هیستوپاتولوژی ذرت آلوده به سیاهک معمولی ناشی از قارچ *Ustilago maydis* *

HISTOPATHOLOGY OF CORN INFECTED BY *Ustilago maydis* CASUAL AGENT OF COMMON CORN SMUT

محبوبه یزدانی** و سیدعلی موسوی جرف[۱]

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۳/۱۸؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۲/۲۲)

چکیده

روند توسعه بیماری قارچ عامل بیماری سیاهک معمولی ذرت ***Ustilago maydis***، با میکروسکوپ‌های نوری و الکترونی بررسی شد. بدین منظور از رقم‌های سینگل‌کراس ۳۰۱، ۶۴۷ و دابل‌کراس۷۰۴ که پیشتر به ترتیب به عنوان رقم‌های حساس، نیمه مقاوم و مقام به این بیماری ذکر شده بود، استفاده شد. مایه قارچ از کشت تلیوسپورهای جمع‌آوری شده از استان خوزستان در محیط‌های **CMA** و **PDA** + ۱۰٪ دکستروز و نگه‌داری در دمای 25^{o} **C** به مدت ۵ روز حاصل شد. مایه‌زنی قارچ به دو روش محلول‌پاشی و تزریق با غلظت 10^{6} اسپور در میلی‌لیتر صورت پذیرفت و نمونه‌ها ۲، ۴، ۷، ۱۱ و ۲۵ روز پس از مایه‌زنی تثبیت گردید. هیجده روز پس از مایه‌زنی علائم آلودگی در بوته‌های مایه‌زنی ابتدا به روش تزریق و سپس محلول‌پاشی دیده شد. در بررسی نحوه نفوذ قارچ به درون سلول‌های میزبان با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره مشخص شد که ریسه ایجاد شده از اسپوریدیوم، آپرسوریوم شفاف و متورمی ایجاد می‌کند که هم از طریق روزنه و هم به صورت مستقیم به درون سلول‌های میزبان نفوذ می‌کند. تغییرات هیستوپاتولوژیک پس از رخنه در این قارچ حاکی از آن است که سلول‌های آلوده در مقایسه با سلول‌های سالم بزرگ‌ترند و ریسه قارچ در ابتدا به صورت بین‌سلولی و سپس درون‌سلولی مشاهده شد. ریسه منشعب درون‌سلولی قارچ اشکال متفاوتی داشت و از ریسه بین‌سلولی متورم تا زوائد انگشت‌مانند متغیر بود. در هنگام تشکیل تلیوسپور حفره بزرگی شامل ریسه‌های قارچ ایجاد می‌شود که در آن به صورت تیپ ***Ustialgo*** تلیوسپورهای بالغ و در حال بلوغ به همراه غلاف ژلاتینی احاطه کننده آنها قابل مشاهده بودند. آلودگی ذرت در شرایط کنترل شده و مساعد به راحتی صورت می‌پذیرد و سیستم راحتی را برای بررسی برخی جنبه‌های تعامل میزبان- بیمارگر مهیا می‌کند.

واژه‌های کلیدی: سیاهک ذرت، ***Ustilago maydis***، تلیوسپور، آپرسوریوم، هیستوپاتولوژی

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

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

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

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

عامل بیماری سیاهک معمولی ذرت قارچ *Ustialgo maydis* (D.C.) Corda است. از خصوصیات بارز این قارچ زادآوری زیاد و دوام نسبتاً طولانی تلیوسپورهای آن، تغییرپذیری زیاد در نحوه زندگی و علائم خاصی که در گیاه ایجاد می‌کند، است. به طور کلی تعداد اسپورهای موجود در یک سانتی‌متر مکعب گال آن را ۲۵-۶ میلیارد تخمین می‌زنند و دوام آنها بین ۷-۵ سال گزارش شده است (Habibi & zamani 2003، Christensen 1963، Perez-Martin *et al*. 2006). تلیوسپورها زیتونی تا قهوه‌ای سیاهرنگ، بیضوی بی‌نوک و خاردار به قطر ۱۱-۸ میکرومتر هستند (Okhovat 1999). تلیوسپورهای دیپلوئید پس از یک تقسیم میوز، که در درون تلیوسپور صورت می‌گیرد، جوانه‌زده و تولید یک بازدیوم چهار سلولی می‌کنند، از هریک از سلول‌ها یک بازیدیوسپور (اسپوریدیم) بیضی شکل و یک هسته بیرنگ به وجود می‌آید (Sharifnabi & Nekooii 1994). معمولاً دوتا از این بازیدیوسپورها از یک تیپ آمیزشی و دوتای دیگر از تیپ آمیزشی سازگار مخالف‌اند (Day & Anagnostakis 1971، Sampson 1939). بعد از جوانه زدن بازیدیوسپورها تولید یک ریسه باریک هاپلوئید می‌نمایند که به طور پوده زیست زندگی می‌کند و احتیاج به آمیزش با ریسه از نوع جنسی سازگار دیگر دارد تا بتواند در گیاه عفونت واقعی به وجود آورد (Agrious 2005). پس از آلوده ساختن میزبان عمل دو هسته‌ای شدن در بافت میزبان به طریق رویشی انجام می‌گیرد. این قارچ از لحاظ جنسی چهار قطبی است (Day 1974). ریسه دو هسته‌ای در چرخه زندگی قارچ نقش اساسی دارد. ریسه تک هسته‌ای به نظر می‌رسد عمر کمتری داشته و به ندرت زیاد رشد می‌کند. این ریسه اصولاً فاقد قوس اتصال بوده و تلیوسپور تولید نمی‌کند (Day & Anagnostakis 1971). میسلیوم سیاهک‌ها به فراوانی در میزبان توسعه نمی‌یابند ولی در بعضی مراحل به مقدار قابل ملاحظه‌ای در میزبان پخش می‌شوند(Pyghami 2002). اختلاف بسیار زیادی بین مطالعات موجود در رابطه با این سؤال که آیا رشد هیف در میزبان درون سلولی است یا بین سلولی است وجود دارد (Snetselaar & Mims 1993). به هر حال گزارش‌ها حاکی از این حقیقت است که هیف قارچ در بیشتر موارد بین سلولی است (Snetselaar & Mims 1993, 1994) و اغلب هیچ علائمی قبل از اسپورزائی در میزبان آلوده دیده نمی‌شود (Snetselaar & Mims 1993, 1994). این قارچ می‌تواند هر بافت مریستمی در گیاه میزبان را آلوده کند. میسلیوم دو هسته‌ای در میزبان سیستمیک نشده ولی به سرعت در محل‌های آلودگی که شامل برگ‌های جوان، جوانه‌های جانبی و بلال در حال رشد است، گسترش می‌یابد. اسپورزایی در این محل-ها، گاهی حتی ۱۰ روز پس آلودگی بروز می‌کند (Snetselaar & Mims 1994). این قارچ دوشکلی بوده به طوری که در خارج از میزبان مخمر مانند و با جوانه‌زدن رشد می‌کند و در داخل میزبان به فرم ریسه‌ای تغییر شکل می‌دهد، برای این تغییر شکل به موادی مانند کیتین نیازمند است (Kahmann & Kamper 2004). این قارچ از نظر ژنتیکی هتروتال چهار قطبی است و برای ایجاد بیماری به استرین سازگار که دارای آلل‌های متفاوت می‌باشد نیازمند است (Day & Anagnostakis 1971). هدف از انجام تحقیق بررسی روند توسعه بیماری سیاهک معمولی ذرت در گیاه میزبان و درک واقعی از نحوه تعامل بیمارگر با گیاه است.

