

الگوی بیان آنزیم‌های مؤثر در کنترل زیستی به‌وسیله برخی جدایه‌های وحشی و جهش‌یافته قارچ *Trichoderma viride*

۱. تبسم ناصری‌پور؛ ۲. سمیرا شهبازی؛ ۳. سعید نصراله نژاد؛ ۳. کامران رهنما*

۱. دانشجوی سابق دکتری بیماری‌شناسی قارچ‌شناسی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی

گرگان، ایران

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

۳. دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۶/۱۹ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۲/۲)

چکیده

این پژوهش با هدف ایجاد جهش در قارچ *Trichoderma viride* به وسیله پرتو گاما و سپس بررسی افزایش یا کاهش بیان آنزیم‌های سلولاز و کیتیناز در جدایه‌های جهش‌یافته نسبت به جدایه وحشی صورت گرفت. القای جهش با دز بهینه ۲۵۰ گری و با استفاده از پرتوگاما انجام شد. پروفایل پروتئینی آنزیم‌های تولید شده کلیه جدایه‌ها با آزمون الکتروفورز SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت الگوی پروتئوم گونه *T. viride* به همراه جدایه جهش‌یافته Tv M21 با سوپسترای کیتین کلونیدی با تکنیک الکتروفورز دوبعدی و نرم‌افزار ImageMaster 2D Platinum ارزیابی شد. بیشترین تنوع در تولید آنزیم‌های سلولازی در جدایه‌های جهش‌یافته نسبت به جدایه وحشی در Tv M21، Tv M10، Tv M16 و Tv M14 و بیشترین تنوع در تولید آنزیم‌های کیتینازی در جدایه‌های جهش‌یافته نسبت به جدایه وحشی در Tv M21، Tv M1 و Tv M4 مشاهده شد. الگوی پروتئوم نشان داد، لکه‌های پروتئینی جدایه‌های جهش‌یافته در مقایسه با جدایه‌های وحشی به صورت کمی و کیفی متفاوت هستند. نتایج نشان داد، اشعه گاما می‌تواند تغییر در میزان تولید آنزیم‌های خارج سلولی و فعالیت آن‌ها را سبب شود. این موضوع می‌تواند در مدیریت بیماری‌های گیاهی و بهره‌وری صنعتی از آنزیم‌های مورد مطالعه مد نظر قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: القای موتاسیون، الکتروفورز دوبعدی، الکتروفورز یک بعدی، پرتو تابی گاما، تریکودرما.

A study of enzymes expression pattern involved in biologic control by some wild and mutant strains of *Trichoderma viride*

Tabasom Naseripour¹, Samira Shahbazi², Saeed Nasrollah Nejad³ and Kamran Rahnema^{3*}

1. Graduated Ph.D. Student, Plant Protection Department, Faculty of Plant production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Golestan, Iran

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

3. Associate Professor, Plant Protection Department, Faculty of Plant production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Golestan, Iran

(Received: Sep. 9, 2016 - Accepted: Feb. 20, 2017)

ABSTRACT

This study was carried out to create mutations in the fungus *Trichoderma viride* by gamma radiation (the optimal dose of 250 Gy) and then to check the increase or decrease in expression of the cellulase and chitinase enzymes in the mutant strains with respect to the wild isolates. Protein profiles were analyzed by SDS-PAGE electrophoresis. Finally, proteome pattern of mutant strains Tv M21 of *T. viride* was evaluated by colloidal chitin substrate and two-dimensional electrophoresis techniques and software ImageMaster 2D Platinum. Highest variability of cellulase enzyme production was observed in the mutant strain wild isolates in the Tv M21, Tv M10, Tv M16 and Tv M14 and the highest diversity in the production of chitinase enzyme in the mutant strain in the wild isolates Tv M21, Tv M4 and Tv M1, respectively. Proteomic pattern revealed that the protein spots of mutant strains in comparison to wild isolates were both quantitatively and qualitatively different. This finding demonstrates that mutations can lead to changes in patterns of secreted proteins, so that may improve the control potential of plant disease.

Keywords: 2D electrophoresis, gamma radiation, induction of mutation, SDS-PAGE electrophoresis, *Trichoderma*.

* Corresponding author E-mail: snasrollanejad@yahoo.com

تازه‌های تحقیق

در این پژوهش برای اولین بار الگوی پروتئومی بیان آنزیم‌های مؤثر در کنترل زیستی به‌وسیله جدایه‌های وحشی و جهش‌یافته قارچ *Trichoderma viride* با سوبسترای کیتین کلوئیدی و سلولز کلوئیدی توسط تکنیک الکتروفورز بعد اول و دوم مورد بررسی قرار گرفت.

مقدمه

یکی از قارچ‌هایی که در کنترل بیولوژیک به عنوان عامل آنتاگونیست استفاده می‌شود، جدایه‌های جنس *Trichoderma* است. گونه‌های این قارچ از قارچ‌های مهم مورد استفاده در کنترل بیولوژیک محسوب می‌شوند که به‌طور طبیعی در محیط زیست وجود دارند. گونه‌های این قارچ با تولید انواع آنزیم‌های خارج سلولی هیدرولیز کننده ترکیبات دیواره سلولی نظیر آنزیم‌های تجزیه کننده آمیلوز، پکتین، پروتئین، لیپید، کیتین و سلولز، مانع رشد عوامل بیماری‌زا شده و در نتیجه در کشاورزی و مدیریت اکوسیستم نقش مهمی ایفا می‌کنند (Ershadfath et al. 2013, Emma et al. 2008).

یکی از عوامل مؤثر در بیوکنترل استفاده از انواع آنزیم‌های هیدرولازی است که با فروپاشیدن ساختار سلولی قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی باعث نابودی آن می‌گردد. این آنزیم‌ها به منظور به حداکثر رساندن کارایی در کنترل زیستی قارچ‌های بیمارگر گیاهی دارای دیواره سلولی کیتینی، مورد نیاز می‌باشند (Delacroix et al. 1999). کیتین دومین پلیمر فراوان در طبیعت و ترکیب عمده دیواره سلولی قارچ‌ها محسوب می‌شود (Hello et al. 2006). کیتیناز- آنزیم تجزیه‌کننده کیتین- کاربردهای وسیعی در بیوتکنولوژی دارد که از جمله آن‌ها می‌توان به تولید پروتئین‌های تک یاخته، تولید کیتوالیگوساکاریدها، ایزوله کردن پروتوپلاست، هدف برای حشره‌کش‌های زیستی، تخمین زیست‌توده قارچی، کنترل حشرات و پزشکی اشاره کرد (Dahiya et al. 2006). این آنزیم‌ها همچنین بازدارنده‌های قوی بسیاری از قارچ‌های بیماری‌زای مهم گیاهی هستند و توانایی تجزیه نمودن دیواره سلولی سخت، هیف‌های بالغ، کینیدی‌ها و کلامیدوسپورها را دارند (Harighi et

2006). کیتینازها، روی دامنه وسیعی از بیمارگرها مؤثر بوده و در غلظت بالا برای گیاه غیرسمی هستند. بنابراین به عنوان گزینه مناسبی برای کنترل بیولوژیک بیماری‌های گیاهی و تقویت دفاع گیاهان در برابر بیماری‌های مختلف به شمار می‌روند. آنزیم‌های سلولاز نیز در موارد مختلفی چون صنعت چوب، صنایع غذایی و کمپوست‌سازی کاربرد دارند (Jun et al. 2011).

وقوع جهش توسط عوامل جهش‌زای تصادفی (اشعه گاما)، میزان تولید پروتئین‌های خارج سلولی و آنزیم‌های هیدرولیتیک مانند کیتینازها و گلوکانازها، اسپورزایی و سرعت رشد ریشه را در گونه‌های مختلف *Trichoderma* افزایش می‌دهد (Shahbazi et al. 2014). آنزیم‌های تجزیه کننده دیواره سلولی و آنتی‌بیوتیک‌ها، در چندین عامل بیوکنترل جهش‌یافته مورد بررسی قرار گرفته‌اند (Howell and Stipanovic 1983, Szekeres et al. 2004). هاول و اسپانویک در مطالعه‌ای نشان دادند که تولید آنتی‌بیوتیک ویریدین با پرتوتابی روی *Gliocladium virens* افزایش می‌یابد (Howell and Stipanovic 1983). همچنین در مقایسه جدایه‌های جهش‌یافته و جدایه وحشی *T. harzianum* جدایه‌های جهش‌یافته نسبت به جدایه وحشی، توانایی بیشتری برای ترشح و تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی و در نتیجه کنترل قارچ *R. solani*، عامل پوسیدگی ریشه گوجه‌فرنگی، دارا بودند (Montealegre et al. 2009).

