مجله دانش گیاهپزشکی ایران
دوره ۴۱، شماره ۱، ۱۳۸۹ (۱۴۲-۱۳۵)

مطالعه وضعیت باروری جنسی وتعیین فراوانی آلل‌های تیپ آمیزشی در جمعیت‌های آمیزشی A و D از گونه مرکب *Gibberella fujikuroi* بدست آمده از برنج و ذرت به کمک PCR

الهام محمدیان[۱]، محمد جوان نیکخواه[۲]*، سید محمود اخوت[۳] و کیوان غضنفری[۴]
۱، ۲، ۳، ۴، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشیار، استاد و کارشناس ارشد،
گروه گیاهپزشکی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
(تاریخ دریافت: ۸۷/۱۰/۱۱- تاریخ تصویب: ۸۸/۳/۲۰)

چکیده

به منظور بررسی وضعیت باروری جنسی و تیپ آمیزشی گونه‌های *Gibberella moniliformis* و *G. intermedia*، عوامل پوسیدگی طوقه یا باکانه برنج و پوسیدگی خوشه و ساقه ذرت از گونه مرکب *G. fujikuroi* به کمک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، از ۱۲۸ جدایه تک اسپور بدست آمده از مزارع برنج استان‌های گیلان و مازندران و مزارع ذرت استان‌های مختلف ایران شامل ۱۶ جدایه *G. moniliformis* از برنج و ۵۴ جدایه از ذرت، ۲۸ جدایه *G. intermedia* از برنج و ۳۰ جدایه از ذرت استفاده شد. از بین این جدایه‌ها ۳۰ جدایه *G. intermedia* از ذرت، ۱۲ جدایه از برنج و پنج جدایه *G. moniliformis* از برنج در مطالعه وضعیت باروری جنسی به کمک جدایه‌های آزمایشگر استاندارد روی محیط غذایی هویج آگار استفاده گردید. جهت تعیین تیپ آمیزشی و وضعیت باروری جدایه‌ها از روش multiplex PCR و دو جفت آغازگر اختصاصی به نام‌های GFmat1a، GFmat1b و Gfmat2c، Gfmat2d استفاده شد و وجود و فراوانی هریک از ایدیومورف‌های تیپ آمیزشی در تمام جدایه‌ها ردیابی و تعیین گردید. از مجموع ۶۸ جدایه *G. moniliformis* از برنج و ذرت، ۴۷ جدایه (۶۹ درصد) متعلق به *MAT-1* و ۲۱ جدایه (۳۱ درصد) متعلق به *MAT-2* بودند. از مجموع ۵۳ جدایه *G. intermedia* از برنج و ذرت، ۳۳ جدایه (۶۲ درصد) متعلق به تیپ آمیزشی *MAT-1* و ۲۰ جدایه (۳۸ درصد) متعلق به تیپ آمیزشی *MAT-2* بودند. از ۴۲ جدایه *G. intermedia* حاصل از برنج و ذرت که در تلاقی با جدایه های استاندارد استفاده گردیدند، ۲۶ جدایه (۶۲ درصد) دارای تیپ آمیزشی *MAT-1* و ۱۶ جدایه (۳۸ درصد) دارای تیپ آمیزشی *MAT-2* بودند. نتایج حاصل از تلاقی جدایه‌های مورد مطالعه با جدایه‌های استاندارد با نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مشابه بود. همچنین جدایه‌های مزرعه‌ای دارای تیپ آمیزشی مخالف (سازگار) با یکدیگر تلاقی داده شدند و پریتسیومی مشاهده نشد که نشان‌دهنده نربارور بودن جدایه‌ها می‌باشد. برای بروز نوترکیبی جنسی و تنوع ژنتیکی درون یک جمعیت وجود هر دو آلل از تیپ‌های آمیزشی مختلف با فراوانی مناسب و اینکه حداقل یکی از دو والد ماده بارور یا هرمافرودیت باشد، ضروری می باشد. در این تحقیق، هر دو تیپ آمیزشی در جمعیت هر دو گونه قارچ شناسایی شدند که البته فراوانی تیپ آمیزشی *MAT-1* نسبتا بیشتر بود ولی با توجه به کم بودن افراد ماده بارور در جمعیت، بروز تنوع ژنتیکی در جمعیت قارچ‌های *G. moniliformis* و *G. intermedia* بدست آمده از برنج و ذرت می‌تواند از طریق مکانیسم‌های دیگر تغییرپذیری باشد.

واژه‌های کلیدی: پوسیدگی طوقه‌برنج، پوسیدگی خوشه و ساقه ذرت، آلل‌های‌تیپ آمیزشی.

