

لیپوپتیدهای خانواده ایتورین به عنوان ترکیب‌های کلیدی در خاصیت آنتاگونیستی باکتری *Bacillus subtilis* UTB96 علیه *Aspergillus flavus*

۱. حمیده افشارمنش؛ ۲. مسعود احمدزاده*

۱. استادیار، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، صندوق پستی ۴۹۸-۳۱۴۸، کرج، ایران
۲. استاد، گروه گیاه‌پزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، صندوق پستی ۷۷۸۷۱-۳۱۵۸۷، کرج، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۱/۷ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۱/۲۵)

چکیده

اعضای جنس باسیلوس به عنوان باکتری‌های آنتاگونیست امیدبخش برای کنترل زیستی (بیولوژیک) عامل‌های بیماریزای گیاهی شناخته شده‌اند. در این تحقیق عصاره بدون یاخته‌ای سه سویه *Bacillus subtilis* UTB96، *B. subtilis* UTB1 و *B. subtilis* UTB70 علیه قارچ *Aspergillus flavus* R5 به روش کشت متقابل بررسی شد که سویه *B. subtilis* UTB96 بیشترین اثر بازدارندگی ($p \leq 0.05$) را نشان داد. رنگ‌نگاری (کروماتوگرافی) لایه نازک با لیپوپتیدهای استخراج شده از باکتری‌ها، نشان‌دهنده حضور هر سه خانواده از لیپوپتیدهای ایتورین، فنجاسین و سورفکتین در هر سه سویه است. تجزیه و تحلیل بیواتوگرافی کروماتوگرام‌ها علیه قارچ *A. flavus* R5، نقش بالقوه ایتورین‌ها را در فعالیت ضدقارچی سویه *B. subtilis* UTB96 مشخص کرد. به منظور تأیید نقش ایتورین‌ها در فعالیت ضدقارچی سویه *B. subtilis* UTB96، ژن *bmyB* (سومین ژن در مسیر زیست‌ساخت یا بیوسنتز ایتورین‌ها) به کمک جهش‌زایی هدفمند تخریب شد. بررسی مولکولی شامل تجزیه و تحلیل PCR و توالی‌یابی قطعه افزایش‌یافته در جهش‌یافته‌ها مشخص کرد که ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک اسپکتینومایسین جایگزین ژن هدف (*bmyB*) شده و به این ترتیب این ژن تخریب شده است. مقایسه فنوتیپی جهش‌یافته‌های *bmyB* با سویه مادری نشان داد که فعالیت ضدقارچی عصاره بدون یاخته‌ای و لیپوپتیدهای استخراج شده جهش‌یافته‌ها در کشت متقابل با *A. flavus*، تجزیه و تحلیل اتوبیوگرافی و نیز روی میوه پسته کاهش چشمگیری یافته است. بنابراین، یافته‌های این پژوهش گویای نقش اصلی لیپوپتیدهای خانواده ایتورین در کنترل زیستی سویه *B. subtilis* UTB96 علیه *A. flavus* R5 است.

کلیدواژه‌گان: *Bacillus*، *Aspergillus*، کنترل بیولوژیک، لیپوپتید.

مقدمه

و روی مواد آلی پوسیده یافت می‌شوند (Dvorockova 1990). این قارچ‌ها به آسانی محصولات مهمی مانند ذرت، پنبه‌دانه، بادام‌زمینی و پسته را به‌ویژه در سال‌های خشک‌سالی کلنیزه می‌کنند. اغلب جدایه‌های *A. flavus*

قارچ *Aspergillus flavus* و گونه نزدیک به آن یعنی *A. parasiticus* در سرتاسر جهان به‌طور گسترده انتشار می‌یابند و اغلب به‌عنوان پوده‌رست (سaprofیت) در خاک

کنترل زیستی در برنامه‌های مدیریت تلفیقی دانستن سازوکار عمل آن‌ها است. اغلب ترکیب‌های ضدقارچی تولیدشده توسط *Bacillus subtilis* وزن مولکولی کمی (کمتر از ۲ کیلو دالتون) داشته و به وسیله آنزیم‌های بزرگی به نام پپتید سینتتازهای غیرریبوزومی (NRPSs) ساخت (سنتر) می‌شوند (Moyné et al. 2001, Stein, 2005). آنتی‌بیوتیک‌هایی که به صورت غیرریبوزومی ساخت می‌شوند شامل لیپوپپتیدهای حلقوی آمفی‌فیلیک هستند که بسته به توالی اسیدآمین و انشعاب زنجیره اسید چرب آن‌ها به سه خانواده اصلی شامل سورفکتین‌ها، ایتورین‌ها و فنجاسین‌ها تقسیم می‌شوند (Ongena and Jacques 2008). سورفکتین‌ها به احتمال قوی‌ترین سورفکتانت‌های زیستی هستند که فعالیت‌های همولیتیک، ضدویروسی، ضدمایکوپلاسمایی و ضدباکتریایی نشان می‌دهند ولی خود فعالیت ضدقارچی یا نداشته و یا خیلی ضعیف است (Ongena and Jacques 2008) بلکه اثرگذاری تشدیدکنندگی روی فعالیت ضدقارچی ایتورین‌ها دارند (Maget-Dana et al. 1992). ایتورین‌ها (مایکوسوبتیلین، ایتورین‌آ و باسیلومایسین) فعالیت ضدقارچی قوی علیه طیف گسترده‌ای از مخمرها و قارچ‌ها نشان می‌دهند ولی فعالیت ضدباکتریایی آن‌ها محدود است و فعالیت ضدویروسی نشان نمی‌دهند (Moyné et al. 2001, Yu, 2011). فعالیت همولیتیکی فنجاسین‌ها (پلی‌پاستاتین‌ها) کمتر از سورفکتین‌ها و ایتورین‌ها است ولی فعالیت ضدقارچی قوی به‌ویژه علیه قارچ‌های رشته‌ای نشان می‌دهند (Koumoutsis et al. 2007a, Romero et al. 2004). ایتورین‌آ تولیدشده توسط سویه *B. subtilis* NK 330 از تولید آفاتوکسین به وسیله *A. parasiticus* و *A. flavus* جلوگیری کرده است (Ono and Kimura 1991). دو همسان (آنالوگ) از باسیلومایسین D با جرم‌های متفاوت از سویه‌هایی از *B. subtilis* خالص‌سازی و شناسایی شده‌اند که فعالیت آنتاگونیستی علیه *A. flavus* نشان داده‌اند (Moyen et al. 2008, Zhang et al. 2001). سویه *B. pumilus* HY1 که از سس سویا جدا شده بود، فعالیت آنتاگونیستی قوی علیه قارچ‌های تولیدکننده آفاتوکسین *A. parasiticus* و *A. flavus* با تولید

A. parasiticus و تولید سوخت‌وسازگر (متابولیت)‌های ثانویه از مشتقات پلی‌کتیدی می‌کنند که آفاتوکسین نامیده می‌شوند. آفاتوکسین‌ها ترکیب‌های فوق‌العاده سمی، جهش‌زا و سرطان‌زا برای انسان و دام هستند (Hesseltine 1965) و باعث ایجاد سرطان کبد در انسان‌ها می‌شوند. در بین محصولات کشاورزی، پسته بیشترین خطر آلودگی به آفاتوکسین را دارد (Pittet et al. 1998). آلودگی پسته به آفاتوکسین مهم‌ترین چالش صادرات آن بوده و یکی از چالش‌های ملی و منطقه‌ای این محصول با ارزش است و همواره کشورهای صادرکننده پسته در راستای رقابت در بازار بین‌المللی از این حربه علیه پسته ایران استفاده کرده‌اند. اتحادیه اروپا در دوم مارس ۲۰۱۰، پرونده حد مجاز آفاتوکسین را نهایی و برای تصویب به پارلمان اروپا ارسال کرد. در این مصوبه اعداد Appb و ۱۰ (میکروگرم بر کیلوگرم یا قسمت در میلیون) برای حد مجاز آفاتوکسین B و آفاتوکسین کل در پسته آماده مصرف و اعداد ۱۲ppb و ۱۵ برای حد مجاز آفاتوکسین B و آفاتوکسین کل در پسته نیازمند فرآوری بعدی تعیین شده است (کمیتة اروپا، ۲۰۱۰).

اگرچه استفاده از سموم شیمیایی مؤثرترین روش کنترل بیماری‌های گیاهی است اما خطرهای زیست‌محیطی ناشی از کاربرد سموم منجر به توجه بیشتر به روش‌های دوستدار محیط‌زیست مانند کنترل زیستی (بیولوژیک) با ریزجانداران (میکروارگانیزم‌های سودمند شده است. دمای زیاد و تنش خشکی در باغ‌های پسته باعث شده که در این شرایط، قارچ‌ها و باکتری‌هایی که در حالت معمول با *A. flavus* رقابت می‌کنند، به آسانی رشد نکرده و *A. flavus* در پدیده رقابت، برتری یابد. لذا در راستای کنترل زیستی اسپرژیلوس پسته، باکتری‌های سودمند متحمل به دمای بالا و تنش (استرس) خشکی موجود در فیتوسفر پسته مانند جدایه‌های *Bacillus* sp. می‌توانند به عنوان ترکیب‌های فعال زیستی، برای کنترل آلودگی استفاده شده و جایگزین سموم شیمیایی شوند. این آنتاگونیست‌ها از راه رقابت، ترشح سوخت‌وسازگرهای ضد میکروبی و آنزیم‌های تجزیه‌کننده مؤثر واقع می‌شوند. یکی از مسائل مهم در کاربرد عملی عامل‌های

دستگاه لرزا (شیکر) رشد داده شدند (Ahimou et al. 2000). پس از سانتریفیوژ در دمای ۴°C و دور ۱۰۰۰۰×g به مدت پانزده دقیقه، عصاره بدون یاخته‌ای به کمک پالایشگر (فیلتر)های سرسرنگی از جنس نیترات سلولز (۰/۲ میکرومتری) تهیه شد. سپس دروایه (سوسپانسیون) اسپور قارچ *A. flavus* R5 (۱×۱۰^۵ کنیدی در میلی لیتر) در مرکز پتری دیش‌های حاوی محیط PDA قرار گرفت و ۱۰۰ میکرولیتر از کشت پالایش شده باکتری‌ها درون چاهک‌هایی به قطر ۵ میلی‌متر که در پتری دیش‌های PDA تعبیه شده بود، ریخته شد. در نمونه شاهد در چاهک‌ها به جای عصاره بدون باکتری، محیط کشت MOLP در چاهک ریخته شد. سپس پتری دیش‌ها در دمای ۳۰°C به مدت یک هفته نگهداری شدند و قطر هاله بازدارندگی اندازه‌گیری شد.

