# جداسازی و شناسایی ژن کیتیناز با فعالیت ضد قارچی علیه *Fusarium solani* f. sp. *melongenae* از یک استرین ایرانی *Streptomyces*

# Isolation and Characterization of a Chitinase Gene Exhibiting Antifungal Activity Against *Fusarium solani* f. sp. *melongenae* from an Iranian *Streptomyces* strain

اعظم بهارلوئی[1]، غلامرضا شریفی سیرچی[2*] و غلامحسین شهیدی بنجار[3]

**چکیده**

قارچ *Fusarium solani* f. sp. *melongenae* یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای خاک‌زی است که دارای دامنه میزبانی بسیار وسیعی بوده و با ایجاد بیماری پژمردگی آوندی روی گیاه بادمجان (*Solanum melongena*) موجب کاهش معنی داری در عملکرد این محصول می‌شود. در جستجوی یک آنتاگونیست موثر علیه قارچ مذکور از خاک‌های زراعی چند منطقه در استان کرمان، تعداد 110 استرین اکتینومیست خاک‌زی به دست آمد که از بین آن‌ها تعداد 18 استرین، فعالیت کیتینازی قوی از خود نشان دادند. از بین استرین‌های مورد بررسی استرین استرپتومایسس 401 توانست به‌طور موثری از فعالیت این قارچ هم در شرایط آزمایشگاهی و هم در شرایط گلخانه‌ای جلوگیری کند. در ادامه برخی ویژگی‌های بیولوژیکی و فیزیولوژیکی این استرین بررسی شد. هم‌چنین، به‌منظور جداسازی ژن کد کننده‌ی کیتیناز، استخراج DNA ژنومی از این جدایه به روش CTAB صورت گرفت. تکثیر ژن کد کننده‌ی کیتیناز با پرایمرهای CH1FB و CH1RB و توالی‌یابی آن نشان‌داد که طول این ژن 876 جفت باز و مشابهت بالا با کیتینازهای خانواده 19 مانند ChiC از باکتری *Streptomycec griseus* دارد.

**کلمات کلیدی**: کنترل بیولوژیک، *Streptomyces*، کیتیناز، *Fusarium solani*

Archive of SID

1 و 2. به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار بخش مهندسی بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر، کرمان.
3. استاد بخش مهندسی گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر، کرمان.
*: نویسنده مسئول



www.SID.ir

**مقدمه**

در کشاورزی پایدار، کنترل بیولوژیک به‌عنوان یک روش جای‌گزین روش‌های شیمیایی برای کنترل بیماری‌های مختلف گیاهی به‌ویژه قارچ‌های بیماری‌زای خاک‌زی مورد توجه است. قارچ *Fusarium solani* عامل بیماری پژمردگی آوندی، یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای خاک‌زی است که دارای دامنه میزبانی بسیار وسیعی بوده و روی گیاهانی مانند گوجه فرنگی، نخود و بادمجان خسارات جدی وارد می‌سازد. کنترل بیولوژیک پژمردگی‌های ناشی از فوزاریوم در انواع محصولات کشاورزی با استفاده از قارچ‌ها و باکتری‌های آنتاگونیست خاک‌زی در سال‌های اخیر در سراسر جهان انجام شده است (Lakrin *et al*. 1996; Leeman *et al*. 1996; Lemanceau *et al*. 1992; Raaijmakers *et al*. 1995). در میان این آنتاگونیست‌ها، اکتینومیست‌ها از عمده‌ترین منابع تولید فرآورده‌های زیستی و واجد ارزش فوق العاده‌ای از نظر تجاری هستند. از جمله ویژگی‌های شاخص این باکتری‌ها که آن‌ها را جهت کنترل پاره‌ای از عوامل خسارت‌زای گیاهی مناسب نموده است، ترشح آنزیم کیتیناز می‌باشد؛ به گونه‌ای که این باکتری‌ها تجزیه کننده اصلی کیتین و عامل اصلی برگرداندن این ماده سخت به چرخه طبیعت هستند (Deshpande 1986). کیتین، پلیمری پلی ساکاریدی بدون شاخه با اتصالات β-1, 4 از واحدهای N- استیل گلوکز آمین است که ترکیب اصلی دیواره سلولی اکثر قارچ‌ها، کوتیکول حشرات، پوشش خارجی نماتدها و تخم و کیست آن‌ها و نیز اسکلت خارجی سخت‌پوستان، میگو و فلس ماهی‌ها را تشکیل می‌دهد (Synowiecki & Al-Khateeb 2003). تعدادی از ژن‌های کیتیناز متعلق به گونه‌های مختلف *Streptomyces* مانند *S. coelicolor* (Saito *et al*. 199)، *S. griseus* (Ohno *et al*. 1996) و *S. olivaceoviridis* (Blaak *et al*. 1993) جداسازی و ویژگی‌های آن‌ها تعیین شده‌اند. از آن‌جا که میکروفلور اکتینومیست‌های خاک‌های ایران به‌خوبی بررسی نشده و در زمینه جداسازی و خصوصیت‌یابی اکتینومیست‌های ایرانی مولد آنزیم کیتیناز تحقیق کافی صورت نگرفته است، این مطالعه روی این گروه باکتری‌های مفید انجام شد. هدف از انجام این پژوهش، استفاده از اکتینومیست‌های کیتینولایتیک جدا شده از خاک‌های کرمان در کنترل بیولوژیک قارچ *F. solani* f. sp. *melongenae* در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای بر روی گیاه بادمجان (*Solanum melongena*) و نیز جداسازی، همسانه سازی و توالی‌یابی ژن کیتیناز از موثرترین عامل بیوکنترل می‌باشد.