* نویسنده مسئول: محمد جوان نیکخواه تلفن: ۰۲۶۱-۲۸۱۸۷۰۵ E-mail: jnikkhah@ut.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

گونه مرکب[1] *Gibberella fujikuroi* (Sawada) Ito &.Kimura آسکومیستی هتروتال[2] است و همه استرین های *Gibberella* مراحل جنسی یا تلئومورف[3] شبه گونه‌های فوزاریوم هستند (Desjardins, 2003). این گونه بر اساس ویژگی‌های بیولوژیکی تا به حال به نه جمعیت آمیزشی[4] تقسیم بندی شده است که تحت عنوان جمعیت های A تا I نام گذاری شده اند (Leslie *et al.*, 2004) با فرم غیرجنسی[5] *G. moniliformis* Wineland (Saccardo) Nirenberg متعلق به جمعیت آمیزشی A و *G. intermedia* (Kuhlman) Samuels, Nirenberg & Seifert با فرم غیر جنسی *F. proliferatum* (Matsushima) Nirenberg متعلق به جمعیت آمیزشی D می‌باشند (Desjardins, 2003; Leslie *et al.*, 2004). هر دو گونه فوق عامل بیماری پوسیدگی طوقه برنج یا باکانه[6] و پوسیدگی خوشه و ساقه ذرت می‌باشند (Danielsen, *et al.*, 1998; Lesli & Kelin, 1996).

فوزاریوم‌ها از نظر ژنتیکی تغییرپذیر بوده و احتمالا در نتیجه تولیدمثل جنسی، فرایند شبه جنسی[7]، جهش[8] و سایر مکانیسم‌های ایجاد کننده تنوع ژنتیکی، بروز نژادهای بیماری‌زای جدید در آنها امکان پذیر شده و بر مقاومت میزبان غلبه می‌کنند و یا این تنوع منجر به مقاومت در برابر قارچ‌کش‌ها می‌شود (Klittich & Leslie, 1988; Pamphile & Azevedo, 2002). از بین عوامل فوق، تولیدمثل جنسی از مهمترین آنها است به طوری که سازگاری جنسی و نوترکیبی حاصل از آن در جمعیت قارچ، مکانیزم‌هایی را برای بروز تنوع ژنتیکی از طریق میوز[9] فراهم می‌کند و موجب تولید ژنوتیپ‌های[10] جدید می‌شود (Dayakar *et al.*, 2000).

سیستم آمیزشی در گونه مرکب *G. fujikuroi* به صورت هتروتالیک می‌باشد، به طوری که در چرخه زندگی خود به اثر متقابل جنسی بین دو استرین که معمولا به طور مورفولوژیکی غیرقابل تشخیص اما به طور فیزیولوژیک متفاوت هستند، نیاز دارند. این تفاوت فیزیولوژیک می‌تواند ناشی از تیپ‌های آمیزشی[11] متفاوت در آنها باشد. تیپ‌های آمیزشی حامل ژن‌های اصلی کنترل کننده تلاقی موفق بین استرین‌ها می‌باشند (Leslie & Klein, 1996). بر اساس مطالعات ژنتیکی، سیستم آمیزشی دو قطبی[12] در فوزاریوم‌ها دیده می‌شود که در آن یک ژنگاه کنترل‌کننده تیپ آمیزشی به نام *MAT* با دو آلل *MAT-1* و *MAT-2* وجود دارد. این آلل‌ها ایدیومورف[13] هستند یعنی آلل‌ها روی یک کروموزوم و در لوکوس مشابه قرار دارند اما توالی آنها یکسان نمی‌باشد (Wallace & Covert, 2000).

برای مطالعه سازگاری جنسی و تعیین تیپ‌های آمیزشی مختلف، از روش تلاقی جدایه‌های بدست آمده از مزرعه (معمولا نمی‌توانند به عنوان استرین ماده در تلاقی‌های آزمایشگاهی عمل کنند) با استرین‌های آزمایشگر استاندارد[14] (دارای ماده باروری بالا) استفاده می‌شود (Leslie & Klein, 1996). در کنار مطالعات فنوتیپی می‌توان از آغازگرهای اختصاصی برای تعیین وضعیت باروری و تعیین تیپ‌های آمیزشی استفاده کرد. در تحقیقی که توسط Steenkamp *et al.* (2000) انجام شد، با استفاده از روش multiplex PCR توالی ایدیومورف‌های *MAT-1* و *MAT-2* تکثیر و شناسایی شد. به طوری که ایدیومورف *MAT-1* قطعه‌ای به طول حدود ۲۰۰ جفت باز دارای منطقه α حفاظت شده و ایدیومورف *MAT-2* قطعه‌ای به طول حدود ۸۰۰ جفت باز دارای یک منطقه به‌نام گروه حرکتی بالا[15] می‌باشد.

