



## مجموعه مقالات

چهارمین همایش ملی کاربرد فناوری هسته‌ای در علوم کشاورزی و منابع طبیعی  
(۲۹-۳۰ اردیبهشت، ۱۳۹۴، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای)

The 4<sup>th</sup> National Congress on Nuclear Technology Application in Agricultural & Natural Resource Sciences (19-20 May, 2015, Nuclear Agriculture Research School)

### بررسی اثر برخی متابولیت‌های تولید شده توسط موتانت‌های باکتری *Bacillus subtilis* UTB1 علیه قارچ *Aspergillus flavus*

حمیده افشارمنش<sup>۱\*</sup>، مسعود احمدزاده<sup>۲</sup>، کیوان بهبودی<sup>۲</sup>، فرحناز معتمدی سده<sup>۱</sup>

۱- پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، کرج، ایران

۲- گروه گیاهپزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

\*مسئول مکاتبات: hafsharmanesh@nrcam.org

**چکیده:** باکتری *Bacillus subtilis* UTB1، یک عامل بیوکنترل جداشده از پسته می‌باشد که دارای فعالیت آنتاگونیستی علیه قارچ *Aspergillus flavus* می‌باشد. در این مطالعه به منظور بهبود فعالیت آنتاگونیستی *B. subtilis* UTB1 علیه *A. flavus*، موتاسیون تصادفی با دز مختلف اشعه گاما (۰/۱ تا ۳ کیلوگری) انجام شد. پس از پرتوتابی، ۵۰۰ کلونی باکتری به طور تصادفی انتخاب شده و اثرات آنها علیه *A. flavus* R5 با استفاده از روش کشت متقابل بررسی شد که ۴۵ کلونی (۹٪) فعالیت بازدارندگی بیشتری در مقایسه با استرین UTB1 نشان دادند. آنالیز rep-PCR نشان داد که هشت کلونی باکتریایی از بین ۴۵ کلونی، تنوع ژنتیکی با استرین وحشی نشان دادند که عصاره خارج سلولی شش عدد از آنها توانستند رشد قارچ را به طور معنی داری در مقایسه با استرین مادری کاهش دهند. کروماتوگرافی لایه نازک نشان داد که تولید لیپوپپتیدهای حلقوی شامل خانواده‌های سورفکتین، فنجاسین و ایتورین در این شش موتانت افزایش یافت. آنالیز بیواتوگرافی علیه *A. flavus* R5، ممانعت قابل توجهی از رشد قارچ که مربوط به تولید ایتورین‌ها می‌باشد، را مشخص نمود. با توجه به نتایج هم‌ردیفی چندگانه توالی ژن *sfp* (مسئول بیوسنتز آنزیم فسفوننتین ترانسفراز) می‌توان بیان کرد که این ژن در این شش موتانت دچار جهش شده است که تولید سه خانواده از لیپوپپتیدهای غیرریبوزومی را به طور همزمان تحت تاثیر قرار داده است.

**واژگان کلیدی:** *Aspergillus flavus*، بیوکنترل، *Bacillus subtilis*، لیپوپپتیدهای حلقوی، موتاسیون، پرتو گاما.

### Effect of some metabolites produced by *Bacillus subtilis* UTB1 mutants against *Aspergillus flavus*

Hamideh Afsharmanesh<sup>1\*</sup>, Masoud Ahmadzadeh<sup>2</sup>, Keivan Behboudi<sup>2</sup>, Farahnaz Motamedi Sede<sup>1</sup>

1-Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute (NARS-NSTR), Karaj, Iran

2- Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

\*hafsharmanesh@nrcam.org

**Abstract:** *Bacillus subtilis* UTB1, a biocontrol bacterium isolated from pistachio nuts, has been shown to have antagonistic activity against *Aspergillus flavus*. In this study, a random mutagenesis using 10 doses of gamma irradiation (0.1-3 KGy) was applied on *B. subtilis* UTB1 to improve its antagonistic activity against *A. flavus*. After irradiation, 500 bacterial colonies were selected randomly and their effects against *A. flavus* R5 were assessed using dual culture assay. Forty-five colonies (9%) revealed higher inhibition activity as compared to strain UTB1. Eight colonies out of the 45 were selected based on genetic diversity by means of rep-PCR analyses; six of which could significantly inhibit



## مجموعه مقالات

چهارمین همایش ملی کاربرد فناوری هسته‌ای در علوم کشاورزی و منابع طبیعی  
(۲۹-۳۰ اردیبهشت، ۱۳۹۴، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای)

The 4<sup>th</sup> National Congress on Nuclear Technology Application in Agricultural & Natural Resource Sciences (19-20 May, 2015, Nuclear Agriculture Research School)

the fungal growth using cell-free supernatants as compared to the parental strain. Thin layer chromatography showed that the production of cyclic lipopeptides including surfactin, fengycin and iturin families increased in these six mutants. TLC-bioautography analysis against *A. flavus* R5 revealed a considerable inhibition of the fungal growth, which associated with iturins production. According to the results of *sfp* (responsible for biosynthesis of phosphopantetheinyl transferase) multiple alignment, we could display that the *sfp* sequence underwent a mutation in the six mutants.

