فصلنامه‌ی تحقیقات بیماری‌های گیاهی
سال اول، شماره‌ی چهارم، زمستان ۱۳۹۲
صص ۸۳-۷۳

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

یلدا واصبی *[۱]، ناصر صفایی [۲]

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۰/٤ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۲/۱۱

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 ٥٤/٥ درصد جدایه‌ها مقاوم به کلرات بوده و فنوتیپ رشد 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، به طوری که جدایه‌های M21 و M30 با واکنش مقاوم به کلرات و فنوتیپ رشد متراکم به عنوان بیماری‌زاترین جدایه‌ها شناسایی شدند.

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

[۱]- دانشجوی سابق گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
[۲]- دانشیار گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
*نویسنده مسئول مقاله: yalda_vasebi@yahoo.com

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 و گلرنگ 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 در نهایت موجب مرگ گیاه می‌شود. گیاهان بالغ دچار پژمردگی می‌شوند و سیستم آوندی به دلیل تولید میکرواسکلروت، تیره یا خاکستری می‌شود. علائم مشخص بیماری شامل لکه‌های تیره یا خاکستری کشیده روی برگ‌های بالغ، تشکیل اسکلروت‌ها بر روی 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 بسته به شرایط محیطی به مدت دو تا ۱۵ سال در خاک و بقایای گیاهی بقا می‌یابند (Cook *et al*., 1973; Papavizas, 1977; Campbell and Van der Gaay, 1993). ممکن است بیماری پوسیدگی زغالی 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 تنها گونه‌ی آن *Macrophomina phaseolina* می‌باشد که 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، در مطالعات انجام شده، تنوع ژنتیکی بالائی در جمعیت‌های آن 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 *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 به دست 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; Pearson *et al*., 1986, 1987a).

در سال‌های اخیر، طبقه‌بندی جدایه‌های *M. phaseolina* بر اساس ریخت‌شناسی پرگنه بر روی محیط کلرات پیشنهاد گردیده است. در این بررسی‌ها، از ساز و کار توانایی استفاده از منابع مختلف ازت استفاده می‌شود. *پیرسون و همکاران* (Pearson *et al*., 1987b) بیان کردند که نحوه‌ی مصرف منابع ازته مبین آن است که جدایه‌های *M. phaseolina* به دست آمده از سویا نسبت به جدایه‌های ذرت به طور موثرتر و بیش‌تر 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 و احیای آن به کلریت توسط آنزیم 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 می‌گیرند (Dhingra and Sinclair, 1972). عموماً استرین‌های حساس به کلرات قادر به احیای نیترات به نیتریت هستند، ولی 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 پذیرفته است. طلیعی و همکاران (Taliey *et al*., 2007) جدایه‌های قارچ *M. phaseolina* 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 دندروگرام مبتنی بر پلی مورفیسم RAPD، جدایه‌های حساس به کلرات در دو گروه مجاور قرار گرفتند؛ درحالی‌که جدایه‌های مقاوم در گروه‌های مختلف، به صورت پراکنده قرار گرفتند (Cook *et al*., 1973). نوع فنوتیپ کلراتی در شدت بیماری‌زایی جدایه‌ها بر روی میزبانان مختلف تاثیرگذار می‌باشد؛ 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

به منظور 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 مرکزی طی 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 مرفولوژیک (ماکروسکوپی و میکروسکوپی)، از جمله سرعت رشد پرگنه، رنگ پرگنه قارچی، مشخصات میکرواسکلروت و میسلیوم و ویژگی‌های مولکولی (با استفاده از آغازگر اختصاصی) انجام گرفت.

