فصلنامه

دانش میکروب شناسی

سال اول، شماره ۲، بهار۱۳۸۸

بیوکنترل قارچ تریکودرما هارزیانوم ترانسفورمنت مقاوم به بنزیمیدازول و محاسبه EC50

الهام سیاسی تربتی [1*] و پروفسور یانگ کوئین [2]

۱- مربی گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال ۲- مرکز قارچ شناسی دانشگاه پکن

چکیده

اخیرا" بررسی گونه های تغییرژنتیکی داده شده تریکودرما هارزیانوم که دارای ژن مقاوم به بنزیمیدازول بوده و برای تعدادی از قارچ های بیماری زای گیاهی پاتوژن هستند، مورد توجه قرارگرفته است. این امر از لحاظ حفظ محیط زیست نسبت به استفاده بی رویه قارچ کش های شیمیایی که برای مبارزه با بیماری های گیاهی به کار گرفته می شوند و نقش بیوکنترل بودن این سویه های خاص از تریکودرما هارزیانوم حائز اهمیت است. در این تحقیق سطح مقاومت و پایداری مقاومت نسبت به بنزیمیدازول (که یک قارچ کش شیمیایی برای افات گیاهی است) در گونه های تغییر ژنی داده شده تریکودرما هارزیانوم مورد مطالعه قرار گرفته است. به این ترتیب که ابتدا گونه های ترانس فورمنت شده تریکودرما هارزیانوم در محیط پوتیتودکستروز اگار کشت داده می شوند و قطر کلنی آنها بعد از۵روز اندازه گیری می شود. سپس قارچ های مذکور در محیط پوتیتودکستروز اگار به همراه غلظت های متفاوت بنزیمیدازول۵۰٪ شامل (۰/۱ mg/ml و۱و۱۰و۱۰۰و۱۰۰۰) کشت داده می شوند و در مدت ۳ هفته قطر کلنی انها اندازه گرفته می شود و با قطر کلنی ها در حالت اول (قارچ در محیط پوتیتو دکسروز اگار بدون بنزیمیدازول) مقایسه می شود و کاهش اندازه رشد کلنی برای تعیین سطح مقاومت با فرمول اندازه مهار رشد کلنی = ۱- (اندازه رشد کلنی در حالت دوم / اندازه رشد کلنی در حالت اول) محاسبه میشود. به این ترتیب مشخص می شود سطح مقاومت گونه های تغییر ژنی داده شده تریکودرما هارزیانوم نسبت به بنزیمیدازول ۱۰۰۰ mg/ml است. برای بررسی پایداری مقاومت، گونه هایی از قارچ رشد کرده روی محیط پوتیتو دکستروزاگار همراه با بنزیمیدازول را بر روی محیط پوتیتودکستروزاگار بدون بنزیمیدازول برای ۱۰ بار متوالی کشت می دهند. سپس از آن قارچ ها روی محیط پوتیتودکستروزاگار دارای غلظت های متفاوت از بنزیمیدازول کشت تهیه می کنند و رشد آنها را کنترل می نمایند. توانایی بقا و رشد کردن انها بعد از ۱۰ بار کشت متوالی بیانگر ان است که گونه های ترانسفورمنت شده تریکودرما هارزیانوم نسبت به محیط دارای بیش از ۱۰۰۰ mg/ml بنزیمیدازول مقاوم هستند و این مقاومت ژنتیکی در انها پایدار است. همچنین در این تحقیق غلظت موثر کربندازیم (EC50) برای قارچ تریکودرما هارزیانوم محاسبه شده است. به این ترتیب که این غلظت، غلظت مناسبی از کربندازیم می باشد که درآن غلظت ۵۰ ٪ ازقارچ ها توانایی رشد و بقاء را دارند. این مطالعه نشانگر آن است که می توان از قارچ تریکودرم هارزیانوم ترانسفورمنت شده بعنوان عامل بیولوژیکی درکنترل بیماری های گیاهی استفاده نمود.

