The study of soil chitinolytic bacterial strains and their use against fungal pathogen *Alternaria alternata* in vitro

Hosein Honari *
PhD in Molecular genetics, Department of Biology, Biology Research Center, Imam Hosein University, Tehran, honari.hosein@gmail.com
Amin Alborzian-Dehsheikh
MSc of Plant Biotechnology, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran, aminalborzian@yahoo.com
Ramin Hosseini
Associate professor of Biotechnology, Faculty of Engineering and Technology, Imam Khomeini International University, Qazvin, r.hosseini@ikiu.ac.ir
Mohammadreza Akbari
PhD Student of Nanobiotechnology, Department of Biology, Biology Research Center, Imam Hosein University, Tehran, rezamohammad@yahoo.com
Seyed-Ismail Razavi
Assistant professor of Plant medicine, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, gorgan, Iran, razavi@gau.ac.ir
Seyed-Masih E'temad-Aubi
PhD Student of nanobiotechnology, Department of Biology, Biology Research Center, Imam Hosein University, Tehran, masih.etemadi@gmail.com

Abstract

Introduction: In sustainable agriculture, biological control is an important alternative to control various plant diseases, in particular, pathogenic fungus that causes the most economic damage to agricultural products in the world. Each soil species bacterium has unique specified features and abilities. *Alternaria sp* has specific herbal poisons that lead to diseases in them. Biological control of fungal diseases in agricultural products across the world has been done in recent years using fungi and soil antagonist bacteria. Some bacterial isolates that produce chitinase enzymes fight with fungal pathogens.

Materials and Methods: To achieve an antagonist chitinolytic bacteria against *Alternaria alternata* fungal, screening soil species bacterium that produce chitinase of some urban and agriculture soil samples of Qazvin were carried out.

Results: In this study, five different strain of chitinolytic bacteria were found, two strains of *Pseudomonas nitroreducens* in vitro and one strain (AHH4), they had the ability to destroying fungal pathogen *Alternaria sp* in the farm. as the presence of high concentrations (0/05 OD_{600} and above) of the bacteria, *A. alternata* fungus growth stopped completely.

Discussion and conclusion: However, one of them, *P. nitroreducens* (AHH4) could control the fungus at in vitro and *invivo* and inhibit the growth of fungus. So *P. nitroreducens* (AHH4) chitinolytic bacteria has efficiently effect on inhibit *A. alternata* fungal growth. As the presence of high concentrations (0/05 OD_{600} and above) of the bacteria *A. alternata* fungus growth stopped completely. The isolate AHH4 was submitted to NCBI/DDBJ/EMBL as KR905055 accession number.

Key words: Biological control, Chitinolytic, Chitinase, *Alternaria alternata*

* Corresponding author
Received: June 12, 2016 / **Accepted:** May 16, 2017

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال هفتم، شماره ۲۵، بهار ۱۳۹۷، صفحه ۶۳- ۷۴
تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۳/۲۳ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۲/۲۶

مطالعه جدایه‌های باکتری‌های کیتینولایتیک از خاک و کاربرد آنها علیه قارچ بیمارگر *Alternaria alternata* در شرایط آزمایشگاه

حسین هنری*: دانشیار ژنتیک، گروه و مرکز تحقیقات زیست‌شناسی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران، honari.hosein@gmail.com
امین البرزیان ده شیخ: کارشناس ارشد بیوتکنولوژی گیاهی، دانشگاه امام خمینی قزوین، ایران، aminalborzian@yahoo.com
رامین حسینی: دانشیار بیوتکنولوژی، دانشکده فنی مهندسی، دانشگاه امام خمینی قزوین، ایران، r.hosseini@ikiu.ac.ir
محمدرضا اکبری: دانشجوی دکتری تخصصی نانوبیوتکنولوژی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران، rezamohammad@yahoo.com
سیداسماعیل رضوی: استادیار گیاه‌پزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی گرگان، ایران، razavi@gau.ac.ir
سیدمسیح اعتمادایوبی: دانشجوی دکتری تخصصی نانوبیوتکنولوژی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران، masih.etemadi@gmail.com

چکیده

مقدمه: کنترل زیستی در کشاورزی پایدار، روش جایگزین درخور توجهی برای کنترل بیماری‌های مختلف گیاهی به‌ویژه قارچ‌های بیمارگر خاکزی است که بیشترین خسارت اقتصادی را به محصولات کشاورزی در دنیا وارد می‌کنند. هر یک از گونه‌های باکتری خاکزی، ویژگی‌ها و توانایی‌های منحصربه‌فردی فرد دارند. قارچ *Alternaria sp.* دارای سموم ویژه میزبانان گیاهی است که به بیماری در آنان منجر می‌شوند. در سال‌های اخیر در سراسر جهان، کنترل زیستی بیماری‌های قارچی در انواع محصولات کشاورزی با استفاده از قارچ‌ها و باکتری‌های آنتاگونیست خاکزی انجام شده است. برخی جدایه‌های باکتریایی تولیدکننده آنزیم کیتیناز با بیمارگرهای قارچی مبارزه می‌کنند.

مواد و روش‌ها: با هدف یافتن آنتاگونیست مولد کیتیناز علیه قارچ *Alternaria alternata*، غربال‌گری باکتری‌های خاکزی مولد آنزیم کیتیناز با نمونه‌برداری از خاک‌های زراعی و شهری چند منطقه استان قزوین انجام شد.

نتایج: در پژوهش حاضر، پنج جدایه مختلف باکتری کیتینولایتیک یافت شدند؛ دو جدایه *Pseudomonas nitroreducens* در شرایط آزمایشگاهی و یک جدایه (AHH4) توانایی مبارزه علیه قارچ بیمارگر *Alternaria sp.* را در شرایط مزرعه داشتند. وجود غلظت‌های زیاد باکتری (OD_{600} ۰/۰۵ و بیشتر)، رشد قارچ *A. alternata* را کامل متوقف کرد.

بحث و نتیجه‌گیری: از بین جدایه‌های بررسی‌شده، جدایه AHH4 *P. nitroreducens* به‌طور مؤثری از فعالیت این قارچ در شرایط آزمایشگاهی و نیز در شرایط گلخانه‌ای جلوگیری و از رشد قارچ در نمونه‌های بررسی‌شده ممانعت کرد. بنابراین، باکتری کیتینولایتیک *P. nitroreducens* Strain AHH4 به‌طور کارآمدی توانایی بازدارندگی از رشد قارچ *A. alternata* را دارد و رشد قارچ *A. alternata* در حضور غلظت‌های زیاد باکتری (OD_{600} ۰/۰۵ و بیشتر) کامل متوقف می‌شود. جدایه AHH4 با شماره دسترسی KR905055 در پایگاه NCBI/DDBJ/EMBL ثبت شد.

