Archive of SID

"نهال و بذر"
جلد ۱۹، شماره ۲، شهریور ۱۳۸۲

شناسائی جدایه‌های قارچ *Fusarium moniliforme* عامل بیماری پوسیدگی طوقه برنج با استفاده از مارکرهای مولکولی RAPD

Identification of Isolates of *Fusarium moniliforme*, the Causal Agent of Rice Foot Rot Disease, Using RAPD Technique

محمود دامادزاده

مؤسسه بین‌المللی تحقیقات برنج، فیلیپین

تاریخ دریافت: ۸۰/۹/۳۰

چکیده

دامادزاده، م. ۱۳۸۲. شناسایی جدایه‌های قارچ *Fusarium moniliforme* عامل بیماری پوسیدگی طوقه برنج با استفاده از مارکرهای مولکولی RAPD. نهال و بذر ۱۹: ۲۴۴-۲۲۷.

در این بررسی ضمن جمع‌آوری ۵۸ جدایه قارچ *Fusarium moniliforme* عامل بیماری پوسیدگی طوقه برنج، مشخصات مرفولوژیکی و بیماریزایی آن‌ها روی گیاه برنج در آزمایشگاه و گلخانه در مرکز تحقیقات بین‌المللی برنج (IRRI) مورد مطالعه قرار گرفت. بعلاوه با استفاده از روش RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) به کمک پرایمر ۱۱ـ J از کیت Operon باتواتر 5-ACTCCTGCGA-3 قسمت‌های تصادفی از DNA هر جدایه تکثیر گردید. سپس جدایه‌ها به کمک تجزیه خوشه‌ای با در نظر گرفتن ۲۵ درصد تشابه گروه‌بندی شدند. نتایج به دست آمده نشان داد که جدایه‌ها از نظر میزان رشد چهار روزه کلنی در هشت گروه، از نظر تعداد روز تا رسیدن قطر کلنی به ۹۰ میلی‌متر (دیواره تشتک پتری) در یک گروه، از لحاظ ویژگی اثرگذاری روی میزان ارتفاع گیاه در پنج گروه و از نظر الگوی ژنتیکی در ۱۳ گروه مختلف قرار می‌گیرند. براساس آزمون t درون گروه‌های مزبور از نظر خصوصیات اندازه‌گیری شده در آزمایشگاه و گلخانه، مشخص شد که هیچ‌کدام از جدایه‌ها در هیچ یک از خصوصیات با میانگین گروه مربوطه تفاوت معنی‌داری ندارند. بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری نمود که با استفاده از مارکرهای مولکولی به روش RAPD می‌توان به جداسازی جدایه‌ها بر اساس مرفولوژیکی و بیماریزایی اقدام نمود. ضریب همبستگی ($r = ۰/۵۴$) مثبت و معنی‌داری بین میزان رشد کلنی قارچ در تشتک پتری و تأثیرگذاری قارچ بر ارتفاع بوته به دست آمد. بدین معنی که هرچه رشد قارچ در محیط کشت سریع‌تر بود موجب افزایش بیشتر ارتفاع گیاه گردید.

واژه‌های کلیدی: برنج، بیماری پوسیدگی طوقه، *Fusarium moniliforme*، جدایه‌ها، RAPD.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

بیماری پوسیدگی طوقه برنج به‌طور گسترده در برنج‌کاری‌های مناطق حاره و معتدله جهان پراکنده است و به نام‌های مختلف باکانا (Bakanae)، قدکشیدگی، سرسفیدی در کشورهای مختلف نامگذاری شده است. Sun and Synder (1981) و Booth (1971) فرم غیرجنسی قارچ عامل بیماری باکانا و سایر قارچ‌های مشابه را در گونه *F. moniliforme* Sheldon قرار دادند. این قارچ علاوه بر برنج، ذرت، سورگوم، پنبه، نیشکر و مارچوبه و تعداد زیادی علف‌های هرز از خانواده‌های مختلف را آلوده می‌کند.

واضح‌ترین علائم این بیماری قدکشیدگی و پوسیدگی طوقه بوته‌های آلوده می‌باشد. در اصفهان در خزانه برنج با وجودی که بعضی از گیاهچه‌ها آلوده می‌باشند علائم این بیماری به ندرت ظاهر می‌گردد. در اکثر نقاط برنج‌خیز جهان و همچنین در شمال ایران گیاهچه‌های آلوده به رنگ سبز مایل به زرد درآمده و به‌طور غیرعادی نازک و کشیده می‌شوند و بسیاری از آن‌ها در اثر بیماری از بین می‌روند. بوته‌هائی که در خزانه زنده مانده‌اند و آلوده می‌باشند بعد از نشاء علائم آلودگی را نشان می‌دهند. در زمین اصلی ابتدا برگ‌های مسن بوته‌های آلوده و سپس سایر برگ‌ها از قسمت حاشیه، قهوه‌ای شده و سرانجام خشک می‌شوند. طوقه و گره‌های پائین، قهوه‌ای و سپس سیاه رنگ شده و در صورتی که شکافی طولی به ساقه داده شود، توده میسلیوم قارچ همراه با اسپورهای آن به رنگ خاکستری مایل به صورتی در محل بندهای پائینی و طوقه به وضوح دیده می‌شود. در صورت شدت بیماری، توده میسلیوم قارچ در سطح خارجی بند پائینی ساقه در زیر غلاف برگ نیز دیده می‌شود. همچنین در گیاهان در حال مرگ و یا مرده در بندهای بالای ساقه نیز آلودگی مشاهده می‌گردد. یکی دیگر از علائم بارز بیماری تولید ریشه‌های نابجا در گره‌های بالاتر از سطح آب می‌باشد. بوته‌های آلوده در مزارع اصفهان کوتاه‌تر از بوته‌های سالم می‌باشد (دامادزاده و حسن‌پور، ۱۳٦٦).

میزان خسارت این بیماری در ژاپن به ۲۰ درصد، در هندوستان ۱۵ درصد و در تایلند ۱٤/۷-۳/۷ درصد کاهش محصول برآورد شده است (Ou, 1985). ابراهیم نسبت (۱۳٤۳) برای اولین بار در اواخر سال ۱۳٤۳ این بیماری را در دهستان شالکوراب از توابع شهرستان فومن مشاهده و میزان خسارت آن را در مزرعه ۸-۵ درصد تخمین زده است. فروتن و همکاران (۱۳۷۰) میزان آلودگی مزارع برنج مازندران را در شهرستان نور، با حداکثر ٤٦/٦ درصد روی رقم خزر و در شهرستان تنکابن، با حداقل ۵/۲۸ درصد روی رقم طارم گزارش کرده‌اند. دامادزاده و حسن‌پور (۱۳٦٦) میزان آلودگی مزارع برنج در لنجان اصفهان را ۱۲/۲-۹/۱ درصد تعیین کرده و میزان آلودگی بذرهای جمع‌آوری شده از مزارع مختلف را ۲۰-۲/۵ درصد مشخص نموده‌اند.

www.SID.ir

Archive of SID

کامران و بنی‌هاشمی (۱۳۶۸) این بیماری را از استان فارس گزارش و اتیولوژی آن را بررسی کرده‌اند. پاداشت و همکاران (۱۳۷۲) فرم جنسی و غیرجنسی قارچ عامل بیماری پوسیدگی طوقه برنج در گیلان را مطالعه و نام فرم جنسی آن را *Gibberella fujikuroi* تعیین کردند.

