

## بررسی تولید آنزیم کیتیناز در چندین جدایه‌ی قارچ فوزاریوم جدا شده از نماتد سیست طلائی سیب‌زمینی (*Globodera rostochiensis*)

خدیجه عباسی<sup>۱\*</sup> - دوستمراد ظفری<sup>۲</sup>

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۲/۰۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۷/۰۸

### چکیده

کیتین ترکیب غالب دیواره تخم نماتدها از جمله نماتدهای سیستی می‌باشد و کیتینازها به عنوان آنزیم‌های تجزیه‌کننده کیتین در دامنه وسیعی از موجودات از جمله قارچ‌ها وجود دارند. در این پژوهش میزان فعالیت کیتینازی ۱۶ جدایه‌ی قارچ فوزاریوم جدا شده از نماتد سیست طلائی سیب‌زمینی *Globodera rostochiensis* مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و تعیین توالی نواحی ITS از DNA ریبوزومی، ۱۶ جدایه‌ی مذکور شناسائی و سه گونه‌ی *Fusarium solani*، *F. oxysporum* و *F. equiseti* را شامل شدند. از بین این جدایه‌ها، جدایه F12 با فعالیت ویژه ۱/۰۲ واحد بر میلی‌گرم (U/mg) به عنوان فعال‌ترین و جدایه F15 با فعالیت ویژه ۰/۴ واحد بر میلی‌گرم به عنوان ضعیف‌ترین جدایه تعیین شدند. با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان از جدایه‌های فعال مورد بررسی در این مطالعه، در کنترل بیولوژیک نماتد سیست طلائی سیب‌زمینی استفاده نمود. همچنین شرایط بهینه جهت تولید آنزیم کیتیناز در جدایه‌های F12 و F15 مورد مطالعه قرار گرفت که عبارت بودند از: pH=۶، زمان ۹۶ ساعت کشت قارچ در دمای ۲۵°C و زمان مناسب برای انجام واکنش بین آنزیم و سوبسترا به مدت یک ساعت.

**واژه‌های کلیدی:** ایزوزایم، سوبسترا، کنترل بیولوژیک، واکنش آنزیمی

### مقدمه

کاهش نسبت کربن به نیتروژن در خاک، ماندگاری در خاک و در نتیجه آلودگی آب‌های زیرزمینی و قیمت بالا، ممنوع شده و همچنین در کشورهای توسعه یافته عدم دسترسی به آن‌ها و کاهش تأثیر آن‌ها به سبب استفاده مداوم از این ترکیبات منجر به این تصمیم شده است (۵). به دلیل مضرات ذکر شده، محققان به دنبال دستیابی به راه‌های مناسب برای مهار نماتدها هستند که روش مناسب برای این امر، کنترل به وسیله عوامل آنتاگونیستی مطرح شده است و از این روش به عنوان یک روش عملی و امیدبخش یاد می‌شود (۸ و ۲۲). قارچ‌های *Arthrotrichum* spp.، *Acremonium* spp.، *Dactylella* spp.، *Cylindrocarpon* spp.، *Aspergillus* spp.، *Lecanicillium* spp.، *Fusarium* spp.، *Paecilomyces* spp.، *Monacrosporium* spp.، *Pochonia* spp.، *Trichoderma* spp.، *Pyrenochaeta* spp.، *Penicillium* spp. و *Verticillium* spp. شایع‌ترین جنس‌های قارچی مرتبط با پارازیتسم تخم نماتدها هستند (۳، ۷ و ۲۵). تحقیقات زیادی روی تولید آنزیم‌های خارج سلولی توسط عوامل قارچی بیوکنترل، به طور متقاعد کننده‌ای درگیری شان را در کاهش رشد بیمارگر و آلودگی نشان می‌دهد. پروتئازها و کیتینازها جزء آنزیم‌های هیدرولیتیک خیلی مهم در این زمینه هستند (۱۲). از بین قارچ‌های همراه نماتد،

نماتدها از عوامل مهم کاهش عملکرد و بروز خسارت در تولیدات گیاهی محسوب می‌شوند و هر ساله مقدار قابل توجهی از محصولات کشاورزی در سطح جهان به دلیل آلودگی به نماتدها دچار خسارت و کاهش محصول می‌شوند (۱۱). در بین نماتدهای انگل گیاهی، نماتد سیست طلائی سیب‌زمینی *Globodera rostochiensis* (Wollenweber, 1923; Behrens, 1975) به عنوان مخرب‌ترین و خسارت‌زاترین عامل بیماری‌زای این محصول در دنیا محسوب می‌گردد که می‌تواند تا ۱۰۰ درصد باعث خسارت شود (۲). تا چند سال اخیر کاربرد سموم شیمیایی یکی از روش‌های قابل اطمینان در مدیریت این بیماری بوده است (۱۶). در حال حاضر بر اساس توافقات بین‌المللی، استفاده از نماتدکش‌های شیمیایی در بعضی از کشورها به دلایلی از قبیل اثرات مخرب آن‌ها روی انسان و محیط زیست،

۱- دانشجوی سابق دکتری گروه گیاهپزشکی، دانشگاه بوعلی سینا همدان و استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشگاه ایلام

\*- نویسنده مسئول: (Email: ma\_sarine86@yahoo.com)

۲- استاد گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا همدان  
DOI: 10.22067/jpp.v32i4.66605

سیست طلایی سیبزمینی (*G. rostochiensis*) طی تابستان ۱۳۹۳ از مزارع سیبزمینی استان همدان جداسازی و خالص سازی گردید. به این ترتیب که سیست‌های نماد سه بار در آب مقطر شستشو و با محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد ضد عفونی شدند. سپس روی کاغذ صافی سترون آب‌گیری شده و در داخل تشتک‌های حاوی محیط کشت آب-آگار (WA) کشت داده شدند. تشتک‌های حاوی سیست و تخم نماد در انکوباتور با دمای  $25^{\circ}\text{C}$  نگهداری و قارچ‌های رشد کرده از آن‌ها به محیط کشت های PDA (Potato dextrose agar) و (Clove leaf agar) منتقل و جداسازی شدند. برای خالص‌سازی جدایه‌ها از روش تک اسپور و نوک هیف استفاده شد.

### شناسایی جدایه‌های قارچی

بررسی‌های مورفولوژیکی: مشخصات ماکروسکوپی و میکروسکوپی برای تشخیص گونه‌های جدایه‌های قارچی با استفاده از کلید شناسایی سیفرت (۱۹) مورد بررسی قرار گرفت.

### بررسی‌های مولکولی

استخراج DNA ژنومی: استخراج DNA ژنومی از زیست‌توده میسلیومی تازه با استفاده از کیت تجاری (Qiagen DNAeasy plant mini kit, Hilden, Germany) مطابق با دستورالعمل سازنده انجام شد. تنظیم شرایط PCR با استفاده از آغازگرهای عمومی ITS1-ITS4 (۲۶) در مخلوط واکنشی به حجم ۲۵ میکرولیتر شامل: ۱۲/۵ میکرولیتر Takara EmeraldAmp GT Master Mix، ۲/۵ میکرولیتر آغازگر رفت ITS1 (۵ میکرومولار)، ۲/۵ میکرولیتر آغازگر برگشت ITS4 (۵ میکرومولار)، ۶/۵ میکرولیتر آب سترون دو بار تقطیر و یک میکرولیتر DNA الگو صورت گرفت.

تعیین توالی نواحی ITS و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی: تعیین توالی دوطرفه قطعات DNA تکثیر شده‌ی جدایه‌های مورد نظر، در آزمایشگاه منابع ژنومی دانشگاه ماساچوست آمریکا انجام گرفت. در این بررسی جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها و رسم کلادوگرام از نرم‌افزار Mega 5 استفاده شد. به کمک جستجوی بلاست و با توجه به مقالات متعدد در زمینه تاکسونومی جدایه‌های منتخب و Outgroup مناسب انتخاب و بعد از هم‌ردیف کردن توالی‌های به دست آمده، کلادوگرام جدایه‌ها با هزار بار نمونه‌گیری کاذب (Bootstrap) رسم گردید.

### سنجش فعالیت آنزیم کیتیناز به روش

#### دی‌نیترو سالیسیلیک اسید (DNS)

تهیه محیط کشت پایه جهت تولید آنزیم کیتیناز به روش زبلینگر

گونه‌های تریکودرما ظرفیت بیوکنترلی بالایی دارند و تولید آنزیم‌های هیدرولیزکننده مانند کیتیناز، گلوکاناز و پروتئاز به عنوان مهم‌ترین مکانیسم برای فعالیت‌های بیوکنترلی در این قارچ جهت کنترل نماتدهای انگل گیاهی به ویژه نماتدهای سیستی مطرح می‌باشد (۱۴). سیفاله و توماس (۱۵) و شارون و همکاران (۲۱) اثر متقابل بین گونه *Trichoderma harzianum* و نماد سیست طلایی سیبزمینی در شرایط آزمایشگاه را بررسی کردند و بیان داشتند که قارچ به کمک فعالیت آنزیمی در سیست و تخم داخل آن نفوذ کرده و سبب مرگ لاروها می‌شود. در بررسی‌های انجام شده توسط داکمن (۴) مشاهده شد که گونه‌ی *Verticillium suchlasporium* نود درصد تخم‌های *G. rostochiensis* را پس از ده روز پارازیته کرد و این امر ناشی از فعالیت آنزیم‌های پروتئاز و کیتیناز تولید شده توسط قارچ مذکور بود. در مطالعه‌ای که توسط تیکونو و همکاران (۲۴) انجام گرفت تیمار تخم‌های *G. pallida* با کیتیناز CHI43 به دست آمده از قارچ *V. suchlasporium* باعث ایجاد حالتی شبیه جای زخم روی تخم شد و اضافه کردن سرین پروتئاز P32 سبب گسترش این حالت به سطح بیشتری از تخم گردید. ایشان نتیجه گرفتند هر دو آنزیم در فرآیند بیماری‌زایی نماد نقش دارند. اسزابو و همکاران (۲۳) آنزیم‌های *chi18-5* و *chi18-12* قارچ *T. harzianum* را در فرآیند پارازیته کردن تخم نماد *Caenorhabditis elegans* دخیل دانستند. در مطالعه‌ی انجام شده توسط مانزانیلا لویز و همکاران (۹) روی عملکرد قارچ *Pochonia chlamydosporia* در کنترل نماتدهای انگل گیاهی، نقش آنزیم‌های خارج سلولی از جمله پروتئاز و کیتیناز در آلودگی تخم نماتدها مهم عنوان شد. همچنین سانتوس و همکاران (۱۸) بیولوژی، پارامترهای رشد و فعالیت آنزیمی چندین جدایه *P. chlamydosporia* جدا شده از نماتدهای سیستی سیبزمینی و ریشه‌گرهی را مورد بررسی قرار داده و پروتئازها و کیتینازهای خاصی را از این قارچ جدا کردند. بنابراین با توجه به این که کیتین، ترکیب غالب لایه میانی پوسته‌ی تخم نماد می‌باشد و از آنجایی که کیتینازها به عنوان آنزیم‌های تجزیه‌کننده کیتین در دامنه وسیعی از موجودات از جمله قارچ‌ها وجود دارند، در این پژوهش تلاش شده پتانسیل قابل توجه این آنزیم‌ها در چندین جدایه‌ی قارچ فوزاریوم جدا شده از نماد سیست طلایی سیبزمینی مورد بررسی قرار گیرد و با توجه به نتایج حاصل می‌توان از جدایه‌های بالقوه‌ی مورد بررسی در این مطالعه در کنترل بیولوژیک این نماد استفاده نمود.