Archive of SID

www.SID.ir

مواد و روش‌ها

تهیه گیاهچه‌ها

به منظور بررسی نحوه نفوذ و ایجاد گال توسط بیمارگر از ارقام سینگل‌کراس ۳۰۱، ۶۴۷، دابل‌کراس۷۰۴ ذرت که به عنوان رقم‌های حساس، نیمه مقاوم و مقاوم به این بیماری شناخته شده بود، استفاده شد (Zamani & Sabzi 2000، Zamani & Estakhr 2007 and Zamani & Estakhr 2004). بذرهای مورد نظر با هیپوکلراید سدیم ۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه و یا با کاربوکسین تیرام به میزان ۲۰۰ گرم و پنتاکلروبنزن به مقدار ۳۷۵ گرم در صد کیلو بذر ضدعفونی گردید. کلیه ارقام ذکر شده به تعداد ۴ بذر در گلدان‌هایی به قطر ۳۰ سانتی‌متر در خاک گلخانه سترون شده با اتوکلاو، به منظور برطرف نمودن اثر تلیوسپورهای احتمالی و دیگر شرایط آلوده کننده ذرت، کشت گردید. به منظور تقویت گیاهچه در حال رشد قبل از کاشت بذرها در گلدان به خاک گلدان‌ها پس از سترون شدن کود برگی ضدعفونی شده و دو هفته پس از رشد گیاهچه‌ها، کودهای تقویتی فسفات آمونیوم و سولفات پتاسیم هر کدام به مقدار۵ گرم در گلدانی به عمق ۳۰ سانتی‌متر استفاده گردید (Snetselaar & Mims 1993، Zamani & Sabzi 2000، Zamani & Estakhr 2004، Zamani & Estakhr 2007، Zamani & Estakhr *et al.* 2007، Habibi 1999، Ghaedrahmat *et al.* 1999). آزمایش در اتاق رشد با دما و رطوبت کنترل شده و دوره نوری مساعد رشد ذرت انجام پذیرفت.

تهیه مایه قارچ و مایه‌زنی

به منظور تولید اسپوریدیوم قارچ از روش *تاکور و همکاران* (Thakur *et al.* 1987) با کمی تغییرات استفاده شد. در این روش ابتدا تلیوسپورهای سیاهک تشکیل شده را روی بلال‌های آلوده که از نقاط مختلف استان خوزستان جمع‌آوری شده بودند با یکدیگر مخلوط و پودر کرده و در هیپوکلرید سدیم ۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه و یا با ۱- ۰/۵٪ سولفات مس به مدت ۱۶ ساعت روی شیکر ضدعفونی و پس از دو بار شستشو با آب مقطر سترون روی محیط‌های کشت CMA و PDA حاوی ۱۰گرم در لیتر دکستروز کشت شد. در این تحقیق شناسایی و تعیین نژاد صورت نگرفت و صرفاً توده‌ای از مخلوط اسپورهای گال‌های مختلف استفاده شد. محیط‌های کشت به مدت ۵ روز در دمای ۲۵°C در انکوباتور نگه‌داری شدند. پس از تندش تلیوسپورها و تولید اسپوریدیوم‌ها، سطح محیط کشت را پس از خراش دادن با اسکالپل با استفاده از آب مقطر سترون شسته و پس از عبور از پارچه ململ اقدام به جمع آوری اسپوریدیوم‌ها گردید (Thakur *et al.* 1998، Zamani & Sabzi 2000).

