بررسی جمعیت ها و تیپ های آمیزشی قارچ عامل پوسیدگی طوقه برنج، *Gibberella fujikuroi*، در استان مازندران

Investigation on mating populations and mating types of *Gibberella fujikuroi*, the causal agent of rice bakanae disease in Mazandaran province

سید امین علیان*، محمد جوان نیکخواه، حشمت‌اله امینیان و وحید خسروی

گروه گیاهپزشکی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، پاکدشت، گروه گیاهپزشکی، پردیس کرج، دانشگاه تهران، کرج و بخش گیاهپزشکی ،معاونت موسسه تحقیقات برنج، آمل

دریافت ۱۳۸۶/۵/۲۰ پذیرش ۱۳۸۷/۹/۶

چکیده

از بوته‌های برنج آلوده به بیماری پوسیدگی طوقه در مناطق مختلف استان مازندران شصت و یک جدایه فوزاریوم متعلق به بخش لایزئولا بدست آمد. تمامی این جدایه ها در آزمون های بیماری زایی علایم عمومی پوسیدگی طوقه را روی گیاهچه های برنج ایجاد کردند. پس از شناسایی جدایه ها بر اساس خصوصیات مورفولوژیک و به منظور تعیین جمعیت و تیپ های آمیزشی، تمامی این جدایه ها به عنوان والد نر با جدایه های آزمون گر استاندارد هر دو تیپ آمیزشی از سه جمعیت آمیزشی A ، C و D قارچ *Gibberella fujikuroi* تلاقی داده شدند. بر این اساس ٪ ۱۸/۰۳ (۱۱ جدایه) جدایه ها بارور بودند و تمامی این ۱۱ جدایه با جدایه های آزمون گر استاندارد *MATD-1* تولید پریتسیوم کردند و به عنوان *G. fujikuroi MATD-2* شناسایی شدند. هیچ کدام از جدایه های *Fusarium fujikuroi* و *F. verticillioides* در این مطالعه بارور نبودند. این اولین گزارش از وجود یک جمعیت آمیزشی یا گونه بیولوژیک قارچ *G. fujikuroi* در استان مازندران می باشد.

---

* مسئول مکاتبه

Archive of SID

www.SID.ir

واژه‌های کلیدی: برنج، مازندران، پوسیدگی طوقه ،*Fusarium*، لایزئولا، *Gibberella*، جمعیت آمیزشی، تیپ آمیزشی

مقدمه

پس از گندم، برنج بیشترین نقش را در تغذیه مردم ایران دارد. استان مازندران در شمال ایران بیش از ۴۰٪ تولید برنج کشور را به خود اختصاص داده است. باکانه یکی از مهمترین بیماری های بذرزاد برنج می باشد که با وجود گسترش جهانی قدرت همه گیری و میزان خسارت کمی دارد (Mew & Misra 1994)، اما آلودگی بذرها به گونه‌های فوزاریوم عامل بیماری به خاطر زهرابه‌های قارچی‌ای که تولید می‌کنند می تواند برای سلامت انسان و دام خطرناک باشد (Desjardins *et al*. 2000). تاکنون مشخص نشده که کدامیک از گونه فوزاریوم عامل بیماری باکانه هست؛ این موضوع از یک طرف به خاطر گیج کننده بودن شناسایی گونه در فوزاریوم ها و از طرفی به خاطر همراهی چندین گونه فوزاریوم با برنج های آلوده به باکانه در دنیا است (Desjardins *et al*. 2000) .

مرحله جنسی قارچ عامل پوسیدگی طوقه برنج در سال ۱۹۱۹ توسط *ساوادا* (Sawada 1919) در تایوان یافت شد و *Lisea fujikuroi* نامگذاری گردید. *آیتو و کیمورا* (Ito & Kimura 1931) قارچ عامل بیماری را به عنوان *Gibberella* و مرحله کنیدیوم زای آن را به عنوان *Fusarium moniliforme* شناسایی کردند. در هر حال آرایه *F. moniliforme* شامل تعدادی گونه مجزا است که اکنون مجموعا تحت عنوان مجموعه گونه های *Gibberella fujikuroi* شناخته می‌شود (Leslie 1991). تشکیل فرم جنسی *Gibberella* می‌تواند جمعیت آمیزشی (mating population) یا گونه های بیولوژیک را در درون این گروه مشخص کند (Leslie 1991). ماهیت هتروتالیک تولید مثل جنسی قارچ عامل بیماری روی برنج توسط آیتو و کوروساوا پیشنهاد شد (Ou 1985). پس از عدم تشکیل فرم جنسی در تلاقی بعضی از جدایه هایی که انتظار می رفت با هم سازگار باشند، تلاش هایی برای تشخیص جمعیت های آمیزشی در *F. moniliforme* صورت گرفت (Hsieh *et al*. 1977). حتی بعضی محققین (Kuhlman 1982) در صدد بودند تا بر اساس خصوصیات مورفولوژیک این جمعیت ها را به عنوان واریته هایی از *Gibberella fujikuroi* معرفی کنند اما این گروه ها به دلیل همپوشانی زیاد

