بررسی خاصیت آنتاگونیستی وتنوع ژنتیکی جدایه های استرپتومایسس استخراج شده از خاکهای استان کرمان جهت کنترل بیولوژیک قارچ بیمارگر *Sclerotinia sclerotiorum*

فاطمه بنی اسدی[۱]، امین باقی زاده[۲]* و غلامحسین شهیدی بنجار[۱]

[۱] کرمان، دانشگاه شهید باهنر کرمان، دانشکده کشاورزی

[۲] کرمان، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، گروه بیوتکنولوژی

تاریخ دریافت: ۹۴/۹/۱۱ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱/۱۹

چکیده

در تحقیق حاضر برای تعیین جدایه های مناسب استرپتومایسس، 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 استرپتومایسس در روش Dual Culture از خود خاصیت آنتاگونیستی نشان دادند که بیشترین آن به استرپتومایسس 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 باند 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 استرپتومایسس 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: استرپتومایسس، *Sclerotinia sclerotiorum*، تنوع ژنتیکی، نشانگر RAPD

* نویسنده مسئول، تلفن:۰۹۱۳۱۴۱۴۱۵۶ ، پست الکترونیکی: amin_4156@yahoo.com

مقدمه

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 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 (۱۷و۱۸). برای استفاده بهینه از این باکتریها به عنوان عوامل بیوکنترل،

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 همبارز 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 پلوئیدی 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 (۱۵و۱۶). 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 آکتنومیست 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 مؤثر و غیرمؤثر بر قارچ بیمارگر *Butrytis alli* را از یکدیگر تمیز داد (۹). بهارلویی و همکاران در سال ۲۰۱۱ اثرات آنتاگونیستی۱۱۰ جدایه آکتنومیست خاکزی استان کرمان علیه قارچ بیمارگر*Sclerotinia sclerotiorum* را مورد بررسی قراردادند. نتایج نشان داد استرپتومایسس جدایه۴۲۲ بیشترین خاصیت آنتاگونیستی را دارا می باشد(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 ، زرند، 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 هرنمونه، 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 (۱۱و۱۹). 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

انگلیسی به حرکت در آورده شد. آنگاه نمونه ها در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد نگهداری شدند (۲۰و۲۱).

خالص سازی نمونه ها: پس از ۱۰-۷ روز انکوباسیون، پرگنه های اکتینومیست ها و همچنین برخی قارچها و باکتریها ظاهر شدند. از هر پرگنه اکتینومیست، کشت خطی بر روی محیط کشت CGA تهیه شد و نمونه های خالص انتخابی بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی، فیزیکی و شیمیایی(۳۰ نمونه) در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد 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 PDA (Potato Dextrose Agar) بود.

غربالگری جدایه های استرپتومایسس به منظور تعیین فعالیت ضد قارچی: به منظور تعیین توانایی جدایه های استرپتومایسس به دست آمده در تولید ماده ضد قارچی علیه قارچ مذکور، قطعه ای از پرگنه های هر جدایه ۱۰-۷ روزه در کشت خطی همراه با محیط کشت به قطر۶ میلی متر توسط چوب پنبه سوراخ کن جدا نموده و بر روی کشت چمنی تازه قارچ قرار داده شد. سپس پلیتها به مدت ۵ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد قرار گرفتند و بر اساس قطر ناحیه ممانعت از رشد، جدایه های استرپتومایسس فعال انتخاب گردیدند (۲۳و۲۴).

