بررسی نقش آنزیم‌های پروتئولیتیک برخی جدایه‌های متعلق به جنس آرتروبوتریس در کنترل زیستی نوزاد عفونت‌زای همونکوس کونتورتوس

دکتر بهار شمشادی*[۱]، دکتر علی اسلامی[۲]، دکتر شاهرخ رنجبر بهادری[۳]، دکتر مهدی رزاقی ابیانه[۴]، دکتر رسول زارع[۵]

چکیده

در بررسی حاضر وجود آنزیم پروتئاز در سه جدایه آرتروبوتریس الیگوسپورا، واریته الیگوسپورا و سارماتیکا وآرتروبوتریس کلادودس واریته ماکروییدس مطالعه شد هرسه قارچ واجد پروتئاز بودند ولی میزان پروتئاز بر اساس قرائت با اسپکتروفتومتر در آرتروبوتریس کلادودس واریته ماکروئیدس بیشتر از دو جدایه دیگر بود واین اختلاف از نظر آماری معنی دار بود (P< ۰/۰۵). در حالیکه فعالیت پروتئاز در دو گونه دیگر اختلاف معنی داری با یکدیگر نداشتند (P>۰/۰۵). در مورد اثر مهارکننده ها نشان داده شد مهارکننده اختصاصی قارچ های مورد مطالعه نیست ولی PMSF یا (Phenyl Methyl Sulphonil Fluoride) به عنوان مهار کننده اختصاصی آنزیم پروتئاز در این قارچها شناخته می‌شود (p< ۰/۰۵). با اضافه کردن غلظت‌های مختلف مهارکننده‌های ذکر شده به محیط کشت قارچ آرتروبوتریس الیگوسپورا واریته سارماتیکا در مقایسه با گروه شاهد اختلاف معنی داری در بی حرکت کردن نوزاد نماتود ها مشاهده نشد (p>۰/۰۵). مقایسه مهار کننده ها در سه جدایه قارچ تحت مطالعه نشان داد که در حضور PMSF یک میلی مولار اختلاف آماری معنی داری بین نسبت لاروهای متحرک و بی حرکت درسه جدایه قارچ مورد نظروجود ندارد(۰/۰۵ >P) و این مهارکننده با غلظت یک میلی مولار توانایی مهار کامل آنزیمهای موجود در محیط را دارد. اما در حضورPMSF ۰/۱ میلی مولار تعداد لاروهای بی حرکت در ارتروبوتریس کلادودس واریته ماکروییدس بیشتر از دو گونه دیگر بود. در دو قارچ دیگر یعنی آرتروبوتریس اولیگوسپورا واریته الیگوسپورا وآرتروبوتریس الیگوسپورا واریته سارماتیکا در مجاورPMSF ۰/۱ میلی مولار اختلاف آماری معنی داری بین نسبت لاروهای متحرک و بی حرکت مشاهده نشد(p> ۰/۰۵).

واژگان کلیدی: *کنترل زیستی، قارچ نماتودخوار، آنزیم پروتئولیتیک*

مقدمه

نشخوارکنندگان کوچک و بزرگ چنانچه چرای آزاد داشته باشند در معرض ابتلا به انواع آلودگی های کرمی لوله

The role of proteolytic enzymes of some local isolates of Arthrobotrys Spp. in the biocontrol of third stage larvae of Haemonchus contortus

Shemshadi, B.[1*], Eslami, A. [2], Ranjbar bahadori, S.[3], Razzaghi Abyaneh, M.[4], Zare, R. [5]

1- Graduated of Parasitology, Faculty of Specialized Veterinary Sciences, Islamic Azad University, Science & Research Branch, Tehran, Iran (*bshemshadi@yahoo.com)*

2- Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

3- Department of Parasitology, Islamic Azad University, Garmsar Branch

4- Department of Mycology, Pasteur Institute, Tehran, Iran

5- Department of Mycology, Pest & Plant Diseases Research Institute, Tehran, Iran

In this study the presence of protease in three isolates of fungi Arthrobotrys including A.oligospora. var.oligospora, A.cladodes .var.macroides and A.oligospora. var. sarmatica (zare), was investigated. Our finding revealed the presence of protease in all three local isolates of Arthrobotrys. Althoug the highest activity of the enzyme was observed in A.cladodes var macroides (p<0.05).Statistically, No difference was observed between the proteolytic enzyme activity of two other isolates (p>0.05). Proteolitic activity of three isolate was shown in both media used, but was higher in Soy peptone. Anti protease activity of PMSF at 1mM and 0.1mM in phenyl PMSF media were higher than EDTA, for A. cladodes var macro ides and A.oligospora var oligospor (p<0.05). Although adding inhibitors of protease to A.oligospora var sarmatica media had no effect on immobilization of third stage larve of H.contortus.

Key words: *Biological control, Nematophagous fungi, Photolytic enzyme*

*۱- دانش آموخته دکتری تخصصی انگل شناسی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم وتحقیقات، تهران- ایران پست الکترونیکی bshemshadi@yahoo.com

۲- گروه انگل شناسی- دانشکده دامپزشکی ،دانشگاه تهران -ایران

۳ - گروه انگل شناسی ،دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار

۴ - بخش قارچ شناسی، انستیتو پاستور ایران

۵- بخش قارچ شناسی، موسسه تحقیقات آفات و بیماریهای نباتی ،تهران، ایران

گوارش، کبد و ریه هستند ازمیان این آلودگی‌ها، ابتلا به نماتودهای لوله گوارش از همه شایع تر بوده و آلودگی با این گروه از انگل ها بر روی تولید گوشت، شیر، پشم، استقرار جنین، دوقلو زایی، وزن بره ها در زمان تولد و بعد از آن اثرات منفی دارد(۱). به دلیل مشکلات درمان شیمیائی که هنوز بهترین روش مبارزه با آلودگی کرمی نشخوار کنندگان است و تا حداقل یک دهه آینده مهم ترین وسیله خواهد بود کنترل جامع نماتودهای لوله گوارش نشخوار کنندگان که استفاده از مجموعه‌ای ازروش‌ها از جمله استفاده از سایر موجودات زنده (کنترل بیولوژیکی)، کنترل ژنتیکی، کنترل ناقلین، واکسیناسیون مورد توجه قرار گرفته است (۱و۸). این روشها نمی‌توانند جایگزین درمان شیمیایی شوند ولی می توانند همراه با درمان شیمیائی از اثرات سوء مصرف بیش از حد داروهای شیمیائی بکاهند. از میان روشهای فوق کنترل بیولوژیکی به دلیل آنکه از زمان‌های بسیار دور در طبیعت فعالانه درکنترل بسیاری از آفات ازجمله نماتودهای گیاهی و حیوانی دخالت داشته‌اند بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. ازسال های قبل یعنی در سال ۱۸۷۴ برای اولین بار نماتودخواری قارچ‌های ساپروفیت موجود درخاک نشان داده شد(۴).