Archive of SID

www.SID.ir

بین این خصوصیات نتوانستند به عنوان گونه های قابل تمایز مورفولوژیکی تقسیم بندی شوند. با استفاده از مفهوم گونه بیولوژیک در رده بندی *Gibberella fujikuroi* (Leslie 1991)، بخشی از این مشکلات برطرف شد هر چند با اضافه شدن جدایه ها همچنان شاهد افزایش تعداد گونه‌های بیولوژیک یا جمعیت های آمیزشی قارچ *G. fujikuroi* هستیم. در هرحال رده بندی فوزاریوم ها همیشه بحث انگیز بوده است به طوری که حتی در کلیدهای شناسایی مورفولوژیک پذیرفته شده، تعداد و توصیف گونه‌های شناخته شده در بخش *Liseola* با هم مشابه نیست (Booth 1971; Gerlach & Nirenberg 1982; Nelson *et al.*1983) . تاکنون ده گونه بیولوژیک در گونه کمپلکس *Gibberella fujikuroi* تشخیص داده شده است. این گونه های بیولوژیک تحت عنوان جمعیت های آمیزشی A تا I و بدون حرف برای *F. andyazi* نامگذاری شدند. این روش معمولا بر اساس آزمون آمیزش (mating test) بنا می‌شود. هر گونه بیولوژیک معادل یک گونه مورفولوژیک در نظر گرفته می‌شود (Zeller *et al*. 2003). روش مستقیم تعیین گونه های بیولوژیک استفاده از آزمون تلاقی است. در این روش نمایندگان دو جمعیت را با هم تلاقی می دهند و با بررسی زنده بودن نتاج آنها می توان ثابت کرد که آنها متعلق به یک گونه بیولوژیک هستند (Harrington & Rizzo 1999). به دلیل محدودیت های تلاقی، پس از شناسایی گونه های بیولوژیک شناسگرهای فنوتیپی و ژنوتیپی مختلفی برای شناسایی و تمایز آنها از هم استفاده شده‌اند (Amoah *et al*. 1996; Huss *et al*. 1996; Leslie *et al*. 1992; Leslie *et al*. 2001; Xu *et al*. 1995; Yan *et al*. 1993).

تاکنون سه جمعیت آمیزشی از کمپلکس *G. fujikuroi* در ارتباط با بیماری باکانه برنج بوده‌اند. ابتدا جمعیت آمیزشی C (MPC) (با آنامورف *F. fujikuroi*) در سال ۱۹۷۷ از میان جدایه های برنج تایوان پیدا شد (Hsieh *et al*. 1977). بعدا جمعیت آمیزشی A با آنامورف *F. verticillioides* (synonym: *F. moniliforme*) و جمعیت آمیزشی D (با آنامورف *F. proliferatum*) از برنج های آفریقا، استرالیا و امریکا جدا شده است (Amoah *et al*. 1996; Desjardins *et al*. 1997; Nelson *et al*. 1993) . بنابراین بیش از یک گونه فوزاریوم ممکن است بتواند برنج را آلوده کرده و علایم بیماری باکانه را ایجاد کند (Desjardins *et al*. 2000).

Archive of SID

www.SID.ir

در ایران تا زمان انجام ای‌ن تحقی‌ق تنها از مفهوم مورفولوژیک گونه برای شناسایی عامل بیماری استفاده شده بود و از اصفهان (Damadzade 1988) ، خراسان (Moradzade Eskandary and Falahati Rastegar 1998) و فارس (Kamran and Banihashemi 1989) به عنوان *F. proliferatum var. proliferatum* از مازندران (Khosravi 1999) به عنوان *F. proliferatum* و از زنجان (Saremi 2004) به عنوان *F. moniliforme* و از گیلان (Padasht 1992) به عنوان*F. fujikuroi* گزارش شده است.

روش بررسی

نمونه برداری و جداسازی

برای تهیه جدایه های این تحقیق (جدول۱) نمونه برداری های گسترده ای از سرتاسر استان مازندران و از تمام مراحل کشت برنج صورت گرفت. نود و شش منطقه شامل ۱۳خزانه در مرکز استان، و ۸۳ مزرعه در سرتاسر استان مورد بازدید قرار گرفت به گونه ای که در جاده های اصلی و فرعی مناطق مورد بازدید به فاصله هر پنج کیلومتراز یک مزرعه نمونه‌برداری از گیاهان مشکوک به آلودگی صورت گرفت. دو نمونه بوته بیمار نیز از یک مزرعه در استان فارس جمع آوری شد. نمونه ها درکیسه های پلاستیکی به آزمایشگاه منتقل شدند. برای جداسازی قارچ از نمونه های خزانه ای و بعضی نمونه های مزرعه ای ، ناحیه طوقه گیاهان مشکوک به آلودگی به قطعات کوچک تقسیم شد. این قطعات پس از ضدعفونی سطحی و خشک شدن به تشتک های پتری حاوی محیط کشت های PDA و محیط *نش و اشنایدر* (Nash & Snyder 1962) منتقل شده و در دمای C° ۲۵ نگهداری شدند. خالص سازی قارچها به روش تک اسپور انجام شد و جدایه ها به محیط PDA منتقل شدند. با توجه به اینکه قارچ عامل بیماری در داخل و روی بافت اکثر گیاهان آلوده در زمین اصلی قابل مشاهده است، در مورد نمونه هایی که چنین وضعیتی داشتند سوسپانسیون اسپور مستقیما از رشد قارچ در داخل بافت گیاهی تهیه شد و مراحل خالص سازی صورت گرفت.

آزمون‌های بیماری‌زایی

برای اثبات بیماری زا بودن جدایه های به دست آمده از دو روش استفاده شد، آزمون بیماری‌زایی بعضی از جدایه‌ها به هر دو روش و بعضی تنها با یک روش صورت گرفت.