**Keywords:** *Aspergillus flavus*, biocontrol, *Bacillus subtilis*, cyclic lipopeptides, mutation, gamma irradiation

### مقدمه

قارچ *Aspergillus flavus* و گونه نزدیک به آن یعنی *A. parasiticus* در سرتاسر جهان به طور وسیع انتشار می‌یابند و اغلب به عنوان ساپروفیت در خاک و روی مواد آلی پوسیده یافت می‌شوند [۱]. این قارچ‌ها به آسانی محصولات مهمی مانند ذرت، بذر پنبه، بادام زمینی و پسته را به ویژه در سال‌های خشکسالی کلنیزه می‌کنند. اغلب ایزوله‌های *A. flavus* و *A. parasiticus* تولید ترکیباتی فوق العاده سمی، موتانت‌زا و سرطان‌زا برای انسان و دام به نام آفلاتوکسین می‌کنند [۲]. روش‌های مختلف از جمله کنترل بیولوژیک، کنترل آفات و ایجاد کولتیوارهای مقاوم برای کنترل آفلاتوکسین‌ها در محصولات بررسی شده است که در بین آنها کنترل بیولوژیک یک روش امید بخش در کنترل آفلاتوکسین در مرحله قبل و بعد از برداشت می‌باشد. میکروارگانیزم‌های مختلفی از جمله باکتری‌ها، مخمرها و قارچ‌های آنتاگونیست برای کنترل آلودگی آفلاتوکسین‌ها بررسی شده‌اند. این آنتاگونیست‌ها از طریق رقابت، ترشح متابولیت‌های ضد میکروبی و آنزیم‌های تجزیه کننده موثر واقع می‌شوند. یکی از این عوامل بیوکنترل باکتری‌های اسپورزای *Bacillus sp.* می‌باشند که متحمل به دمای بالا و استرس خشکی بوده و می‌توانند جایگزین سموم شیمیایی شوند. دانشمندان سعی می‌کنند با اصلاح ژنتیکی میکروارگانیزم‌های آنتاگونیست، تأثیر آنها را به عنوان عوامل کنترل بیولوژیک افزایش می‌دهند. اصلاح ژنتیکی میکروارگانیزم‌ها می‌تواند به وسیله موتاسیون شیمیایی (مانند اتیل متان سولفونات) و فیزیکی (مانند پرتو گاما یا اشعه ماوراء بنفش) و نیز دستکاری ژنتیکی صورت گیرد و منجر به توسعه خصوصیات مطلوبشان شود. مثال‌هایی از کاربرد عوامل موتانت‌زای تصادفی به منظور بهبود توانایی آنتاگونیستی عوامل بیوکنترل بیمارگرهای گیاهی وجود دارد که از آن جمله می‌توان به تحقیقات لی و همکاران [۳] و لیو و همکاران [۴] اشاره کرد که موتانت‌هایی را از باکتری *B. subtilis* با استفاده از تکنیک کاشت پرتو یونی معرفی کردند که فعالیت ضد قارچی قوی‌تری را نسبت به استرین وحشی علیه *Rhizoctonia solani* و *Gibberella zeae* نشان دادند. استرین *B. subtilis* BSP1(UTB1) قادر است به مقدار قابل توجهی (بیشتر از ۸۰ درصد) آفلاتوکسین را تجزیه نماید اما توانایی این استرین در کاهش رشد قارچ *A. flavus* ضعیف است [۵]. در این تحقیق تلاش می‌شود با بهره‌گیری از تکنیک موتاسیون تصادفی با اشعه گاما، توانایی بیوکنترل باکتری *B. subtilis* UTB1 در جلوگیری از رشد



## مجموعه مقالات

چهارمین همایش ملی کاربرد فناوری هسته‌ای در علوم کشاورزی و منابع طبیعی  
(۲۹-۳۰ اردیبهشت، ۱۳۹۴، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای)

The 4<sup>th</sup> National Congress on Nuclear Technology Application in Agricultural & Natural Resource Sciences (19-20 May, 2015, Nuclear Agriculture Research School)

قارچ *A. flavus* افزایش یابد. سپس نقش متابولیت‌ها و آنتی‌بیوتیک‌های ضدقارچی موتانت‌های اصلاح شده مشخص گردند.