### مواد و روش‌ها

#### تهیه جدایه‌های قارچ

تعداد ۱۶ جدایه از گونه‌های مختلف قارچ *Fusarium* از نماد

دقیقه با دور ۶۰۰۰ بر دقیقه سانتریفیوژ گردید و بخش رویی (محلوم رویی شناور) میکروتیوب‌ها برداشته شد و جذب نوری آن‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۴۰ نانومتر در دو زمان ۲۴ ساعت و ۹۶ ساعت اندازه‌گیری گردید. برای رسم منحنی استاندارد از آن استیل‌دی‌گلوکزآمین به عنوان استاندارد استفاده شد. جهت محاسبه‌ی فعالیت ویژه‌ی آنزیم و تعمیم فعالیت آنزیم به میلی‌گرم پروتئین موجود در عصاره، میزان پروتئین کل موجود در نمونه‌ها به روش برادفورد (۱) تعیین و از سرم آلبومین گاوی (BSA) برای تهیه‌ی منحنی استاندارد پروتئین استفاده گردید. نهایتاً دو جدایه به عنوان فعال‌ترین و ضعیف‌ترین جدایه‌ها جهت بررسی‌های بیشتر و تعیین شرایط بهینه تولید آنزیم انتخاب شدند.

#### سنجش آنزیمی دو جدایه‌ی منتخب با استفاده از کیت

فعالیت آنزیمی در جدایه‌های F12 و F15 که بر اساس سنجش فعالیت ویژه‌ی آنزیم کیتیناز به روش DNS در دو زمان ۲۴ ساعت و ۹۶ ساعت رشد قارچی به ترتیب به عنوان فعال‌ترین و ضعیف‌ترین جدایه‌ها شناخته شده بودند، با استفاده از کیت Chitinase assay (CS1030) fluorimetric تهیه شده از شرکت Sigma بر اساس سه سوبسترای اختصاصی جهت بررسی فعالیت سه نوع ایزوزایم کیتینازی (جدول ۱) در دو طول موج ۳۶۰nm (طول موج تحریک) و ۴۵۰nm (طول موج نشر) در پنج روز متوالی از رشد قارچ اندازه‌گیری شد. از قارچ *Trichoderma viride* به عنوان کنترل مثبت در این آزمایش استفاده گردید.

و همکاران (۲۷) انجام گرفت. از کشت پنج روزه‌ی ۱۶ جدایه‌ی قارچی، دیسک‌هایی به قطر پنج میلی‌متر در محیط کشت مایع MSM (Minimal synthetic medium) شامل  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ : ۲/۸ گرم، Urea: ۰/۶ گرم،  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : ۴ گرم،  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ : ۰/۶ گرم،  $\text{MgSO}_4$ : ۰/۲ گرم،  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : ۰/۰۱ گرم،  $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ : ۰/۰۲۸ گرم،  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ : ۰/۰۳۲ گرم و یک گرم در لیتر کلوئیدی استفاده شد. برای تهیه کیتین کلئیدی، ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید فسفریک ۸۵ درصد به ده گرم پودر کیتین (Sigma) افزوده شد و مخلوط حاصل به مدت ۲۴ ساعت در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. به مخلوط فوق، آب اضافه شده و با پارچه پنبه صاف گردید. برای حذف کامل اسید، مراحل افزودن آب و صاف کردن آن، چندین بار تکرار شد. ماده‌ی خمیری شکل حاصل، در هوای آزاد خشک و پودر گردید و از آن به‌عنوان منبع کربن در محیط کشت استفاده شد (۲۰). سپس ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت مذکور را در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته و روی شیکر با سرعت ۱۲۰ دور بر دقیقه و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج روز قرار داده شدند.

بررسی فعالیت آنزیم کیتیناز به روش مونرال و ریس (۱۰) به شرح زیر صورت پذیرفت. ترکیب واکنش شامل ۲۰۰ میکرولیتر محلول ۰/۵ درصد کیتین تهیه شده در بافر سیترات فسفات ۰/۰۵ مولار (pH=۶/۶) و ۲۰۰ میکرولیتر عصاره‌ی آنزیم بود. مخلوط حاصل برای مدت ۶۰ دقیقه در حمام آب ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از آن، به مخلوط واکنش یک میلی‌لیتر معرف DNS اضافه و به مدت پنج دقیقه در آب در حال جوشیدن قرار گرفت. سپس برای مدت پنج

جدول ۱- سوبستراهای مورد استفاده جهت بررسی فعالیت سه نوع ایزوزایم کیتینازی

Table 1- The substrates used to assessment of three chitinase isozymes

سوبسترا Substrate	ایزوزایم Isozyme
4-Methylumbelliferyl N,N'- diacetyl-β-D-chitobioside	Chitobiosidase (Exochitinase)
4-Methylumbelliferyl N-acetyl-β-D-glucosaminide	β-N-acetylglucosaminidase (Exochitinase)
4-Methylumbelliferyl β-D-N,N',N''-triacetylchitotriose	Endochitinase

بهینه تولید آنزیم برای هر دو جدایه در نظر گرفته شد. بدین منظور از دو جدایه‌ی منتخب، کشت‌هایی در pH‌های ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸ و ۹، دماهای ۲۲، ۲۵، ۲۸ و ۳۱ درجه سانتی‌گراد و زمان واکنش بین آنزیم و سوبسترا به مدت یک، شش و ۲۴ ساعت تهیه گردید.

#### تجزیه آماری داده‌ها

تجزیه واریانس فعالیت ویژه‌ی آنزیم کیتیناز در روز اول و چهارم

#### بررسی شرایط بهینه تولید آنزیم در دو جدایه‌ی منتخب

به منظور بررسی شرایط بهینه تولید آنزیم کیتیناز در دو جدایه‌ی منتخب F12 و F15، نقش تغییرات pH، دما و زمان مورد نیاز جهت انجام واکنش بین آنزیم و سوبسترا به روش DNS مورد بررسی قرار گرفت. چون بر اساس اندازه‌گیری فعالیت آنزیم با استفاده از کیت سنجش، جدایه‌های مذکور در روز چهارم (۹۶ ساعت) بیشترین فعالیت را نشان دادند، روز چهارم به عنوان زمان مناسب جهت بررسی شرایط

هوایی به صورت جانبی تولید شده و زمانی که اسپوردوخیوم تولید شد، در آن سلول‌های مونوفیالید کوتاه و متراکم تولید می‌شوند. ماکروکنیدیوم‌ها در این گونه خمیده بوده و دارای دیواره‌های ضخیم و در دو انتها باریک شده‌اند. معمولاً سلول انتهایی باریک و بلند است و سلول پایه‌ای به‌طور بسیار مشخصی پاشنه‌ای شکل و ساقه‌دار می‌باشد. ماکروکنیدیوم‌ها معمولاً ۷-۴ دیواره‌ای هستند. میکروکنیدیوم در این گونه تشکیل نمی‌شود. کلامیدوسپورها در این گونه فراوان، به صورت زنجیره‌ای یا خوشه‌ای روی ریشه‌های هوایی و یا در محیط کشت تشکیل می‌گردند.

### *Fusarium oxysporum*

از این گونه قارچی تعداد هفت جدایه جداسازی و شناسایی گردیدند و جدایه F16 با کد IRAN 2830C در کلکسیون قارچ‌های زنده در مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی ایران نگهداری می‌شود. میزان رشد پرگنه قارچ روی محیط کشت PDA پس از ده روز در دمای ۲۵°C به ۸/۵ سانتی‌متر می‌رسد. رنگ پرگنه این قارچ در جدایه‌های مختلف بسیار متنوع بوده و رنگ پرگنه در سطح زیرین محیط کشت PDA از سفید، بنفش متمایل به ارغوانی تا بنفش تیره متغیر بود. ریشه‌های هوایی روی محیط کشت نسبتاً فراوان، پنبه‌ای و ابتدا سفید رنگ بوده، سپس به رنگ صورتی تا بنفش کم‌رنگ تغییر می‌یابند. در بعضی از جدایه‌ها ریشه‌های هوایی به مقدار بسیار کمی تشکیل شد. کنیدیوم‌ها دارای سلول‌های کنیدیوم‌زای مونوفیالیدی منشعب و غیرمنشعب می‌باشند. کنیدیوم‌های اولیه به‌صورت جانبی و کوتاه روی ریشه‌های هوایی تولید می‌شوند. ابتدا غیرمنشعب بوده و بعداً ممکن است منشعب شوند. سلول‌های کنیدیوم‌زای مونوفیالید در مقایسه با گونه‌ی *F. solani* کوتاه هستند. میکروکنیدیوم‌ها به فراوانی و به‌صورت سرهای دروغین تشکیل شده و تک سلولی و دو سلولی‌اند. به شکل بیضوی، تخم‌مرغی تا تقریباً چماقی شکل دیده می‌شوند ولی غالباً بیضوی هستند. دو انتهای ماکروکنیدیوم‌ها کمی باریک شده، سلول انتهایی آن‌ها کمی نوک‌تیز می‌باشد و سلول پایه‌ای آن‌ها نسبتاً ساق‌دار است. البته سلول پایه‌ای در بعضی جدایه‌ها به‌طور مشخص پاشنه‌ای شکل بوده و در بعضی دیگر کاملاً پاشنه‌ای شکل نبودند. اغلب ماکروکنیدیوم‌ها سه دیواره‌ای هستند، اما گاهی چهار دیواره‌ای هم وجود دارد. اسپوردوخیوم‌های نارنجی‌رنگ معمولاً پس از ۷-۵ روز تولید می‌شوند. کلامیدوسپورهای ریشه‌ای و کنیدیومی به فراوانی و به صورت میانی و انتهایی تشکیل می‌شوند که اغلب سطحی صاف دارند، ولی در برخی هم با سطحی ناصاف مشاهده می‌شوند. به شکل کروی و به صورت منفرد، جفتی و گاهی به‌صورت توده‌ای تشکیل می‌شوند. به طور کلی تولید میکروکنیدیوم‌ها به‌صورت سرهای دروغین و روی فیالیدهای کوتاه، تولید کلامیدوسپور و شکل ظاهری ماکروکنیدیوم‌ها از مشخصات عمده‌ی این گونه می‌باشد. قارچ

