جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی
جلد چهاردهم، شماره ششم، بهمن ـ اسفند ۱۳۸۶
www.jasnr.info
www.sid.ir
www.magiran.com/jasnr

مقایسه روش‌های تولید آپوتسیم جدایه‌های قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* از مزارع کلزا در شرایط آزمایشگاهی

زهرا وکیلی زارج[1]*، کامران رهنما[2]، سید اسماعیل رضوی[3] و منصور صلاتی[4]

[1]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد گروه گیاهپزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [2]دانشیار گروه گیاهپزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [3]مربی گروه گیاهپزشکی دانشکده علوم زراعی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [4]بخش تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی مرکز تحقیقات کشاورزی گلستان، گرگان

تاریخ دریافت: ۸۵/٤/٤ ؛ تاریخ پذیرش: ۸٦/۹/۲۳

چکیده

پوسیدگی سفید ساقه کلزا با عامل قارچی *Sclerotinia sclerotiorum* مهمترین بیماری این گیاه در شمال کشور است. این قارچ عامل بیماری با تولید سختینه در خاک بقای خود را حفظ کرده یافته و آپوتسیم‌ها نیز از همین سختینه‌ها منشاء می‌گیرند. در این تحقیق ابتدا از ۱۹ جدایه خالص‌سازی شده از مزارع کلزا استان گلستان، به‌روش کوهن و پوردی سختینه تولید گردید و سپس سختینه‌ها به‌منظور تامین نیاز سرمایی به مدت ۷-٦ هفته در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای تولید آپوتسیم از روش‌های پتری حاوی آب آگار، پتری و گلدان حاوی پرلیت مرطوب و گلدان های حاوی ماسه مرطوب استفاده شد. سپس پتری‌ها و گلدان‌ها ابتدا در شرایط دمایی ۱۰ درجه سانتی‌گراد به‌منظور تولید پایه آپوتسیم و سپس در دمای ۱ ± ۱٤ درجه سانتی‌گراد با دوره نوری ۱٤ ساعت به‌منظور ظهور آپوتسیم کامل قرار گرفتند. بعد از ٥-٤ هفته در محیط پرلیت مرطوب و ۷-٦ هفته در محیط آب آگار و ۸-۷ هفته در محیط شن مرطوب آپوتسیم کامل به‌دست آمد. در جدایه‌های مختلف تفاوت‌هایی از نظر تعداد آپوتسیم و زمان تشکیل آن وجود داشت، به‌طوری‌که حتی در ٥ جدایه از ۱۹ جدایه آزمایش شده هیچ آپوتسیمی تولید نگردید و در برخی جدایه‌ها از یک سختینه حدود ۳٥-۳۰ آپوتسیم تولید شد. از هر سختینه به‌طور متوسط ۱٥آپوتسیم و حداقل آن ٤-۳ آپوتسیم تولید شده بود. به‌طور کلی، روش پرلیت مرطوب در مقایسه با دو روش دیگر به‌مدت زمان کمتری برای تولید آپوتسیم نیاز داشت.

واژه‌های کلیدی: *Sclerotinia sclerotiorum*، پوسیدگی سفید ساقه، کلزا، تولید آپوتسیم.

مقدمه

قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* یکی از مهمترین قارچ های بیماری‌زای گیاهی است که دامنه میزبانی آن شامل بیش از ٤۰۰ گونه گیاهی می‌باشد. مهمترین گیاهان زراعی میزبان شامل کلزا، آفتابگردان، سویا، توتون و سبزیجاتی مانند کاهو، لوبیا، کدو، هویج، سیب‌زمینی و تعداد دیگری از گیاهان گلدار است (بولند و هال، ۱۹۹٤). این بیماری در ایران تاکنون از روی

* - مسئول مکاتبه: Zahra_va_1359@yahoo.com

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

میزبان‌های مختلفی چون آفتابگردان، کلزا، شب بوو کاهو نیز گزارش شده است (براری و همکاران، ۲۰۰۰). در استان گلستان نیز این بیماری از سال ۱۳۸۰ در کلزا گزارش شده و به‌تدریج خسارت آن افزایش پیدا کرده است (رهنما و همکاران، ۲۰۰٤).

با بررسی چرخه زندگی قارچ مشخص می‌شود که آسکوسپورهای حاصل از آپوتسیم‌ها، نقش عمده‌ای را به‌عنوان مایه تلقیح اصلی و اولیه برای شیوع بیماری در اکثر گیاهان حساس بخصوص کلزا، لوبیا و سویا بعهده دارد (میل چرست و و هلر، ۱۹۸۷؛ بولند و هال، ۱۹۸۸). همچنین در مطالعات مربوط به بیماری‌زایی، تأثیر و قدرت قارچکش‌ها، ارزیابی مقاومت به بیماری، تعیین شرایط محیطی مورد نیاز برای توسعه بیماری، مدیریت بیماری شناسایی گونه قارچ از آسکوسپورها استفاده می‌گردد (باردین و هونگ، ۲۰۰۱؛ هائو و همکاران، ۲۰۰۳). به‌طورکلی، در بررسی‌های آزمایشگاهی برای تولید آپوتسیم، از سختینه‌های بالغ حاصل از محیط کشت‌های مغذی استفاده می‌شود. تاکنون از محیط‌های طبیعی مانند کرفس اتوکلاو شده، سبوس گندم و آرد ذرت (میل چرست و وهلر، ۱۹۸۷)، دیسک‌های هویج (کوهن، ۱۹۷۹) و یا محیط‌های کشت آگاری مانند سیب‌زمینی دکستروز آگار (اسمیت و بولند، ۱۹۸۹) برای تولید سختینه استفاده شده است. محیط‌های مذکور بعد از مایه‌زنی، تحت شرایط تاریکی و در دمای معین نگهداری شده‌اند، تا سختینه‌ها بعد از مدت زمان معینی به‌دست آیند. همچنین برای تولید آپوتسیم از بسترهای مختلفی مانند: آب مقطر استریل (آباوی و گروگان، ۱۹۷۵)، ماسه مرطوب (هونگ، ۱۹۹۱)، ورمیکولیت (گروگان و آباوی، ۱۹۷۵)، خاک، کمپوست و یا پرلیت مرطوب (سانسفوردو کولی اسمیت، ۱۹۹۲) استفاده شده است. در بیشتر این روش‌ها نتایج تولید آپوتسیم از ٤ هفته تا ۷ ماه متغیر بوده است (کوساشیو و همکاران، ۱۹۷۵).