Archive of SID

www.SID.ir

بذرهای برنج رقم طارم محلی برای آزمون بیماری زایی انتخاب شد. برای ضدعفونی سطحی، بذرها به مدت سه دقیقه در محلول ۱/۵ درصد هیپوکلریت سدیم غوطه ور شده و سپس سه بار با آب مقطر سترون شسته شدند. از سوسپانسیونی با غلظت 10^6 اسپور در میلی لیتر از کشت یک هفته ای قارچ ها بر روی محیط کشت PDA به عنوان مایه قارچ استفاده شد.

روش آغشته کردن بذر: بیست و چهار بذر ضدعفونی شده رقم طارم محلی بعد از یک روز خیسانده شدن در آب مقطر سترون و متورم شدن، به مدت دو ساعت در سوسپانسیونی با غلظت 10^6 اسپور در میلی لیتر خیسانده و بعد خروج از سوسپانسیون، به مدت ۴۸ ساعت در دمای $25\ ^\circ C$ و تاریکی کامل قرار داده شدند. بذرها در این مدت به خوبی جوانه زدند. سپس بذرهای جوانه زده روی کاغذ صافی سترون مرطوب که در ظروف پلاستیکی به ابعاد ۲۰cm ×۱۵ و با ارتفاع ۷ سانتی متر قرار داشتند با فاصله دو سانتی متر از یکدیگر قرار داده شدند. این ظروف با کیسه های پلاستیکی پوشانده شدند. به این ترتیب در زمان رشد گیاهچه تا زمان نزدیک به بروز علایم از خشک شدن کاغذ صافی و احتمال آلودگی بذرها با عوامل محیطی جلوگیری شد. در صورت کاهش رطوبت کاغذ های صافی، آب دهی صورت می گرفت. بعد از ۷ تا ۱۰روز علایم روی گیاهچه ها در مقایسه با شاهد که به جای سوسپانسیون اسپور در آب مقطر سترون قرار داده شده بود، یادداشت شد (Padasht 1992).

روش تزریق سوسپانسیون: برای تهیه نشاء های دو تا سه هفته ای سالم برنج ، بذرهای ضد عفونی شده به روش فوق بعد از جوانه دار شدن در شرایط سترون، در ظرفی حاوی خاک سترون نشده مزرعه کاشته شدند. نشاءهای سالم دو تا سه هفته ای به دست آمده به تعداد سه عدد به ازای هرگلدان حاوی خاک شالیزاری و چهارگلدان برای هر جدایه منتقل شدند. به این ترتیب برای هر جدایه ۱۲ نشای سالم تهیه شد. با استفاده از سرنگ های سترون مخصوص انسولین (به دلیل ظرافت این سرنگ ها نسبت به سرنگ های عادی) حداکثر یک میلی لیتر سوسپانسیون با غلظت 10^6 اسپور در میلی لیتر و معمولا تا جایی که امکان داشت، به ناحیه طوقه تزریق گردید. آبیاری به صورتی انجام می گرفت که حالت غرقابی ایجاد شود. نتایج بعد از ۲ هفته در مقایسه با شاهد، که به آن تنها آب مقطر سترون تزریق شده بود، یادداشت شد (Padasht 1992).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- خصوصیات جدایه‌های مورد مطالعه قارچ *Gibberella fujikuroi*

Table 1. Characteristics of investigated *Gibberella fujikuroi* isolates

نام جدایه (Isolate)	رقم (Cultivar)	محل جمع‌آوری (Geographic location)	گونه مورفولوژیک (Morphologic species)	جمعیت و تیپ آمیزشی (Mating population and Mating type)
F1	طارم	چپرسر	*F. proliferatum*	*MATD_2*
F2	طارم	نور- سیدکلا	*F. fujikuroi*	_
F3	خزر	نور- بهدشت	*F. fujikuroi*	_
F4	طارم	محمود آباد- نرسیده به سه راه کلوده	*F. fujikuroi*	_
F5	پرمحصول- نامعلوم	محمود آباد- کمربندی آمل	*F. proliferatum*	_
F6	شفق	محمود آباد- کمربندی آمل	*F. proliferatum*	_
F7	طارم هاشمی	آمل- قلعه کش	*F. fujikuroi*	_
F8	طارم	آمل- موسسه	*F. proliferatum*	_
F9	خزر	آمل- موسسه	*F. proliferatum*	_
F10	خزر	آمل- موسسه	*F. fujikuroi*	_
F11	پرمحصول- نامعلوم	درویش خیل- رئیس آباد	*F. fujikuroi*	_
F12	پر محصول- نامعلوم	درویش خیل- مرزنگو	*F. proliferatum*	*MATD_2*
F13	طارم	درویش خیل- کلیک سر دا بو	*F. verticillioides*	_
F14	طارم	درویش خیل- بعد از کلیک سر دابو	*F. proliferatum*	*MATD_2*
F15	طارم	درویش خیل- بیشه محله کوچک	*F. proliferatum*	_
F16	طارم	درویش خیل- بیشه محله کوچک	*F. oxysporum*	_
F17	طارم	جاده آمل به بابل- لاله آباد	*F. proliferatum*	_
F18	طارم	جاده آمل به بابل- امین آباد	*F. verticillioides*	_
F19	طارم	سرخرود- شاهکلا	*F. fujikuroi*	_
F20	طارم	جاده سرخرود به آمل	*F. proliferatum*	_
F21	طارم	فریدونکنار- خط سوته۱	*F. proliferatum*	*MATD_2*
F22	طارم	فریدونکنار- خط سوته۲	*F. proliferatum*	*MATD_2*
F23	بینام	فریدونکنار- خط سوته۳	*F. proliferatum*	_
F24	طارم	فریدونکنار- خط سوته۴	*F. proliferatum*	*MATD_2*
F25	طارم هاشمی	بابلسر- یورمحله	*F. proliferatum*	_
F26	طارم	بابلسر- احمدکلا	*F. proliferatum*	*MATD_2*
F27	طارم	بابلسر- احمدکلا	*F. fujikuroi*	_
F28	طارم	بابل- جاده کیاکلا- موذیکله۱	*F. proliferatum*	_
F29	طارم	بابل- جاده کیاکلا- موذیکله۲	*F. proliferatum*	_
F30	طارم	بابل- بندپی شرقی- گتاب	*F. fujikuroi*	_

