Archive of SID

بیماریهای گیاهی، جلد ٤٠، ١٣٨٣

بررسی وضعیت باروری و پراکندگی آلل‌های تیپ آمیزشی قارچ *Magnaporthe grisea*، عامل بلاست برنج در استان گیلان*

Study on fertility status and distribution of mating type alleles of *Magnaporthe grisea*, the rice blast fungus, in Guilan province

صدیقه موسی‌نژاد**، ابراهیم محمدی‌گل‌تپه و محمد جوان‌نیکخواه**

بخش گیاهپزشکی، مؤسسه تحقیقات برنج کشور، رشت، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس و گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران

دریافت ٨٢/٣/١٨ پذیرش ٨٣/٥/١٤

چکیده

یکصد و پنجاه و هشت جدایه از قارچ *Magnaporthe grisea* شامل ٩٤ جدایه از نمونه‌های بلاست برگ و گردن خوشه برنج جمع‌آوری شده از مناطق مختلف استان گیلان و ٦٤ جدایه از نمونه‌های مزرعه آزمایشی مؤسسه تحقیقات برنج کشور در رشت به منظور بررسی وضعیت باروری و تعیین پراکندگی آلل‌های تیپ آمیزشی مورد مطالعه قرار گرفتند. در این مطالعه، از چهار جدایه مرجع هرمافرودیت به نام‌های KA3 و TH12 (نماینده‌های تیپ آمیزشی Mat1-1) و KA9 و TH16 (نماینده‌های تیپ آمیزشی Mat1-2) استفاده گردید. نتایج حاصل از تلاقی جدایه‌های مورد مطالعه با جدایه‌های مرجع روی محیط غذایی آرد برنج- آگار نشان داد که

*بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول ارائه شده به دانشگاه تربیت مدرس

** مسئول مکاتبه

٦٢/٧٦ درصد از جدایه‌های نمونه‌های نقاط مختلف استان گیلان و ٣٢/٨١ درصد از جدایه‌های

www.SID.ir

Archive of SID

نمونه‌های مزرعه آزمایشی مؤسسه تحقیقات برنج، بارور و بقیه جدایه‌ها نابارور بودند. تمامی جدایه‌های بارور، از نوع نربارور و تنها از تیپ آمیزشی Mat1-1 بودند.

واژه‌های کلیدی: برنج، بلاست، *Magnaporthe grisea*، باروری، تیپ آمیزشی، پریتسیوم، ایران

مقدمه

بیماری بلاست برنج یکی از مهمترین و شایعترین بیماریهای قارچی برنج در بیشتر مناطق برنج‌کاری دنیا می‌باشد که تحت شرایط مساعد محیطی و روی ارقام حساس موجب خسارت شدید می‌گردد (Zeigler, 1998). اگرچه تاکنون قارچکش‌های مؤثری برای کنترل این بیماری معرفی‌شده است اما همانند اغلب بیماریهای گیاهی دیگر، استفاده از ارقام مقاوم برای کنترل آن بیشتر از سایر روش‌ها مورد توجه قرار گرفته است (Zeigler, 1998).

تحقیقات نشان داده است که قارچ عامل بلاست برنج، *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr با آنامورف *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc. از نظر ژنتیکی تغییرپذیر بوده و با تولید نژادهای بیماریزای جدید قادر است بر مقاومت میزبان غلبه نماید و طی چند سال بعد از بوجود آمدن رقم مقاوم باعث شکسته‌شدن مقاومت آن گردد. تغییرات ژنتیکی و ظهور نژادهای جدید قارچ به علت بروز جهش‌ها و نوترکیبی‌های ژنتیکی اتفاق می‌افتد. سازگاری جنسی و نوترکیبی حاصل از آن در جمعیت قارچ مکانیزم‌هایی را برای ایجاد تنوع ژنتیکی از طریق میوز فراهم می‌کند و موجب تولید ژنوتیپ‌های جدید می‌گردد (Zeigler, 1998).

برای اولین بار، هبرت (Hebert, 1971) با تلاقی دو جدایه *P. grisea* از علف پنجه‌کلاغی (*Digitaria sanguinalis* (L.) Scopoli) از کارولینای شمالی مرحله کامل قارچ را در محیط کشت مصنوعی شناسایی نمود. قارچ عامل بیماری بلاست برنج از نظر ژنتیکی یک آسکومیست هتروتال می‌باشد که در مرحله جنسی خود تولید پریتسیوم می‌کند. باروری در جدایه‌های مزرعه‌ای *M. grisea* دامنه‌ای از عقیمی کامل، نرباروری تا باروری کامل دارد (Valent *et al*. 1986) . از دست دادن صفت ماده‌باروری یا ماده و نرباروری قارچ در طبیعت طی تغییر و تحولات ناشی از پدیده تکامل صورت می‌گیرد (Zeigler, 1998). تیپ آمیزشی

www.SID.ir

Archive of SID

در *M. grisea* به وسیله یک ژن‌جایگاه منفرد به نام Mat1 با دو آلل به نام‌های Mat1-1 و Mat1-2 [بر اساس نامگذاری ژنتیکی یودر و همکاران (Yoder *et al*. 1986)] کنترل می‌شود و تولیدمثل جنسی تنها با وجود افرادی از دو تیپ آمیزشی مخالف امکان‌پذیر است (Valent *et al*. 1986; Coppin *et al*. 1997, Zeigler 1998).

جدایه‌های برنج نسبت به جدایه‌های سایر گندمیان میزبان مانند جدایه‌های ارزن پنجه‌ای (*Eleusine coracana*)، علف غاز (*Eleusine indica*)، علف‌عشق (*Eragrostis curvula*) وسوازی (*Brachiaria mutica*) باروری خیلی پائین‌تری دارند و حتی با وجود هر دو تیپ آمیزشی در یک منطقه جغرافیایی تلاقی‌های کمی بین جدایه‌های برنج امکان‌پذیر است، زیرا اکثر جدایه‌های برنج نربارور هستند، در صورتی که جدایه‌های میزبان‌های غیربرنج اغلب هرمافرودیت هستند و در صورت وجود هر دو تیپ آمیزشی در جمعیت آنها، تولیدمثل جنسی امکان‌پذیر است (Yaegashi and Nishihara 1976, Kato 1977 Yaegashi and Asaga 1981, Valent *et al*. 1986, Itoi *et al*. 1980).

