شناسایی جمعیت‌های ایرانی *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* با استفاده از مطالعات ریخت‌شناسی، مولکولی و بیماری‌زایی*

IDENTIFICATION OF IRANIAN POPULATIONS OF *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* USING MORPHOLOGICAL, MOLECULAR AND PATHOLOGICAL STUDIES

لیلا صادقی[۱]، عزیزاله علیزاده[۱]، ناصر صفایی[۱**] و مجتبی قلندر[۲]

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۲/۶؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۵/۲۶)

چکیده

گونه‌های مختلف *Gaeumannomyces* به ویژه *Gaeumannomyces graminis* از مهم‌ترین قارچ‌های بیماری‌زای خاک‌زاد هستند که باعث بروز بیماری خطرناک پاخوره یا پاسوزه غلات و سایر گندمیان در سراسر دنیا می‌شوند. در این تحقیق ۵۲ جدایه بیماری‌زا *G. graminis* از مناطق مختلف مزارع گندم استان‌های تهران، مرکزی، مازندران، گلستان و فارس در دو فصل زراعی۸۵-۱۳۸۴ جمع‌آوری، جدا و خالص‌سازی شد. در آزمون بیماری‌زایی تمام جدایه‌ها روی گندم بیماری‌زا بودند ولی تنها ۱۰ جدایه از این میان روی یولاف نیز بیماری‌زا بودند. شدت بیماری‌زایی بین جدایه‌ها و قدرت بیماری‌زایی در دو میزبان گندم و یولاف تفاوت معنی‌داری نشان دادند. شدت بیماری‌زایی در ۶۴ درصد از جدایه‌ها روی گیاهچه‌های گندم بیش از ۶۰ درصد برآورد شد. همه جدایه‌ها به استثنای یک جدایه از نقش‌رستم استان فارس پاهای ریسه‌ای (ریسه های رونده) ساده تولید کردند. دامنه تغییرات طول آسکوسپور جدایه‌ها در آزمون بیماری‌زایی گندم ۸۶-۶۷ میکرومتر و در یولاف ۸۱-۶۶ میکرومتر متغیر بود. عامل بیماری *G. graminis* (Sacc.) Arx & Olivier var. *tritici* Walker تشخیص داده شد. به طور متوسط میزان رشد جدایه‌ها روی محیط کشت PDA در ۲۵°C، ۵/۳۵-۱/۸۱ میلی‌متر در روز متغیر بود. هم‌بستگی معنی‌داری بین سرعت رشد و قدرت بیماری‌زایی جدایه‌ها در گندم مشاهده نشد. برای تشخیص دقیق‌تر بیمارگر از آغازگرهای اختصاصی استفاده شد. این آغازگرها با تکثیر دو قطعه اختصاصی ۹۳ و ۱۳۲ جفت بازی، علاوه بر این‌که ۵۲ جدایه *G. graminis* را واریته *G. graminis* var. *tritici* تشخیص دادند، آنها را به دو تیپ A و B تفکیک کردند که ۴۹ جدایه با تکثیر قطعه ۹۳ جفت بازی متعلق به تیپ A و سه جدایه با تکثیر قطعه ۱۳۲ جفت بازی متعلق به تیپ B بودند. این آغازگرها در واریته *G. graminis* var. *graminis* و *Magnaporthe grisea* هیچ قطعه‌ای را تکثیر ننمودند.

واژه‌های کلیدی: گندم، یولاف، *Gaeumannomyces graminis*، ریخت‌شناسی، بیماری‌زایی، آغازگرهای اختصاصی

---

* : بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول ارائه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

**: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: nsafaie@modares.ac.ir

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

۲. مربی پژوهشی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان مرکزی، اراک

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

قارچ *Gaeumannomyces graminis* از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای خاک‌زاد می‌باشد که باعث بروز بیماری خطرناک پاخوره یا پاسوزه (take-all) در تمام مناطق گندم‌خیز دنیا می‌شود (Asher & Shipton 1981, Cook & Rovira 1976). گونه *G. graminis* مهم‌ترین گونه جنس *Gaeumannomyces* است که به غلات و سایر گرامینه‌ها حمله می‌کند. در میان غلات، گندم بیشتر از جو و جو بیش از چاودار به بیماری حساسیت نشان می‌دهد (Gutteridge *et al*. 1993). بنابر اظهارات *ترولدنیر* (Trolldenier 1981)، این بیماری پس از زنگ سیاه، دومین بیماری مخرب گندم در جهان است. بیماری اولین بار در ایران از گرگان و مازندران گزارش گردید (Forutan *et al*. 1989). از این گونه چهار واریته شناسایی شده که براساس دامنه میزبانی، بیماری‌زایی، اندازه آسکوسپور و نوع ریسه های رونده از هم تفکیک می‌شوند. واریته (Ggt) *G. graminis* (Sacc.) Arx & Olivier var. *tritici* Walker عامل اصلی پاخوره گندم (*Triticum aestivum* L.) چاودار (*Secale cereale* L.) و جو (*Hordeum vulgare* L.) و مهم‌ترین بیمارگر مجموعه عوامل *Gaeumannomyces-Phialophora* می‌باشد. واریته *G. graminis* (E. M. Tuurner) Dennis var. *avenae* (Gga) به یولاف (*Avena sativa* L.) حمله کرده و عامل پاخوره روی سایر گرامینه‌ها نیز می‌باشد. واریته *G. graminis* var. *graminis* (Ggg) روی مرغ (*Cynodon* sp.) و عامل پوسیدگی قهوه‌ای برنج (*Oryza sativa* L.) می‌باشد اما روی گندم بیماری‌زایی ضعیفی داشته و یا غیربیماری‌زاست. واریته *G. graminis* var. *maydis* (Ggm) عامل پاخوره ذرت است ولی آلودگی جزئی روی سایر غلات می‌تواند ایجاد کند (Deacon 1981, Freeman & Ward 2004). واریته‌های Ggt و Gga دارای ریسه های رونده ساده هستند و واریته Ggg ریسه های رونده لب‌دار دارد. روش مرسوم تشخیص بررسی‌های میکروسکوپی و آزمون بیماری‌زایی می‌باشد (Clarkson & Polley 1981, Mathere 1992). بعضی از این ویژگی‌ها هم‌پوشانی دارند و شناسایی گونه و واریته را سخت و غیرقطعی می‌کند. شناسایی متعارف براساس بیماری‌زایی گاهی غیراختصاصی و وقت‌گیر است. جدایه‌های Ggt با وجود تشابه ریخت‌شناسی که اساساً روی گندم بیماری‌زا هستند به زیر گروه‌هایی که نمی‌توانند به چاودار حمله کنند و آنهایی که روی چاودار بیماری‌زا هستند، تقسیم می‌شوند (Hollins & Scott 1990). این سازگاری مربوط به جدایه‌های Gga است که علاوه بر آلودگی یولاف قادر به آلوده کردن چاودار و گندم می‌باشند. در حالی که غالب جدایه‌های Ggt قادر به آلوده کردن یولاف نیستند (Ward & Gray 1992). پاخوره گندم یک بیماری ویرانگر بوده و کنترل آن مشکل است. یکی از پیش‌نیازهای مبارزه با این بیماری روش دقیق و سریع برای شناسایی عامل بیماری می‌باشد. در چند سال گذشته به روش‌های سریع و شناسایی اختصاصی *G. graminis* بخصوص Ggt برای جایگزین کردن روش‌های کلاسیک و قدیمی آزمایشگاهی توجه خاصی شده است (Rachdawong *et al*. 2002).

خسارت بیماری پاخوره در ایران برآورد نشده، اما در بعضی مناطق کشور، این بیماری به عنوان مهم‌ترین بیماری گندم گزارش شده است (Ghalandar 2000). این بیماری مهم‌ترین بیماری ریشه در مزارع استان مرکزی با درصد پراکنش ۱۲/۵، ۱۱/۵ و ۹/۴ به ترتیب از شهرستان‌های شازند، اراک و خمین گزارش شده است (Ghalandar 2000). با وجود خسارت نسبتاً قابل توجه این قارچ در انهدام مزارع گندم، تاکنون شناسایی مولکولی و میزان تنوع جمعیت Ggt از نظر ریخت‌شناسی و بیماری‌زایی آن در ایران مطالعه دقیق صورت نگرفته است و بیماری‌زا بودن برخی از جدایه‌های Ggt روی یولاف در تحقیقات سایر محققین (Yeates *et al*. 1986, Ward & Akrofi 1994, Bryan *et al*. 1995) و تعلق این جدایه‌ها به Gga در ایران همچنان مورد سؤال می‌باشد. ضرورت تحقیق در مورد خصوصیات جدایه‌های ایرانی عامل پاخوره گندم کاملاً محسوس است. هدف از این پژوهش مطالعه بررسی خصوصیات ریخت‌شناسی و بیماری‌زایی جدایه‌ها روی دو

Archive of SID

www.SID.ir

میزبان گندم و یولاف در جمعیت Ggt و تشخیص مولکولی آنها در ایران است.

