مطالعه گونه‌های *Cylindrocarpon* همراه با پوسیدگی ریشه و طوقه ذرت و کلزا در استان خوزستان*

STUDY OF THE *Cylindrocarpon* SPECIES ASSOCIATED WITH CORN AND CANOLA CROWN AND ROOT ROT IN KHUZESTAN PROVINCE

مرضیه محامدی[1]**، رضا فرخی نژاد[1] و حمید رجبی معماری[2]

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۸/۱۷؛ تاریخ پذیرش:۱۳۹۰/۴/۲۹)

چکیده

به منظور شناسایی و مطالعه گونه‌های *Cylindrocarpon* همراه با ریشه و طوقه کلزا و ذرت در استان خوزستان طی سال زراعی ۱۳۸۶- ۱۳۸۵، از مزارع کلزا و ذرت در مناطق ایذه، دزفول، شوشتر، شوش، اندیمشک و ملاثانی نمونه‌برداری به عمل آمد. در این بررسی پنج گونه از جنس سیلندروکارپن شناسایی شد که به ترتیب فراوانی شامل *C. destructans* (۹۶ جدایه)، *C. didymium* (۶۹ جدایه)، *C. hederae* (۲۵ جدایه)، *C. obtusisporum* (۱۴ جدایه) و *C. macrodidymum* (۳ جدایه) بودند. جداسازی گونه‌های مذکور از ذرت و کلزا برای اولین بار در دنیا انجام می‌شود. در این تحقیق از جفت آغازگرهای ITS4 & ITS5 برای شناسایی گونه‌های سیلندروکارپن استفاده شد. محصول تکثیر شده از DNA جدایه‌های سیلندروکارپن با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، قطعه‌ای به وزن ۵۶۰-۵۰۰ جفت باز تکثیر نمود. مقایسه توالی‌های به دست آمده از گونه‌های فوق با توالی‌های موجود در بانک ژن، با استفاده از ابزار جستجوی(BLAST(Basic Local Alignment Search Tool، نشان داد که تمامی توالی‌های به‌دست آمده از نمونه‌های مورد بررسی به گونه‌های سیلندروکارپن تعلق دارند. گروه‌بندی گونه‌های سیلندروکارپن با استفاده از توالی ITS مناطق ریبوزومی مطابق با طبقه‌بندی بر اساس خصوصیات مرفولوژیکی ارائه شده است. این مطلب نشان می‌دهد که تعیین توالی ITS مناطق ریبوزومی یک ابزار مفید و کارآمد در ارزیابی رابطه فیلوژنتیکی گونه‌های جنس سیلندروکارپن است.

واژه‌های کلیدی: کلزا، ذرت ، خوزستان، *Cylindrocarpon*، ITS، rDNA

---

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

**: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mmohamedi1364@yahoo.com

۱. به ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد و استاد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز

۲. استادیار زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز

مقدمه

گونه‌های جنس *Cylindrocarpon* خاکزی بوده ، و به صورت بیمارگر گیاهی، درون رست وگندرو در اغلب خاک‌ها وجود دارند و معمولاً همراه با سایر قارچ‌ها مانند گونه‌هایی از *Pythium*، *Fusarium* و *Rhizoctonia* باعث پوسیدگی ریشه و طوقه در گیاهان مختلف می‌شوند (Singleton *et al*. 1992). گسترش جنس سیلندروکارپن به دلیل توانایی رشد در شرایط بدون اکسیژن سریع است. این قارچ‌ها توسط رشد میسلیومی در لایه‌های زیرین خاک منتشر می‌شوند و با تولید کلامیدوسپور دوام می‌آورند.

جنس سیلندروکارپن تحت شرایط مرطوب، خیس و رطوبت اشباع به خوبی رشد کرده و با سرعت پیشرفت می‌کند. این بیمارگر از توانایی رقابت بالا، توانایی استفاده از هر دو نوع نیتروژن آلی و معدنی، رشد در خاک‌های قلیایی و رشد سریع میسلیوم برخوردار می‌باشد (Alaniz *et al*. 2007). گونه های مختلف سیلندروکارپن در مناطق مختلف دنیا با شرایط آب و هوایی مختلف به طیف وسیعی از گیاهان چوبی و علفی از جمله سبزیجات، درختان میوه و درختان جنگلی حمله می‌کنند؛ تاکنون گیاهان بسیاری در دنیا به عنوان میزبان گونه‌های جنس *Cylindrocarpon* معرفی شده‌اند که می‌توان به انگور، جینسینگ، سوزنی برگان، سیب، یونجه و چای اشاره کرد (Rahman & Punja 2005). اولین بار در سال ۱۹۶۱ گونه *C. destructans* (Zins.)Scholten از فرانسه به عنوان عامل بیماری پوسیدگی سیاه ریشه و طوقه انگور گزارش گردید (Maluta & Larignon 1991). پس از آن گونه‌های مختلف این جنس از میزبان‌های متفاوت در کشورهایی مانند ایتالیا (Grasso 1984)، پرتغال (Rego *et al*. 2000)، نیوزلند (Bleach *et al*. 2007)، آفریقای جنوبی (Halleen *et al*. 2006a)، شیلی (Auger *et al*. 2007)، اسپانیا (Alaniz *et al*. 2007)، کانادا (Seifert *et al*. 2003) گزارش شده‌اند. در ایران گزارش‌های کمی از گونه‌های *Cylindrocarpon* وجود دارد. گونه *C. destructans* برای اولین بار در مناطق انگورکاری ایران در سال ۱۹۷۰ توسط گرلاخ و ارشاد شناسایی شد (Gerlach & Ershad 1970). در سال ۱۳۷۴ گونه *C. destructans* از زردآلو و سیکلامن، گونه *C. obtusisporum* از درختان سیب، گونه *C. alnea* از *Alnus subcordata* و گونه *C. congoense* از آفتابگردان و توت، گونه *C. liriodendri* از انگور و گونه *C. lucidum* از نماتد سیستی چغندرقند در ایران گزارش شد (Ershad 2009). در سال ۱۳۸۱ بیماری از پا افتادگی و مرگ گیاهچه در قلمستان‌های کاج شهرهای نوشهر و کلاردشت واقع در شمال ایران گزارش شد که گونه *C. didymum* عامل بیماری معرفی گردید (Najafinia *et al*. 2004). در جیرفت گونه *C. didymum* به عنوان عامل بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه گیاه دارویی چای مکه (*Hibiscus sabdariffa*) و در سال ۱۳۸۵ عامل بیماری پوسیدگی خشک غده‌های سیب زمینی در انبار و سردخانه‌ها گزارش شد (Azadvar *et al*. 2007). *محمدی و همکاران* نیز (Mohammadi *et al*. 2009) از مناطق انگورکاری استان فارس گونه *C. liriodendri* را گزارش نمودند. برای این جنس حدود ۱۲۵ گونه تخمین زده‌اند.

