کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی
دوره۱۰، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۴۰۰ (۸۷-۷۷) مقاله پژوهشی DOI: 10.22059/JBIOC.2022.340408.317

جداسازی و ارزیابی فعالیت آنتاگونیستی یک استرین باکتری و اکتینومیست اپیفیت برعلیه باکتری عامل هسته یخ در گیاه پسته

مژده دهقان مقدم[۱]، مهدیه رستمی[۲*]

۱ دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، واحد رفسنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، رفسنجان، ایران

۲ استادیار گروه بیماری شناسی گیاهی، واحد رفسنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، رفسنجان، ایران*

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۱/۱۵ - تاریخ پذیرش:۱۴۰۱/۰۸/۰۷)

چکیده

یکی از عوامل تشدیدکننده در میزان سرمازدگی، وجود باکتری‌های عامل هسته‌یخ در سطح گیاهان است. کنترل بیولوژیک باکتری‌های عامل هسته‌یخ توسط آنتاگونیست‌ها، یکی ازگزینه‌های امیدبخش در کاهش این نوع سرمازدگی به‌نظر می‌رسد. در این مطالعه فعالیت آنتاگونیستی باکتری‌ها و اکتینومیست‌های اپی‌فیت پسته، با بررسی ممانعت از رشد باکتری عامل هسته‌یخ جداسازی شده از سطح درختان پسته رفسنجان (*Pseudomonas fragi raf*$_3$)، ارزیابی شد. به‌همین منظور نمونه‌هایی از برگ سالم درختان پسته مناطق مختلف شهرستان رفسنجان جمع‌آوری گردید. از بین باکتری‌ها و اکتینومیست‌های جداسازی‌شده، دو جدایه (A_4 و B_{52}) که دارای بیشترین هاله بازدارندگی بودند، براساس آزمون‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی مورد بررسی قرارگرفتند. نتایج نشان داد که قطر هاله ممانعت از رشد باکتری عامل هسته یخ، روی پتری دیش توسط جدایهA_4، ۲۰میلی‌متر و در جدایه B_{52} به میزان ۱۴ میلی‌متر بود. همچنین بررسی خصوصیات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی مشخص نمود، جدایه A_4 با کلونی‌های سفیدرنگ و خشک مشابه اکتینومیست‌ها، قادر به تجزیه گلوکز و ساکارز به‌عنوان منبع کربن بوده و همچنین دارای فعالیت لیپازی، پروتئازی و کاتالازی مثبت می‌باشد. این جدایه قادر به رشد در شرایط با اسیدیته ۵ و ۷ بوده و توان تحمل غلظت‌های نمک کلریدسدیم۲، ۵، ۷و۱۰درصد دارد. همچنین حساس به تتراسایکلین و مقاوم به پنی سیلین بود. جدایه آنتاگونیست دیگر، B_{52} با کلونی‌های زرد رنگ روی محیط آگار مغذی، یک باکتری گرم منفی، کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی، دارای تنفس بی‌هوازی اختیاری و قادر به تخمیر لاکتوز بود.

واژه های کلیدی: آنتاگونیست، اپی‌فیت، پسته، رفسنجان، سرمازدگی.

Antagonistic activity of some epiphytic bacteria and actinomycetes against ice nucleation active bacteria on Rafsanjan pistachio trees

Mozhdeh Dehghan Moghadam[1], Mahdieh Rostami [2*]

[1]Former Ms.c. Student, Department of Plant Protection, Rafsanjan Branch, Islamic Azad University, Rafsanjan, Iran

[2]*Assistant Professor, Department of Plant Protection, Rafsanjan Branch, Islamic Azad University, Rafsanjan, Iran*

(Received: Apr ,04, 2022- Accepted: Oct ,29, 2022)

Abstract

One of the aggravating factors in the amount of frost damage, is the presence of epiphytic ice nucleation bacteria on plant philosopher. Biological control of ice nucleation bacteria seems to be a promising option to reduce this type of frost damage. In this study, the antimicrobial capacity of epiphytic bacteria and actinomycetes was evaluated through growth inhibition of ice nucleation active bacteria (*Pseudomonas fragi raf*$_3$) on pistachio in Rafsanjan. For this purpose, samples were collected from healthy pistachio leaves in Rafsanjan. Among the isolated bacteria and actinomycetes, two isolates (A_4 and B_{52}) with the highest inhibitory zone were subject to different biochemical and physiological tests. Results showed that the zone of inhibition growth of ice nucleation bacterium on Petri dish, was 20 mm and 14 mm for isolates A_4 and B_{52} respectively. Analysis of morphological and biochemical characteristics showed that isolate A_4 was noted to be Gram-positive and to form white, dry colonies similar to actinomycetes. It was able to degrade glucose and sucrose as a carbon source and able to produce lipase, protease and catalase enzymes. This isolate was able to grow in conditions with pH 5 and 7, as well as, showed 2, 5,7 and 10% (w/v) salt-salt (sodium chloride) tolerance. It was tetracycline-sensitive and penicillin-resistance. The other antagonist isolate, B_{52}, had yellow colonies on nutrient agar media Gram-negative bacterium, catalase positive, oxidase negative, facultative anaerobic and lactose fermenting.

Key words: Antagonist, Epiphyte, Pistachio, Rafsanjan, Frost damage.

