Journal of Microbial World
Volume 14, No. 4, March 2022

Original Article

Antifungal activity of Bacillus subtilis isolated from soil in Tehran's parks against Fusarium graminearum

Fatemeh Rafiee[1], Mohammad Reza Fazeli[2] , Abbas Akhavan Sepahi[3] , Zahra Noormohammadi[1]

[1]Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. [2]Department of Drug and Food Control, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Quality Assurance Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. [3]Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences North Tehran, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Soil microorganisms play an important role in the biological control of pathogenic fungi. The aim of this investigation was to isolate soil-borne Bacillus subtilis with the ability to produce antifngal lipopeptides that are suitable for suppressing Fusarium graminearum, which contaminates wheat, corn, potato and a wide range of plants.

Materials & Methods: *B. subtilis* was isolated from the rhizospher of healthy plants of park slocated in the five areas north, south, east, west and center of Tehran and was identified based on morphological characteristics, biochemical tests and sequencing of 16S rRNA. The antagonistic activity of isolated strains against *F. graminearum* was investigated by Well method. The strains that inhibited the growth of fungi and showed the greatest inhibition zone, were selected. Surfactin of selected bacteria was purified by methanol method and bacterial metabolites and pure surfactin (Sigma Company) were compared with, high performance liquid chromatography (HPLC).

Results: Among 60 isolated strains, 27 strains had antifungal activity. Six strains with the highest fungal inhibition zone (8-16 mm) were selected and their yellow color and transparency was a confirmation to HPLC. Two bacteria with the highest amount of surfactin production by molecular method showed high similarity with *B. subtilis*.

Conclusion: The results show that *Bacillus subtilis* isolated from soil are good candidates for biological control of plant pathogenic fungi and therefore can a suitable alternative to chemical fungicides.

Keywords: Bacillus subtilis, Fusarium graminearum, antifungal agent, surfactin.

Received: 30 September 2021 Revised: 5 January 2022 Accepted: 2 February 2022

Correspondence to: Mohammad Reza Fazeli
Tel: +98 2164131417
E-mail: mofazeli@yahoo.com
Journal of Microbial World 2022, 14(4): 17-28
DOI:10.30495/jmw.2021.690445

Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.

مجله دنیای میکروب‌ها
سال چهاردهم شماره چهارم (پیاپی ۴۹) زمستان ۱۴۰۰
صفحات ۲۸-۱۷

Original Article

فعالیت ضد قارچی *باسیلوس سوبتیلیس* بومی تهران علیه قارچ *فوزاریوم گرامینئاروم*

فاطمه رفیعی[۱]، محمدرضا فاضلی[۲*]، عباس اخوان سپهی[۳]، زهرا نور محمدی[۱]

[۱] گروه میکروبیولوژی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. [۲] دانشکده داروسازی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
[۳] گروه میکروبیولوژی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: میکروارگانیسم‌های خاک نقش مهمی درکنترل بیولوژیک قارچ‌های بیماری‌زا دارند. هدف از این تحقیق یافتن باسیلوس سوبتیلیس (B.subtilis) بومی خاک با توانایی تولید لیپوپپتیدهای ضدقارچی می‌باشد که برای از بین بردن فوزاریوم گرامیناروم (Fusarium graminearum)، عامل آلودگی گندم، ذرت، سیب زمینی و بسیاری از گیاهان دیگر کارآمد است.

مواد و روش‌ها: باکتری باسیلوس سوبتیلیس از خاک اطراف ریشه گیاهان سالمِ پارک‌های پنج منطقه‌ی شمال، جنوب، شرق، غرب و مرکز شهر تهران جداسازی شد و بر اساس خصوصیات مورفولوژیک، آزمون‌های بیوشیمیایی و تعیین توالی قطعه‌ی 16S rRNA مورد شناسایی قرار گرفت. فعالیت آنتاگونیستی جدایه‌های به دست آمده علیه قارچ فوزاریوم گرامیناروم به روش چاهک‌گذاری بررسی و جدایه‌هایی که مانع رشد قارچ‌ها بودند و بیشترین هاله‌ی عدم رشد را نشان دادند، انتخاب شدند. سورفکتین (surfactin) حاصل از باکتری‌های منتخب با روش متانولی خالص گردید و با استفاده از کروماتوگرافی مایع با فشار بالا high performance (liquid chromatography) (HPLC)، متابولیت باکتری‌ها و سورفکتین خالص (شرکت سیگما) مورد مقایسه قرار گرفت.

یافته‌ها: بر اساس نتایج، از بین ۶۰ جدایه منتخب، ۲۷ جدایه فعالیت ضدقارچی داشتند. ۶ جدایه با بیشترین میزان هاله‌ی عدم رشد قارچی برابر با ۸-۱۶ میلی‌متر انتخاب شدند، سورفکتین زرد و شفاف تولیدی آن‌ها با HPLC تایید گردید. ۲ باکتری با بیشترین میزان تولید ، با روش مولکولی قرابت نزدیکی با باسیلوس سوبتیلیس را نشان دادند.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان می‌دهند که باسیلوس سوبتیلیس‌های جداسازی شده از خاک، گزینه خوبی برای کنترل زیستی قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی می‌باشند و بنابراین می‌توانند جایگزینی مناسب برای قارچ کش‌های شیمیایی باشند.

واژگان کلیدی: باسیلوس سوبتیلیس، فوزاریوم گرامیناروم، مواد ضد قارچی، سورفکتین.

دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۷/۸ ویرایش مقاله: ۱۴۰۰/۱۰/۱۵ پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۱۱/۱۳

مقدمه

محصولات کشاورزی بخش مهمی از رژیم غذایی انسان را تشکیل می‌دهند (۱). قارچ‌ها از مهم‌ترین آفات گیاهان هستند. ۲۰ درصد از میوه‌های برداشت شده و انبار شده در معرض حمله قارچی هستند و انبارداری گیاهان از موارد مهم اقتصاد کشاورزی می‌باشد (۲). به دلیل شرایط مناسب انبارها برای تولید سموم قارچی از جمله تاریکی و رطوبت، سالانه میلیون‌ها تن از محصولات کشاورزی در این مکان‌ها از بین می‌روند (۳ و ٤). فوزاریوم از قارچ‌های مهمی است که آفت گیاهی محسوب می‌شود و سفیدک ناشی از قارچ فوزاریوم

*) آدرس برای مکاتبه: دانشگاه تهران، دانشکده داروسازی، تهران، ایران.
تلفن: ۰۲۱٦٤۱۳۱٤۱۷ پست الکترونیک: mofazeli@yahoo.com

حقوق نویسندگان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد و تحت مجوز مالکیت خلاقانه (http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/) در فصلنامه دنیای میکروب‌ها منتشر شده است. هرگونه استفاده غیرتجاری فقط با استناد و ارجاع به اثر اصلی مجاز است.

