Crop Biotech.
Autumn and Winter (2013) 5: 33-40

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال سوم، شماره پنجم، پائیز و زمستان ۱۳۹۲ (۴۰- ۳۳)

افزایش فعالیت ژن کیتیناز قارچ *Trichoderma harzianum* با استفاده از جهش القایی ناشی از پرتو گاما

سمیرا شهبازی[۱]*، حسین اهری مصطفوی[۲]، محمدعلی ابراهیمی[۳]، حامد عسکری[۴]، سید مهیار میرمجلسی[۵] و مهسا کریمی[۶]

۱، استادیار گروه کشاورزی هسته‌ای، پژوهشکده تحقیقات کشاورزی، پزشکی و صنعتی، کرج، ۲، مربی گروه کشاورزی هسته‌ای، پژوهشکده تحقیقات کشاورزی، پزشکی و صنعتی، کرج، ۳، دانشیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ۴، کارشناسی‌ارشد صنایع غذایی، همکار گروه کشاورزی هسته‌ای، پژوهشکده تحقیقات کشاورزی، پزشکی و صنعتی، کرج، ۵، کارشناسی‌ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، همکار گروه کشاورزی هسته‌ای، پژوهشکده تحقیقات کشاورزی، پزشکی و صنعتی، کرج، ۶، مدرس و کارشناسی‌ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران.

(تاریخ دریافت: ۹۲/۶/۲- تاریخ تصویب: ۹۲/۱۰/۴)

Enhancement of Chitinase Gene Activity In Mutated *Trichoderma harzianum* via Gamma Radiation

S. SHAHBAZI[1]*, H. AHARI MOSTAFAVI[2], M.A. EBRAHIMI[3], H. ASKARI[4], M. MIRMAJLESI[5] AND M. KARIMI[6]

1, Assistant Professor, Agricultural, Medical and Industrial Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, Karaj, Iran, 2, M.Sc. of Plant Pathology- Agricultural, Medical and Industrial Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, Karaj, Iran, 3, Associate Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Payame Noor University, Tehran, Iran, 4, M.Sc. of Food Science and Technology, Agricultural, Medical and Industrial Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, Karaj, Iran, 5, M.Sc. of Plant Pathology, Agricultural, Medical and Industrial Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, Karaj, Iran, 6, Department of Agricultural Biotechnology, Payame Noor University, Tehran, Iran

(Received: Aug. 24, 2013 - Accepted: Dec. 25, 2013)

Abstract

Trichoderma spp as promising biological control agents to control numerous of plant pathogenic fungi assigned to the highest value of degrading enzymes production (chitinases and glucanases) between micro- organisms. chitinases have effective role in myco-parasitism mechanism of plant pathogenic fungi. Application of genetic engineering and direct mutation in fungal genome in order to increase *T. harzianum* antagonistic potential via enhancement in chitinase activity has positive results. In this study, mutation induction in *T. harzianum* with optimum dose of 250 Gry based on appearance 40-50% of the spore germination was selected and after substrate preparation and induction of chitinase enzyme mutant isolates activity of 20 mutants have been evaluated that this check 15 mutants especially the two mutant isolates Th M15 and Th M8 with specific activity of the enzyme 38/17 and 36/53(U/mg) the most active isolates and 5 mutants especially the two mutant isolates Th M7 and Th M9 with specific activity of the enzyme 1/99 and 5/38(U/mg) strains were weakest. Thus, induced mutation by gamma irradiation in order to improve antagonistic capacity of native iranian *Trichoderma spp*. to obtain effective and useful bio- control agents is advisable.

Keywords: Chitinase enzyme, Induced mutation, Gamma irradiation, *Trichoderma spp*

چکیده

قارچ تریکودرما به‌عنوان یک عامل کنترل بیولوژیک موفق و با کنترل دامنه وسیعی از قارچ‌های پاتوژن گیاهی بالاترین میزان تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره (کیتیناز و گلوکاناز) را در بین میکروارگانیسم‌ها به خود اختصاص داده است. کیتینازها نقش مؤثری در فرآیند مایکوپارازیتیسم قارچ‌های بیمارگر گیاهی دارند. کاربرد روش‌های مهندسی‌ژنتیک و ایجاد موتاسیون مستقیم در ژنوم قارچ به‌منظور افزایش پتانسیل آنتاگونیستی *T. harzianum* از طریق افزایش فعالیت کیتینازها نتایج مثبتی داشته است. در این مطالعه القای جهش در *T. harzianum* با دز اپتیمم ۲۵۰ گری بر اساس ظهور تقریبا ۵۰-۴۰٪ جوانه‌زنی اسپور انتخاب و انجام گردید. پس از آماده‌سازی سوبسترا و القا آنزیم کیتیناز در جدایه‌های موتانت فعالیت کیتینازی ۲۰ جدایه موتانت حاصل اندازه‌گیری شد، که در این بررسی ۱۵ جدایه، به‌خصوص دو جدایه موتانت Th M15 و Th M8 با فعالیت ویژه آنزیمی (U/mg) ۳۸/۱۷ و ۳۶/۵۳ فعال‌ترین جدایه‌ها و پنج جدایه به‌خصوص دو جدایه Th M7 و Th M9 با فعالیت ویژه آنزیمی (U/mg) ۱/۹۹ و ۵/۳۸ ضعیف‌ترین جدایه‌ها بوده‌اند، بر این اساس می‌توان روش القای موتاسیون در افزایش پتانسیل آنتاگونیستی جدایه‌های بومی قارچ تریکودرما در ایران را به‌منظور دست‌یابی به منابع بیوکنترل مؤثر و کارا توصیه نمود.

