

هیستوپاتولوژی گندم آلوده به سیاهک هندی

سید علی موسوی جرف^۱، عزیز الله عزیزاده^۲ و رضا فرخی نژاد^۱

چکیده

هیستوپاتولوژی گندم آلوده به سیاهک هندی با استفاده از میکروسکپ نوری بررسی شد. گیاهان حساس گندم با دو روش گوتز (خواباندن گیاهان و قراردادن محیط کشت حاوی اسپورییدیومهای فعال قارچ بصورت وارونه بر روی سنبله‌ها) و تزریقی، مایه‌زنی شدند. در طی مراحل اولیه آلودگی، در گیاهان مایه‌زنی شده به روش گوتز، ریشه‌ها بصورت بین سلولی در بخشهای انتهایی تا میانی گلوم و لما مشاهده شدند، حال آنکه قاعده آنها عاری از آلودگی بود و در تخمدان، بند ناف و محور سنبله، ریشه قارچ مشاهده نگردید. برعکس در گیاهانی که به روش تزریقی مایه‌زنی شده بودند، در مراحل اولیه آلودگی، ریشه‌های بین سلولی در تمام بخشهای گلوم، لما، و محور سنبله دیده شد ولی تخمدان و بند ناف نیز در این مرحله عاری از آلودگی بود. در مراحل بعدی ریشه‌های قارچ در برش‌های تهیه شده از بند ناف نیز مشاهده شد. ظاهراً ریشه‌ها به طرف پایه گلچه‌ها رشد نموده و سپس وارد تخمدان می‌شوند. ده روز پس از مایه‌زنی، تلیوسپورهای درحال توسعه در پوسته دانه‌ها رویت گردید، و ۱۳ روز پس از مایه‌زنی، تلیوسپورهای توسعه یافته با دیواره خارجی ضخیم مشاهده شدند.

واژه‌های کلیدی: *Neovossia indica*، سیاهک هندی گندم، هیستوپاتولوژی

مقدمه

قرنطینه‌ای محسوب می‌شد تا اینکه در سال ۱۳۷۵ در شهرستان جیرفت، در استان کرمان مشاهده گردید (۴۰) و با بررسیهای بعدی وجود بیماری در سایر نقاط استان کرمان و نیز استانهای فارس و هرمزگان به اثبات رسید (۲، ۳، ۷). این بیماری در سال ۱۳۷۵ سطحی در حدود ۱۰۰ هزار هکتار از مزارع گندم استانهای فارس، کرمان و هرمزگان را آلوده نمود. در همین سال میزان آلودگی براساس نمونه برداری از محموله‌های آلوده و مزارع گندم بین ۲۸-۲ درصد متغیر بود (۳). وجود شرایط آب و هوایی مساعد برای گسترش بیماری در برخی از کشورها از جمله استرالیا و آلمان نیز نگرانیهایی را بوجود آورده است (۲۳، ۳۵).

وقوع آلودگی در زمان گلدهی و اینکه گلچه‌ها بصورت موضعی آلوده می‌شوند، از چندین سال پیش تشخیص داده شده است (۶، ۱۱، ۱۳، ۴۱). با این وجود یافته‌های هیستوپاتولوژیکی

سیاهک هندی یا سیاهک کارنال در انواع گندم مانند گندم نانی، دوروم، تریتیکاله (هیبریدی از گندم و چاودار) و چاودار دیده می‌شود. عامل این بیماری قارچ *Neovossia indica* (Mitra) Mundkur (*Tilletia indica* Mitra) است. معمولاً تنها قسمتی از دانه‌های گندم آلوده می‌شوند و از اینرو آنرا سیاهک ناقص یا جزئی نیز می‌نامند (۲۶). این بیماری اولین بار در سال ۱۹۳۰ در ایستگاه تحقیقات کشاورزی کارنال هند گزارش شد (۲۸) و در حال حاضر در منطقه پنجاب هند شایع است. از آن زمان به بعد این بیماری از پاکستان (۳۳)، نپال (۳۸)، سوریه و از محموله گندم ارسالی از افغانستان به آمریکا (۲۵) گزارش شده است. در سال ۱۹۹۶ بیماری در ایالت آریزونا، آمریکا مشاهده و از آن زمان فعالیت اضطرابی ویژه‌ای برای ریشه‌کشی بیماری آغاز شد (۸، ۹، ۴۲). در ایران این بیماری سال‌ها به عنوان بیماری

ب - مایه زنی

۱- روش تزریقی^۱: گیاهان رقم حساس گندم WL711، که در گلخانه در دمای ۲۵-۱۷ درجه سانتیگراد و نور طبیعی (حدود ۱۳ ساعت در روز) رویانده شده بودند، در مرحله به غلاف رفتن (بلافاصله یا ظهور ریشکها) با سوسپانسیون از اسپوریدیومهای ثانویه به غلظت 2×10^5 اسپوریدیوم در هر میلی لیتر بوسیله سرنگ مایه زنی شدند (۱۷ و ۴۱). سنبله های مایه زنی شده با آب مقطر مه پاشی و با نایلون شفاف پوشانده شدند. این گیاهان به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد و نور مداوم حاصل از دو لامپ فلورسنت ۴۰ وات نگهداری و سپس به گلخانه با دمای ۲۵-۱۷ درجه سانتیگراد و نور طبیعی منتقل گردیدند. سنبله ها و سایر قسمت های سنبله از سنبله های مایه زنی شده ۲، ۴، ۷، ۱۰ و ۱۳ روز پس از مایه زنی جدا و تثبیت شدند. هر پنج سنبله مایه زنی شده که در گلخانه تا مرحله بلوغ بعنوان شاهد نگهداری شده بودند، آلوده به سیاهک شدند که میانگین درصد آلودگی دانه ها در آنها ۳۳/۳۴ درصد بود.

۲- روش مایه زنی گوتز^۲: گیاهان رقم حساس گندم WL711، در سه تکرار برای هر مرحله تثبیت، قبل از گلدهی برای مایه زنی استفاده شدند. گلدها و گیاهان حاوی آنها به بغل خوابانده شد، و سنبله ها بر روی آب آگار ۲٪ تازه در تشتک پتری YPDA قرار داده شدند. سپس تشتکهای پتری YPDA حاوی پرگنه قارچ بصورت وارونه بر روی آنها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد و نور مداوم قرار داده شدند (۲۱). در طی این دوره، اسپوریدیومهای ثانویه بر روی سنبله ها پرتاب شده و رشد اسپوریدیومها بر روی آب آگار بصورت ماکروسکوپی نمایان شد. سپس سنبله های که در

اندکی مخصوصا در باره مراحل اولیه آلودگی تا مرحله تولید تلیوسپور وجود دارد. گوتز (۲۱) گیاهان رقم حساس گندم را با روش ابداعی خود مایه زنی کرد و پس از تثبیت سنبله ها در مراحل مختلف، یافته های هیستوپاتولوژیکی جالبی بدست آورد. با این وجود روش مایه زنی او در مقایسه با مایه زنی تزریقی، از آنچه که در طبیعت رخ میدهد متفاوت است زیرا در طبیعت اسپوریدیومهای ثانویه هوازا یا آنهایی که بر روی برگ پرچم نشست پیدا کرده اند، در مرحله غلاف توسط آب باران یا شبنم به داخل غلاف سنبله شسته می شوند و در شرایط مناسب موجب آلودگی می گردند (۸، ۹، ۲۴، ۳۶). در این مطالعه گیاهان رقم حساس گندم به دو روش گوتز و تزریقی مایه زنی شدند، و هیستوپاتولوژی آنها در مراحل مختلف پس از مایه زنی بوسیله میکروسکپ نوری مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

الف - تهیه مایه قارچ

جوانه زنی تلیوسپورهای حاصل از دانه های آلوده جمع آوری شده از منطقه درزوسایبان شهرستان لار در استان فارس بر روی آب آگار ۲٪ در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد صورت گرفت. یک تشتک پتری از تلیوسپورهای جوانه زده روی محیط کشت حاوی سیب زمینی دکستروز آگار حاوی ۰/۱٪ عصاره مخمر (YPDA) بصورت وارونه بمدت ۲۴ ساعت در ۲۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد. در طی این مدت، اسپوریدیومهای ثانویه سوسپسی شکل بر روی YPDA پرتاب شدند. تشتکهای پتری حاوی YPDA به مدت ۵-۴ روز در ۲۰ درجه سانتیگراد نگهداری شدند و پرگنه های سفیدی که شامل اسپوریدیومهای ثانویه فراوان و فعال بودند، تولید گردید.