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- (ادامه) Table 1. (continued)

F31	خزر	بابل- بندپی غربی- خشکرودپی	*F. proliferatum*	_
F32	طارم	جاده بهنمیر به جویبار- اسماعیل کلا	*F. proliferatum*	_
F33	طارم	جویبار- تلنار	*F. verticillioides*	_
F34	طارم	ابتدای جاده قائم شهر به ساری	*F. verticillioides*	_
F35	طارم	جاده قائم شهر به ساری- ارطه	*F. proliferatum*	_
F36	طارم	انتهای جاده قائم شهر به ساری	*F. proliferatum*	_
F37	طارم	شیرگاه- آبدنگ سر	*F. fujikuroi*	_
F38	طارم	بین شیرگاه و زیراب- جاده تهران	*F. proliferatum*	*MATD_2*
F39	طارم	جاده شیرگاه به قائم شهر(نظامی)-شیرجی کلا	*F. proliferatum*	*MATD_2*
F40	طارم	جاده قائم شهر به سوادکوه- نشل	*F. proliferatum*	*MATD_2*
F41	طارم	ساری- جاده پایین کلا- بالادراز	*F. proliferatum*	*MATD_2*
F42	طارم	ساری- پایین کلا	*F. fujikuroi*	_
F43	طارم	ساری- چهاردانگه	*F. proliferatum*	_
F44	طارم	ساری سنگتراشان	*F. fujikuroi*	_
F45	طارم	نکا- سیاوش کلا	*F. verticillioides*	_
F46	طارم	شیراز۱	*F. proliferatum*	_
F47	طارم	شیراز۲	*F. proliferatum*	_
F48	طارم	محمود آباد-گالش پل	*F. proliferatum*	_
F49	طارم	محمود آباد- اول کلوده	*F. proliferatum*	_
F50	خزر	اول کمربندی آمل- محمودآباد	*F. proliferatum*	_
F51	طارم هاشمی	درویش خیل- کلیک سر داوو	*F. proliferatum*	_
F52	طارم	جاده آمل- بابل. گاوان آهنگر	*F. proliferatum*	_
F53	طارم	بابل- ابتدای جاده نظامی	*F. proliferatum*	_
F54	طارم	سرخرود به آمل۱	*F. proliferatum*	_
F55	طارم	سرخرود به آمل۲	*F. proliferatum*	_
F56	طارم	سرخرود به آمل۳	*F. proliferatum*	_
F57	طارم	سرخرود به آمل۴	*F. proliferatum*	_
F58	طارم	آمل	*F. proliferatum*	_
F59	طارم	فریدونکنار	*F. proliferatum*	_
F60	بینام	فریدونکنار	*F. proliferatum*	_
F61	طارم	فریدونکنار	*F. proliferatum*	_
F62	طارم	قائم شهر- ساری. قراخیل	*F. proliferatum*	_

Archive of SID

www.SID.ir

شناسایی گونه های فوزاریوم عامل بیماری

از محیط کشت های سیب زمینی دکستروز آگار (PDA) و SNA جهت شناسایی گونه های فوزاریوم استفاده شد (Nirenberg & O'Donnell 1998).خصوصیات ماکروسکوپی پرگنه از کشت‌های روی PDA که در ۲۵°C و در تاریکی نگهداری شده بودند (Gerlach & Nirenberg 1982) و خصوصیات میکروسکوپی از کشت های SNA در طی چهارده روز که درشرایط تاریکی و ۲۰°C نگهداری شده بودند (Nirenberg & O'Donnell 1998)، سنجیده شد.

آزمون‌های سازگاری جنسی

آزمون‌های تلاقی جنسی در *Gibberella* با استفاده از روش تلاقی متقابل (reciprocal cross) صورت می‌گیرد (Sun & Snyder 1981). با فراهم شدن جدایه های آزمون گر استاندارد از South African Meical Research Council (MRC) (جدول ۲) که باروری بالایی به عنوان والد ماده دارند و تیپ آمیزشی آنها مشخص است جدایه‌های مزرعه‌ای به عنوان والد نر در آزمون های تلاقی مورد استفاده قرار گرفتند. آزمون‌های تلاقی جنسی تا کنون روی محیط کشت های مختلفی انجام شده است ، اما در حال حاضر بیشتر از محیط هویج آگار استفاده می‌شود (Leslie 1991).