E-mail: m.rostami_1355@yahoo.com

مقدمه

پسته، به‌عنوان یک محصول کشاورزی با ارزش و یکی از منابع درآمدهای ارزی غیرنفتی کشور به‌شمار می‌آید. سرمازدگی شدید بهاره، پدیده پرخطری برای فعالیت‌های کشاورزی، از جمله تولید پسته است. سرمازدگی، طبق آمار به‌دست آمده از اداره حفظ نباتات استان کرمان، هر سال بین ۱۵ تا ۱۰۰ درصد خسارت در اغلب باغات پسته مناطق مختلف استان کرمان، ازجمله رفسنجان وارد می‌کند. باکتری‌های عامل هسته یخ، با توانایی خود در القای تشکیل یخ در دماهای نزدیک به صفر درجه سلسیوس، با استفاده از پروتئین‌های هسته‌ساز یخ موجب سرمازدگی گیاهان می‌شوند. چنانچه هر گرم از بافت گیاهی توسط ۱۰۰۰ سلول باکتری عامل هسته یخ کلونیزه شود، بافت گیاهی در دمای بالاتر از ۵- درجه سلسیوس در معرض یخ زدگی قرار خواهد گرفت. باکتری‌های عامل هسته یخ در طبیعت به‌صورت اپی‌فیت وگروهی بیمارگر در سطح گیاهان مستقر هستند به همین دلیل گیاهان حساس به سرما در اثر کاهش مختصر دما به زیر صفر، دچار خسارت سرمازدگی می‌شوند (Gurian *et al*., 1993). در ایران نیز گونه‌های مختلف باکتری‌های فعال هسته‌یخ از میزبان‌های مختلف جداسازی شده است. همچنین نقش باکتری‌های عامل هسته‌یخ در خسارت سرمازدگی درختان پسته رفسنجان ثابت شده و تعدادی از این باکتری‌ها شناسایی شده‌اند (Rostami *et al*., 2018). بنابراین برای مقاومت گیاهان به سرما و یخزدگی لازم است تا مدیریت تنش رعایت شود. این مدیریت می‌تواند با استفاده از باکتری‌کش‌ها یا آنتاگونیست‌ها در سطح گیاهان، در محدوده زمانی که خطر کاهش دما وجود دارد و مدیریت سرمازدگی گیاهان با در نظر گرفتن نقش باکتری‌های عامل هسته یخ در منابع متعددی اشاره شده است (Lukas *et al*., 2022). یکی از عمده‌ترین راه‌های مقابله، استفاده از مواد شیمیایی مثل سموم و آفت‌کش‌هاست که در طولانی مدت نه تنها سبب ایجاد عوامل بیماری‌زای مقاوم می گردند، بلکه تجمع این مواد در محیط زیست و ورودشان به چرخه‌های طبیعی برای انسان نیز خطرساز است (Moosavi *et al*., 2011). بنابراین تحقیقات برای استفاده از میکروارگانیسم‌های غیربیماری‌زا به‌عنوان عوامل کنترل کننده زیستی در برابر بیمارگرهای گیاهی یک راهکار امیدوارکننده محسوب می‌شود و گزینه مناسبی برای جایگزینی آنها در برابر مواد شیمیایی محسوب می‌شود. با وجود تاریخچه نسبتا طولانی کنترل بیولوژیک توسط اکتینومیست‌ها، در سال‌های اخیر توجهات بیشتری را به خود جلب کرده است (Gomes *et al*., 2018). با توجه به جهت‌گیری‌های سیستم‌های جدید کشاورزی و تاکید بر کشاورزی ارگانیک یا تعبیری دقیق‌تر، کشاورزی زیستی استفاده از عوامل میکروبی به‌ویژه باکتری‌های اپی‌فیت گیاهی به‌عنوان گزینه مناسب با بسیاری از بیمارگرها مطرح شده است. تقریباً بیش از۸۵ درصد آنتی‌بیوتیک‌هایی که از فرآورده‌های طبیعی تولید می-شوند و تعدادی از آن‌ها که اهمیت کاربردی در کشاورزی دارند، از اکتینومیست‌ها وعمدتاً از گونه‌های مختلف جنس *Streptomyces* به‌دست آمده‌اند و نقش کنترل‌کننده در بسیاری بیماری‌های گیاهی داشته اند (Promnuan *et al*, 2020). اکتینومیست‌ها، دارای ویژگی‌های خاصی هستند، توانایی کلونیزه کردن سطوح گیاهی، آنتی‌بیوز علیه پاتوژن‌های گیاهی، سنتز پروتئین‌های خارج سلولی و تجزیه فیتوتوکسین‌ها، آن‌ها را جهت بهره‌گیری به عنوان عوامل کنترل بیولوژیک مطرح می‌نماید (Doumbou *et al*., 2002). حتی کلونیزاسیون فیلوسفر گیاه هم توسط استرپتومایسزهای ساکن خاک تایید شده است (Vergnes *et al*, 2020). جنس *Streptomyces* که شایع‌ترین و احتمالا مهم‌ترین اکتینومیست است، منبع خوبی از ترکیبات زیست فعال، آنتی بیوتیک‌ها و آنزیم‌های خارج سلولی است. خواص آنتاگونیستی آن-ها علیه دامنه وسیعی از پاتوژن‌های گیاهی گزارش شده است. این جنس در طول زمان توانسته است آینده کشاورزی بدون سم را پررنگ‌تر نشان دهد. در حال حاضر برخی از محصولات بیوکنترل این جنس به‌عنوان کود زیستی در بازار عرضه می شود،

درحالی‌که هنوز کار بر روی این جنبه تولیدی ادامه دارد (Olanrewaju and Babalola, 2019). اکتینومیست‌های دارای اثر بازدارندگی رشد باکتری عامل بلایت برگی برنج، از سطح برگ‌های برنج توسط Ilsan و همکاران جداسازی و جنس‌های *Streptomyces*، *Actinomadura*، *Nonomuraea* و *Micromonospora* براساس تعیین توالی ناحیه 16S rDNA شناسایی شد (Ilsan *et al*., 2016). فعالیت ضدباکتریایی در اکتینومیست‌های ساکن دریا نیز بررسی شده است. متابولیت‌های ضدمیکروبی جداسازی شده از *Streptomyces* sp. strain SCA_{29} درکشور هند به‌شدت فعال بودند درحالی‌که اثر سمی قابل توجهی بر سلول زنده ندارند (Siddharth and Vittal, 2019).

هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثر بیوکنترلی باکتری‌ها و اکتینومیست‌های ساکن سطح درختان پسته برعلیه باکتری *Pseudomonas fragi raf*$_3$ می‌باشد.

مواد و روش ها

تهیه گونه خالص جدایه عامل هسته یخ:

جدایه خالص عامل ایجاد هسته یخ گونه *Pseudomonas fragi raf*$_3$ (که بیشترین فعالیت هسته یخ را در بین باکتری‌های جداسازی شده از سطح درختان پسته نشان داده است) از مجموعه باکتری‌های عامل هسته یخ جداسازی شده توسط رستمی و همکاران در دانشگاه آزاد اسلامی واحد رفسنجان تهیه شد. ویژگی‌های مورفولوژیکی و فعالیت هسته‌یخ جدایه *Pseudomonas fragi raf*$_3$ توسط رستمی و همکاران شرح داده شده است (Rostami *et al*., 2018). پس از رشد مناسب و اطمینان از عدم آلودگی جدایه عامل هسته‌یخ، فعالیت هسته یخ جدایه‌ها مجددا بررسی و تایید شد.

