





دانشکده کشاورزی

گروه زراعت و اصلاح نباتات

بررسی برهمکنش قارچ‌ها بر باکتری‌های پاتوژن گیاهی به منظور کنترل زیستی باکتری‌ها

دانشجو: ساره کاظم‌زاده

اساتید راهنما:

دکتر ناصر فرخی

دکتر مجتبی ممرآبادی

اساتید مشاور:

دکتر سعید امین‌زاده

دکتر شاهرخ قرنچیک

پایان نامه ارشد جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد

تابستان ۱۳۹۲

دانشگاه صنعتی شاهرود

دانشکده : کشاورزی

گروه : زراعت و اصلاح نباتات

پایان نامه کارشناسی ارشد خانم ساره کاظمزاده

تحت عنوان: بررسی برهمکنش قارچ‌ها بر باکتری‌های پاتوژن گیاهی به منظور کنترل زیستی باکتری‌ها

در تاریخ توسط کمیته تخصصی زیر جهت اخذ مدرک کارشناسی ارشد مورد ارزیابی و با درجه مورد پذیرش قرار گرفت.

| امضاء | اساتید مشاور | امضاء | اساتید راهنما |
|-------|--|-------|--|
| | نام و نام خانوادگی: دکتر سعید امین - زاده | | نام و نام خانوادگی: دکتر ناصر فرخی |
| | نام و نام خانوادگی: دکتر شاهرخ قرنجیک | | نام و نام خانوادگی: دکتر مجتبی ممر آبادی |

| امضاء | نماینده تحصیلات تکمیلی | امضاء | اساتید داور |
|-------|---|-------|---|
| | نام و نام خانوادگی: دکتر کامبیز جهان بین | | نام و نام خانوادگی: دکتر مهدیه پارسایان |
| | | | نام و نام خانوادگی: دکتر حمیدرضا اصغری |
| | | | |
| | | | |

تقدیم به:

پدرم

که راهی جز علم از فرزندانش نطلبید، کرچه زمانه امان نداد که خودباستان خویشتن این کتبه را به پیشکش تقدیم کنم.

مادرم

که محضات ناب باور بودن، لذت و غرور دانستن، جسارت خواستن، عظمت رسیدن و تمام تجربه های یکتا و زیبای

زندگیم مدیون حضورش است.

شکر و قدردانی

این پیام نامه حاصل پشتیبانی فکری و روحی افراد بسیاری است که بر خود لازم می‌دانم در اینجا بخشی از آن یادآور شوم: تحت از محبت‌های بی‌دریغ خانواده‌ام، خصوصاً مادر مهربانم و برادران عزیزم عباس و حسین، که آرامش روحی و آسایش فکری مرا فراهم نمودند تا با حمایت‌های همه‌جانبه در محیطی مطلوب، مراتب تحصیلی و نیز این پیام نامه را به نحو احسن به اتمام برسانم صمیمانه قدردانی می‌نمایم.

از اساتید گرامی جناب آقای دکتر ناصر فرخی و جناب آقای دکتر سعید امین زاده که در طول اجرای این تحقیق مرا صمیمانه و مشتاقانه یاری داده‌اند شکر و قدردانی می‌نمایم. همچنین از جناب آقای دکتر مجتبی مرآبادی و جناب آقای دکتر شهنخ قریحک که در طول اجرای این تحقیق از بیچ‌گونه مساعدت و راهنمایی‌های بی‌دریغ نمودند شکر و پاسکزاری می‌نمایم.

از جناب آقای دکتر سید مهدی علوی مدیر گروه محترم طرح اولویت محور شکر مرکبات به خاطر تائید هزینه‌های مالی طرح و نظارت در تمامی مراحل اجرایی پیام نامه صمیمانه شکر و پاسکزاری می‌نمایم.

از جناب آقای دکتر سرپرده سینت علمی مؤسسه کیا، پهنشکی تهران به خاطر کمک در تهیه برخی از سویه‌های قارچ شکر و پاسکزاری می‌کنم. همچنین از جناب آقای ابوالفضل مسعودی به خاطر کمک در تهیه جدایه‌های قارچ و یاری‌ها و راهنمایی‌های ایشان پاسکزاری می‌کنم. از جناب آقای دکتر حسن رکنی زاده به خاطر راهنمایی‌هایشان که به بهبود نتیجه کمک کرد پاسکزارم.

در انتها فرصتی است متعجبانه تا از محبت‌های تمام دوستان عزیزم در پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک، خانم‌ها زینب امروزی، طناز کوردزی، فاطمه زبردست، اناز فیهی، ریحانه عزتی، سحر شجاعی، پروانه بک‌تاش، بهاره رجایی، اعظم مختاری و آقایان داریوش خلاصی، علی مطاع، رضا بهروزی، یاسر امینی، یشم رضایی و امین کوحری پور شکر نمایم. همچنین از بسیاری دیگر از اساتید و دانشجویان پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری که بنده را در طی دوره پژوهشی از دیدگاه‌ها و ایده‌های پرفایده‌شان در ارتباط با موضوع این تحقیق بهره‌مند ساختند، صمیمانه پاسکزاری می‌کنم.

تعهد نامه

اینجانب ساره کاظمزاده دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه بررسی برهمکنش قارچ‌ها بر باکتری‌های پاتوژن گیاهی به منظور کنترل زیستی باکتری‌های پاتوژن تحت راهنمایی دکتر ناصر فرخی و دکتر مجتبی ممرآبادی متعهد می شوم.

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است.
- در استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است.
- مطالب مندرج در این پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است.
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه صنعتی شاهرود » و یا « Shahrood University of Technology » به چاپ خواهد رسید.
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از این پایان نامه رعایت می گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که از موجود زنده (یا بافتهای آنها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری، ضوابط و اصول اخلاقی انسانی رعایت شده است.

تاریخ

امضای دانشجو

مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، کتاب، برنامه های رایانه ای، نرم افزارها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد. این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود.
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در این پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی باشد.

* متن این صفحه نیز باید در ابتدای نسخه های تکثیر شده پایان نامه وجود داشته باشد.

چکیده

بیماری‌های باکتریایی از جمله دلائل اصلی خسارت در گیاهان به شمار می‌آیند. در این میان، باکتری عامل بیماری شانکر مرکبات، *Xanthomonas citri* ssp. *citri* (Xcc) کشت لیمو در سراسر دنیا را تحت تأثیر خود قرار داده است. عمدتاً کنترل بیماری‌های گیاهی از طریق مواد شیمیایی صورت می‌گیرد که دارای اثرات منفی بر اکوسیستم‌ها است. در این مطالعه کنترل بیولوژیک پاتوژن‌های باکتریایی، که روشی سازگار با محیط است به کار گرفته شد. اثرات آنتاگونیستی سکروتوم دو قارچ در مقابل جدایه NIGEB-88 باکتری Xcc با استفاده از روش دیسک مورد ارزیابی قرار گرفت. به منظور تعیین ماهیت عصاره‌های دارای خاصیت ضد میکروبی، فعالیت هر دو سکروتوم در برابر طیفی از پروتئازها بررسی شد. فعالیت هر دو عصاره در حضور پروتئازها کاهش یافت که نشان از پروتئینی بودن ماهیت ترکیب بازدارنده دارد. در ادامه مطالعات، طیف بازدارندگی پروتئین‌های ضد میکروبی (AMPs) در مقابل سایر قارچ‌ها و باکتری‌های پاتوژن نیز مورد ارزیابی واقع شد که در همه موارد طیفی از بازدارندگی مشاهده گردید. همچنین این ترکیبات در مقابل گرما، pH های اسیدی و بازی و همینطور دترژنت‌ها پایداری خوبی را نشان دادند.

واژگان کلیدی: بیماری‌های باکتریایی، قارچ، کنترل بیولوژیک

فصل اول: مقدمه

| | |
|--|----|
| ۱-۱ کلیات و سابقه تحقیق..... | ۲ |
| ۲-۱ کنترل زیستی..... | ۵ |
| ۳-۱ آنتی بیوتیک‌ها..... | ۸ |
| ۱-۳-۱ پپتیدهای ریبوزومی..... | ۱۳ |
| ۲-۳-۱ پپتیدهای غیرریبوزومی..... | ۱۳ |
| ۴-۱ پپتیدهای آنتی باکتریال..... | ۱۶ |
| ۱-۴-۱ پپتیدهای ضد میکروبی با منشا باکتریایی..... | ۱۸ |
| ۲-۴-۱ پپتیدهای ضد میکروبی پستانداران..... | ۲۰ |
| ۳-۴-۱ پپتیدهای ضد میکروبی گیاهی..... | ۲۰ |
| ۴-۴-۱ پپتیدهای ضد میکروبی حشره‌ای..... | ۲۱ |
| ۵-۴-۱ پپتیدهای ضد میکروبی دوزیستان..... | ۲۲ |
| ۵-۱ مکانیزم عمل پپتیدهای آنتی باکتریال..... | ۲۲ |
| ۶-۱ آنالیز توالی‌های پپتیدهای آنتی باکتریال..... | ۲۵ |

فصل دوم: مواد و روش‌ها

| | |
|--|----|
| ۱-۲ مواد شیمیایی..... | ۲۸ |
| ۲-۲ دستگاه‌های آزمایشگاهی..... | ۲۸ |
| ۳-۲ میکروارگانیزم‌ها..... | ۲۹ |
| ۴-۲ جمع‌آوری داده‌ها به صورت بیوانفورماتیکی..... | ۲۹ |
| ۵-۲ نمونه‌برداری و جداسازی قارچ از خاک..... | ۲۹ |
| ۶-۲ جداسازی تک اسپور..... | ۳۱ |
| ۷-۲ تهیه عصاره خام از هر یک از جدایه‌های قارچ..... | ۳۱ |
| ۸-۲ سنجش فعالیت آنتی میکروبیال..... | ۳۲ |
| ۹-۲ شناسایی مولکولی جدایه قارچی دارای خاصیت آنتاگونیستی..... | ۳۳ |
| ۱-۹-۲ استخراج DNA ژنومی به روش CTAB..... | ۳۳ |
| ۲-۹-۲ تکثیر 18S rRNA به کمک واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز..... | ۳۴ |
| ۱۰-۲ تست برادفورد..... | ۳۶ |
| ۱۱-۲ تاثیر پروتئازها بر فعالیت عصاره قارچی..... | ۳۶ |
| ۱۲-۲ تأثیر حرارت بر فعالیت عصاره قارچی..... | ۳۷ |
| ۱۳-۲ تأثیر pH بر فعالیت عصاره قارچی..... | ۳۷ |

| | |
|---------|---|
| ۳۸..... | ۲-۱۴ تأثیر مواد شیمیایی بر فعالیت عصاره قارچی..... |
| ۳۸..... | ۲-۱۵ تست تعیین حداقل غلظت بازدارنده پروتئین آنتی‌باکتریال..... |
| ۳۹..... | ۲-۱۶ بررسی اثر زمان کشت بر تولید پروتئین های ضد میکروبی..... |
| ۳۹..... | ۲-۱۷ تست عصاره‌های قارچ به منظور بررسی اثر بازدارندگی بر روی آنزیم ترنسکریپتاز معکوس..... |
| ۳۹..... | ۲-۱۷-۱ استخراج RNA..... |
| ۴۰..... | ۲-۱۷-۲ سنتز cDNA..... |
| ۴۱..... | ۲-۱۸ SDS PAGE Tris Tricin..... |
| ۴۴..... | ۲-۱۹ تشخیص پروتئین دارای خاصیت کنترل کنندگی با استفاده از الکتروبلاتینگ..... |
| ۴۵..... | ۲-۲۰ تخلیص پروتئین..... |
| ۴۵..... | ۲-۲۰-۱ جداسازی و تخلیص پروتئین با استفاده از HPLC..... |

فصل سوم: نتایج

| | |
|---------|--|
| ۴۸..... | ۳-۱ شناسایی عصاره‌های دارای خاصیت آنتاگونیستی..... |
| ۵۲..... | ۳-۲ شناسایی جدایه قارچی شماره ۳..... |
| ۵۲..... | ۳-۳ بررسی طیف بازدارندگی سکروتوم قارچ <i>T.harzianum 1103</i> و <i>Aspergillus Sp.</i> |
| ۵۶..... | ۳-۴ بررسی اثر آنتاگونیستی دو عصاره قارچی بر روی سایر سویه‌های زانتوموناس..... |
| ۵۶..... | ۳-۵ تعیین غلظت پروتئین به روش بردفورد..... |
| ۶۰..... | ۳-۶ تأثیر پروتئین‌ها بر فعالیت عصاره قارچی..... |
| ۶۰..... | ۳-۷ اثر دما، pH و مواد شیمیایی بر فعالیت عصاره‌های قارچی..... |
| ۶۳..... | ۳-۸ تعیین حداقل غلظت بازدارنده..... |
| ۶۳..... | ۳-۹ بررسی اثر زمان کشت بر تولید پروتئین‌های ضد میکروبی..... |
| ۶۵..... | ۳-۱۰ تست عصاره‌های دارای خاصیت آنتاگونیستی به منظور بررسی اثر بازدارندگی بر روی آنزیم..... |
| ۶۶..... | ۳-۱۱ SDS PAGE Tris Tricin و تعیین الگوی پروتئینی برای عصاره‌های قارچی..... |
| ۶۷..... | ۳-۱۲ تشخیص پروتئین دارای خاصیت کنترل کنندگی با استفاده از الکتروبلاتینگ..... |
| ۶۷..... | ۳-۱۳ تخلیص پروتئین ضد میکروبی عصاره قارچ <i>Aspergillus Sp.</i> با استفاده از HPLC..... |

فصل چهارم: بحث

| | |
|---------|----------------|
| ۶۹..... | بحث..... |
| ۷۴..... | پیشنهادات..... |
| ۷۵..... | منابع..... |

فصل اوّل

مقدمہ

مقدمه

روش‌های مختلفی برای کنترل بیولوژیک باکتری‌ها وجود دارد که از بین آن‌ها می‌توان به آنتی-بیوتیک‌ها (توکسین‌های میکروبی)، پپتیدها (پروتئین‌هایی با کمتر از ۱۰۰ اسید آمینه) و برخی پروتئین‌ها اشاره نمود. از آن‌جا که تأثیر قارچ‌ها بر کنترل بیولوژیک باکتری‌ها با استفاده از پروتئین‌ها و یا پپتیدهای آنتی‌باکتریال در تعداد محدودی از مطالعات گزارش شده است، در این پایان‌نامه بر آن شدیم ضمن معرفی این عوامل، تأثیر کنترلی قارچ‌ها را بر روی برخی از باکتری‌های پاتوژن، مورد بررسی قرار دهیم. برای این کار ابتدا مواد مترشحه مجموعه‌ای از قارچ‌ها جداسازی شد و اثر بیوکنترلی آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج حاصل از این مطالعه در فصل سوم آورده شده است. به‌طور کلی اهداف زیر از انجام این پژوهش متصور بوده است:

- ۱) شناسایی امکان کنترل باکتری‌ها به کمک قارچ‌ها و اثرات متقابل آن‌ها
- ۲) بررسی امکان کنترل بیولوژیک توسط مواد مترشحه قارچی

۱-۱ کلیات و سابقه تحقیق

کنترل آفات و بیماری‌ها و علف‌های هرز به دلیل خسارتی که به محصولات کشاورزی وارد می‌کنند در همه‌ی کشورها از اهمیت زیادی برخوردار است. برای کنترل این عوامل خسارت‌زا از روش‌های گوناگونی استفاده می‌شود که از آن‌جمله می‌توان به کنترل زراعی، مکانیکی، بیولوژیکی، شیمیایی و تلفیقی اشاره کرد (صالحی و همکاران، ۱۳۸۸). کنترل شیمیایی رایج‌ترین شیوه کنترل آفات و بیماری‌های گیاهی است. افزایش سریع جمعیت کره زمین و نیاز روز افزون به تولید هر چه بیشتر مواد غذایی موجب گردیده تا علی‌رغم زیان‌ها و خطرات استفاده از سموم و مواد شیمیایی، این شیوه همچنان به‌عنوان شایع‌ترین روش در سراسر جهان، حتی در پیشرفته‌ترین کشورها در نظر

گرفته شود. چنانکه بزرگ‌ترین مصرف‌کنندگان سموم و مواد شیمیایی کشاورزی آمریکا، ژاپن و فرانسه هستند. آمار و ارقام موجود نشان می‌دهند که مصرف آفت‌کش‌ها، علف‌کش‌ها و سموم کشاورزی در سال‌های اخیر در ایران نیز رشد نسبتاً چشمگیری داشته است (رضایی مقدم و همکاران، ۲۰۰۵). به طوری که در کمتر از یک دهه میزان فروش سموم در کشور از ۱۴,۸۰۰ تن (۱۳۷۴) به ۲۵,۸۰۰ تن (۱۳۸۱) رسیده است (خسروشاهی، ۱۳۸۵).

افزایش مصرف سموم شیمیایی، هزینه‌های بسیار زیادی از قبیل آلودگی آب، انتقال آن به خاک و دام‌ها، آلودگی مواد غذایی و علوفه دامی و آلودگی هوا را به دنبال داشته است (کاشانی، ۱۳۸۰). براساس گزارش‌های داخلی، شیوع بیش از اندازه بیماری‌هایی چون سرطان دستگاه گوارش، در برخی استان‌های کشور به مصرف بی رویه سموم کشاورزی نسبت داده شده است. روشن است که حفظ سلامت جامعه جز با رعایت استانداردهای کشاورزی پایدار ممکن نیست. از همین روست که در چند سال گذشته محدودیت‌هایی مانند عوارض زیست محیطی در مورد سموم در حال ثبت به طور جدی در دستور کار مسئولان قرار گرفته است. لذا راهبردهایی که مصرف سموم و مواد شیمیایی را کاهش دهند، می‌توانند از تخریب فزاینده محیط زیست جلوگیری و سبب بهبود آن شود (صالحی و همکاران، ۱۳۸۸).

تاریخچه‌ی آغاز کنترل بیولوژیک به انسان‌هایی بر می‌گردد که از کشاورزی با برنامه و برخوردار از نظم بهره می‌جستند. در هزاره سوم و چهارم پیش از میلاد مسیح به‌طور محدودی در منطقه بین‌النهرین از تناوب^۱ و کشت مخلوط^۲ استفاده می‌شد و خیلی زود سیستم‌های کشاورزی قرون وسطایی اروپا از تناوب و آیش برای کاهش بیماری‌ها و افزایش حاصلخیزی استفاده کردند. واژه

1- Crop rotation
2- Inter cropping

کنترل بیولوژیک اول بار برای کنترل حشرات به‌وسیله شکارگرها^۱ به کار گرفته شد (کوک و بیکر، ۱۹۸۳؛ بیکر، ۱۹۸۷). گزارش‌ها در خصوص کنترل بیولوژیک بیماری‌ها توسط قارچ‌های آنتاگونیست، به اوایل قرن ۲۰ میلادی بازمی‌گردد. هارتلی (۱۹۲۱) قارچ آنتاگونیست خاکزادی را برای کنترل بوته میری^۲ در گیاهچه‌های کاج معرفی کرد. در سال ۱۹۲۸ آنتی‌بیوتیکی خاص به نام پنی‌سیلین توسط فلمینگ کشف شد (کمپبل، ۱۹۸۹؛ بابایی و همکاران، ۱۳۷۸). هنری (۱۹۴۳) بیماری‌های ریشه غلات را به‌وسیله میکروارگانیزم‌های خاک کنترل کرد. واکسمن (۱۹۴۳) استرپتومایسین را از *Streptomyces* به دست آورد (سیلوا و داز، ۲۰۰۴). با گذشت زمان به علت پیدایش مقاومت در باکتری‌ها تأثیر آنتی‌بیوتیک‌ها روز به روز کمتر شد. در نتیجه دانشمندان تلاش کردند تا آنتی‌بیوتیکی جدید را کشف کنند. در راستای تحقق این هدف از *Corylophilum dierckx* *penicillium* آنتی‌بیوتیکی جدا شد که علیه *Stauveus* و *Micrococcus leuetaus* خاصیت ضد میکروبی داشت (سیلوا و داز، ۲۰۰۴). ریشبت (۱۹۶۳) مقاله‌ای را در مورد کنترل *Fomes annosus* به‌وسیله *Peniophora gigantea* منتشر کرد. در سال ۱۹۶۷، آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین برای کنترل بیماری‌های گیاهی ناشی از موجودات شبه باکتریایی به کار رفت (اگریوس، ۲۰۰۵). بندیکت و بردی (۱۹۷۲) فعالیت متابولیت‌های mushroom های انتخابی را روی تعدادی از باکتری‌ها امتحان و گزارش دادند که بهترین پاسخ بازدارندگی علیه باکتری‌های گرم مثبت و مخمرها است. این کشف اطلاعاتی را در مورد فعالیت ضد میکروبی تعدادی از mushroom ها فراهم کرد. سپس مایجیند و همکاران (۲۰۰۵) پپتید آنتی‌باکتریال دیگری را تحت عنوان plectasin از قارچ ساپروفیت *Pseudoplectania nigrella* با استفاده از NMR^۳ شناسایی کردند که این پپتید با

1- Predators

2- Damping off

3- Nuclear magnetic resonance

طولی معادل ۴۰ اسید آمینه و بار خالص +۳ دارای خاصیت آنتی‌باکتریالی علیه *Streptococcus pneumoniae* بود. سویوزنگ و همکارانش (۲۰۱۰) به پروتئین آنتی‌باکتریالی جدید از قارچ *Clitocybe sinopica* به وزن مولکولی ۴۴ کیلو دالتون دست یافتند. در همین سال یک پپتید آنتی‌باکتریال دیگر به وزن مولکولی ۶ کیلو دالتون به نام AcAMP^۱ با طولی معادل ۵۱ اسید آمینه و بار خالص +۷ از قارچ *Aspergillus clavatus* جدا شد که دارای آثار ضد باکتریایی علیه چندین باکتری گرم مثبت و گرم منفی بود (حاجی و همکاران، ۲۰۱۰). در جدول (۱-۱) نام و توالی انتهای آمینی سه پپتید و پروتئین آنتی‌باکتریال جدا شده از قارچ‌ها آورده شده است.

در ادامه توضیحات بیشتری پیرامون کنترل باکتری‌های پاتوزن گیاهی به شیوه زیستی با استفاده از پروتئین‌ها و پپتیدهای ضد میکروبی داده می‌شود.

۲-۱ کنترل زیستی^۲

براساس تعریف آکادمی ملی علوم آمریکا، کنترل زیستی عبارت است از: استفاده از موجودات طبیعی یا تغییر یافته ژنتیکی و فرآورده‌های ژنی آن‌ها، برای کاهش اثر موجودات مضر و مناسب کردن شرایط برای موجودات مفید که از آن جمله می‌توان به گیاهان زراعی، حشرات و میکروارگانیسم‌های مفید اشاره کرد (احمدزاده، ۱۳۸۱).

واژه کنترل زیستی در علم زیست‌شناسی به‌ویژه حشره‌شناسی و بیماری‌شناسی گیاهی استفاده می‌شود. در حشره‌شناسی، برای توصیف حشرات زنده، شکارگرها^۳ و نماتدها و همچنین برای پاتوزن‌های میکروبی که جمعیت حشرات مختلف آفت را سرکوب می‌کنند استفاده شده است. در بیماری‌شناسی گیاهی نیز این واژه در مورد استفاده از آنتاگونیست‌های میکروبی برای سرکوب بیماری‌ها و همچنین

1- *Aspergillus clavatus* antimicrobial peptide

2- Biological control

3- Predators

در استفاده از میزبان تخصصی پاتوژن‌ها برای کنترل جمعیت علف‌های هرز کاربرد دارد. در هر دو رشته، موجودی که پاتوژن را سرکوب می‌کند به‌عنوان عامل کنترل بیولوژیک (BCA^1) تعریف می‌شود (اگریوس، ۲۰۰۵). به‌طور کلی آثار متقابلی که منجر به کنترل زیستی می‌شوند، در سه دسته کلی

| جدول ۱-۱ نام و توالی پپتیدها و پروتئین‌های آنتی‌باکتریال جدا شده از قارچ‌ها (aps.unmc.edu) | |
|--|--|
| نام قارچ | توالی آمینواسیدی |
| <i>Pseudoplectania nigrella</i> | GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGGYCAKGGFVCKCY |
| <i>Clitocybe sinopica</i> | ATRVVYCNRRSGSVVGGDDTVYYEG |
| <i>Aspergillus clavatus</i> | ATYDGKCYKKNICKYKAQSGKTAICKCYVKVCPRDGAKCEFDYKGGKCYC |

شامل آنتاگونیست مستقیم^۱، آنتاگونیست ترکیبی^۲ و آنتاگونیست غیر مستقیم^۳ قرار می‌گیرند که هریک دارای انواعی است. در ادامه به انواع مکانیزم‌های کنترل زیستی به تفکیک اشاره خواهد شد. آنتاگونیست مستقیم در حقیقت براساس تماس‌های فیزیکی ایجاد می‌شود و خود شامل مکانیزم هایپرپارازیتسم^۴ است که در این مکانیزم پاتوژن به صورت مستقیم به وسیله عوامل کنترل زیستی مورد حمله قرار می‌گیرد (کریشنا و گاردنر، ۲۰۰۶).

در آنتاگونیست غیرمستقیم یک پاتوژن به وسیله‌ی عوامل کنترل بیولوژیک مورد حمله قرار نمی‌گیرد. بلکه در اثر رقابت^۵ و القا مقاومت میزبانی^۶ عامل بیمارگر، حشره آفت و یا علف هرز از میان برداشته می‌شود.

رقابت زمانی رخ می‌دهد که دو و یا تعداد بیشتری از موجودات از همان چیزی که به مقدار کمتر وجود دارد استفاده می‌کنند (کمپبل، ۱۹۸۹). به‌عنوان مثال بعضی از میکروارگانیسم‌ها با تولید ترکیباتی به نام سیدروفور (سیدروفور ریشه یونانی دارد و به معنی حامل آهن است) با آهن سه ظرفیتی پیوند برقرار کرده و سبب می‌شود که ترکیبات حاصل به مصرف گیاه برسد و بدین صورت آهن را از دسترس بیمارگرهای گیاهی خارج می‌کنند (احمدزاده، ۱۳۸۱).