تهیه محیط کشت هویج آگار: برای تهیه این محیط ۴۰۰ گرم هویج تازه کاملا شسته شده و به قطعات کوچک حدود ۰/۵ سانتی متر مربعی خرد شد و همراه با ۴۰۰ میلی لیتر آب به مدت نیم ساعت در دمای ۱۲۱ °C اتوکلاو گردید. حجم عصاره به دست آمده با آب مقطر به یک لیتر رسانده شد و به آن ۲۰ گرم آگار اضافه گردید و سپس به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شد (Klittich & Leslie 1988). به هر تشتک پتری شش سانتی متری، ۱۴ میلی لیتر محیط اضافه شد تا لایه محیط کشت قطوری فراهم شود. طی مکاتبات بعدی (Abbaszade, personal communication) برای تهیه محیط کشت قطعات هویج خرد شده به جای اتوکلاو کردن، با حرارت کاملا پخته شده و عصاره به دست آمده با ۵۰ تا ۱۰۰ میلی لیتر عصاره جوشانده ساقه برنج نیز مخلوط شد.

کشت والدهای نر و ماده: برای شروع یک تلاقی، جدایه های آزمون گر استاندارد به عنوان والد ماده به صورت یک تکه میسلیومی به تشتک های پتری یکبار مصرف ۶ سانتی متری

Archive of SID

www.SID.ir

حاوی محیط کشت هویج_ آگار منتقل شد. همزمان با والد ماده، والد نر درون لوله های حاوی محیط کج PDA کشت شد.

آزمون های تلاقی: برای تعیین جمعیت ها و تیپ های آمیزشی جدایه ها، آزمون های آمیزش با جدایه های آزمون گر استاندارد سه جمعیت آمیزشی C، A و D و هر دو تیپ آمیزشی آنها (جدول ۲) حداقل در دو تکرار انجام شد. این آزمون ها بر اساس دستور کار کلیتیچ و لزلی (Klittich & Leslie 1988) صورت گرفت. پس از پر شدن تشتک های پتری با رشد جدایه های آزمون گر، رشد والد نر درون لوله ها با ۳ تا ۵ میلی لیتر محلول۰/۲ درصد توئین ۶۰ سوسپانسیون شد و ۱ تا ۱/۵ میلی لیتر از سوسپانسیون با یک میله شیشه ای روی سطح پرگنه والد ماده پخش شد.

جدول ۲- مشخصات جدایه های آزمون‌گر استاندارد سه جمعیت آمیزشی از قارچ *Gibberella fujikuroi* مورد استفاده برای آزمون های تعیین جمعیت و تیپ آمیزشی

Table 2- Characteristics of tester standard isolates of three mating populations of *Gibberella fujikuroi* complex

Fusarium Species	MRC Number	Mating Population and Mating Types
F. verticillioides	8559	*MATA-1*
	8560	*MATA-2*
F. fujikuroi	8532	*MATC-1*
	8534	*MATC-2*
F. proliferatum	8549	*MATD-1*
	8550	*MATD-2*

شرایط نگهداری: کشت ها در دمای C ۲۵° و تناوب ۱۲ ساعتی نور و تاریکی به مدت یک ماه نگهداری شدند (Klittich & Leslie 1988). با توجه به عدم موفقیت در تشکیل پریتسیوم های بالغ با استفاده از این روش، و با مکاتبات انجام شده با دکتر *لزلی* از روش دیگری

Archive of SID

www.SID.ir

(Leslie & Summerell 2006) که تا آن زمان چاپ نشده بود، استفاده شد. در این روش، کشت والد نر در حین رشد احتیاج به نور ندارند و در تاریکی نگهداری می شوند. پرگنه های ماده را می توان تا زمان تلقیح در تاریکی نگه داشت، اما بلافاصله بعد از تلقیح، نور دائمی (تلفیق نور سفید سرد و نزدیک یو وی) برای تشکیل پریتسیوم لازم است. توصیه شده که تشتک های پتری در بیش از دو طبقه روی هم قرار داده نشوند تا نور کافی دریافت کنند. در این روش بر عدم استفاده از پوشش پلاستیکی دور تشتک های پتری تاکید شده است. آب اضافه جمع شده روی درب تشتک های پتری در صورت لزوم باید حذف شود. دمای نگهداری در مواردی که بهینه دما تعیین نشده ، بین ۲۲ °C تا ۲۳ °C توصیه گردیده است. متاسفانه تلاش برای تهیه نور نزدیک یو وی بی نتیجه ماند اما سایر موارد کاملا رعایت شد.

نتیجه

آزمون های بیماری زایی

از میان هشتاد جدایه انتخاب شده، بیماری زا بودن شصت و یک جدایه با استفاده از دو روش آغشتگی بذر و تزریق سوسپانسیون اثبات شد. در این آزمون ها نشانه اصلی بیماری، پوسیدگی طوقه در نظر گرفته شد و سایر علایم مثل قدبلندی جزء نشانه‌های فرعی بیماری بودند.

غلظت سوسپانسون معادل ۱×۱۰^{۶} اسپر در میلی لیتر برای مایه تلقیح انتخاب شد و علایم گوناگون بیماری به خوبی مشاهده گردید به طوری که در روش آغشتگی بذر، حتی در یک ظرف که حاوی آزمون بیماری زایی یک جدایه بود و تیمار یکسانی برای تمام بذرها صورت گرفته بود، طیف گسترده علایم از سوختگی گیاهچه تا قد بلندی چند برابر شاهد، ظاهر شد. میزان افزایش قد گیاهچه های آلوده در مورد تکرارهای مختلف یک جدایه و نیز بین جدایه‌های مختلف از چند سانتی متر تا چند برابر قد شاهد متفاوت بود. بعضی از گیاهچه های یک هفته ای تا ده روزی که قدبلندی چشمگیری داشتند، در اولین گره های تولیدی شان نیز ایجاد ریشه های نابجا کردند. بعضی جدایه ها روی بذرهایی که برای آزمون بیماری زایی تیمار شده بود تولید اسپورودوخیوم کردند و بعضی تنها پوششی از میسلیوم قارچ روی بذر و ناحیه طوقه داشتند. پوسیدگی و سیاه شدگی طوقه نیز به خوبی مشاهده شد. با نگهداری

Archive of SID

www.SID.ir

ظروف آزمون بیماری زایی بیش از سه هفته، تمام گیاهچه ها حتی آنهایی که در مرحله اول قدبلند و نسبتا سبز بودند، خشکیدند.