### مواد و روش‌ها

فعالیت آنتاگونیستی موتانت‌های حاصل از پرتودهی با اشعه گاما: فعالیت آنتاگونیستی ۵۰۰ کلونی منتخب از ده دز مختلف اشعه گاما (۰/۱، ۰/۳، ۰/۵، ۰/۷، ۱، ۱/۲، ۱/۵، ۲، ۲/۵ و ۳ کیلوگری) علیه قارچ *A. flavus* R5 با استفاده از روش کشت متقابل بررسی شد [۶]. موتانت‌هایی که باعث افزایش معنی دار در جلوگیری از رشد قارچ نسبت به استرین وحشی شدند انتخاب گردیدند.

**غربالگری مولکولی موتانت‌ها:** به منظور غربالگری موتانت‌های منتخب از کشت متقابل (۴۵ کلونی)، انگشت نگاری DNA به روش rep-PCR انجام شد. مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در هر لوله شامل کیت مخلوط واکنش PCR (سیناژن، ایران)، آغازگرهای ERIC 1R و ERIC 2 یا BOX A1R و DNA ژنومی باکتریایی می‌باشد. برنامه حرارتی PCR شامل یک انکوباسیون اولیه در ۹۵ °C به مدت دو دقیقه و سپس ۳۵ چرخه از ۹۴ °C به مدت ۳۰ ثانیه، ۴۵ (ERIC) یا ۵۰ °C (BOX) به مدت ۶۰ ثانیه و ۷۲ °C به مدت ۶۰ ثانیه انجام شد. پس از تکثیر، باندهای حاصل بین استرین وحشی و موتانت‌ها مورد مقایسه قرار گرفت.

**جلوگیری از رشد *A. flavus* به کمک عصاره فاقد سلولی موتانت‌ها:** فعالیت آنتاگونیستی هشت موتانت منتخب از آنالیز rep-PCR (M600, M562, M523, M464, M458, M455, M425, M419)، با استفاده عصاره فاقد سلولی آنها در کشت متقابل با قارچ *A. flavus* (۱×۱۰<sup>۵</sup> کف در میلی‌لیتر) با استرین وحشی مقایسه شدند. برای تهیه عصاره فاقد سلولی، ابتدا باکتری‌ها در محیط کشت مناسب برای تولید لیپوپپتیدهای غیرریبوزومی به نام مولپ<sup>۱</sup> [۷] به مدت ۷۲ ساعت رشد داده شده و پس از سانتریفیوژ، فیلتر شدند.

**استخراج و آنالیز لیپوپپتیدهای غیرریبوزومی:** لیپوپپتیدها از عصاره‌های فاقد سلولی استرین وحشی UTB1، هشت موتانت منتخب بر اساس rep-PCR و دو استرین مرجع UMAF6614 و UMAF6639 از *B. subtilis* [۸]، با اضافه کردن حلال بوتانول نرمال استخراج شدند [۹]. لایه بوتانول تبخیر شده و باقی‌مانده در متانول حل گردید. لیپوپپتیدهای حل شده در فاز متانولی روی صفحات TLC از جنس سیلیکاژل F254 از یکدیگر جدا شده و ضریب نگهداری (Rf) آنها در استرین UTB1 و موتانت‌های آن در مقایسه با دو استرین مرجع محاسبه شد. به منظور شناسایی ترکیب موثر در فعالیت ضدقارچی جدا شده‌ها، آنالیز بیواتوگرافی TLC علیه قارچ *A. flavus* انجام شد. بدین منظور روی کروماتوگرام‌های ظاهر شده روی صفحه TLC با محیط PDA مذاب حاوی ۱×۱۰<sup>۵</sup> اسپور قارچ در میلی‌لیتر، پوشانده شدند. پس از نگهداری در

<sup>۱</sup> optimal medium for lipopeptides production (MOLP)



## مجموعه مقالات

چهارمین همایش ملی کاربرد فناوری هسته‌ای در علوم کشاورزی و منابع طبیعی  
(۲۹-۳۰ اردیبهشت، ۱۳۹۴، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای)

The 4<sup>th</sup> National Congress on Nuclear Technology Application in Agricultural & Natural Resource Sciences (19-20 May, 2015, Nuclear Agriculture Research School)

دمای °C ۲۸، هاله بازدارندگی مشاهده می‌گردد. مقادیر ضریب نگهداری از هاله بازدارندگی تخمین زده شد و با مقادیر مربوط به لیوپیتیدهای مختلف مقایسه شد.