**مواد و روش‌ها**

نمونه برداری قطری از خاک‌های زراعی و باغی مناطق سیرچ و ماهان استان کرمان انجام شد. سپس با تهیه رقت‌های متوالی و کشت نمونه خاک، اکتینومیست‌ها جداسازی شدند (Lee & Hwang 2002). برای رشد اکتینومیست‌ها، محیط سنتزی کازئین – گلیسرول – آگار (CGA) استفاده شد (Saadoun & Gharaibeh 2001). پس از تهیه کیتین کلوئیدال، اکتینومیست‌ها به‌منظور تعیین فعالیت کیتینازی در محیط حداقل کیتین آگار غربال‌گری شدند (Baharloui *et al*., 2010).

کشت خالص قارچ *F. solani* f. sp. *melongenae* از بخش بیماری‌های دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان تهیه و روی محیط PDA (Potato Dextrose Agar) رشد داده شد.

به‌منظور تعیین توانایی جدایه‌های اکتینومیست به دست آمده در تولید ماده ضد قارچی علیه قارچ *F. solani* f. sp. *melongenae*، آزمون آنتی‌بیوگرام به روش Dual Culture انجام و بر اساس قطر ناحیه بازدارنده رشد (Inhibition Zone) جدایه‌های فعال انتخاب شدند (Shahidi Bonjar & karimi 2004). جهت بررسی ماهیت ماده موثره در کنترل قارچ *F. solani* f. sp. *melongenae*، آزمایش حساسیت به کلروفرم انجام شد (davelos *et al*. 2004). با کشت جدایه‌های فعال در محیط گلیسرین-کازئین (Casein Glycerin (CG)) و انجام آزمون زیستی در سه تکرار روی کشت چمنی قارچ، منحنی تولید ماده موثر رسم شد (Konishi *et al*. 1991).

با عصاره‌گیری از محیط‌های کشت مایع گلیسرین-کازئین CG و تهیه ماده خام ناخالص (Baharloui *et al*., 2009)، حداقل غلظت بازدارنده از رشد، پایداری ماده موثر در شرایط آزمایشگاهی و دمای غیر فعال کننده ماده موثر بررسی شد ( Shahidi Bonjar & karimi 2004). جهت تشخیص میزان قطبیت ماده موثر، حلالیت عصاره خام در حلال‌های آلی (متانول، کلروفرم، استون، هگزان و آب مقطر) طبق روش منصوری و همکاران (2001) انجام شد.

Archive of SID



www.SID.ir

تعیین فعالیت قارچ‌کشی[1] و یا قارچ ایستایی[2] استرین اکتینومیسـتی در کنتـرل قـارچ *F. solani* f. sp. *melongenae*، طبق روش شهیدی بنجار و کریمی (2004) بررسی گردید.

مورفولوژی سطح اسپورها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نوع اسکنینگ[3] مدل Lutz 100A با ولتاژ kv 20 در دانشکده فنی دانشگاه شهید باهنر کرمان انجام شد.

**بررسی گلخانه‌ای**

آزمایش در سال 1388 در قالب طرح کـاملاً تصـادفی با 4 تیمار و 8 تکرار، در گلخانه آزمایشی دانشکده کشـاورزی فجر دانشگاه شهید باهنر کرمان انجام گرفت. ترکیب تیمارهـا به صورت زیر بود:

1- اسـترین استرپتومایسـس 401 کـه طبـق آزمـایش‌هـای آنتی‌بیوگرام، دارای بیشترین اثر آنتاگونیستی روی قارچ بـود. 2- قـارچ *F. solani* f. sp. *melongenae* 3- قـارچ *F. solani* f. sp. *melongenae* و اسـترین استرپتومایسـس 401 و 4- شاهد که هیچ تیماری دریافت نکرد.

بذر گیاهـان در گلـدان‌هـای حـاوی پرلیـت اسـتریل کاشته شد. پس از رسیدن گیاهان به مرحله دو برگی، گلدان‌های حاوی خـاک اسـتریل مربـوط بـه تیمـار یـک و سـه بـا سوسپانسیون اسپور جدایـه استرپتومایسـس 401 بـا غلظـت $10^8$ اسـپور در هـر میلـی‌لیتـر بـر پایـه روش بهـارلوئی و همکاران (1388) تلقیح شدند. سپس گیاهـان بـا احتیـاط از پرلیت خارج شده و پس از قرار دادن به مدت 5-3 دقیقـه در محلول حاوی سوسپانسیون اسپور قارچ با غلظـت $10^6$ اسـپور در هر میلی‌لیتر، در گلدان کشت شدند. در مورد تیمار دو نیز گیاهان پس از قرار گـرفتن در محلـول حـاوی سوسپانسـیون اسپور قارچ، در گلدان‌هـای حـاوی خـاک اسـتریل کـه فاقـد سوسپانسیون اسـپور جدایـه استرپتومایسـس بودنـد، کشـت شدند.