واژه‌های کلیدی: کنترل زیستی، کیتینولایتیک، کیتیناز، *Alternaria alternata*

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

Copyright©2018, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

کیتین پس از سلولز، دومین پلی‌ساکارید فراوان در طبیعت است که در اسکلت خارجی حشره‌ها، دیواره سلولی قارچ ها، مخمرها، جلبک ها و ساختارهای داخلی برخی جانوران وجود دارد. کیتین ساختاری از β-1,4 ساکارید بدون شاخه با اتصال‌های واحدهای N-استیل گلوکزآمین است. سلولاز و کیتیناز ساختارهای مشابهی دارند به‌طوری که کمیته نام‌گذاری بین‌المللی بیوشیمی و زیست مولکولی[1] این دو آنزیم را به شکل موازی نام‌گذاری کرده است (سلولاز: اندو-۱و ۴بتا-گلوکاناز[2] 3.2.1.4 EC و کیتیناز: بتا-ان‌استیل‌هگزوسامینیداز[3] EC 3.21.52)(۱).

کیتینازها، آنزیم هایی هستند که در چرخه کربن و نیتروژن اکوسیستم مشارکت دارند. کیتین و کیتینولایتیک آنزیم‌ها برای کاربردهای فناوری به‌ویژه کنترل بیمارگرهای مزارع کشاورزی اهمیت بسیاری دارند. کیتینازهای گیاهی برخلاف کیتینازهای قارچی فقط بر نوک هیف‌های قارچ بیمارگر تأثیر می گذارند و ساختارهای سخت کیتینی را تجزیه نمی کنند. همچنین، این آنزیم‌ها به‌تنهایی آثار ضد قارچی ضعیفی دارند و تنها بر گونه‌های محدودی از قارچ‌ها مؤثر هستند. از سوی دیگر، بررسی ها نشان داده‌اند که تمام بیمارگرهای دارای کیتین در دیواره نسبت به کیتینازهای قارچ حساس هستند و غلظت‌های زیاد این کیتینازها برای گیاهان سمی نیست (۲). از آنزیم‌های کیتینازی در زمینه‌های مختلفی استفاده می‌شود، ازجمله کنترل زیستی بیمای‌های گیاهی (۳ و ۴)، تهیه مواد دارویی (۵ و ۶)، زیست‌فناوری (۷) و تولید حشره‌کش‌ها (۸). به‌طور کلی کیتینازهای قارچی به دو دسته اندوکیتینازها و اگزوکیتینازها تقسیم می شوند که از میان آنها، کیتیناز ۴۲ کیلو دالتونی نسبت به سایر کیتینازها مانند کیتیناز ۳۳ و ۳۷ کیلو دالتونی و اگزوکیتینازها نقش مؤثرتری در تجزیه کیتین موجود در دیواره قارچ‌ها دارند (۲ و ۴).

خانواده *Pseudomonaceae* پروکاریوت هوازی گرم منفی و جزو گاماپروتئوباکتری‌ها هستند. لیم و همکاران[4]، باکتری *Pseudomonas stutzeri* را باکتری ضد قارچ *Fusarium solani* معرفی کردند (۹). باکتری یادشده رشد هیف‌های قارچی را در ریشه‌های گیاهی کنترل می کند و آنها دریافتند که آنزیم‌های کیتیناز خارج سلولی *P. stutzeri* باعث این عمل و لیزشدن میسلیوم قارچ در ریزوسفر گیاه می‌شوند. باکتری *Pseudomonas aeruginosa* پروتئین‌های خارج سلولی بسیاری را به محیط ترشح می کند. ژن *ChiC*، کدکننده آنزیم کیتینازی است که در این گونه شناسایی شده است و این ژن، پروتئینی با ۴۸۳ آمینواسید را کد می‌کند که در قسمت N-terminal آن پپتید علامت وجود ندارد. این پروتئین همولوگ آنزیم‌های یافت‌شده در *Serratia marcescens*، *Vibrio harveyi* و *Bacillus circulans* است. باکتری *P. aeruginosa* به‌طور معمول آلوده‌کننده زخم و سوختگی‌های پوست معرفی می‌شود که با در نظر گرفتن آنزیم کیتیناز، درمان کننده زخم است (۱۰). ویوات و همکاران[5]، ژن آنزیم کیتیناز باکتری‌های *Aeromonas hydrophila* و *Pseudomonas maltophila* (*CTS*) را برای افزایش فعالیت آفت‌کشی به باکتری *Bacillus thuringiensis* منتقل کردند و موفق به بیان آن شدند (۱۱).

Alternaria sp.، جنسی از قارچ آسکومیست و جزو قارچ‌های فرصت‌طلب است که در دسته فئوهیفومیستا قرار می گیرد. این قارچ باعث ایجاد فعالیت‌های حساسیتی شایع در انسان می‌شود و به‌طور کلی،

کنیدی‌های آن باعث بروز نشانه‌های مرتبط با مشکلات تنفسی می‌شوند. همچنین عوارضی شامل رینیت آلرژیک (تب یونجه)، آسم، پنومونی را باعث می‌شود. مطالعه‌های متعدد نشان داده‌اند که *Alternaria* sp. باعث عفونت ناخن نیز می‌شود و گونه‌های *Alternaria* sp. بیمارگرهای گیاهی بزرگی شناخته شده‌اند که در طبیعت بسیار شایع هستند و در گردوغبار منازل به‌وفور یافت می‌شوند. همچنین بیماری ناشی از قارچ *آلترناریا* به‌ندرت در بذر چاودار مشاهده می‌شود. *Alternaria* sp.، یکی از مهم‌ترین گندروهای قارچی در بذر، دانه، کاه، برگ‌ها و میوه‌های در حال فساد و گوشت‌های نمک‌سودنشده است. این قارچ ساختار رویشی و زایشی دارد و میسلیوم‌های رنگی ایجاد می‌کند. قارچ *Alternaria* sp. حاوی سموم ویژه میزبانان گیاهی است که به بیماری در آنان منجر می‌شود. در سال‌های اخیر، کنترل زیستی بیماری‌های قارچی در انواع محصولات کشاورزی با استفاده از قارچ ها و باکتری‌های آنتاگونیست خاکزی در سراسر جهان انجام شده است (۱۲-۱۴). کنترل زیستی، راهکار جایگزین سموم شیمیایی گوناگون برای کنترل بیماری های گیاهی است (۱۵).

با هدف یافتن آنتاگونیست مولد کیتیناز علیه قارچ یادشده، غربال‌گری باکتری‌های خاکزی مولد آنزیم کیتیناز با نمونه‌برداری از خاک‌های زراعی و شهری چند منطقه در استان قزوین انجام شد.

