کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی
دورۀ ۵، شمارۀ ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۵ (۵۸-۴۹)
DOI: 10.22059/jbioc.2016.58604

بهینه‌سازی محیط کشت BG11 به‌منظور افزایش تأثیر ضدقارچی سیانوباکتری *Cyanobacterium* sp. PGU1 علیه برخی بیمارگرهای قارچی گیاهان

۱. مریم نجفیان گرجی؛ ۲. محمد مدرسی*؛ ۳. مهران آوخ کیسمی؛ ٤. فاطمه جمالی
۱. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی دریا، دانشکدۀ علوم و فنون دریایی، دانشگاه خلیج‌فارس (بوشهر)، ایران
۲ و ٤. استادیاران، گروه اصلاح نباتات، دانشکدۀ کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه خلیج‌فارس، بوشهر، ایران
۳. استادیار، مرکز آموزش عالی جهاد کشاورزی میرزا کوچک‌خان (گیلان)
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۲/۳ - تاریخ تصویب: ۱۳۹٤/۱۲/۱۱)

چکیده

سیانوباکتری‌ها به‌علت تولید انواع متابولیت‌های ثانویه و ترکیبات ضدمیکروبی موردتوجه بسیاری از محققان قرارگرفته‌اند. این تحقیق به‌منظور بهینه‌سازی محیط کشت BG11 با هدف افزایش تأثیر ضدقارچی سیانوباکتری *Cyanobacterium* sp. PGU1 علیه دو قارچ بیماریزای گیاهی *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* و *Rhizoctonia solani* AG2-2-IIIB انجام شد. سیانوباکتری جداسازی‌شده از آب خلیج‌فارس با دو روش ریخت‌شناختی (مورفولوژیک) و تعیین توالی 16S rRNA با عنوان *Cyanobacterium* sp. PGU1 شناسایی شد. بهینه‌سازی محیط کشت BG11، با تغییر میزان منابع نیتروژن و فسفات موجود در محیط کشت، هرکدام در سه سطح، شامل ۰/۷۵، ۱/۵ و ۳ گرم در لیتر برای $NaNO_3$ و میزان ۰/۰۲، ۰/۰٤ و ۰/۰۸ گرم در لیتر برای K_2HPO_4 انجام شد و تأثیر این مقادیر بر فعالیت ضد قارچی سیانوباکتری بررسی شد. تأثیر ضدقارچی عصارۀ متانولی به‌دست‌آمده از کشت خالص سیانوباکتری، پیش و پس از بهینه‌سازی به روش اختلاط عصاره در محیط کشت بررسی شد. پس از بهینه‌سازی محیط کشت، درصد جلوگیری از رشد *F. oxysporum* f. sp. lycopersici از ۷۹/۳۳ به ۸۷/٤۳ درصد و برای *R. solani* AG2-2-IIIB از ۸۲/٤۷ به ۹۰/٦۲ درصد افزایش یافت.

کلیدواژگان: بهینه‌سازی، ترکیبات ضدقارچی، سیانوباکتری، محیط کشت.

مقدمه

امروزه حیات بشر به گیاهان بستگی دارد و ۹۰ درصد مواد غذایی موردنیاز انسان نیز از گیاهان تأمین می‌شود. با توجه به اهمیت گیاهان و نقش مهمی که در تأمین غذای انسان دارند، کوشش برای افزایش تولید و حفظ آنها از حملۀ آفات و بیماری‌ها اهمیت بالایی دارد (Sharma *et al.* 2012).

عامل‌های بیماریزای گیاهی با ایجاد بیماری‌هایی مانند بوته‌میری، پوسیدگی ریشه، پژمردگی و مرگ گیاهچه، سبب کاهش محصول در گیاهان می‌شوند. متأسفانه کاربرد آفت‌کش‌های شیمیایی از جمله قارچ‌کش‌ها در این راستا، موجب مخاطرات زیست‌محیطی بسیاری شده است. از جمله زیان‌های کاربرد آفت‌کش‌های شیمیایی در تولید محصولات غذایی، از بین‌بردن موجودهای غیرهدف و پیدایش عامل‌های بیماریزای مقاوم به آفت‌کش‌ها است؛ ازاین‌رو، راهبرد کنترل زیستی (بیولوژیک) و جایگزینی آفت‌کش‌های شیمیایی با عامل‌های زیستی بدون خطر،

* تلفن: ۰۹۱۷۳۰۳۱۵۵۰
E-mail: Modarresi@pgu.ac.ir

مطرح شده است و استفاده از روش‌های جایگزین برای کنترل بیمارگرها مانند کنترل زیستی امری مهم در مدیریت تلفیقی بیمارگرها به‌شمار می‌آید (Tantawy 2011, Alwathnani and Perveen 2012).

در پژوهش‌های مرتبط با کاربرد انواع سیانوباکتری‌ها در کنترل زیستی، موارد زیادی از تأثیر آنتاگونیستی متابولیت‌های ثانویهٔ تولیدشده توسط این ریزموجودها مانند انواع آنتی‌بیوتیک‌ها و سموم مختلف گزارش شده است. سیانوباکتری‌ها یا جلبک‌های سبز-آبی در انواع محیط‌های آب شیرین، دریا و محیط‌های خاکی وجود دارند. در سال‌های اخیر متابولیت‌های ثانویهٔ بسیاری از این ریزموجودات به‌ویژه سیانوباکتری‌ها استخراج شده است. بیش از پانزده‌هزار ترکیب جدید شیمیایی از زیست‌تودهٔ ریز جلبک‌ها به دست آمده است که از جملهٔ آنها می‌توان ترکیبات منحصربه‌فردی مانند کاروتنوئیدها، آنتی‌اکسیدانت‌ها، اسیدهای چرب، آنزیم‌ها، پلیمرها، پپتیدها، استرول و سموم مختلف را نام برد (Basha and Bhatnagar 2012). از سوی دیگر، ترکیبات بسیاری با خاصیت‌های ضدمیکروبی، ضدسرطان، ضدغده (تومور)، ضدویروس و ضدقارچی از آنها استخراج شده است (Stensvik *et al.* 1998, Heidari *et al.* 2012). به‌همین دلیل، این ریزموجودها به عنوان گزینهٔ مناسبی برای کشف و استخراج مواد زیستی سودمند شناخته شده‌اند. در نتیجه می‌توان اذعان داشت که سیانوباکتری‌ها از جمله عامل‌های مهم زیستی هستند که می‌توان از آنها برای کنترل بسیاری از بیمارگرهای گیاهی، جانوری و انسانی مانند انواع قارچ‌ها، باکتری‌ها و حتی مخمرها استفاده کرد (Latysheva *et al*. 2012).