بررسی پراکنش تیپ آمیزشی در یک جمعیت همگام با تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیکی کمک موثری برای یافتن تاریخ تکاملی می‌باشد (Urashima *et al.*, 1993). با توجه به نقش عمده تولیدمثل جنسی و

1. Species complex
2. Heterothall
3. Teleomorph
4. Mating population
5. Anamorph
6. Bakanae
7. Parasexualism
8. Mutation
9. Meiotic
10. Genotypes
11. Mating types
12. Dimictic
13. Idiomorph
14. Tester
15. HMG (High Mobility Group)

Archive of SID

www.SID.ir

نوترکیبی حاصل از آن در بروز تنوع ژنتیکی در جمعیت قارچها، انجام این تحقیق ضروری به نظر رسید. لذا هدف از این مطالعه، ارزیابی وضعیت باروری جنسی در جدایه‌های جمعیت آمیزشی A (*G. moniliformis*) و جمعیت آمیزشی D (*G. intermedia*) از گونه مرکب *G. fujikuroi* و تعیین نحوه پراکنش آلل‌های تیپ آمیزشی در مزارع برنج و ذرت بر اساس تلاقی جدایه‌ها در شرایط آزمایشگاه و به کمک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با آغازگرهای اختصاصی بود.

مواد و روش‌ها

جدایه‌های قارچی

جدایه‌های مورد بررسی در این تحقیق از کلکسیون قارچ‌شناسی گروه گیاهپزشکی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران در کرج، که طی سالهای ۱۳۸۳ و ۱۳۸۴ جمع آوری شده بودند، تهیه گردید. در مجموع از ۱۲۸ جدایه *G. moniliformis* و *G. intermedia* بدست آمده از برنج و ذرت در مطالعه وضعیت باروری جنسی به کمک multiplex PCR استفاده گردید که شامل ۱۶ جدایه *G. moniliformis* از برنج و ۵۴ جدایه از ذرت و ۲۸ جدایه *G. intermedia* از برنج و ۳۰ جدایه از ذرت بودند. از بین این جدایه‌ها ۳۰ جدایه *G. intermedia* از ذرت و ۱۲ جدایه از برنج و پنج جدایه *G. moniliformis* از برنج برای مطالعه وضعیت باروری جنسی بر اساس تلاقی جدایه‌ها با جدایه‌های آزمایشگر استاندارد در شرایط آزمایشگاه استفاده شد.

ارزیابی باروری جنسی و تعیین تیپ آمیزشی جدایه‌ها

جهت تعیین تیپ آمیزشی و وضعیت باروری جدایه‌های مزرعه‌ای از جدایه‌های آزمایشگر استاندارد با تیپ آمیزشی مشخص استفاده گردید (Leslie & Klein, 1996). این جدایه‌ها از کشور آفریقای جنوبی تهیه گردید (جدول۱). هر یک از جدایه‌ها با جدایه‌های استاندارد روی محیط غذایی هویج آگار[1] (شامل ۴۰۰ گرم هویج، ۲۰ گرم آگار و یک لیترآب مقطر) تلاقی داده شدند. به این صورت که در تشتک‌های پتری ۱۵×۶۰ میلی متری حاوی محیط غذایی هویج آگار جدایه‌های استاندارد در دو تکرار با تیپ آمیزشی مخالف کشت داده شدند و بطور همزمان درون لوله‌های حاوی محیط کج سیب‌زمینی دکستروز آگار[2]، جدایه‌های مزرعه‌ای کشت داده شدند. سپس کشت‌ها در دمای ۲۵°C به مدت یک هفته نگهداری شدند. پس از گذشت یک هفته محلول ۰/۲-۰/۲۵ درصد توئین ۶۰[3] به مقدار ۳ تا ۵ میلی لیتر به لوله‌های حاوی جدایه‌های مزرعه‌ای اضافه شد و سوسپانسیون اسپور تهیه شد. سپس یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون روی تشتک پتری حاوی جدایه استاندارد ریخته شد و با یک میله شیشه‌ای خمیده با زاویه ۹۰ درجه روی محیط کشت هویج آگار پخش شد. پس از آن تشتک‌ها به انکوباتور با شرایط روشنایی دایم به صورت تلفیقی از نور سفید و سرد[4] و نزدیک به ماوراء بنفش[5] با طول موج ۴۰۰-۳۲۰ نانومتر و دمای ۲۳-۲۲ با رطوبت کافی منتقل شدند (۱۲). آزمایشها در دو تکرار انجام شدند. برای اطمینان از بارور بودن جدایه‌های استاندارد، این جدایه‌ها با تیپ آمیزشی مخالف تلاقی داده شدند. تولید یا عدم تولید پریتسیوم در فاصله زمانی ۲-۱ ماه پس از کشت بررسی گردید و هر روز به منظور ارزیابی میزان دما و رطوبت و وضعیت تشتک‌های پتری بازرسی انجام شد.

