کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی
دورهٔ ۷، شمارهٔ ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۷ (۴۵-۳۳)
DOI: 10.22059/jbioc.2017.230696.191

کنترل بیولوژیک قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* عامل پوسیدگی سفید خیار با استفاده از اکتینوباکتری‌های ریزوسفر

ساناز عینی [۱] ، کیوان بهبودی*[۲]، احمد علی پوربابایی[۳] و محمد جواد زاهد [۴]
۱و ۴ دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه گیاه پزشکی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.
۲. دانشیار، گروه گیاه پزشکی ، دانشگاه تهران، کرج، ایران.
۳. دانشیار، گروه خاکشناسی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.
(تاریخ دریافت: ۹۶/۰۳/۱۷- تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۷/۱۷)

چکیده

اکتینوباکتری‌ها به‌دلیل داشتن ویژگی‌های آنتاگونیستی بسیار در برابر طیف گسترده‌ای از بیمارگرهای گیاهی به‌ویژه قارچ‌ها، به‌عنوان عوامل کنترل بیولوژیک توجهات زیادی را به خود معطوف کرده‌اند. ***Sclerotinia Sclerotiorum* (Lib.) De Bary** عامل پوسیدگی سفید ساقه خیار که دارای سه خصوصیت عمده همچون دامنه میزبانی وسیع، توان بیماریزایی بالا و دوام طولانی اسکلروت‌ها در شرایط نامناسب محیطی می‌باشد یکی از مخرب‌ترین بیمارگرهای گیاهی در جهان است. با توجه به خسارت شدید و دشواری‌های کنترل توسط روش‌های شیمیایی، روش‌های جایگزینی مانند کنترل بیولوژک توسط گونه‌های اکتینوباکتری برای این بیمارگر مورد ارزیابی قرار گرفته است. در این پژوهش اثر آنتاگونیستی ۱۰۹ جدایه اکتینوباکتری در برابر قارچ پوسیدگی سفید خیار بررسی گردید و سه جدایه **UTS13**، **UTS19** و **UTS49** با بیشترین میزان ممانعت از رشد پرگنه قارچ بیمارگر درون تشتک‌های پتری برای بررسی‌های بیشتر انتخاب شدند. خصوصیات فیزیولوژیکی جدایه‌های برتر حاکی تولید آنزیم‌های پروتئازی و کیتینازی بود. جدایه **UTS13** به‌عنوان جدایه برتر در آزمون‌های گلخانه‌ای مورد شناسایی قرار گرفت و با توجه به توالی **16S rDNA** مورد بررسی قرار گرفت و به عنوان ***Streptomyces albidoflavus*** شناسایی گردید. نتایج نشان داد که جدایه ***S. albidoflavus* UTS 13** باعث کاهش علائم بیماری به‌میزان پنجاه درصد در شرایط گلخانه‌ای و افزایش صفات رشدی گیاه در مقایسه با تیمار شاهد سالم شد. پژوهش حاضر سعی بر معرفی باکتری ***S. albidoflavus* UTS 13** به‌عنوان یک عامل بیوکنترل موثر به همراه طیف وسیعی از فعالیت‌های آنتاگونیستی در برابر قارچ بیمارگر ***S. sclerotiorum*** را داشته است.

واژه‌های کلیدی: آنتاگونیست، کنترل بیولوژیک، ***Sclerotinia sclerotiorum***، کیتیناز.

Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum*, the causal agent of cucumber white stem rot by rhizosphere actinobacteria

Sanaz Eini [1], Keyvan Behbodi [*2], Ahmad Ali Purbabaei [3] and Mohammad Javad Zahed [4]
1 and 4 Graduated Students, Department of Plant Medicine, University of Tehran, Karaj, Iran.
2. Associate Professor, Department of Plant Medicine, University of Tehran, Karaj, Iran.
3. Associate Professor, Department of Soil Science, University of Tehran, Karaj, Iran.
(Received: June 7, 2017- Accepted: October 9, 2017)

ABSTRACT

Actinobacteria have attracted high interests as potential biocontrol agents due to their antagonistic properties against wide range of plant pathogens particularly fungi. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) De Bary, the causal agent of cucumber white stem rot is one of the most destructive phytopathogens throughout the world which has three important characters as wide host range, severe pathogenicity and prolonged survival of the *Sclerotia* in unfavorable environmental conditions. Considering the serious damage of this pathogen that can not be easily controlled by chemical methods, alternative approaches such as biocontrol method using several species of actinobacteria were evaluated against this pathogen. Antifungal bioactivity of 109 isolates of actinobacteria collected from soils of Alborz province of Iran was investigated against *S. sclerotiorum* through agar dual culture bioassays. Among them, *Streptomyces* UTS13, UTS19 and UTS49 revealed reasonable inhibitory capabilities in dual culture procedure. In physiological studies the isolates showed enzymatic activities of chitinase, and protease. The results showed that UTS13 reduced the disease upto 50% in greenhouse conditions and significantly increased plant growth compared with the control. UTS13 isolate was identified with molecular features as *Streptomyces albidoflavus* UTS13. Future perspective includes production of commercial biocontrol products and resistant transgenic plants having antifungal properties originated from biologically active genes of *S. albidoflavus* UTS13. This investigation introduced *S. albidoflavus* UTS13 as an effective biological agent with wide spectrum of antagonistic activity against *Sclerotinia sclerotiorum*.

Keywords: Antagonistic, biological control, *Sclerotinia sclerotiorum*, Chitinase.
* Corresponding author E-mail: behbodi@ut.ac.ir

تازه‌های تحقیق

جدایه UTS13 به‌عنوان جدایه برتر در آزمون‌های گلخانه‌ای مورد شناسایی قرار گرفت و با توجه به توالی 16S rDNA مورد بررسی قرار گرفت و به‌عنوان *Streptomyces albidoflavus* شناسایی گردید. جدایه فوق قادر به رشد در محیط قلیایی و شور می باشد درنتیجه در محیط های فوق میتواند بکار رود.

