مجموعه مقالات
چهارمین همایش ملی کاربرد فناوری هسته‌ای در علوم کشاورزی و منابع طبیعی
(۲۹-۳۰ اردیبهشت، ۱۳۹٤، پژوهشکده کشاورزی هسته ای)
The 4th National Congress on Nuclear Technology Application in Agricultural & Natural Resource Sciences (19-20 May, 2015, Nuclear Agriculture Research School)

بررسی تنوع ژنتیکی گونه‌های موجود دربین موتانت‌های قارچ تریکودرمای جهش یافته با اشعه گاما با استفاده از نشانگرهای مولکولی

هدی اصل فلاح [۱]، سمیرا شهبازی* [۲]، حامد عسکری [۲]، محمد علی ابراهیمی [۱]

۱.گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه پیام نور کرج ، ۲. گروه گیاهپزشکی، پژوهشکده کشاورزی هسته ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای، سازمان انرژی اتمی ایران

* مسئول مکاتبات: sshahbazi@nrcam.org

چکیده: به منظور القای جهش ژنتیکی در دو گونه *T. viride* و *T.harzianum* سوسپانسیون اسپور هر یک از آنها در معرض دزهای ۰ تا ۴۵۰ گری اشعه گاما در دستگاه گاما سل قرار گرفت. آزمون کشت متقابل نشان داد که، تمام جدایه‌های جهش یافته *T. viride* از لحاظ آماری ($p>0.05$) قدرت آنتاگونیستی بالاتری نسبت به جدایه مادری در مقابل *Fusarium solani* دارند. تنها ۲۰٪ از موتانت‌های *T.harzianum* قدرت آنتاگونیستی بالاتری نسبت به جدایه مادری داشتند($p>0.05$) . برای مطالعه اثرات اشعه گاما بر روی جدایه‌های جهش یافته گونه‌های تریکودرما استفاده شد. پنج آغازگر RAPD (OPA09 OPA10, OPA11, OPA14, OPA 16) انتخاب شدند. نتایج حاصل از مارکر RAPD با استفاده از این آغازگرها در سطح تشابه ۸۴٪ ، موتانت‌های *T. viride* را به ترتیب به ۱۲، ۱۶، ۱۴، ۲۰ و ۱۹ گروه تقسیم کرد. بررسی ارتباط پروفیل RAPD جدایه های جهش یافته از *T.viride*، با توانایی آنتاگونیستی آن ها علیه *Fusarium solani* نشان داد که دندروگرام حاصل از جدایه ها و گروه بندی آنها بر اساس آنتاگونیستی علیه این بیمارگر موتانت های این گونه را به گروه های مختلفی تقسیم می کنند که منطبق نیستند. دندروگرام حاصل از پنج آغازگر از آغازگر های RAPD با استفاده از روش UPGMA و ضریب تشابه Jaccard در سطح تشابه ۸۴ درصد جدایه ها را به سه گروه تقسیم کرد که در آن جدایه های جهش یافته Th۹ و Th۱۷ در یک گروه، بقیه جدایه های جهش یافته در گروه دیگر و جدایه مادری از هر دو گروه جهش یافته جدا می شود. بر اساس نتایج این نشانگرهای مولکولی مبتنی برPCR (RAPD)، بین جدایه مادری و جدایه های جهش یافته تفاوت ژنومی وجود دارد و وجود تفاوت معنی دار از نظر خواص آنتاگونیستی ناشی از تفاوت ژنتیکی می باشد که در اثر القای جهش به وجود آمده است. به غیر از جدایه های Th ۹ و Th۱۷ بین جدایه‌های دیگر از نظر آنتاگونیستی تفاوت وجود داشت اما نشانگر مورد مطالعه نتوانست آن ها را از هم متمایز کند.

واژگان کلیدی: تریکودرما، تنوع ژنتیکی، موتاسیون القایی، اشعه گاما، نشانگرهای مولکولی.

