J. of Nuclear Sci. and Tech.
No. 51, pp. 48-51, 2010

مجله علوم و فنون هسته‌ای
شماره ۵۱، صفحات ۵۱-۴۸، ۱۳۸۹

Short Paper
مقاله کوتاه

شناسایی پاتولوژیکی و مولکولی جدایه‌های فوزاریم سولانی اختصاصی لوبیا و تعیین آهنگ دز پرتو گاما مناسب برای القای جهش در آن

حسین اهری مصطفوی*[۱و۲]، ناصر صفایی[۱]، هادی فتح‌اللهی[۲]، محمد بابایی[۲]، حمیدرضا دری[۳]، محمدرضا لک[۳]
۱- گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، صندوق پستی: ۳۳۶-۱۴۱۱۵، تهران ـ ایران
۲- پژوهشکده تحقیقات کشاورزی، پزشکی و صنعتی، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی ایران، صندوق پستی: ۴۹۸-۳۱۴۸۵، کرج- ایران
۳- مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان مرکزی، صندوق پستی: ۸۸۹، اراک ـ ایران

چکیده: در سال‌های ۱۳۸۴-۱۳۸۵ گیاهان با علایم پوسیدگی ریشه و طوقه از ۴۸ مزرعه‌ی مختلف لوبیا واقع در استان‌های خوزستان و مرکزی جمع‌آوری شد. پس از شناسایی ریخت‌شناختی، تعداد ۲۰ جدایه‌ی فوزاریم سولانی تعیین شد. با انجام آزمایش‌های بیماری‌زایی، فرم مخصوص چهار جدایه‌ی فوزاریم سولانی اختصاصی لوبیا مشخص گردید. با به کارگیری آغازگرهای اختصاصی برای این فرم مخصوص (FSPHR و FSPHF)، تعداد سه جدایه به عنوان فرم مخصوص لوبیا مورد تأیید قرار گرفت. به منظور القای جهش، هاگ تولید شده در محیط کشت قارچ پس از شمارش و تعیین رقت، بر سطح محیط کشت آب- آگار پخش شد. محیط‌های کشت حاوی هاگ با استفاده از دستگاه گاماسل با چشمه‌ی کبالت ۶۰ (فعالیت ۲۵۰۰ کوری و آهنگ دز ۰٫۳۸ گری در ثانیه) در دزهای ۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰ و ۱۸۰ گری پرتودهی شد. پس از گذشت ۱۸ ساعت، درصد جوانه‌زنی هاگ‌ها محاسبه گردید. مقایسه‌ی درصد جوانه‌زنی و میزان رشد کولونی در دزهای مختلف نشان داد که در محدوده‌ی ۱۲۰ تا ۱۸۰ گری می‌توان انتظار وقوع جهش مفید در ژنوم هاگ‌های قارچ را داشت.

واژه‌های کلیدی:* *پرتو گاما، القای موتاسیون، فوزاریم سولانی اختصاصی لوبیا، آغازگرهای اختصاصی

Pathological and Molecular Identification of *Fusarium Solani F.Sp. Phaseoli* Isolates and Determination of Suitable Gamma ray Dose Rate for Mutation Induction

H. Ahari Mostafavi[1,2], N. Safaie*[1], H. Fathollahi[2], M. Babaie[2], H.R. Dorri[3], M.R. Lak[3]
1- Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, P.O. Box: 14115-336, Tehran – Iran
2- Agricultural Medical and Industrial Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, AEOI, P.O. Box: 31485-498, Karaj-Iran
3- Agricultural and Natural Resources Researches Center of Markazi Province, P.O. Box: 889, Arak – Iran

Abstract: During 1384-1385, the plants showing root and crown rot were collected from 48 bean fields in the Khuzestan and Markazi provinces. Twenty isolates were identified as Fusarium solani based on morphological characteristics. The pathogenicity tests confirmed four isolates as Fusarium solani f.sp. phaseoli. By using specific primers for this specific form, three isolates showed concordant results with pathogenicity tests. As a result three isolates morphologically and molecularly identified as F.solani f.sp. phaseoli. In order to induce mutation, conidia scraped from F.solani f.sp. phaseoli cultures, were counted, diluted and then plated on water agar. The plates containing conidia were irradiated in a 60Co-gamma cell (with activity of 2500 curi and 0.38 gray per second dose rates) in doses 0, 60, 90, 120, 150, 180 Gy. After 18 hours, the percentage germination of spores were scored. The comparison of percentage germination and vegetative growth in different dose rates showed that spore mutagenesis can be expected in 120-180 Gy.

