أستخدام الأشعة فوق البنفسجية في استحداث المقاومة ضد مرض الذبول الفيوزارمي *Fusarium solani* في البطاطا

Utilization of UV Rays to Induce Resistance against *Fusarium solani* Wilt Disease in Potato Plants

بان سبع حسون * علي عبد الاميرالصالحي **هادي مهدي عبود

وزارة الزراعة

*معهد الهندسةالوراثية 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-mial: baann sabaa@yahoo.com

الملخص

الهدف من هذه الدراسه هو أستحداث المقاومة ضد مرض الذبول الفيوزارمي *Fusarium solani* في البطاطا بأستخدام الاشعه فوق البنفسجيه ultra violet(UV) حيث أظهرت نتائج إستخدام الأشعة فوق البنفسجية ذات الطول الموجي 254 نانوميتر في تشعييع نباتات البطاطا صنف Bellini المكثرة نسيجيا بفترات زمنية مختلفة قدرها 30,60,90و120 ثانية فعالية الأشعة في أستحداث المقاومة ضد الإصابة بالفطر الممرض *Fusarium solani* والذي يسبب مرض الذبول الفيوزارمي للبطاطا بعد أجراء العدوى الأصطناعية للنباتات المشععة وغير المشععة بعد أقلمتها ونقلها إلى التربة. أوضحت النتائج بعد مرور 7 أيام من العدوى الأصطناعية 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 ألمستخدمة.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 المعدل38.5 وحدة /مل عند معاملة السيطرة بعد مرور 7 أيام من أجراء العدوى الأصطناعية .

الكلمات المفتاحية : الاشعة فوق البنفسجية ، البطاطا ،الذبول الفيوارمي

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 الطبيعيه والمستحثه منذ القرن الماضي في محاوله لتحسين صفات معينه في النبات وتطورت هذه التقنيه بشكل كبير رغم ظهور العديد من التقنيات الحيويه والهندسه الوراثيه ونظرا لقلة تكاليفها وسهوله استخدامها ويمكن استخدام المطفرات الفيزيائيه او الكيميائيه لاحداث التغاير الوراثي [3,2]. ان ظهور تقنيه زراعة الانسجةالنباتية ونجاحها من الناحيه التطبيقيه قد مهدت الطريق لتوظيف هذه التقانه في استحداث الطفرات خارج الجسم الحي والتي يطلق عليها *In vitro* mutagenesis ، وتعد هذه التقنيه للتطفير خارج الجسم الحي من التقنيات المهمه والتي اثبت نجاحها في تحسين النبات في العديد من الصفات [4].تصاب البطاطا بمرض فطري وهو الذبول (الفيوزاريوم) ولغرض أستحداث المقاومة لهذه الاصابه استخدمت

البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الاول

العديد من المبيدات لغرض المكافحه التي تكلف مبالغ كبيره فضلا عن اثارها في تلوث البيئه ونتيجه تكرار استخدام المبيدات ادى الى ظهور المقاومه فيها[1, 6,5] .عليه التجأ الباحثون الى ايجاد وسائل اخرى للحصول على نباتات مقاومه له ومن هذه التقنات هي التطفير خارج جسم الحي للنباتات البطاطا . وقد استخدمت اشعه UV في تطفير بعض النباتات المحاصيل للحصول على نباتات مقاومه للمرض[3] .

المواد وطرائق العمل

1- مصدر الزروعات

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

2- تشعيع النباتات

أستخدمت اشعة UV-C ذات الطول الموجي254 نانوميتر في تشعيع 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 للاشعة الفوق البنفسجية بفترات زمنية مختلفة هي 90,60,30و120 ثانية حيث كانت المسافة بين مصدر الاشعاع والاطباق حوالي 15 سم[3] .ثم زرعت عقل النباتات بعد ذلك على الوسط الغذائي (MS) الذي تم تحضيرة مسبقا كما موضح في جدول (1) داخل أنابيب أختبار. وجرى تحضينها في غرفة النمو تحت ظروف نمو 16 ساعة/يوم اضاءة و8 ساعة/يوم ظلام وبدرجة حرارة 24-26س° ولمدة6 أسابيع جرى بعدها اعادة الزراعة لثلاثة اجيال.

جدول (1): مكونات الوسط الغذائي المستعمل في الدراسة

المكونـــات	وسط إكثار العقل ملغم/لتر
املاح MS	قوة كاملة
ثايمين-HCl	0.40
مينو انيستول	100.00
سكروز	30000.00
آكار	8000.00

3-احداث الامراضية

تم اقلمة النباتات النامية والمشعة خارج الجسم الحي بنقلها الى اصص حاوية على التربة والبتموس ،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 نبيته) وبعد التلويث وضعت السنادين في غرفة النمو تحت ظروف مسيطر عليها من درجه حراره 24-26س° ومن ثم متابعه النباتات لتقييم كفاءه الجرعات الاشعائيه لاستحداث المقاومه لمرض الذبول الفيوزاريوم وبعد مرور 7 أيام حسب معدل تطور المرض في كل معاملة من التشعيع .

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

X_2 = شدة الاصابة لليوم السابع

X_1 = شدة الاصابة لليوم الاول

2- تقدير فعالية أنزيم Phenylalanine Ammonia Layse (PAL)

قدرت فعالية الانزيم بسحب نماذج من النباتات(الاوراق) بعد 3 ايام و 7 ايام من التلويث وحفظت النماذج بالفريزعلى -4س°.

