بررسی تاثیر سم‌پاشی در کنترل بیماری لکه خرمایی گندم در شرایط مزرعه در شرق استان گلستان

مهری ضیغمی [۱،*]، محمد علی آقاجانی [۲]

[۱] - *ارشد بیماری شناسی گیاهی و مروج کشاورزی جهاد کشاورزی شهرستان گالیکش*
۲- *عضو هیئت علمی بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان، گرگان*
* *نویسنده مسئول : mmzeighami@gmail.com*

چکیده:

بیماری لکه خرمایی ناشی از قارچ *Pyrenophora tritici-repentis* در سال‌های اخیر در مزارع گندم استان‌های گلستان و مازندران شیوع یافته است. به‌منظور تعیین کارایی قارچ‌کش پروپیکونازول (با دوز ۰/۷ لیتر در هکتار) برای کنترل این بیماری ۳۰ مزرعه گندم از سه منطقه‌ی شرق استان گلستان (ایمر، آق آباد و مینودشت) در سال زراعی ۹۰-۸۹ مورد ارزیابی قرار گرفت. مقدار بیماری (درصد وقوع و شدت متوسط) در مزارع به‌صورت هفتگی یادداشت شد. پس از برداشت محصول، وزن هزاردانه و عملکرد در هکتار در تیمارها محاسبه گردید. تجزیه و تحلیل آماری داده‌های به‌دست آمده، اختلاف کاملاً معنی‌داری ($P\leq0/01$) در میان متغیر های تیمارهای سمپاشی و غیر سمپاشی نشان داد. بدین ترتیب که شدت نهایی بیماری در تیمارهای شاهد و سمپاشی شده در منطقه‌ی ایمر به ترتیب (۴۸ و ۱۶)، آق‌آباد (۵۳ و ۴۷) و مینودشت (۳۹ و ۱۸) گردید. وزن هزاردانه و عملکرد محصول نسبت به شاهد به‌ترتیب به میزان ۳ گرم و ۴۰۰ کیلوگرم در هکتار افزایش نشان داد.

واژگان کلیدی: گندم، لکه خرمایی، *Pyrenophora tritici-repentis*، استان گلستان، کنترل شیمیایی

مقدمه

بیماری لکه خرمایی، ناشی از قارچ *Pyrenophora tritici-repentis* (Died) Shoemaker (ana)، در بیشتر مناطق گندم‌کاری جهان شناسایی شده و یکی از عوامل محدودکننده‌ی محصول گندم به شمارمی‌رود(۱۶، ۱۷). این بیماری به دلیل داشتن انتشار وسیع و قدرت تخریبی بالا، مورد توجه CIMMYT قرار گرفت که با برگزاری کارگاه آموزشی ویژه‌ای با عنوان "*Helminthosporium* Blight of Wheat ; Spot Blotch & Tan Spot" سعی در توسعه‌ی راهبردهای کنترل بیماری و در نهایت کاهش خسارت بیماری نموده است (۸، ۱۲،۱۳،۱۷). در ایران این بیماری در سال ۱۳۷۱ بر اساس گزارش CAB، گزارش شده است(۷). شیوع گسترده آن را بر روی لاین‌ها و ارقام تجاری استان مازندران و گلستان گزارش گردید (۲، ۳، ۴).

افزایش اهمیت اقتصادی بیماری لکه خرمایی به دلیل انتشار سریع آن و کاهش عملکرد ۵۰ درصدی و یا بیشتر، محققان بسیاری را در مناطق مختلف به بررسی شیوه‌های مدیریت و کنترل بیماری سوق داده است. این بیماری، به‌روش‌های مختلف نظیر ارقام مقاوم، تناوب کشت، مدیریت بقایا، پیش‌آگاهی، کنترل بیولوژیک و به‌کارگیری سموم قارچ‌کش کنترل می‌شود(۱۲، ۱۷). در حال حاضر، با به‌کارگیری گسترده سیستم کشت حفاظتی و به‌جا ماندن بقایا در سطح خاک، استفاده از

سموم قارچ‌کش رایج‌ترین راهبرد کنترل این بیماری در بیشتر مناطق به شمار می رود. مطالعات متعددی اثر قارچ‌کش‌ها را در کنترل بیماری‌های برگی گندم و افزایش عملکرد نشان داده است. کنزاس و کلی (۲۰۰۱) طی یک مطالعه ۶ ساله، کارایی قارچ‌کش پروپیکونازول را در افزایش عملکرد گندم حدود ۷۷ درصد نشان دادند. مطالعه و گلو و همکاران(۱۵) با بررسی تاثیر چند قارچ‌کش مختلف را بر روی بیماری لکه خرمایی و سپتوریوز در شرایط مزرعه در منطقه‌ی نبراسکا، نشان دادند استفاده از قارچ‌کش‌ها در مرحله گلدهی می‌تواند در سطح معنی‌داری از مقدار بیماری و خسارت بر عملکرد گندم زمستانه بکاهد(۱۳، ۱۵). در ایران نیز عباسی و همکاران و آقاجانی و همکاران اثر چند قارچ‌کش رایج را در کنترل این بیماری مورد بررسی قرار دادند(۵، ۶). با این وجود، تاکنون بررسی چندانی در ارتباط با چگونگی کنترل شیمیایی بیماری در شرایط مزرعه صورت نگرفته است. هدف از این مطالعه، بررسی تاثیر سمپاشی با سموم رایج در کنترل بیماری در شرایط مزرعه است.

روش بررسی

این بررسی در سال زراعی ۹۰-۱۳۸۹ در ۳۰ مزرعه گندم رقم N-80-19 در شرق استان گلستان در سه منطقه دشت(ایمر)، میان‌دشت(آق‌آباد) و کوهپایه (مینودشت) انجام شد. در هر منطقه، ۱۰ مزرعه انتخاب و به صورت ۵ کادر ۱×۱ متر در بخش سمپاشی‌شده با قارچ‌کش پروپیکونازل (۰/۷ لیتر در هکتار) و ۵ کادر ۱×۱ متر در قسمت سمپاشی‌نشده کادراندازی گردید. زمان سمپاشی با توجه به بررسی مطالعات مختلف در این زمینه، و آلودگی و شرایط جوی حاکم بر مزرعه در مرحله‌ی حساس برگ پرچم و شروع ظهور سنبله انجام شد(۸،۹،۱۱). یادداشت‌برداری با ثبت مرحله‌ی رشد گیاه (بر اساس سیستم BBCH) و میزان بیماری، طبق مقیاس دورقمی تعیین شدت بیماری‌های برگی از (۹۹-۰۰)، مقیاس توسعه‌یافته (Saari & Prescott) تکمیل گردید(۱۴). پس از ظهور بیماری، هر هفته شدت بیماری در مزارع ثبت و بر اساس فرمول زیر بدین صورت که (D_1) نشان‌دهنده‌ی روند توسعه بیماری در طول سایه‌انداز گیاه از سطح زمین و (D_2)، میزان شدت بیماری بر روی سطح برگ آلوده است محاسبه گردید:

$$\% \text{ Severity} = (D_1/9) \times (D_2/9) \times 100 \qquad (۱)$$

پس از جمع‌آوری داده‌ها، شدت و وقوع بیماری و سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری (AUDPC) ترسیم گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار StatGraphics Centurion XV, Version 15.2.05 (شرکت Statpoint) انجام گردید و نتایج مورد بحث و تحلیل قرار گرفت.

نتایج وبحث:

در این تحقیق وضعیت آلودگی مزارع و چگونگی تاثیر سمپاشی بیماری لکه خرمایی گندم در شرایط مزرعه، در شرق استان گلستان مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تجزیه‌ی واریانس داده‌های مقدار بیماری (وقوع و شدت بیماری) و منحنی‌های پیشرفت بیماری و میزان عملکرد، تفاوت کاملا معنی‌داری ($P \leq 0/01$) در میان تیمار سمپاشی و شاهد نشان داد(جدول۱).

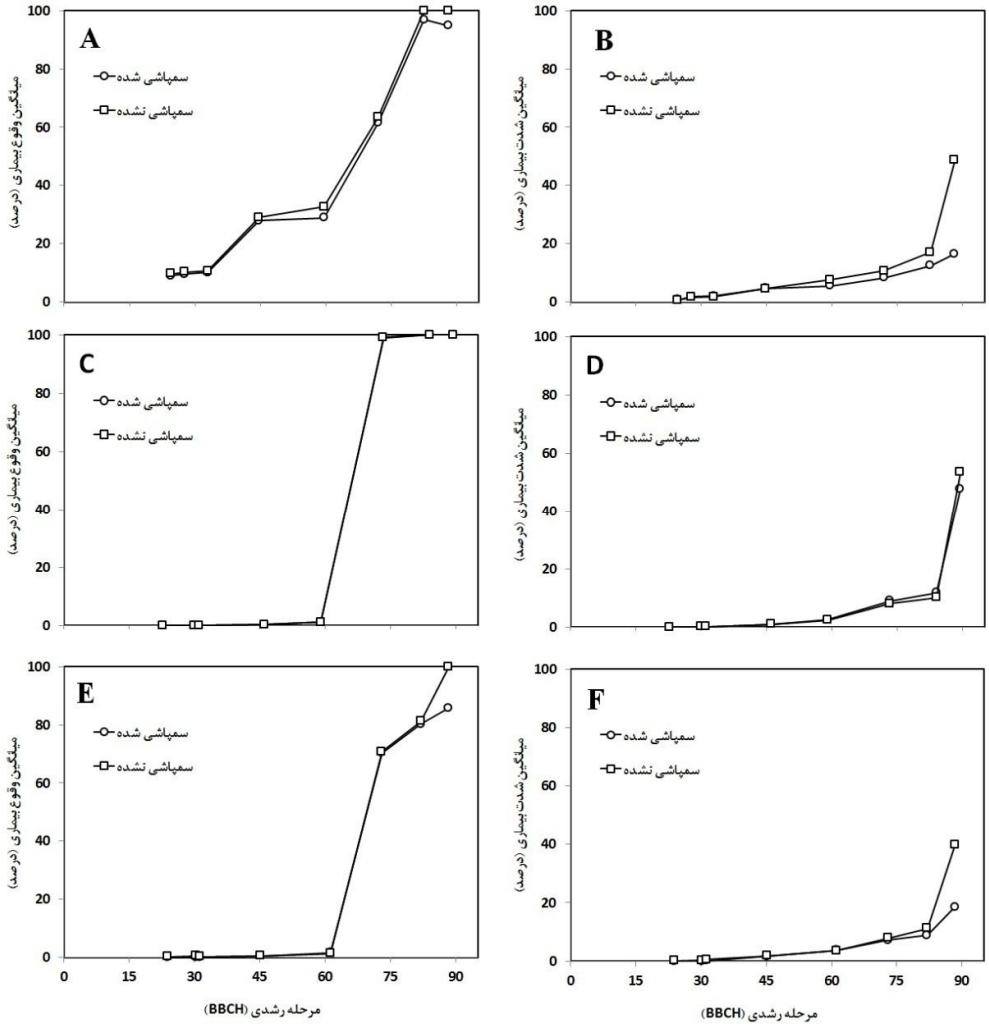
جدول ۱-تجزیه واریانس داده‌های مختلف بیماری لکه خرمایی گندم و عملکرد محصول در سه منطقه از مزارع استان گلستان در سال زراعی ۹۰-۱۳۸۹

	منطقه	خطای a	تیمار(سمپاشی)	خطا	کل
درجه آزادی	۲	۲۷	۱	۲۶۹	۲۹۹
منابع تغییرات					
بیشینه درصد وقوع	۲۷۱۵ ns	۳۱۶۷/۵ ns	۱۰۰/۷ **	۴/۹۸	
بیشینه شدت بیماری	۶۹۳۵ ns	۳۹۰۰/۷۴ ns	۹۶۰۵/۱۳ **	۱۴۳/۷	
[1]AUDPC_I	۲۷۳۲۷۷۰۰ ns	۱۰۰۱۴۳۰۰ *	۱۳۸۸۳۰ **	۱۸۳۸۱/۹	
[2]SAUDPC_I	۶۴۸۲/۷ ns	۲۵۴۵/۲ *	۳۷/۶۵ **	۴/۴۷	
[۳]AUDPC_S	۸۵۳۴۵۷ *	۲۵۵۹۵۴ *	۴۵۳۸۹۳ **	۱۲۴۳۰	
[۴]SAUDPC_S	۲۰۴/۸ *	۶۳/۲۶ *	۱۱۵/۴ **	۳/۱۲	
[۵]AUDPC_IG	۲۷۴۱۰۶۰۰ ns	۱۲۶۸۰۶۰۰ *	۲۴۱۲۹۶ **	۱۴۶۹۳/۵	
[۶]SAUDPC_IG	۶۴۶۰/۹ ns	۲۹۴۱/۶ *	۵۶/۹۸ **	۳/۴۲	
[۷]AUDPC_SG	۸۱۹۹۴۰ *	۲۳۱۰۸۷ *	۲۲۷۳۲۷ **	۸۱۷۳/۹	
[۸]SAUDPC_SG	۲۱۸/۸ *	۵۲/۵۴ *	۵۳/۱۲ **	۱/۸۸	
عملکرد در هکتار	۴۷/۱۹ **	۹/۲ **	۱۴/۰۶ **	۰/۲۷	
وزن هزاردانه	۶۸۲/۳ **	۱۲۶/۲ **	۵۴۶/۷ **	۵/۶۶	

جهت بررسی سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری در مناطق مختلف و مقایسه تیمار سمپاشی با شاهد در شـرایط مزرعـه، نمودار شدت و وقوع بیماری در مزارع هر منطقه در برابر مرحله‌ی رشدی گندم ترسیم گردید (شکل۱) .

در سه منطقه، اولین علایم بیماری اواسط مرحله‌ی پنجه‌زنی مشاهده گردید و به‌تدریج در انتهای تشکیل سنبله بیماری شدت یافت. پس از سمپاشی مزراع در زمان ظهور برگ پرچم به‌تدریج از شدت بیماری در کرت‌های سمپاشی شده در مقایسه با کرت‌های سمپاشی نشده کاسته شد. اختلاف بسیار معنی‌داری بین تیمارهای سمپاشی‌شده و سمپاشی‌نشده ($P\leq0/01$) مشاهده شد. از مقایسه‌ی شدت نهایی بیماری در تیمارها در مناطق اجرای تحقیق و کاهش شدت نهایی بیماری در تیمارهای سمپاشی‌شده در مناطق(ایمر به ترتیب از (۴۸ به ۱۶ درصد)، آق‌آباد[۹] (۵۳ به ۴۷ درصد) و مینودشت (۳۹ به ۱۸ درصد)) می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از قارچ‌کش در زمان تشکیل سنبله می‌تواند از مقدار بیماری کاسته و باعث افزایش عملکرد گندم گردد همانگونه که در این بررسی تیمار سمپاشی شده، وزن هزاردانه و عملکرد محصول را به‌ترتیب به میزان ۳ گرم و ۴۰۰ کیلوگرم در هکتار افزایش داد.

[۱]- سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری بر حسب درصد وقوع (I)
۲- مقدار استانداردشده سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری بر حسب درصد وقوع (I)
۳-سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری بر حسب شدت (S)
۴- مقدار استانداردشده سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری برحسب شدت (S)
۵- سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری بر حسب درصد وقوع (I) بر اساس مرحله رشدی گندم
۶-مقدار استانداردشده سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری بر حسب درصد وقوع (I) بر اساس مرحله رشدی گندم
۷-سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری بر حسب شدت (S) بر اساس مرحله رشدی گندم
۸- مقدار استانداردشده سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری برحسب وقوع (S) بر اساس مرحله رشدی گندم
[۹]در این منطقه، به دلیل شرایط بد جوی حاکم در زمان سمپاشی، امکان سمپاشی در زمان مناسب مقدور نبود و تنها ۵ درصد مزارع مورد سمپاشی قرار گرفت



شکل۲- منحنی پیشرفت بیماری لکه خرمایی گندم در سه منطقه‌ی استان گلستان بر اساس مرحله رشدی (BBCH) و مقایسه مزارع سمپاشی شده و سمپاشی نشده. A) منحنی وقوع بیماری در ایمر، B) منحنی شدت بیماری در منطقه‌ی ایمر، C) منحنی وقوع بیماری در آق‌آباد، D) منحنی شدت بیماری در آق‌آباد، E) منحنی وقوع بیماری در مینودشت، F) منحنی شدت بیماری در مینودشت.

جدول ۲ - مقایسه میانگین داده‌های مختلف بیماری لکه خرمایی گندم و عملکرد محصول در سه منطقه از مزارع استان گلستان در سال زراعی ۹۰-۱۳۸۹

متغیر	مناطق			LSD	تیمار(کنترل)		LSD
	مینودشت	آق آباد	ایمر		سمپاشی	شاهد	
بیشینه درصد وقوع	--	--	--	--	95.67 b	96.83 a	0.18
بیشینه شدت بیماری	--	--	--	--	25.01 b	36.33 a	0.97
AUDPC_I	1433.6b	2257.7 ab	2402.8a	316.4	2009 b	2052 a	11.07
SAUDPC_I	22.05 b	33.69 ab	37.51a	5.04	30.73 b	31.44 a	0.17
AUDPC_S	274.2 b	399.12ab	454.6a	50.59	337.07b	414.8 a	9.1
SAUDPC_S	4.22 b	5.95 ab	7.05 a	0.79	5.12 b	6.36 a	0.14
AUDPC_IG	1581 b	2242.2ab	2615.3a	356.1	2118.1b	2174.8a	9.89
SAUDPC_IG	24.58 b	33.6 ab	40.61a	5.42	32.49 b	33.36 a	0.15
AUDPC_SG	287.8 b	336.7 ab	463.3 a	48.07	335.09b	390.1a	7.38
SAUDPC_SG	4.45 b	5.02 ab	7.25 a	0.72	5.15 b	5.99 a	0.11
عملکرد در هکتار	3.26 ab	2.85 b	4.19 a	0.31	3.63 a	3.25 b	0.04
وزن هزاردانه	42.4 ab	42.94 a	38.17 b	1.12	42.52 a	39.82 b	0.19

منابع

۱- آقاجانی،م. ع. و طلیعی، ف. ۱۳۸۶. نشریه فنی بیماری لکه خرمایی گندم. گروه انتشارات فنی و یافته‌های علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان. ص20.

۲- دهقان، م. ع. ۱۳۸۹. بررسی ظهور و گسترش بیماری لکه خرمایی گندم در استان گلستان و ارزیابی مقاومت ژنوتیپ‌های مختلف گندم نسبت به آن. خلاصه مقالات نوزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران.ص۲۵۷

۳- فروتن، ع.، ابطالی، ی.، هاتم نژاد، س. و فدایی،ا. ۱۳۸۹. شیوع لکه خرمایی گندم در مازندران. خلاصه مقالات نوزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. ص۳۰۴.

۴- فروتن، ع.، دلیلی، ع.، و شایگان،ج،۱۳۷۴. جداسازی *Drechslera tritic –repentis* از برگهای آلوده گندم در مازندران. خلاصه مقالات دوازدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، کرج. ص۴۵

۵- عباسی، ع.، فروتن، ع.، پیرنیا، م.، ۱۳۸۹. مطالعه تاثیر برخی از قارچ کش‌های ثبت‌شده در کنترل لکه خرمایی گندم. خلاصه مقالات نوزدهیمن کنگره گیاهپزشکی ایران، ۸۷۷

۶- آقاجانی، م. ع.، باقرانی، ن. و متکی، ا. ۱۳۸۹. کنترل شیمیایی لکه‌خرمایی گندم در استان گلستان. خلاصه مقالات نوزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. ۷۹۰

7- Anonymous.2005. *Pyrenophora tritici-repentis*. CAB international Crop Protection Compendium. Kew, England.

8- Bankina, B., Prlekule, I. 2011. A review of tan spot research in the Baltic countries: occurrence, biology and possibilities of control. Agriculture, vol. 98. No. 1.p 3-10.

9- Bockus, W.W. 1998. Control strategies for stubble-borne pathogens of wheat. *Canadian Journal of Plant Pathology* 20:371-5.

10- Ciuffetti, L.M. and Tuori, R. P.. 1999. Advances in the characterization of the *Pyrenophora tritici-repentis*–wheat interaction. *Phytopathology* 89:444-9.

11- De Wolf, E.D., Effertz, R. J., Ali, S. and Francl, L. J.. 1998. Vistas of tan spot research. *Canadian Journal of Plant Pathology* 20:349-444.

12- Duveiller, E., Kandel, Y. R., Sharma, R. C. and Shrestha, S. M. 2005. epidemiology of Foliar Blights (Spot Blotch and Tan Spot) of Wheat in the Plains Bordering the Himalayas. *Phytophotology* 95: 248-56..

13- Oliver, R. P., Lord, M., Reybak,k., Faris, J. D.and Solomon P. S. 2007. Emergence of tan spot disease caused by toxigenic *Pyrenophora tritici-repentis* in Australia in associated with increased development of toxin – sensitive cultivars.*Phytopathology*. 98: 488-491.

14- Prescott, J.M., Burnett, P. A., Saari, E. E., Ransom, J., Bowman, J., Milliano, W. de., Singh, R. P. and Bekele. G.1986. Wheat diseases and pests. A guide for field identification. Mexico, D.F.: CIMMYT.

15- Wegulo, S.N., Klein, R. N. and Harveson, R. M. 2006. Tan spot disease of wheat. NebGuide G429. Lincoln: University of Nebraska-Lincoln Extension, Institute of Agriculture and Natural Resources. Available online at http://www.ianrpubs.unl.edu/epublic/live/g429/build/g429.pdf.
16- Wiese, M.V. 1987. Tan spot (yellow leaf spot). In M.V. Wiese (ed.), Compendium of wheat diseases. St. Paul, MN: The American Phytopathological Society (APS Press). Pp. 42-3
17- Wolf, E. D., Effertz, R. J., Ali, S., Francl, L. J.,1998. Vistas of tan spot research. Canadian Jornal of Plant Pathology. 20: 349-370.

ارزیابی خواص ضد میکروبی اسانس دانه گیاهان رازیانه، زیره سیاه و زیره سبز بر قارچ *Botrytis cinerea* تحت شرایط In vitro

فاطمه مونسان[1*] ،اسلام مجیدی هروان [2] ،دکتر وحید زرین نیا[3]

[1]کارشناسی ارشد و [2] استاد گروه اصلاح نباتات، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه علوم و تحقیقات، تهران

[3] استادیار گروه بیماری شناسی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه علوم و تحقیقات، تهران

** نویسنده مسئول Moonesan2009@gmail.com*

چکیده

اثرات ضد قارچی اسانس گیاهان زیره سیاه در غلظت‌های ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰، ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام ، زیره سبز در غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰، ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام و رازیانه در غلظت‌های ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰، ۱۰۰۰، ۱۲۰۰، ۱۴۰۰، ۱۶۰۰، ۱۸۰۰، ۲۰۰۰ پی‌پی‌ام بر روی مهار رشد قارچ *Botrytis cinerea* در محیط کشت PDA مورد بررسی قرار گرفت. این پژوهش بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS تجزیه آماری شده و مقایسه میانگین‌ها با آزمون (LSD) صورت گرفته است. هر تیمار دارای سه تکرار و کنترل مثبت، منفی و کنترل توبین۸۰ می‌باشد. نتایج بررسی نشان داد که اسانس گیاه زیره سیاه و زیره سبز تاثیر قابل توجهی در جلوگیری از رشد قارچ *Botrytis cinerea* داشت ولی اسانس گیاه رازیانه در غلظت‌های مورد استفاده اثر بازدارندگی روی این قارچ نداشت. به طوریکه در بین غلظت‌های مختلف اسانس گیاه زیره سبز، غلظت ۲۰۰ پی‌پی‌ام و بین غلظت‌های مختلف اسانس گیاه زیره سیاه، غلظت ۸۰۰ پی‌پی‌ام میانگین رشد پرگنه پایین‌تری را نشان داد و به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) تعیین گردید، که درصد بازدارندگی (IP) بیشتری (۱۰۰٪) بر روی رشد قارچ اعمال می‌کند. حداقل غلظت قارچ‌کشی اسانس (MFC) روی قارچ *Botrytis cinerea* برای زیره سبز در غلظت‌های ۸۰۰ و ۱۰۰۰ تعیین گردیده است و هیچکدام از غلظت‌های مختلف مورد استفاده اسانس گیاه زیره سیاه خاصیت قارچ‌کشی نداشته است.

واژگان کلیدی:رازیانه، زیره سبز، زیره سیاه، اثرات ضد قارچی، *Botrytis cinerea*

مقدمه

بیماری‌های گیاهی یکی از مشکلات مهمی است که امروزه کشاورزی کشور با آن مواجه بوده و هر ساله خسارات زیادی را به کشاورزان وارد می‌سازد که منجر به کاهش قابل توجه عملکرد محصولات کشاورزی شده است. قارچ‌ها، به‌عنوان یکی از عوامل مهم در ایجاد بیماری‌های گیاهی به‌تنهایی می‌توانند موجبات کاهش ۲۰ درصدی محصولات کشاورزی را فراهم سازند (۲). به همین خاطر، محققان زیادی در تلاش‌اند که با عصاره برخی گیاهان از آن‌ها به‌عنوان راهکاری در جهت حفظ سلامت محیط و کنترل بیماری‌های قارچی استفاده کنند (۳).

استفاده از اسانس گیاهان دارویی به‌دلیل عوارض جانبی کمتر، عدم بروز مقاومت پاتوژن، پایین بودن هزینه‌های تولید، تجزیه شدن در خاک و عدم آلوده کردن محیط زیست می‌توانند به‌عنوان جایگزین مناسب سموم شیمیایی مطرح شوند

(۴). عامل بیماری کپک خاکستری، قارچی است به نام *Botrytis cinerea* که بیمارگر نکروترف همه‌جازی است و پوسیدگی‌های ناشی از آن یکی از شایع‌ترین و گسترده‌ترین بیماری‌های سبزیجات ،گیاهان زینتی، درختان مثمر و گیاهان زراعی می‌باشد (۱).

مواد و روش

در این تحقیق از قارچ *Botrytis cinerea* تهیه شده از کلکسیون قارچ‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران استفاده شده است. جهت تهیه اسانس دانه گیاهان زیره سیاه، زیره سبز و رازیانه از روش تقطیر با بخار آب از دستگاه کلونجر استفاده شده است. غلظت‌های ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام اسانس زیره سیاه، غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام اسانس زیره سبز و غلظت‌های ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰، ۱۰۰۰، ۱۲۰۰، ۱۴۰۰، ۱۶۰۰، ۱۸۰۰ و ۲۰۰۰ پی‌پی‌ام اسانس رازیانه توزین شد و از محلول توئین ۸۰ (۰/۰۵ درصد) امولسیون به مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر به میکروتیوپ حاوی اسانس اضافه شد و سپس به ارلن‌های حاوی محیط کشت PDA اضافه گردید.

دیسک‌هایی از قارچ پنج روزه *Botrytis cinerea* در مرکز ظرف پتری حاوی محیط کشت و غلظت عصاره کشت داده شد و در انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. تیمارهای عصاره گیاهی با سه شاهد، محیط کشت PDA همراه با سم کاربندازیم با غلظت ۲/۵ در هزار، محیط کشت PDA و محیط کشت به همراه توین ۸۰ مقایسه شده است. میانگین رشد پرگنه برای هر قارچ در هر تکرار روزانه به مدت ۵ روز محاسبه شده است. سپس درصد بازدارندگی (IP[1]) غلظت‌های مختلف اسانس‌ها تعیین گردید. حداقل غلظتی که رشد قارچ در آن به میزان صددرصد باز داشته شد، MIC[2] یا حداقل غلظت بازدارندگی و همچنین MFC[3] یا حداقل غلظت قارچ‌کشی نیز تعیین گردید. داده‌های حاصله با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS تجزیه آماری شده و مقایسه میانگین‌ها با آزمون LSD صورت گرفته است.

نتایج و بحث

در این تحقیق اثر ضد میکروبی غلظت‌های مختلف اسانس دانه گیاهان رازیانه، زیره سیاه و زیره سبز بر رشد قارچ بیماری‌زا گیاهی *Botrytis cinerea* مورد بررسی قرار گرفته است تا غلظت بازدارندگی از رشد قارچ مشخص شده و در بررسی‌های آینده بتوان از آن جهت کنترل عوامل بیماری‌زای گیاهی استفاده نمود. تاثیر غلظت‌های مختلف اسانس گیاهی بر روی رشد و توسعه قارچ‌ها در محیط کشت PDA نسبت به شاهد مثبت و منفی مورد ارزیابی قرار گرفته است. با توجه به آزمون انجام شده تمام غلظت‌های اسانس دانه رازیانه فاقد اثر بازدارندگی می‌باشد. در کلیه نیمارهای شاهد مثبت و شاهد توئین ۸۰، کلنی‌های قارچ کاملا رشد کرده بود و شاهد منفی فاقد رشد قارچ بود.

نتایج حاصل از این بررسی نشان می‌دهد که غلظت‌های مختلف اسانس دانه زیره سیاه و دانه زیره سبز بر روی رشد قارچ *Botrytis cinerea* در سطح ۱ درصد اختلاف آماری معنی‌داری داشت (جدول ۱)، به عبارتی تمام غلظت‌های مختلف تاثیرات متفاوتی را در درصد بازدارندگی از رشد قارچ نشان داده‌اند. به این صورت که با افزایش غلظت اسانس‌ها، درصد بازدارندگی از رشد افزایش پیدا کرده است.

جدول ۱-تجزیه واریانس بر اساس درصد بازدارندگی (IP) غلظت مختلف اسانس گیاهان زیره سبز و سیاه بر روی قارچ *Botrytis cinerea*

Source	DF	Sum of Squares	Mean Squara	F Value	pr>F
Model	6	34592.95238	5765.49206	460.36	<.0001
Error	14	175.33333	12.52381		
Corrected Total	20	34768.28571			

1. IP: Inhibitory Percentage

2. MIC: Minimum inhibitory concentration
3. MFC: Minimum fungicidal concentrations

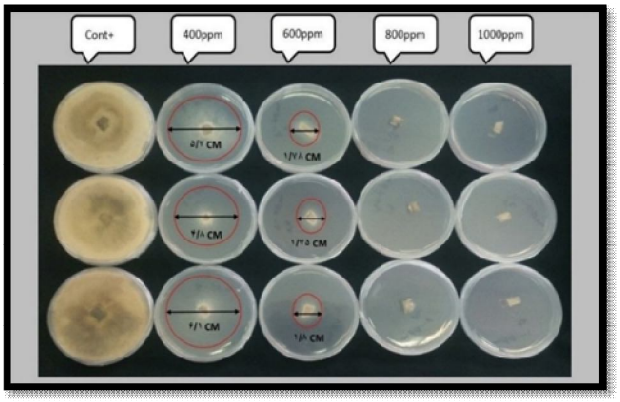
در ادامه از آزمون LSD (جدول ۲) برای مقایسه تاثیر غلظت‌های مختلف اسانس زیره سیاه و سبز بر روی رشد پرگنه قارچ *Botrytis cinerea* انجام گرفت

جدول ۲-مقایسه میانگین درصد بازدارندگی (IP) قارچ *Botrytis cinerea* در تیمار شاهد و رشد کلنی در محیط کشت حاوی غلظت‌های گوناگون اسانس‌های زیره سیاه و زیره سبز

نام تیمار	تعداد	میانگین	گروه بندی t
سبز ۲۰۰	۳	۱۰۰	A*
سیاه ۸۰۰	۳	۱۰۰	A
سیاه ۶۰۰	۳	۸۳	B
سبز ۱۰۰	۳	۸۲/۳۳۳	B
سیاه ۴۰۰	۳	۴۹/۶۶۷	C
سیاه ۰	۳	۰	D
سبز ۰	۳	۰	D

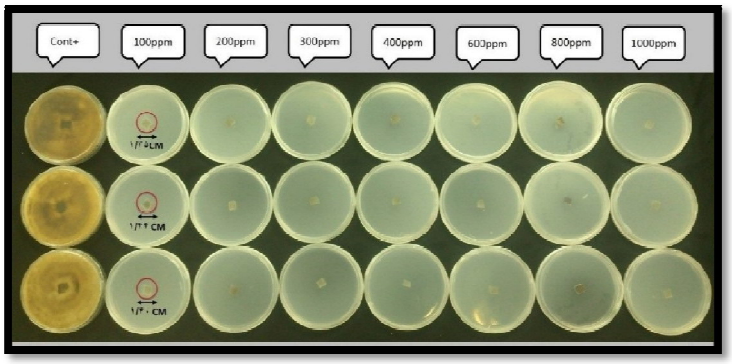
***تیمار هایی که با حروف مختلف نشان داده شده اند، در آزمون LSD ($p<0.01$) با یکدیگر تفاوت معنی داری دارند**

بررسی تاثیر بازدارندگی از رشد قارچ *Botrytis cinerea* در غلظت‌های مختلف اسانس زیره سیاه نشان داد (شکل ۱) که رشد قارچ در غلظت ۶۰۰ پی‌پی‌ام کاهش یافته و در غلظت‌های بالای اسانس دانه زیره سیاه (۸۰۰ پی‌پی‌ام) در محیط کشت PDA توسعه رشد مشاهده نشده است.



شکل۱-آزمون اثر ضد میکروبی غلظت‌های گوناگون اسانس گیاه دارویی زیره سیاه بر روی قارچ *Botrytis cinerea* در محیط کشت PDA ،پس از ۵ روز نگهداری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد.

تاثیر بازدارندگی از رشد قارچ *Botrytis cinerea* در غلظت‌های مختلف اسانس زیره سبز نشان داد (شکل ۲) که رشد قارچ در غلظت ۱۰۰ پی‌پی‌ام کاهش یافته و در غلظت‌های بالای اسانس دانه زیره سیاه (۲۰۰ پی‌پی‌ام) در محیط کشت PDA توسعه رشد مشاهده نشده است.



شکل۲-آزمون اثر ضد میکروبی غلظت‌های گوناگون اسانس گیاه دارویی زیره سبز بر روی قارچ *Botrytis cinerea* در محیط کشت PDA ،پس از ۵ روز نگهداری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد.

با توجه به بروز برخی مشکلات و تهدیدهای ناشی از مصرف سموم شیمیایی در سیستم‌های کشاورزی استفاده از اسانس‌ها در سال‌های اخیر به عنوان یک روش بیولوژیک در کنترل آفات، بیماری‌ها و علف‌های هرز مطرح گردیده است. خاصیت ضد میکروبی اسانس گیاهی به ترکیبات شیمایی آنها بستگی دارد (۵). حساسیت گونه‌های قارچی بسته به نوع اسانس و غلظت‌های گوناگون آن متفاوت است. تفاوت در فعالیت ضد قارچی اسانس‌های گیاهی به ترکیب آن‌ها بستگی دارد. یک ترکیب ممکن است به تنهایی یا به صورت تشدیدکنندگی با سایر ترکیب‌ها فعالیت ضد قارچی اسانس را موجب شود (۶). نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که اسانس زیره سیاه و زیره سبز بر روی رشد قارچ *Botrytis cinerea* اثر مهارکنندگی دارند. به طوریکه در بین غلظت‌های مختلف اسانس گیاه زیره سبز، غلظت ۲۰۰ پی‌پی‌ام و بین غلظت‌های مختلف اسانس گیاه زیره سیاه، غلظت ۸۰۰ پی‌پی‌ام میانگین رشد پرگنه پایین‌تری را نشان داد و به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) تعیین گردید، که درصد بازدارندگی (IP) بیشتری (۱۰۰٪) بر روی رشد قارچ اعمال می‌کند. حداقل غلظت قارچ‌کشی اسانس (MFC) روی قارچ *Botrytis cinerea* برای زیره سبز در غلظت‌های ۸۰۰ و ۱۰۰۰ تعیین گردید و هیچکدام از غلظت‌های مختلف مورد استفاده اسانس گیاه زیره سیاه خاصیت قارچ‌کشی نداشته است. امید است نتایج این پژوهش بتواند در کنار سایر آزمایش‌ها در رسیدن به اهداف کنترل بیماری‌های گیاهی به وسیله روش‌های بیولوژیک سودمند باشد و به جای استفاده از سموم شیمیایی متداول که دارای اثرات سوء برای طبیعت است، در کنترل بیماری‌های گیاهی از اسانس‌های طبیعی استفاده شود که کمترین خطر را برای محیط زیست و سلامت انسان، دام و گیاه دارند.

منابع

۱. افشاری، ح.، ف. زیوهای، غ. ر. باقری، م. افشاری و م. زاده باقری. ۱۳۹۲. بررسی اثر ضد قارچی اسانس گیاهان دارویی بر رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس و تولید آفلاتوکسین B۱ در پسته. فصلنامه علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی زابل. ۵ (۳): ۲۳-۱۶.

2- Agrios, G. N., 2000. Significance of plant disease. In: Plant Pathology, Academic Press, London. 25–37 pp.

3- Abdel-Monaim, M. F., K. A. M., K. M. Abo-ElyousrMorsy. 2011. Effectiveness of plant extracts on suppression of damping-off and wilt diseases of lupine (Lupinus termis Forsik). Crop Prot. 30: 185–0191.

4- Gazim, Z. C., C. M. Rezende, S. R. Fraga, et al. 2008. Antifyngal activity of the essential oil from Calendula officinalis L. (asteraceae) drowing in Brazil. Braz J Microbiol. 39: 61-3.

5- Pitarokili D, Tzakou O, Loukis A and Harvala C. 2003. Volatile metabolites from Salvia fruticosa as antifungal agents in soilborne pathogens. Agricalture Food Chemistry 51:3294-3301.

6- Plotto A, Roberts D and Roberts R G. 2003. Evaluation of plant essential oils as natural postharvest disease control of Tomato (Lycopersicon Esculentum). Acta Horticulturae 628: 737-745.

بررسی اثر سطوح مختلف قارچ تریکودرما *Trichoderma harzianum* و بسترهای مختلف کود بر روی ریشه‌زایی و صفات مورفولوژیکی قلمه گیاه ناز یخی

فاطمه مونسان[۱*]،مرضیه حیدری[۲]،حمیدرضا کلباسی[۳]،

[۱]کارشناس ارشد دانشگاه علوم و تحقیقات، [۲]کارشناس اداره فضای سبز شهرداری منطقه ۱۰ تهران

[۳]کارشناس اداره فضای سبزمنطقه ۱۰ تهران

** نویسنده مسئول:Moonesan2009@gmail.com*

چکیده

به منظور بررسی اثرات دو غلظت قارچ تریکودرما (*Trichoderma harzianum*) و انواع کودهای آلی بر روی ریشه‌زایی و صفات مورفولوژیکی قلمه گیاه ناز یخی آزمایشی در شرایط گلخانه‌ای به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملا تصادفی با چهار تکرار به صورت گلدانی انجام شد. سه بستر کاشت، شامل کود ورمی‌کمپوست و مخلوط خاک و ماسه ،کود دامی و مخلوط خاک و ماسه و کود مرغی و مخلوط خاک و ماسه به نسبت حجمی ۶۰:۴۰ و تیمارهای قارچ تریکودرما در سه غلظت سوسپانسیون (۱۰۰۰×۴، ۱۰۰۰×۶ و صفر) در نظر گرفته شد. ۱۱۰ روز از زمان قلمه‌زنی، اندازه ریشه قلمه‌های ریشه‌دار شده، تعداد برگ قلمه‌های ریشه‌دارشده، اندازه برگ قلمه‌های ریشه‌دارشده، اندازه ساقه قلمه‌های ریشه‌دارشده، وزن تر ساقه و برگ، وزن تر ریشه، وزن خشک ساقه و برگ و وزن خشک ریشه اندازه گیری گردید. نتایج تجزیه واریانس بیانگر این بود که بین دو بستر کود دامی و ورمی‌کمپوست در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. در حالی که بین غلظت‌های مختلف قارچ تریکودرما در هر دو کود دامی و ورمی‌کمپوست اثر معنی‌داری مشاهده گردید به این صورت که با افزایش غلظت تریکودرما، صفات مورد نظر شامل اندازه ریشه، تعداد برگ، اندازه برگ، اندازه ساقه، وزن تر ساقه و برگ، وزن تر ریشه، وزن خشک ساقه و برگ و وزن خشک ریشه افزایش یافت. لذا با توجه به نتایج حاصل از این بررسی می‌توان چنین استنباط کرد که استفاده از قارچ تریکودرما می‌تواند موجب بهبود رشد و افزایش ریشه‌زایی قلمه گیاه ناز یخی شود که این روند در حضور کودهای آلی دامی و ورمی‌کمپوست تسریع خواهد شد.