Molecular markers based diagnosis of genetical diversity in gamma mutated *Trichoderma spp.*

H. Asle Fallah [1], S. Shahbazi*[2], H. Askari[2], M. A. Ebrahimi[1]

1. Biotechnology Department, Faculty of Agriculture, Payam e Noor University, P. O. Box 31578-36899, Tehran, Iran,
2. Plant Protection Department, Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute (NSTRI), Atomic Energy Organization of Iran (AEOI), Alborz, Iran. Corresponding author: sshahbazi@nrcam.org

Abstract: *Trichoderma* spices are the most extensively studied and applied in bio- control fungal agents. In this study, samples from different areas of agricultural fields in Khorasan, khouzestan, mazandaran and tehran provinces have been provided. After single-spore culture on selective medium, *T. viride* and *T.harzianum* species were

identified. To induce mutation in these two fungal spices, spore suspension of *Trichoderma* has been gamma radiated by 0 to450 Gry Gamma ray (with 50 Gry intervals). Optimum mutation induce dose have been evaluated based on 40-50% inhibition of spore growth on PDA and 250 Gry was the optimum dose to induce mutation in *Trichoderma*. The phenotypic data showed that, gamma irradiation effects on mycelial growth, color and colony shape, spore reproduction and antagonistic potential against plant pathogenic fungi "*Fusarium solani*". Dual culture test showed that, all the mutated isolates of *T. viride* have statistically ($p>0.05$) more antagonistic capability than its parent strain against F. solani. Only 20% of *T.harzianum* mutants had more antagonistic capability than its parent ($p>0.05$). To study the effects of irradiation on genetically diversity in mutated isolates of *Trichoderma spp* , RAPD (molecular marker) was used. Among 10 RAPD primers which have been reported for *Trichoderma* bio-diversity diagnosis, five RAPD primers (OPA 09, OPA10, OPA11, OPA14 and OPA 16) were choose, because, these primers amplified different pattern of bands and distinctly grouped the mutants of *T. viride* and *T.harzianum* spices. The results of RAPD marker using by these primers at 84% similarity, divided *T. viride* mutant to 12, 16, 14, 20 and 19 Group respectively. But, RAPD profiles of the muted strains of *T.viride* showed no relevancy with their antagonistic based grouping, thus other primers or markers should be test.Dendrograms by using UPGMA method based on Jaccard's similarity coefficient at similarity level of 84% , were divided *T.harzianum* mutated isolates into three groups. Two mutated isolates (*Th9* and *Th17*) in one group, the rest of the mutant strains in second group and parent strains (non-irradiate) in the third one. Since the results of this study did not indicate the same grouping in antagonistic and PCR based molecular marker (RAPD) with these primers, applying other markers could be helpful in this regard.

Keywords: *Trichoderma*, genetical diversity, induced mutation, Gamma radiation, Molecular marker.

مقدمه:

. *Trichoderma* قارچی است خاک زی، فرصت طلب، غیربیماریزا، هم‌زیست با ریشه گیاهان و به دلیل تنوع متابولیسمی و قدرت رقابتی بالا در اغلب مناطق از موجودات غالب میکروفلور خاک می باشد. قارچ عامل بیماری از گروه پاتوژن های خاکزاد به حساب می آید که به صورت میکرواسکلروت در خاک به سر می برد و فعالیت و خسارت آن در خاک های قلیایی و سنگین مرطوب بیشتر است. مطالعه تنوع ژنتیکی فرآیندی است که تفاوت یا شباهت گونه ها، جمعیت ها و یا افراد را با استفاده از روش ها و مدل های آماری خاص براساس صفات مورفولوژیک، اطلاعات شجره ای یا خصوصیات مولکولی افراد بیان می کنند. یکی از مسائلی که در سالهای اخیر ذهن محققین را به خود مشغول کرده است، نقش، اهمیت و کارآیی داده های مورفولوژیکی و مولکولی در تعیین سطح تنوع ژنتیکی و برآورد روابط بین افراد، ژنوتیپ‌ها و جمعیت‌ها می‌باشد. با توجه باینکه پرتو گاما بطور تصادفی و پراکنده مکانهای مختلفی از ژنوم قارچ راهدف قرار می دهد، چندشکلی های ژنی