Keywords: ***Gamma Ray, Mutation Induction, Fusarium Solani F.Sp.Phaseoli, Specific Primer***

*email: hahari@nrcam.org
تاریخ دریافت مقاله: ۸۷/۴/۲۹ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۸/۹/۱۸

۱- مقدمه

بررسی نقشه‌ی ژنتیکی پاتوژن‌ها و تفکیک ژن‌های مرتبط با صفات مختلف، راهکار جدیدی را پیش روی دانشمندان قرار داده و تفکر نوینی را در روش کنترل عوامل بیماری‌زا حاکم ساخته است. در این راستا طی سالیان اخیر محققین به دنبال راهکاری برای تغییر در ژنوم پاتوژن و حذف صفت بیماری‌زایی برآمده‌اند. بر این اساس، استفاده از امواج الکترومغناطیسی (پرتو گاما، اشعه‌ی ایکس و تابش فرابنفش) به عنوان جهش‌زای فیزیکی برای ایجاد تغییرات ژنتیکی هدف‌دار در عوامل بیماری‌زا مورد بررسی قرار گرفته است. جوریان و همکارانش (۱۹۹۹) با انجام آزمایش‌هایی دز ۱۳۰ گری را برای القای جهش در قارچ عامل پژمردگی گوجه فرنگی انتخاب کردند. آن‌ها با پرتودهی قارچ فوزاریم اکسیسپروم اف. اس.پی. لیکوپرسیسی[1] موفق به ایجاد جهش یافته‌های غیربیماری‌زا شده و از آن‌ها برای زیست مهاری عامل بیماری استفاده نمودند [۱]. مقایسه‌ی ژنوم جهش یافته‌های حاصل با پاتوژن طبیعی نشان داد که علت اصلی غیربیماری‌زایی مربوط به حذف ژن کنترل‌کننده‌ی صفت بیماری‌زایی از ژنوم جدایه‌ی پرتودیده می‌باشد. لاکشمشا و همکارانش (۲۰۰۵) با به کارگیری تابش فرابنفش جهش یافته‌هایی را در قارچ کولتوتریکوم کپسیسی[2] (عامل آنتراکنوز) ایجاد کردند که میزان تولید آنزیم‌های سلولاز و پکتیناز در آن‌ها را حدود ۴۳ و ۴۰ درصد کاهش داد. این کاهش موجب شد که جهش یافته‌های مزبور با کاهش رشد ۴۰ درصدی مواجه شده و از میزان تولید کنیدی در آن‌ها نیز ۱۰ درصد کاسته شود. ظهور علایم سیاه تاول جهش یافته‌های پرتودیده حدود چهار روز دیرتر از قارچ‌های طبیعی اتفاق افتاد و نرخ توسعه‌ی بیماری نیز کاهش معنی‌داری نشان داد [۲]. بیماری پوسیدگی ریشه‌ی لوبیا ناشی از فوزاریم سولانی[3] در همه‌ی مناطق لوبیاکاری دنیا گزارش شده است. در ایران نیز این بیماری همه ساله خسارت قابل‌ملاحظه‌ای به کشاورزان تحمیل می‌نماید به نحوی که در مناطق کاملاً آلوده، تا ۸۵٪ محصول را از بین می‌برد [۳]. از آن جا که صفت بیماری‌زایی فوزاریم سولانی تحت کنترل ناحیه‌ای ژنوم قارچ می‌باشد، پرتودهی با دز معین تابش گاما می‌تواند موجب شکل‌گیری جهش‌یافته‌هایی گردد که با وجود از دست دادن صفت بیماری‌زایی، همه‌ی خصوصیات مربوط به شناسایی میزبان، استقرار در ریشه و رقابت با سایر موجودات ذره‌بینی را حفظ می‌کنند. لازمه‌ی القای جهش، یافتن محدوده‌ی مناسب دز امواج الکترومغناطیسی است که بدون ایجاد اثرات مخرب و عمیق در ژنوم موجودات ذره‌بینی، تنها با ایجاد تغییرات نقطه‌ای در برخی از مکان‌های ژنی منجر به بروز تعداد محدودی از صفات گردد. در این تحقیق ضمن بررسی بیماری‌زایی جدایه‌های فوزاریم سولانی بر روی میزبان‌های مختلف، فرم مخصوص آن تعیین و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی تأیید گردید. سپس دز مؤثر پرتو گاما برای ایجاد جهش در این جدایه‌ها بررسی شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱ جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی پاتوژن

قطعاتی از حد فاصل بافت آلوده و سالم بر روی ریشه، و قطعاتی از نواحی طوقه جدا، و پس از ضدعفونی شدن بر روی محیط آب- آگار (۱٫۵ درصد) کشت داده شدند. ریسه‌های خارج شده به محیط کشت (PDA) انتقال یافت. خالص‌سازی قارچ‌ها به روش تک هاگی بر روی محیط کشت آب- آگار ۲٪ انجام پذیرفت. تشخیص و شناسایی گونه‌ی فوزاریم سولانی با استفاده از کلید شناسایی نلسون و همکارانش (۱۹۸۳) انجام شد [٤].

