فصلنامه‌ی تحقیقات بیماری‌های گیاهی
سال اول، شماره‌ی دوم، پاییز ۱۳۹۰
صص ۷۹-۶۹

واکنش به کلرات در جدایه‌های مختلف *Macrophomina phaseolina* و رابطه‌ی آن با بیماری‌زایی جدایه‌ها

[۱، ۲، ۳]

چکیده

یازده جدایه بیمارگر قارچ *Macrophomina phaseolina* از میزبانان مختلف شامل سویا، آفتابگردان، طالبی، خربزه و گندم از استان‌های مختلف کشور جداسازی گردیده و از نظر واکنش به کلرات پتاسیم بر روی محیط غذایی مورد آزمایش قرار گرفتند. بدین منظور جدایه‌ها در محیط غذایی کمینه حاوی ۱۲۰ میلی مولار کلرات پتاسیم کشت شدند. نتایج به‌دست آمده نشان داد که جدایه‌های مورد بررسی از نظر واکنش به کلرات در دو گروه قرار گرفتند که ۵۴/۵ درصد جدایه‌ها مقاوم به کلرات بوده و فنوتیپ متراکم داشتند. نتایج آزمون بیماری‌زایی جدایه‌ها بر روی گیاه سویا در گلخانه نشان داد که بین شدت پوسیدگی ریشه سویا و واکنش جدایه‌ها به کلرات پتاسیم رابطه‌ی نزدیکی وجود دارد. به‌طوری که جدایه‌های M21 و M30 با واکنش مقاوم به کلرات و فنوتیپ متراکم به‌عنوان بیماری‌زاترین جدایه‌ها شناسایی شدند.

واژه‌های کلیدی: بیماری‌زایی، حساس، مقاوم، فنوتیپ کلرات و *Macrophomina phaseolina*.

۱- .
۲- .
۳- .
*نویسنده مسئول مقاله:

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

یکی از عوامل مهم بیماری‌زایی قارچی با دامنه‌ی وسیع میزبانی که بیش از ۵۰۰ گونه گیاهی در ۱۰۰ خانواده را آلوده می‌نماید، بیمارگر خاکزی *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid بوده که عامل بیماری پوسیدگی زغالی در محصولاتی چون سویا، آفتابگردان، سورگوم، سیب زمینی، پنبه، جالیز، ذرت، کتان، گندم، کنجد، لوبیا، بادام زمینی، گلرنگ و ... می‌باشد(Jana *et al*., 2003; Su *et al*., 1998). علائم پوسیدگی ذغالی در گیاهان جوان شامل ایجاد لکه‌های سیاه و نامنظم می‌باشد که از پایه‌های لپه‌ها شروع شده و به سمت ساقه‌ها گسترش می‌یابد و درنهایت موجب مرگ گیاه می‌شود. گیاهان بالغ دچار پژمردگی می‌شوند و سیستم آوندی به‌دلیل تولید میکرواسکلروت، تیره یا خاکستری می‌شود. علائم مشخص بیماری شامل لکه‌های تیره یا خاکستری کشیده روی برگ‌های بالغ، تشکیل اسکلروت‌ها برروی ساقه، کاهش توان گیاه و درنهایت کاهش عملکرد می‌باشد. میکرواسکلروت‌ها منبع اولیه‌ی اینوکلوم برای آلودگی ریشه‌ها هستند، تا عمق ۲۰ سانتی‌متری خاک یافت می‌شوند و به مدت دو تا ۱۵ سال بسته به شرایط محیطی در خاک و بقایای گیاهی بقاء می‌یابند (Cook *et al*., 1973; Papavizas, 1977; Campbell and van der Gaay, 1993). بیماری پوسیدگی زغالی می‌تواند ۲۳ الی ۱۰۰ درصد محصول را از بین ببرد. آب و هوای گرم و خشک و دمای بالای ۲۸ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت دو الی سه هفته بعد از کاشت، بیماری را توسعه می‌دهد. جنس ماکروفومینا از نظر رده‌بندی مولکولی متعلق به رده‌ی Dothideomycetes، راسته‌ی Botryosphaeriales و خانواده‌ی Botryosphaeriaceae بوده و فقط دارای یک گونه *Macrophomina phaseolina* می‌باشد. فرم جنسی آن هنوز مشخص نشده است(Crous *et al*., 2006). از هم‌نام‌های مختلف نسبت داده شده به *M. phaseolina*، می‌توان *Macrophoma canchoci*، *Macrophoma conjani* و *Rhizoctonia bataticola* را نام برد (Mihail, 1992).

علی‌رغم اینکه *M. phaseolina* تولید مثل جنسی ندارد، تنوع ژنتیکی بالائی در جمعیت‌های آن در مطالعات انجام شده گزارش شده است. در هنگام جوش خوردن ریسه‌ها امکان تشکیل هتروکاریون پس از تفکیک و نوترکیبی میتوزی وجود دارد و بدین ترتیب تنوع در جمعیت‌های قارچی *M. phaseolina* ایجاد می‌شود. به‌رغم دامنه‌ی میزبانی وسیع بیمارگر، جنس *Macrophomina* تنها شامل یک گونه *M. phaseolina* بوده و با وجود این، اختلاف در ریخت‌شناسی و بیماری‌زایی جدایه‌های به‌دست آمده از میزبان‌های مختلف گزارش شده است(Dhingra and Sinclair, 1973). پژوهش‌های مختلفی که جهت شناسایی و تفکیک زیرگونه‌های احتمالی این قارچ بر مبنای اندازه‌ی میکرواسکلرت‌ها، اختلاف در تولید رنگدانه‌ها، قدرت اسپوردهی، اندازه پیکنیدیوم، تغییرات در جمعیت خاک در پاسخ به تناوب و تفاوت در بیماری‌زایی انجام شده، به‌دلیل تنوع زیاد درون گونه‌ای ناموفق بوده است(Dhingra and Sinclair, 1972, Cloud and Rupe, 1991 and Peasson *et al*., 1986, 1987a).

