

SID



سرویس های ویژه



سرویس ترجمه تخصصی



کارگاه های آموزشی



بلاگ مرکز اطلاعات علمی



عضویت در خبرنامه



فیلم های آموزشی

کارگاه های آموزشی مرکز اطلاعات علمی جهاد دانشگاهی



کارگاه آنلاین آشنایی با پایگاه های اطلاعات علمی بین المللی و ترند های جستجو



مباحث پیشرفته یادگیری عمیق؛ شبکه های توجه گرافی (Graph Attention Networks)



کارگاه آنلاین مقاله نویسی IEEE و ISI ویژه فنی و مهندسی



بررسی برخی متابولیت‌های بیواکتیو در *Myrothecium verrucaria*

حمیده صیدمحمدخانی^{1*}، محمدعلی تاجیک¹، ولی‌اله بابایی‌زاد¹ و سلمان شریفی‌مهر²

۱- گروه گیاهپزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، h_mo6589@yahoo.com - ۲- پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان

چکیده- قارچ‌های جنس *Myrothecium* در محیط کشت حباب‌های ریزی تولید می‌کنند که حاوی مقادیر زیادی از ترکیبات آلی فرار می‌باشند. در این بررسی *Myrothecium verrucaria* در محیط PDB کشت داده شد و استخراج ترکیب‌ها با استفاده از اتیل استات انجام شد. پس از خشک کردن حلال، ترکیب باقی مانده در ۱ میلی لیتر متانول حل شد. ترکیب‌های استخراج شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴۰°C نگهداری شدند و شناسایی کیفی ترکیبات با GC-MS انجام شد. نتایج بدست آمده از عصاره استخراج شده متابولیت‌های مختلفی از جمله، Sambucoin، Squalene، Oleic acid، Orcinol، Palmitic acid، Myristic acid و 8-Hydroxyisotrichodermin را نشان داد.

کلیدواژه- متابولیت‌های ثانویه، GC-MS، *Myrothecium verrucaria*

Investigation of some bioactive metabolites in *Myrothecium verrucaria*

Seid Mohammadkhani, H. ^{*1}, M. A. Tajick¹, V. Babaeizad¹ and S. Sharifimehr²

1. Department of Plant Protection, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
h_mo6589@yahoo.com
2. Genetic and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan

Abstract

The *Myrothecium* genus when grown in shake culture produced an abundance of foam. Contained in the foam was a mixture of volatile organic compounds (VOCs). In this study, *Myrothecium verrucaria* was cultured in PDB medium and compounds extracted with Ethyle acetate. After drying the solvent, the remaining compounds finally dissolved in 1 ml of methanol. The extracted compounds was kept at 4°C and quality of the compounds was determined by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Results obtained from extraction of *Myrothecium verrucaria* shown different bioactive metabolites including Sambucoin, Piperitone, Squalene, Oleic acid, Orcinol, Palmitic acid, Myristic acid, and 8-Hydroxyisotrichodermin.

Keywords: Bioactive metabolites, GC-MS, *Myrothecium verrucaria*

۱- مقدمه

سایر ناخالصی‌ها با استفاده از کاغذ صافی فیلتر شدند. استخراج متابولیتها با استفاده از اتیل استات به میزان ۳۰ میلی لیتر در ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع به مدت ۳۰ دقیقه و با استفاده از قیف جدا کننده انجام شد. پس از تشکیل فازها در قیف جداکننده، فاز رویی (حاوی ترکیب متابولیت و اتیل استات) از فاز پایین (حاوی محیط کشت مایع) جدا شد و تبخیر حلال با دستگاه تقطیر صورت گرفت. در نهایت متابولیت بدست آمده در یک میلی لیتر متانول حل شد. محیط حاوی هیف قارچ، قبل از استخراج به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴°C نگهداری شدند.