خصوصیات مورفولوژیکی که برای شناسایی گونه‌های این جنس استفاده می‌شود شامل مرفولوژی پرگنه، میزان و نحوه رشد پرگنه و رنگ آن، تولید یا عدم تولید کلامیدوسپور، اندازه و شکل میکرو و ماکروکنیدیوم‌هاست. اگر چه خصوصیات مورفولوژیکی به طور گسترده‌ای در شناسایی قارچ‌ها و سایر عوامل بیماری‌زای گیاهی به کار می‌روند ولی اغلب اوقات این خصوصیات به تنهایی قادر به تفکیک گونه‌ها نبوده و باعث ایجاد مشکلاتی می‌گردند.

اخیراً اطلاعات مربوط به توالی نوکلئوتیدها به عنوان مکمل همراه با صفات مرفولوژیکی مورد استفاده قرار می‌گیرند. گاهی اوقات استفاده از صفات مورفولوژیکی به تنهایی باعث طبقه‌بندی دو گونه نزدیک به هم به عنوان یک گونه می‌گردد همانطور که این حالت در مورد گونه‌های *C. destructans* و *C. macrodidymum* اتفاق افتاده است (Halleen *et al.* 2004a). هدف از این بررسی شناسایی گونه‌های مختلف جنس سیلندروکارپن از طریق مورفولوژیکی و مولکولی است.

روش بررسی

نمونه برداری

طی سال زراعی ۱۳۸۶- ۱۳۸۵ مزارع عمده کشت کلزا و ذرت در مناطق مختلف استان خوزستان شامل ایذه، دزفول، شوشتر، شوش، اندیمشک و ملاثانی مورد بازدید قرار گرفت و از گیاهان با علائم زردی و پژمردگی، خشکیدگی و پوسیدگی ریشه و طوقه و مرگ گیاهچه نمونه‌برداری صورت گرفت. این نمونه‌برداری شامل مراحل مختلف رشدی گیاه از مرحله گیاهچه تا مرحله برداشت محصول بود. نمونه‌ها درون پاکت‌های پلاستیکی به آزمایشگاه انتقال داده شدند.

جداسازی

نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه و شستشو با آب مقطر به قطعات کوچک ۰/۵× ۰/۵ سانتی‌متر بریده شدند و پس از ضدعفونی سطحی در هیپوکلریت سدیم ۱٪ به مدت ۱-۲ دقیقه، شستشو با آب مقطر سترون و خشک کردن در بین قطعات کاغذ صافی درون تشتک‌های پتری حاوی ماده غذایی عمومی PDA(Merck) کشت شدند. تشتک‌های پتری به مدت ۷-۵ روز در دمای ۲۵ °C در شرایط نور- تاریکی ۱۲ ساعته قرار داده شد و قارچ‌های رشد کرده درون تشتک‌های مجزایی کشت شده و سپس نسبت به خالص‌سازی جدایه‌ها اقدام گردید (Rego *et al.* 2001).

خالص‌سازی جدایه‌ها

خالص‌سازی جدایه‌ها به روش تک اسپور روی محیط کشت آب- آگار ۲٪ انجام گرفت. سپس تک اسپورها به محیط کشت PDA انتقال یافتند.

شناسایی جدایه‌ها

شناسایی جدایه‌های جنس سیلندروکارپن روی محیط‌های غذایی PDA و CLA (برگ میخک-آگار) با در نظر گرفتن خصوصیات مرفولوژیک صورت گرفت(Booth 1966) مرفولوژی پرگنه، میزان و نحوه رشد پرگنه و رنگ آن روی محیط PDA بررسی شد. صفاتی که روی محیط CLA بررسی شدند شامل تولید یا عدم تولید کلامیدوسپور، اندازه و شکل ماکروکنیدیوم و میکروکنیدیوم و ساختار فیالیدها بود (Booth 1966؛ Mantiri 1999 ؛ Rego *et al.* 2001؛ Halleen *et al.* 2004b).

استخراج DNA

بیست جدایه مورد بررسی(جدول۲) در فلاسک‌های ارلن مایر حاوی محیط PDB کشت و در شرایط دمایی ۲۵ °C به مدت ۱۰-۱۴ روز با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه روی همزن نگهداری شدند. استخراج DNA طبق روش ویلند (Weiland 2002)انجام شد. در این روش حدود ۱– ۰/۵گرم بافت ریسه قارچ همراه با نیتروژن مایع، با استفاده از هاون سترون به خوبی پودر شد. مخلوط حاصل به

جدول۱. آغازگرهای مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلی مراز برای تکثیر جدایه‌های *Cylindrocarpon*

Table1. Primers used for PCR amplification of *Cylindrocarpon* isolates

نام آغازگر Primer name	توالی آغازگر Primer sequence
ITS5	5′-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3′
ITS4	5′-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3′

جدول ۲. مشخصات جدایه‌های *Cylindrocarpon* جمع‌آوری شده از مناطق مختلف استان خوزستان مورد استفاده در شناسایی مولکولی

Table 2. Characteristics of *Cylindrocarpon* isolates collected from different parts of Khuzestan province used for molecular identification.

ردیف	نام جدایه Name of isolate	نام گونه Species	محل نمونه‌برداری Location	میزبان Host
۱	D1	*C. destructans*	ایذه(Izeh)	کلزا(Canola)
2	D3	*C. destructans*	دزفول(Dezful)	کلزا(Canola)
3	D5	*C. destructans*	شوشتر(Shushtar)	کلزا(Canola)
4	D8	*C. destructans*	شوش(Shush)	کلزا(Canola)
5	D24	*C. destructans*	اندیمشک(Andimeshek)	ذرت(Maize)
6	M22	*C. macrodidymum*	شوشتر(Shushtar)	کلزا(Canola)
7	M25	*C. macrodidymum*	ایذه(Izeh)	ذرت(Maize)
8	M72	*C. macrodidymum*	دزفول(Dezful)	ذرت(Maize)
9	I12	*C. didymum*	ایذه(Izeh)	کلزا(Canola)
10	I2	*C. didymum*	اندیمشک(Andimeshek)	ذرت(Maize)
11	I16	*C. didymum*	دزفول(Dezful)	ذرت(Maize)
12	I17	*C. didymum*	شوشتر(Shushtar)	ذرت(Maize)
13	I23	*C. didymum*	ملاثانی(Molasani)	ذرت(Maize)
14	H9	*C. hederae*	دزفول(Dezful)	کلزا(Canola)
15	H10	*C. hederae*	اندیمشک(Andimeshek)	ذرت(Maize)
16	H18	*C. hederae*	دزفول(Dezful)	ذرت(Maize)
17	H20	*C. hederae*	شوش(Shush)	ذرت(Maize)
18	O4	*C. obtusisporum*	ایذه(Izeh)	کلزا(Canola)
19	O14	*C. obtusisporum*	دزفول(Dezful)	کلزا(Canola)
20	O15	*C. obtusisporum*	شوشتر(Shushtar)	کلزا(Canola)

میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل و حدود ۵۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (SDS ۵ درصد ۲۰ میلی‌لیتر، ۵۰۰ میلی‌مولار NaCl، ۱۰۰ میلی‌مولار Tris-HCl با pH ۸، ۵۰ میلی‌مولار EDTA با pH ۸ و ۴۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر سترون) به آن افزوده شد تا به صورت سوسپانسیون درآید. سپس میکروتیوب‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم ۶۵ °C نگهداری شدند و بعد از آن نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه روی یخ قرار گرفته و هم حجم محتوی میکروتیوب‌ها مخلوط اشباع بافری فنل-کلروفرم- ایزوآمیل الکل (به نسبت ۱:۲۴:۲۵) اضافه گردید. نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. پس از آن فاز رویی حاصله به میکروتیوب‌های جدید منتقل و دو تا سه برابر حجم آن کلروفرم- ایزوآمیل الکل (به نسبت ۱:۲۴) اضافه گردید. میکروتیوب‌ها پس از هم زدن به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. فاز رویی به میکروتیوب‌های جدید وارد و ۳/۴ حجم آن، ایزوپروپانول سرد اضافه شد و به مدت یک ساعت در دمای ۲۰- قرار گرفتند. نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. در این مرحله پس از حذف فاز رویی، رسوب DNA با اتانول ۷۰٪ شستشو و در دمای اتاق نگهداری شد تا خشک شود. پس از خشک شدن کامل، ۵۰ تا ۸۰ میکرولیتر بافر TE (۱۰ میلی‌مولار Tris-HCl با pH ۸، یک میلی‌مولار EDTA با pH ۸) به آن اضافه شد. سپس دو تا سه برابر حجم آن کلروفرم-ایزوآمیل الکل (به نسبت ۱:۲۴) اضافه و تمامی مراحل بعد از آن مانند بالا دو بار تکرار گردید. میکروتیوب‌های حاوی DNA در دمای ۴°C نگهداری شدند. کیفیت DNA نمونه‌ها به‌وسیله الکتروفورز روی ژل آگارز ۱٪ بررسی شد. حضور تک باند شفاف با وزن مولکولی بالا، نشانه DNA سالم و بدون شکستگی تلقی گردید. بررسی میزان و غلظت DNA استخراج شده و خلوص آن از طریق بیوفتومتری انجام گرفت. اندازه‌گیری میزان جذب در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و محاسبه نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ بوسیله دستگاه بیوفتومتر (Ependorf) تعیین شد. جهت انجام آزمایش‌های مولکولی، غلظت DNA کلیه نمونه‌ها در حد ۲۵ ng/µl تنظیم گردید.

تکثیر DNA

تکثیر DNA در واکنش ۲۵ میکرولیتری شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر 10X PCR (۲۰ میلی‌مولار Tris-HCl با pH ۸، ۵۰ میلی‌مولار KCl)، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$، ۲/۵ میکرولیتر dNTP، ۱ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای رفت و برگشت (۲۵ ng) (جدول۱)، ۲ میکرولیتر DNA ژنومی و ۰/۳ میکرولیتر (حاوی یک یونیت) آنزیم تک پلیمراز در دستگاه ترموسایکلر (BioRad) با برنامه حرارتی ۱ دقیقه در ۹۴ °C، ۳۰ سیکل با ۱ دقیقه در ۹۴ °C، ۱ دقیقه در ۵۵°C، ۱ دقیقه در ۷۲ °C و مرحله گسترش نهایی با ۱۰ دقیقه در ۷۲ °C انجام شد(Alaniz *et al.* 2007). قطعات تکثیر شده در هر واکنش با استفاده از الکترفورز ژل آگارز ۱٪ در بافر TBE 0.5xو با ولتاژ ۸۰ ولت از یکدیگر تفکیک شدند. ژل با قرار گرفتن به مدت ۳۰ دقیقه در محلول Gel Red محصول شرکت Biotium (۵ میلی لیتر کلرید سدیم یک مولار، ۴۵ میلی لیتر آب دو بار تقطیر و ۱۵ میکرولیتر محلول Gel Red (محصول شرکت Biotium) رنگ‌آمیزی و با استفاده از دستگاهGel Doc(Techno gen, Iran) مشاهده و عکس‌برداری گردید. محصول PCR به‌وسیله PCR Product Kit (Fermentas) طبق دستورالعمل سازنده تخلیص گردید. محصول تخلیص شده به منظور

تعیین ترادف به شرکت ژن فن آوران (تهران) ارسال شد.

آنالیز فیلوژنتیکی

برای تجزیه داده‌ها، هر یک از چهار نوع باز پورین و یا پیریمیدین (آدنین، گوانین، سیتوزین و تیمین) در هر توالی به عنوان یک خصوصیت (صفت) محسوب شد و ترتیب قرار گرفتن بازها در توالی‌ها مورد مقایسه قرار گرفت. به منظور مقایسه ترتیب قرارگرفتن بازها در توالی‌های مورد بررسی ابتدا لازم بود توالی‌ها همردیف‌سازی شوند. همردیف‌سازی توالی‌ها در نرم افراز مگا۴(Tamura *et al.* 2007) انجام شد. پس از همردیف کردن توالی‌ها تعداد نوکلئوتیدهای (خصوصیات) مورد بررسی به ۵۰۰ جفت باز رسید. سپس با استفاده از نرم افزار مگا۴(Tamura *et al.* 2007) و با روش UPGMA تبار نما توالی‌های همردیف شده ترسیم گردید.

نتایج و بحث

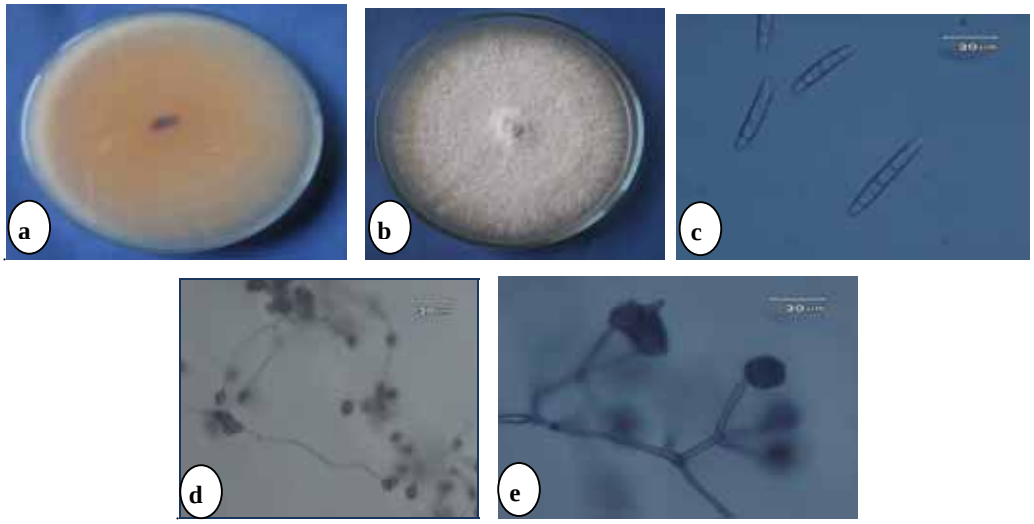
مشخصات قارچ‌های شناسایی شده جدایه‌های سیلندروکارپن به‌دست آمده از ذرت و کلزا بر اساس تقسیم‌بندی بوث (Booth 1966) در دو گروه ۱ و ۳ قرار گرفتند. اعضای گروه۱ میکروکنیدیوم تولید می‌کنند ولی توانایی تولید کلامیدوسپور را ندارند. اعضای گروه ۳ توانایی تولید میکروکنیدیوم و کلامیدوسپور را دارند.

