فنآوری زیستی در کشاورزی/ جلد هفدهم/ شمارهٔ اول/ بهار و تابستان ۹۷
DOI: 10.22084/ab.2018.12901.1336
Archive of SID

ارزیابی توان بیوکنترل و کلنیزاسیون جدایه‌های تریکودرما بهینه‌سازی مولکولی شده در برابر بیماری رایزوکتونیایی لوبیا

Evaluation of Bio-control and Colonization Potential of Molecular Improved *Trichoderma harzianum* Strains gainst *Rhizoctonia solani* Diseases of Bean

سحر محمودیان[۱]، محمدرضا زمانی[۲]، مژگان کوثری[۳*]، مصطفی مطلبی[۴] و عصمت جورابچی[۵]

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۱/۱۳ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۶/۱۷

چکیده

کنترل بیولوژیک یکی از راهکارهای مؤثر کنترل بیماری‌های گیاهی و عاملی برای کاهش مصرف سموم شیمیایی است. قارچ تریکودرما با داشتن خاصیت ضدیتی علیه بسیاری از قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی از موفق‌ترین عوامل کنترل بیولوژیکی محسوب می‌شود. توان بیوکنترلی این قارچ، با میزان تجزیه آنزیمی دیواره سلولی پاتوژن، ارتباط مستقیم دارد. در پروژه قبلی نویسندگان به کمک مهندسی پروتئین، کیتیناز کایمر ۴۲ ساخته شد و پروتئین نوترکیب حاصل به قارچ *T. harzianum* انتقال یافت. در تحقیق حاضر توان بیوکنترلی و کلنیزاسیون جدایه‌های مهندسی شده در برابر پاتوژن *R. solani* در شرایط آزمایشگاه و گلخانه بر روی گیاه لوبیا ارزیابی شدند. پس از تأیید مولکولی، حضور و ثبات قطعات مهندسی شده در ریسه قارچ‌های مهندسی شده بعد از گذشت دو سال، بررسی توان بیوکنترلی در کشت متقابل تریکودرما و پاتوژن انجام شد. یافته‌ها نشان داد که جدایه Chit42- ChBD3 با ۵۳/۸۲ درصد بازدارندگی بیش‌تر نسبت به کنترل، بهترین بیوکنترل در شرایط *In vitro* بوده است. طبق نتایج به‌دست آمده از آزمایش گلخانه‌ای گیاهان تیمار شده با پاتوژن، جدایه‌های مهندسی شده Chit42- ChBD3، Chit42- ChBD7 و Chit42- ChBD15 در تمامی مراحل مختلف اندازه‌گیری (دو برگی، اواسط دوره رویشی، اوایل مرحله زایشی و در مرحله برداشت) علایم بیماری کم‌تراز ۴۰ درصد را نشان دادند. کلنیزاسیون سطحی ریشه و هم‌چنین نفوذ ریسه قارچ به فضای بین سلولی اپیدرم ریشه لوبیا به‌وسیله مطالعات مولکولی با استفاده از آغازگرهای PF1/R3*xba*1 مورد تائید قرار گرفت.

واژه‌های کلیدی: تریکودرما، کیتیناز کایمر، آنتاگونیسم، مهندسی پروتئین، پاتوژن

۱، ۲، ۴ و ۵. به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی‌ارشد، استادان و کارشناس ارشد بخش بیوتکنولوژی گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران
۳. استادیار بخش بیوتکنولوژی میکروبی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، کرج
*: نویسنده مسوول Email: kowsari@abrii.ac.ir
www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

افزایش نیاز جامعه کنونی به تولیدات کشاورزی و کیفیت محصولات، باعث افزایش میزان مصرف کودها و سموم شیمیایی شده است که نتیجه‌ی این رویکرد، آلودگی‌های جدی زیست‌محیطی است. استفاده از عوامل بیوکنترل در برابر پاتوژن‌های گیاهی یکی از راهکارهای کاهش این اثرات مخرب است *ژانگ* و همکاران (Zhang *et al.*, 2016). توانایی گونه‌های مختلف جنس تریکودرما در کنترل رشد بسیاری از قارچ‌های خاکزی، این قارچ را به‌عنوان یکی از عوامل مؤثر و قدرتمند کنترل زیستی بیماری‌های گیاهی مطرح کرده است. *بندهمن* و همکاران (Bendahmane *et al.*, 2012). مطالعات بر روی مکانیسم ضدیتی تریکودرما بر ترشح بسیاری از آنزیم‌های هیدرولیتیکی، به همراه اثر تشدیدکنندگی آنتی‌بیوتیک‌های ضدقارچی و یک سیستم پیچیده برای به دام انداختن قارچ بیمارگر تاکید دارد *برانر* (Brunner, 2005).

ترشح آنزیم‌های هیدرولیتیکی نقش اساسی در کنترل عوامل بیماری‌زا دارد که در بین آنزیم‌ها، کیتینازها جزء اصلی‌ترین گروه آنزیمی دخیل در فعالیت بیوکنترلی قارچ تریکودرما می‌باشند سیدل (Seidl, 2008). آنزیم کیتیناز ۴۲ مهم‌ترین نقش را در فعالیت کیتینازی ایفا می‌کند. کیتیناز ۴۲ قارچ *T. harzianum* فاقد دومین اتصال به کیتین (ChBD) است. این دومین باعث افزایش اتصال آنزیم به سوبسترا می‌شود و امکان اتصال به سوبستراهای نامحلول را بیش‌تر می‌کند *ایجسینک* و همکاران (Eijsink *et al.*, 2008). در تحقیقات اخیر از بهینه‌سازی مولکولی و مهندسی پروتئین برای دستیابی به جدایه‌هایی از تریکودرما که قابلیت و توان بیش‌تری برای اتصال به کیتین دیواره قارچ‌های پاتوژن باشد، استفاده شده است. در تحقیق انجام شده توسط کوثری و همکاران در راستای افزایش فعالیت کیتینازی آنزیم کیتیناز ۴۲ بر روی ساختارهای کیتین تشکیل‌دهنده دیواره سلولی قارچ‌ها سه راه کار اصلی به‌کار گرفته شد *کوثری* و همکاران (Kowsari *et al.*, 2013; Kowsari *et al.*, 2014). روش اول افزایش تعداد ژن کیتیناز ۴۲ در قارچ *T. harzianum* بود. در روش دوم ChBD آنزیم کیتیناز 10-18 از قارچ *T. atroviride* جداسازی شد و توسط لینکر به انتهای آمینی کیتیناز ۴۲ بعد از ناحیه سیگنال پپتید اضافه شد و کیتیناز کایمر حاصل به قارچ *T. harzianum* انتقال یافت. در روش سوم ChBD آنزیم کیتیناز chi1 از قارچ *R. oligosporus* گرفته شد و با اتصال‌دهنده به انتهای کربوکسیلی کیتیناز ۴۲ افزوده شد و سپس به قارچ *T. harzianum* انتقال یافت. یافته‌های آن تحقیق نشان داد که بیان ژن‌های کیتیناز کایمر در قارچ *T. harzianum* سبب افزایش توان بیوکنترلی آن شده و جدایه‌های تریکودرما حاصل می‌توانند به‌عنوان بیوکنترل در برابر بیمارگرهای مهم کشاورزی مورداستفاده قرار گیرند. جهت بررسی توان بیوکنترلی و کلنیزاسیون جدایه‌های بهینه‌سازی در شرایط گلخانه، تحقیق اخیر طراحی شد. گیاه لوبیا به‌عنوان گیاه میزبان انتخاب شد. در بین حبوبات، لوبیا یکی از منابع مهم پروتئین و تولید انرژی برای انسان می‌باشد. لوبیا حاوی ۲۰ تا ۲۵ درصد پروتئین است که می‌تواند جایگزین مناسبی برای پروتئین حیوانی در زنجیره غذایی باشد *بیتوچی* و همکاران (Bitocchi *et al.*, 2012).

