

مطالعه الگوی پروتئوم آنزیم‌های مؤثر در فرآیند مایکوپارازیتسم جدایه جهش یافته قارچ *Trichoderma harzianum*

تبسم ناصری پور^۱، سعید نصراله‌نژاد^۱، سمیرا شهبازی^۱، کامران رهنما^۱

۱- گروه گیاه پزشکی، دانشکده تولیدات گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران

۲- گروه گیاه پزشکی، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی ایران

مسئول مکاتبات: تبسم ناصری پور، پست الکترونیک: naseripour1391@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۴/۱۲

XX-XX (۲) ۶

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۵/۰۳

چکیده

این پژوهش به منظور بررسی الگوی بیان آنزیم‌های کیتیناز در جدایه‌های جهش یافته قارچ *Trichoderma harzianum* نسبت به جدایه وحشی انجام شد. ابتدا جدایه‌های گونه *T. harzianum* با دوز بهینه ۲۵۰ گری پرتو گاما، در معرض جهش قرار گرفتند. توان آنتاگونیستی جدایه‌های جهش یافته و وحشی با آزمون کشت متقابل در حضور بیمارگر گیاهی *Sclerotinia sclerotiorum* مورد بررسی قرار گرفت. تمامی آنالیزهای آماری با نرم‌افزار SAS و آزمون حداقل اختلاف معنی دار (LSD) انجام شد. پروفایل پروتئینی آنزیم‌های تولید شده کلیه جدایه‌ها با آزمون الکتروفورز SDS-PAGE و الگوی پروتئوم گونه وحشی به همراه جدایه جهش یافته Th M8 با سوبسترای کیتین کلونیدی و با استفاده از تکنیک الکتروفورز دوبعدی و نرم‌افزار ImageMaster 2D Platinum مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که اکثر جدایه‌های جهش یافته نسبت به جدایه وحشی در تولید آنزیم‌های خارج سلولی کیتیناز، از نظر آماری در سطح پنج و یک درصد دارای اختلاف معنی دار بودند. همچنین نتایج آزمون آنتاگونیستی نشان داد، پتانسیل کنترل جدایه‌های جهش یافته نسبت به جدایه وحشی در مقابله با قارچ *S. sclerotiorum* به طور معنی داری افزایش یافته است. بیشترین و کمترین بازدارندگی به ترتیب مربوط به جدایه Th M8 با ۷۲ درصد و Th M3 با ۴۳ درصد بازدارندگی بود. از طرفی الگوی پروتئوم بر اساس تکنیک الکتروفورز دوبعدی نشان داد که لکه‌های پروتئینی جدایه جهش یافته در مقایسه با جدایه وحشی به صورت کمی و کیفی متفاوت هستند. این موضوع نشان می‌دهد که موتاسیون می‌تواند منجر به تغییر در الگوی بیان پروتئین‌های مترشح شده شود. به طور کلی نتایج این مطالعه نشان داد که تکنیک پرتو دهی گاما می‌تواند در تولید آنزیم‌های مؤثر در مایکوپارازیتسم و بهبود پتانسیل کنترل بیولوژیک در مدیریت بیماری‌های گیاهی مؤثر واقع شود.

واژه‌های کلیدی: تریکودرما، پرتو گاما، الکتروفورز یک بعدی، الکتروفورز دوبعدی، کیتیناز

مقدمه

غیرزیستی که توسعه کمی و کیفی تولیدات گیاهی را تهدید می‌کنند، مطرح شده است (Pal & Gardener, 2006). *Trichoderma harzianum* یکی از قارچ‌های مهم مورد استفاده در کنترل بیولوژیک محسوب می‌شود که سازوکارهای متعددی برای حمله به قارچ‌های بیمارگر و تقویت گیاهان دارد. یکی از سازوکارهای عمده تریکودرما، فرآیند مایکوپارازیتسم است که عبارت از تهاجم مستقیم یک قارچ به قارچ دیگر است. این فرآیند شامل رشد

مهار زیستی در مدیریت بیماری‌های گیاهی جایگاه بسیار مهمی دارد و در سال‌های اخیر توجه زیادی را به خود جلب کرده است. با توجه به تأکید سیستم‌های نوین کشاورزی بر کشاورزی ارگانیک، استفاده از عوامل مهار زیستی سازگار با محیط زیست مانند باکتری‌های پروبیوتیک گیاهی و باکتری‌ها و قارچ‌های آنتاگونیست به عنوان گزینه مناسبی برای پاسخ به بسیاری از عوامل زیستی و حتی

تریکودرما، شناسایی میزبان و اتصال به آن، سنتز و ترشح آنتی‌بیوتیک‌ها و آنزیم‌های خارج سلولی هیدرولیزکننده ترکیبات دیواره سلولی، نفوذ هیف و تجزیه کردن بافت میزبان است (Howell, 2003).

بخش مهمی از سیستم ضد قارچی تریکودرما، ژن‌های کدکننده آنزیم‌های هیدرولیتیک شامل کیتینازها، گلوکانازها، سلولازها، پروتازها، لیپازها و پکتینازها هستند. مطالعات نشان داده است که ترکیبات آنزیمی تریکودرما، سبب تحلیل رفتن موضعی دیواره سلولی قارچ بیمارگر در محل تماس می‌شوند. برخی از آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی، تخلیص شده و ژن آن‌ها کلون شده است. آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی قارچ *T. harzianum* با برخی از پروتئین‌ها مثل پروتئین‌های شبه تائوماتین به صورت هم‌افزایی عمل می‌کنند و در تقویت سازوکارهای طبیعی دفاعی گیاه، مؤثر می‌باشند (Lorito et al, 1996).

از طرف دیگر، وقوع جهش توسط عوامل جهش‌زای تصادفی (اشعه گاما)، میزان تولید پروتئین‌های خارج سلولی و آنزیم‌های هیدرولیتیک مانند کیتینازها و گلوکانازها، سرعت رشد ریشه و میزان اسپورزایی را در گونه‌های مختلف تریکودرما افزایش می‌دهد. به همین دلیل، برخی از جدایه‌های جهش یافته با تولید متابولیت‌های بیشتر و قدرت آنتاگونیستی بالا در کنترل بیمارگرهای گیاهی موفق عمل کرده‌اند (Shahbazi et al., 2014).

آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی و آنتی‌بیوتیک‌ها، در چندین عامل بیوکنترل جهش یافته مورد بررسی قرار گرفته‌اند (Howell & Stipanovic, 1983; Szekeres et al., 2004). میکروارگانیزم‌های تولیدکننده آنزیم‌های کیتیناز می‌توانند در کنترل بیولوژیک مؤثر باشند. این آنزیم‌ها به منظور به حداکثر رساندن کارایی در مهار زیستی قارچ‌های بیمارگر گیاهی دارای دیواره سلولی کیتینی، مورد نیاز می‌باشند (Delacroix et al., 1999).

تحقیقات نشان داده است که با پرتوتابی روی *Glucadium virens*، تولید آنتی‌بیوتیک ویریدین افزایش یافته و در نتیجه مهار زیستی مؤثری از خود نشان دادند

(Howell & Stipanovic, 1983). در مقایسه جدایه‌های جهش یافته و گونه وحشی *T. harzianum*، نشان داده شد که جدایه‌های جهش یافته نسبت به گونه وحشی، توانایی بیشتری برای ترشح و تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی و در نتیجه کنترل قارچ *Rhizoctonia solani*، عامل پوسیدگی ریشه گوجه‌فرنگی، دارند (Montealegre et al., 2009). همچنین مطالعات گسترده‌ای در زمینه بررسی آنزیم‌های مترشحه قارچ‌ها با کمک تکنیک پروتئومیکس انجام شده است. پیشرفت‌های بیوتکنولوژی در دهه گذشته مطالعات پروتئومیکسی توسط ژل الکتروفورز دوبعدی و تکنیک‌های اسپکترومتری جرمی، نقش پروتئین‌های متعددی شامل آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی را در مایکوپارازیتسم مشخص نموده است (Tseng et al., 2008). پروتئومیکس ثابت کرده است که تکنیک قدرتمندی برای پروتئین‌های بیان‌شونده قارچ‌ها در پاسخ به تغییرات محیطی است (Bhadauria et al., 2007).

در بیشتر مطالعات پروتئومیکسی در رابطه با قارچ *T. harzianum* بر شناسایی پروتئین‌های مترشحه تأکید شده است. این پروتئین‌ها در صنعت نیز اهمیت زیادی دارند و تحلیل‌هایی بر مبنای شناسایی آنزیم‌های مؤثر در تجزیه ترکیبات لیگنوسلولزی توسط گونه‌های تریکودرما، انجام شده است (Monteiro et al., 2010). بررسی پروتئین‌های درگیر در مایکوپارازیتسم قارچ *T. harzianum* و اثبات خصوصیت مهار زیستی آن نیز انجام شده است (Grinyer et al., 2004). شناسایی پروتئوم آنزیم‌های لیگنوسلولازی در قارچ *T. reesei* که توانایی تخریب توده زیستی لیگنوسلولزی در قارچ‌های شاخه بازیدومایکوتا و آسکومایکوتا را دارند نیز توسط (Adav et al., 2012) مورد بررسی قرار گرفته است.

