مطالعه تولید آنزیم کیتیناز در قارچ تریکودرما

نیسانا سیداصلی[۱]، محمدرضا زمانی[۲] ، مصطفی مطلبی[۲] و محمدجواد حریقی[۱]

[۱]گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی

[۲]پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

چکیده

در طول کشت گیاهان زراعی کاهش محصول ناشی از حمله قارچهای بیماریزا به گیاهان همواره بعنوان مهمترین عامل زیانهای اقتصادی محسوب میشود. قارچ تریکودرما، بدلیل ترشح بعضی از انواع آنزیمهای کیتینازی، بعنوان عاملی قوی در کنترل بیولوژیک بیماریهای قارچی مورد استفاده قرار می گیرد.

در این تحقیق، شرایط بهینه جهت تولید آنزیم کیتیناز در جدایه های مختلف قارچ تریکودرما مورد مطالعه قرار گرفت. شرایط بهینه بدست آمده عبارتند از , pH=٥ , ٤٨ ساعت کشت در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و هوادهی مناسب. پس از بهینه سازی شرایط تولید آنزیم کیتیناز در سه جدایه انتخابی قارچ تریکودرما، فعالیت آنزیم کیتینازی در ۳۰ جدایه این قارچ در شرایط بهینه بدست آمده بررسی و جدایه *Trichoderma harzianum8* با فعالیت U/ml ۹۷ و فعالیت ویژه U/mg ۳۵ بعنوان فعال ترین و جدایه *Trichoderma* sp. T.26 با فعالیت U/ml ٤٤ و فعالیت ویژه U/mg ٥ بعنوان ضعیف ترین جدایه انتخاب شدند. برای بررسی بیان ژنهای اندوکیتیناز chit31، chit33 و chit42 در جدایه *Trichoderma harzianum8*، که فعال ترین جدایه از نظر تولید آنزیم کیتیناز میباشد, الگوی SDS-PAGE در محیط های حاوی منابع کربنی متفاوت مقایسه شد و محل تقریبی باندهای سه اندوکیتیناز تعیین گردید. ضمنا، سه جفت آغازگر اختصاصی بر اساس توالیهای موجود از این ژنها در NCBI طراحی شد و پس از انجام PCR اختصاصی، محصولات PCR توسط هضم با آنزیمهای Restriction Endonuclease تأیید شد. بررسی نتایج بدست آمده از این بخش، حضور هر سه ژن اندوکیتیناز را در این جدایه قارچی تأیید می کند. بدین ترتیب، با توجه به مطالعات انجام شده بر روی جدایه*T. harzianum8*، می توان از این جدایه در مطالعات مربوط به کنترل بیولوژیک بیماریهای قارچی استفاده نمود.

واژه های کلیدی: تریکودرما, آنزیم کیتیناز, شرایط بهینه تولید آنزیم، سنجش فعالیت آنزیم، تکثیر ژن کیتیناز

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

آلودگی زمینهای کشاورزی به قارچهای بیماریزا, گاه بحدی می رسد که رشد گیاهان زراعی را در آنها غیر ممکن می سازد. یکی از راههای کنترل بیماریهای قارچی استفاده از قارچ کشها در سطح وسیع می باشد که این امر باعث هزینه های سنگین می شود، که گاه بخش عظیمی از درآمد محصول صرف خرید و استفاده از قارچ کش می گردد. ضمناً برای بسیاری از قارچها قارچ کش مناسب و موثر وجود ندارد و یا عده ای از قارچها خاکزی بوده لذا از قارچ کشها باید بمقدار زیاد استفاده شود. از جمله مشکلات عمده و اساسی استفاده از قارچ کشها، آلودگی محیط زیست, منابع آب زیرزمینی و محصولات کشاورزی می باشد.

یکی از راههای مناسب جهت کنترل بیماریهای ناشی از قارچهای بیماریزا که تأثیرات نامطلوب فوق را نیز نداشته باشد استفاده از روشهای کنترل بیولوژیک است. یکی از قارچهای مهم که بالقوه از عوامل کنترل بیولوژیک علیه قارچهای بیماریزا محسوب می گردد قارچ Trichoderma می باشد (٦ و ١٣). از طرفی نتایج تحقیقات انجام شده بر روی برخی از گیاهان (٤) نشان می دهد که با حضور قارچ Trichoderma در خاک، رشد گیاه بنحو چشم گیری افزایش می یابد. بررسیها نشان می دهد که قارچ تریکودرما با کنترل فلور میکروبی خاک در ناحیه ریزوسفر گیاهان، به این افزایش رشد کمک می کند (٢). توانایی گونه های مختلف سرده تریکودرما در کنترل رشد بسیاری از قارچها و باکتریهای خاکزی، این قارچ را به عاملی قوی در کنترل بیولوژیک بیماریهای گیاهی تبدیل کرده است. دو گونه *Trichoderma harzianum* و *T. virens*، بیش از سایر گونه ها در کنترل بیولوژیک مورد استفاده قرار گرفته اند(٥ و ٢٤). گونه *T. harzianum*، به تنهایی یا همراه گونه های دیگر تریکودرما، در کنترل برخی از بیماریهای گیاهی ناشی از قارچها نقش دارد (١٢ و ١٧ و ٢٣ و ٢٧ و ٢٨). علاوه بر این، بررسیها نشان داده است که بکار بردن قارچ *T. virens* همراه با قارچ کشهای شیمیایی، اثر این مواد را بنحو چشم گیری افزایش می دهد (١٨).

مطالعه میکروسکوپی میان کنش قارچ *T. harzianum* و *Rhizoctonia solani* نشان می دهد که در اثر فعالیت قارچ مهاجم *T. harzianum*، ساختار دیواره قارچ میزبان دستخوش تغییر می شود. بررسیها نشان می دهد که در ابتدای فعالیت مایکوپارازایتیک (Mycoparasitic) قارچ، رشته های میسلیوم تریکودرما به دور میسلیوم میزبان حلقه می زند و سپس، با نفوذ به داخل آن، به تغییر در ساختمان دیواره، بر هم زدن تعادل اسمزی ، جدایی غشای پلاسمایی از دیواره و در نهایت، به بر هم ریختن ساختار سیتوپلاسم می انجامد.

با تخلیص و بررسی آنزیمهای خارج سلولی در طول فعالیت مایکوپارازایتیک *T. harzianum* ، مشخص شده است که بخش عمده ای از تغییرات ایجاد شده در دیواره میزبان، نتیجه مستقیم عمل آنزیم های

Archive of SID

www.SID.ir

هیدرولازی تریکودرما است (۱ و ۱۱) که شامل آنزیمهای گلوکاناز، پروتئاز و کیتیناز می باشند (۲۵) و با فعالیت سینرژیک خود به تجزیه اجزای سازنده دیواره میزبان، و در نهایت، به فروپاشی ساختار دیواره کمک می کنند (۱۰ و ۱٤ و ۲۱).

در این میان حضور آنزیمهای کیتیناز در فعالیت بیوکنترلی بسیار موثر می باشند. در گونه های مختلف قارچ تریکودرما، انواعی از اگزو و اندو کیتیناز ها مشخص شده اند که با شکستن پیوند های گلیکوزیدی موجود در پلیمر خطی کیتین، ساختمان این ترکیب را در هم می شکنند (۱٤).

