مجله دانش گیاه‌پزشکی ایران
دوره ۴۲، شماره ۱، ۱۳۹۰ (۷۴-۶۱)

جمعیت‌های آمیزشی در گونه کمپلکس *Gibberella fujikuroi*، عامل پوسیدگی طوقه برنج در گیلان و تعیین گروه‌های سازگاری رویشی آنها

فریبرز لطفی‌میری[۱]، محمد جوان نیکخواه[۲]*، حمیدرضا زمانی‌زاده[۳] و فریدون پاداشت دهکایی[۴]
۱، ۳، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشیار، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران
۲، دانشیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، ۴، استادیار مؤسسه تحقیقات برنج کشور، رشت
(تاریخ دریافت: ۸۸/۵/۲۶ - تاریخ تصویب: ۸۹/۷/۷)

چکیده

به منظور مطالعه ساختار جمعیت گونه کمپلکس *Gibberella fujikuroi*، عامل پوسیدگی طوقه برنج، نمونه‌برداری از مزارع نقاط مختلف استان گیلان در سال ۱۳۸۳ صورت گرفت. از بین ۴۱ جدایه به دست آمده از ارقام مختلف، به غیر از سه جدایه، بقیه دارای زنجیره میکروکنیدیوم بودند. برای مطالعه باروری جنسی و تعیین جمعیت و تیپ آمیزشی جدایه‌ها، هر یک از آنها با شش جدایه ماده بارور نماینده استاندارد از سه جمعیت آمیزشی A، C و D روی محیط غذایی هویج آگار در آزمایشگاه تلاقی داده شدند. به ازای هر جمعیت آمیزشی دو جدایه نماینده از دو تیپ آمیزشی مخالف شامل *MATA-1* و *MATA-2* برای جمعیت آمیزشی A، *MATC-1* و *MATC-2* برای جمعیت آمیزشی C و *MATD-1* و *MATD-2* برای جمعیت آمیزشی D مورد استفاده قرار گرفتند. در نتیجه، ده جدایه در جمعیت آمیزشی A (*Fusarium verticillioides*)، دو جدایه در جمیعت آمیزشی C (*F. fujikuroi*) و ۲۹ جدایه در جمعیت آمیزشی D (*F. proliferatum*) گروه‌بندی شدند. تمام جدایه‌های *F. verticillioides* متعلق به تیپ آمیزشی *MATA-1* و تمام جدایه‌های *F. fujikuroi* متعلق به تیپ آمیزشی *MATC-1* بودند. در حالی که، هر دو تیپ آمیزشی *MATD-1* و *MATD-2* برای جدایه‌های *F. proliferatum* شناسایی شدند. به علت وجود هر دو تیپ آمیزشی در جدایه‌های جمعیت آمیزشی D، امکان تلاقی بین آنها مطالعه گردید که از ۳۶ تلاقی تنها دو تلاقی منجر به تشکیل پریتسیوم واجد آسک و آسکوسپور شدند. در آزمون سازگاری رویشی با استفاده از جهش یافته‌های *nit* نیز مشخص شد که ده جدایه *F. verticillioides* در نه گروه سازگاری رویشی، دو جدایه *F. fujikuroi* هر کدام در یک گروه سازگاری رویشی جداگانه و ۲۹ جدایه *F. proliferatum* نیز در بیست گروه سازگاری رویشی قرار گرفتند. تلاقی جدایه‌های متعلق به سه جمعیت آمیزشی با هم نیز منجر به تشکیل هتروکاریون نگردید. آزمون بیماری‌زایی ۴۱ جدایه روی رقم خزر انجام گردید و همه جدایه‌ها نشانه پوسیدگی طوقه همراه با کلنی‌های سفید رنگ روی ساقه‌ها را ایجاد کردند. در این تحقیق معلوم شد که جمعیت‌های آمیزشی A، C و D از گونه کمپلکس *G. fujikuroi* در گیلان وجود دارند که در بین آنها جمعیت آمیزشی D غالب است. همچنین براساس آزمون شناسایی گروه‌های سازگاری رویشی تنوع زیادی در دو جمعیت آمیزشی A و D مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: برنج، *Fusarium*، باروری جنسی، تیپ آمیزشی، سازگاری رویشی، بیماری‌زایی.

* نویسنده مسئول: محمد جوان نیکخواه تلفن: ۲۶۰۰۷۳۵- ۰۹۱۲ E-mail: jnikkhah@ut.ac.ir

مقدمه

گونه کمپلکس *Gibberella* Wollenweber *fujikuroi* (Saw) عامل بیماری پوسیدگی طوقه، به عنوان یکی از مهم‌ترین بیماری‌های بذرزاد برنج می‌باشد. محققین با ملاک قراردادن خصوصیات متفاوتی از فرم غیرجنسی، تعداد گونه‌های مختلفی را در بخش *Liseola* از جنس *Fusarium* معرفی نموده‌اند به طوری که، این مسأله سردرگمی خاصی در تاکسونومی فوزاریوم‌های این بخش ایجاد کرده است. همین مسئله موجب شد که این قارچ نیز به صورت یک گونه کمپلکس معرفی شود. یکی از راههایی که محققین برای غلبه بر این مشکل برگزیدند به کارگیری آزمایش‌های تلاقی جنسی برای تشخیص گونه‌ها بود. براین اساس، تاکنون معلوم شده که گونه کمپلکس *G. fujikuroi* از نه جمعیت آمیزشی تشکیل شد که با حروف A تا I نامگذاری شده‌اند (Leslie, 2006; Summerell *et al*., 2003).

در قارچ‌های آسکومیست هتروتالیک، سازگاری جنسی تحت کنترل یک سیستم دو حالتی (dimictic) است که در آن یک لوکوس به نام *MAT* با دوآلل *MAT-1* و *MAT-2* وجود دارد (Glass & Kuldau, 1992). تکثیر جنسی در غالب فوزاریوم‌ها بخصوص در *G. fujikuroi* نیز توسط آلل‌های فوق کنترل می‌شود. Chulze *et al*. (2000) در آرژانتین، با تلاقی دادن جدایه‌های عامل پوسیدگی ساقه ذرت با جدایه‌های استاندارد واجد هر یک از دو تیپ آمیزشی، دو جمعیت آمیزشی A (*F. verticilliodes*) و D (*F. proliferatum*) را شناسایی کردند که در هر یک از آنها دو تیپ آمیزشی *MAT-1* و *MAT-2* با فراوانی متفاوت وجود داشتند.

تعیین گروه‌های سازگاری رویشی (VCGs) یک ابزار مفید جهت تجزیه و تحلیل جمعیت‌های قارچی و یک ابزار مطالعاتی جهت اندازه‌گیری تنوع ژنتیکی می‌باشد. در واقع یک نشانگر برای نشان دادن اختلافات ژنتیکی درون یک گونه است. سازگاری رویشی که به عنوان سازگاری هتروکاریونی نیز شناخته می‌شود دارای تاریخی طولانی در مطالعات قارچ‌شناسی و هم در مطالعات ژنتیکی می‌باشد .(Leslie, 1993) سازگاری رویشی در ساده‌ترین صورت به این معنی است که دو هیف می‌توانند با هم آمیخته شوند و پس از تبادل هسته‌ها، تشکیل یک هتروکاریون پایدار دهند. استرین‌هایی که هتروکاریون پایدار تشکیل می‌دهند به طور رویشی سازگار می‌باشند و در یک گروه سازگاری رویشی (VCGs) قرار می‌گیرند (Puhalla & Spieth, 1983). توانایی تشکیل هتروکاریون در قارچها به طور ژنتیکی به وسیله تعدادی لوکوس ناسازگاری کنترل می‌شود که اصطلاحاً *het* (heterokaryon incompatibility) یا *vic* (vegetative incompatibility) نامیده می‌شوند. اگر تمام آلل‌ها برای این لوکوس‌ها در دو جدایه با هم یکسان باشند، امکان تشکیل هتروکاریون پایدار بین آنها وجود دارد. در غیر این صورت هتروکاریون حاصل به سرعت خواهد مرد یا به شدت از رشد باز می‌ماند. واکنش کشندگی ممکن است در طبیعت به صورت مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی باشد. سرعتی که با آن کشندگی اتفاق می‌افتد به تعداد جایگاه‌های با تفاوت آللی بستگی دارد و اگر تفاوت‌های فراوانی وجود داشته باشد، با سرعت بیشتری رخ می‌دهد (Labarere & Bernet, 1977).

