



## مجموعه مقالات

چهارمین همایش ملی کاربرد فناوری هسته‌ای در علوم کشاورزی و منابع طبیعی  
(۲۹-۳۰ اردیبهشت، ۱۳۹۴، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای)

The 4<sup>th</sup> National Congress on Nuclear Technology Application in Agricultural & Natural Resource Sciences (19-20 May, 2015, Nuclear Agriculture Research School)

### افزایش فعالیت آنزیم های کیتیناز در جدایه های موتانت قارچ *Trichoderma harzianum* با استفاده از القای موتاسیون با پرتو گاما

عبداله بهاروند<sup>۱</sup>، سمیرا شهبازی<sup>۲\*</sup>، حمیده افشارمنش<sup>۲</sup>، محمد علی ابراهیمی<sup>۱</sup>، حامد عسکری<sup>۲</sup>

۱. گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه پیام نور کرج، البرز

۲. گروه گیاهپزشکی و نگهداری مواد غذایی، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی.

نویسنده مسوول: sshahbazi@nrcam.org

**چکیده:** جدایه قارچ *T. harzianum* از خاک ایزوله گردید و سوسپانسیون اسپور آن در دز ۲۵۰ گری پرتو گاما برای القای موتاسیون پرتوتابی شد. موتانت های قارچ *T. harzianum* و جداسازی جدایه های موتانت آن، برای تولید آنزیم های کیتینولیتیک خارج سلولی با استفاده از روش تخمیر غوطه وری مورد استفاده قرار گرفت. کیتین کلوتیدی به عنوان سوسترای تولید آنزیم و سنجش فعالیت آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت. جهت سنجش پروتئین خارج سلولی از روش بردفورد استفاده گردید. همچنین خلوص و ترکیب نمونه های پروتئینی غنی از آنزیم کیتیناز با استفاده از آزمون SDS-PAGE مورد مطالعه قرار گرفت. بالاترین میزان غلظت پروتئین خارج سلولی به ترتیب در نمونه های موتانت T. h M15 و T. h M11 مشاهده شد. جدایه های موتانت T. h M15، T. h M11، T. h M8 و T. h M6 بالاترین میزان فعالیت آنزیم کیتیناز را به خود اختصاص دادند. نتایج آزمون SDS-PAGE دلالت بر حضور آنزیم های  $\beta$ -1,4-N acethyl glucoseaminidase و acetyl glucosaminase در جدایه های مختلف داشت. بالاترین فعالیت آنزیمی در جدایه *T. h M15* مشاهده شد که دارای بالاترین مقادیر آنزیم های اندوکیتینازی (۲۴/۵، ۲۶ و ۴۲ KDa) و آنزیم  $\beta$ -(1,4)-N-acetyl glucoaminidase (۶۸ KDa) بود. نتایج این مطالعه به روشی نشان می دهد که القای موتاسیون با پرتو گاما در قارچ تریکودرما منجر به بهبود تولید آنزیم های کیتیناز برای کنترل بیولوژیک بیماری های گیاهی در آن می شود.

**واژگان کلیدی:** فعالیت آنزیمی، *Trichoderma harzianum*، کیتیناز، SDS-PAGE.

### The enhancement of chitinase enzyme production in *Trichoderma harzianum* by induced mutation by $\gamma$ -irradiation

Baharvand. A<sup>1</sup>, S. Shahbazi<sup>2\*</sup>, H. Afsharmanesh<sup>2</sup>, M. A. Ebrahimi<sup>1</sup>, H. Askari<sup>2</sup>

1. Biotechnology Department, Faculty of Agriculture, Payam e Noor University, Alborz.

2. Plant Protection Department, Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute (NSTRI), Atomic Energy Organization of Iran (AEOI), Alborz, Iran.

sshahbazi@nrcam.org

**Abstract:** The *Trichoderma harzianum* was isolated from soil and its spore suspensions were irradiated in dose of  $\gamma$ -radiation 250 Gy for induced mutation. The *T. harzianum* mutants were used for chitinolytic enzyme production. Colloidal chitin was used to chitinase production and enzyme activity assay. The extracellular protein concentration of *T. viride* and its mutants were determined by the dye binding method of Bradford. Also, the purity and composition of enzyme-rich protein samples were evaluated under denaturing conditions by SDS-PAGE. The highest extracellular protein production was observed in *T. h M15* and *T. h M11*. *Trichoderma* mutants of *T. h M15*, *T. h M11*, *T. h M8* and *T. h M6* maintained higher ability to chitinase enzyme activity, respectively. SDS-Page analysis of the crud protein indicated the presence of different strain comparison



## مجموعه مقالات

چهارمین همایش ملی کاربرد فناوری هسته‌ای در علوم کشاورزی و منابع طبیعی  
(۲۹-۳۰ اردیبهشت، ۱۳۹۴، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای)

The 4<sup>th</sup> National Congress on Nuclear Technology Application in Agricultural & Natural Resource Sciences (19-20 May, 2015, Nuclear Agriculture Research School)

comprise  $\beta$ -1,4-N acetyl glucosaminidase, acetyl glucosaminase. The highest chitinase enzyme production was observed in *T. h* M15, that containing of large amount of Endo chitinase (24.5, 26 and 42 KDa) and  $\beta$ -1,4-N acetyl glucosaminidase (68 KDa). The study clearly showed the possibility of improving the chitinase production of *Trichoderma* for biological control of plant diseases through mutation with  $\gamma$ -radiation.