مقدمه

قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Barry ، یک بیمارگر گیاهی با دامنه میزبانی وسیع است که انتشار جهانی دارد و خسارت این بیمارگر گیاهی ممکن است تا ۱۰۰ درصد نیز برسد (Adams and Ayers 1973). این قارچ سال‌ها به صورت سختینه در خاک بقا می‌یابد و در حضور ترشحات ریشه گیاهان جوانه می‌زند و اگر به درستی کنترل نشود جمعیت سختینه‌ها در خاک افزایش یافته که منجر به افزایش میزان شیوع بیماری می‌گردد (Johanson and Atallah 2006). مرسوم ترین روش کنترل این بیمارگر استفاده از قارچ‌کش‌های شیمیایی است با این حال این روش هزینه سنگین داشته (Rocha and Oliveria 1998) و همچنین موجب ظهور مقاومت این قارچ به قارچ‌کش‌ها و خطرات محیط زیستی ناشی از به‌کارگیری این سموم باعث به خطر افتادن سلامتی انسان‌ها و حیوانات می‌شود (Johanson and Atallah 2006). بیش از سی گونه قارچی و باکتری شناخته شده‌اند که برای اسکلروتینیا خاصیت آنتاگونیستی دارند (Valencia *et al.* 2011). اکتینوباکتری‌ها گروهی از باکترهای گرم مثبت، متعلق به شاخه اکتینوباکتریا هستند که ترکیبات متعددی از جمله آنتی‌بیوتیک‌ها، ویتامین‌ها، آلکالوئیدها، عوامل تحریک کننده رشد گیاهان، آنزیم‌ها و ترکیبات بازدارنده آنزیمی را تولید می کنند در کشاورزی مدرن کاربرد آفت‌کش‌ها هنوز یک روش موثر وکارآمد برای کنترل بیمارگرهای گیاهی است (Gupta *et al.* 2002). کاربرد اکتینوباکتری‌ها بویژه جنس *Streptomyces* با توجه به تولید دامنه گسترده‌ای از متابولیت‌های ثانویه، آنزیم‌های تجزیه کننده، تولید سیدروفور و هورمون‌ها مثل اکسین موجب افزایش رشد گیاه می‌شوند (Abdallah *et al.* 2013, Bonjar and Nik 2004). Mycostop یک قارچکش بیولوژیک از جدایه *S. griseoviridis* است و به‌عنوان یک قارچکش زیستی تجاری در آمریکا و اروپا کاربرد دارد. Rhizovit و Phytoverm از دیگر قارچ‌کش‌های بیولوژیک تجاری هستند که به‌ترتیب جدایه‌های *S. rimosus* و *S. avermitilis* به‌عنوان ماده مؤثر بوده، علیه طیف قابل توجهی از بیمارگرهای خاکزاد در سبزیجات و گیاهان زینتی و زراعی استفاده می‌گردند (Dambou *et al.* 2002). در چین استرین *Streptomyces* sp. 5406 برای مدت ۳۵ سال برای حفاظت محصول پنبه علیه بیمارگرهای خاکزاد به‌کار رفته است (Shimizu *et al.* 2000). برخی میکروارگانیسم‌ها به ویژه از دو جنس *Streptomyces* و *Serratia* از بهترین تجزیه کننده‌های کیتین محسوب می‌شوند (Patil *et al.* 2000). با توجه به اینکه دیواره سلولی قارچ‌ها غنی از کیتین است؛ پتانسیل کاربرد کیتیناز در کنترل بیمارگرهای قارچی گیاهی، مورد توجه قرار گرفت. کیتیناز تولید شده توسط باکتری‌ها می‌تواند به‌طور مستقیم در کنترل قارچ‌ها یا از طریق واردکردن ژن تولیدکننده آن به گیاه، به‌کار گرفته شود (Ordentlich *et al.* 1988). تاهتامونی و همکاران (۲۰۰۶)، در بررسی نمونه مختلف از اکتینوباکتری‌های بومی اردن نشان دادند که جدایه‌های با فعالیت‌های کیتینازی موجب ممانعت از رشد پرگنه قارچ بیمارگر *Sclerotinia sclerotiorum* بر روی محیط کشت در آزمایشگاه شده و همچنین این جدایه‌ها تاثیر قارچ‌کشی داشتند. با در نظر گرفتن توانایی اکتینوباکتری‌ها در تولید آنزیم‌های تجزیه کننده دیواره سلولی و امکان به‌کارگیری این میکروارگانیسم‌ها در کنترل بیولوژیک قارچ‌های بیمارگر خاکزی (Abdallah *et al.* 2013) ، تحقیق اخیر به‌دلیل اهمیت قارچ بیمارگر *S. sclerotiorum* و امکان استفاده از اکتینوباکتری‌های بومی جهت کنترل این بیمارگر صورت گرفته است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و جداسازی اکتینوباکتری‌ها از ریزوسفر

نمونه‌برداری از ناحیه ریزوسفر خیار گلخانه‌ای مناطق مختلف استان البرز انجام شد و متعاقب آن، جداسازی و خالص‌سازی صورت گرفت (Lee and Hwang 2002). جهت جداسازی اکتینوباکتری‌های خاکزی از محیط کشت کازئین-گریسرول آگار ((Casein Glycerol Agar (CGA)

استفاده گردید. این محیط کشت شامل ۱۰ گرم گلیسرول ، ۰/۳. گرم کازئین، ۲ گرم KNO_3، ۲ گرم K_2HPO_4، ۰/۰۵ گرم $MgSO_4.7\ H_2O$، ۲ گرم NaCl، ۰/۰۰۲ گرم $FeSO_4.7\ H_2O$، ۰/۰۵گرم $CaCO_3$ و ۲۰ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر می‌باشد (Adams and Ayers 1982). قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* جداسازی شده از گیاه خیار، از موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور تهیه گردید.

بررسی قدرت بازدارندگی از رشد قارچ بیمارگر درون تشتک‌های پتری

از کشت پنج روزه قارچ بیمارگر، قرصی به قطر شش میلی‌متر در مرکز تشتک‌های پتری حاوی محیط سیب‌زمینی- دکستروز آگار قرار داده شد. هر جدایه اکتینوباکتری به‌صورت کشت خالص روی محیط CGA رشد داده شدند و بعد از نگهداری در دمای ۲۸ درجه سلسیوس به مدت پنج روز، قرص‌هایی به قطر شش میلی‌متر برداشته شد و به فاصله، سه سانتی‌متری از قرص قارچ بیمارگر قرار داده شد سپس نمونه‌ها در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شدند. در این آزمایش از قرص‌هایی از محیط CGA در مقابل قرص قارچی به‌عنوان شاهد استفاده شد (Sinclair and Dhingra 1995)جدایه‌های که دارای قدرت بازدارندگی بالا در برابر بیمارگر بودند، جهت شناسایی و آزمایشات گلخانه‌ای انتخاب گردیدند.

بررسی فعالیت قارچ‌کشی و قارچ‌ایستایی جدایه‌های اکتینوباکتری

به‌منظور انجام این آزمایش، آزمون زیستی به روش دیسک‌گذاری انجام پذیرفت. پس از تشکیل هاله ممانعت از رشد، دیسک‌هایی به قطر پنج میلی‌متر، از ناحیه هاله ممانعت از رشد قارچ برداشته و به تشتک‌های پتری محتوی محیط کشت منتقل گردید. رشد قارچ، نشان دهنده فعالیت قارچ‌ایستایی و عدم رشد آن، نشان دهنده فعالیت قارچ‌کشی هر کدام از جدایه‌های فعال است (Shahidibonjar *et al.* 2005).

بررسی تولید آنزیم پروتئاز جدایه‌های اکتینوباکتری

محیط کشت حاوی یک گرم گلوکز، سه گرم کازئین، دو گرم کلرید کلسیم، پانزده گرم آگار و یک لیتر آب مقطر تهیه و اتوکلاو گردید؛ سپس در تشتک‌های پتری استریل توزیع و پس از گذشت ۲۴ ساعت، دیسک‌هایی از جدایه‌های فعال اکتینوباکتری به قطر شش میلی‌متر از محیط کشت تازه باکتری به این محیط منتقل گردید. هیدرولیز کازئین و خاصیت پروتئولیتیکی، با مشاهده هاله شفاف در اطراف دیسک‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت (Doumbou *et al.* 2001).

بررسی تولید آنزیم کیتیناز جدایه‌های اکتینوباکتری

محیط حداقل[1] حاوی ۰/۴ درصد کیتین کلوئیدال و ۱/۵ درصد آگار، به‌منظور غربالگری جدایه‌های اکتینوباکتری دارای فعالیت کیتینازی تهیه و سترون گردید و پس از گذشت یک شبانه روز، قرص‌های اکتینوباکتری به تشتک‌های پتری حاوی این محیط منتقل شدند. در این محیط، کیتین به‌عنوان تنها منبع کربن استفاده شد و جدایه‌های دارای فعالیت کیتینازی، از طریق تشکیل هاله شفاف در اطراف کلونی‌هایشان، ردیابی شدند (Hsu and Lockwood 1975). مقدار بیست گرم از پودر کیتین با دویست میلی‌لیتر اسید کلریدریک غلیظ مخلوط و به مدت پانزده ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس روی شیکر قرار داده شد تا کیتین به‌طور کامل حل شود. سپس به تدریج، با استفاده از هیدروکسید سدیم (هم حجم اسید)، از حالت اسیدی خارج شد. در این مرحله با اضافه نمودن سود، رسوب سفید رنگ کیتین تشکیل می‌گردد. پس از رسیدن pH محلول به ۸/۵، فاز رویی دور ریخته شد. سپس به رسوب آب مقطر اضافه گردید و به مدت پنج دقیقه در ۵۰۰۰ دور سانتریفیوژ انجام گرفت. طی چند مرحله شستشوی متوالی رسوب با آب مقطر و سپس سانتریفیوژ، در نهایت ماده ژله‌ای که همان کیتین کلوئیدال است، در قسمت تحتانی لوله آزمایش تشکیل می‌گردد (Hsu and Lockwood 1975).