Chulze *et al*. (2000)، ۳۶ جدایه قارچ *F. verticillioides* را به ۲۸ گروه سازگاری رویشی تقسیم کردند که در آن، ۲۳ گروه سازگاری رویشی تک عضوی و ۵ گروه چند عضوی وجود داشت. در گروه‌های چند عضوی، چهار گروه دو عضوی و یک گروه پنج عضوی تشخیص داده شد. در مطالعه ژنتیک جمعیت قارچ *F. moniliforme* (=*F. verticillioides*)، از VCGs به‌عنوان یک نشانگر استفاده شده است. جدایه‌هایی که از نظر رویشی با یکدیگر سازگار بودند در یک گروه سازگاری رویشی قرار گرفتند و معلوم شد که این جدایه‌ها در یک دسته از آلل‌های شناخته شده از لوکوس‌های *het* مشترک هستند (Huang *et al*., 1997). گروه‌های سازگاری رویشی قارچ‌هایی مانند *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinus*، *F. oxysporum*، *F. oxysporum* f. sp. *cepae*، *F. poae* و *F. graminearum* نیز مورد بررسی قرار گرفته است (Ahn *et al*., 1998; Kerenyi *et al*., 1997; Naseri *et al*., 2000; Swift *et al*., 2002).

اهداف این تحقیق شناسایی عوامل پوسیدگی طوقه برنج در داخل گونه کمپلکس *G. fujikuroi*، شناسایی جمعیت و تیپ‌های آمیزشی جدایه‌های عامل بیماری با

استفاده از جدایه‌های نماینده (tester) استاندارد و بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های متعلق به هر گونه براساس شناسایی سازگاری رویشی بود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

در سال ۱۳۸۳، نمونه‌های طوقه آلوده از نشا و همچنین ساقه‌های بوته‌های بیمار آکنده از ریسه‌های سفید و کنیدیوم‌های قارچ از کشتزارهای مختلف برنج استان گیلان به صورت تصادفی جمع‌آوری شدند. با توجه به حساسیت بیشتر رقم خزر نسبت به سایر ارقام، نمونه های بیشتری از این رقم به دست آمد. نمونه‌ها در داخل پاکت کاغذی در یخچال نگهداری شدند.

جداسازی، خالص‌سازی و نگهداری جدایه‌ها

بافت‌های آلوده به مدت پنج دقیقه با جریان ملایم آب شیر شسته شدند. محل طوقه گیاه در اندازه‌های ۱/۵-۱ سانتی‌متری بریده و پس از ضد عفونی سطحی با محلول هیپوکلریت سدیم ۲۵٪ به مدت ۱ دقیقه و شستشو با آب مقطر استریل، روی محیط غذایی PDA منتقل و در انکوباتور با دمای ۲۷°C به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شدند. پس از رشد پرگنه و اسپورزایی، خالص‌سازی به روش تک اسپور کردن روی محیط آب - آگار (water-agar) ۲٪ و با تهیه سوسپانسیون قارچ انجام گردید. برای نگهداری جدایه‌ها از میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری حاوی ماسه استریل استفاده شد (Padasht, 1993). ماسه‌های مرطوب را در میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری در سه نوبت به منظور از بین بردن میکروارگانیسم‌های موجود احتمالی در اتوکلاو در دمای ۱۲۰°C به مدت ۲۰ دقیقه استریل کرده و پس از ریختن دو قطره از سوسپانسیون جدایه‌های خالص‌سازی شده در داخل ماسه استریل، درب میکروتیوب‌ها با پارافیلم مسدود و در دمای ۴°C درون یخچال تا هنگام استفاده نگهداری گردید.

بررسی مرفولوژی جدایه‌ها و شناسایی گونه قارچ عامل بیماری

در این مطالعه، برای شناسایی گونه قارچ عامل بیماری از منابعی نظیر Nirenberg & O'Donnell (1998)، O'Donnell *et al.* (1998) و همچنین Leslie & Summerell (2006) استفاده شد. برای این منظور از محیط غذایی SNA استفاده به عمل آمد. پس از کشت قارچ، تشتک‌های پتری در دمای ۲۰°C و در تاریکی مطلق گذاشته شدند و بعد از گذشت ۱۴-۱۰ روز از نظر شکل و اندازه میکروکنیدیوم روی میسلیوم هوایی، داشتن زنجیره میکروکنیدیوم روی میسلیوم هوایی و طول آن، وجود یا عدم وجود کلامیدوسپور، وجود منوفیالید و پلی فیالید و وجود سرهای دروغی (False-head) بررسی شدند.

آزمون بیماری‌زایی

ابتدا بذرهای رقم خزر با آب شیر شستشو داده شدند. پس از ضد عفونی با محلول هیپوکلریت سدیم ۲۵٪ به مدت ۵ دقیقه و شستشو با آب مقطر استریل، تعداد ۱۵ بذر در داخل هر گلدان کاشته شد. هنگامی که نشاها به اندازه کافی رشد کردند، ۵ نشای پنج برگی در هر گلدان باقی ماند و بقیه نشاها حذف شدند. از هر جدایه، سوسپانسیون قارچ با غلظت 10^6 کنیدیوم در هر میلی‌لیتر تهیه و به هر بوته در مرحله قد کشیدگی یک میلی‌لیتر سوسپانسیون قارچ با سرنگ انسولین تزریق شد. در گلدان شاهد نیز یک میلی‌لیتر آب مقطر استریل به هر بوته تزریق گردید.

بررسی وضعیت باروری جنسی و تعیین جمعیت آمیزشی جدایه‌ها

برای این منظور از محیط غذایی هویج آگار (carrot-agar) کاه برنج که از اضافه نمودن ۵۰ میلی‌لیتر عصاره کاه برنج به ۵۰۰ میلی‌لیتر عصاره هویج و رساندن حجم به ۱۰۰۰ میلی‌لیتر به دست آمد، برای اولین بار به کار گرفته شد (Correll *et al.*, 1987). وضعیت باروری جنسی و تعیین جمعیت و تیپ آمیزشی جدایه‌ها با استفاده از جدایه‌های استاندارد نماینده (tester) ماده بارور که از کشور آفریقای جنوبی تهیه شده بودند، انجام شد. در این مطالعه، از روش تلاقی حلقه یا قوس میسلیومی استفاده شد. بدین ترتیب که ۴۱ جدایه ایرانی با جدایه‌های نماینده از سه جمعیت آمیزشی A (*F. verticillioides*)، C (*F. fujikuroi*) و D (*F. proliferatum*) تلاقی داده شدند. با توجه به نتایج حاصل از مطالعات مرفولوژیک و گونه های شناسایی شده، هر جدایه مورد مطالعه روی محیط هویج آگار

درون تشتک‌های پتری در کنار هر کدام از دو تیپ آمیزشی *MAT-1* و *MAT-2* متعلق به هر جمعیت آمیزشی به صورت مجزا با فاصله ۳-۲ سانتی‌متری کشت گردید. سپس این کشت‌ها به مدت ۵ تا ۶ روز در دمای ۲۶-۲۷°C و در تاریکی قرار گرفتند تا زمانی که کلنی‌ها به اندازه کافی رشد کرده و با هم تماس برقرار کردند. سپس کشت‌های در دمای ۲۲-۲۳°C زیر نور مداوم فلورسنت قرار گرفتند. تشکیل پریتسیوم به مدت حدود دو ماه هر هفته یکبار مورد ارزیابی قرار گرفت. دو تیپ آمیزشی متعلق به هر کدام از جمعیت‌های آمیزشی A، C و D نیز به طور مجزا تلاقی داده شدند و این کشت‌ها نیز به عنوان شاهد در شرایط یکسان با سایر جدایه‌ها قرار گرفتند.

جداسازی جهش یافتگان (nitrate non-utilizing mutant) *nit*

از کشت‌های خالص ۴ تا ۵ روزی هر جدایه در محیط PDA قطعات کوچکی به محیط‌های کشت حاوی کلرات پتاسیم ($KClO_3$) شامل PDC (PDA+chlorate) و MMC (Minimal medium+chlorate) منتقل و تشتک‌های پتری در درجه حرارت ۲۵°C و دوره نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی به مدت ۱۴ تا ۲۱ روز درون انکوباتور نگهداری و مرتباً مورد بررسی قرار گرفتند (Glass & Kuldau, 1992). تیپ وحشی قارچ به دلیل تولید آنزیم احیاء کننده نیترات (nitrate reductase) قادر به تبدیل کلرات به کلریت و به دلیل سمیت کلریت رشد محدود و ناچیزی داشت در حالی که جهش یافتگان مقاوم به کلرات (*crn, nit*[1]) به صورت قطاع های سریع الرشد در این محیط‌ها رشد کردند. جهت شناسایی قطاع های *nit* از قطاع‌های *crn*، قطعاتی از حاشیه قطاع ها به محیط کشت (Minimal Medium) MM منتقل و به مدت ۶-۴ روز در دمای ۲۵°C درون انکوباتور نگهداری شدند (Puhalla & Spieth, 1983). جهش یافتگان *nit* روی این محیط کشت رشد ظریف و گسترده داشتند، اسپور و ریسه هوایی تولید نکردند زیرا قادر به مصرف نیترات (تنها منبع نیتروژن محیط کشت MM) نبودند. در حالی که، جهش یافتگان *crn* روی این محیط به جهت توانایی استفاده از نیترات، رشد تیپ وحشی داشتند. جهش یافتگان *nit* جهت ادامه آزمایش وارد مرحله بعدی شدند و جهش یافتگان *crn* حذف شدند.