روش بررسی

نمونه‌برداری و جداسازی عامل بیماری

در طی فصل‌های زراعی ۱۳۸۴ و ۱۳۸۵ از مزارع گندم مناطق مختلف کشور، شامل استان‌های آذربایجان‌شرقی، آذربایجان‌غربی، اردبیل، اصفهان، قزوین، گلستان، مازندران، مرکزی و همدان نمونه‌های گیاهی مشکوک به آلودگی عامل پاخوره گندم از خاک خارج و به منظور ممانعت از خشک شدن نمونه‌ها درون پاکت‌های کاغذی قرار داده شدند و در اسرع وقت برای جداسازی عامل بیماری به آزمایشگاه قارچ‌شناسی منتقل شدند.

جداسازی عامل بیماری

قسمت‌های آلوده میزبان شامل: ساقه، طوقه، میان گره زیر طوقه، ریشه‌های تاجی و ریشه‌های بذری که دارای علائم پوسیدگی و سیاه‌شدگی بودند، برای جدا نمودن بیمارگر ابتدا تحت جریان ملایم آب شستشو داده شد تا ذرات خاک چسبیده به بافت جدا گردد. سپس این بافت‌ها در آب مقطر سترون شستشو و پس از خشک شدن آنها روی کاغذ صافی، قطعاتی به طول ۱-۰/۵ سانتی‌متر از حد فاصل بافت آلوده و سالم جدا شدند. برای ضدعفونی سطحی در محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۰۵ درصد به مدت ۳-۲ دقیقه با توجه به نوع بافت قرار داده شد. سپس سه بار با آب مقطر سترون شستشو داده شدند و با کاغذ صافی سترون قطعات خشک و حدود ۲۰-۱۵ قطعه روی محیط کشت سیب‌زمینی- دکستروز- آگار حاوی آنتی‌بیوتیک‌های ریفامپیسین و سولفات استرپتومایسین به ترتیب با مقادیر۰/۰۱ و ۰/۱ میلی‌گرم به منظور جلوگیری از رشد باکتری‌ها، کشت شدند. کشت‌ها در انکوباتور در ۲۰°C به مدت دو تا سه روز نگهداری و سپس از نوک ریسه واقع در حاشیه پرگنه قارچ برداشته و به محیط کشت سیب‌زمینی- دکستروز- آگار منتقل شد (Hornby *et al*. 1998).

تولید پریتسیوم

برای تولید پریتسیوم از محیط کشت حاوی بذر جوانه زده گندم، عصاره برگ گندم ـ آگار(WLA)، محیط گلوکز ـ آسپاراژین ـ آگار(GAA)، محیط عصاره مالت ـ پپتون ـ آگار(MPA) و محیط آگار مغذی حاوی برگ گندم و غلاف سویا استفاده شد (Crozier *et al*. 1999, Singleton *et al*. 1992). تمام جدایه‌ها در سه تکرار در این محیط کشت‌ها تلقیح و در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در ۲۰°C به مدت ۸- ۶ هفته در اتاقک رشد نگه‌داری شدند. همچنین از ریشه‌ها و طوقه گیاهچه‌های آلوده در آزمون بیماریزایی برای تولید پریتسیوم استفاده شد (Hornby *et al*. 1998). در جدایه‌هایی که پریتسیوم بالغ تولید کردند به طور تصادفی برای هر جدایه سه پریتسیوم انتخاب و سه اسلاید تهیه و سپس ابعاد پریتسیوم‌ها و طول و عرض ۹۰ آسکوسپور با خط‌کش چشمی اندازه‌گیری شد.

تشخیص گونه و واریته

تشخیص گونه جدایه‌های *Gaeumannomyces* پس از نوک ریسه کردن براساس بررسی و مقایسه خصوصیات ریخت‌شناسی از قبیل نحوه رشد پرگنه قارچ، سرعت رشد، اندازه ابعاد و شکل پریتسیوم، آسک، آسکوسپورها، تولید فیالید و فیالوسپور، کشت روی محیط نیمه انتخابی Rifampicin-PDA (عصاره سیب‌زمینی ۴۰ میلی‌لیتر، ۴ گرم دکستروز و ۱۵ گرم آگار به ازای یک لیتر و ۰/۰۱ میلی‌گرم ریفامپیسین)، هم‌چنین شناسایی در حد واریته براساس نوع ریسه های رونده قارچ، رشد روی محیط کشت حاوی سیستئین (محیط کشت PDA به عنوان محیط پایه، اسیدآمینه سیستئین به میزان ۰/۱ گرم، این محیط کشت به منظور تشخیص قارچ Ggt از Gga می‌باشد)، اندازه‌گیری طول آسکوسپور و آزمون بیماری‌زایی روی گندم و یولاف انجام شد(Gutteridge *et al*. 1993, Duffy & Weller 1994, Hornby *et al*. 1998, Freeman & Ward 2004).

Archive of SID

www.SID.ir

آزمون بیماری‌زایی

این آزمون در لوله‌های آزمایش به ارتفاع ۲۲ سانتی‌متر و قطر دهانه ۲/۵ سانتی‌متر که تا ارتفاع ۱۰ سانتی‌متری از خاک لومی- رسی پر شده بود، انجام شد. دهانه لوله‌ها با پنبه مسدود و در اتوکلاو در سه نوبت به فاصله ۲۴ ساعت به مدت ۳۰ دقیقه سترون شد. سپس تحت شرایط سترون قطعاتی به قطر ۲ سانتی‌متر از حاشیه کشت جوان هر جدایه برداشته و درون لوله‌های فوق قرار داده شد. پس از ریختن خاک سترون روی آنها، دو عدد بذر جوانه‌زده گندم رقم الوند و دو عدد بذر جوانه‌زده یولاف درون لوله‌ها کشت گردید. بذرهای جوانه‌زده به وسیله خاک سترون به ارتفاع یک سانتی‌متر پوشانده شد. سپس لوله‌ها به اتاقک رشد در ۱۸°C تا ۲۵ با شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی منتقل و در زمان‌های خاصی آب مورد نیاز جهت رشد بذرها تأمین شد. در طول مدت آزمایش هیچ گونه ماده غذایی به لوله‌ها افزوده نشد. پس از گذشت چهار هفته، گیاهچه‌ها به آرامی از درون لوله‌ها خارج و خاک ریشه‌ها توسط آب روان شستشو داده شد. علایم بیماری از اندام هوایی و علائم سیاه شدگی روی ریشه‌های بذری و طوقه به دقت بررسی و یادداشت برداری شد. جداسازی قارچ عامل بیماری مجدداً از ریشه‌های آلوده صورت گرفت. هم‌چنین به منظور تعیین میزان پرآزاری جدایه‌ها شدت آلودگی ریشه‌ها با سیستم رتبه‌بندی از صفر تا ۵ درجه‌بندی گردید، به طوری‌که درجه صفر نماینده ریشه کاملاً سالم و بدون زخم و لکه؛ درجه‌های ۱ تا ۵ به ترتیب کمتر از ۱۰٪، ۱۱- ۲۵ درصد، ۲۶ تا ۵۰ درصد، ۵۱ تا ۷۵ درصد و ۷۶ تا ۱۰۰ درصد سیستم ریشه آلوده است (Schoeny *et al*. 1998). طرح آزمایش پایه مورد استفاده در این آزمون طرح کاملاً تصادفی (CRD) و برای هر جدایه مورد بررسی در گندم و یولاف سه تکرار و سه شاهد در نظر گرفته شد. این آزمایش‌ها دو بار تکرار شدند. محاسبات آماری این آزمون با کمک نرم‌افزار MSTATC انجام گرفت و گروه‌بندی تیمارهای آزمایشی شاخص شدت بیماری‌زایی در بین جدایه‌ها و میزبان‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن (DMRT) و تجزیه واریانس شدت بیماری‌زایی بین جدایه‌ها در دو میزبان گندم و یولاف با آزمون ANOVA یک طرفه صورت گرفت.

شناسایی مولکولی جدایه‌ها با استفاده از آغازگرهای اختصاصی

برای تکثیر میسلیوم یک قرص از حاشیه فعال پرگنه هر جدایه به بطری‌های کشت بافت حاوی ۵ گرم گلوکز، ۱ گرم عصاره مخمر و یک لیتر آب مقطر سترون منتقل شد. بطری‌های مایه‌زنی شده به مدت۷ تا ۹ روز در ۲۲°C روی دستگاه شیکر با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه قرار گرفتند (Weber *et al*. 2005). سپس با استفاده از پمپ خلاء، قیف بوخنر و کاغذ صافی تمیز، محیط مایع و حلقه‌های آگار محیط جامد، از میسلیوم خالص هر جدایه جدا گردید و میسلیوم به دست آمده دوبار با آب مقطر سترون شسته شده و سپس به کمک کاغذ صافی سترون کاملاً آبگیری گردید و به درون لوله‌های ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شد. این لوله‌ها در فریزر ۷۰°C- برای استخراج DNA نگه‌داری شدند. میسلیوم منجمد شده هر یک از جدایه‌ها (حدود نیم گرم) درون هاون چینی با نیتروژن مایع به پودر نرمی تبدیل گردیده و استخراج DNA با روش *صفایی و همکاران* (Safaie *et al*. 2005) انجام شد.