جنس فوزاریوم دارای گروه‌های متنوعی است و برای تشخیص گونه از خصوصیات مرفولوژیک استفاده می‌شود (Booth, 1971)، لیکن تنوع زیاد درون گونه یا Forma speciales فقط از طریق میزبان‌ها قابل تشخیص است. به این خاطر کوشش‌های زیادی شده است که بتوانند با استفاده از تکنیک‌های مختلف، جنس فوزاریوم و گونه‌ها و نژادهای آن را تقسیم‌بندی کنند. تکنیک‌های Zymograms, (Scala *et al.*, 1981), Soluble protein electerophoretic pattern (Ausubel *et al.*, 1991), Monoclonal antibody reactions (Xu and Leslie, 1993), Immunoelecterograms (Abd-el-Rehim and Fadel, 1980).

در این زمینه موفقیت‌های نسبی داشته است. اخیراً با استفاده از روش Vegetative Compatibility Group نیز قارچ فوزاریوم را طبقه‌بندی و نژادهای مختلف هر گونه را مشخص کرده‌اند (Puhalla, 1985; Leslie, 1993). روش RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) که می‌تواند تغییرات مولکولی در سطح DNA را مشخص نماید در اینگونه مطالعات بسیار موفق بوده است (Manicom *et al.*, 1987؛ Xu and Leslie, 1993). لیکن این روش بسیار پرخرج و دقت و مواد زیادی نیاز دارد که اختصاصی می‌باشد به این خاطر دانشمندان درگیر مطالعات بیولوژی مولکولی تکنیک جدیدتری بنام RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) را مورد استفاده قرار می‌دهند (Williams *et al.*, 1990). در این روش با استفاده از نوکلئوتیدهای دارای تواتر مشخص بنام پرایمر (Arbitrary Nucleotide Sequence) قسمتی از DNA به طور تصادفی تکثیر می‌گردد که در گونه و یا زیر گونه‌های مختلف محل آن متفاوت است و بنابراین می‌توان تفاوت‌های ژنتیکی را مشاهده کرد. در این مقاله سعی شده است پرایمر قابل استفاده برای تکثیر DNA قارچ *Fusarium moniliforme* را مشخص نموده و سپس ارتباط خصوصیات مرفولوژیک با تغییرات ژنتیکی در جدایه‌های مختلف این قارچ تعیین گردد و نهایتاً مشخص شود آیا جدایه‌های مختلف این قارچ با همدیگر تفاوت دارند و چنانچه لازم باشد در مورد ارقام مقاوم به این بیماری بررسی شود تا چه حد در مورد جدایه‌های مختلف حساسیت باید نشان داد.

مواد و روش‌ها

I ـ تهیه جدایه‌های قارچ

www.SID.ir

Archive of SID

برای تهیه جدایه قارچ با توجه به این که قارچ عامل بیماری بذر زاد می‌باشد ابتدا بذرهای مختلف برنج را مدت چند ثانیه در محلول ۵۰ درصد الکل اتیلیک قرار داده و سپس با محلول ۲۰٪ هیپوکلریت سدیم به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی شدند. بذرهای ضدعفونی شده با آب مقطر استریل شستشو و روی محیط کشت PDA درون ظروف پتری قرار داده شدند. این ظروف درون انکوباتور با دمای ۲۸°C به مدت حداکثر یک هفته نگهداری شدند تا این که قارچ روی بذرها رشد کرد. پس از رشد قارچ، مجدداً قارچ *F. moniliforme* از روی بذرها جداسازی و در ظرف پتری دیگری که حاوی محیط کشت فوق بود کشت داده شدند. قارچی که به طریق فوق از روی بذر به محیط کشت منتقل گردید با روش تک اسپور تکثیر شد. برای این کار مقدار بسیار کمی از میسلیوم قارچ درون ارلن‌مایر حاوی ۲۰-۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل، قرار داده شد و پس از تکان دادن و تخمین تعداد اسپور قارچ در محلول، به وسیله لوپ سطح محیط کشت درون تشتک پتری حاوی آب آگار (WA) به محلول قارچ آلوده گردید. محیط کشت آلوده شده در انکوباتور ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و پس از ۲٤ ساعت اسپورهائی که به طور جداگانه جوانه زده بودند زیر میکروسکپ مشخص و به درون تشتک پتری حاوی محیط کشت PDA منتقل شدند. از کشت به دست آمده پس از رشد، برای آزمایش‌های بعدی از آن‌ها استفاده گردید (Booth, 1971).

II- استخراج DNA

پس از تهیه جدایه‌های قارچ روی محیط کشت PDA، به وسیله میله چوب پنبه سوراخ‌کن سه قطعه محیط کشت حاوی قارچ به قطر ۰/٤ میلی‌متر درون یک ارلن ۱۵۰ میلی‌لیتری که حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع PDB (Potato Dextrose Broth) بود قرار داده شد و برای مدت ۵-٤ روز درون شیکر (Shaker) در محیط آزمایشگاه (۲۵ درجه سانتی‌گراد) نگهداری گردید. در این مدت قارچ درون محیط کشت مایع رشد کرد.

برای جدا کردن میسلیوم‌های قارچ از مایع، محتوی هر ظرف ارلن روی یک ورقه کاغذ صافی Watman No. 1 که روی قیف Buchner قرار داده شده بود و قیف روی ارلن متصل به پمپ خلاء قرار داشت، ریخته شد. توسط پمپ خلاء مایع خارج شد و ورقه میسلیوم روی کاغذ صافی باقی ماند. میسلیوم را از کاغذ صافی جدا کرده و پس از تخمین وزن در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای جدا کردن DNA از قارچ، ابتدا میسلیوم یخ زده را درون ازت مایع به مدت ۲۸ ساعت در دستگاه Lyophilizer قرار داده تا کاملاً خشک شود. میسلیوم‌های خشک شده در یخ (Freeze dry) را درون هاون چینی همراه با ازت مایع به آرامی ساییده تا این که به پودر تبدیل شد. سپس مراحل زیر طی گردید:

www.SID.ir

Archive of SID

۱ـ مقدار حدود ۲۵ میلی‌گرم از پودر میسلیوم (بقیه درون فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد) را درون ۵۰۰ (میکرولیتر) بافر استخراج (Extraction buffer) با فرمول زیر:

100 mM Tris-HCl, pH 8.0;

100 mM EDTA

250 mM NaCl

درون‌میکروفیوژ تیوب (1.5 ml microfuge tube) ریخته و برای مخلوط شدن پودر میسلیوم با محلول بافر آن را کمی روی دستگاه لرزش‌دهنده (Vortex) نگهداشته تا مخلوط شود.

