

بررسی گروههای سازگاری میسلیومی (MCG) در جدایه‌های *Sclerotinia sclerotiorum* از مزارع کلزا استان گلستان

زهرا وکیلی زارچ* - کامران رهنما^۱

تاریخ دریافت: ۸۶/۱۰/۲۳

تاریخ پذیرش: ۸۷/۷/۲۴

چکیده

Sclerotinia sclerotiorum یک عامل بیماری‌زا نکرو تروف با دامنه وسیع میزبانی است و سطح وسیعی از تنوع فنوتیپی درون گونه‌ای را نشان می‌دهد. با توجه به اینکه تشخیص هتروژنی درون گونه‌ای قارچ بر اساس فاکتورهای فنوتیپی محدود می‌باشد، بررسی گروههای سازگاری میسلیومی به عنوان معیار مناسبی برای طبقه بندی و تفکیک هتروژنی درون گونه‌ای معرفی شده است. در این تحقیق ۱۹ جدایه خالص سازی شده *S. sclerotiorum* کلزا بر روی محیط کشت تغییر یافته پاترسون MPM به اضافه ماده رنگی قرمز جفت شدند. در حالت سازگار میسلیومی دو جدایه جفت شده و تشکیل یک پرگنه را دادند، اما در ناسازگاری میسلیومی باتشکیل خط واکنش مشخص به کمک ماده رنگی قرمز در ناحیه واکنش همراه با ناحیه میسلیومی فراوان و یا میسلیومی نازک مشاهده شده و دو جدایه جفت شده توانایی تشکیل هتروکاریون پایدار را ندارند. جفت شدن یک جدایه با خودش به صورت سازگار میسلیومی تلقی شده و ۵ حالت دیگر ناسازگار میسلیومی هم در بین این جدایه‌ها دیده شد. مطالعات میکروسکوپی واکنش میسلیومی جدایه‌ها پیچیده بوده و آنستوموز همیشه در بین جدایه‌های جفت شده مشاهده نشد. در واکنش ناسازگار زوال هیفی مشاهده شد که این مورد در واکنش سازگار مشاهده نگردید. داده‌ها نشان داد که سطح بالایی از ناسازگاری میسلیومی در بین جدایه‌های *S. sclerotiorum* مشاهده می‌شود، که قابل مقایسه با ناسازگاری رویشی است که در آسکومیست‌ها گزارش شده است. این سطح وسیع ناسازگاری نشان می‌دهد که هتروژنی ژنتیکی در داخل این گونه وجود داشته و واکنش سازگاری ناسازگاری میسلیومی روش موثری برای طبقه بندی هتروژنی درون گونه‌ای می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: *Sclerotinia sclerotiorum*، کلزا، سازگاری - ناسازگاری میسلیومی

مقدمه

رویشی داشته و گونه‌های این جنس به وسیله مشخصات مورفولوژی و RFLP (چند شکلی‌های موجود در طول قطعات برش یافته DNA) قابل تفکیک هستند. بررسی‌های سیستماتیکی جهت تشخیص هتروژنی درون گونه‌ای مشکل بوده و با توجه به اینکه تشخیص هتروژنی گروه‌های درون گونه‌ای

قارچ خاکزی *Sclerotinia sclerotiorum* به عنوان عامل بیماری‌زا جهانی تفاوت زیادی در فنوتیپ

۱- به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی و دانشیار گروه گیاهپزشکی دانشکده علوم زراعی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
*نویسنده مسئول
Email: zahra_vakil_1359@yahoo.com

مقایسه با سطح ناسازگاری رویشی است این مورد در آسکومیست‌های دیگر نیز گزارش شده است. ناسازگاری رویشی در دامنه وسیعی از آسکومیست و آنامورف آسکومیست‌ها شامل

Cochliobolus heterostrophus, *Septoria nodorum*, *Aspergillus nidulans*, *Podospora anserina*, *Verticillium dahliae*, *Gibberella fujikuroi*, *Fusarium oxysporium*

شرح داده شده است. همچنین به عنوان ابزار مفیدی برای تشخیص فنوتیپی درون گونه‌ای مانند اختلاف بیماری زایی در جدایه‌های *F. oxysporium* استفاده شده است (۷، ۸).

گروه‌های سازگار میسلومی که احتمالاً از سیستم سازگار رویشی بهره برداری شده از نظر تحرک و جابه جایی هسته (که از طریق جنسی یا رویشی انجام می‌شود) بین گروه‌های سازگار، مشابه گروه‌های سازگار رویشی می‌باشد. البته ناسازگاری میسلومی *Neurospora crassa*، نیز از جهت عدم توانایی اینکه دو استرین جفت شوند و تشکیل هتروکاریون پایداری دهند با ناسازگاری رویشی مرتبط می‌باشد (۶). به علت فقدان موتانت‌های نیت (NIT) جدایه‌ها اهمیت ژنتیکی ناسازگاری رویشی در این گونه ناشناخته مانده زیرا موتانت‌هایی که از نیتروژن استفاده نکنند در این گونه موجود نمی‌باشد و ناسازگاری میسلومی به راحتی قابل بررسی برای ناسازگاری هتروکاریونی در آزمون‌های مکمل نمی‌باشد اما معیارهای مولکولی برای بررسی تنوع و اختلاف ژنتیکی بین و داخل MCG به آسانی موجود است (۷).

جدایه‌های متعلق به یک گروه سازگار میسلومی که روی محیط کشت تعریف شده MPM^۴ کشت داده شده به طرف هم رشد کرده و تشکیل یک پرگنه را می‌دهند این جدایه‌ها دارای یک یا دو باند پروتئینی

قارچ براساس فاکتورهای فنوتیپی گروه‌ها هم چون بیماری زایی و یا پراکنش جغرافیایی محدود می‌باشد، بنابراین وجود معیارهای مستقلی برای تفکیک و طبقه بندی هتروژنی درون گونه‌ای ضروری است (۶، ۷).