مواد و روش‌ها

جداسازی باکتری‌های کیتینولایتیک: برای نمونه‌برداری و خالص‌سازی باکتری از خاک، پنج نمونه خاک مرطوب تا عمق ۱۰ سانتی‌متری از پنج منطقه مختلف شهر قزوین و مزارع کشاورزی اطراف آن تهیه شدند. نمونه‌های خاک به روش رقیق‌سازی متوالی با آب گندزدایی‌شده به رقت 10^{-1} تا 10^{-6} درآمدند. ۱ میلی‌لیتر از هر نمونه روی محیط کشت ویژه جداسازی اکتینومیست[۶] (ا.ج.ا) (Himedia M490) حاوی ۴ گرم بر لیتر کیتین (کلوییدی‌شده) به‌عنوان منبع کربن و ماده اصلی گزینش، ۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک ریفامپیسین[۷] (فرمنتاز)[۸] به‌عنوان ماده جلوگیری‌کننده از رشد سایر باکتری‌ها و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آمفوتریسین ب.[۹] (TC019) به‌عنوان ماده قارچ‌کش ریخته و با پخش آن در سطح پتری‌دیش در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و شرایط تاریکی گرماگذاری و پس از هفت روز، نمونه‌ها بررسی شدند (۱۶). باکتری‌های تولیدکننده کیتیناز، محیط اطراف خود را از کیتین تهی می‌کنند و به‌شکل هاله‌های شفاف روی پلیت ظاهر می‌شوند. علاوه بر آزمون کیتیناز، شناسایی باکتری‌ها از روی توالی ژن حفظ‌شده *16S rRNA* انجام شد. نشان داده شده است که توالی ژن *16S rRNA* در یک جدایه با نزدیک‌ترین همسایگان، حداقل ۹۷ درصد شباهت دارد و یک گونه محسوب می‌شوند (۱۷).

تهیه کیتین کلوییدی: برای استفاده از کیتین (Chitin Himedia RM1356) جامد در محیط کشت، ابتدا به‌شکل کلویید درآورده شد. در پژوهش حاضر، از روش هسو و همکاران[۱۰] برای تهیه کیتین کلوییدال استفاده شد. ابتدا ۴ گرم کیتین به‌شکل پودر جامد به ۶۰ میلی‌لیتر کلریدریک‌اسید غلیظ اضافه و به مدت ۱ ساعت با سرعت ۱۲۰rpm هم زده شد تا کامل حل شود. سپس ۲۰۰ میلی‌لیتر آب خالص گندزدایی‌شده (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) به محلول اضافه شد تا کیتین کلوییدی رسوب کند. کیتین کلوییدی با کاغذ صافی آزمایشگاهی استریل فیلتر و با آب گندزدایی‌شده شسته شد تا به اسیدیته ۳/۵ رسید (۱۸).

استخراج DNA ژنومی: روش کومار و همکاران[11] برای استخراج DNA از باکتری ها استفاده شد (۱۹). حدود ۲۰ میلی‌لیتر باکتری رشدکرده روی محیط کشت ا.ج.ا، میکروسانتریفیوژ شد (دمای ۴ درجه سانتی گراد و ۱۴۰۰۰ دور بر دقیقه برای ۲ دقیقه) و یک پلیت باکتری با وزن ۲۰۰ میلی گرم حاصل شد. پلیت تهیه‌شده در ۰/۵ میلی لیتر بافر TE حاوی ۵۰ میلی مولار Tris-Hcl (Merck) و ۲۵ میلی‌مولار Na-EDTA (Fluka) هر کدام با اسیدیته ۸ و ۰/۱ درصد PVP (Merck)) کامل شده با ۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر لیزوزیم (فرمنتاز) حل شد. تیوب ها ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری شدند و سپس به آنها، ۲۰ میکرولیتر SDS ۱۰ درصد و ۲۰ میکرولیتر پروتئیناز k (۲۵ میلی گرم بر میلی‌لیتر) اضافه شد (Bioneer). تیوب‌ها ۳۰ دقیقه در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد گرماگذاری شدند و سپس هم‌حجم محلول، از محلول کلروفرم: ایزوآمیل‌الکل (۲۴ :۱ v/v) به تیوب‌ها اضافه شد. سپس محلول با سانتریفیوژ در دمای ۴ درجه سانتی گراد و دور ۱۴۰۰۰rpm برای ۲ دقیقه رسوب داده شد و مایع رویی به تیوب استریل جدید منتقل شد. سانتریفیوژ با دمای ۴ درجه سانتی گراد و دور ۱۴۰۰۰rpm برای ۵ دقیقه انجام و DNA رسوب داده شد. مایع رویی دور ریخته و رسوب DNA با ۵۰۰ میکرولیتر الکل ۷۰ درصد شسته شد. دوباره سانتریفیوژ با دمای ۴ درجه سانتی گراد و ۱۴۰۰۰rpm به مدت ۲ دقیقه انجام و الکل دور ریخته شد. پلت DNA در دمای اتاق خشک شد و سپس با توجه به مقدار رسوب، پلت DNA در ۵۰ میکرولیتر بافر TE (اسیدیته۸) حاوی ۲۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر آنزیم RNase A-DNase I free (فرمنتاز) حل شد. پس از حل‌شدن، تیوب‌ها برچسب زده و در فریزر منفی ۲۰ درجه ذخیره شدند. پس از استخراج DNA، از هر نمونه ۳ میکرولیتر DNA استخراج و با دستگاه الکتروفورز افقی ژل آگارز ۰/۸ درصد بررسی شد (۲۰).

واکنش PCR برای تکثیر ژن *16S rRNA*: برای انجام واکنش از آغازگر طراحی‌شده جهانی برای این ژن استفاده شد؛ ویزبرگ و همکاران[12] این آغازگر را طراحی کرده‌اند (۲۱). توالی آغازگرها و ویژگی‌های آنها در جدول ۱ دیده می‌شوند. در تمام آزمایش‌ها از مستر میکس ۲X حاوی آنزیم *Taq* پلیمراز محصول شرکت سیناژن[13] در واکنش‌های PCR استفاده شد.

دماها و زمان‌های اعمال‌شده برای انجام واکنش PCR به ترتیب زیر تنظیم شدند: ابتدا ۳ دقیقه دمای ۹۴ درجه سانتی گراد (دمای واسرشته‌سازی اولیه)، ۳۰ ثانیه دمای ۹۴ درجه سانتی گراد (دمای واسرشته‌سازی)، ۱ دقیقه دمای ۵۴ درجه سانتی گراد (دمای اتصال آغازگرها) و ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه دمای ۷۲ درجه سانتی گراد (دمای تکثیر) در هر چرخه و دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه (دمای تکثیر نهایی). محصولات واکنش PCR با الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد با ولتاژ ۹۰ به مدت ۱ ساعت بررسی شدند.

