

## گروه‌های سازگار میسلیومی و بیماری‌زایی جدایه‌های قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* عامل پوسیدگی سر کلم در ارومیه

وحیده یوسف‌دوست<sup>۱</sup> و یوبرت قوستا<sup>۲\*</sup>

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه

۲- نویسنده مسوول: استادیار گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه (ghoosta@gmail.com)

تاریخ پذیرش: ۹۳/۰۶/۰۹

تاریخ دریافت: ۹۳/۰۱/۳۰

### چکیده

در این مطالعه تعداد ۲۲۳ جدایه از قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* عامل بیماری پوسیدگی اسکروتینیایی سر کلم، از مزارع مختلف تحت کشت این گیاه در شهرستان ارومیه جمع‌آوری شد. شناسایی گروه‌های سازگار میسلیومی جدایه‌ها روی محیط کشت PDA تقویت شده با رنگ مک کورمیک<sup>۱</sup> انجام گرفت و در مجموع تعداد ۳۶ گروه سازگار میسلیومی مشخص گردید. تعداد ۲۳ گروه سازگار میسلیومی (حدود ۶۳/۸۸ درصد)، هر کدام تنها شامل یک جدایه و بقیه، بیش از یک جدایه داشتند. آزمون تعیین شدت بیماری‌زایی جدایه‌ها در آزمایشگاه روی برگ‌های جدا شده کلم انجام گرفت و میزان توسعه لکه‌ها روی برگ‌های تیمار شده اندازه‌گیری شد. تمامی جدایه‌ها روی برگ‌های کلم نشانه‌های بیماری را بروز دادند (بیماری‌زا بودند)، اما شدت بیماری‌زایی در بین جدایه‌ها تفاوت محسوسی داشت. هیچگونه ارتباطی بین شدت بیماری‌زایی جدایه‌ها، گروه‌های سازگار رویشی و یا محل جداسازی آنها مشاهده نشد. جدایه‌های حاصل از یک مزرعه به گروه‌های سازگار میسلیومی مختلفی تعلق داشتند، ضمن اینکه شدت بیماری‌زایی جدایه‌های درون یک گروه سازگار میسلیومی و نیز بین گروه‌های سازگار میسلیومی، متفاوت بود. نتایج این مطالعه نشان داد که سطح بالایی از ناسازگاری میسلیومی در بین جدایه‌های *Sclerotinia sclerotiorum* جمع‌آوری شده از مزارع مختلف تحت کشت کلم در ارومیه وجود دارد. این سطح وسیع ناسازگاری میسلیومی نشان دهنده ناهمسانی ژنتیکی در داخل جدایه‌های این گونه در این منطقه است و باید در برنامه‌های مدیریتی به ویژه ارزیابی و اصلاح ارقام مقاوم مورد توجه قرار گیرد.

کلید واژه‌ها: کلم، تنوع ژنتیکی، شدت بیماری‌زایی، نشانگر فنوتیپی، پوسیدگی اسکروتینیایی

(ارشاد<sup>۱</sup>، ۲۰۰۹). قارچ *Sclerotinia sclerotiorum*

de Bary (Lib.) یک عامل بیماری‌زای مهم، با گسترش جهانی و دارای طیف میزبانی گسترده‌ای است، به طوری که می‌تواند به بیش از ۴۰۸ گونه گیاه در ۲۷۸ جنس و ۷۵ تیره حمله نماید (بلند و هال<sup>۲</sup>، ۱۹۹۴). در ایران نیز، این گونه روی ۲۸ میزبان مختلف از ۱۳ تیره

### مقدمه

کلم با نام علمی (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) یکی از سبزی‌های مهم و پر مصرف در بین سبزیجات محسوب می‌شود. این گیاه در تمامی مناطق دنیا و تحت شرایط مختلف کشت می‌شود و توسط عوامل متنوعی از جمله آفات و عوامل بیماری‌زای گیاهی مورد حمله قرار می‌گیرد که منجر به بروز خسارت اقتصادی در محصول می‌گردند. حدود ۸ گونه قارچی از این گیاه در ایران جداسازی شده است

1- McCormicks

1- Ershad

2- Boland & Hall

میسلومی (MCGs)، چند شکلی در طول قطعات برش داده شده (RFLPs)، مترادف‌یابی DNA، رپید (RAPD) و ریزماهوراک‌ها (microsatellites) استفاده نموده‌اند و ضمن توصیف تنوع در ژنوتیپ‌ها، مدارک مبتنی بر تولید مثل همسانه‌ای (کلونال) و نیز جنسی (دگر لقاحی) را در جمعیت‌های قارچ ارائه نموده‌اند (اکین و همکاران<sup>۳</sup>، سان و همکاران<sup>۴</sup>، ۲۰۰۵؛ سکستون و همکاران<sup>۵</sup>، ۲۰۰۶؛ کوهن و همکاران<sup>۶</sup>، ۱۹۹۰؛ ۱۹۹۱؛ مرت تورک و همکاران<sup>۷</sup>، ۲۰۰۷؛ همتی و همکاران<sup>۸</sup>، ۲۰۰۹). ناسازگاری میسلومی که به صورت ناتوانی دو استرین برای جفت شدن و تشکیل یک هتروکاریون پایدار توصیف شده است به طور گسترده‌ای در مطالعات ژنتیکی قارچ‌ها و به عنوان یک روش موثر برای تعیین تنوع درون‌گونه‌ای در جمعیت‌ها استفاده شده است (کوهن و همکاران، ۱۹۹۱). با توجه به مشکل حصول جهش یافته‌های اوکسوتروف در قارچ‌های جنس *Sclerotinia*، از ناسازگاری میسلومی در مطالعات مربوط به تعیین ناهمسانی (هتروژنی) درون‌گونه‌ای در جمعیت‌های این قارچ استفاده شده است (دورمن و همکاران<sup>۹</sup>، ۲۰۰۳؛ فورد و همکاران<sup>۱۰</sup>، ۱۹۹۵؛ کارپنتر و همکاران<sup>۱۱</sup>، ۱۹۹۹؛ کوبتا و همکاران<sup>۱۲</sup>، ۱۹۹۷؛ کول و همکاران<sup>۱۳</sup>، ۲۰۰۴؛ کوهن و همکاران، ۱۹۹۰؛ ۱۹۹۱؛ کوهن، ۱۹۹۵). ناهمسانی ژنتیکی که توسط گروه‌های سازگار میسلومی مشخص می‌شود در بین جدایه‌های *Sclerotinia* از انواعی از میزبان‌ها و نواحی جغرافیایی مختلف حتی در داخل یک جمعیت مزرعه‌ای نیز گزارش شده است (پترسون و