از سه آغازگر ویژه این قارچ به نام‌های Ggtfwd، GgtArev و GgtBrev2 استفاده شد. دو آغازگر Ggtfwd و GgtArev از ناحیه ITS2 از DNA ریبوزومی و آغازگر GgtBrev2 از ناحیه بین ITS2 و زیر واحد بزرگ ژن rRNA توسط *فریمن و همکاران* (Freeman *et al*. 2005) طراحی شده است. توالی نوکلئوتیدی آنها به صورت GgtFwd: 5'- AAG AAC ATC GGC GGT CTC GCC، GgtArev: 5'- TAG CGG CTG GAG CCC GCC G و GgtBrev2: 5'- CTA CCT GAT CCG AGG TCA ACC TAA GC است. آغازگرها توسط شرکت سیناژن ساخته شدند. تکثیر DNA در

Archive of SID

www.SID.ir

حجمی معادل ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر آب دیونیزه، ۲ میکرولیتر بافر PCR ۱۰ برابر، ۰/۶ میکرولیتر محلول حاوی ۵۰ میلی مولار $MgCl_2$، ۰/۴ میکرولیتر از محلول ۱۰ میلی مول dNTPs حاوی ۲/۵ میلی مول از هر یک از dNTPs، ۰/۵ میکرولیتر محلول حاوی پنج واحد آنزیم *Taq* DNA polymerase در هر میکرولیتر، به ازای هر یک از آغازگرها ۱ میکرولیتر از محلول ۰/۲ میکرومولار و یک میکرولیتر محلول حاوی مقدار تقریبی ۵۰ نانوگرم از DNA الگو صورت گرفت. کلیه مواد به کار رفته در مخلوط PCR از شرکت سیناژن تهیه شد. چرخه حرارتی شامل ۹۴°C واسرشته کردن اولیه، دو دقیقه؛ سپس ۳۵ چرخه شامل ۹۴°C واسرشته کردن، یک دقیقه؛ ۷۲°C دو دقیقه برای اتصال و بسط و ۷۲°C ده دقیقه برای بسط نهایی در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf, Germany) انجام شد. برای مشاهده محصول PCR و ردیابی قطعات DNA ریبوزومی تکثیر شده، الکتروفورز با ژل آگارز ۱/۵ درصد انجام گرفت. جهت تخمین اندازه قطعات تکثیر شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، از نشانگر اندازه ۵۰ جفت بازی استفاده شد.

نتیجه

جداسازی و ریخت‌شناسی

براساس نمونه‌برداری‌هایی که در فصل‌های زراعی ۸۵-۱۳۸۴ از استان‌های مختلف انجام گرفت، ۴۱ جدایه از استان‌های تهران، گلستان، مازندران و مرکزی از بافت طوقه، ریشه و ساقه جداسازی شد. از سایر استان‌ها جدایه‌ای به دست نیامد. اطلاعات مربوط به جدایه‌ها به همراه جدایه‌های دریافتی از سایر محققین در جدول ۱ ارائه شده است.

در جداسازی، اغلب جدایه‌ها از کشت ریشه و ساقه آلوده و در موارد کمتری از طوقه به دست آمدند. علاوه بر قارچ *G. graminis* قارچ‌هایی مانند فوزاریوم، رایزوکتونیا، ماکروفومینا، آلترناریا نیز جدا شد. علایم بیماری در مزرعه بسته به زمان آلودگی متفاوت می‌باشد، در بعضی مزارع با آلودگی بالا در مراحل اولیه رشد علایم بیماری به صورت کم رشدی، زردی کمرنگ برگ‌ها، تنک شدن مزرعه و کاهش پنجه‌ها مشاهده شد. در اوایل خرداد ماه در مزارع گندم استان‌های مازندران و مرکزی در مرحلهٔ ظهور سنبله علائم بیماری با رسیدن غیریک‌نواخت، زودرسی بوته‌های آلوده در مقایسه با بوته‌های سالم، سفید شدن سنبله‌های آلوده که در مزرعه به صورت لکه‌ای یا پراکنده نمایان شد. در گیاهان آلوده پوسیدگی ریشه و کاهش سیستم ریشه مشاهده گردید. این گیاهان به راحتی از خاک خارج شده و علائم سیاه شدگی به وضوح روی ریشه و در مزارع با رطوبت زیاد (ساری- دشت‌ناز) روی قاعده ساقه دیده شد. با بررسی دقیق ریشه‌های آلوده توسط میکروسکوپ تشریح، قهوه‌ای و سیاه شدن سیستم آوندی در ریشه‌ها مشخص بود. از خصوصیات منحصر به فرد این بیماری وجود ریسه‌های رونده تیره رنگ سطحی قارچ (شکل b-۱) روی ریشه، طوقه و روی غلاف پایین‌ترین برگ بود که به صورت دسته‌های ۴ تا ۶ تایی در کنار یکدیگر به صورت رشته‌های سیاه تا قهوه‌ای مشاهده شدند. ریسه‌های رونده دارای دیواره عرضی، ریسه‌های روشن باریک روی پوست و استوانه مرکزی که به هیفویودیوم قارچ منتهی می‌شود تولید می‌کند.

نتایج آزمایش‌های انجام شده نشان داد که از بین روش‌های مختلف برای تولید پریتسیوم بالغ، بالاترین میزان القاء تولید آن در محیط کشت حاوی بذر جوانه زده گندم (۱۴ جدایه) و قرار دادن بافت‌های آلوده در معرض نور (۳۰ جدایه) می‌باشد.

آسک‌ها به تعداد زیاد، تک لایه‌ای، چماقی بلند و متوسط ابعاد آنها ۱۲ – ۱۰ × ۱۱۰ – ۹۰ میکرومتر بودند. هر آسک حاوی هشت آسکوسپور نخی شکل به رنگ روشن با ۱۲-۳ دیواره عرضی مقداری خمیده و در انتها کمی گرد که به طرف پایه باریک و در قسمت وسط پهن‌تر بود. آسکوسپورها به هنگام خروج از پریتسیوم به صورت توده زرد رنگی بودند. ابعاد ساختارهای زایشی تشکیل شده در ۳۰ جدایه Ggt در جدول ۲ آورده شده است. با استفاده از روش (Crozier 1999) پس از یک هفته ریسه‌های رونده به فراوانی روی سطح بدون

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱. مشخصات جدایه‌های *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* عامل پاخوره گندم جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران

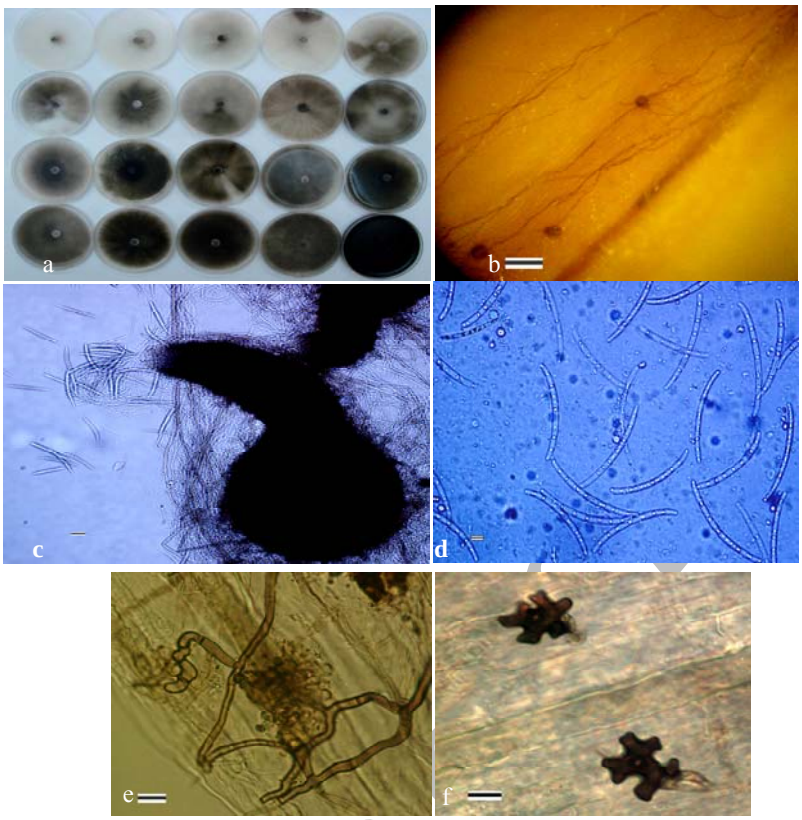
Table 1. *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* recovered from wheat in different regions of Iran