محیط‌های کشت مورد استفاده

الف) محیط پایه (Basal Medium)

این محیط ترکیبی از مواد اصلی و فرعی است که به عنوان محیط پایه در ساختن سایر محیط‌های کشت مورد استفاده قرار گرفت. مواد فرعی با مقادیر ذکر شده در زیر به ۹۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه و پس از استریل کردن در اتوکلاو به عنوان ذخیره در فریزر نگهداری شد و به میزان ۰/۲ میلی‌لیتر جهت ساخت در یک لیتر محیط کشت پایه استفاده گردید.

ب) محیط کشت حداقل (Minimal Medium, MM)

این محیط کشت با افزودن ۲ گرم نیترات سدیم ($NaNO_3$) به یک لیتر محیط پایه تهیه و محیط حاصل استریل شد و برای شناسایی جهش یافتگان *nit*، تعیین فنوتیپ جهش یافتگان و همچنین آزمون مکمل‌سازی آنها استفاده گردید (Correll *et al*., 1987).

ج) محیط کشت PDC (PDA+Chlorate)

برای تهیه این محیط کشت ۴۵-۱۵ گرم کلرات پتاسیم ($KClO_3$)، ۱/۶ گرم ال آسپاراژین (L-Asparagine) و ۲ گرم نیترات سدیم ($NaNO_3$) به یک لیتر محیط کشت PDA اضافه شد و محیط حاصل استریل گردید (Correll *et al*., 1987). لازم به ذکر است که درصد کلرات پتاسیم استفاده شده در این محیط بستگی به جدایه‌ای داشت که مورد آزمایش واقع می‌شد.

د) محیط کشت (Chlorate Minimal Medium) MMC

از این محیط جهت جهت شناسایی و تهیه جهش یافتگان *nit* در بین جدایه‌ها استفاده گردید (Correll *et al*., 1987; Puhalla & Spieth, 1983). برای تهیه این محیط ۴۵-۱۵ گرم کلرات پتاسیم ($KClO_3$) و ۱/۶ گرم ال‌آسپاراژین (L-Asparagine) و ۲ گرم نیترات سدیم ($NaNO_2$) به یک لیتر محیط پایه (BM) اضافه گردید. محیط حاصل استریل شد و مورد استفاده قرار گرفت. مانند محیط PDC درصد کلرات پتاسیم مورد استفاده بستگی به جدایه‌ای داشت که مورد آزمایش واقع می‌شد.

1. Chlorate resistant *nit*

مواد فرعی	مواد اصلی
5.0 gr Citric acid	30 gr Sucrose
5.0 gr $ZnSO_4.7H_2O$	1.0 gr KH_2PO_4
1.0 gr $Fe(NH_4)_2 (SO_4)2.6H_2O$	0.5 gr $MgSO_4.7H_2O$
250 mg $CuSO_4. 5H_2O$	0.5 gr KCl
50 mg $MnSO_4.H_2O$	10 mg $FeSO_4.7H_2O$
50 mg H_3BO_3 (Boric acid)	20 gr Agar
50 mg $Na_2MO_4.2H_2O$	

تعیین کلاس فنوتیپی جهت یافتگان *nit*

حلقه‌های آگاری واجد میسلیوم از هر جهش یافته رشد یافته روی محیط کشت MM به ترتیب روی محیط پایه که دارای یکی از پنج منبع نیتروژن نتیرات سدیم، نیتریت سدیم، هیپوزانتین، تارتارات آمونیوم و اسید اوریک بود، منتقل و تشتک‌های پتری در دمای ۲۵°C به مدت ۴ روز نگهداری شدند. بررسی فنوتیپ جهش یافتگان *nit* براساس جدول ۱ انجام شد (Correll *et al*., 1987). ترکیب محیط‌های پنج گانه فوق به شرح ذیل می‌باشد.

الف) محیط کشت نیترات‌سدیم ($NaNO_3$): با افزودن ۲ گرم نیترات سدیم به یک لیتر محیط پایه تهیه شد.

ب) محیط کشت نیتریت‌سدیم ($NaNO_2$): با افزودن ۰/۵ گرم نیتریت سدیم به یک لیتر محیط پایه تهیه شد.

ج) محیط کشت تارتارات‌آمونیوم ($(NH_4)_2C_4H_4O_6$): این محیط کشت با افزودن یک گرم تارتارات آمونیوم به ۱ لیتر محیط پایه تهیه شد.

د) محیط کشت هیپوزانتین: این محیط کشت با اضافه کردن ۰/۲ گرم هیپوزانتین به یک لیتر محیط پایه تهیه شد.

هـ) محیط کشت اسید اوریک: این محیط با اضافه کردن ۰/۲ گرم اسید اوریک به یک لیتر محیط پایه تهیه شد.

آزمون مکمل‌سازی (Complementary test) جهش یافتگان *nit* و تعیین گروه‌های سازگاری رویشی

در آزمون مکمل‌سازی که بین جهش یافتگان *nit* هر جدایه با هم به طور جداگانه انجام شد، در هر تشتک پتری حاوی محیط کشت MM، تلاقی *Nit* M یک جدایه در برابر *nit* 1 و یا *nit* 3 آن جدایه و یا *nit* 3 یک جدایه در برابر *nit* 1 آن جدایه با قرار دادن حلقه آگار واجد میسلیوم به فاصله ۱ تا ۲ سانتی‌متری از هم انجام شد. با این عمل امکان بروز آناستوموز هیفی و تشکیل هتروکاریون بین جهش یافتگان یک جدایه آزمایش شد.

برای تعیین گروه‌های سازگاری رویشی (VCGs) نیز عمل فوق بین جهش یافتگان جدایه‌های مختلف با همان ترتیبی که گفته شد، انجام گردید. در هر دو آزمون مکمل‌سازی و تعیین گروه‌های سازگاری رویشی تشتک‌های پتری در دمای ۲۵°C به مدت ۱۴-۷ روز و در تاریکی درون انکوباتور نگهداری شدند.

جدول ۱- طبقه‌بندی جهش یافتگان *nit* قارچی برحسب نوع جهش و رشد آنها روی محیط‌های غذایی با منابع مختلف نیتروژن (Correll et al., 1987)

نوع جهش	فنوتیپ	نوع رشد قارچ در منابع نیتروژن				
		نیترات سدیم	نیتریت سدیم	هیپوزانتین	آمونیوم تارتارات	اسید اوریک
بدون جهش	تیپ والد	+	+	+	+	+
جایگاه ژنی آنزیم نیترات ریدوکتاز	*nit* 1	-	+	+	+	+
جایگاه ژنی آنزیم تنظیم کننده مسیر احیاء نیترات	*nit* 3	-	-	+	+	+
جایگاه تنظیم ژنی کوفاکتور مولیبدن	*Nit* M	-	+	-	+	+

نتایج

شناسایی قارچ عامل بیماری

در مجموع بین ۴۱ جدایه مورد مطالعه سه جدایه Gf-235، Gf-211 و Gf-233 روی محیط غذایی SNA فاقد زنجیره میکروکنیدیوم بودند. بر اساس مطالعات مرفولوژیکی جدایه‌ها با استفاده از کلیدها، سه گونه *F. proliferatum*، *F. verticillioides* و *F. fujikuroi* شناسایی شدند.