در سال‌های اخیر، طبقه‌بندی جدایه‌های *M. phaseolina* بر اساس ریخت‌شناسی پرگنه بر روی محیط کلرات پیشنهاد گردید. در این بررسی‌ها، از ساز و کار توانایی استفاده از منابع مختلف ازت استفاده شد. پیرسون و همکاران(Pearson *et al*., 1987b) بیان کردند که نحوه‌ی مصرف منابع ازته مبین آن است که جدایه‌های *M. phaseolina* برگرفته از سویا به‌طور موثرتر و بیشتر نسبت به جدایه‌های ذرت از منابع ازته استفاده می‌کنند و این اختلاف می‌تواند با نوع منبع ازته در شیره‌ی آوند چوبی سویا و ذرت مرتبط باشد. از این رو از آزمون فنوتیپ‌های کلرات به‌عنوان نشانگری برای تشخیص میزبان تخصصی جدایه‌های *M. phaseolina* استفاده شده است(Pearson *et al*., 1986). برای این منظور از محیط کمینه‌ی (Minimal medium) حاوی ۱۲۰ میلی مولار کلرات پتاسیم برای تعیین فنوتیپ‌های مقاوم(Resistant) و حساس (Sensitive) به کلرات استفاده می‌شود. کلرات، آنالوگی از نیترات به‌شمار می‌رود. احیای کلرات به کلریت از طریق نیترات ردوکتاز، منجر به سمیت کلرات در قارچ‌ها و گیاهان می‌شود. بررسی‌ها نشان داده است که *M. phaseolina* در این محیط سه نوع فنوتیپ تولید می‌کند که در دو گروه طبقه‌بندی می‌شوند. فنوتیپ‌های رشدی پر مانند(Feathery growth) و محدود(Restricted) در گروه حساس به کلرات و فنوتیپ رشدی متراکم(Dense) در گروه مقاوم به کلرات قرار می

Archive of SID

www.SID.ir

گیرند(Dhingra and Sinclair, 1972). عموما استرین‌های حساس به کلرات می‌توانند نیترات را به نیتریت احیا کنند و استرین‌های مقاوم به کلرات نمی‌توانند چنین کنند. نوع میزبان و منبع جداسازی اعم از خاک یا ریشه اثر معنی‌داری بر روی حساسیت به کلرات دارد و بین جدایه‌های هر میزبان و منبع جداسازی شده تفاوت‌های فنوتیپی دیده می‌شود. گروه‌بندی جدایه‌ها بر اساس تفاوت‌های فنوتیپی، به آسانی توسط نشانگر مولکولی RAPD نیز انجام پذیرفت. *طلیعی و همکاران* (Taliey *et al*., 2007) جدایه‌های قارچ *M. phaseolina* جدا شده از آفتابگردان، پنبه، خربزه، ذرت، زیتون، سورگوم، سویا، کاج سیاه، کنجد، گلرنگ، لوبیا، لوبیا چشم بلبلی، هندوانه و یونجه را از نظر واکنش به کلرات پتاسیم بررسی کردند. در این تحقیق جدایه‌ها در سه گروه فنوتیپی متراکم، محدود و پرمانند قرار گرفتند. داس و همکاران(Das *et al*., 2006) فنوتیپ کلرات جدایه‌های *M. phaseolina* از سورگوم را مورد مطالعه قرار داده و نتیجه گرفتند که جدایه‌های حساس به کلرات نسبت به انواع مقاوم به لحاظ ژنتیکی به یکدیگر نزدیک‌ترند. چرا که در دندروگرامی بر مبنای پلی مورفیسم RAPD جدایه‌های حساس به کلرات در دو گروه مجاور قرار گرفتند، درحالی‌که جدایه‌های مقاوم در گروه‌های مختلف به‌صورت پراکنده قرار گرفتند(Cook *et al*., 1973). نوع فنوتیپ کلراتی در شدت بیماری‌زایی جدایه‌ها بر روی میزبانان مختلف تاثیرگذار می‌باشد. به‌نحوی که تحقیقات انجام شده، مبین آن می‌باشد که جدایه‌های مقاوم به کلرات از بیماری‌زایی بالایی برخوردار بوده، در حالی که ایزوله‌های حساس به کلرات حالت تهاجمی کمتری دارند(Lohda *et al*., 2003).

بیماری پوسیدگی زغالی در ایران از پراکندگی جغرافیایی وسیعی برخوردار است و گزارش‌های متعددی از وجود بیماری بر روی گیاهان مختلف به‌عمل آمده است(Ershad, 1995). این تحقیق به بررسی میزان حساسیت به کلرات به‌عنوان شاخصی برای شناسایی جدایه‌های مختلف *M. phaseolina* و ارتباط آن با شدت بیماری‌زایی جدایه‌ها پرداخته است.

مواد و روش‌ها

جداسازی بیمارگر

به‌منظور جداسازی قارچ عامل بیماری، نمونه‌های مشکوک و مبتلا به بیماری با علایم پژمردگی و وجود خال‌های سیاه‌رنگ در طوقه و ساقه‌ی گیاهان سویا، آفتابگردان، خربزه، طالبی و گندم از استان‌های گلستان، اردبیل، مازندران، لرستان، اصفهان و اراک در سال‌های ۸۵ تا ۸۶ جمع‌آوری گردید. پس از شستشوی سطحی، قطعات کوچکی از بافت‌های آلوده با کلراکس پنج درصد ضدعفونی شده و در محیط غذایی سیب زمینی – دکستروز – آگار (PDA) حاوی آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل کشت شدند. تشتک‌های پتری حاوی بافت‌های آلوده‌ی کشت شده، در دمای ۲ ± ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد برای رشد قارچ به مدت سه روز نگهداری شدند. خالص‌سازی قارچ به روش نوک ریسه انجام گرفت و جدایه‌های قارچی روی خلال دندان در دمای چهار درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند.