زیادی در جدایه های موتانت ایجاد شد، از اینرو بر آن شدیم تا در این پژوهش از نشانگر مولکولی تصادفی RAPD جهت تعیین تنوع ژنتیکی جدایه های موتانت و وحشی قارچ تریکودرما استفاده نماییم .روش RAPD به دلیل مزایایی چون استفاده نکردن از مواد رادیواکتیو، نیاز به DNA ژنومی اندک و هزینه کم، برای بررسی جمعیت موجودات زنده کاربرد بیشتری دارد، چون معمولا در این بررسی‌ها شمار زیادی نمونه ارزیابی شده و روش‌های دیگر علاوه بر صرف وقت زیاد، به اطلاعات اولیه‌ای از ژنوم موجودات نیاز دارند که در مجموع مقرون به صرفه نمی‌باشد. اگرچه استفاده از RAPD با مشکلاتی چون تکرارپذیری کم برخی از باندها، حساسیت شدید به شرایط واکنش و بهینه سازی طولانی همراه بوده است، ولی در حال حاضر به طور گسترده ای در آزمایش‌های جمعیت و تعیین تنوع به کار گرفته می‌شود.

مواد و روش‌ها:

در این مطالعه ابتدا نمونه های نواحی مختلف زمین‌های کشاورزی استان‌های خراسان، خوزستان، مازندران و تهران تهیه شدند پس از کشت تک اسپور روی محیط کشت انتخابی گونه‌های *T. viride* و *T.harzianum* از بین انها شناسایی شد. . به منظور القای جهش ژنتیکی در این دو گونه قارچی سوسپانسیون اسپور هر یک از آنها در معرض دزهای ۰ تا ۴۵۰ گری اشعه گاما در دستگاه گاما سل قرار گرفت. دوز بهینه القای جهش بر اساس ۴۰-۵۰٪ بازدارندگی از جوانه زنی اسپور روی محیط کشت *PDA* و ۲۵۰ گری دوز بهینه برای القای جهش در تریکودرما تخمین زده شد. داده های فنوتیپی نشان داد که اشعه گاما بر روی رشد میسلیوم، رنگ و شکل کلنی، تولید مثل اسپور و قدرت آنتاگونیستی در برابر قارچ پاتوژن گیاهی *Fusarium solani* موثر می‌باشد. برای مطالعه اثرات اشعه گاما بر روی جدایه‌های جهش یافته گونه‌های تریکودرما RAPD (مارکر مولکولی) استفاده شد. از میان ۱۰ آغازگری که برای شناسایی تنوع زیستی تریکودرما گزارش شده بود، پنج آغازگر(OPA 09, OPA10, OPA11, OPA14, OPA 16) انتخاب شدند، زیرا، این آغازگرها الگوهای باندی متفاوتی را تکثیر می‌کنند و به طور واضح موتانت‌های گونه‌های *T. viride* و *T.harzianum* را گروه بندی می‌نمایند.

آنالیز آماری‌داده‌ها: کلیه آزمایشات در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد و آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون ANOVA و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن و سطح آماری۵ ٪ صورت گرفت.

نتایج و بحث:

. به منظور القای جهش ژنتیکی در این دو گونه قارچی *T. viride* و *T.harzianum* سوسپانسیون اسپور هر یک از آنها در معرض دزهای ۰ تا ۴۵۰ گری اشعه گاما در دستگاه گاما سل قرار گرفت. دوز بهینه القای جهش بر اساس ۴۰-۵۰٪ بازدارندگی از جوانه زنی اسپور روی محیط کشت PDA و ۲۵۰ گری دوز بهینه برای القای جهش در تریکودرما تخمین زده شد. داده های فنوتیپی نشان داد که اشعه گاما بر روی رشد میسلیوم، رنگ و شکل کلنی، تولید مثل اسپور و قدرت آنتاگونیستی در برابر قارچ پاتوژن گیاهی *Fusarium solani* موثر می‌باشد.آزمون کشت متقابل نشان داد که، تمام جدایه‌های جهش یافته *T. viride* از لحاظ آماری ($p>0.05$) قدرت آنتاگونیستی بالاتری نسبت به جدایه مادری در مقابل