۲-۳- GC-MS

شناسایی کیفی متابولیت‌های استخراج شده با استفاده از دستگاه GC از کمپانی Agilent مدل ۷۸۹۰ انجام شد. ستون HP-5MS (با مشخصات ۳۰m، ۰/۲۵mm i.d، ۰/۲۵ μm Thickness film) مورد استفاده قرار گرفت. گاز حامل، هلیوم (۹۹۹/۹۹٪) با فلوی ۱mL/min بکار برده شد. حجم تزریق نمونه ۱μL بوده و تمام تزریق‌ها با روش splitless انجام شدند. دمای انژکتور و دتکتور به ترتیب، شامل ۲۷۰ و ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد بود. دمای اولیه ستون ۵۰°C به مدت ۵ دقیقه بود، سپس به دمای ۲۶۰°C با ۱۰°C/min ramp افزایش یافت و به مدت ۵ دقیقه نگه داشته شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- شناسایی متابولیت‌های تولید شده در محیط

کشت *Myrothecium verrucaria*

آنالیز عصاره استخراج شده با استفاده از GC-MS متابولیت‌های مختلفی را نشان داد (جدول ۱). اسیدهای چرب: Oleic acid، 8-Hydroxyisotrichodermin، Lauric acid، Palmitic acid و Myristic acid، توکسین‌ها: Sambucoin، Orcinol و Squalene، ترکیبات فرار: Octadecane، 1-Docosene، Benzeneethanol و Eicosane، Hexadecanoic acid از جمله متابولیت‌های تولید شده توسط *M. verrucaria* در محیط کشت PDB بودند. بخشی از کروماتوگرام حاصل نیز در شکل ۱ نشان داده شده است.

قارچ‌ها منبع عمده تولید کننده متابولیت‌های ثانویه فعال می‌باشند که از اهمیت زیادی در فعل و انفعالات شیمیایی زیست محیطی برخوردارند. همچنین، آنها می‌توانند نقش مهمی در مبارزه با بسیاری از بیماری‌های انسانی و حیوانی داشته باشند [۴]. جنس *Myrothecium* از گروه قارچ‌های ناقص می‌باشد که در گروه *Deuteromycetes* قرار دارد. فرم غیرجنسی آنها (Necteria) متعلق به قارچ‌های گروه *Ascomycetes* می‌باشد. این جنس شامل هشت گونه است که به علت تولید سلولاز از لحاظ صنعتی قابل توجه می‌باشند و به عنوان آفت کشتهای طبیعی برای کنترل نماتدها و یا به عنوان علفکش از اهمیت زیادی برخوردارند. قارچ‌های جنس *Myrothecium* در محیط کشت حباب‌های ریزی تولید می‌کنند که این حباب‌ها حاوی مقادیر زیادی از ترکیبات آلی فرار هستند. برخی از این ترکیبات هیدروکربن‌ها و مشتقات آنها می‌باشند. همچنین بسیاری از ترکیبات آلی فرار دیگر از جمله کتون‌ها، اسیدهای آلی، ترپن‌ها، الکل‌ها نیز تولید می‌شوند. قابلیت بازداری از رشد برخی قارچ‌های پاتوژن از جمله *Pythium ultimum* و *Sclerotinia sclerotiorum* توسط قارچ‌های جنس *Myrothecium* از جمله *Myrothecium inunduatum* مورد بررسی قرار گرفته است [۱]. روش‌های آنالیز مختلفی به منظور تعیین متابولیت‌ها استفاده می‌شود، از جمله روش‌های کروماتوگرافی با لایه نازک (TLC)، HPLC و GC-MS. در این بررسی از روش GC-MS برای شناسایی کیفی متابولیت‌های ثانوی در گونه *Myrothecium verrucaria* استفاده شده است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- شرایط کشت قارچ‌ها