این تحقیق اولین مطالعه در ارتباط با تشکیل فرم جنسی قارچ عامل بلاست برنج و تعیین تیپ آمیزشی جدایه‌های آن در ایران می‌باشد، اما مطالعات متعددی در این رابطه درکشورهایی نظیر ژاپن (Kato *et al*. 1976, Ueyama *et al*. 1977, Yaegashi 1977, Itoi *et al*. 1983)، هند (Kumar and Zeigler, 1995, Viji and Gnanamanickam 1998, Kumar *et al*. 1999, Dayakar *et al*., 2000)، چین (Hayashi *et al*. 1997)، تایلند (Mekwatanakarn *et al*. 1999) و دیگر کشورهای جهان (Kato and Yamaguchi 1982, Yaegashi and Yamada 1986, Notteghem and Silue 1992, Kato *et al*. 2000) انجام شده است.

اهمیت بررسی وضعیت باروری و تعیین پراکندگی آلل‌های تیپ آمیزشی قارچ عامل بلاست این است که نتایج حاصل از آن می‌تواند امکان وقوع تولیدمثل جنسی قارچ و در نتیجه امکان بروز تغییرات ژنتیکی ناشی از آن را در منطقه مشخص سازد. در صورتی که قارچ عامل بیماری به واسطه توانایی تولیدمثل جنسی از پتانسیل تغییرپذیری ژنتیکی بالایی برخوردار باشد، امکان ظهور نژادهای بیماریزای جدید نیز در منطقه زیاد خواهد بود که بایستی در برنامه‌های اصلاحی برای معرفی ارقام مقاوم برنج به بلاست مورد توجه قرار گیرد.

روش بررسی

www.SID.ir

Archive of SID

۱- آماده‌سازی جدایه‌های قارچ *Magnaporthe grisea*

۱-۱- نمونه‌برداری

نمونه‌های برگ و گردن خوشه آلوده به بیماری بلاست در فاصله سالهای ۱۳۷۸ تا ۱۳۸۰ از شالیزارهای برنج استان گیلان و مزرعه آزمایشی مؤسسه تحقیقات برنج کشور در رشت جمع‌آوری شدند. علت نمونه‌برداری از مزرعه آزمایشی مؤسسه تحقیقات برنج این است که با توجه به اجرای طرحهای تحقیقاتی مختلف در سطح این مزرعه و نیاز آن طرحها، ارقام برنج متفاوت شامل ارقام بومی، اصلاح‌شده و بین‌المللی هرساله در این مزرعه کشت می‌شوند و لذا می‌توان این مزرعه را به عنوان کانون بیماری (hot spot) برای بیماری بلاست در نظر گرفت. لازم به ذکر است که مزرعه آزمایشی مؤسسه تحقیقات برنج تقریباً در نقطه‌ای جدا از سایر شالیزارهای استان و با فاصله مناسب از آنها (چندین کیلومتر) قرار گرفته است و انتظار می‌رود که جمعیت عامل بلاست موجود در مزرعه از ویژگی‌های خاص و تنوع ژنتیکی بالاتری برخوردار باشد. نمونه‌برداری از شالیزارهای سطح استان گیلان به صورت پراکنده از مزارع و ارقام مختلف موجود در منطقه انجام شد. نمونه‌برداری از مزرعه آزمایشی مؤسسه تحقیقات برنج به صورت جداگانه برای هر رقم صورت گرفت. بدین منظور سطح کشت هر رقم به ردیف‌هایی با فاصله پنج متر تقسیم و روی هر ردیف در نقاطی به فاصله ۱۰ متر از یکدیگر نمونه‌برداری انجام شد. در نقطه نمونه‌برداری در حدود ۲۰ نمونه برگ یا گردن خوشه آلوده (با توجه به زمان نمونه‌برداری) برداشته شد. نمونه‌برداری در مرحله بلاست برگ از اواخر خرداد هر سال با پیدایش لکه‌های بیماری روی برگهای ارقام حساس شروع گردید و تا اوایل تیر ادامه داشت (۸۰-۱۳۷۸). نمونه‌برداری در مرحله بلاست گردن خوشه از اوایل مرداد شروع و تا پایان فصل برداشت ادامه پیدا کرد. نمونه‌های برگ و گردن خوشه از محل لکه‌ها، به صورت قطعات دو تا سه سانتی‌متری برش داده شدند و درون پاکتهای کاغذی کوچک قرار گرفتند. این پاکتها به مدت چند روز در شرایط دمای آزمایشگاه قرار گرفتند تا نمونه‌های داخل آنها خشک گردند و سپس تا مرحله جداسازی قارچ در دمای $-20^{\circ}C$ درون فریزر نگهداری شدند. نمونه‌های مربوط به هر نقطه نمونه‌برداری درون یک پاکت جداگانه قرار گرفتند.

۱-۲- جداسازی، خالص‌سازی و نگهداری جدایه‌ها

برای جداسازی و خالص‌سازی قارچ، نمونه‌های برگ و گردن خوشه آلوده به تدریج از

www.SID.ir

Archive of SID

فریزر خارج و بعد از ضدعفونی سطحی با محلول ۳۰ درصد هیپوکلریت سدیم، درون ظروف پتری سترون و روی کاغذ صافی سترون و مرطوب (در شرایط دمای آزمایشگاه) قرار گرفتند تا قارچ عامل بیماری در محل لکه‌ها اسپورزایی کند. آنگاه سوسپانسیون رقیقی از اسپورها در آب مقطر سترون تهیه شد و روی محیط کشت آب-آگار ۲/۵ در صد پخش گردید. بعد از ۲٤ ساعت تک اسپورهای جوانه‌زده روی محیط آب-آگار به کمک میکروسکوپ انتخاب و به محیط غذایی PDA (Potato Dextrose Agar) منتقل گردیدند. به این ترتیب کشت تک اسپور و خالص جدایه‌ها بدست آمد که روی کاغذ صافی سترون و درون میکروتیوبهای دو میلی‌لیتری پلاستیکی یا درون ظروف شیشه‌ای پنی‌سیلین در فریزر (دمای ۲۰°C-) نگهداری شدند. در مجموع ۹٤ جدایه از نمونه‌های جمع‌آوری شده از مزارع سطح استان گیلان و ٦٤ جدایه از نمونه‌های جمع‌آوری شده از مزرعه آزمایشی مؤسسه تحقیقات برنج خالص‌سازی و نگهداری گردیدند.

۲- بررسی وضعیت باروری و تعیین پراکندگی آلل‌های تیپ آمیزشی

به منظور بررسی وضعیت باروری و تعیین تیپ آمیزشی جدایه‌های *M. grisea*، از محیط غذایی آرد برنج-آگار (Notteghem and Silue 1992) و جدایه‌های مرجع هرمافرودیت شامل KA3 و TH12 (نماینده‌های تیپ آمیزشی Mat1-1) و KA9 و TH16 (نماینده‌های تیپ آمیزشی Mat1-2) استفاده گردید. جدایه‌های مرجع از پروفسور J.L. Notteghem از کشور فرانسه دریافت شدند. مشخصات این جدایه‌ها در جدول ۱ آمده است.