با توجه به تأکید مطالعات گذشته در تولید آنزیم‌های هیدرولیتیک به وسیله قارچ *T. harzianum*، در این مطالعه بررسی الگوی بیان و افزایش تولید آنزیم‌های کیتیناز و ارتقاء توان مهار زیستی در جدایه‌ای از *T. harzianum* به‌عنوان یکی از جدایه‌های بومی ایران، با استفاده از پرتوتابی مدنظر می‌باشد.

مواد و روش‌ها

۵/۵ تنظیم شد و به آن ۰/۳٪ (وزنی حجمی) گلوکز افزوده شد. سپس در دمای ۲۸ درجه سلسیوس با سرعت ۱۸۰ دور بر دقیقه به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور متحرک قرار گرفت. بعد از مدت زمان فوق‌الذکر با استفاده از سانتریفیوژ با سرعت ۴۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۷ دقیقه میسلوم‌ها، از محیط کامل رشد تریکودرما جداسازی شدند. جهت القای تولید آنزیم‌های هیدرولیتیک، میسلوم‌های شسته شده با سیلین به محیط تخمیری تریکودرما (محیط کامل تریکودرما + ماده القاء کننده آنزیم مورد نظر به غلظت ۰/۵٪ وزنی - حجمی کیتین کلونیدی) منتقل شد. این محیط در pH ۵/۵ تنظیم شد.

آزمون کشت متقابل جدایه‌های قارچ

تریکودرما با قارچ بیمارگر: آزمون اندازه‌گیری فعالیت بازدارندگی جدایه‌های تریکودرما (وحشی و جهش یافته) علیه قارچ بیمارگر *S. sclerotiorum* با استفاده از روش کشت متقابل انجام شد. پلاک‌های میسلومی (به قطر پنج میلی‌متر) از کشت‌های تازه جدایه‌های آنتاگونیست و قارچ بیمارگر به فاصله ۱۰ میلی‌متر از لبه ظرف پتری حاوی محیط کشت PDA در مقابل یکدیگر، تحت دمای ۲۸ درجه سلسیوس در انکوباتور قرار گرفتند و بعد از ۷۲ ساعت بررسی شدند (Vasebi et al., 2012). درصد ممانعت از رشد قارچ بیمارگر بر اساس فرمول زیر محاسبه شد.

$$IG \% = (1 - Cn/Co) \times 100$$

در این فرمول Cn میانگین قطر پرگنه‌های بیمارگر در حضور آنتاگونیسم و Co میانگین قطر پرگنه‌های قارچ کنترل بیمارگر است.

الکتروفورز و تعیین وزن مولکولی آنزیم‌های

کیتیناز تولیدی جدایه‌های مختلف *T. harzianum*: آزمون الکتروفورز یک بعدی بر اساس روش Laemmli (1970) با استفاده از ژل متراکم کننده ۴٪ و ژل تفکیک کننده ۱۲/۵٪ برای تمامی جدایه‌های جهش یافته و وحشی با سوبسترای کیتین کلونیدی انجام شد. جهت آماده‌سازی نمونه پروتئینی شامل کمپلکس‌های آنزیمی، ابتدا مقدار پنج میلی‌لیتر از مایع رویی محیط تخمیر TFM از هر یک از نمونه‌های حاصل از تخمیرهای تولید آنزیم (کیتیناز) با مقدار پنج میلی‌لیتر از استون سرد مخلوط شد. سپس رسوب

تهیه جدایه‌ها: *T. harzianum* از مرکز

تحقیقات کشاورزی هسته‌ای کرج تهیه شد. این جدایه آن در سال زراعی ۹۰-۱۳۸۹ از خاک مزارع چغندر قند مزرعه تحقیقاتی دانشگاه فردوسی مشهد (Shahbazi et al., 2012; Shahbazi et al., 2013) جداسازی شد. همچنین قارچ بیمارگر *S. sclerotiorum* از گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان که از مزارع کلزای استان گلستان (Vakili & Rahnama, 2008) جداسازی شد، دریافت شد.

پروتئابی و خالص‌سازی جدایه‌ها: ابتدا جدایه

تریکودرما در دمای ۲۸ درجه سلسیوس بر روی محیط سیب زمینی-دکستروز-آگار (PDA) کشت گردید. سپس اسپورهای آن‌ها با استفاده از محلول سیلین (sailine) سترون (نه گرم NaCl در یک لیتر آب مقطر) از سطح پلیت‌ها شستشو شد. سوسپانسیون‌های اسپور برای انجام پروتئابی، با جمعیت یکسان 1×10^6 اسپور در میلی‌لیتر تنظیم گردید. تعداد اسپورها با استفاده از لام گلبول شمار (hemocytometer)، شمارش و بر اساس تعداد اسپور در میلی‌لیتر محاسبه گردید (ناصری‌پور و همکاران، ۱۳۹۴). پروتئابی با استفاده از دستگاه گاماسل مستقر در پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای کرج (سازمان انرژی اتمی ایران) با دوز بهینه ۲۵۰ گری انجام پذیرفت (Moradi et al., 2013).

تولید آنزیم‌های کیتینازی تریکودرما: کیتین

کلونیدی به عنوان منبع کربن برای القاء تولید آنزیم‌های کیتیناز مورد استفاده قرار گرفت. تمامی جدایه‌های جهش یافته در گونه *T. harzianum*، روی محیط کشت مالت - آگار کشت و در دمای ۲۸ درجه سلسیوس در انکوباتور قرار گرفت. سپس پلیت‌های هفت‌روزه جدایه‌ها با استفاده از محلول سیلین شستشو و سوسپانسیون اسپور با جمعیت 10^8 - 10^7 اسپور در میلی‌لیتر با استفاده از لام گلبول شمار، تهیه شد. به منظور تولید میسلومی انبوه تریکودرما کشت اولیه سوسپانسیون اسپوری در محیط کامل رشد تریکودرما TCM (Mandelset al., 1971) انجام گرفت. این محیط روی

ساعت، مرحله دو رسیدن به ولتاژ ۱۰۰۰ ولت به مدت یک ساعت و مرحله سه که رسیدن به ولتاژ ۵۲۲۵۰ ولت با سرعت ثابت ۸۰۰۰ ولت در ساعت انجام گرفت. بعد از انجام IEF در مرحله اول نوار IPG بعد از روغن گیری در داخل بافر متعادل سازی حاوی دی تیوتریتول (DTT) ۱٪ به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفت و در مرحله دوم متعادل سازی نوار IPG به مدت ۱۵ دقیقه در محلول متعادل سازی حاوی یدواستامید ۳٪ قرار داده شد. پس از تکمیل مرحله متعادل سازی، بعد دوم الکتروفورز (ژل پلی آکریل آمید ۱۲/۵٪) در آمپر ثابت ۲۰ میلی آمپر انجام گرفت. بعد از اتمام الکتروفورز، ژل از دستگاه خارج و رنگ آمیزی شد (Westermeier, 2005).

تجزیه و تحلیل داده‌ها: برای بررسی کمی و کیفی

لکه‌های پروتئینی در ژل‌های دو بعدی اسکن شده از نرم افزار ImageMaster 2D Platinum استفاده شد. با استفاده از آزمون آماری T-test، تفاوت بین درصد میانگین‌های حجمی بین تیمار و شاهد مشخص شد. انحراف معیار با نرم افزار SPSS Ver.16 تعیین شد. همچنین به منظور افزایش یا کاهش میزان بیان پروتئین‌ها در شرایط جهش و شاهد، میانگین درصد حجمی هر لکه در مرحله جهش به میانگین درصد حجمی همان لکه در مرحله شاهد تقسیم و به عنوان شاخص تغییرات بیان پروتئین (fold change) در تعیین میزان کاهش یا افزایش هر لکه پروتئینی مورد استفاده قرار گرفت. به منظور گروه بندی لکه‌های با بیان متفاوت و شناسایی لکه‌های پروتئینی هم بیان و تحلیل گروه بندی از نرم افزار PermutMatrix-1.9.3 استفاده شد.

نتایج

از میان صدها جدایه تریکودرمای پرتودیده، ۲۰ جدایه دارای بیشترین تنوع در ظاهر پرگنه و توانایی تولید اسپور نسبت به جدایه وحشی و سایر جدایه‌های جهش یافته در گونه مذکور بودند.