تعیین اثر pH بر روی میزان فعالیت ضدقارچی ماده موثر جدایه‌ها

به‌منظور تعیین این ویژگی ابتدا دامنه pH برای ماده

1. Minimal media

موثره هر جدایه در محدوده ۱۲- ۵، با یک مولار اسیدکلریدریک و نیم مولار هیدروکسید سدیم تهیه گردید. برای هر جدایه فعال اکتینومیست، نه عدد لوله آزمایش برای pH در نظر گرفته شد و سپس آزمون آنتی‌بیوگرام به روش نشت چاهک در سه تکرار انجام شد و در هر چاهک به میزان دویست میکرولیتر از ماده موثره تنظیم شده ریخته شد و اثر pH روی فعالیت ضد قارچی ماده موثره هر جدایه بر روی قارچ بیمارگر مورد بررسی قرار گرفت (Zamaniyan *et al.* 2005).

کشت جدایه‌های اکتینوباکتری در محیط مایع CG و ترسیم منحنی تولید ماده موثر

جهت تولید آزمایشگاهی ماده‌ی ضد قارچی از جدایه‌های اکتینوباکتری فعال، پرگنه‌هایی از باکتری‌ها در محیط مایع CG تلقیح شدند و سپس فلاسک‌ها در شیکر دوار واجد انکوباتور (۱۵۰ دور در دقیقه و دمای سی درجه سلسیوس) نگهداری شدند. از روز سوم تا روز بیستم به‌صورت متوالی، نمونه‌برداری از ریشه گیاه خیار و خاک اطراف آن به‌طور روزانه انجام شد و برای هر نمونه در نه تکرار، آزمون آنتی‌بیوگرام به‌روش نشت چاهک علیه قارچ انجام شد و از محیط CG به‌عنوان شاهد استفاده شد. تشتک‌های پتری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس تا زمان رشد کامل قارچ اسکلروتینیا و ایجاد هاله بازدارندگی نگهداری شدند. در نهایت، با اندازه‌گیری قطر هاله بازدارندگی از رشد در روزهای مختلف، منحنی تولید ماده موثر برای هر جدایه فعال رسم شد (Aktar *et al.* 2009).

تعیین میزان بازدارندگی پروتئین خام بدست آمده از محیط کشت جدایه‌های اکتینوباکتری

پس از اینکه حداکثر بازدارندگی از رشد ماده ضد قارچی و مدت زمان لازم برای رسیدن به آن (نقطه اوج منحنی)، درشرایط کشت مایع تعیین شد، ایزوله‌های فعال، مجدداً در محیط کشت CG تلقیح شده و فلاسک‌ها، در شیکر انکوباتور (۱۳۰دور در دقیقه و دمای ۲۸ درجه سلسیوس) قرار گرفتند. پس از سپری شدن مدت زمان اختصاصی مذکور برای هر ایزوله، سوسپانسیون باکتری به مدت پانزده دقیقه با سرعت ده‌هزار دور در دقیقه در دمای چهار درجه سلسیوس جهت حذف ته‌نشین سانتریفیوژ شد. بعد از صاف کردن رونشین (با فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر)، پروتئین باکتری با سولفات آمونیوم ۸۰٪ رسوب داده شد. بعد از ۲۴ ساعت، مجددا سی دقیقه با سرعت ده هزار دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. محلول رویی برای انجام مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت و پروتئین رسوب داده شده توسط بافر فسفات با pH=۷/۴ شستشو داده شد و سپس ده دقیقه با سرعت ده‌هزار دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید و رسوب به‌عنوان پروتئین خام برای انجام مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت (Ladjama *et al.* 2007). همچنین برای اطمینان از آنزیمی بودن اثر بازدارندگی بیمارگر، ته‌نشین در دمای جوش (یکصد درجه سلسیوس) به‌مدت بیست دقیقه حرارت داده شد، سپس آزمون آنتی‌بیوگرام به‌روش نشت چاهک بر روی قارچ بیمارگر برای نمونه‌های به‌دست آمده انجام شد.

تعیین دمای غیر فعال کننده ماده موثر جدایه‌های اکتینوباکتری

به ازای هر جدایه فعال اکتینوباکتری تعداد نه لوله آزمایش، در نظر گرفته شد و در هر لوله دو میلی‌لیتر از ماده موثره جدایه فعال اکتینوباکتری که از کشت باکتری درون محیط مایع و سپس حذف سلول باکتری به دست آمده ریخته شد. لوله‌های آزمایش به مدت بیست دقیقه در حمام آب گرم با دامنه دمایی ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰، ۹۵ و ۱۰۰ درجه سلسیوس قرار گرفتند و بلافاصله در ظرف حاوی یخ خرد شده، سرد شدند. سپس آزمون آنتی‌بیوگرام به روش نشت چاهک در نه تکرار انجام گرفت و در هر چاهک به میزان دویست میکرولیتر از ماده موثره ریخته شد. در این آزمون، یک لوله آزمایش حاوی غلظت تعیین شده بدون گرمادهی، در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. این عمل تا دمایی انجام گرفت که در آزمون زیستی هیچ هاله ممانعتی اطراف چاهک مورد نظر ایجاد نشود (Shahidi *et al.* 2005).

مطالعات گلخانه‌ای

جهت بررسی تاثیر جدایه‌های اکتینوباکتری بر کنترل و یا کاهش علائم ناشی از قارچ اسکلروتینیا ابتدا بذور خیار

رقم آمیرال در اتانول هفتاددرصد به مدت دو دقیقه و همچنین هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت یک دقیقه به‌صورت سطحی ضدعفونی و سی بار با آب مقطر سترون شستشو داده شدند. سپس در عمق مناسب در گلدان‌ها کاشته شدند. هر یک از جدایه‌ها درون محیط CG به مدت هفت روز در دمای سی درجه سلسیوس درون دستگاه شیکرانکوباتور با سرعت چرخش ۱۵۰ دور در دقیقه نگهداری شدند. سپس تمام جدایه‌ها به صورت سوسپانسون $۱۰^{۸}\times$ ۱ اسپور در هر میلی‌لیتر آماده شده و به خاک گلدان‌ها اضافه شد (Aktar *et al.* 2009). به‌منظور تهیه مایه تلقیح قارچ، ابتدا به میزان سی گرم دانه ارزن در فلاسک‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی چهل میلی‌لیتر آب مقطر سترون به‌مدت سی دقیقه خیسانده شد و سپس در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت سی دقیقه اتوکلاو گردید. از حاشیه‌ی پرگنه‌های در حال رشد *S. sclerotiorum* به میزان ده عدد یا تعداد بیشتری بلوک میسلیومی به قطر شش میلی‌متر تهیه شده و با ارزن‌های ضدعفونی شده تلقیح شدند و به مدت ده روز در دمای ۲۷ درجه سلسیوس نگهداری شدند. فلاسک‌ها به‌صورت دوره‌ای برای اطمینان از یکنواختی کلنیزه شدن تکان داده شدند. یک فلاسک بدون قارچ حاوی ارزن سترون نیز به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. گلدان‌هایی بدون مایه‌زنی به‌عنوان شاهد و گلدان‌هایی که تنها با قارچ بیمارگر مایه‌زنی شده بودند به‌عنوان شاهد بیمارگر در نظر گرفته شدند. هر سه روز یکبار گلدان‌ها آبیاری شدند و پس از گذشت یک ماه اطلاعات مربوط به میزان علائم، طول ساقه و ریشه و همچنین وزن خشک و تر ریشه و ساقه جمع‌آوری گردید (Tahtamouni *et al.* 2010). شدت علائم بیماری با کمک روش عبدل‌جلیل و همکاران (۲۰۱۶) محاسبه شد.

