Archive of SID

بیماریهای گیاهی، جلد ٤٢، ١٣٨٥

تولید شکل جنسی *Rhizoctonia solani* در شرایط آزمایشگاهی

Formation of teleomorph in isolates of *Rhizoctonia solani* under laboratory conditions

ایمان هادی‌زاده، ضیاءالدین بنی‌هاشمی*

بخش گیاهپزشکی- دانشکده کشاورزی- دانشگاه شیراز

دریافت ١٣٨٤/٧/٦ پذیرش ١٣٨٥/٢/١٣

چکیده

بمنظور بدست آوردن روشی قابل اعتماد و تکرار پذیر جهت تولید شکل جنسی و اسپوردهی در جدایه‌های ریزوکتونیا چهار روش: پوشاندن سطح محیط کشت با خاک، انتقال از محیط کشت غنی به محیط ضعیف، استفاده از ترکیبات تولید کننده قارچ ایستایی، تولید اندام جنسی در سطح آب و مایه‌زنی به ساقه گیاه بکار گرفته شد. در این تحقیق از هفده جدایه چند هسته‌ای *Rhizoctonia solani* متعلق به یازده گروه مختلف آناستوموزی، همچنین ٩ جدایه متعلق به میزبانهای مختلف استفاده شد. اندام‌های باروری، شامل دسته‌های خوشه‌ای کوچکی از بازیدیوم و بازیدیوسپور فقط در جدایه‌های متعلق به گروه‌های آناستوموزی AG-3 ،AG-1، AG-4 و زیرگروه AG-1-I-C ، با استفاده از روش انتقال از محیط کشت غنی(محیط رشد اولیه) به محیط کشت فقیر (محیط مخصوص اسپوردهی) و تحت دوره متناوب نور و تاریکی (١٢ ساعت روشنایی و ١٢ ساعت تاریکی) ایجاد گردید. دسته‌های بازیدیومی (basidia clusters) در داخل و روی محیط کشت و در مواردی در پشت درب تشتک پتری تشکیل شدند.

* مسئول مکاتبه

www.SID.ir

Archive of SID

بازیدیوسپور حدودا ۱۴ الی ۲۰ روز بعد از انتقال مشاهده گردید و تولید آنها ۱۵ تا ۱۷ روز ادامه داشت. مشخصات اندام‌های باردهی قارچ (بازیدیوم وبازیدیوسپور) با مشخصات گونه *Thanatephorus cucumeris* مطابقت داشت. جدایه متعلق به AG-1-I-C نسبت به سایر جدایه‌ها قادر به تولید تعداد بیشتری هیمینیوم وبازیدیوسپور (دسته‌های بازیدیومی) بودند. اندام باردهی بر روی محیط کشت TWA (tap water-agar) بوجود آمد، اما بر روی محیط کشت SEA (soil extract agar) هیچ گونه بازیدیوم یا بازیدیوسپوری دیده نشد. روش موفق بکار گرفته شده، روشی تکرار پذیر بود و در طی ۳ بار تکرار آزمایش، بازیدیوسپور در هر چهار جدایه تولید شد. در سایر روش‌ها، اندام‌های شبیه بازیدیوم، شاخه شاخه شدن شدید ریسه‌ها و تولید سلولهای تسبیحی و رشد متراکم قارچ مشاهده شد اما بازیدیوسپور دیده نشد.

واژه‌های کلیدی: ***Thanatephorus cucumeris*، *Rhizoctonia solani*، Anastomosis group، basidium و basidiospore**

مقدمه

امروزه بدلیل اهمیت گونه‌های *Rhizoctonia* بعنوان بیمارگرهای گیاهی، روشهای دقیق و مناسبی جهت شناسایی بسیاری از گروههای ریزوکتونیا توسعه یافته که براساس خصوصیات ریزساختاری، رفتار آناستوموزی، بیولوژی ملکولی و اطلاعات مربوط به شکل جنسی می‌باشد (Cubeta *et al.* 1991, Parmeter, *et al.* 1969, Sneh & Ogoshi, 1996, Ogoshi 1987, Vilgalys & Cubeata, 1994). مطالعات متمرکز انجام شده از این قبیل نشان داد که علاوه بر گونه‌های مورد توجه بالا، تعداد قابل توجهی از تلئومورف‌ها (شکل‌های جنسی) مرتبط با آنامورف‌های *Rhizoctonia* وجود دارد که هنوز در هیچ جنسی طبقه بندی نشده‌اند و در مقابل تعدادی از جدایه‌های *Rhizoctonia* قادر به اسپوردهی نیستند بنابراین هیچ تلئومورفی برای آنها شناخته نشده است (Parmeter & Whitney, 1970, Mueinhardt & Esser, 1990, Sneh *et al.*, 1991). از آنجائی که طبقه‌بندی ریزوکتونیا و تعیین تاکسونهای جدید موجود در این گروه از قارچها هنوز در حال شکل گرفتن می باشد و بدلیل اهمیت این قارچ بر روی توده عظیمی از محصولات در سرتاسر دنیا، لازم است که بتوان فرم جنسی قارچ *Rhizoctonia* را در آزمایشگاه

www.SID.ir

Archive of SID

و تحت روشهای ساده و مورد اعتماد بدست آورد. چرا که توانایی تولید بازیدیوم و بازیدیوسپور قارچ *Rhizoctonia* در آزمایشگاه برای مطالعه و فهم مواردی از قبیل مبنای ژنتیکی، بیماریزایی، سازگاری زیست محیطی (Environmental adaptation)، جنسیت (Sexuality)، فرآیند هتروکاریوزیس (Heterokaryosis)، رابطه با سایر گونه‌ها (Taxonomy)، روابط درون و بین گروههای آناستوزومی و اپیدمیولوژی بیماری ضروری است (Mueinhardt & Esser 1990, Murry 1984, Anderson 1982, Adams 1996). لذا هدف از انجام این تحقیق بدست آوردن روشی قابل اعتماد و تکرار پذیر برای تولید شکل جنسی *R.solani* در کشت‌های خالص و شرایط آزمایشگاهی می‌باشد.