استخراج DNA به‌وسیله‌ی بافر CTAB به روش اصلاح شده توسط *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 ۱٤/۵ میکرولیتر آب دیونیزه، دو میکرولیتر بافر PCR (10X)، ۰/٦ میکرولیتر $MgCl_2$ (50 Mm)، ۰/٤ 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 در ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله‌ی اتصال در ٥٦ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، مرحله‌ی بسط در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه و مرحله‌ی بسط نهایی به مدت 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 ۲٤ 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 مساوی، کشت شدند. زمانی که سه برگچه‌ی اولیه ظاهر شدند، به میزان یک گرم از دانه‌های برنج آلوده به بیمارگر 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 سویا، مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. 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 روزه‌ی رشد کرده در محیط PDA، به محیط کمینه‌ی حاوی ۱۲۰ میلی مولار کلرات پتاسیم منتقل شدند. هر لیتر محیط کمینه شامل ۲۰ گرم آگار،۱/٦ 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 محلول عناصر غذایی (۹۵ میلی‌لیتر آب مقطر، ۱۰ گرم اسیدسیتریک، ۱۰ گرم $ZnSO_4•7H_2O$ ، دو 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 میلی‌لیتر کلروفرم) بود. اسیدیته‌ی محیط برابر ٦/۲ تنظیم گردید. جهت مقایسه، از محیط کمینه‌ی فاقد کلرات پتاسیم به عنوان شاهد برای هر جدایه 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.

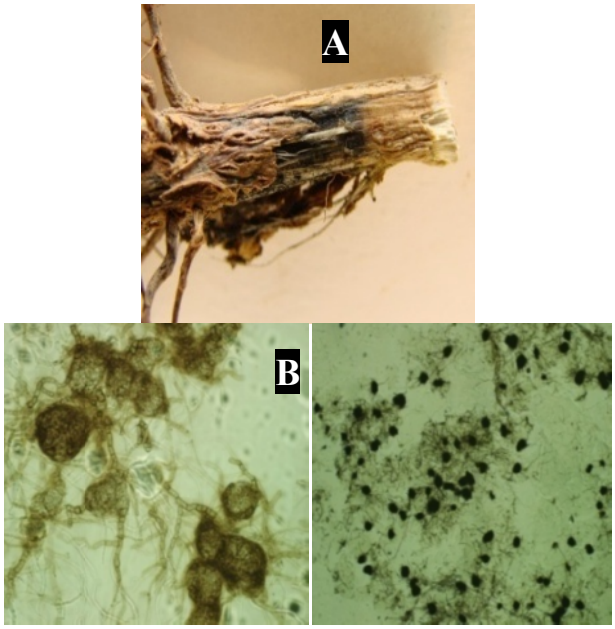
نتایج

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 معمولاً با ریسه‌ی اصلی انشعابات عمودی دارند. اسکلروت‌ها از تجمع سلول‌های ریسه‌ای، یا تقسیم یک سلول منفرد به وجود 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 bp ۳۵۰ را در تمامی جدایه‌ها سبب گردید که موید گونه‌ی تیپ *M. phaseolina* می‌باشد (شکل ۲).

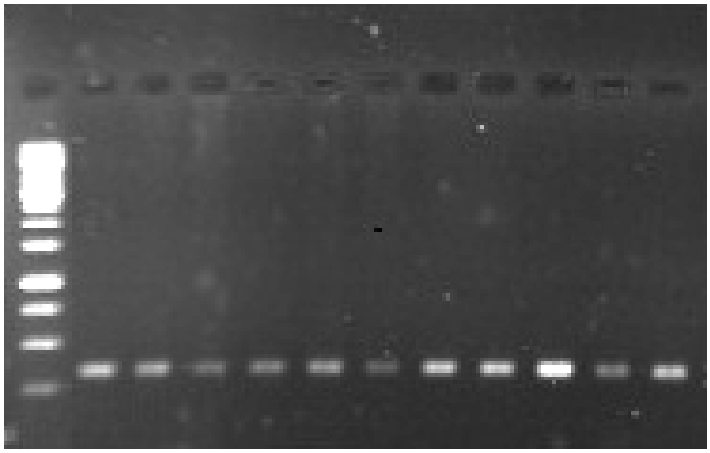
در آزمون بیماری‌زایی، گیاهان مورد آزمایش ۶۰ روز بعد از تلقیح ۱۱ جدایه‌ی قارچ *M. phaseolina*، برای اندازه‌گیری میزان پوسیدگی ریشه مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۳). میکرواسکلروت‌های قارچ، سطوح بیرونی و داخلی طوقه و ساقه را پوشانده بودند. نتایج حاصله از تجزیه و تحلیل داده‌ها، نشان داد که تیمارها در سطح یک درصد اختلاف معنی‌داری دارند. مقایسه‌ی میانگین‌ها، 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.

