

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

اعظم بهارلویی¹، 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 خاک های 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 کیتیناز های خانواده 19 گلیکوزیل هیدرولازها که نقش اصلی را در ممانعت از رشد پاتوژن های گیاهی دارند، نشان داد.

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

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 ماهی‌ها را تشکیل می‌دهد (Synowiecki & Al-Khateeb, 2003). تعدادی از ژن‌های کیتیناز متعلق به گونه‌های 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 شده‌اند. هدف از انجام این تحقیق، استفاده از اکتینومیست‌های کیتینولایتیک جدا شده از خاک‌های کرمان در کنترل بیولوژیک قارچ *R. solani*، جدا شده از پسته در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای بر روی گیاه پسته (*Pistacia vera*) و نیز جداسازی، همسانه‌سازی و توالی‌یابی ژن کیتیناز از موثرترین عامل بیوکنترول می‌باشد.

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 کلئیدال، اکتینومیست‌ها به منظور تعیین فعالیت

مبارزه بیولوژیک با عوامل بیماری‌زای گیاهی، به ویژه پاتوژن‌های خاکزاد که بیشترین 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 بیماری‌زای خاک‌زی 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 می‌سازد (Elahinia, 1999). کنترل بیولوژیک این قارچ در برخی محصولات کشاورزی با استفاده از عوامل آنتاگونیست خاک‌زی انجام شده است (Rothrock *et al.*, 1984; Chi & Hanson, 1984; Sabaratnam & Traquir, 2002; Sadeghi *et al.*, 2006). از جمله‌ی این آنتاگونیست‌ها، اکتینومیست‌ها می‌باشند 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 باکتری‌ها که آنها را جهت کنترل برخی از عوامل خسارت‌زای گیاهی مناسب نموده است، ترشح آنزیم کیتیناز می‌باشد؛ به گونه‌ای که این باکتری‌ها تجزیه‌کننده اصلی کیتین و عامل برگرداندن این ماده سخت به چرخه طبیعت هستند (Deshpande, 1986). کیتین پلیمر پلی ساکاریدی بدون شاخه با اتصالات 1, 4- β از

اکتینومیستی در کنترل قارچ، طبق روش Shahidi Bonjar & Karimi (2004) بررسی گردید. مورفولوژی سطح اسپورها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نوع اسکیننگ⁵ 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 استریتومایسیسی 410 که طبق آزمایشات آنتی بیوگرام، دارای بیشترین اثر آنتاگونیستی روی قارچ بود.

2- قارچ *R. solani*

3- قارچ *R. solani* و جدایه استریتومایسیسی 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 استریتومایسیس 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 2-3 دقیقه، به مدت یک

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 PDA¹ 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 رشد² 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 (*Konishi et 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 موثر در شرایط آزمایشگاهی و دمای غیر فعال کننده ماده موثر بررسی شد (*Shahidi Bonjar & karimi*, 2004). جهت تشخیص میزان قطبیت ماده موثر، حلالیت عصاره خام در حلال‌های آلی (متانول، کلروفرم، استون، هگزان و آب مقطر) طبق روش *Mansouri et al* (2001) انجام شد. تعیین فعالیت قارچ‌کشی³ و یا قارچ ایستایی⁴ جدایه

¹ Potato Dextrose Agar

² Inhibition Zone

³ Fungicide

⁴ Fungistatic

⁵ Scanning

افزوده شد. رسوب DNA 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, از Bioneer, Korea خالص سازی گردید. همسانه سازی با استفاده از Ins T/A Clone™ PCR Product Cloning Kit, Fermentas, Lithuania) باکتری XL1Blue 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 پرگنه های سفید انجام شد. استخراج پلاسمید نو ترکیب با استفاده از کیت AccuPrep® Plasmid extraction Kit, Bioneer, Korea انجام شد. سپس هضم آنزیمی پلاسمید توسط آنزیم های برشی Pst1 و EcoRI صورت گرفت. پلاسمید های نو ترکیب 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

