مجموعه مقالات
چهارمین همایش ملی کاربرد فناوری هسته‌ای در علوم کشاورزی و منابع طبیعی
(۲۹-۳۰ اردیبهشت، ۱۳۹٤، پژوهشکده کشاورزی هسته ای)
The 4th National Congress on Nuclear Technology Application in Agricultural & Natural Resource Sciences (19-20 May, 2015, Nuclear Agriculture Research School)

# استفاده از القای جهش با پرتو گاما جهت افزایش فعالیت اگزوگلوکانازی قارچ تریکودرما با با هدف ارتقای پتانسیل مایکوپارازیتیسم علیه عامل پوسیدگی اسکلروتینیایی کلزا

تبسم ناصری پور[۱]، سعید نصراله نژاد[۱]، سمیرا شهبازی*[۲]، کامران رهنما[۱]، مهدی بهگر[۳]، عبداله بهاروند[۴]

۱-گروه گیاهپزشکی، دانشکده تولیدات گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ۲-گروه گیاهپزشکی و نگهداری مواد غذیی، پژوهشکده کشاورزی هسته ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای، سازمان انرژی اتمی، ۳- گروه علوم دام و دامپزشکی، پژوهشکده کشاورزی هسته ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای، سازمان انرژی اتمی

۴- گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه پیام نور کرج، نویسنده مسوول: sshagbazi@nrcam.org

**چکیده:** قارچ تریکودرما به دلیل داشتن مکانیسم های متعدد از جمله تولید آنزیم های تجزیه کننده دیواره سلولی مانند کیتیناز و گلوکاناز به عنوان یک عامل بیوکنترل مطرح می باشد. هدف این تحقیق بررسی تولید آنزیم های اگزوگلوکانازی قارچ *Trichoderma harzianum* و ۲۰ جدایه پرتودیده(با اشعه گاما) به منظور بالا بردن توان آنتاگونیستی آنها در برابر بیمارگر *Sclerotinia sclerotiorum* می باشد.ابتدا آزمون کشت متقابل بین جدایه وحشی آنتاگونیست و موتانت های آن با بیمارگر انجام گردید.سپس فعالیت آنزیم های اگزوگلوکانازی با استفاده از سوبسترای کریستالی نظیر سلولز و آویسل اندازه گیری شد،همچنین غلظت پروتئین با کمک برادفورد محاسبه گردید..نتایج نشان دادند که القاء جهش در ۹ جدایه پرتو دیده ، منجر به افزایش فعالیت آنزیم اگزوگلوکاناز شده است. توانایی این جدایه ها در آزمون کشت متقابل با پاتوژن و میزان تولید آنزیم اگزوگلوکانازی ارتباط معنی داری برقرار می باشد. در مقایسه پروفایل پروتئینی بدست آمده از آزمون SDS-PAGE پروتئین های خارج سلولی مایع فوقانی محیط تخمیر TFM قارچ *T. harzianum* و موتانت های آن ، آنزیم Cel 7A (CBH I) با وزن مولکولی ۶۷ KDa مشاهده گردید. همچنین آنزیم Cel 6A (CBH II) با وزن مولکولی ۵۸/۸ KDa مشاهده گردید.

**واژگان کلیدی: پرتودهی گاما، اگزوگلوکاناز، پروفایل پروتئینی ، *Trichoderma harzianum*، *Sclerotinia sclerotiorum***

# Using gamma-ray to increased exoglucanase activity in *Trichoderma* and improvement of Sclerotinia rot of canola biocontrol

Tabasom Naseripour[1], Samira Shahbazi[2*], Saeed Nasrollah Nejad[1], Kamran Rahnama[1], Mehdi Behgar[3] Abdollah Baharvand[4]

1. Plant Protection Department, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Golestan, Iran.
2. Plant Protection Department, Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute (NSTRI), Atomic Energy Organization of Iran (AEOI), Alborz, Iran.
3. Animal Science Department, Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute (NSTRI), Atomic Energy Organization of Iran (AEOI), Alborz, Iran.
4. M.Sc. Student of Agricultural Biotechnology, Department of Agricultural Biotechnology, Payam-e-Noor University, I.R. of Iran.
5. sshagbazi@nrcam.org