شناسایی ترکیب‌های ضدقارچی باکتری‌ها

لیپوپپتیدها از عصاره‌های بدون یاخته‌ای پنج سویه یادشده، طی سه مرحله با اضافه کردن یک چهارم حجم حلال بوتانول نرمال و تکان دادن روی دستگاه لرزا به مدت نود دقیقه در مرحله اول و پانزده دقیقه در دفعات دوم و سوم استخراج شدند (Yazgan et al. 2001). لایه بوتانول در شرایط خلأ خشک شده، باقی‌مانده آن در متانول حل شد. لیپوپپتیدهای حل شده در حالت (فاز) F25460 با اندازه ۲۰×۲۰ cm (محصول شرکت مرک آلمان) با تزریق ۱۰۰ میکرولیتر از حالت متانولی از یکدیگر جدا شدند. حالت متحرک شامل کلروفوم: متانول: آب به نسبت حجمی ۴:۲۵:۶۵ است. هنگامی که حالت متحرک به انتهای صفحه TLC رسید، در فضای باز خشک شده و ترکیب‌های آلی به وسیله آب مقطر روی صفحه‌ها نمایان شدند. سپس ضریب نگهداری (Rf) آن‌ها در سویه‌های *B. subtilis* UTB96، *B. subtilis* UTB1 و *B. subtilis* UTB70، در مقایسه با دو سویه مرجع *B. amyloliquefaciens* UMAF6614 و *B. amyloliquefaciens* UMAF6639 محاسبه شد.

به منظور شناسایی ترکیب مؤثر در فعالیت ضدقارچی جدایه‌ها، تجزیه و تحلیل بیواتوگرافی TLC علیه قارچ

لیپوپپتیدهای خانواده ایتورین نشان داد (Cho et al. 2009).

در این تحقیق باکتری *B. subtilis* UTB96 به دلیل داشتن فعالیت بازدارندگی قوی علیه *A. flavus* R5 از مجموعه‌ای از باکتری‌های آنتاگونیست باسیلوس انتخاب شد. هدف این تحقیق بررسی فعالیت بازدارندگی عصاره بدون یاخته‌ای سویه *B. subtilis* UTB96 علیه قارچ مزبور و شناسایی آنتی‌بیوتیک مؤثر در بازدارندگی از رشد قارچ به وسیله تجزیه و تحلیل اتوبیوگرافی گرماتوگرام‌های ناشی از رنگ‌نگاری (کروماتوگرافی) لایه نازک و تأیید آن به کمک جهش (موتاسیون) هدفمند با حذف یکی از ژن‌های مسیر زیست‌ساخت آنتی‌بیوتیک مربوطه است.

مواد و روش‌ها

ریزجانداران و شرایط کشت

باکتری‌های *B. subtilis* UTB1، *B. subtilis* UTB96 و *B. subtilis* UTB70 جدا شده از میوه پسته باغ‌های رفسنجان، از گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه تهران دریافت شد. سویه‌های *B. amyloliquefaciens* UMAF6614 و *B. amyloliquefaciens* UMAF6639 با داشتن فعالیت ضدقارچی علیه قارچ *Podosphaera fusca* (Romero et al. 2004) از گروه میکروبیولوژی دانشگاه مالاگا (اسپانیا) تهیه شد. برای انتخاب باکتری‌های جهش‌یافته، آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین (۱۰۰ μg/mL) و اسپکتینومایسین (۱۰۰ μg/mL) به محیط کشت اضافه شد. قارچ *A. flavus* R5 که از بادام‌زمینی جدا شده بود از گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه تهران دریافت شد.

جلوگیری از رشد *A. flavus* به کمک عصاره بدون یاخته‌ای باکتری‌ها

برای تهیه عصاره بدون یاخته‌ای باکتری‌ها، سویه‌های *B. subtilis* UTB96، *B. subtilis* UTB1، *B. subtilis* UTB70، *B. amyloliquefaciens* UMAF6614 و *B. amyloliquefaciens* UMAF6639 در محیط کشت مناسب برای تولید لیپوپپتیدهای غیرریبوزومی به نام MOLP^۱ به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷°C روی

2. Retention factor

1. Optimal medium for lipopeptides production (MOLP)

مرحله با استفاده از کیت خالص‌سازی محصول PCR (illustrate GFX PCR and Gel Band Purification Kit) از روی ژل آگارز خالص‌شده و سپس هر سه به‌عنوان DNA در مرحله دوم واکنش استفاده شدند. واکنش دوم PCR (Crossover PCR or Fusion PCR) شامل افزایش سه قطعه ایجادشده ناشی از واکنش اول PCR در یک مخلوط واکنش منفرد است. بدین منظور از آغازگرهای بیرونی یعنی آغازگر مستقیم در ناحیه بالادست (- bmyB Fup) و آغازگر معکوس در ناحیه انتهایی ژن هدف (bmyB-Rdn) استفاده شد. واکنش دوم PCR با حجم ۵۰ میکرولیتر شامل بافر 5x phusion HF (New England Biolabs) و ۱۰ میلی‌مول مخلوط دی-نوکلئوزیدتری فسفاتاز، ۱۰ پیکومول از آغازگرهای - bmyB Fup و bmyB-Rdn، ۰/۰۴ واحد در هر میکرولیتر از آنزیم Phusion DNA پلیمرز، ۳ μL از قطعه‌های افزایش‌شده از نواحی بالادست و پایین‌دست ژن bmyB و ۶ μL از ژن پادزی اسپکتینومایسین افزایش‌شده انجام شد. برنامه گرمایی Fusion PCR شامل یک دوره نگهداری (انکوباسیون) اولیه در ۹۸ °C به مدت سی ثانیه و سپس سی چرخه شامل ۹۸ °C به مدت سی ثانیه، ۵۴ °C به مدت سی ثانیه و ۷۲ °C به مدت سه دقیقه است. پس از افزایش، محصول PCR با استفاده از کیت خالص‌سازی محصول PCR خالص شد و برای تعیین توالی به نمایندگی شرکت ماکروژن در هلند فرستاده شد.

A. flavus انجام شد. بدین منظور کروماتوگرام‌های ظاهرشده روی صفحه TLC، در پتری‌دیش‌هایی با اندازه ۲۴۵×۲۴۵mm قرار داده شدند و با محیط PDA مذاب حاوی اسپور قارچ پوشانده شدند. پس از نگهداری در دمای ۲۵ °C به مدت ۵-۷ روز، هاله بازدارندگی را می‌توان مشاهده کرد. مقادیر ضریب نگهداری از هاله بازدارندگی برآورد و با مقادیر مربوط به لیپوپپتیدهای مختلف مقایسه شد (Yáñez-Mendizábal et al. 2011).

تهیه جهش‌یافته‌های *B. subtilis* UTB96

به‌منظور تأیید نقش اعضاء خانواده ایتورین در کنترل قارچ *A. flavus*، جهش هدفمند با هدف حذف سومین ژن (۱۶۰۹۲ جفت باز) در مسیر زیست‌ساخت این ترکیب‌ها با استفاده از روش Fusion PCR و طراحی دو جفت آغازگر انجام شد. بدین منظور دو جفت آغازگر مستقیم و معکوس در نواحی حفاظت‌شده بالادست و ناحیه انتهایی ژن bmyB طراحی شد. به انتهای ۵' آغازگرهای درونی (bmyB-Fdn و bmyB-Rup) توالی‌های مکمل ژن مقاومت به اسپکتینومایسین (۲۴ بازی) اضافه شد. توالی آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۱ آمده است. واکنش اول PCR شامل افزایش نواحی بالادست و ناحیه انتهایی ژن هدف با آغازگرهای مربوطه و نیز افزایش ژن مربوط به اسپکتینومایسین به‌صورت جداگانه است. سه قطعه افزایش‌شده از این

جدول ۱. آغازگرهای استفاده‌شده در این بررسی برای حذف ژن bmyB

Table 1. Primers used in this study to delete bmyB gene

Primer	Sequence
bmyB -Fup	5'- GTAGAGCCGGTCTGTGGGAAT-3'
bmyB -Rup	5'- cgttacgttattagcgagccagtcGCCATATCGGAATGATTTCGC-3'
bmyB -Fdn	5'- caataaaccttgcctcgcctacGCGATTTGTATGCCTATTTTACA -3'
bmyB -Rdn	5'- GCCGTCATACAATTGAATCAGTT -3'
spec-fwd	5'- GACTGGCTCGCTAATAACGTAACGTGACTGGCAAGAG -3'
spec-rev	5'- CGTAGCGAGGGCAAGGGTTTATTGTTTCTAAAATCTG-3'

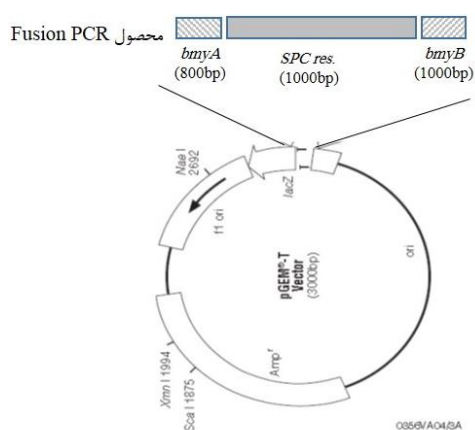
شرکت پرومگا انجام شد. سپس پلاسمید الحاق‌شده به‌دست‌آمده درون باکتری *E. coli* DHα5 منتقل شد. بدین منظور، محصول الحاق‌شده با یاخته باکتریایی مستعد^۱ *E. coli* DHα5 مخلوط شده و پس از یک تکانه (شوک) دمایی روی یخ و دمای ۳۷ °C، محیط کشت LB

تراریختی سویه *B. subtilis* UTB96

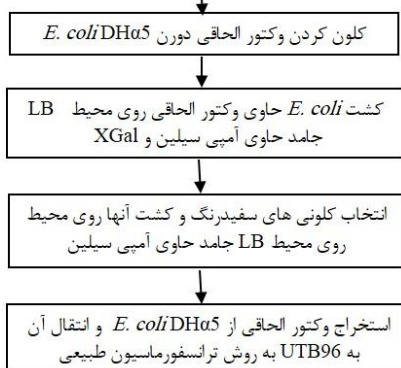
به‌منظور انتقال محصول Fusion PCR به سویه *B. subtilis* UTB96، در آغاز قطعه مزبور درون حامل یا بردار (وکتور) pGEM[®]-T Vector (Promega, USA) کلون شد. عمل الحاق محصول Fusion PCR درون پلاسمید pGEM[®]-T برابر با روش شرح داده‌شده توسط

1. Competent cell

فسفات هیدروژن دی پتاسیم، ۵۲/۴ گرم فسفات پتاسیم، دی‌هیدروژن، ۲۰۰ گرم دی‌گلوکز، ۲۰ گرم ال-گلوتامات، ۱۰۰ میلی‌لیتر سیترات سدیم ۳۰۰ میلی‌مولار، ۱۰ میلی‌لیتر فریک آمونیوم سیترات ۲۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، ۱۰ گرم کازامینواسید است که به مواد بالا آب دیونیزه اضافه شد و سپس با پالایش ۰/۲ میکرومتری سترون (استریل) شد.



الحاق محصول Fusion PCR درون وکتور pGEMT



شکل ۱. مراحل کلون کردن بردار pGEM-T حاوی محصول

E. coli DHα5 درون Fusion PCR

Figure 1. Cloning process of pGEM-T vector including Fusion PCR product into *E. coli* DHα5

بررسی مولکولی و فنوتیپی جهش‌یافته‌های ژن *bmyB*
به‌منظور اطمینان از حذف ژن *bmyB* در کلونی‌های رشدیافته روی محیط حاوی پادزی اسپکتینومایسین و نبود تولید ایتورین در آن‌ها، لازم است کلونی‌ها از نظر مولکولی و فنوتیپی آزمایش شوند.