بررسی‌های مختلف نشان داده است که بروز بسیاری از بیماری‌ها در گیاهان و محصولات گیاهی، با استفاده از ویژگی آنتاگونیستی ترکیبات موجود در سیانوباکتری‌ها کاهش می‌یابد. انجام این بررسی‌ها و جستجو برای درک تأثیر بازدارندهٔ عصارهٔ سیانوباکتری‌ها، از جنبه‌های بسیاری اهمیت دارد (Kulik 1995).

استفاده از ترکیبات فعال زیستی تولیدشده توسط سیانوباکتری‌ها در کنترل بیماری‌های گیاهی برتری‌هایی نسبت به آفت‌کش‌های شیمیایی دارد (Abo-Shady *et al.* 2007). در یکی از پژوهش‌ها، تأثیر ضدقارچی سه سیانوباکتری *Spirulina platensis*، *Anabaena flos-aquae* و *Nostoc muscorum* بر دو قارچ بیماریزای گیاهی شامل *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* و *Rhizoctonia solani* بررسی شد. برای اندازه‌گیری تأثیر ضدقارچی از روش اختلاط عصاره با محیط کشت استفاده و رشد خطی قارچ‌ها نسبت به شاهد اندازه‌گیری شد. در این آزمایش بهترین تأثیر ضدقارچی در جدایهٔ *N. muscorum* مشاهده شد که ۶۴/۴۴ و ۵۴/۸ درصد کاهش رشد را به ترتیب بر *R. solani* و *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* اعمال کرد (Tantawy 2001).

سیانوباکتری‌های جنس *Anabaena*، قادر به تولید آنزیم‌های هیدرولیتیک هستند که از آنها می‌توان برای تولید آفت‌کش‌ها استفاده کرد. بسیاری از سیانوباکتری‌ها از جمله *Oscillatoria* sp.، *Nostoc* sp.، *Calothrix* sp.، *Phormidium* sp.، *Fischerella* sp. و *Anabaena* sp. نیز در زمینهٔ کنترل زیستی عامل‌های بیماریزای گیاهی بسیار بررسی شده‌اند. در بسیاری از آزمایش‌های ضدمیکروبی، متابولیت‌های استخراج‌شده از سیانوباکتری‌ها در مقایسه با قارچ‌کش‌ها و آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد تأثیر بهتری روی انواع بیمارگرهای مورد بررسی از خود نشان دادند (Tantawy 2011).

برخی از سیانوباکتری‌ها توانایی تولید انواع خاصی از توکسین‌ها دارند. زهرابه‌هایی که از جنس‌های *Anabaena* و *Nostoc* استخراج شده است کارایی بالایی در کنترل بوته‌میری و دیگر بیماری‌های ایجادشده توسط عامل‌های بیماریزای گیاهی دارند؛ به‌طور مثال دپسی‌پپتید استخراج‌شده از گونهٔ *Nostoc* تأثیر آنتاگونیستی بالایی در برابر قارچ بیماریزای گوجه‌فرنگی *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* از خود نشان داده و پتانسیل بالایی درزمینهٔ استفاده به‌عنوان دارو و تحقیقات کشاورزی دارد (Tantawy 2011). افزون بر این، در تحقیقات دیگری فعالیت حشره‌کشی و نماتدکشی نیز در مورد این ریزموجودها گزارش شده است (Tong Tan 2007)؛ بنابراین بالفعل کردن قابلیت بالقوهٔ این ریزموجودها در برابر انواع بیمارگرها امری مهم در نظام مدیریتی مبارزه با آفات و بیماری‌ها به‌شمار می‌آید (Tong Tan 2007).

با توجه به تأثیر سودمند متابولیت‌های تولیدشده

توسط سیانوباکتری‌ها در کنترل عامل‌های بیماریزای گیاهی، این پژوهش با هدف جداسازی سیانوباکتری از آب خلیج‌فارس و شناسایی آن با روش‌های مولکولی و ریخت‌شناختی انجام شد. در مرحلهٔ بعد، بهینه‌سازی محیط کشت سیانوباکتری *Cyanobacterium* sp. PGU1 به‌منظور افزایش تأثیر ضدقارچی آن علیه دو قارچ بیماریزای گیاهی *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* عامل پژمردگی آوندی گوجه‌فرنگی و *R. solani* AG2-2-IIIB عامل مرگ گیاهچهٔ لوبیا طراحی و اجرا شد.

مواد و روش‌ها

تهیهٔ جدایه‌های قارچی

قارچ‌های بیماریزای گیاهی شامل *F. oxysporum* f. sp. lycopersici و *R. solani* AG2-2-IIIB از بخش گیاه‌پزشکی دانشکدهٔ کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه خلیج‌فارس بوشهر تهیه و روی محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار(PDA) افزونش شد.

جداسازی و خالص‌سازی سیانوباکتری

به‌منظور جداسازی سیانوباکتری، ۷۵ میکرولیتر از نمونهٔ آب دریا در پلیت حاوی محیط کشت BG11 کشت داده شد. پلیت‌های حاوی نمونهٔ آب دریا به مدت دو هفته در شرایط نوری و دمایی مناسب (نور سفید ۲۰۰۰ لوکس و دمای ۲۸°C) نگهداری شد (Zhang and Feng 2008).

برای تهیهٔ کشت خالص، پلیت‌های کشت داده‌شده پس از دو تا سه هفته نگهداری در شرایط مناسب، در زیر هود لامینار بررسی شدند. کلونی‌های پدیدارشده به‌وسیلهٔ لوپ سترون برداشته و در پلیت دیگری به روش کشت چهار منطقه‌ای کشت داده شدند. پلیت‌ها در شرایط نوری و دمایی مناسب به مدت دو هفته نگهداری شدند تا کشت خالص ایجاد شود. پس‌ازآن تک‌کلونی‌های ایجادشده، در زیر میکروسکوپ نوری بررسی شدند. ازآنجاکه سیانوباکتری‌ها، پروکاریوت و مانند دیگر باکتری‌ها بدون هسته هستند، نمونه‌هایی که در آنها هسته مشاهده نشد بررسی شدند (Mohammadi 2012).

