بررسی مقاومت ارقام نیشکر به سیاهک در شرایط مزرعه و ردیابی قارچ در گیاهچه‌ها*

RESISTANCE ASSESSMENT OF SUGARCANE CULTIVARS TO *Ustilago scitaminea* IN THE FIELD AND DETECTION OF THE FUNGUS IN TISSUE CULTURED PLANTLETS

مهین بانو ایزدی، سیدعلی موسوی جرف** و واهه میناسیان[۱]

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۷/۶/۳۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۸/۲۰)

چکیده

عکس العمل ارقام مختلف نیشکر نسبت به بیماری سیاهک متفاوت می‌باشد. گیاهچه‌های ارقام حساس L62-96، نیمه‌حساس CL73-239 و مقاوم CP73 -21 نیشکر توسط کشت بافت برگی اطراف مریستم انتهایی با استفاده از کشت کالوس در شرایط درون‌شیشه‌ای (*In vitro*) به دست آمد. گیاهچه‌ها با استفاده از مایه‌زنی توسط مخلوط دو تیپ آمیزشی اسپوریدیوم و میسلیوم دو هسته‌ای مایه‌زنی شد. قلمه‌های این ارقام نیز پس از مایه‌زنی در مزرعه کاشته شدند. نتایج به دست آمده از عکس‌العمل این ارقام در مزرعه، بیانگر تولید شلاق در ۳۳/۷۶درصد از بوته‌های رقم حساس و ۱۵/۹ درصد از بوته‌های نیمه‌حساس بود. در صورتی که در ارقام مقاوم هیچ‌گونه علایمی تولید نشد و این در حالی است که DNA قارچ در تمامی قسمت‌های گیاهچه‌های مایه‌زنی شده در این ارقام ردیابی شد.

واژه‌های کلیدی: سیاهک نیشکر، رقم، ردیابی، *Ustilago scitaminea*، *In vitro*، *In vivo*

مقدمه

سیاهک نیشکر برای اولین بار در منطقه ناتال آفریقای جنوبی توسط مارتین گزارش شده است (Mc Martin, 1945). در ایران این بیماری از منطقه هفت تپه در سال ۱۹۷۱ گزارش شده است (Ershad & Bani-Abbassi 1971). تا پایان سال ۱۹۸۳ تنها مناطقی از دنیا که‌این بیماری دیده نشده بود، مناطق استرالیا و فیجی بودند (Agnitori 1990).

این بیماری جزو اولین بیماری‌هایی است که روی نیشکر گزارش شده و این امر به دلیل ظهور شلاق سیاهکی واضح، در قسمت انتهایی گیاه میزبان می‌باشد (Ricaud *et al.* 1989). تلیوسپورهای قارچ سیاهک در شرایط دما و رطوبت مناسب جوانه می‌زنند، در این مرحله اندازه‌ی اسپورها افزایش

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

** : مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: moosavifa@yahoo.com

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

یافته، پوسته خارجی شکاف برداشته و مواد داخل آن به شکل ریسه کوتاهی به نام پرومیسلیوم خارج می‌گردد (Alexander & Krishna 1978). ریسه آلوده کننده پس از رخنه از قسمت پایینی جوانه و زیر فلس‌ها تکثیر یافته و در مدت زمان کوتاهی خود را به منطقه مریستم انتهایی جوانه می‌رساند و موقتاً به حالت خفته در می‌آید (Sinha *et al*. 1982). جوانه‌های آلوده در گیاهان کامل تولید شلاق سیاهک می‌کند و یا تا فصل بعدی زراعی – که از جوانه‌های آلوده برای تهیه قلمه استفاده می‌شود – آلودگی پنهان می‌ماند (Agnitori 1990).

دوره حساسیت جوانه‌ها بسیار کوتاه است و حتی در واریته‌های خیلی حساس وقتی که طول جوانه به ۴ سانتی‌متر برسد، گیاهچه مقاوم می‌شود (Bock 1964). قارچ عامل بیماری فقط در بافت مریستمی وجود دارد. هر جوانه به صورت یک واحد آلوده کننده مجزا عمل می‌کند و این در حالی است که قارچ توانایی حرکت از یک جوانه به سایر نقاط را داراست (Fawcett 1944).

