کلون کردن ژن کیتیناز 42 (*chit*42) از جدایه *Trichoderma atroviride* PTCC5220 و مطالعه ساختار آن

حبیب رضا نژاد [1،2]، محمدرضا زمانی [1*]، مصطفی مطلبی [1] و محمدجواد حریقی [3]

[1] تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

[2] تبریز، دانشگاه تربیت معلم آذربایجان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

[3] کرمانشاه، دانشگاه رازی، دانشکده علوم، گروه بیولوژی

تاریخ دریافت: 86/11/17 تاریخ پذیرش: 87/6/3

چکیده

قارچ تریکودرما، به دلیل ترشح انواعی از آنزیمهای کیتینازی، بعنوان عاملی قوی در کنترل بیولوژیک بیماریهای قارچی مورد استفاده قرار می گیرد. این آنزیمها، غالباً با فرو پاشیدن اجزای ساختاری قارچها، به مبارزه با این عوامل بیماریزا می پردازند. در میان اجزای ساختاری قارچ، دیواره قارچی، نخستین و مهم ترین سدی است که در برابر اثر آنزیمهای هیدرولازی قرار می گیرد. از این رو، بسیاری از آنزیمهای هیدرولازی بویژه آنزیمهای کیتینازی، وظیفه اختصاصی از بین بردن اجزای تشکیل دهنده دیواره قارچی را بر عهده می گیرند. از آنجا که جدایه *Trichoderma atroviride* در میان 30 جدایه مختلف قارچ تریکودرما جمع آوری شده در این آزمایشگاه در سنجش فعالیت آنزیمهای کیتینازی دارای بیشترین میزان فعالیت آنزیمی می باشد، بنابراین در این تحقیق با توجه به اهمیت آنزیم کیتیناز (42 کیلو دالتونی Chit42) در فرآیند کنترل بیماری قارچی نسبت به کلون کردن ژن *chit*42 این جدایه و مطالعه آن اقدام گردید. جهت شناسایی ژن کیتیناز 42 (*chit*42)، استخراج DNA ژنومی از جدایه قارچ *T. atroviride* به روش CTAB صورت گرفت. برای تکثیر این ژن از دو آغازگر اختصاصی (CUM1/CDM2) استفاده گردید و قطعه مورد انتظار به طول تقریبی 1.6 kb تکثیر گردید. آنزیم *Xho*I جهت بررسی الگوی هضم آنزیمی قطعه تکثیر شده مورد استفاده قرار گرفت و صحت قطعه تکثیر شده را مورد تأیید قرار داد. قطعه تکثیر شده در ناقل pUC19 کلون شده و جهت تعیین توالی ژن مذکور مورد استفاده قرار گرفت. مقایسه توالی به دست آمده با توالیهای ثبت شده در بانک ژن، ژن کلون شده *chit*42 را مورد تأیید قرار داده و پلاسمید حاصله بنام pMJH1 نامگذاری گردید. بررسی توالی به دست آمده نشان داد که طول این ژن برابر 1573 bp بوده و دارای سه ناحیه اینترونی به طول 58 bp، 62 bp و 70 bp می باشد. مقایسه توالی نوکلئوتیدی کامل این ژن با توالی ژن *chit42* از سایر قارچها نشان داد که طول اینترون های آنها حدوداً برابر می باشد. ضمناً تعداد اسید آمینه های این آنزیم برابر 421 اسید آمینه می باشد. مقایسه توالی اسید آمینه آنزیم Chit42 به دست آمده در این تحقیق با توالی گزارش شده مربوط به آنزیم Chit42 از قارچهای *T. aureoviride*، *T. viride*، *T. harzianum*، *T. longibrachiatum* و *T. koningii* نشان داد که میزان مشابهت آنها به ترتیب برابر 100، 98، 98، 97 و 96 درصد می‌باشد.

واژه های کلیدی: *Trichoderma atroviride*، آنزیم کیتیناز 42، ژن *chit*42، کلونینگ، جداسازی ژن

* نویسنده مسئول، تلفن تماس: 44580363، پست الکترونیک: zamani@nigeb.ac.ir

مقدمه

یکی از راههای کنترل بیماریهای قارچی که خسارت زیادی را به گیاهان زراعی وارد می سازد استفاده از قارچ کشها در سطح وسیع می باشد که این امر باعث هزینه های سنگین می گردد. برای بسیاری از قارچها قارچکش مناسب و

مؤثری وجود نداشته و یا عده ای از قارچها خاکزی بوده لذا از قارچ کشها باید به مقدار زیاد استفاده شود که باعث آلودگی محیط زیست، آلودگی منابع آبهای زیرزمینی و محصولات کشاورزی می شود.