بیماری پوسیدگی رایزوکتونیایی ریشه و هیپوکوتیل لوبیا از شایع‌ترین بیماری‌های خاکزی شناخته شده در سراسر جهان می‌باشد. میزان خسارت این بیماری بیش از ۱۵ درصد گزارش شده است *ناوارت مایا* و همکاران (Navarrete-Maya *et al.*, 2006). کنترل این بیماری به‌دلیل خاکزی بودن بسیار دشوار می‌باشد. محققین دریافتند که کنترل زیستی با استفاده از قارچ‌ها به‌دلیل سازگاری با طبیعت و هم‌چنین تقویت خود گیاه به خاطر افزایش میزان جذب مواد غذایی و کنترل عوامل بیماری‌زا بسیار مؤثر می‌باشند *هارمن* و همکاران؛ *مایو* و همکاران (Harman *et al.*, 2008; Mayo *et al.*, 2015).

در کنترل بیولوژیک کلنیزاسیون از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. عامل بیوکنترل با کلنیزاسیون سریع جایگاه اکولوژیکی در محل آغاز آلودگی به‌وسیله عوامل بیماری‌زا، با آن‌ها رقابت کرده، جمعیت آن‌ها را حذف کرده یا کاهش می‌دهد *سالاس* و همکاران (Salas *et al.*, 2011). عوامل بیوکنترل برای عملکرد بهینه نیاز به استقرار اولیه خود در سطح گیاه دارد. با توجه به کاربرد عوامل بیوکنترل بر روی بذر یا درون خاک، کلنیزاسیون از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. عوامل بیوکنترل به‌منظور محافظت مناسب از ریشه در مقابل حمله پاتوژن‌ها، باید بتوانند خود را در ریزوسفر مستقر کنند *کای* و همکاران (Cai *et al.*, 2015).

در این تحقیق تعداد ۶ جدایه تریکودرمای بهینه‌سازی شده که در آن ChBD آنزیم کیتیناز E18-10 از قارچ *T. atroviride* جداسازی شد و توسط لینکر به انتهای آمینی کیتیناز ۴۲ *T. harzianum* متصل شده بود و جدایه وحشی در شرایط آزمایشگاه و گلخانه بر روی گیاه لوبیا و علیه پاتوژن قارچی *R. solani* موردبررسی قرار گرفت. هم‌چنین توان کلنیزاسیون جدایه‌های تریکودرما بر سطح و درون ریشه با مطالعات میکروسکوپی و مولکولی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که جدایه‌های مهندسی شده از سرعت رشدی و توان بیوکنترلی بالاتری نسبت به جدایه وحشی برخوردار بودند و توان کلنیزاسیون آن‌ها در هر دو سطح مورد تأیید قرار گرفت.

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش

تهیه جدایه‌های قارچ

جدایه‌های قارچ *T. harzianum* مورد استفاده در این تحقیق از کلکسیون میکروبی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج (ABRII) تهیه شدند و سویه بیماری‌زای قارچ *R. solani* (AG-4) از مرکز تحقیقات کشاورزی اصفهان تهیه شد. این جدایه‌ها برروی محیط‌کشت PDA (Potato Dextrose Agar) کشت شده و در انکوباتور در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

اثبات حضور و پایداری ژن کیتیناز کایمر

ژن کیتیناز ۴۲ از دو قسمت سیگنال پپتید (SP=105bp) و دمین اصلی کیتیناز (Chit42=1170bp) تشکیل شده است که در قارچ‌های مهندسی شده طبق شکل (۱) بخش ChBD (237bp) ژن کیتیناز E18.10 قارچ *T. atroviride* با اتصال دهنده به انتهای آمینی کیتیناز ۴۲ افزوده شده است *کوثری* و همکاران (2014). در این آزمایش برای اثبات حضور و پایداری ژن کیتیناز کایمر، در جدایه‌های مهندسی شده بعد از گذشت دو سال، استخراج DNA از ریسه‌های قارچ با استفاده از روش *کالینگ* و همکاران (Kullnig *et al.*, 2000) همراه با تغییراتی انجام شد. برای تأیید حضور و پایداری قطعه ChBD (237bp) مهندسی شده توسط کوثری و همکاران (2014) از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده شد*که* با استفاده از دو جفت آغازگر (PF1 *Xba*1- R_3*xba*1) و (PF1 *Xba*1-R_3chit42) حضور و پایداری ژن حاوی ChBD در طی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با شرایط زیر موردبررسی قرار گرفت:

جدول ۱: شرایط انجام PCR

Table1: PCR Condition

تعداد چرخه Cycle number	مراحل Steps	زمان (دقیقه) Time (min)	دما (درجه سانتی‌گراد) Temperature (°C)
1	واسرشت اولیه Initial denaturation	10	94
40	واسرشت Denaturation	1	94
	اتصال Annealing	1	62
	گسترش Extention	1	72
1	گسترش نهایی Final extention	10	72

