وضعیت باروری و تیپ آمیزشی *Cochliobolus miyabeanus*، عامل بیماری لکه قهوه‌ای برنج در استان گیلان*

FERTILITY STATUS AND MATING TYPE OF *Cochliobolus miyabeanus*, THE CAUSAL AGENT OF RICE BROWN SPOT DISEASE IN GUILAN PROVINCE

اکرم شمسی[۱]، سیدعلی الهی‌نیا[۱]، سید اکبر خداپرست[۱]** و صدیقه موسی‌نژاد[۲]

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۷/۸/۱۵؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۵/۲۶)

چکیده

این مطالعه به منظور تعیین وضعیت باروری و تیپ آمیزشی جمعیت طبیعی قارچ *Cochliobolus miyabeanus*، عامل بیماری لکه قهوه‌ای برنج انجام گرفت. تعداد ۱۴۷ جدایه قارچ، در بهار و تابستان سال‌های ۱۳۸۵ و ۱۳۸۶ از مزارع مختلف برنج در استان گیلان جداسازی گردید. قارچ عامل بیماری از بذرها و برگ‌های آلوده جداسازی و با استفاده از روش تک اسپور خالص‌سازی شد. جدایه‌های این قارچ با خود و دیگر جدایه‌ها تلاقی داده شدند. براساس نتایج به‌دست آمده، بیشتر جدایه‌ها خودنابارور تشخیص داده شدند و فقط ۲۳/۸ درصد جدایه‌ها بارور بودند. تعداد ۳۵ جدایه بارور در دو تیپ آمیزشی قراردادی A و a قرار گرفتند که ۱۷ جدایه ماده بارور و ۱۸ جدایه نر بارور بودند. قدرت جوانه‌زنی آسکوسپورها روی آب و آب - آگار در شرایط آزمایشگاه بررسی شد. آسکوسپورهای به دست آمده از کلیه جدایه‌های بارور قادر به جوانه‌زنی بودند.

واژه‌های کلیدی: لکه قهوه‌ای برنج، آسکوسپور، ماده و نر بارور، *Cochliobolus miyabeanus*، تیپ آمیزشی

Archive of SID

---

*: بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول، ارایه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان

**: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: khodaparast@guilan.ac.ir

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استاد و دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان

۲. عضو هیئت علمی مؤسسه تحقیقات برنج کشور، رشت

www.SID.ir

مقدمه

قارچ آسکومیست *Cochliobolus miyabeanus* Ito & Kuribayashi با شکل غیرجنسی *Bipolaris oryzae* Breda de Haan متعلق به خانواده Pleosporaceae، راسته Pleosporales و رده Dothideomycetes است (Lumbsch & Hundorf 2007). این قارچ باعث ایجاد بیماری لکه قهوه‌ای برنج می‌شود که یکی از بیماری‌های رایج این گیاه بوده و در تمام مناطق برنج‌خیز دنیا خصوصاً در شرایط آب و هوایی نیمه‌خشک شایع می‌باشد (OU 1985). اپیدمی این بیماری در سال‌های ۴۳-۱۹۴۲ در هند و در خلیج بنگال به وقوع پیوست که باعث قحطی و منجر به خسارت ۹۰-۵۰ ٪ شد (Padmanabhan 1973). قارچ عامل بیماری به صورت فرم غیر جنسی تکثیر یافته و فرم جنسی آن در طبیعت تاکنون گزارش نشده است. مطالعات زیادی در مورد وضعیت باروری و تعیین تیپ آمیزشی جدایه‌های *C. miyabeanus* در دنیا صورت نگرفته است. *درکسلر* (Drechsler 1925) اولین بار فرم جنسی قارچ *Helminthosporium* (*Bipolaris*) sp. را به عنوان عامل لکه‌برگی ذرت تشریح کرد و به طور آزمایشی به عنوان یک گونه جدیدی از *Ophiobolus*، با نام *Ophiobolus heterostrophus* Drechsler نام‌گذاری نمود.

ایتو و کوریبایاشی (Ito & Kuribayashi 1927) قارچ *Ophiobolus miyabeanus* را به عنوان فرم جنسی *B. oryzae* گزارش نمودند. *درکسلر* (Drechsler 1934) جنس *Cochliobolus* را براساس خصوصیات مورفولوژیکی گونه تیپ، *C. heterostrophus* (Drechsler) (= *Ophiobolus heterostrophus*) Drechsler بنا نهاد. گونه*O. miyabeanus* نیز به *C. miyabeanus* تغییر نام یافت. مطابق بررسی‌های انجام شده، تقریبا همه گونه‌های *Cochliobolus* به استثنای دو گونه *C. kusanoi* Nisikadoi و *C. homomorphus* Luttrell & Rogerson هتروتال می‌باشند (Ueyama & Tsuda 1976). *نلسون* (Nelson 1957) الگوی تولید مثلی بسیاری از گونه‌های *Cochliobolus* را مورد بررسی قرار داد. او بیان نمود که آسکوکارپ‌های بالغ فقط وقتی که تلاقی‌ها بین دو گروه مخالف به صورت a و A هستند، تشکیل می‌گردند.