ساعت در دمای 55°C قرار داده شد. سپس $50\mu\text{l}$ از SDS (10 درصد) و $10\mu\text{l}$ از پروتئیناز K (200 mg ml^{-1}) اضافه و برای 10 دقیقه در دمای 65°C انکوبه شد. مقدار $200\mu\text{l}$ از NaCl پنج مولار به تیوب افزوده و پس از ورتکس به مدت 30 ثانیه، مقدار $150\mu\text{l}$ 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 می کند. پروتئین، کربوهیدرات و سایر ناخالصی ها در مایع رویی باقی می ماند. ترکیب اسید نوکلئیک-CTAB ایجاد شده توسط NaCl شکسته می شود. پس از سرد شدن محلول تا دمای 37°C ، هم حجم محلول فوق کلروفرم/ایزواکیل 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 مولکول های 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 می شود. 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 $200\mu\text{l}$ از بافر TE یا آب دو بار تقطیر به رسوب خشک شده

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 جدایه های استرپتومایسس را بین روزهای 7-11 بعد از مایه زنی عنوان کردند. در حالی که، در مورد جدایه های غیر استرپتومایسس بررسی شده توسط آنها، منحنی رشد، روال کاملاً متفاوتی را داشت. میانگین قطر هاله های 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 رایزوکتونمای گوجه، نشان داد که اثر پروپاگول های آنتاگونیست باگذشت زمان کاهش می یابد که با نتایج حاصل از این بررسی مطابقت می کند.

با فرمت الکتروگرام Chromas با استفاده از نرم افزار Chromas Version 1.41 مورد بررسی قرار گرفتند و سپس با توالی های موجود در بانک ژن در شبکه NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) مقایسه شدند. در ضمن آنالیز توالی ها 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 اکتینومیست های دارای فعالیت کیتینازی: از رقت های 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).

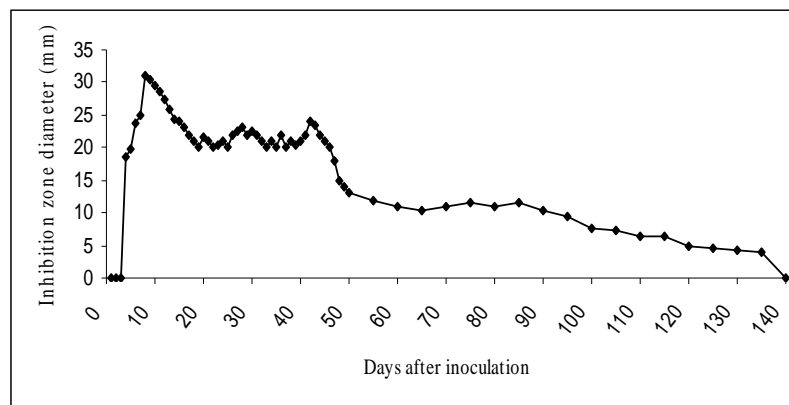
تعیین فعالیت ضد قارچی و منحنی تولید ماده مؤثر

فعالیت آنتاگونیستی جدایه ها با اندازه گیری قطر هاله ممانعت از رشد ارزیابی شد. از بین جدایه های دارای فعالیت کیتینازی، جدایه 410 بیشترین اثر آنتاگونیستی را علیه قارچ *R.*



شکل 1- فعالیت کیتینازی اکتینومیست‌های جدا شده از کشت خاک روی محیط حداقل کیتین آگار پس از ده روز انکوباسیون در 28°C ؛ الف، ب، ج، د، ه به ترتیب جدایه‌های استرپتومایسس 401، 400، 506، 403، 410 و جدایه 379 به 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 vitro condition.

بود و تحت تأثیر کلروفورم، ماده مؤثر آن نتوانست از رشد قارچ جلوگیری نماید. این موضوع موید مطالعه انجام شده توسط Davelos *et al.* (2004) روی بررسی ماده مؤثر تولید شده به وسیله

حساسیت به کلروفورم و تعیین حلالیت ماده مؤثر ضد قارچی در حلال‌های آلی ماده مؤثر جدایه استرپتومایسس 410 دارای فعالیت کیتینازی نسبت به کلروفورم حساس

رشد نبودند. نتایج حلالیت ماده مؤثر ضد قارچی جدایه 410 علیه قارچ نشان داد که ماهیت ماده مؤثر این جدایه شدیداً قطبی بوده و در حلال-های غیرقطبی غیر قابل حل می باشد (جدول 1).

