مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال سوم، شماره چهارم، بهار و تابستان ۱۳۹۲ (۱۱۷-۱۰۹)

Crop Biotech.
Spring & Summer (2013) 4:109-117

بررسی تأثیرات پرتو گاما بر خصوصیات مورفولوژیکی و آنتاگونیستی قارچ *Trichoderma harzianum*

رضا مرادی[۱]، سمیرا شهبازی[۲]*، حسین اهری مصطفوی[۳]، محمدعلی ابراهیمی[۴]، حامد عسکری[۵] و سید مهیار میرمجلسی[۶]

۱، دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ۲، استادیار گروه کشاورزی‌هسته‌ای، پژوهشکده تحقیقات کشاورزی، پزشکی و صنعتی سازمان انرژی اتمی،کرج، ۳، مربی گروه کشاورزی‌هسته‌ای، پژوهشکده تحقیقات کشاورزی، پزشکی و صنعتی سازمان انرژی اتمی، کرج، ۴، استادیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران، ۵، کارشناس‌ارشد صنایع غذایی، همکار گروه کشاورزی‌هسته‌ای، پژوهشکده تحقیقات کشاورزی، پزشکی و صنعتی کرج و ۶، کارشناسی‌ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، همکار گروه کشاورزی هسته‌ای، پژوهشکده تحقیقات کشاورزی، پزشکی و صنعتی کرج

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۲/۸ ـ تاریخ تصویب: ۹۲/۳/۴)

Investigation of Gamma Radiation Effects on Morphological and Antagonistic Characteristics of *Trichoderma harzianum*

R. MORADI[1], S. SHAHBAZI[2]*, H. AHARI MOSTAFAVI[3], M. A. EBRAHIMI[4], H. ASKARI[5] AND M. MIRMAJLESI[6]

1, M. Sc. of Agricultural Biotechnology, Payame Noor University, Tehran, Iran; 2, Assistant Professor, Agricultural, Medical and Industrial Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, Karaj, Iran; 3, M. Sc. of Plant Pathology- Agricultural, Medical and Industrial Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, Karaj, Iran, 4; Assistant Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Payame Noor University, Tehran, Iran; 5, M. Sc. of Food Science and Technology-Agricultural, Medical and Industrial Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, Karaj, Iran. 6; M. Sc. of Plant Pathology- Agricultural, Medical and Industrial Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, Karaj, Iran.

(Received: February 27, 2013 - Accepted: May 25, 2013)

چکیده

در این تحقیق اثر بازدارندگی دزهای مختلف اشعه گاما بر جوانه‌زنی اسپور قارچ *Trichoderma harzianum* و تأثیر آن در خصوصیات مورفولوژیکی و آنتاگونیستی موتانت‌های حاصل در کنترل قارچ بیمارگر *Rhizoctonia solani* بررسی شد. برای این منظور سوسپانسیون اسپور تریکودرما در معرض دزهای ۰، ۵۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰، ۳۵۰، ۴۰۰ و ۴۵۰ گری اشعه گاما قرار گرفت. برای بررسی تأثیر اشعه گاما بر رشد ریسه، قارچ تریکودرما با دزهای ۰، ۴۰۰، ۸۰۰، ۱۲۰۰، ۱۶۰۰، ۲۰۰۰ و ۲۵۰۰ گری پرتوتابی شد. نتایج حاصل نشان داد که پرتوتابی در محدوده دز ۴۵۰ گری به‌طور کامل مانع جوانه‌زنی اسپور قارچ می‌شود و دز ۲۵۰ گری به‌عنوان دامنه دز اپتیمم برای القای جهش در تریکودرما انتخاب شد. همچنین پرتو گاما باعث تنوع در خصوصیات مورفولوژیکی قارچ تریکودرما از جمله شکل، رنگ، اسپوردهی و سرعت رشد ریسه شد. نتایج آزمون آنتاگونیستی نشان داد پتانسیل کنترل‌کنندگی جدایه‌های جهش‌یافته در مقایسه با جدایه مادری (شاهد) در برابر قارچ پاتوژن *R.solani* به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است. براساس نتایج این بررسی، با استفاده از روش القای موتاسیون با پرتوتابی گاما توانایی کنترل بیولوژیکی در قارچ تریکودرما به‌صورت کاملاً معنی‌داری افزایش پیدا می‌کند.

واژه‌های کلیدی: پرتو گاما، جهش، کنترل بیولوژیکی، *Trichoderma harzianum*، *Rhizoctonia solani*

Abstract

In this study, effects of gamma irradiation doses on spore germination of *Trichoderma harzianum* and its effects on morphological and antagonistic capability of the mutants to control *Rhizoctonia solani* have been evaluated. Spore suspension of *Trichoderma* was gamma-radiated by 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 and 450 Gry Gamma ray and the effects on mycelial growth were evaluated by irradiation with 0, 400, 800, 1200, 2000 and 2500 Gry. The results obtained showed that 450 Gry gamma radiations completely blocked the spore germination and 250 Gry was found as the optimum dose to induce mutation in *Trichoderma.* Furthermore, gamma irradiation could change the morphological characteristics such as: colonies shape and color, sporolation and mycelia growth rate. Dual culture test proved that, the mutated isolates had statistically more antagonistic capability against *R. solani* than its parental strains. According to the findings of the present study, bio-control capability of *Trichoderma* could be improved through gamma radiation.