یکی از راههای مناسب جهت کنترل بیماریهای ناشی از قارچهای بیماریزا که تأثیر نامطلوب فوق را نیز نداشته باشد، استفاده از روشهای کنترل بیولوژیکی می باشد. قارچ تریکودرما یکی از قارچهای مهم بوده که بالقوه از عوامل کنترل بیولوژیک علیه قارچهای بیماریزا محسوب می گردد (5 و 10). بررسیها نشان می دهد که این قارچ با کنترل فلور میکروبی خاک در ناحیه ریزوسفر گیاهان، به افزایش میزان رشد گیاه کمک می کند (1). توانایی گونه های مختلف جنس تریکودرما در کنترل رشد بسیاری از قارچها و باکتریهای خاکزی، این قارچ را به عاملی قوی در کنترل بیولوژیک بیماریهای گیاهی تبدیل کرده است.

حضور آنزیمهای کیتینازی در فعالیت کنترل بیولوژیکی قارچ بسیار مؤثر می باشد. در گونه های مختلف قارچ تریکودرما، انواعی از آنزیمهای کیتینازی وجود دارند که با فعالیت افزایشی خود به تجزیه اجزای سازنده دیواره میزبان، و در نهایت، به فروپاشی ساختار دیواره قارچ کمک می کنند (12 و 20).

مطالعه اثر کیتینازهای مختلف بر روی دیواره قارچ میزبان نشان می دهد که هر یک از این آنزیمها، به نحو ویژه ای بر دیواره میزبان اثر می گذارند. مطالعه اثر مستقیم آنزیمهای CHIT42، CHIT33 و CHIT31 ، بر قارچ *Botrytis cinerae* نشان داده است که از این آنزیمها، تنها آنزیم CHIT42 می تواند بر دیواره میزبان اثر تجزیه کنندگی داشته باشد و دو آنزیم دیگر، هر چند در همراهی با CHIT42 ، اثر تجزیه کننده این آنزیم را افزایش می دهند، اما در نبود این آنزیم و به تنهایی، هیچ گونه خسارتی را به دیواره میزبان وارد نمی کنند (7 و 8). بررسیها نشان می‌دهد که با به کار بردن آنزیم CHIT42، جدار لوله‌های زایا (Germ tubes)، اسپورها و میسلیوم قارچ هدف تجزیه شده و باعث تخریب رشته‌های میسلیوم، واکوئوله شدن شدید سیتوپلاسم و در نهایت تورم و از هم پاشیدن ساختمان قارچ می شود (22).

در این تحقیق تکثیر و کلون کردن ژن *chit*42 از جدایه *T. atroviride* انجام گرفته و ساختار این ژن از نظر وجود اینترون‌ها و طول آنها و نیز طول پلی پپتید کد شده مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

مواد و روشها

جدایه *Trichoderma atroviride* PTCC5220 تهیه شده از کلکسیون قارچها و باکتریهای عفونی سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران در طول این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت. جهت نگهداری قارچ از محیط کشت PDA (Potato Dextrose Agar) استفاده گردید. برای تهیه این محیط پودر PDA به میزان 39 گرم در لیتر در آب مقطر حل شده و پس از سترون کردن مورد استفاده قرار گرفت.

