

استخدام الأشعة فوق البنفسجية في استحداث المقاومة ضد مرض الذبول الفيوزاري

Fusarium solani في البطاطاUtilization of UV Rays to Induce Resistance against *Fusarium solani*

Wilt Disease in Potato Plants

**هادي مهدي عبود

* علي عبد الامير الصالحي

بان سيع حسون

وزارة الزراعة

*معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الاحيائية للدراسات العليا/جامعة بغداد

**وزارة العلوم والتكنولوجيا

Ban S. Hassoon

Ali A.AL-Salihy

** Hadi M. Aboud

Ministry of Agriculture

*Institute of Genetic Engineering and Biotechnology for Post Graduate Studies/Baghdad University

**Ministry of Sciences and Technology

E-mail: baann sabaa@yahoo.com

الملخص

الهدف من هذه الدراسة هو استحداث المقاومة ضد مرض الذبول الفيوزاري *Fusarium solani* في البطاطا باستخدام الاشعة فوق البنفسجية (UV) حيث أظهرت نتائج استخدام الأشعة فوق البنفسجية ذات الطول الموجي 254 نانومتر في تشجيع نباتات البطاطا صنف Bellini المكثرة نسيجيا بفترات زمنية مختلفة قدرها 30, 60, 90 و 120 ثانية فعالية الأشعة في استحداث المقاومة ضد الإصابة بالفطر الممرض *Fusarium solani* والذي يسبب مرض الذبول الفيوزاري للبطاطا بعد إجراء العدوى الاصطناعية للنباتات المشعة وغير المشعة بعد أقلمتها ونقلها إلى التربة. أوضحت النتائج بعد مرور 7 أيام من العدوى الاصطناعية إن الجرعة الإشعاعية المستخدمة لمدة 90 ثانية قد أعطت أعلى نسبة من المقاومة للمرض بالإعتماد على حساب معدل تطور المرض (r) والذي أعطى أقل قيمة أذ بلغت 0.189 مقارنة ببقية الفترات الزمنية المستخدمة. كما أشارت نتائج حساب كمية أنزيم Phenylalanine Ammonia Layse (PAL) أن مدة التعرض للأشعة فوق البنفسجية 90 ثانية أعطت أعلى معدل بلغ 44.4 وحدة / مل في حين بلغ المعدل 38.5 وحدة / مل عند معاملة السيطرة بعد مرور 7 أيام من إجراء العدوى الاصطناعية.

الكلمات المفتاحية : الأشعة فوق البنفسجية ، البطاطا ، الذبول الفيوزاري

Abstract

The aim of this study is to induce resistance against *Fusarium solani* wilt disease in potato plants by utilization of UV rays. Results showed that the use of ultraviolet radiation with a wavelength of 254 nanometers to irradiate potato, category Bellini, produced (In vitro) at different periods 30, 60, 90 and 120 seconds resistance against the infection with *Fusarium solani*, which cause a Fusaristic disease of potato after conducting the artificial infection of the radiated and non – radiated plants after being adapted and transferred into the soil. The results also showed , after the passage of 7 days of artificial infection, that the radiation dose which is used for 90 second gave the highest rate of resistance against the disease depending on calculating the disease development rate (r), which gave the less value which is about 0.189 in comparison with the other time periods exposure. The results also showed the enzyme Phenylalanine Ammonia Layse (PAL) plant at duration of exposure to 90 second gave the highest concentration of the enzyme (PAL) reached T 44.4 units/ ml while the rate of the control reached to (38.5 unit/ ml) after seven days of contaminating with fungus pathogen.

Key words: UVultrviol radiation, potato, Fusarium wilts

المقدمة

يعد محصول البطاطا *Solanum tuberosum* L. من محاصيل الخضر الاستراتيجية المهمة في العراق والعالم، وتعد الامراض الفطرية من العوامل المهمة التي تسبب خسائر اقتصادية لذلك ظهرت الحاجة الى تربية نباتات مقاومة لهذه الامراض لتقليل كلفة المكافحة وحماية البيئة من التلوث [1]. لقد استخدم العلماء الطفرات الطبيعية والمستحثه منذ القرن الماضي في محاولة لتحسين صفات معينة في النبات وتطورت هذه التقنية بشكل كبير رغم ظهور العديد من التقنيات الحيوية والهندسة الوراثية ونظرا لقلة تكاليفها وسهولة استخدامها ويمكن استخدام المطفرات الفيزيائية او الكيميائية لاحداث التغيرات الوراثية [2,3]. ان ظهور تقنيه زراعة الانسجة النباتية ونجاحها من الناحية التطبيقية قد مهدت الطريق لتوظيف هذه التقانة في استحداث الطفرات خارج الجسم الحي والتي يطلق عليها *In vitro* mutagenesis ، وتعد هذه التقنيه للتطعيم خارج الجسم الحي من التقنيات المهمة والتي اثبت نجاحها في تحسين النبات في العديد من الصفات [4]. تصاب البطاطا بمرض فطري وهو الذبول (الفيوزاريوم) ولغرض استحداث المقاومة لهذه الاصابه استخدمت