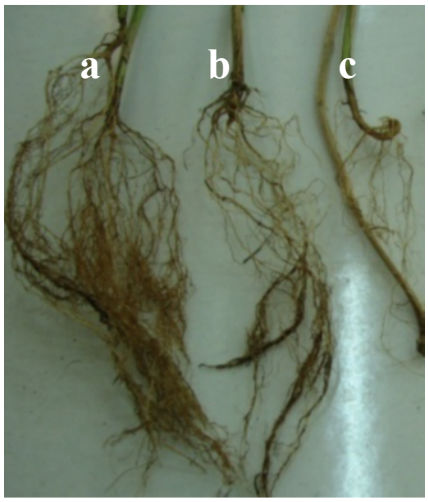
نام جدایه	محل جمع آوری	میزبان	واکنش به کلرات	فنوتیپ	آزمون بیماری‌زایی
MA3	لرستان-الشتر	سویا	حساس	پرمانند	20[e]
MB1	اردبیل-مغان	سویا	حساس	محدود	20[e]
MB2	اردبیل-مغان	سویا	حساس	محدود	42[b]
M13	گلستان-کردکوی	سویا	حساس	محدود	35[c]
M21	گلستان-فاضل آباد	سویا	مقاوم	متراکم	48[a]
M30	مازندران-بابلسر	سویا	مقاوم	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 عمودی و میکرواسکلروت های قارچ



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.

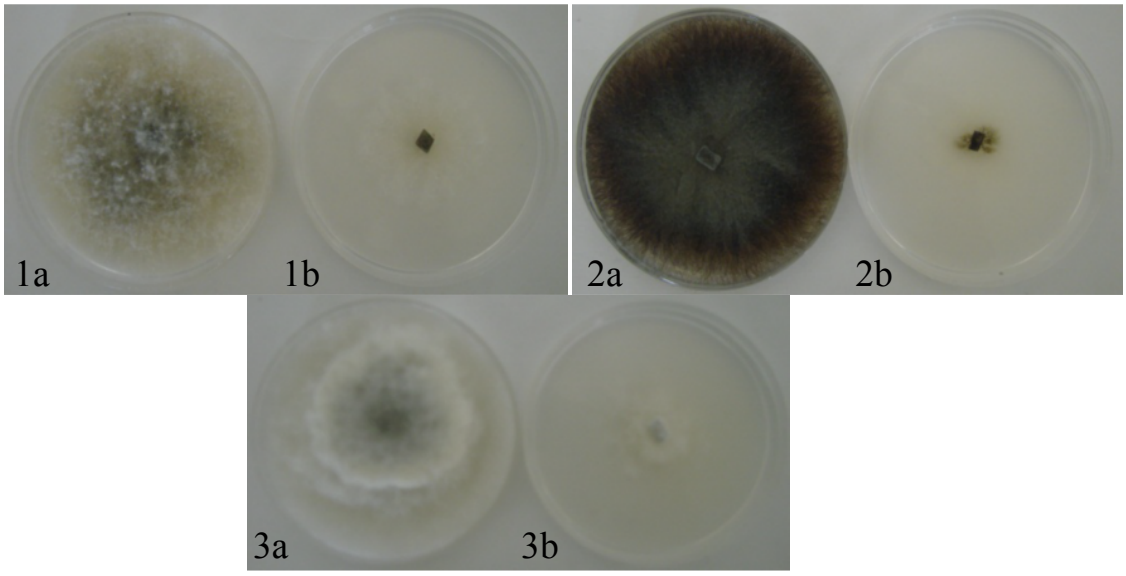


شکل ۳- علایم پوسیدگی ریشه‌ی سویا ناشی از *Macrophomina phaseolina*

a. ریشه گیاه شاهد b. ریشه گیاه آلوده به جدایه‌ی حساس به کلرات

c: ریشه‌ی گیاه آلوده به جدایه‌ی مقاوم به کلرات.