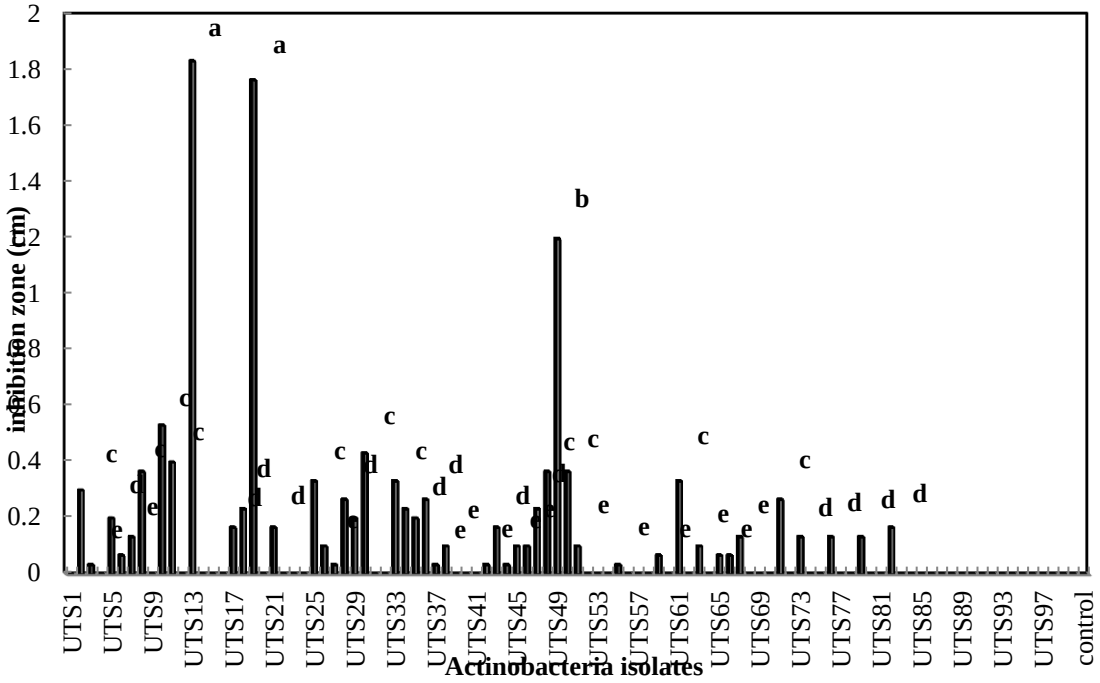
استخراج DNA و شناسایی اکتینوباکتری ها

به‌منظور شناسایی بهترین جدایه استخراج DNA ژنوم از نمونه اکتینوباکتری، ابتدا نمونه‌های باکتری بر روی محیط کشت CGA کشت گردید و به مدت چهار روز در دمای سی درجه سلسیوس قرار داده شدند. سپس باکتری‌ها از روی پلیت‌ها برداشته شدند و به یک میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری حاوی چهارصد میکرولیتر بافر لیزکننده (شامل تریس با pH هشت، نمک NaCl پنج مولار، نیم مولار EDTA و دو درصد SDS) منتقل گردیدند. برای شکستن کامل دیواره سلولی پپتیدوگلیکانی باکتری‌ها، میکروتیوب‌ها ابتدا داخل ازت مایع قرار گرفته و بلافاصله به حمام آب گرم ۶۵ درجه سلسیوس منتقل و سپس ورتکس شدند. پس از افزودن دویست میکرولیتر دیگر از بافر لیز کننده، میکروتیوب‌ها در سانتریفیوژ با دوازده هزار دور در دقیقه به مدت ده دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. مایع رویی برداشته شد و هم‌حجم آن محلول کلروفرم- ایزوامیل الکل (به نسبت ۱:۲۴) افزوده و سپس به مدت ده دقیقه سانتریفیوژ گردید. مایع رویی برداشته شد و هم‌حجم آن ایزوپروپانول سرد افزوده و به مدت یک شب در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری و مجدداً در دوازده هزار دور در دقیقه به مدت ده دقیقه سانتریفیوژ گردید. مایع رویی دور ریخته شده و محتویات درون تیوب با یکصد میکرولیتر الکل هفتاد درصد شستشو داده شد و به‌مدت ده دقیقه در دوازده هزار دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. مایع رویی دور ریخته شده و ۰/۳ میکرولیتر بافر TE به ویال‌ها اضافه شده و در فریزر با دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد.آغازگرهای مورد استفاده در این آزمون شامل 24f/ 16s-1 (5´-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3´) و 16s-2 1525r/ (5´-AAGGAGGTGATCCAGCCGC-3´) بودند. برنامه واسرشت سازی اولیه در ۹۴ درجه سلسیوس (سه دقیقه)، [واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس (۱دقیقه)، اتصال در دمای پنجاه درجه سلسیوس (یک دقیقه)، بسط در دمای ۷۲ درجه سلسیوس (دو دقیقه) که این سه مرحله در سی و پنج دور انجام گرفت] و بسط نهایی در دمای ۷۵ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه به‌منظور تکثیر نهایی انجام شد. محصولات پی سی آر جهت شناسایی و توالی یابی ناحیه 16S rDNA به شرکت کیاژن کره جنوبی فرستاده شد.

نتایج

تعیین فعالیت ضدقارچی جدایه‌های اکتینوباکتری در شرایط آزمایشگاه

از میان یکصد جدایه خالص‌سازی شده اکتینوباکتری تعداد جدایه UTS13 با ۶۲/۱ درصد بیشترین توانایی بازدارندگی از رشد پرگنه قارچی را از خود نشان داد که به لحاظ آماری با جدایه UTS19 با ۵۹ درصد بازدارندگی در یک گروه آماری قرار گرفتند. با مشاهده هاله بازدارندگی و نتایج به‌دست آمده، از بین جدایه‌های اکتینوباکتری که دارای فعالیت ضد قارچی در برابر قارچ *S. sclerotiorum* بودند، جدایه‌های UTS13، UTS19 و UTS49 دارای بیشترین اثر آنتاگونیستی در شرایط آزمایشگاهی در برابر قارچ مورد نظر بودند و جهت سایر آزمایش‌ها در این پژوهش انتخاب شدند (شکل ۱).



شکل ۱. بازدارندگی از رشد پرگنه قارچ *S. sclerotiorum* توسط جدایه‌های اکتینوباکتری. حروف غیر مشابه بیان‌گر اختلاف معنی‌دار است (P > ۰/۰۱)

Figure1. Inhibition of *S. sclerotiorum* mycelium growth by Actinobacteria isolates. Values followed by the different letter are significantly different (p > 0.01)

بررسی تولید آنزیم‌های خارج سلولی توسط جدایه‌های اکتینوباکتری

بررسی تولید آنزیم‌های خارج سلولی مختلف توسط جدایه‌های اکتینوباکتری فعال، نشان دهنده توانایی آن‌ها در تولید آنزیم پروتئاز خارج سلولی بود. جدایه UTS13 و UTS19 توانایی تولید آنزیم کیتیناز را نشان دادند ولی جدایه UTS19 فاقد توانایی تولید این آنزیم بود.

بررسی فعالیت قارچ‌کشی و قارچ‌ایستایی سه جدایه اکتینوباکتری منتخب

مشاهدات میکروسکوپی ناحیه ممانعت از رشد پرگنه قارچی توسط هر سه جدایه اکتینوباکتری حاکی از این بود که پرگنه‌های این قارچ در ناحیه ممانعت تخریب شده و کشت مجدد این ناحیه بر روی محیط کشت موجب رشد مجدد قارچ نمی‌شود که این مطلب نشان دهنده مرگ سلول‌های قارچ بیمارگر اسکلروتینیا در ناحیه ممانعت و تاثیر قارچ‌کشی این سه جدایه بر روی این قارچ است.

تاثیر اسیدیته محیط بر میزان توانایی جدایه‌های اکتینوباکتری در کنترل قارچ بیمارگر

آزمون‌های مربوط به تاثیر pH محیط بر کنترل قارچ بیمارگر نشان داد که در pH برابر هشت بیشترین میزان کنترل توسط هر سه آنتاگونیست مورد مطالعه مشاهده گردید. در مورد جدایه UTS13 کمترین میزان رشد در pH ۵ و۱۱بوده که نسبت به بیشترین میزان که در pH

هشت بود، ۳۱/۵ درصد کاهش جلوگیری از رشد قارچ بیمارگر دیده شد. باکتری UTS13 توانایی رشد در pH ۱۰، را داشت در حالی که سایر جدایه‌ها امکان رشد در pH هشت، را داشتند. تمامی جدایه‌ها در pH کمتر از شش توانایی رشد را نداشتند (جدول۱).

جدول۱. اثر pH بر توانایی ممانعت از رشد پرگنه قارچ *S. sclerotiorum* توسط جدایه های اکتینوباکتری.