نتایج آزمون بازدارندگی جدایه‌های جهش یافته و وحشی *T. harzianum* علیه *S. sclerotiorum* نشان داد (شکل ۱)، بیشترین و کمترین بازدارندگی به ترتیب مربوط به جدایه Th M8 با ۷۲

پروتئینی آن، با استفاده از ساترئیفیوژ کردن با سرعت ۴۵۰۰ دور در دقیقه به مدت هفت دقیقه جمع آوری شد. بعد از خروج استون از نمونه‌ها، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر به آن‌ها اضافه شد و به خوبی مخلوط شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از بافر نمونه به آن‌ها اضافه شد و به مدت پنج دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شد و به مقدار ۲۰ میکرولیتر از نمونه‌ها در هر چاهک تزریق شد.

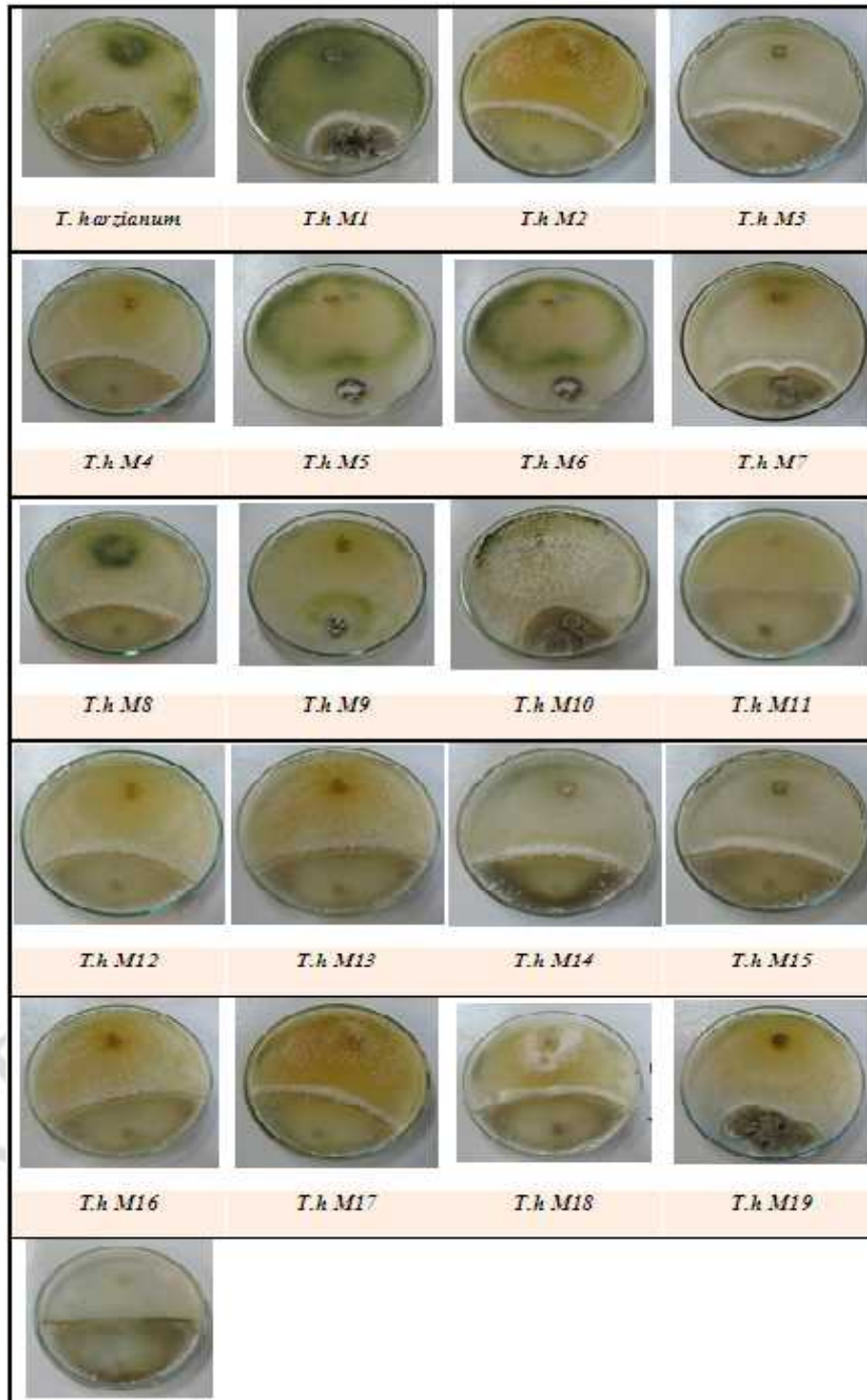
آزمون الکتروفورز در آمپر ثابت (۲۰ میلی آمپر) انجام شد و ژل الکتروفورز با استفاده از کوماسی بریلینانت بلو (R-250) رنگ آمیزی شد. برای تعیین وزن مولکولی از مارکرهای ساخت شرکت سیناژن با ۱۲ باند در محدوده وزن مولکولی ۲۴۵-۱۱ و ۱۷۵-۱۰/۵ کیلودالتون استفاده شد.

بر اساس نتایج آزمون آنتاگونیستی و تنوع باندهای آنزیمی در الکتروفورز بعد اول، جدایه جهش یافته منتخب برای آزمون دو بعدی کاندید شد. برای استخراج پروتئین از روش (Vinzant et al (2001) با تغییرات اندک استفاده شد.

تعیین غلظت پروتئین‌های به دست آمده با استفاده از روش Bradford (1976) و با بهره گیری از دستگاه اسپکتروفوتومتر انجام شد. بدین منظور از کیت خریداری شده از شرکت بیوراد استفاده شد. مقدار پروتئین بهینه برای این مرحله یک میلی گرم در هر ژل بود. این مقدار پروتئین همراه با ۳۴۰ ماکرولیتر از ترکیب (بافر) نمونه 2D (۱۰ میلی لیتر بافر ژل بالا (۶/۱ گرم تریس باز، ۰/۴ گرم SDS، HCl و آب مقطر)، پنج میلی لیتر گلیسرول، یک گرم SDS، ۰/۵ میلی لیتر محلول بروموفنل بلو، یک میلی لیتر ۲- مرکاپتواتانول، ۲۰ میلی لیتر آب مقطر دوبار تقطیر) مخلوط شد و بعد از گذشت ۳۰ دقیقه روی نوار IPG (۱۷ سانتی متری، غیرخطی، pH ۱۰-۳، شرکت بیوراد) بارگذاری شد. مدت ۱۸ ساعت به نوار IPG فرصت داده شد تا هیدراسیون مجدد در دمای آزمایشگاه انجام پذیرد و پروتئین‌ها جذب نوار IPG شوند. جهت جلوگیری از تبخیر ترکیب (بافر) و کریستاله شدن اوره به میزان دو میلی لیتر روغن معدنی روی نوار IPG ریخته شد. سپس نوارها برای انجام بعد اول در دستگاه مولتی فور II قرار گرفتند. انجام IEF در سه مرحله با آمپر ثابت (۵۰ میلی آمپر) شامل مرحله یک: رسیدن به ولتاژ ۵۰۰ ولت به مدت یک

اختلاف معنی‌دار مربوط به جدایه Th M8 و کمترین اختلاف معنی‌دار مربوط به جدایه ThM19 بود (جدول ۱).

درصد و Th M3 با ۴۳ درصد بازدارندگی بود (جدول ۱). بین همه جدایه‌ها (به‌جز جدایه Th M3 و Th M11) و جدایه شاهد، اختلاف معنی‌داری در سطح پنج درصد وجود داشت. بیشترین



شکل ۱- کشت متقابل جدایه‌های وحشی و جهش‌یافته *Trichoderma harzianum* در مقابل *Sclerotinia sclerotiorum*

Fig. 1. Dual cultures of wild and mutant strains of *Trichoderma harzianum* against *Sclerotinia sclerotiorum*.