1 - injection technique

2 - Goates

۲-۲/۳ میلیمتر برای نمونه‌های گلوم و لما بوسیله میکروتوم دوار تهیه شد. مقاطع پارافینی بر روی اسلایدهای آغشته به چسب هایت^۵ منتقل گردید. مقاطع رزین نیز بوسیله لوپ مستقیما روی اسلایدهای میکروسکوپی قرار داده شدند. اسلایدها در دمای ۴۲-۴۰ درجه سانتیگراد خشک گردیدند (۱۵). سپس مقاطع در محلول ۱٪ سفارنین - O در ۳۰٪ اتانول به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه و در محلول ۱٪ متیلن بلو آبی به مدت ۳-۶ دقیقه رنگ آمیزی (۱۴) و بوسیله میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج

در نمونه‌های مایه‌زنی شده به روش تزریق (جدول ۱)، ریشه‌های قارچ در دو روز اول، در تمام قسمتهای گلوم، لما و محور سنبله مشاهده ولی در تخمدان و بافت بندناف^۶ دیده نشد. مقاطع عرضی محور سنبله حاوی ریشه قارچ در مراحل ۲، ۴، ۷ و ۱۰ روز پس از مایه‌زنی در شکل‌های ۳-۱ نشان داده شده است. چهار روز پس از مایه‌زنی، ریشه قارچ به طرف بافت بندناف رشد کرده و در ۴۰٪ مقاطع بند ناف مشاهده گردید (جدول ۱). در این زمان تمام نمونه‌های محور سنبله، گلوم و لما حاوی ریشه قارچ بود (شکل‌های ۲، ۳، ۴، ۱۰). دیواره تخمدان ۷ روز پس از مایه زنی حاوی ریشه قارچ بود. در این مرحله نیز ریشه قارچ در تمام مقاطع گلوم، لما و محور سنبله مشاهده شد (شکل ۳، ۴، ۱۱). در ۱۰ و ۱۳ روز پس از مایه زنی، ریشه قارچ در تمام مقاطع مورد بررسی مشاهده شد (جدول ۱).

در نمونه‌های مایه زنی شده به روش گوتز (جدول ۲)، دو روز پس از مایه زنی، ریشه‌های قارچ در مقاطع نیمه انتهایی گلوم و لما (شکل ۵، ۹) ولی نه در قسمتهای قاعده‌ای آنها مشاهده شد. از

معرض مایه قارچ قرار گرفته بودند، ۲، ۴، ۷، ۱۰ و ۱۳ روز پس از مایه زنی جدا و تثبیت شدند. هر پنج سنبله که در گلخانه بعنوان شاهد نگهداری شده بودند، آلوده به سیاهک شدند و میانگین درصد آلودگی دانه آنها ۴۱/۱۷ درصد بود.

به منظور قرار دادن مایه قارچ بر روی دیواره تخمدان، هر کدام از گلچه‌های سه سنبله به تنهایی با سوسپانسیونی به غلظت 2×10^5 اسپوریدیوم ثانویه در میلی لیتر تزریق شد و سپس گیاهان تزریق شده به مدت سه روز در انکوباتور در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد و نور مداوم نگهداری شدند. سپس دانه‌های در حال توسعه به طول ۵-۲ میلیمتر از گلچه‌های مایه زنی شده جدا و تثبیت شدند.

ج - تثبیت و تهیه مقطع

نمونه‌های مایه زنی شده به مدت ۵ روز در محلول فرمالین - پروپیونیک اسید - الکل (FPA) تثبیت گردید. تعدادی از نمونه‌ها نیز در گلو تارآلدئید ۲٪ در بافر فسفات ۰/۲ مولار (pH=7.2) در دمای اتاق به مدت ۲۴ ساعت غوطه ور شدند. پس از آن این نمونه‌ها در بافر شستشو داده شده، و در محلول ۱٪ آبی اسمیم تتراکسید^۳ به مدت ۲ ساعت تا یک شب تثبیت گردید و سپس در بافر شستشو داده شدند (۵ و ۱۰). نمونه‌ها سپس در سری اتانول آبیگیری و ازسری زایلین / پارافین گذرانده و در پارافین (با نقطه ذوب ۵۸-۵۰ درجه سانتیگراد) گذاشته شدند (۱۵). تعدادی نیز پس از آبیگیری در سری استون، به رزین مصنوعی منتقل گردیدند (۲۱). از بلوکهای پارافین مقاطعی به قطر ۱۰-۷ میکرومتر و از بلوکهای رزینی، مقاطعی به قطر ۲/۵ میکرومتر به فواصل ۰/۲۵-۰/۱۵ میلیمتر برای مقاطع بند ناف^۴ و ۱-۰/۷ میلیمتر برای نمونه‌های محور سنبله و تخمدان و به فواصل

جدول ۱) موقعیت ریشه های *Neovossia indica* در قسمتهای مختلف سنبله های مایه زنی شده به روش تزریق در مراحل مختلف توسعه بیماری

روز بعد از مایه زنی	اجزاء مختلف سنبله*	تعداد نمونه های مقطع گیری شده	درصد نمونه های دارای ریشه در بخشهای مختلف اجزاء سنبله**					
			۱***	۲	۳	میان	۴	۵
۲	G	۵	۶۰	۸۰	۴۰	۶۰	۶۰	۸۰
	L	۵	۶۰	۴۰	۴۰	۶۰	۶۰	۶۰
	R	۵			۸۰	۴۰	۶۰	۶۰
	F	۵						
	O	۵						
۴	G	۵	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۸۰	۱۰۰	۱۰۰
	L	۵	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۶۰	۱۰۰
	R	۵				۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
	F	۵					۴۰	۴۰
	O	۵						
۷	G	۴	۷۵	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
	L	۴	۷۵	۵۰	۵۰	۷۵	۷۵	۷۵
	R	۴				۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
	F	۴					۷۵	۷۵
	O	۴				۷۵	۱۰۰	۷۵
۱۰ و ۱۳****	G	۴	۵۰	۷۵	۷۵	۷۵	۱۰۰	۱۰۰
	L	۶	۶۶	۶۶	۸۳	۸۳	۱۰۰	۱۰۰
	R	۶				۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
	F	۵					۱۰۰	۱۰۰
	O	۵				۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰

G* = گلوم (پوشینه)، L = لما (پوشینک)، R = محور سنبله (راکیس)، F = بند ناف (funiculus)،

O = بافت تخمدان

** سطوح تقریبی مقطع گیری

*** اعداد مربوط به قسمتهای مختلف (انتهایی، میانی، و قاعده ای) نمونه ها است. فواصل بین هر عدد

در نمونه های G و L، ۲-۲/۳ میلیمتر، برای نمونه های R و O، ۱-۱/۷ میلیمتر و برای نمونه های F، ۱۵-۲۵ میلیمتر می باشند.

