

## بررسی خاصیت آنتاگونیستی و تنوع ژنتیکی جدایه های استریپتومایسس استخراج شده از خاکهای استان کرمان جهت کنترل بیولوژیک قارچ بیمارگر *Sclerotinia sclerotiorum*

فاطمه بنی اسدی<sup>۱</sup>، امین باقی زاده<sup>۲\*</sup> و غلامحسین شهیدی بنجار<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup> کرمان، دانشگاه شهید باهنر کرمان، دانشکده کشاورزی

<sup>۲</sup> کرمان، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، گروه بیوتکنولوژی

تاریخ پذیرش: ۹۶/۱/۱۹

تاریخ دریافت: ۹۴/۹/۱۱

### چکیده

در تحقیق حاضر برای تعیین جدایه های مناسب استریپتومایسس، اثرات آنتاگونیستی ۳۰ جدایه استخراج شده از خاکهای استان کرمان علیه قارچ بیمارگر *Sclerotinia sclerotiorum* مورد بررسی قرار گرفت. از مجموع این جدایه ها، ۱۰ جدایه استریپتومایسس در روش Dual Culture از خود خاصیت آنتاگونیستی نشان دادند که بیشترین آن به استریپتومایسس جدایه UK ۳۶۳ مربوط بوده است. آنگاه به منظور بررسی رابطه فیلوژنی و تنوع ژنتیکی ۳۰ جدایه مذکور، استخراج DNA از آنها به روش CTAB صورت گرفت و از ۱۰ آغازگر RAPD جهت انجام PCR استفاده شد. پس از انجام الکتروفورز ۱۲۸ بانده قوی و واضح در محدوده ۲۵۰bp تا ۲۸۰۰bp تشخیص داده شد. اطلاعات به دست آمده توسط نرم افزار NTSYS و به روش UPGMA با ضریب تشابه دایس آنالیز شدند. درختچه به دست آمده، ۳۰ جدایه استریپتومایسس را در خط برش ۵۸ درصد، در دو گروه کلی قرار داد. در گروه اول ۱۰ جدایه دارای خاصیت آنتاگونیستی و در گروه دوم ۲۰ جدایه فاقد خاصیت قرار گرفتند. گروه بندی جدایه ها با استفاده از روش تجزیه به مؤلفه های اصلی نیز انجام شد و پلاتهای دو بعدی و سه بعدی مربوطه رسم گردید و جدایه ها به هشت گروه مختلف تقسیم شدند.

واژه های کلیدی: استریپتومایسس، *Sclerotinia sclerotiorum*، تنوع ژنتیکی، نشانگر RAPD

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۳۱۴۱۴۱۵۶، پست الکترونیکی: amin\_4156@yahoo.com

### مقدمه

یافتن داروهای جدید و به حداقل رساندن اثرات زیان بار قارچکشهای سنتزی استفاده کنند (۲۵). اکتینومیست ها به دلیل رفتار رشدی خاص، توانایی استقرار بر سطح ریشه گیاه، اثرات بازدارندگی روی میکروبها و تولید متابولیتهای ثانویه متنوع از لحاظ شیمیایی، به عنوان عوامل مقتدر کنترل بیولوژیکی علیه بسیاری از عوامل بیماریزای مهم گیاهی به شمار می روند. در میان اکتینومیست ها *Streptomyces spp.* به عنوان تولید کننده اصلی ترکیبات متنوع فعال زیستی شناخته شده اند (۱۷ و ۱۸). برای استفاده بهینه از این باکتریها به عنوان عوامل بیوکنترل،

قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* یک پاتوژن گیاهی است که عامل اصلی بیماریهای مهمی مانند کپک سفید، پژمردگی اسکلروتینیایی و پوسیدگی ساقه و طوقه در دامنه وسیعی از گیاهان است، به طوری که به بیش از ۴۰۰ گونه گیاهی از ۶۴ خانواده و ۲۲۵ جنس حمله می کند (۲۵). مبارزه شیمیایی با عامل مذکور خطر ظهور جدایه های مقاوم به قارچکشها و در عین حال آلودگی محیط پیرامونی را به همراه دارد. اما مبارزه بیولوژیک را می توان به دلیل ایمنی بیشتر و خطرات کمتر مورد توجه قرار داد. این موارد محققان را بر آن داشت که از متابولیتهای میکروبی برای

مؤثر و غیرمؤثر بر قارچ بیمارگر *Butrytis alli* را از یکدیگر تمیز داد (۹). بهارلویی و همکاران در سال ۲۰۱۱ اثرات آنتاگونیستی ۱۱۰ جدایه آکتینومیست خاکزی استان کرمان علیه قارچ بیمارگر *Sclerotinia sclerotiorum* را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد استرپتومایسس جدایه ۴۲۲ بیشترین خاصیت آنتاگونیستی را دارا می‌باشد (۳). هدف از تحقیق حاضر بررسی تنوع ژنتیکی جدایه های استرپتومایسس بومی خاکهای استان کرمان با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD تعریف شد، تا بتوان از نتایج آن در اهداف آتی کنترل بیولوژیک قارچهای بیمارگر بهره برد.