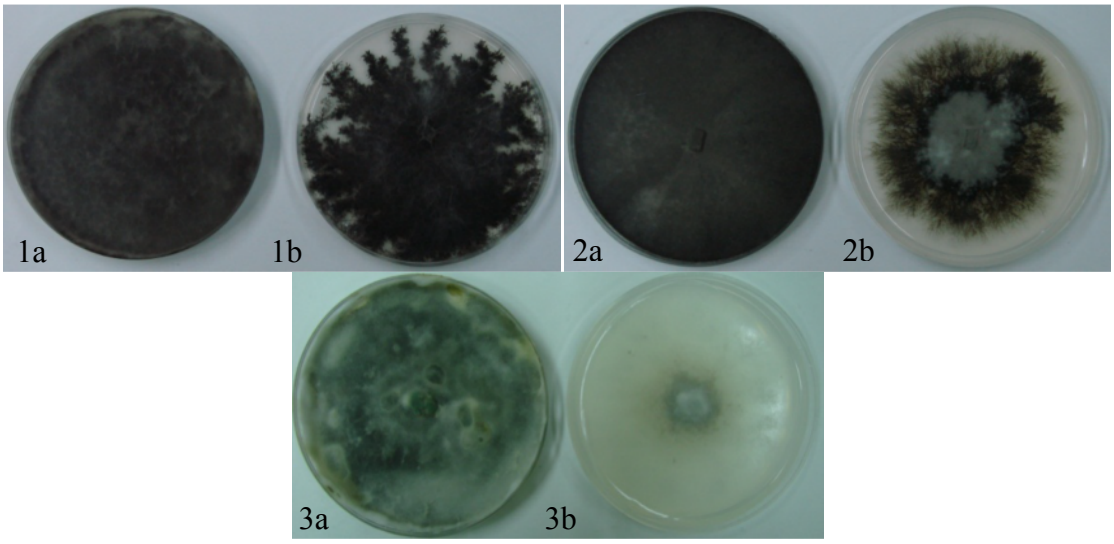
در بررسی فنوتیپ کلرات در جدایه‌های قارچ *M. phaseolina* انتخاب شده برای آزمون مقاومت به کلرات، جدایه‌ها از لحاظ مقاومت در دو گروه مقاوم و حساس و از لحاظ مرفولوژیکی در سه گروه رشدی متراکم، پرمانند و محدود طبقه‌بندی شدند (جدول ۱). جدایه‌های آفتابگردان، خربزه، طالبی و دو جدایه‌ی سویا به‌دست آمده از استان‌های 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 (شکل‌های ٤ و ٥). همچنین بررسی‌ها نشان داد که تولید میکرواسکلروت روی محیط کلرات پتاسیم به وسیله‌ی جدایه‌های مقاوم، در مقایسه با جدایه‌های حساس، بسیار بیش‌تر بوده است.



شکل ٤- 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.
۱- جدایه M13 2-جدایه M30 3-جدایه MG.

بحث

به طورکلی جدایه‌هایی از قارچ‌ها که دارای نیترات ردوکتاز فعال باشند، به کلرات حساس هستند؛ درحالی‌که جدایه‌هایی که قادر به کاتابولیز نیترات نیستند، به کلرات مقاوم می‌باشند (Marzluf, 1981). جدایه‌های برخی از نمونه‌های قارچی *Verticillium dahliae* و *V. albo-atrum*، زمانی که روی محیط آگار حاوی کلرات پتاسیم قرار می‌گیرند، ابتدا رشدشان متوقف می‌شود؛ سپس سکتورهای تصادفی و سریع الرشد تولید می‌کنند. این جهش یافتگان مقاوم به کلرات که دارای نقص ژنتیکی در زمینه‌ی سنتز آنزیم احیاکننده‌ی نیترات هستند، روی محیط حداقل که فقط دارای نیترات به‌عنوان تنها منبع نیتروژن است، قابل شناسایی می‌باشند. در این حالت کلرات به‌عنوان آنالوگ نیترات عمل کرده و به‌وسیله‌ی نیترات ردوکتاز تبدیل به ماده سمی کلریت می‌شود. جهش یافتگان در این محیط، رشدی ضعیف و بدون اسپورزایی دارند (Correll and Leslie, 1987). بر خلاف قارچ مذکور، *M. phaseolina* بر روی محیط حاوی کلرات، سکتور مقاوم به کلرات تولید نمی‌کند، اما از نظر واکنش به کلرات، بین جدایه‌های مختلف، تفاوت‌هایی دیده می‌شود (Pearson *et al*., 1987a). بررسی فنوتیپ کلرات در جدایه‌های *M. phaseolina* از میزبانان و مناطق مختلف، نشان داد که ٥٤/٥ درصد جدایه‌ها، مقاوم به کلرات بوده و فنوتیپ متراکم داشتند. علاوه بر تولید بیش‌تر و متراکم‌تر میکرواسکلروت بر روی محیط کمینه‌ی حاوی کلرات پتاسیم توسط جدایه‌های مقاوم، سرعت رشد شعاعی پرگنه‌ی این جدایه‌ها روی محیط مذکور نسبت به جدایه‌های دیگر بالاتر بود.