(Fusarium Head Blight)، به طور کلی جدی‌ترین بیماری گیاهی و یکی از مهم‌ترین و مخرب‌ترین بیماری‌های قارچی گندم می‌باشد (۵). گونه *فوزاریوم گرامینارووم* که شامل حداقل ۱۱ جدایه فیلوژنیک است، از گونه‌های غالب تولید کننده مایکوتوکسین در ذرت می‌باشد (٦ و ٤). استفاده از سموم شیمیایی عمدتا مؤثرترین روش کنترل بیماری‌های گیاهی است (۷) و قارچ‌کش‌های شیمیایی ابزار اصلی برای کنترل قارچ‌های بیماری‌زا درگیاهان انبار شده می‌باشند (۳). در سال‌های اخیر با توجه به خطرهای زیست محیطی ناشی از سموم شیمیایی، کنترل بیولوژیک مورد توجه قرار گرفته است (۸). در کنترل بیولوژیک می‌توان از باکتری‌هایی با توانایی تولید ترکیباتی ضدمیکروبی مانند پپتیدهای ضدقارچی استفاده نمود و در این میان، باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* یک نماینده مناسب به شمار می‌رود (۹) که می‌تواند مستقیما و از طریق حمله به میسلیوم قارچ‌ها و هم به صورت غیرمستقیم و از راه تولید متابولیت‌های ضدقارچی، از رشد و تکثیر قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی ممانعت به عمل آورد (۱۰). باسیلوس‌ها اکثراً ساپروفیت بوده و از محیط‌های مختلف جدا می‌شوند و قادر به رشد در مناطق مختلفی از بیوسفر هستند (۱و۱۱). جدایه‌های مختلف *باسیلوس سوبتیلیس* برای تولید ایتورین، فنجیسین و سورفکتین استفاده می‌شوند و از رشد انواع مختلفی از قارچ‌ها ممانعت می‌کنند (۱۲). قدرت اثر سورفکتین علیه قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی مشابه سموم شیمیایی می‌باشد و در میان طیف وسیعی از ضدقارچ‌ها، سورفکتین دارای سمیت و حساسیت کمی برای انسان و حیوان بوده و یک کاندیدای مناسب به عنوان آفت‌کش است که خطری برای محیط زیست ندارد (۱۳). سوررفکتین‌ها نوعی لیپوپپتید با ساختاری حلقوی هستند و از ۷ واحد تشکیل شده‌اند که این واحدها به یک بتا–هیدروکسی آمینوفتی‌اسید متصل هستند (۹). این ترکیبات با غشای سیتوپلاسمی قارچ‌ها واکنش داده و سبب ایجاد منافذ و افزایش نفوذپذیری غشای سلول هدف و در نهایت مرگ سلول می‌گردند. سورفکتین‌ها از آمینواسیدهای با زنجیره جانبی اسید چرب تشکیل شده‌اند و به این دلیل در مقایسه با آفت‌کش‌های شیمیایی به سادگی تجزیه‌پذیر هستند (١٤). عوامل کنترل بیولوژیک می‌توانند یا به صورت دوزهایی از لیپوپپتیدهای ضدقارچ باشند و یا به صورت ماده تلقیحی یعنی اسپور باشند که با ایجاد بیوفیلم‌های پایدار در ریشه‌های گیاه، مانع رشد قارچ‌ها می‌شوند(۱۵).

باسیلوس سوبتیلیس با دارا بودن اندوسپور قدرت تحمل شرایط سخت محیطی را دارد و مقاومت ویژه‌ای در آن ایجاد شده است (۵و۱۵) همچنین *باسیلوس سوبتیلیس* قابلیت دستکاری ژنتیکی دارد و میکروارگانیسم مورد تائید اداره غذا و داروی ایالات متحده آمریکا، شناخته شده به عنوان GRAS (generally recognized as safe) و ایمن برای استفاده در صنایع غذایی می‌باشد (۱۰). سورفکتین تولید شده توسط *باسیلوس سوبتیلیس* دارای خاصیت بیوسورفکتانتی نیز هست که کاربردهای مختلفی چون کاهش کشش سطحی، بازیافت نفت خام، زیست‌پالایی و ... دارد (١٦). در این تحقیق، بیشتر خاصیت ضدقارچی سورفکتین مورد مطالعه قرار گرفت، جدایه‌های بومی این باکتری که توان تولید بالایی از مواد ضدقارچی را دارند شناسایی و جداسازی شدند و سورفکتین تولیدی آن‌ها به عنوان یک جایگزین مناسب مواد ضدقارچی شیمیایی معرفی گردید تا کمی از مخاطرات زیست محیطی بکاهد.

مواد و روش‌ها

الف) جداسازی و آماده سازی نمونه‌ها از خاک: بیست وپنج نمونه خاک از پارک‌های پنج منطقه‌ی شمال، جنوب، شرق، غرب و مرکز تهران از عمق ۱۵– ۱۰ سانتی‌متری نزدیکی ریشه‌ی گیاهان ظاهرا سالم با کمک قاشقک استریل جمع‌آوری گردید (۱۷). نمونه‌ها سریعا به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران ارسال شد. نمونه‌های خاک، با الک با قطر منافذ ۲ میلی‌متر الک شده و ۵ گرم از آن در ٤٥ میلی‌لیتر آب مقطر استریل، در ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتر حل کرده و به مدت ۳۰ دقیقه در بن‌ماری ۸۰ درجه سلیسیوس حرارت داده شد (۵و۱۸). پس از خنک شدن

ارلن‌ها، رقت‌های متوالی (۱۰۱ تا ۱۰۸) از نمونه‌ها با سرم فیزیولوژی استریل تهیه گردید (۱۷). سپس ۱ میلی‌لیتر از هر رقت تهیه شده به پلیت استریل انتقال داده شده و ۲۰ میلی‌لیتر محیط نوترینت آگار به آن اضافه گردید. محتویات هر پلیت به منظور پخش شدن یکنواخت هم زده شد و پس از بستن محیط در دمای ۳۵ درجه سلیسیوس به مدت ۲۴ ساعت، در شرایط هوازی، گرمخانه‌گذاری گردید (۱۹).