واژگان کلیدی: ناز یخی، ریشه زایی، صفات مورفولوژیکی، قلمه، *Trichoderma harzianum*

مقدمه

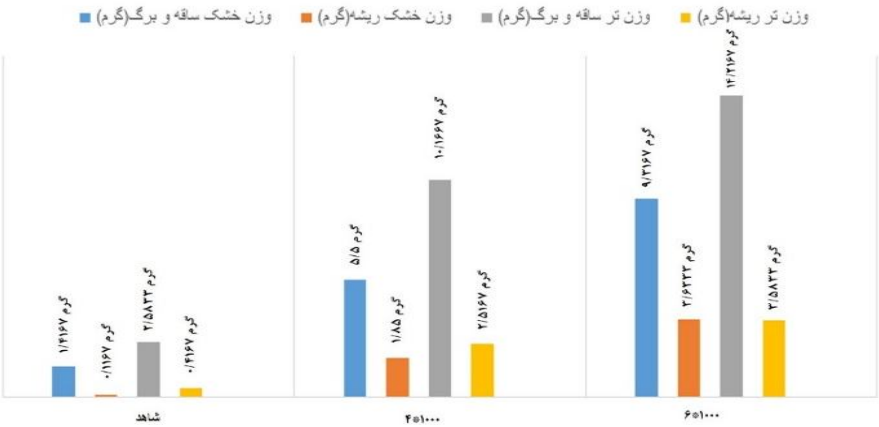
تریکودرما قارچی خاکزی، فرصت‌طلب، غیر بیماری‌زا همزیست با ریشهٔ گیاهان است و به دلیل تنوع متابولیسمی و قدرت رقابتی بالا در بیشتر مناطق از موجودات غالب مایکوفلور خاک است و جزو متداول‌ترین قارچ‌های قابل کشت است و به آسانی تکثیر می‌شود (۴). توان ترشح آنزیم‌های مختلف خارج سلولی در خاک، قدرت هم‌زیستی در ریشه، توان اسپورزایی زیاد، تحمل به شوری و سایر ترکیبات موجود در محیط خاک و ریشه از خصوصیات مهم گونه‌های مختلف جنس تریکودرما به حساب می‌آید (۳). محققین معتقدند که شرایط فیزیکوشیمیائی خاک بر بقاء و روند تغییرات جمعیت تریکودرما مؤثر می‌باشد (۶). بنابراین باید با اضافه کردن قارچ تریکودرما به خاک جمعیت آنها را افزایش داد (۱). لذا هدف از این تحقیق بررسی استفاده از قارچ تریکودرما و بسترهای مختلف کود بر روی ریشه‌زایی و بهبود رشد گیاه ناز یخی بوده است.

مواد و روش

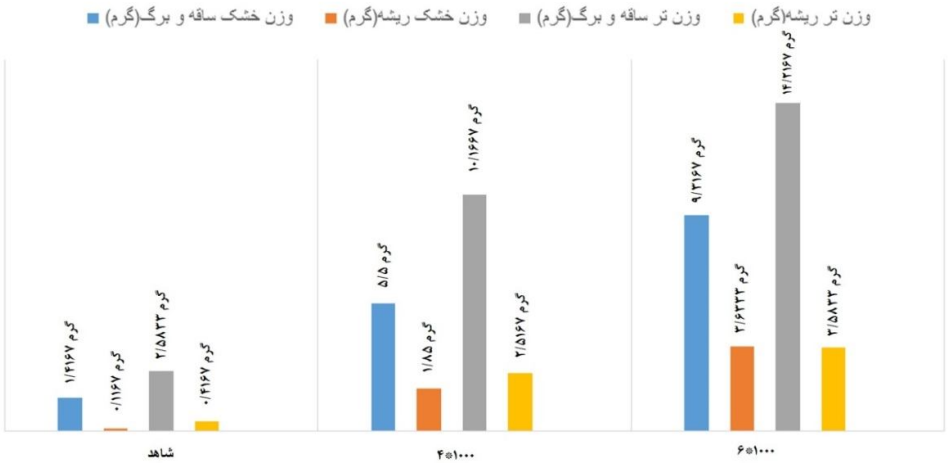
به منظور بررسی اثرات قارچ تریکودرما *T. harzianum* و انواع کودهای آلی بر روی ریشه‌زایی و صفات مورفولوژیکی قلمه گیاه ناز یخی،آزمایشی در گلخانه شهرداری منطقه ۱۰ تهران به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملا تصادفی با چهار تکرار و به صورت گلدانی انجام شد. برای اعمال تیمارهای این پژوهش سه نوع بستر ورمی‌کمپوست و مخلوط خاک و ماسه، کود دامی و مخلوط خاک و ماسه، کود مرغی و مخلوط خاک و ماسه به نسبت حجمی ۶۰:۴۰ آماده شدند. سپس، شاخه‌های گل ناز از پایه‌های مادری که تحت شرایط مطلوب و یکنواخت از نظر تغذیه، آبیاری و سایر عملیات باغداری بودند، در گلخانه تهیه گردیدند. تیمارهای قارچ تریکودرما *T. harzianum* در سه غلظت سوسپانسیون (۱۰۰۰×۴، ۱۰۰۰×۶ و صفر) تهیه و به صورت جداگانه در بشر ریخته شد. قلمه‌ها در دسته‌های ۴۰تایی به مدت ۱۰ دقیقه داخل محلول فرو برده شد، به طوری که حدود ۲ الی ۳سانتیمتر از انتهای آنها داخل محلول قرارگیرد. قلمه‌ها پس ازاعمال تیمارهای مورد نظر در گلدان‌های حاوی بسترهای مختلف قرار داده شدند. پس از گذشت ۱۱۰ روز از زمان قلمه‌زنی، قلمه‌های هر پلات را به‌طور جداگانه به وسیله بیلچه به‌صورتی که ریشه‌ها صدمه نبینند از بستر خارج کرده و پس از شستشوی آنها در داخل آب، صفات مورد نظر شامل اندازه ریشه قلمه‌های ریشه‌دار شده، تعداد برگ قلمه‌های ریشه‌دارشده، اندازه برگ قلمه‌های ریشه‌دارشده، اندازه ساقه قلمه‌های ریشه‌دارشده، وزن تر ساقه و برگ، وزن تر ریشه، وزن خشک ساقه و برگ و وزن خشک ریشه اندازه گیری گردید. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS تجزیه آماری شده و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن صورت گرفته است.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که بین دو بستر کود دامی و ورمی‌کمپوست در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری وجود ندارد و غلظت‌های قارچ تریکودرما در هر دو بستر کود در یک سطح قرار دارد. در حالی که بین غلظت‌های مختلف قارچ تریکودرما در هر دو کود دامی و ورمی‌کمپوست اثر معنی‌داری مشاهده گردید به این صورت که با افزایش غلظت تریکودرما، صفات مورد نظر افزایش یافت. با توجه به خشک شدن تمام تیمارهای کودمرغی، این کود در بررسی آماری حذف گردید. پس از مشاهده اثر متقابل بین غلظت‌های مختلف قارچ تریکودرما و بسترهای مورد بررسی، با انجام آزمون مقایسه میانگین دانکن کلاس بندی غلظت‌ها مشخص گردید(شکل۱، ۲، ۳، ۴).

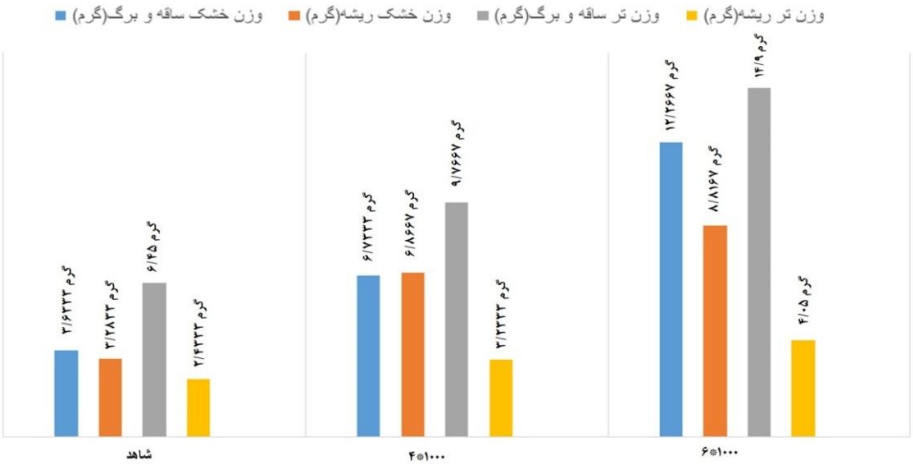


شکل ۱-نمودار مقایسه میانگین غلظت‌های مختلف قارچ تریکودرما و کود ورمی‌کمپوست بر روی صفات مورفولوژیکی قلمه ناز یخی با استفاده از آزمون دانکن



شکل ۲- نمودار مقایسه میانگین غلظت‌های مختلف قارچ تریکودرما و کود ورمی‌کمپوست بر روی صفات مورفولوژیکی قلمه ناز یخی با استفاده از آزمون دانکن

شکل ۳-نمودار مقایسه میانگین غلظت‌های مختلف قارچ تریکودرما و کود دامی بر روی صفات مورفولوژیکی قلمه ناز یخی با استفاده از آزمون دانکن



شکل ۴-نمودار مقایسه میانگین غلظت‌های مختلف قارچ تریکودرما و کود دامی بر روی صفات مورفولوژیکی قلمه ناز یخی با استفاده از آزمون دانکن

بررسی نتایج این آزمایش نشان داد که استفاده از قارچ تریکودرما (*Trichoderma harzianum*) می‌تواند موجب بهبود ریشه‌زایی و افزایش صفات مورفولوژیکی قلمه گیاه ناز یخی شود که این روند در حضور کود هایی نظیر ورمی‌کمپوست و کود دامی تسریع خواهد شد (شکل ۵)بنابراین با پتانسیلی که قارچ تریکودرما در بهبود رشد گیاه نشان داد می‌توان کاربرد آن را برای سایر گیاهان نیز توصیه کرد.

(B) (A)

شکل۵-مقایسه غلظت‌های گوناگون قارچ (*Trichoderma harzianum*) و بستر کود ورمی‌کمپوست (A) و بستر کود دامی (B) بر روی ریشه‌زایی پس از گذشت ۱۱۰ روز از زمان قلمه‌زنی

منابع:

1-Bennett, A.J., and Whipps, J.M. (2008). Beneficial microorganism survival on seed,roots and inrhizosphere soil following application to seed during drum priming.Biological Control. 44: 349-361.
2-Chacon, M.R., Rodríguez-Galán, O., Benítez, T., Sousa, S., Rey, M., Llobell, A.,and Delgado-Jarana1, J.(2007).Microscopic and transcriptome analyses of earlycolonization of tomato roots by *Trichoderma harzianum*. International
Microbiology. 10:19-27.
3-Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M (2004) Trichoderma species-opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews 2: 43-56.
4-Kaewchai S, Soytong K, Hyde KD (2010) Mycofungicides and fungal biofertilizers. Fungal Diversity 38: 25-50.
5-Soltani, H., Zafari, D, and Rohani. (2005). A stady on biological control of thecrown, root and tuber fungal diseases of potato by *Trichoderma harzianuminvitro*and fild condition
6-Singh, A., Srivastava, S, Singh, H.B. (2007). Effect of substrates on growth andshelf life of *Trichoderma harzianum* and its use in biocontrol of diseases.Bioresource Technology. 98: 470-47.

اثر تناوب زمستانه بر بیماری‌های مهم و عملکرد پنبه

سعیدسلطانی*، یاسرجعفری و عبدالقدیرقجری
محققین موسسه تحقیقات پنبه کشور
* نویسنده مسئول *Saeedsol2416@yahoo.com*

چکیده

با هدف بررسی تاثیر محصولات زمستانه بر بیماری‌های مهم و عملکردپنبه آزمایشی به صورت اسپلیت پلات در قالب طرح پایه بلوکهای کامل تصادفی با چهار تکرار در کارکنده (کردکوی) در سال ۱۳۸۸- ۸۹ انجام گرفت. در این تحقیق عامل اصلی محصولات زمستانه شامل(نکاشت، باقلا، نخودفرنگی، کلزا وگندم) و عامل فرعی ارقام پنبه (گلستان وسپید) بودند.برخی از خصوصیات زراعی و بیماری های پنبه مورد ارزیابی قرارگرفتند. نتایج تجزیه واریانس صفات نشان داد که، محصولات زمستانه و رقم تاثیرمعنی داری بر روی صفات زراعی تعداد ،عملکرد، اجزا عملکرد و بیماری داشت. بطوریکه بیشترین درصد مرگ گیاهچه در تیمار کشت پنبه بعد از نخود فرنگی (۱۶/۳۷ درصد) و بیشترین درصد پژمردگی ورتیسلیومی در کشت پنبه پس از نکاشت (۱۳/۴۵ درصد) مشاهده شد.

واژگان کلیدی: مرگ گیاهچه، زودررسی، ورتیسلیوم، کیل و عملکرد

مقدمه

موضوع کشت دوم پنبه (تناوب) به منظور حصول حداکثر استفاده از زمین و فصل زراعی در دیگر کشور های دنیا مانند آمریکا و در ایالت آلاباما و جنوب جرجیا مورد بررسی قرار گرفت (۶). رعایت تناوب پنبه با محصولات زمستانه نظیر گندم، کلزا (۱) و بقولات، (۶) جهت کاهش و یا افزایش روند جمعیت بیماریهای خاکزی مثل پژمردگی ورتیسلیومی و مرگ گیاهچه ضروری به نظر می رسد. همچنین انتخاب رقم مقاوم یا متحمل پنبه یکی از فاکتورهای مهم جهت مقابله با این بیماری ها می باشد (۶). درگزارش (۴) به نقش مفید کودهای سبز در اصلاح خاک، عوامل کنترل کننده بیولوژیکی و ارقام مقاوم به بیماری را از انتخابهای جدید آللو پاتی در کنترل بیماری و آفات خاکزی اشاره کرده است. در هین راستا (۳)، گزارش کردندکه درخاک دارای نیتروژن زیاد بعد از محصولات لگوم، باعث بهبود تولید NH3 ,HNO2 می شود و میکرو اسکلروتهای قارچ *Verticilium dahliae*را ازبین می برد. تاخیردرکاشت پنبه نیز بطور مؤثری آلودگی به *Rizoctonia.solani* یا اسقرارپنبه راتحت تاثیرقرار می دهد. درگزارش تحقیقات(۷)عامل بیماری پژمردگی ورتیسلیومی را در کاشت پنبه بعد از گندم، سورگم، سویا، و جو کاهش می یابد. همچنین عامل بیماری *R.Solani* درکاشت پنبه بعد از گندم کاهش یافت (۷) . بنابراین آزمایش فوق با هدف دستیابی به ارزشمندی در مورد اثرات کاشت محصول زمستانه مختلف بعنوان تناوب زراعی با پنبه برروی خصوصیات زراعی و همچنین اثرات تشدیدکننده روی عامل بیماری مرگ گیاهچه و ورتیسلیوم، طراحی شد.

مواد وروش ها:

این تحقیق سال ۸۹ - ۱۳۸۸در منطقه پنبه کاری کردکوی (کارکنده) در غرب استان گلستان به صورت اسپلیت پلات در قالب طرح پایه بلوک کامل تصادفی و در چهار تکرار انجام گرفت. تیمارها شامل، محصولات زراعی زمستانه (گندم، باقلا، نخود فرنگی، کلزا و نکاشت محصول) به عنوان عامل اصلی و ارقام پنبه شامل، رقم گلستان (زودرس) و رقم سپید (متوسط رس) به عنوان عامل فرعی انتخاب شدند. تاریخ های کشت پنبه در هر یک از تیمار های آزمایشی به طور همزمان پس از برداشت کل محصولات زمستانه صورت گرفت در هر کرت آزمایشی از عامل اصلی، به دو تیمار عامل فرعی (رقم) تقسیم شد. بلافاصله پس از خروج گیاهچه ها از خاک شمارس درصد سبز بوته ها (۱۵ روزه) اندازه گیری شد و بعد از سبز شدن و مطالعه بیماری مرگ گیاهچه و بررسی اثرات محصول زمستانه در افزایش یا کاهش جمعیت بیماری جهت یکنواختی تراکم بوته در هرکرت آزمایشی واکاری صورت گرفت کلیه یادداشت برداریهای صفات زراعی و بیماری با انتخاب ۱۰ بوته از هر کرت آزمایشی و برداشت محصول از چهار خط وسط پس از حذف یک بوته از طرفین ردیف ها انجام شد. صفات زراعی شامل، وزن تک قوزه و تعداد قوزه(۱۰بوته تصادفی) ، درصد زود رسی، عملکرد چین های برداشت، درصد بیماری مرگ گیاهچه، درصد و شدت بیماری پژمردگی ورتیسلیومی اندازه گیری و محاسبه شد و با یکدیگر مورد مقایسه و ارزیابی قرار گرفت.مساحت هر کرت آزمایش ۱۷/۹۲ متر مربع بود و عملکرد وش حاصله به کیلو گرم در هکتار تبدیل شد.تجزیه واریانس با نرم افزار آماریSAS صورت گرفت و مقایسه میانگین داده ها با آزمون چند دامنه دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

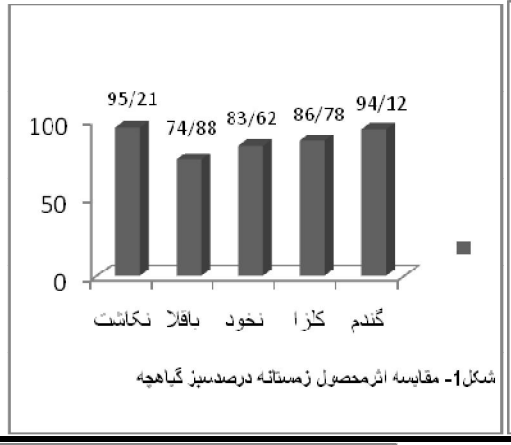
نتایج و بحث:

نتایج تجزیه واریانس صفات حاکی تاثیر معنی دار محصول زمستانه و رقم برصفات عملکرد،اجزای عملکرد و بیماری‌ها بود (جدول۱). نتایج مقایسه میانگین نشان داد که، بین تیمارها از نظر تعداد قوزه (تیمار نکاشت) با میانگین (۱۶/۳۶) ،وزن قوزه تیمارهای کشت پنبه بعد از نخود فرنگی، باقلا و نکاشت بترتیب با میانگین وزن قوزه۵/۷۳، ۵/۶۳ و ۵/۲۶ گرم نسبت به تیمار های دوکشتی دیگربرتری معنی داری نشان داد (جدول۲). در چین اول بیشترین عملکرد وش مربوط به کشت پنبه پس از تیمار نکاشت(تک کشتی) با میانگین وش ۴۴۰۲/۱ گرم درکرت بود و از نظر عملکرد وش در هکتار نیز بیشترین عملکرد مربوط به کشت پنبه بعد از تیمار نکاشت با میانگین عملکرد ۳۵۴۵/۳ کیلوگرم در هکتار نسبت به تیمارهای نخودفرنگی و باقلا، با میانگین عملکرد ۳۰۰۵/۸ و ۲۹۶۵/۶ کیلوگرم درهکتار برتری معنی داری نشان داد و همچنین ازنظردرصد زودرسی محصول(چین اول)، کشت پنبه پس از تیمار تک کشتی نکاشت با میانگین زودرسی (۶۸/۸) وکشت پنبه پس ازتیمار گندم وکلزا به ترتیب با میانگین (۶۵/۵۰ و۶۵/۲۵) درصد نسبت به تیمار باقلا و نخودفرنگی با (۶۱/۸۷ و۶۱/۶۲) درصد برتری داشت ولی این برتری از نظر آماری معنی دار نبود. (جدول۲). در نتایج مقایسه میانگین صفات بیماری در سیستم دوکشتی، بیشترین درصد مرگ گیاهچه در تیمار کشت پنبه بعد از نخودفرنگی (۱۶/۳۷) درصد و کمترین درتیمارگندم با میانگین (۶/۲۵) درصد همچنین درصد پژمردگی ورتیسلیومی(۱۰/۱۸) ، در کشت پنبه بعد از کلزا و (۵/۷۵) درصد تیمار پنبه بعد از گندم دارای برتری معنی داری بود. (جدول۳). درتیمار کشت پنبه بعد از نخود با میانگین (۱/۰۱) درصد نسبت به تیمار کشت پنبه بعد از گندم، باقلا و کلزا به ترتیب با میانگین (۰/۵۷، ۰/۵۸و ۰/۶۸) درصد شدت بیماری اختلاف معنی داری نشان داد (جدول۳) .

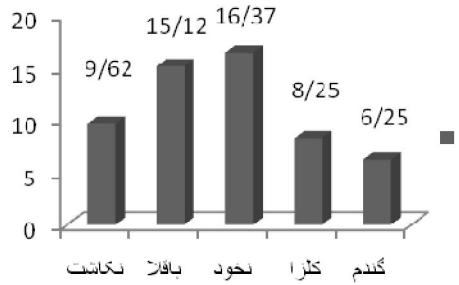
جدول ۱- تجزیه واریانس صفات عملکرد، اجزاء عملکرد و بیماری مورد مطالعه.

منابع تغییرات		میانگین مربعات (MS)							
	درجه ازادی	تعدادقوزه	وزن قوزه	عملکرد چین اوّل	عملکرد کل	٪زود رسی	٪مرگ گیاهچه	٪ورتیسلیوم	شدت ورتیسلیوم
تکرار	۳	۵/۲۳۰ ns	۰/۵۱۸ ns	۲۷۰۴۲۳/۴۲ ns	۲۳۳۴۴۸/۴۸ ns	۷۶/۰۸۶ ns	۸۱/۳۵۸ ns	۶/۹۹۴ ns	۰/۰۸۵ ns
محصول زمستانه	۴	۱۳/۵۸۰ **	۲/۹۸۹ **	۳۱۶۸۰۰۸/۲۰ **	۶۵۱۴۷۷۰/۹۱ **	۷۰/۲۹۶ ns	۱۵۵/۶۸۷*	۱۰۹/۳۵۰**	۰/۵۶۹ **
خطا A	۱۲	۰/۲۰۳	۰/۳۱۰	۳۷۷۳۷۸/۲۱	۲۶۴۳۹۷/۸۶	۳۹/۸۹۰	۴۱/۵۸۷	۴/۰۶۰	۰/۰۳۶
رقم	۱	۵۰/۴۴۵ **	۱/۸۹۰ *	۱۷۱۱۵۷۴۳/۰۶ **	۴۳۵۵۰۷۶/۰۵ **	۱۷۰۰/۴۱۶ **	۵/۶۲۵ ns	۳/۵۴۰ ns	۰/۰۰۹ ns
محصول زمستانه * رقم	۴	۰/۳۷۴ ns	۰/۱۵۱ ns	۲۹۳۴۷۰/۹۰ ns	۸۷۵۳۹/۰۶۳ ns	۱۹/۷۷۸ ns	۱۰/۶۸۷ ns	۱/۴۳۳ ns	۰/۱۷۷ ns
خطا	۱۵	۰/۲۱۰	۰/۳۳۷	۱۹۲۱۵۳/۱۲	۸۱۰۶۹/۴۲	۵۵/۹۳۴	۶/۴۰۸۳	۲/۰۸۲	۰/۰۲۸
ضریب تغییرات	-	۳/۲۶۰	۱۱/۳۴۵	۱۳/۰۴۸	۵/۵۹۰	۱۱/ ۵۷۵	۲۲/۷۵۴	۱۸/۰۹۰	۲۱/۰۳۲

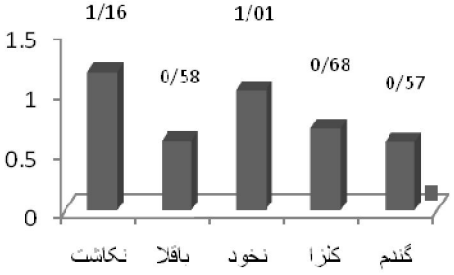
**و*: به ترتیب معنی دار در سطح احتمال یک درصد وپنج درصد. ns : غیر معنی دار.



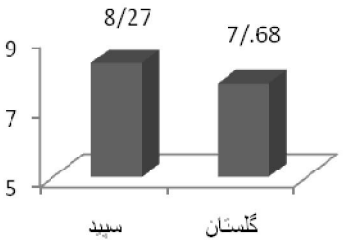
شکل1- مقایسه اثرمحصول زمستانه درصدسبز گیاهچه



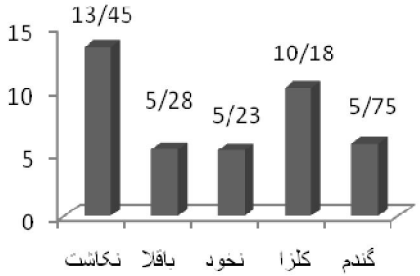
شکل 2- مقایسه اثرمحصول زمستانه بر درصد بیماری مرگ گیاهچه



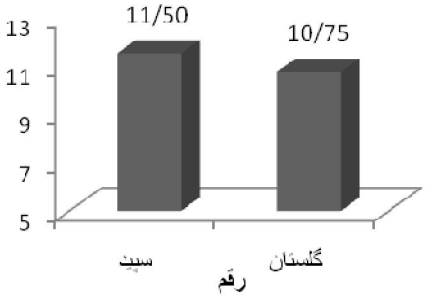
شکل 4- مقایسه اثرمحصول زمستانه بر شدت بیماری پژمردگی ورتیسلیوم



شکل 6- مقایسه اثررقم بردرصدبیماری پژمردگی ورتیسلیوم



شکل3- مقایسه اثرمحصول زمستانه بردرصد بیماری پژمردگی ورتیسلیوم



شکل 5- مقایسه اثر رقم بردرصد بیماری مرگ گیاهچه

جدول ۲ - مقایسه میانگین اثر محصولات زمستانه برصفات عملکرد و اجزای عملکرد.

تیماراصلی	تعدادقوزه	وزن قوزه (گرم)	عملکرد چین اوّل (گرم/کرت)	عملکردچین دوم (گرم/کرت)	عملکرد کل (گرم/کرت)	زود رسی (درصد)
نکاشت	۱۶/۳۶۸ a	۵/۲۶۵ a	۴۴۰۲/۱ a	۱۹۵۶/۴ a	۶۳۴۶/۱ a	۶۹/۳۶ a
باقلا	۱۳/۷۷۸ b	۵/۶۳۷ a	۳۳۶۶/۴ b	۱۹۷۰/۹ a	۵۳۸۰/۳ b	۶۱/۸۷ b
نخود فرنگی	۱۳/۴۹۲ b	۵/۷۳۷ a	۳۳۰۱/۳ b	۲۰۰۷/۲ a	۵۳۰۸/۵ b	۶۱/۶۲ b
کلزا	۱۳/۲۱ b	۴/۳۷۵ b	۲۸۳۱/۱ b	۱۴۲۲/۳ b	۴۱۲۸/۴ c	۶۸/۵۷ ab
گندم	۱۳/۴۸۰ b	۴/۶۰۰ b	۲۸۹۶/۵ b	۱۴۰۴/۴ b	۴۳۰۰/۷ c	۶۵/۵۰ ab

.حروف غیر مشابه نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح احتمال۵ درصد.

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر رقم برصفات عملکرد و اجزای عملکرد.

تیمارموردآزمایش	تعدادقوزه	وزن قوزه (گرم)	عملکرد چین اوّل (گرم درکرت)	عملکردچین دوم (گرم درکرت)	عملکرد کل (گرم درکرت)	زود رسی (٪)
سپید(متوسط رس)	۱۲/۹۴ b	۵ /۳۴ a	۲۸۲۱/۵ b	۱۹۷۹/۱ a	۴۷۶۲/۸۳ b	۵۸ /۰۹ b
گلستان(زودرس)	۱۵ /۱۸ a	۴/۹۰ b	۳۸۹۷/۴ a	۱۵۲۵ /۴ b	۵۴۲۲/۷۶ a	۷۱/۱۳ a

.حروف غیر مشابه نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح احتمال۵ درصدباآزمون دانکن بین تیمارهای مورد آزمایش است.

منابع

1. Buntin, G.D., Raymer, P. L. Bednarz, C.W. Philips, D.V. and Baird, R.E. 2002. Winter crop, tillage and planting date effects on Double-crop cotton. Agron. J. 94: 273-280.
2. Boquet, D.J, and E.L., Clawson. 2009. Cotton planting date, yield, seedling survival, and plant growth. Agron. J. 101:1123-1130.
3. Lazarovits, G.M., Tenuta, and Conn, K.L. 2000. Utilization of high nitrogen and swine manure amendments for control of soil-borne diseases: Efficacy and mode of action.proc.5 int.symp.chem.& Non-chem.soil & subs. Disinfest.59-64.
4. Mattner, S.W. 2006. Ther role of allelopathy in the control of soilborn diseases. Second Australasian soilborne diseases. Paper presented at world cotton research.Conference,February14-17,1994,Australia.
5. Pegg, G.F. 2002. Verticillium Wilts. CAB Publishing. 576 p.
6. Schnathorst.W.C. 1981. Life cycle and epidemiology of Verticillium. Pages 81-111 in : Fungal Wilt Diseases of Plants. M.E.Mace.، A.A.Bell and C.H. Beckman. Academic Press. New York.
7. Wessling , W. H., Eickhoff, W. D. and Slater,G. A. 1977. Short season cotton. cotton Inc. Agro-Industirial rep. 4:3-8.
8. Wheeler, T. A., Gannaway, T.R. Kaufman, H.W. Dever, J.K. Mertley, J.C. and Keeling, W. 1997. Influence of tillage, seed quality and fungicides seed treatment on cotton emergence and yield. J. Product. Agric. 10: 394 - 400.

ارزیابی بیماری لکه خرمایی در مزارع گندم شرق استان گلستان

مهری ضیغمی[۱]*، محمدعلی آقاجانی[۲]

[۱] - *ارشد بیماری شناسی گیاهی و مروج کشاورزی جهاد کشاورزی شهرستان گالیکش*

۲- *عضو هیئت علمی بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان، گرگان*

* *نویسنده مسئول : mmzeighami@gmail.com*

چکیده:

از مفاهیم مهم در ارزیابی روند بیماری‌ها، رابطه‌ی میان وقوع و شدت بیماری است که در فهم ارتباط نرخ افزایش بیماری در ارقام با سطوح مختلف مقاومت، موثر است. در این تحقیق روابط آماری میان مقادیر وقوع و شدت بیماری لکه خرمایی گندم (*Drechslera tritici-repentis*) به عنوان متغیر مهم ارزیابی بیماری در ۳۰ مزرعه در شرق استان گلستان در سال زراعی ۸۹-۸۸، به صورت مدل خام (مدل خطی) و تبدیل‌شده (با سه روش مختلف لگاریتم طبیعی، مکمل لگاریتم لگاریتم و ریشه مربع)، با استفاده از تجزیه‌ی رگرسیون خطی مورد ارزیابی قرار گرفت. مدل‌های نهایی بر اساس ضریب تبیین (R^2)، میانگین مربعات خطا (MSE) و نمودار باقیمانده‌های تجزیه‌ی رگرسیون داده‌های خام و مجدداً تبدیل‌شده ساخته شدند. بر اساس این آماره‌ها، مدل آلومتری (تبدیل لگاریتم طبیعی) با ایجاد برازش با داده‌های ۲۵ مزرعه، بهترین مدل بود و بر اساس صحت پیش‌بینی (تبدیل برگشتی داده‌ها) نیز، مدل آلومتری بهترین مدل در سطح مزارع انتخاب گردید. با توجه به مدل مذکور در مناطق مورد بررسی هر یک درصد افزایش در میزان وقوع، معادل ۰.۲ درصد شدت بیماری است بنابراین روشن است که در ارزیابی بیماری اندازه گیری میزان وقوع بیماری به‌تنهایی، نمی‌تواند تصویر واقعی از مقدار بیماری در مزرعه داشته باشد.

واژگان کلیدی: گندم، *Drechslera tritici-repentis*، استان گلستان، رابطه وقوع و شدت، تجزیه رگرسیون

مقدمه

بیماری لکه خرمایی ناشی از قارچ *Drechslera tritici-repentis*(Died) Shoemaker ، از مهمترین و خسارت‌زاترین بیماری‌های گندم در نقاط مختلف دنیاست و به‌خصوص در مناطق با سیستم کشت حفاظتی، حایز اهمیت است. این بیماری اولین بار در ایالات متحده آمریکا در سال ۱۹۴۰ شناسایی گردید و پس از آن در سایر مناطق به طور پیوسته وقوع و شدت آن افزایش یافت(۹، ۱۹)، که این روند افزایش به عواملی نظیر رقم گندم و توسعه‌ی سیستم کشت حفاظتی در مزارع که منجر به ازدیاد زادمایه در مدت زمان بیشتری بر روی کاه و کلش میگردد، بستگی دارد(۸). در سال‌های اخیر این بیماری به عنوان یک بیماری مخرب بالقوه در مزارع گندم شناخته شده است(۱۷).

بر اساس گزارش CAB، این بیماری در سال ۱۳۷۱ از ایران گزارش شده است(۷). فروتن و همکاران سال ۱۳۷۴ بیماری را در مزارع گندم استان مازندران و در سال ۱۳۸۹ شیوع گسترده‌ی آن را بر روی تمام لاینها و ارقام تجاری آن استان گزارش نمودند(۴، ۵). در سال زراعی ۸۵-۸۴، دهقان ظهور و گسترش بیماری لکه خرمایی گندم در استان گلستان و نیز ارزیابی

مقاومت ژنوتیپ‌های مختلف گندم نسبت به آن را مورد بررسی قرار داد که بررسی‌ها آلوده بودن ۶۵ درصد نمونه‌ها به این بیماری را نشان داد(۳).

مهمترین معیارها در تخمین خسارت بیماری، تعیین میزان وقوع (تعداد واحدهای آلوده نسبت به کل) و شدت (نسبت علایم قابل مشاهده در یک واحد گیاهی) بیماری است. در واقع ارزیابی بیماری به صورت کمّی و یا کیفی انجام می‌گیرد. کمیّت بیماری در یک گیاه (یا مزرعه)، به عنوان مقدار بیماری[1] نامیده می‌شود. این کمیّت در گذشته با شدت بیماری به صورت مترادف مورد استفاده قرار می‌گرفت(۱۵). اما مک رابرتز و همکاران از آن به عنوان یک مفهوم کلّی که بیان‌کننده مقدار بیماری است، یاد کردند(۱۰). مهم‌ترین کمیّت‌های مرتبط به مقدار بیماری، میزان وقوع و شدت بیماری می‌باشند. میزان وقوع (I)، به تعداد واحدهای گیاهی دارای علایم قابل مشاهده بیماری اطلاق می‌گردد و به دو صورت نسبت (صفر تا یک) یا درصد (صفر تا ۱۰۰) واحدهای بیمار در یک جمعیت بیان می‌شود. به بیان ساده‌تر، این که بوته، بیمار شده یا فاقد بیماری است(۷، ۱۲). شدت بیماری (S)، مساحت یا حجم بافت گیاهی بیمار را نسبت به مساحت یا حجم کل بافت‌های گیاهی بیان می‌کند(۱۴، ۱۸). اندازه‌گیری میزان وقوع بسیار آسان‌تر از شدت است و مقادیر آن، اغلب صحیح‌تر، دقیق‌تر و تکرارپذیرتر از اندازه‌گیری شدت بیماری می‌باشد(۱۰). اندازه‌گیری شدت بیماری تحت شرایط مزرعه، کاری پرزحمت، پرهزینه و وقت‌گیر بوده و ممکن است تحت تاثیر تمایلات شخصی و خطای آزمایش قرار گیرد. این کمیّت با استفاده از روش‌های نظیر ارزیابی بصری، سنجش از دور، روش الکترونیکی و روش‌های غیرمستقیم اندازه‌گیری می‌شود(۱۲). علی‌رغم ایرادهای وارد بر اندازه‌گیری شدت، این متغیر در بیان مقدار بیماری موجود در مزرعه جهت محاسبه خسارت بیماری و تاثیر تیمارهای مختلف مدیریت بیماری، در مقایسه با میزان وقوع، از اهمیت بسیار بالاتری برخوردار می‌باشد. از آن‌جایی که میزان وقوع بسیار آسان‌تر و قابل اعتمادتر از شدت ارزیابی می‌باشد، از طرفی، شدت، کمیّت مفیدتری نسبت به وقوع در بررسی‌های خاص است، یک رابطه‌ی کمّی بین میزان وقوع و شدت بیماری می‌تواند ارزیابی مقدار بیماری را در مواردی که داده‌های صحیح و قابل اعتماد مورد نیاز می‌باشد، بسیار آسان نماید(۱۴، ۱۵). مدل‌های کمّی روابط بین میزان وقوع و شدت بیماری در مورد بسیاری از بیماری‌ها مورد بررسی قرار گرفته است(۱، ۲، ۶، ۱۱، ۱۳، ۱۸، ۱۹، ۲۰). این روابط در پاتوسیستم‌های مختلف متفاوت بوده، ممکن است به وسیله‌ی رقم یا اندام گیاهی ارزیابی شده، زمان ارزیابی بیماری طی همه‌گیری، دوره‌ی زمانی فصل رشد، مکان و تیمار اعمال شده در کرت‌ها تحت تاثیر قرار گیرند(۱۸). بنابراین استفاده از این مدل‌ها جهت کمّی کردن و درک روابط بین میزان وقوع و شدت بیماری‌های گیاهی قبل از کاربرد آن‌ها در طیف گسترده‌ای از زمان و مکان ضروری به نظر می‌رسد.

تاکنون در مورد ارزیابی بیماری لکه خرمایی در مزرعه با تعیین روابط بین میزان وقوع و شدت مطالعاتی صورت نگرفته است. لذا این تحقیق با هدف تعیین رابطه کمّی بین این دو کمیّت و ارزیابی صحیح مقدار بیماری در تشریح روند اپیدمیولوژی بیماری در شرق استان گلستان به اجرا درآمد.

روش بررسی

در این تحقیق داده‌های مورد استفاده، در سال زراعی ۸۹-۸۸ از ۳۰ مزرعه گندم (رقم N8019) در سه منطقه مختلف ایمر، آق آباد، مینودشت به ترتیب با سه اقلیم دشت، میان دشت و کوهپایه در شرق استان گلستان به دست آمد. پس از ظهور بیماری، طی بازدیدهای منظم هفتگی مقدار بیماری برای هر مزرعه با ثبت مرحله‌ی رشد گیاه (بر اساس سیستم BBCH) و میزان شدت بیماری، طبق مقیاس دورقمی تعیین شدت بیماری‌های برگی (۹۹-۰۰)، توسعه‌یافته یادداشت‌برداری گردید(۱۶). برای هر ارزیابی درصد شدت و میزان وقوع بیماری بر اساس فرمول زیر محاسبه شد. در محاسبه شدت بیماری (D_1) نشان‌دهنده‌ی روند توسعه بیماری در طول سایه‌انداز گیاه از سطح زمین و (D_2)، میزان شدت بیماری بر روی سطح برگ آلوده است و محاسبه وقوع بیماری در فرمول ذیل شامل بوته‌های بیمار (x) تقسیم بر تعداد کل بوته‌های ارزیابی شده (*N*) می‌باشد:

$$\% \text{ Severity} = (D_1/9) \times (D_2/9) \times 100 \qquad (۱)$$

[1] Disease Intensity

$$I = \Sigma x/N \qquad (۲)$$

جهت تعیین روند کلی داده‌های وقوع و شدت بیماری از رگرسیون خطی برای تعیین تابع ریاضی رابطه بین دو متغیر یاد شده، استفاده گردید. تبدیل‌های معمولی در منابع شامل لگاریتم طبیعی[1] ($\ln(S) = \beta \ln(I) + \ln(\alpha)$)، ریشه‌ی مربع[2] ($(S)= \beta \text{ Sqrt } (I) + \alpha$) و تبدیل مکمل لگاریتم لگاریتم[3] ($\ln [-\ln(1-S)] = \beta \ln [-\ln(1-I)] + \alpha$)، در کنار رابطه‌ی خطی ساده ($S = \beta.I + \alpha$) جهت دستیابی به بهترین رابطه‌ی خطی بین وقوع و شدت در هر مزرعه و شهرستان انجام گردید(۱۱، ۱۵). مقایسه‌ی مدل‌های با تبدیل‌های مختلف، از نظر نکویی برازش، متغیر وابسته‌ی پیش‌بینی شده، تبدیل برگشتی و آماره‌های مختلف مثل ضریب تبیین(R^{*2}) صورت گرفت. بعد از انتخاب بهترین مدل‌ها، رگرسیون خطی بین داده‌های مشاهده شده و پیش‌بینی شده با استفاده از نرم‌افزار StatGraphics Centurion XV, Version15.2.05 صورت پذیرفت.