مطالعات گسترده‌ای در زمینه بررسی آنزیم‌های مترشحه قارچ‌ها با کمک تکنیک پروتئومیکس انجام شده است. (Tseng et al. 2008). پروتئومیکس ثابت کرده است که روش قدرتمندی برای پروتئین‌های بیان‌شونده قارچ‌ها در پاسخ به تغییرات محیطی می‌باشد (Bhadauria et al. 2007). در بیشتر مطالعات پروتئومیکسی در رابطه با گونه‌های *Trichoderma*، بر شناسایی پروتئین‌های مترشحه تأکید شده است. چرا که با تخلیص و بررسی پروفایل پروتئینی آنزیم‌های خارج سلولی در طول فعالیت پارازیتسم *Trichoderma*، مشخص شده است که بخش عمده‌ای از تغییرات ایجاد شده در دیواره میزبان، نتیجه مستقیم عمل آنزیم‌های هیدرولازی *Trichoderma* است (Artigues and Vavet

۲۸ درجه سلسیوس در گرمخانه قرار گرفتند. شستشوی پلیت‌های هفت‌روزه جدایه‌ها با استفاده از محلول سیلین انجام و سوسپانسیون اسپوری با جمعیت 10^7-10^8 اسپور در میلی‌لیتر با استفاده از لام گلبول شمار، تهیه شد. کشت اولیه سوسپانسیون اسپوری در محیط کامل رشد تریکودرما (Mandels et al. 1971) به منظور تولید میسلومی انبوه تریکودرما انجام گرفت. pH محیط کشت تریکودرما روی ۵/۵ تنظیم گردید و ۳/۰٪ (وزنی حجمی) گلوکز به آن افزوده شد. سپس، به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس با سرعت ۱۸۰ دور بر دقیقه در دستگاه گرمخانه متحرک قرار گرفت. میسلوم‌ها بعد از مدت زمان مذکور با استفاده از سانتریفیوژ با سرعت ۴۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۷ دقیقه، از محیط کامل رشد تریکودرما جداسازی شدند. به‌منظور القای تولید آنزیم‌های هیدرولیتیک، میسلوم‌های شسته شده با سیلین، به محیط تخمیری تریکودرما^۱ (محیط کامل تریکودرما + ماده القاکننده آنزیم مورد نظر به غلظت ۵/۰٪ وزنی-حجمی کیتین کلوئیدی) که به صورت مایع بوده منتقل گردید. این محیط در pH ۵/۵ تنظیم شد.

آزمون الکتروفورز و تعیین وزن مولکولی آنزیم‌های کیتیناز و سلولاز تولیدی از جدایه‌های مختلف: آزمون الکتروفورز یک بعدی با استفاده از ژل متراکم‌کننده ۴٪ و ژل تفکیک‌کننده ۵/۱۲٪ (Laemmli 1970) برای تمامی جدایه‌های جهش‌یافته و وحشی انجام شد. آماده‌سازی نمونه پروتئینی شامل مجموعه‌های آنزیمی، با مخلوط نمودن پنج میلی‌لیتر از مایع رویی محیط تخمیر تریکودرما با مقدار ۵ میلی‌لیتر از استون سرد صورت گرفت. رسوب باقیمانده، پس از سانتریفیوژ کردن با سرعت ۴۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۷ دقیقه حاصل گردید. بعد از خروج استون از نمونه‌ها، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر به آن‌ها اضافه شد و به خوبی مخلوط گردید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از ترکیب (بافر) نمونه به آن‌ها اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شد. در نهایت مقدار ۲۰ میکرولیتر از نمونه‌ها در هر چاهک

سیداصل و همکاران، در (1984, Elad et al. 1985). مطالعه‌ای با بررسی تولید آنزیم کیتیناز در جدایه‌های مختلف تریکودرما گونه *T. harzianum* را گونه‌ای با توان مناسب در تولید آنزیم‌های کیتینازی دانسته و استفاده از این جدایه را در مطالعات کنترل زیستی قارچ‌های بیماری‌زا پیشنهاد کردند (Sayed-Asl et al. 2004). گرینر و همکاران، نیز در مطالعه‌ای پروتئین‌های درگیر در پارازیسیسم قارچ *T. harzianum* را بررسی و تأثیر آن‌ها را در کنترل زیستی اثبات نمودند (Grinyer et al. 2004). پروتئوم آنزیم‌های لیگنوسولولازی در قارچ *T. reesei* که توانایی تخریب توده زیستی لیگنوسولولزی در قارچ‌های شاخه بازیدومیکوتا و آسکومیکوتا را دارند نیز مورد بررسی قرار گرفته است (Adav et al. 2012). با توجه به اهمیت آنزیم‌های مترشحه از قارچ مذکور، هدف از این مطالعه بررسی تغییر بیان آنزیم‌های سلولاز و کیتیناز پس از ایجاد جهش به وسیله اشعه گاما نسبت به تریکودرمای وحشی و در نتیجه ارتقای توان کنترل زیستی در گونه *T. viride* می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه جدایه‌ها

قارچ *T. viride* از مرکز تحقیقات کشاورزی کرج تهیه شد. جدایه‌های این قارچ در سال زراعی ۹۰-۱۳۸۹ از خاک مزارع چغندرقدن مزرعه تحقیقاتی دانشگاه فردوسی مشهد (Shahbazi et al. 2012, Shahbazi et al. 2013) جداسازی گردید.

پروتئین‌های جدایه‌ها

القای جهش با دز بهینه ۲۵۰ گری و با استفاده از دستگاه گاماسل (Gamma-cell Issledovatel PX-30) انجام پذیرفت (Moradi et al. 2015).

تولید آنزیم کیتیناز و سلولاز

کیتین کلوئیدی (Shahbazi et al. 2014) و سلولز کلوئیدی (Fleming et al. 2001) به‌عنوان منبع کربن به ترتیب برای القای تولید آنزیم‌های کیتیناز و سلولاز مورد استفاده قرار گرفت. کلیه جدایه‌های جهش‌یافته، روی محیط کشت مالت - آگار کشت شده و در دمای

در نهایت رنگ‌آمیزی ژل‌ها با استفاده از کوماسی بریلیانت‌بلو R-250 به مدت یک ساعت در دمای اتاق صورت پذیرفت (Westermeier 2005).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

به منظور بررسی الگوی بیان لکه‌های پروتئینی، ژل‌ها با دستگاه ImageScanner III (ساخت شرکت Amersham Pharmacia) با فرمت Tiff اسکن و با استفاده از نرم‌افزار Image Master 2D Platinum of Melani 6.0 آنالیز شدند. سپس، تفاوت معنی‌دار حجم هر لکه نسبت به حجم کل لکه‌ها ($P \leq 0.05$) با استفاده از آزمون آماری T-test مشخص شد. فقط لکه‌های پروتئینی تکرارپذیر مورد آنالیز قرار گرفت. به منظور گروه‌بندی لکه‌های با بیان متفاوت و شناسایی لکه‌های پروتئینی هم‌بیان و تحلیل گروه‌بندی از نرم‌افزار Permut Matrix-1.9.3 استفاده گردید.

نتایج

پروفایل پروتئینی آنزیم‌های کیتیناز در جدایه‌های وحشی و جهش‌یافته گونه *T. viride*

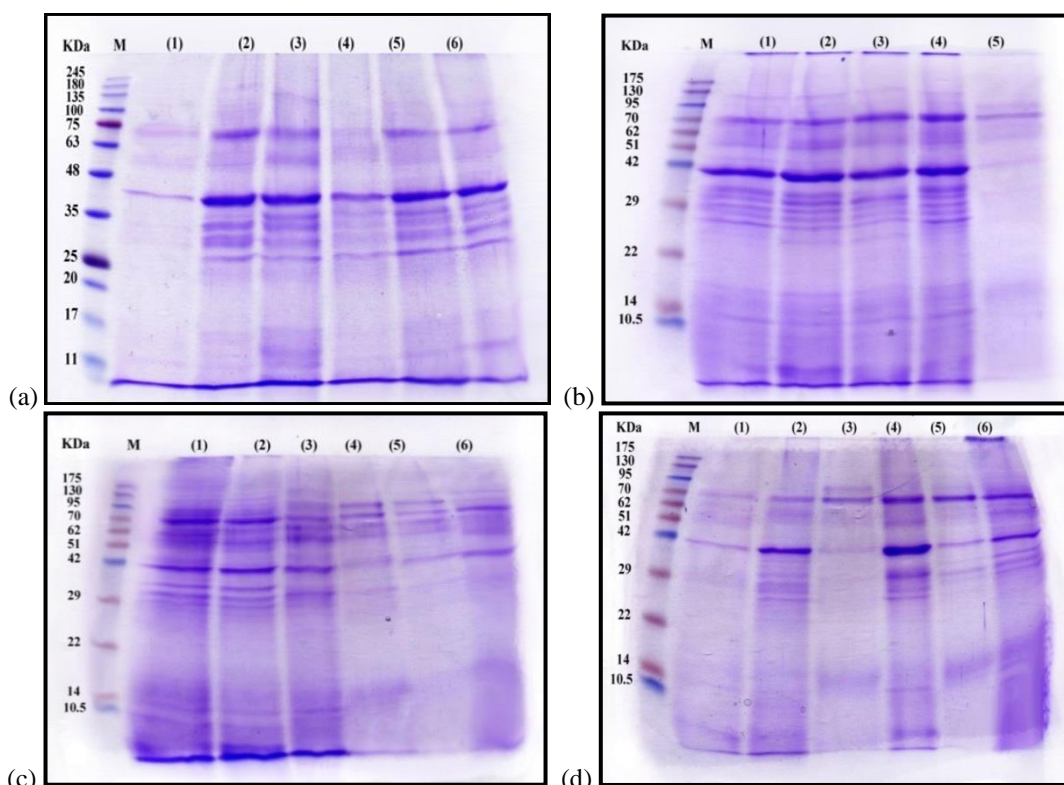
همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، کلیه نمونه‌های مورد مطالعه در پروفایل پروتئینی به‌دست آمده باندهای متعددی را در محدوده وزن مولکولی ۱۱-۲۴۵ کیلودالتون (الف) و ۱۰/۵-۱۷۵ (ب، پ و ت) نشان می‌دهد. باند پروتئینی با وزن مولکولی ۴۲ کیلودالتون مربوط به اندوکیتیناز Chit42 در کلیه جدایه‌ها به‌جز جدایه Tv M10 مشاهده شد. بیان آنزیم مذکور در جدایه‌های Tv M3، Tv M14، Tv M15، Tv M18 و Tv M20 و جدایه وحشی *T. viride* به نسبت ضعیف بود. همچنین آنزیم N-استیل گلوکوزآمینیداز با وزن مولکولی ۷۳ کیلودالتون در جدایه‌های Tv M1 تا Tv M12، Tv M19، Tv M20 و Tv M21 در پروفایل پروتئینی مورد مطالعه مشاهده شد. در جدایه جهش‌یافته Tv M2 باند آنزیمی ضعیفی با وزن مولکولی ۵۷ کیلودالتون دیده شد که احتمالاً متعلق به خانواده اندوکیتینازهاست. کلیه جدایه‌های جهش‌یافته به‌جز جدایه‌های Tv M10، Tv M14، Tv M15، Tv M16 و جدایه وحشی *T. viride* دارای باند پروتئینی با وزن

تزیق شد. سپس الکتروفورز پروتئین در آمپر ثابت ۲۰ میلی‌آمپر انجام شد. برای تعیین وزن مولکولی از مارکرهای ساخت شرکت سیناژن با ۱۲ باند در محدوده وزن مولکولی ۱۱-۲۴۵ و ۱۰/۵-۱۷۵ کیلودالتون استفاده گردید.

