جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

تعیین دز اپتی مم پرتوتابی با اشعه گاما به منظور القای جهش در قارچ *Trichoderma viride*

مرادی، رضا [۱]- شهبازی، سمیرا [۲*]- اهری مصطفوی، حسین [۲]- عسکری، حامد [۲]- میرمجلسی، سید مهیار [۲]- ابراهیمی، محمد علی [۱]

۱- دانشگاه پیام نور، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی
۲- سازمان انرژی اتمی ایران، پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای، پژوهشکده تحقیقات کشاورزی، پزشکی و صنعتی

چکیده

کنش متقابل قارچ تریکودرما با قارچهای بیمارگر گیاهی نمونه کاملی از مایکوپارازیتیسم به شمار می رود. در این تحقیق اثر بازدارندگی دزهای مختلف اشعه گاما بر جوانه زنی اسپور، رشد ریسه قارچ *Trichoderma viride* و تاثیر آن در خصوصیات آنتاگونیستی این قارچ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که پرتوتابی در محدوده دز ۴۵۰ گری به طور کامل مانع جوانه زنی اسپور قارچ می شود. همچنین دز ۲۵۰۰ گری توانست به طور کامل مانع رشد ریسه قارچ تریکودرما گردد و ۲۵۰ گری، ممانعتی در کاهش توانایی آنتاگونیستی نداشت و به عنوان دز اپتیمم جهت القای موتاسیون قابل توصیه است.

واژگان کلیدی : پرتو گاما، جهش، کنترل بیولوژیکی، آنتاگونیسم، *Trichoderma viride*، *Rhizoctonia solani*

مقدمه

در مدیریت عوامل بیماریزا پایدارترین وسازگارترین روش با شرایط زیست محیطی، استفاده از عوامل کنترل کننده بیولوژیک در سیستم مدیریت تلفیقی می باشد [۱]. کاربرد عوامل کنترل بیولوژیک به کاهش کاربرد سموم شیمیایی و بالتبع کاهش باقیمانده سموم در محیط [منابع خاک و آب] و زنجیره غذایی موجودات زنده می انجامد. لذا توجه محققان به یافتن راهکار های ایمن از نظر محیط زیست و سلامت عمومی و در عین حال موثر و کاربردی در کاهش خسارت ناشی از بیماری های گیاهی جلب شده است. به خصوص در مورد بیمارگر های خاکزاد که دشواری هایی از نظر عملیات کاربرد سموم و کاهش میزان تاثیر سموم در خاک، منجر به استفاده از دزهای بالاتر و مخاطرات بیشتر زیست محیطی در سالهای اخیر شده است.

جنس تریکودرما *Trichoderma spp* که از عوامل کنترل بیولوژیک بسیار موفق بر روی قارچ های خاکزاد بوده و مرحله غیرجنسی آسکومیست های جنس *Hypocrea spp*. می‌باشند[۲].

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

قدرت زنده مانی مناسب و بالای تریکودرما به دلیل طبیعت خاکزاد آن و قدرت رقابت بالایی که در شرایط خاک با سایر ارگانیسم ها دارد. آسانی کاربرد تریکودرما در خاک از مزیت های دیگری است که باعث شده است در بین عوامل کنترل بیولوژیک *Rhizoctonia solani* توجه ویژه ای به قارچ تریکودرما معطوف گردد [۳]. بررسی ها نشان داده است که ریسه های تریکودرما در طی فرآیند آنتاگونیسم به دور ریسه های *Rhizoctonia solani* پیچیده و به درون آنها نفوذ می کنند، که این نفوذ با ترشح همزمان آنزیم های تجزیه کننده دیواره سلولی [کیتیناز ها و گلوکانازهای خارج سلولی] در ریسه های تریکودرما همراه است [۴].