ارزیابی توان بیوکنترلی جدایه‌های تریکودرما در کشت متقابل

برای مقایسه توانایی جدایه‌های تریکودرمای مهندسی شده و جدایه وحشی در بازدارندگی از رشد قارچ بیمارگر *R. solani* آزمایشی به روش کشت متقابل در قالب بلوک کاملاً تصادفی در سه تکرار در آزمایشگاه انجام شد بدین صورت که در یک طرف پلیت به فاصله یک سانتی‌متر از لبه پلیت یک دیسک پنج میلی‌متری از کشت ۳ روزه قارچ رایزوکتونیا گذاشته شد و در طرف مقابل یک دیسک پنج میلی‌متری از حاشیه کشت ۳ روزه از هرکدام از جدایه‌های تریکودرما، کشت داده شد. اندازه‌گیری رشد شعاعی قارچ رایزوکتونیا پس از گذشت ۴ روز پس از کشت انجام شد. در این آزمایش میزان بازدارندگی رشد میسیلومی قارچ بیمارگر با استفاده از فرمول زیر در مقابل جدایه‌های مختلف تریکودرما و پیشروی این جدایه‌ها روی میسیلیوم این قارچ بررسی شد *ساندر* و همکاران (Sunder *et al.*, 1995).

$X - Y/X \times 100$ = درصد بازدارندگی, X = رشد پاتوژن در غیاب تریکودرما (کنترل) ,Y = رشد پاتوژن در حضور تریکودرما

بررسی توان بیوکنترلی تریکودرماهای مهندسی شده در گلخانه

این آزمایش درطرح آزمایشی فاکتوریل در قالب بلوک کاملاً تصادفی برای دو فاکتور پاتوژن رایزوکتونیا (حضور و عدم حضور) و ۷ جدایه تریکودرما (حضور و عدم حضور) در ۵ تکرار انجام شد. بعد از آماده‌سازی مایه اینوکولوم قارچی به روش *پاگلیز* و همکاران (Pugliese *et al.*, 2008)، خاک اتوکلاو شده با نسبت وزنی یک درصد (1% W/W) با مایه اینوکولوم جدایه‌های تریکودرما یک هفته قبل از کاشت بذور و ۱۴ روز قبل از آلودگی خاک با پاتوژن، تلقیح شد و زمان کافی برای رشد و تکثیر جدایه‌های بیوکنترل داده شد. بذور ضدعفونی شده با هیپوکلریت سدیم یک درصد به‌مدت یک ساعت در سوسپانسیون اسپورهای

www.SID.ir

Archive of SID

جدایه‌های قارچ تریکودرما با غلظت ۱×۱۰^{۶} (اسپور در میلی‌لیتر) غوطه‌ور شدند بلافاصله بذور در گلدان‌ها کاشته شدند با گذشت یک هفته از کاشت بذور لوبیا، خاک با مایه اینوکولوم پاتوژن آلوده شد. در بررسی تأثیر قارچ تریکودرماهای مهندسی شده و جدایه وحشی روی میزان کنترل بیماری رایزوکتونیا، شدت بیماری ریشه و هیپوکوتیل در زمان‌های مختلف رشدی گیاه لوبیا (مرحله ۲ برگی، اواسط دوره رویشی (شش برگی)، اواخر دوره رویشی و شروع مرحله زایشی پس از میوه‌دهی و هنگام برداشت) براساس مقیاس یک تا پنج روش کیم و همکاران با تغییراتی ارزیابی شد (Kim *et al.*, 1997).

تأیید میکروسکوپی کلنیزاسیون تریکودرما

به‌منظور انجام این آزمایش، استریل سطحی ریشه‌ها انجام شد سپس ریشه‌ها به‌مدت نیم ساعت در KOH، ۱۰ درصدی در حمام آب گرم در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. ریشه‌ها چند بار با آب مقطر شست و شو شده و ۲ الی ۳ دقیقه در اسیدکلریک یک درصد قرارگرفتند، سپس در محلول ۰/۵ درصد تریپان بلو یا متیلن بلو به‌مدت چند ساعت قرار داده شدند بعد از شست و شو زیر میکروسکوپ نوری موردبررسی قرار گرفتند.

بررسی مولکولی کلنیزاسیون سطحی ریسه‌های تریکودرما

برای اثبات کلنیزاسیون سطحی ریسه‌های تریکودرما، ریشه‌های گیاهانی که فقط با جدایه‌های تریکودرما تلقیح شده بودند و ریشه گیاهان شاهد (بدون تلقیح) برای تأیید مولکولی کلنیزاسیون سطحی، به‌صورت سطحی شست و شو داده شدند و ریشه‌ها در هاون سترون با ازت مایع پودر شده و استخراج DNA از ریشه‌ها انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با آغازگر (PF1/R3*xba*1) برای اثبات حضور ژن کیتیناز کایمر انجام شد.

بررسی مولکولی نفوذ ریسه تریکودرما به درون ریشه

باتوجه به اینکه برخی از جدایه‌های قارچ تریکودرما توانایی نفوذ ریسه به داخل ریشه را دارند، جهت تأیید نفوذ ریسه، ریشه‌های گیاهان تلقیح شده با تریکودرما و هم‌چنین ریشه گیاهان شاهد (بدون تلقیح) مورد آزمایش قرار گرفتند. ابتدا ریشه‌ها با آب و هیپوکلریک سدیم ۵ درصد استریل شدند. برای اطمینان از این‌که روی ریشه هیچ ریسه‌ای وجود نداشته باشد زیر لوپ قسمت‌هایی از ریشه‌های مویین بررسی شد. استخراج DNA از ریشه‌های مویین گیاه انجام شد. در نهایت برای تأیید حضور و نفوذ قارچ تریکودرما در ریشه گیاه لوبیا، وجود ژن کیتیناز کایمر با استفاده آغازگرهای PF1/R3*xba*1 مورد بررسی قرار گرفت.

آنالیزهای آماری

تجزیه واریانس داده‌های به‌دست آمده از مرحله آزمایشگاهی و گلخانه‌ای با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ انجام شد. جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد استفاده شد. نتایج حاصل با نرم‌افزار Excel 2007 به‌صورت نمودار گزارش شد.

