



فعالیت آنتاگونیستی *Streptomyces clavuligerus* علیه سوختگی غلاف برگ برنج در

شرایط آزمایشگاه و گلخانه

الهه امینی^{۱*}، محمد علی تاجیک قنبری^۲ و نادر حسن زاده^۱

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد و دانشیار گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران

۲- استادیار گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

*نویسنده مسئول: الهه امینی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران

گروه بیماری شناسی گیاهی

Elaheamini1389@gmail.com

چکیده

سوختگی غلاف برگ برنج ناشی از قارچ *Rhizoctonia solani*، یکی از مهمترین بیماریهای مخرب برنج در سراسر دنیا است. کنترل بیولوژیک می تواند جایگزین مناسبی برای سموم شیمیایی جهت کنترل بیماریهای گیاهی باشد. سوختگی غلاف برگ برنج نیز یکی از بیماریهایی است که تا حدودی توسط کنترل بیولوژیکی کنترل می شود. در این تحقیق قابلیت بیوکنترلی *Streptomyces clavuligerus* علیه *R. solani* مورد ارزیابی قرار گرفت. *S. clavuligerus* در تولید ماده ضد قارچی علیه بیمارگر در روش های دیسک- آگار و نشأت از چاهک در آگار و کشت متقابل با تولید متابولیت های ضد قارچی خارج سلولی، فعالیت آنتاگونیستی بالایی از خود نشان داد. متابولیت فعال *S. clavuligerus* در حلال های قطبی قابل حل بود. و حداقل غلظت بازدارنده از رشد عصاره خام در حلال دی متیل سولفوکساید و متانول ۱.۵۶۲ mg/ml بود. ماندگاری ماده موثر در محیط، در حالت محلول در آب مقطر استریل در دمای اتاق ۳۰-۱۵ درجه سانتی گراد حدود ۶ ماه تعیین شد. عصاره خام تا دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد فعال بوده و ماده فعال در عصاره خشک به ترتیب یک و سه ماه در دمای ۱۵ و ۲۵ درجه سانتی گراد پایداری دارد. ژن های مولد متابولیت های ضد قارچی *S. clavuligerus* کاندیداهای مناسبی برای استفاده در مهندسی ژنتیک جهت افزایش سطح تحمل علیه *R. solani* و سایر عوامل مشابه بیماری زای گیاهی در محصولات مهم زراعی می باشد.

واژگان کلیدی : قابلیت بیوکنترلی، حداقل غلظت بازدارندگی از رشد، دمای غیرفعال کننده ماده موثر، سوختگی غلاف برگ برنج، متابولیت های ضد قارچی.

مقدمه

سوختگی غلاف برگ برنج از بیماری هایی است که از نظر بیماری زایی و زیان اقتصادی در درجه دوم اهمیت بعد از بلاست قرار دارد. در مورد این بیماری کنترل شیمیایی کم کم اهمیت خویش را از دست داده است. از روش های بهینه کنترل که در راستای اهداف زیست محیطی می باشد، کنترل بیولوژیک می باشد. با توجه به پیشرفت های علمی به دست آمده در دهه اخیر در زمینه علوم ژنتیکی، مقاوم سازی گیاهان با استفاده از ژن های عامل آنتی بیوز و جداسازی و فعال تر نمودن ژن های فرمان دهنده مکانیسم های آنتاگونیست می تواند بسیار مفید باشد و سعی شده تا از آنزیم ها و آنتی بیوتیک های مترشح شده استخراج شده، در بیوکنترل استفاده نمود (Rizk et al., 2007). اکتینومایست ها به عنوان یکی از اعضای اصلی فلور میکروبی خاک با تولید آنتی بیوتیک یا انگل بودن برای قارچ ها نقش مهمی را در کنترل قارچ های بیماری زا دارند (El - Tarabily et al., 2000). هدف این تحقیق دستیابی به مبارزه و کنترل بیولوژیکی سوختگی غلاف برگ برنج با *S. clavuligerus* و مطالعه تولید متابولیت های ضد قارچی می باشد.