شناسایی جدایهٔ سیانوباکتری

شناسایی جدایهٔ سیانوباکتری بر پایهٔ ویژگی‌های ریختی

برای شناسایی ریختی، مشخصات میکروسکوپی و ماکروسکوپی جدایه‌های مورد نظر با توجه به کلیدهای شناسایی سیانوباکتری‌ها بررسی شد (Prescott 1962, Anand *et al.* 1990). در این بررسی ویژگی‌هایی مانند تک‌یاخته‌ای و رشته‌ای بودن، شکل یاخته‌ها و اندازه و ابعاد آنها، آرایش یاخته‌ها درکلونی، داشتن یا نداشتن غلاف لعابی، در انواع رشته‌ای تریکومی، منشعب یا ساده بودن تریکوم‌ها، داشتن یاخته‌های تخصص‌یافته مانند هتروسیست، آکینت و واکوئل‌های گازی، داشتن یا نداشتن حرکت لغزشی و از ویژگی‌های ماکروسکوپی، شکل کلونی و رنگ آن در محیط‌های جامد و مایع بررسی شد (Zarrini *et al.* 1390).

شناسایی مولکولی جدایهٔ سیانوباکتری

برای شناسایی مولکولی، از تعیین توالی RNA ریبوزومی ۱۶S استفاده شد. در این روش در آغاز DNA به روش CTAB استخراج شد (Graham *et al.* 1994). در مرحلهٔ بعد به‌منظور افزونش ژن 16S rRNA از واکنش PCR با آغازگر (پرایمر)های اختصاصی سیانوباکتری‌ها استفاده شد (جدول ۱). مخلوط واکنش PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر شامل بافر ۱x، ۰/۲ میلی‌مولار dNTP، ۱۰پیکومول از هر یک از آغازگرها، ۲/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۱۰۰ نانوگرم DNA ژنومی سیانوباکتری و ۲/۵ واحد آنزیم تک‌پلیمراز بود. واکنش در دستگاه PCR با دمای ۹۴°C به مدت سه دقیقه شروع شد و در سی چرخه با برنامهٔ دمایی ۹۴°C به مدت بیست ثانیه، ۵۰°C به مدت بیست ثانیه و ۷۲°C به مدت نود ثانیه دنبال شد و درنهایت با یک زمان پنج دقیقه‌ای در دمای ۷۲°C واکنش تکمیل شد. محصول PCR روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد در دستگاه الکتروفورز بارگذاری شد و سپس در دستگاه عکس‌برداری از ژل بررسی شد. خالص‌سازی محصول PCR و تعیین توالی توسط شرکت Metabion آلمان انجام شد؛ سپس توالی به‌دست‌آمده با توالی‌های ثبت‌شده در NCBI انطباق داده شد تا بیشترین قرابت نمونه‌ها تعیین شود و درنهایت سیانوباکتری موردنظر شناسایی شد (Morin *et al.* 2010).

جدول ۱. آغازگرهای مورد استفاده برای شناسایی مولکولی سیانوباکتری مورد بررسی
Table 1. Primers used for molecular detecting of studied cyanobacteria

Reference	sequence Primer	Primer name
Soltani *et al*. 2008	5´-CGGACGGGTGAGTAACGCGTGA-3´	Forward primer
Zarrini *et al*. 2011	5´-GACTACWGGGGTATCTAATCCCWTT-3´	Reveres primer

تهیهٔ زیست‌تودهٔ سیانوباکتری

در آغاز سیانوباکتری‌های خالص‌شده در لوله‌های آزمایش با حجم ۲۰cc به مدت دو هفته در شرایط نور ۳۵۰۰ لوکس و دمای ۲۵°C در محیط BG11 کشت شدند. سیانوباکتری‌ها در مرحلهٔ رشد لگاریتمی به ارلن‌های ۲۵۰cc حاوی محیط کشت مایع BG11 منتقل و در شرایط نوری ۲۰۰۰ لوکس، دمای ۲۵°C، دوره‌های شانزده ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی و با چرخش صد دور در دقیقه در دستگاه لرزای اتاقک رشد (شیکر انکوباتور) پرورش داده شد (Vonshak 1986).

تعیین فعالیت ضدقارچی عصارهٔ متانولی سیانوباکتری

برای تعیین فعالیت ضدقارچی از روش اختلاط عصارهٔ متانولی با محیط کشت PDA استفاده شد. در این روش غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد حجمی- حجمی در حجم ۲ سی‌سی تهیه و درون پلیت‌ها ریخته شد؛ پس‌ازاینکه دمای محیط PDA اتوکلاو شده به ۴۵ درجهٔ سلسیوس رسید، محتوای پلیت‌ها به حجم ۲۰ سی‌سی رسانده شد.

قرص قارچی از کشت هفت روزه جدا و در مرکز محیط کشت‌های PDA حاوی عصارهٔ سیانوباکتری قرار گرفت. محیط کشت PDA بدون عصاره و حاوی ۲ سی‌سی متانول به عنوان شاهد استفاده شد. پلیت‌ها به مدت پنج روز در ۲۵±۲°C در اتاقک رشد قرار گرفتند. رشد قطری قارچ‌ها از روز اول تا روز پنجم ثبت شد و درصد جلوگیری‌کنندگی عصارهٔ متانولی سیانوباکتری نسبت به شاهد از فرمول زیر محاسبه شد (Alwathnani and Perveen 2012):

$$I = (C-T/C) \times 100$$

I: درصد جلوگیری‌کنندگی

C: رشد قطری قارچ در پلیت شاهد

T: رشد قطری قارچ در پلیت‌های تیمارشده با عصارهٔ سیانوباکتری

بهینه‌سازی محیط کشت BG11

بهینه‌سازی محیط کشت BG11، با تغییر میزان منابع نیتروژن ($NaNO_3$) و فسفات (K_2HPO_4) در محیط کشت انجام شد (Zang and Feng 2006). میزان $NaNO_3$ و K_2HPO_4 موردنیاز برای کشت سیانوباکتری‌ها به‌طورمعمول به ترتیب ۱/۵ و ۰/۰۴ گرم در لیتر است. برای بهینه‌سازی، میزان این ترکیبات نصف و دو برابر و تأثیر تغییر این مقادیر بر فعالیت ضدقارچی سیانوباکتری بررسی شد. بدین منظور ترکیب منبع نیتروژن و فسفات هرکدام در سه سطح با مقادیر ۰/۷۵، ۱/۵ و ۳ گرم برای $NaNO_3$ و مقادیر ۰/۰۲، ۰/۰۴ و ۰/۰۸گرم برای K_2HPO_4 به‌عنوان نه تیمار در سه تکرار در شرایط نوری ۲۰۰۰ لوکس و دمای ۲۵°C آزمایش شد. پس از برداشت سیانوباکتری‌ها در حالت (فاز) لگاریتمی، تودهٔ به‌دست‌آمده در آون خشک و در مجاورت متانول عصاره‌گیری شد. درنهایت تأثیر عصاره‌های به‌دست‌آمده از روش اختلاط عصاره با محیط کشت و در غلظت ۱۰۰درصد (حجم به حجم) بر رشد دو بیمارگر بررسی شد (Xiaobo *et al*. 2006, Azma *et al*. 2011, Kathiresan *et al*. 2006, Saha *et al*. 2003).

