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

زهرا وکیلی زارج* - کامران رهنما[1]

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 گونه ایی قارچ بر اساس فاکتورهای فنوتیپی محدودمی باشد، بررسی گروههای سازگاری میسلیومی به عنوان معیار مناسبی برای طبقه بندی و تفکیک هتروژنی درون گونه ایی 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 به‌صورت 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 آناستوموز 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 می‌دهدکه هتروژنی ژنتیکی در داخل این گونه وجود داشته و واکنش سازگاری ناسازگاری میسلیومی روش موثری برای طبقه بندی هتروژنی درون گونه ایی می‌باشد.

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

مقدمه

قارچ خاکزی *Sclerotinia sclerotiorum* به عنوان عامل بیماری زا جهانی تفاوت زیادی در فنوتیپ 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 به‌اینکه تشخیص هتروژنی گروه‌های درون گونه‌ای

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

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 اونتاریو تا شمال آلبرتا کانادا نشان داد که این جدایه‌ها از نظر ژنتیکی هتروژن و با تعدادی کلون[1] قابل تشخیص هستند. این کلون‌ها سبب تفکیک ژنتیکی و جدا سازی ژنوتیپی درون گونه‌ای می‌گردد. تفکیک و جدا سازی کلون‌ها براساس گروههای سازگار میسلیومی[2] و انگشت نگاری DNA[3] صورت گرفته به طوری‌که همه اعضا یک کلون با هم سازگاری میسلیومی دارند و با اعضا کلون‌های دیگر ناسازگاری دارند و همچنین انگشت نگاری DNA یکسانی دارند(۴).

سیستم سازگاری – ناسازگاری میسلیومی 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 *Cryphonectria parasitica* و *Ophiostoma 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 میسلیومی در بین جدایه‌های قارچ وجود دارد که قابل مقایسه با سطح ناسازگاری رویشی است این مورد در آسکومیست‌های دیگرنیز گزارش شده است. ناسازگاری رویشی در دامنه وسیعی از آسکومیست و آنامورف آسکومیست‌ها شامل

Cochliobolis heterostrophus , *Septoria nodorum* *Aspergillus nidulanse* , *Podospora anserine* , *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 میسلیومی که احتمالا 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 میسلیومی *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 موتان‌هایی که از نیتروژن استفاده نکنند در این گونه موجود نمی باشد و ناسازگاری میسلیومی به راحتی قابل بررسی برای ناسازگاری هتروکاریونی در آزمون‌های مکمل نمی باشد اما معیارهای مولکولی برای بررسی تنوع و اختلاف ژنتیکی بین و داخل MCG به آسانی موجود است(۷).

جدایه‌های متعلق به یک گروه سازگار میسلیومی که روی محیط کشت تعریف شده MPM[4] کشت داده شده به طرف هم رشد کرده و تشکیل یک پرگنه را می‌دهند این جدایه‌ها دارای یک یا دو باند پروتئینی

1- clone
2- MCG
3- fingerprint
4- Modified Patterson Medium

یکسان مربوط به آن MCG[1] می‌باشندو 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 مانیتوبا و کلم در شمال کارولینا و سویا در آرژنتین و کانادا دیده شده، بررسی سازگاری یا ناسازگاری میسلیومی ممکن است روش مؤثری برای طبقه بندی هتروژنی درون گونه‌ای قارچ باشد، و برای مطالعات بیولوژی و تنوع جمعیت و عامل بیماری زا 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 به‌دست می‌آیند در صورتی‌که 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 تکراربالا وجودداشته باشد همان طور که در جدایه‌های مزارع کلزا در استان‌های اونتاریو ، مانیتوبا و ساسکا چوان کانادا بررسی شده است (۳،۴).

بررسی‌ها نشان داده با اینکه *S sclerotiorum* یک قارچ جور ریسه 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 ولی مبادله ژنتیکی و نوترکیبی در کنار جهش در ایجاد ژنوتیپ جدید و تنوع ژنتیکی قارچ نقش دارد. هتروژنی درون گونه‌ای را با تعیین گروه‌های سازگار میسلیومی می‌توان بررسی نمود(۶).

علاوه برآن 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).

