ژنتیک نوین
دوره هفدهم، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۱
صفحه ۴۱۲-۴۰۳

تاثیر عصاره ریز جلبک سبز *Scenedesmus obliquus* بر میزان ترشح آنزیم زایلاناز و سطح رونوشت ژن Xyln در برخی گونه های قارچ Trichoderma

The Effect of Green Microalgae of *Scenedesmus obliquus* Extract on the Level of Xylanase Enzyme Secretion and Transcript level of Xyn Gene in Some Trichoderma spp.

امیر مسعود حیدری نژاد[۱]، سید کاظم صباغ*[۲]، ناصر رادمان[۳]، محمد سالاری[۳] و محمد رضا سرافراز اردکانی[۴]

۱- دانشجوی دکترا بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

۲-دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه یزد، یزد، ایران

۳- دانشیار، گروه گیاهپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

۴- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه یزد، یزد، ایران

Amir Masoud Heydari Nezhad , Seyed Kazem Sabbagh, Mohammad salari, Mohammad Reza Sarafraz Ardakani

1-Lecturer, Department of Plant Protection, ,University of Zabol, Zabol, Iran
2-Associate Professor , Department of Biology, University of Yazd, Yazd, Iran
3-Associate Professor ,Department of Plant Protection, University of Yazd, Yazd, Iran
4-Assistant Professor, Department of Biology, University of Zabol, Zabol, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی:sksabbagh@yazd.ac.ir

(تاریخ دریافت:۱۴۰۰/۷/۱- تاریخ پذیرش:۱۴۰۱/۸/۱)

چکیده

ترکیبات ضد قارچی Trichoderma spp. شامل آنزیم های لیتیک متنوعی است که اغلب آن‌ها نقش مهمی در کنترل بیولوژیک عوامل بیماری‌زا دارند. زایلان گروهی از ترکیبات همی سلولزی است که در دیواره سلولی گیاهان و برخی جلبک‌ها وجود دارد. جلبک‌های سبز و جلبک‌های سبز-آبی با داشتن ترکیبات پکتینی، سلولزی و همی سلولزی زایلان، آرابینوزایلان و غیره در ساختار خود می توانند محرک‌های مناسبی به عنوان پیش ماده برای تولید آنزیم‌های سلولاز، زایلاناز و پکتیناز در قارچ‌ها باشند. ژن‌های بتا-زایلاناز شامل Xyn1 و Xyn2 در گونه های تریکودرما، باعث تولید آنزیم های خانواده شماره ۱۰ گلیکوزید هیدرولازها می شوند. در این تحقیق توانایی عصاره آبی ریز جلبک سبز *Scenedesmus obliquus* در تولید آنزیم در چهار گونه قارچ *T. atroviride*، *T. virens*، *T. longibrachiatum* و *T. reesei* مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور اثر دو غلظت ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر از عصاره آبی جلبک *Scenedesmus obliquus* در دوبازه زمانی ۴ و ۸ روز بعد از تیمار در تولید آنزیم مورد بررسی قرار گرفت. سطح بیان ژن Xyln مرتبط با استفاده از روش سنجش بیان کمی ژن در زمان واقعی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این تحقیق یک اثر مثبت و متغییر را از عصاره جلبک در تولید آنزیم در تمام جدایه‌های تیمار شده تریکودرما نشان داد. بیشترین میزان ترشح آنزیم در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر از عصاره جلبک، در گونه *T. reseei* و بعد از ۸ روز تیمار مشاهده گردید. در همین بازه زمانی و با همین غلظت کمترین میزان آنزیم در گونه *T. atroviride* مشاهده گردید. نتایج حاصل از آنالیز بیان ژن نشان داد که بیشترین میزان بیان ژن Xylan در گونه *T. reseei* و ۸ روز بعد از تیمار با غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر رخ می‌دهد. با توجه به نتایج این تحقیق، چنین نتیجه گیری می‌شود که ترکیبات سلولزی ساختاری در دیواره ریز جلبک سندموس می‌تواند یک اثر قابل ملاحظه‌ای بر روی ترشح آنزیمی قارچ داشته باشد. بنابراین در تحریک قارچ برای تولید آنزیم در پروژه‌های صنعتی و سطح بالا مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی

اندوگلوکاناز
بیان ژن
زایلان
عصاره جلبکی
محیط کشت CMC

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

مقدمه

ریزجلبک‌ها تولیدکنندگان اولیه غالب در اغلب محیط‌های آب شیرین هستند و عمده انرژی را برای بسیاری از شبکه های غذایی آبی فراهم می‌کنند (Guasch et al. 1998). این موجودات تک سلولی و میکروسکوپی قادر به تبدیل انرژی خورشیدی به انرژی شیمیایی از طریق فتوسنتز هستند. ریزجلبک‌ها حاوی ترکیبات فعال زیستی متعددی هستند که می تواند برای مصارف تجاری استفاده شود. ریزجلبک‌ها برای تولید طیف گسترده‌ای از متابولیت‌ها مانند پروتئین‌ها، چربی‌ها، کربوهیدرات‌ها، کاروتنوئیدها و ویتامین‌ها برای سلامت، غذا و مواد افزودنی، مواد آرایشی و برای تولید انرژی می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند (Priyadarshani and Rath 2012). جلبک‌ها از نظر ژنتیکی گروه بسیار متنوعی از موجودات زنده با طیف گسترده‌ای از ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی هستند، بنابراین به‌طور طبیعی بسیاری از چربی‌های متفاوت و غیر معمول، قندها، ترکیبات فعال زیستی و غیره را می توانند تولید کنند (Avagyan 2008). در حال حاضر، جلبک‌های تک‌سلولی به عنوان منبع سوخت حیاتی (Biofuel) و حتی منبع تولید و استخراج انواع آنتی‌بیوتیک‌ها نیز کاربردهای فراوانی یافته‌اند (Mutanda et al. 2011). با این وجود، تحقیقات در زمینه بررسی ارزش غذایی، خصوصاً اسیدهای چرب، در این جلبک‌ها هنوز هم ناقص است (Pratoomyot et al. 2005). خانواده *Scenedesmaceae* از جلبک‌های مهم تک سلولی متعلق به جنس *Scenedesmus* تیره *Acenedesmaceae* راسته *Chlorochocales* از جلبک‌های سبز *Chlorophyta* می‌باشد (Kiani et al. 2013). جلبک‌های سبز (*Chlorophyceae*) و جلبک‌های سبز-آبی (*Myxophyceae*) با داشتن ترکیبات پکتینی، سلولزی و همی سلولزی زایلان، آرابینوزایلان و غیره در ساختار خود می‌توانند محرک‌های خوبی به عنوان پیش ماده برای تولید آنزیم‌های سلولاز، زایلاناز و پکتیناز در قارچ‌ها باشند (Sahoo and Seckbach 2015). جلبک‌های جنس سندسموس یک شاخص زیستی متداول تغییرات فیزیکی و شیمیایی در شرایط زیست محیطی هستند (Mandal and Mallick 2009). این جنس معمولا برای آشکارسازی حضور مواد مغذی یا سموم منتج از منابع انسانی به سیستم‌های آبی استفاده می‌شود. دمای مناسب رشد آن ۱۵-۱۱ درجه سانتی گراد و شدت نور مناسب برای آن ۶۱-۴ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه است (Kiani et al. 2013). شبیه همه کلروفیت‌ها سندسموس دارای دیواره سلولی حاوی سلولز می‌باشد و پلاستیدها حاوی کلروفیل‌های a و b هستند که به آن‌ها یک رنگ سبز روشن می‌دهند (Andersen, 2005).