مطالعه آنزیمهای کیتینازی در گونه *T. harzianum* نشان می دهد که در این قارچ، انواعی از این آنزیمها یافت می شود. مطالعات انجام شده، حضور چهار اندو کیتیناز را در این گونه مشخص کرده است که بترتیب CHIT52، CHIT42، CHIT33 و CHIT31 نامیده شده اند (۱۵). این بررسیها نشان می دهد که آنزیم CHIT52 با وزن مولکولی ۵۲ kDa ، در مقابل حرارت بسیار حساس است (۱۵). مطالعه آنزیمهای کیتیناز در گونه *T. harzianum* Strain CECT 2413 نشان می دهد که پس از ٤۸ ساعت رشد قارچ در محیط حاوی کیتین، آنزیم CHIT42 بیشترین فراوانی را در میان سایر آنزیمهای هیدرولیز کننده کیتین به خود اختصاص می دهد (۱۵). دمای بهینه فعالیت آنزیمی ٤۰ °C و pH بهینه آن ٤/۰ گزارش شده است. مطالعه اثر یونهای فلزی بر فعالیت آنزیمی نشان می دهد که بطور کلی فلزات نقش چندان تعیین کننده ای در فعالیت کیتینازی آنزیم ندارند و بعبارت دیگر برای فعالیت آنزیم CHIT42، نیازی به کوفاکتور نیست (۱٦ و ۲۹).

وزن مولکولی به دست آمده برای پروتئین CHIT33 در *T. harzianum* ، ۳۳kDa می باشد (۱۵). بررسی پروتئین CHIT31 در *T. harzianum* Strain CECT 2413 نشان می دهد که این آنزیم، همچون پروتئینهای CHIT42 و CHIT33، تک واحدی و مونومر است (۷). در بررسی دیگری بر روی این آنزیم، وزن مولکولی این پروتئین ۳۱kDa تعیین شده است در این بررسی مشخص شده است که هر دو آنزیم CHIT33 و CHIT31، نسبت به حرارت بسیار مقاوم هستند (۱۵). مطالعه اثر کیتیناز های مختلف بر روی دیواره قارچ میزبان نشان می دهد که هر یک از این آنزیمها، بنحو ویژه ای بر دیواره میزبان اثر می گذارند. در یکی از بررسیها، مطالعه اثر مستقیم آنزیمهای CHIT42، CHIT33 و CHIT31 ، بر دیواره قارچ *Botrytis cinerae* نشان داده است که از این آنزیمها, تنها آنزیم CHIT42 می تواند بر دیواره میزبان اثر هیدرولایتیک داشته باشد و دو آنزیم دیگر، هر چند در همراهی با CHIT42 ، اثر هیدرولیز کننده این آنزیم را افزایش می دهند، اما در نبود این آنزیم و بتنهایی، هیچ گونه خسارتی را به دیواره میزبان وارد نمی کنند (۷ و ۸). با وجود آن که تاکنون انواعی از آنزیمهای کیتینازی در گونه های

Archive of SID

www.SID.ir

مختلف سرده تریکودرما تخلیص و بررسی شده اند، اما بررسی خصوصیات این آنزیمها در سطح DNA عمدتاً مربوط به سه اندو کیتیناز CHIT31، CHIT33 و CHIT42 بوده است (۲۰ و ۳۰). بررسی ژن chit42 در گونه های مختلف قارچ تریکودرما نشان می دهد که این ژن در اکثر گونه های این قارچ حضور دارد و نمی تواند تنها به فعالیت مایکوپارازایتیک تریکودرما مربوط باشد (۲۰).

در این تحقیق شرایط تولید آنزیمهای کیتینازی و عوامل موثر بر بیان آنها مورد بررسی قرار می گیرد ضمن اینکه حضور و مشابهت ژنهای کیتینازی با ژنهای گزارش شده مورد مطالعه قرار خواهد گرفت.

مواد و روشها

جدایه های قارچ تریکودرما:

تعداد ۳۰ جدایه قارچ Trichoderma که در طول این تحقیق مورد بررسی و مطالعه قرار گرفته اند عمدتاً از مناطق مختلف ایران بوده و از موسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی وزارت جهاد کشاورزی، سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران و دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا همدان تهیه گردیده اند (جدول ۱).

محیط کشت نگهداری قارچ:

جهت نگهداری قارچ از محیط کشت (Potato PDA Dextrose Agar) استفاده گردید. برای تهیه این محیط پودر PDA به میزان ۳۹ گرم در لیتر در آب حل و پس از سترون کردن مورد استفاده قرار گرفت.

بررسی فعالیت آنزیم کیتیناز:

آماده سازی سوبسترا:

برای القاء آنزیمهای کیتینازی در محیط کشت و نیز بعنوان سوبسترا در سنجش فعالیت کیتینازی، از کیتین کلوئیدی استفاده گردید. برای تهیه سوبسترای مورد نظر، به ۱۰ گرم پودر کیتین، ۱۰۰ میلی لیتر اسید فسفریک ۸۵٪ افزوده شد و مخلوط حاصل بمدت ۲٤ ساعت در دمای ٤°C نگهداری گردید. برای ایجاد Polysaccharide swelling ، به مخلوط فوق، آب اضافه شده و با پارچه پنیر صاف گردید. برای حذف کامل اسید مراحل افزودن آب و صاف کردن آن، چندین بار تکرار شد. ماده خمیری شکل حاصل، خشک و پودر گردید و از آن بعنوان منبع کربن در محیط کشت و نیز سوبسترا در واکنش آنزیمی استفاده شد (۲٦).

برای تهیه دیواره قارچ *Rhizoctonia solani* از روش Zeilinger و همکاران (۳۰) استفاده گردید. پس از گذشت مدت زمان کافی برای رشد قارچ، میسلیومهای قارچ جدا شد پس از چندین بار شستشو برای حذف گلوکز محیط, میسلیومها در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد خشک و پس از پودر کردن، به عنوان منبع کربن مورد استفاده قرار گرفت.

تولید و سنجش فعالیت آنزیم کیتیناز:

برای سنجش فعالیت آنزیمهای کیتینازی، از روش تغییر یافته Zeilinger و همکاران (۳۰) استفاده گردید. قارچها، در محیط مایع حاوی یک گرم در

Archive of SID

www.SID.ir

لیتر کیتین کلوئیدی کشت داده شدند. پس از گذشت زمانهای مورد نظر(بمدت ۵ روز و با فواصل ۲٤ ساعت)، با صاف کردن محیط کشت, محلولی شامل پروتئینهای ترشحی حاصل شد که از آن بعنوان منبع آنزیمی استفاده گردید. مخلوط واکنش آنزیمی شامل ۲۰۰ میکرولیتر محلول آنزیمی و ۲۰۰ میکرولیتر محلول ۰/۵ درصد سوبسترا بود. پس از گذشت یک ساعت، با افزودن ۱ میلی لیتر از NaOH یک درصد و سانتریفیوژ محلول حاصل در ٦۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه، واکنش آنزیمی متوقف شد. برای سنجش میزان N-acetylglucosamine آزاد شده در طول واکنش، پس از افزودن ۱۰۰ میکرولیتر بافر پتاسیم تترا بورات ، مخلوط حاصل، به مدت ۳ دقیقه در آب جوش حرارت داده شد و با افزودن ۳ میلی لیتر واکنش گر DMAB، [ده گرم پودر Di- metyl amino benzaldehyde(DMAB) در ۱۰۰ میلی لیتر مخلوط اسید استیک گلاسیال و اسید کلریدریک ۱۰ نرمال بترتیب به نسبت ۱۲/۵ و ۸۷/۵ درصد] محلول حاصل بمدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۸°C-۳٦ قرار گرفته و سپس جذب نوری محلول، بلافاصله در طول موج ٥٤٤ نانومتر خوانده شد. برای بررسی شرایط بهینه تولید آنزیم نقش تغییرات pH، دما، طول زمان کشت و در نهایت شرایط هوا دهی مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور، از سه ایزوله انتخاب شده، کشتهایی در pH های ۳، ٤، ۵، ٦، ۷، ۸ و ۹، دمای ۲۸،۲۵،۲۲ و۳۱ درجه سانتی گراد، و طول مدت کشت ۲٤، ٤۸، ۷۲ و ۱۲۰ساعت در شرایط Shaking (۱۵۰ دور در دقیقه) و non-shaking تهیه گردید.