جدول ۱- مقایسه و تفاضل میانگین درصد بازدارندگی جدایه‌های وحشی و جهش یافته *T. harzianum* در مقابل *S. sclerotiorum*

Table 1. Mean comparison and difference in inhibition of wild type (WT) and mutant strains of *T. harzianum* against *S. sclerotiorum*

Strains	Growth inhibition(%) ± SE	Mean difference to <i>T. harzianum</i> WT	Confidence interval 95% of means difference	
			The beginning of range	End of range
Th 1	67.48 ± 0.54 abcd	22.34	17.96	26.72*
Th 2	66.71 ± 1.58 abcde	21.56	17.18	25.94*
Th 3	43.37 ± 2.63 g	2.60	- 6.16	2.60*
Th 4	67.28 ± 0.99 abcde	22.13	17.76	26.51*
Th 5	66.89 ± 1.55 abcde	21.74	17.36	26.12*
Th 6	70.48 ± 1.50 ab	25.33	20.95	29.71*
Th 7	65.70 ± 1.81 abcde	20.85	16.47	25.23*
Th 8	71.25 ± 1.45 a	26.10	21.72	30.48*
Th 9	69.07 ± 1.50 abc	23.92	19.54	28.30*
Th 10	65.03 ± 3.24 bcde	19.88	15.50	24.26*
Th 11	48.37 ± 2.13 g	3.22	- 1.16	7.60*
Th 12	65.07 ± 1.76 bcde	19.92	15.54	24.30*
Th 13	64.24 ± 1.68 cde	19.10	14.72	23.48*
Th 14	64.04 ± 2.56 cde	18.89	14.51	23.27*
Th 15	65.63 ± 1.41 bcde	20.48	16.10	24.86*
Th 16	63.43 ± 2.01 de	18.28	13.90	22.66*
Th 17	70.05 ± 1.52 ab	24.90	20.52	29.28*
Th 18	61.82 ± 0.59 e	16.68	12.30	21.06*
Th 19	55.17 ± 1.03 f	10.02	5.64	14.40
Th 20	55.40 ± 1.44 f	10.25	5.87	14.63
Th WT	45.15 ± 1.67 g	-	-	-

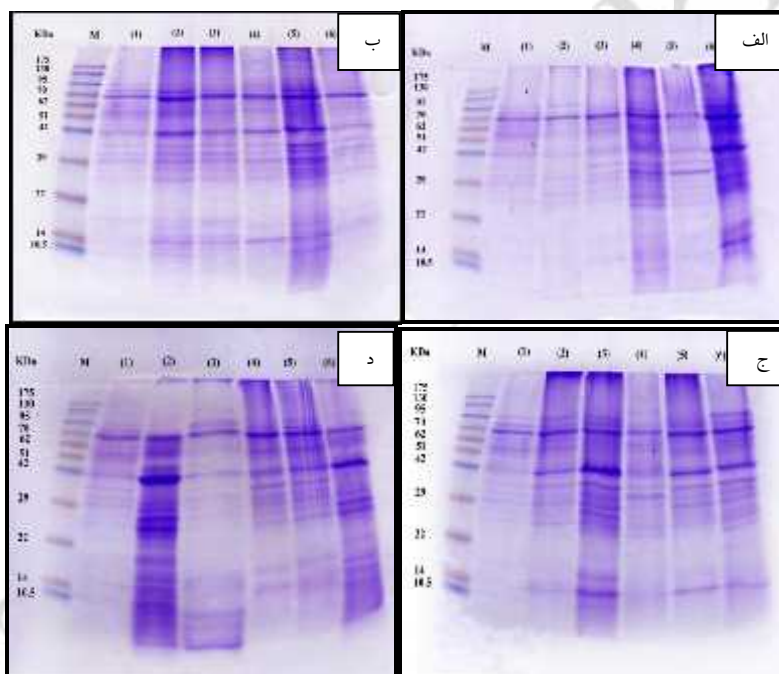
گروه‌هایی که در سطح ۰/۰۵ اختلاف معنی داری با یکدیگر دارند با علامت * مشخص شده‌اند.

کیلودالتون نیز در شکل (۲-ب) قابل مشاهده است. همچنین شدت باند آنزیمی اندو کیتیناز ۴۲ (با وزن مولکولی ۴۲ کیلودالتون) در جدایه‌های جهش یافته Th M4 و Th M1 (شکل ۲-الف)، Th M10 (شکل ۲-ب)، Th M11 و Th M15 (شکل ۲-ج)، Th M17، Th M20، Th M19 و Th M16 نسبت به دیگر جدایه‌ها و جدایه وحشی بالاتر بود. در سایر جدایه‌های جهش یافته و جدایه وحشی *T. harzianum* بیان ضعیفی از آنزیم اندو کیتیناز (با وزن مولکولی ۴۲ کیلودالتون) مشاهده شد. در جدایه Th M4 (شکل ۲-الف) باند پروتئینی واضحی با وزن مولکولی ۳۱ کیلودالتون مشاهده شد که ناشی از حضور آنزیم اندو کیتیناز ۳۱ (با وزن مولکولی ۳۱ کیلودالتون) بود. همچنین باند آنزیمی با وزن مولکولی ۳۶ کیلودالتون مربوط به اندو کیتیناز، در این جدایه جهش یافته مشاهده شد. بالاترین بیان آنزیم اندو کیتیناز ۳۳ کیلودالتون در جدایه‌های جهش یافته Th M9 و Th M8 (شکل ۲-ب) مشاهده شد. باند پروتئینی دیگری با وزن مولکولی

الگوی بیان آنزیم‌های کیتیناز در جدایه‌های وحشی و جهش یافته *T. harzianum* با تکنیک الکتروفورز یک بعدی SDS-PAGE پروفایل پروتئینی به دست آمده (شکل‌های ۲-الف، ب، ج و د)، باندهای آنزیمی متعددی را در محدوده وزن مولکولی ۱۷۵-۱۰/۵ کیلودالتون به نمایش گذاشت. همه جدایه‌ها دارای باند پروتئینی با وزن مولکولی ۶۷-۶۸ کیلودالتون (بیانگر آنزیم N-استیل گلوکوآمینیداز) بودند. بیان آنزیم مذکور به ترتیب در جدایه‌های جهش یافته Th M1، Th M2، Th M3 و Th M5 (شکل ۲-الف)، Th M7 و Th M8 (شکل ۲-ب)، کلیه جدایه‌های جهش یافته (شکل ۲-ج) و جدایه‌های Th M16، Th M17، Th M19 و Th M20 (شکل ۲-د) نسبت به جدایه وحشی *T. harzianum* بالاتر بود. پروفایل جدایه Th M6 (شکل ۲-ب) مشابه با پروفایل جدایه وحشی *T. harzianum* بود. باندهای آنزیمی N-استیل گلوکوآمینیداز با وزن‌های مولکولی بالاتر از ۷۳ کیلودالتون شامل باند آنزیمی ۸۵ و ۱۰۲

مطالعه در پروفایل پروتئینی دارای باند آنزیمی N-استیل گلوکوآمینیداز (با وزن مولکولی ۶۷ کیلودالتون) بودند. جدایه‌های جهش یافته Th M16، Th M17، Th M19 و Th M20 (شکل ۲-د) دارای بیان آنزیمی بالاتری نسبت به جدایه Th M18 بودند. از طرف دیگر، آنزیم اندوکیتیناز با وزن مولکولی ۳۱، ۳۳ و ۳۶ کیلودالتون در جدایه جهش یافته Th M17 (شکل ۲-د) مشاهده شد. در این جدایه باند واضحی با وزن مولکولی ۱۴ کیلودالتون مشاهده شد که این باند آنزیمی در جدایه Th M19 و Th M20 (شکل ۲-د) نیز قابل مشاهده است که احتمالاً نوعی از آنزیم بتاگلوکاناز باشد.

۳۶ کیلودالتون (اندوکیتیناز) در جدایه‌های جهش یافته Th M8، Th M9، Th M10 و Th M7 (شکل ۲-ب) مشاهده شد، اما جدایه جهش یافته Th M6 (شکل ۲-ب) فاقد این باند آنزیمی بود. در جدایه جهش یافته Th M10 (شکل ۲-ب) دو باند آنزیمی دیگر با وزن مولکولی ۳۱ کیلودالتون (بیانگر آنزیم اندوکیتیناز) و ۱۷ کیلودالتون مشاهده شد. دو جدایه جهش یافته Th M13 و Th M14 (شکل ۲-ج) دارای باند آنزیمی واضحی با وزن مولکولی ۲۴/۵ و ۲۶ کیلودالتون بودند که احتمالاً متعلق به خانواده اندوکیتینازها می‌باشند. این باندهای آنزیمی در پروفایل پروتئینی قارچ وحشی *T. harzianum* و دیگر جدایه‌های جهش یافته مشاهده نشد. همچنین کلیه نمونه‌های مورد