گیاهی گزارش شده است (ارشاد، ۲۰۰۹؛ اجاقیان و ژیه<sup>۱</sup>، ۲۰۱۲). بر خلاف بسیاری دیگر از قارچ‌های آسکومیکوتا، این قارچ چرخه زندگی غیر جنسی که تولید کننده کنیدیوم‌ها برای انتشار می‌باشند را ندارد و تکثیر آن وابسته به آسکوسپورها و سختینه‌ها است. سختینه‌ها به عنوان ساختارهای زنده‌مانی عمل نموده و می‌توانند قارچ را تا چندین سال در خاک زنده نگه دارند و به دو روش قادر به جوانه‌زنی هستند. در روش اول، بعد از جوانه‌زنی سختینه‌ها، میسلوم تولید می‌شود که به اندامهایی از گیاه که با خاک در تماس هستند حمله نموده و باعث آلودگی آن‌ها می‌شود و در روش دوم، جوانه‌زنی سختینه‌ها منجر به تولید اندام‌های باردهی جنسی یا آپوتسیوم‌ها می‌شود که آسکوسپورهای تولید شده در داخل آسک‌ها، توسط جریان‌ات هوا پراکنده می‌شوند و موجب آلودگی بخش‌های هوایی گیاهان می‌گردند (می و همکاران<sup>۱</sup>، ۲۰۱۱). بیماری‌های تولید شده توسط این گونه، اغلب تحت نام کپک سفید (white mold) خوانده شده‌اند که به دلیل تشکیل پوشش سفید رنگ و پنبه‌ای از میسلوم‌های قارچ در بخش‌های آلوده میزبان است. آگاهی از ساختار ژنتیک جمعیتی، سیستم‌های آمیزشی و نیز تنوع بیمارگر برای توسعه استراتژی‌های موثر غربالگری میزبان‌ها به منظور شناخت و استفاده از مقاومت میزبانی، راهکارهای مدیریتی آن و درک توانایی بیمارگر در پاسخ به روش‌های مدیریتی ضروری است. گروه‌بندی درون‌گونه‌ای بر مبنای ویژگی‌هایی نظیر رنگ میسلوم، ابعاد آسک و آسکوسپور، اندازه سختینه‌ها و تولید آن‌ها امکان پذیر نیست، زیرا اساس ژنتیکی این ویژگی‌ها هنوز به خوبی شناسایی نشده و احتمالاً بسیار پیچیده است. مطالعات انجام گرفته روی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* از تعدادی از نشانگرهای مختلف ژنتیکی از جمله گروه‌های سازگار

3- Ekin *et al.*  
4- Sun *et al.*  
5- Sexton *et al.*  
6- Kohn *et al.*  
7- Mert-Türk *et al.*  
8- Hemmati *et al.*  
9- Durman *et al.*  
10- Ford *et al.*  
11- Carpenter *et al.*  
12- Cubeta *et al.*  
13- Kull *et al.*

1- Ojaghian & Xie  
2- Mei *et al.*

ناسازگاری میسلومی در بین جدایه‌ها مشاهده شد. مطالعات گسترده‌ای در نقاط مختلف جهان در مورد تنوع ژنتیکی جدایه‌های این قارچ از میزبان‌های مختلف با استفاده از نشانگرهای متفاوت مولکولی و نیز گروه‌های سازگار میسلومی انجام شده است و در تمامی مطالعات به وجود تنوع بالا در بین جدایه‌ها اشاره شده است (اکین و همکاران، ۲۰۱۱؛ کوبتا و همکاران، ۱۹۹۷؛ کول و همکاران، ۲۰۰۴؛ گرگ و همکاران، ۲۰۱۰؛ گومز و همکاران، ۲۰۱۱؛ مرت تورک و همکاران، ۲۰۰۷؛ یانار و اوناران، ۲۰۱۱). با توجه به گسترش بیماری در مزارع تحت کشت کلم در ارومیه و عدم وجود اطلاعات کافی از تنوع ساختار جمعیتی قارچ در مزارع کلم در ایران، این مطالعه با اهداف: ۱- تعیین گروه‌های سازگار میسلومی MCGs در میان جدایه‌های قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* حاصل از گیاهان آلوده کلم، ۲- بررسی شدت بیماری‌زایی جدایه‌های مختلف و ۳- بررسی امکان ارتباط بین بیماری‌زایی جدایه‌ها با گروه‌های سازگار میسلومی انجام گرفته است تا بتوان از نتایج حاصله در مطالعات مربوط به مدیریت بیماری استفاده نمود.

### مواد و روش‌ها

#### جمع‌آوری و خالص‌سازی جدایه‌های قارچی

طی بازدیدها از مزارع تحت کشت کلم در ارومیه در فصول زراعی ۱۳۹۱-۱۳۹۰، از گیاهان دارای نشانه‌های پوسیدگی در بخش قاعده و سر کلم، داشتن پوشش سفید میسلومی و نیز سختینه‌های قارچ در بخش‌های آلوده، نمونه‌برداری انجام گرفت و هر یک از نمونه‌های جمع‌آوری شده درون پاکت کاغذی جداگانه‌ای قرار داده شد و به آزمایشگاه منتقل گردید. برای جداسازی قارچ‌ها از سختینه‌ها، ابتدا سختینه‌ها به مدت ۳-۵ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد (حاوی ۰/۵ درصد هیپوکلریت سدیم) و یا اتانول ۷۰ درصد ضدعفونی سطحی