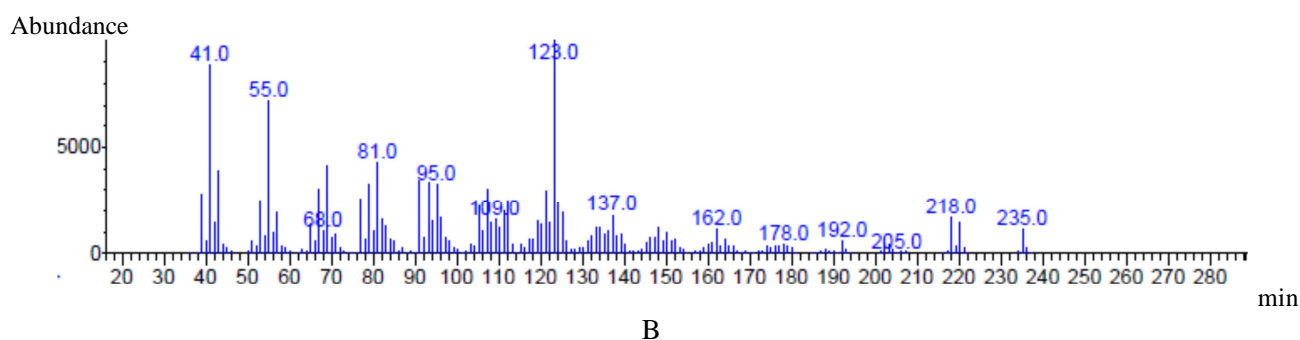
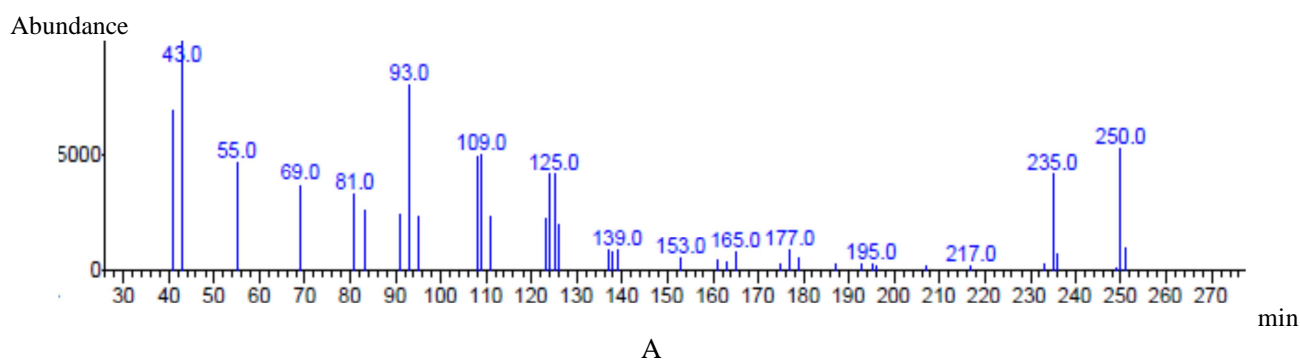
Myrothecium verrucaria پس از شناسایی و جداسازی در محیط PDA (۲۰۰ گرم سیب زمینی، ۱۰ گرم دکستروز، ۱۶ گرم آگار، در ۱ لیتر آب مقطر) به مدت ۷ روز کشت داده شدند و پس از آن به محیط مایع PDB (۲۰۰ گرم سیب زمینی، ۸ گرم دکستروز، در ۱ لیتر آب مقطر) انتقال یافتند و به مدت ۵ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد روی شیکر با سرعت ۱۳۰ rpm نگهداری شدند.

۲-۲- استخراج متابولیت‌ها

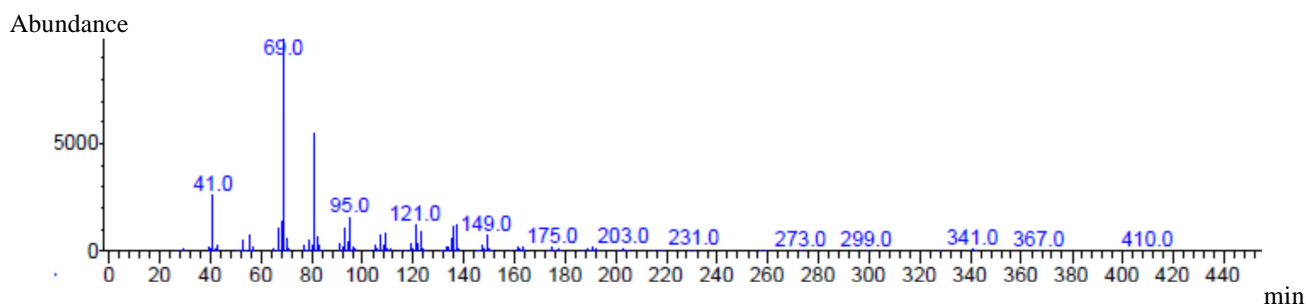
پس از گذشت ۵ روز از رشد قارچ‌ها در محیط PDB هیف‌ها و