**مطالعات مولکولی**

اسـتخراج DNA بـه روش CTAB انجـام شـد (Rogers & Bendich 1994). بـا توجـه بـه تنـوع بـالای ژن کیتیناز در باکتری‌هـای استرپتومایسـس، طراحـی آغـازگر از نواحی حفاظت شده این ژن، بـا در نظـر گـرفتن قوائـد کلـی طراحـی آغـازگر (Sambrook & Russel 2001)، توسـط نـرم افزار DNAMAN صورت گرفت. تعیین دمای بهینـه اتصـال[4]، سازگار بودن جفت آغازگرهای طراحی شـده، تشـکیل دایمـر پرایمر و عدم حضور لـوپ در آغازگرهـا بـه کمـک نـرم افـزار Fast-PCR مورد بررسی قرار گرفت و آغازگرهـای CH1FB با تـوالی '5-CCTTGACAGGTCCAGACCA-3' و CH1RB با توالی '5 -TCAGCAGCTCAGGTT-3' تعیین گردیدنـد. واکنش PCR شامل دمای 94°C به مدت 5 دقیقه، 55°C بـه مـدت 45 ثانیـه، 72°C بـه مـدت 1 دقیقـه، بـرای 30 دور و سپس 72°C به مدت 5 دقیقه با استفاده از آنزیم taq پلیمراز انجام شد و محصول PCR بـا اسـتفاده از AccuPrep® PCR Purification Kit, Bioneer, Korea خـالص سـازی گردیـد. همسانه‌سازی بااستفاده از (Ins T/A Clone ™ PCR Product Cloning Kit, Fermentas, Lithuania) انجـام شـد. بـاکتری ***E. coli*** استرین XL1Blue با استفاده از کلریـد کلسـیم 100 میلی‌مولار به‌حالت مستعد در آمده و پس از ترانسفورماسیون، باکتری‌ها روی پتری دیش‌های LB حاوی آمپی‌سـیلین رشـد داده شـدند. سـپس آزمـون Colony PCR روی پرگنـه‌هـای سفید انجام شد. استخراج پلاسـمید نوترکیـب بـا اسـتفاده از کیـت AccuPrep®Plasmid extraction Kit, Bioneer, Korea انجام شد. سپس هضم آنزیمی پلاسمید توسط آنزیم‌هـای برشـی *Pst1* و *EcoRI* صـورت گرفـت. پلاسـمیدهـای نوترکیب جهت تعیین توالی (توسط شرکت Microgene کـره جنوبی) مورد استفاده قرار گرفت. به‌منظور تعیین توالی دقیق قطعه کلـون شـده، ایـن عمـل در دو جهـت و بـا اسـتفاده از آغازگرهای M13-Forward / Reverse انجام شد.

نتایج حاصـل از تعیـین تـوالی بـا فرمـت الکتروگـرام Chromas بـا اسـتفاده ازنـرم افـزار Chromas Version 1.41 مورد بررسی قرار گرفتند و سـپس بـا تـوالی‌هـای موجـود در بانـک ژن درشـبکه NCBI (http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) مقایسـه شـدند. در ضمن آنالیز توالی‌ها بـا اسـتفاده ازنـرم افـزار DNAMAN Version 4.02 (Lynnon Biosoft. 1994-98) نیـز صـورت گرفت و ماتریس شباهت، درصد همولوژی نیـز بـا اسـتفاده از این نرم افزار به‌دست آمد.

1. Fungicide
2. Fungistatic
3. Scanning
4. Annealing Temperature



www.SID.ir

## نتایج و بحث

### جداسازی اکتینومیست‌های دارای فعالیت کیتینازی

از رقت‌های $10^{-3}$-$10^{-6}$ کشت خاک، تعداد 110 جدایه (46 استرین مربوط به منطقه سیرچ و 64 استرین مربوط به منطقه ماهان) اکتینومیست خاک‌زی به دست آمد که بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی از یک‌دیگر متمایز بودند. از 110 جدایه موجود، تعداد 18 جدایه با فعالیت کیتینازی جداسازی شد (شکل 1).

### تعیین فعالیت ضد قارچی و منحنی تولید ماده موثر

فعالیت آنتاگونیستی استرین‌ها با اندازه‌گیری قطر هاله بازدارنده رشد ارزیابی شد. از بین استرین‌های دارای فعالیت کیتینازی، استرین 401 بیشترین اثر آنتاگونیستی را علیه قارچ *F. solani* f. sp. *melongenae* نشان داد. یافته‌های حاصل، با نتایج چاکرابورتی و چاترجی (Chakraborty & Chatterjee 2008) که کنترل بیولوژیک پژمردگی فوزاریومی را روی گیاه بادمجان به وسیله *Trichoderma* spp. بررسی کردند، مطابقت دارد.

منحنی تولید ماده موثر استرین استرپتومایسس 401 در وضعیت کشت مایع علیه قارچ *F. solani* f. sp. *melongenae* در شکل دو نشان داده شده است. بیشترین فعالیت آنتاگونیستی جدایه 401 در روز نهم بعد از تلقیح بود. منحنی رشد جدایه برتر در این پژوهش، مشابه منحنی رشد گزارش شده ازال-مانسی وبریس (El-Mansi & Bryce 1999) است که آن‌ها نیز بیشترین فعالیت آنتاگونیستی جدایه‌های استرپتومایسسی را بین روزهای 7-11 بعد از مایه‌زنی عنوان کردند در حالی‌که در مورد جدایه‌های غیر استرپتومایسسی بررسی شده توسط آن‌ها، منحنی رشد، روال کاملاً متفاوتی را داشت. میانگین قطر هاله‌های ممانعت از رشد، بعد از رسیدن به روز حداکثر، به تدریج کاهش یافت تا جایی که دیگر جدایه قادر به کنترل قارچ نبود. پژوهش انجام شده توسط ساباراتنام و تراگویر (Sabaratnam & Traguair 2002) بر روی خواص آنتاگونیستی *Streptomyces* sp. استرین Di-844 علیه رایزوکتونیای گوجه، نشان داد که اثر پروپاگول‌های آنتاگونیست باگذشت زمان کاهش می‌یابد که با نتایج حاصل از این بررسی مطابقت می‌کند.

