فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال اول، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۱، صفحه ۱- ۲۲
تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۶/۲۲ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۰/۰۹

جداسازی و غربال‌گری اکتینومیست‌های مولد فیتوتوکسین و بررسی طیف اثر فیتوتوکسین سویه‌های منتخب

ریحان خیاط ماهر: دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه تهران، ایران، reihan65@yahoo.com**
محمد علی آموزگار: دانشیار میکروبیولوژی، دانشگاه تهران، ایران، amoozegar@ut.ac.ir* **
شیما سادات سید مهدی: کارشناس ارشد میکروبیولوژی، مرکز ملی ذخائر ژنتیکی و زیستی ایران، تهران، ایران، sh.seyedmahdi@gmail.com
جواد حامدی: دانشیار میکروبیولوژی، دانشگاه تهران، ایران، jhamedi@ut.ac.ir
محمدرضا نقوی: استاد ژنتیک مولکولی گیاهی، دانشگاه تهران، ایران، mnaghavi@ut.ac.ir
فرانک فروزان فر: دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه تهران، ایران، faranak_microb83@yahoo.com
علی محمد لطیفی: استادیار میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله، تهران، ایران، amlatify@yahoo.com***

چکیده

مقدمه: در بین میکروارگانیسم‌های تولیدکننده علف‌کش‌های زیستی، اکتینومیست‌ها از مهم‌ترین میکروارگانیسم‌های مولد هستند. علف‌کش‌های میکروبی برخلاف مواد شیمیایی، مشکلات زیست محیطی ایجاد نمی‌کنند، به همین دلیل امروزه به استفاده از آن‌ها توجه زیادی می‌شود.

مواد و روش‌ها: ۴۰ نمونه سویه‌های اکتینومیستی از ریزوسفر و فیلوسفر گیاهان جدا شدند. غربال‌گری نخستین روی محیط GAP به‌وسیله دو بذر شاهی و تربچه انجام شد. سویه‌هایی که بالای ۷۰ درصد اثر مهاری نشان دادند، انتخاب و سوپرناتانت حاصل از رشد آن‌ها در دو محیط مایع GPM و SCD سنجش زیستی شد. سپس استخراج فیتوتوکسین با حلال‌های آلی انجام شد. میزان تولید، قدرت مهارکنندگی عصاره برای ۶ سویه برتر و زمان بهینه تولید و طیف اثر فیتوتوکسین سه سویه برتر از این ۶ سویه، با استفاده از ۱۰ گیاه علف هرز بررسی شد.

نتایج: از بین ۴۵۷ جدایه، ۱۱ سویه مهار بالای ۷۰ درصد نشان دادند. همه این سویه‌ها به جنس *Streptomyces* متعلق بودند. ۳ سویه PM2-2، TM14-5 و KB2-2 برای بررسی طیف اثر فیتوتوکسین انتخاب شدند. سویه PM2-2 از لحاظ زمان تولید، قدرت مهارکنندگی و طیف اثر نسبت به سایر سویه‌ها برتری داشت.

بحث و نتیجه‌گیری: اعضای جنس *Streptomyces*، تولیدکننده‌های بسیار مناسبی برای تولید فیتوتوکسین‌ها به‌شمار می‌روند. تنها فیتوتوکسین‌هایی که به‌طور مستقیم به مرحله تجاری شدن رسیده‌اند توسط اعضای این جنس تولید می‌شوند. مهار رشد بیشتر بذرهای گیاهان مورد آزمون توسط سویه‌های جدا شده در این پژوهش، نشان از توانمندی بسیار بالای فیتوتوکسین آن‌ها دارد. فیتوتوکسین برخی از سویه‌های این پژوهش مانند بیشتر فیتوتوکسین‌های تجاری قدرت مهارکنندگی بالا و طیف اثر وسیعی دارند که باعث می‌شود استفاده از آن‌ها از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه باشد.

واژه‌های کلیدی: اکتینومیست، فیتوتوکسین، علف هرز، طیف اثر

---

* نویسنده مسؤول مکاتبات
** آزمایشگاه اکستریموفیل، بخش میکروبیولوژی، دانشکده زیست شناسی و قطب تبارزایی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، ایران
*** مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی و محیط زیست

مقدمه

در حدود ۳۰۰۰۰ نوع علف هرز در سراسر جهان پراکنده اند. سالانه نزدیک به ۹/۷ درصد از کل تولیدات کشاورزی به‌وسیله ۱۸۰۰ نوع از علف‌های هرز از دست می رود (۱). تمامی مردم حق دسترسی به مقادیر کافی غذای با کیفیت را دارند و برای پاسخگویی به این نیاز روز افزون برای غذا، تولیدات سالانه محصولات کشاورزی باید افزایش یابد (۲). با وجود پیشرفت‌های فناورانه انجام شده از دهه ۱۹۴۰، مشکلات آفات (علف‌های هرز، حشرات و بیماری‌زاهای گیاهی) در اکوسیستم ادامه دارد. مواد شیمیایی مصنوعی نقش چشمگیری در افزایش تولید محصولات کشاورزی از طریق مهار آفات دارند (۲).

به علت نگرانی‌های زیست محیطی حاصل از استفاده از علف‌کش‌های شیمیایی و افزایش مداوم تعداد علف‌های مقاوم شده به یک یا چندین علف‌کش، نیاز به توسعه‌ی علف‌کش‌های جدید وجود دارد. ویژگی این علف کش‌های جدید، نیمه عمر کمابیش کوتاه، غیرسمی برای ارگانیسم‌های غیر هدف و دارای ساختارهای شیمیایی مناسب برای عمل بر روی جایگاه‌های مولکولی است که هدف علف‌کش‌های تجاری کنونی و یا قدیمی نبوده‌اند (۳). در حدود ۴۰ سال پیش استفاده از از بیماری‌زاهای گیاهی و ترکیبات آللوشیمیایی حاصل از بیماری‌زاها و سایر میکروارگانیسم‌ها به عنوان عوامل کنترل زیستی علف‌های هرز (علف‌کش‌های زیستی) آغاز شده است. از آن زمان تاکنون، تعداد بسیاری از بیماری‌زاهای گیاهی (باکتری‌ها و قارچ‌ها) و ترکیبات آللوشیمیایی میکروبی جداسازی، شناسایی و از نظر توانایی علف‌کشی ارزیابی شده اند (۳). علف‌کش‌های زیستی می‌توانند به‌طور ویژه بر روی میزبان‌های خاص و یا غیراختصاصی عمل کنند. مانند برخی از بیماری‌زاهای قارچی که به‌طور اختصاصی بر روی میزبان خاصی اثر می‌گذارند. اما بیشتر این ترکیبات طبیعی طیف اثر وسیعی دارند که استفاده از آن‌ها از لحاظ اقتصادی به‌صرفه‌تر است؛ زیرا، در بیشتر زمین‌های کشاورزی چندین نوع علف هرز با هم حضور دارند که باعث از بین رفتن مقادیر بالایی از محصولات کشاورزی می‌شوند (۴).

میکروارگانیسم‌های خاک به‌طور ویژه، قادر به تولید ترکیباتی هستند که برای گیاهان عالی‌تر سمی‌اند (۵). یک گروه از این میکروارگانیسم‌ها، اکتینومیست‌ها به‌ویژه استرپتومیست‌ها هستند که قادرند تعداد زیادی ترکیبات خارج سلولی فعال تولید کنند که توانایی علف‌کشی بسیاری از این ترکیبات مثل بیالفوس[۱]، آنیزومایسین[۲]، هربیسیدین B[۳]، هربیسیدین A[۴] به اثبات رسیده است (۶). فیتوتوکسین‌های بسیاری تاکنون کشف شده‌اند که تعداد بسیار کمی از آن‌ها تجاری شده‌اند؛ بیالفوس و فسفینوتریسین[۵] تنها علف‌کش‌هایی هستند که به طور مستقیم به تولید تجاری رسیده‌اند (۴).

امکان کشف آنتی‌بیوتیک‌های جدید (شامل علف‌کش‌ها) هنوز به شکل نامحدودی وجود دارد و با توجه به کاربرد متابولیت‌های ثانویه برای منافع بشر، تاکنون تنها بخش کوچکی از آن شناخته شده است (۷).

هدف از این پژوهش، یافتن اکتینومایست‌هایی با توان تولید متابولیت‌های علف‌کش است تا بتوان از آن‌ها در کنترل زیستی علف‌های هرز استفاده کرده و آن‌ها را جایگزین احتمالی علف‌کش‌های شیمیایی نمود.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش، مواد مولکولی از شرکت فرمنتاز[۶] و

سایر مواد از شرکت مرک[۷] تهیه شدند. بذر تربچه از شرکت ویکیماسید[۸] دانمارک، بذر خیار از شرکت پتوسید[۹] ایالت متحده آمریکا و بذر شاهی تهیه و استفاده شدند.

جمع‌آوری نمونه‌ها

۴۰ نمونه ریزوسفر (نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده از اطراف ریشه گیاه، در صورت امکان از عمق ۲۰ سانتی‌متری) و فیلوسفر گیاهان از مناطق مختلف ایران شامل کرج، کاشان، جمکران، لوشان، داماش، لاهیجان و قزوین به شکل غیراستریل جمع‌آوری شد.

تیمار نمونه‌ها برای جداسازی اکتینومیست‌ها

نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه به پلیت شیشه‌ای منتقل و در هوای آزاد به مدت یک هفته قرارداده شده تا خشک شوند. سپس، نمونه‌های خاک با استفاده از هاون چینی ساییده و الک شدند. در ادامه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد تیمار شدند. نمونه‌های فیلوسفر پس از خشک و ساییده شدن با استفاده از پرتو UV (۲۸۰ تا ۳۱۵ نانومتر) به مدت ۱۰ دقیقه تیمار شدند.

جداسازی و خالص کردن اکتینومسیت‌ها

برای این منظور، رقت‌های 10^{-3} و 10^{-4} نمونه‌ها تهیه شد. ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت به دو محیط آرژینین- گلیسرول- سالت آگار[۱۰] (AGS) و گلوکز- آسپاراژین- دی پتاسیم فسفات[۱۱] (GAP) منتقل و با استفاده از میله L شکل در داخل پلیت پخش شد (۸ و ۹). پلیت‌ها به مدت یک تا دو هفته در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. کلونی‌های اکتینومیست با استفاده از ویژگی‌های ظاهری مشخص و شناسایی شدند. هر کلونی به منظور خالص‌سازی به پلیت حاوی محیط ISP2 منتقل و به روش خطی کشت داده شد. تجدید کشت تا زمان اطمینان از خالص بودن سویه انجام شد (۱۰).