برای ۱۶ جدایه‌ی قارچی در سه تکرار به صورت طرح پایه کاملاً تصادفی با نرم‌افزار SAS و مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام شد. تجزیه واریانس فعالیت ایزوزایم‌های ۱، ۲ و ۳ با استفاده از کیت سنجش کیتیناز در دو جدایه‌ی منتخب به صورت طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی صورت گرفت. علاوه بر این، به منظور بیان تغییرات فعالیت آنزیم نسبت به زمان، از معادله لجستیک- پیک (معادله ۱) استفاده گردید.

$$Y = a + b \times 4 \times (\exp(-(x-c)/d)) / (1 + \exp(-(x-c)/d))^2 \quad (1)$$

در این معادله a: عرض از مبدا، b: زمان رسیدن به حداکثر تولید آنزیم، c: حداکثر آنزیم و d: نقطه عطف منحنی که در آن تولید آنزیم وارد مرحله‌ی خطی می‌شود و x: زمان، بر حسب روز است. بررسی تغییرات pH، دما و زمان انجام واکنش در تولید آنزیم در دو جدایه F12 و F15 به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار انجام گرفت. قبل از انجام تجزیه واریانس، نرمال بودن توزیع داده‌ها توسط نرم‌افزار SAS با استفاده از آزمون‌های شاپیرو-والک و کولموگراف-اسمیرنوف مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه واریانس آماری داده‌ها با نرم‌افزار SAS، رسم نمودارها به کمک نرم‌افزار Excel و مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد.

## نتایج و بحث

### شناسایی مورفولوژی و مولکولی

شناسایی ۱۶ جدایه‌ی قارچی بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی بر اساس کلید شناسایی سیفرت، ۱۹۹۶ انجام شد. بلاست حاصل از توالی نواحی ITS نشان دهنده شباهت ۹۹٪ به بالای جدایه‌های مورد بررسی در این پژوهش به جدایه‌های موجود در بانک ژن بود. بر اساس بررسی‌های مورفولوژی و مولکولی انجام شده، ۱۶ جدایه‌ی مذکور در سه گونه‌ی *F. solani*، *F. oxysporum* و *F. equiseti* قرار گرفتند (شکل‌های ۱ و ۲).

### *Fusarium equiseti*

از این گونه قارچی تعداد چهار جدایه جداسازی و شناسایی گردیدند و جدایه F5 با کد IRAN 2832C در کلکسیون قارچ‌های زنده در مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی ایران نگهداری می‌شود. میزان رشد پرگنه قارچ روی محیط کشت PDA پس از ده روز در دمای ۲۵°C برابر هفت سانتی‌متر بوده و رنگ سطح زیرین پرگنه زرد تا قهوه‌ای می‌باشد. ریشه‌های هوایی به فراوانی و به صورت پنبه‌ای رشد کرده و به رنگ سفید تا قهوه‌ای دیده می‌شوند. فقط تولید سلول‌های کنیدیوم‌زای مونوفیالیدیک می‌کنند. ابتدا مونوفیالیدها روی ریشه‌های

فیالیدهای منفرد طویل تشکیل می‌شوند. آن‌ها یک یا دو سلولی و به شکل‌های تخم‌مرغی، بیضوی یا قلوهای شکل می‌باشند. در بعضی جدایه‌ها اسپوردوخیوم‌ها تولید نمی‌شوند و در بعضی دیگر اسپوردوخیوم‌های کرم‌رنگ بخش زیادی از پرگنه (به‌خصوص اطراف برگ‌های میخک در محیط‌کشت CLA) را فرا می‌گیرند. کلامیدوسپورها به فراوانی و به صورت میانی یا انتهایی، منفرد یا جفتی، زنجیره‌ای یا توده‌ای تشکیل می‌شوند و معمولاً دارای سطحی صاف هستند. شکل ماکروکنیدیوم‌ها، طویل بودن فیالیدها و وجود کلامیدوسپور از مشخصات بارز این گونه است. این گونه با تولید فیالیدهای طویل از *F. oxysporum* که فیالیدهای کوتاه تولید می‌کند، متمایز می‌گردد.

### فعالیت آنزیمی

فعالیت ویژه آنزیم برای ۱۶ جدایه‌ی مذکور، به صورت میلی‌گرم آن‌استیل‌دی‌گلوکزآمین آزاد شده در دقیقه به ازای یک میلی‌گرم پروتئین کل موجود در عصاره در دو زمان ۲۴ ساعت و ۹۶ ساعت در سه تکرار تعیین شد. تمام جدایه‌ها دارای فعالیت کیتینازی یوده و فعالیت ویژه آنزیم در تمام جدایه‌ها در روز چهارم نسبت به روز اول دارای سیر صعودی بود. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که فعالیت ویژه‌ی آنزیم در روز اول و چهارم، بین جدایه‌های مختلف فوزاریوم در سطح احتمال ۰/۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۲).

*F. solani* را می‌توان به‌عنوان یکی از گونه‌های نزدیک به *Fusarium oxysporum* نام برد. فیالیدهای *F. oxysporum* نسبت به *F. solani* کوتاه‌تر و ضخیم‌تر است. ماکروکنیدیوم‌ها نسبت به *F. solani* کمی باریک‌ترند و خمیدگی بیشتری دارند و میکروکنیدیوم‌های آن نیز کوچک‌تر است.

### *Fusarium solani*

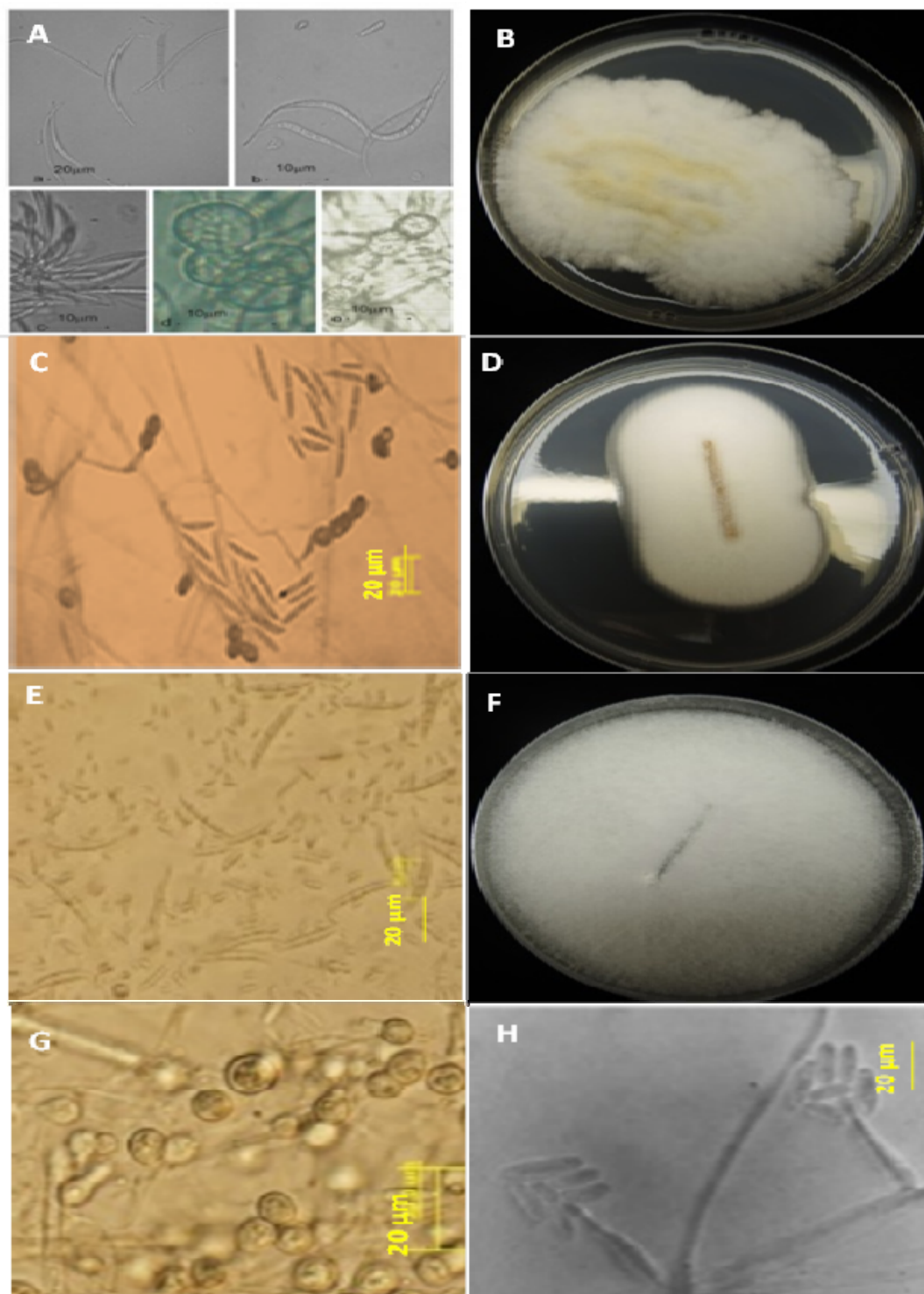
از این گونه قارچی، تعداد پنج جدایه جداسازی و شناسایی گردید. میزان رشد پرگنه قارچ روی محیط‌کشت PDA پس از ده روز در دمای ۲۵°C برابر هشت سانتی‌متر بود. رنگ پرگنه در سطح زیرین، کرم تا بنفش کمرنگ بود. ریشه‌های هوایی روی محیط‌کشت کم و پراکنده و به رنگ قهوه‌ای کمرنگ بود. کنیدیفورهای اولیه دارای سلول‌های کنیدیوم‌زای مونوفیالید غیرمنشعب می‌باشند و بعد از ۳-۴ روز، کنیدیفورهای منشعب هم تعدادشان افزایش می‌یابد. کنیدیفورها به‌صورت جانبی و بلند روی ریشه‌های هوایی تولید می‌شوند. سلول‌های کنیدیوم‌زای مونوفیالید در مقایسه با گونه‌ی *F. oxysporum* بلند هستند. ماکروکنیدیوم‌ها تقریباً سیلندری شکل بوده و قطر آن‌ها زیاد است. ماکروکنیدیوم‌ها کمی خمیده هستند و عمدتاً دیواره‌های ضخیمی دارند. سلول انتهایی آن‌ها تقریباً کوتاه و سلول پایه‌ای آن‌ها کمی فرورفتگی دارد. اغلب ماکروکنیدیوم‌ها سه دیواره‌ای هستند، اما گاهی ۴-۵ دیواره‌ای هم وجود دارد. میکروکنیدیوم‌ها به‌صورت فراوان و به‌صورت سرهای دروغین روی