۲ـ مقدار ۵۰ میکرولیتر (Sodium dodecy sulfate 10% SDS) به هر میکروتیوب اضافه گردید. لوله‌ها درون یک قالب قرار داده شدند به طوری که ته آن‌ها درون آب قرار گیرد. سپس آن‌ها درون حمام آب گرم با دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شدند. در این مدت گاهی به لوله‌ها آهسته ضربه زده می‌شد ولی این کار به آرامی انجام می‌شد تا باعث شکسته شدن DNA نشود.

۳ـ به محلول فوق مقدار ۲۰۰ میکرولیتر محلول استات پتاسیم با pH = ۴/۸ اضافه گردید و لوله‌ها درون فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه نگهداری شدند. برای تهیه محلول استات پتاسیم با pH = ۴/۸ مقدار ۲۹/۴۴ گرم استات پتاسیم را در ۸۸/۵ میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده و سپس مقدار ۱۱/۵ میلی‌لیتر اسید استیک خالص (Glacial acetic acid) به آن اضافه می‌گردد این محلول دارای ۳M پتاسیم و ۵M استات می‌باشد. استات پتاسیم موجب حل کردن پروتئین‌های درون سلول می‌شود.

۴ـ برای جدا کردن DNA محلول از رسوب حاصله، مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه و یا ۱۰ دقیقه با دور ۱۵۰۰۰ سانتریفوژ گردید.

۵ـ با احتیاط مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از فاز مایع (Supernatant) با میکروپیپت استخراج و به میکروتیوب جدید که حاوی ۱ میلی‌لیتر اتانول خالص سرد حدود ۴ درجه سانتی‌گراد می‌باشد انتقال داده شد.

لوله‌ها را یکی دو بار وارونه کرده تا محتوای آن کاملاً مخلوط شود و سپس برای مدت ۱۰ دقیقه در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا رسوب تهیه شود. اتانول باعث رسوب دادن DNA می‌گردد.

۶ـ رسوب نوکلئیک اسید (DNA) به وسیله سانتریفوژ با دور ۱۳۰۰۰ در دقیقه به مدت ۵ دقیقه از محلول جدا گردید. محلول اضافی را پس از سانتریفوژ، با پی‌پت خارج کرده و رسوب باقی مانده با اتانول ۷۰٪ جهت حذف مواد اضافی شستشو داده شد. سپس لوله‌ها در حالی که درب آن‌ها باز بود در مسیر جریان هوا قرار داده شدند تا خشک شوند در این مرحله از دستگاه خشک‌کننده درخلاء نیز استفاده گردید.

۷ـ رسوب خشک شده در هوا در ۲۰۰ میکرولیتر بافر TE حل گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

۸ـ تا این مرحله DNA به صورت محلول در میکروتیوب‌ها وجود داشت ولی ممکن بود رسوب هم دیده شود که قاعدتاً فاقد نوکلئیک بود، بنابراین اگر رسوب وجود داشت محلول به آرامی با میکروپیپت خارج و به میکروتیوب جدید انتقال داده می‌شد. برای روشن شدن این که چه مقدار نوکلئیک اسید در محلول وجود دارد به وسیله دستگاه Fluorometer غلظت آن اندازه‌گیری شد (Frederick *et al.*, 1991).

III ـ آزمایش RAPD

این آزمایش با استفاده از تکنیک PCR (Polymerase Chain Reaction) انجام شد که ذیلاً شرح داده می‌شود:

۱ـ با اضافه کردن آب مقطر استریل غلظت DNA با استفاده از فرمول زیر به مقدار 20ng/µl رسانده شد:

$C_1V_1 = C_2V_2$

V_1 = حجم محلول DNA که باید برداشت و رقیق کرد

C_1 = غلظت DNA که به‌وسیله دستگاه فلورمتریک تعیین شد

V_2 = حجم محلول رقیق شده نهائی (در اینجا ۲۵)

C_2 = غلظت مورد نظر (20 ng/µl)

۲ـ یک محلول ذخیره یا Stock با فرمول زیر تهیه شد:

Sterile deionized Water	13.8 µl
dATP (10 mM)	0.25 µl
dCTP (10 mM)	0.25 µl
dGTP (10 mM)	0.25 µl
dTTP (10 mM)	0.25 µl
Primer (10 µM)	1.0 µl
Taq pol	0.2 µl
10 × incubation buffer	2.0 µl
Total	19.0 µl
Temple DNA	1.0 µl

حجم این محلول برحسب تعداد نمونه اضافه گردید.

تمام این مواد به غیر از آب از فریزر برداشته و نگهداشته می‌شد.

۳ـ پس از اضافه کردن DNA به هر یک از نمونه‌ها، ۲۵ میکرولیتر روغن معدنی (پارافین مایع) اضافه گردید.

٤ـ مخلوط چند ثانیه تا دور ۱۳۰۰۰ در دقیقه سانتریفوژ گردید تا یکنواخت شود.

۵ـ تیوب‌ها در دستگاه PCR که دارای سیکل مخصوص می‌باشد قرار داده شدند. در این آزمایش سیکلی که قبلاً برای قارچ بلاست برنج استفاده شده بود به شرح زیر به کار گرفته شد:

Step 1-	94°C	1 min
Elaps		4.2 min
Step 2-	36 °C	1 min
Elaps		1 min
Step 3-	72 °C	2 min
Elaps		35 Seconds
Cycle	45	

تا این مرحله با استفاده از Primer مخصوص، DNA در قسمت‌های مختلف تکثیر شده است که با استفاده از ژل در دستگاه الکتروفورسیس و رنگ‌آمیزی و عکس‌برداری

www.SID.ir

Archive of SID

کردن می‌توان نتایج به دست آمده را تجزیه و تحلیل کرد.

٦ـ تهیه ژل: ژل مورد استفاده دارای فرمول زیر بود:

Synergel	0.75 gr.
Agarose	0.5 gr.

0.5 × TBE buffer up to 100 ml

که پس از تهیه درون دستگاه الکتروفورسیس ریخته شد. نمونه‌های DNA جدایه‌ها که درون چاهک‌های تزریق شده بودند، در دستگاه قرار داده و دستگاه مدت ٤ ساعت با جریان ۱۰۰ ولت و شدت ۳۰ آمپر به‌کار انداخته شد (Laneth *et al.*, 1983).