مواد و روش ها

۱ - تهیه ایزوله قارچ عامل بیماری و *S. clavuligerus* و ارزیابی فعالیت ضد قارچی

نمونه هایی از بیماری سوختگی غلاف برگ از مزارع برنج مناطق مختلف استان مازندران جمع آوری شد و پس از کشت در پتری حاوی محیط PDA و W.A جدایه هایی از قارچ عامل بیماری جداسازی شد. ایزوله (*S. clavuligerus* (DSM 41826) از مرکز کلکسیون قارچ ها و باکتری های صنعتی ایران خریداری و جهت کشت و تکثیر از محیط کشت اختصاصی GYM medium استفاده شد. قطعه ای از پرگنه همراه با محیط کشت را جدا نموده و روی کشت تازه قارچ قرار داده و قطر ناحیه ممانعت از رشد اندازه گیری شد. بررسی غلظت ماده ضد قارچی در محیط مایع تلقیح و روی شیکر با دور rpm ۱۳۰ در محیط آزمایشگاه ۳۰ روز متوالی نمونه برداری انجام شد.

۲ - تعیین میزان حلالیت ماده مؤثر ضد قارچی در حلال های آلی و تعیین دمای غیر فعال کننده ماده مؤثر

۲ میلی لیتر حلال به ۵۰ میلی گرم عصاره خام اضافه و با ورتکس مخلوط و در سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۳۰۰۰ قرار دادیم. محلول رویی را با Rotary evaporator تبخیر و لوله ها به دسیکاتور منتقل شد. به لوله های آزمایش دی متیل سولفوکساید و متانول (۱:۱:۷ v.v) اضافه و آزمون زیستی به روش چاهک علیه قارچ انجام شد. در ۱۰ لوله غلظت ۲۵ mg/ml عصاره خام را در آب مقطر استریل ریخته و لوله ها را درون ظرف آب با دمای ثابت از ۳۰ تا ۱۰۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار دادیم و سرد کرده و برای محتویات لوله ها، آزمون زیستی به روش چاهک انجام دادیم.

۳ - تعیین حداقل غلظت بازدارنده از رشد و پایداری ماده مؤثر در محیط

غلظت ۵۰ mg/ml عصاره خام را در آب مقطر حل کرده و با سانتریفیوژ با دور rpm ۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه محلول رویی و رسوب را از هم جدا کرده و با Rotary evaporator خشک کردیم. به هر لوله دی متیل سولفوکساید و متانول (۱:۱:۷ v.v) افزوده و ۷ سری رقت متوالی ۵۰، ۲۵، ۱۲٫۵، ۶٫۲۵، ۳٫۱۲۵، ۱٫۵۶۲ و ۰٫۷۸۱ mg/ml تهیه کرده و آزمون زیستی به روش چاهک انجام گرفت. جهت تعیین پایداری ماده مؤثر در محیط غلظت ۲۰ mg/ml از ماده مؤثر در آب مقطر استریل حل کرده و هفته ای ۲ مرتبه آزمون زیستی دیسک - آگار علیه قارچ انجام شد.

۴ - مطالعات گلخانه ای

در ردیف اول، گیاهان با پلات قارچ بیماری زا و در ردیف دوم، گیاهان تیمار شده با سوسپانسیون اسپور *S. clavuligerus*، در ردیف سوم گیاهان تیمار شده با سوسپانسیون مخلوطی از اسپورهای قارچ بیماری زا به همراه *S. clavuligerus* و در ردیف چهارم گیاهان شاهد را قرار می دهیم. پس از گذشت ۴ روز اثرات بازدارندگی و میزان این اثر را مشاهده و ثبت نمودیم.

نتایج و بحث

با روش کشت متقابل بین بیمارگر و آنتاگونیست و اندازه گیری قطر ناحیه ممانعت از رشد معین شد آنتاگونیست فعالیت بیوکنترلی بالایی روی بیمارگر دارد. نتایج میزان حلالیت ماده مؤثر در حلال های آلی نشان می دهد، محتویات لوله آزمایش حاوی محلول رویی در حلال های قطبی (آب مقطر و متانول) در آزمون زیستی هاله ممانعت از رشد ایجاد کردند ولی در حلال غیرقطبی (کلروفرم و هگزان) بدون اثر بوده و در آزمون زیستی هاله ممانعت از رشد ایجاد نکرد. در سال ۲۰۰۹ با جداسازی اکتینومایست های دریایی و مشاهده اثرات بازدارندگی شان روی عامل بیماری سوختگی غلاف برگ برنج حداقل غلظت بازدارندگی از رشد بیمارگر ۱٫۵۶۲ mg/ml معین شد. این اثر بازدارندگی از رشد و جوانه زنی قارچ توسط ترشح ترکیبات هیدرولیزات و هضم کننده دیواره