Cylindrocarpon hederae Booth

این گونه متعلق به گروه ۱ است. رشد پرگنه در محیط غذایی PDA کند بوده و پس از ۷ روز به ۹-۷/۵ میلی‌متر رسید. رنگ پرگنه نخست سفید رنگ ولی به مرور زمان به رنگ قهوه‌ای روشن تغییر نمود (شکل۱). کنیدیوفورها ساده با اندازه ۴-۳ ×۲۰-۱۴ میکرومتر می‌باشند. میکروکنیدیوم‌ها بی‌رنگ، بدون بند، گرد تا دوکی شکل با اندازه ۹-۶ × ۴-۲ و به صورت زنجیری تشکیل می‌شوند(شکل ۱). ماکروکنیدیوم‌ها بی‌رنگ، استوانه‌ای، راست یا خمیده با دو انتهای گرد با ۵-۳ بند و اندازه ۷-۶× ۶۶-۵۷ میکرومتر هستند (شکل۱).

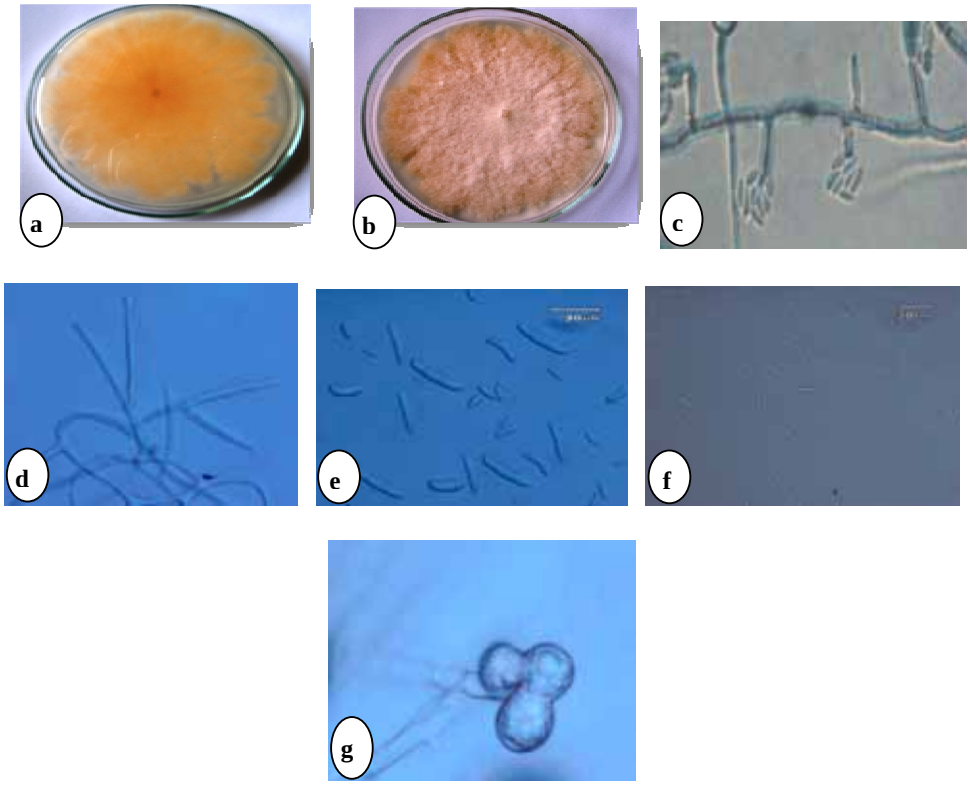
Cylindrocarpon didymum (Hartig) Wollenw.

این گونه از گروه ۳ می‌باشد. قطر پرگنه روی محیط کشت PDA بعد از ۷ روز به ۴ سانتی‌متر می‌رسد. ریسه هوایی ابتدا سفید یا هلویی، متراکم که با گذشت زمان به رنگ نارنجی روشن، بژ، قهوه‌ای روشن یا قهوه‌ای ارغوانی تغییر نمود (شکل۲). کنیدیوفورهای اولیه بلند و باریک و به ندرت منشعب با فیالیدهای انتهایی استوانه‌ای، کنیدیوفورهای بعدی عموماً کوتاه‌تر دیده می‌شوند (شکل۲). اغلب تفاوت زیادی بین میکروکنیدیوم‌ها و ماکروکنیدیوم‌ها دیده نمی‌شود، کنیدیوم‌های اولیه تخم مرغی، روشن و به ابعاد ۸-۶ × ۴/۳-۲/۵ میکرومتر، کنیدیوم‌های ثانویه به اشکال تخم‌مرغی، بیضی شکل تا استوانه‌ای با دو انتهای گرد، باریک و مستقیم یا کمی خمیده، دارای ۱ بند و به ندرت ۲ بند می‌باشند (شکل ۲). کلامیدوسپور به صورت انتهایی روی شاخه‌های جانبی کوتاه یا به صورت میانی، تکی در زنجیره یا خوشه‌ای، به شکل کروی و صاف به رنگ روشن تا قهوای تشکیل می‌شود (شکل ۲).



شکل ۱. گونه ***Cylindrocarpon hederae*** **(a)** سطح زیرین، **(b)** سطح بالایی، **(c)** ماکروکنیدیوم، **(d)** میکروکنیدیوم، **(e)** فیالید.

Fig 1. *Cylindrocarpon hedrae*, (a) under side, (b) upper side, (c) Macroconidium, (d) Microconidium, (e)Phialid.



شکل ۲. ***Cylindrocarpon didymum*** ؛ **(a)** سطح زیرین، **(b)** سطح بالایی، **(c)** کنیدیوفور اولیه، **(d)** کنیدیوفور ثانویه، **(e)** ماکروکنیدیوم، **(f)** میکروکنیدیوم، **(g)** کلامیدوسپور.

Fig 2. *Cylindrocarpon didymum*, (a) under side, (b) upper side., (c) Primary conidiophores, (d) Secondry conidiophores, (e) Macroconidium, (f) Microconidium, (g) Chlamydospores.