ب) جداسازی و شناسایی باسیلوس سوبتیلیس: پس از ظاهر شدن کلنی‌های باکتری، برای شناسایی و جداسازی باسیل‌های گرم مثبت مشکوک به *باسیلوس سوبتیلیس*، نمونه‌ها از لحاظ شکل ظاهری، قوام، رنگ و شکل کلنی و خصوصیات بیوشیمیایی مورد ارزیابی قرار گرفتند (۲۰).

باکتری‌های گرم مثبت اسپورداری که با رنگ‌آمیزی گرم و مالاشیت‌گرین جداسازی شدند، با آزمایشات بیوشیمیایی کاتالاز، هیدرولیز لسیتین، سیترات، SIM، احیای نیترات، تخمیر قندهای گلوکز، آرابینوز، مانیتول، گزیلوز و تست OF شناسایی گردیدند (۲۱).

نمونه‌ی مثبت و منفی به عنوان شاهد، مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌ی مثبت، جدایه استاندارد *باسیلوس سوبتیلیس* PTCC 1023 از مرکز کلکسیون میکروبی باکتری‌های صنعتی ایران خریداری شد (۱۳). تمامی نمونه‌های جداسازی شده به کمک بافر فسفات سالین حاوی ۲۰ درصد گلیسرول در میکروتیوب‌های استریل جمع و در فریزر ۸۰- درجه سلیسیوس نگهداری گردیدند (۲۲).

برای بررسی اثر ضدقارچی، جدایه‌ی *فوزاریوم گرامینارم* نیز از آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران تهیه و بر روی محیط SDA (sabouraud dextrose agar) کشت داده شد و در دمای ۲۵ درجه سلیسیوس به مدت ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید (۲۳).

ج) تعیین فعالیت ضد قارچی: توانایی تولید متابولیت‌های ضد قارچی جدایه‌های باسیلوس با تکنیک چاهک‌گذاری بررسی گردید (۲۴). ابتدا از جدایه باکتریایی و اسپور قارچی، طبق شاهد نیم مک فارلند سوسپانسیون تهیه و در شرایط استریل و زیر هود، در محیط SDA در پلیت، دو چاهک با قطر ۷ میلی‌متر ایجاد شد. از سوسپانسیون قارچی، کشت سطحی داده شد و سپس در هر چاهک ۵۰ مایکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی ریخته و ۴۸ ساعت در ۲۵ درجه سلیسیوس قرار داده شد و سپس هاله‌ی عدم رشد با خط کش آنتی بیوگرام، اندازه‌گیری گردید (۲۵). با توجه به نتایج، متابولیت ضدقارچی (سورفکتین) از جدایه‌هایی که بیشترین قطر هاله‌ی عدم رشد را داشتند، استخراج شد.

د) جداسازی سورفکتین: به منظور استخراج متابولیت، به ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری که حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع بودند، ۲ درصد سوسپانسیون باکتریایی مورد آزمایش تلقیح و ارلن‌ها به مدت ۵ روز در شیکر انکوباتور، با دمای ۲۵ درجه سلیسیوس و دور 200 rpm گرمخانه‌گذاری شدند. پس از آن ۵۰ میلی‌لیتر از نمونه، داخل فالکون ۱۰۰ میلی‌لیتری ریخته شد و با دور 8000 rpm به مدت ۲۵ دقیقه و در دمای ۴ درجه سلیسیوس سانتریفیوژ گردید (۱۵). pH مایع رویی، با اسید کلریدریک ۶ نرمال، به ۲ رسانده شد. مایع رویی اسیدی، مجددا در داخل فالکون ۱۰۰ میلی‌لیتری استریل، با دور 1000 rpm به مدت ۱۵ دقیقه و دمای ۴ درجه سلیسیوس سانتریفیوژ شد. در این مرحله مایع رویی، دور ریخته شد و رسوبی که بر جداره‌ی فالکون‌ها تشکیل شده و حاوی لیپوپپتید ضدقارچی بود، به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلیسیوس قرار داده شد تا رطوبت گیری شود، سپس رسوب در متانول حل شده و دوباره محلول حاصله به مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفیوژ با دور 2000 rpm و دمای ۴ درجه سلیسیوس سانتریفیوژ گردید (۹). به این ترتیب مایع رویی زرد رنگ و شفاف عصاره‌ی متانولی متابولیت ضدقارچ، در میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری برای HPLC آماده گردید (۲۶).

و) تایید و اندازه‌گیری کمی سورفکتین با HPLC: متابولیت ضدقارچی سورفکتین خالص که از شرکت آلمانی Sigma-Aldrich خریداری شده بود به عنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفت. میزان ۲۰ مایکرولیتر از محلول متانولی

شاهد، به دستگاه کروماتوگرافی مایع (مدل zorbox شرکت Agilent ایالات متحده آمریکا) تزریق گردید. ستون Zorbax c-18 به عنوان فاز ثابت و محلول ۱۰۰ در صد متانول به عنوان فاز متحرک در نظر گرفته شد. سرعت ۱ میلی‌لیتر در دقیقه، به مدت ۲۰ دقیقه، با طول موج ۲۴۰ نانومتر تنظیم و پس از تزریق نمونه‌های مجهول به دستگاه، نتایج به صورت پیک‌هایی در منحنی کروماتوگرام ثبت گردید (۱۶). بر اساس نتایج HPLC نمونه‌ای که بیشترین میزان تولید را نشان داد، برای شناسایی به روش 16S rRNA مورد بررسی قرار گرفت (۲۷).

ز) شناسایی مولکولی باکتری باسیلوس سوبتیلیس: به منظور تعیین توالی ژن 16S rRNA، پس از کشت باکتری، استخراج DNA با استفاده از کیت DNeasy Blood and Tissue Haand book (شرکت Qiagen) انجام و PCR برای تکثیر ژن 16S rRNA با پرایمرهای یونیورسال ۲۷ f:5–GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3 و ۱۵۴۱ r:5-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3 انجام شد. برنامه PCR با initial denaturation در دمای ۹۵ درجه سلیسیوس به مدت ۳ دقیقه و denaturation در دمای ۹۳ درجه سلیسیوس به مدت ۴۵ ثانیه و Annealing در دمای ۵۸ درجه سلیسیوس به مدت ۶۰ ثانیه و extention در ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۹۰ ثانیه اجرا گردید. در پایان غلظت DNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. خالص‌سازی محصول PCR با کمک کیت Qiaquick PCR purification انجام و پس از خالص‌سازی محصول PCR، الکتروفورز و همچنین تعیین توالی توسط شرکت Bioneer کره با روش Sanger انجام گردید (۱۳و۲۸).