العديد من المبيدات لغرض المكافحه التي تكلف مبالغ كبيره فضلا عن اثارها في تلوث البيئة ونتيجة تكرار استخدام المبيدات ادى الى ظهور المقاومة فيها [1,5,6]. عليه التجأ الباحثون الى ايجاد وسائل اخرى للحصول على نباتات مقاومة له ومن هذه التقنيات هي التطعيم خارج جسم الحي للنباتات البطاطا . وقد استخدمت اشعه UV في تطعيم بعض النباتات المحاصيل للحصول على نباتات مقاومة للمرض [3].

المواد وطرائق العمل

1- مصدر الزروعات

أستخدم في البحث نباتات الصنف Bellini والمكثّر نسيجيا في مختبرات زراعة الانسجة في معهد الهندسة الوراثية والذي يمتاز بالنمو الجيد وسهولة اكثاره .

2- تشيع النباتات

أستخدمت اشعة UV-C ذات الطول الموجي 254 نانوميتر في تشيع عقل نباتات الصنف Bellini والتي جرى تحضيرها من نباتات الصنف المكثرة نسيجيا حيث تحتوي كل عقلة على عقدة واحدة وضعت العقل في اطباق بتري وبمعدل 20 عقلة لكل طبق وقسمت الى اربع مجاميع. عرضت للأشعة فوق البنفسجية بفترات زمنية مختلفة هي 30,60,90 و120 ثانية حيث كانت المسافة بين مصدر الاشعاع والاطباق حوالي 15 سم [3]. ثم زرعت عقل النباتات بعد ذلك على الوسط الغذائي (MS) الذي تم تحضيره مسبقا كما موضح في جدول (1) داخل أنابيب اختبار. وجرى تحضيرها في غرفة النمو تحت ظروف نمو 16 ساعة/يوم اضاءة و8 ساعة/يوم ظلام ودرجة حرارة 24-26س° ولمدة 6 أسابيع جرى بعدها اعادة الزراعة لثلاثة اجيال.

جدول (1): مكونات الوسط الغذائي المستعمل في الدراسة

المكونات	وسط إكثار العقل ملغم/لتر
املاح MS	قوة كاملة
ثايمين-HCl	0.40
مينو انيستول	100.00
سكريز	30000.00
أكار	8000.00

3- احداث الامراضية

تم اقلمة النباتات النامية والمشعة خارج الجسم الحي بنقلها الى اصص حاوية على التربة والبتومس، ثم بعد ذلك اجريت عملية تلويث النباتات واحداث الاصابة باستخدام عزلة الفطر *Fusarium solani* واخذ لقاحها على شكل اقراص من مستعمراتها وبواقع 0.5 سم (3) اقراص لكل نبتة (وبعد التلويث وضعت السنادين في غرفة النمو تحت ظروف مسيطر عليها من درجة حراره 24-26س° ومن ثم متابعه النباتات لتقييم كفاءه الجرعات الاشعائيه لاستحداث المقاومة لمرض الذبول الفيوزاريوم وبعد مرور 7 أيام حسب معدل تطور المرض في كل معاملة من التشيع .

1- معدل تطور المرض (r) وفق المعادلة [7] :

