

ریخت‌شناسی، بیماری‌زایی و تعیین توالی بخشی از دی ان ای ریوزومی
Ceratorhiza hydrophila از روی برنج در ایران*

MORPHOLOGY, PATHOGENICITY AND PARTIAL
SEQUENCING OF rDNA REGION OF *Ceratorhiza hydrophila*
ON RICE FROM IRAN

امیررضا امیرمیجانی^{۱*}، سیداکبر خداپرست^۱، فریدون پاداشت دهکائی^۲ و محمدمهدی سوهانی^۳

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۶/۲۸؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۳/۳۱)

چکیده

قارچ *Ceratorhiza hydrophila* از غلاف‌های برگ برنج دارای علائم لکه‌های آبسوخته در شالیزارهای استان گیلان به دفعات جدا شده است. این پژوهش به منظور شناخت خصوصیات ریخت‌شناسی، اثبات بیماری‌زایی و بررسی جایگاه فیلوژنتیکی و ارتباط آن با سایر قارچ‌های نزدیک به آن انجام شد. نتایج نشان داد که این قارچ قادر به آلوده کردن بوته‌ها و ایجاد لکه‌های آبسوخته تا قهوه‌ای کم‌رنگ کوچک روی غلاف برگ بعد از یک هفته پس از مایه‌زنی بود. بررسی ریخت‌شناسی جدایه‌ها نشان داد پرگنه در سطح محیط کشت PDA در ابتدا سفید بوده و در نهایت به رنگ خرمایی تغییر یافت. در سطح تشتک حلقه‌بندی‌ها و سختینه‌های تقریباً گرد، منظم و بسیار کوچک ظرف چهار روز پس از کشت به تعداد فراوان تشکیل شدند. رنگ سختینه‌ها در ابتدا سفید بود که با گذشت زمان به رنگ نخودی تا قهوه‌ای تیره تغییر یافت. تجزیه و تجلیل فیلوژنتیک ۵۳۰ جفت باز از ناحیه ITS (شامل 5.8S) نشان داد این قارچ دارای قرابت ژنتیکی بسیار زیادی با گروه ریزوکتونیاها بوده و از گروه *Sclerotium* جدا می‌شود که این نتایج با ریخت‌شناسی پرگنه و سختینه قارچ مطابقت دارد. این اولین گزارش از بیماری‌زایی این قارچ روی برنج از ایران است.

واژه‌های کلیدی: برنج، بیماری‌زایی، تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی، گیلان، *Ceratorhiza hydrophila* ITS rDNA

* بخشی از پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد نگارنده اول، ارائه شده به دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

** مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: ar.amirmijani@gmail.com

۱. به‌ترتیب دانشجوی دوره دکتری و دانشیار قارچ‌شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان

۲. استادیار بیماری‌شناسی گیاهی، مؤسسه تحقیقات برنج کشور

۳. استادیار بیولوژی مولکولی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان

مقدمه

نرسیده است. با توجه به عدم اطلاعات کافی و صحیح از بیماری‌زایی این قارچ در ایران، این بررسی به منظور اثبات بیماری‌زایی، شناخت خصوصیات ریخت‌شناختی و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک آن انجام شد.

