مجله دانش گیاه‌پزشکی ایران
دوره ۴۲، شماره ۱، ۱۳۹۰ (۱۱۲-۱۰۳)

ارتباط واکنش به کلرات پتاسیم در چند جدایه ایرانی قارچ *Macrophomina phaseolina*، عامل پوسیدگی ذغالی سویا با بیماریزایی

فرناز جلالی[۱]، ناصر صفایی[۲]* و سعید عباسی[۳]
۱، ۲، دانش آموخته کارشناسی ارشد و دانشیار دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس
۳، استادیار دانشکده کشاورزی دانشگاه رازی
(تاریخ دریافت: ۸۹/۷/۱۹ - تاریخ تصویب: ۹۰/۳/۲۴)

چکیده

در سال زراعی ۱۳۸۸-۱۳۸۷ آزمایشی به منظور بررسی واکنش به کلرات پتاسیم و بیماریزایی چند جدایه ایرانی *Macrophomina phaseolina*، عامل بیماری پوسیدگی ذغالی سویا انجام شد. بدین منظور، از بین ۴۸ جدایه جمع‌آوری شده از مناطق عمده کشت سویا شامل استان‌های گلستان، مازندران، اردبیل و لرستان، ۲۴ جدایه بر اساس پراکنش جغرافیایی انتخاب گردید. برای بررسی فنوتیپ‌های پرگنه، جدایه‌ها در محیط غذایی PDA حداقل حاوی ۱۲۰ میلی‌مولار کلرات پتاسیم کشت داده شدند. نتایج به دست آمده نشان داد که ۱۹ جدایه (حدود ۸۰٪ جدایه‌ها) در گروه مقاوم به کلرات با رشد متراکم و طبیعی و پنج جدایه (حدود ۲۰٪ جدایه‌ها) در گروه حساس به کلرات با رشد محدود قرار گرفتند. آزمون‌های بیماریزایی در شرایط درون شیشه‌ای (به روش مایه‌زنی بذر) و گلخانه‌ای (به دو روش مایه‌زنی ساقه و خاک) صورت گرفت. در هر سه آزمون، تمامی جدایه‌های مورد بررسی روی رقم ویلیامز سویا بیماریزا بودند و نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که در سطح یک درصد اختلاف معنی‌داری در میزان بیماریزایی جدایه‌ها وجود دارد. مقایسه نتایج این سه آزمون نشان داد که در آزمون‌های درون شیشه‌ای و مایه‌زنی ساقه، جدایه‌های حساس به کلرات کم آزارترین جدایه‌ها روی سویا رقم حساس ویلیامز بودند، درحالی که در روش مایه‌زنی خاک سطح بالاتری از بیماریزایی در میان جدایه‌های حساس به کلرات در مقایسه با دو آزمون دیگر مشاهده گردید. با توجه به نتایج این بررسی به نظر می‌رسد که روش مایه‌زنی می‌تواند بر نوع ارتباط میان حساسیت به کلرات و بیماریزایی در میان جدایه‌های *M. phaseolina*، جداسازی شده از سویا تاثیر داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: مقاوم، حساس، مایه‌زنی، بذر، ساقه و خاک.

مقدمه

قارچ *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goidanich، عامل پوسیدگی ذغالی سویا، از مهم‌ترین عوامل بیماریزای این محصول به ویژه در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری با آب و هوای نیمه‌خشک می‌باشد. این قارچ دامنه میزبانی وسیعی داشته و بیش از ۵۰۰ گونه گیاهی در ۱۰۰ خانواده اعم از تک لپه و دو لپه را مورد حمله قرار می‌دهد (Dhingra & Sinclair, 1977; Jana *et al*., 2003). در برخی از مناطق سویاکاری دنیا خسارت بیماری ۲۰ الی ۵۰ درصد محصول و یا بیشتر (Almeida *et al*., 2003) گزارش شده است. در ایران نیز این بیماری در برخی از مناطق

* نویسنده مسئول: ناصر صفایی تلفن: ۰۹۱۲-۲۶۰۰۵۰۷ E-mail: nsafaie@modares.ac.ir

کشت سویا، خسارت قابل توجهی را به این محصول وارد می‌کند (Raeyat panah *et al*., 2002).

این بیمارگر خاکزاد و بذرزاد بوده و می‌تواند گیاهان را از مرحله گیاهچه تا بلوغ آلوده نماید (Purkayastha *et al*., 2006). *M. phaseolina* دارای دو مرحله پیکنیدیوم و میکرواسکلروت می‌باشد؛ اما معمولاً مرحله پیکنیدیومی در بافت‌های آلوده سویا تشکیل نمی‌شود (Wyllie, 1993). میکرواسکلروت‌ها زادمایه برای آلودگی ریشه‌ها بوده و در شرایط مساعد حتی در غیاب میزبان به مدت دو تا پانزده سال در خاک و بقایای گیاهی دوام می‌آورند. ماندگاری طولانی مدت میکرواسکلرت‌ها در خاک مدیریت بیماری را بسیار دشوار می‌سازد (Jana *et al*., 2005). دمای بهینه برای رشد قارچ ۳۵-۲۸ $^{\circ}$C بوده، بیماری بیشتر در دوره‌های گرم و خشک سال، به ویژه زمانی که دمای بالای ۲۸ $^{\circ}$C به مدت بیشتر از دو الی سه هفته دوام داشته باشد، توسعه می‌یابد. نتایج مطالعات مقایسه‌ای نشان داده است که پوسیدگی ذغالی وزن گیاه، حجم ریشه و وزن ریشه را بیش از ۵۰ درصد کاهش می‌دهد. خسارت وارده به سیستم ریشه‌ای در مرحله تشکیل غلاف و پر شدن دانه‌ها، هنگامی که رقابت برای جذب آب و غذا بیشتر است، مشهودتر می‌باشد، زیرا گیاهان بیمار سیستم ریشه‌ای کوتاه‌تری دارند و در نهایت دانه‌های تولید شده باریک و سبک بوده و به تعداد کمتری تشکیل می‌شوند (Ndiaye, 2007).