واژه‌های کلیدی: آنزیم کیتیناز، جهش القایی، اشعه‌گاما، قارچ تریکودرما

* نویسنده مسئول: سمیرا شهبازی

E-mail: sshahbazi@nrcam.org

مقدمه

آلودگی زمین‌های کشاورزی به قارچ‌های بیماری‌زا ،گاه به حدی می‌رسد که رشد گیاهان زراعی را در آن‌ها غیراقتصادی می‌سازد. یکی از راه‌های کنترل بیماری‌های قارچی استفاده از قارچ‌کش‌های شیمیایی در سطح وسیع می‌باشد، که این امر باعث هزینه‌های سنگین می‌شود و گاه بخش عظیمی از درآمد محصول صرف خرید واستفاده از قارچ‌کش می‌گردد. علاوه بر این برای کنترل اکثر قارچ‌ها خاکزی قارچ‌کش مناسب و مؤثر وجود ندارد و یا باید برای حصول تأثیر دزهای بالاتری از سم استفاده شود که موجب بروز آلودگی‌های جبران‌ناپذیر محیط زیست (منابع زیرزمینی آب و خاک) و حذف موجودات مفید از اکوسیستم می‌گردد (Haran *et al.* 1996). یکی از راه‌های کنترل بیماری‌های قارچی، استقرار ارگانیسم‌های آنتاگونیست قارچ‌های بیمارگر در ناحیه ریزوسفر گیاهان می‌باشد که تحت عنوان کنترل بیولوژیک[1] از آن یاد می‌شود. این آنتاگونیست‌ها از مکانیسم‌های متعددی بهره می‌برند. در این میان آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره‌سلولی[2] قارچ‌ها از معمول‌ترین و مؤثرترین راه‌کارهای کنترل به‌شمار می‌روند. از آنجا که دیواره‌سلولی، نخستین و مهمترین سد در برابر آنزیم های هیدرولازی است، از بین‌بردن اجزای تشکیل‌دهنده دیواره قارچی از جمله کیتینوگلوکان وظیفه اختصاصی بسیاری از این عوامل بیوکنترل می‌باشد. یکی از کاراترین مکانیسم‌ها، تولید آنزیم‌های هیدرولازی نظیرکیتیناز و گلوکاناز است که باعث نابودی و فروپاشیدن ساختار سلولی عوامل بیماری‌زای گیاهی قارچی و باکتریایی می‌گردد (Haran *et al.* 1996).

کیتین، پلیمری خطی از واحدهای N-acetylglucosamine است و یکی از اجزای مهم دیواره قارچ‌ها محسوب می‌شود و در بسیاری از موجودات اعم از سخت‌پوستان و حشرات نیز به وفور یافت می‌شود. کیتینازها در پروسه تولید مونو و الیگوساکارید از کیتین مشارکت داشته و یکی از عوامل ضدقارچی شناخته شده است. این آنزیم پیوندهای β -۱و۴ را هیدرولیز می‌کنند (Cohen-Kupiec and Chet. 1998). به‌طورکلی کیتینازهای قارچی به دو دسته اندوکیتیناز و اگزوکیتینازها تقسیم می‌شوند که از میان آن‌ها کیتیناز ۴۲ کیلودالتونی نسبت به سایر کیتینازها نظیر ۳۳/۳۷ کیلو دالتونی و اگزوکیتینازها نقش مؤثری در تجزیه کیتین موجود در دیواره قارچ‌ها دارد (Lorito *et al.*1998).