قارچ *C. heterostrophus* (Drechsler) Drechsler در تلاقی جدایه‌های سازگار A و a تولید آسکوکارپ می‌نماید. *شومیکر* (Shoemaker 1957) فرآیندهای تولید مثلی *C. sativus* (Ito & Kuribayashi) Drechsler & Dastur را با تاکید بر نحوه توسعه آسک مطالعه نمود. او دو اندام جنسی را تشریح نمود: اسپرماتیوم که به عنوان یک اندام نر بوده و پروتوپریتس جزء اصلی اندام ماده می‌باشد. *تسودا و اویاما* (Tsuda & Ueyama 1976) الگوهای پراکنش و تفکیک تیپ‌های آمیزشی قارچ *C. miyabeanus* را تعیین نمودند. برای تشکیل فرم جنسی این قارچ دو تیپ سازگار جنسی باید در یک منطقه وجود داشته باشد. وجود دو تیپ سازگار روی یک لکه بیمار در مشاهده سیکل زندگی این قارچ در طبیعت حائز اهمیت است. جدایه‌های این قارچ هتروتال و هرمافرودیت می‌باشند. دو تیپ آمیزشی در این قارچ شناسایی شده است که در مزرعه تقریبا به طور مساوی وجود دارند (Tsuda & Ueyama 1976). نتایج حاصل از آزمون‌های باروری جدایه‌های تک کنیدیوم شده و تک آسکوسپور شده نشان داده است که این قارچ توانایی تولید پروتوپریتس به عنوان یک اندام ماده را روی محیط کشت مصنوعی از دست می‌دهد. تشکیل فرم جنسی فقط در شرایط آزمایشگاه و با تلاقی دادن جدایه‌های سازگار امکان پذیر است. اگرچه در مکزیک و آمریکا تعداد کمی از محققان وجود *C. miyabeanus* را در مزرعه برنج گزارش نمودند (Tsuda & Ueyama 1976). در ایران تاکنون هیچ تحقیقی در زمینه تشکیل فرم جنسی این قارچ انجام نشده است. تعیین وضعیت باروری و تیپ‌های آمیزشی موجود در جمعیت قارچ عامل لکه‌قهوه‌ای برنج در یک منطقه می‌تواند بیانگر تنوع ژنتیکی قارچ در منطقه بوده و امکان وقوع نوترکیبی ژنتیکی را از طریق تولید مثل جنسی مشخص نماید. این مطالعه به منظور بررسی وضعیت باروری و تعیین تیپ‌های آمیزشی این قارچ در استان گیلان انجام شده است.

Archive of SID

www.SID.ir

روش بررسی

نمونه‌برداری

به منظور تعیین وضعیت باروری قارچ عامل لکه قهوه‌ای برنج، نمونه‌برداری این قارچ از مزارع استان گیلان در دو مرحله برگ و خوشه انجام گرفت. تعداد ۱۴۷ جدایه قارچ *C. miyabeanus* از مناطق مختلف رشت، سنگر، انزلی، فومن، لنگرود، چمخاله، کیاشهر، آستانه، رودسر و صومعه‌سرا از روی ارقام مختلف جداسازی گردید که ۱۲۶ جدایه از روی برگ و ۲۱ جدایه آن از روی شلتوک برنج بود. برای نمونه‌برداری، برگ‌های سبزی که علائم بارز لکه‌قهوه‌ای، لکه‌های گرد تا بیضوی داشتند و بذرهایی که آلوده به این قارچ بودند، انتخاب شدند. نمونه‌های برگی از محل لکه به صورت قطعات ۲ تا ۳ سانتی‌متری بریده شده و به همراه بذرهای آلوده در پاکت‌های کاغذی قرار گرفتند. مشخصات هر نمونه روی پاکت یادداشت گردید. پاکت‌ها به مدت یک هفته در شرایط آزمایشگاه قرار گرفتند تا نمونه‌های داخل آن خشک شوند.

جداسازی و خالص‌سازی قارچ

برای جداسازی و خالص‌سازی قارچ، نمونه‌ها از داخل پاکت خارج و از فاصله بین بافت سالم و آلوده به قطعات کوچک‌تر برش داده شدند. سپس به منظور شستشوی سطحی، ۱۵ دقیقه زیر جریان ملایم شیر آب قرار گرفتند. برای ضدعفونی سطحی، نمونه‌های برگی به مدت یک دقیقه و بذرها به مدت سه دقیقه در محلول رقیق شده هیپوکلریت سدیم حاوی ۰/۵ درصد کلر فعال قرار داده شده، سپس دوبار با آب مقطر سترون (هر بار سه دقیقه) شستشو شدند. پس از این مرحله نمونه‌ها با پنس سترون روی کاغذ خشک‌کن قرار گرفته تا آب آنها گرفته شود. کلیه مراحل ضدعفونی زیر هود و در شرایط سترون انجام شد. پس از ضدعفونی و خشک‌کردن، نمونه‌ها به تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت سیب‌زمینی- دکستروز- آگار (PDA) منتقل، سپس در دمای ۲۷ °C نگه‌داری شدند. پس از سه روز خالص‌سازی انجام گرفت، به این صورت که سوسپانسیون اسپور روی محیط کشت آب- آگار ۲٪ پخش گردید و برای تک‌اسپورکردن، برخی از اسپورهای جوانه‌زده روی محیط کشت PDA منتقل شده و پرگنه به دست آمده از آنها برای مطالعات بعدی حفظ شد.