تجزیه‌وتحلیل آماری

آزمایش به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح پایهٔ کامل تصادفی، با سه تکرار اجرا شد. داده‌های به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار SAS تجزیهٔ واریانس شدند. برای مقایسهٔ میانگین نتایج به‌دست‌آمده نیز از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد (Kim and Kim 2008).

نتایج و بحث

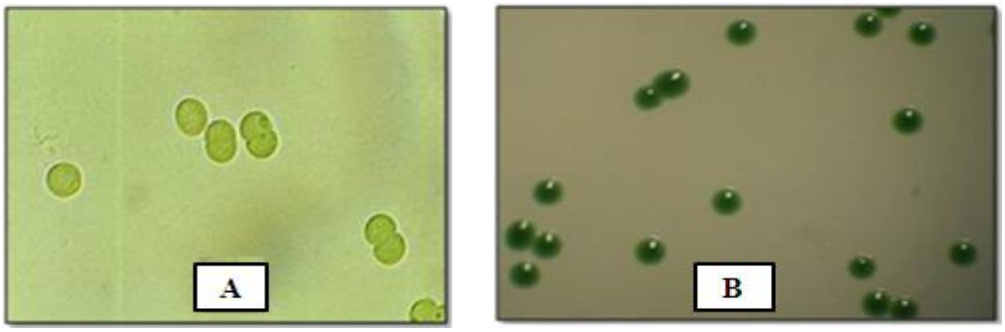
بررسی مشخصات ریختی میکروسکوپی و ماکروسکوپی جدایهٔ موردنظر و تطبیق آن با کلیدهای شناسایی معتبر مشخص کرد کلونی‌ها دو، چهار و یا هشت‌تایی بوده و ظاهری لایه‌لایه یا طبقه‌طبقه داشتند و با یک غلاف مخاطی احاطه شده بودند. سیانوباکتری بدون هتروسیست

و اکینت بوده و تک‌یاخته‌ای با ظاهری دیپلوکوک بود که نشان‌دهندهٔ نوع افزونش آن به‌صورت تقسیم دوتایی است. تطابق این ویژگی‌های با کلیدهای شناسایی مشخص کرد که سیانوباکتری موردنظر از راستهٔ *Chrococcules* است (شکل ۱).

در دهه‌های اخیر روش‌های تجزیهٔ مولکولی در شناسایی سیانوباکتری‌ها بر پایهٔ بررسی توالی ژن کدکنندهٔ زیرواحدهای سازندهٔ 16S rRNA، گسترش زیادی یافته است (Fiore *et al.* 2000).

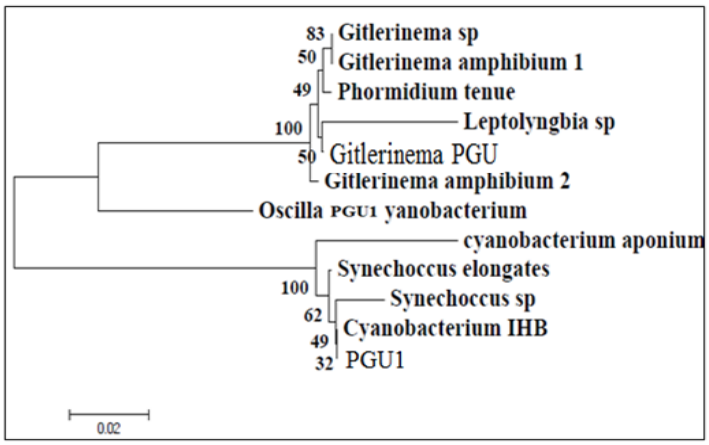
ناحیهٔ کدکنندهٔ ژن 16S rRNA حفاظت شده است و می‌توان توالی ژن کدکنندهٔ این بخش از ژنوم را پس از افزونش، به کمک روش PCR توالی‌یابی کرد و سپس با واردکردن این توالی در بانک‌های جهانی ژن، می‌توان گونهٔ دارای آن توالی را شناسایی کرد. این روش توسط بسیاری از محققان انجام شده است (Fiore *et al.* 2000, Morin *et al.* 2010, Saha 2003).

بخشی از توالی 16S rRNA (۶۱۰ باز) با استفاده از آغازگرهای مستقیم و معکوس افزونش و با استفاده از BLAST با توالی‌های ثبت‌شده در بانک ژن جهانی مقایسه شد. توالی 16S rRNA به‌دست‌آمده از جنس مورد بررسی، بالاترین همولوژی (بیش از ۹۸درصد) با جنس *Cyanobacterium* IHB داشت. نظر به اینکه جدایهٔ سیانوباکتری از خلیج‌فارس جدا شده بود، جدایهٔ مورد بررسی در این تحقیق PGU1 نامیده شد. درخت تبارزایی (فیلوژنتیک) نزدیکی و مقایسهٔ *Cyanobacterium* sp. PGU1 مورداستفاده در این پژوهش با برخی جنس‌های دیگر در شکل ۲ مشاهده می‌شود.



شکل۱. (A)؛ یاخته‌های سیانوباکتری جنس *Cyanobacterium* sp. PGU1 در بزرگنمایی × ۴۰
(B) کلونی سیانوباکتری جنس *Cyanobacterium* sp. PGU1 کشت‌شده روی محیط کشت BG11

Figure1. Cyanobacterium cells (*Cyanobacterium* sp. PGU1) in magnifying × 40 (A), cyanobacterium colonies of *Cyanobacterium* sp. PGU1 on BG11 medium



شکل ۲. درخت تبارزایی سیانوباکتری *Cyanobacterium* sp. PGU1 با برخی جنس‌های موجود در بانک ژنی جهانی ترسیم‌شده با استفاده از نرم‌افزار MEGA 5.2 بر پایهٔ تجزیه Neighbor-Joining

Figure 2. Phylogenetic tree of some cyanobacteria genus of global gene bank and *Cyanobacterium* sp. PGU1 based on Neighbor-Joining method in MEGA 5.2 software