Table1. Effect of pH on Actinobacteria isolates potential for inhibition of *S. sclerotiorum* mycelium growth.

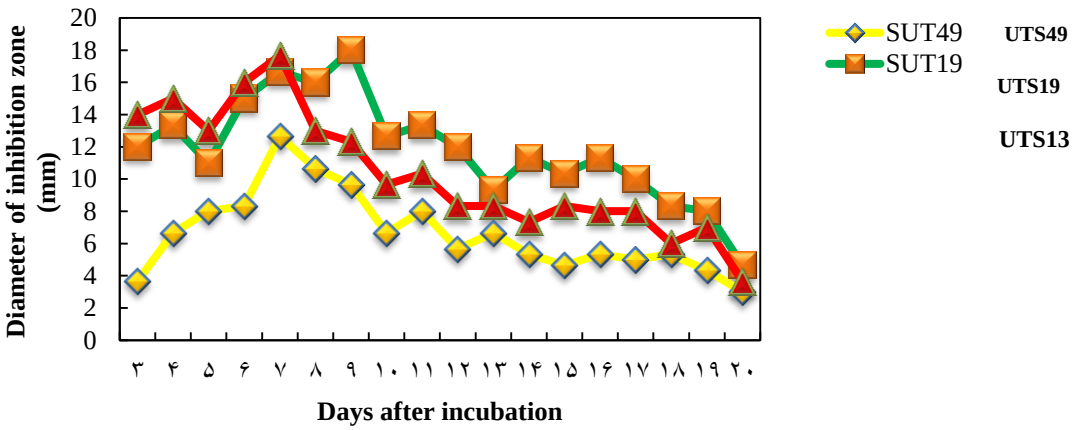
pH	Inhibition of fungal growth in different pH (cm)		
	UTS13	UTS19	UTS49
5	0.5 a	0.5 a	0.5 a
6	1 a	0.7 b	0.5 b
7	1 a	0.8 b	0.8 b
8	1.6 a	1.3 b	1 c
9	1.4 a	1.1 b	0.7 c
10	1.2 a	0.5 b	0.4 b
11	0.5 a	0 b	0 b
12	0 a	0 a	0 a

* اعداد، میانگین سه تکرار است. حروف غیر مشابه بیان‌گر اختلاف معنادار در سطح۱٪ ($P \leq ۰/۰۱$) است..

* Each attribute is the average of three replicates. Dissimilar words are indicating significant differences at the level of 1% ($P \leq 1\%$).

منحنی تولید ماده موثر جدایه‌های UTS13، UTS19 و UTS49 در محیط مایع CG

آزمون‌های آنتی‌بیوگرام با استفاده از ماده‌موثر، مبین اثر بازدارندگی جدایه‌های فعال اکتینوباکتری، علیه قارچ بیمارگر مورد نظر بود. نتایج حاصل از آزمون‌های آنتی‌بیوگرام پی‌درپی (تا بیست روز به‌طور متوالی) مطابق شکل دو و منحنی ترسیم شده با استفاده از داده‌های به‌دست آمده حاکی از آن بود که محیط کشت فیلتر شده جدایه UTS19، بیشترین بازدارندگی را از رشد پرگنه قارچ از خود نشان داد. این در حالی است که میزان بازدارندگی، برای جدایه‌های UTS13 و UTS49 در روز هفتم پس از تلقیح، به بیشترین میزان خود رسید.



شکل ۲. منحنی تولید ماده موثره جدایه UTS49، UTS13 و UTS19 در کشت مایع به‌طور متوالی تا بیست روز.

Figure2. Production curve of effective ingredient for isolate UTS49, UTS13 and UTS19 in a 20 continues day's period.

تعیین دمای غیر فعال‌کننده ماده موثر سه جدایه UTS49، UTS13 و UTS19

با توجه به نتایج، اثر بازدارندگی جدایه‌های UTS13 و UTS19 در ۵۵ درجه سلسیوس و جدایه UTS49 در پنجاه درجه سلسیوس به صفر کاهش یافت. بیشترین میزان تاثیر در دمای سی درجه سلسیوس مشاهده شد و با افزایش دما این میزان به تدریج کاهش یافت (جدول۲). در مورد جدایه UTS13 در دمای پنجاه درجه

سلسیوس نسبت به دمای بیست و پنج درجه سلسیوس به میزان ۶۸/۷۵ درصد از خاصیت بازدارندگی از رشد پرگنه قارچ بیمارگر ماده موثره باکتری کاسته شد.

جدول۲. اثر تیمارهای دمایی مختلف بر خاصیت ضد قارچی ماده موثره اکتینوباکتری ها در برابر *S. sclerotiorum* به روش نشت چاهک.

Table 2. Effect of temperature on antifungal activities of bacterial effective ingredient against *S. sclerotiorum* under *in vitro* condition.

Temperatures (°C)	inhibition of fungal growth (cm)		
	UTS13	UTS19	UTS49
25	1.6 a	1.3 b	1.6 c
30	1.6 c	1.3 b	1.06 a
40	1.4 a	0.7 b	0.73 b
50	1.1 c	0.45 b	0 a
55	0 a	0 a	0 a

*حروف غیر مشابه بیان‌گر اختلاف معنی‌دار در سطح۱٪ ($P \leq ۰/۱۰۱$) و همچنین اعداد، میانگین سه تکرار می‌باشد.

* Each attribute is the average of three replicates and Values followed by the different letter are significantly different ($p > 0.01$).

تعیین اثر بازدارندگی *Sclerotinia sclerotiorum* با استفاده از پروتئین خام به‌دست آمده از مایع صاف شده محیط کشت

پس از انجام آزمون آنتی‌بیوگرام علیه قارچ *S. sclerotiorum* با استفاده از محلول رویی و پروتئین خام به‌دست آمده از ماده موثر جدایه‌های فعال با استفاده از آمونیوم سولفات، نتایج به‌دست آمده نشان داد که محلول رویی هر سه جدایه فاقد اثر بازدارندگی می‌باشند، در حالی که پروتئین رسوب داده شده هر سه جدایه اثر بازدارندگی بر روی قارچ بیمارگر داشتند. در اثر حرارت، پروتئین رسوب داده شده اثر بازدارندگی خود را بر روی قارچ بیمارگر از دست داد که این موضوع بیان می‌دارد که خاصیت بازدارندگی، آنزیمی است.

اثر جدایه‌های اکتینوباکتری برتر بر کنترل بیماری پوسیدگی سفید ساقه خیار

یک ماه پس از کاربرد جدایه‌های اکتینوباکتری (UTS19، UTS13 و UTS19) به‌طور قابل توجهی علائم قارچ بیمارگر اسکلروتینیا روی گیاه خیار در مقایسه با شاهد (بیمارگر به تنهایی) کاهش یافت. جدایه UTS19 و UTS13 کاهش پنجاه درصدی در وقوع بیماری در مقایسه با شاهد مثبت (بیمارگر به تنهایی: هشتاد درصد) نشان دادند. جدایه UTS19 سبب کاهش وقوع بیماری تا چهل درصد در مقایسه با تیمار شاهد نشان داد. سلامت کامل بوته‌ها در تیمار شاهد سالم و عدم مشاهده علائم بیماری در گیاهچه‌های تیمار شده با جدایه‌های اکتینوباکتری مورد بررسی به تنهایی قابل ملاحظه بود.

ارزیابی تاثیر تیمار اکتینوباکتری‌ها بر شاخص‌های رشدی گیاه

تاثیر تیمارهای باکتری بر افزایش طول ساقه گیاه خیار دو هفته بعد از تلقیح مورد ارزیابی قرار گرفت. گیاهان تیمار شده با جدایه UTS13 بیشترین میزان افزایش طول ساقه و ریشه را نسبت به شاهد نشان دادند و از سوی دیگر جدایه اکتینوباکتری UTS49 بیشترین تاثیر را بر وزن خشک و تر کل گیاه داشته است. بر اساس مقایسه میانگین جدایه UTS13 و UTS49 با به‌ترتیب با ۳۲/۸۱ و ۳۸ درصد موجب افزایش وزن تر گیاه نسبت به شاهد سالم شدند. جدایه UTS13 با بیست و پنج درصد و UTS49 با ۳۴/۱۴ درصد ممجب افزایش در وزن خشک گیاه نسبت به شاهد توانایی افزایش رشد بیشتری را نسبت به سایر جدایه‌ها از خود نشان دادند (جدول ۳).