**ردیابی ژن *sfp*:** تکثیر ژن *sfp* (مسئول بیوسنتز آنزیم فسفوپنتین ترانسفراز) در استرین UTB1 و هشت موتانت منتخب با استفاده از جفت آغازگر (5'-cggaggatctagaatgaagattac-3' *sfp-F* و 5'-sfp-R1 (3'-ggcgactgaaaaggaatcaagcgg-5xPCR)، مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در هر لوله شامل بافر 5xPCR، کلرید منیزیم (۲۵ میلی‌مول)، مخلوط دی‌نوکلئوزید تری فسفات (۱۰ میلی‌مول)، آنزیم *GoTaq DNA* پلیمرز (۵ واحد در هر میکرولیتر) و ۱۰ پیکومول از هر آغازگر می‌باشد. برنامه حرارتی PCR مشابه با rep-PCR و دمای اتصال °C ۶۰ می‌باشد. سپس محصولات PCR مربوط با استفاده از کیت خالص سازی محصول PCR خالص شده و تعیین توالی گردیدند. توالی به دست آمده از ژن *sfp* در استرین وحشی و هشت موتانت مذکور، با استفاده از نرم افزار Vector NTI Advance 10 همدریف شدند تا جهش‌های احتمالی بین توالی UTB1 با موتانت‌ها مشخص گردد. شجره فیلوژنتیکی براساس روش Maximum likelihood (ML) و با آزمون اعتبارسنجی با ۱۰۰۰ تکرار با استفاده از نرم افزار MEGA5 ترسیم گردید [۱۰].

## نتایج و بحث

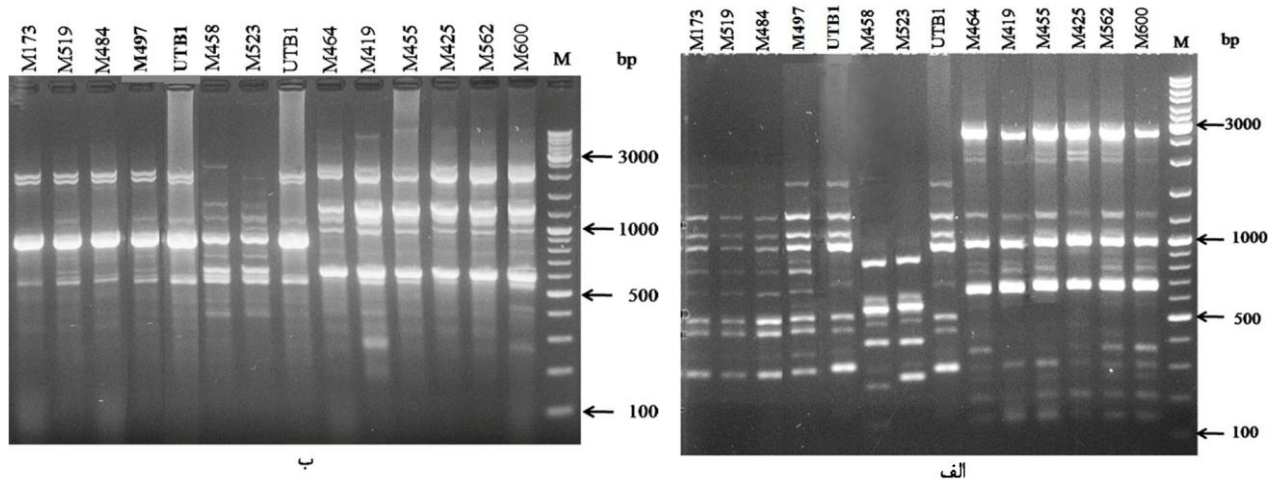
**فعالیت آنتاگونیستی موتانت‌ها و غربالگری آنها:** از مجموع ده دز پرتوتابی، ۵۰۰ کلونی باکتری به طور تصادفی انتخاب شده و فعالیت آنتاگونیستی آنها علیه قارچ *A. flavus* R5 بررسی شد. سه نوع فنوتیپ در نتایج حاصل از کشت متقابل مشاهده شد: ۱- در ۳۰ کلونی (۶ درصد) شعاع رشد قارچ نسبت به استرین وحشی UTB1 افزایش معنی‌داری نشان داد. ۲- در ۴۵ کلونی (۹ درصد) حاصل از پرتودهی با دزهای ۲، ۲/۵ و ۳ کیلوگری، شعاع رشد قارچ نسبت به استرین UTB1 کاهش معنی‌داری نشان داد. ۳- در سایر کلونی‌ها (۸۵ درصد) از نظر شعاع رشد قارچ، اختلاف معنی‌داری نسبت به استرین وحشی دیده نشد. نتایج حاضر نشان داد که بیشترین نرخ موتانت مطلوب با فعالیت بازدارندگی بیشتر علیه قارچ زمانی اتفاق افتاد که جمعیت زنده باکتری‌ها به مقدار ۳-۴ واحد لگاریتمی کاهش یافته بود. به منظور غربالگری مولکولی ۴۵ کلونی منتخب از کشت متقابل که افزایش معنی‌داری ( $P \leq 0.01$ ) در کاهش رشد قارچ نشان دادند، انگشت نگاری DNA به روش rep-PCR انجام شد. نتایج تکثیر DNA نشان داد که هشت کلونی M419, M425, M455, M458, M464, M523, M562 و M600 با استرین UTB1 اختلاف ژنتیکی نشان می‌دهد (شکل ۱). الگوی پلی‌مورفیسم نشان داد که می‌توان موتانت‌ها را به سه گروه مجزا تقسیم کرد: گروه اول شامل شش موتانت M419, M425, M455, M464, M562 و M600 بوده که الگوی پلی‌مورفیسم در آنها شبیه یکدیگر و متفاوت از استرین وحشی است. گروه دوم شامل دو موتانت M458 و M523 با الگوی پلی‌مورفیسم مشابه و متفاوت با UTB1 می‌باشد و سایر موتانت‌ها به همراه استرین UTB1 گروه سوم را تشکیل می‌دهند. انگشت نگاری DNA به روش rep-PCR روشی سریع، قابل اعتماد و تکرار پذیر است که قادر است تنوع ژنتیکی بین ژنوم گونه‌ها و استرین‌های مختلف باکتریایی را مشخص نماید [۱۱].