در این آزمایش از N-acetylglucosamine بعنوان استاندارد استفاده گردید. هر واحد فعالیت آنزیمی (U) ، عبارت از مقدار آنزیمی است که می تواند در طول یک ساعت واکنش، در دما و pH مشخص، یک میکرو مول از N-acetylglucosamine یا الیگومر هایی از آن را آزاد کند(۲۹). برای اندازه گیری مقدار پروتئین از روش (۳) Bradford استفاده شد که در آن از پروتئین Bovine serum albomin (BSA) بعنوان استاندارد استفاده گردید. فعالیت ویژه آنزیمی ، به صورت مقدارفعالیت آنزیم(U/ml) بمقدار کل پروتئین (µg/ml) موجود در محیط، تعریف می شود. برای بررسی الگوی پروتئینی از SDS-PAGE به روش Laemmlli (۱۹) استفاده گردید. الکتروفورز در سیستم ناپیوسته (Stacking،۵٪ و Resolving،۱۲٪) انجام شد.

روش استخراج DNA :

میسلیوم منجمد شده قارچ توسط ازت مایع بصورت پودر درآمده و استخراج DNA ژنومی آن بروش CTAB انجام شد (۹) . DNA بدست آمده در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر سترون حل و در 20ºC- برای استفاده بعدی نگهداری گردید.

آغازگرهای مورد استفاده:

آغازگرهای مورد استفاده جهت تکثیر بخشی از ژنهای chit31, chit33 و chit42 بشرح زیر می باشند که

Archive of SID

www.SID.ir

در آن F آغازگر forward (روبه جلو) و R آغازگر (برگشتی) reverse می باشد.

شماره دسترسی در NCBI	نام آغازگر	ترادف
AJ251419	chit31	F: 5'GATACGCTTCTTGAGCCTTT3' R: 5'GGGGGAAACATATACCAAGA3'
AF525753	chit33	F: 5'CAAAATGGCTACAACGTGAT3' R: 5'TGTAGGGAACCTTGATTGTG3'
X79331	chit42	F: 5'ACCTCATGGCCTACGACTAT3' R: 5'AATAACGCTCCCTGCATAAT3'

شرایط انجام PCR اختصاصی:

PCR اختصاصی در مخلوط واکنشی به حجم ۲۵ میکرولیتر، شامل ۲ میلی مولار $MgCl_2$، ٤٠ نانوگرمDNA، ٦٠ نانوگرم آغازگر, ۰/٤ میلی مولار dNTP، و ۲/۵ واحد آنزیم Taq polymerase و ۲/۵ میکرولیتر بافر (10X) (۲۰۰ میلی مولار Tris-HCl, pH=8.4, ۵۰۰ میلی مولار KCl و ۵۰ میلی مولار $MgCl_2$) صورت گرفت. قبل از انتقال نمونه ها به دستگاه ترموسایکلر هر کدام با یک قطره از روغن پارافین پوشش داده شد. سپس واکنش برای ٣٤ دور, شامل دمای ٩٤°C بمدت ۹۰ ثانیه، دمای ٥٦°C بمدت ۳۰ ثانیه و در نهایت، دمای ٧٢°C بمدت ٤٥ ثانیه انجام گردید. بعد از اتمام ٣٤ دور, واکنش در ۷۲ درجه بمدت ٤ دقیقه قرار گرفت. محصول PCR روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز گردید.

نتایج و بحث

بررسی میزان تولید آنزیم کیتینازی:

با توجه به تنوع گونه ای موجود در ۳۰ ایزوله جمع آوری شده از قارچ تریکودرما، برای بدست آوردن شرایط بهینه جهت تولید آنزیم کیتینازی از جدایه های فوق, ابتدا سه جدایه قارچی از سه گونه متفاوت (جدایه های *T. viridae1*، *T. harzianum7* و *T. longibrachiatum5*)، بطور تصادفی انتخاب و مورد استفاده قرار گرفتند. در بررسی شرایط بهینه تولید آنزیم، نقش ٤ عامل هوادهی, دما، pH و زمان کشت مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاصله نشان داد که میزان فعالیت کیتینازی در دماها, pHها

Archive of SID

www.SID.ir

وزمانهای مختلف , در صورت هوا دهی محیط کشت نسبت به شرایط ثابت (غیر هوا دهی) بطور محسوسی افزایش می یابد. بطوریکه میزان تولید آنزیم در قارچ *T. harzianum* در شرایط هوادهی حدود دو برابر بیشتر از شرایط ثابت می باشد. این نتایج با گزارشهای موجود مبنی بر موثر بودن نقش هوا دهی در میزان تولید آنزیم کیتینازی مطابقت دارد (۸ و ۳۰).

در گزارشهای موجود در مورد دمای مناسب جهت تولید آنزیم کیتیناز در گونه *T. harzianum*، دو دمای ۲۵°C و ۲۸°C ، به عنوان دمای بهینه تولید آنزیم، ذکر شده است (۸ و ۲۵ و ۲۹). در این تحقیق جهت بررسی نقش دما، سه جدایه قارچی در دماهای ۲۲, ۲۵, ۲۸ و ۳۱ درجه سانتی گراد کشت داده شد و فعالیت ویژه کیتینازی در آنها مقایسه گردید. نتایج بدست آمده نشان داد که بیشترین فعالیت ویژه کیتینازی هر سه جدایه بترتیب ۱۹/۵ U/mg، ۱۹/۵ U/mg و ۱٤/۵ U/mg، در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد صورت می گیرد (شکل ۱).

طبق گزارشهای موجود در خصوص pH محیط کشت در گونه *T. harzianum* ، pH اپتیمم کشت در این گونه، محدوده pH ٤ تا ۷ را در بر می گیرد (۸ و ۳۰) . بنابر این در بررسی نقش pH محیط کشت، میزان تولید آنزیم کیتیناز سه جدایه مورد نظر، در pH های ۳، ٤، ۵، ٦، ۷، ۸ و ۹ مورد مطالعه قرار گرفت . بررسی میزان تولید آنزیم در جدایه های قارچی نشان می دهد که جدایه های *T. viridae1*، *T. harzianum7* و *T. longibrachiatum5* بترتیب به میزان ۲۹ U/mg، ۲۵ U/mg و ۲۲ U/mg بیشترین فعالیت ویژه را در pH= ۵ نشان می دهند (شکل۲). از آنجا که قدم بعدی در بررسی فعالیت آنزیمی، مقایسه فعالیت ۳۰ جدایه است، رسیدن به شرایط بهینه یکسان در مرحله بهینه سازی ضرورت می یابد. از این رو، با توجه به بالا بودن فعالیت ویژه جدایه ها در pH= ۵ این pH ، بعنوان pH بهینه در نظر گرفته شد.