روشهای بسیاری جهت تحریک به تولید مرحله جنسی *R. solani* و قارچهای مرتبط با آن در آزمایشگاه گزارش شده است (Adams & Butler 1983b, Stretton *et al.* 1964 , Flentje 1956) این روش‌ها به چهار گروه عمده: اسپوردهی بر روی آگار، سطح خاک، بافت گیاه زنده و ترکیبات تولید کننده قارچ ایستایی (Fungistatic) تقسیم می‌شوند (Noel *et al.* 1995 , Kangatharalingam & Carson 1988). اساس این روش‌ها، ایجاد تنش تغذیه‌ای و یا محیطی برای قارچ است. برای موفقیت در این روش‌ها فراهم بودن شرایط خاص محیطی الزامی است (Noel *et al.* 1995, Murry 1982, 1984, Adams & Butler 1983 a, b Quimio 1973,). خاک محیطی مناسب جهت تولید بازیدیوسپور و بازیدیوم قارچ ریزوکتونیا می‌باشد (Flentje 1956, Huang *et al.* 1991, Stretton *et al.* 1964). *فلنج* (Flentje 1956) برای اولین بار از سطح خاک بعنوان محیطی جهت تولید بازیدیوسپور استفاده کرد. و اظهار داشت که وقتی سطح خاک ناصاف و کلوخه باشد میزان هیمینیوم تشکیل شده بیشتر است. همچنین رطوبت مهمترین فاکتور مؤثر در طول استریگما است. *استریتون* و همکاران (Stretton *et al.* 1964) گزارش کردند که استفاده از خاک سترون به جای خاک طبیعی، این فایده را دارد که: ۱) از خطر وقوع آناستوموز بین جدایه‌هایی که بطور طبیعی در خاک وجود داشته‌اند و جدایه‌های مورد آزمایش جلوگیری کند. ۲) مانع اسپوردهی جدایه‌های طبیعی موجود در خاک می‌شود. ۳) بازیدیوسپورها قادر به کلونیز کردن خاک ضدعفونی شده نیستند، بنابراین احتمال آلوده شدن خاک مورد آزمایش از طریق هوا توسط بازیدیوسپورهای بیگانه

www.SID.ir

Archive of SID

(سایر جدایه‌ها) بسیار کم است. آنها گزارش کردند که توانایی جدایه‌ها برای اسپوردهی بر روی خاکهای مختلف متفاوت است اما در بیشتر موارد بهترین اسپوردهی بر روی ماسه‌های کف رودخانه، خاک red brown loam و clay loam انجام پذیرفت. *تو و کیمبورو* (Tu & Kimbrough 1975)، *اوگوشی* (Ogoshi 1975)، *اونیکی* و همکاران (Oniki *et al.* 1985) و *هوانگ* و همکاران (Huang *et al.* 1991) این روش را تکمیل کرده و عوامل مؤثر بر آن را مورد ارزیابی قرار دادند. در روش بکار گرفته شده، از محیط PYDA (potato yeast extract dextrose agar) (بعنوان محیط اولیه- ماده زمینه‌ای جهت رشد قارچ) و از خاک loamy-clay (بعنوان محیط ثانویه- ماده زمینه‌ای جهت تولید هیمینیوم) استفاده شد. آنها عوامل زنده و غیرزنده مؤثر در تشکیل هیمینیوم و بازیدیوسپور را شامل: جدایه قارچ مورد نظر، ترکیبات محیط کشت، بافت خاک، دما، پ هاش خاک برابر با ۸-٦، خاکهای لومی و وجود عصاره مخمر در محیط کشت اولیه بیان کردند. این روش دارای یک اشکال اساسی است و آن نگهداری محیط کشت‌ها در شرایطی که احتمال آلودگی آنها بالاست (Adams & Butler 1983 a, Kangatharalingam & Carson 1988, Murry 1984).

مولر (Muller 1923) برای اولین بار تشکیل بازیدیوسپور *R. solani* را بر روی محیط کشت مصنوعی گزارش داد. *کوتیلا* (Kotila 1929, 1947) *R. solani* را روی محیط کشت آب - آگار و دیواره شیشه‌ای ارلن وادار به اسپوردهی نمود. *هاون و وانترپول* (Hawn & Vanterpool 1953)، *فلنج* (Flentje 1956)، *پاپاویزاس* (Papavizas 1965)، *پارمتر* و همکاران (Parmeter *et al.* 1969) با استفاده از روش انتقال از محیط غنی به ضعیف (Nutrient step-down) بازیدیوسپور *R. solani* را بر روی محیط‌کشت مصنوعی ایجادکردند. *موری* (Murry 1982, 1984) و *آدامز و باتلر* (Adams & Butler 1983a,b) با بهینه کردن شرایط محیطی و تغذیه‌ای در این روش، طیف کاربردی آن را وسیع‌تر کردند. آنها نشان دادند که غلظت مناسب نیتروژن، گلوکز و عصاره مخمر در محیط مخصوص رشد قارچ (محیط کشت غنی اولیه) تأثیر مستقیمی بر شدت اسپوردهی قارچ در محیط‌های ضعیف مانند Soil extract agar (SEA) دارد. همچنین در رطوبت نسبی ۱۰۰ درصد ریسه‌های هوایی بطور متراکم تولید شده و این باعث می‌شود که بازیدیوم‌ها بجای تولید اسپور، سلولهای تسبیحی شفاف تولید کنند. در صورتی که رطوبت نسبی کمتر از

www.SID.ir

Archive of SID

۱۰۰ درصد منجر به تحریک اسپوردهی در بسیاری از جدایه‌ها شد. *نوئل* و همکاران (Noel *et al*. 1995) بیان نمودند که وضعیت فیزیولوژیک میسیلیوم در تحت تنش غذایی نقش محوری در تحریک ریسه جهت تولید بازیدیوسپور دارد. *کوتیلا* (Kotila 1929, 1947) برای اولین بار تشکیل بازیدیوسپور را بر روی دمبرگ و پهنک برگهای بیمار گیاه چغندرقند که در رطوبت نسبی تقریباً ۱۰۰٪ و دمای ۲۱^{O}C نگهداری شده بودند ،گزارش داد. هیمینیوم بصورت یک لایه متراکم بر سطح رویی برگها ظاهر شد. *یول‌استراپ* (Ullstrup, 1939) با قراردادن قطعات ساقه پنبه آلوده بر روی آب تولید بازیدیوسپور را تحریک کرد. *اکسنر و چیلتون* (Exner & Chilton 1944) گزارش کرد که بازیدیوسپور روی بافت ریشه و ساقه علف‌هرز Alligator (*Alernanthera philoxerioides*) مایه‌زنی شده با توده میسیلیوم قارچ، دیده شد. *فلنج* (Flentje 1956) بذرهای گیاهان گوجه فرنگی، گندم و غده سیب‌زمینی را در خاکی که از قبل توسط *R. solani* مایه‌زنی شده بود کشت داد، توده هیمینیوم بر روی ساقه گیاهان مزبور در حدود ٤ تا ٥ سانتی متر بالاتر از سطح خاک بوجود آمد. بررسی اپیدرم گیاهان آلوده نشان داد که لایه هیمینیوم کاملاً خارجی می‌باشد. سیمز (Sims 1956) و *هیتالا* و همکاران (Hietala *et al*. 1994) تلئومورف جدایه‌های *Rhizoctonia* را با مایه‌زنی قارچ بر روی اندام‌های گیاهی (پنبه، سیب زمینی، چغندرقند و بذور کاج) ایجاد کردند. حضور مواد گیاهی یک منبع غذایی محدود شده را برای قارچ ایجاد می‌کند که ممکن است تولید اندام باردهی را تحریک کند و یا اینکه متابولیت‌های گیاهی تولید شده، قارچ را در تحت شرایط تنش قرار داده و آن را وادار به تولید فرم جنسی کند.