## مجموعه مقالات

چهارمین همایش ملی کاربرد فناوری هسته‌ای در علوم کشاورزی و منابع طبیعی  
(۲۹-۳۰ اردیبهشت، ۱۳۹۴، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای)

The 4<sup>th</sup> National Congress on Nuclear Technology Application in Agricultural & Natural Resource Sciences (19-20 May, 2015, Nuclear Agriculture Research School)



شکل ۱- مقایسه الگوهای بانندی بین استرین وحشی UTB1 و موتانت‌های حاصل از پرتودهی در ژل آگارز یک درصد، با استفاده از (الف) -ERIC- PCR و (ب) BOX-PCR. نام جدایه‌ها بالای هر چاهک نوشته شده است. M، مارکر DNA مخلوط از ۱۰۰ تا ۱۰۰۰۰ جفت باز.

**اثر عصاره فاقد سلولی در جلوگیری از رشد *A. flavus*:** ارزیابی اثرات بازدارندگی کشت فیلترشده استرین UTB1 و هشت موتانت آن علیه *A. flavus* نشان داد که قطر هاله بازدارندگی در شش موتانت M419, M425, M455, M464, M562, M600 نسبت به UTB1 افزایش معنی‌داری دارد. درحالی‌که دو موتانت M523 و M458 اختلاف معنی‌داری را از نظر هاله بازدارندگی با استرین وحشی نشان ندادند (جدول ۱).

**نقش لیپوپپتیدهای غیرریبوزومی در فعالیت ضد قارچی:** اندازه‌گیری مقدار ضریب نگهداری (Rf) مربوطه در باندهای ظاهر شده روی صفحات TLC و مقایسه با دو استرین مرجع (UMAF6614 و UMAF6639)، وجود باندهای مربوط به سه خانواده اصلی از لیپوپپتیدهای سورفکتین (Rf=۰/۷-۰/۸)، ایتورین (Rf=۰/۳-۰/۴) و فنجایسین (۰/۲-۰/۱) را در استرین UTB1 و هشت موتانت منتخب نشان داد. با توجه به اندازه لکه‌های ظاهر شده روی صفحات TLC، مقدار لیپوپپتیدهای تولید شده توسط استرین UTB1 و دو موتانت M523 و M458 محسوس نبود درحالی‌که مقدار لیپوپپتیدها به ویژه لیپوپپتیدهای خانواده ایتورین و سورفکتین افزایش قابل توجهی در شش موتانت M419, M425, M455, M464, M562 و M600 در مقایسه با استرین UTB1 نشان داده است (شکل ۲-الف). آنالیز بیواتوگرافی TLC با استفاده از *A. flavus* (شکل ۲-ب) نشان داد که ممانعت قابل توجهی از رشد میسلیمی و اسپورزایی قارچ در شش موتانت مذکور مشاهده شد که با توجه به مقدار ضریب نگهداری هاله بازدارندگی ایجاد شده (۰/۳-۰/۴)، متعلق به لیپوپپتیدهای خانواده ایتورین می‌باشد. استرین وحشی UTB1 و دو موتانت M458 و M523 قادر به جلوگیری از رشد قارچ با تولید ایتورین نبودند. این موضوع احتمالاً به این دلیل است که مقدار تولید ایتورین در این سه جدایه خیلی کم است که قادر به جلوگیری از رشد قارچ نیستند. در ضریب نگهداری متناسب با خانواده فنجایسین و سورفکتین، ممانعت از رشد و





## مجموعه مقالات

چهارمین همایش ملی کاربرد فناوری هسته‌ای در علوم کشاورزی و منابع طبیعی  
(۲۹-۳۰ اردیبهشت، ۱۳۹۴، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای)

The 4<sup>th</sup> National Congress on Nuclear Technology Application in Agricultural & Natural Resource Sciences (19-20 May, 2015, Nuclear Agriculture Research School)