گونه‌های *Trichoderma* قارچ‌های همه جازی می باشد که در خاک، مواد آلی و چوب های در حال تجزیه و همچنین در ارتباط با ساختارهای ریشه گیاهی به فراوانی یافت می شوند (Kumar et al. 2012). ترکیبات ضد قارچی *Trichoderma* spp. شامل آنزیم‌های لیتیک متنوعی است که اغلب آن‌ها نقش زیادی در بیوکنترل دارند (Khan et al. 1986).

تریکودرما یکی از مهمترین جنس‌های قارچی است که به صورت تجاری در آماده است و سهم بالایی از بازار مربوط به فرآورده‌های بیولوژیک تجاری به آن اختصاص دارد (Kuhad et al. 2011). جدایه‌های مختلف تریکودرما می توانند طیف وسیعی از بیمارگرهای خاکزاد و هوازاد را کنترل کنند (Mukherjee et al. 2012). موفقیت گونه‌های تریکودرما به عنوان عوامل کنترل بیولوژیک مرهون مکانیسم‌های مختلف آنتاگونیستی شامل رقابت با پاتوژن بر سر غذا و زیستگاه، آنتی‌بیوز با تولید آنزیم‌ها و آنتی بیوتیک‌ها، پارازیتیسم و ایجاد مقاومت القایی در گیاهان می‌باشد (Schuster et al. 2010). همچنین گونه‌های مختلف قارچ تریکودرما با ایجاد مقاومت القایی در گیاهان به صورت غیر مستقیم باعث کنترل بیماری های گیاهی می‌گردند (Mukherjee et al. 2012).

به دلیل قابلیت‌های بالای جدایه‌های تریکودرما، تحقیقات بسیاری در زمینه کنترل بیولوژیکی بیماری‌های گیاهی، با استفاده از جدایه‌های مختلف این جنس قارچی صورت گرفته است (Benitez et al. 2004). کیتینازها، سلولازها، پروتئازها از جمله مهمترین آنزیم‌های برون یاخته‌ای این آنتاگونیست می‌باشد که در مکانیسم‌های هیپرپارازیتیسم قادر به تجزیه دیواره یاخته‌ای بسیاری از قارچ‌ها، نابودی و فروپاشی ساختار یاخته‌ای عوامل بیماری زای گیاهی هستند (Zavari et al. 2012).

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

زایلان گروهی از ترکیبات همی سلولزی است که در دیواره سلولی گیاهان و برخی جلبک‌ها وجود دارد (Jun et al. 2009; Holdt and Karan 2011). قند زایلان دومین و مهمترین پلی ساکارید دیواره سلولی گیاهان است و از ترکیب واحدهای زایلوز ساخته شده است (Royer and Nakas 1989).

مهمترین آنزیم برای تجزیه زایلان ها اندو ۱-۴ بتازایلاناز است که می تواند به طور تصادفی سبب کاهش پلیمر شدن و تاثیر قوی روی ساختار آرابینوزایلان و عملکرد آن داشته باشد (Rennie and Scheller 2014). گونه هایی از تریکودرما نظیر *T. harizianum* و *T. virens* به میزان قابل توجهی آنزیم‌های زایلاناز ترشح می کنند (Mohamed et al. 2013).

خانواده گلیکوزید هیدرولازها گروه گسترده‌ای از آنزیم‌ها هستند که پیوند گلیکوزیدی بین دو یا تعداد بیشتری از کربوهیدرات‌ها را تجزیه می‌کنند (Heinze et al. 2017). ژن‌های بتا-زایلاناز شامل *Xyn1* و *Xyn2* در گونه‌های تریکودرما، خانواده شماره ۱۰ گلیکوزید هیدرولازها که مسئول ترشح آنزیم‌های اندوگالوکاناز (Ec 3.2.1.4)، سلوبیوهیدرولاز (EC 3.2.1.91) و زایلاناز (EC 3.2.1.8) هستند، را تولید می‌کند (Zheng et al. 2016).

در این تحقیق توانایی و اثر عصاره آبی ریز جلبک *Scenedesmus obliquus* در تولید آنزیم زایلاز در چهار گونه قارچ *T. atroviride*، *T. virens*، *T. longibrachiatum* و *T. reesei* و همچنین میزان بیان ژن *Xyln* مسئول تولید آنزیم زایلاناز با روش سنجش بیان کمی ژن در زمان واقعی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش نیاز به تهیه و نگهداری جدایه‌های قارچی بود که جدایه‌های مورد آزمایش شامل چهار گونه قارچ تریکودرما (*T. atroviride*، *T. virens*، *T. longibrachiatum* و *T. reesei*) از کلکسیون قارچی گروه گیاهپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد و گروه زیست شناسی دانشگاه یزد تهیه شد. به منظور نگهداری جدایه‌ها از دو روش کاغذ صافی سترون و لوله آزمایش حاوی محیط کشت PDA استفاده شد. جهت شناسایی مولکولی جدایه‌ها، استخراج DNA به کمک کیت استخراج شرکت Topaz Gene و همچنین روش CTAB انجام شد (Gawel and Jarret 1991). کیفیت DNA استخراجی توسط الکتروفورز ژل آگارز ۱/۲ درصد بررسی و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از ترموسایکلر (PeQlab, Germany) و آغازگرهای ناحیه بین ژنی ITS (Internal transcribed spacer) انجام شد (جدول ۱).

