بررسی سیستم ناسازگاری جنسی در جدایه‌های ایرانی *Tilletia indica*

سیدعلی موسوی جرف[۱]، عزیزاله علیزاده[۱] ، رضا فرخی نژاد[۲] و ناصر صفائی[۱]

برای بررسی سیستم ناسازگاری جنسی در جدایه‌های ایرانی قارچ عامل سیاهک ناقص گندم (*Tilletia indica*) که بیماریزایی را نیز کنترل می‌کند، در یک طرح کاملا تصادفی با هفت تکرار، لاین‌های تک‌اسپوریدیومی بصورت جفتی و تکی به سنبله‌های گندم در مرحله به غلاف رفتن مایه‌زنی شد. جفتی از لاینها که بیماریزا بودند، حاوی تیپهای آمیزشی مختلف (از لحاظ جنسی سازگار)، درصورتیکه جفتهای غیربیماریزا، دارای تیپ آمیزشی مشابه (از لحاظ جنسی ناسازگار) فرض شد. در تمام حالتها تک لاینها غیربیماریزا بودند. نتایج حاصله از بررسی پانزده لاین تک اسپوریدیومی، که با تمام حالتهای ممکن جفت شدند، بیانگر آن بود که هتروتالیسم حداقل بوسیله پنج آلل فرضی در یک جایگاه ژنی کنترل می‌شود.

واژه‌های کلیدی : *Tilleta indica*، کارنال بانت، سیاهک ناقص گندم، ناسازگاری، هتروتالیسم، ایران

مقدمه

سیاهک ناقص یا کارنال بانت گندم، ناشی از ***Tilletia indica*** **Mitra**، اولین بار در سال ۱۹۳۱ توسط میترا[۳] (۱۱) از هند گزارش شد، و تاکنون از پاکستان، سوریه، افغانستان، مکزیک، نپال، ایالات متحده امریکا و ایران گزارش شده است (۱۵، ۱۴، ۱۲ و ۵). در سال ۱۳۷۵، این بیماری در ایران در سطحی حدود ۱۰۰ هزار هکتار از مزارع جنوب کشور بصورت اپیدمی ظاهر شد و میزان آلودگی براساس نمونه‌برداری از محموله‌های آلوده و مزارع گندم بین

۱- گروه بیماریِ شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس

۲- گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران

3- Mitra

دریافت: ۷۹/۳/۲۸ پذیرش: شهریورماه ۷۹

۲۸-۲ درصد متغیر بود (۱).

اگرچه در برخی از عوامل سیاهک آمیزش بین اسپوریدیومها و تشکیل میسلیومهای دیکاریوتیک بر روی محیط کشت مصنوعی قابل بررسی است (۵،۸)، اما دوران و کرومارتی[1] در سال ۱۹۷۷ (۷) هیچ‌گونه آمیزشی بین لاینهای تک اسپوریدیومی این قارچ روی محیطهای کشت مختلف مشاهده ننمودند. همین محققین با مایه‌زنی گیاهان بوسیله ترکیبات دوتایی از این لاینها، در تعدادی از گیاهان آلودگی را مشاهده نموده و اظهار داشتند که این قارچ هتروتال و دارای سیستم ناسازگاری و بیماریزایی دوقطبی است که بوسیله آللهای چندتایی[2] در یک جایگاه ژنی[3] کنترل می‌شود. نامبردگان وجود چهار آلل مسئول ناسازگاری را در مطالعات خود نشان دادند. در سال ۱۹۸۳ کریشنا و سینگ[4] (۱۰) طبیعت هتروتالیک قارچ را مورد تأیید قرار داده و هفت آلل را برای کنترل ناسازگاری و بیماریزایی گزارش نمودند. در سال ۱۹۸۵ پژوهشگران دیگری از جمله رویر و رایتر[5] (۱۳) حداقل سه تیپ آمیزشی (سه آلل) مختلف را گزارش نموده و در سال ۱۹۹۰ اوجلا و شارما[6] (۴) در مطالعات خود سیستم ناسازگاری چهارقطبی را برای این قارچ پیشنهاد کردند.