مواد و روش کار

۱) کشت قارچ

برای کشت جدایه های آرتروبوتریس اولیگوسپورا واریته اولیگوسپورا(IRAN 678C)و آرتروبوتریس کلادودس واریته ماکروئیدس (Arthrobotrys cladodes machroides) (IRAN 677) جدا شده از خاکهای مازندران (۲) و (۹) و آرتروبوتریس اولیگوسپورا واریته سارماتیکا (Arthrobotrys oligospora sarmatica) (IRAN 608C) جدا شده از خاک پرورش قارچ خوراکی در کرج نمونه ها از موسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های نباتی تهیه شد. پس از ساخت محیط کشت کورن میل آگار (CMA)، کشت قارچ‌های ذکر شده بالا درمحیط های کشت انجام گرفت و دوهفته کشت ها در ۲۵ درجه سانتی گراد قرار گرفتند.

۲) تهیه سوسپانسیون کنیدیوم قارچ ازکشت‌های ۲-۱ هفته

آب مقطراستریل حاوی توین ۸۰ (۰/۱ درصد) به کشت ها افزوده شد وسپس با استفاده از یک میله شیشه‌ای استریل سطح محیط کشت هموژن گردید

۳) شمارش حجم توتال سوسپانسیون اسپور

تمامی محیط‌های جامد مورب مربوط به یک قارچ با روش فوق آماده شد و از گاز استریل قرار گرفته روی قیف که در دهانه یک ارلن استریل قرار دارد عبور داده شد تا قطعات میسلیوم و محیط کشت حذف شود. سپس ازسوسپانسیون اسپور جمع شده داخل ارلن برداشته و شمارش گردید و $۱۰^{۶}$ – $۱۰^{۵}$ اسپوربه ازاء هرسی سی محیط کشت مایع اضافه شد.

۴) تهیه محیط مایع

دونوع محیط مایع در این بررسی مورد استفاده قرار گرفت:

۱- محیط مایع حاوی سویاپپتون خنثی ۰/۰۱٪ و فنیل آلانین ۰/۰۵ گرم بر لیتر به همراه یک لیتر آب مقطر که pH نهایی آن ۷/۷-۷/۵ باشد ازاین به بعد این محیط تحت عنوان SP نامبرده می‌شود.

۲- محیط مایع حاوی پروتئوز پپتون (۱۰ گرم) و عصاره مخمر بدون آگار به میزان ۱ گرم و سولفات آمونیوم و سولفات منیزیم هر یک به میزان ۰/۵ گرم و سولفات آهن به میزان ۰/۰۱ گرم که در یک لیتر فسفات بافر سورنسون با pH نهایی ۶/۵ حل شد. این محیط در طول بررسی تحت نام PP معرفی می‌گردد.

۵) تلقیح سوسپانسیون اسپور قارچ درمحیط های کشت مایع

۵×۱۰^{۶} اسپور درهر ارلن که حاوی ۵۰^{CC} محیط مایع است اضافه می شود. برای هر قارچ در یک نوع محیط سه ارلن درنظر گرفته شد و پس از افزودن اسپورها به محیط های مایع SP و PP ، کشت ها به مدت ۱۰ روز دردمای ۲۸ درجه و درشرایط متحرک نگهداری شدند و به منظور اطمینان ازعدم آلودگی درحین کار، یک ارلن تلقیح شده از نوع محیط درکنارارلن های تحت آزمون قرارداده شد.درمرحله بعدی جداسازی مسیلیوم های قارچی از محیط های کشت با استفاده ازکاغذ واتمن شماره ۲ انجام شد.

۶) بررسی وجودپروتئازها درمحیط های کشت با استفاده ازسوبسترای آزوکل SIGMA-A4341-1G وسنجش فعالیت پروتئاز

برای نشان دادن وجود پروتئاز در جدایه های هر قارچ از محیط های کشت حاوی آنزیم پروتئاز میسلیوم ها را جدا کرده و به هر لوله آزمایش ۲ سی سی محیط مایع کشت اضافه کرده سپس ۱۰ میلی گرم آزوکل به آن اضافه شددر لوله های آزمایش کنترل ۲ سی سی محیط کشت مایع اضافه شدوجهت غیر فعال کردن آنزیم پروتئاز لوله ها به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری جوش قرار گرفتند سپس ۱۰ میلی گرم آزوکل به آن اضافه شد و به عنوان کنترل مورد استفاده قرار گرفت. سپس در دستگاه اسپکتروفتومتری جذب نوری در طول موج ۵۲۰ نانومتر برای لوله ها انجام گرفت، و لوله ها بمدت ۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

در مرحله بعد فیلتراسیون مخلوط واکنش وقرائت جذب فیلترا درطول موج ۵۲۰ نانومتر درمقابل کنترل انجام گرفت و فعالیت آنزیمی سه جدایه تحت مطالعه مقایسه شد(۷و۵)

۷) بررسی تأثیر مهارکننده های پروتئاز برحدت قارچ‌های نماتود خوار

تعداد سه رأس گوسفند ماده یکساله نژاد زل که قبلاً با داروهای ضد کرمی درمان شده اند و درآزمایش مدفوع عاری بودن آنها از آلودگی کرمی نشان داده شده است با ۲۰۰۰۰ نوزادمرحله سوم عفونت زای همونکوس کونتورتوس به طورتجربی آلوده شدند. برای بدست آوردن نوزادهای مورد نیاز درمراحل مختلف آزمایش ، مقدار زیادی مدفوع کشت داده شد و پس از یک هفته قرار دادن در۲۷ درجه سانتیگراد نوزادهای تولید شده توسط دستگاه برمن جدا شده و درسرم فیزیولوژی و دریخچال ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد(۷و۶). برای بررسی تأثیر مهار کننده های پروتئازی برخاصیت نماتودخواری قارچ ها فنیل متیل سولفونیل فلوراید Phenyl methyl sulphonil floride، ۱ میلی مولار و ۰/۱ میلی مولار و EDTA مرک ۱ میلی مولار تهیه شد. برای مطالعه تأثیر هرکدام ازمهارکننده ها سه پلیت حاوی هر قارچ نماتودخوار و به ازاء هر سه پلیت یک شاهد (بدون اضافه کردن مهار کننده) در نظر گرفته شد. پس از اضافه کردن مهار کننده ها به سه پلیت تیمار، ۱۵ دقیقه بعد، ۶۰ لارو مرحله سوم همونکوس کونتورتوس به پلیت ها اضافه شد و ۴ ساعت بعد و ۲۰ ساعت بعد تعداد لاروهای بی حرکت شده با کمک میکروسکوپ نوری شمارش شدند (به پلیت های شاهد مهار کننده ای اضافه نشد و فقط لارو مرحله سوم اضافه گردید) در این مدت محیط ها در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. پس از شمارش لاروهای متحرک و بی حرکت شده در.پلیت های تیمار وشاهد با استفاده از آزمون آماری مربع کای (χ^2) میزان تاثیر مهار کننده ها در هر سه جدایه قارچ مورد ارزیابی قرار گرفت(۷و۶). لازم به ذکر است که تمام نمونه ها با سه تکرار مورد آزمون قرارگرفتند. پس از بدست آوردن نتایج، برای ارزیابی نتایج از نرم افزار SPSS آنالیز واریانس یک طرفه Anova و آزمون مربع کای استفاده شد.