اسپورزایی قارچ در هیچیک از جدایه‌ها مشاهده نشد سورفکتین که یک سورفکتانت قدرتمندی است، فعالیت ضد میکروبی آن بسیار محدود است [۱۲] اما فعالیت شدیدکنندگی قوی در ترکیب با ایتورین آ نشان داده است [۱۳]. یافته‌های این آزمون از نقش آنتی بیوز مبتنی بر تولید خانواده ایتورین به عنوان فاکتور ضدقارچی اصلی در شش موتانت فوق حمایت می‌کند. آنتی بیوتیک‌های گروه ایتورین در حضور استرول موجود در غشاء سیتوپلاسمی ارگانیزم عمل می‌کنند [۱۴]. غشاءهای کبیدی‌های *A. flavus* حاوی ارگسترول و کلسترول هستند که می‌توانند هدف باسیلومايسين دی باشند [۱۵]. باسیلومايسين دی فعالیت ضدقارچی موثری علیه *A. flavus* و طیف وسیعی از قارچ‌های بیمارگر گیاهی نشان داده است [۱۶ و ۱۷].

جدول ۴- اثر عصاره فاقد سلولی استرین UTB1 و موتانت‌های آن در جلوگیری از رشد *A. flavus* R5

تیمار	هاله بازدارندگی (mm)
M419	$a_0/6 \pm 15/33$
M464	
M600	$a_0 \pm 15$
M562	
M455	$a_0/6 \pm 14/66$
M425	
M523	
UTB1	$a_1 \pm 14$
M458	
شاهد	$a_0 \pm 14$
	$b_0/6 \pm 4/33$
	$b_0/6 \pm 4/66$
	$b_0/6 \pm 4/66$
	$c_0$

\*داده‌ها نشان دهنده میانگین هاله بازدارندگی  $\pm$  انحراف معیار از سه تکرار می‌باشند.

\*\*حروف غیر متشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۱٪ با استفاده از آزمون دانکن می‌باشد.

ردیابی ژن *sfp* و مقایسه توالی آن: هم‌ردیفی چندگانه توالی *sfp* بین استرین مادری UTB1، هشت موتانت منتخب و هشت استرین از توالی‌های ثبت شده *sfp* در NCBI (*B. subtilis* 168, *B. subtilis* EPC5, *B. subtilis* 96-41, *B. mojavensis* GS1, *mojavensis* GS2, *B. amyloliquefaciens* FZB42, *B. amyloliquefaciens* 96-79, *B. amyloliquefaciens* 96-82) نشان داد که این توالی بین

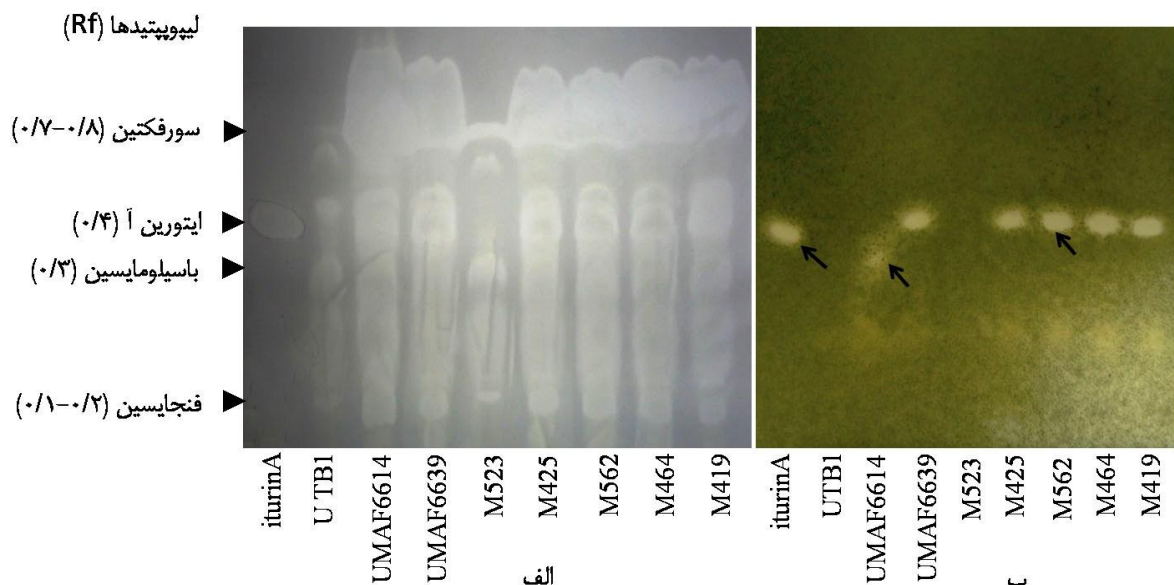


## مجموعه مقالات

چهارمین همایش ملی کاربرد فناوری هسته‌ای در علوم کشاورزی و منابع طبیعی  
(۲۹-۳۰ اردیبهشت، ۱۳۹۴، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای)