آنالیز جدایه‌های جمع آوری شده گیاه کلزا آلوده در اوتاریو تا شمال آلبرتا کانادا نشان داد که این جدایه‌ها از نظر ژنتیکی هتروژن و با تعدادی کلون^۱ قابل تشخیص هستند. این کلون‌ها سبب تفکیک ژنتیکی و جدا سازی ژنوتیپی درون گونه‌ای می‌گردد. تفکیک و جدا سازی کلون‌ها براساس گروه‌های سازگار میسلومی^۲ و انگشت نگاری DNA^۳ صورت گرفته به طوری که همه اعضا یک کلون با هم سازگاری میسلومی دارند و با اعضا کلون‌های دیگر ناسازگاری دارند و همچنین انگشت نگاری DNA یکسانی دارند (۴).

سیستم سازگاری - ناسازگاری میسلومی روش ماکروسکوپی بوده که از روش Self-nonself, self-self جدایه‌ها استفاده می‌کند، که در حالت سازگاری دو جدایه جفت شده و تشکیل یک پرگنه را می‌دهند. اما در حالت ناسازگار پرگنه‌های هر جدایه با تشکیل یک سری از سلولهای مرده بین دو پرگنه قابل تفکیک هستند، این روش در قارچ‌ها معمول بوده و علاوه بر *S. sclerotiorum* در مطالعات قارچ‌های دیگر از جمله *Ophiostoma* و *Cryphonectria parasitica* *ulmi* به عنوان روش مؤثری برای تشخیص و ارزیابی تنوع درون گونه‌ای در جمعیت عامل بیماری زا شناسایی شده است (۸).

تحقیقات نشان داد که سطح بالایی از ناسازگاری میسلومی در بین جدایه‌های قارچ وجود دارد که قابل

1- clone
2- MCG
3- fingerprint

4- Modified Patterson Medium

ولی مبادله ژنتیکی و نو ترکیبی در کنار جهش در ایجاد ژنوتیپ جدید و تنوع ژنتیکی قارچ نقش دارد. هتروژنی درون گونه‌ای را با تعیین گروه‌های سازگار میسلیمی می‌توان بررسی نمود (۶).

علاوه بر آن مقایسه جمعیت قارچ روی گیاه کلزا و میزبان وحشی (*Ranunculus ficaria*) نشان می‌دهد که در میزبان وحشی با اینکه از نظر فنوتیپی مانند نرخ رشد، رنگ پرگنه و ... تنوع وجود دارد ولی تنوع آن از نقطه نظر MCG و انگشت نگاری DNA در مقایسه با کلزا کمتر می‌باشد (۵).

نظریه این که ساختار MCG در میزبان‌های زراعی پیچیده تر می‌باشد بنابراین ممکن است عملیات زراعی نیز روی تکرار و طرح MCG تأثیر گذار باشند و این وسعت و گوناگونی MCG و تکرار آنها بر روی گوناگونی جدایه‌ها و تهاجم MCG در جمعیت قارچ تأثیر گذار است. به طوری که در مطالعات گلخانه‌ای اختلافاتی بین کلون‌ها در تهاجم روی گیاه کلزا دیده شده ولی ارتباطی بین تکرار کلون و تهاجم آن وجود ندارد و به‌طور کلی ساختار جمعیت عامل بیماریزا و گوناگونی در تهاجم جدایه‌ها ممکن است در سیستم مدیریت بیماری قابل توجه باشد (۴،۵،۸).

بررسی جدایه‌های قارچ عامل بیماری ساقه سفید مزارع کلزا استان گلستان از نظر رشد، تولید آپوتسیم و بیماریزایی، تفاوت‌هایی را در جدایه‌ها مشخص ساخت (۱،۲). با توجه به اینکه تفاوت جدایه‌ها از نظر رشد، تولید آپوتسیم و بیماریزایی نشان دهنده تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای قارچ می‌باشد و تشخیص هتروژنی درون گونه‌ای قارچ بر اساس فاکتورهای فنوتیپی محدود می‌باشد به منظور بررسی هتروژنی درون گونه‌ای قارچ از سیستم سازگاری - ناسازگاری میسلیمی به روش ماکروسکوپی و میکروسکوپی استفاده شد، که استفاده از این سیستم به

یکسان مربوط به آن MCG می‌باشند و تنوع آنها مربوط به یک تا پنج باند هیبریدی است. اما جدایه‌های مربوط به MCG مختلف دارای تنوع مولکولی بیشتری بوده و در بیشتر از پنج باند هیبریدی نیز اختلاف دارند (۳،۱۰).

با توجه به اینکه جمعیت *S sclerotiorum* مخلوط هتروژنی از MCG است و طبق تحقیقات انجام شده در گیاهانی چون کلزا در کانادا، سبزیجات در نورژین و آفتابگردان در مانتوبا و کلم در شمال کارولینا و سویا در آرژنتین و کانادا دیده شده، بررسی سازگاری یا ناسازگاری میسلیمی ممکن است روش مؤثری برای طبقه بندی هتروژنی درون گونه‌ای قارچ باشد، و برای مطالعات بیولوژی و تنوع جمعیت و عامل بیماریزا قابل استفاده می‌باشد (۵،۸).

MCG و کلون‌ها در مسافت طولانی گسترش یافته و تحقیقات نشان داده که در هر مزرعه کلزا هم ممکن است تعداد زیادی کلون قارچ وجود داشته باشد که تعداد کمی از آنها به طور مکرر و طی چند سال به دست می‌آیند در صورتی که تعداد بیشتری از آنها یک یا دو بار به صورت محلی اتفاق می‌افتند و این نشان می‌دهد که MCG ممکن است در پراکنش وسیع در تکرار بالا وجود داشته باشد همان طور که در جدایه‌های مزارع کلزا در استان‌های اونتاریو، مانتوبا و ساسکاچوان کانادا بررسی شده است (۳،۴).