علاوه بر نقش تجزیه خودبهخود در قارچ‌ها که برای رشد انتهای هیف ضروری می‌باشد، کیتینازها در قارچ‌های مایکوپارازیت[3] مانند *Tricoderma spp.* در پارازیتسم سایر قارچ‌ها مشارکت دارند. آنزیم‌های کیتینازی این قارچ نسبت به کیتینازهای سایر ارگانیسم‌های از جمله کیتینازهای گیاهی دارای مزایای متعددی می‌باشند. به‌عنوان مثال کیتینازهای گیاهی برخلاف کیتینازهای قارچی فقط رأس (نوک) هیف‌های قارچ پاتوژن را تحت تأثیر قرار می‌دهند و قادر به تجزیه ساختارهای سخت کیتین نیستند. از سوی دیگر بررسی‌ها نشان داده است که تمام پاتوژن‌های دارای کیتین در دیواره نسبت به کیتینازهای قارچ تریکودرما حساس می‌باشند، درعین حال غلظت‌های بالای این آنزیم‌ها برای گیاهان اثرات سمی ندارد (Lorito *et al.* 1993) از طرفی نتایج تحقیقات انجام‌شده بر روی برخی از گیاهان نشان می‌دهدکه باحضور قارچ *Trichoderma spp.* در خاک، رشد گیاه به نحو چشم‌گیری افزایش می‌یابد (Baker. 1988). توانایی گونه های مختلف تریکودرما در کنترل رشد بسیاری ازقارچ‌ها و باکتری‌های خاکزی، این قارچ رابه عاملی قوی در کنترل بیولوژیک بیماری‌های گیاهی تبدیل کرده است. دو گونه *T. harzianum* و *T. virens* بیش از سایر گونه‌ها در کنترل بیولوژیک مورداستفاده قرار گرفته‌اند (Chet. 1987). گونه *T. harzianum* به‌تنهایی یا همراه گونه‌های دیگر تریکودرما، در کنترل دامنه گسترده‌ای از بیماری‌های گیاهی ناشی از قارچ‌ها اعم از خاکزاد و هوازاد نقش دارد (Elad *et al.*1995).

مطالعات متعددی در زمینه افزایش پتانسیل آنتاگونیستی *T. harzianum* با استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک و ایجاد موتاسیون مستقیم در ژنوم قارچ (با استفاده از مواد شیمیایی موتانت‌زا و اشعه فرابنفش و گاما) صورت گرفته است (Howell. 1998). باتوجه به گزارشات متعددی که مؤید بروز جهش‌های ناشی از پرتو گاما در ژنوم قارچ تریکودرما که منجر به افزایش بیان ژن‌های کیتیناز و گلوکاناز در آن شده است (Mukherjee *et al.* 2003; Abdel latif *et al.* 2005; Haggag. 2002)، و همچنین پایین‌بودن کارایی روش کنترل بیولوژیک در مقایسه با روش شیمیایی که سبب عدم‌اقبال عمومی کشاورزان در جایگزینی آن با روش‌های پرمخاطره‌ای مانند کاربرد سموم وسیع‌الطیف شده است، این مطالعه با هدف افزایش کارایی تریکودرما با استفاده از

1. Biological Control
2. Cell Wall Degrading Enzymes
3. Mycoparasite Fungus

فن‌آوری هسته‌ای و به‌منظور افزایش تولید متابولیت‌های آنزیمی این قارچ انجام شده است که در کشور برای نخستین بار انجام می‌شود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و شناسایی قارچ تریکودرما

نمونه‌برداری جدایه‌های قارچ تریکودرما از خاک اطراف ریشه مزارع کشت چغندرقند شرق کشور (مزرعه تحقیقاتی دانشگاه فردوسی مشهد، خراسان رضوی) انجام گرفت. سوسپانسیون نمونه‌های خاک روی محیط کشت PDA (۳۹ گرم در لیتر) منتقل و بعد از رشد پرگنه‌ها با استفاده از مشخصات مورفولوژیکی فیالیدها، فیالوسپورها، انتوژنزکنیدیوم‌ها و همچنین با استفاده از کلید شناسایی قارچ‌های ناقص جدایه‌های تریکودرما مورد شناسایی قرار گرفتند (شکل ۱).

شکل ۱ – شکل ماکروسکوپی کلونی گونه *T. harzianum* وحشی

دزیابی و پرتوتابی به‌منظور القای موتاسیون در قارچ تریکودرما

کنیدیوم‌ها (اسپورهای غیرجنسی) به‌عنوان اندام هدف برای پرتوتابی انتخاب شدند، زیرا اسپور تحت تأثیر تابش اشعه، تغییرات ژنتیکی حاصل را به‌طور یکنواخت در تمام ریسه‌های حاصل از کلونی ایجادشده در محیط کشت نشان خواهد داد که خالص‌سازی آن‌ها از یکدیگر را تسهیل خواهد نمود. به‌منظور ایجاد جهش در قارچ تریکودرما ابتدا عملیات دزیابی با نه دامنه ۰– ۵۰– ۱۵۰– ۲۰۰– ۲۵۰– ۳۰۰– ۳۵۰– ۴۰۰– ۴۵۰ گری انجام شد. درصد جوانه‌زنی با شمارش اسپورهای جوانه‌زده (در محدوده بزرگ‌نمایی۱۰ میکروسکوپ نوری) برای هر محدوده دز تعیین شد. دز اپتیمم برای پرتوتابی به‌منظور القای موتاسیون براساس ظهور تقریباً ۵۰–۴۰٪ جوانه‌زنی اسپور انتخاب گردید. پرتوتابی گونه‌های *T. harzianum* با سه تکرار در دز اپتیمم، در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از دستگاه گاماسل با چشمه کبالت ۶۰ – اکتیویته ۲۵۰۰ کوری و نرخ دز ۰/۲۳ گری در ثانیه مستقر در مرکز تحقیقات کشاورزی و پزشکی هسته‌ای کرج (سازمان انرژی اتمی ایران) انجام پذیرفت. پس از ایجاد جهش و تهیه جدایه‌های جهش‌یافته خالص‌سازی‌شده فعالیت آنزیم کیتیناز اندازه‌گیری شد.