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

نویسنده مسئول: سمیرا شهبازی
E-mail: sshahbazi@nrcam.org

مقدمه

کنترل تلفیقی در مدیریت بیماری‌های گیاهی راهکار اصلی در کشاورزی پایدار امروز است. امروزه مشکلات فراوانی ناشی از کاربرد وسیع سموم شیمیایی در کشاورزی بروز کرده است، که از یک سو هزینه‌های تولید را افزایش داده (میلیاردها تومان هزینه سم‌پاشی انواع محصولات) ایجاد نموده و از سوی دیگر آسیب‌های جبران‌ناپذیر زیست‌محیطی در اکوسیستم طبیعی بروز می‌کند. همچنین باقی‌مانده سموم در محصولات کشاورزی و فرآورده‌های آن‌ها (ورود مستقیم سموم به زنجیره‌غذایی انسان و دام) منجر به افزایش بروز بیماری‌های مختلف از جمله انواع سرطان‌ها شده است (Moradi *et al.*, 2011). در مدیریت عوامل بیماری‌زا پایدارترین و سازگارترین روش با شرایط زیست‌محیطی، استفاده از عوامل کنترل‌کننده بیولوژیک در این سیستم مدیریت تلفیقی می‌باشد. زیرا کاربرد عوامل کنترل بیولوژیک به کاهش کاربرد سموم‌شیمیایی و بالتبع کاهش باقی‌مانده سموم در محیط (منابع خاک و آب) و زنجیره غذایی موجودات زنده می‌انجامد. لذا توجه محققان 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. به‌خصوص در مورد بیمارگرهای خاکزاد که دشواری‌هایی از نظر عملیات کاربرد سموم و کاهش میزان تأثیر سموم در خاک، منجر به استفاده از دزهای بالاتر و مخاطرات بیشتر زیست‌محیطی در سال‌های اخیر شده است.

Rhizoctonia یکی از بیمارگرهای خاکزاد بسیار مهم در کشاورزی می‌باشد که فاقد اسپور غیرجنسی بوده و سختینه‌های آن در خاک باعث بقاء و انتقال بیماری از یک فصل به فصل دیگر می‌شود. ریشه یونانی کلمه *Rhizoctonia* به‌معنای مرگ ریشه‌ای است، زیرا این قارچ به‌سرعت به ریشه گیاهان نهاندانه حمله کرده و آن‌ها را از بین می‌برد. علائم بیماری ناشی از فعالیت این قارچ شامل پوسیدگی بذر، مرگ گیاهچه، پوسیدگی ریشه و طوقه و بلایت برگی در گیاهان مختلف می‌باشد و گونه معروف آن *R.solani* است که تنوع‌ژنتیکی بسیار بالایی از جمعیت آن گزارش گردیده است (Vilgalis and Cubeta. 1994). شبه جنس ریزوکتونیا براساس تعداد هسته‌های موجود در هر سلول هیف، به سه دسته ریزوکتونیاهای تک‌هسته‌ای، دوهسته‌ای و چندهسته‌ای گروه‌بندی شده است. دو گروه اخیر براساس مفهوم گروه‌بندی آناستاموزی AG[1] به چندین گروه که از لحاظ ژنتیکی مجزا هستند تقسیم‌بندی می‌شود (Carling. 1996). با توجه به عدم‌کارایی کافی و دشواری‌های کاربرد سموم شیمیایی در خاک و تأثیر ناکافی آن بر سختینه (اندام مقاوم) در این بیمارگر و به‌علاوه عدم‌آرایه منابع قابل قبول مقاومت به *Rhizoctonia solani* در گیاهان میزبان، کنترل بیولوژیک از روش‌های امیدبخش در راستای کاهش خسارات ناشی از این بیمارگر به‌شمار می‌رود و گونه‌های مختلف تریکودرما به‌ویژه *T. harzianum* در بین عوامل کنترل بیولوژیک معرفی شده از تأثیر و کارایی بهتری برخوردار است (Haggag. 2007).

جنس تریکودرما *Trichoderma spp* که از عوامل کنترل بیولوژیک بسیار موفق بر روی قارچ های خاکزاد بوده و مرحله غیرجنسی آسکومیست‌های جنس *Hypocrea spp.* می‌باشند که به‌عنوان عامل کنترل بیولوژیک بر علیه دامنه بسیار وسیعی از سایر ارگانیسم‌های بیمارگر مانند باکتری‌ها، پروتوزوآها، نماتدها و حتی ویروس‌ها شناخته می‌شود (Howell. 2009). قدرت زنده‌مانی مناسب و بالای تریکودرما به‌دلیل طبیعت خاکزاد آن و قدرت رقابت بالایی که در شرایط خاک با سایر ارگانیسم‌ها دارد و آسانی کاربرد تریکودرما در خاک از مزیت‌های دیگری است که باعث شده است در بین عوامل کنترل بیولوژیک *R.solani* توجه ویژه‌ای به قارچ تریکودرما و به‌خصوص گونه *T. harzianum* معطوف گردد (Chet *et al.*, 2005). مطالعات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گسترده‌ای بر روی تعامل تریکودر ما با رایزوکتونیا انجام شده است. نتایج بررسی‌ها نشان داده است که ریسه‌های تریکودرما در طی فرآیند آنتاگونیسم به دور ریسه‌های *R.solani* پیچیده و به درون آن‌ها نفوذ می‌کنند، که این نفوذ با ترشح همزمان آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره‌سلولی (کیتینازها و گلوکانازهای خارج سلولی) در ریسه‌های تریکودرما همراه است (Etebarian. 2006).