با وجود این‌که گال‌ها معمولاً روی بلال‌ها مشاهده می‌شوند و کاهش محصول به علت خسارت به بلال است (Naien 1979، Snetselaar & Mims 1993) ولی بررسی روند تشکیل گال حتی در گال‌های ایجاد شده روی برگ نیز امکان‌پذیر می‌باشد (Snetselaar & Mims 1994). بدین منظور مخلوطی از اسپوریدیوم‌های سازگار با غلظت نهایی 10^6 سلول در میلی‌لیتر بر روی گیاهچه‌ها با سن یک هفته (۷ روز) یا بیشتر (احتمال می‌رفت گیاهچه مایه‌زنی شده در اثر شدت آلودگی بمیرد) به مقدار حدود ۱ میلی‌لیتر هر غلظت به درون گیاه با سرنگ سترون هیپودرمی، تزریق گردید. این روش مایه‌زنی برای مطالعه بسیار آسان می‌باشد چراکه گال‌ها پس از دو هفته مایه‌زنی بروز می‌کنند(Snetselaar & Mims 1994). در روش دیگری مخلوطی از اسپوریدیوم‌های سازگار توسط آبپاش به مقدار تقریبی ۱۰ میلی‌لیتر برای هر بوته روی سطح گیاه

Archive of SID

www.SID.ir

پاشیده شدند. از هر روش حداقل ۳ شاهد بدون مایه‌زنی چه به روش محلول پاشی و چه به روش تزریق به عنوان شاهد کنار گذاشته شد. در شاهد روش تزریق، تزریق با آب مقطر سترون و در شاهد روش محلول‌پاشی، محلول‌پاشی با آب مقطر سترون صورت پذیرفت.

نمونه‌برداری، تثبیت و آنالیز واریانس داده‌ها

گیاهان در فواصل زمانی ۲، ۴، ۷، ۱۱ و تا روز ایجاد علائم (روز ۲۵م) نمونه‌برداری و به منظور بررسی با میکروسکوپ الکترونی نگاره به مدت ۵ روز در فرمالین- پروپیونیک اسید- الکل (FPA: Formalin Propionic acid Alcohol) تثبیت شدند (Bauer *et al.* 1997). به منظور بررسی با میکروسکوپ نوری از تثبیت کننده فرمالین- اسید استیک- الکل (FAA:Formalin Acetic acid Alcohol)، به مدت حداقل ۱۸ ساعت استفاده شد. سپس برای بی‌رنگ کردن نمونه‌ها و شفاف شدن هرچه بیشتر آنها، نمونه‌ها به مدت حدود ۱۰ دقیقه در پتاس ۱۰٪ قرار گرفتند (Khalil & Abou-Heilah 1985) و پس از آبگیری، بلوک‌های پارافینی تهیه و با استفاده از میکروتوم دوار برش‌های میکروسکوپی به قطر ۱۲-۷ میکرون از آنها تهیه شد. پس از پارافین‌زدایی و آبدهی برش‌ها به صورت مضاعف به روش توصیف شده توسط کیو (Kue 1991) با دو رنگ سافرانین O و متیلن بلو رنگ‌آمیزی شدند.

آنالیز واریانس داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح α=۰/۵ صورت پذیرفت.