بذرهای شاخص و چگونگی استریل کردن بذرها

بذرهای گیاه برای سنجش زیستی اکتینومیست‌های مولد فیتوتوکسین استفاده می‌شوند. از میان بذرهای شاخص در این زمینه، دو بذر شاهی و تربچه برای غربال‌گری نخستین و دومین و سه بذر شاهی، تربچه و خیار برای سنجش زیستی ترکیب استخراج شده از محیط مایع با استفاده از حلال آلی، به کار برده شدند. این بذرها در مدت کوتاهی جوانه می‌زنند و شرایط رشد آن‌ها در آزمایشگاه آسان است. به همین دلیل برای انجام مراحل غربال‌گری استفاده می‌شوند. به منظور استریل کردن بذرهای شاهی و تربچه از روش تغییر یافته یانگ لب[۱۲] (۱۱) استفاده شد. به این شکل که بذرها در ویال ۱/۵ میلی‌لیتری تا حجم ۲۵ درصد ویال ریخته شدند. یک میلی‌لیتر از محلول اتانول ۷۰ درصد به اضافه تریتون ۰/۱X درصد[۱۳] اضافه شده و به مدت ۸ دقیقه ورتکس شدند. سپس، محلول تا جای ممکن خالی شده، یک میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد اضافه و ۳۰ ثانیه ورتکس انجام شد. این مرحله دو مرتبه تکرار شد. در پایان بذرها در داخل پلیت حاوی کاغذ صافی استریل ریخته شده، در زیر هود قرار گرفت تا خشک شوند.

نخستین مرحله غربال‌گری اکتینومیست‌های مولد فیتوتوکسین

برای انجام سنجش زیستی سویه‌ها در مرحله غربال‌گری نخستین، سویه‌ها به روش کشت نواری[۱۴] بر روی محیط گلوکز- آسپاراژین- دی پتاسیم فسفات آگار سنجش زیستی شدند (۹ و ۱۲). به این شکل که سویه‌های مورد نظر به شکل یک باند دو سانتی‌متری در میانه پلیت حاوی محیط GAP کشت داده شدند. پس از

دو هفته گرماگذاری در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد، بذرهای شاخص (شاهی و تربچه) استریل در دو طرف باند کشت قرار داده شدند و پس از چهار روز گرماگذاری در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد میزان رشد بذرها با کنترل (بذرهای رشد کرده در محیط GAP بدون تلقیح) مقایسه شد. سپس، برای سویه‌هایی که قادر بودند رشد بذرها را در مقایسه با کنترل ۷۰ درصد یا بالاتر کاهش دهند تکرار گذاشته و در صورت مشاهده مهار، سویه‌های مورد نظر برای غربال‌گری دومین به محیط کشت مایع برده شدند. نحوه محاسبه درصد مهار رشد بذرها به این شکل است:

$$\text{درصد مهار رشد بذر} = 100 - \left(\frac{\text{میانگین رشد بذرها}}{\text{میانگین رشد بذرها در کنترل}} \times 100\right)$$

دومین مرحله غربال‌گری اکتینومیست‌های مولد فیتوتوکسین (بررسی تولید در محیط کشت مایع)

در این مرحله از دو محیط مایع GPM (گلوکز- پپتون- ملاس[۱۵]) و SCD (آرد سویا- شیرابه ذرت- دکسترین[۱۶]) در سه تکرار استفاده شد (۱۳). به این شکل که یک کلونی متوسط رشد کرده از محیط ISP2 به لوله آزمایش حاوی دو میلی‌لیتر آب مقطر استریل، منتقل و با استفاده از میله شیشه‌ای و ورتکس قطعه قطعه شد. یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون تهیه شده به فلاسک ۱۰۰ میلی‌لیتر (حاوی ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت مایع مورد نظر) برای پیش کشت منتقل و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۸۰ rpm همزده شد. در ادامه از ارلن مذکور به فلاسک ۲۵۰ میلی‌لیتر (حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع مورد نظر) به نسبت ۱:۲۰ تلقیح انجام شد و به مدت ۷ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۸۰ rpm همزده شد. سپس جدا کردن سلول‌ها از محیط کشت مایع با سانتریفوژ (۲۰ دقیقه، ۴۵۰۰ rpm) و دو بار صاف کردن در شرایط کاملاً استریل انجام شد. پنج میلی‌لیتر از مایع رویی صاف شده با ۱۰ میلی‌لیتر آب آگار ۱/۵ درصد (نسبت ۲:۱) مخلوط و در داخل پلیت شیشه‌ای استریل ریخته شد. پس از بسته شدن محیط، بذرهای استریل (شاهی و تربچه) بر روی محیط حاصل قرار داده شده (از هر بذر ۶ عدد) و به مدت چهار روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. پس از طی زمان ذکر شده میزان رشد بذرها (ریشه‌چه و ساقه‌چه) با کنترل (محیط کشت مایع تلقیح نشده که مراحل قبل روی آن به طور مشابه انجام شده است) مقایسه و درصد مهار بذرها محاسبه شد.

استخراج و سنجش زیستی فیتوتوکسین

پس از ۷ روز رشد سویه در محیط مایع SCD و یا GPM (۲۸ درجه سانتی‌گراد و ۱۸۰ rpm)، مایع تخمیر[۱۷] با استفاده از سانتریفوژ در دور ۴۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه جدا شد. مایع تخمیر با حلال آلی به میزان دو برابر حجم مایع تخمیر (v/v ۱:۲) به مدت ۶۰ دقیقه مخلوط شد. فاز آلی از فاز آبی با کمک دکانتور جدا شد. فاز آلی حاوی ترکیب استخراج شده به دستگاه روتاری اواپریتور[۱۸] منتقل و در دمای بالای ۳۰ درجه سانتی‌گراد حلال تبخیر شد. باقیمانده در ۲/۵ میلی‌لیتر حلال آلی حل شده، محلول روی فیلتر کاغذی قرار داده شده و در پلیت ریخته شد. پس از تبخیر حلال، فیلتر با ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر مرطوب شد. در ادامه، برای سنجش زیستی ترکیب استخراج شده، بذرها (شاهی، تربچه و خیار) بر روی فیلتر گذاشته شده و به مدت چهار روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. پس از طی زمان ذکر شده میزان رشد بذرها (ریشه‌چه و ساقه‌چه) با کنترل مقایسه و درصد مهار بذرها محاسبه

شد. در این مرحله از سه حلال آلی عمومی دی کلرومتان، اتیل استات و کلروفرم استفاده شد. در ابتدا استخراج با استفاده از حلال دی‌کلرومتان انجام شد و در صورت مشاهده نشدن مهار که گویای عدم استخراج ترکیب فیتوتوکسین با حلال آلی است، آزمایش با استفاده از دو حلال اتیل‌استات و کلروفرم تکرار شد.

شناسایی سویه‌های اکتینومیست مولد فیتوتوکسین

برای بررسی صفات ریخت‌شناسی، از محیط‌های کشت توصیه شده توسط شرلینگ[۱۹] و گوتلیب[۲۰]، شامل: ISP2 (عصاره مخمر- عصاره مالت آگار)، ISP3 (اوتمیل[۲۱] آگار)، ISP4 (نمک‌های معدنی- نشاسته آگار)، ISP5 (گلیسرول- آسپاراژین آگار) استفاده شد (۱۴). رنگ میسلیوم هوایی بالغ حاوی اسپور و رنگ میسلیوم رویشی (رنگ پشت کلونی) براساس ۷ رنگ اصلی ذکر شده توسط ترسنر[۲۲] و باکوس[۲۳] (۱۵) به همان شکلی که توسط شرلینگ و گوتلیب عنوان شده است و با استفاده از سیستم استاندارد تعیین رنگ (۱۶) ISCC-NBS تعیین شد. همچنین، تولید پیگمان‌های محلول (به غیر از پیگمان‌های ملانوئیدی) در چهار محیط مذکور بررسی شد.

به منظور بررسی ریخت‌شناسی میکروسکوپی و بررسی آرایش زنجیره‌های اسپوری از روش کشت لام مایل[۲۴] استفاده شد (۱۷). برای این منظور، محیط کشت ISP2 حاوی دو گرم بر لیتر کربنات کلسیم تهیه و پس از استریل کردن در پلیت ریخته شد. قبل از بستن کامل محیط، لام‌های استریل به شکل مورب در محیط فرو برده شدند. پس از بستن کامل محیط، باکتری در نزدیکی سطح مایل لام (سطح تماس لام با محیط کشت) کشت داده شده و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. لام‌ها در روزهای متفاوت با استفاده از پنس استریل از محیط خارج شده و با میکروسکوپ فاز کنتراست با بزرگنمایی ۱۰۰۰ برابر مشاهده شدند.

توانایی تولید پیگمان ملانوئیدی بعد از گذشت دو و چهار روز از گرماگذاری روی محیط‌های ISP6 (پپتون- عصاره مخمر- آهن آگار) و ISP7 (تیروزین آگار) در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد بررسی شد (۱۸).

برای بررسی محدوده رشد سویه‌ها در حضور غلظت‌های مختلف سدیم‌کلرید از محیط بنت آگار[۲۵] اصلاح شده با اسیدیته۷ (گلیسرول دو گرم بر لیتر، عصاره مالت یک گرم بر لیتر، عصاره مخمر یک گرم بر لیتر، پپتون دو گرم بر لیتر، آگار ۲۰ گرم بر لیتر) استفاده شد. رشد سویه‌ها در غلظت‌های مختلف سدیم‌کلرید ۱۵، ۱۲/۵، ۱۰، ۷/۵، ۵، ۳ و صفر درصد بعد از ۷ و ۱۴ روز بررسی شد (۱۸).

به منظور تعیین ترادف rRNA ۱۶S سویه‌های اکتینومیست منتخب، ابتدا سویه‌ها در محیط ISP2 براث کشت داده شده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در همزن[۲۶] با دور ۲۲۰ rpm گرماگذاری شدند (۱۵). پنج میلی‌لیتر از محیط‌های کشت مایع به لوله‌های فالکون استریل منتقل و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد در rpm ۴۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. زیتوده‌های[۲۷] سلولی به دست آمده به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری استریل منتقل و دو بار با آب دیونیزه شسته شدند. در مرحله بعد، برای استخراج DNA تام سویه‌های اکتینومیستی منتخب از روش رسوب با نمک[۲۸] برای استخراج DNA ژنومی استفاده شدند (۱۹). در نهایت توالی rRNA ۱۶S اکتینومیست‌ها با استفاده از جفت پرایمرهای 27F-1492R و 10F-1500R تکثیر و تعیین ترادف شدند (۲۰). برنامه دمایی PCR برای هر جفت از پرایمرها به شرح زیر بود:

– 27F- 1492R: واسرشتی[۲۹] اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه انجام شد. چرخه تکثیر شامل ۳۵ سیکل تکرار شونده با دمای واسرشتی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، دماهای اتصال ۵۵/۵، ۵۷/۵ و ۵۹/۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و دمای ساخت ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و ۳۰ ثانیه بود. پس از اتمام چرخه‌ها و به منظور تکمیل نهایی ساختار DNA های تکثیر شده، نمونه‌ها به مدت پنج دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

– 10F- 1500R: واسرشتی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. چرخه تکثیر شامل ۳۰ سیکل تکرار شونده با دمای واسرشتی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، دمای‌های اتصال ۵۶، ۵۸ و ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و دمای ساخت ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه بود. پس از اتمام چرخه‌ها و به منظور تکمیل نهایی ساختار DNA های تکثیر شده، نمونه‌ها به مدت پنج دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

میزان تولید فیتوتوکسین‌ها و قدرت مهارکنندگی آن‌ها

در این مرحله ۶ سویه KB2-21، Li7-8، TM14-5، PM2-10، PM2-2، PM2-B برای تولید فیتوتوکسین در محیط مایع SCD کشت داده شدند. سپس، عصاره هر ۶ سویه با روش استخراج با حلال آلی (دی-کلرومتان) گرفته شد. وزن خشک عصاره‌ها محاسبه شد. در ادامه رقت‌های ۱، ۱/۲، ۱/۴ و ۱/۸ از عصاره‌ها تهیه شد و بر روی بذرهای خیار، شاهی و تربچه اثر داده شد تا قدرت مهارکنندگی عصاره‌ها مشخص شود.