در روش تزریق سوسپانسیون نیز علایم متنوع بود. در مورد بعضی جدایه ها علایم غالب خشکیدگی و مرگ و بعضی جدایه ها زردی و قدبلندی بود. تقریبا هر دوی این موارد همراه با ریشه های نابه جا و رشد قارچ در ناحیه طوقه و گره های پایینی ساقه بودند. علایمی مشابه علایم مزرعه ای نیز در تزریق سوسپانسیون به طوقه گیاهان ۵۰ تا ۷۰ روزه مشاهده شد در این موارد خشکیدگی و مرگ زود هنگام دیده نشد و پس از بروز علایم کامل مزرعه ای شامل پوسیدگی و سیاه شدگی طوقه و ریشه های نابجا در گره های پایینی و رشد قارچ در محل طوقه و گره هاو به خصوص قدبلندی مشهود در مورد اکثر آنها، بوته ها کم کم خشک شدند.

شناسایی قارچ عامل بیماری

شصت و یک جدایه که بیماری زا بودنشان اثبات شد، برای شناسایی تحت شرایط استاندارد قرار گرفتند. با توجه به کلید شناسایی گونه ها در کمپلکس *Gibberella fujikuroi* (Nirenberg & O'Donnell 1998) و برخی خصوصیات مورفولوژیک همچون نوع فیالید (مونو یا پلی فیالید)؛ در صورت وجود پلی فیالید، نادر یا فراوان بودنشان؛ شکل میکروکنیدیوم؛ تشکیل یا عدم تشکیل کنیدیوم ها در زنجیر و تشکیل و یا عدم تشکیل کلامیدوسپور روی محیط SNA در شرایط تاریکی و دمای $20^{\circ}C$ ، جدایه های بیماری زای این مطالعه در سه طیف عمده قرار گرفتند. خصوصیات مشترک این جدایه ها شامل عدم تشکیل کلامیدوسپور بعد از ۱۴ روز؛ تشکیل میکروکنیدیوم های گرزی در سر های دروغین و زنجیرهای دارای بیش از ۱۵ کنیدیوم بود. خصوصیات تفکیک کننده مربوط به نوع و تعداد فیالید ها بود. به این ترتیب سه گونه *Fusarium proliferatum*، *F. fujikuroi* Nirenberg و *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg در بین جدایه ها شناسایی شدند که *F. proliferatum* با ۴۴ جدایه به عنوان گونه غالب عامل بیماری در استان شناخته شد (جدول۱).

تعیین جمعیت و تیپ های آمیزشی جدایه های قارچ *G. fujikuroi*

به منظور تعیین جمعیت ها و تیپ های آمیزشی قارچ عامل بیماری در استان مازندران، ۶۲ جدایه (۶۱ جدایه عامل بیماری و یک جدایه *F. oxysporum* به عنوان شاهد منفی) به عنوان والد نر با جدایه های آزمون گر استاندارد از هر دو تیپ آمیزشی *MAT-1* و *MAT-2* سه جمعیت