**Keyword: Enzyme activity, *Trichoderma harzianum*, Chitinase, SDS-PAGE**

### مقدمه

کیتین پس از سلولز فراوانترین پلی ساکارید در طبیعت می باشد که در اسکلت خارجی سخت پوستان مانند میگو، دیواره سلولی قارچ های واقعی و حشرات یافت می شود (Kapat et al., 1996) این پلیمر خطی از واحدهای پیوندی  $\beta$ -1,4 N-acetylglucosamine تشکیل شده است. آنزیم های کیتیناز پیوندهای گلیکوزیدی بتا (۱,۴) پلیمر کیتین را به اجزای سازنده اش تجزیه می کنند (Cohen-Kupiec & Chet, 1998). این آنزیمها نقش مهمی در تغذیه و بیماریزایی باکتریها و قارچها و شکل زایی و اتولیز قارچها ایفا می کنند. از کیتینازها در صنایع مختلف و همچنین تصفیه بیولوژیک آب دریا و صنایع داروسازی و سایر کاربردهای کلینیکی استفاده می شود. تجزیه آنزیمی کیتین موجب تولید مشتقات کیتینی متنوعی مثل استیل گلوکزآمین و دی استیل کتوبیوز می شود که یک دی ساکارید با ارزش اقتصادی و پتانسیل با کاربردهای بیوتکنولوژیکی می باشد (Deleon et al., 2004). در واقع این آنزیم از آنزیم های کلیدی در لیز دیواره سلولی در خلال مایکوپارازیتیسیم در مقابل فیتوپاتوژن های قارچی می باشد. اگرچه باکتری های آنتاگونیست از اهمیت زیادی در مبارزه بیولوژیک برخوردارند، اما تعدادی از قارچ ها نیز به عنوان عوامل مبارزه بیولوژیک شناخته شده اند (Weller et al., 2002). مکانیسم عمومی در کنترل بیولوژیکی به دو نوع تاثیر مستقیم و غیر مستقیم (عامل بیوکنترل بر بیمارگر گیاهی) تقسیم می شود. اثرات مستقیم شامل رقابت برای غذا و مکان تولید آنتی بیوتیک ها و آنزیم ها و غیر فعال کردن آنزیم های بیمارگر می باشد. اثرات غیر مستقیم نیز شامل تمامی فعالیت هایی که می تواند سبب تغییرات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی در گیاه میزبان (نظیر تنش های مختلف، حلالیت ترکیبات غیر آلی و هم چنین القای مقاومت سیستمیک) شود (Viterbo et al., 2002). جنس *Trichoderma* spp از جمله قارچ های آزادزی هستند که عمدتاً در خاک فعالیت نموده و به عنوان عوامل کنترل بیولوژیک مؤثر علیه دامنه بسیار وسیعی از ارگانیسم های بیمارگر شامل قارچ های بیمارگر گیاهی (اعم از خاکزاد و هوا زاد) باکتری ها، پروتوزوآها، نماتدها و حتی ویروس ها شناخته می شوند (Howell, 2003). گونه های تریکودرما به چند شیوه علیه موجودات هدف عمل می کنند. سویه های پارازیت کننده قارچ میزبان، اثر خود را از طریق نفوذ مستقیم در هیف میزبان و یا تولید آنزیم های خارج سلولی اعمال می کنند. علاوه بر آن، ممکن است آنتی بیوتیک های ضد قارچی تولید نموده و نیز آنزیم های هیدرولیز کننده القاکننده بیماری زایی را در پاتوژن مهار نمایند. همچنین ممکن است تجزیه کننده های مواد آلی بوده و به ویژه وقتی که عناصر غذایی، عامل محدود کننده به شمار می آیند، به عنوان رقیب پاتوژن های قارچی در فازهای ساپروبییک عمل کنند. گزارش شده است که برخی از سویه ها، فعالیت باکتری



## مجموعه مقالات

چهارمین همایش ملی کاربرد فناوری هسته‌ای در علوم کشاورزی و منابع طبیعی  
(۲۹-۳۰ اردیبهشت، ۱۳۹۴، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای)

The 4<sup>th</sup> National Congress on Nuclear Technology Application in Agricultural & Natural Resource Sciences (19-20 May, 2015, Nuclear Agriculture Research School)

های ساپروبییک و قارچ‌های مایکوریزا<sup>۱</sup> را افزایش می‌دهند و بعضی هم به عنوان محرک‌های رشد گیاهی مطرح بوده و سبب افزایش در اندازه گیاه، سطح و وزن برگ و نیز القای مقاومت در گیاه نسبت به پاتوژن‌های گیاهی می‌گردند. نقش دوگانه فعالیت آنتاگونیستی علیه بیمارگرهای گیاهی و بهبود حاصلخیزی خاک، باعث می‌شود سویه‌های تریکودرما جانشین خوبی برای قارچ‌کش‌ها و مواد ضد عفونی‌کننده تدخینی باشند. بسیاری از سویه‌های تریکودرما که دارای پتانسیل کنترل بیماری‌ها هستند، معرفی شده‌اند (Monte, 2001). با مشخص شدن عوامل ژنتیکی دخیل در القای مقاومت، امکان ایجاد موتان‌های جدید با قابلیت‌های برتر برای اجرای کنترل بیولوژیکی مورد بررسی قرار گرفته است. دانشمندان با ایجاد تغییرات ژنتیکی در آنتاگونیست‌ها سعی می‌کنند تا کیفیت عمل آنها را به عنوان عوامل کنترل بیولوژیکی ارتقا دهند. یکی از روشهای بکار گرفته شده برای افزایش توانایی آنتاگونیست، القای موتاسیون تصادفی با بکارگیری موتاژن‌های فیزیکی نظیر امواج الکترومغناطیس UV، X، گاما و یا استفاده از موتاژن‌های شیمیایی مانند اتیل متان سولفونات می‌باشد (Gohel et al., 2004). در این پژوهش قارچ *Trichoderma harzianum* از خاک جداسازی گردیده و با استفاده از پرتوتابی گاما القای موتاسیون در آن صورت گرفته است و جدایه‌های موتانت آن از نظر میزان تولید پروتئین خارج سلولی و الگوی الکتروفوریک آن و تغییرات فعالیت آنزیم کیتیناز مورد مطالعه قرار گرفته است.

### مواد و روش‌ها

#### تولید کیتین کلونیدی

کیتین کلونیدی به عنوان منبع کربن برای تولید آنزیم‌های کیتیناز و سنجش فعالیت آنزیم کیتیناز مورد استفاده قرار می‌گیرد، چراکه القاکننده آنزیم کیتیناز می‌باشد. کیتین کلونیدی بوسیله پیش تیمار کیتین پوست میگو در اسید ارتوفسفریک ۸۵٪ (w/v) برای مدت ۲۴ ساعت در ۴ °C انجام گرفت تا خاصیت کلونیدی در کیتین افزایش پیدا کند به نحوی که به آسانی توسط آنزیم مورد استفاده قرار گیرد. بعد از پیش تیمار با اسید، مواد جامد با استفاده از یک فیلتر پارچه‌ای صاف شد و چندین مرتبه با آب مقطر شستشو گردید تا pH ماده جامد به حدود ۵ برسد. سپس کیتین کلونیدی در دمای ۷۰- °C برای مدت ۲۴ ساعت منجمد گردید و با استفاده از خشک کن انجمادی برای مدت ۴۸ ساعت خشک گردید و تا اندازه مش ۱۲۵-۵۳ میکرون آسیاب شد.