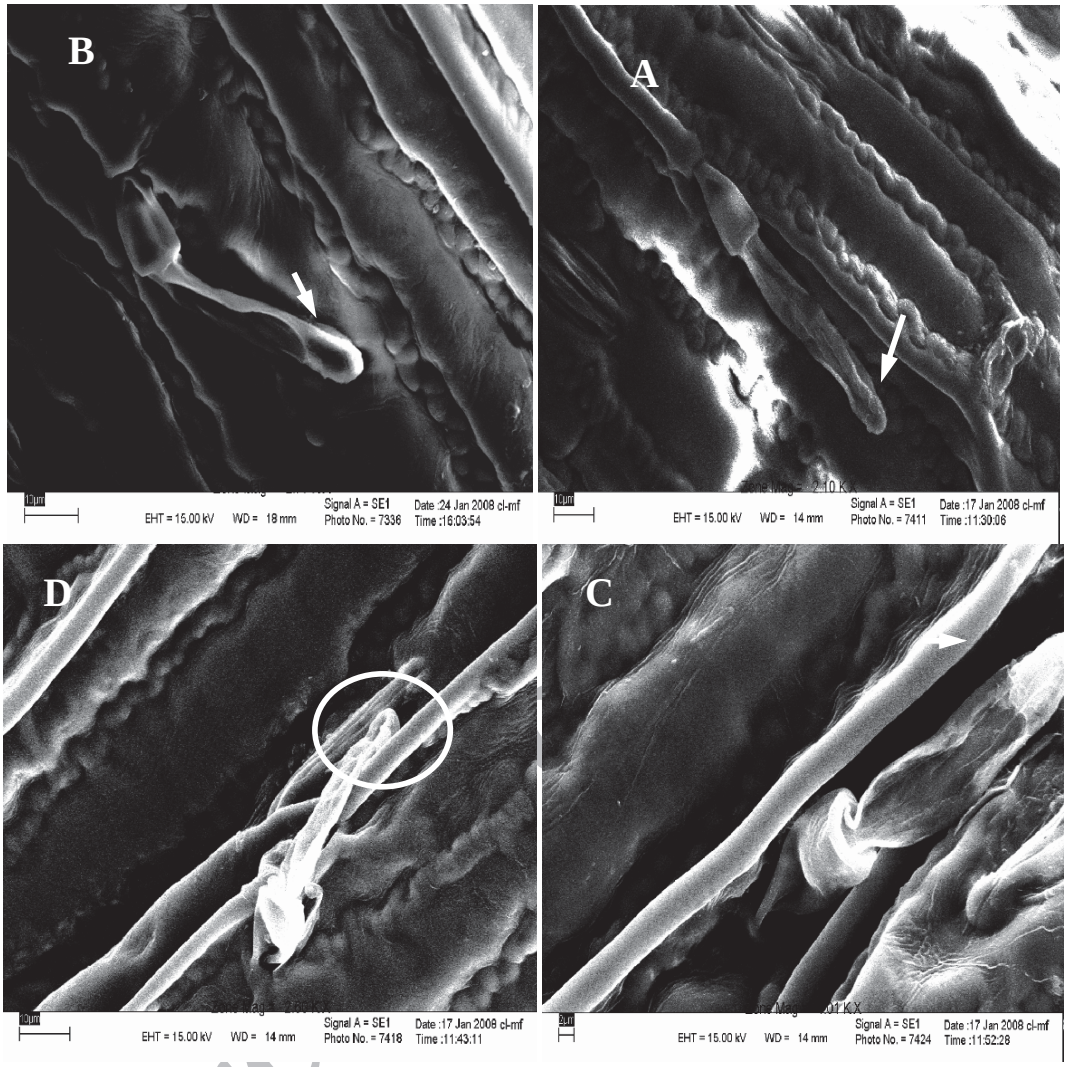
نتایج

ریسه‌های حاصل از جوانه‌زنی اسپوریدیوم‌ها روی سطوح نمونه‌ها در همه جهات رشد کرده و رشد جهت‌دار به طرف روزنه‌ها مشاهده شد (شکل۱-D). انتهای هیف در اکثر موارد قبل از نفوذ اندکی متورم شده و به این ترتیب بالشتک آلودگی(Appressorium) روی تمام سطوح مورد مطالعه دیده شد (شکل۱-B). برخی اسپوریدیوم‌ها ریسه کوچکی تشکیل داده بودند که به داخل سلول میزبان نفوذ نکرده بودند. رخنه مستقیم به اپیدرم سلول در مایه‌زنی به روش محلول‌پاشی دیده شد (شکل ۱-C). در چنین مواردی لوله تندش در نوک متورم شده بودند که بیانگر احتمال رخنه مستقیم در اپیدرم سلول است (شکل ۱-B). رخنه لوله تندش از طریق روزنه به روش محلول‌پاشی دیده شد. در اغلب رخنه‌ها از طریق روزنه، بالشتک آلودگی روی روزنه‌ها تشکیل شد (شکل۱-D).

بررسی تغییرات هیستوپاتولوژیک پس از رخنه در قارچ *U. maydis* نشان داد که در نمونه‌های مایه‌زنی شده به روش تزریق (جدول ۱)، ریسه‌های قارچ در دو روز اول در نزدیکی محل تزریق (۲۳٪ اطراف محل تزریق) دیده شد ولی در منطقه دورتر از آن ریسه‌ای دیده نشد. دو روز بعد از مایه زنی، سلول‌های اپیدرمی از برگ‌های آلوده حاوی ریسه بدون انشعاب بودند. چهار روز پس از مایه‌زنی، ریسه قارچ در فضای بین سلولی رشد کرده و آنجا را اشغال کرده بود و ریسه به صورت منشعب در بافت دیده شد (شکل۲). سلول‌های آلوده در این حالت به طور قابل مشاهده‌ای از سلول‌های سالم بزرگ‌تر بودند. این امر احتمالاً به دلیل تحریک سلول‌های میزبان و ایجاد هیپرتروفی و هیپرپلازی در این سلول‌هاست. از روز

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱. نفوذ ریسه ***Ustilago maydis*** به درون گیاه ذرت با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره. **A**: جوانه‌زنی اسپوریدیوم روی قسمت-های مختلف بوته. (محل روزنه با پیکان نشان داده شده است). **B**: انتهای هیف در اکثر موارد قبل از نفوذ اندکی متورم گردیده و به این ترتیب بالشتک آلودگی روی تمام سطوح مورد مطالعه دیده شد (پیکان). **C**: رخنه مستقیم به اپیدرم سلول در مایه‌زنی به روش محلول پاشی. **D**: رخنه لوله تندش از طریق روزنه به روش محلول‌پاشی دیده شد. بالشتک آلودگی با پیکان نشان داده شده است (عکس از نگارنده).

Fig. 1. Scanning electron microscopy of *Ustilago maydis* hyphae penetration in maize leaves. A: sporidium germination on different parts of plant. (place of stoma mark with arrows). B: Most of the time appressorium form at the site of penetration (arrows). C: Direct penetration in leaf epidermic cells occur on a spray method inoculation. D: Stoma penetration on a spray method inoculatin. Appressorium mark with arrow (photos made by author).

www.SID.ir

جدول ۱. موقعیت ریسه‌های *Ustilago maydis* در قسمت‌های مختلف نهال آلوده مایه‌زنی شده به روش تزریق و محلول‌پاشی در مراحل مختلف توسعه بیماری

- نمونه‌ها در مقاطع ۱۲-۷ µm (به طور متوسط ۸/۵ µm) بریده شده‌اند.

Table1. *Ustilago maydis* hyphae position on different parts of contaminated plant inoculation with injection and spray method during disease development.

- 7-12µm (~8.5µm) Section of embedded specimens.

روزهای بعد از مایه‌زنی Days after inculation (No.)	نمونه‌های برش داده شده Samples sectioned (No.)	درصد حضور ریسه در برش‌های گرفته شده از هر رقم Percent of samples with hyphe in approximate level of sectioning in each varietes					
		دابل‌کراس۷۰۴		سینگل‌کراس ۶۴۷		سینگل‌کراس ۳۰۱	
		تزریق Injection	محلول-پاشی Spray	تزریق Injection	محلول-پاشی Spray	تزریق Injection	محلول-پاشی Spray
2	5	23	16	22	18	15	9
4	5	42	38	40	43	30	26
7	5	72	69	68	77	45	42
11	5	83	80	75	83	61	62
مشاهده علایم (25)	5	100	100	100	100	100	100