نمونه ریزجلبک سبز *Scenedesmus obliquus* بر اساس روش شوچنکو و همکاران (Shevchenko et al. 2009). در محیط غنی غذایی Bold's Basal Medium مایع و روی شیکر در شرایط دمایی و تناوب نوری مناسب کشت داده و پس از رشد، نمونه ها از محیط کشت تخلیص و در آون خشک شدند. مقدار ۵۰ گرم از بافت خشک جلبک جهت استخراج عصاره آبی به وسیله دستگاه سوکسله مورد استفاده قرار گرفت. حلال آبی با استفاده از روش Boiling extract تبخیر شد (Ramluckan et al. 2014). پس از پایان عصاره گیری مقدار ۰/۱ گرم از عصاره استحصال شده جلبک در ۱۰۰ میلی لیتر آب حل شده و بعد از رقیق سازی عصاره پایه جلبکی با غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر تهیه و تا زمان استفاده در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده بر میزان ترشح آنزیم زایلاناز و سطح رونوشت ژن *Xyln* در برخی گونه های قارچ *Trichoderma*

نام آغازگر	توالی رفت	توالی برگشت	طول قطعه	دمای اتصال
Xyln	ACTTTGCTGGCGCAGACTAC	CAACATCCCAAGCGTAAAGC	۲۰۱	۵۸
ITS1-4	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	TCCTCCGCTTATTGATATGC	۶۰۰	۵۶
Actin	GGTCTGGAGAGCGGTGGTAT	GAAGAAGGAGCAAGAGCAGT	۱۷۰	۵۹

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

برای بررسی تاثیر عصاره جلبک بر روی فعالیت آنزیمی گونه های قارچ تریکودرما، ابتدا یک و نیم لیتر محیط کشت پایه ($NH_4H_2PO_4$ 0.5gr, KCl 0.1gr $MgSO_4$. $7H_2O$ 0.5gr, Yeat extract 0.5gr)، آماده شد. سپس مقدار ۱/۳ گرم از ماده CMC (Carboxymethyl Cellulose) به محیط کشت اضافه گردید. مقدار ۲۰۰ میلی لیتر از محیط کشت آماده شده به داخل ارلن‌های نیم لیتری منتقل گردید. به هر ارلن یک دیسک از قارچ تازه رشد کرده اضافه گردید. از دو غلظت عصاره جلبک به میزان ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر برای القاء قارچ به تولید آنزیم استفاده شد. ارلن‌ها برای رشد قارچ به داخل انکوباتور شیکردار با سرعت دورانی ۸۰ دور در دقیقه به مدت هشت روز و در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. برای انجام فعالیت آنزیم سنجی، در ابتدا مقداری از محیط کشت رشد کرده قارچی از فیلتر ۴۵ با قطر ۴۵ میکرون عبور داده و تخلیص گردید. به ۲۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی، مقدار ۱/۸ از بافر سیترات (۰/۰۵مولار و اسیدیته ۵/۳) اضافه شد. محلول واکنش به مدت پنج دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد و سپس سه میلی لیتر محلول DNS (NaOH 2M, 20ml, DNS 1gr, Potassium sodium tartrate 30gr, Distilled water, 100ml) اضافه شده و محتوای مخلوط به مدت سه دقیقه در حمام آب داغ در دمای ۹۴ درجه سلسیوس قرار داده شد. پس از خنک شدن مخلوط فوق، جذب نوری نمونه ها در طول موج ۵۴۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (AnalytiKJena Speko1500, Germany) در سه تکرار قرائت و ثبت شد. هر واحد فعالیت زایلاناز به عنوان مقدار آنزیمی که یک میکرومول گلوکز در هر دقیقه آزاد می کند، تعیین می‌شود (Bailey et al. 1991).

از محلول Triozol و بافر RNX-Plus جهت استخراج مولکول‌های RNA از هیف‌های قارچی رشد کرده تحت تیمار عصار جلبک استفاده شد برای استفاده شد (Simms et al. 1993). جهت حذف مولکول‌های DNA باقیمانده در محلول حاوی RNA از آنزیم DNase I (SinaClon, Iran) استفاده گردید. سنتز cDNA با استفاده از 2X Hyperscript™ One-Step RT-PCR Premix انجام شد. بررسی نسبی سطوح تغییرات ژن *Xyln* در تیمارهای بکار رفته به روش آنالیز بیان ژن در زمان واقعی (Quantitative Real-time PCR) با استفاده از دستگاه Real-Time PCR (Applied Biosystems® StepOne™) در سه تکرار بیولوژیکی انجام شد. اجزای واکنش شامل دو میکرولیتر cDNA (۱۰۰ نانوگرم)، یک میکرولیتر (غلظت ۱۰۰ نانومولار) از آغازگرهای رفت و برگشت ژن *Xyln* و ۷/۵ میکرولیتر محلول Master Mix (RealQ Plus 2x, Ampliqon) استفاده شد. از آب مقطر دوبار تقطیر و استریل برای تنظیم حجم نهایی واکنش به میزان ۱۵ میکرولیتر استفاده گردید. از ژن بتا اکتین به عنوان ژن خانه‌داری استفاده شد (جدول ۱).