Archive of SID

www.SID.ir

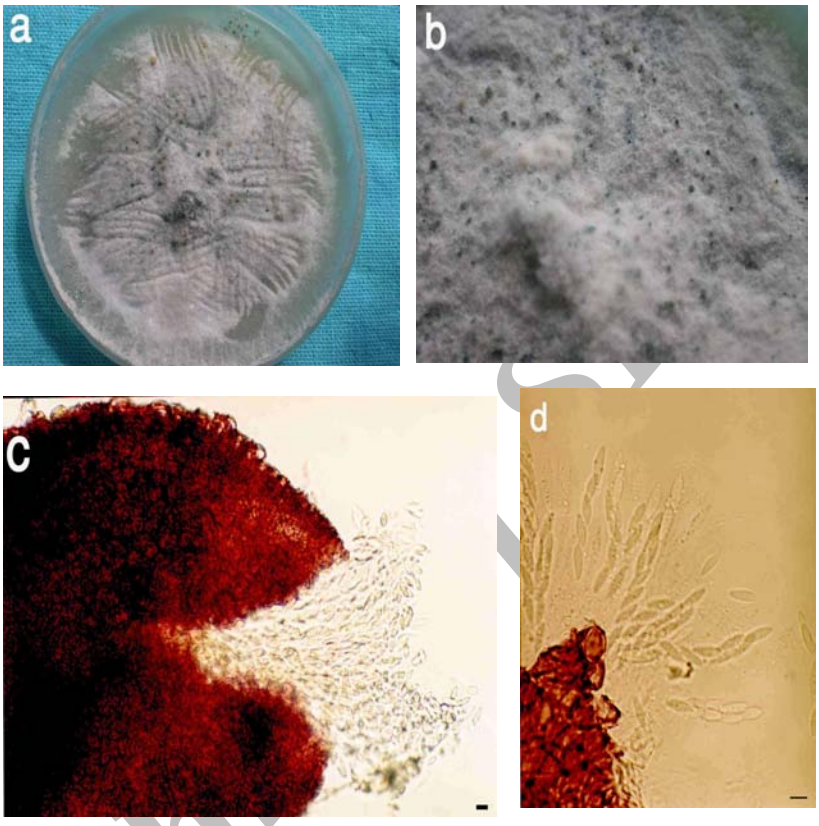
آمیزشی A، C وD از گونه کمپکس *G. fujikuroi* (جدول۳–۳) به عنوان والد ماده، حداقل در دو تکرار جفت شدند و تشکیل پریتسیوم در آنها بررسی شد. در مواردی که مشکوک به تولید پریتسیوم بودند، با تهیه اسلاید های میکروسکوپی و مشاهده آسکوسپورهای دو سلولی از وقوع تولید مثل جنسی اطمینان حاصل شد. آسکوسپورها خالص سازی شده و از نظر باروری و توانایی تولید پرگنه بررسی شدند. معمولا ۲ هفته پس از تلقیح کشت والد ماده با استفاده از سوسپانسیون غلیظ اسپور والد نر، ساختمان اولیه پریتسیوم ها به صورت نقاط سیاه رنگ کوچک روی کشت تشکیل می شد (شکل های 1-a ,1-b). با گذشت ۴ تا ۶ هفته پس از تلقیح، آسکوسپورهای کامل در پریتسیوم تشکیل شده و با شکافتن آسکوکارپ در اسلاید های میکروسکوپی به خوبی مشاهده می شدند (شکل های 1-c, 1-d). در مورد بعضی جدایه ها پس از گذشت بیش از سه هفته و با کهنه شدن محیط، نقاط سیاهرنگی روی محیط تشکیل شد که نسبتا درشت بوده و در اسلاید میکروسکوپی تهیه شده از آنها، ماکرو کنیدیوم به فراوانی مشاهده گردید. این اندام بافتی شبیه به بافت پریتسیوم داشته و در محلول اسید استیک ۲۵٪ به رنگ ارغوانی در می آمد، اما چون آسکوسپوری نداشت به عنوان پریتسیوم در نظر گرفته نشد. بر اساس آزمون های صورت گرفته تنها یازده جدایه (۱۸/۰۳ درصد کل جدایه ها) توانایی ایجاد پریتسیوم داشتند که همگی به عنوان والد نر با جدایه آزمون گر استاندارد *MATD-1* که به عنوان والد ماده کشت شده بود، تولید پریتسیوم کردند (شکل ۴–۱۱). به این ترتیب همه جدایه های دارای قدرت تولید مثل جنسی این مطالعه به عنوان *MATD-2* شناسایی شدند. جالب اینکه جدایه های بارور تقریبا در تمام نقاط استان پراکنده بودند (شکل۲). لازم به ذکر است که جدایه های آزمون گر استاندارد جمعیت آمیزشی C قادر به تولید مثل جنسی با یکدیگر نیز نبودند و با هم تولید پریتسیوم نکردند.

بحث

تاکنون سه جمعیت آمیزشی A، C وD از قارچ *G.fujikuroi* در نقاط مختلف دنیا به عنوان قارچ های همراه با بیماری پوسیدگی طوقه برنج معرفی شده اند. در این مطالعه نیز شناسایی جدایه ها بر اساس خصوصیات مورفولوژیک وجود سه گونه *F. proliferatum*، *F. fujikuroi* و