نتایج

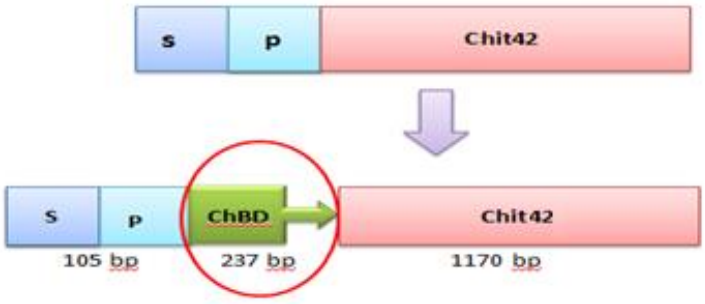
تأیید حضور ژن کیتیناز کایمر

برای تأیید پایداری ژن کیتیناز کایمر، با آغازگرهای (PF1 *Xba*1- R3*xba*1) که به ناحیه ابتدای سیگنال پپتید و انتهای chit42 متصل می‌شوند واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز انجام گرفت (شکل ۲a). طبق آنچه مورد انتظار بود دو باند با طول‌های متفاوت مشاهده گردید که در جدایه‌های مهندسی شده باند بزرگ‌تر با اندازه ۱۵۱۲ جفت باز نشان‌دهنده ژن کیتیناز همراه با ChBD و باند کوچک‌تر نشان‌دهنده ژن کیتیناز بدون ChBD که قطعه‌ای حدود ۱۲۷۵ جفت باز است. در جدایه وحشی (قارچ غیرتراریخت) تنها یک قطعه به طول ۱۲۷۵ جفت باز مشاهده شد (شکل ۲b).

برای تأیید مجدد با استفاده آغازگرهای (PF1 *Xba*1-R3chit42) قسمتی از ژن *Chit42* و *ChBD* به همراه سیگنال پپتید تکثیر شد (شکل ۳a). قطعه تکثیر شده با اندازه ۱۰۸۱ جفت باز در جدایه‌های مهندسی شده، ژن کیتیناز کایمر ۴۲ (ژن کیتیناز همراه با ChBD) را نشان داد و قطعه کوچک‌تر بیانگر ژن کیتیناز (بدون ChBD) با اندازه ۸۴۴ جفت باز بود. در جدایه وحشی (قارچ غیرتراریخت) تنها یک باند با اندازه ۸۴۴ جفت باز مشاهده شد (شکل ۳b).

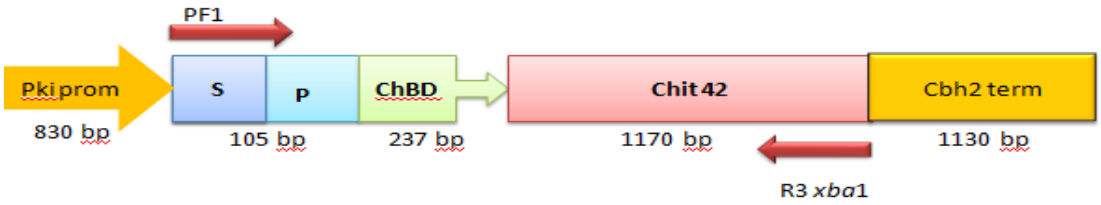
www.SID.ir

Archive of SID



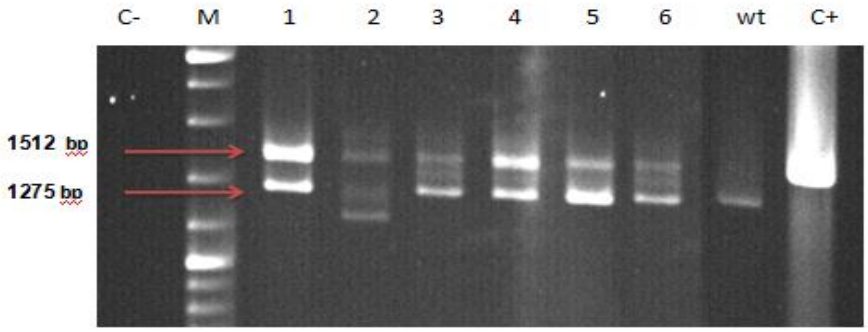
شکل ۱: ChBD آنزیم کیتیناز E18-10 از قارچ *T. atroviride* و اتصال به انتهای آمینی کیتیناز ۴۲ بعد از ناحیه سیگنال پپتید

Fig. 1: ChBD Chitinase Enzyme E18-10 from the *T. atroviride* fungus and binding to the amino end of chitinase 42 after the peptide signal region



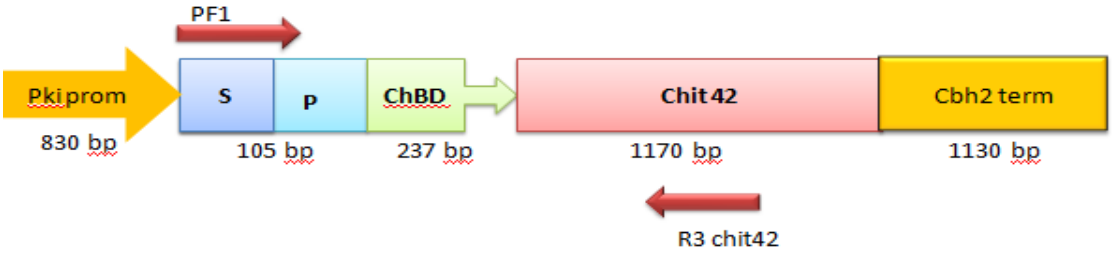
شکل ۲a: شکل شماتیک ژن کیتیناز کایمر ۴۲ با آغازگر (PF1/R3*xba*1)

Fig. 2a: Schematic diagram of the chitinase gene of Cimmer 42 with primer (PF1/R3xba1)



شکل ۲b: تأیید ژن کیتیناز کایمر ۴۲ با آغازگرهای (PF1/R3*xba*1).C^-: نمونه بدون DNA، M: ladder mix 100bp، 1: Chit42- ChBD 3، 2: Chit42- ChBD6، 3: Chit42- ChBD7، 4: Chit42- ChBD11، 5: Chit42- ChBD13، 6: Chit42- ChBD15، wt: *T. harzianum* (T8-7)، C^+: پلاسمید PEJT

Fig. 2b: Confirmation of the chitinase chimer42 with primers (PF1/R3xba1) .C^-: Sample without DNA M, ladder mix 100bp, 1: Chit42-ChBD 3, 2: Chit42-ChBD6, 3: Chit42-ChBD7, 4: Chit42-ChBD11, 5: Chit42-ChBD13, 6: Chit42-ChBD15, wt: *T. harzianum* (T8-7), C^+: PEJT plasmid