نتایج و بحث:

روابط آماری بین مقادیر وقوع و شدت بیماری لکه خرمایی گندم در استان گلستان، به صورت مدل خام (مدل خطی) و تبدیل شده (با سه روش مختلف)، با استفاده از تجزیه‌ی رگرسیون خطی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که مدل آلومتری (تبدیل لگاریتم طبیعی) و خطی و ریشه مربع، ساده‌ترین و دارای بالاترین برازش با داده‌ها بوده که به ترتیب با ۲۵ و ۱۲ و ۱۲ مزرعه، برازش نشان داده‌اند (جدول ۱). بر اساس تعداد مزارع دارای برازش، ضریب تبیین مناسب، انحراف معیار پایین و نمودار باقیمانده‌ها، مدل آلومتری به عنوان بهترین مدل در سطح مزارع انتخاب گردید.

جدول ۱- مناطق یادداشت برداری و تعداد مزارع دارای بهترین برازش با مدل‌های مختلف رابطه وقوع-شدت بیماری لکه خرمایی گندم در شرق استان گلستان

مدل	ایمر	آق آباد	مینودشت	کل
خطی	۱	۱۰	۱	۱۲
آلومتری	۱۰	۶	۹	۲۵
مکمل لگاریتم لگاریتم	۰	۰	۰	۰
ریشه مربع	۵	۴	۳	۱۲

در مرحله بعدی، آنالیز رگرسیون برای هر منطقه انجام گردید. نتایج این مرحله مشابه مرحله‌ی اول (در سطح مزارع) بود و مدل آلومتری توانست در هر سه منطقه بهترین برازش را با داده‌ها فراهم آورد (جدول۲). مدل خطی و ریشه‌ی مربع نیز برازش خوبی با داده‌ها در این مرحله نشان دادند. مدل خطی، پیچیدگی‌های محاسباتی کمتری نسبت به مدل آلومتری دارد اما نمودار باقی‌مانده‌های مدل خطی غالباً دارای الگوی غیرتصادفی بوده و این امر نشان می‌دهد که مدل یاد شده، تمام تنوع مشاهده شده در داده‌ها را بیان نمی‌کند(۱۰)، بنابراین، مدل خطی، با وجود معنی‌دار بودن و داشتن ضریب تبیین بالا، مدل مناسبی برای این داده‌ها نمی‌باشد. نتایج رگرسیون خطی بین مناطق مشخص کرد که اختلاف معنی‌داری میان مدل‌های خطی و آلومتری از نظر پارامتر شیب خط رگرسیون در میان مناطق وجود ندارد و هر سه منطقه در یک گروه آماری قرار می‌گیرند و رگرسیون خطی داده‌های تبدیل برگشتی شده با داده‌های مشاهده شده نشان داد که در مجموع برای داده‌های ثبت شده در ۳۰ مزرعه در این ۳ منطقه در سال زراعی ۹۰-۱۳۸۹، ساده‌ترین و مناسب‌ترین مدل‌ها، مدل‌های آلومتری و خطی و ریشه مربع است (جدول۲).

1 Natural Logarithm (Allometric family)
2 Square root
3 Complementary Log-Log (CLL)

جدول۲- پارامترها و آماره‌های مدل‌های مختلف رابطه وقوع-شدت بیماری لکه خرمایی گندم در مناطق اجرای تحقیق

منطقه	مدل	عرض از مبدا	شیب	ضریب تبیین (درصد)	انحراف معیار
ایمر	آلومتری	۱/۱۴	۰/۳۲	۳۴/۶	۰/۷۷
	خطی	۲	۰/۲	۲۹/۴۵	۱۴/۴
	ریشه مربع	۰/۷۶	۰/۳۵	۵۳/۸۴	۱/۴۵
آق آباد	آلومتری	۱/۱۲	۰/۳۱	۳۸/۵۹	۰/۷۸
	خطی	۰/۶۶	۰/۱۹	۳۷/۰۷	۱۱/۶
	ریشه مربع	۰/۲۹	۰/۳۷	۶۵/۵۹	۱/۲۵
مینودشت	آلومتری	۱/۰۷	۰/۳۲	۴۰/۴۹	۰/۸۵
	خطی	۱/۵۸	۰/۱۷	۳۰/۸۱	۱۱/۴۵
	ریشه مربع	۰/۵۵	۰/۳۵	۵۹	۱/۲۴

نتایج بررسی حاصل نشان میدهد که ارزش‌های میزان وقوع بیماری همیشه با ارزش‌های شدت بیماری برابر نمی‌باشند. در هر سه منطقه هر یک درصد افزایش در میزان وقوع، معادل ۰/۲ درصد شدت بیماری را افزایش خواهد داد(جدول۳). لذا در ارزیابی بیماری استفاده از داده‌های وقوع به تنهایی، از صحت و اعتبار لازم برخوردار نخواهد بود.

جدول۳- مدل‌های نهایی وقوع- شدت بیماری لکه خرمایی گندم در شرق استان گلستان بر اساس رگرسیون خطی داده‌های تبدیل شده و تبدیل برگشتی شده

منطقه	مدل	معادله	ضریب تبیین (درصد)	انحراف معیار	ضریب تبیین (درصد)تبدیل برگشتی	انحراف معیار تبدیل برگشتی
ایمر	آلومتری	$S = ۳/۱\ I^{۰/۳}$	۳۴/۶	۰/۷۷	۳۵/۴۱	۰/۷۸
	خطی	$S = (۰/۲)\ I + ۲$	۲۹/۴۵	۱۴/۴	۲۹/۴۵	۱۴/۳۸
	ریشه مربع	$SQRT(S) = ۰/۷+۰/۳۷\times SQRT(I)$	۵۳/۸	۱/۴۵	۵۰/۴۱	۱/۵۱
آق آباد	آلومتری	$S = ۳/۱\ I^{۰/۳}$	۳۸/۵۹	۰/۷۸	۴۰/۵	۰/۷۷
	خطی	$S = (۰/۲)\ I + ۰/۷$	۳۷/۰۷	۱۱/۶	۳۷/۰۷	۱۱/۶۱
	ریشه مربع	$SQRT(S) = ۰/۳+۰/۳۵\times SQRT(I)$	۶۵/۶	۱/۲۵	۶۳/۸	۱/۲۸
مینودشت	آلومتری	$S = ۳/۱\ I^{۰/۳}$	۴۰/۴۹	۰/۸۵	۴۰/۴۹	۰/۸۵
	خطی	$S = (۰/۲)\ I + ۱/۶$	۳۰/۸۱	۱۱/۵۴	۳۰/۸۱	۱۱/۵۴
	ریشه مربع	$SQRT(S) = ۰/۵+۰/۳۴\times SQRT(I)$	۵۹	۱/۲۴	۵۴/۱۳	۱/۳۲

منابع

۱- آقاجانی، م. ع.، صفایی، ن. و علیزاده، ع. ۱۳۸۷. رابطه بین شدت و وقوع در بیماری پوسیدگی اسکلروتینیای ساقه کلزا. خلاصه مقالات هجدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران.ص ۵۳.

۲- توکلی، ف.، آقاجانی، م. ع.، اعتباریان، ح. ر. و رستمی، م. ۱۳۸۹. رابطه وقوع وشدت بیماری سوختگی غلاف برنج. خلاصه مقالات نوزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. ص ۳۷۴.

۳- دهقان، م. ع. ۱۳۸۹. بررسی ظهور و گسترش بیماری لکه خرمایی گندم در استان گلستان و ارزیابی مقاومت ژنوتیپ‌های مختلف گندم نسبت به آن. خلاصه مقالات نوزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران.ص۲۵۷

۴- فروتن، ع.، ابطالی، ی.، هاتم نژاد، س. و فدایی،ا. ۱۳۸۹. شیوع لکه خرمایی گندم در مازندران. خلاصه مقالات نوزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. ص۳۰۴.

۵- فروتن، ع.، دلیلی، ع.، و شایگان،ج،۱۳۷۴. جداسازی *Drechslera tritic –repentis* از برگهای آلوده گندم در مازندران. خلاصه مقالات دوازدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، کرج. ص۴۵.

۶- منتظریان،ا.، آقاجانی، م. ع. و اسکندری، ع. ۱۳۸۹. بررسی روابط وقوع- شدت بیماری پوسیدگی ذغالی سویا. خلاصه مقالات نوزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. ص۳۴۳.

7- Anonymous.2005. Pyrenophora tritici-repentis. CAB international Crop Protection Compendium. Kew, England.

8- Bankina, B., 2005. Tan spot- the most harmful wheat leaf disease in Latvia. Acta Agrobotanica. 58: 5-10.

9- Bankina, B., Prlekule, I. 2011. A review of tan spot research in the Baltic countries: occurrence, biology and possibilities of control. Agriculture, vol. 98. No. 1.p 3-10.

10- Campbell, c. l., Madden, l. V. 1990. Introduction to Plant Disease Epidemiology John Wiley & Sons, New York. 161-187.

11- Cardoso, J. E., Santos, A. A., Rossetti, A. G., and Vidal, J. C., 2004. Relationship between incidence and severity of cashew gummosis in semiarid north-eastern Brazil. Plant Pathology. 53: 363-367.

12- Hughes, G., Mcroberts, N., Madden, L. V., and Gotwald, T. R. 1997. Relationships between disease incidence at two levels in a spatial hierarchy. Phytopathology 87: 542-550.

13- Mcrobert, N. Hughes, G., and Madden, L. V. 2003. The theoretical basis and practical application of relationships between different disease intensity measurements in plants. Annals of Applied Biology 142: 191-211.

14- Nutter, F. W. J. 2001. Disease assessment. PP312-233, In: Encyclopedia of plant pathology, O. C. Maloy and T. D. Murray, eds. John Wiley & Sons, Inc..

15- Paul, P. A., Lipps, P. E. and Madden, L. V. 2005. Relationship between visual estimates of fusarium head blight intensity and deoxynivalenol accumulation in harvested wheat grian: A meta-analysis. Phytopathology, 95: 1225-1236.

16- Prescott, J.M., P.A. Burnett, E.E. Saari, J. Ransom, J. Bowman, W. de Milliano, R.P. Singh and G. Bekele. 1986. Wheat diseases and pests. A guide for field identification. Mexico, D.F.: CIMMYT.

17- Ronis, A., Semaskiene, R.2005. Development of tan spot (Pyrenophora tritici-repentis) in winter wheat under field conditions.Agronomy Research. 4: 331-334.

18- Seem, R. C. 1984. Disease incidence and severity relationships. Annual Review of Phytopathology, 22: 133-150.

19- Wilocquet, L., Fernadez, L., and Savary, S. 2000. Effect of various crop establishment methods practiced by Asian farmers on epidemics of rice sheath blight caused by Rhizoctonia solani. Plant pathology, 49: 346-354.

20- Wolf, E. D., Effertz, R. J., Ali, S., Francl, L. J.,1998. Vistas of tan spot research. Canadian Jornal of Plant Pathology. 20: 349-370.

۲بررسی خواص ضد باکتریایی اسانس گیاه نعناع فلفلی (*Mentha piperita*) بر روی باکتری *Bacillus subtilis*

خسرو چهری[۱،*]، ماریا حیدری نیا[۲]
[۱]گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی، کرمانشاه
[۲]گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد واحد سنندج، کردستان
* نویسنده مسئول: khchehri@gmail.com

چکیده

گیاه نعناع فلفلی با نام علمی *Mentha piperita* از جمله گیاهان دارویی، خوراکی و معطری است که اسانس آن مصارف دارویی، غذایی، بهداشتی و آرایشی فراوانی دارد. اسانس گیاه نعناع فلفلی دارای خواص ضد باکتریایی موثری است و می‌توان آن‌را به همراه داروهای شیمیایی مورد استفاده قرار داد. در این پژوهش، خاصیت ضدمیکروبی اسانس استخراج شده از گیاه نعنا فلفلی مورد بررسی قرارگرفت و اثر ضد باکتریایی آن بر روی باکتری *Bacillus subtilis* با روش انتشار در تشتک کشت بررسی گردید. نتایج به دست آمده نشان داد که حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) این گیاه روی باکتری *B. sutilis* برابر با ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. نتایج به دست آمده در این تحقیق می‌تواند برای تهیه ترکیبات مفید گیاهی که آلوده‌کننده محیط زیست نیستند به کار برده شود.

واژگان کلیدی: اسانس گیاهی، MIC، خواص ضد باکتریایی، *Bacillus subtilis*

مقدمه

در قرن حاضر تحقیقات گسترده‌ای بر روی گیاهان دارویی انجام پذیرفته به طوری که در حال حاضر حدود یک سوم داروهای مورد استفاده در جوامع بشری را داروهایی با منشاء طبیعی و گیاهی تشکیل می دهد (۱). اسانس‌ها به عنوان متابولیت‌های ثانویه برخی از گیاهان دارویی در جلوگیری از رشد باکتری‌ها و قارچ‌ها موثر بوده و جایگزین طبیعی برای آنتی بیوتیک‌ها هستند. گیاه نعناع فلفلی از جمله گیاهان دارویی است که به واسطه اثرات دارویی متعدد از دیرباز توجه محققان را به خود معطوف داشته است. مصرف این گیاه در اشکال مختلف غذایی، بهداشتی و دارویی، سبب امتیاز این گیاه نسبت به سایر گیاهان دارویی شده است (۲). این گیاه نتیجه هماوردی بین دو گونه *Mentha aquatic* و *Mentha spicata* است (۳). اسانس نعناع فلفلی خواص ضد باکتریایی، ضد قارچی، ضد میکروبی، ضد عفونی کنندگی، ضد التهاب ، ضدخارش دارد و به عنوان یک داروی معطر ضد نفخ کاربرد وسیع دارد (۴). اسانس گیاه نعناع فلفلی که در آغاز مرحله گلدهی از قسمت های هوایی به دست می آید حاوی حداقل ۴۴ درصد منتول، ۱۵ تا ۳۰ درصد منتون و ۵ درصد استر به علاوه انواع ترپنوئیدها

است. سایر ترکیباتی که در اسانس یافت می شوند شامل فلاونوییدها (۱۲٪)، پلی فنل های پلیمریزه شده (۱۹٪)، کاروتن، توکوفرول، بتایین و کولین می باشد (۵).

B. subtilis جزء باکتری‌های گرم مثبت، دارای اسپور، هوازی و میله‌ای شکل است که در اغلب محیط‌های معمولی آزمایشگاه رشد می‌کند (۶). این باکتری به شدّت مستعد تغییرات ژنتیکی است و به طور گسترده به عنوان میکروارگانیسم مدل در مطالعات آزمایشگاهی استفاده می شود (۷). *B. subtilis* گاهی به عنوان عامل عفونت چشمی معرفی شده است و در صورت رشد و تکثیر در ماده غذایی، توکسین مقاوم به حرارت تولید می کند که باعث مسمومیت غذایی در انسان می شود (۸). *B. subtilis* عامل بیماری در افرادی شناخته شده است که به شدت دچادر نقص سیستم ایمنی هستند و بالعکس در افراد سالم می‌توان از آن به عنوان پروبیوتیک استفاده کرد (۹).

مواد و روش ها

تهیه مواد گیاهی و استخراج اسانس

بذرهای گیاه نعناع فلفلی از پژوهشکده گیاهان دارویی دانشگاه رازی کرمانشاه تهیه گردید و در گلخانه کشت گردید. اندام‌های هوایی گیاه نعناع فلفلی، پس از رشد کافی و قبل از مرحله گلدهی برداشت و به آزمایشگاه منتقل گردیدند. اندام‌های هوایی گیاه نعناع فلفلی بلافاصله پس از جمع‌آوری، تحت شرایط مناسب و دور از نور خورشید و رطوبت خشک گردید. برای استخراج روغن‌های اسانسی گیاه نعناع فلفلی، از روش تقطیر با آب و از دستگاه اسانس‌گیری کلونجر استفاده شد. در هر بار اسانس‌گیری ۵۰ گرم پودر گیاه خرد شده استفاده گردید. استخراج اسانس به مدت ۴ ساعت انجام گرفت. اسانس بدست آمده به وسیله سولفات سدیم خشک، آبگیری و در شیشه های تیره در دمای ۴ درجه سلسیوس در درون یخچال نگهداری شد.

بررسی فعالیت ضد باکتریایی اسانس نعناع فلفلی با روش دیسک دیفیوژن

باکتری *B. subtilis*(RaziBs1) از کلکسیون میکروبیولوژی گروه زیست شناسی دانشگاه رازی کرمانشاه تهیه گردید. برای تولید زادمایه، باکتری تجدید کشت می‌شود. بعد از کشت باکتری روی محیط کشت نوترینت آگار، پلیت های کشت داده شده در داخل انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده می‌شوند. برای تعیین خاصیت ضد باکتریایی به روش دیسک دیفیوژن، محیط کشت مولر هینتون آگار[1] استریل تهیه می‌شود. در این پژوهش جهت بررسی فعالیت ضد باکتریایی، اسانس استخراج شده در توئین ۲۰ رقیق شده و غلظت های ۱/۵ ، ۲، ۲/۵، ۳ و ۴ میلی گرم بر میلی لیتر از آن تهیه شد. از نمونه باکتریایی، سوسپانسیون‌هایی با رقت ۵/. مک فارلند در سرم فیزیولوژی استریل تهیه شد. بعد از تهیه سوسپانسیون میکروبی، درکنار شعله در تشتک را برداشته و با سوآپ آغشته به سوسپانسیون میکروبی روی محیط کشت مولر هینتون آگار، به صورت چمنی کشت داده‌شد. چند دقیقه بعد از کشت، دیسک های کاغذ صافی آغشته به غلظت‌های مشخص از اسانس نعناع فلفلی را با استفاده از پنس استریل بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار آلوده به باکتری قرار داده‌شد. سپس، در تشتک‌ها را بسته و به مدت ۲۴ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ در جه سانتی گراد قرار گرفت. بعد از مدت زمان انکو باسیون تشتک‌ها مورد برسی قرار گرفتند.

نتایج و بحث

نتایج بدست آمده از بررسی حداقل غلظت بازدارندگی کامل (MIC) اسانس گیاه نعناع فلفلی بر روی *B. subtilis* نشان داد که بطور کلی با افزایش غلظت اسانس تا میزان ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر میزان فعالیت ضدباکتریایی بطور کامل افزایش یافت و حداقل غلظت بازدارندگی ۳ میلی‌گرم بر میلی لیتر تعیین شد. همه آزمایشات در ۳ تکرار انجام شد. همچنین میانگین قطر

[1] . Muller–Hinton Agar

هاله بازدارنده بر اساس روش تست هاله بررسی شد و نتایج بدست آمده نشان داد در غلظت ۳ میلی گرم بر میلی لیتر اسانس نعنا فلفلی خاصیت ضد باکتریایی و مهار کنندگی کامل روی *B. subtilis* دارد (جدول ۱).

اسانس نعناع فلفلی دارای فعالیت ضد میکروبی علیه ۲۱ میکروارگانیسم بیمارگر است و به‌شدت از رشد میکروارگانیسم‌های بیمارگر جلوگیری می‌کند و منتول مسئول خواص ضدمیکروبی شناخته شده‌است (۵ و ۱۰). با توجه به نتیجه تحقیق حاضر و مطالعه تحقیقات سایر محققین، به علت خواص ضد میکروبی قوی اسانس این گیاه ، می‌توان برخی از نمونه های بیماریزای باکتریایی را کنترل کرد و به ساخت داروهای مناسب با منشأ گیاهی و عوارض جانبی بسیار کمتر امیدوار بود. همچنین، می-توان از اسانس این گیاه در مواد غذایی به عنوان یک ترکیب ضد میکروبی طبیعی به جای مواد نگهدارنده مصنوعی استفاده کرد.

جدول۱- نتایج بدست آمده از بررسی حداقل غلظت بازدارندگی کامل (MIC) اسانس نعناع فلفلی بر *B. subtilis* به روش تست هاله

اسانس	غلظ (میلی گرم بر میلی لیتر)	میانگین قطر هاله بازدارنده اندازه گیری شده (میلی متر)*a**
	1.5	[a]0±0
نعناع فلفلی	2	[b]8.50 ± 0.25
	2.5	[c]15.50 ± 0.25
	3	[d]24.67 ± 0.57
	4	[d]25.53 ± 0.66

*a قطر هاله بازدارنده اندازه گیری شده در هر تیمار مربوط به ۳ تکرار است.

** حروف غیر متشابه بیانگر اختلاف معنی دار در سطح p≤%5 می باشد.

منابع

1. Celiktas, O.Y., Kocabas, E.H., Bedir, E., Sukan, F.V., Ozek, T., Baser, K. 2007. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of Rosmarinus officinalis, depending on location and seasonal variations. Food Chemistry.100(2): 553-559.
2. Fadaei, S., Abroumand, A.P., Sharifan, A., Larijani, K. 2001. Evaluation of antimicrobial activity of *Mentha piperita* L. essential oil and its comparison with sodium benzoate. Food Technilogy and Nutrition. 8: 34-41.
3. Abdolmaleki, M., Bahraminejad, S., Salari, M., Abbasi, S., Panjeke, N. 2011. Antifungal activity of peppermint (*Mentha piperita* L.) on phytopathogenic fungi. Journal of Medicinal Plants.
4. Iscan, G., Kirimer, N., Kürkcüoglu, M., Baser, H.C., Demirci, F. 2002. Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. Journal of agricultural and food chemistry. 50(14): 3943-3946.
5. Gul, P. 1994. Seasonal variation of oil and menthol content in Mentha arvensis Linn. Pakistan. J. For. 44:16-20.
6. Zeinali, H., Hosseini, H., shirzadi, M. 2014. Effects of nitrogen fertilizer and harvest time on agronomy, essential oil and menthol of *mentha piperita*. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants. 30: 486-495.
7. Hong, H.A., Khaneja, R., Tam, N.M., Cazzato, A., Tan, S., Urdaci, M., Brisson, A., Gasbarrini, A., Barnes, I., Cutting, S.M. 2009. *Bacillus subtilis* isolated from the human gastrointestinal tract. Research in microbiology. 160(2):134-143.
8. Jay, J., Loessner, M., Golden, D. 2005. *Bacillus cereus* gastroenteritis. Modern food microbiology, 7th edition, Springer Science, Inc, New York, USA. 583-90.
9. Oggioni, M.R,, Pozzi, G., Valensin, P.E., Galieni, P., Bigazzi, C. 1998. Recurrent septicemia in an immunocompromised patient due to probiotic strains of *Bacillus subtilis*. Journal of clinical microbiology. 36(1): 325-6.
10. Izadi, Z., Esna-Ashari, M., Ahmadvand, G., Davoodi, P., Piri, K. 2009. Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essence oil of Peppermint (*Mentha piperita* L). Armaghane danesh. 14(3):45-54.

ارزیابی پتانسیل بازدارندگی اسانس گیاه نعناع فلفلی (*Mentha piperita*) روی رشد قارچ‌های *Cladosporium oxysporum* و *Penicillium oxalicum*

خسرو چهری[۱،*]، ماریا حیدری نیا[۲]
[۱]گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی، کرمانشاه
[۲]گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد واحد سنندج، کردستان
* نویسنده مسئول: khchehri@gmail.com

چکیده

گیاه نعناع فلفلی با نام علمی *Mentha piperita* از جمله گیاهان دارویی، خوراکی و معطری است که اسانس آن مصارف دارویی، غذایی، بهداشتی و آرایشی فراوانی دارد. قارچ‌های *Cladosporium oxysporum* و *Penicillium oxalicum* با تولید آنزیم های هیدرولیزکننده خارج سلولی، معمولا پوسیدگی‌های پس از برداشت را روی محصولات کشاورزی ایجاد می‌کنند. همچنین، هر دو قارچ در محیط بیمارستان ها و مکان های عمومی بر روی بیماران با سیستم ایمنی ضعیف ایجاد بیماری می‌کنند. در این پژوهش، از اندام های هوایی گیاه نعناع فلفلی اسانس گیری انجام شد و اثر ضد قارچی آن بر روی قارچ‌های مذکور به روش اختلاط اسانس با محیط کشت عصاره سیب زمینی دکستروز آگار و دیسک دیفیوژن بررسی شد. نتایج به دست آمده نشان می دهد که اسانس نعناع فلفلی دارای خاصیت ضد قارچی بر روی میکروارگانیسم های مذکور است.

واژگان کلیدی: اسانس گیاهی، خواص ضد قارچی، *Penicillium oxalicum*، *Cladosporium oxysporum*

مقدمه

امروزه به خاطر سمی بودن داروهای سنتزی و آنتی بیوتیک‌ها و اثر نامطلوب آنها در سلامتی انسان‌ها، روند استفاده از گیاهان دارویی و داروهای گیاهی در سراسر جهان، در حال افزایش است. گیاهان دارویی جزو وسیع‌ترین منبع دارویی برای اکثر مردم جهان محسوب می‌شوند. مزیت‌های متعدد گیاهان دارویی از قبیل ارزان و قابل دسترس بودن و سازگاری با طبع و عوارض جانبی کمتری که نسبت به داروهای شیمیایی دارند باعث شده که در درمان بسیاری از بیماری‌ها مورد توجه قرار گیرند (۱). با توجه به خواص ضد میکروبی که در اسانس بعضی از گیاهان وجود دارد، می توان از این فراورده ها به عنوان جایگزین طبیعی برای آنتی بیوتیک‌ها استفاده کرد (۲). گیاه نعناع فلفلی از جمله گیاهان دارویی است که به واسطه اثرات دارویی متعدد از دیرباز توجه محققان را به خود معطوف داشته است. مصرف این گیاه در اشکال مختلف غذایی، بهداشتی و دارویی، سبب امتیاز این گیاه نسبت به سایر گیاهان دارویی شده است (۳). نعناع فلفلی با نام علمی M. piperita و نام رایج Peppermint گیاهی علفی، پایا و چند ساله از تیره نعناع است. برگ و سرشاخه های گل دار نعناع فلفلی، دارای اسانس، تانن و کولین است. منوترپن ها و سزکویی ترپن ها در گیاه نعناع فلفلی سنتز می شود (۴). از مهمترین ترکیبات موجود در اسانس این گیاه میتوان به منتول، منتون و متیل استات اشاره داشت (۵).

قارچ *C. oxysporum* یک پاتوژن نادر است. این قارچ باعث ایجاد بیماری در انسان می‌شود و یک عامل بیماری خیلی نادر فائوهیفومایکوزیس جلدی و بیماری کراتیت قارچی است (۶). در گیاهان این قارچ اغلب بیماری‌های پس از برداشت محصولات را ایجاد می‌کند (۷). *C. oxysporum* به عنوان عامل بیماری‌زای حشرات شناخته شده و به عنوان یک عامل کنترل بیولوژیکی در برابر حشرات آفات مزارع استفاده می‌شود (۸). عملکرد اصلی قارچ‌های جنس *Penicillium* در طبیعت تجزیه مواد آلی است و پوسیدگی پس از برداشت محصولات غذایی را ایجاد می‌کند (۹). قارچ *P. oxalicum* در طبیعت رایج است و ثابت شده است که یکی از منابع غنی تولید متابولیت‌های ثانویه فعال زیستی هستند. این قارچ در افراد با نقص سیستم ایمنی ایجاد بیماری می‌کنند و از عوامل ایجاد بیماری در بیماران مبتلا به HIV مثبت محسوب می شوند و از جمله قارچ های تولید کننده مایکوتوکسین هستند که باعث ایجاد سرطان کبد در انسان و حیوانات می شوند (۱۰).

مواد و روش ها

آماده سازی مواد خام گیاهی و استخراج اسانس

اندام های هوایی گیاه نعناع فلفلی ، پس از رشد کافی و قبل از مرحله گل دهی برداشت شده و به آزمایشگاه منتقل گردیدند و خشک شد. استخراج اسانس به روش تقطیر با آب و به کمک دستگاه کلونجر و به مدت ۴ ساعت انجام گرفت. برای استخراج اسانس نعناع فلفلی در هر بار اسانس گیری ۵۰ گرم پودر گیاه خرد شده استفاده شد.

بررسی فعالیت ضد قارچی اسانس نعناع فلفلی با روش اختلاط با محیط کشت PDA

قارچ ها روی محیط کشت PDA کشت داده شده در داخل انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک هفته قرارداده شدند. به منظور تعیین حداقل غلظت بازدارندگی، اسانس استخراج شده از گیاه نعناع فلفلی در توئین و آب مقطر رقیق شده و غلظت های ۷۵، ۱۵۰، ۳۰۰، ۶۰۰، ۱۲۰۰ میکرولیتر در لیتر از آن تهیه شد. سپس اسانس نعناع فلفلی با غلظت های مشخص، در بطری های حاوی محیط کشت استریل عصاره سیب زمینی دکستروز آگار به صورت مذاب انتقال یافته و به هم زده می شود و بلافاصله درون ظرف پتری ریخته می‌شود.

برای کشت قارچ ها دیسک های قارچی به قطر شش میلی متر توسط پنس استریل از کشت های جوان (یک هفته ای) قارچ تهیه و در وسط پتری حاوی محیط کشت PDA مخلوط با اسانس قرار داده شد. یکی از پلیت‌ها به عنوان شاهد قارچ انتخاب شد، نمونه شاهد حاوی محیط کشت و قارچ بدون اسانس بود. پتری ها در انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت یک هفته نگه داری شدند. تا زمانی که سطح محیط کشت پتری های شاهد توسط قارچ به طور کامل اشغال شود، اندازه گیری هاله رشد قارچ ادامه داشت. درصد بازدارندگی غلظت‌های مختلف اسانس با استفاده از فرمول Abbot محاسبه شد.

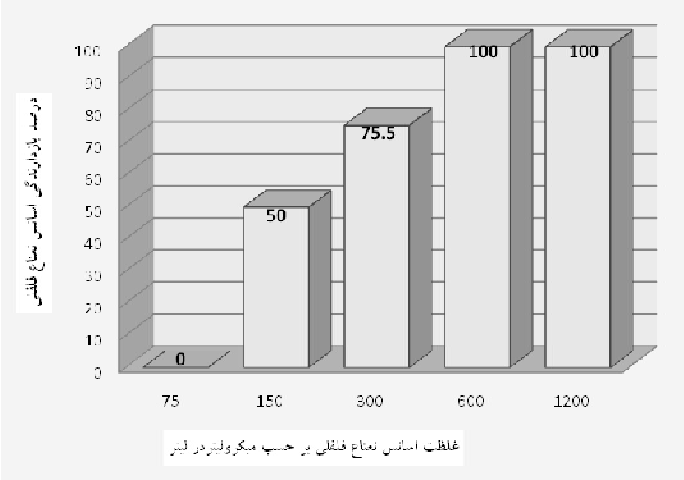
بررسی فعالیت ضد قارچی اسانس نعناع فلفلی با روش دیسک دیفیوژن

اسانس نعناع فلفلی در توئین ۲۰ رقیق شده و از آن غلظت‌های ۷۵، ۱۵۰، ۳۰۰، ۶۰۰، ۱۲۰۰ میکرولیتر در لیتر تهیه شد. سپس عمل کشت قارچ مورد نظر در مجاورت شعله و زیر هود لامینار صورت گرفت. برای کشت قارچها روی محیط کشت PDA از دیسک‌های قارچی به قطر شش میلی متر استفاده می‌شود. در روش دیسک دیفیوژن دیسک‌های کاغذ صافی استریل به قطر ۶ میلی متر تهیه شد. دیسک‌های کاغذ صافی آغشته به اسانس نعناع فلفلی روی محیط کشت آلوده به قارچ قرار داده شده و به مدت یک هفته در انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و سپس بررسی می‌شود.

نتایج و بحث

نتایج به دست آمده از بررسی حداقل غلظت بازدارندگی کامل (MIC) اسانس گیاه نعنا فلفلی به روش مخلوط با محیط کشت PDA نشان می دهد که به طورکلی با افزایش غلظت اسانس تا میزان ۶۰۰ میکرولیتر در لیتر میزان فعالیت ضدقارچی

بطور کامل فزایش می‌یابد. و حداقل غلظت بازدارندگی ۶۰۰ میکرولیتر در لیتر تعیین شد. تعیین حداقل غلظت بازدارندگی کامل (MIC) با استفاده از فرمول Abbot محاسبه شد و تایج محاسبات در نمودار ۱- آمده است.



نمودار ۱- درصد بازدارندگی اسانس نعناع فلفلی با استفاده از فرمول Abbot در غلظت های مختلف اسانس نعناع فلفلی بر حسب میکرولیتر در لیتر

نتایج بدست آمده بر اساس روش تست هاله نشان داد در غلظت ۶۰۰ میکرولیتر در لیتر اسانس نعناع فلفلی خاصیت قارچ ایستایی روی قارچهای *C. oxsysporum* و *P. oxalicum* دارد (جدول ۱).

جدول ۲- نتایج حاصل از بررسی حداقل غلظت بازدارندگی کامل (MIC) اسانس نعناع فلفلی روی قارچهای *C. oxsysporum* و *P. oxalicum* به روش تست هاله

اسانس	غلظت (میکرولیتر در لیتر)	قطر هاله بازدارنده اندازه گیری شده (میلی متر) **a*	
		C. oxsysporum	***P. oxalicum***
نعناع فلفلی (*Menth piperita*)	75	^{a}0±0	^{a}0±0
	150	^{b}2±0.25	^{b}3±0.25
	300	^{c}10±0.25	^{c}10±0.25
	600	^{d}19±1.00	^{d}18±1.15
	1200	^{d}19±1.00	^{d}18±1.15

*a قطر هاله بازدارنده اندازه گیری شده در هر تیمار مربوط به ۳ تکرار است.

** حروف غیر متشابه بیانگر اختلاف معنی دار در سطح $p \leq 5\%$ می باشد.

نوع و مقدار ترکیبات شیمیایی اسانس نعناع فلفلی بسته به شرایط محیطی، شرایط اکولوژیک، مراحل رشد و نموی، تنش‌ها و نوع اندام‌های تولید کننده اسانس و بسیاری عوامل دیگر، متفاوت و متغیر است ومی تواند افزایش یا کاهش یابد (۱۱). گیاهان تیره نعناع به سبب ترکیبات ترپنوئیدی گوناگون، اسانس و ترکیبات فنلی بخصوص فلانوئید ها از لحاظ اثرات ضد میکروبی بسیار مورد توجه می باشند (۱۲). با توجه به اهمیت اسانس نعناع فلفلی، شناسایی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس، به منظور بررسی فعالیت ضد میکروبی ضرورت دارد. در این تحقیق اسانس نعناع فلفلی روی قارچهای *C. oxsysporum* و *P.*

oxalicum خاصیت ضد قارچی داشته است که این موضوع برای اولین بار در دنیا و ایران گزارش می‌شود. با توجه به نتیجه تحقیق حاضر و مطالعه تحقیقات سایر محققین، به علت خواص ضد میکروبی قوی اسانس این گیاه ، می توان برخی از نمونه های بیماریزای قارچی را کنترل کرد و به ساخت داروهای مناسب با منشأ گیاهی و عوارض جانبی بسیار کمتر امیدوار بود.

منابع:

1. Mulabagal, V., Tsay, H-S. 2004. Plant cell cultures-an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. Int J Appl Sci Eng. 2(1):29-48.
2. Sroka, Z., Fecka, I., Cisowski, W. 2005. Antiradical and anti-H2O2 properties of polyphenolic compounds from an aqueous peppermint extract. Zeitschrift für Naturforschung C. 60(11):826-32.
3. Fadaei, S., Abroumand, A.P., Sharifan, A., Larijani, K. 2011. Evaluation of antimicrobial activity of Mentha piperita L. essential oil and its comparison with sodium benzoate. Journal Of Food Technology And Nutrition 8 (29): 34-41.
4. McCaskill, D., Croteau, R. 1995. Monoterpene and sesquiterpene biosynthesis in glandular trichomes of peppermint (Mentha x piperita) rely exclusively on plastid-derived isopentenyl diphosphate. Planta. 197(1):49-56.
5. Mahboubi, M., Haghi, G. 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of Mentha pulegium L. essential oil. Journal of ethnopharmacology.119(2):325-7.
6. De Hoog, G., van den Ende, A.G., Uijthof, J., Untereiner, W. 1995. Nutritional physiology of type isolates of currently accepted species ofExophiala andPhaeococcomyces. Antonie van Leeuwenhoek. 46(1).68-95.
7. Baiswar, P., Chandra, S., Bag, T., Patel, R., Ngachan, S., Deka, B.C. 2011. Cladosporium oxysporum on Prunus nepalensis in India. Australasian Plant Disease Notes. 6(1):3-6.
8. Samways, M. 1983. Interrelationship between an entomogenous fungus and two ant-homopteran (Hymenoptera: Formicidae-Hemiptera: Pseudococcidae & Aphididae) mutualisms on guava trees. Bulletin of Entomological Research. 73(02):321-31.
9. Frisvad, J.C., Smedsgaard, J., Larsen, T.O., Samson, R.A. 2004. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in Penicillium subgenus Penicillium. Studies in Mycology.
10. Bian, X., Bai, J., Hu, X., Wu, X., Xue, C., Han, A., et al. 2015. Penioxalicin, a novel 3-nor-2, 3-seco-labdane type diterpene from the fungus Penicillium oxalicum TW01-1. Tetrahedron Letters.56(35):5013-6.
11. Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review .International journal of food microbiology. 94(3):223-253.
12. Clark, I.V., Cameron, G.C. 2002. An aroma chemical profile. Menthol Perfumer and Flavorist 23(4): 33-46.

کاربرد کشت مریستم در کنترل ویروس موزاییک خیار

سیده عاطفه حسینی
استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند
** نویسنده مسئول: ahosseini@birjand.ac.ir*

چکیده

کشت مریستم انتهایی به منظور ایجاد گیاهان عاری از ویروس به کار می رود. ویروس موزاییک خیار از اقتصادی‌ترین ویروس های گیاهی می باشد که کنترل آن حائز اهمیت است. بدین‌منظور گیاه توتون *Nicotiana rustica* در شرایط گلخانه‌ای کشت شد و ویروس موزاییک خیار بر روی آن مایه‌زنی گردید. پس از چهار هفته مریستم انتهایی آن جداسازی گردید و بر روی محیط کشت انتقال یافت. گیاهک هایی که ریشه داده بودند به گلدان های با قطر ۴ سانتیمتر انتقال و با قرار دادن گلدان ها در سینی کاشت بذر، شرایط گلخانه‌ای برای آنها فراهم شد. گیاهک‌های خوب رشد کرده به گلدانهای حاوی کمپوست منتقل و دو تا سه بار برای آلودگی به ویروس با روش الایزا بررسی شدند. نتایج بیانگر تولید گیاهان عاری از ویروس به میزان بالای ۹۵ درصدی بود.

واژگان کلیدی: مریستم انتهایی، کنترل، کوکوموویروس

مقدمه

بسیاری از گیاهان توسط ویروس‌ها آلوده می شوند و نتیجه آن کاهش قدرت رشد، نکروز، پیچیدگی برگ‌ها، ساقه‌ها و یا گلها، کاهش عملکرد و مرگ گیاه است. هیچ تیمار شیمیایی به منظور رهاشدن از آلودگی‌های ویروسی وجود ندارد، ویروس‌ها معمولا باعث آلودگی جنین از طریق بذر نمی‌شوند (۲). با وجود این، در سال ۱۹۵۲ مورل و مارتین ، ایده جالبی از کشت مریستم انتهایی کوکب آلوده به ویروس در محیط آزمایشگاه، ارائه دادند. آن‌ها اولین کسانی بودند که از کشت مریستم انتهایی کوکب و سیب زمینی آلوده به ویروس، گیاهان عاری از ویروس به دست آوردند (۱). در بافت‌های مریستمی، در هنگام تقسیم سلولی ظرفیت برای سنتز اسیدهای نوکلئیک به مصرف تولید سلول می رسد که این امر مانع از تکثیر ویروس می شود. در سلول‌های زیرین مریستم، سلول ها به‌جای تقسیم شدن، از نظر اندازه بزرگ می‌شوند و تکثیر ویروس ها به صورت بی وقفه ای انجام می شود. همچنین کواک پیشنهاد دیگری را ارائه کرد که فقدان آوندی در مریستم ممکن است مانع از انتقال ویروس شود (۴). ویروس موزاییک خیار در خانواده کوموویریده، دارای دامنه میزبانی وسیعی بوده و در سرتاسر دنیا حائز اهمیت است. این گونه خسارتزاترین گونه جنس کوکوموویروس و دارای ژنوم سه بخشی است. در تحقیق حاضر به بررسی ایجاد گیاهان توتون عاری از آلودگی به این ویروس با روش کشت مریستم پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

کاشت گیاهان توتون

توتون *Nicotiana rustica*در گلخانه تحقیقاتی در ابتدا در خزانه کشت شد و در مرحله سه‌برگی نشا گردید. سپس با ویروس موزاییک خیار تلقیح گردید و ۴ هفته پس از تلقیح، نوک جوانه انتهایی جدا شد.