IV – آزمایش بیماریزایی جدا شده‌های مختلف قارچ *Fusarium moniliforme*

در این آزمایش بذرهای برنج رقم IR58 که نسبت به قارچ فوزاریوم حساس تشخیص داده شده بود تهیه گردید و ابتدا درصد جوانه‌زنی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت که بیش از ۹۵٪ بود. تعداد بذر مورد نیاز را جدا کرده و به وسیله محلول سفیدکننده ۲۰٪ (هیپوکلریت سدیم ۵/۲۵٪) به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی سطحی شدند. بذرهای ضدعفونی شده چندین بار با آب مقطر استریل شسته شده و در آب مقطر استریل در ظرف شیشه‌ای برای جوانه زدن در اتاق مخصوص جوانه زدن بذر با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا این که کلیه بذرها به طور یکنواخت جوانه زنند. هنگامی که بذرهای جوانه زده آماده گردید در سوسپانسیون جدایه‌های مختلف قارچ ریخته شدند. به این ترتیب که در این موقع درون هر یک از ظروف پتری که جدایه‌های قارچ به دست آمده از تک اسپور قارچ کشت داده شده بود مقدار ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه کرده و میسلیوم‌های سطح تشتک پتری را به وسیله لوپ جمع کرده و موقعی که میزان اسپور این محلول به تعداد ۵۰ تا ۱۰۰ عدد در یک دید میکروسکپ با بزرگنمائی ٤۰۰ رسید این محلول درون ظرف پتری پلاستیکی حاوی تعداد ٦۰ عدد بذر برنج جوانه‌دار ریخته و مدت ۲ روز در دمای اتاق نگهداری شدند. تعداد ۲۰ عدد بذر برنج فوق را در دو ردیف درون گلدان‌های پلاستیکی با ابعاد ۱۰×۲۰ سانتی‌متر که حاوی خاک معمولی بود کشت نموده و در گلخانه با دمای متوسط ۲۵°C نگهداری شدند. این آزمایش در ۳ تکرار انجام شد.

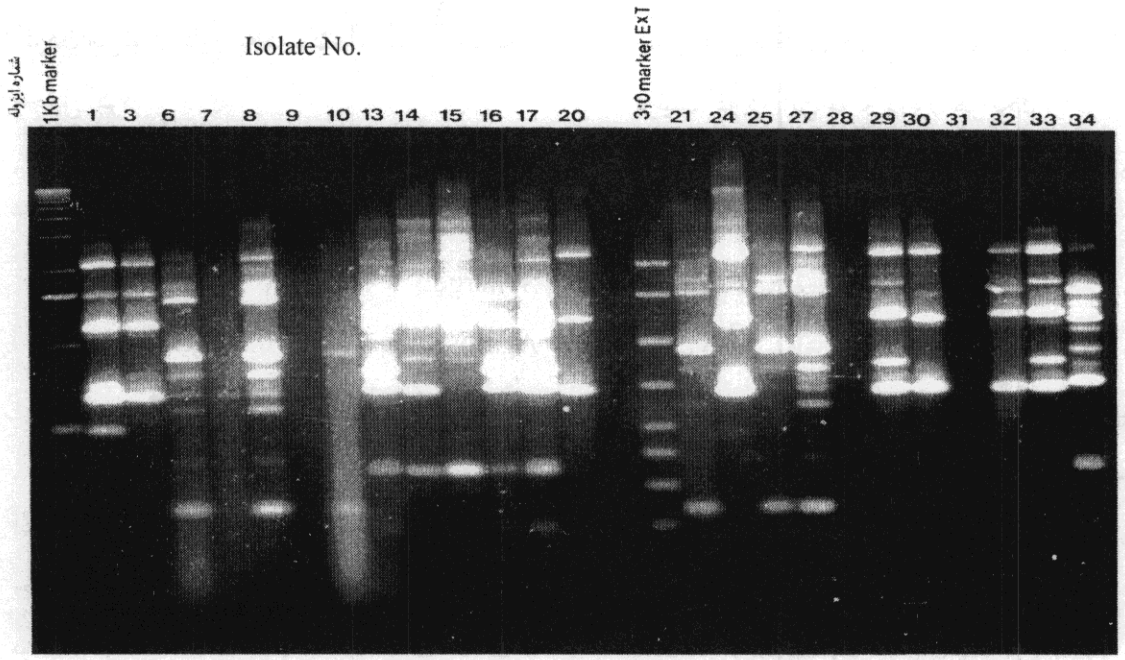
٤ هفته پس از کاشت تعداد بذرهای سبز شده، درصد بوته‌های بیمار و طول بوته‌ها اندازه‌گیری شد (دامادزاده و حسن‌پور، ۱۳٦٦؛ پاداشت و همکاران، ۱۳۷۲).

V ـ اندازه‌گیری میزان رشد جدا شده‌های مختلف قارچ

برای اندازه‌گیری میزان رشد قارچ از روش بوث (Booth, 1971) استفاده گردید به این ترتیب که هر یک از جدایه‌های قارچ که با روش تک‌اسپور روی محیط کشت PDA تکثیر شده بودند به وسیله میله چوب پنبه سوراخ‌کن یک قطعه از وسط تشتک پتری حاوی

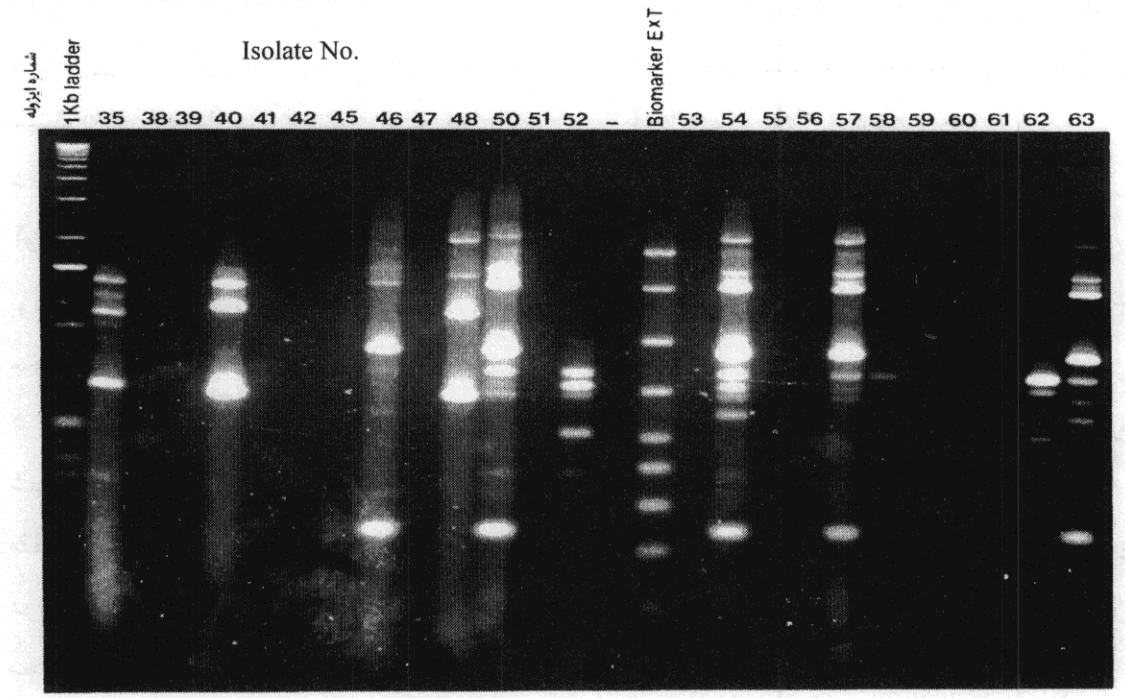
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱ـ مقایسه باندهای جدایه‌های مختلف قارچ *Fusarium moniliforme*