شناسایی جدایه‌های قارچ *C. miyabeanus*

برای اسپورزایی این قارچ از محیط کشت عصاره کاه برنج- آگار (Rice straw decoction-agar) به اضافه کاه برنج استفاده شد. قارچ‌های کشت شده، ابتدا به مدت یک هفته در دمای ۲۷ °C و تحت شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی قرار گرفته، سپس به مدت دو هفته در شرایط تاریک قرار گرفتند تا اسپورزایی نمایند. پس از اسپورزایی جدایه‌های قارچ روی محیط کشت، با استفاده از محلول اسید لاکتیک و لاکتوفنل اسلاید میکروسکوپی تهیه گردید. نمونه‌های میکروسکوپی بوسیله میکروسکوپ Nikon مورد مطالعه و بررسی قرار گرفتند. حداقل ۴۰ مورد از اندام‌های مختلف توسط عدسی مدرج روی میکروسکوپ اندازه‌گیری و حداقل، حداکثر و میانگین اندازه‌ها محاسبه گردید. برای تشخیص این قارچ از توصیف *سیوانسان* (Sivanesan 1987) استفاده شد. رسم و عکس‌برداری اندام‌های میکروسکوپی قارچ توسط لوله ترسیم و دوربین عکاسی متصل به میکروسکوپ انجام گرفت.

بررسی فرم جنسی و تیپ‌های آمیزشی در قارچ *C. miyabeanus*

به منظور مشاهده فرم جنسی این قارچ طبق روش *اویاما* و *تسودا* (Ueyama & Tsuda 1975) از محیط کشت ساکس- آگار (Such's agar) استفاده شد که این محیط کشت شامل: KNO_3: ۱ گرم، $MgSO_4.7H_2O$: ۰/۵گرم، $Ca(NO_3)_2$: ۰/۵گرم، $Ca_3(PO_4)_2$: ۰/۵گرم، NaCl: ۰/۵گرم، $FeCl_3$: trace و آگار ۱۲ گرم می‌باشد. این محیط کشت پس از تهیه و اتوکلاو شدن به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱°C و با فشار ۱/۵ پاسکال به تشتک‌های پتری به قطر ۹ سانتی‌متر پلاستیکی و شیشه‌ای انتقال یافت. سپس یک قطعه کاه برنج ۴-۳ سانتی‌متری (سه بار اتوکلاو و در سه روز

Archive of SID

www.SID.ir

متوالی) در مرکز آنها قرار گرفت. قطعه آگار حاوی کشت سه روزه جدایه‌ها به صورت دو به دو در هر تشتک پتری و در دو طرف کاه به فاصله مساوی از آن کشت گردیدند. تشتک‌های حاوی قارچ در دو شرایط آزمایشگاه و انکوباتور با دمای ۲۴ °C قرارگرفتند. برای مشاهده فرم جنسی این قارچ، از محیط کشت عصاره کاه برنج- آگار به اضافه کاه برنج نیز استفاده گردید و به جای کاه برنج از برگ و شلتوک آن نیز استفاده شد.

