مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۶، دوره ۷۲، شماره ۳، ۲۹۵-۲۸۹
DOI: 10.22059/jvr.2018.35257.1976
Original Article

ارزیابی سنجش فعالیت آنزیمی برخی جدایه‌های قارچ‌های انتوموپاتوژن مورد مطالعه بر روی کنه ایکسودس ریسینوس

یاسر پیرعلی[1*] اسحق کریمی[2] صدیقه نبیان[3] وحیدرضا ذیلابی[4]

۱) گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
۲) گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه رازی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
۳) گروه انگل شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران
۴) دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

(دریافت مقاله: ۲۵ دی ماه ۱۳۹۵، پذیرش نهایی: ۵ اردیبهشت ماه ۱۳۹۶)

چکیده

زمینه مطالعه: در سال‌های اخیر کنترل بیولوژیک انگل‌ها به وسیله قارچ‌های انتوموپاتوژن به عنوان یکی از روش‌های جایگزین به جای سموم مختلف مورد توجه قرار گرفته است. این قارچ‌ها به فراوانی در طبیعت یافت شده، به آسانی قابل جمع آوری و تکثیر بوده و برای دام‌ها و گیاهان غیرپاتوژن هستند. **هدف:** هدف از این مطالعه بررسی مکانیسم اثر آنزیمی برخی جدایه‌های قارچ‌های انتوموپاتوژن بر کنه ی ایکسودس ریسینوساست. **روش کار:** در این مطالعه پس از کشته شدن کنه‌ها توسط جدایه‌های قارچی، شناسایی و آنالیز آنزیم‌های قارچی شامل کیتیناز، لیپاز و پروتئاز در ساختارهای قارچی رشد کرده بر روی کنه‌های کشته شده با استفاده از روش‌های استاندارد مانند اسپکترو فتومتری انجام گرفت. **نتایج:** بر اساس نتایج این مطالعه بین فعالیت آنزیم‌های کیتیناز، لیپاز و پروتئاز در جدا یه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری وجود داشت ($p>0/05$). این مطالعه برای اولین بار در کشور اقدام به سنجش آنزیم‌های دخیل در اثرات کنه کشی این گروه از قارچ‌ها نموده است. **نتیجه گیری نهایی:** با انجام این آزمایش می‌توان ارتباط بین میزان فعالیت آنزیم‌های مورد مطالعه و اثرات کنه کشی جدایه‌های قارچی را مورد بررسی و مقایسه قرار داد و از این طریق جدایه‌های قارچی مؤثر تر را برای کنترل زیستی کنه‌ها انتخاب نمود.

واژه‌های کلیدی: فعالیت آنزیمی، قارچ‌های آکاروپاتوژن ، کنترل بیولوژیک، ایکسودس ریسینوس

مقدمه

قارچهـای انتوموپاتوژن با اسـتفاده از ترکیبی از مکانیسـم‌های آنزیمی و مکانیکی و بدون نیاز به بلع اسـپور باعث سـوراخ کردن کوتیکول کنه‌ها میشوند و دارای طیف میزبانی وسیعی بوده و با موفقیت برای کنترل آفات کشـاورزی و مراتع استفاده شـده اند. این قارچ‌ها با تولید کیتیناز، پروتئاز، لیپاز و سـاختارهای قارچی، کوتیکول و پوشـش بدن بند پایان (کنه‌ها) را سوراخ می‌کنند. نفوذ به تگومنت سخت و با صلابت به واسطه فعالیت‌های مکانیکی و آنزیماتیک اتفاق می‌افتد (۱۴). برگشـت غشـاهای کوتیکول متعاقب نفوذ قارچ‌ها به طور مشـخص نشان دهنده فشارهای مکانیکی و دخالت عوامل مکانیکی در نفوذ قارچ‌ها به داخل تگومنت است. همچنین Brey و همکاران در سال ۱۹۸۶ (۲) نقش مهم آنزیم‌های آزاد شده توسط لوله تندش (Germ tube) در طول سوراخ کردن کوتیکول حشرات را تائید نمودند. نتایج تأثیرات آنزیمی قارچ بواریا باسیانا بر روی کوتیکول حشره بید توسط Samsinakova و همکاران در سال ۱۹۷۱ مورد تائید قرار گرفته و نشان داده شده که هضم تگومنت نیاز به فعالیت انواع لیپاز، پروتئاز و کیتیناز دارد (۱۹). بر اساس مطالعات Paris و Ferron در بسیاری از حشرات تولید لیپاز، پروتئاز و کیتیناز با میزان تهاجم قارچ همبسـتگی دارد، برای مثال جدایه‌هـای فاقد کیتیناز و لیپاز بواریا برونگنیورتی قادر به ایجاد عفونت در سوسک ملولونتا ملولونتا نیستند (۱۶). همچنین بنا بر گزارشات Jackson و همکاران حدت ورتیسلیوم لکانی با سطح بالای فعالیت خارج سلولی کیتیناز در ارتباط اسـت (۱۰). Grula و همکاران در سال ۱۹۸۴ مشخص نمودند جدایه‌های مهاجم بواریا باسینا روی هلیوتیس زئا بیشترین میزان الاستاز را ترشح می‌کنند (۷). مطالعه روی متاریزیوم آنیزوپلیه توسط ST leger و همکاران در سـال ۱۹۸۶ (۲۱) نشان داد که تمام جدایه‌های حاد این گونه بیشـترین میزان پروتئازها را تولید می‌کنند و از بین پروتئازها کیموالاستاز و یک آنزیم شـبیه تریپسین بیشترین فعالیت را نشان می‌دهند. نقش این پروتئازها در نفوذ و سـوراخ کردن کوتیکول با اسـتفاده از مهار کننده‌های پروتئاز در سطح کوتیکول که باعث تاخیر قابل قبولی در مرگ و میر حشرات در مقایسـه با گروه کنترل گردید مورد تائید قرار گرفته اسـت (۲۰). در این مطالعه علاوه بر بررسی پتانسیل جدایه‌های انتوموپاتوژن متاریزیوم و بواریا روی کنه ایکسودس ریسینوس، جهت بررسی مکانیسم اثر بیوشیمیائی این جدایه‌ها اقدام به آنالیز آنزیم‌های موجود (کیتیناز و لیپاز و ...) می‌گردد.