گزارشهای موجود در مورد زمان کشت گونه *T. harzianum*، محدوده زمانی ۱۲۰-٤۸ ساعت را ذکر می کنند (۸ و ۲۵ و ۲۹). بنابراین در بررسی اثر زمان کشت، فعالیت آنزیم پس از کشتهای ٤۸، ۷۲ و ۱۲۰ ساعته در۳ جدایه قارچی مورد بررسی قرار گرفت. با توجه بنتایج بدست آمده، هر سه جدایه مورد بررسی (*T. viridae1*، *T. harzianum7* و *T. longibrachiatum5*)، پس از زمان ٤۸ ساعت به فعالیت ویژه ماکزیمم خود (بترتیب به میزان ۲۲ U/mg، ۲۵ U/mg و ۱۸ U/mg) می رسند (شکل ۳).

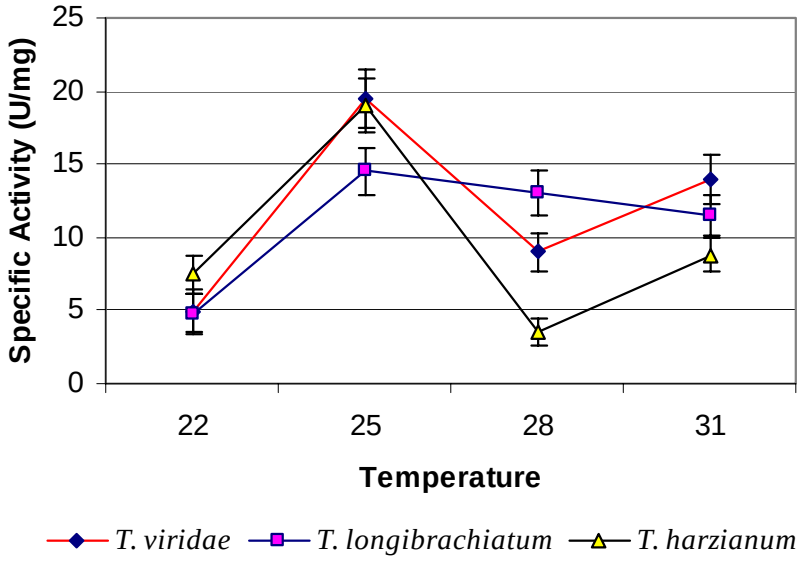
بررسی نتایج بدست آمده از شرایط فوق نشان می دهد که احتمالاً بهترین شرایط برای کشت جدایه ها و تولید آنزیم کیتینازی در محیط کشت, عبارت از pH=۵ , ٤۸ ساعت کشت در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و هوادهی مناسب می باشد. برای بررسی و مقایسه تولید و فعالیت آنزیمی در ۳۰ جدایه جمع آوری شده از قارچ تریکودرما، جدایه های قارچی در شرایط بهینه به دست آمده جهت تولید آنزیم، کشت

Archive of SID

www.SID.ir

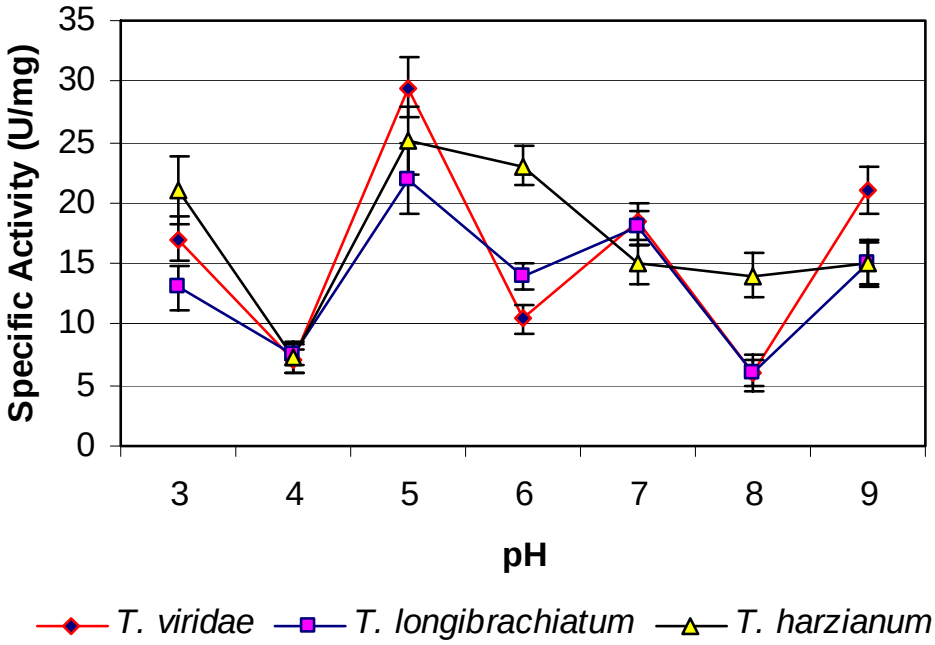
داده شده و فعالیت ویژه کیتینازی در آنها مقایسه گردید. بررسی فعالیت ویژه جدایه های مورد مطالعه نشان می دهد که این جدایه ها، از نظر تولید آنزیم کیتینازی، تنوع نسبتاً زیادی را از خود نشان می دهند، ضمن اینکه، جدایه *T. harzianum*8 با فعالیت U/ml ۹۷ و فعالیت ویژه U/mg ۳۵ و جدایه T26 با فعالیت U/ml ٤٤ و فعالیت ویژه U/mg ٥، بترتیب، بعنوان فعال ترین و ضعیف ترین جدایه از نظر تولید آنزیم مشخص شدند (شکل ٤) .

استفاده از گونه *T. harzianum* بعنوان عامل کنترل بیولوژیک (۱۷ و ۲۳) و نیز، تمرکز مطالعه آنزیمها و ژنهای کیتیناز بر روی گونه فوق، نشان می دهد که آنزیمهای کیتیناز گونه *T. harzianum* در میان سایر گونه های این سرده، شاخص اند. در این تحقیق, مطالعه فعالیت ویژه آنزیم کیتیناز در ۳۰ جدایه قارچ تریکودرما نشان می دهد که قارچ *T. harzianum 8* بیشترین فعالیت ویژه آنزیمی را نشان می دهد. بدین ترتیب، در مراحل بعدی تحقیق از این جدایه استفاده شده است.

