



مجموعه مقالات

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

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

تولید آنزیم های کیتینولیتیک از جدایه های موتانت قارچ *Trichoderma viride* و بررسی الگوی الکتروفوریتیک پروتئین های خارج سلولی آنها

عبداله بهاروند^۱، سمیرا شهبازی*^۲، حمیده افشارمنش^۲، محمد علی ابراهیمی^۱، حامد عسکری^۲

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. viride* از خاک ایزوله گردید و سوسپانسیون اسپور آن در دز ۲۵۰ گری پرتو گاما برای القای موتاسیون پرتوتابی شد. موتانت های قارچ *T. viride* 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 کلونیدی به عنوان سوبسترای 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. v M7* و *T. v M8* مشاهده شد. جدایه های موتانت *T. v M19*، *T. v M1*، *T. v M5*، *T. v M4* و *T. v M6* بالاترین میزان فعالیت آنزیم کیتیناز را به خود اختصاص دادند. نتایج آزمون SDS-PAGE دلالت بر حضور آنزیم های β -1,4-N acethyl glucoseaminidase و acetyl glucosaminase در جدایه های مختلف داشت. بالاترین فعالیت آنزیمی به ترتیب در جدایه *T. v M19* مشاهده شد که دارای بالاترین مقادیر آنزیم های اندوکیتینازی (۴۲ و ۳۱ KDa) و آنزیم β -1,4-N-acetyl glucoaminidase (۷۳ KDa) بود. نتایج این مطالعه به روشنی نشان می دهد که القای موتاسیون با پرتوگاما 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 viride*، کیتیناز، SDS-PAGE.

Chitinolytic enzymes production by γ -irradiated mutants of *Trichoderma viride* and investigation of their electrofortic patterns of proteins

A. Baharvand¹, S. Shahbazi*², H. Afsharmanesh², M. A. Ebrahimi¹, H. Askari²

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.

3. sshahbazi@nrcam.org

Abstract: The *Trichoderma viride* was isolated from soil and its spore suspensions were irradiated in dose of γ -radiation 250 Gy for induced mutation. The *T. viride* 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. v M7* and *T. v M8*. *Trichoderma* mutants of *T. v M19*, *T. v M1*, *T. v M5*, *T. v M4* and *T. v M6* maintained higher ability to chitinase enzyme activity, respectively. SDS-Page analysis of the crud protein indicated the presence of different strain comparison comprise β -1,4-N acethyl glucoseaminidase, acetyl glucosaminase. The highest chitinase enzyme production



مجموعه مقالات

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

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

was observed in *T. v* M19, that containing of large amount of Endo chitinase (42 KDa and 31 KDa) and β -1,4-N acethyl glucoseaminidase (73 KDa). The study clearly showed the possibility of improving the chitinase production of *Trichoderma* for biological control of plant diseases through mutation with γ -radiation.

Keywords: Enzyme activity, *Trichoderma viride*, Chitinase, SDS-PAGE

مقدمه

کنترل بیمارگر های خاکزاد گیاهی بسیار مشکل بوده به نحوی که روش های زراعی و کاربرد مواد شیمیایی در برخی از موارد نتوانسته است، سبب ممانعت از خسارت قارچ های پاتوژن بیماریزای گیاهی شود. 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 ارگانسیم 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 های ساپروبییک و قارچ های میکوریزا^۱ را افزایش می دهند و بعضی هم به عنوان محرک های رشد گیاهی مطرح بوده و سبب افزایش در اندازه گیاه، سطح و وزن برگ و نیز القای مقاومت در گیاه نسبت به پاتوژن های گیاهی می گردند. نقش دوگانه فعالیت آنتاگونیستی علیه بیمارگرهای گیاهی و بهبود حاصلخیزی خاک، باعث می شود سویه های تریکودرما جانشین خوبی برای قارچ کش ها و مواد ضد عفونی کننده تدخینی باشند. بسیاری از سویه های تریکودرما که دارای پتانسیل کنترل بیماری ها هستند، معرفی شده اند (Monte, 2001). با مشخص شدن عوامل ژنتیکی دخیل در القای مقاومت، امکان ایجاد موتان های جدید با قابلیت های برتر برای اجرای کنترل