عکس‌العمل ارقام مختلف نسبت به سیاهک از یک کشور به کشور دیگر و از یک منطقه به منطقه دیگر متفاوت می‌باشد (James 1969؛ Ferreria & Comstock 1980). مقاومت براساس درصد تولید شلاق و از درجه ۱ (خیلی مقاوم) تا درجه ۹ (خیلی حساس) ارزیابی می‌شود (Hutchison 1969). واریته‌های حساس عموماً علایم بیماری را که شامل ظهور شلاق‌های سیاهک می‌باشد زودتر (درمدت ۹۰ روز) در مقایسه با واریته‌های مقاوم نشان می‌دهند (Durajraj et al. 1972).

مؤثرترین روش برای کنترل بیماری‌های نیشکر استفاده از ارقام مقاوم است (Schenck 1998). برای تشخیص ارقام مقاوم، روش‌های مختلفی مورد استفاده قرار گرفته است و بیشترین روشی که در مناطق نیشکرخیز استفاده شده روش مزرعه‌ای است. برای تشخیص کلون‌های مقاوم نسبت به سیاهک نیاز به گسترش روش‌های مایه‌زنی برای تعیین عکس‌العمل این کلون‌ها نسبت به بیماری می‌باشد (Byther & Steiner 1967). به طور کلی از بین روش‌های مایه‌زنی از روش مستغرق کردن دانه‌ها و قلمه‌های دارای ۲ تا ۳ جوانه در سوسپانسیون اسپور به مدت ۱۰ دقیقه بیشتر استفاده شده است (Durajraj et al. 1972).

شینک در سال ۱۹۹۸ پیشنهاد داد که واکنش زنجیره‌ای پلی مراز(PCR) برای ردیابی قارچ سیاهک خیلی بهتر از روش میکروسکوپی می‌باشد و با استفاده از PCR وجود قارچ سیاهک به صورت اختصاصی‌تر و انتخابی‌تری در بافت گیاه قابل ردیابی است (Schenck 1998). در این تحقیق عکس‌العمل ارقام بر اساس درصد تولید شلاق در مزرعه مورد بررسی قرار گرفت و پس از تعیین حساسیت و مقاومت ارقام نسبت به سیاهک نیشکر، وجود قارچ عامل بیماری در گیاهچه‌های حاصل از کشت بافت این ارقام توسط PCR با استفاده از آغازگر های اختصاصی ردیابی شد.

روش بررسی

آزمون بیماری‌زایی در شرایط مزرعه‌ای (*In vivo*)

قلمه‌های جدا شده از ارقام CP57-614, CP73-21, CP82-1172, CL73-239, CP70-1143, L62-96, NCO310, SP70-1143, CP76-331, CP78-1628, N56-1472, به مدت نیم ساعت در آب گرم ۵۰°C ضدعفونی گردیدند. ۷۵ عدد قلمه تک جوانه از هر رقم انتخاب کرده و درون سوسپانسیون تلیوسپور (دو گرم تلیوسپور در یک لیتر آب با درصد جوانه‌زنی بیش از ۷۰ درصد) به مدت ۲۰ دقیقه غوطه‌ور گردید. سپس قلمه‌ها به مدت سه روز در دمای ۳۰°C و شرایط تاریکی با رطوبت ۹۰ درصد نگه‌داری شدند. پس از ۳ روز قلمه‌هایی که دارای جوانه متورم و رشد کرده بودند در مزرعه کاشته شدند. بعد از گذشت دو ماه از کشت قلمه‌ها، بوته‌های آلوده به مدت نه ماه به صورت هفتگی تشخیص داده شد و شلاق‌ها جمع‌آوری گردید.