### مواد و روشها

**تهیه نمونه های خاک:** به منظور جدا سازی اکتینومیست های خاکزی، از خاک نواحی و زمینهای کشاورزی متفاوت در شهرستانهای کرمان، زرنند، رفسنجان، راور، بافت، جیرفت، بم، سیرجان، بردسیر و انار در استان کرمان نمونه برداری به عمل آمد. از هر شهرستان سه نمونه تهیه گردید. برای تهیه هر نمونه، برداشت خاک با اوگر از عمق ۱۰ سانتیمتری خاک انجام گردید، برای هر نمونه به میزان دو اوگر، خاک برداشته شد. نمونه ها در کیسه های پلی اتیلن تمیز قرار داده شدند و سپس کاملاً مخلوط شده و از غربال با مش دو میلی متر عبور داده شدند و تا زمان استفاده درون یخچال نگهداری شدند. به هنگام استفاده، ۱۰ گرم نمونه خاک مورد نظر، در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر استریل به صورت سوسپانسیون در آورده شد و روی شیکر دوار به مدت ۳۰ دقیقه و با سرعت ۱۳۰ دور در دقیقه قرار داده شد. پس از آن، از غلظت  $10^{-1}$  اولیه، رقتهای متوالی  $10^{-2}$ ،  $10^{-3}$ ،  $10^{-4}$ ،  $10^{-5}$  و  $10^{-6}$  تهیه گردید (۱۱ و ۱۹). سپس ۱ میلی لیتر از رقتهای متوالی  $10^{-3}$ ،  $10^{-4}$ ،  $10^{-5}$  و  $10^{-6}$  به دست آمده را در پلیت ریخته و مقدار ۲۵-۲۰ میلی لیتر از محیط کشت CGA را با آن مخلوط کرده و بر روی میز کار آزمایشگاه به صورت عدد هشت

توسعه روشهای مولکولی برای تشخیص این گونه ها اهمیت فراوانی دارد. نشانگرهای مولکولی ابزارهای بسیار مهم و قوی در ارزیابی روابط خویشاوندی ژنتیکی، انتخاب گونه های برتر و بررسی شباهت و تفاوت بین نمونه های مختلف می باشند. این نشانگرها از نظر درجه چند شکلی، غالب یا همباز بودن، توزیع در سطح کروموزوم، تکرارپذیری، نیاز یا عدم نیاز به توالی یابی DNA و غیره با هم تفاوت دارند. انتخاب بهترین سیستم نشانگری به هدف تحقیق و سطح پلوییدی موجود مورد مطالعه بستگی دارد (۲۶). تا کنون مطالعات اندکی برای مطالعه استرپتومایسس ها با استفاده از نشانگرهای مولکولی صورت گرفته است. در یک مطالعه از نشانگر RAPD جهت تعیین تنوع ژنتیکی ۷۳ جدایه استرپتومایسس تولید کننده آنتی بیوتیک جدا شده از خاکهای اردن استفاده شده است که کلاستر بندی به روش UPGMA، جدایه ها را در دو گروه اصلی بزرگ قرار داد. همچنین نتایج بررسی ژنتیکی با تفاوتهای ظاهری و فنوتیپی جدایه ها همخوانی داشت (۷). جهت بررسی تنوع ژنتیکی و حذف جدایه های استرپتومایسس مشابه در برنامه غربالگری میکروبی در ژاپن از نشانگر RAPD استفاده شد (۲). اوشی در سال ۲۰۰۴ و کینگ چاو در سال ۲۰۰۸ از نشانگر AFLP جهت بررسی تنوع ژنتیکی اکتینومیست ها استفاده کردند (۱۵ و ۱۶). از نشانگر RAPD جهت شناسایی و طبقه بندی استرپتومایسس ها در فرانسه استفاده شد و نتایج نشان داد که RAPD یک نشانگر مؤثر و کارا در تعیین تنوع ژنتیکی جدایه های استرپتومایسس می باشد (۱۴). در ایران نیز مطالعات اندکی در این زمینه صورت گرفته است از جمله جرجندی و همکاران در سال ۲۰۱۱ اثرات آنتاگونیستی آکتینومیست های خاکزی استان کرمان علیه قارچ بیمارگر *Butrytis alli*، عامل پوسیدگی خاکستری پیاز و تنوع ژنتیکی جدایه های استرپتومایسس به وسیله نشانگر مولکولی RAPD رامورد بررسی قرار دادند و نتایج نشان داد که با استفاده از نشانگر RAPD می توان جدایه های

غلظت ۵۰ mM، ۲/۵ μl dNTP با غلظت ۲/۵ mM، ۲/۳ μl Taq DNA polymerase با غلظت ۵ unit/μl، ۲ μl پرایمر با غلظت ۲ μM، ۲/۵ μl PCR Buffer دارای غلظت ۱۰ برابر [۵۰۰ mM KCl و Tris-HCl (pH=۸/۴)] و ۱۴/۷ μl آب دو بار تقطیر استریل بود. ترموسایکلر مورد استفاده در این تحقیق از نوع اپندورف در نوع ساده و گرادیان بود. ابتدا دمای اتصال بهینه هر آغازگر با استفاده از ترموسایکلر گرادیان (شیب دمایی) به دست آمد. برنامه دمایی PCR برای همه آغازگرها مانند هم بود و بخش متغیر آن دمای اتصال آغازگر به DNA تک رشته بود. تکثیر بدین صورت انجام گرفت: ۱- واسرشت آغازین DNA در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه (یک سیکل)، ۲- ۳۵ سیکل شامل: تک رشته‌ای شدن DNA در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه، اتصال آغازگر به DNA تک رشته‌ای در دمای اتصال بهینه مربوط به هر آغازگر (۴۷-۵۵ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۴۰ ثانیه، بسط آغازگر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، ۳- تکمیل بسط در دمای ۷۲ °C به مدت ۸ دقیقه (یک سیکل). پس از انجام برنامه در دستگاه PCR، نمونه‌ها بلافاصله خارج شده و تا زمان انجام الکتروفورز، در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد حداکثر به مدت یک ماه نگهداری شدند.