روش بررسی

در بازدیدهایی که طی تابستان سال ۱۳۸۷ در زمان حداکثر پنجه‌زنی تا مرحله رسیدن دانه از برخی مزارع برنج استان گیلان صورت گرفت، نمونه‌ها از غلاف‌های دارای علائم مشکوک به بیماری جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شده و بلافاصله کشت شدند. پس از رشد از کلیه جدایه‌ها نوک ریشه به‌دست آمد. برای تعیین ویژگی‌های ریخت‌شناختی قرص‌های میسیلیومی پنج میلی‌متری از حاشیه کشت‌های دو روزه به مرکز تشک‌های پتری نه سانتی‌متری حاوی ۲۰ میلی‌لیتر PDA (سه تکرار برای هر جدایه) منتقل و تشک‌ها در تاریکی و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، طی یک دوره سه هفته‌ای نگهداری شدند. تشک‌ها روزانه بازدید و مشخصاتی مانند شکل ظاهری و رنگ پرگنه، تولید دواير متحدالمرکز، تولید ریشه‌های هوایی و سختینه (رنگ، شکل و الگوی پراکنش)، یادداشت شد. برای اندازه‌گیری طول و عرض سلول‌های ریشه از ۵۰ سلول نوک ریشه و ریشه‌های دارای انشعاب برای هر جدایه در تکرارهای مختلف استفاده شد. ابعاد سلول‌ها با بزرگنمایی ۴۰ برابر توسط میکروسکوپ نوری مدل اولمپیوس به‌دست آمد. قطر سختینه‌ها نیز از طریق اندازه‌گیری قطر ۱۰۰ سختینه در دو جهت عمود بر هم برای هر جدایه در تکرارهای مختلف به‌وسیله استرئومیکروسکوپ اولمپیوس مدرج در بزرگنمایی ۴۰ برابر به‌دست آمد (Kim et al. 1994). برای این‌که تفاوت بین جدایه‌ها از نظر مشخصات اندازه‌گیری شده بررسی و آزمون آماری بین آنها انجام

یکی از این بیماری‌های سختینه‌دار برنج که سبب سوختگی برگ یا پوسیدگی ساقه برنج می‌شود، توسط قارچ *Ceratorhiza hydrophila* (= *Sclerotium hydrophilum*) به‌وجود می‌آید که اولین بار در سال ۱۹۷۱ از ژاپن و تحت عنوان *Sclerotium hydrophilum* گزارش شد (Morrison & King 1971). علاوه بر ژاپن، از سایر مناطق برنج‌کاری دنیا نیز گزارش گردیده است. هم‌چنین این قارچ قادر به آلودگی روی برنج وحشی *Zizania aquatica* (Punter et al. 1984) و نیلوفر آبی *Nymphaea odorata* نیز است (Aye et al. 2009). جنس *Sclerotium* دارای گونه‌های بیماری‌زای گیاهی بسیاری است که برخی این گونه‌ها فاقد مرحله جنسی بوده و یا به ندرت فرم جنسی تولید می‌کنند و تنها براساس مرحله غیرجنسی شناسایی می‌شوند (Kohn 2004). به گفته دکاندول (De Candolle 1815) برخی گونه‌های آن با جنس آنامورفیک *Rhizoctonia* مرتبط بوده و دارای سختینه، ریشه‌های عقیم و انشعابات قائمه می‌باشند (Xu et al. 2010). علاوه بر این، در سطح توالی DNA نیز شباهت‌هایی بین اینها وجود دارد. طبق گفته یوهانسون و همکاران (Johanson et al. 1998) جفت آغازگر اختصاصی قارچ *Rhizoctonia solani* قادر به تکثیر DNA قارچ *S. hydrophilum* نیز هستند. این قارچ همراه با گونه‌های *Rhizoctonia solani* و *Rhizoctonia oryzae-sativae* از گیاهان برنج دارای علائم آبسوخته به‌صورت نقاط تیره قهوه‌ای جدا می‌شود و به‌عنوان یک بیمارگر ضعیف برنج از آن نام برده شده است (Cedeno et al. 1997). هر چند این قارچ از مزارع شمال کشور گزارش شده است (جانی‌پور و همکاران ۲۰۰۹) ولی تاکنون بیماری‌زایی آن به اثبات

شود، جدایه‌ها به‌عنوان تیمار در نظر گرفته شده و تفاوت آماری آنها در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار آزمون شد. سپس از آزمون اختلاف معنی‌دار قابل اعتماد توکی (Tukey) برای مقایسه میانگین جدایه‌ها از نظر هر صفت استفاده شد.