۲-۲ آزمون بیماری‌زایی و دامنه‌ی میزبانی

برای اثبات بیماری‌زا بودن جدایه‌های جمع‌آوری شده، آزمون بیماری‌زایی در گلخانه انجام شد. برای تهیه‌ی مایه‌ی تلقیح از روش وسترلاند و همکارانش (۱۹۷۴) استفاده شد [۵]. شدت بیماری‌زایی هر ۲۰ جدایه براساس درجه‌بندی پنج شماره‌ای مک فادن و همکارانش (۱۹۸۹) مورد ارزیابی قرار گرفت [۶]. تعیین فرم مخصوص جدایه‌های بیماری‌زا طی دو مرحله انجام شد:

- ***بررسی دامنه‌ی میزبانی در گلخانه***

  تهیه‌ی مایه‌ی تلقیح به همان روش قبلی انجام و عمل مایه‌زنی بر روی گیاهانی از خانواده‌ی بقولات (نخود، سویا، ماش و عدس) و کدوییان (خیار، طالبی و خربزه) انجام پذیرفت.

- ***به کارگیری آغازگرهای اختصاصی***

  استخراج دی‌ان‌اِ ژنومی

  استخراج دی ان اِ براساس روش صفایی و همکارانش (۱۳۸۴) انجام پذیرفت [۷].

  واکنش زنجیره‌ای پی سی آر

  برای شناسایی تکمیلی جدایه‌ها از آغازگر مختص فوزاریم سولانی اختصای لوبیا که توسط فیلبون و همکارانش (۲۰۰۳) طراحی شده است

استفاده گردید [۸]. آغازگر بالادست ۵-AACCCCGCCCGAGGACTCA-۳ و پایین دست ۵-AGACATGAGCGATGAGAGGCA-۳ بدین منظور مورد استفاده قرار گرفت.

۳-۲ دزیابی

تشتک‌هایی که سوسپانسیونی از هاگ خالص قارچ بر سطح آن پخش شده بود تا دزهای ۰ (شاهد)، ۶۰ ، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰ و ۱۸۰ گری پرتودهی شدند. پرتودهی با استفاده از دستگاه گاماسل با چشمه‌ی کبالت-۶۰ به فعالیت ۲۵۰۰ کوری و آهنگ دز ۰٫۳۸ گری در ثانیه در پژوهشکده‌ی تحقیقات کشاورزی، پزشکی و صنعتی (سازمان انرژی اتمی ایران) انجام پذیرفت. ۱۲ ساعت پس از پرتودهی، برای هر میزان دز تعداد ۳ هاگ جوانه زده مشخص شد و با استفاده از سوزن به محیط سیب‌زمینی- دکستروز- آگار انتقال یافت. پس از ۱۰ روز، مقایسه‌ی رشد با اندازه‌گیری قطر کلونی‌ها انجام پذیرفت. علاوه بر این، درصد جوانه‌زنی میکروکنیدی و ماکروکنیدی‌ها نیز پس از گذشت ۱۸ ساعت ثبت شد. تجزیه و تحلیل آماری نتایج با استفاده از نرم‌افزار MSTATC و در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با ۶ تیمار و ۳ تکرار انجام پذیرفت.

۳- نتایج و بحث

۳-۱ جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی پاتوژن

با توجه به خصوصیات ریخت‌شناختی، تعداد بیست جدایه (۱۲ جدایه از منطقه‌ی خمین و ۸ جدایه از دزفول) به عنوان فوزاریم سولانی شناسایی شدند.

۳-۲ آزمون بیماری‌زایی و دامنه‌ی میزبانی

براساس آزمون بیماری‌زایی جدایه‌ها بر روی میزبان‌های مختلف، چهار جدایه‌ی Kh۹، Kh۱۲، Kh۱۱ و D۶ به عنوان فرم مخصوص لوبیا مشخص شد.