خالص‌سازی محصول PCR و توالی‌یابی قطعه *16S rRNA*: به منظور آماده‌سازی و ارسال نمونه‌های تکثیرشده برای توالی یابی، ابتدا محصولات PCR با استفاده از کیت خالص‌سازی محصول[14] PCR (AccuPrep-Bioneer، کره جنوبی) طبق دستورعمل شرکت سازنده خالص شدند. نمونه‌ها در دو جهت رفت و برگشت و با روش دای‌داکسی‌ریبونوکلئوتید[15]، توالی‌یابی و در پایگاه NCBI در قسمت BLAST جنس و گونه با بیشترین شباهت به هر توالی بررسی شدند.

جدول ۱- ویژگی‌های آغازگرهای تکثیرکننده ژن *16S rRNA*

نام آغازگر	توالی نوکلئوتیدی	تعداد نوکلئوتید	دمای اتصال	طول قطعه (Kb)
27f	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'	۲۰	۵۴ °C	۱/۵
1525r	5'-AAGGAGGTGWTCCARCC-3'	۱۷	۵۴ °C	

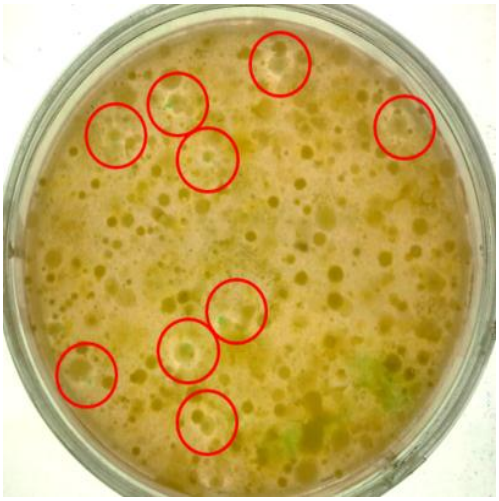
بررسی اثر باکتری های کیتینولایتیک بر قارچ *Alternaria alternata* در شرایط آزمایشگاه: قارچ بیمارگر *A. alternata* که یکی از بیمارگرهای سیب‌زمینی است، از دانشکده گیاه‌پزشکی دانشگاه تهران (پردیس کشاورزی، کرج، ایران) تهیه و محیط سیب‌زمینی دکستروز آگار[۱۶] (اس.دی.آ) (Merck) برای حفظ و نگهداری آن استفاده شد. برای بررسی اثر آزمایشگاهی باکتری‌های کیتینولایتیک بر قارچ *A. alternata*، ابتدا قارچ *A. alternata* به‌شکل چمنی (کشت یکنواخت در سطح پلیت) روی محیط کشت جامد کشت شد و سپس جدایه‌های مختلف باکتری‌های کیتینولایتیک به‌شکل نقطه‌ای کشت شدند. سپس، پلیت‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و تاریکی گرماگذاری و تا دو هفته بررسی شدند. در آزمایش دیگری، رقت‌های مختلف (۰/۰۰۵، ۰/۰۵ و ۰/۵ OD_{600}) باکتری‌های کیتینولایتیک مخلوط با قارچ *A. alternata* کشت شدند. برای این منظور، تمام باکتری‌ها به‌شکل نقطه‌ای و قارچ بیماری‌زای *آلترناریا* به‌شکل چمنی روی پلیت کشت داده شدند.

بررسی اثر باکتری‌های کیتینولایتیک بر قارچ *A. alternate*: برای بررسی آثار باکتری های کیتینولایتیک روی غده سیب‌زمینی، ابتدا غده‌ها ۳ ساعت با آب روان شسته و سپس، ۱ ساعت در محلول ۱ درصد هیپوکلریت سدیم غرق شدند. پس از آن، غده ها با آب گندزدایی شده شسته و برای آزمایش آماده شدند. در این مرحله، شیارهایی به عمق ۱ تا ۳ میلی‌متر با تیغ جراحی گندزدایی‌شده روی غده‌ها ایجاد شدند و سپس، غده‌ها با قارچ *A. alternata* تلقیح و به‌عنوان تیمار شاهد مثبت ارزیابی شدند. غده‌هایی تلقیح‌شده با باکتری‌های کیتینولایتیک به‌عنوان تیمار اصلی ارزیابی شدند. تمام تیمارها در دمای اتاق و تاریکی نگهداری و طی مدت چهار هفته بررسی شدند. ویژگی جدایه‌ها به‌شکل قارچ ایستایی بوده است.

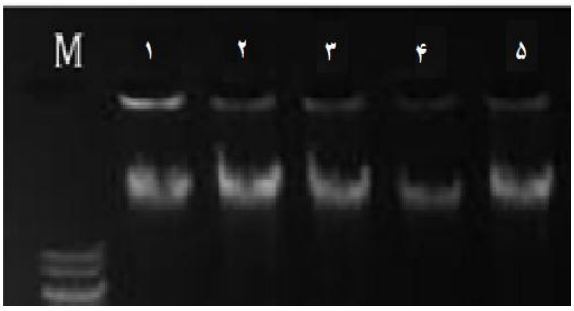
نتایج

خالص‌سازی و شناسایی باکتری از خاک: با کشت نمونه های خاک، تنوع ظاهری زیادی مشاهده شد (شکل ۱ و ۲). بررسی‌ها از طریق توالی‌یابی قطعه *16S rRNA* نشان داده‌اند که چهار واکشت متوالی از پرگنه‌ها به خلوص کامل جدایه‌ها منجر می‌شود (۲۲). نتایج توالی‌یابی قطعه‌های *16S rRNA* پس از بررسی اولیه، مرتب و در پایگاه NCBI در بخش BLAST برای تعیین شبیه‌ترین قطعه *16S rRNA* بررسی شدند. قطعه‌های *16S rRNA* هر جدایه با درجه شباهت حداقل ۹۷ درصد به نزدیک‌ترین گونه هم‌ردیف شدند. نشان داده شده است که توالی ژن *16S rRNA* در یک جدایه با نزدیک ترین، همسایگان حداقل ۹۷ درصد شباهت دارد و یک گونه محسوب می‌شوند (۱۶). بنابراین، باکتری‌های حاصل عبارت بودند از: *Pseudomonas sp.*، *Aeromonas hydrophila* و *Pseudomonas nitroreducens* و *Acinetobacter sp.*

استخراج DNA: DNA باکتری با روش استخراج یادشده به خوبی استخراج و در نهایت، DNA کافی برای انجام واکنش PCR حاصل شد. غلظت DNA خالص‌شده حاصل ۲۴۵ نانوگرم بر میکرولیتر است. برای هر واکنش ۲۵ و ۲۰۰ میکرولیتری PCR به ترتیب از ۱۰۰ و ۱۰۰۰ نانوگرم DNA استفاده شد. شکل ۳، DNA استخراج‌شده روی ژل آگارز ۸ درصد را نشان می‌دهد.



شکل ۱- باکتری‌های کیتینولایتیک. هاله شفاف بر اثر هیدرولیز کیتین کلوییدی در محیط ایجاد می‌شود. نتایج پس از رشد در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و تاریکی به مدت ۷ روز و دایره‌های قرمزرنگ، پرگنه‌های باکتری کیتینولایتیک را نشان می‌دهند.