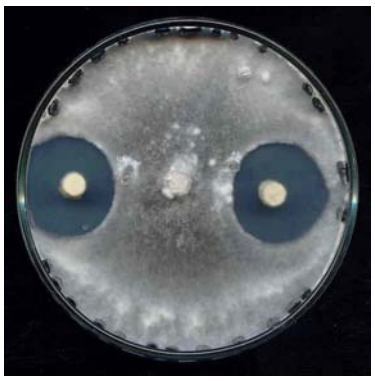
استخراج DNA استرپتومایسس ها و انجام PCR با نشانگر RAPD : پس از غربالگری جدایه های استرپتومایسس، DNA ژنومی هر جدایه با روش CTAB استخراج گردید(۱۰) و واکنش زنجیره ای پلیمراز با ۱۰ آغازگر تصادفی RAPD انجام پذیرفت. مواد واکنش دهنده در مخلوط ۲۵ میکرولیتری PCR شامل ، ۱µl از DNA الگوی تهیه شده با غلظت ۵۰ng/µl، ۲µl $MgCl_2$ با غلظت ۵۰mM، dNTP ۲/۵µl با غلظت ۲/۵mM، ۰/۳µl Taq DNA polymerase با غلظت ۵ unit/µl، ۲ µl پرایمر با غلظت ۲ µM، ۲/۵ µl PCR Buffer دارای غلظت ۱۰برابر [۵۰۰ mM KCl و Tris-HCl (pH=۸/۴)] و ۱۴/۷µl آب دو بار تقطیر استریل بود. ترموسایکلر مورد استفاده در این تحقیق از نوع اپندورف در نوع ساده وگرادیان بود. ابتدا دمای اتصال بهینه هر آغازگر با استفاده از ترموسایکلر گرادیان (شیب دمایی) به دست آمد. برنامه دمایی PCR برای همه آغازگر ها 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 سانتی گراد به مدت ۴ دقیقه (یک سیکل)، ۲- ۳۵ سیکل شامل: تک رشته ای شدن DNA در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵۰ ثانیه، اتصال آغازگر به DNA تک رشته ای در دمای اتصال بهینه مربوط به هر آغازگر(۵۵-۴۷ درجه سانتی گراد) به مدت ۴۰ ثانیه، بسط آغازگر در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه، ۳- تکمیل بسط در دمای $72\ ^{\circ}C$ به مدت ۸ دقیقه (یک سیکل). پس از انجام برنامه در دستگاه PCR، نمونه ها بلافاصله خارج شده و تا زمان انجام الکتروفورز، در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد حداکثر به مدت یک ماه نگهداری شدند.

آنالیز باندهای حاصل از الکتروفورز: جهت بررسی فرآورده های واکنش زنجیره ای پلیمراز از ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد. پس ازانجام الکتروفورز و مشاهده باندها در دستگاه ژل نگار، 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 نمونه ها با استفاده از شاخص دایس و تجزیه خوشه ای با استفاده از روش UPGMA در نرم افزار

NTSYS صورت گرفت .برای کاهش حجم داده ها و تفسیر راحت تر مشاهدات، با استفاده از تجزیه به مؤلفه های اصلی پلاتهای دو بعدی و سه بعدی نیز رسم شد.

نتایج و بحث

غربالگری جدایه های استرپتومایسس جهت تعیین فعالیت ضد قارچی: پس از انجام آزمایش آنتی بیوگرام به روش دیسک گذاری، منطقه ممانعت از رشد به صورت یک هاله شفاف نزدیک جدایه ها علیه *S. sclerotiorum* ایجاد گردید (شکل۱) (۴). از مجموع ۳۰ جدایه استرپتومایسس ۱۰ جدایه توانایی جلوگیری از رشد قارچ را داشتند و ۲۰ جدایه دیگر غیر فعال بودند.



شکل ۱- ایجاد هاله های ممانعت از رشد در اطراف دیسکهای جدایه استرپتومایسس ۳۶۳UK (چپ و راست) علیه قارچ بیمارگر *Sclerotinia sclerotiorum* به روش Disc-Agar در محیط کشت PDA. (نقل از۴)

سپس جدایه های استرپتومایسس براساس روش El- Trabily و همکارانش (۵) به چهار دسته تقسیم شدند. سه دسته فعال شامل ۱- قطر هاله ممانعت از رشد برای جدایه های استرپتومایسس ضعیف ۱۰–۵ میلی متر(+)، ۲- برای جدایه های متوسط ۳۰-۱۰ میلی متر(++) ۳- برای جدایه های قوی بالاتراز۳۰ میلی متر(+++) و یک دسته غیر فعال که هاله ممانعت از رشد ایجاد نمی کنند. جدول ۱ نحوه تمایز جدایه های استرپتومایسس فعال را نشان می دهد.