گیاهان به‌طور عمده با دو شیوه با استفاده از القا مقاومت در میزبان، در مقابل پاتوژن از خودشان دفاع می‌کنند. اولاً واکنش‌های ساختاری که در واقع موانع و سدهای فیزیکی گیاه هستند و این ساختارها مانع از نفوذ و انتشار بیمارگر در گیاه می‌شوند و ثانیاً واکنش‌های بیوشیمیایی که در سلول‌ها و بافت‌ها رخ می‌دهد که نتیجه آن تولید موادی است که برای بیمارگر سمی هستند یا

-
- 1- Direct antagonism
 - 2- Mixed-path antagonism
 - 3- Indirect antagonism
 - 4 - Hyper parasitism
 - 5- Competition
 - 6- Induction of host resistance

شرایطی را ایجاد می‌کند که مانع از رشد بیمارگر در گیاه می‌شوند. این مکانیزم‌ها ممکن است از پیش وجود داشته باشند یا در اثر تحریک بیمارگر یا عوامل دیگر مثل باکتری‌های مفید ریشه ایجاد شود. در نتیجه این تحریکات سیگنال‌های مقاومت تولید و در سراسر گیاه پخش می‌شوند. این پیام‌ها باعث تحریک پروتئین‌های تنظیم‌کننده بیان ژن‌های مقاومت می‌گردد و موجب بیان این ژن‌ها در سراسر گیاه می‌شوند (احمدزاده، ۱۳۸۱).

در نهایت آنتاگونیست ترکیبی، به مکانیزم‌هایی اطلاق می‌شود که بر اساس ترکیب پاتوژن، آنتاگونیست را بوجود می‌آورند که خود به دو گروه آنزیم‌های لیتیک^۱ و آنتی‌بیوتیک‌ها^۲ تقسیم می‌شوند:

به‌طور کلی میکروارگانیزم‌ها متابولیت‌هایی را ترشح می‌کنند که می‌تواند در رشد پاتوژن و یا فعالیت آن اختلال ایجاد کند. تعداد زیادی از میکروارگانیزم‌ها آنزیم‌های تجزیه‌کننده‌ای مانند کیتینازها، گلوکونازها و پروتازها را تولید می‌کنند که می‌تواند ترکیباتی مثل پروتئین‌ها، سلولز، همی سلولز، DNA و... را تجزیه کنند. از جمله فرآورده‌های جانبی که ممکن است از رشد پاتوژن‌ها ممانعت کند هیدروژن سیانید است که به‌طور مؤثری مسیر سیتوکروم اکسیداز را بلوکه می‌کند (کریشنا و گاردنر، ۲۰۰۶).

۱-۳ آنتی‌بیوتیک‌ها

در واقع توکسین‌های میکروبی هستند که در غلظت‌های کم سمی هستند و می‌توانند سبب مرگ سایر موجودات شوند (کریشنا و گاردنر، ۲۰۰۶). تاکنون چندین سویه باکتریایی برای تولید آنتی‌بیوتیک‌ها شناخته شده‌اند که می‌توانند از رشد یک یا چند پاتوژن جلوگیری کنند مثلاً سویه‌ی *Bacillus cereus* UW85، به تولید زوپیترومایسین و کانامایسین می‌پردازد (اسمیت و همکاران،

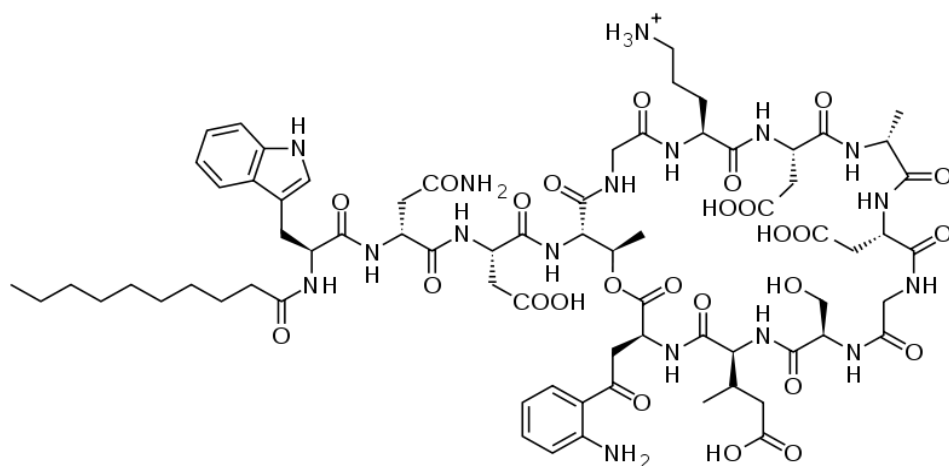
1- Lytic enzymes

2- Antibiotics

۱۹۹۳). توانایی تولید چند آنتی‌بیوتیک به‌طور مؤثری از رشد پاتوزن‌ها جلوگیری می‌کند و می‌تواند احتمال بیوکنترل را افزایش دهد. از جمله این آنتی‌بیوتیک‌ها می‌توان به لیپوپپتیدهای حلقوی^۱ (شکل ۱-۱) اشاره کرد (کریشنا و گاردنر، ۲۰۰۶). به‌طور کلی صدها آنتی‌بیوتیک با ساختار پپتیدی در طی نیم قرن گذشته شناسایی شده‌اند (هنکوک و همکاران، ۱۹۹۵؛ کلیانکوف و همکاران، ۱۹۸۸؛ پرلمن و همکاران، ۱۹۷۱) که در دو گروه، پپتیدهای غیر ریبوزومی^۲ مانند gramacidins، defensin، bacitracin، polymyxins، glycopeptides و... و پپتیدهای ریبوزومی^۳ (طبیعی) مثل defensin طبقه‌بندی می‌شوند. گروه اول اغلب به وسیله‌ی باکتری‌ها و قارچ‌ها تولید می‌شود (موتز و همکاران، ۲۰۰۲؛ ریبر و همکاران، ۲۰۰۵). در حالی که گروه دوم متابولیت‌های بیواکتیو را در همه موجودات زنده تولید می‌کنند (هنکوک و کیل، ۱۹۹۹). پپتیدهای آنتی‌میکروبیال (AMPS)^۴ نقش حفاظتی مهمی برای موجودات زنده ایفا می‌کنند. با مقایسه پپتیدهای تمامی موجودات زنده می‌توان به این نتیجه رسید که می‌توان از آن‌ها، برای طراحی پپتیدهایی علیه برخی موجودات خاص استفاده کرد. هرچند برخی از گروه‌های ساختاری در این پپتیدها به‌صورت تصادفی ایجاد می‌شوند (هنکوک و همکاران، ۱۹۹۵). این پپتیدها با یک بخش قطبی و یک بخش آب‌گریز، ساختار دوگانه دوستی^۵ دارند. آب‌گریزی^۶ خصوصیت ضروری برای پپتیدهای آنتی‌میکروبیال است چون به واسطه این خاصیت می‌توانند با غشای دولایه تماس برقرار کنند (یمن و همکاران، ۲۰۰۳). اکثر پپتیدهای آنتی‌میکروبیال حداقل ۵۰٪ اسیدهای آمینه هیدروفوب و نسبت پایینی از اسیدهای آمینه خنثی و

-
- 1- Cyclic lipopeptid
 - 2- Non ribosomally
 - 3- Ribosomally
 - 4- Antimicrobial peptides
 - 5- Amphipathic
 - 6- Hydrophobicity

بار منفی را دارا هستند. هرچند پپتیدهای که فعالیت ضد قارچی دارند، نسبت بالاتری از اسدآمینه های خنثی را دارند (هنکوک و همکاران، ۱۹۹۹).



شکل ۱-۱ ساختاری از Daptomycin- یک لیپوپپتیدحلقوی. Daptomycin از جمله لیپوپپتیدهای حلقوی است که در درمان عفونت‌های ناشی از باکتری‌های گرم مثبت مورد استفاده قرار می‌گیرد (en.wikipedia.org)

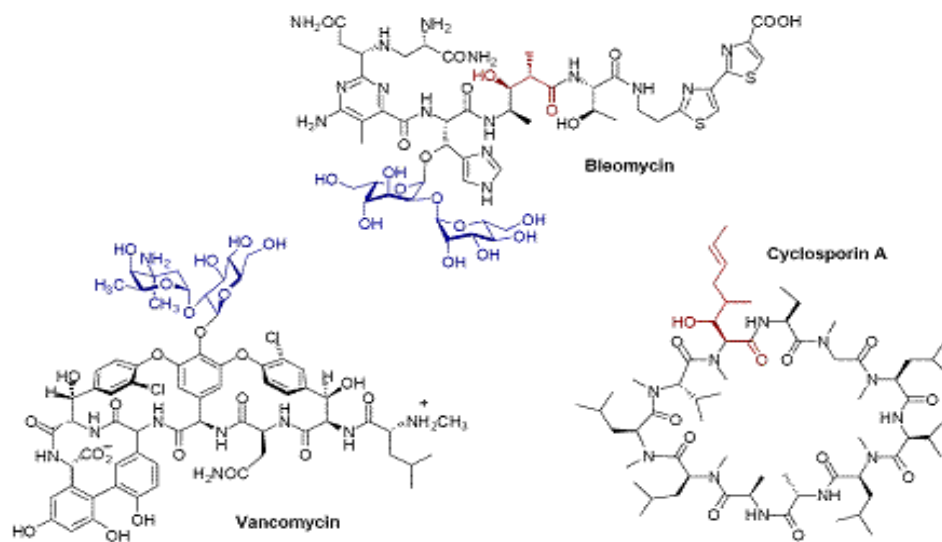
تعداد زیادی از پپتیدهای آنتی میکروبیال که تا این زمان کشف شده‌اند بار مثبتی را از +۲ تا +۹ نشان می‌دهند. باید توجه کرد که ارتباط بین بار و خاصیت آنتی‌باکتریالی ضرورتاً خطی نیست. اساساً تا محدوده خاصی افزایش بار مثبت پپتید، سبب افزایش خاصیت آنتی‌میکروبیالی آن می‌شود. به‌عنوان مثال در Magainin پپتید آنتی‌باکتریال ترش‌حی به وسیله پوست قورباغه، دیده شده است که افزایش بار از +۳ به +۵ سبب افزایش فعالیت آنتی‌باکتریالی، علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی می‌شود. اما وقتی بار از +۶ به +۷ افزایش یافت خاصیت تجزیه‌کنندگی^۱ نیز افزوده شد در حالی که خاصیت آنتی‌میکروبیالی کاهش یافت (داته و همکاران، ۲۰۰۱).

اگرچه پپتیدهای ضد میکروبی ساختار متفاوتی دارند ولی بیشتر آن‌ها دارای دو یا چند اسید آمینه با بار مثبت مثل آرژنین و لیزین هستند. پپتیدهای ضد میکروبی اثر آنتی‌بیوتیکی خود را به طرق مختلف از جمله نفوذپذیر کردن غشاء و تداخل در متابولیسم با هدف قرار دادن اجزای سیتوپلاسمی خاص اعمال می‌کنند.

در بسیاری موارد، این فعالیت آنتی‌بیوتیکی با آزمایشات زیست‌شناسایی می‌شود و مکانیزم واقعی کشتن ناشناخته است. علاوه بر کشتن میکروارگانیسم‌ها به‌طور مستقیم، این پپتیدها با سیستم ایمنی نیز واکنش می‌دهند. این پپتیدها برعکس آنتی‌بیوتیک‌های متعارف عموماً طیف اثر گسترده‌ای دارند و ظاهراً بر علیه آن‌ها مقاومت ایجاد نمی‌شود. دلیل این مسئله هم تا حدی این است که آن‌ها بیشتر باکتریوساید^۲ هستند و در زمان کوتاهی سبب کشتن سلول‌های بیماریزا می‌شوند. به-عبارت دیگر موجوداتی که با غلظت مؤثر این ترکیبات مواجه می‌شوند، عموماً قبل از آن که وقتی برای ایجاد مقاومت پیدا کنند کشته می‌شوند. چون این پپتیدها مولکول‌های کاملاً مؤثر و قدرتمندی

1- Hemolytic
2- Bactericide

هستند، لذا در میزان‌ها به مقدار بسیار ناچیزی وجود دارند. در نتیجه خالص سازی مقدار کافی آن‌ها، حتی برای آنالیز معمولاً دشوار است (www.zare-bidaki.com). در شکل (۱-۲) ساختار چند پپتید آنتی بیوتیک آورده شده است.



شکل ۱-۲ ساختاری از چند پپتید آنتی میکروبیال که به شیوه غیر ریبوزومی سنتز شده‌اند (www.beilstein-institut.de). Vancomycin یک آنتی بیوتیک گلیکوپپتیدی است که با اثر بر روی ساخت دیواره سلولی بر روی اغلب باکتری‌ها کشنده است. Bleomycin از جمله آنتی‌بیوتیک‌های گلیکوپپتیدی است که فعالیت ضد سرطانی دارد. Cyclosporin A سرکوب کننده سیستم ایمنی است.

۱-۳-۱ پپتیدهای ریبوزومی

این پپتیدها در طی فرآیند ترجمه mRNA، در داخل ریبوزوم‌ها ایجاد می‌شوند. نخستین بار کیس و میچل (۱۹۶۲) به حضور پپتیدهای ضد میکروبی و همولیتیک در ترشحات پوستی *Bombina vaiegata* توجه کردند و این مسئله به جدا کردن یک پپتید آنتی میکروبیال با ۲۴ اسید آمینه به نام bombinin کمک کرد (کزورداس و میچل، ۱۹۷۰). از پوست قورباغه قرن‌هاست که برای اهداف دارویی استفاده می‌شود و هنوز هم در کشورهای آمریکای جنوبی از آن استفاده می‌کنند. ده سال بعد نیز یک پپتید همولیتیک آنتی میکروبیال دیگری به نام melittin از سم زنبورعسل^۱ جدا شد (هابرمن، ۱۹۷۲).

Melittin محرک قدرتمندی برای فسفولیپازها است و این ماهیت تجزیه‌کنندگی اجازه نمی‌داد که از آن به عنوان آنتی میکروبیال جدید بهره برداری شود، اما منجر به جدا شدن پپتیدهای متعددی با فعالیت ضد میکروبی و بدون فعالیت تجزیه‌کنندگی شد (بونیز، ۱۹۹۴؛ کریل، ۱۹۹۴؛ بومن، ۱۹۹۵؛ هنکوک و همکاران، ۱۹۹۵؛ بروکرت و همکاران؛ ۱۹۹۷؛ گنز و لهر، ۱۹۹۷).

پپتیدهای آنتی میکروبیال ریبوزومی به عنوان بخش مهمی از ایمنی ذاتی به رسمیت شناخته شده‌اند (بونیز، ۱۹۹۴؛ بومن، ۱۹۹۵؛ هنکوک و لهر، ۱۹۹۸). با این حال بررسی این پپتیدها مشخص کرده است که این توالی‌ها همولوژی کمی با هم دارند و این نشان می‌دهد که هر پپتید، برای انجام عملی مطلوب در طبیعت تکامل یافته است. البته این عدم همسانی، پیش بینی توالی آن‌ها را نیز با دشواری مواجه ساخته است (هنکوک و همکاران، ۱۹۹۹).

۱-۳-۲ پپتیدهای غیر ریبوزومی

1- Bee venom

پپتیدهای غیر ریبوزومی طبقه‌ای از متابولیت‌های ثانویه پپتیدی‌اند که معمولاً به وسیله‌ی باکتری‌ها و قارچ‌ها تولید می‌شوند و از دو یا چند اسید آمینه مشتق شده‌اند (پرلمن و بودن اسکای، ۱۹۷۱؛ کلینکوف و دوهرن، ۱۹۸۸). بیوسنتز این پپتیدها به وسیله یک و یا تعداد خاصی از آنزیم‌های اختصاصی، تحت عنوان NRPs^۱ صورت می‌گیرد. اولین پپتید غیر ریبوزومی قارچی Cyclosporin بود که تنها به وسیله یک NRPs با وزن مولکولی ۱/۶ مگادالتون سنتز می‌شود. ژن‌های NRPs در پروکاریوت‌ها در اپران^۲ و در یوکاریوت‌ها در خوشه‌های ژنی^۳ سنتز می‌شوند (وست و همکاران، ۲۰۰۲؛ کلهر و همکاران، ۲۰۰۵). این آنزیم‌ها قالب‌هایی را سازماندهی می‌کنند که هر قالب شامل چندین دوماین^۴ با عملی مشخص است و این دوماین‌ها هر یک با spacerهایی که طول هر یک حدود ۱۵ اسید آمینه است جدا می‌شوند (تورگای و همکاران، ۱۹۹۲). مسیر بیوسنتز پپتید آنتی‌باکتریال Tyrocidine A در شکل ۱-۳ ترسیم شده است. همانطور که در شکل نشان داده شده است، سنتز پپتیدهای غیر ریبوزومی بر اساس مکانیزمی چند ناقلی^۵ انجام می‌پذیرد (استین و همکاران، ۱۹۹۶). در این مجموعه‌ی الگو، مجموعه‌ای از پپتیدهای چند منظوره^۶ بسیار بزرگ، با برنامه‌ریزی مدون، پپتید را سنتز می‌کنند. این مکانیزم می‌تواند سبب تنوع شیمیایی زیادی در محصولات پپتیدی شود. شامل هیدروکسی^۷، راست گرد و چپ گرد بودن و یا حتی در پیدایش اسیدهای آمینه غیر معمول^۸ نقش داشته باشد که خود می‌تواند سبب تغییرات بعدی، از جمله N-متیلاسیون^۹، آسیلاسیون^۱، گلوکوزیلاسیون^۲ و یا تشکیل حلقه هتروسیکلیک^۳ را موجب گردد.

1- Nonribosomal peptide synthetases

2- Operon

3- Gene clusters

4- Domains

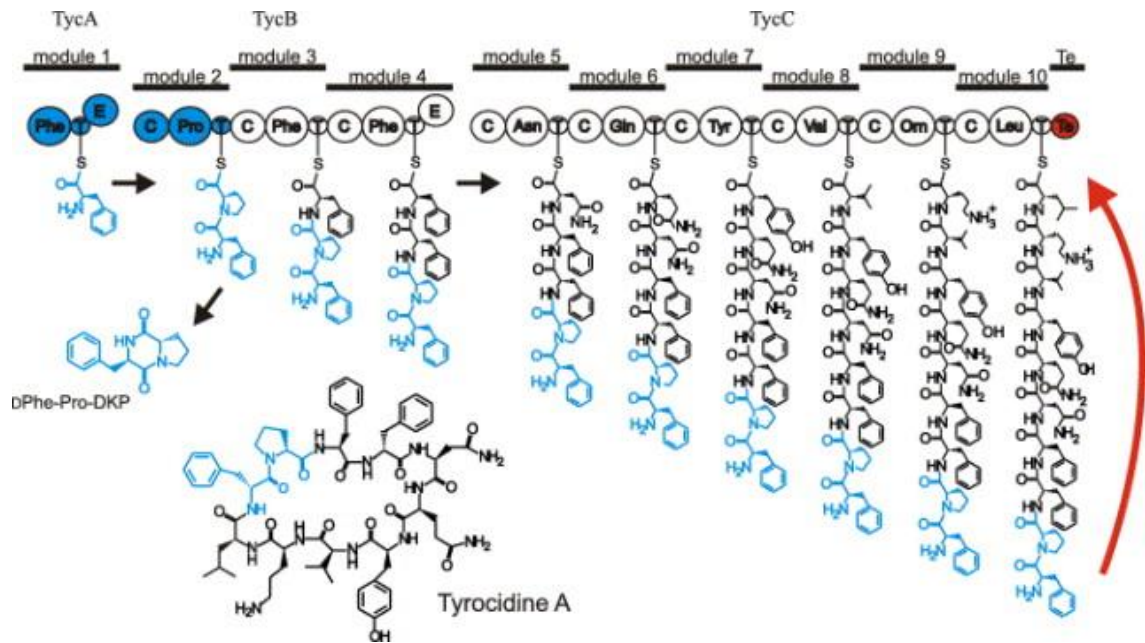
5- Multi-carrier

6- Multifunctional

7- Hydroxy

8- Unusual amino acids

9- N-metylation



شکل ۱-۳ به طور کلی ۳ آنزیم NRPs، شامل TycA، TycB، TycC برای سنتز Tyrocidine A فعالیت می‌کنند. TycA از یک قالب، TycB از سه قالب و TycC از ۶ قالب تشکیل شده‌اند. هر یک از این قالب‌ها مسئول درج یک اسیدآمینو در زنجیره پلی‌پپتیدی هستند. در نهایت دوماین TE (که با رنگ قرمز مشخص شده است) در قالب انتهایی TycC سبب انتشار نسخه نهایی پپتید می‌شود (هنینگ، ۲۰۰۰)

- 1- Acylation
- 2- Glycosylation
- 3- Heterocyclic ring

از جمله پپتیدهای غیر ریبوزومی می‌توان به گلیکوپپتیدهایی^۱ مثل vancomycin و Teicoplanin اشاره کرد که در آن‌ها زنجیره‌های پپتیدی حاوی زیرواحد قندی است (شکل ۱-۴) (ریبر و همکاران، ۲۰۰۵).

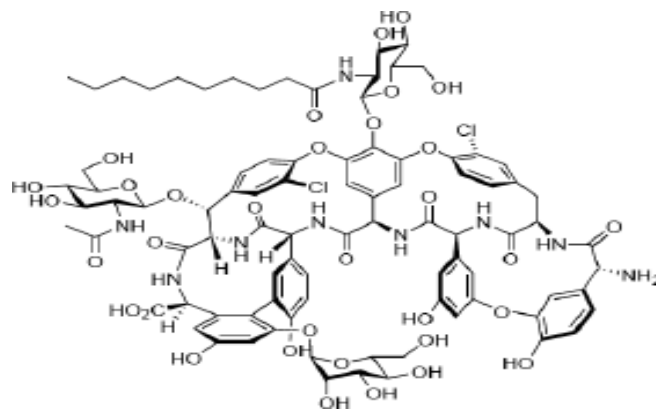
۴-۱ پپتیدهای آنتی‌باکتریال

این پپتیدها، آنتی‌بیوتیک‌هایی با طیف عمل گسترده هستند که به عنوان عوامل نوین درمانی مطرح هستند. نخستین بار، هولتمارک و همکارانش (۱۹۸۰) دو پپتید مقاوم در برابر حرارت را که خاصیت آنتی‌باکتریالی زیادی داشتند، از *Hyalophora cecropia* جدا کردند. یک سال بعد نیز دو پپتید خطی دیگر با ۳۵ و ۳۷ اسید آمینه و بدون سیستمین خالص شد (استینر و همکاران، ۱۹۸۱). در سال ۱۹۸۳ دو پپتید آنتی‌باکتریال با سه سیستمین از خرگوش جدا گردید که بعدها نام آن - defensin گذاشتند (سلسند و همکاران، ۱۹۸۵). این کار با جدا کردن پپتیدهایی از سایر حشرات و پستانداران ادامه یافت. پس از جدا کردن magainin توسط زاسلوف^۲ از ترشحات پوست قورباغه، دانشمندان به این موضوع علاقمند شدند. تاکنون حدود ۱۳۹۶ توالی پپتیدی با خاصیت آنتی-باکتریالی از موجودات مختلف کشف شده است (Aps.unmc.edu). اما از این تعداد، تنها ۴ توالی آن متعلق به قارچ‌هاست.

به‌طور کلی پپتیدهای آنتی‌باکتریال را می‌توان در ۵ گروه با ساختارهای سه‌بعدی متفاوت گروه-بندی کرد (بومن، ۱۹۹۵؛ جک و همکاران، ۱۹۹۸) اما تاکنون دانشمندان فقط روی سه گروه آن تمرکز کرده‌اند. این گروه‌ها شامل: (۱) پپتیدهای خطی بدون سیستمین و اغلب با یک ماریچج آلفا و

1- Glycopeptide
2- Zasloff

ساختاری دوگانه دوست (۲) پپتیدهایی با سه پیوند دی سولفیدی با ساختار β -sheet (۳) پپتیدهایی با اسیدهای آمینه غیر معمول مثل پرولین، آرژینین، تریپتوفان و هیستیدین.



شکل ۱-۴ شمایی از Teicoplanin- پپتید غیر ریبوزومی حاوی زیر واحد قندی. این پپتید آنتی‌بیوتیک با مهار سنتز دیواره سلولی علیه باکتری‌های گرم مثبت فعالیت می‌کند (www.jmg.ch.cam.ac.uk).

توضیح آن‌که این اسیدهای آمینه غیر معمول از طریق تغییر در اسیدهای آمینه معمولی در اثر تغییرات پس از رونویسی^۱ ایجاد می‌شوند. اغلب آمینواسیدهای غیر معمول به فعالیت زیستی پروتئین‌ها و پپتیدهای آنتی‌باکتریال از جمله افزایش طول عمر در شرایط *in vivo*، خاصیت انتخابی و ... کمک می‌کنند (بومن، ۲۰۰۳). در ادامه نگاهی اجمالی به پپتیدهای ضد میکروبی در باکتری‌ها، پستانداران، دوزیستان، حشرات و گیاهان خواهیم داشت.

۱-۴-۱ پپتیدهای ضد میکروبی با منشأ باکتریایی

تاکنون ۱۴۳ پپتید ضد میکروبی با منشأ باکتریایی کشف شده است (aps.unmc.edu). این پپتیدها هر دو گروه خنثی و کاتیونیک را دارا هستند و از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی ترشح می‌شوند. پپتیدهای ضد میکروبی ترشح شده به وسیله باکتری‌ها، تحت عنوان کلی باکتریوسین‌ها^۲ طبقه بندی می‌شوند (آبی، ۱۹۹۵؛ باب و اسکونیند، ۱۹۹۸؛ جک و ژانگ، ۱۹۹۸). باکتریوسین‌ها می‌توانند رقبای باکتریایی خود را از بین ببرند این در حالیست که برای باکتری میزبان، به علت تغییرات پس از رونویسی و یا مکانیزم‌های خاص ایمنی، کمتر آسیب پذیر هستند (اسکونیند و باب، ۱۹۹۸). تعدادی از باکتریوسین‌ها، شامل Microcin c7 از باکتری *Escherichia coli* پپتیدی با ۷ اسید آمینه را تولید می‌کند که از سنتز پروتئین‌ها جلوگیری می‌کند و یا پپتید Mersacidin که توسط *Lactococcus* ایجاد و از بیوسنتز پپتیدوگلیکان‌ها ممانعت می‌کند، با مکانیزم‌های خاصی عملکرد باکتریایی را کاهش می‌دهند. هر چند تصور می‌شود که بیشتر این پپتیدها مثل Nisin و Epidermidin در غشا سلول هدف ایجاد نشت می‌کنند (وان و همکاران، ۱۹۹۱؛ اسکونیند و باب، ۱۹۹۸). در جدول (۱-۲) نام برخی از پپتیدهای ضد میکروبی جدا شده از باکتری‌ها آورده شده است.

