

مقایسه‌ی بسترهای مختلف رشد در اسپورزایی *Alternaria solani* در شرایط آزمایشگاهی

COMPARISON OF SUBSTRATES FOR SPORULATION OF *ALTERNARIA SOLANI* UNDER LABORATORY CONDITIONS

مجید خنشا^۱، ضیال‌الدین بنی هاشمی^{۱*}، حبیب‌الله حمزه زرقانی^۱

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۹/۱۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۳/۱۷)

چکیده

امروزه به منظور اسپورزایی گونه‌های آلترناریا و بخصوص *Alternaria solani* از محیط کشت V-8 استفاده می‌نمایند. عدم دسترسی لازم، صرف وقت و هزینه بالا در زمینه تهیه و استفاده از این محیط کشت همواره محققان و بخصوص پژوهشگران ایرانی را با مشکلات جدی در زمینه اسپورزایی *A. solani* روبرو کرده است. هدف از این پژوهش آزمون چندین ترکیب پیشنهادی به منظور تهیه محیط کشت و مقایسه میزان اسپورزایی آن‌ها با عصاره V-8 می‌باشد. نتایج نشان داد که بین میزان اسپورزایی گونه *A. solani* در محیط کشت‌های عصاره برگ گوجه فرنگی، عصاره برگ سیب زمینی، عصاره میوه گوجه فرنگی و عصاره V-8 تفاوت معنی‌داری یافت نشد. استفاده از عصاره میوه گوجه فرنگی نسبت به رب گوجه فرنگی ارجحیت نشان داد. همچنین استفاده از نور و تاریکی متناوبی در مقایسه با تاریکی مداوم بطور معنی‌داری میزان اسپور دهی را افزایش داد.

کلیدواژه: اسپورزایی، محیط کشت V-8، *Alternaria solani*، عصاره میوه گوجه فرنگی

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: zia1937@gmail.com

۱- بخش گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

مقدمه

مواد و روش‌ها

جدایه *Alternaria solani* مورد استفاده در این پژوهش که یک جدایه‌ی بیماری‌زا بود از دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه ارومیه (اهدایی دکتر قوستا)، تهیه شد.

محیط کشت‌های مختلف طبق روش زیر تهیه گردید:

محیط کشت عصاره هشت‌سبزی آگار (V-8)

V-8 ۲۰۰ میلی لیتر

۳ گرم CaCO_3

۲۰ گرم آگار

آب مقطر ۸۰۰ میلی لیتر

عصاره‌ی V-8 (ساخت کارخانه‌ی Campbell Soup Co آمریکایخرداری شده از دویی) با CaCO_3 مخلوط گردید. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ، مایع رویی با آگار مخلوط و حجم به ۱ لیتر رسانیده شد. سپس محلول حاصل به مدت ۲۰ دقیقه با دمای ۱۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و فشار ۱ اتمسفر سترون گردید (Barksdale 1969).

عصاره برگ گوجه فرنگی

برگ سالم گوجه فرنگی ۲۰۰ گرم

آگار ۱۵ گرم

آب مقطر ۱۰۰۰ میلی لیتر

برگ‌های گوجه‌فرنگی در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب به مدت ۳۰ دقیقه جوشانده شد و بعد عصاره بدست آمده با پارچه‌ی مناسب جدا گردید، آگار نیز در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب حل کرده و بعد این دو محلول با هم مخلوط و به حجم ۱ لیتر رسانیده شد. سپس محلول حاصل به مدت ۲۰ دقیقه با دمای ۱۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و فشار ۱ اتمسفر سترون