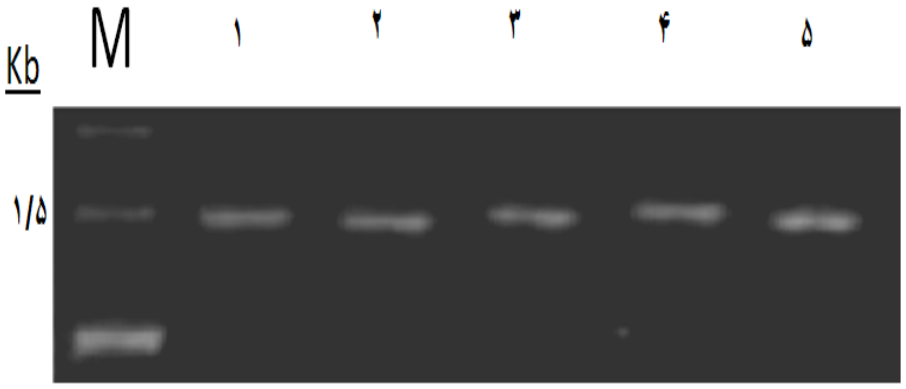


شکل ۲- باندهای DNA استخراج‌شده از چهار نمونه باکتری کیتینولایتیک: ۱. *Pseudomonas* sp.، ۲. *Aeromonas hydrophila*، ۳. *Pseudomonas nitroreducens*، ۴. *P. nitroreducens*، ۵. *Acinetobacter* sp.. M: نشانگر DNA (1kb).

تکثیر و توالی‌یابی قطعه *16S rRNA*: واکنش PCR با استفاده از DNA استخراج شده و طبق شرایط یادشده انجام شد. واکنش در مقدار ۲۵ و نیز ۲۰۰ میکرولیتر به‌خوبی پیش رفت و قطعه با اندازه مدنظر تکثیر شد (شکل ۴). باندهای *16S rRNA* با اندازه ۱/۵ کیلوباز[۱۷]، کیفیت خوبی روی ژل آگارز ۰/۸ درصد نشان دادند. باند تکثیرشده، تک باند و وضوح بسیار خوبی داشت و نیازی به استخراج از ژل نبود. واکنش PCR با حجم ۲۰۰ میکرولیتر انجام شد و باندها در این حالت نیز کیفیت خوبی داشتند.

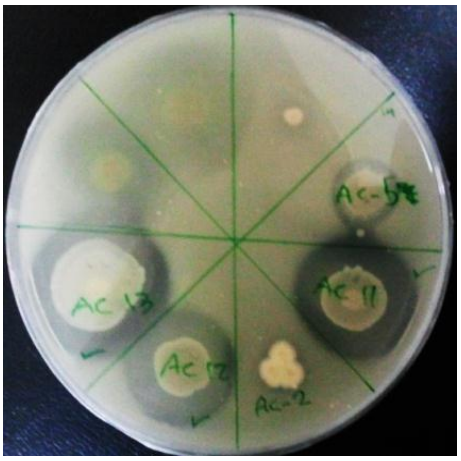
```
Pseudomonas          --------------------------------------------------lmgywhn-wpa
Streptomyces         ---------------------------------------------pahalvgylhasfan
Streptacidiphilus    ------------------------------------------------khlvtgyw-qdfdn
Nocardiopsis         mlsprktrlailsglaavatafvtsvgaltpepaqastapvetqqtsqwltgyw-hnfdn
                                                                      : **    :

Pseudomonas          gpadgyqrgqfanmsleevprdynvvavafmkgsgi------------ptfkpynlsdae
Streptomyces         gs---------gytrladvpdswdvidlafgeptsatsgdirfhrcpv-tecpnaesdad
Streptacidiphilus    ga---------tdqkisdvssqydiiavsfatadpsntggitfsldstlqsklggytdaq
Nocardiopsis         gs---------tvmplseipaeynlvavafadnhpqldggitfnlas---delngytdaq
                     *              : ::  .:::: ::*                          :**:

Pseudomonas          frrqvgvlnsqgravlmslggadahialn-pgqeqplaneiirlvetygfdgldidlegs
Streptomyces         fkaairakqaagkkvlisiggqngqvqltttaardafvssvsdiidtygldgldidfegh
Streptacidiphilus    fkadiaakhaagkkvvlsvggqngtisvassaaatnfansayslmqtygfdgvdidlehg
Nocardiopsis         frediaaiqaqgrkviisvggelghvnvtnptqaknfadtthalmqdygfdgvdidlehg
                     *:  : . .: *: *::*:**  . : :        :..    ::: **:**:***:*

Pseudomonas          aidfaanktvlp--------aalklvkdhyaaegkhfiismapefpyltsa---------
Streptomyces         slsldandtdfrhpttpvivnlisalktlkaaygakfvltmapetffvqngyqyygtgkw
Streptacidiphilus    lnp----------------tymaqalhslaskagsgfvltmapqtidmlns---------
Nocardiopsis         ina----------------ehmtsalrdlsgkagpgliitmapqtidfqsp---------
                                         . ::   .  *  ::::***:   . .

Pseudomonas          -------gryvdylkalegyydfiapqfynqggdgl-wvqeanngkgawiaqnndalked
Streptomyces         ggqdprcgaylpvihalrddltllhvqdynsgpvmgldnqyhsmg------------gad
Streptacidiphilus    ------ssdylatalavkdvltivntqyynsgsmngcdggvyseg------------tvd
Nocardiopsis         ------sagyyqlasnisdiltivnmqyynsgsmlgcdssvyqqg------------tsd
                           . *      :     ::  * **.*          . *              *

Pseudomonas          flfylteslvsg-------trgftripadkfviglpanvdaaatgyvvnptaltnafkrl
Streptomyces         fhiamtdmlltgfpvagdpdhvfpplrpdqvaigmpastn-agngyva-paevtraldcl
Streptacidiphilus    fitsmacta------------iqaglspsqvgigvpastsaagsgyva-psvvenalncl
Nocardiopsis         fvaalaciq------------lemglspdqvglglpavpsaagggyla-psgiisaldcl
                     *   ::                  :  .:. :*:**  . *. **:. *: :  *:. *

Pseudomonas          ya-----------kgvsikglmtwsvnwd-----------------
Streptomyces         tkktdcgayathgtwpslrglmtwsvnwdryanwefqknf-----
Streptacidiphilus    akgtncgtfkpsttwpaiggvmtwstnwd----------------
Nocardiopsis         etgtscgsfspttpygpiggvmtwsinwdatnnyafanaisarlq
                                        : *:**** ***
```

شکل ۳- مقایسه توالی آمینواسیدی آنزیم کیتیناز *P. nitroreducens* با چند آنزیم هومولوگ در گونه باکتری خانواده اکتینومیست و استرپتومایسس. توالی‌ها، شباهت‌های بسیاری نشان دادند، به‌طوری که حداقل شباهت بین *P. nitroreducens* و *Streptomyces durhamensis* ۴۲ درصد بود. خط قرمز، محل قرارگیری دمین کاتالیتیک را نشان می‌دهد. باکس قرمزرنگ جایگاه فعال را نشان می‌دهد که کامل حفظ شده باقیمانده است. آنزیم کیتیناز از باکتری‌های *P. nitroreducens* (WP_028689291.1)، *Nocardiopsis prasina* (BAC45251.1)، *Streptacidiphilus jeojiense* (WP_030257847.1) و *Streptomyces durhamensis* (WP_031167453.1) مقایسه شدند.