1 - Post transcriptional modification

2- Bacteriocins

جدول ۱-۲ برخی از پپتیدهای ضد میکروبی جدا شده از باکتری‌ها (Aps.unmc.edu)

| Name of bacteria | Name of antibiotic | sequence | Reference |
|---|--------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> AY25 | Microcin J25 | VGIGTPIFSYGGGAGHVPEY F | (Rosengren KJ and et al., 2003) |
| <i>Serratia plymuthica</i> | Serracin-P | ALPKKLYLNLNDFNFY MGVV | (Jabrane A. and et al., 2002) |
| <i>Serratia plymuthica</i> | Serracin-P | DYHHGVRVL | (Jabrane A. and et al., 2002) |
| <i>Bacillus subtilis</i> | Entianin | WKSESVCTPGCVTGLLQTC FLQTITCNCKISK | (Fuchs SW. and et al., 2011) |
| <i>Escherichia coli</i> | Microcin C7 | MRTGNAD | (Garcia-Bustos JF. And et al., 1985) |
| <i>Bacillus thuringiensis</i> DPC 6431 | Thuricin CD | GNAACVIGCIGSCVISEGIG SLVGTAFLG | (Rea MC. And et al., 2010) |
| <i>Halobacterium strain</i> AS7092 | Nisin Q | ITSISLCTPGCKTGVLGCN LKTATCNCSVHVSK | (Zendo T. and et al., 2003) |
| <i>Streptococcus mutans</i> | Mutacin II | NRWWQGVVPTVSYECRM NSWQHVFCC | (Nicolas G, and et al., 2006) |

۱-۴-۲ پپتیدهای ضد میکروبی پستانداران

تاکنون ۴۳ پپتید آنتی باکتریال از پستانداران جدا شده است (Aps.unmc.edu). پپتیدهای ضد میکروبی پستانداران را می‌توان در نوتروفیل‌ها^۱ (گویچه‌های سفید بیگانه‌خوار)، ترشحات پوستی سلول‌های مخاطی^۲ و یا در تجزیه ترکیبات پروتئینی یافت (بومن، ۱۹۹۵). نوتروفیل‌هایی که اختصاصاً فعالیت ضد میکروبی دارند حاوی طیف وسیعی از پروتئین‌ها و پپتیدهای آنتی‌میکروبیال هستند که از آن جمله می‌توان به لیزوزیم، لاکتوفرین^۳، defensin و cathelicidins ... اشاره کرد (گنز و همکاران، ۱۹۲۰؛ هنکوک و همکاران، ۱۹۹۵). انواع سلول‌های دیگر از جمله سلول‌های اپیتلیال، β -defensin تولید می‌کنند. بیشتر تحقیقات انجام شده در ارتباط با پپتیدهای پستانداران، در مورد defensin ها است (گنز و همکاران، ۱۹۲۰). defensin ها در دو گروه قرار می‌گیرند، شامل β -defensin و انواع کلاسیک، که گاه آن‌را آلفا می‌نامند. عمدتاً defensin کلاسیک در درون نوتروفیل‌ها و سلول‌های paneth و β -defensin در سلول‌های اپیتلیال، نوتروفیل‌ها و لکوسیت‌ها حضور دارند. البته defensin ها در چربی بدن حشرات و دانه گیاهان نیز یافت شده‌اند (بومن، ۱۹۹۵؛ بروکارت و همکاران، ۱۹۹۷). پپتیدهای ضد میکروبی پستانداران بر علیه باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها مؤثر هستند (گنز و همکاران، ۱۹۲۰).

۱-۴-۳ پپتیدهای ضد میکروبی گیاهی

تاکنون ۶۲ پپتید آنتی‌باکتریال از گیاهان جدا شده است (aps.unmc.edu). اصولاً پپتیدهای گیاهی مولکول‌های پروتئینی با وزن کمتر از ۱۰ کیلو دالتون و اغلب دارای توالی موتیفی خاصی

1- Neutrophils
2- Epithelial cell
3- Lactoferrin

هستند. تیونین^۱ اولین پپتید آنتی‌میکروبیال جدا شده از گیاهان است که امروزه به عنوان یک آنتی-بیوتیک جدید گسترش یافته است (فرخی و همکاران، ۲۰۰۸). این پپتیدها برای باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی، قارچ‌ها، مخمرها و انواع مختلف سلول‌های پستانداران سمی هستند. عمدتاً پپتیدهای آنتی‌میکروبیال جدا شده از گیاهان ساختاری مشابه defensin حشرات و پستانداران دارند به همین علت به آنها defensin‌های گیاهی^۲ می‌گویند. در حالی که بیشتر پپتیدهای باکتریایی و حیوانی فعالیت ضد باکتریایی دارند، پپتیدهای گیاهی فعالیت ضد قارچی زیادی دارند (بروکارت و همکاران، ۱۹۹۷).

۱-۴-۴ پپتیدهای ضد میکروبی حشره‌ای

تاکنون بیش از ۱۶۷ پپتید آنتی‌باکتریال از حشرات جدا شده است (aps.unmc.edu). پپتیدهای ضد میکروبی حشره‌ای به دو طریق می‌توانند ترشح شوند. این پپتیدها یا در داخل بدن حشرات ترشح می‌شوند مثل cecropin (هولتمارک و همکاران، ۱۹۸۰)، و یا در خارج از بدن آنها، مثل venoms که از زنبور melittin ترشح می‌شود (هابرمن، ۱۹۷۲). cecropin ها عمدتاً علیه باکتری‌های گرم منفی مؤثر هستند (بومن، ۱۹۹۵). حشرات می‌توانند پپتیدهای مختلفی را با توجه به نوع مهاجم بیان کنند. به عنوان مثال حداقل هفت پپتید ضد میکروبی در همولنف مگس سرکه^۳ وجود دارد (هافمن و همکاران، ۱۹۹۷). تعدادی از این پپتیدها پس از آلودگی القا می‌شوند و زیر مجموعه‌ای از پپتیدهای دیگر را توسط همان نوع مسیر القا می‌کنند. جالب است که مگس سرکه

1- Thionin

2- Plant defensins

3- Drosophila

می‌تواند بین موجودات مختلف تفاوت قائل شود و پپتید مناسبی را تولید کند (لمیتر و همکاران، ۱۹۹۷).

۱-۴-۵ پپتیدهای ضد میکروبی دوزیستان

دوزیستان به واسطه زندگی در مرداب‌ها و تالاب‌ها از قوی‌ترین سیستم‌های دفاع با ایمنی اولیه برخوردارند. غدد گرانولار پوست دوزیستان انباری از ترکیبات مختلف زیستی است. این ترکیبات در پاسخ به محرک‌های مختلف به سطح پشتی حیوان ترشح می‌شوند و در تنظیم نقش فیزیولوژیک پوست و یا در دفاع علیه میکروارگانیسم‌های مهاجم فعالیت می‌کنند.

جدا شدن bombinin (سورداس و همکاران، ۱۹۷۰) و متعاقباً magainin از گونه‌ی *xenopus* (زاسلوف، ۱۹۸۷) منجر به کشف و بررسی پپتیدهای ضد میکروبی در گونه‌های مختلف دوزیستان شد. مثلاً در *xenopus* بیش از دوازده پپتید آنتی‌بیوتیک در غدد پوستی، سلول‌های مخاط معده و مجرای روده کشف شده است. در قورباغه *Phylomedusa sauvagii* خانواده‌ای با پنج پپتید آنتی-بیوتیک حضور دارند که به‌طور قابل توجهی علیه قارچ‌ها مؤثر هستند (مور و همکاران، ۱۹۹۴). دنباله پپتیدهای دوزیستان همولوژی کمی با هم دارند (کریل، ۱۹۹۴).

۱-۵ مکانیزم عمل پپتیدهای آنتی‌باکتریال

پپتیدهای آنتی‌باکتریال به طرق مختلف، از جمله اختلال در غشا، تداخل در متابولیسم و هدف قرار دادن اجزای سیتوپلاسمی، باکتری‌ها را از بین می‌برند. چون سطح باکتری آنیونی است، تماس اولیه بین پپتید و باکتری به صورت الکتروستاتیک ایجاد می‌شود. ترکیب اسیدآمینه‌ای پپتیدها، دوگانه دوستی^۱، بار کاتیونی و سایز به آنها اجازه می‌دهد تا در غشای دو لایه^۱ درج و به وسیله سه

1- Amphipathicity

مکانیزم Barrel stave, Carpet و یا Toriodal pore منافذی را در آن ایجاد کنند. این پپتیدها همچنین می‌توانند به وسیله‌ی اتصال به مولکول‌های درون سلولی که برای زندگی سلول حیاتی هستند سنتز دیواره سلولی، DNA، RNA، پروتئین‌ها و یا آنزیم‌های خاص را مهار کنند (شای، ۲۰۰۲). بنابراین، اتصال به غشای میکروبی اولین گام AMP برای از بین بردن باکتری است. بعد از اتصال، همه AMPها ساختار ثانویه خود را به دست می‌آورند. البته در بسیاری موارد مکانیزم دقیق کشته شدن شناخته شده نیست. به طور کلی فعالیت ضد میکروبی این پپتیدها به وسیله اندازه گیری حداقل غلظت بازدارنده (MIC^2) تعیین می‌شود که پایین‌ترین غلظتی است که رشد باکتری‌ها را مهار می‌کند (ژنگ و همکاران، ۲۰۱۰).

مکانیزم Barrel stave: در این مکانیزم پپتید ابتدا به سطح غشا متصل می‌شود و بعد از رسیدن غلظت آن به یک حد آستانه، در غشای دو لایه به صورت عمود درج می‌شود. در این حالت لوله‌هایی مشابه بشکه^۳ شکل می‌گیرند. این پپتیدها از طرف نواحی آبدوست جذب لومن منافذ غشایی شده و از طرف نواحی هیدروفوب با غشای دولایه ارتباط برقرار می‌کنند. البته پپتیدهای کمی از مکانیزم Barrel stave استفاده می‌کنند و بیشتر مطالعات اخیر پیرامون مدل Toriodal pore بوده است (یمن و همکاران، ۲۰۰۳).

مکانیزم Toroidal pore: یکی از مشخصه‌های بسیار خوب تماس پپتید و غشا، تشکیل منافذ Toroid است. مدل Toroid pore از پپتیدهای مارپیچی همچون Magainin پیشنهاد شده است. در این مکانیزم، مشابه با مکانیزم Barrel stave پپتید به صورت عمود در غشای دو لایه درج

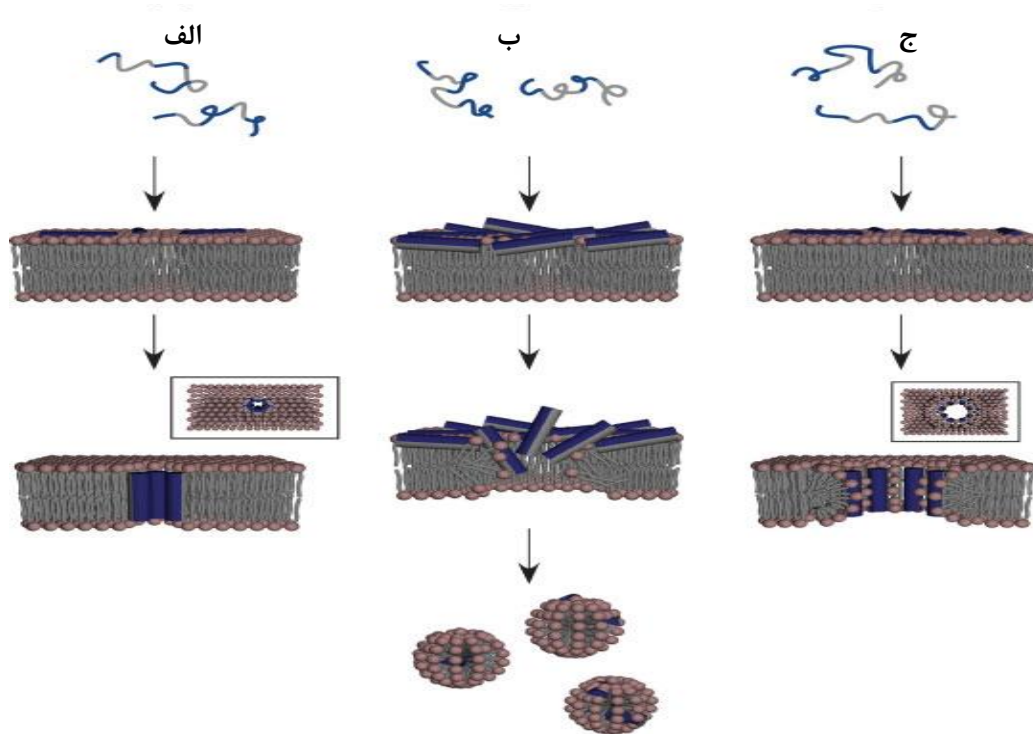
1- Bilayers

2- Minimum inhibitory concentration

3- Barrel

می‌شوند اما به جای آن که به موازات فسفولیپیدها قرار بگیرند، سبب انحنای غشا می‌شوند به گونه‌ای که بین غشای داخلی و خارجی پیوستگی ایجاد شود (یمن و همکاران، ۲۰۰۳).

مکانیزم Carpet: برخی از پپتیدها ممکن است علیه میکروارگانیزم‌ها از طریق شیوه نسبتاً پراکنده-ای موسوم به مکانیزم Carpet تأثیر بگذارند. در این مکانیزم پپتیدها به موازات غشای دولایه تجمع پیدا می‌کنند ناحیه مورد نظر را مشابه یک فرش^۱ پوشش می‌دهند و در یک غلظت مشخصی، فعالیتی مشابه دترژنت‌ها خواهند داشت و سبب تشکیل منافذی روی غشا می‌شوند (یمن و همکاران، ۲۰۰۳).



شکل ۱-۵ مکانیزم عمل پپتیدهای آنتی باکتریال. الف: مکانیزم Barrel stave، در این مکانیزم پپتید ابتدا به سطح غشا متصل می‌شود و پس از آن که غلظت آن به یک حد آستانه رسید، در غشای دولایه درج می‌شود. ب: مکانیزم Carpe، در این مکانیزم پپتیدها به موازات غشای دولایه تجمع پیدا می‌کنند و ناحیه مورد

نظر را مشابه یک فرش پوشش می‌دهند، ج: مکانیزم Toroid در این مکانیزم، پپتید به صورت عمود در غشای دو لایه درج می‌شود (گلینل و همکاران، ۲۰۱۲).

۱-۶ آنالیز توالی‌های پپتیدهای آنتی‌باکتریال

با بررسی ۴۸۶ پپتید آنتی‌باکتریال، نوعی اختصاصیت در پایانه‌های کربوکسیلی^۱ و آمینی^۲ دیده شد. هر دو انتها، نقش مهمی را در رساندن خاصیت آنتی‌باکتریالی به این پپتیدها بازی می‌کنند. مثلاً انتهای کربوکسیلی در تماس با غشا و تشکیل منفذ^۳ اهمیت دارد، در حالی که انتهای آمینی در فرآیند تعامل^۴ با باکتری مهم است (اتووس، ۲۰۰۵).

در طی آزمایشی نیز فراوانی حضور هر ۲۰ اسید آمینه در هر دو انتها بررسی شد. مشاهده شد که اسید آمینه‌های خاصی در پپتیدهای آنتی‌باکتریال بیشتر هستند. آمینواسیدهای گلايسين و فنیل آلانین به مقدار قابل توجهی در اولین جایگاه انتهای آمینی پپتیدهای آنتی‌باکتریال بیشتر از غیر آنتی‌باکتریال‌ها هستند. به‌طور مشابهی تریپتوفان، ایزولوسین، لوسین، فنیل آلانین فراوانی زیادی در جایگاه دوم انتهای آمینی دارند. آمینواسیدهایی مثل پرولین، سرین، گلوتامیک اسید، آسپاراتیک اسید در پپتیدهای آنتی‌باکتریال در ارجحیت نیستند. اگرچه هر دو انتها دارای فراوانی بالایی از اسیدهای آمینه مثبت مثل لیزین و آرژنین هستند. اختلاف بین این پپتیدهای آنتی-باکتریال و غیر آنتی‌باکتریال در انتهای کربوکسیلی آنها است. فراوانی زیاد بار مثبت در انتهای کربوکسیلی ممکن است به تماس با غشای منفی باکتری و در انتهای آمینی ممکن است در تماس بین این پپتیدها و ترکیبات داخل سلولی مثل DNA و RNA کمک کند و از فعالیت‌های مهم

1 - C-terminal
2 - N-terminal
3 - Pore
4- Interaction

باکتری ممانعت کند. آمینو اسیدهایی مثل لیزین، ایزولوسین، سیستئین، گلایسین در پپتیدهای آنتی‌باکتریال زیادند و نسبت سیستئین نیز در پایانه آمینی بیشتر است (لتا و همکاران، ۲۰۰۷).

در این پژوهش سعی گردید مطالعاتی در خصوص برهم‌کنش قارچ‌ها بر مجموعه‌ای از باکتری‌های پاتوژن گیاهی و جانوری به‌منظور شناسایی ترکیبات مؤثر در کنترل زیستی این باکتری‌های پاتوژن انجام پذیرد و توجه بیشتری معطوف به کنترل زیستی باکتری زانتوموناس عامل بیماری شانکر مرکبات با استفاده از پپتیدها و پروتئین‌های آنتی‌باکتریال موجود در سکروتوم قارچ‌های مورد بررسی در این مطالعه شد.

فصل دوم

مواد و روش ها

۱-۲ مواد شیمیایی

اسیداستیک، اسیدکلریدریک، آگارز، آگار، گلیسرول، اتانول، متانول، گلوکز، گلایسین، تراپسین، نیترات نقره، پپتون، عصاره مخمر، تریس باز، اکریل آمید، بیس اکریل آمید، برموفنول بلو، فرمالدئید، رنگ کوماسی بلو، آمونیوم پرسولفات، پوتیتو دکستروز آگار، استونیتریل خالص، اتیل استات، Na_2HPO_4 ، NaOH ، $\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ، Tris-HCl ، NaCl ، SDS ، TCA ، TEMED ، EDTA ، NaH_2PO_4

Na_2CO_3 (خریداری شده از شرکت Merck، آلمان)

پروتئیناز k، پپسین، تریپسین (خریداری شده از شرکت Sigma، آمریکا)

BSA ، PMSF ، نشانگرهای وزن ملکولی ۱kb، RT ، RT Buffer ، Random hexamer ، DEPC water

(خریداری شده از شرکت Fermentase، آمریکا)

PCR Buffer ، dNTP ، MgCl_2 ، $\text{Taq DNA polymerase}$ ، کیت استخراج RNA (خریداری شده از

شرکت سیناژن، ایران)

پرایمر 18S rRNA (خریداری شده از شرکت ژن فناوری، ایران)

کیت خالص سازی محصول PCR (خریداری شده از شرکت Roche، آلمان)

۲-۲ دستگاه‌های آزمایشگاهی

دستگاه PCR معمولی (Peq lab)، ورتکس (Heidolph)، تانک الکتروفورز (Akhtarian)، دستگاه

HPLC (Agilent)، تانک الکتروفورز افقی (Paya pajuhesh pars)، فریزر -۲۰ (Pars)، فریزر -۷۰

(Jahl)، یخچال (Pars)، میکروفیوژ یخچال دار (Beckman)، سانتریفیوژ یخچال دار (Eppendorf)،

میکروسکوپ نوری (Leica)، هودهای بیولوژی مولکولی (Sarv tajhiz sakkoo)، مایکروویو

(Panasonic)، اسپکتروفتومتر (Biorad)، سمپلر ۱۰۰μl، ۱۰۰۰μl، ۱۰۰۰μl (Eppendorf)، اتوکلاو

(Iran Tolid)، میکروفیوژ (Heraeus)، سانتریفیوژ (Pars Asma Co)، شیکر انکوباتور (Jeio tech)، هیتر- استریبر (Bibby)، pH متر (Cenco)

۲-۳ میکروارگانیزم‌ها

در این پژوهش از میکروارگانیزم‌ها با مشخصات ارائه شده در جدول (۲-۱) استفاده شد.

۲-۴ جمع آوری داده‌ها به صورت بیوانفورماتیکی

در گام اول، برای جستجو و استخراج توالی‌های پروتئینی و پپتیدی دارای خاصیت آنتی‌باکتریالی از پایگاه aps.unmc.edu استفاده شد. سپس برای هم‌ردیفی چندگانه^۱ توالی‌های بدست آمده از الگوریتم ClustalW استفاده شد. در نهایت درختچه‌های فیلوژنتیکی^۲ مربوطه رسم گردید. تمامی آنالیزهای اشاره شده مربوط به توالی‌ها در پایگاه align.genome.jp انجام گرفت.

۲-۵ نمونه‌برداری و جداسازی قارچ از خاک

نمونه‌برداری از خاک باغات نواحی شمال کشور (استان‌های گلستان و مازندران) و جنوب کشور (استان‌های هرمزگان، فارس و کرمان) در تابستان ۹۰ صورت گرفت. سپس از هر یک از نمونه‌های خاک، سری رقتی^۳ تهیه و بر روی محیط PDA (پپتون، گلوکز و آگار) کشت و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و در تاریکی به مدت یک هفته انکوبه شد. سپس جدایه‌های به‌دست آمده از هر یک از

1 - Multiple sequence alignment

2 - Phylogenetic tree

3 - Serial dilution

نمونه‌های خاک به ظروف پتری حاوی محیط کشت آب آگار منتقل شدند و با گرفتن تک اسپور از آن‌ها و انتقال به محیط PDA دیگری خالص شدند. در ادامه توضیحات بیشتری پیرامون خالص سازی قارچ‌ها و جداسازی تک اسپور داده می‌شود.

جدول ۱-۲ میکروارگانیسم‌های استفاده شده در این پژوهش

| نام ارگانیسم | سویه‌های مورد مطالعه | نحوه تهیه |
|--------------|---|---|
| باکتری | <i>Xanthomonas citri</i> (NIGEB-88 , NIGEB-9322) <i>Bacillus subtilis</i> <i>Erwinia amylovora</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Salmonella typhi</i> | همه سویه‌ها از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری تهیه شدند. |
| قارچ | ۱۳ جدایه قارچی که از خاک‌های باغات شمال و جنوب ایران جدا شدند. <i>Trichoderma atraviridae</i> <i>Trichoderma virens</i> 1101 <i>Trichoderma virens</i> <i>Trichoderma harzianum</i> 1482 <i>Talaromyces flavus</i> <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Macrophomina phaseolina</i> <i>Trichoderma harzianum</i> 1103 <i>Trianum-p</i> (T22) | همه سویه‌ها از مؤسسه گیاهپزشکی کشور تهیه شد. |

۲-۶ جداسازی تک اسپور^۱

در ابتدا با استفاده از لوپ استریل، بخشی از سطح کلونی‌ها خراشیده^۲ و درون ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل سوسپانسیون شدند. سوسپانسیون اسپوری با همزن لوله یکنواخت شد. سپس با انجام رقیق سازی مکرر و تهیه سوسپانسیون 10^{-4} ، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون مورد نظر در کف یک پتری دیش^۳ استریل قرار گرفت. سپس مقداری آب آگار به نحوی که به طور کامل کف پتری را بپوشاند روی آن قرار گرفت. در نهایت پتری‌ها در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۷۲-۴۸ ساعت انکوبه شدند. برای تهیه کشت ثانویه^۴ کلونی‌هایی که از یک اسپور تک رشد یافته بودند توسط یک اسکالپل استریل به همراه مقدار کمی از آگار بریده و به پلیت PDAی دیگری منتقل شدند.

۲-۷ تهیه عصاره‌ی خام^۵ از هر یک از جدایه‌های قارچ

بدین منظور، از حاشیه کشت هفت روزه هر یک از جدایه‌ها، دو قطعه از محیط کشت قارچ حاوی ژلوز محیط کشت، به ابعاد تقریبی (۱cm×۱cm) حاوی $10^6 \times 75$ سلول اسپور به‌طور تقریبی، جدا و در فلاسک ارلن مایر شامل ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط PDB (شامل ۴ گرم پپتون، ۲۰ گرم گلوکز) ریخته شد و به مدت ۲۰ روز در شیکر انکوباتور با دور ۱۸۰ rpm و دمای ۳۰ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شد. سپس محیط کشت حاوی میسلیوم‌های قارچی، با عبور از کاغذ صافی، فیلتر شد. برای استفاده طولانی مدت از مایع عبوری از کاغذ صافی و حفظ پروتئین‌های آن از تأثیر پروتئازها، به آن

¹ - Single-spore culture

² - Scrape

³ - Plate

⁴ - Subculture

⁵ - Crude extract

PMSF^۱ افزوده شد. سپس ۱۰ میلی‌لیتر مایع عبوری از صافی با ۱۰ میلی‌لیتر اتیل استات مخلوط و به مدت یک ساعت در دمای ۲۰- درجه سلسیوس قرار داده شد. پس از گذشت یک ساعت، به مدت ۳۰ دقیقه در $11,627 \times g$ سانتریفیوژ شد. در نهایت عصاره با استفاده از تبخیر چرخشی در دستگاه Eppendorf/Hamburg/Germany) Concentrator SpeedVac به میزان ده برابر غلیظ شدند. تمامی عصاره‌ها در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند (جانانان و همکاران، ۲۰۰۷؛ تونگ و همکاران، ۲۰۱۱؛ راجی و همکاران، ۲۰۱۱).

۸-۲ سنجش فعالیت آنتی‌میکروبیال

عصاره ۲۰ قارچ برای سنجش فعالیت آنتی‌باکتریالی در مقابل دو سویه از باکتری زانتوموناس (سویه NIGEB-88 نماینده تیپ A و سویه NIGEB-9322 نماینده تیپ A*) و همچنین سایر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی دیگر، از جمله *Bacillus subtilis*، *Escherichia coli*، *Erwinia amylovora* و همچنین ۲ قارچ *Macrophomina phaseolina*، *Rhizoctonia solani* با استفاده از روش دیسک^۲ مورد بررسی قرار گرفت. برای تعیین طیف بازدارندگی عصاره‌های قارچی، تأثیر خاصیت آنتاگونیستی آن‌ها روی سایر سویه‌های زانتوموناس نیز مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۳-۳).

برای بررسی فعالیت آنتی‌باکتریالی عصاره‌های قارچی، ابتدا مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از باکتری کشت داده شده در محیط مایع YP (عصاره مخمر و پپتون) شامل $10^{23} \text{ cfu.ml}^{-1} \times 4$ تعداد باکتری، روی سطح پتری‌هایی که حاوی محیط کشت PDA بودند با استفاده از سواپ^۳ استریل کشت شد.

1 - Phenylmethylsulfonyl fluoride

2 - Disk metode

3 - Swap

سپس مقدار ۱۵ میکرولیتر از هر یک از عصاره‌های قارچی روی سطح دیسک‌های اتوکلاو ۵ میلی-متری که به واسطه پانچ کاغذ صافی ایجاد شده بود، قرار گرفت و دیسک‌ها روی سطح پلیت‌های آغشته به سوسپانسیون باکتری، قرار داده شد. ظرف در دمای ۳۰ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. فعالیت آنتی‌باکتریالی به صورت اندازه‌گیری قطر ناحیه بازدارنده بر حسب میلی‌متر مورد ارزیابی قرار گرفت (جورجنسن و همکاران، ۲۰۰۷؛ حاجی و همکاران، ۲۰۱۰؛ ژنگ و همکاران، ۲۰۱۰؛ رادجی و همکاران، ۲۰۱۱).