ح) آنالیز آماری: در این پژوهش کلیه‌ی آزمون‌ها با سه تکرار انجام شدند، تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ با استفاده از آزمون ANOVA انجام و نمودار با استفاده از نرم افزار EXEL ترسیم گردید.

یافته‌ها

الف) جداسازی و آماده سازی نمونه‌ها از خاک: در مرحله اول میکروارگانیسم‌های هتروتروف مزوفیل هوازی که قادر به تولید اندوسپورهای مقاوم به دمای ۸۰ درجه سلیسیوس بودند جدا شدند و پس از کشت در محیط نوترینت آگار، کلنی‌هایی با قطر ۳-۱ میلی‌متر، سفید، گرد، خشک و خشن، برآمده با حاشیه‌ای مضرس که مشکوک به *باسیلوس سوبتیلیس* بودند جداسازی شدند .

ب) شناسایی و جداسازی باسیلوس سوبتیلیس با روش‌های شیمیایی: پس از رنگ‌آمیزی گرم، باسیل‌های بنفش گرم مثبت و با رنگ‌آمیزی مالاشیت‌گرین، باسیل‌های گرم مثبتی که دارای اسپور بیضی شکل انتهایی با رنگ سبز و سلول‌های رویشی قرمز بودند، انتخاب شدند.

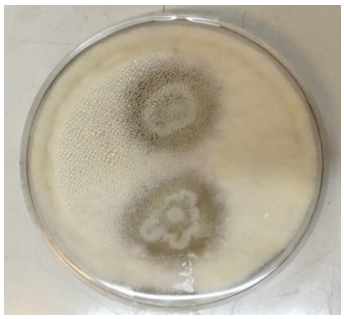
پس از بررسی بیوشیمیایی، جدایه‌های کاتالاز مثبت، لسیتیناز منفی، سیترات مثبت، دارای حرکت، حاوی آنزیم ردوکتاز، هوازی و با قابلیت استفاده از قندهای گلوکوز، آرابینوز، مانیتول و گزیلوز به عنوان باکتری‌های *باسیلوس سوبتیلیس* شناسایی شدند که در مجموع ۶۰ جدایه بودند.

ج) تعیین فعالیت ضدقارچی: با بررسی اثر ضدقارچی با روش چاهک‌گذاری، پس از مجاورت ۶۰ جدایه منتخب با قارچ *فوزاریوم گرامیناروم*، ۲۷ جدایه که در محیط SDA در دمای ۲۵ درجه سلیسیوس به مدت ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری، هاله‌ی عدم رشد نشان داده و تولید کننده‌ی بیشترین متابولیت ضد قارچی بودند جدا شده (شکل ۱) و از بین آن‌ها ۶ جدایه با بالاترین میزان تولید (بزرگترین هاله‌ی عدم رشد) برای ادامه کار انتخاب شدند (شکل۲). بیشترین میزان هاله‌ی عدم رشد ۱۶ میلی‌متر و کمترین مقدار ۸ میلی‌متر بود. در بقیه جدایه ها قطر هاله از ۹ تا ۱۵ میلی‌متر بود.

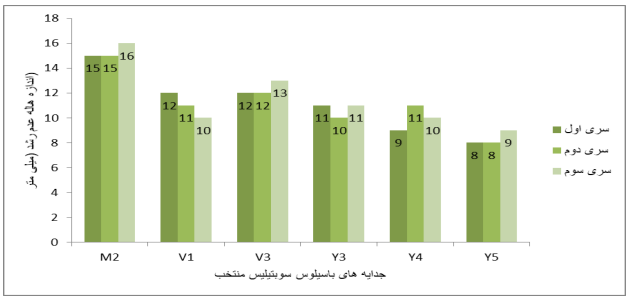
د) جداسازی سورفکتین: از ۶ جدایه منتخب با روش مجاورت با اسید و متانول، لیپوپپتید ضدقارچی زرد و شفاف سورفکتین خالص سازی شد و با سورفکتین خالص استاندارد، با روش HPLC مورد ارزشیابی قرار گرفت.

ه) اندازه‌گیری کمی سورفکتین با HPLC: با توجه به منحنی‌های کروماتوگرام وجود متابولیت سورفکتین در تمامی نمونه‌ها تایید گردید (شکل ۳ الف – ب). در کروماتوگرام حاصل از این

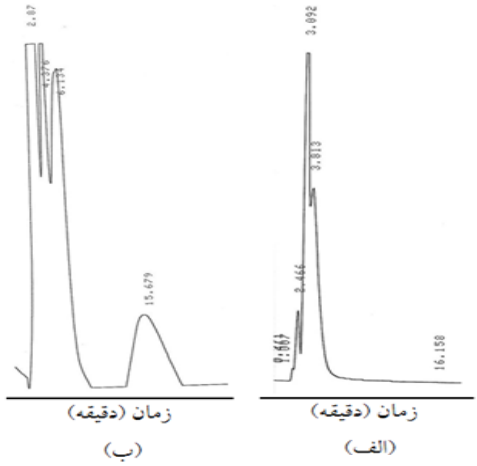
نمونه در زمان ۲ دقیقه و ۸۷ دهم ثانیه یک پیک ظاهر شد که به ترتیب با زمان ظهور پیک‌های سورفکتین در کروماتوگرام حاصل از سورفکتین استاندارد در زمان ۳ دقیقه و ۳ صدم ثانیه مطابقت دارد. جدایه‌هایی که بیشترین میزان تولید را بر اساس سطح زیر نمودار نشان دادند، برای اطمینان بیشتر به روش 16S rRNA مورد شناسایی قرار گرفتند.



شکل ۱: هاله‌ی عدم رشد *فوزاریوم گرامیناروم* در برابر سورفکتین *باسیلوس سوبتیلیس* در محیط SDA.