زمان بهینه تولید

از سویه‌ها طبق روش ذکر شده، پیش‌کشت ۴۸ ساعته تهیه شد و به محیط مایع تولید SCD (۲۵۰ میلی‌لیتر در ارلن یک لیتری) تلقیح شد. محیط‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۸۰ rpm قرار گرفتند. در روزهای سوم، پنجم، هفتم و نهم از ارلن‌ها نمونه‌برداری انجام شد (هر بار ۵۰ میلی‌لیتر از هر ارلن) و با روش گفته شده استخراج با حلال انجام شد. عصاره به‌دست آمده خشک و وزن آن محاسبه شد. سپس عصاره‌ها بر روی بذرهای خیار، شاهی و تربچه اثر داده، پس از چهار روز گرماگذاری در ۲۸ درجه سانتی‌گراد درصد جوانه‌زنی در مقایسه با کنترل بررسی شد. آزمایش‌ها با سه بار تکرار انجام شد (۲۱).

بررسی طیف اثر

برای بررسی طیف اثر فیتوتوکسین سویه‌هایی که با توجه به نتایج مراحل قبلی انتخاب شده بودند (KB2-21، PM2-7، TM14-5)، عصاره به‌دست آمده از آن‌ها بر روی بذرهای زیر اثر داده شد

شقایق، قاصدک[۳۰]، چغلونه[۳۱]، *Draba melanopus*، عروسک پشت پرده[۳۲]، تاج خروس قرمز[۳۳]، جو سرارود[۳۴]، خاکشیر شیرین[۳۵]، شب بوی آفریقایی[۳۶]، بومادران[۳۷] و *Adoropus litoraodis*.

این گیاهان همگی از علف‌های هرز مقاوم محسوب می‌شوند و در بین آن‌ها، هم گیاه تک لپه و هم دولپه وجود دارد. همه بذرها با استفاده از روش تغییر یافته یانگ لب، استریل شدند. عصاره فیتوتوکسین سویه‌ها در ۲/۵ میلی‌لیتر حلال دی‌کلرومتان حل شد و در پلیت‌های شیشه‌ای بر روی کاغذ صافی ریخته شد. پس از خشک شدن حلال ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر به کاغذهای صافی اضافه شد و بذرها بر روی آن‌ها قرار گرفت. در پلیت شاهد همه مراحل یکسان است اما فیتوتوکسین وجود

ندارد. بیشتر این بذرها در دماهای بین ۱۵ تا ۲۰ درجه سانتی‌گراد قادر به رشد بودند. بنابراین، همه پلیت‌ها در دمای ۱۷ درجه سانتی‌گراد به مدت دو هفته قرار گرفتند. از هر گیاه ۶ بذر در هر پلیت قرار گرفت و برای هر گیاه سه پلیت استفاده شد (۱۸ بذر از هر گیاه). پس از دو هفته درصد جوانه‌زنی بذرها در مقایسه با کنترل اندازه‌گیری شد. این آزمایش یک بار دیگر نیز تکرار شد. نتایج بدست آمده به روش آزمایش فاکتوریل (شامل دو فاکتور سویه و گیاه) توسط نرم‌افزار MSTATC تجزیه و تحلیل آماری شدند.

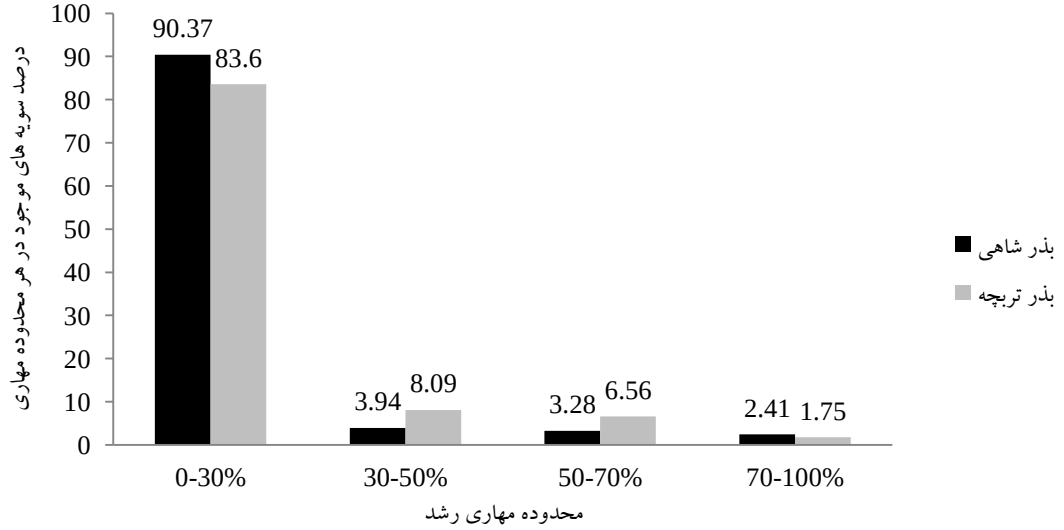
نتایج

نخستین مرحله غربال‌گری اکتینومیست‌های مولد فیتوتوکسین

از نمونه‌های کار شده ۷۲۴ جدایه اکتینومیست به دست آمد. با کنار گذاشتن جدایه‌های مشابه در هر نمونه در نهایت ۴۵۷ سویه انتخاب و بر روی محیط GAP آگار به روش کشت نواری غربال‌گری اولیه شدند (۱۲).

شکل ۱، درصد سویه‌های اکتینومیست سنجش شده در طی غربال‌گری نخستین را نشان می‌دهد. رشد بذرها در محدوده‌های بین صفر تا ۳۰ درصد، ۳۰ تا ۵۰ درصد، ۵۰ تا ۷۰ درصد و ۷۰ تا ۱۰۰ درصد نسبت به کنترل مهار شده اند. همان‌طور که در نمودار مشاهده می‌شود، از سویه‌های اکتینومیست سنجش شده تنها ۲/۴ درصد رشد بذر شاهی و ۱/۷ درصد رشد بذر تربچه را بیش از ۷۰ درصد مهار کرده اند.

۱۱ سویه برتر اکتینومیست که در غربال‌گری نخستین مهار ۷۰ درصد یا بیشتر را در مقایسه با کنترل نشان دادند عبارت بودند از: AJ-30، TM14-5، PM2-10، PM2-2، PM2-B، KB2-21، Li7-8، Lo14-7، Lo14-1، CH7-4 و Lo14-5. در جدول ۱ میزان مهار مشاهده شده در هر بذر به تفکیک میزان مهار رشد ریشه‌چه و رشد ساقه‌چه در مقایسه با کنترل آمده است. هر ۱۱ سویه رشد بذر شاهی را بیش از ۷۰ درصد در مقایسه با کنترل مهار کردند درحالی‌که ۸ سویه رشد بذر تربچه را بیش از ۷۰ درصد مهار کردند.



شکل ۱- نمودار درصد سویه‌های اکتینومیست سنجش شده موجود در هر محدوده مهاری رشد بذرها

بر اساس نتایج گرفته شده، می‌توان گفت بذر شاهی نسبت به بذر تربچه حساسیت بالاتری دارد و تعداد زیادی از سویه‌های غربال‌گری شده بذر شاهی را به طور چشمگیری مهار کردند. در مورد هر دو بذر، در بیشتر موارد رشد ریشه‌چه نسبت به ساقه‌چه، بیشتر مهار شده است.

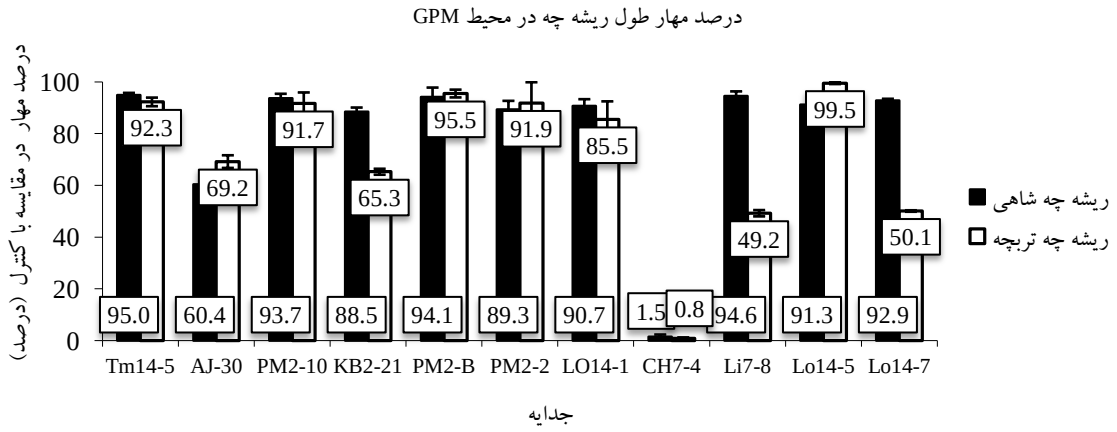
جدول ۱- درصد مهار رشد بذرها در مقایسه با کنترل در ۱۱ سویه برترغربال‌گری نخسین

سویه	درصد مهار رشد بذرها در مقایسه با کنترل(درصد) در محیط GAP			
	تربچه		شاهی	
	ساقه چه	ریشه‌چه	ساقه‌چه	ریشه‌چه
AJ-30	۷۲/۰	۸۶/۴	۹۷/۰	۸۹/۸
Tm14-5	۷۲/۷	۸۸/۹	۶۶/۷	۹۱/۷
PM2-10	۷۷/۷	۸۴/۳	۹۴/۳	۷۷/۳
PM2-2	۱۲/۸	۴۱/۹	۹۴/۳	۷۷/۳
PM2-B	۶۱/۷	۶۸/۹	۱۰۰/۰	۱۰۰/۰
KB2-21	۷۰/۱	۸۱/۴	۱۰۰/۰	۱۰۰/۰
Li7-8	۲۸/۳	۷۰/۷	۹۵/۳	۹۵/۸
Lo14-5	۶۵/۳	۸۷/۹	۸۹/۷	۹۳/۵
CH7-4	۳/۵	۷۸/۷	۸۶/۳	۹۳/۸
Lo14-1	۸۵/۰	۹۴/۷	۹۰/۶	۹۶/۱
Lo14-7	۲۲/۹	۶۶/۷	۹۹/۴	۹۹/۴

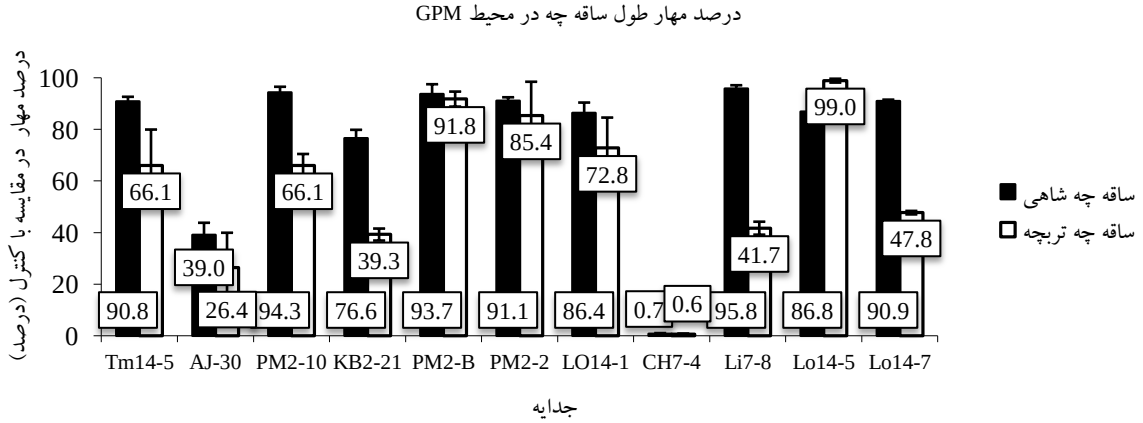
دومین مرحله غربال‌گری اکتینومیست‌های مولد فیتوتوکسین

تولید فیتوتوکسین ۱۱ سویه منتخب غربال‌گری نخستین، در محیط‌های مایع SCD و GPM برای غربال‌گری دومین ارزیابی شد.