در این مطالعه که برای اولین بار در ایران انجام شد، با مایه‌زنی جدایه‌های تک اسپوریدیومی بصورت منفرد و دوتایی به گندم حساس، سیستم ناسازگاری در جدایه‌های ایرانی این قارچ مورد بررسی قرار گرفت.

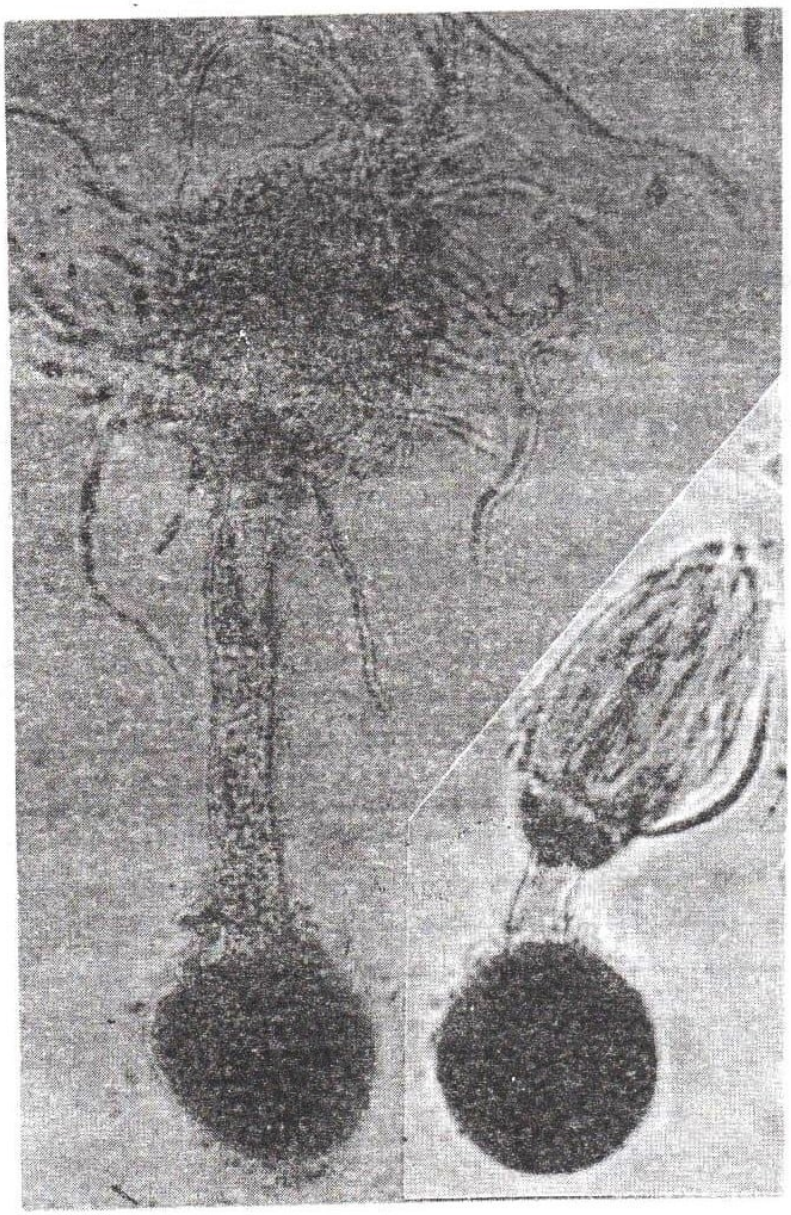
مواد و روشها

۱ - جدایه‌ها

سه توده دانه آلوده از مناطق داراب، جیرفت و لار در جنوب ایران جمع‌آوری شد. جوانه‌زنی تلیوسپورها برروی آب - آگار ۲٪ در ۲۰ درجه سانتیگراد صورت گرفت.

1- Duran and Cromarty
2- Multiple alleles
3- Locus
4- Krishna and Singh
5- Royer and Rytter
6- Aujla and Sharma

اسپوریدیومهای اولیه قارچ از هرکدام از تلیوسپورهای جوانه‌زده (شکل ۱)، در ۰/۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل جمع‌آوری و روی سطح آب - آگار در تشتک پتری پخش شد و به مدت ۳ روز در ۲۰ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.