مطالعـه حاضر با هدف بررسـی فعالیـت آنزیمی برخـی جدایه‌های قارچ‌های انتوموپاتوژن متاریزیوم آنیزوپلیه و بواریا باسـیانا طراحی و انجام گردید.

مواد و روش کار

تهیه کنه‌ها و جدایه‌های قارچی: کنه‌های ایکسودس خون خورده مورد نیاز از مناطق شـمالی کشور (استان مازندران) مستقیماً از روی دام‌ها جمع

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۰۳۸۱-۴۴۲۴۴۲۷ نمابر: ۰۳۸۱-۴۴۲۴۴۲۷ Email: khpirali@yahoo.com

آوری و در ظروف مخصوص با قابلیت تهویه و رطوبت مناسب (حدود ۲۵-۱۵ کنه در هر ظرف) به آزمایشگاه منتقل گردید. چهار جدایه بومی از قارچ متاریزیوم آنیزوپلیه و بواریا باسیانا از موسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی وزارت جهاد کشاورزی تهیه و برای انجام آزمایش بر روی محیط PDA کشت گردیدند. مشخصات قارچهای مورد استفاده در جدول ۱ آمده است. کنه‌ها بلافاصله پس از رسیدن به آزمایشگاه در الکل اتیلیک ۷۰٪ ضد عفونی شدند. سالم بودن کنه‌های بالغ خون خورده مهم بوده و در اسرع وقت پس از جمع آوری مورد ارزیابی قرار گرفتند. کنه‌های صدمه دیده و تغییر رنگ داده حذف شدند. کنه‌های سالم دارای حرکت بودند و زمانی که در زیر یک منبع نور قرار می‌گرفتند به سمت نور حرکت می‌کردند (۱۷). برای انجام آزمایش و مشاهده تأثیر این قارچها بر مرگ و میر و تعیین حدت قارچها، سوسپانسیونی حاوی $۲/۴ \times ۱۰^{۷}$ کنیدیوم در هر میلی لیتر از هر کدام از ۴ جدایه تهیه گردید و در دمای ۴ °C نگه داری شد و کنه‌ها در این سوسپانسیون برای چند ثانیه غوطه ور شدند و در یک بازه زمانی بیست روزه مرگ و میر آن‌ها ثبت و مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۷).

سنجش فعالیت آنزیم کیتیناز: سنجش فعالیت کیتیناز بر اساس روش تجزیه کیتین به مونومرهای N-acetyl-glucosamine (NAG) انجام شد (۸،۱۲،۱۴). در این راستا NAG تولید شده احیا گردید و در مخلوط واکنش با رنگ p-Dimethylaminobenzaldehyde یا DMAB کمپلکس شده و جذب آن در طول موج ۵۸۵ nm خوانده شد. فعالیت کل کیتیناز بر اساس میکرومول کیتین مصرف شده بر ساعت (µmol/h) و فعالیت ویژه کیتیناز بر اساس میکرومول کیتین مصرف شده بر میزان پروتئین بر ساعت (mol/g/hµ) بیان شد.

Chitin -- oligosaccharides + NAG -- reduced NAG --à NAG + dye (DMAB)

سنجش فعالیت آنزیم پروتئاز: فعالیت پروتئولیتیک نمونه‌ها با استفاده از هیدرولیز آزوکازئین Azocasein ۲ ٪ به عنوان سوبسترا انجام شد (۵). به طور خلاصه، تهیه ی آنزیمی همراه سوبسترا در ۵۰mmol Tris-HCL با pH برابر با ۷.۵ در دمای ۲۵ °C در لوله آزمایش مخلوط و به مدت یک ساعت انکوبه گردید. سپس با افزودن ۱۰٪ trichloroacetic acid (TCA) واکنش متوقف شده و مخلوط حاصل در دور ۶۵۰۰ و دمای °C ۲۵ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی برداشته شده و جذب آن در دستگاه اسپکتروفتومتر در مقابل بلانک در طول موج ۴۴۰ nm قرائت گردید (۷). فعالیت کل پروتئیناز بر اساس میکرومول آزوکازئین هیدرولیز شده بر ساعت (µmol/h) و فعالیت ویژه پروتئیناز بر اساس میکرومول آزوکازئین هیدرولیز شده بر میزان پروتئین بر ساعت (mol/g/hµ) بیان شد (۵).

