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)

نحوه جهش‌زایی پرتوها در قارچ تریکودرما

لیلا سهام پور[۱*] ، سید رضا فانی[۲]
۱. دانشجوی کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی در کشاورزی مجتمع آموزش عالی شیروان
۲. مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی یزد
Sahampourl@gmail.com

چکیده: قارچ تریکودرما از عوامل موفق در کنترل بیولوژیک بیمارگرهای گیاهی است. این قارچ در کنار فعالیت آنتاگونیستی خود به رشد گیاه نیز کمک می‌کند.سویه‌های تریکودرما علاوه بر تولید آنزیم‌های هضم کننده دیواره قارچ‌ها با ترشح آنتی بیوتیک‌های مختلف و پارازیتیسم نیز می‌توانند باعث ازبین رفتن بیمارگرهای‌قارچی مختلف شوند. برای افزایش توان آنتاگونیستی دراین قارچ، مطالعات بسیاری صورت گرفته است که می‌توان به دستکاری ژنتیکی با استفاده از تکنیک‌های مهندسی ژنتیک و ایجاد جهش به روش‌های مختلف اشاره کرد. کاربرد انواع پرتوها به منظور ایجاد جهش و افزایش کارایی عوامل بیوکنترل از دیرباز مورد استفاده محققین بوده است. پرتوها در میکروارگانیسم‌ها با توجه به میزان نوع اشعه و دوز مصرفی اثرات مختلفی می‌گذارند. انرژی بالای پرتوها باعث تخریب مولکول DNA می‌شود ولی استفاده از آنها در دوزهای پایین با ایجاد تغییراتی خاص در مولکول های اطراف رشته DNA به ایجاد جهش منجر شده و احتمال به‌وجودآمدن سویه‌ای جدید با قابلیت‌های مورد انتظار از جمله توان آنتاگونیستی بالا علیه عوامل بیماری‌زای گیاهی را فراهم می‌کند. در اکثر مطالعات صورت گرفته برروی تریکودرما به منظور ایجاد جهش از پرتو گاما و ماوراءبنفش استفاده شده است؛ و دوز اپتیمم برای هر کدام مشخص گردیده است. اشعه ماوراءبنفش با ایجاد دایمر تیمین و پرتو گاما با ایجاد رادیکال آزاد منجر به جهش می‌شوند. در این مقاله اثر پرتوها را در موجودات زنده و چگونگی ایجاد جهش در عوامل بیوکنترل و ایجاد سویه‌های جدید به کمک فناوری هسته‌ای بررسی می‌گردد.

واژگان کلیدی: فناوری هسته ای، پرتودهی، جهش، تریکودرما، کنترل بیولوژیک

Mechanism of Mutagenicity by radiation in *Trichoderma*

L. Sahampour[1], S.R. Fani[2]
[1.] M.Sc. Student, Agricultural Biotechnology, Shirvan Higher Education Center
[2.] Yazd Agricultural and Natural Resources Research and Education Center
Sahampourl@gmail.com

Abstract: *Trichoderma* species are considered as a successful biological agent in controlling of plant pathogens. The fungus, along its antagonistic activity, is capable of helping plant's growth. In addition to producing digestive enzymes of fungi's walls, *Trichoderma* strains can eliminate various fungal pathogens through secretion of different antibiotics and parasitism. Many studies have been done to increase the antagonistic capability of this fungus, including genetic manipulation through genetic engineering techniques and stimulation of mutation by using different methods. Researchers have applied different types of radiations to mutagenesis and increasing the efficiency of biocontrol agents for a long time. With respect to the type and dose of radiations, they play a different function on microorganisms. High energy of radiations may destroy the DNA molecule; however, their use with low doses with regarding to creating specific changes in molecules surrounded DNA strand may result in mutation may finally causing the new

strain creation with respected capability like antagonistic high power against pathogenic agents of plants. Many accomplished studies about *Trichoderma* used gamma and UV radiation to create mutation; moreover optimum dose has been determined for each case. UV and Gamma radiation result in mutation through creating thymine dimer and free radicals respectively. In this paper by using nuclear technology the effect of radiations on living organisms and the quality of mutation formation in bio-control agents and creating new strains is investigated.

