بسم الله الرحمن الرحيم

۱۱۵۰۹۷

دانشگاه شهید باهنر کرمان

دانشکده کشاورزی

گروه مهندسی گیاهپزشکی

پایان نامه تحصیلی جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی

مطالعه اثرات آنتاگونیستی اکتینومیست‌های خاکزی علیه قارچ بیمارگر *Magnaporthe oryzae* (syn: *Pyricularia oryzae*)

استاد راهنما:

پروفسور غلامحسین شهیدی بنجار

استادان مشاور:

دکتر فریدون پاداشت دهکایی

دکتر سید امین آیت اللهی موسوی

مؤلف:

مرضیه ابراهیمی زرندی

بهمن ۱۳۸۶

۱۳۸۸/۴/۱۶

از اطلاعات مدارک علمی دوره تحصیلات تکمیلی

۱۱۵۰۹۷

دانشگاه شهید باهنر کرمان

این پایان نامه به عنوان یکی از شرایط احراز درجه کارشناسی ارشد

به بخش مهندسی گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی

دانشگاه شهید باهنر کرمان

تسلیم شده است و هیچ گونه مدرکی به عنوان فارغ از تحصیل دوره مربوطه شناخته نمی شود.

	نام و نام خانوادگی	امضاء
دانشجو	مرضیه ابراهیمی زرندی	
استاد راهنما	آقای پروفسور غلامحسین شهیدی	
استاد مشاور اول	آقای دکتر فریدون پاداشت دهکایی	
استاد مشاور دوم	آقای دکتر سید امین آیت اللهی موسوی	
داور	آقای دکتر حمید عبداللهی	
نماینده تحصیلات تکمیلی	آقای دکتر محمد حسن فولادی	

حق چاپ محفوظ و مخصوص دانشگاه می باشد.

دانشگاه شهید باهنر
کرمان
اداره تحصیلات تکمیلی

تقدیم به

روان پاک مهندس علیرضا افضلی پور و بانو فاخره صبا

تقدیم به

پدر و مادرم بزرگوارم، آنها که این نوشته و بسی ناگفته‌های دیگر وامدار تلاشهای وصف ناشدنی شان می باشد.

تقدیم به

خواهر و برادران عزیزم، آنها که همیشه و همه حال بی ریاترین محبت‌ها را نثارم کردند.

تشکر و قدردانی

سپاس و ستایش یکتا پروردگاری را که عشق به آموختن را در دل انسانها به ودیعه نهاد.

با سپاس از استاد بزرگوارم جناب آقای پروفسور غلامحسین شهیدی که پندار، گفتار و کردار نیکش در وصول به این مقصود پیوسته چون چراغی فرا رویم بود، بی گمان شاگردی ایشان برای همیشه مایه فخر و مباهات من خواهد بود.

با سپاس از جناب آقای دکتر فریدون پاداشت که در طول این دوره همواره حمایت های بی دریغ ایشان در به ثمر رسیدن این پایان نامه نقش ارزنده ای داشت. از جناب آقای دکتر سید امین آیت اللهی موسوی که با راهنمایی های خویش حقیر را مورد لطف قرار دادند، صمیمانه تشکر می نمایم. از جناب آقای دکتر حمید عبداللهی که زحمت داوری این پایان نامه را تقبل کردند، سپاسگزارم.

از سرکار خانم مهندس عقیقی که در طول انجام این تحقیق همواره راهنما و مشوقم بوده اند، سپاسگزارم. همچنین از جناب آقای مهندس نگارستانی که در بخش آماری این پژوهش از راهنمایی های ایشان استفاده نموده ام، تشکر می نمایم.

از کلیه اساتید محترم بخش کیاهپزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان که در دوران تحصیل از محضر پرفیض شان بهره های فراوان بردم نهایت امتنان را دارم.

و ارج می نهم بهدلی دوستانی را که لحظه ای در این مسیر صعب همراهی مهربانانه شان را از من دریغ نداشتند.