Fig. 1. Comparison of different *Fusarium moniliforme* isolates bands

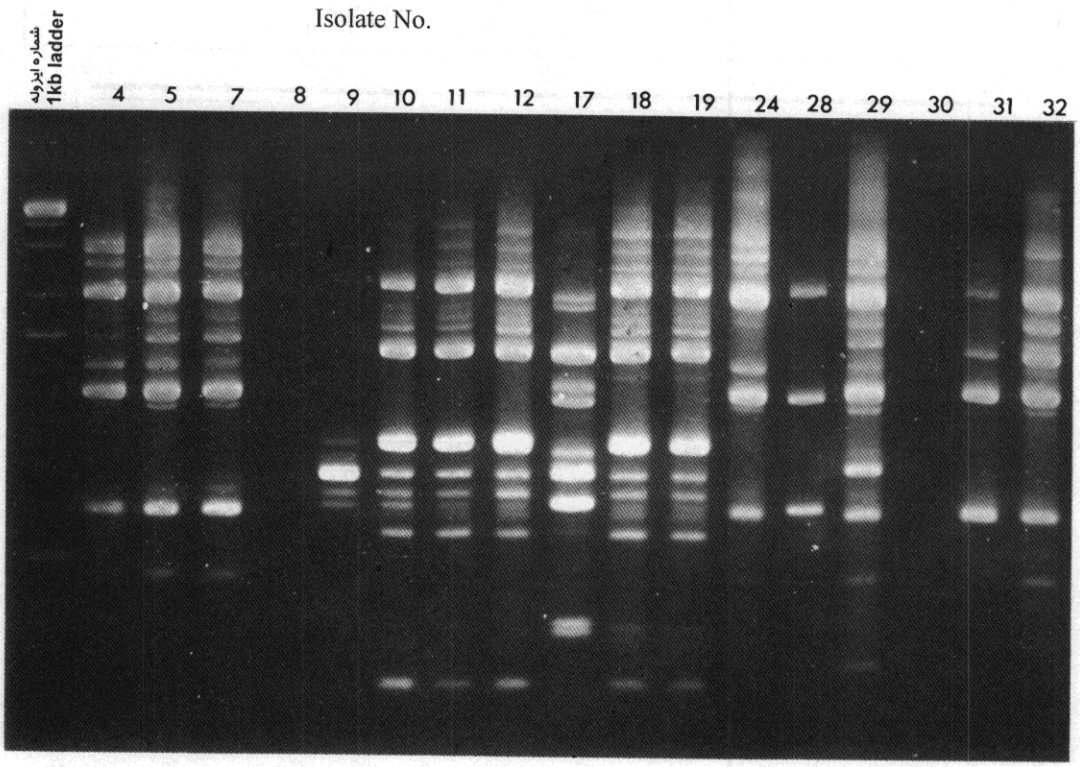


شکل ۲ـ مقایسه باندهای جدایه‌های مختلف قارچ *Fusarium moniliforme*

Fig. 2. Comparison of different *Fusarium moniliforme* isolates bands

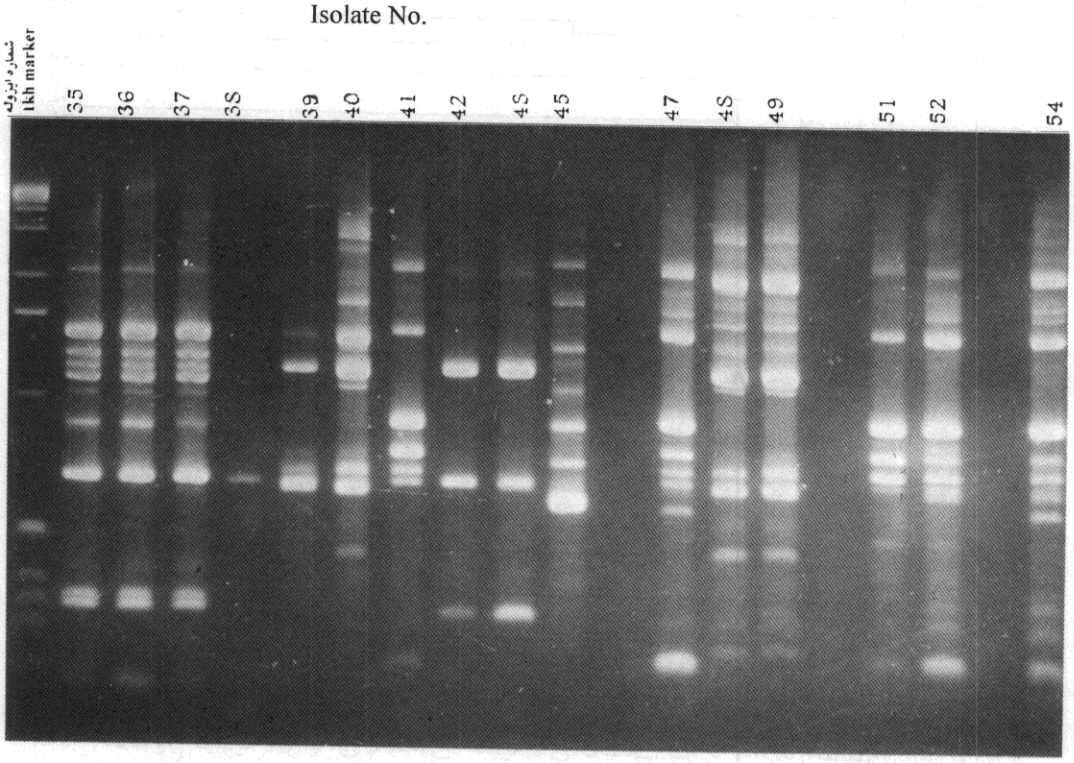
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳ـ مقایسه باندهای جدایه‌های مختلف قارچ *Fusarium moniliforme*