شکل ۱ - تلیوسپورهای جوانه‌زده *Tilletia indica*، همراه با تعداد فراوان اسپوریدیومهای اولیه‌ای که با هم جوش نمی‌خورند(X۱۰۰۰).

اسپوریدیومهای جوانه‌زده، در زیر میکروسکپ علامت‌گذاری، و به محیط سیب زمینی دکستروز آگار[1] منتقل شدند. اسپوریدیومهای اولیه بصورت تصادفی از تلیوسپورهای مختلف جداسازی گردیدند، به‌این ترتیب پانزده جدایه (لاین تک اسپوریدیومی) تهیه شد (جدول ۱).

۲ - تولید مایه تلقیح و مایه‌زنی

هر کدام از لاینهای تک اسپوریدیومی در تشتکهای پتری محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار حاوی ۰/۱ ٪ عصاره مخمر در ۲۰ درجه سانتیگراد به مدت ۵ روز تکثیر شدند (۳) و سوسپانسیونی از اسپوریدیهای ثانویه سوسیسی شکل با غلظت $۲X۱۰^{۵}$ اسپوریدی در میلی‌لیتر تهیه شد. بلافاصله قبل از مایه‌زنی مقداری از دو سوسپانسیون تک اسپوریدیومهای مختلف به نسبت مساوی با هم مخلوط شد و برای مایه‌زنی بکار برده می‌شد. سنبله‌های گندم رقم حساس **WL711** در قالب یک طرح کاملا تصادفی با هفت تکرار، در اوایل مرحله خروج ریشکها[2] با تزریق ۲-۱ میلی‌لیتر از هرکدام از لاینهای تک اسپوریدیومی بصورت منفرد(شاهد) و یا مخلوط دوتایی آنها مایه زنی شدند. بعد از مایه زنی گلدانها در شرایط ۲۰ درجه سانتیگراد و رطوبت نسبی بالای ۷۰٪ و نور طبیعی در گلخانه نگهداری شدند. پس از برداشت، وجود یا عدم وجود آلودگی در هر کدام از سنبله‌ها بررسی شد.

1- Potato Dextrose Agar (PDA) 2- booting stage

جدول ۱- تعداد سنبله‌های آلوده شده (هفت سنبله مایه‌زنی شده) با هر جفت از ترکیبات ممکن پانزده لاین تک اسپوریدیومی واکنشهای سازگار (+) و ناسازگار (-) بین لاینها و آللهای فرضی ناسازگاری تعیین شده.

Monosporidial lines	Teliospore No.	Postulated alleles	Monosporidial lines														
			D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	L1	L2	J1	J2
			Postulated alleles														
			a1	a2	a2	a3	a1	a4	a1	a1	a2	a2	a1	a3	a1	a5	a5
D1	1	a1	0(-)	3(+)	2(+)	1(+)	0(-)	4(+)	0(-)	0(-)	1(+)	2(+)	0(-)	5(+)	0(-)	5(+)	2(+)
D2	1	a2		0(-)	0(-)	2(+)	1(+)	1(+)	5(+)	2(+)	0(-)	0(-)	4(+)	7(+)	3(+)	5(+)	1(+)
D3	1	a2			0(-)	4(+)	5(+)	3(+)	4(+)	1(+)	0(-)	0(-)	6(+)	2(+)	1(+)	3(+)	2(+)
D4	2	a3				0(-)	1(+)	5(+)	1(+)	4(+)	7(+)	5(+)	1(+)	0(-)	3(+)	5(+)	6(+)
D5	3	a1					0(-)	6(+)	0(-)	0(-)	5(+)	2(+)	0(-)	1(+)	0(-)	2(+)	3(+)
D6	3	a4						0(-)	4(+)	4(+)	7(+)	3(+)	1(+)	2(+)	1(+)	1(+)	2(+)
D7	3	a1							0(-)	0(-)	3(+)	1(+)	0(-)	3(+)	0(-)	6(+)	1(+)
D8	3	a1								0(-)	3(+)	3(+)	0(-)	1(+)	0(-)	3(+)	5(+)
D9	4	a2									0(-)	0(-)	2(+)	7(+)	7(+)	6(+)	2(+)
D10	4	a2										0(-)	3(+)	4(+)	4(+)	5(+)	6(+)
D11	5	a1											0(-)	6(+)	0(-)	4(+)	4(+)
L1	6	a3												0(-)	4(+)	6(+)	5(+)
L2	6	a1													0(-)	5(+)	5(+)
J1	7	a5														0(-)	0(-)
J2	7	a5															0(-)