Keywords: Nuclear technology, Irradiation, Mutation, *Trichoderma*, Biological control

مقدمه:

امروزه با رشد بی‌رویه جمعیت و نیاز به موادغذایی، افزایش سطح زیر کشت محصولات کشاورزی امری ضروری بوده و همچنین نیاز بازار به محصولات در تمام فصول سال منجر به کشت در گلخانه گشته است. این مسائل باعث افزایش میزان خسارت آفات و بیماری‌های گیاهی شده‌است. برای رفع این مشکل از مواد شیمیایی و سموم استفاده می‌شود که دارای برخی محدودیت‌ها است. این مواد از طرفی با ایجاد آلودگی زیست محیطی و از طرف دیگر با ورود به چرخه غذایی انسان و دام از طریق باقی مانده سمی تهدیدی جدی برای انسان است[3,2,1]. یکی از بهترین و ایمن‌ترین راه‌های مبارزه با بیمارگرهای گیاهی استفاده از عوامل بیوکنترل علیه آنها است. یکی از مهمترین و پرکاربردترین این عوامل قارچ تریکودرما است. از حدود ۸۰ سال پیش، توانایی آنتاگونیستی گونه‌های جنس تریکودرما توسط وندلینگ به عنوان عامل بیوکنترل شناخته شد. وی برای اولین بار در سال ۱۹۳۲ نشان داد که این جنس توانایی فعالیت پارازیتی علیه برخی پاتوژن‌ها را دارد. از آن پس، گونه‌های مختلفی از تریکودرما را به عنوان عوامل بیوکنترل مورد آزمایش قرار دادند؛ و مشخص شد که گونه‌های این جنس توانایی مبارزه با پاتوژن‌های گیاهی خصوصاً پاتوژن‌های خاکزاد، که از لحاظ اقتصادی مهم‌اند را دارا هستند و در آزمایشات زیادی مشخص شد که در کنترل بیولوژیک موفق بوده اند[7].از مزیت‌های تریکودرما میتوان به قدرت زنده‌مانی بالا به دلیل خاکزاد بودن، همچنین قدرت رقابت بالا با دیگر میکروارگانیسم‌ها در شرایط خاکی و آسانی استفاده از آن اشاره نمود[1]. این قارچ یک همزیست با گیاه به شمار می‌رود. تریکودرما عموماً به عنوان یک مایکوپارازیت نکروتروفیک عمل کرده؛ بدین معنی که آنتاگونیست ابتدا میزبان خود را می‌کشد و سپس مواد غذایی آزاد شده را مصرف می‌کند[8]. این قارچ دارای چندین مکانیسم تکامل یافته است، که به بهبود مقاومت گیاه در برابر بیماری و رشد وباروری آن کمک می‌کند. تریکودرما به واسطه تولید آنزیم‌های درون سلولی و خارج سلولی مختلف از جمله سلولاز، کیتیناز،βگالاکتوزیداز و βگلوکاناز باعث تخریب دیواره قارچی بیمارگرها می‌شود. همچنین با تولید ترکیبات فنلی و آنتی‌بیوتیک‌ها مانند تریکودرمین، گلیوتوکسین و ویریدین به مقاومت گیاه کمک می‌کند. از سوی دیگر این قارچ با قدرت رقابت بالایی که با دیگر میکروارگانیزم‌ها دارد می‌تواند به کنترل آنها منجر شود. در کنار تمام مزایای تریکودرما، در زمان استفاده از این عامل بیوکنترل باید به تنش‌های محیطی موجود نیز توجه کرد چرا که این تنش‌ها می‌توانند در میزان رشد و کارایی تریکودرما اثر بگذارند. شوری، PH خاک، فلزات سنگین و حتی سموم و مواد شیمیایی استفاده شده می‌توانند فعالیت‌های این قارچ را تحت تأثیر قرار داده و چه بسا کاهش دهند[4]. با