محل جمع‌آوری Location/	شماره جدایه‌ها Isolate No./	واریته Variety/	میزبان Host/
اراک (مرکزی) Arak (Markazi)	(T-2, T-3, T-4, T-52)	Ggt	گندم/ *T.aestivum*
شازند (مرکزی) Shazand (Markazi)	(T-6, T-11, T-12, T-13, T-14, T-15)	Ggt	گندم/ *T.aestivum*
خبیحان (مرکزی) Khabihan (Markazi)	(T-7)	Ggt	گندم/ *T.aestivum*
خنداب (مرکزی) Khandab (Markazi)	(T-8, T-48)	Ggt	گندم/ *T.aestivum*
خمین (مرکزی) Khomein (Markazi)	(T-50, T-51)	Ggt	گندم/ *T.aestivum*
ساوه (مرکزی) Saveh (Markazi)	(T-10, T-16, T-17, T-18, T-19, T-43, T-46)	Ggt	گندم/ *T.aestivum*
توره (مرکزی) Tureh (Markazi)	(T-5)	Ggt	گندم/ *T.aestivum*
آستانه امامزاده (مرکزی) Astaneh-emamzadeh (Markazi)	(T-9)	Ggt	گندم/ *T.aestivum*
دشت سراء (مرکزی) Dashte sarae (Markazi)	(T-49)	Ggt	گندم/ *T.aestivum*
قره کهریز (مرکزی) Ghrah-kahriz (Markazi)	(T-47)	Ggt	گندم/ *T.aestivum*
کربال (فارس) Karbal (Fars)	(T-20, T-21)	Ggt	گندم/ *T.aestivum*
مرودشت (فارس)[۱] Marvdasht (Fars)	(T-23, T-24, T-29, T-30)	Ggt	گندم/ *T.aestivum*
نقش‌رستم (فارس)[۱] Naghshe-rostam (Fars)	(T-25, T-28)	Ggt	گندم/ *T.aestivum*
زرقان (فارس)[۱] Zarghan (Fars)	(T-22)	Ggt	گندم/ *T.aestivum*
اقلید (فارس)[۱] Eghlid (Fars)	(T-27)	Ggt	گندم/ *T.aestivum*
سعادت‌شهر (فارس)[۱] Saadat-shahr (Fars)	(T-26)	Ggt	گندم/ *T.aestivum*
بابع‌کلا (مازندران) Baykola (Mazandaran)	(T-31, T-32, T-33, T-34, T-35, T-36)	Ggt	گندم/ *T.aestivum*
حلمسر (مازندران) Halomsar (Mazandaran)	(T-37, T-38)	Ggt	گندم/ *T.aestivum*
دشت‌ناز (مازندران) Dashte-naz (Mazandaran)	(T-39, T-40, T-41, T-42)	Ggt	گندم/ *T.aestivum*
ساری (مازندران)[۲] Sari (Mazandaran)	(g-38)	Ggg	برنج/ *O. sativa*
آق‌قلا (گلستان) Agh-ghala (Golestan)	(T-45)	Ggt	گندم/ *T.aestivum*
کرج (تهران) Karaj (Tehran)	(T-44)	Ggt	گندم/ *T.aestivum*

۱ و ۲) جدایه‌های اهدایی از طرف آقای دکتر فصیحیانی(مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان فارس) و آقای مهندس نعیمی

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱. مشخصات ریخت‌شناسی *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* عامل بیماری پاخوره گندم (a) تنوع ریخت‌شناسی در پرگنه جدایه‌های مختلف قارچ روی محیط کشت PDA دو هفته بعد از کشت و نگه‌داری در ۲۵°C (b) ریسه‌های رونده سیاه قارچ بر سطح ریشه پوسیده گندم(c و d) آسک و آسکوسپورهای در حال خروج از پریتسیوم (e) ریسه های رونده ساده و (f) ریسه های رونده لب‌دار در گیاهچه‌های گندم آلوده. خط مقیاس برابر ۱۰ میکرومتر است.

Fig. 1. Morphology of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, the causal agent of take-all of wheat. Variation of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* isolates in colony morphology on PDA after 15 days at 25°C (a), dark runner hyphae on rotten roots of wheat (b), Exiting asci from perithecium and mature and slightly curved ascospores (c, d), simple hyphopodia (e) and lobed hyphopodia on the leaf sheath at the stem base of infected wheat plants (f).

محیط کشت در تشتک پتری نمایان شدند. جدایه‌های با ریسه های رونده ساده، تولید تجمعی از ریسه‌های کوتاه کردند که این ریسه‌ها در انتها کمی متورم بودند و قطر آنها ۱۰–۵ میکرومتر اندازه‌گیری شد. در این روش، تولید ریسه‌های رونده در تشتک در مدت زمان کوتاهی انجام گرفت. در بین ۵۲ جدایه همه ریسه های رونده ساده داشتند فقط یک جدایه از فارس و یک جدایه از واریته Ggg مورد مطالعه در این تحقیق علاوه بر داشتن ریسه های رونده ساده، ریسه های رونده لب‌دار نیز تولید کردند. ریسه های رونده لب‌دار به رنگ تیره با ابعاد ۱۶/۷ × ۱۴/۳ میکرومتر بود که از چندین لب چسبیده به هم تشکیل شده است (شکل f و e–۱). محل تشکیل ریسه های رونده‌ها در میانه و یا در انتهای ریسه‌ها تشخیص داده شد. هم‌چنین رنگ ریسه های رونده لب‌دار تیره‌تر از نوع ساده بود. ریسه های رونده‌ها از هر دو نوع ریسه تیره و روشن خارج می‌شدند.

آسک‌ها به تعداد زیاد، تک لایه‌ای، چماقی بلند و متوسط ابعاد آنها ۱۲۰ – ۱۰ × ۱۱۰ – ۹۰ میکرومتر بودند. هر آسک

Archive
www.SID.ir

جدول ۲. ابعاد ساختارهای زایشی در ۳۰ جدایه *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* از مناطق مختلف ایران

Table 2. Dimensions of sexual structures in 30 isolates of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* from different province of Iran

جدایه Isolates	قطر پریتسیوم Diameter of perithecium	طول گردن پریتسیوم Length of perithecium neck	طول آسکوسپور Length of ascospore
T-3	283.5*× 297	450	72.2
T-5	240× 235	340	74.4
T-11	283.5× 297	486	86
T-12	364.5×324	445.5	74
T-13	241×235	307.8	81.5
T-14	260× 250	405	76.3
T-15	267×251	408.2	77.4
T-16	243× 257	472.5	77
T-19	300× 283	282.5	73.3
T-23	270× 297	282.5	74
T-24	324× 324	445.5	73.3
T-25	311× 270	534.6	70
T-26	299×299	350	68.2
T-27	344× 334	575	67.4
T-31	311× 267	324	79
T-32	446× 419	540	81
T-34	311× 284	432	77.4
T-35	454× 470	389	76
T-39	269× 270	267	74.2
T-40	285×281	260	76.5
T-41	267× 270	267.3	76.3
T-42	286× 300	219	74.6
T-43	202.5× 202.5	202.5	74
T-44	304× 304	364.5	85
T-45	379×403	408.3	81.4
T-47	383.5× 283.5	202.5	67.3
T-48	243×273	283.5	67.5
T-50	300× 270	256.5	70.5
T-51	267×283.5	470	3.67
T-52	270× 283.5	421	77.5

* All measurements are in µm

Archive of SID

www.SID.ir

حاوی هشت آسکوسپور نخی شکل به رنگ روشن با ۱۲-۳ دیواره عرضی مقداری خمیده و در انتها کمی گرد که به طرف پایه باریک و در قسمت وسط پهن‌تر بود. آسکوسپورها به هنگام خروج از پریتسیوم به صورت توده زرد رنگی بودند. ابعاد ساختارهای زایشی تشکیل شده در ۳۰ جدایه Ggt در جدول ۲ آورده شده است. با استفاده از روش (Crozier 1999) پس از یک هفته ریسه‌های رونده به فراوانی روی سطح بدون محیط کشت در تشتک پتری نمایان شدند. جدایه‌های با ریسه‌های رونده ساده، تولید تجمعی از ریسه‌های کوتاه کردند که این ریسه‌ها در انتها کمی متورم بودند و قطر آنها ۱۰-۵ میکرومتر اندازه‌گیری شد. در این روش، تولید ریسه‌های رونده در تشتک در مدت زمان کوتاهی انجام گرفت. در بین ۵۲ جدایه همه ریسه‌های رونده ساده داشتند فقط یک جدایه از فارس و یک جدایه از واریته Ggg مورد مطالعه در این تحقیق علاوه بر داشتن ریسه‌های رونده ساده، ریسه‌های رونده لب‌دار نیز تولید کردند. ریسه‌های رونده لب‌دار به رنگ تیره با ابعاد ۱۶/۷ × ۱۴/۳ میکرومتر بود که از چندین لب چسبیده به هم تشکیل شده است (شکل f و e-۱). محل تشکیل ریسه های رونده‌ها در میانه و یا در انتهای ریسه‌ها تشخیص داده شد. هم‌چنین رنگ ریسه های رونده لب‌دار تیره‌تر از نوع ساده بود. ریسه های رونده‌ها از هر دو نوع ریسه تیره و روشن خارج می‌شدند.