جدایه‌های به دست آمده ازسویا، دارای هر دو نوع عکس‌العمل مقاوم و حساس بودند و تعداد فنوتیپ پر مانند بیش‌تر از متراکم (چهار به یک) بود. در تحقیق انجام شده توسط سو و همکاران (Su *et al*., 2001)، در میان ۱۱ جدایه‌ی سویای مورد آزمون، هر دو نوع گروه مقاوم و حساس به کلرات شناسایی شدند که در این آزمون نیز در میان جدایه‌های مورد بررسی تعداد فنوتیپ رشدی پر مانند (شش جدایه)، بیش‌تر از فنوتیپ متراکم (یک جدایه) بود. از این‌رو با توجه به تفاوت حساسیت در

جدایه‌های مختلف *M. phaseolina* به کلرات، می‌توان از این خصوصیت برای گروه‌بندی جدایه‌های مختلف آن که ضمن داشتن تنوع بالا فاقد فرم جنسی می‌باشد، استفاده نمود. اما به دلیل تنوع کم فنوتیپی (سه فنوتیپ) حاصله از میزبانان مختلف در تحقیقات انجام شده، تنها به این خصوصیت نمی‌توان اکتفا کرد (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 نسبت به جدایه‌های حساس 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 میان جدایه‌های *M. phaseolina* با شدت بیماری پوسیدگی زغالی ارتباط نزدیکی دارد و جدایه‌های مقاوم به کلرات دارای قدرت بیماری-زایی بالاتری هستند. بالا بودن قدرت بیماری‌زایی جدایه‌های مقاوم در بررسی‌های گلخانه‌ای را می‌توان با تولید بیشتر و متراکم‌تر میکرواسکلروت و رشد شعاعی سریع‌تر این جدایه‌ها روی محیط کمینه، مرتبط دانست. از آنجایی که جدایه‌های حساس به کلرات *M. phaseolina*، ترکیب نیتروژنی مورد مصرف جدایه‌های مقاوم به کلرات را مصرف نمی‌کنند؛ تفاوت سرعت رشد روی محیط کلرات پتاسیم می‌تواند به‌دلیل تفاوت توانایی‌های جدایه‌ها در استفاده از منابع نیتروژنی نسبت به توانایی آنها در بلوکه کردن اثر سمی کلرات باشد. هرچند مطالعات سو و همکاران (۲۰۰۱) نشان داد که جدایه‌های حساس به کلرات نسبت به جدایه‌های مقاوم به کلرات، از توانایی بالاتری در کلنیزه کردن ریشه‌ی سویا برخوردار بودند. ممکن است که سویا روی متابولیسم نیتروژن در *M. phaseolina* تاثیر داشته باشد. همچنین گزارش شده 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 به‌دست آمده از تحقیقات، این امر به متفاوت بودن منابع ازته‌ی گیاهان مختلف نسبت داده شده است (Su *et al*., 2001).

نتیجه‌گیری کلی

از آنجایی که بیماری پوسیدگی زغالی، یک بیماری وابسته به استرس است و عامل بیماری 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 می-گیرند. البته به نظر 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 میزبانی هستند؛ هرچند که هنوز ساز و کارهای اختصاصی دخیل در این ارتباط دقیقاً مشخص نشده است (Su *et al*., 2001).