به منظور تهیه محیط آرد برنج - آگار (Rice Flour – Agar)، جوشانده ۳۰ گرم کاه خشک برنج (به مدت ۲۰ دقیقه) با افزودن آب دوبار تقطیر به یک لیتر رسانده شد و سپس ۱٤ گرم آرد برنج، ۲/۵ گرم عصاره مخمر و ۱۷ گرم آگار به آن اضافه گردید. هر جدایه *M. grisea* درون تشتک‌های پتری هشت سانتی‌متری حاوی محیط RFA بین دو جدایه مرجع از دو تیپ آمیزشی مخالف (با فاصله حدود دو سانتی‌متر) کشت گردید. جدایه‌های مرجع از دو تیپ آمیزشی مخالف نیز در کنار یکدیگر به عنوان شاهد کشت شدند. تمامی کشت‌ها در هر زمان با سه تکرار انجام شدند و آزمایش نیز دو بار تکرار گردید. کشت‌ها به مدت سه تا پنج روز در دمای ۲۸°C و در تاریکی قرار گرفتند. بعد از تماس میسلیوم‌های جدایه مرجع و جدایه مورد

www.SID.ir

Archive of SID

مطالعه، کشت‌ها در دمای ۲۱°C درجه سانتی‌گراد و زیر نور فلورسنت قرار گرفتند. پانزده روز تا دو ماه بعد از کشت، تشکیل پریتسیوم‌ها مورد مطالعه قرار گرفت.

جدول۱- مشخصات جدایه‌های مرجع *Magnaporthe grisea* که برای تعیین وضعیت باروری و تیپ آمیزشی جدایه‌های این قارچ از استان گیلان مورد استفاده قرار گرفتند

Table1.Characteristics of reference isolates of *Magnaporthe grisea* used as testers for determination of fertility status and mating type of the isolates from Guilan province

Reference isolate code	Location	Host	Mating type	Source
KA3 (OG2, UG77-15-1-1)	Uganda	*Eleusine coracana*	1-1	ex. Notteghem
KA9 (OG5, UG77-14-1-1)	Uganda	*Eleusine coracana*	1-2	ex. Notteghem
TH12	Thailand	*Hordeum* sp.	1-1	ex. Notteghem
TH16	Thailand	*Hordeum* sp.	1-2	ex. Notteghem

نتیجه

با توجه به اینکه جدایه‌های مرجع، هرمافرودیت بودند، نواری از پریتسیوم‌ها بعد از دو تا سه هفته (از زمان قرار گرفتن در دمای ۲۱°C و زیر نور فلورسنت) در دو طرف محل تماس دو جدایه مرجع از دو تیپ آمیزشی مخالف تولید گردید. تمامی جدایه‌های مرجع از توانایی تولید پریتسیوم بالایی برخوردار بودند و تعداد زیادی از پریتسیوم‌ها را در محل تماس با جدایه مرجع دیگر از تیپ آمیزشی مخالف تولید کردند (شکل ۱). فنوتیپ پریتسیوم‌های تولید شده بسته به جدایه مرجع متفاوت بود(شکل‌های ۲، ۳، ٤ و ٥). جدایه‌های مرجع KA3 و KA9 در سمت خود تولید پریتسیوم‌هایی کردند که دارای گردن‌هایی کوتاه، ضخیم و تیره بودند. این پریتسیوم‌ها بسیار نزدیک به یکدیگر تولید شدند، لذا باندی از پریتسیوم را که بسیار متراکم ولی از پهنای کمی برخوردار بود تولید کردند. جدایه‌های مرجع TH12 و TH16 تولید باندی از پریتسیوم کردند که از پهنای بیشتر و تراکم کمتری نسبت به جدایه‌های KA3 و KA9 برخوردار بودند. پریتسیوم‌های تولید شده توسط این جدایه‌ها دارای گردن‌هایی بلند، باریک و به رنگ روشن بودند و با فاصله اندکی از یکدیگر روی محیط کشت تولید شدند. تشکیل پریتسیوم در محل تماس ٥٩ جدایه از ٩٤ جدایه نقاط مختلف استان گیلان و ۲۱ جدایه از ٦٤ جدایه مزرعه

www.SID.ir

Archive of SID

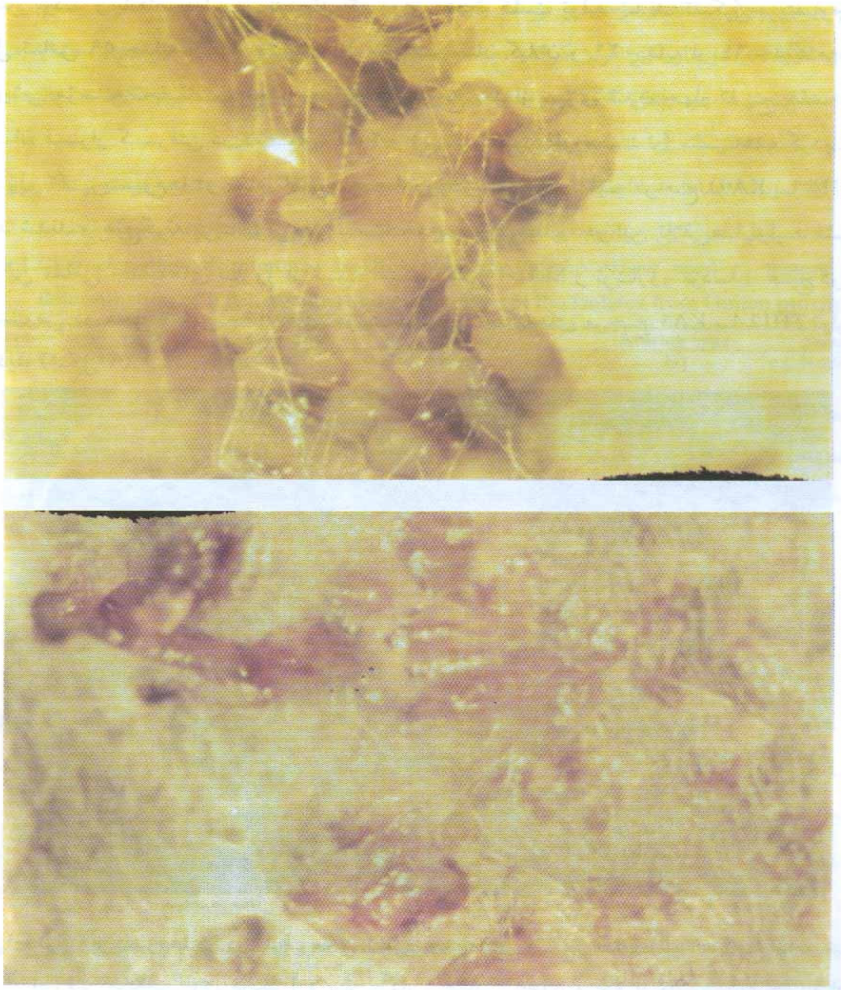
آزمایشی مؤسسه تحقیقات برنج با جدایه‌های مرجع بعد از سپری شدن چهار تا پنج هفته (از زمان قرار گرفتن در دمای ۲۱°C و زیر نور فلورسنت) مشاهده گردید (جدول ۲). پریتسیوم‌ها در تمام تلاقی‌های بارور، در سمت جدایه مرجع (KA9 یا TH16) تولید شدند و هیچ‌گونه پریتسیومی در سمت جدایه مورد مطالعه در این تلاقی‌ها تولید نشد. بنابراین تمامی جدایه‌های بارور از تیپ آمیزشی Mat1-1 و نربارور بودند. هیچ‌گونه پریتسیومی در محل تماس جدایه‌های مورد مطالعه با جدایه‌های مرجع KA3 یا TH12 تولید نگردید (شکل ٦).

