کنترل بیولوژیک قارچ *Rhizocronia solani* جدا شده از روی پسته و خصوصیت یابی ژن کیتیناز از موثرترین عامل بیوکنترل

اعظم بهارلوئی[1]، غلامرضا شریفی سیرچی*[2]

[1] دانشجوی کارشناسی ارشد بخش بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

[2] استادیار بخش بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

تاریخ دریافت: 1389/08/29، تاریخ پذیرش: 1390/09/30

چکیده

قارچ *Rhizoctonia solani* یکی از مهمترین عوامل بیماری زای خاک زی است که دارای دامنه میزبانی بسیار وسیعی بوده و با ایجاد بیماری مرگ گیاهچه و پوسیدگی ریشه و ساقه روی گیاه پسته، خسارت قابل توجهی به این محصول وارد می سازد. با هدف به دست آوردن یک آنتاگونیست مولد کیتیناز علیه قارچ مذکور، غربالگری اکتینومیست های خاکزی مولد آنزیم کیتیناز با نمونه برداری از خاک‌های زراعی و باغی چند منطقه در استان کرمان انجام شد. از بین جدایه های مورد بررسی، جدایه استرپتومایسس 410 توانست به طور موثری از فعالیت این قارچ هم در شرایط آزمایشگاهی و هم در شرایط گلخانه ای جلوگیری کند. در ادامه با طراحی آغازگر های اختصاصی، ژن کد کننده ی کیتیناز به طول 603 جفت باز جداسازی و پس از همسانه سازی در وکتور pTZ57R/T تعیین توالی و خصوصیت یابی گردید. نتایج نشان داد که این ژن پروتئینی به طول 200 اسید آمینه با وزن مولکولی 21636/9 دالتون را کد می کند. این پروتئین تشابه زیادی را با کیتینازهای خانواده 19 گلیکوزیل هیدرولازها که نقش اصلی را در ممانعت از رشد پاتوژن‌های گیاهی دارند، نشان داد.

واژه های کلیدی: *پسته، کنترل بیولوژیک، کیتیناز، Rhizoctonia solani، Streptomyces.*

* نویسنده مسئول: غلامرضا شریفی سیرچی تلفن: 0341-3202638 E. Mail:sharifi-sirchi@mail.uk.ac.ir

مقدمه

مبارزه بیولوژیک با عوامل بیماری زای گیاهی، به ویژه پاتوژن‌های خاکزاد که بیشترین و بالاترین خسارات اقتصادی را به محصولات کشاورزی در دنیا وارد می‌سازند، به عنوان یک روش جایگزین روش‌های شیمیایی برای کنترل بیماری‌های مختلف گیاهی مورد توجه است. قارچ Rhizoctonia solani یکی از مهمترین عوامل بیماری زای خاک زی است که دارای دامنه میزبانی بسیار وسیعی بوده و با ایجاد بیماری مرگ گیاهچه و پوسیدگی ریشه و ساقه روی گیاه پسته، خسارت قابل توجهی به این محصول وارد می سازد (Elahinia, 1999). کنترل بیولوژیک این قارچ در برخی محصولات کشاورزی با استفاده از عوامل آنتاگونیست خاک زی انجام شده است (Rothrock *et al.*, 1984; Chi & Hanson, 1984; Sabaratnam & Traquir, 2002; Sadeghi *et al.*, 2006). از جمله ی این آنتاگونیست ها، اکتینومیست‌ها می باشند که به علت دارا بودن ترکیبات بالقوه در ممانعت یا حذف پاتوژن‌های گیاهی متعدد، به ویژه قارچ‌ها و باکتری‌های بیمارگر ریشه‌ها شناسایی شده‌اند. از جمله ویژگی‌های شاخص این باکتری ها که آنها را جهت کنترل برخی از عوامل خسارت‌زای گیاهی مناسب نموده است، ترشح آنزیم کیتیناز می باشد؛ به گونه ای که این باکتری ها تجزیه کننده اصلی کیتین و عامل اصلی برگرداندن این ماده سخت به چرخه طبیعت هستند (Deshpande, 1986). کیتین پلیمر پلی ساکاریدی بدون شاخه با اتصالات β-1, 4 از واحدهای N- استیل گلوکز آمین است که ترکیب اصلی دیواره سلولی اکثر قارچ‌ها، کوتیکول حشرات، پوشش خارجی نماتدها و تخم و کیست آنها و نیز اسکلت خارجی سخت پوستان، میگو و فلس ماهی ها را تشکیل می‌دهد (Synowiecki & Al-Khateeb, 2003). تعدادی از ژن‌های کیتیناز متعلق به گونه های مختلف Streptomyces، مانند S. coelicolor (Saito *et al.*, 1999)، S. griseus (Ohno *et al.*, 1996) و S. olivaceoviridis (Blaak *et al.*, 1993) جداسازی و خصوصیت یابی شده اند. هدف از انجام این تحقیق، استفاده از اکتینومیست های کیتینولایتیک جدا شده از خاک‌های کرمان در کنترل بیولوژیک قارچ R. solani، جدا شده از پسته در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه ای بر روی گیاه پسته (Pistacia vera) و نیز جداسازی، همسانه سازی و توالی یابی ژن کیتیناز از موثرترین عامل بیوکنترل می باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری از خاک‌های زراعی و باغی مناطق سیرچ و ماهان استان کرمان انجام شد. سپس با تهیه رقت‌های متوالی 10^{-3}، 10^{-4}، 10^{-5} و 10^{-6} و کشت نمونه خاک، اکتینومیست‌ها جداسازی شدند (Lee and Hwang, 2002). برای رشد اکتینومیست‌ها، محیط سنتزی کازئین– گلیسرول– آگار (CGA) استفاده شد (Saadoun & Gharaibeh, 2001). پس از تهیه کیتین کلوئیدال، اکتینومیست‌ها به منظور تعیین فعالیت