D= جدایه های داراب

L= جدایه های لار

J= جدایه های جیرفت

نتایج و بحث

علائم بیماری تنها دربرخی از ترکیبات دوتایی لاینهای تک اسپوریدیومی در سنبله‌های تلقیح شده مشاهده شد. داده‌های خلاصه شده در جدول ۱ بیانگر طبیعت هتروتالیک بودن قارچ است، زیرا اولا در هیچ کدام از سنبله‌های تلقیح شده بوسیله لاینهای تک اسپوریدیومی منفرد آلودگی ایجاد نشد و ثانیا تنها برخی از جفت لاینها بیماریزا بودند.

نتایج مایه‌زنی لاینهای جداشده از یک تلیوسپور نشان داد که اسپوریدیهای حاصل از یک تلیوسپور دارای تنها دو تیپ آمیزشی هستند. با این حال چنانچه یک لاین از یک تلیوسپور با لاین دیگری از تلیوسپور دیگر جفت می‌شد، تیپهای آمیزشی بیشتری آشکار می‌شد. مثلا لاینهای جداشده از هرکدام از تلیوسپورهای شماره ۱، ۳ و ۶ (جدول ۱) حامل تنها دو تیپ آمیزشی بودند. ازطرفی اگرچه بعنوان مثال اسپوریدیهای حاصل از تلیوسپور شماره ۳ دارای تیپهای آمیزشی *a1* و *a4* بودند، ولی با ترکیب هرکدام از آنها با لاین **D4** حاصل از تلیوسپور شماره ۲، تیپ آمیزشی از *a3* نیز آشکار شد. جالب توجه اینکه تلیوسپورهای شماره ۲ و ۳ از یک دانه آلوده جداسازی شده بودند که اسپوریدیهای با ناسازگاری *a1*، *a3* و *a4* آنها استحصال گردید. این موضوع نشان می‌دهد که هاگبنه قارچ[1] احتمالا در نتیجه آلودگی چندین اسپوریدی با تیپهای آمیزشی مختلف است و اینکه آناستوموز بین منوکاریونهای با تیپ ناسازگاری متفاوت ممکن است در داخل میزبان رخ دهد. با این وجود در طبیعت، زمان تشکیل دیکاریونها، بعد یا قبل از رخنه به میزبان، ناشناخته باقی مانده است. که با نتایج دوران و کرومارتی (۷) تطابق دارد.

از پانزده لاین مورد آزمایش شش لاین بعنوان تیپ آمیزشی *a1* چهارتا بعنوان *a2* دوتا بعنوان *a3* یکی بعنوان *a4* و دوتا بعنوان *a5* فرض شدند. در تفسیر نتایج حاصل از مایه‌زنی لاینهای تک اسپوریدیومی می‌توان اشاره کرد که در اثر مایه‌زنی حالتهای مختلف لاینهای سازگار، سنبله‌ها سیاهک زده می‌شدند، و اینکه سنبله‌ها با هر ترکیبی از پنج تیپ آمیزشی مفروض آلوده شدند(شکل ۲). این مطلب مبین آن است که ناسازگاری در *T. indica* بوسیله *T.* چندین آلل کنترل می‌شود. تعداد فراوان سنبله‌های مایه‌زنی شده بوسیله جدایه‌های تک *a*) (اسپوریدیومی که بصورت تصادفی از تلیوسپورهای مختلف جدا شده بودند، نشان داد که

1- sorus

کنترل *indica* هتروتال و دوقطبی بوده و ناسازگاری بوسیله چندین آلل در یک جایگاه ژنی می‌شود.