بستره‌ایی که سختینه در آن تشکیل می‌شود نقش مهمی در زمان تولید و تعداد آپوتسیم دارد. همچنین، با استفاده از دوره سرمادهی و شرایط مرطوب، تولید آپوتسیم افزایش می‌یابد و نور برای تولید آپوتسیم کامل ضروری بوده ولی برای تولید پایه آپوتسیم مورد نیاز نمی‌باشد (کوهن، ۱۹۷۹). از آن جایی که در استفاده از روش‌های فوق از جدایه‌های قارچی سایر کشورها استفاده شده است و وضعیت جدایه‌های قارچ از مزارع کلزا داخل کشور در ارتباط با مسائل فوق مشخص نبود، در این تحقیق نیاز به بررسی بود.

بررسی تاثیر دما برروی رشد ریشه‌ها و تولید سختینه جدایه‌های قارچ عامل بیماری پوسیدگی سفید ساقه مزارع کلزا استان گلستان تفاوت‌هایی را در جدایه‌ها مشخص ساخت، اما از وجود این اختلاف در بین جدایه‌ها از نظر تشکیل آپوتسیم اطلاعات کاملی در دسترس نیست (وکیلی و همکاران، ۲۰۰٦).

با توجه به نقشی که آسکوسپورها به‌عنوان مایه تلقیح اولیه و اصلی در مطالعات بیماری‌زایی بیمارگر دارند. به‌منظور بررسی حساسیت ارقام مختلف، لازم به تلقیح با آسکوسپورها به‌عنوان عامل اپیدمیک می‌باشد، و این امر مستلزم بررسی روش معتبر برای تولید آپوتسیم در زمان کوتاهتر می‌باشد. از طرفی به علت طولانی بودن زمان تولید آپوتسیم در شرایط طبیعی، بر این پایه تحقیق حاضر مورد اجرا گذاشته شد، تا روش‌های مختلف تولید آپوتسیم در شرایط آزمایشگاهی بررسی شود و روشی که در مدت زمان کمتری تعداد بیشتر آپوتسیم تولید می‌کند معرفی گردد. علاوه بر آن، تفاوت جدایه‌ها از نظر تعداد و زمان تشکیل آپوتسیم مشخص گردد.

مواد و روش‌ها

برای تولید آپوتسیم قارچ مورد نظر ابتدا سختینه‌هایی با روش کوهن (۱۹۷۹) و پوردی (۱۹۷۹) تولید گردید.

روش‌های تولید سختینه

روش کوهن: یکصد گرم هویج که به‌صورت حلقه‌های ۵-۳ میلی‌متری بریده شده بودند، به همراه ۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر در داخل ارلن ۵۰۰ میلی‌لیتری ریخته و به‌مدت

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

۲۰ دقیقه در حرارت ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱ اتمسفر اتوکلاو شدند. بعد از سرد شدن محتویات ارلن‌ها، تعداد ۵-٤ قرص ۵ میلی‌متری از کشت ٤-۳ روزه هر جدایه روی محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار در شرایط سترون به داخل هر کدام از ارلن‌ها اضافه شد. ارلن‌ها به‌مدت ٦-٤ هفته در دما ۲۲-۲۰ درجه سانتی‌گراد در شرایط تاریکی نگهداری شدند.

روش پوردی: در این روش از محیط کشت آماده سیب‌زمینی دکستروز آگار استفاده گردید و بعد از تهیه محیط کشت ۲۰ میلی‌لیتری، مقداری از آن درون تشتک‌های پتری به قطر ۹ سانتی‌متر ریخته شد و پس از سرد شدن، قرص ۵ میلی‌متری از کشت قارچ به هر کدام از تشتک‌های پتری منتقل گردید و تشتک‌ها در انکوباتور با دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد در شرایط تاریکی به مدت دو تا سه ماه نگهداری شدند.

روش‌های تولید آپوتسیم : به‌منظور بررسی تأثیر روش‌های مختلف بر تولید آپوتسیم جدایه‌های قارچ *S.sclerotiorum*، آزمایشی در قالب طرح کامل تصادفی با ۳ تکرار در مورد ۵ جدایه Ss_5، Ss_{11}، Ss_{18}، Ss_{14}، Ss_8 انجام گرفت، و تعداد آپوتسیم بعد از ۲ ماه در روش‌های مختلف در بین جدایه‌ها در هر پتری و گلدان شمارش شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. با مقایسه میانگین تعداد آپوتسیم در روش‌های مختلف و نیز میزان تفاوت جدایه‌های قارچ در روش‌های مختلف پی برده شد.