کیتینازی در محیط حداقل کیتین آگار غربالگری شدند (Baharlouei *et al.*, 2011). کشت خالص قارچ از بخش بیماری‌های دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان تهیه و روی محیط PDA[1] رشد داده شد. به منظور تعیین توانایی جدایه های اکتینومیست به دست آمده در تولید ماده ضد قارچی علیه قارچ مذکور، آزمون آنتی بیوگرام به روش Dual Culture انجام و بر اساس قطر ناحیه ممانعت از رشد[2] جدایه های فعال انتخاب شدند (Shahidi Bonjar & karimi, 2004). سپس جهت بررسی ماهیت ماده موثره در کنترل قارچ، آزمایش حساسیت به کلروفرم انجام شد (Davelos *et al.*, 2004) و با کشت جدایه-های فعال در محیط Casein Glycerin (CG) و انجام آزمون زیستی در سه تکرار روی کشت چمنی قارچ، منحنی تولید ماده موثر رسم شد (*et* Konishi *al.*, 1991). با عصاره گیری از محیط-های کشت مایع CG و تهیه ماده خام ناخالص (Baharlouei *et al.*, 2011)، حداقل غلظت بازدارنده از رشد، پایداری ماده مؤثر در شرایط آزمایشگاهی و دمای غیر فعال کننده ماده مؤثر بررسی شد (Shahidi Bonjar & karimi, 2004). جهت تشخیص میزان قطبیت ماده مؤثر، حلالیت عصاره خام در حلال‌های آلی (متانول، کلروفرم، استون، هگزان و آب مقطر) طبق روش Mansouri et al (2001) انجام شد. تعیین فعالیت قارچ‌کشی[3] و یا قارچ ایستایی[4] جدایه اکتینومیستی در کنترل قارچ، طبق روش Shahidi Bonjar & Karimi (2004) بررسی گردید. مورفولوژی سطح اسپورها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نوع اسکنینگ[5] مدل Lutz 100A با ولتاژ 20 KV انجام شد.

آزمایش در سال 1388 در قالب طرح کاملاً تصادفی با 4 تیمار و 8 تکرار، در گلخانه آزمایشی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید باهنر کرمان انجام گرفت. ترکیب تیمارها به صورت زیر بود:

1- جدایه استرپتومایسسی 410 که طبق آزمایشات آنتی بیوگرام، دارای بیشترین اثر آنتاگونیستی روی قارچ بود.

2- قارچ R. solani

3- قارچ R. solani و جدایه استرپتومایسسی 410

4- شاهد که هیچ تیماری دریافت نکرد.

تلقیح قارچ بر پایه ی روش Muslim *et al* (2003) انجام شد.

استخراج DNA به روش CTAB با اندکی تغییرات انجام شد (Rogers & Bendich, 1994). به این نحو که ابتدا باکتری استرپتومایسس در 30 ml محیط کشت CG تلقیح و به مدت یک هفته در شیکر انکوباتور (دمای 28°C، 125 rpm) قرار داده شد. بعد از رشد باکتری و اطمینان از آلوده نبودن آن، پرگنه‌های باکتری در 6000 rpm به مدت 10 دقیقه رسوب داده شد. مقدار 500µl از بافر TE25S به علاوه 15µl آنزیم لیزوزیم به رسوب اضافه و پس از ورتکس شدید به مدت 3-2 دقیقه، به مدت یک

[1] Potato Dextrose Agar
[2] Inhibition Zone
[3] Fungicide
[4] Fungistatic
[5] Scanning

ساعت در دمای 55°C قرار داده شد. سپس 50µl از SDS (10 درصد) و 10µl از پروتئیناز K ($200\ mg\ ml^{-1}$) اضافه و برای 10 دقیقه در دمای 65°C انکوبه شد. مقدار 200µl از NaCl پنج مولار به تیوب افزوده و پس از ورتکس به مدت 30 ثانیه، مقدار 150µl بافر CTAB/NaCl اضافه کرده و به مدت 10 دقیقه در دمای 65°C قرار داده شد. CTAB با اسیدهای نوکلئیک ترکیب غیر محلولی ایجاد کرده و رسوب می‌کند. پروتئین، کربوهیدرات و سایر ناخالصی‌ها در مایع رویی باقی می‌ماند. ترکیب اسید نوکلئیک-CTAB ایجاد شده توسط NaCl شکسته می‌شود. پس از سرد شدن محلول تا دمای 37°C، هم حجم محلول فوق کلروفرم/ایزوآمیل الکل (24:1) اضافه کرده و 15 تا 2 دقیقه با سر و ته کردن تیوب، محلول را مخلوط و سپس به مدت 10 دقیقه در 14000 rpm و در دمای 4°C سانتریفیوژ شد. این عمل باعث جداسازی مولکول‌های پروتئینی از عصاره استخراج می-گردد. فاز رویی به یک تیوب جدید منتقل و 0/8 حجم آن، ایزوپروپانول سرد افزوده و با سر و ته کردن تیوب، کلاف سفید رنگ DNA تشکیل می‌شود. کلاف تشکیل شده توسط تیپ دهان گشاد استریل به تیوب جدید حاوی اتانول 70% منتقل و پس از شستشو، به مدت 10 دقیقه در 14000 rpm و دمای 4°C سانتریفیوژ شد. پس از حذف مایع رویی و هوا خشک شدن نمونه برای خروج کامل اتانول، مقدار 200µl از بافر TE یا آب دو بار تقطیر به رسوب خشک شده افزوده شد. رسوب DNAی ژنومی پس از گذشت حدود 5 دقیقه در دمای آزمایشگاه به آرامی و به طور کامل حل شد. در نهایت نمونه DNA تا زمان استفاده در فریزر -20°C نگهداری شد. سپس با بررسی نواحی حفاظت شده ژن کیتیناز، آغازگرهای اختصاصی طراحی گردید. واکنش PCR شامل دمای 94°C به مدت 5 دقیقه، 55°C به مدت 45 ثانیه، 72°C به مدت 1 دقیقه،برای 30 دور و سپس 72°C به مدت 5 دقیقه انجام شد و محصول PCR با استفاده از AccuPrep® PCR Purification Kit, Bioneer, Korea خالص سازی گردید. همسانه سازی با استفاده از Ins T/A Clone ™ PCR Product Cloning Kit, Fermentas, Lithuania) انجام شد. باکتری XL1Blue با استفاده از کلرید کلسیم 100 میلی مولار به حالت مستعد در آمد و پس از ترانسفورماسیون، باکتری-ها روی پتری دیش های LB حاوی آمپی سیلین رشد داده شدند. سپس آزمون Colony PCR روی پرگنه‌های سفید انجام شد. استخراج پلاسمید نوترکیب با استفاده از کیت AccuPrep®Plasmid extraction Kit, Bioneer, Korea انجام شد. سپس هضم آنزیمی پلاسمید توسط آنزیم‌های برشی Pst1 و EcoRI صورت گرفت. پلاسمید های نوترکیب جهت تعیین توالی (توسط شرکت Microgene کره جنوبی) مورد استفاده قرار گرفت. به منظور تعیین توالی دقیق قطعه کلون شده، این عمل در دو جهت و با استفاده از آغازگرهای M13-Forward / Reverse انجام شد. نتایج حاصل از تعیین توالی