#### تولید آنزیم کیتیناز

جدایه‌های قارچ *T. harzianum* (موتانت و وحشی) - کلکسیون گروه پژوهشی گیاه پزشکی و نگهداری مواد غذایی پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای) بر روی محیط کشت MYG agar حاوی ۵ g.L<sup>-1</sup> عصاره مالت، ۲/۵ g.L<sup>-1</sup> عصاره مخمر، ۱۰ g.L<sup>-1</sup> گلوکز و ۲۰ g.L<sup>-1</sup> آگار کشت داده شدند و در دمای ۲۸ °C گرمخانه‌گذاری گردیدند. با استفاده از محلول سیلین از پلیت‌های هفت روزه حاوی اسپور، سوسپانسیون اسپوری با جمعیت ۱۰<sup>۸</sup>-۱۰<sup>۷</sup> spore.ml<sup>-1</sup> تهیه گردید. کشت اولیه سوسپانسیون اسپوری در محیط *Trichoderma complete medium* (TCM) حاوی ۱ گرم در لیتر باکتوپتون، ۰/۳ گرم در لیتر اوره، ۲ گرم در لیتر KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>، ۱/۴ گرم در لیتر (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>، ۰/۳ گرم در لیتر MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O، ۰/۳ گرم در

<sup>1</sup> Mychorhiza



## مجموعه مقالات

چهارمین همایش ملی کاربرد فناوری هسته‌ای در علوم کشاورزی و منابع طبیعی  
(۲۹-۳۰ اردیبهشت، ۱۳۹۴، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای)

The 4<sup>th</sup> National Congress on Nuclear Technology Application in Agricultural & Natural Resource Sciences (19-20 May, 2015, Nuclear Agriculture Research School)

لیتر  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ،  $0/005$  گرم در لیتر  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ،  $0/002$  گرم در لیتر  $\text{MnSO}_4$ ،  $0/002$  گرم در لیتر  $\text{ZnSO}_4$  و  $0/002$  گرم در لیتر  $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  و  $2$  میلی لیتر در لیتر توئین انجام گرفت. pH محیط کشت TCM بر روی  $5/5$  تنظیم گردید و به آن  $0/3$  % (w/v) گلوکز افزوده شد. انجام عمل تخمیر در محیط کشت TCM در ارلن مایر  $250$  ml حاوی  $50$  ml محیط TCM در دمای  $28^\circ\text{C}$  به مدت  $24$  ساعت و  $180$  rpm انجام گرفت و بعد از مدت زمان فوق اسپورها تبدیل به حالت رویشی میسلیوم گردیدند. با استفاده از سانتریفیوژ کردن در  $4500$  rpm به مدت  $7$  دقیقه میسلیوم ها از محیط TCM جداسازی شدند و جهت القای تولید آنزیم های هیدرولیتیک میسلیوم های شسته شده با سیلین به ارلن مایر  $500$  ml حاوی  $50$  ml محیط *Trichoderma fermentation medium* (TFM) (مشابه ترکیبات محیط TCM، اما بدون باکتوپتون و گلوکز) انتقال داده شد. این محیط در pH  $5/5$  تنظیم شده بود و برای القای قارچ به تولید آنزیم های کیتیناز به آن مقدار  $0/5$  % (w/v) کیتین کلونیدی اضافه شده بود. شرایط رشد مشابه شرایط قبل در  $180$  rpm و دمای  $28^\circ\text{C}$  به مدت  $48$  ساعت انجام شد. بعد از مدت زمان فوق میسلیوم های قارچ توسط سانتریفیوژ کردن در  $4500$  rpm به مدت  $7$  دقیقه خارج گردید و مایع فوقانی برای اندازه گیری پروتئین خارج سلولی و فعالیت آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت.

### اندازه گیری غلظت پروتئین خارج سلولی تولیدی در محیط TFM

اندازه گیری پروتئین در مایع فوقانی محیط TFM با استفاده از روش بردفورد انجام گرفت. مقدار  $3$  میلی لیتر از معرف بردفورد در داخل لوله آزمایش ریخته شد و به آن  $150$  میکرولیتر از مایع فوقانی TFM تخمیر شده اضافه شد. از مایع فوقانی TFM استریل به عنوان نمونه شاهد استفاده گردید. جذب نمونه ها در طول موج  $595$  نانومتر با استفاده از اسپکتروفوتومتر قرائت گردید و با استفاده از نمودار استاندارد ترسیم شده با پروتئین خالص Bovine serum albumin (BSA)، مقدار پروتئین بر حسب میلی گرم در میلی لیتر ( $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) در مایع فوقانی محیط تخمیر TFM محاسبه گردید.

### تعیین فعالیت آنزیم های کیتیناز

مخلوط واکنش آنزیمی شامل  $200$  میکرولیتر مایع فوقانی محیط تخمیر TFM حاوی آنزیم کیتیناز،  $200$  میکرولیتر بافر استات پتاسیم  $15$  میلی مولار ( $5/5$  pH) که حاوی  $0/5$  گرم در لیتر کیتین کلونیدی می باشد، تهیه و در حمام آبگرم دمای  $37$  سانتی گراد به مدت یک ساعت انکوبه شدند. برای توقف واکنش آنزیمی از افزودن یک میلی لیتر NaOH یک درصد و سانتریفیوژ متعاقب انجام شد.  $100$  میکرولیتر بافر پتاسیم تترابورات  $0/8$  مولار با ( $8/9$  PH) افزوده و به مدت  $3$  دقیقه در آب جوش قرار گرفت.  $3$  میلی لیتر معرف DMAB ( $10$  گرم در  $100$  میلی لیتر مخلوط  $0/12/5$  اسید استیک گلاسیال و  $0/87/5$  اسید کلریدریک  $10$  نرمال) به محلول فوق افزوده شد و در آب جوش به مدت  $5$  دقیقه قرار داده و سپس در آب سرد قرار دادیم و بلافاصله جذب نوری محلول در طول موج  $544$  نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتوفوتومتر قرائت شد.