### حساسیت به کلروفرم و تعیین حلالیت ماده مؤثر ضد قارچی در حلال‌های آلی

ماده مؤثر استرین استرپتومایسس 401 دارای فعالیت کیتینازی نسبت به کلروفرم حساس بود و تحت تاثیر کلروفرم، ماده موثر آن نتوانست از رشد قارچ جلوگیری نماید. این موضوع بیان‌گر بررسی انجام شده توسط دولوس و همکاران (Davelos *et al*. 2004) روی ماده موثر تولید شده به وسیله استرپتومایسس‌ها است. در این مطالعه آن‌ها نشان دادند که استرین‌های فعالی که با ترشح آنزیم از رشد قارچ جلوگیری می‌کردند، پس از قرارگیری در معرض کلروفرم، ماهیت خود را از دست داده و قادر به کنترل قارچ و ایجاد هاله ممانعت از رشد نبودند. نتایج حلالیت ماده موثر ضد قارچی استرین 401 علیه قارچ نشان داد که ماهیت ماده موثر استرین 401 شدیداً قطبی بوده و در حلال‌های غیرقطبی غیر قابل حل می‌باشد (جدول 1).

الف A

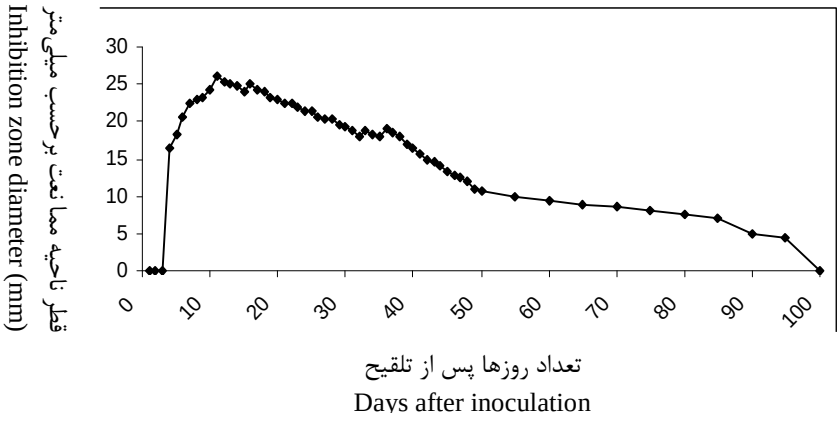
ب B

شکل1: الف: پتری‌دیش حاوی رقت $10^{-4}$ نمونه خاک در محیط کشت CGA پس از هفت روز انکوباسیون در $28^{\circ}C$. پرگنه‌های اکتینومیست و برخی پرگنه‌های قارچ‌ها و باکتری‌ها مشخص می‌باشد. ب: فعالیت کیتینازی اکتینومیست‌های جدا شده از کشت خاک روی محیط حداقل کیتین آگار پس از ده روز انکوباسیون در $28^{\circ}C$

Figure 1: A. Soil sample culture ($10^{-4}$ dilution) on CGA Medium, 7 days after incubation at 28°C. .Chitinase activity of some Streptomyces isolates on minimal chitin agar (MCA) medium, 8–10 d after incubation at 28°C



www.SID.ir




شکل 2: منحنی فعالیت ماده ضد قارچی استرپتومایسس استرین 401 علیه قارچ پاتوژن *F. solani* f. sp. *melongenae* در شرایط آزمایشگاه

Figure 2: Diagram of antifungal activity of *Streptomyces* isolate 401 against *F. solani* f. sp. *melongenae* in in vitro condition

جدول 1: نتایج حلالیت ماده موثر ضد قارچی استرپتومایسس استرین 401 علیه قارچ *F. solani* f. sp. *melongenae*

Table 1: Bioassay results of solubility tests of the antifungal principle (s) of *Streptomyces* isolate No. against *F. solani* f. sp. *melongenae* in fractions of different solvents indicated by well diffusion-۰۱4 method at 20 mg $mL^{-1}$ of dry crude.

| حلال Solvent | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| هگزان Hexane | | استون Acetone | | کلروفروم Chloroform | | متانول Metanol | | آب مقطر Distilled water | |
| **S** | **P** | **S** | **P** | **S** | **P** | **S** | **P** | **S** | **P** |
| + | + | + | - | - | - | + | - | + | + |