پرتوتابی با اشعه گاما سبب تغییر ساختمان شیمیایی مولکول‌های ماده وراثتی می‌شود که نتیجه آن جهش ژن یا شکستن کروموزوم و ترتیب مجدد بازهای آلی خواهد بود. درصورتی‌که فعالیت این ژن‌های جهش‌یافته به مسیر بیوسنتز یک ترکیب مانند توکسین و یا آنزیم قرار متعلق باشند، این تغییرات در ترادف بازهای آلی و جهش‌ها می‌تواند میزان تولید این ترکیبات را دستخوش تغییر (اعم از افزایش یا کاهش)

1. Anastamosis Group

نماید (Shahbazi *et al.*, 2011).

از سوی دیگر دانشمندان با ایجاد تغییرات ژنتیکی در آنتاگونیست‌ها همواره سعی در افزایش پتانسیل و ارتقای عمل آن‌ها دارند. یکی از روش‌های به‌کار گرفته‌شده برای افزایش قدرت آنتاگونیستی القای موتاسیون تصادفی[1] با به‌کارگیری موتاژن‌های فیزیکی از جمله اشعه فرابنفش و گاما، امواج الکترومغناطیس و ایکس و یا موتاژن‌های شیمیایی مانند اتیل متان سولفانات می‌باشد. البته این القای موتاسیون همیشه مطلوب نبوده است و به‌عنوان مثال به‌کارگیری اشعه فرابنفش سبب کاهش تولید آنزیم‌های سلولاز و پکتیناز در قارچ *Colletotrichum capsisi* (عامل بیماری آنتراکنوز) شده است که موجب کاهش رشد ۴۰ درصدی ریسه‌ها و کاهش ۱۰ درصدی اسپورزایی در موتانت‌ها گردید (Mostafavi. 2009).

ازسوی دیگر گزارشاتی نیز وجود دارد که نشان می‌دهند ایجاد جهش با استفاده از پرتو گاما می‌تواند در افزایش پتانسیل آنتاگونیستی و دست‌یابی به منابع ژنتیکی جدید از عوامل بیوکنترل مؤثر و کارا کمک کند (Howell. 1998). در گونه *T.virens* ایجاد موتاسیون با استفاده از اشعه گاما به افزایش قدرت رشد و رقابت و اسپورزایی قارچ همزمان با افزایش بیان‌ژن‌های مرتبط با افزایش مقاومت به *Rhizoctonia solani* همراه بوده است (Mukherjee. 2003). کارایی جدایه‌های جهش‌یافته *T.harzianum* با استفاده از اشعه گاما نیز در کنترل *Sclerotium cepivorum, S. rolfsii* افزایش چشمگیری یافته است (Haggag. 2002) (Coventry *et al.*, 2006) همچنین پرتوتابی با اشعه گاما در افزایش کنترل بیولوژیکی همزمان *S. rolfsii* و *Rhizoctonia solani* توسط گونه‌های *T. harzianum* مؤثر بوده است (Muusa. 2003). جدایه‌های جهش‌یافته *T. harzianum* با استفاده از اشعه گاما در کنترل *Botrytis cinerea* نیز موفق بوده‌اند (Abdel-Latif *et al.*, 2005). نتایج مشابهی نیز از افزایش قدرت آنتاگونیستی جدایه‌های جهش‌یافته *T. harzianum* با اشعه گاما بر روی *Fusarium oxysporum* به‌دست آمده است (Baek *et al.*, 1999). از پرتو گاما جهت ایجاد جهش در باکتری‌ها، قارچ‌ها و گیاهان استفاده شده و سابقه مطالعاتی محدودی در این زمینه در کشورمان وجود دارد. نتایج پرتوتابی میوه سیب با اشعه گاما در محدوده دز ۳ کیلو گری برای کنترل جوانه‌زنی اسپور و رشد ریسه قارچ عامل بیماری کپک‌آبی (*Penicillium expansum*) نشان داد که به‌طور کاملاً معنی‌داری کاهش می‌یابد (Mostafavi. 2010). پرتوتابی قارچ *Fusarium solani sp.phaseoli* با اشعه گاما باعث کاهش بیماری پوسیدگی ریشه لوبیا و افزایش عملکرد گیاه شد (Mostafavi. 2009). هدف از این تحقیق بررسی تغییرات مورفولوژیکی ناشی از پرتوتابی با اشعه گاما بر روی کنیدیوم‌های قارچ *T. harzianum* و بررسی ارتباط افزایش پتانسیل آنتاگونیستی و برخی خصوصیات مورفولوژیکی در جدایه‌های جهش‌یافته می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری، جداسازی و شناسایی قارچ‌های مورد مطالعه

برای جداسازی قارچ *T. harzianum* از خاک ناحیه ریزوسفر گیاهانی که بدون استفاده از سموم‌شیمیایی در مقایسه با سایر گیاهان شدت بیماری کمتری در آن‌ها مشاهده شده بود و یا نقاطی از مزرعه که به‌طور لکه‌ای گیاهان فاقد علائم بودند، نمونه‌برداری انجام و سوسپانسیون این نمونه‌های خاک را بر روی محیط کشت PDA انتقال داده شدند. کلنی‌های حاصل را بعد از تهیه کشت تک اسپور (به‌منظور خالص‌سازی) با استفاده از کلید شناسایی قارچ‌های ناقص و براساس خصوصیات مورفولوژیکی فیالیدها و فیالوسپورها و انتوژنز کنیدیوم‌ها مورد شناسایی قرار گرفتند.