برای بررسی اثر ضد قارچی هر یک از عصاره‌های قارچی، ابتدا دو قارچ *Rhizoctonia solani* و *Macrophomina phaseolina* در پتری‌دیش حاوی محیط PDA واکشت شدند، سپس دیسک‌های آغشته به هر یک از عصاره‌های قارچی در اطراف پلیت‌ها قرار داده شد.

۲-۹ شناسایی مولکولی جدایه قارچی دارای خاصیت آنتاگونیستی

۲-۹-۱ استخراج DNA ژنومی به روش CTAB^۱

میسلیوم‌های قارچ از محیط مایع PDB جمع‌آوری و درون ویال ۲ میلی‌لیتری ریخته شد و با دور $13,000 \times g$ و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. محلول رویی را دور ریخته و میسلیوم‌های زیرین روی کاغذ صافی قرار داده شد تا کاملاً خشک شود. بعد از خشک شدن مجدداً به داخل ویال برگردانده و درون هر ویال ۲ عدد ساچمه قرار داده شد. سپس ویال‌ها به مدت ۵ دقیقه در ازت مایع قرار گرفت تا میسلیوم‌ها منجمد شوند. آن‌گاه توسط دستگاه خرد کن^۲ میسلیوم‌ها پودر شدند. بعد از خارج کردن ساچمه‌ها، به اندازه حجم محتوای ویال از بافر CTAB

1- N-Cetyl-N,N,N-trimethyl-ammonium bromide

2 - Cruncher

ریخته و ویال به خوبی ورتکس شد تا پودر حاصل درون بافر کاملاً حل شود. ویال به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد و سپس ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در هر دو مرحله هر ۲-۳ دقیقه یک‌بار محتوای ویال را ورتکس نموده، سپس ۷۰۰ میکرولیتر محلول کلروفرم و ایزوآمیل الکل به نسبت ۲۴ به ۱ به محتوای ویال افزوده و ورتکس شد. ویال به مدت ۱۰ دقیقه با دور $\times g$ ۸۰۰۰ در دمای اتاق سانتی‌فیوژ شد. سپس ۷۵۰ میکرولیتر از فاز روئی (حاوی DNA ژنومی) به ویال ۱/۵ میلی‌لیتری استریل منتقل و به آن ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول مطلق افزوده شد و چند بار به آرامی تکان داده شد. در نهایت به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. سپس ویال به مدت ۱۵ دقیقه با دور $\times g$ ۱۳۰۰۰ در دمای اتاق سانتی‌فیوژ شد. محلول رویی را دور ریخته و ۴۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰٪ (v/v) سرد به رسوب اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه با دور $\times g$ ۱۳۰۰۰ و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتی‌فیوژ شد. مایع رویی را دور ریخته و ویال به صورت وارونه روی دستمال قرار گرفت تا رسوب ته ویال کاملاً خشک شود. در انتها ۱۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه به رسوب اضافه شد. آن‌گاه برای مشاهده میزان و کیفیت ژنوم استخراج شده، مقداری از آن روی ژل آگارز بررسی شد.

۲-۹-۲ تکثیر 18S rRNA به کمک واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)^۱

برای شناسایی ملکولی جدایه شماره ۳، می‌بایستی با استفاده از پرایمرهای عمومی، توالی 18 S rRNA (R18S-5'-GCTTGATCCTTCTGCAGGTT-3' , F18S-5'-CCTGGTTGATCCTGCCAGTA-3') آن

تکثیر شود و پس از تعیین توالی با توالی‌های مربوط در سایت NCBI مقایسه گردد.

برای تکثیر توالی 18S rRNA در طی PCR از برنامه ارائه شده در جدول (۳-۲) استفاده شد. مواد مورد نیاز برای انجام این واکنش در جدول (۲-۲) ذکر شده است.

جدول ۲-۲ مواد مورد نیاز PCR مربوط به تکثیر توالی 18S rRNA

| ترکیبات | مقدار بر حسب μl |
|---------------------------------|----------------------------|
| بافر 10x PCR | ۲/۵ |
| (50 mM) MgCl_2 | ۰/۸ |
| (10 mM) dNTP | ۰/۵ |
| آغازگر Forward (10 pmol) | ۰/۵ |
| آغازگر Reverse (10 pmol) | ۰/۵ |
| DNA الگو (با غلظت ۵-۱۰ نانوگرم) | ۱ |
| Taq DNA polymerase | ۰/۲ |
| ddH ₂ O | ۱۹ |

جدول ۳-۲ برنامه PCR استفاده شده برای تکثیر توالی 18S rRNA

| تعداد سیکل | زمان | دما | مرحله |
|------------|--------|-------|--------------------|
| ۱ | ۵ min | ۹۴ °C | واسرشته سازی اولیه |
| | ۱ min | ۹۴ °C | واسرشته سازی |
| ۳۰ | ۱ min | ۵۶ °C | اتصال |
| | ۲ min | ۷۲ °C | طویل شدن |
| ۱ | ۱۰ min | ۷۲ °C | طویل شدن نهایی |

پس از انجام واکنش PCR، محصول PCR با استفاده از کیت Roch خالص سازی شد. دستورالعمل استفاده از این کیت در پیوست ارائه شده است (پیوست ۵).

پس از خالص سازی برای بررسی کیفیت قطعات DNA، الکتروفورز ژل آگارز انجام شد. پس از اینکه نمونه‌ها به قدر کافی روی ژل حرکت کردند، رنگ آمیزی انجام شد و در انتها بر روی دستگاه مولد UV (UVP bioimaging systems/USA) با طول موج ۳۲۰ nm برای مشاهده قرار داده شد و از آن عکس تهیه گردید.

۲-۱۰ تست برادفورد^۱

به منظور تعیین غلظت پروتئین موجود در عصاره‌های قارچی که خاصیت آنتاگونیستی شاخص-تری را نسبت به بقیه نشان داده بودند، از روش برادفورد (تکنیک رنگ سنجی، ۱۹۷۶) استفاده شد.

پس از انجام تست برادفورد و تعیین غلظت پروتئین موجود در عصاره‌های دارای خاصیت آنتاگونیستی، برای اینکه تشخیص بدهیم آیا خاصیت آنتی‌باکتریالی مربوط به پروتئین‌ها و یا پپتیدهای آنتی‌باکتریال است یا خیر؟ تأثیر پروتئین‌ها را بر فعالیت آنتاگونیستی مورد بررسی قرار دادیم که در ذیل آن را شرح می‌دهیم.

۲-۱۱ تأثیر پروتئین‌ها بر فعالیت عصاره قارچی

برای انجام این تست از آنزیم پپسین، تریپسین و پروتئیناز k با غلظت ۱ mg/ml استفاده شد. بدین منظور مقدار ۱۵ میکرولیتر از هر یک از آنزیم‌ها و مقدار ۱۵ میکرولیتر از هر یک از عصاره‌های دارای خاصیت آنتاگونیستی با غلظت تقریبی ۳ میکروگرم در میلی‌لیتر در داخل یک میکروتیوب در

1 - Bradford

دمای اتاق مجاور گردید. پس از گذشت یک ساعت برای عصاره قارچ *T.harzianum1103* و دو ساعت برای عصاره قارچ *Aspergillus sp.* مقدار ۱۵ میکرولیتر از هر نمونه روی سطح دیسک‌های کاغذی ریخته شد و هر دیسک روی سطح پلیتی که با ۱۰۰ میکرولیتر از باکتری (88 - NIGEB) *Xanthomonas citri* آغشته شده بود قرار گرفت (حاجی و همکاران، ۲۰۱۰). از سرم فیزیولوژیک به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

۲-۱۲ تأثیر حرارت بر فعالیت عصاره قارچی

برای انجام این تست نمونه را به مدت ۱ ساعت در دمای ۵۰، ۷۰، ۹۰ و ۱۰۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از باکتری زانتوموناس سویه ۸۸ روی محیط کشت جامد PDA کشت شد. در نهایت مقدار ۱۵ میکرولیتر از هر یک از نمونه‌های فوق روی سطح دیسک‌ها قرار گرفت و دیسک‌ها روی سطح پلیت‌های کشت داده شده با باکتری زانتوموناس قرار داده شدند (سولانیلا و همکاران، ۲۰۰۳؛ اسکوری و همکاران، ۲۰۰۸؛ حاجی و همکاران، ۲۰۱۰؛ ژنگ و همکاران، ۲۰۱۰).

۲-۱۳ تأثیر pH بر فعالیت عصاره قارچی

برای انجام این تست بافر فسفات ساخته شد. بدین منظور غلظت ۰/۲۵ مولار Na_2HPO_4 و ۰/۰۲۵ مولار از NaH_2PO_4 تهیه شد. وقتی ۴۰ میلی‌لیتر NaH_2PO_4 و ۶۰ میلی‌لیتر Na_2HPO_4 با هم به خوبی مخلوط شود، مقدار pH معادل ۷/۴ خواهد بود. بر همین اساس سایر pH ها (از ۴ تا ۹)، درست شد. سپس ۲۰ میکرولیتر از عصاره و ۲۰ میکرولیتر از pH مورد نظر را در داخل یک ویال ریختیم و اجازه داده شد به مدت نیم ساعت در همین شرایط باقی بماند. در نهایت به مقدار ۱۵ میکرولیتر از هر pH روی هر دیسک قرار داده شد و دیسک‌ها روی پلیتی که با ۱۰۰ میکرولیتر از

سویه ۸۸ باکتری زانتوموناس کشت داده شده بود، قرار گرفت (حاجی و همکاران، ۲۰۱۰؛ ژنگ و همکاران، ۲۰۱۰).

۲-۱۴ تأثیر مواد شیمیایی بر فعالیت عصاره قارچی

برای بررسی اثر شلات کننده‌ی EDTA^۱ و دترژنت سدیم دودسیل سولفات (SDS) عصاره قارچی با EDTA و SDS یک درصد به مدت نیم ساعت در دمای اتاق مجاور گردید و فعالیت آنتاگونیستی با استفاده از روش دیسک بررسی شد (مژگانی و همکاران، ۱۳۸۵).

۲-۱۵ تست تعیین حداقل غلظت بازدارنده^۲ پروتئین آنتی‌باکتریال

MIC کمترین غلظت از آنتی‌بیوتیک است که رشد قابل رؤیت باکتری‌ها را بعد از یک انکوباسیون ۱۸ ساعته متوقف می‌کند. MIC برای تأیید مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها در آزمایشگاه‌های تشخیصی و همچنین برای بررسی طیف مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف و یا میزان فعالیت یک آنتی‌بیوتیک جدید بر علیه باکتری‌ها در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی استفاده می‌شود. در این مطالعه آزمایش MIC به روش Broth microdilution انجام گرفت (<http://www.nccls.org>).

در این مطالعه دامنه غلظت از ۲۰۴۸ $\mu\text{g/ml}$ شروع شد و به ۲ $\mu\text{g/ml}$ ختم گردید. برای ساختن غلظت‌های ذکر شده ابتدا ۲/۰۴۸ میلی‌گرم از عصاره دارای خاصیت آنتاگونیستی را در ۱ میلی‌لیتر محیط کشت، حل نموده تا محلول استوک با غلظت ۲۰۴۸ $\mu\text{g/ml}$ بدست آید. برای رسیدن به غلظت‌های کمتر به نسبت ۱ به ۲ رقت سازی صورت گرفت. محلول استوک در یخچال به مدت دو هفته قابل نگهداری است.

1 - EthyleneDiamineTetraacetic Acid

2 - Minimum Inhibitory Concentration

پس از ساختن غلظت‌های مختلف از عصاره، کدورت نمونه‌های باکتریایی را به کمک دستگاه اسپکتروفوتومتری به نیم مک فارلند رساندیم. لازم به ذکر است که میزان جذب نیم مک فارلند در طول موج ۶۲۵ نانومتر معادل $0/13 - 0/08$ است که کدورت باکتری در آن برابر با 10^8 cfu.ml^{-1} می‌باشد. اما کدورت استاندارد برای انجام آزمایش MIC معادل $10^5 \text{ cfu.ml}^{-1} \times 5$ است که برای رسیدن به این عدد پس از اینکه کدورت نمونه‌ها در نیم مک فارلند تنظیم گردید، آن‌ها را به میزان ۱ به ۲۰۰ رقیق نمودیم. در نهایت میکروپلیت را در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۱۸ ساعت قرار دادیم.

۱۶-۲ بررسی اثر زمان کشت بر تولید پروتئین‌های ضد میکروبی

برای تعیین مناسبترین زمان عصاره‌گیری، فعالیت آنتی‌باکتریالی علاوه بر روز بیستم، در ۳، ۵، ۷ و ۱۴ روز پس از کشت در محیط مایع نیز مورد ارزیابی قرار گرفت.

۱۷-۲ تست عصاره‌های قارچ *T. harzianum* 1103 و *Aspergillus Sp.* به منظور بررسی اثر

بازدارندگی بر روی آنزیم ترنسکریپتاز معکوس^۱

در این تست فعالیت آنتاگونیستی هر یک از قارچ‌های *T.harzianum* 1103 و *Aspergillus Sp.* بر روی آنزیم ترنسکریپتاز معکوس مورد ارزیابی قرار گرفت. هدف از انجام این تست بررسی اثر ضد ویروسی عصاره‌های قارچی بوده است.

۲-۱۷-۱ استخراج RNA

در این پژوهش برای استخراج RNA از کیت RNX-plus (سیناژن/ایران) استفاده شد. استخراج برطبق دستورالعمل زیر صورت گرفت.

ابتدا مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از باکتری زانتوموناس سویه NIGEB-88 رسوب داده شد. در حقیقت به مدت ۱۰ دقیقه در $8000 \times g$ سانتریفیوژ شد تا رسوب ایجاد شود. بعد مایع رویی را بیرون ریخته و رسوب برداشته شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از محلول RNX-plus به رسوب باکتری اضافه شد (محلول RNX-plus باید روی یخ نگهداری شود). ۱۰-۵ ثانیه مخلوط فوق ورتکس شد و در نهایت به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. در این مرحله ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به مخلوط فوق اضافه شد. سپس روی یخ به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت. در مرحله بعد در دور $12000 \times g$ و دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ سانتریفیوژ شد. سپس فاز بالایی به یک تیوب استریل دیگر اضافه شد و به مقدار برابر ایزوپروپانول اضافه شد. به آرامی آن را تکان داده و روی یخ به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد. مخلوط فوق در $12000 \times g$ در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس سوپرناتانت را دور ریخته و ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۵ درصد به آن اضافه شد. درانتها در ۴ درجه سلسیوس به مدت ۸ دقیقه در $7500 \times g$ سانتریفیوژ شد. سوپرناتانت را دور ریخته و اجازه داده شد رسوب در زمان کم در دمای اتاق خشک شود. در پایان کار رسوب در ۵۰ میکرولیتر آب DEPC^۱ حل شد. برای کمک به حل رسوب آن را در ۶۰-۵۵ درجه سلسیوس در Hot plate به مدت ۱۰ دقیقه قرار دادیم. RNA را باید پس از استخراج در دمای ۷۰- درجه سلسیوس قرار داده شود.

۲-۱۷-۲ سنتز cDNA

1 - Diethylpyrocarbonate

غلظت RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ اندازه گرفته شد. در مرحله ابتدایی مطابق با جدول (۲-۵) محتویات Master I را با یکدیگر مخلوط می‌کنیم و به مدت ۵ دقیقه در دمای °C ۶۵ قرار می‌دهیم. در مرحله بعد محتویات Master II را به میکروتیوب‌های حاوی Master I اضافه می‌کنیم. در نهایت به مدت ۱۰ دقیقه وبال‌ها در دمای ۲۵ درجه سلسیوس، و به مدت ۱ ساعت در دمای °C ۴۲ قرار داده شد. در پایان کار cDNA سنتز شده را در دمای °C ۲۰- قرار می‌دهیم. در این تست برای بررسی اثر آنتاگونیستی عصاره‌ی هر دو قارچ *T. harzianum* 1103 و *Aspergillus Sp.* بر ترنسکریپتاز معکوس، ابتدا مقدار ۰/۵ میکرولیتر از RT و ۰/۵ میکرولیتر از هر دو عصاره به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ انکوبه شدند تا تأثیر آن بر فعالیت ترنسکریپتاز معکوس و در نهایت سنتز cDNA مورد ارزیابی قرار بگیرد. سپس همانطور که شرح داده شد، سنتز cDNA صورت گرفت. برای تشخیص سنتز cDNA و اطمینان از سلامت آن برای نمونه cDNA سنتز شده PCR گذاشته شد. واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای 16S rRNA انجام شد (جدول ۲-۵، ۲-۶ و ۲-۷).

۱۸-۲ SDS-PAGE Tris -Tricine

SDS-PAGE روشی کم هزینه، سریع و تکرار پذیر در مطالعه پروتئین‌ها است. این روش به طور معمول برای بررسی مراحل خالص سازی، محاسبه مقدار نسبی و تعیین وزن مولکولی پروتئین‌ها و پپتیدها به کار می‌رود. این روش را می‌توان با هدف خالص سازی مقادیر کم پروتئین‌ها نیز به کار برد. در این نوع ژل به جای استفاده از گلیسین، از تریسین در بافر الکتروود استفاده می‌شود. تریسین به دلیل حرکت الکتروفورزی سریعتر نسبت به گلیسین باعث می‌شود تا کمپلکس‌های پپتید- SDS بهتر تفکیک گردند. در ضمن این ماده برخلاف گلیسین در آزمایشاتی همچون تعیین توالی اسیدهای آمینه اختلال ایجاد نمی‌کند.

ژل مورد استفاده برای جداسازی در این پژوهش با روش فوق دارای سه قسمت پایینی، میانی و بالایی است که در آن درصد ¹T به ترتیب از پایین به بالا شامل ۱۶/۵ ، ۱۰ و ۴ درصد می‌باشد.

جدول ۲-۴ محتویات ترکیبات به کار رفته در هر یک از Masterها

| ترکیبات موجود در هر یک از Master ها | | غلظت |
|-------------------------------------|-----------------------|--------|
| Master I | RNA | 5 µl |
| | Random hexamer | 0.5 µl |
| | DEPC water | 6.5 µl |
| Master II | 5x Buffer | 4 µl |
| | dNTP | 2 µl |
| | Reverse Transcriptase | 1 µl |
| | RNase Inhibitor | 0.5 µl |

| جدول ۵-۲ ترکیبات واکنش PCR | |
|----------------------------|------------------------|
| ترکیبات | مقدار بر حسب میکرولیتر |
| بافر 10 x PCR | ۲/۵ |
| (50 mM) MgCl ₂ | ۰/۷۵ |
| (10 mM) dNTP | ۰/۵ |
| آغازگر Forward (10 pmol) | ۱ |
| آغازگر Reverse (10 pmol) | ۱ |
| Template (cDNA) | ۲ |
| Taq DNA polymerase | ۰/۵ |
| ddH ₂ O | ۱۵/۵ |

| جدول ۶-۲ برنامه PCR استفاده شده برای تکثیر توالی cDNA | | | |
|---|------|-------|------------|
| مرحله | دما | زمان | تعداد سیکل |
| واسرشته سازی اولیه | ۹۴°C | ۵ min | ۱ |
| واسرشته سازی | ۹۴°C | ۳۰ s | |
| اتصال | ۵۷°C | ۴۵ s | ۳۵ |
| طویل شدن | ۷۲°C | ۹۰ s | |
| طویل شدن نهایی | ۷۲°C | ۵ min | ۱ |

چگونگی آماده‌سازی هر یک از بافرهای مورد نیاز برای این شیوه الکتروفورز، در ذیل آورده شده است:

محلول استوک اکریل آمید. ۲۹/۴ گرم اکریل آمید و ۰/۹ گرم بیس اکریل آمید را در زیر هود وزن کرده و در آب مقطر تا حجم نهایی ۱۰۰ میلی‌لیتر حل می‌کنیم سپس محلول را صاف و در ظرف تیره در یخچال نگهداری می‌شود. C^۱ و T در این محلول به ترتیب ۳۰ و ۳ درصد است.

بافر ژل پایین و میانی. ۳۶/۴ گرم تریس باز و ۰/۳ گرم SDS را در حدود ۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده، pH آن را با اسید کلریدریک غلیظ حدود ۳ مولار به ۸/۹ می‌رسانیم. سپس آب مقطر تا حجم نهایی ۱۰۰ میلی‌لیتر اضافه می‌شود. غلظت تریس در این بافر ۳ مولار است.

بافر ژل بالا. ۶ گرم تریس باز را در حدود ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده و pH آن را با اسید کلریدریک ۲ مولار به ۶/۸ می‌رسانیم. سپس آب مقطر تا حجم نهایی ۱۰۰ میلی‌لیتر اضافه می‌کنیم. غلظت تریس در این بافر ۰/۵ مولار است.

بافر کاند (مخزن بالا). ۱۲/۱ گرم تریس باز، ۱۷/۹ گرم تریسین^۱ و ۱ گرم SDS را در یک لیتر آب مقطر حل می‌کنیم. pH این محلول حدود ۸/۲ است و نیازی به تنظیم ندارد. غلظت تریس، تراپسین و SDS در این بافر به ترتیب ۰/۱ مولار، ۰/۱ مولار و ۰/۱ درصد (W/V) است. تفاوت SDS-PAGE Tris Glycine با روش اخیر در همین قسمت محلول سازی است. چرا که در آن جا به جای استفاده از تراپسین از گلاپسین استفاده می‌شود.

۱ - ۱۰۰ × گرم (اکریل آمید + بیس) / گرم (بیس) = % C - 1

2- Tricine: N-tris[hydroxymethyl]methylglycine

بافر آند (مخزن پایین). ۲۴/۲ گرم تریس باز را در حدود نیم لیتر آب مقطر حل کرده و pH آن را با اسید کلریدریک ۱ یا ۲ مولار به ۸/۹ می‌رسانیم. سپس آب مقطر تا حجم نهایی یک لیتر اضافه می‌کنیم. غلظت تریس در این بافر حدود ۰/۲ مولار است.

بافر نمونه (۲x). شامل ۰/۲ گرم SDS، ۱/۲۵ میلی‌لیتر بافر ژل بالا، ۱ میلی‌لیتر گلیسرول و ۷/۵ میلی‌لیتر آب مقطر است. پس از مخلوط کردن اجزای فوق چند کریستال برموفنول بلو اضافه می‌کنیم تا محلول آبی رنگ شود.

محلول EDTA ۰/۲ مولار. ۰/۱۵۲ گرم EDTA (نمک دارای چهار سدیم) را در ۲ میلی‌لیتر آب مقطر حل می‌کنیم.

محلول پر سولفات آمونیوم ۱۰ درصد. ۰/۱ گرم پر سولفات آمونیوم در ۱ میلی‌لیتر آب مقطر حل می‌کنیم (این محلول بایستی تازه باشد).

محلول TEMED^۱ ۱۰ درصد. ۰/۱ میلی‌لیتر TEMED در ۰/۹ میلی‌لیتر آب مقطر حل می‌کنیم. این محلول نیز بایستی تازه باشد.

۱۹-۲ تشخیص پروتئین دارای خاصیت کنترل کنندگی با استفاده از الکتروبلاتینگ^۲

در این روش ابتدا الکتروفورز (USA, Bio-Rad) به شیوه PAGE انجام گرفت. اصول انجام PAGE مشابه روش SDS PAGE Tris-Tricine است. تنها تفاوت آن در نحوه آماده سازی ژل است. که در پیوست، جداول مربوط به تهیه ژل آن آورده شده است. سپس باندهای پروتئینی جدا شده به وسیله الکتروفورز، از روی ژل به غشای نیتروسلولوزی، در طی ۲۴ ساعت منتقل شدند. در نهایت غشا

1 - Tetramethylethylenediamine

2 - Electroblothing

را از ژل جدا کرده و با استفاده از یک اسکالپل تمیز نواحی مربوط به باندهای پروتئینی برش داده شد و روی سطح پلیتی که با ۱۰۰ میکرولیتر باکتری زانتوموناس سویه 88 - NIGEB کشت داده شده بود، قرار گرفت.

۲-۲۰ تخلیص پروتئین

۱-۲۰-۲ جداسازی و تخلیص پروتئین با استفاده از HPLC^۱

HPLC ابزاری قدرتمند جهت جمع آوری اطلاعات کمی و کیفی برای شناخت و ارزیابی واکنش‌های شیمیایی و جداسازی محصولات این واکنش‌ها است. در HPLC فاز ثابت از جنس جامد و فازمتحرک مایع است. از مزایای این تکنیک کم بودن زمان کروماتوگرافی، قدرت تفکیک بالا و حساسیت بالا است. حساسیت این روش به قدری است که مقادیر در حد پیکومول نیز با این روش قابل تفکیک هستند. در این ارزیابی ستون C₁₈ به عنوان فاز ثابت و آب و استونیتریل به عنوان فاز متحرک استفاده شد. ستون C₁₈ عمدتاً به عنوان فاز ثابت در نظر گرفته می‌شود چرا که نسبت به سایر ستون‌ها (C₈ یا C₄ و ...) خاصیت آگریزی بیشتری دارد و می‌تواند با بسیاری از ترکیبات تعامل داشته باشد. لازم به توضیح آن‌که در فاز آنالایتیکال HPLC تنها تعیین کمیت و کیفیت ترکیب مد نظر قرار می‌گیرد این در حالی است که در فاز Preparative جداسازی و خالص سازی مقدار قابل توجهی از محصول در نظر گرفته می‌شود (هیوبر، ۲۰۰۷). شرایطی که در دو مرحله Analytical و Preparative مورد استفاده قرار گرفت، در جدول (۲-۴) آورده شده است. نکته قابل توجه آن‌که، حجم محلول تزریقی در مرحله آنالایتیکال ۵۰ میکرولیتر و در مرحله Preparative، ۱۰۰۰ میکرولیتر بوده

1- High Performance Liquid Chromatography

جدول ۲-۷ شرایطی که در HPLC به شیوه Analytical و Preparative استفاده شد.

| | Analytical | Preparative |
|------------------------------------|---|---|
| نوع ستون | C ₁₈ | C ₁₈ |
| Flow (میلی لیتر در دقیقه) | ۱ | ۲۰ |
| طول موج | ۲۲۰ | ۲۲۰ |
| سایز ستون (میلی متر) | ۲۵۰ | ۱۵۰ |
| قطر داخلی (میلی متر) | ۴/۲ | ۲۱/۲ |
| سایز ذرات C ₁₈ (میکرون) | ۵ | ۵ |
| شیب گرادیانت | از ۱۰٪ استونیتریل شروع و به ۶۰٪ ختم شد. | از ۱۰٪ استونیتریل شروع و به ۶۰٪ ختم شد. |

فصل سوم

نتیج

همانطور که در بخش (۱-۲) شرح داده شد، پس از بررسی پایگاه (aps.unmc.edu) و تقسیم‌بندی توالی‌های آنتی‌باکتریال پپتیدی در گروه‌های مختلف به این نتیجه رسیدیم که می‌توان از قارچ‌ها به عنوان منبعی برای بررسی خصوصیات آنتاگونیستی بهره جست. جدول (۱-۳) پپتیدها و پروتئین‌های آنتی‌باکتریال گزارش شده از موجودات مختلف را نشان می‌دهد. نکته قابل توجه آن‌که بررسی‌های ما نشان داد تاکنون تنها از ۳ قارچ این توالی‌های پروتئینی و پپتیدی جدا شده است.