گروگان<sup>۱</sup>، ۱۹۸۵؛ عطاالله و همکاران<sup>۲</sup>، ۲۰۰۴؛ کوهلی و همکاران<sup>۳</sup>، ۱۹۹۲؛ وو و ساباراتو<sup>۴</sup>، ۲۰۰۶). سازگاری میسلومی توسط لوکوس‌های چندگانه کنترل می‌شود و استرین‌هایی که این توانایی را از خود نشان می‌دهند در یک گروه سازگار میسلومی یا Mycelial Compatibility Group (MCG) قرار داده می‌شوند. گروه‌های مختلف، نمایانگر افراد نامشابه از نظر ژنتیکی هستند (کوهن و همکاران، ۱۹۹۰؛ ۱۹۹۱؛ گلگس و کانکو<sup>۵</sup>، ۲۰۰۳). در ایران تنوع ژنتیکی جدایه‌های *Sclerotinia sclerotiorum* از مزارع کلزا با استفاده از نشانگرهای میکروستلایت (همتی و همکاران، ۲۰۰۹) و نیز روش انگشت‌نگاری rep-PCR (کریمی و همکاران<sup>۶</sup>، ۲۰۱۱)، مورد بررسی قرار گرفته و تنوع بالای ژنتیکی در جدایه‌های مورد مطالعه گزارش شده است. تنوع بیماری‌زایی و گروه‌های سازگار میسلومی در بین ۱۸۶ جدایه از این قارچ که از مزارع آفتابگردان جمع‌آوری شده‌اند، مورد بررسی قرار گرفت و ۲۶ گروه سازگار میسلومی مشخص گردید (ایرانی و همکاران<sup>۷</sup>، ۲۰۱۱). همچنین تنوع ژنتیکی جمعیت‌های قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* جدا شده از نواحی عمده تحت کشت کلزا در ایران با استفاده از روش تعیین گروه‌های سازگار میسلومی مورد مطالعه قرار گرفت و ۳۱ گروه سازگار میسلومی در میان جدایه‌های مورد مطالعه مشخص گردید (براری و همکاران<sup>۸</sup>، ۲۰۱۱). گروه‌های سازگار میسلومی در جدایه‌های *Sclerotinia sclerotiorum* از مزارع کلزا در استان گلستان (وکیلی زارج و رهنما، ۱۳۸۷) و سیب‌زمینی از استان همدان (اجاقیان و زی، ۲۰۱۲). مورد بررسی قرار گرفت و سطح بالای

1- Patterson & Grogan

2- Atallah *et al.*

3- Kohli *et al.*

4- Wu & Subbarao.

5- Glass & Kaneko

6- Karimi *et al.*

7- Irani *et al.*

8- Barari *et al.*

9- Grag *et al.*

10- Gomes *et al.*

11- Yanar & Onaran

اتوکلاو و خنک شدن محیط کشت تا دمای ۵۰-۴۵ درجه سلسیوس، محیط کشت به داخل تشتک‌های پتری ۸ سانتی‌متری سترون ریخته شد و در شرایط آزمایشگاه نگهداری گردید تا محیط سفت شود (ملوارز و همکاران<sup>۱</sup>، ۲۰۰۷). جدایه‌های قارچی به صورت دو به دو مقابل هم و در تمامی ترکیبات ممکن، روی این محیط، کشت داده شدند. برای این منظور، حلقه‌های به قطر ۵ میلی‌متر از پرگنه در حال رشد فعال قارچ، و از فاصله یک سانتیمتری از حاشیه پرگنه، بریده شدند و این حلقه‌ها، به فاصله‌ی ۳ سانتیمتری از هم روی محیط کشت آماده شده قرار گرفتند (اجقیان و ژیه، ۲۰۱۲؛ فلیپس و همکاران<sup>۲</sup>، ۲۰۰۲). تشتک‌های پتری در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند و بعد از گذشت ۷-۴ روز، مورد ارزیابی قرار گرفتند. جدایه‌ها زمانی به عنوان سازگار مشخص شدند که ریشه‌های دو جدایه در محل تماس با هم، پیوند ریشه (آناستوموز) داده و یک کلنی واحد را تشکیل دادند و زمانی به عنوان ناسازگار مشخص شدند که یکی از حالات زیر در محل تماس دو جدایه مشاهده شد: (۱) زمانی که بعد از گذشت ۷ روز، یک خط قرمز رنگ مشخصی در سطح پرگنه و نیز از پشت تشتک پتری، در محل تلاقی دو جدایه در پرگنه نمایان شد. (۲) زمانی که خط قرمز تنها از پشت تشتک پتری در پرگنه دیده شد و در سطح پرگنه نیز، ناحیه دارای میسلوم فراوان در محل تلاقی دو جدایه مشاهده گردید. (۳) زمانی که یک ناحیه عاری از میسلوم در ناحیه تلاقی دو جدایه مشاهده شد و (۴) زمانی که یک باند مشخص و فراوان از میسلوم‌های هوایی به صورت خط ضخیم در ناحیه تلاقی دو جدایه مشاهده شد. (کوهن و همکاران، ۱۹۹۰). این آزمایش‌ها دو بار تکرار شد.

### آزمون بیماری‌زایی

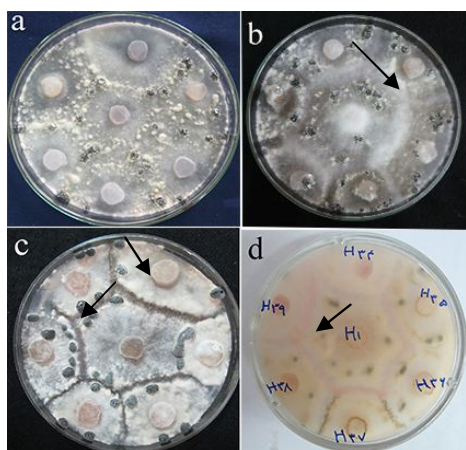
برای بررسی بیماری‌زایی و نیز تعیین شدت بیماری ایجاد شده توسط جدایه‌های قارچی، از روش مایه‌زنی روی