نتایج

مقایسه فعالیت آنزیمی پروتئازهای این قارچ‌ها نشان داد که پروتئاز در هر سه گونه وجود دارد و با توجه به نتایج آزمون و تست آماری آنالیز واریانس یک طرفه (Anova) مشخص گردید که میزان آنزیم در قارچ آرتروبوتریس کلادودس واریته ماکروئیدس(جذب نوری در محیط PP =۰/۹۷۹وجذب نوری در محیط SP= ۱/۸۸۳) به طور معنی‌داری بیشتر ازدوگونه دیگر است (p< ۰/۰۵) (جدول۱). ولی بین دوگونه دیگر یعنی آرتروبوتریس اولیگوسپورا واریته اولیگوسپورا (جذب نوری در محیط PP =۰/۵۰۲ وجذب نوری در محیط SP= ۰/۸۷۴) و آرتروبوتریس اولیگوسپورا واریته سارماتیکا (جذب نوری در محیط PP =۰/۳۰۴ و جذب نوری در محیط SP= ۰/۷۰۹) اختلاف معنی‌داری وجود ندارد (p>۰/۰۵) (جدول۲و۳). فعالیت قارچ آرتروبوتریس کلادودس واریته ماکروئیدس در هر دو محیط مورد استفاده یعنی SP وPP یکسان بود و فعالیت آنزیم پروتئاز این جدایه درهر دو محیط بیشتر از دو قارچ دیگر بود اما در بین دو محیط SP و PP میزان ترشح آنزیم پروتئاز درمحیط SP یعنی محیط حاوی سویا پپتون فنیل آلانین و والین بیشتر بود و این محیط محرک ترشح آنزیم می‌باشد (جدول ۱). اختلاف آماری معنی‌داری بین فعالیت آنزیم پروتئاز در دو قارچ دیگر آرتروبوتریس اولیگوسپورا واریته اولیگوسپورا و آرتروبوتریس اولیگوسپورا واریته سارماتیکا در دومحیط SP و PP وجود نداشت (p>۰/۰۵) (جدول۲و۳).

قارچ آرتروبوتریس کلادودس واریته ماکروئیدس در مجاورت PMSF با غلظت یک میلی مولار، ۲۳٪ لاروها را غیرمتحرک نمود که این بی‌حرکت شدن لاروها در مجاورت مهارکننده PMSF با غلظت ۰/۱ میلی مولار ۳۸٪ بود و مجاور EDTA به میزان یک میلی مولار ۸۳٪ لاروها غیر متحرک شدند که از لحاظ آماری پس از انجام آزمون مربع کای مشخص شد که PMSF مهار کننده اختصاصی آنزیم پروتئاز است و با (p<۰/۰۵) از لحاظ آماری اثر این مهارکننده برآنزیم پروتئازمعنی‌دار می‌باشد (جدول۴) ولی درمورد EDTA می‌توان گفت که EDTA مهارکننده خوبی برای آنزیم پروتئاز نیست و نتایج از لحاظ آماری معنی‌دار نبود (p>۰/۰۵)(جدول۵).

درمورد قارچ آرتروبوتریس اولیگوسپورا واریته اولیگوسپورا همانطورکه درجدول ۵ و نمودار۲ مشاهده می‌شود درصد لاروهای غیرمتحرک ۱۳/۵٪ درمجاورPMSF با غلظت ۱ میلی مولارتعیین گردید و ۲۸٪ لاروها درمجاورتPMSF با غلظت ۰/۱ میلی‌مولارغیرمتحرک شدند (p<۰/۰۵). درمورد EDTA با غلظت یک میلی‌مولار ۶۷٪ لاروها بی‌حرکت بودند و در گروه شاهد ۶۶٪ لاروهابی‌حرکت بودند که این اختلاف معنی‌دار نمی‌باشد (p>۰/۰۵). درمورد قارچ آرتروبوتریس اولیگوسپورا واریته سارماتیکا مطابق جدول ۶ و نمودار ۵ غلظت‌های مختلف PMSF و EDTA تفاوت معنی‌داری درتعداد لاروهای غیر متحرک ایجاد نکرد و این یافته با فعالیت آنزیمی قارچ که کمتر از قارچ‌های دیگر مورد مطالعه بود وهمچنین عدم نماتودخواری آن مطابقت دارد.

درجدول ۶ تاثیر مهارکننده‌های آنزیمی بر فعالیت نماتودخواری قارچ آرتروبوتریس‌الیگوسپورا واریته‌سارماتیکا در غلظت‌های مختلف PMSF وEDTA درحضور شاهد مقایسه گردید و با استفاده از تست آماری اختلاف عملکرد مهارکننده‌های آنزیمی محاسبه گردید. در غلظت‌های مختلف PMSF و EDTA تفاوت معنی‌داری درتعداد لاروهای غیر متحرک مشاهده نگردید. همانطور که در نمودار۴ دیده می‌شود قدرت غیر متحرک کردن لاروها در عدم حضور مهارکننده آنزیمی در قارچ آرتروبوتریس کلادودس واریته ماکروئیدس از دو قارچ دیگر بیشتر است (p<۰/۰۵) و همچنین قدرت غیر متحرک کردن لاروها در عدم حضور مهارکننده آنزیمی در قارچ آرتروبوتریس الیگوسپورا واریته الیگوسپورا از آرتروبوتریس الیگوسپورا واریته سارماتیکا بیشتر است (p<۰/۰۵).