همانطور که در قسمت مواد و روش‌ها شرح داده شد به منظور تعیین موتیف‌های^۱ مشترک در بین توالی‌های ضد میکروبی قارچی و سایر توالی‌های مربوط به موجودات مختلف، همه توالی‌های ضد میکروبی با یکدیگر هم‌ردیف شدند. بررسی‌های ما نشان داد که این توالی‌ها همولوژی بسیار کمی با یکدیگر دارند و این می‌تواند بیانگر این مهم باشد که هر توالی ضد میکروبی با ماهیت پپتیدی یا پروتئینی برای عملی خاص در طبیعت تکامل یافته است. در شکل (۱-۳) بخشی از هم‌ردیفی مربوط به توالی‌های ضد میکروبی حشره‌ای و قارچی آورده شده است. رسم درختچه‌های فیلوژنتیکی نیز مؤید عدم وجود موتیف مشترک بین توالی‌های قارچی با سایر موجودات بود (شکل ۲-۳).

۱-۳ شناسایی عصاره‌های دارای خاصیت آنتاگونیستی

پس از انجام تست آنتی‌باکتریالی نتایج و بررسی‌های اولیه بر روی سویه NIGEB-88 باکتری زانتوموناس با استفاده از عصاره خام ۲۰ قارچ مورد آزمون در این پژوهش، نشان داد ۲ قارچ خاصیت کنترل‌کنندگی بیشتری نسبت به سایرین دارند. از این دو قارچ، قارچ شماره ۳ جدایه و قارچ شماره ۱۶، *Trichoderma harzianum* 1103 اهدایی از موسسه گیاهپزشکی کشور بود. نتایج انجام این تست آنتی‌باکتریالی در جدول (۲-۳) آورده شده است.

جدول ۱-۳ پپتیدهای آنتی‌باکتریال جدا شده از موجودات مختلف (aps.unmc.edu)

| نام موجود | تعداد پروتئین و پپتید آنتی‌باکتریال |
|--------------|-------------------------------------|
| حیوانات | ۸۲۷ |
| حشرات | ۱۶۷ |
| باکتری‌ها | ۱۴۳ |
| گیاهان | ۶۲ |
| انسان | ۴۹ |
| پرندگان | ۳۲ |
| سخت پوستان | ۲۹ |
| سنتتیک | ۲۶ |
| عنکبوتیان | ۲۱ |
| نماتد | ۱۶ |
| تک سلولی‌ها | ۹ |
| قارچ‌ها | ۳ |
| مجموع | ۱۳۸۴ |

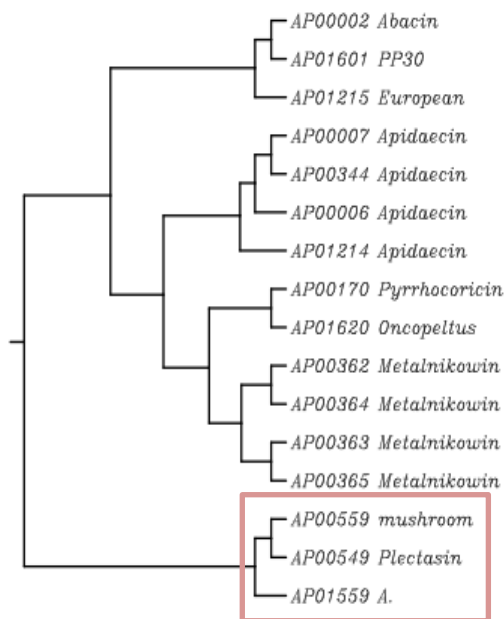
```

AP00002_Abacin -----YVPLPNVPQPGRRPFTFPQGPFNPKIKWP-QGY
AP01601_PP30_ -----YVPPVQKPHPNGPKFPTFP-----
AP01215_European -----FVPYNPPRPYQSKPFPSFPGHGPFNPKIQWP-YPL
AP00007_Apidaecin -----GNNRPVYIPQPRPPHPRL-----
AP00344_Apidaecin -----GNNRPYIPQPRPPHPRL-----
AP00006_Apidaecin -----GNNRPVYIPQPRPPHPRI-----
AP01214_Apidaecin -----GNNRPVYIPPPRPPHPRL-----
AP00170_Pyrrhocoricin -----VDKGSYLPRPTPPRIYNNR-----
AP01620_Oncopeltus -----VDKPPYLPRPPPPRIYNNR-----
AP00362_Metalnikowin -----VDKPDYRPRRPNNM-----
AP00364_Metalnikowin -----VDKPDYRPRPWPRNMI-----
AP00363_Metalnikowin -----VDKPDYRPRPWPRPN-----
AP00365_Metalnikowin -----VDKPDYRPRPWPRNNM-----
AP00559_mushroom -----ATRVVYCNRRSGSVVGGDDTVYEG-----
AP00549_Plectasin -----GFGCNGPWEDDMQCHNHCKSIKGYKGGYCAKGGF-VCK
AP01559_A. ATYDGKCYKKNICKYKAQSGKTAICKCYVKVCPRDGAKCEFDYSYKGCY
    
```

```

AP00002_Abacin -----
AP01601_PP30_ -----
AP01215_European PNPNGH
AP00007_Apidaecin -----
AP00344_Apidaecin -----
AP00006_Apidaecin -----
AP01214_Apidaecin -----
AP00170_Pyrrhocoricin -----
AP01620_Oncopeltus -----
AP00362_Metalnikowin -----
AP00364_Metalnikowin -----
AP00363_Metalnikowin -----
AP00365_Metalnikowin -----
AP00559_mushroom -----
AP00549_Plectasin CY---
AP01559_A. C---
    
```

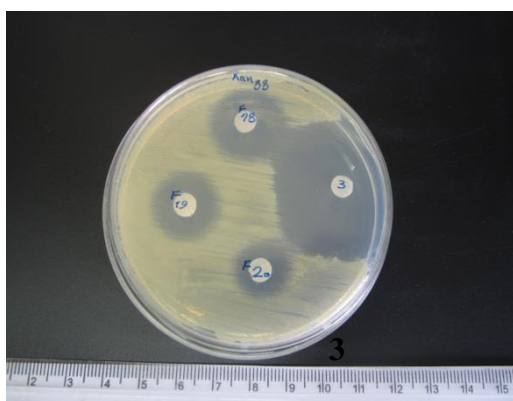
شکل ۳-۱ نمونه‌ای از همردیفی چندگانه بین توالی‌های ضد میکروبی قارچی و حشرات- همانطور که در تصویر فوق مشخص است هیچ شباهتی بین توالی‌های ضد میکروبی قارچی و حشره‌ای وجود ندارد. از الگوریتم ClastalW برای ترسیم همردیفی چندگانه استفاده شد. نواحی پررنگ شده مربوط به توالی‌های قارچی می‌باشد.



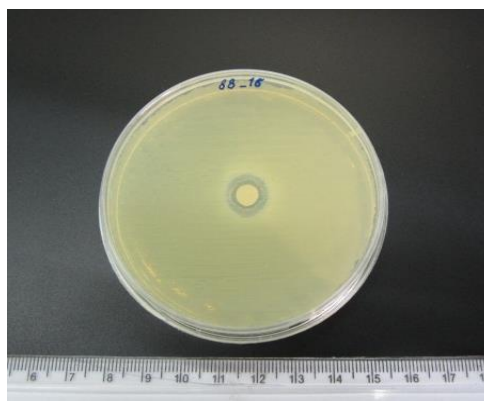
شکل ۳-۲ قرار گرفتن قارچ‌ها در شاخه‌ای جداگانه بیانگر عدم شباهت آن‌ها با توالی‌های ضد میکروبی حشره‌ای است.

جدول ۲-۳ میزان ناحیه بازدارنده عصاره خام ۲۰ قارچ مورد بررسی در این پژوهش

| قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر) | کد قارچ |
|---------------------------------|---------|
| سویه NIGEB-88 باکتری زانتوموناس | |
| ۰ | ۰۱ |
| ۰ | ۰۲ |
| ۳۰ | ۰۳ |
| ۰ | ۰۴ |
| ۰ | ۰۵ |
| ۰ | ۰۶ |
| ۰ | ۰۷ |
| ۰ | ۰۸ |
| ۰ | ۰۹ |
| ۰ | ۰۱۰ |
| ۰ | ۰۱۱ |
| ۰ | ۰۱۲ |
| ۰ | ۰۱۳ |
| ۱۰ | ۰۱۴ |
| ۰ | ۰۱۵ |
| ۱۵ | ۰۱۶ |
| ۰ | ۰۱۷ |
| ۰ | ۰۱۸ |
| ۰ | ۰۱۹ |
| ۰ | ۰۲۰ |



ب

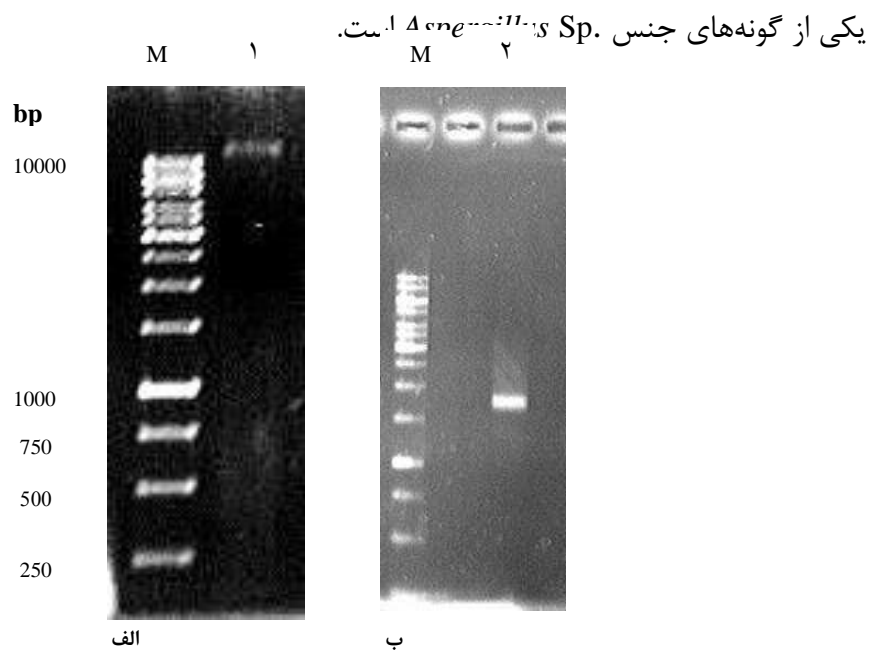


الف

شکل ۲-۳ بررسی خاصیت آنتاگونیستی عصاره خام الف: قارچ *Trichoderma harzianum* 1103 ب: جدایه شماره ۳

۲-۳ شناسایی جدایه قارچی شماره ۳

پس از تأیید کیفیت محصول PCR با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز، محصول PCR با استفاده از کیت Roche (Penzberg/Germany) خاص و برای تعیین توالی به شرکت ژن فناوریان فرستاده شد. نتیجه توالی‌یابی حاصل پس از انجام BLAST در سایت NCBI نشان داد که توالی حاصل مربوط به



شکل ۳-۳ الف: الکتروفورز ژل آگارز DNA استخراجی از جدایه شماره ۳ ب: الکتروفورز ژل آگارز محصول PCR حاصل از تکثیر توالی 18S rRNA از جدایه قارچی شماره ۳ ، M ، مارکر، ۱. DNA استخراجی از جدایه ۳ ، ۲. توالی ناحیه 18S rRNA

۳-۳ بررسی طیف بازدارندگی سکروتوم قارچ *Trichoderma harzianum* 1103 و

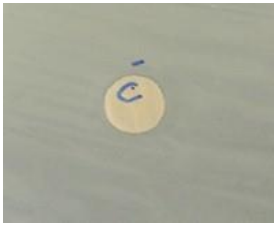
Aspergillus Sp.

طیف بازدارندگی ترکیب ضد میکروبی سکروتوم قارچ *Trichoderma harzianum* 1103 و

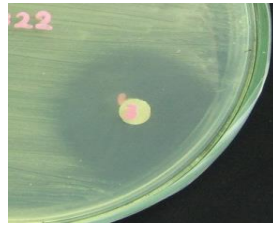
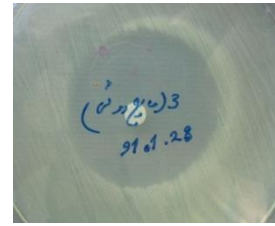
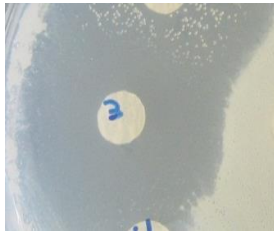
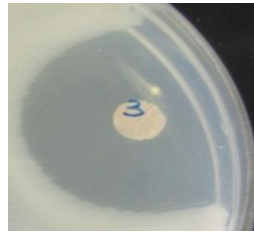
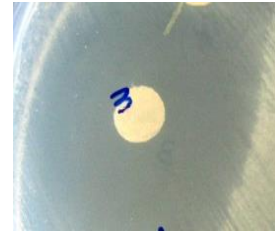
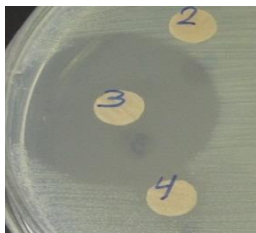
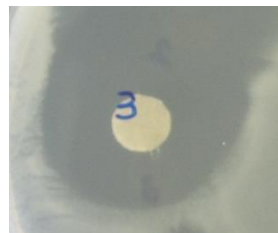
Aspergillus sp. بر علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی دیگر از جمله باکتری *Bacillus*

Staphylococcus aureus ، *Pseudomonas fluorescens* ، *Erwinia amylovora* ، *subtilis*

citri باکتری NIGEB-9322 همین‌طور سویه *Escherichia coli* و *Salmonella typhi* نیز بررسی شد (شکل ۳-۴ و ۳-۵). همچنین برای بررسی اثر ضد قارچی فعالیت آن‌ها بر روی دو قارچ *Macrophomina phaseolina* و *Rhizoctonia solani* مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۳-۶).



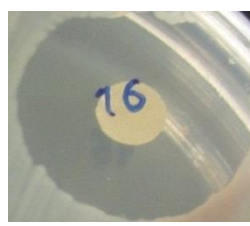
C

*Xanthomonas citri* NIGEB-9322*Cronobacter* Sp. DGH1*Salmonella typhi**Erwinia amylovera**Staphylococcus aureus**Pseudomonas fluorescens**Bacillus subtilis*

شکل ۳-۴ بررسی اثر آنتاگونیستی سکروتوم *Aspergillus* Sp. بر روی *Erwinia amylovera*، *Bacillus subtilis*، *Salmonella typhi*، *Staphylococcus aureus*، *Pseudomonas fluorescens* و *X. citri* (NIGEB-9322) و *Cronobacter* Sp. DGH1

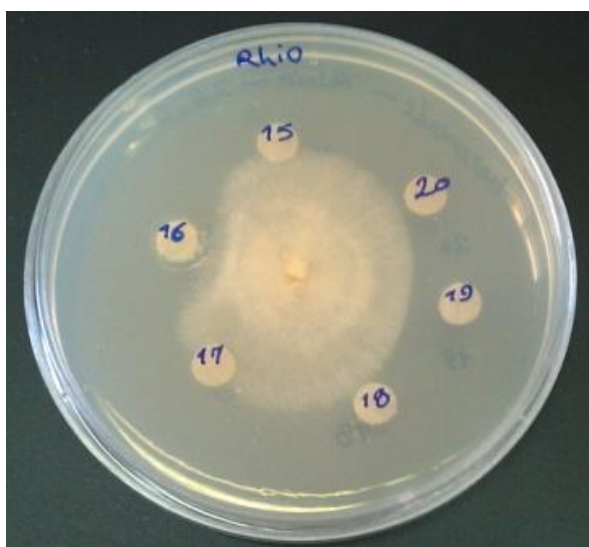


C

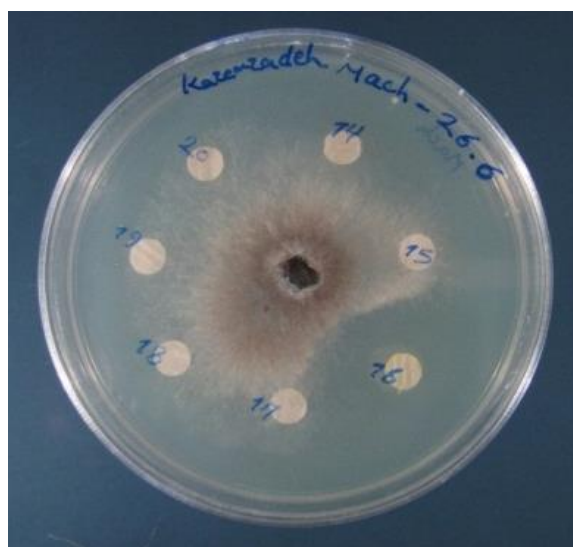
*Salmonella typhi**Escherichia coli**Staphylococcus aureus**Bacillus subtilis*

شکل ۳-۵ بررسی خاصیت آنتاگونیستی سکروتوم قارچ 1103 *T. harzianum* بر روی *Bacillus subtilis*

Escherichia coli ، *Salmonella typhi* ، *Staphylococcus aureus*



Rhizoctonia solani



Macrophomina phaseolina

شکل ۳-۶ بررسی خاصیت آنتاگونیستی سکروتوم قارچ 1103 *T.harzianum* بر روی دو قارچ پاتوژن *Rhizoctonia solani* و *Macrophomina phaseolina* سکروتوم قارچ *Aspergillus Sp.* اثری بر روی این دو قارچ نداشته است.

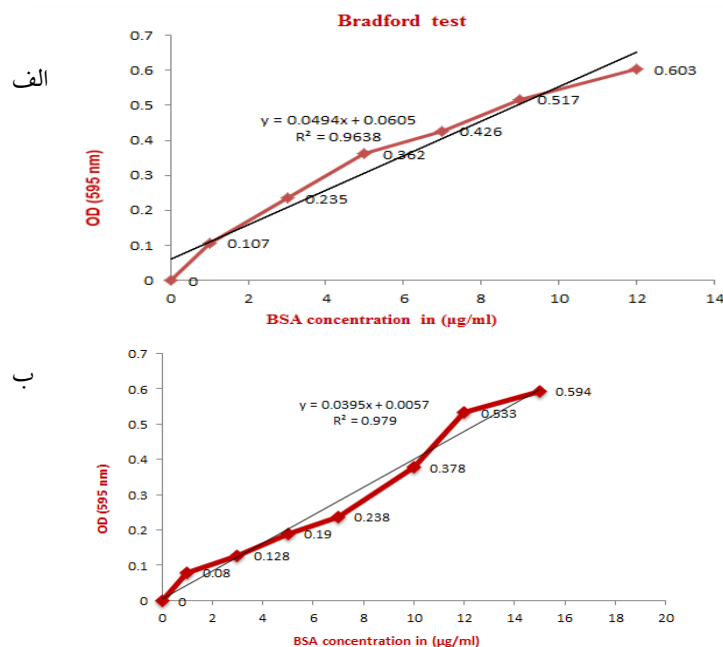
۳-۴ بررسی اثر آنتاگونیستی دو عصاره قارچی دارای خاصیت آنتاگونیستی بر روی سایر

سویه‌های زانتوموناس

عصاره دو قارچ *Trichoderma harzianum* 1103 و *Aspergillus Sp.* بر روی ۲۶ سویه بیماری-زای دیگر از زانتوموناس مورد تست واقع شدند. در جدول (۳-۳) میزان ناحیه کنترل کننده توسط هر یک آورده شده است. بخشی از تصاویر مربوط به انجام این تست نیز در شکل (۳-۸ و ۳-۹) آورده شده است.

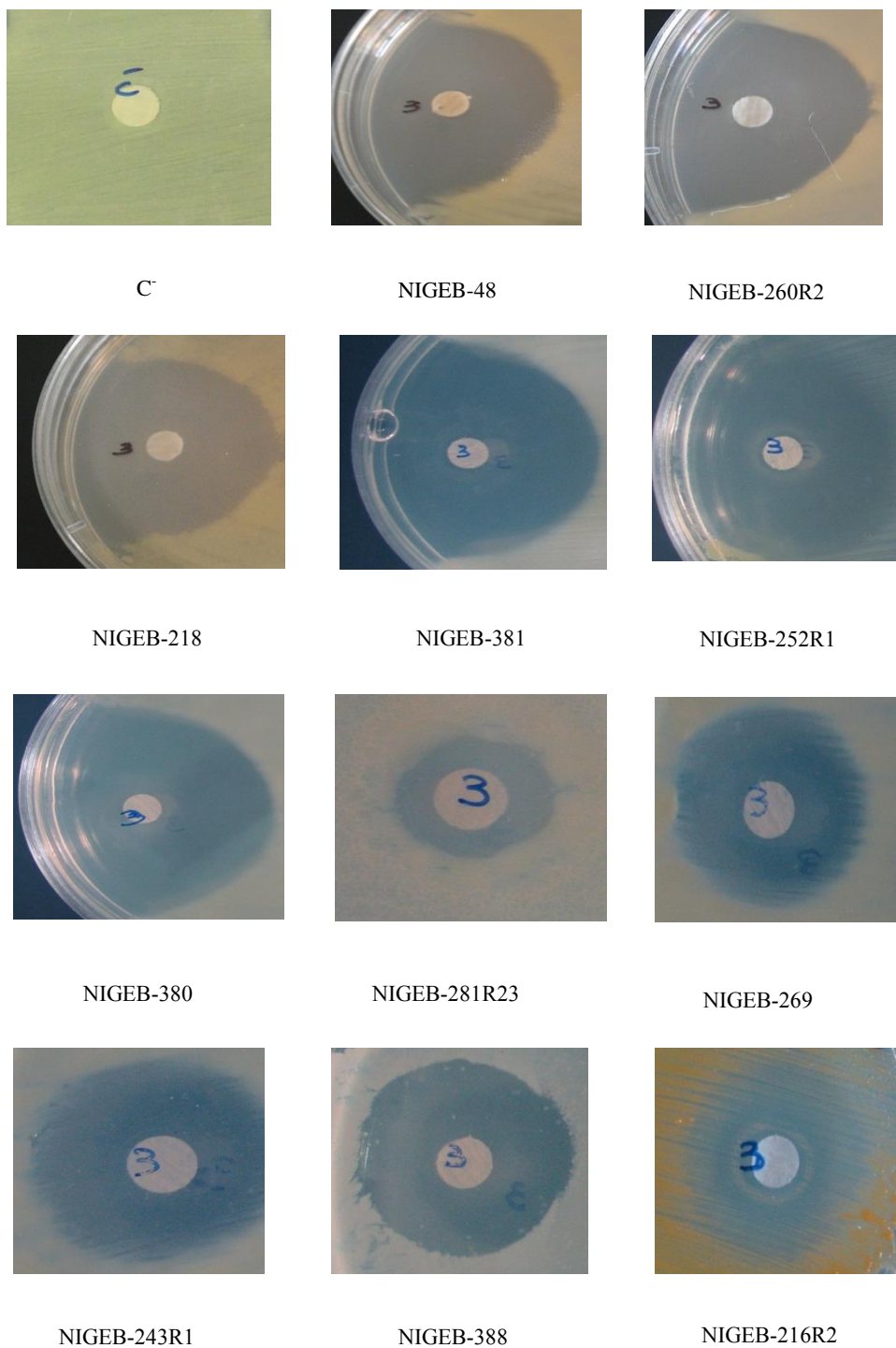
۳-۵ تعیین غلظت پروتئین به روش بردفورد

برای بررسی میزان پروتئین موجود در سکروتوم قارچ‌های دارای خاصیت آنتاگونیستی، میزان غلظت پروتئین موجود در عصاره با استفاده از روش بردفورد مورد بررسی قرار گرفت. در شکل (۳-۷) منحنی مربوط به این تست آورده شده است. این میزان برای قارچ *T. harzianum* 1103 ۳/۴ میکروگرم در میلی‌لیتر و برای قارچ *Aspergillus sp.* ۱/۰۲ میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آمد.