نتیجه

بررسی امکان تولید فرم جنسی قارچ *C. miyabeanus*

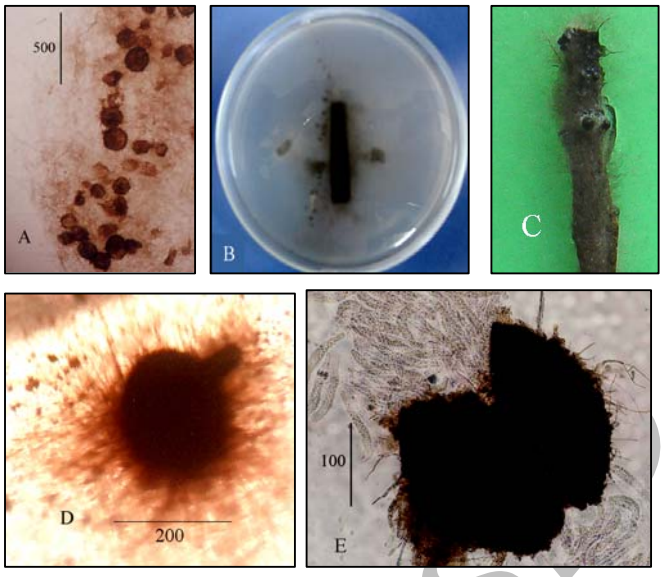
از کشت دو جدایه قارچ به فاصله مناسب روی محیط کشت ساکس- آگار که یک قطعه کاه برنج داشت، حدود ۱۰-۷ روز بعد پروتوپریتسیوم‌ها به صورت نقاط سیاه رنگی در نزدیکی کاه برنج و در محل تماس دو جدایه سازگار روی محیط کشت یا روی کاه تشکیل شدند. سپس پروتوپریتسیوم‌ها توسعه پیدا کرده و پس از حدود ۳۰-۲۳ روز آسک‌ها، سودوپارافیزها و آسکوسپورها داخل آنها نمایان شدند. آسکوکارپ‌ها (سودوپریتس‌ها) ابتدا در محیط کشت یا روی کاه برنج فرورفته بوده و پس از بلوغ آسکوسپورها شکوفا شدند (شکل‌های 1-B, 1-C). در ابتدای تشکیل آسک، آسکوکارپ با سودوپارافیزها پر شده که به صورت انبوه مشاهده شدند. آسک‌ها در این مرحله با سیتوپلاسم سازمان نیافته قابل مشاهده بودند. پس از بلوغ آسک و تشکیل آسکوسپور، سودوپارافیزها ناپدید شدند. آسکوکارپ‌ها دارای گردن یا فاقد آن بودند، اما در هر دو صورت آسک و آسکوسپور تشکیل شد (شکل‌های 1-D, 1-E). بیشتر آسکوکارپ‌ها روی کاه برنج و به صورت انفرادی یا گروهی مشاهده شدند و فقط تعداد خیلی کمی روی محیط کشت تشکیل گردیدند. پروتوپریتس‌ها نیز در برخی از جدایه‌های قارچ تشکیل شده که به صورت انفرادی یا گروهی بودند. این اندام‌ها کروی و به رنگ قهوه‌ای بوده و از لحاظ شکل تفاوتی با آسکوکارپ نداشتند، اما داخل آنها هیچ آسک و آسکوسپوری مشاهده نگردید. پروتوپریتس‌ها روی هر سه محیط کشت PDA، ساکس- آگار و عصاره کاه برنج- آگار به اضافه کاه برنج تولید شدند (شکل 1-A). آسکوکارپ‌های بالغ بیشتر در قسمت‌های زیرین کاه تشکیل شدند و بیانگر این بود که برای تشکیل آسکوکارپ نیازی به نور نبوده و بدون حضور نور نیز آسکوکارپ‌ها تشکیل می‌شوند. تعداد آسکوکارپ‌های تشکیل شده در بین جدایه‌ها متفاوت بود. در برخی تلاقی‌ها فقط ۵-۳ آسکوکارپ مشاهده شد. پس از مقایسه تولید آسکوکارپ در شرایط آزمایشگاه و انکوباتور (۲۴ °C) مشخص شد که در هر دو شرایط آسکوکارپ تولید می‌شود، اما در شرایط انکوباتور تعداد آسکوکارپ‌های بالغ بیشتر بود. برای تشکیل آسکوکارپ از شلتوک و برگ برنج نیز استفاده شد، اما روی این نمونه‌ها هیچ آسکوکارپی تشکیل نگردید. روی محیط کشت عصاره کاه برنج- آگار آسکوکارپ مشاهده گردید، اما به مرحله بلوغ نرسید. در پوسته بذر برنج ممکن است ماده‌ای وجود داشته باشد که مانع از تشکیل آسکوکارپ روی آن گردد، همچنین این قارچ برای تولید آسکوکارپ به کربوهیدرات خیلی کم نیاز داشته و در عوض نیازمند مواد معدنی خاصی بوده که فقط در محیط کشت ساکس- آگار وجود دارد (Tsuda & Ueyama 1975). در واقع می‌توان نتیجه گرفت که تشکیل آسکوکارپ بالغ در شرایط خاص (دمای ۲۴ °C و محیط کشت ساکس- آگار) صورت می‌گیرد.

مشخصات قارچ *C. miyabeanus*

آسکوکارپ‌ها قهوه‌ای تیره، کروی تا بیضوی با گردن استوانه‌ای کوتاه یا فاقد آن و به اندازه ۷۰۵/۶-۲۹۴×۷۸۴-۳۷۲/۴ میکرومتر بودند. گردن آسکوکارپ نیز به ابعاد ۱۴۷-۸۰/۶×۲۱۵/۶-۱۱۲/۶ میکرومتر بود. آسک‌ها استوانه‌ای، گرزی و گرزی وارونه، راست تا خمیده، پایه‌دار یا بدون پایه و در انتها گرد و به ابعاد ۳۶/۶-۱۵/۶×۲۶۲/۶-۱۳۷/۸ میکرومتر بودند. آسک‌ها حاوی آسکوسپورهای مارپیچ هستند (شکل‌های 2-A, 2-C, 2-D) . آسکوسپورها نخی شکل، بیرنگ، در دو انتها باریک، و به ابعاد

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱. تشکیل فرم جنسی قارچ *Cochliobolus miyabeanus* روی محیط کشت ساکس-آگار به اضافه کاه برنج. A) پروتوپریتسیوم‌ها، B) تشکیل سودوپریتس‌ها در محل برخورد دو جدایه ، C) سودوپریتس‌ها روی کاه برنج، D) سودوپریتس با گردن استوانه‌ای شکل، E) سودوپریتس فاقد گردن و آسک‌های خارج شده از دهانه آن.