شکل ۲ - سیاهک ناقص بر روی رقم **WL711** گندم در پی مایه‌زنی با جفتی از لاینهای *Tilletia indica*. **a**) سنبله‌های آلوده، با هاگینه‌هایی که تااندازه‌ای بوسیله پوشینه‌ها پوشانده شده‌اند(X۱)، و **b**) دانه‌های سنبله‌های سیاهک زده که طبیعت موضعی بودن هاگینه‌های قارچ را نشان می‌دهد(X۱).

نتایج حاصل از این بررسی مبنی بر هتروتال و دوقطبی بودن قارچ عامل سیاهک ناقص گندم و اینکه ناسازگاری بوسیله چندین آلل در یک جایگاه ژنی کنترل می‌شد با نتایج حاصل از مطالعات مفصل دوران و کرومارتی (۷) و کریشنا و سینگ (۱۰) کاملا منطبق است. نامبردگان به ترتیب چهار و هفت آلل مسئول ناسازگاری و بیماریزایی را در طی مطالعاتشان گزارش کرده‌اند. رویر و رایتر (۱۳) نیز سه تیپ آمیزشی مختلف برای این قارچ گزارش نمودند و سیستم سازگاری دوقطبی را برای آن پیشنهاد کردند. اوجلا و شارما (۴) سیستم ناسازگاری چهارقطبی را برای این قارچ پیشنهاد کردند و در بحث خود به کار رویر و رایتر (۱۳) استناد کردند. در تحقیقات رویر و رایتر (۱۳) تصریح شده که این قارچ دو قطبی بوده و سه تیپ آمیزشی از آن گزارش شده است، ولی اوجلا و شارما (۴) تنها به دلیل گزارش سه تیپ آمیزشی، نتایج رویر و رایتر(۱۳) را دال بر چهارقطبی بودن این قارچ دانستند. بنابراین شواهد محکمی (۷، ۱۰ و ۱۳) برای دو قطبی بودن سیستم ناسازگاری در این قارچ وجود دارد.

بطورکلی در سیاهکها دو سیستم ناسازگاری دوقطبی و چهارقطبی گزارش شده است (۶ و ۹). بااین وجود اخیرا مشاهده شده است که برخی از عوامل سیاهکی که دارای سیستم ناسازگاری دوقطبی‌اند، دارای توالی DNA بوده که نه تنها با قطعه DNA مربوط به جایگاه ژنی تیپ آمیزشی *a* از ***Ustilago maydis*** هیبرید می‌شوند، بلکه با قطعه DNA مربوط به جایگاه ژنی تیپ آمیزشی *b* هم هیبرید می‌شود. این نتایج نشان می‌دهد که ژنهایی شبیه به تیپ آمیزشی *b* نیز ممکن است در سیاهکهای دوقطبی وجود داشته باشد و اینکه ممکن است در این گروه از قارچها وظایف این دو جایگاه ژنی با هم ترکیب شده باشد (۹). با عنایت به نتایج این تحقیقات و مطالعات سایر پژوهشگران در مورد ***T. indica*** (۶، ۷، ۱۰ و ۱۳) به نظر می‌رسد که این قارچ دوقطبی است و ادعای اوجلا و شارما (۴) مبنی بر چهارقطبی بودن این قارچ را به دلیل تعداد کم جدایه‌های مورد مطالعه توسط نامبردگان و عدم تکرار آزمایشات نمی‌توان تأیید کرد و تنها با بکارگیری سری کامل اسپوریدیومها با تکرار کافی می‌توان صحت و سقم آنرا تعیین نمود (۷).

منابع: REFERENCES

۱ - علیزاده - عزیزاله و سعیدی - عباس . ۱۳۷۸. گزارش پیشرفت پروژه بیماری سیاهک ناقص گندم و امکان کنترل آن در ایران. وزارت کشاورزی. سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی. مؤسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر. بخش تحقیقات غلات. ۲۳۰ ص .