The 4<sup>th</sup> National Congress on Nuclear Technology Application in Agricultural & Natural Resource Sciences (19-20 May, 2015, Nuclear Agriculture Research School)

استرین UTB1 و دو موتانت M458 و M523 مشابه بوده اما متفاوت از شش موتانت M419, M25, M455, M464, M562 و M600 می‌باشد. درخت فیلوژنتیکی مبتنی بر Maximum likelihood روابط بین جدایه‌ها را نشان می‌دهد (شکل ۳). یکی از فرضیه‌هایی که در افزایش همزمان سه لیپوپتید در یک موتانت مطرح می‌شود، جهش در ژن *sfp* می‌باشد که آنزیم کدشده توسط آن (۴- فسفوپنتین ترانسفراز) نقش ضروری در آماده‌سازی آنزیم‌های پتیدسینتازهای غیرریبوزومی دارد [۱۸]. سنتز غیرریبوزومی پلی‌پتیدهای حلقوی بستگی به حضور محصول کارآمد ژن *sfp* دارد به طوری که جهش از نوع از کار انداختن این ژن (knockout) منجر به عدم تولید ترکیبات سورفکتین، باسیلومایسین و فنجاسین می‌شود [۱۸]. با توجه به نتایج هم‌ردیفی چندگانه ژن *sfp*، به نظر می‌رسد این ژن در شش موتانت M419, M25, M455, M464, M562 و M600 دچار جهش‌هایی از نوع جابجایی شده است که تولید سه خانواده از لیپوپتیدهای غیرریبوزومی (سورفکتین، ایتورین و فنجاسین) را به طور همزمان تحت تاثیر قرار داده است.



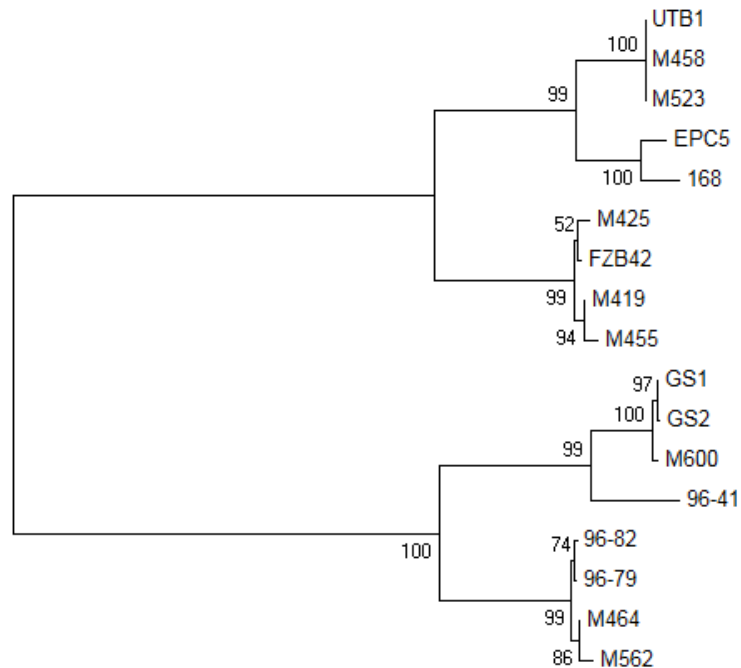
شکل ۲- آنالیز کروماتوگرافی لایه نازک (الف) و بیواتوگرافی (ب) لیپوپتیدهای استرین UTB1 *B. subtilis* و موتانت های M425, M523, M425, M562, M464, M419 و M562. استرین‌های UMAF6639 (تولیدکننده لیپوپتیدهای سورفکتین، فنجاسین و ایتورین آ) و UMAF6614 (تولیدکننده لیپوپتیدهای سورفکتین، فنجاسین و باسیلومایسین) از *B. subtilis* و نیز لیپوپتید خالص ایتورین آ به عنوان شاهد مثبت استفاده شدند.



## مجموعه مقالات

چهارمین همایش ملی کاربرد فناوری هسته‌ای در علوم کشاورزی و منابع طبیعی  
(۲۹-۳۰ اردیبهشت، ۱۳۹۴، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای)

The 4<sup>th</sup> National Congress on Nuclear Technology Application in Agricultural & Natural Resource Sciences (19-20 May, 2015, Nuclear Agriculture Research School)



ترسیم درخت فیلوژنتیکی توالی *sfp*

کمک روش Maximum

0.1

شکل ۳-

به

likelihood برای استرین وحشی *B. subtilis* UTB1، هشت موتانت M419، M425، M455، M458، M464، M523، M562 و M600 و هشت استرین مرجع (96-8، 96-79، 96-8، B. FZB42، GS1، GS2، 96-41، EPC5، 168). اعداد روی شاخه‌ها درصد اعتبارسنجی بیشتر از ۵۰ درصد را نشان می‌دهد.