روش‌های تولید آپوتسیم

تولید آپوتسیم به روش آب آگار: در این روش از محیط آب آگار یک درصد استفاده شد. تشتک‌های پتری به قطر ۲۰ سانتی‌متر تا نیمی از عمق با آب آگار که در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱ اتمسفر به‌مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شده بود، پر شد. بعد از سرد شدن محیط کشت، درون هر کدام ازپتری‌ها تعداد ۱۰ سختینه که به‌روش کوهن تولید شده بود، قرارداده شد و اطراف در پتری‌ها با پارا فیلم بسته و سپس پتری‌ها داخل اتاقک رشد با دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد قرارگرفتند.

پس از ظهور پایه آپوتسیم روی سختینه‌ها، تشتک‌ها را در تناوب نوری ١٤ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی (در معرض نور ۱۸۰۰-۱۵۰۰ لوکس) با دمای ۱ ± ١٤ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند تا آپوتسیم‌ها ظاهر شوند (پاترسون و گروگان، ۱۹۸۵).

سختینه‌های تولید شده به روش کوهن، با آب مقطر استریل شستشو داده شدند و بعد از این که کاملاً با کاغذ صافی خشک شدند، به‌منظور تامین نیاز سرمایی به مدت ٦-٤ هفته در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و قبل از بررسی جوانه‌زنی آنها، به‌مدت ۱ دقیقه با مخلوط اتانول ۱۰ درصد و هیپو کلریت سدیم ۱ درصد ضدعفونی و با آب مقطر استریل شستشو داده شدند.

تولید آپوتسیم به روش ماسه مرطوب: گلدان‌های پلاستیکی به ارتفاع ١٤ و قطر دهانه ١٤ سانتی‌متر با ماسه سترون تا ۲ سانتی‌متر از لبه گلدان پر گردید. به هر گلدان تعداد ۱۰ اسکلروت که به‌روش کوهن تولید شده بود و به‌مدت یک ماه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به‌منظور تامین نیاز سرمایی قرار گرفته بود، اضافه شد. سپس گلدان‌ها در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد در تاریکی قرار داده شدند، و برای حفظ رطوبت روی هر کدام پوشش پلاستیکی شفاف کشیده و در صورت نیاز به آنها مقداری آب مقطر اضافه شد (۷۰۰-٦۷۰ میلی‌لیتر) و پس از ظهور پایه آپوتسیم روی سختینه‌ها، گلدان‌ها در تناوب نوری ١٤ ساعت در دمای ۱ ± ١٤ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و به تدریج آپوتسیم‌ها تشکیل شدند (هائو و همکاران، ۲۰۰۳).

تولید آپوتسیم به‌روش پرلیت مرطوب: در این روش از روش سانسفورد و کولی اسمیت (۱۹۹۲) همراه با تغییراتی استفاده شد به‌طوری که گلدان‌های پلاستیکی به ارتفاع ٦ و قطر دهانه ٦ سانتی‌متر یا پتری‌دیش‌های ۹ سانتی‌متری از پرلیت مرطوب پر شده و در هر گلدان و پتری تعداد ۱۰ اسکلروت که به‌روش کوهن تولید شده بود، قرار داده شد. برای حفظ رطوبت در صورت نیاز آب

مقطر به آنها اضافه شد. سپس پتری و گلدان‌ها در دما ۱۰ درجه سانتی‌گراد به‌منظور تولید پایه آپوتسیم و سپس در دما ۱ ± ۱٤ درجه سانتی‌گراد با دوره نوری ۱٤ ساعت به‌منظور ظهور آپوتسیم کامل قرار گرفت.

با تعیین روش پرلیت مرطوب به‌عنوان سریع‌ترین روش در میان سه روش آزمایش شده آزمایشی در قالب طرح کامل تصادفی با ۳ تکرار در مورد ۱۹ جدایه با استفاده از سختینه‌های تولید شده به روش پوردی انجام یافت و تعداد آپوتسیم در هر پتری شمارش شد. داده‌ها از طریق آزمون LSD با استفاده از نرم‌افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. با مقایسه میانگین تعداد آپوتسیم به میزان تفاوت جدایه‌های قارچ از نظر تولید آپوتسیم پی برده شد.

نتایج

بررسی روش‌های مختلف تولید سختینه: در دو روش مورد استفاده برای تولید سختینه(روش کوهن، پوردی) مشخص شد که در روش کوهن تعداد سختینه بیشتر و بزرگتری نسبت به روش پوردی به دست آمد، به‌طوری‌که تعداد و اندازه اسکلروت در روش کوهن به‌ترتیب ٤٥-٤٠ عدد و اندازه آنها ۵۰-۲۵ میلی‌متر بود و حال آن که در روش پوردی تعداد آنها ۲۰- ٦ عدد و اندازه آنها ۱۰-۸ میلی‌متر بوده است. همچنین شکل سختینه در روش کوهن کشیده‌تر و متنوع‌تر بود اما در روش پوردی بیشتر بیضوی و کروی است (شکل‌های ۱ و۲).

شکل ۱- تولیدسختینه به‌روش کوهن (با استفاده از محیط مغذی هویج) در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد.

شکل ۲- تولید سختینه به روش پوردی (با استفاده از محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار). در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد.

بررسی روش های مختلف جوانه زنی سختینه و تولید آپوتسیم: در بررسی تولید آپوتسیم به ۳ روش پرلیت مرطوب، ماسه مرطوب، آب آگاردر مورد ۵ جدایه Ss_5، Ss_{11}، Ss_{18}، Ss_{14}، Ss_8، جدول تجزیه واریانس نشان داد که بین تعداد آپوتسیم تولید شده در روش‌های مختلف و نیز بین جدایه‌های مختلف قارچ و اثر متقابل جدایه‌های قارچ و روش‌های تولید آپوتسیم، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود دارد (جدول ۱).