### الکتروفورز و تعیین وزن مولکولی آنزیم های تولیدی در جدایه های موتانت

آزمون الکتروفورز با استفاده از روش Laemmli ( $1970$ ) با استفاده از ژل متراکم کننده  $4$  % و ژل تفکیک کننده  $12/5$  % انجام شد. جهت آماده سازی نمونه پروتئینی حاوی کمپلکس های آنزیمی، ابتدا مقدار  $5$  ml از مایع فوقانی محیط



## مجموعه مقالات

چهارمین همایش ملی کاربرد فناوری هسته‌ای در علوم کشاورزی و منابع طبیعی  
(۲۹-۳۰ اردیبهشت، ۱۳۹۴، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای)

The 4<sup>th</sup> National Congress on Nuclear Technology Application in Agricultural & Natural Resource Sciences (19-20 May, 2015, Nuclear Agriculture Research School)

تخمیر TFM از هر یک از نمونه‌های حاصل از تخمیرهای تولید آنزیم (سلولاز، کیتیناز و گلوکاناز) با مقدار ۵ ml از استون سرد ( $20^{\circ}\text{C}$ ) مخلوط شد و رسوب پروتئینی آن با استفاده از سانتریفیوژ کردن در ۴۵۰۰ rpm به مدت ۷ دقیقه جمع آوری شد. بعد از خروج استون از نمونه‌ها، مقدار ۱۰۰  $\mu\text{l}$  آب مقطر دوبار تقطیر به آنها اضافه شد و به خوبی مخلوط گردید. سپس ۱۰۰  $\mu\text{l}$  از بافر نمونه به آنها اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شد و به مقدار ۲۰ از نمونه‌ها در هر چاهک تزریق شد. آزمون الکتروفورز در آمپر ثابت ۲۰ mA انجام شد و ژل الکتروفورز با استفاده از کوماسی بریلیانت گرین R-250 رنگ آمیزی گردید و با استفاده از رنگبر حاوی متانول:اسید استیک:آب به نسبت‌های ۸:۱:۱ رنگبری گردید.

### آنالیز آماری

کلیه نتایج آزمایشات با استفاده از آنالیز واریانس (ANOVA) و مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن در سطح آماری  $P < 0.05$  انجام گرفت. آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار SPSS (ویرایش ۱۳) انجام گرفت و کلیه آزمایشات در سه تکرار انجام شد.

### نتایج و بحث

با توجه به نتایج بدست آمده در مطالعات قبلی (Mohamadi et al., 2014)، دز پرتوآبی ۲۵۰ Gy به عنوان دز مناسب برای القای موتاسیون در اسپوره‌های قارچ تریکودرما تشخیص داده شد، زیرا باعث کاهش حدود ۵۰٪ در قدرت جوانه زنی اسپور شده بود. بر این اساس سوسپانسیون اسپور از قارچ *T. harzianum* با جمعیت  $1 \times 10^6$  spore/ml تهیه گردید و در دز ۲۵۰ Gy پرتوآبی شد و بعد از تهیه سریال رقت و کشت آنها بر روی محیط کشت PDA، جداسازی تک اسپورها صورت گرفت و به محیط کشت تازه انتقال داده شدند و جهت کامل شدن رشد قارچ، کلیه پلیت‌ها به مدت ۷۲ ساعت در داخل گرمخانه  $28^{\circ}\text{C}$  قرار داده شدند و کشت‌های متوالی از هر پلیت در طول فواصل زمانی مختلف گرفته شده تا خصوصیات جدایه‌های موتانت تثبیت گردد. از کلیه جدایه‌های قارچ مورد آزمون کشت تازه بر روی محیط PDA تهیه گردید و جهت تولید اسپور بر روی محیط MYG agar کشت داده شدند. از محیط‌های ۷-۵ روزه آنها با استفاده از محلول سیلین سوسپانسیون اسپور تهیه گردید و جمعیت آنها در  $10^7$  spore.ml<sup>-1</sup> تنظیم گردید. بعد از تلقیح اسپورها در محیط TCM و گرمخانه‌گذاری آنها در  $28^{\circ}\text{C}$  برای مدت ۲۴ ساعت در ۱۸۰ rpm، میسلیم‌های تولید شده بعد از سانتریفیوژ کردن در ۴۵۰۰ rpm به مدت ۷ دقیقه و جداسازی محیط TCM از آنها با استفاده از محلول سیلین شستشو داده شدند و به محیط تخمیر TFM منتقل شدند و به مدت ۴۸ ساعت در همان شرایط قبل گرمخانه‌گذاری شدند. سپس نمونه‌ها بعد از زمان فوق سانتریفیوژ شدند و مایع فوقانی آنها برای اندازه‌گیری غلظت پروتئین خارج سلولی و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های کیتیناز مورد استفاده قرار گرفتند.

### مقایسه تولید پروتئین خارج سلولی و تعیین فعالیت آنزیمی

شکل ۱، مقایسه میانگین غلظت پروتئین (mg/ml) و فعالیت آنزیم کیتیناز (U/ml) در مایع فوقانی محیط تخمیر TFM حاوی کیتین کلونیدی برای قارچ وحشی *T. harzianum* و جدایه‌های موتانت آنرا نشان می‌دهد. کلیه نتایج در سطح آماری ۰/۰۵ دارای اختلاف معنی دار آماری بودند. نتایج نشان داد که بالاترین میزان غلظت پروتئین خارج سلولی به ترتیب در نمونه‌های موتانت Th M11، Th M15، Th M10، Th M12 و Th M4 مشاهده می‌شود. میزان تولید پروتئین