آماده‌سازی سوبسترا

کیتین کلوئیدی با اضافه‌کردن ۱۰۰ میلی‌لیتر اسیدفسفریک ۸۵ ٪ به ۱۰ گرم پودر کیتین استحصال شده از پوست میگو تهیه و برای حذف کامل اسید چند بار شستشو با آب‌مقطر تکرار شد. ماده خمیری شکل حاصل لیوفلیزه و برای القاء آنزیم‌های کیتینازی به محیط کشت قارچ تریکودرما افزوده شد.

القای بیان آنزیم کیتیناز در جدایه‌های موتانت

برای استخراج آنزیم تولیدشده توسط هر جدایه ابتدا کلنی‌های جهش‌یافته و وحشی *T.harzianum* در محیط MGA حاوی (yeast extract، malt extract و Glucose) کشت و بعد از ۷ روز، یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپور هر جدایه به محیط TCM، (Moradi *et al*. 2012) اضافه گردید. نمونه‌ها را به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و بر روی شیکر با RPM۱۸۰ قرار داده شدند. میسلیوم‌های حاصل از رشد قارچ‌ها پس از دو بار شستشو با محلول سیلین (۹ گرم NaCl در لیتر) برای تولید آنزیم کیتیناز به ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت TFM حاوی اوره، فسفات‌پتاسیم، سولفات‌منیزیم، کلریدکلسیم، عناصر کمیاب و کیتین کلوئیدی ۱۵ درصد (pH=۵/۵) انتقال داده شده و به‌مدت ۴۸ ساعت دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و بر روی شیکر قرار داده شد. سپس با استفاده از سانتریفوژ ۳۰ میلی‌لیتر از محلول فوقانی که حاوی آنزیم کیتیناز است را به دستگاه خشک‌کن انجمادی انتقال و پودر حاصل برای سنجش آنزیم کیتیناز استفاده گردید.

سنجش فعالیت آنزیم کیتیناز

۲۰۰ ماکرو لیتر محلول آنزیمی به‌دست‌آمده از مایع فوقانی محیط تخمیر TFM را با مقدار ۲۰۰ ماکرولیتر از سوسپانسیون کیتین کلوئیدی ۰/۵ ٪ (w/v) در بافر استات‌پتاسیم ۰/۰۱۵ مولار (pH= ۴) مخلوط و در دمای C ۳۷ به‌مدت ۱ ساعت گرمخانه گذاری شد. سپس بعد از گذشت زمان ۱ ساعت فعالیت آنزیم توسط سانتریفیوژکردن نمونه‌ها در g ۹۰۰۰ به‌مدت ۷ دقیقه و اضافه‌کردن ml ۱ محلول سود ۱٪ (w/v) متوقف گردید. به تمامی نمونه‌ها مقدار ۱۰۰

ماکرولیتر بافر تترا بورات پتاسیم (۰/۸مولار با pH=۸/۹) اضافه و سه دقیقه در آب جوش حرارت داده شد. با افزودن سه ماکرو لیتر واکنش‌گر DMAB، (Di-metyl amino benzaldehyde)، محلول حاصل ۱۰ دقیقه در دمای ۳۸-۳۶ درجه قرار گرفت و بلافاصله جذب نوری آن در ۵۴۴ نانومتر به‌وسیله دستگاه Spectofotometr قرائت گردید. در این آزمایش از N-acetylglucosamine به‌عنوان استاندارد استفاده گردید. هر واحد فعالیت آنزیمی (U)، عبارت از مقدار آنزیمی است که می‌تواند در طول یک ساعت واکنش، در دما و pH مشخص، یک میکرومول از N-acetylglucosamine یا الیگومرهایی از آن را آزاد کند (Ulhoa and Peberdy. 1992). برای اندازه‌گیری مقدار پروتئین از روش Bradford (Bradford. 1976) که در آن از پروتئین (BSA)[1] به‌عنوان استاندارد استفاده شد. فعالیت ویژه آنزیم، به‌صورت مقدار فعالیت آنزیم (U/ml) به‌مقدار کل پروتئین (µg/ml) موجود در محیط، تعریف می‌شود.