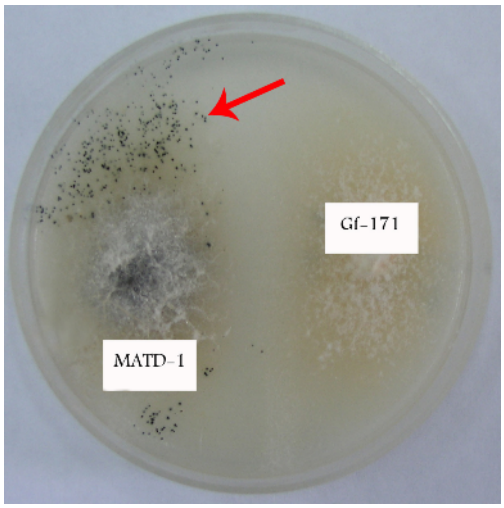
آزمون بیماری‌زایی

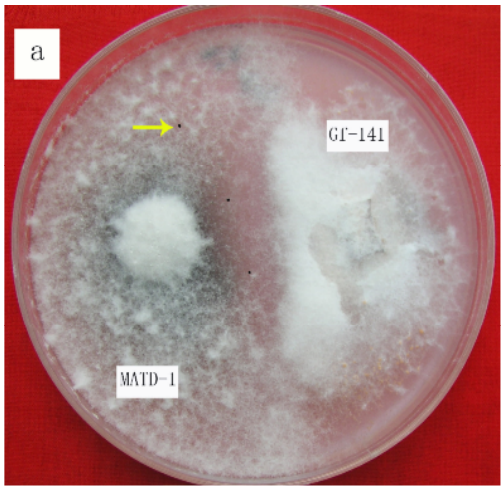
از بین ۴۱ جدایه، تنها جدایه Gf-233 علائم بیماری پوسیدگی طوقه را ایجاد نکرد ولی برای بقیه جدایه‌ها علائم بیماری به صورت پوشش سفید رنگ کلنی قارچ روی ساقه‌ها مشاهده گردید (شکل ۱). زمان بروز علائم برای جدایه‌های مختلف متفاوت بود به طوری که برای بعضی از آنها پس از ۲۵ روز، برای بعضی پس از ۳۱ روز و برای برخی دیگر پس از ۴۵ روز از زمان مایه‌زنی، علائم بیماری روی ساقه‌ها ظاهر گردید.

شکل ۱- علائم بیماری ناشی از تزریق سوسپانسیون اسپور *Gibberella fujikuroi* عامل بیماری پوسیدگی طوقه برنج روی رقم خزر در گلخانه.

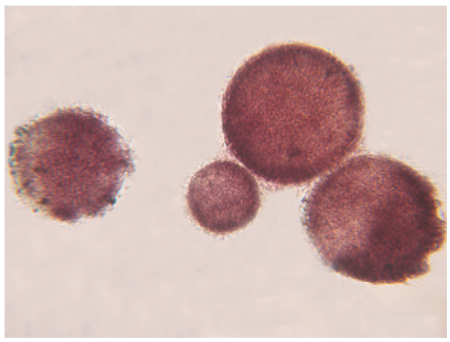
شناسایی جمعیت و تیپ آمیزشی جدایه‌ها

با تلاقی هرکدام از جدایه‌های ایرانی *G. fujikuroi*، با دو تیپ آمیزشی مربوط به هر سه جمعیت آمیزشی A، C و D (جدایه‌های نماینده) روی محیط هویج آگار، نوع جمعیت و تیپ آمیزشی جدایه‌ها مشخص شد (شکل ۲). سه جدایه Gf-235، Gf-211 و Gf-233 که فاقد زنجیره میکروکنیدیوم بودند، بر اثر تلاقی با جدایه‌های نماینده مربوط به جمعیت آمیزشی D پریتسیوم و آسکوسپور تولید نمودند. در هیچ یک از جدایه‌های مورد مطالعه، ناباروری جنسی مشاهده نشد و برای همه آنها پریتسیوم و آسکوسپور تشکیل شد (شکل ۳). از ۴۱ جدایه ایرانی، ده جدایه به جمعیت آمیزشی A (*F. verticillioides*)، دو جدایه به جمعیت آمیزشی C (*F. fujikuroi*) و ۲۹ جدایه به جمعیت آمیزشی D (*F. proliferatum*) تعلق داشتند (شکل ۴).





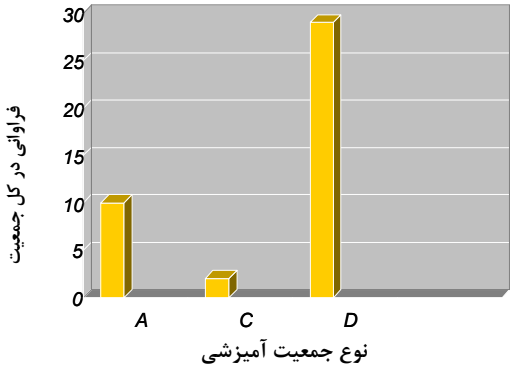
شکل ۲- پریتسیوم‌های تشکیل شده در تلاقی جدایه‌های Gf-171 (راست) و Gf-141 (چپ) هر دو با تیپ آمیزشی *MAT-2* از جمعیت آمیزشی D گونه کمپلکس *Gibberella fujikuroi* با جدایه نماینده استاندارد از تیپ آمیزشی *MATD-1* روی محیط غذایی هویج آگار.



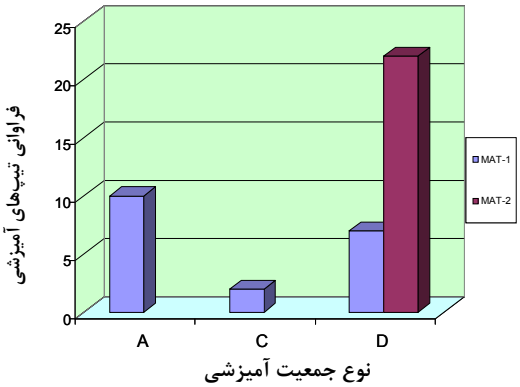
شکل ۳- پریتسیوم‌های تشکیل شده از تلاقی جدایه Gf-237 با تیپ آمیزشی *MATD-2* از جمعیت آمیزشی D گونه کمپلکس *Gibberella fujikuroi* با جدایه نماینده استاندارد (پایین با بزرگنمایی ۱۶۰ برابر). آسکوسپورهای دوسلولی حاصل از تلاقی جدایه Gf-229 همین جمعیت با جدایه نماینده استاندارد (بالا با بزرگنمایی ۴۰۰ برابر).

لازم به ذکر است که تلاقی مثبت به آن دسته از تلاقی‌ها گفته می‌شود که پریتسیوم تشکیل شود و آسکوسپور از پریتسیوم جدا گردد. همه ده جدایه جمعیت آمیزشی A متعلق به تیپ آمیزشی *MATA-1* و دو جدایه جمعیت آمیزشی C از تیپ آمیزشی *MATC-1* بودند. از ۲۹ جدایه جمعیت آمیزشی D، هفت جدایه از تیپ آمیزشی *MATD-1* و ۲۲ جدایه از تیپ آمیزشی *MATD-2* شناسایی شدند (جدول ۲).

هر دو تیپ آمیزشی لازم برای باروری موفق فقط در جدایه‌های جمعیت آمیزشی D مشاهده شد (شکل ۵) بنابراین، تنها در جمعیت آمیزشی D به علت وجود هر دو نوع تیپ آمیزشی *MATD-1*, *MATD-2* امکان تلاقی وجود داشت. به طور آزمایشی از ۳۶ تلاقی انجام شده بین جدایه‌های ایرانی متعلق به این جمعیت تنها ۲ تلاقی بین جدایه‌های Gf-248 با Gf-187 و Gf-266 با Gf-45 منجر به تشکیل پریتسیوم و آسکوسپور شد و در بقیه تلاقی‌ها باروری مشاهده نگردید.



شکل ۴- فراوانی هر یک از جمعیت‌های آمیزشی A، C و D در بین جدایه‌های گونه کمپلکس *Gibberella fujikuroi* مطالعه شده در این تحقیق.



شکل ۵- فراوانی هر یک از تیپ‌های آمیزشی مربوط به جمعیت‌های آمیزشی A، C و D در بین ۴۱ جدایه گونه کمپلکس *Gibberella fujikuroi*.