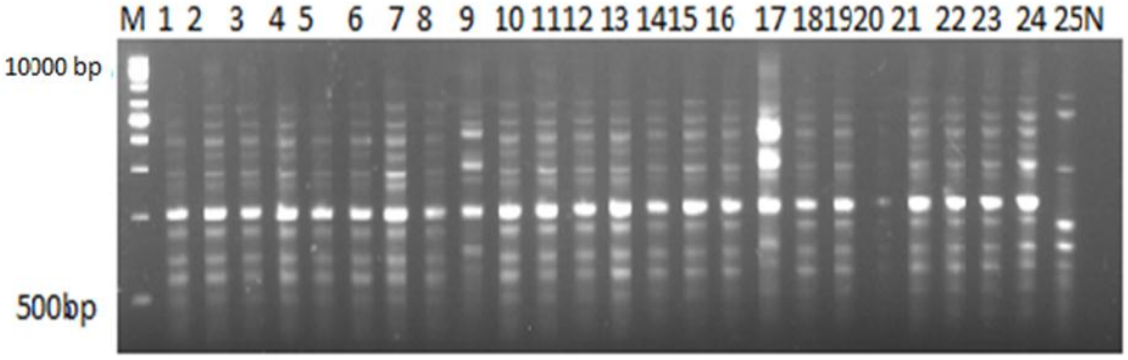
Fusarium solani دارند. تنها ۲۰٪ از موتانت‌های *T.harzianum* قدرت آنتاگونیستی بالاتری نسبت به جدایه مادری داشتند($p>0.05$) . برای مطالعه اثرات اشعه گاما بر روی جدایه‌های جهش یافته گونه‌های تریکودرما RAPD (مارکر مولکولی) استفاده شد. از میان ۱۰ آغازگری که برای شناسایی تنوع زیستی تریکودرما گزارش شده بود، پنج آغازگر(OPA 09, OPA10, OPA11, OPA14, OPA 16) انتخاب شدند، زیرا، این آغازگرها الگوهای باندی متفاوتی را تکثیر می‌کنند و به طور واضح موتانت‌های گونه‌های *T. viride* و *T.harzianum* را گروه بندی می‌نمایند. نتایج حاصل از مارکر RAPD با استفاده از این آغازگرها در سطح تشابه ۸۴٪ ، موتانت‌های *T. viride* را به ترتیب به ۱۲، ۱۶، ۱۴، ۲۰ و ۱۹ گروه تقسیم کرد. بررسی ارتباط پروفیل RAPD جدایه های جهش یافته از *T.viride*، با توانایی آنتاگونیستی آن ها علیه *Fusarium solani* نشان داد که دندروگرام حاصل از جدایه ها و گروه بندی آنها بر اساس آنتاگونیستی علیه این بیمارگر موتانت های این گونه را به گروه های مختلفی تقسیم می کنند که منطبق نیستند و شاید نشانگرهای مولکولی دیگر بهتر باشند. دندروگرام حاصل از پنج آغازگر از آغازگر های RAPD با استفاده از روش UPGMA و ضریب تشابه Jaccard در سطح تشابه ۸۴ درصد جدایه ها را به سه گروه تقسیم کرد که در آن جدایه های جهش یافته Th۹ و Th۱۷ در یک گروه، بقیه جدایه های جهش یافته در گروه دیگر و جدایه مادری از هر دو گروه جهش یافته جدا می شود. بر اساس نتایج این نشانگرهای مولکولی مبتنی برPCR (RAPD) ، بین جدایه مادری و جدایه های جهش یافته تفاوت ژنومی وجود دارد و وجود تفاوت معنی دار از نظر خواص آنتاگونیستی ناشی از تفاوت ژنتیکی می باشد که در اثر القای جهش به وجود آمده است. . به غیر از جدایه های Th ۹ و Th۱۷ بین جدایه های دیگر از نظر آنتاگونیستی تفاوت وجود داشت اما نشانگر مورد مطالعه نتوانست آن ها را از هم متمایز کند شاید به کارگرفتن نشانگرهای دیگر می توانست در این رابطه موثر باشد.