استخراج DNA و شناسایی اکتینوباکتری UTS13

توالی جدایه UTS13 با چندین توالی مشابه که از بانک اطلاعاتی NCBI اخذ شده بود، مورد ارزیابی ,و بلاست قرار گرفت و با میزان یکصد درصد تشابه با باکتری *Streptomyces albidoflavus* AIH12_KJ573071

تشخیص داده شد. مطالعات فیلوژنتیکی و ترسیم درخت فیلوژنتیکی تکاملی مشخص کرد که جدایه UTS13 با AIH12_KJ573071 قرابت فیلوژنتیکی نشان داد.

۱۳۳۸ نوکلئوتید نیز به میزان یکصد درصد حمایت اعتبارسنجی با سویه *S. albidoflavus*

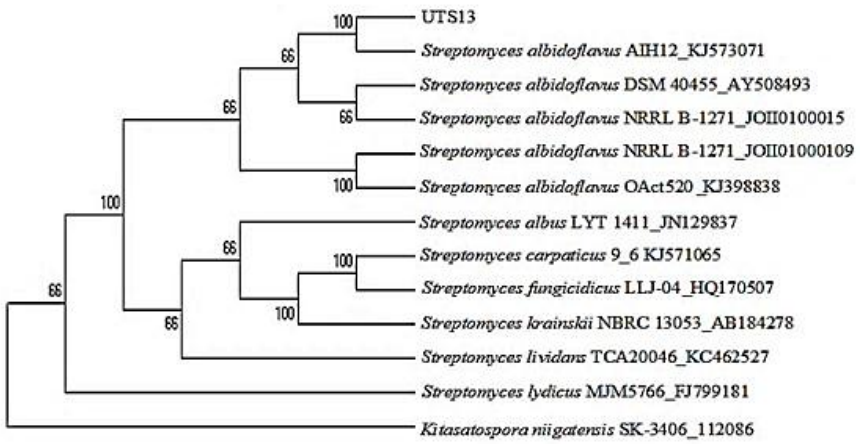
جدول ۳. مقایسه تاثیر تیمارهای جدایه‌های اکتینوباکتری بر شدت علائم بیماری پوسیدگی ساقه خیار و ویژگی‌های رشدی گیاه خیار.

Table3. Comparing different treatments of Actinobacteria isolates on disease severity of white stem rot and cucumber growth traits.

Treatment	Disease severity (%)	Shoot length (cm)	Root length (cm)	Total Fresh weight (g)	Total Dry weight (g)
S. sclerotiorum+ UTS13	50	24.11 bc	13.23 b	3.93 d	0.3 d c
S. sclerotiorum+ UTS19	50	20.49 d	10.42 c	3.55 de	0.33 e
S. sclerotiorum+ UTS49	60	19.22 d	11.2 c	3.44 e	0.2 e
UTS49	-	27 b	16.25 a	6.27 a	0.41 a
UTS13	-	31.4 a	16.6 a	5.79 b	0.36 b
UTS19	-	24.18 bc	13.8 b	4.96 c	0.33 bc
Control	-	21 dc	13.1 b	3.89 d	0.27 d
Pathogen	80	14.5 e	8.85 d	1.52 f	0.1 f

* حروف غیر مشابه بیان‌گر اختلاف معنی‌دار در سطح ۱٪ (P ≤ ۱٪) و همچنین اعداد میانگین سه تکرار می‌باشد.

* Each attribute is the average of three replicates. Dissimilar words are indicating significant differences at the level of 1% (P ≤ 1%).



شکل ۳. درخت فیلوژنتیکی استنباط شده از ناحیه16S rDNA برای جدایه UTS13 با روش maximum parsimony. اعداد بالای هر شاخه حمایت اعتبارسنجی بالاتر از پنجاه درصد را نشان می‌دهد. . گونه *Kitasatospora niigatensis* SK-3406_112086 به‌عنوان گروه خارجی در نظر گرفته شد.

Figure3. Phylogenetic tree derived from maximum parsimony analysis of the 16S rDNA genes from UTS13 isolate. Branch points supported bootstrap value over 50%. *Kitasatospora niigatensis* SK-3406_112086 used as the out group.

بحث

قارچ بیمارگر *S. Sclerotiorum* عامل پوسیدگی سفید ساقه و ریشه خیار یکی از مخرب‌ترین بیمارگرهای گیاهی است که دارای سه خصوصیت عمده چون دامنه

میزبانی وسیع، توان بیماریزایی بالا و دوام طولانی اسکلروت‌ها در شرایط نامناسب محیطی است و کنترل شیمیایی توسط قارچ‌کش‌ها با توجه به هزینه زیاد، ظهور نژادهای مقاوم و آلودگی محیطی یک روش مناسب برای این بیمارگر محسوب نمی‌شود. در مطالعات آزمایشگاهی نتایج رضایت‌بخشی از کاربرد اکتینوباکتری‌ها در برابر برخی از بیمارگرهای خاکزاد به‌دست آمده است (Shimizu *et al.* 2000). مارتینز (۲۰۱۴) ، از میان۱۵۱ اکتینوباکتری جداشده از خاک‌های مکزیک، شش جدایه تولید کننده کیتیناز نسبت به سایر جدایه‌ها دارای بیشترین میزان بازدارندگی در کشت متقابل درون تشتک‌های پتری در برابر بیمارگرهای مختلف گیاهی بودند (Evangelista-Martínez 2014). تاهتامونی و همکاران (۲۰۱۰) فعالیت ضدقارچی توسط برخی از جدایه‌های استرپتومایسس در برابر *S. sclerotiorum* را در شرایط آزمایشگاه مورد مطالعه قرار دادند که نتایج نشان‌دهنده بازدارندگی از رشد پرگنه قارچ توسط جدایه‌های تولید کننده آنزیم کیتیناز در کشت متقابل تا شصت درصد بود و همچنین میزان تولید کیتیناز با میزان ممانعت رابطه مستقیم داشت. از سوی دیگر، جدایه‌هایی که توان تولید آنزیم کیتیناز را نداشتند دارای خاصیت قارچ‌ایستایی در مقابل قارچ بیمارگر گیاهی *S. sclerotiorum* بودند. از میان ۱۰۰ جدایه جداسازی شده از ریزوسفر گیاه خیار، جدایه‌های UTS13 و UTS19 به‌عنوان جدایه‌هایی با توان تولید آنزیم کیتیناز در برابر *S. sclerotiorum*، بیشترین اثر آنتاگونیستی را در محیط آزمایشگاهی از خود نشان دادند. از سوی دیگر جدایه UTS49 که تولید کننده کیتیناز به‌شمار نمی‌آید کمتر از دو جدایه UTS13 و UTS19 از رشد پرگنه قارچی ممانعت کرد. توانایی مهار قارچ توسط استرپتومایسس‌ها ممکن است مربوط به تولید آنزیم‌های هیدرولیز کننده به‌ویژه کیتیناز باشد (Gohel *et al.* 2006). اکتینوباکتری های تولید کننده کیتیناز، می‌توانند به‌طور مستقیم در بیوکنترل قارچ‌های بیمارگر و یا از طریق دستکاری ژن‌ها مورد استفاده قرار گیرند (Doumbou *et al.* 2002). از آنجایی که دیواره سلولی قارچی، حاوی فیبرهای کیتینی و گلوکانی است که در ماتریکسی از پروتئین قرار گرفته‌اند، پروتئازها نقش قابل توجهی را در تجزیه این دیواره ایفا می‌کنند (Flores *et al.* 1997) که در پژوهش حاضر هر سه جدایه منتخب تولید کننده آنزیم پروتئاز بودند. در بررسی‌های میکروسکوپی هر سه جدایه UTS13، UTS19 و UTS49 در ناحیه ممانعت کنندگی از رشد پرگنه قارچ موجب تجزیه، تخریب و مرگ سلول هیف قارچ شدند و خاصیت قارچ‌کشی هر سه جدایه نیز به اثبات رسید. فعالیت لیتیک استرپتومایسس‌ها به‌طور عمده در نتیجه آنزیم‌های هیدرولاز مانند کیتیناز و گلوکوناز است (Matsumoto *et al*. 2001).