Archive of SID

www.SID.ir

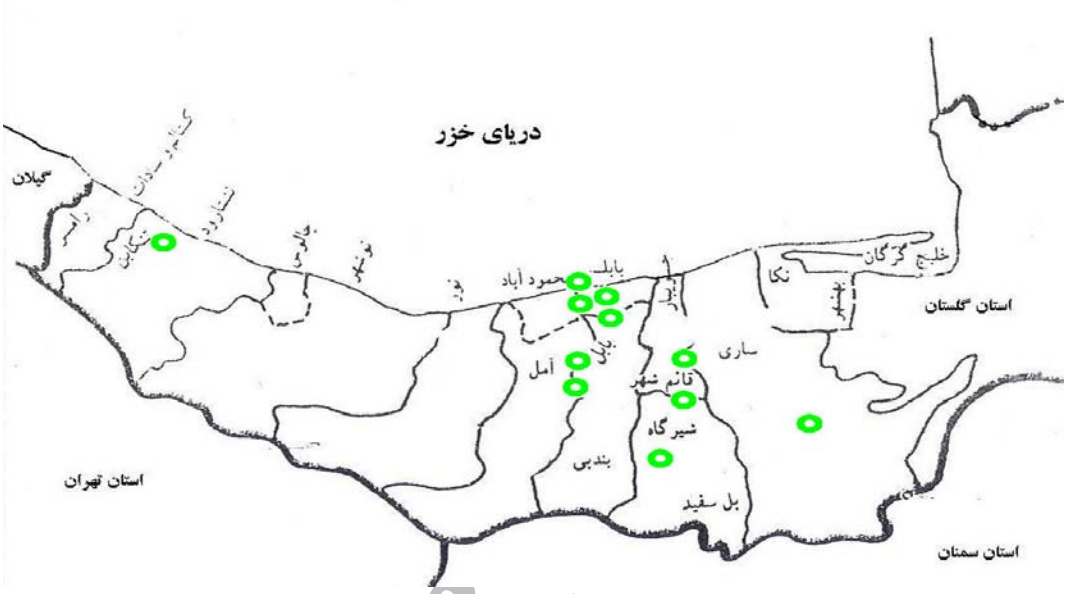


شکل ۱- تشکیل فرم جنسی قارچ *Gibberella fujikuroi* روی محیط کشت هویج آگار ناشی از تلاقی جدایه F12 با جدایه تستر استاندارد *MATD-1* . a) نمای عمومی یک تشتک پتری ۶ سانتی متری که درون آن پریتسیوم تشکیل شده است. b) نمای نزدیک از تشکیل پریتسیوم . c) نمای میکروسکوپی یک پریتسیوم شکافته شده. d) نمای میکروسکوپی آسک ها و آسکوسپورها. اسلایدهای میکروسکوپی در محلول اسید استیک ۲۵٪ تهیه شدند. خط شاخص معادل ۱۰ میکرومتر است.

Fig 1. Ascocarp formation of *Gibberella fujikuroi* on Carrot agar medium. a, b) Petri dish containing crosses and perithecia formation. c) A crushed ascocarp. d) Microscopic feature of asci and ascospores. scale bar = 10 µ.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۲- نقشه پراکنش تنها جمعیت و تیپ آمیزشی یافت شده (*MATD-2*) در بین جدایه های مورد مطالعه قارچ *Gibberella fujikuroi* عامل بیماری پوسیدگی طوقه برنج در استان مازندران.

Fig 2. Geographic distribution of fertile isolates of *Gibberella fujikuroi MATD-2* , causal agent of bakanae disease of rice, in Mazandaran province.

F. verticillioides را که فرم های غیر جنسی همین جمعیت ها می باشند در جمعیت قارچ عامل بیماری در استان تائید کرد. با توجه به اینکه خصوصیات تفکیک کننده این سه گونه از هم بسیار ظریف هستند و احتمال اشتباه در شناسایی بر اساس خصوصیات مورفولوژیک وجود داشت در این مطالعه تمامی جدایه ها با هر دو تیپ آمیزشی از هر سه جمعیت آمیزشی یاد شده تلاقی داده شدند. تمام جدایه های باروری که به عنوان *G. fujikuroi MATD-2* شناسایی شدند بر اساس خصوصیات مورفولوژیک *F. proliferatum* بودند که این نتایج یکدیگر را تایید می کنند. بیش از پنجاه و هفت درصد جدایه های این تحقیق مربوط به گونه

Archive

www.SID.ir

F. proliferatum بود که ۲۵ درصد آنها بارور بودند. این در حالی است که همراهی جمعیت آمیزشیD با برنج های دارای علایم باکانه در دنیا بیش از سایر جمعیت های آمیزشی این قارچ بوده است (Desjardins *et al*. 2000) .

درصد پایین باروری جدایه های این مطالعه (۱۸/۰۳ درصد) و محدود بودن جدایه های بارور به *MATD-2* با وجود مشاهده پریتسیوم های *G. fujikuroi* در اکثر مزارع مورد بازدید در اواخر فصل زراعی عجیب به نظر می رسد. در واقع وقوع فرم جنسی در طبیعت نشان دهنده حضور هر دو تیپ آمیزشی در جمعیت قارچ است و با توجه به اینکه شناسایی پرگنه های حاصل از تک آسکوسپور پریتسیوم های یافت شده در مناطق مختلف استان نشان دهنده تشکیل فرم جنسی توسط هر دو گونه *F. proliferatum* و *F. fujikuroi* در طبیعت می باشد انتظار داشتیم در میان جدایه های این مطالعه هر دو تیپ آمیزشی از این دو جمعیت آمیزشی(C, D) را داشته باشیم. با توجه به اینکه جدایه های آزمون گر استاندارد جمعیت آمیزشی C نیز نتوانستند در شرایط فراهم شده با هم تشکیل پریتسیوم دهند، شاید شرایط مناسب برای تشکیل پریتسیوم توسط جدایه های این جمعیت فراهم نشده باشد. این درحالی است که در نتایج سایر محققان (Desjardins *et al*. 1997) نیز میزان باروری پائین جدایه های *F. fujikuroi* گزارش شده است. در هر حال به نظر می رسد جمعیت مورد مطالعه در این تحقیق از نظر تیپ آمیزشی توزیع مشابهی با کل جمعیت قارچ *F. proliferatum* در استان مازندران نداشته باشد. پیشنهاد می شود برای مطالعات بعدی تعداد جدایه های بیشتری مورد بررسی قرار گرفته و حتی الامکان از روش های مولکولی نیز برای تعیین تیپ های آمیزشی استفاده گردد.

سپاسگزاری

از آقای دکتر شفرد (South African Meical Research Council (MRC) به خاطر ارسال جدایه های آزمون گر استاندارد و نیز همکاری صمیمانه معاونت موسسه تحقیقات برنج که مراحل اجرایی این تحقیق در آنجا انجام شد، کمال تشکر را داریم.

منابع

Archive of SID

www.SID.ir

جهت ملاحظه به صفحات (32-29) متن انگلیسی مراجعه شود.

آدرس نگارندگان: سید امین علیان، محمد جوان نیکخواه، حشمت‌اله امینیان و وحید خسروی
گروه گیاهپزشکی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، پاکدشت، گروه گیاهپزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج و بخش گیاهپزشکی، معاونت موسسه تحقیقات برنج، آمل

Archive of SID

www.SID.ir