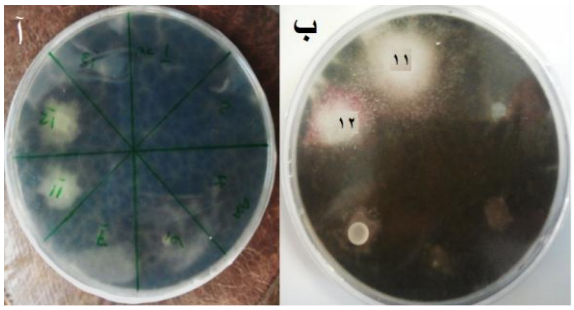


شکل ۴- قطعه *16S rRNA* تکثیرشده از باکتری ۱. *Pseudomonas* sp، ۲. *Aeromonas hydrophila*، ۳. *P. nitroreducens*، ۴. *P. nitroreducens*، ۵. *Acinetobacter sp*. M: نشانگر DNA (1kb).

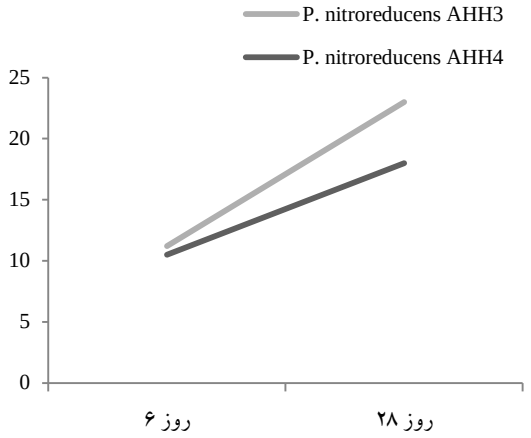
بررسی اثر باکتری‌های کیتینولایتیک بر قارچ *A. alternata* در شرایط آزمایشگاه: پس از یافتن باکتری های کیتینولایتیک (شکل ۵)، آزمایش‌های بعدی برای بررسی آثار این جدایه‌ها بر عامل بیمارگر گیاهی *A. alternata* انجام شدند. نتایج در تمام آزمایش ها برای اطمینان تا ۲۸ روز بررسی شدند، هرچند نتایج پس از گذشت ۶ روز تا روز پایان ثابت ماندند (شکل ۶). بررسی‌ها نشان دادند که در بین پنج جدایه، تنها جدایه‌های *Pseudomonas nitroreducens* رشد قارچ را تاحدی محدود می کنند (شکل ۷). اثر کشت هم‌زمان باکتری *P. nitroreducens* به‌شکل مخلوط با قارچ *A. alternata* نشان داد که در حضور غلظت‌های زیاد این باکتری (OD_{600} ۰/۰۵ و بیشتر)، رشد قارچ *A. alternata* کامل متوقف می‌شود (شکل ۸).



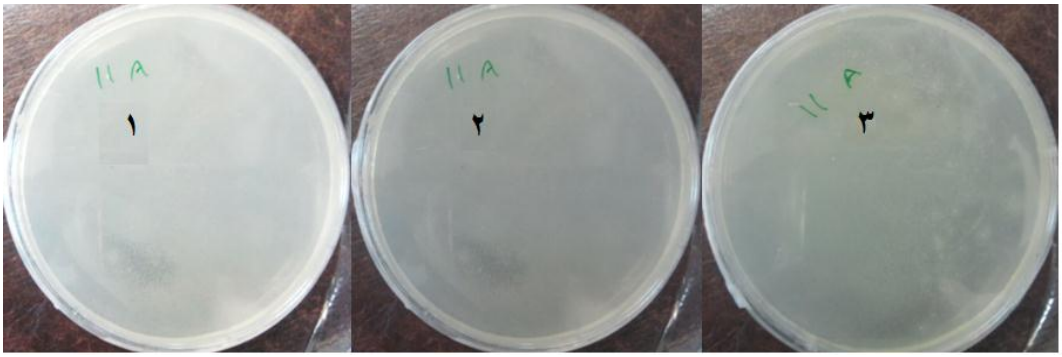
شکل ۵- باکتری‌های کیتینولایتیک. هاله شفاف بر اثر هیدرولیز کیتین کلوییدی در محیط ایجاد می شود. نتایج پس از رشد در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و تاریکی به مدت ۴ روز



شکل ۶- اثر باکتری‌های کیتینولایتیک روی قارچ بیمارگر *Alternaria* sp. پرگنه باکتری‌های ۱۱ (*P. nitroreducens* AHH4) و ۱۲ (*P. nitroreducens* AHH3) توانایی رقابت با قارچ را داشته‌اند و تا حدودی آن را عقب رانده‌اند. آ. نتیجه پس از ۶ روز، ب. نتیجه پس از ۲۸ روز



شکل ۷- نمودار اثر باکتری‌های کیتینولایتیک روی قارچ بیمارگر *Alternaria* sp. پرگنه باکتری‌های ۱۱ (*P. nitroreducens* AHH4) و ۱۲ (*P. nitroreducens* AHH3). محور افقی زمان بر حسب روز و محور عمودی قطر هاله مهاری بر حسب میلی‌متر است.



شکل ۸- اثر کشت مخلوط باکتری‌های کیتینولایتیک با قارچ بیمارگر *Alternaria* sp. باکتری‌ها باعث رشدنکردن بیمارگر شده‌اند (نتایج پس از ۱۴ روز). غلظت‌های مختلفی از باکتری استفاده شد: ۱. غلظت OD_{600} ۰/۵، ۲. غلظت OD_{600} ۰/۰۵ و ۳. غلظت OD_{600} ۰/۰۰۵.

بررسی اثر باکتری‌های کیتینولایتیک بر قارچ *A. alternata* در شرایط مزرعه: در مرحله پیش باکتری کیتینو لایتیک *Pseudomonas nitroreducens* AHH4، عامل ضد *A. alternata* شناسایی شد و در این مرحله کشت و به‌شکل محلول در آب روی غده‌ها تیمار شد. نتایج، کنترل کامل بیماری را روی غده‌های تلقیح‌شده با *A. alternata* نشان دادند (شکل ۹).