بررسی‌ها نشان داده با اینکه *S sclerotiorum* یک قارچ جور ریشه بوده و تولید مثل جنسی به وسیله خود باروری و تشکیل آپوتسیم و آسکوسپور هوازی و تولید مثل غیر جنسی با تشکیل اسکلرت است، که این روش‌های تولید مثلی می‌تواند به حفظ ژنوتیپی کمک کند و سبب محدودیت تغییر پذیری ژنتیکی گردد

دمای اتاق (22°C) به مدت ۷ روز کشت شده، استفاده گردید. سپس بلوک‌های ۵ میلی متری از حاشیه رشد پرگنه در فاصله ۳/۵ سانتیمتر از جدایه دیگر درشتک پتری ۹ سانتی متری روی محیط MPM در دمای اتاق قرار گرفت. جدایه‌ها در ۴ تکرار در مقابل جدایه دیگر قرار گرفته و واکنش جفت شدن طی ۷ و ۱۴ روز مورد بررسی قرار گرفت.

جفت شدن میسلیمی به منظور مطالعه میکروسکوپی اسلایدهای شیشه‌ای میکروسکوپی با لایه نازک MPM یا WA پوشیده شد و سپس درشتک پتری سترون روی کاغذ صافی قرار گرفت. در شرایط سترون روی هر لام شیشه‌ای بلوک‌های آگار ۵ میلی متری از جدایه‌ها به فاصله ۱/۵ سانتی متر از هم قرار گرفت. سپس کاغذ صافی با گلیسرول ۵٪ برای حفظ رطوبت اشباع شد و در شرایط تاریکی و دما 22°C قرار گرفت. برای هر جفت شدن نیز ۵ تکرار در نظر گرفته شد. و اسلایدها پس از ۴، ۷ و ۱۴ روز با قرار دادن یک لامل روی بلوک آگار با میکروسکوپ مورد ارزیابی قرار گرفتند (۶).

نتایج و بحث

ارزیابی ماکروسکوپی جفت شدن میسلیمی نتایج حاصل از جفت شدن میسلیمی ۱۹ جدایه در شکل ۱ آمده است، جدایه‌ها در حالت سازگار به صورت مربع شکل و در حالت ناسازگار به صورت دایره شکل که البته با توجه به نوع ناسازگاری حالات مختلف شکلی نمایان می شود (به صورت مربع خالی، دایره خالی، کاملاً پریا متقاطع). خط قرمز موجود در ناحیه واکنش در تعدادی از جفت شدن ناسازگار به علت جمع شدن ماده رنگی قرمز در ناحیه واکنش و تا حدودی به علت وجود عناصر رنگی در سیتوپلاسم هیف می باشد.

منظور مطالعه ساختار جمعیت بیمارگرو گوناگونی در بیماریزی جدایه‌ها در سیستم مدیریت بیماری قابل استفاده است و تعیین سازگاری-ناسازگاری میسلیمی جدایه‌های قارچ *S. sclerotiorum* اولین بررسی در این زمینه در کشور می باشد.

مواد و روش‌ها

در طی فصل زراعی گیاه کلزا نمونه برداری از اول فروردین ماه ۱۳۸۳ شروع و تا تیرماه از مزارع مختلف استان گلستان ادامه یافت. بعد از جدا سازی و خالص سازی جدایه‌های قارچی در محیط سیب زمینی دکستروز آگار و آب آگار، ۱۹ جدایه از مناطق مختلف استان گلستان به دست آمد، که از این جدایه‌ها در بررسی سازگاری ناسازگاری میسلیمی استفاده گردید (جدول ۱).

تعیین سازگاری میسلیمی جدایه‌های *S. sclerotiorum*

محیط کشت ماده رنگی قرمز MPM+

برای تعیین سازگاری میسلیمی از محیط کشت MPM با تغییراتی (بدون ماده رنگی McCormack) شامل ۰/۶۸ گرم KH_2PO_4 ، ۰/۵ گرم $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۰/۱۵ گرم KCl، ۰/۵ گرم عصاره مخمر، ۱ گرم NH_4NO_3 ، ۱۸/۴۰ گرم D گلوکز، ۰/۲ میلی لیتر محلول عناصر ترانس (کود مایع ازته)، ۱۵ گرم آگار و ۱ میلی لیتر از محلول رنگی قرمز خوراکی (شرکت Abias شیمی) برای هر لیتر استفاده شد. هر جدایه قبل از استفاده برای جفت شدن، ابتدا در این محیط کشت قرار داده شد. لازم به ذکر است که محلول رنگی قرمز برای تفکیک محیط کشت از سایر محیط کشت‌ها و مهمتر از آن با جمع شدن در ناحیه واکنش به عنوان نشانه برای تفکیک انواع ناسازگاری استفاده شد (۶).