بررسی تأثیر ضد قارچی عصارهٔ متانولی سیانوباکتری علیهٔ *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* و AG 2-2-IIIB *R. solani* نشان داد که عصاره به ترتیب موجب ۷۹/۳۳ و ۸۲/۴۷ درصد کاهش رشد قطری در این بیمارگرها شد. در تحقیقی که روی خاصیت آنتاگونیستی دو گونه سیانوباکتری *Phormidium autumnale* و *Nostoc linckia* و سه قارچ *Aspergillus*، *Alternaria* و *Cladosporium* علیه قارچ *F. oxysporium* f. sp. *lycopersici* صورت گرفت مشخص شد که در بین قارچهای آنتاگونیست، *Aspergillus* و در بین گونه‌های سیانوباکتری، *Nostoc* بیشترین بازدارندگی را از رشد *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* از خود نشان دادند. بیشترین کاهش رشد قارچ ۹۳ درصد بود که در تیمار با *Nostoc* sp. به دست آمد. درجات آنتاگونیستی مختلف، احتمال دارد به دلیل تولید آنتی‌بیوتیک‌ها و ترکیبات مهارکنندهٔ دیگر تولیدشده توسط آنتاگونیست‌ها باشد که با توجه به ماهیت، کیفیت و میزان این مواد متفاوت بود (Alwathnani and Perveen 2001). بررسی تأثیر بازدارندگی عصارهٔ یکی دیگر از گونه‌های *Nostoc* sp. روی *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* و چند قارچ بیماریزای گیاه گوجه‌فرنگی نشان داد که با افزایش غلظت عصارهٔ سیانوباکتری، میزان آلودگی قارچی کاهش یافته و بیشترین میزان مهارکنندگی با ۸۱درصد کاهش رشد روی *F .oxysporum* f. sp. *lycopersici* توسط عصارهٔ *Nostoc* sp. به دست آمد (Kim and Kim 2008).

به‌منظور بهینه‌سازی محیط کشت سیانوباکتری PGU1 برای افزایش تأثیر ضد قارچی آن علیه قارچهای بیماریزای مورد آزمون، منابع نیتروژن و فسفات محیط کشت BG11 تغییر داده شد. منابع نیتروژن و فسفات محیط کشت سیانوباکتری از جمله منابع مؤثر در تولید ترکیبات زیستی در این ریزموجودها به‌شمار می‌روند (Kathiresan 2002).

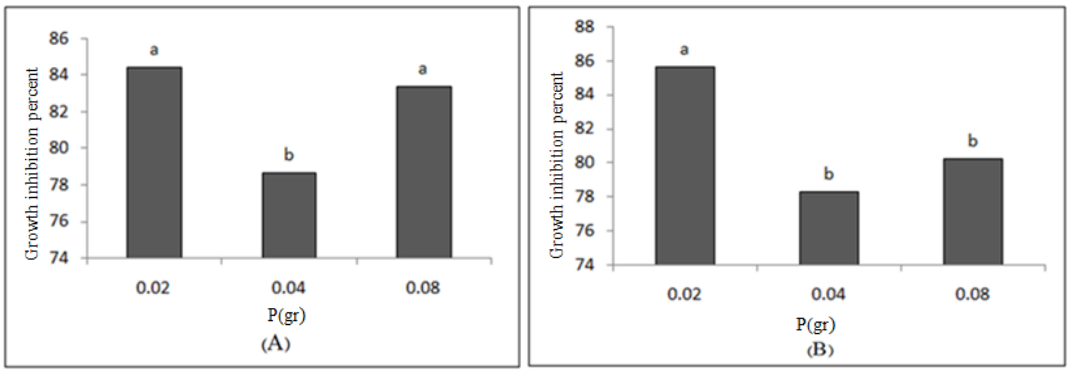
جدول ۲. تجزیهٔ واریانس بهینه‌سازی محیط کشت BG11 به‌منظور افزایش تأثیر ضد قارچی علیه دو قارچ بیماریزای گیاهی در مقادیر مختلف منابع نیتروژن ($NaNO_3$) و فسفات (K_2HPO_4)

Table 2. Analysis of variance for optimization of BG11 medium in order to increasing antifungal activity against two pathogen fungi in different amounts of nitrogen($NaNO_3$) and phosphate (K_2HPO_4)

Source of variation	Degree of freedom (df)	Optimization of N and P sources for increasing antifungal activity of against *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*	Optimization of N and P sources for increasing antifungal activity against AG2-2-IIIB *R. solani*
Treatment	9	45.31***	80.52***
N	2	58.80***	144.83***
P	2	84.86***	138.37***
N × P	4	18.79**	19.43**
Error	18	3.56	4.82
Coefficient of variation	-	2.30	2.70

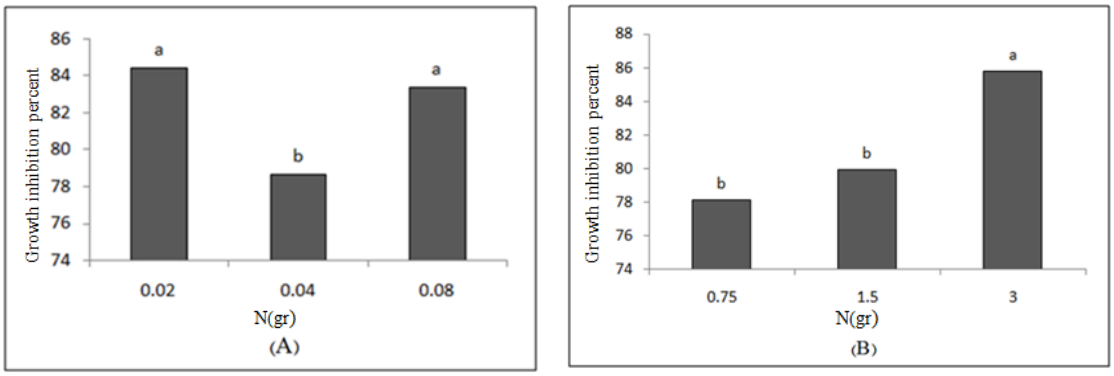
** and *** are significant different at 0.01 and 0.001 respectively

** و *** به ترتیب تفاوت معنی‌دار در سطح یک در هزار و ۱ درصد.



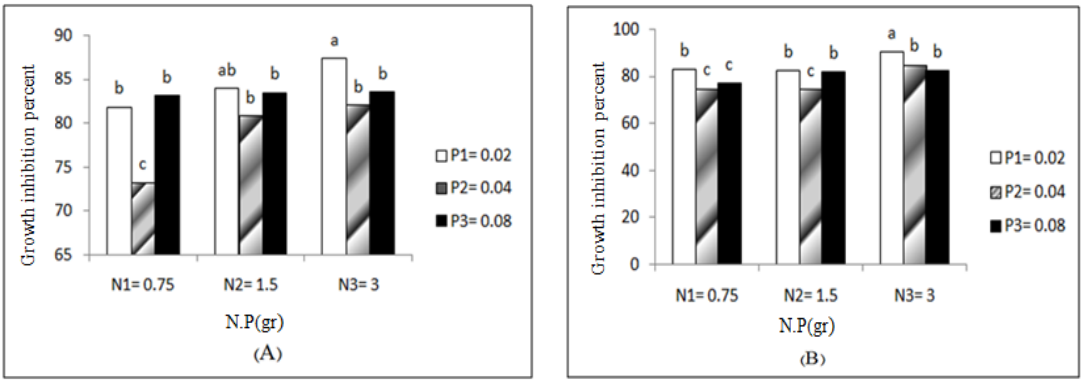
شکل ۳. نمودار A و B به ترتیب مقایسهٔ میانگین بهینه‌سازی منبع فسفات (P) یا (K_2HPO_4) محیط کشت BG11 به‌منظور افزایش تأثیر ضد قارچی علیه قارچهای بیماریزای گیاهی *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* و *R. solani* AG2-2-IIIB