پس از اتمام تکثیر ناحیه هدف در cDNA و ترسیم منحنی ذوب نمونه (Melting curve analysis) توسط نرم افزار اصلی ترموسایکلر، نتایج حاصل از واکنش Real Time- PCR به روش $^{-(\Delta\Delta CT)}$ ۲ محاسبه و همسان سازی شد (Yuan et al. 2006). تغییرات Ct (cycle threshold) هر نمونه در هر بازه زمانی با نمونه کنترل و ژن مرجع طبق فرمول زیر به دست آمد:

$$\Delta Ct_{\text{target}} = Ct_{\text{treatment}} - Ct_{\text{control}}$$
$$\Delta C_{\text{reference}} = Ct_{\text{treatment}} - Ct_{\text{control}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{target}} - \Delta Ct_{\text{reference}}$$

$$Ratio = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

ترسیم نمودارها با استفاده از نرم افزار Graphpad Prism 7 تحلیل آماری داده‌ها به وسیله نرم افزار IBM SPSS Statistics 22 و ترسیم Heatmap بیان سطح بیان ژن‌ها به وسیله نرم افزار RStudio انجام شد (Allaire 2012).

نتایج و بحث

مشاهده تک باند حاصل از قطعه تکثیری در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز روی ژل آگارز ۱/۲ درصد، حاکی از تکثیر صحیح وعاری از خطای قطعه مورد نظر بود. پس از دریافت نتایج حاصل از تعیین توالی، خروجی حاصل از بلاست آرایش نوکلئوتیدی دریافتی، شباهت ۹۹ تا ۱۰۰ درصدی را به گونه‌های ثبت شده در جدول نشان داد. توالی بین ژنی مطالعه شده در بانک ژن (National Center for Biotechnology Information-NCBI)

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

ثبت و گونه‌های ثبت شده به عنوان نمونه استاندارد برای مطالعات این آزمایش استفاده شدند.

جدول ۲- مشخصات جدایه های قارچ تریکودرما استفاده شده در مطالعه تاثیر عصاره ریز جلبک سبز *Scenedesmus obliquus* بر میزان ترشح آنزیم زایلاناز و سطح رونوشت ژن *Xyln* در برخی گونه های قارچ *Trichoderma*

شماره دسترسی	درصد تشخیص	گونه قارچ
MH635413	۱۰۰	*T. atroviride*
MH635414	۹۹/۶۴	*T. virens*
MH635415	۱۰۰	*T. longibrachiatum*
MH635416	۹۹/۸۳	*T. reesei*

نتایج آزمون طیف سنجی به منظور مطالعه بیوشیمیایی میزان تغییرات آنزیم زایلاناز در اثر تیمار با عصاره جلبک در غلظت‌های مختلف در دو بازه زمانی نشان داد که سطح ترشح آنزیم در روز هشتم پس از کشت در همه گونه‌های مورد مطالعه نسبت به روز چهارم افزایش داشته است. میزان ترشح آنزیم در تمامی سطوح در گونه *T. reesei* نسبت به سایر گونه‌ها بیشتر بوده است. به طوری که در نمونه کنترل در این گونه در روز چهارم پس از کشت سطح ترشح آنزیم زایلاناز ۱/۳ واحد بر میلی لیتر و در روز هشتم پس از کشت برای نمونه تیمار شده با عصاره ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر جلبکی به میزان ۵/۰۳ واحد بر میلی لیتر بود (شکل ۱). کمترین سطح ترشح آنزیم در گونه *T. atroviride* مشاهده شد، به طوری که در نمونه کنترل در روز هشتم سطح ترشح آنزیم ۰/۷۴ واحد بر میلی لیتر و در نمونه تیمار با عصاره ۱۰۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر عصاره جلبک سندسموس به میزان ۲/۱۳ واحد بر میلی لیتر بود که نسبت به نمونه شاهد فقط در سطح پنج درصد معنی دار بود. سطوح ترشح آنزیم زایلاناز در محیط کشت CMC در هر دو بازه زمانی برای دوگونه *T. longibrachitaum* و *T. atroviride* از نمونه ۵۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر عصاره جلبک بیشتر بود (شکل ۱).

نتایج حاصل از آنالیز سطوح بیان ژن *Xyln* نشان داد که افزایش سطح رونوشت ژن *Xyln* در گونه *T. reseei* تیمار شده با سه فاکتور مورد بررسی در هر دوبازه زمانی بیشترین میزان افزایش را نسبت به نمونه شاهد داشته است (شکل ۲). به طوری که در روز هشتم پس از تیماردهی، سطح بیان این ژن در نمونه حاوی CMC، و غلظت های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر عصاره جلبکی به ترتیب ۳/۶۷، ۵/۱۳۳ و ۸/۰۵ برابر بوده است (جدول ۳). همچنین با توجه به دندروگرام به دست آمده، میزان تغییرات بیان ژن هدف در دو گونه *T. longiberachiatum* و *T. virens* از نظر فاکتورهای زمانی و القایی رابطه نزدیکتری داشت (شکل ۲).

کمترین میزان تغییرات سطح بیان ژن مورد بررسی مربوط به گونه *T. atroviride* در روز چهارم پس از کشت می‌باشد. که این میزان برای نمونه حاوی CMC، و غلظت ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره جلبکی در محیط کشت پایه به ترتیب ۱/۲۶، ۱/۵۳۱ و ۱/۸۹ برابر نسبت به نمونه شاهد بود. برای گونه *T. virens* سطوح ژن *Xyln* در بازه زمانی روز هشتم پس از تیماردهی برای سه تیمار به ترتیب ۲/۰۸، ۳/۴۱، ۴/۷۷ و برای گونه *T. longibrachiatum* به ترتیب ۳/۸۲، ۲/۸۷ و ۵/۲۱ بود (جدول ۳).

با توجه به نتایج به دست آمده مشخص شد که برای هر چهار گونه مورد مطالعه افزایش غلظت عصاره جلبکی از نمونه شاهد تا غلظت ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر، در محیط کشت باعث روند مثبت در میزان ترشح آنزیم زایلاناز شده است. نتایج تیمار با محیط کشت حاوی CMC در گونه‌های *T.longibrachiatum* و *T. atroviride* نشان داد که ترشح آنزیم در هر دو بازه زمانی از نمونه تیمار شده با عصاره ۵۰۰ میلی گرم

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

جدول ۳. مقایسه میانگین داده های حاصل از بیان ژن *Xyln* در جدایه های قارچ تریکودرما تیمار شده با عصاره جلبک در بازه‌های زمانی مختلف