**Abstract:** Trichoderma due to several mechanisms of cell wall degrading enzymes such as chitinase and glucanase is known as a biocontrol agent. The purpose of this study was to investigate the production of exogluconase enzymes in wild type and 20 motant isolates (gamma ray) of Trichoderma harzianum to raise to be antagonistic against the pathogen Sclerotinia sclerotiorum. . At first, the dual culture performed between the wild type and mutant strains of the pathogen .then Exogluconase activity enzymes is done using

substrates such as cellulose and Avicel crystal, and the protein concentration determined by Bradford. Results showed that the induction 9 irradiated mutant isolates, leading to increased activity of the Exogluconase enzyme. The ability of these isolates in dual culture with pathogens and production of Exogluconase enzymes is a significant relationship. Comparing protein profiles from SDS-PAGE analysis of proteins of the extracellular fluid TFM upper fermentation medium of T. harzianum and its mutant enzyme was observed Cel 7A (CBH I) with molecular weight 67KDa and Cel 6A (CBH II) with KDa 58.8 molecular weight.

**Keywords: gamma Radiation, exoglucanase, biological control, *Trichoderma harzianum, Sclerotinia sclerotiorum*.**

**مقدمه:**

گونه های قارچ تریکودرما به عنوان عوامل بالقوه بیوکنترل شناخته شده اند که توانایی تولید مواد ضد میکروبی و آنزیم های تجزیه کننده دیواره سلولی قارچ های بیماریزای گیاهی را دارا می باشد. یکی از شناخته شده ترین آنزیم های تجزیه کننده دیواره سلولی که نقش مهمی در مکانیسم بیوکنترل قارچ تریکودرما دارند آنزیم های گلوکانازی می باشد.بیماری پوسیدگی اسکلروتینیایی ساقه ناشی از قارچ *Sclerotinia sclerotiorum (lib) de bary* عامل بیماریزای گیاهی با دامنه وسیع میزبانی و جغرافیایی و یکی از مهم ترین بیماری های کلزا می باشد (Bolland & Hall, 1994). این بیماری با توجه به علائمی که ایجاد می کند به نام های مختلف از قبیل بلایت سفید، پوسیدگی سفید، بلایت ساقه، شانکر کلزا... نامیده می شود (Gaetn & Madina 2005). ساقه آلوده ممکن است شکافته شود، در این صورت تعداد زیادی سختینه منظم، کروی سفید خاکستری تا سیاه در داخل بافت ساقه ایجاد می شود(Kolte, 1985). گونه های قارچ تریکودرما حداقل دو اگزوگلوکاناز (EC 3.2.1.58) (سلوبیوهیدرولاز) شامل CBH I, Cel 7A, CBH II, Cel 6A تولید می کنند که بصورت اختصاصی به پیوندهای β-۱و۳-گلوکان حمله می برند (Sutherland, 1999).اگزوگلوکانازها یا سلوبیوهیدرولازها (EC 3.2.1.91) که بر روی انتهای احیاکننده و غیر احیاکننده زنجیره سلولز عمل نموده و گلوکز، سلوبیوز یا سلواولیگوساکاریدها را به عنوان تولیدات مهم خود آزاد می سازند.در مطالعات پیشین نشان داده شده است که β-۱و۳-گلوکانازها نقش تغذیه ای در ساپروفیت ها و مکانیسم مایکوپارازیتیسم دارند (Chet, 1997). علاوه بر این، β-۱و۳-گلوکانازها از جمله پاسخ های دفاعی گیاهان در برابر حمله پاتوژن ها هستند (Simmons, 1994).

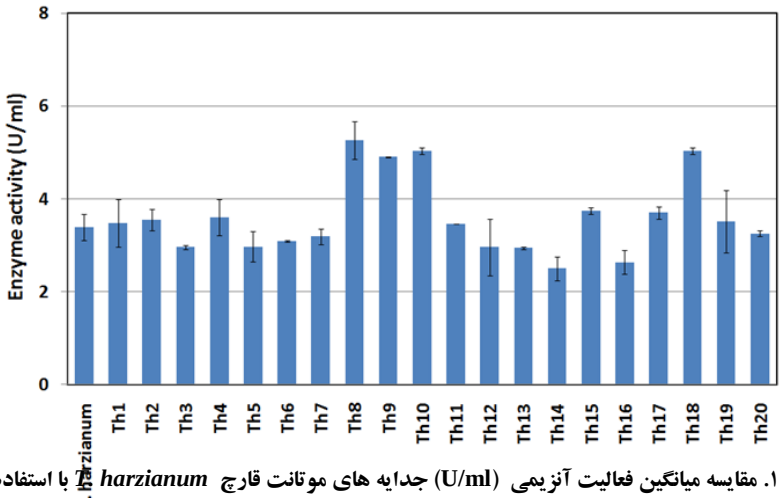
## مواد و روش ها:

از قارچ *Trichoderma harzianum* و ۲۰ جدایه جهش یافته ناشی از اشعه گاما (ناصری پور و همکاران، ۲۰۱۴) به عنوان مایه تلقیح آنتاگونیست و از قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* جدا شده از کلزا (وکیلی و همکاران) به عنوان بیمارگر استفاده گردید.کشت متقابل قارچ T. harzianum و جدایه های جهش یافته با *Sclerotinia sclerotiorum* با استفاده از روش مورگان و همکاران انجام گردید. اندازه گیری فعالیت آنزیم های اگزوگلوکانازی با استفاده از سوبسترای کریستالی نظیر سلولز و آویسل انجام می شود. فعالیت آنزیم اگزوگلوکاناز (سلوبیوهیدرولازها) در گونه های مختلف قارچ تریکودرما و جدایه های موتانت آن با استفاده از محلول ۰/۵ ٪ آویسل در بافر استات پتاسیم M ۰/۰۵ در pH ۴/۸ و دمای گرمخانه گذاری °C ۵۰ اندازه گیری شد. اندازه گیری فعالیت آنزیمی با استفاده از روش Gamma **و** Mota **(۱۹۹۸)** با استفاده از معرف دی نیترو سالیسیلیک اسید انجام شد. غلظت پروتئین خارج سلولی در محیط تخمیر با استفاده از روش بردفورد انجام گردید. مقادیر پروتئین با استفاده از پروتئین خالص آلبومین (BSA) و مقادیر آنزیم با استفاده از گلوکز به عنوان استاندارد محاسبه گردید آزمون الکتروفورز از روش Laemmli (۱۹۷۰) با استفاده از ژل متراکم کننده ۴ ٪ و ژل تفکیک کننده ۱۲/۵ ٪ انجام شد. تجزیه و تحلیل آماری این پژوهش با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۹، و رسم نمودار با Exel انجام گردید. برای مقایسه میانگین ها از آزمون دانکن با سطح احتمالی ۵٪ استفاده شد.