به رغم دامنه میزبانی وسیع بیمارگر، جنس *Macrophomina* تنها شامل یک گونه، *M. phaseolina* بوده و کارهای مختلف جهت شناسایی زیر گونه‌های این قارچ بر مبنای ویژگی‌های پرگنه، اندازه میکرواسکلروت‌ها، تغییرات جمعیتی در خاک بر اثر تناوب، اختلاف در تولید رنگدانه، قدرت اسپوردهی و اندازه پیکنیدیوم به علت تنوع زیاد درون گونه و دشواری کمی نمودن خصوصیات قارچ موفقیت آمیز نبوده است (Dhingra & Sinclair, 1972; Dhingra & Sinclair, 1973; Pearson *et al*., 1986; Cloud & Rupe, 1991).

Pearson *et al*. (1986, 1987) برای نخستین بار استفاده از فنوتیپ‌های کلرات (مورفولوژی‌های پرگنه روی محیط حداقل تکمیل شده با ۱۲۰mM کلرات پتاسیم) را به عنوان نشانگری برای تشخیص جدایه‌های اختصاصی میزبان *M. phaseolina* مورد توجه قرار دادند. کلرات آنالوگی از نیترات است. احیای کلرات به کلریت از طریق نیترات ردوکتاز می‌تواند منجر به مسمومیت کلرات در قارچ‌ها و گیاهان گردد (Lewis & Fincham, 1970; Solomonson & Vennesland, 1972). بررسی‌ها نشان داده‌است که *M. phaseolina* در این محیط سه نوع فنوتیپ تولید می کند که در دو گروه طبقه‌بندی می‌شوند. فنوتیپ رشدی پر مانند (Feathery growth) و محدود (Restricted) در گروه حساس به کلرات (Chlorate sensitive) و فنوتیپ رشدی متراکم (Dense) در گروه مقاوم به کلرات (Chlorate resistant) قرار می‌گیرند. عموما استرین‌های حساس به کلرات می‌توانند نیترات را به نیتریت احیا کنند و استرین‌های مقاوم به کلرات نمی‌توانند چنین کنند (Su *et al*., 2001; Purkayastha *et al*., 2006; Das *et al*., 2008). Su *et al* (2001) نشان دادند که نوع میزبان و منبع جداسازی- خاک یا ریشه- اثر معنی‌داری بر روی حساسیت به کلرات دارد. به علاوه ارتباط معنی داری بین حساسیت به کلرات و شدت بیماریزایی جدایه‌ها در برخی مطالعات گزارش گردید (Su *et al*., 2001; Purkayastha *et al*., 2006; Das *et al*., 2008).

بیماری پوسیدگی ذغالی سویا در ایران از پراکندگی و اهمیت قابل توجهی برخوردار است (Raeyat panah *et al*., 2002). با این حال بررسی‌های مربوط به شناخت جدایه‌ها محدود بوده است (Taliey *et al*., 2007). این تحقیق به بررسی فنوتیپ کلرات در میان چند جدایه ایرانی *M. phaseolina* از سویا و بررسی ارتباط احتمالی بین این نشانگر و بیماریزایی جدایه‌ها می‌پردازد.

مواد و روش‌ها

جدایه‌های قارچی

در بازدیدهایی که در سال ۱۳۸۵ از مزارع سویا در استان‌های گلستان، مازندران، اردبیل و لرستان به عمل آمد، نمونه‌های مشکوک به بیماری پوسیدگی ذغالی جمع‌آوری شده و به آزمایشگاه منتقل گردیدند. پس از شستشو با آب به منظور حذف گل و لای و آلودگی‌های

سطحی، نمونه‌ها با هیپوکلریت‌سدیم ۱ درصد ضدعفونی شده و قطعاتی از بافت آلوده درون تشتک‌های پتری روی محیط کشت آب آگار یا عصاره‌ی سیب زمینی دکستروز آگار (PDA) حاوی ۲۵۰ قسمت در میلیون کلرامفنیکل قرار داده شد. به منظور رشد قارچ تشتک‌های پتری در دمای ۳۵°C-۲۸ نگهداری شدند. خالص‌سازی جدایه‌ها به روش نوک ریسه انجام گرفت. از مجموع ۴۸ جدایه *M. phaseolina* به دست آمده از گیاه سویا ۲۴ جدایه با توجه به پراکنش جغرافیایی انتخاب و در مطالعه حاضر به کار رفتند (جدول ۱).

بررسی فنوتیپ‌های کلرات

در بررسی فنوتیپ کلرات در میان جدایه‌های قارچی، آزمون با قرار دادن گرده‌ای به قطر نیم سانتی‌متر از حاشیه فعال پرگنه‌ی پنج روزه قارچ از محیط PDA، در محیط کشت کمینه (minimal) حاوی ۱۲۰ میلی‌مولار کلرات پتاسیم صورت گرفت (Pearson *et al.*, 1986). تشتک‌ها به مدت هفت روز در تاریکی و در دمای ۲۸°C نگهداری شدند. برای هر جدایه از محیط کشت فاقد کلرات پتاسیم به عنوان شاهد استفاده شد. آزمون بر اساس طرح کاملاً تصادفی با ۲۴ جدایه و سه تکرار انجام گرفت و آزمایش دو بار تکرار شد.