چکیده

عوارض ناشی از عفونتها و آلودگیهای پاتوژنهای قارچی گیاهان در دهه های اخیر افزایش یافته است و روشهای کنترل سنتی آنها، فاقد کارایی لازم است. قارچ *Magnaporthe oryzae* ، با فرم غیرجنسی *Pyricularia oryzae* به عنوان یکی از مهمترین قارچهای بیمارگر گیاهی است که در سراسر دنیا پراکنده می باشد و مبارزه با آن از طرق روشهای غیر سنتی مورد توجه متخصصین دنیا قرار گرفته است. اهمیت این قارچ در کشاورزی با توجه به ایجاد بیماری مخرب بلاست در گیاه برنج که تغذیه بیش از نیمی از مردم جهان به اتکا آن می‌باشد، روز به روز بیشترمی شود. همچنین بیمارگر مذکور سمومی تولید می کند که شواهدی از ارتباط بین این سموم و بیماریهای انسانی وجود دارد. اکتینومیست‌ها با خصلت پراکنش گسترده، رشد رشته‌ای در خاک، توانایی در کلونیزه کردن سطح ریشه گیاه، اثرات بازدارندگی روی میکروارگانیسم‌ها و تولید متابولیت‌های ثانویه متنوع از لحاظ شیمیایی از جمله آنتی‌بیوتیک‌ها، به عنوان عوامل مقتدر کنترل بیولوژیکی علیه بسیاری از عوامل بیماریزای گیاهی به شمار می‌روند و همچنین می‌توانند در استقرار موازنه میکروبیولوژیکی در خاک، نقش فعالی داشته باشند. در این تحقیق جهت کنترل بیولوژیکی *M. oryzae*، فعالیت آنتاگونیستی اکتینومیست‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت و جدایه‌های فعال از این گروه میکروارگانیسم‌ها تهیه شد، که فعالیت چشمگیری در کنترل بیماری داشتند. از میان ۱۱۸جدایه به دست آمده از خاک مناطقی از شهرهای کرمان و زرند، دو جدایه ۲۶۳ و ۳۳۹ که تأثیر بیشتری بر قارچ مذکور داشتند، مورد بررسی قرار گرفتند. غربالگری از طریق آزمون زیستی به دو روش Agar disk methode و Well diffusion method انجام گرفت. سویه های فعال جهت تعیین منحنی تولید متابولیت فعال در کشتهای غوطه ور تکثیر شدند. جدایه ۲۶۳ به نام *Streptomyces sindeneusis* شناسایی گردید و جدایه ۳۳۹ در مرحله شناسایی قرار دارد. هر دو جدایه بعد از قرار گرفتن در معرض کلروفرم اثر آنتی بیوتیکی خود را روی قارچ *M. oryzae* حفظ نمودند. بررسی ویژگیهای بیوشیمیایی دو جدایه استرپتومایسس ۲۶۳ و ۳۳۹ نشان داد که ماده فعال ضد قارچی جدایه ۳۳۹ قطبی بوده و در آب حل می گردد در حالی که قابلیت حل شدن در کلروفرم و تتراکلریدکربن را ندارد ولی ماده مؤثر موجود در عصاره خام جدایه ۲۶۳ دارای ترکیباتی است که هم ماهیت قطبی و هم ماهیت غیر قطبی دارند زیرا هم در حلالهای قطبی و هم در حلالهای غیر قطبی حل می‌شود. درآزمایش مربوط به تعیین دامنه حرارتی و تعیین پایداری در محیط این دو جدایه، جدایه ۲۶۳ تا دمای ۱۶۰°C و جدایه ۳۳۹ دمای ۷۰°C فعالیت بیولوژیک خود را حفظ نمودند و پایداری آنها تحت شرایط آزمایشگاهی به ترتیب حدود ۱۸۰ و ۳۴ روز ارزیابی شد. حداقل غلظت بازدارنده از رشد(MIC)، با استفاده از حلالیت ماده خشک عصاره سویه‌های فعال در حلال دی‌متیل سولفوکساید و متانول (۱:۱، v/v) درpellet، برای جدایه ۲۶۳، ۳/۱۲۵mg/cc و برای جدایه ۳۳۹ ۵۰ mg/cc مشخص شد، در حالی کهMIC در supernatant، برای دو جدایه به ترتیب، ۶/۲۵mg/cc و mg/cc ۵۰ بود. اثر هر دو جدایه روی بیمارگر مورد مطالعه به صورت قارچ ایستایی بود. در آزمایشات گلخانه ای، جدایه ۲۶۳ به دلیل ایجاد هاله ممانعت بیشتر و پایداری در دماهای بالاتر، انتخاب و روی بوته‌های برنج تیمار شد. مطالعه آماری تأثیر تیمارهای مختلف روی صفات، تعداد لکه روی برگ، ارتفاع بوته، وزن خشک کل گیاه، وزن خشک ریشه، وزن خشک ساقه و برگ بوته‌های برنج رقم حساس کاظمی طی ۴ تیمار و ۱۰ تکرارانجام گردید. تجزیه و تحلیل داده های حاصل در قالب طرح کاملاً تصادفی و آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام گرفت و چنین نتیجه شد تیماری که در آن قارچ و جدایه ۲۶۳ با هم استفاده شده بود در مقایسه باتیمار شاهد و تیماری که فقط قارچ دریافت کرده بود با میانگین بالاتری، بیشترین اثر مثبت را روی صفت ارتفاع بوته داشت و بین میانگین این تیمارها در سطح ۵٪ تفاوت معنی‌داری