نمونه‌برداری از قارچ بیمارگر به‌طور تصادفی از مزارع چغندرقند آلوده با علائم پوسیدگی طوقه و ریشه، مرگ گیاهچه، ضعف و زردی عمومی، به‌همراه مقداری خاک منطقه ریزوسفر گیاهان آلوده و همچنین گیاهانی که روی ریشه و طوقه آن‌ها علائم شانکر نیز وجود داشت جمع‌آوری شدند. جداسازی به‌روش طعمه‌گذاری (Sneh. *et al.*, 1986) انجام شد. نمونه‌های خاک در تشتک‌های پتری ۱۰سانتی ریخته و با آب‌مقطر مرطوب گردید و در هر تشتک ۱۰ عدد بذر چغندرقند اتوکلاوشده (به‌عنوان تله قارچ ریزوکتونیا) قرار داده شد و بعد از ۷۲ ساعت در تاریکی و دمای اتاق، بذور چغندرقند روی محیط کشت آب- آگار (WA) قرار داده و کلنی‌های قارچ پس از شناسایی گونه، برای تعیین گروه آناستاموزی به مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند کشور انتقال داده شدند.

بررسی دز ممانعت‌کننده از رشد ریسه

بعد از شناسایی و خالص‌سازی جدایه‌ها بروی محیط

1. Random Mutagenesis

PDA، از کشت‌های هفت روزه، سوسپانسیون اسپور تهیه و شمارش اسپور با استفاده از لام همی‌سایتومتر انجام شد. تعداد ۷۰۰ اسپور در اسفند ۱۳۸۹ در معرض تابش اشعه گاما با هفت دامنه دز ۰، ۴۰۰، ۸۰۰، ۱۲۰۰، ۱۶۰۰، ۲۰۰۰ و ۲۵۰۰ گری (هر یک سه تکرار و در قالب طرح کاملاً 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 اسپورهای پرتودیده برای کشت و محاسبه درصد زنده‌مانی و رشد ریسه بر روی محیط PDA کشت و در انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Haggag *et al.*, 2007).

آزمون دزیابی به‌منظور القای موتاسیون در قارچ تریکودرما

درصد جوانه‌زنی با شمارش اسپورهای جوانه‌زده (در محدوده بزرگ‌نمایی۱۰ میکروسکوپ نوری) برای هر محدوده دز تعیین شد. معیار دز جذبی مناسب برای القای موتاسیون غیرکشنده در ارگانیسم‌ها، ظهور تقریباً ٪۵۰-۴۰ جوانه‌زنی اسپور بعد از پرتوتابی می‌باشد (Mostafavi. 2009). آزمون مقایسه سرعت رشد با اندازه‌گیری قطر کلنی‌های سه، پنج و هفت روزه جدایه‌های جهش‌یافته و مادری انجام شد. به‌منظور ایجاد جهش در قارچ تریکودرما عملیات پرتوتابی با نه دامنه دز ۰، ۵۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰، ۳۵۰، ۴۰۰ و ۴۵۰ گری (برای هر دامنه دز سه تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی)، انجام پذیرفت. دز اپتیمم برای پرتوتابی به‌منظور القای موتاسیون براساس این نتایج انتخاب گردید. کلیه آنالیزهای آماری در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم‌افزار SPSS 11.3 انجام شد.

مقایسه خصوصیات مورفولوژیک جدایه‌های جهش‌یافته قارچ تریکودرما

بعد از پرتوتابی و القای جهش، محیط‌های کشت حاوی تک اسپورهای جوانه‌زده به‌مدت ۱۲ ساعت در انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. کلنی‌های حاصل دو مرتبه واکشت شده و هر بار به محیط کشت PDA جدید منتقل شدند تا از ثابت‌بودن خصوصیات هر کلنی و به توارث‌رسیدن آن اطمینان حاصل شود. بعداز ۵ روز نگهداری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد خصوصیات مورفولوژیک هر کلنی شامل سرعت رشد جوانه‌زنی اسپور، رنگ و شکل کلنی و سرعت رشد ریسه اندازه‌گیری شد. برای تعیین قدرت اسپورزایی، از کلیه نمونه‌ها سوسپانسیون اسپور با رقت یک صدم تهیه و با استفاده از لام هموسایتومتر در محدوده بزرگ‌نمایی۱۰ میکروسکوپ نوری اسپورها را شمرده و در فرمول مربوطه قرار دادیم. کلیه جدایه‌های جهش‌یافته بعد از شمارش اسپور به لحاظ رنگ کلونی با یکدیگر مقایسه شدند.