**آنالیز باندهای حاصل از الکتروفورز:** جهت بررسی فرآورده‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمرز از ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد. پس از انجام الکتروفورز و مشاهده باندها در دستگاه ژل‌نگار، از ژل با فرمتهای مختلف عکس تهیه گردید. سپس عکسها به نرم افزار Gene tools منتقل گردید. حضور یا عدم حضور هر کدام از باندهای مشاهده شده برای هر یک از ۱۰ آغازگر به ترتیب با اعداد ۱ و ۰ امتیازدهی شدند و سپس در نرم افزار Excel یک ماتریس از اعداد ۱ و ۰ برای آغازگرهای مورد استفاده تهیه شد. تعیین تشابه بین نمونه‌ها با استفاده از شاخص دایس و تجزیه خوشه‌ای با استفاده از روش UPGMA در نرم افزار

انگلیسی به حرکت در آورده شد. آنگاه نمونه‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (۲۰ و ۲۱).

**خالص سازی نمونه‌ها:** پس از ۷-۱۰ روز انکوباسیون، پرگنه‌های اکتینومیست‌ها و همچنین برخی قارچها و باکتریها ظاهر شدند. از هر پرگنه اکتینومیست، کشت خطی بر روی محیط کشت CGA تهیه شد و نمونه‌های خالص انتخابی بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی، فیزیکی و شیمیایی (۳۰ نمونه) در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند (۲۲).

**تهیه گونه خالص قارچ:** قارچ بیماریزای گیاهی *Sclerotinia sclerotiorum* از دانشکده کشاورزی کرج- دانشگاه تهران، به صورت کشت خالص تهیه گردید. محیط کشت مناسب جهت رشد این قارچ (Potato PDA (Dextrose Agar) بود.

**غربالگری جدایه‌های استرپتومایسس به منظور تعیین فعالیت ضد قارچی:** به منظور تعیین توانایی جدایه‌های استرپتومایسس به دست آمده در تولید ماده ضد قارچی علیه قارچ مذکور، قطعه‌ای از پرگنه‌های هر جدایه ۷-۱۰ روزه در کشت خطی همراه با محیط کشت به قطر ۶ میلی‌متر توسط چوب پنبه سوراخ‌کن جدا نموده و بر روی کشت چمنی تازه قارچ قرار داده شد. سپس پلیتها به مدت ۵ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و بر اساس قطر ناحیه ممانعت از رشد، جدایه‌های استرپتومایسس فعال انتخاب گردیدند (۲۳ و ۲۴).

**استخراج DNA استرپتومایسس‌ها و انجام PCR با نشانگر RAPD:** پس از غربالگری جدایه‌های استرپتومایسس، DNA ژنومی هر جدایه با روش CTAB استخراج گردید (۱۰) و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با ۱۰ آغازگر تصادفی RAPD انجام پذیرفت. مواد واکنش دهنده در مخلوط ۲۵ میکرولیتری PCR شامل، ۱ μl از DNA الگوی تهیه شده با غلظت ۵۰ ng/μl، ۲ μl MgCl<sub>2</sub>

جدول ۱- تنظیم جدایه‌های استریتومایسس فعال بر اساس روش EI- tarabily و همکاران (۵)

منطقه	جدایه‌های	منطقه	جدایه‌های
استریتومایسس	ممانعت	استریتومایسس	ممانعت
فعال	از رشد	فعال	از رشد
+++	۳۶۳UK	+++	۳۷۰UK
++	۳۶۰UK	++	۱۳۹UK
++	۳۶۱UK	++	۲۷۳UK
++	۳۴۴UK	++	۳۶۴UK
++	۲۴۶UK	++	۲۶۲UK

نتایج حاصل از امتیاز دهی ژل‌ها و تجزیه و تحلیل آنها:

پس از مشاهده باندها و عکس برداری از ژل‌ها با دستگاه ژل نگار، مجموعاً ۱۲۸ باند قوی و واضح توسط ۱۰ آغازگر در محدوده ۲۵۰bp تا ۲۸۰۰bp تشخیص داده شد. تعداد باندهای ایجاد شده برای هر پرایمر متفاوت بوده و بین ۶ باند برای آغازگر ۳۹۱ تا ۲۰ باند برای آغازگر ۵۴ متغیر بود (شکل ۲). به طور متوسط هر آغازگر ۱۲/۸ باند را تکثیر نمود. میانگین تعداد باند چند شکل برای هر آغازگر ۱۱/۶ بود (جدول ۲).

درختچه حاصل از تجزیه خوشه‌ای با ضریب تشابه دایس در شکل ۳ نشان داده شده است. اگر خط برش در فاصله تشابه ۵۸ درصد در درختچه حاصل از تشابه دایس زده شود، جدایه‌های استریتومایسس به دو گروه کلی تقسیم می‌شوند. گروه اول شامل جدایه‌هایی است که توانایی جلوگیری از رشد قارچ و ایجاد هاله ممانعت را داشتند، یعنی جدایه‌های استریتومایسس ۳۶۳UK، ۳۶۱UK، ۳۴۴UK، ۳۷۰UK، ۳۶۴UK، ۲۷۳UK، ۲۶۲UK، ۳۶۰UK، ۱۳۹UK و ۲۴۶UK که در فاصله تشابه ۶۱ درصد، این جدایه‌ها خود به سه زیرگروه تقسیم می‌شوند (جدول ۳).

گروه دوم شامل جدایه‌های استریتومایسس ۳۵۳UK، ۴۳۱UK، ۳۶۷UK، ۳۵۹UK، ۲۱۱UK، ۱۴۵UK، ۱۲۶UK، ۱۵۷UK، ۴۲۵UK، ۹۸UK، ۳۰۲UK، ۳۳۵UK، ۳۶۵UK

NTSYS صورت گرفت. برای کاهش حجم داده‌ها و تفسیر راحت‌تر مشاهدات، با استفاده از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی پلاتهای دو بعدی و سه بعدی نیز رسم شد.