شکل۱- تولید پریتسیوم‌ها در دو طرف محل تماس جدایه‌های مرجع *Magnaporthe grisea* از دو تیپ آمیزشی مخالف روی محیط آرد برنج-آگار. جدایه‌های مرجع از راست به چپ شامل TH16 (MAT 1-2)، TH12 (MAT 1-1) و KA9(MAT 1-2) می‌باشند.

Fig. 1. Production of perithecia at the contact site of reference isolates of *Magnaporthe grisea* from two different mating types on rice flour-agar including TH16(MAT1-2), TH12(MAT1-1) and KA9 (MAT1-2) from right to left respectively.

www.SID.ir

Archive of SID

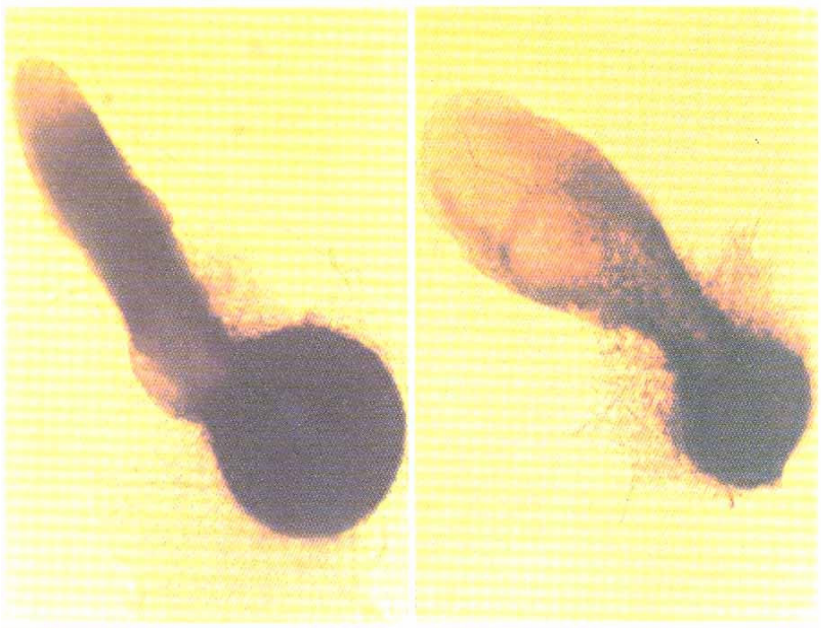


شکل۲- پریتسیوم‌های تولید شده توسط جدایه‌های مرجع KA9 (a) و KA3 (b) در محل تلاقی آنها روی محیط آرد برنج-آگار (بزرگنمایی تقریبی a,b: 175X).

Fig. 2. Perithecia that were produced by KA9(a) and KA3 (b) at their contact site on rice flour-agar (a,b: 175 X).

www.SID.ir

Archive of SID



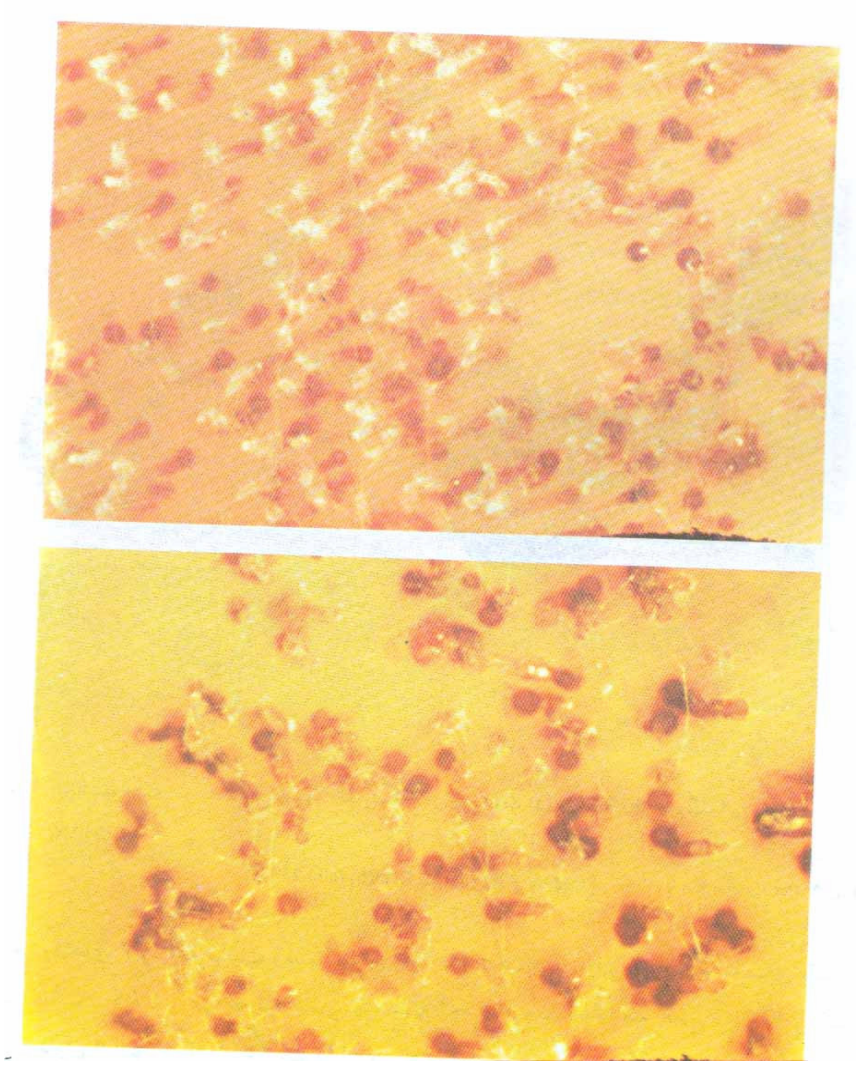
شکل۳- پریتسیوم‌های تولید شده توسط جدایه‌های مرجع KA9 (a) و KA3 (b) (بزرگنمایی تقریبی :a,b 250 X).