بررسی قدرت آنتاگونیستی جدایه‌های جهش‌یافته تریکودرما علیه بیمارگر *Rhizoctonia solani*

به‌منظور تعیین میزان قدرت آنتاگونیستی قارچ *T. harzianum* جهش‌یافته از کشت متقابل جدایه‌های جهش‌یافته و شاهد (جدایه مادری) با بیمارگر *R. solani* استفاده گردید. آزمون کشت متقابل شامل کشت تک کلنی جدایه‌های تریکودرمای جهش‌یافته با تک کلنی جدایه قارچ بیمارگر می‌باشد. از آن‌جایی‌که این بیمارگر فاقد اسپور می‌باشد نتایج حاصله می‌تواند معیار قابل قبولی از قدرت آنتاگونیستی هر یک از جدایه‌ها را مشخص نماید و احتمال بروز آلودگی و تداخل کشت‌های دو قارچ به حداقل ممکن خواهد رسید. در این مطالعه ۹۶ جدایه *T. harzianum* جهش‌یافته حاصل از پرتوتابی با اشعه گاما به همراه شاهد (کشت متقابل همزمان جدایه غیرموتانت) با قارچ بیمارگر *R. solani* (AG-4) کشت متقابل شد. جدایه‌ها به‌طور همزمان با فاصله ۶ سانتی‌متر از یکدیگر کشت داده شدند. سرعت رشد کلنی‌های *R. solani* در سه روز متوالی پس از کشت (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) اندازه‌گیری و در فرمول زیر قرار داده شد و بر این اساس درصد ممانعت‌کنندگی هریک از جدایه‌های جهش‌یافته و شاهد محاسبه گردید.

$$IG = \frac{C - T}{C} \times ۱۰۰$$

IG: درصد بازدارندگی رشد میسیلیومی قارچ بیماری‌زا

C: قطر کلنی قارچی بیمارگر در بدون کشت متقابل با تریکودرما

T: قطر کلنی قارچی بیمارگر در کشت متقابل با تریکودرما

نتایج و بحث

جداسازی و شناسایی قارچ‌های مورد مطالعه

براساس نتایج به‌دست‌آمده جدایه‌های قارچ جدا شده از خاک اطراف ریشه پس از خالص‌سازی، براساس خصوصیات مورفولوژیکی فیالیدها و فیالوسپورها و انتوژنز کنیدیوم‌ها به گونه *T. harzianum* متعلق بودند.

قارچ بیمارگر جمع‌آوری شده ازمزارع چغندرقند آلوده با علائم پوسیدگی ریشه و طوقه نیز به گونه *R.solani* تعلق داشتند. براساس آزمون هم‌دهانی ریسه جدایه‌های مذکور با

جدایه‌های استاندارد بین‌المللی موجود در آزمایشگاه قارچ‌شناسی پژوهشکده تحقیقات چغندرقند کشور، جدایه‌های *R.solani* جداشده در این تحقیق همگی در گروه آناستاموزی ۴ (AG-4) قرار دارند. بررسی خصوصیات و بیماری‌زای گروه‌های آناستاموزی *R.solani* جداشده از چغندرقند در یک تحقیق جامع در آمریکا نشان داده است که AG-4 گروه آناستاموزی غالب مرگ گیاهچه چغندرقند می‌باشد (Haggag. 2007)

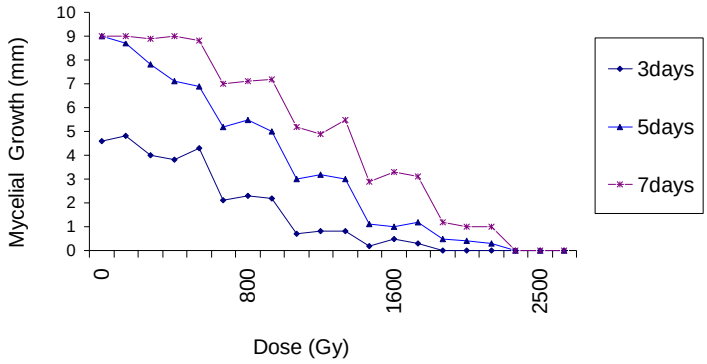
بررسی دز ممانعت‌کننده از رشد ریسه

پرتودهی در محدوده ۲۵۰۰ گری توانست به‌طور کامل رشد ریسه قارچ تریکودرما را کنترل نماید. با افزایش دز سرعت رشد ریسه کاهش می‌یابد تا جایی‌که در محدوده ۱۲۰۰ گری، تولید اسپور با تأخیر انجام می‌شود و طی ۳ روز اول، تنها رشد ریسه‌ای مشاهده گردید (جدول۱، شکل ۱). در نتایج سایر مطالعات نیز مشاهده شده بود که پرتوتابی میوه سیب با اشعه گاما در محدوده دز ۳ کیلو گری برای کنترل جوانه‌زنی اسپور و رشد ریسه قارچ عامل بیماری کپک‌آبی (*Penicillium expansum*) به‌طور کاملاً معنی‌داری کاهش می‌یابد (Mostafavi. 2009). با توجه به اینکه *T. harzianum* از نظر تاکسونومیکی قرابت بالایی با *Penicillium expansum* دارد نزدیک‌بودن این دو دامنه دز ممانعت‌کننده کاملاً قابل‌قبول به‌نظر می‌رسد.

جدول ۱- تأثیر اشعه گاما بر رشد ریسه قارچ *T. harzianum* بر روی محیط کشت PDA

	پرتوتابی با اشعه گاما (Gray)						
day	0	400	800	1200	1600	2000	2500
3	4.56 (A)	4 (B)	2.2 (C)	0.76 (D)	0.16 (E)	0 (E)	0 (E)
5	8.9 (A)	7.26 (B)	5.23 (C)	3 (D)	1.1 (E)	0.4 (F)	0 (G)
7	9 (A)	8.9 (A)	7.1 (B)	5.2 (C)	3.1 (D)	1 (E)	0 (F)

ns: در هر ردیف، میانگین‌های با حروف مشترک در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.