با فرمت الکتروگرام Chromas با استفاده ازنرم افزار Chromas Version 1.41 مورد بررسی قرار گرفتند و سپس با توالی‌های موجود در بانک ژن در شبکه NCBI (http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) مقایسه شدند. در ضمن آنالیز توالی‌ها با استفاده از نرم افزار DNAMAN Version 4.02 (Lynnon Biosoft. 1994-98) نیز صورت گرفت و ماتریس شباهت، درصد همولوژی نیز با استفاده از این نرم افزار به دست آمد.

نتایج و بحث

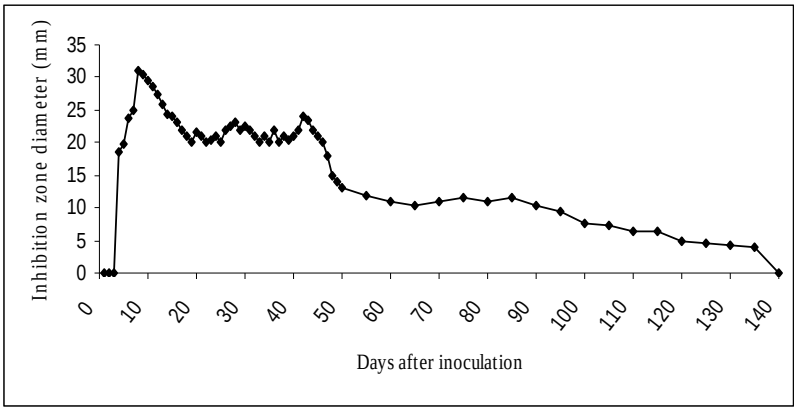
جداسازی اکتینومیست‌های دارای فعالیت کیتینازی: از رقت‌های 10^{-3}- 10^{-6} کشت خاک، تعداد 110 جدایه (46 جدایه مربوط به منطقه سیرچ و 64 جدایه مربوط به منطقه ماهان) اکتینومیست خاکزی به دست آمد که بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی از یکدیگر متمایز بودند. از 110 جدایه موجود، تعداد 18 جدایه با فعالیت کیتینازی جداسازی شد (شکل 1).

تعیین فعالیت ضد قارچی و منحنی تولید ماده مؤثر

فعالیت آنتاگونیستی جدایه‌ها با اندازه گیری قطر هاله ممانعت از رشد ارزیابی شد. از بین جدایه‌های دارای فعالیت کیتینازی، جدایه 410 بیشترین اثر آنتاگونیستی را علیه قارچ *R. solani* نشان داد. یافته های حاصل، با نتایج Sabaratnam & Traguair (2002)، که کنترل بیولوژیک R. solani را روی گیاه گوجه فرنگی به وسیله جدایه Di-844 از Streptomyces sp. بررسی کردند مطابقت داشت. منحنی تولید ماده موثر جدایه استرپتومایسس 410 در وضعیت کشت مایع علیه قارچ R. solani در شکل 2 نشان داده شده است. بیشترین فعالیت آنتاگونیستی این جدایه در روز هفتم بعد از تلقیح بود. منحنی رشد جدایه برتر در این پژوهش، منحنی رشد مشابه منحنی گزارش شده از El-Mansi & Bryce (1999) بود که آنها نیز بیشترین فعالیت آنتاگونیستی جدایه‌های استرپتومایسسی را بین روزهای 11-7 بعد از مایه زنی عنوان کردند. در حالی که، در مورد جدایه‌های غیر استرپتومایسسی بررسی شده توسط آنها، منحنی رشد، روال کاملا" متفاوتی را داشت. میانگین قطر هاله‌های ممانعت از رشد، بعد از رسیدن به روز حداکثر، به تدریج کاهش یافت تا جایی که دیگر جدایه قادر به کنترل قارچ نبود. تحقیق انجام شده توسط Sabaratnam & Traguair(2002) روی خواص آنتاگونیستی *Streptomyces sp.* جدایه Di-844 علیه رایزوکتونیای گوجه، نشان داد که اثر پروپاگول‌های آنتاگونیست باگذشت زمان کاهش می‌یابد که با نتایج حاصل از این بررسی مطابقت می‌کند.

شکل 1- فعالیت کیتینازی اکتینومیست‌های جدا شده از کشت خاک روی محیط حداقل کیتین آگار پس از ده روز انکوباسیون در28°C؛ الف، ب، ج، د، ه به ترتیب جدایه‌های استرپتومایسس 400، 401، 506، 403، 410 و جدایه 379 0به عنوان کنترل منفی که در مرکز پتری دیش قرار دارد.

Figure 1- Chitinase activity of some Streptomyces isolates on minimal chitin agar (MCA) medium, 8–10 d after incubation at 28°C.



شکل 2- منحنی فعالیت ماده ضد قارچی جدایه 410 علیه قارچ پاتوژن R. solani.

Figure 2- Diagram of antifungal activity of Streptomyces isolate 410 against *R. solani* in in vitro condition.