توجه به اهمیت استفاده از این عامل بیوکنترل، محققان در پی افزایش قدرت آنتاگونیستی آن به منظور استفاده در سطح تجاری وهمچنین بهبود کارایی آن در تنش‌های مختلف محیطی، از روش‌های مختلفی استفاده نمودند. دستکاری ژنتیکی به واسطه مهندسی ژنتیک و امتزاج پرتوپلاستی به ایجاد سویه‌های جدید با کارایی بیشتر کمک می‌کند؛ اما با توجه به هزینه‌بر و زمان‌بر بودن آن به میزان کافی فراگیر نشده‌است. روش دیگر برای ایجاد سویه‌های جدید، ایجاد جهش و بدست آوردن جهش‌یافته‌هایی با قابلیت‌های باارزش است[3]. برای ایجاد جهش میتوان از تیمارهای شیمیایی یا فیزیکی استفاده کرد. موتاژن‌های شیمیایی مثل EMS، و یا موتاژن های فیزیکی مثل اشعه ماوراء بنفش و گاما اغلب باعث القای موتاسیون تصادفی می‌شوند. این مواد با تغییر در ماهیت ماده وراثتی و یا با شکستن کروموزوم و قرارگیری مجدد بازها کنار هم باعث ایجاد موتاسیون شده، که با توجه به ایجاد جهش در ژنی خاص باعث تغییر در محصول آن ژن و با افزایش و یا کاهش تولید محصول ژن، باعث تغییر در متابولیسم و یا چرخه‌های آن می‌گردد[1]. پرتوها با تغییراتی که در رشته DNA ایجاد کرده و منجر به جهش می‌شوند، گاهی به سمت سویه‌ای بهتر با توان آنتاگونیستی بالا و یا کارآمد در تنش‌های محیطی گام برداشته و به کشاورزان در کنترل عوامل بیماری‌زای گیاهی کمک شایانی می‌کنند. در ذیل به بحث درباره موتاژن‌های فیزیکی پرداخته و مکانیزم عمل آن‌ها به صورت مختصر اشاره می‌گردد.

موتاژن‌های فیزیکی:

امواج با طول موج‌های۰,۰۱ تا ۱۰ آنگستروم و سایر پرتوها، شوک های حرارتی و برودتی و بی‌وزنی می‌توانند بر روی ماده ژنتیکی اثر گذاشته و باعث ایجاد تغییرات دائمی در آن شوند. پرتوها با توجه به میزان دوز مصرفی می‌توانند اثرات مستقیم و غیر مستقیم بر روی مولکول‌های ارگانیزم زنده بگذارند. اثر پرتوها به عوامل مختلفی از جمله نوع پرتو، دوز پرتودهی و نوع سلول پرتو داده شده بستگی دارد[9]. در صورتی که از دوز بالایی برای پرتودهی استفاده شود، به صورت مستقیم برروی ماکرومولکول‌ها اثر گذاشته و باعث تخریب آن‌ها می‌شود. اما اگر از دوزهای پایین در پرتودهی استفاده گردد، اثری غیرمستقیم بر ماده ژنتیکی داشته، بدین معنی که مولکول‌های اطراف ماده ژنتیکی را تحت تأثیر قرار داده و این امر باعث تغییراتی در رشته DNA شده و جهش ایجاد می‌گردد. این پرتوها بر اساس شدت اثر به دو دسته اشعه های یون‌ساز و غیر یون‌ساز تقسیم می‌شوند. پرتو ماوراءبنفش جزو اشعه‌های غیر یون‌زا است و اشعه‌های ایکس، گاما، ذرات نوترونی با ایجاد یونیزاسیون در مولکول‌ها جزو اشعه های یون‌زا محسوب می‌گردند[5].

پرتوهای غیر یون زا:

پرتو ماوراءبنفش از امواج خورشیدی محسوب می‌شود که ایجاد موتاسیون می‌کند. پرتو ماوراءبنفش شامل UVA، UVB و UVC است. نوع UVA توانایی عبور از لایه ازن را داشته و به فتوسنتز گیاهان کمک می‌کند. انواع UVB و UVC توسط لایه ازن جذب شده و برای موجودات زنده بسیار مضر است[10]. پرتو ماوراءبنفش به دلیل داشتن انرژی پایین نسبت به دیگر پرتوها معمولاً برای ایجاد جهش در بافتهای نازک مثل گرده و اسپور قارچها مورد استفاده قرار می‌گیرد. تابش پرتو ماوراءبنفش به DNA باعث اتصال دو باز پریمیدینی مجاور هم (T,C) در یک رشته DNA و تشکیل دایمر می‌شود.