در مطالعه حاضر، سه جدایه منتخب برای تعیین منحنی فعالیت ضد قارچی، در آزمون‌های کشت مایع بررسی شدند. منحنی‌های تولید ماده موثر ترسیم شده برای این جدایه‌ها تا روز بیستم در آزمون‌های آنتی‌بیوگرام به‌صورت پی‌درپی، نشان داد که حداکثر میزان ممانعت از رشد قارچ برای جدایه‌های UTS13 و UTS19 در روز هفتم پس از تلقیح به بیشترین میزان خود می‌رسد. در حالی که میزان بازدارندگی، برای جدایه UTS19 در روز نهم پس از تلقیح به اوج خود رسید. یافته‌های حاصل، با نتایج بنی‌اسدی و همکاران (۲۰۰۹)، که حداکثر فعالیت بازدارندگی جدایه‌های اکتینوباکتری را در برابر قارچ *S. sclerotiorum* در روز هفتم پس از تلقیح عنوان کردند، هم‌راستا بود (Baniasadi *et al.*, 2009) . بهارلوئی و همکاران (۲۰۱۱)، گزارش کردند که تولید ماده موثره ۰*Streptomyces* sp. 410 در کشت مایع، علیه قارچ *Rhizoctonia solani* در روز هفتم بعد از تلقیح به بیشترین مقدار خود می‌رسد (Baharlouei *et al*. 2011). منحنی فعالیت آنتاگونیستی جدایه‌ها، با منحنی گزارش شده توسط ال- مانسی و همکاران (۱۹۹۹) مطابقت داشت که در این برررسی نیز بیشترین فعالیت آنتاگونیستی جدایه‌های استرپتومایسسی را بین هفت تا یازده روز بعد از مایه‌زنی عنوان کردند (El-Mansi *et al.* 1999). تاثیر دما و pH بر میزان فعالیت ضد قارچی مشاهده شده در این پژوهش مطابقت خوبی با یافته های بوکاو و پراسرتسان (۲۰۱۳) دارد که آن ها نیز نزدیک به ۹۴ تا یکصد درصد توان کنترلی باکتری *S. philanthi* RM-1-138 را در بین روز های ششم تا نهم

ارزیابی کردند و pH ۷/۵ را به‌عنوان بهترین میزان pH برای کنترل و دمای ۳۰ درجه سلسیوس را بیشینه دمای تاثیر عصاره باکتری معرفی کردند (Boukaew *et al.* 2013).

فعالیت ضد قارچی هر سه جدایه به‌صورت قارچ‌کشی بود و پروتئین خام به‌دست آمده از ماده موثر هر سه جدایه اثر بازدارندگی بر روی بیمارگر داشتند که در اثر حرارت این توانایی را از دست دادند، این امر می‌تواند نشان‌دهنده ماهیت آنزیمی این جدایه‌ها علیه قارچ *S. sclerotiorum* باشد و با توجه به فعالیت کیتینولیتیکی جدایه‌های UTS13 و UTS19 و از دست رفتن خاصیت ضد قارچی آنها پس از رسوب پروتئین ماده موثره توسط سولفات آمونیوم و حرارت دادن آن در دمای جوش، نشان می‌دهد که احتمالا این آنزیم در رفتار ضد قارچی جدایه‌های مذکور دخالت دارد (Swiontek Brzezeinska *et al.* 2013). سوئینتک بزینسکا و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که آنزیم کیتیناز رسوب داده شده توسط سولفات آمونیوم هشتاد درصد از باکتری *S. albidoflavus*، اثر بازدارندگی بر روی قارچ‌های بیماریزای گیاهی از جمله *Alternaria alternata, F. culmorum, F. oxysporum ,Fusarium solani* و *Botrytis cinerea* داشته است. جدایه UTS13با کمک توالی 16S rDNA و ویژگی‌های ریخت‌شناسی به‌عنوان باکتری *S. albidoflavus* UTS13 شناسایی و معرفی شد. اکتینوباکتری *S. albidoflavus* توانایی تولید آنتی‌بیوتیک استرپتوتریسین [۲] و دی بوتیل فتالیت [۳] را دارند و دی بوتیل فتالیت یک ترکیب با ویژگی ضد قارچی است (Roy *et al.* 2006). همچنین با توجه به نتایج اینااموری و همکاران (۱۹۹۰) که به اثبات تاثیر ضد قارچی استرپتوتریسین انجامید احتمالا تاثیر ضد قارچی*S. albidoflavus* در نتیجه توام آنزیم‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها است. با توجه به تاثیرات تیمار دمایی باید ذکر گردد که ترکیب دی بوتیل فتالیت در دمای سی درجه سلسیوس غیر فعال می‌شود و در صورتی که جدایه *S. albidoflavus* UTS13 توانایی تولید این ماده را داشته باشد، در دمای بالاتر از این میزان خاصیت کنترل‌کنندگی مربوط به سایر ترکیبات از جمله آنزیم‌های هیدرولیز کننده مانند کیتیناز است (Inamori *et al.* 1990).

در آزمایش‌های گلخانه‌ای، جدایه‌های UTS13 و UTS19 ۵۰٪ علائم بیماری را نسبت به شاهد تیمار شده با بیمارگر به‌تنهایی کاهش دادند. نتایج حاضر با نتایج تاهتامونی و همکاران (۲۰۰۹) ، که نشان می‌دهد جدایه‌های اکتینوباکتری تولید کننده کیتیناز شدت پوسیدگی سفید ساقه خیار ناشی از *S. sclerotiorum* را در گلخانه کاهش می‌دهند مطابقت دارد. همچنین بهارلوئی و همکاران (۲۰۱۱)، کاهش شصت درصدی علائم بیماری پوسیدگی کلزا ناشی از قارچ بیمارگر گیاهی *S. sclerotiorum* توسط جدایه‌های اکتینوباکتری تولید کننده کیتیناز را در شرایط گلخانه گزارش دادند (Baharlouei *et al.* 2011). میگروارگانیسم‌های افزایش دهنده رشد گیاهی ممکن است به‌طور مستقیم مانند کلاته کردن آهن، حل فسفات، تثبیت نیتروژن و تولید هورمون‌های گیاهی یا به شیوه غیر مستقیم مانند سرکوب بیمارگرهای گیاهی و تولید آنزیم‌های خارج سلولی مانند آمیلاز و کیتیناز و القای مقاومت در گیاهان میزبان در برابر عوامل بیماری‌زا باعث افزایش رشد گیاه شوند (Basak and Biswas 2009; Panhwar *et al.* 2010). تیمار با سه جدایه اکتینوباکتری منتخب در این پژوهش علاوه بر کاهش علائم بیماری اثر مثبتی بر شاخص‌های رشد گیاه نظیر ارتفاع بوته، ارتفاع ریشه، وزن خشک و وزن تر ریشه و اندام‌های هوایی در مقایسه با تیمار شاهد داشت. نتایج نشان داد که جدایه‌های UTS13 و UTS49 توانایی بالایی در افزایش شاخص‌های رشدی گیاه داشتند. در این راستا، گوپالاکریشنان و همکاران (۲۰۱۴)، نشان دادند که جدایه‌هایی از اکتینوباکتری‌ها که توانایی تولید لیپاز، کیتیناز و گلوکوناز را داشتند به‌طور قابل توجهی تمام صفات زراعی سورگوم در شرایط گلخانه‌ای و برنج در شرایط مزرعه‌ای در مقایسه با تیمار شاهد افزایش دادند (Gopalakrishnan *et al.* 2014). هانان و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند که جدایه *S. griseus* BH7 باعث افزایش رشد اندام‌های هوایی در گندم شده است (Hanan *et al.* 2008). ناسارو و همکاران (۲۰۰۳) نشان دادند که *S. griseolutes* از طریق تولید پلی‌آمین‌هایی

2. Streptothricin
3. Dibutyle phthalate

مانند پوترسکین، اسپرمیدین و اسپرمین باعث افزایش رشد در گیاه لوبیا می‌شود (Nassaro *et al.* 2003).