در محیط GPM سویه CH7-4 قادر به تولید فیتوتوکسین در محیط مایع نبود و کمترین درصد مهار را داشت. سویه AJ-30 نیز در مقایسه با دیگر سویه‌ها تولید خوبی نداشت. اما سایر سویه‌ها درصد بالایی از مهار را در مقایسه با کنترل نشان دادند. در محیط SCD کمترین درصد مهار را سویه CH7-4 نشان داد و سایر سویه‌ها درصد بالایی از مهار را در مقایسه با کنترل نشان دادند. سویه‌های AJ-30، PM2-10، KB2-21، PM2-B، PM2-2، Li7-8 و Lo14-7 در محیط SCD تولید بالاتری را نشان دادند. این در حالی است که مهار رشد مشاهده شده در سنجش زیستی سوپرناتانت حاصل از رشد سویه TM14-5 در هر دو محیط GPM و SCD کمابیش یکسان بود. سویه Lo14-1 در محیط GPM تولید بالاتری داشت. سویه Lo14-5 رشد بذر شاهی را در هر دو محیط کمابیش یکسان، اما رشد بذر تربچه را در محیط GPM به طور درخور توجهی بیشتر مهار کرد. در شکل‌های ۲ و ۳ به ترتیب، اثر سوپرناتانت کشت سویه‌های منتخب در محیط مایع GPM بر رشد ریشه‌چه و ساقه‌چه بذرهای شاهی و تربچه در مقایسه با کنترل (محیط مایع GPM بدون تلقیح) نشان داده شده است.

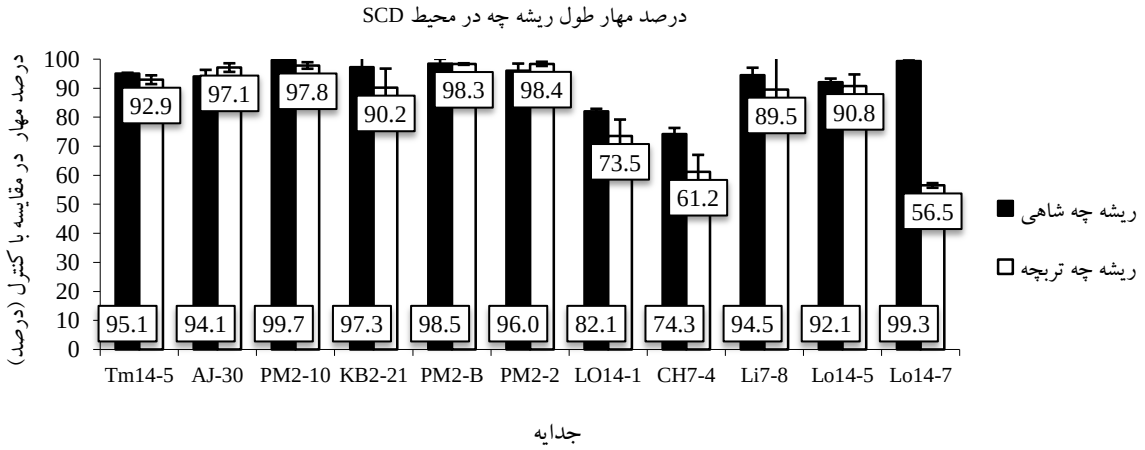


شکل۲- نمودار اثر سوپرناتانت کشت سویه‌های منتخب در محیط مایع GPM بر رشد ریشه چه بذرهای شاهی و تربچه در مقایسه با کنترل (محیط مایع GPM بدون تلقیح). رشد در کنترل ۱۰۰ درصد و درصد مهار کنترل صفر در نظر گرفته شده است.

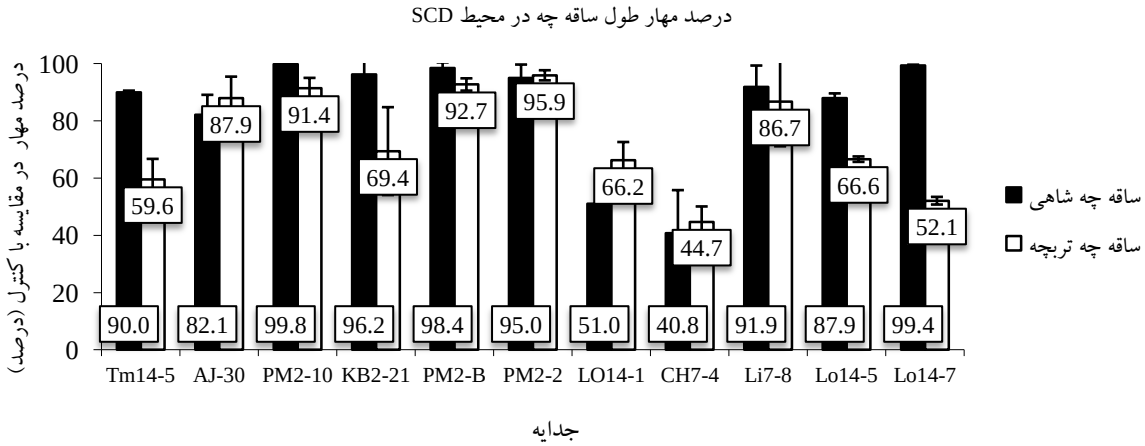


شکل ۳- نمودار اثر سوپرناتانت کشت سویه‌های منتخب در محیط مایع GPM بر رشد ساقه چه بذرهای شاهی و تربچه در مقایسه با کنترل (محیط مایع GPM بدون تلقیح). رشد در کنترل ۱۰۰ درصد و درصد مهار کنترل صفر در نظر گرفته شده

در شکل‌های ۴ و ۵، به ترتیب اثر سوپرناتانت کشت سویه‌های منتخب در محیط مایع SCD بر رشد ریشه‌چه و ساقه‌چه بذرهای شاهی و تربچه در مقایسه با کنترل (محیط مایع SCD بدون تلقیح) نشان داده شده است. نتایج، بر اساس میانگین اعداد محاسبه شده در سه تکرار ارائه شده است. به طور کلی، درصد مهار طول ریشه‌چه در هر دو محیط بیشتر از طول ساقه‌چه ارزیابی شد.



شکل ۴- نمودار اثر سوپرناتانت کشت سویه‌های منتخب در محیط مایع SCD بر رشد ریشه چه بذرهای شاهی و تربچه در مقایسه با کنترل (محیط مایع SCD بدون تلقیح). رشد در کنترل ۱۰۰ درصد و درصد مهار کنترل صفر در نظر گرفته شده است.



شکل ۵- نمودار اثر سوپرناتانت کشت سویه‌های منتخب در محیط مایع SCD بر رشد ساقه چه بذرهای شاهی و تربچه در مقایسه با کنترل (محیط مایع SCD بدون تلقیح). رشد در کنترل ۱۰۰ درصد و درصد مهار کنترل صفردر نظر گرفته شده است.

استخراج و سنجش زیستی فیتوتوکسین

بر اساس نتایج بدست آمده از غربال‌گری دومین، استخراج فیتوتوکسین از سوپرناتانت کشت سویه‌های AJ-30، PM2-10، KB2-21، PM2-B، PM2-2، Li7-8 و Lo14-7 در محیط مایع SCD انجام شد. برای سویه‌های Lo14-5 و TM14-5 استخراج از هر دو محیط SCD و GPM انجام و برای سویه Lo14-1 از محیط GPM استفاده شد.

سنجش زیستی ترکیبات استخراج شده از محیط‌های کشت مایع سویه‌های PM2-10، KB2-21، TM14-5، PM2-B، PM2-2 و Li7-8 با استفاده از حلال دی‌کلرومتان، رشد بذرهای شاهی، تربچه و خیار را به میزان چشمگیری مهار کردند. برای سایر سویه‌ها (Lo14-7، Lo14-5، Lo14-1 و CH7-4) استخراج با