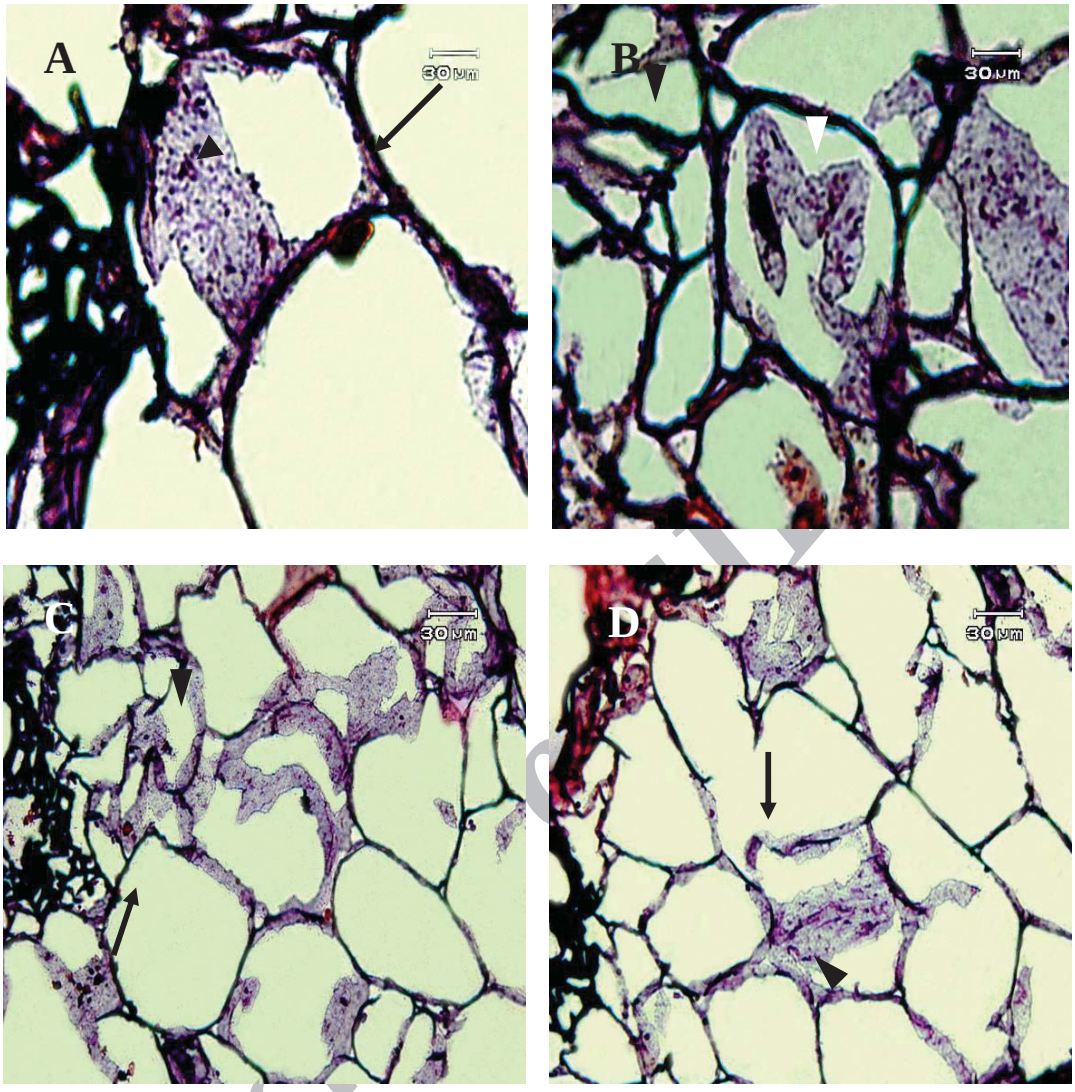
۱۱ به بعد ریسه قارچ به درون سلول نفوذ کرده و در تمام مقاطع مورد بررسی دیده شد (شکل ۲). انشعابات قارچ شکل‌های متفاوتی داشتند؛ برخی ساده و به نظر می‌رسید ریسه‌هایی هستند که رشد آنها ادامه دارد (شکل۲- C)، برخی شاخه‌های بین سلولی متورمی بودند (شکل۲- A و D) و برخی دیگر به صورت انگشت‌مانند خاتمه یافته بودند و یا به نوعی متورم گشته بودند (شکل۲-B). ریسه نفوذ کرده در داخل سلول میزبان، غلاف ژلاتینی را ایجاد کرده بود که سلول‌های نابالغ و بالغ را احاطه کرده بود (شکل ۳). در نهایت ریسه آلوده کننده در حفره‌های ایجاد شده و یا درون سلول به صورت Ustilago type تولید تلیوسپورکردند. تلیوسپورهای ایجاد شده گرد تا بیضوی بی نوک، دارای زواید خاردار مشاهده شدند که به مقدار فراوان در محل آلودگی یافت شدند.

در نمونه‌های مایه‌زنی شده به روش محلول پاشی (جدول ۱)، دو روز پس از مایه‌زنی ریسه‌ها به مقدار کمی در در محل محلول پاشی به درون بافت نفوذ کرده بودند. به غیر از مدت زمان اولیه برای نفوذ تفاوت قابل ملاحظه‌ای در توسعه بعدی قارچ در گیاه در دو روش مایه‌زنی دیده نشد.