روش بررسی

هفده جدایه چند هسته‌ای *R. solani* متعلق به یازده گروه مختلف آناستوموزی از کلکسیون بخش گیاهپزشکی دانشگاه شیراز همچنین ۹ جدایه متعلق به میزبانهای مختلف از کلکسیون مرکز تحقیقات ساری در جهت تولید فرم جنسی در این تحقیق بکار گرفته شد (جدول ۱). تلاش برای تشکیل شکل جنسی در جدایه‌های ریزوکتونیا با استفاده از روشهای پیشنهاد شده بهمراه تغییراتی در آنها بعمل آمد. تمام روش‌ها بین ۲ تا ۳ بار تکرار گردید. روش‌های بکار

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- فهرست جدایه‌های منتخب بکار گرفته شده در تشکیل فرم جنسی *Rhizoctonia solani*

Table 1. List of selected isolates of *Rhizoctonia solani* used for formation of teleomorph

منبع جدایه‌های *R. solani* Sources of *R. solani* isolates	میزبان Host	گروه و زیر گروه آناستوموزی AG Group	کد جدایه Code
کلکسیون بخش گیاهپزشکی[a]	؟	AG-1	R.1
“	″	AG-1-I-A	R.2
“	″	AG-1-I-B	R.3
“	″	AG-1-1-C	R.4
“	″	AG-2-1(USA)	R.5
“	″	AG-2-1-B	R.6
“	″	AG-2-2 (IIIB)	R.7
“	″	AG-2-2 (IV)	R.8
“	″	AG-3	R.9
“	″	AG-4(USA)	R.10
“	″	AG-4(IIIB)	R.11
“	″	AG-5	R.12
“	″	AG-6	R.13
“	″	AG-7	R.14
“	″	AG-8	R.15

www.SID.ir

Archive of SID

Table 1. (continued) جدول ۱- (ادامه)

"	"	AG-9	R.16
"	"	AG-11	R.17
مرکز تحقیقات ساریb	*Amaranthus retroflexus*	AG-2-2 (IIIB)	Amr.1
"	گزنه سفید *Lamium ablum*	AG-4	Lam.1
"	اویار سلام *Cyperus* sp.	AG-2-2(IIIB)	55.1
"	گردو *Juglans regia*	AG-1-IA	Jur.1
"	برنج *Oryza sativa*	AG-1-I-A	OS.3
"	جو وحشی *Hordeum glaucum*	AG-1-I-B	Hog.1
"	یولاف *Avena ludviciana*	AG-1-I-B	AVL.1
"	ذرت *Zea mays*	AG-1-I-A	Zm.1
"	پسته *Pistacia vera*	AG-1-I-A	Pv.1

a. Department of Plant Protection, Shiraz University (World collection)
b. Sari Agricultural Experiment Station (Iran)

گرفته شده عبارت بودند از:

پوشاندن سطح محیط کشت قارچ با خاک

روش اول) در این روش که بوسیله *اووگوشی* (Ogoshi 1975) توصیه شده است، از محیط کشت PYDA (Potato yeast extract dextrose agar) جهت رشد قارچ استفاده شد. هنگامی که

www.SID.ir

Archive of SID

پرگنه قارچ به حاشیه تشتک پتری رسید، سطح آن با یک لایه خاک هوا خشک که ذرات آن سه تا پنج میلی‌متربود، پوشانده شد و تشتک‌ها با درب باز در دمای اطاق نگهداری شدند. برای حفظ رطوبت هر روز ۱ تا ۳ بار مقدار کمی آب مقطر سترون به تشتک‌های پتری اضافه شد.

روش دوم) مطابق روش *تو و کیمبورو* (TU & Kimbrough 1975) قارچ ریزوکتونیا روی محیط‌کشت PYDA کشت داده شد و درب تشتک‌ها برداشته و سطح پرگنه قارچ با ۹۰ گرم خاک آون خشک بطور یکنواخت (به ارتفاع ۱ سانتی‌متر) پوشانده شد. پ هاش خاک در حدود ۹-۸ تنظیم شد. تشتک‌ها روزانه ۳ بار آبیاری شدند تا رطوبت نسبی در حد بالایی نگه داشته شود. تغییراتی در این روش جهت تلاش برای بدست آوردن بازیدیوسپور صورت گرفت. آزمایش ۱): از خاکهایی با بافت متفاوت (loamy sand ، loamy clay ، silty clay) (که همگی از منطقه باجگاه جمع‌آوری شده بودند در این آزمایش استفاده شد، ظروف پتری همراه با خاک در دمای اتاق نگهداری شدند. آزمایش ۲): در این آزمایش تشتک پتری پوشیده شده با خاک در دماهای ۲۰، ۲۵ و ۳۰^{O}C در انکوباتور و دمای متغیر (دمای روز ۲٦ ^{O}C و دمای شب ۱۳ ^{O}C) در گلخانه نگهداری شدند. آزمایش ۳): ظروف پتری پس از پوشش با خاک در شرایط نوری متفاوت قرار داده شدند. تعدادی از آنها در تاریکی مطلق، تعدادی در شرایط نور ثابت (دو عدد لامپ مهتابی ٤۰ وات در فاصله ۳۰ سانتی‌متری بالای تشتک‌های پتری) و تعدادی در شرایط نور متغیر (۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی) قرار داده شدند. در حالت اخیر ظروف پتری درون ژرمینیاتور با دمای ثابت ۲٦ ^{O}C قرار گرفتند. در کلیه آزمایشات، ظروف پتری تا ۲۸ روز نگهداری شدند.

روش انتقال از محیط کشت غنی به محیط ضعیف

در این روش ابتدا قارچ روی یک محیط غنی (از نظر مواد غذایی) کشت داده و سپس به یک محیط ضعیف انتقال داده شد.

روش اول) مطابق روش *پاپاویزاس* (Papavizas,1965) از PDA (potato dextrose agar) غنی شده (حاوی یک گرم در لیتر عصاره مخمر (PYDA)) جهت کشت جدایه‌ها استفاده شد. بلوکی از پرگنه پنج روزه جدایه‌های کشت شده روی این محیط به محیط عصاره خاک- آگار

www.SID.ir

Archive of SID

(soil extract agar = SEA) انتقال داده شد. در مدت آزمایش ظروف پتری در دمای ۲۳ تا ۲٤ ^{O}C در انکوباتور نگهداری شدند.

روش دوم) در این آزمایش از روش تغییر یافته موری (Murry, 1982) استفاده شد. از محیط کشت‌های PDMA (potato dextrose malt agar) و یا DMA (dextrose malt agar) با پ هاش حدود ۵/۱-۵/۳ بعنوان محیطی جهت رشد قارچ (محیط کشت اولیه) و از محیط کشت‌های TWA (tap water agar) یا WA (water agar)بعنوان محیط اختصاصی تولید بازیدیوسپور استفاده شد.هر جدایه وابسته به گروههای آناستوموزی مختلف روی محیط کشت PDMA یا DMA به مدت ۳ الی ۵ روز در تاریکی در دمای^{O}C ۲٦ کشت داده شد. پس از این مدت، قرصی ($1cm^2$) از حاشیه پرگنه رشد کرده قارچ به حاشیه محیط کشت TWA یا WA انتقال داده شد. پس از انتقال قارچ، ظروف پتری حاوی محیط کشت مخصوص اسپوردهی به همراه بلوک قارچ در تحت شرایط نوری متفاوت بصورت آزمایش های زیر قرار داده شد.