نمونه‌برداری و کشت جدایه‌های اپی‌فیت

نمونه‌برداری درفصل پاییز و بهار سال ۹۸-۱۳۹۷ از بخش‌های هوایی به‌خصوص برگ‌ها، جوانه‌ها و سرشاخه‌های درختان پسته در شهرستان رفسنجان به صورت تصادفی انجام گرفت و پس از ثبت مشخصات لازم و درج مختصات جغرافیایی در پاکت-های کاغذی و در شرایط خنک به آزمایشگاه بیماری-شناسی منتقل و تا زمان کشت در یخچال نگه‌داری شدند (جدول ۱). حدود ۴۰-۳۰ گرم از هر نمونه در فلاسک ارلن حاوی ۵۰ میلی‌لیتر آب‌مقطر استریل به‌همراه یک قطره توین[1] ۲۰ و مدت یک ساعت روی شیکر با ۱۸۰ دور در دقیقه قرار داده شد. توین به‌عنوان یک شوینده جهت جداسازی بهتر ارگانیسم‌های سطح گیاه اضافه شد. یک لوپ از سوسپانسیون‌های حاصل، روی سطح تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت‌های آگار غذایی[2] شامل ، CGA[3] و GYNA[4] به‌صورت مخطط کشت داده شد در سه تکرار و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی-گراد نگه‌داری شدند. (محیط کشت CGA محتوی Casein: 0.3 g , NaCl: 2 g, KNO3: 2 g, k2HPO4: 2 g, MgSO4: 0.5 g, CaCO3: 0.2 g, glycerin: 10 g, Agar: 18g در ۱۰۰۰میلی لیتر آب مقطر است) (Soltani *et al*., 2015). محیط کشت GYNA، شامل یک لیتر محیط کشت آگار مغذی غنی شده با ۱ گرم گلوکز به همراه ۱ گرم عصاره مخمر است (Rostami *et al*., 2018). پس از ظهور پرگنه‌های باکتریایی و اکتینومیست، به‌منظور خالص‌سازی، پرگنه‌های دارای شکل و رنگ متفاوت دوباره بر روی محیط کشت آگار غذایی و به صورت خطی کشت داده‌شدند و سپس از هر کدام یک پرگنه انتخاب و به صورت لکه‌ای کشت داده شد. به‌منظور نگه‌داری طولانی مدت، یک لوپ از کشت ۲۴ ساعته هریک از جدایه‌ها در یک لیتر آب مقطر استریل سوسپانسیون شد و به یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. همچنین تک کلنی‌های منتخب بر روی محیط کشت به‌صورت لکه‌ای کشت و به‌صورت ماهیانه تجدید کشت شدند

1 Tween
2 Nutrient agar : Merck, Darmstadt, Germany
3 Casein-Glycerol-Agar (3.3 g Bacto peptone, 2.7 g Difco nutrient broth, 2.0 g yeast extract, and 15.0 g Bacto agar/1 L distilled H2O)
4 Glucose yeast extract nutrient agar (28g Nutrient Agar, 5g Glucose and 5g yeast extract /1 L distilled H2O)

(Schaad *et al.*, 2001). برای تهیه محیط کشت انتخابی جهت رشد اکتینومیست‌ها، محیط کشت کازئین-گلیسیرین-آگار (CGA) مورد استفاده قرار گرفت (Dhingra and Sinclair, 1995).

جدول۱ – مختصات جغرافیایی مناطق نمونه برداری.

Table1- Geographical Coordinates of Sampling Sites.

Latitude	Longitude	City	Locations	Pistachio Cultivar	
7N."28′34º30	E"2.55º 44 ′16	Rafsanjan	Ahmad-Abad	Fandoghi	1
N"4.30º 28′20	1"E.55 º42′51	Rafsanjan	Ahmad-Abad	Akbari	2
7"N.28′29º30	3"E.55 º44′12	Rafsanjan	Mohamad-Abad	Akbari	3
*6"N.28′38º 30	55 º44′17.3"E	Rafsanjan	Mohamad-Abad	Akbari	4
02"N.28′34º30	7.7"E١55 º44′	Rafsanjan	Mohamad-Abad	Kale-Ghoochi	5
9"N٧،19′º30	E"56 º22′ 7.6	Rafsanjan	Kabutar-khan	Fandoghi	6
N 6.75" 30º19′	E"56 º22′7.21	Rafsanjan	Kabutar-khan	Akbari	7
30º19′7.37"N	E"56 º22′7.33	Rafsanjan	Kabutar-khan	Akbari	8
30º19′7.33"N	E"56 º22′7.19	Rafsanjan	Kabutar-khan	Akbari	9
30º19′7.7"N	E"56 º22′7.43	Rafsanjan	Kabutar-khan	Kale-Ghoochi	10
30º19′7.32N	E"56 º22′7.17	Rafsanjan	Kabutar-khan	Kale-Ghoochi	11
30°19′1.7"N	E"56°22′49.4	Rafsanjan	Kabutar-khan	Kale-Ghoochi	12
30°19′3.9"N	E"56°23′42.7	Rafsanjan	Kabutar-khan	Kale-Ghoochi	13
30°19′1.6"N	E"56°23′5.8	Rafsanjan	Kabutar-khan	Akbari	14
30°19′2.8"N	E"56°22′49.7	Rafsanjan	Kabutar-khan	Ohadi	15
*30°19′8.1"N	E"56°23′50	Rafsanjan	Kabutar-khan	Kale-Ghoochi	16
30°18′28.8"N	E"56°22′35.3	Rafsanjan	Kabutar-khan	Ohadi	17
30°18′52.1"N	E"56°22′26.9	Rafsanjan	Kabutar-khan	Kale-Ghoochi	18
30°18′28"N	E"56°22′37.2	Rafsanjan	Kabutar-khan	Ohadi	19
30°25′24.48"N	E"56°21′3.02	Rafsanjan	Mohamad-Abad	Fandoghi	20
30°84.6′25.5"N	E"55°77′47.5	Rafsanjan	Bahreman	Kale-Ghoochi	21
30°85.9′15.3"N	E"55°76′44.8	Rafsanjan	Bahreman	Momtaz	22
30°22′72.1"N	E"55°56′0.33	Rafsanjan	Rafsanjan	Fandoghi	23