روش استخراج DNA : برای تهیه میسلیوم قارچ، ارلن های 250 میلی لیتری که حاوی 100 میلی لیتر محیط کشت مایع MY (Yeast extract 0.2%, Malt extract 2%) سترون شده بودند توسط اسپور تلقیح شده و در دمای 30- 25 درجه سانتی گراد همراه با هوادهی انکوبه شدند. پس از جمع آوری میسلیوم ها از محیط کشت (یک هفته پس از تلقیح) آنها را با آب مقطر سترون شستشو داده، سپس با کاغذ صافی واتمن شماره یک سترون آبگیری و در 20- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. میسلیوم منجمد شده قارچ توسط ازت مایع بصورت پودر درآمده و استخراج DNA ژنومی آن به روش CTAB انجام شد (9). DNA به دست آمده در 50 میکرولیتر آب مقطر سترون حل شده و در 20- درجه سانتی گراد برای استفاده بعدی نگهداری گردید.

```
GGATGAAAATTCCATCCAGCAGCAGCAACTTGGAGAGCTCTTTTCAGCAGCAACTTCTTC      60

CTTTCAAAGCATTTCTTGACAACCTTTGCTGAATCTCAAACACTTCACCATGTTGGGTTT     120
                                                  M  L  G  F
CCTCGGAAAGTCCGTGGCCCTGCTTGCTGCGCTGCAGGCCACTCTCACCTCTGCATCTCC     180
 L  G  K  S  V  A  L  L  A  A  L  Q  A  T  L  T  S  A  S  P
TGTGTCTACAAACGACGTCTCAGTTGAGAAGAGAGCCAGCGGATACGCAAACGCTGTCTA     240
 V  S  T  N  D  V  S  V  E  K  R  A  S  G  Y  A  N  A  V  Y
CTTCACCAACTGgtgagtgaagctaactcgtggtcatgaatttcagggctaactatgggc     300
 F  T  N  W
gattaaagGGGTATCTATGGCCGCAACTTTCAACCCCAGGACCTGGTTGCGTCGGACATC     360
        G  I  Y  G  R  N  F  Q  P  Q  D  L  V  A  S  D  I
ACTCATGTCATCTACTCTTTCATGAACTTCCAAGCAGACGGCACTGTgtaagtttcgaag     420
T  H  V  I  Y  S  F  M  N  F  Q  A  D  G  T  V
ccaagagttttccatctctattcagtcgctgacctttcaactatagTGTCTCTGGAGAT     480
                                                  V  S  G  D
GCCTACGCCGATTATCAGAAGCACTATTCTGACGATTgtatgacagctctttccccttag     540
A  Y  A  D  Y  Q  K  H  Y  S  D  D  S
tactccaactttgagccaatccatataaactaacatctataatagCCTGGAATGATGTCG     600
                                              W  N  D  V  G
GCAACAACGCATACGGTTGTGTGAAGCAGTTGTTCAAGTTGAAGAAGGCCAACCGCAACT     660
  N  N  A  Y  G  C  V  K  Q  L  F  K  L  K  K  A  N  R  N  L
TGAAGGTTATGCTCTCTATCGGTGGCTGGACCTGGTCCACCAACTTCCCTTCTGCAGCAA     720
  K  V  M  L  S  I  G  G  W  T  W  S  T  N  F  P  S  A  A  S
GCACCGATGCCAACCGCAAGAACTTTGCCAAGACGGCCATCACCTTCATGAAGGACTGGG     780
  T  D  A  N  R  K  N  F  A  K  T  A  I  T  F  M  K  D  W  G
GTTTTGATGGTATTGACGTCGACTGGGAGTACCCTGCCGATGACACCCAGGCCACCAACA     840
  F  D  G  I  D  V  D  W  E  Y  P  A  D  D  T  Q  A  T  N  M
TGATTCTTCTGCTCAAGGAGATCCGATCTCAACTAGATGCCTATGCTGCGCAATACGCTC     900
  I  L  L  L  K  E  I  R  S  Q  L  D  A  Y  A  A  Q  Y  A  P
CAGGCTACCACTTCCTGCTCTCCATCGCTGCCCCCGCTGGACCAGAGCACTACTCTGCGC     960
  G  Y  H  F  L  L  S  I  A  A  P  A  G  P  E  H  Y  S  A  L
TGCACATGGCCGACCTTGGTCAAGTTCTCGACTATGTCAACCTTATGGCCTATGACTATG    1020
  H  M  A  D  L  G  Q  V  L  D  Y  V  N  L  M  A  Y  D  Y  A
CTGGTTCTTGGAGCAGCTACTCTGGACACGATGCCAACTTGTTTGCCAACCCGTCCAACC    1080
  G  S  W  S  S  Y  S  G  H  D  A  N  L  F  A  N  P  S  N  P
CCAACTCTTCACCATACAACACCGATCAGGCTATCAAGGCTTATATCAACGGAGGCGTTC    1140
  N  S  S  P  Y  N  T  D  Q  A  I  K  A  Y  I  N  G  G  V  P
CCGCAAGCAAGATCGTTCTTGGCATGCCTATCTATGGACGATCTTTCGAGAGCACTAACG    1200
  A  S  K  I  V  L  G  M  P  I  Y  G  R  S  F  E  S  T  N  G
GCATTGGCCAAACCTACAGTGGAATTGGATCTGGAAGCTGGGAGAACGGTATCTGGGACT    1260
  I  G  Q  T  Y  S  G  I  G  S  G  S  W  E  N  G  I  W  D  Y
ACAAGGTTCTTCCCAAGGCCGGCGCTACAGTCCAGTACGACTCTGTCGCACAGGCGTACT    1320
  K  V  L  P  K  A  G  A  T  V  Q  Y  D  S  V  A  Q  A  Y  Y
ACAGCTATGATTCTAGCAGCAAGGAGCTCATCTCTTTCGATACCCCTGACATGGTCAGCA    1380
  S  Y  D  S  S  S  K  E  L  I  S  F  D  T  P  D  M  V  S  K
AAAAGGTCTCTTACCTCAAGAATCTCGGCCTGGGAGGCAGCATGTTCTGGGAGGCTTCTG    1440
  K  V  S  Y  L  K  N  L  G  L  G  G  S  M  F  W  E  A  S  A
CTGACAAGACTGGCTCCGACTCCTTGATCGGAACAAGCCACAGAGCGCTGGGAAGCCTGG    1500
  D  K  T  G  S  D  S  L  I  G  T  S  H  R  A  L  G  S  L  D
ACTCAACTCAGAACTTGCTGAGCTACCCCAACTCCCAGTATGATAACATCCGAAGCGG      1560
  S  T  Q  N  L  L  S  Y  P  N  S  Q  Y  D  N  I  R  S  G*
TCTCAACTAG                                                      1573
 L  N  *
```

شکل 4- توالی ژن *chit42* از گونه *T. atroviride* و توالی اسیدآمینه ای پروتئین مربوطه: توالی 5'UTR بصورت underline مشخص شده است. توالی اگزونی با حروف بزرگ و توالی اینترونی با حروف کوچک نشان داده شده است.

