بررسی باروری جنسی و تنوع ژنتیکی *Magnaporthe salvinii* عامل پوسیدگی ساقه برنج در شمال ایران*

STUDY ON SEXUAL FERTILITY AND GENETIC DIVERSITY OF *Magnaporthe salvinii*, CAUSAL AGENT OF RICE STEM ROT IN NORTHERN IRAN

راضیه پورسعید[۱]، محمد جوان نیکخواه[۱]**، خلیل بردی فتوحی فر[۱]، وحید خسروی[۲] و کیوان غضنفری[۱]

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۹/۱۳؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۱۱/۲۷)

چکیده

پنجاه و یک جدایه از *Nakataea sigmoidea* فرم غیر جنسی *Magnaporthe salvinii*، عامل پوسیدگی ساقه برنج، جمع‌آوری شده از استان‌های گیلان و مازندران جهت تعیین تیپ آمیزشی (Mating type) روی محیط کشت Sach's agar در شرایط آزمایشگاه تلاقی داده شدند. بعلاوه تنوع ژنتیکی ۲۰ جدایه با استفاده از دو آغازگر BOX و ERIC به روش rep-PCR تجزیه و تحلیل شد. در این بررسی تیپ آمیزشی ۳۷ جدایه (۷۲/۵۵ درصد) از نوع *MAT*x1 و ۱۴ جدایه (۲۷/۴۵ درصد) از نوع *MAT*x2 تشخیص داده شدند و بسیاری از جدایه‌ها در تلاقی‌ها از توان باروری بالایی برخوردار بودند. نتایج انگشت نگاری DNA موید وجود پنج گروه انگشت نگاری با ۱۹ هاپلوتیپ بود که بیانگر تنوع ژنتیکی نسبتاً زیاد در نمونه‌های مورد مطالعه است.

واژه‌های کلیدی: آلل‌های *MAT*، آنامورف، برنج، پریتسیوم، تلئومورف، *Nakataea sigmoidea*

---

*: بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول، ارائه شده به گروه گیاه‌پزشکی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج

**: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: jnikkhah@ut.ac.ir

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشیار، استادیار و کارشناس ارشد بیماری شناسی گیاهی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج

۲. مربی پژوهشی مؤسسه تحقیقات برنج کشور، آمل

مقدمه

بیماری پوسیدگی ساقه به طور معمول یکی از شایع‌ترین بیماری‌های قارچی برنج در کشورهای تولید کننده این محصول محسوب می‌شود. این قارچ در اکثر مزارع برنج‌کاری گیلان و مازندران پراکنده است و باعث بروز خسارت روی ارقام محلی و ارقام اصلاح شده می گردد (Javan-Nikkhah *et al*. 2001). قارچ عامل بیماری، *Magnaporthe salvinii* (Catt.) Krause & Webster با فرم غیرجنسی *Nakataea* (Cavara) Hara *sigmoidea* معرفی شده است. این قارچ متعلق به شاخه آسکومیکوتا می‌باشد و از نظر سازگاری جنسی هتروتال است (Krause & Webster 1972, Ferreira & Webster 1975). سازگاری جنسی در قارچ‌های هتروتال متعلق به شاخه آسکومیکوتا توسط یک جفت مکان ژنی *MAT* کنترل می‌گردد. این سیستم آمیزشی دو حالتی یا دو قطبی (Dimictic) نامیده می‌شود. به طوری که یک لوکوس کنترل کننده تیپ آمیزشی به نام *MAT* با دو آلل وجود دارد. از آنجا که این قارچ‌ها هاپلوئید هستند هر فرد قارچی می‌تواند یکی از آلل‌ها را دارا باشد. این آلل‌ها که تعیین کننده تیپ آمیزشی هستند در واقع آلل نیستند و ایدیومورف (Idiomorph) نامیده می‌شوند (Debuchy & Turgeon 2006, Coppin *et al*. 1997). *متزنبرگ وگلاس* (Metzenberg & Glass 1990) اصطلاح ایدیومورف را برای تعیین اشکال متناظر یک جایگاه ژنی که موقعیت کروموزومی یکسانی را اشغال کرده‌اند، ولی شباهتی در توالی بازهای DNA و پروتئین‌های کد شده توسط آنها وجود ندارد، پیشنهاد کردند. سازگاری جنسی و نوترکیبی حاصل از آن در جمعیت قارچ مکانیزم‌هایی را برای ایجاد تنوع ژنتیکی از طریق میوز فراهم می‌کند و موجب بروز ژنوتیپ‌های جدید می‌گردد (Zeigler 1998). در صورت وجود دو ایدیومورف تیپ آمیزشی با نسبت‌های نزدیک به هم در جمعیت هر قارچ، امکان وقوع تولید مثل جنسی افزایش می‌یابد.

کراوس و وبستر (Krause & Webster 1972) پریتسیوم‌های قارچ *M. salvinii* را در شرایط طبیعی از روی غلاف‌های خارجی برنج جداسازی کرده و هم‌چنین توانستند پریتسیوم‌ها را از تلاقی جدایه‌های سازگار در شرایط آزمایشگاهی تولید کنند.

در ایران *جوان نیکخواه* (۱۹۹۵) برای اولین بار فرم جنسی این قارچ را گزارش کرد و با تلاقی جدایه‌های سازگار جنسی در شرایط آزمایشگاهی به پریتسیوم‌های این قارچ دست یافت و به دلیل تشکیل پریتسیوم در تلاقی‌ها و عدم تشکیل آن در کشت منفرد هر جدایه، خاطر نشان نمود که قارچ خود بارور نبوده، بلکه هتروتال است.

اگر چه فرم جنسی عامل پوسیدگی ساقه برنج در طبیعت مشاهده شده و در شرایط آزمایشگاهی نیز با استفاده از تلاقی جدایه‌های سازگار اقدام به تولید آن شده است اما در مورد نوع و فراوانی آلل‌های تیپ آمیزشی این قارچ، اطلاعات کاملی در دست نیست.

در زمینه تعیین تنوع ژنتیکی جمعیت‌های این قارچ با استفاده از روش‌های مولکولی، تاکنون بررسی جامعی انجام نگرفته است. این در حالی است که تنوع ژنتیکی جمعیت‌های بزرگی از میکروارگانیسم‌ها با استفاده از نشانگر مولکولی rep-PCR بررسی شده است. این نشانگر به میزان زیادی قابل اعتماد بوده و سرعت تکرارپذیری و قدرت تمایز آن بسیار عالی است (Louws *et al*. 1999).