* منطقه جداسازی نمونه آنتاگونیست

Site of the antagonist isolation

آزمون‌های زیستی *In Vitro* جهت تعیین فعالیت ضدباکتریایی

توانایی ایزوله‌های اکتینومیست و باکتری‌های اپی‌فیت در ممانعت از رشد باکتری عامل هسته‌یخ و انتخاب ایزوله مناسب از دو روش کشت متقابل (Dhingra and Sinclair, 1995) و روش دیسک‌گذاری (Shahidi Bonjar and Karimi Nick, 2004) بررسی و مطالعه شد. آزمون‌ها در سه تکرار انجام شد. در صورت ایجاد هاله ممانعت، قطر هاله توسط کولیس با دقت ۰/۱ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. میانگین قطر ناحیه ممانعت

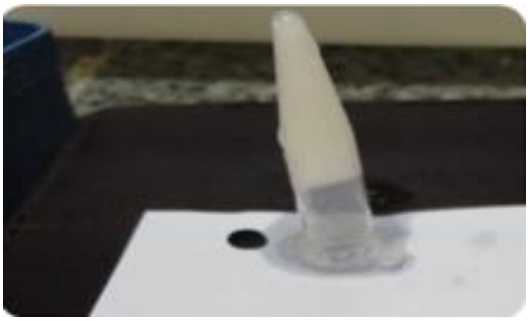
از رشد هرکدام از ایزوله‌ها ثبت شد (Fourati-Ben Fguira *et al*., 2005). پس از گزینش ایزوله‌های دارای خاصیت بازدارندگی، بررسی خواص فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی ایزوله‌ای که بیشترین ممانعت را ایجاد کرد، انجام شد. در روش کشت متقابل، کشت جوان باکتری عامل هسته یخ یک دیسک با قطر ۶ میلی‌متر برداشته و در مرکز پتری دیش حاوی آگار مغذی قرار داده شد. سپس از ایزوله‌های اکتینومیست خالص کشت داده شده رویCGA که به مدت ۶ تا ۸ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده بودند بلوک‌های ۶ میلی‌متری جدا شده و در فاصله ۳ سانتی‌متری از بلوک باکتری عامل هسته یخ قرار داده شدند. به‌عنوان شاهد بلوک CGA عاری از میکروب قرار داده شد. این نمونه‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری و بر اساس قطر ناحیه ممانعت از رشد ایزوله‌های فعال هسته یخ انتخاب شدند Dhingra (and Sinclair, 1995). همچنین کشت متقابل برای باکتری‌های اپیفیت که در مدت زمان ۲۴ تا ۴۸ ساعت روی محیط کشت GYNA رشد کرده بودند، جهت ارزیابی فعالیت آنتاگونیستی آنها انجام شد. در روش دیسک‌گذاری، روی پتری دیش حاوی آگار مغذی که ۲۴ ساعت قبل کشت چمنی باکتری روی آن صورت گرفته بود، مطابق روش قبل دیسک‌های اکتینومیست یا باکتری اپی‌فیت انتقال یافتند. نمونه شاهد حاوی دیسک محیط کشت CGA یا GYNA، بدون اکتینومیست یا باکتری بود. این نمونه‌ها در انکوباتور در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و بر اساس قطر هاله ممانعت از رشدشان میزان فعالیت آنها سنجیده شد (Shahidi Bonjar and Karimi Nick, 2004).

ویژگی بیوشیمیایی جدایه‌ها

جدایه‌های اکتینومیست که بیشترین بازدارندگی را از رشد باکتری فعال هسته یخ نشان دادند، از نظر قابلیت رشد در شرایط مختلف نمک، pH، قابلیت مصرف قندهایی مانند گلوکز، لاکتوز و ساکارز، وجود آنزیم‌هایی، مانند پروتئاز، لیپاز، کاتالاز و همچنین مقاومت به برخی آنتی بیوتیک‌ها بررسی شدند (Gulve and Deshmukh, 2011). همچنین باکتری‌های بازدارنده رشد، بر اساس آزمون‌های اولیه مانند آزمون گرم، کاتالاز، اکسیداز، رشد در شرایط هوازی و بی هوازی، تشکیل یا عدم تشکیل پرگنه زرد روی محیط YDC[۵]، بررسی شدند.

نتایج

۴۰ جدایه اکتینومیست و باکتری ساکن سطح درختان پسته که از نظر مورفولوژی با یکدیگر متفاوت بودند، جداسازی و خالص‌سازی شدند. باکتری‌ها در پتری‌دیش‌های حاوی محیط NA و اکتینومیست‌ها در محیط CGA کشت و نگهداری شد. قبل از کشت متقابل جدایه‌ها با باکتری فعال هسته یخ، با انجام آزمون انجماد درون لوله از فعالیت هسته یخ باکتری *Pseudomonas fragi raf*$_3$، اطمینان حاصل شد (شکل ۱).

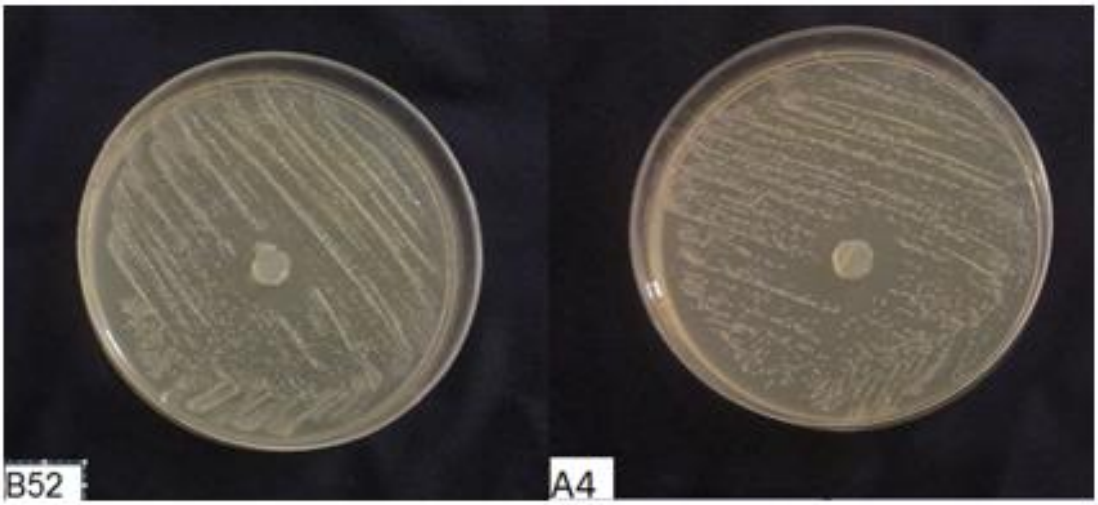


شکل۱ – نتیجه مثبت *Pseudomonas fragi raf*$_3$ در آزمون هسته یخ درون لوله .