آزمون بیماری‌زایی در شرایط درون شیشه‌ای (*in vitro*)

تهیه گیاهچه از کشت بافت

جهت تهیه بافت برای کشت کالوس، از قسمت وسط برگ‌های پیچیده اطراف مریستم انتهایی واقع در سرنی استفاده شد. جهت

تهیه کالوس از کشت بافت، نمونه‌های بافت آماده شده درون محلول کلرور جیوه (۰/۷ گرم کلرور جیوه در ۱ لیتر آب مقطر به مدت ۱۵ دقیقه) ضدعفونی و سپس به حلقه‌هایی به قطر۷-۵ میلی‌متر تقسیم شدند و به محیط کشت MS حاوی ۳-۲ میلی‌گرم در لیتر هورمون 2,4-D انتقال یافتند. تشتک‌های پتری در دمای ۲۵ °C در شرایط تاریکی نگه‌داری شدند. جهت باززایی بافت کالوس تهیه شده، کالوس‌ها به قطعات ۶-۳ میلی‌متری تقسیم و به محیط کشت MS حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP (Taylor & Dukic 1993) انتقال یافتند. تشتک‌های پتری در شرایط روشنایی با نور سفید به طور مداوم در دمای ۲۵ °C نگه‌داری شدند. به منظور رشد گیاهچه از توده باززایی شده کالوس، ابتدا توده‌ی باززایی شده‌ی کالوس به لوله‌های حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت MS با هورمون BAP (Taylor & Dukic 1993) منتقل شدند و به مدت یک هفته در دمای ۲۵ °C و شرایط نور سفید به طور مداوم، نگه‌داری گردیدند. سپس توده‌های دارای گیاهچه‌های ۵-۲ میلی‌متری به محیط کشت MS مایع حاوی هورمونBAP انتقال یافتند.

تهیه‌ی مایه‌ی آلودگی

تلیوسپورهای قارچ سیاهک از شلاق‌های بوته‌های آلوده به سیاهک در منطقه خوزستان جمع‌آوری گردید. تلیوسپورها درون محلول آب مقطر سترون حاوی ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک سولفات استرپتوماسین به مدت دو ساعت نگه‌داری و سپس سوسپاسیون تلیوسپور، توسط لوپ سترون روی محیط کشت YGC(Yeast Glucose Chloramphenicol) کشیده شد. تشتک‌های پتری در شرایط تاریکی به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰-۲۸ °C نگه‌داری گردیدند. جهت تهیه کشت‌های تک‌اسپوریدیومی، از کشت ۲۴ ساعته تلیوسپورهای جوانه زده استفاده شد. بدین منظور ۱ میلی‌لیتر آب مقطر سترون به تشتک‌های پتری اضافه و تکان داده شدند. سوسپانسیون حاصل، توسط لوپ سترون روی محیط کشت YGC پخش گردید. تشتک‌های پتری به مدت ۴۸ ساعت در شرایط تاریکی و دمای ۳۰-۲۸ °C، نگه‌داری شدند. پس از ۴۸ ساعت از هر تک کلونی تولید شده به صورت مجزا توسط لوپ سترون برداشته و روی محیط کشت YGCپخش شد. تشتک‌های پتری به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰-۲۸ °C در شرایط تاریکی نگه‌داری گردیدند. به منظور تعیین نوع تیپ آمیزشی کشت‌های تک‌اسپوریدیومی، به صورت دو به دو روی محیط کشت YGC با هم تلاقی داده شدند. وجود میسلیوم سفید رنگ و برافراشته در محل تلاقی نشان دهنده وجود دو تیپ جنسی مخالف بود و به صورت تصادفی یکی مثبت و دیگری منفی در نظر گرفته شد.

برای تهیه میسلیوم دو هسته‌ای، سوسپانسیونی از مخلوط دو تیپ آمیزشی به صورت مساوی روی محیط کشت YGC پخش گردید. تشتک‌های پتری در دمای ۳۰-۲۸ °C به مدت ۴۸ ساعت در شرایط تاریکی نگه‌داری شدند.

مایه‌زنی گیاهچه‌ها

جهت مایه‌زنی گیاهچه‌ها ازمخلوطی از هر دو تیپ آمیزشی اسپوریدیوم به نسبت مساوی ۱:۱ و میسیلیوم دو هسته‌ای به دست آمده از مخلوط دو تیپ آمیزشی روی محیط کشت استفاده شد. نوک گیاهچه‌ها توسط تیغ اسکالپل از ۳-۵ میلی‌متر بالای مریستم انتهایی قطع گردید، سپس توسط سرنگ هامیلتون ۷ میکرولیتر از مایه آلودگی در قسمت بالای مریستم انتهایی قرار داده شد. برای گیاهان شاهد از مایه‌زنی گیاهچه‌ها توسط ۷ میکرولیتر آب مقطر سترون استفاده شد. گیاهچه‌های مایه‌زنی شده با دو نوع مایه آلودگی و آب مقطر سترون از هر رقم که دارای یک پاجوش سالم (مایه‌زنی نشده) بودند به درون لوله‌های حاوی ۲۵ میلی لیتر محیط کشت MS بدون هورمون انتقال یافتند. لوله‌ها در اتاق رشد در شرایط دمایی ۲۵ °C و دوره‌ی نوری ۱۸ ساعته نگه‌داری گردیدند.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)