واژگان کلیدی: تریکودرما هارزیانوم، بیوکنترل، ترانسفورمنت، بنزیمیدازول، غلظت موثرEC50

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

بنزیمیدازول از خانواده قارچ کش هایی است که در کشاورزی بطور سیستمیک به میزان فراوان علیه بیماریهای قارچی به کار گرفته می شود. از اصلی ترین قارچ کش های این خانواده کربندازیم را می توان نام برد. کربندازیم نقش مهمی در کنترل بیماری های قارچی گیاهان دارد. اخیرا در برنامه های مدیریتی برای کنترل بیماریهای قارچی در گیاهان و رفع مشکلات مقاوم شدن آفات گیاهی به قارچ کش ها مورد توجه قرار گرفته است. امروزه این قارچ کش بعنوان عامل بیو کنترل در غلبه بر بیماریهای گیاهی در کشاورزی به کار گرفته می شود زیرا کاربرد عوامل شیمیایی به تنهایی در بیماری های گیاهی بسیار مشکل ساز است. هنگامی که عوامل بیو کنترل همراه عوامل شیمیایی در مبارزه با آفات گیاهی استفاده می شوند بسیاری از عوامل بیماری زا را که برای مدت طولانی در کشاورزی مشکل ساز بودند مهار می کنند یا بطور کامل از بین می برند (۱). قارچ تریکودرما هارزیانوم نسبت به کربندازیم بسیار حساس است. این قارچ به عنوان کنترل بیولوژیکی در بیماری های گیاهی حائز اهمیت است چرا که می تواند گیاهان را در برابر بیماری ها با تولید انواع آنتی بیوتیک ها محافظت نماید (۲). همچنین توانایی کنترل بسیاری از بیماری های گیاهی را خصوصا در سبزیجات و میوه ها دارد. با وجود این که تریکودرما هارزیانوم‌بعنوان میکروارگانیسم‌موثردربیوکنترل‌بیماری‌های گیاهی مطرح است ولی بسیار به قارچ کش های خانواده بنزیمیدازول حساس است و در مواردی که این قارچ‌کش‌ها در مبارزه با بیماری های گیاهی به کار گرفته می شوند به سختی توانایی بقا دارد. به همین دلیل بعد از این که عوامل پاتوژن گیاهی به قارچ کش های شیمیایی مقاوم می شوند و مهار کنترل آنها از بین می رود زیان های اقتصادی فراوانی به بار می آید (۳). بنابراین در این گونه موارد کنترل بیماری های گیاهی با عوامل بیولوژیکی که تحت عنوان بیوکنترل مطرح هستند مورد توجه قرار می گیرد (۴). در این مطالعه عامل بیوکنترل قارچ تریکودرما هارزیانوم است که باید نسبت به ترکیبات بنزیمیدازولی مقاوم باشد تا بتواند همراه با این قارچ کش در برنامه های مبارزه با آفات گیاهی به کار گرفته شود. در این راستا ۹ گونه ترانسفورمنت شده از قارچ تریکودرما هارزیانوم به صورت موفقیت آمیز کاربردشان نشان داده شده است که شامل گونه های T1, T2, T3, T6a, T8, T8801, T8802, T8803. می باشند.

مواد و روش ها

جداسازی نمونه های قارچی

نه گونه ترانسفورمنت شده تریکودرما هارزیانوم که از نظر ژنتیکی دستکاری شده اند و شامل T1, T2, T3, T6a, T8, T8801, T8802, T8803 هستند توسط پروفسور یانگ چی ان از دپارتمان بیوتکنولوژی انستیتو تکنولوژی هاربین تهیه گردید.

محیط کشت و عوامل شیمیایی

محیط کشت برای رشد این قارچ ها پوتیتو دکستروز اگار بود. همچنین کربندازیم ۵۰٪ برای بررسی مقاومت قارچ به قارچ کش به غلظت های متفاوت به محیط کشت اضافه گردید.

زمان مناسب برای رشد قارچ ها

بار اول گونه های ترانسفورمنت شده از قارچ تریکودرما هارزیانوم در مدت ۲۱ روز روی محیط کشت پوتیتو دکستروز اگار بررسی شدند و قطر کلنی ان ها بعد از ۵روز اول اندازه گیری شد.

بررسی کاهش رشد قارچ های ترانسفورمنت شده

بار دوم به محیط کشت پوتیتودکستروزاگار غلظت‌های متفاوت از کربندازیم به نسبت های ۰، ۰/۱ ، ۱، ۱۰، ۱۰۰و ۱۰۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر افزوده شد. پس از رشد، قطر کلنی قارچ ها اندازه گرفته شد و با اندازه حالت اول مقایسه شد. (این مراحل ۳ بار تکرار گردید).