شناسایی جدایه‌ها با مقایسه مشخصات مورفولوژیک آنها با شرح این قارچ و قارچ‌های نزدیک به آن در منابع قابل دسترس شامل اسنه و همکاران (Sneh et al. 1991)، موردو (Mordue 1974)، پانتر و همکاران (۱۹۸۴)، سدنو و همکاران (۱۹۹۷)، کراس و ویستر (Krause & Webster 1972) و اونیکسی و همکاران (Oniki et al. 1979) انجام گرفت. جهت مایه‌زنی از توده میسلیمی استفاده شد. قارچ عامل بیماری روی محیط غذایی PDA کشت شد، سپس قرص‌هایی ۸/۵ میلی‌متری از حاشیه پرگنه بیمارگر تهیه گردیده و ده عدد از آنها را به هر ظرف ارلن حاوی ۱۲۵ میلی‌لیتر محیط غذایی سیب‌زمینی دکستروز مایع (Potato Dextrose Broth) منتقل کرده، به مدت ۴۰ ساعت در ۳۰ درجه سانتی‌گراد داخل اطاقک رشد شیکردار (با سرعت ۱۰۰ rpm) نگهداری شدند. پس از این مدت هر قرص تبدیل به یک پرگنه یا توده میسلیمی گوی شکل گردید. هر یک از این توده میسلیمی را داخل یک برگ دستمال کاغذی پیچیده و برای آلوده‌سازی هر بوته در مرحله شروع خوشه‌دهی، استفاده گردید (Padasht et al. 2010). گلدان‌های حاوی بوته‌های مایه‌زنی شده در شرایط دمایی ۲۵-۳۰ درجه سانتی‌گراد و در رطوبت در حد اشباع که از پایین بوته تأمین می‌شد، نگهداری شدند. رقم مایه‌زنی شده رقم بومی هاشمی بوده است. جهت استخراج DNA، از روش (Walsh et al. 1991; Hirata & Chelex 5%)

محصول PCR جدایه به منظور تعیین توالی به شرکت Macrogen در کره‌جنوبی ارسال شد. پس از مرتب‌سازی توالی به‌دست آمده از این قارچ همراه با تعدادی از توالی‌های مربوط به جنس‌های *Sclerotium Rhizoctonia* و *Waitea* با نرم‌افزار GeneDoc (Nicholas & Nicholas 1997) و برنامه Clustal x (Thompson et al. 1997)، ردیف و تنظیم شدند. در این بررسی دو جدایه قارچ *R. solani* به‌دست آمده از مزارع برنج استان گیلان نیز توالی‌یابی شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها در نرم‌افزار MEGA5 (Tamura et al. 2011) و با دو روش Neighbor-Joining (با گزینه‌های Complete deletion option و Maximum Composite Likelihood method) انجام شد. در هر دو روش همه جایگاه‌های دارای فضای خالی حذف شدند. آزمون اعتبارسنجی در هر دو روش با ۱۰۰۰ تکرار انجام شد.

نتیجه و بحث

پس از جداسازی عوامل ایجادکننده سوختگی غلاف برگ برنج در آزمایشگاه، دو جدایه قارچ *C. hydrophila* از منطقه پیربازار رشت و شهرستان کياشهر به‌دست آمد. بررسی خصوصیات ظاهری پرگنه قارچ *C. hydrophila* مورد مطالعه در این پژوهش، مطابق با مطالعات دیمرچی و همکاران (Demirci et al. 2009)، لانوازیلت و همکاران (۲۰۰۲)، آی و همکاران (۲۰۰۹) و جانی‌پور و همکاران (۲۰۰۹) بود.

