J. of Nucl Sci. and Tech.
71, 2015, 96-104

مجله‌ی علوم و فنون هسته‌ای
۷۱، ۱۳۹۴، ۹۶-۱۰۴

بررسی اثرهای پرتو گاما بر ویژگی‌های ریخت‌شناسی و آنتاگونیستی قارچ تریکودرما هارزیانوم

رضا مرادی[۱]، سمیرا شهبازی*[۲]، حسین اهری مصطفوی[۲]، محمدعلی ابراهیمی[۱]، حامد عسکری[۲]
۱. گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه پیام نور، صندوق پستی: ۳۶۸۹۹-۳۱۵۷۸، تهران ـ ایران
۲. پژوهشکده‌ی کشاورزی هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی ایران، صندوق پستی: ۴۹۸-۳۱۴۸۵، کرج ـ ایران

چکیده: اثر بازدارندگی دزهای مختلف پرتو گاما بر جوانه‌زنی هاگ قارچ تریکودرما هارزیانوم و اثر آن بر ویژگی‌های ریخت‌شناسی و توانایی آنتاگونیستی جهش یافته‌های حاصل در کنترل قارچ بیمارگر ریزوکتونیا سولانی بررسی شد. برای این منظور سوسپانسیون هاگ تریکودرما در پژوهشکده‌ی کشاورزی هسته‌ای کرج در معرض دزهای ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰، ۳۵۰، ۴۰۰، ۴۵۰ گری پرتو گاما قرار گرفت. برای بررسی اثر پرتو گاما بر رشد ریسه، قارچ تریکودرما با دزهای ۰، ۴۰۰، ۸۰۰، ۱۲۰۰، ۱۶۰۰، ۲۰۰۰، ۲۵۰۰ گری پرتودهی شد. نتایج نشان داد که پرتودهی با دز ۴۵۰ گری به طور کامل مانع جوانه‌زنی هاگ قارچ شد و دز ۲۵۰ گری به عنوان دامنه‌ی دز بهینه برای القای جهش در تریکودرما انتخاب شد. هم‌چنین پرتو گاما باعث تنوع در ویژگی‌های ریخت‌شناسی قارچ تریکودرما از جمله شکل، رنگ، هاگ‌دهی و سرعت رشد ریسه شد. نتایج آزمون آنتاگونیستی نشان داد که پتانسیل کنترل‌کنندگی جدایه‌های جهش یافته در مقایسه با جدایه‌ی مادری (شاهد) در برابر قارچ پاتوژن ریزوکتونیا سولانی به طور معنی‌داری افزایش یافته بود. براساس نتایج این بررسی، با استفاده از روش القای موتاسیون با پرتودهی گاما توانایی کنترل زیست‌شناسی در قارچ تریکودرما به صورت کاملاً معنی‌داری افزایش پیدا می‌کند.

کلیدواژه‌ها: پرتو گاما، جهش، کنترل زیست‌شناسی، تریکودرما هارزیانوم، ریزوکتونیا سولانی

Investigation of gamma radiation effects on morphological and antagonistic characteristics of *Trichoderma harzianum*

R. Moradi[1], S. Shahbazi*[2], H. Ahari Mostafavi[2], M.A. Ebrahimi[1], H. Askari[2], M. Mirmajlesi[2]
1. Biotechnology Department, Faculty of Agriculture, Payame Noor University, P.O.Box: 31578-36899, Tehran – Iran
2. Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, AEOI, P.O.Box: 31485-498, Karaj – Iran

Abstract: The effects of gamma irradiation doses on spore germination of *Trichoderma harzianum* and its effects on morphological variation and antagonistic capability of the mutants to control *Rhizoctonia solani* were evaluated. Spore suspension of Trichoderma has been gamma irradiated with 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 and 450 Gry in Nuclear Agricultural Research School (Nuclear Science and Technology Research Institute, Karaj). Gamma ray effects on mycelial growth were evaluated by irradiation with 0, 400, 800, 1200, 2000 and 2500 Gry. The results showed that the 450 Gry gamma radiations completely blocked the spore germination and 250 Gry was the optimum dose to induce mutation in Trichoderma. Furthermore, gamma irradiation could change the morphological characteristics such as colony shape and color, sporulation and mycelia growth rate. The dual culture test showed that the mutated isolates have statistically higher antagonistic capability against R.solani than their parent strain. According to these results, the bio-control capability of Trichoderma could be improved through the gamma radiation.

Keywords: ***Gamma radiation, Mutation, Biological control, Trichoderma harzianum, Rhizoctonia solani***