شکل ۳-۷ منحنی مربوط به تست بردفورد الف: قارچ *Aspergillus sp.* ، ب: *Trichoderma harzianum* 1103

| جدول ۳-۳ میزان ناحیه بازدارنده دو عصاره قارچی برای سویه‌های مختلف زانتوموناس | | | |
|--|---------------|-------------------------------------|------------------------|
| ردیف | نام سویه | قطر ناحیه بازدارنده بر حسب میلی‌متر | |
| | | <i>Trichoderma harzianum</i> 1103 | <i>Aspergillus</i> Sp. |
| ۱ | NIGEB-213R1 | ۱۰ | ۲۵ |
| ۲ | NIGEB-243R2 | ۱۰ | ۱۵ |
| ۳ | NIGEB-31 | ۱۲ | ۱۶ |
| ۴ | NIGEB-287R1 | ۱۱ | ۲۲ |
| ۵ | NIGEB-A2L3R1L | ۱۰ | ۱۳ |
| ۶ | NIGEB-213R2 | ۱۵ | ۳۵ |
| ۷ | NIGEB-281R23 | ۱۲ | ۱۶ |
| ۸ | NIGEB-216R2 | ۱۱ | ۲۵ |
| ۹ | NIGEB-228R1 | ۱۰ | ۲۰ |
| ۱۰ | NIGEB-244R1 | ۷ | ۱۷ |
| ۱۱ | NIGEB-266R2 | ۷ | ۱۰ |
| ۱۲ | NIGEB-243R1 | ۶ | ۱۱ |
| ۱۳ | NIGEB-384 | ۶ | ۱۰ |
| ۱۴ | NIGEB-170 | ۱۰ | ۱۵ |
| ۱۵ | NIGEB-232 | - | ۲۰ |
| ۱۶ | NIGEB-385 | ۶ | ۲۰ |
| ۱۷ | NIGEB-48 | - | ۳۵ |
| ۱۸ | NIGEB-218 | - | ۳۵ |
| ۱۹ | NIGEB-9322 | ۱۳ | ۲۵ |
| ۲۰ | NIGEB-A252R1 | ۱۰ | ۴۰ |
| ۲۱ | NIGEB-388 | ۱۰ | ۲۲ |
| ۲۲ | NIGEB-380 | ۱۲ | ۳۵ |
| ۲۳ | NIGEB-260R2 | - | ۳۰ |
| ۲۴ | NIGEB-381 | ۱۰ | ۳۵ |
| ۲۵ | NIGEB-242R1 | ۱۱ | ۲۵ |
| ۲۶ | NIGEB-269 | ۱۱ | ۲۵ |



شکل ۳-۸ بررسی اثر آنتاگونیستی سکروتوم قارچ *Aspergillus Sp.* بر روی برخی از سویه‌های بیماری‌زای زانتوموناس



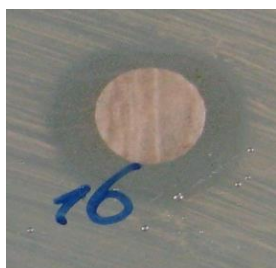
C



NIGEB-170



NIGEB-31



NIGEB-213R1



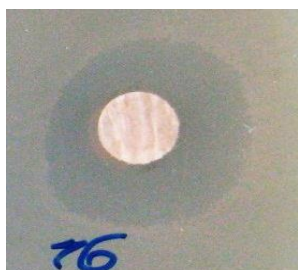
NIGEB-228R1



NIGEB-216R2



NIGEB-242R1



NIGEB-213R2



NIGEB-281R23

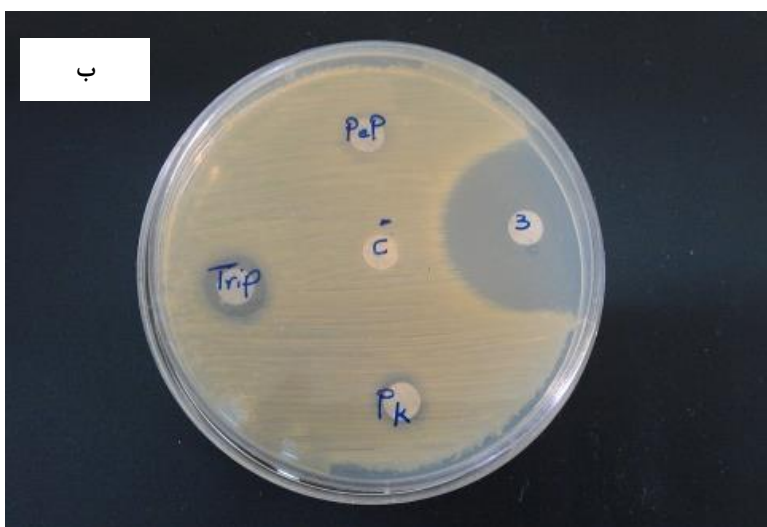
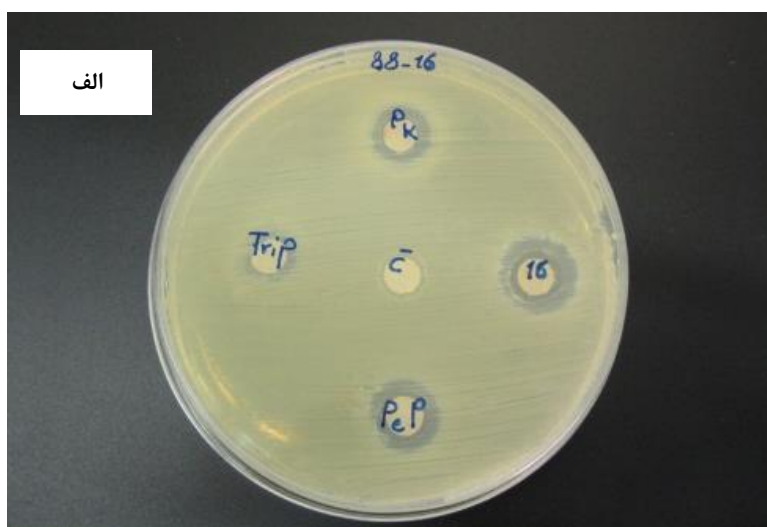
شکل ۳-۹ بررسی اثر آنتاگونیستی سکروتوم فارچ 1103 *T. harzianum* بر روی برخی از سویه‌های زانتوموناس

۶-۳ تأثیر پروتئازها بر فعالیت عصاره قارچی

عصاره قارچ *T. harzianum* 1103 به مدت یک ساعت و عصاره قارچ *Aspergillus* sp. به مدت ۲ ساعت با سه پروتئاز پپسین، تریپسین و پروتئیناز k مجاور شد. فعالیت هر دو عصاره در حضور پروتئازها با غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر کاهش یافته است (شکل ۱۰-۳). بنابراین انتظار می‌رود که عصاره قارچی ماهیت پروتئینی داشته باشد.

۷-۳ اثر دما، pH و مواد شیمیایی بر فعالیت عصاره های قارچی

برای بررسی خصوصیات ماده ضد میکروبی موجود در هر یک از عصاره‌های قارچی *T. harzianum* 1103 و *Aspergillus* Sp. فعالیت هر دو عصاره در طیف دمای ۵۰-۱۰۰ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ دقیقه بررسی شد. عصاره قارچ *T. harzianum* 1103 پس از ۱۵ دقیقه ماندن در دمای ۹۰ درجه سلسیوس به میزان قابل توجهی کاهش یافت اما خاصیت مهم عصاره *Aspergillus* Sp. پایداری در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس به مدت یک ساعت است (شکل ۳-۱۳). همچنین در طیف pH های تولیدی (۹-۴) هر دو عصاره پس از ۳۰ دقیقه مجاورت فعالیت خود را به خوبی حفظ کردند (شکل ۳-۱۲). ترکیب عصاره قارچ *Aspergillus* sp. با EDTA و SDS یک درصد نیز تغییری را در عملکرد آن ایجاد نکرد. این درحالی است که فعالیت عصاره قارچ *Trichoderma harzianum* 1103 در مجاورت با SDS کاهش یافت (شکل ۳-۱۱).

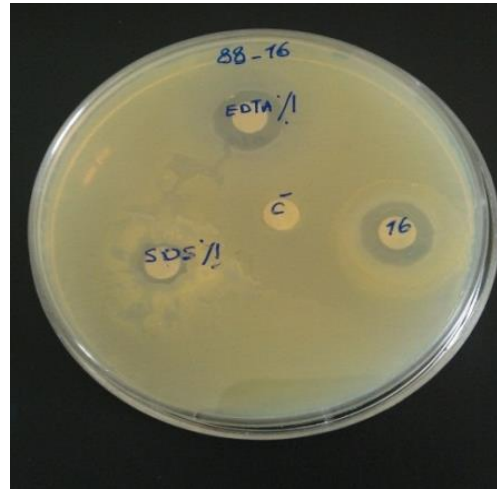


شکل ۳-۱۰ تأثیر سه پروتئاز پپسین، تریپسین و پروتئیناز k بر عصاره قارچ الف: *T. harzianum* 1103، ب:

Aspergillus sp.

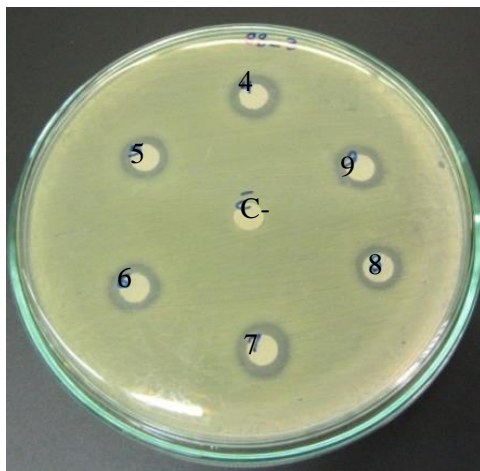


ب

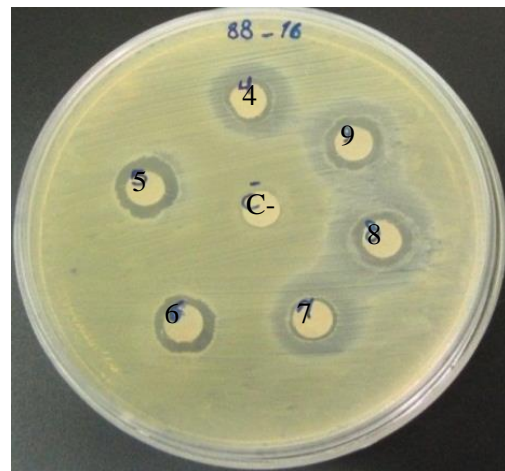


الف

شکل ۳-۱۱ بررسی اثر مواد شیمیایی SDS و EDTA بر روی الف: عصاره قارچ *T. harzianum* 1103، ب: عصاره قارچ *Aspergillus* Sp.

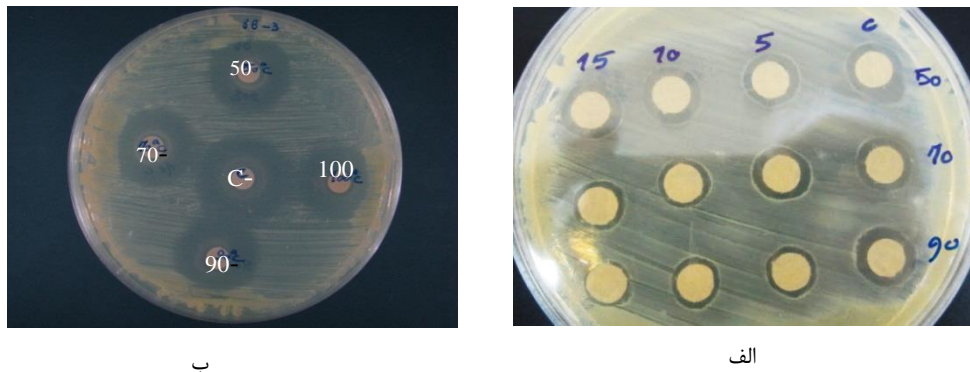


ب



الف

شکل ۳-۱۲ بررسی اثر عصاره قارچ *T. harzianum* 1103 بر سویه NIGEB-88 باکتری زانتوموناس در pHهای مختلف (الف) بررسی اثر عصاره قارچ *Aspergillus* sp. در pHهای مختلف (ب).



شکل ۳-۱۳ بررسی اثر عصاره قارچ الف: *T.harzianum* 1103 ب: *Aspergillus* Sp. بر سویه NIGEB-88 باکتری زانتوموناس در دماهای مختلف

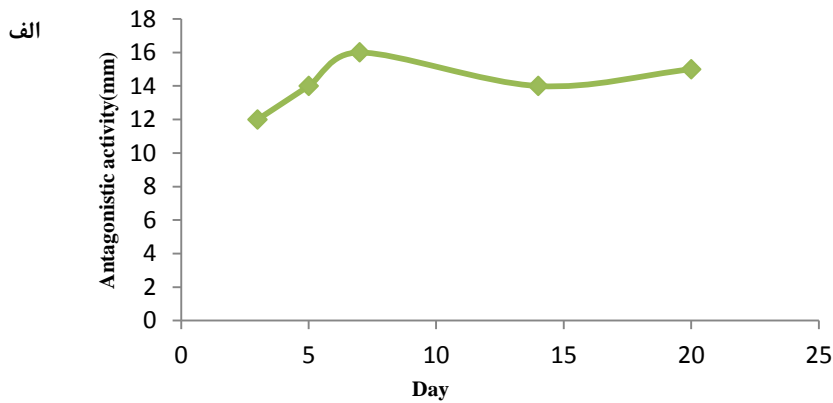
۳-۸ تعیین حداقل غلظت بازدارنده (Minimum Inhibitory Concentration)

این تست به روش Broth microdilution و در میکروپلیت الیزا انجام گرفت. حداقل غلظت بازدارنده برای عصاره *Trichoderma harzianum* 1103، ۲۶۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد. این در حالی است که این مقدار برای عصاره قارچ *Aspergillus* Sp.، ۱۲۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد. لازم به توضیح آن‌که MIC، بیان‌کننده کمترین غلظتی است که می‌تواند رشد باکتری را مهار کند.

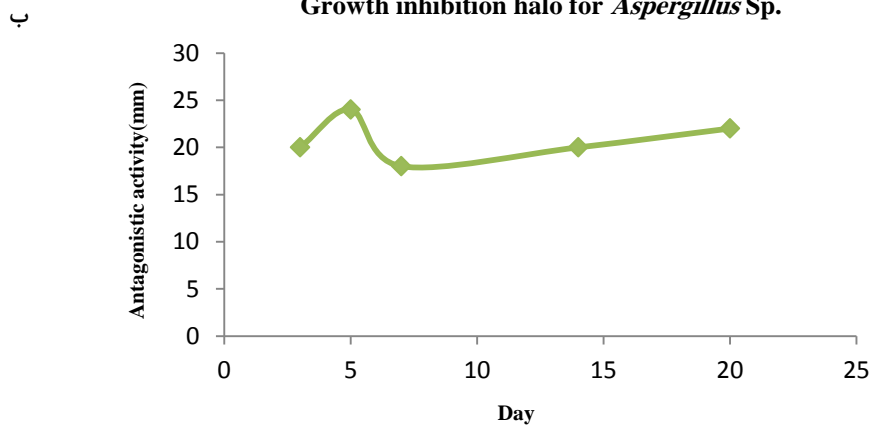
۳-۹ بررسی اثر زمان کشت بر تولید پروتئین‌های ضد میکروبی

همانطور که در قسمت مواد و روش‌ها شرح داده شد، میزان هاله عدم رشد هر دو قارچ *Aspergillus Sp.* و *Trichoderma harzianum* 1103 علاوه بر روز بیستم، در ۳، ۵، ۷ و ۱۴ روز پس از کشت نیز مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس مشاهدات ما و همانطور که در شکل (۳-۱۴) مشخص است، عملاً تفاوت معنی داری در قطر هاله عدم رشد در روزهای مختلف وجود ندارد.

Growth inhibition halo for *T. harzianum* 1103



Growth inhibition halo for *Aspergillus Sp.*



شکل ۳-۱۴ بررسی هاله عدم رشد در عصاره‌ی مربوط به روزهای ۳، ۵، ۷، ۱۴ و ۲۰ روز بعد از کشت در محیط مایع.

الف) *Aspergillus Sp.* (ب) *T. harzianum* 1103

۳-۱۰ تست عصاره‌های قارچ *T. harzianum* 1103 و *Aspergillus Sp.* به منظور بررسی اثر

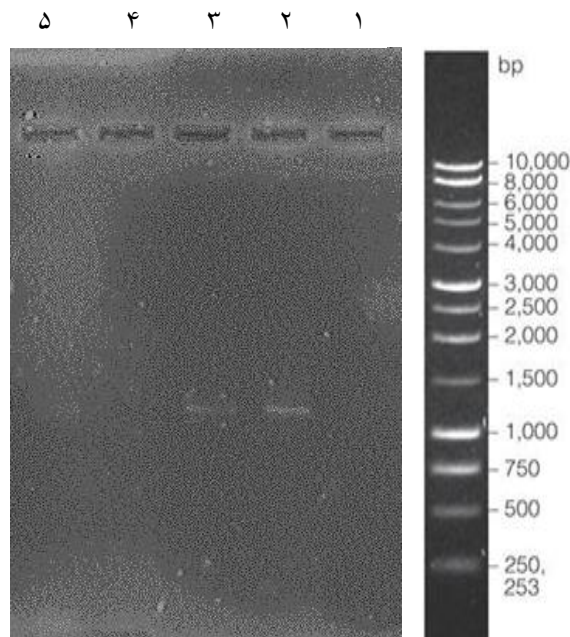
بازدارندگی بر روی آنزیم ترنسکریپتاز معکوس^۱

این تست به منظور بررسی اثر ضد ویروسی عصاره‌های قارچی بر روی آنزیم ترنسکریپتاز معکوس

انجام گرفت. همانطور که در تصویر (۳-۱۵) مشخص است، در حضور هر دو عصاره قارچ *Asprgillus*

Sp. و *T.harzianum* 1103 سنتز cDNA صورت نگرفته است و این بیانگر آن است که پروتئین‌های

ضد میکروبی یافته شده در این پژوهش خاصیت ضد ویروسی نیز دارند.

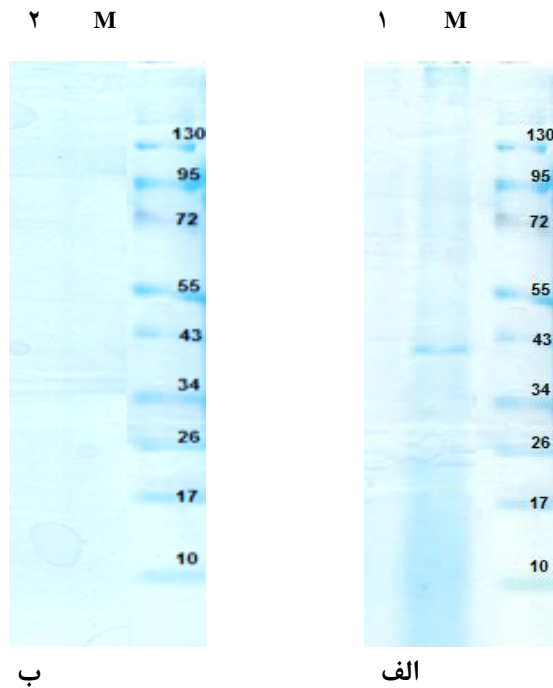


شکل ۳-۱۵: ۱: کنترل منفی، ۲ و ۳: کنترل مثبت، ۴: عدم سنتز cDNA پس از نیم ساعت مجاورت با سکروتوم قارچ

۵: عدم سنتز cDNA پس از نیم ساعت مجاورت با سکروتوم قارچ *Aspergillus Sp.*

۱۱-۳ SDS PAGE Tris-Tricine و تعیین الگوی پروتئینی برای عصاره‌های قارچی

برای بررسی الگوی پروتئینی عصاره‌های قارچی از SDS PAGE Tris-Tricin استفاده شد. در قارچ *Trichoderma harzianum* 1103 سه باند که بیان بالایی نداشتند دیده شد. این در حالیست که عصاره *Aspergillus* sp. هیچ باندهایی بر روی ژل SDS-PAGE نشان نداد. در شکل زیر سه باند ضعیف در ناحیه ۴۰، ۳۵ و ۲۶ کیلو دالتون برای عصاره قارچ *Trichoderma harzianum* 1103 دیده می‌شود



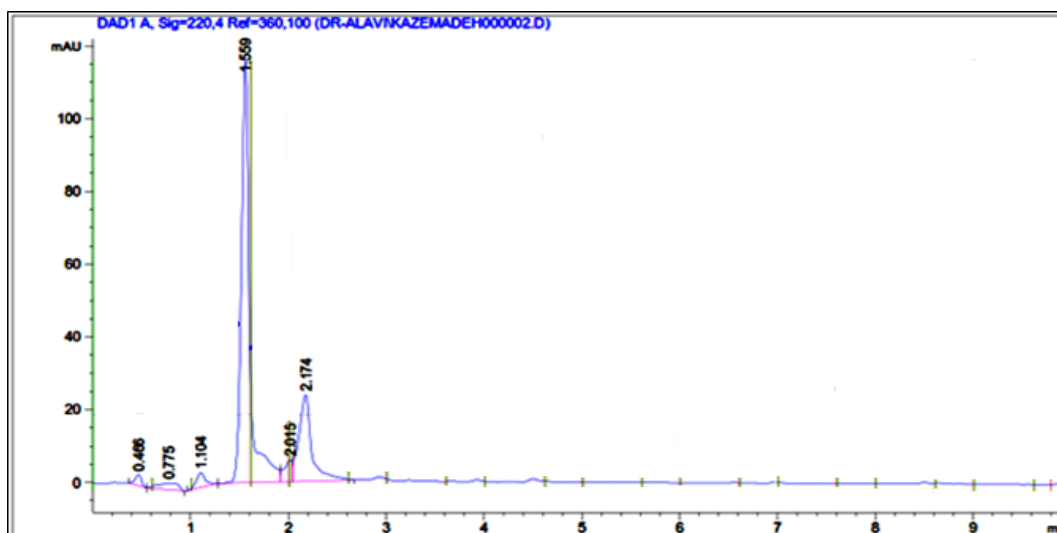
شکل ۱۶-۳ الف: ۱. ژل SDS-PAGE مربوط به سکروتوم قارچ *T. harzianum* 1103 ب: ۲. ژل مربوط به سکروتوم *Aspergillus* sp. همانطور که در تصویر مشخص است باندهایی دیده نمی‌شود. M: مارکر

۳-۱۲ تشخیص پروتئین دارای خاصیت کنترل کنندگی با استفاده از الکتروبلاتینگ

برای تعیین باند پروتئینی دارای خاصیت کنترل کنندگی پس از انتقال باندهای پروتئینی به غشای نیتروسلولوزی، غشا بریده شد و روی سطح پلیت کشت شده با باکتری زانتوموناس سویه NIGEB-88 قرار گرفت. انجام این تست برای تشخیص باند دارای خاصیت کنترل کنندگی نتیجه‌ای را در بر نداشت.

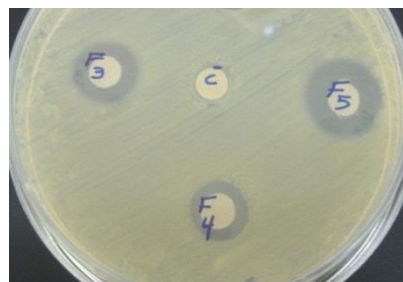
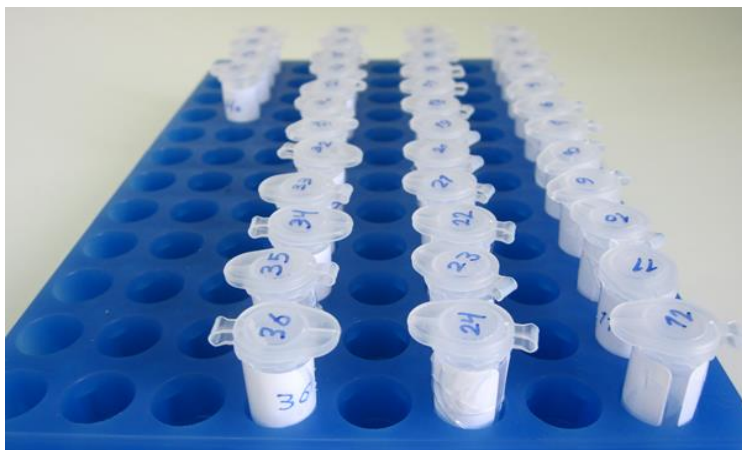
۳-۱۳ تخلیص پروتئین ضد میکروبی عصاره قارچ *Aspergillus sp.* با استفاده از HPLC

برای تخلیص پروتئین دارای خاصیت آنتی‌باکتریالی *Aspergillus sp.* از HPLC-Preparative استفاده شد. در مرحله آنالیتیکال ۴۰ جدایه کروماتوگرافی ایجاد شد (شکل ۱۷-۳) که پس از بررسی تک تک آن‌ها و انجام تست دیسک ۳ جدایه فعال (شکل ۱۸-۳) که دارای خاصیت آنتاگونیستی بودند انتخاب شدند. در مرحله Preparative (شکل ۱۹-۳) هم که ۱۰۰۰ میکرولیتر به دستگاه تزریق شد ۳ جدایه انتخابی جداسازی و لیوفیلیزه شدند.

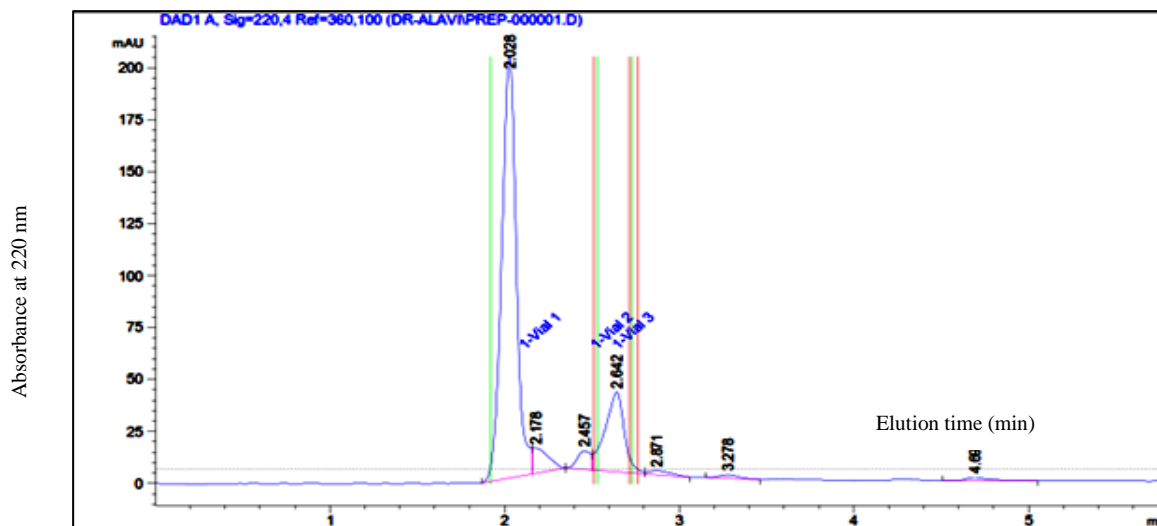


Elution time (min)

شکل ۳-۱۷ دیگرام مربوط مرحله آنالیتیکال HPLC - از ستون C_{18} به عنوان فاز ثابت و آب و استونیتریل به عنوان فاز متحرک استفاده شد.



شکل ۳-۱۸ جدایه‌های جدا شده از مرحله آنالیتیکال و بررسی خاصیت ضد میکروبی آن‌ها بر روی سویه NIGEB-88 باکتری زانتوموناس



شکل ۳-۱۹ دیگرام مربوط به مرحله HPLC-Preparative - از ستون C_{18} به عنوان فاز ثابت و آب و استونیتریل به عنوان فاز متحرک استفاده شد.

فصل چہارم

بحث

پروتئین‌ها و پپتیدهای آنتی‌باکتریال ارزش اقتصادی بسیار زیادی دارند به این علت که آن‌ها گیاهان و جانوران را از خسارت مربوط به آلودگی‌های باکتریایی، محافظت می‌کنند. بیماری باکتریایی شانکر مرکبات که به وسیله باکتری *Xanthomonas citri* pv. *Citri* ایجاد می‌شود، از جمله بیماری‌های باکتریایی است که بر روی درختان میوه ایجاد می‌گردد. عامل این بیماری دارای دو تیپ متفاوت A و A* است. سویه‌های تیپ A در اغلب مناطق کشت و تولید مرکبات دیده می‌شود و سویه‌های تیپ A* تنها در هند، تایلند و کشورهای حوضه خلیج فارس از جمله ایران شناسایی شده‌اند و دامنه میزبانی آن‌ها تنها محدود به درخت لیموترش است. این تحقیق به لحاظ بررسی اثر ترکیبات ضد میکروبی با ماهیت پروتئینی در بیوکنترل عامل بیماری شانکر مرکبات منحصر به فرد است چرا که تاکنون پژوهشی پیرامون کنترل بیماری شانکر مرکبات با استفاده از پروتئین‌ها و پپتیدهای ضد میکروبی گزارش نشده است.

