ایجاد مقاومت به بیماری پژمردگی فوزاریومی در موز با استفاده از پرتوگاما

بهنام ناصریان خیابانی*، اعظم برزویی، محمد رضا راحمی، لیلا باقری

پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، صندوق پستی ۳۱۴۶۵/۱۴۹۸ کرج- ایران

چکیده

موز یکی از محصولات مهم کشاورزی است که متعلق به جنس Musa بوده و دارای گونه‌های بسیاری شامل انواع دیپلوئید، تری پلوئید و تترا پلوئید است. تولید موز توسط عوامل بیماری‌زای قارچی و ویروسی تهدید می‌شود. یکی از مهمترین تهدیدات که تولید موز با آن مواجه است بیماری پرمردگی فوزاریومی می‌باشد. به دلیل تولید مثل رویشی موز، القا جهش مطمئن‌ترین روش جهت اصلاح و توسعه ارقام جدید در این گیاه می‌باشد. به منظور ایجاد مقاومت به بیماری پژمردگی فوزاریومی از تلفیق روش ریز ازدیادی و پرتوتابی با اشعه گاما استفاده شد.پس از تعیین دز مناسب، دز ۳۵ گری پرتوگاما برای القا جهش در موز کاوندیش استفاده شد. ۱۰۰۰ مریستم انتهایی با دز ۳۵ گری پرتو گاما پرتودهی شدند. به منظور حذف شیمر سه بار واکشت انجام گرفت. گیاهچه‌های پرتوتابی شده در شرایط درون شیشه‌ای با عامل زنده بیماری تلقیح و گزینش و ارزیابی موتانت‌های مقاوم انجام گرفت. ۵۰۰۰ گیاهچه پرتوتابی شده ارزیابی و ۱۰ موتانت مقاوم به بیماری به دست آمد.

کلیدواژه‌ها: موز، ارزیابی درون شیشه‌ای، پرتو گاما، موتانت مقاوم

Development of Resistance to Fusarium wilt Disease in Banana Using Gamma ray

Behnam Naserian Khiabani*, Azam Borzouei, Mohamad Reza Rahemi, Leila Bagheri

Nuclear Agricultural research School, Nuclear Science & Technology Institute, PO Box 31645/1498, Karaj- Iran

Abstract

Banana is one of the most important agricultural products that belong to the Musa genus. It has many species includes diploid, triploid, and tetraploid. Banana production is threatened by fungal and viral pathogens. One of the most important diseases faced by banana production is Fusarium wilt. Due to the vegetative reproduction of bananas, induction of mutation is the safest way to improve and develop new cultivars in this plant. A dose of 35 Gy was used to induce mutations in Cavendish bananas. About 1000 shoot tip meristems were irradiated with a dose of 35 Gy of the gamma-ray. Three subcultures were performed to remove the chimera. To provide resistance to Fusarium wilt, a combination of micro-propagation and irradiation with gamma rays was used. Irradiated explants were inoculated in-vitro with live disease agents (sports and mycelium), and resistant mutants were selected. About 5000 irradiated seedlings were evaluated. Finally, ten resistant seedlings were obtained.

Keywords: Banana, In-vitro assay, Gamma rays, resistant mutant.