شدند و سپس ۳ بار با آب مقطر سترون شسته شدند. جهت حذف آب اضافی، سختینه‌ها بین دو لایه کاغذ صافی سترون آبگیری شده و سختینه‌های ضد عفونی شده به چند قسمت بریده شدند و به تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت Potato Dextrose Agar (PDA) (حاوی ۲۰۰ پی‌پی‌ام آنتی‌بیوتیک سولفات استرپتومایسین، برای بازداری از رشد باکتری‌ها) منتقل گردیدند. برای جداسازی قارچ از نمونه‌های گیاهی فاقد سختینه، ابتدا بافت‌های گیاهی زیر شیر آب شسته شدند و بعد از ضد عفونی سطحی و آبگیری بین دو لایه کاغذ صافی سترون، از حاشیه بافت‌های سالم و آلوده قطعات کوچکی برداشته شد و به تشتک‌های حاوی محیط کشت PDA منتقل گردید. تشتک‌های پتری در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند و هر روز مورد بازرسی قرار گرفتند (کریمی و همکاران، ۲۰۱۱؛ کوهن و همکاران، ۱۹۹۰). از میسلوم‌های رشد کرده از سختینه‌ها یا بافت‌های گیاهی، قطعات کوچکی برداشته شد و به محیط کشت جدید PDA برای خالص سازی منتقل گردید. عمل خالص سازی جدایه‌ها از طریق کشت نوک ریشه انجام گرفت. جدایه‌های خالص شده در لوله‌های آزمایش حاوی محیط کشت Potato Carrot Agar (PCA) به همراه تکه‌ای از کاغذ صافی رشد داده شدند و بعد از رشد به میزان کافی، در یخچال با دمای ۴ درجه سلسیوس برای مطالعات بعدی نگهداری شدند. همچنین سختینه‌های تشکیل شده توسط جدایه‌های خالص شده، جداسازی شدند و بعد از خشک شدن زیر هود سترون، به داخل لوله‌های اپندورف منتقل و در یخچال با دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند (کریمی و همکاران، ۲۰۱۱). تمامی جدایه‌های قارچی در آزمایشگاه بیماری شناسی گروه گیاهپزشکی دانشگاه ارومیه نگهداری می‌شوند.

### تعیین گروه‌های سازگار میسلومی

جهت تعیین گروه‌های سازگار میسلومی، ابتدا مقدار ۱۷۵ میکرولیتر از رنگ غذایی قرمز مک کورمیک به یک لیتر محیط کشت PDA اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس اتوکلاو گردید. بعد از اتمام

از منطقه قوطولو (G)، ۵۸ جدایه از منطقه توپراق قلعه (T)، ۵۱ جدایه از منطقه حسین آباد (H)، ۳۶ جدایه از منطقه پشت سیلو (ناحیه) (Ps)، ۴ جدایه از منطقه نازلو (N)، ۵ جدایه از منطقه آغچه قلعه (AG) و ۳ جدایه از منطقه جاده دریا (JD) جمع آوری گردید. مناطق توپراق قلعه، حسین آباد و پشت سیلو بیشترین سطح زیر کشت کلم و بیشترین میزان آلودگی به این بیماری را به خود اختصاص دادند و لذا بیشترین تعداد جدایه‌ها از این مناطق به دست آمد. مطالعات مربوط به تعیین گروه‌های سازگار میسلومی نشان داد که در مجموع، ۳۶ گروه سازگار میسلومی در بین ۲۲۳ جدایه مورد مطالعه وجود داشت. در گروه‌های سازگار، در محل تلاقی دو جدایه، هیچ خط واکنش مشاهده نشد و دو جدایه تشکیل یک پرگنه واحد را دادند (شکل ۱a)، در صورتیکه در گروه‌های ناسازگار، تشکیل یک نوار از میسلوم‌های فراوان هوایی در ناحیه تلاقی دو جدایه (شکل ۱b)، تشکیل یک ناحیه عاری از رشد ریشه در ناحیه تلاقی دو جدایه (شکل ۱c) و تشکیل خط قرمز رنگ در محل تلاقی دو جدایه از پشت تشنگ پتری (شکل ۱d)، مشاهده گردید. از بین این ۳۶ گروه سازگار میسلومی، تعداد ۲۳ گروه، تنها دارای یک جدایه بودند و در بقیه گروه‌ها، بیش از یک جدایه در هر گروه وجود داشت. گروه‌های سازگار میسلومی



شکل ۱- واکنش‌های سازگاری-ناسازگاری در کشت‌های متقابل جدایه‌های قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* جمع آوری شده از مزارع کلم ارومیه، a. واکنش سازگاری میسلومی جدایه‌ها، که با تشکیل یک پرگنه پیوسته در محل تماس جدایه‌ها دیده می‌شود؛ b-d. واکنش ناسازگاری میسلومی جدایه‌ها که با تشکیل میسلوم‌های هوایی (b)، تشکیل ناحیه عاری از میسلوم (c) و تشکیل خط قرمز رنگ (d) در محل تماس جدایه‌ها دیده می‌شود.

برگهای جدا شده کلم استفاده شد (دیلارد و هانتز<sup>۱</sup>، ۱۹۸۶). ابتدا بذرهای ضد عفونی شده کلم رقم KOIKAZE، در گلدان‌های به قطر داخلی ۱۳ سانتیمتر و حاوی خاک زراعی مناسب، کاشته شدند و در شرایط گلخانه با دمای  $23 \pm 2$  درجه سلسیوس نگهداری گردیدند. پس از ظهور گیاهچه‌ها، تعداد ۳ بوته در هر گلدان حفظ و بقیه حذف شدند. عملیات مناسب زراعی روی این گیاهان انجام گرفت. بعد از گذشت ۲-۳ ماه، از برگ‌های این گیاهان برای آزمون‌های بیماری‌زایی استفاده شد. برای این منظور، حلقه‌های ۵ میلی‌متری از حاشیه پرگنه‌های در حال رشد فعال جدایه‌ها در محیط کشت PDA برداشته شد و روی برگ‌های سالم جدا شده گیاهان کلم قرار گرفت. برگ‌های مایه‌زنی شده در داخل ظروف پلاستیکی سترون و حاوی یک عدد کاغذ صافی مرطوب سترون قرار داده شدند و مجموعه در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شد. علائم آلودگی در بافت برگ‌های تیمار شده بعد از گذشت ۳ و ۵ روز مورد بررسی قرار گرفت. ابعاد لکه‌های ایجاد شده در اطراف محل تلقیح اندازه‌گیری شد. در تیمارهای شاهد از حلقه‌های آگاری بدون قارچ استفاده گردید (دیلارد و هانتز، ۱۹۸۶؛ هودینچیا و همکاران<sup>۲</sup>، ۲۰۰۰). آزمایش به صورت طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۳ تکرار برای هر تیمار انجام گرفت. داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس (ANOVA) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و میانگین‌ها با استفاده از آزمون SNK در سطح احتمال آماری ۵ درصد ( $P=0.05$ ) مقایسه شدند.