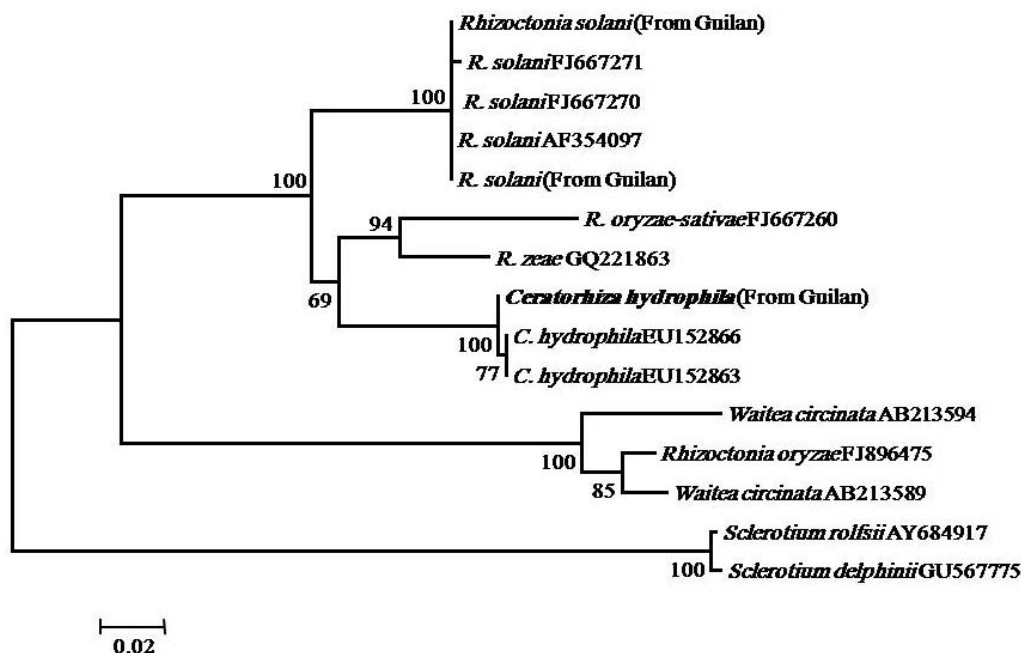
است. این اولین گزارش از بیماری‌زایی قارچ *C. hydrophila* روی برنج از ایران است.

پس از استخراج DNA، ۵۳۰ جفت باز از ناحیه ITS (شامل 5.8S) توالی‌یابی شد. این توالی با شماره دسترسی JQ359765 در بانک ژن (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ثبت شده است. نتیجه مشابهت‌یابی در بانک ژن نشان داد توالی حاصل با توالی‌های ثبت شده در بانک ژن از شباهت بالا و گاه ۱۰۰ درصدی برخوردار است که این نتیجه تأییدی بر تشخیص صحیح این جدایه از سایر جدایه‌های غیرمرتبط توسط توالی ناحیه rDNA بود و این نتایج توانایی توالی‌یابی ناحیه ژنی ITS را برای ردیابی و تشخیص مولکولی قارچ، تأیید می‌کند. هو و همکاران (Hu et al. 2008) براساس توالی ناحیه ژنی ITS آغازگر اختصاصی برای این قارچ طراحی کردند و بیان نمودند این آغازگرها قادر به ردیابی قارچ سه روز پس از مایه‌زنی در گیاهان برنج هستند.

بررسی ارتباط فیلوژنتیکی این قارچ با گونه‌های قارچ‌های مورد مطالعه نشان داد که در هر دو درخت جدایه *C. hydrophila* در کنار گونه‌های ریزوکتونیای دو هسته‌ای قرار می‌گیرد (شکل ۱) و از *Sclerotium* جدا می‌شود. در بررسی میکروسکوپی ریشه‌های قارچ معمولاً دارای انشعابات قائمه و راست و دارای دو هسته در هر سلول هستند. این نتیجه با مطالعه تردوای و بارپی (Tredway & Burpee 2001) نیز مطابق است. ایشان با توجه به انشعابات قائمه ریشه در این قارچ بیان نمودند که گونه *S. hydrophilum* با گونه‌های جنس ریزوکتونیا مرتبط است. در این گونه ساختار سختینه از دو قسمت اصلی تشکیل شده و برخلاف گونه‌های جنس *Sclerotium* فاقد لایه میانی یا کرتکس است که از این