بر اساس نتایج به دست آمده حاصل از آنالیز واریانس داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح α =۰/۵ در مایه‌زنی به روش تزریق بین رقم‌های سینگل‌کراس ۳۰۱ و ۶۴۷، و بین رقم‌های ۶۴۷ و

Archive of SID

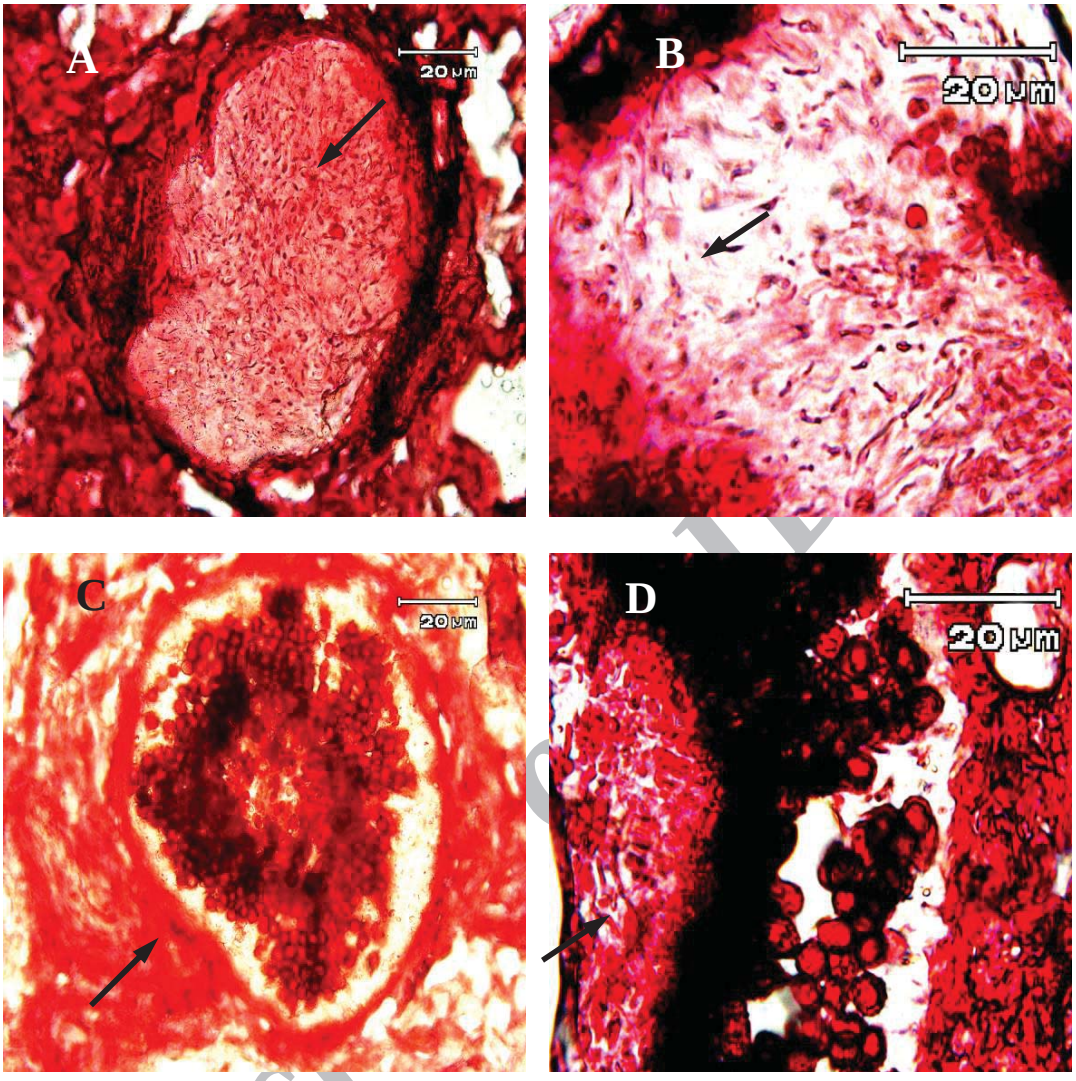
www.SID.ir



شکل۲. ریسه‌های بین سلولی و درون سلولی قارچ*U. maydis* در گیاه ذرت ۱۱ روز پس از مایه‌زنی. ریسه‌های بین سلولی با پیکان و ریسه‌های درون سلولی با نوک پیکان نشان داده شده است. در شکل A و D شاخه‌های بین سلولی متورمی از ریسه درون سلول مشاهده می‌شود. انتهای انگشت‌مانند ریسه به داخل سلول در شکل B نشان داده شده است. ریسه در شکل C به نظر ریسه‌ای می‌رسد که رشد آن ادامه دارد (عکس از نگارنده).

Fig. 2. *Ustilago maydis* intra and inter cellular hyphae in maize 11 days after inoculation. Inter cellular hyphae shows with arrows and intra ones shows with arrowhead. Fig. A and D shows swollen intercellular hyphae. Finger like terminated hyphae shows on fig. B. hyphae seem to continue growing on fig. C (photos made by author).

www.SID.ir



شکل ۳. سلول بزرگ شده حاوی تلیوسپورهای بالغ و نابالغ درون غلاف ژلاتینی. در شکل A و B سلول بزرگ شده مشاهده می‌شود که در آن تلیوسپورهای نابالغ در حال بلوغ هستند. تشکیل تلیوسپور در بافت آلوده در شکل C نشان داده شده است تلیوسپورهای ایجاد شده در غلاف ژلاتینی قرار دارند. شکل D در مکانی که پیکان قرار دارد ریسه‌ای را نشان می‌دهد که تلیوسپورها در حال شکل‌گیری هستند (عکس از نگارنده).

Fig. 3. Growing cells contain both mature and immature teliospors surrounded by gelatinus sheath. On fig. A and B growing cell contain immature teleiospors turn to mature ones. Teliospore formation on contaminated tissue shows in fig. C. Sporgenous hyphae shows with arrow on fig. D (photos made by author).