آزمون‌های بیماریزایی

آزمون‌های بیماریزایی جدایه‌ها به دو روش انجام گردید:

۱. شرایط درون‌شیشه‌ای

۲. شرایط گلخانه

جدول ۱- مشخصات جدایه‌های *M. phaseolina* عامل پوسیدگی ذغالی سویا جمع‌آوری شده از چهار استان کشور

ردیف	محل جمع آوری	کد جدایه	ردیف	محل جمع آوری	کد جدایه
۱	کردکوی- گلستان	G-13*	۲۵	کفشگیری- گلستان	G-Ka3
۲	آق قلا- گلستان	G-16*	۲۶	کفشگیری- گلستان	G-Ka4
۳	خان بین- گلستان	G-19*	۲۷	کفشگیری- گلستان	G-Ka5*
۴	قرن آباد- گلستان	G-20*	۲۸	لمسک- گلستان	G-Lm1
۵	حسین آباد- گلستان	G-21*	۲۹	لمسک- گلستان	G-Lm2*
۶	عطا آباد- گلستان	G-22*	۳۰	لمسک- گلستان	G-Lm3
۷	علی آباد- گلستان	G-23*	۳۱	لمسک- گلستان	G-Lm4
۸	بابلسر- مازندران	M-30*	۳۲	لمسک- گلستان	G-Lm5*
۹	الشتر- لرستان	L-Al*	۳۳	نصر آباد- گلستان	G-NA1*
۱۰	جعفرآباد- اردبیل	A-Ja1*	۳۴	نصر آباد- گلستان	G-NA2
۱۱	جعفرآباد- اردبیل	A-Ja2*	۳۵	نصر آباد- گلستان	G-NA3
۱۲	بالاجاده- گلستان	G-Bj1*	۳۶	نصر آباد- گلستان	G-NA4
۱۳	بالاجاده- گلستان	G-Bj2	۳۷	نصر آباد- گلستان	G-NA5
۱۴	بالاجاده- گلستان	G-Bj3	۳۸	سر کلاته- گلستان	G-Sk1*
۱۵	بالاجاده- گلستان	G-Bj4*	۳۹	سر کلاته- گلستان	G-Sk2
۱۶	بالاجاده- گلستان	G-Bj5	۴۰	سر کلاته- گلستان	G-Sk3
۱۷	مغان- اردبیل	A-Mo*	۴۱	سر کلاته- گلستان	G-Sk4
۱۸	قلندر محله- گلستان	G-Gm1	۴۲	سیدمیران - گلستان	G-Sm1*
۱۹	قلندر محله- گلستان	G-Gm2*	۴۳	سیدمیران- گلستان	G-Sm2
۲۰	قلندر محله- گلستان	G-Gm3	۴۴	سیدمیران- گلستان	G-Sm3*
۲۱	قلندر محله- گلستان	G-Gm4	۴۵	سیدمیران- گلستان	G-Sm4
۲۲	قلندر محله- گلستان	G-Gm5	۴۶	توسکستان-گلستان	G-Tu1*
۲۳	کفشگیری- گلستان	G-Ka1*	۴۷	توسکستان-گلستان	G-Tu2
۲۴	کفشگیری- گلستان	G-Ka2	۴۸	توسکستان-گلستان	G-Tu3

*: جدایه‌هایی که در مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند.

آزمون بیماریزایی در شرایط درون‌شیشه‌ای

ارزیابی میزان بیماریزایی در شرایط درون شیشه‌ای، در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با سه تکرار به اجرا در آمد. به این منظور، جدایه‌های منتخب *M. phaseolina*، در تشتک‌های پتری ۹ سانتی‌متری کشت شده و در ۳۰°C و در تاریکی نگهداری شدند. سپس هنگامی که رشد قارچ تمام سطح محیط کشت را فراگرفت، در هر ظرف پتری، تعداد ۱۰ عدد بذر سویای رقم حساس ویلیامز (Williams) که قبلاً با محلول هیپوکلریت سدیم نیم درصد ضدعفونی شده بودند، در سطح پرگنه قارچ قرار داده شدند. برای اطمینان از عدم آلودگی‌های بذر زاد بذور سویا، برای تیمارهای شاهد ۱۰ بذر ضدعفونی شده درون تشتک‌های پتری PDA سترون قرار گرفت. تشتک‌های پتری، سپس به مدت پنج روز در دمای ۲۸°C و در تاریکی نگه‌داری گردیده و پس از طی این مدت، مقیاس شش‌گانه Manici *et al*. (1995) با اعمال برخی اصلاحات به این شرح جهت ارزیابی درجه‌ی بیماریزایی مورد استفاده قرار گرفت: ۰= بذر سالم ۱= بذر به وسیله میسلیوم و اسکلروت‌ها مورد تهاجم قرار گرفته و آلوده است ولی گیاهچه سالم می‌باشد. ۲= بذر به وسیله میسلیوم و اسکلروت‌ها مورد تهاجم قرار گرفته و آلوده است و بخشی از گیاهچه هم که در تماس با میسلیوم است تغییر رنگ داد. ۳= بذر آلوده است و گیاهچه رشد کرده و آلوده است. ۴= بذر آلوده است و گیاهچه به محض خروج آلوده شده و رشد نکرده است. ۵= بذر آلوده بوده و جوانه نزده است.

پس از نمره‌دهی بذرها که مطابق مقیاس فوق انجام شد، شاخص شدت بیماریزایی جدایه‌ها با ضرب تعداد بذور در درجه شدت بیماریزایی (برای مثال ۶ بذر با شدت بیماریزایی ۴ و ۴ بذر با شدت بیماریزایی ۵ برابر با ۴/۴ = ۱۰/ (۲۰+۲۴)) محاسبه گردید. برای تثبیت نتایج، این آزمایش دو بار تکرار شد. داده‌های حاصل با استفاده از برنامه MSTATC مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و گروه بندی تیمارها با استفاده از آزمون دانکن در سطوح یک و پنج درصد انجام شد.

آزمون بیماریزایی در شرایط گلخانه

این آزمون به دو روش ۱) مایه‌زنی ساقه و۲) مایه‌زنی خاک انجام شد.