جدول ۲- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) فعالیت ویژه‌ی آنزیم به روش دی نیتروسالیسیلیک اسید در روز اول و چهارم رشد در ۱۶ جدایه‌ی مختلف از قارچ فوزاریوم

Table 2- Analysis of variance (mean square) of the chitinase specific activity by DNS method in 24 h and 96 h after fungal growth among 16 isolates of *Fusarium* spp

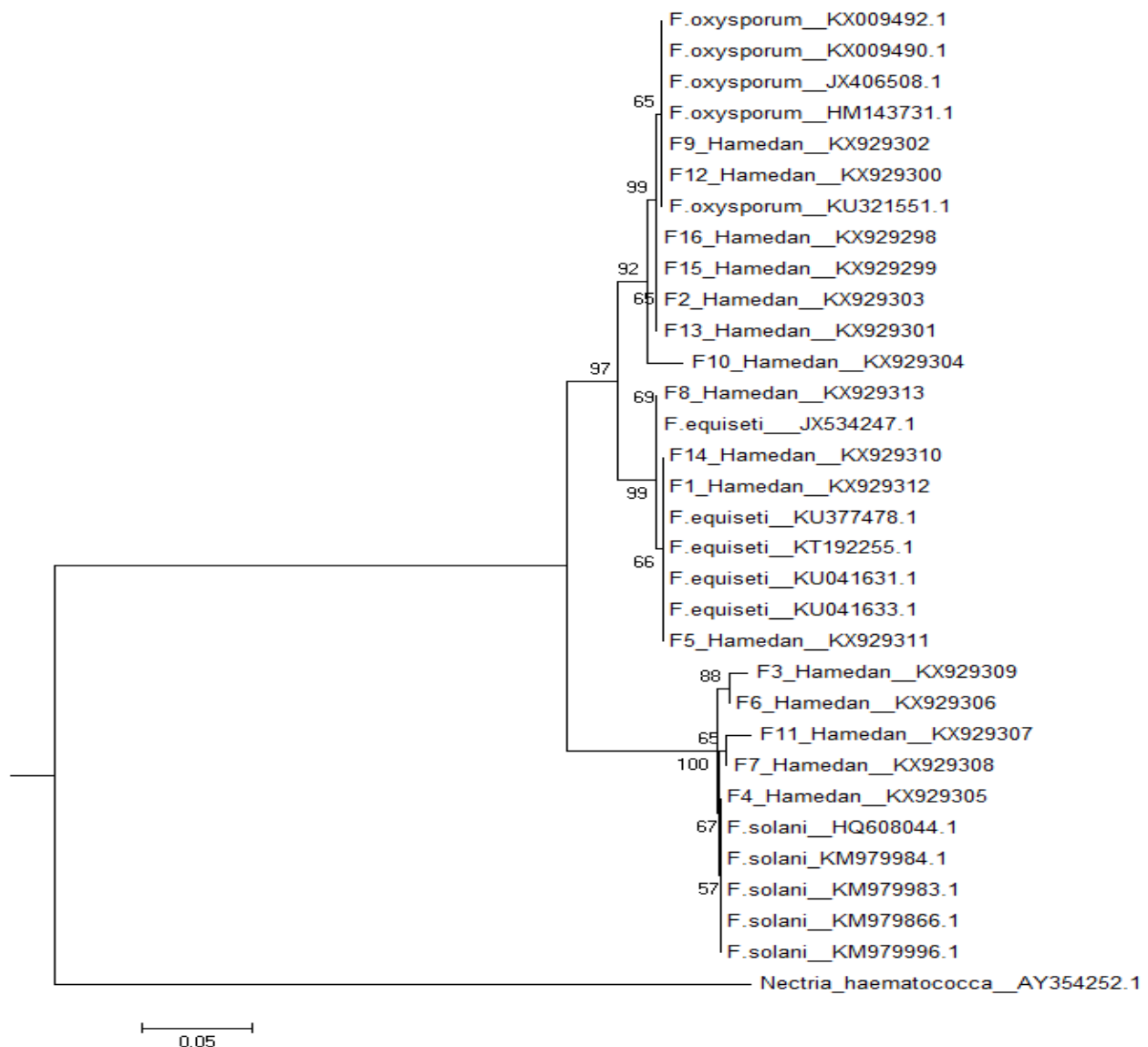
منابع تغییرات Sources of variance	درجه آزادی Degree of freedom	فعالیت ویژه (۲۴ ساعت) Specific activity (24 h)	فعالیت ویژه (۹۶ ساعت) Specific activity (96 h)
جدایه Isolate	15	0.009409***	0.085646***
خطا Error	32	0.000099	0.013514
ضریب تغییرات (درصد) CV%	-	4.96	17.84

\*\*\*: معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۱ درصد  
\*\*\*: Significant at 0.1% level



شکل ۱- گونه‌ی قارچی *F. equiseti*، A: اشکال کنیدیوم و کلامیدوسپور، B: سطح رویی پرگنه. گونه‌ی قارچی *F. solani*، C: اشکال کنیدیوم، D: سطح رویی پرگنه. گونه‌ی قارچی *F. oxysporum*، E: اشکال کنیدیوم، F: سطح رویی پرگنه، G: کلامیدوسپور، H: سرهای دروغین

Figure 1- Fungal species, *F. equiseti*, A: Conidia and chlamydospores, B: Mycelium. *F. solani*, C: Conidia, D: Mycelium. *F. oxysporum*, E: Conidia, F: Mycelium, G: Chlamydospore, H: False heads



شکل ۲- کلادوگرام به دست آمده از توالی نواحی ITS در ۱۶ جدایه از قارچ فوزاریوم با استفاده

از نرم‌افزار Mega 5 و روش Neighbour-Joining

Figure 2- Cladogram obtained from ITS sequences of 16 isolates of *Fusarium* by Mega 5 software using Neighbour-Joining method

انتخاب شدند.

در بررسی‌های مربوط به اندازه‌گیری فعالیت سه ایزوزایم کیتینازی با استفاده از کیت سنجش کیتیناز در دو جدایه F15 و F12، نتایج نشان داد که اثرات زمان رشد قارچ (روز اول، دوم، سوم، چهارم و پنجم) بر فعالیت ایزوزایم ۱ (Chitobiosidase)، ایزوزایم ۲ (Endochitinase) و ایزوزایم ۳ (β-N-acetylglucosaminidase) در هر دو جدایه معنی‌دار بود. اثرات جدایه بر فعالیت ایزوزایم ۲ و ایزوزایم ۳ نیز معنی‌دار گردید (جدول ۳).

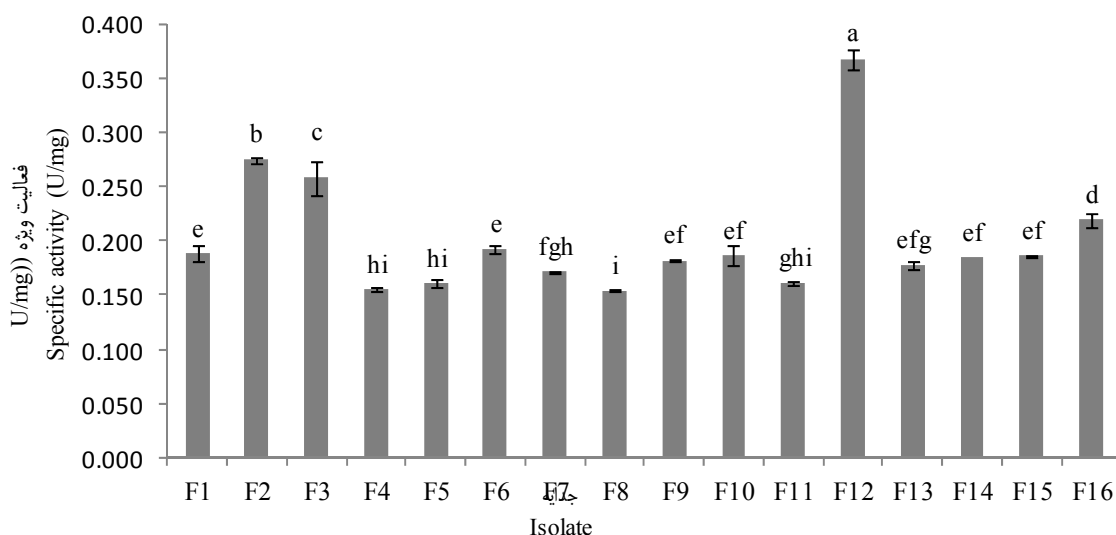
بیشترین و کمترین فعالیت ویژه‌ی آنزیم در روز اول به ترتیب در جدایه‌های F12 (۰/۳۷ واحد بر میلی‌گرم) و F8 (۰/۱۵ واحد بر میلی‌گرم) به دست آمد (شکل ۳). در روز چهارم نیز، بیشترین فعالیت ویژه‌ی آنزیم ۱/۰۲ (واحد بر میلی‌گرم) در جدایه F12 و کمترین فعالیت ویژه‌ی آنزیم ۰/۴۵ (واحد بر میلی‌گرم) در جدایه F15 مشاهده گردید (شکل ۴). نهایتاً براساس نتایج روز چهارم، جدایه‌های F12 و F15 به عنوان فعال‌ترین (دارای بیشترین فعالیت ویژه) و ضعیف‌ترین (دارای کمترین فعالیت ویژه) جدایه‌ها جهت مطالعات بعدی