نظربه 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 برروی گوناگونی جدایه‌ها و تهاجم MCG در جمعیت قارچ تأثیر گذار است. به طوری‌که 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 میسلیومی به روش ماکروسکوپی و میکروسکوپی استفاده شد، که استفاده از این سیستم به

1- Mycellial Compatibillity Group

منظـور مطالعـه سـاختار جمعیـت بیمـارگرو گونـاگونی در بیماریزایی جدایه‌ها در سیستم مدیریت بیماری قابل اسـتفاده اسـت و تعیـین سـازگاری-ناسـازگاری میـسلیومی جدایه‌های قارچ *S sclerotiorum* اولین بررسی در این زمینه در کشور می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در طـی فـصل زراعـی گیـاه کلـزا نمونـه بـرداری از اول فروردین ماه ۱۳۸۳ شروع و تا تیرماه از مزارع مختلف اسـتان گلـستان ادامـه یافـت. بعـد از جـدا سـازی و خـالص سـازی جدایه‌های قارچی در محیط سیب زمینـی دکـستروز آگـار و آب آگـار، ۱۹ جدایـه از منـاطق مختلـف اسـتان گلـستان بـه‌دسـت آمـد، کـه از ایـن جدایـه‌هـا دربررسـی سـازگاری ناسازگاری میسلیومی استفاده گردید(جدول۱).

تعیین سازگاری میسلیومی جدایه‌های *S. sclerotiorum*
محیط کشت ماده رنگی قرمز +MPM

برای تعیین سازگاری میسلیومی از محیط کـشت MPM با تغییراتـی (بـدون مـاده رنگـی Mccormack) شـامل۰/۶۸ گـرم KH_2PO_4، ۰/۵ گـرم $MgSo_4.7H_2O$، ۰/۱۵ گـرم Kcl، ۰/۵ گـرم عـصاره مخمـر، ۱گـرم NH_4NO_3 ، ۱۸/۴۰گـرم Dگلوکز، ۰/۲ میلی لیتـر محلـول عناصـر تـراس (کـود مـایع ازته)، ۱۵ گـرم آگـار و۱ میلـی لیتـر از محلـول رنگـی قرمـز خوراکی(شرکت Abias شیمی) برای هر لیتر اسـتفاده شـد. هر جدایـه قبـل از اسـتفاده بـرای جفـت شـدن، ابتـدا در ایـن محیط کشت قرار داده شد. لازم بـه ذکـر اسـت کـه محلـول رنگـی قرمـز بـرای تفکیـک محـیط کـشت از سـایر محـیط کشت‌ها و مهمتر از آن بـا جمـع شـدن در ناحیـه واکـنش بـه عنوان نشانه برای تفکیک انواع ناسازگاری استفاده شد (۶).

جفت شدن میسلیومی به منظور مطالعه ماکروسکوپی

برای این مورد از جدایه‌هـایی کـه در محـیط MPM در دمـای اتـاق (22^0_C) بـه مـدت ۷ روز کـشت شـده، اسـتفاده گردید. سپس بلوک‌های ۵ میلی متری از حاشـیه رشـدپرگنه در فاصـله۳/۵ سـانتیمتر از جدایـه دیگـر درتـشتک پتـری ۹ سانتی متری روی محیط MPM در دمـای اتـاق قرارگرفـت. جدایه‌ها در ۴ تکـرار در مقابـل جدایـه دیگـر قـرار گرفتـه و واکنش جفت شدن طی ۷ و ۱۴ روز مورد بررسی قرار گرفت.

جفت شدن میسلیومی به منظور مطالعه میکروسکوپی

اسلایدهای شیشه‌ای میکروسکوپی با لایه نـازک MPM یاWA پوشیده شدو سپس درتشتک پتری سترون روی کاغذ صافی قرارگرفت. در شـرایط سـترون روی هـر لام شیـشه‌ای بلوک‌های آگـار ۵ میلـی متـری از جدایـه‌هـا بـه فاصـله ۱/۵ سانتی متر از هم قرارگرفت. سپس کاغذ صافی بـا گلیـسرول ۵٪ برای حفظ رطوبت اشباع شد و درشرایط تاریکی و دمـا 22^0_C قرارگرفت. برای هر جفت شدن نیـز ۵ تکـرار در نظـر گرفته شد. واسلایدها پس از ۴،۷ و ۱۴ روز با قرار دادن یک لامل روی بلوک آگار با میکروسکوپ مـورد ارزیـابی قـرار گرفتند(۶).