استخراج DNA به روش موری و تامسون(1980) برای نمونه گیاهچه‌های مایه‌زنی شده همراه با پاجوش در نقاط زیر نقطه

مایه‌زنی شده (a)، چند روز بعد از مایه‌زنی و رشد گیاه در بالای نقطه مایه‌زنی شده (b) و پاجوش‌ها (c) انجام گرفت. DNA استخراج شده از گیاهچه‌های مایه‌زنی شده، اسپوریدیوم قارچ و آب مقطر سترون برای ردیابی قارچ سیاهک *U. scitaminea* توسط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) گسترش داده شدند. مواد لازم برای هر واکنش ۲۵ میکرولیتری شامل ۲ میکرولیتر از DNA استخراج شده، ۰/۲۴µM از هر کدام از آغازگرهای bE4 (5'-CgCTCTggTTCATCAACg-3') و bE8 (5'-TgCTgTCgATggAAggTgT-3') (ساخت شرکت آلمانی TIB-Molbiol) که ژن مربوط به تیپ آمیزشی را در قارچ عامل سیاهک نیشکر تکثیر می‌کند، ۰/۲mM ازdNTPs، $MgCl_2$ ۰/۵ mM، ۱/۵ Unit/ µl آنزیم *Taq* DNA polymerase و برنامه چرخه حرارتی شامل ۳۰ چرخه از واسرشت در ۹۴ °C به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در ۵۷ °C به مدت ۳۰ ثانیه و گسترش در ۷۲ °C به مدت ۱ دقیقه در نظر گرفته شد. و در نهایت ۷ میکرولیتر از محصول PCR روی ژل آگاروز الکتروفورز شد. برای شاهد منفی از DNA گیاهان مایه‌زنی شده با آب مقطر سترون و نمونه‌ی آب مقطر سترون استفاده گردید.

نتیجه

کشت بافت

انتقال ریزنمونه‌ها به محیط کشت پایه‌ی MS حاوی هورمون 2,4-D سبب تحریک ریزنمونه‌ها به کال‌زایی گردید. ریزنمونه‌ها پس از ۴-۲ هفته تولید کالوس سفید تا کرم رنگ در قسمت بریده شده، در اطراف بافت ریزنمونه کردند. قطعات چند میلی‌متری کالوس بعد از ۴-۲ هفته نگه‌داری در محیط پایه MS با غلظت ۱میلی‌گرم در لیتر هورمون 2,4-D رشد کرده و اندازه‌ی این قطعات چند برابر گردید. انتقال بافت کالوس به محیط پایه‌ی MS به علاوه یک میلی‌گرم در لیتر هورمون BAP بعد از۲ تا ۴ هفته سبب باززایی و تمایز سلول‌های بافت کالوس و سبز شدن سلول‌های بافت کالوس گردید (شکل ۱).

جداسازی و خالص‌سازی پرگنه‌های مخمری و ریسه‌ای قارچ

تلیوسپورهای کشت شده روی محیط کشت پس از ۲۰ دقیقه شروع به جوانه‌زنی کردند. ۲۴ ساعت پس از کشت تلیوسپور روی محیط کشت YGC اکثر تلیوسپورها به صورت پرومیسلیوم و اسپوریدی جوانه‌زنی کردند (شکل ۲).

۴۸ ساعت پس از پخش سوسپانسیون تلیوسپور برروی محیط YGC، اسپوریدی‌ها جوانه زده و تولید پرگنه‌های مخمری کرم تا سفید رنگ و ریسه‌های سفید رنگ افراشته به صورت مخلوط بر روی محیط کردند (شکل ۳).