در آزمون دوبعدی از جدایه جهش‌یافته Tv M21 استفاده شد. استخراج پروتئین با استفاده از روش ویزانت و همکاران با تغییرات اندکی انجام گردید (Vinzant et al. 2001). تعیین غلظت پروتئین‌های به‌دست آمده با استفاده از روش برادفورد (Bradford 1976) و کیت شرکت بیوراد و با بهره‌گیری از دستگاه اسپکتروفوتومتر (Jenway, USA) صورت گرفت. مقدار پروتئین بهینه یک میلی‌گرم در هر ژل بود که همراه با ۳۴۰ ماکرولیتر از ترکیب (بافر) نمونه 2D (۱۰ میلی‌لیتر بافر ژل بالا) (۶/۱ گرم تریس باز، ۰/۴ گرم SDS، HCl و آب مقطر)، ۵ میلی‌لیتر گلیسرول، ۱ گرم SDS، ۰/۵ میلی‌لیتر محلول بروموفنل بلو، ۱ میلی‌لیتر ۲-مرکاپتواتانول، ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر دوبار تقطیر) مخلوط شد. بعد از گذشت ۳۰ دقیقه این محلول روی نوار IPG (۱۷ سانتی‌متری، غیرخطی، pH ۳-۱۰، شرکت بیوراد) بارگذاری گردید. هیدراسیون مجدد در دمای آزمایشگاه و به مدت ۱۸ ساعت انجام پذیرفت. به‌منظور جلوگیری از تبخیر ترکیب (بافر) و کریستاله شدن اوره به میزان دو میلی‌لیتر روغن معدنی روی نوار IPG ریخته شد. در نهایت نوارها برای انجام بعد اول در دستگاه مولتی‌فور II قرار گرفتند. انجام IEF طی سه مرحله با آمپر ثابت ۵۰ میلی‌آمپر، شامل رسیدن به ولتاژ ۵۰۰ ولت (یک ساعت)، رسیدن به ولتاژ ۱۰۰۰ ولت (یک ساعت) و رسیدن به ولتاژ ۵۲۲۵۰ ولت (با سرعت ثابت ۸۰۰۰ ولت در ساعت) انجام گرفت. بعد از انجام IEF، نوار IPG طی دو مرحله متعادل‌سازی شد؛ در مرحله اول نوار IPG بعد از روغن‌گیری داخل بافر متعادل‌سازی حاوی دی‌تیوتریتول (DTT) ۱٪ (۱۵ دقیقه) قرار گرفت و در مرحله دوم در محلول متعادل‌سازی حاوی یدواستامید ۳٪ (۱۵ دقیقه) قرار داده شد. بعد از شستشو با آب مقطر، بعد دوم الکتروفورز روی ژل جداکننده ۱۲/۵٪ و متراکم‌کننده ۵٪ با ابعاد ۱۸×۱۸ سانتی‌متر در آمپر ثابت ۲۰ میلی‌آمپر انجام شد.

جدایه وحشی نبود. همچنین جدایه Tv M1 دارای باند اگزوکیتینازی ضعیفی با وزن مولکولی ۳۹ کیلودالتونی است. جدایه‌های Tv M6، Tv M7، Tv M8 و Tv M9 دارای باندهای آنزیمی متعددی با وزن‌های ۲۷، ۲۹، ۳۱، ۳۳ و ۳۶ کیلودالتون هستند. در نهایت در جدایه‌های Tv M14 و Tv M15 باند آنزیمی متفاوتی با وزن مولکولی ۱۰۲ کیلودالتون مربوط به آنزیم N-استیل گلوکوآمینیداز، مشاهده گردید. جدایه جهش‌یافته Tv M18 دارای باند پروتئینی ضعیفی با وزن مولکولی ۱۰۲ کیلودالتون مربوط به آنزیم N-استیل گلوکوآمینیداز می‌باشد. این باند پروتئینی در دیگر جدایه‌های مورد مطالعه در این پروفایل مشاهده نشد.

مولکولی ۳۱ کیلودالتون متعلق به خانواده اندوکیتینازها بودند. باند پروتئینی دیگری با وزن مولکولی ۳۳ کیلودالتون (مربوط به خانواده اندوکیتینازها)، در جدایه‌های Tv M1 تا Tv M9، Tv M19 و Tv M21 قابل مشاهده بود. آنزیمی دیگر با وزن مولکولی ۲۸ کیلودالتون (مربوط به خانواده اندوکیتینازها) در جدایه‌های جهش‌یافته Tv M1 تا Tv M6، Tv M11 و Tv M12 و با وزن مولکولی ۳۶ کیلودالتون در جدایه‌های مذکور به اضافه جدایه‌های Tv M6 تا Tv M9 مشاهده شد. همچنین، در جدایه‌های جهش‌یافته Tv M2، Tv M3، Tv M4 و Tv M5 باند اگزوکیتیناز با وزن مولکولی ۳۹ کیلودالتون مشاهده گردید. این باند در



شکل ۱. پروفایل پروتئینی آنزیم‌های کیتیناز در جدایه وحشی و جهش‌یافته قارچ *T. viride* a (۱): قارچ وحشی *T. viride*، (۲): M1، (۳): M2، (۴): M3، (۵): M4 و (۶): M5. b: (۱): M6، (۲): M7، (۳): M8، (۴): M9، (۵): M10. c: (۱): M11، (۲): M12، (۳): M13، (۴): M14، (۵): M15، (۶): M16 و d: (۱): جدایه وحشی *T. viride*، (۲): M17، (۳): M18، (۴): M19، (۵): M20، (۶): M21 و M: مارکر پروتئینی

Figure 1. Profile of chitinase enzymes protein in the wild and mutant strains of *T. viride* a (1): Wild strain of *T. viride*, (2): M1, (3): M2, (4): M3, (5): M4 and (6): M5. b (1): M6, (2): M7, (3): M8, (4): M9, (5): M10. c (1): M11, (2): M12, (3): M13, (4): M14, (5): M15, (6): M16 and d (1): wild strains of *T. viride*, (2): M17, (3): M18 (4): M19, (5) M20, (6) M21 and M: marker protein.

باندهای پروتئینی متفاوتی در محدوده وزن مولکولی ۱۷۵-۱۰/۵ کیلودالتون می‌باشد. باند شارپ ایجاد شده در چاهک شماره یک (جدایه وحشی) مربوط به دو باند

پروفایل پروتئینی آنزیم‌های سلولاز در جدایه‌های وحشی و جهش‌یافته گونه *T. viride* پروفایل پروتئینی به‌دست آمده در شکل ۲، دارای

به آنزیم EG VI در این جدایه مشاهده گردید. جدایه‌های جهش‌یافته Tv M10 دارای باند آنزیمی با وزن مولکولی ۱۸ و ۴۸ کیلودالتون مربوط به آنزیم اندوگلوکاناز Cel 5A (EG II) مشاهده گردید و در جدایه‌های جهش‌یافته Tv M8، Tv M7 و Tv M6 دارای باند آنزیمی با وزن مولکولی ۲۷ کیلودالتون مربوط به آنزیم Cel 61B (EG) مشاهده شد که در سایر جدایه‌ها مشاهده نشد (شکل ۱-b-۱).

جدایه جهش‌یافته Tv M12، دارای باندهای آنزیمی با وزن‌های مولکولی ۵۶، ۵۹ و ۶۵ کیلودالتون، مربوط به آنزیم‌های Cel 7B (EG I)، Cel 6A (CBH II) و Cel 7A (CBH I) می‌باشد. آنزیم Cel 7B (EG I) با وزن مولکولی ۵۶ کیلودالتون در جدایه‌های جهش‌یافته Tv M15، Tv M17 و Tv M13 بیان بالایی را نشان داد.

در جدایه‌های Tv M12 تا Tv M16 باند پروتئینی شارپی با وزن مولکولی ۱۰۲ کیلودالتون مشاهده گردید که مربوط به آنزیم EG VI بود. اما جدایه جهش‌یافته Tv M17 فاقد این باند آنزیمی بود. جدایه‌های جهش‌یافته Tv M13 و Tv M17 دارای بیان مشابهی از آنزیم Cel 61B (EG) با وزن مولکولی ۲۷ کیلودالتون هستند. دیگر جدایه‌های جهش‌یافته در این پروفایل پروتئینی فاقد این باند آنزیمی می‌باشند. در جدایه‌های جهش‌یافته Tv M14، Tv M15، Tv M16 باند پروتئینی با وزن مولکولی ۱۷ کیلودالتون (آنزیم اندوگلوکاناز) مشاهده شد. در جدایه‌های جهش‌یافته Tv M13 تا Tv M17 باند پروتئینی مربوط به آنزیم Cel 5B (EG) با وزن مولکولی ۴۵ کیلودالتون مشاهده شد که بالاترین بیان آنزیم مربوط به جدایه جهش‌یافته Tv M13 می‌باشد (شکل ۲-c-۲).