جداسازی جهش یافتگان *nit*

بیشتر قطاع‌های میسلیومی (sectors) مقاوم به کلرات به دست آمده قادر به مصرف نیترات نبودند و روی محیط MM رشد غیر متراکم و بدون میسلیوم هوایی داشتند. به عبارتی ۹۴/۲٪ از قطاع‌های مقاوم به کلرات به دست آمده، قطاع *nit* بودند. تعدادی از جدایه‌ها روی محیط‌های غذایی دارای کلرات پتاسیم در غلظت ۴٪- ۱/۵٪ قطاع‌های مقاوم به کلرات تولید نکردند. با افزایش غلظت کلرات پتاسیم به ۴٪ تا ۶٪ و بعضاً ۷٪ و ۷/۵٪، پس از ۷ تا ۱۰ روز اولین قطاع‌های جهش یافته به صورت نامنظم از کلنی تیپ وحشی قارچ شروع به گسترش نمودند. برای ۱۴ جدایه، قطاع‌های سریع‌الرشد در محیط PDC با کلرات ۵٪ و برای ۲۷ جدایه، قطاع‌ها در محیط MMC با درصدهای متفاوت کلرات به دست آمدند. طوری که، یک جدایه در کلرات ۴٪، شش

جدول ۲- مشخصات جدایه‌های ایرانی گونه کمپلکس *Gibberella fujikuroi* به دست آمده از برنج بر اساس آزمایش‌های تلاقی باروری و سازگاری جنسی با جدایه‌های نماینده استاندارد از جمعیت‌های آمیزشی مختلف. تمام جدایه‌ها از مناطق مختلف استان گیلان جمع‌آوری شده‌اند.

نام جدایه	محل جمع‌آوری	جمعیت آمیزشی	تیپ آمیزشی	Male/Female	گونه آنامورف قارچ
Gf-5	طالم‌سه شنبه سنگر	*MP-A	*MATA-1*	Male	*F. verticillioides*
Gf-13	طالم‌سه شنبه سنگر	MP-A	*MATA-1*	Male	*F. verticillioides*
Gf-37	کسار	MP-A	*MATA-1*	Male	*F. verticillioides*
Gf-49	پسیخان	MP-A	*MATA-1*	Male	*F. verticillioides*
Gf-89	گوشلوندان فومن	MP-A	*MATA-1*	Male	*F. verticillioides*
Gf-91	گوشلوندان فومن	MP-A	*MATA-1*	Male	*F. verticillioides*
Gf-93	گوشلوندان فومن	MP-A	*MATA-1*	Male	*F. verticillioides*
Gf-111	لاکسار صومعه سرا	MP-A	*MATA-1*	Male	*F. verticillioides*
Gf-115	طالش‌محله‌صومعه‌سرا	MP-A	*MATA-1*	Male	*F. verticillioides*
Gf-173	سراوان	MP-A	*MATA-1*	Male	*F. verticillioides*
Gf-105	لاکسار صومعه سرا	MP-C	*MATC-1*	Male	*F. fujikuroi*
Gf-151	لاکسار صومعه سرا	MP-C	*MATC-1*	Male	*F. fujikuroi*
Gf-201	شیخ محله	MP-D	*MATD-2*	Male	*F. proliferatum*
Gf-155	سه‌راهی‌سیاه‌درویشان	MP-D	*MATD-1*	Male	*F. proliferatum*
Gf-243	راه پل شاقاجی	MP-D	*MATD-2*	Male	*F. proliferatum*
Gf-187	شهرستان سنگر	MP-D	*MATD-1*	Male	*F. proliferatum*
Gf-215	آبکنار انزلی	MP-D	*MATD-2*	Male	*F. proliferatum*
Gf-19	طالم سه شنبه سنگر	MP-D	*MATD-2*	Male	*F. proliferatum*
Gf-237	شاقاجی سنگر	MP-D	*MATD-2*	Male	*F. proliferatum*
Gf-266	سه‌راهی شفت فومن	MP-D	*MATD-2*	Male	*F. proliferatum*
Gf-35	کسار	MP-D	*MATD-2*	Male	*F. proliferatum*
Gf-41	کسار	MP-D	*MATD-2*	Male	*F. proliferatum*
Gf-43	کسار	MP-D	*MATD-2*	Male	*F. proliferatum*
Gf-69	بین سنگر و شاقاجی	MP-D	*MATD-2*	Male	*F. proliferatum*
Gf-81	بین سنگر و شاقاجی	MP-D	*MATD-2*	Male	*F. proliferatum*
Gf-141	لاکسار صومعه سرا	MP-D	*MATD-2*	Male	*F. proliferatum*
Gf-211	لمیر	MP-D	*MATD-2*	Male	*F. proliferatum*
Gf-229	طالم سه شنبه سنگر	MP-D	*MATD-2*	Male	*F. proliferatum*
Gf-233	شیخ‌محله‌صومعه سرا	MP-D	*MATD-2*	Male	*F. proliferatum*
Gf-248	پیش کنار سنگر	MP-D	*MATD-2*	Male	*F. proliferatum*
Gf-123	گاوکده صومعه سرا	MP-D	*MATD-2*	Male	*F. proliferatum*
Gf-117	طالش‌محله‌صومعه‌سرا	MP-D	*MATD-2*	Male	*F. proliferatum*
Gf-45	کسار	MP-D	*MATD-1*	Male	*F. proliferatum*
Gf-239	شیخ محله	MP-D	*MATD-2*	Male	*F. proliferatum*
Gf-131	طالش‌محله‌صومعه‌سرا	MP-D	*MATD-1*	Male	*F. proliferatum*
Gf-99	گوشلوندان	MP-D	*MATD-1*	Male	*F. proliferatum*
Gf-203	شیخ محله	MP-D	*MATD-1*	Male	*F. proliferatum*
Gf-139	لاکسار صومعه سرا	MP-D	*MATD-2*	Male	*F. proliferatum*
Gf-183	سه‌راهی‌سیاه‌درویشان	MP-D	*MATD-2*	Male	*F. proliferatum*
Gf-171	آق قلا	MP-D	*MATD-2*	Male	*F. proliferatum*
Gf-235	خمیران	MP-D	*MATD-1*	Male	*F. proliferatum*

*mating population

جدایه در کلرات ۵٪، هیجده جدایه در کلرات ۶٪، یک جدایه در کلرات ۷٪ و یک جدایه در کلرات ۷/۵٪ تولید قطاع نمودند.

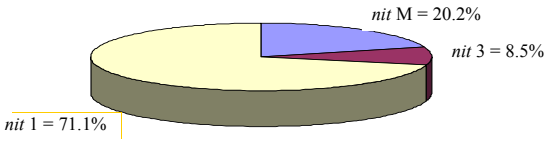
در مجموع از ۴۱ جدایه، ۲۹۸ قطاع میسلیومی مقاوم به کلرات به دست آمد که ۲۸۱ قطاع (جهش یافته) *nit* در آنها شناسایی و جدا گردید. از ۲۸۱ قطاع *nit*، ۱۲۶ قطاع متعلق به ۱۴ جدایه، روی محیط PDC و ۱۵۵ قطاع متعلق به ۲۷ جدایه دیگر روی محیط MMC تولید شدند. مدت زمان تولید قطاع در جدایه‌های مختلف متفاوت و از چند روز تا دو هفته و حتی بیشتر متغیر بود. از نظر مرفولوژی کلنی، رنگ میسلیوم، تولید یا عدم تولید میسلیوم هوایی، حاشیه قطاع سریع‌الرشد و تعداد قطاع تولید شده از هر پرگنه تیپ وحشی (با رشد محدود در محیط کلرات) تنوع زیادی مشاهده شد.

تعیین کلاس فنوتیپی جهش یافتگان *nit*

از ۲۸۱ جهش یافته *nit*، ۷۱/۱٪ متعلق به کلاس فنوتیپی *nit* 1، ۸/۵٪ به کلاس فنوتیپی *nit* 3 و ۲۰/۲٪ نیز در کلاس فنوتیپی *nit* M قرار گرفتند (شکل ۶). نوع کلاس فنوتیپی جهش یافتگان *nit* با توجه به رشد آنها روی منابع مختلف ازت مشخص شد.