از پخش کردن هر کدام از پرگنه‌های مخمری تولید شده روی محیط کشت YGC یک کشت تک اسپوریدیوم به دست آمد که پس از ۴۸ ساعت نگه‌داری در دمای ۲۸ °C به صورت پرگنه‌های مخمری در سطح تشتک‌های پتری دیده می‌شد (شکل ۴).

۴۸ ساعت پس از کشت سوسپانسیون مخلوط پرگنه‌های مخمری دو تیپ آمیزشی (+و-)، ریسه‌های سفید رنگ و افراشته در محل تلاقی سوسپانسیون اسپوریدیوم، در سطح تشتک‌های پتری تشکیل شد (شکل ۵).

عکس‌العمل ارقام نسبت به بیماری در شرایط *In vivo*

آزمایش‌های مزرعه‌ای برای بررسی مقاومت و حساسیت ۱۱ رقم نیشکر در شرایط جغرافیایی ایران و در استان خوزستان نتایج زیر را نشان داد.

دو ماه پس از کشت قلمه‌ها در مزرعه، اولین علایم از ظهور شلاق در واریته SP70-1143 دیده شد. در کلیه ارقام مورد آزمایش، اوج ظهور آلودگی بعد از گذشت ۷ الی ۸ ماه از سن گیاه، در اردیبهشت ماه سال بعد مشاهده گردید. در بین ۱۱ رقم کشت شده، ارقام N56-1472 و L62-96 خیلی حساس (HS)، رقم CP76-331 حساس(S)، ارقام CL73-239 و NCO-310 نسبتاً حساس (MS)، ارقام CP57-614، CP82-1172، SP70-1143، و CP70-1143 نسبتاً مقاوم(MR) و ارقام CP78-1628 و

شکل ۱. رشد طولی گیاهچه‌های نیشکر حاصل از کشت بافت در محیط کشت نیمه جامد MS بدون هورمون.

Fig. 1. Longitudinal growth of tissue cultured sugarcane plantlets in semi-solid MS medium minus hormone.

شکل ۲. جوانه‌زنی تلیوسپور *Ustilago scitaminea* و تولید پرومیسلیوم و اسپوریدیوم‌های سیاهک نیشکر.

Fig. 2. Teliospore germination, formation of promycelium and sporidia of *Ustilago scitaminea* on YGC medium.

شکل ۳. تشکیل پرگنه‌های مخمری و ریسه‌ای *Ustilago scitaminea* روی محیط کشت YGC پس از ۴۸ ساعت.

Fig. 3. Formation of yeast-like and mycelial colonies of *Ustilago scitaminea* after 48 hrs on YGC medium.

شکل۴. پرگنه‌های مخمری سیاهک نیشکر حاصل از رشد تک اسپوریدیوم روی محیط کشت YGC پس از ۴۸ ساعت.

Fig. 4. Yeast-like colonies of sugarcane smut resulting from streaking a colony grown from single sporidium on YGC in 48 hrs at 28 °C.

شکل ۵. ریسه‌های حاصل از کشت مخلوط دو تیپ آمیزشی مخالف سیاهک نیشکر روی محیط کشت YGC پس از ۴۸ ساعت.

Fig. 5. White erect hyphae obtained from culture of sporidial suspension of two opposite (+ &-) mating types of *Ustilago scitaminea* after 48 hrs on YGC medium.

CP73-21 مقاوم (R) بودند. در ارقام مقاوم هیچ‌گونه علایمی مشاهده نشد و درصد بیماری صفر بود (جدول۱).

اختصاصیت واکنش PCR

آغازگرهای bE4 و bE8 (Schenck 1998) یک قطعه bp ۴۵۹، از DNA را در دمای اتصال ۵۷°C در تمامی نمونه‌های بافت گیاهچه، که DNA قارچ *U. scitaminea* را همراه داشتند و نمونه DNA قارچ استخراج شده از اسپوریدیوم‌ها را به طور اختصاصی ردیابی کرد. این قطعه از DNA در گیاهان شاهد مایه‌زنی شده با آب مقطر سترون و نمونه آب مقطر سترون – که به عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شده بود – با همان شرایط PCR تکثیر پیدا نکرد. از ۱۸ ساعت تا ۱ماه بعد از مایه‌زنی گیاهچه‌ها، قطعه bp ۴۵۹ DNA قارچ در همه گیاهان مایه‌زنی شده در شرایط یکسان واکنش PCR تشخیص داده شد. در گیاهان شاهد هیچ قطعه‌ای تکثیر پیدا نکرد و ردیابی نشد.