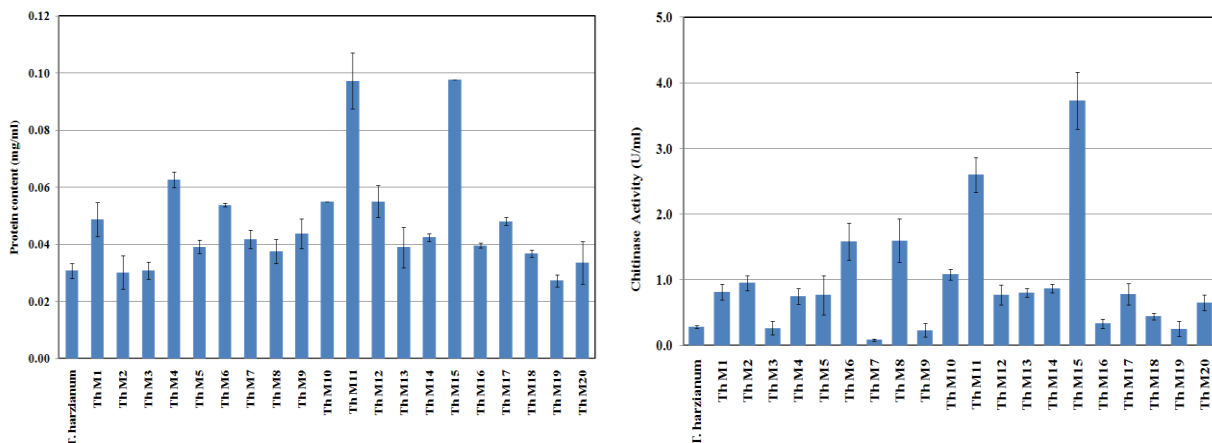


## مجموعه مقالات

چهارمین همایش ملی کاربرد فناوری هسته‌ای در علوم کشاورزی و منابع طبیعی  
(۲۹-۳۰ اردیبهشت، ۱۳۹۴، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای)

The 4<sup>th</sup> National Congress on Nuclear Technology Application in Agricultural & Natural Resource Sciences (19-20 May, 2015, Nuclear Agriculture Research School)

خارج سلولی از مقدار ۰/۰۳۰ الی ۰/۱۰۰ mg/ml متغیر بود. پایین‌ترین میزان تولید پروتئین خارج سلولی در جدایه موتانت Th M19 مشاهده گردید. بالاترین فعالیت آنزیم کیتیناز به ترتیب در جدایه‌های موتانت Th M15، Th M11، Th M8 و Th M6 مشاهده گردید. میزان فعالیت آنزیم کیتیناز در قارچ وحشی *T. harzianum* و جدایه‌های موتانت آن از ۰/۰۸ الی ۳/۷۳ U/ml متغیر بود. پایین‌ترین میزان فعالیت آنزیم کیتیناز در جدایه موتانت Tv M7 مشاهده گردید.



شکل ۱. مقایسه غلظت پروتئین خارج سلولی و فعالیت آنزیم کیتیناز در مایع فوقانی محیط تخمیر TFM حاوی کیتین کلونیدی در قارچ وحشی *T. harzianum* و جدایه‌های موتانت آن

### بررسی پروفایل پروتئینی آنزیم‌های کیتیناز در قارچ *T. harzianum* و جدایه‌های موتانت آن

شکل ۲- (a)، پروفایل پروتئین آنزیم‌های کیتیناز در قارچ *T. harzianum* و جدایه‌های موتانت آن (Th M1 الی Th M5) را نشان می‌دهد. کلیه نمونه‌های مورد مطالعه در این پروفایل پروتئینی باند‌های متعددی را در محدوده وزن مولکولی ۱۷۵-۱۰/۵ KDa را نشان می‌دهند. کلیه نمونه‌ها دارای باند پروتئینی شارب‌ی در وزن مولکولی ۶۷ KDa بودند که بیانگر آنزیم N-استیل گلوکوز آمینیداز می‌باشد. بیان این آنزیم به ترتیب در جدایه‌های موتانت Th M1، Th M4، Th M2، Th M3 و Th M5 نسبت به نمونه قارچ وحشی *T. harzianum* بالاتر بود. باند آنزیمی شارب‌ی دیگری در وزن مولکولی ۴۲ KDa مشاهده گردید که بیانگر حضور آنزیم اندوکیتیناز (Chit 42) می‌باشد. بیان این آنزیم در این پروفایل پروتئینی در جدایه‌های موتانت Th M1 و Th M4 نسبت به دیگر جدایه‌ها بالاتر بود. همچنین باند ضعیفی از این آنزیم در جدایه‌های موتانت Th M2 و Th M3 مشاهده گردید. با این حال گونه وحشی قارچ *T. harzianum* و جدایه موتانت Th M5 دارای باند آنزیمی ضعیفی از این پروتئینی در پروفایل خود بود. در جدایه Th M4 باند پروتئینی شارب‌ی در وزن مولکولی ۳۱ KDa مشاهده شد که ناشی از حضور آنزیم اندوکیتیناز (Chit 31) بود. همچنین باند آنزیمی با وزن مولکولی ۳۶ KDa مربوط به آنزیم اندوکیتیناز در این جدایه موتانت قابل مشاهده بود. این باند آنزیمی در دیگر جدایه‌های موتانت و قارچ وحشی *T. harzianum* دارای بیان ضعیفی بود. شکل ۲- (b) پروفایل پروتئینی آنزیم‌های کیتیناز در قارچ وحشی *T.*