*email: sshahbazi@nrcam.org

تاریخ دریافت مقاله: ۹۳/۱/۱۹ تاریخ پذیرش مقاله: ۹۳/۸/۲۴

Archive of SID
www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir

۱. مقدمه

کنترل تلفیقی در مدیریت بیماری‌های گیاهی راهکار اصلی در کشاورزی پایدار امروز است. امروزه مشکل‌های فراوانی به دلیل کاربرد وسیع سم‌های شیمیایی در کشاورزی بروز کرده است، که از یک‌سو هزینه‌های تولید را افزایش (میلیاردها تومان هزینه‌ی سم‌پاشی انواع محصول‌های کشاورزی) و از سوی دیگر آسیب‌های جبران‌ناپذیر زیست محیطی در اکوسیستم طبیعی بروز داده است. هم‌چنین باقی‌مانده‌ی سم‌ها در محصول‌های کشاورزی و فرآورده‌های آن‌ها (ورود مستقیم سم‌ها به زنجیره‌ی غذایی انسان و دام) منجر به افزایش بروز بیماری‌های مختلف از جمله انواع سرطان‌ها شده است [۱]. در مدیریت عامل‌های بیماری‌زا پایدارترین و سازگارترین روش با شرایط زیست محیطی، استفاده از عامل‌های کنترل‌کننده‌ی زیست‌شناسی در این سیستم مدیریت تلفیقی است. کاربرد عامل‌های کنترل زیست‌شناسی به کاهش کاربرد سم‌های شیمیایی و در نتیجه کاهش باقی‌مانده‌ی سم‌ها در محیط (منابع خاک و آب) و زنجیره‌ی غذایی موجودات زنده می‌انجامد. لذا توجه پژوهش‌گران به یافتن راهکارهای ایمن از نظر محیط زیست و سلامت عمومی و در عین حال مؤثر و کاربردی در کاهش خسارت ناشی از بیماری‌های گیاهی جلب شده است. به خصوص در مورد بیمارگرهای خاکزاد، دشواری‌هایی از نظر عملیات کاربرد سم‌ها و کاهش میزان تأثیرآن‌ها بر خاک، منجر به استفاده از دزهای بالاتر و مخاطرات بیش‌تر زیست محیطی در سال‌های اخیر شده است.

ریزوکتونیا[۱] یکی از بیمارگرهای خاکزاد بسیار مهم در کشاورزی است که فاقد هاگ غیرجنسی بوده و سختینه‌های (اندام‌های مقاوم) آن در خاک باعث بقا و انتقال بیماری از یک فصل به فصل دیگر می‌شود. ریشه‌ی یونانی کلمه ریزوکتونیا به معنای مرگ ریشه‌ای است، زیرا این قارچ به سرعت به ریشه‌ی گیاهان نهان‌دانه حمله کرده و آن‌ها را از بین می‌برد. علامت‌های بیماری ناشی از فعالیت این قارچ شامل پوسیدگی بذر، مرگ گیاهچه، پوسیدگی ریشه و طوقه و بلایت برگی در گیاهان مختلف است؛ گونه‌ی معروف این بیمارگر ریزوکتونیا سولانی[۲] است که تنوع ژنتیکی بسیار بالایی از جمعیت آن گزارش شده است [۲]. شبه جنس ریزوکتونیا براساس تعداد هسته‌های موجود در هر سلول هیف، به سه دسته‌ی ریزوکتونیای تک‌هسته‌ای، دو هسته‌ای و چند هسته‌ای گروه‌بندی شده است. دو گروه اخیر براساس مفهوم گروه‌بندی آناستاموزی[۳] (AG) به چندین گروه از لحاظ ژنتیکی مجزا تقسیم‌بندی می‌شود [۳]. با توجه به عدم کارآیی کافی و دشواری‌های کاربرد سم‌های شیمیایی در خاک و تأثیر ناکافی آن بر سختینه در این بیمارگر، و به علاوه عدم ارایه‌ی منابع قابل قبول مقاومت گیاهان میزبان در برابر ریزوکتونیا سولانی، کنترل زیست‌شناسی از روش‌های امیدبخش در راستای کاهش خسارات ناشی از این بیمارگر به شمار می‌رود و گونه‌های مختلف تریکودرما به ویژه تریکودرما هارزیانوم[۴] در بین عامل‌های کنترل زیست‌شناسی معرفی شده از تأثیر و کارآیی بهتری برخوردار است [۴].

گونه‌های جنس تریکودرما spp که از عامل‌های کنترل زیست‌شناسی بسیار موفق بر روی قارچ‌های خاکزاد بوده و مرحله‌ی غیرجنسی آسکومیست‌های جنس هیپوکرا[۵] است به عنوان عامل کنترل زیستی بر علیه دامنه‌ی بسیار وسیعی از سایر ریزموجودات بیمارگر مانند باکتری‌ها، پروتوزوآها، نماتدها و حتی ویروس‌ها به کار رفته‌اند [۵]. قدرت زنده‌مانی مناسب و بالای تریکودرما به دلیل طبیعت خاکزاد آن و قدرت رقابت بالایی که در شرایط خاک با سایر ریزموجودات دارد و آسانی کاربرد تریکودرما در خاک از مزیت‌های دیگری است که باعث شده است در بین عوامل کنترل زیستی علیه ریزوکتونیا سولانی توجه ویژه‌ای به قارچ تریکودرما و به خصوص گونه‌ی هارزیانوم معطوف شود [۶]. مطالعه‌های فیزیولوژیکی و زیست‌شیمیایی گسترده‌ای بر روی تعامل تریکودرما با ریزوکتونیا انجام شده است. نتایج بررسی‌ها نشان داده است که ریسه‌های تریکودرما در طی فرایند آنتاگونیسم به دور ریسه‌های ریزوکتونیا سولانی پیچیده و به درون آن‌ها نفوذ می‌کنند، که این نفوذ با ترشح هم‌زمان آنزیم‌های تجزیه‌کننده‌ی دیواره‌ی سلولی (کیتینازها و گلوکانازهای خارج سلولی) در ریسه‌های تریکودرما همراه است [۷].

پرتودهی با گاما سبب تغییر ساختمان شیمیایی مولکول‌های ماده‌ی وراثتی می‌شود که نتیجه‌ی آن جهش ژن یا شکستن کروموزوم و ترکیب مجدد بازهای آلی خواهد بود. در صورتی که فعالیت این ژن‌های جهش یافته به مسیر زیست‌آمایی یک ترکیب مانند توکسین و یا آنزیم متعلق باشند، این تغییرها در ترادف بازهای آلی و جهش‌ها می‌تواند میزان تولید این ترکیب‌ها را دستخوش تغییر (اعم از افزایش یا کاهش) نماید [۸].