Email: bnaserian@aeoi.org.ir

۱. مقدمه

موز یکی از محصولات مهم کشاورزی است که متعلق به جنس Musa بوده و دارای گونه‌های بسیاری شامل انواع دیپلوئید، تری پلوئید و تتراپلوئید است. موز به صورت طبیعی عقیم بوده و به شکل رویشی تکثیر می‌شود. موز دسری از موزهای گروه کاوندیش (*Musa acuminata*) است. این موزها اغلب بر پایه ژنوم A هستند. موزهای پلانتین (*Musa balbisiana*) دارای ژنوم B بوده و معمولا به صورت پخته شده در مناطق گرمسیری به عنوان یکی از منابع اصلی غذایی استفاده می‌شود[۱]. در حال حاضر به منظور توسعه ارقام جدید در موز از چندین روش استفاده می‌شود. اما به دلیل عقیمی موز، اصلاح از طریق کلاسیک با مشکلات بسیاری همراه است. به نظر می‌رسد در ارقام *M. acuminata*، هتروزیگوزیتی ساختاری یکی از دلایل اصلی عقیمی و عدم تولید بذر باشد، که برای به دست آوردن میوه‌های بدون دانه ضروری است اما روند اصلاح موز را با مشکل روبرو می‌کند [۲]. علارغم آنکه تلاش‌های بسیاری در جهت اصلاح ارقام جدید موز صورت گرفته است اما همچنان چالش‌های بسیاری پیش روی به‌نژادگران موز است. تولید موز مواجه با تنش‌های زیستی و غیر زیستی است. بنابراین علاوه بر اینکه وجود تنوع ژنتیکی جهت ایجاد ارقام جدید مقاوم به بیماری‌ها و تنش‌های غیر زیستی مورد نیاز است، به منظور تامین امنیت غذایی ضروری است که ارقام پر محصول با پایداری عملکرد، کارایی بالاتر مصرف آب و کاهش مصرف سموم ایجاد شوند [۳].

القا جهش به کمک موتاژن‌های فیزیکی یا شیمیایی روش سودمندی در القا تنوع ژنتیکی است. با توجه به ماهیت تکثیر غیر جنسی موز، تلفیق القا جهش با روش‌های درون شیشه‌ای ابزار قدرتمندی در جهت القا تنوع ژنتیکی و انتخاب صفات جهش یافته است. استفاده از موتاسیون به همراه ریز ازدیادی مزایای متعددی دارد که می‌توان تولید تعداد زیاد گیاه در فضای محدود، امکان حذف شیمر و گزینش درون شیشه‌ای را برشمرد. استفاده از پاجوش‌های موز به منظور القا جهش با موفقیت بالایی همراه نبوده است [۴]. استراتژی ایجاد جهش در شرایط درون شیشه‌ای با استفاده از مواد موتاژن نظیر EMS، نوترون‌ها، اشعه گاما در به‌نژادی گیاهان بسیاری به کاربرده شده است. این روش‌ها جهش‌های نقطه‌ای، حذف یا اضافه شدگی را در ژنوم گیاه ایجاد می‌کنند که در اصلاح به منظور ایجاد مقاومت به تنش‌های زیستی و غیر زیستی مفید هستند [۵]. تنوع سوماکلونال و القا جهش با موتاژن‌های فیزیکی یا شیمیایی و به دنبال آن انتخاب در شرایط درون شیشه‌ای روش اصلاحی جایگزینی است که می‌توان در اصلاح موز در کنار روش‌های اصلاح کلاسیک به کار برد [۶].

تولید موز توسط عوامل بیماری‌زای قارچی و ویروسی تهدید می‌شود. یکی از مهمترین چالش‌ها که تولید موز با آن مواجه است بیماری پژمردگی فوزاریومی می‌باشد [۷]. عامل بیماری قارچ فوزاریوم (*Fusarium oxysporum* f. sp. Cubense (Foc) است. نژاد یک (race I) این پاتوژن در اواسط قرن بیستم رقم موز گروس میشل را در سراسر جهان آلوده کرد و منجر به از بین رفتن آن شد [۸]. هر چند موزهای گروه کاوندیش به نژاد یک فوزاریوم مقاومت دارند [۹] اما ظهور نژاد جدید (TR4) که موزهای کاوندیش به آن حساس هستند، بار دیگر باعث به خطر افتادن تولید جهانی موز شده است [۱۰].

با توجه به اهمیت ایجاد ارقام جدید موز که متحمل به بیماری فوزاریومی، جهت حفظ تولید موز و تامین امنیت غذایی و نیز درآمد کشاورزان محلی این بررسی به منظور ایجاد جهش و تولید لاین‌های موتانت متحمل به بیماری فوزاریومی در پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای اجرا شد.