$$r = 2.3 / T_2 - T_1 \times \log X_2 / X_1$$

r = معدل تطور المرض

T = الزمن

X₂ = شدة الاصابة لليوم السابع

X₁ = شدة الاصابة لليوم الاول

2- تقدير فعالية أنزيم (PAL) Phenylalanine Ammonia Layse

قدرت فعالية الانزيم بسحب نماذج من النباتات (الاوراق) بعد 3 ايام و 7 ايام من التلويث وحفظت النماذج بالفريز على -4س°. استخدمت الطريقة المتبعة من قبل Dickerson وآخرون [8] في تقدير نشاط انزيم PAL من خلال تتبع تحول الفينيل اللانين الى حامض السيناميك. أخذ 0.5غم من النباتات الملوثة بالفطر بعمر 3 ايام و 7 ايام والمحفوظة داخل الفريز - 4س° بعد ان غسلت جيداً وجففت بورق ترشيع وقطعت بمقص معقم مزجت مع 3مل من داريء بورات الصوديوم (تركيز 0.1مولاري و pH=7) وسحقت في هاون خزفي بظروف مبردة ونبد المزيج بسرعة 16000 دورة ولمدة 15 دقيقة وأستعمل الطافي كمصدر للأنزيم. مزج 0.4 مل من مستخلص الأنزيم في أنبوب زجاجي مع 0.5 مل من داريء بورات الصوديوم 0.1مولاري و pH= 8.8 و 0.5 مل من Phenylalanine-L وحضن لمدة 30 دقيقة بدرجة 30±1 س°. ثم أضيف للجزء المتبقي من مستخلص الأنزيم ماء مقطر بنفس الكمية للمقارنة وقيس معدل التغير من Phenylalanine-L الى Trans-cinnamic acid من خلال تقدير امتصاص العينات للضوء بأستعمال المطياف الضوئي على طول موجي 290 نانوميتر وحسبت فعالية الأنزيم على أساس كمية الأنزيم اللازم لتكوين مايكروغرام سينامك أسيد في الدقيقة الواحدة لكل غم نسيج نباتي في ظروف التفاعل وكررت العملية على النباتات بعمر 7 ايام بعد تلويثه بالفطر.

$$PAL \text{ Activity } (U / L) = (\Delta A / T / \Sigma) X (Vt / Vs) X (1000000)$$

ΔA = معدل التغير بالامتصاصية مع الوقت .

T=الوقت

Σ=معامل النفاذ

Vs= حجم العينة = 0.4ML

Vt=الحجم النهائي=1.4

النتائج والمناقشة

كفاءة الجرعات الاشعاعية

تشير نتائج جدول (2) فعالية الجرعات الاشعاعية في استحداث صفة المقاومة للذبول الفيزياري في أذ تبانين بتباين الجرعات الاشعاعية المستخدمه حيث اظهرت الجرعه التي وقت تعريضها 90 ثانية اعلى درجة من المقاومة معبر عنها بمعدل تطور الاصابة (r) الذي بلغت شدة المرض لـ 90 ثانية اقل قيمة وبلغت 0.189 في حين اظهرت الجرعه التي وقت تعريضها 30 ثانية مع معاملة السيطرة اقل مستوى من المقاومة بأعلى قيمة حيث بلغت 0.290. وقد يعود السبب للتعرض للأشعة لمدة 90 ثانية ادى الى احداث تغيرات في زيادة نشاط بعض الانزيمات المهمة مثل B-1,3-glucanase، Chitinase، وProtease وغيرها التي اثرت في النمو مما انعكس ايجابيا في زيادة استحداث صفة المقاومة متزامنة مع الزيادة في طول المجموع الخضري للساق والجذر وزيادة عدد الاوراق وكذلك زيادة الوزن الطري والجاف للساق والجذر [9].

جدول (2): معدل تطور المرض للنباتات المشعة

يوم	شدة المرض عند فترة التعريض للـ 30 ثانية	شدة المرض عند فترة التعريض للـ 60 ثانية	شدة المرض عند فترة التعريض للـ 90 ثانية	شدة المرض عند فترة التعريض للـ 120 ثانية	شدة المرض للـ con
الاول	-	-	-	-	-
الثاني	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08
الثالث	0.21	0.08	0.08	0.08	0.21
الرابع	0.31	0.38	0.13	0.17	0.38
الخامس	0.42	0.38	0.25	0.25	0.38
السادس	0.46	0.42	0.25	0.25	0.46
السابع	0.46	0.42	0.25	0.42	0.46
معدل تطور المرض (r)	0.290	0.276	0.189	0.276	0.290

نتائج تقدير فعالية انزيم (PAL) Phenyl alanine Ammonia Layse

بينت نتائج جدول (3) الى وجود فرق معنوي بين النباتات المشعة و معاملة السيطرة قبل وبعد تلويث النباتات بالفطر الممرض (فيوزاريوم) في استحداث مقاومة واضحة وقيست بدلالة تقدير تركيز كل من أنزيم (PAL). أذ بلغ أعلى معدل في زيادة فعالية أنزيم PAL للنباتات المشعة ونباتات معاملة السيطرة قبل معاملتها بالفطر الفيوزاريوم في اليوم السابع للنباتات المشعة لـ 90 ثانية و بلغت 40.2 وحدة / مل في حين بلغ أقل معدل للأنزيم في اليوم السابع للنباتات المشعة لـ 60 ثانية وبلغ 30.8 وحدة / مل وكذلك تفوقت على معاملة السيطرة التي بلغ 35.3 وحدة / مل. أما أعلى معدل في زيادة فعالية أنزيم PAL للنباتات المشعة ونباتات معاملة السيطرة بعد معاملتها بالفطر الفيوزاريوم في اليوم السابع للنباتات المشعة لـ 90 ثانية كانت 44.4 وحدة / مل في حين بلغ أقل معدل للأنزيم في اليوم السابع للنباتات المشعة لـ 120 ثانية 34.6 وحدة / مل وكذلك تفوقت على معاملة السيطرة التي بلغت 39.5 وحدة / مل. نستنتج مما سبق ان مدة التعريض 90 ثانية للأشعة فوق البنفسجية كان الاكثر فعالية إذ يسهم أنزيم PAL في تصنيع المركبات الفينولية وتكوين اللكتين في جدران الخلايا وعمل حاجز ضد اختراق مسببات المرضية فضلاً عن إنتاجها مركبات أخرى تسهم في تنشيط آليات الدفاع في النبات [10].