محاسبه مهار رشد قارچ روی محیط کشت دارای کربندازیم

برای محاسبه مهار رشد گونه های ترانسفورمنت شده از فرمول زیر استفاده گردید:

اندازه مهار رشد کلنی = (اندازه قطر کلنی در محیط دارای کربندازیم/ اندازه قطر کلنی در محیط پوتیتو دکستروز آگار فاقد کربندازیم)

Archive of SID

www.SID.ir

محاسبه غلظت موثر EC50 کربندازیم برای گونه های قارچی مورد مطالعه

برای این منظور گونه های ترانسفورمنت شده روی محیط پتیتو دکستروز آگار دارای غلظت های متفاوت از کربندازیم به نسبت های ۰و ۰/۱و ۱و ۱۰و ۱۰۰و ۱۰۰۰ mg/ml در دمای c ۲۵-۲۲ کشت داده می شوند سپس با استفاده از روش محاسباتی زیر مقدار غلظت موثر EC50 کربندازیم برای هر یک از گونه ها محاسبه می شود.

روش محاسبه غلظت موثر EC50 :

x = Log concentration
y = Inhibition growth rate
N= concentration number
B= (sp / ssx), A= (Y-B / X)
X = (Y-B / A)
Log X = EC50

نتایج و بحث

بررسی کاهش اندازه رشد کلنی تریکودرما های ترانسفورمنت شده

مهار اندازه رشد گونه های ترانسفورمنت شده با استفاده از روش ذکر شده محاسبه گردید. بررسی ها نشان داد که کربندازیم رشد گونه های ترانسفورمنت شده تریکودرما هارزیانوم راهنگامی که غلظت کربندازیم بیش از ۱۰۰۰ mg/ml باشد، مهار می کند (جدول ۱).

تعیین سطح مقاومت گونه های ترانسفورمنت شده

گونه های ترانسفورمنت شده روی محیط پوتیتو دکستروز اگار به اضافه غلظت های ۰و ۰/۱و ۱و ۱۰و ۱۰۰و ۱۰۰۰ mg/ml کربندازیم کشت داده شدند و بررسی ها نشان داد که توانایی رشد در محیط کشت دارای بیش از ۱۰۰۰ mg/ml کربندازیم را دارند.

تعیین پایداری مقاومت

گونه های ترانسفورمنت شده ای که روی محیط پوتیتو دکستروز اگار به همراه غلظت های متفاوت از کربندازیم رشد کرده بودند را روی محیط کشت پوتیتو دکستروز اگار بدون کربندازیم برای ۱۰ بار متوالی کشت دادند و سپس بعد از ۱۰ بار دوباره روی محیط کشت دارای غلظت های متفاوت از کربندازیم کشت دادند و با مشاهده رشد قارچ ها مشخص گردید که تغییر ژنتیکی در گونه های ترانسفورمنت شده تریکودرما هارزیانوم پایدار است.

تعیین EC50 برای گونه های ترانسفورمنت شده

رای گونه های ترانسفورمنت شده ایی که روی غلظت های ۰ mg/ml ، ۰/۱ ، ۱، ۱۰، ۱۰۰و ۱۰۰۰ کربندازیم کشت داده شدند مقدار غلظت موثری از کربندازیم را که در آن غلظت ۵۰٪ از قارچ ها توانایی رشد و بقا را دارند با استفاده از روش ذکر محاسبه گردید و مشخص گردید که این گونه های ترانسفورمنت شده در روی محیط پتیتودکستروزآگار دارای بیش از ۱۰۰۰ mg/ml کربندازیم توانایی رشد و بقا را دارند (جدول ۲).

نتایج بیانگر این مسئله می باشند که از گونه های ترانسفورمنت شده قارچ تریکودرما هارزیانوم با توانایی رشد و بقاء در غلظت های بالا از قارچ کش کربندازیم می توان بعنوان عوامل بیولوژیکی مقاوم به قارچ کش های شیمیایی (عوامل بیوکنترل) در کشاورزی استفاده نمود.

در این مطالعه گونه های ترانسفورمنت شده توانایی رشد و بقا در محیط دارای بیش از ۱۰۰۰ mg/ml کربندازیم را دارند. این سطح مقاومت خیلی بیشتر است نسبت به مقداری که قارچ کش برای مهار پاتوژن های گیاهی به کار گرفته می شود. این امر بیانگر آن است که این گونه های ترانسفورمنت شده در برنامه های کنترل بیماری های گیاهی می توانند بعنوان عامل بیوکنترل کاربرد داشته باشند

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱. اندازه مهار رشد گونه های ترانسفورمنت تریکودرما هارزیانوم در محیط کشت با غلظت های متفاوت (۰و ۰/۱و ۱و ۱۰و ۱۰۰و ۱۰۰۰ mg/ ml) از کربندازیم با ۳ تکرار برای هر گونه قارچی.