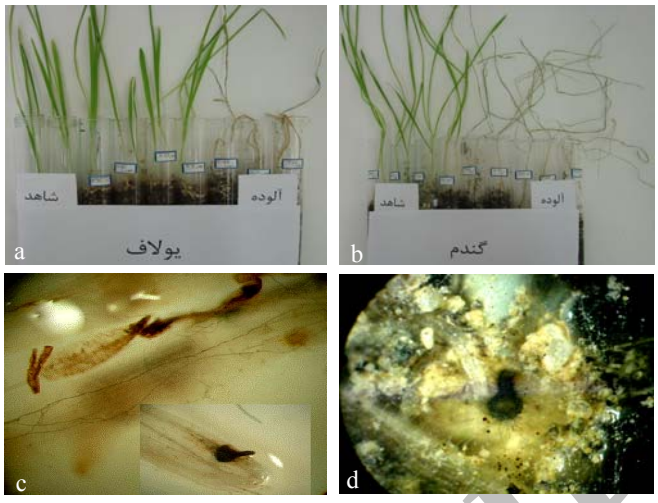
به طور متوسط میزان رشد جدایه‌ها در ۲۵°C پس از سه روز ۴۷-۳/۴ میلی‌متر و میزان رشد روزانه آنها به طور متوسط ۵/۵-۱/۸ میلی‌متر بود. رنگ پرگنه قارچ روی محیط کشت PDA پس از دو هفته بین جدایه‌ها از روشن تا خاکستری تیره متغیر می‌باشد (شکلa -۱). پرگنه معمولاً فاقد میسلیوم هوایی بوده ولی برخی از جدایه‌ها با مسن شدن پرگنه، ریسه‌های هوایی ایجاد کردند. در جدایه‌های دارای رنگ پرگنه روشن، میسلیوم فقط شامل ریسه‌های باریک شفاف بوده، اما در جدایه‌های دارای پرگنه تیره میسلیوم شامل ریسه‌های باریک شفاف و ریسه‌های ضخیم تیره مشاهده شد. هم‌چنین در بعضی جدایه‌ها قطاع‌هایی تشکیل شد که زمینه میسلیوم تیره و روشن را از هم جدا می‌نمود. جدایه‌ها در محیط کشت بخصوص در محیط کشت‌های ضعیف مثل WA تمایل به برگشتن ریسه‌ها به طرف مرکز پرگنه از حاشیه پرگنه دارند که از خصوصیات منحصر به فرد این قارچ است. تراکم ریسه‌ها در محیط کشت‌های ضعیف مثل چاپک و آب- آگار کمتر و در محیط‌های غنی‌تر مثل PDA و عصاره مالت- یتپون زیاد بود.

آزمون بیماری‌زایی

در آزمایش انجام شده روی گندم در اتاقک رشد پس از سه هفته علائم بیماری شامل زردی، کم رشدی، خشکیدگی برگ‌ها، و سیاه شدن ریشه‌ها نمایان گردید (شکل a و b-۲). شدت بیماری در ۶۴ درصد از جدایه‌های مورد بررسی در گیاهچه‌های گندم بیش از ۶۰ درصد و جدایه‌هایی که علاوه بر گندم در گیاهچه‌های یولاف نیز بیماری‌زا بودند ۱۹ درصد (۱۰ جدایه) جدایه‌ها را تشکیل دادند. سه جدایه از استان فارس (T-23، T-24 و T-25)، دو جدایه از استان مازندران (T-34 و T-31) و چهار جدایه از استان مرکزی (T-16، T-19، T-43 و T-47) بالاترین شدت بیماری‌زایی را روی یولاف داشتند. این نکته جالب توجه بود که جدایه T-28 با ریسه‌های رونده لب‌دار با شدت بیماری‌زایی کمتر از ۲۰ درصد به ریشه‌های یولاف نفوذ کرده بود. از هفته سوم به تدریج علائم زخم و نکروز در ریشه و ساقه گیاهچه‌ها شروع و به تدریج تا هفته چهارم منجر به پوسیدگی کامل ۳-۲ سانتی‌متر از ساقه و ریشه شد به طوری که ریسه‌های رونده سیاه‌رنگ و پریتسیوم روی ریشه‌ها و غلاف پایین‌ترین برگ گیاهچه‌های گندم و یولاف به خوبی قابل مشاهده بود (شکل c و d-۲). از میان جدایه‌های بیماری‌زای یولاف تنها چهار جدایه T-19، T-23، T-34 وT-43 پریتسیم تولید کردند که دامنه ابعاد آنها ۵۶۷-۲۴۳×۳۲۴-۲۷۰×۳۲۴-۲۷۵ میکرومتر و طول آسکوسپور این جدایه‌ها ۸۱-۶۶ میکرومتر بود. ریسه‌های رونده قارچ پس از رنگ‌بری ریشه‌های یولاف و گندم به وضوح قابل مشاهده بود. ریسه‌های رونده لب‌دار جدایه T-28 نیز پس از رنگ‌بری ریشه‌های یولاف

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۲. علائم بیماری پاخوره روی گیاهچه‌های گندم و یولاف ۲۰ روز پس از تلقیح آزمون بیماری‌زایی از چپ به راست شاهد، جدایه‌های غیربیماری‌زا و بیماری‌زا(b و a) تشکیل پریتسیوم بالغ در آزمون بیماری‌زایی گندم (d) و یولاف (c) چهار هفته پس از تلقیح.

Fig. 2. symptoms of take-all disease on wheat and oat seedlings 20 days after inoculation pathogenicity assay left to right control, virulence isolates and non virulence (a, b), production mature perithecium on wheat (d) and oat (c) after four week in pathogenicity assay.

مشاهده شد (شکل f –۱). تجزیه واریانس شدت بیماری‌زایی جدایه‌ها در گندم و یولاف در سطح P< ۰/۰۱ نشان داد که قدرت بیماری‌زایی بین جدایه‌ها و بیماری‌زایی آنها در یولاف و گندم تفاوت معنی‌داری وجود دارد (شکل ۳). مقایسه میانگین شدت بیماری‌زایی در بین جدایه‌ها و همچنین گروه‌بندی آماری تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح یک درصد تفاوت معنی‌داری در درجه بیماری‌زایی جدایه‌های Ggt در گندم و یولاف و حتی بین جدایه‌ها در یک میزبان نشان داد. براساس گروه‌بندی آماری جدایه‌ها در سطح a و ab بیشترین علائم بیماری را با میزان شاخص ۲/۳ در گندم و یولاف نشان دادند. کمترین میزان آلودگی در گندم مربوط به دو جدایه از استان مرکزی، دو جدایه از استان فارس و دو جدایه از استان مازندران، یک جدایه از استان تهران و جدایه‌ای از واریته Ggg با میزان شاخص ۱/۶ در گروه f جای گرفتند (شکل a– ۳). به جز ده جدایه بیماری‌زای یولاف سایر جدایه‌ها در کمترین سطح آماری در گروه j قرار گرفتند (شکل b – ۳).

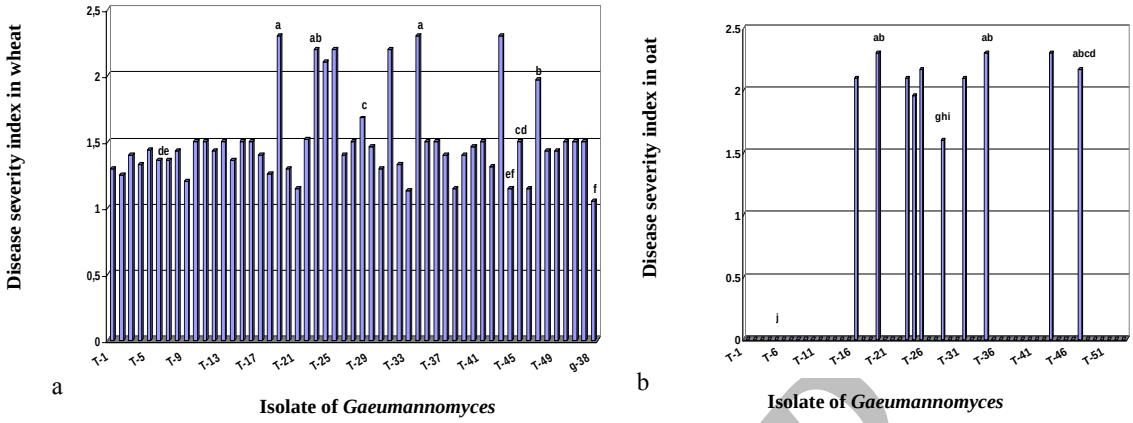
تشخیص مولکولی قارچ با استفاده از آغازگرهای اختصاصی

نتایج حاصل از تکثیر DNA با آغازگرهای اختصاصی Ggt نشان داد که این آغازگرها علاوه بر تشخیص واریته Ggt از واریته‌های Ggg و Gga، می‌توانند جمعیت درون واریته را به دو تیپ A و B تفکیک نماید. این آغازگرها دو باند اختصاصی ۹۳ و ۱۳۲ جفت بازی را فقط درجدایه‌های این واریته تکثیر نمود. در واریته Ggg و گونه *Magnaporthe grisea* باندی دیده نشد (شکل۴). بر این اساس تمام جدایه‌های مورد استفاده در این تحقیق Ggt تشخیص داده شدند. جدایه‌های تیپ B شامل سه جدایه T-1، T-9 و T-44 قطعه bp ۱۳۲ را تکثیر نموده و سایر جدایه‌ها به عنوان تیپ A قطعه bp ۹۳ تکثیر نمودند. هم‌چنین جدایه T-28 به جهت نوع ریسه های رونده تصور می‌رفت واریته Ggg باشد ولی باندی به اندازه bp ۹۳ را مطابق با سایر جدایه‌های تیپ A تکثیر نمود.

