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)

تاثیر پرتو گاما بر خصوصیات مرفولوژیک سه گونه تریکودرمای بومی ایران

تبسم ناصری پور[۱]، سعید نصراله نژاد[۱]، سمیرا شهبازی*[۲]، کامران رهنما[۱]، مهدی بهگر[۲]

۱--گروه گیاهپزشکی، دانشکده تولیدات گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ۲-گروه گیاهپزشکی و نگهداری مواد غذایی، پژوهشکده کشاورزی هسته ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای، سازمان انرژی اتمی، ۳- گروه علوم دام و دامپزشکی، پژوهشکده کشاورزی هسته ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای، سازمان انرژی اتمی،

نویسنده مسوول: sshahbazi@nrcam.org

چکیده: پرتو گاما بعنوان یک تکنیک هسته ای در کنار دیگر روش های کلاسیک می تواند در افزایش تنوع و بهبودخصوصیات قارچ تریکودرما موثر باشد. دراین مطالعه تاثیر پرتودهی با اشعه گاما روی خصوصیات مرفولوژیک (شکل ورنگ پرگنه،ابعاد اسپور و میزان اسپور) ۶۰ جدایه منتخب سه گونه *Trichoderma virens(60-11), T.koningii, T. atroviridae(60-22)* انجام شد. همچنین میزان رشد میسلیوم جدایه های موتانت منتخب تریکودرما درمحیط PDA (سیب زمینی-دکستروز- آگار) در زمان های مختلف ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت در مقایسه با گونه وحشی آنها انجام گردید. نتایج نشان دادکه پرتو گاما در فنوتیپ و مشخصات میکروسکوپی و سرعت رشد میسلیوم جدایه ها تاثیر معنی دار داشته است.

واژگان کلیدی: پرتودهی گاما، خصوصیات مرفولوژیکی، *T.atroviridae*، *T. koningii* و *T.virens* .

Gamma radiation effects on morphological characteristics of three iranian *Trichoderma* species

Tabasom Naseripour[1], Saeed Nasrollah Nejad[1], Samira Shahbazi[2*], Kamran Rahnama[1], Mehdi Behgar[3]

1. Plant Protection Department, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Golestan, Iran.
2. Plant Protection Department, Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute (NSTRI), Atomic Energy Organization of Iran (AEOI), Alborz, Iran.
3. Animal Science Department, Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute (NSTRI), Atomic Energy Organization of Iran (AEOI), Alborz, Iran.

sshahbazi@nrcam.org

Abstract: As a nuclear gamma-ray techniques with other classical methods is effective to increase diversity and improve the properties of Trichoderma. In this study, the effect of gamma irradiation on morphological characteristics (shape and color of the colonies, the size of the spores and spores), 60 isolates of the three species of *Trichoderma virens* (60-11), *T.koningii*, *T. atroviridae* (60-22) was performed. Then, mycelium growth rate of the mutant strains of Trichoderma in PDA culture (potato-dextrose- agar) at different times of 24, 48, 72 hours, compared with wild species were taken. The results showed that gamma ray and microscopic characteristics of the phenotype and mycelium growth rate of isolates had a significant impact.

Keywords: Gamma Radiation, Morphological characteristics, *T.atroviridae, T. koningii , T.virens* .

مقدمه

طبق مطالعات انجام شده، قارچ های جنس تریکودرما همواره به عنوان یک ابزار مهم کنترل بیولوژیک در برابر بیماری های گیاهان مطرح می باشد (مونته ۲۰۰۱). یکی از راه‌های القای جهش، کاربرد امواج الکترومغناطیس می-باشد که طی آن عوامل میکروارگانیسم در معرض تابش شدت‌های مشخصی از اشعه گاما، ایکس و یا فرابنفش قرار می‌گیرند (اهری مصطفوی و همکاران، ۱۳۸۹). عوامل جهش‌زای شیمیایی و فیزیکی با تاثیر روی اسپورهای قارچی گونه های تریکودرما پتانسیل بیوکنترل گونه‌ها را افزایش می دهند(Haggag, Wafaa and Mohamed, 2002). تقریباً در بیشتر موارد خصوصیات مرفولوژیکی در شناسایی قارچ ها اهمیت دارد.اشعه گاما میتوانددر تغییر یا بهبود خصوصیات مرفولوژیک و بیولوژیک موثر باشد.