شناسایی بیمارگر

شناسایی قارچ بر اساس ویژگی‌های مرفولوژیکی(ماکروسکوپی و میکروسکوپی) از جمله سرعت رشد پرگنه، رنگ پرگنه قارچی، مشخصات میکرواسکلروت و میسلیوم و مولکولی(آغازگر اختصاصی) انجام گرفت.

استخراج DNA به‌وسیله‌ی بافر CTAB به روش صفایی و همکاران(Safaie *et al*., 2005) انجام پذیرفت. از یک جفت آغازگر اختصاصی گونه MpKF1 (5′-CTCAAACAGGCATGCTC-3′) و MpKR1 (5′-CAGCAATAGTTGGTGGA-3′) جهت تکثیر اختصاصی DNA و شناسایی مولکولی جدایه‌ها استفاده شد (Babu *et al*., 2007). تکثیر DNA در حجمی معادل ۲۰ میکرولیتر از مخلوط واکنش PCR حاوی ۱۴/۵ میکرولیتر آب دیونیزه، دو میکرولیتر بافر PCR (PCR buffer 10X)، ۰/۶ میکرولیتر ($MgCl_2$ (50 Mm، ۰/۴ میکرولیتر dNTPs mix (10Mm)، یک میکرولیتر آغازگر (10µM)، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم (Taq DNA polymerase, 5u/ml) و یک میکرولیتر DNA انجام گرفت. برنامه حرارتی برای واکنش PCR و تکثیر قطعه DNA در ۲۵ چرخه شامل مرحله‌ی واسرشت‌سازی ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال ۵۶ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، مرحله‌ی بسط ۷۲ درجه‌ی

Archive of SID

www.SID.ir

سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه و مرحله‌ی بسط نهایی ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد تنظیم شد(Babu *et al*., 2007). برای مشاهده‌ی محصول PCR، الکتروفورز بر روی ژل آگارز یک درصد انجام گردید.

تهیه‌ی مایه‌ی تلقیح بیمارگر

برای تهیه‌ی مایه‌ی تلقیح قارچ جهت استفاده در آزمون بیماری‌زایی، مقداری برنج خیس خورده در فلاسک‌های شیشه‌ای به مدت ۲۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه‌ی سانتی‌گراد، دو مرتبه به فاصله‌ی ۲۴ ساعت اتوکلاو شد. سپس دو تا سه قطعه از حاشیه‌ی فعال پرگنه قارچی به قطر نیم سانتی‌متر با رعایت شرایط سترون به هر یک از فلاسک‌ها اضافه گردید. فلاسک‌ها در دمای ۲ ± ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۰ روز در تاریکی نگهداری شدند.

آزمون بیماری‌زایی

آزمون بیماری‌زایی با شش جدایه‌ی به‌دست آمده از سویا، دو جدایه از آفتابگردان و یک جدایه از خربزه، طالبی و گندم روی گیاه سویا به این ترتیب انجام گرفت که ابتدا بذور سویای ضدعفونی شده با کلراکس پنج درصد در گلدان‌هایی با قطر دهانه‌ی ۱۷ سانتی‌متر و محتوای ترکیبی خاک استریل، پرلیت و پیت ماس به نسبت ۱ :۱: ۱ کشت شدند. زمانی که برگ‌های سه برگچه‌ی اولیه ظاهر شدند، دانه‌های برنج آلوده به بیمارگر به میزان یک گرم در اطراف طوقه و ریشه‌ی هر بوته پخش گردیدند. در تیمار شاهد، گیاهان مورد آزمون با دانه‌های برنج غیر آلوده تلقیح شدند. آزمون در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با ۱۱ تیمار و سه تکرار انجام گرفت. داده‌های به‌دست آمده از اندازه‌گیری میزان پوسیدگی ریشه‌ی مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. گروه‌بندی تیمارها با استفاده از آزمون دانکن در سطوح یک و پنج درصد انجام شد.

بررسی فنوتیپ‌های کلرات در جدایه‌های قارچ *M. phaseolina*

برای انجام آزمون، ابتدا دیسک‌های نیم سانتی‌متری جدا شده از حاشیه‌ی فعال کلنی قارچی پنج روزه رشد کرده در محیط PDA، به محیط کمینه حاوی ۱۲۰ میلی مولار کلرات پتاسیم منتقل شدند. هر لیتر محیط کمینه شامل ۲۰ گرم آگار،۱/۶ گرم آسپاراژین، ۱۵ گرم کلرات پتاسیم، ۳۰ گرم ساکارز، دو گرم $NaNo_3$، یک گرم KH_2PO_4، نیم گرم $MgSO_4$ و دو میلی‌لیتر عناصر غذایی(۹۵ میلی‌لیتر آب مقطر، ۱۰ گرم اسیدسیتریک، ۱۰ گرم $ZnSO_4•7H_2O$ ، ۲ گرم $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2•6H_2O$ ، نیم گرم $CuSO_4•5H_2O$ ، ۱۰۰ میلی‌گرم $MnSO_4•H_2O$ ، ۱۰۰ میلی‌گرم H_3BO_3، ۱۰۰ میلی‌گرم $Na_2MoO_4•2H_2O$ و یک میلی‌گرم کلروفرم) بود. pH محیط روی ۶/۲ تنظیم گردید. از محیط کمینه‌ی فاقد کلرات پتاسیم به‌عنوان شاهد برای هر جدایه جهت مقایسه استفاده گردید. کشت‌ها در دمای ۲±۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۵ روز در تاریکی نگهداری شدند. بررسی صفات پرگنه‌ها از جمله ریخت شناسی و میزان رشد ریسه‌ها روی محیط کشت در روزهای پنجم و پانزدهم بعد از کشت انجام گرفت. آزمون در قالب طرح کاملا تصادفی با ۱۱ جدایه و سه تکرار، دو مرتبه انجام گرفت.