استرپتومایسس ها است. در این مطالعه آنها نشان دادند که جدایه های فعالی که با ترشح آنزیم از رشد قارچ جلوگیری می کردند، پس از قرار گیری در معرض کلروفرم، ماهیت خود را از دست داده و قادر به کنترل قارچ و ایجاد هاله ممانعت از

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.

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 گونه های استرپتومایسس علیه چهار باکتری گرم مثبت و گرم منفی بین 32-64 mg ml⁻¹ به دست

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 1 mg ml⁻¹

اسپورها در گونه *S. niveus*، به صورت صاف گزارش شد. همچنین شکل زنجیره اسپور با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نوع اسکیننگ¹ در گونه‌های *S. vinaceus*، *S. hygrosopicus* و *S. griseus* به ترتیب به شکل فنری²، حلقوی³ و راست تا انعطاف‌پذیر⁴ 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.

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 استرپتومایسس 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 قارچ‌کشی می باشد.

تعیین مورفولوژی سطح اسپور

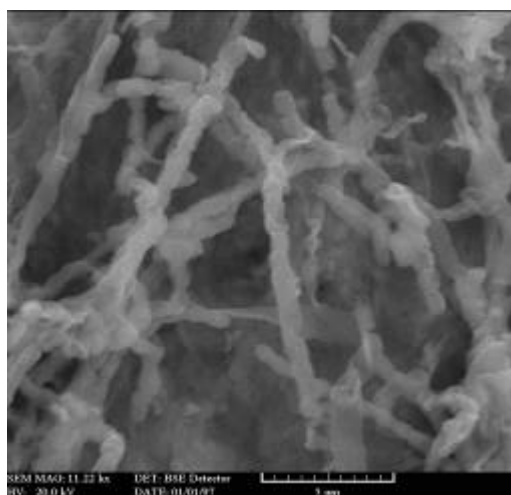
مورفولوژی میسلیوم و اسپور جدایه استرپتومایسس 410 زیر میکروسکوپ الکترونی در شکل 3 نشان داده شده است. همان طور که در شکل دیده می‌شود، شکل زنجیره اسپور به صورت راست تا انعطاف‌پذیر است. همچنین سطح اسپور به صورت صاف و مستطیلی شکل می باشد. در پژوهشی که به منظور شناسایی و رده بندی گونه‌های مختلف *Streptomyces* توسط Locci (1989) با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نوع اسکیننگ انجام شد، سطوح

