دوازدهمین کنگره علوم خاک ایران
تبریز، 12 الی 14 شهریور 1390
(بیولوژی و بیو تکنولوژی خاک)

جداسازی، شناسایی، تعیین میزان فعالیت سلولازی و پکتینازی چند گونه قارچ خاکزاد و ردیابی ژن اندوگلوکاناز ایزوله برتر در استان مازندران

سحر لیلایی[1]. سید کاظم صباغ[2]. محمدعلی تاجیک قنبری[3]. محمد سالاری[2]. احمد اصغرزاده[4]

1- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه گیاهپزشکی، دانشگاه زابل

2- استادیار،گروه گیاهپزشکی دانشگاه زابل

3- استادیار،گروه گیاهپزشکی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری

4- موسسه منابع آب و خاک تهران

Leylaisahar@gmail.com

چکیده

میکروارگانیسمها بخش مهمی از فلور خاک را تشکیل میدهند که قارچها نیز شامل آن هستند. سلولز و پکتین فراوانترین پلیمرهای بیوسفر و بیومس گیاهی میباشند، قارچهای تجزیه کننده سلولز و پکتین در تجزیه مواد گیاهی خاک موثراند. براساس جداسازی قارچها از خاکهای زراعی، 22 ایزوله از 16گونه متفاوت شناسایی و فعالیت سلولازی، پکتینازی بترتیب در محیط CMCو پکتین اندازه گیری گردید، ایزوله *Trichoderma longibrachiatum*115 بیشترین فعالیت سلولازی و ایزوله *Trichoderma harzianum*AS12-2بیشترین فعالیت پکتینازی را دارا بودند. همچنین ژن بتا1و4اندوگلوکاناز مولد آنزیم 1-4-β-D-گلوکاناز(سلولاز) در ایزوله فعال ردیابی شد. بنظر میرسد محیط CMC قادر به القای بیان ژن بتا1و4 اندوگلوکاناز در *T. Longibrachiatum* میباشد.

کلمات کلیدی: **اندوگلوکاناز، پکتیناز، قارچ های خاکزی، سلولاز**

مقدمه

سلولز به عنوان فراوان ترین ماده الی قابل تجزیه حدود نیمی از تولید ناخالص مواد حیاتی توسط فتوسنتز گیاهان را تشکیل می دهد. پکتین به طور فراوان در ناحیه خارجی دیواره میانی و در دیواره سلولی اولیه وجود دارند .تجزیه بیولوژیک سلولز در خاک که به وسیله سلولاز ها و سلولوزم های تولید شده توسط شماری از میکروارگانیسم ه اصورت می پذیرد، نقش مهمی را در جریان کربن و تغییر کربن تثبیت شده به CO_2، هم چنین تولید محصولات بیولوژیک پایدار و بیوانرژی به منظور جایگزینی برای سوخت های فسیلی دارد.(Zangh. *et al*, 2006) خاک یک اکوسیستم فعال و تشکیل شده از اجزا زنده و غیرزنده است .موجودات زنده خاک به دو گروه مجزاشامل میکروفلور و فون تقسیم می شوند.میکروفلورشامل گروه متنوعی ازمیکرو ارگانیسم هاست که عمدتا باچشم غیر مسلح قابل رویت نیستند و شامل باکتری ها،قارچ ها، جلبک ها و اکتینومایست ها میباشند(Franzluebbers A. J, 2004). تعدادزیادی از میکروارگانیسم ها از جمله قارچ ها، باکتری ها،اکتینومایست ها و پروتوزوئر ها قادر به تجزیه سلولز و پکتین میباشند. قارچهای ساپروفیتی میتوانند یکی از مفید ترین منابع انزیم های سلولازی و پکتینازی باشند و مشخص شد که بالغ بر صدها گونه قارچی روی سلولز و پکتین به عنوان تنها منبع کربن رشد می کنند، به نظر می رسد که قارچ ها به دلیل دارا بودن سیستم آنزیمی قوی تر مهم ترین نقش را در تجزیه ترکیبات سلولزی و پکتینی در خاک بر عهده دارند(Gow *et al*,1999)آنزیم های سلولاز و پکتیناز از جمله آنزیم های مهم صنعتی می باشد که در کشاورزی برای تجزیه ضایعات لیگنوسلولزی، در صنایع غذایی برای کاهش سلولز و پکتین مواد اولیه غذایی در صنایع کاغذ سازی برای نرم کردن چوب، در صنعت آبمیوه سازی و در مصارف مختلف دیگر