وجود دارد ولی روی صفت وزن خشک برگ، ریشه و وزن خشک کل اگر چه تیماری که فقط قارچ بیماریزا را دریافت کرده بود با حداقل میانگین کمترین اثر را داشته ولی بین تیمارها اختلاف معنی دار وجود نداشته است. درمورد صفت تعداد لکه روی برگ، بین دو تیمار بیمارگر و تیمار بیمارگر به اضافه پاتوژن مقایسه میانگین‌ها بر اساس توزیع t استیودنت انجام گرفت و مشخص گردید که در سطح ۱٪ بین دو تیمار مذکور اختلاف معنی‌داری وجود دارد. همچنین میانگین درصد آلودگی سطح برگ بر اساس مقیاس تعیین شده توسط مرکز بین المللی تحقیقات برنج فیلیپین ۸٪ برای تیماری که فقط با بیمارگر *M. oryzae* تلقیح شده بود و ۰/۵٪ برای تیماری که *M. oryzae* و *S. sindeneusis* توامأ تلقیح شده بودند، ارزیابی شد. ممانعت از پیشروی قارچ توسط اکتینومیست در نقطه تلقیح در تیماری که *M. oryzae* + جدایه۲۶۳ استفاده شده بود، به خوبی مشهود بود. چنین استنتاج می‌شود که در این تیمار قارچ *M. oryzae* قادر به نفوذ به بافت برگ می‌باشد ولی آلودگی در همان مراحل اولیه توسط آنتاگونیست مذکور (استرپتومایسس جدایه ۲۶۳) متوقف می‌شود که به صورت لکه های کوچک سفید رنگ با نقاط مرکزی سیاهرنگی دیده می‌شود. عواملی که به نظر می‌رسد در ایجاد این اثر آنتاگونیستی مؤثر باشند عبارتند از: ۱) تولید ماده ضد قارچی با ماهیت آنتی‌بیوتیکی ۲) القاء مقاومت سیستمیک Systemic Induced Resistance (SIR)، با توجه به اینکه مکانیزم عمل *Streptomyces sindeneusis* علیه قارچ *M. oryzae* به صورت قارچ ایستایی می‌باشد و با استناد به نتایج بدست آمده از آزمایشات برون‌تنی، این فرض که پدیده روشن سازی ژنها (Priming یا Potentiation) در بروز اثر آنتاگونیستی استرپتومایسس مذکور علیه بیمارگر عامل بلاست برنج دخیل می‌باشد، قوت می‌یابد البته واضح است که اثبات این موارد نیاز به تحقیقات فراتر در این زمینه دارد. از آنجا که طی مطالعات آزمایشگاهی اثر آنتاگونیستی جدایه ۲۶۳ اثبات گردید و آزمایشات گلخانه‌ای آن را قوت بخشید، باید آن را به عنوان یک عامل مؤثر در کنترل بیولوژیک مورد مطالعه فراتر مزرعه ای قرار داد و باید ژن مسئول تولید ماده مؤثر را شناسایی و مورد مطالعه قرار داد و در صورت امکان جهت تولید گیاهان تراریخت مقاوم به کار گرفت. با توجه به اینکه یکی از راههای بقا بیمارگر عامل بلاست برنج از طریق بقایای گیاهی در خاک می‌باشد، اضافه کردن جدایه مذکور به خاک سبب کاهش اینوکلوم اولیه و در نهایت کاهش بیماری خواهد شد لذا از این جدایه می‌توان به صورت کودهای بیولوژیک بهره گرفت همچنین از آن می‌توان در تحقیقات آتی خصوصاً جهت پوششهای بذری (Seed coat) استفاده نمود.

فهرست مطالب

فصل اول: اکتینومیست‌ها

عنوان	صفحه
۱-۱- مقدمه	۱
۱-۲- مورفولوژی اکتینومیست‌ها	۳
۱-۲-۱- میسلیوم هوایی	۳
۱-۲-۲-انشعابات ریسه	۳
۱-۲-۳- مرفولوژی ریسه های اسپورزا	۳
۱-۲-۴- مرفولوژی آرتروسپورها	۳
۱-۳- بیولوژی اکتینومیست‌ها	۵
۱-۴- اکولوژی	۷
۱-۴-۱- تأثیر شرایط محیطی	۹
۱-۴-۲- فساد مواد آلی	۱۰
۱-۴-۳- موازنه میکروبی	۱۱
۱-۵- روشهای شناسایی و ردیابی	۱۲
۱-۵-۱- روشهای مورفولوژیکی	۱۲
۱-۵-۲- روشهای رنگ آمیزی	۱۷
۱-۵-۳- بررسی الگوهای آنزیم ها و پروتئین ها	۱۸
۱-۵-۴- مطالعه همولوژی **DNA-DNA**	۱۸
۱-۵-۵- روشهای مولکولی	۱۹
۱-۵-۶ روشهای بیوشیمیایی	۲۰
۱-۵-۷- روشهای فیزیولوژیکی	۲۳
۱-۶- رده‌بندی اکتینومیست‌ها	۲۵
۱-۶-۱- جایگاه تاکسونومیکی اکتینومیست ها	۲۶
۱-۶-۲- - طبقه بندی عددی یا تاکسومتریک (Numerical Classification)	۲۶