گونه	بازه زمانی تیماردهی	تیمار	میانگین	بیان کمی ژن
T. reesei	4 days	**Control**	**30.82**	**1**
		0.5 µg/mL	28.968	4.389
		1 µg/mL	28.233	**6.717**
		CMC	29.036	3.855
	8 days	**Control**	**29.965**	**1**
		0.5 µg/mL	27.842	5.133
		1 µg/mL	26.95	**8.05**
		CMC	28.151	3.67
T. longibrachiatum	4 days	**Control**	**31.82**	**1**
		0.5 µg/mL	30.42	2.95
		1 µg/mL	29.1	**5.1**
		CMC	29.52	4.03
	8 days	**Control**	**31.15**	**1**
		0.5 µg/mL	29.741	2.87
		1 µg/mL	28.86	**5.21**
		CMC	29.1	3.82
T. Virens	4 days	**Control**	**31.56**	**1**
		0.5 µg/mL	30.42	2
		1 µg/mL	29.47	**4.233**
		CMC	31.11	1.957
	8 days	**Control**	**31.05**	**1**
		0.5 µg/mL	29.939	3.41
		1 µg/mL	29.1	**4.77**
		CMC	30.392	2.08
T. atroviride	4 days	**Control**	**31.92**	**1**
		0.5 µg/mL	31.03	1.261
		1 µg/mL	30.755	**1.89**
		CMC	31.45	1.56
	8 days	**Control**	**31.45**	**1**
		0.5 µg/mL	30.508	1.598
		1 µg/mL	29.69	**3.358**
		CMC	30.163	2.388

بر میلی لیتر جلبک *Scenedesmus obliquus* بیشتر بوده است (شکل۱) ، این در حالی است که پاسخ دو گونه *T. virens* و *T. reseei* به هر دو غلظت عصاره جلبکی نسبت به محرک CMC به منظور ترشح آنزیم زایلاناز بیشتر بوده است. بر اساس مطالعه محمد و همکاران (۲۰۱۳) که بر روی دو گونه *T. harizianum* و *T. virens*، به انجام رسیده است، مشخص شده است که تکثیر این دو گونه بر روی محیط طبیعی پوسته هنداونه و طالبی باعث افزایش ترشح آنزیم های گلاکتوروناز و زایلاناز نسبت به نمونه شاهد شده است. بیشترین میزان سطح ترشح آنزیم زایلاناز روز پنجم پس از کشت بوده است. همچنین استفاده منابع قندی-کربنی به عنوان القاگر تأثیر پایین تری نسبت به عصاره طبیعی بستر کشت در افزایش سطح ترشح آنزیم زایلاناز داشته است (Mohamed et al. 2013). بیشترین سطوح فاکتورهای رشدی در بازه زمانی بین ۵ تا ۷ روز پس از کشت و تحت تیمارهای تحریک کننده اتفاق می افتد (Shojaosadati and Asadollahi. 2016).

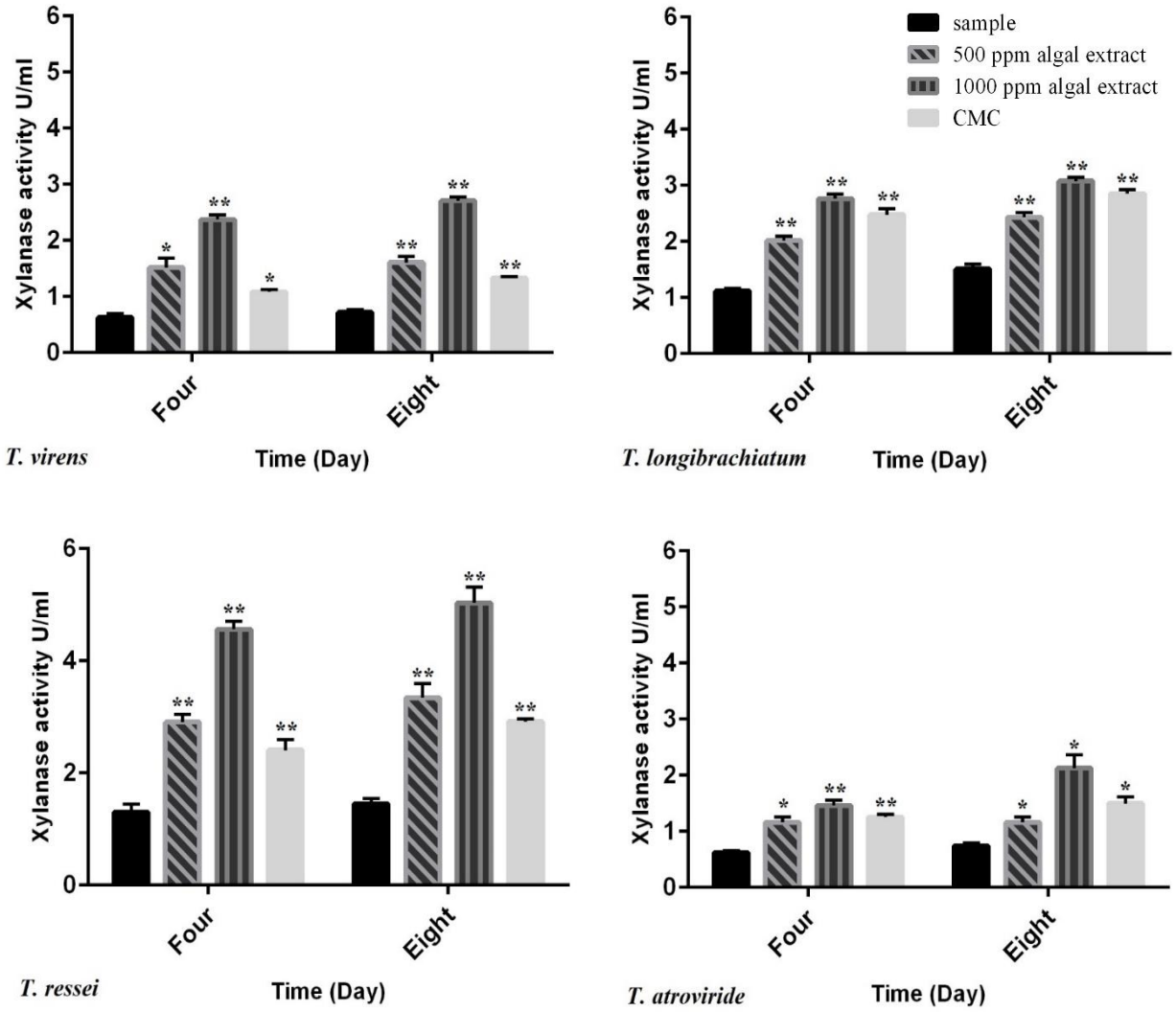
بر اساس نتایج مطالعه پیش رو سطح ترشح پایه آنزیم در گونه *T. longibrachiatum* در هر دو بازه زمانی در مقایسه با ترشح پایه آنزیم در گونه *T.reesi* بسیار به هم نزدیک است و این میزان با