Archive of SID

www.SID.ir

از سوی دیگر دانشمندان با ایجاد تغییرهای ژنتیکی در آنتاگونیست‌ها همواره سعی در افزایش توانایی و ارتقای عمل آن‌ها دارند. یکی از روش‌های به کار گرفته شده برای افزایش قدرت آنتاگونیستی، القای جهش‌زایی تصادفی[۶] با به کارگیری جهش‌زاهای فیزیکی از جمله تابش فرابنفش و پرتو گاما، امواج الکترومغناطیسی و ایکس و یا جهش‌زاهای شیمیایی مانند اتیل متان سولفونات است. البته این القای جهش‌زایی همیشه مطلوب نبوده است؛ به عنوان مثال به کارگیری تابش فرابنفش سبب کاهش تولید آنزیم‌های سلولاز و پکتیناز در قارچ کولتوتریکیم کاپسیسی[۷] (عامل بیماری آنتراکنوز) شده که کاهش رشد ۴۰ درصدی ریسه‌ها و کاهش ۱۰ درصدی هاگ‌زایی در جهش‌یافته‌ها را به دنبال داشته است [۹].

گزارش شده است که ایجاد جهش با استفاده از پرتو گاما می‌تواند به افزایش توانایی آنتاگونیستی و دست‌یابی به منبع‌های ژنتیکی جدید از عامل‌های زیست‌کنترل مؤثر و کارآ کمک کند [۱۰]. در گونه‌ی تریکودرمای ویرنس[۸] ایجاد جهش با استفاده از پرتو گاما هم‌زمان با افزایش بیان ژن‌های مرتبط با افزایش مقاومت در برابر ریزوکوتونیا سولانی با افزایش قدرت رشد و رقابت و هاگ‌زایی قارچ همراه بوده است [۱۱]. کارآیی جدایه‌های جهش یافته‌ی تریکودرما هارزیانوم با استفاده از پرتو گاما نیز در کنترل اسکلروتیم سپیوریم[۹] و اسکلروتیم رولفیزی[۱۰] افزایش چشم‌گیری یافته است [۱۲]. هم‌چنین پرتودهی با گاما در افزایش کنترل زیستی هم‌زمان اسکلروتیم رولفیزی و ریزوکتونیا سولانی به وسیله‌ی گونه‌های تریکودرما هارزیانوم مؤثر بوده است [۱۳]. جدایه‌های جهش یافته‌ی تریکودرما هارزیانوم با استفاده از پرتو گاما در کنترل بوتریتیس سینرا[۱۱] نیز موفق بوده است [۱۴]. نتایج مشابهی نیز برای افزایش قدرت آنتاگونیستی جدایه‌های جهش یافته‌ی تریکودرما هارزیانوم با پرتو گاما بر روی فوزاریم اکسیسپروم[۱۲] به دست آمده است [۱۵]. پرتو گاما برای ایجاد جهش در باکتری‌ها، قارچ‌ها و گیاهان استفاده شده و سابقه‌ی مطالعاتی محدودی در این زمینه در کشورمان وجود دارد. نتایج پرتودهی میوه‌ی سیب با دز ۳ کیلوگری پرتو گاما برای کنترل جوانه‌زنی هاگ و رشد ریسه‌ی قارچ عامل بیماری کپک آبی[۱۳] نشان داد که این عامل به طور کاملاً معنی‌داری کاهش می‌یابد [۱۶]. پرتودهی گاما‌یی قارچ فوزاریم سولانی فرم ویژه فازیولی[۱۴] باعث کاهش بیماری پوسیدگی ریشه‌ی لوبیا و افزایش عملکرد گیاه شد [۱۷]. هدف این پژوهش بررسی تغییرهای زیست‌شناسی ناشی از پرتودهی گامایی کنیدیم‌های قارچ تریکودرما هارزیانوم و ارتباط افزایش توانایی آنتاگونیستی و برخی ویژگی‌های ریخت‌شناسی در جدایه‌های جهش یافته بود.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲ نمونه‌برداری، جداسازی و شناسایی قارچ‌های مورد مطالعه

برای جداسازی قارچ تریکودرما هارزیانوم از خاک ناحیه‌ی ریزوسفر گیاهانی که بدون استفاده از سم‌های شیمیایی در مقایسه با سایر گیاهان شدت بیماری مشاهده شده در آن‌ها کم‌تر بود و یا نقاطی از مزرعه (ی هندوانه، خربزه، کدو، خیار) که به طور لکه‌ای گیاهان فاقد علایم بودند نمونه‌برداری انجام و سوسپانسیون این نمونه‌های خاک، به روی محیط کشت PDA انتقال داده شدند. کلنی‌های حاصل بعد از تهیه‌ی کشت تک‌هاگ (به منظور خالص‌سازی) با استفاده از کلید شناسایی قارچ‌های ناقص و براساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی فیالیدها و فیالوسپورها و انتوژنز کنیدیم‌ها مورد شناسایی قرار گرفتند.

نمونه‌برداری از قارچ بیمارگر به طور تصادفی از مزارع چغندر قند آلوده با علایم پوسیدگی طوقه و ریشه، مرگ گیاهچه، ضعف و زردی عمومی، به همراه مقداری خاک منطقه‌ی ریزوسفر گیاهان آلوده و هم‌چنین گیاهانی که روی ریشه و طوقه‌ی آن‌ها علایم شانکر نیز وجود داشت به عمل آمد. جداسازی قارچ بیمارگر از نمونه‌ی گیاهان بیمار به همراه خاک اطراف طوقه و ریشه به روش طعمه‌گذاری [۱۸] انجام شد. نمونه‌های خاک در تشتک‌های سفالی ۱۰ سانتی با آب مقطر مرطوب و در هر تشتک ۱۰ عدد بذر چغندر قند در اتوکلاو قرار گرفته (به عنوان تله‌ی قارچ ریزوکتونیا) قرار داده شد و بعد از ۷۲ ساعت در تاریکی و دمای اتاق، بذور چغندر قند روی محیط کشت آب- آگار (WA) قرار گرفته و کلنی‌های قارچ پس از شناسایی گونه، برای تعیین گروه آناستاموزی به مؤسسه‌ی تحقیقات و تولید بذر چغندر قند کشور انتقال داده شدند.