جدول۱- مشخصات جدایه‌های آزمایشگر استاندارد جمعیت های آمیزشی A و D گونه مرکب *G. fujikuroi* در آزمون‌های تعیین تیپ آمیزشی

نام گونه	تیپ آمیزشی	جمعیت آمیزشی	شماره استرین
G. moniliformis	*MAT-1*	A	8559
G. moniliformis	*MAT-2*	A	8560
G. intermedia	*MAT-1*	D	8549
G. intermedia	*MAT-2*	D	8550

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای ردیابی آلل‌های تیپ آمیزشی

برای این منظور از روش multiplex PCR برای ارزیابی فراوانی ایدیومورف‌های تیپ آمیزشی تمام جدایه‌ها (بارور و نابارور در آزمایش قبل) استفاده شد.

1. Carrot agar

2. Potato Dextrose Agar (PDA)
3. Tween 60
4. Cool white
5. Near-UV

Archive of SID

www.SID.ir

ابتدا میسلیوم جدایه‌ها به منظور استخراج DNA با کشت روی محیط مایع سیب‌زمینی دکستروز[1] (شامل ۲۰۰ گرم سیب‌زمینی، ۲۰-۱۷ گرم دکستروز و یک لیتر آب مقطر) بدست آمد. استخراج DNA به روش Leslie & Summerell (2006) با اندکی تغییر انجام شد. ابتدا بافر لیزکننده[2] (شامل ۱۰۰ میلی‌مول Tric HCl با pH ۸، ۲۰ میلی‌مول EDTA با pH ۸ و ۱/۴ مول NaCl) تهیه شد و با آب مقطر به حجم یک لیتر رسانده شد. سپس ۲ درصد CTAB[3] به آن افزوده شد. به هنگام استفاده از بافر لیزکننده یک درصد ۲-مرکاپتواتانول به آن اضافه شد. میسلیوم‌های تر که در دمای ۲۰- °C نگهداری شده بودند به مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم وزن شدند و توده میسلیوم هر جدایه در هاون مجزا به خوبی ساییده شد. سپس ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده به آن اضافه شد و به لوله ۱/۵ میلی لیتری منتقل شد و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۶۵ °C قرار گرفت. پس از آن به اندازه یک دوم حجم محتویات لوله مخلوط فنل- کلروفرم افزوده شد و بعد از چند ثانیه ورتکس کردن، به مدت پنج دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰g سانتریفوژ شدند. سپس محلول رویی به لوله دیگری منتقل شد، و به اندازه یک دوم حجم محلول، کلروفرم خالص اضافه شد و بعد از ورتکس کردن، مجدداً به مدت پنج دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰g سانتریفوژ شد. محلول رویی به لوله جدید منتقل شد و به اندازه حجم برابر با آن پروپانول سرد اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در یخچال نگهداری شد. سپس به مدت دو دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰g سانتریفوژ شد. محلول رویی دور ریخته شد و به رسوب ته لوله‌ها یک میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد سرد اضافه شد. پس از دو دقیقه سانتریفوژ با سرعت ۱۰۰۰۰g، محلول رویی دور ریخته شد و ته لوله رسوب سفید حاوی DNA مشاهده شد. پس از اینکه رسوب در هوای آزاد خشک شد، ۵۰-۳۰ میکرولیتر آب دیونیزه سترون به آن افزوده شد. جهت اطلاع از موفقیت انجام عمل استخراج، DNA حاصل از ژل آگارز ۰/۸ درصد عبور داده شد. جهت رنگ‌آمیزی و مشاهده بندهای DNA، از محلول اتیدیوم بروماید[4] و دستگاه Gel Documentation مدل (B & L system) استفاده شد. به منظور انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از دو جفت آغازگر اختصاصی با توالی زیر ساخت شرکت MWG-Biotech کشور آلمان استفاده شد:

GF*MAT*1a: (5′-GTTCATCAAAGGGCAAGCG-3′)
GF*MAT*1b: (5′-TAAGCGCCCTCTTAACGCCTTC-3′)
Gf*MAT*2c: (5′-AGCGTCATTATTCGATCAAG-3′)
Gf*MAT*2d: (5′-CTACGTTGAGAGCTGTACAG-3

جفت آغازگر GFmat1a و GFmat1b جهت تکثیر قطعه DNA با طول حدود ۲۰۰ جفت‌باز برای *MAT-1* و جفت آغازگر Gfmat2c و Gfmat2d جهت تکثیر قطعه‌ای با طول حدود ۸۰۰ جفت‌باز برای *MAT-2* استفاده شدند. برنامه حرارتی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در ۳۵ چرخه شامل واسرشت سازی اولیه در ۹۴°C، سه دقیقه، ۳۵ چرخه به صورت واسرشت سازی در ۹۴°C، یک دقیقه، دورگه سازی در ۵۸°C، یک دقیقه، بسط در ۷۲°C، یک دقیقه و بسط نهایی در ۷۲°C، ۱۰ دقیقه بود. مشاهده محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به طریقی که قبلا بیان شد، انجام گرفت.