۲. روش کار

۲-۱- مواد گیاهی

مواد گیاهی از پاجوش‌های سالم از رقم کاوندیش پاکوتاه در منطقه چابهار سیستان و بلوچستان تهیه و به آزمایشگاه کشت بافت پژوهشکده کشاورزی منتقل شدند. برای ضدعفونی ابتدا پاجوش‌ها کاملا شسته شده و بخش مریستمی به صورت بلوک استخراج و در محلول الکل ۹۵ ٪ به مدت ۲۰ ثانیه قرار گرفتند. سپس پس از شستشو با آب مقطر استریل به مدت ۲۰ دقیقه در محلول ضد عفونی کننده تجاری(v/v) ٪۱۰(حاوی ۵ درصد هیپوکلرید سدیم) ضدعفونی شده و حداقل سه بار با آب مقطر استریل در لایمنار شتشو شدند. بخش مریستم (به ابعاد ۵ میلی‌متر) در محیط MS [۱۱] تغییر یافته، مایع حاوی ۵ میلیگرم در لیتر ۶ بنزیل آمینو پورین (BAP) کشت شدند و در اتاق رشد با دمای ۲±۲۶ با دوره نوری ۱۶/۸ قرار گرفتند.

۲-۲- ایجاد جهش و پرتوتابی با اشعه گاما

مریستم انتهایی گیاهچه‌های درون شیشه‌ای جدا شده و به مدت ۲ روز در محیط تکثیر مایع قرار داده شدند. سپس به منظور تعیین دز بهینه در شرایط استریل (پتری دیش‌های استریل فاقد محیط کشت) با دزهای ۰، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۵، ۴۵ و ۶۰ گری پرتوگاما (Issoledo vatle Gamma cell PX-30 dos، با شدت دز ۰/۰۱۸ گری در ثانیه) پرتوتابی شدند. نمونه‌های پرتوتابی شده بلافاصله در محیط تکثیر قرار داده شدند. برای هر دز ۳۰ نمونه استفاده شد که به صورت طرح کاملا تصادفی با ۶ تکرار ارزیابی شدند. صفات درصد زنده‌مانی، میزان تکثیر و تولید ساقه جدید، تعداد برگ‌های تشکیل شده، طول گیاهچه و وزن‌تر پس از ۳۰ روز اندازه‌گیری شدند.

۲-۳ ایجاد جمعیت موتانت

در حدود ۱۰۰۰ مریستم‌های انتهایی موز با دز بهینه تعیین شده پرتوتابی و در محیط تکثیر کشت شدند. این نمونه ها سه بار در فواصل زمانی ۴۵ روز واکشت شدند. گیاهچه‌های پرتوتابی شده پس از سومین واکشت به محیط جامد ریشه‌زایی حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید (NNA) منتقل شدند.

۲-۴- ارزیابی و گزینش درون شیشه‌ای

به منظور ارزیابی مقاومت به بیماری پژمردگی فوزاریومی گیاهچه های ریشه‌دار با طول ۴-۵ سانتی‌متر به محیط MS با نیمی از غلظت نمک‌های ماکرو و میکرو منتقل شدند. محیط جدید فاقد ویتامین‌ها و هورمون‌های رشد گیاه بوده و حاوی ۷/۵ گرم در لیتر ساکاروز بود. پس از دو هفته هر گیاهچه توسط یک دیسک کاغذی (قطر ۵ mm) آغشته به سوسپانسون قارچ *Fusarium oxysporum* با تراکم $۱۰^{۶}$ اسپور در هر میلی لیتر، تلقیح شدند. ارزیابی مقاومت به بیماری در ۲۱ تا ۳۰ روز پس از آلوده سازی بر اساس علائم و نشانه‌های بیماری بر اساس روش توصیف شده توسط وو و همکاران [۱۲] انجام شد.