## نتایج

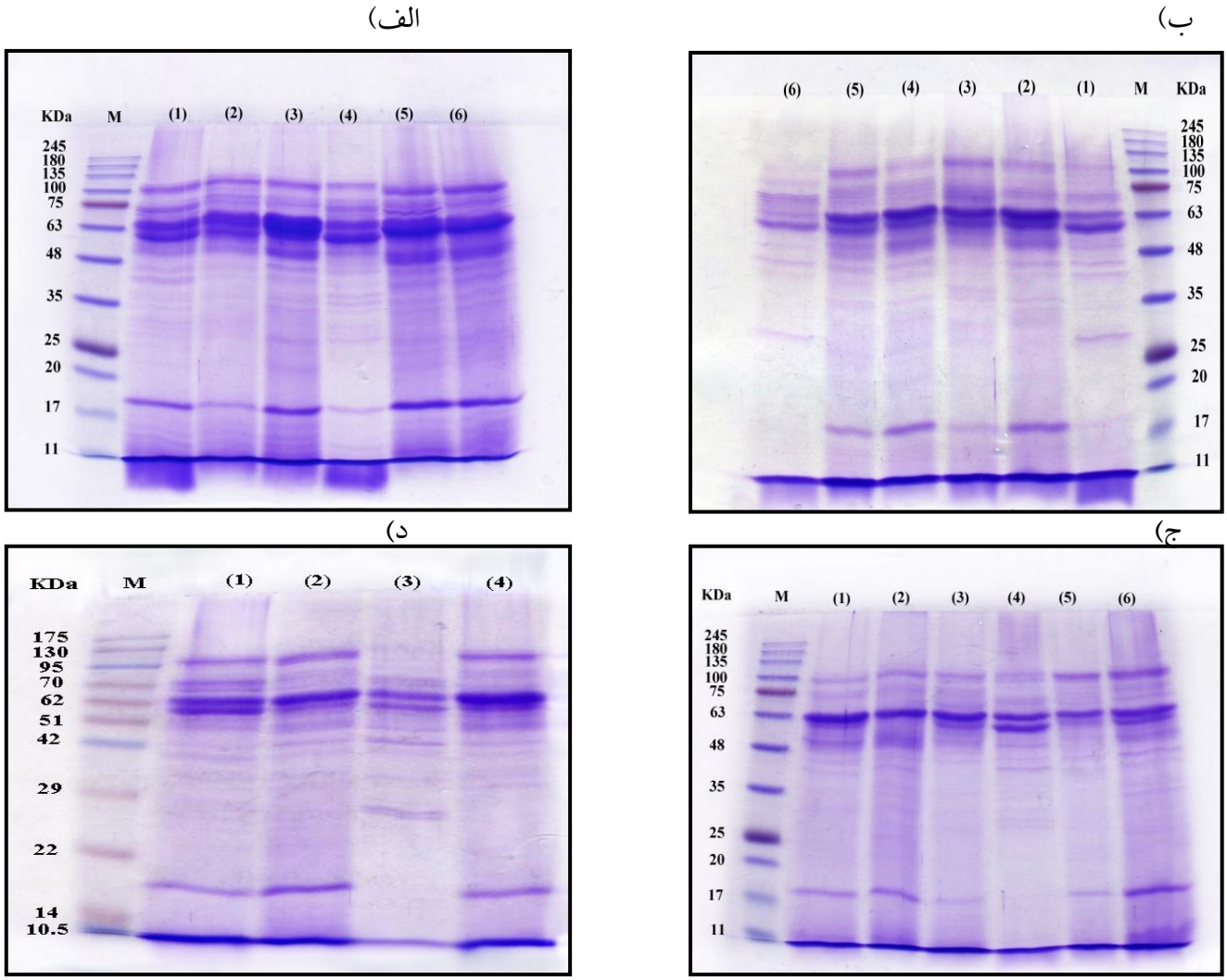
مقایسه میانگین میزان بازدارندگی جدایه های موتانت و وحشی قارچ *T.harzianum* در برابر قارچ پاتوژن *S. sclerotiorum* نشان می دهد،کلیه جدایه های موتانت دارای اختلاف معنی دار آماری در سطح ۰/۰۵ هستند. میزان بازدارندگی از رشد بیمارگر از۵۱/۸۸ ٪ تا ۷۲/۱۷ متغیر بود. کلیه جدایه های موتانت فعالیت آنتاگونیستی بالاتری نسبت به قارچ وحشی *T.harzianum* از خود نشان دادند. بالاترین میزان فعالیت بازدارندگی به ترتیب در جدایه های Th M8، Th M17، Th M15، Th M10، Th M9، Th M2، Th M11، Th M6 و با بیش از ۶۷٪ ممانعت از رشد قارچ بیمارگر مشاهده شد.

مقایسه میانگین فعالیت آنزیم اگزوگلوکاناز (U/ml) و غلظت پروتئین قارچ وحشی *T. harzianum* و جدایه های موتانت آن را در مایع فوقانی محیط تخمیر TFM ا نشان می دهد.که کلیه نمونه ها در سطح آماری ۰/۰۵ دارای اختلاف معنی دار آماری هستند (شکل ۱).




**شکل ۱. مقایسه میانگین فعالیت آنزیمی (U/ml) جدایه های موتانت قارچ *T. harzianum* با استفاده از سوبسترای آویسل جهت سنجش فعالیت آنزیم خارج سلولی تولید شده در مایع فوقانی محیط تخمیر TFM حاوی سلولز کلوئیدی.**

بالاترین میزان فعالیت آنزیم اگزوگلوکاناز در جدایه های موتانت Th M8، Th M10، Th M18 و Th M9 با مقدار ۵/۲۷، ۵/۰۴، ۵/۰۴، ۴/۹۱ مشاهده گردید. میزان تغییرات فعالیت اگزوگلوکاناز از ۲/۵۰ الی ۵/۲۷ متغیر بود. پایین ترین میزان فعالیت آنزیمی در جدایه موتانت Th M14 مشاهده گردید. اما با توجه به اینکه نمونه Th M16 در میزان پروتئین کمتر فغالیت آنزیمی بالاتری را نشان داده است دارای بالاترین فعالیت آنزیمی ویژه در بین موتانت ها از خود نشان می دهد.پروفایل پروتئین بدست آمده از آزمون SDS-PAGE پروتئین های خارج سلولی مایع فوقانی محیط تخمیر TFM قارچ *T. harzianum* در شکل ۲ نشان داده شده است.