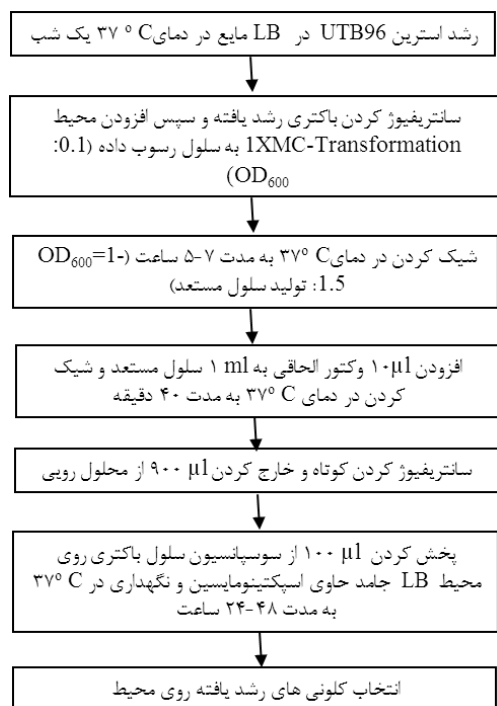
بررسی مولکولی جهش‌یافته‌ها

برای بررسی مولکولی جهش‌یافته‌ها، کلونی PCR با

به آن اضافه شده و به مدت دو ساعت در دمای ۳۷°C روی دستگاه لرزا رشد داده شد. پس‌از آن باکتری رشد یافته روی محیط LB آگاردار حاوی ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آمپی‌سیلین و ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محلول XGal پخش شد. پس از ۱۶-۲۴ ساعت، کلونی‌های سفید انتخاب شده و روی محیط جدید حاوی آمپی‌سیلین کشت شدند (شکل ۱). برای اطمینان از وجود قطعه موردنظر درون پلاسمید بالا، کلونی PCR با استفاده از آغازگرهای بیرونی انجام شد. پس از اطمینان از وجود قطعه موردنظر درون بردار، پلاسمید به‌دست‌آمده را از *E. coli* DHα5 با استفاده از کیت QIAprep Spin Miniprep Kit (Germany, Qiagen) استخراج کرده و غلظت آن با استفاده از دستگاه نانودراپ (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer) تعیین شد.

انتقال بردار pGEM[®]-T به درون سویه *B. subtilis* UTB96 به روش تراریختی (ترانسفورماسیون) طبیعی انجام شد. در این روش، در آغاز سویه *B. subtilis* UTB96 به مدت یک‌شب کشت داده شد. سپس سانتریفیوژ شده و یاخته باکتریایی رسوب داده شده در ۱۰ میلی‌لیتر محیط تراریختی (۱ لیتر محیط تراریختی شامل ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط 10xMC، ۳/۳۳ میلی‌لیتر سولفات منیزیم، ۵ میلی‌لیتر تریپتوفان ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، ۵ میلی‌لیتر ال-فنیل آلانین ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، ۸۸۶/۷ میلی‌لیتر آب دیونیزه است.) سوسپانسیون شدند، به‌طوری‌که جذب آن در ۶۰۰ نانومتر ۰/۱-۰/۸۵ باشد. سپس در دمای ۳۷°C روی دستگاه لرزا به مدت ۵-۷ ساعت رشد داده شد. به‌طوری‌که جذب نهایی آن در ۶۰۰ نانومتر ۱-۱/۵ شود. پس‌از آن، ۱ میلی‌لیتر از کشت بالا با ۱۰ میکرولیتر از بردار pGEM[®]-T حاوی قطعه موردنظر مخلوط شد و روی دستگاه لرزا در دمای ۳۷°C به مدت ۳۷°C به مدت ۳۷°C قرار گرفتند. سپس یک سانتریفیوژ کوتاه انجام شده و یاخته باکتریایی روی محیط LB آگاردار حاوی ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر حاوی اسپکتینومایسین پخش شد. سپس در دمای ۳۷°C به مدت ۲۴-۴۸ ساعت نگهداری شدند. کلونی‌های رشد کرده، جدا شده و روی محیط جدید حاوی اسپکتینومایسین کشت داده شدند (شکل ۲). ۱ لیتر محیط 10xMC شامل: ۱۰۷/۱۲ گرم

۳۰°C و شرایط تاریکی به مدت یک هفته و تکان شدید روزانه به مدت پنج دقیقه، جمعیت اسپور قارچ در گرم پسته محاسبه شد.



شکل ۲. مراحل تراریختی طبیعی سویه *B. subtilis* UTB96
Figure 2. Natural transformation process of *B. subtilis* UTB96

تجزیه و تحلیل آماری

آزمایش‌ها در قالب طرح کامل تصادفی انجام شدند. میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون LSD به کمک نرم‌افزار SAS (V9.1) در سطح ۵ درصد مقایسه شدند.

نتایج

جلوگیری از رشد *A. flavus* R5 به کمک عصاره بدون یاخته‌ای

تأثیر کشت پالایش‌شده بدون یاخته‌ای سویه‌های وحشی *B. subtilis* UTB96، *B. subtilis* UTB70، *B. subtilis* UTB1 و *B. subtilis* UMAF6614 در مقایسه با سویه‌های مرجع *B. subtilis* UMAF6639 و *B. amyloliquifaciens* UMAF6639 با استفاده از *B. amyloliquifaciens* R5 علیه *A. flavus* R5 با استفاده از روش کشت متقابل بررسی شدند. اندازه‌گیری هاله بازدارندگی پس از هفت روز نشان داد که بین عصاره‌های بدون یاخته‌ای سویه‌های *B. subtilis*

آغازگرهای بیرونی ژن *bmyB* (*bmyB*-Fup و *bmyB* - Rdn) و نیز با آغازگرهای ژن اسپکتینومايسين انجام شد. بردار pGEM®-T به‌عنوان شاهد مثبت و سویه وحشی *B. subtilis* UTB96 به‌عنوان شاهد منفی استفاده شد. سپس قطعه افزایش‌یافته با استفاده از کیت خالص‌سازی محصول PCR از ژل خالص‌شده و با استفاده از آغازگرهای نام‌برده برای تعیین توالی به نمایندگی شرکت ماکروژن در هلند فرستاده شد.

بررسی فنوتیپی جهش‌یافته‌های *bmyB*

برای بررسی ویژگی‌های فنوتیپی جهش‌یافتگان ژن *bmyB*، لیپوپپتیدهای سویه وحشی و جهش‌یافته‌ها با بوتانل نرمال استخراج شدند و تجزیه و تحلیل بیواتوگرافی علیه قارچ *A. flavus* R5 انجام شد. همچنین تأثیر عصاره‌های بدون یاخته‌ای (ناشی از رشد به مدت ۷۲ ساعت در محیط MOLP) سویه وحشی *B. subtilis* UTB96 و جهش‌یافته‌های ژن *bmyB* در جلوگیری از رشد *A. flavus* با روش کشت متقابل انجام شد. در یک آزمایش تکمیلی، غلظت‌های ۱:۱، ۱:۲ و ۱:۴ از عصاره بدون یاخته‌ای سویه وحشی و جهش‌یافته‌ها با ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت PDB و ۵ میکرولیتر اسپور قارچ (1×10^6) در پلیتهای ۹۶ چاهکی ریخته شدند و میزان رشد قارچ پس از ۲۴ ساعت نگهداری در دمای ۳۰°C از لحاظ ظاهری بررسی شد (Malina and Shai 2005).

بررسی تأثیر لیپوپپتیدهای استخراج‌شده در جلوگیری

از رشد جدایه *A. flavus* R5 روی میوه پسته

پسته‌های رقم اکبری با پوسته رویی سالم و بدون آسیب‌دیدگی انتخاب شدند، پوسته رویی و استخوانی آن‌ها جدا شده و سپس با هیپوکلریت سدیم ۱ درصد ضدعفونی سطحی شدند و سه مرحله با آب مقطر سترون شسته شده و سپس در زیر هود لامینار به‌طور کامل خشک شدند. ۱۵ گرم مغز پسته در ارن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری ریخته شد، سپس ۱ میلی‌لیتر از لیپوپپتیدهای استخراج‌شده (با بوتانل نرمال) از سویه *B. subtilis* UTB96 و جهش‌یافته‌های آن اضافه شد. سپس پسته‌ها با ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون اسپور قارچ (1×10^4) آلوده شدند. پس از نگهداری در دمای

شدند. اندازه گیری میزان ضریب نگهداری (Rf) مربوطه در نوار (باند) های ظاهر شده روی صفحه های TLC و مقایسه با دو سویه مرجع، وجود باندهای مربوط به سه خانواده اصلی از لیپوپتیدهای سورفکتین (Rf=۰/۷-۰/۸)، ایتورین (Rf=۰/۳-۰/۴) و فنجایسین (Rf=۰/۱-۰/۲) را در هر سه سویه نشان داد. با توجه به اندازه ظاهری لکه های ظاهر شده روی صفحه های TLC، میزان لیپوپتیدهای تولید شده توسط سویه *B. subtilis* UTB1 و *B. subtilis* UTB70 محسوس نبود در حالی که در سویه *B. subtilis* UTB96 میزان لیپوپتیدهای خانواده ایتورین و سورفکتین شایان توجه و شایان مقایسه با دو سویه مرجع *B. amyloliquifaciens* UMAF6639 و *B. amyloliquifaciens* UMAF6614 بود (شکل ۳- A).

برای بررسی ارتباط بین لیپوپتیدها و فعالیت ضدقارچی جدایه های باکتری ها، تجزیه و تحلیل بیواتوگرافی TLC با استفاده از *A. flavus* انجام شد (شکل ۳- B). بازدارندگی شایان توجهی از رشد میسلومی و اسپورزایی قارچ در سویه های *B. subtilis* UTB96 و *B. amyloliquifaciens* UMAF6639 و به میزان کمتری در سویه های *B. amyloliquifaciens* UMAF6614 و *B. subtilis* UTB70 مشاهده شد که با توجه به میزان ضریب نگهداری هاله بازدارندگی ایجاد شده (۰/۳-۰/۴) متعلق به لیپوپتیدهای خانواده ایتورین (ایتورین) و باسیلومایسین است. در ضریب نگهداری متناسب با اعضای خانواده سورفکتین بازدارندگی از رشد و اسپورزایی قارچ در هیچ یک از جدایه ها مشاهده نشد. یافته های این آزمون نقش آنتی بیوز مبتنی بر تولید خانواده ایتورین به عنوان عامل ضدقارچی اصلی در سویه *B. subtilis* UTB96 را تأیید می کند.

مختل کردن تولید ایتورین ها در سویه *B. subtilis* UTB96 و کاهش فعالیت ضدقارچی آن علیه *A. flavus* با توجه به نتایج اتوبیوگرافی صفحه های TLC علیه قارچ *A. flavus* R5 مشخص شد که اعضای خانواده ایتورین (ایتورین، باسیلومایسین و یا مایکوسوبتیلین) در سویه *B. subtilis* UTB96 در جلوگیری از رشد قارچ نقش اساسی دارند. نوع ایتورین تولید شده در سویه

UTB96، *B. amyloliquifaciens* UMAF6639 و *B. amyloliquifaciens* UMAF6614 با سویه های *B. subtilis* UTB1، *B. subtilis* UTB70 در محیط کشت PDA از نظر ویژگی ضدقارچی تفاوت معنی داری در سطح ۵ درصد وجود دارد (جدول ۲). بیشترین هاله بازدارندگی مربوط به سویه های *B. amyloliquifaciens* UMAF6639 (۱۴/۶۶ میلی متر) و *B. subtilis* UTB96 (۱۴/۳۳ میلی متر) و کمترین آن مربوط به سویه *B. subtilis* UTB1 (۴/۶۶ میلی متر) است. بدین ترتیب در بین سویه های بومی ایران، سویه *B. subtilis* UTB96 بیشترین تأثیر بازدارندگی را علیه *A. flavus* R5 نشان داد.