کاربرد دارد(Kutateladze *et al*, 2009 and Baht M. K, 2000) قارچ های دارای توانایی بالای پکتینازی و سلولازی برای میکروفلور خاک مهم میباشند، همچنین با وجود توسعه جهانی صنعت تولیـد و تهیه آنزیم، این صنـــعت درکشور ما هنوز جایــگاهی ندارد و همچـــــنان آنزیمهای پر مصرف مورد استفاده درصنایع از طریق واردات تامین می شود . نکته قابل توجه دیگر این است که جدایه های قارچی که تولید مقادیر بالای آنزیم می کنند در تمام دنیا از آنها به عنوان منابع سری و محرمانه حفاظت می شود. تنها راه خروج از این وضع بدست آوردن دانش و منابع تولید بومی و داخلی است(لطفی و همکاران، 1388). در این تحقیق با بررسی بر روی خاکهای زراعی مناطق شمال کشور و جداسازی وشناسایی ایزوله های موجود، با استفاده از محیط های کشت کربوکسی متیل سلولز و پکتین به عنوان تنها منبع کربن قابل دسترس قارچ، توانایی آنها را برای تجزیه سلولز و پکتین در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار داده و سپس اولین ژن در پروسه تجزیه سلولاز در فعال ترین ایزوله ردیابی شد، تا بتوان بستر اولیه و مقدماتی در جهت تعیین گونه برتر برای مطالعات سنجش توانایی مولکولی و میزان بیان ژنهای تولید کننده آنزیم سلولاز فراهم و در نهایت آنها را به عرصه صنعت معرفی نمود.

مواد و روشها

جدایه های قارچی و خالص سازی آنها

نمونه برداری از عمق 10 سانتیمتری خاکهای مناطق زراعی با روش تصادفی انجام و روی هر نمونه محل جمع آوری ثبت شد، سپس سوسپانسیون خاک در محیط آب آگار کشت گردید، پس از رشد قارچ ها یک قرص 6 میلیمتری از نمونه به محیط کشت PDA انتقال یافت. با ساخت اسلاید از هرجدایه و مشاهده خصوصیات مورفولوژیکی قارچ مانند رنگ کلونی، شکل و ساختمان هیف، اندازه و شکل اسپور و... به کمک کلید شناسایی، ایزوله ها شناسایی شدند(Samuels .G.J , 1998). بعد از حصول اطمینان از خلوص، نمونه ها در محیط های اختصاصی دو آنزیم کشت داده شد.

کشت در محیط اختصاصی سلولاز و پکتیناز

ارزیابی تجزیه سلولز در شرایط آزمایشگاهی با تهیه محیط کمینه حاوی منابع ازت و میکرو المنت ها و کربوکسی متیل سلولز (CMC)به عنوان تنها منبع کربن انجام شد. برای تهیه 1 لیتر محیط کشت، 5 میلی گرم سولفات آهن($FeSO_4 . H_2O$)، 25%گرم سولفات منگنز($MnSO_4 . H_2O$)، 25%گرم کلرید کبالت($CoCl_2$)، 25%گرم سولفات روی ($Zn\ SO_4$) ، 25%گرم سولفات آمونیوم($(NH_4)_2SO_4$)) ،2گرم فسفات هیدروژن پتاسیم (KH_2Po_4)، 25%گرم سولفات منیزیم ($MgSO_4 .7\ H_2O$)، 4/. گرم کلرید کلسیم(CaCl2)،10 گرم کربوکسی متیل سلولز (CMC)، 3 /. گرم اوره، 2/. گرم Tween 80 و1 گرم پپتون استفاده می شود. سپس محیط کشت های آماده شده، در دمای 120 درجه به مدت 20 دقیقه استریل شد(Red and Yazdanparast., 1998). جهت تحریک ایزوله‌های مورد بررسی به ترشح پکتیناز، از محیط کشت اختصاصی تولید آنزیم استفاده شد (Cruick Shank and Wade, 1980). برای تهیه‌ی 1 لیتر محیط کشت، 10 گرم پکتین، و 2/64 گرم سولفات آمونیوم ($(NH_4)_2SO_4$)) ، 0/34 گرم فسفات هیدروژن پتاسیم (KH_2PO_4)، و 0/14 گرم سولفات منیزیم ($MgSO_4$)، استفاده شد. سپس محیط کشت‌های آماده شده، محیط کشت‌ها در دمای120 درجه سانتیگراد به مدت20 دقیقه استریل شد. جهت القاء قارچ به تولید آنزیم یک تکه از محیط کشت حاوی هیف تازه رشد کرده قارچ به قطر تقریبی 6 میلی متر از روی محیط کشت PDA جدا و به ارلنهای حاوی 100 سی سی محیط های کشت منتقل شد. آزمایش در سه تکرارانجام ودر دمای 25 درجه سانتیگراد نگهداری انجام شد.