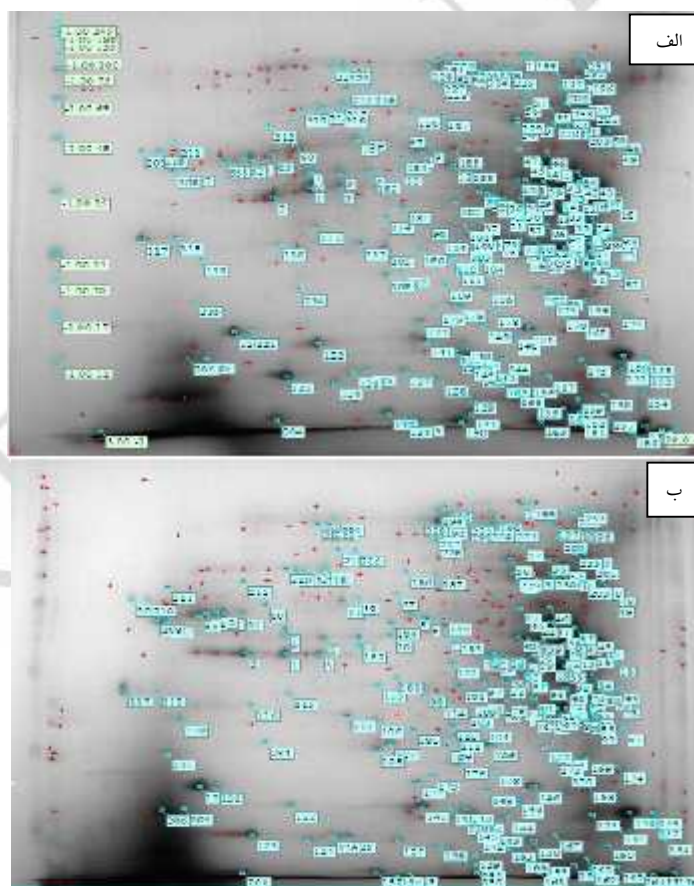
شکل ۲- پروفایل پروتئینی آنزیم‌های کیتیناز در جدایه‌های وحشی و جهش یافته گونه *T. harzianum* (الف: به ترتیب (۱): *T. harzianum* WT (۲): Th M1 (۳): Th M2 (۴): Th M3 (۵) Th M4 (۶) Th M5 و M: مارکر پروتئین)، (ب: به ترتیب (۱): *T. harzianum* (۲): Th M6 (۳): Th M7 (۴): Th M8 (۵) Th M9 (۶) Th M10 و M: مارکر پروتئین)، (ج: به ترتیب (۱): *T. harzianum* (۲): Th M11 (۳): Th M12 (۴): Th M13 (۵) Th M14 (۶) Th M15 و M: مارکر پروتئین)، (د: به ترتیب (۱): *T. harzianum* (۲): Th M16 (۳): Th M17 (۴): Th M18 (۵) Th M19 (۶) Th M20 و M: مارکر پروتئین).

Fig 2. Profile of chitinase enzyme protein in the wild and mutant strains of *T. harzianum* (a: (1): *T. harzianum* WT (2): Th M1 (3): Th M2 (4): Th M3 (5) Th M4 (6) Th M5 and M: protein marker, respectively), (b: (1): *T. harzianum* (2): Th M6 (3): Th M7 (4): Th M8 (5) Th M9 (6) Th M10 and M: protein marker, respectively), (c: (1): *T. harzianum*, (2): Th M11, (3): Th M12, (4): Th M13, (5) Th M14, (6) Th M15 and M: marker protein, respectively and D: (1): *T. harzianum*, (2): Th M16, (3): Th M17, (4): Th M18, (5) Th M19, (6) Th M20 and M: marker protein, respectively).

۱۰۷، ۱۸۴، ۱۸۶، ۱۹۹، ۲۲۷ و ۲۵۴ نیز سایر لکه‌های با افزایش بیان هستند که در جدایه جهش یافته Th M8 نسبت به مرحله شاهد دچار افزایش بیان شده‌اند. علاوه بر این، در این مطالعه کاهش در میزان بیان برخی پروتئین‌ها در محدوده PI مورد بررسی دیده شد که شامل لکه‌های با شماره ۵۲، ۶۲، ۶۴، ۶۵، ۷۳، ۹۶، ۹۹ و ۱۵۰ می‌باشد. البته شایان ذکر است که این میزان کاهش در بیان لکه‌های پروتئینی در جدایه جهش یافته Th M8 نسبت به مرحله شاهد، بر اساس میزان IF بسیار ناچیز بوده است؛ به طوری که میزان افزایش در بیان پروتئین‌ها بسیار چشم‌گیرتر از میزان کاهش آن‌هاست.

همچنین بر اساس اطلاعات به دست آمده از آنالیز شجره‌ای (شکل ۴) سه گروه بزرگ هم‌بیانی شناسایی شد که دو گروه، واجد قرابت نزدیک‌تری بودند.

الگوی پروتئوم گونه *T. harzianum* و جدایه جهش یافته Th M8 پس از جفت نمودن ژل‌های جدایه وحشی و جدایه جهش یافته و اطمینان از بالا بودن میزان تکرارپذیری و عدم وجود خطای ناشی از تفاوت غلظت در ژل‌های مورد بررسی، تعداد ۲۵۶ لکه به صورت تکرارپذیر مورد شناسایی قرار گرفت (شکل ۳-الف و ب). بر این اساس مقدار کمی درصد حجمی لکه‌های متناظر دارای تغییر بیان در ژل‌ها مشخص شد (جدول ۲). آزمون آماری T-test نشان داد که از تعداد کل لکه‌های تکرارپذیر ۲۳۸ لکه (۹۲/۹۷٪) بدون تغییر بوده، ۸ لکه (۳/۱۳٪) کاهش بیان و ۱۰ لکه (۳/۹۱٪) افزایش بیان داشتند. همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، لکه شماره ۴۶ (با وزن مولکولی ۴۲ کیلودالتون) به طور قابل ملاحظه‌ای دچار افزایش بیان شده است (۱۰۶/۴۹۸۴ برابر). لکه‌های شماره ۳۷، ۳۸، ۵۷،



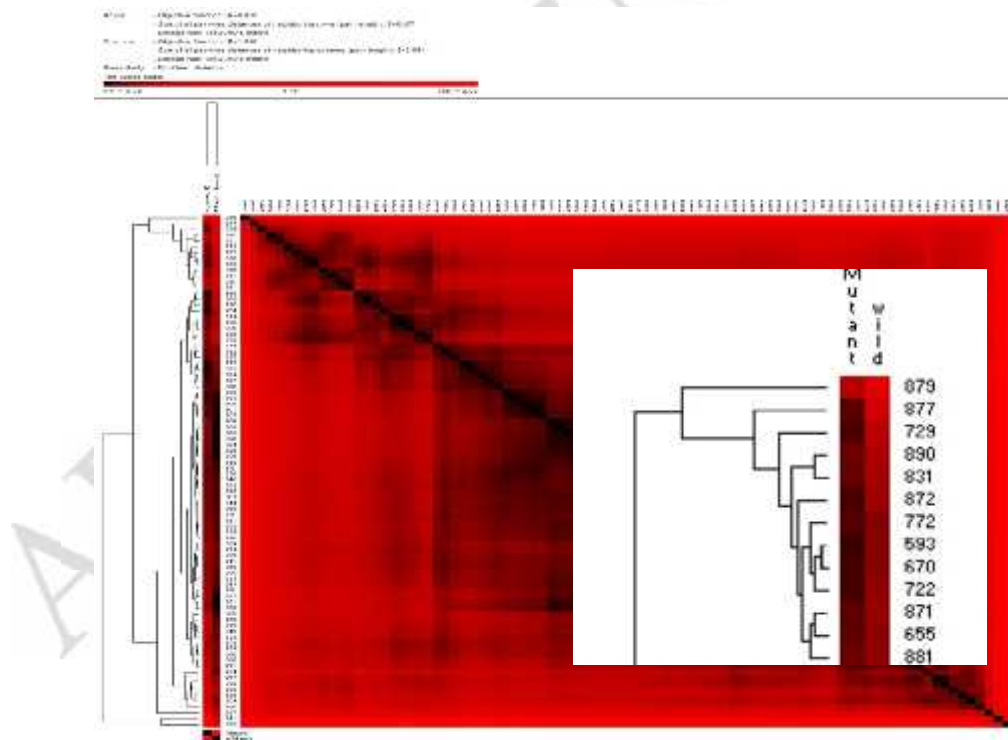
شکل ۳- الگوی پروتئوم با پیش ماده کیتین کلئیدی در محدوده pH ۱۰-۳ و با وزن مولکولی ۱۱-۲۴۵ کیلودالتون (الف) جدایه وحشی *T. harzianum*، (ب) جدایه جهش یافته Th M8.

Fig. 3. Proteomics pattern with colloidal chitin precursor, 10-3 pH and molecular weight in the range of 11-245 kDa (a) wild type isolate of *T. harzianum*, (b) mutant strain Th M8.

جدول ۲- لکه‌های پروتئینی دارای تغییر بیانی معنی‌دار در جدایه وحشی *T. harzianum* و جدایه جهش یافته Th M8.

Table 2. The protein spots with significant expression changes in mutant strains and WT isolate *T. harzianum* Th M8.