جدول ۳- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) فعالیت سه نوع ایزوزایم کیتینازی با استفاده از کیت سنجش در پنج روز متوالی رشد بین دو جدایه F15 و F12

Table 3- Variance analysis (mean squares) of the chitinase activity of three isozymes in isolates F12 and F15 in 5 days

منابع تغییرات Sources of variance	درجه آزادی Degree of freedom	ایزوزایم ۱ Isozyme 1	ایزوزایم ۲ Isozyme 2	ایزوزایم ۳ Isozyme 3
بلوک (زمان) Block (time)	4	6.708**	14.089***	2.377*
جدایه Isolate	1	0.588 <sup>ns</sup>	1.822***	2.330*
خطا Error	4	0.366	0.015	0.229
ضریب تغییرات (درصد) CV%	-	40.18	4.20	27.03

\*\*\* و \*\* : به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۰.۱ و ۱ درصد  
 \*, \*\*, \*\*\*: Significant at 5 %, 1 % and 0.1 % probability levels, respectively



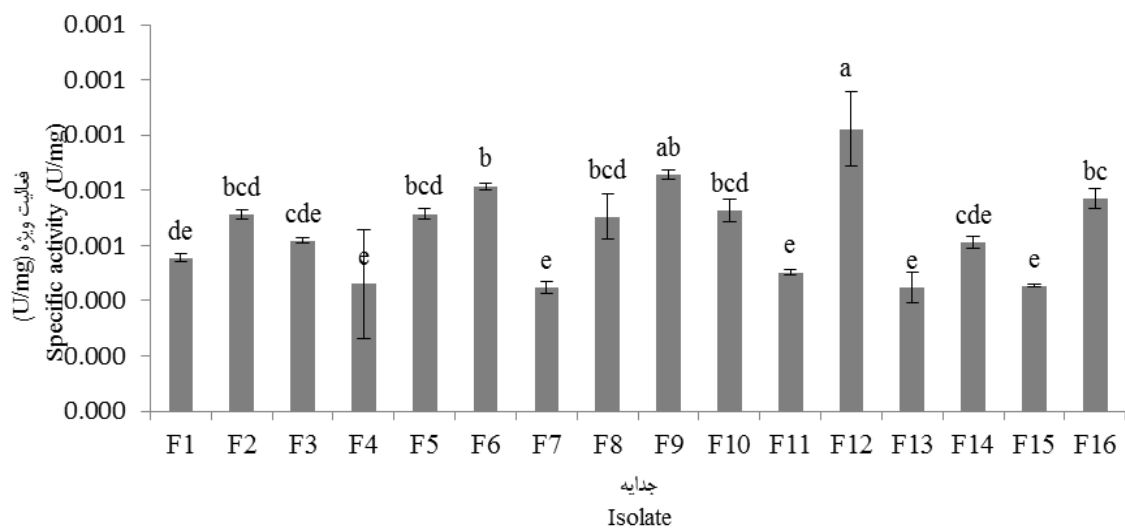
شکل ۳- فعالیت ویژه آنزیم کیتیناز به روش دی نیتروسالیسیلیک اسید در ۲۴ ساعت رشد در ۱۶ جدایه از قارچ فوزاریوم  
 Figure 3- Chitinase specific activity by DNS method in 24 h after fungal growth among 16 isolates of *Fusarium* spp

جدول ۴- مقایسه میانگین فعالیت سه نوع ایزوزایم کیتینازی با استفاده از کیت سنجش در پنج روز متوالی  
 Table 4- Mean comparison of the chitinase activity of three isozymes in 5 days

زمان (روز) Time (day)	ایزوزایم ۱ (واحد بر میلی لیتر) Isozyme 1 (U/ml)	ایزوزایم ۲ (واحد بر میلی لیتر) Isozyme 2 (U/ml)	ایزوزایم ۳ (واحد بر میلی لیتر) Isozyme 3 (U/ml)
1	0.22 <sup>b</sup>	0.7 <sup>c</sup>	0.049 <sup>b</sup>
2	0.15 <sup>b</sup>	2.1 <sup>b</sup>	3.559 <sup>a</sup>
3	0.18 <sup>b</sup>	3.4 <sup>b</sup>	10.585 <sup>a</sup>
4	58.64 <sup>a</sup>	344.5 <sup>a</sup>	13.614 <sup>a</sup>
5	25.45 <sup>a</sup>	384 <sup>a</sup>	17.207 <sup>a</sup>

Means followed by the same letters in each column are not significantly different according to Duncan's multiple range test (p≤0.01)





شکل ۴- فعالیت ویژه‌ی آنزیم کیتیناز به روش دی نیتروسالیسیلیک اسید در ۹۶ ساعت رشد در ۱۶ جدایه از قارچ فوزاریوم  
Figure 4- Chitinase specific activity by DNS method in 96 h after fungal growth among 16 isolates of *Fusarium* spp

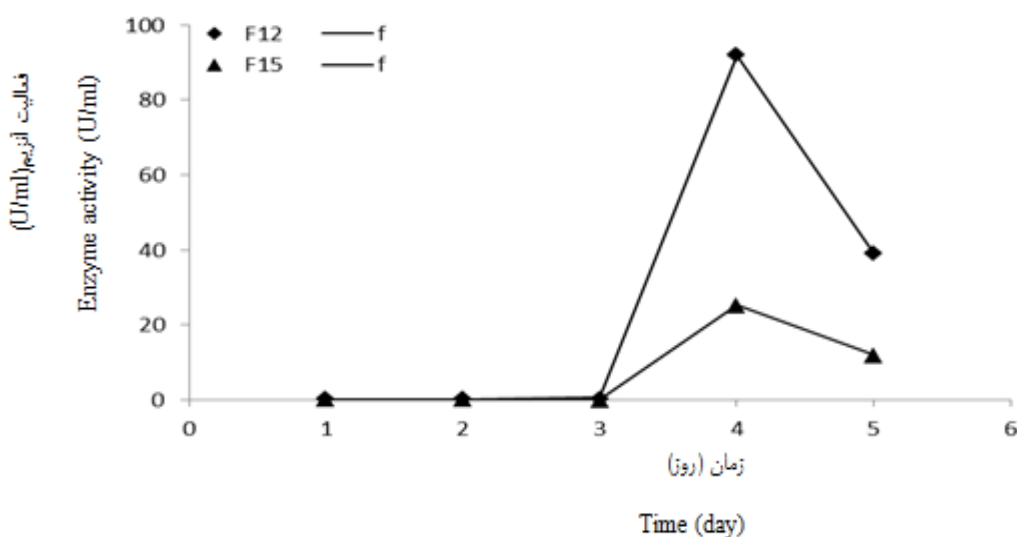
ایزوزایم ۱ نشان داد که تولید آنزیم در هر دو جدایه بعد از سه روز از انکوباسیون دیده شد و در روز چهارم به حداکثر مقدار خود رسید و با انکوباسیون بیشتر فعالیت آنزیم کاهش یافت (شکل ۵). ایزوزایم ۲ روند مشابه با ایزوزایم ۱ را در هر دو جدایه نشان داد (شکل ۶) اما فعالیت ایزوزایم ۳ در یک روز بعد از انکوباسیون آغاز و در روز چهارم به حداکثر مقدار خود رسید و سپس روند نزولی در پیش گرفت (شکل ۷). بر اساس نتایج به دست آمده از اثرات زمان رشد قارچ (روز اول، دوم، سوم، چهارم و پنجم) بر فعالیت ایزوزایم ۱، ایزوزایم ۲ و ایزوزایم ۳ بیشترین فعالیت آنزیم برای هر دو جدایه در روز چهارم مشاهده گردید.

بیشترین فعالیت آنزیم ۱ در روزهای چهارم و پنجم و کمترین مقدار آن در روزهای اول، دوم و سوم مشاهده گردید. بیشترین فعالیت آنزیم ۲ در روزهای چهارم و پنجم و کمترین مقدار آن در روز اول مشاهده گردید. زمان‌های دوم تا پنجم از نظر فعالیت آنزیم ۳ اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند و کمترین مقدار در روز اول مشاهده گردید (جدول ۴). در بین دو جدایه‌ی F15 و F12 از نظر فعالیت آنزیم ۱ با هم اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. بیشترین فعالیت آنزیم ۲ و ۳ در جدایه‌ی F12 به دست آمد (جدول ۵).  
روند فعالیت ایزوزایم‌های ۱، ۲ و ۳ در زمان‌های مختلف (پنج روز متوالی) بین دو جدایه‌ی F15 و F12 نیز بررسی شد. بررسی فعالیت

جدول ۵- مقایسه میانگین فعالیت سه نوع آنزیم کیتینازی با استفاده از کیت سنجش بین دو جدایه F12 و F15  
Table 5- Mean comparison of the chitinase activity of three isozymes in isolates F12 and F15