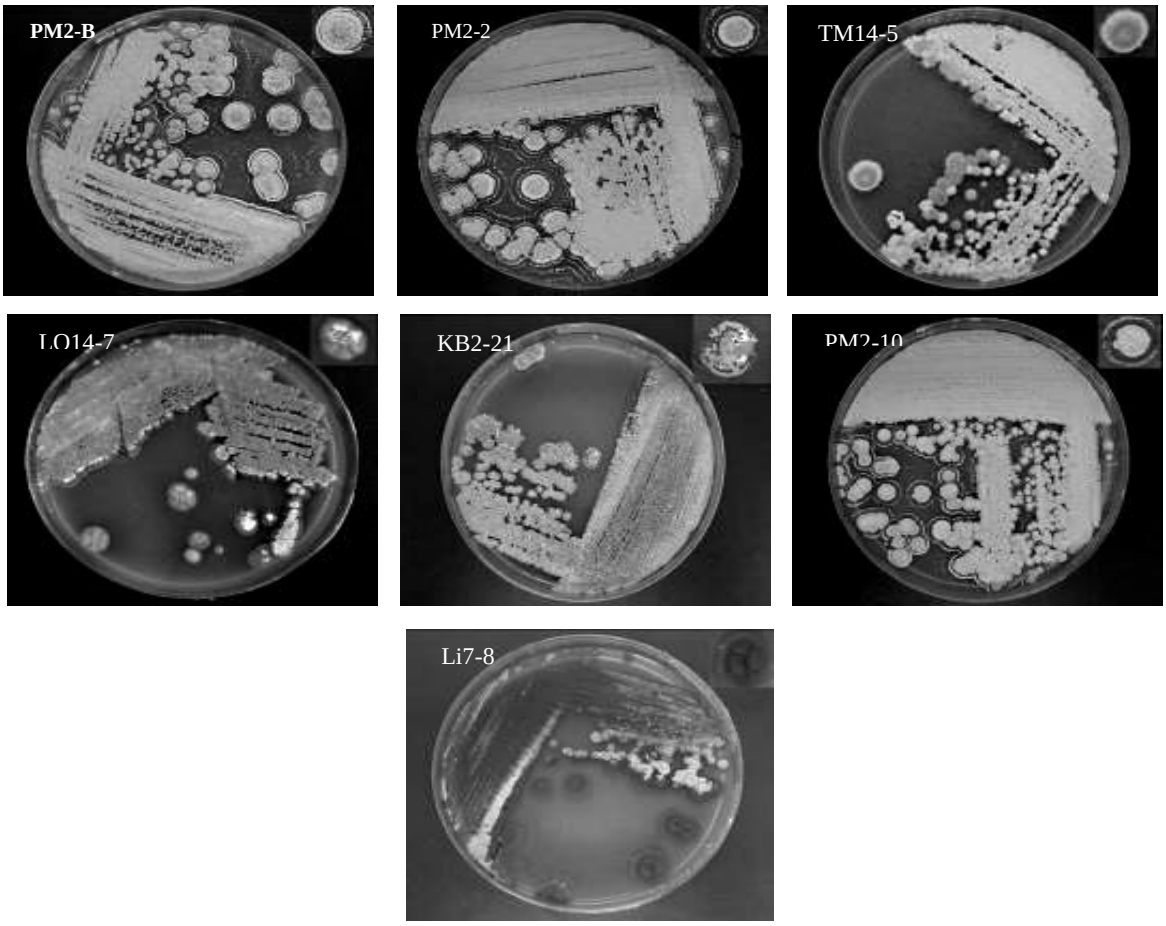
استفاده از حلال‌های اتیل‌استات و کلروفرم تکرار شد.

ترکیبات استخراج شده با استفاده از حلال‌های مذکور از محیط‌های مایع کشت سویه‌های Lo14-1، Lo14-5 و CH7-4 اثر مهاری درخور توجهی روی هیچ یک از بذرها نشان ندادند.

میانگین نتایج بدست آمده از دو تکرار انجام شده مربوط به ۷ سویه‌ای که ترکیب استخراج شده از سوپرناتانت کشت آن‌ها در محیط مایع اثر مهاری قابل توجهی روی بذرهای شاخص نشان دادند، در جدول ۲ آورده شده است. تصاویر این ۷ سویه در شکل ۶ نشان داده شده است. درصد مهار طول ریشه‌چه در تمامی موارد بیش از ساقه‌چه ارزیابی شد.

جدول ۲- پاسخ بذرهای شاهی، تربچه و خیار روی کاغذ صافی مرطوب شده (با ترکیب استخراج شده با حلال آلی از سوپرناتانت کشت سویه‌ها در محیط مایع در مقایسه با کنترل)

سویه	درصد مهار رشد بذرها در مقایسه با کنترل (درصد)					
	شاهی		تربچه		خیار	
	ریشه‌چه	ساقه‌چه	ریشه‌چه	ساقه‌چه	ریشه‌چه	ساقه‌چه
KB2-21	۹۹/۳	۹۸/۹	۱۰۰/۰	۱۰۰/۰	۹۷/۸	۹۷/۱
PM2-10	۹۸/۵	۷۹/۹	۹۹/۴	۹۴/۴	۹۷/۸	۹۷/۱
PM2-2	۹۷/۰	۹۵/۸	۹۸/۶	۹۳/۷	۹۸/۰	۹۷/۶
PM2-B	۹۸/۵	۹۵/۸	۹۷/۱	۸۸/۹	۹۷/۸	۹۶/۶
Tm14-5	۹۳/۷	۸۷/۴	۹۶/۸	۷۹/۴	۹۷/۸	۹۶/۶
Li7-8	۹۸/۵	۹۷/۹	۱۰۰/۰	۱۰۰/۰	۹۳/۶	۹۱/۵
Lo14-7	۹۷/۴	۹۶/۳	۴۵/۴	۴۶/۰	۵۲/۰	۵۱/۷



شکل ۶- تصاویر سویه‌های *Streptomyces* دارای توان بالای تولید فیتوتوکسین

در مورد بذر شاهی، بالاترین درصد مهار در سویه KB2-21 و کمترین درصد مهار در سویه TM14-5 مشاهده شد. بالاترین درصد مهار بذر تربچه در سویه‌های KB2-21 و Li7-8 مشاهده شد و کمترین درصد مهار را سویه TM14-5 نشان داد. بالاترین اثر مهاری روی بذر خیار را سویه PM2-2 نشان داد درحالی‌که کمترین اثر مهاری به سویه Lo14-7 مربوط بود.

ترکیبات استخراج شده از سوپرناتانت کشت سویه‌های KB2-21، PM2-10، Li7-8، PM2-2 و PM2-B اثر مهاری بسیار بالا روی هر سه بذر شاخص نشان دادند. این درحالی است که ترکیب استخراج شده از سوپرناتانت کشت سویه TM14-5 با وجود اثر مهاری محسوس روی بذرهای تربچه و شاهی، اثر مهاری درخور توجهی روی بذر خیار نشان داد. ترکیب استخراج شده با استفاده از حلال کلروفرم از محیط مایع کشت سویه Lo14-7 رشد بذر شاهی را بیش از ۹۶ درصد مهار کرد در حالی‌که اثر مهاری کمی روی بذرهای تربچه و خیار نشان داد.

شناسایی سویه‌های اکتینومیست مولد فیتوتوکسین

ویژگی‌های فنوتیپی مانند میزان رشد، تشکیل اسپور، رنگ میسلیوم هوایی و رویشی و تولید پیگمان محلول توسط سویه‌های منتخب مولد فیتوتوکسین روی محیط‌های ISP2-ISP5 در جدول ۳ آورده شده است.

تولید پیگمان ملانوئیدی روی محیط‌های ISP6 و ISP7 توسط سویه‌های KB2-21، TM14-5 و Li7-8 مثبت ارزیابی شد. سویه LO14-7 تنها روی محیط ISP6 پیگمان تولید کرد.

جدول ۳- رشد، ریخت‌شناسی و تولید پیگمان محلول سویه‌های منتخب بر روی محیط‌های ISP2-ISP5 (بر اساس طیف رنگی ISCC-NBS). در محیط‌هایی که سویه‌های مورد نظر اسپور تولید نکردند (رشد sparse)، برای میسلیوم هوایی رنگی گزارش نشده است.

	تولید پیگمان محلول	رنگ میسلیوم رویشی	رنگ میسلیوم هوایی	رشد
نام سویه	Li7-8			
ISP2	+	قهوه‌ای مایل به قرمز تیره	-	ضعیف
ISP3	+	قهوه‌ای تیره	قهوه‌ای مایل به خاکستری تیره	خوب
ISP4	+	قهوه‌ای مایل به زرد تیره	قهوه‌ای مایل به خاکستری	خوب
ISP5	+	نارنجی پررنگ	-	ضعیف
نام سویه	KB2-21			
ISP2	+	نارنجی پررنگ	-	ضعیف
ISP3	+	قهوه‌ای پررنگ	قهوه‌ای مایل به خاکستری تیره	خوب
ISP4	-	قهوه‌ای زیتونی تیره	قهوه‌ای مایل به زرد پر رنگ	خوب
ISP5	+	نارنجی پررنگ	-	ضعیف
نام سویه	PM2-10			
ISP2	+	نارنجی پررنگ	نارنجی شفاف	خوب
ISP3	+	قهوه‌ای مایل به زرد پر رنگ	زرد مایل به سبز شفاف	خوب
ISP4	+	زیتونی ملایم	زرد مایل به سبز پر رنگ	خوب
ISP5	+	زرد نارنجی روشن	سفید	خوب

ادامه جدول ۳

	تولید پیگمان محلول	رنگ میسلیوم رویشی	رنگ میسلیوم هوایی	رشد
نام سویه	Tm14-5			
ISP2	−	زرد پر رنگ	سفید	ضعیف
ISP3	+	زرد پر رنگ	سفید	خوب
ISP4	−	زیتونی ملایم	آبی مایل به خاکستری تیره	خوب
ISP5	+	زرد نارنجی پر رنگ	−	ضعیف
نام سویه	PM2-2			
ISP2	+	زرد نارنجی پر رنگ	سفید	خوب
ISP3	+	قهوه‌ای زیتونی ملایم	زرد مایل به سبز پر رنگ	خوب
ISP4	+	زیتونی تیره	زرد مایل به سبز پر رنگ	خوب
ISP5	+	زرد پر رنگ	سفید	خوب
نام سویه	PM2-B			
ISP2	+	قهوه‌ای مایل به قرمز پر رنگ	نارنجی شفاف	خوب
ISP3	+	قهوه‌ای تیره	زرد مایل به سبز شفاف	خوب
ISP4	+	زیتونی تیره	زیتونی کمرنگ	خوب
ISP5	+	زرد نارنجی روشن	سفید	خوب
نام سویه	Lo14-7			
ISP2	−	قهوه‌ای زیتونی ملایم	خاکستری تیره	خوب
ISP3	−	زرد مایل به خاکستری تیره	خاکستری زیتونی	خوب
ISP4	−	قهوه‌ای مایل به زرد روشن	−	ضعیف
ISP5	−	زرد مایل به سبز روشن	−	ضعیف

نتایج بررسی رشد در غلظت‌های متفاوت کلرید سدیم نشان داد که بهینه‌ی رشد همه سویه‌ها در محیط بدون نمک است. سویه PM2-10 تا ۱۵ درصد نمک رشد داشت که یک باکتری تحمل‌کننده نمک[۳۸] است.

با بررسی نتایج حاصل از تعیین ترادف ژن ۱۶S rRNA مشخص شد که سویه‌های PM2-10، PM2-B و PM2-2 بیشترین شباهت را به گونه *Streptomyces cyaneofuscatus* JCM 4364 وسویه‌های KB2-21، Li7-8 و LO14-7 بیشترین شباهت را به گونه *Streptomyces galilaeus* JCM 4757 دارند. سویه TM14-5 نیز بیشترین شباهت را به گونه *Streptomyces corchorusii* NBRC_13032 دارد.

میزان تولید فیتوتوکسین‌ها و قدرت مهارکنندگی آن‌ها

در جدول ۴ درصد و قدرت مهارکنندگی عصاره حاوی فیتوتوکسین ۶ سویه ذکر شده (در رقت‌های مختلف) آورده شده است. تحلیل آماری نتایج توسط نرم‌افزار MINITAB نشان داد که تفاوت اثر مهارکنندگی عصاره سویه‌های KB2-21 و Li7-8 (این دو سویه بیشترین شباهت را به گونه *Streptomyces galilaeus* دارند) در اکثر موارد معنادار است (در سطح احتمال پنج درصد) و اثر عصاره KB2-21 بیشتر است. تفاوت اثر مهارکنندگی عصاره سویه‌های PM2-2، PM2-B و PM2-10 که بیشترین شباهت را به گونه *Streptomyces cyaneofuscatus* دارند، در اکثر موارد معنادار است و PM2-2 اثر بهتری دارد. اثر عصاره سویه

TM14-5 کـــه بیشـــترین شـــباهت را بـــه ســـویه *Streptomyces corchorusii* دارد، در اکثـر مـوارد بـا عصاره PM2-2 اختلاف معنـادار نـدارد. براسـاس نتـایج بدست آمده در این بخش، سه سـویه KB2-21، PM2-2 و TM14-5 نتایج ارزشمندتر و بهتری را نسبت بـه سـایر سویه‌ها نشان می‌دادند.