Fig. 3. Comparison of different *Fusarium moniliforme* isolates bands

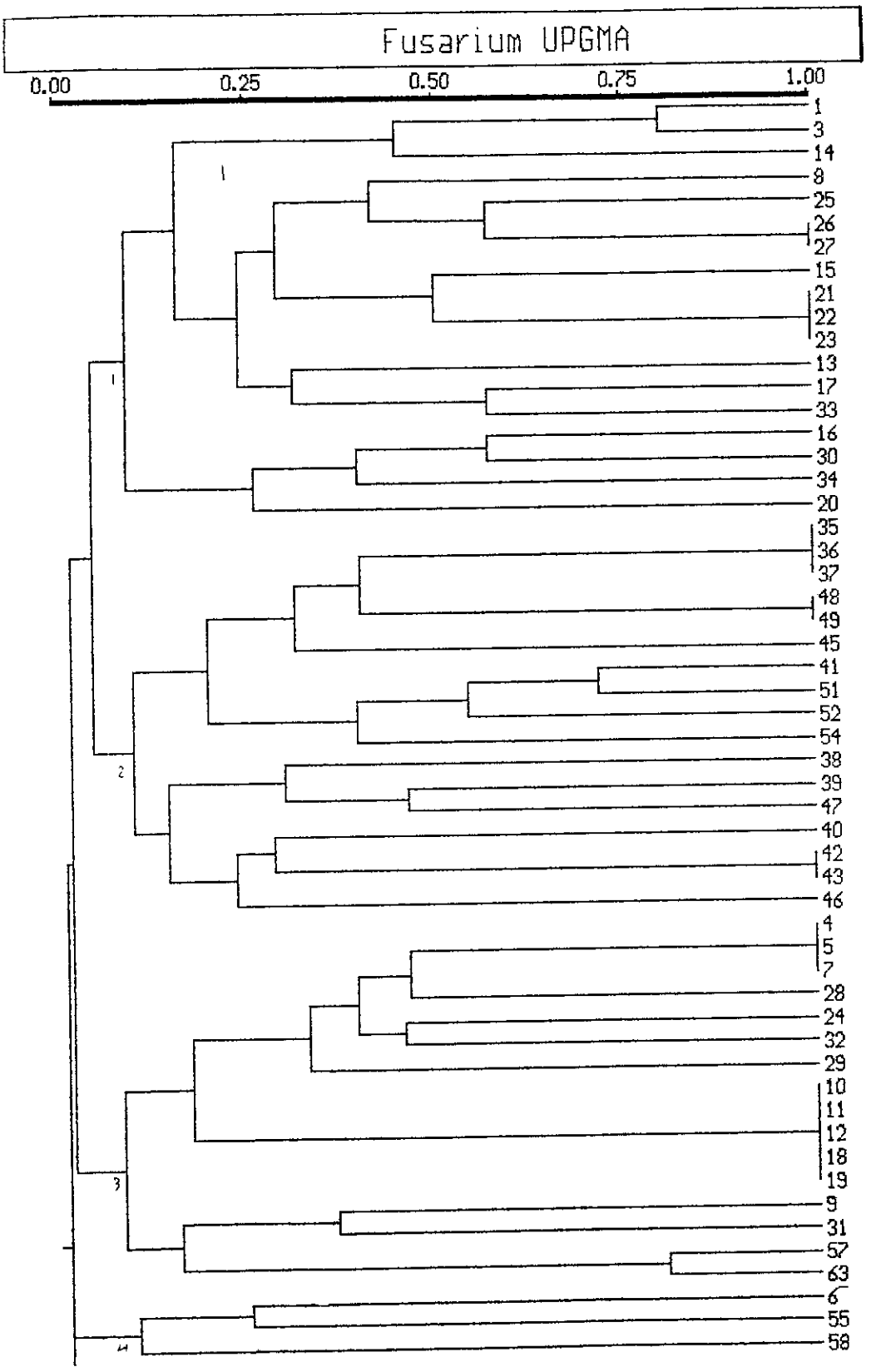


شکل ٤ـ مقایسه باندهای جدایه‌های مختلف قارچ *Fusarium moniliforme*

Fig. 1. Comparison of different *Fusarium moniliforme* isolates bands

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۵ـ نتایج تجزیه خوشه‌ای باندهای جدایه‌های مختلف قارچ *Fusarium moniliforme*

Fig. 5. Cluster analysis of the bands of different isolates of *Fusarium moniliforme*

www.SID.ir

www.SID.ir

جدول ۱ـ شاخص‌های آماری و تعداد جدایه‌های مربوط به هر گروه قارچ *F. moniliforme* برای صفت ارتفاع گیاه (میلی‌متر) در گلخانه

Table 1. The means of seedling length (mm) of the isolates of *F. moniliforme* in each group and their statistical characters in greenhouse condition

شاخص آماری Statistical Parameters		گروه اول group 1	گروه دوم group 2	گروه سوم group 3	گروه چهارم group 4	گروه پنجم group 5	گروه ششم group 6	گروه هفتم group 7	گروه هشتم group 8	گروه نهم group 9	گروه دهم group 10	گروه یازدهم group 11	گروه دوازدهم group 12	گروه سیزدهم group 13
Mean	میانگین	338.7	198.3	251.3	175.6	192.7	144.7	169.1	188.3	209.4	232.0	196.5	154.8	129.3
S. d.	انحراف معیار	9.7	35.4	3.0	53.1	45.7	32.6	38.9	67.4	8.5	1.4	73.3	33.2	0
S. E.	خطای استاندارد	5.6	10.7	1.5	21.7	22.9	18.9	19.5	25.4	3.8	1	51.9	23.6	0
C.V. %	ضریب تغییرات	4.4	17.9	1.2	30.2	23.8	22.5	23.0	35.8	4.0	0.61	37.3	21.5	0
Number	تعداد	3	11	4	6	4	3	4	7	5	2	2	2	1

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲ـ شاخص‌های آماری و تعداد جدایه‌های مربوط به هر گروه قارچ *F. moniliforme* برای صفت تعداد روز تا رسیدن قطر کلنی به ۹۰ میلی‌متر در آزمایشگاه

Table 2. The means of days that *F. moniliforme* reached to the 90 mm growth in each group and their statistical characters under lab. condition

شاخص آماری Statistical parameters		گروه اول group 1	گروه دوم group 2	گروه سوم group 3	گروه چهارم group 4	گروه پنجم group 5	گروه ششم group 6	گروه هفتم group 7	گروه هشتم group 8	گروه نهم group 9	گروه دهم group 10	گروه یازدهم group 11	گروه دوازدهم group 12	گروه سیزدهم group 13
Mean	میانگین	13.3	12.6	12.8	14.9	14.1	11.2	16.0	15.3	14.2	14.5	15.7	13.40	19
S. d.	انحراف معیار	4.9	3.4	4.4	3.6	2.2	2.5	3.7	5.2	2.9	7.8	4.8	0.14	0
S. E.	خطای استاندارد	2.9	1.0	2.2	1.5	1.1	1.4	1.9	2.0	1.3	5.5	3.2	0.10	0
C.V.%	ضریب تغییرات	37.1	27.0	34.7	24.3	15.7	22.1	23.4	33.9	20.4	53.7	30.3	1.04	0
Number	تعداد	3	10	4	6	4	3	4	7	5	2	2	2	1

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۳ـ شاخص‌های آماری و تعداد جدایه‌های مربوط به هر گروه قارچ *F. moniliforme* برای صفت قطر کلنی میسلیوم بعد از ٤ روز در آزمایشگاه

Table 3. The means of *F. moniliforme* growth after 4 days in Petri dishes in each group and their statistical characters under lab. condition

شاخص آماری Statistical parameters		گروه اول group 1	گروه دوم group 2	گروه سوم group 3	گروه چهارم group 4	گروه پنجم group 5	گروه ششم group 6	گروه هفتم group 7	گروه هشتم group 8	گروه نهم group 9	گروه دهم group 10	گروه یازدهم group 11	گروه دوازدهم group 12	گروه سیزدهم group 13
Mean	میانگین	49	42.8	50.0	50.1	29.5	39.8	43.6	44.8	34.9	40.4	37.3	36.4	21.8
S. d.	انحراف معیار	2.4	8.9	5.8	10.2	3.8	0.6	0.7	1.5	5.1	3.3	5.0	0.6	0
S. E.	خطای استاندارد	1.4	2.7	2.9	4.2	1.9	0.35	0.3	0.6	2.3	2.4	3.6	0.4	0
C.V.%	ضریب تغییرات	5.0	20.9	11.7	20.5	12.9	1.5	1.6	3.3	14.6	8.2	13.5	1.6	0
Number	تعداد	3	10	4	6	4	3	4	7	5	2	2	2	1

Archive of SID

Archive of SID

محیط کشت PSA (Potato Sucrose Agar) که اسیدیته آن ٦/٥ بود قرار داده و ظروف پتری درون اتاق رشد با دمای ۲۵-۲۲ درجه سانتی‌گراد که دارای ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی با فاصله ۲۵/۳۵ سانتی‌متر بود قرار داده شدند. ٤ روز پس از شروع آزمایش میزان رشد کلنی اندازه‌گیری گردید.

