptomyces labedae* (99.1%). It should be noted that greenhouse experiment is underway.

Keywords: *Capsicum annuum*, Extracellular enzymes, *Phytophthora nicotianae*, *Streptomyces*