پرتو تابی با اشعه گاما سبب تغییر ساختمان شیمیایی مولکولهای ماده وراثتی می شود که نتیجه آن جهش ژن یا شکستن کروموزوم و ترتیب مجدد بازهای آلی خواهد بود. درصورتی که فعالیت این ژنهای جهش یافته به مسیر بیوسنتز یک ترکیب مانند توکسین و یا آنزیم قرار متعلق باشند، این تغییرات در ترادف بازهای آلی و جهش ها می تواند میزان تولید این ترکیبات را دستخوش تغییر[اعم از افزایش یا کاهش) نماید [۵]. از سوی دیگر دانشمندان با ایجاد تغییرات ژنتیکی در آنتاگونیست ها همواره سعی در افزایش پتانسیل و ارتقای عمل آنها دارند. یکی از روش های بکار گرفته شده برای افزایش قدرت آنتاگونیستی القای موتاسیون تصادفی Random Mutagenesis با بکارگیری موتاژن های فیزیکی از جمله اشعه فرابنفش و گاما، امواج الکترومغناطیس و ایکس و یا موتاژن های شیمیایی مانند اتیل متان سولفانات می باشد. البته این القای موتاسیون همیشه مطلوب نبوده است و به عنوان مثال بکارگیری اشعه فرا بنفش سبب کاهش تولید آنزیم های سلولاز و پکتیناز در قارچ *Colletotrichum capsisi* (عامل بیماری آنتراکنوز) شده است که موجب کاهش رشد ۴۰ درصدی ریسه ها و کاهش ۱۰ درصدی اسپورزایی در موتانت ها گردید [۶].

گزارشات قبلی نشان می دهند ایجاد جهش با استفاده از پرتو گاما در برخی موارد توانسته است در افزایش پتانسیل آنتاگونیستی و دست یابی به منابع ژنتیکی جدیداز عوامل بیوکنترل موثر و کارا کمک کند [۷]. پرتوتابی با اشعه گاما در افزایش کنترل بیولوژیکی همزمان *S. rolfsii* و *Rhizoctonia solani* توسط گونه های *T. viride* موثر بوده است [۸]. در گونه *T.virens* ایجاد موتاسیون با استفاده از اشعه گاما به افزایش قدرت رشد و رقابت و اسپورزایی قارچ همزمان با افزایش بیان ژن های مرتبط با افزایش مقاومت به *Rhizoctonia solani* همراه بوده است [۹]. کارایی جدایه های جهش یافته *T.harzianum* با استفاده از اشعه گاما نیز در کنترل *Sclerotium cepivorum , S. rolfsii* افزایش چشمگیری یافته است [۱۱و۱۰].

هدف از این تحقیق بررسی میزان تاثیر اشعه گاما بر روی اسپورهای قارچ *T. viride* و تعیین دزهای اپتی مم برای پرتوتابی با این اشعه به منظور ایجاد جهش در قارچ های ریسه ای از جمله تریکودرما بوده است. نتایج این بررسی می تواند برای سایر محققان که به دنبال ایجاد جهش و تغییر در خصوصیات این گونه قارچی با اهداف مختلف از جمله ارتقای پتانسیل انتاگونیستی آن در کنترل عوامل بیماری زا به منظور کاربرد این جدایه های موتانت به جای سموم شیمیایی کشاورزی هستند، راهگشا باشد. علاوه بر این با توجه به اینکه قارچ تریکودرما منبع شناخته شده ای ازتولید متابولیت های مفید از جمله آنزیم ها و آنتی

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

بیوتیکها می باشد نتایج این بررسی می تواند در مطالعاتی که برای دست یابی به منابع بیولوژیک تولید این دسته از ترکیبات انجام می شود، مفید باشد.

مواد و روشها

نمونه برداری، جداسازی و شناسایی قارچ های مورد مطالعه: به منظور جداسازی قارچ تریکودرما از خاک ناحیه ریزوسفر گیاهانی که بدون استفاده از سموم شیمیایی در مقایسه با سایر گیاهان شدت بیماری کمتری در آنها مشاهده شده بود و یا نقاطی از مزرعه که به طور لکه ای گیاهان فاقد علائم بودند نمونه برداری انجام و سوسپانسیون این نمونه های خاک را برروی محیط کشت PDA انتقال داده شدند. کلنی های حاصل را بعد از تهیه کشت تک اسپور (به منظور خالص سازی) با استفاده از کلید شناسایی قارچ های ناقص و براساس خصوصیات مورفولوژیکی فیالید ها و فیالوسپورها و انتوژنز کنیدیوم‌ها مورد شناسایی قرار داده شد.