Figure 3. Mean comparison of optimization of phosphate sources (K_2HPO_4) in BG11 medium for increasing antifungal activity against *F. oxysporum* f. sp. *Lycopersici* (A) and *R. solani* AG2-2-IIIB (B)



شکل ۴. نمودار A و B به ترتیب مقایسهٔ میانگین بهینه‌سازی منبع نیتروژن (N) یا ($NaNO_3$) محیط کشت BG11 به‌منظور افزایش تأثیر ضد قارچی علیه قارچ‌های بیماریزای گیاهی *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* و *R. solani* AG2-2-IIIB

Figure 4. Mean comparison of optimization of nitrogen sources ($NaNO_3$) in BG11 medium for increasing antifungal activity against *F. oxysporum* f. sp. *Lycopersici* (A) and *R. solani* AG2-2-IIIB (B)



شکل ۵. نمودار A و B به ترتیب اثرهای متقابل بهینه‌سازی به‌منظور افزایش تأثیر ضد قارچی علیه قارچ‌های بیماریزای گیاهی *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* و *R. solani* AG2-2-IIIB در مقادیر مختلف منابع فسفات (K_2HPO_4) و نیتروژن ($NaNO_3$) N.P- اثر متقابل منبع نیتروژن و فسفات

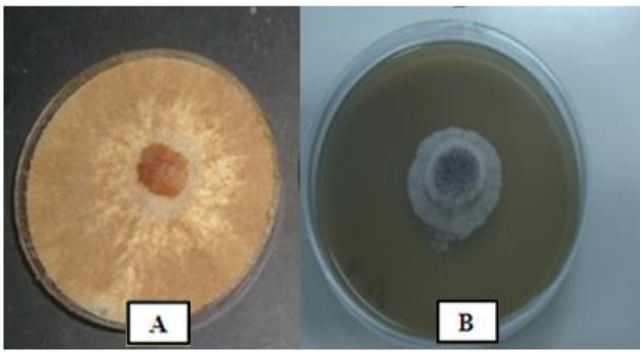
Figure 5. Mean comparison of optimization of nitrogen ($NaNO_3$) and phosphate (K_2HPO_4) sources in BG11 medium for increasing antifungal activity against *F. oxysporum* f. sp. *Lycopersici* (A) and *R. solani* AG2-2-IIIB (B)

نتایج تجزیهٔ واریانس گویای اختلاف معنی‌دار سطوح عامل‌ها و اثرهای متقابل آنهاست (جدول۲). به‌عبارت‌دیگر سطح نیتروژن و فسفات و نیز اثرهای متقابل آنها در سطح ۰/۰۰۱ معنی‌دار شد (شکل‌های ۳ تا ۵) که با توجه به معنی‌دار شدن اثرهای متقابل، از تفسیر اثرهای ساده به تنهایی خودداری و اثرهای متقابل آنها تفسیر شد.

در بهینه‌سازی منبع نیتروژن و فسفات محیط کشت سیانوباکتری PGU1، بهترین شرایط برای افزایش تأثیر ضد قارچی علیه دو قارچ بیماریزای *R. solani* AG2-2-IIIB و *F. oxysporum*f. sp. *lycopersici* در تیمار عصارهٔ به‌دست‌آمده از محیط کشت حاوی سه گرم $NaNO_3$ و ۰/۰۲ گرم K_2HPO_4، با ۹۰/۶۲ و ۸۷/۴۳ درصد کاهش رشد ایجاد شد (شکل ۶). نتایج به‌دست‌آمده از بهینه‌سازی محیط کشت سیانوباکتری نشان می‌دهد که با کاهش میزان فسفات و افزایش میزان نیتروژن، تأثیر ضد قارچی سیانوباکتری *Cyanobacterium* sp. PGU1 افزایش می‌یابد (شکل ۵).

در یکی از تحقیقات انجام‌شده روی تأثیر فسفات در تولید ترکیبات فعال زیستی در سیانوباکتری *Oscilatoria* sp.، مشخص شد که با کاهش میزان فسفات در محیط کشت تولید ترکیبات فعال زیستی و میزان سمّیت توسط سیانوباکتری افزایش می‌یابد (Samosorrn *et al.* 2007). در این پژوهش، کمترین درصد کاهش رشد دو قارچ بیماریزای گیاهی *R. solani* AG2-2-IIIB و *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* به ترتیب ۷۴/۵۷ و ۷۳/۳ درصد در مقادیر ۰/۷۵ و ۱/۵ گرم منبع نیتروژن و ۰/۰۴گرم منبع فسفات در محیط کشت سیانوباکتری به‌دست آمد که اختلاف معنی‌داری نیز نداشتند. میانگین

تولید مواد مؤثره در سطوح مختلف نیتروژن و فسفات برای *R. solani* AG2-2-IIIB و *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* نزدیک به یکسان بود و به ترتیب ۸۱/۱ و ۸۱/۳ به دست آمد. درمجموع نتایج گویای بهینه‌سازی برای مبارزه با هر دو عامل بیماریزا نزدیک به یکسان بوده است. تحقیقات دیگر گویای آن است که منبع فسفات و نیتروژن موجود در محیط کشت، دو منبع اهمیت در رشد، افزونش و تولید متابولیت‌های ثانویه در این ریزموجودها دارند که این امر با یافته‌های به‌دست‌آمده از این تحقیق همخوانی داشت (Takagi *et al.* 2000, Golberg and Chen 2006, Samosorn *et al.* 2007, Azarm and Mohajer 2010).