S: supernatant, P: pellet +: Soluble; -: Insoluble

**حداقل غلظت بازدارنده از رشد، دمای غیر فعال کننده و پایداری ماده مؤثر در شرایط آزمایشگاهی**

حداقل غلظت بازدارنده از رشد عصاره خام استرین 401 علیه قارچ *F. solani* f. sp. *melongenae* مقدار mg $ml^{-1}$ 1/25 [1] **به دست** آمد. طی مطالعه انجام شده توسط ذاکیر و همکاران (Zakir *et al*. 2002)، حداقل غلظت بازدارنده از رشد یک متابولیت فعال جدا شده از گونه‌های استرپتومایسس علیه چهار باکتری گرم مثبت و گرم منفی بین mg $ml^{-1}$ 32-64 به دست آمد. از آن‌جایی که استرپتومایسس بررسی شده در این پژوهش، در رقت‌های بسیار پایین‌تر نیز قادر به کنترل قارچ بیمارگر می‌باشد، می‌توان نتیجه گرفت که از نظر آنتاگونیستی اثر بسیار خوبی در کنترل بیمارگر مورد مطالعه دارد. متوسط دمای غیر فعال کننده ماده ضد قارچی عصاره خام استرین استرپتومایسس 401، دمای 90°C به‌دست آمد. ماندگاری عصاره خام در شرایط آزمایشگاه و در دمای محیط (26-28°C) مدت 124 روز بود. ساباراتنام و تراگویر نیز در سال 2002، ماندگاری عصاره خام استرین استرپتومایسس Di -944 را برابر با 180 روز گزارش کردند.

نتایج حاصل از ارزیابی فعالیت قارچ‌کشی یا قارچ ایستایی استرین 401 علیه قارچ *F. solani* نشان‌داد که این استرین دارای فعالیت قارچ ایستایی می‌باشد.

**تعیین مورفولوژی سطح اسپور**

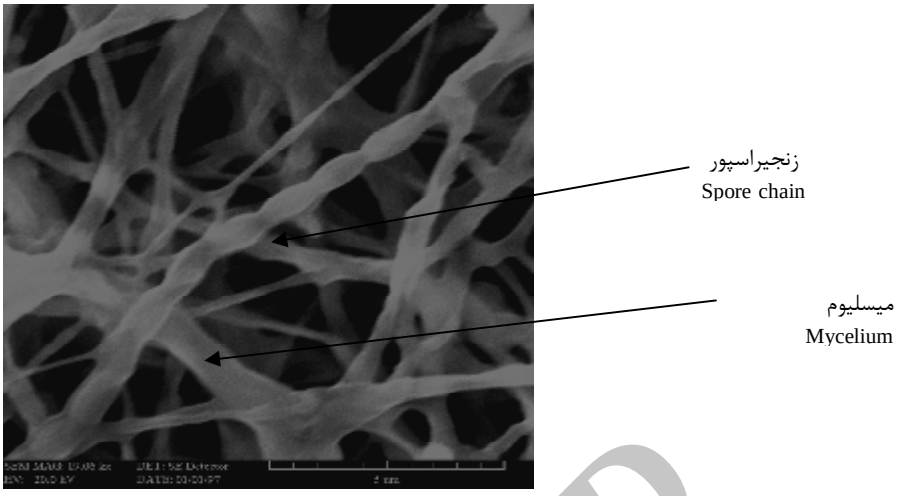
مورفولوژی میسلیوم و اسپور استرپتومایسس استرین 401 زیر میکروسکوپ الکترونی در شکل 3 نشان داده شده است. همان‌طور که در شکل دیده می‌شود، شکل زنجیره

Archive of SID



www.SID.ir

اسپور به‌صورت راست تا انعطاف‌پذیر است. هم‌چنین سطح اسپور به‌صورت صاف و بیضی شکل می باشد.




شکل 3: بررسی مورفولوژی میسلیوم و زنجیره اسپور استرپتومایسس استرین 401 با میکروسکوپ الکترونی Scanning مدل Lutz 100A

Figure 3: Scanning electron micrograph of mycelia of *Streptomyces* isolate No. 401

در پژوهشی که به منظور شناسایی و رده‌بندی گونه‌های مختلف *Streptomyces* توسط لوسی (Locci 1989) با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نوع اسکنینگ انجام شد، سطوح اسپورها در گونه *S. niveus*، به‌صورت صاف گزارش شد. هم‌چنین شکل زنجیره اسپور با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نوع اسکنینگ[1] در گونه‌های *S. hygroscopicus*، *S. vinaceus* و *S. griseus* به‌ترتیب به شکل فنری[2]، حلقوی[3] و راست تا انعطاف‌پذیر[4] گزارش شد.

**مطالعات گلخانه‌ای**

در نتیجه تلقیح قارچ روی گیاهچه بادمجان، علائم نکروزه شدن، زردی برگ‌های گیاه، آسیب دیدگی آوندی، پژمردگی و در نهایت مرگ گیاهچه دیده شد. در تیمار گیاهچه‌ها به‌طور هم‌زمان با استرپتومایسس استرین 401 و پاتوژن، علائم بیماری مشاهده نشد. هم‌چنین گیاهچه‌هایی که تنها با جدایه استرپتومایسس تلقیح شده بودند، از وضعیت رشدی بهتری نسبت به سایر تیمارها برخوردار بودند (شکل 4). چان و همکاران (Chan *et al.* 2003) نیز استفاده از خواص آنتاگونیستی باکتری *Bacillus subtilis* جدا شده از خاک‌های زراعی علیه قارچ *F. solani* را بررسی کردند. نتایج حاصل از آزمایش‌های گلخانه‌ای نشان داد که این باکتری آنتاگونیست به‌طور موثری قادر به کنترل قارچ مذکور از طریق جلوگیری از رشد میسلیوم می‌باشد.

**مطالعات مولکولی**

غلظت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و الکتروفورز DNA روی ژل آگارز یک درصد انجام شد. جهت تکثیر ژن کیتیناز، با استفاده از جفت آغازگر (CH1FB و CH1RB) قطعه‌ای به طول تقریبی 900 جفت باز به دست آمد. (شکل 5- الف).