توانایی جدایه *S. albidoflavus* UTS13 در کاهش علائم بیماری در شرایط گلخانه‌ای و همچنین فعالیت آنتاگونیستی آن‌ها در شرایط آزمایشگاهی نشان می‌دهد که این جدایه کاندیدای مناسبی برای به‌کارگیری به‌عنوان عامل بیوکنترلی در برابر *S. sclerotiorum* و مدیریت پوسیدگی سفید ساقه کدوئیان و محصولات دیگر است.

REFERENCES

Abdallah ME, Haroun, SA, Gomah AA, El-Naggar, NE, Badr HH (2013) Application of Actinomycetes as biocontrol agents in the management of onion bacterial rot diseases. Archives of Phytopathology and Plant Protection 46(15): 1797-1808.

Ouhaibi-Ben Abdeljalil N, Vallance J, Gerbore J (2016) Bio-suppression of Sclerotinia stem rot of tomato and bioformulation of plant growth using tomato-associated rhizobactria. Journal of Plant Pathology and Microbiology 7331: 2.

Adams PB, Ayers WA (1982) Biological control of Sclerotinia lettuce drop in the field by *Sporidesmium sclerotivorum*. Phytopathology 72 (5): 485-488.

Aktar W, Sengupta D, Chowdhury A (2009) Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. Interdisciplinary Toxicology 2 (1): 1-12.

Adams PB, Ayers WA (1979) Ecology of *Sclerotinia* Species. Phytopathology 69: 896-899.

Baharlouei A, Sharifi GR, Shahidi GH (2011) Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (oilseed rape isolate) by an effective antagonist *Streptomyces.* African Journal of Biotechnology 10: 5785- 5794.

Baniasadi F, Shahidi GH, Nik AK (2009) *In vitro* petroleum decomposition by actinomycetes isolated from petroleum contaminated soils. American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science 6 (3): 268-270.

Bonjar GS, Nik AK (2004) Antibacterial activity of some medicinal plants of Iran against *Pseudomonas aeruginosa* and *P. fluorescens*. Asian Journal of Plant Sciences, 50 (5): 373-383.

Boukaew S, Plubrukam A, Prasertsan P (2013) Effect of volatile substances from *Streptomyces philanthi* RM-1-138 on growth of *Rhizoctonia solani* on rice leaf. BioControl 58 (4): 471-482.

Basak BB, Biswas DR (2009) Influence of potassium solubilizing microorganisms (*Bacillus mucilaginosus*) and waste mica on potassium uptake dynamics by sudan grass (*Sorghum vulgare* Pers.) grown under tow Alfisols. Plant Soil 317: 235–255.

Doumbou CL, Hamby-Salove MK, Crawford DL, Beaulieu C (2001) *Actinomycetes*, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth. Phytoprotection 82 (3): 85-102.

El-Mansi EMT, Bryce CFA, Hartly BS (1999) Fermentation biotechnology: an historical perspective, Fermentation microbiology and biotechnology. Taylor & Francis, Ltd., London, United Kingdom, 1-8.

El-Tarabily KA, Soliman MH, Nassar AH, Al-Hassani HA, Sivasithamparam K, McKenna F, Hardy GS (2000) Biological control of *Sclerotinia minor* using a chitinolytic bacterium and *actinomycetes*. Plant Pathology 49 (5): 573-583.

Flores A, Chet I, Herrera-Estrella A (1997) Improved biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* by over-expression of the proteinase-encoding gene prb1. Current Genetics 31 (1): 30-37.

Gohel V, Singh A, Vimal M, Ashwini, P, Chhatpar HS (2006) Review-Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms. Applied Microbiology and Biotechnology 40 (4): 181-195.

Gonzalez-Franco CA, Robles-Hernandez RY (2009) *Actinomycetes* as biological control agents of phytopathogenic fungi. Tecnociencia Chihuahua 3 (2): 64-73.

Gopalakrishnan S, Srinivas M, Sree Vidya M, Rathore A (2014) Plant growth-promoting activities of *Streptomyces* spp. in sorghum and rice. Phytoprotection, 62(2), 68-76.

Gupta R, Beg Q, Khan, S, Chauhan B (2002) An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. Applied Microbiology and Biotechnology 60 (4): 381-395.

Hanan H, Mahamed H, Virrol M. Yedir O (2008) Rock phosphate-solubilizing Actinomycetes: screening for plant growth-promoting activities. World Journal of Microbiology Biotechnology 24: 2565-2575.

Hsu SC, Lockwood JL (1975) Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of *actinomycetes* in water and soil. Applied Microbiology 29 (3): 422-426.

Inamori Y, Amino H, Tsuoi M, Yamaguchi S, Sujibo H (1990) Biological Activities of Racemomycin-B, B-Lysine Rich Streptothricin Antibiotic, the Main Component. Microbiological Research 156 (2): 161-1626.

Johanson DA, Atallah ZK (2006) Timing fungicide application for managing Sclerotinia stem rot of potato. Plant Disease 90: 755-758.

Ladjama A, Taibi Z, Meddour A (2007) Production of pectinolytic enzymes using *Streptomyces* strains isolated from palm grove soil in Biskra area (Algeria). African Crop Science Conference Proceedings 8: 1155-1158.

Marmur J (1961) A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. Journal of Molecular Biology 3 (2): 208-IN1.

Martinez Z (2014) Isolation and characterization of soil *Streptomyces* species as potential biological control agents against fungal plant pathogens. World Journal of Microbiol Biotechnology 30:1639–1647.

Matsumoto Y, Revah S, Saucedo G, Hall GM, Shirai K (2001) Chitinases production in solid state fermentation of shrimp waste silage. Chitin enzymology. Atec Edizioni, Italy, 381-389.

Nassaro AH, El-Tarabily KA, Sivasithamparam K (2003) Growth promotion of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by a polyamine-producing isolate of *Streptomyces griseoluteus*. Plant Growth Regulation 40: 97-106.

Ordentlich A, Elad Y, Chet I (1988) The role of chitinase of *Seratia marcescenc* in biological control of *Sclerotium rolfssi*. Phytopathology 78: 84-92.

Panhwar QA, Othman R, Rahman ZA, Meon S, Ismail MR (2012) Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from aerobic rice. African Journal of Biotechnology 11:2711–2719.

Rocha J R, Olieviera N (1998) Biological Control of *Colletotrichum gloesporides* by *Trichoderma* koningii. Phytopathology 24: 180-183.

Roy RN, Laskar S, Sen SK (2006) Dibutyl phthalate, the bioactive compound produced by *Streptomyces albidoflavus* 321.2. Microbiological Research 161(2), 121-126.

Shahidi Bonjar GH, Barkhordar B, Pakgohar N, Aghighi S, Biglary S, Rashid Farrokhi P, Aghelizadeh A (2006) Biological control of *Phytophthora drechsleri* Tucker, the causal agent of pistachio gummosis, under greenhouse conditions by use of *actinomycetes*. Plant Pathology Journal 5 (1): 20-23.

Shahidi Bonjar GH, Rashid Farrokhi P, Aghighi S, Shahidi Bonjar L, Aghelizadeh A (2005) 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 (1): 78-84.

Shimizu M, Nakagawa Y, Yukio SATO, Furumai T, Igarashi Y, Onaka H, Kunoh H (2000) Studies on endophytic actinomycetes (I) *Streptomyces* sp. isolated from Rhododendron and its antifungal activity. Journal of General Plant Pathology 66 (4): 360-366.

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.

Sinclair JB, Dhingra OD (1995) Basic plant pathology methods, CRC Press, USA.

Swiontek Brzezinska M, Jankiewicz U, Burkowska A (2013) Purification and Characterization of *Streptomyces albidoflavus* Antifungal Components. Applied Biochemistry and Microbiology 49 (5): 451–457.

Valencia GB, Vargas VH, Soto JNU, Corral JH (2011) *Trichoderma* sp. native from chili region of Poanans, Durango, Mexico antagonist against phytophatogens fungi. American Journal of Agricultural Biological Science 6 (2): 185-188.

Zamanian S, Shahidi Bonjar GH, Saadoun I (2005) First report of antibacterial properties of a new strain of *Streptomyces plicatus* (strain 101) against *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. Biotechnology 4: 114-120.