Fig. 3. Perithecia that were produced by KA9 (a) and KA3(b) (a,b: 250 X).

جدول‌های ۳ و ٤ به ترتیب وضعیت باروری جدایه‌های *M. grisea* از نمونه‌های نقاط مختلف استان گیلان و مزرعه آزمایشی مؤسسه تحقیقات برنج را به تفکیک ارقامی که نمونه‌برداری از آنها انجام شده است نشان می‌دهند. با توجه به جدول ۳ مشاهده می‌شود جدایه‌هایی که از ارقامی نظیر بینام، طارم مولایی و دم‌سیاه جدا شده‌اند از درصد باروری بالاتری نسبت به جدایه‌های رقمی نظیر هاشمی برخوردار هستند، اما چنین تفاوتی در جدول ٤ مشاهده نمی‌شود. وضعیت باروری جدایه‌های *M. grisea* از استان گیلان به تفکیک شهر یا

www.SID.ir

Archive of SID

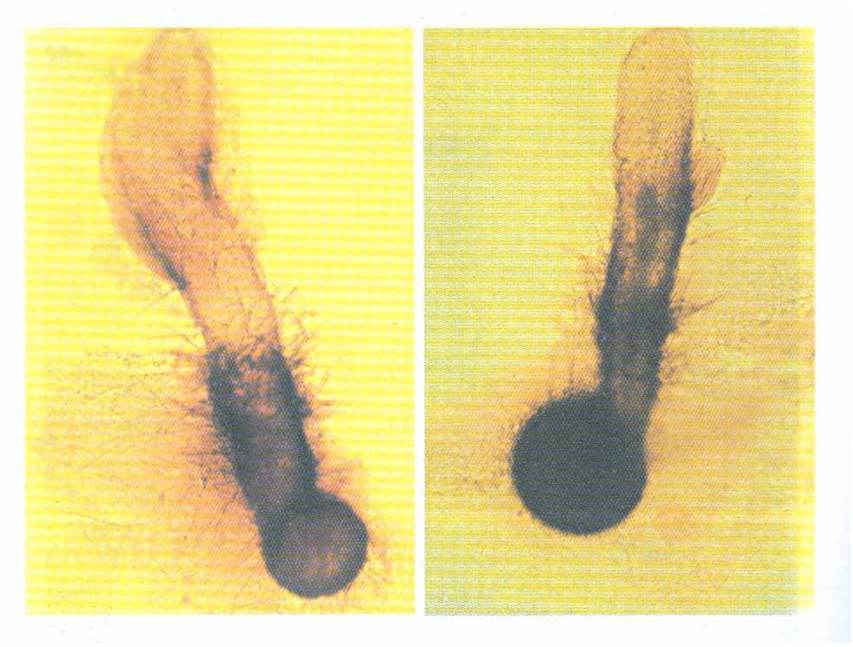


شکل٤- پریتسیوم‌های تولید شده توسط جدایه‌های مرجع TH16 (a) و TH12 (b) در محـل تلاقـی آنهـا روی محیط آرد برنج-آگار (بزرگنمایی تقریبی 175 X :b, a).

Fig. 4. Perithecia that were produced by TH16(a) and TH12(b) at their contact site on rice flour-agar (a,b: 175 X).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل۵- پریتسیوم‌های تولید شده توسط جدایه‌های مرجع TH16(a) و TH12(b) (بزرگنمایی تقریبی a,b: 250 X).

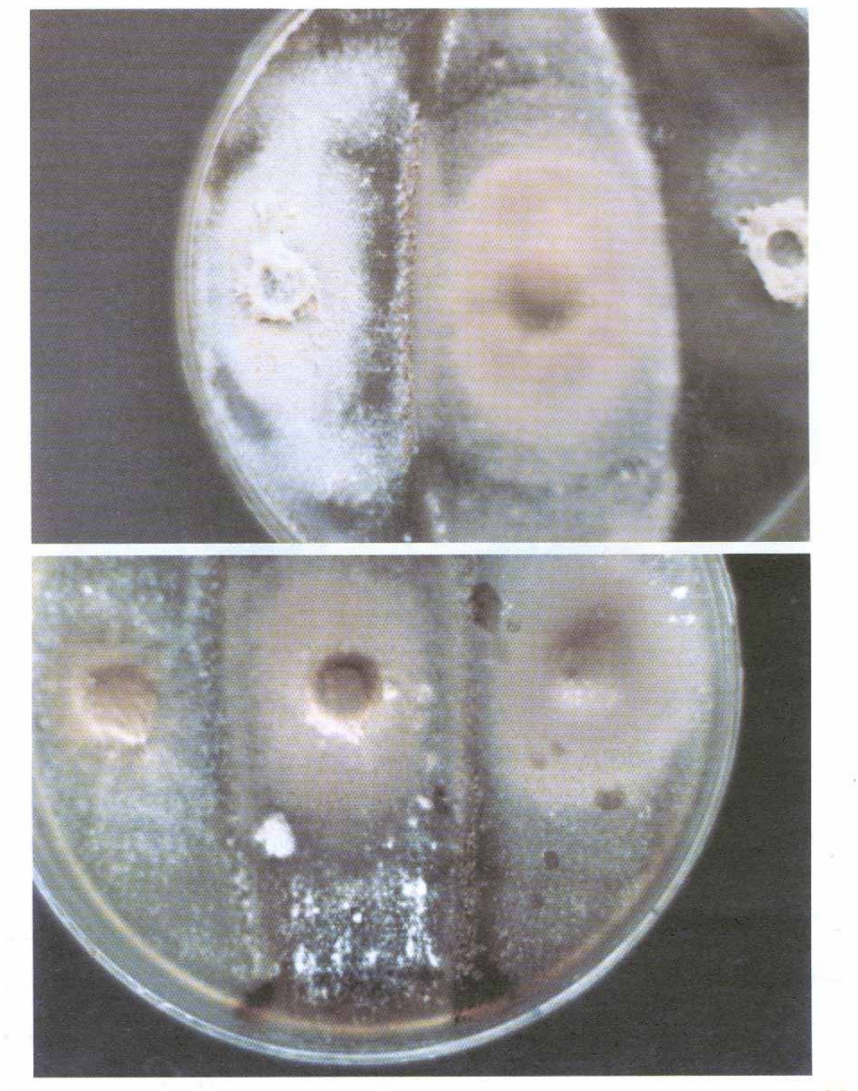
Fig. 5. Perithecia that were produced by TH16(a) and TH12(b) (a,b: 250 X).