در جدایه وحشی *T. viride* باندهای پروتئینی با وزن مولکولی ۴۹، ۵۸ و ۶۴ کیلودالتون به ترتیب مربوط به آنزیم‌های Cel 5A (EG II)، Cel 6A (CBH II) و Cel 7A (CBH I) مشاهده گردید. همچنین در جدایه وحشی *T. viride* باند ضعیفی با وزن مولکولی ۴۲ کیلودالتون نیز مشاهده شد که مربوط به آنزیم اندوگلوکاناز بوده و در جدایه‌های Tv M18، Tv M19 و Tv M20 بیان بالایی داشت. باند آنزیمی دیگری نیز در ۳۹ کیلودالتون مشاهده گردید که وزن مولکولی نزدیک

پروتئینی با وزن مولکولی نزدیک به هم (۶۴/۵ و ۶۶/۵ کیلودالتون) می‌باشد، که بیانگر آنزیم‌های Cel 6A (CBH II) و Cel 7A (CBH I) است. این آنزیم‌ها نوعی اگزوسولولاز به‌نام سلوبیوهیدرولاز می‌باشند. همچنین باندهای آنزیمی ضعیفی با وزن مولکولی ۴۱، ۴۸ و ۵۴ کیلودالتون مشاهده شد که به ترتیب مربوط به آنزیم اندوگلوکاناز، Cel 5A (EG II) و Cel 7B (EG I) می‌باشد.

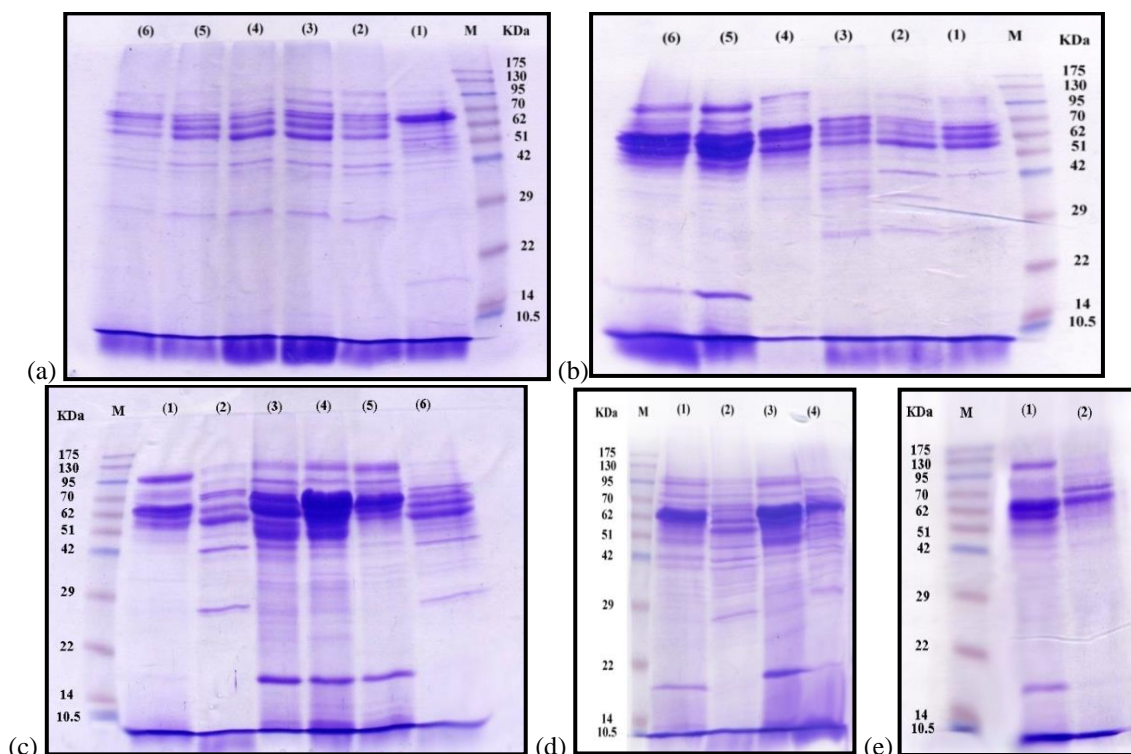
در پروفایل پروتئینی جدایه وحشی *T. viride* (شکل ۲-a) تنها حضور قابل توجه آنزیم‌های سلوبیوهیدرولاز مشهود است، اما در جدایه‌های جهش‌یافته Tv M1 تا Tv M5 باندهای پروتئینی متعددی شامل آنزیم‌های سلوبیوهیدرولاز، اندوگلوکاناز و β -گلوکوزیدازها نیز مشاهده گردید. باند پروتئینی با وزن مولکولی ۹۴ کیلودالتون مربوط به آنزیم Cel 3B (BGL) در جدایه‌های جهش‌یافته Tv M1 و Tv M2 دارای بیان ضعیفی بودند. همچنین باند آنزیمی (۷۷ کیلودالتون) با بیان بالا مربوط به آنزیم Cel 3A (BGL I)، تنها در پروفایل پروتئینی جدایه جهش‌یافته Tv M2 مشاهده گردید. لازم به ذکر است در پروفایل پروتئینی جدایه وحشی *T. viride* باند آنزیمی ضعیفی با وزن مولکولی ۱۸/۵ کیلودالتون (احتمالاً مربوط به آنزیم اندوگلوکاناز) مشاهده شد که در جدایه‌های جهش‌یافته Tv M1 الی Tv M5 این باند پروتئینی حضور نداشت. باندهای آنزیمی مربوط به آنزیم Cel 61B (EG) مشاهده شده با وزن مولکولی ۲۷ کیلودالتون تنها در جدایه‌های جهش‌یافته Tv M1 الی Tv M5 ظاهر شد. همچنین بیان آنزیمی Cel 7A (CBH I) با وزن مولکولی ۳۹ کیلودالتون به شکل ضعیفی در جدایه‌های جهش‌یافته مشاهده گردید (شکل ۲-a-۲).

در جدایه جهش‌یافته Tv M6 (شکل ۲-b) سه باند پروتئینی شارپ (۵۵، ۶۲ و ۶۶ کیلودالتون) و در جدایه جهش‌یافته Tv M8 یک باند پروتئینی شارپ (۷۶ کیلودالتون) مشاهده شد که به ترتیب بیانگر آنزیم‌های Cel 7A (CBH I)، Cel 6A (CBH II) و Cel 7B (EG I) و Cel 3A (BGL I) می‌باشند. باند پروتئینی با وزن ۷۶ کیلودالتون در جدایه جهش‌یافته Tv M9 مشاهده نشد، اما باند آنزیمی با وزن مولکولی ۱۰۲ کیلودالتون مربوط

کیلودالتون بودند. این دو آنزیم با بیان بالایی در جدایه جهش‌یافته Tv M19 نیز مشاهده شد. قارچ وحشی *T. viride* فاقد این باند آنزیمی در پروفایل پروتئینی خود بود. آنزیم Cel 5A (EG II) با وزن مولکولی ۴۸ کیلودالتون در جدایه‌های جهش‌یافته Tv و Tv M19 و M20 و قارچ وحشی *T. viride* مشاهده گردید. آنزیم دیگری با وزن مولکولی ۴۵/۵ کیلودالتون در جدایه جهش‌یافته Tv M18 مشاهده شد که احتمالاً آنزیم Cel 5B (EG) می‌باشد. در جدایه جهش‌یافته Tv و Tv M18 و M20 باندی با وزن مولکولی ۲۷/۵ کیلودالتون مربوط به آنزیم Cel 61B (EG) مشاهده گردید، که جهش‌یافته Tv M19 و قارچ وحشی *T. viride* فاقد بیان این آنزیم در پروفایل پروتئینی خود بودند. همچنین باندی با وزن مولکولی ۱۸/۵ کیلودالتون (احتمالاً Cel 45A (EGV)) در پروفایل پروتئینی *T. viride* و با بیان بالاتر در جدایه جهش‌یافته Tv M19 مشاهده گردید (شکل d-۲).

به وزن مولکولی آنزیم Cel 61A (EG IV) (۳۴ کیلودالتون) داشت که احتمالاً مربوط به یک آنزیم اندوگلوکاناز باشد. وزن‌های مولکولی بالاتر عمدتاً حضور آنزیم‌های بتاگلوکوزیداز در پروفایل پروتئینی *T. viride* (چاهک شماره ۱) نشان می‌دهد. باند آنزیمی با وزن مولکولی ۹۴ کیلودالتون، بیانگر آنزیم Cel 3B (BGL) به ترتیب با بیان نسبتاً بالا و ضعیف در جدایه جهش‌یافته Tv M19 و M20 مشاهده گردید. همچنین آنزیم Cel 3A (BGL I) نیز با وزن مولکولی ۷۵ کیلودالتون در پروفایل پروتئینی *T. viride* و جدایه‌های Tv M19 و Tv M20 و با بیان ضعیف‌تر در جدایه Tv M18 مشاهده گردید.