نتیجه‌گیری

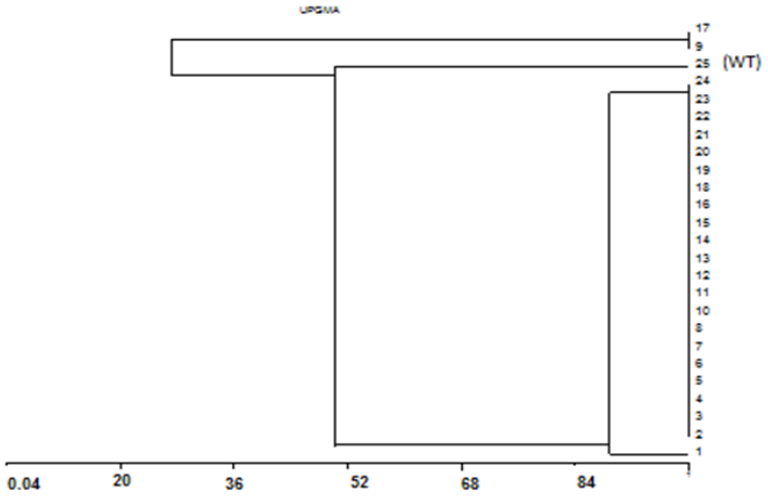
- پرتو تابی با اشعه گاما را می توان به عنوان ابزار ی کارآمد در افزایش تنوع ژنتیکی و دستیابی به منابع ژنی متنوع تر در قارچ های رشته ای توصیه نمود.
- دز پرتوتابی در دامنه دز ۲۵۰ گری به عنوان دز بهینه به منظور القای موتاسیون غیر کشنده در جدایه مادری *T.viride* و *T.harzianum* انتخاب شد.
- با ایجاد جهش در ژنوم قارچ تریکودرما، میزان قدرت ممانعت کنندگی از رشد قارچ بیمارگر *Fusarium solani* در سطح ۵٪ در کلیه جدایه های جهش یافته گونه *T.viride* و در ۲۰درصد از موتانت های گونه ها *T.harzianum* افزایش نشان داد که پرتودهی با اشعه گاما را به عنوان یک روش تصادفی اما موفق در افزایش پتانسیل آنتاگونیستی این دو گونه تریکودرما معرفی نمود.

- بررسی ارتباط پروفیل RAPD جدایه های جهش یافته از *T.viride*، با توانایی آنتاگونیستی آن ها علیه *Fusarium solani* نشان داد که دندروگرام حاصل از جدایه ها و گروه بندی آنها بر اساس آنتاگونیستی علیه این بیمارگر موتانت های این گونه را به گروه های مختلفی تقسیم می کنند که منطبق نیستند و شاید نشانگرهای مولکولی دیگر بهتر باشند.