¹ Mychorrhiza



مجموعه مقالات

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

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

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 سولفانات می‌باشد (Gohel et al., 2004). در این پژوهش قارچ *Trichoderma viride* 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 الکتروفوریتیک 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 پیش‌تیمار کیتین پوست میگو در اسید ارتوفسفریک ۸۵٪ (w/v) برای مدت ۲۴ ساعت در 4°C انجام گرفت تا خاصیت کلونیدی در کیتین افزایش پیدا کند به نحوی که به آسانی توسط آنزیم مورد استفاده قرار گیرد. بعد از پیش‌تیمار 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 70°C - برای مدت ۲۴ ساعت منجمد گردید و با استفاده از خشک‌کن انجمادی برای مدت ۴۸ ساعت خشک گردید و تا اندازه ۱۲۵-۵۳ میکرون آسیاب شد.

تولید آنزیم کیتیناز

جدایه‌های قارچ *T. viride* (موتانت و وحشی) - کلکسیون گروه پژوهشی گیاه پزشکی و نگهداری مواد غذایی پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای) بر روی محیط کشت MYG agar حاوی 5 g.L^{-1} عصاره مالت، $2/5\text{ g.L}^{-1}$ عصاره مخمر، 10 g.L^{-1} گلوکز و 20 g.L^{-1} آگار کشت داده شدند و در دمای 28°C گرمخانه‌گذاری گردیدند. با استفاده از محلول سیلین از پلیت‌های هفت روزه حاوی اسپور، سوسپانسیون اسپوری با جمعیت $10^7-10^8\text{ spore.ml}^{-1}$ تهیه گردید. کشت اولیه سوسپانسیون اسپوری در محیط *Trichoderma complete medium* (TCM) حاوی ۱ گرم در لیتر باکتوپیتون، $0/3$ گرم در لیتر اوره، ۲ گرم در لیتر KH_2PO_4 ، $1/4$ گرم در لیتر $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ، $0/3$ گرم در لیتر $\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ ، $0/3$ گرم در لیتر $\text{CaCl}_2.6\text{H}_2\text{O}$ ، $0/05$ گرم در لیتر $\text{FeSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ ، $0/02$ گرم در لیتر MnSO_4 ، $0/02$ گرم در لیتر ZnSO_4 و $0/02$ گرم در لیتر $\text{CoSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ و ۲ میلی‌لیتر در لیتر توئین انجام گرفت. pH محیط کشت TCM بر روی ۵/۵ تنظیم گردید و به آن $0/3$ ٪ (w/v) گلوکز افزوده شد. انجام عمل تخمیر در محیط کشت TCM در ارلن مایر ۲۵۰ ml حاوی ۵۰ ml محیط TCM در دمای 28°C به مدت ۲۴ ساعت و ۱۸۰ rpm انجام گرفت و بعد از مدت زمان فوق اسپورها تبدیل به حالت رویشی میسلیم گردیدند. با استفاده از سانتریفوژ کردن در ۴۵۰۰ rpm به مدت ۷ دقیقه میسلیم‌ها از محیط TCM جداسازی شدند و جهت القای تولید آنزیم‌های



