12th Iranian Horticultural Science Congress
September 05-08 2021
۱۴ لغایت ۱۷ شهریورماه ۱۴۰۰
دوازدهمین کنگره علوم باغبانی ایران
دانشگاه شهید باهنر کرمان

شناسایی مولکولی و بررسی برخی خصوصیات فیزیولوژیکی سویه های استرپتومایسس علیه شبه قارچ *Phytophthora nicotianae* مولد بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه گیاه فلفل دلمه ای

فاطمه حسن خانی، غلامحسین شهیدی بنجار، سونیا عقیقی
دانشجوی کارشناسی ارشد،رشته بیماری شناسی گیاهی، بخش مهندسی گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهیدباهنرکرمان
استاد تمام ،رشته بیماری شناسی گیاهی، بخش مهندسی گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهیدباهنرکرمان
استادیار،رشته بیماری شناسی گیاهی،بخش فناوری تولیدات گیاهی،دانشگاه شهیدباهنر کرمان
fatemehassankhani@gmail.com

چکیده

در این پژوهش ابتدا از طریق نمونه برداری خاک منطقه ریشه درختان جنگل قائم شهر کرمان ۶۰ جدایه استرپتومایسس بدست آمده و خالص سازی گردیدند. سپس فعالیت ضد شبه قارچی این جدایه ها علیه عامل پوسیدگی ریشه و طوقه فلفل *Phytophthora nicotianae* مورد بررسی قرار گرفت که سه جدایه H1، H8و H2 فعالیت بازدارندگی در شرایط آزمایشگاهی اعمال نمودند. آزمایشاتی شامل اثبات بیماری زایی روی میوه گیاه فلفل دلمه ای، بررسی آزمون رشد درحضورکلرید سدیم، بررسی تولید آنزیمهای خارج سلولی جدایه های مذکور انجام گرفت. نتایج این پژوهش نشان داد که شبه قارچ *P. nicotianae* بعد از ۷ روز کاملا 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 می باشند و جدایه H1 در کلرید سدیم ۵٪ رشدخوبی داشت ولی جدایه های H8 و H24 رشد ضعیفی داشتند. همچنین جدایه H1 در حضور کلریدسدیم ۷٪ رشد نسبتا خوبی داشت. جدایه های مزبور بر اساس آنالیز توالی زیرواحد کوچک RNA ریبوزومی (16S rDNA) شناسایی و بر اساس نتایج حاصل، این جدایه ها همگی متعلق به گونه های استرپتومایسس بوده و سویه H1 بیشترین همپوشانی را با *Streptomyces labedea*داشت.

مقدمه

کنترل بیولوژیک به مدیریت غیرشیمیایی عوامل بیمارگر گیاهی از طریق کاهش اثرات مضر یک بیمارگراز طریق کاربرد دیگر موجودات زنده اطلاق می گردد(۳).گونه های استرپتومایسس و متابولیت‌های آن‌ها به عنوان عوامل کارآمدی برای کنترل بیمارگرهای گیاهی مختلف قارچی و باکتریایی محسوب می شوند. تولید آنتی‌بیوتیک‌ها و ترکیبات آلی فرار از ویژگیهای منحصر به فرد این میکروارگانیسم ها بوده و توسعه آنها در قالب کود و سموم طبیعی می‌تواند سبب کاهش مصرف ترکیبات مضر شیمیایی در سیستم های کشاورزی اعم از گلخانه یا مزرعه گردد(۷) . *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 قرار گرفته است(۲).

مواد و روش ها

نمونه برداری و جداسازی استرپتومایسس ها :از خاک ناحیه ریشه درختان منطقه جنگل قائم واقع در شهرکرمان نمونه برداری انجام شد ودرشرایط آزمایشگاهی کشت خاک صورت گرفت و ۶۰ جدایه استرپتومایسس خالص سازی گردید.(۱)

اثبات بیماریزایی روی میوه: با استفاده از روشی به نام تله میوه اثبات بیماریزایی انجام شد و بعد از گذشت ۷ روز شبه قارچ کاملا میوه فلفل را آلوده نمود.

آزمون رشد درحضور کلریدسدیم: محیط کشتCGA حاوی ۵٪، ۷٪، ۱۰٪ تهیه شده و جدایه های استرپتومایسس روی آن کشت گردید و در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد انکوبه شدند(۱)

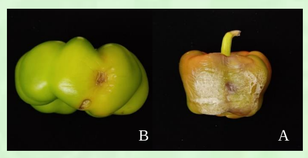
آزمون فعالیت لیپازی: برای سنجش ترشح آنزیم لیپاز از محیط کشتی شامل ۱۰ گرم پپتون، ۵گرم کلرورسدیم، ۱۵گرم آگار و۱لیتر آب مقطر استفاده شد، که پس از استریل شدن به این محیط که در حال سرد شدن است ۱۰ میلی لیتر توین۸۰ استریل اضافه شده و بعد از کشت جدایه های استرپتومایسس در صورت ترشح آنزیم لیپاز، هاله رسوبی در اطراف محل رشدباکتری دیده می شود که نشان دهنده هیدولیز شدن توین است(۶).