همان‌طور که ذکر شد با توجه به وضعیت باروری جنسی در قارچ *M. salvinii*، احتمال وقوع تولید مثل جنسی و به دنبال آن نوترکیبی و بروز ژنوتیپ‌های جدید

وجود دارد. بنابراین برای تایید فرضیه‌های استنتاج شده، بررسی تنوع ژنتیکی در جمعیت قارچ مهم به نظر می‌رسد. براین اساس، این تحقیق در راستای نیل به اهداف زیر انجام گرفت.

۱- مطالعه سازگاری جنسی جدایه‌ها از طریق تقابل آنها روی محیط‌های غذایی اختصاصی (تعیین فراوانی ایدیومورف‌های تیپ آمیزشی)

۲- بررسی تنوع ژنتیکی برخی از جدایه‌های جمع‌آوری شده به کمک نشانگر مولکولی rep-PCR

روش بررسی

۱- نمونه‌برداری، جداسازی و نگهداری جدایه‌ها

به منظور تهیه جدایه‌های مورد استفاده در این تحقیق، از مزارع برنج در استان‌های گیلان و مازندران نمونه‌برداری صورت گرفت. در مناطق مورد بازدید به ازای حدوداً هر ده کیلومتر یک مزرعه به طور تصادفی انتخاب شد و نمونه‌هایی از ساقه و غلاف برنج که واجد علائم بیماری بودند جمع آوری شدند. نمونه‌های مذکور در دمای اتاق خشک شدند. هر یک از نمونه ها درون پاکت‌های کاغذی قرار داده شدند و در دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری گردیدند. از آنجا که این قارچ در درون ساقه و بافت غلاف برگ اسکلروت‌های ریز و سیاه رنگ تولید می‌کند، عمل جداسازی قارچ از اسکلروت‌ها انجام گرفت. به طوری که ابتدا اسکلروت‌ها از بافت گیاه خارج و جمع آوری شدند و سپس روی تکه پارچه‌ای قرار داده شدند و به مدت دو تا سه دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد (۰/۵ درصد کلر فعال) ضدعفونی شدند. اسکلروت‌های ضدعفونی شده درون تشتک‌های پتری روی محیط کشت آب آگار (water agar) دو درصد قرار داده شدند. پس از طی ۴۸ ساعت میسلیوم‌های رشد کرده به محیط کشت سیب زمینی– دکستروز– آگار (PDA) منتقل شدند. جهت تولید کنیدی و کنیدیوفور قارچ، میسلیوم‌ها روی محیط کشت هویج آگار(carrot agar) (۲۰ گرم آگار و عصاره ۲۰ گرم هویج در یک لیتر آب مقطر) کشت داده شدند. به این ترتیب، قرص میسلیومی به قطر پنج میلی‌متر از حاشیه پرگنه دو روزه قارچ روی محیط کشت PDA، به روی محیط هویج آگار درون تشتک پتری انتقال داده شد. تشتک‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق نگهداری شدند و سپس زیر نور دایم فلئورسنت (با شدت ۱۹۰۰-۱۶۰۰ لوکس) در دمای اتاق قرار گرفتند. پس از اسپورزایی قارچ، عمل تک اسپورسازی انجام گرفت. سپس جدایه‌ها روی کاغذ صافی سترون و خشک و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس درون فریزر نگهداری گردیدند.

به این ترتیب ۳۸ جدایه از استان گیلان و ۱۳ جدایه از استان مازندران جداسازی شدند و در این تحقیق مورد آزمایش قرار گرفتند (جدول ۱).

۲- تعیین فراوانی آلل‌های تیپ آمیزشی

۲-۱- تعیین تیپ آمیزشی برخی جدایه‌ها

به منظور شناسایی جدایه‌هایی با قابلیت باروری زیاد و به دنبال آن تفکیک سریع‌تر و آسان‌تر جدایه‌ها به دو گروه تیپ آمیزشی، ابتدا تلاقی ها بین ۲۳ جدایه از ۵۱ جدایه که به صورت تصادفی انتخاب شده بودند، انجام گرفت.

برای انجام تلاقی بین جدایه‌های فوق، از محیط کشت Sach's agar (۱ گرم $Ca(NO_3)_2$، ۰/۲۵ گرم $MgSO_4.7H_2O$، ۰/۲۵ گرم K_2HPO_4، ۴ گرم $CaCO_3$، $FeCl_3$ به مقدار جزئی و ۲۰ گرم آگار در یک لیتر آب

جدول ۱. تیپ آمیزشی و وضعیت باروری جدایه‌های قارچ *Magnaporthe salvinii* در تلاقی با چهار جدایه مزرعه‌ای آزمایشگر

Table 1. Mating type and fertility status of *Magnaporthe salvinii* isolates in crosses with four field- tester isolates

محل جمع آوری Sampling location	نوع تیپ آمیزشی	جدایه های مزرعه‌ای آزمایشگر				نام جدایه
		تیپ آمیزشی *MAT*x2		تیپ آمیزشی *MAT*x1		
		G27	G21	G11	G3	
Experimental field of Iranian Rice Research Institute, Guilan	*MAT*x1	++	+++	–	–	G3
Siahkal to Lahijan Road (Ezborum), Guilan	*MAT*x1	+++	+++	–	–	G11
Pirbazar to Ziabar Road (Kafte rood), Guilan	*MAT*x1	++	+++	–	–	G14
Rezvanshahr to Ziabar Road (Shilsar), Guilna	*MAT*x1	++	+++	–	–	G15
Pounel to Rezvanshahr Road (Ardojan), Guilan	*MAT*x1	++	++	–	–	G19
Khomam to Khoshkbijar Road (Kord Khil), Guilan	*MAT*x1	++	+++	–	–	G20
Vilage of Shahrestan, Guilan	*MAT*x1	++	+++	–	–	G23
Khoshkbijar, village of Taze Abad, Guilan	*MAT*x1	+++	+++	–	–	G24
Pirbazar to Ziabar Road (Nargestan), Guilan	*MAT*x1	+	+++	–	–	G25
Ziba kenar to Kiashahr, Guilan	*MAT*x1	+	++	–	–	G28
Khomam to Khoshkbijar Road, Khomam Guilan	*MAT*x1	++	++	–	–	G29
Khomam to Khoshkbijar Road (Kashel azadsara), Guilan	*MAT*x1	++	++	–	–	G30
Ziba kenar, Guilan	*MAT*x1	+	+++	–	–	G31
Astaneh Road, Kilomere 15, Guilan	*MAT*x1	++	+	–	–	G32
Kochesfehan Road (Eslam abad), Guilan	*MAT*x1	++	+++	–	–	G33
Astane to Lahijan Road (Bazkiagorab), Guilan	*MAT*x1	+	+++	–	–	G34
Langroud, Guilan	*MAT*x1	++	+++	–	–	G36
Kochesfehan to Astane Road (Khoshkarondan), Guilan	*MAT*x1	++	+++	–	–	G37
Sangar, Guilan	*MAT*x1	++	++	–	–	G39
Kochesfehan Road (Rashtabad), Guilan	*MAT*x1	++	+++	–	–	G41
Experimental field of Iranian Rice Research Institute, Guilan	*MAT*x1	++	+++	–	–	G46
Experimental field of Iranian Rice Research Institute, Guilan	*MAT*x1	++	++	–	–	G47
Rasht to Rostam abad Road, Guilan	*MAT*x1	+++	++	–	–	G48
Experimental field of Iranian Rice Research Institute, Guilan	*MAT*x1	+++	+++	–	–	G57
Experimental field of Iranian Rice Research Institute, Guilan	*MAT*x1	++	+++	–	–	G60
Experimental field of Iranian Rice Research Institute, Guilan	*MAT*x1	+++	++	–	–	G99
Experimental field of Iranian Rice Research Institute, Guilan	*MAT*x1	++	+++	–	–	G100
Babol, Vardkasht, Mazandaran	*MAT*x1	++	++	–	–	M49