جدول ۴ – بررسی درصد و قدرت مهارکنندگی بذر فیتوتوکسین سویه‌ها

نام سویه	رقت	نام بذر	درصد مهار بذر
KB2-21	۱	خیار	۳۵/۴±۰/۳
		شاهی	۹۷/۵±۰/۴
		تربچه	۹۵/۶±۰/۴
	۱/۲	خیار	۱۰/۷±۰/۵
		شاهی	۲۱/۵±۰/۵
		تربچه	۹۶/۶±۰/۵
	۱/۴	خیار	۵/۳±۰/۵
		شاهی	۱۲/۵±۰/۶
		تربچه	۳۰/۷±۰/۶
	۱/۸	خیار	۲/۳±۰/۶
		شاهی	۱۰/۳±۰/۷
		تربچه	۱۲/۶±۰/۷
Li7-8	۱	خیار	۲۴/۷±۰/۵
		شاهی	۱۰۰±۰
		تربچه	۹۱/۲±۰/۴
	۱/۲	خیار	۵/۵±۰/۵
		شاهی	۸۲/۳±۰/۵
		تربچه	۳۸/۲±۰/۷
	۱/۴	خیار	۳/۲±۰/۶
		شاهی	۶۰/۷±۰/۸
		تربچه	۲۰/۳±۱
	۱/۸	خیار	۱/۸±۰/۷
		شاهی	۵۵/۵±۰/۸
		تربچه	۱۰/۳±۰/۶
PM2-2	۱	خیار	۹۸±۰/۸
		شاهی	۱۰۰±۰
		تربچه	۱۰۰±۰
	۱/۲	خیار	۹۵±۰/۸
		شاهی	۱۰۰±۰
		تربچه	۹۳/۳±۰/۷
	۱/۴	خیار	۹۵±۰/۶
		شاهی	۱۰۰±۰
		تربچه	۹۰/۴±۰/۶
	۱/۸	خیار	۹۰/۰±۰/۷
		شاهی	۱۰۰±۰
		تربچه	۸۹/۷±۰/۶
PM2-B	۱	خیار	۹۷±۰/۶
		شاهی	۱۰۰±۰
		تربچه	۱۰۰±۰
	۱/۲	خیار	۹۴/۹±۰/۷
		شاهی	۱۰۰±۰
		تربچه	۹۰/۸±۰/۷
	۱/۴	خیار	۹۰/۷±۰/۸
		شاهی	۱۰۰±۰
		تربچه	۸۸/۶±۰/۵
	۱/۸	خیار	۸۶/۹±۰/۷
		شاهی	۱۰۰±۰
		تربچه	۷۶/۲±۰/۷
PM2-10	۱	خیار	۹۳±۰/۷
		شاهی	۱۰۰±۰
		تربچه	۱۰۰±۰
	۱/۲	خیار	۹۰/۸±۰/۷
		شاهی	۱۰۰±۰
		تربچه	۹۴/۲±۰/۶
	۱/۴	خیار	۸۶/۳±۰/۷
		شاهی	۹۸/۹±۰/۷
		تربچه	۸۳/۲±۰/۷
	۱/۸	خیار	۸۱/۵±۰/۶
		شاهی	۹۵/۲±۰/۸
		تربچه	۷۴/۱±۰/۷
TM14-5	۱	خیار	۹۷/۹±۰/۹
		شاهی	۱۰۰±۰
		تربچه	۱۰۰±۰
	۱/۲	خیار	۹۴/۷±۰/۷
		شاهی	۱۰۰±۰
		تربچه	۹۲±۰/۷
	۱/۴	خیار	۹۰±۰/۶
		شاهی	۱۰۰±۰
		تربچه	۸۸/۹±۰/۷
	۱/۸	خیار	۸۷±۰/۵
		شاهی	۱۰۰±۰
		تربچه	۸۰/۱±۰/۷

زمان بهینه تولید

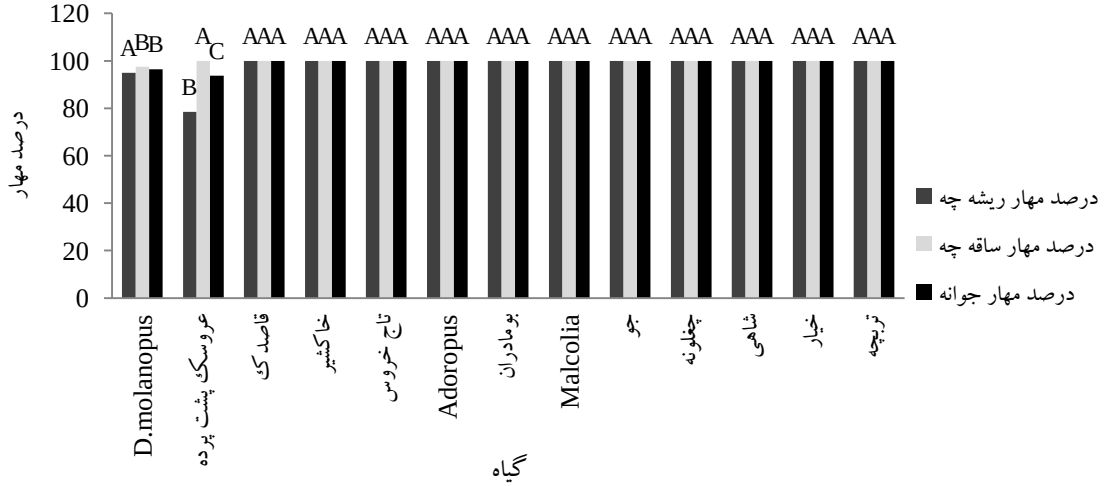
وزن خشک عصاره‌های حاصل از سه سویه KB2-21، PM2-2 و TM14-5 محاسبه و اثر آن بر روی بذرهای شاخص بررسی شد. سویه PM2–2 در کوتاهترین زمان (۳ روز) بیشترین مقدار تولید (۰/۰۰۸ گرم در ۵۰ میلی‌لیتر) را نسبت به سایر سویه‌ها داشت.

بررسی طیف اثر

فیتوتوکسین تولید شده توسط سویه KB2-21 توانست بذرهای *Adoropus litoraodis*، تاج خروس قرمز، قاصدک و عروسک پشت پرده را در حدود ۸۰ درصد، بذر خاکشیر شیرین را حدود ۹۷ درصد و *D.molanopus* را ۳۴ درصد مهار کند. عصاره این سویه بر روی سایر بذرها اثری نداشت.

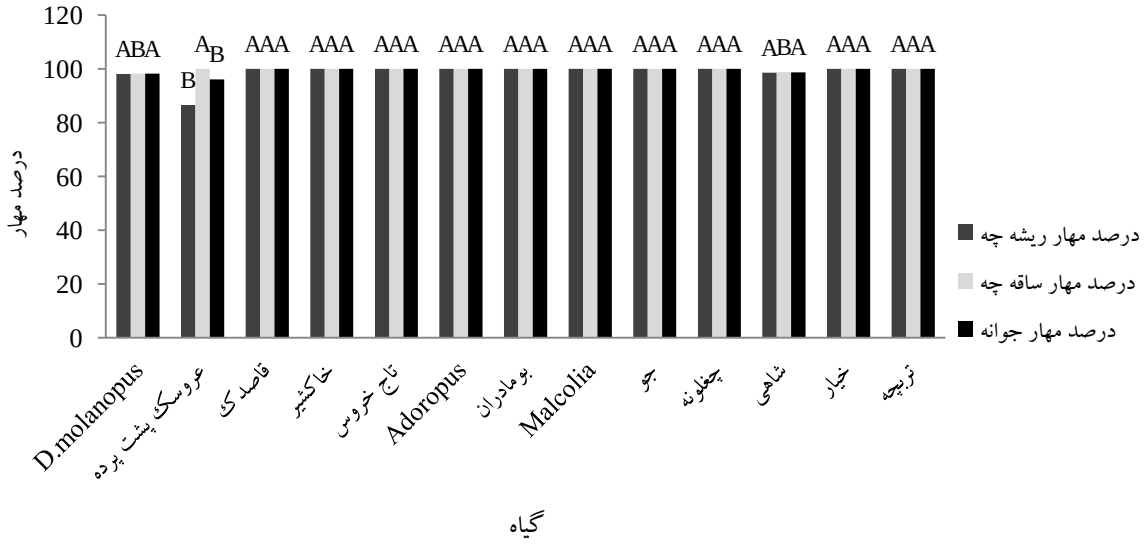
فیتوتوکسین تولید شده توسط سویه TM14-5 بذرهای قاصدک، خاکشیر شیرین، تاج‌خروس قرمز، *Adoropus litoraodis*، جو سرارود، شب بوی آفریقایی[۳۹]، بومادران[۴۰]() و چغلونه را ۱۰۰ درصد مهار کرد. همچنین بذرهای عروسک پشت پرده و *D. melanopus* را بالای ۸۵ درصد مهار کرد.

فیتوتوکسین تولید شده توسط سویه PM2-2، بذرهای شقایق، قاصدک[۴۱]، چغلونه[۳۱]، جو سرارود[۴۲]، خاکشیر شیرین[۴۳]، شب‌بوی آفریقایی[۴۴]، *Adoropus litoraodis*، تاج‌خروس قرمز[۴۵]، بومادران[۴۶] و خیار را ۱۰۰ درصد مهار کرد؛ و قادر بود بذرهای *D. melanopus*، عروسک پشت پرده[۴۷]، شاهی و تربچه را بیش از ۹۰ درصد مهار کند. در شکل ۷، ۸ و ۹ نتایج تحلیل آماری مربوطه آورده شده است. بر اساس تحلیل آماری نتایج، اختلاف بین اکثر درصدهای مهار رشد ریشه‌چه، ساقه‌چه و جوانه گیاهان مختلف معنادار است. در شکل ۱۰ تصاویر مهار بذرها آورده شده است. فیتوتوکسین سویه‌های PM2-2 و TM14-5 بر روی همه بذرها اثر مهاری خوبی داشتند. می‌توان گفت فیتوتوکسین این سویه‌ها طیف اثر وسیعی دارد.