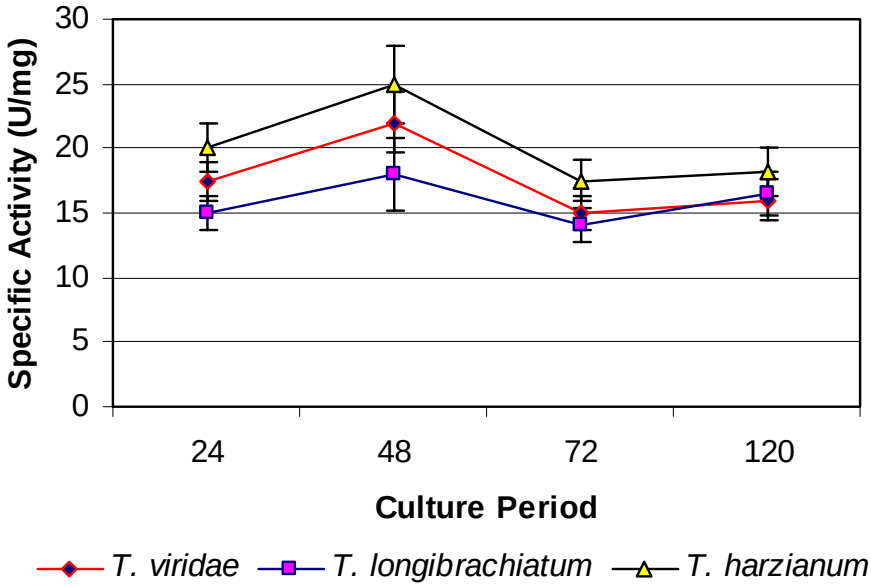


شکل ۱) بررسی تاثیر دما بر تولید آنزیم کیتیناز

www.SID.ir

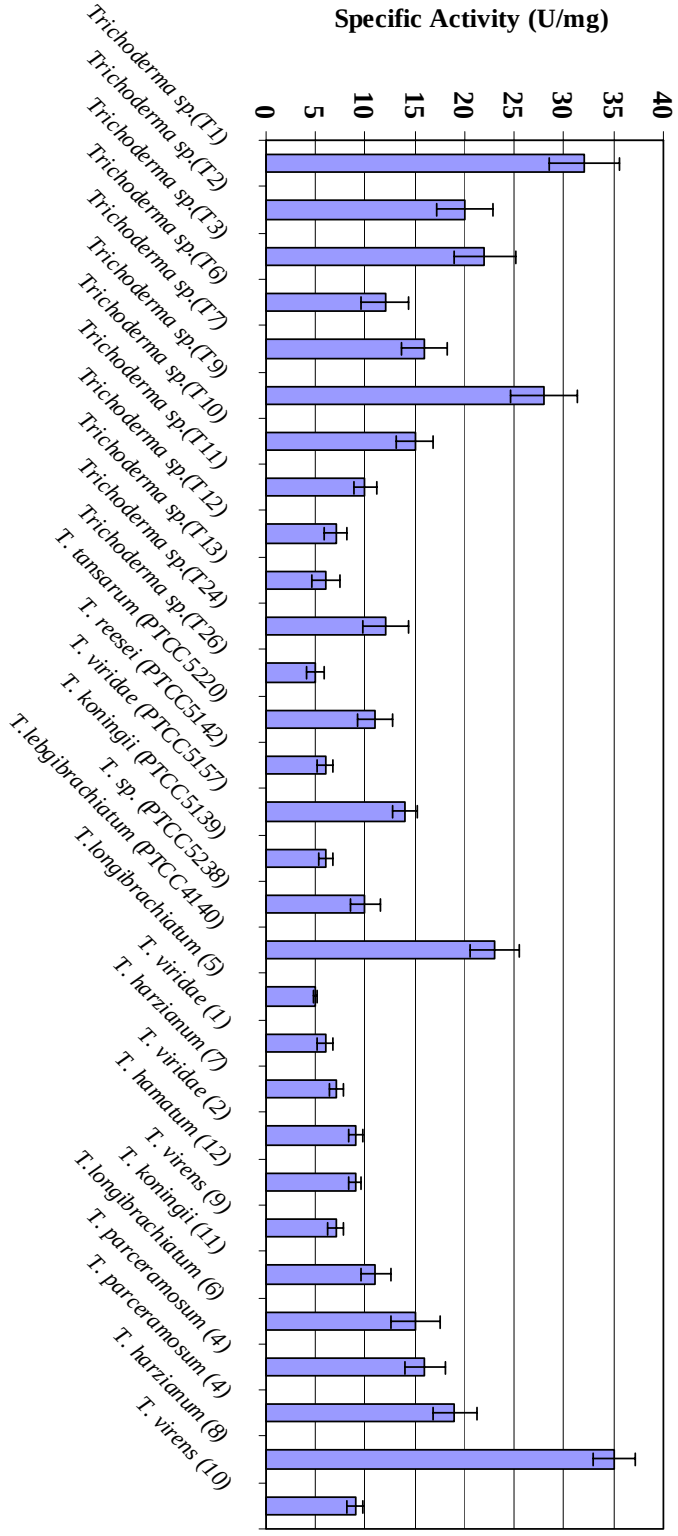


شکل ۲) بررسی pH اپتیمم برای تولید آنزیم کیتیناز



شکل ۳) بررسی تاثیر زمان کشت قارچ بر تولید آنزیم کیتیناز

www.SID.ir



شکل ۴) میزان فعالیت ویژه آنزیم کیتیناز در ۳۰ جدایه تریکودرما مورد مطالعه

www.SID.ir

مطالعه بیان ژنهای اندوکیتیناز در الگوی پروتئینهای ترشحی:

از میان آنزیمهای کیتیناز موجود در گونه *T. harzianum*، سه آنزیم اندوکیتیناز CHIT31، CHIT33 و CHIT42 بیشتر از سایر آنزیمها مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته است (۱٤). طبق گزارشهای موجود، آنزیمهای اندوکیتیناز مورد نظر که وزنهای مولکولی شان بترتیب، ۳۱kDa، ۳۳kDa و ٤۲kDa است، توسط مواد کیتینی القاء می گردند. از سوی دیگر، قندهایی چون گلوکز، گالاکتوز، مالتوز و سوکروز، در بیان ژن این آنزیمها اثر بازدارندگی دارند (۷ و ۱٤ و ۲۲).

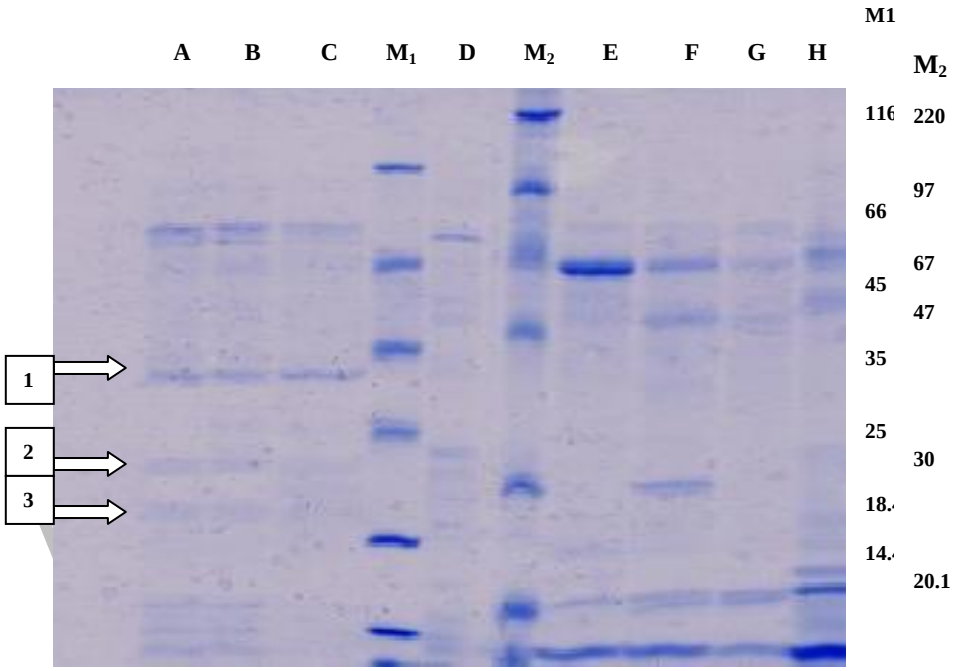
همانگونه که ذکر گردید, با توجه به مطالعه تولید آنزیم کیتینازی، دو جدایه *T. harzianum8* و T.26 ، بترتیب، بعنوان بیشترین و کمترین تولید کننده های آنزیم کیتیناز شناخته شدند. بدین ترتیب، با توجه به مطالب فوق، الگوی پروتئینهای ترشحی دو جدایه در شرایط القاء و بازدارندگی ژنها مورد مطالعه قرار گرفت. مقایسه شدت باندهای پروتئینی در محدوده وزنهای مولکولی kDa ۳۱ تا kDa ٤۲ در الگوی پروتئینهای ترشحی، می تواند جهت تشخیص حضور و بیان ژنهای مربوطه مورد استفاده قرار گیرد. در تهیه این الگو، قارچ *T. harzianum8* ، در محیط های حاوی کیتین(سوبسترای اختصاصی)، دیواره قارچ *Rhizoctonia solani* (بعنوان منبع کربن) و قند های گلوکز، گالاکتوز، مالتوز و سوکروز کشت و پروتئینهای ترشحی آن جمع آوری گردید. بررسی الگوی SDS-PAGE در این محیط ها نشان می دهد (شکل ٥) که در محیط کیتین دار، در محدوده مورد انتظار سه باند قوی مربوط به اندوکیتینازها تشکیل شده است. افزایش بیان آنزیمهای کیتینازی در محیط حاوی کیتین (به عنوان منبع کربن)، می تواند دال بر القاء ژنهای کیتیناز باشد. شدت باند های موجود در این سه ناحیه، در محیط دارای دیواره قارچ *Rhizoctonia solani*، نسبت به محیط دارای کیتین کاهش می یابد. این امر می تواند بدلیل کاهش میزان کیتین در دسترس قارچ، نسبت به محیط قبلی، و نیز بدلیل وجود منابع کربنی دیگر برای استفاده قارچ باشد. در محیط دارای قندهای جایگزین کیتین، باند های ناحیه مورد نظر بسیار ضعیف اند و در بیشتر موارد ناپدید می شوند (شکل ٥). این مشاهدات، با پدیده ممانعت قندی و Catabolite Repression، توجیه پذیر است. بداین ترتیب، در حضور قند های ساده تر، ژنهای کیتیناز به کمترین حد بیان خود می رسند.