Figure 1.Positive result of *Pseudomonas fragi raf*$_3$ in tube nucleation test.

تمامی ایزوله‌های جدا شده، در آزمون‌های زیستی شرکت داده شده و فعالیت ضد باکتریایی آنها با سنجش میزان هاله ممانعت از رشد باکتری فعال هسته‌یخ اندازه‌گیری شد. از بین ایزوله‌های جدا شده از سطح درختان پسته منطقه رفسنجان، سه ایزوله هاله ممانعت کننده از رشد ایجاد کردند. از این سه جدایه دو جدایه A_4 و B_{52} به طور مشخص هاله

ممانعت قویتری نسبت به جدایه سوم ایجاد کردند. میانگین قطر هاله بازدارندگی در جدایه A_4، ۲۰ و در B_{52}، ۱۴ و در جدایه سوم ۵ میلی‌متر بود (شکل۲). لذا دو جدایه A_4 و B_{52} برای بررسی درمراحل آتی انتخاب شدند.



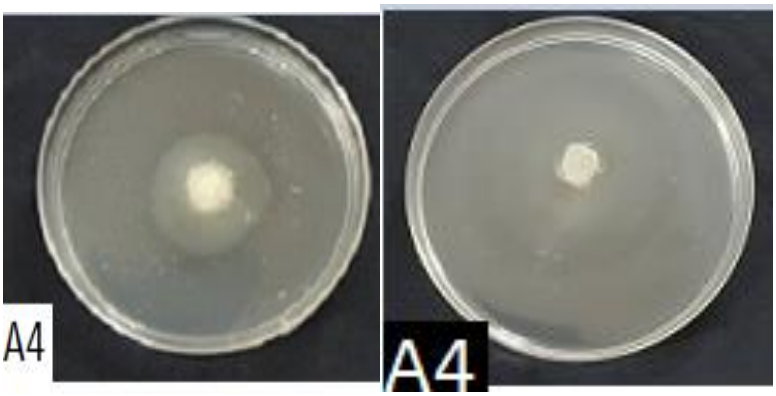
شکل ۲- فعالیت ضدباکتریایی با ایجاد هاله ممانعت در جدایه‌های A_4 و B_{52}

Fig. 1 Antibacterial activity showing inhibition zone in A_4 and B_{52} isolates.

بررسی تحمل شوری و فشار اسمزی جدایه A_4 (جدول۲) نشان داد که جدایه مذکور در محیط با غلظت شوری ۲، ۵ ،۷ و ۱۰ درصد به خوبی رشد می‌کند (شکل۳) . همچنین این سویه قادر به تجزیه گلوکز و ساکارز به‌عنوان منبع کربن بوده، ولی قادر به مصرف لاکتوز نبود. در بررسی تولید آنزیم‌های خارج سلولی نتایج نشان داد، جدایه A_4 دارای فعالیت لیپازی، پروتئازی و کاتالازی مثبت بود (شکل۴ و ۵). این جدایه قادر به رشد در شرایط با اسیدیته ۷ و ۵ بوده اما در اسیدیته ۹ قادر به رشد نبود. جدایه A_4 به آنتی بیوتیک تتراسایکلین حساسیت نشان داد و ایجاد هاله نمود، در حالیکه به آنتی بیوتیک پنی سیلین مقاوم بوده و هیچ هاله بازدارندگی مشاهده نشد (شکل ۶). کلونی‌های لزج باکتریایی زرد رنگ جدایه B_{52}، در پاسخ به آزمون های بیوشیمایی، گرم منفی، کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی، دارای تنفس بی‌هوازی اختیاری و قادر به تخمیر لاکتوز بود (شکل۷) و (جدول ۳).

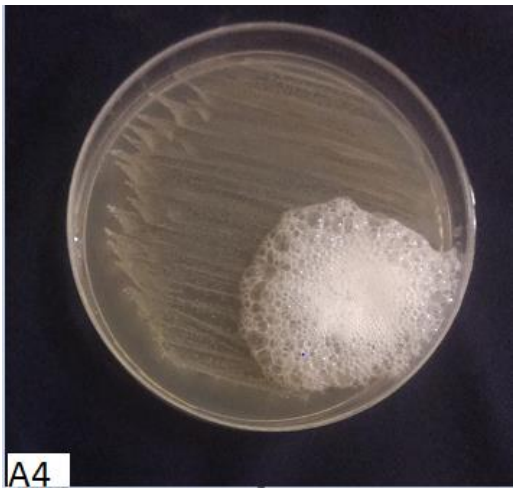
شکل ۳- رشد جدایه A_4 در غلظت های ۲، ۵ ،۷ و ۱۰ درصد نمک کلرید سدیم.

Fig. 2. Growth of isolates A_4 in 2, 5, 7 and 10 % concentrations of NaCl



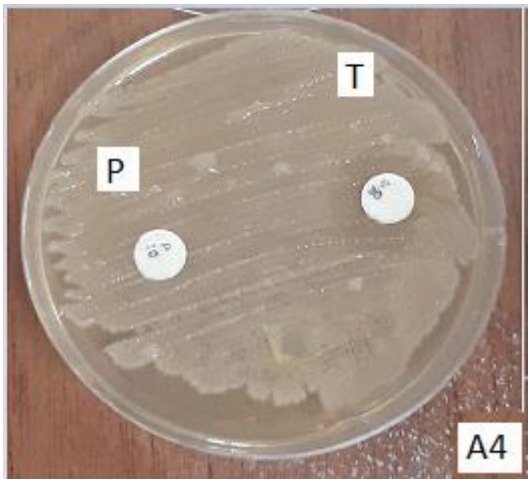
شکل ۴- نتایج فعالیت پروتئازی جدایهA_4 (سمت راست) و آزمون فعالیت لیپازی (سمت چپ)

Fig 3. Results of protease activity for isolates A_4 (the right side) and lipase (the left side).



شکل ۵- نتیجه فعالیت کاتالازی مثبت جدایه A_4

Positive result of catalase for isolate A_4.Fig 4.