نتایج و بحث

ارزیابی ماکروسکوپی جفت شدن میسلیومی

نتـایج حاصـل از جفـت شـدن میـسلیومی ۱۹ جدایـه در شکل۱ آمده است، جدایه‌ها در حالـت سـازگار بـه صـورت مربع شکل و در حالت ناسازگار به صورت دایـره شـکل کـه البته با توجه به نوع ناسازگاری حالات مختلف شکلی نمایان می شود (به صورت مربـع خـالی،دایره خـالی، کـاملاً پـر یـا متقاطع). خط قرمز موجود در ناحیـه واکـنش در تعـدادی از جفت شدن ناسازگار به علت جمع شدن ماده رنگی قرمـز در ناحیه واکنش و تا حدودی به علت وجـود عناصـر رنگـی در سیتوپلاسم هیف می باشد.

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	Ss18	Ss16	Ss20	Ss19	Ss11	Ss8	Ss13	Ss6	Ss2K	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 مسیلیوم 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

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

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

در جفت شدن ریسه‌های ناسازگار چندین حالت در بین جدایه‌های مختلف توصیف گردیدشامل :

۱- زمانی‌که 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، شکل۳)

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

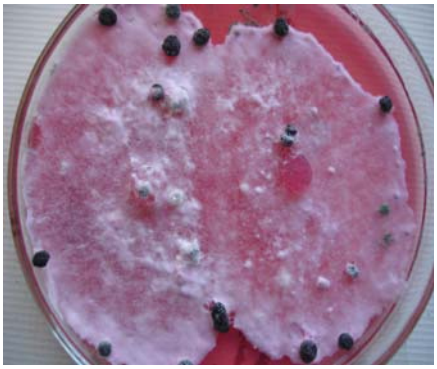
۳- زمانی‌که خط قرمز روی پرگنه و در حالت برعکس پرگنه (از پشت پتری) دیده می شود البته فضا آزاد میسلیومی در ناحیه واکنش مشاهده شد(دایره متقاطع، شکل ۵).

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

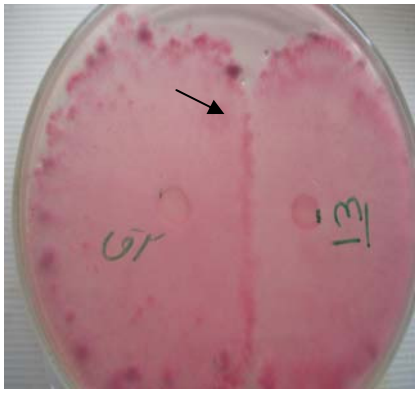
۵- زمانی‌که خط قرمز مشخصی دیده نمی شود ولی یک باند نازک میسلیوم تقریباً به صورت خط در ناحیه واکنش مشاهده شد(دایره⊖ شکل ۷). از ۱۹ جدایه آزمایش شده حالات مختلف ناسازگاری دیده شد و در حالت self-self به صورت سازگار بودند. سپس بعد از ۷ یا ۱۴ روز جفت شدن‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

در جدایه Ss6 از ۵ حالت ناسازگار تنها ۲ حالت دیده شده شامل(دایره تو پر و دایره⊖) که بیش‌ترین حالت ممکن هم به صورت باند مشخص و فراوان از میسلیوم 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 نشدو در

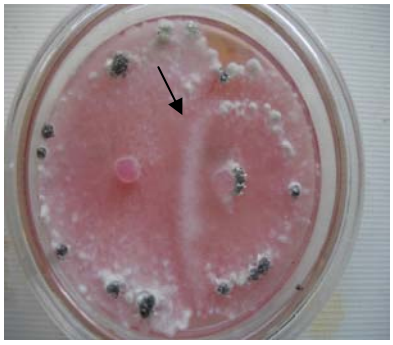
جدایه‌های Ss8,Ss18 حالتی از فضا آزاد میسلیومی(دایره متقاطع) مشاهده نشد. در ۱۲ جدایه از ۱۹ جدایه مورد آزمایش (Ss1،Ss3،Ss4،Ss5،Ss7، Ss12،Ss2،Ss16،Ss20،Ss11،Ss2K،Ss1C) هر ۵ حالت ناسازگاری دیده شد.