استریل‌سازی ریزنمونه ها

ساقه‌های حاوی جوانه ابتدا کاملا تمیز و تا حد امکان تمام برگ-های ساقه جدا و ساقه ها یا جوانه ها در صورتی که هیچ برگی جدا نشده بود برای مدت کوتاهی در الکل ۷۰ درصد فرو برده شد (۶). این کار به منظور بیرون راندن حباب‌های هوایی که در سطح اندام‌ها حبس شده اند، انجام می شود. بعد از این مرحله، عمل استریل، از طریق ضدعفونی با محلول رقیق شده هیپوکلریت سدیم انجام شده و نهایتا به وسیله آب مقطر استریل، شسته شد.

جداسازی نوک مریستم

برگهای باقی مانده و جوانه های آغازین برگ زیر استریومیکروسکوپ جدا شد. اغلب از سوزن و تیغ جراحی برای این مرحله استفاده شد. نوک ساقه، محکم به وسیله یک دست گرفته شده (انگشت تمیز یا انبرک) و با دست دیگر عملیات انجام گرفت. در حین عملیات سوزن به طور منظم استریل شد. مریستم انتهایی همراه با یک یا دو جوانه آغازین برگ (معمولا یک سوم از ماده) به وسیله تیغ قطع گردید (۶).

کشت مریستم

مریستم همراه با برگ آغازین، بلافاصله روی محیط کشت که بر اساس روش Murashige و Shoog آماده شده بود (۴)، انتقال‌یافت. مریستم با جوانه آغازین برگ که بسیار کوچک است همراه می باشد (۰/۱ میلی متر قطر، ۰/۲ تا ۰/۴ میلی متر طول). زیرا اگر فقط مریستم انتهایی جدا شود شانس زیادی برای به دست آوردن گیاهان عاری از ویروس وجود ندارد (۳).

تیمارهای بعد از کشت

گیاهک ریشه دار شده به گلدان با قطر ۴ سانتیمتر منتقل گردید و این گلدان ها روی سینی کاشت بذر و زیر سایه‌انداز قرار گرفت تا با رشد در شرایط گلخانه عادت نماید. جوانه‌های خوب رشدیافته در خاک استریل کاشته و داخل گلخانه عاری از حشره قرار گرفت. در این مدت ۳-۲ بار گیاهان برای وجود ویروس با الایزا آزمایش شدند.

نتایج و بحث

گیاهان توتون کشت شده در گلخانه که مجددا با آزمون الایزا تست گردیدند، بالای ۹۰ درصد عاری از ویروس موزاییک خیار بودند، همچنین نتایج نشان داد که شانس بقای مریستم بدون جوانه آغازین برگ، خیلی کم است. جدا کردن مریستم های بزرگتر (با جوانه‌های آغازین برگ بیشتر) احتمال به دست آوردن گیاهان عاری از ویروس را کاهش می دهد. گرچه که در تمام مریستم‌ها، ساقه گیاهان به عنوان مواد اولیه مناسب هستند، به نظر می رسد که شانس موفقیت به نوع جوانه ساقه و یا به موقعیت جوانه‌ها بستگی دارد(۷). همچنین درصد گیاهان عاری از ویروس به مقدار زیادی بستگی به فصل رشد دارد. به منظور اطمینان از تشکیل مناسب ریشه در ساقه ها گاهی اوقات توصیه می شود که جدا کردن مریستم در فصل بهار انجام شود. تولید جرم‌پلاست عاری از ویروس، تولید توده‌ای از ژنوتیپ مورد تمایل، نگهداری جرم پلاست در این ویترو، حذف پاتوژنهای قارچی و باکتریایی از مزایای دیگر کشت مریستم می باشد (۵).

منابع

۱- عبدالرضا باقری. ۱۳۷۶. مبانی کشت بافتهای گیاهی. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد.
2-Brown, D. C. W., and T. A. Thorp. 1995. Crop improvement through tissue culture. World Journal of Microbiology & Biotechnology. 11. 409-415.
3-Dixon, R. A., and R. A. Gonzales. 1996. Plant cell culture. Oxford university press.
4-Helgeson, J. P., and B. J. Deverall. 1983. Use of tissue culture and protoplasts in plant pathology. Academic press.
5-Kumar, U. 2002. Methods in plant tissue culture. Agribis publication.
۶-Russo, P., and S. A. Slack. 1998. Tissue culture methods for the screening and analysis of putative virus-resistant transgenic potato plants. Virology. vol. 88, No. 5.
۷-Smith, R. H. 2000. Plant tissue culture. Academic press.

کاربرد ویروس موزاییک لوبیا چشم بلبلی در نانوتکنولوژی

سیده عاطفه حسینی[۱،*] و خدیجه سالاری [۲]

۱- استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند

۲-مربی بیماری شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت

** نویسنده مسئول: ahosseini@birjand.ac.ir*

خلاصه

فناوری نانو واژه ای است کلی که به تمام فناوری‌های پیشرفته در عرصه کار با مقیاس نانو گفته می‌شود. در سال های اخیر استفاده از ویروس های چندوجهی و میله ای در نانوتکنولوژی گسترش یافته است که یکی از مهم ترین آن‌ها ویروس موزاییک لوبیا چشم بلبلی می باشد. بدین منظور سطح خارجی پوشش‌پروتئینی به صورت ژنتیکی، مکانیکی، شیمیایی و یا ترکیبی از هر دو تغییر می کند تا اجازه باندشدن ویروس با ساختارهای نانو را بدهد. اغلب زیرواحدهای موجود در پوشش پروتئینی دارای آمین در سطح اسید آمینه لایزین بوده که قابلیت باند با مولکولهای به اندازه ۲۴۰ دای را دارند. با افزودن ماده PEG سطح ویروس توانایی اتصال به نانو ذرات را پیدا می کند. اخیرا استفاده از بخش‌های درونی پیکره‌ها نیز در نانوتکنولوژی به کار می‌رود. ویروس تغییریافته در نانوذرات، در تشخیص سلول های سرطانی پزشکی، تولید داروهای ضد باکتریایی یا ضد قارچی و نیز به عنوان نانوسیلور در دفع جراحات سوختگی، جای جوش و زخم موثر می باشد.

واژگان کلیدی: نانو، ویروس، تکنولوژی

مقدمه

نانو فناوری عبارت از هنر دستکاری مواد در مقیاس اتمی یا مولکولی و به خصوص ساخت قطعات و لوازم میکروسکوپی مانند روبات های میکروسکوپی است. ویروس های گیاهی تاکنون با سه روش مختلف در نانوبیوتکنولوژی به کار رفته اند. پوشش پروتئینی اغلب ویروس های گیاهی ساختاری ساده دارد و از چندین کپی از زیرواحدهای پروتئینی ساخته شده است که دارای تقارن مکعبی یا مارپیچی است. در بسیاری از موارد پوشش پروتئینی در گیاه با آلوده سازی یا بیان زیر واحدها ایجاد می شود. به دلیل پایداری این زیر واحدها و بیان آسان آن، پارتیکل های ویروسی در بیونانوتکنولوژی کاربرد دارد. به این ترتیب که سطح خارجی پیکره ابتدا به صورت ژنتیکی یا شیمیایی تغییر می کند سپس مواد موردنظر به پیکره ها متصل می شود و نهایتا پیکره‌ها به ساختارهای فوق مولکول می چسبند (۴). پوشش‌پروتئینی ویروس دارای رشته‌های جانبی برای تغییرات شیمیایی است، که اغلب گروه آمینو در اسید آمینه‌های لایزین و گروه کربوکسیل در آسپاراتیک و گلوتامیک اسید است. گروه تیول سیستئین و گروه هیدروکسیل تیروزین نیز مهم است. زمانیکه این زنجیره‌ها در سطح خارجی ویروس باشد، با مواد شیمیایی قابل باند شدن است.

تغییرات شیمیایی که در سطح ویروس اعمال می شود، نباید به حدی شدید باشد که سبب تغییر در ساختار ویروس گردد. ویروس موزاییک لوبیا چشم‌بلبلی اولین ویروسی است که برای جایگزینی پپتیدهای خارجی به کار رفته و تغییرات شیمیایی

وسیعی در آن صورت گرفته است (۳و۶) دسترسی ساختارهای سه بعدی ویروس کمک می کند تا بدون آسیب به پوشش پروتئینی، با پپتیدهای هترولوگ شناسایی گردد (۲) و این پپتیدهای هترولوگ به مولکول های فلورسانت، فلزی، شکر و پلیمرها متصل می‌گردند.

کاربرد بخش های خارجی ویروس موزاییک لوبیا چشم بلبلی

این ویروس اولین ویروس گیاهی بود که برای اتصال به پپتیدهای خارجی به کار رفت. این ویروس دارای ژنوم ssRNA مثبت است که در دو پیکره پوشش دار می شود. پوشش پروتئین پیکره کوچک یا S آن دارای ۶۰ زیرواحد است. این پیکره به دلیل اینکه به مقدار زیاد از بافت های آلوده قابل جداسازی است، در ۶۰ درجه سانتیگراد و pH حدود ۱۰-۴ و در برخی مواد آلی قابل حل در آب باقی می ماند (۸) و از طرف دیگر چون همسانه آلوده کننده آن ساخته شده است گزینه مناسبی در نانوبیوتکنولوژی است. شناسایی ساختار سه بعدی آن این اجازه را می دهد تا مکان‌های دارای پتانسیل برای جایگزینی با پپتیدهای هترولوگ در پوشش پروتئینی آن شناسایی گردد (۷). در میان روش های مختلف موجود در بیوسنتز نانو ذرات، استفاده از ویروس ها از توجه ویژه ای بر خوردار است. طلا به همراه نقره از مهم ترین فلزاتی هستند که اکثر مقالات موجود در زمینه زیست سنتز این دو یون انتشار یافته است(۱۰).در آخرین تحقیقات انجام شده درباره سنتز نانو ذرات طلا، از ویروس موزاییک لوبیا چشم بلبلی برای احیای یون های سه ظرفیتی طلا از یک محلول کلریدی به نانو ذرات ۵ تا ۲۵ نانومتری به شکل هرم های چهار ضلعی، در دما و فشار محیط استفاده شده است. مکان های مناسب برای جا دادن مولکول های خارجی در سطح پوشش پروتئینی، در زیرواحدهای آن در لوپ BC و BB و در زیر واحدهای S این ویروس است. در این جایگاه ها مولکول های با وزن مولکولی کمتر از ۴۰ اسید آمینه جای می گیرند. همچنین بخش های جانبی مثل لوپ بتا E و لاندا B در پیکره کوچک آن در اتصال کاربرد دارد (۶). اخیرا یک هگزا هیستیدین در نقاط متفاوت روی سطح ویروس معرفی کرده اند که در سطح پیکره ها برای باند شدن با هدف بسیار مناسب است. در این حالت پیکره های تغییر یافته از طریق هیستیدین به شیشه یا به اسید نیتریل تری استیک اسید وصل می شود. این هیستیدین ها در سطح بیرونی ویروس با اسید نیتریل تری استیک اسید-بیوتین باند می شوند و اجازه اتصال بعدی با داده های کوانتومی از طریق واکنش avidin-biotin فراهم می آورند(۵). این ویروس موزاییک لوبیا چشم بلبلی متصل شده به پپتیدهای طراحی شده روی ورقه ثابت شده و با پلاتینیوم - نقره و نیکل باند می شود. همچنین قابلیت باند شدن با نانوذرات آهن به اندازه ۳۰ نانومتر را دارد. این اندازه کوچک در تولید نانو ذرات با هیچ موجود دیگری قابل اتصال نیست (۸). تولید این پیکره ها از نظر زیست محیطی نیز کمترین آلودگی را دارد.

پیکره های اصلی ویروس دارای پنج مکان لایزین و ۸ مکان کربوکسیلات مربوط به آسپاراتیک و گلوتامیک می باشند که این نشان می دهد، هر پیکره باید ۳۰۰ گروه آمینی و ۴۸۰-۴۵۰ گروه کربوکسیلی در هر ویروس داشته باشد که در تیروزین نیز وجود دارد. این جایگاه ها به طور طبیعی قابل تغییر است. اغلب گروه ها دارای آمین در سطح لایزین بوده که قابلیت باند با مولکولهای به اندازه ۲۴۰ دای می باشد. با افزودن ماده PEG ویروس به محیط وصل می شود. لایزین با ماده فروسنکار بوکسیلات واکنش داده و به نانو ذرات طلا یا مس می چسبد. لایزین قابلیت باند شدن با بسیاری از مولکول های فلورسنت، فلزی، پلیمر و شکر را نیز دارد (۹).

کاربرد بخش های داخلی پیکره ویروس لوبیا چشم بلبلی

بخش داخلی پوشش پروتئینی ویروس پتانسیلی را برای بسته بندی نانوذرات فراهم می آورد. در این راستا دو روش وجود دارد که در پوشش دار شدن مولکول های خارجی در پوشش ویروس به کار می رود. در روش اول مولکول خارجی در حین پوشش دار شدن ویروس به آن متصل می گردد. در روش دوم مولکول های خارجی پیش از سر هم شدن پیکره به آن متصل می گردند. تا به حال بخش داخلی ویروس موزاییک لوبیا چشم بلبلی با مولکول خارجی ترکیب نشده است اما تلاش هایی برای ایجاد پیکره های بدون RNA با استفاده از pH بالا به کار رفته است. دراین حالت جایگاه سیستئین در داخل پیکره که معمولا

با RNA ویروسی اشغال می گردد، می تواند به پروتئین های خارجی وصل گردد. روش دیگر ایجاد پیکره ای خالی با بیان همزمان VP60 و پروتئیناز 24K است که پیکره را قادر می سازد تا در درون آن مولکول های کبالت یا اکسید آهن قرار گیرد (۱). اتصال یون ها با ویروس اجازه مشاهده آن با میکروسکوپ الکترونی را می دهد. استفاده از هر دو فناوری پوشش دار کردن دارو ها و نانوذرات در پوشش ویروسی همراه با تغییرات شیمیایی در سطح پیکره ویروسی، دریچه روشنی برای توسعه بیشتر در این علم را می گشاید.

نتایج و بحث

جایگاه لیزین در ویروس های موزاییک لوبیا چشم بلبلی، برای بسیاری از اهداف مناسب است. در دو دهه گذشته، دستکاری در پیکره ویروس از نظر ژنتیکی و مولکولی در نانوتکنولوژی حایز اهمیت بوده است. در دو دهه اخیر پیشرفت ها در دستکاری پیکره های ویروس گیاهی هم به صورت ژنتیکی و بیوشیمیایی دیده می شود و تحقیقاتی در این خصوص صورت گرفته است. اما این تحقیقات بیشتر جنبه دانشگاهی داشته است اما بایستی به سمت کاربرد در هر دو سطح نانو و بیوتکنولوژی حرکت کند. به عنوان مثال اگر چه پیکره های ویروس گیاهی تغییر یافته می تواند سیستم دفاعی حیوانات آزمایشگاهی را تغییر دهد اما تکنولوژی در خارج از آزمایشگاه برای ان وجود ندارد، همچنانکه تکنولوژی مشخصی جهت نحوه اتصال آن به مواد خارجی در پیکره ویروسی به دست نیاده است. هدف اصلی برای استفاده از ویروس های گیاهی در نانوتکنولوژی این است که نهایتا صرفه اقتصادی نیز داشته باشد (۴). قطعا برای دستیابی به این اهداف، بایستی مطالعاتی برای توسعه بیشتر روش ها به منظور کاربرد راحت تر ویروس ها در بیوتکنولوژی و نانوتکنولوژی صورت گیرد تا این ویروس های تغییر یافته متصل به نانو ذرات زیستی، در تشخیص سلول های سرطانی در پزشکی، تولید داروهای ضد باکتریایی یا ضد قارچی و نیز به عنوان نانوسیلور در دفع جراحات سوختگی، جای جوش و زخم کاربردی باشند (۸و۹).

منابع

1-Aljabali, A., Barclay, J.E. 2010. Redox-active ferrocene modified Cowpea mosaic virus nanoparticle. Dalton Trans. 39:7569-7574

2- Franssen, H., Goldbach, R., Broekhuijsen, M. 1982. Expression of middle component RNA of Cowpea mosaic virus: in vtro generation of a precursor to both capsid proteins by a bottom component RNA encoded protease from infected cell. Journal of Virology. 41:17-8

3-Lin, T. and Johnson, J.E. 2003. Structure of picorna-like viruses: implication and applications. Advanced Virus Research 62:167-239

4-Lomonosoff, G.P., Evans, D.J. 2011. Applications of plant viruses in bionanotechnology. Current topics in microbiolog nd Immunilogy. 375: 61-87

5-Medintz, IL., Sapsford, KE. 2005. Detection of discretely immobilized cow pea mosaic virus with luminescent quantum dots. Langmuir 21:5501-5510

6-Porta, C., Spall, V.E, Findly, K.C. 2003. Cowpea mosaic virus based chimareas. Effects of inserted peptides on the phenotype, host-range and transmissibility of the modified viruses Virology 310:50-63

7-Taylor, K.M., Lin, T., Porta, C. 2000. Influence of three dimentional structure on the immunogenicity of peptide expressed on the surface of plant virus. Journal of Molecular recognit 13:71-82

8-Saunders, K., Sainsbury, F., Lomonossoff, G.P. 2009. Efficient generation of Cowpea mosaic virus empty virus-like particles by the proteolytic processing of precursors in insect cells and plants Virology 393:329-337

9- Shah, S.N., Steinmetz, N.F, Aljabali AA 2009 Environmentally begin synthesis of virus-templated, monodisperse, iron – platinum nanoparticles. Dalton trans 8479-8480

10-Steinmetz, N.F., Manchester, M. 2009. PEGylated Viral nanoparticles fpr biomedicine: impact of PEG chain lengh on VNP cell interaction in vitro and ex vivo. Biomacromolecules 13: 10784-10792.

ارزیابی مقاومت ارقام زیتون در مقابل بیماری لکه طاووسی (*Spilocaea oleaginea*) دراستان مازندران در سال ۱۳۹۵

صفا بگجانی[۱]*، صفرعلی مهدیان [۲]، عبدالقیوم ابراهیمی[۳]
[۱]*دانشجوی کارشناسی ارشد .دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان، گرگان*
[۲]*عضو هیئت علمی .دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری*
[۳]*استاد .دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان، گرگان، ایران*
* *نویسنده مسئول: safabeg9631@gmail.com*

چکیده

بیماری لکه طاووسی یا لکه برگی زیتون که بوسیله قارچ *Spilocaea oleaginea* بوجود می آید می تواند موجب کاهش رشد و نمو ، کاهش محصول و خسارت اقتصادی روی درختان زیتون گردد. برای تعیین رقم های زیتون مقاوم و حساس نسبت به بیماری لکه طاووسی، شمارش تعداد برگ آلوده و درصد آن با استفاده از روش مکدونالد وهمکاران انجام گردید؛ ارزیابی مقاومت ۱۳ رقم زیتون در منطقه ساری در مقابل این بیماری در اوایل اردیبهشت ماه ۱۳۹۵ نشان داد که میزان آلودگی و شدت بیماری لکه طاووسی روی درختان زیتون بالا بوده است. نتایج ارزیابی مقاومت رقم های زیتون در مقابل بیماری لکه طاووسی نشان داد که در منطقه ساری واکنش رقم زیتون زرد از نوع مقاوم، ارقام زیتون میشن، شنگه، سویلانا، نیمه مقاوم، ارقام زیتون ماری، رقم شهرداری، آمیگدالیفونیا، کنسروالیا، والانولیا، فیمشی و زیتون روغنی از نوع نیمه حساس و در نهایت ارقام زیتون رشید و گرگان حساس بود. با توجه به شدت بیماری لکه طاووسی در منطقه مورد مطالعه ، توصیه می‌شود از بین ارقام مورد آزمایش ارقام زرد ، میشن ، ماری ، شنگه ، سویلانا ، روغنی که مقاومت قابل قبولی در مقابل بیماری لکه طاووسی نشان دادند ، جهت کشت در این منطقه مورد استفاده قرار گیرند.

واژگان کلیدی: زیتون، بیماری لکه طاووسی، مقاومت ارقام زیتون، *Spilocaea oleaginea*

مقدمه

کشت درختان زیتون (*Olea eurapaea*) در استان مازندران تقریباً جدید است و در دو دهه اخیر بصورت قابل توجهی به ویژه در اطراف شهرستان ساری گسترش یافته است. رشد درختان زیتون و تولید محصول آن در این استان بوسیله بیماری لکه طاووسی یا لکه برگی زیتون مورد حمله قرار می‌گیرد که بوسیله قارچ *Spilocaea oleaginea* بوجود می‌آید. این قارچ روی برگ درختان زیتون به صورت پارازیت زندگی می‌کند و در ارقام حساس دمبرگ، میوه و دم میوه را نیز آلوده می‌کند و خسارت کمی و کیفی قابل ملاحظه ای به محصول زیتون وارد می کند (۴). بیماری لکه طاووسی زیتون در مناطق مرطوب شیوع دارد و عامل اصلی ضعف درختان زیتون و کم بارآوری آن است (۲). این قارچ برای نفوذ و ایجاد آلودگی به آب آزاد یا رطوبت تقریباً اشباع به مدت ۱ تا ۲ روز بسته به درجه حرارت احتیاج دارد (۷). آلودگی ها معمولاً در فصل های مرطوب سال(پاییز، زمستان و اوایل بهار) ایجاد می‌شود. در این فصول روی لکه های بیماری به مقدار زیادی مایه (اسپورهای دوکی

شکل دو سلولی) وجود دارد و توسط حشرات و عوامل محیطی به اطراف پخش می شود(۳). آلودگی های جدید در فصل بهار رخ میدهد و موجب ریزش برگ های جوان می شود . در آب و ، هوای گرم و خشک رشد بیمارگر محدود شده، بیماری غیر فعال و آلودگی بندرت واقع می شود(۸). برخی از کشاورزان بعد از گذشت بیش از ۴۵ سال از کاشت زیتون در استان مازندران، از باردهی آن قطع امید کرده و به قطع درختان زیتون ۴۵ساله راضی شدند (مشاهدات شخصی). لازم به ذکر است که مهمترین علت گسترش و شیوع قارچ عامل لکه طاووسی زیتون وجود رطوبت بالا در این استان و پس از آن کاشت ارقام حساس و نا آگاهی از روش های کنترل این بیماری است. بنابراین در مناطقی مانند استان مازندران که میزان بیماری لکه طاووسی بالا است تنها روش کنترل آن کاشت ارقام مقاوم زیتون می باشد. استفاده از رقم های مقاوم ضمن پایین آوردن میزان بیماری و جلوگیری از خسارت آن مشکلات زیست محیطی نیز ندارد . انتظار براین است نتیجه این آزمایشات در کنترل لکه طاووسی و در نتیجه در افزایش محصول زیتون در استان مازندران کارآیی بالایی داشته باشد. در نتیجه ارقامی که به این بیماری مقاوم باشند جهت کاشت در استان مازندران توصیه خواهند شد.

مواد و روش‌ها

این بررسی در اوایل اردیبهشت ماه ۱۳۹۵ در دانشکده کشاورزی ساری انجام گرفت. که میزان رطوبت در ساری نزدیک به ۶۵ درصد و دمای ۲۴-۲۵ درجه سانتی گراد در اوایل صبح نمونه برداری انجام گردید. کل رقم های درختان زیتون کاشته شده در دانشکده ساری ۱۳ رقم و هر رقم ۳ درخت زیتون با سن تقریبی ۱۵ ساله مشاهده شد (۹). این آزمایش با استفاده از روش مکدونالد وهمکاران انجام گردید. بدین صورت که از ارتفاع تقریباً دو متری و بالاتر تعداد ۲۰ شاخه که هر یک از آنها حامل حداقل ۲۰ برگ (جمعاً ۴۰۰ برگ) از چندین درخت از یک رقم جمع آوری گردید و به این صورت از تمام رقم های موجود جمع آوری نمونه صورت گرفت. لازم به ذکراست که شاخه ها از قسمت داخلی و بیرونی درخت از جهات مختلف بصورت تصادفی بریده شده تا امکان خطا در بررسی وجود نداشته باشد و داخل پاکت مقوایی قرار داده و برای انجام شمارش تعداد لکه ها به آزمایشگاه منتقل شد (۹). این آزمایش در سه تکرار انجام گرفت. تعیین مقدار ریزش برگ هر رقم در اثر بیماری لکه طاووسی و تعیین درصد آن با مشاهده پوشش کلی درخت و تخمین درصد سرشاخه های لخت و بدون برگ در باغ انجام شده و اعداد یادداشت شدند (۹). در آزمایشگاه نمونه های جمع‌آوری شده بصورت لایه‌ای روی میز پخش شده و از بین برگهای جمع‌آوری شده یک زیر نمونه (۲۵ برگی) بطور تصادفی جدا شدند و شمارش تعداد برگ آلوده و درصد آن انجام گردید. بطوریکه تعداد لکه روی برگ و تخمین درصد سطح پوشیده شده برگ با لکه ها با استفاده از روش بالا بوسیله نمرات ۱ (۱ لکه)، ۲ (۲ لکه) ، ۳ (۳ تا ۵ لکه)، ۴ (۶ تا ۱۰ لکه) و ۵ (۱۱ لکه و بیشتر) درجه بندی شد (۹). شدت بیماری یا حساسیت رقم بوسیله نمرات ۵ ، ۱۲/۵، ۲۵، ۳۷/۵ ، ۵۰ ، ۷۵، ۹۰ و ۱۰۰درصد با توجه به سطح پوشیده شده برگ به وسیله لکه‌ها درجه‌بندی شده برای اینکه مشخص شوند چه ارقامی به این بیماری حساس و چه رقم هایی مقاوم هستند. لازم به دکر است ک در این آزمایش از طرح اماری استفاده نشده است و فقط با استفاده از روش مکدونالد به بررسی و مطالعه این بیماری پرداخته شده است.

نتایج و بحث

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که ارقام زیتون مورد مطالعه در منطقه ساری نسبت به بیماری لکه طاووسی از حساسیت های مختلفی برخوردار هستند و برخی از ارقام نسبت به بیماری لکه طاووسی مقاوم و برخی حساس بودند. رقم زیتون ماری با ۴ برگ آلوده و تعداد ۳ لکه در هر برگ آلوده ؛ ۳۷/۵ درصد آلودگی و ۲۵ درصد ریزش برگ را به خود اختصاص داده و از ارقام تقریباً حساس به شمار می رود. رقم زیتون میشن با ۴ برگ آلوده و تعداد ۳ لکه در هر برگ آلوده ؛ ۲۵ درصد آلودگی و ۲۵ درصد ریزش برگ را به خود اختصاص داده و از ارقام تقریباً مقاوم به شمار می رود. رقم زیتون با ۴ برگ آلوده و تعداد ۵ لکه در هر برگ آلوده ؛ ۵۰ درصد آلودگی و ۳۷/۵ درصد ریزش برگ را به خود اختصاص داده و از ارقام تقریباً حساس به شمار می

رود. رقم زیتون رشید با ۵ برگ آلوده و تعداد ۵ لکه در هر برگ آلوده ؛ ۹۰ درصد آلودگی و ۷۵/۵ درصد ریزش برگ را به خود اختصاص داده و از ارقام حساس به شمار می رود. رقم زیتون زرد با ۳ برگ آلوده و تعداد ۳ لکه در هر برگ آلوده ؛ ۱۲/۵ درصد آلودگی و ۱۲/۵ درصد ریزش برگ را به خود اختصاص داده و از ارقام مقاوم به شمار می رود. رقم زیتون با ۳ برگ آلوده و تعداد ۴ لکه در هر برگ آلوده ؛ ۲۵ درصد آلودگی و ۲۵ درصد ریزش برگ را به خود اختصاص داده و از ارقام تقریباً مقاوم به شمار می رود. رقم زیتون سویلانا با ۳ برگ آلوده و تعداد ۴ لکه در هر برگ آلوده ؛ ۲۵ درصد آلودگی و ۱۲/۵ درصد ریزش برگ را به خود اختصاص داده و از ارقام تقریباً مقاوم به شمار می رود. رقم زیتون آمیگدالیفونیا با ۳ برگ آلوده و تعداد ۵ لکه در هر برگ آلوده ؛ ۳۷/۵ درصد آلودگی و ۲۵ درصد ریزش برگ را به خود اختصاص داده و از ارقام تقریباً حساس به شمار می رود. رقم زیتون فیمشی با ۴ برگ آلوده و تعداد ۵ لکه در هر برگ آلوده ؛ ۳۷/۵ درصد آلودگی و ۳۷/۵ درصد ریزش برگ را به خود اختصاص داده و از ارقام تقریباً حساس به شمار می رود. رقم زیتون روغنی با ۴ برگ آلوده و تعداد ۴ لکه در هر برگ آلوده ؛ ۳۷/۵ درصد آلودگی و۲۵ درصد ریزش برگ را به خود اختصاص داده و از ارقام تقریباً حساس به شمار می رود. رقم زیتون والانولیا با ۴ برگ آلوده و تعداد ۴ لکه در هر برگ آلوده ؛ ۳۷/۵ درصد آلودگی و ۱۲/۵ درصد ریزش برگ را به خود اختصاص داده و از ارقام تقریباً حساس به شمار می رود. رقم زیتون کنسروالیا با ۴ برگ آلوده و تعداد ۴ لکه در هر برگ آلوده ؛ ۳۷/۵ درصد آلودگی و۲۵ درصد ریزش برگ را به خود اختصاص داده و از ارقام تقریباً حساس به شمار می رود. حداکثر میزان درصد آلودگی نسبت به بیماری لکه طاووسی در ارقام زیتون رشید و زیتون گرگان درمنطقه ساری با ۹۰ درصد آلودگی و حداقل میزان درصد آلودگی نسبت به بیماری لکه طاووسی در رقم زیتون زرد با ۵ درصد آلودگی مشاهده شد. بنابراین می توان گفت در بین ارقام زیتون مورد بررسی ارقام زیتون رشید وگرگان در منطقه ساری حساس ترین ارقام نسبت به بیماری لکه طاووسی می باشند. همچنین بررسی مقدار ریزش برگ در ارقام مورد بررسی نشان داد که حداکثر مقدار ریزش برگ در ارقام زیتون رشید و زیتون گرگان درمنطقه ساری با ۷۵ درصد ریزش و حداقل مقدار ریزش برگ در رقم زیتون زرد با ۵درصد ریزش برگ مشاهده شد. به طور کلی میتوان بیان کرد که که در منطقه ساری واکنش رقم زیتون زرد از نوع مقاوم، ازقام زیتون میشن، شنگه، سویلانا، نیمه مقاوم، ارقام زیتون ماری، رقم شهرداری، آمیگدالیفونیا، کنسروالیا، والانولیا، فیمشی و زیتون روغنی از نوع نیمه حساس و در نهایت ارقام زیتون رشید و گرگان حساس بود. با توجه به شدت بیماری لکه طاووسی در مناطق مورد مطالعه ، توصیه می شود ارقام زرد ، میشن ، شنگه ، سویلانا ، روغنی که مقاومت قابل قبولی در مقابل بیماری لکه طاووسی نشان دادند، جهت کشت در این منطقه مورد استفاده قرار گیرند.

جدول (۱) : نتایج بدست آمده از تعداد برگ آلوده، درصد الودگی ، درصد ریزش برگ و مقاومت ارقام زیتون مورد آزمایش

نام رقم	تعداد برگ آلوده	تعداد لکه در هر برگ آلوده	در صد آلودگی	درصدریزش برگ	محل جمع آوری	میزان حساسیت و مقاومت
ماری	۴	۳	۳۷/۵	۲۵	ساری	نیمه حساس
میشن	۴	۳	۲۵	۲۵	ساری	نیمه مقاوم
رقم شهرداری(فاقد	۴	۵	۵۰	۳۷/۵	ساری	نیمه حساس
رشید	۵	۵	۹۰	۷۵	ساری	بسیارحساس
زرد	۳	۳	۱۲/۵	۱۲/۵	ساری	مقاوم
شنگه	۳	۴	۲۵	۲۵	ساری	نیمه مقاوم
سویلانا	۳	۴	۲۵	۱۲/۵	ساری	نیمه مقاوم
امیگدالیفونیا	۳	۵	۳۷/۵	۲۵	ساری	نیمه حساس
فیمشی	۴	۵	۳۷/۵	۳۷/۵	ساری	نیمه حساس
روغنی	۴	۴	۳۷/۵	۲۵	ساری	نیمه حساس
گرگان	۵	۵	۹۰	۷۵	ساری	یسیارحساس
والانولیا	۴	۴	۳۷/۵	۱۲/۵	ساری	نیمه حساس
کنسروالیا	۴	۴	۳۷/۵	۲۵	ساری	نیمه حساس

این مطالعه نشان داد که بیماری لکه طاووسی در مناطق ساری شایع بوده است که شیوع بالای رقم های زیتون در منطقه ساری را میتوان به شرایط آب و هوایی به خصوص رطوبت بالای این مناطق نسبت داد (۶) ؛ زیرا میزان بارش سالیانه در منطقه ساری۷۸۹/۲ میلیمتر می باشد. زمانی که شرایط آب و هوایی مرطوب باشد برای عامل بیماری لکه طاووسی که مفید بوده زیرا اسپورزایی و جوانه زنی این قارچ را افزایش میدهد (۲). مازن سلمان بیماری لکه طاووسی را در ارقام زیتون در مناطقی از فلسطین همچون هبرون، بثلعم، رام الله، نبلوس، خلق الله، تولکارم، سالفیت، جنین و توباس بررسی کردند و بیان کردند که بیماری لکه طاووسی یکی از بیماری های رایج در ارقام زیتون می باشد و بیان کردند که شدت بیماری لکه طاووسی با میزان بارش سالیانه و رطوبت در مناطق مورد بررسی رابطه مستقیم دارد. بدین معنی که در مناطقی که رطوبت بیشتری وجود داشت میزان بیماری لکه طاووسی در ارقام زیتون بیشتر بوده است (۱۰). صفر علی در سال ۱۳۸۶ ؛ بیماری لکه طاووسی زیتون و مقاومت چند رقم زیتون در مقابل بیماری لکه طاووسی را مورد بررسی و ارزیابی قرار داد. نتایج ارزیابی مقاومت ارقام زیتون در مقابل بیماری لکه طاووسی نشان داد که ارقام منزانیلا، روغنی (محلی رودبار)، زرد، کالامون، سویلانو، میشن، آمیگدالولیا، کارولئا، کنسروالیا، کورونایکی، فرانگیونتو، روغنی (محلی گرگان) آسکولانا، کراتینا، و ولانونیا حساس بودند، ارقام آربکینا، نابعلی بلدی و مرایولو نیمه حساس و ارقام ماری، فرانتویو، روسو، سیماری ملا، پیکوال، لچینو و دلچه اگوجیا مقاوم بودند. با توجه به میزان شیوع بیماری در منطقه ؛ توصیه می شود. رقم های ماری، فرانتویو، روسو، سیماری ملا ، پیکوال ، لچینو و دلچه اگوجیا که مقاومت قابل قبولی در مقابل بیماری لکه طاووسی نشان دادند، جهت کشت در این منطقه مورد استفاده قرار گیرند. (۱) ابانور و همکاران گزارش کردند که در سال ۲۰۰۸ که دمای هوا ۱۵ درجه و رطوبت بالا بود میزان بیماری لکه طاووسی شیوع بیشتری داشته است (۵). کلیه نتایج مطالعات محققین نشان میدهد که بیماری لکه طاووسی از بیماری های رایج درختان زیتون بوده و برخی ارقام به این بیماری حساس و برخی مقاوم می باشند. همچنین در کلیه مطالعات مشاهده شد که بین میزان فراوانی و شدت بیماری با میزان رطوبت رابطه مستقیمی وجود دارد. بطوریکه در کلیه مناطقی که رطوبت بالا وجود داشت ، میزان بیماری لکه طاووسی شدت بیشتری داشت که با نتایج بدست امده از تحقیق حاضر همسو بوده و مطابقت داشته است. بررسی بیماری لکه طاووسی و ارزیابی مقاومت ۱۳ رقم زیتون در منطقه ساری در مقابل این بیماری در اوایل اردیبهشت ماه ۱۳۹۵ نشان داد که میزان آلودگی و شدت بیماری لکه طاووسی روی درختان زیتون بالا بوده است. نتایج ارزیابی مقاومت ارقام زیتون در مقابل بیماری لکه طاووسی نشان داد که در منطقه ساری رقم های زیتون زرد (مقاوم) ، زیتون میشن (نیمه مقاوم) ، زیتون شنگه (نیمه مقاوم ، زیتون سویلانا نیمه مقاو) ، زیتون ماری (نیمه حسا)، رقم شهرداری فاقد نام) (نیمه حساس، زیتون رشید (حساس)، زیتون آمیگدالیفونیا (نیمه حساس)، زیتون فیمشی (نیمه حساس) ، زیتون روغنی (نیمه حساس) ، زیتون گرگان (حساس) ، زیتون والانولیا (نیمه حساس) ، زیتون کنسروالیا (نیمه حساس) بودند. با توجه به شدت بیماری لکه طاووسی در مناطق مورد مطالعه ، توصیه می شود ارقام زرد ، میشن ، شنگه ، سویلانا ، روغنی که مقاومت قابل قبولی در مقابل بیماری لکه طاووسی نشان دادند ، جهت کشت در این منطقه مورد استفاده قرار گیرند.

منابع

۱- مهدیان،ص.۱۳۸۶. بیماری لکه طاووسی زیتون و مقاومت چند رقم زیتون در مقابل*Spilocaea oleaginea* . علوم کشاورزی ایران، دوره۳۸.شماره ۳. ص ۳۶۵-۳۷۱

2-Al-Khatib M., Alhussaen K., El-Banna N., Zyadeh M., 2212. Biological control of olive leaf spot (peacock spot disease) caused by Cycloconium oleaginum(*Spilocea oleagina*). J. Microbiol. Antimicrob., Vol. 2(6): 64-67

3-Azeri, T., 1993. Research on olive leaf spot, olive knot and verticillium wilt of olive in Turkey. Bull. OEPP/EPPO Bull. 23: 437-442.

4-Mazen Salman, Abd-Almonem Hawamda, Ahmad Al-Ashqar Amarni, Mahmoud Rahil, Hajaj Hajjeh, Basel Natsheh, Ruba Abuamsha. 2211. Evaluation of the Incidence and Severity of Olive Leaf Spot Caused by *Spilocaea oleaginaon* Olive Trees in Palestine. American Journal of Plant Sciences, 2, 457-462

5- Obanor, F. O. Walter, M. E., Jones. E. and Jaspers, M. V.2225.Sources Variation in a Field Evaluation of the Incidence and Severity of Olive Leaf Spot," New Zealand Plant Protection, Vol. 58, 2225, pp. 273-277.

6-F.O. Obanor, M. Walter, E. E. Jones and M. V. Jaspers, 2228. “Effect of Temperature, Relative Humidity, Leaf Wetness and Leaf Age on Spilocaea oleaginaConidium Germination on Olive Leaves,”European Journal of Plant Pathology, Vol. 122, No. 3, pp. 211-222.

7-Graniti, A., 1993. Olive scab: a review. Bull. OEPP/EPPO Bull. 23: 377-384.

8- González-Lamothe R, Segura R, Trapero,A, Baldoni L, Botella MA, Valpuesta V (2222). Phylogeny of the fungus Spilocaea oleagina, the causal agent of peacock leaf spot in olive. FEMS Microbiol. Lett.,212: 149-155

9-Laviola, C. and Scarito, G., 1993. Observations on spore production in Spilocaea oleagina in southern Italy. Bull. OEPP/EPPO Bull. 23: 411-416.

10-Macdonald, A. J., M. Walter, M. Trought, C. M. Frampton and G. Burnip, 2222. Survey of olive leaf spot in New Zealand, New Zealand plant protection, 53: 126-132.