بررسی دز ممانعت کننده از رشد ریسه: بعد از شناسایی و خالص سازی جدایه های قارچ تریکودرما بروی محیط عصاره سیب زمینی (PDA)، از کشت‌های هفت روزه قارچ سوسپانسیون اسپور تهیه و شمارش اسپورها با استفاده از لام همی سایتومتر انجام شد. تعداد ۷۰۰ اسپور *Trichoderma viride* در معرض تابش اشعه گاما با هفت دامنه دز ۰- ۴۰۰- ۸۰۰- ۱۲۰۰- ۱۶۰۰- ۲۰۰۰- ۲۵۰۰ گری با (هریک سه تکرار و در قالب طرح کاملا تصادفی) با استفاده از دستگاه گاماسل با چشمه کبالت ۶۰ – اکتیویته ۲۵۰۰ کوری و نرخ دز ۰/۲۳ گری در ثانیه مستقر در مرکز تحقیقات کشاورزی و پزشکی هسته‌ای کرج (سازمان انرژی اتمی ایران)، قرارگرفت. سپس اسپور های پرتو دیده برای کشت و محاسبه درصد زنده مانی و رشد ریسه بر روی محیط PDA کشت و در انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری شدند [۲].

آزمون دزیابی به منظور القای موتاسیون در قارچ تریکودرما: درصد جوانه زنی با شمارش اسپورهای جوانه زده [در محدوده بزرگ نمایی ۱۰ میکروسکوپ نوری] برای هر محدوده دز تعیین شد. معیار دز جذبی مناسب برای القای موتاسیون غیر کشنده در ارگانیسم ها، ظهور تقریباً ۴۰-۵۰٪ جوانه زنی اسپور بعد از پرتوتابی می‌باشد [۶]. آزمون مقایسه سرعت رشد با اندازه گیری قطر کلنی‌های سه، پنج و هفت روزه جدایه‌های جهش یافته و مادری انجام شد. به منظور ایجاد جهش در قارچ تریکودرما عملیات پرتوتابی با نه دامنه دز ۰- ۵۰- ۱۵۰- ۲۰۰- ۲۵۰- ۳۰۰- ۳۵۰- ۴۰۰- ۴۵۰ گری سه تکرار برای هر دامنه دز ، انجام پذیرفت. دز اپتیمم برای پرتوتابی به منظور القای موتاسیون بر اساس این نتایج انتخاب گردید. کلیه آنالیزهای آماری در قالب طرح کاملا تصادفی با استفاده از نرم افزار SPSS 11.3 انجام شد.

نتایج و بحث

جداسازی و شناسایی قارچ های مورد مطالعه: بر اساس نتایج بدست آمده جدایه های قارچ جدا شده از خاک اطراف ریشه پس از خالص سازی، براساس خصوصیات مورفولوژیکی فیالید ها و فیالوسپورها و انتوژنز کنیدیوم‌ها به گونه *T.viride* متعلق بودند.

بررسی دز ممانعت کننده از رشد ریسه: پرتودهی در محدوده ۲۵۰۰ گری توانست به طور کامل رشد ریسه قارچ تریکودرما را کنترل نماید. با افزایش دز سرعت رشد ریسه کاهش می یابد تا جایی که در

محدوده ۱۲۰۰ گری، تولید اسپور با تاخیر انجام می شود و طی ۳ روز اول، تنها رشد ریسه ای مشاهده گردید [جدول۱]. در نتایج پرتو تابی میوه سیب با اشعه گاما در محدوده دز ۳ کیلو گری برای کنترل جوانه زنی اسپور و رشد ریسه قارچ عامل بیماری کپک آبی *Penicillium expansum* نشان داد که به طور کاملا معنی داری کاهش می یابد [۱۲]. با توجه به اینکه *T.viride* از نظر تاکسونومیکی قرابت بالایی با *Penicillium expansum* دارد نزدیک بودن این دو دامنه دز ممانعت کننده کاملا قابل قبول به نظر می رسد.

جدول۱. تاثیر اشعه گاما بر رشد ریسه *Trichoderma* بر روی محیط کشت PDA

	دز پرتوتابی [Gy]						
روز	۰	۴۰۰	۸۰۰	۱۲۰۰	۱۶۰۰	۲۰۰۰	۲۵۰۰
۳	۴۵/۶ [A]	۴۰/۳ [B]	۲۲ [C]	۷۶ [D]	۱۶ [E]	۰ [E]	۰ [E]
۵	۸۹ [A]	۷۲/۶ [B]	۵۲/۳ [C]	۳۰/۶ [D]	۱۱ [E]	۴ [F]	۰ [E]
۷	۹۰ [A]	۸۹ [A]	۷۱ [B]	۵۲ [C]	۳۱ [D]	۱۰/۶ [E]	۰ [F]

*: در هر ردیف، میانگین های با حروف مشترک در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی داری ندارند.