فصل دوم: *Magnaporthe oryzae*، مورفولوژی، بیماریزایی و کنترل

۲-۱-اهمیت بیماری و انتشار ۳۱
۲-۲-عامل بیماری ۳۲
۲-۳- فرم جنسی *Pyricularia oryzae* ۳۳
۲-۳-۱- طبقه‌بندی فرم جنسی ۳۴
۲-۴- علائم بیماری ۳۴
۲-۵- چرخه بیماری ۳۸
۲-۶- اپیدمیولوژی ۳۸
۲-۷- جنبه‌های فیزیولوژیکی بیماریزایی ۴۰
۲-۸- توکسین‌های تولید شده توسط قارچ *Pyricularia oryzae* ۴۱
۲-۹- فیتوآلکسین ها ۴۱
۲-۱۰- تأثیر مواد غذایی روی بیماریزایی ۴۲
۲-۱۰-۱- ازت ۴۲
۲-۱۰-۲- فسفر ۴۳
۲-۱۰-۳- پتاسیم ۴۳
۲-۱۰-۴- سیلیس ۴۳
۲-۱۱- مقاومت وتغییرات عامل بیماری ۴۴
۲-۱۲- پیش‌آگاهی ۴۶
۲-۱۳- روشهای کنترل بیماری ۴۶
۲-۱۳-۱- کنترل زراعی ۴۶
۲-۱۳-۲- کنترل شیمیایی ۴۸
۲-۱۳-۳- کنترل بیولوژیک ۴۹

فصل سوم: کنترل بیولوژیک

۳-۱- کنترل بیولوژیک ۵۴
۳-۲- آنتی‌بیوتیک ها ۵۶

۱-۲-۳-تاریخچه آنتی‌بیوتیک ها ۵۶
۳-۳- ملاحظات اکولوژیکی ۵۸
۱-۳-۳- خاکهای بازدارنده ۶۱
۲-۳-۳- افزایش مواد آلی و کمپوست‌ها به خاک ۶۱
۴-۳- روشهای فیزیکی و شیمیایی ۶۱
۵-۳- نقش موجودات زنده در کنترل بیولوژیک بیماریها ۶۲
۶-۳- روشهای فعالیت عوامل کنترل بیولوژیک ۶۲
۷-۳- روشهای فعالیت مستقیم ۶۲
۱-۷-۳- رقابت ۶۲
۲-۷-۳- تولید آنتی‌بیوتیک ها ۶۳
۳-۷-۳- پارازیتیسم ۶۳
۸-۳- روشهای فعالیت غیر مستقیم ۶۴
۹-۳- نمونه هایی از کنترل بیولوژیکی عوامل بیماریزای گیاهی توسط اکتینومیستها ۶۴
۱-۹-۳- برخی مطالعات انجام شده در ایران ۶۴
۲-۹-۳- برخی مطالعات انجام شده در سایر نقاط جهان ۶۶
۱۰-۳- آنتی بیوتیک ها در کشاورزی ۶۸
۱۱-۳- تولید آنتی بیوتیک و تقابل با میکروارگانیسم های خاک ۶۹
۱۲-۳- شواهد ژنتیکی در مورد نقش آنتی بیوتیک ها در بیوکنترل ۷۰
۱۳-۳- کاربرد تجاری اکتینومیستها و فرآورده های آنها در کشاورزی ۷۱
۱۴-۳- تولید آنتی بیوتیکها در مقادیر صنعتی ۷۲
۱۵-۳- مقاومت به آنتی بیوتیکها ۷۴

فصل چهارم: مواد و روشها

۱-۴- تهیه نمونه های خاک ۷۷
۲-۴-تهیه محیط کشت، رقت های متوالی و کشت خاک ۷۷
۳-۴-خالص سازی اکتینومیست ها ۷۸
۴-۴- تهیه نمونه خالص قارچ ۷۸

۴-۵- غربالگری جدایه های اکتینومیست جهت تعیین فعالیت ضد قارچی ۷۹
۴-۶- آزمون کلروفرم ۷۹
۴-۷- کشت جدایه های فعال در محیط مایع Casein glycerin (CG) ۸۰
۴-۸- تعیین منحنی تولید ماده مؤثر در وضعیت کشت مایع ۸۰
۴-۹- عصاره گیری از محیط های کشت مایع CG و تهیه ماده خام ناخالص ۸۰
۴-۱۰- تعیین حلالیت ماده مؤثر ضد قارچی در حلال های آلی ۸۱
۴-۱۱- تعیین حداقل غلظت بازدارنده از رشد Minimum Inhibitory ۸۲
(MIC) Concentration
۴-۱۲- تعیین پایداری ماده مؤثر در محیط Longevity In Vitro (LIV) ۸۳
۴-۱۳- تعیین دمای غیر فعال کننده ماده مؤثر Thermal Inactivation Point (TIP) ۸۳
(
۴-۱۴- بررسی فعالیت قارچ کشی (Fungicidal) و قارچ ایستایی (Fungistatic) ۸۴
۴-۱۵- - شناسایی جدایه فعال اکتینومیست ۸۴
۴-۱۶- تعیین ویژگیهای مورفولوژیکی ۸۵
۴-۶۱-۱- تعیین مورفولوژی اسپوروفور ۸۵
۴-۱۷- ویژگی های فیزیولوژیکی ۸۵
۴-۱۸- مطالعات گلخانه ای ۸۶
۴-۱۸-۱- مشخصات مکان و نحوه اجرای آزمایش ۸۶
۴-۱۸-۲- نحوه اندازه گیری شاخص های رشد ۸۷