References:

1. Babu BK, Saxena AK, Srivastava AK and Arora DK. 2007. Identification and detection of *Macrophomina phaseolina* by using species- specific oligonucleotide primers and probe. Mycologia 99: 797–803.
2. Campbell CL and van der Gaay DJ. 1993. Temporal and spatial dynamics of microsclerotia of *Macrophomina phaseolina* in three fields in North Carolina over four to five years. Phytopathology 83: 1434–1440.
3. Cloud GL and Rupe JC. 1991. Morphological instability on a chlorate medium of isolates of *Macrophomina phaseolina* from soybean and sorghum. Phytopathology 81: 892–895.
4. Cook GE, Boosalis MG, Duncle LD and Odvody GN. 1973. Survival of *Macrophomina phaseolina* in corn and sorghum stalk residue. Plant Disease Reporter 57: 873–875.
5. Correll JC and Leslie JF. 1987. Recovery of spontaneous selenate resistant mutant from *F. oxysporum* and *F. moniliform*. Phytopathology 71: 1710 (Abstract).
6. Crous PW, Slipper B, Wingfield MJ, Rheeder J, Marasas WFO, Philips AJL, Alves A, Burgress T, Barber P and Groenewald JZ. 2006. Phylogenic lineages in the *Botryosphaeriaceae*. Studies in Mycology 55: 235–253.
7. Das IK, Fakhrudin B and Arora DK. 2006. RAPD cluster analysis and chlorate sensitivity of some Indian isolates of *Macrophomina phaseolina* from sorghum and their relationship with pahogenicity. Mycological Research 163: 215–24.
8. Dhingra OD and Sinclair JB. 1972. Variation among isolates of *Macrophomina phaseolina* (*Rhizoctonia bataticola*) from the soybean plant. Phytopathology 62: 1108 (Abstact).
9. Dhingra OD and Sinclair JB. 1973. Location of *Macrophomina phaseolina* on soybean plants related to culture characteristics and virulence. Phytopathology 63: 934–936.
10. Ershad J. 1995. Fungi of Iran. Tehran: Ministry of agriculture, Agricultural Research, Education and Extention Organization. 888 p.
11. Jana T, Sharma T, Prasad RD and Arora DK. 2003. Molecular characterization of *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium* species by a single primer RAPD technique. Microbiological Research 158: 249–257.
12. Lohda S, Sharma SK, Mathur BK and Aggarwal RK. 2003. Integration sublethal heating with *Brassica amendments* and summer irrigation for control of *Macrophomina phaseolina*. Plant and Soil 256: 423–430.
13. Marzluf GA. 1981. Regulation of nitrogen metabolism and gene expression in fungi. Microbial Review 45: 437–461.
14. Papavizas GC. 1977. Some factors affecting survival of sclerotia of *Macrophomina phaseolina* in soil. Soil Biochemistry 9: 337–341.
15. Pearson CAS, Lesli JF and Schwenk FW. 1986. Variable chlorate resistance in *Macrophomina phaseolina* from corn, soybean and soil. Phytopathology 76: 646–649.
16. Pearson CAS, Lesli JF and Schwenk FW. 1987a. Nitrogen utilization by chlorate-resistant and chlorate-sensitive isolates of *Macrophomina phaseolina*. Trans Brazilian Mycology Society 88: 497–502.
17. Pearson CAS, Lesli JF and Schwenk FW. 1987b. Host preference correlated with chlorate resistance in *Macrophomina phaseolina*. Plant Disease 71: 828–831.
18. Purkayastha S, Kaur B, Dildaghi N and Choudhury A. 2006. Characterization of *Macrophomina phaseolina*, the charcoal rot pathogen of clusterbean, using

conventional techniques and PCR-based molecular markers. Plant Pathology 55: 106–116.
19. Safaie N, Alizadeh A, Saidi A, Rahimian H and Adam G. 2005. Molecular characterization and genetic diversity among Iranian populations of *Fusarium graminearum*, the causal agent of wheat head blight. Iranian Journal of Plant Pathology 41: 171–189.
20. Strausbaugh CA, Schroth MN, Weinhold AR and Hancock JG. 1992. Assessment of vegetative compatibility of *Verticillium dahliae* tester strains and isolates from California potatoes. Phytopathology 82: 61–67.
21. Su G, Such SO and Russin JS. 1998. Genetic and physiological evidence for host specialization in *Macrophomina phaseolina*. Phytopathology 88: 886.
22. Su G, Such SO, Scheider W and Russin JS. 2001. Host specialization in the charcoal rot fungus, *Macrophomina phaseolina*. Phytopathology 91: 120–126.
23. Taliey F, Sanei SJ and Razavi SE. 2007. Study of various chlorate reactions in the isolates of *Macrophomina phaseolina*. Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources 14: 140–148.