Fig 1. Ascocarp formation of *Cochliobolus miyabeanus* on Such's agar- rice straw medium. A) Protoperithecia, B) Pseudothecia formation in crossing of two isolates, C) Pseudothecium on rice straw, D) Pseudothecium with cylindrical neck, E) Pseudothecium without neck and asci emerging from it.

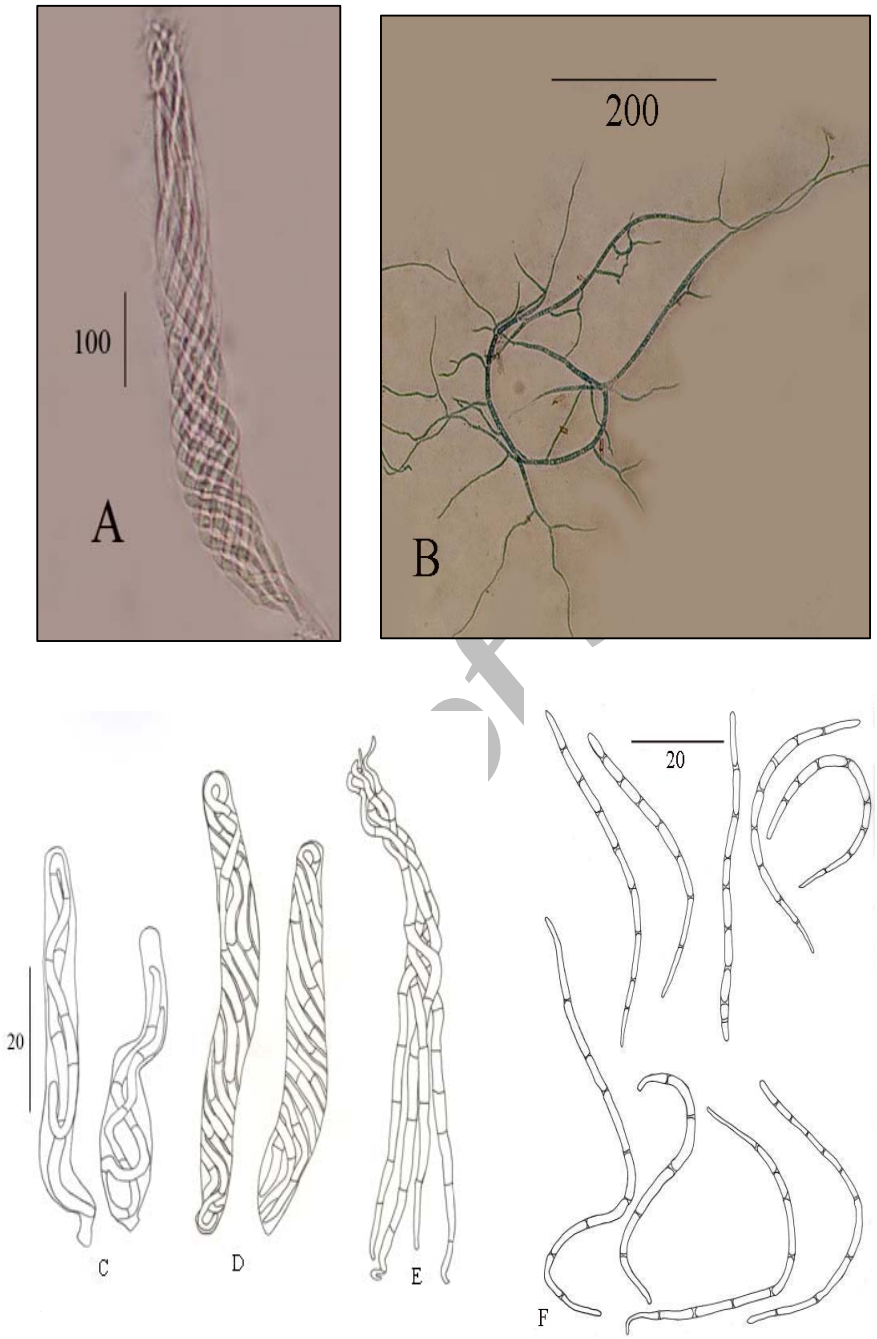
۱۰–۵×۳۷۲/۴–۱۲۲ میکرومتر و دارای دیواره‌های عرضی متعدد بوده که به تعداد ۸–۱ عدد به صورت مارپیچ داخل آسک قرار می‌گیرند (شکل‌های 2-E, 2-F). برخی آسکوسپورها پس از خارج شدن از آسک سریعا داخل آب جوانه زده و خروج جوانه از دو انتها و از سلول‌های میانی انجام گرفت (شکل 2- B). تعداد دیواره آسکوسپورها از ۱۹–۵ عدد متفاوت بوده، اما بیشتر در حدود ۱۲–۸ عدد بود (جدول ۱).