نتایج

علایم ناشی از قارچ *M. phaseolina* در سطح مزرعه بسته به زمان آلوده شدن گیاه در طول فصل رشد فرق می‌کند. از مجموع نمونه‌های آلوده‌ی منتقل شده به آزمایشگاه، ۱۱ جدایه‌ی *M. phaseolina* جداسازی و خالص‌سازی گردیدند. پرگنه‌ی قارچی در محیط PDA ابتدا به رنگ سفید و کرک مانند بوده و سپس به مرور زمان قهوه‌ای تا خاکستری شده و درنهایت با پیر شدن قارچ، سیاه می‌شود. از لحاظ ویژگی‌های میکروسکوپی، میسلیوم‌ها دیواره‌دار بوده و معمولا با هیف اصلی انشعابات راست دارند. اسکلروت‌ها از تجمع سلول‌های هیفی یا تقسیم یک سلول منفرد به‌وجود می‌آیند که توسط ماده‌ی ملانین به‌هم می‌چسبند. اسکلروت‌ها سیاه کروی تا کشیده و نامنظم می‌باشند(شکل ۱). استفاده از آغازگرهای اختصاصی MpKF1 و MpKR1، تکثیر یک قطعه به اندازه‌ی ۳۵۰ bp را در تمامی جدایه‌ها سبب گردید که موید گونه‌ی تیپ *M. phaseolina* می‌باشد (شکل ۲).

در آزمون بیماری‌زایی، گیاهان مورد آزمایش ۶۰ روز بعد از تلقیح ۱۱ جدایه‌ی قارچ *M. phaseolina*، برای اندازه‌گیری میزان پوسیدگی ریشه مورد بررسی قرار گرفتند(شکل ۳). میکرواسکلروت‌های قارچ سطوح بیرونی و داخلی طوقه و ساقه را

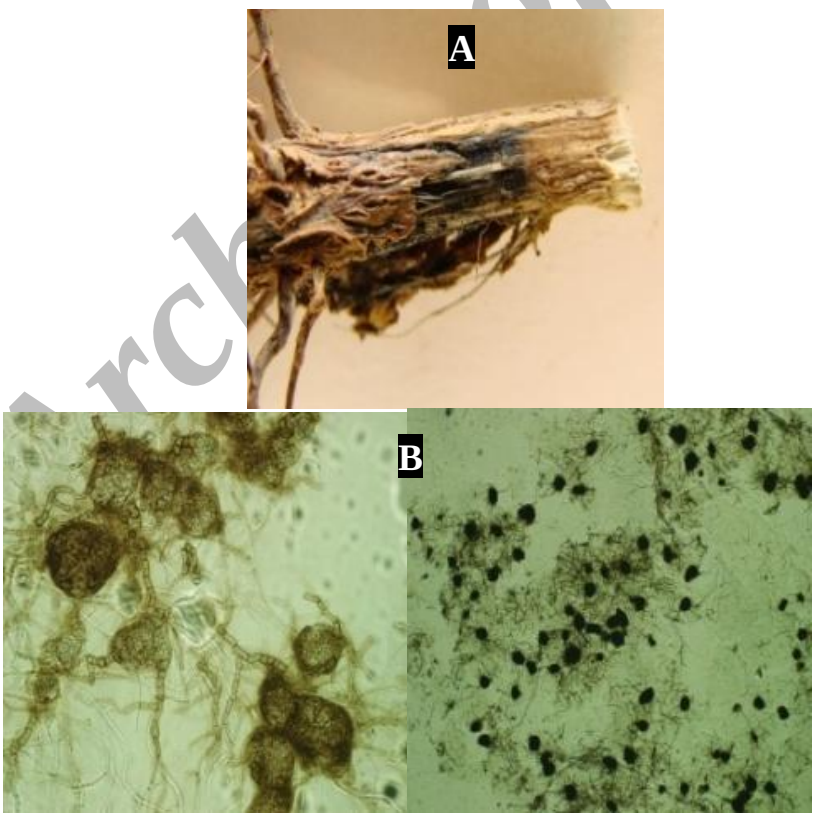
Archive of SID

www.SID.ir

پوشانده بودند. نتایج حاصله از تجزیه و تحلیل داده‌ها، نشان داد که تیمارها در سطوح یک درصد اختلاف معنی‌داری دارند. مقایسه‌ی میانگین انجام شده‌ی جدایه‌ها را در پنج گروه طبقه‌بندی کرد که جدایه‌های M21 و M30 با بیشترین درصد پوسیدگی ریشه، به‌عنوان بیماری‌زاترین جدایه‌ها شناخته شدند(جدول ۱).

جدول ۱- مشخصات فنوتیپی جدایه‌های *Macrophomina phaseolina* در آزمون واکنش به کلرات و گروه‌بندی جدایه‌ها بر اساس درصد پوسیدگی ریشه در آزمون بیماری‌زایی.