دایمرها غالباً از نوع تیمین دایمر هستند. دایمر باعث ایجاد برآمدگی در DNA شده که باعث از بین رفتن پیوند بین تیمین دایمر و آدنین مکمل آن می شود. این پدیده در همانند سازی ایجاد اختلال میکند، چرا که در همانندسازی معلوم نمیگردد که چه بازی باید رو به روی دایمر قرار بگیرد؛ پس هر بازی به صورت تصادفی وارد رشته DNA میگردد و این امر باعث جهش می شود. همچنین پرتو ماوراءبنفش می‌تواند باعث هیدرولیز شدن بازها شود، که این نیز در همانندسازی و جفت شدن بازها اختلال ایجاد کرده و در نهایت به جهش منجر می‌گردد[5].

پرتوهای یون زا:

اشعه هایی مثل ایکس، گاما، ذرات نوترونی و ... انرژی بسیار بالایی داشته که این انرژی بالا باعث جداشدن کامل یک یا چند الکترون از اتم شده و آنرا به یون بسیار فعالی تبدیل می‌کند. با ایجاد یون، یکسری تغییرات شیمیایی در مولکول ایجاد می‌شود. این مولکول می‌تواند یک ژن باشد و در آن یکسری تغییرات ایجاد گردد[5]. با توجه به یونیزاسیون رخ داده، اشعه ها به دو گروه کم تراکم و پرتراکم تقیسم می‌شوند. اشعه‌های کم تراکم مثل اشعه ایکس، گاما و ... در دوزهای بالا نیز باعث ایجاد موتاسیون نقطه ای شده تا تغییرات کروموزومی، در حالی که اشعه های پرتراکم مثل ذرات نوترونی و... به دلیل برخورد مکانیکی با مولکول بیشتر باعث تغییرات کروموزومی می‌شوند ولی ایجاد جهش نقطه ای نیز می‌کنند[5]. اشعه های یون ساز یا به صورت مستقیم باعث ایجاد یون می‌شوند و یا مولکولهای اطراف DNA، خصوصاً آب را یونیزه کرده و رادیکال آزاد ایجاد می‌کنند. رادیکال آزاد قسمتی از مولکول یا اتم‌هایی هستند که الکترون غیرجفت داشته و پس از تشکیل بسیار فعال و واکنش پذیر هستند، خصوصاً آنهایی که اکسیژن فعال دارند. این رادیکال‌های آزاد باعث شکستگی در مولکول DNA شده که اگر شکستگی در دو رشته رخ دهد امکان اصلاح آن بسیار پایین بوده و نهایتاً منجر به بروز جهش می‌شود[6,5].

دوز اشعه‌ها:

برای ایجاد یک جمعیت با تنوع ژنتیکی، تعیین دوز مناسب مهم است[6]. میزان دوز اشعه ها از جنبه های مختلف مورد اهمیت است.هر یک یون سازی باعث ایجاد یک جهش می‌شود که این یون سازی خود میزان دوز اشعه بستگی دارد، همچنین دوز اشعه ها در صورت بالا بودن امکان ایجاد خسارات فیزیولوژیکی را دارا هستند[5]. معمولاً برای تریکودرما از اشعه‌های گاما و ماوراءبنفش برای ایجاد موتاسیون استفاده می‌کنند و غالباً دوزهای مختلفی از این پرتوها استفاده و دوز اپتیمم مشخص گشته است. بر روی اسپور قارچ تریکودرما از اشعه گاما با دوزهای ۰ تا ۴۵۰ گری استفاده شد که دوز ۲۵۰ گری به عنوان دوز اپتیمم انتخاب گردید[3,1]. در مورد پرتو ماوراءبنفش برروی قارچ تریکودرما، از طول موج ۲۵۰nm برای ۲۰minاستفاده گردید[12,11] در این دوز بیشترین جذب پرتو ماوراءبنفش توسط مولکول DNA است[6].