بررسی‌های ما در شرایط *in silico* مشخص کرد که تاکنون پروتئین‌ها و پپتیدهای بسیاری با فعالیت‌های آنتی‌باکتریال و ضدقارچی گزارش شده‌اند که بیشتر آن‌ها از حیوانات (استینر و همکاران، ۱۹۸۱؛ لمیتر و همکاران، ۱۹۹۶؛ دستومیوکس و همکاران، ۱۹۹۷؛ کریشنا کوماری و نگاراج، ۱۹۹۷؛ تورس لاریوس و همکاران، ۲۰۰۰)، گیاهان (هاین و همکاران، ۱۹۹۲؛ کامو و همکاران، ۱۹۹۵؛ تالاس، ۲۰۰۴) و باکتری‌ها (بارجا و همکاران، ۱۹۸۹؛ جیمز و همکاران، ۱۹۹۶؛ لونجیون و همکاران، ۲۰۰۴) استخراج شده‌اند و تاکنون تنها ۳ توالی پروتئینی و پپتیدی با خاصیت آنتی‌باکتریال از قارچ‌های *Clitocybe sinopica* (ژنگ و همکاران، ۲۰۱۰)، *Pseudoplectania nigrella* (مایچیند و همکاران، ۲۰۰۵)، *Aspergillus clavatus* ES1 (حاجی و همکاران، ۲۰۱۰) جداسازی شده است (aps.unmc.edu) و این اهمیت کار روی قارچ‌ها را بیشتر می‌کند. هرچند تاکنون توالی‌های بسیاری با فعالیت ضد قارچی از قارچ‌ها جدا شده است که از آن

جمله می‌توان به AFP از *Penicillium chrysogenum* (لاکاندا و همکاران، ۱۹۹۵)، NAF از *Penicillium nalviogense* و AnAFP از *Aspergillus niger* (مارکس، ۲۰۰۴) اشاره کرد. همه-ی ترکیبات فوق دارای خاصیت ضد قارچی هستند و هرگز فعالیت آنتی‌باکتریالی نداشته‌اند.

در این بررسی دو عصاره قارچ *Aspergillus Sp.* و *T. harzianum* 1103 علیه باکتری مولد بیماری شانکر مرکبات خاصیت آنتاگونیستی نشان دادند. جهت تعیین ماهیت عصاره ضد میکروبی عصاره قارچ *Aspergillus Sp.* و *Trichoderma harzianum* 1103، اثر پروتئازهای گوناگون بر فعالیت ضد میکروبی هر دو عصاره مورد آزمایش قرار گرفت. هر دو عصاره پس از مجاورت با سه پروتئاز پپسین، تریپسین و پروتئیناز k با غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر فعالیت خود را از دست دادند که نشان از ماهیت پروتئینی ترکیب بازدارنده دارد. این مطابق با نتایجی است که توسط حاجی و همکاران (۲۰۱۰) به دست آمده است. آن‌ها نشان دادند که فعالیت AcAMP^۱ پس از یک ساعت مجاورت با سه آنزیم پپسین، تریپسین و پروتئیناز k با غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به طور کامل از بین رفت.

نتایج بررسی‌های ما در شرایط آزمایشگاهی ثابت کرد که می‌توان از پروتئین‌های ضد میکروبی موجود در سکروتوم قارچ *Aspergillus Sp.* و *T. harzianum* 1103 به عنوان عاملی برای بیوکنترل سایر باکتری‌های پاتوژن استفاده نمود.

پروتئین ضد میکروبی تولید شده توسط قارچ *T. harzianum*-1103 علاوه بر سویه‌های مختلف باکتری زانتوموناس فعالیت بازدارندگی بر علیه سایر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی دیگر از جمله *E. coli*، *Bacillus subtilis*، *Pseudomonas fluorescense* و دو پاتوژن مهم انسانی *Staphylococcus aureus*، *Salmonella typhi* را نشان داد اما علیه باکتری *Erwinia*

amylovora اثر کنترل‌کنندگی نشان نداد. این در حالی است که پروتئین ضد میکروبی تولید شده توسط قارچ *Aspergillus Sp.* توانست با اثر کنترل‌کنندگی بسیار زیاد تمامی باکتری‌های مورد آزمون در این پژوهش را به خوبی کنترل کند. هر دو پروتئین ضد میکروبی موجود در سکروتوم قارچ *Aspergillus Sp.* و *T.harzianum* 1103 توانستند فعالیت آنزیم ترنسکریپتاز معکوس را متوقف کنند و این مسئله نشان از ضد ویروسی بودن این ترکیبات دارد. این مهم بیانگر وسیع الطیف بودن این پروتئین‌های ضد میکروبی است و این اثر بازدارندگی وسیع می‌تواند ناشی از سیستم‌های پیچیده آنتاگونیستی باشد که توسط این قارچ‌ها تولید می‌شود. نتایج حاصل از بررسی‌های ژنگ و همکاران (۲۰۱۰) و زارع (۱۳۸۶) مؤید همین مسئله است.

همچنین فعالیت ضد قارچی سکروتوم *T. harzianum*-1103 بسیار قابل توجه بوده است. البته گزارشات متعددی پیرامون استفاده از تریکودرماها در امر بیوکنترل بیماری‌های قارچی موجود است (سید اصلی و همکاران، ۱۳۸۳؛ حریقی و همکاران، ۱۳۸۵). هرچند سکروتوم قارچ *Aspergillus Sp.* هیچ اثر کنترل‌کنندگی را در مقابل دو قارچ *Macrophomina phaseolina* و *Rhizoctonia solani* نشان نداد.

خاصیت مهم پروتئین ضد میکروبی موجود در سکروتوم قارچ *Aspergillus Sp.* پایداری در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس به مدت یک ساعت است که احتمالاً ناشی از ساختار سه بعدی آن‌ها و عدم نقش نیروهای ضعیف الکتروستاتیک و هیدروژنی در شکل‌گیری این پروتئین است. گزارشات بسیاری پیرامون مقاومت پروتئین‌های آنتی‌میکروبیال در دماهای بالا وجود دارد. هرچند پروتئین ضد میکروبی موجود در سکروتوم *T.harzianum* 1103 پس از ۱۵ دقیقه ماندن در دمای ۹۰ درجه سلسیوس فعالیتش را به طور کامل از دست داد.

ژنگ و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند حساسیت پروتئین‌های آنتی‌میکروبیال نسبت به pH بسیار متفاوت است و تعداد زیادی از آن‌ها در محدوده‌ی وسیعی از pH ها فعال می‌باشند. هر دو پروتئین استخراجی در این پژوهش نیز همین خصوصیت را نشان داده و در تمامی pH های تهیه شده فعالیت خود را به خوبی حفظ کردند. مشابه نتایج مژگانی و همکاران (۱۳۸۵) ترکیب هر دو عصاره دارای خاصیت ضد میکروبی با EDTA پس از نیم ساعت مجاورت تغییری را در عملکرد آن‌ها ایجاد نکرد. این عدم بازدارندگی حاکی از این است که کاتیون‌های فلزی نقشی در فعالیت این پروتئین ضد میکروبی ندارند. این در حالیست که در مجاورت با SDS عملکرد عصاره قارچ *T. harzianum* 1103 کاهش یافت که مطابق با نتایجی است که توسط تگ و همکاران (۱۹۷۶) گزارش شد که حاکی از آن است که اگر زیر واحد بزرگ توسط دترژنت‌ها به زیر واحد کوچک‌تر تقسیم شود، ممکن است فعالیت ضد میکروبی آن‌ها کاهش یابد و یا به طور کلی متوقف شود.

همچنین در این تحقیق اثر زمان کشت بر تولید پروتئین ضد میکروبی در دو قارچ *Aspergillus Sp.* و *T. harzianum* 1103 در زمان‌های ۳، ۵، ۷، ۱۴ و ۲۰ روز نیز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از مطالعات فوق ثابت نمود که عملاً از روز پنجم به بعد تفاوت معنی داری در قطر هاله عدم رشد و میزان کنترل‌کنندگی وجود ندارد.

با توجه به نتایج حاصل از مرحله تخلیص پروتئین موجود در سکروتوم قارچ *Aspergillus Sp.* می‌توان نتیجه گرفت که HPLC در دو مرحله Preparative و Analytical روشی کارآمد در تخلیص پروتئین‌های ضد میکروبی محسوب می‌شود. در این مورد می‌توان به تحقیقات رکنی زاده و همکاران (۲۰۱۲) اشاره کرد و به جرأت می‌توان گفت این شیوه در قیاس با تخلیص به شیوه دستی بسیار مؤثرتر و کارآمدتر است.

در پایان می‌توان با قاطعیت ابراز کرد که برای نخستین بار عامل بیماری شانکر مرکبات به وسیله پروتئین‌های ضد میکروبی موجود در سکروتوم قارچ *Aspergillus sp.* و *Trichoderma harzianum* 1103 در شرایط *in vitro* در این پروژه توانست کنترل شود. از آن‌جا که این پتیدها و پروتئین‌های ضد میکروبی برعکس آنتی‌بیوتیک‌های متعارف عموماً طیف اثر گسترده‌ای دارند و بر علیه آن‌ها مقاومت ایجاد نمی‌شود لذا سرمایه‌گذاری بر روی این پروتئین‌های استخراجی جهت مهار بیماری شانکر مرکبات و سایر بیماری‌های باکتریایی و قارچی دیگر ارزشمند خواهد بود.

پیشنهادات

- پیشنهاد می‌شود اثر پروتئین‌های ضد میکروبی در شرایط *in vivo* نیز مورد بررسی قرار بگیرد.
- با توجه به طیف گسترده اثر پتیدها و پروتئین‌های ضد میکروبی پیشنهاد می‌شود اثر این پروتئین‌های ضد میکروبی بر روی سلول‌های سرطانی با انجام تست¹ MTT صورت بگیرد.
- شناسایی ژن‌های کدکننده این ترکیبات ضد میکروبی و Over expression آن‌ها
- از آنجا که این ترکیبات ضد میکروبی مکانیزم عمل مشخصی ندارند، شناسایی مکانیزم عمل این پروتئین‌های ضد میکروبی و تعیین ساختار آن‌ها نیز می‌تواند در دستور کار قرار بگیرد.
- پیشنهاد می‌شود جهت تولید هر چه بیشتر این پروتئین‌های ضد میکروبی بهینه‌سازی محیط کشت انجام بگیرد.

پیوست

۱. محلول‌ها

۱-۱ محلول‌های مورد استفاده در ژل PAGE^۱

محلول استوک اکریل آمید (۳۰/۸ درصد). ۳۰ گرم اکریل آمید و ۰/۸ گرم بیس اکریل آمید در حدود ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل می‌شود و سپس حجم نهایی آن را به ۱۰۰ میلی‌لیتر می‌رسانیم. محلول را صاف کرده و در ظرف تیره می‌ریزیم. این محلول تا سه ماه در یخچال قابل نگهداری است.

بافر ژل پایین. این بافر دارای غلظت ۱/۵ مولار تریس با pH ۸/۸ است. برای تهیه آن ۱۸/۲ گرم تریس باز را در حدود ۷۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل می‌کنیم. سپس pH آن را با اسید کلریدریک ۲ مولار تا ۸/۸ پایین آورید و حجم نهایی را با آب مقطر به ۱۰۰ میلی‌لیتر می‌رسانیم.

بافر ژل بالا. این بافر دارای غلظت ۰/۵ مولار تریس با pH ۶/۸ است. برای تهیه آن ۶/۱ گرم تریس باز در حدود ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل می‌شود. سپس با اسید کلریدریک ۲ مولار، pH آن را به ۶/۸ تنظیم می‌کنیم و حجم نهایی را با آب مقطر به ۱۰۰ میلی‌لیتر می‌رسانیم.

بافر الکتروود. این بافر دارای غلظت ۲۵ مولار تریس باز و ۱۹۲ میلی‌مولار گلیسین^۲ است. برای تهیه آن ۳ گرم تریس باز و ۱۴/۴ گرم گلیسین را در یک لیتر آب مقطر حل کردیم. pH این بافر حدود ۸/۳ است و نیازی به تنظیم ندارد.

بافر نمونه 5x. شامل ۱۵ میلی‌لیتر تریس ۱ مولار با pH ۶/۸، ۲۵ میلی‌لیتر گلیسرول و ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر می‌باشد. پس از مخلوط کردن این مواد، چند بلور برموفنول بلو اضافه می‌شود تا بافر به رنگ آبی تیره درآید.

1 - Polyacrylamide gel electrophoresis

2 - Glycine

پرسولفات آمونیوم ۱۰ درصد (w/v). ۰/۱ گرم پر سولفات آمونیوم را در یک میلی لیتر آب مقطر حل کردیم. این محلول باید تازه تهیه شود.

TEMED ۱۰ درصد (V/V). ۰/۱ میلی لیتر TEMED و ۰/۹ میلی لیتر آب مقطر را با هم مخلوط می کنیم. این محلول نیز باید تازه تهیه شود.

۲-۱ محلول های رنگ آمیزی با کوماسی بلو (R250 یا G250)

رنگ آمیزی با محلول کلونیدی G-250 براساس روش بلاکسلی^۱ و بوئز^۲ با بعضی تغییرات انجام می گیرد. با توجه به حالت کلونیدی کوماسی در این روش، زمینه ژل آنچنان رنگ نمی شود. حساسیت رنگ آمیزی با کوماسی G-250 به مراتب بیش از رنگ آمیزی با R-250 است و در حدود ۲۰-۳۰ نانوگرم پروتئین در هر باند است. بدین منظور مقدار ۰/۲ گرم از پودر رنگ را وزن کرده و در ۲۰ میلی لیتر اسید استیک و ۹۰ میلی لیتر متانول حل می کنیم. سپس حجم نهایی را با آب مقطر به ۲۰۰ میلی لیتر می رسانیم.

۳-۱ محلول رنگ بر^۳

این محلول حاوی ۱۰۰ میلی لیتر متانول، ۱۰۰ میلی لیتر اسید استیک گلیسالی و ۸۰۰ میلی لیتر آب مقطر است.

۴-۱ محلول رنگ آمیزی با نیترات نقره

نقره از اواسط قرن ۱۷ میلادی در عکاسی و سپس در روش های بافت شناسی مورد استفاده قرار گرفت. استفاده از نقره برای رنگ آمیزی پروتئین ها در الکتروفورز توسط اسوتیزر^۱ و همکارانش در

1 - Blakesley

2 - Boezi

3 - Destain

سال ۱۹۷۹ میلادی مطرح گردید. از آن زمان تاکنون بیش از صد مقاله در مورد اشکال مختلف رنگ آمیزی با روش نقره به چاپ رسیده است.

حساسیت اشکال مختلف روش نقره ده‌ها تا صدها برابر روش کوماسی آبی است. در بعضی روش‌ها - های نقره تا ۰/۱ نانو گرم پروتئین در هر باند قابل تشخیص است. بدین لحاظ با این روش اجزای بسیار ناچیز یک نمونه و اجزای یک نمونه پروتئینی بسیار رقیق را می‌توان تشخیص داد. معمولاً اشکالی از روش نقره که سریع‌تر انجام می‌گیرند، حساسیت کمتری دارند. رنگ آمیزی با روش نقره به رغم حساسیت بسیار بالا اشکالاتی هم دارد. این روش وقت‌گیر و گران است. به مواد شیمیایی و آب مقطر با درجه خلوص بالا نیازمند بوده، در غیر اینصورت، کیفیت رنگ آمیزی مطلوب نیست. اثر آینه‌ای نقره و عدم و یا ضعف رنگ پذیری بعضی از پروتئین‌ها از مشکلات دیگر این روش است.

رنگ آمیزی با نیترات نقره در ۸ مرحله صورت می‌گیرد که در ذیل به تشریح آن می‌پردازیم:

مرحله ۱: فرمالدئید ۵۰ میکرولیتر، اسید استیک ۱۲ میلی‌لیتر و متانول ۵۰ میلی‌لیتر را با هم ترکیب کرده و حجم نهایی را به ۱۰۰ می‌رسانیم. سپس ژل به مدت یک ساعت در محلول فوق باقی می‌ماند و به آرامی شیک^۲ می‌شود.

مرحله ۲: ژل را در می‌آوریم و در اتانول ۵۰ درصد قرار می‌دهیم (دو تا ۱۰ دقیقه‌ای). بعد از ۱۰ دقیقه خالی می‌کنیم و در اتانول جدید قرار می‌دهیم.

مرحله ۳: ۰/۰۲ گرم $\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ را در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل می‌کنیم (به مدت یک دقیقه در آن بماند). ۲ میلی‌لیتر از محلول فوق برای استفاده در مرحله ۷ کنار بماند.

مرحله ۴: ۳ تا ۲۰ ثانیه با آب مقطر شستشو می‌دهیم.

1 - Switzer

2 - Shake

مرحله ۵: در محلول ۵۰ میکرولیتر فرمالدئید و ۰/۲ گرم $AgNO_3$ (حجم نهایی را به ۱۰۰ میلی لیتر می‌رسانیم). به مدت ۲۰ دقیقه بماند.

مرحله ۶: با آب مقطر به مدت ۳ تا ۲۰ ثانیه ژل را می‌شوئیم.

مرحله ۷: ۲ میلی لیتر از محلول مرحله شماره ۷ را در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر ریخته و به آن ۵۰ میکرولیتر فرمالدئید اضافه می‌کنیم.

مرحله ۸: هر موقعی که باندها ظاهر شد بلافاصله محلول را تخلیه می‌کنیم و محلول متانول ۵۰ درصد و اسید استیک ۱۲ درصد را روی آن می‌ریزیم.

۵-۱ بافر TBE

از این بافر برای الکتروفورز DNA استفاده شد. ترکیبات محلول ذخیره ۵ بار تغلیظ شده آن (x) (5) در زیر دیده می‌شود (جدول ۲-۵). pH بافر بایستی قبل از اتوکلاو روی ۸ تنظیم گردد. پس از تهیه، بافر به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو می‌شود. این بافر در دمای اتاق نگهداری و در زمان مصرف با آب مقطر به میزان $0.5 \times$ رقیق شد.

۶-۱ تهیه آگارز ۱ درصد

برای تهیه ژل آگارز ۱ درصد، ۱ گرم از آگارز با استفاده از بافر TBE به حجم ۱۰۰ رسانده شد.

۷-۱ محلول رنگ آمیزی ژل الکتروفورز

محلول ذخیره اتیدیوم برماید (sigma) با غلظت ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر در آب مقطر حل شد. این محلول باید در تاریکی نگهداری شود.

۲. محیط کشت‌های مورد استفاده در این پژوهش

۱-۲ محیط YP (Yeast Extracte , Peptone)

این محیط حاوی پپتون و عصاره مخمر است که محیطی اختصاصی برای رشد باکتری‌هاست. به نظر می‌رسد زانتوموناس بهترین رشد را در همین محیط دارد. برای تهیه این محیط کشت در حجم ۲۰ میلی‌لیتر، ابتدا مقدار ۰/۱ گرم پپتون و ۰/۰۶ گرم عصاره مخمر را وزن و سپس با آب مقطر به حجم ۲۰ میلی‌لیتر می‌رسانیم. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس، محیط کشت را اتوکلاو می‌کنیم.

۲- محیط (Potato Dextrose Broth) PDB

این محیط حاوی پپتون و گلوکز است. pH کم این محیط مانع از رشد باکتری‌ها می‌شود. برای تهیه این محیط در حجم یک لیتر مقدار ۲۰ گرم گلوکز و ۴ گرم پپتون را توزین کرده و سپس با آب مقطر به حجم ۱۰۰۰ میلی‌لیتر می‌رسانیم. سپس درون آن یک مگنت قرار داده، آن را روی استریر^۱ گذاشته و اجازه می‌دهیم پپتون و گلوکز حل شود. پس از آن به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس اتوکلاو می‌شود.

۳-۲ محیط (Potato Dextrose Agar) PDA

برای تهیه این محیط کشت از پودر آماده آن استفاده شد. بدین منظور مقدار ۱۹/۵ گرم از پودر آماده PDA را توزین کرده و با آب مقطر به حجم ۵۰۰ میلی‌لیتر می‌رسانیم. سپس یک مگنت در آن قرار داده و آن را روی استریر قرار می‌دهیم. پس از اینکه محیط همگنی حاصل شد محیط را برداشته و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس اتوکلاو می‌کنیم. این مقدار محیط ساخته شده برای ۲۲ پتری دیش ۹ سانتی‌متری شیشه‌ای کافی می‌باشد.

۳-۱ محیط نگهداری ذخیره باکتری‌ها

برای نگهداری باکتری‌ها باید از آن‌ها استوک تهیه کرد. برای این کار ابتدا باکتری را در محیط جامد کشت می‌دهیم. پس از ۲۴ ساعت به میزان یک لوپ از محیط کشت باکتری برداشته و وارد ۵ سی سی محیط مایع YP می‌کنیم. سپس در دمای ۳۲ درجه و دور ۱۸۰ rpm به مدت ۱۶ ساعت محیط کشت را انکوبه کردیم. لازم به ذکر اینکه ۱۶-۱۴ ساعت زمان مناسبی برای رشد باکتری‌ها است. سپس باکتری را در ۸۰۰۰ g و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ می‌کنیم. در زیر هود و در شرایط کاملاً استریل مایع رویی^۱ را خارج کرده و رسوب^۲ را نگه می‌داریم. در فالكونی دیگر مقدار ۸۰۰ میکرولیتر از محیط کشت و ۲۰۰ میکرولیتر از گلیسرول را که قبلاً اتوکلاو شده بود، با یکدیگر با ورتکس^۳ مخلوط می‌کنیم. سپس محتویات فالكون مذکور را به فالكون حاوی رسوب باکتری، اضافه می‌کنیم و با تکان دادن با دست، باکتری را در محیط فوق حل می‌کنیم. سپس تعدادی میکروتیوب برداشته و به هر یک مقداری از مخلوط فوق را اضافه می‌کنیم و در نهایت استوک‌ها را در دمای ۷۰- درجه سلسیوس قرار می‌دهیم.

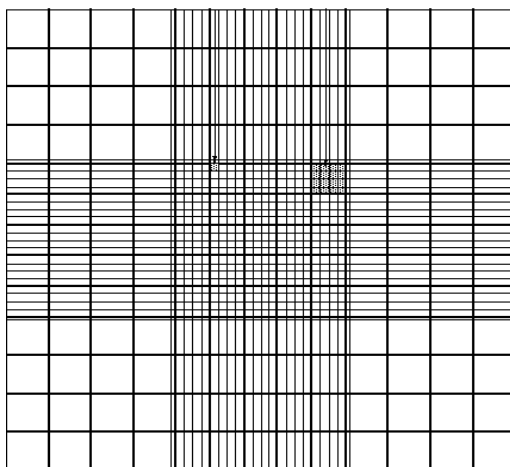
۳. شمارش اسپور

۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون یکنواخت اسپوری روی لام شمارش نئوبار (هموسیتومتر) قرار داده شد. این لام دارای ۴ مربع ۱۶ خانه‌ای می‌باشد که برای شمارش، اسپورهای تمام ۴ مربع ۱۶ خانه‌ای شمرده می‌شود. تصویر این لام زیر میکروسکوپ در شکل (۲-۱) آمده است. تعداد به دست آمده ابتدا تقسیم بر ۴ و سپس در ۱۰^۴ ضرب می‌شود که تعداد اسپور در ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون اسپوری را نشان می‌دهد. سپس با توجه به ضریب رقت مقدار تلقیح اسپور محاسبه می‌شود.

1 - Supernatant

2 - Pellet

3 - Vortex



شکل ۲-۱ تصویر لام شمارش نئوبار (هموسیتومتر) زیر میکروسکوپ

$10^4 \times$ ضریب رقت $\times 4$ / تعداد کل اسپوره‌های شمرده شده در هر چهار مربع = تعداد اسپور در سوسپانسیون

۴. نحوه استفاده از PMSF^۱

PMSF یک بازدارنده برای فعالیت سرین پروتئازها است. این ترکیب خیلی سریع در آب حل می‌شود

و استوک آن را می‌توان در اتانول، ایزوپروپانول و DMSO تهیه کرد.

برای استفاده از این ترکیب، باید در محلول نهایی ۱ میلی مولار باشد. چون درست کردن ۱ میلی

مولار سخت است، ۱۰۰ میلی مولار درست می‌کنیم و بعد در نمونه‌ها رقیق می‌شود و به ۱ میلی مولار

می‌رسد. مثلاً در ۱ لیتر محیط کشت:

$$1 \text{ Lit} \times 147 \text{ g/l} \times 0.001 = 0.147 \text{ g}$$

نکته: وزن مولکولی PMSF، ۱۴۷ گرم بر لیتر است.

بنابراین ۰/۱۴۷ گرم PMSF را در ۱۰ میلی لیتر متانول حل کردیم. در حقیقت به هر فالكون (۲۰ عدد) مقدار ۰/۵ میلی لیتر اضافه می گردد.

۵. خالص سازی محصول PCR طبق کیت Roch

خالص سازی محصول PCR طبق پروتکل زیر صورت گرفت. این مراحل برای ۱۰۰ میکرولیتر محصول PCR می باشد.

۱. ۵۰۰ میکرولیتر Binding buffer را به ۱۰۰ میکرولیتر محصول PCR اضافه کرده و خوب

مخلوط می کنیم.

۲. فیلتر تیوب را به تیوب جمع کننده^۱ وارد می کنیم و نمونه را از مرحله ۱ به فیلتر تیوب

انتقال می دهیم. ۳۰ تا ۶۰ ثانیه با دور بالا در دمای ۲۵-۱۵ درجه سلسیوس سانتریفیوژ

می کنیم.

۳. محلول داخل تیوب جمع کننده را دور ریخته و دوباره فیلتر تیوب داخل آن قرار داده شد.

۴. ۵۰۰ میکرولیتر بافر شستشو^۲ را به بالای فیلتر تیوب اضافه شد و ۱ دقیقه در سرعت

۱۳۰۰۰×g سانتریفیوژ شد.

۵. محلول زیری را دور ریخته و ۲۰۰ میکرولیتر بافر شستشو اضافه کردیم و ۱ دقیقه در سرعت

۱۳۰۰۰×g سانتریفیوژ شد.

1 - Collection tube

2 - Wash buffer

۶. محلول زیری همراه با تیوب جمع کننده دور انداخته و فیلتر تیوب را درون یک میکروسانتریفیوژ استریل ۱/۵ میلی لیتری وارد کردیم.
۷. ۵۰-۱۰۰ میکرولیتر بافر ایلوت کننده^۱ را به فیلتر تیوب اضافه کرده و ۱ دقیقه در سرعت $13000 \times g$ سانتریفیوز شد.
۸. DNA خالص شده در دمای -20 درجه سانتی گراد نگهداری شد.