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

افزایش زمان کشت در گونه *T. longibrachiatum* افزایش بیشتری نیز می‌یابد، نکته قابل توجه افزایش بیشتر سطوح ترشح آنزیمی با اعمال هریک از تیمارهای سه گانه به عنوان القاگر در محیط کشت، برای گونه *T.reseei* می باشد (شکل ۱). بررسی ها نشان می دهد که استفاده از پوسته پرتقال و همچنین عضاره جلبک سبز *Spyrogira* sp. در شرایط محیطی قارچ *Aspergullus niger* به افزایش میزان تولید آنزیم‌های پلی گالاکتوروناز، زایلاناز و پکتیناز منجر می‌شود (Rodríguez et al. 2011; Heydari nezhad et al. 2020). مطالعات Botella و همکاران نشان می‌دهد که افزودن گلوکز ۶٪ به منابع کربنی در محیط کشت *Aspergillus awamori* باعث افزایش معنی دار ترشح آنزیم‌های گالاکتوروناز و زایلاناز می شود، این در حالی است که افزودن گلوکوز تا میزان ۸٪ سطح ترشح آنزیم‌های مذکور را کاهش می‌دهد (Botella et al. 2005). مطالعه Salazar و همکاران حاکی از آن است که سطوح ترشح آنزیم کتیناز بر اساس روش اسپکتروفتومتری و پروتئومیکس روی محیط کشت غذایی حاوی پودر قارچ‌های چتری به عنوان منبع کربن برای دو گونه *T. harizianum* و *T. atroviride* به ترتیب در روزهای ششم و هشتم پس از کشت به میزان ۱/۶ و ۱/۳ واحد در لیتر به بیشترین سطح خود رسیده و پس از آن روند ترشح آنزیم کاهشی بوده است (Salazar et al. 2019). در مطالعه حاضر نتایج بررسی سطح بیان ژن *Xyln* به طور نسبی همبستگی مثبت با نتایج سطوح آنزیمی ترشح شده نشان داد. باتوجه به این که میزان سطح رو نوشت ژن *Xyln* که یکی از فاکتورهای اصلی در سنتز و ترشح آنزیم های گروه زایلاناز می باشد، این رابطه قابل توجیه می‌باشد. بیشترین میزان بیان ژن مذکور در گونه *T. reseei* مشاهده شد که در روز هشتم به واسطه دوز ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره جلبکی بیش از هشت برابر نمونه کنترل بود. بیان ژن هدف در تیمار مربوط به منبع کربنی CMC نیز در تمام آزمایش‌ها سطح بیان کمتری در برابر عصاره ۱۰۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر عصاره جلبکی داشت، اما در برخی نتایج افزایش بیشتر سطوح رونوشت ژن از عصاره ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره جلبکی بیشتر بوده است. آنچه مشخص است عصاره جلبک سبز سندسموس در دوز بالاتر (۱ میلی گرم در میلی لیتر) تاثیر بیشتری نسبت به منبع کربنی شیمیایی موجود در محیط کشت CMC در تحریک و سنتز آنزیم‌های مرتبط با گروه زایلاناز داشته است. جلبک‌ها منشاء سرشاری از هیدروکربن‌ها و مواد ژلاتینی بوده که در صنایع مختلف نظیر پزشکی، داروسازی و کشاورزی حائز اهمیت بوده و استفاده از ریز جلبک‌ها در مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی در حال افزایش می‌باشد (Maity et al. 2014). استفاده از جلبک‌ها به عنوان عوامل مفید در تولید سوخت‌های زیستی نظیر گاز هیدروژن و تولید انواع الکل‌ها و بیودیزل‌ها، مورد استفاده قرار گرفته اند (Demirbas, 2010; Gorgich et al. 2020). یکی از اهداف مهم بیوتکنولوژی صنعتی در جهت تولید در مقیاس وسیع، گسترش طیف پیش ماده‌های قابل مصرف یک میکروارگانیسم می باشد. این موضوع انعطاف پذیری فرایند را افزایش داده و فرایند را از نظر اقتصادی توجیه پذیر می‌نماید(Wijffels et al. 2013). در مسیرهای منتهی به تولید انبوه قیمت پیش ماده سهم زیادی در قیمت تمام شده محصول دارد. امروز تحقیقات گسترده ای در جهت توانمند ساختن میکروارگانیسم‌ها برای مصرف پیش ماده‌هایی مانند زایلوز، لاکتوز، سلولز و نشاسته شده است (Shojaosadati and Asadollahi. 2016).