بررسی وضعیت باروری جدایه‌های قارچ *C. miyabeanus*

جدایه‌های قارچ *C. miyabeanus* از نظر باروری با هم مقایسه شدند. جدایه‌هایی از این قارچ که قدرت تولید پروتوپریتس را به عنوان یک اندام ماده بارور داشتند، قادر به تولید آسکوکارپ و آسک بودند. جدایه‌هایی که این اندام را تولید نکردند، قادر به تولید هیچ آسکوکارپی نبودند. فقط تعداد کمی از جدایه‌ها قادر به تولید پروتوپریتس روی محیط‌های کشت آگاردار بودند. جدایه‌هایی که این اندام را تولید نمودند، از لحاظ باروری ماده بارور یا هرمافرودیت بودند. در بین ۱۴۷ جدایه بررسی شده، فقط ۳۵ جدایه بارور بودند که ۱۸ جدایه آن ماده‌بارور و ۹ جدایه دیگر به دلیل عدم تولید پروتوپریتس، نربارور تشخیص داده شدند (جدول ۲). در مجموع، حدود ۲۳/۸ درصد جدایه‌ها بارور بودند و بقیه نابارور بوده یا از لحاظ قدرت باروری ضعیف بودند. به نظر محققین مختلف، قارچ‌ها ممکن است توانایی جنسی را در چرخه‌های زندگیشان از دست بدهند. این فرآیند براساس اتفاقات متعددی روی می‌دهد. بروز حتی یک جهش در هر یک از مکان‌های ژنی که در تولید مثل جنسی به کار رفته می‌تواند در تمام یا نصف این فرآیند پیچیده دخالت کند (Raju 1992). تغییر ممتد در باروری از قبیل کم شدن باروری در بین جدایه‌های وحشی برخی گونه‌ها ممکن است به خاطر جداشدن تصادفی بسیاری از ژن‌های مؤثر در باروری باشد. از بین رفتن تولید مثل جنسی در برخی از آسکومیست‌های هتروتال ممکن است در اثر از بین رفتن افراد حامل تیپ آمیزشی مخصوص باشد (Turgeon *et al.* 1993).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۲. آسک و آسکوسپورها در قارچ *Cochliobolus miyabeanus*. A) ۸ عدد آسکوسپور در یک آسک، B) جوانه‌زنی آسکوسپور، C) آسک‌ها با یک آسکوسپور مارپیچ، D) آسک‌ها با چندین آسکوسپور مارپیچ، E) چهار آسکوسپور خارج شده از یک آسک، F) آسکوسپورها با چندین دیواره عرضی.

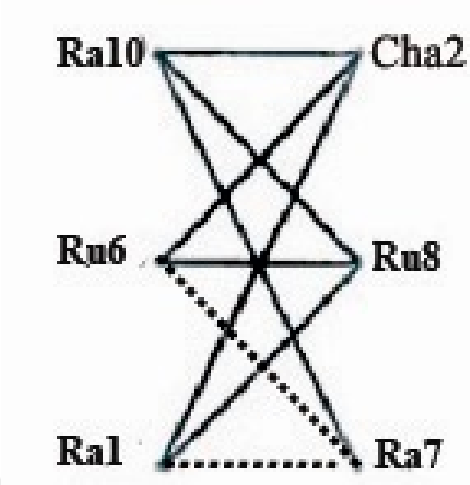
Fig. 2. Asci and ascospores in *Cochliobolus miyabeanus*. A) Eight ascospores in an ascus, B) Germination of ascospore, C) Asci with one helicoid ascospore, D) Asci with several helicoids ascospores, E) Four ascospores emerging from an ascus, F) Ascospores with several septa.

www.SID.ir

جدول ۱. مقایسه خصوصیات مورفولوژیکی *Cochliobolus miyabeanus*

Table 2. Comparison of morphological characteristics of *Cochliobolus miyabeanus*

جدایه‌های گیلان Guilan isolates	اویاما و تسودا (۱۹۷۵) Ueyama & Tsuda (1975)	ایتو و کوریبایاشی (۱۹۳۱) Ito & Kuribayashi (1931)	خصوصیت Characteristic
372/4-784×294-705/6 (510) (532)	238-688×213-750 (376/6) (379/8)	370-760×370-780	آسکوکارپ Ascocarp
112/6-215/6×80/6-147 (118) (112)	125-325×50-113 (233/3) (7/8)	95-200×55-110	گردن آسکوکارپ Ascocarp neck
137/8-262/6×15/6-36/6 (208) (23)	133-250×17/5-35 (183/3) (24/4)	142-235×21-36	ابعاد آسک Ascus
122-372/4×5-10 (243) (6)	116-391×5/2-13/9 (242/8) (7/8)	235-468×6-9	ابعاد آسکوسپور Ascospore
5-19(7-12)	6-16(8-12)	4-19(7-12)	تعداد دیواره عرضی آسکوسپور Septa of ascospore



شکل ۳. ارتباط بین تعدادی از جدایه‌های *Cochliobolus miyabeanus*.