در روش اول ابتدا بذرهای رقم حساس ویلیامز با هیپوکلریت سدیم نیم درصد به مدت ۳ دقیقه ضدعفونی شده و پس از شستشو با آب، در تشت‌های بزرگ حاوی پیت ماس سترون کشت گردیدند. سپس گیاهچه‌های حاصل در مرحله دو برگی به گلدان‌های اصلی با قطر دهانه ۱۷ سانتی‌متر (به ظرفیت ۳Kg) و حاوی ترکیب خاک سترون، پرلیت و پیت ماس به نسبت ۱:۱:۱ انتقال داده شدند. آزمایش در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار به اجرا درآمد و در هر گلدان سه گیاهچه کاشته شد. مایه‌زنی گیاهان مذکور چهار ماه پس از انتقال و به روش Young (1943) همراه با تغییراتی صورت گرفت. در این روش برای تهیه زادمایه قارچ، قطعاتی به طول تقریبی یک سانتی‌متر از طرفین چوب‌های خلال دندان جدا شده و طی دو مرحله به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱°C، اتوکلاو شدند. سپس تعدادی از این قطعات چوب در شرایط سترون به درون تشتک‌های پتری حاوی کشت تازه جدایه‌های بیمارگر انتقال داده شدند. تشتک‌های پتری سپس تا زمانی که قطعات خلال دندان کاملاً کلنیزه شده و میکرواسکلروت‌های قارچ در سطح آن‌ها ظاهر شود، در دمای ۳۰±۲°C نگهداری شدند.

به منظور مایه‌زنی ساقه گیاه، ابتدا با استفاده از اسکالپل سترون شکاف کوچک و ظریفی در ساقه گیاه ایجاد گردیده و سپس به کمک پنس سترون یک قطعه خلال دندان کلنیزه شده، حامل میکرواسکلروت‌های بیمارگر، از سر نوک تیز خود به داخل ساقه هدایت گردید. نهایتاً دورادور محل مایه‌زنی کاملاً با پارافیلم پوشانده شد. تیمار شاهد با خلال دندان‌های غیر آلوده و اتوکلاو شده مایه‌زنی گردید. ۲۱ روز پس از مایه‌زنی طول زخم ایجاد شده در ساقه هر یک از گیاهان یادداشت گردید (Purkayastha *et al*., 2006) و داده‌های حاصل با استفاده از برنامه MSTATC مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. گروه‌بندی تیمارها با استفاده از آزمون دانکن در سطوح یک و پنج درصد انجام شد.

در آزمون بیماریزایی به روش مایه‌زنی خاک، برای تهیه زادمایه قارچ، ۱۵۰ گرم ارزن خیس خورده به ازای هر جدایه در ارلن‌های شیشه‌ای به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد، دو مرتبه به فاصله ۲۴

ساعت اتوکلاو شدند. سپس دو تا سه قطعه از حاشیه فعال پرگنه قارچی به قطر نیم سانتی‌متر با رعایت شرایط سترون به هر یک از ارلن‌ها اضافه گردید. ارلن‌ها در دمای ۲±۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ روز و تا زمانی که کاملا با جدایه‌های قارچی پوشیده گردند، نگهداری شدند. در این مرحله هر گلدان (به ظرفیت ۳Kg) با ترکیب خاک سترون، پرلیت و پیت ماس به نسبت ۱:۱:۱، مخلوط با ۵۰ گرم ارزن کلونیزه شده با هر جدایه قارچی در سه تکرار پر گردید. تیمارهای شاهد با بذور ارزن سترون مایه‌زنی شدند. بذرهای رقم حساس ویلیامز به روش قبل ضدعفونی گردیده و مستقیما درون گلدان‌ها (۶ بذر در هر گلدان) کاشته شدند. آزمایش در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار به اجرا درآمد. آبیاری بر حسب نیاز آبی گیاه صورت گرفت و گیاهان به مدت ۷۰ روز وتا زمان ظهور علائم نگهداری شدند. در پایان این دوره، گیاهان به طور کامل با سیستم ریشه از خاک خارج شدند و از نظر علائم موجود بر روی ریشه و ساقه (کاهش حجم و پوسیدگی ریشه و ظهور میکرواسکلروت‌ها روی ساقه) به دقت مورد بررسی قرار گرفتند. وزن تر و خشک کل گیاه و نیز اندام هوایی و ریشه به تفکیک (با قطع گیاه یک سانتی‌متر بالای خاک) اندازه گیری شد. داده‌های حاصل با استفاده از برنامه MSTATC مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و گروه‌بندی تیمارها با استفاده از آزمون دانکن در سطوح یک و پنج درصد انجام شد.

نتایج

تعیین فنوتیپ مقاومت به کلرات

جدایه‌های منتخب برای آزمون مقاومت به کلرات، از لحاظ مقاومت در دو گروه مقاوم و حساس و از لحاظ مورفولوژیکی در دو گروه متراکم و محدود طبقه‌بندی شدند. تمامی جدایه‌های مقاوم به کلرات دارای فنوتیپ متراکم و جدایه‌های حساس دارای فنوتیپ محدود بودند و فنوتیپ پر مانند مشاهده نگردید (جدول ۲، شکل ۱).