قند سنجی

ارزیابی تجزیه سلولز و پکتین در شرایط آزمایشگاهی به ترتیب بر روی محیط های کشت CMC (کربوکسی متیل سلولاز) و پکتین به عنوان تنها منابع کربن انجام شد. قند سنجی چهار روز بعد از تلقیح و تا یک ماه، سه روز یک بار انجام گرفت. با نمونه برداری از محیط میزان گلوکز ایجاد شده از دو محیط توسط معرف آرسنات مولیبدات اشکار سازی و توسط اسپکتروفوتومتر در طول موج 575 نانومتر جذب، قرائت شد. برای استفاده از استاندارد جهت از غلظت های مختلف گلوکزاز 1/ تا 01/ گرم درلیتر استفاده شد.(Kossem and, Nannpieri, 1995).

استخراج RNA و تکثیر قطعه مورد نظر ژن بتا 1و4 اندوگلوکاناز

فعالترین جدایه سلولازی در محیط کشت اختصاصیCMC (کربوکسی متیل سلولز) کشت داده شد. از هیف قارچ تحریک شده(تیمار) و تحریک نشده(شاهد) استخراج RNA با استفاده از محلول استخراج Roch صورت گرفت. سپس با تکنیک Reverse Transcriptase (کیت کیاژن Ominiscrip)، امارانهای استخراج شده تبدیل به cDNA شدند. پرایمر مورد نیاز جهت تکثیر cDNA ژن بیان شده با استفاده از نرم افزار Vector از اگزون دوم و سوم ژن EG با استفاده از توالی این ژن قارچ *T.longibrachiatum* FU05 با شماره GenBank: GU144298.1 طراحی گردید که جفت آغازگر مستقیم و معکوس بدین شرح میباشد: (F:5́aacggcaccctcaacacgagc 3́ و R:5́ atcacccgcaagtaccggcag 3́) و قطعه تولیدی توسط این جفت آغازگر bp 275 میباشد.

نتایج بحث

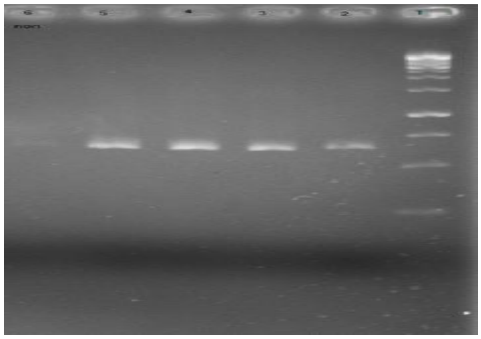
مطالعات انجام شده به جداسازی قارچ ها و تهیه محیط سلولولیتیک مناسب برای رشد قارچ ها پرداخته شده است و فعالیت سلولازی و پکتینازی قارچ های ایزوله شده از خاک مورد بررسی واقع شده است.

ایزوله های جدا شده از محیط از گونه های مختلف جنس های *Trichoderma, Fusarium ,Aspergilluse, penicillium* بوده است که در جدول 1، ایزوله های قارچی موجود در خاک ومیزان قند آزاد شده در دو محیط کربوکسی متیل سلولز و پکتین برای هر جدایه در زمان حداکثر حضور گلوکز در محیط ثبت شده است.

جدول 1- میزان قندهای آزاد شده در دو محیط CMC و پکتین توسط ایزوله های متفاوت شناسایی شده

ایزوله قارچی	قند سنجی سلولاز(میلی گرم بر لیتر)	قند سنجی پکتیناز(میلی گرم بر لیتر)	ایزوله قارچی	قندسنجی سلولاز(میلی گرم بر لیتر)	قندسنجی پکتیناز(میلی گرم بر لیتر)
Trichoderma harzianum15-6	0,074	0,054	*Trichoderma citrinoviride*	0,045	0,036
Trichoderma virns1-3	0,069	0,067	*Trichoderma koningiopsis*	0,065	0,061
Trichoderma tometosporium3	0,053	0,063	*Trichoderma harzianum*AS12-2	0,065	0,092
Trichoderma longibrachiatum 115	۰,۰۸۹	0,071	*Fusarium solani*	0,045	0,043
Trichoderma harzianum3-5	0,076	0,073	*Fusarium moniliforme*	0,067	0,054
Aspergillus terreus	0,065	0,071	*Fusarium oxyspoium*	0,049	0,045
Aspergillus niger1	0,058	0,054	*Trichoderma reesie H2*	0,056	0,072
Aspergillus niger113	0,071	0,059	*Trichoderma harzianum*12-6	0,049	0,048
Aspergillus carbonarium	0,054	0,058	*Trichoderma harzianum* 115	0,066	0,058
Trichoderma harzianum11-1	0,073	0,069	*Trichoderma reesie H1*	0,082	0,079
Trichoderma hamatum12-4	0,069	0,075	*Trichoderma viride11-12*	0,075	0,087