Archive of SID

www.SID.ir

۲.۲ بررسی دز ممانعت‌کننده از رشد ریسه

بعد از شناسایی و خالص‌سازی جدایه‌ها بر روی محیط کشت PDA، از کشت‌های هفت روزه‌ی، ۱۸۶ جدایه‌ی قارچ تریکودرما، سوسپانسیون هاگ تهیه و شمارش هاگ با استفاده از لام همی‌سایتومتر انجام شد. با استفاده از چشمه‌ی کبالت ۶۰ دستگاه گاماسل پژوهشکده‌ی کشاورزی هسته‌ای کرج (سازمان انرژی اتمی ایران) با فعالیت ۲۵۰۰ کوری و با نرخ دز ۰٫۲۳ گری در ثانیه تعداد ۷۰۰ هاگ با دزهای ۰، ۴۰۰، ۸۰۰، ۱۲۰۰، ۱۶۰۰، ۲۰۰۰، ۲۵۰۰ گری (هر یک سه تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی) تحت پرتودهی قرار گرفت. سپس هاگ‌های پرتو دیده برای کشت و محاسبه‌ی درصد زنده‌مانی و تعیین سرعت رشد ریسه بر روی محیط کشت PDA و در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد گرماگذاری شدند [۴].

۳.۲ تعیین دز مناسب برای القای جهش در قارچ تریکودرما

درصد جوانه‌زنی با شمارش هاگ‌های جوانه‌زده برای هر کدام از دامنه‌های دز تعیین شد. معیار دز جذبی مناسب برای القای جهش غیرکشنده در قارچ‌ها، ظهور تقریباً ۴۰ تا ۵۰ درصد جوانه‌زنی هاگ بعد از پرتودهی بود [۹]. آزمون مقایسه‌ی سرعت رشد با اندازه‌گیری قطر کلنی‌های سه، پنج و هفت روزه‌ی جدایه‌های جهش یافته و مادری انجام شد. به منظور ایجاد جهش در قارچ تریکودرما عملیات پرتودهی با دزهای ۰، ۵۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰، ۳۵۰، ۴۰۰، ۴۵۰ گری (برای هر دز سه تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی)، انجام شد. دز بهینه برای پرتودهی به منظور القای جهش براساس این نتایج انتخاب شد. کلیه‌ی پژوهش‌های آماری در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم‌افزار نسخه SPSS ۱۱٫۳ انجام شد.

۴.۲ مقایسه‌ی ویژگی‌های ریخت‌شناسی جدایه‌های جهش یافته‌ی قارچ تریکودرما

بعد از پرتودهی و القای جهش، محیط‌های کشت حاوی تک‌هاگ‌های جوانه زده به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. کلنی‌های حاصل دو مرتبه واکشت شده و هر بار به محیط کشت PDA جدید منتقل شدند تا از ثابت بودن ویژگی‌های هر کلنی و به ارث رسیدن آن‌ها اطمینان حاصل شود. بعد از ۵ روز نگه‌داری در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، ویژگی‌های ریخت‌شناسی هر کلنی شامل سرعت رشد جوانه‌زنی هاگ، رنگ و شکل کلنی و سرعت رشد ریسه اندازه‌گیری شد. برای تعیین قدرت هاگ‌زایی، از کلیه‌ی نمونه‌ها، سوسپانسیون هاگ با رقت یک صدم تهیه و با استفاده از لام هموسایتومتر در محدوده‌ی بزرگ نمایی ۱۰ میکروسکوپ نوری هاگ شمرده شدند. کلیه‌ی جدایه‌های جهش یافته بعد از شمارش هاگ به لحاظ رنگ کلونی با یک‌دیگر مقایسه شدند.

۵.۲ بررسی توانایی آنتاگونیستی جدایه‌های جهش یافته‌ی تریکودرما در برابر بیمارگر ریزوکتونیا سولانی

به منظور اندازه‌یابی میزان توانایی آنتاگونیستی قارچ تریکودرما هارزیانوم جهش یافته، از کشت متقابل جدایه‌های جهش یافته و شاهد (جدایه‌ی مادری) با بیمارگر ریزوکتونیا سولانی استفاده شد. آزمون کشت متقابل شامل کشت تک کلنی جدایه‌های تریکودرمای جهش یافته با تک کلنی جدایه‌ی قارچ بیمارگر بود. از آن‌جایی که این بیمارگر فاقد هاگ است نتایج حاصل می‌تواند معیار قابل قبولی از توانایی آنتاگونیستی هر یک از جدایه‌ها بوده و احتمال بروز آلودگی و تداخل کشت‌های دو قارچ به حداقل ممکن خواهد رسید. در این مطالعه ۹۶ جدایه‌ی تریکودرما هارزیانوم جهش یافته‌ی حاصل از پرتودهی گاما به همراه شاهد (کشت متقابل هم‌زمان جدایه‌ی غیرجهش یافته) با قارچ بیمارگر ریزوکتونیا سولانی کشت متقابل شد. جدایه‌ها به طور هم‌زمان با فاصله‌ی ۶ سانتی‌متر از یک‌دیگر کشت داده شدند. سرعت رشد کلنی‌های ریزوکتونیا سولانی در سه روز متوالی پس از کشت (۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت) اندازه‌گیری و با استفاده از رابطه‌ی زیر درصد ممانعت‌کنندگی هر یک از جدایه‌های جهش یافته و شاهد محاسبه شد.

$$IG=C-T/C\times 100$$

که در آن، IG، درصد ممانعت‌کنندگی از رشد میسیلیمی قارچ بیماری‌زا، C قطر کلنی قارچی بیمارگر در نبود تریکودرما و T قطر کلنی قارچی بیمارگر در کشت متقابل با تریکودرما است.