جدول ۱- جدول تجزیه واریانس مربوط به آزمایش اثر متقابل روش تولید آپوتسیم × جدایه.

منبع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F. Value
تکرار	۳	۸۸٤/۷۱۱	٤٤/۳۵۵	۲/۱۷
جدایه	٤	۳٦۳۹۸/۳۵۵	۹۰۹۹/۵۸۸	٤٤٤/٤۳**
روش تولید آپوتسیم	۲	۷۵۵٦/۹۷۷	۳۷۷۸/٤۸۸	۱۸٤/۵۵**
جدایه×روش تولید آپوتسیم	۸	۳۱۲۳/۲٤٤	۳۹۰/٤۰۵	۱۹/۰۷**
خطا	۲۸	۵۷۳/۲۸۸	۲۰/٤۷٤	
مجموع	٤٤	٤۷۷٤۰/۵۷۷		

(۱۰/۹۳درصد=CV) (**در سطح ۱ درصد معنی‌دار می‌باشد).

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل روش تولید آپوتسیم × جدایه بر تعداد آپوتسیم تولید شده.

جدایه	WA	ماسه مرطوب	پرلیت مرطوب
Ss_5	٤۸/۳۳ a *	۸۰/۰۰ a	۱۱۰/۳۳ a
Ss_{11}	٤۲/۰۰ a	٦۲/٦٦ b	۸۳/۰۰ b
Ss_8	۲۸/۳۳ b	٤۳/۳۳ c	٦۰/۰۰ c
Ss_{18}	۱۰/۰۰ c	۱۸/٦٦ d	۳٤/۰۰ d
Ss_{14}	۰ d	۰ e	۰ e
LSD =٪۵	۸/٤۲	۷/۸۸	۹/۸٤

* میانگین‌هایی که با حروف مختلف در هر ستون نشان داده شده‌اند در سطح ۵ درصد دارای اختلاف معنی‌داری هستند (میانگین اعداد مربوط به تعداد تولید آپوتسیم در ۳ تکرار می‌باشد).

در روش آب آگار بین ۵ جدایه مورد آزمایش، جدایه‌های Ss_5 و Ss_{11} به‌ترتیب دارای حداکثر (٤۸/۳۳، ٤۲ عدد آپوتسیم) و Ss_{18} دارای حداقل (۱۰ عدد آپوتسیم) بودند و در روش‌های ماسه مرطوب و پرلیت مرطوب جدایه Ss_5 به‌ترتیب دارای حداکثر(۸۰، ۱۱۰/۳۳عدد) و جدایه Ss_{18} حداقل تعداد آپوتسیم (۱۸/٦٦، ۳٤ عدد) را تولید کردند (جدول ۲).

در هر سه روش مورد آزمایش جدایه Ss_{14} در بین ۵ جدایه، هیچ آپوتسیمی را تولید نکرد. در روش پرلیت مرطوب حداکثر و در روش آب آگارحداقل تعداد آپوتسیم تولید گردید. علاوه بر آن در روش پرلیت مرطوب در مقایسه با دو روش دیگر مدت زمان کمتری برای تولید آپوتسیم لازم بود. به‌طوری که بعد از گذشت ۵-٤ هفته از زمان نگهداری سختینه‌ها در دما ۱۰ درجه سانتی‌گراد در بستر پرلیت مرطوب پایه آپوتسیم ظاهر شد در حالی که در روش آب آگارو ماسه مرطوب مدت زمان به‌ترتیب ۷-٦ هفته و ۸-۷ هفته، زمان لازم برای تولید آپوتسیم است (شکل‌های ۳ و٤).

شکل ۳- تولید آپوتسیم جدایه Ss_8 در محیط آب آگار در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد بعد از گذشت ۲ ماه.

شکل ٤- تولید آپوتسیم جدایه Ss_8 به‌روش ماسه مرطوب در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد بعد از گذشت ۲ ماه.

ارزیابی جدایه‌های مختلف از نظر تولید آپوتسیم به‌روش پرلیت مرطوب : در بررسی تولید آپوتسیم به‌روش پرلیت مرطوب در مورد ۱۹ جدایه، جدول تجزیه واریانس نشان داد که بین تعداد آپوتسیم جدایه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد وجود دارد (جدول ۳).

در بین ۱۹ جدایه مورد بررسی، جدایه Ss_5 حداکثر تعداد آپوتسیم (۹٦/٦٦) و جدایه Ss_{18} و Ss_{1C} حداقل تعداد (به‌ترتیب ۲۰ و ۲٦عدد) آپوتسیم را دارا می‌باشند. جدایه‌های Ss_{19} و Ss_2 و Ss_3 و Ss_{20} با میانگین تعداد آپوتسیم نزدیک به‌هم در یک گروه مشابه قرار می‌گیرند.

در بین ۱۹ جدایه، در ٤ جدایه Ss_{13}، Ss_{14}، Ss_{12} و Ss_6 بعد از مدت زمان طولانی (حدود ۳ ماه) هیچ آپوتسیمی تولید نگردید. برای سایر جدایه‌ها نیز مدت زمان لازم برای تولید آپوتسیم در جدول ٤ آمده است. بعد از تولید پایه آپوتسیم در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد، گلدان و یا پتری‌ها برای تولید آپوتسیم کامل به‌شرایط دمایی ۱ ± ۱٤ درجه سانتی‌گراد با دوره نوری ۱٤ ساعت (در معرض نور ۱۸۰۰–۱۵۰۰ لوکس) منتقل شدند که زمان نگهداری جدایه‌ها در این شرایط بین ۲–۱ هفته متغیر بوده است (شکل۵).