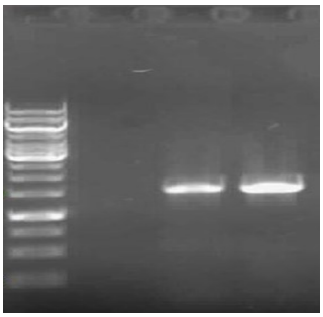


شکل ۲: هاله‌ی عدم رشد ٦ جدایه‌ی منتخب *باسیلوس سوبتیلیس* در برابر *فوزاریوم گرامیناروم* با سه تکرار در محیط SDA.



شکل ۳: کروماتوگرام حاصل از HPLC الف) سورفکتین استاندارد، پیک در اطراف دقیقه سوم. ب) متابولیت‌های حاصل از جدایه‌ی بومی پیک‌های دقیقه سوم مربوط به سورفکتین می‌باشد.

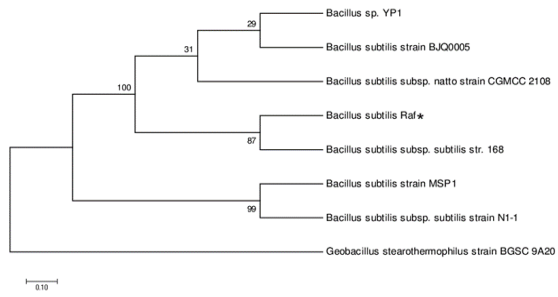
و) شناسایی مولکولی باکتری باسیلوس سوبتیلیس: پس از استخراج DNA و انجام PCR برای تکثیر ژن 16S rRNA، غلظت DNA در طول موج ۲٦۰ نانومتر، به میزان 5/94 ng/µL بود که با خالص‌سازی محصول PCR و الکتروفورز انجام شده روی آن، وجود قطعه‌ی ۱۵۰۰ نوکلئوتیدی تائید گردید (شکل ٤).



شکل ٤: محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از پرایمرهای یونیورسال *B.subtilis* در ژل آگار ۱٪. از سمت چپ به ترتیب: ستون ۱: مارکر DNA یک کیلو جفت باز. ستون ۲: کنترل منفی. ستون ۳و٤: ژنوم جدایه‌های *B.subtilis* منتخب.

پس از بلاست توالی‌ها در سایت NCBI، جدایه انتخاب شده که بیشترین میزان هاله‌ی عدم رشد را نشان داد از نوع *باسیلوس سوبتیلیس* بود و با عنوان *Bacillus subtilis Raf* مشخص شد که شباهت آن با سایر گونه‌های *باسیلوس سوبتیلیس* ۹۹/۷۰٪ می‌باشد. با رسم درخت فیلوژنتیکی قرابت اجدادی آن‌ها هم مشخص گردید (شکل۵).

درخت فیلوژنتیکی با نرم افزار مگا ۷ روش اتصال مجاور (۲۹) بر اساس توالی ژن 16S rRNA بوت استرپ ۱۰۰۰ (۳۰) رسم شد.



شکل ۵: درخت فیلوژنتیکی باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* مولد سورفکتین جدا شده از خاک با بیشترین هاله‌ی عدم رشد.

بحث

امروزه به دلیل توجه ویژه به سلامتی انسان و محیط زیست و همچنین مقاوم شدن برخی جدایه‌های عوامل بیماری‌زا به سموم شیمیایی و آلودگی محیط زیست به وسیله این آفت‌کش‌ها، از اواخر سال ۱۹۰۰ دانشمندان تلاش‌های زیادی به منظور استفاده از آنتاگونیسم‌های طبیعی بین ارگانیسم‌های ساکن خاک برای حفاظت از گیاهان انجام داده‌اند (۳۱). باکتری‌های خاک‌زی و غیر بیماری‌زا با توانایی آنتاگونیستی قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی و جلوگیری از بیماری، یک جایگزین مناسب برای قارچ‌کش‌های شیمیایی هستند و از مهم‌ترین عوامل مؤثر در برقراری و ایجاد پایداری در سیستم‌های کشاورزی و زراعی می‌باشند (۱٤). گونه‌های باسیلوس به ویژه *باسیلوس سوبتیلیس* به واسطه داشتن یک سری ویژگی‌های خاص، از قبیل تولید ترکیبات آنتی‌بیوتیکی ضد قارچی و نیز آنزیم‌های هیدرولیتیک و توانایی تولید اسپور پایدار، به عنوان عوامل کنترل کننده بیولوژیک، کارایی زیادی در زمینه سیستم مدیریت تلفیقی آفات که یک راه مناسب برای مدیریت آفات به وسیله ترکیب ابزار بیولوژیک، فیزیکی و شیمیایی، بدون خطرات اقتصادی و محیطی است دارند (۳۲).

هدف از انجام این تحقیق بررسی اثر ضدقارچی سورفکتین به دست آمده از جدایه‌های *باسیلوس سوبتیلیس* بومی جدا شده از خاک می‌باشد. به همین منظور و با توجه به عدم بررسی‌های این موضوع در ایران، طی این مطالعه با تکیه بر استفاده از منابع بومی، ٦۰ جدایه *باسیلوس سوبتیلیس* از خاک پارک‌های تهران، با فعالیت ضدقارچی علیه قارچ *فوزاریوم گرامینارم* جدا شدند و به همراه جدایه استاندارد *باسیلوس سوبتیلیس* PTCC1023 مورد مطالعه قرار گرفتند. جنس فوزاریوم سبب پژمردگی، خشکیدگی و پوسیدگی بذر، ریشه، ساقه و مرگ گیاهچه می‌شود (۳۳). از این‌رو طی این تحقیق امید است که با شناسایی جدایه‌های مناسب تولید کننده آنتی‌بیوتیک سورفکتین و مؤثر واقع شدن آن‌ها برای کنترل بیولوژیک قارچ‌های بیماری‌زا، راهکارهای مناسبی برای کاهش بیماری‌های ایجاد شده در گیاهان توسط عوامل بیولوژیک ایمن و بدون خطرات زیستی محیطی ارائه شود. از مطالعات انجام شده می‌توان به پژوهش انجام شده توسط رضاییان دلویی (Rezaeian Doloei) و همکاران در سال ۱۳۹۰ اشاره کرد که *فوزاریوم گرامینارم* را به عنوان عامل اصلی آلودگی گندم در ایران و جهان مورد بررسی قرار داد که موجب کاهش تولید محصول و مسمومیت انسان و دام می‌شود (۳٤). همچنین مطالعه مهرزاد (Mehrzad) و همکاران در سال ۱۳۹۷ که *فوزاریوم گرامینارم* را یکی از عمده‌ترین گونه‌های قارچی مولد مایکوتوکسینِ زرالنون معرفی نمود که اغلب باعث آلودگی غلاتی نظیر ذرت می‌شود (٤). در این مطالعه با توجه به وجود مخاطرات ناشی از آلودگی غلات به ویژه گندم و ذرت که جیره اصلی خوراک انسان و دام را تشکیل می‌دهند با *فوزاریوم گرامینارم*، کنترل بیولوژیکی این قارچ مورد بررسی قرار گرفت.