**شکل ۲ مقایسه پروفایل پروتئین (الگوی الکتروفورزیس) بدست آمده از آزمون SDS-PAGE پروتئین های خارج سلولی مایع فوقانی محیط تخمیر TFM حاوی آنزیم های گلوکاناز در قارچ *T. harzianum* و موتانت های آن: الف) قارچ وحشی T. harziaum: (۱)، Th (2): M1، Th M2 (3): Th M3، (4): Th M4، (5): Th M5، (6) و M: مارکر پروتئین) . ب) (۱): Th M6، Th M7 (2): Th M8، (3): Th M9، (4): Th M10، (5): Th M11، (6) و M: مارکر پروتئین . ج) (۱): Th M12، Th M13 (2): Th M14، (3): Th M15، (4): Th M16، (5): Th M17، (6) و M: مارکر پروتئین). د) (۱): T. harzianum، Th M18 (2): Th M19، (3): Th M20 (4) و M: مارکر پروتئین)**

بالاترین بیان آنزیم Cel 7A (CBH I) با وزن مولکولی ۶۴ KDa به ترتیب در جدایه های موتانت Th M2، Th M4، Th M5 و Th M1 قابل مشاهده بود (شکل۲. الف). میزان غلظت باند پروتئینی Cel 7A (CBH I) جدایه موتانت Th M3 نزدیک به بیان این پروتئین در قارچ وحشی *T. harzianum* بود. از طرف دیگر بیان پروتئین Cel 6A (CBH II) در جدایه موتانت Th M3 بالاتر از بیان آنزیم Cel 7A (CBH I) ، در این جدایه و همچنین دیگر جدایه های موتانت

(Th M1، Th M2، Th M4 و Th M5) بود. پروفایل پروتئین آنزیم های گلوکاناز در جدایه های موتانت Th M6 الی Th M11 را نشان می دهد. کلیه نمونه های مورد مطالعه در این پروفایل پروتئینی دارای باند های آنزیمی متعددی در محدوده وزن مولکولی KDa ۲۴۵-۱۱ بودند. شاخص ترین باند پروتئینی در بین این جدایه ها در محدوده وزن مولکولی KDa ۶۳ مشاهده گردیدکه بالاترین غلظت پروتئین در این پروفایل در جدایه موتانت Th M7 مشاهده گردید. این وزن مولکولی مربوط به آنزیم Cel 7A (CBH I) می باشد. همچنین Cel 6A (CBH II) در محدوده وزن مولکولی KDa ۵۷ در این پروفایل پروتئینی مشاهده گردید که بالاترین غلظت این باند پروتئینی در جدایه موتانت Th M6 مشاهده شد. بیان آنزیم Cel 7A (CBH I) در جدایه موتانت Th M11 دارای کمترین غلظت باند پروتئینی بود. کلیه جدایه های موتانت در این پروفایل پروتئینی دارای آنزیم های Cel 7A (CBH I) و Cel 6A (CBH II) به ترتیب با وزن مولکولی ۶۳ و KDa ۵۷ بودند. بالاترین بیان پروتئینی آنزیم Cel 7A (CBH I) به ترتیب در جدایه های موتانت Th M7، Th M9، Th M10، Th M8 و Th M6 و بصورت جزئی در جدایه موتانت Th M11 مشاهده گردید. جدایه موتانت Th M11 باند پروتئینی Cel 6A (CBH II) مشخص تری نسبت به دیگر باند های پروتئینی بویژه باند پروتئینی آنزیم Cel 7A (CBH I) از خود نشان داد، با این حال بیان این پروتئین (Cel 6A (CBH II)) نسبت به جدایه های موتانت Th M6، Th M10 و Th M7 غلظت کمتری را نشان می دهد. مقایسه پروفایل پروتئین آنزیمی (شکل ۲. ج) جدایه های موتانت Th M12 الی Th M17 نشان می دهد که در کلیه نمونه های مورد مطالعه ، باند های پروتئینی متفاوتی در محدوده وزن مولکولی KDa ۲۴۵-۱۱ وجود دارد. کلیه جدایه های موتانت دارای باند پروتئینی شارپی در وزن مولکولی KDa ۶۳ مربوط به آنزیم Cel 7A (CBH I) بودند. پروفایل پروتئینی آنزیم های سلولاز در قارچ وحشی *T. harzianum* (چاهک شماره ۱) و جدایه های موتانت Th M18 الی Th M20 را نشان می دهد (شکل ۲.د). کلیه جدایه های موتانت مورد مطالعه در این پروفایل پروتئینی دارای باند های پروتئینی متفاوت در محدوده وزن مولکولی KDa ۱۷۵-۱۰/۵ بودند. پروفایل پروتئین جدایه های موتانت Th M18، Th M19 و Th M20 مشابه با پروفایل پروتئینی قارچ وحشی *T. harzianum* دارای باند پروتئینی شارپی با وزن مولکولی KDa ۶۴/۵ مربوط به آنزیم Cel 7A (CBH I) بودند. بالاترین غلظت این آنزیم در این پروفایل پروتئینی در جدایه موتانت Th M20 و پایین ترین آن در جدایه موتانت Th M19 مشاهده گردید. آنزیم Cel 6A (CBH II) در بین این جدایه های موتانت در Th M19 و بصورت جزئی در جدایه های موتانت Th M18 و Th M20 مشاهده گردید. با این حال بیان این آنزیم نسبت به جدایه وحشی قارچ *T. harzianum* پایین تر بود .آنزیم Cel6A (CBH II) در پروفایل پروتئینی قارچ *T. harzianum* در وزن مولکولی KDa ۵۸/۲ مشاهده گردید. Cel6A یک گلوکوهیدرولاز از خانواده ۶ سلوبیوهیدرولازها می باشد. آنزیم Cel6A یک آنزیم پیشرو می باشد که باند های گلیکوزیدی را در ساختارهای سلولزی با استفاده از مکانیسم معکوس هیدرولیز می کند و نشان داده شده است که این آنزیم ترجیحاً زنجیره سلولزی را از انتهای غیر احیا کننده هیدرولیز می کند (Boisset et al. 2000).. پروفایل پروتئین قارچ *T. harzianum* حاوی سه باند پروتئینی عمده با وزن های مولکولی ۱۶، ۳۴/۴۲ و ۵۸/۲۰ بود. گزارشات قبلی بیان کرده اند که قارچ *T. harzianum* تولید آنزیم های β-1,3-glucanase مختلف با وزن های مولکولی ۱۷، ۳۱، ۳۶، ۶۷، ۷۴، ۷۵، ۷۸