ادامه جدول ۱.

Amool, Sirojan, Mazandaran	*MAT*x1	+++	+++	–	–	M54
Behshahr, Mazandaran	*MAT*x1	++	+++	–	–	M56
Behshahr, Mazandaran	*MAT*x1	+++	+++	–	–	M76
Behshahr, Mazandaran	*MAT*x1	+++	+++	–	–	M79
Behshahr to Tirtash (Gelogah), Mazandaran	*MAT*x1	+++	+++	–	–	M85
Mahmoud abad, Mazandaran	*MAT*x1	+++	+++	–	–	M91
Joybar, Mazandaran	*MAT*x1	+++	++	–	–	M95
Salarmahale, Mazandaran	*MAT*x1	+++	+++	–	–	M96
Behshahr, Mazandaran	*MAT*x1	+++	+++	–	–	M97
Pirbazar to Ziabar Road (Nargestan), Guilan	*MAT*x2	–	–	+++	++	G6
Experimental field of Iranian Rice Research Institute, Guilan	*MAT*x2	–	–	+++	+++	G12
Fouman to Somaesara Road, Guilan	*MAT*x2	–	–	+	++	G18
Ziba kenar to Kiashahr, Guilan	*MAT*x2	–	–	+++	+++	G21
Chaparpareh, Guilan	*MAT*x2	–	–	+++	++	G26
Khomam to Khoshkbijar Road (Chapak), Guilan	*MAT*x2	–	–	+++	+	G27
Sangar, village of sedeh, Guilan	*MAT*x2	–	–	++	+++	G35
Roudsar to Kalachay Road Kilometer 1, Gilan	*MAT*x2	–	–	++	++	G38
Roudsar to Kalachay Road, kilomere 5, Gilan	*MAT*x2	–	–	++	+++	G40
Rasht (Jafarabad), Guilan	*MAT*x2	–	–	+	+++	G42
Experimental field of Iranian Rice Research Institute, Guilan	*MAT*x2	–	–	+++	++	G44
Babol kenar, Kamranmahale, Mazandaran	*MAT*x2	–	–	+	++	M66
Amool, Vaskas, Mazandaran	*MAT*x2	–	–	+++	++	M73
Noor, Jorband, Mazandaran	*MAT*x2	–	–	+++	+++	M81

–: عدم تشکیل پریتسیوم؛ + : باروری کم = تشکیل ۱۰-۱ پریتسیوم؛ ++ : باروری متوسط = تشکیل ۵۰-۱۱ پریتسیوم؛ +++ : باروری زیاد = تشکیل بیش از ۵۰ پریتسیوم در سطح تشتک پتری نه سانتی‌متری حاوی محیط کشت Sach's agar.

مقطر) استفاده شد. پس از تهیه و انعقاد محیط کشت، قطعات بریده شده و استریل ساقه برنج در سطح آن قرار داده شدند به گونه‌ای که در سمت هر جدایه یک قطعه ساقه به طول تقریبی شش سانتی‌متر قرار داده شد. این محیط توسط *کراوس و وبستر* (Krause & Webster 1972)، برای تولید پریتسیوم‌های قارچ به کار گرفته شده است. برای انجام تلاقی بین جدایه‌ها، در هر تشتک پتری دو قرص میسلیومی به قطر پنج میلی‌متر متعلق به دو جدایه مختلف از کشت دو روزه قارچ روی محیط غذایی PDA با فاصله تقریبی سه سانتی‌متر از یکدیگر قرار داده شدند. به این ترتیب ۲۳ جدایه در همه تلاقی‌های ممکن در مقابل هم کشت داده شدند. تشتک‌های پتری حاوی جدایه‌های تلاقی داده شده ابتدا به مدت ۴۸ ساعت برای رسیدن میسلیوم دو جدایه مورد آزمایش به یکدیگر در

دمای ۲۷ درجه سلسیوس در آزمایشگاه و شرایط تاریکی دایم قرار گرفتند. سپس تشتک‌های پتری به درون انکوباتور با نور دایم فلئورسنت (با شدت ۱۹۰۰-۱۶۰۰ لوکس) و واجد شرایط دمایی ۲۶-۲۴ درجه سلسیوس منتقل شدند. پس از حدود ۱۶ روز بر اساس تشکیل پریتسیوم در هر تلاقی‌ها، برای هر یک از جدایه‌ها تیپ آمیزشی یعنی *MAT*x1 و *MAT*x2 تعیین شد. به علاوه برای حصول اطمینان از بارور بودن پریتسیوم‌ها، با تهیه نمونه‌های میکروسکوپی وجود یا عدم وجود آسک و آسکوسپور در آنها مورد بررسی قرار گرفت.

۲-۲- تعیین میزان باروری جدایه‌های *Magnaporthe salvinii*

میزان باروری جدایه‌های قارچ *M. salvinii* براساس میزان استعداد آنها در تشکیل پریتسیوم واجد آسک و آسکوسپور تعیین شد. در هر تلاقی، تعداد پریتسیوم تشکیل شده در سطح هر تشتک پتری ۹ سانتی‌متری با استفاده از استریومیکروسکوپ نوری و به عنوان شاخص باروری مورد شمارش قرار گرفتند. بر این اساس، تلاقی‌ها به سه گروه با قابلیت باروری زیاد، متوسط و کم تفکیک شدند.