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

القای موتاسیون در قارچ تریکودرما با استفاده از اشعه گاما

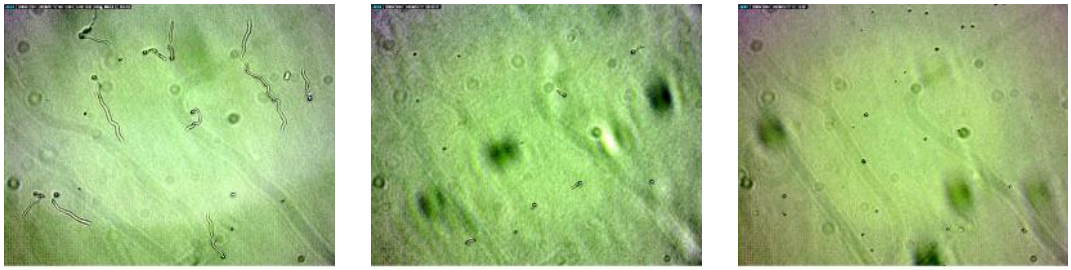
مقایسه درصد جوانه‌زنی اسپور بعد از گذشت ۲۴ ساعت از پرتوتابی با دزهای مختلف، تیمارها را در چند گروه مختلف قرار داد. براین اساس تأثیر پرتوتابی با اشعه گاما در محدوده دز ۲۵۰ گری هیچ‌گونه ممانعتی برای رشد ریسه نداشته و نیز ۴۶/۷٪ اسپورهای قارچی نیز توانایی جوانه‌زنی خود را حفظ نموده‌اند. از آن‌جایی‌که معیار دز جذبی مناسب برای القای موتاسیون غیرکشنده در ارگانیسم‌ها، ظهور تقریباً ٪ ۵۰-۴۰ جوانه‌زنی اسپور بعد از پرتوتابی می‌باشد (Mostafavi. 2009)، دز اپتیمم القای موتاسیون انتخاب و جدایه‌های جهش‌یافته با این دز تهیه گردید (جدول۲، شکل۲).

جدول ۲- تأثیر اشعه گاما بر جوانه‌زنی اسپور قارچ *T. harzianum* بر روی محیط کشت PDA بعد از ۲۴ ساعت

پرتوتابی با اشعه گاما (Gray)

0	50	150	200	250	300	350	400	450
84.5	81.1	73.9	59.7	43.4	15.5	11.9	9.7	0
(A)	(B)	(C)	(D)	(E)	(F)	(G)	(G)	(H)

ns: در هر ردیف، میانگین های با حروف مشترک در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.



0 Gray (شاهد) 250 Gray 450 Gray

شکل ۲- تصویر میکروسکوپی اسپورهای جوانه‌زده در سه دامنه دز با شاهد

نتایج بررسی پتانسیل آنتاگونیستی جدایه‌های جهش‌یافته تریکودرما علیه بیمارگر *R. solani*

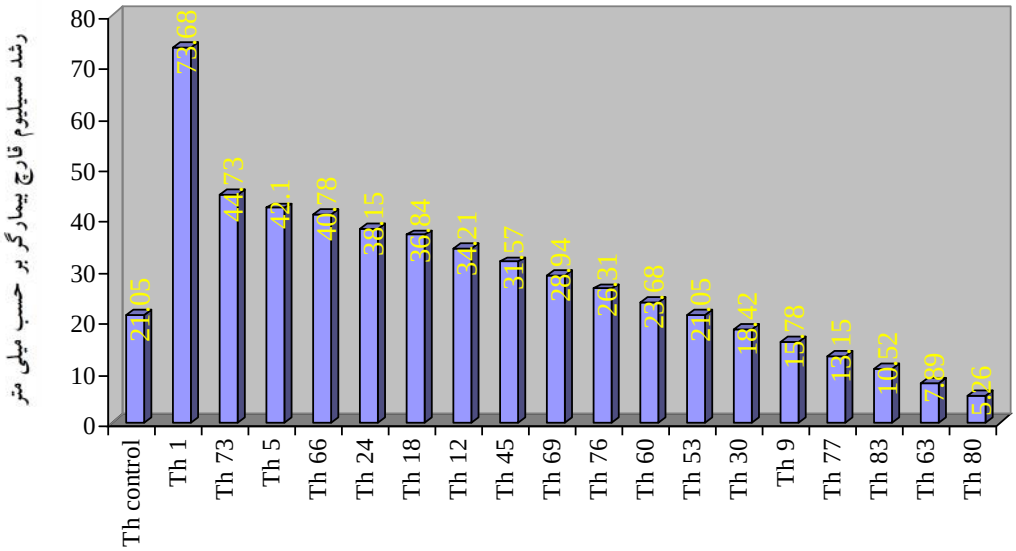
تعداد زیادی از جدایه‌های جهش‌یافته در آزمایش کشت متقابل از رشد میسیلیومی *R.solani* (AG-4) جلوگیری کردند (شکل۳). آزمون آنتاگونیستی علیه *R.solani* نشان داد که جدایه‌های جهش‌یافته در مقایسه با نمونه شاهد از پتانسیل آنتاگونیستی بالایی برخوردار بودند (شکل۴).