ردیابی قارچ عامل سیاهک نیشکر در گیاهچه‌های مایه‌زنی شده توسط PCR

به منظور ردیابی سیاهک در گیاهچه‌های مایه‌زنی شده با اسپوریدیوم، از گیاهچه‌های مایه‌زنی شده با آب مقطر سترون، برای همه ارقام به عنوان شاهد منفی استفاده گردید. آزمون PCR برای DNA استخراج شده از تمامی قسمت‌های گیاهچه‌های مایه‌زنی شده با تیپ آمیزشی مثبت و تیپ آمیزشی منفی از اسپوریدیوم، گیاهچه‌های مایه‌زنی شده با سوسپانسیون مخلوط دو تیپ آمیزشی(مثبت و منفی) اسپوریدی، با نسبت ۱:۱، در زمان‌های مختلف ۱۸ ساعت، ۳روز، یک هفته، دوهفته و یک ماه پس از مایه‌زنی پاسخ مثبت را نشان داد (شکل ۶).

در این تحقیق علاوه بر مایه‌زنی توسط اسپوریدیوم، مایه‌زنی گیاهچه‌ها توسط میسلیوم دو هسته‌ای نیز انجام گرفت. جهت ردیابی سیاهک در گیاهچه‌های مایه‌زنی شده با میسلیوم دو هسته‌ای نیز گیاهچه‌های مایه‌زنی شده با آب، برای همه ارقام به عنوان شاهد منفی استفاده گردید. آزمون PCR برای DNA استخراج شده از تمامی قسمت‌های گیاهچه‌های ارقام مورد آزمایش مایه‌زنی شده با میسلیوم دو هسته‌ای ، در زمان‌های مختلف ۱۸ ساعت، ۳ روز، ۱ هفته، ۲ هفته و ۱ ماه پس از مایه‌زنی پاسخ مثبت را نشان داد (شکل ۷).

این آزمون برای DNA استخراج شده از تمامی قسمت‌های گیاهچه‌های مایه‌زنی شده با آب مقطر سترون در شرایط واکنش PCR یکسان با گیاهچه‌های مایه‌زنی شده توسط قارچ، پاسخ

جدول ۱. درصد بیماری ناشی از سیاهک و نرخ بیماری ۱۱رقم نیشکر کشت شده در مزرعه

Table 1. Disease Percentag of 11 sugarcane cvs to *Ustilago scitaminea* in the field nine months after inoculation of cuttings with sporidial suspension.

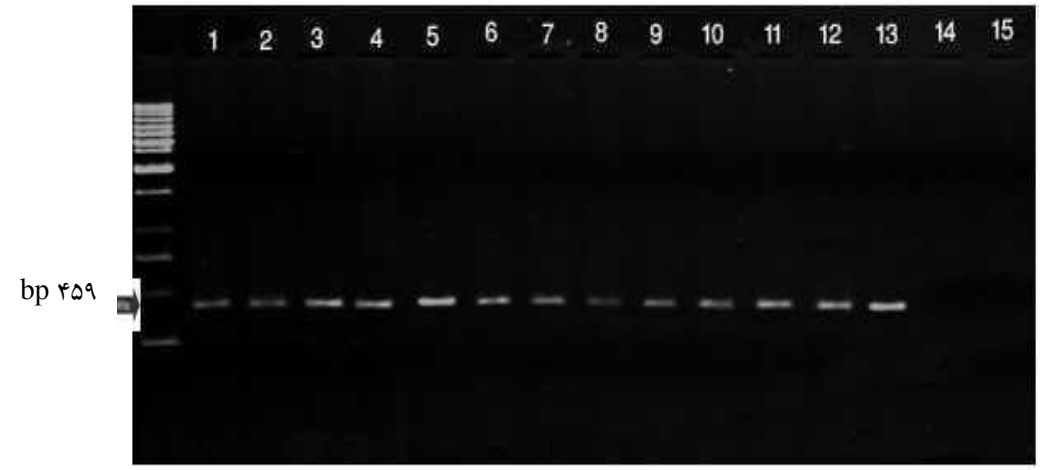
نام رقم cv.	تعداد بوته‌ی سبز شده No. cuttings	تعداد بوته‌ی آلوده No. infected cuttings	درصد بیماری Disease incidence (%)	نرخ بیماری Disease rate
CP57-614	39	3	7.8	3 (MR)
SP701143	65	1	1.53	3 (MR)
CP82-1172	17	1	5.88	3 (MR)
L62-96	77	26	33.76	9 (HS)
NCO-310	58	10	17.3	5 (MS)
CP70-1143	36	2	5.6	3 (MR)
N56-1472	58	25	43.1	9 (HS)
CL73-239	44	7	15.9	5 (MS)
CP73-21	76	0	0	1 (R)
CP76-331	72	18	25	7 (S)
CP78-1628	79	0	0	1 (R)