در تلاقی‌های با قابلیت باروری زیاد، بیش از ۵۰ پریتسیوم تشکیل شدند که با علامت +++ مشخص گردیدند. در تلاقی‌هایی با باروری متوسط ۵۰-۱۱ پریتسیوم (++) و در تلاقی‌هایی با قابلیت باروری کم، حدود ۱۰-۱ پریتسیوم (+) تشکیل شدند (Hebert 1971).

۲-۳- انتخاب جدایه‌های آزمایشگر و تعیین تیپ آمیزشی سایر جدایه‌ها

در بین تلاقی‌های موفق انجام شده، دو جدایه از هر گروه تیپ آمیزشی که از سطح باروری بالایی در تلاقی با جدایه‌های از تیپ آمیزشی مخالف برخوردار بودند، به عنوان آزمایشگر انتخاب شدند.

پس از آن سایر جدایه‌ها (۲۸ جدایه باقی‌مانده) تنها با جدایه‌های نماینده از هر دو گروه تلاقی داده شدند و گروه تیپ آمیزشی آنها تعیین گردید. به این ترتیب که در صورت تشکیل پریتسیوم در تلاقی هر جدایه با جدایه‌های آزمایشگر، گروه تیپ آمیزشی آن جدایه مخالف گروه تیپ آمیزشی جدایه آزمایشگر در نظر گرفته شد. سطح باروری این جدایه‌ها نیز به صورتی که در بند ۲-۲ اشاره گردید، با شمارش پریتسیوم‌ها در سطح تشتک‌های پتری ۹ سانتی‌متری ارزیابی شد.

۳- تعیین تنوع ژنتیکی جدایه‌ها با استفاده از نشانگر مولکولی rep-PCR

هر یک از جدایه‌ها درون ظروف ارلن مایر ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع (PDB: potato dextrose broth) کشت داده شدند. ظروف ارلن مایر به مدت چهار تا پنج روز روی دستگاه شیکر با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه در دمای ۲۷ درجه سلسیوس در آزمایشگاه قرار داده شدند. پس از تشکیل توده میسلیوم و استخراج آنها، میسلیوم‌ها تحت خلاء به صورت خشک منجمد (Lyophlize) شدند. استخراج DNA از میسلیوم های خشک شده طبق روش *لیو و همکاران* (Liu *et al*. 2000) انجام گرفت.

جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) از آغازگرهای طراحی شده بر اساس نواحی تکرار شونده در

ژنوم قارچ به نام‌های ERIC و BOX (MWG, Germany) استفاده شد. توالی آغازگرها به شرح زیر می باشد (McDonald *et al*. 2000).

ERIC:1R (5' – ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC-3′)

2I (5' - AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3′)

BOX:1A-1R (5' - CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3′)

حجم نهایی مخلوط واکنش ۲۰ میکرولیتر بود. مخلوط واکنش برای آغازگر ERIC شامل ۶/۷ میکرولیتر آب دیونیزه استریل، ۲ میکرولیتر بافر PCR (10X)، ۲/۵ میکرولیتر از محلول حاوی ۶/۲۵ میلی‌مول $MgCl_2$، ۲ میکرولیتر از محلول حاوی ۱ میلی‌مول dNTPs، ۰/۵ میکرولیتر محلول حاوی ۵ واحد آنزیم *Taq* DNA Polymerase، ۳ میکرولیتر DNA ژنومی الگو (با غلظت ۵ نانوگرم)، ۱/۵ میکرولیتر از محلول حاوی ۷/۵ پیکومول آغازگر ERIC 1R، ۱/۵ میکرولیتر از محلول حاوی ۷/۵ پیکومول آغازگر ERIC 2R و ۰/۳ میکرولیتر DMSO (۱/۵٪) و برای آغازگر BOX شامل ۷/۷ میکرولیتر آب دیونیزه استریل، ۲ میکرولیتر بافر PCR (10X)، ۳ میکرولیتر از محلول حاوی ۷/۵ میلی‌مول $MgCl_2$، ۲ میکرولیتر از محلول حاوی ۱ میلی‌مول dNTPs، ۰/۵ میکرولیتر محلول حاوی ۵ واحد آنزیم *Taq* DNA Polymerase، ۳ میکرولیتر DNA ژنومی الگو (با غلظت ۵ نانوگرم)، ۱/۵ میکرولیتر از محلول حاوی ۷/۵ پیکومول آغازگر BOX و ۰/۳ میکرولیتر DMSO (۱/۵٪) بود. برنامه حرارتی برای انجام PCR و تکثیر قطعات DNA برای هر دو آغازگر در ۳۵ چرخه عبارت بود از واسرشت‌سازی اولیه در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، واسرشت‌سازی در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳ ثانیه و در ۹۲ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، واسرشت‌سازی در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳ ثانیه و در ۹۲ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، دو رگه‌سازی در ۴۹ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه، بسط در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت هفت دقیقه، بسط نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه. برای مشاهده محصولات حاصل از PCR، الکتروفورز محصولات تکثیر شده در ژل آگارز ۱/۲۵ درصد انجام شد. برای امتیازدهی الگوی باندی هر ژل، وجود یا عدم وجود هر باند DNA در یک مکان خاص برای هر نمونه به صورت ۱ و صفر در جدول داده‌ها (data matrix) در نرم‌افزارMicrosoft Excel 2003 ثبت شد. تجزیه و تحلیل خوشه‌ای به روش unweighted pair-group method with arithmetic averages (UPGMA) و نرم افزار کامپیوتری NTSYSpc-2.02e انجام شد و فنوگرام مربوطه رسم گردید.

نتایج

۱- شناسایی قارچ

مشخصات مرفولوژیکی فرم غیر جنسی قارچ عامل بیماری پوسیدگی ساقه برنج، به شرح زیر است.