جفت شدن میسلیمی به منظور مطالعه ماکروسکوپی

برای این مورد از جدایه‌هایی که در محیط MPM در

شکل ۱- سازگاری - ناسازگاری میسلیومی در بین ۱۹ جدایه قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* پس از تلاقی با یکدیگر از مزارع استان گلستان

	Ss1	Ss3	Ss4	Ss5	Ss7	Ss12	Ss14	Ss2	SsAR	Ss-8	Ss16	Ss20	Ss19	Ss11	Ss8	Ss13	Ss5	Ss7K	Ss1C
Ss1	■	○	○	○	○	○	○	○	□	●	—	□	○	○	○	●	●	□	○
Ss3		■	○	○	○	○	○	○	●	●	○	□	○	○	○	●	●	□	○
Ss4			■	□	○	○	○	□	●	●	○	□	□	○	○	○	○	○	○
Ss5				■	○	○	○	—	●	○	○	○	□	□	○	○	●	○	□
Ss7					■	○	○	○	○	●	○	○	□	○	○	○	●	○	□
Ss12						■	○	○	○	○	○	□	○	○	○	○	●	○	□
Ss14							■	○	●	○	○	●	○	○	○	○	●	○	○
Ss2								■	●	—	○	□	□	□	□	□	○	○	○
SsAR									■	●	—	○	○	○	○	○	○	○	○
Ss18										■	—	○	○	○	○	○	○	○	○
Ss16											■	□	○	○	○	○	○	○	○
Ss20												■	○	○	○	○	○	○	○
Ss19													■	○	○	○	○	○	○
Ss11														■	○	○	○	○	○
Ss8															■	○	○	○	○
Ss13																■	○	○	○
Ss6																	■	○	○
Ss2K																		■	○
Ss1C																			■

■ واکنش سازگار و تشکیل یک پرگنه توسط دو جدایه □ وجود خط قرمز مشخص روی سطح پرگنه و برعکس بعد از گذشت ۷ روز، ○ وجود خط قرمز مشخص تنها در پشت پتری و نواحی میسلیومی فراوان روی سطح پرگنه ⊗ وجود خط قرمز روی سطح پرگنه و برعکس با فضا آزاد میسلیومی در ناحیه واکنش ● وجود باند مشخص و فراوان میسلیوم هوایی با صورت خط ضخیم در ناحیه واکنش، ⊖ وجود باند نازک میسلیوم تقریباً بصورت خط در ناحیه واکنش

جدول ۱- مشخصات جدایه‌های *S.sclerotiorum* جمع آوری شده از مزارع کلزا استان گلستان

منطقه جمع آوری	تاریخ جمع آوری	کد جدایه
کردکوی	۸۳/۲/۲۰	Ss1
جاده قدیم کردکوی	۸۳/۲/۲۱	Ss7
جاده کردکوی	۸۳/۲/۲۰	Ss3
جاده کردکوی	۸۳/۲/۲۱	Ss4
جاده کردکوی	۸۳/۲/۲۰	Ss5
گرگان	۸۳/۲/۲۵	Ss2
گرگان	۸۳/۲/۳۰	SsAR
آق قلا	۸۳/۳/۱۰	Ss12
بندر ترکمن	۸۳/۳/۱۰	Ss14
علی آباد	۸۳/۳/۱۲	Ss16
فاضل آباد	۸۳/۳/۱۲	Ss8
علی آباد	۸۳/۳/۱۲	Ss20
جاده مینو دشت	۸۳/۳/۱۵	Ss11
جاده گنبد	۸۳/۳/۱۵	Ss19
جاده کلاله	۸۳/۳/۲۰	Ss1C
جاده کلاله	۸۳/۳/۲۰	Ss6
مینودشت	۸۳/۳/۲۰	Ss18
گالیکش	۸۳/۳/۲۰	Ss13
جاده کلاله	۸۳/۳/۲۰	Ss2K

۴- زمانی که خط قرمز مشخصی دیده نشد اما یک باند مشخص و فراوان از میسلیم هوایی به صورت خط ضخیم در ناحیه واکنش مشاهده گردید (دایره تو پر، شکل ۶).

۵- زمانی که خط قرمز مشخصی دیده نمی شود ولی یک باند نازک میسلیم تقریباً به صورت خط در ناحیه واکنش مشاهده شد (دایره \ominus شکل ۷). از ۱۹ جدایه آزمایش شده حالات مختلف ناسازگاری دیده شد و در حالت self-self به صورت سازگار بودند. سپس بعد از ۷ یا ۱۴ روز جفت شدن‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

در جدایه Ss6 از ۵ حالت ناسازگار تنها ۲ حالت دیده شده شامل (دایره تو پر و دایره \ominus) که بیشترین حالت ممکن هم به صورت باند مشخص و فراوان از میسلیم هوایی به صورت خط ضخیم در ناحیه واکنش است (دایره تو پر) علاوه بر آن در جدایه Ss14 نیز حالتی از خط قرمز مشخص روی سطح پرگنه و برعکس (مربع خالی) دیده نشد و در

جفت شدن زمانی به عنوان سازگار تلقی می شود که ۲ جدایه تشکیل یک پرگنه را داده بدون این که ناحیه واکنش واضحی بین دو جدایه دیده شود (مربع تو پر، شکل ۲).

در جفت شدن ریشه‌های ناسازگار چندین حالت در بین جدایه‌های مختلف توصیف گردید شامل:

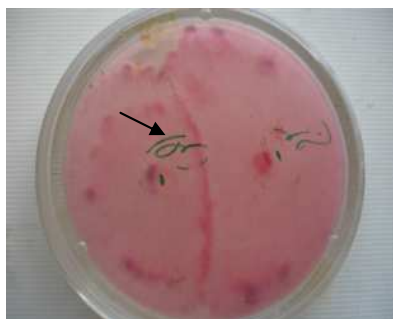
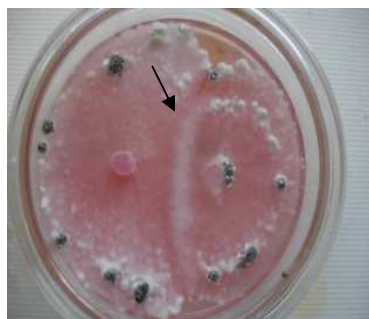
۱- زمانی که بعد از گذشت ۷ روز از کشت ۲ جدایه مورد آزمایش خط قرمز مشخصی روی سطح پرگنه و در حالت برعکس پرگنه نمایان شد (مربع خالی، شکل ۳)

۲- زمانی که خط قرمز تنها در حالت برعکس پرگنه دیده می شود و روی سطح پرگنه نیز نواحی میسلیمی فراوان در ناحیه واکنش مشاهده گردید (دایره خالی، شکل ۴).