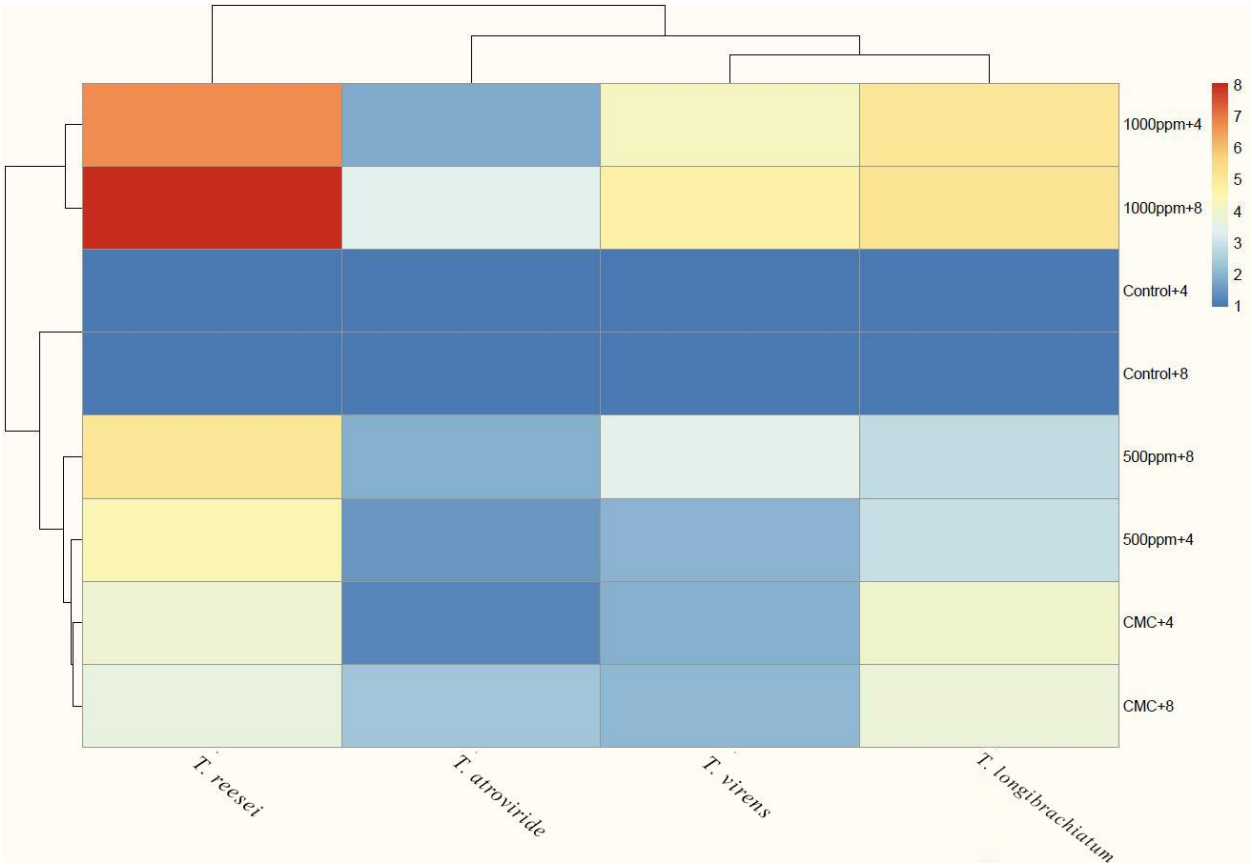
نتایج این پژوهش نشان داد ترکیبات سلولزی ساختاری در دیواره میکروجلبک سبز سندموس در صورتی که در دسترس گونه‌های تریکودرما قرار گیرند، با فعال سازی سیستم سیگنال دهی، بیان ژن های رمز کننده تجزیه کننده این مواد از جمله خانواده گروه ۱۰ گلیکوزید هیدرولازها، ترشح این آنزیم‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Wubben et al. 2010). این آنزیم ها در مکانیسم‌های مرتبط با واکنش‌های آنتی بیوزی قارچ‌های تریکودرما در مسیرهای کنترل بیولوژیک قادر به تجزیه دیواره یاخته‌ای بسیاری از قارچ‌ها، نابودی و فروپاشی ساختار یاخته‌ای عوامل بیماری زای گیاهی هستند (Zavari et al. 2012).

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]



شکل ۱ -مقایسه سطوح ترشح آنزیم زایلاناز در دو بازه زمانی چهار و هشت روز در چهار گونه *Trichoderma*. نمونه‌های آزمایشی شامل، نمونه شاهد، تیمار شده با عصاره ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر جلبک *Scendesmus* و محیط کشت حاوی CMC. محور طولی بازه زمانی ۴ و ۸ روز را نشان می‌دهد. محور عرضی نشان دهنده فعالیت زایلانازی نمونه‌ها (واحد بر میلی‌لیتر) است. **: معنی‌دار در سطح یک درصد. *: معنی‌دار در سطح پنج درصد.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]



شکل ۲- نمایش نقشه گرمایی سطح بیان ژن *Xyln*. نقشه ارتباط بیان ژن را در چهار گونه قارچ *Trichoderma* تحت تیمار با سه فاکتور القاگر شامل محیط کشت حاوی CMC، محیط کشت حاوی عصاره جلبکی ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و محیط کشت حاوی عصاره جلبکی ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر را نشان می‌دهد. تغییر بیان ژن در گونه‌های دارای دندروگرام‌های مرتبط تشابه بیشتری داشته است. خانه‌های مایل به رنگ آبی سطح بیان ژن پایین‌تر و خانه‌های مایل به رنگ قرمز سطح بیان ژن بالاتری دارند.

منابع

Allaire J (2012) RStudio: integrated development environment for R. Boston, MA, 537:538.

Andersen RA (2005) Algal culturing techniques. Elsevier Pressin, London, UK. 1-223.

Avagyan A (2008) Microalgae: big feed potential in a small package. Feed International 29:16-18.

Bailey, M. Biely, P. and Poutanen K (1991) Interlaboratory testing of methods for assay of endo-1, 4-beta-xylanase activity. In International Symposium on Xylans and Xylanases. Elsevier.

Benítez T, Rincón AM, Limón MC, Codon AC (2004) Biocontrol mechanisms of Trichoderma strains. International Microbiology 7:249-260.

Botella C, De Ory I, Webb C, Cantero D, Blandino A (2005) Hydrolytic enzyme production by Aspergillus awamori on grape pomace. Biochemical Engineering Journal 26:100-106.

Del Rocío Urbina-Salazar A, Inca-Torres AR, Falcón-García G, Carbonero-Aguilar P, Rodríguez-Morgado B, del Campo JA, Parrado J, Bautista J (2019) Chitinase Production by Trichoderma harzianum Grown on a Chitin-Rich Mushroom Byproduct Formulated Medium. Waste and Biomass Valorization 10:2915-2923.

Demirbas A (2010) Use of algae as biofuel sources. Energy Conversion and Management, 51:2738-2749.

Gawel NJ, Jarret, RL (1991) A modified CTAB DNA extraction procedure for Musa and Ipomoea. *Plant Molecular* Biology Reporter, 9:262-266.

Gorgich M, Mata T, Martins AA, Branco-Vieira M, Caetano NS (2020) Comparison of different lipid extraction procedures applied to three microalgal species. Energy Reports 6: 477-482.