**** داده ها نماینده ۲-۴ نمونه برای هر کدام از روزهای بعد از مایه زنی است.

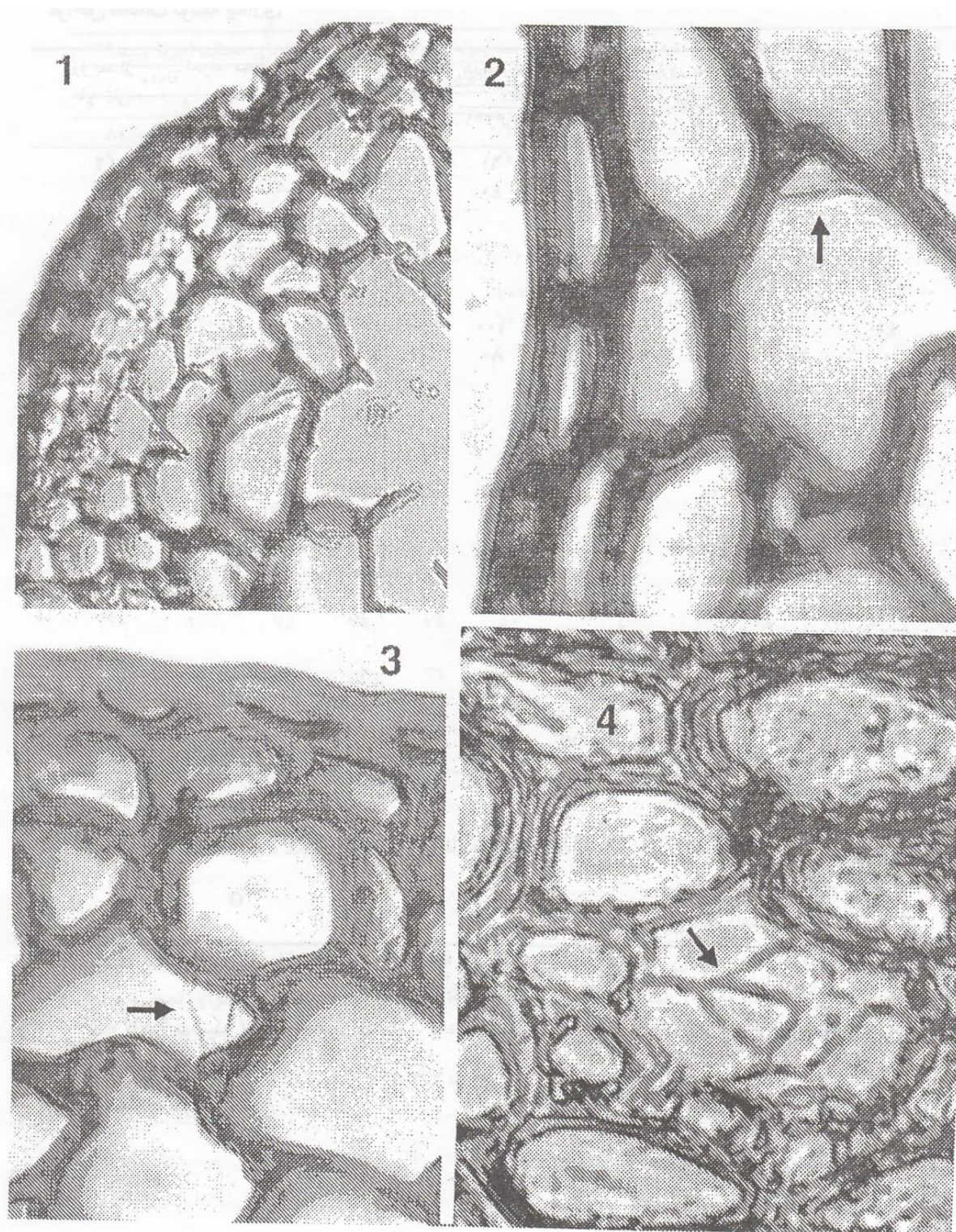
جدول ۲) موقعیت ریشه های *Neovossia indica* در قسمتهای مختلف سنبله های مایه زنی شده به روش کوتزدر مراحل مختلف توسعه بیماری

روز بعد از مایه زنی	اجزاء مختلف سنبله*	تعداد نمونه های مقطع گیری شده	درصد نمونه های دارای ریشه در بخشهای مختلف اجزاء سنبله**				
			انتهاپی	میانی	قاعده	۶	۵
۲	G	۵	۶۰	۸۰	۴۰	۰	۰
	L	۵	۴۰	۴۰	۲۰	۰	۰
	R	۵				۰	۰
	F	۵				۰	۰
	O	۵				۰	۰
۴	G	۵	۱۰۰	۱۰۰	۸۰	۸۰	۴۰
	L	۵	۸۰	۱۰۰	۶۰	۲۰	۰
	R	۵				۲۰	۰
	F	۵				۴۰	۲۰
	O	۵				۰	۰
۷	G	۴	۷۵	۱۰۰	۷۵	۱۰۰	۱۰۰
	L	۴	۵۰	۷۵	۵۰	۵۰	۵۰
	R	۴				۷۵	۵۰
	F	۴				۷۵	۷۵
	O	۴				۵۰	۷۵
۱۰ و ۱۳****	G	۵	۶۰	۸۰	۸۰	۱۰۰	۱۰۰
	L	۷	۵۷	۷۱	۸۶	۱۰۰	۱۰۰
	R	۶				۱۰۰	۱۰۰
	F	۵				۱۰۰	۱۰۰
	O	۵				۱۰۰	۱۰۰