نتایج

وضعیت تشکیل پریتسیوم‌ها

تقریبا بعد از گذشت چهار تا شش هفته از زمان تلاقی جدایه‌های مزرعه‌ای و جدایه‌های آزمایشگر استاندارد (والد ماده) پریتسیوم‌های[5] تیره رنگی در تشتک‌های پتری تشکیل شدند (شکل ۱، الف و ب). جدایه‌های آزمایشگر استاندارد با تیپ آمیزشی مخالف در اثر جفت شدن با همدیگر از توانایی تولید پریتسیوم برخوردار بودند. برای اطمینان از وقوع تولیدمثل جنسی و تشکیل پریتسیوم، اسلایدهای میکروسکوپی از آسکوسپورهای[6] دو سلولی تهیه شد (شکل ۲، الف و ب).

وضعیت باروری جدایه‌ها

1. Potato Dextrose Broth (PDB)
2. Lysis Buffer
3. Cethyltrimethylamonium bromide
4. Ethidium Bromide
5. Perithecia
6. Ascospores

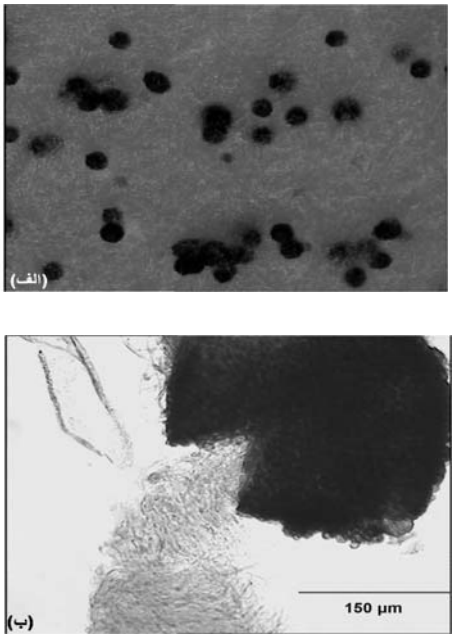
Archive of SID

www.SID.ir

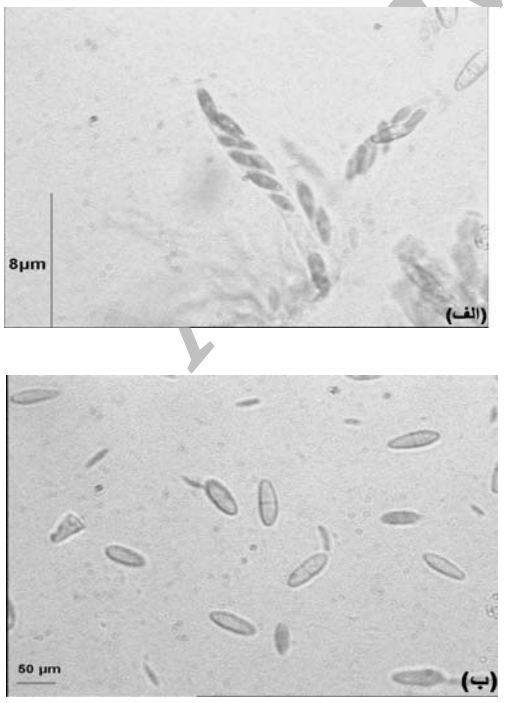
از مجموع ۳۰ جدایه *G. intermedia* بدست آمده از ذرت که همه بارور بودند، ۱۹ جدایه (۶۳ درصد) متعلق به تیپ آمیزشی *MAT-1*، ۱۱ جدایه (۳۷ درصد) متعلق به تیپ آمیزشی *MAT-2* بودند. از ۱۲ جدایه این قارچ بدست آمده از برنج، هفت جدایه (۵۸ درصد) با تیپ آمیزشی *MAT-1* و پنج جدایه (۴۲ درصد) با تیپ آمیزشی *MAT-2* شناسایی شدند. تیپ آمیزشی پنج جدایه *G. moniliformis* از برنج به دلیل عدم تشکیل پریتسیوم شناسایی نشدند. بین جدایه‌های مزرعه‌ای با تیپ آمیزشی مخالف تلاقی صورت گرفت و پریتسیوم، آسک[1] و آسکوسپور مشاهده نشد.

آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تعیین تیپ‌های آمیزشی

با استفاده از روش multiplex PCR قطعات DNA به طول حدود ۲۰۰ جفت باز برای *MAT-1* و حدود ۸۰۰ جفت باز برای *MAT-2* تکثیر شدند (شکل ۳). از مجموع ۱۲۸ جدایه مورد بررسی شامل ۵۴ جدایه *G. moniliformis* بدست آمده از ذرت و ۱۶ جدایه بدست آمده از برنج و ۳۰ جدایه *G. intermedia* بدست آمده از ذرت و ۲۸ جدایه حاصل از برنج، تیپ آمیزشی ۱۲۱ جدایه با الگوی باندی واضح شناسایی شد و هفت جدایه فاقد الگوی باندی واضح بودند. در مجموع ۳۸ جدایه (۷۰ درصد) *G. moniliformis* از ذرت با تیپ آمیزشی *MAT-1* و ۱۶ جدایه (۳۰ درصد) با تیپ آمیزشی *MAT-2* شناسایی شدند. همچنین نه جدایه (۶۴ درصد) از برنج به عنوان *MAT-1* و پنج جدایه (۳۶ درصد) به عنوان *MAT-2* شناسایی شدند. از بین پنج جدایه *G. moniliformis* از برنج که در تلاقی با جدایه‌های استاندارد تیپ آمیزشی آنها شناسایی نشده بود تیپ آمیزشی سه جدایه با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تعیین شد و دو جدایه دیگر الگوی باندی واضحی نداشتند. برای ۱۹ جدایه (۶۳ درصد) *G. intermedia* از ذرت تیپ آمیزشی *MAT-1* و برای ۱۱ جدایه (۳۷ درصد) تیپ آمیزشی *MAT-2* شناسایی شد. همچنین ۱۴ جدایه (۶۱ درصد) از برنج به عنوان *MAT-1* و نه جدایه (۳۹ درصد) *MAT-2* تعیین شدند و پنج جدایه الگوی باندی واضحی نداشتند. نتایج این آزمون با نتایج حاصل از تلاقی جدایه‌ها با جدایه‌های استاندارد مشابه بود.



شکل ۱- تشکیل پریتسیوم‌های *G. intermedia* روی محیط غذایی هویج آگار، حاصل از تلاقی جدایه MTa_1 با جدایه آزمایشگر استاندارد *MAT-2* از جمعیت آمیزشی D (الف)، پریتسیوم شکافته شده و آسک‌ها و آسکوسپورهای در حال آزاد شدن (ب).



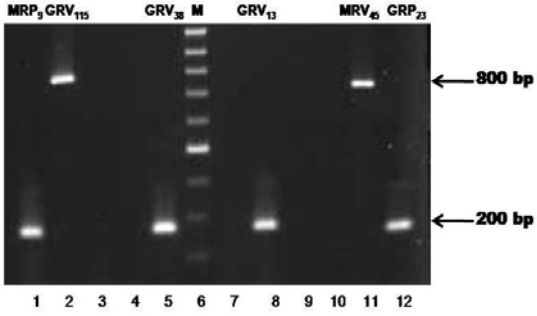
شکل ۲- آسک‌های حاوی آسکوسپور قارچ *G. intermedia* حاصل از تلاقی جدایه MTa_1 با جدایه استاندارد *MAT-2* از

1. Ascus

Archive of SID

www.SID.ir

جمعیت آمیزشی D (الف)، آسکوسپورهای یک و دو سلولی (ب).



شکل ۳- الگوی تکثیر ایدیومورف‌های تیپ آمیزشی *MAT-1* و *MAT-2* در جدایه‌های *G. moniliformis* و *G. intermedia* بدست آمده از برنج به کمک آغازگرهای اختصاصی. Gene Ruler^{TM} DNA Ladder Mix = M