Cylindrocarpon obtusisporum (Cooke & Harkness) Wollenw

این گونه به گروه ۳ تعلق دارد. قطر پرگنه روی محیط کشت PDA کند بوده و بعد از ۷ روز به ۱سانتی‌متر می‌رسد. رنگ مسیلیوم نخست روشن که بعد از مدتی به رنگ کرم تا بژ کم رنگ و خیلی به ندرت به رنگ قهوه‌ای شکلاتی تغییر می‌کند (شکل ۳). میکروکنیدیوفور فیالیدهای کشیده و نوک تیز تولید می‌کند. ماکروکنیدیوفور انشعابات باز تولید می‌کند که هر انشعاب به ۳-۱ فیالید ختم می‌شود (شکل ۶). میکرو کنیدیوم‌ها تخم‌مرغی شکل به ابعاد ۴-۵ × ۷-۸ میکرومتر، ماکروکنیدیوم‌ها به رنگ روشن، کمی خمیده، استوانه‌ای با انتهای گرد، گاهی با یاخته پایه نوکدار و ۳-۱ بند می‌باشند (شکل ۳). کلامیدوسپور صاف، کروی، به رنگ روشن یا قهوه‌ای روشن که به صورت تکی یا در زنجیره، در ریسه یا در کنیدی تشکیل می‌شود (شکل ۳).

Cylindrocarpon destructans (Zins.) Scholten

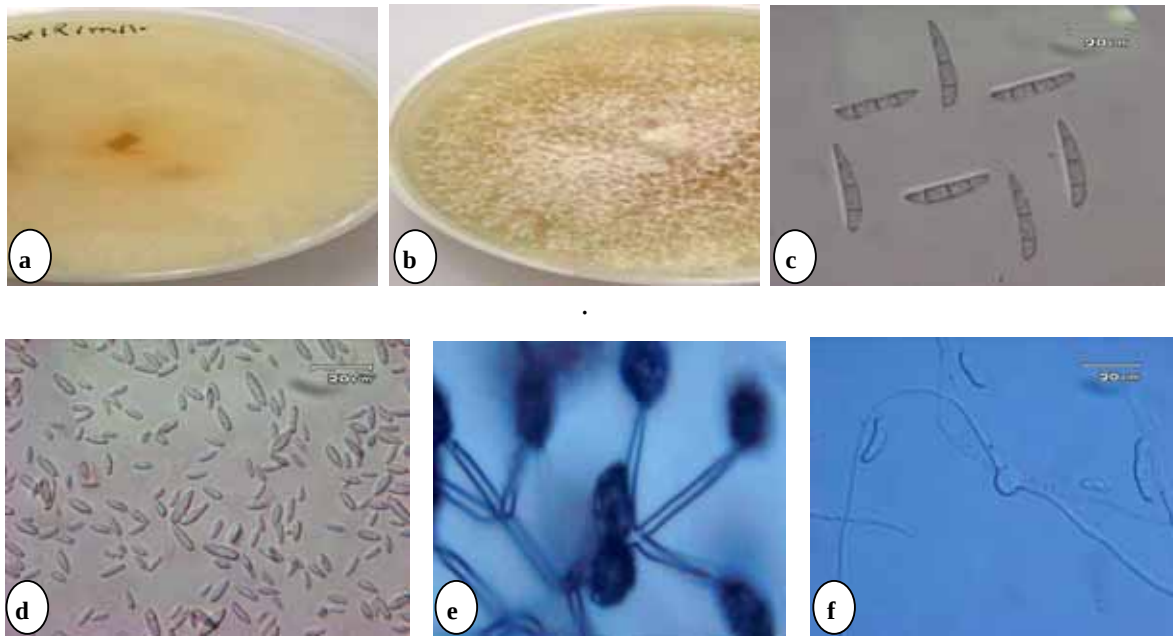
این گونه به گروه ۳ تعلق دارد. قطر پرگنه روی محیط کشت PDA کند بوده و بعد از ۷ روز به ۱۰-۱۲ میلی‌متر می‌رسد. رنگ میسلیوم ابتدا سفید مایل به خاکستری که بعدا به رنگ قهوه‌ای روشن تا قهوای قرمز تیره در می‌آید (شکل ۴). میکروکنیدیوفور تولید فیالیدهای جانبی یا انتهایی روی انشعابات جانبی کوتاه می‌کند، ماکروکنیدیوفور انشعابات جانبی با ساقه بلند تشکیل می‌دهد که هر انشعاب در انتها به یک یا چند فیالید ختم می‌شود (شکل۴). میکروکنیدیوم‌ها روشن (بی‌رنگ) تخم مرغی یا بیضی شکل هستند (شکل ۴). ماکروکنیدیوم‌ها نیز بی‌رنگ، سیلندری شکل با دو انتهای گرد، مستقیم یا کمی انحنا که در قسمت پایه کمی باریک شده است. معمولاً ۳-۱ بند دارند، هرچند ممکن است اسپورهایی با ۴ تا ۵ بند هم مشاهده شود (شکل ۴). کلامیدوسپورها کروی، صاف و در ابتدا بی‌رنگ بوده که با ضخیم شدن یاخته‌ها به رنگ طلایی یا قهوه‌ای دیده می‌شوند. کلامیدوسپورها به صورت میانی یا انتهایی در میسیلیوم، منفرد، زنجیره‌ای یا خوشه‌ای و یا در یاخته‌های ماکرو کنیدیوم تشکیل می‌شوند (شکل ۴).

Cylindrocarpon macrodidymum Halleen, Schroers & Crous

قطر پرگنه در محیط کشت PDA پس از ۷ روز به ۲۵-۲۳ میلی‌متر می‌رسد. رنگ پرگنه بسیار متغیر، از سفید تا زرد و قهوه‌ای تیره دیده می‌شود(شکل ۵). میکروکنیدیوفور تولید فیالیدهای جانبی یا انتهایی روی انشعابات جانبی کوتاه می‌کند ماکروکنیدیوفور انشعابات جانبی با ساقه بلند تشکیل می‌دهد که هر انشعاب در انتها به یک یا چند فیالید ختم می‌شود (شکل ۵). میکروکنیدیوم‌ها روشن (بی‌رنگ) تخم‌مرغی یا بیضی شکل هستند (شکل ۵). ماکروکنیدیوم‌ها نیز بی‌رنگ، سیلندری شکل با دو انتهای گرد، مستقیم اغلب۳ بند دارند (۱-۳ بند) (شکل ۵). در این گونه کلامیدوسپور به ندرت تولید می‌شود که کروی و صاف می‌باشند. در این تحقیق تمامی جدایه‌های شناسایی شده کلامیدوسپور تولید کردند که البته تعداد آن نسبت به سایر گونه‌های شناسایی شده در این تحقیق کمتر بود (شکل ۵).