آزمون‌های بیماریزایی

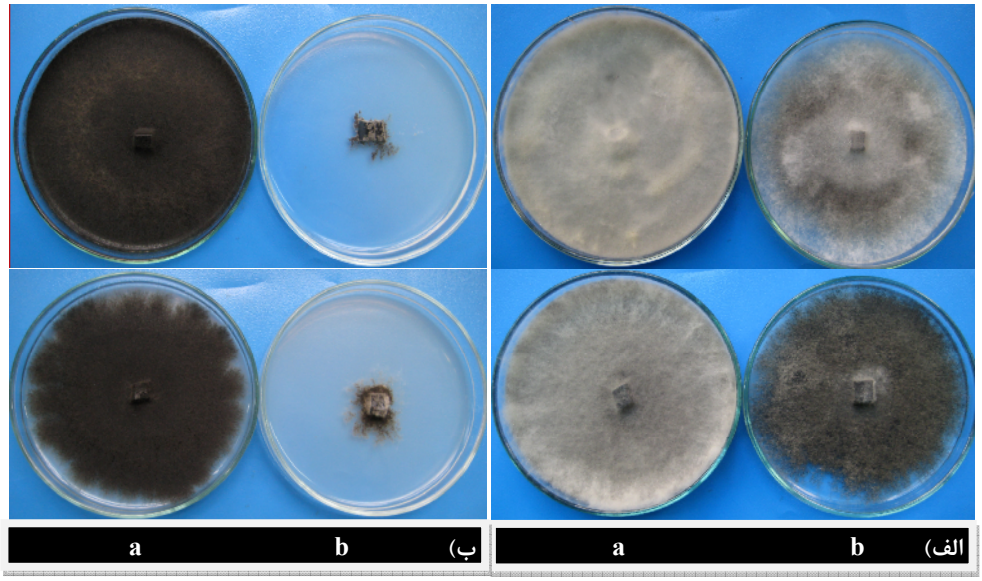
آزمون بیماریزایی در شرایط درون‌شیشه‌ای

در آزمون‌های بیماریزایی که در شرایط درون‌شیشه‌ای انجام شد، شدت بیماریزایی از پوشیده شدن کامل بذر توسط میسلیوم و اسکلروت‌های قارچ مهاجم تا عاری ماندن کامل بذر از آلودگی متغیر بود تیمارهای شاهد (بذور قرار داده شده درون تشتک‌های PDA سترون) علایمی نشان نداده و سالم باقی ماندند (شکل۲).

تمامی جدایه‌های مورد بررسی روی رقم ویلیامز سویا بیماریزا بودند. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌داری در شدت بیماریزایی جدایه‌ها وجود دارد. به طور کلی جدایه‌های مقاوم به کلرات از بیماریزایی بیشتری نسبت به جدایه‌های حساس به کلرات برخوردار بوده و جدایه‌های حساس به کلرات کم آزارتر بودند (جدول ۳).

جدول۲- مشخصات فنوتیپی جدایه‌های *Macrophomina phaseolina* در آزمون مقاومت به کلرات

نام جدایه	عکس العمل مقاومت به کلرات	فنوتیپ	نام جدایه	عکس العمل مقاومت به کلرات	فنوتیپ
G-13	مقاوم	متراکم	G-Bj4	حساس	محدود
G-16	حساس	محدود	A-Mo	مقاوم	متراکم
G-19	مقاوم	متراکم	G-Gm2	مقاوم	متراکم
G-20	حساس	محدود	G-Ka1	مقاوم	متراکم
G-21	مقاوم	متراکم	G-Ka5	مقاوم	متراکم
G-22	حساس	محدود	G-Lm2	مقاوم	متراکم
G-23	حساس	محدود	G-Lm5	مقاوم	متراکم
M-30	مقاوم	متراکم	G-Na1	مقاوم	متراکم
L-Al	مقاوم	متراکم	G-Sk1	مقاوم	متراکم
A-Ja1	مقاوم	متراکم	G-Sm1	مقاوم	متراکم
A-Ja2	مقاوم	متراکم	G-Sm3	مقاوم	متراکم
G-Bj1	مقاوم	متراکم	G-Tu1	مقاوم	متراکم



شکل ۱- مشخصات فنوتیپ‌های حاصل از رشد *Macrophomina phaseolina* بر روی محیط حاوی کلرات
a- محیط فاقد کلرات b- محیط حاوی ۱۲۰mM کلرات، الف) فنوتیپ مقاوم ب) فنوتیپ حساس

شکل ۲- الف) بذرهای آلوده با جدایه‌های *Macrophomina phaseolina* در مقایسه با ب) بذرهای شاهد در آزمون بیماریزایی در شرایط درون شیشه‌ای ج) شدت‌های متفاوت بیماریزایی جدایه‌های *M. phaseolina* بر روی بذر رقم حساس ویلیامز سویا در آزمون بیماریزایی درون شیشه‌ای ۱: بذر سالم و ۵: بذر کاملا آلوده؛ ۴-۲: حالت های حد واسط.

آزمون بیماریزایی در شرایط گلخانه

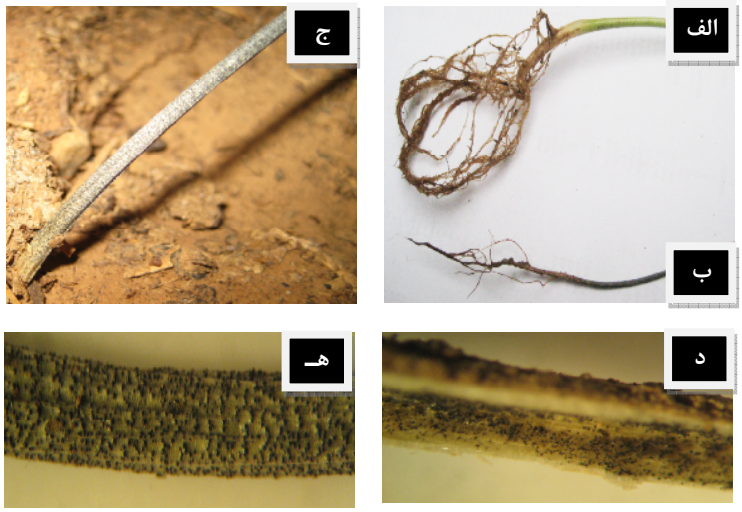
در آزمایش‌های گلخانه‌ای به روش مایه‌زنی ساقه، شدت بیماریزایی جدایه‌ها به صورت ایجاد زخم‌هایی با طول متفاوت بر روی ساقه گیاه تفاوت نشان داد. تیمارهای شاهد مایه‌زنی شده با خلال دندان‌های غیرآلوده و سترون هیچ نوع علائمی نشان نداده و سالم باقی ماندند (شکل ۳).