جدول۱- تنظیم جدایه های استرپتومایسس فعال بر اساس روش El-tarabily **و همکاران (۵)**

جدایه های استرپتومایسس فعال	منطقه ممانعت از رشد	جدایه های استرپتومایسس فعال	منطقه ممانعت از رشد
۳۶۳UK	+++	۳۷۰UK	++
۳۶۰UK	++	۱۳۹UK	++
۳۶۱UK	++	۲۷۳UK	+
۳۴۴UK	++	۳۶۴UK	+
۲۴۶UK	++	۲۶۲UK	+

نتایج حاصل از امتیاز دهی ژل ها و تجزیه وتحلیل آنها: پس از مشاهده باندها وعکس 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 خوشه ای با ضریب تشابه دایس در شکل۳ نشان داده شده است. اگر خط برش در فاصله تشابه ۵۸ درصد در درختچه حاصل از تشابه دایس زده شود، جدایه های استرپتومایسس به دو گروه کلی تقسیم می شوند. گروه اول شامل جدایه هایی است که توانایی جلوگیری از رشد قارچ و ایجاد هاله ممانعت را داشتند، یعنی جدایه های استرپتومایسس ۳۶۱ UK،۳۶۳UK، UK،۳۶۰UK،۲۶۲UK،۲۷۳UK،۳۶۴UK،۳۷۰UK،۳۴۴UK ۱۳۹وUK ۲۴۶ که در فاصله تشابه ۶۱ درصد ، این جدایه ها خود به سه زیرگروه تقسیم می شوند (جدول ۳).

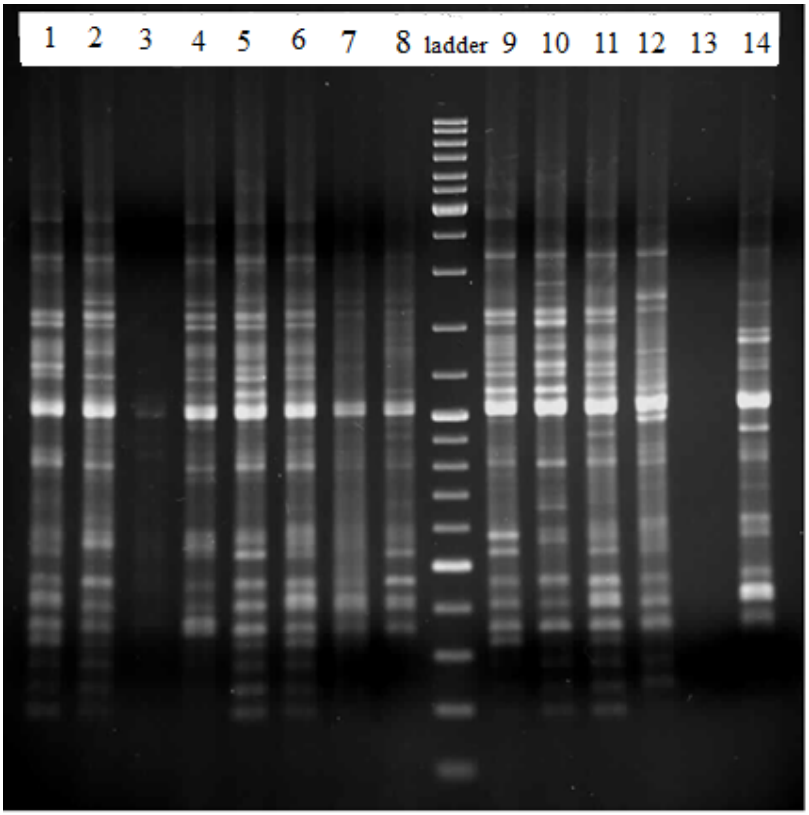
گروه دوم شامل جدایه های استرپتومایسس ۳۵۳UK، ۴۳۱UK، ۳۶۷UK، ۳۵۹UK، ۲۱۱UK، ۱۴۵UK، ۱۲۶UK، ۱۵۷UK، ۴۲۵UK، ۹۸UK، ۳۰۲UK، ۳۳۵UK، ۳۶۵UK،

۳۳۱UK، ۳۷۱UK، ۴۱۲UK، ۳۰۴UK، ۴۳۲UK، ۳۲۱UK و ۳۶۶UK می باشد.