آزمایش ۱) ابتدا ظروف پتری حاوی محیط مخصوص اسپوردهی به مدت ۸ روز در تاریکی نگهداری شدند و سپس به مدت ۱۰ روز تحت دوره متناوب تاریکی - روشنایی (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) قرار گرفتند.

آزمایش ۲) ظروف پتری حاوی محیط مخصوص اسپوردهی به مدت ۱۸ روز در تاریکی نگهداری شدند.

آزمایش ۳) ظروف پتری ابتدا به مدت ۸ روز در تاریکی و سپس به مدت ۱۰ روز در تحت نور مستقیم نگهداری شدند این نور، توسط دو لامپ فلورسنت ٤۰ وات در ۳۰ سانتی‌متری بالای ظروف پتری تأمین می‌شد.

در کلیه آزمایشات، دما در محدوده ۲٦ تا ۳۰ ^{O}C متغیر بود. برای هر جدایه در هر آزمایش ۵ عدد ظروف پتری در نظر گرفته شد. ظروف پتری پس از ۱۸ روز از نظر تولید بازیدیوسپور بررسی شدند.

روش سوم) ابتدا جدایه‌های مورد نظر را روی محیط مایع عصاره سیب‌زمینی حاوی ۵ گرم در لیتر سوکروز رشد داده شد و سپس توده میسیلیومی بدست آمده به درون لوله

www.SID.ir

Archive of SID

آزمایش حاوی قطعه‌ای از کاغذ صافی مرطوب برده شد. لوله‌های آزمایش بدون درپوش، در تحت دمای ^{O}C ۲۵ نگهداری شدند.

روش استفاده از قارچ‌کش

با اصلاحاتی که در روش *کانگاتارالینگام و کارسون* (Kangatharalingam & Carson 1988) انجام شد، جهت تولید شکل جنسی قارچ ریزوکتونیا به شیوه زیر عمل گردید. دیسک‌هایی ۱/۵ سانتی متری از کاغذ صافی در داخل سوسپانسیون هفت درصد قارچکش مانکوزب (دیتان ام ٤٥ پودر قابل تعلیق) غوطه‌ور شد و سپس به فاصله دو سانتی‌متری از حاشیه خارجی ظروف پتری روی آب – آگار ۲٪ قرار گرفت. قرص‌هایی به قطر یک سانتی‌متر ازپرگنه سه روزه قارچ ریزوکتونیا رشد داده بر روی PDA به فاصله دو الی سه سانتی‌متر از دیسک کاغذ صافی بصورت معکوس در سطح آب – آگار قرار داده شد. یک یا دو عدد لام سترون به حالت شیب‌دار در مسیر رشد قارچ قرار داده شد. ظروف پتری درون ژرمیناتور با دمای ^{O}C ۱±۲۰ و در تاریکی نگهداری شدند. پس از ۱۷ روز جهت ایجاد تحریک دوباره در قارچ، چند قطره از سوسپانسیون هفت درصد قارچکش بوسیله سرنگ در چند نقطه از سطح محیط بر روی پرگنه قارچ قرار داده شد.

مایه‌زنی به ساقه گیاه

گیاهان سیب‌زمینی، چغندرقند، گوجه‌فرنگی در خاک سترون در شرایط گلخانه کاشته شدند. قرص‌هایی یک سانتی‌متری از حاشیه پرگنه سه روزه قارچ رشد داده شده بر روی محیط PDA غنی شده (حاوی ۱ گرم عصاره مخمر) بر روی ساقه و طوقه گیاهان مزبور قرار داده شد. محل اتصال قرص‌ها به ساقه و طوقه با پارافیلم پوشیده شده تا از خشک شدن بلوک و از بین رفتن قارچ جلوگیری شود. سپس گلدان به همراه گیاه مایه‌زنی شده درون کیسه‌های پلاستیکی مرطوب قرار داده شد تا رطوبت نسبی فضای اطراف گیاه و محل زخم در حدود ۱۰۰٪ حفظ شود. دمای گلخانه در محدودهٔ ^{O}C ٢٤-٢٠ متغیر بود.

روش تولید اندام جنسی در سطح آب

در این آزمایش روش *هیتالا* و همکاران (Hietala *et al.* 1994) بکار گرفته شد. برای این منظور از دانهال‌های زنده کاج *Pinus sylvestris* (بذر کاج از مؤسسه تحقیقات جنگل تهیه شد) جهت تحریک قارچ برای تولید فرم جنسی استفاده شد. ابتدا بذرها پس از ضدعفونی سطحی

www.SID.ir

Archive of SID

با مایع سفید کننده (هیپوکلریت سدیم) ٪۱ و شستشوی آنها در آب مقطر دوبار سترون، به مدت ۳٦ ساعت در دمای ^{O}C ۵ قرار داده شدند. پس از این مدت بذرها به مدت ۵ دقیقه در محلول Tween-80 (۳ قطره در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر) قرار داده شدند. پس از ۳ بار شستشو، بذرها در آب اکسیژنه (به نسبت ۳۰٪ حجمی) به مدت ۱۵ دقیقه تیمار و در محیط کشت آب – آگار ۱/۲٪ به نسبت ۱۵ تا۲۰ بذر در هر ظروف پتری قرار داده شدند. ظروف پتری بصورت وارونه به مدت ١٤ روز در تاریکی و در دمای ^{O}C ۲۱ نگهداری شدند. پس از جوانه زدن بذرها، هر دانهال درون یک ظرف پتری حاوی ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر دوبار سترون قرار داده شد و بلوکی از حاشیه پرگنه ۳ روزه رشد داده شده جدایه‌های مورد نظر بر روی PDA در^{O}C۲۵ به ظروف پتری مورد نظر انتقال داده شد. سپس ظروف پتری در روی میزهای آزمایشگاه در شرایط نور طبیعی غیر مستقیم نگهداری شدند.

نتیجه

در این تحقیق اندام‌های باروری (بازیدیوم و بازیدیوسپور) گروههای آناستوموزی AG-1، AG-1-I-C و AG-3 و AG—4 (USA) تنها با استفاده از روش انتقال از محیط کشت غنی (از نظر مواد غذایی) به محیط کشت فقیر (روش دوم) ایجاد گردید ولی در مورد سایر گروههای آناستوموزی نتیجه منفی بود (جدول ۲). در سایر روش‌ها، اندام‌های شبیه بازیدیوم، شاخه شاخه شدن شدید ریسه‌ها و تولید سلولهای تسبیحی و رشد متراکم قارچ مشاهده شد. در روش موفق بکار برده شده، حدوداً ۱۴ الی ۲۰ روز بعد از انتقال بلوک‌های قارچ به محیط‌های مخصوص اسپوردهی، بازیدیوسپور مشاهده گردید و تولید آن ۱۵ تا ۱۷ روز ادامه داشت. تقریباً کمی قبل و یا بعد از آزاد شدن بازیدیوسپورها، بازیدیوم‌ها حالت تورژسانس خودشان را از دست داده، جمع شده و بسرعت چروکیده شدند. در شرایط فوق، شکل جنسی شامل دسته‌های خوشه‌ای کوچکی از بازیدیوم‌های تولید کننده بازیدیوسپور (basidia clusters) بود که در داخل و روی محیط کشت (شکل ۱– A، B) و در مواردی در پشت درب تشتک پتری تشکیل شدند (شکل ۱– C، D). جهت مشاهده میکروسکوپی اندام‌های جنسی، ظروف پتری یا