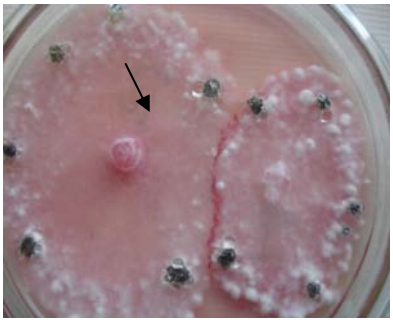
شکل۲- سازگاری میسلیومی جدایه Ss13 × Ss13 در محیط MPM + ماده رنگی قرمز غذایی، پس از گذشت ۷ روز

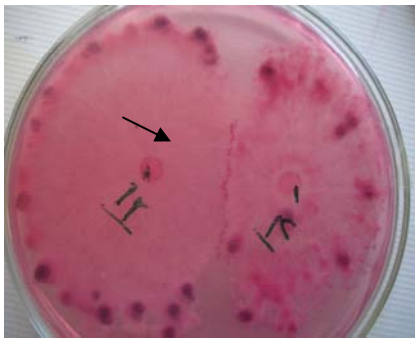


شکل۳- ناسازگاری میسلیومی جدایه $Ss_2 \times Ss_{13}$، وجود خط قرمز در سطح پرگنه و برعکس (پشت پتری) در ناحیه واکنش در محیط MPM+ ماده رنگی قرمز غذایی، پس از گذشت ۷ روز



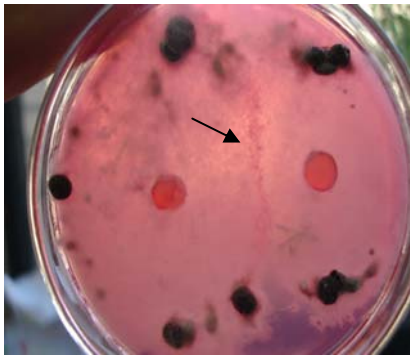
شکل۴- ناسازگاری میسلیومی جدایه Ss1C × Ss2K، وجود ناحیه میسلیومی فراوان در سطح پرگنه قارچ و خط قرمز پشت پرگنه در ناحیه واکنش روی محیط MPM +ماده رنگی قرمز غذایی، پس از گذشت ۱۴ روز





شکل۵- ناسازگاری میسلیومی جدایه Ss4×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

شکل۶- ناسازگاری میسلیومی جدایه Ss7×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



شکل۷- ناسازگاری میسلیومی جدایه Ss13× Ss7، وجود باند نازک میسلیومی تقریبا به صورت خط در ناحیه واکنش روی محیط MPM+ ماده رنگی قرمز غذایی، پس از گذشت ۷ روز

ارزیابی میکروسکوپی جفت شدن میسلیومی

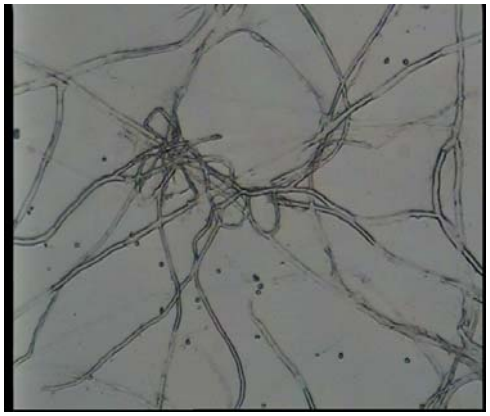
با رشد هیف از مرکز یک پرگنه به طرف ناحیه واکنش می‌توان ارزیابی نمود که آیا آناستوموز بین پرگنه‌های جفت شده وجود دارد و یا ترکیب درون پرگنه بدون ایجاد آناستوموز انجام می شود. در حالت واکنش سازگار دو پرگنه، آناستوموز بین پرگنه‌ها همیشه مشاهده نمی‌شود و در واکنش سازگار (self-self) یک پرگنه به سادگی روی پرگنه دیگر ظاهر شده بدون این‌که 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 (شکل۸) .

در تعدادی از جفت شدن سازگار آناستوموز توسط تشکیل خوشه از هیف اصلی در نقطه ترکیب مشخص می گردد (شکل۹). 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 (شکل۸). در هر دو حالت سازگار یا ناسازگار ساختمانی شبیه نردبان در آناستوموز پرگنه‌ها مشاهده شد(شکل۱۰).