جدایه جهش‌یافته Tv M18 دارای مقادیر قابل ملاحظه‌ای از آنزیم Cel 6A (CBH II) با وزن مولکولی ۵۹/۵ کیلودالتون بود. جدایه مذکور به همراه جدایه جهش‌یافته Tv M20 به ترتیب دارای بیان ضعیف و قوی از آنزیم Cel 7A (CBH I) با وزن مولکولی ۶۵



شکل ۲. پروفایل پروتئینی آنزیم‌های سلولاز در جدایه‌های وحشی و جهش‌یافته قارچ *T. viride*: (a) (۱): *T. viride*، (۲): M1، (۳): M2، (۴): M3، (۵): M4، (۶): M5 (b) (۱): M6، (۲): M7، (۳): M8، (۴): M9، (۵): M10، (۶): M11 (c) (۱): M12، (۲): M13، (۳): M14، (۴): M15، (۵): M16، (۶): M17 (d) (۱): *T. viride* وحشی، (۲): M18، (۳): M19، (۴): M20 (e) (۱): M21، (۲): *T. viride* و M: مارکر پروتئینی

Figure 2. Comparison of protein profiles of cellulase enzymes in the wild and mutant strains of *T. viride*: (b) (1): *T. viride*, (2): M1, (3): M2, (4): M3, (5): M4, (6): M5 (b) (1): M6, (2): M7, (3): M8, (4): M9, (5): M10, (6): M11 (c) (1): M12, (2): M13, (3): M14, (4): M15, (5): M16, (6): M17 (d) (1): wild *T. viride*, (2): M18, (3): M19, (4): M20 (e) (1): M21, (2): *T. viride* and M: protein marker.

داد که برخی از لکه‌ها به‌صورت اختصاصی در هر کدام از جدایه‌ها بیان شده‌اند. به عنوان نمونه لکه شماره ۱۱ در فرم وحشی وجود دارد، در حالی که در جدایه جهش‌یافته دیده نمی‌شود. به نظر می‌رسد این اتفاق ناشی از کاهش بیان باشد. در رابطه با لکه شماره ۲۶ نیز همان‌طور کاهش بیان مشهود است. با این وجود، لکه‌هایی نیز به‌صورت اختصاصی در جدایه جهش‌یافته بیان شده‌اند، به عنوان نمونه لکه‌های شماره ۴ و ۵، به‌صورت اختصاصی در جدایه جهش‌یافته قابل رویت می‌باشد. مقایسه بیشتر الگوی پروتئومی دو جدایه جهش‌یافته و وحشی به‌صورت آشکارتر بیان پروتئین‌ها را به‌صورت افتراقی مشخص‌تر می‌سازد، در مورد لکه‌های شماره ۳۷، ۳۸، ۳۱ نیز به‌صورت اختصاصی در جدایه جهش‌یافته بیان شده است.

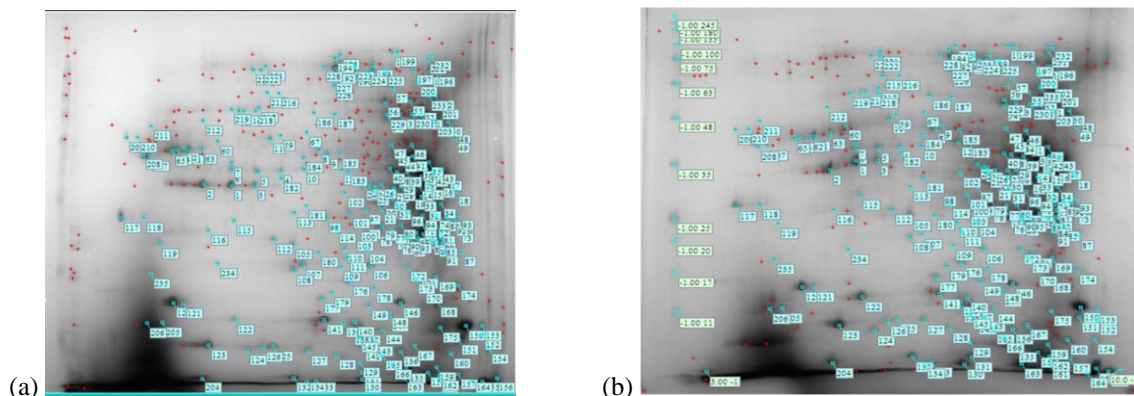
همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، آنالیز گروه‌بندی لکه‌های با بیان معنی‌دار در دو جدایه وحشی و جهش‌یافته برای تعیین لکه‌های هم بیان نشان داد که لکه‌های با بیان متفاوت سه گروه با تعداد لکه‌های متفاوت را تشکیل دادند.

با توجه به ارزیابی ژل دو بعدی و شناسایی نمودن لکه‌های پروتئینی (شکل ۳-a، b)، تعداد ۲۲۱ لکه تکرارپذیر در الگوی پروتئومی مشاهده گردید. بر این اساس مقدار کمی درصد حجمی لکه‌های متناظر دارای تغییر بیان در ژل‌ها مشخص گردید (جدول ۱). به‌طور کلی، تعداد ۸۸ لکه (۳۹/۸۲٪) کاهش بیان، ۸۱ لکه (۳۶/۶۵٪) بدون تغییر و ۵۲ لکه (۲۳/۵۳٪) افزایش بیان نشان دادند.

پروفایل پروتئینی قارچ وحشی *T. viride* (چاهک شماره ۲) مشابه با پروفایل پروتئین آن در ژل‌های قبل می‌باشد. به‌طوری که، جدایه جهش‌یافته Tv M21 دارای باندهای پروتئینی متفاوتی در مقایسه با جدایه وحشی می‌باشد. بالاترین بیان باند آنزیمی در پروفایل پروتئینی جدایه جهش‌یافته Tv M21 در محدوده وزن مولکولی ۶۴ کیلودالتون مشاهده گردید که مربوط به آنزیم Cel (CBH II) 6A می‌باشد. باند آنزیمی دیگری با وزن مولکولی ۵۶ کیلودالتون مشاهده شد که مربوط به Cel (EG I) 7B می‌باشد. این جدایه همچنین باند پروتئینی با وزن مولکولی ۱۰۲ کیلودالتون مربوط به آنزیم EG VI و باند شارپی در وزن مولکولی ۱۸ کیلودالتون، مربوط به آنزیم‌های خانواده اندوگلوکاناز ظاهر ساخت.

بررسی الگوی پروتئوم گونه *T. viride* و جدایه جهش‌یافته Tv M21 با پیش‌ماده کیتین کلونیدی

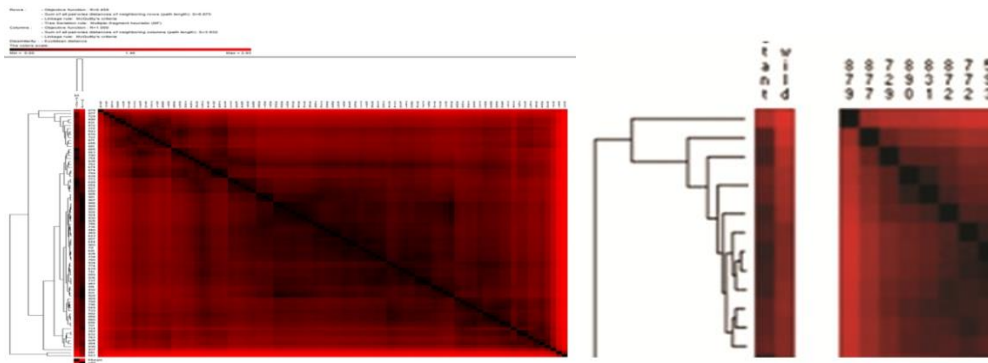
ببا توجه به ارزیابی ژل دو بعدی و شناسایی نمودن لکه‌های پروتئینی (شکل ۳ الف و ب)، تعداد ۲۲۱ لکه تکرارپذیر در الگوی پروتئومی مشاهده گردید. بر این اساس مقدار کمی درصد حجمی لکه‌های متناظر دارای تغییر بیان در ژل‌ها مشخص گردید (جدول ۱). به‌طور کلی، تعداد ۸۸ لکه (۳۹/۸۲٪) کاهش بیان، ۸۱ لکه (۳۶/۶۵٪) بدون تغییر و ۵۲ لکه (۲۳/۵۳٪) افزایش بیان نشان دادند. لکه‌های پروتئینی تقریباً در تمامی سطح ژل با نقاط مختلف ایزوالکتریک پراکنده شده‌اند. مقایسه الگوی پروتئومی جدایه وحشی و جهش‌یافته *T. viride* نشان



شکل ۳. الگوی پروتئوم با سوبسترای کیتین کلونیدی در محدوده pH ۱۰-۳ و وزن مولکولی ۱۱-۲۴۵ کیلودالتون.

(a): جدایه وحشی *T. viride*; (b): جدایه جهش‌یافته Tv M21.

Figure 3. Proteome pattern with colloidal chitin substrate 3-10 pH and molecular weight in the range of 11-245 kDa (a) wild strains of *T. viride* (b) mutant Tv M21.



شکل ۴. آنالیز شجرهای لکه‌های با بیان معنی‌دار در الگوی پروتئوم *T. viride* و جدایه جهش‌یافته Tv M21
 Figure 4. Phylogenetic analysis of spots with significant expression of the proteome pattern *T. viride* and mutant strains Tv M21

جدول ۱. لکه‌های پروتئینی بیان شده با تغییرات معنی‌دار در قارچ *T. viride* و جدایه Tv M21

Table 1. Expressed protein spots with significant changes in the *T. viride* isolate Tv M21