سنجش فعالیت آنزیم لیپاز: جهت سنجش فعالیت لیپاز، ابتدا روغن زیتون ۵۰٪ با صمغ عربی ۵ ٪ به شکل امولسیون آماده شد و سپس

جدول ۱. جدایه های قارچی مورد استفاده در این مطالعه.

قارچ	جدایه	میزبان	محل
متاریزیوم آنیزوپلیه	IRAN ۴۳۷ C	کرم ساقه خوار برنج	رشت
متاریزیوم آنیزوپلیه	DEMI ۰۰۲	-	نور
بوورياباسيانا	IRAN ۴۰۳ C	خاک	کرج
بوورياباسيانا	IRAN ۴۲۸ C	کرم ساقه خوار برنج	رشت

محلول حاوی آنزیم حاوی تهیه ی قارچی با آب مقطر و بافر نمکی فسفات pH ۷ به آن افزوده شد و در ۳۷ °C به مدت ۳ ساعت انکوبه شد. آنزیم لیپاز موجود سوبسترا روغن زیتون را به گلیسرول و اسید چرب تجزیه کرده و میزان اسید تولید شده بر اساس سود مصرفی ۰/۰۵ نرمال در حضور محلول الکلی معرف فنول فتالئین در تیتراسیون اندازه گیری می‌شد (۳،۴). فعالیت لیپاز برابر با میلی اکی والان قلیای مصرف شده (سود ۰/۰۵ نرمال) به ازای هر گرم پروتئین جهت خنثی سازی اسیدهای چرب آزاد شده از روغن زیتون بود.

آنالیز آماری: تمامی اطلاعات به دست آمده به صورت میانگین میانگین خطای معیار (Mean ± SEM) ارائه شده است. آنالیز واریانس داده‌ها با استفاده از آزمون one-way ANOVA در سطح $p<۰/۰۵$ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و در صورت وجود اختلاف معنی‌دار تست توکی (Tukey's HSD) جهت مقایسه میانگین‌ها در گروه‌های مختلف استفاده شد. آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزارهای SPSS نسخه ۱۶ انجام گرفت. جهت وابستگی سنجش کیتیناز به بتا گلوکوزیداز از paired T-Test استفاده شد.

نتایج

با توجه به جدول ۳ از لحاظ فعالیت آنزیم آلکالین پروتئاز بین جدایه قارچی IRAN ۴۳۷ C با سه جدایه دیگر اختلاف معنی‌دار می‌باشد و از لحاظ فعالیت آنزیم آلکالین پروتئاز، جدایه قارچی IRAN ۴۳۷ C بیشترین فعالیت را در بین گروه‌ها دارد ($p<۰/۰۵$). همچنین با توجه به جدول ۳ از نظر فعالیت ویژه آنزیم آلکالین پروتئاز بین جدایه قارچی IRAN ۴۳۷ C با سه جدایه دیگر اختلاف معنی‌دار می‌باشد و از لحاظ فعالیت ویژه آنزیم آلکالین پروتئاز همانند فعالیت کل این آنزیم جدایه قارچی IRAN ۴۳۷ C بیشترین فعالیت را در بین گروه‌ها دارد ($p<۰/۰۵$). مطابق جدول ۳ از لحاظ فعالیت آنزیم لیپاز بین گروه DEMI ۰۰۲ و IRAN ۴۲۸ C با IRAN ۴۰۳ C و IRAN ۴۳۷ C اختلاف معنی‌دار است و از لحاظ فعالیت آنزیم لیپاز جدایه‌های DEMI ۰۰۲ و IRAN ۴۲۸ C بیشترین فعالیت را دارد و جدایه قارچی IRAN ۴۰۳ C نیز کمترین فعالیت را دارد ($p<۰/۰۵$).

همچنین مطابق جدول ۳ از نظر فعالیت ویژه آنزیم لیپاز گروه IRAN ۴۰۳ C با هر سه گروه دیگر اختلاف معنی‌داری داشت و در واقع این آنزیم کمترین فعالیت ویژه را در گروه مربوط به جدایه قارچی IRAN ۴۰۳ C داشته است ($p<۰/۰۵$). بر اساس جدول ۳ از لحاظ فعالیت آنزیم کیتیناز

جدول ۲. حجم به کار رفته (براساس میکرولیتر) از بافراولیه، سوبسترا، آنزیم بتا گلوکوزیداز (یا آب مقطر) و نمونه آماده شده در سنجش آنزیم کیتیناز.