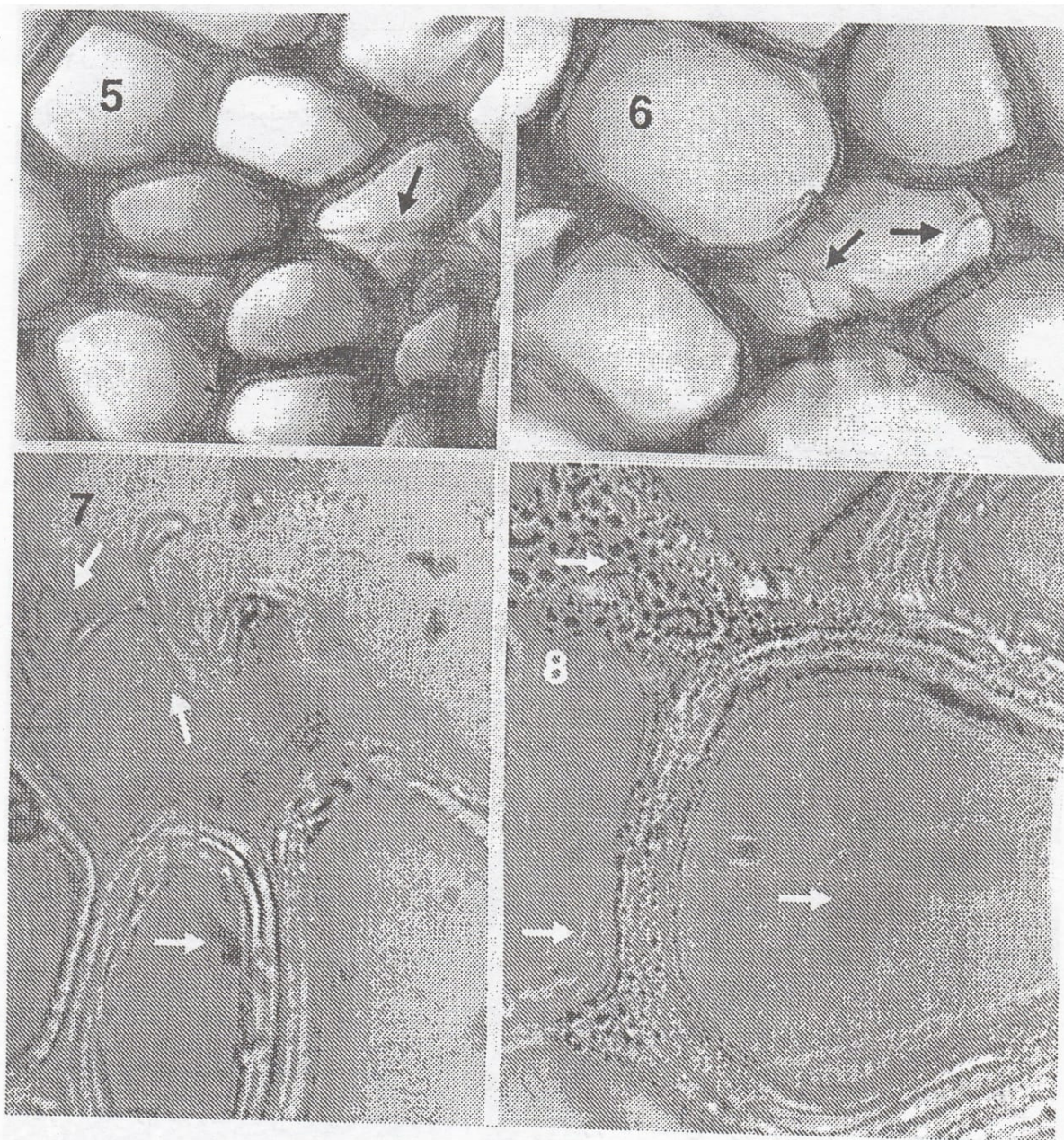
G* = گلوم (پوشینه)، L = لما (پوشینک)، R = محور سنبله (راکیس)، F = بند ناف (funiculus)،

O = بافت تخمدان

** سطوح تقریبی مقطع گیری



شکلهای ۱-۴) مقاطع عرضی محور سنبله در مراحل مختلف آلودگی به روش مایه زنی تزریقی، ریشه های قارچ بوسیله پیکان نشان داده شده اند. شکلهای ۱ تا ۴ به ترتیب ۲، ۴، ۷ و ۱۰ روز پس از مایه زنی، بزرگ‌نمایی $\times 1780$



شکل‌های ۵-۸) مقاطع عرضی گلوم به ترتیب در ۲، ۴، ۷ و ۱۰ روز پس از مایه زنی، ریشه های قارچ بوسیله پیکان نشان داده شده اند. (۵، $\times 1780$) قسمت قاعده ای، مایه زنی شده به روش کوتز، ۶) قسمت قاعده ای، مایه زنی شده به روش تزریق، ۷) قسمت میانی، مایه زنی شده به روش کوتز، ۸) قسمت میانی، مایه زنی شده به روش تزریقی.

در پایه تخمدان پس از رشد اولیه آنها به صورت بین سلولی از میان گلوم، لما و محور سنبله صورت می‌گیرد. سپس ریشه‌ها از طریق بندناف وارد تخمدان می‌شوند.

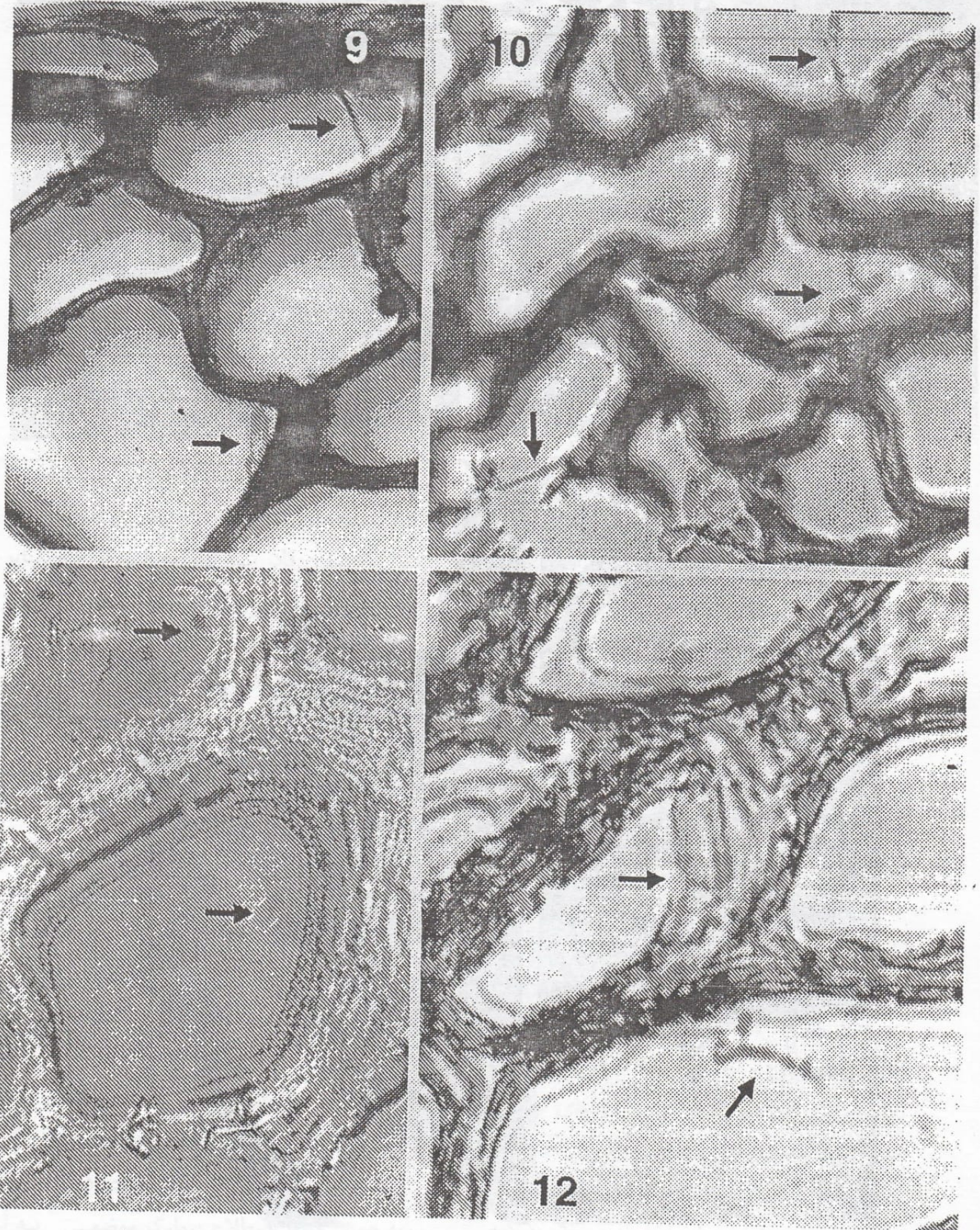
در روش مایه زنی گوتز به دلیل اینکه محور سنبله و بخشهای قاعده ای گلوم و لما در موقع مایه زنی در معرض مایه قارچ قرار نمی‌گیرند، در مراحل اولیه پس از مایه‌زنی این قسمت‌ها عاری از ریشه قارچ باقی می‌مانند، ولی در نمونه‌های مایه زنی شده به روش تزریق، این قسمت‌ها آلوده شده و حاوی ریشه قارچ بودند. با این حال علیرغم اینکه در هر دو روش، در مراحل اولیه آلودگی هیچ‌گونه ریشه قارچی در بافت تخمدان و بند ناف مشاهده نشد، ولی در مراحل بعدی این بافت‌ها حاوی ریشه‌های قارچ بودند. به عبارت دیگر در زمانی که ریشه‌ها در تخمدان و بندناف وجود نداشتند، ریشه‌ها (در موقعیت طولی) در قسمت‌های پایه‌ای گلوم، لما و محور سنبله قابل رؤیت بودند. از طرفی چنانچه ریشه‌ها در تخمدان وجود داشته باشند، نوعاً در بافت‌های بندناف، گلوم، لما و محور سنبله نیز موجود بودند. این مشاهدات تأییدی بر این مطلب است که صرف نظر از شروع آلودگی از هر جزئی از اجزاء سنبله، ادامه روند توسعه آلودگی از مسیر پایه گلچه و از طریق بندناف به دیواره تخمدان صورت می‌گیرد. نتایج گوتز (۲۱) نیز تأییدی بر مشاهدات ما در این خصوص است. به علاوه، این مطالعه نشان داد که قارچ پس از ورود به دیواره تخمدان، بین دو لایه خارجی و داخلی دیواره تخمدان قرار گرفته و تکثیر می‌یابد. به عبارت ساده‌تر استقرار، رشد و تلیوسپورزایی قارچ منحصر در بین دو لایه دیواره تخمدان صورت می‌گیرد.