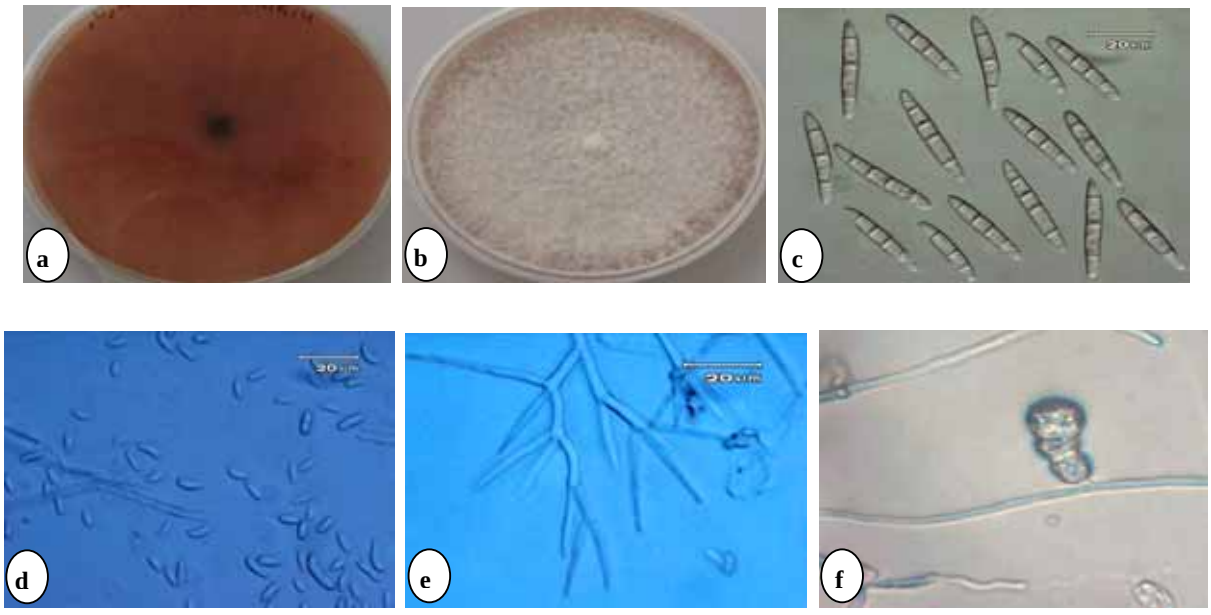
استخراج DNA

اکثر جدایه‌ها پس از گذشت ۱۲ روز در محیط PDB بافت میسلیومی قطوری تولید نمودند. در اکثر جدایه‌ها غلظت DNA استخراج شده بسیار بالا بود، هم‌چنین



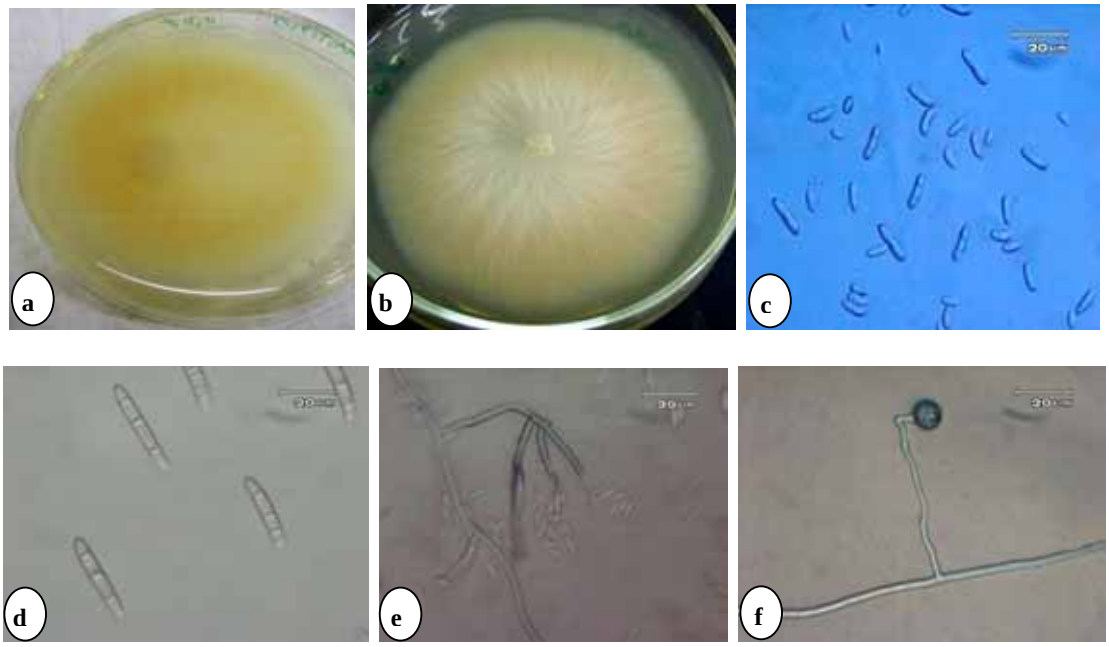
شکل۳. *Cylindrocarpon obtusisporum*؛ (a) سطح زیرین، (b) سطح رویی، (c) ماکروکنیدیوم، (d) میکروکنیدیوم، (e) فیالید، (f) کلامیدوسپور

Fig. 3. *Cylindrocarpon obtusisporum*, (a) under side, (b) upper side, (c) Macroconidium, (d) microconidium, (e) Phialid, (f) Chlamydospore.



شکل۴. *Cylindrocarpon destructans*؛ (a) سطح زیرین، (b) سطح رویی، (c) ماکروکنیدیوم، (d) میکروکنیدیوم، (e) فیالید، (f) کلامیدوسپور

Fig. 4. *Cylindrocarpon destructans*, (a) under side, (b) upper side, (c) Macroconidium, (d) Microconidium, (e)Phialid, (f) Chlamydospores



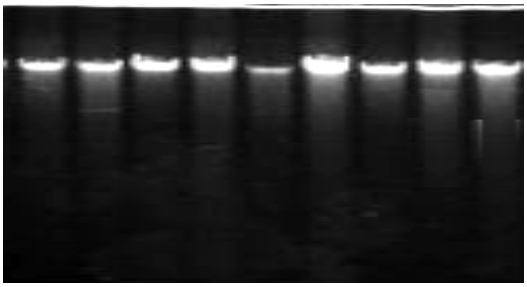
شکل ۵. *Cylindrocarpon macrodidymum*: (a) سطح زیرین، (b) سطح رویی، (c) میکروکنیدیوم، (d) ماکروکنیدیوم، (e)فیالید، (f)کلامیدوسپور

Fig. 5. *C. macrodidymum*, (a) under side, (b) upper side, (c) Microconidium, (d) Macroconidium, (e)Phialid, (f) chlamydospore

کیفیت باندهای تولید شده مناسب بود که این موارد حاکی از کارایی بالای روش استخراج می‌باشد(شکل۶).