Fig 3. Correlation between some isolates of *Cochliobolus miyabeanus.*

شناسایی تیپ‌های آمیزشی جدایه‌های قارچ *C. miyabeanus*

برای تعیین تیپ آمیزشی یک قارچ هتروتال نیاز به جدایه آزمایشگر می‌باشد. چون جدایه آزمایشگر در دسترس نبود، بنابراین تمامی تلاقی‌های ممکن بین جدایه‌های بدست آمده از مزارع استان گیلان انجام گرفت. جدایه‌های این قارچ پس از تلاقی‌های متعدد آسکوکارپ تشکیل داده که در نهایت دو جدایه Ra10 و Cha2 به ترتیب از رشت و چمخاله به عنوان جدایه‌های آزمایشگر انتخاب شدند. این دو جدایه با بقیه جدایه‌ها تلاقی داده شدند و به دلیل تولید پروتوپریتس روی محیط‌های کشت قادر بودند با بقیه جدایه‌ها تشکیل آسکوکارپ بارور داده و از سازگاری بالایی برخوردار بودند. این دو جدایه هم‌چنین در تلاقی با یکدیگر تولید آسکوکارپ بالغ نمودند و ماده بارور بودند. جدایه‌های بارور پس از حداقل سه بار تلاقی با جدایه‌های آزمایشگر، تولید آسک‌های بارور نموده و آسکوسپورهای آنها داخل

www.SID.ir

جدول ۲. مشخصات جدایه‌های بارور *Cochliobolus miyabeanus*

Table 1. Characteristics of fertile isolates of *Cochliobolus miyabeanus*

ردیف Number	نام جدایه Isolate name	محل نمونه برداری Location	رقم Cultivar	پروتوپریتس Protoperithecium	وضعیت باروری Fertility status	تیپ آمیزشی Mating type
1	Ra1	Rasht	Khazar	−	♂	MAT-a
2	Ra6	Rasht	Hybrid	+	♀	MAT-A
3	Ra7	Rasht	Alikazemi	−	♂	MAT-A
4	Ra10	Rasht	Hybrid	+	♀	MAT-a
5	Ra12	Rasht	Hybrid	−	♂	MAT-a
6	Ra16	Rasht	Hybrid	−	♂	MAT-a
7	Ra19	Rasht	Hybrid	+	♀	MAT-A
8	Ra22	Rasht	Alikazemi	−	♂	MAT-a
9	Ra23	Rasht	Alikazemi	−	♂	MAT-A
10	Ra28	Rasht	Hybrid	−	♂	MAT-A
11	Ra35	Rasht	Hashemi	+	♀	MAT-a
12	Ra37	Rasht	Hybrid	−	♂	MAT-A
13	Ra41	Rasht	Hybrid	+	♀	MAT-a
14	Az4	Anzali	Hashemi	−	♂	MAT-A
15	Az7	Anzali	Hashemi	+	♀	MAT-A
16	Az10	Anzali	Hashemi	+	♀	MAT-A
17	Az12	Anzali	Hashemi	−	♂	MAT-A
18	Fu1	Fuman	Hashemi	+	♀	MAT-A
19	Fu6	Fuman	Alikazemi	+	♀	MAT-A
20	Cha1	Chamkhale	Hashemi	+	♀	MAT-A
21	Cha2	Chamkhale	Hashemi	+	♀	MAT-A
22	La7	Langeroud	Hashemi	−	♂	MAT-A
23	La8	Langeroud	Hashemi	−	♂	MAT-A
24	La(s)12	Langeroud	Hashemi	+	♀	MAT-A
25	Ks2	Kiashahr	Hashemi	−	♂	MAT-A
26	Ks(s)7	Kiashahr	Hashemi	+	♀	MAT-A
27	As3	Astane	Alikazemi	−	♂	MAT-A
28	Ru3	Roudsar	Alikazemi	−	♂	MAT-A
29	Ru6	Roudsar	Alikazemi	−	♂	MAT-a
30	Ru8	Roudsar	Alikazemi	+	♀	MAT-A
31	Ru(s)13	Roudsar	Hashemi	−	♂	MAT-A
32	Ru(s)21	Roudsar	Hashemi	+	♀	MAT-a
33	Ru30	Roudsar	Hashemi	−	♂	MAT-A
34	Su(s)1	Somesara	Khazar	+	♀	MAT-A
35	Su(s)4	Somesara	Khazar	+	♀	MAT-A