2- AL-MUGHRABI, K. I., and HSIANG, T. 1998. The mating system of *Daedaliopsis confragosa*. Mycologia 90:82-84.

3- AUJLA, S. S.,KAUR, S. and GILL, K. S. 1990. Efficacy of different free living propagules of *Neovossia indica* in causing ear infection of wheat. Plant Disease Research 5:112-114.

4- AUJLA, S. S., and SHARMA, I. 1990. Compatibility system in *Neovossia indica*. Indian Phytopathology 43:222-223.

5- BONDE, M. R., PETERSON, G. L. and SCHAAD, N. W.1997. Karnal bunt of wheat. Plant Disease 81: 1370-1377.

6- CASSELTON, L. A. and OLESINCKY, N. S. 1998. Molecular genetics of mating recognition in basidiomycete fungi. Microbiology & Molecular Biology Reviews 62:55-70.

7- DURAN, R. and CROMARTY, R. 1977. *Tilletia indica* : a heterothallic wheat bunt fungus with multiple alleles controlling incompatibility. Phytopathology 67:812-815.

8- FISCHER, G. W., and HOLTON, C. S. 1957. Biology and Control of the Smut Fungi. The Ronald Press Company, New York, 622p.

9- HARGREAVES, J. A., BAILY, A. M. and KEON, J. P. R. 1995. Determinants of parasitism in smut fungi. PP 189-215, IN: K. Kohmoto, U.S. Singh and R. P. Singh (eds.) Pathogenesis and

Host Specificity in Plant Diseases, Histopathological, Biochemical, Genetics, and Molecular Bases. Vol:2, Pergamon, Elsevier Science Ltd., U.K. 407pp.

10- KRISHNA, A. and SINGH, R. S. 1983. Multiple alleles controlling the incompatibility in *Neovossia indica*.Indian Phytopathology 36:746-748.

11- MITRA, M. 1931. A new bunt of wheat in India. Annual Applied of Biology 18: 178-179.

12- NAGARAJAN, S., AUJLA, S. S., NANDA, G. S., SHAEMA, I., GOEL, L. B., KUMAR. j., and SINGH, D. V. 1997. Karnal bunt (*Tilletia indica*) of wheat - a review. Review of Plant Pathology 76:1207-1214.

13- ROYER, M. H. and RYTTER, J. 1985. Artificial inoculation of wheat with *Tilletia indica* from Mexico and India. Plant Disease 69:317-319.

14- TORABI, M., MARDOUKHI, V., and JALIANI, N.1996. First report on the occurrance of partial bunt on wheat in the southern parts of Iran. Iranian Seed and Plant 12: 8-9.

15- YKEMA, R. E., FLOYD, J. P., PALM, M. E., and PETERSON, G. L. 1996. First report of Karnal bunt of wheat in the United Stutes. Plant Disease 80: 1207 (Abstract).

SEXUAL INCOMPATIBILITY SYSTEM IN IRANIAN ISOLATES OF *TILLETIA INDICA*

S.A. Moosavi-Jorf[1], A. Alizadeh[1] , R. Farrokhi-Nejad[2] & N. Safaee[2]

Keywords: *Tilletia indica*, Karnal bunt, Partial bunt, Incom pati - bility, heterothallism, Iran.

SUMMARY

To survey the sexual incompatibility system in Iranian isolates of the causal agent of partial bunt of wheat (*Tilletia indica*) which governs pathogenicity as well, in a Completely Randomized Design with seven replications, paired and nonpaired monosporidial lines were used to inoculate wheat heads in the boot stage. Paired lines which resulted in disease were postulated to be of different mating types(sexually compatible), whereas nonpathogenic pairs were postulated to consist of the same mating type(sexually incompatible). In all cases, nonpaired lines were nonpathogenic. The results of all possible combination of 15 monosporidial lines showed that heterothallism is controlled by at least five postulated alleles at one locus.

---

1. Assistant Professor, Department of Plant Pathology, College of Agriculture of TMU, Tehran Iran.
2. Assistant Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Shahid Chamran University, Ahwaz, Iran.