Spot Number	Mean of Vol %±Standard Error		Increase or Decrease of expression	Spot Number	Mean of Vol %±Standard Error		Increase or Decrease of expression
	Control	Treatment			Control	Treatment	
1	0.11±6.45	0.061±1.13	Decrease	84	0.003±0.19	0±0.0001	Decrease
2	0.09±5.11	0.146±0.36*	Decrease	86	0.007±0.39	0±0.0001	Decrease
3	0.008±0.47	0.199±2.79	Increase	87	0.011±0.62	0±0.0001	Decrease
4	0.014±0.81	0±0.0001	Decrease	88	0.008±0.46	0±0.0001	Decrease
5	0.011±0.63	0±0.0001	Decrease	89	0.005±0.29	0±0.0001	Decrease
6	0.015±0.87	0±0.0001	Decrease	91	0.004±0.27	0±0.0001	Decrease
7	0.007±0.39	0±0.0001	Decrease	93	0.003±0.21	0±0.0001	Decrease
8	0.005±0.54	0±0.0001	Decrease	94	0.024±1.36	0±0.0001	Decrease
9	0.063±3.44	0.154±0.35	Decrease	95	0.008±0.46	0±0.0001	Decrease
11	0.044±2.39	0.031±0.86	Decrease	96	0.004±0.26	0±0.0001	Decrease
12	0.009±0.59	0.002±0.76	Increase	97	0.011±0.61	0±0.0001	Decrease
13	0.025±1.41	0.011±0.28	Decrease	99	0.005±0.29	0.067±1.27	Increase
16	0.023±1.28	0.012±0.28	Decrease	100	0.003±0.17	0.007±0.41	Increase
18	0.039±2.14	0±0.0001	Decrease	103	0.026±1.43	0.006±0.05	Decrease
20	0.025±1.38	0.031±0.96	Decrease	104	0.002±0.09	0±0.0001	Decrease
21	0.005±0.83	0.003±0.63	Increase	105	0.007±0.43	0±0.0001	Decrease
23	0.016±1.51	0±0.0001	Decrease	106	0.014±0.79	0±0.0001	Decrease
24	0.017±0.91	0±0.0001	Decrease	107	0.015±0.83	0±0.0001	Decrease
25	0.011±0.61	0±0.0001	Decrease	110	0.011±0.58	0±0.0001	Decrease
26	0.002±0.16	0±0.0001	Increase	112	0.008±0.48	0±0.0001	Decrease
27	0.006±0.29	0.008±0.68	Increase	113	0.002±0.08	0±0.0001	Decrease
28	0.006±0.16	0±0.0001	Decrease	116	0.004±0.26	0±0.0001	Decrease
29	0.006±0.23	0±0.0001	Decrease	117	0.015±0.83	0±0.0001	Decrease
30	0.006±0.24	0±0.0001	Decrease	118	0.009±0.53	0±0.0001	Decrease
31	0.002±0.11	0.017±0.42	Increase	119	0.005±0.23	0±0.0001	Decrease
33	0.002±0.07	0±0.0001	Decrease	121	0.006±0.37	0±0.0001	Decrease
34	0.006±0.37	0±0.0001	Decrease	125	0.025±0.51	0±0.0001	Decrease
35	0.003±0.13	0.009±0.23	Increase	126	0.056±1.91	0±0.0001	Decrease
37	0.005±0.18	0±0.0001	Decrease	129	0±0.0001	0.016±0.39	Increase
38	0.007±0.36	0.0007±0.44	Increase	130	0±0.0001	0.231±2.33	Increase
39	0.003±0.12	0±0.0001	Decrease	131	0±0.0001	0.067±1.27	Increase
40	0.005±0.27	0±0.0001	Decrease	133	0±0.0001	0.045±1.19	Increase
44	0.0009±0.06	0±0.0001	Decrease	137	0±0.0001	0.009±0.68	Increase
45	0.005±0.31	0±0.0001	Decrease	138	0±0.0001	0.115±1.25	Increase
46	0.004±0.18	0±0.0001	Decrease	140	0±0.0001	0.005±0.49	Increase
48	0.005±0.16	0±0.0001	Decrease	141	0±0.0001	0.016±0.29	Increase
50	0.011±0.66	0±0.0001	Decrease	142	0±0.0001	0.006±0.17	Increase

ادامه جدول ۱. لکه‌های پروتئینی بیان شده با تغییرات معنی‌دار در قارچ *T. viride* و جدایه Tv M21

Continued table 1. Expressed protein spots with significant changes in the *T. viride* isolate Tv M21

Spot Number	Mean of Vol %±Standard Error		Increase or Decrease of expression	Spot Number	Mean of Vol %±Estandard Error		Increase or Decrease of expression
	Control	Treatment			Control	Treatment	
51	0.009±0.51	0±0.0001	Decrease	143	0±0.0001	0.024±0.37	Increase
52	0.011±0.57	0±0.0001	Decrease	145	0±0.0001	0.045±0.98	Increase
53	0.011±0.56	0±0.0001	Decrease	146	0±0.0001	0.059±0.61	Increase
54	0.024±1.35	0±0.0001	Decrease	147	0±0.0001	0.017±0.42	Increase
55	0.021±1.12	0±0.0001	Decrease	149	0±0.0001	0.021±0.24	Increase
56	0.012±0.68	0±0.0001	Decrease	150	0±0.0001	0.0007±0.18	Increase
57	0.016±0.88	0±0.0001	Decrease	153	0±0.0001	0.045±0.48	Increase
58	0.009±0.51	0±0.0001	Decrease	154	0±0.0001	0.009±0.23	Increase
59	0.004±0.15	0±0.0001	Decrease	158	0±0.0001	0.004±0.16	Increase
60	0.011±0.61	0±0.0001	Decrease	159	0±0.0001	0.007±0.43	Increase
61	0.006±0.32	0±0.0001	Decrease	160	0±0.0001	0.041±0.89	Increase
62	0.004±0.21	0±0.0001	Decrease	162	0±0.0001	0.048±0.64	Increase
63	0.002±0.09	0±0.0001	Decrease	164	0±0.0001	0.029±0.58	Increase
64	0.004±0.26	0±0.0001	Decrease	166	0±0.0001	0.003±0.22	Increase
65	0.002±0.09	0±0.0001	Decrease	168	0±0.0001	0.034±0.38	Increase
66	0.001±0.07	0±0.0001	Decrease	170	0±0.0001	0.004±0.21	Increase
67	0.011±0.64	0±0.0001	Decrease	172	0±0.0001	0.011±0.18	Increase
68	0.006±0.32	0±0.0001	Decrease	175	0±0.0001	0.014±0.39	Increase
69	0.009±0.54	0±0.0001	Decrease	176	0±0.0001	0.008±0.44	Increase
70	0.013±0.72	0±0.0001	Decrease	177	0±0.0001	0.014±0.39	Increase
71	0.024±1.36	0±0.0001	Decrease	179	0±0.0001	0.007±0.18	Increase
72	0.007±0.39	0±0.0001	Decrease	180	0±0.0001	0.0001±0.15	Increase
73	0.017±0.94	0±0.0001	Decrease	184	0±0.0001	0.011±0.22	Increase
74	0.005±0.26	0±0.0001	Decrease	185	0±0.0001	0.032±0.54	Increase
75	0.011±0.61	0±0.0001	Decrease	186	0±0.0001	0.014±0.58	Increase
76	0.014±0.81	0±0.0001	Decrease	188	0±0.0001	0.053±0.76	Increase
77	0.015±0.79	0±0.0001	Decrease	189	0±0.0001	0.038±0.46	Increase
78	0.008±0.48	0±0.0001	Decrease	190	0±0.0001	0.005±0.18	Increase
79	0.009±0.47	0±0.0001	Decrease	199	0±0.0001	0.051±0.59	Increase
80	0.015±0.83	0±0.0001	Decrease	201	0±0.0001	0.048±0.52	Increase
81	0.008±0.48	0±0.0001	Decrease	206	0±0.0001	0.014±0.21	Increase
82	0.007±0.36	0±0.0001	Decrease	210	0±0.0001	0.003±0.38	Increase
83	0.013±0.72	0±0.0001	Decrease	212	0±0.0001	0.031±0.34	Increase

بحث

میزان بیان آنزیمی در هر یک از جدایه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. سنجش بیان آنزیم‌ها در تحقیق حاضر نشان داد که جهش سبب ایجاد تغییرات در تولید یا ترشح پروتئین در جدایه‌های جهش‌یافته در مقایسه با جدایه مادری آن‌ها شده است. این موضوع با گزارش آبواستیت و همکاران، پراباواسی و همکاران، زو و همکاران و Abo-State *et al.* 2004, (Prabavathy *et al.* 2006, Abo-State *et al.* 2011, Xu *et al.* 2011).

به‌کارگیری تکنیک جهش به منظور بهبود جدایه‌ها برای تولید آنزیمی، به عنوان روشی موفق شناخته شده است (Bailey and Tahtiharju 2003, Villena and Gutierrez-Correa 2006). تاکنون روش‌های شیمیایی، پرتو فرابنفش و نیز ترکیب عوامل جهش‌زا برای دستیابی به جدایه‌های با توان بالای تولید آنزیمی، استفاده شده است (Kotchoni and Shonukan 2000). در این پژوهش پس از القای جهش توسط پرتو گاما،

گردید. هارمان و همکاران، اندوکیتینازهای مشابهی با وزن مولکولی ۳۳ کیلودالتون و ۳۱ کیلودالتون را از قارچ *T. harzianum* TM گزارش کرده‌اند (Harman et al. 1998). در این مطالعه، پروفایل پروتئینی آنزیم‌های اندوکیتیناز در قارچ *T. viride* با وزن مولکولی ۳۲ کیلودالتون مشاهده شد.

