

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

یاسر پیرعلی^۱، اسحق کریمی^۲، صدیقه نبیان^۳ و وحیدرضا ذیلایی^۴

(۱) گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهر کرد، شهر کرد، 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 شهر کرد، شهر کرد، 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 انتوموپاتوزن 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 جمع‌آوری و تکثیر بوده و برای دام‌ها و گیاهان غیرپاتوزن هستند. **هدف:** هدف از این مطالعه بررسی مکانیسم اثر آنزیمی برخی جدایه‌های قارچ‌های انتوموپاتوزن بر کنه ی ایکسودس ریسینوس است. **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 اسپکتروفتومتری 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 کنه‌کشی این گروه از قارچ‌ها نموده است. **نتیجه‌گیری نهایی:** با انجام این آزمایش می‌توان ارتباط بین میزان فعالیت آنزیم‌های مورد مطالعه و اثرات کنه‌کشی 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 آکاروپاتوزن، کنترل بیولوژیک، ایکسودس ریسینوس

مقدمه

همکاران حدت ورتیسلیوم لکانی با سطح بالای فعالیت خارج سلولی کیتیناز در ارتباط است (۱۰). Grula و همکاران در سال ۱۹۸۴ مشخص نمودند جدایه‌های مهاجم بواریا باسینا روی هلیوتیس زتا بیشترین میزان الاستاز را ترشح می‌کنند (۷). مطالعه روی متاریزیوم آنیزوپلیه توسط ST Ieger و همکاران در سال ۱۹۸۶ (۲۱) نشان داد که تمام جدایه‌های حاد این گونه بیشترین میزان پروتئازها را تولید می‌کنند و 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 مهار کننده‌های پروتئاز در سطح کوتیکول که باعث تاخیر قابل قبولی در مرگ و میر حشرات در مقایسه با گروه کنترل گردید مورد تأیید قرار گرفته است (۲۰). در این مطالعه علاوه بر بررسی پتانسیل جدایه‌های انتوموپاتوزن متاریزیوم و بواریا روی کنه ایکسودس ریسینوس، جهت بررسی مکانیسم اثر بیوشیمیایی این جدایه‌ها اقدام به آنالیز آنزیم‌های موجود (کیتیناز و لیپاز و ...) می‌گردد. مطالعه حاضر با هدف بررسی فعالیت آنزیمی برخی جدایه‌های قارچ‌های انتوموپاتوزن متاریزیوم آنیزوپلیه و بواریا باسینا طراحی و انجام گردید.

قارچ‌های انتوموپاتوزن با استفاده از ترکیبی از مکانیسم‌های آنزیمی و مکانیکی و بدون نیاز به بلع اسپور باعث سوراخ کردن کوتیکول کنه‌ها میشوند و دارای طیف میزبانی وسیعی بوده و با موفقیت برای کنترل آفات کشاورزی و مراتع استفاده شده‌اند. این قارچ‌ها با تولید کیتیناز، پروتئاز، لیپاز و ساختارهای قارچی، کوتیکول و پوشش بدن بند پایان (کنه‌ها) را سوراخ می‌کنند. نفوذ به تگومنت سخت و با صلابت به واسطه فعالیت‌های مکانیکی و آنزیماتیک اتفاق می‌افتد (۱۴). برگشت غشاهای کوتیکول متعاقب نفوذ قارچ‌ها به طور مشخص 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 تأیید نمودند. نتایج تأثیرات آنزیمی قارچ بواریا باسینا بر روی کوتیکول حشره بید توسط Samsinakova و همکاران در سال ۱۹۷۱ مورد تأیید 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 همبستگی دارد، برای مثال جدایه‌های فاقد کیتیناز و لیپاز بواریا برونکنیورتی قادر به ایجاد عفونت در سوسک ملولونتا ملولونتا نیستند (۱۶). همچنین بنا بر گزارشات Jackson و