Guasch H, Ivorra N, Lehmann V, Paulsson M, Real M, Sabater S (1998) Community composition and sensitivity of periphyton to atrazine in flowing waters: the role of

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

environmental factors. Journal of Applied Phycology 10:203-215.
Heinze S, Mechelke M, Kornberger P, Liebl W, Schwarz WH, Zverlov VV (2017) Identification of endoxylanase XynE from Clostridium thermocellum as the first xylanase of glycoside hydrolase family GH141. Scientific Reports 7:1-10.
Heydari Nejad AM, Panjehkeh N, Sabbagh SK, Salari M, Sarafraz Ardakani MR (2019) Effect of green algae extract; Spirogyra sp. on the rate of pectinase enzyme secretion and expression level of PgaA gene in Aspergillus niger. Journal of Molecular and Cellular Research 34 (In Farsi).
Holdt SL, Kraan S (2011) Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. Journal of Applied Phycology 23:543-597.
Jun H, Bing Y, Keying Z, Xuemei D, Daiwen C (2009) Expression of a Trichoderma reesei β-xylanase gene in Escherichia coli and activity of the enzyme on fiber-bound substrates. Protein Expression and Purification 67:1-6.
Khan A, Tremblay D, LeDuy A (1986) Assay of xylanase and xylosidase activities in bacterial and fungal cultures. Enzyme and Microbial Technology 8:373-377.
Kiani S (2013) Effect of heavy metals (Nickel, Lead and Copper) on the growth and colony formation of green microalgae Scenedesmus quadricauda. Isfahan University of Technology , Iran (In Farsi).
Kuhad RC, Gupta R, Singh A (2011) Microbial cellulases and their industrial applications. Enzyme research 2011: 1-15.
Kumar K, Amaresan N, Bhagat S, Madhuri K, Srivastava RC (2012) Isolation and characterization of Trichoderma spp. for antagonistic activity against root rot and foliar pathogens. Indian Journal of Microbiology 52: 137-144.
Mach RL, Strauss J, Zeilinger S, Schindler M, Kubicek CP (1996) Carbon catabolite repression of xylanase I (xyn1) gene expression in Trichoderma reesei. Molecular Microbiology 21:1273-1281.
Maity JP, Hou CP, Majumder D, Bundschuh J, Kulp, TR, Chen CY, Chuang, L., Chen CNN, Jean JS, Yang TC, Chen CC (2014) The production of biofuel and bioelectricity associated with wastewater treatment by green algae. Energy, 78:94-103.
Mandal S, Mallick N (2009) Microalga Scenedesmus obliquus as a potential source for biodiesel production. Applied Microbiology and Biotechnology 84:281-291.
Mohamed SA, Al-Malki AL, Khan JA, Kabli SA, Al-Garni SM (2013) Solid state production of polygalacturonase and xylanase by Trichoderma species using cantaloupe and watermelon rinds. Journal of Microbiology 51:605-611.
Mukherjee M, Mukherjee PK, Horwitz BA, Zachow C, Berg G, Zeilinger S (2012) Trichoderma–plant–pathogen interactions: advances in genetics of biological control. Indian Journal of Microbiology 52:522-529.
Mutanda T, Ramesh D, Karthikeyan S, Kumari S, Anandraj A, Bux F (2011) Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production. Bioresource Technology 102:57-70.
Pratoomyot J, Srivilas P, Noiraksar T (2005) Fatty acids composition of 10 microalgal species. Songklanakarin J Sci Technology 27:1179-1187.
Priyadarshani I, Rath B (2012) Commercial and industrial applications of micro algae–A review. Journal of Algal Biomass Utilization 3:89-100.
Ramluckan K, Moodley KG, Bux F (2014) An evaluation of the efficacy of using selected solvents for the extraction of lipids from algal biomass by the soxhlet extraction method. Fuel 116:103-108.
Rennie EA, Scheller HV (2014) Xylan biosynthesis. Current Opinion in Biotechnology 26:100-107.
Rodríguez-Fernández D, Rodríguez-León J, De Carvalho J, Sturm W, Soccol CR (2011) The behavior of kinetic parameters in production of pectinase and xylanase by solid-state fermentation. Bioresource Technology 102:10657-10662.
Royer J, Nakas J (1989) Xylanase production by Trichoderma longibrachiatum. Enzyme and microbial technology 11:405-410.
Sahoo D, Seckbach J (2015) The algae world. Springer, Neugebauer. Berlin, 1-598.
Schuster A, Schmoll M (2010) Biology and biotechnology of Trichoderma. Applied microbiology and biotechnology 87:787-799.
Shevchenko NM, Burtseva YV, Zvyagintseva TN, Makar TN, Sergeeva OS, Zakharenko AM, Van Huyen P (2009) Polysaccharides and sterols from green algae *Caulerpa lentillifera* and *C. sertularioides*. Chemistry of Natural Compounds, 45:1-5.
Shojaosadati SA, Asadollahi MA (2016) Industrial Biotechnology. Tarbiat Modares University, 8th Edition.444Pp.
Simms D, Cizdziel PE, Chomczynski P (1993). TRIzol: A new reagent for optimal single-step isolation of RNA. Focus, 15:532-535. (In Farsi)
Wijffels RH, Kruse O, Hellingwerf KJ (2013) Potential of industrial biotechnology with cyanobacteria and eukaryotic microalgae. Current Opinion in Biotechnology 24:405-413.
Wubben JP, Ten Have A, Van Kan JA, Visser J (2000) Regulation of endopolygalacturonase gene expression in Botrytis cinerea by galacturonic acid, ambient pH and carbon catabolite repression. Current Genetics, 37:152-157.
Yuan JS, Reed A, Chen F, Stewart Jr CN (2006) Statistical analysis of real time PCR data, MBC Bioanformatic, 7: 85.
Zavari F, Sahebani N, Etebarian H (2012) Measuring of β-1, 3 glucanase activity in Trichoderma virens isolates and selection of the best isolates for biological control of cucumber root rot. Journal of Stainable Agriculture and Production Science 22:150-161.
Zheng Y, Li Y, Liu W, Chen CC, Ko TP, He M, Yao B (2016) Structural insight into potential cold adaptation mechanism through a psychrophilic glycoside hydrolase family 10 endo-β-1, 4-xylanase. Journal of Structural Biology, 193:206-211.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]