Spot Number	% Vol. value for each protein spot \pm SE		Fold change (IF)	Increase or Decrease of expression
	Control	Mutant		
37	0.216 \pm 0.003 de	0.339 \pm 0.0006 bc	1.548	Increase
38	0.122 \pm 0.002 f	0.415 \pm 0.022 b	3.416	Increase
46	0.003 \pm 0.00004 h	0.279 \pm 0.017 c	106.498	Increase
52	0.196 \pm 0.013 e	0.003 \pm 0.0005 g	0.012	Increase
57	0.189 \pm 0.009 e	0.379 \pm 0.013 bc	2.006	Increase
62	0.500 \pm 0.033 c	0.004 \pm 0.002 g	0.00071	Decrease
64	0.621 \pm 0.006 bc	0.374 \pm 0.021 bc	0.602	Decrease
65	0.378 \pm 0.003 cd	0.156 \pm 0.011 de	0.413	Decrease
73	0.279 \pm 0.015 de	0.0946 \pm 0.003 f	0.339	Decrease
96	1.0068 \pm 0.061a	0.183 \pm 0.016 d	0.171	Decrease
99	0.742 \pm 0.014 b	0.156 \pm 0.024 de	0.209	Decrease
107	0.213 \pm 0.018 de	0.645 \pm 0.019 ab	3.017	Increase
150	0.338 \pm 0.003 cd	0.004 \pm 0.0003g	0.009	Increase
184	0.011 \pm 0.008 g	0.229 \pm 0.017 cd	21.641	Increase
186	0.004 \pm 0.0003 h	0.125 \pm 0.00008 e	40.08	Increase
199	0.085 \pm 0.015 fg	0.652 \pm 0.044 a	7.688	Increase
227	0.025 \pm 0.006 g	0.119 \pm 0.006 ef	4.813	Increase
254	0.004 \pm 0.0002 h	0.249 \pm 0.016 cd	74.07	Increase



شکل ۴- آنالیز شجره در الگوی پروتئوم *T. harzianum* و جدایه جهش یافته Th M8

Fig 4. Phylogenetic analysis of proteomics pattern of spots with significant expression of the mutant isolate *T. harzianum* Th M8

بحث

در این پژوهش، آنزیم‌های N-استیل گلوکوآمینیداز برای قارچ *T. harzianum*، با وزن مولکولی ۶۷ کیلودالتون و باند ضعیف‌تری با وزن ۷۵ کیلودالتون مشاهده شد. اکثر مطالعات روی تولید آنزیم‌های کیتیناز اغلب به اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی اکتفا نموده‌اند و مطالعات کمی در رابطه با کمپلکس‌های آنزیمی مختلف تولید شده، پرداخته‌اند.

چهار اندو کیتیناز بیان شده است که توسط قارچ *T. harzianum* تولید می‌شود. (Harman et al (1998) یک اندو کیتیناز با وزن مولکولی ۵۲ کیلودالتون را گزارش کردند. اندو کیتیناز دیگری با وزن مولکولی ۴۲ کیلودالتون توسط Harman et al (1998) و مطالعات تحقیقاتی متعدد دیگر گزارش شده است. (Peberdy (1990) شبه اندو کیتینازی با وزن مولکولی ۴۰ کیلودالتون را از قارچ *T. harzianum* گزارش کرد. همچنین زمانی که قارچ *T. harzianum* CECT 2413 روی کیتین به‌عنوان منبع کربن رشد داده شد، دو اندو کیتیناز با وزن مولکولی ۳۳ و ۳۷ کیلودالتون تولید شد. (Harman et al (1998) اندو کیتینازهای مشابهی با وزن مولکولی ۳۳ کیلودالتون و ۳۱ کیلودالتون را از قارچ *T. harzianum* TM گزارش کرده‌اند.

طبق گزارشات قبلی، ژن‌های آنزیم‌های اندو کیتیناز ۴۲ کیلودالتونی (ech 42)، اندو کیتیناز ۳۳ کیلودالتونی (Chit 33) و N-استیل β دی گلوکوآمینیداز (nag 1) با دیواره سلولی قارچ‌ها یا کیتین کلونیدی (Peterbauer et al., (1996 و گرسنگی کربن (Limon et al., 1995) تحریک می‌شود. در گونه *T. harzianum* باند پروتئینی با وزن مولکولی ۲۸ کیلودالتون مشاهده می‌گردد که مشابه آن در گونه *T. atroviride* کیتوزان با وزن مولکولی ۲۸ کیلودالتون گزارش شده است.

آنالیز زیستی جدایه‌های قارچ *T. harzianum* نشان داد که تطبیق‌پذیری متابولیکی این قارچ، منجر به تولید سری‌های مختلفی از آنزیم‌های هیدرولیتیک می‌شود. همچنین حمله مستقیم گونه‌های تریکودرما به قارچ‌های بیمارگر گیاهی مبتنی بر ترشح ترکیبات

پروفایل پروتئینی آنزیم‌های کیتیناز در جدایه‌های جهش یافته قارچ *T. harzianum* با استفاده از آزمون SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت. به دلیل حجم یکسان پروتئین تزریق شده به هر چاهک، بالاتر بودن غلظت هر باند در این پروفایل پروتئینی، نشان‌دهنده اختلاف بیان آنزیم در بین جدایه‌های مختلف مورد مطالعه می‌باشد. جدایه مورد مطالعه در این تحقیق، آنزیم‌های تجزیه‌کننده کیتین (کیتیناز) ترشح می‌کند که توانایی تجزیه دیواره سلولی آسکومیسیت‌ها و بازیدیومیست‌ها را دارد (Mach et al., 1999). آنزیم‌های کیتیناز تولید شده توسط گونه‌های تریکودرما بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند؛ زیرا کیتین یکی از ترکیبات اصلی ساختار دیواره سلولی بسیاری از قارچ‌ها است (Viswanathan et al., 2006). به همین دلیل، کیتینازها در کنترل تعداد زیادی از عوامل بیماری‌زای گیاهی نقش مهمی دارند. (Harman et al (1998) گزارشی کرده‌اند که با توجه به گونه، سیستم کیتینولیتیک جدایه‌های قارچ تریکودرما، شامل پنج تا هفت آنزیم منفرد می‌باشد. در مطالعه دقیق گونه *T. harzianum* مشخص شد، این سیستم شامل دو آنزیم بتا N(۱،۴) استیل گلوکوآمینیداز (با وزن مولکولی ۱۰۲ کیلودالتون و ۷۳ کیلودالتون)، چهار آنزیم اندو کیتیناز (۵۲، ۴۲، ۳۳ و ۳۱ کیلودالتون) و یک آگزو کیتیناز (۴۰ کیلودالتون) است (Lorito et al., 1993). (Harman et al (1995) آنزیم N-استیل گلوکوآمینیداز (با وزن مولکولی ۱۰۲ کیلودالتون)، از قارچ *T. harzianum* TM در زمان رشد روی کیتین (منبع کربن) گزارش کرده‌اند. مطالعات نشان داد، این همان آنزیم مطرح شده توسط Peberdy (1990) است و اختلاف در تخمین وزن مولکولی، به علت اختلاف در روش آزمایش می‌باشد. آنزیم N-استیل گلوکوآمینیداز دیگری، از قارچ *T. harzianum* PI خالص‌سازی شد، وزن مولکولی آن ۷۲ کیلودالتون تخمین زده شد (Lorito et al., 1998). همچنین در تحقیقی توسط Firmino et al (2002) آنزیم N-استیل گلوکوآمینیداز با وزن مولکولی ۶۸ کیلودالتون از قارچ *T. harzianum* تخلیص شد.

سوبسترای کیتین کلونیدی مورد ارزیابی قرار گرفت. جدایه‌های جهش یافته نسبت به جدایه‌های وحشی، الگوی پروتئومی متفاوتی نشان دادند که تأییدکننده نتایج آزمایش قبلی ما در آنالیزهای SDS-PAGE در زمینه تولید میزان بیان متفاوت و الگوهای بیان متفاوت آنزیم‌های کیتیناز بود. هرچند در این آزمایش لکه‌های پروتئینی برای توالی‌یابی ارسال نشد، ولی بر اساس میزان وزن مولکولی و با استفاده از نرم‌افزار TagIdent سرور ExPasy به دست آوردن تعدادی از کلاس‌های پروتئینی قابل دست‌یابی است (Nasiri et al., 2011). دامنه نسبتاً بالای پروتئین‌ها با بیان متفاوت از نظر وزن مولکولی، حاکی از وجود سازوکارها و مسیرهای بیولوژیکی گسترده‌ای از این قارچ در تولید آنزیم‌ها می‌باشد. طیف گسترده لکه‌های با بیان افتراقی نشان می‌دهد که سازوکارهای گسترده‌ای در حین جهش دستخوش تغییر می‌شوند و این تغییرات حداقل در سطح پروتئین خود را نشان می‌دهد. این پروتئین‌ها عمدتاً آنزیم‌های کیتینازی بودند؛ چرا که لکه شماره ۴۶ (با وزن مولکولی ۴۲ کیلودالتون) به‌طور قابل ملاحظه‌ای دچار افزایش بیان شده است که آزمایش قبلی را تأیید می‌کند. (Grinyer et al (2004) بیان کردند که جدایه‌های تریکودرما در مقابله با قارچ‌های بیمارگر گیاهی، آنزیم‌های پروتاز را همزمان با کیتیناز و گلوکوناز تولید می‌کنند. این آنزیم‌ها می‌توانند در شرایط سخت محیطی از نظر دمایی و pH زنده بمانند.