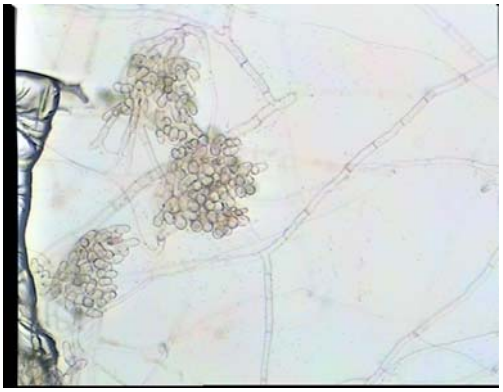
هم‌چنین در هر دو حالت سازگار و ناسازگار گاهی تیپ هیفی در تعدادی جدایه‌ها به مرحله میکروکنیدیوژنسیس

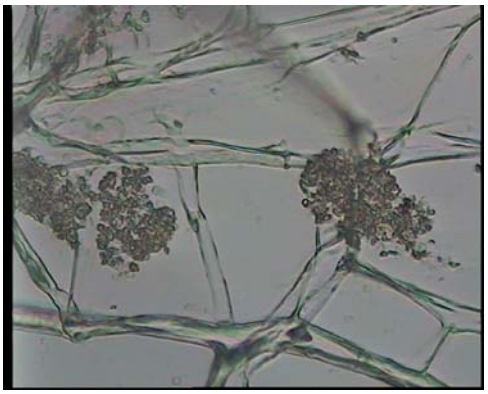
اختصاص داده شد. به خصوص در آنهایی که در حالت ماکروسکوپی در ناحیه واکنش نواحی میسلیومی فراوانی دیده شده است (شکل ۱۱).

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 (شکل۱۲،۱۳)

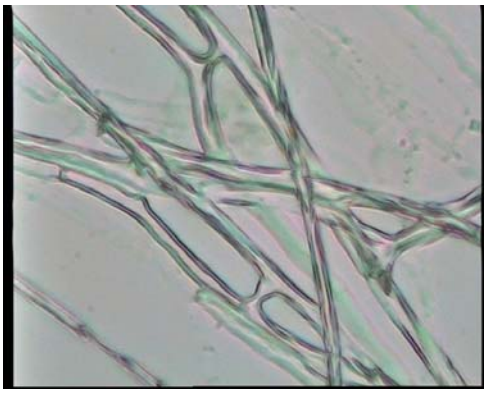


شکل۸- سازگاری میسلیومی جدایه Ss5×Ss5 (سمت راست) و ناسازگاری میسلیومی جدایه Ss12× Ss8 (سمت چپ) به صورت پیچاپیچ هیف‌ها و تشکیل حلقه‌های فراوان پس از گذشت ۳ روز (۱۰۰×)



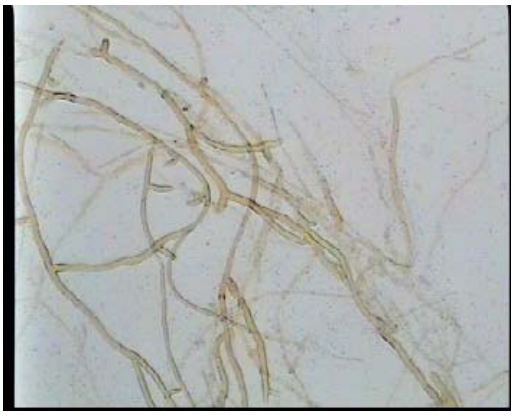


شکل۹- سازگاری میسلیومی جدای Ss8×Ss8 (سمت راست) و Ss2×Ss2 (سمت چپ) به صورت تشکیل خوشه پس از گذشت ۳ روز(۱۰۰×)



شکل۱۰- سازگاری میسلیومی جدایه Ss3×Ss3 به صورت ساختمان شبیه نردبان پس از گذشت۳روز

شکل۱۱- تبدیل تیپ هیفی به تولیدکننده میکروکنیدیوم و تولید اسپرماتی در جدایه Ss5 پس از گذشت۱۴ روز