جدول ۱- تغییرات جذب به دلیل فعالیت آنزیمی Arthrobotrys cladodes machroides

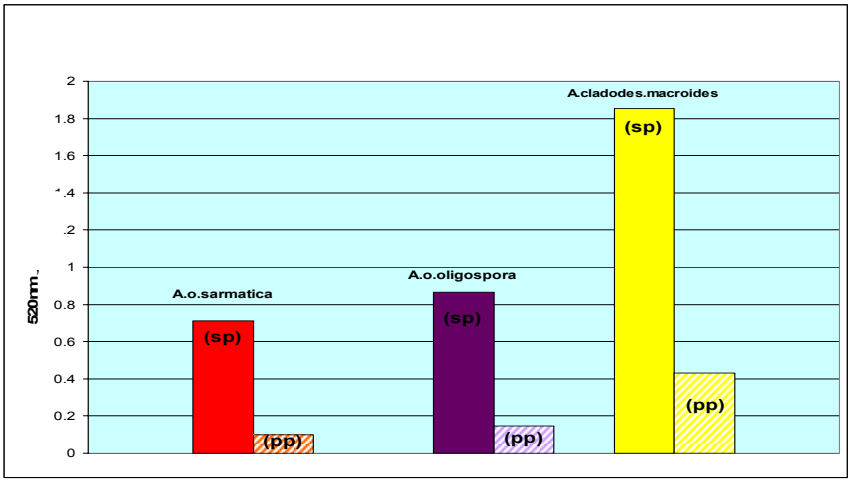
جذب در 520 nm	محیط sp			محیط pp		
بلانک	۰/۱۸۷	۰/۲۰۹	۰/۱۹۴	۱/۰۸۲	۱/۶۲	۱/۲۶۹
محیطهای محتوی Azocoll بدون شوک حرارتی	۲/۱۰۶	۲/۲۳۹	۲/۲۵۳	۲/۲۴۴	۲/۶۸۳	۲/۶۸۹
محیطهای محتوی Azocoll و شوک حرارتی	۰/۳۰۵	۰/۳۱۷	۰/۳۲۶	۱/۳۱۳	۱/۷۵۱	۱/۶۱۳
اختلاف جذب به دلیل فعالیت آنزیم	۱/۸۰۱	۱/۹۲۲	۱/۹۲۷	۰/۹۳۱	۰/۹۳۲	۱/۰۷۶

جدول۲- تغییرات جذب به دلیل فعالیت آنزیمی Arthrobotrys oligospora oligospora

جذب در 520 nm	محیط sp			محیط pp		
بلانک	۰/۱۰۶	۰/۱۴۹	۰/۱۲۹	۱/۹۵۶	۱/۸۸۶	۱/۸۷۶
محیطهای محتوی Azocoll بدون شوک حرارتی	۱/۱۰۱	۱/۰۴۶	۱/۳۲۹	۲/۳۷۶	۲/۴۶۶	۲/۲۸۶
محیطهای محتوی Azocoll و شوک حرارتی	۰/۲۳	۰/۳۲۳	۰/۳۰۱	۱/۸۷۴	۱/۹۰۷	۱/۸۴۱
اختلاف جذب به دلیل فعالیت آنزیم	۰/۸۷۱	۰/۷۲۳	۱/۰۲۸	۰/۵۰۲	۰/۵۵۹	۰/۴۴۵

جدول۳- تغییرات جذب به دلیل فعالیت آنزیمی Arthrobotrys oligospora sarmatica

جذب در 520 nm	محیط sp			محیط pp		
بلانک	۰/۲۲۸	۰/۲۳۹	۰/۱۸۵	بلانک	۲/۱۱۴	۲/۰۶۵
محیطهای محتوی Azocoll بدون شوک حرارتی	۱/۱۸۶	۱/۰۰۶	۱/۱۲۶	۲/۵۲۸	۲/۳۱۸	۲/۴۸۷
محیطهای محتوی Azocoll و شوک حرارتی	۰/۴۰۶	۰/۴۴۱	۰/۳۴۲	۲/۲۱۴	۲/۰۹۸	۲/۱۰۷
اختلاف جذب به دلیل فعالیت آنزیم	۰/۷۸	۰/۵۶۵	۰/۷۸۴	۰/۳۱۴	۰/۲۲	۰/۳۸



نمودار ۱- مقایسه فعالیت پروتئاز در سه گونه قارچی نماتود خوار

جدول ۴- اثر عوامل ممانعت کننده فعالیت آنزیم بر فعالیت نماتود خواری Arthrobotrys cladodes machroides

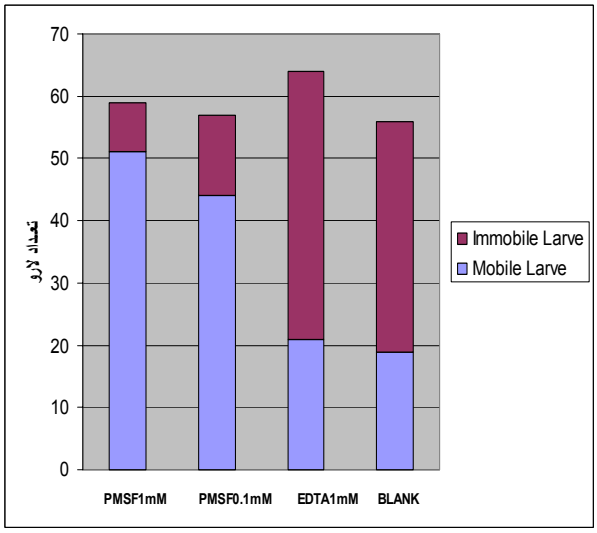
ممانعت کننده	غلظت (mM)	لارو متحرک نماتود	لارو غیر متحرک نماتود	درصد لاروهای غیر متحرک	
PMSF	۱	۴۷	۱۴	۲۳	P< ۰/ ۰۵
PMSF	۰/۱	۳۴	۲۱	۳۸	P< ۰/ ۰۵
EDTA	۱	۱۰	۴۹	۸۳	P> ۰/ ۰۵
کنترل	-	۸	۵۶	۸۷/۵	

جدول ۵- اثر عوامل ممانعت کننده فعالیت آنزیم بر فعالیت نماتود خواری Arthrobotrys oligospora oligospora

ممانعت کننده	غلظت (mM)	لارو متحرک نماتود	لارو غیر متحرک نماتود	درصد لاروهای غیر متحرک	
PMSF	۱	۵۱	۸	۱۳/۵	P< ۰/ ۰۵
PMSF	۰/۱	۴۴	۱۳	۲۸/۸	P< ۰/ ۰۵
EDTA	۱	۲۱	۴۳	۶۷	P> ۰/ ۰۵
کنترل	-	۱۹	۳۷	۶۶	