دابل‌کراس۷۰۴ اختلاف غیر معنی‌دار و بین رقم‌های سینگل‌کراس ۳۰۱ و دابل‌کراس۷۰۴ اختلاف معنی‌داری از لحاظ رخنه و گسترش بیماری وجود دارد، هم‌چنین در مایه‌زنی به روش محلول‌پاشی اختلاف معنی‌داری بین رقم‌های سینگل‌کراس ۳۰۱ و ۶۴۷ با رقم دابل‌کراس۷۰۴ دیده شد.

www.SID.ir

بحث

شیوه‌های مختلف مایه‌زنی به ذرت در مراحل مختلف ابداع شده است که آلودگی موفقی را در اندام‌های مختلف بسته به محل مایه‌زنی، روی برگ، ساقه، بلال‌ها، جوانه‌های جانبی و گل آذین های نر ایجاد کرده است (Pop & MaCarter 1992). روش مایه زنی توصیف شده در این آزمایش به طور موفقی آلودگی را در گیاهچه‌های رشد داده شده در اتاق رشد ایجاد کرد. گال‌های ایجاد شده در روی برگ و ساقه و بلال هرچند با اندازه طبیعی آنها در مزرعه کمی تفاوت داشت ولی وجود تلیوسپور به خوبی در آنها مشهود بود.

در ایران تحقیقات زیادی در رابطه با ارزیابی رقم‌های مقاوم و شدت آلودگی قارچ سیاهک ذرت صورت گرفته است (Mehriyan *et al.* 1999، Jalali & Zamani 2000، Zamani & Estakhr 2004، Estakhr *et al.* 2007، Zamani & Estakhr 2007، Habibi 1999، Ghedrahmat *et al.* 1999). *سبزی* (۱۹۹۶) با بررسی ارقام رایج ذرت رقم دابل‌کراس۷۰۴ را با میانگین ۱/۹ درصد آلودگی بلال و ۳/۸ درصد آلودگی بوته در کلیه مناطق به عنوان متحمل‌ترین رقم بین ارقام رایج در کشور و رقم سینگل‌کراس ۳۰۱ با میانگین ۱۶ درصد آلودگی بلال و ۲۰/۶ درصد آلودگی بوته حساس ترین رقم گزارش کرده است (Sabzi 1996). نتایج حاصل از هیستوپاتولوژی این ارقام در این آزمایش با تأیید این مطلب نشان داد که بین ارقام دابل‌کراس۷۰۴ و سینگل‌کراس ۳۰۱ تفاوت معنی‌داری از لحاظ گسترش بیمارگر در میزبان وجود دارد.

شیوه رخنه و ایجاد آلودگی توسط *U. maydis* با برخی از سیاهک‌ها متفاوت است (Snetselaar & Mims 1993، Lutterll 1986، Pataky & Snetselaar 2006). سیاهک معمولی ذرت سیستمیک نیست و آلودگی موفق در این بیماری زمانی اتفاق می‌افتد که اسپوریدیوم پس از جوانه‌زنی و رخنه به میزبان، بتواند در میزبان توسعه یابد (Christensen 1963).

کریستنسن (Christensen 1963) بیان کرد که تزریق سوسپانسیون اسپوریدیوم در درون پیچ برگی از گیاهچه دائماً باعث آلودگی شده و منجر به ایجاد گال برگی یا انحراف نقطه رشد و یا مرگ گیاهچه می شود. ایجاد گال برگی و انحراف از نقطه رشد دقیقاً علائمی بود که در این بررسی پس از آلوده شدن گیاهچه‌ها در آنها دیده شد. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که مخلوطی از اسپوریدیوم جمع‌آوری شده از استان خوزستان توانایی آلوده کردن ارقام ذرت را دارد و لذا دارای اسپوریدیوم‌های سازگار در آلل‌های a و b می‌باشد. از آنجایی که هدف این مطالعه بررسی روند بیماری‌زایی این قارچ در گیاه میزبان ذرت بود تلاشی برای تعیین نوع استرین اسپوریدیوم‌ها صورت نگرفت.

بالشتک آلودگی ایجاد شده روی سطح گیاه در این بررسی کاملا شبیه هم بوده این بالشتک آلودگی بدون رنگدانه بوده و از نظر ساختمانی با دیگر بالشتک‌های آلودگی از دیگر قارچ‌های بیماری‌زا تفاوتی ندارد این نتایج، نتایج *استنسلار و میمس* (Snetselaar & Mims 1992, 1993) و *لوتیرل* (Lutterll 1986) را نیز تأیید می‌کند. بالشتک آلودگی در این قارچ به طور ساده‌ای از ریسه به وسیله متورم شدن انتهای ریسه قابل تشخیص می‌باشد. ریسه آلوده کننده دارای بالشتک آلودگی احتمالاً قادر به ورود مستقیم به داخل سلول‌های میزبان است. در طول مراحل نفوذ، غشای سیتوپلاسمی سلول مورد حمله در محل حمله ضخیم می‌شود و اطراف هیف نفوذی را

Archive of SID

www.SID.ir

می‌گیرد (Snetselaar & Mims 1993). این نوع رشد در طول کلونیزه شدن لایه اپیدرمی میزبان ادامه می‌یابد. در طول این مراحل ریسه دو هسته‌ای شروع به تکثیر می‌کند (Scherer *et al.* 2006). در مطالعه روند آلودگی در این بررسی، جهت‌دار بودن یا نبودن رشد ریسه‌های حاصل از جوانه‌زنی اسپوریدیوم بر روی اجزای گیاه مورد بررسی قرار گرفت. مطالعات میکروسکوپ الکترونی نگاره نشان داد که رشد ریسه‌ها روی سطوح مختلف از الگوی خاصی تبعیت نمی‌کند و رشد جهت‌دار ریسه به طرف روزنه‌ها دیده نشد. *استسلار و میمس* (Snetselaar & Mims 1992) بیان کردند که ریسه از طریق روزنه رشد نکرده و به جای آن از طریق کوتیکول به سلول‌های اپیدرمی نفوذ می‌کند. بنابراین با توجه به نتایج حاصل شده می‌توان چنین استدلال کرد که نفوذ قارچ به درون گیاه از الگوی خاصی تبعیت نمی‌کند و هم به صورت مستقیم از طریق پاره کردن کوتیکول و هم غیر مستقیم از طریق روزنه صورت می‌پذیرد.