Th 9 Th 73 Th شاهد

شکل ۳- آزمون آنتاگونیستی جدایه‌های جهش‌یافته *T. harzianum*

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق در حدود ۶۹/۲۳ ٪ جدایه‌های جهش‌یافته حاصل، پتانسیل آنتاگونیستی بالاتری نسبت به جدایه شاهد (مادری) داشته‌اند، که نشان می‌دهد تعداد قابل توجهی از جهش‌های تصادفی ناشی از پرتوتابی با اشعه گاما مطلوب بوده‌اند. درحالی‌که در ۳/۸۴٪ جدایه‌های جهش‌یافته تفاوت در قدرت آنتاگونیستی نسبت به جدایه شاهد (مادری) از نظر آماری معنی‌دار نبوده است و جهش‌های احتمالی یا در مکان‌های ژنومی غیرمرتبط با ژن‌های دخیل در مکانیسم آنتاگونیستی بوده‌اند و یا در دسته جهش‌های خاموش (Silent Mutation) می‌گنجند. از سوی دیگر آنالیز داده‌های حاصل از این مطالعه نشان داده‌اند که تنها ۲۶/۹۲ ٪ از جدایه‌های جهش‌یافته حاصل، توانایی آنتاگونیستی کمتری نسبت به جدایه شاهد (مادری) داشته‌اند. بر این اساس می‌توان نتیجه گرفت تعداد اندکی از جهش‌های تصادفی حاصل از پرتوتابی با اشعه گاما در این مطالعه منجر به جهش‌های نامطلوب در ژنوم قارچ تریکودرما شده است. در مطالعات قبلی نیز گزارش شده است که پرتوتابی با اشعه گاما در افزایش کنترل بیولوژیکی همزمان *S. rolfsii* و *Rhizoctonia solani* توسط گونه‌های *T. harzianum* مؤثر بوده است (Abdel-Latif *et al.*, 2005) و در گونه *T.virens* ایجاد موتاسیون با استفاده از اشعه گاما به افزایش قدرت رشد و رقابت و اسپورزایی قارچ همزمان با افزایش بیان

ژن‌های مرتبط با افزایش مقاومت به *Rhizoctonia solani* همراه بوده است (Coventry *et al.*, 2006). از نتایج مشابهی که در این مطالعه به‌دست‌آمده است می‌توان به این نتیجه رسید که با استفاده از روش القای موتاسیون با پرتو گاما امکان ایجاد موتانت‌هایی که قابلیت کنترل بیولوژیک بیمارگرهای گیاهی در آن‌ها ارتقاء یافته است وجود دارد.



شکل ۴- نتایج آزمون آنتاگونیستی *T. harzianum* علیه *R.solani*

بررسی خصوصیات مورفولوژیک جدایه‌های جهش‌یافته

از ۱۸۶ نمونه قارچ تریکودرمای جهش‌یافته، تعداد ۲۷ نمونه قارچ *T. harzianum* که قدرت رشد مناسبی داشتند به همراه شاهد (جدایه مادری) انتخاب شدند که از نظر مورفولوژیکی تنوع زیادی برخوردار بودند. این ۲۷ نمونه از نظر خصوصیات موفولوژیک در ۸ گروه مختلف قرار گرفتند: از نظر شکل کلونی ۳۰ درصد دارای حاشیه گلبرگی مشابه جدایه شاهد و ۷۰ درصد دارای حاشیه صاف مشابه جدایه مادری (شاهد) بودند. از لحاظ رنگ، کلنی‌های حاصل دارای سه رنگ (سبز روشن، سبز معمولی و سبز تیره) بودند (شکل۵) که فراوانی هر یک از این فنوتیپ‌ها در جدول ۳ مشاهده می‌شود.

جدول۳- نتایج بررسی خصوصیات ظاهری کلنی در جدایه‌های قارچ *T.harzianum*

الگوی رشد کلنی	گلبرگی	گلبرگی	گلبرگی	صاف	صاف	صاف
رنگ کلنی	سبز تیره	سبز معمولی	سبز روشن	سبزتیره	سبز معمولی	سبز روشن
درصد جمعیت	11	8	11	26	22	22

شکل ۵- تنوع خصوصیات مورفولوژیکی جدایه‌های جهش‌یافته *T. harzianum*

بررسی رابطه خصوصیات مورفولوژیک با قدرت آنتاگونیستی قارچ *T. harzianum*

داده‌های حاصل از آزمایشات انجام‌شده مشخص نموده است که در جدایه‌های جهش‌یافته قارچ *T. harzianum* در مقایسه با شاهد با تیره‌شدن رنگ سبز کلونی قارچ که ناشی از افزایش میزان اسپور می‌باشد، درصد بازدارندگی رشد میسیلیومی قارچ بیمارگر، یا به عبارتی میزان قدرت آنتاگونیستی افزایش می‌یابد (جدول۴). در نتیجه می‌توان گفت رابطه مستقیم بین رنگ کلنی (میزان اسپورزایی) و میزان قدرت آنتاگونیستی وجود دارد. مطالعات گذشته نشان داده‌اند که با تیره‌ترشدن رنگ کلنی و افزایش میزان اسپورزایی، پتانسیل قدرت آنتاگونیستی قارچ نیز افزایش می یابد (Howell. 1998; Haggag. 2002). نتایج این تحقیق نشان داد که می‌توان بین خصوصیات مورفولوژیکی کلنی‌ها (قدرت تکثیر و اسپورزایی) جدایه‌های موتانت و میزان قدرت آنتاگونیستی آن‌ها ارتباط معنی‌داری برقرار نمود. از آن‌جایی‌که در حدود ۶۹/۲۳٪ جدایه‌های جهش‌یافته حاصل از پرتوتابی با اشعه گاما جهش‌های تصادفی نتایج مطلوبی به دنبال داشته است و منجر به افزایش قدرت آنتاگونیستی جدایه شده است، پرتوتابی با اشعه گاما را می‌توان به‌عنوان ابزار موفقی در دست‌یابی به منابع کنترل بیولوژیک موفق‌تر توصیه نمود.