کاربردهای عملی پرتودهی برروی تریکودرما:

همانطور که قبلاً اشاره شد، ایجاد جهش برای بدست آوردن سویه‌هایی با توانایی‌های ارزشمند امری کارآمد بوده، که در بین عوامل جهش‌زا، استفاده از فناوری هسته‌ای و پرتو گاما بسیار شایع است. مطالعات بسیاری برروی قارچ تریکوما با ایجاد جهش به واسطه اشعه گاما صورت گرفته است و در اکثر موارد به نتایج قابل قبولی دست یافته‌اند. از جمله این مطالعات میتوان

به افزایش میزان آنزیم های قارچ تریکودرما [4,3]، بررسی خصوصیات مورفولوژیکی تریکودرما[1] ایجاد سویه های مقاوم در برابر تنشهای مختلف محیطی شامل مقاومت به شوری[13]، مقاومت به سموم و مواد شیمیایی[14] و مقاومت به فلزات سنگین[15]، ایجاد سویه‌های کاراتر به عنوان یک عامل بیوکنترل[7] اشاره نمود. تمامی این مطالعات نشان می‌دهد که استفاده از اشعه گاما در ایجاد سویه‌های بهتر قارچ تریکودرما بسیار مفید و مؤثر است.

بحث ونتیجه گیری:

برای افزایش توانایی تریکودرما در مواجهه با بیمارگرهای گیاهی روش‌های مختلفی وجود دارد که آسانترین آن استفاده از موادجهش‌زا و ایجاد جهش است. جهش در طبیعت به صورت خود بخودی صورت می‌گیرد، که با ایجاد آلل‌های جدید در یک ژن و در جمعیت‌های موجودات زنده به تکامل کمک می‌کنند. همچنین با القا جهش احتمال ایجاد تغییرات بهتر در ماده ژنتیکی وجود دارد و احتمالاً می‌تواند به افزایش کارکرد موجود کمک نماید. با ایجاد جهش و تغییر در ماده ژنتیکی، احتمال وقوع تغییرات نامناسب در مولکول DNA وجود دارد و این امر می‌تواند منجر به ایجاد مشکلاتی در موجود زنده شود و یا در زنده‌مانی آن تأثیر بگذارد. به همین خاطر یکسری مکانیسم‌هایی برای رفع جهش در سلول وجود دارد. با توجه به این موضوع پس از ایجاد جهش به‌صورت القایی باید تا ۷ نسل جهش یافته‌ها کشت شوند تا تثبیت جهش مورد نظر در مولکول DNA بررسی گردد[5]. عوامل مختلفی از جمله مواد شیمیایی و یا پرتوها در ایجاد جهش نقش دارند. فناوری هسته‌ای خصوصاً اشعه گاما به عنوان یک عامل جهش‌زای موفق در افزایش کارایی قارچ جنس تریکودرما استفاده می‌شود. با توجه به بررسی های صورت گرفته، جهش‌های ایجاد شده در ماده ژنتیکی تریکودرما اکثراً به بهترشدن کارکرد این قارچ منجر گشته‌اند و جهش‌های نامطلوب یا به صورت خاموش بوده‌اند و یا در مناطقی رخ داده‌اند که بیان نمی‌شدند[1]. این موضوع به استفاده از پرتو گاما برای بهتر کردن کارایی، زنده‌مانی و تولید اسپور این قارچ بسیار کمک کرده است تا امری کارامد و مناسب باشد. البته در کنار مطالعات آزمایشگاهی، آزمایشات مزرعه‌ای میان مدت و طولانی مدت برای بررسی ثبات توانایی‌های به‌دست‌آمده توسط جهش‌یافته‌ها در مواجهه با بیمارگرهای گیاهی در محصولات مختلف نیز ضرورت دارد. همانطور که در اکثر مطالعات گذشته این امر مشهود است، در آینده نیز بررسی جهش‌یافته‌های تریکودرما با پرتوها به عنوان یک عامل بیوکنترل امری مقرون به صرفه و کارآمد خواهد بود.