۲-۵- تجزیه آماری

تجزیه داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 و رسم نمودارها با استفاده از اکسل انجام گرفت. به منظور تجزیه آماری ارزش هر صفت به صورت درصد نسبت به تیمار شاهد (پرتوتابی نشده) محاسبه و تجزیه آماری شد.

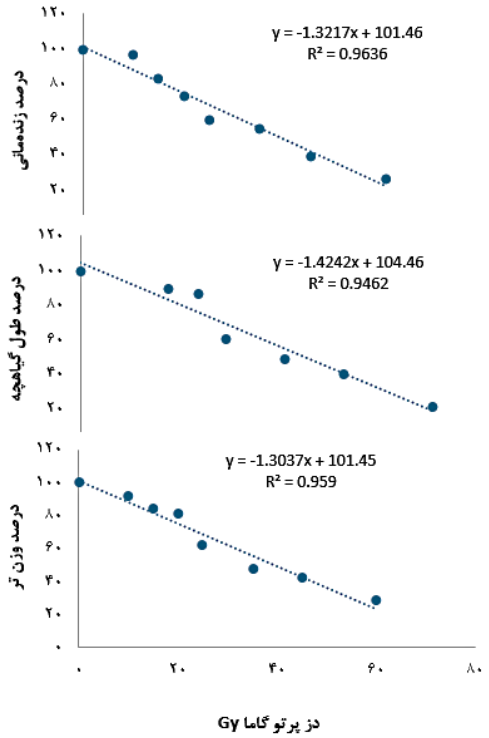
۳. نتیجه گیری

تجزیه واریانس اختلاف معنی‌دار بین سطوح مختلف اشعه گاما برای تمام صفات اندازه گیری شده نشان داد (جدول تجزیه واریانس آورده نشده است). نتایج مقایسه میانگین صفات در سطوح مختلف اشعه گاما در جدول ۱ آورده شده است. روند نزولی در تمام صفات اندازه گیری شده همزمان با افزایش دز پرتو گاما مشاهده شد. دز ۱۰ گری تفاوت معنی‌داری با شاهد پرتوتابی نشده نداشت. روند نزولی درصد تکثیر و درصد تولید برگ جدید کندتر از سایر صفات بود. در حالیکه درصد وزن‌تر و درصد طول ساقه در دزهای پایین‌تری حساسیت نشان دادند شد. بنابراین صفات اخیر حساسیت بیشتری به پرتوگاما داشتند.

جدول ۱ مقایسه میانگین اثر پرتو گاما در صفات اندازه گیری شده موز رقم کاوندیش

دز پرتو گاما (Gy)	زنده مانی ٪		تکثیر ٪		تولید برگ ٪		طول گیاهچه ٪		وزن تر ٪	
۰	a	۱۰۰	a	۱۰۰	a	۱۰۰	a	۱۰۰	a	۱۰۰
۱۰	a	۹۶/۶	a	۹۶/۷	a	۹۹/۳	ab	۹۶/۹	ab	۹۲/۵
۱۵	b	۸۳/۳	a	۹۵/۵	ab	۹۸/۶	ab	۸۹/۵	bc	۸۴/۲
۲۰	b	۷۳/۳	a	۹۵/۵	ab	۹۸/۶	b	۸۶/۴	c	۸۱/۲
۲۵	c	۶۰	b	۷۲/۲	ab	۸۹/۳	c	۶۴/۶	d	۶۲
۳۵	d	۵۵/۳	c	۷۳/۱	ab	۸۶/۴	d	۵۱/۸	e	۴۷/۷
۴۵	e	۳۹	c	۷۱/۸	b	۸۵	e	۴۴/۵	e	۴۲/۱
۶۰	f	۲۶/۶	c	۷۰/۲	b	۸۴/۳	f	۲۰/۹	f	۲۸/۱
%۵LSD	۱۱/۲		۵/۴۴		۱۲/۲		۱۲/۱		۱۱/۱	