پس از ترانسفورماسیون ناقل به باکتری ***E. coli*** استرین XL1Blue و انجام Colony PCR، از پرگنه‌های حاوی پلاسمید نوترکیب، استخراج پلاسمید انجام شد. هضم آنزیمی پلاسمید توسط آنزیم‌های برشی *Pst1* و *EcoRI* صحت قطعه کلون شده را تائید کرد. (شکل 5- ب).

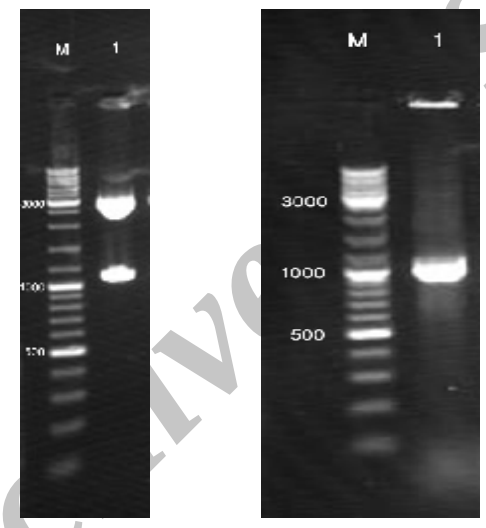
1. Scanning
2. Spirales
3. Rectinaculiaperti
4. Rectiflexibles



www.SID.ir

شکل 4: علائم ایجاد شده روی قسمت‌های هوایی گیاهچه‌های بادمجان تیمار شده با قارچ ***F. solani*** و استرین استرپتومایسس 401: **A**: گیاهان تلقیح شده با استرین استرپتومایسس؛ این گیاهان رشد بهتری را نسبت به سایر تیمارها نشان می‌دهند، **A+P**: گیاهان تلقیح شده توام با استرین استرپتومایسس و پاتوژن؛ گیاهان در این تیمار فاقد علائم بیماری می‌باشند، **C**: گیاهان شاهد؛ بدون علائم، **P**: گیاهان تلقیح شده با پاتوژن که علائم بیماری قابل مشاهده است.

Figure 4: *In vivo* greenhouse results in eggplant seedlings (P): In plants inoculated with the pathogene (*F. solani*) alone and (A+P): Plants inoculated with both *F. solani* and the antagonist *Streptomyces* isolate 401, (C): Untreated control plants. (A): Plants inoculated with *Streptomyces* isolate 401alone




الف ب

A B

شکل 5: الف: ژن کیتیناز تکثیر شده با جفت آغازگر (CH1FB و CH1RB)؛ M: مارکر مولکولی (kb 1)؛ 1: قطعه تکثیر شده به طول 900 جفت باز از استرین 401 با جفت آغازگر (CH1FB و CH1RB). ب: : نتایج حاصل از بررسی حضور ژن کیتیناز در پرگنه‌های سفید با استفاده از تکنیک Colony PCR و جفت آغازگر (CH1FB و CH1RB) که در آنها وجود ژن کیتیناز با حضور باند 900~ جفت بازی به اثبات رسیده است. M: مارکر مولکولی (kb 1)؛ 1: پرگنه سفید بررسی شده از استرپتومایسس استرین 401.

Figure 5: A. Electrophoretic mobility pattern of PCR amplified fragment (900 bp) of partial chitinase gene from Streptomyces isolate 401 (line 1) and pattern of DNA ladder mix (100–10000 bp) (line M). B. Electrophoretic mobility pattern of colony PCR fragment (900 bp) of white colony.

**تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک**

اطلاعات به‌دست آمده از تعیین توالی نشان‌داد که طول ژن کیتیناز جداسازی شده از استرپتومایسس استرین 401 برابر با 876 جفت باز است که پروتئینی به طول 292 اسید آمینه را کد می‌کند.

توالی نوکلئوتیدی و اسیدآمینه‌ای، ماتریس همولوژی و درصد مشابهت توالی اسید آمینه‌ای به‌دست آمده از این ژن با توالی‌های کیتیناز موجود در بانک ژن در شبکه NCBI در شکل 6-8 آمده است.