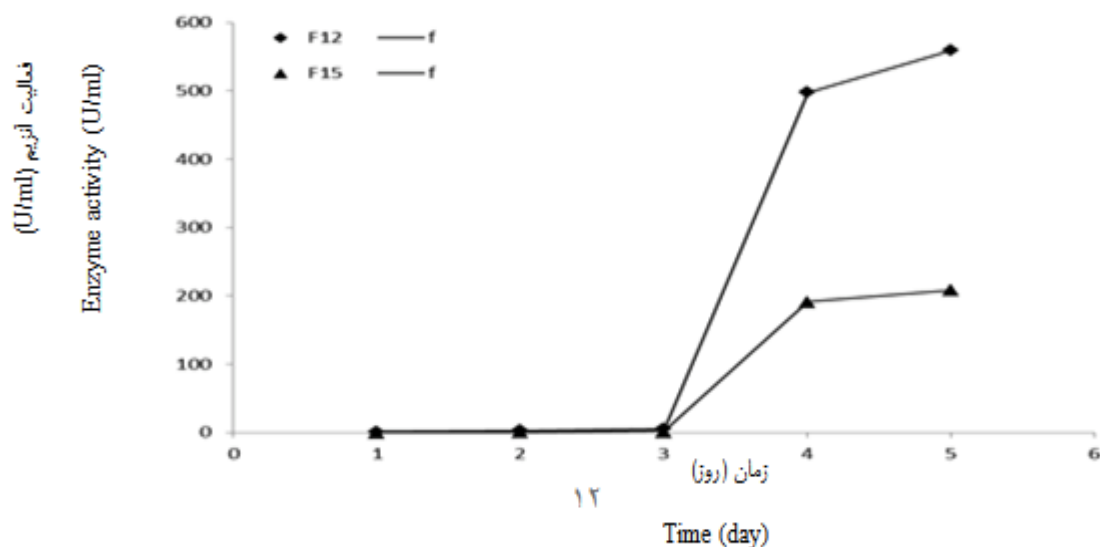
جدایه Isolate	ایزوزایم ۱ (واحد بر میلی لیتر) Isozyme 1 (U/ml)	ایزوزایم ۲ (واحد بر میلی لیتر) Isozyme 2 (U/ml)	ایزوزایم ۳ (واحد بر میلی لیتر) Isozyme 3 (U/ml)
F12	26.32 <sup>a</sup>	213.44 <sup>a</sup>	14.359 <sup>a</sup>
F15	7.54 <sup>a</sup>	80.45 <sup>b</sup>	3.646 <sup>b</sup>

Means followed by the same letters in each column are not significantly different according to Duncan's multiple range test ( $p \leq 0.01$ )



شکل ۵- روند فعالیت آنزیم کیتیناز (Chitobiosidase) بین دو جدایه‌ی F12 و F15 در پنج روز متوالی رشد قارچ بر اساس سوبسترا (4-Methylumbelliferyl N,N'-diacetyl-β-D-chitobioside)

Figure 5- The activity of the isozyme 1 (Chitobiosidase) in isolates F12 and F15 in five successive days based on substrate (4-Methylumbelliferyl N, N'-diacetyl-β-D-chitobioside)



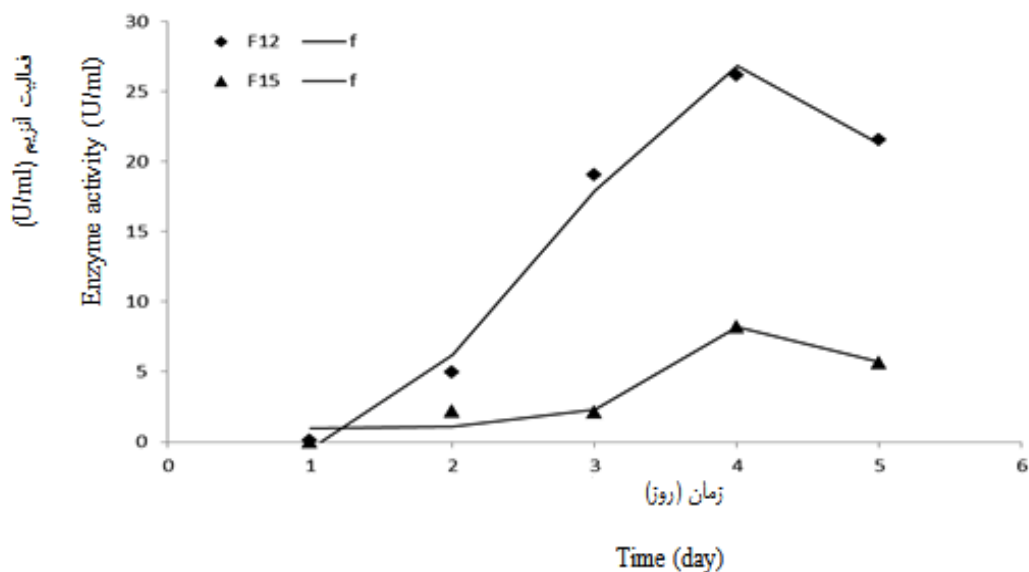
شکل ۶- روند فعالیت آنزیم کیتیناز (β-N-acetylglucosaminidase) بین دو جدایه‌ی F12 و F15 در پنج روز متوالی رشد قارچ بر اساس سوبسترا (4-Methylumbelliferyl N-acetyl-β-D-glucosaminide)

Figure 6- The activity of the isozyme 2 (β-N-acetylglucosaminidase) in isolates F12 and F15 in five successive days based on substrate (4-Methylumbelliferyl N-acetyl-β-D-glucosaminide)

بیشترین فعالیت ویژه‌ی آنزیم برای در هر دو جدایه‌ی F12 و F15 در دمای ۲۵°C به دست آمد. بنابراین دمای ۲۵°C دمای بهینه جهت تولید آنزیم در هر دو جدایه می‌باشد (شکل ۸).

#### شرایط بهینه تولید آنزیم

نتایج نشان داد که تأثیر جدایه و دما بر فعالیت ویژه‌ی آنزیم در سطح احتمال ۰/۱ درصد معنی‌دار گردید. همچنین اثرات متقابل تیمارها بر فعالیت در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۶).



شکل ۷- روند فعالیت آنزیم کیتیناز (Endochitinase) در بین دو جدایه‌ی F12 و F15 در پنج روز متوالی رشد قارچ بر اساس سوبسترا (4-Methylumbelliferyl β-D-N,N',N''-triacetylchitotriose)

Figure 7- The activity of the isozyme (Endochitinase) in isolates F12 and F15 in five successive days based on substrate (4-Methylumbelliferyl β-D-N,N',N''-triacetylchitotriose)

جدول ۶- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) فعالیت ویژه‌ی آنزیم بین دو جدایه‌ی F12 و F15 در دماهای مختلف.

Table 6- Variance analysis (mean squares) of effect of temperature on chitinase specific activity in 2 fungal isolates, F12 and F15

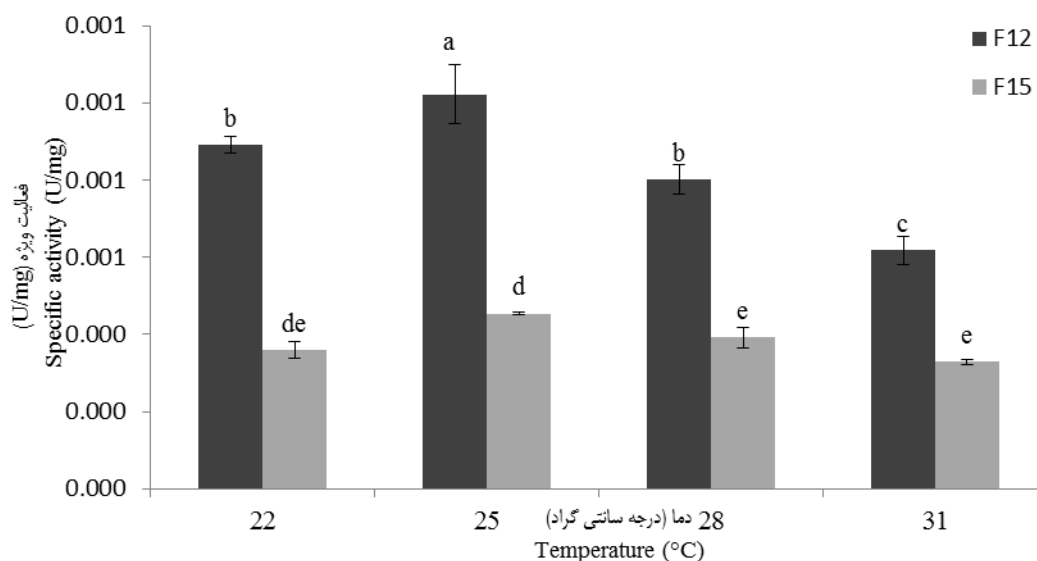
منابع تغییرات Sources of variance	درجه آزادی Degree of freedom	فعالیت ویژه (۹۶ ساعت) Specific activity(96 h)
جدایه Isolate	1	1.2143***
دما Temperature	3	0.0705***
جدایه × دما Isolate × Temperature	3	0.0240**
خطا Error	16	0.0038
ضریب تغییرات (درصد) CV%	-	10.18

\*\* و \*\*\*: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۰/۱ درصد

\*\*, \*\*\*: Significant at 1 % and 0.1 % probability levels, respectively

همچنین نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که فعالیت ویژه‌ی آنزیم تحت تأثیر جدایه، زمان واکنش بین آنزیم و سوبسترا و اثر متقابل آن‌ها قرار گرفت (جدول ۸). در هر دو جدایه، بیشترین فعالیت ویژه‌ی آنزیم در زمان واکنش یک ساعت به دست آمد و در جدایه‌ی F15 بین دو زمان واکنش شش و ۲۴ ساعت اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد و کمترین فعالیت ویژه‌ی آنزیم را دارا بودند (شکل ۱۰).

تأثیر جدایه و اسیدیته بر فعالیت ویژه‌ی آنزیم در سطح ۰/۱ درصد معنی‌دار بود. همچنین اثرات متقابل آن‌ها بر فعالیت ویژه‌ی آنزیم نیز در سطح یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۷). در جدایه‌ی F12 بیشترین فعالیت ویژه‌ی آنزیم در pH=۶ و کمترین فعالیت ویژه‌ی آنزیم در این جدایه در pH=۳ به دست آمد. همچنین در جدایه‌ی F15 بیشترین فعالیت ویژه‌ی آنزیم در pH=۶ و کمترین مقدار در pH=۳ و pH=۴ حاصل گردید (شکل ۹).