## نتایج

در این مطالعه، تعداد ۲۲۳ جدایه در فاصله دو فصل زراعی جدا سازی شده و مورد مطالعه قرار گرفتند. مناطق تحت کشت کلم در ارومیه به ۱۴ منطقه تقسیم بندی شدند. تعداد ۱۸ جدایه از منطقه وزیرآباد (VZ)، ۹ جدایه از منطقه اوچ‌قیله (OG)، ۱۴ جدایه از منطقه پر (Pa)، ۱۲ جدایه از منطقه کفسی (K)، ۹ جدایه از منطقه امامزاده (E)، ۴ جدایه

1- Dillard & Hunter

2- Hudynia

یوسف دوست و قوستا: گروه‌های سازگار میسلیمی و بیماریزایی...

- ۱ (MCG 1) با تعداد ۸۷ جدایه، گروه سازگار میسلیمی ۳ مطالعات مربوط به بیماریزایی جدایه‌ها نشان داد که تمامی جدایه‌ها روی کلم بیماریزا بودند، اگر چه تفاوت قابل توجهی در شدت بیماریزایی جدایه‌های مختلف وجود داشت (شکل ۲). جدایه‌های حاصل از یک مزرعه خود اختصاص دادند و بقیه گروه‌ها در رده‌های بعدی از نظر تعداد جدایه قرار گرفتند (جدول ۱).
- ۲ (MCG 3) با تعداد ۳۷ جدایه و گروه سازگار میسلیمی ۲
- ۳ (MCG 2) با تعداد ۲۴ جدایه بیشترین تعداد جدایه‌ها را به

جدول ۱- کد جدایه‌های قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* متعلق به هر کدام از گروه‌های سازگار میسلیمی

MCG Groups	Isolates
MCG1	K2, K3, K4, K6, K7, K8, K9, K10, K11, K13, T2-1, T2-2, T2-3, T2-5, T2-7, T2-8, T2-9, T2-14, T2-15, PA1, PA10, PA12, PA14, E2, E5, E6, E8, G2, PS2, PS3, PS5, PS7, PS8, PS13, PS17, PS18, PS20, PS22, PS32, PS36, PS41, PS46, PS47, PS49, N1, N2, N3, VZ1, VZ3, VZ5, VZ8, VZ13, VZ15, VZ18, T1-1, T1-4, T1-5, T1-7, T1-8, T1-9, T1-10, T1-12, T1-13, T1-15, T1-16, T1-17, T1-18, T1-22, T1-26, T1-27, T1-28, T1-30, T1-34, T1-36, T1-38, T1-39, T1-40, T1-42, T1-43, T1-44, T1-46, T1-47, T1-48, T1-49, T1-50, T1-51, AG4
MCG2	OG1, OG2, OG3, OG4, OG5, OG6, AG2, JD3, PS10, PS14, PS35, PA6, PA8, PA9, K1, VZ2, VZ4, VZ6, VZ7, VZ9, VZ10, VZ11, VZ12, VZ14
MCG3	H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15, H16, H17, H18, H19, H20, H22, H24, H25, H26, H27, H28, H31, H32, H35, H36, H38, H40, H41, H42, H43, H44, H45, H47
MCG4	PS9, PS11, PS43, T2-4, T2-11, T2-13, N4, JD1, JD2
MCG5	T1-19, T1-31, T1-37, H30
MCG6	G1, T1-6, T1-14, T1-33, T1-41, T1-45, E3, E4
MCG7	PS44, PA3, PA4, PA7, PA11, PA13
MCG8	H50, H51, X12, T2-6, PS26, H21, H23, H29
MCG9	OG7, OG8
MCG10	AG5, AG6
MCG11	PS1, PS4, PS25, PS29, PS31, PS33, PS38, PS45, PS48
MCG12	T1-2, T1-3, T1-32
MCG13	H1
MCG14	H15
MCG15	H29
MCG16	H33
MCG17	H34
MCG18	H37
MCG19	PS24
MCG20	PS34
MCG21	PS42
MCG22	E9
MCG23	T52
MCG24	T2-10
MCG25	AG3
MCG26	VZ16
MCG27	VZ17
MCG28	PA2
MCG29	PA5
MCG30	E1
MCG31	E7
MCG32	K5
MCG33	OG9
MCG34	G3
MCG35	G4
MCG36	H48, H49

مزارع کلم ارومیه، یک مخلوط نامتجانسی از گروه‌های سازگار میسلومی است. از طرف دیگر، تعداد ۲۳ گروه سازگار میسلومی از میان ۳۶ گروه سازگار میسلومی شناسایی شده یک جدایه‌ای بودند و این می‌تواند نمایانگر رویداد جهش تصادفی و یا معرفی جدید آن گروه سازگار میسلومی باشد. مطالعات دیگر محققین روی کلزا در کانادا (کوهلی و همکاران، ۱۹۹۲)، آفتابگردان در کانادا (کوهلی و همکاران، ۱۹۹۵)، کلم در کارولینای شمالی (کویتا و همکاران، ۱۹۹۷)، سبزیجات در نروژ (کارپتر و همکاران، ۱۹۹۹)، سویا در آرژانتین (دورمن و همکاران، ۲۰۰۳) و کانادا (هامبلتون<sup>۱</sup> و همکاران، ۲۰۰۲)، نیز به نتایج مشابهی دست یافته‌اند. همچنین، شدت بیماریزایی جدایه‌های مختلف حاصل از یک مزرعه یا مزارع مختلف بر اساس رتبه‌بندی انجام شده شده تغییرات زیادی را بروز دادند و نمایانگر غیر یکنواختی شدت بیماریزایی جدایه‌ها است. در این رتبه‌بندی تعدادی از جدایه‌ها بیماریزایی زیاد و تعدادی هم بیماریزایی ضعیفی داشتند و بقیه در حد وسط این دو گروه قرار گرفتند که به احتمال زیاد، دلالت بر توزیع نرمال آن‌ها دارد (جدول ۲). همپوشانی بالا در سطوح



شکل ۲- آزمون بیماریزایی جدایه‌های قار *Sclerotinia sclerotiorum* روی برگ‌های جدا شده کلم رقم KOIKAZE در شرایط آزمایشگاهی a. تیمار شاهد، b. شدت بیماری در جدایه G2 (بیماریزایی کم)، c. شدت بیماری در جدایه PS20 (بیماریزایی متوسط) و d. شدت بیماری در جدایه T18 (بیماریزایی زیاد).