نتیجه‌گیری کلی

به‌طور کلی، نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که القای جهش توسط پرتو گاما می‌تواند در تقویت فعالیت آنزیم‌های کیتیناز تریکودرما مؤثر باشد. عوامل مختلفی می‌تواند با ایجاد تغییرات در فعالیت آنزیم تولید شده از یک جدایه جهش یافته مرتبط باشد. تقویت فعالیت‌های آنزیمی ممکن است به‌علت افزایش سطح پروتئین‌های تنظیم‌کننده یا کوفاکتورهای تقویت‌کننده‌ی فعالیت‌های آنزیمی باشد (Chandra et al., 2009).

پیچیده‌ای از آنزیم‌هایی تجزیه‌کننده و نفوذکننده در دیواره سلول‌های قارچ است که عمده عملکرد این فرآیند به آنزیم‌های تجزیه‌کننده کیتین و گلوکان نسبت داده می‌شود که اکثر آن‌ها، جداسازی و تعیین ویژگی شده‌اند (Benitez et al., 2004).

در آزمون کشت متقابل، جدایه‌های گونه مذکور رشد عوامل بیمارگر را محدود کردند. این کاهش رشد را می‌توان مربوط به تسخیر سریع سوبسترا توسط عوامل مهار زیستی و نشت متابولیت‌های خارج سلولی این عوامل به سمت پرگنه بیمارگر نسبت داد، زیرا رشد سریع این عوامل شرایط مناسبی را برای تصاحب مکان (سطح محیط کشت) و غذا فراهم می‌کند و نشت متابولیت‌های خارج سلولی این عوامل مهار زیستی (که تولید تأخیری و بعد از رشد را دارد) این تأثیر را تکمیل می‌کنند. تحقیقات Schirmbock et al. (1994)، Kucuk & Kvan (2004) این نتایج را تأیید می‌کند. همچنین Hermosa et al. (2004) با قرار دادن بیمارگر *Fusarium Phoma beta Rosellinia necatrix* در مقابل *Botrytis cinerea* و *oxysporum f.sp dianthi* چند جدایه تریکودرما روی محیط کشت‌های مختلف به این نتیجه رسیدند که اسپورزایی و قدرت تهاجمی (رشد تریکودرما در مقابل قارچ بیمارگر) به نوع قارچ عامل بیماری و ترکیب محیط کشت بستگی دارد.

اطلاعات بسیار کمی در رابطه با سیستم پروتئومی ترشح شده بوسیله جدایه‌های جنس تریکودرما وجود دارد. علی‌رغم این موضوع، مشخص شده است که این پروتئین‌ها نقش اساسی را در توانایی کنترل زیستی برعهده داشته و جهش یافته‌های *T. harzianum* که با استفاده از پرتو دهی با اشعه فرابنفش ایجاد شدند، ویژگی‌های آنتاگونیستی بهبود یافته‌ای به همراه نرخ بالایی از پروتئین‌های مترشح را از خود نشان دادند (Szekeres et al., 2004). پروتئین‌های مترشحه عمدتاً در شکستن دیواره سلولی و یا غیرفعال ساختن آنزیم‌های دخیل در بیماری‌گری که در فرآیند آلوده‌سازی گیاهی نقش دارند، دخیل می‌باشند (Elad & Kapat, 1999).

در این مطالعه، الگوی پروتئومی در جدایه‌های جهش یافته و وحشی گونه *T. harzianum* در واکنش به

جداسازی و شناسایی پروتئین‌های مؤثر در جدایه‌های قارچ‌های رشته‌ای مانند تریکودرما می‌تواند، محققان را در طراحی استراتژی مه‌ار زیستی یاری کند.

سپاسگزاری

این مقاله با استفاده از پروژه شماره A88A099 پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی اجرا و نگارندگان از همکاری آن پژوهشگاه و گروه بیماری‌شناسی دانشکده کشاورزی گرگان تشکر و قدردانی می‌نمایند.

نتایج به‌دست آمده از این تحقیق نشان داد امکان ایجاد تغییر در تولید میزان پروتئین خارج سلولی و فعالیت آنزیم‌های کیتیناز، با کمک پرتو گاما وجود دارد و بدین ترتیب جدایه‌های قارچی پرتو دیده و جهش‌یافته با توان بالای تولید آنزیم‌های کیتیناز، پتانسیل بیشتری در مدیریت بقایای گیاهی و تولید زیست انرژی و دیگر فرآورده‌های زیستی خواهند داشت. درک تغییرات محتوی پروتئینی در مقابله با عوامل بیمارگر در جدایه‌های جهش یافته و وحشی، یکی از مهم‌ترین مراحل برای شناسایی عوامل تعیین‌کننده در کنترل زیستی می‌باشد. این امر در ابعاد گسترده‌تر، یعنی

References

- Abo-State, M.A. M., Hammad, A.I., Swelim, M. & Gannam, R.B. 2011. Enhanced production of cellulase(s) by *Aspergillus* spp. isolates from agriculture wastes by solid state fermentation. American-Eurasian Journal of Agriculture and Environmental Science, 8: 402–410.
- Abo-State, M.A.M. 2004. High-level xylanase production by radio-resistant, thermophilic *Bacillus megaterium* and its mutants in solid-state fermentation. Egyptian Journal of Biotechnology, 17: 119–137.
- Adav, S.S., Chao, L.T. & Sze, S.K. 2012. Quantitative secretomic analysis of *Trichoderma reesei* strains reveals enzymatic composition for lignocellulosic biomass degradation. Molecular and Cellular Proteomics, 10:1–15.
- Adney, W.S. Mohagheghi, A. Thomas, S.T. & Himmel, M.E. 1995. Comparison of protein content of cellulase preparations in a worldwide round-robin assay, In: Enzymatic Degradation of Insoluble Carbohydrates. American Chemistry Society, 618: 256–271.
- Benitez, T., Rincon, A.M., Limon, M.C. & Codon, A.C. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. International Microbiology, 7: 249–260.
- Bhadauria, V., Popescu, L., Zhao, W.S. & Peng, Y.L. 2007. Fungal transcriptomics. Microbiology Research, 162: 285–298.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. Analytical Biochemistry, 7: 248–54.
- Durand, H. Clanet, M. & Tiraby, G. 1988. Genetic improvement of *Trichoderma reesei* for large scale cellulase production. Enzyme Microbiology Technology, 10:341–346.
- Elad, Y. & Kapat, A. 1999. The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. European Journal of Plant Pathology, 105: 177–189.
- Firmino, A.P., Ulhoa, C.J., Sousa, M.V., Ferreira Filho, E.X. & Ricart, C.A. 2002. Involvement of G proteins and cAMP in the production of chitinolytic enzymes by *Trichoderma harzianum*. Brazilian Journal of Microbiology, 33:169–173.
- Grinyer, J., McKay, M., Nevalainen, H. & Herbert, B.R. 2004. Fungal proteomics: initial mapping of biological control strain *Trichoderma harzianum*. Current Genetics, 45:163–9.
- Grinyer, J., Hunt, S., McKay, M., Herbert, B.R. & Nevalainen, H. 2005. Proteomics response of the biological control fungus *Trichoderma atroviride* to growth on the cell walls of *Rhizoctonia solani*. Current Genetics, 47:381–388.
- Harman, G.E. & Bjorkman, T. 1998. Potential and existing uses of *Trichoderma* and *Gliocladium* plant disease control and plant growth enhancement. In: Kubicek, C.P., Harman, G.E. (Eds.), *Trichoderma* and *Gliocladium*, Enzymes, Biological Control and Commercial Applications, 2: 229–265.
- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Review Microbiology, 2:43–56.