تمامی جدایه‌های مورد بررسی روی رقم ویلیامز

سویا بیماریزا بودند. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌داری در شدت بیماریزایی جدایه‌ها وجود دارد. همانند آزمون درون‌شیشه‌ای، جدایه‌های مقاوم به کلرات از بیماریزایی بیشتری نسبت به جدایه‌های حساس به کلرات برخوردار بوده و جدایه‌های حساس به کلرات کم‌آزارتر بودند (جدول ۳).

در آزمایش‌های گلخانه‌ای به روش مایه‌زنی خاک، کاهش شدید حجم و وزن، و پوسیدگی ریشه در بیشتر جدایه‌ها نسبت به تیمار شاهد به طرز محسوسی قابل مشاهده بود. در برخی از گیاهان میکرواسکلروت‌ها سطوح بیرونی و درونی ساقه را پوشانده بودند (شکل ۴). نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌داری در شدت بیماریزایی جدایه‌ها وجود دارد. در این آزمون جدایه‌های حساس به کلرات از سطح بیماریزایی بالاتری نسبت به دو آزمون قبلی برخوردار بودند (جدول ۳).

شکل ۳- الف)گیاه شاهد سویا در مقایسه با ب)گیاه آلوده سویا در آزمون بیماریزایی ج) شدت‌های متفاوت بیماریزایی جدایه‌های *Macrophomina phaseolina* بر روی ساقه رقم حساس ویلیامز سویا در آزمون بیماریزایی گلخانه‌ای؛ ۱: گیاه شاهد و ۶: گیاه کاملاً آلوده؛ ۵-۲: حالت‌های حد واسط.



شکل ۴- الف) ریشه گیاه شاهد سویا در مقایسه با ب) ریشه گیاه آلوده سویا در آزمون بیماریزایی به روش مایه‌زنی خاک
ج، د و هـ) تشکیل میکرواسکلروت‌ها بر روی سطوح بیرونی و درونی ساقه سویای آلوده

جدول ۳- مقایسه میانگین داده‌های حاصل از آزمون بیماریزایی ۲۴ جدایه *Macrophomina phaseolina*، روی رقم حساس ویلیامز سویا به روش‌های مایه‌زنی بذر، ساقه و خاک در سطح احتمال یک درصد

جدایه‌ها	شاخص شدت بیماریزایی	گروه‌بندی حاصل از مایه‌زنی بذر	طول زخم ایجاد شده در ساقه (cm)	گروهبندی حاصل از مایه‌زنی ساقه	نسبت کاهش وزن ریشه نسبت به جدایه شاهد	گروهبندی حاصل از مایه‌زنی خاک
G-13	۴/۵۳	ab	۲/۹۹	abc	۰/۴۷	abc
G-16*	۲/۴۳	e	۱/۱۳	bcde	۰/۷۷	ab
G-19	۴/۲۳	abc	۲/۲۵	abcd	۰/۷۲	ab
G-20*	۳/۶۷	bcd	۱/۱۰	cde	۰/۵۸	ab
G-21	۴/۴۳	ab	۲/۳۱	abcd	۰/۶۹	ab
G-22*	۳/۲۷	cde	۰/۸۸	de	۰/۴۲	abc
G-23*	۲/۹۳	de	۱/۱۷	bcde	۰/۸۵	ab
M-30	۴/۴۳	ab	۱/۸۸	abcde	۰/۷۷	ab
L-Al	۴/۰۷	abc	۱/۲۵	bcde	۰/۸۷	a
A-Ja1	۴/۳۳	abc	۱/۲۹	bcde	۰/۶۶	ab
A-Ja2	۴/۰۷	abc	۲/۵۰	abcd	۰/۷۳	ab
G-Bj1	۴/۰۷	abc	۳/۰۱	abc	۰/۳۹	abc
G-Bj4*	۲/۷۳	de	۰/۸۲	de	۰/۹۱	a
A-Mo	۴/۵۰	ab	۱/۳۷	bcde	۰/۸۹	a
G-Gm2	۴/۳۷	ab	۳/۱۰	abc	۰/۸۴	ab
G-Ka1	۴/۲۰	abc	۳/۱۷	ab	۰/۵۹	ab
G-Ka5	۴/۰۳	abc	۲/۱۸	abcd	۰/۴۰	abc
G-Lm2	۴/۳۷	ab	۲/۶۶	abcd	۰/۴۵	abc
G-Lm5	۴/۳۷	ab	۳/۶۰	a	۰/۲۹	bc
G-Na1	۴/۱۳	abc	۲/۳۶	abcd	۰/۳۸	abc
G-Sk1	۴/۱۰	abc	۲/۹۴	abc	۰/۸۴	ab
G-Sm1	۴/۴۷	ab	۲/۴۴	abcd	۰/۴۰	abc
G-Sm3	۴/۸۷	a	۲/۴۴	abcd	۰/۴۸	abc
G-Tu1	۴/۵۰	ab	۳/۱۴	abc	۰/۷۰	ab

*: جدایه‌های حساس به کلرات در آزمون مقاومت به کلرات (برای توضیحات بیشتر به جدول ۲ مراجعه شود.)

بحث

پیشنهاد استفاده از فنوتیپ کلرات برای مطالعه جدایه‌های *Macrophomina phaseolina* بر مبنای مطالعه‌ای بود که نشان داد جدایه‌های این بیمارگر جداسازی شده از ریشه و خاک مزارع سویا وقتی روی محیط حداقل اصلاح شده با کلرات پتاسیم ۱۲۰ Mm رشد می‌کردند تنها فنوتیپ حساس (محدود یا پر مانند) تولید می‌کردند، در حالی که جدایه‌های بافت ذرت غالباً فنوتیپ مقاوم تولید می‌کردند. بنابراین جدایه‌های بافت ذرت می‌توانستند از جدایه‌های ریشه یا خاک مزارع سویا جدا گردند (Purkayastha *et al*., 2006). در این مطالعه از آنجا که جدایه‌های ریشه سویا هر دو فنوتیپ کلرات محدود و متراکم را نشان دادند، بنابراین این نشانگر نمی‌تواند در تشخیص جدایه‌های *M. phaseolina* از ریشه سویا مفید باشد. Taliey *et al*. (2007) نیز پیش از این وقوع هر سه نوع فنوتیپ را در میان جدایه‌های ایرانی سویای *M. phaseolina* گزارش کرده بودند.