مواد و روش کار

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



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

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

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 فتالین در تیتراسیون اندازه گیری می شد (۳،۴). فعالیت لیپاز برابر با میلی اکسی والان قلیایی 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 داده ها با استفاده از آزمون one-way ANOVA در سطح $p < 0/05$ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و در صورت وجود اختلاف معنی دار تست توکی (Tukey's HSD) جهت مقایسه میانگین ها در گروه های مختلف استفاده شد. آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزارهای SPSS نسخه ۱۶ انجام گرفت. جهت وابستگی سنجنش 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 معنی دار می باشد و از لحاظ فعالیت آنزیم آلکالین پروتئاز، جدایه قارچی IRAN ۴۳۷ C بیشترین فعالیت را در بین گروه ها دارد ($p < 0/05$). همچنین با توجه به جدول ۳ از نظر فعالیت ویژه آنزیم آلکالین پروتئاز بین جدایه قارچی IRAN ۴۳۷ C با سه جدایه دیگر اختلاف معنی دار می باشد و از لحاظ فعالیت ویژه آنزیم آلکالین پروتئاز همانند فعالیت کل این آنزیم جدایه قارچی IRAN ۴۳۷ C بیشترین فعالیت را در بین گروه ها دارد ($p < 0/05$). مطابق جدول ۳ از لحاظ فعالیت آنزیم لیپاز بین گروه DEMI ۰۰۲ و IRAN ۴۲۸ C با IRAN ۴۳۷ C و IRAN ۴۰۳ C اختلاف معنی دار است و از لحاظ فعالیت آنزیم لیپاز جدایه های DEMI ۰۰۲ و IRAN ۴۲۸ C بیشترین فعالیت را دارد و جدایه قارچی IRAN ۴۰۳ C نیز کمترین فعالیت را دارد ($p < 0/05$). همچنین مطابق جدول ۳ از نظر فعالیت ویژه آنزیم لیپاز گروه IRAN ۴۰۳ C با هر سه گروه دیگر اختلاف معنی داری داشت و در واقع این آنزیم کمترین فعالیت ویژه را در گروه مربوط به جدایه قارچی IRAN ۴۰۳ C داشته است ($p < 0/05$). بر اساس جدول ۳ از لحاظ فعالیت آنزیم کیتیناز

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 بیماری های گیاهی وزارت جهاد کشاورزی تهیه و برای انجام آزمایش بر روی محیط PDA کشت گردیدند. مشخصات قارچ های مورد استفاده در جدول ۱ آمده است. کنه ها بلافاصله پس از رسیدن به آزمایشگاه در الکل اتیلیک ۷۰٪ ضد عفونی شدند. سالم بودن کنه های بالغ خون خورده مهم بوده و در اسرع وقت پس از جمع آوری مورد ارزیابی قرار گرفتند. کنه های صدمه دیده و تغییر رنگ داده حذف شدند. کنه های سالم دارای حرکت بودند و زمانی که در زیر یک منبع نور قرار می گرفتند به سمت نور حرکت می کردند (۱۷). برای انجام آزمایش و مشاهده تأثیر این قارچ ها بر مرگ و میر و تعیین حدت قارچ ها، سوسپانسیون حاوی $10^7 \times 2/4$ کنیدیوم در هر میلی لیتر از هر کدام از ۴ جدایه تهیه گردید و در دمای ۴°C نگه داری شد و کنه ها در این سوسپانسیون برای چند ثانیه غوطه ور شدند و در یک بازه زمانی بیست روزه مرگ و میر آن ها ثبت و مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۷).

سنجنش فعالیت آنزیم کیتیناز: سنجنش 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 DMAB یا Dimethylaminobenzaldehyde کمپلکس شده و جذب آن در طول موج ۵۸۵ nm خوانده شد. فعالیت کل کیتیناز بر اساس میکرومول کیتین مصرف شده بر ساعت ($\mu\text{mol/h}$) و فعالیت ویژه کیتیناز بر اساس میکرومول کیتین مصرف شده بر میزان پروتئین بر ساعت ($\text{mol/g/h}\mu$) بیان شد.