¹ Scanning

² Spirales

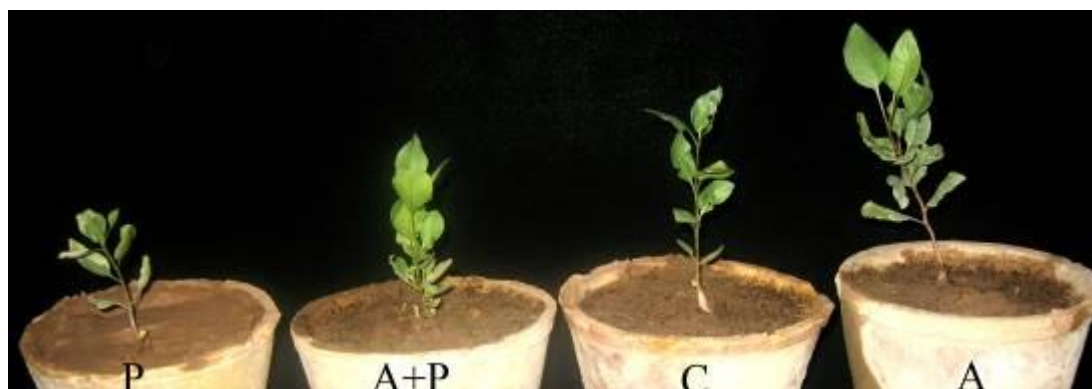
³ Rectinaculiaperti

⁴ Rectiflexibles



شکل 3- مورفولوژی میسلیم 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 می دهند، A+P: گیاهان تلقیح شده توأم با جدایه استرپتومایسس و پاتوژن؛ گیاهان در این تیمار فاقد علائم بیماری می باشند، 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 (C3HRB و C3HFB) 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 نو ترکیب، استخراج پلاسمید انجام شد. هضم آنزیمی پلاسمید توسط آنزیم های برشی *EcoRI* و *Pst1* صحت قطعه کلون شده را تأیید کرد.

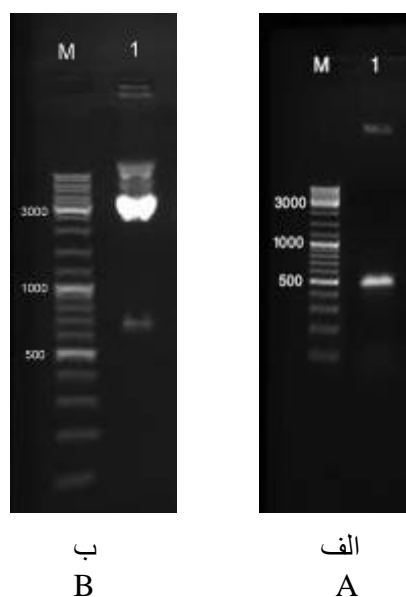
تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک

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

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

بررسی توالی ها و مقایسه آنها با توالی نوکلئوتیدی و اسید آمینه ای سایر ژن های 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* (strain J-13-3) توسط *Katsuichiro et al.* (2004) همسانه سازی شد.

نتایج تعیین توالی نشان داد که این ژن از 298 اسید آمینه تشکیل شده و پروتئینی با وزن مولکولی 31081 دالتون را کد می کند که شامل یک توالی سیگنال به طول 29 اسید آمینه و یک پروتئین به طول 269 اسید آمینه است. مقایسه توالی اسیدهای آمینه ژن مذکور با سایر کیتینازها نشان داد که کیتیناز J-13-3 متعلق به کیتینازهای خانواده 19 می باشد.



شکل 5- الف: ژن کیتیناز تکثیر شده با جفت آغازگر (C3HRB و C3HFB)؛ 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 (C3HRB و C3HFB) 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.

GAGGCCAGTTCAACCAGATGTTCCCGAACCAGGAACTCCTTCTACACCTACAGCGGCCTC60
 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
 CGCGAGGCGGCCGCTTCTCGCCAATGTCAGCCACGAGACGGGCGGCCTCGTCCACATC180
 A A F L A N V S H E T G G L V H I S G L
 AAGGAAGTCAACGAGGCAACTACCCCACTACTGCGACCGGAACCAGCCCTACGGCTGC240
 K E V N E A N Y P H Y C D R N Q P Y G C
 CCGGCCGGCCAGGCCGCTACTACGGGCGCGGCCCATCCAGCTCAGCTGGAACCTCAAC300
 P A G Q A A Y Y G R G P I Q L S W N F N
 TACAAGGCCCGGGGACGCCCTCGGCATCGACCTGCTGAACAACCCCTACCTGGTCGAG360
 Y K A A G D A L G I D L L N N P Y L V E
 CAGAACGCTCCGCTCGCCTGGCGGACCGCCTGTGTTACTGGAACACCCAGTCCGGCCCC420
 Q N A S V A W R T G L W Y W N T Q S G P
 GGCACCATGACCCCGCACAAACGCCATAGTCAACAACCGCGGCTTCGGCGAGACCATCCGC480
 G T M T P H N A I V N N R G F G E T I R
 TCGATCAACGGCTCGATCGAGTGCAACGGCGGCAACCCGGCCCAGGTGCAAGGCCGGATC540
 S I N G S I E C N G G N P A Q V Q S R I
 CGACAAGTTACCTCCTTCGCACAGATCCTCGGCACCACCGGTTCCAACCTGTACTGC600
 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.