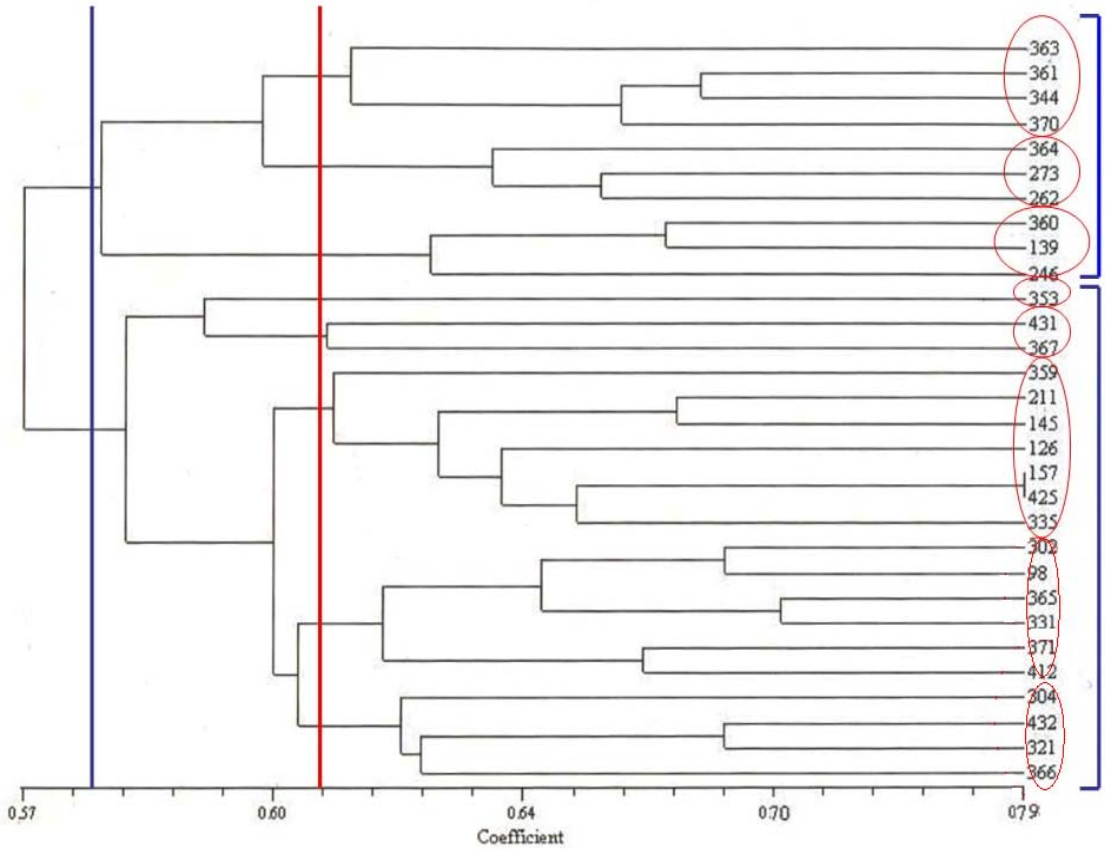
این جدایه ها توانایی جلوگیری از رشد قارچ را نداشتند. خط برش در فاصله تشابه ۶۱ درصد، این جدایه ها را در پنج زیرگروه قرار می دهد (جدول ۴).

جدول۲- تعداد باندها و میزان چندشکلی آغازگرهای RAPD مورد استفاده

شماره آغازگر	نام آغازگر	توالی آغازگر	تعداد کل باندها	تعداد باندهای چند شکل	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 درتعدادی از جدایه های استرپتومایسس پس از الکتروفورز



شکل۳- 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

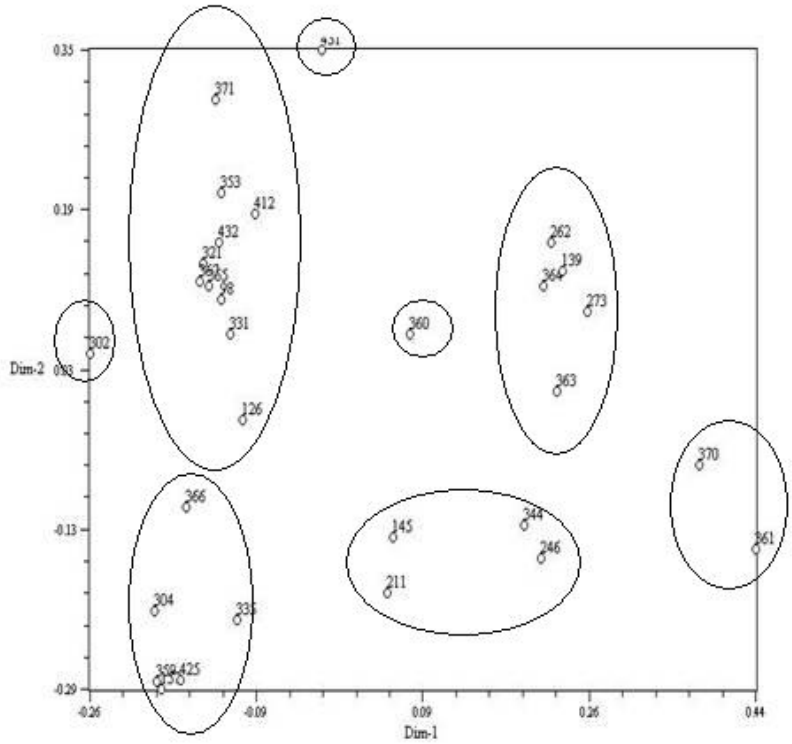
زیرگروه	جدایه های استرپتومایسس
الف	۳۶۳ UK،۳۷۰ UK،۳۴۴UK،۳۶۱UK
ب	۲۷۳ UKو۲۶۲UK،۳۶۴UK
ج	۲۴۶UKو۱۳۹ UK،۳۶۰UK