روی محیط غذایی PDA، میسلیوم‌ها ابتدا به رنگ سفید هستند و سپس به رنگ خاکستری روشن تا تیره در می‌آیند. اسکروت‌ها دارای سطح صاف بوده و در سطح یا درون محیط غذایی و هم‌چنین در بافت ساقه و غلاف برنج تشکیل می‌گردند که در حالت بلوغ به اشکال، کروی و یا نیمه کروی بوده و به رنگ سیاه دیده می‌شوند. کنیدیوفور قارچ به طور مستقیم روی اسکلروت‌ها و هیف‌های قارچ تشکیل می‌گردند و از هیف‌های قارچ قابل تمایز هستند. کنیدی‌ها به طور منفرد و به روش سیمپودیال

(Sympodial) روی کنیدیوفور تشکیل می‌شوند. کنیدی‌ها دوکی شکل و اغلب سیگموئید هستند. اندازه کنیدی‌ها ۱۴/۵-۱۰ × ۷۶-۴۵ میکرومتر است. کنیدی‌ها تقریباً در اکثر موارد دارای سه جداره عرضی می‌باشند. خصوصیات پرگنه و مرفولوژیکی جدایه‌های مورد بررسی در این تحقیق با گونه توصیف شده توسط *الیس و هالیدی* (Ellis & Holiday 1972) مطابقت داشت. به این ترتیب گونه *Nakataea sigmoidea* (Cavara) Hara به عنوان فرم غیرجنسی جدایه‌های مورد مطالعه تأیید شد.

مشخصات مرفولوژیکی فرم جنسی قارچ عامل بیماری پوسیدگی ساقه برنج به شرح زیر است. پریتسیوم‌ها سیاه رنگ بوده و کروی شکل هستند، پریتسیوم‌ها درون بافت غلاف خارجی برگ فرو رفته‌اند. آسک‌ها استوانه‌ای شکل بوده و طویل هستند و دیواره‌ای نازک دارند که دارای پایه کوتاه می‌باشند. زمانی‌که آسکوسپورها بالغ می‌شوند آسک‌ها ناپدید می‌گردند. آسکوسپورها در دو ردیف (Biseriate) و به تعداد هشت عدد در هر آسک تشکیل می‌شوند. آسکوسپورها دارای سه جداره عرضی بوده و در محل جداره‌ها فرورفتگی (Constricted) دارند. آسکوسپورها دوکی شکل (Fusiform) و خمیده هستند. اندازه آسکوسپورها ۸/۷ × ۶۵-۳۵ میکرومتر می‌باشد. مرفولوژی آسک و آسکوسپور و هم‌چنین پریتسیوم‌های جدایه‌های مورد بررسی در این تحقیق با توصیف ذکر شده توسط *کراوس و وبستر* (Krause & Webster 1972) برای گونه *Magnaporthe salvinii* (Catt.) Krause & Webster به عنوان فرم جنسی *N. sigmoidea* مطابقت داشت.

۲- تعیین فراوانی آلل‌های تیپ آمیزشی

۲-۱- تعیین تیپ آمیزشی جدایه ها

در تلاقی‌هایی که منجر به تشکیل پریتسیوم شد آن دو جدایه به تیپ‌های آمیزشی مخالف، و تلاقی‌های بدون تشکیل پرتیسیوم به تیپ آمیزشی مشابه احتمالی اختصاص داده شدند. بر این اساس جدایه‌های بارور در دو گروه با تیپ‌های آمیزشی *MAT*x1 و *MAT*x2 شناسایی شدند. از بین تلاقی‌های موفق انجام شده، از هر گروه تیپ آمیزشی دو جدایه که قادر به تشکیل بیشترین تعداد پریتسیوم در تلاقی با جدایه‌هایی از تیپ آمیزشی مخالف بودند، به عنوان آزمایشگر (tester) انتخاب شدند. جدایه‌های G3 و G11 از گروه تیپ آمیزشی *MAT*x1 و جدایه‌های G21 و G27 از گروه تیپ آمیزشی *MAT*x2 توانستند در تلاقی با جدایه‌های از تیپ آمیزشی مخالف تعداد پریتسیوم قابل ملاحظه‌ای تشکیل دهند. این موضوع بیانگر این است که این جدایه‌ها از قابلیت باروری زیادی برخوردار هستند و به عنوان جدایه‌های آزمایشگر برای تلاقی با جدایه‌های باقیمانده انتخاب شدند.

پس از انتخاب چهار جدایه آزمایشگر و تعیین تیپ آمیزشی آنها، سایر جدایه‌ها (۲۸ جدایه باقی‌مانده) تنها با جدایه‌های آزمایشگر از هر دو گروه تیپ آمیزشی تلاقی داده شدند و تیپ آمیزشی آنها تعیین شد. جدایه‌های متعلق به گروه تیپ آمیزشی *MAT*x1 در تلاقی با جدایه‌های آزمایشگر با تیپ آمیزشی *MAT*x2 پریتسیوم تولید کردند و در تلاقی با جدایه‌های آزمایشگر از گروه *MAT*x1 هیچ پریتسیومی تولید نشد. هم‌چنین جدایه‌های متعلق به گروه تیپ آمیزشی *MAT*x2 هنگامی که با جدایه‌های آزمایشگر با تیپ آمیزشی *MAT*x1 تلاقی داده شدند پریتسیوم تولید کردند ولی وقتی که با جدایه‌های آزمایشگر از گروه *MAT*x2 تلاقی داده شدند پریتسیومی تشکیل نشد. به این

ترتیب هتروتال بودن قارچ تأیید شد و در قارچ‌های هتروتال، فقط افرادی با تیپ آمیزشی سازگار (مخالف) می‌توانند با هم تولید مثل جنسی داشته و پریتسیوم تشکیل دهند (جدول ۱).

از مجموع ۵۱ جدایه بررسی شده در این تحقیق، ۳۷ جدایه از تیپ آمیزشی *MAT*x1 (۷۲/۵۵ ٪) و ۱۴ جدایه از تیپ آمیزشی *MAT*x2 (۲۷/۴۵ ٪) تشخیص داده شدند. در بین ۳۸ جدایه استان گیلان، ۷۱/۰۵ ٪ از تیپ آمیزشی *MAT*x1 و ۲۸/۹۵ ٪ از تیپ آمیزشی *MAT*x2 بودند. از ۱۳ جدایه استان مازندران نیز، ۷۶/۹۲ ٪ از تیپ آمیزشی *MAT*x1 و ۲۳/۰۸ ٪ از تیپ آمیزشی *MAT*x2 تشخیص داده شدند (جدول ۲). در هر حال، در بین جدایه‌های مزرعه‌ای مطالعه شده، تیپ آمیزشی *MAT*x1 از فراوانی بیشتری در مقایسه با *MAT*x2 برخوردار بود.