آزمون فعالیت آمیلازی :جهت سنجش تولید آنزیم آمیلاز و توانایی تجزیه نشاسته استفاده گردید، محیط کشت CGA بدون کازئین و حاوی ۱٪ نشاسته تهیه و جدایه های استرپتومایسس کشت شدند بعد از گذشت ۳ روزسپس روی پتری‌ها ۱۰میلی‌لیتر محلول لوگول (ید) ریخته شد. ید با نشاسته واکنش داده و رنگ آبی ایجاد می‌کند و قسمت‌هایی که نشاسته تجزیه شده اند، هاله بی‌رنگی بجا می‌ماند.(۵)

آزمون فعالیت کیتینازی:در این آزمون از محیط حداقل که حاوی ۴/۰درصد کیتین کلوئیدال و ۵/۱ درصد آگار، به منظور شناسایی جدایه‌های اکتینومیست دارای فعالیت کیتینازی، استفاده شد. در این محیط، کیتین به عنوان تنها منبع کربن استفاده شد. این محیط در دمای ۱۲۱°C به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شد. پس از آن، محیط به تشتک-های پتری استریل منتقل شد و بعد از انجماد، جدایه‌های اکتینومیست به صورت نقطه‌ای روی محیط آماده شده کشت شد. جدایه‌های اکتینومیست دارای فعالیت کیتینازی، از طریق هیدرولیز کیتین و تشکیل هاله شفاف در اطراف کلنی‌هایشان، قابل تشخیص خواهند بود.(۴)

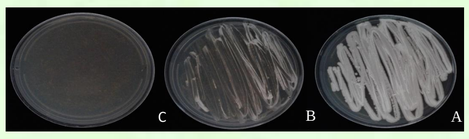
نتایج و بحث

اثبات بیماریزایی روی میوه:بعد از سه روز شبه قارچ روی میوه فلفل شروع به رشد نمود و بعد از۷روز این شبه قارچ کاملا میوه فلفل را منهدم کرد.



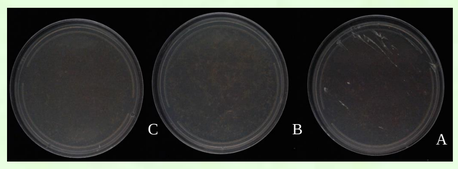
شکل۱ . آزمون اثبات بیماریزایی روی میوه فلفل . A : بیماریزایی روی میوه فلفل _ B: تیمار شاهد

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 نسبتا خوبی داشت و جدایه های H1و H24 رشد نداشتند، هرسه جدایه جدایه در غلظت ۱۰٪ رشدی نداشتند.



شکل ۲ . آزمون رشد در حضور کلرید سدیم جدایه H1

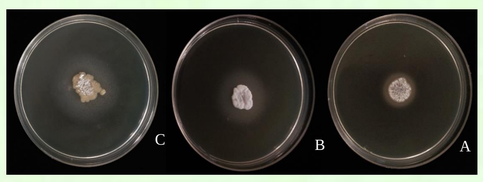
اشکال به ترتیب غلظت A:غلظت ۵٪،B:غلظت ۷٪، C:غلظت ۱۰٪کلریدسدیم را نشان می دهند،این جدایه در غلظت ۵٪ و ۷٪ رشد کرده. های



شکل ۳. آزمون رشد در حضور کلرید سدیم H8 جدایه

اشکال به ترتیب غلظت های A: غلظت ۵٪، B: ۷٪، C: ۱۰٪ کلرید سدیم را نشان می دهند. این جدایه در غلظت ۵٪ رشد ضعیفی داشت

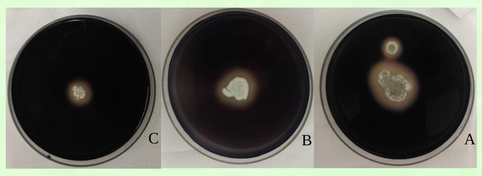
آزمون فعالیت لیپازی: هر سه جدایه H24,H8,H1 آنزیم لیپاز را ترشح می کنند. وبه میزان مشابه نسبت به هم لیپید موجود در محیط کشت را تجزیه کردند.



شکل ۵. آزمون فعالیت لیپازی

هر سه جدایه استرپتومایسس فعالیت لیپازی دارند. A:جدایه H1- B: جدایه H8- C:جدایهH24

آزمون فعالیت آمیلازی: پس از رشد پرگنه ها و اضافه شدن لوگول به محیط آن ها درهرسه جدایه استرپتومایسسH24,H8,H1 هاله بیرنگی دیده شدکه نشان دهنده فعالیت آمیلازی و تجزیه نشاسته محیط است.



شکل٦. آزمون فعالیت آمیلازی

هر سه جدایه استرپتومایسس فعالیت آمیلازی دارند.A: جدایهH1- B:جدایهH8- C:جدایه H24

نتیجه گیری: نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که دراثبات بیماریزایی روی میوه *Phytophthora nicotianae* بعداز۷روز میوه فلفل راکاملامنهدم کردوجدایه H1 درکلریدسدیم غلظت ۵٪ رشدخوبی داشت ودر غلظت ۷٪ رشدنسبتا خوبی داشت ولی جدایه های H8و H24 رشدنکردند و در غلظت۱۰٪ هیچکدام از سه جدایه رشدنکردند و دربررسی تولیدآنزیم های خارج سلولی هرسه جدایه استرپتومایسس H24,H8,H1 هاله شفاف ایجادکرده و توانایی تولید آنزیم لیپاز،آمیلاز وکیتیناز را دارامی باشند.

منابع

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

۲. میجانی، ر.، شهیدی بنجار، غ. ح. ، عقیقی، س.، صادقی، ا.، ۱۳۹۹، ارزیابی تاثیر استرپتومایسس های خاکبرد برشاخص 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

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

4. 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*(3), 422-426.

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

6.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(1), 15-22.

7.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(4), 952..