جدول ۳- مقایسه میانگین تعداد آپوتسیم در جدایه‌های مختلف به روش پرلیت مرطوب دردمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد.

جدایه	میانگین تعداد آپوتسیم	حداکثر تعداد آپوتسیم از یک اسکلروت
Ss_5	۹۶/۶۶[a]*	۱۵
Ss_{19}	۹۱/۶۶[ab]	۱۰
Ss_2	۹۱/۶۶[ab]	۱۰
Ss_3	۹۰/۰۰[ab]	۱۲
Ss_{20}	۸۶/۶۶[bc]	۱۱
Ss_1	۸۰/۰۰[cd]	۱۰
Ss_{2k}	۷۸/۳۳[d]	۱۰
Ss_{AR}	۷۶/۶۶[d]	۱۰
Ss_7	۷۳/۳۳[de]	۱۰
Ss_{11}	۶۶/۶۶[ef]	۸
Ss_4	۶۰/۰۰[fg]	۸
Ss_8	۵۶/۶۶[gh]	۸
Ss_{16}	۵۰/۰۰[h]	٤
Ss_{10}	۲۶/۶۶[i]	۵
Ss_{18}	۲۰/۰۰[i]	٤
Ss_{13}	۰/۰۰[j]	۰
Ss_{14}	۰/۰۰[j]	۰
Ss_{12}	۰/۰۰[j]	۰
Ss_6	۰/۰۰[j]	۰
LSD =٪۵	۷/۸۸	

* میانگین‌هایی که با حروف مختلف نشان داده شده‌اند در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌داری هستند (میانگین اعداد مربوط به تعداد تولید آپوتسیم در ۳ تکرار می‌باشد).

شکل ۵- مقایسه تولید آپوتسیم کامل با جدایه‌های قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* در محیط پرلیت مرطوب در دما ۱۰ درجه سانتی‌گراد بعد از دو ماه، تولید آپوتسیم کمتر با جدایه Ss_{18} (سمت راست) و تولید بیشتر آپوتسیم با جدایه Ss_5 (سمت چپ).

جدول ٤- مدت زمان نگهداری سختینه‌ها برای ظهور آپوتسیم کامل (پایه و کلاهک) در جدایه‌های *Sclerotinia sclerotiorum* در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد.

جدایه‌ها	محل جدایه‌ها	مدت زمان لازم برای تولید آپوتسیم (روز)
Ss_1	کردکوی	۳۸
Ss_7	جاده قدیم کردکوی	٤۰
Ss_3	سالیکنده جاده کردکوی	۳۸
Ss_4	روستای جفاکنده جاده کردکوی	٤۰
Ss_5	پلیس راه نوکنده	۳۵
Ss_2	روستای زنگیان گرگان	۳۵
Ss_{AR}	عراقی محله گرگان	۳۸
Ss_{12}	آق‌قلا	-
Ss_{14}	بندرترکمن	-
Ss_{16}	روستای الازمن علی آباد	٤۰
Ss_8	فاضل آباد	۳۸
Ss_{20}	علی آباد	۳۰
Ss_{11}	مینودشت	۳۵
Ss_{19}	گنبد	۳۵
Ss_{1C}	صوفیان کلاله	۳۸
Ss_6	روستای دهنه کلاله	-
Ss_{18}	مینودشت	٤۵
Ss_{13}	گالیکش	-
Ss_{2K}	کلاله	۳۸

بحث

در مقایسه دو روش تولید سختینه مشاهده شد که روش کوهن (تولید سختینه در محیط کشت طبیعی هویج) نسبت به روش پوردی (تولید سختینه در محیط کشت حاوی کربو هیدرات) تعداد سختینه بیشتر و با اندازه درشت‌تری تولید می‌کند که دلیل آن وجود مواد غذایی فراوانتر و وجود بتا کاروتن (عامل تحریک‌کننده) در محیط کشت طبیعی نسبت به محیط کشت حاوی کربوهیدرات است. این نتایج با تحقیقات میل چرست و وهلر (۱۹۸۷)، سانسفورد وکولی اسمیت (۱۹۹۲) و کوهن (۱۹۷۹)، نلسون و همکاران (۱۹۹۱) که از محیط کشت طبیعی گندم یا هویج برای تولید سختینه استفاده کرده‌اند مطابقت دارد. طبق نظر این محققین نیزنیز فراوانی مواد غذایی در محیط کشت طبیعی سبب افزایش تعداد و اندازه سختینه می‌گردد و علاوه بر آن باعث آمادگی بیشتر این سختینه‌ها برای تولید مرحله جنسی شده و در نتیجه تعداد بیشتر و بزرگتری آپوتسیم از آنها به وجود می‌آید. از طرفی کشت پی در پی و عدم تناوب موثر با گیاهان غیر میزبان به تشکیل آپوتسیم در مزرعه کمک خواهد نمود، اگر چه عوامل دیگری چون رطوبت و مواد آلی خاک در این امر دخالت دارند (فراز و همکاران، ۱۹۹۹).