القای موتاسیون در قارچ تریکودرما با استفاده از اشعه گاما: مقایسه درصد جوانه زنی اسپور بعد از گذشت ۲۴ ساعت از پرتوتابی با دزهای مختلف، تیمارها را در چند گروه مختلف قرار داد. بر این اساس تاثیر پرتوتابی با اشعه گاما در محدوده دز ۲۵۰ گری هیچ گونه ممانعتی برای رشد ریسه نداشته و ۴۴/۶٪ اسپورهای قارچی نیز توانایی جوانه زنی خود را حفظ نموده اند از آنجایی که معیار دز جذبی مناسب برای القای موتاسیون غیر کشنده در ارگانیسم ها، ظهور تقریباً ۴۰-۵۰٪ جوانه زنی اسپور بعد از پرتوتابی می‌باشد [۶]. در نتیجه دز اپتیمم القای موتاسیون انتخاب و جدایه های جهش یافته با این دز تهیه گردید [جدول۲].

جدول۲. تاثیر اشعه گاما بر جوانه زنی اسپور *Trichoderma* بر روی محیط کشت PDA

	دز پرتوتابی [Gy]								
	۰	۵۰	۱۵۰	۲۰۰	۲۵۰	۳۰۰	۳۵۰	۴۰۰	۴۵۰
جوانه زنی اسپور [٪]	۸۴/۵ [A]	۸۱/۱ [B]	۷۳/۹ [C]	۵۹/۷ [D]	۴۳/۴ [E]	۱۵/۵ [F]	۱۱/۹ [G]	۹/۷ [G]	۰ [H]

*: در هر ردیف، میانگین های با حروف مشترک در سطح **احتمال** ۵ درصد تفاوت معنی داری ندارند

با توجه به نتایج این مطالعه می توان دز اپتی مم برای ایجاد جهش در قارچ تریکودرما را با اهداف گوناگون از جمله افزایش تولید عمده ترین متابولیت های ثانویه موثر در مایکوپارازیتیسم تریکودرما، که همان آنزیم های تجزیه کننده ترکیبات دیواره سلولی قارچهای واقعی (کیتیناز و گلوکاناز) و عوامل شبه قارچی(سلولازها) است، می باشد را توصیه نمود. این جدایه های موتانت در صورتی که با یک فرمولاسیون قابل کاربرد در مزارع به جای سموم شیمیایی مرسوم درآیند می توانند در سیستم مدیریت تلفیقی بیماری ها استفاده و در کاهش آلودگی های زیست محیطی موثر باشند. همچنین ایجاد جهش بهمنظور افزایش سایر متابولیت های ثانویه این قارچ مانند سایر آنزیمها (که می توانند در تجزیه بقایای گیاهی به منظور تولید بیواتانل، اسید لاکتیک و سایر ترکیبات شیمیایی مفید) وآنتی بیوتیک های فلوروکوئینولون (سیپروفلاکسین و نوروفلاکسین موثر در درمان برخی از عفونت های انسانی) نیز می تواند در مطالعات بعدی مورد بررسی قرار گیرد. تولید بیشتر هر یک از این ترکیبات می تواند به دست یابی به منابع کنترل بیولوژیک جدیدی درمدیریت بیماری های گیاهی خاکزاد و حتی بیماری های پس از برداشت و تولید دارو ها و مواد شیمیایی مورد نیاز در صنایع مختلف منجر شود.

تشکر و قدردانی: از همکاران طرح" کنترل بیماری های خاکزاد گیاهی با استفاده از فناوری های هسته ای و مولکولی" در گروه پژوهشی کشاورزی هسته ای پژوهشکده تحقیقات کشاورزی سازمان انرژی اتمی که در انجام این مطالعه ما را یاری داده اند تشکر و قدردانی می نماییم .

منابع

۱. مرادی. ر. شهبازی. س، اهری مصطفوی. ح، میرمجلسی. م، ابراهیمی. م " تعیین دز مناسب پرتو تابی در راستای القای جهش مطلوب و بررسی تاثیرات مورفولوژیکی در قارچ تریکودرما " اولین کنگره ملی علوم و فناوری های نوین کشاورزی. ۱۹ تا ۲۱ شهریور. دانشگاه دولتی زنجان. صفحه ۲۹ [۱۳۹۰].