Cloud & Rupe (1991) تنها حساسیت به کلرات (فنوتیپ محدود یا پر مانند) را برای جدایه‌های سویا گزارش کرده بودند، در حالی که در مطالعه Su *et al*. (2001) وقوع هر سه نوع فنوتیپ برای جدایه‌های سویا گزارش گردید و در آزمون بیماریزایی جدایه‌ها به روش مایه‌زنی ریشه، جدایه‌های حساس به کلرات از قدرت تهاجمی بیشتری برخوردار بودند.

در مطالعه Purkayastha *et al*. (2006) نیز وقوع دو نوع فنوتیپ پر مانند و متراکم (حساسیت و مقاومت به کلرات) در میان جدایه‌های سویا مشاهده گردید و در آزمون بیماریزایی به روش مایه‌زنی ساقه جدایه‌های حساس به کلرات از قدرت تهاجمی کمتری برخوردار

بوده و لکه‌های محدودتری بر روی ساقه گوآر (*Cyamopsis tetragonoloba*) ایجاد کردند.

توان بیماریزایی این ۲۴ جدایه به دو طریق؛ در شرایط درون‌شیشه‌ای و گلخانه، و در گلخانه نیز به دو روش مایه‌زنی ساقه و خاک مورد آزمون قرار گرفت. نتایج موید وجود ارتباط معنی‌داری میان دو آزمون بیماریزایی در شرایط درون‌شیشه‌ای و مایه‌زنی ساقه و نیز نتایج آزمون کلرات بود. تمامی جدایه‌ها دارای قدرت بیماریزایی بر روی بذور و ساقه سویای حساس رقم ویلیامز بودند؛ گرچه تفاوت معنی‌داری در قدرت تهاجمی جدایه‌ها وجود داشت. در هر دو آزمون جدایه‌های دارای فنوتیپ حساس از قدرت تهاجمی کمتری بهره‌مند بوده؛ در آزمون بیماریزایی در شرایط درون شیشه‌ای قدرت کلنیزه‌کنندگی کمتری بر روی بذور سویا داشته و در آزمون مایه‌زنی ساقه نیز زخم‌های محدودتری بر روی ساقه سویا ایجاد کردند که منطبق با یافته‌های Purkayastha *et al*. (2006) می‌باشد.

مناسب و موثق بودن استفاده از روش درون‌شیشه‌ای برای سنجش بیماریزایی جدایه‌ها، پیش از این توسط Reyes-Franco *et al*. (2006) گزارش شده بود، چرا که آن‌ها بر این مبنا توانسته بودند تفاوت روشنی بر مبنای الگوهای مقاومت و حساسیت در بین ارقام مختلف لوبیا نشان دهند که با داده‌های گلخانه‌ای حاصل از مطالعه Mayek-Perez *et al*. (2001) بر روی همان جدایه‌ها مطابقت داشت. بیماریزایی بیشتر جدایه‌ها روی بذرها تحت شرایط درون شیشه‌ای نسبت به گیاهان بالغ در شرایط گلخانه‌ای به دلیل بالا بودن سطح مقاومت در گیاهان بالغ نسبت به بذرها طبیعی به نظر می‌رسید.

این در حالی است که نتایج آزمون مایه‌زنی خاک با آزمون‌های درون‌شیشه‌ای و مایه‌زنی ساقه تفاوت نشان داد و جدایه‌های حساس به کلرات در آزمون مایه‌زنی خاک از سطح بیماریزایی به مراتب بالاتری نسبت به دو آزمون دیگر برخوردار بودند که با نتایج Su *et al*. (2001) مطابقت بیشتری دارد.

به نظر می‌رسد فاکتورهای بسیاری (از جمله روش و زمان مایه‌زنی) بر نوع ارتباط میان شدت بیماریزایی و فنوتیپ کلرات جدایه‌های مورد بررسی تأثیر دارند که در جای خود قابل توجه است. Su *et al*. (2001) نیز گزارش کرده بودند که نوع میزبان و منبع جداسازی - خاک یا گیاه - اثر معنی‌داری بر روی حساسیت به کلرات دارد. هرچند این نتایج با مناطق جمع‌آوری جدایه‌ها، ارتباط معنی‌داری را نشان نداد.

با در نظر گرفتن اینکه آزمون بیماریزایی به روش مایه‌زنی خاک، روشی است که به آنچه در طبیعت رخ می‌دهد، نزدیکی بیشتری دارد و در مقابل آزمون‌های درون‌شیشه‌ای و مایه‌زنی ساقه روش‌های مصنوعی‌تری تلقی می‌گردند، و از آنجا که بیماری پوسیدگی ذغالی یک بیماری وابسته به تنش است که بیشتر به گیاهان مسن تحت شرایط نامطلوب محیطی حمله می‌کند، بنابراین می‌توان وقوع واکنش‌های متفاوت به کلرات را به تغییر ترکیبات نیتروژنه گیاه تحت تنش نسبت داد، زیرا تغییرات در متابولیسم نیتروژن میزبان تحت تنش ممکن است باعث تبدیل یک گیاه به سوبسترای مناسب برای بیمارگر شود (Taliey *et al*., 2007). تحت شرایط تنش، ترکیبات مختلف نیتروژنه از جمله اسیدهای آمینه آزاد در گیاه تولید می‌شوند که توسط بیمارگرهای فرصت‌طلبی مثل *M. phaseolina* به عنوان منبع انرژی مورد استفاده قرار می‌گیرند. البته به نظر می‌رسد که جدایه‌های مختلف از نظر مصرف انواع مختلف این منابع با هم متفاوت هستند و ترجیحات آنها در این زمینه یکسان نیست. هر چند که هنوز سازوکارهای اختصاصی دخیل در این ارتباط دقیقاً مشخص نشده است (Strausbaurgh *et al*., 1992) و نیاز به تحقیقات بیشتری دارد.