♂: Male- fertile ♀: Female- fertile (s): Seed

Archive of SID

www.SID.ir

آب و آب- آگار جوانه زدند. فقط جدایه Cha1 در تلاقی با جدایه Ra10 آسک تولید نمود، اما آسکوسپور مشاهده نشد. تعدادی از جدایه‌های قارچ *C. miyabeanus* روی محیط کشت آب- آگار تک‌آسکوسپور شدند. پرگنه‌های حاصل از این جدایه‌ها از نظر شکل و رنگ تفاوتی با جدایه‌های تلاقی داده شده نداشت. بر اساس نتایج به دست آمده، دو تیپ آمیزشی در جدایه‌های این قارچ تشخیص داده شد که به طور قراردادی در دو گروه آمیزشی MAT-A و MAT-a قرار گرفتند. نسبت این دو تیپ سازگار تقریبا سه به یک بود، به طوری‌که ۲۶ جدایه در گروه آمیزشی MAT-A و ۹ جدایه در گروه آمیزشی MAT-a قرار گرفتند.

ارتباط بین ۶ جدایه بارور در شکل ۳ آورده شده است. خطوط تیره بین جدایه‌ها نشانه تشکیل آسکوکارپ و بارور بودن جدایه‌ها و خط نقطه‌چین نشانه عدم تشکیل آسکوکارپ می‌باشد. جدایه های Ra1 و Ra7 پس از تلاقی با یکدیگر و چندین تکرار هیچ آسکوکارپی تشکیل ندادند. بین دو جدایه Ru6 و Ra7 نیز آسکوکارپی تشکیل نشد. این جدایه‌ها روی محیط‌های کشت آگاردار قادر به تولید پروتوپریتس نبودند. پس می‌توان نتیجه گرفت که این جدایه‌ها به دلیل عدم تشکیل پروتوپریتس روی محیط‌های کشت، نربارور بودند. جدایه‌های Cha2، Ru8 و Ra7 در گروه آمیزشی MAT-A قرار گرفته و تعداد جدایه‌های این گروه ۲۶ جدایه بود. جدایه‌های Ra10، Ru6 و Ra1 در گروه آمیزشی MAT-a قرار داشته و این گروه ۹ جدایه را شامل می‌شد. جدایه‌های هر گروه آمیزشی به هیچ عنوان در تلاقی با یکدیگر آسکوکارپ تشکیل ندادند.

مقایسه خصوصیات مرفولوژیک در قارچ *C. miyabeanus*

جدایه‌های قارچ *C. miyabeanus* از لحاظ ابعاد آسکوکارپ تفاوت قابل ملاحظه‌ای با جدایه‌های بررسی شده توسط *ایتو و کوریبایاشی* (Ito & Kuribayashi 1931)، *اویاما و تسودا* (Ueyama & Tsuda 1975) نداشتند (جدول ۱). از لحاظ ابعاد گردن آسکوکارپ با نتایج *ایتو و کوریبایاشی* (۱۹۳۱) مطابقت داشته، اما با *تسودا و اویاما* (۱۹۷۵) کمی متفاوت بودند. از لحاظ ابعاد آسک تفاوت خیلی کم وجود داشت. طول آسکوسپور به دست آمده با نتایج تسودا و اویاما مطابقت داشته، اما با نتایج ایتو و کوریبایاشی قدری متفاوت بود. تعداد دیواره عرضی آسکوسپور با نتایج این محققان مطابقت داشت (جدول ۱).

به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که بارور بودن جدایه‌های قارچ *C. miyabeanus* ارتباط خیلی زیادی با تشکیل پروتوپریتس‌ها روی محیط‌های کشت داشت. جدایه‌هایی که این اندام را تولید نمودند، بارور بودند. جدایه‌های با قابلیت تولید پروتوپریتس بیشتر، آسکوکارپ (سودوپریتس) بیشتری تولید نمودند. تشکیل فرم جنسی قارچ *C. miyabeanus* برای اولین بار در جدایه‌های این قارچ از استان گیلان و در شرایط آزمایشگاه به دست آمد. دو تیپ آمیزشی نیز در جدایه‌های این قارچ شناسایی گردید. وجود باروری تا حد کامل (تشکیل آسکوسپور و جوانه‌زنی آنها) در بین جدایه‌های قارچ *C. miyabeanus* می‌تواند به شناسایی دقیق این قارچ منجر شود.

سپاسگزاری

بخشی از این تحقیق در مؤسسه تحقیقات برنج کشور (رشت) انجام شده است که نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از مسئولین محترم موسسه تحقیقات برنج کشور(رشت) بخصوص بخش گیاهپزشکی آن مؤسسه به خاطر همکاریهای بیدریغ در تمام مراحل تحقیق و در اختیار قرار دادن امکانات کمال تشکر و سپاسگزاری را اعلام نمایند. انجام این تحقیق با حمایت مالی قطب علمی برنج کشور امکان‌پذیر شده است که بدین‌وسیله از مدیریت محترم قطب علمی برنج کشور، قدردانی می‌شود.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (26-25) متن انگلیسی مراجعه شود.

Archive of SID

www.SID.ir