نمونه ها	نمونه + بتاگلوکوزیداز	بلانک	بلانک + بتاگلوکوزیداز	
بافر	۷۵	۷۵	۷۵	۷۵
سوبسترا	۶۷/۵	۶۷/۵	۰	۰
بتاگلوکوزیداز	۰	۶۷/۵	۰	۶۷/۵
آب مقطر	۶۷/۵	۰	۶۷/۵	۰
هموژن‌کننده	۵۰	۵۰	۵۰	۵۰
برای ۲ ساعت در انکوباتور مجهز به شیکر قرار داده شده				
سوبسترا	۰	۰	۶۷/۵	۶۷/۵

جدول ۳. اطلاعات مربوط به فعالیت کل بر اساس (µmol/h) و ویژه بر اساس (mol/g/hµ) آنزیم‌های کیتیناز، لیپاز و آلکالین پروتئاز (میانگین ±انحراف معیار). * حروف غیر مشترک مبنی بر وجود اختلاف معنی‌دار بین فعالیت آنزیم‌ها در جدایه‌های مختلف (در هر سطر) می‌باشد.

آنزیم ها	میزان فعالیت آنزیم‌ها در جدایه های قارچی Mean ± SD			
	DEMI ۰۰۲	IRAN ۴۰۳ C	IRAN ۴۲۸ C	IRAN ۴۳۷ C
آلکالین پروتئاز	۰/۴۶۰۴±۴/۰۲۶۷ a	۰/۷۰۸۹±۲/۹۱۶۷ a	۱/۰۹۹۶±۴/۶۴۳۳ a	۱/۰۴۵۷۵±۶/۶۷۶۷ b
آلکالین پروتئاز ویژه	۰/۷۹۶۰±۶/۹۴۳۳ a	۱/۴۴۴۴±۵/۹۵۳۳ a	۲/۳۳۹۷±۹/۸۷۳۳ a	۲/۶۰۹۴±۱۶/۶۹۳ b
لیپاز	۱/۲۳۳۳±۰/۰۶۰۲ a	۰/۶۶۶۷±۰/۱۴۵۷ b	۱/۰۲۰۰±۰/۰۳۴۶ a	۰/۷۶۳۳±۰/۰۵۵ c
لیپاز ویژه	۲/۱۲۶۷±۰/۱۰۰۱ a	۱/۳۶۰۰±۰/۳۰۱۹ b	۲/۱۷۰۰±۰/۰۶۹۲ a	۱/۹۰۶۷±۰/۱۴۵۰ a
کیتیناز	۱/۳۸۳۳±۰/۰۲۸۸ a	۰/۸۱۶۶±۰/۱۲۵۸ b	۰/۹۳۳۳±۰/۱۵۲۷ b	۱/۱۵۰۰±۰/۰۸۶۶ a
کیتیناز ویژه	۲/۳۸۵۰±۰/۴۹۷۰ a	۱/۶۶۶۷±۰/۲۵۶۸ b	۱/۹۸۵۸±۰/۳۲۵۰ a	۲/۸۷۵۰±۰/۲۱۶۵ c

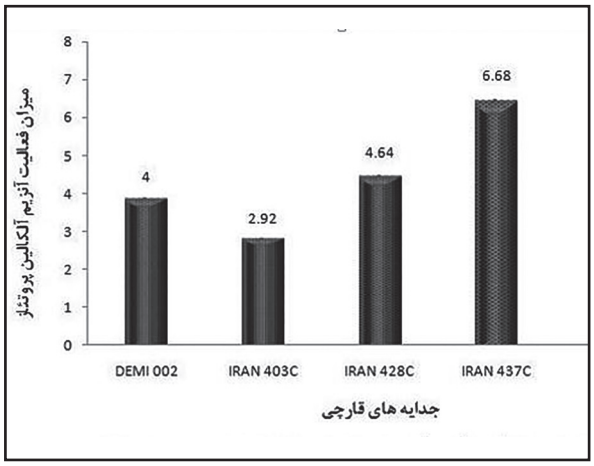
بیـن گروه‌هـای DEMI ۰۰۲ و IRAN ۴۳۷ C و دو گروه دیگر اختلاف معنی‌دار است و در واقع دو جدایه DEMI ۰۰۲ و IRAN ۴۳۷ C بیشترین فعالیـت را از نظر فعالیت این دو آنزیم داشـته و دو جدایه IRAN ۴۰۳ C و IRAN ۴۲۸ C نیـز کمترین فعالیت را داشـته‌اند (p<۰/۰۵). همچنین مطابق جدول ۳ از لحاظ فعالیت ویژه این آنزیم نیز بین گروه DEMI ۰۰۲ و گروه IRAN ۴۲۸ C با دو گروه دیگر اختلاف معنی‌دار اسـت و از لحاظ فعالیـت ویژه آنزیم کیتیناز گروه مربوط به جدایـه قارچی IRAN ۴۳۷ C دارای بیشـترین فعالیـت و گروه مربوط به جدایه قارچـی IRAN ۴۰۳ C دارای کمترین فعالیت می‌باشند (p<۰/۰۵).