نتایج و بحث

در این بررسی تعداد ۱۲ پرایمر از کیت DNA Operon به طور تصادفی انتخاب و مورد آزمایش قرار گرفت که فقط پرایمر J-11 با تواتر 5-ACTCCTGCGA-3 توانست ٥٤ جدایه تکثیر شده را مشخص نماید. با استفاده از مارکرهای استاندارد، وزن ملکولی باندهای مختلف اندازه‌گیری و به وسیله روش تجزیه خوشه‌ای گروه‌بندی شدند. نتایج به دست آمده در شکل‌های ۱، ۲، ۳ و ٤ و همچنین تجزیه خوشه‌ای در شکل ٥ نشان داده شده‌اند.

نتایج بررسی‌های مرفولوژیک و بیماریزایی جدایه‌ها نیز در جدول‌های ۱، ۲ و ۳ ارائه گردیده است. میانگین نتایج به دست آمده در جدول ٤ ارائه گردیده و مشخص می‌گردد که این جدایه‌ها از نظر خصوصیات میزان رشد کلنی پس از ٤ روز در ۸ گروه و از نظر صفت تعداد روز تا رسیدن قطر کلنی به ۹۰ میلی‌متر (دیواره تشتک پتری) در یک گروه و از لحاظ ویژگی اثرگذاری روی میزان ارتفاع گیاه در ٥ گروه قرار می‌گیرند. ضریب همبستگی ($r = ۰/٥٤$) مثبت و معنی‌دار در سطح احتمال ۹۵ درصد بین میزان رشد کلنی قارچ در ظرف پتری و تأثیرگذاری قارچ روی ارتفاع بوته به دست آمد. بدین معنی که هر چقدر قارچ در محیط کشت سریع‌تر رشد کرده بود موجب افزایش بیشتر ارتفاع گیاه گردید و برعکس. نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای نشان داد که جدایه‌های مختلف قارچ از نظر الگوی ژنتیکی با در نظر گرفتن ۲۵٪ تشابه در ۱۳ گروه مختلف قرار می‌گیرند که پس از انجام آزمون t درون گروه‌های تقسیم شده بر اساس تجزیه خوشه‌ای برای هر یک از خصوصیات اندازه‌گیری شده فوق مشخص شد که هیچکدام از جدایه‌ها در هیچ یک از خصوصیات با میانگین دسته مربوطه در سطح احتمال ٥ درصد تفاوت معنی‌دار ندارند و بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری نمود که با استفاده از روش RAPD می‌توان جدایه‌های قارچ *Fusarium moniliforme* را در رابطه با مشخصات مرفولوژیک و بیماریزایی شناسایی نمود.

نکته بسیار جالب توجه در این بررسی این است که از ۲۰٪ جدایه‌هائی که در دستجات مختلف در تجزیه خوشه‌ای باندهای پروتئینی دارای ۱۰۰ درصد تشابه بودند ۱۵ جدایه از روی بذر و محل مشابه جمع‌آوری شده بود یعنی می‌توان به ۷۵٪ نتایج حاصل روش RAPD برای جدا کردن جدایه‌ها اطمینان پیدا کرد و همچنین

www.SID.ir

Archive of SID

جدایه‌های قارچ فوزاریوم را با استفاده از این روش براساس مشخصات مرفولوژیک و بیماریزائی شناسایی نمود. هوانگ و همکاران (Huang *et al.*, 1997) در بررسی جدایه‌های مختلف قارچ *F. moniliforme* از روی ذرت به این نتیجه رسیده‌اند که با روش ساده RAPD می‌توان تمام گروه‌های مختلف رشدی (Vegetative compatibility group) این قارچ و همچنین ژنوتیپ‌های آن را جداسازی و تشخیص داد. ویگ و همکاران (Voigt *et al.*, 1995) تغییرات ژنتیکی جدایه‌های قارچ فوزاریوم را با استفاده از مارکرهای RAPD مشخص کرده‌اند. موریلو و همکاران (Murillo *et al.*, 1998) با تعیین یک اولیگو نوکلئوتید به عنوان پرایمر برای تکثیر قارچ *F. moniliforme* توانستند میسلیوم این قارچ را از روی بذرهای ذرت آلوده جداسازی وشناسایی کنند که درآزمایشگاه‌های‌سلامت بذر

جدول ٤ـ مقایسه میانگین‌های عوامل اندازه‌گیری شده در محیط کشت و گلخانه برای سیزده گروه ژنتیکی جدایه‌های قارچ *F. moniliforme*

Table 4. The comparison of the means of different characters which measuared in the laboratory and greenhouse for 13 different genetical groups of *F. moniliforme* isolates

Treatment	تیمار	قطر کلنی پس از چهار روز Fungal colony after 4 days (mm)	تعداد روز برای رسیدن قطر کلنی به ۹۰ میلی‌متر No. of days to 90 mm fungal growth	ارتفاع گیاه Seedling length (mm)
Group 4	گروه ٤	50.050 a	14.867 a	175.62 abc
Group 3	گروه ٣	49.950 a	12.750 a	251.00 a
Group 1	گروه ١	49.000 ab	13.333 a	238.65 ab
Group 8	گروه ٨	44.800 abc	15.314 a	188.24 abc
Group 7	گروه ٧	43.575 abc	16.000 a	169.15 abc
Group 2	گروه ٢	42.773 abc	12.545 a	198.82 abc
Group 10	گروه ١٠	40.350 abcd	14.500 a	232.00 ab
Group 6	گروه ٦	39.670 abcd	11.167 a	144.67 c
Group 11	گروه ١١	37.250 bcd	15.650 a	196.50 abc
Group 12	گروه ١٢	36.400 cd	13.400 a	154.80 bc
Group 9	گروه ٩	34.900 cd	14.200 a	209.42 abc
Group 5	گروه ٥	29.575 de	14.075 a	192.70 abc
Group 13	گروه ١٣	21.800 e	19.000 a	129.30 c
		8 groups	one group	5 groups

میانگین‌ها با آزمون چنددامنه دانکن مقایسه شده‌اند در هر ستون میانگین‌هایی که دارای یک حرف مشترک می‌باشند از نظر آماری در سطح احتمال ٥٪ فاقد تفاوت معنی‌دار می‌باشند.