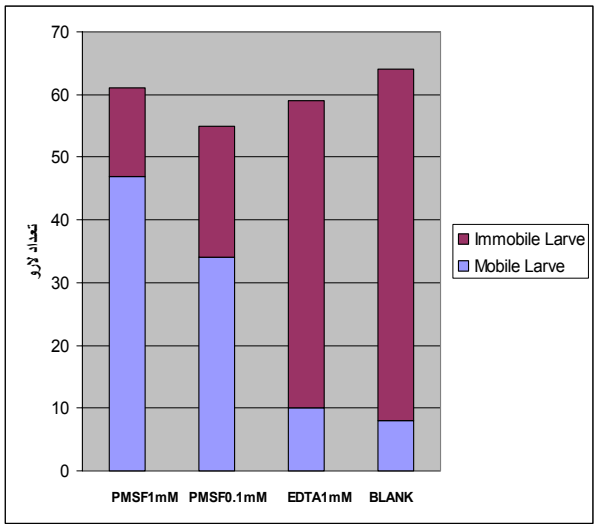
جدول ۶- اثر عوامل ممانعت کننده فعالیت آنزیم بر فعالیت نماتود خواری Arthrobotrys oligospora sarmatica

ممانعت کننده	غلظت (mM)	لارو متحرک نماتود	لارو غیر متحرک نماتود	درصد لاروهای غیر متحرک	
PMSF	۱	۵۰	۱۰	20	P> ۰/ ۰۵
PMSF	۰/۱	۴۷	۱۱	۱۹	P> ۰/ ۰۵
EDTA	۱	۵۴	۹	۱۷	P> ۰/ ۰۵
کنترل	-	۵۲	۷	۱۳/۵	-



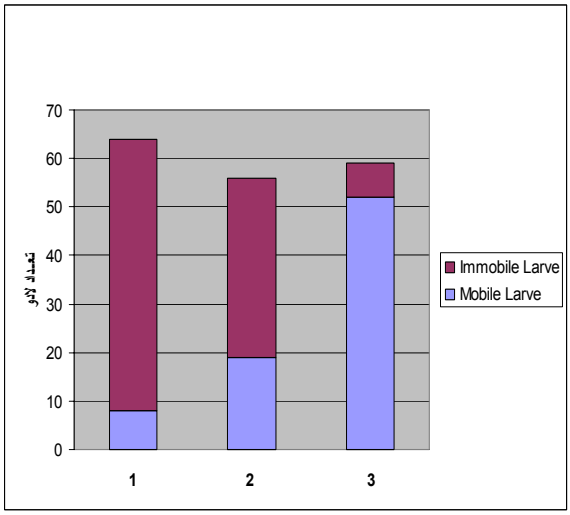
نمودار ۲- اثر عوامل ممانعت کننده فعالیت آنزیم بر فعالیت نماتود خواری

Arthrobotrys oligospora oligospora

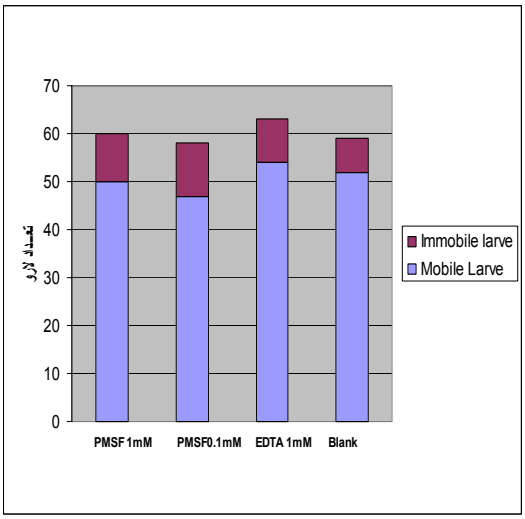


نمودار۳- اثر عوامل ممانعت کننده فعالیت آنزیم بر فعالیت نماتود خواری

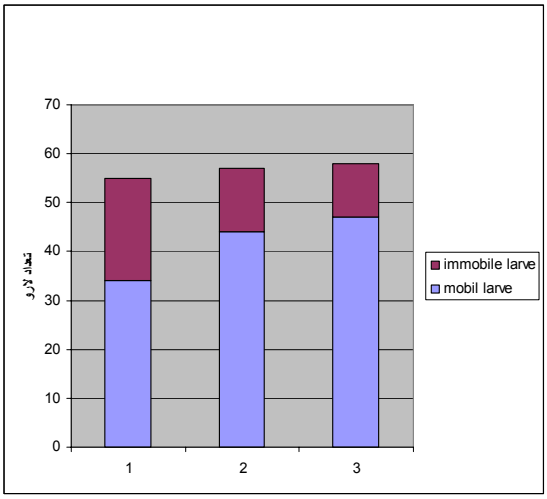
Arthrobotrys cladodes machroides



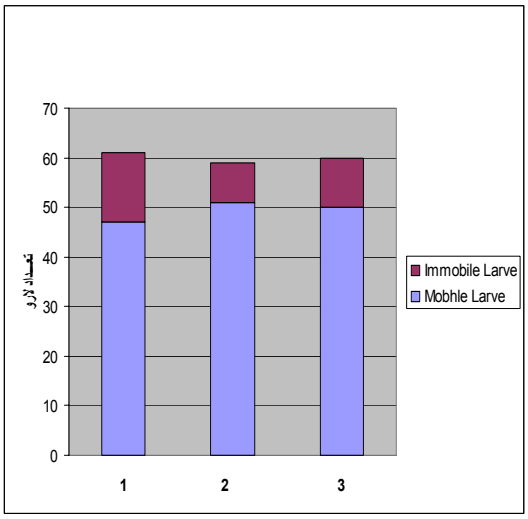
نمودار۴- مقایسه قدرت غیر متحرک کردن لارو سه گونه قارچی تحت مطالعه در محیط فاقد مهار کننده آنزیمی



نمودار۵- اثر عوامل ممانعت کننده فعالیت آنزیم بر فعالیت نماتود خواری Arthrobotrys oligospora sarmatica



نمودار۶- مقایسه فعالیت غیر متحرک سازی سه گونه قارچی در محیط محتوی ۰/۱ PMSF mM



نمودار۷- مقایسه فعالیت غیر متحرک سازی سه گونه قارچی در محیط محتوی ۱ PMSF mM

با توجه به نمودار ۷ مشاهده می شود که در حضور مهارکننده آنزیمیPMSF با غلظت ۱ مولار اختلاف آماری معنی داری بین نسبت لاروهای متحرک و غیر متحرک سه نوع قارچ تحت مطالعه وجود نداشت(P>۰/۰۵) که ممکن است این موضوع بعلت مهار شدت تمام آنزیم های محیط توسط این مهار کننده اختصاصی در غلظت بکار رفته باشد. مقایسه قدرت غیر متحرک کردن لارو ها در سه گونه قارچی تحت مطالعه در حضور PMSF با غلظت ۰/۱ میلی مولار (نمودار ۶) نشان می‌دهد که میزان لارو های غیرمتحرک درآرتروبوتریس کلادودس واریته ماکروئیدس بطورمعنی داری بیشتر ازدوگونه قارچی دیگر است (P<۰/۰۵) اما بین دو گونه آرتروبوتریس الیگوسپورا واریته

الیگوسپورا و آرتروبوتریس الیگوسپورا واریته سارماتیکا از این نظر اختلاف آماری معنی داری مشاهده نشد(P>۰/۰۵).