11-Mazen Salman, Abd-Almonem Hawamda, Ahmad Al-Ashqar Amarni, Mahmoud Rahil, Hajaj Hajjeh, Basel Natsheh, Ruba Abuamsha. 2211. Evaluation of the Incidence and Severity of Olive Leaf Spot Caused by Spilocaea oleaginaon Olive Trees in Palestine. American Journal of Plant Sciences, 2, 457-462

باکتری‌های اندوفیت بذر پنبه و بررسی تاثیر آنها بر جوانه-زنی و برخی خصوصیات گیاه‌چه پنبه

محمد رضی نتاج[1] و غلام خداکرمیان[2]*

۱- دانشجوی دکتری دانشگاه بوعلی سینا همدان و عضو هیات علمی موسسه تحقیقات پنبه کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان، ایران

۲- استاد دانشکده کشاورزی- دانشگاه بوعلی سینا همدان

** نویسنده مسئول: khodakaramian@yahoo.com*

چکیده

به منظور بررسی باکتری های اندوفیت بذر پنبه بر روی خصوصیات گیاهچه پنبه، جدایه های باکتری های اندوفیت از گیاهچه و ریشه چه های بذر پنبه جداسازی شدند. کلیه بذور با استفاده از اسید سولفوریک غلیظ کرک‌زدایی و با آب مقطر سترون شستشو شده و در داخل کاغذ صافی های سترون مرطوب، جوانه زنی شدند. شش جدایه پس از انجام آزمونهای بیوشیمیایی و تکمیلی انتخاب شدند. بذور، پس از کرک زدایی با اسید سولفوریک غلیظ و آب شویی با آب مقطر سترون در سوسپانسیونی از باکتری‌ها به غلظت cfu 10^5-10^6، به مدت ۲ ساعت قرار گرفتند. تعداد ۱۰۰ عدد بذر در داخل کاغذهای حوله‌ای سترون در سه تکرار قرار گرفته و در انکوباتور ۲۷ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. در دروه های سه و شش روزه خصوصیاتی نظیر درصد و سرعت جوانه زنی، طول ریشه چه و ساقه چه اندازه گیری و داده ها با استفاده از نرم افزار آماری SAS تجزیه و تحلیل شد. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل آماری گیاهچه سه روزه نشان داد که از نظر خصوصیات طول ریشه چه جدایه های ۹ و ۱۰ در مقایسه با سایر جدایه ها برتری داشتند. در مقایسه نتایج حاصل از گیاهچه شش روزه در خصوصیاتی نظیر طول ساقه چه، درصد و سرعت جوانه زنی و سرعت جوانه زنی کل جدایه های ۹، ۱۰ و ۱۶ در اغلب موارد تفاوت معنی داری داشتند. بر اساس نتایج حاصل از آزمونهای بیوشیمیایی و تجزیه ژنتیکی، جدایه ۱۶ به عنوان *Stenotrophomonas* sp. و سایر جدایه ها *Bacillus* sp. شناسایی شدند.

واژگان کلیدی: باکتری، اندوفیت، گیاهچه، پنبه

مقدمه

باکتری های تحریک کننده رشد گیاه، جزیی از برنامه مدیریت تلفیقی بیماری بوده و موجب کاهش مصرف مواد شیمیایی و عملیات کنترل زراعی می شوند (۱۵). این باکتریها می توانند در مقابل طیف وسیعی از عوامل بیماریزای گیاهی، سیستم مقاومت سیستمیک القایی را تحریک کنند. مقاومت سیستمیک القایی مکانیسمی است که نواحی غیر آلوده در گیاهانی که قبلا آلوده شده اند، در مقابل آلودگی مقاوم تر می شوند (۱۰). القای مقاومت القایی در برابر بیماری های مختلف در محصولات متعدد نظیر موز، لوبیا، برنج، و خیار توسط باکتری های *Pseudomonas* و *Bacillus* گسترده گزارش شده است (۳ و ۵). عوامل محرک رشد سودوموناس ها شامل تولید سیانید هیدروژن، سیدروفور، پروتئاز، ترکیبات ضدمیکربی و آنزیم های تثبیت کننده فسفات می باشد (۱۶).

اغلب گونه های *Pseudomonas* spp. به طور معنی داری طول گیاه، طول ریشه، و ماده خشک را افزایش داده و منجر به تولید جوانه و ریشه گیاه می شود. اغلب باکتری های تحریک کننده رشد گیاه مخصوصا اگر قبل از کاشت در بذر تلقیح شوند

قادر به استقرار در ریشه هستند. استفاده از باکتری های تحریک کننده رشد گیاه به عنوان عامل کنترل بیولوژیک جایگزینی برای استفاده از کودهای شیمیایی است که منجر به آلودگی محیط زیست شده اند (۱). در سال های اخیر استفاده از عوامل بیوکنترل به عنوان جایگزین و در جهت کاهش مصرف مواد شیمیایی در کشاورزی مطرح شده است (۸، ۱۸ و ۲۰). سودوموناس ها گروه عمده باکتری های ریزوسفر در بین جمعیت باکتریایی تحریک کننده رشد گیاه هستند که با راهکارهایی نظیر تولید هورمون های گیاهی، تحریک جذب مواد غذایی و کنترل بیمارگران گیاهی فعالیت می کنند (۷ و ۱۸).

طول ریشه و جوانه گوجه فرنگی، خیار، کاهو و سیب زمینی در نتیجه استفاده از باکتری *Pseudomonas* spp. افزایش یافت (۱۷). افزایش معنی داری در جوانه زنی، میزان شادابی و وزن خشک پنبه در استفاده از *P. fluorescens* در شرایط گلخانه رخ داد. جدایه *P. fluorescens* موجب تحریک ظهور و رشد گیاهچه و افزایش عملکرد همراه با کاهش بیماری شد (۱۳).

مواد و روش ها

جدایه های باکتری های اندوفیت از گیاهچه و ریشه چه های بذر پنبه جداسازی شدند. کلیه بذور با استفاده از اسید سولفوریک غلیظ کرکزدایی و با آب مقطر سترون شستشو شده و در داخل کاغذ صافی های سترون مرطوب، جوانه زنی شدند. شش جدایه پس از انجام آزمونهای بیوشیمیایی و تکمیلی انتخاب شدند. بذور، پس از کرک زدایی با اسید سولفوریک غلیظ و آب شویی با آب مقطر سترون در سوسپانسیونی از باکتری‌ها به غلظت cfu 10^{5}-10^{6}، به مدت ۲ ساعت قرار گرفتند. تعداد ۱۰۰ عدد بذر در داخل کاغذهای حوله‌ای سترون در سه تکرار قرار گرفته و در انکوباتور ۲۷ درجه سانتیگراد قرار گرفتند (ISTA). در دروه های سه و شش روزه خصوصیاتی نظیر درصد و سرعت جوانه زنی، طول ریشه چه و ساقه چه اندازه گیری و داده ها با استفاده از نرم افزار آماری SAS تجزیه و تحلیل شد.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل آماری گیاه‌چه سه روزه نشان داد که از نظر خصوصیات طول ریشه‌چه جدایه‌های ۵۵۰ و ۵۶۳ در مقایسه با سایر جدایه‌ها برتری داشتند. در مقایسه نتایج حاصل از گیاه‌چه شش روزه در خصوصیاتی نظیر طول ساقه-چه، درصد و سرعت جوانه‌زنی و سرعت جوانه‌زنی کل جدایه‌های ۵۵۰، ۵۶۳ و ۵۲۶ در اغلب موارد تفاوت معنی‌داری داشتند. بر اساس نتایج حاصل از آزمون‌های بیوشیمیایی و تجزیه ژنتیکی، جدایه ۵۲۶ به عنوان *Stenotrophomonas* sp. و سایر جدایه‌ها *Bacillus* sp. شناسایی شدند. افزایش میزان رشد و عملکرد در شرایط مزرعه ممکن است ناشی از تولید ترکیبات محرک رشد گیاه نظیر جیبرلین، سیتوکینین و اکسین توسط عوامل بیوکنترل باشد (۲ و ۹). مواد محرک رشد در توتون ناشی از استفاده از سویه *P. fluorescens* 89B-61، *B. pumilis* SE 34، *B. pumilis* T4، *B. pasteurii* C-9 و *Serratia marcescens* 90-166 گزارش شده است (۲۱). افزایش میزان شادابی گوجه‌فرنگی و فلفل در اثر استفاده از جدایه‌های *P. fluorescens* در بذر مشاهده شده است (۱۱). تولید مواد فرار ۲و۳-بوتاندیول و استوئین در گیاه برای تحریک رشد آرابیدوپسیس در اثر *B. subtilis* GB03 و *B. amyloliquefaciens* IN937a مشخص شد (۱۲).

جدول ۱- تجزیه واریانس صفات مختلف گیاهچه سه روزه پنبه در تیمارهای باکتریایی مختلف بذری

جدایه باکتری	طول ریشه‌چه	طول ساقه‌چه	وزن تر گیاه‌چه	وزن خشک گیاه‌چه	درصد جوانه‌زنی	سرعت جوانه‌زنی
شاهد	۲/۳۰۸ cd	۱/۳۱۶ab	۰/۵۰۸cd	۰/۲۹۹a	۹۳b-d	۳۰/۹۹۷b-d
۵۶۰	۲/۰۱۶cde	۱/۳۳۳ab	۰/۴۸۵d	۰/۲۸ab	۸۴fg	۲۷/۹۹۵fg
۵۵۴	۲/۷۳۳bc	۱/۳۷۴a	۰/۵۹bc	۰/۲۸۶ab	۹۲cd	۳۰/۶۶۲cd
۵۵۰	۲/۴۸۳cd	۱/۱۴۹ab	۰/۵۴۹cd	۰/۲۷ab	۹۷a	۳۲/۳۳a
۵۶۳	۳/۳۵۸ab	۱/۳۳۳ab	۰/۶۵۴ab	۰/۲۸۷ab	۹۵ab	۳۱/۶۶۵ab
۵۷۵	۳/۵۱۶a	۱/۳۰۸ab	۰/۶۰۵bc	۰/۲۶۴ab	۹۱d	۳۰/۳۳d
۳۵۰	۲/۳۱۶cd	۱/۳۵۸ab	۰/۵۳cd	۰/۲۶۴ab	۹۵ab	۳۱/۷۴۷ab
۵۲۶	۲/۲۱۶cd	۱/۲۹۱ab	۰/۵۳۷cd	۰/۲۷۴ab	۹۵ab	۳۱/۶۶۵ab

اعداد در هر ستون که حداقل در یک حرف مشترک می باشند، از نظر آماری در یک گروه قرار می گیرند.

جدول ۲- تجزیه واریانس صفات مختلف گیاهچه شش روزه پنبه در تیمارهای باکتریایی مختلف بذری

جدایه باکتری	طول ریشه چه	طول ساقه چه	وزن تر گیاه-چه	وزن خشک گیاه‌چه	درصد جوانه زنی	سرعت جوانه‌زنی	سرعت جوانه‌زنی کل
شاهد	۲/۷۵۸g	۴/۶۷۵de	۰/۹۴۸bc	۰/۲۸۷a-c	۹۶bc	۱۵/۹۹bc	۴۶/۹۹c-f
۵۶۰	۶/۶۷۵a	۶/۷۵۸a	۱/۱۸۷a-c	۰/۲۶۸a-c	۹۶bc	۱۵/۹۹bc	۴۳/۹۹gh
۵۵۴	۵/۹۵a-c	۵/۳۳۳a-e	۱/۰۵۵bc	۰/۲۳۹c	۹۳d	۱۵/۵d	۴۶/۱۶f
۵۵۰	۳/۷۰۸a-d	۶/۲۵۸a-c	۱/۱۶a-c	۰/۲۴۳c	۹۸ab	۱۶/۳۳ab	۴۸/۶۶a
۵۶۳	۵/۲b-d	۵/۱۵b-e	۰/۹۴۴bc	۰/۲۵۴bc	۹۶bc	۱۵/۹۹bc	۴۷/۶۶a-d
۵۷۵	۴/۴۰۸d-f	۴/۷۶۶c-e	۱/۰۹۴a-c	۰/۲۵۳bc	۹۸ab	۱۶/۳۳ab	۴۶/۶۶d-f
۳۵۰	۴/۸۵b-e	۵/۳a-e	۱/۱۷۹a-c	۰/۳۳۱a	۹۶bc	۱۵/۹۹bc	۴۷/۷۴a-c
۵۲۶	۵/۴۶۶a-d	۴/۱e	۱/۱۹۸ab	۰/۳۱۸ab	۱۰۰a	۱۶/۶۶a	۴۸/۳۲ab

اعداد در هر ستون که حداقل در یک حرف مشترک می باشند، از نظر آماری در یک گروه قرار می گیرند.

منابع

1. Ali, B., Sabri, A.N.and Hasnain, S. 2010. Rhizobacterial potential to alter auxin content and growth of *Vigna radiata* (L.) World Journal of Microbiology and Biotechnology 26:1379-1384.
2. Dubeikovsky, A. N., Mordukhova, E. A., Kochethov, V. V., Polikarpova, F. Y.and Boronin, A. M. 1993. Growth promotion of black current soft wood cuttings by recombinant strain *P. fluorescens* BSP53 synthesizing an increased amount of indole-3-acetic acid. Soil Biology and Biochemistry, 25:1277–1281.
3. Dutta, S., Mishra, A. K., and Kumar, B. S. D. 2008. Induction of systemic resistance against fusarial wilt in pigeon pea through interaction of plant growth promoting rhizobacteria and rhizobia. Soil Biology and Biochemistry 40:452–461.
4. Harish, S., Kavino, M., Kumar, N., Saravanakumar, D., Soorianathasundaram, K. and Samiyappan, R. 2008. Biohardening with plant growth promoting rhizosphere and endophytic bacteria induces systemic resistance against Banana bunchy top virus. Applied Soil Ecology 39:187–200.
5. Hasan, M. N., Afghan, S. and Hafeez, F. Y. 2010. Suppression of red rot caused by *Coletotrichium falcatum* on sugarcane plants using plant growth-rhizobacteria. BioControl 55:531-542.
6. ISTA. 1999. International Rules for Seed Testing. Seed Science and Technology 27: Supplement Rules:27–31.
7. Minaxi, S. and Saxena J. 2010. Disease suppression and crop improvement in moong beans (*Vigna radiata*) through Pseudomonas and Burkholderia strains isolated from semi-arid region of Rajasthan, India. BioControl 55:799–810.
8. Misk, A. and Franco, C. 2011. Biocontrol of chik pea root rot using endophytic actinobacteria. Bio Control 56:811-822.
9. Pal, K. K., Dey, R., Bhat, D. M. and Chauhan, S. M. 2000. Enhancement of groundnut growth yield by plant growth promoting rhizobacteria. International Arachis News Letter,19:51–53.
10. Pieterse, C. M. J., Pelt, J. A., Verhagen, B. W. M., Jurriaan, T., Wees, S. C. M., Léon-Kloosterziel, K. M. and Loon, L. C. 2003. Induced systemic resistance by plant growth-promoting rhizobacteria. Symbiosis, 35:39-54.
11. Ramamoorthy, V., Raguchander, T. and Samiyappan, R. 2000. Enhancing resistance of tomato and hot pepper to Pythium diseases by seed treatment with fluorescent pseudomonads. European Journal of Plant Pathology, 108:429–441.

12. Ryu, C. M., Farag M. A., Hu, C. H., Reddy, M. S., Wei, H. X., Pare, P. W., Kloepper, J. W. 2003. Bacterial volatiles promote growth in Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences, 100: 4927-4932.
13. Safyazov, J. S., Mannanov, R. N., Sattarova, R. F. 1995. The use of bacterial antagonists for the control of cotton diseases. Field Crops Research, 43:51–54.
14. Santhanam, V. 196): Breeding in cotton. Indian Council Agriculture Research Technical Bulletin,10:68.
15. Shivalingaiah, S and Umesh, S. 2013. *Pseudomonas fluorescens* inhibits the *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, the bacterial leaf blight pathogen in rice. Canadian Journal of Plant Protection, 1:147-153.
16. Suresh, A., Pallavi, P., Srinivas, P., Kumar, V. P., and Chandra, S. J. 2010. Plant growth promoting activities of fluorescent pseudomonads associated with some crop plants. African Journal of Microbiology Research 4:1491-1494.
17. Van Peer, R. and Schippers, B. 1988. Plant growth response in bacterization with selected *Pseudomonas* spp. strains and rhizosphere microbial development in hydrophonic cultures. Canadian Journal of Microbiology, 35:456–463.
18. Vega, F. E., Posada, F., Aime, M. C., Pava, R. M., Infante, F., and Rehner, S. A. 2008. Entomopathogenic fungal endophytes. BioControl 46:72-82.
19. Weller, D. M., 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. Annual Review of Phytopathology 26:379-407.
20. Yang, X. J., Jiang, D., Fu Y., Li, G., and Lin, F. 2007. Antifungal substances produced by *Penicilliuum oxalium* strain py-I potential antibiotics against plant pathogenic fungi. World Journal of Microbial Biotechnology 24:909-915.
21. Zhang, S., Reddy, M. S. and Kloepper, J. W. 2003. PGPR mediated growth promotion of tobacco and blue mold disease control. In: Proceedings of the International Seminar, International Spice Research Institute, Calicut, India:444-45

ارزیابی برخی ژنوتیپ های پنبه نسبت به بیماری پژمردگی ورتیسلیومی

محمد رضی نتاج*[1] و حجت اله محمد جانلو[2]

۱ و ۲- اعضای هیات علمی موسسه تحقیقات پنبه کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان، ایران

* نویسنده مسئول: *mrazinataj@yahoo.com*

چکیده

در جهت ارزیابی عملکرد و اجزای عملکرد ارقام جدید پنبه و تحمل به بیماری پژمردگی ورتیسلیومی در مزرعه، ده رقم پنبه در غالب طرح بلوکهای کاملا تصادفی با چهار تکرار در ایستگاه تحقیقات پنبه کردکوی در طی سالهای۱۳۹۱ و ۱۳۹۲مورد ارزیابی قرار گرفتند. درصد بیماری، شاخص، شدت بیماری، عملکرد و اجرای عملکرد مورد بررسی قرارگرفت و مطالعه بیماری براساس آلودگی آوندی ساقه و آلودگی برگی انجام شد. نتایج نشان داد که ارقام Teshkhi-9 و J74-14 کم‌ترین درصد وقوع (۲۱/۹۸ و ۲۲/۲۱)، کم‌ترین شدت (۱/۰۷ و ۰/۸۳) و کم‌ترین شاخص بیماری (۲۳/۳۷ و ۱۹/۳۸) را داشته و از طرفی رقم ورامین بالاترین درصد وقوع (۴۴/۰۷)، بالاترین شدت (۲/۰۳) و بالاترین شاخص بیماری (۹۰/۳۲) را داشت و جزو ارقام حساس به بیماری بود. ارقام CRI-114، CRI-108، **Teshkhi-9** و J74-14 به ترتیب بیشترین محصول وش را تولید کرده و اختلاف معنی‌داری با دیگر ارقام داشته و نسبت به بیماری پژمردگی ورتیسلیومی، متحمل‌تر بودند.

واژگان کلیدی: ژنوتیپ، پنبه، پژمردگی ورتیسلیومی و تحمل

مقدمه

بیماری پژمردگی ورتیسلیومی (*Verticilium dahliae* Kleb) عامل پژمردگی محصولات مهم زراعی و باغی، یک قارچ خاکزی با گسترش جهانی است و در بعضی از مناطق پنبه‌کاری که مستعد توسعه بیماری می‌باشند عامل محدودکننده‌ی کشت پنبه است. در ایران این بیماری در مناطق پنبه‌کاری کشور مثل استان‌های گلستان، فارس، خراسان، اردبیل، آذربایجان، قم و استان مرکزی وجود دارد ولی خسارت آن در استان فارس در شهرستان استهبان و در استان گلستان مناطق کردکوی، بندرگز، فاضل‌آباد و خان ببین بیش‌تر است و عامل محدودکننده‌ی کشت ارقام پر محصول و حساس به بیماری است (۱). قارچ عامل بیماری از گروه بیمارگرهای خاک‌زاد به حساب می آید که به‌صورت میکرو اسکلروت در خاک به‌سر می برد، فعالیت و خسارت آن بیشتر در خاک‌های قلیایی (pH =۷/۵) و زمین‌های سنگین و مرطوب که دارای ازت بیشتری هستند می‌باشند (۷ و ۸).

یکی از استراتژی‌های اصلی برای مدیریت پژمردگی ورتیسلیومی پنبه شامل استفاده از ارقام متحمل و یا مقاوم در برابر بیماری است (۲ و ۱۰). علاوه بر این، تلاش‌های گسترده‌ای در انتقال ژن صفات مطلوب از ارقام پنبه باربادانس به پنبه‌های آپلند در دستور کار قرار دارد (۹). گزارش شده است که بالاترین کاهش عملکرد در گیاهانی دیده شد که علائم بیماری قبل از اول مرحله‌ی گلدهی مشاهده شد و اثرات علائم مرحله‌ی آخر بر عملکرد ناچیز بود (۳). در تحقیقی چهار جدایه از بیماری پژمردگی ورتیسلیومی را جهت غربال چهار رقم پنبه را مورد بررسی قراردادند و نتیجه گرفتند که ارقام پیما ۷ و اکالا برما مقاوم‌ترین به بیماری بودند و رقم اکالا ۴۴ حساس‌ترین به بیماری بودند (۴). ۲۸ رقم از ارقام تجاری پنبه در ترکیه مورد

ارزیابی قرار گرفتند و نشان داده شد که رقم کار من به سویه برگ‌ریز حساس بودند و به سویه‌ی غیر برگ‌ریز مقاومت نشان دادند. ولی رقم st-373 به هر دو پاتوتیپ برگ‌ریز و غیر برگ‌ریز حساسیت نشان دادند (۶).

مواد و روش

این آزمایش در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار و ۱۰ تیمار در ایستگاه تحقیقات پنبه کارکنده (واقع در ۷ کیلومتری غرب کردکوی) در دو سال (۱۳۹۱-۹۲) به اجرا درآمد. هر کرت آزمایش شامل ۶ خط یازده متری با تراکم ۲۰×۸۰ سانتی‌متر کشت گردید و کلیه‌ی یادداشت‌برداری‌ها و برداشت محصول روی چهار خط وسط هر کرت با حذف نیم متر از ابتدا و انتهای خطوط به‌منظور حاشیه کرت آزمایش انجام شد. درصد و شدت بیماری در نیمه‌ی دوم شهریورماه از طریق ارزیابی تعدادی از بوته‌های هر کرت و درجه‌بندی صفرتا سه از طریق برش عرضی ساقه (۰=بدون آلودگی در بخش تنه ساقه، ۱=۱-۳۳ درصد رنگ‌پریدگی آوند چوبی،۲=۳۴-۶۷ درصد رنگ‌پریدگی آوند چوبی، ۳=۶۸-۱۰۰ درصد رنگ‌پریدگی آوند چوبی با فرمول ذیل محاسبه شدند. شاخص بیماری از حاصل‌ضرب درصد بیماری در شدت بیماری به‌دست می‌آید. a اشاره به تعداد بوته‌های بیمار با درجه صفر، b اشاره به تعداد بوته‌های بیمار با درجه یک، c اشاره به تعداد بوته‌های بیمار با درجه دو، d اشاره به تعداد بوته‌های بیمار با درجه ۳ و m اشاره به تعداد کل بوته مورد بررسی در کرت است (بوچناور و اروین، ۱۹۷۶). پس از تجزیه واریانس و مقایسه میانگین، حساس‌ترین و مقاوم‌ترین رقم تعیین گردید. تجزیه واریانس مرکب (دوساله) صفات انجام و میانگین صفات در ارقام و دورگ‌های مختلف با روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن مورد مقایسه قرار گرفتند و تجزیه آماری صفات با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام شد.

$$\text{درصد وقوع} = \frac{\text{تعداد بوته های بیمار هر کرت}}{\text{تعداد بوته های سبز هر کرت}} \times 100$$

$$\text{شدت بیماری} = \frac{(a\times0)+(b\times1)+(c\times2)+(d\times3)}{m}$$

نتایج و بحث

جدول تجزیه‌ی واریانس صفات نشان داد که اثر سال در صفات تعداد و شدت بیماری در سطح یک درصد معنی‌دار و در صفت شاخص بیماری و عملکرد محصول در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود. تغییرات آب و هوای سالهای ۹۱ و ۹۲ شرایط مطلوب جهت تعداد، شدت و تا حدودی شاخص بیماری فراهم نمود. این تغییرات در درصد بیماری معنی‌دار نبود. عملکرد وش تحت تأثیر شرایط سال بود میانگین بیماری دوساله نشان می‌دهد که ظهور بیماری به علت شرایط خشکی دوساله در حداقل بوده و میانگین درصد بیماری بین ۲۸ تا ۲۹ درصد بوده است (جدول۱). اختلاف ارقام و دو رگ‌ها در صفات بیماری(تعداد،شاخص،درصد و شدت بیماری) و در عملکردوش در سطح یک درصد معنی‌دار بود. نتایج نشان داد که ارقام و دو رگ‌ها در تحمل و حساسیت به بیماری و عملکرد متغیرند. اثر متقابل سال در تیمار درشدت بیماری در سطح ۵ درصد و در شاخص بیماری در سطح یک درصد معنی‌دار بود. نتایج نشان داد که ارقام در شرایط سال و آب و هوای مناسب بیمار شدند و تغییرات آب و هوا در اثر شرایط سال موجب افزایش یا کاهش شدت و شاخص بیماری گردید (جدول ۱).

تغییرات درشدت و شاخص بیماری بیشتر تحت تأثیر تغییرات سال و شرایط آب‌و هوا هست. درجه حرارت بین ۲۲ و ۲۷ درجه سانتیگراد و افزایش رطوبت محیط موجب پیشرفت بیماری می‌شود و شرایط سال بیش‌ترین تأثیر را در بین ارقام با دوره رشدی یکسان دارد. رقم ورامین بیش‌ترین درصد بیماری (۴۴ درصد) و بیش‌ترین شدت بیماری (بیشتر از ۲) و بیش‌ترین تعداد و شاخص بیماری را دارد و نسبت به بقیه ارقام و دو رگ‌ها حساس‌ترین ارقام محسوب می‌شود. افزایش بیماری به‌ویژه شدت بیماری که نشان می‌دهد بیشتر بوته‌های آلوده به بیماری در این رقم درجه ۲ یا بیشتر بوده و موجب کاهش محصول کل وش شده است. کم‌ترین آلودگی مربوط به ارقام و دو رگ‌های J74-14، Teshkhi-9، CRI-108 و CRI-114 بود و این ارقام و دو رگ‌های جدید کم‌ترین شدت، درصد و شاخص بیماری داشته و بیش‌ترین محصول وش را تولید کردند. ارقام پنبه اکالا در کالیفرنیا و مکزیک، بهتر از ارقام باربادانس پیما به بیماری پژمردگی ورتیسلیومی مقاومت داشته و ارقامی مانند پی ماستر HS-26، دلتاپاین ۵۶۹۰ و استونویل ۴۹۵ نسبت به بیماری کم‌تر مقاوم بودند (۱۰).

جدول۱- نتایج تجزیه واریانس مرکب دوساله صفات کمی و زراعی ارقام پنبه

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات				
		تعداد بوته‌های بیمار	شاخص بیماری	درصد وقوع	شدت بیماری	عملکرد کل (Kg/h)
سال	۱	۱۶۳۸/۰۵**	۳۹۹۱/۴۴**	ns۲۰/ ۸	۵/۶۱**	*۰/۰۳۶
تکرار در سال	۶	۶۲/۰۱	۶۷۲/۵۴	۱۲۱/۲۷	۰/۴۶۱	۰/۰۶۴
تیمار	۹	۸۲/۱۰**	۳۱۷۲/۳۹**	۳۵۳/۰۱۵**	۰/۸۴۲**	۰/۰۵۹**
سال * تیمار	۹	ns۳۶/۶۸	۴۳۷/۱۱*	ns۷۵/۲۶	۰/۴۳**	ns۰/۰۱۵
اشتباه کل	۵۴	۲۵/۳۳	۱۸۳/۵۰	۷۰/۵۵	۰/۱۴۴	۰/۰۰۸
ضریب تغییرات	-	۱۱/۵۶	۳۵/۵۶	۹/۲۳	۲۹/۰۲	۲/۵۲
میانگین	-	۱۴/۷۷	۳۸/۰۹	۲۸/۴۸	۱/۳۰	۲۷۲۰/۶۷

: عدم اختلاف معنی‌دار * : اختلاف معنی‌دار در سطح آماری ۵ درصد ** : اختلاف معنی‌دار در سطح آماری ۱ درصدns

جدول۲- مقایسه میانگین مرکب (دوساله) صفات کمی و کیفی ارقام پنبه

ارقام	تعداد بیماری	شاخص بیماری	درصد بیماری	شدت بیماری	محصول کل (Kg/h)
TBL-60	۱۶/۳۷ ab	۴۵/۸۲ b	۲۹/۵۵ bc	۱/۵۳ b	۱۸۵۹ e
CRI-114	۱۲ bcd	۲۶/۰۶ cde	۲۲/۶۵ c	۱/۲۳ bc	۳۵۹۲ a
CRI-108	۱۱/۲۵ d	۳۴/۲۴ bcd	۲۳/۹۵ c	۱/ ۵۰ b	۳۲۸۰a
TBL-180	۱۵/۳۷ bcd	۳۶/۳۷ bcd	۳۰/۰۲ bc	۱/۲۲ bc	۱۷۴۵ e
J74-14	۱۲/۳۷ cd	۱۹/۳۸ e	۲۲/۵۲ c	۰/۸۳ d	۳۲۳۴ a
Teshkhi-9	۱۲ cd	۲۳/۳۷ de	۲۱/۹۸ c	۱/۰۷ cd	۳۰۷۴ ab
N2G-80	۱۸/۶۲ ab	۳۸/۵۵ bc	۳۲/۶۲ b	۱/۲۵ bc	۲۵۹۸ bc
V-930	۱۴/۷۵ bcd	۳۳/۰۹ bcd	۲۸/۰۴ bc	۱/۱۷ bcd	۲۴۵۹ cd
Varamin	۲۱/۱۲ a	۹۰/۳۲ a	۴۴/۰۷ a	۲/۰۳ a	۲۰۲۵ de
Sahel	۱۳/۸۷ bcd	۳۴/۰۴ bcd	۲۹/۴۲ bc	۱/۱۷ bcd	۲۶۳۷ bc

حروف مشابه در هر ستون نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشد.

منابع

۱. عرب سلمانی ، م .ک، رهنما.ح، رحیمیان و ض، بنی‌هاشمی. ۱۳۸۳. برآوردی از درصد کاهش عملکرد پنبه ناشی از بیماری پژمردگی ورتیسلیومی در استان گلستان. مجموعه مقالات شانزدهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران، تبریز. صفحه ۳۱۰.

2. Bajaj, S., Wang, W., Hughs, S. E. Percy, R. G., Ulloa, M. and Zhang, J. 2008. Evaluation of cotton germplasm and breeding populations for salt tolerance. National Cotton Council Beltwide Cotton Conference, January 8-11, 2008, Nashville, TN. Chapter 10.
3. Bejarano-Alcazar, J., Blanco-Lopez, M. A., Melero-Vara, J. M. and Jimenez-Diaz, R. M. 1997. The influence of verticillium wilt epidemics on cotton yield in Southern Spain. Plant Pathology. 46:168-178.
4. Bolek Y., Bell, A. A., El-Zik, K. M., Thaxton, P. M. and Magill, C. W. 2005. Reaction of cotton cultivars and an F2 population to stem inoculation with isolates of *Verticillium dahliae*. Journal of Phytopathology, 153: 1-5.

5. Buchenauer, H. D. and Erwin, C. 1976. Effect of the plant growth retardant Pydanon on Verticillium wilt of cotton and tomato. Phytopathology. 49:68-72.
6. Gore, M. E., Caner, K. O., Altin, N., Aydin, M. H., Erdogan, O., Filizer, F. and Buyukdogerlioglu, A. 2009. Evaluation of cotton cultivars for resistance to pathotypes of *Verticillium dahliae*. Crop protection,28: 215-219.
7. Pegg, G. F. 2002. Verticillium Wilts. CAB Publishing. 576 p.
8. Schnathorst, W. C. 1981. Life cycle and epidemiology of Verticillium. Pages 81-111 in: Fungal Wilt Diseases of Plants. M. E. Mace, A. A. Bell and C. H. Beckman. Academic Press. New York
9. Zhang J. and Percy, R. G. 2007. Improving Upland cotton, *Gossypium hirsutum* by introducing desirable genes from *G. barbadense*. Proceedings of the fourth World Cotton Research Conference, 10-14September 2007, Lubbock, Texas, USA, pp.19.
10. Zhang, J. F., Wang, W., Bajaj, S., Gatica, H., Sanogo, S., Flynn, R., French, C., Percy, R., Ulloa, M. and Hughs, E. 2008. Verticillium wilt resistance in cotton: germplasm evaluation and inheritance. p 838–855. In Proc. Beltwide Cotton Conf.

شناسایی باکتری اندوفیت جنس *Bacillus* sp. به عنوان آنتاگونیست باکتری *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum*

محمد رضی نتاج[1] و غلام خداکرمیان[2*]

۱- دانشجوی دکتری دانشگاه بوعلی سینا همدان و عضو هیات علمی موسسه تحقیقات پنبه کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان، ایران

۲- استاد دانشکده کشاورزی- دانشگاه بوعلی سینا همدان

* نویسنده مسئول: *mrazinataj@yahoo.com*

چکیده

به منظور بررسی اثرات آنتاگونیستی باکتری های اندوفیت بذر پنبه بر روی عامل بیماری بلایت باکتریایی پنبه *Xanthomonas citri subsp. malvacearum*، جدایه های باکتری های اندوفیت از گیاهچه و ریشه چه های بذر پنبه جداسازی شدند. به منظور بررسی خواص آنتاگونیستی جدایه های اندوفیت، در غالب طرح کاملا تصادفی در سه تکرار، سوسپانسیونی از جدایه باکتری عامل بلایت پنبه به رقت 1×10^{7} cfu/ml تهیه و چند قطره از آن به طور یکنواخت در روی محیط کشت آگار غذایی پخش گردید. دیسکی از کشت ۲۴-۴۸ ساعته باکتری های آنتاگونیست به طور وارونه بر روی محیط قرار گرفت. پتری دیش در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت قرار گرفت. اندازه هاله بازدارنده مورد بررسی و با نرم افزار آماری SAS ارزیابی شد. بر اساس نتایج حاصله اغلب جدایه ها قادر به جلوگیری از رشد عامل بیماری بلایت باکتری پنبه نبودند و در بین جدایه ها بیشترین بازدارندگی مربوط به جدایه های ۵۵۰ و ۵۷۵ بوده است که بر اساس نتایج حاصل از آزمون های بیوشیمیایی و مولکولی جدایه های مزبور به جنس *Bacillus* sp. تعلق داشتند. بر اساس تحقیقات انجام شده نیز برخی از ترکیبات تولید شده توسط این باکتری ها خواص ضدباکتریایی و ضدقارچی دارند که می توانند در برنامه مدیریت تلفیقی عوامل بیماریزا در نظر گرفته شوند.

واژگان کلیدی: اندوفیت، آنتاگونیست، بلایت باکتریایی پنبه و*Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum*

مقدمه

بلایت باکتریایی پنبه یکی از مهمترین عوامل خسارتزای پنبه می باشد که تقریبا در اکثر مناطق پنبه خیز دنیا وجود دارد و در فصولی که شرایط محیطی برای گسترش این بیماری مناسب باشد کاهش عملکرد شدیدی را سبب می شود (۲). عامل بیماری باکتری *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* می باشد که منبع اولیه آن از بذور آلوده می باشد.

کنترل بیولوژیک بیماری های گیاهی به عنوان یکی از موثرترین روش های جایگزین استفاده از مواد شیمیایی در سال های اینده مطرح می باشد. در بین باکتری های متعدد، گونه های *P. fluorescens*، *P. putida*، *Burkholderia cepacia* و *P. aeruginisa* با موفقیت شناسایی شدند (۱۲ و ۱۵). کارایی *P. fluorescens* در جهت کنترل بیماری بلایت باکتریایی برنج ناشی از *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (۱۴)، *Pectobacterium caratovorum* subsp. *caratovorom* (۷) ، *Ralstonia solanacearum* در موز، بادنجان و گوجه فرنگی (۱) گزارش شده است. جدایه باکتری *P. fluorescens* FPT9601 جدا شده از

ریزوسفر گوجه فرنگی به طور معنی داری بیماری پژمردگی باکتریایی گوجه فرنگی ناشی از *Ralstonia solanacearum* را محدود نمود (۱۶).

برخی سودوموناس های فلورسنت اندوفیت بوده و می توانند ازطریق تیمار بذری گسترش یابند (۸). سودوموناس های فلورسنت و *B. subtilis* به عنوان عوامل القای مقاومت در بیماری اندام هوایی شناخته می شوند (۴ و ۹). هر دو روش بازدارندگی و القای مقاومت می تواند در کنترل بیماری بلایت باکتریایی پنبه با استفاده از مخلوط جدایه های *Pseudomonas fluorescens* و *B. subtilis* نقش داشته باشند. پارامترهای رشد مانند ارتفاع گیاه، طول ریشه، تعداد شاخه و تعداد غوزه نیز در تیمارهایی که از عوامل بیوکنترل استفاده شده بود افزایش یافت. افزایش توده بیومس ممکن است به علت تولید محرکهای رشد گیاه و یا تحریک مستقیم در جذب و تولید سیدروفور و آنتی بیوتیک برای محافظت از عوامل مضر در ریزوسفر باشد (۱۲).

مواد و روش ها

بذور دلینته شده چهار رقم پنبه پس از آبشویی با آب لوله شهری، با هیپوکلریت سدیم ۱ درصد و تریتون X-100 ۰/۰۵ درصد به مدت ۹۰ دقیقه استریل شدند. بذور در داخل پتری دیشهای استریل در دمای ۲۵-۲۷ درجه سانتیگراد به مدت سه روز قرار گرفتند. ریشه چه های گیهچه های سه روزه با ابزار استریل جدا شده و در هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد همراه با سورفاکتانت به مدت دو دقیقه ضدعفونی شده و سپس با آب مقطر استریل سه بار آبشویی شدند. قطعات گیاهی فوق در آب مقطر استریل له شده و سوسپانسیون حاصل در روی محیط آگار غذایی مخطط گردید. پتری دیشها در دمای ۲۷ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شده و تک کلنی های ظاهر شده خالص سازی شده و سایر آزمایشات انجام شد (۱۰).

به منظور بررسی خواص آنتاگونیستی جدایه های اندوفیت، سوسپانسیونی از جدایه باکتری عامل بلایت پنبه به رقت cfu/ml 1×10^{7} تهیه و چند قطره از آن به طور یکنواخت در روی محیط کشت آگار غذایی پخش گردید. دیسکی از کشت ۲۴-۴۸ ساعته باکتری های آنتاگونیست به طور وارونه بر روی محیط قرار گرفت. پتری دیش در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت قرار گرفت. اندازه هاله بازدارنده مورد بررسی قرار گرفت (۵). آزمایش در غالب طرح کاملا تصادفی با چهار تکرار انجام و نتایج با نرم افزارهای آماری تجزیه و تحلیل شد.

نتایج و بحث

در بین چهل و نه جدایه، اغلب آن‌ها قادر به جلوگیری از رشد عامل بیماری بلایت باکتری پنبه نبودند و در بین جدایه ها بیشترین بازدارندگی مربوط به جدایه های ۵۵۰ و ۵۷۵ بوده است که بر اساس نتایج حاصل از آزمون های بیوشیمیایی و مولکولی جدایه های مزبور به جنس *Bacillus* sp. تعلق داشتند. بر اساس تحقیقات انجام شده نیز برخی از ترکیبات تولید شده توسط این باکتری ها خواص ضدباکتریایی و ضدقارچی دارند که می توانند در برنامه مدیریت تلفیقی عوامل بیماریزا در نظر گرفته شوند (۳).

اسپری گیاه پنبه با جدایه *P. fluorescens* در کاهش وقوع بیماری بلایت باکتریایی مشاهده شده است. پنج جدایه از *Psudomonas* sp. در کنترل بیماری بلایت باکتریایی پنبه موثر بودند (۱۱). از باکتری *B. subtilis*، برای کنترل بیماری بلایت باکتریایی پنبه در شرایط گلخانه استفاده شد (۱۳). استفاده از گونه های *Bacillus* spp. برای کنترل بیماری در مقابل استفاده از گونه های *Pseudomonas* spp. و سایرباکتری های گرم منفی دارای مزیت‌هایی مانند، دوره زندگی طولانی تر به خاطر توانایی در تشکیل اندوسپور و فعالیت های وسیع الطیف تر آنتی بیوتیک های تولیدی آنها است (۶).