## نتایج و بحث

غربالگری جدایه‌های استریتومایسس جهت تعیین فعالیت ضد قارچی: پس از انجام آزمایش آنتی بیوگرام به روش دیسک‌گذاری، منطقه ممانعت از رشد به صورت یک هاله شفاف نزدیک جدایه‌ها علیه *S. sclerotiorum* ایجاد گردید (شکل ۱) (۴). از مجموع ۳۰ جدایه استریتومایسس ۱۰ جدایه توانایی جلوگیری از رشد قارچ را داشتند و ۲۰ جدایه دیگر غیر فعال بودند.



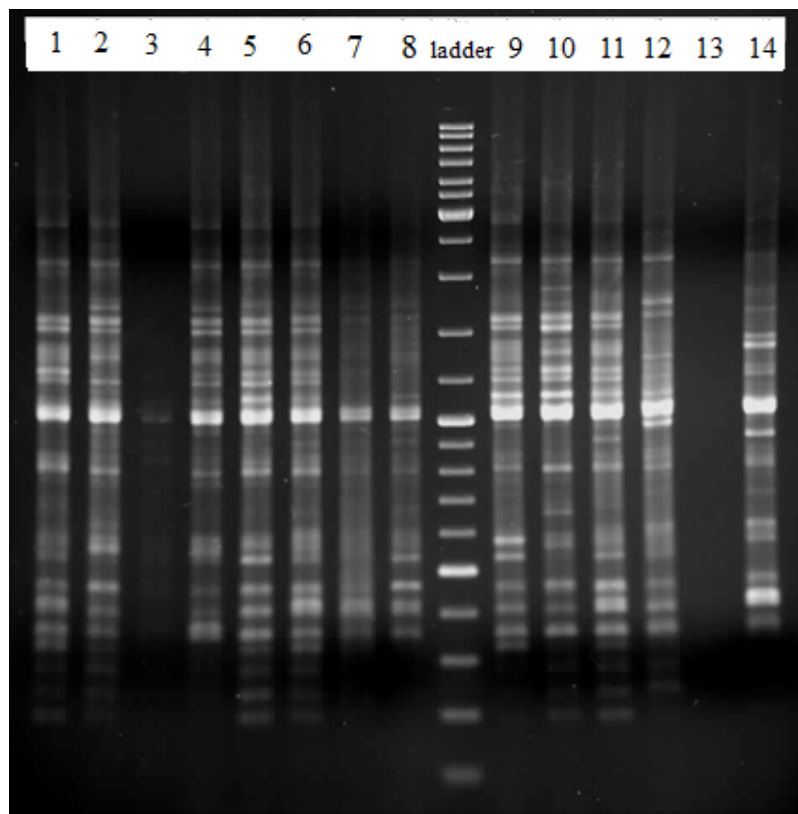
شکل ۱- ایجاد هاله‌های ممانعت از رشد در اطراف دیسک‌های جدایه استریتومایسس ۳۶۳UK (چپ و راست) علیه قارچ بیمارگر *Sclerotinia sclerotiorum* به روش Disc-Agar در محیط کشت PDA. (نقل از ۴)

سپس جدایه‌های استریتومایسس براساس روش EI- Tarabily و همکارانش (۵) به چهار دسته تقسیم شدند. سه دسته فعال شامل ۱- قطر هاله ممانعت از رشد برای جدایه‌های استریتومایسس ضعیف ۱۰-۵ میلی متر (+)، ۲- برای جدایه‌های متوسط ۳۰-۱۰ میلی متر (++) و ۳- برای جدایه‌های قوی بالاتر از ۳۰ میلی متر (+++) و یک دسته غیر فعال که هاله ممانعت از رشد ایجاد نمی‌کنند. جدول ۱ نحوه تمایز جدایه‌های استریتومایسس فعال را نشان می‌دهد.