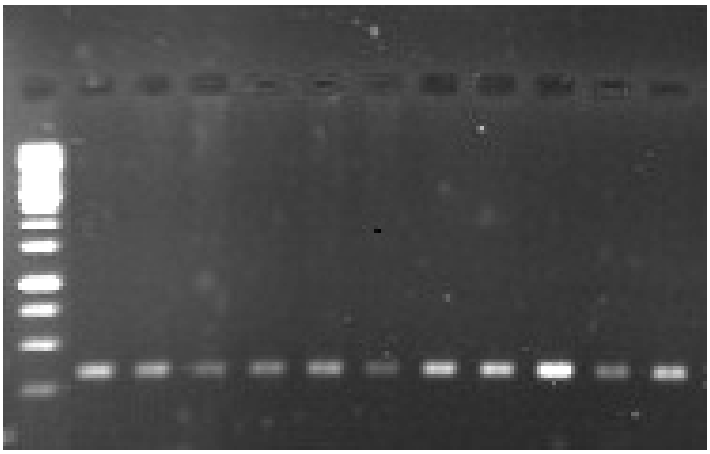
نام جدایه	محل جمع آوری	میزبان	واکنش به کلرات	فنوتیپ	آزمون بیماری‌زایی
MA3	لرستان-الشتر	سویا	حساس	پرمانند	20^{e}
MB1	اردبیل-مغان	سویا	حساس	محدود	20^{e}
MB2	اردبیل-مغان	سویا	حساس	محدود	42^{b}
M13	گلستان-کردکوی	سویا	حساس	محدود	35^{c}
M21	گلستان-فاضل آباد	سویا	مقاوم	متراکم	48^{a}
M30	مازندران-بابلسر	سویا	مقاوم	متراکم	48^{a}
MAF1	گلستان-لمسک	آفتابگردان	مقاوم	متراکم	42^{b}
MAF2	گلستان-لمسک	آفتابگردان	مقاوم	متراکم	42^{b}
MT	اصفهان-کازرون	طالبی	مقاوم	متراکم	27^{d}
MKH	اصفهان-داراب	خربزه	مقاوم	متراکم	20^{e}
MG	مرکزی-اراک	گندم	حساس	پرمانند	20^{e}



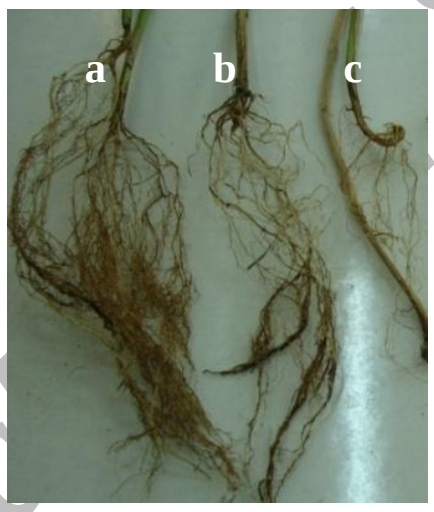
شکل ۱ - A - میکرواسکلروت‌های *Macrophomina phaseolina* ایجاد شده در روی طوقه‌ی سویا B- هیف با انشعابات راست و میکرواسکلروت های قارچ

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۲ - الگوی باندی حاصل از تکثیر DNA با استفاده از آغازگرهای اختصاصی MpKR1 و MpKF1 در جدایه‌های مختلف *Macrophomina phaseolina*. L: DNA lader 1 kbp.

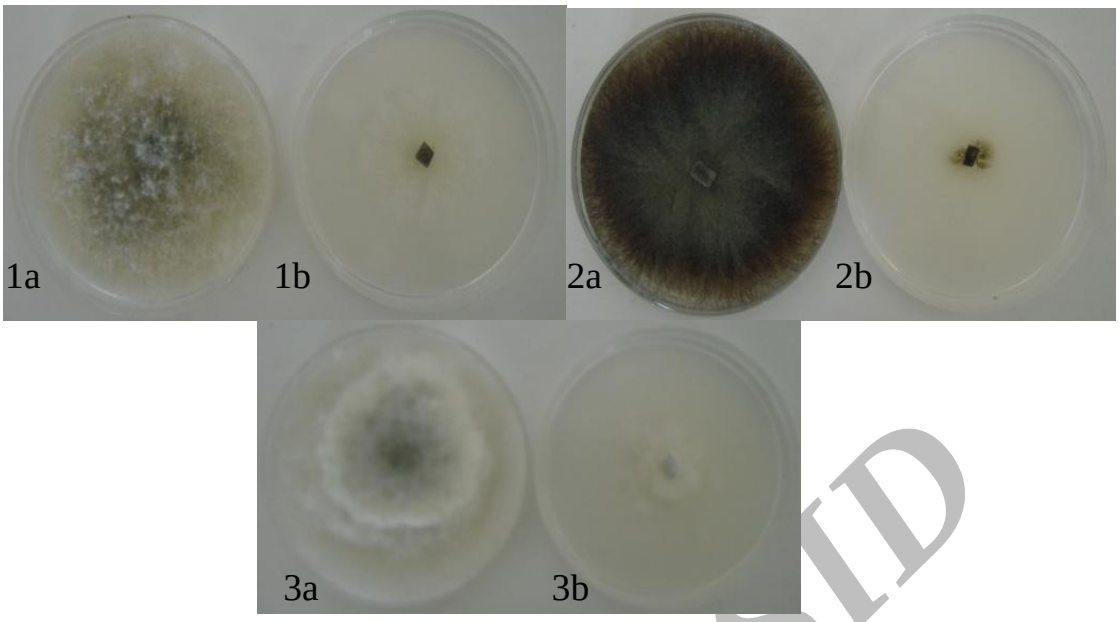


شکل ۳- علایم پوسیدگی ریشه‌ی سویا ناشی از *Macrophomina phaseolina*
a: ریشه گیاه شاهد b: ریشه گیاه آلوده به جدایه‌ی حساس به کلرات
c: ریشه‌ی گیاه آلوده به جدایه‌ی مقاوم به کلرات.