فصل پنجم: نتیجه گیری

۵-۱- خالص سازی جدایه های اکتینومیست ۸۸
۵-۲- غربالگری جدایه های اکتینومیست ۸۸
۵-۳-آزمون کلروفرم ۹۰
۵-۴- کشت جدایه اکتینومیست فعال در محیط مایعCG ۹۳
۵-۵- تعیین منحنی تولید ماده مؤثردر وضعیت کشت مایع ۹۴
۵-۶- تعیین حلالیت ماده مؤثر ضد قارچی در حلال های آلی ۹۶

۵-۷- تعیین حداقل غلظت بازدارنده ازرشد (MIC) ماده مؤثر ۹۹
۵-۸- تعیین پایداری ماده مؤثر در محیط (LIV) ۱۰۱
۵-۹- تعیین دمای غیر فعال کننده ماده مؤثر(TIP) ۱۰۲
۵-۱۰- ارزیابی فعالیت Fungistatic و Fungicidal جدایه های فعال ۱۰۲
۵-۱۲- - شناسایی جدایه های فعال اکتینومیست ۱۰۴
۵-۱۲-۱- ویژگیهای مورفولوژیکی پرگنه ها ۱۰۴
۵-۱۲-۲- ویژگیهای مورفولوژیکی اسپور واسپوروفور ۱۰۴
۵-۱۲-۳- ویژگیهای فیزیولوژیکی ۱۰۵
۵-۱۳- شاخص های رشد و علائم حاصل از تیمارها ۱۰۷
۵-۱۴- تجزیه و تحلیل آماری ۱۱۳

فصل ششم: بحث

بحث ۱۱۵

فصل هفتم: منابع

فهرست منابع ۱۲۳

فهرست اشکال

عنوان	صفحه
شکل ۱-۱- میکروگراف الکترونی آرتروسپور خاردار(Kutzner و Korn-Wendisch،1992)	۴
شکل ۲-۱- مورفولوژی میسلیوم هوایی برخی گونه های *Streptoverticillium* (A) تا (E): میکروسکوپ نوری ۲۵۰X.(A) *Streptoverticillium netropsis*، (B) *Streptoverticillium reticulum* (C) *Streptoverticillium cinnamomeum* subsp. *Azacolutum* (D) *Streptoverticillium mobaraense* (E) *Streptoverticillium septatum* (F) میکروسکوپ الکترونی نوع اسکنینگ .*Streptoverticillium* sp ۲۰۰X، (Kutzner و Korn-Wendisch، 1992)	۴
شکل ۳-۱- زنجیره اسپور راست تا انعطاف پذیر (Rectiflexibles) در *Streptomyces griseus*، میکروسکوپ الکترونی نوع اسکنینگ. µm ۲ (Locci، 1989)	۱۴
شکل ۴-۱- زنجیره اسپور فنری (Spirales) در *Streptomyces hygroscopicus*، میکروسکوپ الکترونی نوع اسکنینگ. µm ۵ (Locci، 1989)	۱۴
شکل ۵-۱- زنجیره اسپور حلقوی (Rectinaculiaperti) در *Streptomyces vinaceus*، میکروسکوپ الکترونی نوع اسکنینگ. µm ۲ (Locci، 1989)	۱۵
شکل ۶-۱- اسپورهای صاف *Streptomyces niveus*، میکروسکوپ الکترونی نوع اسکنینگ. µm ۲ (Locci، 1989)	۱۵
شکل ۷-۱- اسپورهای مویی *Streptomyces glaucescens*، میکروسکوپ الکترونی نوع اسکنینگ. µm ۰/۵ (Locci، 1989).	۱۶
شکل ۸-۱- اسپورهای خاردار Streptomyces viridochromogenes، میکروسکوپ الکترونی نوع اسکنینگ. µm ۰/۵ (Locci، 1989)	۱۶
شکل ۱-۲- کنیدی‌های قارچ *Pyricularia oryzae* در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی X ۴۰۰ (عکس از نویسنده).	۳۳
شکل ۲-۲- لکه‌های دوکی شکل روی برگ برنج ناشی از *Pyricularia oryzae* (http://www.imtech.res.in/raghava/rbpred/home.html)	۳۶