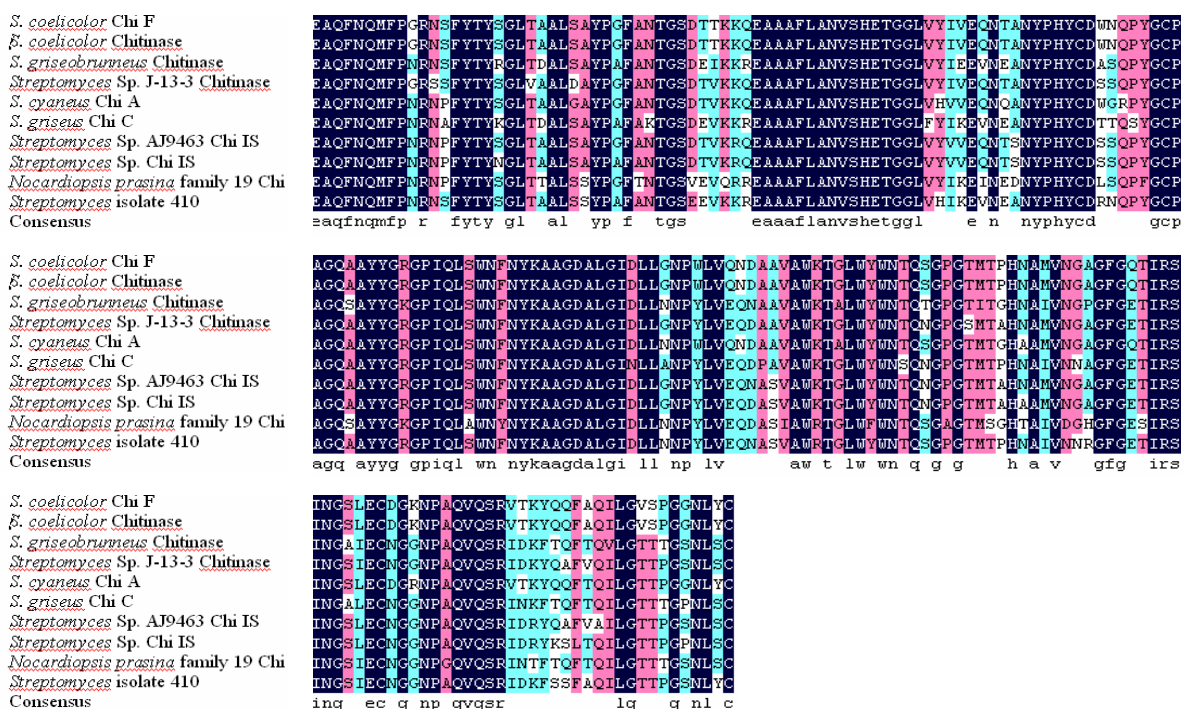
<i>S. coelicolor</i> Chi F	100%
<i>S. coelicolor</i> Chitinase	100.0% 100%
<i>S. griseobrunneus</i> Chitinase	79.5% 79.5% 100%
<i>Streptomyces</i> Sp. J-13-3 Chitinase	88.0% 88.0% 84.0% 100%
<i>S. cyaneus</i> Chi A	91.5% 91.5% 80.0% 85.0% 100%
<i>S. griseus</i> Chi C	80.0% 80.0% 87.0% 82.5% 79.0% 100%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

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.

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 پرموتر CaMV 35S به برنج منتقل شد و برنج‌های 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. پژوهش‌های نشان داده که کیتینازهای متعلق به این خانواده، نقش اصلی را در ممانعت از رشد پاتوژن‌های گیاهی

- 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 *Fusarium solani* 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 Biotechnolog 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 Streptomyces 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 Microbiology 48: 407-417.
- Locci R (1989). Streptomyces 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, Watanabe 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, Hessian 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 *Rhizoctonia 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