Archive of SID

www.SID.ir

۳. نتایج و بحث

۱.۳ جداسازی و شناسایی قارچ‌های مورد مطالعه

جدایه‌های قارچ تهیه شده از خاک اطراف ریشه پس از خالص‌سازی، براساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی فیالیدها و فیالوسپورها و انتوژنز کنیدیم‌ها به گونه‌ی تریکودرما هارزیانوم متعلق بودند.

قارچ بیمارگر جمع‌آوری شده از مزرعه‌های چغندرقند با علایم پوسیدگی ریشه و طوقه، بعد از انجام آزمایش بیماری‌زایی به گونه‌ی ریزوکتونیا سولانی تعلق داشتند. براساس آزمون هم‌دهانی ریسه‌ی جدایه‌های مذکور با جدایه‌های استاندارد بین‌المللی موجود در آزمایشگاه قارچ‌شناسی مؤسسه‌ی تحقیقات و تولید بذر چغندرقند کشور، جدایه‌های ریزوکتونیا سولانی جدا شده در این پژوهش همگی در گروه آناستاموزی-۴ قرار داشتند. بررسی ویژگی‌ها و بیماری‌زایی گروه‌های آناستاموزی ریزوکتونیا سولانی جدا شده از چغندرقند در یک پژوهش جامع در امریکا نشان داده است که گروه آناستاموزی-۴ گروه غالب مرگ گیاهچه‌ی چغندرقند است. آزمایش‌های اثبات بیماری‌زایی در گلخانه نشان داده است که بیش‌تر جدایه‌های ریزوکتونیا سولانی تهیه شده از مرگ گیاهچه‌ی چغندرقند در گروه آناستاموزی-۴ قرار دارند [۱۹]. با توجه به این‌که نمونه‌برداری این پژوهش نیز از مزرعه‌های این محصول انجام شده بود قرار گرفتن همه‌ی نمونه‌ها در گروه آناستاموزی-۴ مورد انتظار بود.

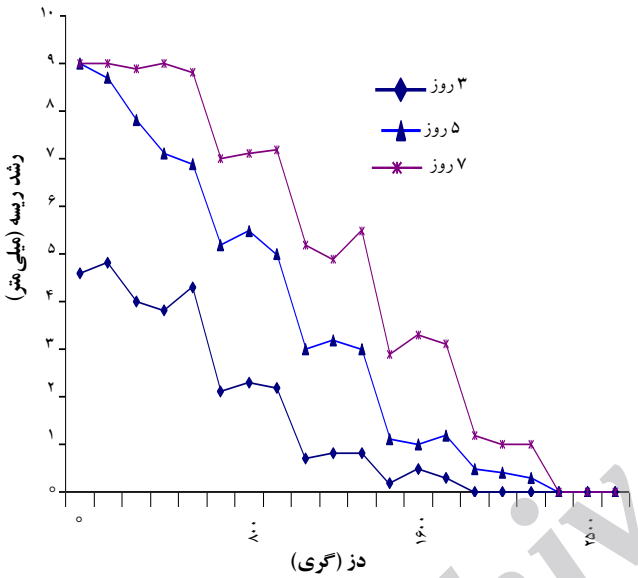
۲.۳ دز ممانعت‌کننده از رشد ریسه

پرتودهی با دز ۲۵۰۰ گری توانست به طور کامل رشد ریسه‌ی قارچ تریکودرما را کنترل نماید. با افزایش دز، سرعت رشد ریسه کاهش یافت تا جایی که با دز ۱۲۰۰ گری، تولید هاگ با تأخیر انجام و طی ۳ روز اول، تنها رشد ریسه‌ای مشاهده شد (جدول ۱، شکل ۱). در پژوهش دیگری نیز مشاهده شده بود که پرتودهی میوه سیب با پرتو گاما در گستره دز ۳ کیلوگری جوانه‌زنی هاگ و رشد ریسه قارچ عامل بیماری کپک آبی به طور کاملاً معنی‌داری کاهش می‌یابد [۱۶]. با توجه به این‌که تریکودرما هارزیانوم از نظر تاکسونومیکی قرابت بالایی با قارچ عامل کپک آبی دارد نزدیک بودن این دو دامنه دز ممانعت‌کننده کاملاً قابل قبول به نظر می‌رسد.

جدول ۱. اثر دزهای مختلف پرتو گاما بر رشد (mm) ریسه‌ی قارچ تریکودرما هارزیانوم در محیط کشت PDA

مدت پرتودهی (روز)		دز (گری)						
		۰	۴۰۰	۸۰۰	۱۲۰۰	۱۶۰۰	۲۰۰۰	۲۵۰۰
۳		۴٫۵	۴	۲٫۲	۰٫۷۶	۰٫۱۶	۰	۰
		(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(e)	(e)
۵		۸٫۹	۷٫۲	۵٫۲	۳	۱٫۱	۰٫۴	۰
		(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	(g)
۷		۹	۸٫۹	۷٫۱	۵٫۲	۳٫۱	۱	۰
		(a)	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)

میانگین‌های با حروف مشترک در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.



شکل ۱. اثر پرتو گاما با دزهای مختلف بر رشد ریسه.