مجموعه مقالات

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

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

هیدرولیتیک میسلیموم های شسته شده با سیلین به ارلن مایر ۵۰۰ ml حاوی ۵۰ ml محیط *Trichoderma* fermentation (TFM) medium (مشابه ترکیبات محیط TCM، اما بدون باکتوپیتون و گلوکز) انتقال داده شد. این محیط در pH ۵/۵ تنظیم شده بود و برای القای قارچ به تولید آنزیم های کیتیناز به آن مقدار ۰/۵٪ (w/v) کیتین کلونیدی اضافه شده بود. شرایط رشد مشابه شرایط قبل در ۱۸۰ rpm و دمای ۲۸ °C به مدت ۴۸ ساعت انجام شد. بعد از مدت زمان فوق میسلیموم های قارچ توسط سانتریفیوژ کردن در ۴۵۰۰ rpm به مدت ۷ 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 ۳ میلی لیتر از معرف بردفورد در داخل لوله آزمایش ریخته شد و به آن ۱۵۰ 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 ۵۹۵ نانومتر با استفاده از اسپکتروفوتومتر قرائت گردید و با استفاده از نمودار استاندارد ترسیم شده با پروتئین خالص (BSA) Bovine serum albumin، 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 ۲۰۰ میکرولیتر مایع فوقانی محیط تخمیر TFM حاوی آنزیم کیتیناز، ۲۰۰ میکرولیتر بافر استات پتاسیم ۱۵ میلی مولار (pH ۵/۵) که حاوی ۰/۵ گرم در لیتر کیتین کلونیدی می باشد، تهیه و در حمام آبگرم دمای ۳۷ 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. ۱۰۰ میکرولیتر بافر پتاسیم تترابورات ۰/۸ مولار با (PH ۸/۹) افزوده و به مدت ۳ دقیقه در آب جوش قرار گرفت. ۳ میلی لیتر معرف DMAB (۱۰ گرم در ۱۰۰ میلی لیتر مخلوط ۱۲/۵٪ اسید استیک گلاسیال و ۸۷/۵٪ اسید کلریدریک ۱۰ نرمال) به محلول فوق افزوده شد و در آب جوش به مدت ۵ دقیقه قرار داده و سپس در آب سرد قرار دادیم و بلافاصله جذب نوری محلول در طول موج ۵۴۴ 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 (۱۹۷۰) با استفاده از ژل متراکم کننده ۴٪ و ژل تفکیک کننده ۱۲/۵٪ انجام شد. جهت آماده سازی نمونه پروتئینی حاوی کمپلکس های آنزیمی، ابتدا مقدار ۵ ml از مایع فوقانی محیط تخمیر TFM از هر یک از نمونه های حاصل از تخمیر های تولید آنزیم (سلولاز، کیتیناز و گلوکاناز) با مقدار ۵ ml از استون سرد (۲۰ °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 نمونه ها، مقدار ۱۰۰ μl آب مقطر دوبار تقطیر به آنها اضافه شد و به خوبی مخلوط گردید. سپس ۱۰۰ μl از بافر نمونه



مجموعه مقالات

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

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

به آنها اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شد و به مقدار ۲۰ µl 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 نسبت های ۱:۱:۸ رنگبری گردید.

آنالیز آماری

کلیه نتایج آزمایشات با استفاده از آنالیز واریانس (ANOVA) و مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن در سطح آمای ۰/۰۵ < P 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 پرتوتابی 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. viride* با جمعیت 1×10^6 spore/ml تهیه گردید و در دز ۲۵۰ Gy پرتوتابی 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°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⁻¹ تنظیم گردید. بعد از تلقیح اسپورها در محیط TCM و گرمخانه گذاری آنها در 28°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 گرمخانه گذاری شدند. سپس نمونه‌ها بعد از زمان فوق سانتریفیوژ شدند و مایع فوقانی آنها برای اندازه گیری غلظت پروتئین خارج سلولی و اندازه گیری 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 کلوییدی برای قارچ وحشی *T. viride* 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 Tv M7 و Tv M8 مشاهده می‌شود. میزان تولید پروتئین خارج سلولی از مقدار ۰/۰۱۹ الی ۰/۰۸۳ mg/ml متغیر بود. پایین

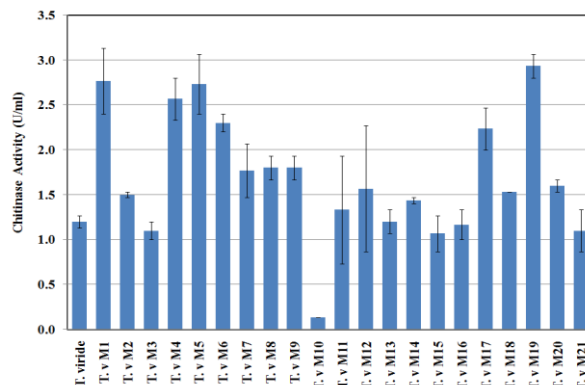
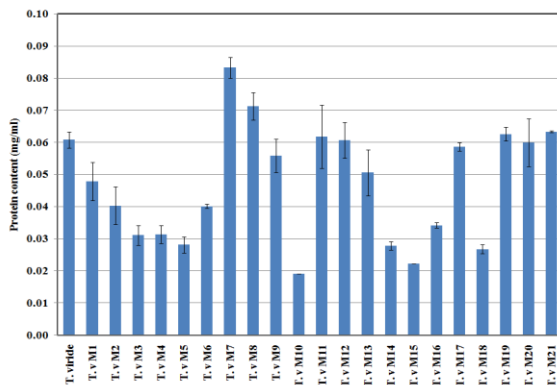