مواد و روش ها

تهیه قارچ آنتاگونیست ، پرتوتابی و خالص سازی جدایه های آنتاگونیست با دز اپتیمم

قارچ آنتاگونیست *Trichoderma virens*(60-11), *T. atroviridae* (60-22) از بخش گیاهپزشکی دانشکده تولیدات گیاهی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان و جدایه آنتاگونیست *T. koningii* از بخش گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه ساری تهیه گردید. ابتدا کشت های ۵ روزه گونه های تریکودرما در دمای ۲۸ °C بر روی محیط کشت PDA تهیه گردید و اسپورهای گونه ها با استفاده از محلول سیلین از سطح پلیت ها شسته شدند و سوسپانسیون های آنها برای انجام پرتو تابی در جمعیت 1×10^{6} spore/ml تنظیم گردید. پرتوتابی با استفاده از دستگاه گاماسل با چشمه کبالت ۶۰– اکتیویته مستقر در مرکز تحقیقات کشاورزی و پزشکی هسته‌ای کرج (سازمان انرژی اتمی ایران) با دز اپتیمم ۲۵۰ Gy(اهری مصطفوی،۱۳۸۷) انجام پذیرفت. جهت جداسازی اسپورهای موتانت از یکدیگر، با استفاده از روش سریال رقت، سوسپانسیون های اسپور با رقت های 10^{-1}، 10^{-2}، 10^{-3}، 10^{-4}، 10^{-5}، 10^{-6} از نمونه های سوسپانسیون اسپور جدایه های پرتوتابی شده تهیه گردید و بصورت تکرار های سه تایی از رقت های 10^{-3}، 10^{-4}، 10^{-5} و 10^{-6} بر روی محیط کشت PDA کشت سطحی داده شد و به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۲۸ °C انکوباتور قرار داده شدند. سپس با استفاده از میکروسکوپ نوری (بزرگنمایی ۱۰ x و ۴۰ x) اسپورهای جوانه زده شناسایی، از سطح پلیت جداسازی و به محیط کشت تازه PDA انتقال داده شد و در همان شرایط قبل انکوباتور قرار گرفتند. سپس بر روی محیط کشت PDA به مدت ۵ روز در دمای ۲۸ °C قرار گرفتند. سپس اسپورهای هر یک از گونه ها با استفاده از محلول سیلین استریل از سطح پلیت های کشت شده جمع آوری گردید و جمعیت اسپورها در 1×10^{6} spore/ml تنظیم گردید و در داخل ظروف پلی اتیلنی استریل قرار داده شد.

۱.٦.۳ بررسی فنوتیپ جدایه های موتانت تریکودرما وتعیین ابعاد اسپورها

به منظور مقایسه شکل کلنی ها و رنگ آنها در جدایه های آنتاگونیست برتر و موتانت های آنها از پلیت های PDA کشت شده برای اندازه گیری سرعت رشد ریسه ها استفاده شد و مشخصات کلنی ها (شکل و رنگ) ثبت گردید. برای سنجش اسپورهای قارچی آنتاگونیست، حداقل ۳۰ اسپور از هر جدایه با میکروسکوپ نوری(۴۰X) و نرم افزار اندازه گیری شد.

۲.٦.۳ اندازه گیری سرعت رشد ریسه بر روی محیط کشت PDA

پلاک های میسلیوم (به ابعاد ۵ mm) از کشت های تازه هر یک از جدایه های موتانت قارچ تریکودرما(شامل *T. atroviridae(60-22)*، *T. koningii* و *T. virens(60-11)*) به مرکز ظرف پتری حاوی محیط کشت PDA انتقال داده شد و در دمای ۲۸ °C قرار گرفتند. اندازه گیری سرعت رشد ریسه (cm/day) در فواصل ۲۴ ساعت به مدت ۳ روز (۷۲ ساعت) انجام گردید.