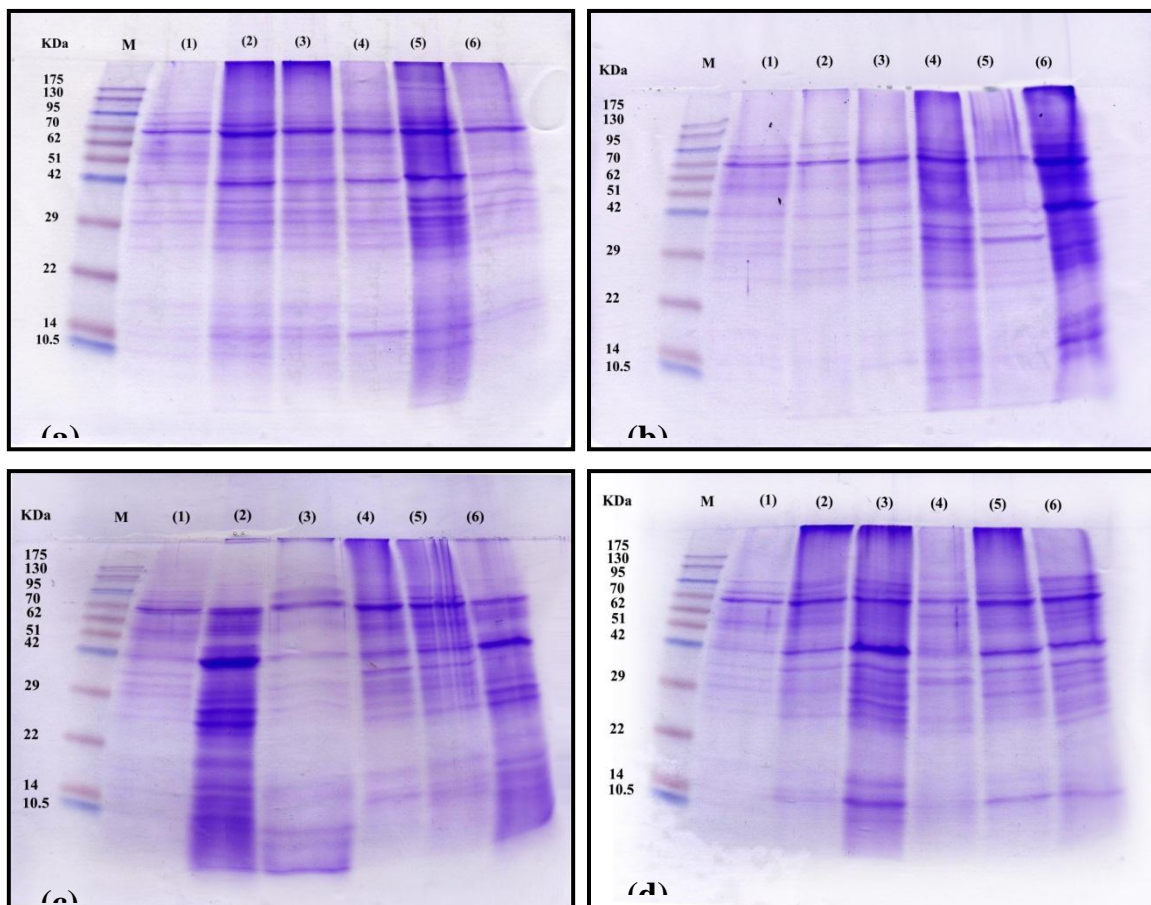


## مجموعه مقالات

چهارمین همایش ملی کاربرد فناوری هسته‌ای در علوم کشاورزی و منابع طبیعی  
(۲۹-۳۰ اردیبهشت، ۱۳۹۴، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای)

The 4<sup>th</sup> National Congress on Nuclear Technology Application in Agricultural & Natural Resource Sciences (19-20 May, 2015, Nuclear Agriculture Research School)

*harzianum* و جدایه‌های موتانت آن (Th M6 الی Th M10) را نشان می‌دهد. کلیه نمونه‌های مورد آزمون دارای باندهای پروتئینی متفاوتی در محدوده وزن مولکولی ۱۰/۵-۱۷۵ KDa بودند. کلیه نمونه‌های مورد آزمون دارای باندهای پروتئینی متفاوتی در محدوده وزن مولکولی ۱۰/۵-۱۷۵ KDa بودند و دارای باند پروتئینی شارپی در وزن مولکولی ۶۸ KDa بودند که مربوط به آنزیم N-استیل گلوکوآمینیداز می‌باشد.



شکل ۲. مقایسه پروفایل پروتئینی آنزیم‌های کیتیناز در قارچ وحشی *T. harzianum* و جدایه‌های موتانت آن

- (a): به ترتیب (۱): قارچ وحشی *T. harzianum*. (۲): Th M1. (۳): Th M2. (۴): Th M3. (۵): Th M4. (۶): Th M5 و M: مارکر پروتئین)
- (b): به ترتیب (۱): قارچ وحشی *T. harzianum*. (۲): Th M6. (۳): Th M7. (۴): Th M8. (۵): Th M9. (۶): Th M10 و M: مارکر پروتئین)
- (c): به ترتیب (۱): قارچ وحشی *T. harzianum*. (۲): Th M11. (۳): Th M12. (۴): Th M13. (۵): Th M14. (۶): Th M15 و M: مارکر پروتئین)
- (d): به ترتیب (۱): قارچ وحشی *T. harzianum*. (۲): Th M16. (۳): Th M17. (۴): Th M18. (۵): Th M19. (۶): Th M20 و M: مارکر پروتئین)



## مجموعه مقالات

چهارمین همایش ملی کاربرد فناوری هسته‌ای در علوم کشاورزی و منابع طبیعی  
(۲۹-۳۰ اردیبهشت، ۱۳۹۴، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای)

The 4<sup>th</sup> National Congress on Nuclear Technology Application in Agricultural & Natural Resource Sciences (19-20 May, 2015, Nuclear Agriculture Research School)