مجموعه مقالات

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

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

ترین میزان تولید پروتئین خارج سلولی در جدایه موتانت Tv M10 مشاهده گردید. فعالیت آنزیم کیتیناز قارچ وحشی *T. viride* و جدایه های موتانت آن با استفاده از کیتین کلونیدی به عنوان سوبسترای اندازه گیری فعالیت آنزیمی اندازه گیری شد و نتایج آن در شکل ۳-۲۵ نشان داده شده است. کلیه نتایج در سطح آماری ۰/۰۵ دارای اختلاف معنی دار آماری بودند. بالاترین فعالیت آنزیم کیتیناز به ترتیب در جدایه های موتانت Tv M19، Tv M1، Tv M5، Tv M4 و Tv M6 مشاهده گردید. میزان فعالیت آنزیم کیتیناز در قارچ وحشی *T. viride* و جدایه های موتانت آن از ۰/۱۳ الی ۲/۹۳ U/ml متغیر بود. پایین ترین میزان فعالیت آنزیم کیتیناز در جدایه موتانت Tv M10 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. viride* و جدایه های موتانت آن

بررسی پروفایل پروتئینی آنزیم های کیتیناز در قارچ *T. viride* و جدایه های موتانت آن

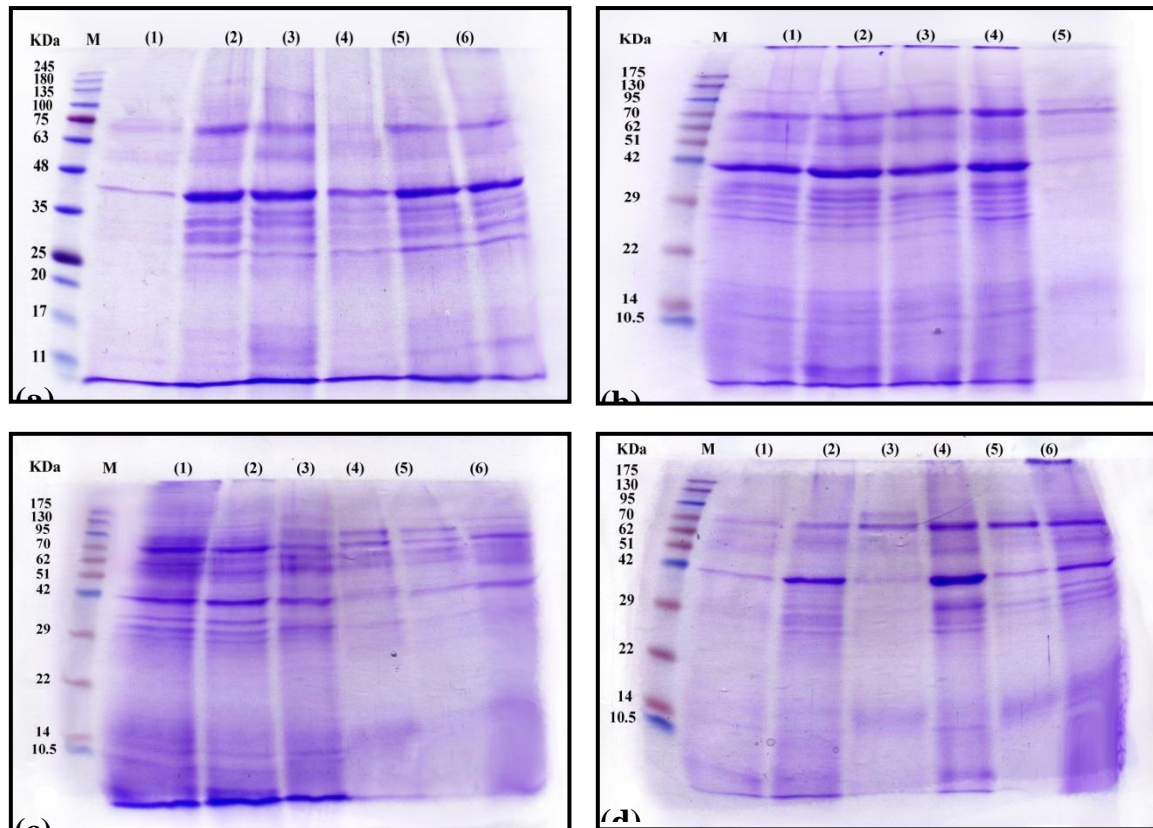
شکل ۲- (a)، پروفایل پروتئین آنزیم های کیتیناز در قارچ *T. viride* و جدایه های موتانت آن (Tv M1 الی Tv M5) را نشان می دهد. کلیه نمونه های مورد مطالعه در این پروفایل پروتئینی باند های متعددی را در محدوده وزن مولکولی ۲۴۵ KDa-۱۱۱ KDa نشان می دهند. در کلیه جدایه های موتانت باند پروتئینی شاری در وزن مولکولی ۴۲ KDa ایجاد گردید که بیانگر آنزیم اندوکیتیناز (Chit42) بود. جدایه های موتانت Tv M1، Tv M2، Tv M4، و Tv M5 نسبت به جدایه Tv M3 و همچنین قارچ وحشی *T. viride* بیان آنزیمی بالاتری را از خود نشان دادند. همچنین آنزیم β -(1,4)-N-acetylglucosaminidases با وزن مولکولی ۷۳ KDa در جدایه های موتانت Tv M1، Tv M2، Tv M4، و Tv M5 و قارچ وحشی *T. viride* قابل مشاهده بود. بالاترین بیان این آنزیم در این پروفایل پروتئینی در جدایه موتانت Tv M1 مشاهده گردید. قارچ وحشی *T. viride* باند ضعیفی از این آنزیم را از خود نشان می داد.