میانگین‌های با حداقل یک حرف مشترک اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ ٪ ندارند



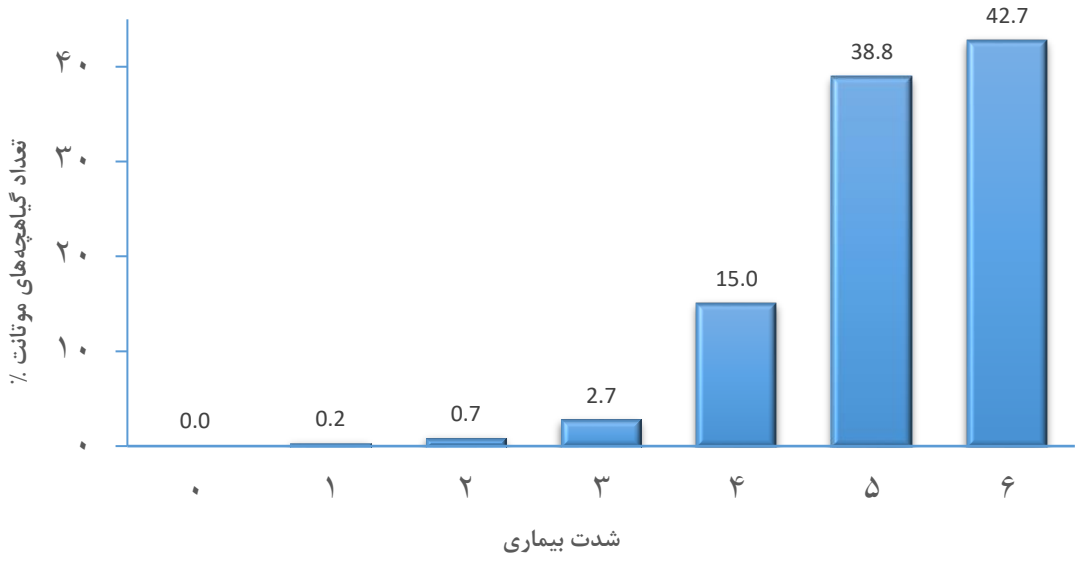
شکل ۱. برازش خطی رابطه دز پرتو و صفات درصد زنده مانی، طول گیاهچه و وزن‌تر در موز کاوندیش

تجزیه رگرسیون و برآزش خطی برای رابطه دز و درصد زنده‌مانی، درصد طول گیاهچه و درصد وزن‌تر به منظور تعیین دز بهینه انجام گرفت (شکل ۱). بر اساس معادلات به دست آمده از درصد زنده‌مانی، درصد طول گیاهچه و درصد وزن تر به ترتیب دزهای LD50 و GR50 محاسبه شد (جدول ۲). دز مطلوب دزی است که ضمن ایجاد حداکثر جهش به اندازه‌ای بالا نباشد که منجر به کاهش جمعیت گردد [۱۳, ۱۴]. بنابراین دز مطلوب در محدوده ۳۵ Gy تعیین و انتخاب شد و نمونه های گیاهی درون شیشه‌ای با ۳۵ گری پرتوتابی شدند.پس از سه بار واکشت نمونه های M1V3 به محیط ریشه‌زایی منتقل شده و پس از ریشه دار شدن برای ارزیابی مقاومت به بیماری فوزاریوم به محیط MS تغییر یافته منتقل شدند. در حدود ۶۰۰۰ گیاهچه پرتوتابی شده با این روش ارزیابی شدند.