و نیز جدایه‌های متعلق به یک گروه سازگار میسلومی از نظر شدت بیماریزایی با هم تفاوت داشتند و هیچگونه ارتباطی بین بیماریزایی جدایه‌ها و گروه‌های سازگار میسلومی مشاهده نگردید. شدت بیماریزایی در جدایه E1 بیشترین و در جدایه H34 کمترین میزان محاسبه گردید و بقیه جدایه‌ها در حد واسط این دو قرار گرفتند (جدول ۲).

### بحث

بیماری پوسیدگی ناشی از قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* یکی از بیماری‌های مهم و خسارت‌زا در تعدادی از گیاهان از جمله آفتابگردان و کلزا در منطقه ارومیه و استان آذربایجان غربی است و در سال‌های اخیر، شیوع این بیماری در مزارع کلم مشاهده شده و به شدت در حال گسترش است. کشت مداوم گیاهان در یک مزرعه آلوده، امکان جابجایی سختینه‌های قارچ از طریق آب آبیاری و یا بقایای گیاهی و همچنین عدم آگاهی کشاورزان از زیست‌شناسی و بیماریزایی این قارچ باعث افزایش جمعیت آن در خاک و در نتیجه تشدید بیماری در طول سالیان بعدی شده است. از طرف دیگر، کنترل بیماری‌های ناشی از این قارچ به دلیل دامنه میزبانی وسیع و نیز توان بقا طولانی مدت آن در خاک از طریق سختینه‌ها، بسیار مشکل است. استراتژی‌های مدیریت بیماری‌ها نیازمند توجه به جمعیت‌های قارچ به جای مدیریت جمعیتی قارچ در طراحی استراتژی‌های مدیریتی بسیار موثر خواهد بود. در این مطالعه تنوع ژنتیکی این قارچ بر اساس گروه‌های سازگاری میسلومی مورد بررسی قرار گرفت.

وجود ۳۶ گروه سازگار میسلومی در بین ۲۲۳ جدایه مورد مطالعه، نمایانگر تنوع بالای ژنتیکی این قارچ در منطقه مورد مطالعه می‌باشد که می‌تواند نشان دهنده نرخ بالای مهاجرت و یا تبادل ژنتیکی و نوترکیبی در جمعیت قارچ باشد (کوهلی و همکاران، ۱۹۹۵). بر این اساس، ساختار جمعیتی *Sclerotinia sclerotiorum* در

جدول ۲- مقایسه شدت بیماری در جدایه‌های مختلف قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* بر اساس آزمون بیماریزایی روی برگ‌های جدا شده کلم رقم KOIKAZE به همراه گروه سازگار میسلیمی آن‌ها

نام جدایه	MCG	مساحت لکه در روز پنجم (میلی متر مربع)	نام جدایه	MCG	مساحت لکه در روز پنجم (میلی متر مربع)	نام جدایه	MCG	مساحت لکه در روز پنجم (میلی متر مربع)
E1	۳۰	۹۷/۴ a*	PS10	۲	۳۸/۶۶ f-n	E5	۱	۱۸/۴۳ p-y
T52	۲۳	۸۶/۰۸ a	X1	۸	۳۸ f-o	H29	۱۵	۱۷/۴۳ p-y
H21	۸	۶۷/۸۶ b	PS1	۱۱	۳۷/۷۳ f-o	N4	۴	۱۷/۲۰ p-y
T19	۵	۶۶/۳۶ bc	PS24	۱۹	۳۷/۳۳ f-o	H16	۳	۱۶/۶۵ p-y
T18	۱	۶۵/۵۹ bc	PS34	۲۰	۳۶/۹۳ f-o	PA4	۷	۱۵/۷۰ p-y
K10	۱	۶۲/۸۷ bcd	PA3	۷	۳۶/۷۳ f-o	H22	۳	۱۵/۴۳ q-y
T30	۱	۵۶/۹۰ b-e	PS20	۱	۳۶/۶۲ f-o	OG9	۳۳	۱۳/۳۹ r-y
H14	۳	۵۴/۷۶ b-f	N3	۱	۳۳/۸۳ g-p	VZ17	۲۷	۱۳/۲۱ r-y
JD1	۴	۵۴/۳۳ b-f	H3	۳	۳۳/۱۶ h-q	OG7	۹	۱۲/۹۳ r-y
T37	۵	۵۳/۱۶ b-f	H30	۵	۳۲/۳۶ h-q	PA8	۲	۱۲/۷۶ r-y
PA2	۲۸	۵۲ b-f	T2-10	۲۴	۳۰/۳ i-r	AG4	۱	۱۱/۹ s-y
G4	۳۵	۵۱/۱۶ b-g	H37	۱۸	۳۰/۱۳ i-r	AG6	۱۰	۱۱/۸۳ s-y
T13	۱	۴۹/۶۶ c-h	PS44	۷	۳۰/۱ i-r	VZ16	۲۶	۱۱/۶۶ s-y
PS42	۲۱	۴۸/۲۲ d-i	H33	۱۶	۲۹/۳۳ j-s	G2	۱	۱۱/۵۵ s-y
OG8	۹	۴۶/۱۳ d-j	K5	۳۲	۲۸/۸۳ j-t	H40	۳	۱۰/۶۴ v-z
K8	۱	۴۵/۸۳ d-j	PA12	۱	۲۵/۵۶ k-u	E7	۳۱	۱۰ u-y
VZ1	۱	۴۵/۷۵ d-j	T2-4	۴	۲۵/۵ k-u	G1	۶	۸/۷۳ u-y
T14	۶	۴۵/۵ d-j	T36	۱	۲۵/۳۳ k-u	G3	۳۴	۶/۴۸ v-y
N2	۴	۴۵/۵ d-j	AG5	۱۰	۲۴/۵ k-v	H15	۱۴	۶/۴۶ v-y
K2	۱	۴۵/۱ e-j	K13	۱	۲۳/۵ l-w	H1	۱۳	۵/۸ v-y
PS29	۱۱	۴۳/۳۳ e-k	PA5	۲۹	۲۲/۳۶ m-x	H39	۸	۵/۲۶ w-y
T33	۶	۴۱/۸۶ e-k	PS7	۱	۲۰/۶۶ n-y	H34	۱۷	۳/۳۳ y
PA1	۱	۴۰/۹۶ e-l	VZ4	۲	۲۰/۳۶ o-y			
AG3	۲۵	۳۹ e-m	E9	۲۲	۲۰ o-y			