شکل ۹- اثر باکتری‌های کیتینولایتیک روی غده‌های سیب‌زمینی در شرایط مزرعه. ۱. نمونه شاهد (بدون باکتری کیتینولایتیک و قارچ *A. alternata*)، ۲. نمونه تیمارشده با قارچ بیماری‌زای *A. alternata* و رشد این قارچ مشاهده می‌شود، ۳. نمونه تیمارشده با قارچ بیماری‌زای *A. alternate* و باکتری‌های کیتینولایتیک و باکتری‌های کیتینولایتیک از رشد قارچ *A. alternata* جلوگیری کرده‌اند.

بحث و نتیجه‌گیری

تاکنون چندین سویه باکتری و قارچ با توانایی کیتینولایتیک شناسایی شده‌اند؛ ازجمله *Serratia mercescens* برای کنترل *Sclerotium rolfsii* (۲۳)، *Paenibacillus illinoisensis* علیه *Rhizoctonia solani Kuhn* (۲۴) و *Trichoderma harzianum* برای کنترل *Botrytis cinerea* (۲۵). همچنین، تعدادی از ژن‌های کیتیناز متعلق به گونه‌های مختلف *Streptomyces* مانند *S. coelicolo* (۲۶)، *S. griseus* (۲۷) و *S. olivaceoviridis* (۲۸) جداسازی و ویژگی‌های آنها تعیین شده‌اند. طی پژوهشی، ژن این آنزیم (*ChiC*) به‌شکل نوترکیب در گیاه برنج با پروموتور CaMV 35S کلون شد و برنج‌های تراریخت از رشد قارچ *Magnaporthe grisea* عامل بیماری بلاست جلوگیری کردند.

باکتری *Pseudomonas stutzeri*، باکتری ضد قارچ *Fusarium solani* شناخته می‌شود و رشد هیف‌های قارچی را در ریشه‌های گیاهی کنترل می‌کند. آنزیم‌های کیتیناز خارج سلولی *P. stutzeri*، باعث این عمل و نیز لیزشدن میسلیوم قارچ در ریزوسفر[18] گیاه می‌شوند. ژن *ChiC*، کدکننده آنزیم کیتینازی است که در این گونه شناسایی شده است. ویوات و همکاران، ژن آنزیم کیتیناز باکتری‌های *Aeromonas hydrophila* و *Pseudomonas maltophila* (*CTS*) را برای افزایش فعالیت آفت کشی به باکتری *Bacillus thuringiensis* منتقل و پروتئین مدنظر را تولید کردند (۱۱).

روبرت و همکاران[19]، کیتینازهای گیاهی را برای فعالیت ضدقارچی و ویژگی آنزیم ها مطالعه کردند. طبق این مطالعه ها، کیتینازهای جداشده از دانه گندم،

جو و ذرت به‌عنوان اندو-کیتیناز عمل می کنند و مانع رشد هیف‌ها می‌شوند (۲۹). همچنین مشاهده شده است که گسترش کندتر بیماری توسط *Sclerotium rolfsii* روی دانه‌های لوبیا در حضور *Serratia marcescens* با فعالیت شدید کیتینازی رخ می‌دهد. شاپیرا و همکاران[۲۰] نیز ژن کیتیناز *S. marcescens* را در *E. coli* کلون کردند و آماده‌سازی کیتیناز به‌طور مؤثری بیماری ایجادشده توسط *S. rolfsii* در لوبیا و *R. solani* در پنبه را در شرایط گلخانه کاهش داد (۳۰).

در ابتدای کار برای جداسازی باکتری کیتینولایتیک از آنتی‌بیوتیک Rifampicin به‌عنوان ماده جلوگیری‌کننده از رشد سایر باکتری‌ها و Amphotericin B به‌عنوان ماده قارچ‌کش استفاده شد. برای گزینش اکتینومیست‌ها و جلوگیری از رشد سایر باکتری‌هایی که نمی‌توانند از کیتین استفاده کنند، به‌جای گلیسرول در محیط‌کشت Actinomycete isolation agar فقط از کیتین کلوییدال (منبع کربن) استفاده شد.

اکتینومیست‌ها، باکتری‌هایی هستند که شباهت بسیاری به قارچ ها دارند. سرده های این خانواده مانند استرپتومایسس و نوکاردیا منابع عظیمی برای تولید انواع آنتی‌بیوتیک‌هایی هستند که در پزشکی و گیاه‌پزشکی استفاده می‌شوند. امروزه، باکتری‌های *استرپتومایسس* و *نوکاردیا* در مراکز پژوهشی از خاک و به‌ویژه خاک‌های قلیایی (دارای اسیدیته ۷ تا ۹) غربال می‌شوند. سپس با تعیین قدرت ضد میکروبی و آزمایش تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی، گونه‌ها و سویه های قوی از نظر تولید مواد ضد میکروبی انتخاب و چنانچه ماده مؤثر ضد میکروبی روی جمعیت داوطلب انسانی تأیید شود، به بازار مصرف معرفی می‌شود (۳۱ و ۳۲). در ادامه، قطعه *16S rRNA* تکثیرشده و نتایج توالی‌یابی قطعه‌های *16S rRNA* پس از بررسی اولیه، مرتب و در پایگاه NCBI در بخش BLAST برای تعیین شبیه‌ترین قطعه *16S rRNA* بررسی شدند. قطعه *16S rRNA* تمام باکتری‌ها با شباهت حداقل ۹۷ درصد به جنس یا گونه‌های ثبت‌شده در پایگاه موجود بود. بر اساس نتایج بدویی دلفارد و همکاران[۲۱] ال- آسپاراژیناز نوترکیب تعیین توالی شد و نتایج همردیفی نشان می دهد که توالی پیشنهادی اسید آمینه ایی شباهت بالایی با ال- آسپاراژینازهای سایر *سودوموناس ایروجینوزها* در حدود ۹۹ درصد دارد(۳۳). در نهایت، با بررسی آثار باکتری‌های کیتینولایتیک در شرایط آزمایشگاهی نشان داده شد که در حضور غلظت‌های زیاد (OD_{600} ۰/۰۵ و بیشتر)، رشد قارچ *A. alternata* کامل متوقف می‌شود. همچنین، این جدایه از بیماری غده سیب‌زمینی در شرایط مزرعه توسط قارچ بیمارگر جلوگیری کرد و بنابراین باکتری کیتینولایتیک *P. nitroreducens* Strain AHH4 به‌طور کارآمدی توانایی بازدارندگی رشد قارچ *A. alternata* را دارد. با انجام مطالعه‌های تکمیلی و دست‌ورزی مناسب، سویه بسیار امیدبخش (*P. nitroreducens*) برای کنترل بیماری‌های قارچی معرفی می‌شود.

References

(1) Hamid R., Khan MA., Ahmad M., Ahmad MM., Abdin MZ., Musarrat J., et al. Chitinases: An update. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*. 2013; 5: 21-29.