بیان این آنزیم در جدایه Th M10 نسبت به دیگر جدایه‌ها بالاترین مقدار را داشت و کمترین میزان بیان این آنزیم در جدایه Th M9 مشاهده گردید. دیگر جدایه‌های موتانت در این پروفایل پروتئینی شامل Th M8، Th M7 و Th M6 نیز دارای بیان بالاتری نسبت به قارچ وحشی *T. harzianum* بودند. پروفایل پروتئین آنزیم Th M6 مشابه با پروفایل پروتئین قارچ وحشی *T. harzianum* بود و باند‌های آنزیمی N-استیل گلوکوزآمینیداز با وزن‌های مولکولی بالاتر از ۷۳ KDa شامل باند آنزیمی ۸۵ KDa و ۱۰۲ KDa در آن قابل مشاهده بود. بالاترین بیان آنزیم اندوکیتیناز با وزن مولکولی ۴۲ KDa در جدایه موتانت Th M10 مشاهده گردید. بیان این آنزیم در دیگر جدایه‌های موتانت و قارچ وحشی *T. harzianum* به صورت جزئی قابل مشاهده بود. بالاترین بیان آنزیم اندوکیتیناز ۳۳ KDa در جدایه‌های موتانت Th M9 و Th M8 مشاهده گردید. دیگر جدایه‌های موتانت در این پروفایل پروتئینی دارای باند پروتئینی ضعیفی از این آنزیم بودند. باند پروتئینی دیگری در وزن مولکولی ۳۶ KDa قابل مشاهده بود که بالاترین بیان این آنزیم اندوکیتینازی (Chit 36) در جدایه‌های موتانت Th M8، Th M9، Th M10 و Th M7 مشاهده گردید. جدایه موتانت Th M6 فاقد این باند آنزیمی بود. در جدایه موتانت Th M10 دو باند آنزیمی شارپ دیگر نیز قابل مشاهده بود. یکی با وزن مولکولی ۳۱ KDa که بیانگر آنزیم اندوکیتیناز (Chit 31) بود و همچنین احتمال دارد نوعی آلکالین پروتئاز باشد و همچنین آنزیم دیگری با وزن مولکولی ۱۷ KDa در جدایه موتانت Th M10 مشاهده شد که احتمالاً به دلیل تولید بالای آنزیم کیتیناز در این جدایه موتانت و اتولیز دیواره سلولی قارچ منجر به تحریک این جدایه به تولید آنزیم  $\beta$ -(۱-۳)-اندوگلوکاناز شده باشد. شکل ۲- (c) پروفایل پروتئین آنزیم‌های کیتیناز در قارچ وحشی *T. harzianum* و جدایه‌های موتانت آن (Th M11 الی Th M15) را نشان می‌دهد. کلیه نمونه‌های مورد آزمون دارای باند‌های آنزیمی متفاوتی در محدوده وزن مولکولی ۱۷۵-۱۰/۵ KDa بودند. آنزیم N-استیل گلوکوزآمینیداز با وزن مولکولی ۶۸ KDa در کلیه نمونه‌های مورد مطالعه در این پروفایل پروتئینی قابل مشاهده بودند. بالاترین بیان این آنزیم در جدایه موتانت Th M13 و Th M14 مشاهده گردید. با این حال کلیه جدایه‌های موتانت دارای بیان آنزیمی بالاتری نسبت به قارچ وحشی *T. harzianum* بودند. آنزیم اندوکیتیناز با وزن مولکولی ۴۲ KDa باند پروتئینی شارپی در جدایه Th M11 و Th M15 ایجاد نمود. دیگر جدایه‌های موتانت دارای باند آنزیمی ضعیف تری نسبت به این دو جدایه بودند. همچنین قارچ وحشی *T. harzianum* باند آنزیمی ضعیفی در وزن مولکولی ۴۲ KDa که بیانگر آنزیم اندوکیتیناز می‌باشد را ایجاد نمود. دو جدایه موتانت Th M13 و Th M14 دارای باند آنزیمی شارپی در وزن مولکولی ۲۴/۵ KDa و ۲۶ KDa بودند که احتمالاً متعلق به خانواده اندوکیتینازها می‌باشند. این باند‌های آنزیمی در پروفایل پروتئینی قارچ وحشی *T. harzianum* و دیگر جدایه‌های موتانت مشاهده نگردید. شکل ۲- (d) پروفایل پروتئینی آنزیم‌های کیتیناز در قارچ وحشی *T. harzianum* (چاهک شماره ۱) و جدایه‌های موتانت آن را نشان می‌دهد. کلیه نمونه‌های مورد آزمون دارای باند پروتئینی متفاوتی در محدوده وزن مولکولی ۱۷۵-۱۰/۵ KDa بودند. کلیه نمونه‌های مورد مطالعه در این پروفایل پروتئینی دارای باند آنزیمی N-استیل گلوکوزآمینیداز با وزن مولکولی ۶۷ KDa بودند. جدایه‌های موتانت Th M16، Th M17، Th M19 و Th M20 دارای بیان آنزیمی بالاتری نسبت به جدایه Th M18 بودند. باند آنزیمی شارپ دیگری در وزن مولکولی ۴۲ KDa مربوط به آنزیم اندوکیتیناز مشاهده گردید که بالاترین بیان این آنزیم در جدایه موتانت Th M17 و بعد از آن در جدایه‌های موتانت Th M20، Th M19 و Th M16 صورت گرفت. این جدایه‌های موتانت دارای بیان آنزیمی اندوکیتیناز بالاتری نسبت به قارچ وحشی *T. harzianum* بودند. همچنین آنزیم اندوکیتیناز با وزن مولکولی ۳۱، ۳۳ و ۳۶ KDa در جدایه موتانت Th M17 قابل مشاهده بود. در این جدایه باند شارپی با وزن مولکولی ۱۴ KDa





## مجموعه مقالات

### چهارمین همایش ملی کاربرد فناوری هسته‌ای در علوم کشاورزی و منابع طبیعی (۲۹-۳۰ اردیبهشت، ۱۳۹۴، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای)

The 4<sup>th</sup> National Congress on Nuclear Technology Application in Agricultural & Natural Resource Sciences (19-20 May, 2015, Nuclear Agriculture Research School)

مشاهده گردید که این باند آنزیمی در جدایه Th M19 و Th M20 نیز قابل مشاهده بود که احتمالاً نوعی از آنزیم  $\beta$ -(۳-۱)-اندوگلوکاناز می باشد.