شکل۱۲- تولید اسپرمودوکیوم در سازگاری بعد از گذشت۱۴ روز (۱۰۰×) Ss6×Ss6

شکل۱۳- ناسازگاری میسلیومی جدایهSs5×Ss2 به صورت تبدیل تیپ هیفی به تولید کننده میکروکنیدیوم و تولید اسپرمودوکیوم پس از گذشت ۱۴ روز (۱۰۰×)

در سازگاری میسلیومی جدایه‌های *S. sclerotiorum* به روش ماکروسکوپی و میکروسکوپی با توجه به شکل۱ مشاهده گردید که جدایه‌های قارچ مذکور ناسازگار بوده و توانایی تشکیل یک پرگنه را ندارند و انواع ناسازگاری را تشکیل می‌دهند و این ناسازگاری میسلیومی جدایه‌ها نشاندهنده هتروژنی ژنتیکی داخل گونه‌ای قارچ می‌باشد و واکنش سازگاری ناسازگاری میسلیومی 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 میسلیومی ناسازگار است ولی در *S.sclerotiorum* انواع ناسازگاری وجود دارد، که در همه آن‌ها خط واکنش مشخص نمی باشد 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 میسلیومی نیز پیچیده بوده به‌طوری‌که 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 به‌صورت فضای آزاد میسلیومی در ناحیه واکنش می‌باشد برای مثال Ss12 با جدایه‌های(Ss3، SsAR، Ss2، Ss4و Ss13). ممکن است آناستوموز به صورت ترکیب مستقیم، پیچاپیچی ریسه‌ها و تشکیل حلقه‌های فراوان و یا ساختمان شبیه نردبان وغیره باشد. اما به‌طور یقین در همه واکنش‌های سازگار ناسازگار این قارچ آناستوموز دیده نمی‌شود اما در قارچ‌های دیگر مثل *Neurospora* به طور حتمی آناستوموز 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 آناستوموز درون گونه‌ای

ایـن قـارچ: ۱- در حالـت واکـنش فـضای آزاد میـسلیومی بیش‌تـر زوال هیفـی در یـک جدایـه و یـا در ناحیـه واکـنش مربوط بـه دو جدایـه دیـده مـی‌شـود. ۲- در واکـنش برخـی جدایـه‌هـا نیـز تبـدیل تیـپ هیفـی بـه حالـت تولیـد کننـده میکروکنیدیوم سبب نـاتوانی در آناسـتوموز مـی‌شـود و ایـن حالت در واکنش ناسازگار بیشتر از سازگار دیـده مـی‌شـود. اگرچه فاکتورهایی چون کمبـود موادغـذایی و یـا تمـاس بـا سطح خارجی برای مثال میسلیوم دیگر، آگار خیلـی خـشک و یا در لام‌هـای مـسن‌تـر (بـیش‌تـر از ۱۴ روز) تـأثیر زیـادی درروند تبدیل شدن تیپ هیفی به تولیدکننده میکروکنیـدیوم دارد (۶). به‌طوری‌که به فاصله سلول انتهایی شاخه‌های تولید کننده اسپرماتی ایجـاد مـی‌شـود و ایـن اسـپرماتیوفرها اغلـب شـاخه شـاخه شـده و تـشکیل اسـپرمودوکیوم پیچیـده‌ای را مـی‌دهـد. اگـرچـه پاترسـون و گروگـان (۹) تولیـد کننـده میکروکنیـدی در ناحیـه واکـنش را از علائـم ناسـازگاری میسلیومی این قارچ ذکر نموده، ولی در آزمایشات مـشخص شده که تولید میکروکنیـدی در هـر دو حالـت جفـت شـدن سازگار و ناسازگار دیده می‌شود وتولید میکروکنیدی تنها به عنـوان مـلاک ضـعیف بـرای ناسـازگاری میـسلیومی در *S. sclerotiorum* می‌باشد که این نتـایج بـا نتـایج کـوهن و همکـاران (۶) تطـابق کامـل دارد، ایـن محقـق همچنـین در بررسی‌های خـود بـه ایـن نتیجـه رسـیده بـود کـه سـازگاری رویشی و تشکیل هتروکاریون (وجود هسته‌هایی از تیپ‌های مادری مختلف در داخـل یـک سیتوپلاسـم) بـه‌علـت فقـدان پروپاگول تک هسته‌ای و وجود پروتوپلاست بزرگ و چنـد هسته‌ای در قارچ *S.sclerotiorum* امکان پذیر نبوده و علاوه بر آن به علت فقدان موتانت‌های نیت جدایه‌ها در ایـن گونـه قـارچ اهمیـت ژنتیکـی ناسـازگاری رویـشی در ایـن گونـه ناشناخته مانده، زیرا موتان‌هایی که از نیتروژن استفاده نکننـد در این گونه موجود نمی‌باشد (۱۰).