جهش القایی نه تنها می‌تواند مستقیماً ژن‌های سلولازی را متأثر کند، بلکه قادر است در سنتز و ترشح آنزیم‌های سلولازی هم اثر کند (Gulya et al. 1997). در پژوهشی در پی یافتن علتی برای افزایش فعالیت سلولاز در جدایه‌های جهش‌یافته *T. citrinoviride* در مقایسه با تیمار جدایه والد، الگوی باندی آن‌ها مورد مقایسه قرار گرفت و ایجاد تغییراتی در توالی ژن جهش‌یافته گزارش شد (Chandra et al. 2009). در این مطالعه، پروفایل پروتئینی آنزیم سلولاز در جدایه‌های جهش‌یافته قارچ *T. viride* با استفاده از آزمون SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت. به دلیل یکسان بودن میزان پروتئین تزریق شده به هر چاهک، بالاتر بودن غلظت هر باند در این پروفایل پروتئینی نشان‌دهنده اختلاف بیان پروتئین در بین جدایه‌های مختلف مورد مطالعه می‌باشد. این اختلاف در بیشتر جدایه‌های جهش‌یافته نسبت به جدایه وحشی قابل ملاحظه بود. نتایج به‌دست آمده نشان داد که در بین جدایه‌های مورد مطالعه قارچ *T. viride*، جدایه‌های جهش‌یافته Tv M6، Tv M5، Tv M4، Tv M1 و Tv M19 بالاترین میزان آنزیمی کیتیناز را نشان دادند. هارمان و همکاران، آنزیم N-استیل گلوکوامینیداز با وزن مولکولی ۱۰۲ کیلودالتون، از قارچ *T. harzianum* TM در زمان رشد روی کیتین (منبع کربن) گزارش کرده‌اند (Harman et al. 2008). همچنین در تحقیقی دیگر، توسط آنزیم N-استیل گلوکوامینیداز با وزن مولکولی ۶۸ کیلودالتون از قارچ *T. harzianum* تخلیص شد (Firmino et al. 2002). در این پژوهش، آنزیم‌های N-استیل گلوکوامینیداز برای قارچ *T. viride* با وزن مولکولی ۶۹ کیلودالتون مشاهده گردید. اکثر مطالعات روی تولید آنزیم کیتیناز اغلب به اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی اکتفا نموده‌اند و مطالعات کمی به کمپلکس‌های آنزیمی مختلف تولید شده، پرداخته‌اند. هارمان و همکاران، یک اندوکیتیناز با وزن مولکولی ۵۲ کیلودالتون را گزارش کرده‌اند (Harman et al. 1998). همچنین زمانی که قارچ *T. harzianum* CECT 2413 روی کیتین به عنوان منبع کربن رشد داده شد، دو اندوکیتیناز با وزن مولکولی ۳۳ و ۳۷ کیلودالتون تولید

گونه‌های مختلف جنس تریکودرما، آنزیم‌های تجزیه‌کننده کیتین ترشح می‌کنند که توانایی تجزیه دیواره سلولی آسکومیست‌ها و بازیدیومیست‌ها را دارند (Mach et al. 1999). آنزیم‌های کیتیناز تولید شده توسط گونه‌های تریکودرما، مورد توجه زیادی قرار گرفته‌اند؛ زیرا کیتین یکی از ترکیبات اصلی ساختار دیواره سلولی بسیاری از قارچ‌ها می‌باشد (Viswanathan et al. 2006). به همین دلیل، کیتینازها در کنترل تعداد زیادی از عوامل بیماری‌زای گیاهی نقش مهمی دارند. پروفایل پروتئینی آنزیم کیتیناز در جدایه‌های جهش‌یافته قارچ‌های *T. viride* با استفاده از آزمون SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت. به دلیل یکسان بودن میزان پروتئین تزریق شده به هر چاهک، بالاتر بودن غلظت هر باند در این پروفایل پروتئینی، نشان‌دهنده اختلاف بیان پروتئین در بین جدایه‌های مختلف مورد مطالعه می‌باشد. این اختلاف در بیشتر جدایه‌های جهش‌یافته نسبت به جدایه وحشی قابل ملاحظه بود. نتایج به‌دست آمده نشان داد که در بین جدایه‌های مورد مطالعه قارچ *T. viride*، جدایه‌های جهش‌یافته Tv M6، Tv M5، Tv M4، Tv M1 و Tv M19 بالاترین میزان آنزیمی کیتیناز را نشان دادند. هارمان و همکاران، آنزیم N-استیل گلوکوامینیداز با وزن مولکولی ۱۰۲ کیلودالتون، از قارچ *T. harzianum* TM در زمان رشد روی کیتین (منبع کربن) گزارش کرده‌اند (Harman et al. 2008). همچنین در تحقیقی دیگر، توسط آنزیم N-استیل گلوکوامینیداز با وزن مولکولی ۶۸ کیلودالتون از قارچ *T. harzianum* تخلیص شد (Firmino et al. 2002). در این پژوهش، آنزیم‌های N-استیل گلوکوامینیداز برای قارچ *T. viride* با وزن مولکولی ۶۹ کیلودالتون مشاهده گردید. اکثر مطالعات روی تولید آنزیم کیتیناز اغلب به اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی اکتفا نموده‌اند و مطالعات کمی به کمپلکس‌های آنزیمی مختلف تولید شده، پرداخته‌اند. هارمان و همکاران، یک اندوکیتیناز با وزن مولکولی ۵۲ کیلودالتون را گزارش کرده‌اند (Harman et al. 1998). همچنین زمانی که قارچ *T. harzianum* CECT 2413 روی کیتین به عنوان منبع کربن رشد داده شد، دو اندوکیتیناز با وزن مولکولی ۳۳ و ۳۷ کیلودالتون تولید

نسبت به جدایه‌های وحشی، الگوی پروتئومی متفاوت را نشان داد که تایید کننده آزمایش قبلی ما در آنالیزهای SDS-PAGE در زمینه تولید میزان بیان‌های متفاوت و الگوهای متفاوت آنزیم‌های کیتیناز و سلولاز بود. تعدادی از لکه‌های پروتئینی در جدایه‌های جهش‌یافته نسبت به جدایه وحشی دچار تغییر شدند که بیشتر به صورت اختصاصی بود. دامنه نسبتاً بالای بیان پروتئین‌ها و همچنین دامنه بالای اختلاف معنی‌دار در حجم بیان پروتئین‌ها، در گونه مورد مطالعه از نظر وزن مولکولی و نقطه ایزوالکتریک، حاکی از وجود سازوکارها و مسیرهای بیولوژیکی گسترده‌ای از این قارچ در تولید آنزیم‌ها می‌باشد. به عبارت دیگر، طیف گسترده لکه‌های با بیان افتراقی نشان می‌دهد که القای جهش سازوکارهای گسترده‌ای را تحت تأثیر قرار داده و باعث تغییراتی در آن‌ها شده است؛ این تغییرات حداقل در سطح پروتئین خود را نشان می‌دهد. هر چند این شرایط آزمایشی به صورت دقیق شرایط درون زیستی را فراهم نمی‌کند، اما امکان شناسایی آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی تولید شده بوسیله تریکودرما را مهیا می‌سازد (Suarez et al. 2004). البته توالی‌یابی این لکه‌های پروتئینی برای صحت گذاشتن این ادعا لازم می‌باشد ولی نتایج مشابهی را، Kucuk and Kvan (2003)، از برهم‌کنش جدایه‌های جهش یافته و وحشی قارچ *T. harzianum* به دست آوردند. به‌طور کلی، نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان داد، اشعه گاما می‌تواند تغییر در میزان تولید آنزیم‌های خارج سلولی و فعالیت آن‌ها را سبب شده و این امکان را فراهم نماید. این موضوع می‌تواند در مدیریت بیماری‌های گیاهی و بهره‌وری صنعتی از آنزیم‌های مورد مطالعه مد نظر قرار گیرد.

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 می‌گردد.

کیلودالتون است و روی ژل دارای وزن مولکولی، ۶۶ کیلودالتون می‌باشد (Shoemaker et al. 1983). این آنزیم نیز در پروفایل پروتئینی قارچ وجود داشت و احتمالاً یک آنزیم کلیدی برای هیدرولیز سلولز کریستالی می‌باشد (Divne et al. 1998). آنزیم Cel 7B (EG I) یک گلیکوهیدرولاز متعلق به خانواده هفت اندوگلوکانازها می‌باشد. Cel7B دارای وزن مولکولی ۴۸ کیلودالتون بوده و وزن مولکولی آن روی ژل ۵۵-۵۰ کیلودالتون برآورد شده است (Shoemaker et al. 1983). باند آنزیمی Cel 7B نیز در پروفایل پروتئینی مربوط به قارچ *T. viride* مشاهده گردید. آنزیم EG IV یا Cel61A یک آنزیم گلیکوهیدرولاز متعلق به خانواده ۶۱ اندوگلوکانازها با وزن مولکولی ۳۵/۵ کیلودالتون می‌باشد (Karlsson et al. 2002). آنزیم EG V یا Cel45A یک آنزیم گلیکوهیدرولاز با وزن مولکولی ۲۳ کیلودالتون است که علاوه بر اندوگلوکاناز یک گلوکومانانز نیز محسوب می‌شود (Karlsson et al. 2002). این دو آنزیم دارای محل متصل شونده به سلولز بوده و پروفایل پروتئینی گونه *T. viride* مشاهده گردید. در بین آنزیم‌های سلولازی، بتاگلوکوزیدازها بیشترین تنوع را از لحاظ ساختار و موقعیت نشان می‌دهند. در پروفایل پروتئینی قارچ *T. viride* بتاگلوکوزیداز BGL I (Cel3A) مشاهده گردید. با این حال مطالعه روی گونه‌های مختلف تریکودرما نشان داده است که این آنزیم تنها یک درصد از پروتئین‌های مترشحه محیط کشت را تشکیل می‌دهد و بخش بزرگی از آن متصل به دیواره قارچ باقی می‌ماند (Andersen 2007).