میانگین‌ها با حروف مشابه در هر ستون فاقد تفاوت معنی دار در سطح احتمال آماری ۵ درصد می‌باشند.

مشاهده نگردید. نتایج مطالعات انجام شده توسط دیگر محققین نیز با نتایج حاضر همخوانی دارد (آتاناایاکه و همکاران<sup>۱</sup>، ۲۰۱۳؛ کول و همکاران، ۲۰۰۴؛ همتی و همکاران، ۲۰۰۹؛ یانار و اوناران، ۲۰۱۱). آگاهی از ساختار ژنتیکی جمعیتی بیمارگر در ارزیابی مقاومت ارقام و ژنوتیپ‌های میزبان ضروری است. بر اساس نتایج بدست آمده، ضرورت دارد که قبل از استفاده از

شدت بیماریزایی، پیشنهاد برخی از محققین مبنی بر این که شدت بیماریزایی در گونه *Sclerotinia sclerotiorum* یک تسلسلی از شدت بیماریزایی است، را تایید می‌کند (اکین و همکاران، ۲۰۰۷؛ مزلر و بولند<sup>۱</sup>، ۱۹۹۶؛ مورال و همکاران<sup>۲</sup>، ۱۹۷۲). هیچ‌گونه ارتباطی بین شدت بیماریزایی جدایه‌ها و گروه‌های سازگار میسلیمی

3- Attanayake

1- Melzer & Boland  
2- Morrall et al.



جدایه‌ها در برنامه‌های غربالگری مقاومت، غربالگری شدت بیماریزایی جدایه‌ها به بهترین نحو ممکن انجام شود تا اطمینان حاصل شود از جدایه‌های دارای شدت بیماریزایی کمتر (ضعیف‌تر) در برنامه‌های غربالگری مقاومت استفاده نشود. همچنین استفاده از چندین جدایه و حتی روش‌های مختلف مایه‌زنی می‌توانند در برنامه‌های غربالگری مقاومت، نه تنها برای اطمینان از استفاده از جدایه‌های دارای بیماریزایی شدید، بلکه برای غربالگری دیگر ویژگی‌های عامل بیماریزا، مفید باشند.

### منابع

۱. وکیلی زارچ، ز. و رهنما، ک. ۱۳۸۷. بررسی گروه‌های سازگار میسلیمی (MCG) در جدایه‌های *Sclerotinia sclerotiorum* از مزارع کلزا استان گلستان. مجله حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)، ۲۲ (۲): ۱۴۷-۱۵۹.
2. Atallah, Z.K., Larget, B., Chen, X., and Johnson, D.A. 2004. High genetic diversity, phenotypic uniformity, and evidence of outcrossing in *Sclerotinia sclerotiorum* in the Columbia basin of Washington state. *Phytopathology*, 94: 737-742.
3. Attanayake, R.N., Carter, P.A., Jiang, D., del Río-Mendoza, L., and Chen, W. 2013. *Sclerotinia sclerotiorum* populations infecting canola from China and the United States are genetically and phenotypically distinct. *Phytopathology*, 103: 750-761.
4. Barrari, H., Alavi, V., Yasari, E., and Badalyan, S.M. 2011. Study of genetic variations based on the morphological characteristics, within the population of *Sclerotinia sclerotiorum* from the major oilseed planting areas in Iran. *International Journal of Biology*, 3: 61-66.
5. Boland, G.J., and Hall, R. 1994. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 16: 93-108.
6. Carpenter, M.A., Frampton, C., and Stewart, A. 1999. Genetic variation in New Zealand populations of the plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 27: 13-21.
7. Cubeta, M.A., Cody, B.R., Kohli, Y., and Kohn, L.M. 1997. Clonality in *Sclerotinia sclerotiorum* on infected cabbage in eastern North Carolina. *Phytopathology*, 87: 1000-1004.
8. Dillard, H.R., and Hunter, S.E. 1986. Association of common ragweed with *Sclerotinia* rot of cabbage in New York State. *Plant Disease*, 70: 26-28.
9. Durman, S.B., Menendez, A.B., and Godeas, A.M. 2003. Mycelial compatibility groups in Buenos Aires field populations of *Sclerotinia sclerotiorum* (Sclerotiniaceae). *Australian Journal of Botany*, 51: 421-427.
10. Ekins, M.G., Aitken, E.A.B., and Goulter, K.C. 2007. Aggressiveness among isolates of *Sclerotinia sclerotiorum* from sunflower. *Australasian Plant Pathology*, 36: 580-586.