برای تأیید بیشتر موقعیت باند های کیتیناز، الگوی جدایه T.26 نیز که در بررسی کلی ایزوله ها بعنوان ضعیف ترین ایزوله معرفی شده است، مورد توجه قرار گرفت. بررسی این الگو و مقایسه آن با الگوی پروتئینی *T. harzianum 8* نشان می دهد که باند های ناحیه مورد نظر، در ایزوله ضعیف بسیار ناچیز است (شکل ٥).

Archive of SID

www.SID.ir

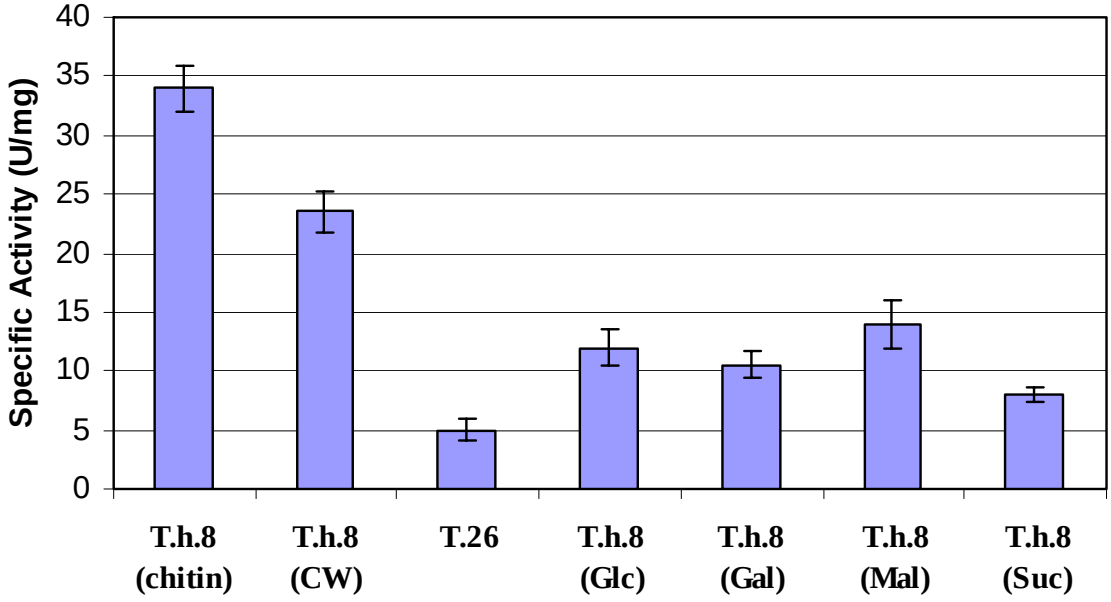
بمنظور مطالعه بیشتر نتایج فوق، فعالیت ویژه آنزیمهای کیتینازی نمونه های مذکور، مقایسه شده است (شکل ٦). بررسی نتایج بدست آمده نشان می دهد که بیشترین فعالیت ویژه آنزیمی برابر ۳٥U/mg و مربوط به پروتئین ترشحی قارچ *T. harzianum8* در محیط کیتین دار است، در حالیکه، در محیط حاوی دیواره قارچ *Rhizoctonia solani* ، فعالیت ویژه کیتینازی تا U/mg ٢٤ کاهش می یابد (شکل ٦). بررسی فعالیت ویژه آنزیمی در محیط های قندی، نشان می دهد که در این محیط ها، فعالیت کیتینازی کاهش چشم گیری پیدا می کند. فعالیت بدست آمده در محیط واجدگلوکز، U/mg ۱۲، در محیط واجدگالاکتوز، U/mg ۱۰/۳ و در محیط های دارای مالتوز و سوکروز بترتیب، U/mg ١٤ وU/mg ۹ می باشد. در این بررسیها، فعالیت ویژه جدایه ضعیف T.26، ۰/۰٥U/µg بدست آمده است که در مقایسه با فعالیت ویژه *T. harzianum8*، کاهش چشمگیری نشان می دهد (شکل ٦). با بررسی تطبیقی الگوی پروتئینی و فعالیتهای ویژه کیتینازی، مشخص می شود که شدت و ضعف باند های احتمالی کیتینازی، در تمامی نمونه ها، با افزایش و کاهش فعالیت ویژه مطابقت دارد. بدین ترتیب، احتمال حضور باند های کیتیناز در محدوده مورد بررسی افزایش می یابد.



شکل۵) الگوی پروتئینی ایزوله *T. harzianum8* و T.26 : (فلش ها نواحی احتمالی سه اندوکیتیناز مورد بررسی را نشان می دهند) AوB قارچ *T. harzianum8* در محیط واجد کیتین؛ C قارچ *T. harzianum8* در محیط حاوی دیواره قارچ *Rhizoctonia solani* ؛D قارچ T.26 در محیط واجد کیتین؛ E قارچ *T.*

www.SID.ir

harzianum8 در محیط واجد گلوکز؛ F قارچ *T. harzianum8* در محیط واجدگالاکتوز ؛G قارچ *T.* *harzianum8* در محیط واجد مالتوز؛ H قارچ *T. harzianum8* در محیط واجد سوکروز؛ M مارکر پروتئینی (kDa) 1= CHIT42، 2= CHIT33، 3= CHIT31



شکل۶) فعالیت ویژه آنزیمهای کیتیناز در نمونه هایی که در شکل ۳-۵، الگوی پروتئینی آنها ارائه شده است

T.h.8 (Chitin): *T. harzianum8* in chitin medium

T.h.8 (C.W.): *T. harzianum8* in *R. solani* cell wall

T.26: ایزوله ضعیف

T.h.8 (Glc): *T. harzianum8* in glucose medium

T.h.8 (Gal): *T. harzianum8* in galactose medium

T.h.8 (Mal): *T. harzianum8* in maltose medium

T.h.8 (Suc): *T. harzianum8* in sucrose medium

Archive

www.SID.ir

مطالعه و بررسی ژنهای کیتیناز توسط PCR:

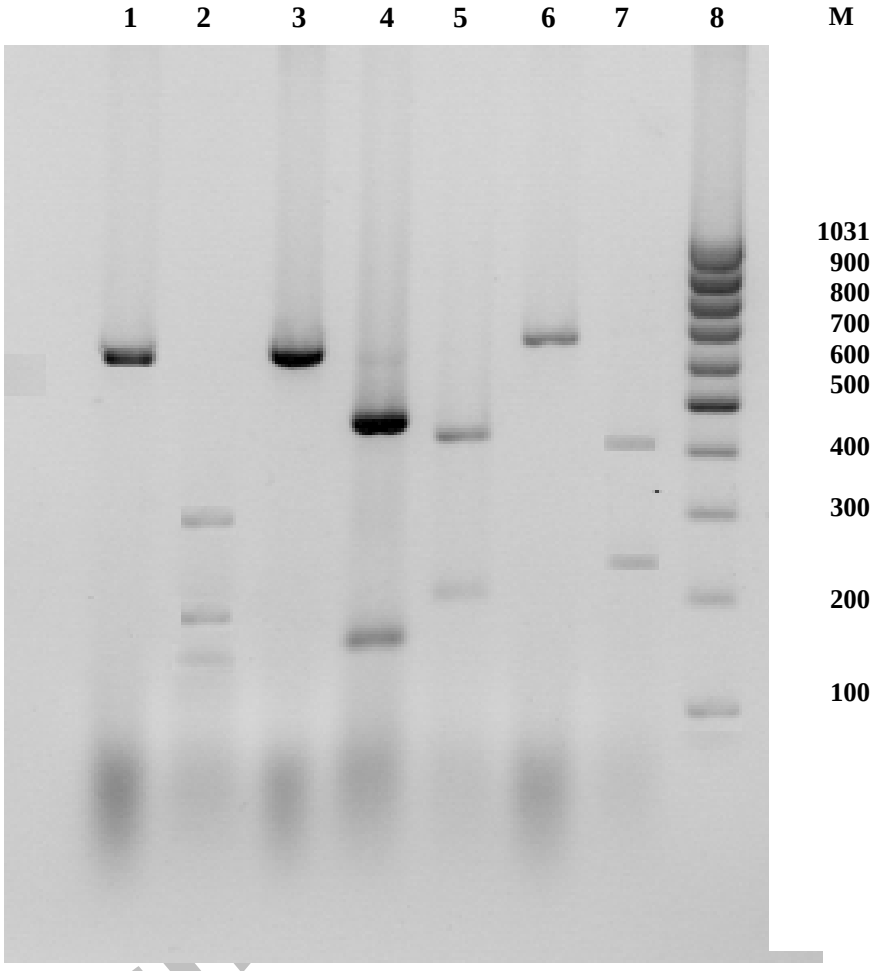
برای بررسی وجود ژنهای کیتینازی ، DNA ژنومی جدایه فعال انتخابی (*T. harzianum8*) مورد استفاده قرار گرفت. طی بررسیهای بعمل آمده در NCBI ، مشخص شده است که برخی از نواحی سه ژن مورد بررسی (chit31، chit33 و chit42) ، در گونه های مختلف تریکودرما حفظ شده اند. بدین ترتیب، سه جفت آغازگر اختصاصی برای نواحی حفظ شده طراحی و واکنش PCR انجام گرفت. طول قطعات تکثیر شده توسط سه جفت آغازگر بترتیب، ۶۳۰bp، ۶۴۰bp و ۶۶۶ bp مورد انتظار می باشد (AJ251419 ، AF525753 و X79331). بررسی قطعات تکثیر شده فوق، در شرایط بسیار اختصاصی، نشان می دهد که هر سه جفت آغازگر، قطعاتی با طول مورد انتظار را تکثیر می کنند (شکل ۷).

با توجه به اینکه، حتی در شرایط PCR اختصاصی، احتمال دارد پرایمرها قطعاتی خارج از محدوده ژن مورد نظر را تکثیر کنند، بمنظور تأیید محصولات PCR ، الگوی هضم آنزیمی آنها با آنزیمهای Restriction Endonuclease مناسب، مورد مطالعه قرار گرفت. قطعات حاصل از هضم محصولات PCR، بر روی ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز شدند(شکل ۷). بررسی الگوی به دست آمده نشان می دهد که مطابق پیش بینی (AJ251419)، در نتیجه عمل آنزیم Hinf1 بر روی محصول PCR حاصل از ژن chit31، سه قطعه به طولهای حدود ۲۸۰bp، ۱۹۹bp و ۱۵۱bp حاصل می شود و هضم قطعه حاصل از ژن chit33 توسط آنزیم Sal1 ، دو قطعه به طولهای حدود ۱۶۸bp و ۴۷۲bp ایجاد می کند (AF525753). در اثر عمل آنزیم BamH1 بر روی این محصول، دو قطعه حدود ۲۱۰ bp و ۴۳۰bp حاصل می گردد. در نهایت، از هضم محصول حدود ۶۶۶bp ژن chit42 توسط آنزیم Bgl1 ، دو قطعه به طولهای حدود bp ۲۵۱ و ۴۱۵bp ایجاد می شود (X79331). نتایج بدست آمده از الگوی هضم آنزیمی قطعات PCR ذکر شده, صحت قطعات مذکور را مورد تأیید قرار می دهد (شکل ۷). این امر نشان می دهد جدایه *T. harzianum8* که بومی ایران می باشد نیز دارای نواحی حفاظت شده ژنهای اندوکیتینازی برخی از گونه های Trichoderma می باشد.

در مجموع با توجه بنتایج مطالعات انجام شده در این تحقیق و توان مناسب جدایه *T. harzianum8* برای تولید آنزیمهای کیتینازی انتظار می رود که بتوان از این جدایه در مطالعات مربوط به کنترل بیولوژیک قارچهای بیماریزا استفاده نمود.

تشکر و قدردانی: بدینوسیله از جناب آقای دکتر روحانی عضو هیات علمی دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا همدان برای اهداء تعدادی از جدایه های قارچ تریکودرمای مورد استفاده در این تحقیق تشکر و قدردانی می گردد.

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۷) الگوی هضم آنزیمی محصولات PCR

۱- محصول PCR ژن کیتیناز ۳۱، ۲- هضم آنزیمی محصول PCR ژن کیتیناز ۳۱ با Hinf1

۲- محصول PCR ژن کیتیناز ۳۳، ٤- هضم آنزیمی محصول PCR ژن کیتیناز ۳۳ با Sal1

٥- هضم آنزیمی محصول PCR ژن کیتیناز ۳۳ با BamH1

٦- محصول PCR ژن کیتیناز ٤۲، ۷- هضم آنزیمی محصول PCR ژن کیتیناز ٤۲ با Bgl1

۸- M مارکر (bp)

www.SID.ir

جدول ۱) لیست جدایه های قارچ تریکودرمای مورد استفاده در این تحقیق.