بحث

در مورد خاصیت نماتودخواری قارچ ها صدها مقاله علمی در مجلات مختلف منتشر شده است و تعداد قابل توجهی قارچ نماتودخوار معرفی گردیده اند ولی مکانیسم دقیق نماتود خواری شرح داده نشده است. اگر چه بنظر می رسد مکانیسم اثر آنها مانند قارچ های آنتوموپاتوژن باشد و آنزیم های هیدرولتیک نقش اساس برای نفوذ قارچ در کوتیکول نماتود دارند (۱۱). در میان جنس ها و گونه های قارچ های نماتودخوار گونه های آرتروبوتریس از همه مهمتر هستند. در دنیا تاکنون ۳۲ گونه آرتروبوتریس گزارش شده و نماتودخواری ۲۷ گونه نشان داده شده است (۱۵). در ایران بررسی های اولیه حاکی از وفور این قارچ ها در بوم سازون ایران می باشد. در یک بررسی از ۱۰۰ نمونه خاک جدا شده از نقاط مختلف استان مازندران در ۱۱ نمونه، قارچ نماتودخوار جدا گردید که خالص سازی قارچ در سه نمونه انجام شد و آرتروبوتریس اولیگوسپورا واریته اولیگوسپورا و آرتروبرتریس اولیگوسپورا واریته ماکروئیدس از آنها جدا گردید(۲و۹). در بررسی های بعدی خاصیت نماتودخواری این گونه ها و عبور موفقیت آمیز کونیدی ها از لوله گوارش و سایر جنبه های آن مورد بررسی قرار گرفت(۲). استفاده عملی از این قارچ ها در کنترل نماتودهای لوله گوارش با پخش تعداد فوق العاده زیاد کونیدی در مرتع و یا خورانیدن کونیدی ها همراه با مواد غذایی مورد بررسی قرار گرفته است(۱۳، ۱۶و۱۹). مطالعات تکمیلی بعد حاکی از آن است که در نماتودخواری قارچ ها آنزیم ها نقش اساسی را در نفوذ به کوتیکول نوزاد نماتود دارند (۱۱و۲۰). آنزیم های پروتئاز بویژه خانواده سابتیلیزین از سرین پروتئازها جزء عوامل مهم تشدید کننده فعالیت نماتودخواری قارچ ها شناخته شده است و وجود آنها درقارچ های آرتروبوتریس اولیگوسپورا، ورتیسیلیوم سوکلاسپوریوم و ورتیسیلیوم کلامیدوسپوریوم، پسیلومایسس لیناسینوس، به تأیید رسیده است (۱۸،۱۷و۲۱). این آنزیم‌ها در محل اثر برسوبسترا دارای سه اسید آمینه سرین، هیستیدین و اسید اسپارتیک هستند و سوبسترای آنها نیز دارای سرین است و به فسفات فلوراید معدنی حساس است(۱۰). در سال ۱۹۸۸ یک محقق اسپانیایی پروتئاز خارج سلولی قارچ ورتیسیلیوم سوکلاسپوریوم را که قارچ انگل داخلی و تخم نماتودها را آلوده می کند شناسایی کرد(۱۴). دو سال بعد اولین سرین پروتئاز (P_{32}) در جدایه ورتیسیلیوم سوکلاسپوریوم خالص سازی شد و تأثیر آن بر پروتئین های تخم نماتودها تعیین گردید، دیری نپائید که اثر P_{32} در روند نماتودخواری با کمک آزمایش های ایمنوسیتوشیمیایی مورد تأیید قرار گرفت و نتیجه گرفته شد که این پروتئاز در نفوذ به تخم نماتودها نقش بسیار مهمی دارد(۱۴). تاکنون ۵ نوع سرین پروتئاز در قارچ های نماتودخوار مختلف شناسایی شده است و نقش آنها درتشدید خاصیت نماتودخواری قارچ ها مورد بررسی قرار گرفته است. قارچ آرتروبوتریس یکی از مهمترین قارچ هایی است که ۲۷ گونه آن نماتودخوار هستند(۱۵). قارچ آرتروبوتریس اولیگوسپورا یکی از شناخته شده ترین گونه های این جنس از نظر نماتودخواری است و مکانیسم نماتودخواری آن با صید نماتود، ایجاد شبکه های سه تایی و توانایی نفوذ و بی حرکت کردن نماتودها در عرض چند ساعت می باشد و نقش آنزیم های پروتئاز خارج سلولی در روند نفوذ این قارچ کاملاً تأیید شده است. سنجش فعالیت پروتئاز خارج سلولی در کشت مایع انجام می گیرد و با کمک مهار کننده های آنزیمی می توان نقش این آنزیم ها را در روند نماتودخواری تأیید نمود (۱۱و۱۲). مطالعه دیگری که در سال ۲۰۰۲ انجام شد نقش آنزیم های پروتئاز خارج سلولی را در آرتروبوتریس