۳.۳ القای جهش در قارچ تریکودرما

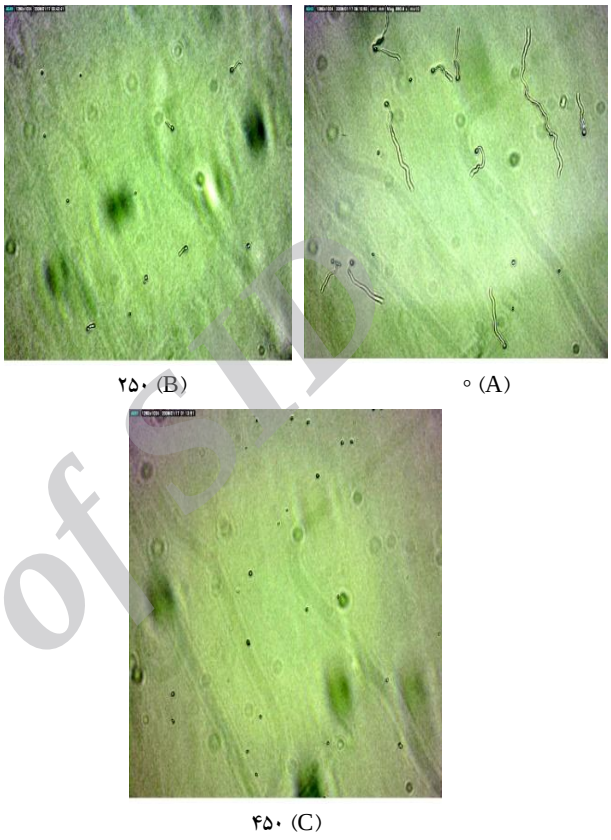
مقایسه‌ی درصد جوانه‌زنی هاگ، ۲۴ ساعت پس از خاتمه‌ی پرتودهی با دزهای مختلف، تیمارها را در چند گروه مختلف قرار داد. براساس نتایج به دست آمده، پرتودهی با دز ۲۵۰ گری هیچ‌گونه اثر ممانعت‌کنندگی از رشد ریسه نشان نداد و ۵۰ تا ۵۱ درصد هاگ‌های قارچی توانایی جوانه‌زنی خود را حفظ نمودند (جدول ۲). از آن‌جایی که معیار دز جذبی مناسب برای القای جهش غیرکشنده در قارچ‌ها، ظهور تقریباً ۴۰ تا ۵۰٪ جوانه‌زنی هاگ بعد از پرتودهی است [۹]، دز بهینه‌ی القای جهش، انتخاب و جدایه‌های جهش یافته با این دز تهیه شدند (جدول ۲، شکل ۲).

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۲. جوانه‌زنی هاگ قارچ تریکودرما هارزیانوم در محیط کشت PDA، ۲۴ ساعت پس از خاتمه‌ی پرتودهی با دزهای مختلف گاما

دز (گری)	۰	۵۰	۱۵۰	۲۰۰	۲۵۰	۳۰۰	۳۵۰	۴۰۰	۴۵۰
جوانه‌زنی	۸۴/۵	۸۱/۱	۷۳/۹	۵۹/۷	۴۳/۴	۱۵/۵	۱۱/۹	۹/۷	۰
(میلی‌متر)	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	(g)	(g)	(h)

میانگین‌های با حروف مشترک در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

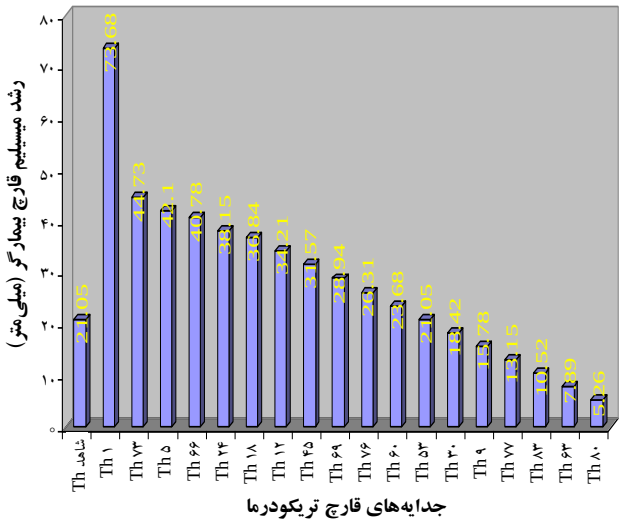


شکل ۲. تصویر میکروسکوپی هاگ‌های جوانه‌زده پس از پرتودهی با شاهد (A) و دو دز مختلف (B و C).

۴.۳ توانایی آنتاگونیستی جدایه‌های جهش یافته‌ی تریکودرما در برابر بیمارگر ریزوکتونیا سولانی

تعداد ۷۰ جدایه‌ی جهش یافته، در آزمایش کشت متقابل، از رشد میسیلیمی-۴ ریزوکتونیا سولانی ممانعت کردند (شکل ۳). آزمون آنتاگونیستی در برابر ریزوکتونیا سولانی نشان داد که جدایه‌های جهش یافته در مقایسه با نمونه‌ی شاهد از توانایی آنتاگونیستی بالایی برخوردار بودند (شکل ۴).

شکل ۳. آزمون آنتاگونیستی جدایه‌های جهش یافته‌ی تریکودرما هارزیانوم.



شکل ٤. نتایج آزمون آنتاگونیستی جهش یافته‌های تریکودرما هارزیانوم در برابر بیمارگر ریزوکتونیا سولانی.