آغازگرهای مورد استفاده: مشخصات آغازگرهای طراحی شده جهت تکثیر ژن *chit42* که از توالی گزارش شده مربوط به قارچ *T. harzianum* در سایت NCBI توسط Carsolio و همکاران (1999) باشماره ثبت X79381 استفاده شده است(3)، بشرح زیر می باشد.

5′GCAGGTCGACGGATGAAAATTCCATCCA3′ -CUM1

5′GGGAATTCGTTGAGACCGCTTCGGATGT3′ -CDM2

Bf- 5′ACCTCATGGCCTACGACTAT3'

Br- 5′ATTATGCAGGGAGCGTTATT3'

M13f- 5' GCTAGTTATTGCTCAGCGG3'

M13r- 5'GTAAAACGACGGCCAGT3'

شرایط انجام PCR اختصاصی: PCR اختصاصی پس از بهینه سازی در مخلوط واکنشی به حجم 25 میکرولیتر، شامل 2 میلی مولار $MgSO_4$، 30 نانوگرم DNA، 0/3 میکرومولار آغازگر، 0/2 میلی مولار dNTP، و 2/5 واحد آنزیم *pfu*-polymerase و 2/5 میکرولیتر بافر (10X) (200 میلی مولار Tris-HCl، pH=8/8 ، 100 میلی مولار KCl ، 100 میلی مولار $(NH4)_2SO_4$ ، 1 درصد تریتون X100 و یک میلی گرم در میلی لیتر از BSA) صورت گرفت. سپس واکنش برای 30 دور، شامل دمای 94 درجه سانتی گراد بمدت 60 ثانیه، دمای 54 درجه سانتی گراد بمدت 60 ثانیه و در نهایت، دمای 72 درجه سانتی گراد بمدت 100 ثانیه انجام گردید. بعد از اتمام 30 دور، واکنش در 72 درجه سانتی گراد بمدت 10 دقیقه قرار گرفت. محصول PCR روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز گردید. جهت تأیید الگوی هضم آنزیمی قطعه بدست آمده توسط PCR از آنزیم *Xho*I استفاده گردید.

روش استخراج پلاسمید و کلون کردن DNA: استخراج پلاسمید به روش Alkaline lysis صورت گرفت (24). برای کلون کردن ژن تکثیر شده از وکتور pUC18 استفاده شد. وکتور مذکور و قطعه تکثیر شده توسط PCR با آنزیمهای اختصاصی *Sal*I و *Eco*RI (که در دو طرف قطعه تکثیر شده دارای جایگاه می باشند) هضم گردید. Ligation توسط آنزیم T4 DNA ligase انجام شد. باکتری *E. coli* (DH5α) با استفاده از کلرید کلسیم 100 میلی مولار به حالت مستعد شده درآمده و به مدت یکساعت همراه با DNA مربوطه جهت transformation روی یخ انکوبه گردیده و سپس به مدت دو ساعت در دمای 37 درجه سانتی گراد انکوبه گردید. باکتریها پس از شوک حرارتی 42 درجه سانتی گراد به مدت 90 ثانیه در محیط SOB (2% Bacto tryptone, 0.5% Bacto-yeast extract, 10mM NaCl, 2.5mM KCl, 10mM $MgCl_2$, 10mM $MgSO_4$) حاوی 100 میکروگرم در هر میلی لیتر آمپی سیلین گسترش داده شدند. در این مرحله کلونیهای سفید رنگ حاصله بعنوان کلونهای حاوی قطعات مورد نظر انتخاب گردیدند. قطعات کلون شده پس از تأیید توسط الگوی هضم آنزیمی جهت تعیین توالی (توسط شرکت SeqLab Gottingen, Germany) مورد استفاده قرار گرفت. بمنظور تعیین توالی دقیق قطعات کلون شده، تعیین توالی در دو جهت با استفاده از آغازگرهای M13- forward/reverse انجام گردید.