آزمون مکمل‌سازی و تعیین گروه‌های سازگاری رویشی

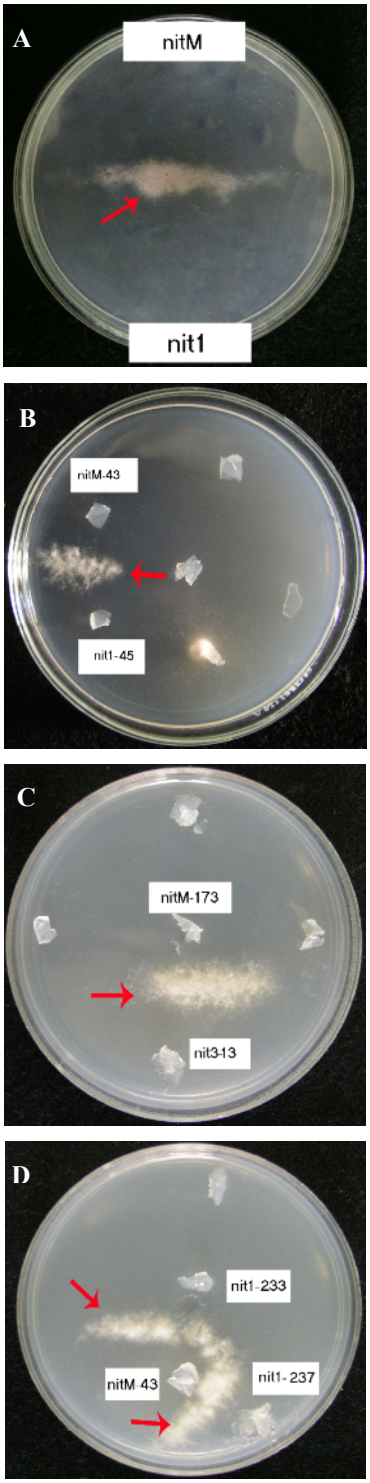
برای ۳۱ جدایه به علت وجود تنها یک نوع جهش یافته *nit* در بین جهش یافتگان (برای ۲۳ جدایه تنها *nit* 1 ، برای ۴ جدایه تنها *Nit* M و برای ۴ جدایه تنها *nit* 3 جدا شد)، آزمون مکمل سازی بین جهش یافتگان *nit* هر جدایه برای مشاهده تشکیل هتروکاریون و بروز سازگاری بین آنها ممکن نبود. برای ۱۰ جدایه دیگر که دارای دو نوع جهش یافته بودند (هشت جدایه دارای *nit* M و *nit* 1 و دو جدایه دارای *nit* 1 و *nit* 3) تشکیل هتروکاریون بین جهش یافتگان *nit* به دست آمده از آنها مشاهده شد و خودسازگاری آنها به اثبات رسید (شکل۷A). در آزمون مکمل‌سازی، رشد متراکمی از ریسه‌های هوایی قارچ در محل برخورد دو کلنی *nit* یک جدایه (رشد تیپ وحشی)، نشان‌دهنده خودسازگاری رویشی جدایه مورد نظر می‌باشد.



شکل ۶- فراوانی جهش یافتگان *nit* 1، *nit* 3 و *nit* M به دست آمده از مجموع ۴۱ جدایه *Gibberella fujikuroi*.

در آزمون تعیین گروه‌های سازگاری رویشی نیز تشکیل هتروکاریون پایدار بین جهش یافتگان *nit* دو جدایه مختلف نشان‌دهنده تعلق آنها به یک VCGs و تشکیل نشدن هتروکاریون نشان‌دهنده قرار گرفتن دو جدایه در دو گروه VCGs متمایز است (Correll *et al*., 1987). در آزمون سازگاری رویشی، گروه‌بندی بین جدایه‌های مربوط به هر جمعیت آمیزشی به طور جداگانه انجام شد. در بین ده جدایه متعلق به جمعیت آمیزشی A، نه گروه سازگاری رویشی شناسایی شد. در یک گروه دو جدایه و در هشت گروه دیگر هر کدام تنها یک جدایه قرار گرفت (هشت گروه تک عضوی). دو جدایه متعلق به جمعیت آمیزشی C با هم سازگاری نداشتند و هرکدام در یک گروه سازگاری رویشی جداگانه جای گرفتند. در بین ۲۹ جدایه متعلق به جمعیت آمیزشی D، بیست گروه سازگاری رویشی شناسایی شد. به طوری که، ۱۲ جدایه در سه گروه پنج، چهار و سه عضوی و بقیه ۱۷ جدایه هر کدام در یک گروه سازگاری رویشی جداگانه جای گرفتند (۱۷ گروه تک عضوی).

رشد پروتوتروف (تیپ وحشی) بین میسلیوم‌های تلاقی یافته جهش یافتگان *nit* جدایه‌های مختلف معیاری برای سازگاری آنها بود (شکل‌های ۷B، ۷C و ۷D). در مجموع در بین ۴۱ جدایه مورد مطالعه متعلق به گونه کمپلکس *G. fujikuroi*، ۳۱ گروه سازگاری رویشی شناسایی شد که از این تعداد ۲۷ گروه تک عضوی بودند و چهار گروه دو، سه، چهار و پنج عضوی نیز شناسایی شدند. تشکیل هتروکاریون و واکنش سازگاری رویشی بین جهش یافتگان متعلق به جمعیت‌های آمیزشی A، C و D با هم مشاهده نشد.



شکل ۷- واکنش سازگاری رویشی بین جهش یافتگان *nit* گونه کمپلکس *Gibberella fujikuroi*. A) تشکیل هتروکاریون پایدار بین جهش یافتگان M *nit* و 1 *nit* جدایه Gf-91؛ B) سازگاری رویشی بین جهش یافتگان *nit* دو جدایه Gf-43 و Gf-45؛ C) سازگاری رویشی بین جهش یافتگان *nit* دو جدایه Gf-173 و Gf-13؛ D) سازگاری رویشی بین جهش یافتگان *nit* جدایه‌های Gf-233 و Gf-43 و بین جهش یافتگان دو جدایه Gf-43 و Gf-237.

بحث

گونه کمپلکس *G. fujikuroi* روی میزبان‌های مختلف گیاهی بیماری‌زا است و در بعضی موارد بیماری‌های خطرناکی را ایجاد می کند. تاکنون براساس آزمایش‌های سازگاری جنسی در آزمایشگاه نه جمعیت آمیزشی برای این گونه شناسایی و با حروف A تا I نامگذاری شده‌اند. هریک از این جمعیت‌ها یک گونه بیولوژیکی است که مشخصات مرفولوژیکی آنامورف آن تشریح شده و تلئومورف آنها نیز شناسایی و معرفی شده است (Leslie, 2006; Summerell *et al*., 2003). سه گونه *F. verticillioides*، *F. fujikuroi* و *F. proliferatum*، که به ترتیب متعلق به جمعیت‌های آمیزشی A، C و D از این گونه کمپلکس می‌باشند، از روی برنج در نقاط مختلف جهان جدا شده‌اند. این سه گونه از نظر خصوصیات مرفولوژیکی تا حد زیادی شبیه هم هستند و عامل پوسیدگی طوقه برنج محسوب می‌شوند (Summerell *et al*., 2003) بررسی خصوصیات مرفولوژیکی جدایه‌های به دست آمده از گیلان نشان داد که عوامل پوسیدگی طوقه برنج در این استان شباهت زیادی به گونه‌های *F. verticillioides*، *F. fujikuroi* و *F. proliferatum* دارند.

Padasht (1993) هفده روز پس از آلوده‌سازی، نشانه‌های پوسیدگی طوقه را در نشاهای برنج مشاهده نمود. اما در تحقیق حاضر اولین علائم بیماری پس از ۲۵ روز مشاهده شد. حتی در بعضی موارد علائم بیماری پس از ۴۵ روز دیده شد. اینطور به نظر می‌رسد که دمای محیط عامل مؤثری در این تأخیر باشد. زیرا دمای مطلوب برای جوانه‌زنی قارچ بعد از تزریق ۲۵-۳۰°C می‌باشد ولی چون آزمایش بیماری‌زایی در فصل تابستان و در ماه‌های تیر و مرداد با دمای ۳۵-۴۰°C در گلخانه انجام شد، لذا دمای بالا می‌تواند به عنوان عاملی ممانعت‌کننده (محدود کننده) در رشد قارچ لحاظ گردد. در این آزمایش بعد از این که دما تا حدود ۳۰°C پایین آورده شد، علائم بیماری ظاهر گردید. در آزمایش‌های بیماری‌زایی در تابستان ۱۳۸۳، هیچگونه علائم قدکشیدگی در بوته‌ها مشاهده نگردید. استرین‌های جمعیت آمیزشی C (*F. fujikuroi*) به طور معمول مقدار زیادی جیبرلیک اسید تولید می‌کنند و باعث

قدکشیدگی بوته‌های آلوده می‌شوند (Tudzynski, 1999). در حالی که استرین‌های دو جمعیت آمیزشی A و D مقدار زیادی فومونیسین (fumonisin) را تولید می‌نمایند (Malonek *et al*., 2004; Rojas *et al*., 2001; Tudzynski *et al*., 1999).