نتایج

جداسازی و شناسایی قارچ تریکودرما

از مجموع ۳۵ نمونه گیاهی جمع‌آوری‌شده ۲۳ نمونه دارای قارچ تریکودرما بودند. براساس نتایج به‌دست‌آمده جدایه‌های قارچ جداشده از خاک اطراف ریشه گیاهان، به گونه‌های قارچ*T. harzianum* متعلق بودند (شکل۱).

القای موتاسیون در قارچ تریکودرما با استفاده از اشعه گاما

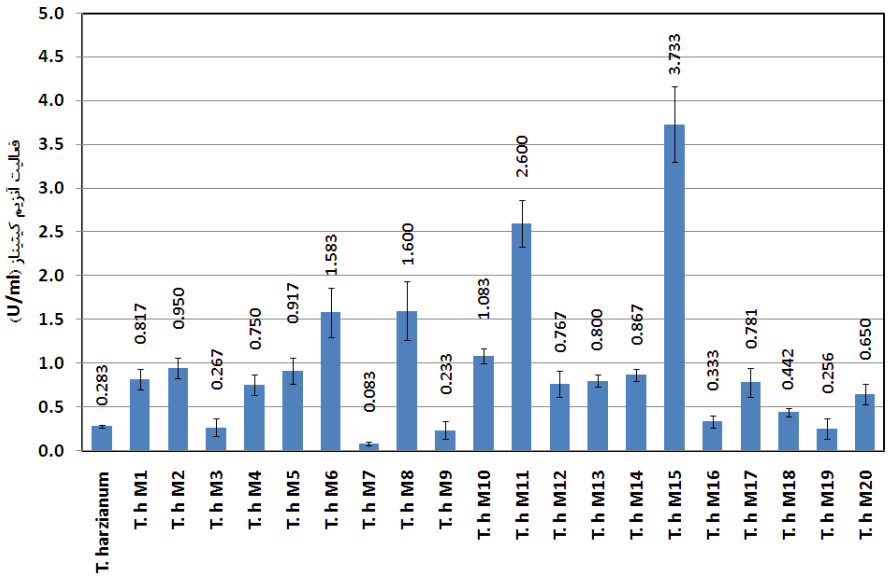
هیچ‌گونه ممانعت از رشد ریسه در محدوده ۲۵۰ گری بر اساس پرتوتابی با اشعه گاما وجود نداشته و اسپورهای قارچی ۵۰-۴۰٪ جوانه‌زنی خود را حفظ نموده‌اند که به‌عنوان دز اپتیمم القای جهش انتخاب و جدایه‌های موتاسیون یافته با این دز تهیه گردید.

بررسی میزان تولید آنزیم کیتیناز

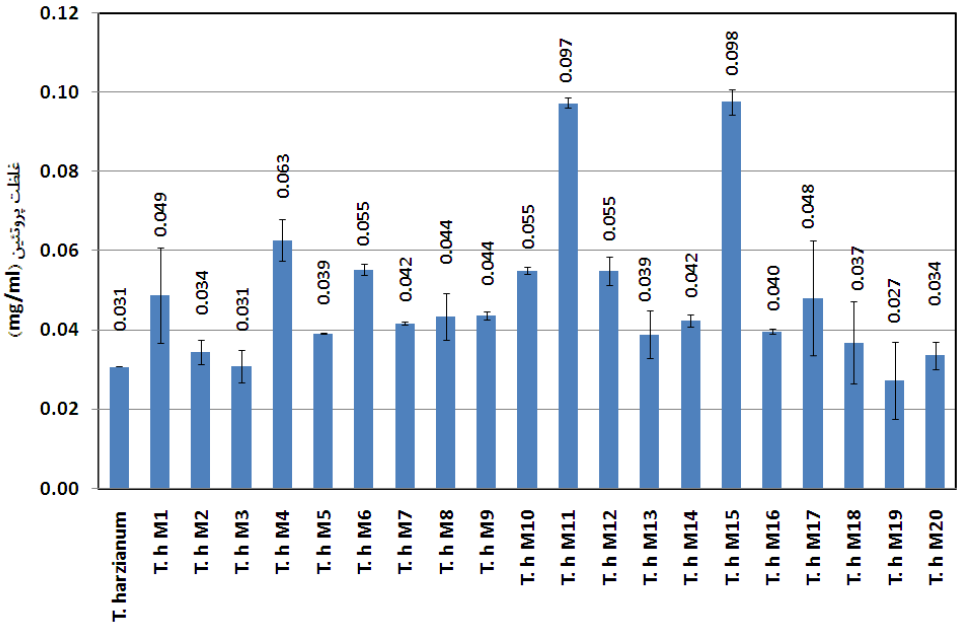
تولید و اندازه گیری فعالیت آنزیم کیتیناز در قارچ *T. harzianum* وحشی و جدایه های جهش یافته آن با استفاده از کیتین کلوئیدی به عنوان سوبسترا انجام گرفت. کلیه نتایج در سطح آماری ۰/۰۵ دارای اختلاف معنی دار آماری بودند. فعالیت آنزیم کیتیناز (U/ml) در مایع فوقانی محیط تخمیر TFM حاوی کیتین کلوئیدی برای قارچ وحشی *T. viride* و جدایه های موتانت آن در شکل ۲ نشان داده شده است. میزان فعالیت آنزیم کیتیناز در قارچ وحشی *T. harzianum* و جدایه های موتانت آن از ۰/۰۸ الی U/ml ۳/۷۳ متغیر بود. همانطور که در شکل ۲ مشاهده می کنید بالاترین فعالیت آنزیم کیتیناز به ترتیب در جدایه های موتانت Th M15، Th M11، Th M8 و Th M6 مشاهده گردید. شکل ۳ نیز میانگین غلظت پروتئین بر حسب(mg/ml) در قارچ وحشی *T. harzianum* و جدایه های موتانت آن را نشان می دهد. برای مقایسه دقیق تر فعالیت ویژه آنزیم کیتیناز از تقسیم میزان عددی فعالیت آنزیم کیتیناز بر غلظت پروتئین خارج سلولی با واحد (U/mg) برای هریک از جدایه های مورد مطالعه محاسبه گردید.