طرفی ریشه‌ها در مقاطع تخمدان، بافت بند ناف و محور سنبله مشاهده نشد. از پنج نمونه مایه‌زنی شده به روش گوتز که چهار روز پس از مایه‌زنی تثبیت شده بود، ریشه قارچ در مقاطع نیمه قاعده‌ای در ۲-۴ نمونه از نمونه‌های گلوم، ۰-۲ نمونه از نمونه‌های لما، ۰-۱ نمونه از نمونه‌های محور سنبله و ۱-۲ نمونه از نمونه‌های بافت بندناف مشاهده شد (جدول ۲). در این مرحله نیز ریشه‌های در تخمدان دیده نشد. هفت روز پس از مایه‌زنی، ریشه قارچ در ۷۵-۵۰٪ دیواره تخمدان مشاهده شد. در این زمان ریشه‌های قارچ در ۱۰۰-۵۰٪ مقاطع گلوم، لما، محور سنبله و بافت بند ناف (جدول ۲، شکل ۷) وجود داشت. ۱۰ و ۱۳ روز پس از مایه‌زنی ریشه قارچ در تمام نمونه‌های مورد مطالعه دیده شد (جدول ۲، شکل‌های ۸، ۱۲).

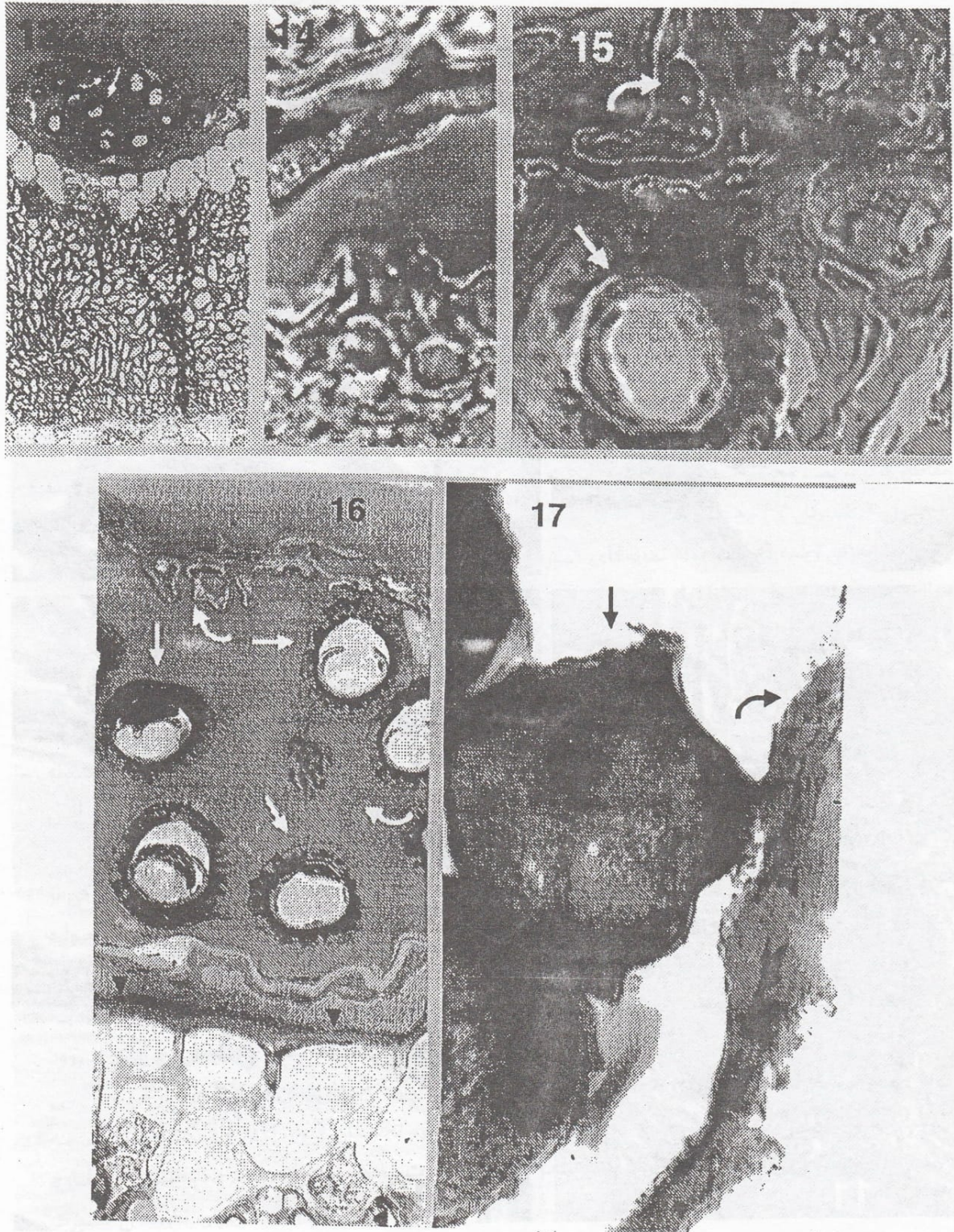
در نمونه‌های مایه زنی شده با هر دو روش، ۱۰ روز پس از مایه زنی، آغاز تولید تلیوسپور در دیواره تخمدان (شکل ۱۴) مشاهده شد. تلیوسپورهای کامل با دیواره خارجی ضخیم در مقاطع تخمدان، ۱۳ روز پس از مایه‌زنی، وجود داشت (شکل ۱۳، ۱۵-۱۷). میسلیم‌های اسپورزا در این مقاطع تغییر شکل یافته و ژلاتینی شدند. توده تلیوسپور و ریشه‌های قارچ در دیواره تخمدان بوسیله پوسته بذر^۷ (شکل ۱۶) محدود بوده و بافت آلبومین و جنین در هیچکدام از مقاطع آلوده نبودند.