در این آزمایش‌ها مشخص شد که بیشترین آپوتسیم از سختینه حاصل از محیط کشت طبیعی به تعداد ٤۰-۳۵ عدد با میانگین طول پایه ۲۰ میلی‌متر تولید می‌شود، در حالی‌که در سختینه حاصل از محیط کشت حاوی کربوهیدرات این مقدار ۲۰-۱۵ عدد با طول پایه ۸ میلی‌متر می‌باشد. این نتایج که بیانگر نقش مثبت محیط طبیعی و عوامل مغذی در کارایی جوانه‌زنی سختینه برای تولید مرحله جنسی است مطابقت دارد، به‌طوری‌که سختینه حاصل از محیط کشت حاوی کربوهیدرات نسبت

به سایر محیط کشت‌های طبیعی مانند (کرفس) شانس کمتری را حتی در شرایط ایده‌آل برای تولید آپوتسیم دارد و در زمان طولانی‌تر تعداد کمتری آپوتسیم از این سختینه‌ها تولید می‌گردد (پوردی، ۱۹۷۹). همچنین به عقیده هائو و همکاران (۲۰۰۳) بین تعداد پایه آپوتسیم تولید شده و اندازه سختینه ارتباط مثبتی وجود دارد و به علت اندازه کوچک سختینه در *S.minor*، بندرت تولید زیاد آپوتسیم صورت می‌گیرد.

سه روش تولید آپوتسیم (آب آگار، ماسه مرطوب، پرلیت مرطوب) با هم تفاوت داشته و در روش پرلیت مرطوب تعداد بیشتر و با اندازه بزرگتر آپوتسیم، نسبت به دو روش دیگر تولید می‌شود.

عوامل مؤثر در تولید آپوتسیم علاوه بر بستره‌ای که سختینه روی آن تولید شده، دما، رطوبت و نور می‌باشد. از نظر مواد غذایی، سختینه‌هایی که در این ۳ روش استفاده شده‌اند سختینه‌های حاصل از روش کوهن بوده و همگی از منبع غذایی یکسانی برخوردار بوده‌اند. علاوه بر آن، دما و نور نیز در هر ۳ روش یکسان استفاده شده و علت تفاوت سه روش از نظر تولید آپوتسیم را می‌توان به رطوبت نسبت داد. زیرا در روش آب آگار درصد رطوبت نسبت به دو روش دیگر کمتر بوده و در نتیجه تعداد کمتری آپوتسیم تولید می‌کند.

بنابراین در روش پرلیت مرطوب علت تولید بیشتر و سریع‌تر آپوتسیم، وجود پوشش مرطوب روی سختینه‌هاست که در روش ماسه مرطوب نیز این پوشش البته با رطوبت کمتری وجود دارد و به‌علت تبخیر نیاز به آبیاری حداقل سه روز در هفته می‌باشد. این نتایج با تحقیقات فراز و همکاران (۱۹۹۹) مطابقت دارد که به نظر آنها نیز پوشش مرطوب روی سختینه‌ها تولید آپوتسیم را تسریع می‌نماید. همچنین سانسفورد وکولی اسمیت (۱۹۹۲) نیز استفاده از پرلیت مرطوب را در مقایسه با استفاده از کمپوست بهتر ارزیابی نمودند، به‌طوری‌که در این روش از ۷ جدایه مورد آزمایش در ۵ جدایه تولید آپوتسیم انجام شد اما در استفاده از کمپوست فقط در یک جدایه تولید آپوتسیم تشکیل گردید.

روش آب آگار با اینکه تعداد کمتری آپوتسیم تولید می‌کند ولی در مقایسه با روش ماسه مرطوب نیاز به زمان کمتری برای تولید آپوتسیم دارد و این زمان کوتاهتر و حفظ رطوبت برای یک مدت بدون رسیدگی خاص احتمالاً از دلایلی بوده که پاترسون و گروگان (۱۹۸۵) روش آب آگار را نسبت به ماسه مرطوب بهتر ارزیابی نموده‌اند.

علاوه بر تفاوت روش‌های تولید آپوتسیم، نتایج دیگری را که در تولید آپوتسیم می‌توان به آن اشاره نمود تفاوت جدایه‌ها از نظر تعداد آپوتسیم می‌باشد، به‌طوری‌که در سه روش مورد استفاده برای تولید آپوتسیم از ۵ جدایه مورد آزمایش، در جدایه Ss_{14} با هر سه روش هیچ آپوتسیمی تولید نشد و در ٤ جدایه دیگر نیز از نظر میانگین تعداد آپوتسیم (جدول ۲) تفاوت وجود دارد. علاوه بر آن روش پرلیت مرطوب که به‌عنوان بهترین روش برای ارزیابی تولید آپوتسیم در بین ۱۹ جدایه هم استفاده شده و با توجه به اینکه ازسختینه حاصل از روش پوردی در این بخش از آزمایش استفاده گردیده، بنابراین میانگین تعداد آپوتسیم حاصل از این سختینه‌ها در ٤ جدایه Ss_8، Ss_{18}، Ss_5 و Ss_{11} جمع‌آوری شده از مزارع به‌ترتیب ٦٦، ٩٦، ۲۰، ٥٦عدد (جدول ۳) نسبت به میانگین تعداد آپوتسیم حاصل از سختینه‌های روش کوهن در مورد این چهار جدایه به‌ترتیب ۸۳، ۱۱۰، ٣٤، ٦۰ عدد کمتر است (جدول ۲).