قارچ ها مانند آنزیم های کیتیناز صورت می گیرد (Ningthoujam et al., 2009). *Streptomyces aureofaciens* نیز با قابلیت تولید کیتیناز با از بین بردن دیواره سلولی و میسلیوم اثر بازدارندگی روی جوانه زنی اسپور *R. solani* را داراست (Taechowisan et al., 1956). بررسی های گلخانه ای نیز نشان داد که *S. clavuligerus* اثر قابل توجهی در کنترل بیمارگر عامل سوختگی غلاف برگ برنج داشته و از میزان علائم بیماری به طور قابل توجهی می کاهد.



نمودار ۱. نتایج آزمون زیستی *S. clavuligerus* علیه *R. solani* در محیط کشت مایع و بررسی قطر ناحیه بازدارنده از رشد در ۳۰ روز متوالی

نتیجه گیری

نتایج حاصل نشان می دهد که این باکتری و متابولیت های ضدقارچی تولید شده توسط آن می تواند در کنترل بیولوژیک بسیاری از قارچ های بیماری زای گیاهی و در نتیجه کنترل خسارت وارده به بسیاری از انواع محصولات کشاورزی، مورد استفاده قرار گیرد.

- 1- El- Tarabily, K. A ., Soliman , M. H., Nassar, A . H., Al – Hassani , H. A ., Sivasithamparam, K., Mc Kenna, F., and Stj Hardy, G. E. 2000 . Biological control of *Sclerotinia minor* using a chitinolytic bacterium and Actinomycetes . Plant Pathology 49: 573 – 583
- 2- Ningthoujam, D. S., Sanasam, S., Tamreihao, K., and Nimaichand, S. 2009. Antagonistic activities of local Actinomycete isolates against Rice fungal pathogen. African Journal of Microbiology Research. 3: 737 – 742
- 3- Rizk, M., Abdel – Rahman, T., and Metwally, H. 2007. Screening of antagonistic activity in different *Streptomyces* species against some pathogenic microorganisms . Journal of Biological Sciences . 7: 1418 – 1423
- 4- Taechowisan, T., Peberdy, J. F., Lumyong, S. 2003. Chitinase production by endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAC 130 and its antagonism against phytopathogenic fungi. Annals of Microbiology . 53: 447 – 461



**Antagonistic Activity of *Streptomyces clavuligerus* against
Rice sheat blight on invitro and greenhouse
Elahe Amini^{1*}, Mohammad Ali Tajick Ghanbari², Nader Hasanzade¹**

**1- Department of Plant Pathology, Science and Research Branch, Islamic Azad
University, Tehran-Iran**

**2- Department of Plant Protection, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources
University, Sari-Iran**

***Corresponding author: Elaheamini1389@gmail.com**

Abstract

Rice sheat blight, caused by *Rhizoctonia solani*, is one of the most destructive rice diseases worldwide. Biological control offers a friendly alternative to the use of chemical pesticides for controlling plant diseases. Rice sheat blight is one of the plant diseases which have been controlled using a biological control approach. In this research, biocontrol ability of *Streptomyces clavuligerus* was investigated against *R. solani*. *S. clavuligerus* showed strong antagonistic activity against pathogen in Agar disk, Well- diffusion and Dual culture methods by producing extra cellular antifungal metabolites. The active metabolite of *S. clavuligerus* was polar. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the crude in DM solvent was determined as 1.562 mg/ml. Stability of the active crude in distilled water at room temperature (15 - 30°C) was about 6 months. Thermal inactivation point (TIP) of active phase was 100°C and dry form persisted one month at 15°C and three months at 25°C respectively. Antifungal gene from *S. clavuligerus* is a useful candidate for genetic engineering of agriculturally important crops for increased tolerance against *R. solani* and similar phytopathogens.

Keywords: Biocontrol ability, Minimum Inhibitory Concentration, Thermal inactivation point, Rice sheat blight, Antifungal metabolites.