استخدمت الطريقة المتبعة من قبل Dickerson وآخرون [8]في تقدير نشاط انزيم PAL من خلال تتبع تحول الفنيل اللأنين الى حامض السينماميك. أخذ 0.5غم من النباتات الملوثة بالفطر بعمر3 أيام و7 ايام والمحفوظة داخل الفريز - 4س°بعد ان غسلت جيداً وجففت بورق ترشيح وقطعت بمقص معقم مزجت مع3مل من داريء بورات الصوديوم (تركيز0.1مولاري و7=pH) وسحقت في هاون خزفي بظروف مبردة ونبذ المزيج بسرعة 16000 دورة ولمدة 15 دقيقة وأستعمل الطافي كمصدر للأنزيم. مزج0.4 مل من مستخلص الأنزيم في أنبوب زجاجي مع 0.5 مل من داريء بورات الصوديوم 0.1مولاري وpH = 8.8 و 0.5 مل منL- Phenylalanine وحضن لمدة 30 دقيقة بدرجة 30±1 س°.ثم أضيف للجزءالمتبقي من مستخلص الأنزيم ماءمقطر بنفس الكمية للمقارنة وقيس معدل التغير منL- PhenylalanineالىTrans-cinnamic acid من خلال تقدير أمتصاص 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 بعمر7 أيام بعد تلويثه بالفطر.

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

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 المقاومه للذبول الفيوزارمي أذ تباينت بتباين الجرعات الاشعاعيه المستخدمه حيث اظهرت الجرعه التي وقت تعريضها 90 ثانية اعلى درجة من المقاومه معبر عنها بمعدل تطور الاصابة (r) الذي بلغت شدة المرض لل 90 ثانيةاقل قيمة وبلغت 0.189 في حين اظهرت الجرعه التي وقت تعريضها 30 ثانية مع معاملة السيطرة اقل مستوى من المقاومة بأعلى قيمةحيث بلغت 0.290. وقد يعود السبب للتعرض للأشعة لمدة90 ثانية ادى الى احداث تغيرات في زيادة نشاط بعض الانزيمات المهمة مثل B-1,3-glucanas، Chitinase، Cellulaseو Protease وغيرها التي اثرت في النمو مما انعكس ايجابيا في زيادة استحداث صفة المقاومه 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 للنبيتات المشعة

يوم	شدة المرض عند فترة التعريض للـ30ثانيه	شدة المرض عند فترة التعريض للـ60 ثانيه	شدة المرض عند فترة التعريض للـ90 ثانيه	شدة المرض عند فترة التعريض للـ120 ثانيه	شدة المر ض للـcon
الاول	-	-	-	-	-
الثاني	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08
الثالث	0.21	0.08	0.08	0.08	0.21
الرابع	0.3 1	0.38	0.13	0.17	0.38
الخامس	0.42	038.	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 Phenyl alanine Ammonia Layse (PAL)

بينت نتائج جدول (3) الى وجود فرق معنوي بين النبيتات المشعه و معاملة السيطرة قبل وبعد تلويث النبيتات بالفطر الممرض (فيوزاريوم) في استحداث مقاومة واضحة وقيست بدلالة تقدير تركيز كل من أنزيم (PAL) .أذ بلغ أعلى معدل في زيادة فعالية أنزيم PAL لنبيبات المشعة ونباتات معاملة السيطرة قبل معاملتها بالفطر الفيوزاريوم في اليوم السابع للنبيتات المشعة ل 90 ثانية و بلغت40.2 وحدة / مل في حين بلغ اقل معدل للانزيم في اليوم السابع للنبيتات المشعة ل 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 لنبيبات المشعة ونباتات معاملة السيطرة بعد معاملتها بالفطر الفيوزاريوم في اليوم السابع للنبيتات المشعة ل 90 ثانية كانت 44.4 وحدة / مل في حين بلغ اقل معدل للانزيم في اليوم السابع للنبيتات المشعة ل 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 اللكنين في .جدران الخلايا وعمل حاجز ضد أختراق المسببات المرضية فضلاً عن إنتاجها مركبات أخرى تسهم في تنشيط آليات الدفاع في النبات[10].

جدول (3): تأثير بعض عوامل التشعيع والتلويث بالفطرالممرض على فعالية انزيمPAL في نباتات البطاطا الناتجة من الزراعة النسيجية

رمز العينة	فعالية PAL(U\L)
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 غيرشععة)،(فترة التشعيع)30ثانية،60ثانية،90ثانية،120ثانية.

الاستنتاج

نستنتج من هذه الدراسه أن أستخدام أشعة UV بمدد مختلفة قد أحدث تغايرات في الصفات المدروسة للنبيتات المكثرة نسيجيا وكذلك إستخدامها في إستحثاث تغايرات وراثية لصفة المقاومة للأمراض والاعتماد في تقدير تركيز انزيم PAL كمؤشر يعتمد علية 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 lssue. No. 45.

3.الساعدي، جاسم حسين وعبد الجاسم محيسن الجبوري وسها محسن البصام.(2012) . تأثير المجال الكهرومغناطيسي في الظواهر الفسيولوجية لنبيتات الخيار *Cucumis sativus* L خارج الجسم الحي. مجلة ابن الهيثم للعلوم الصرفة والتطبيقية .المجلد25(3) :1-12.

4.الصميدعي، كاظم محمد ابراهيم. (2016.) تطبيقات في التقانات الاحيائية النباتية .وزارة التعليم العالي والبحث العلمي .دارالكتب 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 laboratoryexercies.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 *Helminthosporiumcarbonum* 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 pinasterait) seedling:ɹ 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 peper response to *Glomus intraradices* and *Phytophthora capsici*. Journal of Zhejiang University Science. 68:778-786.