با توجه به نتیجه‌های به دست آمده در این پژوهش، حدود ٪۶۹/۲۳ جدایه‌های جهش یافته‌ی حاصل، توانایی آنتاگونیستی بالاتری نسبت به جدایه‌ی شاهد (مادری) داشته‌اند، که نشان می‌دهد که تعداد قابل توجهی از جهش‌های تصادفی ناشی از پرتودهی مطلوب بوده‌اند. در حالی که در ٪۳/۸۴ جدایه‌های جهش یافته تفاوت در قدرت آنتاگونیستی نسبت به جدایه‌ی شاهد از نظر آماری معنی‌دار نبود و جهش‌های احتمالی یا در مکان‌های ژنومی غیرمرتبط با ژن‌های دخیل در سازوکار آنتاگونیستی بوده‌اند و یا در دسته‌ی جهش‌های خاموش[۱۵] می‌گنجند. از سوی دیگر تحلیل داده‌های حاصل از این مطالعه نشان داد که تنها ٪۲۶/۹۲ جدایه‌های جهش یافته‌ی حاصل، توانایی آنتاگونیستی کم‌تری نسبت به جدایه‌ی شاهد داشته‌اند (جدول ۳). بر این اساس می‌توان نتیجه گرفت که تعداد اندکی از جهش‌های تصادفی حاصل از پرتودهی گامایی در این مطالعه منجر به جهش‌های نامطلوب در ژنوم قارچ تریکودرما شده است.

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۳. توانایی آنتاگونیستی جدایه‌های جهش یافته‌ی تریکودرما هارزیانوم در مقایسه با شاهد

بیش‌تر از شاهد	مشابه شاهد	کم‌تر از شاهد
٪ ۶۹٫۲۳	٪ ۳٫۸۴	٪ ۲۶٫۹۲

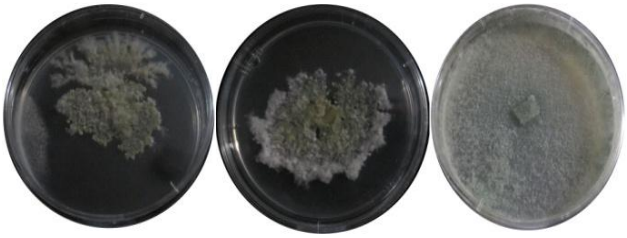
در مطالعه‌های پیشین نیز گزارش شده که پرتودهی گامایی در کنترل زیستی هم‌زمان اسکلروتیم رولفیزی و ریزوکتونیا سولانی توسط گونه‌های تریکودرما هارزیانوم مؤثر است [۱۳] و در گونه‌ی تریکودرمای ویرنس، القای جهش با استفاده از پرتو گاما هم‌زمان در افزایش قدرت رشد، رقابت و هاگ‌زایی قارچ تریکودرما و افزایش بیان ژن‌های مرتبط با افزایش مقاومت در برابر ریزوکتونیا سولانی همراه بوده است [۱۱] از نتایج مشابهی که در این مطالعه به دست آمده است می‌توان به این نتیجه رسید که با استفاده از روش القای جهش با پرتو گاما امکان ایجاد جهش‌یافته‌هایی که قابلیت کنترل زیستی بیمارگرهای گیاهی در آن‌ها ارتقا یافته است وجود دارد.

۵.۳ ویژگی‌های ریخت‌شناسی جدایه‌های جهش یافته

از ۱۸۶ نمونه‌ی قارچ تریکودرمای جهش یافته، تعداد ۲۷ نمونه‌ی قارچ تریکودرما هارزیانوم که قدرت رشد مناسبی داشتند به همراه شاهد (جدایه‌ی مادری) انتخاب شدند. این ۲۷ نمونه از نظر ویژگی‌های ریخت‌شناسی از تنوع زیادی برخوردار بوده و در ۸ گروه مختلف قرار گرفتند: از نظر شکل کلنی، ۳۰ درصد دارای حاشیه‌ی گلبرگی و ۷۰ درصد دارای حاشیه‌ی صاف (مشابه جدایه‌ی مادری) بودند. از لحاظ رنگ، کلنی‌های حاصل دارای سه رنگ (سبز روشن، سبز معمولی، سبز تیره) بودند (شکل ۵)؛ فراوانی هر یک از این فنوتیپ‌ها در جدول ۴ داده شده است.

۶.۳ رابطه‌ی ویژگی‌های ریخت‌شناسی با توانایی آنتاگونیستی قارچ تریکودرما هارزیانوم

براساس نتیجه‌های حاصله، جدایه‌های جهش یافته‌ی قارچ تریکودرما هارزیانوم در مقایسه با شاهد، بعد از شمارش کامل تعداد هاگ با لام همی‌سایتومتر با تیره شدن رنگ سبز کلنی قارچ که ناشی از افزایش میزان هاگ بود، درصد بازدارندگی از رشد میسیلیمی قارچ بیمارگر، یا به عبارتی توانایی آنتاگونیستی جدایه‌های جهش یافته‌ی تریکودرما هارزیانوم افزایش یافت



شکل ۵. تنوع ویژگی‌های ریخت‌شناسی جدایه‌های جهش یافته‌ی تریکودرما هارزیانوم.