### منابع:

- 1- Dvorockova, I. 1999. Aflatoxins and human health. CRC Press. Boca Raton.
- 2- Hesseltine, C. W. 1965. A Millennium of Fungi, Food, and Fermentation. *Mycologia*. 57(2): 149-197.
- 3- Li, D., Nie, F., Wei, L., Wei, B. and Chen, Z. 2007. Screening of high-yielding biocontrol bacterium Bs-916 mutant by ion implantation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75:1401-1408
- 4- Liu, J., Liu, M., Wang, J., Yao, J. M., Pan, R. R. and Yu, Z. L. 2005. Enhancement of the *Gibberella zeae* growth inhibitory lipopeptides from a *Bacillus subtilis* mutant by ion beam implantation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69: 223-228.





## مجموعه مقالات

چهارمین همایش ملی کاربرد فناوری هسته‌ای در علوم کشاورزی و منابع طبیعی  
(۲۹-۳۰ اردیبهشت، ۱۳۹۴، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای)

The 4<sup>th</sup> National Congress on Nuclear Technology Application in Agricultural & Natural Resource Sciences (19-20 May, 2015, Nuclear Agriculture Research School)

۵- فرزانه، م. ۱۳۸۹. بررسی مکانیزم عمل باکتری *Bacillus subtilis* در جلوگیری از رشد قارچ *Aspergillus flavus* و کاهش آفلاتوکسین روی پسته. رساله دکتری. پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران. ۱۶۵ صفحه.

- 6- Palumbo, J.D., Baker, J.L., Mahoney, N.E. 2006. Isolation of bacterial antagonists of *Aspergillus flavus* from almonds. *Microb Ecol.*52: 45-52.
- 7- Ahimou, F., Jacques, P. and Deleu, M. 2000. Surfactin and iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. *Enzyme. Microb. Technol.* 27: 749-754.
- 8- Romero, D., de Vicente, A., Olmos, J. L., Dávila, J. C. and Pérez-García, A. 2007. Effect of lipopeptides of antagonistic strains of *Bacillus subtilis* on the morphology and ultrastructure of the cucurbit fungal pathogen *Podosphaera fusca*. *J. Appl. Microbiol.* 103: 969-976.
- 9-Yazgan, A., Ozcengiz, G. and Marahiel, A. 2001. Tn10 insertional mutations of *Bacillus subtilis* that block the biosynthesis of bacilysin. *Biochim. Biophys. Acta. Struct. Expr.*1518: 87-94.
- 10-Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* 28(10): 2731-2739.
- 11- Versalovic, J., Schneider, M., DE-Bruijn, F.J. and Lupski, J.R. 1994. Genomic fingerprint of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Method. Mol. Cell. Biol.* 5: 25-40.
- 12- Straus, S. K. and Hancock, R. E. W. 2006. Mode of action of the new antibiotic for Gram-positive pathogens daptomycin: Comparison with cationic antimicrobial peptides and lipopeptides. *Biochim. Biophys. Acta. Biomembr.* 1758: 1215-1223.
- 13- Maget-Dana, R., L. Thimon, F. Peypoux, and M. Ptak. 1992. Surfactin/iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A. *Biochimie.* 74:1047-1051.
- 14- Quentin, M.J., Besson, F., Peypoux, F. and Michel, G. 1982. Action of peptidolipidic antibiotics of the iturin group on erythrocytes. Effect of some lipids on hemolysis. *Biochim. Biophys. Acta.* 684: 207-211.



## مجموعه مقالات

چهارمین همایش ملی کاربرد فناوری هسته‌ای در علوم کشاورزی و منابع طبیعی  
(۲۹-۳۰ اردیبهشت، ۱۳۹۴، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای)

The 4<sup>th</sup> National Congress on Nuclear Technology Application in Agricultural & Natural Resource Sciences (19-20 May, 2015, Nuclear Agriculture Research School)

---

- 15- DeLucca, A.J., Bland, J.M., Jacks, T.J., Grimm, C., Cleveland, T.E. and Walsh, T.J. 1997. Fungicidal activity of cecropin A. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 41: 481-483.
- 16- Moyne, A.L., Shelby, R., Cleveland, T.E. and Tuzun, S. 2001. Bacillomycin D: an iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus*. *J. Appl. Microbiol.* 90: 622-629.
- 17- Zhang, T. Shi, Z. Q., Hu, L.B., Cheng, L.G. and Wang, F. 2008. Antifungal compound from *Bacillus subtilis* B-FS06 inhibiting the growth of *Aspergillus flavus*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24: 783-788.
- 18- Chen, X.H., Koumoutsi, A., Scholz, R. and Borriss, R. 2009. More than anticipated- production of antibiotics and other secondary metabolites by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *J. Mol Microbiol. Biotechnol.* 16(1-2):14-24.