در رابطه با این مسئله که این قارچ بین سلولی یا درون سلولی است گزارش‌های متفاوتی وجود دارد. *لوتیرل* (Lutterll 1986) بیان کرد که قارچ ***U. maydis*** اندام مکینه مانندی را به درون سلول‌های میزبان می‌فرستد. *هیچکوک و نورتن* (Hichcock & Norton 1896) میسلیوم بین سلولی ظریفی را توصیف کردند که انشعابات کوتاه و ضخیمی به درون سلول می‌فرستد. *لوتیرل* (Lutterll 1986) گزارش داد که میسلیوم قارچ عامل سیاهک ذرت همیشه درون سلولی است. *خاربوش* (Kharbush 1928) میسلیوم درون سلولی با مکینه‌ای را توصیف کرد که او آن را به نام انشعابات کوتاه و ضخیم توصیف نمود. *بانت و هرکوویتز* (Bannutt & Herskowitz, 1996) بیان کردند که اندکی بعد از نفوذ تا تشکیل ابتدایی گال، رشد بین سلولی ادامه می‌یابد و به قارچ این امکان را می‌دهد که از لایه سلول‌های اپیدرمی به مزوفیل و طناب‌های آوندی گسترش یابد. احتمالاً از روز پنجم به بعد قارچ ریسه‌هایی را به درون سلول می‌فرستد و ارتباط غذایی مستقیم بین گیاه و بیمارگر به وجود می‌آید. این انشعابات گاهی شبیه به ریسه‌های ادامه داری از قارچ بودند که به درون سلول گیاه نفوذ کرده بودند. از آنجایی که این انشعابات شکل‌های یکسانی نداشتند بر خلاف نظر *لوتیرل* (Lutterll 1986) آنها مکینه نامگذاری نشدند. مشاهدات این پژوهش حاکی از این مطلب است که، بعد از نفوذ اولیه به سلول‌های اپیدرمی، رشد هیف به صورت بین سلولی بوده و ریسه قارچ به غشای سلول میزبان نفوذ نمی‌کند. این نتایج، نتایج *لوتیرل* (Lutterll 1986)؛ *استسلار و میمس* (Snetselaar & Mims 1992, 1993) و *کاهمن و کامپر* (Kahmann & Kamper 2004) را نیز تأیید می‌کند.

در این بررسی انشعابات درون سلولی شکل‌های متفاوتی داشتند؛ برخی ساده و به نظر می‌رسید ریسه‌هایی هستند که رشد آنها ادامه دارد، برخی شاخه‌های بین سلولی متورمی بودند و برخی دیگر به صورت انگشت‌مانند خاتمه یافته بودند. این نتایج، نتایج حاصله از پژوهش‌های *استسلار و میمس* (Snetselaar & Mims 1992, 1993)؛ *بانت و هرکوویتز* (Bannutt & Herskowitz, 1996)؛ *دوهلیمون و همکاران* (Doehlemonn *et al.* 2008) را نیز تأیید می‌کند. در رابطه با این مسئله که قطعه قطعه شدن هیف درون سلول صورت می‌گیرد یا خارج از آن نظریات متفاوتی وجود دارد؛ *بانت و هرکوویتز* (Bannutt & Herskowitz 1996) قطعه قطعه شدن هیف را درون سلول‌های بزرگ شده توصیف کردند و برعکس آن *استسلار و میمس* (Snetselaar & Mims 1994)

Archive of SID

www.SID.ir

هیف اسپورزا را بین سلولی شناسایی کردند. آنها بیان کردند که در این مرحله، سلول‌های گیاهی از هم جدا شده بودند و فضای بین آنها به وسیله ریسه در حال رشد پر شده بود. در این پژوهش سلول‌های حجیم شده‌ای دیده شد که درون آن پر از ریسه اسپورزا بود. از طرف دیگر سلول‌های گیاهی مشاهده شد که از هم جدا شده بودند ولی درون آنها اسپورزایی صورت می‌گرفت. بنابراین بر اساس این مشاهدات قطعه قطعه شدن هیف هم درون سلول و هم درون حفره صورت می‌پذیرد. ژلاتینه شدن دیوار هیف توسط *لوتیرل* (Lutterll 1986)، *کریستنسن* (Christensen 1963)، *فیشر* و *هولتون* (Fisher & Holton 1975) و *استسلار* و *میمس* (Snetselaar & Mims 1992 1993) نیز گزارش شده است. سلول‌های میزبان در این مرحله بسیار بزرگ‌تر از حالت طبیعی بودند.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (67-65) متن انگلیسی مراجعه شود.

به نظر می‌رسید که اسپورهای بالغ شده و پیر در مرکز سلول و اسپورهای جوان در اطراف آن قرار دارند. گال‌های *U. maydis* در این مرحله و تا زمان بالغ شدن کامل آنها شامل اسپورهایی در همه مراحل توسعه بودند. این نتایج، نتایج *استسلار* و *میمس* (Snetselaar & Mims 1993, 1994)، *پیریز- مارتین* و همکاران (Perez-Martin *et al*. 2006) و *روییز- هررا* و *مارتین- اسپینوزا* (Ruiz-Herrera & Martinez- Espinoza 1998) را تأیید می‌کند.

مطالعه هیستوپاتولوژی قارچ *U. maydis* درک صحیح از رابطه بیمارگر میزبان و امکان مسدود کردن قسمتی از چرخه زندگی قارچ به منظور جلوگیری از بیماری‌زایی قارچ را فراهم می‌کند.

Archive of SID

www.SID.ir