اولیگوسپورا به عنوان عامل تشدید نماتودخواری تأیید نمود(۳). محقق این مطالعه این محقق با ایجاد موتاسیون در ژن P_{II} آزمایش خود را انجام داد و مشخص شد در موتان های فاقد ژن P_{II} نماتودخواری قارچ محدود می شود و در موتان هایی که ژن P_{II} آنها تقویت شده است توانایی صید نماتودها در آنها افزایش زیادی یافته است. ضمناً نشان داده شد عامل مهم تشدید نماتودخواری در قارچ آرتروبوتریس اولیگوسپورا سرین پروتئاز P_{II} می باشد که در صید نماتودها و انهدام آنها در میزبان نقش دارد و مطالعات انجام گرفته در سرین پروتئازهای قارچ های مختلف نشان داد که از نظر ساختمانی و مکانیسم اثر تشابه زیادی با هم دارند(۳). بر این اساس جستجوی آنزیم های موجود در سه گونه قارچ گزارش شده از ایران یعنی آرتروبوتریس اولیگوسپورا واریته اولیگوسپورا (IRAN 678C) وآرتروبوتریس کلادودس واریته ماکروئیدس (IRAN 677C) و آرتروبوتریس اولیگوسپورا واریته سارماتیکا (IRAN 808C) و اثر آنها در کنترل نماتودها مورد بررسی قرار گرفت. در بررسی های قبلی که بر روی دو گونه قارچ آرتروبوتریس اولیگوسپورا واریته اولیگوسپورا وآرتروبوتریس کلادودس واریته ماکروئیدس انجام شد نشان داده شد که میزان نماتودخواری آرتروبوتریس کلادودس واریته ماکروئیدس بیش از گونه دیگر است (۹). اما گونه دیگر یعنی آرتروبوتریس اولیگوسپورا واریته سارماتیکا که از خاک محل پرورش قارچ خوراکی جدا شده بود در چند بررسی خاصیت نماتودخواری نشان نداد. شاید دلیل عمده آن وجود این قارچ در محیط کشت قارچ خوراکی باشد که در معرض آلودگی با نوزاد نماتودها نمی باشد و در این قارچ زندگی ساپروفیتی بر زندگی انگلی پیشی گرفته است و مواد غذایی مورد نیاز قارچ به صورت زندگی ساپروفیتی تأمین می شود. در این بررسی متناسب با اثر نماتودخواری دو قارچ نماتودخوار گزارش شده از ایران فعالیت آنزیم پروتئاز در آرتروبوتریس کلادودس واریته ماکروئیدس بیش از آرتروبرتریس اولیگوسپورا واریته اولیگوسپورا و آرتروبوتریس اولیگوسپورا واریته سارماتیکا بود. این اختلاف از نظر آماری نیز معنی دار بود ($p< ۰/۰۵$). اما علیرغم نماتودخوار بودن آرتروبوتریس اولیگوسپورا واریته اولیگوسپورا و عدم نماتودخوار بودن آرتروبوتریس اولیگوسپورا واریته سارماتیکا نیز فعالیت پروتئاز هر دو قارچ تقریباً مشابه هم بود و از نظر آماری اختلاف معنی داری را نشان نداد ($p>۰/۰۵$) . تاکنون درباره فعالیت آنزیم پروتئاز در قارچ آرتروبرتریس کلادودس واریته ماکروئیدس مطالعه ای در دنیا صورت نگرفته است و برای اولین بار در این بررسی گزارش می شود. با توجه به فعالیت شدیدتر نماتودخواری این قارچ و متناسب با آن فعالیت شدیدتر آنزیم های پروتئاز استفاده از این قارچ و آنزیم های آن در کنترل نماتودها باید مورد توجه بیشتری قرار گیرد (۹). بررسی اخیر نشان داد که برای مطالعه اثر آنزیم پروتئاز در روند نماتودخواری قارچ های نماتودخوار استفاده از مهارکننده PMSF از مهارکننده EDTA بهتر است زیرا در حضور PMSF آنزیم پروتئاز مهار می شود و نماتودهای موجود در محیط کشت نمی توانند توسط قارچ صید شوند اما در حضور EDTA خاصیت نماتودخواری قارچ های مورد مطالعه تفاوتی با گروه شاهد که فاقد مهار کننده بود نشان نداد و EDTA مهار کننده اختصاصی آنزیم پروتئاز نمی باشد اما PMSF به عنوان مهار کننده اختصاصی آنزیم پروتئاز شناخته شده است. نتایج حاصل از بررسی دیگری که بر روی مهار کننده های مختلف آنزیم پروتئاز انجام گرفته است با نتایج بدست آمده از این تحقیق مطابقت دارد (۱۸). در ایران اثر نماتودخواری آرتروبوتریس اولیگوسپورا واریته سارماتیکا مورد بررسی قرار گرفت و نماتودخواری مشاهده نشد. در دنیا سنجش فعالیت آنزیمی آرتروبوتریس اولیگوسپورا انجام گرفته است (۱۷)، اما به صورت مقایسه ای کار نشده است در بررسی حاضر سنجش فعالیت آنزیم پروتئاز این سه قارچ با هم مقایسه و نتایج به دست آمده

نشان داد که در جدایه بومی آرتروبوتریس کلادودس واریته ماکروئیدس میزان فعالیت آنزیم پروتئاز نسبت به دو قارچ دیگر یعنی آرتروبوتریس اولیگوسپورا اولیگوسپورا و آرتروبوتریس اولیگوسپورا سارماتیکا بیشتر است و چون قارچ آرتروبوتریس اولیگوسپورا سارماتیکا فعالیت نماتودخواری ندارد، می توان نتیجه گرفت که در این قارچ زندگی ساپروفیتی بر زندگی انگلی غلبه دارد و آنزیم های پروتئاز این قارچ به حدی نیست که بتواند آسیب جدی به کوتیکول نماتودها وارد کند و آن را نابود نماید. اگر چه ایجاد تله و سایر مکانیسم های مکانیکی نماتودخواری نیز در این قارچ دیده نشد. بر اساس نتایج بدست آمده از این تحقیق مشخص گردید. فعالیت آنزیمی پروتئاز قارچ آرتروبوتریس کلادودس واریته ماکروئیدس اختلاف آماری معنی داری با گونه های آرتروبوتریس اولیگوسپورا واریته اولیگوسپورا و آرتروبوتریس اولیگوسپورا واریته سارماتیکا دارد (p<۰/۰۵). اما فعالیت آنزیم پروتئاز قارچ های آرتروبوتریس اولیگوسپورا واریته اولیگوسپورا و آرتروبوتریس اولیگوسپورا واریته سارماتیکا اختلاف آماری معنی داری با هم ندارند (p>۰/۰۵). با توجه به آزمون مربع کای انجام شده روی نتایج حاصل از روش های مهار کردن مشاهده شد غلظت ۰/۱ و ۱ میلی مولار PMSF در قارچ آرتروبوتریس کلادودس واریته ماکروئیدس بصورت معنی داری از بی حرکت شدن لاروها جلوگیری نمود(p<۰/۰۵) . و بین قدرت مهارکنندگی و بی حرکت شدن لاروها در غلظت های ۰/۱ و ۱ میلی مولار PMSF این قارچ اختلاف معنی داری وجود داشت(P<۰/۰۵)، اما غلظت ۱ میلی مولار EDTA نتوانست بصورت معنی داری از بی حرکت شدن لاروها جلوگیری نماید (p>۰/۰۵). در گونه آرتروبوتریس اولیگوسپورا واریته اولیگوسپورا غلظت های ۰/۱ و ۱ میلی مولار PMSF توانست بصورت معنی داری از بی حرکت شدن لاروهای تحت آزمایش جلوگیری نماید(p<۰/۰۵) اما EDTA در غلظت ۱ میلی مولار در این گونه هم نتوانست از بی حرکت شدن لاروها بصورت معنی داری جلوگیری نماید(p>۰/۰۵). در این قارچ نیز بین میزان بیحرکت شدن لاروها درحضور PMSF با غلظت ۱و ۰/۱ اختلاف معنی داری وجود داشت (p<۰/۰۵). در گونه آرتروبوتریس اولیگوسپورا واریته سارماتیکا هیچکدام از روشهای مهار کردن آنزیم مورد استفاده، تأثیر آماری معنی داری بر بی حرکت کردن لاروها نداشت(p>۰/۰۵)و در مورد این گونه قارچی تعداد لاروهای بی حرکت در محیط کشت شاهد بسیار کمتر از دو گونه فوق بود که می تواند دلیل بر عدم توانایی این قارچ برای به دام انداختن لاروها و غیر فعال کردن لاروها باشد. در حضور مهارکننده آنزیمیPMSF با غلظت۱ میلی مولار اختلاف آماری معنی داری بین نسبت لاروهای متحرک و غیر متحرک سه نوع قارچ تحت مطالعه وجود نداشت(p>۰,۰۵) که ممکن است این موضوع بعلت مهار شدید تمام آنزیم های محیط توسط این مهارکننده اختصاصی در غلظت بکار رفته باشد.از یافته های بالا می توان نتیجه گرفت که آنزیم های پروتئاز فاکتور تشدید کننده فعالیت قارچ های نماتودخوار محسوب می شوند و میزان فعالیت آنها با میزان اثر نماتودخواری قارچ رابطه مستقیم دارد و هرچه فعالیت آنزیم های پروتئاز در یک قارچ نماتودخوار بیشتر باشد این قارچ توانایی بیشتری برای صید نماتودها و نفوذ به کوتیکول آنها خواهد داشت.