تولید اسپور برای اهداف مختلف یک جزء کلیدی می‌باشد. در مورد بیماری سوختگی زود هنگام ناشی از قارچ *Alternaria solani* در سیب زمینی و گوجه‌فرنگی از سوسپانسیون اسپور به عنوان مایه تلقیح استفاده می‌شود، اما تولید اسپور *A. solani* در شرایط آزمایشگاهی نیاز به شرایط ویژه دارد. با ایجاد شرایط نامطلوب برای رشد رویشی، تولید اسپور از گونه‌های آلترناریا بهبود می‌یابد (Rotem & Bashi 1969; Shahin & Shepard 1979; Zhu et al, 1985; Rodrigues et al, 2010). عامل مهم شامل تغذیه، طیف نور و دما بر تولید اسپور در شرایط آزمایشگاهی نقش دارند (Rodrigues et al, 2010). به عنوان مثال از محیط کشت‌های (سیب زمینی - دکستروز - آگار) PDA، (بلغور ذرت - آگار) CMA و V-8 برای القاء تولید اسپور از گونه‌های مختلف قارچ آلترناریا و به خصوص *A. solani* استفاده شده است (Miller 1955, Liuchienhui et al, 1997, Shahin & Shepard 1979, Rodrigues et al, 2010). بسیاری از پژوهشگران به بررسی تولید اسپور در قارچ *A. solani* در شرایط آزمایشگاه و محیط کشت‌های مختلف پرداخته‌اند و همگی پروتکل‌هایی برای تولید اسپور *A. solani* ارائه داده‌اند ولی مقایسه‌ای بین محیط کشت‌ها به منظور توان تولید اسپور بیشتر صورت نگرفته است. لذا این پژوهش به منظور مقایسه‌ی چند محیط کشت در اسپورزایی جدایه‌ی *A. solani* و بررسی بهترین جایگزین برای محیط V-8 به علت عدم دسترسی به آن در ایران صورت گرفت. نتایج به دست آمده ممکن است برای گسترش مطالعات مشابه بر روی گونه‌های مختلف آلترناریا مفید و موثر باشد.

گردید (Arunakumara & Kulkarni 2006).

قرار گرفت.

محیط کشت‌ها درون تشتک‌های ۸ سانتی متری ریخته و پس از انجماد بلوک‌های مساوی از جدایه قارچ در مرکز تشتک‌ها گذاشته شدند. تشتک‌ها در اتاقک رشد با دمای ثابت ۲۵ درجه سانتیگراد با شدت نور ۳۰۰۰ لوکس (که بوسیله‌ی لوکس‌متر Mastech با مدل ms 6610 و توان ۳۶ وات برای هر منبع نوری فلورسنت) بر مبنای آزمایش فاکتوریل با دو فاکتور نور (۱۲ ساعت روشنایی + ۱۲ ساعت تاریکی، روشنایی مداوم، تاریکی مداوم) و نوع محیط کشت در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار قرار داده شدند. بعد از ۷ الی ۱۰ روز از رشد قارچ بر روی محیط‌های مورد آزمایش به منظور شمارش اسپورهای تولید شده در هر محیط، تشتک‌ها به آزمایشگاه منتقل شدند. برای این منظور بلوک‌هایی با قطر ۶ میلی‌متر از محیط کشت‌ها برداشته و در لوله‌های آزمایشگاه به طول ۲۰ سانتی متر که حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر بودند انداخته و به مدت ۵ دقیقه لوله‌های آزمایش ورتکس گردیدند تا اسپورها از بلوک جدا و در آب معلق شوند. به منظور جلوگیری از ته‌نشین شدن اسپورها از ۰/۰۱ درصد توئین ۲۰ (Foolad et al, 2000) در آب استفاده شد. سپس با سمپلر یا پیپت (نمونه بردار) ۱ میلی‌لیتر از آب حاوی اسپور درون لوله برداشته و بوسیله‌ی هموسیتمتر در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ۳/۲× تعداد اسپورها برای هر نمونه شمارش شد و سپس میزان اسپور تولید شده در سانتی‌متر مربع هر محیط کشت محاسبه گردید. در پایان داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD انجام شد.

عصاره‌ی برگ سیب زمینی

برگ سیب زمینی سالم ۲۰۰ گرم

آگار ۱۵ گرم

آب مقطر ۱۰۰۰ میلی لیتر

روش تهیه این محیط کشت همانند محیط عصاره‌ی برگ گوجه‌فرنگی می‌باشد.

۱- عصاره‌ی میوه‌ی گوجه‌فرنگی

میوه‌ی گوجه‌فرنگی ۲۰۰ گرم

آگار ۲۰ گرم

آب مقطر ۱۰۰۰ میلی لیتر

میوه‌ی گوجه‌فرنگی در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب به مدت ۳۰ دقیقه جوشانده نموده شد سپس عصاره بدست آمده با پارچه‌ی مناسب جدا، آگار نیز به محلول اضافه کرده و حجم محلول به ۱ لیتر رسانده شد. و محلول حاصل به مدت ۲۰ دقیقه با دمای ۱۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و فشار ۱ اتمسفر سترون گردید.