۳- زمانی که خط قرمز روی پرگنه و در حالت برعکس پرگنه (از پشت پتری) دیده می شود البته فضا آزاد میسلیمی در ناحیه واکنش مشاهده شد (دایره متقاطع، شکل ۵).



شکل ۳- ناسازگاری میسلیمی جدایه $Ss_2 \times Ss_{13}$ ، وجود خط قرمز در سطح پرگنه و برعکس (پشت پتری) در ناحیه واکنش در محیط MPM+ ماده رنگی قرمز غذایی، پس از گذشت ۷ روز



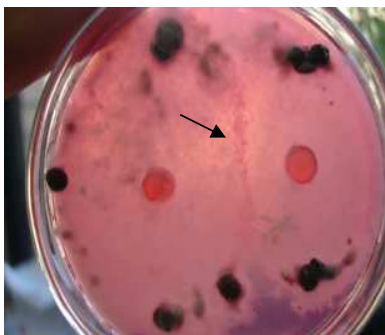
شکل ۴- ناسازگاری میسلیمی جدایه $Ss_{2K} \times Ss_{1C}$ ، وجود ناحیه میسلیمی فراوان در سطح پرگنه قارچ و خط قرمز پشت پرگنه در ناحیه واکنش روی محیط MPM+ ماده رنگی قرمز غذایی، پس از گذشت ۱۴ روز

جدایه‌های Ss_8, Ss_{18} حالتی از فضا آزاد میسلیمی (دایره متقاطع) مشاهده نشد. در ۱۲ جدایه از ۱۹ جدایه مورد آزمایش ($Ss_7, Ss_5, Ss_4, Ss_3, Ss_1$) ناسازگاری دیده شد.

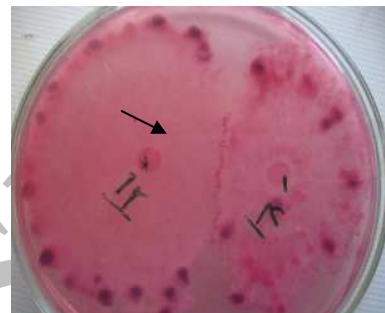
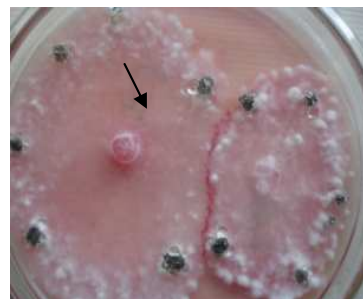


شکل ۲- سازگاری میسلیمی جدایه $Ss_{13} \times Ss_{13}$ در محیط MPM + ماده رنگی قرمز غذایی، پس از گذشت ۷ روز





شکل ۷- ناسازگاری میسلیمی جدایه $Ss7 \times Ss13$ ، وجود باند نازک میسلیمی تقریباً به صورت خط در ناحیه واکنش روی محیط $MPM+$ ماده رنگی قرمز غذایی، پس از گذشت ۷ روز



شکل ۵- ناسازگاری میسلیمی جدایه $Ss4 \times Ss12$ ، وجود خط قرمز در سطح و برعکس پرگنه قارچ با فضای آزاد میسلیومی در ناحیه واکنش روی محیط $MPM+$ ماده رنگی قرمز غذایی، پس از گذشت ۱۴ روز

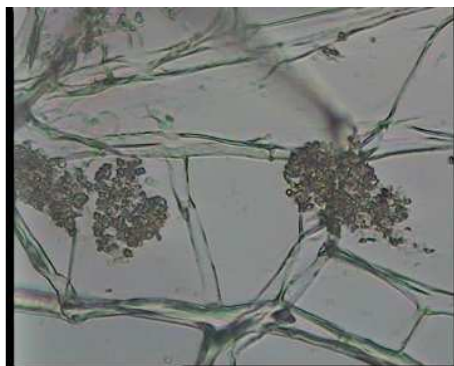


شکل ۶- ناسازگاری میسلیمی جدایه $Ss7 \times Ss2$ ، وجود باند مشخص و فراوان از میسلیوم به صورت خط ضخیم در ناحیه واکنش در محیط $MPM+$ ماده رنگی قرمز غذایی، پس از مدت ۱۴ روز

ارزیابی میکروسکوپی جفت شدن میسلیومی با رشد هیف از مرکز یک پرگنه به طرف ناحیه واکنش می توان ارزیابی نمود که آیا آناستوموز بین پرگنه های جفت شده وجود دارد و یا ترکیب درون پرگنه بدون ایجاد آناستوموز انجام می شود. در حالت واکنش سازگار دو پرگنه، آناستوموز بین پرگنه ها همیشه مشاهده نمی شود و در واکنش سازگار (self-self) یک پرگنه به سادگی روی پرگنه دیگر ظاهر شده بدون این که ترکیب هیفی مشخصی داشته باشند و در صورت ایجاد آناستوموز به صورت ترکیب مستقیم یا پیچیدن یک هیف به دور هیف به صورت حلقه های فراوان دیده می شود (شکل ۸).

در تعدادی از جفت شدن سازگار آناستوموز توسط تشکیل خوشه از هیف اصلی در نقطه ترکیب مشخص می گردد (شکل ۹). در جفت شدن ناسازگار نیز آناستوموز غالباً مشاهده نشده و در صورت تشکیل نیز شبیه به حالت سازگار بصورت پیچاپیچ یک هیف به دور دیگری است (شکل ۸). در هر دو حالت سازگار یا ناسازگار ساختمانی شبیه نردبان در آناستوموز پرگنه ها مشاهده شد (شکل ۱۰).