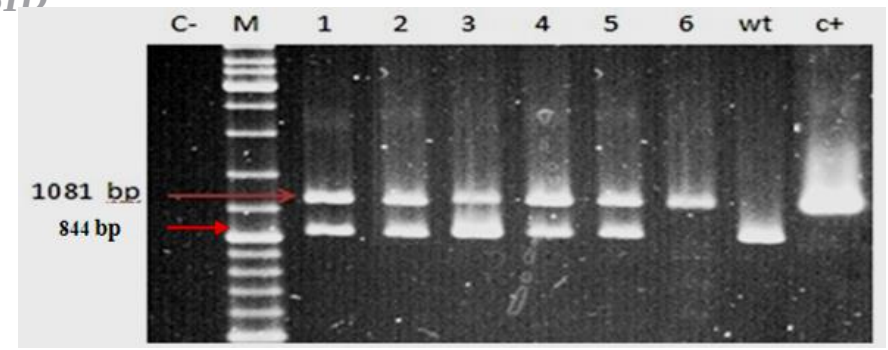


شکل ۳a: شماتیک ژن کیتیناز کایمر ۴۲ با آغازگر (PF1/R3Chit42)

Fig. 3a: Schematic of Chitinase Chimer 42 with Primer (PF1/R3chit42)

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳b: تأیید ژن کیتیناز کایمر ۴۲ با آغازگرهای قطعه (PF1/R3Chit42). C^-: نمونه بدون DNA، M: ladder mix 100bp، 1: Chit42- ChBD3، 2: Chit42- ChBD6، 3: Chit42- ChBD7، 4: Chit42- ChBD11، 5: Chit42- ChBD13، 6: Chit42- ChBD15، wt: *T. harzianum* (T8-7)، C^+: پلاسمید PEJT

Fig. 3b: Confirmation of Chimeric 42 gene with primers (PF1/R3Chit42).) .C^-: Sample without DNA, M: ladder mix 100bp, 1: Chit42-ChBD3, 2: Chit42-ChBD6, 3: Chit42-ChBD7, 4: Chit42-ChBD11, 5: Chit42-ChBD13, 6: Chit42-ChBD15, Wt: *T. harzianum* (T8-7), C^+: plasmid PEJT

بررسی توان بیوکنترلی در کشت متقابل

کاهش میزان رشد شعاعی قارچ پاتوژن *R. solani* در کشت متقابل با تریکودرما به‌عنوان توان بیوکنترلی جدایه‌های مهندسی شده در ۴ روز بعد از کشت در نظر گرفته شد. جدایه مهندسی شده Chit42- ChBD 3 با ۸۰ درصد بازدارندگی کلی و افزایش ۵۳/۸۲ درصدی، بیش‌ترین میزان توان بیوکنترلی را در بین جدایه‌های مهندسی شده به خود اختصاص داده است (شکل ۴). جدایه‌های Chit42- ChBD 6، wild type، Chit42- ChBD 11 در رتبه بعدی بیوکنترلی قرار گرفتند (شکل ۵).

بررسی توان بیوکنترلی تریکودرماهای مهندسی شده در گلخانه

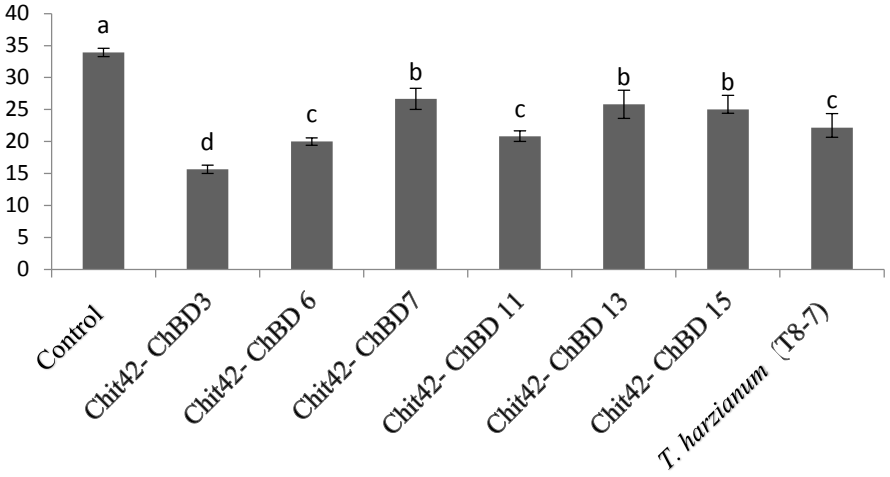
برای ارزیابی بهترین بیوکنترل در برابر بیماری پوسیدگی ریشه رایزوکتونیایی لوبیا، علایم بیماری در مراحل مختلف رشدی (دو برگی، اواسط دوره رویشی، اوایل مرحله زایشی و در مرحله برداشت) در گلخانه بررسی شدند. آنالیز یافته‌ها نشان داد در مرحله دو برگی جدایه‌های Chit42- ChBD15، Chit42- ChBD3،Chit42- ChBD13 و Chit42- ChBD7 حدود ۶۰ درصد و جدایه‌های Chit42- ChBD6 وChit42- ChBD11 به میزان ۵۰ درصد بیماری را کاهش داده است. اواسط دوره رویشی میزان توان بیوکنترلی جدایه‌های تریکودرما در بازه ۷۰-۶۰ درصد بود. در اواخر دوره رویشی و اوایل مرحله زایشی توان بیوکنترلی ۷۵-۶۰ درصد بود و این میزان قدرت بیوکنترلی در مرحله پس از میوه‌دهی و هنگام برداشت نیز در بین جدایه‌ها مشاهده شد (جدول ۱). بررسی کلی یافته‌ها نشان داد که جدایه‌های بهینه‌سازی شده در کنترل بیماری پوسیدگی رایزوکتونیای ریشه مؤثر بوده است.