بحث

روند توسعه آلودگی *Neovossia indica* و تغییرات هیستوپاتولوژیک پس از رخنه در رقم حساس گندم WL711 که با دو روش مختلف (روش گوتز و روش تزریقی) مایه‌زنی شده بودند، مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاصل از این دو روش با اندکی تفاوت نشان داد که رخنه ریشه‌ها



شکل‌های ۹-۱۲) مقاطع عرضی لما به ترتیب در ۲، ۴، ۷ و ۱۰ روز پس از مایه زنی، ریشه های قارچ بوسیله پیکان نشان داده شده اند. (۹، ×۱۷۸۰) قسمت قاعده ای، مایه زنی شده به روش گوتز، ۱۱-۱۰) قسمت میانی، مایه زنی شده به روش تزریقی، ۱۲) قسمت میانی، مایه زنی شده به روش گوتز.



شکل‌های ۱۷-۱۳) مقاطع عرضی تخمدان، ۱۰ و ۱۳ روز پس از مایه زنی، ۱۳) سیزده روز پس از مایه زنی به روش تزریق، ۱۵-۱۴) ده و سیزده روز پس از مایه زنی به روش گوتز، به ترتیب $\times 1270$ و $\times 1780$ ، ۱۷-۱۶) سیزده روز پس از مایه زنی به روش تزریق، $\times 1780$ (تلیوسپورها بوسیله پیکان، ریشه های اسپورزا بوسیله پیکان خمیده و پوشش بدری بوسیله سر پیکان نشان داده شده است A: لایه آلرون، E: اندوسپرم).

قارچ و اسپورزائی آن در لایه میانی دیواره تخمدان صورت می گیرد.

در مطالعه حاضر، رخنه مستقیم ریشه های *N. indica* به دیواره تخمدان حتی با مایه زنی مستقیم مشاهده نشد. این نوع رخنه مستقیم به عنوان یکی از روشهای آلوده سازی میزبان در میان نظریه های ارائه شده توسط برخی از محققین آمده است (۴، ۱۹، ۳۴ و ۳۹)، ولی در این بررسی و همچنین در مطالعات گوتز (۲۱) رخنه ریشه به دیواره تخمدان به هیچوجه مشاهده نشد. بنابراین نظریه رخنه مستقیم ریشه ها از طریق دیواره تخمدان مردود به نظر می رسد.

در پژوهش های متعددی گزارش شده است که ریشه های *N. indica*، پس از استقرار در دیواره تخمدان قادر به توسعه آلودگی به سایر بافتهای دانه بوده و می توانند اندوسپرم (۲۲ و ۳۲) یا جنین (۲۲، ۲۹، ۳۱ و ۳۹) را نیز مورد تهاجم قرار دهند. گوتز معتقد است که اغلب این گزارشات به همراه مطالعات گسترده هیستوپاتولوژیکی نبوده است (۲۱). در مطالعات نامبرده، حتی در دانه های شدیداً آلوده، جنین و اندوسپرم به وسیله پوشش لیگنینی بذر از تهاجم ریشه ها محافظت شده بودند. در این بررسی نیز در اندوسپرم و جنین هیچگونه آلودگی مشاهده نشد و حتی در دانه های شدیداً آلوده نیز پوشش لیگنینی بذر و لایه آلرون^۹ که اندوسپرم و جنین را می پوشانند، سالم باقی مانده بودند.

وجود چند دانه سیاهک زده در یک سنبله و در موقعیت های مختلف، چنین وانمود می کند که بیمارگر بصورت موضعی آلودگی ایجاد می نماید و به همین خاطر اصطلاح بیمارگر موضعی^{۱۰} به آن نسبت داده شده است (۱۰)، شواهد غیر مستقیم

بررسیهای هیستوپاتولوژیک در این تحقیق نشان داد که روند پیشرفت بیمارگر پس از رخنه تا رسیدن به دیواره تخمدان از مسیر پایه گلچه ها و از طریق بند ناف می باشد. چنانچه ریشه های قارچ از طریق روزنه ها و سلولهای حبابی^۸ در اپیدرم گلوم و لما رخنه کرده باشند (۳۰)، به صورت بین سلولی به طرف پایه گلچه ها رشد می کند و از طریق بندناف وارد دیواره تخمدان می شوند و اگر رخنه از طریق روزنه ها و سلولهای حبابی در اپیدرم محور سنبله صورت گرفته باشد، قارچ از طریق سلولهای آوندی محور سنبله، نه تنها خود را به پایه گلچه ها می رساند، بلکه قادر است سنبلچه های مجاور را نیز مورد تهاجم قرار دهد. گوتز (۲۱) در تحقیقات خود، روند پیشرفت ریشه بیمارگر را بصورت بین سلولی از طریق گلوم و لما و پاله آ گزارش کرده است و دالیوال و همکاران (۱۲) توسعه آلودگی از طریق سلولهای آوندی محور سنبله را پیشنهاد کرده اند که در این مطالعه مورد بررسی و تایید قرار گرفت.

یافته های تحقیقات حاضر نشانگر آن است که ریشه های قارچ در دیواره تخمدان مستقر می شود. دیواره تخمدان در مراحل اولیه توسعه، مرکب از یک لایه خارجی از سلولهای اپیدرمی و ۱۹-۱۲ لایه از سلولهای پارانشیمی است که در قسمت داخلی با یک لایه اپیدرم بسیار نازک محدود می شود (۱۰). با آلوده شدن دیواره تخمدان به ریشه های قارچ و تجزیه لایه میانی سلولهای پارانشیمی در این دیواره، در مراحل بعدی توسعه گیاه، دو لایه خارجی و داخلی دیواره تخمدان نمی توانند با هم ترکیب شوند و بدین صورت در دیواره تخمدان یک حفره ای ایجاد می شود که قارچ در آن محبوس شده و بدینسان رشد و توسعه

9 - aleurone

10 - local lesion pathogen

8 - bulliform cells

نشان می‌دهد که علاوه بر این، بیمارگر می‌تواند از طریق محور سنبله سنبلچه‌های مجاور را نیز آلوده نماید (۱۲). مطالعات هیستوپاتولوژیک در این تحقیق، وجود ریشه‌های *N. indica* در قطعات محور سنبله بین سنبلچه‌های آلوده را نشان داد. وجود این ریشه‌ها در هر دو روش مایه‌زنی گوتز و تزریقی در قطعات محور سنبله بین سنبلچه‌های آلوده، قابل مشاهده بود، با این تفاوت که ریشه‌های قارچ در روش مایه‌زنی تزریقی از همان مراحل اولیه آلودگی در محور سنبله دیده شد ولی در روش مایه‌زنی گوتز، ریشه‌های قارچ در مراحل بعدی آلودگی در این قطعات مشاهده شد. بنابراین به نظر می‌رسد که محور سنبله می‌تواند به عنوان پل ارتباطی برای گسترش بیماری از یک سنبلچه آلوده به سنبلچه مجاور عمل نماید. در تأیید این موضوع، گسترش بیماری از مرکز آلودگی اولیه و آلوده شدن دانه‌ها در سنبلچه‌های مجاور، شدیداً وابسته به شرایط محیطی مناسب بوده و در این رابطه آلوده شدن تا ۱۳ دانه در نتیجه پیشرفت آلودگی از یک مرکز آلودگی اولیه نیز گزارش شده است (۲۰). همچنین آلودگی همزمان دو سنبلچه مجاور یا گلچه‌های یک سنبلچه، حاصل از یک کانون آلودگی اولیه گزارش شده است (۶). مطالعات در مورد موقعیت مکانی دانه‌های آلوده نشان داده است که بیشترین آلودگی در دانه‌هایی اتفاق می‌افتد که مستقیماً به محور سنبله متصل هستند و درصد آلودگی دانه‌های مجاور کمتر است (۲۰). این نوع پیشرفت آلودگی از طریق سلولهای آوندی محور سنبله قابل توجیه است (۱۲) و بر این اساس و بر پایه بررسی‌های رخنه از طریق روزنه‌های محور سنبله، دالیوال و همکاران (۱۲) پیشنهاد کردند که سلولهای آوندی محور سنبله محل مناسبی است که از طریق آن قارچ می‌تواند خود را به گلچه‌های سنبلچه‌های مجاور برساند. البته پیشرفت آلودگی به گلچه‌ها و سنبلچه‌های