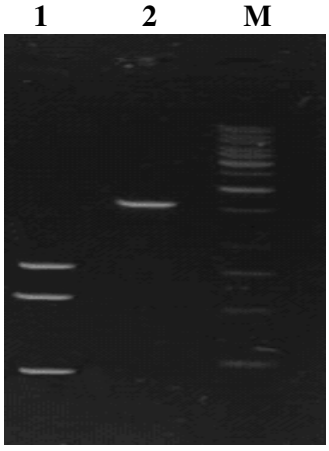
تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک: بررسی مشابهت توالی ژن *chit42* با اطلاعات موجود در بانک ژن بروش BLAST انجام شد. مقایسه توالی نوکلئوتیدی و اسید آمینه ای ژن مذکور با توالیهای ثبت شده در بانک ژن توسط برنامه نرم افزاری CLUSTAL W انجام گرفت

نتایج

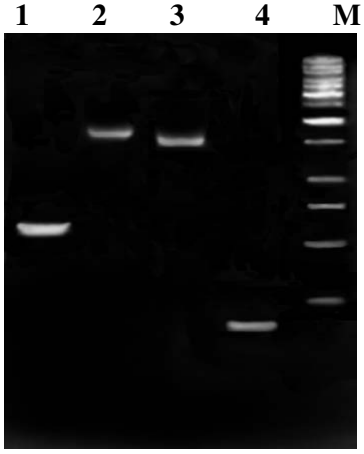
مطالعه ژن *chit42* قارچ *T. atroviride* : برای تکثیر و بررسی ژن *chit42*، DNA ژنومی، جدایه *T. atroviride* مورد استفاده قرار گرفت. آغازگرهای اختصاصی (CUM1/CDM2) برای تکثیر ژن کامل *chit42* طراحی و واکنش PCR با استفاده از آنزیم *pfu*-polymerase (دارای توانایی proofreading می باشد) انجام گرفت. طول DNA تکثیر شده توسط این آغازگرها با احتساب توالی مربوط به جایگاههای آنزیمی آغازگرها براساس توالی مربوط به ژن *chit42* قارچ *T. harzianum* (3) 1573 bp مورد انتظار می باشد. بررسی قطعه تکثیر شده فوق در شرایط بسیار اختصاصی (بالاترین دمای اتصال ممکن)، نشان می دهد که این آغازگرها، DNA با طول مورد انتظار را تکثیر می نمایند (شکل 1).

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 DNA تکثیر شده با آنزیمهای برشی مناسب (*Xho*I)، مورد مطالعه قرار گرفت. قطعات حاصل از هضم محصول PCR، روی ژل آگارز 2 درصد الکتروفورز شدند(شکل 1). بررسی الگوی به دست آمده نشان می دهد که مطابق پیش بینی، در نتیجه عمل آنزیم *Xho*I روی محصول PCR حاصل از ژن *chit42* ، سه قطعه به طولهای 800 bp و 600 bp و 173 bp حاصل می شود. نتایج به دست آمده از الگوی هضم آنزیمی DNA تکثیر شده با PCR، صحت قطعه مذکور را مورد تأیید قرار می دهد (شکل 1). با توجه به نتایج حاصل از الگوی هضم آنزیمی با استفاده از عمل آنزیم فوق می توان نتیجه گیری نمود که آغازگرهای CUM1 و CDM2 قطعه‌ای که به طول حدود 1573 bp را تکثیر نموده‌اند، همان قطعه مورد انتظار از ژن *chit42* در قارچ *T. atroviride* می باشد. این قطعه تمامی ORF (Open Reading Frame) ژن مذکور همراه با 110 جفت باز از ناحیه 5′UTR را دارا می باشد.

با توجه به اینکه در دو آغازگر مورد استفاده CUM1 و CDM2 به ترتیب جایگاههای هضم آنزیمی *Sal*I و *Eco*RI برای کلون کردن در وکتور pUC19 طراحی شده اند، لذا قطعه تکثیر شده همراه با وکتور مربوطه با آنزیمهای *Eco*RI و *Sal*I هضم و ligation صورت گرفت. پلاسمید حاوی DNA تکثیر شده از کلونیهای سفید رنگ به دست آمده در محیط کشت انتخابی، استخراج و پس از تأیید بنام pMJH1 نامگذاری گردید. صحت قطعه کلون شده توسط PCR (شکل 2) و هضم آنزیمی (شکل 3) تأیید شده و پس از خالص سازی برای تعیین توالی مورد استفاده قرار گرفت. اطلاعات بدست آمده از تعیین توالی نشان داد که طول قطعه تکثیر شده مربوط به ژن *chit42* در جدایه مورد بررسی برابر bp 1573 (شکل 4) و با محتوای GC برابر 53/02 درصد می باشد. توالی ژن *chit42* مربوط به این قارچ (*T. atroviride*) با کد DQ022674 در بانک ژن ثبت گردید.