شکل ۴: کشت متقابل رایزوکتونیا و تریکودرما (بعد از چهار روز) سمت بالا از راست به چپ (wild type، Chit42- ChBD7، Chit42- ChBD6، Chit42- ChBD3 سمت پایین *R. solani* (AG-4)، ChBD15، Chit42- ChBD13، Chit42- ChBD11 قارچ تریکودرما =T، قارچ رایزوکتونیا=R

Fig. 4: Dual culture of *Rhizoctonia* and *Trichoderma* (after four days) from the upper right to left wild type, Chit42-ChBD7, Chit42-ChBD6, Chit42-ChBD3, downstream of *R. solani* (AG-4), ChBD15, Chit42- ChBD13, Chit42-ChBD11, T = *Trichoderma* R =*Rhizoctonia*

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۵: بررسی ماکروسکوپی کشت متقابل رایزوکتونیا با جدایه‌های تریکودرما. ۷۲ ساعت بعداز کشت. Control: پتری حاوی رایزوکتونیا. هر عدد میانگین ۳ تکرار می‌باشد. اختلاف معنی‌دار آماری در سطح احتمال ($P\leq0.05$) با آزمون چنددامنه‌ای دانکن)

Fig. 5: Macroscopic examination of dual culture of *Trichoderma* and *Rhizoctonia*. 72 hours after planting. Control: Petri contain *Rhizoctonia*. Each number has an average of 3 replays. Significant statistical difference at probability level ($P\leq0.05$) with Duncan multiple test

جدول ۲: بررسی شدت بیماری پوسیدگی ریشه گیاه لوبیا در شرایط گلخانه (مراحل مختلف رشدی)

Table 2: Root disease in greenhouse conditions (different growth stages)

برداشت Harvesting	شروع زایشی Beginning of the reproductive stage	اواسط رویشی Mid-vegetative	دو برگی Double leaf	گلدان‌های تیمار شده با Pots treated with…
40-35^{c}	25^{cd}	35^{bcd}	40^{bc}	Chit42- ChBD 3
42^{c}	30^{bc}	≤30^{d}	45-50^{b}	Chit42- ChBD 6
40-35^{c}	20^{d}	≤30^{ed}	40^{bc}	Chit42- ChBD 7
70-60^{b}	30^{bc}	38^{bc}	45-50^{b}	Chit42- ChBD 11
40-35^{c}	40^{b}	40^{b}	40^{bc}	Chit42- ChBD 13
40-35^{c}	25^{cd}	30^{cd}	40^{bc}	Chit42- ChBD 15
60^{b}	40^{b}	40^{b}	50 ^{b}	*T. harzianum* (T8-7)
0^{d}	0^{e}	0^{e}	0^{c}	Control (without treatment)
100^{a}	100^{a}	100^{a}	100^{a}	Control (with pathogen)

شدت بیماری به‌صورت درصد نشان داده شده است. هر عدد میانگین پنج تکرار است. حروف غیرمشابه در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار آماری در سطح احتمال ($P\leq0.05$) با آزمون چنددامنه‌ای دانکن

The severity of the disease is shown as percentages. Each number is five repetitions. Non-similar letters in each column have a statistically significant difference at probability level ($P\leq0.05$) with Duncan's multiple test

تأیید میکروسکوپی کلونیزاسیون

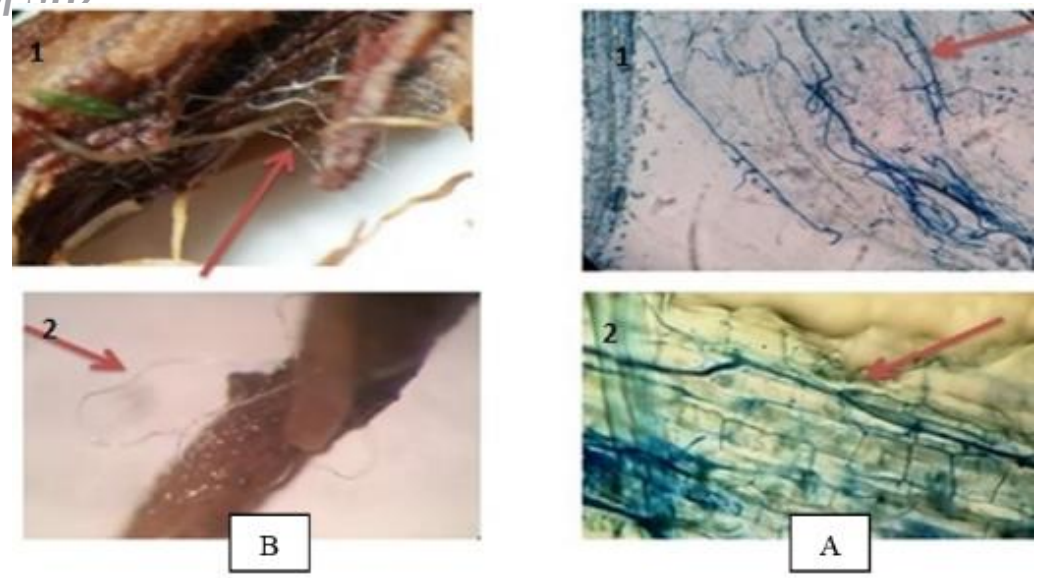
برای تأیید میکروسکوپی کلنیزاسیون تریکودرماهای مهندسی شده، ریشه‌ها بعد از رنگ‌آمیزی با تریپان بلو زیر میکروسکوپ نوری بررسی شد. نفوذ ریسه به فضای بین سلولی اپیدرم شکل ۶ (A: 1, 2) و هم‌چنین کلنیزه شدن سطحی ریشه شکل ۶ (B: 1, 2) قابل مشاهده است.

تأیید مولکولی کلنیزاسیون

برای تأیید مولکولی کلنیزاسیون سطحی و داخلی پس از شست و شوی سطحی ریشه (اثبات کلنیزاسیون سطحی ریشه) و استریل سطحی (نفوذ ریسه به ریشه) استخراج DNA از ریشه‌های مویین انجام شد. نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با آغازگرهای PF1/R3*xba*1 نشان داد که جدایه تریکودرما Chit42- ChBD3 قادر است کلنیزاسیون سطحی را انجام دهد اما نفوذ به بافت‌های داخلی ریشه اتفاق نیفتاده است شکل ۷ (3a-b). جدایه تریکودرما Chit42- ChBD6 نیز رفتار مشابهی نشان داده است و فقط کلنیزاسیون سطحی اتفاق افتاده است شکل ۷ (6a-b). در مورد جدایه‌های Chit42- ChBD7، Chit42- ChBD11، Chit42- ChBD13، Chit42- ChBD15 کلنیزاسیون هم به‌صورت سطحی و هم داخلی صورت گرفته است شکل ۷ (7a-15b). طول قطعه مورد انتظار ۱۵۱۲ جفت باز بود که در نمونه‌های مورد نظر مشاهده شد.