بحث

علائم پاخوره گندم در مزرعه، شامل پوسیدگی ریشه و سیاه

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۳. مقایسه میانگین شدت بیماری‌زایی در ۵۲ جدایه *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* در گندم (a) و یولاف (b) از مناطق مختلف ایران.

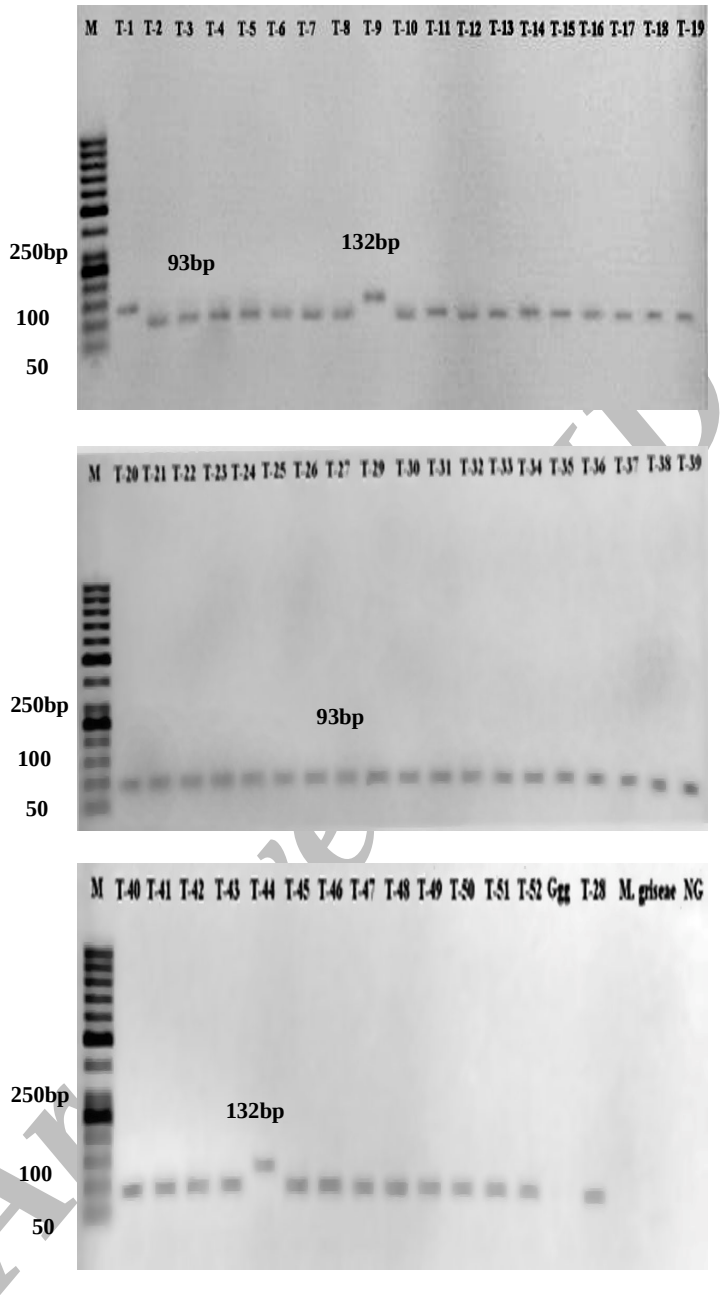
Fig. 3. Comparison of the disease severity means in 52 isolates of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in wheat (a) and oat (b).

شدگی آنها، زودرسی و تولید خوشه‌های سفید، کوتولگی ناشی از خسارت به ریشه‌ها می‌باشد. اما علائم مزبور می‌تواند به وسیله سایر بیمارگرها در شرایط محیطی نامساعد و در خاک‌های فقیر نیز ایجاد شود (Henson *et al.* 1993). علاوه بر قارچ Ggt، قارچ‌های *Ceratobasidium* sp.، *Fusarium culmorum*، *Pseudocercosporella herpotricoides*، *Rhizoctonia cerealis* و *Cochliobolus sativus* نیز می‌توانند علائمی مشابه پاخوره از جمله سفید شدن خوشه ایجاد کنند (Hornby *et al.* 1998). علاوه بر جداسازی قارچ Ggt، قارچ‌های فوزاریوم، رایزوکتونیا و ماکروفومینا نیز از بافت‌های آلوده جدا شدند. با توجه به علائمی که *واکر* (Walker 1973) به این بیماری نسبت داده، در این تحقیق نیز علائم بیماری با تغییراتی بسته به زمان نمونه‌برداری و جغرافیای محل مشاهده شد که با علائم قارچ *G. graminis* var. *tritici* مطابقت داشت.

دامنه تغییرات سرعت رشد تعداد زیادی جدایه جمع‌آوری شده از ویرجینیا، مونتانا و بریتانیا توسط *آشر* (Asher 1980) از ۷۷ –۷۰ میلی‌متر پس از هفت روز متغیر بود. در تحقیق حاضر میانگین رشد برای تمام جدایه‌ها در دمای ۲۵°C، پس از هشت روز ۳۵ میلی‌متر برآورد گردید. در تحقیقات *کروزیر* (Crozier 1999) سرعت رشد در ۲۵°C پس از هشت روز ۵۰ میلی‌متر بود. *وبر و همکاران* (Weber *et al.* 2005) سرعت رشد جدایه‌های Ggt در محیط PDA را ۱/۶۷ تا ۶ میلی‌متر در روز گزارش نمودند. در حالی‌که *وبر* (Weber 2002) در تحقیق قبلی روی ۳۲ جدایه Ggt متوسط رشد روزانه را ۳/۱–۷/۳ میلی‌متر گزارش کرده بود. این نتایج نشان می‌دهند که جدایه‌های ایرانی مورد مطالعه در این تحقیق سرعت رشد آهسته‌تری نسبت به جدایه‌های مورد مطالعه دیگران در محیط کشت PDA دارند. گرچه سرعت رشد بین جدایه‌های *آشر* (Asher 1980) بسیار متنوع بوده اما میانگین سرعت رشد جمعیت Ggt، بین جدایه‌های مختلف اختلاف معنی‌داری نداشت. در مطالعات تجزیه و تحلیل رگرسیون داده‌های رشد در مقابل داده‌های بیماری‌زایی، جدایه‌های با رشد سریع‌تر روی PDA در گلخانه خسارت بالاتری را به گندم وارد می‌کردند. اما تحقیقات گلخانه‌ای سایر محققین بین سرعت رشد و بیماری‌زایی هم‌بستگی نشان ندادند (Crozier 1999). داده‌های این تحقیق نشان داده است که مقایسه میانگین سرعت رشد روزانه جدایه‌ها اختلاف معنی‌داری وجود دارد. با توجه به تنوعی که در سرعت رشد جدایه‌ها وجود دارد ولی شدت بیماری‌زایی قابل پیش‌گویی نیست. براساس نتایج به دست آمده جدایه‌های با سرعت رشد کند از توانایی بیماری‌زایی

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۴. تکثیر باند اختصاصی ۹۳ و ۱۳۲ جفت بازی در ۵۲ جدایه *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* و شناسایی به دو تیپ A و B. عدم تکثیر این باند اختصاصی در واریته (Ggg) *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* و *Magnaporthe grisea*. M: نشانگر اندازه ۵۰ جفت بازی و NG: کنترل منفی.

Fig. 4. Amplification of specific bands of 93 and 132 bp in 52 isolates of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and identification of A and B types. No amplification was observed in *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* (Ggg) and *Magnaporthe grisea*, M: 50 bp size marker and NG: Negative control.

www.SID.ir

بالاتری برخوردار بودند.