همچنین در هر دو حالت سازگار و ناسازگار گاهی تیپ هیفی در تعدادی جدایه ها به مرحله میکروکنیدیوزنسیس اختصاص داده شد. به خصوص در آنهایی که در حالت



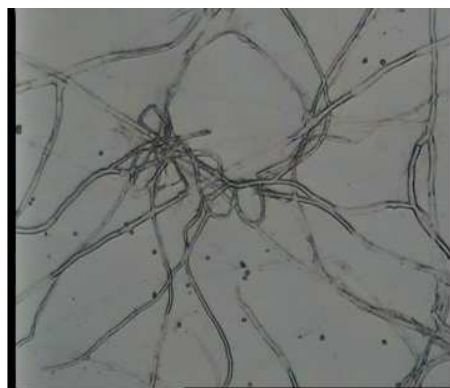
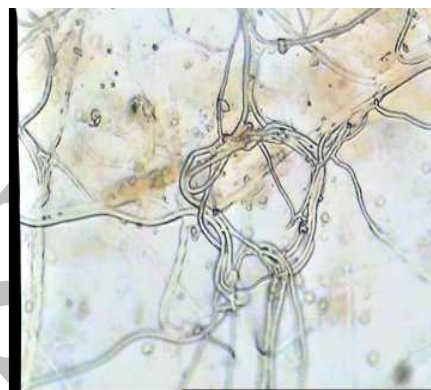
شکل ۹- سازگاری میسلیمی جدایه $Ss8 \times Ss8$ (سمت راست) و $Ss2 \times Ss2$ (سمت چپ) به صورت تشکیل خوشه پس از گذشت ۳ روز ($\times 100$)



شکل ۱۰- سازگاری میسلیمی جدایه $Ss3 \times Ss3$ به صورت ساختمان شبیه نردبان پس از گذشت ۳ روز

ماکروسکوپی در ناحیه واکنش نواحی میسلیمی فراوانی دیده شده است (شکل ۱۱).

تبدیل تیپ هیفی به تیپ تولید کننده میکرو کنیدیوم که سبب تولید اسپرمودوکیوم حاوی اسپرماتی می شود علت اصلی ناتوانی برای آناستوموز در حالت سازگار و یا ناسازگار می باشد (شکل ۱۲، ۱۳)

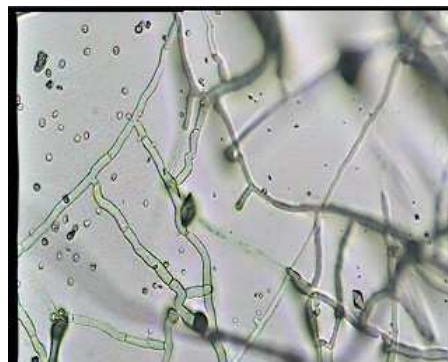


شکل ۸- سازگاری میسلیمی جدایه $Ss5 \times Ss5$ (سمت راست) و ناسازگاری میسلیمی جدایه $Ss8 \times Ss12$ (سمت چپ) به صورت پیچاپیچ هیفها و تشکیل حلقه‌های فراوان پس از گذشت ۳ روز ($\times 100$)

روش ماکروسکوپی و میکروسکوپی با توجه به شکل ۱ مشاهده گردید که جدایه‌های قارچ مذکور ناسازگار بوده و توانایی تشکیل یک پرگنه را ندارند و انواع ناسازگاری را تشکیل می‌دهند و این ناسازگاری میسلومی جدایه‌ها نشاندهنده هتروژنی ژنتیکی داخل گونه‌ای قارچ می‌باشد و واکنش سازگاری ناسازگاری میسلومی می‌تواند به عنوان روش موثر طبقه بندی هتروژنی درون گونه‌ای باشد.

اگر چه در تعداد زیادی از آسکومیست‌ها برای مثال *Ophiostom ulmi* (عامل بیماری زوال نارون) و *Cryphonectria parasitica* (بیماری خشکیدگی شاه بلوط) یک خط واکنش واضح نتیجه حتمی از جفت شدن میسلومی ناسازگار است ولی در *S.sclerotiorum* انواع ناسازگاری وجود دارد، که در همه آن‌ها خط واکنش مشخص نمی‌باشد و در برخی از انواع ناسازگاری نیز در صورت استفاده از محیط کشت اصلاح شده با ماده رنگی قرمز خوراکی خط واکنش دیده می‌شود. مشخصات میکروسکوپی سازگاری ناسازگاری میسلومی نیز پیچیده بوده به طوری که در ناسازگاری زوال هیفی در یک جدایه و یا در ناحیه واکنش مربوط به دو جدایه دیده می‌شود. به خصوص در مورد ناسازگاری که در حالت ماکروسکوپی به صورت فضای آزاد میسلومی در ناحیه واکنش می‌باشد برای مثال Ss12 با جدایه‌های (Ss2، SsAR، Ss3 و Ss4 و Ss13). ممکن است آناتوموز به صورت ترکیب مستقیم، پیچایی ریشه‌ها و تشکیل حلقه‌های فراوان و یا ساختمان شبیه نردبان و غیره باشد. اما به طور یقین در همه واکنش‌های سازگار ناسازگار این قارچ آناتوموز دیده نمی‌شود اما در قارچ‌های دیگر مثل *Neurospora* به طور حتمی آناتوموز در حالت واکنش رویشی سازگار به صورت proliferation (رشد سریع سلول) و در حالت ناسازگار به صورت deterioration (زوال) می‌باشد (۶).