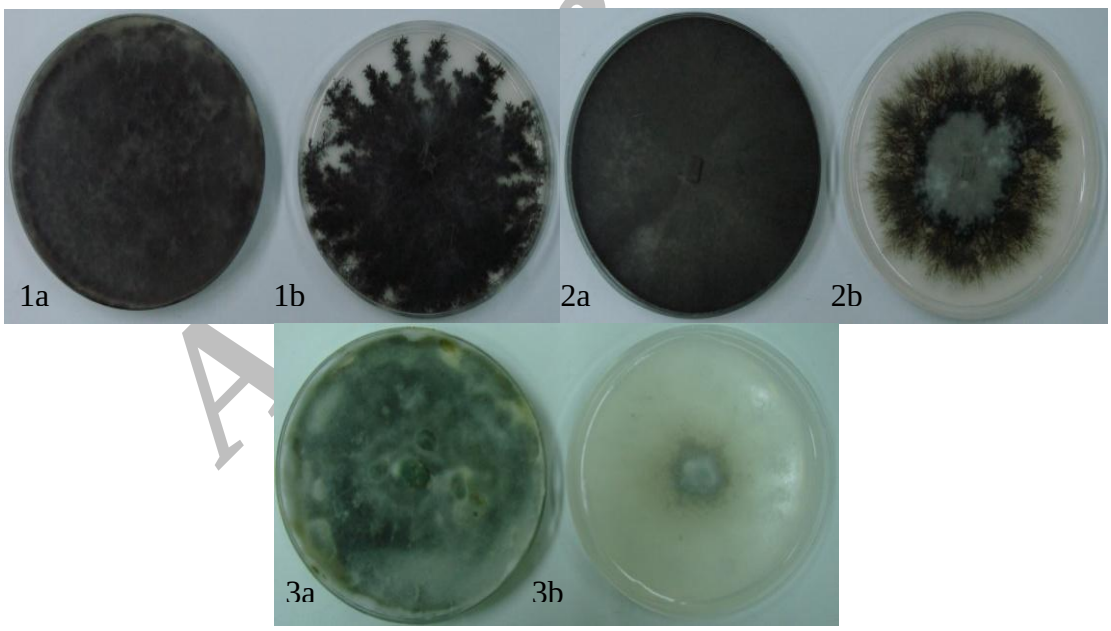
در بررسی فنوتیپ کلرات در جدایه‌های قارچی *M. phaseolina* انتخاب شده برای آزمون مقاومت به کلرات، جدایه‌ها از لحاظ مقاومت در دو گروه مقاوم و حساس و از لحاظ مرفولوژیکی در سه گروه متراکم، پرمانند و محدود طبقه‌بندی شدند(جدول ۱). جدایه‌های آفتابگردان، خربزه، طالبی و دو جدایه‌ی سویا به‌دست آمده از استان‌های مختلف با صفت مقاومت به کلرات دارای فنوتیپ متراکم بوده و بقیه‌ی جدایه‌ها از جمله جدایه‌های سویا و گندم با حساسیت به کلرات، فنوتیپ‌های محدود و پرمانند را نشان دادند(شکل ۴ و ۵). همچنین بررسی‌ها نشان داد که تولید میکرواسکلروت روی محیط کلرات پتاسیم به‌وسیله‌ی جدایه‌های مقاوم در مقایسه با جدایه‌های حساس خیلی بیشتر بوده است.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۴- فنوتیپ‌های حاصل از رشد *Macrophomina phaseolina* روی محیط کمینه پنج روز بعد از کشت
a- محیط فاقد کلرات b- محیط حاوی ۱۲۰ mM کلرات پتاسیم
1- جدایه M13 2-جدایه M30 3-جدایه MG.



شکل ۵- فنوتیپ‌های حاصل از رشد *Macrophomina phaseolina* روی محیط کمینه ۱۵ روز بعد از کشت
a- محیط فاقد کلرات b- محیط حاوی ۱۲۰ mM کلرات پتاسیم
1- جدایه M13 2-جدایه M30 3-جدایه MG.

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

به‌طورکلی جدایه‌هایی از قارچ‌ها که دارای نیترات ردوکتاز فعال باشند، به کلرات حساس هستند؛ درحالی‌که جدایه‌هایی که قادر به کاتابولیز نیترات نیستند، بـه کلـرات مقـاوم مـی‌باشـند(Marzluf, 1981). جدایـه‌هـای برخـی از نمونـه‌هـای قـارچی *Verticillium dahliae* و *V. albo-atrum* زمانی که روی محیط آگار حاوی کلرات پتاسیم قرار مـی‌گیرنـد، ابتـدا رشدشـان متوقف می‌شود؛ سپس سکتورهای تصادفی و سریع الرشدی تولید می‌کنند. این جهش‌یافتگان مقاوم به کلرات کـه دارای نقـص ژنتیکی در زمینه‌ی سنتز آنزیم احیاکننده‌ی نیترات هستند؛ روی محیط حداقل که فقـط دارای نیتـرات بـه‌عنـوان تنهـا منبـع نیتروژن است، قابل شناسایی می‌باشند. در این حالت کلرات به‌عنوان آنالوگ نیترات عمل کرده و بـه‌وسـیله‌ی نیتـرات ردوکتـاز تبـدیل بـه مـاده سـمی کلریـت مـی‌شـود. جهـش‌یافتگـان در ایـن محـیط، رشـدی ضـعیف و بـدون اسـپورزایی دارنـد (Correll, and Leslie, 1987). بر خلاف قارچ مذکور، *M. phaseolina* بر روی محیط حاوی کلرات، سکتور مقاوم به کلرات تولید نمی‌کند، اما در واکنش به کلرات بین جدایه‌های مختلف تفاوت‌هایی دیده مـی‌شـود(Pearson *et al*., 1987a). بررسـی فنوتیپ کلرات در جدایه‌های *M. phaseolina* جدا شده از میزبانان و مناطق مختلـف نشـان داد کـه ۵۴/۵ درصـد جدایـه‌هـا، مقاوم به کلرات بوده و فنوتیپ متراکم داشتند. علاوه بر تولید بیشتر و متـراکم‌تـر میکرواسـکلروت در جدایـه‌هـای مقـاوم روی محیط کمینه‌ی حاوی کلرات پتاسیم، سرعت رشد شعاعی پرگنه‌ی این جدایه‌ها روی محیط مذکور نسبت به جدایه‌های دیگـر بالاتر بود.