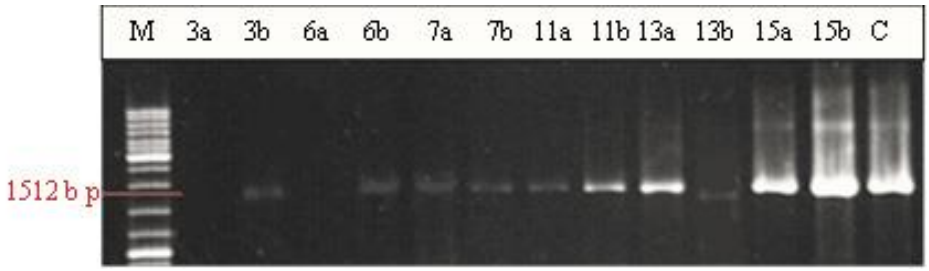
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۶: تأیید میکروسکوپی کلنیزاسیون A: تأیید نفوذ ریسه به داخل ریشه B: تأیید کلنیزاسیون سطحی

Fig. 6: Microscopic confirmation of colonization A: confirmation of the penetration of the hypha into the root B: confirmation of surface colonization



شکل ۷: بررسی مولکولی کلنیزاسیون جدایه‌های Chit42- ChBD 3، Chit42- ChBD 6، Chit42- ChBD 7، Chit42- ChBD 11، Chit42- ChBD 13، Chit42- ChBD 15 تریکودرما. a: استریل سطحی ریشه، b: شستشوی سطحی ریشه، C: کنترل مثبت، M: ladder mix

Fig. 7: Molecular analysis of colonization of *Trichoderma* isolates: Chit42-ChBD 3, Chit42-ChBD 6, Chit42-ChBD 7, Chit42-ChBD 11, Chit42-ChBD 13, Chit42-ChBD 15. a: Root surface sterilization, b: Washing the root, C: Positive control, M: Ladder mix

بحث

افزایش نیاز جامعه کنونی به تولیدات کشاورزی و کیفیت محصولات، باعث افزایش میزان مصرف کودها و سموم شیمیایی شده است که نتیجه‌ی این رویکرد، آلودگی‌های جدی زیست محیطی است. استفاده از عوامل بیوکنترل یک راهکار برای کاهش این اثرات مخرب است. ساخت کیتیناز کایمری با ویژگی اتصال قوی به کیتین برای کیتیناز ۴۲ قارچ *T. harzianum* با اتصال ChBD از منشأ گیاهی و همچنین Celloluse Binding Domain (CBD) از ژن سلوبیوهیدرولاز II، مربوط به *Trichoderma reesei*، حاصل شده است *لیمون* و همکاران (Limon *et al.*, 2001). کیتینازهای کایمری حاصل در باکتری‌های نوترکیب، روی دیواره سلولی قارچ غنی از کیتین نسبت به کیتینازهای طبیعی فعالیت هیدرولیتیکی بالاتری داشتند. تراریخت‌هایی که کیتینازهای کایمری را بیان می‌کنند نسبت به کیتینازهای طبیعی و قارچ‌های تراریخت نشده فعالیت کیتینازی ویژه و ضدقارچی بیش‌تری نشان دادند *لیمون* و همکاران (Limon *et al.*, 2004).

کوثری و همکاران به‌منظور افزایش توان آنزیم، دومین متعلق به ژن کیتیناز E18-10 قارچ *T. atroviride* را به انتهای آمینی کیتیناز ۴۲ افزوده و در میزبان قارچی بیان کردند. نتایج به‌دست آمده نشان داد که آنزیم کیتیناز کایمری ۴۲ نسبت به آنزیم فاقد این دومین دارای فعالیت بالاتری خصوصاً در حضور سوبسترای غیرکلوئیدی می‌باشد. دومین متصل به سوبسترا، به کیتیناز ویژگی اتصال بالایی به سوبستراهای کریستالی و نامحلول می‌دهد و در نتیجه فعالیت آن‌ها را افزایش می‌دهد. وجود کیتین نامحلول (یکی از عمده‌ترین ترکیبات دیواره سلولی قارچ‌ها)، دلیل اصلی این افزایش فعالیت می‌باشد (*کوثری* و همکاران، 2014). در این تحقیق حضور ژن کیتیناز کایمر ۴۲ مهندسی شده در ژنوم

www.SID.ir

Archive of SID

قارچ پس از ۲۰ بار واکشت تأیید مولکولی شد که نشان‌دهنده پایداری ژن نوترکیب در ژنوم قارچ بود. مطالعه آنزیم‌های کیتیناز در گونه *T. harzianum* نشان می‌دهد که در این قارچ انواع مختلفی از آنزیم‌های کیتینازی ازجمله Chit31, 33, 42 وجود دارند. قطعه نوترکیب ساخته شده نیز دارای Chit42 می‌باشد (شکل ۱).

حضور قطعه ۱۲۷۵ جفت بازی در همه جدایه‌ها (شکل ۲b) علاوه بر قطعه ۱۵۱۲ جفت بازی (شکل ۲b) بیانگر این موضوع است که نوترکیبی همولوگی بین قطعه منتقل شده و ژنوم قارچ به شباهت توالی منتقل شده با ژنوم قارچ اتفاق نیفتاده است. *بی و کندسن* (Bae and Knudsen, 2000). به همین دلیل جدایه‌های حاصل می‌توانند از توان هر دو آنزیم (وحشی و مهندسی شده) به‌صورت توأم استفاده کنند که این خود سبب افزایش توان بیوکنترلی جدایه‌ها خواهد شد.