بحث

در این تحقیق وضعیت باروری، نحوه پراکنش و فراوانی آلل‌های تیپ آمیزشی جدایه‌های دو قارچ *G. moniliformis* و *G. intermedia* که هر دو بیمارگرهای مزارع برنج استان‌های گیلان و مازندران و مزارع ذرت استان‌های مختلف هستند، ارزیابی گردید. نتایج حاصل از تلاقی جدایه‌های جمعیت آمیزشی D (*G. intermedia*) از برنج و ذرت با جدایه‌های آزمایشگر استاندارد نشان داد که هر دو تیپ آمیزشی *MAT-1* (۶۲ درصد) و *MAT-2* (۳۸ درصد) در جمعیت این گونه از برنج و ذرت وجود دارند و فراوانی *MAT-1* نسبت به *MAT-2* بیشتر بود. تحقیقات مشابه در ایران انجام شده، با این تفاوت که فراوانی تیپ آمیزشی *MAT-2* نسبت به *MAT-1* بیشتر بوده است (Abbas Zadeh *et al*., 2007). در کاستاریکا نیز برای جدایه‌های بدست آمده از بذور ذرت در نتیجه تلاقی با جدایه‌های آزمایشگر استاندارد، هر دو تیپ آمیزشی مشاهده شد و فراوانی *MAT-2* نسبت به *MAT-1* بیشتر بود (Danielsen *et al*., 1998). جدایه‌های *G. moniliformis* از برنج که در تلاقی با جدایه‌های استاندارد پریتسیوم تشکیل ندادند در واقع نابارور یا عقیم می‌باشند. ولی با توجه به اینکه سه جدایه از میان این جدایه‌ها در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز الگوی باندی واضحی را نشان دادند، بنابراین، این جدایه‌ها آلل‌های لوکوس کنترل‌کننده تولیدمثل جنسی (*MAT*) را دارند. علاوه بر تیپ آمیزشی ویژگی‌های دیگری در توانایی یک قارچ برای کامل کردن مرحله جنسی از چرخه زندگی موثر می‌باشند، مانند بعضی از ترکیبات مولکولی پیچیده از قبیل کارتن‌ها و استروئیدها و یا سیگنال‌های مولکولی که هنوز ناشناخته‌اند. بنابراین، در این جدایه‌ها ممکن است این ویژگی‌ها وجود نداشته باشند و منجر به ناباروری آنها شوند (Leslie & Klein, 1996). در تحقیق حاضر از تلاقی جدایه‌های مزرعه‌ای با تیپ‌های آمیزشی مخالف که تیپ آمیزشی آنها در نتیجه تلاقی این جدایه‌ها با جدایه‌های استاندارد شناسایی شده بودند، هیچ پریتسیومی تشکیل نشد. این نتیجه نشان‌دهنده این است که همه جدایه‌های مزرعه‌ای نر بارور بودند، که می‌تواند حاکی از تکثیر غیرجنسی قارچ و یا انتخاب طبیعی باشد که منجر به کم شدن یا از بین رفتن افراد ماده بارور شده است (Leslie & Klein, 1996; Leslie & Summerell, 2006). نتایج بدست آمده با استفاده از روش مولکولی multiplex PCR نیز به همین ترتیب بود، به طوری که در میان ۱۲۱ جدایه *G. moniliformis* و *G. intermedia* از برنج و ذرت فراوانی تیپ آمیزشی *MAT-1* (۶۶ درصد) نسبت به *MAT-2* (۳۴ درصد) بیشتر بود. در آرژانتین مشابه این نتیجه در برای جمعیت آمیزشی A بدست آمده است، به طوری که از میان ۷۰ استرین نسبت فراوانی *MAT-1* به *MAT-2*، ۴۷ به ۲۳ بود (Chulze *et al*., 2000).

با توجه به اینکه هر دو تیپ آمیزشی *MAT-1* و *MAT-2* در بین جدایه‌های مورد بررسی در این تحقیق وجود دارند امکان وقوع تولیدمثل جنسی بین جدایه‌های مزرعه‌ای در طبیعت وجود دارد. فراوانی جدایه‌های ماده بارور در جمعیت قارچها به عنوان شاخصی برای وقوع تولیدمثل جنسی در طبیعت می‌باشد (Leslie, 1995; Leslie & Summerell, 2006). ولی از آنجاکه در تحقیق حاضر جدایه‌ها نربارور تشخیص داده شدند و برای وقوع تولیدمثل جنسی و تشکیل پریتسیوم، آسک و آسکوسپور در یک جمعیت باید دو جدایه با دو تیپ آمیزشی مخالف باشند و همچنین یکی از جدایه‌ها ماده بارور و دیگری حداقل نربارور باشد، بنابراین امکان وقوع تولیدمثل جنسی خیلی کم می‌باشد. با توجه به اینکه یکی از عوامل بروز تنوع ژنتیکی در جمعیت قارچها در

Archive of SID

www.SID.ir

طبیعت تولیدمثل جنسی می‌باشد، بنابراین در جمعیت *G. moniliformis* و *G. intermedia* بدست آمده از مزارع برنج و ذرت اگرچه امکان وقوع تولید مثل جنسی کم است، تنوع ژنتیکی می‌تواند از طریق دیگر مکانیسم های تغییرپذیری از قبیل جهش، نوترکیبی حاصل از پدیده شبه‌جنسی و حتی مهاجرت سالیانه بذور آلوده باشد (Chulze *et al.*, 2000). معمول ترین روش برای شناسایی گونه‌های بیولوژیکی در جمعیت‌های گونه مرکب *G. fujikuroi* انجام آزمایشات تلاقی جدایه‌های مزرعه‌ای با جدایه‌های استاندارد می‌باشد. با توجه به وقت گیر بودن این آزمایشات که حداقل نیازمند چهار تا شش هفته از زمان تلاقی تا نتایج نهایی می‌باشد (Huss *et al.*, 1996)، بنابراین ارزیابی تیپ آمیزشی بر مبنای روش‌های مولکولی می‌تواند باعث افزایش کارایی و کاهش زمان لازم برای دست‌یابی به نتایج شود. با این تفاوت که در مطالعات مولکولی آگاهی از وضعیت باروری جدایه‌ها امکان‌پذیر نمی‌باشد ولی قادر به شناسایی تیپ آمیزشی قارچ‌های غیرجنسی مانند *Fusarium oxysporum* می‌باشد (Kerenyi *et al.*, 1996; Steenkamp *et al.*, 2000).