مجموعه مقالات

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

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



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

(a): به ترتیب (۱): قارچ وحشی *T. viride*، (۲): Tv M1، (۳): Tv M2، (۴): Tv M3، (۵): Tv M4، (۶): Tv M5 و M: مارکر پروتئین.

(b): به ترتیب (۱): Tv M6، (۲): Tv M7، (۳): Tv M8، (۴): Tv M9، (۵): Tv M10 و M: مارکر پروتئین.

(c): به ترتیب (۱): Tv M11، (۲): Tv M12، (۳): Tv M13، (۴): Tv M14، (۵): Tv M15، (۶): Tv M16 و M: مارکر پروتئین.

(d): به ترتیب (۱): قارچ وحشی *T. viride*، (۲): Tv M17، (۳): Tv M18، (۴): Tv M19، (۵): Tv M20، (۶): Tv M21 و M: مارکر پروتئین.

پروتئین.

جدایه موتانت Tv M2 باند آنزیمی ضعیفی را در وزن مولکولی ۵۷ kDa از خود نشان داد که احتمالاً متعلق به خانواده اندوکیٹینازها می باشد. کلیه جدایه‌های موتانت در این پروفایل دارای باند های پروتئینی متعددی در وزن مولکولی ۲۸، ۳۱،



مجموعه مقالات

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

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

۳۳ و ۳۶ KDa بودند که متعلق به خانواده اندوکیتینازها می باشند. این باندهای آنزیمی در جدایه موتانت Tv M3 نسبت به دیگر جدایه های موتانت ضعیفتر بود و همچنین در پروفایل قارچ وحشی *T. viride* هیچکدام از این باندها وجود نداشت. بعلاوه جدایه های موتانت Tv M2، Tv M3، Tv M4 و Tv M5 دارای باند آگروکیتیناز با وزن مولکولی KDa ۳۹ بودند که این باند در جدایه وحشی قارچ *T. viride* مشاهده نشد. جدایه موتانت Tv M1 نیز باند آگروکیتینازی ضعیفی در وزن مولکولی ۳۹ KDa ایجاد کرده بود. شکل ۲- (b)، پروفایل پروتئینی آنزیم های کیتیناز در جدایه های موتانت قارچ وحشی *T. viride* (جدایه های موتانت Tv M6 الی Tv M10) را نشان می دهد. کلیه نمونه های مورد مطالعه در این پروفایل پروتئینی دارای باند های آنزیمی متعددی در محدوده وزن مولکولی ۱۷۵-۱۰/۵ KDa بودند. باند آنزیمی شارپی مربوط به آنزیم اندوکیتیناز (Chit 42) با وزن مولکولی ۴۲ KDa در جدایه های موتانت Tv M6، Tv M7، Tv M8 و Tv M9 قابل مشاهده بود. جدایه موتانت Tv M10 فاقد باند آنزیمی اندوکیتیناز ۴۲ KDa بود. همچنین کلیه جدایه های موتانت در این پروفایل پروتئینی حاوی باند آنزیم N-استیل گلوکوآمینیداز با وزن