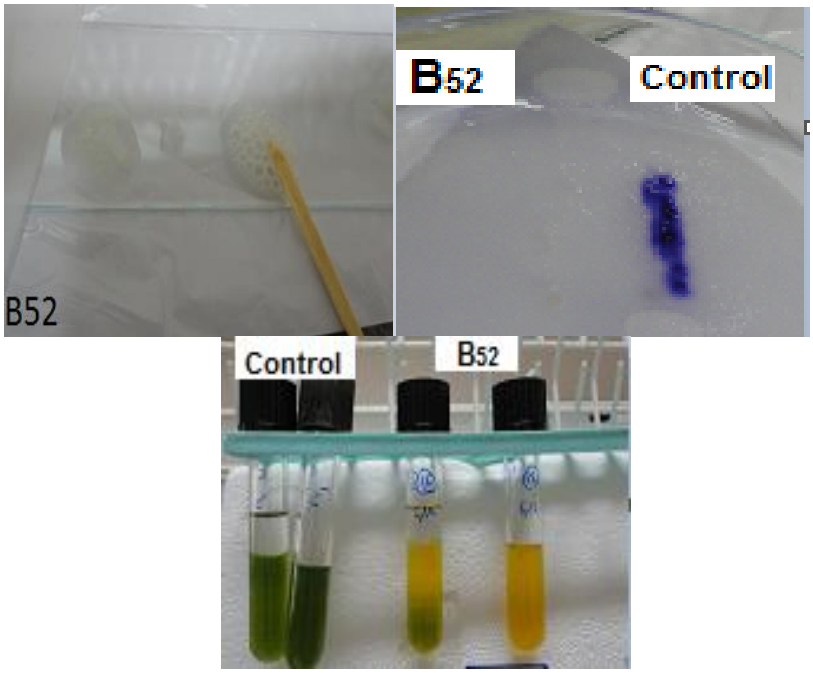
شکل ۶- هاله بازدارندگی جدایه (A4) در حساسیت به آنتی بیوتیک تتراسایکلین (T) و عدم مشاهده هاله بازدارندگی به آنتی بیوتیک پنی‌سیلین (P).

Fig. 5. Inhibition halo results for isolate A4 in Tetracycline (T) susceptibility and showed no inhibition halos with a penicillin (P) antibiotic.

جدول ۲- ویژگی‌های مورفولوژی و بیوشیمیایی سویه A_4.

Table 1. Morphological and biochemical characteristics of strain A_4

Characteristics Strain A_4		Rersult
Color Mycelium		White gray
Fermentation Sugar	Glucose	+
	Lactose	-
	Sucrose	+
enzymes Extracellular	Protease	+
	Lipase	+
	Catalase	+
Growth in salinity (NaCl%)	2	+
	5	+
	7	+
	10	+
Growth in PH	5	+
	7	+
	9	-



شکل۷. نتایج تست‌های بیوشیمیایی سویه B_{52}. به ترتیب از راست به چپ.۱- پاسخ مثبت به تست کاتالاز۲-پاسخ منفی به تست اکسیداز۳- رشد در شرایط هوازی و بی‌هوازی

Fig 6. Results of biochemical tests for isolate B_{52}. from right to left respectively.1. Positive result of catalase assay. 2.Negative result of oxidase test. 3. Growth Under aerobic and anaerobic conditions.

جدول ۳- ویژگی‌های مورفولوژی و بیوشیمیایی سویهB_{52}.

.Table 2. Morphological and biochemical characteristics of strain B_{52}

Characteristics	Yellow pigment	Aerial mycelium	Grame reaction	Catalase	Oxidase	Lactose Fermentation	Anaerobic growth
Result for Strain B_{52}	+	-	-	+	-	+	+

بحث

وجود منابع و مستندات فراوان درخصوص نقش باکتری‌های عامل هسته یخ در بروز خسارت سرمازدگی و همچنین نقش احتمالی آنها در بروز بیماری‌های ثانویه، ضرورت بررسی و مطالعه این باکتری‌ها را در جهت ارائه راهکارهای مفید برای

مدیریت جمعیت این باکتری‌ها در پسته بیان می‌کند (Hirano *et al*., 2000). در حال حاضر، داده‌های متعددی برای کنترل خسارت سرمازدگی ناشی از باکتری‌های عامل هسته یخ در دسترس می‌باشد. این روش ها شامل استفاده از باکتری‌کش‌ها، استفاده از گیاهان اصلاح شده مقاوم به باکتری‌های عامل هسته‌یخ و به‌کارگیری باکتری‌های آنتاگونیست فاقد هسته یخ برای رقابت با باکتری‌های مولد هسته یخ می‌باشد (Kohl *et al*., 2019). در بین مطالعات هدفداری که برای یافتن میکروارگانیسم‌های مهار کننده عوامل بیماری‌زا انجام شده است، این مطالعه برای نخستین بار در جهت کنترل عوامل هسته یخ توسط آنتاگونیست‌ها انجام شد. نتایج این مطالعه نشان داد دو جدایه A_4 و B_{52} به طور معنی داری از رشد باکتری هسته یخ روی محیط کشت ممانعت کردند و دارای پتانسیل کنترل زیستی بوده و عوامل مناسبی برای جایگزینی مواد شیمیایی در مدیریت جمعیت باکتری های هسته یخ می باشند.