منفی را نشان داد و نتایج الکتروفورز تکثیر هیچ باندی را نشان نداد. ژن مربوط به تیپ آمیزشی (bE) قارچ *U. scitaminea* به طور ۱۰۰٪ در همه نمونه‌های DNA استخراج شده از گیاهچه‌ها در زیر نقطه مایه‌زنی شده (a)، چند روز بعد از مایه‌زنی و رشد گیاه در بالای نقطه مایه‌زنی شده (b) و پاجوش‌ها (c) ردیابی شد.

بحث

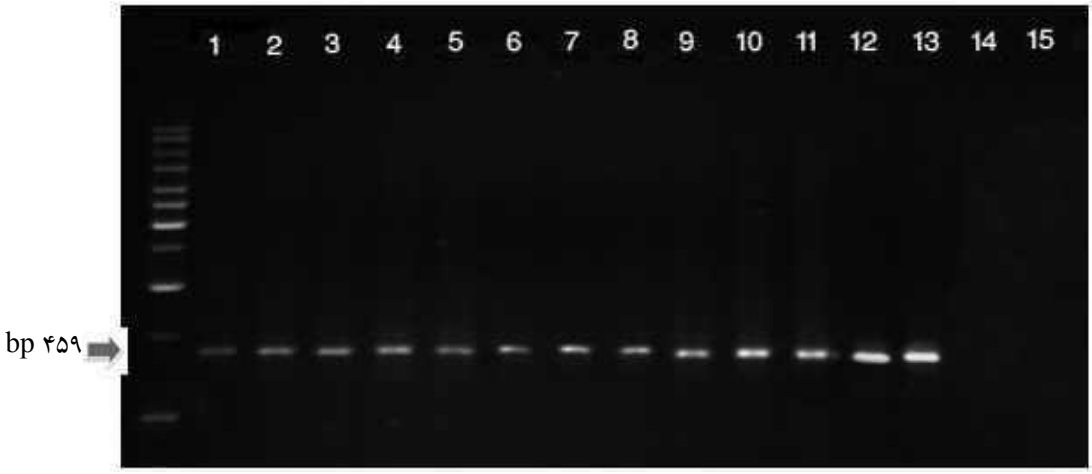
نتایج حاصل از آزمایش‌های مزرعه‌ای برای بررسی عکس‌العمل ارقام مختلف نسبت به سیاهک نشان داد که میزان ۳۳/۷۶ درصد از بوته‌های رقم حساس L62-96 و ۱۵/۹ درصد از بوته‌های نیمه حساس CL73-239 شلاق تولید کردند. رقم CP73-21 هیچ گونه علایمی را تولید نکرد. در صورتی که DNA قارچ در تمامی قسمت‌های گیاهچه و پاجوش گیاهچه‌های مایه‌زنی شده توسط اسپوریدیوم و میسلیوم دوجورهسته در این ارقام با استفاده از روش مولکولی PCR ردیابی گردید. نتایج حاصل از این مطالعه، نتایج *سینک و همکاران* (2004) را تأیید می‌کند. فاوست نیز در سال ۱۹۴۴ اظهار داشت که قارچ عامل بیماری توانایی حرکت از یک جوانه به سایر نقاط گیاه را دارد (Fawcett 1944). با توجه به نتایج به دست آمده چنین نتیجه‌گیری می‌شود که قارچ عامل سیاهک نیشکر پس از رخنه به گیاه در همه ارقام نیشکر می‌تواند به صورت سیستمیک در گیاه و پاجوش‌های مرتبط با گیاه وجود داشته باشد.