و ۱۱۰ KDa می نماید (El-Katatny et al., 2004;). به طور کلی، نتایج حاصله از این تحقیق نشان میدهد که القای موتاسیون توسط پرتو گاما در تقویت گلوکانازی تریکودرما مؤثر است. عوامل مختلفی میتواند با ایجاد تغییرات در فعالیت آنزیم تولیدی از یک موتانت مرتبط باشد.

## سپاسگزاری

این مقاله از اعتبارات پروژه "تولید مواد بیولوژیک به منظور کنترل عوامل بیماری زای گیاهی خاکزاد- A88A099" انجام شده و نویسندگان از همکاران گروه گیاهپزشکی و نگهداری مواد غذایی- پژوهشکده کشاورزی هسته ای و آقای مهندس عسکری که که در انجام این مطالعه ما را یاری داده اند، تشکر و قدردانی می نمایند.

منابع:

1. Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685.
2. Boisset, C., Fraschini, C., Schulein, M., Henrissat, B., and Chanzy, H. 2000. Imaging the enzymatic digestion of bacterial cellulose ribbons reveals the endo character of the cellobiohydrolase Cel6A from Humicola insolens and its mode of synergy with cellobiohydrolase Cel7A. Appl. Environ. Microbiol. 66: 1444-1452.
3. El-Katatny, M., Gudelj, M.,Robra, K.H., Elnaghy, M. and Gübitz, G. (2001). Characterization of a chitinase and an endo-ß-1, 3-glucanase from Trichoderma harzianum Rifai T24 involved in control of the phytopathogen Sclerotium rolfsii. Applied Microbiology and Biotechnology, 56: 137-۱٤۳.
4. Bradford MM.1976.A rapid and sensitive for the quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical
5. Boland GJ, Hall R (1994) Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. Canadian Journal of Plant Pathology 16: 93-10
6. Boland GJ, Hall R (1994) Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. Canadian Journal of Plant Pathology 16: 93-10
7. Gama FM, Mota M. 1998. Cellulases for oligosaccharide synthesis: a preliminary study. Carbohydrate Polymers, 37279–281