جدایه‌های سویای مورد استفاده دارای هر دو نوع عکس‌العمل مقاوم و حساس بودند که تعداد فنوتیـپ پـر ماننـد بیشـتر از متراکم(چهار به یک) بود. در تحقیق انجام شده توسط سو و همکاران(Su *et al*., 2001) در میان ۱۱ جدایـه‌ی سـویای مـورد آزمون، هر دو نوع گروه مقاوم و حساس به کلرات شناسایی شدند که در این آزمون نیز در میان جدایه‌های مورد بررسی تعـداد فنوتیپ رشدی پر مانند(شش جدایه)، بیشتر از فنوتیپ متراکم(یک جدایه) بـود. از ایـن‌رو بـا توجـه بـه تفـاوت حساسـیت در جدایه‌های مختلف *M. phaseolina* به کلرات، می‌توان از این خصوصیت برای گروه‌بندی جدایـه‌هـای مختلـف آن کـه ضـمن داشتن تنوع بالا فاقد فرم جنسی می‌باشد، استفاده نمود. اما به‌دلیل تنوع کم فنوتیپی(سه فنوتیپ) حاصله از میزبانـان مختلـف در تحقیقات انجام شده، تنها به این خصوصیت نمی‌توان اکتفـا کـرد(Cloud and Rupe, 1991, Su *et al*., 2001, Das *et al*., 2006, Purkayastha *et al*., 2006).

همچنین بررسی‌ها نشان داد که جدایه‌های مقاوم به کلرات، از قدرت بیماری‌زایی بالاتری نسـبت بـه جدایـه‌هـای حسـاس برخوردار بودند. این نتایج با تحقیقات انجام شده توسط پورکایاستا و همکاران(Purkayastha *et al*., 2006) هماهنگی داشته، به‌طوری‌که در تحقیق‌های انجام گرفته، مشخص شده است که حساسیت به کلرات در میـان جدایـه‌هـای *M. phaseolina* بـا شدت بیماری پوسیدگی زغالی ارتباط نزدیکی دارد و جدایه‌های مقاوم به کلرات دارای قدرت بیماری‌زایی بالاتری هسـتند. بـالا بودن قدرت بیماری‌زایی جدایه‌های مقاوم در بررسی‌های گلخانه‌ای را می‌توان به تولید بیشتر و متراکم‌تر میکرواسکلروت و رشد شعاعی سریع‌تر این جدایه‌ها روی محیط کمینه، مرتبط دانست. از آنجایی که جدایه‌های حساس به کلـرات *M. phaseolina*، ترکیب نیتروژنی مورد مصرف جدایه‌های مقاوم به کلرات را مصرف نمی‌کنند؛ تفاوت سرعت رشد روی محـیط کلـرات پتاسـیم می‌تواند به‌دلیل تفاوت توانایی‌های جدایه‌ها در استفاده از منابع نیتروژنی نسبت به توانایی آنها در بلوکه کردن اثر سمی کلـرات باشد. هرچند مطالعات سو و همکاران(۲۰۰۱) نشان داد که جدایه‌های حساس به کلرات نسبت به جدایه‌های مقاوم بـه کلـرات، از توانـایی بـالاتری در کلنیـزه کـردن ریشـه‌ی سـویا برخـوردار بودنـد. ممکـن اسـت کـه سـویا روی متابولیسـم نیتـروژن در *M. phaseolina* تاثیر داشته باشد. همچنین گزارش شد که جدایه‌های *M. phaseolina* از سورگوم با فنوتیپ متراکم، وقتی به سویا مایه‌زنی شدند، شروع به تغییر به الگوی رشد محدود کردند. بر اساس نتایج بـه‌دسـت آمـده از تحقیقـات، ایـن امـر بـه متفاوت بودن منابع ازته‌ی گیاهان مختلف نسبت داده شده است(Su et al., 2001).

Archive of SID

www.SID.ir

نتیجه‌گیری کلی

از آنجایی که بیماری پوسیدگی زغالی، یک بیماری وابسته به استرس است و بیشتر به گیاهان مسن تحت شرایط نامطلوب محیطی حمله می‌کند؛ بنابراین می‌توان وقوع واکنش‌های متفاوت به کلرات را به تغییر ترکیبات ازته‌ی گیاه تحت استرس نسبت داد. زیرا تغییرات در متابولیسم ازت میزبان تحت تنش، ممکن است باعث تبدیل یک گیاه به سوبسترای مناسب برای بیمارگر شود(Taliey *et al*., 2007). تحت شرایط تنش، ترکیبات مختلف ازته از جمله اسیدهای آمینه‌ی آزاد در گیاه تولید می‌شوند که توسط بیمارگرهای فرصت‌طلبی مانند *M. phaseolina* به‌عنوان منبع انرژی مورد استفاده قرار می‌گیرند. البته به‌نظر می‌رسد، جدایه‌های مختلف از نظر مصرف انواع این منابع با هم متفاوت هستند(Strausbaugh *et al*., 1992). بررسی‌ها نشان می‌دهد که گونه‌های گیاهی مختلف از نظر وجود ترکیبات مختلف ازت درون آوندهای چوبی متفاوت هستند. بنابراین قادر به ایجاد فشار انتخاب بر روی بیمارگر بوده و اختصاصیت میزبانی برای استرین‌های مختلف یک بیمارگر را موجب می‌شود. از طرفی جدایه‌های مختلف قارچ که از نظر حساسیت به کلرات متفاوت هستند، دارای اختصاصیت میزبان هستند؛ هرچند که هنوز ساز و کارهای اختصاصی دخیل در این ارتباط دقیقا مشخص نشده است(Su *et al*., 2001).