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

سنجنش فعالیت آنزیم پروتئاز: فعالیت پروتئولیتیک نمونه ها با استفاده از هیدرولیز آزوکازئین Azocasein ۲٪ به عنوان سوبسترا انجام شد (۵). به طور خلاصه، تهیه ی آنزیمی همراه سوبسترا در ۵۰ mmol 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 ۴°C 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 ($\mu\text{mol/h}$) و فعالیت ویژه پروتئیناز بر اساس میکرومول آزوکازئین هیدرولیز شده بر میزان پروتئین بر ساعت ($\text{mol/g/h}\mu$) بیان شد (۵).

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



جدول ۲. حجم به کار رفته (بر اساس میکرولیتر) از بافر اولیه، سوستر، 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
سوستر	۶۷/۵	۶۷/۵	۰
بتاگلوکوزیداز	۰	۶۷/۵	۶۷/۵
آب مقطر	۶۷/۵	۰	۶۷/۵
هموزن کننده	۵۰	۵۰	۵۰
برای ۲ ساعت در انکوباتور مجهز به شیکر قرار داده شده			
سوستر	۰	۰	۶۷/۵

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

آنزیم ها	میزان فعالیت آنزیم‌ها در جدایه های قارچی			
	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD
آلکالین پروتئاز	۰/۴۶۰۴±۴/۰۲۶۷ ^a	۰/۷۰۸۹±۲/۹۱۶۷ ^a	۰/۴۴۴۴±۵/۹۵۳۳ ^a	۰/۷۹۶۰±۶/۹۴۳۳ ^a
آلکالین پروتئاز ویژه	۰/۷۹۶۰±۶/۹۴۳۳ ^a	۰/۷۰۸۹±۲/۹۱۶۷ ^a	۰/۴۴۴۴±۵/۹۵۳۳ ^a	۰/۷۹۶۰±۶/۹۴۳۳ ^a
لیپاز	۰/۲۳۳۳±۰/۰۶۰۲ ^a	۰/۲۰۰±۰/۰۳۴۶ ^a	۰/۶۶۶۷±۰/۱۴۵۷ ^b	۰/۷۶۶۳±۰/۰۵۵ ^c
لیپاز ویژه	۰/۲۳۳۳±۰/۰۶۰۲ ^a	۰/۲۰۰±۰/۰۳۴۶ ^a	۰/۶۶۶۷±۰/۱۴۵۷ ^b	۰/۷۶۶۳±۰/۰۵۵ ^c
کیتیناز	۰/۳۸۳۳±۰/۰۲۸۸ ^a	۰/۹۳۳۳±۰/۱۵۲۷ ^b	۰/۸۱۶۶±۰/۱۲۵۸ ^b	۰/۷۱۵۰±۰/۰۸۶۶ ^a
کیتیناز ویژه	۰/۳۸۳۳±۰/۰۲۸۸ ^a	۰/۹۳۳۳±۰/۱۵۲۷ ^b	۰/۸۱۶۶±۰/۱۲۵۸ ^b	۰/۷۱۵۰±۰/۰۸۶۶ ^a

معنی دار است و از نظر فعالیت ویژه آنزیم لیپاز گروه C ۴۰۳ IRAN با هر سه گروه دیگر اختلاف معنی داری داشت.

لیپازها از جمله آنزیم‌های چند منظوره ای هستند که هیدرولیز پیوندهای استری در لیپیدهای خنثی مانند Triacylglycerol را انجام می‌دهند. این آنزیم‌ها در تمام موجودات زنده و در سراسر دنیا وجود دارند و حتی در برخی ویروس‌ها نیز ژن لیپاز را پشتیبانی 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 (۲۲، ۱۱). از لحاظ فعالیت آنزیم کیتیناز بین گروه‌های DEMI ۰۰۲، C ۴۳۷ IRAN و دو گروه دیگر اختلاف معنی دار است و از لحاظ فعالیت ویژه این آنزیم نیز بین گروه DEMI ۰۰۲ و گروه C ۴۲۸ IRAN با دو گروه دیگر اختلاف معنی دار است.