شکل ۳-۲- علائم برگی و ساقه بیماری بلاست برنج ایجاد شده توسط قارچ *Pyricularia oryzae* (عکس از نویسنده) ۳۶
شکل ۴-۲- علائم بیماری بلاست برنج روی گره‌ها و خوشه (www.plantpath.k-state.edu/DesktopDefault.aspx...) ۳۷
شکل ۵-۲- مزرعه برنج آلوده به بلاست (www.plantpath.k-state.edu/DesktopDefault.aspx...) ۳۷
شکل ۶-۲- تأثیر سیلیکون و بنومیل روی وقوع بیماری بلاست برنج(Datnoff et al.، 1997) ۴۹
شکل۷-۲- کاربرد Glisoprenin سبب ممانعت از تشکیل چنگک (Appressorium) قارچ عامل بلاست برنج شد (تصویر سمت راست) و عدم استفاده از Glisoprenin و تشکیل چنگک (تصویر سمت چپ) (Thines *et al.*، 2000) ۵۳
شکل ۱-۵- پلیت حاوی رقت 10^{-5} نمونه خاک در محیط کشت CGA، پس از هفت روز انکوباسیون در $29^{\circ}C$ پرگنه‌های اکتینومیست و برخی پرگنه‌های قارچها و باکتریها مشخص می باشد ۸۸
شکل ۲-۵- کنیدی‌ها و ریسه‌های قارچ *Magnaporthe oryzae* (مرحله کنیدی‌زایی) زیر میکروسکوپ نوری (بزرگنمایی۴۰۰X) ۸۹
شکل ۳-۵- رشد قارچ *Magnaporthe oryzae* (مرحله کنیدی‌زایی) روی محیط کشت Prune Agar ۸۹
شکل ۴-۵- کشت خالص خطی جدایه ۳۳۹ استرپتومایسس روی محیط CGA ۹۰
شکل ۵-۵- کشت خالص خطی جدایه ۲۶۳ استرپتومایسس روی محیط CGA ۹۱
شکل ۶-۵- برداشت قطعاتی از کلونی های جدایه ۳۴۲ اکتینومیست از استریک رشد کلونی توسط چوب پنبه سوراخ کن به قطر شش میلی متر ۹۱
شکل ۷-۵- آزمون زیستی جدایه های ۳۳۹ (سمت چپ) و ۳۲۸ اکتینومیست (سمت راست) به روش agar disk method علیه قارچ *Magnaporthe oryzae* (مرکز) ۹۲
شکل ۸-۵- آزمون زیستی جدایه های ۲۶۳، شاهد و ۲۰۲ اکتینومیست (از بالا در جهت عقربه های ساعت) علیه قارچ *Magnaporthe oryzae* (مرکز) (در این تصویر ۲۰۲ بدون اثر ممانعت ارزیابی شد) ۹۲
شکل ۹-۵- آزمون زیستی جدایه های ۳۳۹ (بالا) و ۲۶۳ (پایین)، علیه قارچ ۹۴

Magnaporthe oryzae در آزمون کلروفرم، پرگنه‌های سمت چپ و راست حاوی جدایه های غیر فعال است

شکل ۱۰-۵- پرگنه‌های استرپتومایسس جدایه ۳۳۹ در کشت مایع CG ۹۵

شکل ۱۱-۵- پرگنه‌های استرپتومایسس جدایه ۲۶۳ در کشت مایع CG ۹۵

شکل۱۲-۵- فعالیت ماده ضد قارچی استرپتومایسس جدایه ۳۳۹ درکشت مایع علیه *Magnaporthe oryzae* ۹۷

شکل ۱۳-۵- آزمون زیستی عصاره کشت مایع استرپتومایسس جدایه۲۶۳ روز هشتم (از بالا در جهت حرکت عقربه های ساعت: ۲۶۳،۳۱۱ و شاهد) به روش Well diffusion method علیه کشت چمنی قارچ *Magnaporthe oryzae*. ۹۷

شکل ۱۴-۵- فعالیت ماده ضد قارچی استرپتومایسس جدایه ۲۶۳ درکشت مایع علیه *Magnaporthe oryzae* ۹۹

شکل۱۵-۵- آزمون زیستی استرپتومایسس جدایه ۲۶۳ در حلال کلروفرم علیه کشت چمنی قارچ *Magnaporthe oryzae* ، از بالا در جهت عقربه‌های ساعت Pellet، شاهد و Supernatant ۱۰۰

شکل۱۶-۵- MIC ماده ضدقارچی استرپتومایسس عصاره جدایه ۲۶۳ علیه *Magnaporthe oryzae* درغلظت ۵۰mg/ml ۱۰۱

شکل ۱۷-۵- تأثیر درجه حرارت بر فعالیت ماده ضدقارچی استرپتومایسس عصاره جدایه ۲۶۳ علیه *Magnaporthe oryzae* ۱۰۳

شکل ۱۸-۵- تأثیر درجه حرارت بر فعالیت ماده ضدقارچی استرپتومایسس عصاره جدایه ۳۳۹ علیه *Magnaporthe oryzae* ۱۰۴

شکل ۱۹ -۵- تصویر زنجیره اسپور *Streptomyces sindeneusis* استرین ۲۶۳ توسط میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ ۱۰۶

شکل ۲۰-۵- تصویر زنجیره اسپور جدایه ۳۳۹ توسط میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ ۱۰۶