شکل۶. افزایش تأثیر ضد قارچی عصارهٔ سیانوباکتری *Cyanobacterium* sp.PGU1 علیه قارچ *R. solani* AG2-2-IIIB نسبت به شاهد

(A). رشد قطری قارچ *R. solani* AG2-2-IIIB در محیط کشت بدون عصارهٔ سیانوباکتری *Cyanobacterium* sp.PGU1

(B). رشد قطری قارچ *R. solani* AG2-2-IIIB در محیط کشت با عصارهٔ سیانوباکتری *Cyanobacterium* sp.PGU1

Figure 6. Increasing of antifungal activity of cyanobacterium extract against *R. solani* AG2-2-IIIB with respect to control
A: diagonal growth of *R. solani* AG2-2-IIIB without *Cyanobacterium* sp.PGU1extract
B: diagonal growth of *R. solani* AG2-2-IIIB with *Cyanobacterium* sp.PGU1extract

با توجه به افزایش درصد جلوگیری از رشد *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* از ۷۹/۳۳ به ۸۷/۴۳ درصد و *R. solani* AG2-2-IIIB از ۸۲/۴۷ به ۹۰/۶۲ درصد در این پژوهش می‌توان چنین استنباط کرد که سیانوباکتری‌ها عامل‌های بالقوه‌ای برای کنترل زیستی عامل‌های بیماریزای گیاهی به‌شمار می‌روند. ازاین‌رو بهینه‌سازی محیط کشت آنها برای افزایش تولید متابولیت‌های ضد قارچی تأثیر بسزایی در بالا بردن خاصیت ضد میکربی عصارهٔ آنها خواهد داشت. با توجه به تأثیر مثبت سیانوباکتری *Cyanobacterium* sp.PGU1 در شرایط آزمایشگاهی و نظر به تولید متابولیت‌های ثانویهٔ مؤثر توسط این جدایه، تأکید می‌شود برای ارزیابی تأثیر این سیانوباکتری در شرایط گلخانه بر کنترل بیماری‌های گیاهی نیز تحقیق دقیق‌تر و همه‌جانبه‌ای انجام شود.

REFERENCES

Abdelillah A, Houcine B, Halima D, Meriel C, Imane Z, Eddine SD, Abdallah M, Daoudi CS (2013) Evaluation of antifungal activity of free fatty acids methyl esters fraction isolated from Algerian *Inumusita tissimum* L. seeds against toxigenic *Aspergillus*. Journal of Tropical Biomedicine 3(6): 443-448.

Abo-Shady AM, Ghaffar BA, Rahhal MMH, Monem HA (2007) Biological control of faba bean pathogenic fungi by three cyanobacterial filtrates. Pakistan Journal of Biological Sciences 10(18): 3029-3038.

Abu-Nada Y (2006) Metabolic profiling of potato cultivars varying in horizontal resistance to late blight, *Phytophthora infestans*. Ph.D. thesis, McGill University, Canada.

Agoramoorthy G, Chandrasekaran M, Venkatesalu V, Hsu MJ (2007) Antibacterial and antifungal activities of fatty acid methyl esters of the blind-your-eye mangrove from India. Brazilian Journal of Microbiology 38: 739-742.

Alwathnani HA, Perveen K (2012) Biological control of Fusarium wilt of tomato by antagonist fungi and cyanobacteria. African Journal of Biotechnology 11(5): 1100-1105.

Anand NL, Radha RS, Ravati G, Subramianam TD (1990**)** Perspectives in phycology. Today and Tomorrow's Printers and Publishers New Delhi. pp. 383-391.

Azarm A, Mohajer R (2010) The role of cyanobacteria biological fertilizer in improving the quality of soil. Proceeding of the first Congress of Fertilizer Challenges in Iran: half century of application of fertilizer, 2010, Tehran, Iran. (in Persian)

Basha M, Bhatnagar A (2010) Biodiversity of microalgae and cyanobacteria from fresh water bodies of Jodhpur, rajasthan (India). Journal of Algal Biomass 1(3): 45-69.

Cardoso VM, Solano AG, Prado MA, Nunan A (2006) Investigation of fatty acid esters to replace isopropyl myristate in the sterility test for ophthalmic ointments. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 42(5): 630-4.

Fiore M, Neilan BA, Copp JN, Rodrigues JLM, Tsai M, Lee H, Trevors JT (2005). Characterization of nitrogen-fixing cyanobacteria in the Brazilian Amazon floodplain. Water research 39: 5017-5026.

Goldberg IK, Cohen Z (2006) The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*. Phytochemistry 67: 696-701.

Graham GC, Mayer P, Henry RJ (1994) A simplified method for the preparation of fungal genomic DNA for PCR and RAPD analysis. Biotechniques 1: 48-50.

Heidari F, Riahi H, Yousefzadi M, Asadi M (2012) Antimicrobial activity of cyanobacteria isolated from hot spring of Geno. Middle-East Journal of Scientific Research 12(3): 336-339.

Huang CB, George B, Ebersole JL(2010) Antimicrobial activity of n-6, n-7 and n-9 fatty acids and their esters for oral microorganisms. Archives of Oral Biology 55(8): 555-560.

Khairy H, El-Kassas H (2010) Active substance from some blue green algal species used as antimicrobial agents. African Journal of Biotechnology 9(19): 2789-2800.

Kathiresan S, Sarada R, Bhattacharya SGA (2006) Culture media optimization for growth and phycoerythrin production from *Porphyridium purpureum.* Biotechnology and Bioengineering 96(3): 456-463.

Kulik MM (1995) The potential for using cyanobacteria (blue-green algae) and algae in the biological control of plant pathogenic bacteria and fungi. European Journal of Plant Pathology 101: 585-599.

Latysheva N, Palmer J, Codd GA, Barker D (2012) The evolution of nitrogen fixation in cyanobacteria. Bioinformatics 28(5): 603-606.

Lin J, Dou J, Xu J, Aisa HA (2012) Chemical composition, antimicrobial and antitumor activities of the essential oils and crude extracts of *Euphorbia macrorrhiza.* Molecules 17: 5030-5039.

Martineau E, Susanna A, Matthew R, Miller J, Anne D, Hawes JI, Webster-Brown J, Packer MA (2013) Characterisation of antarctic cyanobacteria and comparison with New zealand strains. Hydrobiologia 711:139-154.

Mikaeili A, Karimi T, Shamspur T, Gholamine B, Modaresi M, Khanlari M (2012) Anti-candidal activity of *Astragalus verus* in the *in vitro* and *in vivo* guinea pig models of cutaneous and systemic candidiasis. Brazilian Journal of Pharmacognosy 22(5): 1035-1043.

Mohammadi F, Heshmatipour Z, Khanafari A, Njafi S, Hajipour S (2012) Isolation and identification of thermophilic cyanobacteria from hot spring in Ramsar. The 13th Iranian and the 2nd international congress of Microbiology, Ardabil, Iran, 121.