بـه اسـتناد تحقیقـات موجـود (Walker 1972) گونـه *G. graminis* براساس نوع ریسه‌هـای رونـده و میـانگین طـول آسکوسپور به سه واریته قابل تفکیک است. ولی تحقیقات سایر محققـین (Willests 1961, Chambers & Flentje 1967, Yeates 1986, Smith *et al*. 1989) و نتایج بـه دسـت آمـده از این تحقیـق نـشان مـی‌دهـد کـه خـصوصیات ریخـت‌شناسـی جدایـه‌هـای *G. graminis* بـسیار متنـوع بـوده و بـا یگـدیگر هم‌پوشانی دارد. هر سه واریته به فراوانی ریسه های رونده ساده تولید می‌کنند و تغییرات طول آسکوسپور نوعاً ۱۰-۵ میکرومتـر می‌باشد (Walker 1981). جدایه‌هایی که از بافت آلوده گیـاهی، با علائم مـشخص پـاخوره جـدا مـی‌شـوند اغلـب بـه آسـانی نمـی‌تواننـد بـه عنـوان واریتـه *G. graminis* var. *avenae* یـا *G. graminis* var. *tritici* شناسـایی شـوند (Walker 1981). تغییرات طول آسکوسپور اندازه‌گیـری شـده در ایـن مطالعـه از ۸۵-۶۷ میکرومتر متغیر و مطابق با تحقیق‌های سایر پژوهشگران (Turner 1940, Walker 1972, Walker 1981, Willests 1961, Yeates 1986, Thomas 2004) بـود. طـول آسکوسـپورهای اندازه‌گیری شده از ریشه‌های آلوده یولاف بسیار نزدیک به طول آسکوسـپورهای انـدازه‌گیـری شـده از گنـدم بـود و تفـاوت معنی‌داری در بین طول آسکوسپور جدایه‌های به دست آمـده از میزبـان‌هـای مختلـف مـشاهده نـشد. ولـی بلـوغ پریتـسیوم در تغییرات دامنه طول آسکوسپور و میانگین آنهـا مـی‌توانـد مـؤثر باشد. این داده‌ها مشابه نتایج تحقیقات *واکر* (Walker 1981) و *یتز* (Yeates 1986) بود. *ترنر* (Turner 1940) جدایه‌هـایی را از گندم به دست آورده بود که روی یولاف بیمـاری‌زا بودنـد. وی این جدایه‌ها را براساس متوسط طول آسکوسپور و بیماری‌زایی روی یـولاف واریتـه *avenae* شناسـایی کـرد. *یتـز و همکـاران* (Yeates *et al.* 1986) جدایه‌هایی از ریشه‌های یولاف و چمـن با علائم پاخوره جـدا کـرده و مـورد مطالعـه قـرار دادنـد. آنهـا براساس خصوصیات ریخـت‌شناسـی ارائـه شـده توسـط *ترنـر* (Turner 1940) که در آن ریسه های رونـده سـاده بـا میـانگین طول آسکوسپور بیش از ۱۰۱ میکرومتر به عنـوان Gga و طـول آسکوسپور کوتاه‌تر از ۱۰۰ میکرومتر به عنوان Ggt معرفی کرده بود. *یتز و همکـاران* (Yeates *et al.* 1986) در تحقیقـات خـود وقتی داده‌های ریخت‌شناسی را با داده‌های بیماری‌زایی ترکیـب و مورد تجزیه و تحلیل قرار دادند به این نتیجه رسـیدند کـه دو جمعیت بیمـاری‌زا از گونـه *G. graminis* روی یـولاف وجـود دارد. یـک گـروه جدایـه‌هـایی کـه بـه واریتـه Gga و دیگـری جدایه‌هایی بودند که به واریته Ggt تعلـق داشـت ولـی هـر دو گروه قادر به آلوده کردن یولاف می‌باشند.

جدایه‌های مورد بررسی در این تحقیـق کـه روی یـولاف بیماریزا بودند از نظر طول آسکوسپور با جدایـه‌هـای توصـیفی *ترنر* (Turner 1940) مطابقت نداشتند. در آزمـون بیمـاری‌زایـی روی یولاف از ۵۲ جدایه Ggt، تنها نـه جدایـه بـه شـدت روی یولاف بیماری‌زا بودند و یک جدایه با ریسه‌های رونـده لـب‌دار نیز با شدتی کمتر از ۲۰ درصد توانسته بود به ریشه‌های یولاف نفوذ کند. مجموعه مشخصات ریخـت‌شناسـی تأییـدی بـر Ggt بودن آنها می‌باشد که توانایی بیماری‌زایی روی یولاف را دارند. نتایج دیگـر مطالعـات (Ward & Akrofi 1994, Bryan *et al.* 1995) براسـاس تجزیـه و تحلیـل مولکـولی دی ان ای ریبـوزومی (rDNA) نیـز نـشان دادنـد کـه جدایـه‌هـای "Oat-attacking Ggt" شناسـایی شـده توسـط *یتـز* و همکـاران (Yeates *et al*. 1986) قرابـت بـسیار نزدیکـی بـه واریتـه Gga داشته است. این نتایج نشان می‌دهد که جدایه‌هایی کـه توانـایی بیماری‌زایی مشابه دارند از نظـر ژنتیکـی نیـز بیـشتر شـبیه هـم هستند و تمایز واریته‌ها را براساس بیماری‌زایی و ریخت‌شناسی حمایـت مـی‌کنـد (Thomas 2004). جدایـه‌هـای بیمـاری‌زا در یولاف در این پژوهش براساس خصوصیات ریخت‌شناسـی بـه ویژه از نظر طول آسکوسپور با تحقیقات سایرین مطابقت ندارد چـرا کـه طـول آنهـا کمتـر از جدایـه‌هـای مـورد مطالعـه *یتـز* (Yeates 1986) و *توماس* (Thomas 2004) مـی‌باشـد ولـی از نظر بیماری‌زایی و توانایی آنها در کلونیزاسیون ریشه‌های یولاف و تولید پریتسیوم شباهت داشت. نتایج آزمون بیماری‌زایی روی

Archive of SID

www.SID.ir

گندم و یولاف نشان می‌دهد که جدایه‌های ایرانی Ggt از نظر بیماری‌زایی تنوع زیادی دارند. محققان بسیاری اطلاعات مشابهی را از سایر مناطق دنیا گزارش کرده‌اند (Asher 1980, Dewan & Sivasithamparam 1989, Crozier 1999).

بررسی‌ها نشان داده است که برخی از جدایه‌هایی که به گندم حمله می‌کند دارای ریسه‌های رونده لب‌دار می‌باشند (Nilson 1972, Ward & Akrof 1994, Augustin *et al*. 1999). در میان جدایه‌های مورد بررسی این پژوهش یک جدایه از نقش‌رستم استان فارس علاوه بر بیماری‌زایی روی گندم و تولید هر دو نوع ریسه های رونده لب‌دار و ساده، روی یولاف نیز بیماری ایجاد کرد. یک جدایه از واریته Ggg با ریسه های رونده لب‌دار نیز بیماری‌زایی اندکی روی گندم نشان داد. این جدایه (Ggg) پریتسیوم تولید نکرد. از طرفی جدایه‌های Ggg در مطالعات *توماس* (Thomas 2004) پریتسیوم تولید کردند ولی روی گندم بیماری‌زایی نداشتند. در تحقیقات *کروزیر* (Crozier 1999) نیز دو جدایه غیرعادی وجود داشت که براساس مطالعات مولکولی واریته *graminis* تشخیص داده شدند. این دو جدایه دارای بیماری‌زایی اندکی بودند و ریسه‌های رونده ساده تولید کردند. در گزارش‌های مستند آمده است که بیماری‌زایی Ggg روی گندم بسیار ضعیف است. ریشه‌های گندم به وسیله ریسه‌های رونده سطحی قارچ می‌تواند کلونیزه شود و به لایه‌های سطحی پوست ریشه نفوذ کند ولی قادر نیست به بافت آوندی مشابه واریته‌های Gga و Ggt حمله کرده و ایجاد خسارت کند. استفاده از جدایه‌های غیربیماری‌زا یا با بیماری‌زایی خفیف واریته Ggg به عنوان کنترل بیولوژیک در مقابل سایر قارچ‌های بیمارگر قابل توجه می‌باشد (Walker 1981).

تصور این است که ریشه‌های یولاف به دلیل داشتن ماده اوناسین از نفوذ قارچ Ggt جلوگیری می‌کند ولی جدایه‌های Gga به دلیل داشتن آنزیم اوناسیناز می‌توانند به یولاف نفوذ کنند. اوناسین موجود در ریشه یولاف، نقش یک عامل مقاومت نسبت به بیماری را بازی می‌کنند. در یک بررسی گزارش شده است که وجود مقدار کمی از اوناسین از رشد Ggt ممانعت می‌کند اما روی سایر قارچ‌ها تأثیر بسزایی نداشته است (Maizel *et al*. 1963). وجود چندین گروه آنزیم اوناسیناز با فعالیت خیلی کم در Ggt نشان داده شده است (Turner 1961, Crombie *et al*. 1986, Osbourn *et al*. 1991).