- Hayward, T., Hamilton, J., Tholudur, A. & McMillan, J. 2000. Improvements in titer, productivity and yield using Solka-floc for cellulase production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 84: 859–74.
- Hermosa, M.R., Keck, E., Chamorro, I., Rubio, B., Sanz, L., Vizcaíno, J.A., Grondona, I. & Monte, E. 2004. Genetic diversity shown in *Trichoderma* biocontrol isolates. *Mycological Research*, 108: 897–906.
- Howell, C.R. 2003. Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts. *Plant Disease*, 87: 4–10.
- Howell, C.R. & Stipanovic, R.D. 1983. Gliovirin, a new antibiotic from *Gliocladium virens*, and its role in the biological control of *Pythium ultimum*. *Journal of Microbiology*, 29:321-324.
- Kucuk, C. & Kvanç, M. 2003. Isolation of *Trichoderma* spp. and determination of their antifungal, biochemical and physiological features. *Turkish Journal of Biology*, 27:247–253.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680–685.
- Limón, M.C., Lora, J.M., García, I., de la Cruz, J., Llobell, A., Benítez, T. & Pintor-Toro JA. 1995. Primary structure and expression pattern of the 33-kDa chitinase gene from the fungus *Trichoderma harzianum*. *Current Genetics*, 28(5): 478-483.
- Lorito, M., Harman, G.E., Hayes, C.K., Broadway, R.M., Tronsmo, A., Woo, S.L. & Di Pietro, A. 1993. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*; Antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. *Phytopathology*, 83: 302–307.
- Lorito, M., Woo, S. L., D'Ambrosio, M., Harman, G. E., Hayes, C. K., Kubicek, C. P., & Scala, F. 1996. Synergistic interaction between cell wall degrading enzymes and membrane affecting compounds. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 9: 206–213.
- Lorito, M., Woo, S., Fernandez, I.G. & Colucc, G. 1998. Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant Resistance to fungal pathogens. *Journal of Agricultural Sciences*, 95: 7860–7865.
- Mach, R.L., Peterbauer, C.K., Payer, K., Jaksits, S., Woo, S.L., Zeilinger, S., Kullnig, C.M., Lorito, M. & Kubicek, C.P. 1999. Expression of two major chitinase genes of *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum* P1) is triggered by different regulatory signals. *Applied Environmental Microbiology*, 65:1858–63.
- Manafi Dizaji, R., Babay Ahari, A. Arzanlou, M. & Valizadeh, M. 2012. Assessment of resistance in tomato varieties under greenhouse conditions against Fusarium wilt, and biological control of the disease. *Journal of Agricultural Science and Sustainable Production*, 22:145–158. (In Persian with English summary)
- Mandels, M., Weber, J. & Parizek, R. 1971. Enhanced cellulase production by a mutant of *Trichoderma viride*. *Applied Microbiology*, 21: 152–154.
- Mehrabi Koushki, M., Zafari, D. & Rouhani, H. 2008. Study on adaptability of *Trichoderma* species with recommended fungicides for bunt of wheat and barley. *Journal of Agricultural and Natural Resources Sciences*, 14: 151–160. (In Persian with English summary)
- Montealegre, J., Valderrama, L., Herrera, R., Besoain, X. & Pérez, L.M. 2009. Biocontrol capacity of wild and mutant *Trichoderma harzianum* (Rifai) strains on *Rhizoctonia solani* 618: effect of temperature and soil type during storage. *Electronic Journal of Biotechnology*, 12: 2–3.
- Monteiro, A.S., Bonfim, M.R., Domingues, V.S., Corrêa A, J. Siqueira, E.P., Zani, C.L. & Santos, V.L. 2010. Identification and characterization of bioemulsifier-producing yeasts isolated from effluents of a dairy industry. *Bioresource Technology*, 101:5186–93.
- Moradi, R., Shahbazi, S., Ahari Mostafavi, H, Ebrahimi, M.A., Askari, H. & Mirmajlesi, S.M. 2013. Investigation of gamma radiation effects on morphological and antagonistic characteristics of *Trichoderma harzianum*. *Crop Biotechnology*, 3(4): 109–117. (In Persian with English summary)
- Nasiri, n., Ne'matzadeh, Gh., Askari, H. & Shekari, A. 2012. Proteome study, *Aelouropus littoralis* leaves under salt stress. *Journal of Cellular and Molecular Biology Biotechnology News*, 2: 35–27. (In Persian with English summary)
- Pal, K.K. & Gardener, B. 2006. Biological Control of Plant Pathogens. *The Plant Health Instructor*. 1–26.
- Peberdy, J.F. 1990. Fungal cell wall a review. *Biochemistry of cell walls and membranes in fungi*. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag, 5–24.
- Peterbauer, C.K., Lorito, M., Hayes, C.K., Harman, G.E. & Kubicek, C.P. 1996. Molecular cloning and expression of *nag1*, a gene encoding N-acetylglucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. *Current Genetics*, 30: 325–331.

- Schirmbock, M., Lorito, M., Wang, Y. L., Hayes, C. K., Arisan-Atac, I., Scala, F., Harman, G. E., & Kubicek, C. P. 1994. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 4364–4370.
- Shahbazi, S., Ahari Mostafavi, H. & Mirmajlesi, S.M. 2012. Assessing enzymes and molecular markers of *Trichoderma* mutants Endochitinases with specific STS. Iran's 3rd National Conference on Agricultural Biotechnology. Mashhad Ferdowsi University of Mashhad. (In Persian with English summary)
- Shahbazi, S., Ahari Mostafavi, H., Ebrahimi, M. A., Askari, H., Mirmajlesi, S. M. & Karimi, M. 2013. Increased activity of chitinase gene from the fungus *Trichoderma harzianum* induced mutation using gamma rays. *Journal of Biotechnology Crop Plants*, 5: 40–33. (In Persian with English summary)
- shahbazi, S., Ispareh, Kh., Karimi, M., Askari, H., & Ebrahimi, M.A. 2014. Gamma and UV radiation induced mutagenesis in *Trichoderma reesei* to enhance cellulases enzyme activity. *International Journal of Farming and Allied Sciences*, 3: 543–554. (In Persian with English summary)
- Szekeres, A., Kredics, L., Antal, Z., Kevei, F. & Manczinger, L. 2004. Isolation and characterization of protease overproducing mutants of *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiological Societies*, 233:215–222.
- Tseng, Y.H., Kokkotou, E., Schulz, T.J., Huang, T.L Winnay, J.N., Taniguchi, C.M., Tran, T., Suzuki, R., Espinoza, D.O., Yamamoto, Y., Ahrens, M.J., Dudley, A.T., Norris, A.W., Kulkarni, R.N. & Kahn, R. 2008. New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. *Nature*, 454: 1000–1004.
- Vakili, Z. & Rahnema, K. 1387. A study compatible mycelium groups (MCG) *Sclerotinia sclerotiorum* isolates from canola fields in Golestan province. *Journal of Plant Protection (Agricultural Science and Technology)*. 22 (2): 147–159. (In Persian with English summary)
- Vasebi, Y., Alizadeh, A. & Safaie, N. 2012. Biological Control of Soybean Charcoal Rot Caused by *Macrophomina Phaseolina* Using *Trichoderma harzianum*. *Journal of Agricultural Knowledge and Sustainable Production*, 22:41- 54. (In Persian with English summary)
- Viswanathan, R., Premkumari, S.M., Sundar, A.R & Kathiresan, T. 2006. Cloning partial endochitinase cDNA of *Trichoderma harzianum* antagonistic to *Colletotrichum falcatum* causing red rot of sugarcane. *Current Science*, 91: 951–956.
- Vu, V.H., Pham, T.A. & Kim, K. 2011. Improvement of fungal cellulase production by mutation and optimization of solid State Fermentation. *Mycobiology*, 39: 20–25.
- Westermeyer, R., 2005. *Electrophoresis in practice: a guide to methods and applications of DNA and Differential protein separations*. Fourth ed. Willey-VCH Publications.
- Xu, F. Wang, J. Chen, S. Qin, W. Yu, Z. Zhao, H. Xing, X. & Li, H. 2011. Strain improvement for enhanced production of cellulase in *Trichoderma viride*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 47: 53–58.

Study of proteome enzymes involved in mycoparasitism process of *Trichoderma harizanum* mutant isolate

Tabasom Naseripour¹, Saeed Nasrollah Nejad¹, Samira Shahbazi², Kamran Rahnama¹

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.

Corresponding author: Tabasom Naseripour, email: naseripour1391@ gmail.com

Received: Jul., 25, 2018

6(2) xx-xx

Accepted: Jul., 03, 2019

Abstract:

This study was conducted to investigate the expression pattern of chitinase in mutant strains of the fungus *Trichoderma harizanum*, to the wildisolate. For this purpose, the strains of *T. harizanum* were subjected to mutation with optimum doses of 250 Gy of gamma radiation. Both the anti-mutant and wild strains were studied with the dual culture on the plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. All statistical analyzes were performed with SAS software and test least significant difference (LSD). The profile protein of produced enzymes by all strains using SDS-PAGE electrophoresis and proteome pattern of wildisolate with Th M8 mutant strains by colloidal chitin substrate was investigated using two-dimensional electrophoresis techniques and software ImageMaster 2D Platinum. The results showed that the majority of mutant strains compared to wild strains in the production of extracellular enzyme chitinase, were significantly different in the 1% and 5%. The results of the test antagonist showed that the potential control mutant strains compared to wild strains of the fungus *S. sclerotiorum* cope with significantly increased. The highest and lowest inhibition is related to strain ThM8 to 72% and ThM3 to 43%, respectively. On the other hand, the proteome pattern based on, two-dimensional electrophoresis technique showed that the protein spots of mutant strains compared to wild type isolates different both quantitatively and qualitatively. This suggests that mutations can lead to a change in the pattern of expression of the protein is secreted. The results of this study showed that gamma irradiation techniques can be effective in the production of enzymes in maycoparasitism and improvement biological control potential of plant diseases to be effective in management.

Keywords: Trichoderma, gamma-ray, SDS-PAGE, 2D electrophoresis, chitinase