جدول ۲. تأثیر عصاره بدون یاخته ای سویه های باسیلوس در جلوگیری از رشد *A. flavus* R5

Table 2. Effects of cell-free supernatants of *Bacillus* strains in inhibition of *A. flavus* growth

Treatment	Inhibition zone (mm)
UMAF6639	14.66±0.6 ^{a**}
UMAF6614	13.33±0.6 ^b
UTB96	14.66±0.6 ^{ab}
UTB70	5.66±0.6 ^c
UTB1	4.66±0.6 ^d
Control	0 ^e

* داده ها نشان دهنده میانگین هاله بازدارندگی ± انحراف معیار از سه تکرار هستند. آزمایش دو بار در سه تکرار انجام شد.

** حروف ناهممانند بیانگر اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون LSD است.

* Data represent the means ± standard deviation from three replicates. The experiment was conducted two times with three replicates.

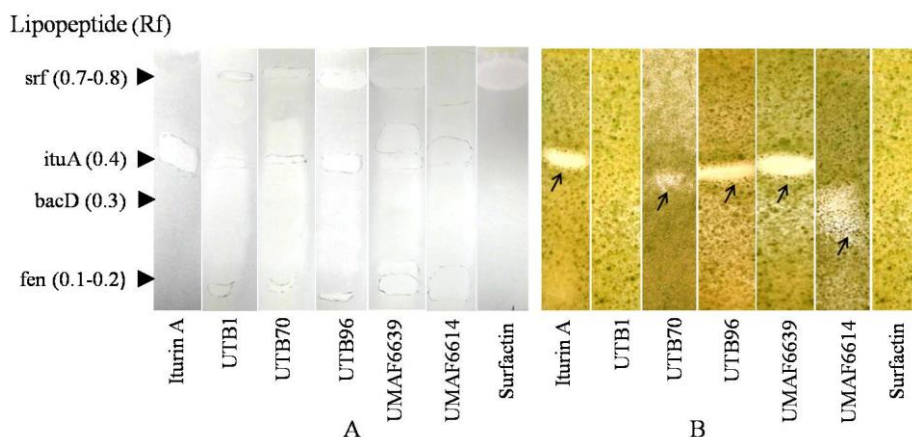
** Values followed by the same letter were not significantly different at P=0.05 using Fisher's least significant difference test.

تجزیه و تحلیل لیپوپتیدهای غیر بیوزومی و نقش آن ها در فعالیت ضد قارچی

به منظور تعیین پروفایل لیپوپتیدهای تولید شده توسط سویه های *B. subtilis* UTB96، *B. subtilis* UTB70 و *B. subtilis* UTB1 تجزیه و تحلیل رنگ نگاری لایه نازک با لیپوپتیدهای استخراج شده از عصاره بدون یاخته ای باکتری ها انجام شد که با لیپوپتیدهای دو سویه مرجع *B. amyloliquifaciens* UMAF6639 (تولیدکننده لیپوپتیدهای سورفکتین، فنجایسین و ایتورین) و *B. amyloliquifaciens* UMAF6614 (تولیدکننده لیپوپتیدهای سورفکتین، فنجایسین و باسیلومایسین) (Romero et al. 2007a) و نیز لیپوپتیدهای تجاری خالص ایتورین آ و سورفکتین (Sigma Co.) مقایسه

است که طراحی آغازگر باید در نواحی حفاظت‌شده انجام گیرد تا بتوان از آن توالی برای حذف ژن در سوپه انجام داد. بدین ترتیب جهش هدفمند با هدف حذف سومین ژن (۱۶۰۹۲ جفت باز) در مسیر ساخت‌زیست ترکیب‌های ایتورین با استفاده از روش Fusion PCR انجام شد.

B. subtilis UTB96 خیلی مشخص نیست و با توجه به اینکه تنها تفاوت سه نوع ایتورین یادشده در جابجایی چند اسیدآمینه در موقعیت‌های ۴ و ۵ و ۶ یا ۷ در هپتاپپتید است، حذف هر یک از ژن‌های مسیر ساخت‌زیست اعضای این خانواده می‌تواند منجر به تولید نشدن شود. تنها نکته‌ای که باید مدنظر قرار گیرد این



شکل ۳. تجزیه و تحلیل رنگ‌نگاری لایه نازک (A) و بیواتوگرافی (B) لیپوپپتیدهای سویه‌های *B. subtilis* UTB70، *B. subtilis* UTB1 و *B. amyloliquifaciens* UMAF6614 و *B. amyloliquifaciens* UMAF6639. نیز لیپوپپتیدهای خالص ایتورین A و سورفکتین به‌عنوان شاهد مثبت استفاده شدند. (A) لیپوپپتیدهای سویه‌های یادشده با رنگ‌نگاری لایه نازک از یکدیگر جداسازی شده و با آب مقطر روی صفحه‌های TLC ظاهر شدند. (B) تجزیه و تحلیل بیواتوگرافی کرماتوگرام‌های ظاهر شده از تجزیه و تحلیل TLC علیه قارچ *A. flavus* نواحی بازدارندگی از رشد قارچ با اعضای خانواده ایتورین با فلش نشان داده شده است. ضریب‌های نگهداری (Rf) متناسب با لیپوپپتیدهای سورفکتین، ایتورین A، باسیلومایسین و فنجایسین در سمت چپ شکل آمده است.

Figure 3. Thin-layer chromatography (TLC) analysis (A) and bioautography (B) of lipopeptides of strains *B. subtilis* UTB1, *B. subtilis* UTB70, *B. subtilis* UTB96, *B. amyloliquifaciens* UMAF6639 and *B. amyloliquifaciens* UMAF6614. Strains UMAF6639 and UMAF6614 and also purified iturin A and surfactin were used as positive control. A) The lipopeptides of the strains were fractionated by TLC and revealed with H₂O. B) Bioautographic analysis of the revealed chromatograms against *A. flavus*. The inhibition zones of the fungal growth induced by iturin are shown by arrows. Retention factor (Rf) values of the different lipopeptide families, surfactins (surf), iturins including iturin (itu) and bacillomycin (bacillo), or fengycins (fengy) are indicated on the left.

ناحیه بالادست و ناحیه انتهایی ژن *bmyB* و نیز ژن مقاومت به اسپکتینومایسین به‌عنوان DNA الگو در واکنش دوم PCR (Fusion PCR) استفاده شدند و قطعه درازی به طول در حدود ۳۰۰۰ جفت باز با استفاده از آغازگرهای بیرونی یعنی آغازگر مستقیم در ناحیه بالادست (*bmyB*-Fup) و آغازگر معکوس ناحیه انتهایی ژن هدف (*bmyB*-Rdn) و آنزیم Phusion DNA پلیمرز افزایش شد (شکل ۵).

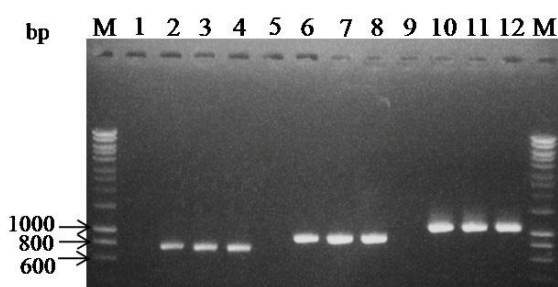
پس از کلون کردن محصول Fusion PCR درون بردار pGEM[®]-T، کلونی‌های سفید رشد کرده روی محیط LB جامد حاوی X-Gal و آمپی‌سیلین انتخاب

واکنش اول PCR شامل افزایش ناحیه بالادست ژن *bmyB* (در حدود ۸۰۰ جفت باز)، ناحیه انتهایی ژن *bmyB* (۱۰۰۰ جفت باز) در سویه‌های *B. subtilis* UTB96 و *B. amyloliquifaciens* UMAF6639 (شاهد مثبت) با آغازگرهای مربوطه (*bmyB*-Rup، *bmyB*-Fup، *bmyB*-Fdn و *bmyB*-Rdn) و نیز افزایش ژن مربوط به مقاومت به اسپکتینومایسین (در حدود ۱۰۰۰ جفت باز) در سویه‌ای از *Bacillus* sp. دارای کاست مربوط به این پادزی، با آغازگرهای *spec*-fwd و *spec*-rev به‌صورت جداگانه است (شکل ۴).

فرآورده‌های خالص‌سازی‌شده از واکنش اول PCR

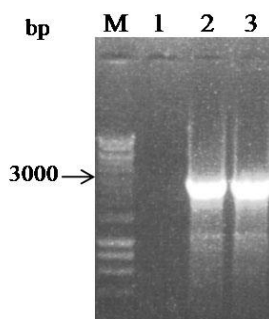
همسانی (بیشتر از ۹۵ درصد) را با ژن‌های *bmyA* یا *ituA* (ناحیه بالادست ژن *bmyB*)، *bmyB* یا *ituB* و ژن مقاومت به پادزی اسپکتینومایسین نشان داد که نشان‌دهنده این است که قطعه به‌دست‌آمده توالی صحیح موردنظر ما را دارد. پس از اطمینان از وجود قطعه حاصل از Fusion PCR در پلاسمید pGEM-T و اطمینان از توالی بهینه آن، پلاسمید به‌دست‌آمده در سویه *E. coli* DH α 5 افزایش و خالص شد، سپس به روش تراریختی طبیعی به درون *B. subtilis* UTB96 منتقل شد.

شده و برای اطمینان از وجود قطعه موردنظر در پلاسمید یادشده، کلونی PCR با استفاده از آغازگرهای بیرونی انجام شد. در برخی کلونی‌ها قطعه ۳۰۰۰ جفت بازی افزایش شد که نشان می‌دهد پلاسمید حاوی قطعه موردنظر ماست. به‌منظور اطمینان بیشتر، پلاسمید از این کلونی‌ها استخراج‌شده و با استفاده از آغازگرهای یادشده تعیین توالی شد. پس از توالی‌یابی، با استفاده از برنامه BLAST و بر پایه توالی‌های معتبر موجود در بانک‌های اطلاعاتی، توالی مربوط بیشترین میزان



شکل ۴. فرآورده‌های PCR ناشی از افزایش ناحیه بالادست و ناحیه انتهایی ژن *bmyB* در سویه‌های *B. subtilis* UTB96 و *B. amyloliquefaciens* UMAF6639 و نیز افزایش ژن مقاومت به اسپکتینومایسین. ۱) شاهد منفی با آغازگرهای *bmyB*-Fup و *bmyB*-Rup و ۲) افزایش ناحیه بالادست ژن *bmyB* در سویه UMAF6639. ۳ و ۴) افزایش ناحیه بالادست ژن *bmyB* در سویه UTB96. ۵) شاهد منفی با آغازگرهای *bmyB*-Fdn و *bmyB*-Rdn. ۶) افزایش ناحیه انتهایی ژن *bmyB* در سویه UMAF6639. ۷ و ۸) افزایش ناحیه انتهایی ژن *bmyB* در سویه UTB96. ۹) شاهد منفی با آغازگرهای spec-fwd و spec-rev. ۱۰، ۱۱ و ۱۲) افزایش ژن مقاومت به اسپکتینومایسین در سویه‌ای از *Bacillus* sp. که کاست مربوط به این پادزی را دارد. M، نشانگر DNA (HyperLadder I: 200 -10,000bp).