از میان باکتری‌های مختلف *باسیلوس سوبتیلیس* به عنوان مهارکننده قوی قارچ‌ها مطرح می‌باشد. البته سودوموناس‌ها ولاکتوباسیل‌ها هم به عنوان تولیدکنندگان مواد ضدقارچی معرفی شده‌اند ولی در این تحقیق استفاده نشدند زیرا سودوموناس‌ها از میکروب‌های بیماری‌زا بوده بنابراین پس از تولید، محصول آن‌ها حتما باید پس از خالص‌سازی استفاده گردد، در صورتیکه *باسیلوس سوبتیلیس* می‌تواند مستقیم هم به خاک کشاورزی اضافه شود (۲۸). در مورد لاکتوباسیل‌ها هم، مزیت *باسیلوس سوبتیلیس* نسبت به آن‌ها، بومی بودن خاک و رشد سهل‌تر آن‌ها موجب انتخاب این جنس و گونه گردید (۳۵). از مطالعات انجام شده می‌توان به تحقیقات کازورلا (Cazorla) و همکاران در سال ۲۰۰۷ اشاره نمود که از مجموع ۹۰۵ جدایه جداسازی شده از ریزوسفر درختان آواکادو در اسپانیا، ٤ جدایه را به عنوان *باسیلوس سوبتیلیس* شناسایی نموده و فعالیت ضدقارچی این جدایه‌ها را علیه قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی *F.oxysporum*، *Pythium ultimum*، *Rhizoctonia solani* و *Rosellina necartix* مورد بررسی قرار دادند که مشخص گردید این ٤ جدایه علیه *F.oxysporum* و *Rosellina necartix* فعالیت ضدقارچی قابل ملاحظه‌ای را نشان می‌دهند اما علیه *Pythium ultimum* فعالیتی را نشان

نداده‌اند (۳۶). همچنین ربیب (Rebib) و همکاران در سال ۲۰۱۲، ۶۹ جدایه *باسیلوس سوبتیلیس* جداسازی شده از خاک‌های شور در شمال تونس را علیه گونه‌های مختلف فوزاریوم مورد بررسی قرار دادند و مشخص گردید که یکی از این جدایه‌ها به نام *باسیلوس سوبتیلیس* SR146، علیه *فوزاریوم کولموروم* (*F.culmorum*) فعالیت آنتاگونیستی قوی تا ۸۲/۸۵ درصد را نشان می‌دهد ولی علیه *فوزاریوم سولانی* (*F. solani*) مهار قابل ملاحظه‌ای را نشان ندادند. طی آنالیزهای بعدی مشخص شد که این فعالیت به دلیل تولید آنزیم‌های هیدرولیتیک و ترکیبات لیپوپپتیدی ضدقارچی توسط این جدایه‌هاست (۳۶). در بررسی حاضرنیز، ۶۰ جدایه به دست آمده از خاک توسط روش‌های بیوشیمیایی به عنوان *باسیلوس سوبتیلیس* تأیید شدند که می‌توان نتیجه گرفت خاک، یکی از منابع مناسب برای جداسازی *باسیلوس سوبتیلیس* تولیدکننده مواد ضدقارچی می‌باشد. روش چاهک‌گذاری برای تعیین فعالیت ضد قارچی انتخاب شد که روشی ساده ولی کاربردی است. با استفاده از روش چاهک‌گذاری ملاحظه گردید که ۲۷ جدایه فعالیت ضدقارچی علیه *فوزاریوم گرامیناروم* را دارند و در ادامه قدرت فعالیت ضدقارچی این جدایه‌ها با جدایه استاندارد مورد ارزیابی قرار گرفت از موارد مشابه مطالعات انجام شده روی خاصیت آنتاگونیستی جدایه‌های *باسیلوس سوبتیلیس* علیه قارچ‌های بیماری‌زا با استفاده از روش چاهک‌گذاری می‌توان به مطالعه‌ی یو (Yu) و همکاران در سال ۲۰۰۲ اشاره نمود که فعالیت ضدقارچی *B.subtilis amilolicofasian*، در سرکوب بیماری‌های ناشی از قارچ بیماری‌زای *R.solani* را مورد بررسی قرار دادند و میانگین قطر هاله‌ی عدم رشد قارچ در حضور سوسپانسیون باکتری، ۲۵ میلی‌متر بود (۳۷). ژانگ (Zhang) و همکاران نیز در سال ۲۰۱۲، اثر ضدقارچی *باسیلوس سوبتیلیس* TS06 را علیه بیماری پوسیدگی ناشی از *Verticillium dahliae* و *Fusarium oxysporum*، طی روش چاهک‌گذاری مورد بررسی قرار دادند. میزان قطر هاله‌ی عدم رشد این قارچ‌ها در برابر سوسپانسیون باکتری، به ترتیب ۱۴ و ۱۵ میلی‌متر گزارش شد (۳۹). ما نیز در این تحقیق به هاله‌ی عدم رشد ۱۵ میلی‌متر دست یافتیم که با توجه به انتخاب یک جدایه‌ی بومی و مزایای زیست محیطی و سازگاری آن نتیجه خوبی بود.