حساسیت به کلروفرم و تعیین حلالیت ماده مؤثر ضد قارچی در حلال‌های آلی

ماده مؤثر جدایه استرپتومایسس 410 دارای فعالیت کیتینازی نسبت به کلروفرم حساس بود و تحت تأثیر کلروفرم، ماده مؤثر آن نتوانست از رشد قارچ جلوگیری نماید. این موضوع موید مطالعه انجام شده توسط Davelos *et al.* (2004) روی بررسی ماده موثر تولید شده به وسیله

استرپتومایسس‌ها است. در این مطالعه آنها نشان دادند که جدایه‌های فعالی که با ترشح آنزیم از رشد قارچ جلوگیری می‌کردند، پس از قرار گیری در معرض کلروفرم، ماهیت خود را از دست داده و قادر به کنترل قارچ و ایجاد هاله ممانعت از رشد نبودند. نتایج حلالیت ماده مؤثر ضد قارچی جدایه 410 علیه قارچ نشان داد که ماهیت ماده موثر این جدایه شدیدا" قطبی بوده و در حلال-های غیرقطبی غیر قابل حل می باشد (جدول 1).

جدول 1- نتایج حلالیت ماده مؤثر ضد قارچی جدایه 410 علیه قارچ R. Solani .

Table 1- Bioassay results of solubility tests of the antifungal principle (s) of Streptomyces isolate No. 410 against *R. solani* in fractions of different solvents indicated by well diffusion-method at 20 mg mL^{-1} of dry crude.

فعالیت Activity	فاز Phase	حلال Solvent
+	S	آب مقطر
+	P	
+	S	متانول
-	P	
-	S	کلروفرم
-	P	
+	S	استون
-	P	
-	S	هگزان
+	P	

S: supernatant, P: pellet, +: Soluble, -: Insoluble.

حداقل غلظت بازدارنده از رشد، دمای غیر فعال کننده و پایداری ماده مؤثر در شرایط آزمایشگاهی

حداقل غلظت بازدارنده از رشد عصاره خام جدایه 410 علیه قارچ *R. solani* مقدار mg ml^{-1} 0/625 به دست آمد. طی مطالعه انجام شده توسط Zakir *et al.* (2002)، حداقل غلظت بازدارنده از رشد یک متابولیت فعال جدا شده از گونه‌های استرپتومایسس علیه چهار باکتری گرم مثبت و گرم منفی بین mg ml^{-1} 32-64 به دست

آمد. از آنجائی که استرپتومایسس بررسی شده در این پژوهش، در رقت‌های بسیار پایین‌تر نیز قادر به کنترل قارچ بیمارگر می‌باشد، می‌توان نتیجه گرفت که از نظر آنتاگونیستی اثر بسیار خوبی در کنترل بیمارگر مورد مطالعه دارد. متوسط دمای غیر فعال کننده ماده ضد قارچی عصاره خام جدایه استرپتومایسس 410، دمای 90°C به دست آمد. ماندگاری عصاره خام در شرایط آزمایشگاه و در دمای محیط (26-28°C) مدت 210 روز بود. Sabaratnam & Traguair (2002) نیز، ماندگاری عصاره خام جدایه استرپتومایسسی Di 944- را برابر با 180 روز گزارش کردند که کم و بیش با نتایج حاصل از پژوهش حاضر مطابقت می‌کند.

نتایج حاصل از ارزیابی فعالیت قارچ‌کشی یا قارچ ایستایی جدایه 410 علیه قارچ *F. solani* نشان داد که این جدایه دارای فعالیت قارچ کشی می باشد.

تعیین مورفولوژی سطح اسپور

مورفولوژی میسلیوم و اسپور جدایه استرپتومایسس 410 زیر میکروسکوپ الکترونی در شکل 3 نشان داده شده است. همان طور که در شکل دیده می‌شود، شکل زنجیره اسپور به صورت راست تا انعطاف‌پذیر است. همچنین سطح اسپور به صورت صاف و مستطیلی شکل می باشد. در پژوهشی که به منظور شناسایی و رده بندی گونه‌های مختلف Streptomyces توسط Locci (1989) با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نوع اسکنینگ انجام شد، سطوح اسپورها در گونه *S. niveus*، به صورت صاف گزارش شد. همچنین شکل زنجیره اسپور با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نوع اسکنینگ[1] در گونه‌های *S. hygroscopicus*، *S. vinaceus* و *S. griseus* به ترتیب به شکل فنری[2]، حلقوی[3] و راست تا انعطاف‌پذیر[4] گزارش شد.

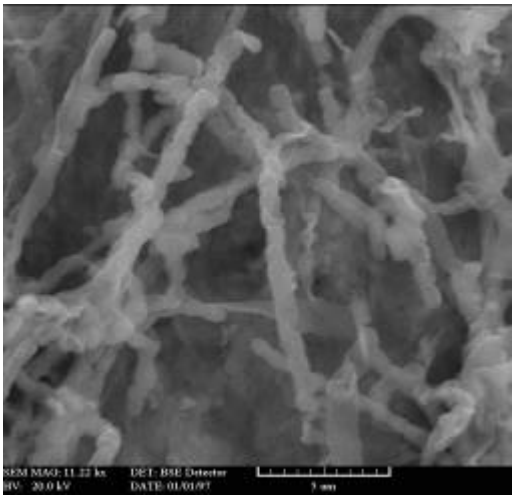
مطالعات گلخانه‌ای

نهال‌های تلقیح شده با قارچ *R. solani*، علائم نکروتیک روی برگ، زخم روی ریشه و طوقه، شروع پژمردگی برگ و در نهایت خشکیدگی کامل نهال پسته را نشان دادند. در گیاهانی که تیمار جدایه استرپتومایسس 410 و قارچ بیماریزا را دریافت کرده بودند، علائم بیماری کاهش یافت و در مورد نهال‌هایی که فقط با جدایه 410 تلقیح شده بودند، وضعیت رشدی بهتری نسبت به سایر تیمارها مشاهده شد (شکل 4).

در پژوهشی Chan *et al.* (2003) استفاده از خواص آنتاگونیستی باکتری *Bacillus subtilis* جدا شده از خاک‌های زراعی علیه قارچ *F. solani* را بررسی کردند. نتایج نشان داد که این باکتری آنتاگونیست به طور موثری قادر به کنترل قارچ مذکور از طریق جلوگیری از رشد میسلیوم می باشد.