		۰	۰/۱	۱	۱۰	۱۰۰	۱۰۰۰
	۱	۰	۸/۰۱	۱۲/۴۰	۱۸/۷۰	۲۵/۱۰	۳۰/۱۳
T1	۲	۰	۹/۰۵	۱۵/۲۰	۱۹/۲۰	۲۶/۸۰	۳۰/۱۰
	۳	۰	۹/۱۰	۱۵/۹۰	۲۰/۱۰	۲۹/۵۰	۳۲/۵۰
	۱	۰	۹/۴۰	۱۱/۷۵	۱۶/۱۰	۲۱/۲۰	۳۰/۷۰
T2	۲	۰	۱۰/۵۰	۱۳/۲۵	۱۹/۷۰	۲۶/۳۰	۳۲/۵۰
	۳	۰	۱۰/۱۵	۱۲/۹۰	۱۸/۹۰	۲۹/۵۵	۳۱/۹۰
	۱	۰	۱۰/۱۶	۱۵/۲۵	۱۸/۶۴	۲۵/۴۲	۳۲/۲۰
T3	۲	۰	۸/۴۴	۱۲/۹۶	۱۷/۵۹	۲۴/۹۲	۳۴/۱۰
	۳	۰	۸/۲۷	۱۲/۷۲	۱۶/۳۶	۲۳/۶۳	۳۲/۷۲
	۱	۰	۱۱/۰۷	۱۷/۲۰	۲۱/۱۰	۲۹/۱۰	۳۴/۹۰
T6a	۲	۰	۱۰/۰۹	۱۵/۳۰	۲۰/۲۵	۲۷/۲۰	۳۳/۱۰
	۳	۰	۹/۹۵	۱۵/۰۱	۲۰/۱۰	۲۶/۹۰	۳۲/۹۵
	۱	۰	۱۰/۸۰	۱۵/۷۰	۱۹/۱۰	۲۵/۱۰	۳۱/۹۰
T6b	۲	۰	۹/۹۵	۱۵/۰۱	۱۸/۹۰	۲۴/۹۵	۳۰/۸۵
	۳	۰	۸/۹۰	۱۴/۱۰	۱۷/۹۵	۲۴/۰۱	۳۰/۷۰
	۱	۰	۱۱/۲۵	۱۶/۷۰	۲۰/۱۰	۲۴/۷۰	۳۲/۶۰
T8	۲	۰	۹/۸۵	۱۵/۳۵	۱۹/۸۰	۲۱/۲۵	۳۰/۱۵
	۳	۰	۱۰/۵۰	۱۶/۰۵	۱۹/۹۵	۲۳/۵۰	۳۱/۳۳
	۱	۰	۹/۵۴	۱۴/۹۵	۱۹/۸۰	۲۴/۳۰	۳۰/۷۵
T8801	۲	۰	۲۰/۲۶	۱۵/۷۰	۲۰/۱۰	۲۶/۵۰	۳۲/۸۲
	۳	۰	۱۱/۷۵	۱۶/۶۲	۲۰,۹۵	۲۷/۲۰	۳۰/۱۰
	۱	۰	۱۰/۲۰	۱۵/۰۵	۱۹/۷۰	۲۵/۹۰	۳۲/۲۵
T8802	۲	۰	۱۱/۳۵	۱۵/۹۵	۲۰/۱۵	۲۹/۸۱	۳۴/۲۰
	۳	۰	۹/۸۵	۱۴/۸۰	۱۸/۹۵	۲۴/۱۰	۳۰/۰۱
	۱	۰	۹/۸۰	۱۴/۲۰	۱۹/۰۱	۲۵/۷۵	۳۲/۵۰
T8803	۲	۰	۸/۹۵	۳۲/۹۵	۱۸/۹۰	۲۳/۲۵	۳۱/۹۵
	۳	۰	۱۰/۱۵	۱۵/۷۰	۱۹/۷۰	۲۶/۷۰	۳۴/۷۰

جدول ۲. غلظت موثر EC50 برای کربندازیم که در آن غلظت از کربندازیم، ۵۰٪ از گونه های ترانسفورمنت شده از تریکودرما هارزیانوم قادر به ادامه رشد و بقا می باشند.