منابع

1- Anuratha, C. S. and Gnanamanickam, S. S. 1990. Biological control of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum* in India with antagonistic bacteria. Plant and Soil, 124:109–116.
2- Bradbury, J. F. 1986. Guide to Plant Pathogenic Bacteria. C.A.B. International Mycological Institute, Ferrylane, Kew, Surrey, England. 332 pp.
3- Choudhary, D. K. and Johri, B. N. 2009. Interactions of *Bacillus* spp. and plants – With special reference to induced systemic resistance (ISR). Microbiological Research, 164:493–513.
4- Jayaraj, J., Yi, H., Liang, G. H., Muthukrishnan, S. and Velazhahan, R. 2004. Foliar application of *Bacillus subtilis* AUBS1 reduces sheath blight and triggersdefense mechanisms in rice. Journal of Plant Diseaseand Protection, 111:115–125.
5- Khodakaramian, Gh., Heydari, A. and Balestra, G. M. 2008. Evaluation of pseudomonads bacterial isolates in biological control of citrus bacterial canker disease. Internatio. J. Acric. Res. 3:268-272.
6- Kim, D. S., Cook, R. J., Weller, D. M. 1997. *Bacillus* sp. L324-92 for biological control of three root diseases of wheat grown with reduced tillage. Phytopathology, 87:551–558.
7- Kloepper, J. W., Leong, J., Teintze, M. and Schroth, M. N. 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. Nature,286:885–886.
8- Krishnamoorthy, K. and Gnanamanickam, S. S. 1998. Biological control of rice blast by *Pseudomonas fluorescens* strain Pf7-14: Evaluation of a marker gene and formulations.Biological Control,13:158–165.
9- Liu, L., Kloepper, J. W. and Tuzun, S. 1995. Induction of systemic resistance in cucumber against bacterial angular leaf spot by plant growth-promoting rhizobacteria. Phytopathology, 85:843–847.
10- Misaghi, I. J. and Donndelinger, C. R. 1990. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. Phytopathology 80:808-811.
11- Mondal, K. K. 1999. Beneficial effects of indigenous cotton rhizobacteria on seed greminability, growth promotion and suppression of bacterial blight disease. Indian Phytopathology, 52:228–235.
12- Salaheddin, K., Valluvaparidasan, V., Ladhalakshmi, D. and Velazhahan, R. 2010. Management of bacterial blight of cotton using a mixture of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*. Plant Protect. Sci., 46:41–50.
13- Sanjay, A., Parashar, R. D. 2002. Mechanisms of biological control of cotton bacterial blight by phylloplane antagonists. Tropical Agriculture, 79:56–60.
14- Vidhyasekaran, P., Kamala, N., Ramanathan, A., Rajappan, K., Paranidharan, V. and Velazhahan, R. 2001. Induction of systemic resistance by *Pseudomonas fluorescens* Pf1 against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice leaves. Phytoparasitica, 29:155–166.
15- Vidhyasekaran, P. and Muthamalin, M. 1999. Evaluation of powder formulation of *Pseudomonas fluorescens* Pf1 for control of rice sheath blight. Biological Science and Technology, 9:67–74.
16- Zhang, Z., Yuen, G. Y., Sarath, G. and Penheiter, A. 2001. Chitinases from the plant disease biocontrol agent, *Stenotrophomonas maltophilia* C3. Phytopathology, 91, 204–211.

ارزیابی کارایی نانو ذرات نقره سیلور در کنترل بیماری های مرگ گیاهچه پنبه

محمد رضی نتاج
عضو هیات علمی موسسه تحقیقات پنبه کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان، ایران
** نویسنده مسئول: mrazinataj@yahoo.com*

چکیده

مرگ گیاهچه ناشی از عوامل قارچی نظیر ریزوکتونیا و وفوزاریوم، به عنوان یکی از بیماری های مهم پنبه در ایران محسوب می شود. خسارت بیماری ناشی از پوسیدگی بذر و مرگ گیاه می باشد. در بررسی دزهای پیشنهادی نانو ذرات نقره شرکت سازنده به عنوان عامل کنترل کننده مرگ گیاهچه پنبه، اثر این ماده در کنترل بیماری مرگ گیاهچه در طی دو سال در ایستگاه تحقیقات کارکنده در غالب طرح بلوکهای کامل تصادفی با شش تیمار و چهار تکرار مورد ارزیابی قرار گرفت. بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش ماده نانوسیلور در دزهای ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ پی پی ام موثر نبوده و نتوانستند از بروز و گسترش بیماری مرگ گیاهچه جلوگیری کند.

واژگان کلیدی: نانوسیلور، مرگ گیاهچه، پنبه و قارچکش

مقدمه

عدم رویش و یا پوسیدگی بذر به عوامل ژنتیکی، مکانیکی، فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی مربوط است. میکروارگانیسمهای بذرزاد یا خاکزاد مسئول ایجاد پوسیدگی بذر هستند. شرایط محیطی مانند رطوبت زیاد، خاکهای سنگین، وجود علفهای هرز و عدم دقت در جین زدن وش از جمله عوامل تشدید کننده پوسیدگی بذر هستند. ضدعفونی بذر شیوه ای برای نابودی و خنثی سازی عوامل بیماریزا، حفاظت بذر در حال رویش و جوانه از عوامل بیماریهای خاکزاد و بذر زاد می باشد. استفاده از سموم شیمیائی در ضدعفونی بذر ارزان ترین و موثرترین راه کنترل اکثر عوامل بیماریزا می باشد. ضدعفونی بذر توسط یک قارچکش ممکن است باعث نابودی یا بازدارندگی رشد عوامل بیماریزای خاکزاد شده و یا با ایجاد پرده حفاظتی در اطراف بذر باعث کاهش پوسیدگی بذر و بلایت گیاهچه ناشی از عوامل بیماریزای خاکزاد و در نتیجه تولید گیاهچه های سالم و با قدرت رویشی بالا گردد (۶). ترکیبات شیمیائی ضدعفونی کننده بذر بصورت فرمولاسیون‌های مختلف در دسترس می باشند. قارچکش‌های حفاظت کننده بذر از یک محصول به محصول دیگر و از یک منطقه به منطقه دیگر متفاوت هستند (۴). در قارچکش کربوکسین تیرام به منظور گسترش دامنه عملکرد و کاهش امکان گزینش برای انواع مقاوم قارچها، قارچکش سیستمیک کربوکسین با قارچکش غیر سیستمیک تیرام در هم آمیخته اند. مخلوط متالاکسیل و کلرونب در کنترل موفق بیماری مرگ گیاهچه پنبه ناشی از *Pythium ultimum* و *Rhizoctonia soloni* استفاده شده است. در هندوستان تاثیر بیشتر قارچکش های بنزیمیدازول در کنترل بیماری مرگ گیاهچه ناشی از ریزوکتونیا نسبت به کربوکسین گزارش شده است.

به وسیله ضدعفونی بذر و آغشتن خاک به سموم کاربندازیم و کربوکسین، آلودگی مزارع پنبه نسبت به انواع قارچها کنترل شد. نتایج محققین نشان داده است که پودرهای خشک به خوبی به سطح بذر نچسبیده و در نتیجه ضدعفونی ناقص خواهد بود و توزیع یکسان و پوشانندگی یکنواختی در بذور حاصل نمی شود (۶). در دزهای برابر ترکیبات مختلف تیرام در روی بذر

نخود، میزان چسبندگی بصورت پودر ۳۸ درصد و بصورت محلول ۸۰ درصد بود (۵). اضافه نمودن فرمولاسیون های پودری و محلول قارچکش ایپرودیون به بذر به ترتیب ۶۳-۸۱ و ۷۱-۸۱ درصد از دز هدف را در مقایسه با پوشش سطحی (۹۳٪) فراهم کرد (۵). هدف این تحقیق ارزیابی تاثیر ماده ضدعفونی کننده نانو ذرات نقره علیه بیماریهای ناشی از مرگ گیاهچه در پنبه در مقایسه با قارچکش رایج کربوکسین تیرام می باشد.

مواد و روش ها

این تحقیق در غالب طرح بلوکهای کامل تصادفی در شش تیمار و چهار تکرار در مزرعه ایستگاه تحقیقات پنبه کارکنده، کردکوی با استفاده از بذر رقم ساحل در طی دو سال اجرا شد. تیمارهای آزمایشی شامل دزهای ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ پی پی ام از ماده نانو سیلور، استفاده از کاربوکسین تیرام به میزان ۴-۶ در هزار و شاهد (بدون تیمار سم) بود. در هر چاله کاشت تعداد ۵ عدد بذر افزوده شد. یادداشت برداری‌های مربوط به درصد رویش و مرگ گیاهچه طی دوره های ۷، ۱۴، ۲۱ و ۳۰ روز پس از کاشت با محاسبه درصد سبز در کرت‌های آزمایش انجام شد. قوه نامیه بذور قبل از کاشت اندازه گیری شده به منظور تعیین درصد جوانه زنی اصلاح شده از فرمول زیر استفاده شد(۲ و ۳). قبل از اجرای آزمایش ماده شیمیائی نانوسید توسط شرکت نانونصب پارس تهیه شد. در پایان نتایج با استفاده از نرم افزار آماری Statgraphics آنالیز و تیمارها مقایسه انجام شدند.

$$\text{درصد جوانه زنی اصلاح شده} = \frac{\text{تعداد بذرهای جوانه زده در تیمار} \times ۱۰۰}{\text{تعداد بذر جوانه زده در شاهد}}$$

نتایج و بحث:

براساس نتایج حاصله، در ایستگاه کارکنده، بیشترین درصد مرگ گیاهچه در سال اول، در هفته چهارم پس از کشت و در سال دوم، در هفته سوم مشاهده شد. علائم مشاهده شده روی طوقه گیاهچه اغلب به صورت بروز لکه های قهوه ای تا قرمز رنگ بود که در ادامه با پیشرفت بیماری به صورت نکروز بروز کرده و موجب نابودی کامل گیاهچه می شد. بر اساس بررسی ها و جداسازی های آزمایشگاهی، عمدتا قارچهای *Rhizoctonia solani* و *Fusarium* sp. از گیاهچه ها بیمار جداسازی گردید. نظر به اینکه در سالهای اجرای طرح در زمان کاشت، هوای گرم و کم بارش در منطقه حاکم بود، فعالیت این قارچها به عنوان عوامل اصلی عامل مرگ گیاهچه دور از انتظار نبود. مقایسه میانگین تیمارهای آزمایش در طی دوسال اجرای طرح، نشان داد که بین هیچ کدام از تیمارها از نظر آماری اختلاف معنی داری وجود نداشت.

جدول ۱- تجزیه واریانس درصد مرگ گیاهچه و عملکرد پنبه در طی دو سال ۱۳۸۷ در ایستگاه کارکنده

		نتایج سال ۸۷		نتایج سال ۸۸	
منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات (درصد بیماری)	میانگین مربعات (عملکرد)	میانگین مربعات (درصد بیماری)	میانگین مربعات (عملکرد)
تکرار	۳	ns۰/۴۶۶	ns۱/۹۰۶	ns۱۹/۶۱۵	ns۲۴۴۷۶۷
تیمار	۵	ns۳۰/۸۰۹	ns۶۰۸۹۶۸	ns۹/۷۸۴	ns۷۱۳۱۱
خطا	۱۵	ns۳۰/۴۵۶	ns۶۴۶۹۶۸	ns۶/۳۱۳	ns۶۴۸۷۷۱
کل	۲۳				

جدول ۲- گروه بندی تیمارهای مختلف بر اساس درصد مرگ گیاهچه و میزان عملکرد در سال اول اجرای طرح در کارکنده

تیمار	درصد مرگ گیاهچه	میانگین عملکرد	درصد مرگ گیاهچه	میانگین عملکرد
	سال ۸۷		سال ۸۸	
۱	a۱۴/۱۶۷	a۲۷۴۴/۵	ab۴/۳۷۵	a۹۹۲۸/۷۵
۲	a۸/۳۳۲	a۳۰۹۶/۵	b۷/۲۹۲	a۸۸۵۵/۵
۳	a۶/۹۴۵	a۲۳۹۴	a۲/۹۱۵	a۹۱۲۰/۲۵
۴	a۶/۹۴۲	a۳۱۰۷/۲۵	ab۴/۹۹۷	a۹۶۳۹/۲۵
۵	a۸/۳۳۲	a۳۳۶۹/۲۵	ab۵/۸۳۵	a۹۱۲۶/۷۵
۶	a۷/۲۲	a۳۴۱۷/۵	ab۶/۴۵۷	a۱۰۹۵۱/۸

۱= ۸۰ پی پی ام ۲= ۶۰ پی پی ام ۳= ۴۰ پی پی ام ۴= ۲۰ پی پی ام ۵= کاربوکسین تیرام ۶= بدون سم

در پژوهشی که توسط صابرباغبان و همکاران (۱۳۸۹) انجام شد میزان EC50 نانوسیلور بر روی قارچ *Rhizoctonia solani* در حد ppm ۴۹۳ تعیین شد. لذا استفاده از نانوسیلور برای کنترل مرگ گیاهچه پنبه با دزهای انجام شده توصیه نشده و لازم است، برای کنترل مرگ گیاهچه ناشی از این قارچ حداقل دز مصرفی در شرایط آزمایشگاهی بالاتر از این مقدار باشد. دزهای مورد آزمایش نیز به پیشنهاد شرکت سازنده سم مورد نظر مورد آزمایش قرار گرفت. تیمار سم کاربوکسین تیرام که به عنوان سم کنترل مرگ گیاهچه پنبه در دز ۴-۶ در هزار توصیه می شود نیز از لحاظ آماری با تیمار شاهد (بدون سم)، در هیچ یک از مناطق اجرای طرح در طی دو سال معنی دار نبوده است، لذا بررسیهای دقیق‌تر در این زمینه لازم است. همچنین ممکن است عوامل بیمارگر به مرور زمان نسبت به سم فوق مقاوم شده باشند و استفاده از این سم در دز مورد استفاده نتوانسته به طور موفقیت آمیزی از بروز و گسترش بیماری مرگ گیاهچه جلوگیری کند.

منابع

۱- صابرباغبان، ز.، احمد زاده، م.، شریفی تهرانی، ع. بهبودی، ک. و محمدزاده کاشانی، م. ۱۳۸۹. بررسی اثر غلظتهای مختلف نانو ذرات نقره بر تشکیل بیوفیل از سه جدایه PGPR. نوزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، تهران، صفحه ۹۱۱.

۲- فرزانه، س. ۱۳۸۰. بررسی تحمل ژنوتیپهای پنبه به خشکی در مرحله جوانه زنی و رشد گیاهچه. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ۸۳ صفحه.

۳- کرنژادی، ع. ۱۳۸۰. بررسی تحمل ژنوتیپهای پنبه به شوری در مرحله جوانه زنی و رشد گیاهچه. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ۱۰۶ صفحه.

4-Agarwal, V. K. and Nene, Y. L. 1987. Seed borne Diseases of Field Crops and their Control. Indian Council of Agricultural Research. New Dehli, 69 pp.

5-Maude, R. B., Presly, A. H. and Lovett, T. F. 1986. Demonstration of the adherence of thiram to pea seeds using a rapid method of spectrophotometric analysis. Seed Sci. Technol. 14: 361.

6-Nene, Y. L. and Thapliyal, P. N. 1993. Fungicides in Plant Disease Control. Oxford and IBH, new Dehli, 621 pp.

7-Taylor, A. G. and Harman, G. E. 1990. Concepts and technologies of selected seed treatment. Ann. Rev. Phytopathol. 28: 321.

بررسی دوام باکتری عامل بلایت باکتریایی پنبه روی بذور آلوده شده به روش مصنوعی و تعیین درصد آلودگی آن

محمد رضی نتاج
عضو هیات علمی موسسه تحقیقات پنبه کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان، ایران
** نویسنده مسئول: mrazinataj@yahoo.com*

چکیده:

بیماری بلایت باکتریائی پنبه یکی از مهم ترین بیماری های پنبه در اکثر مناطق پنبه خیز دنیا است. علائم این بیماری در تمام مراحل رشد گیاه بروز می کند. منبع آلودگی به بیماری معمولا از بذر و بقایای گیاهی تأمین می شود و گیاهان آلوده بعنوان کانونهای ثانویه بیماری بشمار می روند. برای انجام آزمایش مقداری از بذور پنبه پس از ضدعفونی با محلول کلراکس تجاری ۱۰ درصد به مدت ۵ دقیقه و آبشویی پس از آن، با سوسپانسیون باکتری با رقت تقریبی cfu/ml $۱۰^{۸}$-$۱۰^{۹}$ تلقیح و مدت زمان بقا و درصد بیماری بررسی شد. درصد بروز بیماری در سه رقم ساحل، ورامین و سپید یکسان بوده و حدود ۸ درصد از بذور کاشته شده علائم بیماری را نشان دادند. ۲۱ ماه پس از تلقیح بذور، بقای باکتری به صفر رسید.

واژگان کلیدی: بلایت باکتریائی پنبه، *Xanthomonas citiri* subsp. *malvacearum* و بقا

مقدمه

بلایت باکتریایی پنبه یکی از مهمترین عوامل خسارت زای پنبه می باشد که تقریبا در اکثر مناطق پنبه خیز دنیا وجود دارد و اگر شرایط محیطی برای گسترش این بیماری مناسب باشد کاهش عملکرد شدیدی را سبب می شود. باکتری عامل بیماری قادر است در تمام مراحل رشد گیاه و به همه قسمت های هوایی بوته حمله نماید و علائم متفاوتی شامل سوختگی گیاهچه، سیاه شدن ساقه، لکه زاویه ای برگو پوسیدگی قوزه را ایجاد می نماید (۳). در ساقه و شاخه ها زخم های فرورفته و نکروزه نیز به طول چند سانتیمتر دیده می شوند که در مراحل پیشرفته ممکن است تمام گیاه بصورت اسکلت عریان سیاه رنگ مشاهده شود.

لکه‌های آبسوخته و زاویه دار کوچک در ادامه تبدیل به لکه های قهوه ای تیره تا سیاه شده که به رگبرگ ها محدود شده و حالت زاویه ای مشاهده می شوند (۲ و ۶). رگبرگ ها نیز تغییر رنگ داده، قهوه ای و نکروزه شده و باعث گسترش آلودگی می شوند (۲) که در این حالت بلایت رگبرگ رخ می دهد. در برخی از ارقام برگ های آلوده زرد و چروکیده شده و ریزش می کنند. لکه های آبسوخته سیاه و گرد روی غوزه بوجود آمده که از مرکز قهوه ای می شوند و در آلودگی های شدید، با گسترش آن به داخل، موجب تغییر رنگ و تخریب الیاف و بذور می شود (۹) و بذرزادی و انتقال با بذر این بیماری نیز به این دلیل می باشد.

منبع آلودگی به بیماری معمولا از بذر و بقایای گیاهی تأمین می شود و گیاهان آلوده بعنوان کانونهای ثانویه بیماری بشمار می روند این باکتری بر روی گیاه نیز قادر است بصورت اپیفیت زندگی نماید. عامل بیماری باکتری *Xanthomonas*

citri subsp. malvacearum است. یک باکتری بذرزاد است. میزبان های اصلی بیمارگر گیاهان متعلق به جنس Gossypium هستند. دیپلوئیدهای حساس گونه های زراعی *G. arboretum* و *G. herbaceum* و گونه های وحشی *G. thurberi*، *G. harknessii* و *G. stocksii* گزارش شده اند. ارقام تتراپلوئید زراعی *G. hirsutum* و *G. barbadense* و رقم وحشی *G. tomentosum* از میزبان های باکتری گزراش شده اند. عامل بیماری در خاک در غیاب پنبه آلوده توان بقا کمی دارد. اصلی ترین مایه اولیه آلودگی از بذرهای آلوده و بقایای گیاهی تامین می شود. در طول رشد بذر در خاک باکتری های موجود در بذر سبب آلوده کردن کوتیلدون ها شده و سبب ایجاد لکه های سبز روشن تا قهوه ای مایل به سیاه در کوتیلدون ها و برگ های اولیه و همچنین در صورت مساعد بودن شرایط محیطی برای شیوع بیماری سبب سوختگی گیاهچه پنبه می شود (۸).

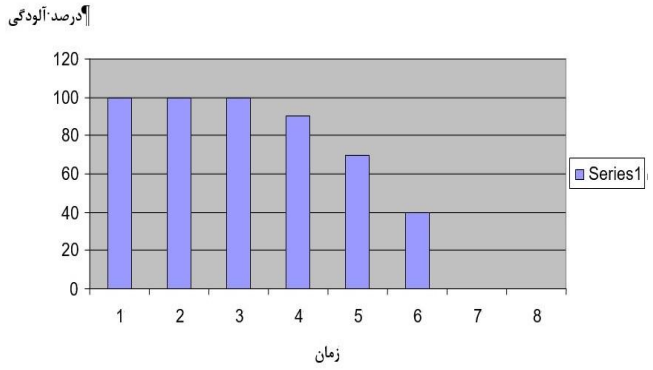
مواد و روش ها:

مقدار ۲۰۰ گرم از بذر پنبه در ۴ تکرار انتخاب شده که پس از شستشوی سطحی و ضدعفونی با محلول کلراکس ۱۰ درصد، و آبشوئی مجدد با آب مقطر استریل در معرض هوای گرم خشک شد. سپس بذور فوق در محلول سوسپانسیون باکتری با رقت 10^{7}-10^{8} cfu عامل بیماری بلایت باکتریائی پنبه بمدت یک ساعت خیسانده شدند. در ادامه بذور فوق در شرایط انبار نگهداری شده و در فواصل زمانی سه ماهه آلودگی بذور فوق بررسی شد.

سوسپانسیون حاصل از بذور آلوده فوق در روی محیط پایه شامل محیط پپتون سوکروز آگار (PSA) حاوی ۰/۳۵ گرم $Ca(No_3)_2$، ۰/۳۵ گرم $FeSO_4$، ۱/۴ گرم $Na_2 HPo_4$، ۳/۵ گرم پپتون، ۱۴ گرم سوکروز، ۱۰/۵ گرم آگار و ۷۰۰ میلی لیتر آب مقطر در pH=۶/۸ مخطط گردید (۴). میزان درصد آلودگی بذور آلوده شده نیز بر روی سه رقم ساحل، سپید و ورامین تعیین شد.

بحث و نتیجه گیری

در بررسیهای به عمل آمده درصد بروز بیماری در هر سه رقم یکسان بوده و حدود ۸ درصد از بذور کاشته شده علائم بیماری را نشان دادند. قابل توجه آنکه میزان بروز بیماری در این روش ناشی از آلودگی مصنوعی ارقام بوده و در آلودگی طبیعی میزان بروز بیماری ممکن است کمتر از این مقدار باشد. در سه ماهه اول پس از تلقیح، بقای باکتری در بذور کاهش نداشت. از سه ماه چهارم بعد از تلقیح، بقای باکتری کاهش یافت تا آنکه در سه ماه هفتم (۲۱ ماه پس از تلقیح)، بقای باکتری به صفر رسید و در کشت بذور آلوده، هیچ موردی از باکتری مشاهده نشد.



شکل ۱- نمودار روند تدریجی کاهش آلودگی بذور آلوده به باکتری با گذشت زمان

عامل بیماری در خاک در غیاب پنبه آلوده توان بقا کمی دارد. اصلی ترین مایه اولیه آلودگی از بذرهای آلوده و بقایای گیاهی تامین می شود. در طول رشد بذر در خاک باکتریهای موجود در بذر سبب آلوده کردن کوتیلدونها شده و سبب ایجاد لکه های سبز روشن تا قهوه ای مایل به سیاه در کوتیلدونها و برگهای اولیه و همچنین در صورت مساعد بوده شرایط محیطی برای شیوع بیماری سبب بلایت گیاهچه پنبه می شود (۸).

اگرگیاهچه آلوده دوام بیاورد آلودگی ثانویه در دیگر گیاهان و در مراحل مختلف ایجاد خواهد شد. مایه آلودگی توسط باد و باران، آبیاری بارانی و آب آبیاری از گیاه آلوده به گیاهان سالم دیگر انتقال می یابد و سبب ایجاد آلودگیهای بعدی می شود. براساس تحقیقات انجام شده در روسیه بیمارگر قادر است در روی الیاف و بذر به مدت ۵۶ ماه زنده بماند. الیاف و بذر وقتی قوزه ها آلوده شدند حامل بیمارگر هستند و علاوه بر آن در موقع جین زدن پنبه توان آلوده شدن را دارند. بیمارگر در اندامهای تازه گیاه به مدت ۵-۶ ماه دوام داشت. گزارشاتی نیز وجود دارد که نشان می دهد بیمارگر قادر بوده به مدت ۱۷ سال در اندامهای خشک گیاه دوام بیاورد. ولی اگر اندامهای گیاه آلوده در خاک مرطوب دفن شوند حداکثر به مدت یک ماه دوام خواهد آورد. گیاهان آلوده ای نیز که بصورت خودرو و از بذرهای سال قبل مزرعه زودتر از گیاهان اصلی سبز می شوند منبع آلودگی در مزرعه هستند (۸). این باکتری مانند دیگر زانتوموناداها نسبت به خشکی و حرارت بالا حساس بوده و به سرعت از بین می رود (۵). باکتری عامل بیماری از برگ‌های آلوده‌ای که در کلکسیون نگهداری می‌شدند، پس از گذشت نه سال، جداسازی شده و علائم بیماری را تولید کردند (۱).

منابع:

۱. رضی نتاج، م. و خداکرمیان، غ. ۱۳۹۴. بازیابی و بیماریزایی باکتری *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* از برگهای آلوده نه ساله پنبه و بررسی خصوصیات بیوشیمیایی جدایه ها. پژوهش های پنبه ایران، جلد ۳ صفحات ۶۵-۷۲.

2. Cook, A. A. 1981. Diseases of Tropical and Subtropical Field, Fiber and Oil Plants. McMillan Pub. Co. New York, 450p.
3. Krishna, A. 2002. Cotton Diseases: Diagnosis and Control. Associated Publishing Co. New Delhi. 69p.
4. Mehta, Y. R., Boonfeti, C. and Bolognini, V. 2005. A semi-selective agar medium to detect the presence of *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* naturally infected cotton seed. Fitopathol. Bras. 30:489-496.
5. Mehta, Y.R. 1990. Management of *Xanthomonas campestris* pv. *undulosa* through cereal seed testing. Seed Science and Technol. 18: 467-476. 14
6. Parmar, K. S. and K. Ramchandran. 1992. Cotton Growing and Marketing in India.
7. Schaad, N. W., Jones, J. B. and Chun, W. (eds). 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3nd edition. Aps Press. St. Minnesota, USA. 373pp.
8. Srinivasan, K. V. 1994. Cotton Diseases. CIRCOT Press. 314pp.
9. Watkins, G. M. (ed.). 1981. Compendium of Cotton Diseases. Ame. Phytopath. Soc. 87 p.

بررسی تأثیر نیتروژن برشدت بیماری‌های برگی در ارقام مختلف گندم

عبدالخلیل قوچزاده[1*]، محمدعلی آقاجانی[2]، احمد قلی پور[3]، علی‌اکبر منوری[4]

دانش‌آموخته‌ی کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی[1]

دانشیار بخش گیاه‌پزشکی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی گلستان[2]

دانش‌آموخته‌ی کارشناسی ارشد کشاورزی اکولوژیک (آگرواکولوژی)[3]

دانش‌آموخته‌ی کارشناسی ارشد زراعت[4]

** نویسنده مسئول: khalil.ghoochzadeh@yahoo.com*

چکیده

این تحقیق در سال زراعی ۹۱-۱۳۹۰ به‌منظور بررسی تأثیر نیتروژن بر شدت بیماری‌های برگی در ۵ رقم گندم به مدت یک سال زراعی در شرایط مزرعه در ایستگاه تحقیقات کشاورزی گنبد انجام شد. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در سه تکرار بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی و در شرایط آبی انجام گرفت. فاکتورهای آزمایش شامل مقدار نیتروژن در ۳ سطح (۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ کیلوگرم نیتروژن خالص در هکتار) و ارقام گندم (مروارید، N-80-19، گنبد، فلات و تجن) بود. یادداشت‌برداری از شدت بیماری‌های لکه خرمایی با مقیاس ۹۹-۰۰ درجه‌ای انجام گردید. جهت یادداشت‌برداری از بیماری زنگ قهوه‌ای از مقیاس اصلاح‌شده کب پیشنهادی پترسون و همکاران و هم‌چنین برای ارزیابی واکنش گیاه به آلودگی (تیپ آلودگی) از روش رولفز و همکاران استفاده شد. نتایج تجزیه‌ی واریانس نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای کود نیتروژنی ازلحاظ درصد وقوع بیماری لکه خرمایی و همچنین ازلحاظ درصد وقوع و شدت بیماری زنگ قهوه‌ای وجود دارد ($P<0/05$)، اما بر اساس شدت بیماری لکه خرمایی، درصد وقوع و شدت بیماری زنگ زرد اختلاف میان سطوح نیتروژن معنی‌دار نبود. نتایج مقایسه‌ی میانگین داده‌ها نشان داد که بیش‌ترین و کم‌ترین درصد وقوع بیماری زنگ قهوه‌ای، به ترتیب در تیمارهای ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار (با ۹۹/۲ درصد) و صفر کیلوگرم در هکتار (با ۷۸/۸۳ درصد) دیده شد. هم‌چنین بیش‌ترین و کم‌ترین شدت بیماری، به ترتیب در تیمارهای ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار (با ۱۲/۳۳ درصد) و صفر کیلوگرم در هکتار (با ۸/۳۳ درصد) دیده شد. بر اساس درصد وقوع بیماری زنگ قهوه‌ای نیز بیش‌ترین و کم‌ترین درصد وقوع بیماری به ترتیب در رقم مروارید با ۱۴/۴ درصد، رقم تجن با ۱۰ درصد و رقم گنبد با ۷/۲۲ درصد مشاهده گردید.

واژگان کلیدی: گندم، بیماری‌ها، لکه خرمایی، زنگ زرد، زنگ قهوه‌ای، تغذیه، نیتروژن.

مقدمه

به علت افزایش روزافزون جمعیت به‌خصوص در کشورهای درحال‌توسعه، افزایش تولیدات غذایی اهمیت ویژه‌ای دارد. برای این منظور علاوه برافزایش تولید محصول، باید به فکر تکنیک‌های حفظ محصول در برابر آفات و بیماری‌ها از زمان کاشت تا برداشت و زمانی که به دست مصرف‌کننده برسد، نیز بود (۲). بیماری‌های گیاهی درمجموع ترکیبی از عکس‌العمل‌های گیاه

میزبان و عامل بیماری‌زا و شرایط محیطی اعمال‌شده بر آن‌ها می‌باشد که تشکیل یک مثلث بیماری یا پاتوسیستم در یک اکوسیستم را می‌دهد (۱۳). نتیجه‌گیری‌های روستایی (۲) در خصوص اثرات متفاوت ازت بر بیماری‌های گیاهی مختلف نشان داد که کاربرد بیش‌ازحد ازت، سبب رشد رویشی تازه و آبدار گیاه شده و بلوغ را عقب می‌اندازد. عامل بیماری‌زایی که به اندام چنین گیاهانی حمله می‌کنند به‌وسیله میزان ازت بالا مساعد می‌شوند. در چنین مواردی ممکن است ضروری باشد که ازت کاهش داده شود. بیماری شیت بلایت در برنج، بیماری سیاهک دروغی در برنج و بلایت برنج مثال‌هایی از این حالت هستند؛ و از طرف دیگر هنگام کمبود ازت گیاه ضعیف، توسعه‌اش ناقص و بلوغ آن جلو می‌افتد. عوامل بیماری‌زایی که با رشد آهسته میزبان مساعد می‌شوند، با نیتروژن کم مساعد می‌شوند. پژمردگی گوجه‌فرنگی، پژمردگی باکتریایی، پوسیدگی ریشه و بلایت زرد سیب‌زمینی مثال‌های از این حالت هستند. کاربرد زیادی نیتروژن سبب کاهش میزان نرخ آلودگی و میزان نهایی بیماری خواهد شد. لکه خرمایی از بیماری‌های مهم گندم در مناطق تحت کشت این گیاه در بسیاری از مناطق جهان بوده که در سال‌های اپیدمی خسارت زیادی را به محصول وارد می‌سازد (۳). بیماری زنگ زرد یکی از خطرناک‌ترین بیماری‌های غلات در ایران است که اولین بار در کشور در سال ۱۳۲۶ به‌وسیله اسفندیاری (۱) گزارش‌شده است و در حال حاضر در بسیاری از نقاط کشور شیوع دارد. اپیدمی‌های آن هر ۴ تا ۵ سال یک‌بار خسارت‌های شدیدی ایجاد می‌کند. در بهار سال ۱۳۷۲، این بیماری در مزارع گندم مناطق مختلف کشور به‌صورت اپیدمی نسبتاً شدید ظاهرشده و خسارات قابل‌توجهی به محصول وارد نمود. خوشبختانه از آن سال تاکنون، به دلیل توسعه کاشت ارقام مقاوم و نیز کانون کوبی‌هایی که به‌وسیله‌ی برخی سموم قارچ‌کش مؤثر انجام‌گرفته است، این بیماری نتوانسته به‌صورت همه‌گیر بروز نماید. از سوی دیگر باید توجه داشت که عامل بیماری قادر به ایجاد نژادهای فیزیولوژیک متعدد می‌باشد که بر اساس بیماری‌زایی آن روی میزبان‌های مختلف و برهم‌کنش ژنی هر نژاد و میزبان شناسایی می‌شوند؛ بنابراین کار تهیه ارقام مقاوم باید دائمی باشد. زنگ قهوه‌ای چون غالباً درروی برگ‌ها دیده می‌شود به آن زنگ برگ (Leaf rust) نیز می‌گویند. این زنگ نسبت به زنگ زرد و سیاه گندم حرارت دوست‌تر بوده و در مناطقی مانند دشت مغان و خوزستان گزارش‌شده است.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در سال زراعی ۱۳۹۰-۹۱ به‌منظور بررسی تأثیر نیتروژن برشدت بیماری‌های برگی در ۵ رقم گندم در شرایط مزرعه در ایستگاه تحقیقات کشاورزی گنبد انجام شد. ایستگاه تحقیقات کشاورزی گنبدکاووس (در ۳ کیلومتری شرق شهرستان گنبدکاووس) با ارتفاع ۴۵ متر از سطح دریا، طول جغرافیایی ۱۰-۵۵ و عرض جغرافیایی ۱۵-۳۷، با خاکی با بافت متوسط، زهکشی مناسب، مواد آلی کافی و pH حدود ۶/۵ می‌باشد. این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در سه تکرار در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی و در شرایط آبی انجام گرفت. ارقام به‌عنوان عامل اول که سطوح آن ۵ رقم (مروارید،N-80-19، گنبد، فلات و تجن) و نیتروژن به‌عنوان عامل دوم در سه سطح (۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ کیلوگرم نیتروژن خالص در هکتار) بوداند. هر تیمار در ۴ خط به طول ۱ متر بافاصله ردیف ۲۰ سانتی‌متر کشت شد. بر اساس نتایج آزمایش خاک کودهای P-K به زمین داده شد. عملیات داشت بر اساس عرف منطقه شامل دادن کود سرک اوره در مراحل پنجه‌زنی و ساقه رفتن هر بار بر مبنای ۰-۱۰۰-۱۵۰ کیلوگرم نیتروژن خالص در هکتار صورت گرفت. به‌منظور کنترل شیمیایی شته و سوسک برگ‌خوار (لما)، از حشره‌کش دیازینون (۱ لیتر در هکتار) در مرحله پنجه‌زنی استفاده گردید. از اواخر فروردین‌ماه که مصادف با اواخر مرحله ساقه دهی و اوایل مرحله خوشه‌دهی بود آبیاری انجام گرفت. اولین یادداشت‌برداری از تیپ و شدت بیماری‌های موردنظر در تاریخ ۲۰ فروردین‌ماه ۱۳۹۲ انجام شد و یادداشت‌برداری‌های بعدی به فاصله ۷ روز و تا رسیدن گیاه و انهدام برگ‌ها ادامه یافت و درنهایت ۶ مرحله یادداشت‌برداری از ۳ بیماری لکه خرمایی، زنگ قهوه‌ای و زنگ زرد در مراحل رشدی مختلف گندم انجام شد. یادداشت‌برداری شدت بیماری‌های لکه خرمایی با روش ساری و پرسکات (۱۲) ، تغییر یافته ایال و همکاران (۵) و مقیاس ۹۹-۰۰ به شرح جدول شماره ۱ انجام شد. جهت یادداشت‌برداری بیماری زنگ قهوه‌ای از مقیاس اصلاح‌شده کب

پیشنهادی پترسون و همکاران (۹) و هم‌چنین برای ارزیابی واکنش گیاه به آلودگی (تیپ آلودگی) از روش رولفز و همکاران (۱۰) استفاده شد.

در مرحله بعد متوسط شدت بیماری هر کرت (MS) از فرمول ۱ زیر محاسبه گردید.

$$MS = \sum X_i n_i / N X_{max} \quad (۱)$$

تجزیه‌وتحلیل آماری

داده‌های به‌دست‌آمده توسط نرم‌افزار آماری StatGraphics مورد تجزیه‌وتحلیل آماری قرار گرفتند. گروه‌بندی تیمارها با استفاده از آزمون LSD و در سطح اطمینان ۹۹ درصد ($p\leq$۰/۰۱) انجام شد.

نتایج و بحث

بیماری لکه خرمایی

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بر اساس درصد وقوع و شدت بیماری لکه خرمایی، اختلاف معنی‌داری بین ارقام موردبررسی وجود دارد (P<۰/۰۱) (جدول ۲). بر این اساس، بیش‌ترین و کم‌ترین درصد وقوع بیماری، به ترتیب در ارقام فلات، گنبد، N-80-19 و مروارید (با میزان وقوع ۱۰۰ درصد) و رقم تجن (با میزان وقوع ۹۸/۹ درصد) دیده شد (جدول ۳). بر اساس شدت بیماری نیز بیش‌ترین و کم‌ترین درصد شدت بیماری به ترتیب در رقم فلات با شدت بیماری ۴۳/۵ درصد، رقم تجن با شدت بیماری ۳۱/۴ درصد، رقم گنبد با شدت بیماری ۳۰/۷ درصد و رقم N-80-19 با شدت بیماری۳۰/۰۴ درصد مشاهده گردید (جدول ۳). نتایج تجزیه واریانس نشان داد که ازنظر تأثیر نیتروژن بر درصد وقوع بیماری لکه خرمایی، اختلاف معنی‌داری بین تیمارها وجود دارد (P<۰/۰۵)، ولی تأثیر نیتروژن برشدت بیماری لکه خرمایی معنی‌دار نبود (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیش‌ترین و کم‌ترین درصد وقوع بیماری، به ترتیب در تیمارهای ۱۵۰-۱۰۰ کیلوگرم در هکتار (هر دو با ۱۰۰ درصد) و صفر کیلوگرم در هکتار (با ۹۹/۳۸ درصد) دیده شد (جدول ۴). هم‌چنین طبق نتایج تجزیه واریانس بر اساس درصد وقوع و شدت بیماری لکه خرمایی اثر متقابل ارقام و سطوح نیتروژن معنی‌دار گردید (P<۰/۰۵). از آنجایی اثر متقابل سطوح رقم و نیتروژن ازنظر درصد وقوع بیماری لکه خرمایی معنی‌دار شد، بنابراین برش دهی داده‌ها صورت پذیرفت و تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها بر اساس داده‌های برش داده‌شده انجام گرفت. نتایج نشان داد که در سطح صفر کود نیتروژنه اختلاف معنی‌داری میان رقم تجن با سایر ارقام ازلحاظ درصد وقوع بیماری لکه خرمایی وجود داشت (جدول ۵).

جدول ۲- نتایج آزمون تجزیه واریانس درصد وقوع و شدت بیماری‌ها در ژنوتیپ‌های مختلف گندم در ایستگاه تحقیقات کشاورزی گنبدکاووس

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات					
		لکه خرمایی		زنگ زرد		زنگ قهوه‌ای	
		درصد وقوع	شدت	درصد وقوع	شدت	درصد وقوع	شدت
تکرار	۲	۰/۳۸^{ns}	۰/۵۹^{ns}	۰/۱۰^{ns}	۰/۵۷^{ns}	۰/۲۲^{ns}	۰/۶۱^{ns}
رقم	۴	۰/۰۴*	۰/۰۰**	۰/۰۰**	۰/۰۰**	۰/۳۳^{ns}	۰/۰۲*
نیتروژن	۲	۰/۰۷*	۰/۵۸^{ns}	۰/۴۴^{ns}	۰/۵۸^{ns}	۰/۰۹*	۰/۰۴*
نیتروژن × رقم	۸	۰/۰۱*	۰/۳۶^{ns}	۰/۸۵^{ns}	۰/۸۱^{ns}	۰/۱۰^{ns}	۰/۷۹^{ns}
خطا کل	۲۸						
ضریب تغییرات		۰/۶۵	۴۴/۲۵	۸۰۹/۵۹	۸۱/۷۸	۶۴۶/۳	۱۷/۸۱

* و ** به ترتیب معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد را نشان می‌دهند و ^{ns} به مفهوم معنی‌دار نبودن اختلاف بین تیمارها می‌باشد.

جدول ۳- نتایج مقایسه میانگین و گروه‌بندی تیمارها در ارتباط با مقدار بیماری‌های موردبررسی در ایستگاه تحقیقات کشاورزی گنبدکاووس

ارقام	لکه خرمایی		زنگ زرد		زنگ قهوه‌ای	
	درصد وقوع	شدت	درصد وقوع	شدت	درصد وقوع شدت	
تجن	۹۸/۹^{b}	۳۱/۴۱^{a}	۳/۵۵^{c}	۸/۹^{b}	۱۰^{b}	۲۱/۱۱^{ab}
فلات	۱۰۰^{a}	۴۳/۵۵^{a}	۳/۵۵^{c}	۰^{b}	۱۰/۵۵^{ab}	۱۹/۴۴^{b}
گنبد	۱۰۰^{a}	۳۰/۷۹^{a}	۳/۵۵^{c}	۰^{b}	۷/۲۲^{b}	۱۵/۵۵^{b}
N-80-19	۱۰۰^{a}	۳۰/۰۴^{b}	۴۴/۴۴^{b}	۱۲/۲۲^{a}	۱۰/۵۵^{ab}	۲۰^{b}
مروارید	۱۰۰^{a}	۳۱/۹۶^{b}	۸۸/۸۸^{a}	۱۹/۴۴^{a}	۱۴/۴۴^{a}	۲۶/۶۶^{a}

اعداد با حروف مشابه در هر ستون بر اساس آزمون LSD اختلاف آماری معنی‌داری ندارند ($P\leq 0.05$).