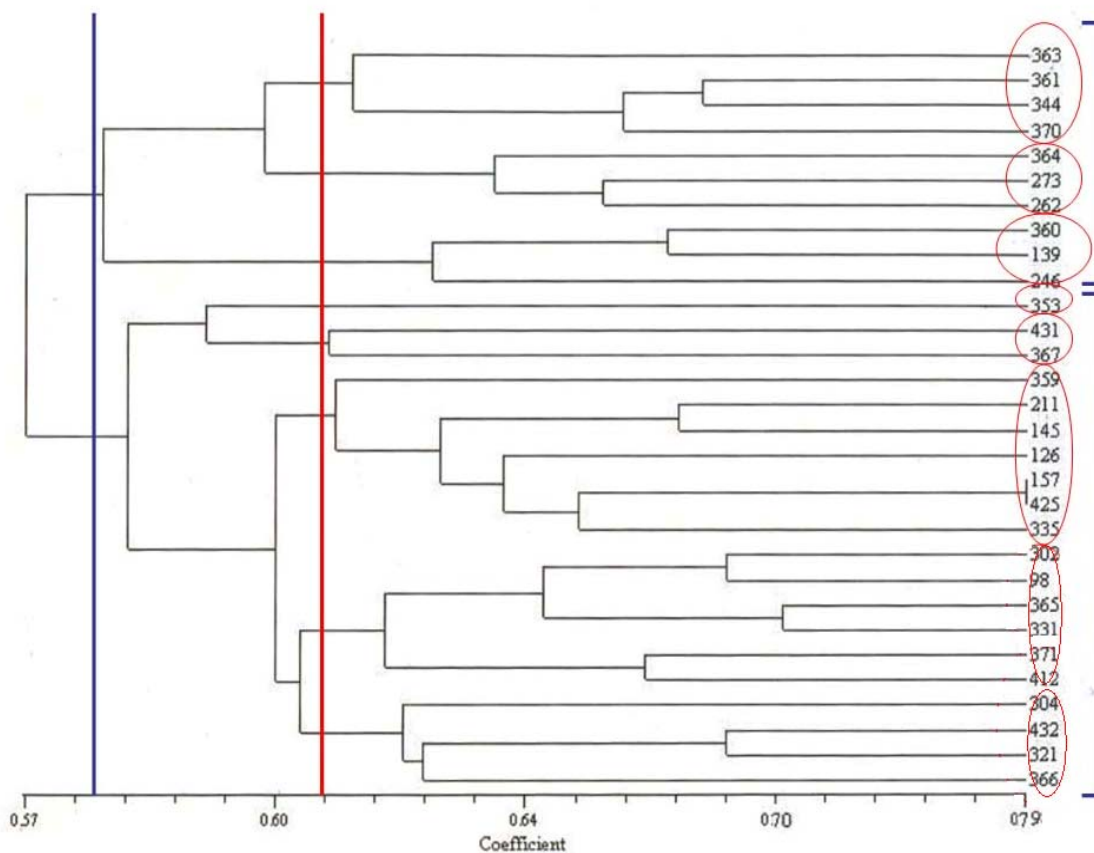
۳۳۱UK، ۳۷۱UK، ۴۱۲UK، ۳۰۴UK، ۴۳۲UK، ۳۲۱UK این جدایه ها توانایی جلوگیری از رشد قارچ را نداشتند. خط برش در فاصله تشابه ۶۱ درصد، این جدایه ها را در ۳۶۶UK می باشد. پنج زیرگروه قرار می دهد (جدول ۴).

جدول ۲- تعداد باندها و میزان چندشکلی آغازگرهای RAPD مورد استفاده

شماره آغازگر	نام آغازگر	توالی آغازگر	تعداد کل باندها	تعداد باندهای چند شکلی	درصد چند شکلی
۱	۳۹۱	5' GCG-AAC-CTC-<G> 3'	۶	۵	۸۳
۲	۳۹۶	5' GAA-TGC-GAG-<G> 3'	۱۱	۱۱	۱۰۰
۳	۳۷۹	5' GGG-CTA-GGG-<T> 3'	۱۵	۱۳	۸۷
۴	۳۹۲	5' CCT-GGT-GGT- <T> 3'	۱۲	۱۱	۹۲
۵	۵۴	5' GTC-CCA-GAG-<C> 3'	۲۰	۱۷	۸۵
۶	۶۲	5' TTC-CCC-GTC-<G> 3'	۱۳	۱۲	۹۲
۷	۶۹	5' GAG-GGC-AAG-<A> 3'	۱۴	۱۳	۹۳
۸	۶۳	5' TTC-CCC-GCC- <C> 3'	۱۱	۱۱	۱۰۰
۹	۶۶	5' GAA-TGC-GAG-<G> 3'	۱۸	۱۶	۸۹
۱۰	۵۳	5' CTC-CCT-GAG- <C> 3'	۸	۷	۸۷



شکل ۲- باندهای چند شکلی مشاهده شده با نشانگر ۶۶ در تعدادی از جدایه های استرپتومایسس پس از الکتروفورز



شکل ۳- درختچه حاصل از تجزیه خوشه ای ۳۰ جدایه استرپتومایسس مورد بررسی با ضریب تشابه دایس

جدول ۳- زیر گروه‌های مربوط به گروه اول درختچه حاصل بر اساس ضریب تشابه دایس

زیرگروه	جدایه های استرپتومایسس
الف	۳۶۳ UK، ۳۷۰ UK، ۳۴۴UK، ۳۶۱UK
ب	۲۷۳ UK و ۲۶۲UK، ۳۶۴UK
ج	۲۴۶UK و ۱۳۹ UK، ۳۶۰UK

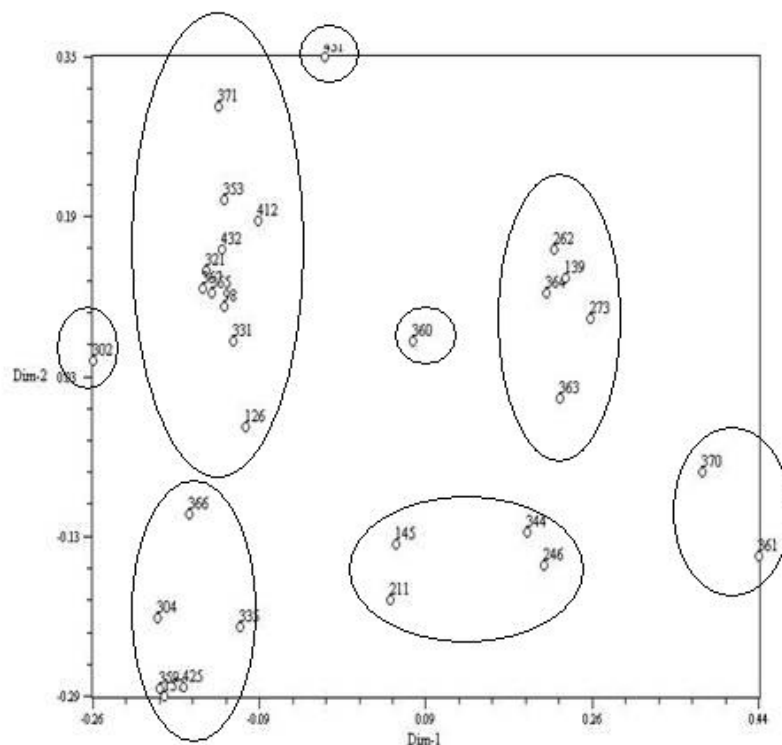
جدول ۴- زیر گروه‌های مربوط به گروه دوم درختچه حاصل بر اساس ضریب تشابه دایس