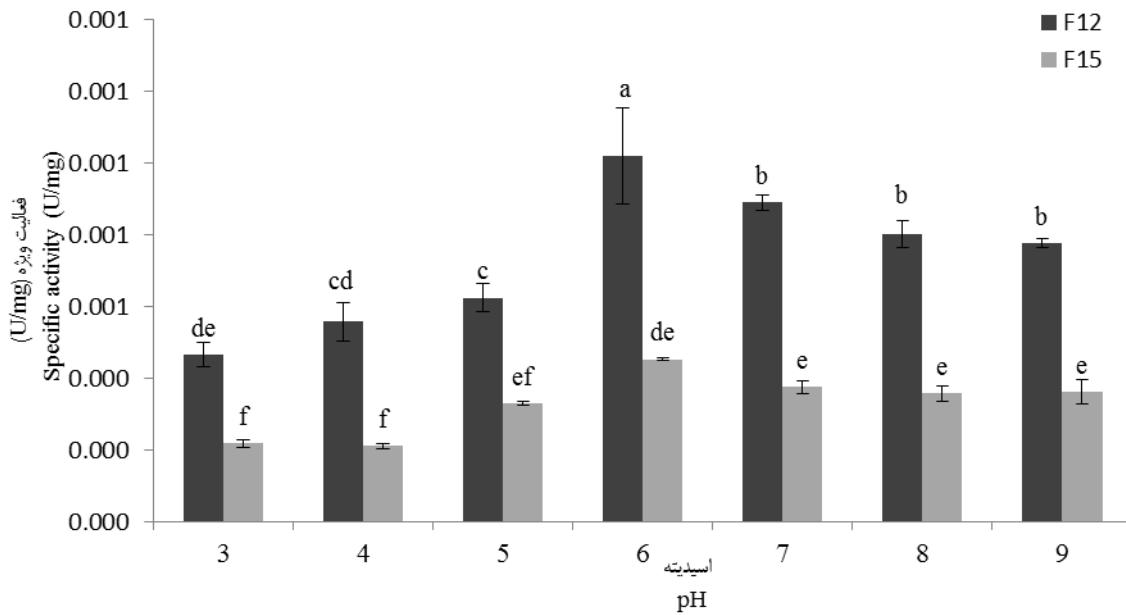


شکل ۸- اثر دما بر فعالیت ویژه آنزیم کیتیناز در جدایه‌های F12 و F15  
 Figure 8- Effect of temperature on chitinase specific activity in two isolates, F12 and F15

جدول ۷- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) فعالیت ویژه آنزیم کیتیناز بین دو جدایه F12 و F15 در pHهای مختلف.  
 Table 7- Variance analysis (mean squares) of effect of pH on chitinase specific activity in 2 isolates F12 and F15

منابع تغییرات Sources of variations	درجه آزادی Degree of freedom	فعالیت ویژه (۹۶ ساعت) Specific activity(96 h)
جدایه Isolate	1	1.7101***
اسیدیته Ph	6	0.1162***
اسیدیته × جدایه Isolate×pH	6	0.0202**
خطا Error	28	0.0059
ضریب تغییرات (درصد) CV%	-	14.42

\*\* و \*\*\*: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۰/۱ درصد  
 \*\*, \*\*\*: Significant at 1 % and 0.1 % probability levels, respectively



شکل ۹- اثر pH بر فعالیت ویژه آنزیم کیتیناز در جدایه‌های F12 و F15  
Figure 9- Effect of pH on chitinase specific activity in 2 isolates F12 and F15

جدول ۸- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) فعالیت ویژه آنزیم بین دو جدایه‌ی F12 و F16 در زمان‌های مختلف واکنش بین آنزیم و سوبسترا

Table 8- Variance analysis (mean squares) of effect of reaction time between enzyme and substrate on chitinase specific activity in 2 isolates, F12 and F15

منابع تغییرات Sources of variance	درجه آزادی Degree of freedom	Specific activity(96 h) فعالیت ویژه (۹۶ ساعت)
جدایه Isolate	1	0.7758***
زمان واکنش Reaction time	2	0.2634***
زمان واکنش × جدایه Isolate×Reaction time	2	0.0443**
خطا Error	12	0.0070
ضریب تغییرات (درصد) CV%	-	15.43

\*\* و \*\*\*: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۰/۱ درصد

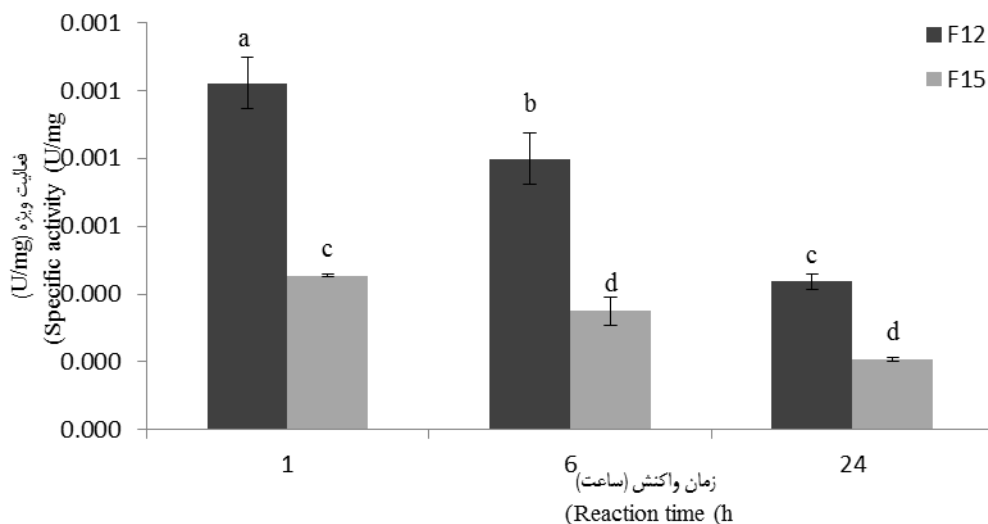
\*\*, \*\*\*: Significant at 1 % and 0.1 % probability levels, respectively

ابراهیم و همکاران (۶) نیز چندین قارچ از تخم و لارو نماتد *M. incognita* بیمارگر گوجه‌فرنگی جداسازی نمودند که شامل قارچ‌های *Rhizoctonia solani* *Aspergillus* spp. *F. oxysporum* و *P. lilacinus* و *Verticillium chlamydosporium* بودند. تأثیر کنترل قارچ‌ها سبب کاهش قابل توجه گال‌ها شده به طوری که مایه‌زنی ریشه‌ی گوجه‌فرنگی با *F. oxysporum* سبب کاهش درصد گال‌ها به میزان ۷/۹۲ درصد نسبت به گیاهان شاهد بدون قارچ شده

نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان می‌دهد که قارچ فوزاریوم می‌تواند به عنوان یک عامل بیوکنترلی قوی جهت کنترل نماتد سیب‌زمینی معرفی گردد که نتایج محققینی که در ادامه به آن‌ها اشاره خواهد شد مؤید این مهم می‌باشد. سانکانارایانان و همکاران (۱۷) قارچ‌های *F. sporotrichioides*، *F. oxysporum*، *Phoma glomerata*، *Paecilomyces lilacinus* و *T. viride* را از تخم‌های نماتد ریشه‌ی گرهی *M. incognita* جداسازی نموده‌اند.

جدا شده از نماتد *M. incognita* انجام داده‌اند، از ۶۷ جدایه‌ی قارچی، جدایه‌های غالب متعلق به قارچ‌های *Penicillium* است. در بررسی دیگری که رونپانون و همکاران (۱۳) روی قارچ‌های جدا شده از نماتد *M. incognita* انجام داده‌اند، از ۶۷ جدایه‌ی قارچی، جدایه‌های غالب متعلق به قارچ‌های *Penicillium* است. در بررسی دیگری که رونپانون و همکاران (۱۳) روی قارچ‌های جدا شده از نماتد *M. incognita* انجام داده‌اند، از ۶۷ جدایه‌ی قارچی، جدایه‌های غالب متعلق به قارچ‌های *Penicillium* است.

است. در بررسی دیگری که رونپانون و همکاران (۱۳) روی قارچ‌های جدا شده از نماتد *M. incognita* انجام داده‌اند، از ۶۷ جدایه‌ی قارچی، جدایه‌های غالب متعلق به قارچ‌های *Penicillium* است.



شکل ۱۰- اثر زمان واکنش بین آنزیم و سوبسترا بر فعالیت ویژه‌ی آنزیم کیتیناز در جدایه‌های F12 و F15  
Figure 10- Effect of reaction time between enzyme and substrate on chitinase specific activity in 2 isolates, F12 and F15

۲۵°C به دست آمد.

با توجه به مطالب ذکر شده می‌توان از جدایه‌های فعال مورد بررسی در این مطالعه، در کنترل بیولوژیک نماتد سیست طلایی سیب‌زمینی استفاده نمود و کاربرد قارچ فوزاریوم به عنوان یک عامل بالقوه جهت کنترل نماتد سیستی سیب‌زمینی مدنظر قرار گیرد.

## نتیجه‌گیری

در این پژوهش میزان فعالیت کیتینازی ۱۶ جدایه قارچ فوزاریوم جدا شده از نماتد سیست طلایی سیب‌زمینی مورد بررسی قرار گرفت و شرایط بهینه جهت تولید آنزیم در دو جدایه با بیشترین و کمترین فعالیت آنزیمی به صورت pH=۶، زمان مناسب واکنش بین آنزیم و سوبسترا به مدت یک ساعت و زمان ۹۶ ساعت کشت قارچ در دمای

## منابع

- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram. *Analytical Biochemistry*, 72: 248–254.
- Brodie B.B. 1984. Nematode parasites of potato. In: Nickle W.R. (ed.): *Plant and Insect Nematodes*. Marcell Dekker, Inc, New York and Basel, Pp:169–181.
- Chen S.Y., Dickson D.W., and Whitty E.B. 1996. Fungi associated with egg masses of *Meloidogyne incognita* and *M. javanica* in a Florida tobacco field. *Nematropica*, 26(2): 153–157.
- Dackman C. 1990. Fungal parasites of the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*: isolation and reinfection. *Journal of Nematology*, 22(4): 594–597.
- Dong J.Y., Zhao Z.X., Cai L., Liu S.Q., Zhang H.R., Duan M., and Zhang K.Q. 2004. Nematicidal effect of fresh water fungal cultures against the pine-nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Fungal Diversity*, 15: 125–135.
- Ibrahim G.H., Al Rehiyani S.M., and Bellal M.M. 2009. Use of biocontrol fungi, *Bacillus thuringiensis* and organic soil amendment to control root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in tomato and eggplant. *Mansoura University Journal of Agricultural Sciences*, 34 (11):10761–10770.
- Kok C.J., Papert A., and Hok A Hin C.H. 2001. Microflora of *Meloidogyne* egg masses: species composition, population density and effect on the biocontrol agent *Verticillium chlamyosporium*. *Nematology*, 3(8): 729–734.
- Liu T., Wang L., Duan Y. X., and Wang X. 2008. Nematicidal activity of culture filtrate of *Beauveria bassiana* against *Meloidogyne hapla*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24: 113–118.