بخش محل نمونه‌برداری نیز در جدول ۵ نشان داده شده است. تنها نکته مورد توجه در این جدول درصد باروری بالاتر در جمعیت‌های *M. grisea* از شهرستانهای شفت و صومعه‌سرا می‌باشد.

تعداد پریتسیومی که در محل تماس جدایه مورد مطالعه و جدایه مرجع KA9 یا TH16 و در سمت جدایه مرجع تولید شد برای جدایه‌های مختلف متفاوت بود. در مورد بعضی از جدایه‌ها نواری مشخص از پریتسیوم‌ها در سمت جدایه مرجع تولید می‌گردید و برای بعضی از آنها تعداد پریتسیوم‌ها از چند عدد تجاوز نمی‌کرد. فنوتیپ پریتسیوم‌های تولید شده نیز

www.SID.ir

Archive of SID



شکل٦- تولید پریتسیوم در محل تماس یک جدایه برنج *Magnaporthe grisea* از استان گیلان با جدایـه مرجع KA9(a) و TH16(b). تیپ آمیزشی این جدایه Mat1-1 می‌باشد.

Fig. 6. Production of perithecia at the contact site of a rice isolate of *Magnaporthe grisea* from Guilan province with KA9(a) and TH16(b). The mating type of this isolate is Mat1-1.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- وضعیت باروری و تیپ آمیزشی جدایه‌های *Magnaporthe grisea* از نقـاط مختلـف استان گیلان و مزرعه آزمایشی مؤسسه تحقیقات برنج (رشت)

Table 2. Fertility status and mating type of *Magnaporthe grisea* isolates from different sites of Guilan province and test field of Rice Research Institute (Rasht)

ردیف No.	محل جمع‌آوری Site of collection	تعداد جدایه Number of isolates	Mat1-1(%)	Mat1-2(%)	نابارور Sterile(%)
1	نقاط مختلف استان گیلان Different sites of Guilan	94	62.76	_	37.23
2	مزرعه آزمایشی مؤسسه تحقیقـات برنج کشور Rice Research Institute test field	64	32.81	_	67.18
3	مجموع جدایه‌ها Total	158	50.63	_	49.36

جدول ۳- وضعیت باروری و تیپ آمیزشی جدایه‌های *Magnaporthe grisea* از نمونه‌های نقاط مختف استان گیلان به تفکیک ارقامی که نمونه‌برداری از آنها انجام شده است

Table 3. Fertility status and mating type of isolates of *Magnaporthe grisea* from different sites of Guilan province based on the rice cultivars

ردیف (No.)	نوع رقم (Cultivar)	تعداد جدایه (Number of isolates)	MAT1-1	MAT1-2	نابارور (Sterile)
1	بینام (Binam)	33	23	_	10
2	طارم‌مولایی (Tarom-Molai)	5	4	_	1
3	هاشمی (Hashemi)	15	6	_	9
4	خزر (Khazar)	2	1	_	1
5	حسنی (Hasani)	1	0	_	1
6	حسن‌سرایی (Hasan-Sarai)	4	3	_	1

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳- (ادامه)

Table. 3. (continued)

7	علی کاظمی (Ali-Kazemi)	2	1	–	1
8	دم‌سیاه (Domsiah)	9	9	–	0
9	دم‌سرخ (Domsorkh)	2	1	–	1
10	دم‌زرد (Domzard)	4	3	–	1
11	نامشخص (Unknown)	17	8	–	9

جدول ٤- وضعیت باروری و تیپ آمیزشی جدایه‌های *Magnaporthe grisea* از نمونه‌های مزرعه آزمایشی مؤسسه تحقیقات برنج به تفکیک ارقامی که نمونه‌برداری از آنها انجام شده است

Table 4. Fertility status and mating type of isolates of *Magnaporthe grisea* from test field of Rice Research Institute based on the rice cultivars.

ردیف	نوع رقم	تعداد جدایه	MAT1-1	MAT1-2	نابارور
(No.)	(Cultivar)	(Number of isolates)			(Sterile)
1	بینام (Binam)	21	6	–	15
2	طارم‌مولایی (Tarom-Molai)	15	6	–	9
3	هاشمی (Hashemi)	10	4	–	6
4	خزر (Khazar)	13	5	–	8
5	حسنی (Hasani)	4	0	–	4
6	حسن‌سرایی (Hasan-Sarai)	1	0	–	1

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۵- وضعیت باروری و تیپ آمیزشی جدایه‌های *Magnaporthe grisea* از استان گیلان به تفکیک شهر یا بخشی که نمونه برداری از آن انجام شده است

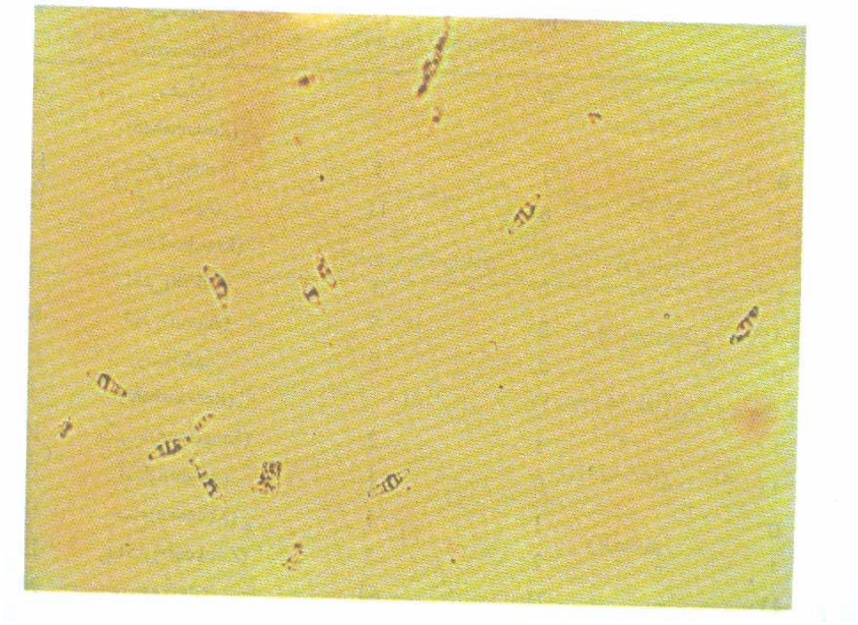
Table 5. Fertility status and mating type of isolates of *Magnaporthe grisea* from Guilan province based on the site of collection