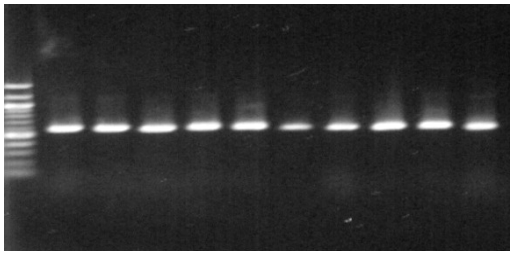
واکنش PCR

محصول تکثیر شده از DNA جدایه‌های سیلندروکارپن با استفاده از جفت آغازگر ITS4 & ITS5 روی ژل آگارز یک درصد متشکل از یک قطعه DNA با اندازه تقریباً یکسان برای کلیه جدایه‌ها با وزن تقریبی ۵۶۰- ۵۰۰ جفت باز بود(شکل ۷). توالی‌های به دست آمده با استفاده از دستگاه توالی یاب در بانک ژن NCBI مورد تأیید قرار گرفت. بدین ترتیب که با استفاده از ابزار جستجوی BLAST(Basic Local Alignment Search Tool) موجود در بانک ژن، هر کدام از توالی‌های به‌دست آمده با سایر توالی‌های موجود در بانک ژن مقایسه شد. نتایج نشان داد که تمامی توالی‌های به‌دست آمده از نمونه‌های مورد بررسی به ناحیه ITS4 &ITS5، DNA ریبوزومی گونه‌های سیلندروکارپن تعلق دارند. توالی مربوط به *Fusarium solani* با شماره دسترسی FN394717 به عنوان گروه خارجی برای انجام آنالیزها مورد استفاده قرار گرفت. تبارنمای حاصل از آنالیز UPGMA به همراه مقادیر Bootstrap در شکل ۸ آورده شده است. همان طور که در این تبارنما مشاهده می‌شود، به جز گروه خارجی هفت شاخه فیلوژنتیکی جداگانه مشاهده می‌شود، در یکی از شاخه‌ها جدایه‌های گونه *C. destructans* قرار گرفتند. شاخه دیگر متعلق به جدایه‌های گونه *C. obtusisporum* به‌دست آمده از کلزا می‌باشد. پنج جدایه گونه *C. didymum* در دو شاخه فیلوژنتیکی قرار گرفتند. در یک شاخه جدایه I12 جدا شده از کلزا و در شاخه دیگر سایر جدایه‌های این گونه که از ذرت حاصل



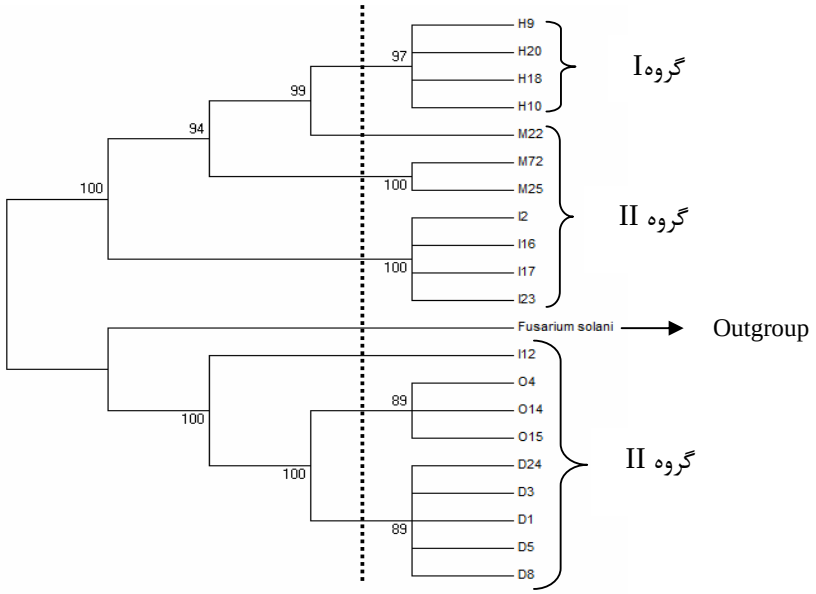
شکل ۶. DNA ژنومی استخراج شده. M= 1-Kb؛ ۱= کنترل مثبت؛ ۲ و ۳= *Cylindrocarpon hederae* . ۴ = *Cylindrocarpon macrodidymum*؛ ۵ = *Cylindrocarpon obtusisporum*؛ ۶ و ۷ = *Cylindrocarpon didymum*؛ ۸ و ۹ = *Cylindrocarpon destructans*

Fig. 6. Extract genomic DNA. M= 1Kb ladder Biolab; lane 1= positive control; lane 2,3= *Cylindrocarpon hederae*. Lane 3= *Cylindrocarpon macrodidymum*; lane 5= *Cylindrocarpon obtusisporum*; lane 6,7= *Cylindrocarpon didymium*; lane 8,9= *Cylindrocarpon destructans*



شکل ۷. برخی از محصولات واکنش PCR

Fig. 7. PCR Product



شکل ۸. تبارنمای جدایه‌های مختلف سیلندروکارپن به‌دست آمده از کلزا و ذرت بر اساس UPGMA (اعداد روی انشعابات مقادیر Bootstrap هستند)

Fig. 8. Denderogram of different isolated of *Cylindrocarpon* from canola and maize base on UPGMA.

شده بودند قرار گرفتند. جدایه‌های گونه *C. macrodidymum* نیز در دو شاخه دسته‌بندی شدند که یک شاخه متعلق به جدایه حاصل شده از ذرت و شاخه دیگر متعلق به جدایه‌های به دست آمده از کلزا است. هم‌چنین جدایه‌های *C. hederae* در یک شاخه جداگانه قرار گرفتند. به عبارت دیگر گونه‌های شناسایی شده در دو گروه I و II قرار گرفتند. گروه I با گروه یک کلید شناسایی جنس سیلندروکارپن ارائه شده توسط بوث (Booth 1966) همخوانی دارد. گروه II با گروه سه کلید شناسایی فوق مطابقت دارد. گونه *C. hederae* در گروه I و گونه‌های *C. destructans*، *C. obtusisporum*، *C. didymum* و *C. macrodidymum* در گروه II دسته‌بندی شدند (شکل۸).