بررسی فعالیت ویژه جدایه‌های مورد مطالعه نشان می‌دهد که از نظر فعالیت ویژه آنزیم کیتیناز دو جدایه موتانت Th M15 و Th M8 با فعالیت ویژه آنزیمی به‌ترتیب (U/mg) ۳۸/۱۷ و ۳۶/۵۳ فعال‌ترین جدایه‌ها بوده‌اند که تا میزان سه تا چهار برابر فعالیت بالاتری از جدایه شاهد (غیرموتانت) داشته‌اند. این در حالی است که جدایه Th M7 و Th M9 با فعالیت ویژه آنزیمی به‌ترتیب (U/mg) ۱/۹۹ و ۵/۳۸ ضعیف‌ترین جدایه‌ها بوده‌اند (شکل۴). نتایج نشان می‌دهد که در ۷۵٪ جدایه‌ها ایجاد جهش در اثر پرتوتابی با اشعه گاما منجر به افزایش فعالیت کیتینازی آن‌ها شده است و در ۱۵٪ جدایه‌ها تفاوت معنی‌داری در قدرت تولید آنزیم مشاهده نشده است. تنها در ۲۰٪ جمعیت موتانت حاصل فعالیت کیتینازی کاهش یافته که جهش نامطلوب به‌شمار می‌رود و با توجه به تصادفی‌بودن جهش در اثر پرتوتابی با اشعه گاما این جدایه‌ها کاندیدای مناسبی برای استفاده در کنترل تلفیقی بیماری‌های قارچی به‌شمار نمی‌روند.

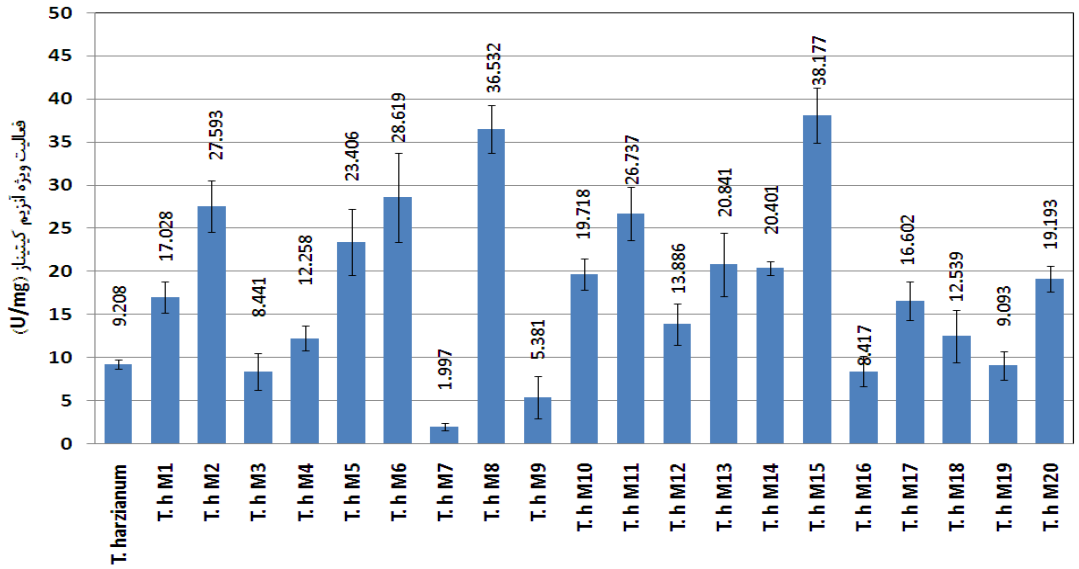
1. Bovine serum albomin



شکل ۲- فعالیت آنزیم کیتیناز جدایه‌های جهش‌یافته *T.harzianum* در مقایسه با جدایه شاهد