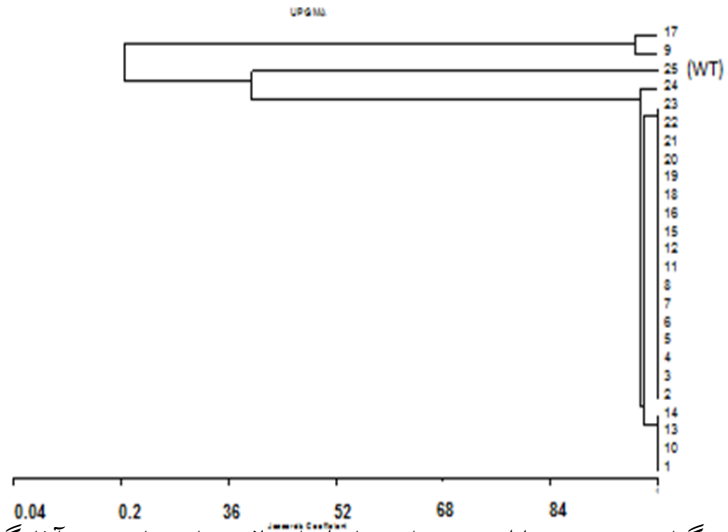
- دندروگرام حاصل از پنج آغازگر از آغازگر های RAPD با استفاده از روش UPGMA و ضریب تشابه Jaccard در سطح تشابه ۸۴ درصد جدایه ها را به سه گروه تقسیم کرد که در آن جدایه های جهش یافته Th۹ و Th۱۷ در یک گروه، بقیه جدایه های جهش یافته در گروه دیگر و جدایه مادری از هر دو گروه جهش یافته جدا می شود. بر اساس نتایج این نشانگرهای مولکولی مبتنی بر PCR، بین جدایه مادری و جدایه های جهش یافته تفاوت ژنومی وجود دارد و وجود تفاوت معنی دار از نظر خواص آنتاگونیستی ناشی از تفاوت ژنتیکی می باشد که در اثر القای جهش به وجود آمده است. به غیر از جدایه های Th۹ و Th۱۷ بین جدایه های دیگر از نظر آنتاگونیستی تفاوت وجود داشت. اما نشانگر مورد مطالعه نتوانست آن ها را از هم متمایز کند شاید به کارگرفتن نشانگرهای دیگر می توانست در این رابطه موثر باشد.



شکل۱. الگوهای باندی مربوط به آغازگر OPA14. چاهک های ۱ تا ۲۴ مربوط به جدایه های جهش یافته و چاهک ۲۵ مربوط به تیپ وحشی را نشان می دهد.N ، کنترل منفی و M، ladder 1KB (گونه و موتانت های *T.harzianum*).



شکل۲. دندروگرام تجزیه و تحلیل خوشه ای حاصل از داده های آغازگر OPA14 با استفاده از روش UPGMA و ضریب تشابه Jaccard.



شکل۳. دندروگرام تجزیه و تحلیل خوشه ای حاصل از تلفیق داده های پنج آغازگر RAPD با استفاده از روش UPGMA و ضریب تشابه Jaccard (گونه و موتانت های *T.harzianum*).

منابع:

۱. ارشاد، ج .(۱۳۷۴)، قارچ های ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران،ص ۸۸۸ .

۲. اهری مصطفوی، ح. صفایی، ن.(۱۳۸۷)، کاربرد فناوری هسته ای در گیاه پزشکی ص ۱۲۲.

۳. آیزنک،م.(۱۳۸۷) ، مبانی شناخت انسان (ترجمه ب. کوشا- چاپ اینترنتی – ویرایش اول) - (فصل اول) ص ۶۳-۶۴.

۴. زراع مایوان، ح.(۱۳۷۰)، مبانی قارچ شناسی ص ۵۰-۴۷ و ص ۱۲۲-۱۱۹.

۵. قنادیی، م.(۱۳۷۵)، رادیو شیمی و روش های تجزیه هسته ای، انتشارت سازمان انرژی اتمی ایران، ص ۷۲۸.

۶. نقوی، م. قره یاضی، ب. حسینی سالکده، ق. (۱۳۸۸)، نشانگرهای مولکولی، انتشارات دانشگاه تهران، ص ۱۰۰-۷۳.

۷. شکوهی فر، ف. (۱۳۸۲)، تعیین تنوع ژنتیکی قارچ عامل بیماری برق زدگی نخود ایران با استفاده از مارکرهای مولکولی RAPD.

محمدی، ا. (۱۳۸۵)، تجزیه و تحلیل داده‌های مولکولی از دیدگاه بررسی تنوع ژنتیکی.