دیگر همان سنبله ممکن است به علت وجود مراکز آلودگی اولیه متعدد در سنبله نیز صورت پذیرد (۶). بنابراین طبیعت گسترش ثانویه بیماری از دو طریق قابل توجیه است. اول اینکه آلودگی‌های بعدی ممکن است بوسیله رخنه قارچ از محل‌های جدید باشد یا اینکه قارچ بصورت نیمه‌سیستمیک از محل اولیه آلودگی و از طریق سلولهای آوندی محور سنبله موجب ایجاد آلودگی‌های ثانویه شود. لذا طبیعت گسترش ثانویه بیماری یا از طریق هوا زاد صورت می‌گیرد و یا به صورت سیستمیک قابل توجیه است (۶، ۱۱، ۱۳ و ۴۱).

گوتز (۲۱) در بررسی روند آلودگی اظهار داشته است که قسمتهای قاعده‌ای گلوم و لما و همچنین قطعات محور سنبله بین سنبلچه‌ها در مراحل اولیه آلودگی عاری از آلودگی بودند. نامبرده تجمع اسپوریدیومهای قارچ را در قسمتهای انتهایی سطوح گلوم و لما مشاهده نمود و این امر را اینگونه توجیه می‌کند که وجود نیروهای الکتروستاتیکی باعث نشست ناهمگن مایه اولیه قارچ بر سطوح گلوم و لما شده است. ولی در بررسی حاضر مشخص شد که قسمتهای قاعده‌ای گلوم و لما و همچنین قطعات محور سنبله محدود شده بین سنبلچه‌ها، در موقع مایه زنی به روش گوتز در معرض مستقیم مایه قارچ قرار نمی‌گیرند. در مطالعه نامبرده همچنین هیچ نوع رخنه از طریق روزنه‌های محور سنبله مشاهده نشد که احتمالاً فقدان اسپوریدیومها بر روی این سطوح در موقع مایه زنی، می‌تواند دلیلی بر عدم آلودگی محور سنبله باشد. از آنجائیکه در روش مایه‌زنی تزریقی تمام اجزاء سنبله در معرض مایه قارچ قرار می‌گیرند و از آنجائیکه در مطالعات شناخت چگونگی رخنه ثابت شده است که روزنه‌ها از محل‌های رخنه قارچ به حساب می‌آیند (۳۰)، لذا با توجه به وجود روزنه‌های فراوان در این اجزاء و بویژه روی محور سنبله ارقام مورد مطالعه، به نظر

رقم حساس (۱) نشان داد که تلیوسپورها ۱۰ روز پس از آلودگی بصورت اجسام کروی با دیواره صاف تولید می‌شوند و تلیوسپورهای کامل با دیواره توسعه یافته ۲۵ روز پس از مایه‌زنی مشاهده شده‌اند. این فرآیند در تحقیق حاضر بسیار کوتاهتر (۱۳ روز) برآورد گردید که علت یا علل امر می‌تواند به تفاوت در روش، ارقام مورد استفاده، جدایه قارچ و یا شرایطی که تحت آن آزمایش صورت گرفته است، نسبت داده می‌شود.

می‌رسد که آلودگی می‌تواند از کلیه سطوح اجزاء سنبله شامل گلوم، لَمّا و قطعات محور سنبله بین سنبلچه‌ها ایجاد شود و این امر خود توضیحی بر آلودگی سیستمیک سنبلچه‌های مجاور از طریق محور سنبله می‌باشد.

در مطالعه حاضر، تولید تلیوسپور از روز دهم پس از مایه زنی در دیواره تخمدان مشاهده شد و در روز سیزدهم، تلیوسپورهای بالغ مشاهده گردید. توسعه دیواره خارجی اسپور در تلیوسپورهای این گونه، با آنچه که برای تیپ *Tilletia* توصیف شده است (۳۷)، مطابقت دارد. مطالعه آنتوژنی توسعه دیواره تلیوسپور *N. indica* در گندم نانی یک

References :

- 1- AGGRAWAL, R., SINGH, D. V., and SRIVASTAVA, K. D. 1999. Studies on ontogeny of teliospore ornamentation of *Neovossia indica* observed through scanning electron microscopy. *Indian Phytopathol.*, **52**: 417-419.
- 2- ALIZADEH, A., MALIHIPOUR, A., MOOSAVI-JORF, S. A., and MARDOUKHI, V. 2001. Quantitive survey of teliospore of *Tilletia indica* in wheat field soils of Fars, Hormozgan and Kerman provinces. *Iran. J. Plant Pathol.* (in press) (in Farsi and English summary).
- 3- ALIZADEH, A., and SAEEDI, A. 1999. (Partial Bunt Disease of Wheat and the Possibility of its Control in Iran: Project Progress Report.) Dep. Cereal Res., Agric. Res. Seed and Plant Improv. Instit., Agric. Res. Educat. Extens. Organization, Ministry of Agriculture, Iran. (in Farsi).
- 4- AUJLA, S. S., SHARMA, I., GILL, K. S., and GREWAL, H. S. 1988. Establishment of *Neovossia indica* in wheat kernal. *Plant Dis. Res.* **3**: 62-63.
- 5- BAUER, R., OBERWINKLER, F., and VANKY, K. 1997. Ultrastructural marker and systematics in smut fungi and allied taxa. *Can. J. Bot.* **75**:1273-1314.
- 6- BEDI, P.S., and DHIMANN, J.S. 1984. Spread of *Neovossia indica* in the wheat ear. *Indian Phytopathol.* **57**:335-337.

- 7- BEHROOZIN, M. 1997 . Distribution of Karnal bunt in Iran. In: Abstracts of Symposium and Poster Sessions. International Conference on Integrated Plant Disease Management for Sustainable Agriculture. , p. 462, 10-15 November, New Delhi, India.
- 8- BONDE, M. R., PETERSON, G. L. and SCHAAD, N. W. 1997 . Karnal bunt of wheat. *Plant Dis.* 81 : 1370-1377.
- 9- BONDE, M.R., and SMILANICK, J.L. 2000. Life cycle and environmental requirements of *Tilletia indica* . In: Karnal Bunt : A Fungal Disease of Wheat. eds. Malik, V.S., Jones, L., and Peterson, M.K. USDA, APHIS, Plant Protection and Quarantine., Published Online., National Karnal Bunt, Coordinator, WebMaster, Global Strategist.
- 10- CASHION, N. L., and LUTTRELL, E. S. 1988 . Host-parasite relationship in Karnal bunt of wheat. *Phytopathology* 78:75-84.
- 11- DHALIWAL, H.S., GILL, K.S., RANDHAWA, A.S., and SHARMA, K.S. 1983a. Systematic spread of Karnal bunt disease of wheat. *Wheat Inf. Serv.* 56:24-27.
- 12- DHALIWAL, H.S., NAVARRETE-MAYA, R., and VALDAZ, J. 1989 . Scanning electron microscope studies of penetration mechanism of *Tilletia indica* in wheat spikes. *Rev. Mexicana Fitopatol.* 7:150-155.
- 13- DHALIWAL, H.S., RANDHAWA, A.S., CHAND, K., and SINGH, D. 1983b. Primary infection and further development of Karnal bunt of wheat. *Indian J. Agric. Sci.* 53:239-244.
- 14- DHINGRA, O.D., and SINCLAIR, J.B. 1995. Basic Plant Pathology Methods. Second ed. Lewis Publishers, CRC Press, Boca Raton, Florida.
- 15- DNYANSAGAR, V.R. 1986. Cytology and Genetics. Tata McGraw-Hill Publishing, New Delhi.
- 16- DURAN, R. 1972 . Further aspects of teliospore germination in North American smut fungi. *Can. J. Bot.* 50:2569-2573.
- 17- FUENTES-DAVILA, G. 1996 . Karnal bunt. In: Bunt and Smut Diseases of Wheat. Wilcoxon, R.D., and Saari, E. E. (eds.), pp 26-32, CIMMYT, Mexico. D.F., Mexico.
- 18- FUENTES-DAVILA, G. 1997 . Karnal bunt in Mexico. In: APS Karnal Bunt Symposium Transcript Available in :
<http://www.apsnet.org/online/karnal/kbspaper/artmex.htm>