جدول (3): تأثير بعض عوامل التشعيع والتلويث بالفطر الممرض على فعالية انزيم PAL في نباتات البطاطا الناتجة من الزراعة النسيجية

رمز العينة	فعالية PAL (UL)
CON-3-A	37.4
CON-3-B	35.3
CON-7-A	35.3
CON-7-B	39.5
30-3-A	39.9
30-3-B	40.9
30-7-A	36.7
30-7-B	37.4
60-3-A	39.9
60-3-B	38.5
60-7-A	30.8
60-7-B	38.5
90-3-A	39.2
90-3-B	40.2
90-7-A	40.2
90-7-B	44.4
120-3-A	37.8
120-3-B	35.3
120-7-A	35
120-7-B	34.6
قيمة LSD	4.093 *

* (P<0.05)

A) عينات غير ملوثة بالفطر، B) عينات ملوثة بالفطر. 3) ثلاثة (ايام)، 7) سبعة (ايام)، CON) نباتات غير مشعة، (فترة التشعيع) 30 ثانية، 60 ثانية، 90 ثانية، 120 ثانية.

الاستنتاج

نستنتج من هذه الدراسة أن استخدام أشعة UV بمدد مختلفة قد أحدث تغييرات في الصفات المدروسة للنباتات المكثرة نسيجياً وكذلك إستخدامها في إستحداث تغييرات وراثية لصفة المقاومة للأمراض والاعتماد في تقدير تركيز انزيم PAL كمؤشر يعتمد عليه في تحديد صفة المقاومة للمرض.

المصادر

1. Parra, G. and Ristanio, J.B. (2001). Resistance to mefenoxam and metalaxyl among field isolates of *Phytophthora capsici* causing phytophthora blight of bell pepper. Plant Disease. 85:1069-1075.
2. Das, A.; Gosal, S. S.; Sidhu, J.S. and Dhaliwal, H. S. (2001). *In Vitro* Mutagenesis and production of agronomically useful potato variants. Mutation and Breeding News letter Issue. No. 45.
3. الساعدي، جاسم حسين وعبد الجاسم محيسن الجبوري وسها محسن البصام. (2012). تأثير المجال الكهرومغناطيسي في الظواهر الفسيولوجية لنباتات الخيار *Cucumis sativus* L خارج الجسم الحي. مجلة ابن الهيثم للعلوم الصرفة والتطبيقية. المجلد 25 (3): 1-12.
4. الصميدعي، كاظم محمد ابراهيم. (2016). تطبيقات في التقانات الاحيائية النباتية. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. دار الكتب للطباعة والنشر - جامعة النهرين- العراق.
5. Martin, S. B., Compbell, C. T. and Lucas, L.T. (1984). Response of tall Rhizoctonia blights fescue to selected fungicides in greenhouse. Phytopathology. 74:782-785
6. Taylor, R. J., Salas, B., Secor, G. A., Rivera, V and. Gudmestad, N. C. (2002). Sensitivity of nor American isolates of *Phytophthora erythroseptica* and *Pythium ultimum* to mefenoxam (Metalaxy Plant Disease. 86:797-802.
7. Trigiano, R. N., Windham, M. T. and Windham, A. S. (2004). Plant pathology concepts and laboratory exercises. CRC press. pp701.
8. Dickerson, D.P., Pascholati, S.F., Hagerman, A. E., Butler, L. G. and Nicholson, R. L. (1984). Phenylalanine ammonia-lyase and hydroxycinnamate: CoA ligase in maize mesocotyls inoculated with *Helminthosporium maydis* or *Helminthosporium carbonum* Physiological plant Pathology, 25:111- 123.
9. Dubos, C and Plomion, C. (2011). Drought differentially affects expression of PR-10 protein in needles of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) seedling. J Exp. Bot. 52:1143-4.
10. Zheng, H. Z., Cui, C. I., Zhang, Y. T., Wang, D., Jing, Y. and Kim, K. Y. (2005). Active changes of lignifications related enzymes in pepper response to *Glomus intraradices* and *Phytophthora capsici*. Journal of Zhejiang University Science. 68:778-786.