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 UKو۴۲۵UK،۱۵۷ UK،۱۲۶ UK،۱۴۵UK،۲۱۱UK، ۳۵۹UK
د	۳۰۲ UKو۹۸UK،۳۶۵ UK، ۳۳۱ UK،۳۷۱ UK ،۴۱۲UK
ه	۳۰۴UK ،۴۳۲ UK،۳۲۱ UK،۳۶۶UK

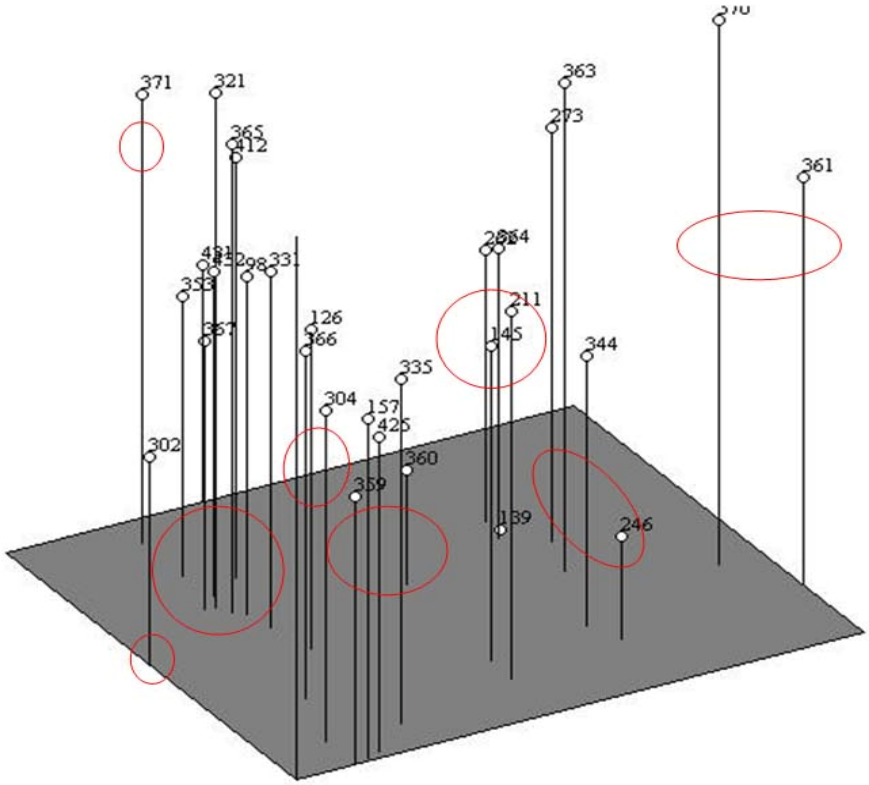
جدایه های استرپتومایسسUK ۳۵۹،UK ۳۶۰، UK۳۶۱ ، UK۳۶۳، UK۳۶۴، UK۳۶۵ وUK ۳۶۶ از یک مکان جمع آوری شده بودند، نتایج نشان داد که این جدایه های جمع آوری شده از یک ناحیه جغرافیایی لزوماً دارای قرابت ژنتیکی نمی باشند، به طوری که سه جدایهUK ۳۵۹، UK۳۶۵ وUK ۳۶۶ برخلاف چهار جدایه دیگر که متعلق به همان مکان بودند و توانایی جلوگیری از رشد قارچ را داشتند، نتوانستند از رشد قارچ جلوگیری نمایند و این جدایه ها در گروهها و زیر گروههای مختلفی قرار گرفتند.