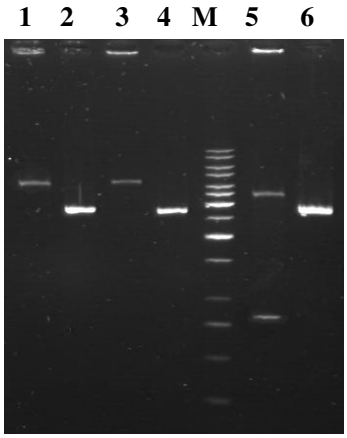
شکل 1) الگوی هضم آنزیمی ژن *chit*42 تکثیر شده بوسیله PCR: **1)** هضم آنزیمی قطعه تکثیر شده با آنزیم *Xho*I 2) **تکثیر ژن** *chit*42 با استفاده از آغازگرهای CUM1 و CDM2، M) **مارکر**



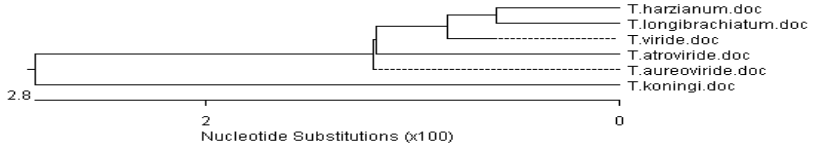
شکل 2) تأیید کلونینگ ژن *chit*42 با استفاده از واکنش PCR: 1) تکثیر قطعه حدود 650 bp با استفاده از آغازگرهای درون ژنی Bf/Br، 2) تکثیر قطعه حدود 1800 bp با آغازگرهای M13f/r، 3) تکثیر قطعه حدود 1600 bp با آغازگرهای CUM1 و CDM2، (در واکنشهای PCR انجام شده قطعات مورد انتظار مشاهده گردید) 4) باند 200bp محصول واکنش PCR با استفاده از pUC18 و پرایمرهای M13f/r، این پرایمرها تنها بخشی معادل 210bp را از پلاسمید pUC18 تکثیر می کنند. M) مارکر

مقایسه توالی DNA ژنومی بدست آمده در این تحقیق با توالی cDNA ژن *chit42* از این قارچ (14) نشان می دهد که این ژن دارای سه اینترون به طولهای bp 58، bp 62 و

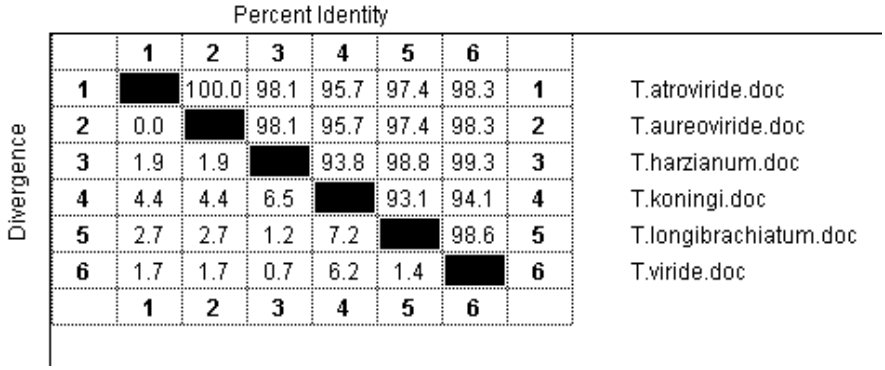
bp 70 بوده و Open Reading Frame موجود در این ژن یک پلی پپتید به طول 421 اسید آمینه (شکل 4) با وزن ملکولی 46/1 کیلو دالتون را کد می نماید. مقایسه توالی اسید آمینه ای آنزیم Chit42 از روش Multiple Alignment با استفاده از برنامه CLUSTAL W انجام گرفت. مقایسه توالی اسید آمینه Chit42 از قارچ *T. atroviride* بدست آمده در این تحقیق با توالیهای اسید آمینه ای مرتبط در بانک ژن گزارش شده از قارچهای *T. aureoviride* (AAW31956)، *T. viride* (AAG09447)، *T. harzianum* (AAZ95175)، *T. longibrachiatum* (ABD42921) و *T. koningii* (AAF19612) نشان داد که اکثر اسید آمینه های این آنزیم در این گونه ها بصورت حفاظت شده می باشند. مقایسه توالی اسید آمینه ای آنزیم Chit42 مورد بررسی در این تحقیق با استفاده از روش Pairwise Alignment با توالی اسید آمینه ای آنزیم Chit42 از گونه های *T. aureoviride*، *T. viride*، *T. harzianum*، *T. longibrachiatum* و *T. koningii* به ترتیب بمیزان 100، 98، 98، 97 و 95 درصد مشابهت نشان می دهد (شکل 5).



شکل 3))تأیید کلونینگ ژن *chit*42 **با استفاده از** الگوی هضم آنزیمی:1) هضم آنزیمی pMJH1 **با** آنزیم *SalI*، 2) هضم آنزیمی pUC18 با آنزیم *SalI* ، 3و4) تکرار مرحله قبل با آنزیم *EcoRI*، 5 و6) تکرار مرحله قبل با آنزیم *HincII* (در واکنشهای هضم آنزیمی قطعات مورد انتظار مشاهده گردید) و M) مارکر



A



B

شکل 5- A) دندروگرام حاصل از آنالیز توالیهای اسید آمینه ای قارچهای *T. aureoviride*، *T. harzianum*، *T. viride*، *T. longibrachiatum* و *T. koningii*.