سپاسگزاری

این تحقیق با استفاده از اعتبار ویژه پژوهشی اختصاص داده شده از طرف معاونت پژوهشی دانشگاه تهران انجام شده است. بدینوسیله از آن معاونت محترم و مسئولین محترم گروه گیاهپزشکی تشکر بعمل می‌آید.

REFERENCES

1. Abbas Zadeh, M., Javan-Nikkhah, M., Padasht Dehkai, F. & Mousanejad, S. (2007). Sexual fertility and mating types of *Gibberella fujikuroi* species complex, the cause of bakanae disease and foot rot in Guilan province, Iran. *Iranian Journal of Agricultural Science*, 38, 685-692. (In Farsi).
2. Chulze, S. N., L. Ramirez, M., Torres, A. & Leslie, J. F. (2000). Genetic variation in *Fusarium* sectiom *Liseola* from no-till maize in Argentina. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 5312-5315.
3. Danielsen, S., Meyer, U. M. & Jensen, D. F. (1998). Genetic characteristics of *Fusarium verticillioides* isolates from maize in Costa Rica. *Plant Pathology*, 47, 615-622.
4. Dayakar, B. V., Narayanan, N. N. & Gnanamanickam, S. S. (2000). Cross-compatibility and distribution of mating type alleles of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* in India. *Plant Disease*, 84, 700-704.
5. Desjardins, A. E. (2003). *Gibberella* from A (venaceae) to Z (eae). *Annual Review of Phytopathology*, 41, 177-198.
6. Huss, M. J., Campbell, C. L., Jennings, D. B. & Leslie, J. F. (1996). Isozyme variation among biological species in the *Gibberella fujikuroi* species complex (*Fusarium* saction *Liseola*). *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 3750-3756.
7. Kerenyi, Z., Zeller, K., Hornok, L. & Leslie, J. F. (1999). Molecular standardization of mating type terminology in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 4071-4076.
8. Klittich, C. J. R. & Leslie, J. F. (1988). Nitrate reduction mutants of *Fusarium moniliform* (*Gibberella fujikuroi*). *Genetics*, 118, 417-423.
9. Leslie, J. F. (1995). *Gibberella fujikuroi*: available populations and variable traits. *Canadian Journal of Botany*, 73 (Suppl. 1), S282-S291.
10. Leslie, J. F. & Klein, K. K. (1996). Female fertility and mating type effects on effective population size and evolution in filamentous fungi. *Genetics*, 144, 557-567.
11. Leslie, J. F., Zeller, K. A., Logrieco, A., Mule, G., Moretti, A. & Ritieni, A. (2004). Species diversity of and toxin production by *Gibberella fujikuroi* species complex strains isolated from native prairie grasses in Kansas. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 2254- 2262.
12. Leslie, J. F. & Summerell, B. A. (2006). *The Fusarium laboratory manual*. Black wellPublishing. Oxford.
13. Moretti, A., Mule, Susca, G. A., Gonzalez- Jean, M. T. & Logrieco, A. (2004). Toxin profile, fertility and AFLP analysis of *Fusarium verticillioides* from banana fruits. *European Journal of Plant Pathology*, 110, 601-609.
14. Pamphile, J. A. & Azevedo, J. L. (2002). Molecular characterization of endophytic strains of *Fusarium verticillioides* (= *Fusarium moniliforme*) from maize (*Zea mays*. L). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18, 391-396.

Archive of SID

www.SID.ir

15. Steenkamp, E. T., Wingfield, B. D., Coutinho, T. A., Zeller, K. A., Wingfield, M. J., Marasas, W. F. O. & Leslie, J. F. (2000). PCR-based identification of *MAT-1* and *MAT-2* in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4378- 4382.
16. Urashima, A. S., Igarashi, S. & Kato, H. (1993). Host range, mating type, fertility of *Pyricularia grisea* from wheat in Brazil. *Plant Disease*, 77, 1211- 1216.
17. Wallace, M. M. & Covert, S. F. (2000). Molecular mating type assay for *Fusarium circinatum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 5506- 5508.

Archive of SID

www.SID.ir