نتیجه بررسی این جدایه ها با آزمون‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی مشخص کرد، جدایه باکتریایی B_{52} گرم منفی، شیری مایل به زرد رنگ و بی‌هوازی اختیاری که ساکن معمول سطح گیاهان است. این جدایه باتوجه به توان رشد در شرایط بی هوازی، پاسخ منفی به آزمون اکسیداز، پاسخ مثبت به تست کاتالاز و داشتن کلونی‌های شیری رنگ و سایر ویژگی‌های بیوشیمیایی و مورفولوژیکی به جنس *Pantoea* ازخانواده Entrobacteriaceae مشابهت داشت. آزمون‌های آنتی‌بیوزیس در این مطالعه نشان داد که جدایه باکتریایی B_{52} به‌طور مشخص بر علیه باکتری فعال هسته یخ *Pseudomonas fragi* raf_3 فعالیت آنتاگونیستی داشته و از رشد این باکتری روی محیط کشت در شرایط آزمایشگاه جلوگیری می‌کند. Babu و همکاران نیز فعالیت آنتاگونیستی *Pantoea agglomerans* از خانواده Entrobacteriaceae را تایید کرده‌اند (Babu *et al*, 2005). در مطالعه مزبور، جدایه *Pantoea agglomerans* از خانواده سطح گیاهان برنج سالم جداسازی و فعالیت آنتاگونسیتی آن بر علیه باکتری *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* اثبات شده است و تایید می‌کند که این جدایه توان کلونیزاسیون سایت‌های اختصاصی در فیلوسفر گیاه را دارد که از ویژگی‌های شاخص برای یک آنتاگونسیت در رقابت موفق در سطح گیاه می باشد. Nunes و همکاران از جدایه *Pantoea agglomerans* برای کنترل بیولوژیک بیماری‌های پس از برداشت گلابی استفاده کرده اند (Nunes *et al*, 2001). همچنین فعالیت آنتاگونیستی این جدایه در کنترل پوسیدگی قهوه‌ای میوه‌جات تایید شده است (Lahlali *et al*., 2020). استفاده از جدایه‌های دارای توان بازدارندگی بصورت کاربردی در کنترل بیولوژیک نیاز به تحقیقات گسترده و مطالعات بیواکولوژیک دارد. چه بسا ممکن است بسیاری از این موارد پاتوژن‌های فرصت طلب باشند. فهرستی از انواع مختلف باکتری‌های اپیفیت گیاهان در مطالعات متعدد ارایه شده است. بسیاری از این اپی‌فیت‌های برگ، میله‌ای شکل و گرم منفی هستند (Nongkhlaw and Joshi, 2014). باکتری‌های اپی‌فیت حاضر در سطح برگ و یا اضافه شده به صورت محلول پاشی نقش مهمی در سرکوب باکتری های بیماری‌زای گیاهی ایفا می‌کنند.

جدایه A_4، جدایه گرم مثبت اپی‌فیت دیگر جداسازی شده در این مطالعه است که به‌طور مشخص مانع از رشد باکتری عامل هسته یخ در شرایط آزمایشگاه شد. با توجه به ویژگی‌های مورفولوژیکی، این جدایه کلونی‌هایی مشابه اکتینومیست‌ها داشت. نتایج نشان داد که این جدایه توان تحمل فشار اسمزی بالا و رشد در غلظت‌های متعدد نمک کلریدسدیم را دارد. همچنین رشد در اسیدیته‌های مختلف محیط کشت (جدول ۲)، از یک طرف توان سازگاری یک آنتاگونیست را در شرایطی مشابه رشد گیاه میزبان (شوری و خشکی) را نشان می دهد و از طرف دیگر به‌عنوان یک یافته در تصمیم‌گیری در شرایط تولید یک محصول به‌عنوان معیار کنترل بیولوژیک مفید خواهد بود (Passari *et al*., 2016). آنتاگونیست‌های اپی فیت در صورت داشتن سازگاری

با شرایط محیطی بهترین گزینه برای کنترل بیولوژیک تنش های بیماریزایی و فیزیولوژیکی هستند. یکی دیگر از نتایج این مطالعه نشان داد این جدایه قادر به تولید آنزیم‌های لیپاز، پروتئاز و کاتالاز می باشد. در مطالعات متعدد نشان داده شده است توان تولید آنزیم‌های لیتیک مثل لیپاز و پروتئاز ارتباط مستقیمی با توان آنتاگونیستی یک میکرواورگانیسم دارد (Mamphogoro *et al*., 2021). در بررسی قند مصرفی، نتایج نشان داد جدایه A_4، قادر به تجزیه گلوکز و ساکارز به‌عنوان منبع کربن بوده، در حالی‌که نمی‌تواند لاکتوز را تجزیه کند. این داده علاوه بر اینکه در حمایت رشد میکروبی این آنتاگونیست در محیط کمک می کند، نشان می دهد که می توان با تامین منابع کربنی مورد نیاز سویه‌های آنتاگونیست، فعالیت آنتاگونیستی آنها را افزایش داد. همچنین این یافته می‌تواند به شرکت‌های علاقه‌مند به بسته‌بندی و فرمولاسیون این آنتاگونیست کمک کند که بهترین شرایط را برای بهبود کارایی آن فراهم کند. این جدایه در نتایج آزمون گرم مثبت بوده و به آنتی بیوتیک پنی سیلین مقاومت نشان داد. نتایج ویژگی‌های مورفولوژیکی و نتایج تست‌های بیوشیمیایی این جدایه شباهت آن را به *Streptomyces* نشان می‌داد که با نتایج مطالعه Rashard و همکاران (۲۰۱۵) مطابقت داشت. البته جهت شناسایی دقیق به آزمون‌های تکمیلی و تعیین توالی نوکلئوتیدی در مطالعات آینده نیازمند است. اگر چه باکتری‌های گرم مثبت بیش از نیمی از ترکیبات ضد میکروبی جهان را تولید می‌کنند و در عرصه‌های مختلف زندگی آدمی به خصوص در کنترل بیماری های گیاهی اثر گذاشته‌اند (Doumbou *et al*., 2002; Shimizu *et al*., 2000).

پیشنهادات

پیشنهاد می‌شود مطالعات تکمیلی در خصوص شناسایی این جدایه ها، خالص سازی مواد ضد باکتریایی این آنتاگونیست ها و توان کلونیزاسیون آنها در سطح گیاه بررسی شود. همچنین پیشنهاد می‌شود توان بیوکنترل این دو جدایه ، روی گیاه بررسی گردد. در واقع این مطالعه مقدمه‌ای است بر انجام آزمایشات تکمیلی مانند کاربرد آنتاگونیست‌های مذکور علیه باکتری‌های فعال هسته یخ در شرایط باغ در قالب طرح‌های آماری که باید در مدت زمان حداقل سه سال صورت گیرد. در صورت تطابق نتایج حاضر با شرایط مزرعه آن‌گاه می‌توان به جدایه‌های *Streptomyces*موجود به‌عنوان عوامل بیوکنترل کاندید در کنترل زیستی محسوب کرد. و در این راستا بایستی امنیت آنها از نظر تاثیر بر محیط زیست، تاثیر آنها بر رشد گیاه و همچنین تاثیرات احتمالی آنها در چرخه زیستی مواد غذایی با تاکید بر مصرف کننده اصلی که انسان است مورد توجه قرار گیرد.