جدول ۲– نتایج روشهای مختلف بکار گرفته شده در ایجاد مرحله جنسی در جدایه‌های *Rhizoctonia solani*

www.SID.ir

Archive of SID

Table 2. Results of different techniques used for formation of sexual stage in isolates of *Rhizoctonia solani*

نتایج Results	جدایه‌های ریزوکتونیا *R. solani* isolates	روش و منبع Method and Source
تشکیل یک توده بهم بافته ریسه Formation of mycelial tuft	همه جدایه‌های منتخب All isolates	پوشاندن کشت قارچ با خاک Ogoshi (1975) Soil over lays
بدون تأثیر No effect	R_2, R_3, R_5, R_6, R_7, R_9, R_{10}, R_{12}, R_{13}	TU & Kimbrough (1975)
تشکیل اندامی شبیه Synnema به ارتفاع ۳۰ میلی متر Synnema like formation (30mm)	R_{11}, R_8, R_4, R_1	”
بدون تأثیر No effect	Amr.1, Lam.1, 55.1 Hog.1, Jur.1, Pv1	”
شاخه شاخه شدن شدید ریسه‌ها در نزدیکی قرص کاغذ صافی آغشته به قارچکش Severe hyphal branching	همه جدایه‌های منتخب به استثناء(R_{10}, R_4, R_1) all isolates except (R_{10}, R_4, R_1)	استفاده از قارچکش Fungicide
“	R_{10}, R_4, R_1	“
تشکیل سلولهای تسبیحی بصورت خوشه‌ای و شاخه شاخه شدن ریسه‌ها Moniloid cell and hyphal branching	R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}, R_{11}	انتقال از محیط کشت غنی به فقیر Rich to poor medium Papavizas (1965)
“	Amr.1, Lam.1, 55.1, AVL.1, Pv1	”
بازیدیوم و بازیدیوسپور به میزان فراوان تولید شد Abundant basidiospore formation	(AG-1) $R._1$	Murry (1982)
“	(AG-1-I-C) $R._4$	“
“	(AG-3) $R._9$	”
تولید بازیدیوم و بازیدیوسپور به میزان بسیار کم Few basidiospore formation	(AG-4) (USA) $R._{10}$	”

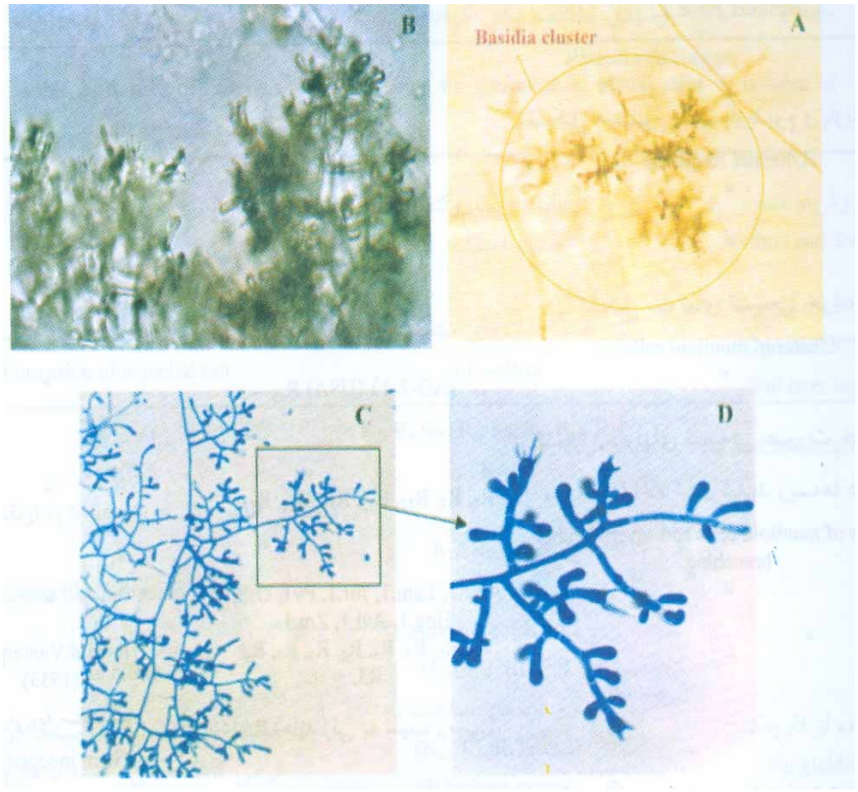
www.SID.ir

Archive of SID

Continued Table 2.		ادامه جدول ۲
“	(AG-1-I-A) R.$_2$	“
تشکیل هیمینیوم بدون بازیدیوم و بازیدیوسپور Hymenial formation	(AG-2-2-IV) R.$_8$	“
“	(AG-4-(IIIB)) R.$_{11}$	“
“	(AG-8) R.$_{15}$	”
تشکیل سلولهای تسبیحی خوشه‌ای Cluster of moniloid cells	(AG-1-I-B) R.$_3$	”
”	(AG-2-1) (USA) R.$_5$	”
تشکیل سلولهای تسبیحی بصورت خوشه‌ای و شاخه شاخه شدن شدید ریسه‌ها در انتها Clusters of moniloid cells and severe hyphal branching	R_6, R_7, R_{12}, R_{13}, R_{14}, R_{16}, R_{17},	”
“	Amr.1, Lam.1, Jur.1, Pv1, Os3, Hog.1, Avl.1, Zm.1	“
–	R_1, R_2, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9 R3,	Hawn &Vanterpool (1953)
–	R.$_1$ (مایه زنی به سیب زمینی)	مایه زنی به ساقه گیاه Stem inoculation
روی ساقه سیب زمینی، هیمینیوم و بازیدیوم بوجود آمد اما بازیدیوسپور دیده نشد Formation of only basidium on potato stem	R.$_4$ (مایه زنی به ساقه سیب‌زمینی و گوجه فرنگی)	”
توده متراکم ریسه‌ها در اطراف طوقه چغندرقند Formation of compact hyphal mat around sugar beet crown	R.$_8$ (مایه زنی به چغندرقند و گوجه فرنگی)	”
”	R.$_{11}$ (مایه زنی به چغندرقند)	“
“	R.$_7$ (مایه زنی به چغندرقند)	“
“	R.$_6$ (مایه زنی به چغندرقند)	“
رشد متراکم ریسه‌ها در سطح آب و در اطراف و روی دانهال کاج	R_1, R_4, R_8, R_{10}, R_{15}	استفاده از دانهال کاج Use of pine seedling Hietella (1994)

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱- دسته‌های خوشه‌ای بازیدیومی در داخل (B) و سطح (A) محیط کشت آب-آگار (A,B) و در روی درب ظروف پتری (C,D).