فهرست منابع

۱- اسلامی. ع (۱۳۷۸) : کرم شناسی دامپزشکی (نماتود ها وآکانتوسفالا)، چاپ اول ،جلد سوم، انتشارات دانشگاه تهران ،تهران.

۲ - رنجبر بهادری. ش (۱۳۸۱): کنترل زیستی برخی از نماتودهای مهم لوله گوارش نشخوارکنندگان کوچک ایران (همونکوس کونتورتوس) توسط قارچ های نماتود خوار با تأکید برگونه های آرتروبوتریس اولیگوسپورا و دادینگتونیا

فلگرانس، پایان نامه برای دریافت درجه دکتری تخصصی انگل شناسی ، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، شماره ۱۵۵.

3.Ahman, J., Johansson, T., Olsson, M., Punt, P.J., Vanden Hondel, C.A. and Tunlid, A.(2002): Improving the pathogenicity of a nematod-trapping fungus by genetic engineering of a subtilisin with nematotoxic activity. APPL. Environ. Microbiol. 68:3408-3415.

4.Barron, G.L.(1977):The nematode destroying fungi.Topics in Mycology No.1, Guelph, Ontario, Canada.

5.Bonants, P.J.M., Fitters, P.F.L., Thijs, H.den Belder,E., Walwijk, C. and Henfling, J.W.D.M. (1995). A basic serine protease from paecilomyces lilacinus with biological 141: 775-784.

6.Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem.72:248-254.

7.Chavira, R., Jr., Burnett, T.J., and Hageman, J.H. (1984): Assaying proteases with Azocol. Ann. Biochem. B6: 446-450.

8.Eslami, A. and Nabavi, L. (1976): Species of gastrointestinal nematodes of sheep from Iran. Bull. Soc. Pathol. Exot.96:92-95.

9.Eslami, A., Ranjbar-bahadori, S., Zare, R. and Razzaghi-Abyaneh, M. (2005): The predatory capability of Arthrobotrys cladodes var.macroides in the control of Haemunchus contortus infective larvae. vet.parasitol Bo 263-266.

10.Gams, W., Zare, R. (2001): A revision of Verticillium section prostrata. III Generic classification. Nova Hedwigia 72: 329-337.

11.Huang, X., Zhao, N. and Zhang, k.. (2004): Extra cellular enzymes serving as virulence factors in nematophagous fungi involved in infection of the host. Res. Microbiol. 115: 811-816.

12.Huang, X., Tian, B., et al. (2005): An extra cellular protease from Brevibacillus laterosporus G4 without parasporal crystals can serve as a phathogenic factor in infection of nematodes. Res.Microbiol. 156:719-727.

13.Larsen, M., Wolstrup, J., Henriksen, S.A., Dackman, C., Gronvold, J. and Nansen, P. (1991): In vitro stress selection of nematophagous fungi for bio control of parasitic nematodes in ruminants. J. Helminthol. 65, 193-200.

14. Lopez-Lorca, L.V. (1990): Purification and properties of extra cellular proteases produced by the nematophagous fungus Verticillium suchlasporium.can.J.Microbiol.36: 530-537.

15.Oorschot, C.A.N. (1985): Taxonomy of the Dactrylaria complex, V. Areview of Arthrobotrys and allied genera, studies in Mycol. NO 26: 61-96.

16.Nordbring-Hertz, B. (1977): Nematode induced. Morphogenesis in the predacious fungus Arthrobotrys oligospora.Physiol.Plant, 29:223-233

17.Schenk, S.T., Chase, J.R., Rosenzweig, W.D. and Pramer, D. (1980): Collagenase production by nematode-trapping fungi. Appl. Environ.Microbiol.40: 567-570.

18.Tunlid, A. and Sansson, S. (1991): Proteases and their involvement in the infection and immobilization of nematodes by nematophagous fungus Arthrobotrys oligospora, Appl. Environ. Microbiol. 57: 2868-2872.

19.Waller, P.J, and Faedo M.A., (1993): The potential of nematophagous fungi to control the free living stages of nematode parasites of sheep,vet.parasitol.49,285-293.

20.Yang, J., Huang, X.,Tian, B.,Wang, M. and et al. (2005): Isolation and characterization of a serine protease from the nematophagous fungus, Lecanicillium psalliotae, displaying nematocidal activity.Biotechnol. let.27: 1123-1128.

21.Zare, R.,Gams, W. and Culham A., (2000): A revision of Verticillium section prostrata.I.phylogenetic studies using ITS sequences. Nova Hedwigia 71: 465-480.