REFEFENCES

Babu, A. G. C., and Thind, B. S. (2005). Potential use of combinations of *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas flourescenc* and *Bacillus subtilis* as biocontrol agents for the control of bacterial blight of rice. Annals of the Sri Lanka, department of agriculture, 7, 23-37.

Dhingra, O. D. and Sinclair, J. B. (1995). Basic plant pathology methods'. CRC Press: USA, pp: 287-296, 390- 391.

Doumbou, C. L., Hamby Salove, M. K., Crawford, D. L., and Beaulieu, K. (2002). Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth. Phytoprotection. 82: 85-102.

Fourati-Ben Fguira, L., Fotso, S., Ben Ameur-Mehdi, R., Mellouli, L., and Laatsch, H. (2005). Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated *Streptomyces* sp. strain US80. Research in Microbiology, 156: 341-347.

Gomes, E. D. B., Dias, L. R. L., & Rita de Cassia, M. (2018). Actinomycetes bioactive compounds: Biological control of fungi and phytopathogenic insect. African Journal of Biotechnology, 17(17), 552-559.

Gulve R. M., and Deshmukh, A. M. (2011). Enzymatic activity of actinomycetes isolated from marine sediments. Recent Research in Science and Technology, 3: 80-83.

Gurian Sherman, D and Lindow, S. E. (1993). Bacterial ice nucleation: significance and molecular basis. FASEBJ. 7: 1338-1343

Hirano S.S., and Upper C.D. (2000). Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae* a pathogen, ice nucleus, and epiphyte, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 3:624-653.

Ilsan, N. A., Nawangsih, A. A., Wahyudi, A. T. (2016). Rice Phyllosphere Actinomycetes as Biocontrol Agent of Bacterial Leaf Blight Disease on Rice. Asian Journal of Plant Pathology. 10(1-2): 1 – 8.

Kohl, J., Kolnaar, R., & Ravensberg, W. J. (2019). Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy. Frontiers in plant science, *10*, 845.

Lahlali, R., Aksissou, W., Lyousfi, N., Ezrari, S., Blenzar, A., Tahiri, A., ... & Amiri, S. (2020). Biocontrol activity and putative mechanism of *Bacillus amyloliquefaciens* (SF14 and SP10), *Alcaligenes faecalis* ACBC1, and *Pantoea agglomerans* ACBP1 against brown rot disease of fruit. Microbial Pathogenesis, 139, 103914

Lukas, M., Schwidetzky, R., Eufemio, R. J., Bonn, M., and Meister, K. (2022). Toward Understanding Bacterial Ice Nucleation. The Journal of Physical Chemistry B, 126, 1861-1867.

Mamphogoro, T. P., Kamutando, C. N., Maboko, M. M., Aiyegoro, O. A., and Babalola, O. O. (2021). Epiphytic bacteria from sweet pepper antagonistic in vitro to Ralstonia solanacearum BD 261, a causative agent of bacterial wilt. *Microorganisms*, *9*(9), 1947.

Moosavi S.M.A., Dehnad, A., Kamali, S., and Pour-Soltan, M. (2011). Evaluation of antifungal effects and activity of Chitinase 19 from one strain of Iranian native Streptomyces griseus. Journal of Microbial Biotechnology. 3: 1-6 (In Farsi with English abstract)

Nongkhlaw, F. M. W., and Joshi, S. R. (2014). Distribution pattern analysis of epiphytic bacteria on ethno medicinal plant surfaces: A micrographical and molecular approach. Journal of Microscopy and Ultrastructure, 2(1), 34-40.

Nunes, C., Usall, J., Teixidó, N., and Viñas, I. (2001). Biological control of postharvest pear diseases using a bacterium, *Pantoea agglomerans* CPA-2. International journal of food microbiology, 70 (1-2), 53-61

Olanrewaju, O. S., and Babalola, O. O. (2019). *Streptomyces*: implications and interactions in plant growth promotion. Applied microbiology and biotechnology, 103(3), 1179-1188.

Passari, A. K., Mishra, V. K., Leo, V. V., Gupta, V. K., & Singh, B. P. (2016). Phytohormone production endowed with antagonistic potential and plant growth promoting abilities of culturable endophytic bacteria isolated from Clerodendrum colebrookianum Walp. *Microbiological research*, *193*, 57-73.

Promnuan, Y., Promsai, S., & Meelai, S. (2020). Antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. isolated from Apis dorsata combs against some phytopathogenic bacteria. PeerJ, 8, e10512.

Rashard, F. M., Fathy, H. M., El-Zayat, A. S., and Elghonaimy, A. M. (2015). Isolation and characterization of multifunctional Streptomyces species with antimicrobial, nematicidal and phytohormone activities from marine environments in Egypt. Microbiological research, 175, 34-47.

Rostami, M., Hasanzadeh, N., Khodaygan, P., and Riahi-Madvar, A. (2018). Ice nucleation active bacteria from pistachio in Kerman Province, Iran. Journal of Plant Pathology, 100(1), 51-58.

Schaad, N. W., Jones, J. B., & Chun, W. (2001). Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria (No. Ed. 3). American Phytopathological Society (APS Press).

Shahidi Bonjar, G. H. and Karimi Nick, A. (2004). Antibacterial activity of some medicinal plants of Iran against *Pseudomonas aeruginosa* and *P. fluorescens*. Asian Journal of plant Sciences. 3:61-64.

Shimizu, M., Nakagawa, Y., Sato Y., Furumai, T., Igaroshi, Y., Onaka, H., Yoshida, R., Kunoh, H. (2000). Studies on endophytic Actinomycetes (I) *Streptomyces* sp. isolated from Rododendron and its antifungal activity. Journal of General Plant Pathology, 66: 360-366

Siddharth, S., & Vittal, R. R. (2019). Isolation, characterization, and structural elucidation of 4-methoxyacetanilide from marine actinobacteria Streptomyces sp. SCA29 and evaluation of its enzyme inhibitory, antibacterial, and cytotoxic potential. Archives of microbiology, 1-10.

Soltani, N. M., Shahidi, B. G., & Khaleghi, N. (2015). Biosynthesis of gold nanoparticles using *Streptomyces fulvissimus* isolate.

Vergnes, S., Gayrard, D., Veyssière, M., Toulotte, J., Martinez, Y., Dumont, V., ... & Dumas, B. (2020). Phyllosphere colonization by a soil *Streptomyces* sp. promotes plant defense responses against fungal infection. Molecular Plant-Microbe Interactions, 33(2), 223-234.