بحث

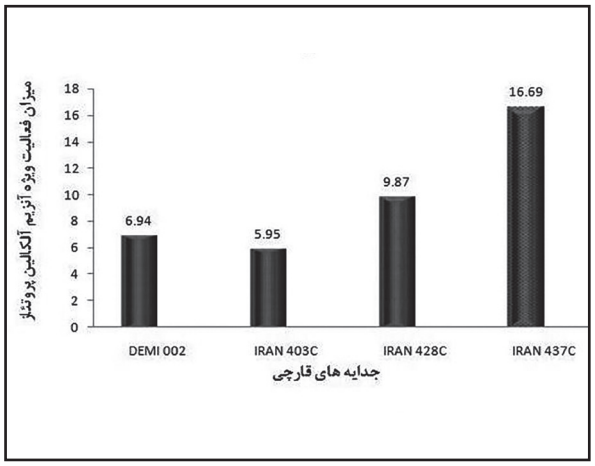
در ایـن مطالعه فعالیت آنزیم‌های کیتینـاز، لیپاز و آلکالین پروتئاز بر مبنای میکرو مول سوبسترای مصرفی بر واحد زمان (µmolh-۱) در چهار جدایـه DEMI ۰۰۲، IRAN ۴۰۳ C، IRAN ۴۲۸ C و IRAN ۴۳۷ C از دو سویه متاریزیوم آنیزوپلیه و بواریا باسیانا مورد سنجش قرار گرفت. بر اسـاس نتایج این مطالعه از لحاظ فعالیت آنزیم آلکالین پروتئاز بین جدایه قارچی IRAN ۴۳۷ C با سه جدایه دیگر اختلاف معنی‌دار می‌باشد. از نظر فعالیـت ویژه آنزیـم آلکالین پروتئاز بین جدایه قارچـی IRAN ۴۳۷ C با سـه جدایه دیگر اختلاف معنی‌دار می‌باشـد و از لحاظ فعالیت ویژه آنزیم آلکالین پروتئاز همانند فعالیت کل این آنزیم جدایه قارچی IRAN ۴۳۷ C بیشترین فعالیت را در بین گروه‌ها دارد. از لحاظ فعالیت آنزیم لیپاز بین گروه DEMI ۰۰۲، IRAN ۴۰۳ C، IRAN ۴۲۸ C و IRAN ۴۳۷ C اختـلاف معنی‌دار است و از نظر فعالیت ویژه آنزیم لیپاز گروه IRAN ۴۰۳ C با هر سه گروه دیگر اختلاف معنی‌داری داشت.

لیپازهـا از جملـه آنزیم‌های چند منظوره ای هسـتند کـه هیدرولیز پیوندهای اسـتری در لیپیدهای خنثی مانند Triacylglycerol را انجام می‌دهند. این آنزیم‌ها در تمام موجودات زنده و در سراسـر دنیا وجود دارند و حتـی در برخی ویروس‌ها نیز ژن لیپاز را پشـتیبانی می‌کنند (۶، ۴). این آنزیم‌های تجزیه کننده چربی، زنجیره ی Acyl را در مواضع اولیه و ثانویه تجزیه می‌کنند (۱۸). همچنین گزارشاتی وجود دارد مبنی بر اینکه لیپازهای حیوانی و میکروبی کمی وجود دارند که فسفولیپیدها را هیدرولیز می‌کنند (۱۱،۲۲). از لحاظ فعالیت آنزیم کیتیناز بین گروه‌های DEMI ۰۰۲، IRAN ۴۳۷ C و دو گروه دیگر اختلاف معنی‌دار است و از لحاظ فعالیت ویژه این آنزیـم نیز بین گروه DEMI ۰۰۲ و گروه IRAN ۴۲۸ C با دو گروه دیگر اختلاف معنی‌دار است.

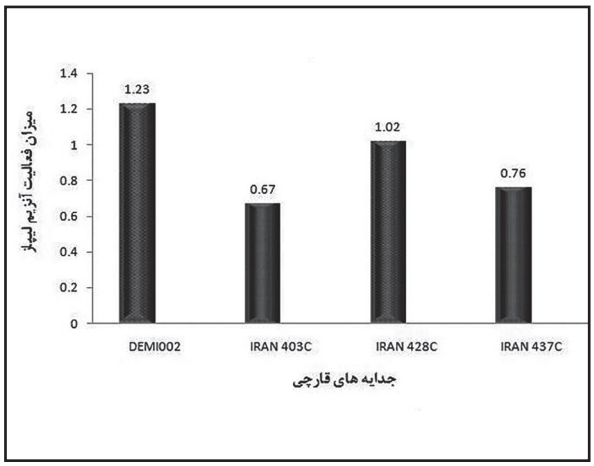
Kaaya و Hassan در سـال ۲۰۰۰ در یک بررسـی نشان دادند که بواریا باسینا و متاریزیوم آنیزوپلیه سبب مرگ و میر ۱۰۰-۸۰٪ در جمعیت کنه‌هـای *Rhipicephalus appendiculatus* و *variegatum Amblyomma* و حدود ۵۳٪ در جمعیت *Boophilus decoloratus* در مراحل مختلف رشد کنه شدند (۱۳). در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۱ توسط Onofre و همکاران اثرات ۴ جدایه قارچی انتوموپاتوژن در برابر بووفیلوس میکروپلوس بررسی گردید. در این مطالعه قارچ‌های انتوموپاتوژن متاریزیوم فلاوویریده و متاریزیوم آنیزوپلیه هر کدام دو جدایه در شرایط آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار گرفتند و نشان داده شد که جدایه‌های متاریزیوم آنیزوپلیه