Figure 4. Amplification of the upstream and the end region of *bmyB* in strains *B. subtilis* UTB96 and *B. amyloliquefaciens* UMAF6639 and also amplification of spectinomycin resistance gene. 1) negative control with *bmyB*-Fup and *bmyB*-Rup primers. 2) Amplification of the *bmyB* upstream in UMAF6639. 3, 4) Amplification of the *bmyB* upstream in UTB96. 5) Amplification of the end region of *bmyB* with *bmyB*-Fdn and *bmyB*-Rdn. 6) Amplification of the end region of *bmyB* in UMAF6639. 7, 8) Amplification of the end region of *bmyB* in UTB96. 9) Negative control with spec-fwd and spec-rev primers. 10, 11, 12) Amplification of spectinomycin resistance gene in one strain of *Bacillus* sp. which has spectinomycin resistance cassette. M, HyperLadder I: 200 -10,000bp.



شکل ۵-۲ و ۳، فرآورده‌های Fusion PCR ناشی از افزایش نواحی بالادست و انتهایی ژن *bmyB* در سویه *B. subtilis* UTB96 و نیز ژن اسپکتینومایسین در یک مخلوط واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای *bmyB*-Fup و *bmyB*-Rdn. ۱) شاهد منفی. M) مارکر DNA (HyperLadder I: 200 -10,000bp).

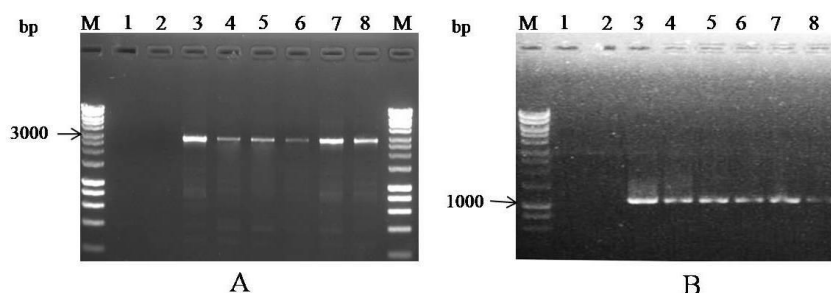
Figure 5. 2, 3, Fusion PCR products resulted from amplification of the upstream and the end of region of *bymB* in *B. subtilis* UTB96 and also spectinomycin resistance gene in a PCR reaction using *bmyB*-Fup and *bmyB*-Rdn and DNA Phusion polymerase. 1) Negative control without the upstream and the end of region of *bymB* and spectinomycin resistance gene. M) HyperLadder I: 200 -10,000bp.

ژن مقاومت به اسپکتینومایسین جایگزین ژن *bmyB* شده است و به این ترتیب ژن *bmyB* از ژنوم باکتری حذف شده است. در سویه وحشی *B. subtilis* UTB96 هیچ بانندی دیده نشد که دلیل آن بزرگ بودن درازای ژن *bmyB* (حدود ۱۶۰۰۰ جفت باز) است و در زمان کوتاه PCR، امکان افزایش این قطعه بزرگ وجود ندارد (شکل ۶).

سپس برای تأیید حذف ژن *bmyB*، قطعه افزایش یافته در جهش یافته‌ها از ژل آگارز خالص شده و با استفاده از آغازگرهای *bmyB*-Rdn و *bmyB*-Fup تعیین توالی شدند. پس از توالی‌یابی، با استفاده از برنامه BLAST و بر پایه توالی‌های معتبر موجود در بانک‌های اطلاعاتی، قسمتی از توالی که با آغازگر *bmyB*-Fup تعیین توالی شده بود، بیشترین همسانی را با ژن *bmyA* یا *ituA* و ژن مقاومت به پادزی اسپکتینومایسین نشان داد و بخشی از توالی که با آغازگر *bmyB*-Rdn تعیین توالی شده بود بیشترین همسانی را با قطعه کوچکی از ژن *bmyB* یا *ituB* و نیز ژن مقاومت به اسپکتینومایسین نشان داد که نشان‌دهنده جایگزینی ژن مقاومت به اسپکتینومایسین به جای ژن هدف یعنی *bmyB* است و بدین ترتیب این ژن حذف شده است.

بررسی مولکولی جهش یافته‌های ژن *bmyB*

پس از عمل تراریختی طبیعی سویه *B. subtilis* UTB96، کلونی‌هایی روی محیط LB حاوی اسپکتینومایسین رشد کردند که مشخص می‌کند پلاسمید وارد آن‌ها شده است. به منظور تأیید وجود ژن اسپکتینومایسین و نیز تأیید حذف ژن *bmyB*، کلونی PCR با استفاده از آغازگرهای مربوط به اسپکتینومایسین و نیز آغازگرهای بیرونی (*bmyB*-Fup و *bmyB*-Rdn) در این کلونی‌ها انجام شد. نتایج کلونی PCR با آغازگرهای ژن اسپکتینومایسین نشان داد که در کلونی‌های رشد یافته روی محیط حاوی اسپکتینومایسین، ژن مقاومت به اسپکتینومایسین (قطعه‌ای به طول ۱۰۰۰ جفت باز) افزایش شد و این مشخص می‌کند که پلاسمید حاوی قطعه مورد نظر (قطعه حاصل از Fusion PCR شامل ژن مقاومت به اسپکتینومایسین و نیز نواحی بالادست و انتهایی ژن *bymB*) وارد ژنوم باکتری شده است. همچنین در کلونی‌های رشد کرده روی محیط حاوی اسپکتینومایسین پس از PCR با آغازگرهای بیرونی، قطعه‌ای به طول در حدود ۳۰۰۰ جفت باز افزایش شد که هم‌اندازه قطعه حاصل از Fusion PCR است و این مشخص می‌کند که پلاسمید حاوی قطعه مورد نظر وارد ژنوم باکتری شده و



شکل ۶. تشخیص مولکولی حذف ژن *bymB* در تراریخت‌های *B. subtilis* UTB96. (A) فرآورده‌های PCR با استفاده از آغازگرهای *bmyB*-Rdn و *bmyB*-Fup در تراریخت‌های UTB96. ۱) مخلوط واکنش PCR بدون ژنوم باکتری. ۲) سویه UTB96. ۳) بردار pGEM-T حاوی قطعه مورد نظر (شاهد مثبت). ۴-۸) تراریخت‌های ایتورین‌ها. (B) افزایش ژن مقاومت به اسپکتینومایسین با آغازگرهای *spec*-fwd و *spec*-rev: ۱) مخلوط واکنش PCR بدون ژنوم باکتری. ۲) سویه UTB96. ۳) بردار pGEM-T حاوی قطعه مورد نظر. ۴-۸) تراریخت‌های ایتورین‌ها. (M) نشانگر DNA (HyperLadder I: 200-10,000bp).

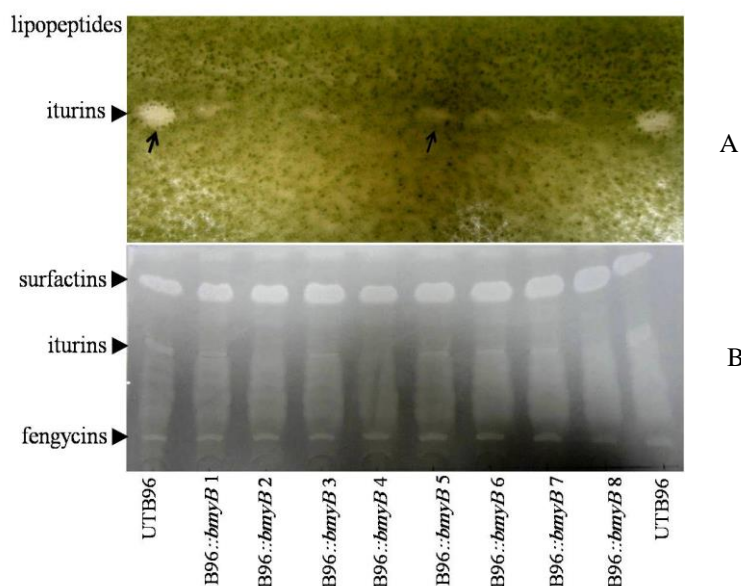
Figure 6. Molecular diagnosis revealed the deletion of the gene *bmyB* in transformants of *B. subtilis* UTB96. (A) PCR products obtained with the pair of primers *bmyB*-Fup and *bmyB*-Rdn on bacterial transformants of UTB96. 1) PCR mix without bacterial DNA. 2) Strain UTB96. 3) pGEM-T vector containing the desirable fragment (positive control). 4-8) iturins-deficient transformants.

(B) Amplification of the spectinomycin resistance cassette using the pair of primers *spec*-fwd and *spec*-rev primers. Lane 1) PCR mix without bacterial DNA. Lane 2) wild strain UTB96. Lane 3) pGEM-T vector containing the desirable fragment. Lanes 4-8) iturins-deficient transformants. M) HyperLadder I: 200-10,000bp.

جلوگیری از رشد قارچ در ناحیه مربوط به ایتورین‌ها نیستند، بدین ترتیب مشخص می‌شود که با حذف ژن *bmyB* در این جهش‌یافته‌ها، پادزی‌های خانواده ایتورین تولید نمی‌شوند. هاله بازدارندگی در پنج جهش‌یافته دیگر، کاهش فراوانی نسبت به سویه *B. subtilis* UTB96 نشان داده است (شکل ۷). در این پنج جهش‌یافته با وجود حذف ژن *bmyB* که از لحاظ مولکولی ثابت شد، ولی تولید ایتورین به‌کلی حذف نشده است. در این مورد دو فرضیه مطرح می‌شود: یکی اینکه ممکن است هم‌ریخت (ایزوفرم)‌هایی از ایتورین‌ها تولید شوند که قادر به جلوگیری جزئی از رشد قارچ هستند. دوم، ترکیب‌های حد واسطی که در مسیر زیست‌ساخت ایتورین‌ها تولید می‌شوند، بسته به ترکیب اسیدآمین در ساختار پپتیدی آن‌ها می‌توانند کم‌وبیش مؤثر باشند.