مشاهده پریتسیوم‌های تشکیل شده روی ساقه‌های باقیمانده در مزرعه پس از برداشت برنج حاکی از قدرت باروری جمعیت گونه گونه کمپلکس *G. fujikuroi* در مزارع گیلان است. هر چند درصد کمی از تلاقی جدایه‌های ایرانی با هم روی محیط غذایی هویج آگار در شرایط آزمایشگاه با تولید پریتسیوم و آسکوسپور همراه بود اما این می‌تواند به دلیل برخی تفاوت‌های شرایط محیطی بین آزمایشگاه و طبیعت باشد. همچنین، نتیجه تلاقی جدایه‌های ایرانی با جدایه‌های نماینده (tester) استاندارد نشان داد که جدایه‌های متعلق به سه جمعیت آمیزشی یاد شده عامل بیماری در گیلان از نظر باروری جنسی فعال هستند. هر چند که، در جمعیت آمیزشی A، تیپ آمیزشی *MATA*-2 در بین جدایه‌های مطالعه شده شناسایی نشد و به نظر می‌رسد فراوانی تیپ آمیزشی *MATA*-2 در جمعیت آمیزشی A در جدایه‌های ایرانی کم است. البته، تعداد جدایه‌های این جمعیت که در تحقیق حاضر به کار رفتند زیاد نبود و احتمالا با بررسی جدایه‌های بیشتر حضور تیپ آمیزشی *MATA*-2 در جمعیت A معلوم خواهد شد. دو جدایه جمعیت آمیزشی C از تیپ آمیزشی *MATC*-1 بودند و واضح است که نمی توان فقط با بررسی دو جدایه راجع به باروری جنسی و فراوانی تیپ‌های آمیزشی در این جمعیت اظهار نظر نمود. لازم به ذکر است به طور کلی حضور این جمعیت در مقایسه با دو جمعیت A و D روی برنج در درجه سوم اهمیت قرار دارد. در جمعیت آمیزشی D، هر دو تیپ آمیزشی *MATD*-1 (برای هشت جدایه) و *MATD*-2 (برای ۱۵ جدایه) شناسایی شدند. با توجه به باروری نسبتا بالایی که جدایه‌های این جمعیت در آزمایشگاه نشان دادند و وجود هر دو تیپ آمیزشی در بین جدایه‌ها می توان انتظار داشت که وقوع تولیدمثل جنسی و به دنبال آن نوترکیبی جنسی در این جمعیت در طبیعت به خوبی رخ می‌دهد. در تحقیقی دیگر توسط Abbaszadeh *et al*. (2007) روی جدایه‌های به دست آمده در گیلان، از مجموع ۶۰ جدایه مورد مطالعه ۴۷ جدایه با جدایه‌های نماینده استاندارد پریتسیوم تشکیل دادند و آسکوسپور از پریتسیوم جدا گردید. در این تحقیق وجود تیپ آمیزشی *MATC*-2 در سه جدایه از ده جدایه مربوط به جمعیت آمیزشی C به اثبات رسید اما در ۱۴ جدایه مربوط به جمعیت آمیزشی A، تیپ آمیزشی *MATA*-2 یافت نگردید.

با توجه به نتایج به دست آمده از مطالعات باروری جنسی جدایه‌های استان گیلان به نظر می‌رسد که جدایه‌های *F. proliferatum* از قدرت باروری بیشتری نسبت به دو گونه دیگر برخوردار باشند. این مسأله در تعداد پریتسیوم‌های تشکیل شده در آزمایش‌های باروری جنسی و بارور بودن آنها از نظر تعداد آسکوسپورهای تولیدی به خوبی مشهود بود. با توجه به اینکه *F. proliferatum* گونه غالب از نظر فراوانی و قدرت باروری جنسی در گیلان می‌باشد، شاید بتوان آن را مهمترین عامل پوسیدگی طوقه برنج در گیلان معرفی نمود.

در اکثر قریب به اتفاق تلاقی‌های انجام شده برای جدایه‌های مختلف در این تحقیق، پریتسیوم در سمت جدایه‌های نماینده استاندارد تشکیل شد که این مسئله ماده باروری جدایه‌های نماینده و نر باروری جدایه‌های ایرانی را نشان داد. در استرین‌های *G. fujikuroi* مطالعه شده توسط Leslie & Klein (1996) نیز ماده باروری غالباً وجود نداشت و جمعیت‌ها ترکیبی از هرمافرودیت‌ها و استرین‌های ماده عقیم بودند. هر چند به طور اتفاقی استرین‌های نر عقیم و ماده بارور نیز پیدا شدند (Leslie & Klein, 1996). تعداد پریتسیوم‌های تولید شده در اثر تماس جدایه مورد مطالعه و جدایه نماینده برای جدایه‌های مختلف متفاوت بود که به قدرت باروری جدایه مورد مطالعه مربوط می‌باشد زیرا قدرت باروری جدایه‌های نماینده از نظر تولید اندام‌های جنسی نر و ماده در تلاقی‌های مختلف همواره ثابت است. به منظور تشکیل پریتسیوم و تولید آسکوسپور باید دو جدایه در یک جمعیت آمیزشی از دو تیپ آمیزشی مخالف با هم تلاقی یابند.

Padasht (1993)، *F. fujikuroi* را به عنوان عامل باکانه و پوسیدگی طوقه از مزارع گیلان گزارش کرد.

تحقیق حاضر، بر اساس آزمایش‌های بیماری‌زایی و باروری جنسی معلوم شد علاوه بر *F. fujikuroi* (جمعیت آمیزشی C)، *F. verticillioides* (جمعیت آمیزشی A) و *F. proliferatum* (جمعیت آمیزشی D) نیز در گیلان عامل بیماری هستند و *F. proliferatum* عامل غالب است و *F. verticillioides* و *F. fujikuroi* به ترتیب از نظر فراوانی بعد از آن قرار می‌گیرند.

قطاع‌های میسلیومی سریع‌الرشد در واقع جهش یافته‌های اگزوتروفی هستند که به دلیل تغییرات در یکی از مکان‌های ژنی توانایی سنتز آنزیم نیترات ردوکتاز (nitrate reductase) را نداشته و یا اینکه نمی‌توانند این آنزیم را القاء کنند (Correll *et al*., 1987). در این بررسی بازده تولید سکتور روی محیط PDC بیشتر از MMC بود. تولید قطاع تحت تأثیر عوامل مختلف مثل دما، میزان تغذیه و فشار انتخابی مثل رشد روی محیط سمی یا میزبان مقاومت قرار می‌گیرد (Correll *et al*., 1987). منبع اولیه مایه قارچی مانند ماکروکنیدیوم، میکروکنیدیوم یا میسلیوم‌ها نیز بازده تولید قطاع را تحت تأثیر می‌دهند (Correll *et al*., 1987).

در این تحقیق در آزمایش‌های تعیین گروه‌های سازگاری رویشی (VCGs)، جدایه‌های موجود در هر جمعیت آمیزشی به طور جداگانه گروه‌بندی شدند. این گروه‌بندی جداگانه به این دلیل است که VCGs اساساً تقسیم‌بندی جمعیت‌های درون یک گونه به زیرگروه‌های معین است و این روش، تنوع ژنتیکی جمعیت‌های درون یک گونه را مشخص می‌سازد. هر چند این روش، جهت تجزیه و تحلیل استرین‌هایی که در گونه‌های بیولوژیکی مختلف قرار می‌گیرند و جهت ارزیابی اتفاقاتی که در سطوح بالاتر از گونه رخ می‌دهد نیز مناسب نخواهد بود.

با توجه به تعداد زیاد گروه‌های تک عضوی سازگار رویشی در هر جمعیت (بخصوص دو جمعیت A و D)، به نظر می‌رسد که این جمعیت‌ها در گیلان از تنوع ژنتیکی بالایی برخوردار باشند. این تنوع ژنتیکی زیاد می تواند در نتیجه تنوع زیاد در ژنگاه‌های ناسازگاری رویشی (آلل‌های لوکوس *vic*) باشد که باعث جدایی گروه‌های سازگاری رویشی از یکدیگر شده است. با توجه به تعداد اندک تشکیل هتروکاریون‌های پایدار در طول انجام آزمون سازگاری رویشی به نظر می‌رسد که نوترکیبی ژنتیکی در گونه کمپلکس *G. fujikuroi* به چرخه شبه‌جنسی (parasexual cycle) محدود نمی‌شود. به عبارت دقیق‌تر، با توجه به تشکیل فراوان فرم جنسی در طبیعت، به نظر می‌رسد اساس تنوع ژنتیکی، نوترکیبی‌های ایجاد شده در نتیجه کراسینگ اور میوزی در طول تولیدمثل جنسی است که این مسأله ژنگاه‌های ناسازگاری رویشی را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهد. اگر در این گونه کمپلکس مکانیزم اصلی تنوع چرخه پراجنسی از طریق هتروکاریوزیس بین ریسه‌ها بود قاعدتاً باید در آزمون VCGs بروز واکنش‌های هتروکاریونی (سازگاری رویشی) بیشتری را شاهد می‌بودیم. اما نتیجه به دست آمده عکس این ایده را به اثبات رساند. تشکیل فراوان فرم جنسی قارچ در گیلان باروری جنسی بالای گونه کمپلکس *G. fujikuroi* را در این منطقه نشان می‌دهد. توصیه می‌شود که در بررسی گروه‌های سازگاری رویشی، جمعیت غیر بیماری‌زا و ساپروفیت قارچ‌ها نیز مورد مطالعه قرار گیرد زیرا دسترسی به دانش صحیح از این بخش از جمعیت‌های قارچی می‌تواند در درک کامل‌تر از تنوع بین جدایه‌های بیماری‌زا بسیار مفید واقع شود.