www.SID.ir

```
TCAGACGTGTCTCAGCTGCTGGTCGCGCTCGCCGCGGTCGTCGCGGCGCTCGTCGTCCTC60
 S  D  V  S  Q  L  L  V  A  L  A  A  V  V  A  A  L  V  V  L
CCCGCGGCCACCGCCCAGGCCCGCCACTGCGTCACCGCCTGGAACTCCTCGTCCGTCTAT120
 P  A  A  T  A  Q  A  R  H  C  V  T  A  W  N  S  S  S  V  Y
ACGGGCGGCCAGACCGCCTCGTACAACGGCCGCAACTACACCGCCAAGTGGTGGACCCAG180
 T  G  G  Q  T  A  S  Y  N  G  R  N  Y  T  A  K  W  W  T  Q
AACGAGCGGCCGGGCTCCTCCGACGTCTGGGCCGACAACGGCGCCTGCGGCACGGGCGGG240
 N  E  R  P  G  S  S  D  V  W  A  D  N  G  A  C  G  T  G  G
GGCGGCGAGCAGCCGGGCACCGGCTTCGTCGTCAGCGAGGCCCAGTTCAACCAGATGTTC300
 G  G  E  Q  P  G  T  G  F  V  V  S  E  A  Q  F  N  Q  M  F
CCGAACCGGAACTCCTTCTACACCTACAGCGGCCTCACCGCCGCCCTCAGCTCCTACCCG360
 P  N  R  N  S  F  Y  T  Y  S  G  L  T  A  A  L  S  S  Y  P
GCCTTCGCCAACACCGGCAGCACCGAGGTGAAGAAGCGCGAGGCCGCGGCCTTCCTCGCC420
 A  F  A  N  T  G  S  T  E  V  K  K  R  E  A  A  A  F  L  A
AACGTCAGCCACGAGACCGGCGGGCTGGTGTACATCAAGGAAGTCAACGAGGCCAACTAC480
 N  V  S  H  E  T  G  G  L  V  Y  I  K  E  V  N  E  A  N  Y
CCGCACTACTGCGACACCAGCCAGTCCTACGGCTGCCCGGCCGGCCAGGCCGCGTACTAC540
 P  H  Y  C  D  T  S  Q  S  Y  G  C  P  A  G  Q  A  A  Y  Y
GGCCGCGGCCCCATCCAGCTGAGCTGGAACTTCAACTACAAGGCCGCCGGTGACGCCCTC600
 G  R  G  P  I  Q  L  S  W  N  F  N  Y  K  A  A  G  D  A  L
GGCATCAACCTGCTGGCCAACCCCTACCTGGTGGAGCAGAACGCCTCCGTGGCCTGGAAG660
 G  I  N  L  L  A  N  P  Y  L  V  E  Q  N  A  S  V  A  W  K
ACCGGCCTCTGGTACTGGAACACCCAGAACGGCCCCGGCACCATGACGCCGCACAACGCC720
 T  G  L  W  Y  W  N  T  Q  N  G  P  G  T  M  T  P  H  N  A
ATCGTCAACAACCGCGGGTTCGGCGAGACCATCCGCTCCATCAACGGTTCGATCGAGTGC780
 I  V  N  N  R  G  F  G  E  T  I  R  S  I  N  G  S  I  E  C
AACGGCGGCAACCCGGCGCAGGTCCAGAGCCGGATCAACAAGTTCACGCAGTTCACCCAG840
 N  G  G  N  P  A  Q  V  Q  S  R  I  N  K  F  T  Q  F  T  Q
ATCCTCGGCACCACCACCGGCTCGAACCTGAGCTGCTGA
 I  L  G  T  T  T  G  S  N  L  S  C
```

شکل 6: توالی نوکلئوتیدی و اسیدآمینه‌ای ژن کیتیناز جدا شده از *Streptomyces* استرین 401.

Figure 6: Nucleotide sequence of the partial chitinase gene and the predicted amino acid

| | |
|---|---|
| *S. coelicolor* Chi F | 100% |
| *S. coelicolor* Chitinase | 100.0% 100% |
| *S. griseobrunneus* Chitinase | 84.2% 84.2% 100% |
| *Streptomyces* Sp. J-13-3 Chitinase | 90.6% 90.6% 87.5% 100% |
| *S. cyaneus* Chi A | 93.5% 93.5% 84.6% 88.3% 100% |
| *S. griseus* Chi C | 84.6% 84.6% 90.0% 86.3% 83.8% 100% |
| *Streptomyces* Sp. AJ9463 Chi IS | 89.2% 89.2% 86.9% 94.5% 88.8% 86.1% 100% |
| *Streptomyces* Sp. Chi IS | 88.0% 88.0% 86.5% 92.2% 88.8% 87.3% 96.1% 100% |
| *Nocardiopsis prasina* family 19 Chi | 79.2% 79.2% 86.1% 82.0% 80.3% 83.4% 83.8% 83.4% 100% |
| *Streptomyces* isolate 401 | 85.4% 85.4% 90.8% 88.7% 84.2% 93.8% 88.8% 88.0% 87.3% 100% |

شکل 7: ماتریس همولوژی ترادف اسیدآمینه‌ای ژن کیتیناز جدا شده از *Streptomyces* استرین 401 و سایر ژن‌های کیتیناز خانواده 18 و 19 موجود در NCBI با استفاده از نرم افزار DNAMAN.

Figure 7: Homology matrix of *chitinase* gene amino acid isolated from *Streptomyces* isolate 401 and other existed *chitinase* genes from 18 and 19 family of chitinase in NCBI by using DNAMAN software