جدایه‌های منتخب را می‌توان از طریق روش‌های مهندسی ژنتیک بهینه‌سازی نمود (۱۵) و با دستکاری ژنتیکی ژن‌های بیان کننده متابولیت‌های ضدقارچی و تلفیق خصوصیات ضدقارچی دو یا چند متابولیت ضدقارچی و همچنین انتقال ژن‌های بیان کننده متابولیت‌های ضدقارچی به باکتری‌های تندرشد همچون *Escherichia coli* می‌توان به جدایه‌هایی با خصوصیات برجسته دست یافت. با توجه به این که از میان مواد ضد قارچی، سورفکتین کمتر مورد مطالعه قرار گرفته بود، در این پژوهش شناسایی سورفکتین به عنوان عامل ضد قارچی مد نظر قرار گرفت و در ادامه تحقیق متابولیت حاصل از ۶ جدایه‌ی برتر با بیشترین هاله‌ی عدم رشد، استخراج گردید و نتایج حاصل از HPLC و بررسی کروماتوگرام‌های حاصل از جدایه‌های بومی منتخب و جدایه استاندارد حاکی از این مسأله بود که همه جدایه‌ها با قدرت مهار رشد قارچ، توانایی تولید سورفکتین را در زمان و محدوده‌ی نمونه‌ی استاندارد شرکت سیگما دارند و در نتیجه سورفکتین، یکی از متابولیت‌های مناسب تولید شده توسط *باسیلوس سوبتیلیس* به عنوان کنترل کننده رشد قارچ‌های بیماری‌زا می‌باشد. کینسلا (Kinsella) و همکاران در سال ۲۰۰۹ تولید دو آنتی‌بیوتیک مهم سورفکتین و ایتورین A را در *باسیلوس سوبتیلیس* QST713 جدا شده از ریزوسفر خیار، با استفاده از HPLC در کنار ایتورین A و سورفکتین استاندارد شرکت سیگما مورد مطالعه قرار دادند و طی این مطالعه به این نتیجه رسیدند که این جدایه توانایی تولید هر دو لیپوپپتید ضدقارچی را دارد و در کروماتوگرام حاصل از این نمونه مشاهده کردند که در زمان ۳ دقیقه و ۷ دهم ثانیه و نیز ۴ دقیقه و ۷ دهم ثانیه دو پیک ظاهر می‌شود که به ترتیب با زمان ظهور پیک‌های ایتورین A و سورفکتین در کروماتوگرام حاصل از آن‌ها مطابقت دارد (۴۰).

در نهایت با توجه به نتایج HPLC، جدایه‌های برتر تولید کننده سورفکتین انتخاب و به بررسی و شناسایی مولکولی آن‌ها با

روش 16S rRNAپرداخته شد و قرابت ژنتیکی جدایه منتخب با جدایه استاندارد *باسیلوس سوبتیلیس* تایید و در پایان درخت فیلوژنتیکی هم ترسیم شد.

نتیجه‌گیری

اثر ضدقارچی *باسیلوس سوبتیلیس*ها بر روی قارچ *فوزاریوم گرامیناروم* شناخته شد. این تحقیق و تحقیقات فراوان دیگر در سال‌های اخیر برتری محصولات بیولوژیک را نسبت به مشابه شیمیایی آن‌ها نشان می‌دهند. با توجه به خطرات زیست محیطی سموم شیمیایی، کنترل بیولوژیک به‌ویژه با میکروارگانیسم‌های بومی جایگزینی مناسب می‌باشند و پیشنهاد می‌شود از باکتری‌های مختلف به صورت هم‌زمان برای تولید متابولیت‌های متفاوت ضدقارچی در مزارع استفاده شود.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از شرکت رویان تیسان سبز و جناب آقای محمدجواد اوستا به دلیل حمایت پژوهشی کمال امتنان را دارند.

تعارض و منافع

وجود ندارد.

References

1. Wang Y, Xu Z, Zhu P, Liu Y, Zhang Z, Mastuda Y, et al. Post harvest biological control of melon pathogens using Bacillus subtilis EXWB1. J Plant Pathol. 2010;92(3):645–52.
2. Sarrafi O, Faezi GM, Chaichi NA. Isolation and characterization of toxicogenic fungi strains from wheat and corn used in Kerman city. 2016;8(4):330-336
3. Magan N, Hope R, Cairns V, Aldred D. Post-harvest fungal ecology: impact of fungal growth and mycotoxin accumulation in stored grain. In: Epidemiology of mycotoxin producing fungi. 2003; 723–30.
4. M MA _Mehraban SMSADR. Identification and detection of zearalenone-producing genes of Fusarium graminearum strains isolated from corn kernels. Food Sci Technol. 2019;15(11): 411–8.
5. Zaccardelli M, Sorrentino R, Caputo M, Scotti R, Falco E De, Pane C. Stepwise-Selected Bacillus Amyloliquefaciens and B. Subtilis Strains from Composted Aromatic Plant Waste Able to Control Soil-Borne Diseases. Agriculture. 2020;10(2):30.
6. Nourozian J, Etebarian HR, Khodakaramian G. Biological control of Fusarium graminearum on wheat by antagonistic bacteria. Songklanakarin J Sci Technol. 2006;28(1):29–38.
7. Safikhani N, Morid B, Zamanizadeh H, Hajmansoor S. Identification of resistant eggplant cultivars to Fusarium oxysporum f. sp. melongenae, the causal agent of fusarium wilt using molecular markers in Iran. 2019;11(4).392-403.

8. Köhl J, Kolnaar R, Ravensberg WJ. Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy. Front Plant Sci. 2019;10:845.

9. Goswami M, Deka S. Biosurfactant production by a rhizosphere bacteria Bacillus altitudinis MS16 and its promising emulsification and antifungal activity. Colloids Surfaces B Biointerfaces. 2019;178:285–96.

10. Leelasuphakul W, Hemmanee P, Chuenchitt S. Growth inhibitory properties of Bacillus subtilis strains and their metabolites against the green mold pathogen (Penicillium digitatum Sacc.) of citrus fruit. Postharvest Biol Technol. 2008;48(1):113–21.

11. He Y, Zhu M, Huang J, Hsiang T, Zheng L. Biocontrol potential of a Bacillus subtilis strain BJ-1 against the rice blast fungus Magnaporthe oryzae. Can J Plant Pathol. 2019 ;41(1):47–59.

12. Joshi S, Bharucha C, Desai AJ. Production of biosurfactant and antifungal compound by fermented food isolate Bacillus subtilis 20B. Bioresour Technol. 2008;99(11):4603–8.

13. de Faria AF, Teodoro-Martinez DS, de Oliveira Barbosa GN, Gontijo Vaz B, Serrano Silva Í, Garcia JS, et al. Production and structural characterization of surfactin (C14/Leu7) produced by Bacillus subtilis isolate LSFM-05 grown on raw glycerol from the biodiesel industry. Process Biochem 2011;46(10):1951–7.