شکل۳- غلظت پروتئین جدایه‌های جهش‌یافته *T.harzianum* در مقایسه با جدایه شاهد



شکل ۴- فعالیت ویژه آنزیم کیتیناز جدایه‌های جهش‌یافته *T.harzianum* در مقایسه با جدایه شاهد

بحث

بررسی‌های پیشین نشان داده‌اند که قارچ تریکودرما یکی از موفق‌ترین عوامل کنترل بیولوژیک شناخته شده است و بالاترین توانایی تولید این آنزیم‌ها را در بین اکثر ارگانیسم‌های زنده دارا می‌باشد (Howell. 2003). گونه‌های مختلف تریکودرما به‌عنوان عامل کنترل بیولوژیک بسیاری از عوامل بیماری‌زای خاکزاد قارچی و باکتریایی مطرح می‌باشند و در مورد گونه *T. harzianum* بیش از سایر گونه‌های کنترل‌کننده بیولوژیک مطالعه صورت گرفته است (Chet. 1987). دانشمندان بسیاری به‌دنبال افزایش قدرت آنتاگونیستی این قارچ به‌منظور استفاده مؤثر و در سطح تجاری این قارچ با روش‌های متعدد از جمله القای موتاسیون یا انتقال ژن‌های دخیل در مکانیسم‌های کنترل بیولوژیک بوده‌اند (Muusa *et al.* 2003; Abdel-latif *et al.* 2005; Baker. 1988). نقش کیتینازهای خارج سلولی *T. harzianum* در فعالیت بیوکنترل با به‌کاربردن دستکاری ژنتیکی در نژادهای این قارچها مورد بررسی قرار گرفته است. با استفاده از نژادهای *T. harzianum* که ژن کیتیناز آن‌ها غیرفعال شده و یا دچار تغییر در توالی شده‌اند، نتایجی به‌دست‌آمده که نشان می‌دهد صفاتی مانند سرعت رشد، اسپورزایی، تولید آنتی‌بیوتیک، کلونیزاسیون ریشه و بقاء در خاک در مقایسه با نژادهای وحشی الگوهای متفاوتی را نشان می‌دهند (Beak *et al.* 1999). همچنین ایجاد موتاسیون در گونه *T. virens* با استفاده از اشعه گاما با افزایش قدرت رشد، رقابت و اسپورزایی قارچ همزمان با افزایش بیان ژن‌های مرتبط با افزایش مقاومت به *R. solani* همراه بوده است (Mukherjee *et al.* 2003). کارایی جدایه‌های جهش یافته *T. harzianum* با استفاده از اشعه گاما نیز در کنترل *Sclerotium cepivorum* و *S. rolfsii* افزایش چشمگیری یافته است (Haggag. 2002). همچنین پرتوتابی با اشعه گاما در افزایش کنترل بیولوژیکی همزمان *S. rolfsii* و *R. solani* توسط گونه‌های *T. harzianum* و *T. viride* مؤثر بوده است (Muusa and Rizk. 2003). جدایه‌های جهش‌یافته *T. harzianum* با استفاده از اشعه گاما در کنترل *Botrytis cinerea* نیز مؤفق بوده‌اند(Abdel-latif *et al.* 2005). نتایج مشابهی نیز از افزایش قدرت آنتاگونیستی جدایه‌های جهش‌یافته *T. harzianum* با اشعه گاما بر روی *Fusarium oxysporum* به‌دست‌آمده است (Baker. 1988). القای موتاسیون با به‌کاربستن پرتو گاما افزایش تولید متابولیت‌های قارچی و به‌دست‌آوردن اثر بیولوژیکی گونه‌های تریکودرما در مقابل *S. cepivorum* عامل بیماری پوسیدگی سفید پیاز را افزایش داده است. موتاسیون در سه گونه *T.harzianum*، *T. koningii* و *T.viride* در کنترل *S.cepivorum* نشان داده *T. harzianum* و *T. koningii* بالاترین مقدار ایزوآنزیم‌های کیتیناز و β-گلوکاناز را دارند و موتانت *T. viride* بالاترین مقدار ایزوآنزیم‌های سلولاز و کیتیناز را دارند (Haggag. 2002). با توجه به مطالعات گذشته می‌توان به این نتیجه رسید که اشعه گاما با ایجاد جهش در ژنوم قارچ تریکودرما می‌تواند روی ژن‌های کیتیناز، گلوکاناز