۲-۲- زمان و نحوه تشکیل پریتسیوم‌ها

حدود یک هفته پس از انتقال تشتک‌های پتری واجد تلاقی‌ها به انکوباتور دارای نور دایم فلئورسنت و دمای ۲۷-۲۴ درجه سلسیوس، تشکیل پریتسیوم‌ها که فاقد آسک و آسکوسپور بودند شروع شد و با گذشت ۱۸ روز از زمان انجام تلاقی، پریتسیوم‌های بالغ دارای آسک و آسکوسپور تشکیل شدند. پریتسیوم‌های تشکیل شده توسط توده میسلیوم سفید رنگی پوشیده شده بودند (شکل‌های ۱a و ۱b). لازم به ذکر است که در اسلایدهای میکروسکوپی تهیه شده از تمامی تلاقی‌های موفق، پریتسیوم‌های واجد آسک و آسکوسپور دیده شدند (شکل‌های ۱d-f). پریتسیوم‌های بالغ، به رنگ سیاه بوده و واجد گردن بلند و یا کوتاه بودند (شکل ۱c).

۳- انگشت‌نگاری DNA به روش rep-PCR

مجموع باندهای DNA چند شکلی تکثیر شده قابل ارزیابی آغازگرهای BOX و ERIC برای ۲۰ جدایه از قارچ *N. sigmoidea*، ۱۴ باند با اندازه‌های ۲۰۰ تا ۹۴۳ جفت باز بود. الگوی باندی قطعات DNA تکثیر شده در برخی جدایه‌ها، در شکل ۲ نشان داده شده است.

در ارزیابی و تجزیه و تحلیل نهایی داده‌های حاصل از دو آغازگر ERIC و BOX، پنج دودمان کلونی (Clonal lineage) یا گروه انگشت‌نگاری DNA در بین ۲۰ جدایه از قارچ *M. salvinii* مشخص شد و به ترتیب از بالا به پایین با حروف A، B، C، D و E از هم مشخص گردیدند (شکل ۳). هریک از این گروه‌ها از جدایه‌هایی تشکیل شده بودند که از نظر ژنتیکی ۱۰۰-۹۳٪ با هم شباهت داشتند. در پنج دودمان کلونی به دست آمده در بین ۲۰ جدایه، ۱۹ هاپلوتیپ شناسایی شده است. فراوانی جدایه‌های قارچ *M. salvinii* در هر یک از پنج دودمان شناسایی شده در جدول ۳ آمده است.

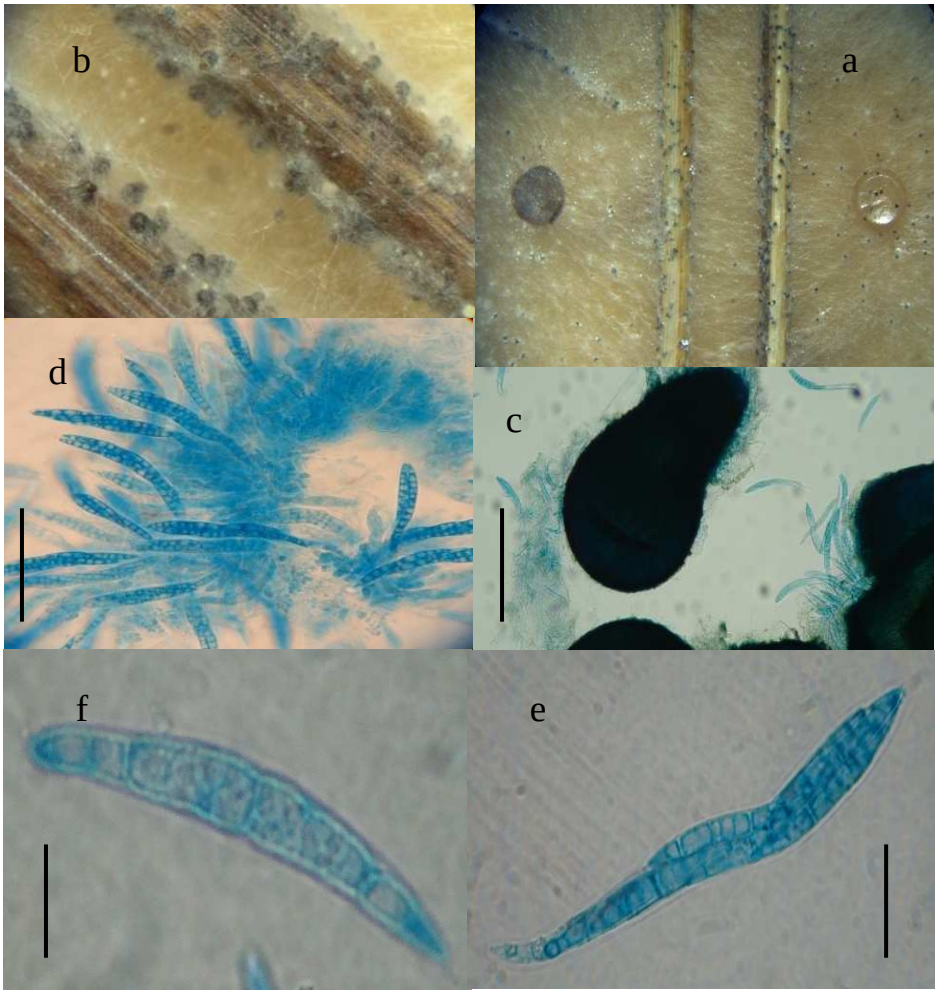
بحث

در این تحقیق، وضعیت باروری و پراکنش ایدیومورف‌های تیپ آمیزشی جدایه‌های قارچ *M. salvinii* عامل پوسیدگی ساقه برنج مورد بررسی قرار گرفت. در قارچ‌های هتروتال، وجود دو تیپ آمیزشی (Mating type) سازگار در یک جمعیت، برای وقوع تولید مثل جنسی ضروری هستند. ژن‌های تیپ آمیزشی معمولاً به عنوان عامل اصلی در کنترل تولید مثل جنسی جدایه‌های قارچی عمل می‌کنند (Leslie & Summerell 2006, Coppin *et al*. 1997).

جدول ۲. مقایسه پراکنش آلل‌های تیپ آمیزشی *Magnaporthe salvinii* در استان‌های گیلان و مازندران.