تجزیه به مؤلفه های اصلی: از تجزیه به مؤلفه های اصلی بر روی داده های حاصل از RAPD یک پلات دو بعدی (شکل ۴) و یک پلات سه بعدی (شکل۵) حاصل شد. سه مؤلفه اصلی که بیشترین سهم را در ایجاد تنوع داشته اند به ترتیب ۲۷/۶۸، ۱۶/۱۸و ۹/۶۴ در صد از میزان کل تنوع را کنترل کرده اند.



شکل۴- پلات دو بعدی حاصل از تجزیه به مؤلفه های اصلی

نتایج حاصل از پلات دو بعدی و سه بعدی اگرچه اطلاعات خلاصه شده و مناسبی از وضعیت جدایه های استرپتومایسس را نشان داد، اما نتایج کلی و اطلاعات حاصله نشان می دهد که کلاستر بندی حاصل از کل اطلاعات ، نتایج دقیق تر و جامع تری را حاصل کرده است که نشان از انتخاب مناسب نسبی پرایمرها می باشد. ضمن آنکه با افزایش تعدادآغازگرها می توان اطلاعات دقیق تری به دست آورد. برای استفاده بهینه از باکتریها به عنوان عوامل بیوکنترل، توسعه روشهای مولکولی برای تشخیص این گونه ها اهمیت فراوانی دارد. استفاده از انگشت نگاری DNA یک روش ایده آل است که به طور وسیع در شناسایی موجودات از جمله باکتریها به کار رفته است (۶ و۱۲). استفاده از نشانگر مولکولی RAPD یکی از روشهای موفق است که می تواند جهت تولید الگوهای تکثیری متفاوت برای گونه های مختلف به کار رود (۱و۸).



شکل۵- پلات سه بعدی حاصل از تجزیه به مؤلفه های اصلی

جدول۵- گروه بندی جدایه های استرپتومایسس بر اساس پلات سه بعدی

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

قطعات DNA چند شکلی تکثیر شده، می توانند به عنوان نشانگر جهت تشخیص حضور گونه های استرپتومایسس بکار روند. استرپتومایسس ها کاربردهای بیشماری در علوم مختلف از جمله پزشکی، کشاورزی، میکروبیولوژی وبیوتکنولوژی دارند و میزان استفاده از آنها بسیار گسترده است. با توجه به تنوع شرایط اقلیمی ایران، گونه های بسیاری از استرپتومایسس نیز در ایران وجود دارد، اما علی رغم این گستردگی و تنوع، متاسفانه هنوز برای پیدا نمودن تنوع استرپتومایسس ها 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 جدایه های مذکور علیه قارچ *S. Sclerotiorum* مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج

حاصل از آزمایشهای مولکولی با نتایج آزمایشهای مربوط به کنترل بیولوژیک همخوانی داشت. یعنی جدایه هایی که دارای فعالیت بازدارندگی رشد قارچ بودند، از لحاظ ژنتیکی نیز به هم شباهت داشتند و جدایه های 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 جدایه های استرپتومایسس خاکزی استفاده کردند که تجزیه خوشه ای حضور پلی مورفیسم را میان جدایه ها مشخص کردو دو گروه با تنوع زیاد در میان جدایه ها مشخص شد. نتایج آنها نشان داد تکنیک RAPD یک روش مؤثر و کارا در تعیین تنوع ژنتیکی جدایه های استرپتومایسس می باشد و دندروگرام حاصل نشان داد که می توان از RAPD جهت طبقه بندی استرپتومایسس ها استفاده کرد(۱۳). این مورد در تحقیقات Martin و همکارانش که در فرانسه (۲۰۰۰) انجام شد، نیز دیده شده است. آنها ازتکنیک RAPD جهت شناسایی و طبقه بندی استرپتومایسس ها استفاده کردند (۱۴).

سپاسگزاری

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

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 scleratiorum* , causal agent of sunflower head and stem rot disease, by use of soil borne actiniomycetes 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 Onchocerea 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 Microbilogy, 48: 407-417.

12. Louws F, Rademaker J, de Bruijin 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 differencesby 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, Ioo: 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 it's 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.[1], Baghizadeh A.[2] and Shahidi Bonjar Gh.H.[1]

[1] College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, I.R. of Iran

[2] 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