از جمله علل کمبود و یا عدم آناتوموز درون گونه‌ای



شکل ۱۱- تبدیل تیپ هیفی به تولیدکننده میکروکنیدیوم و تولید اسپرماتی در جدایه Ss5 پس از گذشت ۱۴ روز



شکل ۱۲- تولید اسپرمودوکیوم در سازگاری بعد از گذشت ۱۴ روز (Ss6×Ss6 (×۱۰۰)



شکل ۱۳- ناسازگاری میسلومی جدایه Ss2×Ss5 به صورت تبدیل تیپ هیفی به تولیدکننده میکروکنیدیوم و تولید اسپرمودوکیوم پس از گذشت ۱۴ روز (×۱۰۰)

در سازگاری میسلومی جدایه‌های *S. sclerotiorum* به

مقایسه با سازگاری - ناسازگاری رویشی به عنوان روش موثر برای طبقه بندی هتروژنی درون گونه‌ای قارچ *Sclerotium sclerotiorum* می‌باشد همان طور که در مورد قارچ‌های دیگر مانند *Ophiostoma ulmi* و *Cryphonectria parasitica* هم استفاده می‌شود.

به‌طور کلی سطح ناسازگاری میسلیمی و عدم ترکیب هیفی بین جدایه‌ها در *S. sclerotiorum* منعکس کننده هتروژنی درون گونه‌ای قارچ می‌باشد و مطالعات انجام شده توسط باردین و هونگ (۴) در مزارع کلزا کشور کانادا در نواحی مختلف هم نشان داده که این قارچ هتروژنیک بوده و تغییرات ژنتیکی فراوانی در میان جدایه‌های مزارع کلزا وجود داشته است به طوری که جمعیت این قارچ در مزارع کشور نروژ در اروپا از جمعیت جدایه‌های قارچ موجود در مزارع کلزا کشور کانادا کاملاً متفاوت است.

اگر چه این مسئله وجود دارد که آیا این تنوع ژنتیکی نتیجه تولید مثل جنسی و یا در ارتباط با سایر عوامل محیطی است، زیرا تبادل (بخصوص در سیستم آسکوژن در تولید مثل جنسی) و نو ترکیبی در کنار جهش در این تنوع ژنتیکی نقش دارند. که البته تولید مثل جنسی هموتالیک در *S. sclerotiorum* امکان نو ترکیبی را کاهش می‌دهد و علاوه بر تولید آپوتسیم توسط قارچ و انتشار آسکوسپورها و وجود اندام مقاوم اسکروت در خاک، مواردی از جمله تاریخچه کاشت محصول، میکرو و ماکرو کلیما و پراکنده سازی بذرهاى آلوده به اسکروت و حتی میسلیم قارچ در پوسته بذر توسط فعالیت انسانی نیز می‌تواند در توزیع و پراکنش MCG قارچ نقش داشته باشد (۷).

باردین و هونگ (۴) نیز عوامل متعددی مانند عملیات کشاورزی، آب آبیاری، حرکت ماشین آلات کشاورزی و نوع بذر را در تغییرات جمعیت قارچ در خاک تأثیرگذار دانسته اند و علت تنوع MCG قارچ در میان گیاه کلزا در مقایسه با میزبان وحشی (*Ranunculus ficaria*) را به علت

این قارچ: ۱- در حالت واکنش فضای آزاد میسلیمی بیش تر زوال هیفی در یک جدایه و یا در ناحیه واکنش مربوط به دو جدایه دیده می‌شود. ۲- در واکنش برخی جدایه‌ها نیز تبدیل تیپ هیفی به حالت تولید کننده میکروکنیدیوم سبب ناتوانی در آناستوموز می‌شود و این حالت در واکنش ناسازگار بیشتر از سازگار دیده می‌شود. اگرچه فاکتورهایی چون کمبود مواد غذایی و یا تماس با سطح خارجی برای مثال میسلیم دیگر، آگار خیلی خشک و یا در لام‌های مسن تر (بیش تر از ۱۴ روز) تأثیر زیادی در روند تبدیل شدن تیپ هیفی به تولید کننده میکروکنیدیوم دارد (۶). به طوری که به فاصله سلول انتهایی شاخه‌های تولید کننده اسپرماتی ایجاد می‌شود و این اسپرماتوفرها اغلب شاخه شاخه شده و تشکیل اسپرمودوکیوم پیچیده‌ای را می‌دهد. اگرچه پاترسون و گروگان (۹) تولید کننده میکروکنیدی در ناحیه واکنش را از علائم ناسازگاری میسلیمی این قارچ ذکر نموده، ولی در آزمایشات مشخص شده که تولید میکروکنیدی در هر دو حالت جفت شدن سازگار و ناسازگار دیده می‌شود و تولید میکروکنیدی تنها به عنوان ملاک ضعیف برای ناسازگاری میسلیمی در *S. sclerotiorum* می‌باشد که این نتایج با نتایج کوهن و همکاران (۶) تطابق کامل دارد، این محقق همچنین در بررسی‌های خود به این نتیجه رسیده بود که سازگاری رویشی و تشکیل هتروکاریون (وجود هسته‌هایی از تیپ‌های مادری مختلف در داخل یک سیتوپلاسم) به علت فقدان پروپاگول تک هسته‌ای و وجود پروتوپلاست بزرگ و چند هسته‌ای در قارچ *S. sclerotiorum* امکان پذیر نبوده و علاوه بر آن به علت فقدان موتانت‌های نیت جدایه‌ها در این گونه قارچ اهمیت ژنتیکی ناسازگاری رویشی در این گونه ناشناخته مانده، زیرا موتانت‌هایی که از نیتروژن استفاده نکنند در این گونه موجود نمی‌باشد (۱۰).

بنابراین واکنش سازگاری - ناسازگاری میسلیمی در

عملیات کشاورزی ذکر نموده اند.