مولکولی ۷۳ KDa بودند. شدت این باند آنزیمی در جدایه های Tv M9 و Tv M8 بالاتر از دیگر جدایه های موتانت بود. همچنین جدایه های موتانت Tv M6، Tv M7، Tv M8 و Tv M9 دارای باند های آنزیمی متعددی در وزن های ۲۷، ۲۹، ۳۱، ۳۳ و ۳۶ KDa بودند. بالاترین فعالیت آنزیم اندوکیتیناز ۳۶ KDa در جدایه Tv M9 و بعد از آن در جدایه های Tv M7 و Tv M6 مشاهده گردید. جدایه های موتانت Tv M8 و Tv M10 فاقد این باند آنزیمی بودند. شکل ۲- (c)، پروفایل پروتئین آنزیم های کیتیناز در جدایه های موتانت قارچ وحشی *T. viride* (جدایه های موتانت Tv M11 الی Tv M16) را نشان می دهد. کلیه نمونه های مورد مطالعه در این پروفایل پروتئینی دارای باند های آنزیمی متعددی در محدوده وزن مولکولی ۱۷۵-۱۰/۵ KDa بودند. بالاترین بیان آنزیم اندوکیتیناز (Chit 42) با وزن مولکولی ۴۲ KDa در جدایه های موتانت Tv M11، Tv M12 و بعد از آنها Tv M13 و Tv M16 مشاهده گردید. دو جدایه موتانت Tv M14 و Tv M15 باند های اندوکیتینازی ضعیفی در وزن مولکولی ۴۲ KDa ایجاد کردند. همچنین بالاترین بیان آنزیم N-استیل گلوکوآمینیداز با وزن مولکولی ۷۳ KDa در جدایه Tv M11 و Tv M12 مشاهده گردید. بعلاوه جدایه های موتانت Tv M14 و Tv M15 دارای باند آنزیمی متفاوتی با وزن مولکولی ۱۰۲ KDa مربوط به آنزیم N-استیل گلوکوآمینیداز بودند که در دیگر جدایه های موتانت در این پروفایل پروتئینی مشاهده نگردید. دو جدایه موتانت Tv M11 و Tv M12 باند های آنزیمی متعددی در وزن های مولکولی ۲۸، ۳۱ و ۳۶ KDa متعلق به خانواده اندوکیتینازها را تولید نمودند. جدایه موتانت Tv M13 تنها دارای باند آنزیمی اندوکیتیناز ۳۱ KDa (Chit 31) بود. شکل ۲- (d)، مقایسه پروفایل پروتئین آنزیم های کیتیناز در قارچ وحشی *T. viride* و جدایه های موتانت آن را نشان می دهد. کلیه نمونه های مورد مطالعه در این پروفایل پروتئین دارای باندهای آنزیمی متعددی در محدوده وزن مولکولی ۱۷۵-۱۰/۵ KDa بودند. جدایه موتانت Tv M18 دارای باند پروتئینی ضعیفی در وزن مولکولی ۱۰۲ KDa مربوط به آنزیم N-استیل گلوکوآمینیداز می باشد. این باند پروتئینی در دیگر نمونه های مورد مطالعه در این پروفایل مشاهده نشد. جدایه های موتانت Tv M19، Tv M20 و Tv M21 به ترتیب بالاترین شدت باند را در وزن مولکولی ۷۳ KDa مربوط به آنزیم N-استیل گلوکوآمینیداز ایجاد کردند. این باند آنزیمی بصورت ضعیف تر در