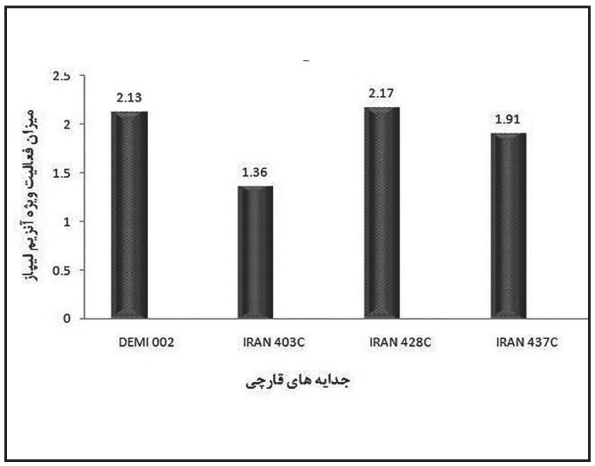
نمودار ۱. مقایسه میزان فعالیت آنزیم آلکالین پروتئاز در جدایه‌های قارچی بر اساس µmol/h.



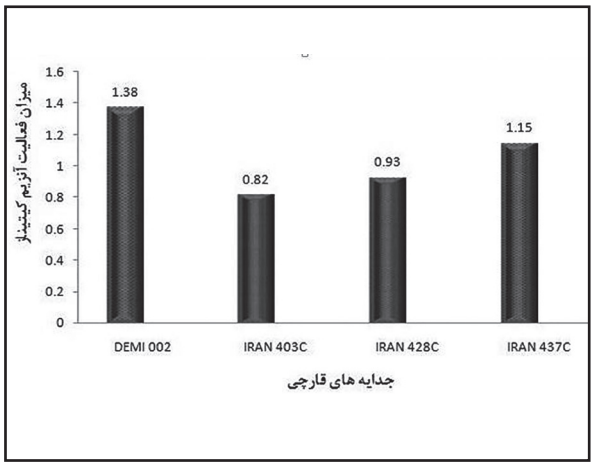
نمودار ۲. مقایسه میزان فعالیت ویژه آنزیم آلکالین پروتئاز در جدایه‌های قارچی براساس µmol/h.



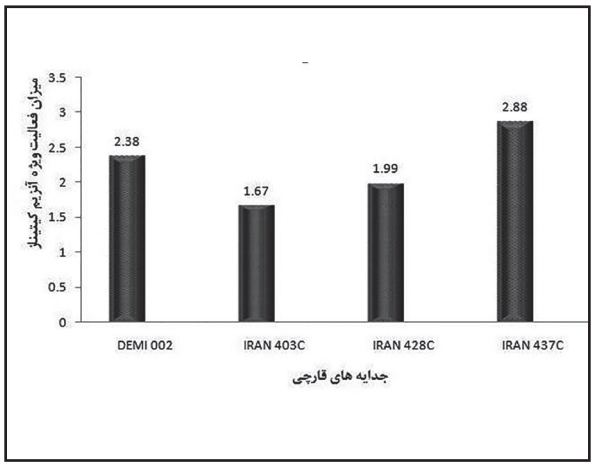
نمودار ۳. مقایسه میزان فعالیت آنزیم لپاز در جدایه‌های قارچی براساس µmol/h.



نمودار۴. مقایسه میزان فعالیت ویژه آنزیم لیپاز در جدایه‌های قارچی براساس µmol/h.



نمودار۵. مقایسه میزان فعالیت آنزیم کیتیناز در جدایه‌های قارچی براساس µmol/h.



نمودار ۶. مقایسه میزان فعالیت ویژه آنزیم کیتیناز در جدایه‌های قارچی براساس µmol/h.

و متاریزیوم فلاوویریده به عنوان عوامل کنترل بیولوژیک در برابر بووفیلوس میکروپلوس بوده و مؤثرترین قارچ، متاریزیوم فلاوویریده جدایه CG۲۹۱ معرفی گردید (۱۵). Benjamin و همکاران در سال ۲۰۰۲ تأثیر قارچ متاریزیوم آنیزوپلیه روی کنه Ixodes scapularis را در آزمایشگاه و محیط بررسی کردند. آن‌ها در این مطالعه به پتانسیل‌های این قارچ برای استفاده عملی در فیلد توجه نمودند. در آزمایشگاه در حدود ۹۶٪ مرگ و میر در غلظت $۴\times spore/ml۱۰^{۹}$ و در محیط به صورت اسپری حدود ۵۳ ٪ مؤثر ارزیابی شده است. در نهایت تاکید شده که فعالیت آکاریسیدی