نتایج

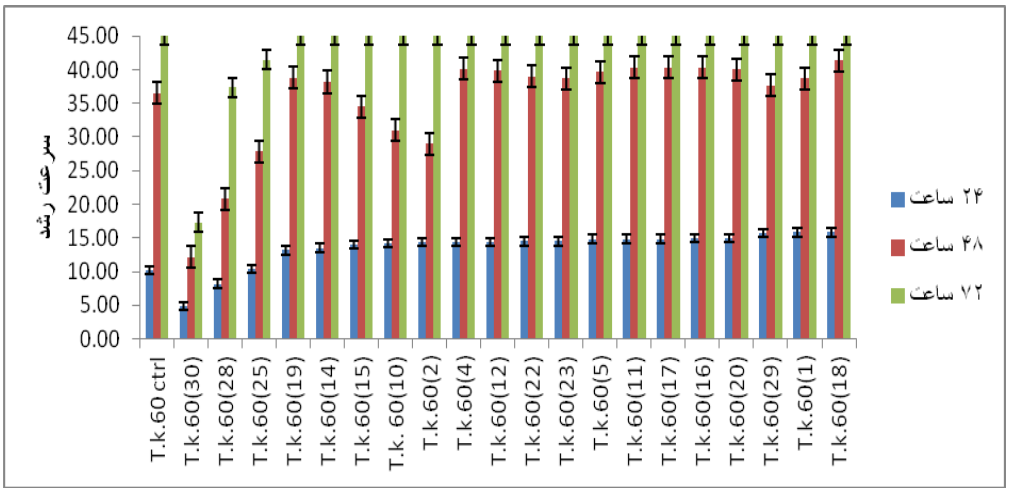
از ۱۰۰ نمونه قارچ تریکودرمای جهش یافته، ۶۰ نمونه موتانت که بیشترین تنوع مرفولوژیکی را نسبت به جدایه های تیپ وحشی نشان دادند ، انتخاب گردیدند. تعداد ۲۰ جدایه قارچ *T.atroviridae* و۲۰ جدایه *T.virens* و ۲۰ جدایه *T. koningii* انتخاب شدند. که از نظر مورفولوژیکی تنوع زیادی را از خود نشان دادند (جدول ۱). از نظر تغییر رنگ پرگنه در گونه *T.virens* ، گونه های پرتو دیده نسبت به جدایه وحشی شدت رنگ شان بیشتر شده و از بیرنگی به شیری رنگ شدن و زرد رنگی تغییر رنگ یافته اند. از نظر شکل نیز ، جدایه های T.vi 7 و T.vi 9 گلبرگی شکل هستند و بقیه جدایه ها همراه با جدایه وحشی، کلونی صاف دارند. در مورد گونه *T. koningii* تمام جدایه ها زرد رنگ یا شیری رنگ می باشد و تنها جدایه T.k 22 سفید رنگ می باشد و شکل کلونی تمام جدایه های پرتو دیده و جدایه تیپ وحشی، صاف می باشد. در جدایه های پرتو دیده گونه *T. atroviridae* به جز جدایه T.a 5.2 و T.a 18 مانند جدایه تیپ وحشی برفی رنگ بودند اما این دو جدایه پرگنه ای بیرنگ داشتند و شکل کلونی تمام جدایه ها به جز جدایه T. a11(گلبرگی شکل)، مانند جدایه تیپ وحشی صاف می باشد.

جدول۱- مقایسه خصوصیات مورفولوژیکی جدایه های موتانت گونه های *T. atroviridae*، *T. virens* و *T. koningii*