با وجود شباهت ریخت‌زایی زیاد بین Ggt و Gga براساس توالی DNA، واریته Ggt قرابت نزدیکی‌تری با Ggg نسبت به Gga دارد. اختلاف در توالی اسیدآمینه ژن اوناسیناز به خصوص در انتهای ´3 بین Gga و Ggg و Ggt در فعالیت این آنزیم بین سه واریته اختلاف ایجاد می‌کند. اجداد Ggg، Gga و Ggt احتمالاً دارای ژن اوناسیناز مشترک هستند (Rachdowang *et al*. 2002). در توجیه توانایی تجزیه اوناسین در Ggt و Ggg با توجه به میزبان این دو واریته فشار انتخابی روی ژن‌های شبه اوناسیناز از آنجایی که میزبان آنها فاقد اوناسین، هستند وجود نداشته است (Osbourn *et al*. 1994). بنابراین در توجیه بیماری‌زایی جدایه‌های Ggt روی یولاف با توجه به تحقیقات انجام شده (Yeates *et al*. 1986, Ward & Akrofi 1994, Bryan *et al*. 1995) دور از انتظار نیست که برخی جدایه‌های Ggt بتوانند با نفوذ به ریشه‌های یولاف با تولید اوناسیناز بیماری‌زا شوند. این پدیده می‌تواند دلایل مختلف ژنتیکی نیز داشته باشد. از جمله اینکه ژن‌های شبه اوناسیناز فعالیت هر چند کم خود را جهت خنثی کردن اوناسین موجود در یولاف را شروع کرده باشند. در یافته‌های *برایان و همکاران* (Bryan *et al*. 1995) جدایه‌های به دست آمده از گندم در استرالیا که روی یولاف بیماری‌زا بودند به کمک آغازگرهای اختصاصی، Gga تشخیص داده شدند. ولی در تحقیق حاضر با آغازگرهای اختصاصی جدایه‌های مهاجم به یولاف Ggt تشخیص داده شدند. تفکیک جدایه‌ها در توانایی آلوده کردن چاودار به دو گروه نشان می‌دهد که آنها باید پاتوتیپ‌هایی از Ggt باشند (Bryan *et al*. 1995). از طرفی سه جدایه *G. graminis* مهاجم به یولاف از استرالیا براساس طول آسکوسپور به عنوان Ggt شناسایی شدند (Yeates *et al*. 1986). این جدایه‌ها قرابت

Archive of SID

www.SID.ir

نزدیکی با Gga دارند و پیشنهاد طبقه‌بندی آنها براساس ریخت‌شناسی آسکوسپور به تنهایی ممکن است گمراه کننده باشد. از این‌رو جدایه‌های بیشتری برای مطالعه اختلاف بین واریته‌های Ggt و Gga برای پذیرش یا رد این اختلاف نیاز است (Bryan *et al*. 1995). تحقیقات *بریان و همکاران* (Bryan *et al*. 1995) نشان داد که جدایه‌های AT2 و AT1 برخلاف جدایه‌های AT3، Gga و Ggt آنزیم خنثی‌کننده ساپونین (اوناسیناز) تولید نمی‌کنند (Osbourn *et al*. 1991, Bryan *et al*. 1995) ولی به اوناسین مقاوم هستند و قادر به آلوده کردن یولاف هستند. ظاهراً این جدایه‌ها یک مکانیسم جایگزین دیگری برای تحمل اثر سم اوناسین میبایستی داشته باشد (Bryan *et al*. 1995).

استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای شناسایی و تشخیص واریته Ggt از واریته Ggg و Gga و سایر گونه‌های *Gaeumannomyces* در ایران برای اولین بار انجام گرفت. در واکنش PCR از سه آغازگر اختصاصی GgtFwd، GgtArev و GgtBrev2 دو باند اختصاصی ۹۳ جفت بازی (جدایه‌های تیپ A) و ۱۳۲ جفت بازی (جدایه‌های تیپ B) در همه جدایه‌های ایرانی مشکوک به Ggt تولید شد. سه جدایه متعلق به تیپ B شدت بیماری‌زایی پایینی داشتند. نتایج به دست آمده از این آزمایش با مطالعات *فریمن و همکاران* (Freeman *et al*. 2005) مطابقت دارد. در مطالعات این محققین جدایه‌های تیپ B نسبت به قارچ‌کش سیلتیوفام حساسیت و جدایه‌های تیپ A نسبت به این قارچ‌کش مقاومت نشان دادند (Freeman *et al*. 2005). شناسایی مرسوم *G. graminis* زمان‌بر و غیرقابل اعتماد است تنوع در خصوصیات محیط کشت به شناسایی غیرقطعی قارچ و واریته‌های آن منجر می‌شود (Asher 1980). حتی علی‌رغم استفاده از خصوصیات ریخت‌شناسی و زایشی مثل ریسه های رونده و اندازه طول آسکوسپور هنوز تشخیص دو واریته Ggt و Gga به دلیل شباهت‌های ریخت‌شناسی و زایشی که با هم دارند، شناسایی صحیح و دقیق آنها را مشکل و سخت می‌کند. همچنین آزمون‌های بیماری‌زایی به دلیل طولانی و وقت‌گیر بودن آسان نیست. استفاده از محیط کشت‌های اختصاصی نیز نمی‌تواند واریته‌های *G. graminis* را از هم تشخیص دهد و از آنجایی که این قارچ ویرانگر بوده و کنترل آن نیز بسیار مشکل می‌باشد لذا یک روش دقیق، سریع و حساس که بتواند قارچ را علاوه بر استفاده از توده میسلیومی، در خاک و گیاه آلوده نیز تشخیص دهد، ضرورت دارد. آغازگرهای طراحی شده توسط *فریمن و همکاران* (Freeman *et al*. 2005) علاوه بر تمایز جدایه‌های Ggt از سایر گونه‌ها آنها را از واریته‌های Ggg و Gga نیز تفکیک می‌نماید. در این تحقیق در دو مورد یکی بیماری‌زایی نه جدایه روی یولاف و دیگری وجود یک جدایه با ریسه‌های رونده لب‌دار در بین جدایه‌های مورد مطالعه این ابهام را به وجود آورد که آیا این جدایه‌ها ممکن است متعلق به واریته Gga باشد. با روش‌های ریخت‌شناسی به طور دقیق امکان تشخیص دقیق آنها و رفع این ابهام نبود و در مورد جدایه دارای ریسه‌های رونده لب‌دار این سؤال مطرح بود که آیا ممکن است این جدایه Ggg یا از گونه‌های *Phialophora* باشد. با استفاده از آغازگرهای اختصاصی مشخص شد که جدایه‌های مهاجم به یولاف متعلق به Ggt می‌باشد. با توجه به نتایجی که در این آزمایش به دست آمده است می‌توان گفت که جدایه‌های بیماری‌زای یولاف در ایران نیز ممکن است پاتوتیپ‌هایی از Ggt باشند. جدایه با ریسه‌های رونده لب‌دار در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با آغازگرهای اختصاصی باندی به اندازه ۹۳ جفت باز تکثیر نمود. این جدایه با خصوصیاتی که در جدایه‌های *نیلسون* (Nilsson 1972) و *وارد و آکروفی* (Ward & Akrofi 1994) از نظر نوع ریسه های رونده و بیماری‌زایی در گندم ذکر کرده‌اند مطابقت دارد و بیانگر آن است جدایه‌هایی از Ggt وجود دارند که ممکن است ریسه‌های رونده لب‌دار داشته باشند. *فولی و ویلکینسون* (Fouly & Wilkinson 2000) دو آغازگر عمومی NS6 و NS5 را از ناحیه 18S rDNA طراحی کردند که قادر است گونه‌های *Gaeumannomyces* و واریته‌ها را از هم تفکیک کند. آغازگرهای GGT-RP و GGA-RP به وسیله آنالیز قطعات

Archive of SID

www.SID.ir

NS5–NS6 طراحی شدند. جفت آغازگر NS5:GGT-RP یک قطعه اختصاصی ۴۱۰ جفت بازی برای Ggt و یک قطعه ۳۰۰ جفت بازی برای Gga تکثیر می‌کند. این آغازگر قطعه‌ای را برای Ggg و سایر گونه‌های *Gaeumannomyces* تکثیر نمی‌کنند. از این آغازگر برای تشخیص Ggt و Gga از ریشه‌های گندم، یولاف و گراس‌ها و یا در محیط کشت می‌توان استفاده کرد. نتایج *لبرتون و همکاران* (Lebreton *et al*. 2004) نشان داد که چهار استرین متعلق به گروه حمله کننده به چاودار از واریته Ggt به طور ژنتیکی متعلق به گروه G2 که گروه مهاجمی می‌باشد، است. این نتیجه با نتایج این تحقیق که جدایه‌های مهاجم یولاف را در تیپ A قرار می‌داد مطابقت دارد. نتایج این تحقیق گامی برای مطالعات ژنتیکی عمیق‌تر جدایه‌های Ggt و درک روابط بین گروه‌های مهاجم و غیرمهاجم و حساسیت آنها با قارچ‌کش سیلتیوفام است که یکی از قارچکش‌هایی می‌باشد که در حال حاضر می‌تواند تا حدی در کنترل پاخوره گندم مؤثر باشد.

سپاسگزاری

از آقای دکتر فصیحیانی به خاطر در اختیار گذاشتن جدایه‌های استان فارس و از آقای مهندس شهرام نعیمی به خاطر در اختیار گذاشتن جدایه‌ای از *G. graminis* var. *graminis* تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (30-27) متن انگلیسی مراجع شود.

Archive of SID

www.SID.ir