علاوه بر آن ممکن است تفاوت جدایه‌ها از نظر تولید آپوتسیم مربوط به نیاز دمایی متفاوت آنها برای تولید آپوتسیم باشد. در آزمایش‌هایی که انجام شده از دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد به‌عنوان دمای بهینه مورد نیاز برای تولید پایه آپوتسیم استفاده گردید، به‌طوری‌که در مورد سختینه‌های که به‌روش کوهن تولید شده بود بعد از تأمین نیاز سرمایی (نگهداری به مدت دو ماه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد) در هر ۳ روش (آب آگار، ماسه مرطوب و

پرلیت مرطوب) پنج جدایه مورد آزمایش برای ظهور پایه آپوتسیم در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در مورد سختینه هایی که به روش پوردی در دمای ۱۰ درجه‌سانتی‌گراد تهیه شده بودند بعد از نگهداری آنها به‌مدت یک ماه در این دما، برای تولید آپوتسیم نیز، بعد از قرارگیری روی پرلیت مرطوب در همین دما (۱۰ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند و علت استفاده از این دما گزارش هونگ (۱۹۹۱) بود که در آزمایش‌های خود در درجه حرارت‌های مختلف برای تولید آپوتسیم به این نتیجه رسیده بود سختینه‌هایی که روی محیط غذایی سیب‌زمینی دکستروز آگار در ۱۰ درجه سانتی‌گراد برای ۸ هفته قرار می‌گیرند، شروع به جوانه‌زنی به صورت کارپوژنیک را تسریع می‌نمایند ولی سختینه‌هایی که در دمای ۲۵ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد تشکیل شده بودند قادر به جوانه‌زنی نبوده مگر اینکه در دمای سرد (۱۰ درجه سانتی‌گراد) برای ٤ هفته و یا طولانی‌تر قرار گیرند. با توجه به آمار هواشناسی منطقه رسیدن این دمای سرد طی فصل زمستان در مزارع کلزای استان گلستان و فراهم بودن رطوبت کافی در خاک، تولید آپوتسیم را می‌تواند تسریع نماید.

علاوه بر این در بسیاری از آزمایش‌های سانسفورد وکولی اسمیت (۱۹۹۲) و میل چرست و وهلر (۱۹۸۷) نیز بعد از تولید سختینه و برآورده شدن نیاز سرمایی، سختینه‌ها را به‌منظور تولید پایه آپوتسیم در دمای۱۰ درجه سانتی‌گراد قرار دادند. اما با توجه به نتایج این آزمایش‌ها مشخص شد که جدایه‌ها از نظر تعداد آپوتسیم تولید شده و زمان تولید آن با یکدیگر فرق دارند و حتی برخی از آنها هیچ آپوتسیمی تولید نمی‌کنند، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که در مورد برخی جدایه‌ها دمای ۱۰ درجه‌سانتی‌گراد ممکن است دمای بهینه مورد نیاز برای تولید پایه آپوتسیم نباشد. همان‌طور که در بررسی سان و یانگ (۲۰۰۰) نیز مشاهده شد علت اختلاف در تولید پایه آپوتسیم و یا عدم تولید در برخی جدایه‌ها به‌علت نیاز دمایی متفاوت جدایه‌ها بوده که این امر به علت تفاوت جغرافیایی جدایه نیز می‌باشد، به‌طوری‌که بار دین و هونگ (۲۰۰۱) از جمله عوامل موثر در تولید آپوتسیم جدایه‌ها را ناحیه جغرافیایی مربوط به جداسازی جدایه، دمای تشکیل سختینه و دمایی که مایه تلقیح مادری (میسلیوم یا سختینه) تشکیل شده، ذکر می‌نمایند.

اگرچه عدم تولید آپوتسیم و یا تولید تعداد متفاوت در جدایه‌ها ممکن است منشأ ژنتیکی داشته باشد که نتایج حاصل با نظر بلند و هال (۱۹۸۸) مطابقت دارد، به نظر آنها تعداد متفاوت آپوتسیم تولید شده توسط جدایه‌های مختلف بستگی به ساختار ژنتیکی جدایه‌ها دارد.

نظر به اهمیت کاربرد روش‌های ارائه شده و ارتباط آنها با مباحث شایع و همه‌گیر شدن بیماری در طبیعت است که می‌توان پتانسیل و توان جدایه‌های مختلف قارچ عامل بیماری را در تولید آسک و آسکوسپور که مربوط به فرم تولید مثل جنسی قارچ است، مطالعه نمود و با توجه به نقش آسکوسپور به‌عنوان عامل اپیدمیک بررسی‌های بیشتری در ارتباط با میزان رطوبت و زمان آزادسازی آسکوسپور در طبیعت و درجه حرارت و تاثیر آنها روی آزادسازی این قبیل اسپورها مورد مطالعه قرار داد و از این طریق می‌توان در رابطه با کنترل عامل بیماری و مدیریت در مزرعه را همراه با ایجاد مدل‌های مختلف آب و هوایی بیماری را کنترل نمود.

منابع

1.Abawi, G.S. and Grogan, R.G. 1975. Source of primary inoculum and effects of temperature and moisture on infection of beans by *Whetzelinia sclerotiorum*. Phyto Pathology. 65:300-309.

2.Barari, H., Zamani-zadeh, H., Ershad, J., and Forotan, A. 2000. Distribution of canola stems white rot in Mazandaran. Proceeding of the 14th Iranian Plant Protection congress. Abstract. P. 295.

3.Bardin, S.D., and Huang, H.C. 2001. Research on biology and control of Sclerotinia Disease in Canada . Can. j. Plant Pathology. 23:88-98.