Archive of SID

www.SID.ir

References:

1. Booth C. 1971. The Genus *Fusarium*. CMI. Kew, Survey, UK. 237p.
2. Burgess L W, Summerell B A , Bullock S, Gott K P and Backhous D. 1994. Laboratory Manual for *Fusarium* Research. *Fusarium* Research Laboratory, Department of Crop Science, University of Sydney and Royal Botanic Gardens. 133p.
3. Chandra S, Raizada M and Gaur A K S. 1983. Pathological variability in *Fusarium oxysporum* and *F. solani*. Indian Phytopatholoy 36: 36- 40.
4. Chen W and Swart W. 2001. Genetic variation among *Fusarium oxysporum* isolates associated with root rot of *Amaranthus hybridus* in South Africa. Plant Disease 85:1076-1080.
5. Correll J C, Klittich C J R and Leslie J F. 1987. Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. Phytopathology 77:1640-1646.
6. Correll J C, Puhala J E and Schneider RW. 1986. Identification of *Fusarium oxysporum* f.sp. *appi* on the basis of colony size, virulence, and vegetative compatibility. Phytopathology 76: 396-400.
7. Cucuzza J D, Watterson J C and Bernhardt E A. 1991. Foot rot of tomato caused by *Fusarium solani* in California. Plant Disease 76:101.
8. Dhingra O D and Sinclair J B. 1987. Basic Plant Pathology Methods. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. 355p.
9. Elmer W H and Stephens C T.1989. Classification of *Fusarium oxysporum* f.sp. *asparagi* into vegetative compatible groups. Phytopathology 79 : 88-93.
10. Hawthorn B T and Rees-George J. 1996. Use of nitrate non-utilizing mutants to study vegetative incompatibility in *Fusarium solani* (*Nectria haematococca*), especially members of mating population I, V, and VI. Mycological Research 100 : 1075-1081.
11. Kistler H C. 1997. Genetic diversity in the plant pathogenic fungus, *Fusarium oxysporum*. Phythopathology 87 : 474-479.
12. Klittich C J R and Leslie J F. 1988. Nitrate reduction mutants of *Fusarium moniliform* (*Gibberella fujikuroi*). Genetics 118 : 417-423.
13. Leslie J F. 1993. Fungal vegetative compatibility. Annual Review of Phytopathology 31 : 127-150.
14. McDonald B. 1997. The population genetics of fungi : tools and techniques. Phytopathology 87 : 448-453.
15. Menzies J G, Koch C and Seywerd F. 1990. Additions to the host range of *Fusarium oxysporum* f.sp *radicis-lycopersici*. Plant Disease 74 : 569-572.
16. Mohammadi A and Nooras Mofrad N. 2009. Genetic diversity in population of *Fusarium solani* from cumin in Iran. Journal of Plant Protection Research 49 : 283-286.
17. Nash, S. M., and Snyder, W. C. 1962. Quantitative estimations by plate counts of propagules of the bean root rot Fusarium in field soils. Phytopathology 52:567-572.
18. Nelson P E, Toussoun TA and Marasas W F D. 1983. *Fusarium* species: An Illustrated Manual for Identification. Pennsylvania State University Press. 193p.
19. Ommati F and Ershad J. 2004. Identification of fungal agents of tomato wilting from nurseries and field of Semnan province. Paper presented at: 16th Iranian Plant Protection Congress; Aug. 28- Sept. 1; Tabriz, Iran.
20. Puhalla J E. 1985. Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. Canadian Journal of Botany 63 : 179-183.

www.SID.ir

21. Rahkhodaei E. 2000. Vegetative compatibility groups and pathogenicity of *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum* from potato in Fars and Khuzestan Provinces. Msc. thesis. Shahid Chamran university. 108P.
22. Raouffi M, Farrokhi Nejad R and Mahmoudi S B. 2004. Population genetic diversity of *Fusarium solani* the causal agent of sugar beet root rot, using vegetative compatibility groups (VCGs) and its relationship to virulence of isolates. Sugar Beet. 20(1): 39-53.
23. Romberg M K and Davis R M. 2007. Host range and phylogeny of *Fusarium solani* f.sp. *eumartii* from potato and tomato in California. Plant Disease 91 : 585-592.
24. Sidhu G F and Webster J M. 1979. A study of heterokaryosis and its influence on virulence in *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Canadian Journal of Botany 57 : 548-555.
25. Vawdrey L L and Peterson R A. 1988. *Fusarium solani,* cause of foot rot of tomatoes in central Queensland. Australasian Plant Pathol. 17: 24–25.
26. Venter S L , Theron D J , Steyn P J , Ferreira D I and Eicker A.1992. Relationship between vegetative compatibility and pathogenecity of isolates of *Fusarium oxysporum* f.sp. *tuberosi* from potato. Phytopathology 82 : 858-862.
27. Viani A , Alizadeh A , Babadoost M and Pieghami E. 2008. Investigation on *Fusarium* diseases of tomatoes in East Azarbaijan. Journal of Agricultural Science and Natural Resources 14(5) : 192-206.
28. Wolcan S M and Lori G A. 1993. Tomato foot rot caused by *Fusarium solani*. Review of Plant Pathology 72: 2193.
29. Woo S L , Zoina A , Delsorbo G , Lorito M , Nanni B , Scala F and Novielo C. 1996. Characterization of *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* by pathogenic races, VCG, RLFP, and RAPD. Phytopathology 86 : 966-973.

Archive

www.SID.ir