Morin N, Vallaeys T, Hendrickx L, Natalie L, Wilmotte N (2010) An efficient DNA isolation protocol for filamentous cyanobacteria of the genus *Arthrospira*. Journal of Microbiological Methods 80 (2): 148–154.

Prescott, GW (1982) Algae of the western great lakes areas William, C. Brown Company publisher, Dubuqe, Iowa.

Pohl CH, Kock JLF, Thibane VS (2011) Antifungal free fatty acids: a Review *In*: Mendes-yalis A (ed.), Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. FORMATEX, France, Pp 61-71.

Rodrigues LA, Lima DS, Johann S, Cisalpino PS, Pinheiro L, Pimenta S, AméliaBoaventura M (2011) *In vitro* antifungal activity of fatty acid methyl esters of the seeds of *Annona cornifolia* A. St.-Hil. (Annonaceae) against pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 44(6): 777-780.

Saha SK, Uma L, Subramanian G (2003) Nitrogen stress induced changes in the marine cyanobacterium *Oscillatoria willei* BDU 130511. FEMS Microbiology Ecology 45: 263-272.

Salem O, Hoballah E, Ghazi S, Hanna S (2014) Antimicrobial activity of microalgal extracts with special emphasize on *Nostoc* sp.. Life Science Journal 11(12): 752-758.

Samosorn A, Pumnuan J, Insung A, Ruangsomboon S (2007) Effects of nitrate and phosphate in culture medium on production of bioactive compounds by *Oscillatoria* sp. affecting on the house dust mite, *Rmatophagoides pteronyssinus* (Trouessart). The 8th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology, 215-219.

Sharma V, Singh G, Kaur H, Saxena A K, Ishar MP (2012) Synthesis of β-ionone derived chalcones as potent antimicrobial agents. Journal of Bioorganic and Medical Chemistry Letters 22(20): 6343-6.

Soltani N, Dezfoulian, Shokravi Sh, Bafteh-Chi L, Ehsan Sh (2008) Isolation and morphological and molecular characterization of new species of cyanobacteria from firooz-kooh area (Tehran province) using different media cultures. Science Journal 8(4): 319-328. (in Persian)

Takamatsu S, Nagle DG, Gerwick WH (2004) Secondary metabolites from marine cyanobacteria and algae inhibit LFA-1/ICAM-1 mediated cell adhesion. Journal of Natural Products 70(2):127-31.

Tantawy STA (2011) Biological potential of cyanobacterial metabolites against some soil pathogenic fungi. Journal of Food, Agriculture & Environment 9 (1): 663-666.

Takagi M, Watanabe K, Yamaberi K, Yoshida Y (2000) Limited feeding of potassium nitrate for intracellular lipid and triglyceride accumulation of *Nannochloris* sp. Applied Microbiology and Biotechnology 54, 112-117.

Tong Tan, L (2007) Bioactive natural products from marine cyanobacteria for drug discovery. Phytochemistry 68: 954-979.

Viyoch J, Pisutthanan N, Faikreua A, Nupangta K, Wangtorpol K, Ngokkuen J (2006) Evaluation of in vitro antimicrobial activity of Thai basil oils and their micro-emulsion formulas against Propioni bacterium acnes. International Journal of Cosmetic Science 28(2): 125-33.

Vonshak A (1986) Laboratory techniques for the cultivation ofrnicroalgae. *In*: Richmond A (ed.), Handbook of micro algal mass culture. CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 89-95

Wada H, Murata M (1990) Temperature-induced changes in the fatty acid composition of the *cyanobacterium, Synechocystis* PCC68031.Plant Physiology 92: 1062-1069.

Xiaobo Z, haiying W, Linyu H, Yongcheng L, Zhongtao L (2006) Medium optimization of carbon and nitrogen sources for theproduction of eucalyptene A and xyloketal A from Xylaria sp. 2508 using response surface methodology.Process Biochemistry 41: 293-298.

Yoon MY, Choi GJ, Choi, YH, Jang KS, Cha B, Kim JC (2011) Antifungal activity of polyacetylenes isolated from *Cirsium japonicum* roots against various phyto pathogenic fungi. Journal of Industrial Crops and Products 34(1): 882-887.

Zarrini G, Rasooli I, Abazari M, GhasemiY (2011). Investigation of antimicrobial activity of cyanobacteria isolated from urmialake catchment area. Journal of Ardabil University Medical Sciences 11(4): 329-336. (in Persain)

Zhang W, Feng Y (2008) Characterization of nitrogen-fixing moderate halophilic cyanobacteria isolated from saline soils of Songnen Plain in China. Progress in Natural Science 18: 769-773.

Biological Control of Pests and Plant Diseases
Vol. 5, No. 1, Spring & Summer 2016

Optimization of BG11 culture medium for increasing antifungal activity of *Cyanobacterium sp*. PGU1 against some plant pathogenic fungi

Maryam Najafian Gorji[1], Mohammad Modarresi[2*], Mehran Keysami[3] and Fatemeh Jamali[4]
1. M.Sc. Student in Marine Biotechnology, Faculty of Marin Sciences and technology, Persian Gulf University, Bushehr, Iran
2, 4. Assistant Professors, Plant Breeding Department, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Persian Gulf University, Bushehr, Iran
3. Assistant Professor, Technical and Vocation Jihad Agriculture High Education center Mirza koochak Khan
(Received: Feb. 22, 2015 - Accepted: Mar. 1, 2016)

ABSTRACT

Cyanobacteria have been considered due to producuction of types of secondary metabolites and antimicrobial compounds. This research designated for optimization of BG11 culture medium to increase the antifungal activity of *Cyanobacterium* sp. PGU1 against the plant pathogenic fungi, *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* and *Rhizoctonia solani*AG2-2-IIIB. Cyanobacterium was isolated from the Persian Gulf and identified as *Cyanobacterium* sp. using morphological characteristics and 16S rRNA sequencing. Optimization was done by changing the amount of nitrogen ($NaNO_3$) (0.75, 1.5 and 3 g/l) and phosphate (K_2HPO_4) (0.02, 0.04 and 0.08 g/l) and then the antifungal activity of cyanobacterium was investigated. Antifungal effects of pure culture methanol extract of cyanobacterium were investigated under *in vitro* conditions by mixing the extract derived from pure culture before and after optimization to the pathogen culture medium. Growth inhibition percentage for *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *R. solani* AG2-2-IIIB increased from 79.33 to 87.43, and from 82.47 to 90.62 percent, respectively.

Keywords: Antifungal compounds, culture medium, Cyanobacteria, optimization.

* Corresponding author E-mail: Modarresi@pgu.ac.ir Tel: +98 9173031550