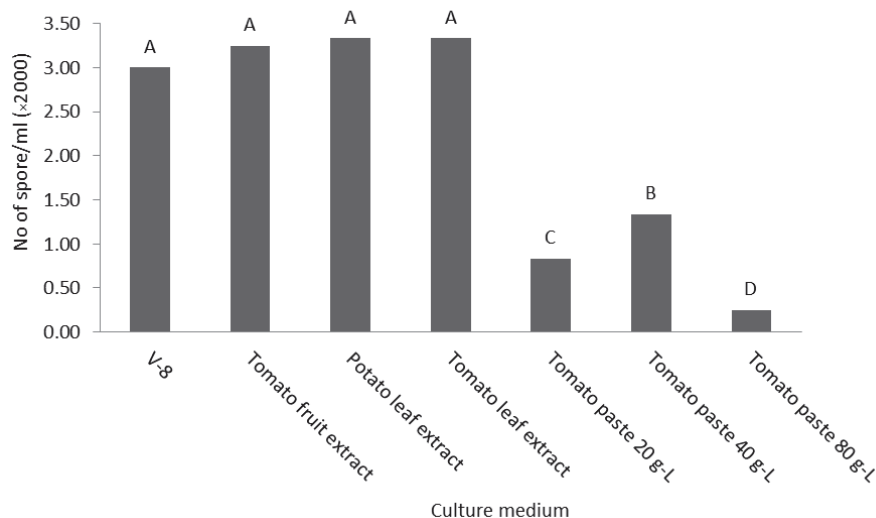
عصاره رب‌گوجه‌فرنگی

رب گوجه‌فرنگی ۲۰-۸۰ گرم

آگار ۲۰ گرم

آب مقطر ۱۰۰۰ میلی لیتر

رب گوجه‌فرنگی را با ۵۰۰ میلی لیتر آب مخلوط کرده و محلول بدست آمده از پارچه‌ی مناسب عبور داده شد، سپس آگار نیز به محلول اضافه و حجم محلول به ۱ لیتر رسانده و به مدت ۲۰ دقیقه با دمای ۱۲۰ درجه‌ی سانتی-گراد و فشار ۱ اتمسفر سترون گردید. غلظت‌های مختلف رب گوجه‌فرنگی به مقدار ۲۰، ۴۰ و ۸۰ گرم مورد استفاده



شکل ۱- اثر محیط کشت بر اسپورزایی *Alternaria solani*. محیط کشت های دارای حرف یکسان از نظر آماری تفاوت معنی داری ندارند

Fig 1. The effect of culture medium on the sporulation of *Alternaria solani*. Bars with common letters have no significant difference

عصاره‌ی برگ گوجه فرنگی، عصاره‌ی برگ سیب زمینی، V-8 و عصاره‌ی میوه گوجه فرنگی می‌باشد و کمترین مقدار اسپور مربوط به محیط کشت رب گوجه‌فرنگی ۸۰ گرم در لیتر بود. در تاریکی مداوم نیز بیشترین مقدار اسپور مربوط به عصاره‌ی برگ گوجه فرنگی و کمترین مقدار تولید اسپور مربوط به محیط کشت‌های رب گوجه‌فرنگی ۲۰ گرم در لیتر و رب گوجه‌فرنگی ۸۰ گرم در لیتر بود. محیط کشت رب گوجه‌فرنگی ۸۰ گرم در لیتر در هر تیمار نوری کمترین مقدار اسپور را داشت. همچنین مشابه همین آزمایش با نور لامپ‌های رشته‌ای و با شدت ۳۰۰۰ لوکس انجام گرفت که اسپورزایی در هیچ کدام از تیمارها دیده نشد.

اسپورزایی جدایه‌ی *A. solani* به طور معنی داری روی محیط کشت‌های مختلف در دمای ثابت ۲۵ درجه‌ی سانتی گراد متفاوت بود. این فرایند به طور مستقل تحت تاثیر نور

نتایج و بحث

اسپورزایی جدایه‌ی *A. solani* به طور معنی داری تحت تاثیر محیط کشت و نور قرار گرفت و همچنین اثر متقابل دو فاکتور محیط کشت و نور بر اسپورزایی جدایه‌ی قارچ خیلی معنی دار شد.

اثرات محیط کشت به طور معنی داری متفاوت از یکدیگر بودند (شکل ۱).

محیط‌های عصاره‌ی برگ گوجه فرنگی، عصاره‌ی برگ سیب زمینی، V-8 و عصاره‌ی میوه گوجه فرنگی به طور معنی داری پربازده‌ترین بودند.

اثر متقابل نور و محیط کشت در جدول ۱ نشان داده شده است.

با استفاده از نور ۱۲ ساعت روشنایی + ۱۲ ساعت تاریکی بیشترین مقدار اسپور مربوط به محیط کشت‌های

جدول ۱- مقایسه میانگین تولید اسپور توسط *Alternaria solani* در تیمارهای نوری و محیط کشت های مختلف به روش LSD. اعداد دارای حرف یکسان از نظر آماری در سطح یک درصد تفاوت معنی‌داری ندارند

Table 2. Comparison of mean sporulation of *Alternaria solani* in different culture media and light treatments as determined by LSD method. Values with common letters have no significant difference at 1% level.