جدول ۲ معادله خطی و برآورد دز بهینه پرتو گاما در موز رقم کاوندیش

صفت اندازه گیری شده	معادله خطی دز و صفت	R2	LD50 (Gy)	GR 50 (Gy)
درصد زنده مانی	Y = -۱/۳۲ X +۱۰۱/۴۶	۰/۹۶	۳۸/۹۸	-
درصد طول گیاهچه	Y = -۱/۴۲ X +۱۰۴/۴۶	۰/۹۵	-	۳۵/۶۹
درصد وزن تر	Y = -۱/۳۰ X +۱۰۱/۴۵	۰/۹۶	-	۳۹/۵۷

گیاهچه‌های موتانت بر اساس علائمی مشاهده شده از ۰ تا ۶ رتبه بندی شدند[۱۲]، که رتبه صفر و ۶ به ترتیب نشانگر مقاومترین و حساسترین موتانت‌ها بود. شکل ۲ فراوانی موتانت‌های ارزیابی شده را بر اساس علائم ظاهری بیماری نشان می‌دهد. در حدود ۰/۲ درصد از ۵۰۰۰ گیاهچه ارزیابی شده در رتبه یک قرار گرفتند (۱۰ گیاهچه موتانت) که به عنوان موتانت مقاوم دسته بندی شدند. ۸۵ درصد مواد گیاهی پرتوتابی شده کاملا حساس به بیماری بودند.



شکل ۲. فراوانی موتانت‌های ارزیابی شده بر اساس میزان حساسیت به بیماری پژمردیگی، جمعیت ارزیابی شده ۶۰۰۰ گیاهچه درون شیشه ای

۴. منابع

1. Pillay, M., J. Hratman, and A. Tenkovano, *Future challenges in Musa breeding* in *Crop Improvement,Challenges in the twenty-first century.*, M. Kang, Editor. 2002, Food products press: New york, USA.
2. Pillay, M. and A. Tenkovano, *Genomes, Cytogenetics and flowcytometry of Musa*. Bananna Breeding progress and challenges ed. M. pillay and A. Tenkovano. 2011, Boca Raton FL, USA: CRC press.
3. Heslop-Harrison, J.S. and T. Schwarzacher, *Domestication, genomics and the future for banana.* Annals of botany, 2007. 100(5): p. 1073.
4. Jain, S.M. and R. Swennen, *Banana improvement: cellular, molecular and mutagenesis approaches*. 2004, New Hampshire: Science Publishers.
5. Bhagwat, B. and E. Duncan, *Mutation breeding of Highgate (Musa acuminata, AAA) for tolerance to Fusarium oxysporum f. sp. cubense using gamma irradiation.* Euphytica, 1998. 101(2): p. 143.
6. Dita, M.A., et al., *Biotechnology approaches to overcome biotic and abiotic stress constraints in legumes.* Euphytica, 2006. 147(1-2): p. 1.

7. Dita, M.A., et al. *Banana in Latin America and the Caribbean: current state, challenges and perspectives*. in *VII International Symposium on Banana: ISHS-ProMusa Symposium on Bananas and Plantains: Towards Sustainable Global Production 986*. 2011.
8. Ploetz, R., *Management of Fusarium wilt of banana: a review with special reference to tropical race 4.* Crop Prot., 2015. 73: p. 7.
9. Hwang, S.-C. and W.-H. Ko, *Cavendish banana cultivars resistant to Fusarium wilt acquired through somaclonal variation in Taiwan.* Plant disease, 2004. 88(6): p. 580.
10. Butler, D., *Fungus threatens top banana.* Nature News, 2013. 504(7479): p. 195.
11. Murashige, T. and F. Skoog, *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures.* Physiologia Plantarum, 1962. 15: p. 473.
12. Wu, Y.L., G.J. Yi, and X.X. Peng, *Rapid screening of Musa species for resistance to Fusarium wilt in an in vitro bioassay.* Eur J Plant Pathol, 2010. 128: p. 409.
13. Naserian, K., B., et al., *Suitable gamma ray dose determination in order to induce genetic variation in kaboli chickpea (Cicer Arietinum L).* Journal of Nuclear Science and Technology, 2008: p. 19.
14. Borzouei, A., et al., *Effects of gamma radiation on germination and physiological aspects of wheat (Triticum aestivum L.) seedlings.* Pak. J. Bot, 2010. 42(4): p. 2281.