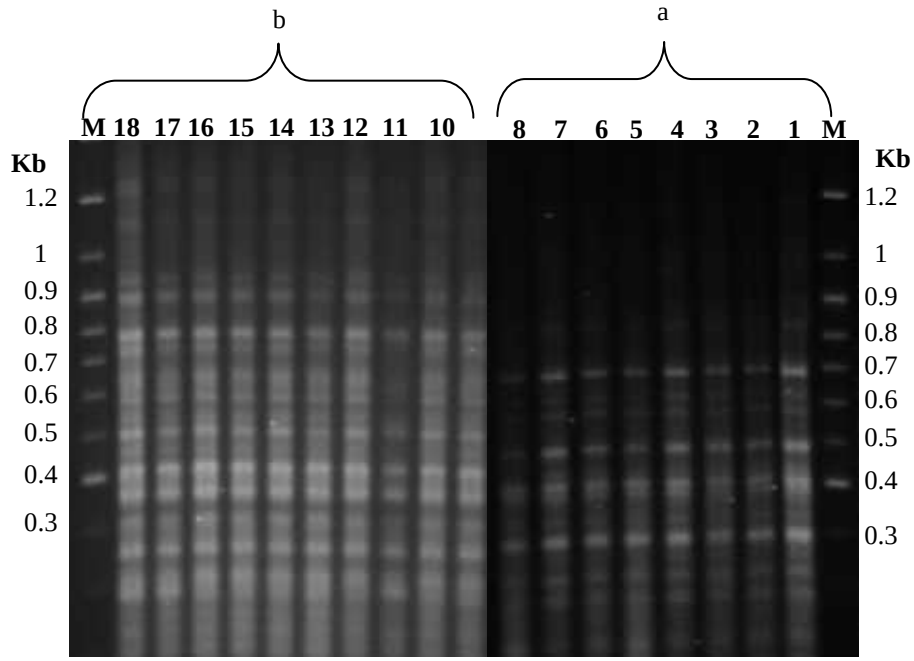
Table 2. Comparison of distribution of mating type alleles distribution of *Magnaporthe salvinii* in Guilan and Mazandaran provinces

محل نمونه برداری Sampling location	تعداد و درصد جدایه‌های متعلق به هر تپ آمیزشی Number and percent of isolates belonged to each mating type		تعداد کل جدایه‌ها Total number of isolates
	*MAT*x1	*MAT*x2	
Guilan province	27 (71.05%)	11 (28.95%)	38
Mazandaran province	10 (76.92%)	3 (23.08%)	13
Total	37 (72.55%)	14 (27.45%)	51



شکل ۱. تشکیل فرم جنسی قارچ *Magnaporthe salvinii* در شرایط آزمایشگاه. a و b) پریتسیوم‌های تشکیل شده در تلاقی بین جدایه‌های M91 و G21 روی محیط کشت Sach's agar. c) پریتسیوم‌های بالغ، d و e) آسک‌های حاوی آسکوسپورها. مقیاس سنجش: برای c برابر ۴۰۰ میکرومتر، برای d برابر ۱۰۰ میکرومتر، برای e برابر ۴۰ میکرومتر و برای f برابر ۱۰ میکرومتر می‌باشد.

Fig. 1. Development of perfect state of *Magnaporthe salvinii* in laboratory condition. a , b) Perithecia produced in cross between M91 and G21 on Sach's agar, c) Matural perithecia, d , e) Ascus containing ascospores, f) An ascospore. Bar: c = 400 µm, d = 100 µm, e = 40 µm and f = 10 µm.

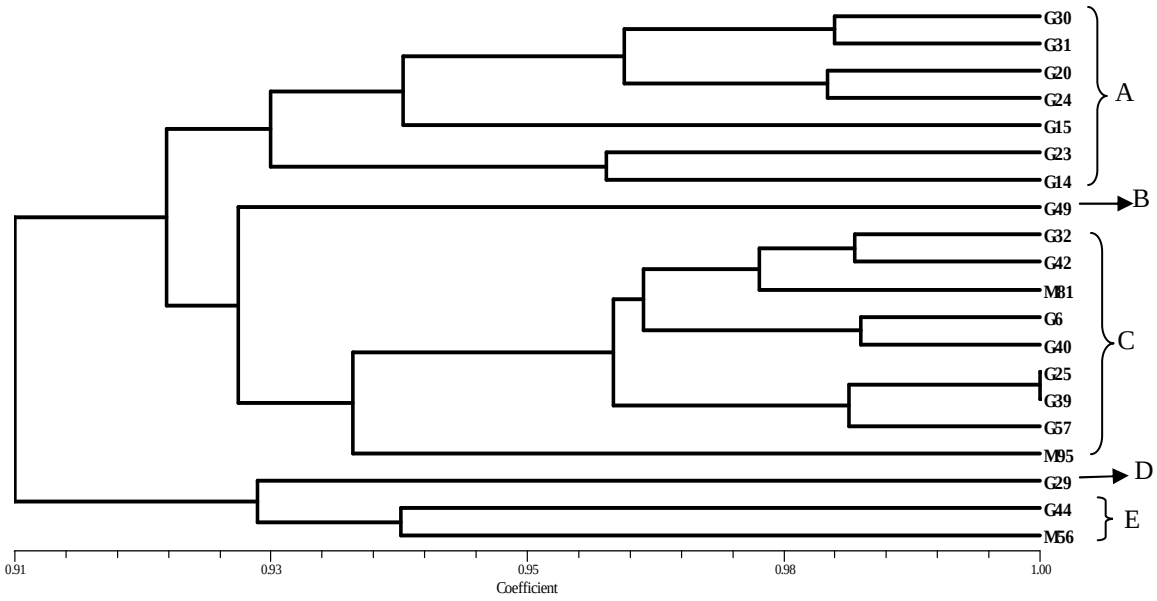


شکل ۲. الگوی باندی قطعات DNA تکثیر شده به روش rep-PCR برای جدایه‌های قارچ *Magnaporthe salvini* ، در ژل آگـارز ۱/۲۵ ٪. a) آغازگر ERIC، شماره های ۱ تا ۸ به ترتیب مربوط به جدایه‌هـای G6، G39، G40، G42، M56، G57، M81 و M95. b) آغازگر BOX، شماره های ۹ تا ۱۸ به ترتیب مربوط بـه جدایـه هـای G39، G32، G40، G25، G24، G23، G20، G15، G14 و G6 می‌باشند. M: نشانگر اندازه DNA (Gene ruler™ DNA Ladder Mix).

Fig 2. Banding patterns obtained from amplified DNA fragments by rep-PCR for the *Magnaporthe salvinii* isolates, in a 1.25% agarose gel. a) ERIC primer, 1 to 8 numbers are corresponding to G6, G39, G40, G42, G56, G57, M81, and M95. b) BOX primer, 9 to 18 numbers are corresponding to G39, G32, G40, G25, G24, G23, G20, G15, G14 and G6 isolates, respectively. M = DNA size marker (Gene ruler™ DNA Ladder Mix).