B) درصد مشابهت توالی اسید آمینه ای آنزیم کیتیناز 42 (Chit42) از قارچ *T. atroviride* با توالی اسید آمینه ای ژنهای مشابه در بانک ژن.

بحث

ترشح آنزیمهای کیتینازی، تولید آنتی‌بیوتیک و رقابت ریزوسفری قارچ تریکودرما باعث شده تا این میکروارگانیسم در کنترل بیماریهای گیاهی ناشی از قارچهای بیماریزا دارای پتانسیل کنترل بیولوژیکی مناسبی باشد (17). پتانسیل گونه‌های تریکودرما بعنوان عامل مهم کنترل بیولوژیک بیماریهای گیاهی، برای اولین بار در اوایل دهه 1930 شناخته شد و در سالهای بعد کنترل بسیاری از بیماریها توسط این قارچ مشخص گردید. نتایج تحقیقات انجام شده بر روی گیاهان گوجه فرنگی (19)، تنباکو (6) و انواع مختلف گیاهان زراعی نشان می‌دهد که با حضور قارچ تریکودرما در خاک، رشد گیاه به نحو چشمگیری افزایش می‌یابد (4). بررسیها نشان می‌دهد که قارچ تریکودرما با کنترل فلور میکروبی خاک در ناحیه ریزوسفر گیاهان به این افزایش رشد کمک می‌کند (1).

برخی از قارچهای تریکودرما با ترشح آنزیمهای تجزیه کننده باعث تجزیه دیواره سلولی غنی از کیتین قارچهای بیماریزا می گردد (2). از جمله مهمترین آنزیمهای هیدرولازی که توسط قارچهای تریکودرما تولید می شوند آنزیمهای کیتینازی می باشند (15 و 16). کیتینازها آنزیمهای هیدرولازی هستند که بیوپلیمر کیتین را با شکستن پیوندهای گلیکوزیدی β-1,4 به زیر واحدهای تشکیل دهنده آن یعنی N–استیل گلوکز آمین تجزیه می‌نمایند. این آنزیمها با تجزیه اجزای سازنده دیواره قارچها باعث کنترل عوامل بیماریزا می شوند. از آنجا که در تحقیقات قبلی نشان داده شده است که جدایه *T. atroviride* در میان 30 جدایه مختلف قارچ تریکودرما در سنجش فعالیت آنزیمهای کیتینازی دارای بیشترین میزان فعالیت آنزیمی بوده است (13)، و نیز با توجه به اینکه گزارشات موجود نشان می دهند که آنزیم کیتیناز 42 کیلو دالتونی در میان آنزیمهای کیتینازی قارچ تریکودرما نقش مؤثرتری در تجزیه کیتین موجود در دیواره قارچها دارد (18 و 21)، بنابراین با توجه به اهمیت این آنزیم نسبت به مطالعه و کلون کردن ژن *Chit42* از جدایه *T. atroviride* اقدام گردید. مقایسه توالی نوکلئوتیدی کامل این ژن که دارای سه ناحیه اینترونی به طول 58 bp، 62 bp و 70 bp می باشد و تعداد و طول اینترونهای آنها حدوداً برابر می باشد ضمناً تعداد اسید آمینه های این آنزیم با تعداد اسید آمینه های آنزیم CHIT42 در قارچهای *T. aureoviride* و *T. koningii* برابر بوده (421 اسید آمینه) در صورتی که این آنزیم در قارچهای *T. viride*، *T. harzianum* و *T. lingibrachiatum* تعداد سه اسید آمینه بیشتر دارد (11، 23، 25 و 26). ژن *chit*42 مورد مطالعه در این تحقیق که از جدایه *T. atroviride* با بیشترین میزان فعالیت آنزیمهای کیتینازی شناسایی و کلون شده است می تواند با استفاده از ناقلهای مناسب، جهت انتقال به گیاهان زراعی که در معرض بیماریهای قارچی می باشند مورد بهره برداری قرار گیرد.

منابع

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

2- Benhamou, N., Chet, I. 1993. Hyphal Interaction Between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*: Ultrastructure and Gold Cytochemistry of the Mycoparasitic Process. Phytopathology *83:* 1062-1071.

3- Carsolio, C., Benhamou, N., Haran, S., Cortes, C., Gutierrez, A., Chet, I., Herrera-Estrella, A. 1999. Role of the *Trichoderma harzianum* Endochitinase Gene, ech42, in Mycoparasitism. Applied and Environmental Microbiology *65:* 929-935.

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- Cohen-Kupiec R., Chet I. 1998. The molecular biology of chitin digestion. Current Opinion in Biotechnology *9:* 270-277.

6- Cole J. S., Zvenyika Z. 1986. Integrating *Trichoderma harzianum* and triadimenol for the control of tobacco sore shin in zimbabwe. Bull. Inf. Coresta *68*.

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.

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- 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.