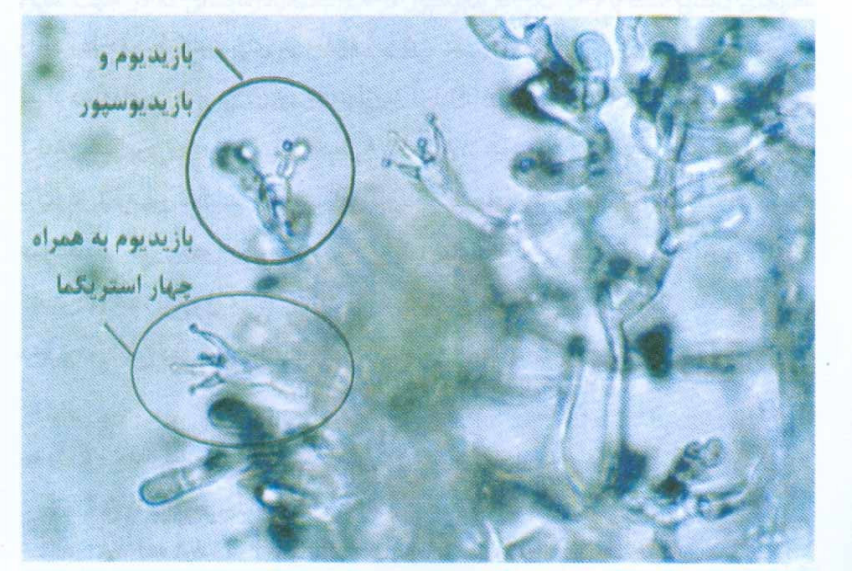
Fig. 1. Basidia clusters on surface (A) and within (B) water agar media and on Petridish cover (C,D).

بطور مستقیم روی صفحه میکروسکوپ قرار داده شدند و یا آگار اطراف دسته‌های خوشه‌ای بازیدیوم‌ها با یک سوزن بسیار ظریف بریده شد و قطعه مربع کوچک بدست آمده روی یک اسلاید تمیز قرار داده شد، سپس یک قطره از لاکتوفنل حاوی ۵ درصد متیل بلو روی آن ریخته و بدون لامل زیر میکروسکوپ قرار داده شد. هیمینیوم قارچ به رنگ سفید مایل به خاکستری، پودری با بیش از ۱۰ میکرومتر پهنا بود. اندام‌های باردهی قارچ شامل بازیدیوم و

www.SID.ir

Archive of SID

بازیدیوسپور بود. بازیدیوم‌ها تقریباً بشکه‌ای به ابعاد ۱۰–۸×۲۰–۱۰ میکرومتر بوده که بر روی هر بازیدیوم بطور معمول چهار استریگما و در مواردی دو، سه و پنج عدد هم دیده شد (شکل ۲). استریگماهای تشکیل شده بر روی بازیدیوم‌های مختلف از نظر طول با هم اختلاف داشتند. طول آنها در حدود ۱۲/۹–۱۶/۷ و عرض درحدود ۲/۵–۳/۷ میکرومتر بود. بازیدیوسپورها تخم‌مرغی تا بیضی به ابعاد ۸–۱۳×٤–۶ میکرومتر بوده و قدرت جوانه‌زنی و تولید بازیدیوسپورهای ثانوی را داشتند.



شکل ۲– بازیدیوم، استریگما و بازیدیوسپورهای *Thanatephorus cucumeris*.

Fig. 2. Basidium, strigma and basidiospores of *Thanatephorus cucumeris*.

براساس *اسنه* و همکاران (Sneh *et al.* 1991) مشخصات مشاهده شده با مشخصات گونه *R. solani*، آنامورف *Thanatephorus cucumeris* مطابقت داشت. دسته‌های بازیدیومی (basidia clusters) با تکثیر سلولهای prebasidia تشکیل می‌شوند و توأم با توسعه و رشد این دسته‌ها، بازیدیوسپورها تولید و آزاد می‌گردند. پس از مدتی تکثیر سلولهای prebasidia متوقف

www.SID.ir

Archive of SID

می‌شود و در نتیجه شکل و اندازه دسته‌های ثابت می‌ماند (Sneh *et al.* 1991, Noel *et al.* 1995). بنابراین تعداد دسته‌های بازیدیومی می‌تواند معیار مناسبی جهت اندازه‌گیری میزان اسپوردهی در هر جدایه باشد. بررسی محیط کشت‌ها نشان داد که دسته‌های بازیدیومی در هر سه جدایه متعلق به AG-1، AG-1-I-C و AG-3 فقط دردوره متناوب نور و تاریکی بوجود آمده‌اند. اما در زیرگروه AG-1-I-C و AG-4(USA) در تحت تاریکی مطلق تعداد بسیار کمی دسته‌های بازیدیومی در سطح محیط کشت دیده شد (در هر تشتک پتری ۱ یا ۲ عدد دسته بازیدیومی دیده شد). شمارش میانگین تعداد دسته‌های بازیدیومی در واحد سطح محیط کشت برای هر جدایه (در ۵ تشتک پتری و با ۲ تکرار) نشان داد که متوسط تعداد دسته‌های بازیدیومی در جدایه متعلق به AG-1-I-C نسبت به دو جدایه متعلق به AG-1 و AG-3 بیشتر بود (جدول ۳). دو محیط TWA و WA هیچ مزیتی نسبت به یکدیگر از لحاظ تولید بازیدیوسپور نداشتند. علاوه بر این محیط کشت‌های اولیه PDMA و DMA بطور یکسان عمل کردند بطوری که جدایه‌های مربوط به گروههای آناستوموزی AG-1، AG-1-I-C و AG-3 کشت داده شده بر روی هر دوی آنها پس از انتقال به محیط کشت مخصوص به محیط کشت مخصوص اسپوردهی تولید بازیدیوسپور کردند.

جدول ۳- تعداد دسته‌های بازیدیومی شمارش شده در واحد سطح دو محیط کشت TWA و WA برای هر جدایه

Table 3. Number of basidia clusters that counted per surface unit of TWA and WA media for each isolate