9. Manzanilla Lopez R.H., Esteves I., Fintti Sialer M.M., Hirsch P.R., Ward E., Devonshire J., and Hidalgo Diaz L. 2013. *Pochonia chlamydosporia*: Advances and challenges to improve its performance as a biological control agent of sedentary endo-parasitic nematodes. *Journal of Nematology*, 45(1): 1–7.
10. Monreal J., and Reese E.T. 1969. The chitinase of *Sarratia marcescens*. *Canadian Journal Microbiology*, 15:689–696.
11. Nicol J.M., Turner S.J., Coyne D.L., den Nijs L., Hockland S., and Tahna Maafi Z. 2011. Current nematode threats to world agriculture. In Jones, J., Gheysen, G., and Fenoll, C (Eds.), *Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions*. Springer Science + Business Media, Pp. 21–43.
12. Pereira L., Noronha E.F., Miller R.N. G., and Franco O.L. 2007. Novel insights in the use of hydrolytic enzymes secreted by fungi with biotechnological potential. *Letters of Applied Microbiology*, 44: 573–581.
13. Ruanpanun P., Tangchitsomkid N., Hyde K.D., and Lumyong S. 2010. Actinomycetes and fungi isolated from plant-parasitic nematode infested soils: screening of the effective biocontrol potential, indole-3-acetic acid and siderophore production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26: 1569–1578.
14. Safari Motlagh M.R., and Samimi Z. 2013. Evaluation of *Trichoderma* spp.as biological agents in some of plant pathogens. *Annals of Biological Research*, 4(3): 173–179.
15. Saifullah and Thomas B.J. 1996. Studies on the parasitism of *Globodera rostochiensis* by *Trichoderma harzianum* using low temperature scanning electron microscopy. *International Journal of Nematology*, 6: 117–122.
16. Saifullah., and Naqibullah khan. 2014. Low temperature scanning electron microscopic studies on the interaction of *Globodera rostochiensis* woll and *Trichoderma harzianum* rifai. *Pakistan Journal of Botany*, 46(1): 357–361.
17. Sankaranarayanan C., Hussaini S. S., Kumar P. S., and Rangeswaran R. 2002. Parasitism of *Meloidogyne incognita* eggs by *Fusarium oxysporum* and other fungi. *Indian Journal of Nematology*, 32: 1 (Abstract).
18. Santos MC., Esteves I., Kerry B., and Abrantes I. 2013. Biology, growth parameters and enzymatic activity of *Pochonia chlamydosporia* isolates from potato cyst and root-knot nematodes. *Nematology*, 15: 493–504.
19. Seifert K. 1996. *FusKey: Fusarium* interactive key. Agriculture and Agri-Food Canada, Research Branch, Eastern Cereal & Oilseed Research Centre.
20. Seyedasli N., Zamani M., Motallebi M., and Harghighi M.J. 2004. The study of chitinase production in *Trichoderma* fungus. *Iran Biology*, 17(3): 227–246.
21. Sharon E., Bar Eyal M., Chet I., Herrera E., Strella A., Klefeld O., and Splege, Y. 2001. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*, 91: 687–693.
22. Sharon E., Chet I., and Spiegel Y. 2009. Improved attachment and parasitism of *Trichoderma* on *Meloidogyne javanica* in vitro. *European Journal of Plant Pathology*, 123: 291–299.
23. Szabó M., Csepregi K., Gálber M., Virányi F., and Fekete C. 2012. Control plant-parasitic nematodes with *Trichoderma* species and nematode-trapping fungi: the role of *chi18-5* and *chi18-12* genes in nematode egg-parasitism. *Biological Control*, 63: 121–128.
24. Tikhonov V.E., Lopez Llorca L.V., Salinas J., and Jansson H.B. 2002. Purification and characterization of chitinases from the nematophagous fungi *Verticillium chlamydosporium* and *V. suchlasporium*. *Fungal Genetics and Biology*, 35: 67–78.
25. Verdejo Lucas S., Ornat C., Sorribas F.J., and Stchiegel A. 2002. Species of root-knot nematodes and fungal egg parasites recovered from vegetables in Almeria and Barcelona, Spain. *Journal of Nematology*, 34 (4): 405–408.
26. White T.J., Bruns T.D., Lee S., and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA., Gelfand D.H., Sninsky J.J., and White T. J (eds) *PCR protocols, a guide to methods and applications*. San Diego, California: Academic Press, 315–322.
27. Zeilinger S., Galhaup C., Payer K., Woo S.L., Mach R.L., Fekete C., Lorito M., and Kubicek C.P. 1999. Chitinase gene expression during mycoparasitic interaction of *Trichoderma harzianum* with its host. *Fungal Genetics and Biology*, 26: 131–140.



## Evaluation of Chitinase Enzyme Production in Some of the *Fusarium* Isolates Obtained from *Globodera rostochiensis*

Kh. Abbasi<sup>1\*</sup>- D. Zafari<sup>2</sup>

Received: 29-04-2018

Accepted: 30-09-2018

**Introduction:** The plant parasitic nematodes are among the most important agents causing losses in agricultural crops (Nicol *et al.* 2013). The golden cyst nematode, *Globodera rostochiensis* (Wollenweber, 1923; Behrens, 1975) is the most destructive nematode of potato in the world (Brodie, 1984). Chitin is the most abundant polymer in structure of nematode eggshell. Chitinases are widely distributed in fungi and play important roles in degradation of chitin. The aim of this study was to assay chitinase activity in 16 isolates of various species of *Fusarium* obtained from golden potato cyst nematode, *Globodera rostochiensis*.

**Materials and Methods:** In the current study, 16 *Fusarium* isolates were recovered from infected eggs of the golden potato cyst nematode, *G. rostochiensis*. These isolates were identified based on morphological (Seifert, 1996) and molecular features including internal transcribed spacer (ITS) regions (ITS1, ITS2 and 5.8S gene) of ribosomal DNA. Total genomic DNA was extracted from lyophilized mycelia with a QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit (Germany). ITS regions of ribosomal DNA were amplified with the ITS1 (forward primer) and ITS4 (reverse primer) primers. PCR amplifications were performed with total reaction volume of 25  $\mu$ l using a Takara EmeraldAmp GT PCR Master Mix. PCR products were separated by electrophoresis technique using 1% agarose gel in 1X Tris-Borate-EDTA (TBE) buffer by adding 12  $\mu$ l SYBR-safe 10,000X concentrate DNA stain to melted agarose before running the gel and finally visualized under ultraviolet illuminator. The ITS1, ITS2 and 5.8S sequences were obtained by sequencing both strands in opposite directions using the PCR amplification primers, ITS1 and ITS4 in genomics resource laboratory at Massachusetts University, USA. Colloidal chitin was prepared using the procedure of Tikhonov *et al.* (2002). For enzyme assay in liquid media, the 16 isolates were grown in minimal synthetic medium (MSM) containing colloidal chitin ( $1 \text{ g l}^{-1}$ ) based on the method described by Zeilinger *et al.* (1999). The culture medium was filtered through Whatman paper No. 3 filter followed by filtration through 0.2-mm Millipore polydifluoropropylene membranes. The filtrate obtained was analyzed for chitinolytic activity. Chitinase activity was determined by measuring the release of reducing saccharides from colloidal chitin by the *N*-acetyl-glucosamine-dinitrosalicylate method according to the method described by Monreal and Reese (1969). Protein concentration was determined according to Bradford (1976) with bovine serum albumin (Sigma) as the standard. Chitinase specific activity was obtained by dividing the enzyme activity rate by total protein mass. Enzyme assay was done to determine the most promising isolates for biological control of *G. rostochiensis* in 24 and 96 h after fungal growth. The chitinase specific activity data was subjected to analysis of variance (ANOVA) using software SAS, version 9.0 (Statistical Analysis System Institute Inc., USA) in a CRD (completely randomized design) with three replicates.

Two selected isolates were assayed using a chitinase assay, fluorimetric kit-CS1030 (Sigma). The assay included three substrates, 4-Methylumbelliferyl *N,N'*-diacetyl- $\beta$ -D-chitobioside, 4-Methylumbelliferyl *N*-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminide and 4-Methylumbelliferyl  $\beta$ -D-*N,N',N''*-triacetylchitotriose for the detection of the chitinolytic isozymes Chitobiosidase,  $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidase and Endochitinase. The experiment was a randomized complete block design (RCB) with three replicates. Chitinase activity was subjected to analysis of variance using software SAS, version 9.0. Enzyme activity was expressed over time using the Logistic-Peak, software Slide Write, version 2.0. Two isolates (the strongest and weakest ones) were selected to determine the optimum conditions for chitinase production. The measured conditions were pH, temperature and reaction time between enzyme and substrate in a *N*-acetyl-glucosamine-dinitrosalicylate method. According to measurements taken by an enzyme activity assay kit, the fourth day (96 h) showed the highest activity for the two selected isolates. We then tested our two isolates at pHs of 3, 4, 5, 6, 7, 8 and 9,

1- Ph.D. Former Student, Department of Plant Protection, Bu-Ali Sina University and Assistant Professor of Plant Protection, Ilam University

(\*- Corresponding Author Email: ma\_sarine86@yahoo.com)

2- Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran



temperatures of 22°C, 25°C, 28°C, 31°C for differing periods of time (1 h, 6 h, and 24 h). The experiment was based on factorial experiment in a completely randomized design with three replicates. Analysis of variance chitinase activity was performed using SAS 9.0 software.

**Results and Discussion:** Among 16 isolates, F12 (1/02 U/mg) and F15 (0/04 U/mg) had the maximum and minimum amount of specific activity, respectively. According to morphological features and sequencing of ITS regions (ITS1, ITS2 and 5.8S gene) of ribosomal DNA, these 16 isolates were classified in three species i.e. *F. solani*, *F. oxysporum* and *F. equiseti*. The optimum conditions to produce chitinase in isolates of F12 and F15 were pH=6, 96 hours after fungal growth in 25°C and the reaction between the enzyme and substrate during one hour achieved by the N-acetyl-glucosamine-dinitrosalicylate method. As a producer of various chitinase enzymes, the filamentous fungus, *Fusarium* spp. seems to be recommendable to biologically control *Globodera rostochiensis*.

**Keywords:** Biological control, Enzymatic reaction, Isozyme, Substrate