14. Mihalache G, Balaes T, Gostin I, Stefan M, Coutte F, Krier F. Lipopeptides produced by Bacillus subtilis as new biocontrol products against fusariosis in ornamental plants. Environ Sci Pollut Res.2018;25(30):29784–93.

15. Wang XY, Zhang Z, Zhou XB, Liu P, Chen YH. Planting pattern and irrigation effect on farmland microclimate and yield of winter wheat. J Anim Plant Sci. 2015;25:708–15.

16. Chen C, Lin J, Wang W, Huang H, Li S. Cost-Effective Production of Surfactin from Xylose-Rich Corncob Hydrolysate Using Bacillus subtilis BS-37. Waste and Biomass Valorization. 2019;10(2):341–7.

17. Saha D, Purkayastha GD, Ghosh A, Isha M, Saha A. Isolation and characterization of two new Bacillus subtilis strains from the rhizospher of eggplant as potentional biocontrol agents. J Plant Pathol. 2012 ;94(1):109–18.

18. Mizumoto S, Hirai M, Shoda M. Enhanced iturin A production by Bacillus subtilis and its effect on suppression of the plant pathogen Rhizoctonia solani. Appl Microbiol Biotechnol. 2007;75(6):1267–74.

19. Kim G, Lee S-E. Antifungal and antiaflatoxigenic properties of naphthoquinones toward Aspergillus flavus and their mode of inhibitory action on aflatoxin biosynthesis. food Control. 2021;119.

20. Tashakor A, Hosseinzadehdehkordi M, Emruzi Z, Gholami D. Isolation and identification of a novel bacterium, Lactobacillus sakei subsp. dgh strain 5, and optimization of growth condition for highest antagonistic activity. Microb Pathog. 2017;106:78–84.

21. Perez KJ, Viana J dos S, Lopes FC, Pereira JQ, dos Santos DM, Oliveira JS, et al. Bacillus spp. Isolated from Puba as a Source of Biosurfactants and Antimicrobial Lipopeptides. Frontiers in Microbiology. 2017;8. 61.

22. Wei Y-H, Wang L-C, Chen W-C, Chen S-Y. Production and Characterization of Fengycin by Indigenous Bacillus subtilis F29-3 Originating from a Potato Farm. International Journal of Molecular Sciences . 2010;11.4526-4539.

23. Ongena M, Jacques P. Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. Trends Microbiol. 2008;16(3):115–25.

24. Jasim B, Sreelakshmi KS, Mathew J, Radhakrishnan EK. Surfactin, Iturin, and Fengycin Biosynthesis by Endophytic Bacillus sp. from Bacopa monnieri. Microb Ecol. 2016;72(1):106 –19.

25. Selseleh-Zakeri S, Akhavan-Sepahy A, Khanafari A, Saadat-Mand S. Isolation and characterization of Bacillus isolates from Tehran and investigation of their antifungal activity against some species of Fusarium head blight fungi from Ardebil. Iran J Plant Pathol. 2016;52 (1):20–9.

26. Vedaraman N, Venkatesh N. Production of surfactin by bacillus subtilis mtcc 2423 from waste frying oils . Vol. 28, Brazilian Journal of Chemical Engineering . 2011; 175–80.

27. Alonso S, Martin PJ. Impact of foaming on surfactin production by Bacillus subtilis: Implications on the development of integrated in situ foam fractionation removal systems. Biochem Eng J]. 2016;110:125–33.

28. Al-Fadhal FA, AL-Abedy AN, Alkhafije DA. Isolation and molecular identification of Rhizoctonia solani and Fusarium solani isolated from cucumber (Cucumis sativus L.) and their control feasibility by Pseudomonas fluorescens and Bacillus subtilis. Egypt J Biol Pest Control. 2019;29;47.

29. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol. 1987;4(4):406–25.

30. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution (N Y). 1985;39(4):783–91.

31. Meena KR, Sharma A, Kumar R, Kanwar SS. Two factor at a time approach by response surface methodology to aggrandize the Bacillus subtilis KLP2015 surfactin lipopeptide to use as antifungal agent. J King Saud Univ - Sci. 2020;32(1):337–48.

32. Mousivand M, Jouzani GS, Monazah M, Kowsari M. Characterization and antagonistic potential of some native biofilm-forming and surfactant producing Bacillus subtilis srains against six pathotypes of Rhizoctonia solani. J Plant Pathol. 2012;94(1):171–80.

33. Khezri M, Ahmadzadeh M, Jouzani GS, Behboudi K, Ahangaran A, Mousivand M, et al. Characterization of som biofilm forming Bacillus subtilis strains and evaluation of their biocontrol potential against Fusarium culmorum. J Plant Pathol. 2011;93(2):373–82.

34. Rezaeian Doloie R, Razavi M. Molecular identification and detection of gene encoding deoxynivalenol in Fusarium graminearum isolates, the causal agent of fusarium head blight of wheat in Iran. Agroecol J. 2011;7(1):19.

35. Scano P, Pisano MB, Murgia A, Cosentino S, Caboni P. GC-MS Metabolomics and Antifungal Characteristics of Autochthonous Lactobacillus Strains. Dairy. 2021;2(3):326–35.

36. Cazorla FM, Romero D, Pérez-García A, Lugtenberg BJJ, Vicente A de, Bloemberg G. Isolation and characterization of antagonistic Bacillus subtilis strains from the avocado rhizoplane displaying biocontrol activity. J Appl Microbiol. 2007;103(5):1950–9.

37. Yu GY, Sinclair JB, Hartman GL, Bertagnolli BL. Production of iturin A by Bacillus amyloliquefaciens suppressing Rhizoctonia solani. Soil Biol Biochem. 2002;34(7):955–63.

38. Zhang RS, Liu YF, Luo CP, Wang XY, Liu YZ, Qiao JQ, et al. Bacillus amiloliquefaciens L x -11, a potential biocontrol agent against rice bacterial leaf streak. J Plant Pathol. 2012;94 (3):609–19.

39. Zhang Y, Yang H, Turra D, Zhou S, Ayhan DH, DeIulio GA, et al. The genome of opportunistic fungal pathogen Fusarium oxysporum carries a unique set of lineage-specific chromosomes. Commun Biol. 2020;3(1):1–12.

40. Kinsella K, Schulthess CP, Morris TF, Stuart JD. Rapid quantification of Bacillus subtilis antibiotics in the rhizosphere. Soil Biol Biochem . 2009;41(2):374–9.