4.Boland, G.J., and Hall, L.R. 1988. Relationships between the spatial pattern and number of apothecia of *S.sclerotiorum* and stem rot of soybean. Plant Pathology. 37:329-336.
5.Boland, G.J., and Hall, R. 1994. Index of plant hosts of *sclerotinia sclerotiorum*. Can J. Plant Pathology. 16:93-108.
6.Coley–Smith, J.R., and Cooke, R.C. 1971. Survival and germination of fungal sclerotia. Ann. Rev Phyto Pathology. 9:65-92.
7.Ferraz, L.C.L., Cafe fillho, A.C., Nasser, L.C., and Azevedo, J. 1999. Effects of soil moisture organic matter and gress mulching on the carpogenic germination of sclerotia and infection of bean by *sclerotinia sclerotiorum*. Plant Pathology. 48:77-82.
8.Grogan, R.C., and Abawi. G.S. 1975. Influence of water potential on growth and survival of *Whetzelinia sclerotiorum*. Phyto Pathology. 65:122-128.
9.Hao, J.J., Subbarao, K.V., and Duniway, J.M. 2003. Germination of *S.minor* and *Sclerotinia sclerotiorum* sclerotia under various soil moisture and temperature combination. Phyto Pathology. 43:443-450.
10.Honda, Y., and Yunoki, T. 1977. Control of Sclerotinia disease of greenhouse eggplant and cucumber by inhibition of development of apothecia. Plant Disease Reporter, 61:1036-1040.
11.Huang, H.C. 1991. Induction of myceliogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* by exposure to subfreezing temperatures. Plant Pathology. 40:621-625.
12.Kohn, L.M. 1979. Delimitation of the economically important plant pathogenic Sclerotinia species. Phyto Ppathology. 69:881-886.
13.Kosashi, B.D., and Willetts, H.J. 1975. Ontogenic and biochemical studies of the apothecium of Sclerotinia sclerotiorum. Annals of Botany, 39:185-191.
14.Mylchreest, S.J., and Wheeler, B.E.J. 1987. A method for inducing apothecia from sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. Plant Pathology. 36:16-20.
15.Nelson, B., Duval, D., and Wu, H. 1988. An in vitro technique for large–scale production of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. Phyto Pathology. 1470-1472.
16.Patterson, C.L., and Grogan, R.C. 1985. Differences in epidemiology and control of lettuce drop caused by Sclerotinia *sclerotiorum* and *Sclerotinia minor*. Plant Disease, 69:766-770
17.Purdy, L.H. 1979. *Sclerotinia sclerotiorum*: History, disease and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. Phyto Pathology. 69:875-880.
18.Rahnama, K., Vakili, Z., and Razavi, S.I. 2004. Distribution of canola stems white rot *(Sclerotinia sclerotiorum)* in Golestan province and its control. Second Proceeding of National oil seeds festival, Gorgan-Iran. P. 34.
19.Sansford, C.E., and Coley-Smith, J.R. 1992. Production and germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. Plant Pathology. 41:154-156.
20.Smith. E.A., and Boland. G.J. 1989. A reliable method for the production and maintenance of germinated sclerotia of *sclerotina sclerotiorum*. Can J. Plant Pathology. 11:45-48.
21.Sun, P., and Yang, X.B. 2000. Light, temperature, and moisture effects on apothecium's production of *sclerotinia sclerotiorum*. Plant Disease. 84: 1287-1293.
22.Vakili, Z., Rahnama, K., Razavi, S.I., and Salati, M. 2006. Effect of temperature on the mycelial growth and sclerotia production of fungal isolates of canola stem white rot *(Sclerotinia sclerotiorum)* in Golestan province. Proceeding of the 17th Iranian Plant Protection Congress. Abstract. Karaj, Iran.

J. Agric. Sci. Natur. Resour., Vol. 14(6), Feb-March 2008
www.jasnr.info
www.sid.ir
www.magiran.com/jasnr

Comparsion methods for apothecium production between fungal isolates of *Sclerotinia sclerotiorum* of canola field *in vitro* condition

***Z. Vakili[1], K. Rahnama[2], S.E. Razavi[3] and M. Salati[4]**
[1]Former M.Sc. student Dept. of Plant Protection, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran, [2]Associate Prof. Dept. of Plant Protection, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran, [3]Instructor, Dept. of Plant Protection, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran, [4]Dept. of Pest and Plant Diseases of Golestan Research Center, Iran

Abstract

Canola white stem rot fungus, *Sclerotinia sclerotiorum* is the most serious disease of this crop in North of Iran. The fungal pathogen survives in soil with sclerotia production and then apothecia originate from sclerotia. In this research from 19 fungal isolates purified previously from canola field of Golestan province, sclerotia produced by methods of Purdy and Kohn and then their sclerotia for processing of dormancy under cooled temperature incubated at 4^0C for six up to seven weeks. The methods followed for production of apothecium included: water agar, Petri and pot with moisture perlit, and pot with moisture sand. In order to produce apothecium stipe petriplates and pots initially incubated at 10^oC and then for initiation of apothecium incubated at 14 ± 1^oC with light period of 14h. Apothecia produced 4-5 weeks after incubation in damp perlite condition and 6-7 weeks after incubation in water agar and 7-8 weeks after incubation in moisture sand. Although, there are variations between isolates due to number of apothecium and time of occurrence. Where as in five isolates of 19 isolates tested there was no production of any apothecium but, in some of isolates from one sclerote produced about 30-35 apothecium, and an average of 15 apothecia and minimum 3-4 apothecia in each sclerotium. Howevers moisture perlite in comparision with two other procedures needs time less than others for apothecium formation.

Keywords: *Sclerotinia sclerotiorum*; Stem white rot; Canola; Apothecium production.

*- Corresponding Author; Email: Zahra_va_1359@yahoo.com