#### نتیجه گیری

گونه های مختلف جنس *تریکودرما* آنزیم های تجزیه کننده کیتین (کیتیناز) ترشح می کنند که می توانند دیواره سلولی آسکومیست ها و بازدیومیست ها را تجزیه کنند. آنزیم های کیتیناز تولید شده توسط گونه های *تریکودرما*، مورد توجه زیادی قرار گرفته اند، زیرا کیتین یکی از ترکیبات اصلی ساختار دیواره سلولی بسیاری از قارچ های پاتوژن خاکزاد گیاهی می باشد و به همین دلیل، کیتینازها در کنترل تعداد زیادی از عوامل بیماریزای گیاهی نقش مهمی دارند. با توجه به نتایج بدست آمده از اندازه گیری فعالیت آنزیم کیتیناز، در میان جدایه های قارچ *T. harzianum*، جدایه های موتانت Th M15، Th M11، Th M8 و Th M6 دارای بالاترین میزان فعالیت آنزیمی نسبت به نمونه قارچ وحشی و دیگر جدایه های موتانت بودند. همانطور که در جدول ۲ نشان داده شده است جدایه موتانت Th M15 دارای بالاترین شدت باند آنزیمی اندوکیتیناز با وزن های مولکولی ۴۲ KDa و ۲۴/۵ و ۲۶ KDa و همچنین آنزیم  $\beta$ -(1,4)-N-acetyl glucoaminidase با وزن مولکولی ۶۸ KDa است. اثرات سینرژیستی این آنزیم ها بر سوبسترای کیتین کلونیدی و تولید بیشتر این آنزیم ها در این جدایه موتانت موجب برتری آن در بین جدایه های موتانت قارچ *T. harzianum* شده است. پروفایل پروتئینی جدایه موتانت Th M15 مشابه با پروفایل پروتئین جدایه موتانت Th M11 بود و تفاوت عمده این دو قارچ با دیگر جدایه ها در داشتن باند های آنزیمی با وزن مولکولی ۲۴/۵ و ۲۶ KDa بود. جدایه موتانت Th M8 نیز دارای باندهای آنزیمی شاپی در وزن های مولکولی ۳۳، ۳۶ و ۶۸ KDa بود. غلظت باند آنزیمی  $\beta$ -(1,4)-N-acetyl glucoaminidase با وزن مولکولی ۶۸ KDa در این جدایه قابل توجه بود. همچنین جدایه Th M6 دارای پروفایل پروتئینی مشابه ای با نمونه قارچ وحشی *T. harzianum* بود و تنها تفاوت آن، عدم حضور آنزیم های اندوکیتیناز ۳۶ و ۳۱ KDa در جدایه موتانت Th M6 بود. بر اساس نتایج بدست آمده تفاوت هایی در فعالیت آنزیم کیتیناز و الگوی باند های حاصل از پروتئین های خارج سلولی در جدایه های جهش یافته در مقایسه با جدایه های والد (وحشی) مشاهده گردید. استفاده از روش القای موتاسیون با پرتو تابی گاما توانایی تولید آنزیم های کیتیناز و متعاقباً کنترل بیولوژیکی در قارچ *تریکودرما* را به صورت کاملاً معنی داری افزایش می دهد.

#### منابع:

- [1]. Adams, G.C. 1988. *Thanatephorus cucumeris (Rhizoctonia solani)*, a species of wide host range. In *Advances in Plant pathology: Genetics of Plant pathogenic Fungi* (eds. D.S. Ingram & P.H. William), pp. 353-552. Academic Press: London, UK.
- [2]. Agrios, G.N., 2000. Significance of plant disease. *Plant Pathology*. ed., Agrios, G.N. academic Press. London. pp: 25-37.
- [3]. Cohen-Kupiec, R. Chet, I. 1998, The molecular biology of chitin digestion. *Current Opinion in Biotechnology* 9, 270-277 .
- [4]. Deleon, A. Jimenez-las, H. Gonzalez-Cuevas, M. and Paulina, B.A. 2004, Analysis of the expression of the *Trichoderma harzianum* ech42 gene in two isogenic clones of *Escherichia coli* by surface response methodology. *process Biochemistry*. Vol. 39, pp. 2173-2178.



## مجموعه مقالات

چهارمین همایش ملی کاربرد فناوری هسته‌ای در علوم کشاورزی و منابع طبیعی  
(۲۹-۳۰ اردیبهشت، ۱۳۹۴، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای)

The 4<sup>th</sup> National Congress on Nuclear Technology Application in Agricultural & Natural Resource Sciences (19-20 May, 2015, Nuclear Agriculture Research School)

- [5]. Gohel.,V. Megha.,C. Vyas.,P. and Chhatpar.,H.S. 2004, Strain improvement of chitinolytic enzyme producing isolate *Pantoea dispersa* for enhancing its biocontrol potential against fungal plant pathogens. *Annals of Microbiology*, Vol. 54(4), pp. 503-515.
- [6]. Grosch, F.F., Lottmann, J. and Berg, G., 2005. Effectiveness of three antagonistic bacterial isolates to suppress *Rhizoctonia solani* Kuhn on lettuce and potato, *Canadian Journal of Microbiology* 51:345-353.
- [7]. Howell, C. R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The History and evolution of current concepts. *Plant Dis.*: 87, 4-10.
- [8]. Kapat.,A. Rakshit.,S.K. and Panda.,T. 1996, Optimization of carbon and nitrogen sources in the medium and environmental factors for enhanced production of chitinase by *T.harzianum* . *Bioproc Eng*, pp(5):13-20.
- [9]. Kiewnick, S., Jacobsen, B.J., Braun-Kiewnick, A., Eckhoff, J.L. and Bermann, J.W. 2001. Integrated control of *Rhizoctonia* crown and root rot of sugar beet with fungicides and antagonistic bacteria. *Plant Disease* 85:719-722.
- [10]. Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- [11]. Mohamadi, A. S., Shahbazi, S., Askari, H. 2014. Investigation of  $\gamma$ -radiation on morphological characteristics and antagonist potential of *Trichoderma viride* against *Rhizoctonia solani*. *International Research Journal of Applied and Basic Sciences*. 8 (3): 329-336.
- [12]. Monte, E. 2001, Understanding *Trichoderma*, between biotechnology and microbial ecology. *Int Microbiol* 4:1-4.
- [13]. Ogoshi, A. 1996. Introduction – the genus *Rhizoctonia solani*. In: Sneh, B., Jabaji-Hare, S., Neate, S.M., Dijst, G. (eds), *Rhizoctonia* species, Taxonomy, Molecular Biology, Ecology; Pathology and Disease Control. Kluwer, Dordrecht, pp. 1–9.
- [14]. Raut, J.G. and B.B. Bhombe, 1984. Longevity of *M. phaseolina* in sunflower seeds. *Indian Phytopathology*, 37(2): 333-334.
- [15]. Viterbo, A. Ramot, O. Chernin, L. and Chet, I. 2002, Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. 81: 549–556.
- [16]. Weller, D. M., J. M. Raaijmakers, et al. (2002). "Microbial Populations Responsible for Specific Soil Suppressiveness to Plant Pathogens 1." *Annual Review of Phytopathology* 40(1): 309-348.