بررسی فنوتیپی جهش‌یافته‌های ژن *bmyB*

تجزیه و تحلیل لیپوپپتیدهای غیرریبوزمومی جهش‌یافته‌های *bmyB* و اتوبیوگرافی علیه *A. flavus* لیپوپپتیدهای استخراج‌شده از سویه وحشی *B. subtilis* UTB96 و هشت جهش‌یافته ژن *bmyB* به‌وسیله رنگ‌نگاری لایه نازک از یکدیگر جداسازی شدند. پس از ظاهر شدن لکه‌ها به کمک آب مقطر، مشاهده شد که لکه متناسب با ضریب نگهداری مربوط به خانواده ایتورین در سه جهش‌یافته (*B96ΔbmyB2*، *B96ΔbmyB4* و *B96ΔbmyB8*) از بین رفته است و در پنج جهش‌یافته دیگر اندازه لکه در مقایسه با سویه مادری UTB96 *B. subtilis* کاهش یافته است. تجزیه و تحلیل بیواتوگرافی کروماتوگرام‌های حاصل علیه قارچ *A. flavus* R5 نیز نشان داد که سه جهش‌یافته *B96ΔbmyB2*، *B96ΔbmyB4* و *B96ΔbmyB8* قادر به



شکل ۷. نقص در تولید لیپوپپتید ایتورین و جلوگیری از رشد *A. flavus* در تراخیتهای *B. subtilis* UTB96 (A) استخراج‌های بوتانولی به‌وسیله رنگ‌نگاری لایه نازک روی صفحه TLC از هم جداسازی شده که پس از پاشش با آب مقطر در سویه UTB96 سه خانواده از لیپوپپتیدها ظاهر شد ولی در جهش‌یافته‌های *UTB96::bmyB2*، *UTB96::bmyB4* و *UTB96::bmyB8* در ضریب نگهداری متناظر با ایتورین‌ها هاله‌ای مشاهده نشد. (B) تجزیه و تحلیل بیواتوگرافی TLC علیه قارچ *A. flavus* صفحه TLC با محیط PDA حاوی اسپور *A. flavus* پوشانده شد. نواحی بازدارندگی از رشد قارچ به‌وسیله اعضاء خانواده ایتورین با فلش نشان داده شده است. تراخیتهای *UTB96::bmyB2*، *UTB96::bmyB4* و *UTB96::bmyB8* توانایی جلوگیری از رشد قارچ و اسپوزایی *A. flavus* را به‌کلی از دست دادند.

Figure 7. The transformants from *B. subtilis* UTB96 fail in production of the lipopeptide iturin and suppression of *A. flavus* *in vitro*. (A) Butanolic extracts fractionated by TLC and treated with water revealed the presence of the three lipopeptides in wild-type UTB96, and no water-extruded halo at retention time of iturins the mutants (*UTB96::bmyB2*, *UTB96::bmyB4* and *UTB96::bmyB8*). (B) TLC-bioautographic analysis against *A. flavus*. The TLC plates were covered with a suspension of PDA medium containing *A. flavus* conidia. Arrow: Zone of inhibition of fungal growth induced by iturins. The *UTB96::bmyB2*, *UTB96::bmyB4* and *UTB96::bmyB8* transformants lost completely the ability to inhibit the growth and sporulation of *A. flavus*.

حدودی بازدارندگی کرده‌اند اما با رقیق کردن عصاره‌های بدون یاخته‌ای به میزان دو و چهار برابر نتوانستند مانند سویه وحشی از رشد قارچ جلوگیری کنند و رشد قارچ در غلظت ۱:۴ همانند شاهد (بدون عصاره باکتری) بود. این موضوع نشان می‌دهد که سوخت‌وسازگرهای دیگری افزون بر ایتورین‌ها در جلوگیری از رشد *A. flavus* نقش دارند اما ایتورین‌ها نقش اصلی را ایفا می‌کنند چراکه در غلظت اول بیشتر جهش‌یافته‌ها توانسته‌اند تا حدودی جلوی رشد قارچ را بگیرند اما با رقیق کردن آن‌ها به دلیل اینکه ایتورین تولید نمی‌شود و غلظت دیگر سوخت‌وسازگرها نیز کاهش یافته است، جلوگیری از رشد قارچ به میزان زیادی کاهش می‌یابد. درحالی‌که با رقیق کردن عصاره بدون یاخته‌ای سویه *B. subtilis* UTB96 جلوگیری از رشد قارچ کاهش محسوسی نشان نمی‌دهد. بدین ترتیب مشخص می‌شود که در بین سوخت‌وسازگرهای این سویه باکتری، اعضای خانواده ایتورین نقش اصلی در جلوگیری از رشد قارچ دارند.

تأثیر لیپوپپتیدهای استخراج‌شده از جهش‌یافته‌های *bymB* در جلوگیری از رشد *A. flavus* روی مغز پسته پس از مشخص شدن نقش ایتورین‌ها در جلوگیری از رشد قارچ *A. flavus* در محیط کشت، لازم است این نتایج روی میوه پسته به تأیید برسد. پس از هفت روز نگهداری پسته‌های تلقیح‌شده با اسپور قارچ (1×10^4) و لیپوپپتیدهای استخراج‌شده (محلول در آب مقطر) از سویه وحشی UTB96 *B. subtilis* و نیز جهش‌یافته‌های B96AbmyB2، B96AbmyB4 و B96AbmyB8 در دمای ۳۰ درجه سلسیوس، اسپورهای قارچ زیر میکروسکوپ شمارش شدند. نتایج نشان داد که جمعیت اسپور در جهش‌یافته‌ها افزایش معنی‌داری در سطح ۱ درصد در مقایسه با سویه *B. subtilis* UTB96 نشان دادند ولی با شاهد (که تنها با اسپور قارچ مایه‌زنی شده بود) تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۴). بنابراین، می‌توان بیان کرد لیپوپپتیدهای خانواده ایتورین یکی از ترکیب‌های مؤثر در سویه *B. subtilis* UTB96 هستند که منجر به کاهش رشد قارچ *A. flavus* R5 می‌شوند.

تأثیر عصاره‌های بدون یاخته‌ای جهش‌یافته‌های *bymB* در جلوگیری از رشد *A. flavus* تأثیر عصاره‌های بدون یاخته‌ای سویه وحشی *B. subtilis* UTB96 و هشت جهش‌یافته ژن *bymB* در جلوگیری از رشد *A. flavus* نشان داد که در چهار جهش‌یافته B96AbmyB2، B96AbmyB3، B96AbmyB4 و B96AbmyB8 توانایی بازدارندگی از رشد قارچ پس از هفت روز به میزان شایان توجهی در مقایسه با سویه *B. subtilis* UTB96 از بین رفته است و تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد نشان دادند. اما چهار جهش‌یافته B96AbmyB1، 5، 6، 7 اختلاف معنی‌داری از لحاظ رشد قارچ با سویه وحشی نشان ندادند (جدول ۳).

جدول ۳. تأثیر عصاره بدون یاخته‌ای جهش‌یافته‌های *bymB* در جلوگیری از رشد *A. flavus* R5

Table 3. Effects of cell-free supernatants of *bymB* mutants in inhibition of *A. flavus* R5 growth

Bacterial isolates	inhibition zone (mm)
UTB96	*13.66±0.6 ^{a**}
B96AbmyB5	13.33±0.6 ^{ab}
B96AbmyB7	13.33±0.6 ^{ab}
B96AbmyB6	13±1 ^{abc}
B96AbmyB1	13±1 ^{abc}
B96AbmyB2	11.66±0.6 ^{bc}
B96AbmyB8	11.33±0.6 ^c
B96AbmyB3	5.66±0.6 ^d
B96AbmyB4	5.33±0.6 ^d

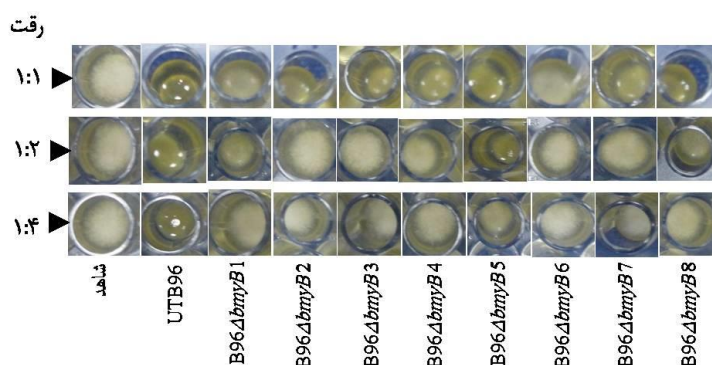
* داده‌ها نشان‌دهنده میانگین هاله بازدارندگی ± انحراف معیار از سه تکرار هستند. آزمایش دو بار در سه تکرار انجام شد.

** حروف ناهم‌نامند بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون LSD است.

* Data represent the means ± standard deviation from three replicates. The experiment was conducted two times with three replicates.

** Values followed by the same letter were not significantly different at P=0.05 using Fisher's least significant difference test.

به‌منظور تکمیل آزمایش یادشده، پس از ۲۴ ساعت نگهداری سه غلظت (۱:۱، ۱:۲ و ۱:۴) از عصاره‌های بدون یاخته‌ای سویه وحشی *B. subtilis* UTB96 و جهش‌یافته‌های ژن *bymB* همراه با اسپور قارچ *A. flavus* R5 در پلیت‌های ۹۶ چاهکی در دمای ۳۰ درجه سلسیوس، میزان رشد قارچ از لحاظ ظاهری بررسی شد. همان‌طور که در شکل ۸ مشاهده می‌شود سویه *B. subtilis* UTB96 در هر سه غلظت، به میزان زیادی از رشد قارچ جلوگیری کرده است. هشت جهش‌یافته ژن *bymB* در غلظت اول از رشد قارچ تا



شکل ۸. تأثیر بازدارندگی عصاره‌های بدون یاخته‌ای UTB96 *B. subtilis* و جهش‌یافته‌های ایتورین (UTB96::bmyB2, UTB96::bmyB4 and UTB96::bmyB8) علیه *A. flavus* با استفاده از آزمون میکروپلیت. شاهد: محیط PDB تلقیح‌شده با اسپور قارچ (1×10^5). همه غلظت‌های عصاره سوپه وحشی از رشد قارچ جلوگیری کردند ولی تنها غلظت ۱:۱ از عصاره‌های جهش‌یافته‌ها قادر به جلوگیری از رشد قارچ بودند.

Figure 8. Inhibitory effect of dilutions of cell free supernatants of *B. subtilis* UTB96 and iturins-deficient mutants (UTB96::bmyB2, UTB96::bmyB4 and UTB96::bmyB8) against *A. flavus* using a microplate bioassay. Control is PDB medium inoculated with only *A. flavus* conidia (1×10^5 conidia/ mL). All dilutions of the wild type supernatant inhibited the fungal growth, and only 1:1 dilutions of the mutant's supernatants were capable inhibiting the fungal growth.

جدول ۴. جمعیت اسپور قارچ *A. flavus* R5 و کارایی کنترل بیمارگر پس از مایه‌زنی مغز پسته شده با لیپوپپتیدهای

خالص شده UTB96 *B. subtilis* با جهش‌یافته‌های B96ΔbmyB2, B96ΔbmyB4 و B96ΔbmyB8

Table 4. Spore population of *A. flavus* R5 and pathogen control efficacy after inoculation of pistachio nuts with lipopeptide-enriched extracts of *B. subtilis* UTB96 or iturins-deficient transformants

Treatment	Spore population	Pathogen control efficacy (%)
Untreated	$2.84 \times 10^{8a**}$	0
UTB96::bmyB4	2.56×10^{8b}	9.86
UTB96::bmyB2	2.46×10^{8b}	13.38
UTB96::bmyB8	2.42×10^{8b}	14.79
UTB96	1.5×10^{8c}	47.18

شاهد، پسته‌های آلوده تنها با 1×10^4 اسپور قارچ *A. flavus* R5 است.

* داده‌ها میانگین دو تکرار مستقل با سه تکرار است.

** حروف ناهم‌اندک بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با استفاده از LSD است.

The control treatment is pistachio nuts inoculated just with 1×10^4 *A. flavus* spores.