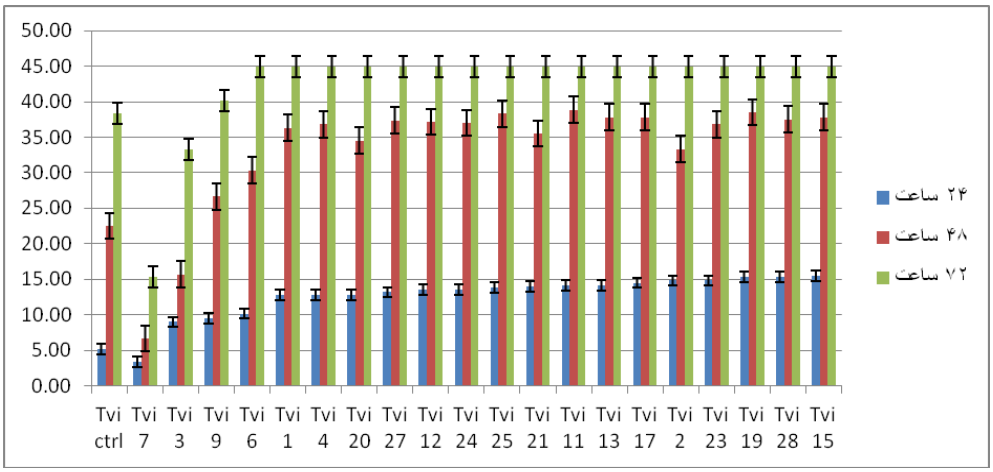
تعداد اسپور spore/ml (×۱۰^۶)	ابعاد اسپور		استرین	تعداد اسپور spore/ml (×۱۰^۶)	ابعاد اسپور		استرین	تعداد اسپور spore/ml (×۱۰^۶)	ابعاد اسپور		استرین
	طول اسپور	عرض اسپور			طول اسپور	عرض اسپور			طول اسپور	عرض اسپور	
۱/۶	۲,۷۸	۲,۶	T.a1	۸/۷۶	۵,۶۰	۲,۷۰	T.k.1	۷/۱۴	۲,۷۸	۳	Tvi 1
۲/۴۲	۲,۵۴	۲,۱۲	T.a2	۸/۴۲	۴,۳۴	۲,۱۲	T.k.2	۲/۹۸	۲,۹۱	۳,۰۶	Tvi 2
۳/۲۶	۲,۵۹	۲,۳۱	Ta2.5	۹/۲۶	۵,۱۹	۲,۳۱	T.k.4	۶/۲۶	۲,۵۹	۲,۳۱	Tvi 3
۲/۲۹	۲,۶۹	۲,۰۸	Ta3.7	۷/۲۹	۴,۶۹	۲,۱۸	T.k.5	۵/۲۹	۳,۳۲	۳,۱۷	Tvi 4
۳/۲۵	۲,۵	۲,۲۹	T.a4	۹/۲۵	۵,۵	۲,۲۹	T.k.10	۸/۲۵	۲,۹۳	۲,۷۸	Tvi 6
۳/۹۶	۲,۴۸	۲,۲۶	T.a5	۸/۹۶	۵,۴۸	۲,۲۶	T.k.11	۶/۹۶	۲,۵۵	۲,۶۹	Tvi 7
۳/۶۵	۲,۹۹	۲,۱۵	Ta5.2	۱۰/۶۵	۴۹۹	۲,۵۵	T.k.12	۶/۶۵	۲,۹۹	۳,۱۰	Tvi 9
۴/۰۹	۲,۷۱	۲,۲۴	T.a6	۹/۰۹	۵,۷۱	۲,۲۴	T.k.14	۶/۰۹	۲,۷۱	۲,۶۴	Tvi 11
۳/۶۷	۲,۸۷	۲,۳۰	T.a7	۶/۶۵	۴,۸۷	۲,۳۰	T.k.15	۵/۶۷	۲,۸۷	۲,۷۴	Tvi 12
۲/۶۰	۳,۰۱	۱,۸۷	Ta7.3	۶/۶۰	۵,۶۰	۲,۰۷	T.k.16	۴/۶۰	۳,۰۱	۲,۸۷	Tvi 13
۳/۵۱	۳	۲,۰۴	T.a9	۹/۷۶	۵,۰۹	۲,۴۴	T.k.17	۴/۷۱	۳	۲,۸۴	Tvi 15
۴/۶۰	۲,۵۸	۱,۹۹	T.a11	۱۱/۶۰	۵	۲,۷۶	T.k.18	۶/۶۰	۲,۵۸	۲,۹۹	Tvi 17
۲/۱۷	۳,۱۰	۲,۱۷	T.a11.4	۱۱/۱۷	۴,۶۶	۲,۱۷	T.k.19	۷/۱۷	۳,۱۰	۲,۸۷	Tvi 19
۳/۵۷	۲,۹۵	۲,۰۱	T.a14	۱۰/۴۴	۴,۹۵	۲,۳۱	T.k.20	۷/۵۷	۲,۹۵	۳,۲	Tvi 20
۳/۱۴	۳,۲۴	۲,۲۷	T.a15	۸/۱۴	۴,۸۷	۲,۵۹	T.k.22	۹/۱۴	۳,۲۴	۳,۰۱	Tvi 21
۳/۶۴	۲,۸۷	۲,۱۹	T.a17	۹/۶۴	۴,۶۶	۲,۳۹	T.k.23	۶/۶۴	۲,۹۸	۳,۱۱	Tvi 23
۳/۳۶	۳,۱۲	۲,۲۶	T.a18	۸	۵,۱۹	۲,۲۶	T.k.25	۸	۳,۱۲	۲,۶۹	Tvi 24
۳/۳۲	۳,۲۰	۲,۴۵	T.a20	۱۰/۳۲	۵,۱۲	۲,۴۵	T.k28	۶/۳۲	۳,۲۰	۲,۸۶	Tvi 25
۲/۷۹	۲,۶۹	۲,۱۰	T.a21	۹/۷۹	۴,۹۹	۲,۸۱	T.k.29	۱/۷۹	۲,۶۹	۲,۴۶	Tvi 27
۳/۸۵	۲,۹۸	۲,۱۱	T.a25	۹/۸۵	۵,۶۴	۲,۳۵	T.k.30	۶/۸۵	۳	۳۱۱	Tvi 28
۲/۰۴	۳,۱۹	۲,۱۵	T.at ctrl	۷/۶۴	۵,۳۲	۲,۴۴	T.k. ctrl	۵/۰۴	۳,۱۹	۳,۲۲	T.vi ctrl