Refrences:

۱. ر.مرادی، س. شهبازی، ح. اهری مصطفوی، م. ابراهیمی، ح. عسکری و م. میرمجلسی و ،"بررسی تأثیرات پرتو گاما بر خصوصیات مورفولوژیکی و آتاگونیستی قارچ *Trichoderma harzianum*" مجله علمی-پژوهشی زیست فناوری گیاهان زراعی.۳(۴)، ۱۱۷-۱۰۹(۱۳۹۲).

۲. د.نیک‌نژاد،"نقش فناوری هسته ای در ایمنی غذایی و سلامتی" مجموعه مقالات دومین همایش ملی کاربرد فناوری هسته‌ای در علوم کشاورزی و منابع طبیعی. ۳۹۰-۳۸۲(۱۳۸۷).

۳. س.شهبازی، ح. اهری مصطفوی، م.ع. ابراهیمی، ح. عسکری، م. میرمجلسی و م. کریمی،" افزایش فعالیت ژن کیتیناز قارچ *Trichoderma harzianum* با استفاده از جهش القایی ناشی از پرتو گاما" مجله علمی-پژوهشی زیست فناوری گیاهان زراعی. ۳(۵)، ۴۰-۳۳(۱۳۹۲).

۴. س. ر.فانی و د. ظفری، "اصلاح سویه‌های تریکودرما با پرتودهی" مجموعه مقالات دومین همایش ملی کاربرد فناوری هسته‌ای در علوم کشاورزی و منابع طبیعی. ۳۴۸-۳۵۲(۱۳۸۷).

۵. س. ع. م.میرمحمدی میبدی و آ. میر لوحی،"ژنتیک(اصول و مبانی)" جهاددانشگاهی واحد صنعتی اصفهان. ۶، ۳۷۷-۲۷۷(۱۳۸۸).

۶. م. ا.موسوی شلمانی، ب. ناصریان خیابانی، ح. اهری مصطفوی، م. حیدریه و ع. مجدآبادی،"کشاورزی هسته‌ای(از علم تا عمل)" پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای.۱، ۱۰۵-۸۵ و ۲۰۵-۱۷۷(۱۳۸۸).

7. D. K.Arora," Fungal Biotechnology in Agricultural,Food and Enviromental Applications", New York,147-148(2002).
8. G. H.Harman,"Overview of Mechanism and uses of *Trichoderma spp.*", The American Phytopatholog society.190-192(2006).
9. R. M.Panganiban, A. L. Snow and R. M. Day,"Mechanism of radiation Toxicity in Transformed and Non-Transformed cell", International Journal of M olecular Sciences. 14, 15931-15958(2013).
10. J.Ravana, T. Douki and J. Cadet,"Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components", Journal of photochemistry and photobiology.63,88-102(2001).
11. S.Shahbazi, K. Ispareh, M. Karimi, H. Askari and A. Ebrahimi,"Gamma and UV radiation induced mutagenesis in *Trichoderma reesei* to enhance cellulose enzyme activity, International Journal of farming and allied sciences, 543-554(2014). R.M.Panganiban, A.L.Snow and R.M.Day,"Mechanism of radiation Toxicity in Transformed and Non-Transformed cell", International Journal of M olecular Sciences. 14, 15931-15958(2013).
12. I. S.Melo, J. L. Faull and K. A. Graeme-cook,"Relationship between in vitro cellulose production of uv-induced mutants of *Trichoderma harzianum* and their bean rhizospher competence", mycological research,11,1389-1392(1997).
13. A.Abdel-latif, H. Mohamed and W. M. Haggag,"Biocontrol potential of salinity tolerance mutants of *Trichoderma harzianum* against *Fusarium oxysporum*",3(4),181-191(2002).
14. L.Hatvani, L. Manczger, A. Zsazsanna and C. Vagvolgi,"Production of *Trichoderma* strains whit pesticide-polyrestance by mutagenesis and protoplast fusion", Antonie van ieeuwenhook,89,387-393(2006).

L. Kredics, Z. Antal, L. Manczinger and E. Nagi,"Breeding of mycoparasitic *Trichoderma* strains for heavy metal resistance",Academic press,235(2007).