ردیف (No.)	محل نمونه‌برداری (Site of collection)	تعداد جدایه (Number of isolates)	MAT1-1	MAT1-2	نابارور (Sterile)
1	شفت(Shaft)	9	7	–	2
2	فومن(Phoman)	8	5	–	3
3	آستانه(Astaneh)	4	3	–	1
4	ماسال(Masal)	4	3	–	1
5	لشت‌نشاء (Lashteneshah)	8	4	–	4
6	سیاهکل(Siahkal)	3	2	–	1
7	رشت(Rasht)	11	6	–	5
8	خشکبیجار (Khoshkebijar)	2	0	–	2
9	صومعه‌سرا (Somehsara)	17	14	–	3
10	رستم‌آباد (Rostamabad)	1	0	–	1
11	سنگر(Sangar)	1	1	–	0
12	کوچصفهان (Kouchesfahan)	11	6	–	5
13	تالش(Talesh)	1	0	–	1
14	انزلی(Anzali)	5	2	–	3
15	رضوانشهر (Rezvanshahr)	2	2	–	0
16	لنگرود(Langeroud)	2	1	–	1
17	آستارا(Astara)	1	0	–	1
18	خمام(Khomam)	1	1	–	0
19	زیباکنار(Zibakenar)	3	2	–	1
20	مزرعه آزمایشی مؤسسه تحقیقات برنج (Test field of Rice Research Institute)	64	21	–	43

www.SID.ir

Archive of SID

بستگی به جدایه مرجع داشت. از تعدادی از تلاقی‌های انجام‌شده پریتسیوم‌هایی انتخاب گردید. این پریتسیوم‌ها به کمک سوزن از روی محیط برداشته شدند، روی لام میکروسکوپ قرار گرفتند و به کمک سوزن پاره شدند تا آسک‌ها و آسکوسپورها آزاد گردند. از آنجایی که *M. grisea* تولید پریتسیوم‌هایی می‌کند که حاوی آسک‌هایی با دیواره ناپایدار می‌باشند، امکان مشاهده آسک‌های کامل و دست‌نخورده وجود نداشت تنها گاهی بقایایی از آسک‌ها بعد از باز شدن پریتسیوم روی لام مشاهده گردید. آسکوسپورها اغلب چهارسلولی بودند که دو سلول وسطی آنها تیره و دو سلول انتهایی روشن بود(شکل۷). آسکوسپورهایی با تعداد سلولهای کمتر یا بیشتر نیز مشاهده شدند. اغلب سلولهایی متورم یا تحلیل‌رفته در آسکوسپورها مشاهده گردید.



شکل۷- آسکوسپورهای *Magnaporthe grisea* (بزرگنمایی تقریبی 500 X).

Fig. 7. Ascospores of *Magnaporthe grisea* (500 X).

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

تحقیقات زیادی که به منظور تعیین وضـــعیت باروری و پراکندگی تیپ‌هـای آمیـــزشی *M. grisea* در مناطق و کشورهای مختلف انجام شده‌است نشان داده‌اند که وضعیت باروری و پراکندگی تیپ‌های آمیزشی جدایه‌های برنج در مناطق جغرافیایی مختلف بسیار متفاوت است. جدایه‌های *M. grisea* در تعدادی از کشورها از توانایی باروری بسیار پائینی برخوردار هستند و اغلب کاملاً عقیم هستند، اما در مناطق دیگری جمعیـت موجـود در آنهـا از توانـایی بـاروری بالایی برخوردار بوده و حتی جدایه‌های هرمافرودیـت نیـز در آن منـاطق شناسـایی شـده‌انـد (Chengyun *et al*. 1991, Chengyun *et al*. 1992, Shen *et al*. 1994). پراکندگی تیپ‌هـای آمیزشـی نیز در مناطق مختلف نوسانات زیادی دارد. در بعضی مناطق تنها تیـپ آمیزشـی Mat1-1 و در مناطق دیگر تنها تیپ آمیزشی Mat1-2 یا هر دو تیپ آمیزشی با درصدهـای فراوانـی مختلـف دیده می‌شوند (Kato and Yamaguchi 1982, Yaegashi and Yamada 1986, Notteghem and Silue, 1992, Kumar and Zeigler 1995, Hayashi *et al*. 1997, Viji and Gnanamanickam 1998, Mekwatanakarn *et al*. 1999, Kumar *et al*. 1999, Dayakar *et al*. 2000). جابجـایی جدایـه‌هـای *M. grisea* با توانایی‌های جنسی مختلف در کشورها و مناطق مختلـف، تـرجیح میزبـانی ایـن جدایه‌ها در هر منطقه، موانع جغرافیایی که از ورود جدایه‌های جدید به یک منطقه جلوگیـری می‌کنند، تغییرات ژنتیکی ایجاد شده در جدایه‌های یک منطقه کـه در غیرفعـال یـا فعـال‌شـدن لوکوس‌های باروری نقش دارند و عوامل دیگر موجب این تفاوت‌ها می‌گردند.

در این تحقیق، نتایج حاصل از تلاقی جدایه‌های برنج بـا جدایـه‌هـای مرجـع از دو تیـپ آمیزشی مخالف نشان داد که جمعیت *M. grisea* از استان گیلان از درصد باروری بالایی نسبت به بعضی از مناطق برنج‌کاری دنیا برخوردار است. براساس نتایج حاصـل، مشـخص شـد کـه بیش از ٦٠ درصد جدایه‌های *M. grisea* از نمونه‌های نقاط مختلف استان گیلان و بـیش از ٣٠ درصد جدایه‌های نمونه‌های مزرعه آزمایشی مؤسسه تحقیقات برنج کشور از قـدرت بـاروری برخوردارهستند. تمـامی ایـن جدایـه‌هـا از تیـپ آمیزشـی Mat1-1 و نربـارور بودنـد و هـیچ پریتسیومی در سمت جدایه مورد مطالعه هنگام تماس با جدایه‌هـای مرجـع از تیـپ آمیزشـی مخالف تولید نگردید.

تعداد پریتسیوم‌های تولید شده در سمت جدایه مرجع، در محل تماس جدایه مورد مطالعه

www.SID.ir

Archive of SID

و جدایه مرجع، برای جدایه‌های مختلف متفاوت بود. این امر به قدرت باروری جدایه مورد مطالعه (توانایی تولید آنتریدیوم بیشتر) مربوط می‌شود، زیرا قدرت باروری جدایه مرجع از نظر تولید اندام‌های جنسی نر و ماده همواره در تلاقی‌های مختلف ثابت است.