بنابراین واکـنش سـازگاری – ناسـازگاری میـسلیومی در مقایسه با سـازگاری – ناسـازگاری رویـشی بـه عنـوان روش مـوثر بـرای طبقـه بنـدی هتروژنـی درون گونـه‌ای قـارچ S sclerotiorum می‌باشد همان طـور کـه در مـورد قـارچ‌هـای دیگـر ماننـد *Ophiostoma ulmi* و *Cryphonectria parasitica* هم استفاده می‌شود.

به‌طور کلی سطح ناسازگاری میـسلیومی و عـدم ترکیـب هیفـی بـین جدایـه‌هـا در *S.sclerotiorum* مـنعکس کننـده هتروژنی درون گونه‌ای قارچ می‌باشد و مطالعات انجام شـده توسط باردین و هونگ (۴) در مزارع کلزا کـشور کانـادا در نواحی مختلف هم نشان داده که این قارچ هتروژنیک بوده و تغییرات ژنتیکـی فراوانـی در میـان جدایـه‌هـای مـزارع کلـزا وجود داشته است به‌طوری‌که جمعیت ایـن قـارچ در مـزارع کشور نروژ در اروپا از جمعیت جدایه‌های قارچ موجـود در مزارع کلزا کشور کانادا کاملا متفاوت است.

اگر چه این مسئله وجود دارد که آیـا ایـن تنـوع ژنتیکـی نتیجه تولید مثل جنسی و یا در ارتباط با سایر عوامل محیطـی است، زیرا تبادل (بخـصوص در سیـستم آسـکوژن در تولیـد مثل جنسی) و نو ترکیبی در کنار جهش در این تنوع ژنتیکی نقـش دارنـد. کـه البتـه تولیـد مثـل جنـسی هموتالیـک در *S.sclerotiorum* امکـان نـو ترکیبـی را کـاهش مـی‌دهـد و علاوه بر تولید آپوتسیم توسط قارچ و انتشار آسکوسپورها و وجود اندام مقـاوم اسـکلروت در خـاک، مـواردی از جملـه تاریخچه کاشت محـصول، میکـروو ماکروکلیمـا و پراکنـده سازی بذرهای آلوده به اسکلروت و حتی میـسلیوم قـارچ در پوسته بذرتوسـط فعالیـت انـسانی نیـز مـی‌توانـد در توزیـع و پراکنش MCG قارچ نقش داشته باشد(۷).

باردین و هونگ (۴) نیز عوامل متعـددی ماننـد عملیـات کشاورزی، آب آبیاری، حرکت ماشـین آلات کـشاورزی و نوع بذر را در تغییرات جمعیـت قـارچ در خـاک تأثیرگـذار دانسته اند و علت تنوع MCG قـارچ در میـان گیـاه کلـزا در مقایسه با میزبان وحـشی (*Ranunculus ficaria*)را بـه‌علـت

عملیات کشاورزی ذکر نموده اند.

نظر به این‌که 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 به‌صورت هتروژنی عنوان نماید، ضمن این‌که 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 وگوناگونی MCG بر روی گوناگونی جدایه‌ها و تهاجم جمعیت قارچ تأثیرگذار است(۵،۶). به ویژه این‌که 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 اسکلروت 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 ظاهرمی‌گردد. 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.

منابع

۱-وکیلی زارج، ز.، ک،رهنما.و ر.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 زارج، ز.، ک،رهنما.، س.ا.،رضوی.و م،صلاتی. ۱۳۸۵. تاثیر دما بر رشد میسلیومی و تولید اسکلرت 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 estearn 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.Rahnama[1]

Abstract

Sclerotinia sclerotiorum is the causal necrotroph pathogen with wide host range and showed various phenotipic 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 Agricural Sciences and Nutural Resources