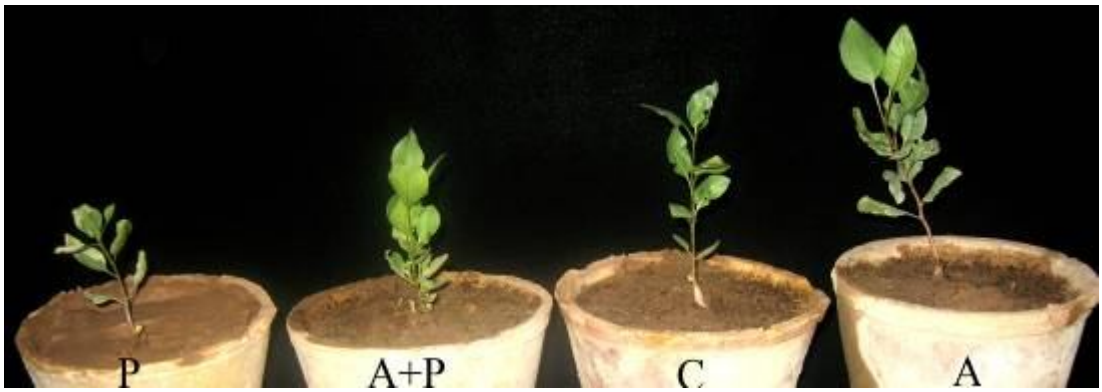
---

[1] Scanning
[2] Spirales
[3] Rectinaculiaperti
[4] Rectiflexibles



شکل 3- مورفولوژی میسلیوم و زنجیره اسپور استرپتومایسس جدایه 410 زیر میکروسکوپ الکترونی Scanning مدل Lutz 100A.

Figure 3- Scanning electron micrograph of mycelia of Streptomyces isolates No. 410.



شکل 4- علائم ایجاد شده روی قسمت های هوایی نهال های پسته تیمار شده با قارچ *R. solani* و جدایه استرپتومایسس 410: A: گیاهان تلقیح شده با جدایه استرپتومایسس؛ این گیاهان رشد بهتری را نسبت به سایر تیمارها نشان می‌دهند، A+P: گیاهان تلقیح شده توأم با جدایه استرپتومایسس و پاتوژن؛ گیاهان در این تیمار فاقد علائم بیماری می‌باشند، C: گیاهان شاهد؛ بدون علائم، P: گیاهان تلقیح شده با پاتوژن که علائم بیماری قابل مشاهده است.

Figure 4- In vivo greenhouse results in pistachio seedlings (P): In plants inoculated with the pathogene (*R. solani*) alone and (A+P): Plants inoculated with both *R. solani* and the antagonist Streptomyces isolate 410, (C): Untreated control plants. (A): Plants inoculated with Streptomyces isolate 410 alone

مطالعات مولکولی

جهت بررسی غلظت و کیفیت DNA استخراج شده از دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد. به علاوه، الکتروفورز DNA روی ژل آگارز 1 درصد انجام شد. نتایج نشان داد که DNA از غلظت و کیفیت مطلوبی برخوردار است. جهت تکثیر ژن کیتیناز، با استفاده از جفت آغازگر (C3HFB و C3HRB) قطعه ای به طول تقریبی 600 جفت باز به دست آمد (شکل 5).

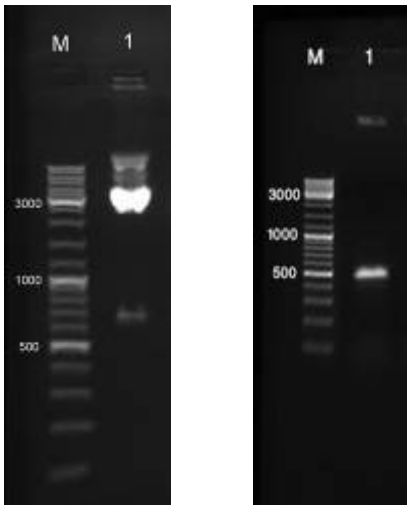
پس از ترانسفورماسیون با باکتری XL1Blue و انجام Clony PCR، از پرگنه های حاوی پلاسمید نوترکیب، استخراج پلاسمید انجام شد. هضم آنزیمی پلاسمید توسط آنزیم‌های برشی *Pst*1 و *Eco*RI صحت قطعه کلون شده را تائید کرد.

تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک

اطلاعات به دست آمده از تعیین توالی نشان داد که طول ژن کیتیناز جداسازی شده از استرپتومایسس جدایه 410 برابر با 603 جفت باز است که پروتئینی به طول 200 اسید آمینه را کد می‌کند.

توالی نوکلئوتیدی و اسیدآمینه‌ای، ماتریس همولوژی و درصد مشابهت توالی اسید آمینه‌ای به دست آمده از این ژن با توالی‌های کیتیناز موجود در بانک ژن در شبکه NCBI در شکل 6 آمد.

بررسی توالی‌ها و مقایسه آنها با توالی نوکلئوتیدی و اسید آمینه‌ای سایر ژن‌های موجود در بانک ژن در شبکه NCBI (http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) مشخص کرد که این ژن مشابهت بالایی را با کیتینازهای خانواده 19 مانند ChiC از S. griseus در سطح اسیدهای آمینه دارد. ژن کد کننده کیتیناز از Streptomyces sp (strainJ-13-3) توسط Katsuichiro *et al.* (2004) همسانه‌سازی شد. نتایج تعیین توالی نشان داد که این ژن از 298 اسید آمینه تشکیل شده و پروتئینی با وزن مولکولی 31081 دالتون را کد می‌کند که شامل یک توالی سیگنال به طول 29 اسیدآمینه و یک پروتئین به طول 269 اسیدآمینه است. مقایسه توالی اسیدهای آمینه ژن مذکور با سایر کتیینازها نشان داد که کیتیناز J-13-3 متعلق به کیتینازهای خانواده 19 می‌باشد.