از آنجایی که مقاومت در گیاهان می‌تواند به وسیله یک یا چند ژن کنترل شود (Parlevliet 1979) و القای مقاومت در مراحل اولیه حمله‌ی پاتوژن به گیاه در ارقام مقاوم (Thokoane & Rutherford 2001) و در ارقام حساس (Lioyd & Pilly 1981) به اثبات رسیده است؛ بنابراین با توجه به نتایج به دست آمده توسط آزمون PCR و اثبات وجود بیمارگر در ارقام حساس و مقاوم نیشکر، می‌توان چنین فرض کرد که اگر چه شکل‌های اولیه مقاومت در ارقام مقاوم و حساس وجود دارند؛ ولی این شکل از مقاومت می‌تواند توسط بیمارگر در ارقام



شکل ۶. تکثیر باند bp ۴۵۹از قارچ سیاهک نیشکر در گیاهچه‌های مایه‌زنی شده با اسپوریدی قارچ. ۱-۴: ناحیه a ۵-۸: ناحیه b ،۹-۱۲: ناحیه c, ۱۳: اسپوریدی، ۱۴: گیاهچه‌های شاهد مایه‌زنی شده با آب مقطر، ۱۵: آب مقطر سترون.

Fig. 6. Amplification of 459 bp band in plantlets inoculated with sporidia of *Ustilago scitaminea* using primer pair bE4/bE8. DNA was extracted from (lanes 1 to4) tissue below the point of inoculation; (lanes 5to8) tissue above the point of inoculation; (lanes 9 to12) tissue from suckers; (lane 13) sporidia; (lane 14) plantlets inoculated with distilled water; (control); (lane 15) negative control (H2O).



شکل ۷. تکثیر باند bp ۴۹۵ از قارچ سیاهک نیشکر در گیاهچه‌های مایه‌زنی شده با ریسه دیکاریوتیک با استفاده از جفت آغازگر bE4/bE8 . ۱-۴: ناحیه a ۵-۸: ناحیه b ،۹-۱۲: ناحیه c, ۱۳: ریسه دیکاریوتیک، ۱۴: گیاهچه‌های شاهد مایه‌زنی شده با آب مقطر، ۱۵: آب مقطر سترون.

Fig. 7. Electrophoretic pattern of PCR product obtained from plantlets inoculated with dikaryotic hyphae of *Ustilago scitaminea* using primer pair bE4/bE8. Lanes 1to 4, tissue below the point of inoculation; lanes 5 to8, tissue above the point of inoculation; lanes 9to 12, tissue from suckers; lane 13, dikaryotic mycelium; lane 14, control (plantlets inoc ulated with distilled water); lane 15, negative control- H2O.

مختلف حساس و مقاوم نیشکر مغلوب شوند و شکل‌های بعدی مقاومت نسبت به اسپورزایی در ارقام مقاوم می‌توانند عمل کنند و از تشکیل شلاق جلوگیری کنند. این شکل از مقاومت در گیاهان ارقام حساس و نیمه‌حساس هم وجود دارد؛ زیرا در آزمایش‌های مزرعه‌ای تولید شلاق در همه بوته‌های هر رقم مشاهده نگردید.

با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق از روش ردیابی قارچ در گیاه نمی‌توان برای بررسی مقاومت و حساسیت ارقام مختلف نیشکر استفاده کرد؛ زیرا آزمون PCR با حساسیت و دقت بالا، توانست بیمارگر را در همه

ارقام حساس تا مقاوم و حتی در پاجوش‌های این ارقام، ۱۸ ساعت پس از مایه‌زنی ردیابی کند.

سپاسگزاری

بخشی از این تحقیق در مرکز تحقیقات نیشکر شرکت توسعه نیشکر و صنایع جانبی انجام شد که به این وسیله تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (38-37) متن انگلیسی مراجعه می‌شود.