درصد باروری پائین جدایه‌های *M. grisea* از نمونه‌های مزرعه آزمایشی مؤسسه تحقیقات برنج ممکن است به علت جدایی جغرافیایی این مزرعه از نقاط دیگر استان گیلان باشد. عدم وجود جدایه‌هایی از تیپ آمیزشی Mat1-2 در جمعیت‌های مطالعه شده می‌تواند به دلیل جدایی جغرافیایی مناطق شمالی کشور از سایر مناطق برنج‌کاری دنیا باشد. همچنین این احتمال وجود دارد که جدایه‌هایی که حاوی آلل Mat1-2 هستند نیازهای غذایی یا آب و هوایی خاصی داشته باشند و به ارقام خاصی از برنج وابسته باشند، لذا امکان تکثیر و گسترش را در کشتزارهای استان گیلان پیدا نکرده‌اند. به عنوان مثال ممکن است آلل Mat1-2 به یک سری از ژنها یا آلل‌های بیماریزایی پیوستگی داشته باشد، لذا امکان تولیدمثل و گسترش جدایه‌های دارای آلل Mat1-2 نیازمند کشت ارقام خاصی از برنج در منطقه باشد (Zeigler, 1998). با توجه به پیوستگی کامل شالیزارهای استانهای گیلان و مازندران انتظار می‌رود که تنوع ژنتیکی جمعیت قارچ عامل بلاست در استان مازندران نیز مشابه جمعیت این قارچ در استان گیلان باشد.

تفاوت بین درصد باروری جمعیت‌های *M. grisea* از ارقام و شهرهای مختلف در استان گیلان احتمالاً مربوط به دور یا نزدیک بودن نقاط نمونه‌برداری از یکدیگر می‌باشد که تنوع ژنتیکی جمعیت را تحت تأثیر قرار داده است. به عنوان مثال درصد باروری پایین‌تر جمعیت *M. grisea* که از رقم هاشمی جداسازی شده است به این دلیل است که اکثر نمونه‌هایی که از این رقم جمع‌آوری شده‌اند مربوط به بخش کوچصفهان می‌باشند. چنین تفاوتی بین درصد باروری جمعیت‌های *M. grisea* از ارقام مختلف در مزرعه آزمایشی مؤسسه تحقیقات برنج مشاهده نشد و به نظر می‌رسد رابطه‌ای بین وضعیت باروری جدایه‌ها و ترجیح میزبانی آنها وجود نداشته باشد.

اکثر جدایه‌های *M. grisea* به دلیل از دست دادن صفت ماده باروری طی تغییر و تحولات ناشی از پدیده تکامل در طبیعت، غالباً به حالت نربارور ظهور می‌یابند و لذا خود توانایی تولید

www.SID.ir

Archive of SID

هیچ گونه پریتسیومی را ندارند. در چنین حالتی حتی با وجود هر دو تیپ آمیزشی در جمعیت، امکان وقوع تولیدمثل جنسی وجود ندارد (Zeigler, 1998). جدایه‌های بارور *M. grisea* در این مطالعه نیز نربارور بودند و هیچ جدایه هرمافرودیت یا ماده‌بارور در این جمعیت‌ها مشاهده نگردید. این در حالی است که گزارش‌هایی از وجود جدایه‌های هرمافرودیت *M. grisea* از گیاه برنج طی سالهای گذشته وجود دارد (Leung and Williams 1985, Leung *et al*. 1988, Chao and Ellingboe 1991, Chengyun *et al*. 1992, Kumar and Zeigler, 1995). تیپ آمیزشی تعداد زیادی از جدایه‌های *M. grisea* تعیین نگردید. این امر به دلیل عقیمی کامل این جدایه‌ها می‌باشد که اجازه تولید هیچ‌گونه پریتسیومی را در محل تماس با جدایه مرجع نمی‌دهد.

نوترکیبی جنسی به عنوان یک ابزار مهم برای تغییرات ژنتیکی و بیماریزایی در قارچهایی است که مرحله جنسی را به عنوان قسمتی از سیکل زندگی خود دارند. برای قارچهای هتروتال تولید مثل جنسی نیازمند وجود هر دو تیپ آمیزشی در یک منطقه جغرافیایی و در یک جمعیت می‌باشد. اما در صورت از دست رفتن یا دژنره شدن بخشی از جنسیت یا تمام آن در جدایه‌های یک قارچ، وجود یا عدم وجود هردو تیپ آمیزشی در یک جمعیت از اهمیت زیادی برخوردار نخواهد بود. در *M. grisea* عدم وجود تولیدمثل جنسی حتی در مناطقی که هر دو تیپ آمیزشی را دارا می‌باشند به دلیل از دست رفتن جنسیت می‌باشد (Zeigler 1998).

امروزه با فهم بهتر سازمان ژنومی *M. grisea* (یا سایر قارچها) و فراهم شدن روش‌های مولکولی دقیق و آغازگرهای مربوط به آلل‌های تیپ آمیزشی در بسیاری از مناطق دنیا، وجود و پراکندگی تیپ‌های آمیزشی در هر منطقه و هر جمعیت بدون نیاز به توانایی باروری جدایه‌ها و با دقت بسیار بیشتر تعیین می‌گردد (Xu and Hamer, 1995).

با توجه به نتایج حاصل از تحقیق انجام‌شده، امکان وقوع تولیدمثل جنسی قارچ عامل بیماری بلاست در استان گیلان به دلیل از دست رفتن صفت ماده‌باروری و همچنین وجود تنها یک تیپ آمیزشی در جمعیت قارچ، بسیار بعید به نظر می‌رسد. این واقعیت بیانگر این مطلب است که جمعیت قارچ در این استان از پتانسیل تغییرپذیری ژنتیکی بالایی برخوردار نیست و تنها می‌توان عواملی نظیر جهش یا تشکیل هتروکاریون در اثر پدیده سازگاری رویشی را به عنوان عوامل مؤثر در بروز تغییرات ژنتیکی نام برد. بنابراین ظهور نژادهای بیماریزای جدید

www.SID.ir

Archive of SID

قارچ در استان گیلان و در نتیجه شکست مقاومت ارقام نیز از روند کندتری نسبت به سایر عوامل بیماریزا با توانایی تولیدمثل جنسی در طبیعت برخوردار می‌باشد.

سپاسگزاری

نگارندگان از پروفسور J. L. Notteghem از کشور فرانسه به دلیل ارسال جدایه‌های مرجع *Magnaporthe grisea* و از مسؤولین محترم مؤسسه تحقیقات برنج کشور به خاطر فراهم نمودن امکانات لازم در انجام این تحقیق صمیمانه تشکر می‌نمایند. هزینه انجام این تحقیق از محل اعتبارات طرح شماره۰۰٤-۸۱-۱۸-۱۰۰ مؤسسه فوق تأمین شده است.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات 54-51 متن انگلیسی مراجعه شود.

نشانی نگارندگان: صدیقه موسی‌نژاد، بخش گیاهپزشکی، مؤسسه تحقیقات برنج کشور، رشت، صندوق پستی ١٦٥٨؛ ابراهیم محمدی‌گل‌تپه، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس و محمد جوان‌نیکخواه، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران

www.SID.ir