11- Giczey,G., Kerenyi,Z., Dallmann,G. and Hornok,L. 1998. Homologous transformation of Trichoderma hamatum with an endochitinase encoding gene, resulting in increased levels of chitinase activity. FEMS Microbiol. Lett. 165 (2): 247-252

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

13- Harighi M.J., Motallebi M., and Zamani M.R. 2006_a. Purification of chitinase 42 from *Trichoderma atroviride* PTCC5220. Iranian Journal of Biology. 19(2): 203- 214.

14- Harighi M.J., Motallebi M. , and Zamani M.R. 2006_b. Antifungal activity of heterologous expressed chitinase 42 (Chit42) from *Trichoderma atroviride* PTCC5220. Iranian Journal of Biotechnology. 4(2): 95-103.

15- Harman G.E., T. A. G., Stasz T.E. 1989. Combining effective strains of *Trichoderma harzianum* and solid matrix priming to improve biological seed treatments. Plant Disease *73:* 631-637.

16- Harman, G. E., Hayes, C. K., Lorito, M., Broadway, R. M., Di Pietro, A., Peterbauer, C., and Tronsmo, A. 1993. Chitinolytic Enzymes of *Trichoderma harzianum*: Purification of Chitobiosidase and Endochitinase. Phytopathology *83:* 313-318.

17- Howell, C. R. 2003. Mechanisms Employed by Trichoderma Species in the Biological Control of Plant Diseases: The history and Evolution of Current Concepts. Plant Disease *87(1):* 4-10.

18- 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.

19- Lindsey D. L., Baker R. 1967. Effect of certain fungi on dwarf tomatoes grown under gnotobiotic conditions. Phytopathology *57:* 1262.

20- 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.

21- Lorito M., Woo S.L., fernandez I.G., Colacci C., Harman G.E., Pintor Toro J.A., Filippone E., Muccifora S., Lawrence C.B., Zoina A., Tuzun S., and Scala F. 1998. Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. Proceeding of the National Academy of Sciences, USA. 95: 7860-7865.

22- Lorito, M., Harman, G. E., Hayes, C. H., Broadway, R. M., Tronsmo, A., Woo, S. L., Di Pietro, A. 1993. Chitinolytic Enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: Antifungal Activity of Purified Endochitinase and Chitobiosidase. Phytopathplogy *83:* 302-307.

23- Nakahara,K., Yoshida,K., Ito,T., Suzaki,K. and Kudo,A. 2000. Cloning and sequencing of endochitinase genes from Gliocladium

24- Sambrook J., Russell D.W., 2001 *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor: New York.

25- Song, J., Yang, Q., Liu, B. and Chen, D. 2005. Expression of the chitinase gene from Trichoderma aureoviride in *Saccharomyces cerevisiae.* Appl. Microbiol. Biotechnol. 69 (1): 39-43.

26- Zhang,H.Y., Ouyang,F. and Chen,Z.H. 1999. Direct Submission. Submitted (28-NOV-1999) Group 305, Institute of Genetics, Academy of Sciences, Datun Road, Beijing 100101, P.R. China

Cloning of *chit*42 gene from *Trichoderma atroviride* PTCC5220 and its structure analysis

Rezanezhad H.[1,2], Zamani M.R. [1]., Motallebi M [1], and Harighi M.J[3]

[1]National Institute for Genetic Engineering & Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran

[2] Biology Dept, Faculty of Science, Azarbaiejan Teacher Training Univ., Tabriz, Iran

[3] Biology Dept., Faculty of Science, Razi Univ., Kermanshah, Iran.

Abstract

Filamentous fungi such as *Trichoderma spp.* Produce a variety of chitinase enzymes that degrade chitin and play an important role in biological control of fungal diseases. Chitinases are hydrolysis enzymes which degrade chitin, a linear biopolymer of N-acetylglucosamine, into its component residues by breaking the β-1,4 glycosidic bonds. In this research *Trichoderma atroviride* PTCC5220 an over producer of chitinase enzyme among 30 *Trichoderma* sp. isolates used for study of *chit*42 gene. Two specific primers (CUM1/CDM2) and genomic DNA from *T. atroviride* were used for *chit*42 amplification. The amplified DNA fragment (about 1.6 kb) was analyzed and confirmed by restriction pattern using *Xho*I enzyme.The *chit*42 DNA fragment was cloned into pUC19 and designated as pMJH1. Comparison of the cloned fragment with the cDNA sequence indicated that this gene contains three short introns (58bp, 62bp and 70 bp long) and also an open reading frame coding for a protein of 421 amino acids. Alignment of the amino acid sequence with other reported Chit42 sequence from *Trichoderma* sp. (*T. aureoviride, T. viride, T. harzianum, T. longibrachiatum* and *T. koningii*) showed 100%, 98%, 98%, 97% and 96% identity, respectively.

Keywords: *Trichoderma atroviride*, Chitinase enzyme, *chit*42 gene