تأثیر داشته باشد و برخی از این جهش‌ها می‌تواند باعث تولید بیشتر این آنزیم‌ها شود. همچنین نقش آنزیم‌های کیتیناز در فعالیت آنتاگونیستی قارچ تریکودرما به اثبات رسیده (Abdel-latif *et al*. 2005; Howell. 1998; Mukherjee *et al*. 2003; Haggag. 2002)، و جهش در ژن‌های کدکننده آنزیم‌های مذکور در قارچ تریکودرما می‌تواند به افزایش فعالیت آنتاگونیستی آن منجر شود. با توجه به گزارشات متعددی که مؤید بروز جهش‌های ناشی از پرتو گاما در ژنوم قارچ تریکودرما که منجر به افزایش بیان ژن‌های کیتیناز و گلوکاناز در آن شده است (Mukherjee *et al*. 2003; Abdel- latif *et al*. 2005; Haggag. 2002) و نتایج این بررسی به‌نظر می‌رسد می‌توان از روش القای موتاسیون با اشعه گاما در افزایش پتانسیل آنتاگونیستی جدایه های بومی تریکودرما در ایران و دست‌یابی به منابع ژنتیکی جدیدی از عوامل بیوکنترل مؤثر و کارا استفاده نمود.

سپاسگزاری

از همکاران طرح "کنترل بیماری‌های خاکزاد گیاهی با استفاده از فناوری‌های هسته‌ای و مولکولی" در گروه پژوهشی کشاورزی هسته‌ای پژوهشکده تحقیقات کشاورزی سازمان انرژی اتمی که در انجام این مطالعه ما را یاری داده‌اند تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

Abdel-Latif H, Mohamed A, Haggag WM (2005) Biocontrol potential of salinity tolerant mutants of *Trichoderma harzianum* against *Fusarium oxysporum*causing tomato wilt disease. Arab J. Biotech, 1: 35-48.

Baker R (1988) Trichoderma sp. as plant-growth stimulants. Critical reviews in Biotechnology, 7: 97-106.

Beak M, Howell CR, Kenerley CM (1999) The role of an extracellular chitinase from *Trichoderma virens* (Gv29-8) in the biocontrol of *Rhizoctonia solani* Curr Genet, 35: 41-50.

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, 72: 248-254.

Chet I (1987) Trichoderma Application, mode of action and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. Innovative Approaches to Plant Diseases. I. Chet , ed. John Wiley & Sons, New York, pp137-160.

Cohen-Kupiec R, Chet I (1998) The molecular biology of chitin digestion. Current Opinion in Biotechnology, 9: 270-277.

Elad Y, ONeil T, Cohen A, Schtlenberg O (1995) Factors influencing control of gray mold by means of Trichodex (*Trichoderma harzianum* (T39) field conditions .In Fifth international Trichoderma and Glyocladium workshop (Beltsville).

Haran S, Schickler H, Chet I (1996) Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. Microbiology, 142: 2321-2331.

Haggag WM (2002) Induction of hyper producing chitinase Trichoderma mutants for efficient biocontrol of *Botrytis cinerea*on tomato and cucumber plants growing in plastic houses .Arab J. Biotech, 2: 151-164.

Howell CR (1998) The role of antibiosis in bicontrol. In Harman, GE. and Kubicek, CP. (eds.). Trichoderma and Gliocladium Taylor and Francis, London, 173-184.

Howell CR (2003) Mechanisms Employed by Trichoderma Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts Plant Disease, 1: 4-10.

Lorito M, Harman GE, Hayes CK, Broadway RM, Tronsmo A, Woo SL, Di Pietro A (1993) Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*; Antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase Phytopathology, 83: 302-307.

Lorito M, Woo SL, Fernandez IG, Colacci C, Harman GE, Pintor Toro JA, Filippone E, Muccifora S, Lawrence CB, Zoina A, Tuzun S, Scala F (1998) Genes from myco-parasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. Proceeding of the National Academy of Sciences, USA. 95: 7860-7865.

Moradi R, Shahbazi S, Ahari Mostafavi H, Askari H, Mirmajlesi M, Ebrahimi MA (2011) Investigation of Gamma Radiation effects on Morphological and Antagonistic Characteristics of *Trichoderma harzianum.* Proceedingof the 1st National Agricultural Conference, Dec 1 2012 in Varamin, Iran. : 405-406.

Mukherjee M, Hadar R, Mulherjee PK, Horwitz BA (2003) Homologus expression of a mutated beta-tubulin gene dose not confers benomyl resistance on *Trichoderma harzianum"* J. Applied Microbiol, 95: 861-867.

Muusa TA, Rizk MA (2003) Impact of Gamma radiation stresses on control of sugar beet pathogens *R. solani* and *S. rolfsii*. Pakistan J. of Plant Pathology, 2: 10-20.

Ulhoa CJ, Peberdy JF (1992) Purification and some properties of the extracellular chitinase produced by *Trichoderma harzianum*. Enzyme Microb. Technol. 14: 236-240.