متاریزیوم آنیزوپلیه برای استفاده در برنامه کنترل Ixodes scapularis مؤثر می‌باشد (۱). Hartelt و همکاران در سال ۲۰۰۷ تأثیر قارچ‌های انتوموپاتوژن و نماتودها را روی مراحل مختلف رشد کنه *Ixodes ricinus* بررسی کرده و عنوان کردند تمامی قارچ‌های مورد آزمایش در برابر کنه *Ixodes ricinus* مؤثر بوده اما تأثیر متفاوتی دارند. در این مطالعه متاریزیوم آنیزوپلیه سویه ۹۷ مؤثرترین قارچ معرفی شده است (۹). مطالعه روی متاریزیوم آنیزوپلیه توسط ST leger و همکاران در سال ۱۹۸۶ نشان داد که تمام جدایه های حاد این گونه بیشترین میزان پروتئازها را تولید می‌کنند. از بین پروتئازها کیموالاستاز و یک آنزیم شبیه تریپسین بیشترین فعالیت را نشان می‌دهند. نقش این پروتئازها در نفوذ و سوراخ کردن کوتیکول با استفاده از مهارکننده‌های پروتئاز در سطح کوتیکول که باعث تاخیر مشخص و قابل قبولی در مرگ و میر حشرات در مقایسه با گروه کنترل گردید مورد تائید قرار گرفته است (۵،۲۱).

Gutowska و همکاران در سال ۲۰۰۴ نشان دادند که فعالیت آنزیم کیتیناز در بعضی حیوانات کشف نشده است زیرا آن‌ها احتیاج به آنزیم کیتوبیاز دارند و در واقع آنزیم کیتیناز می‌تواند الیگوساکاریدها را از کیتین آزاد کند اما برای شکسته شدن این الیگوساکاریدها و تبدیل به NAG نیاز به آنزیم دیگری به نام کیتوبیاز دارند (۸).

بر اساس نتایج این مطالعه بین فعالیت آنزیم‌های کیتیناز، لیپاز و پروتئاز در سویه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری وجود داشت ($p>0/05$). این مطالعه برای اولین بار در کشور فعالیت آنزیمی قارچ‌های پاتوژن حشرات را مورد سنجش و ارزیابی قرار داده است و انجام مطالعات بیشتر بر روی سایر گونه‌های کنه ای و نیز استفاده از سایر گونه‌های قارچی برای یافتن بهترین و مؤثرترین گونه قارچ‌ها توصیه می‌گردد.

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشگاه شهرکرد به خاطر حمایت مالی این مطالعه و از کلیه ی عزیزانی که در انجام این مطالعه ما را یاری رساندند کمال تشکر و قدردانی را داریم.

References

1. Benjamin, M.A., Zhioua, E., Ostfeld, R.S. (2000) Laboratory and field evaluation of the entomopathogenic fungus Metarhizium anisopliae (Deuteromycetes) for controlling questing adult Ixodes scapularis (Acari Ixodidae). J Med Entomol. 39: 723-728.
2. Brey, P.T., Latge, J. P., Prevost, M.C. (1986) Integumental penetration of the pea aphid, Acyrthosiphon Pisum by Coniddiobolus obscures. J Invertebr Pathol. 48: 34 -41.
3. Cherry, I. S., Crandell, J. R. (1932) The specificity of pancreatic lipase: its appearance in blood after pancreatic injury. J Physiol. 100: 266-273.
4. Demacker, P.N.M., Mol, M.J., Stalenhoef, A.F. (1990) Increased hepatic lipase activity and increased direct removal of very-low-density lipoprotein remnants in Watanabe heritable hyperlipidaemic (WHHL) rabbits treated with ethinyl oestradiol. J Biochem. 272: 647-651.
5. Garcia-Careno, F., Hernandez- Cortes, M.P., Haard, N.F. (1994) Enzymes with peptidase and proteinase activity from the digestive systems of a freshwater and a marine decapods. J Agric Food Chem. 42: 1456-1461.
6. Girod, A., Wobus, C., Zádori, Z. (2002) The VP1 capsid protein of adeno- associated virus type 2 is carrying a phospholipase A2 domain required for virus infectivity. J Genet Virol. 83: 973-938.
7. Grula, E.A., Woods, S. P., Russel, H. (1984) Studies utilizing Beauveria bassiana as an entomopathogen. In: Infection Processes of Fungi. Roberts, D.W., Aist, J.R. (eds.) publs. Rockefeller Fdn. p. 147 -152.
8. Gutowska, M., Drazen, J., Robison, B. (2004) Digestive chitinolytic activity in marine fishes of Monterey Bay. California Comp Biochem Physiol. 139: 351-358.
9. Hartelt, K., Wurst, E., Collatz, J., Zimmermann, G., Kleespies, R.G., Oehme, R., Kimmig, P., Steidle, J.L. M., Mackenstedt, U. (2008) Biological control of the tick *Ixodes ricinus* with entomopathogenic fungi and nematodes: Preliminary results from laboratory experiments. J Med Microbiol. 298: 314-320.
10. Jackson, C.W. Heale, J.B., Hall, R.A. (1985) Traits associated with virulence to the aphid Macrosiphonniella sambrni in eighteen isolates of Verticillium Lecanii. Ann AppL Biol. 106: 39 -48.
11. Jensen, G.L., Daggy, B., Bensadoun, A. (1982) Triacylglycerol lipase, monoacylglycerol lipase and phospholipase activities of highly purified rat hepatic lipase. Biochem Biophysiol Acta. 710: 464-470.
12. Jeuniaux, C., Dandrifosse, G., Micha, J.C. (1982)