جدول ۴- بررسی میزان پتانسیل قدرت آنتاگونیستی *T. harzianum* در مقایسه با شاهد

درصد ممانعت‌کنندگی از رشد ریسه بیمارگر (IG)		
افزایش (بیشتر از شاهد)	حد واسط (مشابه شاهد)	کاهش (کمتر از شاهد)
٪ ۶۹/۲۳	٪ ۳/۸۴	٪ ۲۶/۹۲

سپاسگزاری

از همکاران طرح "کنترل بیماری‌های خاکزاد گیاهی با استفاده از فناوری‌های هسته‌ای و مولکولی" در گروه پژوهشی کشاورزی هسته‌ای پژوهشکده تحقیقات کشاورزی سازمان انرژی اتمی که در انجام این مطالعه ما را یاری داده‌اند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

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

Baek M, Howell CR, Kenerley CM (1999) The role of an extracellular chitinase from (*Trichoderma virens*) (Gv29-8) in the biocontrol of (*Rhizoctonia solani*). Curr. Genet. 35: 41-50.

Carling DE, Kuninaga S, Brainard KA (1996) 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.

Chet I, Harman GE, Baker R (2005) *Trichoderma hamatum*: Its hyphal interactions with (*Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp). Microb. Ecology 7: 29-38.

Coventry E, Noble R, Mead A, Marin FR, Perez JA, Whips JM (2006) Allium White Rot Suppression with Composts and (*Trichoderma viride*) in Relation to Sclerotia Viability J. of Biological Control, 96 (9): 1009-1021.

Etebarian HR (2006) Evaluation of *Trichoderma* isolates for biological control of charcoal stem rot in melon caused by (*Macrophomina phaseolina*). Journal Agriculture Science Technology. 8: 243-250.

Haggag WM (2002). 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): 151-164.

Haggag WM, Abdel-Latif H, Mohamed A (2007) Biotechnological Aspects of Microorganisms Used in Plant Biological Control. American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture 1: 7-12.

Howell CR (1998) The role of antibiosis in bicontrol. In Harman, G. E. and Kubicek, C. P. (eds.). (*Trichoderma* and

Gliocladium). Taylor and Francis, Londan, pp. 173-184.

Howell CR (2009) 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.

Moradi R, Shahbazi S, Mostafavi H, Mirmajlesi M, Ebrahimi M A (2011) Appointment suitable Irradiation in suggestion desired mutation and evaluation of morphological effect in (*Trichoderma*) The 1st Congress of Agricultural Science and Technology. The University of Zanjan. p. 27.

Mostafavi H (2009). Application nuclear technology in management parasits and plant disease. the second congress national application nuclear technology in agricalture. Nuclear Science and Technology Research institute of Karaj. p. 331-335.

Mostafavi H, Safaee N, Fatollahi H (2009). Evaluation Biological control beans root rot with mutants safe isolate (*Fusarium solani f.sp. phaseoli*). Review research Plant product. N. 3

Mostafavi H, Mirjalili M, Mirmajlesi M, Fatollahi H, Mansoripor M (2010). Evaluation Gamma radiation effect on decrease spor Germination and mecylial growth (*Penicillium expansum*). Agricultural, Medical and Industrial Research School (Nuclear Science and Technology Research Institute, Karaj). p: 479-485.

Mukherjee M, Hadar R, Mulherjee PK, Horwitz BA (2003) Homologus expression of a mutated beta-tubulin gene dose not confers benomyl resistance on (*Trichoderma harzianum*). J. Applied Microbiol. 95: 861-867.

Muusa TA, Rizk MA (2003). Impact of Gamma radiation stresses on control of sugarbeet pathogens (*R. solani* and *S. rolfsii*). Pakistan J. of Plant Pathology 2(1): 10-20.

Shahbazi S, Moradi R, Safaee N, Mostafavi H, Mirmajlesi M (2011). Detoxification of fusarium deoxynivalenol by glycosyltransferases. National Congress of Stable Agriculture. Varamin University. P: 1-4.

Sneh, B, Zeidan M, Ichielevich- Austet M, Barash I, and Koltin Y (1986). Increased growth responses induced by a non pathogenetic isolate of (*Rhizoctonia solani*). Can. J. Bot. 64: 2372-2378.

Vilgalis R, Cubeta MA (1994) Molecular systematics and population biology of (*Rhizoctonia*) annual Review of Phytopathology. 32: 135-155.

Windels CE, Nabben DJ (1989). characterization and pathogenicity of anastamosis group of (*Rhizoctonia solani*). isolated from *Beta vulgaris* Phytophatology 79: 83-88.