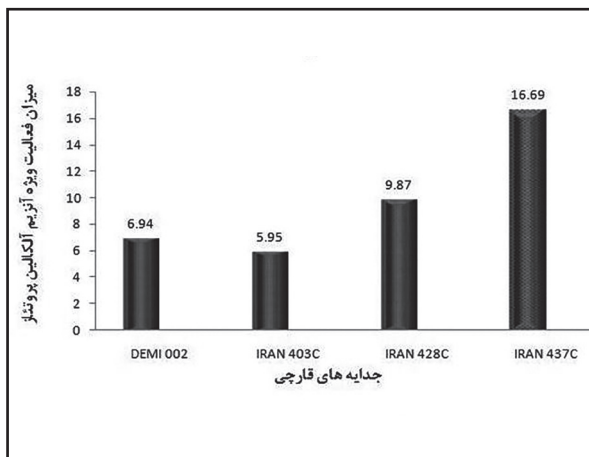
Kaaya و Hassan در سال ۲۰۰۰ در یک بررسی نشان دادند که بواریا باسینا و متاریزیوم آنیزوپلیه سب مرگ و میر ۱۰۰-۸۰٪ جمعیت کنه‌های *Rhipicephalus appendiculatus* و *variegatum* و *Amblyomma* حدود ۵۳٪ در جمعیت *Boophilus decoloratus* در مراحل مختلف رشد کنه شدند (۱۳). در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۱ توسط Onofre و همکاران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

بین گروه‌های DEMI ۰۰۲ و C ۴۳۷ IRAN و دو گروه دیگر اختلاف معنی دار است و در واقع دو جدایه DEMI ۰۰۲ و C ۴۳۷ IRAN بیشترین فعالیت را از نظر فعالیت این دو آنزیم داشته و دو جدایه C ۴۰۳ IRAN و C ۴۲۸ IRAN نیز کمترین فعالیت را داشته‌اند ($p < 0/05$). همچنین مطابق جدول ۳ از لحاظ فعالیت ویژه این آنزیم نیز بین گروه DEMI ۰۰۲ و گروه C ۴۲۸ IRAN با دو گروه دیگر اختلاف معنی دار است و از لحاظ فعالیت ویژه آنزیم کیتیناز گروه مربوط به جدایه قارچی C ۴۳۷ IRAN دارای بیشترین فعالیت و گروه مربوط به جدایه قارچی C ۴۰۳ IRAN دارای کمترین فعالیت می‌باشند ($p < 0/05$).