براساس مطالعات انجام شده به نظر می‌رسد هر دو گروه جدایه مربوط به مناطق سردسیر (کانادا) و جدایه‌های مناطق گرمسیر در میان جدایه‌های قارچ عامل بیماری جدا شده وجود دارد. در نتیجه این احتمال وجود دارد که جدایه‌های موجود در این تحقیق و سایر جدایه‌های مورد آزمایش در این چند سال اخیر از طریق بذر کلزا وارداتی آلوده به اسکروت به مزارع کلزا کشور راه یافته اند، و بدین شکل خسارت و آسیب وارده در مزارع برخی از سال‌ها متناسب با شرایط آب و هوایی منطقه متفاوت ظاهر می‌گردد. وجود آلودگی در مزارعی که کلزا اولین بار در آن کشت شده است از جمله مسائل بسیار مهم و پیچیده است که لازم است در این مورد در آینده بررسی‌های بیشتری انجام گیرد.

نظر به این که از ۱۹ جدایه جمع آوری شده از مزارع کلزا در استان گلستان ۱۲ جدایه ظاهراً مشخصات انواع ناسازگاری را نشان می‌دهند که می‌تواند مسئله شاخص ژنتیکی را به صورت هتروژنی عنوان نماید، ضمن این که می‌توان پیش بینی نمود نظر به توسعه کشت کلزا در استان در آینده نزدیک از طریق پدیده آناستوموز کلون‌های جدیدی تشکیل شوند که از نظر خصوصیات ژنتیکی کاملاً متنوع از اجداد قبلی باشند و اینکه در این میان اپیدمی‌های جدید با شدت بیماری‌زایی بیشتر از گذشته، همراه با پراکنش MCG تشکیل شود، امکان آن وجود دارد. زیرا وسعت و گوناگونی MCG بر روی گوناگونی جدایه‌ها و تهاجم جمعیت قارچ تأثیرگذار است (۵،۶). به ویژه این که

منابع

- ۱- وکیلی زارچ، ز.، ک، رهنما، و.ا.، بهمرام. ۱۳۸۵. ارزیابی واکنش ارقام کلزا در برابر ۴ جدایه *Sclerotinia sclerotiorum* در استان گلستان. خلاصه مقالات هفدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. ص ۲۴۰.
- ۲- وکیلی زارچ، ز.، ک، رهنما، س.ا.، رضوی. و.م، صلاتی. ۱۳۸۵. تأثیر دما بر رشد میسلومی و تولید اسکروت جدایه‌های قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* از مزارع کلزا استان گلستان. خلاصه مقالات هفدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. ص ۲۷۱.
3. Atallah , Z.K. , B. Larget ., X. Chen., and D.A .Johnson. 2004 . High genetic diversity , phenotypic uniformity , and evidence of outcrossing in *Sclerotinia sclerotiorum* in the Columbia Basin of Washington State . *Phytopathol.* 94:237-242
4. Bardin , S.D. and H.C. Huang . 2001 . Research on biology and control of *Sclerotinia* Disease in Canada. *Pl.Pathol.* 23:88-98 .
5. Cubeta , M.A. , B.R. Cody., Y. kohli and L.M .kohn. 1997 . Clonality in *Sclerotinia sclerotiorum* on infected cabbage in eastern North Carolina . *Phytopathol.* 87:1000-1004 .
6. Kohn, L.M. , L. Carbone. and J.B. Anderson. 1990 . Mycelial interactions in *S.sclerotiorum*. *Experimental Mycology.* 14:255-267.
7. Kohn , L.M. , E .Stasovski. , I. Carbone., J.Royer and J.B .Anderson. 1991 . Mycelial in compatibility and molecular markers indentify genetic variability in field populations of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathol.* 81:480-485.
8. Kull , L.S. , W.L. Pederson. , D. palmquist. and G.L .Hartan. 2004 . Mycelial compatibility grouping and aggressivenss of *S.sclerotiorum*. *Plant Dis.* 88:325-332.
9. Patterson , C.L. and R.G. Grogan . 1985 . Differences in epidemiology and control of lettuce drop caused by *Sclerotinia sclerotiorum* and *Sclerotinia minor* . *Plant Dis.* 69:766-770.
10. Phillips , D.V., I .Carbone., S.E.Gold., and L.M. khon. 2002. Phylo- geography and genotype – symptom associations in early and Late season infections of canola by *Sclerotinia sclerotiorum* .*Phytopathol.* 92:785-793.

Study on mycelial compatibility of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates from Canola field of Golestan

Z.Vakili zarej* - K.Rahnama¹

Abstract

Sclerotinia sclerotiorum is the causal necrotroph pathogen with wide host range and showed various phenotypic intraspecies variability. Considering to difficult identification of intraspecies heterogeneity on the basis of phenotypic factors, compatible mycelium groups introduced as an appropriate tool for classification and intraspecies heterogeneity distinction. In this research, 19 fungal isolates purified from canola and paired on modified patterson,s medium (MPM) with red food colour. Pairings were scored as compatible when isolates merged to form one colony but mycelia incompatibility pairings resulted in an interaction zone in which a distinct reaction line and abundant aerial mycelia or thin mycelial were observed. But, incompatible mycelial with occurrence of interaction zone by red food colour in reaction zone on medium showed there is no potential of heterokaryon to be stable when two isolates were paired. All pairings of self isolates were compatible and five mycelial incompatible groups in isolates observed. Microscopically, mycelial interactions in pairings of isolates were complex. Anastomosis between paired isolates was not always observed. Incompatible pairings were followed by hyphal deterioration, that was not observed in compatible interaction. The result showed that a high level of mycelial incompatibility exists among isolates of *S. sclerotiorum*, comparable to level of vegetative incompatibility reported in other ascomycetes. The extent of mycelial incompatibility indicates that the genetic heterogeneity exists within the species and the mycelial compatibility- incompatibility reactions may be an effective way of categorizing intraspecific heterogeneity.

Key words: *Sclerotinia sclerotiorum*, Canola, mycelial compatibility- incompatibility

*- Coressponding author Email: zahra_vakil_1359@yahoo.com

1- Contributio from Collrge of Gorgan University of Agriculral Sciences and Nutural Resources