ب
B

الف
A

شکل 5- الف: ژن کیتیناز تکثیر شده با جفت آغازگر (C3HFB و C3HRB)؛ M : مارکر مولکولی (1 kb)؛ 1: قطعه تکثیر شده به طول 600 جفت باز از جدایه ی 410 با جفت آغازگر (C3HFB و C3HRB)؛ ب: نتایج حاصل از بررسی حضور ژن کیتیناز در پرگنه‌های سفید با استفاد از تکنیک Colony PCR و جفت آغازگر (C3HFB و C3HRB) که در آنها وجود ژن کیتیناز با حضور باند 600 جفت بازی به اثبات رسیده است. M: مارکر مولکولی (1 kb)؛1: پرگنه سفید بررسی شده از استرپتومایسس جدایه ی 410.

Figure 5- A. Electrophoretic mobility pattern of PCR amplified fragment (600 bp) of partial chitinase gene from Streptomyces isolate 410 (line 1) and pattern of DNA ladder mix (100–10000 bp) (line M). B. Electrophoretic mobility pattern of colony PCR fragment (600 bp) of white colony.

```
GAGGCCCAGTTCAACCAGATGTTCCCGAACCGGAACTCCTTCTACACCTACAGCGGCCTC60
 E   A   Q   F   N   Q   M   F   P   N   R   N   S   F   Y   T   Y   T   A   A
ACCGCCGCCCTCAGCTCCTACCCGGCCTTCGCCAACACCGGCAGCGAGGAGGTCAAGAAG120
 L   S   S   Y   P   A   F   A   N   T   G   S   E   E   V   K   K   R   E   A
CGCGAGGCGGCCGCCTTCCTCGCCAATGTCAGCCACGAGACGGGCGGCCTCGTCCACATC180
 A   A   F   L   A   N   V   S   H   E   T   G   G   L   V   H   I   S   G   L
AAGGAAGTCAACGAGGCCAACTACCCCCACTACTGCGACCGGAACCAGCCCTACGGCTGC240
 K   E   V   N   E   A   N   Y   P   H   Y   C   D   R   N   Q   P   Y   G   C
CCGGCCGGCCAGGCCGCCTACTACGGGCGCGGCCCCATCCAGCTCAGCTGGAACTTCAAC300
 P   A   G   Q   A   A   Y   Y   G   R   G   P   I   Q   L   S   W   N   F   N
TACAAGGCCGCCGGGGACGCCCTCGGCATCGACCTGCTGAACAACCCCTACCTGGTCGAG360
 Y   K   A   A   G   D   A   L   G   I   D   L   L   N   N   P   Y   L   V   E
CAGAACGCCTCCGTCGCCTGGCGGACCGGCCTGTGGTACTGGAACACCCAGTCCGGCCCC420
 Q   N   A   S   V   A   W   R   T   G   L   W   Y   W   N   T   Q   S   G   P
GGCACCATGACCCCGCACAACGCCATAGTCAACAACCGCGGCTTCGGCGAGACCATCCGC480
 G   T   M   T   P   H   N   A   I   V   N   N   R   G   F   G   E   T   I   R
TCGATCAACGGCTCGATCGAGTGCAACGGCGGCAACCCGGCCCAGGTGCAGAGCCGGATC540
 S   I   N   G   S   I   E   C   N   G   G   N   P   A   Q   V   Q   S   R   I
CGACAAGTTCACCTCCTTCGCACAGATCCTCGGCACCACCACCGGTTCCAACCTGTACTGC600
 D   K   F   T   S   F   A   Q   I   L   G   T   T   T   G   S   N   L   Y   C
TGA
```

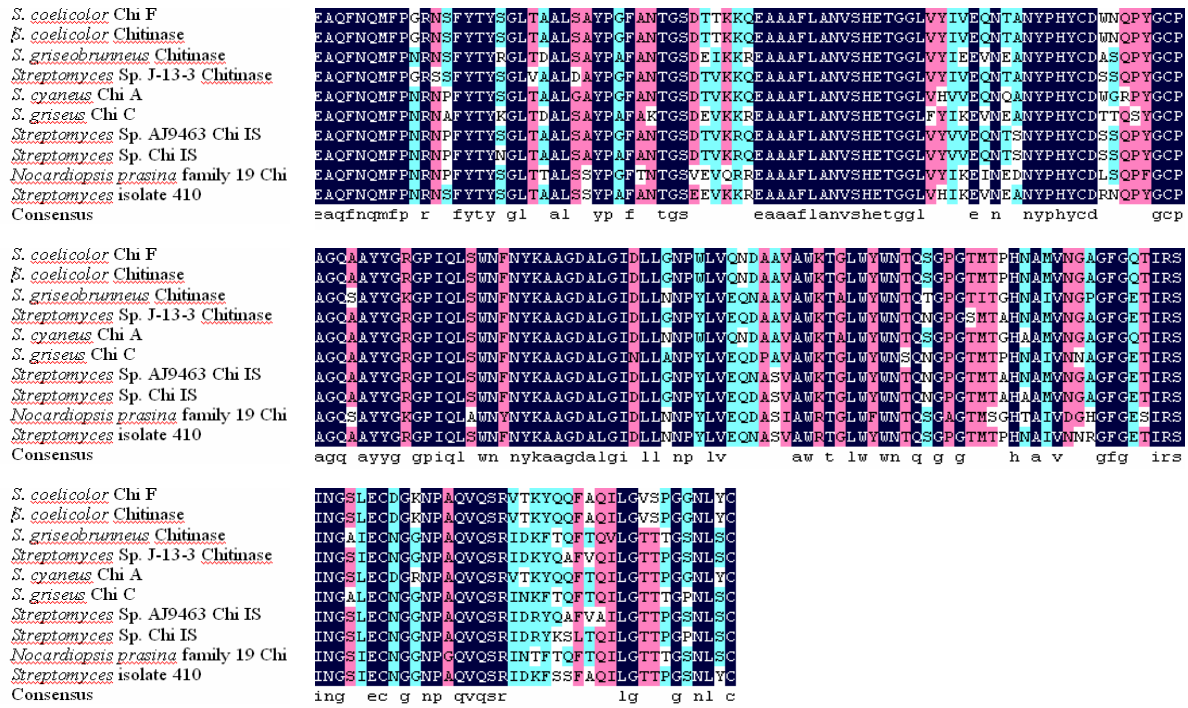
شکل 6- توالی نوکلئوتیدی و اسیدآمینه‌ای ژن کیتیناز جدا شده از Streptomyces جدایه 410.