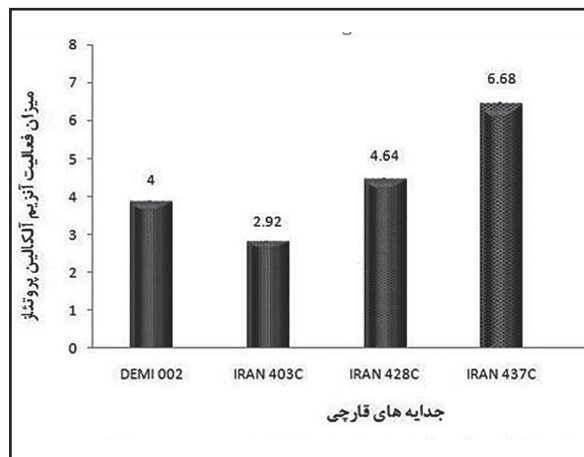
بحث

در این مطالعه فعالیت آنزیم‌های کیتیناز، لیپاز و آلکالین پروتئاز بر مبنای میکرو مول سوسترای مصرفی بر واحد زمان (۱-μmol/h) در چهار جدایه DEMI ۰۰۲، C ۴۰۳ IRAN، C ۴۲۸ IRAN و C ۴۳۷ IRAN از دو سویه متاریزیوم آنیزوپلیه و بواریا باسینا مورد سنجش قرار گرفت. بر اساس نتایج این مطالعه از لحاظ فعالیت آنزیم آلکالین پروتئاز بین جدایه قارچی C ۴۳۷ IRAN با سه جدایه دیگر اختلاف معنی دار می‌باشد. از نظر فعالیت ویژه آنزیم آلکالین پروتئاز بین جدایه قارچی C ۴۳۷ IRAN با سه جدایه دیگر اختلاف معنی دار می‌باشد و از لحاظ فعالیت ویژه آنزیم آلکالین پروتئاز همانند فعالیت کل این آنزیم جدایه قارچی C ۴۳۷ IRAN بیشترین فعالیت را در بین گروه‌ها دارد. از لحاظ فعالیت آنزیم لیپاز بین گروه DEMI ۰۰۲، C ۴۰۳ IRAN، C ۴۲۸ IRAN و C ۴۳۷ IRAN اختلاف

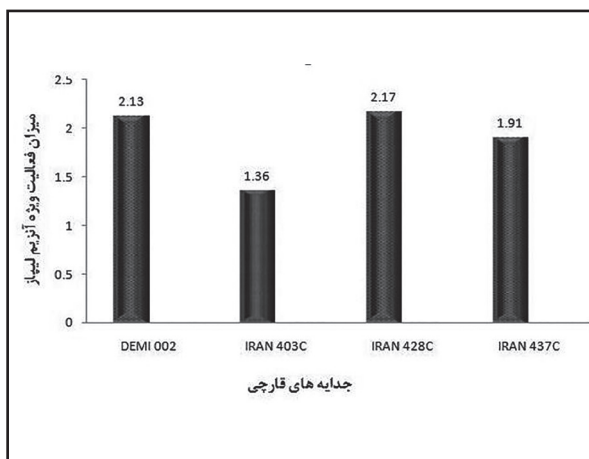




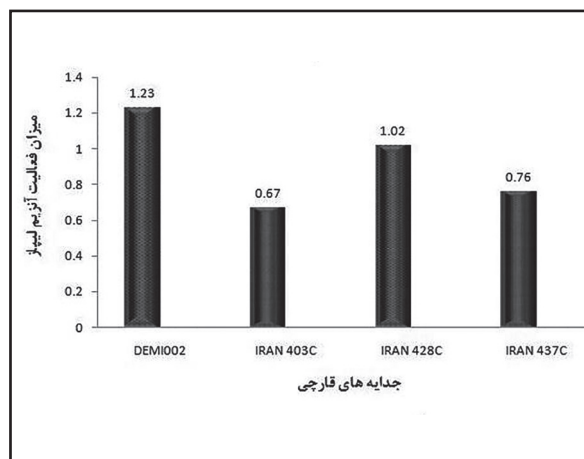
نمودار ۲. مقایسه میزان فعالیت ویژه آنزیم آلکالین پروتاز در جدایه های قارچی بر اساس $\mu\text{mol/h}$.



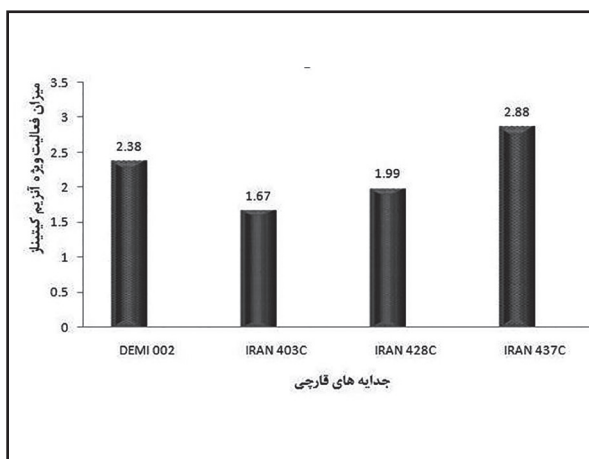
نمودار ۱. مقایسه میزان فعالیت آنزیم آلکالین پروتاز در جدایه های قارچی بر اساس $\mu\text{mol/h}$.