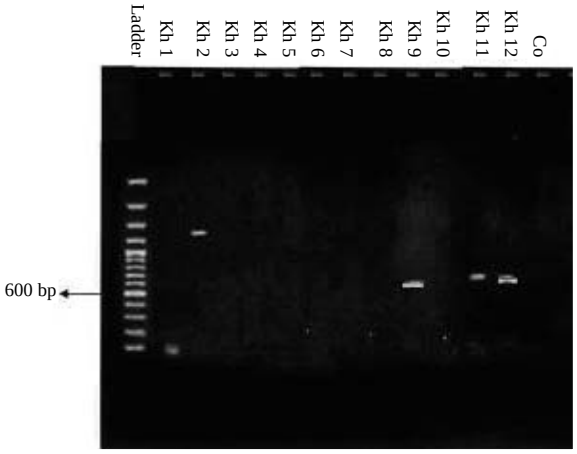
۳-۳ تأیید فرم مخصوص جدایه‌های بیماری‌زا با به کارگیری آغازگر اختصاصی

تعیین فرم مخصوص جدایه‌ها نشان داد که آغازگرهای اختصاصی در سه جدایه‌ی Kh۹، Kh۱۱، Kh۱۲ یک باند ۵۶۰bp ویژه‌ی فرم مخصوص فوزاریم سولانی اختصاصی لوبیا تکثیر می‌نمایند (شکل ۱). چنین باندی در هیچ یک از جدایه‌های D۸-D۱ (جمع‌آوری شده از دزفول) مشاهده نشد. از آن جا که این آغازگر ویژه‌ی فرم مخصوص فوزاریم سولانی اختصاصی لوبیا است [۸] تکثیر چنین باندی تأییدکننده‌ی آزمایش‌های گلخانه‌ای می‌باشد.

۳-۴ دزیابی

با گذشت سه ساعت از آزمایش هنوز جوانه‌زنی هاگ در دزهای ۱۲۰، ۱۵۰ و ۱۸۰ گری مشاهده نشد در حالی که در دزهای ۶۰ و ۹۰ گری میکرو و ماکرو کنیدی‌ها جوانه زدند. درصد جوانه‌زنی در دزهای ۱۵۰ و ۱۸۰ گری (پس از ۱۲ ساعت) به طور معنی‌داری نسبت به سایر دزها کاهش نشان داد در حالی که دز ۶۰ گری نتوانست در میزان جوانه‌زنی هاگ‌ها تأثیر معنی‌دار بگذارد (جدول ۱).

پرتودهی با دزهای ۱۵۰ و ۱۸۰ گری به طور معنی‌داری سبب کاهش قطر کلونی نسبت به شاهد و سایر دزها شد (شکل ۲).

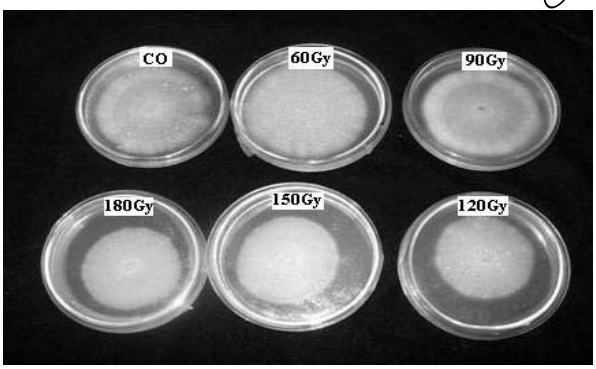


شکل ۱- محصولات تکثیریافته‌ی پی سی آر دی ان ا استخراج شده‌ی جدایه‌های گونه‌ی فوزاریم سولانی شهرستان خمین بر روی ژل آگاروز.

جدول ۱- مقایسه‌ی میانگین درصد جوانه‌زنی و قطر کلونی قارچ فوزاریم اختصاصی لوبیا در دزهای مختلف پرتوگاما.

دز پرتو گاما (گری)	جوانه‌زنی	قطر کولونی (سانتی‌متر)
۰	۹۶٫۳ (A)	۷٫۷۳ (A)
۶۰	۹۳٫۲ (A)	۷٫۱۷ (AB)
۹۰	۸۱٫۳۳ (B)	۷٫۰۳ (B)
۱۲۰	۵۹٫۶۷ (C)	۶٫۹۷ (B)
۱۵۰	۵۴٫۳۳ (D)	۶ (C)
۱۸۰	۵۱٫۶۷ (D)	۵٫۵ (C)

میانگین‌های دارای حرف مشترک، در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌داری ندارند.



شکل ۲– مقایسه‌ی میزان رشد تیمارهای مختلف پرتودهی شده، پس از ۱۰ روز بر روی محیط PDA.