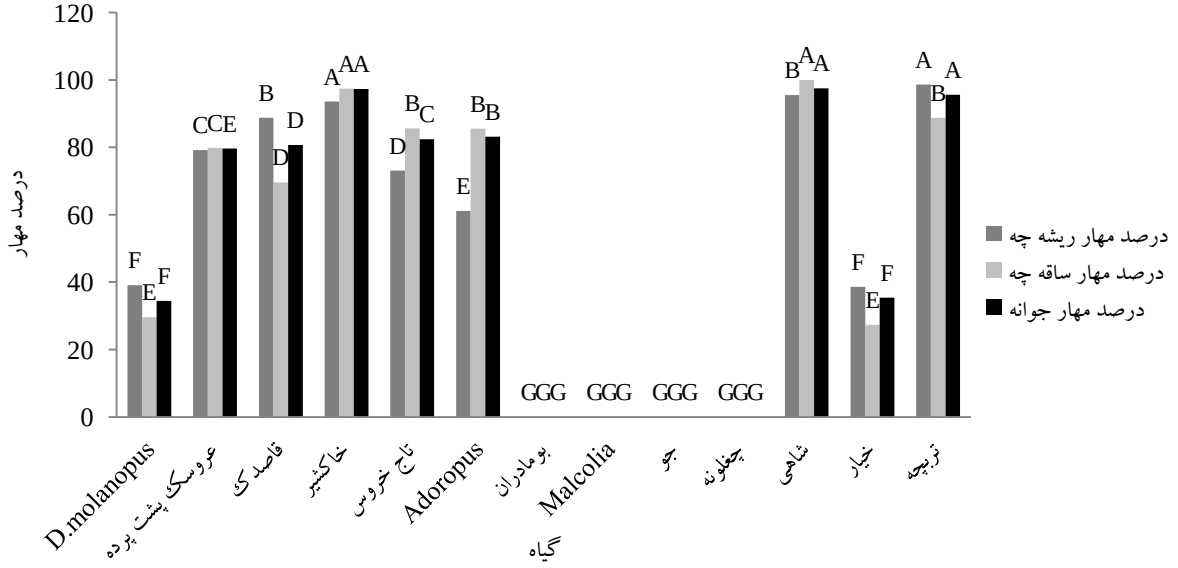
شکل ۷- تحلیل نتایج آماری بررسی طیف اثر فیتوتوکسین سویه TM14-5

A، B و C (شاخص گروه‌بندی دانکن): گروه A بهترین و بالاترین درصد مهار گیاه مورد نظر (ریشه‌چه، ساقه‌چه و جوانه) را نشان می‌دهد و گروه B و C در رتبه‌های بعدی قرار می‌گیرند. بین درصدهای مهاری که در یک گروه دانکن قرار می‌گیرند، تفاوت معناداری وجود ندارد.



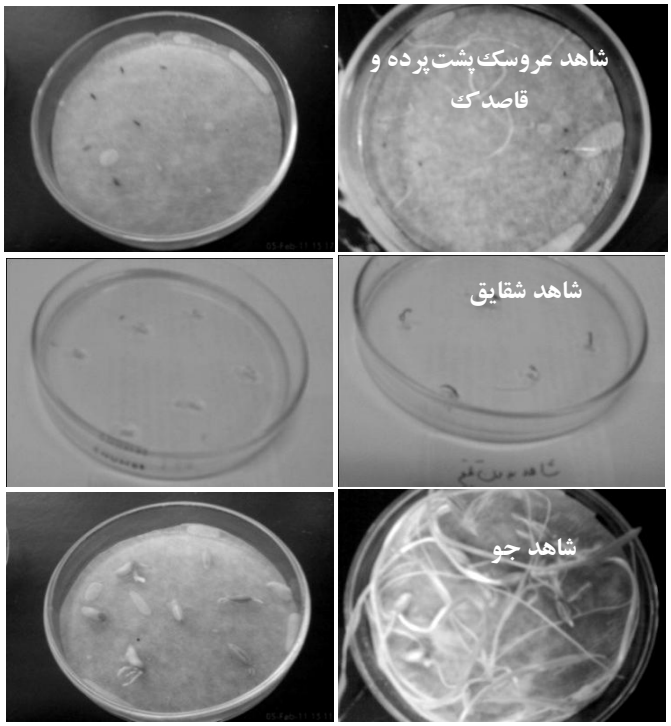
شکل ۸- تحلیل نتایج آماری بررسی طیف اثر فیتوتوکسین سویه PM2-2

A، B و C: شاخص گروه‌بندی دانکن



شکل ۹- تحلیل نتایج آماری بررسی طیف اثر فیتوتوکسین سویه KB2-21

A، B، C، D، E، F و G: شاخص گروه‌بندی دانکن



شکل ۱۰- تصاویر مهار برخی از بذرها توسط سویه PM2-2

بحث

متابولیت‌های ثانویه میکروبی را شاید بتوان بهترین منبع ترکیبات زیستی فعال علیه گیاهان دانست. بیالفوس، فسفینوتریسین[۴۸] و بسیاری فیتوتوکسین تولید شده به وسیله‌ی جنس *Streptomyces* ثبت شده و در حال حاضر به عنوان علف‌کش‌های طبیعی و موافق اکوسیستم به فروش می‌رسند (۱).

در این پژوهش، برای افزایش شانس یافتن اکتینومیست‌های مولد فیتوتوکسین سعی شد نمونه‌برداری از مناطق مختلف انجام شود. نمونه‌برداری از مناطق شمالی (لوشان، لاهیجان، داماش و چمخاله)، شمال غربی (لیقوان تبریز)، مرکزی (کرج، قزوین، کاشان و جمکران) و جنوبی (کرمان) ایران انجام شد. سویه‌های مولد شناسایی شده نیز به مناطق مختلف تعلق داشتند. Lo14-7 از لوشان، PM2-2، TM14-5، PM2-B و PM2-10 از قزوین، KB2-21 از کرج و Li7-8 از لیقوان جداسازی شدند.

روش غربال‌گری نخستین در این پژوهش همانند دیگر پژوهش‌های انجام شده روی محیط آگار دار با استفاده از روش کشت نواری انجام شد (۱۲). با توجه به نتایج بدست آمده در این پژوهش، این روش بسیار کارامد و تکرار پذیر است و هر ۱۱ سویه بدست آمده از غربال‌گری نخستین، در غربال‌گری دومین نیز رشد بذرهای شاخص را مهار کردند.

روش غربال‌گری دومین به کار گرفته شده، متفاوت از دیگر پژوهش‌هایی که تاکنون برای غربال‌گری اکتینومیست‌های مولد فیتوتوکسین انجام شده است، انجام شد. در سایر پژوهش‌ها، بررسی اثر مهاری سوپرناتانت محیط کشت مایع سویه‌ها بر رشد بذرهای شاخص روی کاغذ صافی آغشته شده به سوپرناتانت رقیق شده با آب مقطر (به نسبت ۱:۱) انجام شده است

(۱۲). در حالی‌که در این پژوهش بر اساس آزمون‌های انجام شده، سوپرناتانت به نسبت ۲:۱ با آب آگار ۱/۵ درصد رقیق شده و اثر مهاری سوپرناتانت بر رشد بذرها بر روی محیط جامد حاصل بررسی شد. روش استفاده از کاغذ صافی آغشته به سوپرناتانت رقیق شده با آب مقطر به نسبت ۱:۱ در تکرارهای انجام شده نتایج یکسانی را نشان نداد. با توجه به این‌که غنی بودن محیط کشت مایع خود عامل مهاری رشد بذرهاست، رقت‌های بالاتر ۲:۱ و ۳:۱ با آب مقطر نیز بررسی شدند که نتایج بدست آمده تکرار پذیر نبود.

در مرحله استخراج ترکیب فیتوتوکسیک، سنجش زیستی ترکیب استخراج شده با استفاده از حلال‌های آلی، مانند سایر پژوهش‌ها انجام شد و رشد بذرهای شاخص روی کاغذ صافی مرطوب شده با ترکیب استخراج شده با حلال از سوپرناتانت کشت سویه‌ها در محیط مایع با کنترل (ترکیب استخراج شده از محیط مایع بدون تلقیح) مقایسه شد. در تکرارهای انجام شده به این روش نیز نتایج حاصل، کاملاً تأیید کننده یکدیگر بودند که نشان دهنده مناسب بودن و قابل اطمینان بودن روش است.

۷ سویه برتر مولد غربال‌گری شده در این پژوهش، به جنس *Streptomyces* متعلق هستند. از آنجائی‌که جنس *Streptomycetes*، اکتینومیست‌های غالب در محیط هستند و تاکنون نزدیک به ۱۷ درصد از متابولیت‌های فعال زیستی از این جنس به دست آمده‌اند، این امر غیر قابل انتظار نبوده است. در سایر پژوهش‌های انجام شده در زمینه غربال‌گری اکتینومیست‌های مولد فیتوتوکسین نیز اعضای جنس *Streptomycetes* به عنوان مولدین اصلی در بین اکتینومیست‌ها معرفی شده‌اند (۱۲). همان‌طور که در نتایج پژوهش ذکر شد، سویه‌های PM2-B، Li7-8، PM2-2، KB2-21 و PM2-10 اثر مهاری درخور توجه (نزدیک به ۱۰۰ درصد) روی هر سه بذر شاهی، خیار و تربچه نشان دادند، درحالی‌که سویه Tm14-5 بیشترین اثر مهاری را روی بذر خیار نشان داد و سویه LO14-7 رشد بذر شاهی را در حدود ۱۰۰ درصد مهار کرده در صورتی‌که اثر مهاری کمی روی بذرهای خیار و تربچه نشان داد. این نتایج نشان می‌دهد فیتوتوکسین‌های حاصل از سویه‌های Tm14-5 و LO14-7 تا حدی انتخابی عمل می کنند و بقیه محدوده میزبانی وسیع‌تری دارند.

در این پژوهش، زمان بهینه تولید نیز مشابه آن‌چه توسط هیسی[۴۹] و پوتنام[۵۰] (۶) و پالمر[۵۱] و بندر[۵۲] (۲۱) انجام شده بود، برای سه سویه ذکر شده، بررسی شد. زمان بهینه تولید برای دو سویه TM14-5 و KB2-21 در روز هفتم بود؛ در حالی‌که برای سویه PM2-2 زمان بهینه، مانند پژوهش هیسی و پوتنام، در روز سوم بود. کوتاه بودن زمان تولید، یک مزیت مهم در تولید محصولات میکروبی محسوب می‌شود.

فیتوتوکسین‌ها می‌توانند به‌شکل اختصاصی و یا غیراختصاصی بر روی میزبان عمل کنند. در این پژوهش، اثر فیتوتوکسین سه سویه KB2-21، PM2-2 و TM14-5 بر روی ۱۰ نوع بذر بررسی شد. سویه KB2-21 نسبت به دو سویه دیگر اثر مهاری کمتری بر روی بذرها دارد و بر روی برخی بذرها اصلاً اثر مهاری ندارد. سویه PM2-2 و TM14-5 (بویژه PM2-2) بر روی همه بذرها اثر مهاری خوبی داشتند. اثر فیتوتوکسین‌های این سویه‌ها بر روی همه این بذرها نشان می‌دهد که این فیتوتوکسین‌ها دارای طیف اثر وسیعی هستند و غیراختصاصی عمل می‌کنند. در کشاورزی

بیشتر از فیتوتوکسین‌های با طیف اثر وسیع استفاده می‌شود، زیرا به طور معمول در مزارع چندین نوع علف هرز به‌طور همزمان با هم حضور دارند. فیتوتوکسین‌های غیراختصاصی میزبان با وجود این‌که عملکرد غیراختصاصی دارند، به‌طور انتخابی عمل می‌کنند (۱). در نتیجه، با انتخاب فیتوتوکسین مناسب می‌توان از آسیب به محصول اصلی جلوگیری کرد. نکته برتر در این پژوهش نسبت به سایر پژوهش‌ها این است که در این پژوهش، از تعداد زیادی بذر استفاده شده است که علف‌های هرز مقاوم و بومی محسوب می‌شوند؛ در حالی‌که در پژوهش‌های دیگر از تعداد محدودتری از بذرها استفاده شده است که بیشتر بذرهای شاخص و حساس هستند. برای مثال، داناسکاران[۵۳] و همکاران (۲۲) اثر فیتوتوکسین یک اکتینومیست را بر روی چهار نوع بذر علف هرز بررسی کردند که سویه آن‌ها تنها توانسته بودند یکی از چهار نوع بذر را مهار کنند. داناسکاران و همکاران (۲۳) از ۶ نوع علف هرز برای بررسی اثر آللوپاتیک سویه‌های اکتینومیستی استفاده کردند که تنها برخی از آنها توانسته بودند هر ۶ نوع علف هرز را مهار کنند.