جدول ۱: متابولیت‌های بدست آمده از آنالیز GC-MS

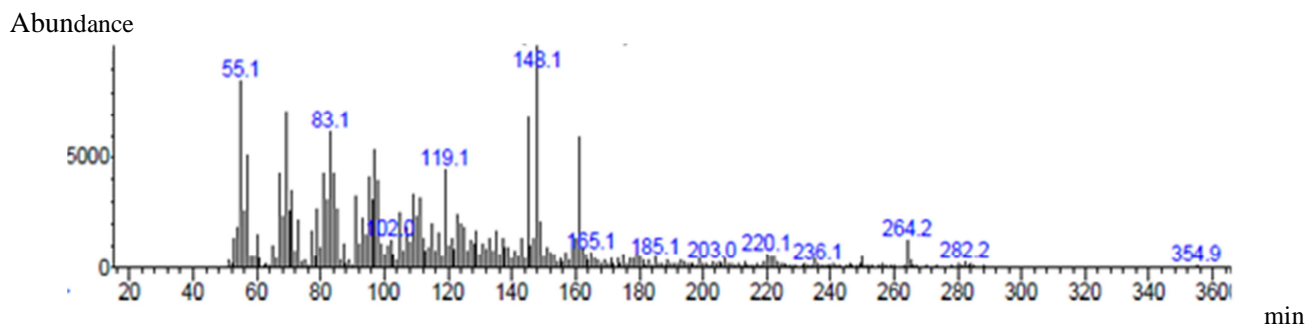
Compounds	Formula	Retention time (min)	Abundance (%)
Sambucosin	$C_{15}H_{22}O_3$	39.10	98
Orcinol	$C_7H_8O_2$	12.274	54
Squalene	$C_{30}H_{50}$	55.131	95
Oleic acid	$C_{18}H_{34}O$	41.845	60
Lauric acid	$C_{12}H_{24}O_2$	27.362	98
Myristic acid	$C_{14}H_{28}O_2$	32.855	99
Palmitic acid	$C_{16}H_{32}O_2$	37.954	98
Octadecane	$C_{19}H_{40}$	33.691	98
Eicosane	$C_{20}H_{42}$	38.606	99
Benzeneethanol	$C_{14}H_{12}Cl_2O_2$	12.422	91
8-Hydroxyisotrichodermin	-	40.077	43
1-Docosene	$C_{22}H_{44}$	48.991	56
Hexadecanoic acid	$C_{16}H_{32}O_2$	36.872	96



شکل ۱: کروماتوگرام برخی ترکیبات بدست آمده از آنالیز GC-MS از محیط کشت *Myrothecium verrucaria*: (A) Sambucosin، (B) 8-hydroxyisotrichodermin، (C) Squalene، (D) Oleic acid.

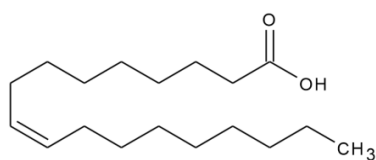


C

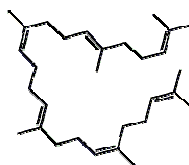


D

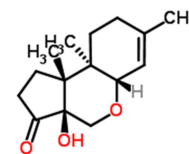
شکل ۱: (ادامه)



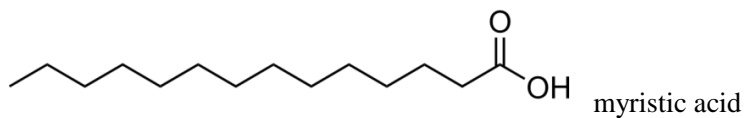
Oleic acid



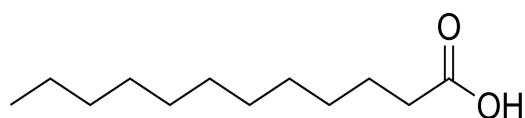
Squalene



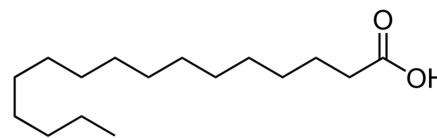
Sambucinin



myristic acid



Lauric acid



Palmitic acid

شکل ۲: ساختار شیمیایی برخی ترکیبات بدست آمده از آنالیز GC-MS

ometry methodology. Journal of Chromatography A. 1002, 111–136.