گروه آناستوموزی AG	TWA	WA
AG-1-I-C	1	1.4
AG-1	0.5	0.48
AG-3	0.35	0.4

روش استفاده از قارچکش جهت تحریک قارچ ریزوکتونیا به ایجاد فرم جنسی، موفقیت آمیز نبود. در این روش در کلیه جدایه‌ها رشد متراکم قارچ در محل تماس با قارچکش مانکوزب مشاهده شد ولی تا ۱ ماه پس از نگهداری در شرایط آزمایش هیچگونه

www.SID.ir

Archive of SID

بازیدی‌وم و بازیدیوسپور در سطح آب – آگار دیده نشد. در جدایه‌های متعلق به گروه AG-1، AG-4 (USA) و AG-1-I-C اندامی شبیه بازیدی‌وم دیده شد اما در این روش هیچ گونه بازیدیوسپور بر روی آنها مشاهده نگردید. در روش پوشش سطح محیط کشت با خاک، رشد متراکم ریسه‌های قارچ بر روی سطح خاک دیده شد و گاهی بر روی این توده میسیلیومی، اندامی شبیه سینما (synnema) که ارتفاع آن به ۳۰ میلی‌متر هم می‌رسید دیده شد. رنگ‌آمیزی سلولهای این اندام نشان داد که این سلولها دو هسته‌ای هستند، دو هسته‌ای بودن از ویژگیهای سلولهای زایشی است با وجود این بازیدیوسپور در هیچ یک از آزمایشاتی که در جهت تغییر در روش پوشش کشت قارچ با خاک انجام شد، دیده نشد. در روش مایه زنی به ساقه گیاه، توده متراکم ریسه‌ها بروی سطح ساقه گیاه سیب‌زمینی، گوجه‌فرنگی و اطراف طوقه وزیر برگهای چغندرقند دیده شد. کلیه سطوح ساقه و برگهای گیاهان مزبور بوسیله میکروسکوپ استریو مورد بررسی قرار گرفتند. اما اثری از بازیدیوم و بازیدیوسپور دیده نشد. اما در مـــورد جدایه متعلق به AG-3 بروی سطح ساقه سیب‌زمینی، توده متراکم هیمینیومی دیده شد. با بررسی این توده متراکم در زیر میکروسکوپ نوری اندامی شبیه بازیدیوم دیده شد اما بازیدیوسپور دیده نشد. با تکرار این آزمایش بر روی ساقه سیب زمینی نتایج قبلی بدست نیامد. در روش تولید فرم جنسی بر سطح آب در حضور دانهال کاج، در هیچ یک از جدایه‌های دو هسته‌ای و چند هسته‌ای منتخب اثری از وجود فرم جنسی دیده نشد.

بحث

اعتقاد بر این است که اعمال یک دوره بخصوص تنش محیطی باعث تحریک قارچها (بخصوص بازیدیومیست‌ها) در تولید شکل جنسی می‌شود (Talbot 1970, Warcup & Talbot 1966). بنظر می‌رسد که اعمال تنش غذایی، روشی موفق برای تولید فرم جنسی در قارچ ریزوکتونیا می‌باشد. علاوه بر این نتایج بدست آمده نشان داد که روش فوق‌الذکر، روشی تکرارپذیر است چون در طی ۲ بارتکرار آزمایش‌ها، بازیدیوسپور در هر سه جدایه تولید شد. لذا بهینه‌سازی شرایط محیطی و تغذیه‌ای می‌تواند طیف کاربردی این روش را وسیع‌تر کند هر چند در این تحقیق کاربردی عمومی جهت تحریک مرحله جنسی در تمام جدایه‌ها نداشت. در

www.SID.ir

Archive of SID

آزمایشات انجام شده در سه گروه AG-1، AG-1-I-C و AG-3 اندام باردهی بر روی TWA و WA بوجود آمد، اما بر روی SEA هیچ گونه بازیدیوم یا بازیدیوسپوری دیده نشد. این محیط در مقایسه با دو محیط اول از نظر مواد غذایی غنی‌تر است و شاید به همین دلیل در ایجاد تنش غذایی جهت اسپوردهی مناسب نیست. هرچند *فلنج* (Flentje 1956) و *پاپاویزاس* (Papavizas 1965) در استفاده از این محیط بر روی اسپوردهی موفق بودند.

تشکیل مرحله جنسی در مورد تمام گروههای آناستوموزی *R. solani* در آزمایشگاه گزارش شده است (Anderson 1982, Ogoshi 1987, Sneh and Ogoshi 1996). توانایی بالقوه تولید فرم جنسی در تمام ریزوکتونیاها وجود دارد. چون در هیچ موردی شواهدی مبنی بر از دست دادن توانایی تولید برخی ساختارهای لازم برای تولیدمثل جنسی در طی فرآیند تکامل (مثلاً از دست دادن توانایی پرتاب اسپور، توانایی تولید اسپور ثانویه، از دست دادن استریگماهای اولیه یا ثانویه) دیده نشده است. دلیل دیگر برای پذیرش توانایی *T. cucumeris* در تولید فرم جنسی این است که در مواردی هم که تولید اسپور در طبیعت مشاهده نشده در آزمایشگاه بطور موفقیت آمیز بازیدیوسپور بدست آمده است (Anderson 1982, Adams 1996). بنابراین طبق شواهد، تولید اسپور جنسی معمول است هرچند مشاهده نشده باشد و باید آن را مهمترین عامل مؤثر در تنوع ژنتیکی *T. cucumeris* دانست. پس باید چنین فرض کرد که عدم تولید بازیدیوسپور در یک جدایه نمی‌تواند بیان کننده نقص ژنتیکی در توانایی تولید فرم جنسی باشد. با وجود اینکه *T. cucumeris* هموتالیک است، اما بطور طبیعی موتانت‌های خود عقیم آن به وفور در نتاج تک اسپوری آن تولید می‌شود و حتی تولید اسپور در سویه‌های خودبارور نیز معمولاً نامنظم بوده و همیشگی نیست (Stalpers and Anderson 1996). گزارشاتی از این قبیل اهمیت وراثت عوامل تنظیم کننده اسپوردهی را نشان می‌دهد. ولی این عوامل ژنتیکی بی‌تأثیر از شرایط محیطی نیستند و اغلب بدنبال قرار گرفتن در شرایط محیطی یا تغذیه‌ای مناسب قدرت بروز می‌یابند (Anderson 1982, Adams 1996). اما این نکته حائز اهمیت است که تفاوت‌های قابل توجهی از نظر شرایط تغذیه‌ای و محیطی مورد نیاز برای اسپوردهی در بین اعضای یک گروه آناستوموزی و بین گروههای مختلف آناستوموزی دیده شده است (Ogoshi 1975, Murry 1982, 1984, Noel *et al*. 1995, Adams and Butler 1983a, b).