شکل ۲۱-۵- نتایج بررسی اثر آنتاگونیستی *Streptomyces sindeneusis* جدایه ۲۶۳ علیه بیمارگر *Magnaporthe oryzae* روی بوته های برنج در شرایط گلخانه. A و B) علائم برگی در اثر آلودگی با قارچ *Magnaporthe oryzae*، C-F) تأثیر کاربرد توأم *Streptomyces sindeneusis* جدایه ۲۶۳ و *Magnaporthe oryzae* روی برگها که نشان دهنده اثر ممانعت قوی آنتاگونیست مذکور در توسعه ۱۰۸

علائم بلاست می‌باشد
شکل ۲۲-۵- نتایج بررسی اثر آنتاگونیستی *Streptomyces sindeneusis* جدایه ۲۶۳ علیه بیمارگر *Magnaporthe oryzae* روی بوته های برنج در شرایط گلخانه. A) شاهد، گلدانهایی که هیچ تیماری دریافت نکردند. B) بوته هایی که برگهای آنها توسط استرپتومایسس جدایه ۲۶۳ تلقیح شد. C) گلدانهایی که توأماً توسط بیمارگر *Magnaporthe oryzae* و استرپتومایسس جدایه ۲۶۳ تلقیح گردید. D) گلدانهایی که فقط توسط *Magnaporthe oryzae* تلقیح شدند ۱۰۹
شکل ۲۳-۵- مقیاس اندازه گیری درصد آلودگی سطح برگ تعیین شده توسط مرکز بین المللی تحقیقات برنج فیلیپین (IRRI، 1993) ۱۱۰
شکل ۲۴-۵- تأثیر دوتیمار روی میانگین تعداد لکه روی برگ، M: قارچ *Magnaporthe oryzae*، St +M: استرپتومایسس جدایه ۲۶۳ توأم با قارچ مذکور ۱۱۱
شکل ۲۵-۵- تأثیر چهار تیمار روی میانگین ارتفاع بوته برنج، St: *Streptomyces sindeneusis* جدایه ۲۶۳، M: قارچ *Magnaporthe oryzae*، St +M: استرپتومایسس جدایه ۲۶۳ توأم با قارچ مذکور و C: شاهد ۱۱۱
شکل ۲۶-۵- تأثیر چهار تیمار روی میانگین وزن خشک کل بوته، St: *Streptomyces sindeneusis* جدایه ۲۶۳، M: قارچ *Magnaporthe oryzae*، St +M: استرپتومایسس جدایه ۲۶۳ توأم با قارچ مذکور و C: شاهد ۱۱۲
شکل ۲۷-۵- تأثیر چهار تیمار روی میانگین وزن خشک ساقه و برگ، St: *Streptomyces sindeneusis* جدایه ۲۶۳، M: قارچ *Magnaporthe oryzae*، St +M: استرپتومایسس جدایه ۲۶۳ توأم با قارچ مذکور و C: شاهد ۱۱۲
شکل ۲۸-۵- تأثیر چهار تیمار روی میانگین وزن خشک ریشه، St: *Streptomyces sindeneusis* جدایه ۲۶۳، M: قارچ *Magnaporthe oryzae*، St +M: استرپتومایسس جدایه ۲۶۳ توأم با قارچ مذکور و C: شاهد ۱۱۳

فهرست جداول

عنوان صفحه

جدول ۱-۱- درصد احتمال ماتریس مثبت برای گونه‌های استرپتومایست تعریف شده به وسیله گروههای اصلی Williams و همکاران (1983) در تاکسونومی عددی (Locci، 1989) ۲۸

جدول ۲-۱- خصوصیات مفید جهت افتراق گونه‌های فرعی توصیف شده توسط Williams و همکاران (1983) در تاکسونومی عددی (Locci، 1989) ۲۹

جدول ۳-۱- خصوصیات مفید جهت افتراق گروه‌های با عضو منفرد توصیف شده توسط Williams و همکاران (1983) در تاکسونومی عددی (Locci، 1989) ۳۰

جدول ۱-۳- میکروارگانیسم‌های جدا شده به عنوان عوامل بازدارنده خاک (Whipps، 1997) ۶۰

جدول ۱-۵- گروه‌بندی فعالیت آنتاگونیستی جدایه‌های فعال بر اساس ایجاد هاله‌های ممانعت از رشد ۹۳

جدول ۲-۵- قطر هاله ممانعت ازرشد ناشی از عصاره استرپتومایسس جدایه ۳۳۹ علیه *Magnaporthe oryzae* ۹۶

جدول ۳-۵- قطر هاله ممانعت ازرشد ناشی از عصاره استرپتومایسس جدایه ۲۶۳ علیه *Magnaporthe oryzae* ۹۸

جدول۴-۵- نتایج حلالیت ماده مؤثر ضد قارچی جدایه۲۶۳ در حلالهای مختلف در غلظت ۵۰mg/ml ۱۰۰

جدول۵-۵- متوسط دمای غیرفعال کننده ماده ضدقارچی عصاره خام استرپتومایسس جدایه ۲۶۳ در غلظت ۱۰mg/ml و جدایه ۳۳۹ در غلظت ۵۰mg/ml علیه قارچ *Magnaporthe oryzae* ۱۰۲