بر اساس نتایج ایزوله *T.longibrachiatum*115 با تولید 0,089میلیگرم برلیتر گلوکز در محیط کربوکسی متیل سلولز و ایزوله *Trichoderma harzianum*AS12-2 با تولید 0,092 میلی گرم بر لیتر گلوکز در محیط پکتین فعال ترین ایزوله های موجود در بین قارچ های جداسازی شده میباشند. سپس ژن بتا1و4اندوگلوکاناز مولد آنزیم 1-4-β-D-گلوکاناز(EC 3.2.1.4)که پیوندهای داخلی بلورهای سلولز را هیدرولیز و در مرحله اول تجزیه ترشح میشود، در ایزوله فعال ردیابی ودر ژل آگارز مشاهده شد، پرایمر طراحی شده ازتوالی ژن EG قارچT.longibrachiatum قادربه تکثیر قطعه مورد نظر به طول275bpدر در قارچ *T. Longibrachiatum* 115 میباشد (شکل 1). بر اساس نتایج محیط کربوکسی متیل سلولز قادر به القائ بیان ژن EG در قارچ *Trichoderma longibrachiatum* 115 می باشد**.** سان و همکاران(2004)، به وسیله HPLC در محیط کربوکسی متیل سلولز وجود آنزیم EG را با وزن ملکولی 51 کیلو دالتون که بوسیله قارچ *Trichoderma harzianum* تولید شده بود شناسایی کردند. میتوان بیان داشت که این محیط باعث فعالیت آنزیم و بیان آن می شود.



شکل 1 – باندهای cDNA تکثیر شده از ژن اندوگلوکاناز با طول bp 275(2،3،4،5: باندهای قارچ در5 تکرار ،6:قارچ القائ نشده و1:Lader)

لطفی و همکاران(1386)، با بررسی بر روی 50 گونه قارچی که بیان داشتند گونه *Trichoderma* بیشترین فعالیت سلولازی را در محیط کشت کربوکسی متیل سلولاز (CMC) دارا بود که با نتایج ما همخوانی دارد. جورجسون و همکاران(2005)، تولید آنزیم سلولاز و پکتیناز را بر اساس قند موجود در محیط کشت در دو گونه پنی سلیوم *P. pinophilum* و *P. brasilianum* موجود در خاک نشان دادند. آنها میزان قند در محیط را با دی نیترو سالسیلیک اسید سنجیدند. وجود قند های آزاد احیا شونده حاکی از وجود آنزیم در محیط بود. بر اساس نتایج ملکولی و بیوشیمیایی حاصل میتوان بیان داشت بعضی از قارچ های جداسازی شده از خاک دارای توان بالایی آنزیمی می باشند و تمام ایزوله ها قادر به تجزیه سلولز و پکتین در اکوسیستم خاک هستند.

منابع

لطفی، ا. رنجبر، غ. ع. و تاجیک قنبری ،م. ع. 1387. ارزیابی فعالیت سلولازی در چند جدایه قارچ خاکزی، .پایان نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی. دانشگاه علوم کشاورزی ساری. صفحات 80-55.

Bhat MK, 2000, Cellulases and related enzymes in biotechnology. Journal Biotechnology Advances. 18: 355–383.

Cruickshank RH and Wade GC, 1980, Detection of pecticenzymes in pectin-acrylamide gels. Anal. Biochem. 107: i77-181.

Franzluebbers AJ, 2004, Soil biology. USDA Agricultural Research Service,24 (1):1-7.

Gow NAR, Robson GD and Gadd GM, 1999, The fungal colony. Published for British mycologistssociety ,Cambridge university press.

Haiyan S, Xiangyang Ge, Zhikui H and Ming P, 2010, Cellulase production by Trichoderma sp. on applepomace under solid state fermentation,African Journal of Biotechnology Vol. 9 (2), pp. 163-166,

Jorgeson H and Olsson L, 2005, Production of cellulose by Penicillium brasilianum IBT 20888 Effect of substrate on hydrolitik performance. Enzyme and Microbial Technology. 26: 125-132.

Kossem A and Nanniperi P, 1995, Soil cellulose activity.Methods in Applide Soil Microbiol. Biochem., Academic Prees, San Diego, A. pp: 345-350.

Kutateladze L, Zakariashvili N, Jobava M, Urushadze T, Khvedelidze R and Khokhashvili I,2009. Selection of Microscopic Fungi - Pectinase Producers. Bulletion of the georgiav national academy of scinces , vol. 3, no. 1, 2009

Rad BL and Yazdanparast R, 1998, Desorption of cellulose system of Trichoderma reesei and Botrytis sp. Journal of Biotech. Technology. 12: 693-696.

Samuelse GJ, Petrini O, Kuhlens K, Kubick CP, The Hypocrea schweinitzii complex and Thrichoderma,1998.p 70.

Zhang YH, Himmel MH, Mielenz JR, 2006, Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. Biotechnology Advances, 24, 452–481.