2. R. Vilgalis, M. A. Cubeta "Molecular systematics and population biology of Rhizoctonia annual Review of Phytopathology " 32: 135-155, [1994].
3. D. E. Carling, S. Kuninaga, K. A. Brainard "Hyphal anastomosis reaction, DNA- internal transcribed spacer sequences, and virulence levels among subsets of Rhizoctonia solani anastamosis group- 2 [AG2] and AG-BI" 92: 43-50 [1996]
4. W. M. Haggag, H. Abdel-Latif and A. Mohamed "Biotechnological Aspects of Microorganisms Used in Plant Biological Control" American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture 1, 7-12, [2007].
5. C. R. Howell, "Mechanisms Employed by Trichoderma Species in the Biological Control of Plant Diseases :The History and Evolution of Current Concepts" USDA/ARS Southern Plains Agricultural Research Center [2009].

6. I. Chet, G. E. Harman and R. Baker "Trichoderma hamatum: Its hyphal interactions with Rhizoctonia solani and Pythium spp" Microbial Echology, Vol. 7, No 1, 29-38, [2005].
7. H. R. Etebarian "Evaluation of Trichoderma isolates for biological control of charcoal stem rot in melon caused by Macrophomina phaseolina". Journal Agriculture Science Technology. 8: 243-250, [2006].

۸. شهبازی. س، مرادی. ر، صفایی. ن، اهری مصطفوی. ح، میرمجلسی. میرمجلسی" سم زدایی از داکسی نیوالنون فوزاریومی با استفاده از آنزیم گلوکوزیل ترانس فراز" همایش ملی کشاورزی پایدار. ۱۰ آذرماه. دانشگاه آزاد ورامین پیشوا. صفحه ۴-۱ [۱۳۹۰]

۹. اهری مصطفوی. ح ، "کاربرد فنآوری هسته ای در مدیریت علف های هرز و بیماری های گیاهی" دومین همایش ملی کاربرد فنآوری هسته ای در علوم کشاورزی و منابع طبیعی. ۱۹-۲۰ خرداد، پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای کرج. صفحه ۳۳۱- ۳۳۵ [۱۳۸۷].

10. C. R. Howell "The role of antibiosis in bicontrol. In Harman, G. E. and Kubicek, C. P. [eds.]. Trichoderma and Gliocladium" Taylor and Francis, Londan, 173-184. [1998].
11. T. A. Muusa, M. A. Rizk. "Impact of Gamma radiation stresses on control of sugarbeet pathogens R. solani and S. rolfsii" Pakistan J. of Plant Pathology 2[1], 10-20 [2003].
12. M. Mukherjee, R. Hadar, P. K. Mulherjee ,B. A. Horwitz "Homologus expression of a mutated beta-tubulin gene dose not confers benomyl resistance on Trichoderma harzianum" J. Applied Microbiol, 95, 861-867 [2003].
13. E.Coventry, R. Noble, A. Mead, F. R. Marin, J. A. Perez, J. M. Whips" Allium White Rot Suppression with Composts and Trichoderma viride in Relation to Sclerotia Viability" J. of Biological Control, Vol. 96, No. 9, 1009-1021 [2006].
14. W. M. Haggag "Induction of hyperproducing chitinase Trichoderma mutants for efficient biocontrol of Botrytis cinerea on tomato and cucumber plants growing in plastic houses" Arab J. Biotech, Vol. 5, No. 2, 151-164 [2002].
15. Sneh, B., Zeidan, M., Ichielevich- Austet, M., Barash, I., and Koltin, Y. Increased growth responses induced by a non pathogenetic isolate of Rhizoctonia solani. Can. J. Bot. Vol. 64: 2372-2378 [1986].
16. C. E. Windels, D. J. Nabben "characterization and pathogenicity of anastamosis group of Rhizoctonia solani isolated from Beta vulgaris Phytophatology, 79: 83-88 [1989].

۱۷. اهری مصطفوی. ح، میرجلیلی. م ، میر مجلسی. م، فتح اللهی. ه، منصوری پور. م، بابایی. م، بررسی اثر اشعه گاما بر عامل بیماری پس از برداشت میوه سیب، سومین همایش *Penicillium expansum*کاهش جوانه زنی اسپور و رشد ریسه ملی کاربرد فنآوری هسته ای در علوم کشاورزی و منابع طبیعی. ۱۸-۱۹ خرداد، پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای کرج. صفحه ۴۷۹-۴۸۵. [۱۳۸۹]