*Each value represents the means of two independent experiments with three replicates.

**Values followed by the same letter within a column are not significantly different at $P=0.05$ using Fisher's least significant difference test.

به‌عنوان یک روش مدیریت بیماری‌های گیاهی توجه شده است (Fravel 2005). سطح موفقیت در مورد هر عامل کنترل زیستی وابسته به دانستن سازوکار فعالیت آن عامل است (Spurr 1981). اعضای جنس باسیلوس به‌عنوان عامل‌های کنترل زیستی موفق علیه بیمارگرهای متنوع مطرح هستند (Krebs et al. 1998, Wulff et al. 2002, Kildea et al. 2008, Arguelles-Arias et al. 2009, Pérez-García et al. 2011). یکی از مهم‌ترین سازوکارهای آن‌ها تولید انواع آنتی‌بیوتیک به‌ویژه لیپوپپتیدهای حلقوی آلفی فیلپک است (Shoda 2000, Stein 2005, Ongena and Jacques 2008).

در این پژوهش سوپه باکتری UTB96 *B. subtilis* را به‌عنوان عامل کنترل زیستی بالقوه قارچ بیمارگر

بحث

در بین فرآورده‌های کشاورزی، پسته خیلی حساس به قارچ‌های فرصت‌طلب بیمارگر گیاهی مانند *A. flavus* (Mojtahedi et al. 1979, Sinha and Bhatnagar 1998) است که سوخت‌وسازگرهای ثانویه قارچی سرطان‌زایی به نام آفلاتوکسین تولید می‌کنند (Amaike and Keller 2011). روش‌های کنترل شیمیایی و تدخین (فومیگاسیون) همیشه مؤثر نیستند بلکه می‌توانند اثر منفی روی سلامت انسان و محیط‌زیست بگذارند (Droby 2006). بنابراین تحقیقات روی راهبرد (استراتژی)‌های مدیریتی جدیدی که این محدودیت‌ها را کاهش دهد، متمرکز می‌شود (Dorner 2004, Cotty and Mellon 2006). در سال‌های اخیر کنترل زیستی

ژن‌های *ituD*، *fenB* و *bymA* در سویه‌های UMAF6614 و UMAF6639 از *B. amyloliquefaciens* به کمک جهش‌زایی هدفمند نشان داد که جهش‌یافته‌های این ژن‌ها قادر به کنترل سفیدک پودری هندوانه ناشی از *Podosphaera fusca* نیستند و به‌این ترتیب مشخص شد ایتورین‌ها (شامل ایتورین‌آ و باسیلومایسین) و فنجایسین‌ها سهم مشترکی در کنترل زیستی سفیدک پودری دارند (Romero et al. 2007b). تخریب ژن *ituD* در *B. amyloliquefaciens* PPCB004 با استفاده از جهش‌زایی هدفمند که منجر به بازدارندگی از تولید ایتورین می‌شود، نقش مؤثر ایتورین در جلوگیری از رشد قارچ‌های پس از برداشت مرکبات را تأیید کرد (Arrebola et al. 2010). با تخریب ژن *fenB* به کمک جهش هدفمند در سویه CPA-8 *B. subtilis* مشخص شد که لیپوپپتیدهای خانواده فنجایسین بیشترین توان ضدقارچی علیه پوسیدگی قهوه‌ای هلو ناشی از *Monilinia laxa* و *M. fructicola* را نشان می‌دهند (Yáñez-Mendizábal et al. 2011).

نقش لیپوپپتیدهای خانواده ایتورین (ایتورین‌آ و باسیلومایسین دی) تولیدشده به‌وسیله سویه‌های باسیلوس در کنترل قارچ آسپرژیلوس توسط محققان پیشین گزارش شده است (Ono and Kimura 1991, Klich et al. 1993, Moyne et al. 2001, Zhang et al. 2008). اونو و کیمورا بیان کردند که ایتورین‌آ توانست از تولید آفلاتوکسین به‌وسیله *A. flavus* و *A. parasiticus* جلوگیری کند (Ono and Kimura 1991) ولی بعدها کلیچ و همکاران (Klich et al. 1993) و نیز معین و همکاران (Moyne et al. 2001) شرح دادند که ایتورین‌آ قادر به جلوگیری از رشد *A. flavus* و تولید آفلاتوکسین نیست. معین و همکاران دو همسانه (آنالوگ) از باسیلومایسین D (با جرم‌های ۱۰۴۴ و ۱۰۵۸ دالتون) با فعالیت آنتاگونیستی علیه *A. flavus* از باکتری *B. subtilis* AU195 خالص و جداسازی کردند (Moyne et al. 2001). فعالیت زیستی ایتورین بستگی به طول زنجیره اسید چرب آن دارد. زنجیره طولانی‌تر اسید چرب منجر به فعالیت ضدقارچی بیشتر ایتورین می‌شود (Maget-Dana and Peypoux 1994). ژانگ و همکاران، دو ترکیب همانند باسیلومایسین با جرم‌های ۱۰۵۸ و

A. flavus R5 انتخاب شد. این سویه باکتری، تولید سه خانواده لیپوپپتیدهای سورفکتین، ایتورین و فنجایسین می‌کند. ایتورین‌ها و فنجایسین‌ها فعالیت ضدقارچی قوی علیه طیف گسترده قارچ‌های بیمارگر نشان می‌دهند (Vanittanakom et al. 1986, Razafindralambo et al. 1993, Asaka and Shoda 1996, Moyne et al. 2001, Romero et al. 2007b, Ongena et al. 2009, Yáñez-Mendizábal et al. 2011). درحالی‌که سورفکتین به‌طور عمده به دلیل ویژگی فعالیت سطحی (سورفکتانت) آن شناخته شده است. تجزیه و تحلیل اتوبیوگرافی کروماتوگرام‌های حاصل از TLC علیه *A. flavus* نقش پادزیستی مبتنی بر تولید لیپوپپتیدهای خانواده ایتورین به‌عنوان عامل ضدقارچی اصلی در سویه *B. subtilis* UTB96 را تأیید می‌کند. به‌منظور تأیید نقش ایتورین‌ها در فعالیت ضدقارچی این سویه، ژن *bymB* (سومین ژن در مسیر زیست‌ساخت ایتورین‌ها) به کمک Fusion PCR و جهش‌زایی هدفمند تخریب شد. از بین رفتن فعالیت ناهمسازی جهش‌یافته‌ها علیه *A. flavus* در تجزیه و تحلیل اتوبیوگرافی تأیید کرد که ایتورین‌ها نقش کلیدی در سویه *B. subtilis* UTB96 علیه قارچ یادشده ایفا می‌کنند. به‌این ترتیب یافته‌های ما نشان داد که فعالیت کنترل زیستی سویه *B. subtilis* UTB96 به‌طور عمده به علت تولید لیپوپپتیدهای خانواده ایتورین است. شاهد این مدعا این است که: ۱- جهش‌یافته‌های ژن *bymB* برخلاف سویه وحشی فعالیت ضدقارچی خود را در تجزیه و تحلیل اتوبیوگرافی علیه *A. flavus* از دست دادند. ۲- لیپوپپتیدهای خالص‌شده حاوی ایتورین منجر به کاهش رشد و اسپورزایی قارچ *A. flavus* R5 روی مغز پسته شدند. تخریب ژن‌های مربوط به لیپوپپتیدهای خانواده ایتورین و فنجایسین در گونه‌های مختلف باسیلوس به کمک جهش‌زایی هدفمند و پی بردن به نقش آن لیپوپپتیدها در کنترل عامل‌های بیماری‌زای قارچی در تحقیقات همسان پیشین گزارش شده است. تخریب ژن *bymA* در *B. subtilis* AU195 منجر به از دست دادن توانایی ناهمسازی آن علیه *A. flavus* شد و بدین ترتیب باسیلومایسین دی نقش کلیدی در کنترل زیستی علیه *A. flavus* نشان داد (Moyne et al. 2004). تخریب

گزارش های پیشین شرح داده شده بود (Magnet-Dana et al. 1992, Koumoutsis et al. 2004, Romero et al. 2007b). با این حال این نظریه در مورد آزمایش های ما به دلیل ظاهر نشدن ناحیه بازدارندگی در تجزیه و تحلیل اتوبیوگرافی علیه *A. flavus* R5 چندان محتمل نیست (شکل ۴-B). بنابراین افزون بر لیپوپپتیدها، به احتمال ترکیب های ضد میکروبی دیگری و یا حتی سازوکارهای دیگری در فعالیت کنترل زیستی سویه *B. subtilis* UTB96 نقش دارند (Janisiewicz and Korsten 2002).

نتیجه گیری کلی

در این تحقیق مشخص شد در سویه *B. subtilis* UTB96، لیپوپپتیدهای خانواده ایتورین نقش اصلی در جلوگیری از رشد قارچ *A. flavus* در محیط کشت و روی پسته دارند چراکه با حذف سومین ژن در مسیر زیست ساخت ایتورین ها و در نتیجه تولید نشدن آنها، ویژگی ضدقارچی سویه *B. subtilis* UTB96 کاهش چشمگیری یافت ولی به کلی از بین نرفت و این نشان می دهد ترکیب های دیگری از این سویه افزون بر ایتورین ها در بازدارندگی از رشد قارچ نقش دارند.

سپاسگزاری

از پژوهشکده کشاورزی هسته ای، شرکت فناوری زیستی طبیعت گرا و به ویژه از گروه میکروبیولوژی دانشگاه مالاگای اسپانیا به خاطر حمایت های مالی و فکری برای انجام این تحقیق، تشکر و قدردانی می گردد.

۱۰۷۲ دالتون از *B. subtilis* B-FS06 خالص سازی و شناسایی کردند که یک گروه متیلن بیشتر از ترکیب شناسایی شده به وسیله *B. subtilis* AU195 (Moyne et al. 2001) در زنجیره اسید چرب آن دارد و بیان کردند که فعالیت ضدقارچی سویه B-FS06 بیشتر از سویه AU195 است (Zhang et al. 2008). آنان پیشنهاد کردند که ترکیب های همانند باسیلومایسین تولید شده به وسیله B-FS06 ممکن است به عنوان عامل های کنترل زیستی بالقوه علیه *A. flavus* در حین انبارداری مواد غذایی باشند. بررسی های اولیه نشان داده است که تأثیر ضدقارچی لیپوپپتیدهای ایتورین، بستگی به ساختار شیمیایی آنها (حلقه پپتیدی و طول زنجیره اسید چرب) و نیز میزان استرول غشای پلاسمایی در قارچ های هدف دارد (Latoud et al. 2002, Avis et al. 1990). پادزی های گروه ایتورین روی گروه استرول غشای سیتوپلاسمی موجود (ارگاناسم) عمل می کنند (Quentin et al. 1982). غشای کنیدی های *A. flavus* ارگوسترول و کلسترول دارند (DeLucca et al. 1997) که آنها را حساس به لیپوپپتیدهای ایتورین می کند (Moyne et al. 2001).