جدول۶-۵- ویژگیهای مرفولوژیکی و فیزیولوژیکی *Streptomyces* strain 263 *sindeneusis* ۱۰۵

جدول ۷-۵- نتایج مقایسه میانگین چهار تیمار با آزمون چند دامنه ای دانکن ۱۱۳

جدول ۸-۵- نتایج مقایسه میانگین دو تیمار روی صفت تعداد لکه روی برگ بر اساس توزیع t استیودنت ۱۱۴

فصل اول

اکتینومیست‌ها

۱-۱- مقدمه

اکتینومیست ها گروهی از باکتریهای گرم مثبت، هوازی، غیر متحرک و رشته ای هستند که درصد G+C در ژنوم آنها بیش از ۵۵٪ می‌باشد و متعلق به شاخه *Actinobacteria* هستند. اکتینومیستها از لحاظ مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی تنوع فراوانی داشته و این تنوع هم درتولید آنزیم های خارج سلولی و هم در ایجاد هزاران نوع از تولیدات متابولیکی که آنها سنتز و ترشح می‌کنند دیده می‌شود (Balows *et al.*، 1992 و Boone *et al.*، 2001). اکتینومیست ها تفاوت مورفولوژیکی منحصر به فردی با سایر پروکاریوتها دارند، به طوری که تولید میسلیوم می‌کنند و با تقسیمات ساده دیواره عرضی میسلیوم های هوایی، اسپورها تشکیل می‌گردند. قطر میسلیوم آنها به ندرت از یک میکرون تجاوز می‌کند (Roberts، 2002). اکتینومیست ها توانایی کلونیزه کردن سطح ریشه گیاه را دارند. همچنین توانایی تولید متابولیت های ثانویه متنوعی از لحاظ شیمیایی مانند آنتی‌بیوتیک ها، علف کش ها، حشره کش ها و ضد پارازیت ها را دارا هستند که در میان آنها، آنتی‌بیوتیک ها از نظر اهمیت تجاری و درمانی غالب هستند. همچنین به عنوان عوامل مقتدر کنترل بیولوژیکی علیه بسیاری از عوامل بیماریزای مهم گیاهی محسوب می‌گردند. تقریباً بیش از ۸۵ درصد آنتی‌بیوتیک هایی که از فرآورده های طبیعی تولید می‌شوند و تعدادی از آنها که اهمیت کاربردی در کشاورزی دارند از اکتینومیستها وعمدتاً از گونه های مختلف *Streptomyces* جدا گشته‌اند (Lee و Hwang، 2002). اکتینومیست ها قادر به تولید آنزیمهای خارج سلولی متنوع نظیر کیتینازها، سلولازها، پروتئازها، آمیلازها و لیپازها می‌باشند و همچنین تعدادی از سویه های اکتینومیست ها سطوح بالای سیدروفور را تولید می‌کنند (Subbarao، 1999 و Roberts، 2002).

پیشوند" Actino " به دلیل شکل ظاهری طبیعت پیرامونی رشد پرگنه های (Colonies) اکتینومیست، برای نام آنها در نظر گرفته شده تا آنها را که به موجب شباهت ظاهری به قارچها، Ray Fungi نامیده می‌شوند، از قارچهای حقیقی (True Fungi) متمایز سازند؛ زیرا قارچهای حقیقی، چنین ظاهر رشد ریسه ای شعاعی را در بافتها تشکیل نمی‌دهند (Arai، 1997).

پرگنه اکتینومیست ها در محیط آگاردار برخلاف پرگنه باکتریهایی که ظاهری لزج دارند و به سرعت رشد می‌کنند، به صورت خشک هستند و به آرامی رشد می‌نمایند. اکتینومیست ها وسیع ترین گروه میکروارگانیسم‌های منتشر شده در خاک می‌باشند، به ویژه تحت شرایط قلیایی قسمت اعظم جمعیت میکروبی خاک را تشکیل می‌دهند. بوی مشخص خاک ناشی از مواد شیمیایی به نام Geosmin است که توسط گونه های مختلف آنها تولید می‌گردد. جمعیت اکتینومیست ها در خاکهای مناطق خشک و نیمه خشک از تنوع بیشتری برخوردار است. درصد اکتینومیست ها در کل جمعیت میکروبی با عمق خاک افزایش می‌یابد و حتی می‌توان آنها را در تعداد کافی از نمونه های بدست آمده از افق C پروفیل خاک، جداسازی نمود. اکتینومیست ها نسبت به محیط اسیدی حساس هستند و جمعیت شان در pH=۵ زوال می‌یابد. دامنه pH مناسب رشد آنها ۸- ۶/۵ می باشد. درجه حرارت مناسب جهت رشد اکتینومیست ها، ۳۵-۳۰ درجه سانتیگراد است، اگر چه سویه های گرما دوست در ۶۵ - ۵۵ درجه سانتیگراد رشد می‌کنند (Korn-Wendisch و Kutzner، 1992؛ Subbarao، 1999 و Roberts، 2002).