www.SID.ir

Archive of SID

بر این اساس تفاوت در واکنش به شرایط محیطی مؤثر در اسپوردهی (مانند حساسیت به میزان نور، دما، تهویه، رطوبت، شوک سرمایی) نشان دهنده تغییراتی در ریسه است که در طی رشد در محیط کشت اولیه (غنی) و احتمالاً از طریق بیان شدن ژنهایی که با عوامل محیطی تنظیم می‌شوند، آغاز شده است (Noel *et al*. 1995, Mueinhardt and Esser 1990, Adams 1996). این نتیجه، تأیید می‌کند که در آزمایشات اسپوردهی *R . solani* باید دقت زیادی بکار برد چرا که حساسیت زیاد این قارچ به تغییر در شرایط کشت می‌تواند موجب بروز ناتوانی‌های فیزیولوژیک در اسپوردهی شود. نتیجه آنکه، در این تحقیق ناتوانی در تولید بازیدیوسپور در جدایه‌های متعلق به سایر گروههای آناستوموزی (بجز AG-1 ، AG-1-I-C ، AG-4 وAG-3) بدلیل وجود نقص ژنتیکی در این جدایه‌ها نمی‌باشد بلکه شرایط محیطی بکار گرفته شده در این روش در تحریک این جدایه‌ها جهت تولید شکل جنسی مناسب نبوده است. چرا که هر جدایه جهت تولید اندام باردهی به شرایط خاص خود نیازمند است. اگرچه بعضی از عوامل محیطی و تغذیه‌ای مورد نیاز برای تولید اسپور تعیین شده است (Tu and Kimbrough 1975, Huang *et al.* 1991, Noel *et al*. 1995 Murry 1982, 1984, Adams and Butler 1983a, b,). اما استفاده از نتایج بدست آمده مشکل است چون این نتایج از یک گروه آناستوموزی به گروه دیگر و حتی در بین سویه‌های یک گروه نیز متفاوت است (Adams 1996, Noel *et al*. 1995). این مسئله نشان می‌دهد که توانایی اسپوردهی *R. solani* بستگی به ژنوتیپ سویه بکار رفته دارد (Cubeta *et al.* 1991). بنابراین تفاوت مشاهده شده در میزان تولید دسته‌های بازیدیومی (basidia clusters) در بین اعضای متعلق به یک گروه آناستوموزی (AG-1 و زیرگروه AG-1-I-C آن) مؤید نقش ژنوتیپ در میزان اسپوردهی سویه‌های این گروه آناستوموزی است. این گونه تفاوتهای مرتبط با ژنوتیپ که در تحت کنترل چند ژن (polygenic) می‌باشند در سایر قارچها و خصوصاً آسکومیست‌ها و بازیدیومیست‌ها دیده شده است (Mueinhardt and Esser 1990).

در روش مورد استفاده در این تحقیق، بازیدیوسپور در هر سه گروه آناستوموزی در شرایط نور و تاریکی متناوب تولید شد. نتایج تحقیقات نشان داد کاهش شدت نور در طبیعت باعث پیشرفت مرحله جنسی در این قارچ می‌شود به همین دلیل تولید بازیدیوسپور در فصل بهار و پاییز با نظم بیشتری انجام می‌شود (Hietala *et al.* 1994, Whitney 1964). علاوه بر این،

www.SID.ir

Archive of SID

نور تشکیل هیمینیوم را تحریک می‌کند اما مانع از رسیدن بازیدیوم‌ها و تولید بازیدیوسپور می‌شوند (Noel *et al*. 1995,.Uchida *et al*. 1986). *فلنج* (Flentje 1956) دریافت که تشکیل هیمینیوم در شرایطی با شدت نور ۲۰۰ تا ۲۰۰۰ فوت کندل رخ می‌دهد. مطالعات بیشتر در این زمینه نشان داد که جدایه‌ها در شرایط نور ثابت یا متغیر با شدت ٤ تا ١٤٥٠ فوت کندل و در مدت ۸ تا ٢٤ ساعت تولید بازیدیوسپور می‌کنند اما بهترین شرایط ۱۲ تا ١٦ ساعت نوردهی در تحت شدت ۱۰ تا ٤٤٠ فوت کندل می‌باشد (Murry 1984, Noel *et al*. 1995 Stretton *et al.* 1964, Hietala *et al*. 1994,). اما *ویتنی* (Whitney 1964) بیان نمود که نور مانع تولید توده‌های بازیدیومی می‌شود. علاوه بر این او علت اصلی کاهش یا حذف اسپوردهی در تاریکی را برای برخی جدایه‌ها، تهویه بسیار کم محیط کشت دانست. *موری* (Murry 1984) معتقد بود که ریسه‌ها جهت شروع تولید هیمینیوم باید در یک دوره خاص نوری قرار گیرند (۱۷). *نوئل* و همکاران (Noel *et al*. 1995) بیان نمودند که تأثیر نور روی اسپوردهی در جدایه‌های مختلف، متفاوت است بطوریکه در برخی جدایه‌ها، نور برای تولید بازیدیوسپور لازم نیست اما در برخی دیگر نور ممکن است نقش القاءکننده (inducer) و یا تحریک کننده (stimulant) را داشته باشد.

هر چند روش استفاده از قارچکش در محیط کشت بعنوان یک روش عمومی برای تحریک اسپوردهی در ریزوکتونیا توصیه شده است (Kangatharalingam & Carson 1988) اما در تحقیق حاضر این روش در مورد هیچ یک از جدایه‌های متعلق به گروههای آناستوموزی موفقیت‌آمیز نبود. لذا بنظر می‌رسد تنش تغذیه‌ای در مقایسه با تنش قارچ ایستایی در تحریک اسپوردهی موفق‌تر است. *شروود* (Sherwood 1970) به این نکته اشاره کرد که *R. solani* در برخی آزمایشگاهها راحت‌تر از سایرین اندام باردهی تولید می‌کند. او دلیل این امر را وجود شرایط محیطی خاص آن آزمایشگاه دانسته که ممکن است جهت اسپوردهی مناسب یا غیرمناسب باشد. پس می‌توان نتیجه گرفت که بدست آوردن نتایج متفاوت در این تحقیق یا ناشی از تفاوت ژنوتیپی بین جدایه‌های مورد آزمایش و جدایه‌های بکار رفته در روش توصیف شده می‌باشد، یا ممکن است شرایط محیطی محل آزمایش برای اسپوردهی جدایه بکار رفته مناسب نباشد و یا در اثر تغییرات جزیی غیر عمدی در تکنیک و مواد بکار رفته در روش مورد

www.SID.ir

Archive of SID

استفاده باشد (خطای آزمایش). بطور مثال در این تحقیق با استفاده از روش تغییر یافته پوشش سطح محیط کشت با خاک فرم جنسی در هیچ یک از جدایه‌ها بدست نیامد و شاید دلیل آن استفاده از خاکی متفاوت با خاک استفاده شده در روش توصیف شده باشد. موری (Murry 1982, 1984) بیان نمود که دوباره ذوب کردن محیط کشت PDMA موجب بی‌اثر شدن محیط کشت و در نتیجه عدم تولید فرم جنسی در محیط کشت مخصوص اسپوردهی شد و بنظر می‌رسد که فاکتورهای تحریک کننده اسپوردهی ممکن است در اثر طولانی شدن زمان حرارت‌دهی محیط کشت از بین بروند. علاوه بر موارد گفته شده، ممکن است فاکتورهای ناشناخته بی‌شماری از این قبیل نیز در اسپوردهی مؤثر باشند که هنوز برای ما ناشناخته‌اند. بر همین اساس تقریباً برای بسیاری از جدایه‌ها نتیجه روشهای بکار رفته جهت اسپوردهی قابل پیش‌بینی نیست. اما بطورکلی این روش بدلیل مزایای ار قبیل آسان تر بودن حفظ شرایط سترون، آسان تر بودن بررسی وجود اندام‌های باردهی با میکروسکوپ نوری در محل تولید (*in situ*) و تولید فراوان بازیدیوسپور نسبت به سایر روشها مناسب‌تر است.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (56-53) متن انگلیسی مراجعه شود.

نشانی نگارندگان: دکتر ضیاءالدین بنی‌هاشمی، بخش گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز ایمان هادی‌زاده، بخش گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران، اهواز

www.SID.ir