زیرگروه	جدایه های استرپتومایسس
الف	۳۵۳ UK
ب	۳۶۷ UK و ۴۳۱UK
ج	۳۳۵ UK، ۴۲۵UK، ۱۵۷ UK، ۱۲۶ UK، ۱۴۵UK، ۲۱۱UK، ۳۵۹UK
د	۳۰۲ UK و ۹۸UK، ۳۶۵ UK، ۳۳۱ UK، ۳۷۱ UK، ۴۱۲UK
ه	۳۰۴UK، ۴۳۲ UK، ۳۲۱ UK، ۳۶۶UK

داشتند، نتوانستند از رشد قارچ جلوگیری نمایند و این جدایه‌ها در گروه‌ها و زیر گروه‌های مختلفی قرار گرفتند.

**تجزیه به مؤلفه‌های اصلی:** از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بر روی داده‌های حاصل از RAPD یک پلات دو بعدی (شکل ۴) و یک پلات سه بعدی (شکل ۵) حاصل شد. سه مؤلفه اصلی که بیشترین سهم را در ایجاد تنوع داشته‌اند به ترتیب ۲۷/۶۸، ۱۶/۱۸ و ۹/۶۴ در صد از میزان کل تنوع را کنترل کرده‌اند.

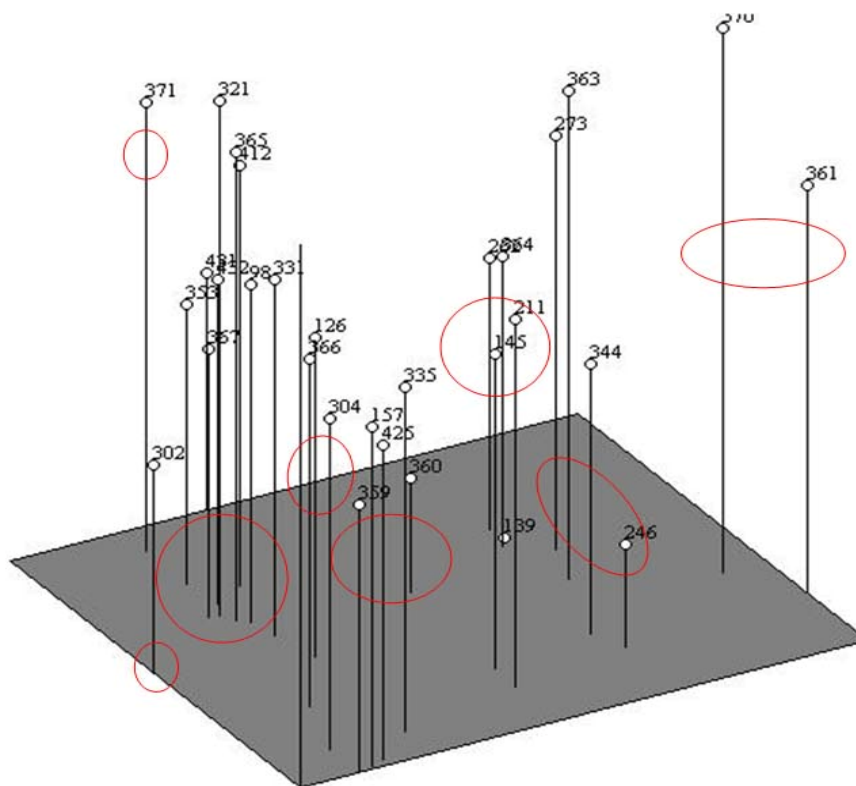
جدایه‌های استریتومایسس UK ۳۵۹، UK ۳۶۰، UK ۳۶۱، UK ۳۶۳، UK ۳۶۴، UK ۳۶۵ و UK ۳۶۶ از یک مکان جمع‌آوری شده بودند، نتایج نشان داد که این جدایه‌های جمع‌آوری شده از یک ناحیه جغرافیایی لزوماً دارای قرابت ژنتیکی نمی‌باشند، به طوری که سه جدایه UK ۳۵۹، UK ۳۶۵ و UK ۳۶۶ برخلاف چهار جدایه دیگر که متعلق به همان مکان بودند و توانایی جلوگیری از رشد قارچ را



شکل ۴- پلات دو بعدی حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی

عوامل بیوکنترل، توسعه روش‌های مولکولی برای تشخیص این گونه‌ها اهمیت فراوانی دارد. استفاده از انگشت‌نگاری DNA یک روش ایده‌آل است که به طور وسیع در شناسایی موجودات از جمله باکتریها به کار رفته است (۶ و ۱۲). استفاده از نشانگر مولکولی RAPD یکی از روش‌های موفق است که می‌تواند جهت تولید الگوهای تکثیری متفاوت برای گونه‌های مختلف به کار رود (۸ و ۱۰).