The means in each column followed by similar letters are not significantly different at 5% level (D. M. R.T.).

www.SID.ir

Archive of SID

قابل استفاده است. همچنین مولر و همکاران (Moller *et al.*, 1999) با استفاده از روش RAPD توانستند گونه‌های *F. moniliforme* و *F. subglutinans* را که باعث پوسیدگی بذر ذرت می‌شود به آسانی جداسازی و تشخیص دهند. با این روش با موفقیت توانستند جدایه‌های قارچ در لهستان را تشخیص داده و آن‌ها را در ذرت‌های هیبرید آلمان شناسایی کنند. چن و همکاران (Chen *et al.*, 1996) با استفاده از ۸۰ پرایمر ده زوجی با تکنیک RAPD توانستند DNA تیپ‌های مختلف قارچ *F. moniliforme* را که به گروه‌های سفید، قرمز و صورتی تقسیم شده بود جداسازی و شناسایی نمایند. در این آزمایش سه الگوی پروتئینی مشخص با سه پرایمر مشخص برای این سه گروه تعیین گردید. چیوک‌چتی و همکاران (Chiocchetti *et al.*, 1999) با استفاده از روش RAPD توانستند ۵۱ جدایه قارچ *F. oxysporum* را شناسایی و جداسازی کنند.

با توجه به موارد فوق می‌توان از تکنیک RAPD در تشخیص و شناسایی و جداسازی گونه‌های قارچ فوزاریوم و یا نژادها و جدایه‌های مختلف قارچ به آسانی استفاده کرده و در کارهای اصلاح نباتات مورد بهره‌برداری قرار گیرد.

سپاسگزاری

نگارنده لازم می‌داند از راهنمائی خانم دکتر R. Nelson و آقای دکتر بهزاد قره‌یاضی در مرکز تحقیقات بین‌المللی برنج در زمان انجام این تحقیق تشکر و سپاسگزاری نماید. همچنین از آقایان دکتر عبدالمجید رضائی و مهندس شهسواری که در تجزیه‌های آماری راهنمایی لازم را مبذول فرمودند تشکر می‌گردد.

منابع مورد استفاده **References**

ابراهیم‌نسبت، ف. ۱۳۴۳. پوسیدگی طوقه برنج، نشریه شماره ۳ مؤسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی، ۱۱ ص.

پاداشت، ف.، حجاروود، ق.، ایزدیار، م.، شریفی تهرانی، ع.، و اخوت، م. ۱۳۷۲. مطالعه فرم جنسی و غیرجنسی قارچ عامل بیماری پوسیدگی طوقه برنج در استان گیلان. خلاصه مقالات یازدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، دانشگاه گیلان، رشت. صفحه ٦٧.

دامادزاده، م.، و حسن‌پور، ح. ١٣٦٦. پوسیدگی طوقه برنج و مبارزه شیمیایی با آن در اصفهان. بیماری‌های گیاهی ۲۳: ٦١-٤٩.

دامادزاده، محمود. ۱۳۷۵. استفاده از مارکرهای ملکولی RAPD در جداسازی ایزوله‌های قارچ *Fusarium monitliforme*، خلاصه مقالات سومین کنگره زراعت و اصلاح نباتات ص ٦٩-٦٨.

www.SID.ir

Archive of SID

فروتن، ع.، میرزالو، م. ر.، بامدادیان، ط.، و گرامی، ق. ۱۳۷۰. پراکندگی بیماری پوسیدگی طوقه برنج در مازندران. خلاصه مقالات دهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. دانشگاه شهید باهنر کرمان. ص ۱۳۹.

کامران، ر.، و بنی‌هاشمی، ض. ۱۳۶۸. بررسی اتیولوژی بیماری پوسیدگی طوقه برنج در استان فارس. خلاصه مقالات نهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. دانشگاه فردوسی مشهد. ص ۱۲۷.

Abd-el-Rehim, M. A., and Fadel, F. M. 1980. Immunoelectrophoretical differences between phytopathogenic *Fusarium* species. Biochem. Syst. Ecol. 8: 7-9.

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. 1991. Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1 and 2. John Wiley & Sons.

Booth, C. 1971. The genus *Fusarium*. C. A. B. 237 pp.

Chen, X. I., Li, X. Y., Yaozu Chen, X, Li, X. Y., and Yan, Y. Z. 1996. RAPD analysis of three different component nuclear types from *Fusarium moniliforme*. Heterokaryon TJ 47-26. Acta-Microbiologica-Sinia 36: 385-388.

Chiocchetti, A., Ghignone, S., Minuto, A., Lodovica, G., Garibaldi, A., and Migheti, Q. 1999. Identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *basilici* from soil Basil seed and plants by RAPD analysis. Italy Plant Disease 83: 576-581.

Huang, R., Galperin, M., Levy, Y., and Peri, T. R. 1997. Genetic diversity of *Fusarium moniliforme* detected by vegetative compatibility groups and RAPD markers. Plant Pathology 46: 871-881.

Laneth, D., Capparelli, R., Marziano, F., Scala, F., and Novielio, C. 1983. Production of hybridomas screening monoclonal antibodies of the genus Fusarium. Mycotaxon 17: 523-532.

Leslie, J. F. 1993. Fungal vegetative compatibility. Annual Review of Phytopathology 31: 127-151.

Manicom, B. Q., Bar-Joseph, M., Rosner, A., Vigodsky-Hass, H., and Kotze, J. M. 1987. Potential application of random DNA probes and restriction fragment length polymorphisms in the taxonomy of Fusaria. Phytopathology 77: 669-672.

Moller, E. M., Chelkowski, J., and Geiger, H. H. 1999. Species specific PCR assays for the fungal pathogens *Fusarium moniliforme* and *F. subglutinans* and their application to diagnose maize ear rot disease. Journal of Phytopathology 147: 497-508.

www.SID.ir

Archive of SID

Murillo, I., Cavallarin, L., and Segundo, B. S. 1998. The development of PCR assay for detection of *Fusarium moniliforme*. European Journal of Plant Pathology 104: 301-311.

Ou, S. H. 1985. Rice Diseases. C. A. B. 380 pp.

Puhalla, J. E. 1985. Classification of strains of *Fusarium oxysporum* of the basis of vegetative compatibility. Candian Journal of Botany 63: 179-183.

Scala, F., Cristinzio, G., Marziano, F., and Noviellio, C. 1981. Endopoly galacturonase zymograms of *Fusarium* species. Transactions of the British Mycological Society 77: 587-591.

Sun, S. K., and Synder, W. C. 1981. The Bakanae disease of rice plant. pp. In: Nelson, P. E., Toussoun, T. A., and Kook, R. J. (eds). *Fusarium*. Biology and Taxonomy. Pennsylvania State University Press.

Voigt, K., Schleier, S., and Bruckner, B. 1995. Genetic variability in *Gibberella fujikuroi* and some ralated species of the genus *Fusarium* based on RAPD markers. Current Genetics 27: 528-535.

Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., and Tingey, S. V. 1990. DNA Polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research. 18: 6531-6535.

Xu, J., and Leslie, J. F. 1993. RFLP map and electrophoretic karyotype of *Gibberalla Fujikuroi* (*Fusarium moniliforme)*. 6th. Congress of Plant Pathology. Page 157.

آدرس نگارنده:

محمود دامادزاده- بخش تحقیقات بیماریهای گیاهان، مؤسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی، صندوق پستی ۱٤٥٤، تهران ۱۹۳۹٥.

www.SID.ir