جدول ۴- نتایج مقایسه میانگین و گروه‌بندی تیمارها در ارتباط با مقدار بیماری‌های موردبررسی در ایستگاه تحقیقات کشاورزی گنبدکاووس

سطح کود	لکه خرمایی	زنگ قهوه‌ای	
	درصد وقوع	درصد وقوع	شدت
۰	۹۹/۳۸^{b}	۷۸/۸^{b}	۸/۳۳^{b}
۱۰۰	۱۰۰^{a}	۹۹/۲۸^{a}	۱۱^{b}
۱۵۰	۱۰۰^{a}	۹۳/۳۳^{ab}	۱۲/۳۳^{a}

اعداد با حروف مشابه در هر ستون بر اساس آزمون LSD اختلاف آماری معنی‌داری ندارند ($P\leq 0.05$).

جدول ۵- نتایج مقایسه میانگین درصد وقوع بیماری لکه خرمایی در سطح صفر نیتروژن

رقم	میانگین (درصد بیماری)
تجن	۹۶/۹۶^{b}
فلات، گنبد، N-80-19، مروارید	۱۰۰^{a}

اعداد با حروف مشابه در هر ستون بر اساس آزمون LSD اختلاف آماری معنی‌داری ندارند ($P\leq 0.05$).

زنگ زرد

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بر اساس درصد وقوع و شدت بیماری زنگ زرد، اختلاف معنی‌داری بین ارقام موردبررسی وجود داشت ($P<۰/۰۱$) (جدول ۲). براین اساس، بیش‌ترین و کم‌ترین درصد وقوع بیماری به ترتیب در رقم مروارید با میزان وقوع ۸۸/۸ درصد و ارقام تجن با میزان وقوع ۳/۵ درصد ، فلات با میزان ۳/۵ درصد و گنبد با میزان ۳/۵ درصد مشاهده شد (جدول ۳). نتایج تجزیه واریانس نشان داد که ازنظر تأثیر نیتروژن بر درصد وقوع و شدت بیماری زنگ زرد اختلاف معنی‌داری بین ارقام موردبررسی وجود نداشت. هم‌چنین طبق نتایج تجزیه واریانس، بر اساس درصد وقوع و شدت بیماری زنگ زرد، اثر متقابل ارقام و سطوح نیتروژن معنی‌دار نگردید (جدول ۲).

زنگ قهوه‌ای

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بر اساس درصد وقوع بیماری زنگ قهوه‌ای، اختلاف معنی‌داری بر روی ارقام موردبررسی وجود نداشت ولی بر اساس شدت بیماری معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$) (جدول ۲). بر این اساس بیش‌ترین و کم‌ترین درصد شدت بیماری به ترتیب رقم مروارید با شدت ۲۶/۶۶ درصد و ارقام تجن با شدت ۲۱/۱۱ درصد، فلات با شدت ۱۹/۴۴ درصد، گنبد با شدت ۱۵/۵۵ درصد، N-80-19 با شدت ۲۰ درصد دیده شد (جدول ۳). بر اساس درصد وقوع بیماری زنگ

قهوه‌ای نیز بیش‌ترین و کم‌ترین درصد وقوع بیماری به ترتیب در رقم مروارید با شدت بیماری ۱۴/۴ درصد و ارقام تجن با شدت بیماری ۱۰ درصد و گنبد با شدت ۷/۲۲ درصد مشاهده گردید (جدول ۳). نتایج تجزیه واریانس نشان داد که ازنظر تأثیر نیتروژن بر درصد وقوع و شدت بیماری زنگ قهوه‌ای، اختلاف معنی‌داری بین تیمارها وجود داشت (P<۰/۰۵) (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیش‌ترین و کم‌ترین درصد وقوع بیماری، به ترتیب در تیمارهای ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار با ۹۹/۲ درصد و صفر کیلوگرم در هکتار با ۷۸/۸۳ درصد دیده شد (جدول ۳). هم‌چنین بیش‌ترین و کم‌ترین درصد شدت بیماری، به ترتیب در تیمارهای ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار با ۱۲/۳۳ درصد و صفر کیلوگرم در هکتار با ۸/۳۳ درصد دیده شد (جدول ۴). طبق نتایج تجزیه واریانس، بر اساس درصد وقوع و شدت بیماری زنگ قهوه‌ای، اثر متقابل ارقام و سطوح نیتروژن معنی‌دار نگردید (جدول ۲).

بحث

گیاه گندم ازجمله مهم‌ترین غلات به شمار می‌آید. یکی از مسائل عدیده‌ای که کشاورزی مناطق وسیعی از کشورمان را از مدت‌ها قبل با مشکل روبه‌رو کرده، استفاده‌ی بی‌رویه از کودهای نیتروژنی است. کودهای نیتروژنی برای دست‌یابی به عملکردهای بالا در گندم ضروری می‌باشد ولی ممکن است باعث توسعه بیماری‌های برگی شود. ازجمله بیماری‌های گندم سفیدک سطحی، زنگ‌های زرد و قهوه‌ای، لکه خرمایی و لکه سپتوریایی و ... می‌باشند. نتایج نشان داد که بر اساس درصد وقوع و شدت بیماری در بیماری‌های لکه خرمایی، زنگ زرد و همچنین ازلحاظ شدت بیماری در زنگ قهوه‌ای اختلاف معنی‌داری میان ارقام وجود دارد؛ که نتایج این تحقیق با مشاهدات سی‌یوفیتی و توری (۴) و جورنسون و اولسن (۶) و مورنو و همکاران (۷) مطابقت دارد؛ و بر اساس درصد وقوع در بیماری لکه خرمایی و نیز درصد وقوع و شدت بیماری در بیماری زنگ قهوه‌ای اختلاف معنی‌داری میان سطوح نیتروژن وجود داشت که نتایج به‌دست‌آمده با مطالعات اولسن و همکاران (۸)، روث و همکاران (۱۱) مطابقت دارد. مقایسه میانگین داده‌ها بر اساس مقیاس LSD نشان داد که در بیماری لکه خرمایی بالاترین شدت بیماری در رقم فلات (۴۳/۵۵ درصد) و پایین‌ترین شدت در ارقام تجن (۳۱/۴۱ درصد)، گنبد (۳۰/۷۹ درصد)، N-80-19 (۳۰/۰۴ درصد) و مروارید (۳۱/۹۶ درصد) مشاهده شد. در بیماری زنگ زرد بالاترین شدت بیماری در ارقام مروارید (۱۹/۴۴ درصد) و N-80-19 (۲۲/۱۲ درصد) و پایین‌ترین شدت در ارقام تجن (۸/۹ درصد)، گنبد (۰ درصد) و فلات (۰ درصد) مشاهده شد. در بیماری زنگ قهوه‌ای بالاترین شدت بیماری در رقم مروارید (۲۶/۶۶ درصد) و پایین‌ترین شدت بیماری در رقم گنبد (۱۵/۵۵ درصد) مشاهده شد. در رابطه با شدت بیماری زنگ قهوه‌ای، بالاترین سطوح نیتروژن سطح ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار و سطحوح ۱۰۰ و ۰ پایین‌ترین سطح نیتروژن بودند.

منابع

۱-اسفندیاری، ا. ۱۳۲۶. بیماری زنگ غلات در ایران، مجله حشره‌شناسی و آسیب‌شناسی گیاهی. ۴: ۶۷-۷۶.

۲-روستایی، م.۱۳۸۰. مدیریت بیماری‌های گیاهی (ترجمه) موسسه نشر جهاد، ۴۱۶ صفحه.

3-Carignano, M., Staggenborg, S.A., Shroyer, J.P. (2008): Management practices to minimize tan spot in a continuous wheat rotation.- Agronomy Journal. 100:145-153.

4-Ciuffetti L. M., Tuori R. P. Advances in the characterization of the Pyrenophora tritici-repentis – wheat interaction // Phytopathology. – 1999, vol. 89, No. 6, p. 444–449.

5-Eyal, Z., Scharen, A. l., Prescott, J. m. and Van Ginkel, M. 1987. The Septoria diseases of wheat: concepts and methods of disease management. CIMMYT, Mexico D. F.

6-Jørgensen L.N., Olsen L.V., 2007. Control of Tan spot (Drechslera tritici-repentis) using cultivar resistance, tillage methods and fungicides. Crop Protection 26: 1606-1616.

7-Moreno, M. V., Stenglein, S. A., Perello, A. E. and Balatti, P. A. 2008. Pathogenic and genetic diversity of isolates of Pyrenophora tritici - repentis causing tan spot of wheat in Argentina. European Journal of Plant Pathology 122: 239 - 252. ISSN: 0929 – 1873.

8-Olsen M, Rasmussen S, Nischwitz C (2003) Effect of powdery mildew of pecan shucks on nut weight and quality and relevance to fungicide application. Crop Protection 22: 679–682.

9-Peterson, R.F., Compbell, A.B. and Hannah, A.E. 1948. A diagrammatic scale for estimating rust intensity of leaves and stems of cereals. Can. J. Res. 26: 496-500.

10-Roelfs, A. P., Singh, R. P., and Saari, E.E.1992.Rust Diseases of Wheat; Concepts and Methods of Disease Management. Mexico, D. F. CIMMYT. 81 pp.
11-Rouse, D. I., MacKenzie, D. R., Nelson, R. R., and Elliott, V. J. 198 1. Distribution of wheat powdery mildew incidence in field plots and relationship to disease severity. Phytopathology 71:1015-1020.
12-Sarri, E. E. and Prescot, J. M. 1975. A scale for apprising the foliar intensity of wheat diseases. Plant Dis. Rep. 59: 377-380.
13-Shaner, G., and Finney, R. 1977. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing in knox wheat. Phytopathology, 67:1051–1056.
14-Stubbs, R.W., Perscott, J.M., Saari, E.E. and Dubin, H.J. 1986. Cereal Disease Methodology Manual. CIMMYT: Mexico, D.F, 46 pp.

اثر بازدارندگی باکتری‌های اندوفیت ریشه بادام‌زمینی بر بیماری پوسیدگی اسکلروتیومی

ندا تقی‌پور دهکردی[۱*]، سید علی الهی‌نیا[۲]، مرتضی گل‌محمدی[۳]، صدیقه موسی‌نژاد[۴]

[۱]دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان
[۲]استاد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان
[۳]استادیار باکتری‌شناسی گیاهی، مؤسسه تحقیقات مرکبات رامس
[۴]استادیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان
** نویسنده مسئول: Taghipour.nd@gmail.com*

چکیده

باکتری‌های اندوفیت گروهی از عوامل بالقوه کنترل بیولوژیک بیمارگرهای گیاهی محسوب می‌شوند. هدف از انجام این پژوهش، ارزیابی فعالیت آنتاگونیستی باکتری‌های اندوفیت ریشه بادام زمینی در کنترل پوسیدگی سفید ساقه بادام زمینی در اثر قارچ *Sclerotuim rolfsii* Sacc. بوده است. در این بررسی، ۵۲ جدایه باکتریایی اندوفیت از ریشه گیاهان سالم بادام زمینی استخراج و توانایی بازدارندگی آن‌ها روی رشد میسلیومی قارچ *S. rolfsii* در شرایط آزمایشگاهی سنجیده شد. براساس نتایج به دست آمده، از میان جدایه باکتریایی مورد آزمایش، هشت جدایه در روش کشت متقابل و ۶ جدایه در آزمون تشتک پتری برعکس به‌طور معنی‌داری مانع رشد میسلیومی *S. rolfsii* شدند. هشت جدایه منتخب، براساس آزمون‌های استاندارد بیوشیمیایی و آنالیز ژن 16S rDNA مورد شناسایی قرار گرفتند. پنج جدایه (Ba1, Ba2, Ba3, Ba4, Ba5) به *Bacillus* spp. و سه جدایه‌ی ST، CR و AG به‌ترتیب به *Stenotrophomonas* sp.، *Chryseobacterium* sp. و *Agrobacterium* sp. بیشترین شباهت را داشتند. این آزمون با سه تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد.

واژگان کلیدی: بادام زمینی، پوسیدگی سفید ساقه، باکتری‌های اندوفیت، آنتاگونیست

مقدمه

پوسیدگی سفید ساقه ناشی از قارچ *Sclerotium rolfsii* یکی از بیماری‌های محدودکننده‌ی کشت بادام زمینی در اواخر فصل رشد است (۱). عامل بیماری یک قارچ خاکزاد و پلی‌فاژ بوده، طیف گسترده‌ای از محصولات زراعی و باغی (بیش از ۵۰۰ گونه گیاهی متفاوت) را آلوده می‌کند. کنترل بیماری به‌دلیل وجود سختینه (اسکلرت) در خاک و بقایای گیاهی تا حدودی مشکل می‌باشد (۶،۱۴). در بیمارگرهای خاکزاد، مدیریت تلفیقی بیماری با به‌کارگیری مواد شیمیایی و بیولوژیک به‌منظور کاهش آسیب‌های زیست‌محیطی از بهترین روش‌ها می‌تواند باشد. حضور باکتری‌های اندوفیت در داخل بافت‌های گیاهان نقش مهمی در توسعه و سلامت آن‌ها ایفا می‌کند. این باکتری‌ها به‌دلیل همزیستی غیرمضر با گیاهان و تولید ترکیبات ضد میکروبی مختلف مورد توجه بسیار قرار گرفته‌اند. مطالعات وسیعی در زمینه کاربرد هر یک از باکتری‌های اندوفیت به‌تنهایی یا در ترکیب با سایر باکتری‌های اندوفیت علیه قارچ *S. rolfsii* در شرایط متعدد آزمایشگاهی، گلخانه‌ای و مزرعه‌ای صورت گرفته که با موفقیت‌هایی همراه بوده است (۱۷، ۱۳، ۲۳، ۴، ۱۹، ۲، ۸). تأثیر مطلوب دو باکتری *Bacillus* sp. و *Bradyrhizobium* sp.

در کاهش قارچ *S. rolfsii* در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه نشان داده شده است (۷). اثر بیوکنترلی باکتری *Streptomyces* sp. (۱۹)، *Bacillus psychrosaccharolyticus* (۲) و *Bacillus* sp. (۴) روی قارچ *S. rolfsii* نیز نتایج قابل ملاحظه‌ای داشته است. فعالیت آنتاگونیستی باکتری *Pseudomonas aeruginosa* روی این قارچ با ۷۳.۷-۴۷ درصد بازدارندگی از رشد شعاعی، از طریق تولید مواد سمی و آنزیم‌های تخریب کننده دیواره سلولی نشان داده شد (۱۳).

هدف از انجام این پژوهش با توجه به نقش باکتری‌های اندوفیت در بهبود رشد و حفاظت گیاه علیه بیمارگر ذکر شده، جداسازی و شناسایی باکتری‌های اندوفیت ریشه گیاه بادام‌زمینی و بررسی فعالیت آنتاگونیستی آن‌ها علیه پوسیدگی اسکلروتیومی بوده، نتایج آن می‌تواند در کنترل این بیماری مهم مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

جدا و خالص‌سازی بیمارگر

بیمارگر از گیاه بادام زمینی با علایم پژمردگی و پوسیدگی اسکلروتیومی جداسازی شد. بافت آلوده ساقه به قطعات دو تا پنج میلی‌متری تقسیم و با هیپوکلریت سدیم نیم درصد ضدعفونی سطحی شده و در تشتک پتری حاوی محیط PDA کشت شده و در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت سه روز نگهداری شدند. خالص‌سازی قارچ به روش تک نوک ریسه انجام شد (۱۸).

جداسازی باکتری‌های اندوفیت از ریشه بادام زمینی

گیاهان سالم و بدون نشانه بیماری در زمان تشکیل دانه در غلاف، رسیدن دانه و برداشت محصول انتخاب شدند. ریشه گیاه به‌منظور جداسازی خاک روی آن به‌دقت با آب مقطر شستشو شد. ضدعفونی سطحی قطعات ریشه به‌ترتیب با اتانول ۷۵ درصد (۱ دقیقه)، هیپوکلریت سدیم ۳ درصد (۳ دقیقه) و اتانول ۷۰ درصد (۳۰ ثانیه) انجام و سپس پنج مرتبه با آب مقطر دو بار استریل آبکشی شد. برای اطمینان از موفقیت در ضدعفونی سطحی، ۱۰۰ میکرولیتر از آب آبکشی آخر روی محیط NA (Nutriant agar) کشت داده تحت دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. عدم رشد باکتری روی محیط کشت مذکور نشان‌دهنده‌ی ضدعفونی سطحی به روش صحیح بود. قطعات ضدعفونی شده‌ی مذکور، به قطعات کوچک‌تر تقسیم شده، روی محیط‌های NA و TSA (Trypticase Soy Agar) کشت داده شدند. محیط‌های کشت داده شده در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷-۵ روز نگهداری شدند (۱۲).

بررسی فعالیت ضد قارچی سویه‌های باکتریایی به روش کشت متقابل

پنجاه میکرولیتر از سوسپانسیون هر سویه باکتریایی با غلظت $۱/۵\times۱۰^{۸}$ CFU/mL روی محیط کشت PDA به فاصله ۲/۵ سانتی‌متر از مرکز تشتک پتری با قطر ۹ سانتی‌متر نقطه گذاری شده، به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس یک دیسک با قطر ۵ mm از کشت سه روزه قارچ *S. rolfsii* در مرکز تشتک پتری حاوی کلنی‌های باکتریایی قرار گرفت و تحت دمای $۲۴ \pm ۱ C^{o}$ برای مدت ۳ روز نگهداری شد (۱۶).

بررسی تولید ترکیبات فرار توسط سویه‌های باکتریایی به روش تشتک پتری برعکس

کشت چمنی سوسپانسیون سویه‌های باکتریایی با غلظت $۱/۵\times۱۰^{۸}$ CFU/mL در تشتک‌های پتری با قطر ۹ سانتی‌متر حاوی محیط TSA انجام شد. یک دیسک به قطر ۵ میلی‌متر از میسلیوم رشد یافته از روی محیط کشت برداشته و به مرکز تشتک پتری دوم (شامل محیط کشت PDA) منتقل شد. تشتک پتری حاوی قارچ به‌صورت واژگون روی تشتک پتری حاوی باکتری قرار گرفت و با پارافیلم به‌هم متصل و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد (۵). در تشتک پتری شاهد از دیسک میسلیومی قارچ و قطرات آب مقطر استریل استفاده شد.

در نمونه‌های کشت شده با هر دو روش کشت متقابل و پتری‌دیش برعکس، پس از ۳-۱ روز رشد شعاعی پرگنه‌های قارچ اندازه‌گیری و میزان بازدارندگی از رشد قارچ توسط باکتری با استفاده از فرمول ویپس (Whipps) تعیین گردید (۲۵). بدین

منظور شعاع رشد پرگنه قارچ در پتری شاهد (R) و شعاع رشد پرگنه قارچ در پتری‌های تیمار با جدایه‌های باکتری (r) اندازه-گیری شد.

$$\text{درصد بازدارندگی} = [(R-r)/R] \times 100 \qquad (۱)$$

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها به‌وسیله‌ی نرم‌افزار SASv. 9.2 و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح p≤۰/۰۱ انجام شد.

شناسایی سویه‌های باکتریایی

پس از استخراج DNA از جدایه‌های باکتریایی، جهت تکثیر ناحیه *16S rDNA* ژنومی، واکنش تکثیر زنجیره‌ای (PCR) با استفاده از پرایمرهای 27F Unive (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') و 1492R Unive (5'-GGCTTACCTTGTTACGACTT-3') در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. محصولات واکنش برای توالی‌یابی به شرکت Bioneer ارسال گردید. توالی‌های به دست آمده پس از ویرایش، با داده‌های NCBI مطابقت داده شدند (۱۱). برای اطمینان از نتایج به دست آمده، آزمون‌های استاندارد بیوشیمیایی شامل رنگ‌آمیزی گرم (Gram)، آزمون اکسیداتیو- فرمنتاز (OF)، اکسیداز، کاتالاز، هیدرولیز نشاسته، هیدرولیز ژلاتین، تست حرکت، استفاده از سیترات، رشد در دمای ۴ و ۴۲ درجه سانتی-گراد، رشد روی منابع مختلف کربن، تحمل نمک و pH و مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها انجام گرفت.

نتایج و بحث

در تمامی آزمایشات تفاوت معنی داری در سطح ۱ درصد میان تیمارهای مختلف مشاهده شد (جدول ۱).

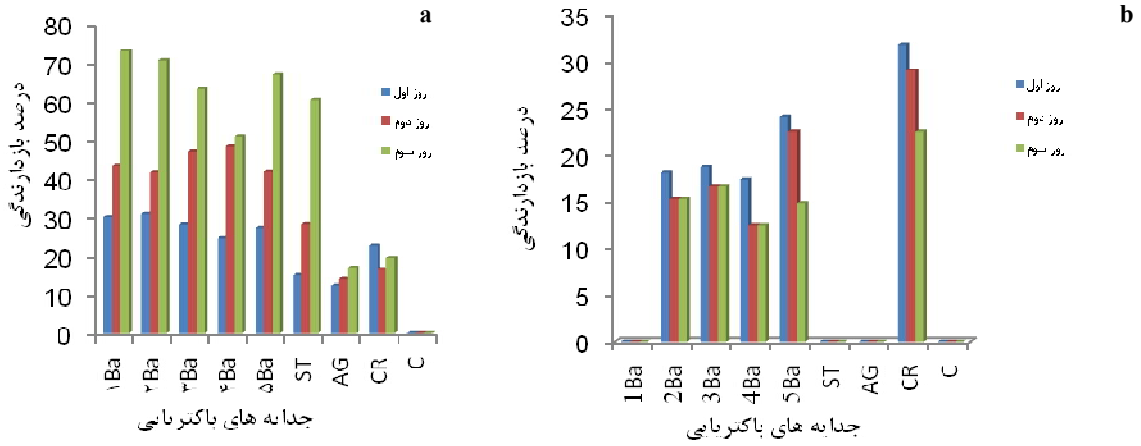
جدول۱- تجزیه واریانس درصد بازدارندگی جدایه‌های باکتریایی علیه قارچ *Sclerotium rolfsii*

منابع تغییرات	درجه آزادی		میانگین مربعات	
	تشتک پتری برعکس	کشت متقابل	تشتک پتری برعکس	کشت متقابل
تیمار	۷	۷	۱۲/۵۲۵۹۵۶۹۴**	۱۰۳۰/۷۹۵۱۴۳**
زمان	۲	۲	۳۰/۳۶۴۲۴۲۵۰**	۷۴/۸۷۱۴۲۶**
تیمار*زمان	۱۴	۱۴	/۸۳۳۶۴۳۴۸**	۱۴/ ۵۹۷۹۹۱**
خطا	۴۸	۴۸	۰/۶۵۶۰۳۲۵	۲/۵۹۳۸۵۸

** معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد

بازدارندگی از رشد میسلیومی *S. rolfsii* توسط باکتری‌های اندوفیت

از میان ۵۲ جدایه بررسی شده، هشت جدایه بازدارندگی معنی‌داری از خود نشان دادند. براساس مقایسه میانگین داده‌ها، در روش کشت متقابل جدایه‌های Ba1، Ba2، Ba3، Ba4، Ba5 و ST میزان بازدارندگی بالای ۶۰ درصد و جدایه‌های AG و CR درصد بازدارندگی کمتر از ۲۰ درصد از خود نشان دادند. نتایج آزمایش نشان داد بیشترین میزان بازدارندگی جدایه‌های باکتریایی در روز سوم صورت گرفته است (شکل ۱a).



شکل ۱- مقایسه میانگین درصد بازدارندگی از رشد شعاعی پرگنه‌های قارچ *Sclerotium rolfsii* توسط جدایه‌های باکتریایی در a) روش کشت متقابل و b) پتری دیش برعکس

در روش کشت متقابل به‌دلیل نشت مواد متابولیکی باکتری‌ها در محیط و تأثیر آن بر روی میسلیوم قارچ، آزمون با نتایج بهتری همراه بود، ولی در روش تشتک پتری برعکس، بازدارندگی از رشد قارچ که نتیجه تأثیر گازهای تولید شده توسط سویه‌های باکتریایی است، در مقایسه با روش کشت متقابل عدد کمتری را نشان داد (شکل ۱b).

شناسایی باکتری‌ها

آنالیز توالی‌های ناحیه 16SrDNA جدایه‌های باکتریایی نشان داد که از هشت جدایه منتخب، ۵ جدایه بیشترین شباهت را به *Bacillus* spp. و سه جدایه‌ی دیگر بیشترین شباهت را به *Stenotrophomonas* spp.، *Cryseobacterium* spp. و *Agrobacterium* spp. داشتند. آزمون‌های بیوشیمیایی انجام شده صحت نتایج شناسایی مولکولی تا سطح جنس را تأییدکرد.

در پژوهشی که توسط ونگ و همکاران (۲۳) صورت گرفت ۹۴ باکتری اندوفیت از قسمت‌های مختلف بادام زمینی جدا شدند که باکتری‌های *Bacillus* sp. و *Stenotrophomonas* sp. از جنس‌های غالب به دست آمده از این گیاه بودند. ونگ و همکاران (۲۴) نیز ۷۲ ایزوله باکتریایی از ریشه گیاه بادام زمینی جداسازی کردند که ۴۸ ایزوله متعلق به *Bacillus* sp. و ۳ ایزوله متعلق به جنس *Stenotrophomonas* sp. بودند.

وجود هاله شفاف در آزمون کشت متقابل جدایه‌های آنتاگونیست و بیمارگر حاکی از بازدارندگی از رشد قارچ توسط باکتری‌های اندوفیت از طریق مکانیزم آنتی‌بیوز می‌باشد (۱۰، ۳). توانایی ایجاد هاله بازدارندگی در تشتک‌های حاوی جدایه-های آنتاگونیست و بیمارگرها احتمالاً نشان‌دهنده این است که جدایه‌های آنتاگونیست مورد بررسی ما توانایی تولید آنزیم‌هایی مانند کیتیناز و گلوکاناز را داشته‌اند (۲۶). همان‌طور که در نتایج مطالعه‌ی ونگ و همکاران مشخص گردید که باکتری - *Stenotrophomonas* sp. دارای فعالیت کیتینولیتیکی بالقوه‌ای بوده و موجب تخریب دیواره سلولی قارچ می‌شود (۲۳). جدایه‌های مورد بررسی توانستند از رشد میسلیومی قارچ *S. rolfsii* به‌طور قابل توجهی (بالای ۶۰ درصد بازدارندگی) جلوگیری کنند. در پژوهشی که توسط فیگوردو و همکاران (۷) در سال ۲۰۱۴ انجام شد، تأثیر دو باکتری *Bacillus* sp. و *Bradyrhizobium* sp. روی قارچ *S. rolfsii* در شرایط آزمایشگاهی به‌طور جداگانه و هم‌زمان مورد آزمون قرار گرفت و نتایج حاکی از بازدارندگی مطلوب علیه این قارچ بود. تاسانا و همکاران (۲۰) در کنترل قارچ *S. rolfsii* با باکتری *B. subtilis* به نتایج مشابهی دست پیدا کردند. آن‌ها بیان داشتند که فیلترای کشت استرین SSE4 از این باکتری فعالیت آنتاگونیستی قابل

توجهی علیه قارچ مذکور را دارد. هی و همکاران (۹) فعالیت‌های ضد قارچی گونه‌های *Bacillus subtilis* را با پپتیدهای با وزن مولکولی پایین که اغلب شامل لیپوپپتیدهای حلقوی فنجی‌سین B و A بود، در ارتباط دانستند. در بررسی دیگری که توسط تونلی و همکاران (۲۱) انجام شد، ۱۹۳ جدایه باکتریایی اپی‌فیت و اندوفیت از اندام‌های مختلف بادام زمینی جداسازی گردیدند که شامل *Pseudomonas* spp. و *Bacillus* sp. بودند. ۷۱ ایزوله از رشد قارچی جلوگیری کردند که از میان آن‌ها تنها جدایه اندوفیت (*Pseudomonas* sp.) BREN6 علیه قارچ *S. rolfsii* بازدارندگی به میزان ۷.۵± ۵۷ درصد را روی محیط YEMA نشان داد.

استفاده از استرین EPCO 16 باکتری *B. subtilis* در کنترل بیماری پوسیدگی ریشه نیشکر ناشی از قارچ *S. rolfsii* ۴۴.۴٪ بازدارندگی در شرایط کشت متقابل به همراه داشت (۱۵).

منابع

۱. ارشاد، ج.۱۳۷۷. قارچهای ایران.انتشارات سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ۵۹۱ ص.

2. Abdel azeiz, A. Z., Shadi, A. I., Nassar, A. R., and EL-Sayed, S. A. 2006. Biological control of the plant pathogenic fungus *Sclerotium rolfsii* using a bacterium isolated from Egyptian soil. Research Bulletin, Ain Shams University.1-11.

3. Abdullah, M. T., Ali, N. Y., and Suleman, P. 2008. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens*. Crop Protection 27: 1354-1359.

4. Amaresan, N., Jayakumar, V. and Thajuddin, N. 2013. Isolation and characterization of endophytic bacteria associated with chilli (*Capsicum annuum*) grown in coastal agricultural acosystem. Department of Microbiology. Indian Journal of Biotechnology 13: 247-255.

5. Fernando, D. W., Ramarathnam, R., Krishnamoorthy, A., and Savchuk, S. 2005. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. Soil Biology and Biochemistry 37: 955-964.

6. Fichner, E. J. 2009. *Sclerotium rolfsii* Sacc. 'Kudzu of the Fungal World. (Online,http://www.cals.ncsu.edu/course/pp758/Sclerotium/ *S.rolfsii*.html, diakses 31 Agustus 2009).

7. Figueredo, M. S. , Tonelli, M. L., Taurian, T., Angelini, J., Ibanez, F., Valetti, L., Munoz, V., Anzuay, M. S., Luduena, L., and Fabra, A. 2014. Interrelationships between *Bacillus* sp. CHEP5 and *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 in the induced systemic resistance against *Sclerotium rolfsii* and symbiosis in peanut plants. Jornal of biosciences 39 (5): 877-885.

8. Helena, A., Keyser, I., and Ferreira, H. S. 1988. Chemical and Biological Control of *Sclerotium rolfsii* in Grapevine Nurseries. Journal of Enology and Viticulture 9(1): 43-44.

9. He, R. L., Wang, G. P., Liu, X. H., Zhang, C. L., and Lin, F. C. 2009. Antagonistic bioactivity of an endophytic bacterium isolated from Epimedium brevicornu Maxim. African Journal of Biotechnology8: 191-195.

10. Inderiati, S. and Franco, C. M. M. 2008. Isolation and identification of endophytic Actinomycetes and their antifungal activity. Journal of Biotechnology Research in Tropical Region 1: 1-6.

11. Jiang, H., Dong, H., Zhang, G., Yu B., Chapman, L. R., and Fields, M. W. 2006. Microbial diversity in water and sediment of Lake Chaka, an athalassohaline lake in northwestern China. Applied and environmental microbiology 72 (6): 3832-3845.

12. Kawai, M., Matsutera, E., Kanda, H., Yamaguchi, N., Tani, K., and Nasu, M. 2002. 16S ribosomal DNA-based analysis of bacterial diversity in purified water used in pharmaceutical manufacturing processes by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. Appl. Environmental Microbiology 68: 699-704.

13. Prasada Babu, G. and Paramageetham, Ch. 2013. Biocontrol of *Sclerotium rolfsii* – a polyphagous plant pathogen by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from forest litter. Research in Plant Scienc. 3(1): 1-4

14. Punja, Z. K. 1988. *Sclerotium (Athelia) rolfsii* a pathogen of many plant species. In: Sidhu G. S. (ed). Advances in Plant Pathology.Genetics of Plant Pathogenic Fungi. Academic Press, London. 6: 523-534.

15. Rasu, T., Sevugapperumal, N., Thiruvengadam, R., and Ramasamy, S. 2013. Biological control of sugarbeet root rot caused by *Sclerotium rolfsii*. Biological, Ecological and Environmental Sciences (IJBEES) 2 (1): ISSN 2277 – 4394.

16. Sadfi, N., Cherif, M., Fliss, I., Boudabbous, A., and Antoun, H. 2001. Evaluation of bacterial isolates from salty soils and *Bacillus* thuringiensis for the biocontrol of Fusarium dry rot of potato tubers. Plant Pathology 83(2): 101-117.

17. Sastrahidayat, R., Sulistyowati, L., Djauhari, S., Muhibuddin, A. and Saleh, N. 2014. Biocontrol of *Sclerotium rolfsii* (Caused Damping-off disease) on soybean varieties using *Streptomyces* sp. and arbuscular mycorrhizal fungi. 83-91.

18. Shabana, W. and El-Bramawy, M. 2011. Impact of dual inoculation with Rhizobium and Trichoderma on damping off, root rot diseases and plant growth parameters of some legumes field crop under greenhouse conditions. International Research Journal of Agricultural Science and Soil Science 1(3): 98-108.

19. Sharad, V. 2010. Screening of *Streptomyces* sp. MTCC4 for the production of antifungal compound against *Sclerotium rolfsii*. Biochemical Technology 2(4):199-202.

20. Thasanaa, N., Prapagdee, B., Rangkadilok, N., Sallabhan, R., Aye, S. L., Ruchirawat, S., and Loprasert, S. 2010. *Bacillus subtilis* SSE4 produces subtulene A, a new lipopeptide antibiotic possessing an unusual C15 unsaturated β-amino acid, FEBS Lett 584: 3209-3214.

21. Tonelli, M. L., Taurian T., Ibáñez, F., Angelini, J., and Fabra A. 2010. Selection and invitro characterization of biocontrol agents with potential to protect peanut plants against fungal pathogens . Plant Pathology 92 (1): 73-82.
22. Vikram, A. and Hamzehzarghani, H. 2011. Integrated Management of *Sclerotium rolfsii* (Sacc) in Groundnut (*Arachis hypogaea* L.) under Pot Culture Conditions. Pest Technology 5 (1): 33-38.
23. Wang, K., Yan, P. S., Ding, Q. L., Wu, Q. X., Wang, Z. B., and Peng, J. 2013. Diversity of culturable root association activity of peanut plant in china. Microbiology and biotechnology 29(1): 1-10.
24. Wang, Sh., Wang W., Zhigang, J., Binghai, D., Yanqin, D., Ting, N., and Fangzan, J. 2013. Screening and diversity of plant growth promoting endophytic bacteria from peanut. Microbiology Research 7 (10): 875-884.
25. Whipps, J. M. 1987. Effect of media on growth and interaction between a rang of soil-borne glasshouse pathogens and antagonistic fungi. New Phytologist 107 (1): 127-142.
26. Widyastuti, S. M. 2003. Biological control of *Sclerotium rolfsii* damping off of Tropical Pine (*Pinus merkusii*) with three isolates of *Trichoderma* spp. Biological Science 3: 95-102.

تعیین ترادف نوکلئوتیدی بخشی از ژن پروتئین پوششی جدایه‌ی گرگان ویروس موزائیک ایرانی قیاق

سارا میرکاظمی[1*]، سعید نصرالله‌نژاد[2]، عبدالقیوم ابراهیمی[3]

[1]*دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان، گرگان، ایران*

[2]*دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان*

[3]*استاد گروه گیاهپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان، گرگان، ایران*

* نویسنده مسئول: *Sara.mirkazemi@yahoo.com*

چکیده

ویروس موزائیک ایرانی قیاق (*Iranian Johnson grass mosaic virus*, IJMV) یکی از مهم‌ترین پوتی-ویروس‌های غلات در کشور به شمار می‌رود. این ویروس بومی ایران بوده و به طور گسترده در مناطق مختلف کشور وجود دارد. هدف از این تحقیق تعیین ترادف بخشی از پروتئین پوششی جدایه گرگان این ویروس می-باشد. به این منظور جهت بررسی ویروس از نمونه‌های دارای علائم ویروسی از گیاهان ذرت، سورگوم و قیاق از آزمون الایزای غیر مستقیم با آنتی سرم IJMV استفاده گردید. نتایج آزمون الایزا نشان داد که گیاهان ذرت، سورگوم و قیاق دارای علائم موزائیک خفیف تا شدید و نوارهای نکروتیک قرمز آلوده به IJMV بودند. RNA کل با استفاده از کیت mRNA از نمونه‌های مذکور استخراج شد و در آزمون RT-PCR با استفاده از آغازگر عمومی پوتی‌ویروس (Oligo1n/Oligo2n)، قطعه‌ای ۳۲۷ جفت بازی مربوط به ژن پروتیئن پوششی این ویروس، تکثیر گردید. قطعات تکثیر شده تعیین ترادف شده و ترادف‌های حاصل در پایگاه اطلاعاتی NCBI با استفاده از نرم‌افزار جستجوگر BLAST شدند. طول قطعه حاصل از تعیین ترادف جدایه گرگان ۷۸۷ نوکلئوتید بدست آمد.

واژگان کلیدی: IJMV ، الایزای غیرمستقیم، RT-PCR و BLAST

مقدمه

پوتی‌ویروس‌ها بزرگترین و از لحاظ اقتصادی مهم‌ترین ویروس‌های گیاهی هستند (۱۲ و ۱۰). این جنس از تیره Potyviridae، دارای ۱۱۸ عضو قطعی و ۸۲ عضو احتمالی می‌باشد (۱۵). سه ویروس موزائیک کوتولگی ذرت (*Maize dwarf mosaic virus*,MDMV)، موزائیک جنوبی مرغ (*Bermuda grass southern mosaic virus*, BgSMV) و موزائیک ایرانی قیاق (*Iranian Johnson grass mosaic virus*, IJMV) از پوتی‌ویروس‌های مهم غلات در ایران می‌باشند (۶).

ویروس موزائیک ایرانی قیاق (*Iranian Johnson grass mosaic virus*, IJMV) یکی از مهم‌ترین پوتی‌ویروس‌های غلات است که تقریبا در اکثر مناطق ایران وجود دارد و بومی ایران است (۵) و همانند ویروس موزائیک کوتولگی ذرت (MDMV) توسط شته‌های *Rhopalosiphum maidis* Fitch، *Ropalosiphumpadi* L. و *Schizaphis graminum* Rondani به سورگوم منتقل می‌شود. رانـدمان انتقال IJMV توسط *S. graminum* نسبت به شته‌های دیگر بیشتر است (۲). میزبان افتراقی آن با MDMV گیاه ارزن مرواریدی است که در آن تکثیر نمی‌یابد (۱۴). قیاق (*Sorghum halpens* L.) گیاهی چندساله، ریزوم‌دار و

تک لپه از خانواده گندمیان است که بعنوان علف هرزی جدی در مزارع ذرت محسوب می‌شود. این گیاه منبع اصلی IJMV و ذرت و سورگوم میزبان‌های زراعی آن می‌باشند (۱۳).

ویروس موزائیک ایرانی قیاق اولین‌بار از روی قیاق و از شیراز توسط ایزدپناه (۱۳۶۱) (۳)، و پس از آن از روی ذرت، سورگوم و قیاق دارای علائم موزائیکی از دیگر مناطق کشورگزارش شد (۱، ۴ و ۷). سپس افشاریفر و ایزدپناه (۱) با مطالعه روی عامل موزائیک ذرت در منطقه بید زرد (شیراز) آن را پوتی‌ویروس معرفی کردند. علائم موزائیک روی قیاق عمدتا مربوط به آلودگی به IJMV است (۵).

اطلاعات ترادف نوکلئوتیدی برای درک بیولوژی، تنوع و تاریخچه تکامل یک ویروس و نیز برای کشف راهبردهای جدید کنترلی ضروری می‌باشد (۹).