نتایج حاصل از پلات دو بعدی و سه بعدی اگرچه اطلاعات خلاصه شده و مناسبی از وضعیت جدایه‌های استریتومایسس را نشان داد، اما نتایج کلی و اطلاعات حاصله نشان می‌دهد که کلاستر بندی حاصل از کل اطلاعات، نتایج دقیق‌تر و جامع‌تری را حاصل کرده است که نشان از انتخاب مناسب نسبی پرایمرها می‌باشد. ضمن آنکه با افزایش تعداد آغازگرها می‌توان اطلاعات دقیق‌تری به دست آورد. برای استفاده بهینه از باکتریها به عنوان



شکل ۵- پلات سه بعدی حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی  
جدول ۵- گروه بندی جدایه‌های استرپتومایسس بر اساس پلات سه بعدی

گروه	جدایه‌های استرپتومایسس
۱	۳۷۰UK، ۳۶۱UK
۲	۲۷۳UK، ۳۶۳UK، ۳۴۴UK، ۲۴۶UK
۳	۳۶۴UK، ۲۶۲UK، ۱۳۹UK، ۱۴۵UK، ۲۱۱UK
۴	۳۳۵UK، ۱۵۷UK، ۴۲۵UK، ۳۶۰UK، ۳۵۹UK
۵	۳۰۴UK، ۳۶۶UK، ۱۲۶UK
۶	۳۷۱UK
۷	۴۳۲UK، ۳۲۱UK، ۴۱۲UK، ۳۶۷UK، ۳۵۳UK، ۴۳۱UK، ۹۸UK، ۳۶۵UK، ۳۳۱UK
۸	۳۰۲UK

رغم این گستردگی و تنوع، متاسفانه هنوز برای پیدا نمودن تنوع استرپتومایسس‌ها کار چندانی انجام نشده است. در تحقیق حاضر سعی شد که فیلوژنی و تنوع ژنتیکی ۳۰ جدایه استرپتومایسس جدا شده از خاکهای استان کرمان توسط ۱۰ آغازگر تصادفی RAPD مورد بررسی قرار گیرد. ضمن آنکه اثرات آنتاگونیستی جدایه‌های مذکور علیه قارچ *S. Sclerotiorum* مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج

قطعات DNA چند شکلی تکثیر شده، می‌توانند به عنوان نشانگر جهت تشخیص حضور گونه‌های استرپتومایسس بکار روند. استرپتومایسس‌ها کاربردهای بیشماری در علوم مختلف از جمله پزشکی، کشاورزی، میکروبیولوژی و بیوتکنولوژی دارند و میزان استفاده از آنها بسیار گسترده است. با توجه به تنوع شرایط اقلیمی ایران، گونه‌های بسیاری از استرپتومایسس نیز در ایران وجود دارد، اما علی



دندروگرام حاصل نشان داد که می‌توان از RAPD جهت طبقه‌بندی استرپتومایسس‌ها استفاده کرد (۱۳). این مورد در تحقیقات Martin و همکارانش که در فرانسه (۲۰۰۰) انجام شد، نیز دیده شده است. آنها از تکنیک RAPD جهت شناسایی و طبقه‌بندی استرپتومایسس‌ها استفاده کردند (۱۴).

### سپاسگزاری

بدینوسیله از پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته به دلیل تأمین هزینه‌های پژوهشی و در اختیار گذاردن کلیه امکانات کمال تشکر را داریم.

حاصل از آزمایش‌های مولکولی با نتایج آزمایش‌های مربوط به کنترل بیولوژیک همخوانی داشت. یعنی جدایه‌هایی که دارای فعالیت بازدارندگی رشد قارچ بودند، از لحاظ ژنتیکی نیز به هم شباهت داشتند و جدایه‌های غیر فعال در کلاستر بندی مولکولی نیز در یک گروه جداگانه قرار گرفتند. Malkawi و همکارانش در اردن در سال ۱۹۹۹، از تکنیک RAPD برای تعیین تنوع ژنتیکی جدایه‌های استرپتومایسس خاکزی استفاده کردند که تجزیه خوشه‌ای حضور پلی‌مورفیسم را میان جدایه‌ها مشخص کرد و دو گروه با تنوع زیاد در میان جدایه‌ها مشخص شد. نتایج آنها نشان داد تکنیک RAPD یک روش مؤثر و کارا در تعیین تنوع ژنتیکی جدایه‌های استرپتومایسس می‌باشد و

### منابع

1. Akopyanz N, Bukanov N O, Westblom T U, Kresovish S, Berg D E (1992) DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 20 (19): 5137-5142.
2. Anzai Y, Okuda T, Watanabe J (1994) Application of the random amplified polymorphic DNA using the polymerase chain reaction for efficient elimination of duplicate strains in microbial screening. II. Actinomycetes. *Journal of Antibiotic*, 47 (2): 183-192.
3. Baharlouei A, Sharifi-Sirchi G R, Shahidi Bonjar G H (2011) Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (oilseed rape isolate) by an effective antagonist *Streptomyces*. *African Journal of Biotechnology*, 10(30): 5785-5794.
4. Baniasadi F, Shahidi Bonjar G H, Baghizadeh A, Karimi Nik A, Jorjandi M, Aghighi S, Rashidfarokhi P (2009) Biological control of *sclerotinia sclerotiorum*, causal agent of sunflower head and stem rot disease, by use of soil borne actinomycetes isolates. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 4(2): 146-151.
5. El-Trabily KA, Hardy St GE, Sivasithamparam K, Hussein AM, Kurtboke DI (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.
6. Fani R, Damiani G, Di Serio C, Gallori E, Grifoni A, Bazzicalupo M (1993) Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) for generating specific DNA probes for microorganisms. *Molecular Ecology*, 2 (4): 243-250.
7. Gharaibeh R, Saadoun I, Mahasneh A (2003) Genotypic and phenotypic characteristics of antibiotic-producing soil *Streptomyces* investigated by RAPD-PCR. *Journal of Basic Microbiology*, 43(1): 18-27.
8. Herder S, Bellec C, Meredith S E, Cuny G (1994) Genomic fingerprinting of *Onchocerca* species using random amplified polymorphic DNA. *Tropical medicine and parasitology*, 45 (3): 199-202.
9. Jorjandi M, Shahidi Bonjar G H, Baghizadeh A, Sharifi Sirchi G R, Massumi H, Baniasadi F, Aghighi S, Rashidfarokhi P (2009) Biocontrol of *botrytis allii* munn the causal agent of neck rot, the post harvest disease in onion, by use of a New Iranian Isolate of *Streptomyces*. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 4 (1): 72-78.
10. Kieser T, Bibb M J, Buttner M J, Chater K F, Hopwood D A (2000) *Practical Streptomyces Genetics*. Norwich, UK: John Innes Foundation.
11. Lee J Y, Hwang B K (2002) Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative

- soils of Korea. Canadian Journal of Microbiology, 48: 407-417.
12. Louws F, Rademaker J, de Bruijn F (1999) The three DS of PCR-based genomic analysis of phytobacteria: diversity, detection and disease diagnosis. Annual review of phytopathology, 37: 81-125.
  13. Malkawi H I, Saadoun I, Moumani F A, Meqdam M M (1999) Use of RAPD-PCR fingerprinting to detect genetic diversity of soil Streptomyces isolates. New Microbiology, 22(1):53-58.
  14. Martin P, Dary A, Andre A, Decaris B (2000) Identification and typing of Streptomyces strains: evaluation of interspecific, intraspecific and intraclonal differences by RAPD fingerprinting. Research in Microbiology, 151(10): 853-864.
  15. O'Shea B, Khare S, Bliss K, Klein P, Ficht T A, Adams L G, Rice-Ficht A C (2004) Amplified Fragment Length Polymorphism Reveals Genomic Variability among *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Isolates. Journal of clinical Microbiology, 42(8): 3600-3606.
  16. Qingchao J, Zhihua J, Qiang W, Yinlin L, Shanjing Y, Peilin C (2008) Genomic variability among high pristinamycin-producing recombinants of *Streptomyces pristinaespiralis* revealed by amplified fragment length polymorphism. Biotechnology Letters, 30, 1423-1429.2008.
  17. Roberts M A (2002) Actinomycetes, biocontrol, questions and answers. Available on internet a: <http://www.palouse.net/ibs/micro2.htm>.
  18. Rowbotham T J, Cross T (1977) Ecology of *Rhodococcus coprophilus* and associated Actinomycetes in fresh water and agricultural habitats. Journal of General Microbiology, 100: 231-240.
  19. Saadoun I, Al-Momani F, Elbetieha A (1999a) Genetic determinants for active antibiotic-producing soil streptomycetes. Microbiologica, 22: 233-234.
  20. Saadoun I, Al-Momani F, Malkawi H I, Mohammad M J (1999b) Isolation, identification and analysis of antibacterial activity of soil streptomycetes isolates from north Jordan. Microbios, 100: 41-46.
  21. Saadoun I, Gharaibeh R (2001) The *Streptomyces* flora of Jordan and its potential as a source of antibiotics active against antibiotic-resistant gram-negative bacteria. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 18: 465-470.
  22. Shahidi Bonjar G H (2004a) Screening for antibacterial properties of some Iranian plants against two strains of *Escherichia coli*. Asian Journal of Plant Sciences, 3: 310-314.
  23. Shahidi Bonjar G H, Karimi Nik A (2004b) Antibacterial activity of some medicinal plants of Iran against *pseudomonas aeruginosa* and *P. fluorescens*. Asian Journal of plant Sciences, 3: 61-64.
  24. Shahidi Bonjar G H, Rashid Farrokhi P, Aghighi S, Shahidi Bonjar L, Aghelizadeh A (2005a) Antifungal Characterization of Actinomycetes Isolated from Kerman, Iran and their Future Prospects in Biological Control Strategies in Greenhouse and Field Conditions. Plant Pathology Journal, 4: 78- 84.
  25. Steadman J R, Marcinkowska J, Rutledge S (1994) A semi-selective medium for isolation of *Sclerotinia sclerotiorum*. Canadian Journal of Plant Pathology, 16:68-70.
  26. Sunil Kumar L (1999) DNA marker in plant improvement: An overview. Biotechnology Advances, 17:143-182.

## Evaluation of antagonistic effect and genetic diversity of *Streptomyces* strains isolated from soils of the kerman province as biological control of *Sclerotinia sclerotiorum*

Baniasadi F.<sup>1</sup>, Baghizadeh A.<sup>2</sup> and Shahidi Bonjar Gh.H.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, I.R. of Iran

<sup>2</sup> Biotechnology Dept., Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, I.R. of Iran

### Abstract

At the present research, 30 isolates of Actinomycetes have been isolated from agricultural soils of Kerman Province of Iran and assayed for antagonistic activity against *Sclerotinia sclerotiorum*. 10 isolates showed antagonistic effect of In Disc-Agar method, Among selected isolates, *Streptomyces* isolate 363 UK showed high antagonistic activity. Also, in order to determine genetic diversity of 30 isolates of *Streptomyces*, the DNA was extracted using CTAB method in laboratory. To do molecular investigation 10 RAPD primers were used for PCR. After doing electrophoresis, 128 sharp bands between 250 and 2800 base pair were recognized. The experiment results were analyzed using NTSYS software and UPGMA method with Dice coefficient. The analyzed cluster found from Dice coefficient divided the 30 *Streptomyces* isolates in two major groups. In the first group, 10 isolates were antagonistic properties, and in the second group of 20 isolates were no antagonistic effect. Grouping isolates using principal components analysis was performed and two-dimensional and three-dimensional plots respective was drawn. The isolates were divided into eight groups.

**Key words:** *Streptomyces*, *Sclerotinia sclerotiorum*, Genetics Diversity, RAPD Molecular Marker