نام سرده(جنس) و گونه	شماره جدایه	محل جمع آوری
Trichoderma longibrachiatum	5	تلاسر (گیلان)
Trichoderma viridae	1	رزوان شهر (گیلان)
Trichoderma harzianum	7	پرش کوه (گیلان)
Trichoderma viridae	2	فتالم (گیلان)
Trichoderma hamatum	12	رشت (گیلان)
Trichoderma virens	9	رشت (گیلان)
Trichoderma koningii	11	ارومیه
Trichoderma longibrachiatum	6	خاک سر (گیلان)
Trichoderma parceramosum	4	خاک سر (گیلان)
Trichoderma parceramosum	3	فجر (گیلان)
Trichoderma harzianum	8	زاله پر (گیلان)
Trichoderma virens	10	دانشکده کشاورزی همدان
Trichoderma tansarum	PTCC 5220	سویه بومی ایران
Trichoderma reesei	PTCC 5142	CBS 383.78 (هلند)
Trichoderma viridae	PTCC 5157	36268 Pris Historic Natural Museum
Trichoderma koningii	PTCC 5139	CBS 124.79 (هلند)
Trichoderma Sp.	PTCC 5138	سویه بومی ایران
Trichoderma lebgibrachiatum	PTCC 5140	CBS (هلند)
Trichoderma sp.	T1	کرمان
Trichoderma sp.	T2	کرمان
Trichoderma sp.	T3	کرمان
Trichoderma sp.	T6	کرمان
Trichoderma sp.	T7	کرمان

Archive of SID

www.SID.ir

Trichoderma sp.	T9	کرمان
Trichoderma sp.	T10	کرمان
Trichoderma sp.	T11	کرمان
Trichoderma sp.	T12	کرمان
Trichoderma sp.	T13	کرمان
Trichoderma sp.	T24	کرمان
Trichoderma sp.	T26	کرمان

فهرست منابع:

1- Artigues M., Vavet P. (1984). Activites (1-3) glucanisque et chitinisque de quelques champignons, en relation avec leur aptitude a detruire les sclerotes de *Corticum rolfsii* dans la terre sterile. Soil Biology and Biochemistry, ***16***: 527-538.

2- Baker R. (1988). Trichoderma sp. as plant-growth stimulants. Critical reviews in Biotechnology, ***7***: 97-106.

3- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, ***72***: 248-254.

4- Chang Y. C., Baker B., Kleifeld O., Chet I. (1986). Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. Plant Disease, *70*, 145.

5- Chet, I. (1987). Trichoderma; application, mode of action and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi, Chet I., ed. (New York: John- Wiley and Sons).6- Cohen-Kupiec R., Chet I. (1998). The molecular biology of chitin digestion. Current Opinion in Biotechnology, ***9***: 270-277.

7- De la Cruz J., Rey M., Lora J. M. , Hidalgo-Gallego A., Dominguez F., Pintor-Toro J.A., Liobell A., Benitez T. (1993). Carbon source control on beta-glucanases, chitobiase and chitinase from *Trichoderma harzianum*. Arch Microbiol,***159*** : 316-322.

Archive of SID
www.SID.ir

8- De Marco J. L., Lima L. H. C. , De Sousa M. V., Felix C. R. (2000). A *Trichoderma harzianum* chitinase destroys the cell wall of the phytopathoge *Crinipellis perniciosa* , the causal agent of witches' broom disease of cocoa. World journal of Microbiology and Biotechnology, ***16***: 383-386.

9- Doyle J. J., Doyle J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus *12*, 13-15.

10- Elad Y., Chet I., Henis Y. (1982). Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. Can. J. Microbiol, ***28***: 719-725.

11- Elad Y., Lifshitz R., Baker R. (1985). Enzymatic activity of the mycoparasite *Pythium nunn* during interaction with host and non-host fungi. Physiological Plant Pathology, ***27***: 131-148.

12- Elad Y., O'Neill T. , Cohen A., Schtlenberg O. (1995). Factors influencing control of gray mold by means of Trichodex (*Trichoderma harzianum* T39) under field conditions. In Fifth international Trichoderma and Glyocladium workshop (Beltsville).

13- El-Katatny M. H., W. Somitsch, K. H. Robra, M. S. El-Katany and G. M. Gubitz. (2000). "production of chitinase and beta-1, 3- glucanase by *T. harizianum* for control of the phytopathogenic fungus *Sclerotinum rolfsii*. Food Technology and Biotechnology, ***38***: 173-180.

14- Haran S., Shickler H., Chet I. (1996). Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. Microbiology, ***142***: 2321-2331.

15- Haran S., Shickler H., Oppenheim A., Chet I. (1995). New components of the chitinolytic system of *Trichoderma harzianum*. Mycol. Res; ***99***: 441-446.

16- Harman G.E., Hayes C. K., Lorito M., Broadway R. M., Di Pietro A., Peterbauer C., Tronsmo A. (1993). Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: purification of chitobiosidase and endochitinase. Phytopathology, ***83***: 313-318.

Archive of SID

www.SID.ir

17- Harman G.E., Kovach J., Latorre B., Agosin E. , San Martin R., Riegel D. G., Tronsmo A., Pearson R.C. (1995). Integrated and biocontrol of Botrytis on grape and strawberry (Beltsville).

18- Howell C. R., De Vay J. E., Garber R. H., Batson W. E. (1997). Field control of cotton seedling diseases with *Trichoderma virens* in combination with fungicide seed treatments. Journal of Cotton Science, ***1***: 15-20.

19- Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, ***227*** : 680-685.

20- Limon M. C., Lora J. M. , Garcia I., De la Cruz J., Liobell A., Benitez T., Pintor-Toro J. A. (1995). Primary structure and expression pattern of the 33-kDa chitinase gene from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. Curr. Genet; ***28***: 478-483.

21- Lorito M., Harman C. K. , Di Pietro A., Woo S. L., Harman G.E. (1994). Purification, characterization and synergistic activity of a gulacan 1,3-beta glucosidase and an N-acetylglucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. Phytopathology, ***84***: 398-405.

22- Lorito M., Mach R. L., Sposato P., Strauss J., Peterbauer C. K., Kubicek C. P. (1996). Mycoparasitic interaction relieves binding of the Cre1 carbon catabolite repressor protein to promoter sequences of the ech42 gene in *Trichoderma harzianum*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. ***93***: 14868-14872.

23- Migheli Q., Herrera-Estrella A. , Avantaneo M., Gullino M. L. (1994). Fate of transformed *Trichoderma harzianum* in the phylloplane of tomato plants. Molecular Ecology, ***3***: 153-159.

24- Papavizas G. C. (1985). Trichoderma and Glyocladium; biology, ecology and potential for biocontrol. Ann. Rev. Phytopathol, *23*, 23.

25- Ridout C. J., Coley-Smith J. R. (1988). Fractionation of extracellular enzymes from a mycoparasitic strain of *Trichoderma harzianum*. Enzyme Microb. Technol ; *10*.

Archive of SID

www.SID.ir

26- Rojas-Avelizapa L. I., Cruz-Camarillo R. , Guerrero M. I., Rodriguez-Vazquez R., Ibarra J. E. (1999). Selection and characterization of a proteo-chitinolytic strain of *Bacillus thuringiensis*, able to grow in shrimp waste media. World journal of Microbiology and Biotechnology, ***15***: 261-268.

27- Sreenivasaprasad S., Manibushanrao K. (1993). Efficacy of *Glyocladium virens* and *Trichoderma longibrachiatum* as biological control agents of groundnut root and stem rot diseases. International journal of Pest Management, ***39***: 167-171.

28- Tronsmo A., Hjeljord L. G. (1995). *Trichoderma harzianum* used in biological control of diseases on apples in Norway. In Fifth international Trichoderma and Glyocladium workshop (Beltsville).

29- Ulhoa C. J., Peberdy J. F. (1992). Purification and some properties of the extracellular chitinase produced by *Trichoderma harzianum*. Enzyme Microb. Technol ; ***14***: 236-240.

30- Zeilinger S., Galhaup C. , Payer K., Woo S. L., Mach R. L., Fekete C., Lorito M., Kubicek C. P. (1999). Chitinase gene expression during mycoparasitic interaction of *Trichoderma harzianum* with its host. Fungal Genetics and Biology, ***26***: 131-140.

Archive of SID

www.SID.ir