Caracteres et evolution des enzymes chitinilytiques chez les vertebres inferieurs. Biochem Syst Ecol. 10: 365-372.
13. Kaaya, G.P., Hassan, S. (2000) Entomogenous fungi as promising biopesticides for tick control. Exp Appl Acarol. 24: 913-926.
14. Lambiase, J.T., Yendol, W.G. (1977) The fine structure of Entomophthora apiculata and its penetration of Trichoplusiani. Can J Microbiol. 23: 452-464.
15. Onofre, S.B., Miniuk, C.M., Debarros, N.M. (2001) Pathogenicity of four strains of entomopathogenic fungi against the bovine tick Boophilus microplus. Am J Vet Res. 62: 1478-1480.
16. Paris, S., Ferron, P. (1979) Study of the Virulence of some mutants of Beauveria brongniartii (B. tenella). J Invertebr Pathol. 34: 71-77.
17. Pirali-kheirabadi, Kh., Haddadzadeh, H.R., Razzaghi- Abyaneh, M. Bokaie, S., Zare, R., Quazavi, M., Shams-Ghahfarokhi, M. (2007) Biological control of Rhipicephalus (Boophilus) annulatus by different strains of Metarhizium anisopliae, Beauveria bassiana and Lecanicillium psalliotae fungi. Parasitol Res. 100: 1297- 1302.
18. Rogalska, E., Cudrey, C., Ferrato, F. (1993) Stereoselective hydrolysis of triglycerides by animal and microbial lipases. Chirality. 5: 24-30.
19. Samsinakova, A., Misikova, S., Leopold, J. (1971) Action of enzymatic systems of Beauveria bassiana on the cuticle of the greater wax moth larvae (Galleria mellonella) J Invertebr Pathol. 18: 322-330.
20. Samish, M and Rehacek, J.A. (1999) Pathogens and predators of tick and their potential in biological control. Ann Vet Entomol. 44: 59-82.
21. ST Leger, R.J., Cooper, R.M., Charnley, A.K. (1986) Cuticle degrading enzymes of entomopathogenic fungi: cuticle degradation in vitro by enzymes from entomopathogens. J Invertebr Pathol. 47: 167-177.
22. Thirstrup, K., Verger, R., Carriere, F. (1994). Evidence for a pancreatic lipase subfamily with new kinetic properties. J Biochem. 33: 2748-2756.

Evaluation of enzymatic effects of some strains of Entomopathogenic fungi studied on hard ticks (*Ixodes ricinus*)

Pirali, Y.[1*], Karimi, I.[2], Nabian, S.[3], Zaylabi, V.[4]

[1]*Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran*
[2]*Department of Basic Veterinary Science, School of Veterinary Medicine, Razi University, Kermanshah, Iran*
[3]*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*
[4]*Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran*
(Received 14 January 2017, Accepted 25 April 2017)

Abstract:

BACKGROUND: Biological control of parasites by using entomopathogen fungi is the one of the recommended ways to control them instead of using the chemical agents. Entomopathogen fungi are not pathogenic for animals and plants, while ticks are one of the most important parasites of animals that can transmit very important microbial pathogens. *Ixodes ricinus* is a hard tick that infests animals and human. **OBJECTIVES:** This study demonstrated enzyme assay of entomopathogen fungi hosted on *Ixodes ricinus*. **METHODS:** Enzymatic activities of chitinase, lipase and protease of fungal structures on the killed tick bodies have been assayed by standard sphectrophotometric methods. **RESULTS:** Chitinase, lipase and protease activities showed significant differences among different fungal strains ($p<0.05$). This research, which was done for first time in Iran demonstrated the effect of some enzymes which affect on acaricidal properties of native strain of entomopathogenic fungi in Iran. **CONCLUSIONS:** This study reveals the relationship between enzyme level of fungal strains and the possibility of selecting more effective strains of entomopathogenic fungi

Keyword: biological control, entomopathogenic fungi, enzyme assay, *Ixodes ricinus*

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Fungal strains which used in this study.

Table 2. Used volume (Micro liter) of primary buffer, substrate, Beta Glucosidase, or (distilled water) and prepared sample in chitinase assay.

Table 3. Informations due to total activity (µmol/h) and also specific activity of chitinase, Lipase and alkaline protease (Mean ± SD) (mol/g/hµ). Non communal letter in rows is shown significant statistical differences between enzyme activities in different strains.

Figure 1. Comparison amount of activity of alkaline protease enzyme in different fungal strains based on µmol/ h.

Figure 2. Comparison amount of specific activity of alkaline protease enzyme in different fungal strains based on µmol/g/ h.

Figure 3. Comparison amount of activity of alkaline protease enzyme in different fungal strains based on µmol/ h.

Figure 4. Comparison amount of specific activity of alkaline protease enzyme in different fungal strains based on µmol/g/ h.

Figure 5. Comparison amount of activity of chitinase enzyme in different fungal strains based on µmol/ h.

Figure 6. Comparison amount of specific activity of chitinase enzyme in different fungal strains based on µmol/g/h.

***Corresponding author's email: khpirali@yahoo.com, Tel: 0381-4424427, Fax: 0381-4424427**