پیوست جداول

جدول ۱. نحوه آماده سازی ژل پایین در PAGE

| درصد T | | | | | | اجزای ژل پایین |
|---------|-----------|---------|-----------|---------|----------|--------------------------|
| (ml)/۲۰ | (ml)/۱۷/۵ | (ml)/۱۵ | (ml)/۱۲/۵ | (ml)/۱۰ | (ml)/۷/۵ | |
| ۳ | ۳ | ۳ | ۳ | ۳ | ۳ | بافر ژل پایین |
| ۷/۸ | ۶/۸ | ۵/۸ | ۴/۹ | ۳/۹ | ۲/۹ | محلول استوک اکریل آمید |
| ۱/۲ | ۲/۲ | ۳/۲ | ۴/۱ | ۵/۱ | ۶/۱ | آب مقطر |
| ۰/۰۵ | ۰/۰۵ | ۰/۰۵ | ۰/۰۵ | ۰/۰۵ | ۰/۰۵ | پرسولفات آمونیوم ۱۰ درصد |
| ۰/۰۵ | ۰/۰۵ | ۰/۰۵ | ۰/۰۵ | ۰/۰۵ | ۰/۰۵ | TEMED ۱۰ درصد |

جدول ۲. نحوه آماده سازی ژل بالا در PAGE

| درصد T | | | اجزای ژل بالا |
|-------------|-------------|-------------|--------------------------|
| (ml) ۵ درصد | (ml) ۴ درصد | (ml) ۳ درصد | |
| ۱/۲۵ | ۱/۲۵ | ۱/۲۵ | بافر ژل بالا |
| ۰/۸۱ | ۰/۶۵ | ۰/۵ | محلول استوک اکریل آمید |
| ۲/۹ | ۳/۰۵ | ۳/۲ | آب مقطر |
| ۰/۰۵ | ۰/۰۵ | ۰/۰۵ | پرسولفات آمونیوم ۱۰ درصد |
| ۰/۰۱۵ | ۰/۰۱۵ | ۰/۰۱۵ | TEMED ۱۰ درصد |

جدول ۳. نحوه آماده سازی ژل پایین و میانی در SDS PAGE Tris Tricin

| ژل میانی (۱۰٪) (ml) | ژل پایین (۱۶/۵٪) (ml) | اجزای ژل |
|---------------------|-----------------------|--------------------------|
| ۲ | ۴ | بافر ژل پایین - میانی |
| ۲ | ۶/۶ | محلول استوک اکریل آمید |
| - | ۱/۳ | گلیسرول |
| ۱/۹۵ | - | آب مقطر |
| ۰/۰۲۵ | ۰/۰۵ | پرسولفات آمونیوم ۱۰ درصد |
| ۰/۰۲۵ | ۰/۰۵ | TEMED ۱۰ درصد |

جدول ۴. نحوه آماده سازی ژل بالا در SDS PAGE Tris Tricin

| ژل بالا (۴٪) (ml) | اجزای ژل |
|-------------------|--------------------------|
| ۱/۵ | بافر ژل بالا |
| ۰/۸ | محلول استوک اکریل آمید |
| ۳/۶ | آب مقطر |
| ۰/۰۵ | پرسولفات آمونیوم ۱۰ درصد |
| ۰/۰۲ | TEMED ۱۰ درصد |
| ۰/۰۵ | EDTA ۰/۲ مولار |

جدول ۵. ترکیبات و مقدار آنها در بافر CTAB

| NaCl 5 M | CTAB | EDTA 0.5 M | Tris 1 M | ماده |
|----------|------|------------|----------|----------------------|
| ۲۸۰ ml | ۲۰ g | ۴۰ ml | ۱۰۰ ml | مقدار ماده در ۱ لیتر |

جدول ۶. ترکیبات بافر 5x - TBE

| ترکیبات | مقادیر در حجم ۱۰۰۰ سی سی |
|-------------|--------------------------|
| EDTA | ۳/۷۵ g |
| Boric acide | ۲۷/۵ g |
| Tris-base | ۵۴ g |

منابع

- احمدزاده، م.، ۱۳۸۱، بررسی اثر ریزوباکتری‌های آنتاگونیست از جنس‌های *Bacillus* و *Pseudomonas* علیه بیماری‌های پوسیدگی بذر و مرگ گیاهچه لوبیا و مطالعه مکانیزم‌های آنتاگونیستی آن‌ها. رساله دکتری دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، ص ۱۴۶.
- بابایی، ن.، ملک‌زاده، ف.، امامی، م. و بابایی، م.، ۱۳۷۸، بررسی خواص ضد میکروبی استرپتومیسس‌ها و قارچ‌های جدا شده از خاک‌های جنگل آمل و مناطق بیابانی کهریزک و حسن آباد خالصه. پژوهش و سازندگی در زراعت و باغبانی. ص ۱۲۰-۱۲۴.
- حریق، م.، مطلبی، م.، زمانی، م.، ۱۳۸۵، خالص سازی آنزیم کیتیناز ۴۲ از *Trichoderma atroviride* PTCC 5220. مجله زیست شناسی ایران. ص ۲۱۴-۲۰۳.
- خسروشاهی، م.، ۱۳۸۵، راهبردهای منابع آب در بیابان و بیابان زدایی: شاخص مهم بیابان زدایی از منظر آب. در دسترس در آدرس اینترنتی. <http://khosromk.blogfa.com/post-62.aspx>.
- سجادی، س.ا.، حسن‌زاده، ن.، بهرامی، م. و خسروی، و.، ۱۳۸۵، بررسی امکان مبارزه بیولوژیک با عامل بیماری سوختگی غلاف برگ برنج توسط آنتاگونیست‌های باکتریایی. ویژه‌نامه علمی- پژوهشی علوم کشاورزی. ص ۲۰۲-۲۱۲.
- سید اصلی، ن.، زمانی، م.، مطلبی، م.، حریق، م.، ۱۳۸۳، مطالعه تولید آنزیم کیتیناز در قارچ تریکودرما. مجله زیست شناسی ایران. ص ۲۳۳-۲۲۷.
- صالحی، س.، رضایی مقدم، ک.، آجیلی، ع.، ۱۳۸۸. نگرش و تمایل کارشناسان کشاورزی به کاربرد فناوری های میزان متغیر سموم با استفاده از مدل معادلات ساختاری. مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی. ص ۷۵۷-۷۷۱.
- صارمی، ح.، اثرات منفی سموم مصرفی برای کنترل آفات و بیماری‌های گیاهی در بهداشت محیط زیست و کاهش مصرف آن با افزایش روش‌های کنترل بیولوژیک، چهارمین همایش کشوری بهداشت محیط. ص ۱۰۶۹-۱۰۷.
- کاشانی، ع.، ۱۳۸۰، کشاورزی پایدار در ایران، مفاهیم، روش‌ها و وضع موجود مجله جهاد. ۲۴۰-۲۴۱.
- مژگانی، ن.، اسماعیل خانیان، س.، عاملی، م.، یوسفی، ا.، ۱۳۸۵، شناسایی و تشخیص باکتریوسین تولید شده توسط *Lactobacillus acidophilus* (RN78) جدا شده از پنیر محلی. پژوهش و سازندگی در امور دام و آبزیان. ص ۴۲-۳۶.
- Agrios, G. (2005) Plant pathology, Dreibelbis, D., 922.
- Abee, T. (1995) Pore-forming bacteriocins of gram-positive bacteria and self-protection mechanisms of producer organisms. *FEMS Microbiol. Lett.* **129**: 1–10.
- Baba, T. and Schneewind, O. (1998) Instruments of microbial warfare: bacteriocin synthesis, toxicity and immunity. *Trends Microbiol.* **6**:66–71.
- Baker, K.F. (1987) Evolving concepts of biological control of plant pathogens. *Annual Review of phytopathology* **25**: 67-85.
- Barja, J.L., Lemos, M.L., Toranzo, A. (1989) Purification and characterization of an antibacterial substance produced by a marine *Alteromonas* species. *Antimicrob Agents Chemother.* **33**: 1674–1679.
- Benedict, R.G., Braddy, L.R. (1972) Antimicrobial activities of Mushroom metabolites. *J. Pharm. Sci.* **61**: 1820 – 1822.
- Bevins, C. (1994) Antimicrobial peptides as agents of mucosal immunity. *Ciba Found. Symp* **186**: 250–269.
- Boman, H.G. (1995) Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu. Rev. Immunol* **13**: 61–92
- Broekaert, W.F., Cammue, B.P.A., Debolle, M.F.C., Thevissen, K., Desamblanx, G.W. and Osborn, R.W. (1997) Antimicrobial peptides from plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* **16**: 297–323.
- Cammue, B.P.A., Thevissen, K., Hendriks, M., Eggermont, K., Goderis, I.J., Proost, P., Damme, J.V., Osborn, R.W., Guerbet, F., Kader, J.C., Broekaert, W.F. (1995) A potent

- antimicrobial protein from onion seeds showing sequence homology to plant lipid transfer proteins. *Plant Physiol.* **109**: 445–455.
- Campbell, R. (1989) Biological control of microbial plant pathogens, 218.
- Cheikhoussef, A., Pogori, N., Zhang, H. (2007) Study of the inhibition effects of *Bidobacterium* supernatants towards growth of *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*. *Int J Dairy Sc.* **2**:116–125.
- Cheikhoussef, A., Pogori, N., Chen, W., Zhang, H. (2008) Antimicrobial proteinaceous compounds obtained from *Bidobacteria*: from production to their application. *Int J Food Microbiol.* **125**: 215–222.
- Cook, R.J., Baker, K.F. (1983) The nature and practice of biological control of plant pathogens. St Paul, Minnesota American Phytopathological Society.
- Csordas, A., and Michl, H. (1970) Isolation and structure of a haemolytic polypeptide from the defensive secretion of European *Bombina* species. *Monatsh. Chem* **101**: 182–189.
- Dathe, M., Nikolenko, H., Meyer, J., Beyermann, M. and Bienert, M. (2001) Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge. *FEBS Lett* **501**:146–150.
- Destoumieux, D., Bulet, P., Loew, D., Dorsselaer, A.V., Rodriguez, J., Bachère, E. (1997) Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). *J Biol Chem* **272**: 398–406.
- Devuyst, L. and Vandamme, E.J. (1994) Bacteriocins of LAB, microbiology, Genetics and applications. Blackie Academic and Professional. London.
- Elov, J.N. (1998) A sensitive and quick microplate method to determine the minimal Inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Med* **64**: 711–713.
- Erlman, D., and Bodansky, M. (1971) Biosynthesis of peptide antibiotics. *Annu. Rev. Biochem* **40**: 449–464.
- Fagad, O.E., Oylade, A.A. (2009) A comparative of the antibacterial activities of some wood-decay fungi to synthetic antibiotic discs. *EJEAFCHE* **8**: 184-188.
- Farrokhi, N., Whitelegge, J.P., and Brusslan, J.A. (2008) Plant peptides and peptidomimics. *Plant Biotechnol* **6**: 105–134.
- Fuchs, S.W., Bochmann, S., Kotter, P., Wichelhaus, T., Karas, M., Stein, T., Entian, K.D. (2011) Entianin, a Novel Subtilin-Like Lantibiotic from *Bacillus subtilis* DSM 15029T with High Antimicrobial Activity. *Appl Environ Microbiol*: 1698-1707.
- Ganz, T., and Lehrer, R.I. (1997) Antimicrobial peptides of leukocytes. *Curr. Opin. Hematol.* **4**: 53–58.
- Garcia-Bustos, J.F., Mendez, E. (1985) Structure and mode of action of microcin 7, an antibacterial peptide produced by *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*: 791-797.
- Gardener, B.B.M., Fravel, D.R. (2002) Biological control of plant pathogens : research, commercialization, and application in the USA, plant health instructor. doi: 10.1094.
- Geison, R.P. (2000) *Nalgiovense* carries a gene which is homologous to the *paf* gene of *P. chrysogenum* which codes for an antifungal peptide. *Int J Food Microbiol* **62**: 95–101.
- Giuliani, A., Pirri, G., Nicoletto, S.F. (2007) Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *Central Eur J Biol* **1**: 1–33.
- Grunewald, J. and Marahiel, M.A. (2006) Chemoenzymatic and template-directed synthesis of bioactive macrocyclic peptides. *Microbiol Mol Biol Rev.* **70**: 121–146.
- Habermann, E. (1972) Bee and wasp venoms. *Science.* **177**: 314–322.
- Hajji, M., Jellouli, K., Hmidet, N., Balti, R., Kamoun, A.S., Naseri, M. (2010) A highly thermostable antimicrobial peptide from *Aspergillus clavatus* ES1: biochemical and molecular characterization, *J Ind microbial biotechnol* **37** : 805-813.
- Hancock, R.E., Chapple, D.S. (1999) Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* **43**: 1317–1323.

- Hancock, R.E.W., Falla, T., and Brown, M.H. (1995) Cationic bactericidal peptides. *Adv. Microb. Physiol* **37**: 135–175.
- Hancock, R.E.W. and Lehrer, R. (1998) Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechnol* **16**:82–88.
- Hartly, C. (1921) Damping off in forest nurseries. *USDA Bulletin* **943**: 1-99.
- Henry, A.w. (1943) The natural microflora of soil in relation to the foot rot problem of wheat, *Canadian of Research* **4**: 69-77.
- Henning, D. (2000) Construction of hybrid peptide synthetase by module and domain fusions. *PNAS* **97** (11): 5848-5853.
- Hoffman, J.A., and Reichart, J.M. (1997) *Drosophila* immunity. *Cell Biol* **7**:309–316.
- Hu, Z., Ye, M.Q., Xia, L.Q., Tu, W.J., Li, L., Zou, G.L. (2006) Purification and characterization of an antibacterial protein from the cultured mycelia of *Cordyceps sinensis*. *Wuhan University Journal of Natural Sciences* **3**: 709–714.
- Hultmark, D., Steiner, H., Rasmusson, T., and Boman, H.G. (1980) Insect immunity: purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *Eur. J. Biochem* **106**:7–16.
- Huynh, Q.K., Bergmeyer, J.R., Zobel, J.F. (1992) Isolation and characterization of a 22 kDa protein with antifungal properties from maize seeds. *Biochem Biophys Res Commun* **182**: 1–5.
- Jabrane, A., Sabri, A., Compere, P., Jacques, P., Vandenberghe, I., Van Beeumen, J. and Thonart, P. (2002) Characterization of serracin P, a phage-tail-like bacteriocin, and its activity against *Erwinia amylovora*, the fire blight pathogen. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 5704-5710.
- Jackson, R.W. (2009) *Plant pathogenic Bacteria: Genomics and Molecular Biology*, 330. ISBN:978-1-90455-37-0.
- Jack, R.W., and Jung, G. (1998). Natural peptides with antimicrobial activity. *Chimia* **52**:48–55.
- James, S.G., Holmstrom, C., Kjelleberg, S. (1996) Purification and characterization of a novel antibacterial protein from the marine bacterium D2. *Appl Environ Microbiol* **62**: 2783–2788.
- Kato, T., Matsuda, T., Yoneyama, Y., Kato, H. and Nakamura, R. (1993) Isolation of *Enterococcus faecium* with antibacterial activity and characterization of its bacteriocin. *Biosci Biotech Biochem* **57**:551-556.
- Kelleher, N.L. and Hicks, L.M. (2005) Contemporary mass spectrometry for the direct detection of enzyme intermediates. *Curr Opin Chem Biol* **9**: 424–430.
- Kiss, G., and Michl, H. (1962) On the venomous skin secretion of the orange speckled frog *Bombina variegata*. *Toxicon* **1**: 33–39.
- Kleinkauf, H. and von Dohren, H. (1988) Peptide antibiotics, b-lactams and related compounds. *Crit. Rev. Biotechnol.* **8**: 1–32.
- Kreil, G. (1994) Antimicrobial peptides from amphibian skin: an overview. *Ciba Found. Symp.* **186**:77–90.
- Krishnakumari, V., Nagaraj, R. (1997) Antimicrobial and hemolytic activities of crabrolin, a 13-residue peptide from the venom of the European hornet, *Vespa crabro*, and its analogs. *J Pept Res* **50**: 88–93.
- Krishna, K., Gardener, B.M. (2006) Biological control of plant pathogens. *The plant health instctor.* 1-25.
- Kristensen, H.H. (2005) Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus. *nature* **437**: 975-980.
- Lacadena, J., Martinez, A., Gasset, M., Patino, B., Campos, R., Vazquez, C. (1995) Characterization of the antifungal protein Secreted by the mould *Aspergillus giganteus*. *Arch Biochem Biophys* **324**: 273–281.

- Lata, S., Sharma, B.K., Raghava, G.P.S. (2007) Analysis and prediction of antibacterial peptides. *BMC Bioinformatics* **8**:1-10
- Lemaitre, C., Orange, N., Saglio, P., Saint, N., Gagnon, J., Molle, G. (1996) Characterization and ion channel activities of novel antibacterial proteins from the skin mucosa of carp (*Cyprinus carpio*). *Eur J Biochem* **240**: 143–149.
- Lemaitre, B., Reichhart, J. and Hoffman, J.A. (1997) *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:14614– 14619.
- Longeon, A., Peduzzi, J., Barthelemy, M., Corre, S., Nicolas, J.L., Guyot M. (2004) Purification and partial identification of novel antimicrobial protein from marine bacterium *Pseudoalteromonas* species strain X153. *Mar Biotechno* **6**: 633–641.
- Marx, F. (2004) Small, basic antifungal proteins secreted from filamentous ascomycetes: comparative study regarding expression, structure, function and potential application. *Appl Microbiol Biotechnol.* **65**:33–42.
- Mayr-Hartings, A., hedges, A.J., and Berkeley, R.C.W. (1972) Methods for studying bacteriocins. *Methods Microbiol* **7**: 315-422.
- Millard, W.A. and Taylor, C.B. (1927) Antagonism of microorganism as the controlling factor in the inhibition of Scab by green manuring. *Annals of Applied Biology* **14**: 202-16.
- Mor, A., and Nicolas, P. (1994). Isolation and structure of novel defensive peptides from frog skin. *Eur. J. Biochem* **219**:145–154.
- Mootz, H.D., Schwarzer, D. and Marahiel, M.A. (2002) Ways of assembling complex natural products on modular nonribosomal peptide synthetases. *ChemBioChem* **3**: 490–504.
- Mygind, P.H., Fischer, R.L., Schnorr, K.M., Hansen, M.T., Sonksen, C.P., Ludvigsen, S., Raventos, D., Buskov, S., Christensen, B., Maria, L.D., Taboureau, O., Yaver, D., Gorgensen, S.G.E., Sorensen M.V., Christensen, B.E., Kjaerlff, S., Moller, N.F., Lehrer, R.L., Zasloff, M., Ngai, P.H.K., Zhao, Z., Ng, T.B. (2005) Agrocybin, an Antifungal peptide from the edible mushroom *Agrocybe clindracea*. *PEPTIDES* **26**: 191-196.
- Nicolas, G.M.H., LaPointe, G., Lavoie, M.C. (2006) Mutacin H-29B is identical to mutacin II (J-T8). *BMC Microbiol* **6**: 3.
- Otvos, L. (2005) Antibacterial peptides and proteins with multiple cellular targets. *J Peptide Sci.* **11**:697-706.
- Perlman, D. and Bodansky, M. (1971) Biosynthesis of peptide antibiotics. *Annu. Rev. Biochem* **40**: 449–464.
- Radji, M., sumiati, A., rachmayani, R. and Elya, B. (2011) Isolation of fungal endophytes from *Garcinia mangoostana* and their antibacterial activity **1**: 103-107.
- Rea MC, S.C., Clayton, E., OConnor, P.M., Whittall, R.M., Zheng, J., Vederas, J.C., Ross, R.P., Hill, C. (2010) Thuricin CD, a posttranslationally modified bacteriocin with a narrow spectrum of activity against *Clostridium difficile*. *Proc Natl Acad Sci U S A*: 9352-9357.
- Reiber, K., Reeves, E.P., Neville, C., Winkler, R., Gebhardt, P., Kavanagh, K. and Doyle, S. (2005) The expression of three nonribosomal peptide synthetases in *Aspergillus fumigatus* is mediated by the availability of free iron. *FEMS Microbiol Lett* **248**: 83–91.
- Rezaei-Moghaddam, K., Karami, E. and Gibson, J. (2005) Conceptualizing sustainable agriculture: Iran as an illustrative case. *J. Sustainable Agric* **27**: 25-56
- Rishbeth, J. (1963) Stump protection against *Fomes annosus*. III Inoculation with *Peniophora gigantea*. *Annals of Applied Biology* **52**: 63-77.
- Rokni-Zadeh, H., Li, W., Sanchez-Rodriguez, A., Sinnaeve, D., Rozenski, J., Martins, J.C., De Mot, R. (2012) Genetic and Functional Characterization of Cyclic Lipopeptide White-Line-Inducing Principle (WLIP) Production by Rice Rhizosphere Isolate *Pseudomonas putida* RW10S2. *Appl. Environ. Microbiol* **78**: 4826–4834.

- Rosengren, K.J., Daly, N.L., Goransson, U., Jones, A., Craik, D.J. (2003) Microcin J25 has a threaded sidechain-to-backbone ring structure and not a head-to-tail cyclized backbone. *J Am Chem Soc* **41**: 12464-12474.
- Sanford, G.B. (1926) Some factors affecting the pathogenicity of *Actinomyces scabies*. *Phytopathology* **16**: 525-47.
- Selsted, M. E., Szklarek, D., Ganz, T. & Lehrer, R. I. (1985) Activity of rabbit leukocyte peptides against *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **49**: 202–206.
- Shai, Y. and Oren, Z. (2001) From “carpet” mechanism to de-novo designed diastereomeric cell-selective antimicrobial peptides. *Peptides* **22**:1629–1641.
- Silva, M.G., Dose, A. (2004) The best penicillin for resistant bacteria. *journal of Antibiotics* **48**: 562-569.
- Smith, K.P., Havey, M. J. and Handelsman, J. (1993) Suppression of cottony leak of cucumber with *Bacillus cereus* strain UW85. *Plant Dis.* **77**:139-142.
- Stack, D., Nevill, C., Doyle, S. (2007) Nonribosomal peptide synthesis in *Aspergillus fumigatus* and other fungi. *Microbiology* **153**: 1297-1306.
- Steiner, H., Hultmark, D., Engstrom, A., Bennich, H., Boman, H.G. (1981) Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* **292**: 246–248.
- Stein, T., Vater, J., Kruff, V., Otto, A., Wittmann-Liebold, B., Franke, P., Panico, M., McDowell, R. and Morris, H.R. (1996) The multiple carrier model of nonribosomal peptide biosynthesis at modular multienzyme templates. *J. Biol. Chem* **271**: 15428–15435.
- Tagg, J.R., Dajani, A.S. and Wannamaker, L.W. (1976) Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriol Rev* **40**:722-756.
- Tahara, T., Kanatani, K., Yoshida, K., Hirosumi, M., Sakamoto, M. and Oshimura, M. (1991) Purification and some properties of acidocin 8912, a novel bacteriocin produced by *L. acidophilus* TK 8912. *Biosci Biotech Biochem* **56**:1212-1215.
- Talas, T. (2004) Screening antimicrobial activities of basic protein fractions from dry and germinated wheat seeds. *Biologia Plantarum* **48**: 583–588.
- Tong, W.Y., Darah, I. and Latiffah, Z. (2011) Antimicrobial activities of endophytic fungal isolation from medicinal herb *Orthosiphon stamineus* benth. **5**: 831-836.
- Torres-Larios, A., Gurrola, G.B., Zamudio, F.Z., Possani, L.D. (2000) Hadrurin, a new antimicrobial peptide from the venom of the scorpion *Hadrurus aztecus*. *Eur J Biochem* **267**: 5023–5031.
- Turgay, K., Krause, M. and Marahiel, M.A. (1992) *Microbiol* **6**: 529.
- Van Belkum, M.J., Kok, J.G., Venema, H., Holo, I.F., Konings, W.N. and Abee, T. (1991) The bacteriocin lactococcin A specifically increases permeability of lactococcal cytoplasmic membranes in a voltage-independent, protein mediated manner. *J. Bacteriol.* **173**:7934–7941.
- Vidaver, A.K. and Lambrecht, P.A. (2004) Bacteria as plant pathogens. *plant health instructor*.doi:10.1094.
- Wiest, A., Grzegorski, D., Xu, B.W., Goulard, C., Rebuffat, S., Ebbole, D.J., Bodo, B. and Kenerley, C. (2002) Identification of peptaibols from *Trichoderma virens* and cloning of a peptaibol synthetase. *J Biol Chem* **277**: 20862–20868.
- Yeaman, M.R. and Yount, N.Y. (2003) Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. *P HARMACOLOGICAL REVIEWS* **55**:27–55
- Zaslof, M. (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**: 389–395.
- Zheng, S., Liu, Q., Zhang, G., Wang, H., Ng, T.B. (2010) Purification and characterization of an antibacterial protein from dried fruiting bodies of antibacterial protein from dried fruiting bodies the wild mushroom *Clitocube sinopica*. *ABPs* **57**: 43-48.
- Zendo, T.F.M., Ueda, K., Higuchi, T., Nakayama, J., Sonomoto, K., (2003) Purification and biological characterization of halocin C₈, a novel Identification of the lantibiotic nisin Q, a

new natural nisin variant produced by *Lactococcus lactis* 61-14 isolated from a river in Japan. Biosci Biotechnol Biochem **67**: 1616-1619.

Abstract

Bacterial phytopathogens have a great impact on yield loss. In between, the causative agent of citrus canker *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc), has influenced citri culture worldwide. Use of chemicals, the common method of bacterial control, has many negative effects on ecosystems. On the other hand, biological control of bacterial pathogens is an environmentally friendly technique that was considered in this study. Two fungal secretomes were used to study their antagonistic effects against an isolate of Xcc, namely NIGEB-88 with disk diffusion method. In order to determine the nature of antimicrobial agent, present in both secretomes, they were treated with a range of protease. As a result the antimicrobial activity were diminished significantly that suggesting being a protein by nature. In continuation of our studies the The inhibitory spectrum of antimicrobial proteins (AMPs) were tested against available bacterial and fungal species, that could inhibit their growth. These compounds showed to be tolerant in response to heat, basic and acidic pHs and number of detergents, too.

Keywords: Bacterial disease, Fungi, Biological control



Shahrood University of Technology
Faculty of Agronomy and Plant Breeding

The Dissertation of M.Sc. in plant Biotechnology

**Study on the Interaction of Fungi with Plant Pathogenic
Bacteria for Bacteria Biocontrol**

Sara kazemzadeh

Supervisors:

Dr. N. Farrokhi
Dr. M. Mamarabadi

Advisors:

Dr. S.Aminzadeh
Dr. Sh.Gharanjik

Date: September 2013