نتایج نشان می‌دهد که هـر دو تیـپ آمیزشـی در جمعیـت مورد بررسـی وجـود دارنـد و ایـن موضـوع نـشان‌دهنـده پتانسیل زیاد این جمعیت برای انجام تولید مثـل جنـسی و در نهایت افزایش تنوع ژنتیکی و نوترکیبی است.

با دانستن فراوانی ایدیومورف‌هـای تیـپ آمیزشـی و وضعیت باروری جدایه‌ها می‌توان احتمال وقوع تولید مثـل جنسی در یک جمعیت و یک منطقه بخـصوص را بـرآورد کرد (Viji & Gnanamanickam 1998). در این تحقیق فراوانی جدایه‌هـای مزرعـه‌ای از تیـپ آمیزشـی *MAT*x1 نسبت به جدایه‌هایی از تیپ آمیزشی *MAT*x2 بیشتر بـود. به طوری که از بین ۵۱ جدایه، ۳۷ جدایه از تیـپ آمیزشـی *MAT*x1 و ۱۴ جدایه از تیپ آمیزشی *MAT*x2 شناسـایی شدند. غالب بودن تنها یک تیپ آمیزشی در جمعیـت غیـر عـادی نبـوده و در برخـی دیگـر از قـارچ‌هـا از جملـه *M. grisea* نیز گزارش‌های مبنی بر وجود نسبتی نا متوازن از تیـپ‌هـای آمیزشـی در جمعیـت قـارچ وجـود دارد (Notteghem & Silue 1992). در مورد غالب بودن یک تیپ آمیزشی در جمعیت، این احتمال وجود دارد که جدایه‌هایی کـه ایـدیومورف غالـب در جمعیـت را حمـل مـی‌کننـد بهتـر مـی‌تواننـد بقـا پیـدا کننـد (Ferreira & Webster 1975).



شکل ۳. دندروگرام ترسیم شده براساس روش UPGMA در نرم افزار NTSYSpc-2.02e برای تعدادی از جدایه‌های *M. salvinii* که نشان‌دهنده پنج دودمان کلونی می‌باشد. این دندروگرام با تجزیه و تحلیل ماتریس دوتایی (binary matrix) با مقایسه الگوی باندی قطعات DNA تکثیر شده جدایه‌های فوق براساس نشانگرمولکولی rep-PCR ، ایجاد شده است. اعضای هر دودمان کلونی ۱۰۰-۹۳٪ با هم از نظر الگوی DNA شباهت دارند.

Fig. 3. The generated dendrogram by the UPGMA method by NTSYSpc-2.02e software for some *M. salvinii* isolates that is showing five clonal lineages. The dendrogram was generated based on a pair wise comparison of banding patterns obtained from amplified DNA fragment by rep-PCR. The DNA patterns of clonal lineages members are similar to each other 93-100%.

جدول ۳. فراوانی پنج دودمان کلونی شناسایی شده در تعدادی از جدایه‌های *Magnaporthe salvinii* در مزارع برنج شمال ایران

Table 3. Frequency of five clonal lineages within some *Magnaporthe salvinii* isolates in northern Iran rice fields.

دودمان کلونی clonal lineage	تعداد جدایه ها number of isolates	فراوانی جدایه ها (٪) Isolates frequency (%)	تعداد هاپلوتیپ‌های شناسایی شده Number of identified haplotypes
A	7	35	7
B	1	5	1
C	9	45	8
D	1	5	1
E	2	10	2

از طرف دیگر، با توجه به الگوی پراکنش تیپ آمیزشی در جدایه‌های مزرعه‌ای، می‌توان گفت که فراوانی بیشتر یک گروه تیپ آمیزشی در مزارع، احتمالاً یکی از دلایل کمیابی مرحله جنسی (وجود پریتسیوم) در طبیعت، است.

برای مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت‌های قارچ‌ها از ابزارها و نشانگرهای متناسب استفاده می‌شود. استفاده از نشانگرهای مولکولی به دلیل عدم تاثیرپذیری آنها از شرایط محیطی داخلی و خارجی موجود، برای شناسایی،

طبقه‌بندی و بررسی تنوع ژنتیکی قارچ‌ها به وفور به‌کار برده می‌شود (McDonald 1997). با توجه به سرعت، تکرار پذیری و کم‌هزینه بودن rep-PCR نسبت به RFLP و مطالعاتی که به کمک آغازگرهای طراحی شده از روی توالی‌های نوکلئوتیدی غیر وابسته از توالی‌های DNA تکرار شونده به نام‌های ERIC و BOX روی سایر قارچ‌ها صورت گرفته بود (Czambor & Arcniuk 1999, Jedryczka *et al*. 1999, McDonald *et al*. 2000)، در این تحقیق برای بررسی تنوع جمعیت قارچ از نشانگر مولکولی rep-PCR و دو آغازگر ERIC و BOX استفاده شد. در ارزیابی و تجزیه و تحلیل نهایی داده‌ها با استفاده از این دو آغازگر، پنج دودمان کلونی یا گروه انگشت‌نگاری در بین ۲۰ جدایه و ۱۹ هاپلوتیپ مشخص شد. با توجه به نتایج حاصل از مطالعه مولکولی، بین جدایه‌های قارچ *M. salvinii* مورد بررسی در این تحقیق مشاهده گردید که در بین ۲۰ جدایه تنوع ژنتیکی زیاد بوده است. دلیل آن را می‌توان بروز ژنوتیپ‌های جدیدی دانست که می‌توانند حاصل تولید مثل جنسی قارچ باشند. آزمایش‌های بررسی سازگاری جنسی در این تحقیق و مقایسه آن با نتایج مولکولی بیانگر این مطلب می‌باشد که وجود قابلیت باروری زیاد، حضور هر دو تیپ آمیزشی در جمعیت مورد آزمایش نیز دلیلی دیگر بر احتمال بروز تولید مثل جنسی و به دنبال آن مشاهده تنوع ژنتیکی زیاد در جمعیت قارچ باشد. در واقع، این تحقیق نشان داد که جمعیت قارچ متنوع است و بروز نوترکیبی جنسی می‌تواند حضور ۱۹ هاپلوتیپ بین ۲۰ جدایه و وجود تنوع ژنتیکی نسبتاً زیاد را توجیه نماید.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (32-31) متن انگلیسی مراجعه شود.