- 19- GILL, K.M., and AUJLA, S.S. 1986 . Research on Breeding for Karnal Bunt Resistance in Wheat. Punjab Agric. Univ. Ludhiana, India.
- 20- GILL, K. S., SHARMA, I., and AUJLA, S. S. 1993. Karnal Bunt and Wheat Production. Punjab Agricultural University, Ludhiana.
- 21- GOATES, B.J. 1988. Histology of infection of wheat by *Tilletia indica*, the Karnal bunt pathogen. *Phytopathology* 78:1434-1441.
- 22- JOSHI, L. M., SINGH, D. V., SRIVASTAVA, K. D., and WILCOXSON, R.D. 1983 . Karnal bunt: a minor disease that is now a threat to wheat. *Bot. Rev.* 49:309-329.
- 23- KEHLENBECK, H., MOTTE, G., and UNGRA, J. G. 1997 . On the analysis of the risk and the consequences of an introduction of *Tilletia indica* into Germany. *Nachrichtenblatt-des- Deutschen- Pflanzenschutzdienstes* 49 : 65-74.
- 24- KUMAR, J., and NAGARAJAN, S. 1998 . Role of flag leaf and spike emergence stage on the incidence of Karnal bunt of wheat. *Plant Dis.* 82:1368-1370.
- 25- LOCKE, C. M., and WATSON, A. J. 1955. Foreign plant diseases intercepted in quarantine inspection. *Plant Dis. Rep.* 39:518.
- 26- MALIK, V.S., JONES, L., and PETERSON, M.K. 2000 .Karnal Bunt : A Fungal Disease of Wheat. USDA, APHIS, Plant Protection and Quarantine., Published Online., National Karnal Bunt, Coordinator, WebMaster, Global Strategist.
- 27- MATHUR, S. B., and CUNFER, B. M. 1993 . Karnal bunt. In: Seed-borne Diseases and Seed Health Testing of Wheat. pp 31–43 , Jordburgsforlaget, Frederiksberg, Denmark.
- 28- MITRA, M. 1931 . A new bunt of wheat in India. *Ann. Appl. Biol.* 18 : 178-179.
- 29- MITRA, M. 1935 . Stinking smut (bunt) of wheat with special reference to *Tilletia indica*. *Indian J. Agric. Sci.* 5 : 56-74.
- 30- MOOSAVI-JORF, S.A. 2000 . Histopathological Studies of Wheat Infected By *Tilletia indica* and Cytology of its Causal Agent. PhD. Thesis, Agric. College, Tarbiat Modarres Univ., Iran.
- 31- MUNDKUR, B.B. 1941 . A second contribution towards a knowledge of Indian Ustilaginales. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 24:312-336.
- 32- MUNDKUR, B.B. 1943. Karnal bunt, a air-borne disease. *Curr. Sci.* 12:230-231.

- 33- MUNJAL, R. L. 1975. Status of Karnal bunt (*Neovossia indica*) of wheat in northern India during 1968–1969 and 1969–1970. *Indian J. Mycol. Plant Pathol.* 5:185–187.
- 34- MUNJAL, R.L., and CHATRATH, M.S. 1976. Studies on mode of infection of *Neovossia indica* incitant of Karnal bunt of wheat. *J. Nucl. Agric. Biol.* 5:40-41.
- 35- MURRAY, G. M., and BRENNAN, J. P. 1998 . The risk to Australia from *Tilletia indica*, the cause of Karnal bunt of wheat. *Australian Plant Pathol.* 27 : 212-225.
- 36- NAGARAJAN, S., AUJLA, S. S., NANDA, G. S., SHARMA, I., GOEL, L. B., KUMAR. J., and SINGH, D. V. 1997 . Karnal bunt (*Tilletia indica*) of wheat – a review. *Rev. Plant Pathol.* 76 : 1207-1214.
- 37- PIEPENBRING, M., BAUER, R., and OBERWINKLER, F. 1998 . Teliospores of smut fungi: general aspects of teliospore walls and sporogenesis. *Protoplasma* 204: 155-169.
- 38- SINGH, D. V., AGRAWAL, R., SHRESTHA, J. K., THAPA, B. R., and DUBIN, H. J. 1989. First report of *Tilletia indica* on wheat in Nepal (Disease note). *Plant Dis.* 73:273.
- 39- SINGH, D. V., JOSHI, L. M., and SRIVASTAVA, K. D. 1983. Karnal bunt a new threat to wheat in India. In: Recent Advances in Plant Pathology. Festschrift, H.K.S. (ed.), pp: 121-135, Print House, Locknow (India).
- 40- TORABI, M., MARDOUKHI, V., and JALIANI, N. 1996 . First report on the occurrence of partial bunt on wheat in the southern parts of Iran. *Seed and Plant* 12 : 8-9.
- 41- WARHAM, E.J., and CASHION, N.L. 1984. Evaluation of inoculation methods in the greenhouse and field. In: Karnal Bunt of Wheat. pp: 11-13, CIMMYT, Mexico D.F., Mexico.
- 42- YKEMA, R.E., FLOYD, J.P., PALM, M.E., and PETERSON, G.L. 1996 . First report of Karnal bunt of wheat in the United States. *Plant Dis.* 80 : 1207 (Abstract).

HISTOPATHOLOGY OF KARNAL BUNT INFECTED WHEAT

S.Ali Moosavi-Jorf¹ and A. Alizadeh² and R. Farrokhi-Nejad¹

Abstract

Histopathology of Karnal bunt infected wheat was investigated using light microscopy. Susceptible wheat plants were inoculated by Goates' and injection methods. During the early stages of infection, in the plants inoculated by Goates' method, hyphae were present intercellularly in the distal to midportions, but not basal portions of the glume and lemma, and were absent in the ovary, funiculus and rachis. In the plants which were inoculated by injection method, during the early stages of infection, intercellular hyphae were present in all portions of glume, lemma, and rachis, but not observed in the ovary and funiculus. Hyphae were seen in funiculus at a later stage. In all observations, it appeared that hyphae from different parts of spike grew toward the basal parts of florets and entered to ovary through funiculus. Ten days after inoculation, developing teliospores were observed in the pericarp of the caryopsis, and 13 days after inoculation, mature teliospores with thick exosporium wall were developed.

Key words: *Neovossia indica*, Karnal bunt, Histopathology

1 - Assistant professor and associate professor, respectively, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Shahid Chamran University, Ahwaz.

2 - Professor, Department of Plant Pathology, College of Agriculture, Tarbiat Modarres University, Tehran.