Figure 6- Nucleotide sequence of the partial chitinase gene and the predicted amino acid.

S. coelicolor Chi F	100%
S. coelicolor Chitinase	100.0% 100%
S. griseobrunneus Chitinase	79.5% 79.5% 100%
Streptomyces Sp. J-13-3 Chitinase	88.0% 88.0% 84.0% 100%
S. cyaneus Chi A	91.5% 91.5% 80.0% 85.0% 100%
S. griseus Chi C	80.0% 80.0% 87.0% 82.5% 79.0% 100%
Streptomyces Sp. AJ9463 Chi IS	86.0% 86.0% 83.0% 93.0% 85.5% 82.0% 100%
Streptomyces Sp. Chi IS	84.5% 84.5% 82.5% 90.0% 85.5% 83.5% 95.0% 100%
Nocardiopsis prasina family 19 Chi	73.0% 73.0% 82.0% 77.0% 74.5% 78.5% 79.0% 78.5% 100%
Streptomyces isolate 410	83.0% 83.0% 87.0% 85.0% 81.5% 85.5% 85.0% 84.0% 82.0% 100%

شکل 7- ماتریس همولوژی ترادف اسیدآمینه‌ای ژن کیتیناز جدا شده از **Streptomyces** جدایه **410** و سایر ژن‌های کیتیناز خانواده **18** و **19** موجود در **NCBI** با استفاده از نرم افزار **DNAMAN**.

Figure 7- Homology matrix of chitinase gene amino acid isolated from Streptomyces isolate 410 and other existed chitinase genes from 18 and 19 family of chitinase in NCBI by using DNAMAN software.



شکل 8- درصد مشابهت توالی اسید آمینه‌ای ژن کیتیناز جداسازی شده از Streptomyces جدایه 410 با سایر توالی‌های اسیدآمینه‌ای ژن کیتیناز موجود در NCBI با استفاده از نرم افزار DNAMAN.

Figure 8- Alignment of the amino acid sequence of partial chitinase gene from Streptomyces isolate 410 with other existed amino acid sequences of families of 18 and 19 chitinases in NCBI by using DNAMAN software.

در پژوهشی Itoh *et al.* (2003) کیتینازی به نام ChiC را در *S. griseus* HUT6037 کشف کردند که این کیتیناز در شرایط آزمایشگاهی توانست از رشد *Trichoderma reesei* ممانعت کند. ژن *chiC* تحت پروموتر CaMV 35S به برنج منتقل شد و برنج های ترانسژنیک توانستند از رشد *Magnaporthe grisea*، عامل بیماری بلاست، در برگ جلوگیری کنند.

ژن کیتیناز بدست آمده از جدایه 410 این پژوهش، تشابه زیادی با کیتینازهای خانواده 19 گلیکوزیل هیدرولازها دارد. پژوهش های نشان داده که کیتینازهای متعلق به این خانواده، نقش اصلی را در ممانعت از رشد پاتوژن‌های گیاهی دارند. لذا، با توجه به قدرت تجزیه کنندگی قوی کیتیناز و اثبات اثرات آنتاگونیستی این جدایه در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای، باید آن را به عنوان یک عامل مؤثر در کنترل بیولوژیک، مورد مطالعه فراتر مزرعه ای قرارداد. همچنین با تشدید بیان ژن همسانه‌سازی شده، می‌توان از آن به طور مستقیم به عنوان یک عامل بیوکنترل موثر علیه پاتوژن‌های کیتین دار استفاده کرد. از سوی دیگر، امکان استفاده از جدایه دارای فعالیت کیتینازی و یا ژن همسانه‌سازی شده از آن در مدیریت ضایعات کیتینی که یکی از مسائل مهم امروزی است، نیز وجود دارد.

منابع

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

Baharlouei A, Sharifi Sirchi GR, Shahidi Bonjar GH (2008). Investigation of Antagonistic Activity of Actinomycetes Against *Sclerotinia sclerotiorum* the Causal Agent of Rot of Oilseed Rape. The 2nd International Student Conference of Biotechnology and New Subjects, 15 Nov, Tehran, Iran (In Farsi).

Baharlouei A, Sharifi Sirchi GR, Shahidi Bonjar GH (2010). Isolation and Characterization of a Chitinase Gene Exhibiting Antifungal Activity Against *Fusariumsolani f.* sp. melongenae from an Iranian Streptomyces strain. Agricultural Biotechnology 9: 39-47.

Baharlouei A, Sharifi Sirchi GR, Shahidi Bonjar GH (2009). Isolation, Cloning and Sequencing of Chitinase Gene from *Streptomyces plicatus*. 13-15 August. The 6th National Biotechnologe Congress of I. R. Tehran. Iran (In Farsi).

Blaak H, Schnellmann J, Walter S, Henrissat B, Schrempf H (1993). Characteristics of an exochitinase from Streptomyces olivaceoviridis, its corresponding gene, putative protein domains and relationship to other chitinases. European Journal of Biochemistry 214: 659-669.

Chakraborty MR, Chatterjee NC (2008). Control of fusarium wilt of *Solanum melongena* by Trichoderma spp. Biological Plantarum 52: 582-586.

Chan YK, Wayne A, McCormick K, Seifert A (2003). Characterization of an Antifungal Soil Bacterium and its Antagonistic Activities Against Fusarium Species. Canadian Journal of Microbiology 49: 253–262.

Chi CC, Hanson EW (1965). In Vitro Effects of *Streptomyces rimosus* on Some Soil-Inhabiting Pathogenic Fungi. Plant Disease Reporter 49:159-163.

Davelos AL, Kinke LL, Samac DA (2004). Spatial Variation in Frequency and Intensity of Antibiotic Interactions Among Streptomycetes from Prairie Soil. Applied and Environmental Microbiology 70: 1051-1058.