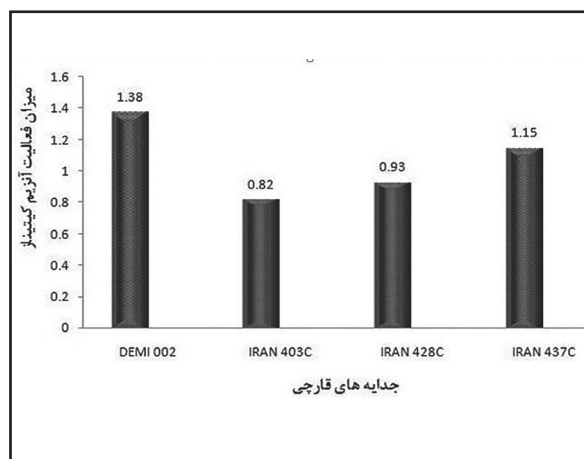
نمودار ۴. مقایسه میزان فعالیت ویژه آنزیم لیپاز در جدایه های قارچی بر اساس $\mu\text{mol/h}$.



نمودار ۳. مقایسه میزان فعالیت آنزیم لپاز در جدایه های قارچی بر اساس $\mu\text{mol/h}$.



نمودار ۶. مقایسه میزان فعالیت ویژه آنزیم کیتیناز در جدایه های قارچی بر اساس $\mu\text{mol/h}$.



نمودار ۵. مقایسه میزان فعالیت آنزیم کیتیناز در جدایه های قارچی بر اساس $\mu\text{mol/h}$.

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 $10^9 \times \text{spore/ml}$ و در محیط به صورت اسپری حدود ۵۳٪ مؤثر ارزیابی شده است. در نهایت تاکید شده که فعالیت آکاریسیدی

و متاریزوم فلاوویریده به عنوان کنترل بیولوژیک در برابر بووفیلوس میکروپولوس بوده و مؤثرترین قارچ، متاریزوم فلاوویریده جدایه CG۲۹۱ معرفی گردید (۱۵). Benjamin و همکاران در سال ۲۰۰۲ تأثیر قارچ متاریزوم آنیزوپلیه روی کنه Ixodes scapularis را در آزمایشگاه و



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, *Acyrtosiphon Pisum* by *Conidiobolus 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.

Ixodes scapularis متاریزیوم آنیزوپلیه برای استفاده در برنامه کنترل 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 جدایه‌های حاد این گونه بیشترین میزان پروتئازها را تولید می‌کنند. از بین پروتئازها کیموآلاستاز 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 تأیید 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 کنه‌ای و نیز استفاده از سایر گونه‌های قارچی برای یافتن بهترین و مؤثرترین گونه قارچ‌ها توصیه می‌گردد.

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشگاه شهر کرد 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.

10. Jackson, C.W. Heale, J.B., Hall, R.A. (1985) Traits associated with virulence to the aphid *Macrosiphonniella samborni* 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 chitinolytiques 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

¹Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

²Department of Basic Veterinary Science, School of Veterinary Medicine, Razi University, Kermanshah, Iran

³Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

⁴Faculty 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 spectrophotometric 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 ($\mu\text{mol/h}$) and also specific activity of chitinase, Lipase and alkaline protease (Mean \pm SD) ($\text{mol/g/h}\mu$). 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 $\mu\text{mol/h}$.

Figure 2. Comparison amount of specific activity of alkaline protease enzyme in different fungal strains based on $\mu\text{mol/g/h}$.

Figure 3. Comparison amount of activity of alkaline protease enzyme in different fungal strains based on $\mu\text{mol/h}$.

Figure 4. Comparison amount of specific activity of alkaline protease enzyme in different fungal strains based on $\mu\text{mol/g/h}$.

Figure 5. Comparison amount of activity of chitinase enzyme in different fungal strains based on $\mu\text{mol/h}$.

Figure 6. Comparison amount of specific activity of chitinase enzyme in different fungal strains based on $\mu\text{mol/g/h}$.



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

J. Vet. Res. 72, 3, 2017