REFERENCES

1. Almeida, A. M. R., Abdelnoor, R. V., Arias, C. A. A., Carvalho, V. P., Martin, S. R. R., Benato, L. C., Pinto, M. C. & Carvalho, C. G. P. (2003). Genotypic diversity among Brazilian isolates of *Macrophomina phaseolina* revealed by RAPD. *Fitopatologia Brasileira*, 28, 279-285.
2. Cloud, G. L. & Rupe, J. C. (1991). Morphological instability on a chlorate medium of isolates of *Macrophomina phaseolina* from soybean and sorghum. *Phytopathology*, 81, 892-895.
3. Das, I. K., Fakrudin, B. & Arora, D. K. (2008). RAPD cluster analysis and chlorate sensitivity of some Indian isolates of *Macrophomina phaseolina* from sorghum and their relationships with pathogenicity.

Microbiological Research, 163(2), 215-224.
4. Dhingra, O. D. & Sinclair, J. B. (1972). Variation among isolates of *Macrophomina phaseoli* (*Rhizoctonia bataticola*) from the same soybean plant. *Phytopathology*, 62, 1108.
5. Dhingra, O. D. & Sinclair, J. B. (1973). Location of *Macrophomina phaseoli* on soybean plants related to culture characteristics and virulence. *Phytopathology*, 63, 934-936.
6. Dhingra, O. D. & Sinclair, J. B. (1977). *An annoted bibliography of Macrophomina phaseolina.* Vicosa: Universidade Federal de Vicosa, Brazil.
7. Jana, T., Sharma, T. R., Prasad, R. D. & Arora, D. K. (2003). Molecular characterization of *Macrophomina phaseolina* and Fusarium species by a single primer RAPD technique. *Microbiological Research*, 158(3), 249-257.
8. Jana, T., Sharma, T. R. & Singh, N. K. (2005). SSR-based detection of genetic variability in the charcoal root rot pathogen *Macrophomina phaseolina*. *Mycological Research*, 109(1), 81-86.
9. Lewis, C. M. & Fincham, J. R. S. (1970). Regulation of nitrate reductase in Basidiomycetes *Ustilago maydis*. *Journal of Bacteriology*, 103, 55-61.
10. Manici, L. M., Caputo, F. & Cerato, C. (1995). Temperature responses of isolates of *Macrophomina phaseolina* from different climatic regions of sunflower production in Italy. *Plant Disease*, 79, 834-838.
11. Mayek-Perez, N., Lpez-Castaeda, C., Gonzglez-Chavira, M., Garcia-Espinosa, R., Acosta-Gallegos, J., de la Vega, O. M. & Simpson, J. (2001). Variability of Mexican isolates of *Macrophomina phaseolina* based on pathogenesis and AFLP genotype. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 59(5), 257-263.
12. Ndiaye, M. (2007). *Ecology and management of charcoal rot (Macrophomina phaseolina) on cowpea in the sahel*. PhD. dissertation. Wageningen University, The Netherland.
13. Pearson, C. A. S., Leslie, J. F. & Schwenk, F. W. (1986). Variable chlorate resistance in *Macrophomina phaseolina* from corn, soybean and soil. *Phytopathology*, 76, 646-649.
14. Pearson, C. A. S., Leslie, J. F. & Schwenk, F. W. (1987). Nitrogen source utilization by chlorate-resistants isolate and chlorate-sensitive isolates of *Macrophomina phaseolina. Tansactions British Mycological Societ*y, 88, 47-52.
15. Purkayastha, S., Kaur, B., Dilbaghi, N. & Chaudhury, A. (2006). Characterization of *Macrophomina phaseolina*, the charcoal rot pathogen of cluster bean, using conventional techniques and PCR-based molecular markers. *Plant Pathology*, 55(1), 106-116.
16. Raeyat panah, S., Foroutan, A. & Oladi, M. (2002). Evaluation of soybean cultivars to charchoal rot caused by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid in Mazandaran. In: Proceedings of the *15th Iranian Plant Protection Congress,* 7-11 Sep*.,* University of Razi, Kermanshah, Iran, p. 158. (In Farsi).
17. Reyes-Franco, M. C., Hernandez-Delgado, S., Beas-Fernandez, R., Medina-Fernandez, M., Simpson, J. & Mayek-Perez, N. (2006). Pathogenic and genetic variability within *Macrophomina phaseolina* from Mexico and other countries. *Journal of Phytopathology*, 154(7-8), 447-453.
18. Solomonson, L. P. & Vennesland, B. (1972). Nitrate reductase and chlorate toxicity in *Chlorella vulgaris* Berjeerinck. *Plant Physiology*, 50, 421-423.
19. Strausbaurgh, C. A., Schroth, M. N. Weinhold, A. R. & Hancock, J. G. (1992). Assessment of vegetative compatibility of Verticillium dahliae tester strains and isolates from California potatoes. *Phytopathology*, 82, 61-67.
20. Su, G., Suh, S. O., Schneider, R. W. & Russin, J. S. (2001). Host specialization in the charcoal rot fungus, *Macrophomina phaseolina*. *Phytopathology*, 91(2), 120-126.
21. Taliey, F., Sanei, S. J. & Razavi, S. E. (2007). Study of various chlorate reactions in the isolates of *Macrophomina phaseolina. Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources*, 14(3), 140-148. (In Farsi).
22. Wyllie, T. D. (1993) *Compendium of Soybean Diseases*. (3rd ed.). The American Phytopathological Society, Saint Paul, Minn.
23. Young, P. C. (1943). Toothpick method of inoculation corn for ear and stalk rots. *Phytopathology*, 33, 16.