[4]. **Frisvad, J. C., Andersen, B and Thrane, U. 2007.** The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. mycological research, 112, 231–240.

[5]. **McCormick, S.P., Alexander, N.J and Proctor, R.H. 2005.** Heterologous expression of two trichothecene P450 genes in *Fusarium verticillioides*. Can. J. Microbial, 52: 220-226.

[6]. **Paltauf, F., Daum, G., Zuder, G., Högenauer, G., Schulz, G and Seidl, G. 1982.** Squalene and ergosterol biosynthesis in fungi treated with naftifine, a new antimycotic agent. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism, Volume 712, Issue 2, 268-273.

[7]. **Shafiquzzaman, S., Al Azad, S., Fatimah, A., Naher, L and Kumar, S. V. 2012.** Separation and identification of hydrocarbons and other volatile compounds from cultures of *Aspergillus niger* by GC_MS using two different capillary columns and solvents. Journal of Saudi Chemical Society.

۲-۳- بیولوژی برخی ترکیبات بدست آمده

اسیدهای چرب، توکسین‌ها، ترکیبات فرار از جمله ترکیبات بدست آمده در محیط کشت *M. verrucaria* می‌باشند. اسیدهای چرب ترکیبات آلی هستند که با داشتن گروه کربوکسیل (-COOH) در یک طرف و گروه متیل (-CH₃) در طرف دیگر ساختار شیمیایی خود، شناخته می‌شوند. اسیدهای چرب اشباع از جمله Tetradecanoic (myristic) acid, Dodecanoic (lauric) acid, Palmitic acid, زنجیره ای از کربن های تک باندی می‌باشند، در حالی که اسیدهای چرب غیراشباع از جمله Oleic acid, یک یا چند باند دوگانه (C=C) در ساختار شیمیایی خود دارند این اسیدها دارای قابلیت ضد قارچی می‌باشند [۳]. Squalene [۶] از گروه 8-hydroxyisotrichodermin [۵], Sambucoin [۲] از گروه توکسینهای Tericothecene می‌باشند. Benzeneethanol, Eicosan, Hexadecanoic acid, 1-Docosene و Octadecane متابولیت های فراری می‌باشند که تولید شده اند. این ترکیبات نیز دارای قابلیت بازداری از رشد برخی پاتوژن‌های بیماری زا می‌باشند [۱۷]. ساختار شیمیایی برخی ترکیبات در شکل ۲ نشان داده شده است.

منابع

- [1]. **Banerjee, D., Strobel, G. A., Booth, E., Geary, B., Sears, J., Spakowicz, D and Busse, S. 2010.** An endophytic *Myrothecium inundatum* producing volatile organic compounds. Mycosphere 1(3), 229–240.
- [2]. **Christopher young, J and Games, D. E. 1993.** Analysis of *Fusarium* mycotoxins by supercritical fluid chromatography with ultraviolet or mass spectrometric detection. Journal of Chromatography A. volume 653, Issue 2, 374-379. (Abstract).
- [3]. **Fog Nielsen, K and Smedsgaard, J. 2003.** Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography–UV–mass spectri-

SID



سرویس های ویژه



سرویس ترجمه تخصصی



کارگاه های آموزشی



بلاگ مرکز اطلاعات علمی



عضویت در خبرنامه

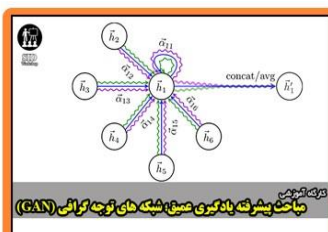


فیلم های آموزشی

کارگاه های آموزشی مرکز اطلاعات علمی جهاد دانشگاهی



کارگاه آنلاین آشنایی با پایگاه های اطلاعات علمی بین المللی و ترند های جستجو



مباحث پیشرفته یادگیری عمیق؛ شبکه های توجه گرافی (Graph Attention Networks)



کارگاه آنلاین مقاله نویسی IEEE و ISI ویژه فنی و مهندسی