11. Ekins, M.G., Hayden, H.L., Aitken, E.A.B., and Goulter, K.C. 2011. Population structure of *Sclerotinia sclerotiorum* on sunflower in Australia. *Australasian Plant Pathology*, 40: 99–108.
12. Ershad, D. 2009. *Fungi of Iran*. (3rd ed.). Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, 530 pp.
13. Ford, E.J., Miller, R.V., Gray, H., and Sherwood, J.E. 1995. Heterokaryon formation and vegetative compatibility in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mycological Research*, 99: 241-247.
14. Glass, N.L., and Kaneko, I. 2003. Fatal attraction: non self recognition and heterokaryon incompatibility in filamentous fungi. *Eukaryotic Cell*, 2: 1-8.
15. Gomes, E.V., do Nascimento, L.B., de Freitas, M.A., Nasser, L.C.B., and Petrofeza, S. 2011. Microsatellite markers reveal genetic variation within *Sclerotinia sclerotiorum* population in irrigated dry bean crops in Brazil. *Journal of Phytopathology*, 159: 94-99.
16. Grag, H., Kohn, L.M., Andrew, M., Li, H., Sivasithamparam, K., and Barbetti, M.J. 2010. Pathogenicity of morphologically different isolates of *Sclerotinia sclerotiorum* with *Brassica napus* and *B. juncea* genotypes. *European Journal of Plant Pathology*, 126: 305-315.
17. Hambleton, S., Walker, C., and Kohn, L.M. 2002. Clonal lineages of *Sclerotinia sclerotiorum* previously known from other crops predominate in 1999-2000 samples from Ontario and Quebec. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 24:309-315.
18. Hemmati, R., Javan-Nikkhah, M., and Linde, C.C. 2009. Population genetic structure of *Sclerotinia sclerotiorum* on canola in Iran. *European Journal of Plant Pathology*, 125: 617–628.
19. Hudyncia, J., Shew, H.D., Cody, B.R., and Cubeta, M.A. 2000. Evaluation of wounds as a factor to infection of cabbage by ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease*, 84: 316-320.
20. Irani, H., Heydari, A., Javan-Nikkhah, M., and Ibrahimov, A.S. 2011. Pathogenicity variation and mycelial compatibility groups in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Plant Protection Research*, 51: 329-336.
21. Karimi, E., Safaei, N., and Shamsbakhsh, M. 2011. Assessment of genetic diversity among *Sclerotinia sclerotiorum* populations in canola fields by rep-PCR. *Trakia Journal of Science*, 9: 62-68.
22. Kohli, Y., Brunner, L.J., Yoell, H., Milgroom, M.G., Anderson, J.B., Morrall, R.A.A., and Kohn, L.M. 1995. Clonal dispersal and spatial mixing in populations of the plant pathogenic fungus, *Sclerotinia sclerotiorum*. *Molecular Ecology*, 4: 69-77.
23. Kohli, Y., Morrall, R.A.A., Anderson, J.B., and Kohn, L.M. 1992. Local and trans-Canadian clonal distribution of *Sclerotinia sclerotiorum* on canola. *Phytopathology*, 82: 875-880.

24. Kohn, L.M. 1995. The clonal dynamic in wild and agricultural plant-pathogen populations. *Canadian Journal of Botany*, 73: 1231-1240.
25. Kohn, L.M., Carbone, I., and Anderson, J.B. 1990. Mycelial interaction in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Experimental Mycology*, 14: 255-267.
26. Kohn, L.M., Stasovski, E., Carbone, I., Royer, J., and Anderson, J.B. 1991. Mycelial incompatibility and molecular markers identify genetic variability in field populations of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology*, 81: 480-485.
27. Kull, L.S., Pedersen, W.L., Palmquist, D., and Hartman, G.L. 2004. Mycelial compatibility grouping and aggressiveness of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease*, 88: 325-332.
28. Malvarez, G., Carbone, I., Granwald, N.J., Subbrao, K.V., Schafer, M., and Kohn, L.M. 2007. New population of *Sclerotinia sclerotiorum* from lettuce in California and peas and lentis in Washington. *Phytopathology*, 97: 470-483.
29. Mei, J., Qian, L., Disi, J.O., Yang, X., Li, Q., Li, J., Frauen, M., Cai, D., and Qian, W. 2011. Identification of resistant sources against *Sclerotinia sclerotiorum* in *Brassica* crops with emphasis on *B. oleracea*. *Euphytica*, 177: 393-400.
30. Melzer, M.S., and Boland, G.J. 1996. Transmissible hypovirulence in *Sclerotinia minor*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 18: 19-28.
31. Mert-Türk, F., Ipek, M., Mermer, D., and Nicholson, P. 2007. Microsatellite and morphological markers reveal genetic variation within a population of *Sclerotinia sclerotiorum* from oilseed rape in the Çanakkale province of Turkey. *Journal of Phytopathology*, 155: 182-187.
32. Morrall, R.A.A., Duczek, L.J., and Sheard, J.W. 1972. Variations and correlations within and between morphology, pathogenicity, and pectolytic activity in *Sclerotinia* from Saskatchewan. *Canadian Journal of Botany*, 50: 767-786.
33. Ojaghian, M.R., and Xie, G.L. 2012. Identifying mycelial compatibility groups of *Sclerotinia sclerotiorum* using potato dextrose agar amended with activated charcoal. *Journal of Plant Protection Research*, 52: 77-82.
34. Patterson, C.L., and Grogan, R.G. 1985. Differences in epidemiology and control of lettuce drop caused by *Sclerotinia minor* and *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease*, 69: 766-770.
35. Phillips, D.V., Carbone, I. Gold, S.E., and Kohn, L.M. 2002. Phylogeography and genotype-symptom association in early and late season infections of canola by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology*, 92: 785-793.
36. Sexton, A.C., Whitten, A.R. and Howlett, B.J. 2006. Population structure of *Sclerotinia sclerotiorum* in an Australian canola field at flowering and stem-infection stages of the disease cycle. *Genome*, 49: 1408-1415.
37. Sun, J. M., Irzykowski, W., Jedryczka, M., and Han, F. X. 2005. Analysis of the genetic structure of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary populations from different

- regions and host plants by random amplified polymorphic DNA markers. *Journal of Integrative Plant Biology*, 47: 385–395.
38. Wu, B.M., and Subbarao, K.V. 2006. Analyses of lettuce drop incidence and population structure of *Sclerotinia sclerotiorum* and *S. minor*. *Phytopathology*, 96: 1322-1329.
39. Yanar, Y., and Onaran, A. 2011. Mycelial compatibility groups and pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary causal agent of white mold disease of greenhouse grown cucumber in Antalya Turkey. *African Journal of Biotechnology*, 19: 3739-3746.