Deshpande M (1986). Enzymatic degradation of chitin and its biological applications. Journal of Science Industry Research 45:273–281.

Elahinia SA (1999). Mycology and phytopathology. Gilan University Publisher. 3 th Edition. Iran.

El-Mansi EMT, Bryce CFA (1999). Fermentation Microbiology and Biotechnology. Taylor and Francis UK.

Itoh Y, Takahashi K, Takizawa H, Nikaidou N, Tanaka H, Nishihashi H, Watanabe T, Nishizawa Y (2003). Family 19 Chitinase of Streptomyces griseus HUT6037 Increases Plant Resistance to the Fungal Disease. Bioscience Biotechnology Biochemistry 67: 847-855.

Katsuichiro O, Yousuke Y, Minoru N, Noriyuki S, Isamu K, Shigeru H (2004). Molecular Cloning and Expression of the Gene Encoding Family 19 Chitinase from Streptomyces sp. J-13-3. Bioscience. Biotechnology and Biochemistry 68: 341-351.

Konishi M, ohkuma H, Matsumoto K, Saitoh K, Miyaki T, Oki T, Kawaguchi H (1991). Dynemicins New Antibiotics with the 1,5-DIYN-3-ENE and Anthraquinone Subunit I Production Iolation and Physico-Chemical Properties. The Journal of Antibiotics 44: 1300-1304.

Lee JY, Hwang BK (2002). Diversity of Antifungal Actinomycetes in Various Vegetative Soils of Korea. Canadian Journal of Microbilogy 48: 407-417.

Locci R (1989). Streptomycetes and Related Genera In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams and willkins USA 4: 2451-2492.

Mansouri, S., Foroumadi, A., Ghaneie, T., Gholamhosseinian Najar, A (2001). Antibacterial Activity of the Crude Extracts and Fractionated Constituents of Myrtus communis. Pharmaceutical Biology 39: 399-401.

Ohno T, Aemand S, Hata T, Nikaidou N, Henrissat B, Mitsutomi M, Watanabe T (1996). A modular family 19 chitinase found in the prokaryotic organism *Streptomyces griseus* HUT 6037 J. Bacteriology 178: 5065-5070.

Rogers SO, Bendich AJ (1994). Extraction of Total Cellular DNA from Plants, Algae and Fungi. In: Gelvin, S.B. and Schilperoort, R.A. (eds), Plant Molecular Biology Manual , 2nd Edition, Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands, D1:1-8.

Rothrock CS, Gottlieb D (1984). Importance of Antibiotic Production in Antagonism of Selected Streptomyces Species to Two Soil-Born Plant Pathogens. The Journal of Antibiotics PP: 830-834.

Saadoun IF, Gharaibeh R (2001). The Streptomyces Flora of Jordan and It's Potential as a Source of Antibiotics Active Against Antibiotic-Resistant Gram-Negative Bacteria. World Journal of Microbiology and Biotechnology 18:465-470.

Sabaratnam S, Traquir JA (2002). Formulation of a Streptomyces Biocontrol Agent for the Suppression of Rhizoctonia Damping-off in Tomato Transplants. Biological Control 23: 245-253.

Saito A, Fujii T, Yoneyama T, Redenbach M, Ohno T, Watanable T, Miyashita K (1999). High-multiplicity of chitinase genes in *Streptomyces coelicolor* A3(2) Bioscience Biotechnology and Biochemistry 63: 710-718.

Sabaratnam S, Traquir JA (2002). Formulation of a Streptomyces Biocontrol Agent for the Suppression of Rhizoctonia Damping-off in Tomato Transplants. Biological Control 23: 245-253.

Sadeghi A, Hessan AR, Askari H, Aghighi S, Shahidi Bonjar GH (2006). Biological Control Potential of Two Streptomyces Isolates on *Rhizoctonia solani*, the Causal Agent of Damping-off of Sugar Beet. Pakistan Journal of Biological Sciences 9: 904-910.

Shahidi Bonjar GH, Karimi NA (2004). Antibacterial Activity of Some Medicinal Plants of Iran Against *Pseudomonas aeruginosa* and *P. fluorescens*. Asian Journal of plant Sciences 3: 61-64.

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: 78-84.

Shapira R, Ordentlich A, Chet I, Oppenheim AB (1989). Control of plant diseases by chitinase expressed from cloned DNA in E. coli. Phytopathology 79: 1246-1249.

Synowiecki J, Al-Khateeb N A (2003) Production, properties and some new application of chitin and its derivatives. Reviews Food Science and Nutrition 43: 145-171.

Zakir Sultan M, Ara Khatune N, Sultana Sathi Z, Shah Alam Bhuiyan MD, Golam Sadik M, Akteruzzaman Choudury M, Gafur MA, Abdur Rahman A (2002). In Vitro Antibacterial Activity of an Active Metabolite Isolated from Streptomyces Species. Biotechnology pp: 100-107.

Biological Control of Rhizocronia solani (Pistachio Isolate) and Molecular Analysis of Chitinase Gene from the Best Bio-Control Agent

Baharlouei A.[1], Sharifi-sirchi G.R.[*2]

[1] MSc Student, Department of Agricultural Biotechnology, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran

Abstract

Rhizoctonia solani, the causal agent of damping-off, root rot and stem rot, is one of the most important phytopathogenes with a wide host range which causes significant reduction in yield of pistachio (*Pistacia vera*). In search for finding chitinolytic biocontrol agents, actinomycetes producing chitinase enzyme were isolated from agricultural soils of Sirch, Kerman province . From tested isolates, Streptomyces isolate 410 significantly reduced the incidence of disease. Chitinase gene (603 bp) was cloned, sequenced and characterized from this isolate. The results showed that nucleotides encoding 200 amino acids and molecular weight of 21636.9 Da. This protein had the high homology with the family 19 chitinases glycosyl hydrolases which have the major role in the defense response against phytopathogens.

Keywords: *Biological control, Streptomyces, Chitinase, Rhizoctonia solani, Pistachio.*

[*]Corresponding Author: Sharifi-Sirchi G. Tel: 03413202638 Email: sharifi-sirchi@mail.uk.ac.ir