در گروه‌های سازگاری رویشی که در آن بیش از یک عضو وجود داشت، اعضاء معمولاً به مناطق مختلف استان گیلان تعلق داشتند که این مسأله می‌تواند به انتقال و انتشار قارچ عامل بیماری از طریق بذر، باد یا باران مربوط باشد. وجود ارتباط یا عدم ارتباط بین گروه‌های سازگاری رویشی و شدت بیماری‌زایی در جدایه‌های متعلق به این گونه کمپلکس به مطالعات بیشتری نیاز دارد. اما تنوع بالای ژنتیکی در جمعیت‌های متعلق به *G. fujikuroi* که در آزمون سازگاری رویشی تأیید شد، می‌تواند در انطباق آن با شرایط محیطی متغیر و به دست آوردن پتانسیل بقا و سازگاری در شرایط سخت موثر باشد. به نظر می‌رسد که احتمال ایجاد افراد نوترکیب از طریق تولید مثل شبه جنسی در جمعیت‌های آمیزشی *G. fujikuroi* پایین باشد. زیرا، در حالت تصادفی، سازگاری رویشی بین جدایه‌ها خیلی پایین بود.

از نتایج بسیار جالب این تحقیق عدم بروز سازگاری رویشی بین جدایه‌های متعلق به سه جمعیت گونه کمپلکس *G. fujikuroi* است که می تواند بیانگر تفکیک

گونه های معرفی شده درون این گونه کمپلکس باشد. به عبارتی در معرفی هر یک از گونه‌ها و اصلاح گونه کمپلکس آزمایش‌های سازگاری جنسی نیز می‌تواند مدنظر قرار گیرد.

در هر حال، در یکی از جمعیت‌های آمیزشی (D) گونه کمپلکس *G. fujikuroi* باروری جنسی بالایی مشاهده شد و شاید با بررسی جدایه‌های بیشتری از دو جمعیت A و C وجود باروری بالا به اثبات برسد چون اغلب جدایه‌های متعلق به این جمعیت‌ها در آزمایشگاه تلاقی‌های جنسی موفقی را نشان دادند. این یافته می‌تواند بیانگر آن باشد که تولید مثل جنسی در چرخه زندگی این گروه از قارچ‌های بیمارگر در بروز تنوع نقش فعال و مهمی ایفاء می‌کند و نباید اهمیت این مسأله را در مطالعات اپیدمیولوژیکی و تولید و به کارگیری ارقام مقاوم فراموش نمود.

در این تحقیق وجود سه جمعیت آمیزشی A (*F. verticillioides*)، C (*F. fujikuroi*) و D (*F. proliferatum*) به عنوان عوامل اصلی بیماری پوسیدگی طوقه برنج در گیلان به اثبات رسید و معلوم شد که جمعیت آمیزشی D غالب است.

سپاسگزاری

این تحقیق با استفاده از امکانات مؤسسه تحقیقات برنج کشور در بخش گیاهپزشکی آن مؤسسه در رشت انجام شده است. نگارندگان بر خود لازم می‌دانند از همکاری‌های صمیمانه ریاست محترم وقت مؤسسه و همچنین مسئول محترم بخش گیاهپزشکی قدردانی به عمل آورند. جدایه‌های نماینده به واسطه دکتر شفرد (Dr.Gordon Shephard) از پروفسور ماراساس (Prof. Walter Marasas) در آفریقای‌جنوبی (PROMEC Unit of Medical Research in South Africa) گرفته شد.

REFERENCES

1. Abbaszadeh, M., Javan-Nikkhah, M. & Padasht-Dekaei, F. (2007). Sexual fertility and mating types of *Gibberella fujikuroi* species complex, the cause of bakanae disease and foot rot in Guilan province, Iran. *Iranian Journal of Agricultural Science*, 38, 685-692. (In Farsi).
2. Ahn, I. P., Chung, H. S. & Lee, Y. -H. (1998). Vegetative compatibility groups and pathogenicity among isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerineum*. *Plant Disease*, 82, 244-246.
3. Chulze, S. N., Ramirez, M. L., Torres, A. & Leslie, J. F. (2000). Genetic variation in *Fusarium* Section *Liseola* from no-till maize in Argentina. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 5312-5315.
4. Correll, J. C., Klittich, C. J. R. & Leslie, J. F. (1987). Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. *Phytopathology*, 77, 1640-1646.
5. Glass, N. L. & Kuldau, G. A. (1992). Mating type and vegetative incompatibility in filamentous ascomycetes. *Annual Review of Phytopathology*, 30, 201-224.
6. Huang, R., Galperin, M., Levy, Y. & Perl-Treves, R. (1997). Genetic diversity of *Fusarium moniliforme* detected by vegetative compatibility groups and random amplified polymorphic DNA markers. *Plant Pathology*, 46, 871 -881.
7. Kerenyi, Z., Taborhegyi, E., Pomazi, A. & Hornok, L. (1997). Variability among strains of *Fusarium poae* assessed by vegetative compatibility and RAPD polymorphism. *Plant Patholology*, 46, 882-889.
8. Labarere, J. & Bernet, J. (1977). Protoplasmic incompatibility and cell lysis in *Podospora anserina*, genetic investigations on mutations of a novel modifier gene that suppresses cell destruction. *Genetics*, 87, 249-257.
9. Leslie, J. F. (1993). Vegetative compatibility in fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 31, 127-151.
10. Leslie, J. F. & Klein, K. K. (1996). Female fertility and mating-type effects on effective population size and evolution in filamentous fungi. *Genetics*, 144, 557-567.
11. Leslie, J. F. & Summerell, B, A. (2006). *The Fusarium laboratory manual.* Blackwell Publishing Professional, Ames, Iowa. Pp. 388.
12. Malonek, S., Rojas, M. C., Hedden, P., Gaskin, P. & Tudzynski, B. (2004). The NADPH: cytochrome P450 reductase gene from *Gibberella fujikuroi* is essential for gibberellin biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 25075-25084.
13. Naseri, B., Alizadeh E. & Safaei N. (2000). Study on population diversity of *Fusarium graminearum* based on VCGs identification and its relationship with partial pathogenicity of isolates. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 36, 261-280. (In Farsi).
14. Nirenberg, H. I. & O'Donnell, K. (1998). New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*, 90, 434-450.

15. O'Donnell, K., Gigelnik, E. & Nirenberg, H. I. (1998). Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*, 90, 465-493.
16. Padasht Dehkai, F. (1993). *Study on rice foot rot (Gibberella fujikuroi) in Guilan province*. M.Sc. Thesis. University of Tehran.
17. Puhalla, J. E. & Spieth, P. T. (1983). Heterokaryosis in *Fusarium moniliforme. Experimental Mycology*, 7, 328-335.
18. Rojas, M. C., Hedden, P., Gaskin, P. & Tudzynski, B. (2001). The *P450-1* gene of *Gibberella fujikuroi* encodes a multifunctional enzyme in gibberellin biosynthesis. In: Proceedings of *the National Academy of Sciences*. 98, 5838-5843.
19. Summerell, B. A., Salleh, B. & Lelie, J. F. (2003). A utilitarian approach to *Fusarium* identification. *Plant Disease*, 87, 117-128.
20. Swift, C. E., Wickliffe, E. R. & Schwartz, H. F. (2002). Vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* from onion in Colorado. *Plant Disease*, 86, 606-610.
21. Tudzynski, B. (1999). Biosynthesis of gibberellins in *Gibberella fujikuroi*: biomolecular aspects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52, 298-310.
22. Tudzynski, B., Homann, V., Feng, B. & Marzluf, G. A. (1999). Isolation, characterization and disruption of the *are A* nitrogen regulatory gene of *Gibberella fujikuroi*. *Molecular Genetics and Genomics*, 261, 106-114.