در مقایسه فعالیت این آنزیم‌ها، اطلاعات بسیار کمی در رابطه با سیستم پروتئومی ترشح شده بوسیله قارچ‌های تریکودرما وجود دارد. علی‌رغم این موضوع، مشخص است که این پروتئین‌ها در توانایی کنترل زیستی بوسیله قارچ‌های تریکودرما نقش اساسی برعهده دارند. مشخص شده است که جهش‌یافته‌های *T. harzianum* با استفاده از اشعه‌دهی نور فرابنفش، ویژگی‌های هم‌ستیزی بهبودیافته‌ای را نشان دادند که نرخ بالایی از پروتئین‌های مترشحه داشتند (Szekeres et al. 2004). در گونه *T. Viride* جدایه‌های جهش‌یافته

REFERENCES

- Abo-State MA, Hammad AI, Swelim M, Gannam RB** (2011) Enhanced production of cellulase(S) by *Aspergillus* spp. isolate from agriculture wastes by solid state fermentation american- Eurasian. Journal of Agriculture Environment Science 8: 402-410.
- Abo-State MA** (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 SS, Chao LT, Sze SK** (2012) Quantitative secretomic analysis of *Trichoderma reesei* strains reveals enzymatic composition for lignocellulosic biomass degradation. Molecular and Cellular Proteomics 10: 1-15.
- Andersen N** (2007) Enzymatic hydrolysis of cellulose: experimental and modeling studies. PhD. Thesis. University of Technical Denmark 154Pp.
- Anderson NL** (2005) The roles of multiple proteomic platforms in a pipeline for new diagnostics. Molecular and Cellular Proteomics 4: 1441-1444.
- Bailey MJ, Tahtiharju J** (2003) Efficient cellulase production by *Trichoderma reesei* in continuous cultivation on lactose medium with a computer-controlled feeding strategy. Applied Microbiology Biotechnology 62(2-3): 156-62.
- Bhadauria V, Popescu L, Zhao WS, Peng YL** (2007) Fungal transcriptomics. Microbiological Research 162: 285-298.
- Bradford MM** (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.
- Chandra M, Kalra A, Sangwan N, Gaurav S** (2009) Development of a mutant of *Trichoderma citrinoviride* for enhanced production of cellulases. Bioresource Technology 100: 1659-1662.
- Dahiya N, Tewari R, Hoondal G** (2006) Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. Applied Microbiology and Biotechnology 71(6): 773-782.
- Divne C, Ståhlberg J, Teeri TT, Jones TA** (1998) High-resolution crystal structures reveal how a cellulose chain is bound in the 50 Å long tunnel of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. Journal of Molecular Biological 275: 309-325.
- El-Katany MH, Gudely M, Robra KH, Elnaghy MA, Gubitez GM** (2001) Characterization of Chitinase and endo β -1, 3 glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T21 involved in control of the phytopathogen sclerotium rolfsii. Applied Microbiology and Biotechnology 562: 137-143.
- Elad Y, Chet I, Henis Y** (1985) Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. Canadian Journal of Microbiology 28: 719-725.
- Emma WG, Simeon OK** (2008) The use of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* as potential biocontrol agent against peanut microflora and their effectiveness in reducing aflatoxin contamination of infected kernels. Biothencnology Asian Network for Scientific Informaiton 1-9.
- Ershadfath F, Mohsenzade F, Banegad H** (2013) A study of Confidor toxin on the growth ability of *Trichoderma* different species agreeable to toxin. Sixteenth National Conference of Environmental Health. Tabriz University of Medical Sciences and Health Services.
- Fägerstam L, Håkansson U, Pettersson G, Andersson L** (1977) Purification of three different cellulolytic enzymes from *Trichoderma viride* QM 9414 on alarge scale. In Proceedings of Bioconversion Symposium. (ed. T. Gohose). Indian Institute of Technology New Dehli 165-178.
- Firmino AP, Ulhoa CJ, Sousa MV, Ferreira Filho EX, Ricart CA** (2002) Involvement of G proteins and cAMP in the production of chitinolytic enzymes by *Trichoderma harzianum*. Brazilian Journal of Microbiology 33:169-173.
- Fleming K, Gray DG, Matthews S** (2001) Cellulose crystallites. Chemistry European Journal 7: 1831-1836.
- Grinyer J, McKay M, Nevalainen H, Herbert BR** (2004) Fungal proteomics: initial mapping of biological control strain *Trichoderma harzianum*. Current Genetics 45:163-9.
- Gulya T, Rashid KY, Masirevic SM** (1997) Sunflower diseases in Sunflower technology and production, A.A. Schneiter (Ed.), American Society of Agronomy, Crop Science Society of American, Soil Science Society of America Madison Wisconsin 263-379.
- Harighi M, Motallebi M, Zamani MR** (2006) Antifungal activity of heterologous expressed chitinase (Chit42) from *Trichoderma atroviride* PTCC5220. Iranian Journal of Biotechnology 4: 95-103. (in Persian)
- Harman GE, 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*. Taylor and Francis London 2: 229-265.
- Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M** (2004) *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Review Microbiology 2:43-56.
- Henrissat B** (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. Biochemistry 280(2): 309-316.

- Hoell IA, Dalhus B, Heggset EB, Aspmo SI, Eijsink VGH** (2006) Crystal structure and enzymatic properties of a bacterial family 19 chitinase reveal differences from plant enzymes. *Federation of European Biochemical Societies Journal* 273: 4889-4900.
- Howell CR, Stipanovic RD** (1983) Gliovirin, a new antibiotic from *Gliocladium virens*, and its role in the biological control of *Pythium ultimum*. *Journal of Microbiology* 29: 321-324.
- Jun H, Kieselbach T, Jönsson L** (2011) Enzyme production by filamentous fungi: analysis of the secretome of *Trichoderma reesei* grown on unconventional carbon source. *Microbial Cell Factories* 10: 68.
- Karlsson J, Saloheimo M, Siika-Aho M, Tenkanen M, Penttilä M, Tjerneld F** (2001) Homologous expression and characterization of Cel61A (EG IV) of *Trichoderma reesei*. *European Journal of Biochemistry* 268(24): 6498-507.
- Karlsson J, Siika-aho M, Tenkanen M, Tjerneld F** (2002) Enzymatic properties of the low molecular mass endoglucanases Cel12A (EG III) and Cel45A (EG V) of *Trichoderma reesei*. *Journal of Biotechnology* 99(1): 63-78.
- Kotchoni SO, Shonukan OO** (2000) Regulatory mutations affecting the synthesis of cellulase. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 18: 487-491.
- Kucuk C, Kvanç M** (2003) Isolation of *Trichoderma* spp. and determination of their antifungal, biochemical and physiological features. *Turkish Journal of Biology* 27(4): 247-253.
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Mach RL, Peterbauer CK, Payer K, Jaksits S, Woo SL, Zeilinger S, Kullnig CM, Lorito M, Kubicek CP** (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.
- Mandels M, Weber J, Parizek R** (1971) Enhanced cellulase production by a mutant of *Trichoderma viride*. *Applied Microbiology* 21: 152-154.
- Montealegre J, Valderrama L, Herrera R, Besoain X, Pérez LM** (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.
- Moradi R, Shahbazi S, Ahari- Mostafavi H, Ebrahimi MA** (2015) To analyze the effects gamma irradiation on morphological characteristics and antagonistic *Trichoderma harzianum*. *Journal of Nuclear Science and Technology* 71: 96-104. (in Persian)
- Peberdy JF** (1990) Fungal cell wall a review. *Biochemistry of cell walls and membranes in fungi*. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag 5-24.
- Prabavathy VR, Mathivanan N, Sagadevan E, Murugesan K, Lalithakumari D** (2006) Strain improvement for enhanced production of cellulase in *Trichoderma viride*. *Enzyme Microbiology and Technology* 38(5): 719-723.
- Sayyedasli N, Zamani MR, Matlabi M, Harighi MJ** (2004) Study of chitinase enzyme produce in *Trichoderma*. *Iranian Journal of Biology* 17(3): 227-233. (in Persian)
- Shahbazi S, Ahari Mostafavi H, Mirmajlesi SM** (2012) Assessing enzymes and molecular markers of *Trichoderma* mutants Endochitinases with specific STS. Iran's Third National Conference on Agricultural Biotechnology. Mashhad Ferdowsi University of Mashhad. (in Persian)
- Shahbazi S, Ahari Mostafavi H, Ebrahimi MA, Askari H, Mirmajlesi SM, 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)
- Shoemaker SP, Brown RD** (1978) Enzymatic activities of endo-1,4-h-D-glucanases purified from *Trichoderma viride*. *Biochemistry and Biophysics* 523: 133-146.
- Shoemaker SP, Watt K, Tsitovsky G, Cox R** (1983) Characterisation and properties of cellulases purified from *Trichoderma reesei* strain L27. *Biology and Technology* 1: 687-690.
- Suarez B, Rey M, Castillo P, Monte E, Llobell A** (2004) Isolation and characterization of PRA1, a trypsin-like protease from the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* CECT 2413 displaying nematocidal activity. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65: 46-55.
- Szekeres A, Kredics L, Antal Z, Kevei F, Manczinger L** (2004) Isolation and characterization of protease overproducing mutants of *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiology Letter* 233: 215-222.
- Tseng YH, Kokkotou E, Schulz TJ, Huang TL, Winnay JN, Taniguchi CM, Tran T, Suzuki R, Espinoza DO, Yamamoto Y, Ahrens MJ, Dudley AT, Norris AW, Kulkarni RN, Kahn R** (2008) New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. *Nature* 454: 1000-1004.
- Villena GK, Gutierrez-Correa M** (2006) Production of cellulase by *Aspergillus niger* biofilms developed on polyester cloth. *Letter Applied Microbiology* 43(3): 226-62.
- Viswanathan R, Premkumari SM, Sundar AR, Kathiresan T** (2006) Cloning partial endochitinase cDNA of *Trichoderma harzianum* antagonistic to *Colletotrichum falcatum* causing red rot of sugarcane. *Current Science* 91: 951-956.

- Westermeier R** (2005) Electrophoresis in practice: a guide to methods and applications of DNA and differential protein separations. Fourth ed. Willey-VCH Publications.
- Wey TT, Hseu TH, Huang L** (1994) Molecular cloning and sequence analysis of the cellobiohydrolase I gene from *Trichoderma koningii* G-39. *Current Microbiology* 28: 31-39.
- 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.