(2) Lorito M., Harman GE., Hayes CK., Broadway RM., Tronsmo A., Woo SL., et al. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*; Antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. *Phytopathology* 1993; 83: 302-307.

(3) Haran S., Shickler H., Chet I. Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum. Microbiology* 1996; 142: 2321-2331.

(4) Limon MC., Lora JM., Garcia I., De la Cruz J., Liobell A., Benitez Tet al. Primary structure and expression pattern of the 33-kDa chitinase gene from the mycoparasitic fungus - *Trichoderma harzianum. Current. Genetic* 1995; 28: 478-483.

(5) De la Vega H., Specht CA., Liu Y., Robbins PW. Chitinases are a muti-gene family in *Aedes*, *Anopheles* and *Drosophila*. *Insect Molecular Biology* 1998; 7: 233-239.

(6) Wen CM., Tseng CS., Cheng CY., Li YK. Purification, characterization and cloning of a chitinase from *Bacillus sp. NCTU*2. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 2002; 35: 213-219.

(7)Revah-Moiseev S., Carroad A. Conversion of the enzymatic hydrolysate of shellfish waste chitin to single-cell protein. *Biotechnology and Bioengineeing* 1981; 23: 1067-1078.

(8) Herrera-Estrella A., Chet I. Chitinases in biological control. *Experientia. Supplementum* 1999; 87: 171-184.

(9) Lim HS., Kim YS., Kim SD. *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 Genetic Transformation and Antifungal Mechanism against Fusarium solani, an Agent of Plant Root Rot. *American Society for Microbiology* 1990; 57: 510-516.

(10) Folders J., Jon A., Marc SR., Leendert C., Van L., Jan T., Wilbert B. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* Chitinase, a Gradually Secreted Protein. *Journal of Bacteriology* 2001; 183: 7044-7052.

(11) Wiwat C., Lertcanawanichakul M., Siwayapram P., Pantuwatana S., Bhumiratana A. Expression of chitinase-encoding genes from *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas maltophila* in *Bacillus thuringiensis* spp. isrealiensis. *Gene.* 1996; 179: 119-126.

(12) Leemann M., Den Ouden FM., Van Pelt JA., Cornelissen C., Matamala GA., Akker PAHM., Schippers B. Suppression of Fusarium wilt of radish by co-noculation of fluorescent *Pseudomonas* spp. and root-colonizing fungi. *European Journal of Plant Pathology* 1996; 102: 21-31.

(13) Lemanceau P., Bakker PAHM., Dekogel WJ., Alabouvette C., Schippers B. Effect of pseudobactin 358 production by *Pseudomonas putida* WCS358 on suppression of Fusarium wilt of carnations by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. *Biocontrol Science and Technology* 1992; 58: 2978-2982.

(14) Raaijmarkers JM., Leeman M., Van Oorschot MMP., Van Der Sluis I., Schippers B., Bakker PAHM. Dose-response relationships in biological control of Fusarium wilt of radish by *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* 1995; 85:1075-1081.

(15) Dehnad A., Esmaili E., Solouki M. Isolation and molecular identification chitinase-producing Streptomyces strains and examination of their in-vitro antagonistic effects. *Biological Journal of Microorganism* 2015; 4(15): 123-134.

(16) Semedol LTA., Linhares RC., Gomes GP., Manfi CS., Alviano LF., Linhares R. Isolation and characterization of actinomycetes from Brazilian tropical soils. *Microbiological research* 2001; 155: 291-299.

(17) Petti CA. Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. *Clinical infectious diseases* 2007; 44: 1108-1114.

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

(19) Kumar V., Alpana B., Omprakash G., Gajraj SB. An improved method for isolation of genomic DNA from filamentous actinomycetes. *Journal of Sciences Engineering and Technology Management* 2010; 2: 10-13.

(20) Sambrook J., Russell DW., editors. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.

(21) Weisburg WG., Barns SM., Pelletier DA., Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriol*ogy 1991; 173: 697-703.

(22) Benson S. *Microbiological Applications, Laboratory Manual*, 8th ed. The McGraw−Hill Science/Engineering/Math; 2001.

(23)Ordentlich A., Elad Y., Chet I. The role of chitinase of *Serratia mercesens* in biocontrol of *Sclerotium rolfsii*. *Journal of Phytopathology* 1988; 78: 84-88.

(24) Jung WJ., An KN., Jin YL., Park RD., Lim KT., Kim KY., et al. Biological control of damping-off caused by *Rhizoctonia solani* using chitinaseproducing *Paenibacillus illinoisensis* KJA-424. *Soil Biology & Biochemistry* 2003; 35: 1261-1264.

(25) Tronsmo A. Biological and integrated controls of *Botrtis cinerea* on apple with *Trichoderma harzianum*. *Biological Control* 1991; 1: 59-62.

(26) Saito A., Fujii T., Yoneyama T., Redenbach M., Ohno T., Watanable T., et al. High-multiplicity of chitinase genes in *Streptomyces coelicolor* A3 (2) *Biosci. Biotechnology, and Biochemistry* 1999; 63(4): 710-718.

(27) Ohno T., Aemand S., Hata T., Nikiadou N., Henrissat B., Mitsutomi M., et al. A modular family 19 chitinase found in the prokaryotic organism *Streptomyces griseus* HUT 6037. *Journal of Bacteriology* 1996; 178: 5065-5070.

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

(29) Roberts WA., Selitrennikoff CP. Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. *Microbiology* 1988; 134: 169-176.

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

(31) Ghai R., McMahon KD., Rodriguez-Valera F. Breaking a paradigm: cosmopolitan and abundant freshwater actinobacteria are low GC. *Environmental Microbiology Reports*. 2012; 4(1): 29–35.

(32) Servin JA, Herbold CW, Skophammer RG, Lake JA. Evidence excluding the root of the tree of life from the actinobacteria. *Molecular Biology and Evolution* 2008; 25(1): 1-4.

(33) Badoei-dalfard A, Karami Z, Ramezani-pour N. Gene sequencing, cloning, and expression of the recombinant L-Asparaginase of *Pseudomonas aeruginosa* SN4 strain in *Escherichia coli*. *Biological Journal of Microorganism* 2016; 4 (16) :11-20.

---

[1]- IUBMB
[2]- Endo-1,4-b-glucanase
[3]- b-*N*-Acetylhexosaminidase
[4]- Lim
[5]- Wiwat
[6]- Actinomycete isolation agar
[7]- Rifampicin
[8]- Fermentas
[9]- Amphotericin B
[10]- Hsu
[11]- Kumar
[12]- Weisburg
[13]- CinnaGen
[14]- AccuPrep Gel purification Kit
[15]- Dideoxyribonucleotide
[16]- Potato Dextrose Agar
[17]- Kb
[18]- Rhizosphere
[19]- Roberts
[20]- Shapira