مقایسه توان بیوکنترلی جدایه‌های مهندسی شده در آزمایشگاه نتایج نشان داد که جدایه‌های Chit42- ChBD3، Chit42- ChBD6 و Chit42- ChBD11 اثرات خوبی در بازدارندگی رشد پاتوژن داشته‌اند. در تحقیقی حدود ۷۸ جدایه مختلف تریکودرما علیه رایزوکتونیا در کشت متقابل بررسی شد که *T. harzianum* AD6 بیش‌ترین درصد بازدارندگی حدود ۶۵/۱۸ را در بین جدایه‌های مختلف دارا بود. ۸۳ درصد جدایه‌ها توانایی بازدارندگی از رشد پاتوژن را داشتند که در این بین ۶۲ درصد قارچ‌ها متعلق به *T. harzianum* بودند. علی‌رغم درصد بازدارندگی بالا در کشت متقابل این آزمایش هاله‌ای بین بیوکنترل و پاتوژن ایجاد نشده بود *نعیمی* و همکاران (Naeimi *et al.*, 2010). اما در تحقیق حاضر جدایه‌های مهندسی شده از پیشروی رایزوکتونیا جلوگیری کرده و هاله‌ای بین تریکودرما و رایزوکتونیا ایجاد شد و جدایه‌های مهندسی شده توانایی اسپورزایی سریع نسبت به جدایه وحشی داشتند (شکل ۴). یکی از مکانیسم‌های بیوکنترلی تریکودرما بر علیه بیمارگر رقابت برسر مواد غذایی است .طبق نتایج به‌دست آمده از گلخانه، جدایه‌های Chit42-ChBD15، Chit42- ChBD7،Chit42- ChBD3 و وحشی بیش‌ترین کاهش علایم بیماری را داشتند ولی با گذشت زمان و در مرحله برداشت جدایه وحشی توان بیوکنترلی خود را از دست داد که این می‌تواند به دلیل کاهش قدرت رقابت‌پذیری در برابر قارچ رایزوکتونیا برای کسب مواد غذایی از محیط باشد. *لو* و همکاران (Lu *et al.*, 2004) با مطالعات میکروسکوپی در کشت متقابل قارچ تریکودرما و قارچ بیمارگر نشان دادند که قارچ تریکودرما در سطح مسیلیوم قارچ بیمارگر رشد کرده و به داخل آن نفوذ می‌کند. آن‌ها نیز با استفاده از روش کشت متقابل آزمایشگاهی توان بیوکنترلی قارچ تریکودرما را پس از تراریختی گزارش کردند.

یافته‌ها نشان داد که جدایه‌های Chit42- ChBD3، Chit42- ChBD6 و Chit42- ChBD11 در سطح آزمایشگاه توان بیوکنترلی خوبی داشتند اما در شرایط گلخانه Chit42- ChBD6 و Chit42- ChBD11 جزء بیوکنترل‌های مؤثر نبودند که این مسئله با یافته‌های سایر محققین مطابقت داشت که شرایط آزمایش در محیط واقعی ممکن است با نتایج آزمایشگاهی هم‌خوانی نداشته باشد *هارمن* (Harman, 2011). در بررسی میزان بیوکنترلی قارچ تریکودرما در شرایط گلخانه‌ای جدایه‌های مهندسی شده Chit42- ChBD3، Chit42- ChBD7، Chit42- ChBD15 در تمامی مراحل مختلف اندازه‌گیری علایم بیماری کم‌تر از ۳۰٪ را نشان دادند. در گلدان‌های تلقیح شده با جدایه وحشی در مرحله برداشت حدود ۶۰ درصد علایم بیماری مشاهده شد که نشان‌دهنده‌ی کاهش توان بیوکنترلی و از دست دادن قدرت رقابت در مقایسه با جدایه‌های مهندسی شده Chit42- ChBD3، Chit42- ChBD7، Chit42- ChBD15 می‌باشد. حضور عوامل بیوکنترل در شرایط مزرعه باعث افزایش رشد گیاه می‌گردد که این می‌تواند به‌دلیل ترشح متابولیت‌های تنظیم‌کننده رشد گیاه و افزایش کارآیی جذب موادغذایی *ساهاران* و همکاران؛ *کنتراس* و همکاران (Saharan *et al.*, 2011; Contreras *et al.*, 2009) و محدود کردن رشد پاتوژن و کاهش علایم بیماری باشد *اردوخانی* و همکاران (Ordookhani *et al.*, 2011). موفقیت سویه‌های تریکودرما به‌عنوان عامل کنترل بیولوژیکی به علت توانایی تکثیر و اسپورزایی بالا، بقا تحت شرایط نامساعد، تحمل شوری و عناصر سنگین، تغییر محیط ریزوسفر، رقابت تغذیه‌ای قوی و قدرت تهاجمی بالا در تقابل با بیمارگرهای رایزوسفر و توان بالای کلنیزاسیون ریزوسفر ریشه و همزیستی با آن است *چیرینووال* و همکاران (Chirino-Valle *et al.*, 2016). در این تحقیق توان کلنیزاسیون جدایه‌ها نیز موردبررسی قرار گرفت دو جدایه Chit42- ChBD6 و Chit42- ChBD3 تنها به‌صورت سطحی بر روی ریشه‌های گیاه ارتباط برقرار کردند.

با توجه به کاربرد عوامل بیوکنترل بر روی بذر یا درون خاک، کلنیزاسیون از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. عوامل بیوکنترل به‌منظور محافظت مناسب از ریشه در مقابل حمله پاتوژن‌ها، باید بتوانند خود را در ریزوسفر مستقر کنند *بروتمن* و همکاران؛ *کای* و همکاران (Cai *et al.*, 2015; Brotman *et al.*, 2013). تاییدات مولکولی نشان داد که از سه جدایه با فعالیت بیوکنترلی برتر Chit42- ChBD3، Chit42- ChBD7، Chit42- ChBD15 دوجدایه Chit42- ChBD7، Chit42- ChBD15 هم به‌صورت

www.SID.ir

Archive of SID

سطحی و هم به شکل اندوفایت با ریشه گیاه ارتباط برقرار می‌کنند. برای انتخاب بهترین جدایه تحقیقات تکمیلی بر روی ویژگی‌های رشدی و هورمونی اندام‌های هوایی و زمینی گیاه و هم‌چنین میزان محصول گیاه صورت گرفت (نتایج نشان داده نشده). یافته‌ها نشان داد جدایه‌ها با توان برقراری دو سطح از کلنیزاسیون، جدایه‌های کارآمدتری هستند.

نتایج کلی نشان داد توان برقرای رابطه و کلنیزه کردن گیاه، ترشح ترکیبات شیمیایی مختلف، قدرت تحمل یا خنثی‌سازی ترکیبات تولید شده توسط گیاهان یا دیگر میکروارگانیسم‌ها، ایجاد و القاء مقاومت با تحریک گیاه و هم‌چنین فعال کردن مکانیسم‌های رشدی از عوامل مؤثر در موفقیت و انتخاب جدایه‌های تریکودرما است.

منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۱-۲ متن انگلیسی مراجعه شود.

www.SID.ir