مقایسه میانگین سرعت رشد در قارچ وحشی و موتانت های گونه ی *T. koningii* پس از ۷۲ ساعت فاقد اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵٪ با گونه وحشی بودند و در یک گروه از نظر آماری قرار گرفتند . کمترین رشد مربوط به موتانت *T.k 30, T.k28,T.k25* بود و بقیه موتانت ها دارای بیشترین رشد قطری بودند. در میان موتانت های گونه *T. virens* کمترین سرعت رشد میسلیوم مربوط به جدایه *T.vi7, T.vi3,T.vi9*بود و بقیه موتانت ها در یک گروه از نظر آماری قرار گرفتند و اختلاف آماری در سطح ۵٪ با گونه وحشی داشتند(نمودار۲). بیشترین میزان سرعت رشد میسلیوم در میان موتانت های گونه *T.atroviridae* مربوط به موتانت *T.a15* بود و کمترین میزان رشد میسلیوم مربوط به موتانت *T.a 3.7* و *T.a 2.5* بود که به مراتب کمتر از گونه وحشی بود(نمودار ۳).

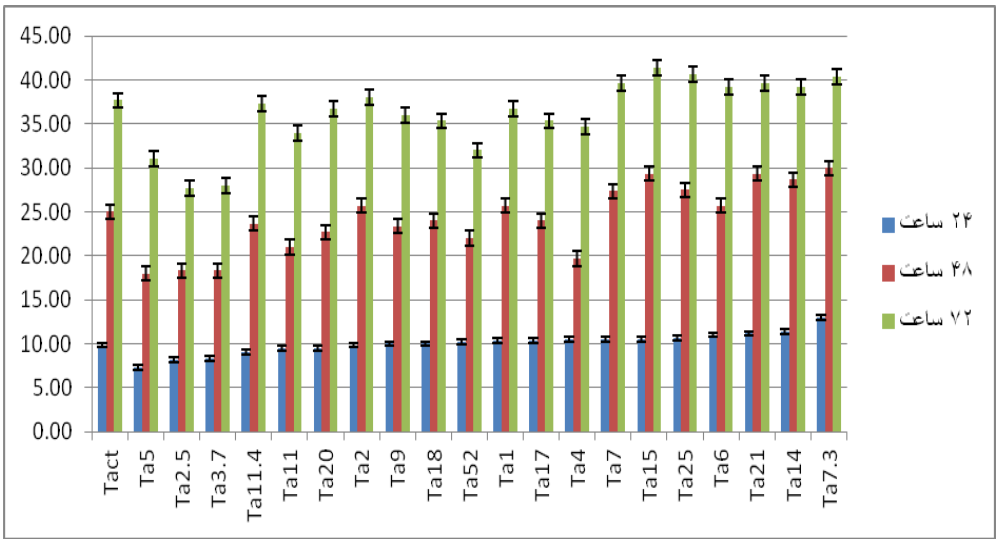
نمودار ۱. سرعت رشد میسلیوم گونه *T. koningii* و جدایه های پرتودیده در زمانهای مختلف



نمودار۲. سرعت رشد میسلیوم گونه *T.virens* و جدایه های پرتو دیده در زمان های مختلف



نمودار ۳. سرعت رشد میسلیوم گونه *T. atroviridae* و جدایه های پرتودیده در زمان های مختلف



سپاسگزاری

این مقاله از اعتبارات پروژه "تولید مواد بیولوژیک به منظور کنترل عوامل بیماری زای گیاهی خاکزاد- A88A099" انجام شده و نویسندگان از همکاران گروه گیاهپزشکی و نگهداری مواد غذایی- پژوهشکده کشاورزی هسته ای و آقای مهندس عسکری که در انجام این مطالعه ما را یاری داده اند، تشکر و قدردانی می نمایند.

منابع

۱- اهری مصطفوی . ح. ۱۳۸۷.کاربرد فناوری هسته ای در مدیریت علف های هرز و بیماری های گیاهی. دومین همایش ملی کاربرد فناوری هسته ای در علوم کشارزی و منابع طبیعی. ۱۹-۲۰ خرداد، پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای کرج. ۳۳۱-۳۳۵

2- MONTE E 2001. Editorial Paper: Understanding *Trichoderma*: Between Agricultural Biotechnology and Microbial Ecology. Int Microbiol 4: 1-4. -۲

3-Haggag, W. M., Abdel-Latif, H., Mohamed, A. 2007. 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(1): 151- 164.