تأثیر پرتو گاما بر جوانه‌زنی هاگ‌های فوزاریم سولانی اختصاصی لوبیا با شروع از دز ۹۰ گری نمایان گردید و با افزایش میزان دز پرتو، درصد جوانه‌زنی هاگ‌ها کاهش یافت. در این آزمایش با شروع از دز ۱۲۰ گری میزان مرگ و میر ۴۰ درصدی هاگ‌ها آغاز و در دز ۱۸۰ گری به حدود ۵۰ درصد رسید. تابش گاما رابطه‌ی مستقیمی با تأثیرات زیست‌شناختی بر سلول زنده دارد. بالاترین تأثیر به صورت مرگ و میر بروز می‌نماید و در نتیجه دزی که بتواند تقریباً نیمی از سلول‌ها را از بین ببرد و یا کاهش ۵۰ درصدی رشد ایجاد نماید به احتمال بسیار زیاد در نیم باقی‌مانده سبب جهش خواهد شد [۹]. بنابراین در محدوده‌ی دز ۱۲۰ تا ۱۸۰ گری می‌توان انتظار وقوع جهش در ژنوم هاگ‌های قارچ را داشت. با رسیدن به دز ۱۵۰ گری، قطر کلونی (میزان رشد) به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد (جدول ۱). با توجه به هدف نهایی دست‌یابی به جهش یافته‌های غیربیماری‌زا برای استفاده در مبارزه‌ی زیست‌شناختی علیه جدایه‌های بیماری‌زا، باید توجه نمود که جهش و القای تغییرات ژنتیکی نباید در حدی باشد که روند طبیعی رشد جهش یافته‌ی حاصل را با اختلال مواجه سازد. زیرا در این صورت در رقابت با تیپ وحشی برای کلونه کردن ریشه‌ی گیاه با مشکل مواجه خواهد شد. بر این اساس پرتودهی در محدوده‌ی دز ۱۲۰ تا ۱۵۰ گری از بیش‌ترین احتمال برای القای جهش مفید در هاگ‌های فوزاریم اختصاصی لوبیا برخوردار است. بررسی‌های انجام یافته توسط سایر محققین برای القای صفت غیربیماری‌زایی در قارچ عامل پژمردگی آوندی گوجه فرنگی نیز منجر به انتخاب دز ۱۳۰ گری برای ایجاد جهش در هاگ‌های قارچ گردید [۱] که در محدوده‌ی دز به دست آمده در این آزمایش قرار دارد.

پی‌نوشت‌ها:

۱- *Fusarium Oxysporum F.Sp.Lycopersici*

۲- *Colletotrichum Capsici*

۳- *Fusarium Solani*

References:

1. J.M. Jurrian, R. Wit, S.T. Christa, D.G. Francis, A.H. Michel, J.C. Ben, “Loss of avirulence and reduced pathogenecity of a gamma-irradiated mutant of fusarium oxysporum f.sp.lycopersici,” Phytopathology, 89, 1131-1137 (1999).

2. K.K. Lakshmesha, N. Lakshmidevi, S. Mallikarjuna, “Changes in pectinase and cellulase activity of colletotrichum capsici mutants and their effect on antheracnose disease on capsicum fruit,” Archives of Phytopathology and Plant Protection, 38: 267-279 (2005).

3. بی‌نام، ”آمار محصولات کشاورزی سالیانه و دایمی استان مرکزی سال زراعی ۸۱-۱۳۸۰،“ سازمان جهاد کشاورزی استان مرکزی، ۲۰ (۱۳۸۲).

4. P.E. Nelson, T.A. Toussoun, W.F.O. Marasas, “Fusarium species: an illustrated manual for identification,” Pensylvania State University Press. University Park, 193 (1983).

5. Westerland, F.U. J.R. Campbell, R.N. Limble, K.A. “Fungal root rots and wilt of chickpea in California,” Phytopathology, 64: 432-436 (1974).

6. W. McFadden, R. Hall, L. Philips, “Relation of initial inoculum density to severity of fusarium root rot of white bean in commercial fields,” Can. J. Plant Pathol. 11: 122-126 (1989).

7. ن. صفایی، ع. علیزاده، ع. سعیدی، ح. رحیمیان، گرهارد آدام، ”تشخیص مولکولی و بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های ایرانی Fusarium graminearum عامل بلایت سنبله گندم،“ مجله بیماری‌های گیاهی، ۴۱، ۱۸۹-۱۷۱ (۱۳۸۴).

8. M. Filion, M. St-Arnaud, S.H. Jabaji-Hare, “Quantification of fusarium solani f.sp. phaseoli in mycorrhizal bean plants and surrounding mycorrhizosphere soil using Real Time polymerase chain reaction and direct isolations on selective media,” The American Phytopathological society, V.93, 2, 229-235 (2003).

9. International Atomic Energy, Vienna, “Manual on mutation breeding,” (1995).