مشاهده میزان کمی فعالیت ضدقارچی لیپوپپتیدهای استخراج شده از جهش یافته های ایتورین در مغز پسته نشان می دهد که دیگر ترکیب های ضدقارچی سویه *B. subtilis* UTB96 از جمله فنجایسین ها و سورفکتین ها می توانند در جلوگیری از رشد قارچ یاد شده نقش داشته باشند. فعالیت هم افزایی (سینرژیستی) بین این لیپوپپتیدها در فعالیت ضد میکروبی دیگر سویه های باسیلوس در

REFERENCES

- Ahimou F, Jacques P, Deleu M (2000) Surfactin and iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. *Enzyme and Microbial Technology* 27: 749-754.
- Amaike S, Keller NP (2011) *Aspergillus flavus*. *Annual Review of Phytopathology* 49: 107-133.
- Arrebola E, Jacobs R, Korsten L (2010) Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogens. *Journal of Applied Microbiology* 108: 386-395.
- Arguelles-Arias A, Ongena M, Halimi B, Lara Y, Brans A, Joris B, Fickers P (2009) *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. *Microbial Cell Factories* 8: 63.
- Asaka O, Shoda M (1996) Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 4081-4085.
- Avis TJ, Bélanger RR (2002) Mechanisms and means of detection of biocontrol activity of *Pseudozyma* yeast against plant-pathogenic fungi. *FEMS Yeast Research* 2: 5-8.
- Cho KM, Math RK, Hong SU, Asraful Islam SM, Mandanna DK et al. (2009) Iturin produced by *Bacillus pumilus* HY1 from Korean soybean sauce (*kanjang*) inhibits growth of aflatoxin producing fungi. *Food Control* 20: 402-406.
- Cotty PJ, Mellon JE (2006) Ecology of aflatoxin producing fungi and biocontrol of aflatoxin contamination. *Mycotoxin Research* 22: 110-117.

- DeLucca AJ, Bland JM, Jacks TJ, Grimm C, Cleveland TE, Walsh TJ** (1997) Fungicidal activity of cecropin A. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41: 481-483.
- Dorner JW** (2004) Biological control of aflatoxin contamination of crops. *Journal of Toxicology* 23: 425-450.
- Droby S** (2006) Improving quality and safety of fresh fruits and vegetables after harvest by the use of biocontrol agents and natural materials. *ISHS Acta Horticulturae* 709: 45-51.
- Dvorockova I** (1999) Aflatoxins and human health. CRC Press. Boca Raton.
- EC (European Commission)** (2010) Commission regulation (EC) no. 178/2010 of 2 March 2010 amending regulation (EC) No 401/2006 as regards groundnuts (peanuts), other oilseeds, tree nuts, apricot kernels, liquoric and vegetable oil. *Official Journal of the European Union*, L52, 32-43, 3.3.2010
- Fravel DR** (2005) Commercialization and implementation of biocontrol. *Annual Review of Phytopathology* 43: 337-359.
- Hesseltine CW** (1965) A millennium of fungi, food, and fermentation. *Mycologia* 57: 149-197.
- Janisiewicz W, Korsten L** (2002) Biological control of postharvest diseases of fruit. *Annual Review of Phytopathology* 40: 411-441.
- Kildea S, Ransbotyn V, Khan MR, Fagan B, Leonard G, Mullins E, Doohan FM** (2008) *Bacillus megaterium* shows potential for the biocontrol of *Septoria tritici* blotch of wheat. *Biological Control* 47: 37-45.
- Klich MA, Lax AR, Bland JM, Scharfenstein LL** (1993) Influence of iturin A on mycelial weight and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in shake culture. *Mycopathologia* 123: 35-38.
- Koumoutsis A, Chen, XH, Henne A, Liesegang H, Hitzeroth G, Franke P, Vater J, Borriss R** (2004). Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *Journal of Bacteriology* 186: 1084-1096.
- Krebs B, Höding B, Kübart S, Workie MA, Junge H, Schmiedeknecht G, Grosch R, Bochow H, Hevesi M** (1998) Use of *Bacillus subtilis* as biological control agent. I. Activities and characterisation of *Bacillus subtilis* strains. *Journal of Plant Diseases and Protection* 105: 181-197.
- Latoud C, Peypoux F, Michel G** (1990) Interaction of iturin A, a lipopeptide antibiotic, with *Saccharomyces cerevisiae* cells: Influence of the sterol membrane composition. *Canadian Journal of Microbiology* 36: 384-389.
- Maget-Dana R, Thimon L, Peypoux F, Ptak M** (1992) Surfactin/iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A. *Biochimie* 74: 1047-1051.
- Malina A, Shai Y** (2005) Conjugation of fatty acids with different lengths modulates the antibacterial and antifungal activity of a cationic biologically inactive peptide *Biochemical Journal* 390: 695-702.
- Mojtahedi H, Rabie CJ, Lubben A, Steyn M, Danesh D** (1979) Toxic *Aspergilli* from pistachio nuts. *Mycopathologia* 67: 123-127.
- Moyne AL, Shelby R, Cleveland TE, Tuzun S** (2001) Bacillomycin D: an iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus*. *Journal of Applied Microbiology* 90: 622-629.
- Moyne AL, Cleveland TE, Tuzun S** (2004) Molecular characterization and analysis of the operon encoding the antifungal lipopeptide bacillomycin D. *FEMS Microbiology Letters* 234: 43-49.
- Ongena M, Henry G, Thonart P** (2009) The roles of cyclic lipopeptides in the biocontrol activity of *Bacillus subtilis*, in Gisi, U., Chet, L., Gullino, M. L. (Eds.), *Recent developments in management of plant diseases, plant pathology in the 21st century*. (Paper presented at the 9th International Congress of Plant Pathology, Berlin).
- Ongena M, Jacques P** (2008) *Bacillus* lipopeptides: Versatile weapons for plant disease control. *Trends in Microbiology* 16: 115-125.
- Ono M, Kimura N** (1991) Antifungal peptides produced by *Bacillus subtilis* for the biological control of aflatoxin contamination. *Proceedings of Japan Association Mycotoxicology* 34: 23-28.
- Pérez-García A, Romero D, de Vicente A** (2011) Plant protection and growth stimulation by microorganisms: Biotechnological applications of Bacilli in agriculture. *Current Opinion in Biotechnology* 22: 187-193.
- Pittet A** (1998) Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds- an updated review. *Revue de Medecine Veterinaire* 149: 479-492.
- Quentin MJ, Besson F, Peypoux F, Michel G** (1982) Action of peptidolipidic antibiotics of the iturin group on erythrocytes. Effect of some lipids on hemolysis. *Biochimica et Biophysica Acta* 684: 207-211.
- Razafindralambo H, Paquot M, Hbid C, Jacques P, Destain J, Thonart P** (1993) Purification of antifungal lipopeptides by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 639: 81-85.
- Romero D, de Vicente A, Olmos JL, Dávila JC, Pérez-García A** (2007a) Effect of lipopeptides of antagonistic strains of *Bacillus subtilis* on the morphology and ultrastructure of the cucurbit fungal pathogen *Podosphaera fusca*. *Journal of Applied Microbiology* 103: 969-976.
- Romero D, de Vicente A, Rakotoalay RH, Dufour SE, Veening JW, Arrebola A, Cazorla FM, Kuipers OP, Paquot M, Pérez-García A** (2007b) The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal* 20: 430-440.

- Romero D, Pe´rez-Garci´a A, Rivera ME, Cazorla FM, de Vicente A** (2004) Isolation and evaluation of antagonistic bacteria towards the cucurbit powdery mildew fungus *Podosphaera fusca*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64: 263-269.
- Sinha KK, Bhatnagar D** (1998) Mycotoxin in agriculture and food safety. New York: Marcel Dekker Inc.
- Shoda M** (2000) Bacterial control of plant diseases. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 89: 515-521.
- Spurr H, Jr W** (1981) Introduction of microbial antagonists for the control of foliar plant pathogens. Pages 323-332. In *Biological Control in Crop Production (BARC Symposium No.5)*. G.C. Papavizas, [ed.], Allanheld, Osum Co., Totowa, N. J.
- Stein T** (2005) *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology* 56: 845-857.
- Vanittanakom N, Loeffler W, Koch U, Jung G** (1986) Fengycin -a novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. *Journal of Antibiotics* 39: 888-901.
- Wulff EG, Mguni CM, Mansfeld-Giese K, Fels J, Lübeck M, Hockenhull J** (2002) Biochemical and molecular characterization of *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis* and *B. pumilus* isolates with distinct antagonistic potential against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Plant Pathology* 51: 574-584.
- Yáñez-Mendizábal V, Zerriouh H, Viñas I, Torres R, Usall J, de Vicente A, Pérez-García A, Teixidó N** (2011) Biological control of peach brown rot (*Monilinia* spp.) by *Bacillus subtilis* CPA-8 is based on production of fengycin-like lipopeptides. *Eur. Journal of Plant Pathology* 132: 609-619.
- Yazgan A, Ozcengiz G, Marahiel A** (2001) Tn10 insertional mutations of *Bacillus subtilis* that block the biosynthesis of bacilysin. *Biochimica et Biophysica Acta* 1518: 87-94.
- Yu GY, Sinclair JB, Hartman GL, Bertagnolli BL** (2002) Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. *Soil Biology and Biochemistry* 7: 955-963.
- Zerriouh H, Romero D, García-Gutiérrez L, Cazorla FM, de Vicente A, Pérez-García A** (2011) The iturin-like lipopeptides are essential components in the biological control arsenal of *Bacillus subtilis* against bacterial diseases of cucurbits. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal* 24: 1540-1552.
- Zhang T, Shi ZQ, Hu LB, Cheng LG, Wang F** (2008). Antifungal compound from *Bacillus subtilis* B-FS06 inhibiting the growth of *Aspergillus flavus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24: 783-788.

The Iturin Lipopeptides as Key Compounds in Antagonism of *Bacillus subtilis* UTB96 toward *Aspergillus flavus*

Hamideh Afsharmanesh¹ and Masoud Ahmadzadeh^{2*}

1. Assistant Professor, Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology
Research Institute (NARS-NSTRI), Karaj 31485/498, Iran

2. Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources,
University of Tehran, Karaj 31587-77871, Iran

(Received: Jan. 27, 2016 - Accepted: Apr. 13, 2016)

ABSTRACT

Members of the genus *Bacillus* are among the most promising candidates for biological control of plant pathogenic bacteria. In this study, cell free supernatants of three strains *B. subtilis* UTB96, *B. subtilis* UTB1 and *B. subtilis* UTB70 against *Aspergillus flavus* R5 were investigated using dual culture assay. Strain *B. subtilis* UTB96 showed the highest inhibition effect. Thin layer chromatography in extracted lipopeptides of the bacterial cell free supernatants proved the presence of the three families of lipopeptides iturin, fengycin and surfactin. Bioautography analysis of the chromatograms against *A. flavus* R5 revealed the antifungal potential of iturins in strain *B. subtilis* UTB96. Gene *bymB* (the third gene in iturin biosynthesis) was disrupted using targeted mutagenesis to confirm role of iturins in antifungal activity. Molecular study (PCR analysis and sequencing the amplified fragment) of the mutants revealed that the targeted gene (*bmyB*) was replaced by spectinomycin resistance gene, hence the gene was disrupted. The phenotypical comparison of the *bmyB* mutants with the parental strain demonstrated that the antifungal activity of cell free supernatants and extracted lipopeptides was decreased interestingly in a dual culture assay with *A. flavus*, bioautography analysis and also on pistachio nuts. To sum up, these findings allowed us to conclude that iturin-like lipopeptides are indispensable for the biocontrol ability of the strain UTB96 against *A. flavus* R5.

Keywords: *Aspergillus*, *Bacillus*, biological control, lipopeptide.