پرگنه قارچ پس از گذشت ۷۲ ساعت سطح تشتک‌های کشت شده را پر کرد. پرگنه در سطح محیط کشت PDA در ابتدا سفید بوده و در نهایت به رنگ خرمایی تغییر یافت. در سطح تشتک حلقه‌بندی‌ها مشخص و سختینه‌های تقریباً گرد، منظم و بسیار کوچک ظرف چهار روز پس از کشت در سطح تشتک و به تعداد فراوان تشکیل شدند. رنگ سختینه‌ها در ابتدا سفید بود که با گذشت زمان به رنگ نخودی تا قهوه‌ای تیره تغییر یافت. ابعاد سلول‌های ریشه $3\mu\text{m} \times 7\mu\text{m} - 192\mu\text{m} \times 37\mu\text{m}$ و قطر سختینه‌ها $275 - 737\mu\text{m}$ میکرومتر محاسبه شد. سطح تحتانی نیز مشابه سطح فوقانی آن بود، با این تفاوت که در محل سختینه‌ها رنگ پرگنه متمایل به قهوه‌ای کم رنگ تا تیره‌تر بود. میسیلیوم هوایی کمی در محیط کشت تولید شد.

در این پژوهش، هر دو جدایه به لحاظ آماری در خصوصیات مورد بررسی مانند قطر سختینه، طول و عرض سلول‌های ریشه اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند. بررسی آزمون بیماری‌زایی نشان داد که قارچ‌های *C. hydrophila* قادر به ایجاد لکه روی غلاف‌های برگ بوته‌های برنج مورد بررسی بوده و پنج روز پس از مایه‌زنی ناحیه آلوده شده را کلنیزه کرد و مقدار زیادی سختینه قارچ روی سطح غلاف و ساقه بوته برنج تشکیل شد. در این ناحیه لکه‌های کوچک به رنگ زرد تا قهوه‌ای کم‌رنگ روی سطح غلاف برگ تشکیل شد. در این بررسی *C. hydrophila* مجدداً از لکه‌ها جدا شد. سدنو و همکاران (۱۹۹۷) بیان نمودند این گونه معمولاً همراه با *R. solani* و *R. oryzae-sativae* روی برنج وجود داشته و سبب ایجاد لکه‌های قهوه‌ای تیره کوچک روی غلاف برگ می‌شود و در آزمون بیماری‌زایی به تنهایی نیز علائم مشابهی ایجاد کرده



شکل ۱. درخت فیلوژنتیکی به‌دست آمده از روش Neighbor-Joining براساس توالی ناحیه ژنی ITS rDNA. اعداد بالای شاخه‌ها، نتایج اعتبارسنجی را براساس ۱۰۰۰ تکرار نشان می‌دهند.

Fig. 1. Phylogenetic tree obtained from Neighbor-Joining method based on sequence of ITS rDNA region. The numbers above the branches represent branch support using 1000 bootstrap replications (Bootstrap values below 50% are not shown).

آمده از داده‌های مولکولی این گونه را به جنس آنامورفیک *Ceratorhiza* منتقل کردند.

سپاسگزاری

انجام این تحقیق با حمایت مالی قطب علمی برنج کشور امکان‌پذیر شده است که بدین وسیله از مدیریت محترم قطب علمی برنج کشور قدردانی می‌شود.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (137-139) متن انگلیسی مراجعه شود.

نظر نیز مشابه گونه‌های ریزوکتونیا است. هم‌چنین در برش عرضی سختینه این گونه از یک پوسته مشخص با ضخامت حدود ۲۰ میکرومتر و بافت اصلی که سلول‌های ریشه مانند آن را به‌وجود آورده‌اند، تشکیل شده است. زوو همکاران (۲۰۱۰) براساس توالی نواحی ژنی LSU و ITS، بیان کردند گونه *S. hydrophilum*، قرابت نزدیکی با گونه‌های ریزوکتونیای دو هسته‌ای دارد و تمامی جدایه‌های *S. hydrophilum* مورد بررسی آنها براساس توالی ناحیه LSU در کنار *R. oryzae-sativae* و سایر گونه‌های جنس *Ceratobasidium* با اعتبار ۹۵ درصد قرار گرفتند و با توجه به عدم وجود قوس اتصال، انشعابات قائمه ریشه آن، فرورفتگی در پایه انشعابات ریشه، تعداد دو هسته در هر سلول ریشه و نتایج به‌دست