جدول ٤. ویژگی‌های ظاهری کلنی در جدایه‌های جهش یافته قارچ تریکودرما هارزیانوم

الگوی رشد کلنی	صاف	صاف	صاف	گلبرگی	گلبرگی	گلبرگی
رنگ کلنی	سبز روشن	سبز معمولی	سبز تیره	سبز روشن	سبز معمولی	سبز تیره
درصد جمعیت	۲۲	۲۲	۲۶	۱۱	۸	۱۱

(جدول ۴). در نتیجه می‌توان گفت بین رنگ کلنی (میزان هاگ‌زایی) و میزان توانایی آنتاگونیستی رابطه‌ی مستقیم وجود دارد. مطالعه‌های پیشین نشان داده‌اند که با تیره‌تر شدن رنگ کلنی و افزایش میزان هاگ‌زایی، توانایی آنتاگونیستی قارچ نیز افزایش می‌یابد [۱۰]. نتایج این پژوهش نشان داد که می‌توان بین ویژگی‌های ریخت‌شناسی کلنی‌های (قدرت تکثیر و هاگ‌زایی) و میزان توانایی آنتاگونیستی آن‌ها ارتباط معنی‌داری برقرار کرد. از آن‌جایی که حدود ٪۶۹٫۲۳ جدایه‌های جهش یافته‌ی حاصل از پرتودهی گامایی نتایج مطلوبی به دنبال داشته و منجر به افزایش توانایی آنتاگونیستی جدایه شده است، پرتودهی گامایی را می‌توان به عنوان ابزاری موفق در دست‌یابی به منبع‌های کنترل زیستی موفق‌تر توصیه نمود.

تشکر و قدردانی

از همکاران طرح «کنترل بیماری‌های خاکزاد گیاهی با استفاده از فن‌آوری‌های هسته‌ای و مولکولی» در پژوهشکده‌ی کشاورزی هسته‌ای پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی که در انجام این مطالعه ما را یاری داده‌اند تشکر و قدردانی می‌نماییم.

Archive of SID
www.SID.ir

پی‌نوشت‌ها

1. Rhizoctonia
2. Rhizoctonia solani
3. Anastamosis group
4. Trichoderma harzianum
5. Hypocrea
6. Randon mutagenesis
7. Colletotrichum capsisi
8. Trichoderma virens
9. Sclerotium cepivorum
10. Sclerotium rolfsii
11. Botrytis cinerea
12. Fusarium oxysporum
13. Penicillium expansum
14. Fusarium solani sp.phaseoli
15. Silent mutation

مرجع‌ها

[1] R. Moradi, S. Shahbazi, H. Ahari Mostafavi, M. Mirmajlesi, M. Ebrahimi Determine the appropriate dose of radiation to induce mutations and study on morphological effects in Trichoderma fungi, First Congress of science and new technologies in agriculture, Zanjan University, 29 (2011) 10-12.

[2] R. Vilgalis, M.A. Cubeta, Molecular systematics and population biology of Rhizoctonia Annual Review of Phytopathology, 32 (1994) 135-155.

[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 (1996) 43-50.

[4] W.M. Haggag, H. Abdel-Latif, A. Mohamed, Biotechnological aspects of microorganisms used in plant biological control, American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture, 1 (2007) 7-12.

[5] C.R. Howell, Mechanisms employed by Trichoderma species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts, USD/ARS southern plains Agricultural Research center (2009).

[6] I. Chet, G. E. Harman, R. Baker, Trichoderma hamatum: Its hyphal interactions with Rhizoctonia solani and Pythium spp, Microbial Echology, 7 (1) (2005) 29-38.

[7] H.R. Etebarian, Evaluation of Trichoderma isolates for biological control of charcoal stem rot in melon caused by Macrophomina phaseolina, Journal of Agriculture Science Technology, 8 (2006) 243-250.

[8] S. Shahbazi, R. Moradi, N. Safaei, H. Ahari Mostafavi, M. Mirmajlesi, Detoxification of fusarium Doxynivalenon using Glucosyl-transferase, The First National Conference on Sustainable Agriculture, Azad University, 1 (2011) 1-4.

[9] H. Ahari Mostafavi, The application of nuclear technology in the management of weeds and plant diseases, Second National Conference on the application of nuclear technology in agricultural sciences and natural resources, Nuclear Science and Technology Research Institute, (2008) 331-335.

[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 (1998) 173-184.

[11] M. Baek, C.R. Howell, C.M. Kenerley, The role of an extracellular chitinase from Trichoderma virens (Gv29-8) in the biocontrol of Rhizoctonia solani, Curr. Genet. 35 (1999) 41-50.

[12] M. Mukherjee, R. Hadar, P.K. Mulherjee, B.A. Horwitz, Homologus expression of a mutated beta-tubulin gene dose not conferes benomyl resistance on Trichoderma harzianum, J. Applied Microbiol, 95 (2003) 861-867.

[13] 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) (2003) 10-20.

[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, 5(2) (2002) 151-164.

Archive of SID

www.SID.ir

[15] H. Abdel-Latif, A. Mohamed, W.M. Haggag, Biocontrol potential of salinity tolerant mutants of Trichoderma harzianum against Fusarium oxysporum causing tomato wilt disease, Arab J. Biotech, 8 (1) (2005) 35-48.

[16] H. Ahari Mostafavi, M. Mirjalili, M. Mirmajlesi, H. Fathollahi, M. Mansouri Pour, The effect of gamma rays on the spore germination and hypha growth of Penicillium expansum, Third National Conference on the application of nuclear technology in agricultural sciences and natural resources, Nuclear Science and Technology Research Institute, (2010) 485-479.

[17] H. Ahari Mostafavi, N. Safaei, B. Naserian, H. Fathollahi, H. Dorri, Evaluation of biological control of bean root rot disease using non-pathogenic mutants of Fusarium solani f.sp. phaseoli, J. of Research in plant production (Agricultural Sciences and Natural Resources), 16 (3) (2007) 33-42.

[18] B. Sneh, M. Zeidan, M. Ichielevich-Austet, I. Barash, Y. Koltin, Increased growth responses induced by a non pathogenetic isolate of Rhizoctonia solani, Can. J. Bot. 64 (1989) 2372-2378.

[19] C.E. Windels, D.J. Nabben, Characterization and pathogenicity of anastamosis group of Rhizoctonia solani, isolated from Beta vulgaris Phytophatology, 79 (1989) 83-88.

Archive of SID

www.SID.ir