نتیجه‌گیری

اعضای جنس *Streptomyces* در تولید فیتوتوکسین‌ها بسیار مورد توجه هستند و تنها فیتوتوکسین‌هایی که به طور مستقیم به تولید تجاری رسیده‌اند (بیالفوس و فسفینوتریسین) توسط اعضای این جنس تولید می‌شوند. علف‌کش‌های زیستی از لحاظ ساختاری بسیار متنوع و دارای جایگاه‌های اثر متفاوتی هستند که باعث می‌شود سرعت ایجاد مقاومت نسبت به آن‌ها کمتر شود. این علف‌کش‌ها بسیار با طبیعت سازگار هستند و بیشتر آن‌ها طیف اثر وسیعی دارند. در بیشتر زمین‌های کشاورزی چندین نوع علف هرز همزمان با هم حضور دارند. در نتیجه برای از بین بردن آن‌ها بیشتر از علف‌کش‌های با طیف اثر وسیع استفاده می‌شود که از لحاظ اقتصادی مقرون به‌صرفه‌تر باشد. فیتوتوکسین سویه‌های حاصل از این پژوهش طیف اثر وسیعی داشتند و بر روی بیشتر علف‌های هرز مورد آزمون اثر مهاری مناسبی داشتند. این مسئله باعث می‌شود استفاده از فیتوتوکسین این سویه‌ها از لحاظ تجاری مقرون به صرفه باشد.

تشکر و قدردانی

این پروژه توسط طرح شماره ۱۴/۱ دانشگاه بقیه الله، حمایت مالی شد.

References

(1) Li Y, Sun Z, Zhuang X, Xu L, Chen Sh, Li M. Research progress on microbial herbicides. *Crop Protection* 2003; 22(2): 247-52.

(2) Saxena S, Pandey A K. Microbial metabolites as eco-friendly agrochemicals for the next millennium. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2001; 55(4): 395-403.

(3) Hoagland R E. Microbial allelochemicals and pathogens as bioherbicidal agents. *Weed Technology* 2001; 15(4): 835-57.

(4) Punzo B. Phytotoxin produced by *Alternaria sonchi*, a potential mycoherbicide for biocontrol of *Sonchus arvensis*. France: Federico II Univ.; 2009.

(5) Heisey R, DeFrank J, et al. *The chemistry of allelopathy*. Washington DC: Am. Chem. Soc; 1985.

(6) Heisey R M, Putnam R. Herbicidal effect of Geldanamycin and Nigericin, antibiotics from *Streptomyces hygroscopicus*. *Natural Products* 1986; 49 (5): 859-65.

(7) Demain A L. New application of microbial products. *Science* 1983; 219 (1): 709-14.

(8) EI-Nakeeb M A, Lechevalier H A. Selective isolation of aerobic actinomycetes. *Applied Microbiology* 1963; 11 (2): 75-7.

(9) Waksman S. Microorganisms (Book Reviews: The Actinomycetes. A Summary of Current Knowledge). *Science* 1967; 157 (3792): 1028.

(10) Pridham T G, Anderson P, Foley C, Lindenfelser L A, Hesseltine C W, Benedict R G. A selection of media for maintenance and taxonomic study of Streptomycetes. *Antibiotic Annual*. 4th ed. New York: Medical Encyclopedia; 1956.

(11) Young Lab 2002. *Seed Sterilization*. Available from: www.gantlet.org/pdf/sterilize.pdf Accessed: October. 12, 2002.

(12) Mallik M A B. Selective Isolation and Screening of Soil Microorganisms for Metabolites with Herbicide Potential. *Crop Production* 2001; 4 (2): 219-36.

(13) Warren H B, Prokop J F, Grundy, W E. Nonsynthetic media for antibiotic producing actinomycetes. *Antibiotic and Chemotherapy* 1995; 5 (2): 6-12.

(14) Shirling E B, Gottlieb D. Methods for characterization of Streptomyces species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1966; 16 (3): 313-40.

(15) Tresner H D, Backus E J. System of color wheels for streptomycete taxonomy. *Appl. Microbiol.* 1963; 11 (4): 335-8.

(16) Kelly K L. *Inter-Society Color Council–National Bureau of Standards Color-Name Charts Illustrated with Centroid Colors.* Washington DC: US Government Printing Office; 1964.

(17) Kawato M, Shinobu R. On *Streptomyces herbaricolor* nov. sp. supplement: A simple technique for the microscopical observation. *Nat. Sci.* 1959; 8 (1): 114-9.

(18). Williams S t, Goodfellow M, Alderson G, Wellington E M H, Sneath P H A, Sackin M J. Numerical classification of Streptomyces and related genera. *J Gen Microbiol.* 1983; 129 (6): 1743 – 1813.

(19) Pospiech A, Neumann B. A versatile quick-prep of genomic DNA from gram-positive bacteria. *Trends in Genetics* 1995; 11(6): 217-18.

(20) Spencer J, de Spencer A, et al. *Environmental microbiology: methods and protocols*. 16th ed. New Jersey: Humana Press Inc.; 2004.

(21) Palmer D A, Bender L. Effects of Environmental and Nutritional Factors on Production of the Plyketide Phytotoxin Coronatine by *Pseudomonas syringae* pv. Glycinea. *Applied and Environmental Microbiology* 1993; 59 (5): 1619-29.

(22) Dhanasekaran D, Nooruddin T, Panneerselvam A. Herbicidal agents from actinomycetes against selected crop plants and weeds. *Natural Product Research* 2010; 24 (6): 521-29.

(23) Dhanasekaran D, Ambika K, Thajauddin N, Panneerselvam A. Allelopathic effect of actinobacterial isolates against selected weeds. *Phytopathology and Plant Protection* 2011; 45 (5): 505-21.

[1]. Bialaphos
[2]. Anisomycin
[3]. Herbicidin B
[4]. Herbicidin A
[5]. Phosphinotricin
[6]. Fermentas
[7]. Merck
[8]. Wikima seed
[9]. Petoseed
[10]. Arginine-Glycerol-Salt Agar
[11]. Glucose-Asparagine-dipotassium phosphate Agar
[12]. Young Lab
[13]. Triton X
[14]. Strip culture technique
[15]. Glucose-Peptone-Molasses
[16]. Soybean Meal-Corn Steep-Dextrin
[17]. fermentation
[18]. rotary evaporator
[19]. Shirling
[20]. Gottlieb
[21]. oatmeal
[22]. Tresner
[23]. Backus
[24]. Slide culture
[25]. Bennet Agar
[26]. Shaker
[27]. Biomass
[28]. Salting out
[29]. Denaturation
[30]. *Taraxacum vagum*
[31]. *Tritichum boeticum*
[32]. *Physalisalke kengi*
[33]. *Amaranthus cruentus*
[34]. *Hordeum violaceum*
[35]. *Sisymbrium septulatum*
[36]. *Malcolmia africana*
[37]. *Achillea millefolium*
[38]. Halotolerant
[39]. *Malcolmia africana*
[40]. *Achillea millefolium*
[41]. *Taraxacum vagum*
[42]. *Hordeum violaceum*
[43]. *Sisymbrium septulatum*
[44]. *Malcolmia africana*
[45]. *Amaranthus cruentus*
[46]. *Achillea millefolium*
[47]. *Physalis alkekengi*
[48]. Phosphinothricin
[49]. Heisey
[50]. Putnam
[51]. Palmer
[52]. Bender
[53]. Dhanasekaran

Isolation and screening of phytotoxin producing actinomycetes and determination of phytotoxin effect spectrum of selected strains

Reyhan khayatmaher [**]
M.Sc. of Microbiology, University of Tehran, Iran, reihan65@yahoo.com
Mohammad Ali Amoozegar [* **]
Associate Professor of Microbiology, University of Tehran, Iran, amoozegar@ut.ac.ir
Shimasadat Seyedmahdi
M.Sc. of Microbiology, Iranian biological resource centre, Tehran, Iran, sh.seyedmahdi@gmail.com
Javad Hamedi
Associate Professor of Microbiology, University of Tehran, Iran, jhamedi@ut.ac.ir
Mohammad Reza Naghavi
Professor of plant molecular genetics University of Tehran, Iran, mnaghavi@ut.ac.ir
Faranak Foroozanfar
M.Sc. of Microbiology, University of Tehran, Iran, faranak_microb83@yahoo.com
Ali Mohammad Latifi [***]
Assistant Professor of Microbiology, Baqiyatallah university of medical science, Tehran, Iran, amlatify@yahoo.com

Abstract

Introduction: Actinomycetes are well-known phytotoxin producing microorganisms. Nowadays the use of microbial herbicides versus traditional chemicals draws a great deal of attention as they do not cause any environmental problems.

Materials and Methods: Actbacterial strains of 40 rhizospheric and phyllospheric samples were isolated. Primary screening was implemented on radish and cress seeds on GAPAgar. Then, bioassay of cellfree broth of strains with more than 70% inhibitory effect on the seed growth was performed using GPM and SCD liquid media. Finally, compounds were extracted by organic solvents. The dryweight, production time and effectiveness of the superior isolate products were examined and three superior products were examined for their product effect spectrum by 10 resistant weeds.

Results: Among 457 screened isolates, 11 strains showed 70% or more inhibitory effect on GAP medium. In secondary screening, seed growth inhibitions of 11 strains were more than 70% using cellfree broth. These strains belonged to *Streptomyces* genus. According to dry weight products, production time and effectiveness PM2-2, TM14-5 and KB2-21 strains were selected for next steps and PM2-2 was the superior strain.

Discussion and Conclusion: Streptomyces species are amog the best phytotoxins producers and the only phytotoxins introduced to the market are produced by the members of this genus. The growth inhibition of the most plant seeds examined by the isolated strains in this experiment showed an excellent potential for these phytotoxins. phytotoxins produced by some of the strains in the present study had high inhibitory effect and broad effect spectrum like commercial ones, so they seem to be economical.

Key words: Actinomycete, Phytotoxin, Herbicide

[*] Corresponding Author
[**] Extremophiles Lab, Dept. of Microbiology, Fac. of Biology and Center of excellence in Phylogeny of Living Organisms, College of Science, University of Tehran, Iran
[***] Applied and environmental biotechnology research centre
Received: September 12, 2012/ **Accepted:** December 29, 2012