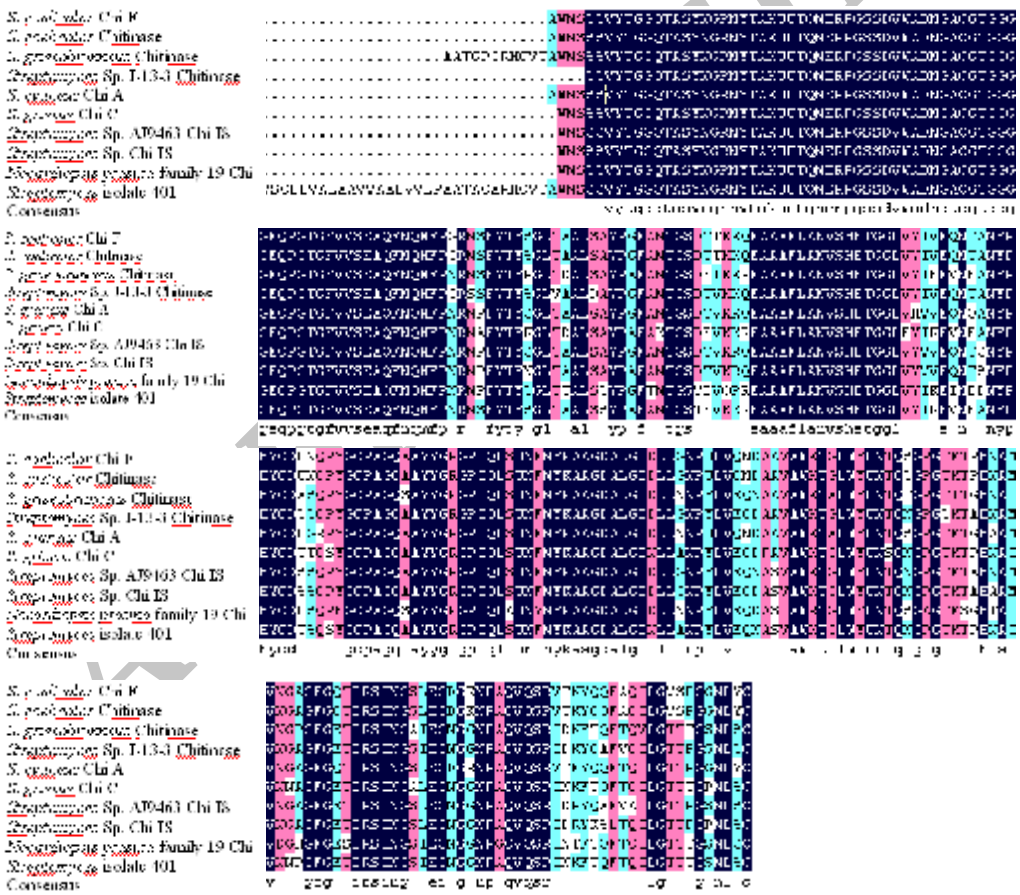
بررسی توالی‌ها و مقایسه آن‌ها با توالی نوکلئوتیدی و اسید آمینه‌ای سایر ژن‌های موجود در بانک ژن در شبکه NCBI مشخص کرد که این ژن کامل بوده و دارای یک دومن متصل شونده و یک دومن کاتالیتیک است که مشابهت بالایی را با کیتینازهای خانواده 19 مانند ChiC از *S. griseus* در سطح اسیدهای آمینه دارد. ژن کد کننده کیتیناز از *Streptomyces* sp (strainJ-13-3) توسط *کاتسوشیرو* و همکاران (Katsuichiro *et al*. 2004) همسانه‌سازی شد. نتایج تعیین توالی نشان‌داد که این قطعه ژن از 298 اسید آمینه تشکیل شده و پروتئینی با وزن مولکولی 31081 دالتون را کد می‌کند که شامل یک توالی سیگنال به‌طول 29 اسیدآمینه و یک پروتئین به‌طول 269 اسیدآمینه است. مقایسه توالی اسیدهای آمینه قطعه ژن مذکور با سایر کتیینازها نشان‌داد که کیتیناز J-13-3 متعلق به کیتینازهای خانواده 19 می‌باشد.



www.SID.ir

*شاپیرا* و همکاران (1989) نشان‌دادند که بیان ژن همسانه سازی شده کیتیناز در *E. coli* باعث کنترل بیماری ناشی از *Sclerotium rolfsii* در لوبیا می‌شود. در مطالعه‌ای دیگر، *ایتو* و همکاران (2003) کیتینازی به نام *ChiC* را در *S. griseus* HUT6037 کشف کردند که این کیتیناز در شرایط آزمایشگاهی توانست از رشد *Trichoderma reesei* ممانعت کند. ژن *chiC* تحت پروموتر CaMV 35S به برنج منتقل شد و برنج‌های ترانسژنیک توانستند از رشد *Magnaporthe grisea*، عامل بیماری بلاست، در برگ جلوگیری کنند.

اثرات منفی سموم شیمیایی مورد استفاده بر محیط زیست و خطر آلودگی مجدد خاک، ایجاد مقاومت در پاتوژن ها، محدودیت آفت‌کش‌ها، عدم موفقیت پایدار دیگر روش‌های کنترل و به‌ویژه دشوار بودن کنترل بیماری‌های خاک‌زی با آفت‌کش‌های اختصاصی، اهمیت استفاده از روش‌های کنترل بیولوژیکی را روز افزون گردانده است. استرین‌های اکتینومیستی فعال از نظرفعالیت کیتینازی می‌توانند نقش بسیار برجسته‌ای در کنترل بیولوژیک پاتوژن‌ها به‌ویژه پاتوژن‌های خاک‌زی داشته باشند. از سوی دیگر، امکان استفاده از خود استرین یا ژن همسانه سازی شده در جهت زیست پالایشی (Bioremediation) ماده سخت کیتین به عنوان یکی از آلاینده‌های محیط زیست در خشکی و دریا نیز وجود دارد.



شکل 8: درصد مشابهت توالی اسید آمینه‌ای ژن کیتیناز جداسازی شده از *Streptomyces* استرین 401 با سایر توالی‌های اسید آمینه-ای ژن کیتیناز موجود در NCBI با استفاده از نرم افزار DNAMAN.

Figure 8: Alignment of the amino acid sequence of partial chitinase gene from *Streptomyces* isolate 401 with other existed amino acid sequences of families of 18 and 19 chitinases in NCBI by using DNAMAN software.

**منابع:**

جهت ملاحظه منابع به صفحه‌های 9-10 متن انگلیسی مراجعه شود.



www.SID.ir