غلظت موثر EC50 از کربندازیم mg/ml	گونه ترانسفورمنت شده از قارچ
۱۳۵۴/۱۰	T1
۱۲۶۱/۵۰	T2
۱۲۰۴/۲۰	T3
۱۱۸۷/۹۳	T6a
۱۲۳۰/۶۰	T6b
۱۳۲۱/۹۰	T8
۱۳۱۶/۰۴	T8801
۱۲۰۲/۸۰	T8802
۱۱۵۲/۸۵	T8803

Archive of SID

www.SID.ir

و این تغییرات ژنتیکی که در گونه های قارچ تریکودرما هارزیانوم داده شده و آنها را بصورت مقاوم به کربندازیم نموده است می تواند راهکاری جدید برای کاربردتکنیک‌های بیولوژیکی درمهار بیولوژیکی‌بیماری‌های گیاهی ارائه دهد (۵ و۶).

سطح مقاومت این گونه های ترانسفورمنت بیش از ۱۰۰۰mg/ml گزارش شده است که خیلی بیشتر از گونه های وحشی می باشد. گونه های تریکودرما بعنوان قارچ های با اهمیت در بیوکنترل بیماری های گیاهی مطرح هستند و در کنار عوامل شیمیایی برای مهار بیماری های گیاهی کاربرد وسیعی پیدا نموده اند (۷و۸). تریکودرما بعنوان‌عامل پاتوژن برای تعدادی از بیماری های قارچی در گیاهان می باشد. تریکودرما هارزیانوم به طور اقتصادی در برنامه های بیوکنترل در برابر عوامل بیماری زای قارچی در گیاهان خصوصا سبزیجات مطرح است (۹و۱۰). اخیرا این نظریه مطرح است که در مکانیسم های انتاگونیستی، گونه های قارچ تریکودرما هارزیانوم تولید آنتی بیوتیک ها و انزیم هایی خاص را می نمایند که توانایی حمله به پاتوژن های قارچی دیگر در گیاهان را دارند (۱۱و۱۲). این پدیده منجر به استفاده از گونه های تریکودرما بعنوان‌عامل بیوکنترل‌با قابلیت‌بالا در برنامه های مبارزه با آفات گیاهی گردیده است. امید است در آینده تحقیقات در این زمینه حقایق جامع تری را مشخص نماید.

منابع

1- Yang Q., (1995). Resistance of plant pathogen to fungicides. Harbin Heilongjiang science and Technology press. 43-47.
2- Chen Z., (1992). Application of plant genetic engineering in agriculture. High Technique news letter, **1**: 1-5.
3- Neff N F, et al., (1983). Isolation of the beta tubulin gene from yeast and demonstration of its essential function in vivo. Cell. **33**: 211-219.
4- Mark S G., (1990). Pathogenicity and growth of metarhizium anisopliae stably transformed to benomyl resistance. Current Genetics. 129-132.
5- Huang D., (1990). Biological Engineering Progress. 24-27.
6- Huang D., (1990). Natural Science Progress National Kay Library News Letter. **4**(3):351-353.
7- Yang Q., (1990). Method of transforming resistance gene to carbendazim into Trichoderma sp. Chinese Science Bulletin. (1): 65-68.
8- Luo K.,(1987). Study on the parasitie fungi on sclerotia of Sclerotinia sclerotiorum in rape. Oil Crops of China. **3**: 40-45.
9- Song J., (2000). A study on biocontrol mechanism of Trichoderma sp. With Emphases on Antagonistic Capability against Sclerotinia Sclerotiorum and Tolerance to Caebendazim. Harbin Institute of Technology.
10- Agrios G N., (1997).Plant Pathology. San Diego. Academic Press.
11- Elad Y. (1983). Parasitism of Trichoderma sp. On *Rhizoctonia solani* and Scleroderma rolfsii Scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. Phytopathology.**73**: 85-88.
12- Benhamou N., (1993). Hyphal interaction between *Trichoderma harzianum and Rhizoctonia solani*. Ultra structure and gold chemistry of the mycoparasitic process. Phytopathology. **83**: 1062-1071.

Archive of SID

www.SID.ir