مجموعه مقالات

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

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

جدایه های موتانت Tv M18 و Tv M17 قابل مشاهده بود. این باند آنزیمی در قارچ وحشی *T. viride* بصورت خیلی ضعیفی قابل مشاهده بود. بالاترین بیان آنزیم اندوکیتیناز (Chit 42) با وزن مولکولی ۴۲ KDa به ترتیب در جدایه موتانت Tv M19، Tv M17 و Tv M21 مشاهده گردید. جدایه های موتانت Tv M18، Tv M20 و قارچ وحشی *T. viride* نیز مقادیر کمی از این باند آنزیمی را از خود نشان دادند. بالاترین بیان آنزیم اندوکیتیناز با وزن مولکولی ۳۱ KDa در جدایه موتانت Tv M19 مشاهده گردید. جدایه های موتانت Tv M17، Tv M20 و Tv M21 نیز باند های ضعیفی از این آنزیم را از خود نشان دادند. آنزیم اندوکیتیناز با وزن ۳۳ KDa تنها در جدایه های موتانت Tv M17 و Tv M21 قابل مشاهده بود.

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 جدایه های قارچ *T. viride*، جدایه های موتانت Tv M5، Tv M1، Tv M19، Tv M4 و Tv M6 بالاترین میزان فعالیت آنزیم کیتیناز را به خود اختصاص دادند. همانطور که در شکل ۲ نشان داده شده است جدایه موتانت Tv M19 دارای بالاترین شدت باندهای اندوکیتینازی ۴۲ و ۳۱ KDa و آنزیم β -(1,4)-N-acetyl glucoaminidase با وزن مولکولی ۷۳ KDa بود. با توجه به اینکه آنزیم اندوکیتیناز و β -(1,4)-N-acetyl glucoaminidase دارای اثر سینرژیستی بر روی یکدیگر هستند و میزان این آنزیم ها نیز بر اساس پروفایل پروتئین از شدت بالایی در این جدایه موتانت برخوردار است باعث گردیده که این جدایه موتانت در بین دیگر جدایه های موتانت قارچ *T. viride* دارای بالاترین فعالیت آنزیمی باشد. دیگر جدایه های برتر از نظر فعالیت آنزیم کیتیناز از جمله Tv M1، Tv M5، Tv M4 و Tv M6 با وجود اینکه دارای فعالیت بالایی از نظر آنزیم اندوکیتیناز ۴۲ KDa بودند ولی در مقادیر آنزیم β -(1,4)-N-acetyl glucoaminidase با یکدیگر متفاوت بودند. جدایه Tv M19 و Tv M1 از نظر فعالیت آنزیمی اختلاف معنی دار آماری ندارند، ولی بالا بودن میزان فعالیت آنزیمی Tv M19 نسبت به Tv M1 اختلاف در شدت باند آنزیم اندوکیتیناز ۳۱ KDa می باشد که جدایه Tv M19 از شدت باند بالاتری برخوردار می باشد. 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:



مجموعه مقالات

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

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

- [17]. 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.
- [18]. Agrios, G.N., 2000. Significance of plant disease. Plant Pathology. ed., Agrios, G.N. academic Press. London. pp: 25-37.
- [19]. 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.
- [20]. 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.
- [21]. 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.
- [22]. 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.
- [23]. Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685.
- [24]. Mohamadi, A. S., Shahbazi, S., Askari, H. 2014. Investigation of γ -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.
- [25]. Monte, E. 2001, Understanding *Trichoderma*, between biotechnology and microbial ecology. Int Microbiol 4:1-4.
- [26]. 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.
- [27]. Raut, J.G. and B.B. Bhombe, 1984. Longevity of *M. phaseolina* in sunflower seeds. Indian Phytopathology, 37(2): 333-334.
- [28]. 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.
- [29]. 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.