Continuous darkness		Light regime		Culture medium
		12/12 (L/D)		
1.25	A	8.75	A	Tomato leaf extract
0.75	AB	9.25	A	Potato leaf extract
0.75	AB	8.25	A	V-8
0.75	AB	9.00	A	Tomato fruit extract
0.00	C	2.50	B	Tomato paste 20 g ^L
0.25	BC	3.75	B	Tomato paste 40 g ^L
0.00	C	0.75	C	Tomato paste 80 g ^L

می‌رسد که نور نقش مهمتری در تولید اسپور نسبت به محیط کشت دارد که نتایج این پژوهش با یافته‌های لوکنز (1963) و داگلاس (Douglas 1972) مطابقت دارد. اسپورزایی در روشنایی مداوم تولید نشد و در تاریکی مداوم نیز خیلی کمتر از ۱۲ ساعت روشنایی + ۱۲ ساعت تاریکی اسپور تولید شد اگر چه قارچ رشد خوبی داشت. رشد قارچ در محیط‌های مختلف متفاوت بود و بهینه‌ی رشد در محیط‌های عصاره‌ی برگ گوجه فرنگی، V-8 و عصاره‌ی میوه گوجه فرنگی دیده شد و کمترین رشد مربوط به محیط رب گوجه فرنگی ۸۰ گرم در لیتر می‌باشد. ضمن اینکه عصاره‌ی برگ گوجه فرنگی، عصاره‌ی برگ سیب زمینی و عصاره‌ی میوه گوجه فرنگی دسترس پذیری بالاتری داشته و در نتیجه هزینه آن نسبت به عصاره V-8 کمتر می‌باشد. همچنین نتایج این پژوهش نشان داد که اسپورزایی در عصاره‌ی برگ گوجه فرنگی، V-8، عصاره‌ی برگ سیب زمینی و عصاره‌ی میوه گوجه فرنگی تفاوت معنی‌داری نداشته بنابراین می‌توان چنین استدلال نمود که عصاره‌ی برگ گوجه فرنگی، عصاره‌ی برگ سیب زمینی، عصاره‌ی میوه گوجه فرنگی می‌تواند جایگزین‌های مناسبی برای عصاره V-8 باشند. از سوی دیگر برگ گوجه فرنگی

و محیط کشت قرار می‌گیرد و همچنین ارتباط معنی‌داری بین این دو متغیر وجود دارد. اثر متقابل نور و محیط کشت به طور معنی‌داری بر اسپورزایی در این پژوهش گزارش شد که با نتایج لیچ (Leach 1967) در رابطه با فاکتور نور همخوانی دارد. لوکنز (Lukens 1963) گزارش داد که کنیدیوفورهای *A. solani* نیاز به دوره‌ی تاریکی ۱۲ ساعته برای تولید اسپور دارند که نتایج این پژوهش با یافته‌های لوکنز (1963) مطابقت دارد. در تیمارهای این پژوهش بیشترین اسپورزایی در محیط کشت‌های عصاره‌ی برگ گوجه فرنگی، عصاره‌ی برگ سیب زمینی، V-8 و عصاره‌ی میوه گوجه فرنگی با ۱۲ ساعت روشنایی + ۱۲ ساعت تاریکی رخ داده است. بنابراین ۱۲ ساعت تاریکی ظاهراً لازم است. لوکنز (Lukens 1965) گزارش داد که مسیر بیوشیمیایی تولید اسپور در *A. solani* با دما متفاوت است و فقط این مسیر در دمای بالاتر از ۲۳ درجه‌ی سانتیگراد حساسیتش به نور بیشتر می‌شود. در دمای ثابت ۲۵ درجه-ی سانتیگراد اسپورزایی به طور معنی‌داری در محیط‌های عصاره‌ی برگ گوجه فرنگی، عصاره‌ی برگ سیب زمینی، V-8 و عصاره‌ی میوه گوجه فرنگی در نور ۱۲ ساعت روشنایی + ۱۲ ساعت تاریکی بیشتر است. بنابراین به نظر

منابع

جهت ملاحظه به صفحه ۱۵۲ متن انگلیسی مراجعه شود.

و سیب زمینی در تمام سال ممکن است در اختیار نباشد اما میوه گوجه فرنگی اغلب در دسترس است و می تواند مورد استفاده قرار گیرد.