بحث

بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه یکی از مهم‌ترین بیماری‌های کلزا و ذرت می‌باشد، به گونه‌ای که می‌توان از آن به عنوان یک فاکتور محدودکننده کشت کلزا و ذرت نام برد. این مسئله به ویژه در مزارعی که این گیاهان به طور پی در پی و هرساله کشت می‌شوند، بیشتر مشهود است. این بیماری در برخی از سال‌های زراعی خسارت‌های شدیدی به محصول وارد می‌کند که میزان خسارت بستگی به شرایط آب و هوایی، نوع خاک، نوع رقم و زمان کاشت دارد. عوامل قارچی بسیاری مانند فوزاریوم، پی تیوم و ریزوکتونیا به گیاهان کلزا و ذرت حمله نموده باعث پوسیدگی ریشه و طوقه این گیاهان می‌شوند. علاوه بر عوامل متعارف بیماری‌زای فوق در نمونه‌برداری‌های متعدد از مناطق مختلف استان خوزستان تعداد زیادی جدایه قارچ *Cylindrocarpon* جداسازی گردید که پس از شناسایی به گونه‌های *C. destructans* (شکل ۴)، *C. didymum* (شکل ۲)، *C. hederae* (شکل ۱)، *C. obtusisporum* (شکل ۳) و *C. macrodidymum* (شکل ۵) تعلق داشتند. در این میان گونه *C.destructans* با ۹۶ جدایه بیشترین فراوانی و گونه *C.macrodidymum* با ۳ جدایه کمترین فراوانی را به خود اختصاص دادند. قابل ذکر است که گونه *C. obtusisporum* از گیاه ذرت جداسازی نگردید. اگر چه تاکنون گیاهان مختلفی در دنیا میزبان گونه‌های جنس سیلندروکارپن معرفی شده‌اند، اما گزارش گونه‌های فوق از گیاهان کلزا و ذرت در دنیا برای اولین بار انجام می‌شود.

پتیت و گوبلر (Petit & Gubler 2005) توانستند چندین جدایه ازجنس سیلندروکارپن را از درختان انگور شناسایی کنند که این جدایه‌ها متعلق به گونه‌های *C. destructans* و *C. macrodidymum* بودند. *هالین و همکاران* (Halleen *et al.* 2005, 2006a, 2006b) نیز گونه‌های مختلفی از این قارچ را عامل بیماری پوسیدگی پا سیاه انگور در آفریقای جنوبی معرفی کردند که می‌توان به گونه‌های *C. macrodidymum*، *C. destructans* و *C. obtusisporum* اشاره کرد. در پرتغال گونه *C. destructans* عامل بیماری پوسیدگی پا سیاه انگور گزارش شده است (Rego *et al.* 2000, 2001؛ Oliveira *et al.* 1998, 2004). *رحمان و پونجا* (Rahman & Punja 2005) گونه *C. destructans* را از ریشه جینسینگ، *کانو و همکاران* (Kanno *et al.*, 2006) و *وینگ و همکاران* (Wing *et al.*, 1994) گونه‌های *C. obtusisporum*، *C. didymum* و *C. destructans* را از ریشه و طوقه توت‌فرنگی آنستم و همکاران (Unestam *et al.* 1989)، *آکسلرود و همکاران* (Axelrood *et al.* 1998) و جمیز (James 2007)

گونه‌های *C. destructans* ، *C. didymum* و *C. obtusisporum* را از ریشه و طوقه درختان سرو نقره‌ای و کاج جداسازی نمودند.

هم‌چنین در این بررسی به کمک تعیین توالی ITS مناطق ریبوزومی گونه‌های فوق شناسایی گردید. توالی‌هایی از DNA که RNAهای ریبوزومی را کد می‌کنند نواحی مناسبی جهت بررسی روابط فیلوژنیک و تاکسونومیک و هم‌چنین قرابت‌های ژنتیکی بین قارچ‌ها به حساب می‌آیند. استخراج DNA گونه‌های مورد نظر بر روی ژل به صورت باند ضخیم مشخص گردید (شکل ۶) که این نتیجه مشابه نتایج *آلانیز و همکاران* (Alaniz *et al.* 2009)، *پتیت و گوبلر* (Petit & Gubler 2005) و مانتیری (Mantiri 1999) می‌باشد. محصول تکثیر شده از DNA جدایه‌های سیلندروکارپن با استفاده از آغازگرهای اختصاصی(جدول۱)، قطعه‌ای به وزن ۵۶۰-۵۰۰ جفت باز تکثیر نمود(شکل ۷). *هالین و همکاران* (Halleen *et al.* 2004b) و *آگر و همکاران* (Auger *et al.* 2007) نیز در کار با گونه‌های *C. destructans*، *C. didymum*، *C. macrodidymum* و *C. obtusisporum* قطعات ۵۶۰-۵۰۰ جفت باز، قطعاتی مشابه قطعات حاصل در این پژوهش، گزارش نمودند. گروه‌بندی گونه‌های *Cylindrocarpon* با استفاده از توالی ITS مناطق ریبوزومی مطابق با طبقه‌بندی بر اساس خصوصیات مرفولوژیکی ارائه شده توسط بوث(Booth 1966) می‌باشد. در تبارنمای حاصل از آنالیز UPGMA (شکل۸) به جز گروه خارجی، هفت شاخه فیلوژنتیکی جداگانه مشاهده می‌شود که هر یک از گونه‌های مورد مطالعه در یک شاخه فیلوژنتیکی جداگانه قرار گرفتند البته جدایه‌های گونه‌های *C. macrodidymum* و *C. didymum* جدا شده از کلزا و ذرت هر کدام در دو شاخه قرار گرفتند که این امر با نتایج *سیفرت و همکاران*(Seifert *et al.* 2003) مطابقت دارد. آنها جدایه هایی از ریشه و طوقه جینسینگ از کانادا و کره شمالی به دست آوردند که جدایه‌های متعلق به کانادا در یک گروه و جدایه‌های متعلق به کره شمالی در گروه دیگر قرار گرفتند. جدایه M22 حاصل در این پژوهش نیز متعلق به گونه *C. macrodidymum* می‌باشد که از منطقه شوشتر جداسازی شد و در گروه جداگانه قرار گرفت. جدایه I12 از گونه *C. didymum* نیز از منطقه ایذه جداسازی گردید که در یک شاخه جداگانه از جدایه‌های گونه *C. didymum* قرار گرفت. دلیل احتمالی دسته‌بندی جداگانه جدایه‌های گونه‌های *C. didymum* و *C. macrodidymum* می‌تواند تفاوت آب و هوایی مناطق باشد. از نظر بیماری‌زایی نیز جدایه‌های جنس *Cylindrocarpon* در گروه‌های مختلف قرار گرفتند (اطلاعات منتشر نشده).

نتایج مطالعات *پتیت و گوبلر* (Petit & Gubler 2000) نیز جدایه‌های *C. destructans* را در دو گروه قرار داد. به کمک توالی ITS-rDNA گونه *C. destructans* جدا شده از گیاه جینسینگ به دو زیر گروه تقسیم گردید که این گروه‌ها با گروه‌هایی که بر اساس خصوصیات فیزیولوژیکی و بیماری‌زایی تقسیم شده بودند، مطابقت داشت (Rahman & Punja 2005). *هالین و همکاران* (Halleen *et al.* 2004a)، *سیفرت و همکاران* (Seifert *et al.* 2003) و *آلانیز و همکاران* (Alaniz *et al.* 2007) از طریق ITS مناطق ریبوزومی گونه‌های *C. destructans* ، *C. macrodidymum* و *C. didymum* را شناسایی کردند که با نتایج حاصل از این پژوهش مطابقت دارد. بنابراین بررسی توالی ITS-rDNA ابزار کارآمدی در شناخت گونه‌های *Cylindrocarpon* می‌باشد.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (115- 113) متن انگلیسی مراجعه شود.