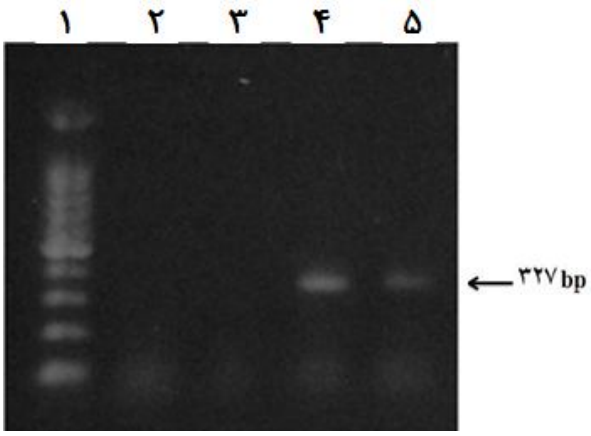
مواد و روش‌ها

نمونه‌های ذرت، سورگوم و قیاق که دارای علائم موزائیک در برگ‌ها بودند در سه نوبت در ماه‌های شهریور، مهر و آبان در سال زراعی ۱۳۹۴-۱۳۹۳ از برخی مزارع ذرت شهرستان گرگان در استان گلستان جمع‌آوری شدند و نمونه‌ها برای انجام آزمایش‌های سرولوژیکی و مولکولی به آزمایشگاه منتقل شدند. جهت شناسایی ویروس IJMV از آزمون الایزا غیرمستقیم TAS-ELISA(۱۱) با آنتی بادی چند همسانه‌ای IgG-IJMV (مرکز تحقیقات ویروس‌شناسی دانشگاه شیراز) استفاده گردید. بعد از شناسایی نمونه‌های آلوده به IJMV، تعداد ۲ جدایه که بیشترین غلظت ویروس را در آزمون الایزا دارا بود انتخاب و از آن‌ها در آزمون PCR استفاده شد. آر.ان.ای این نمونه‌ها با استفاده از کیت mRNA capture (Roche) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج و پس از انجام واکنش RT و ساخت cDNA جهت تکثیر، واکنش PCR انجام شد. جهت انجام واکنش PCR از آغازگرهای عمومی تکثیرکننده بخشی از پروتئین پوششی استفاده گردید. در دستگاه PCR پروفیل حرارتی به شکل زیر برنامه‌ریزی شد: ۴ دقیقه در $۹۴^{\circ}C$ برای واسرشتگی اولیه، یک دقیقه در $۹۴^{\circ}C$ ، ۴۵ ثانیه در$۵۵^{\circ}C$ ، یک چرخه به مدت ۱دقیقه در $۷۲^{\circ}C$ و در نهایت ۱۵ دقیقه در ۷۲ درجهت نشر قطعات ناتمام مورد استفاده قرار گرفت. محصول واکنش PCR در ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد و قطعات تکثیری ژنوم به کمک اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و توسط دستگاه ثبت ژل مورد مشاهده و عکسبرداری قرار گرفتند. در نهایت محصول PCR برای تعیین ترادف به شرکت ماکروژن (کره جنوبی) ارسال شد. ترادف به دست آمده در بانک ژن (GenBank) بلاست گردید.

نتایج و بحث

طبق نتایج علائم گیاهان آلوده به IJMV به صورت موزائیک خفیف تا شدید و نوارهای زرد رنگ به موازات برگ‌ها و نیز نکروز قرمز رنگ به ویژه در سورگوم بود (شکل ۱). این علائم بطور معمول از قاعده برگ‌ها شروع شده و به سمت نوک برگ ادامه پیدا می‌کند. آلودگی به ویروس موزائیک ایرانی قیاق در گیاهان دارای علائم مذکور، با استفاده از آنتی‌سرم اختصاصی IJMV در آزمون الایزای غیرمستقیم مثبت ارزیابی شد. جهت تایید آلودگی در این نمونه‌ها، با استفاده از جفت آغازگر عمومی پوتی‌ویروس‌ها، oligo1n و oligo2n قطعه DNA بطول حدود۳۲۷جفت باز مربوط به بخشی از ناحیه ژن پروتئین پوششی IJMV تکثیر گردید که در نمونه‌های شاهد سالم (منفی) باندی مشاهده نگردید (شکل ۲). برخی نمونه‌ها که آلودگی به IJMV را در آزمون الایزا نشان داده بودند، پس از انجام آزمون PCR و تعیین ترادف، آلودگی به دو ویروس IJMV و MDMV را به طور همزمان نشان دادند. علائم آلودگی در نمونه‌هایی که آلودگی توأم به دو ویروس را داشتند نسبت به نمونه‌هایی که تنها به IJMV آلوده بودند شدیدتر بود.

شکل ۱- علائم ویروسی ایجاد شده توسط **IJMV** روی قیاق (الف) و ذرت (ب). (اصلی)



شکل۲- نتایج آزمون **PCR** در ژل آگارز: راهک ۱ نشانگر **GenRuler^{TM}100bp DNA Ladder ،100bp** از شرکت **Fermentas** ، راهک ۲: شاهد منفی با آب مقطر، راهک ۳: شاهد سالم و راهک ۴ و ۵ قطعات تکثیر شده مربوط به ویروس موزائیک ایرانی قیاق.

پس از تعیین ترادف محصول PCR با استفاده از آغازگرهای عمومی پوتی‌ویروس‌ها و توسط شرکت ماکروژن (کره جنوبی)، ترادف‌های بدست آمده با اطلاعات موجود در ژن بانک در پایگاه اطلاعاتی NCBI و برنامه BLAST مقایسه شدند و صحت ویروسی بودن قطعات تأیید شد. همچنین پس از تجمیع قطعات بدست آمده و حذف قسمت‌های هم پوشان، ترادف نوکلئوتیدی بخشی از پروتئین پوششی IJMV بدست آمد. طول قطعه حاصل از تعیین ترادف جدایه گرگان ۷۸۷ نوکلئوتید بدست آمد.

نتایج تحقیقات نصرالله‌نژاد و همکاران (۱۳۹۳) نشان داد که بیشتر مناطق گرگان دارای درصد بالایی از آلودگی بـه IJMV می‌باشند. همچنین آلودگی مخلوط به دو ویروس IJMV و MDMV در ذرت گزارش شده است اما گفته مـی‌شـود کـه IJMV پراکنش وسیع‌تری نسبت به MDMV دارد. طبق نتایج تحقیق حاضر قطعه به دست آمده از PCR بـا اسـتفاده از آغازگرهـای عمومی پوتی‌ویروس‌ها در تعداد محدودی از نمونه‌های آلوده، پس از تعیین توالی شامل دو ترادف مربوط به بخشی از ژنوم هـر دو ویروس IJMV و MDMV بود که این نتایج با نتایج نصرالله‌نژاد و همکاران (۱۳۹۳) (۸) مطابقت دارد.

منابع

۱. افشاریفر، ع.، و ایزدپناه، ک. ۱۳۷۰. الف. تعیین هویت ویروس رشته‌ای مولد موزائیک ذرت در شیراز و رابطه ایزولات‌های مشابه ویروس از ذرت، سورگوم و قیاق در چند نقطه ایران. خلاصه مقالات دهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. کرمان. ص ۱۶۱.

۲. افشاریفر، ع.، و ایزدپناه، ک. ۱۳۷۰. ب. بروز نوع جدیدی از موزاییک در مزارع ذرت در اطراف شیراز. خلاصه مقالات دهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، کرمان. صفحه۱۶۲.

۳. ایزدپناه، ک. ۱۳۶۱. لیست مشروح بیماری‌های ویروسی و شبه ویروسی گیاهان در استان فارس. انتشارات دانشکده کشاورزی شیراز. شیراز، ۱۸۳ ص.

۴. ایزدپناه، ک.، و کامران، ر. ۱۳۷۴. جداسازی نژادی از ویروس موزائیک نیشکر از ذرت در منطقه سپیدان فارس. خلاصه مقالات دوازدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. کرج. ص ۹۴.

۵. معصومی، م.، زارع، آ.، و ایزدپناه، ک. ۱۳۹۰. مقایسه بیولوژیکی، سرولوژیکی و مولکولی پوتی‌ویروس‌های گیاهان تیره غلات در ایران. بیماری‌های گیاهی (۱) ۴۷: ۴۷-۶۶.

۶. معصومی، م.، حیدری، س.، قهرمانی، ط.، راه‌پیما سروستانی، ن.، و ایزدپناه، ک. ۱۳۹۱. بررسی رابطه اجدادی ویروس موزائیک ایرانی قیاق با سایر ویروس‌های غلات. خلاصه مقالات بیستمین کنگره گیاهپزشکی ایران. شیراز. ص ۸۶۷.

۷. معینی، ع. ا.، و ایزدپناه، ک. ۱۳۸۰. تشخیص و خالص‌سازی پوتی‌ویروس شبیه ویروس موزائیک کوتولگی ذرت (MDMV) در مازندران. مجله بیماری‌های گیاهی ۳۷ :۱۴۷-۱۶۰.

۸. نصرالله‌نژاد، س.، ذاکری، ع.، و مصطفوی نیشابوری، ف. س. ۱۳۹۳. ردیابی سرولوژیکی و مولکولی دو ویروس مولد موزائیک در مزارع ذرت استان گلستان. ژنتیک نوین (۲) ۹:۲۲۴-۲۳۹.

9. Akan, K.U., Martin, R., and Shukla, D. 2007. Coat protein of Potyviruses, comparison of the four Australian strains of *Sugarcane mosaic virus*. Virology 111: 455-462.
10. Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U., and Ball, L.A. 2005. Virus Taxonomy, Eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press. London, 756pp.
11. Converse, R.H., and Martin, R. R. 1990. ELISA methods for plant viruses. APS Press. St Paul, 196pp.
12. Shukla, D.D., Ward, C.W., and Brunt, A.A. 1994. Genome structure, variation and function. Pp. 74-110 in: The *Potyviridae*. CAB Int., Wallingford, UK, relationships within the family Potyviridae: *Wheat streak mosaic virus* and *Brome streak mosaic virus* are not members of the genus Rymovirus. Phytopathology 88: 782-787.
13. Zare, A., Masumi, M., and Izadpanah, K. 2005a. *Bermuda grass mosaic virus*: A distinct potyvirus infecting several geramineous species in Iran. Parasitica 61: 105-110.
14. Zare, A., Masumi, M., and Izadpanah, K. 2005b. Serological and biological properties of MDMV in Iran.Proceeding of 16th Iranian plant protection Congress. Tabriz. 110p.
15. Van Regenmortel, M .H. V. 2000. Virus taxonomy: The classification and nomenclature of viruses. The Seventh Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. San Diego, USA. Academic Press. 1162pp.

آنالیز فیلوژنتیکی و تعیین ساعت مولکولی جدایه‌های ایرانی ویروس موزائیک ایرانی قیاق

سارا میرکاظمی[۱*]، سعید نصرالله‌نژاد[۲]، عبدالقیوم ابراهیمی[۳]

[۱] *دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان، گرگان، ایران*
[۲] *دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان*
[۳] *استاد گروه گیاهپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان، گرگان، ایران*
* *نویسنده مسئول: Sara.mirkazemi@yahoo.com*

چکیده

تاکنون چندین پوتی‌ویروس بیماری‌زا در غلات شناسایی شده که ویروس موزائیک ایرانی قیاق (*Iranian Johnson grass mosaic virus*, IJMV) یکی از مهم‌ترین آن‌ها است. این ویروس بومی ایران بوده و از پراکنش وسیعی در ایران برخوردار است. به منظور تعیین جایگاه فیلوژنتیکی و نیز مقایسه IJMV جدا شده از غلات درگرگان با تعدادی از جدایه‌های موجود در بانک ژن و تعیین ساعت مولکولی، از گیاهان ذرت، سورگوم و قیاق دارای علائم موزائیک خفیف تا شدید و نوارهای نکروتیک قرمز، نمونه‌برداری صورت گرفت. سپس نمونه‌ها با استفاده از جفت آغازگرهای عمومی پوتی‌ویروس‌ها در واکنش RT-PCR تکثیر شد. محصول PCR پس از ترادف‌یابی به همراه ۳۰ جدایه IJMV در دنیا با نرم افزار Clustal X همردیف‌سازی شده و درخت فیلوژنتیکی در نرم‌افزار MEGA5 به روش maximum parsimony ترسیم گردید. همچنین ساعت مولکولی با استفاده از نرم‌افزار Mega5 تعیین شد. طبق نتایج حاصل از تجزیه فیلوژنتیکی، جدایه گرگان IJMV همراه با سایر جدایه‌های این ویروس در ایران، با بیش از ۹۰ درصد تشابه در سطوح نوکلئوتیدی در یک گروه قرار گرفتند. از بین پوتی‌ویروس‌های غلات ZeMV از فلسطین اشغالی با ۸۶ درصد تشابه در سطح نوکلئوتیدی نزدیک‌ترین ویروس به IJMV بود. نتایج تعیین ساعت مولکولی نشان داد که جدایه‌های IJMV از تنوع ژنتیکی و قدمت تکاملی کمی برخوردارند و مکانیزم اصلی تکامل و تنوع این ویروس انتخاب منفی بوده است. با توجه به یکسان بودن نرخ تکاملی بین جدایه‌ها و واگرایی کم بین آن‌ها می‌توان نتیجه گرفت که تاریخ تکاملی (ساعت مولکولی) آن‌ها نزدیک به یکدیگر می‌باشد

واژگان کلیدی: ویروس موزائیک ایرانی قیاق، RT-PCR، درخت فیلوژنی، نرخ تکامل

مقدمه

در سال‌های اخیر سطح زیر کشت و موارد مصرف ذرت در اغلب کشورهای جهان به سرعت افزایش پیدا نموده است (۲). در سطح جهانی از نظر میزان تولید، ذرت پس از گندم رتبه دوم، و از نظر سطح زیر کشت بعد از گندم و برنج رتبه سوم را به خود اختصاص داده است (۱). همچنین ذرت یکی از محصولات مهم و اساسی استان گلستان محسوب می‌شود. کشت ذرت همچنین موجب شیوع برخی بیماری‌های ویروسی شده است که در سال‌های اخیر علائم بیماری‌های ویروسی و شبه‌ویروسی مانند پیچیدگی برگ‌ها، کاهش رشد، زردی بوته‌ها و کاهش محصول در سطح زیادی از مزارع گرگان مشاهده شده است. ذرت میـــزبان طبیعی بیش از ۵۰ ویـــروس است (۱۱). چهار ویروس: مـــوزاییک کوتولگی ذرت (*Maiz dwarf mosaic virus*,

MDMV)، موزاییک نیشکر(*Sugarcane mosaic virus*, SCMV)، موزاییک سورگوم (*Sorghum mosaic virus*, SrMV) و موزاییک قیاق (*Johnson grass mosaic virus*, IJMV) را به‌عنوان پوتی‌ویروس‌های غلات معرفی کردند که قبلا به‌عنوان زیر گروه SCMV در جنس پوتی‌ویروس قرار گرفته بودند (۱۰). ویروس موزائیک ایرانی قیاق یکی از مهم‌ترین این ویروس‌ها می‌باشد. این ویروس بومی ایران است و در تمام نقاط ایران بویژه شمال کشور آن باعث ایجاد علائم موزائیکی و خسارت اقتصادی می‌شود.

ویروس موزائیک ایرانی قیاق گونه‌ای از جنس پوتی‌ویروس از تیره پوتی‌ویریده، بزرگترین تیره ویروس‌های گیاهی و نیز از نظر اقتصادی از مهم‌ترین ویروس‌های گیاهان تک لپه و دو لپه در سرتاسر جهان به شمار می‌رود (۵ و ۹). همه اعضای تیره پوتی‌ویریده دارای RNA ژنومی تک لای مثبت با اندازه تقریبی ۱۰ کیلو باز و ذرات رشته‌ای خمش‌پذیر به طول ۶۸۰ تا ۹۵۰ نانومتر و قطر ۱۱ تا ۱۴ نانومتر هستند که شامل ۹۵ درصد پروتئین و ۵ درصد RNA می‌باشد (۶ و ۷).

این ویروس از پراکنش وسیعی در ایران برخوردار است و بومی ایران می‌باشد (۳ و ۴). ساعت مولکولی روشی است به منظور تعیین تکامل مولکولی که از خصوصیات فسیلی و سرعت تغییرات مولکولی استفاده می‌کند تا زمان واگرایی (جدا شدن) دو گونه یا آرایه مختلف را در مقیاس زمان زمین‌شناسی استنتاج کند. این روش به منظور برآورد زمان وقوع گونه‌زایی و یا گسترش تکاملی استفاده می‌شود. داده‌های مولکولی مورد استفاده برای این چنین محاسباتی معمولاً توالی نوکلئوتیدی برای دی‌ان‌آ و یا توالی اسید آمینه برای پروتئین‌ها است. گاه به ساعت مولکولی نام ساعت‌ژنی یا ساعت تکاملی نیز می‌دهند. با توجه به اهمیت کشت ذرت در استان گلستان، اهمیت شناسایی بیماری‌های ویروسی و نیاز به آگاهی از میزان سرعت جهش در بین ویروس‌های بیمارگر جهت معرفی ارقام مقاوم و مدیریت بیماری، تحقیق حاضر با هدف شناسایی، تعیین جایگاه فیلوژنی و همچنین تعیین ساعت مولکولی ویروس موزائیک ایرانی قیاق در گرگان انجام شد.

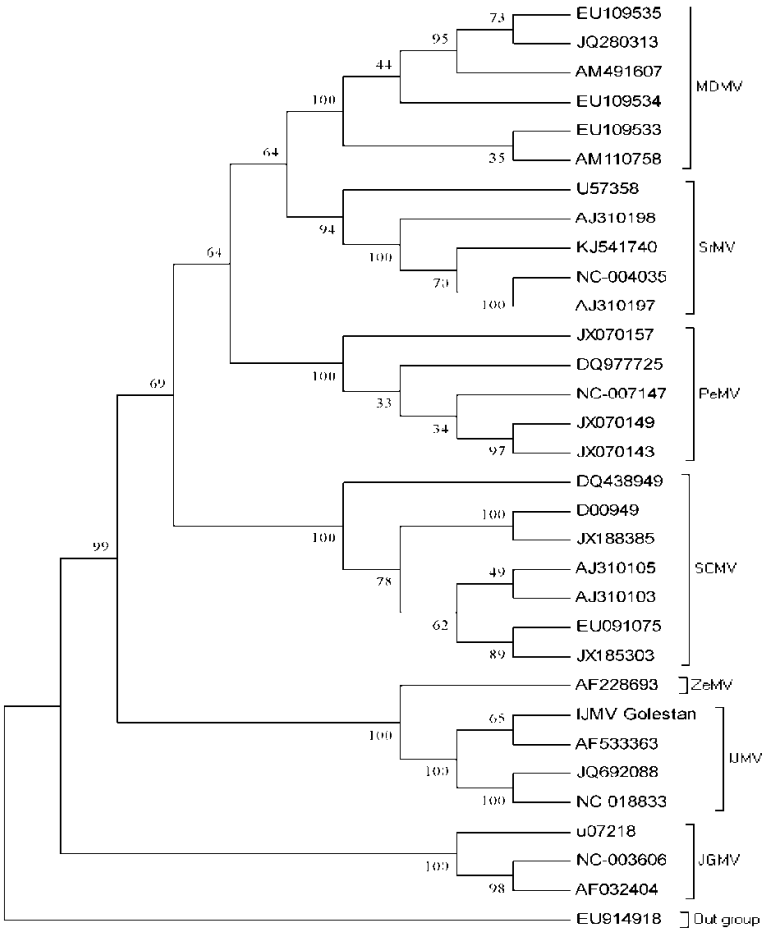
مواد و روش‌ها

در تابستان ۱۳۹۴ نمونه‌برداری از مزارع ذرت گرگان استان گلستان با علائم موزائیک صورت گرفت و نمونه‌ها برای انجام آزمون PCR به آزمایشگاه منتقل شدند. آر.ان.ای این نمونه‌ها با استفاده از کیت mRNA capture (Roche) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج و پس از انجام واکنش RT و ساخت cDNA جهت تکثیر بخشی از ژن پروتئین پوششی به طول bp ۳۲۷، واکنش PCR انجام شد. از آغازگرهای عمومی پوتی‌ویروس‌ها (oligo n1(5'-atggtttggtgcattgagaatgg-3' و oligo n2(5'-cagatgaaggccgcagca-3') (۸) استفاده گردید. در دستگاه PCR پروفیل حرارتی به شکل زیر برنامه‌ریزی شد: ۴ دقیقه در ۹۴°C برای واسرشتگی اولیه، یک دقیقه در ۹۴°C ، ۴۵ ثانیه در۵۵°C ، یک چرخه بمدت ۱دقیقه در ۷۲°C و در نهایت ۱۵ دقیقه در ۷۲ در جهت نشر قطعات ناتمام مورد استفاده قرار گرفت. محصول واکنش PCR در ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد و قطعات تکثیری ژنوم به کمک اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و دستگاه ثبت ژل مورد مشاهده و عکسبرداری قرار گرفتند. در نهایت ۲ محصول PCR برای تعیین ترادف به شرکت ماکروژن (کره جنوبی) ارسال شد. ترادف به دست آمده با ۳۰ ترادف پوتی‌ویروس انتخاب شده از GenBank مقایسه گردیدند. همردیف‌سازی چندگانه Multiple alignment با برنامه Clustal X انجام و با استفاده از نرم افزار Mega5 درخت فیلوژنتیکی به روش maximum parsimony (MP) ترسیم و ساعت مولکولی تعیین شد.

نتایج و بحث

درخت فیلوژنتیکی با استفاده از ترادف نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی جدایه گرگان و تعداد ۳۰ جدایه مختلف از پوتی‌ویروس‌های غلات رسم گردید (شکل۱). بر این اساس کلیه پوتی‌ویروس‌های غلات در ۶ گروه قرار گرفتند. جدایه‌های MDMV از ایران در کنار جدایه‌های این ویروس از اروپا در یک گروه و سایر گروه‌ها شامل جدایه‌های SrMV از چین، جدایه‌های PeMV (*Pennisetum mosaic virus*) از چین و جدایه‌های SCMV از ایران، آمریکا، آلمان و چین بود. جدایه گرگان IJMV

در کنار جدایه‌های این ویروس از شیراز در یک گروه قرار گرفتند و با ZeMV دارای ارتباط نزدیکی می‌باشند. شباهت نوکلئوتیدی بیش از ۹۰ درصد در بین جدایه‌های IJMV نتایج دندروگرام حاصل از هم ردیف‌سازی ناحیه پوشش پروتئینی این جدایه‌ها را تایید می‌کند. گروه دیگر نیز شامل جدایه‌های IGMV از آمریکا و استرالیا می‌باشد.

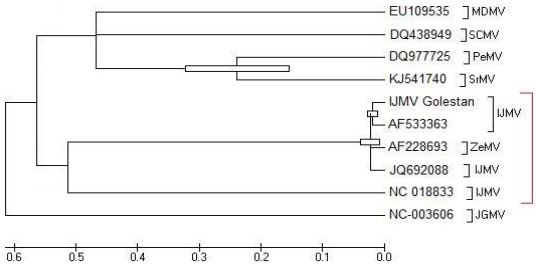


شکل۱- درخت فیلوژنتیک رسم شده به روش **Maximum Parsimony** بدست آمده از همردیف‌سازی ۷۸۷ نوکلئوتید از ژن پروتئین پوششی جدایه **IJMV** گرگان و سایر پوتی‌ویروس‌های غلات.

نتایج مقایسات نشان داد که در مقایسه ناحیه ژن پروتئین پوششی IJMV جدایه گرگان با ۳۰ جدایه از پوتی‌ویروس‌های غلات، جدایه گرگان با سایر جدایه‌های ایران از شیراز و خوزستان، در یک گروه و در ارتباط نزدیک با ZeMV از فلسطین اشغالی قرار می‌گیرند. در بررسی شباهت نوکلئوتیدی نیز بین این جدایه‌ها بیش از ۹۰ درصد شباهت نوکلئوتیدی مشاهده شد. دندروگرام حاصل از هم‌ردیف‌سازی ناحیه پوشش پروتئینی جدایه‌های IJMV نیز این نتایج را تایید می‌کند.

ساعت مولکولی روش آنالیزی بر مبنای سرعت موتاسیون است که امکان تعیین زمان لازم برای رسیدن به شاخه‌های یک درخت ژنی را مشخص می‌کند. در نتایج به دست آمده از آنالیز تاریخ تکاملی (ساعت مولکولی) بین جدایه گرگان و جدایه‌های

شیراز IJMV از نظر نرخ تکاملی اختلافی وجود نداشت. در واقع می‌توان گفت جدایه‌های ویروس موزائیک ایرانی قیاق همگی از یک جد مشترک منشأ گرفته‌اند (شکل۲). با توجه به شکل ۲ مشاهده می‌شود که جدایه‌های IJMV از ایران با یکدیگر و نیز با جدایه ZeMV از فلسطین اشغالی از یک جد مشترک متکامل شده و تاریخ تکاملی آن‌ها نزدیک به یکدیگر می‌باشد. همچنین پراکنش وسیع ویروس موزائیک ایرانی قیاق در ایران این باور را ایجاد می‌کند که این ویروس منشأ بومی داشته باشد.



شکل۲- مقایسه تاریخ تکاملی (ساعت مولکولی) به روش **Maximum Likelihood** بدست آمده از ترادف ژن پروتئین پوششی جدایه **IJMV**گرگان و سایر جدایه‌های این ویروس و نیز پوتی‌ویروس‌های غلات.

نتایج تعیین ساعت مولکولی نشان داد که جدایه‌های IJMV از تنوع ژنتیکی و قدمت تکاملی کمی برخوردارند و مکانیزم اصلی تکامل و تنوع این ویروس انتخاب منفی بوده است. با توجه به یکسان بودن نرخ تکاملی بین جدایه‌ها و واگرایی کم بین آن‌ها می‌توان نتیجه گرفت که تاریخ تکاملی (ساعت مولکولی) آن‌ها نزدیک به یکدیگر می‌باشد.پایین بودن تنوع ژنتیکی نشان می‌دهد که IJMV در ایران یک جمعیت مونوفیلتیک است و علیرغم پراکنش وسیعی که دارد کمتر دچار تنوع شده است، لذا از قدمت تکاملی کمتری برخوردار است.

منابع

۱-خاوری‌خراسانی، س. ۱۳۸۷. راهنمای علمی و کاربردی کاشت، داشت و برداشت ذرت. انتشارات آوای مسیح. تهران، ۱۱۹ ص.
۲-خدابنده، ن. ۱۳۸۸. زراعت گیاهان علوفه‌ای. نشر علم کشاورزی ایران. تهران، ۳۱۸ ص.
۳-معصومی، م.، ایزدپناه، ک.، و بهجت‌نیا، س. ع .ا. ۱۳۸۰. جایگاه تاکسونومیکی ویروس موزائیک ایرانی قیاق. خلاصه مقالات اولین کنگره ویروس شناسی ایران. تهران. ص ۱۳۶.
۴-معصومی، م.، زارع، آ.، و ایزدپناه، ک. ۱۳۹۰. مقایسه بیولوژیکی، سرولوژیکی و مولکولی پوتی‌ویروس‌های گیاهان تیره غلات در ایران. بیماری‌های گیاهی (۱) ۴۷: ۴۷-۶۶.
5. Deng, C. L., Wang, W. J., Wang, Z. Y., Jiang, X., Cao, Y.Y., Zhou, T., Wang, F.R., Li, H. F., and Fan, Z. F. 2008. The genomic sequence and biological properties of Pennisetum mosaic virus, a novel monocot-infecting potyvirus. Archeology Virology 153: 921-927.
6. Lopez-Moya, J. J., and Garcia, J. A. 2008. Potyviruses.Encyclopedia of virology 313-322.
7. Lopez-Moya, J. J., Valli, A., and Garcia, J. A. 2009.Potyviridae. Encyclopedia of life Sciences 1-10.
8. Marei-Jeanne, V., Loos, R., Peyre, J., Alliot., and B., Signoret, P. 2000. Differentiation of poaceaepotyviruses by reverse transcription-polymerase chain reaction and restriction analysis. Journal Phytopathol 148: 141-151
9. Olspert, A., Chung, B. Y., Atkins, J. F., Carr, J. P., and Firth, A. E. 2015. Transcriptional slippage in the positive-sense RNA virus family Potyviridae. EMBO Rep 16: 995-1004.
10. Shukla, D. D. and Teakle, D. S. 1989. Johnsongrass mosaic virus. AAB Description of Plant Viruses No.340. 22p.
11. Zambrano, J. L., Jones, M. W., Brenner, E., Francis, D. M., Tomas, A., and Redinbaugh, M. G. 2014. Genetic analysis of resistance to six virus diseases in a multiple virus resistant maize inbred line. Theory Apple Genetic 127: 867-880.

بررسی بیماری‌های قارچی گندم در سیستم‌های مختلف خاک‌ورزی در منطقه کردکوی

فرانک موجرلو[۱و*]، کامران رهنما[۲]، شعبان کیا[۳] و اسماعیل متکی[۴]

[۱] *دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی موسسه آموزش عالی غیر انتفاعی بهاران*

[۲] *دانشیار بیماری شناسی گیاهی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان*

[۳] *مربی پژوهش مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی گلستان*

[۴] *کارشناس مدیریت حفظ نباتات سازمان جهاد کشاورزی گلستان*

* *نویسنده مسئول : Faranak_m57@yahoo.com*

چکیده

کشاورزی حفاظتی روشی از انجام عملیات زراعی است که کشت جدید بدون نابودی بقایای کشت قبلی و با حفظ آن و رعایت تناوب زراعی صورت می‌گیرد. کشاورزی حفاظتی باعث تغییر در میکروکلیمای داخل کانوپی محصول شده که بر توسعه بیمارگرهای برگی تاثیر می‌گذارد و موجب افزایش بیماری‌ها می شود. به منظور اثر سیستم های مختلف خاک‌ورزی روی بیماری‌های قارچی گندم، پژوهشی در چهار تیمار بدون عملیات خاک‌ورزی، کم خاک‌ورزی، جوی و پشته و مرسوم در طرح آماری بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار اجرا شد. درصد وقوع و شدت بیماری‌ها با روش های استاندارد انجام شد. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف خاک‌ورزی از نظر درصد وقوع و شدت بیماری‌ها به ترتیب در سطح احتمال ۵٪ (P<۰/۰۵) و ۱٪ (P<۰/۰۱) وجود دارد. براساس مقایسه میانگین داده‌ها، تیمار های کم خاک‌ورزی و جوی و پشته به ترتیب بیشترین و کم‌ترین مقدار درصد وقوع و شدت بیماری سفیدک پودری را نشان دادند. از نظر درصد وقوع و شدت بیماری لکه خرمایی، بیشترین و کمترین مقدار به ترتیب در تیمارهای بی‌خاک‌ورزی و جوی و پشته مشاهده شد. درمورد بیماری بلایت فوزاریومی سنبله، تیمارهای بی‌خاک‌ورزی و جوی و پشته به ترتیب بیشترین و کمترین مقدار وقوع و شدت بیماری را داشتند.

واژگان کلیدی: گندم، بیماری، خاک‌ورزی، کشاورزی حفاظتی

مقدمه

کشاورزی به عنوان یکی از محور های اساسی رشد و توسعه، نقش مهمی در توسعه اقتصادی کشورها دارد. انواع مختلفی از سیستم‌های خاک‌ورزی کشاورزی شامل انواع حفاظتی و کشت مرسوم در دنیا موجود می‌باشد(۴). کشاورزی حفاظتی روشی از انجام عملیات زراعی است که کشت جدید بدون نابودی بقایای کشت قبلی صورت می‌گیرد. بدین منظور باید حداقل برهم زدگی خاک صورت گیرد و به هیچ وجه خاک زراعی برگردان نشود و همچنین تناوب زراعی باید رعایت گردد(۴).

با توجه به محدودیت‌های موجود در منابع آب و خاک کشور، تبخیر بالا و بیش از سه برابر بودن از متوسط جهانی، میزان کم بارندگی، پائین بودن مواد آلی خاک‌های کشور، تعدد عملیات خاک‌ورزی، در معرض فرسایش بودن اراضی

کشاورزی، بویژه اراضی دیم و گستردگی این اراضی، نیازمندی به پایداری تولید و امنیت غذایی کشور در طولانی مدت از اهم مواردی است که راهکار اساسی حل آن‌ها از مسیر کشاورزی حفاظتی می‌گذرد(۴).

با توجه به اینکه عامل بیماری‌های سفیدک سطحی، فوزاریوم و لکه خرمایی زمستان را در بقایای محصول(کاه و کلش آلوده) از کشت قبلی در سطح خاک طی می‌کند و مهمترین منبع تلقیح بیماری در بسیاری از مناطق دنیا به‌شمار می‌رود(۱). مدفون کردن بقایای گیاهی از طریق شخم (شخم عمیق) موجب کاهش بیماری می‌شود، هرچند که از بین بردن بقایا موجب فرسایش خاک و از دست رفتن رطوبت زمین می‌شود که با اصول کشاورزی حفاظتی مغایرت دارد(۳و۵).

کشاورزی حفاظتی علی رغم محاسن زیادی که داشته طی سال‌های اخیر موجب افزایش بیماری لکه خرمایی در بسیاری از مناطق دنیا شده است(۴). بیماری لکه خرمایی گندم با نام علمی *Pyrenophora tritici-repentis* موجب کاهش عملکرد به میزان ۱۰-۵۰ درصد می‌گردد(۵). بیماری سفیدک سطحی یا حقیقی (پودری) گندم با نام علمی *Blumeria graminis* f.sp.*tritici* که خسارت ناشی از آن ۱۲ تا ۳۴ درصد و در مواردی تا ۴۵ درصد محصول گندم گزارش شده است و سالیانه خسارت چشمگیری را در بعضی از کشورها به‌وجود می آورد(۳). تغییرات در مدیریت محصول ممکن است باعث تغییر در میکروکلیمای داخل کانوپی محصول شود که روی توسعه بیماری سفیدک پودری تاثیر می‌گذارد(۱۰). بیماری بادزدگی فوزاریومی سنبله گندم با عامل *Fusarium graminearum* می باشد که میزان خسارت این بیماری در چین هر ساله ۱۰-۲۰ درصد و سال‌های اپیدمی بیماری بین ۲۰-۴۰ درصد گزارش شده است(۳). با توجه به مطالعات و مشاهدات توسط موسسه اتاوا درکانادا، عملیات خاک‌ورزی بر وقوع بیماری فوزاریوم سنبله گندم تاثیری نداشته و نیاز به بررسی دارد، مقدار مایه تلقیح از بقایای محصول قبلی به عنوان منبع آلودگی، ارقام حساس و شرایط مساعد آب و هوایی در پیشرفت و شدت بیماری موثر می‌باشد و داده‌های اکولوژی نشان می‌دهد که عملیات بدون خاک‌ورزی سبب افزایش آلودگی بذرگندم در مقایسه با شخم مرسوم می‌گردد(۷).

اثر کشت کم و بی‌خاک‌ورزی، مرسوم و تناوب محصولات پهن برگ بر وقوع و شدت بیماری‌های قارچی گندم و نخود در ساسکاچوان از سال ۱۹۹۱ الی ۱۹۹۸ مورد بررسی قرارگرفت. با توجه به نتایج بدست آمده در این طرح، تناوب و خاک‌ورزی نسبت به شرایط محیطی اثر کمی روی بیماری داشته است. با کاهش خاک‌ورزی افزایش شدت بیماری لکه برگی گندم و نخود قابل ملاحظه نبود در حالی‌که بیمارگرهای ریشه گندم تحت تاثیر قرار گرفتند، درکم خاک‌ورزی، بیمارگرهای *Bipolaris sorokiniana* و *Gaeumannomyces graminis* کاهش یافته و فوزاریوم ریشه در گندم افزایش یافت(۶). وقوع و شدت بیماری بلایت فوزاریومی سنبله گندم کشت شده با استفاده از گاوآهن برگردان دار (کشت مرسوم) کمتر از کشت با گاوآهن قلمی (کم‌خاک‌ورزی) و یا بی‌خاک‌ورزی بود. اگر چه تفاوت هایی میان کم و بدون خاک‌ورزی آشکار نشد(۸).

مواد و روش‌ها

یک قطعه زمین مزرعه گندم به مساحت ۴۰۰ متر مربع جهت اجرای پروژه درمنطقه کردکوی با شرایط مختصات مکانی، آب وهوایی و تغذیه یکسان و بدون محلول پاشی قارچ‌کش انتخاب شد. این پژوهش در چهار تیمار مختلف خاک‌ورزی شامل بدون عملیات خاک‌ورزی[1]، کم خاک‌ورزی[2]، جوی و پشته[3] و مرسوم[4] در طرح آماری بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار اجرا شد. مساحت هر تیمار شامل ۳۳ متر مربع بود. برای بررسی بیماری‌های قارچی شایع در تیمارهای مختلف، به طور تصادفی۵ کادر یک متر مربعی انتخاب شد و در هر کادر بطور تصادفی۳۰ بوته گندم برای ارزیابی شدت بیماری انتخاب شد. با ظهور علائم بیماری‌های مختلف گندم در زمان‌های متفاوت یادداشت‌برداری از درصد وقوع و شدت این بیماری‌ها با استفاده از روش های استاندارد انجام شد. در مورد بیماری های برگی مانند سفیدک پودری و لکه خرمایی گندم یادداشت برداری به

[1] Notillage
[2] Minitillage
[3] Raisebed
[4] Conventional

روش ساری و پرسکات (۱۵) تغییر یافته توسط ایال و همکاران(۹) انجام شد. در مورد بلایت فوزاریومی سنبله گندم یادداشت برداری به روش ایرتا و همکاران(۱۲) انجام شد. داده های بدست آمده با استفاده از نرم افزار Statgraphics تجزیه آماری شده و میانگین ها با آزمون LSD مقایسه شد.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس داده های به دست آمده از درصد وقوع و شدت بیماری های سفیدک پودری، لکه خرمایی و بلایت فوزاریومی سنبله گندم نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف خاک‌ورزی از نظر درصد وقوع و شدت بیماری به ترتیب در سطح احتمال ۵٪ (P<۰/۰۵) و ۱٪ (P<۰/۰۱) وجود دارد (جدول ۱).

مقایسه میانگین داده‌های بدست آمده نیز نشان داد که از نظر درصد وقوع بیماری سفیدک پودری، تیمار کم خاک‌ورزی با ۹۸/۳۳ درصد بیشترین و تیمار جوی و پشته با ۸۵/۶۶ درصد کم‌ترین مقدار درصد وقوع بیماری را داشتند. از نظر مقدار شدت بیماری سفیدک پودری نیز تیمار کم خاک‌ورزی با ۶۷/۹۶ و تیمار جوی و پشته با ۴۸/۵۳ به ترتیب بیشترین و کمترین مقدار شدت بیماری را نشان دادند(جدول ۲). مقدار مایه تلقیح اولیه، تعداد پنجه‌ها(حجم سبزینه محصول) و فاصله بین ردیف‌های کاشت می‌تواند در میزان رطوبت و در نتیجه مقدار شدت بیماری موثر باشد. با وجود اینکه در تیمار جوی وپشته خاکورزی انجام شده اما به علت فاصله بین پشته‌ها هوادهی بیشتری صورت گرفته و رطوبت بین بوته‌ها کمتر بوده ودر نتیجه شدت بیماری نسبت به تیمار مرسوم کاهش یافته است.

مقایسه میانگین داده‌های بدست آمده از درصد وقوع بیماری و شدت بیماری لکه خرمایی نشان داد که تیمار بی‌خاک‌ورزی با ۹۱/۱۰ درصد بیشترین و تیمار جوی و پشته با ۴۷/۷۳ درصد کم‌ترین مقدار درصد وقوع بیماری را داشتند. همچنین تیمار بی‌خاک‌ورزی با ۵۶/۷۶ و تیمار جوی و پشته با ۲۴/۴۳ به ترتیب بیشترین و کمترین مقدار شدت بیماری را نشان دادند(جدول ۲).

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس درصد وقوع و شدت بیماری‌های گندم در تیمارهای مختلف خاک‌ورزی

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات					
		سفیدک پودری		لکه خرمایی		بلایت فوزاریومی سنبله	
		درصد وقوع	شدت	درصد وقوع	شدت	درصد وقوع	شدت
تکرار	۲	ns۱۵/۱۸	ns۷/۸۷	ns۱۲/۴۶	ns۲۱/۵۹	ns۸/۴۵	ns۳/۴۴
تیمار	۳	*۸۳/۵۵	**۲۰۷/۷۱	*۲۳۹/۲۱	**۴۶۲/۸۵	*۴۴/۴۲	**۱۱۷/۷۱
خطا	۶	۱۸/۹۷	۱۰/۱۹	۱۱/۲۲	۲۴/۲۸	۱/۱۹	۳/۲۶

* و ** و ns به ترتیب معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و معنی‌دار نبودن اختلاف بین تیمارها را نشان می‌دهد.

مقایسه میانگین داده‌های درصد وقوع و شدت بیماری بلایت فوزاریومی سنبله نشان داد که بیشترین و کمترین درصد وقوع بیماری به ترتیب در تیمارهای بی‌خاک‌ورزی با ۲۴/۸۳ درصد و جوی و پشته با ۱۵/۸۳ درصد مشاهده شد. بیشترین و کمترین مقدار شدت بیماری نیز به ترتیب در تیمارهای بی‌خاک‌ورزی با ۲۴/۵۲ درصد و جوی و پشته با ۱۱/۳۲ نشان داده شد(جدول ۲).

جدول ۲- مقایسه میانگین درصد وقوع و شدت بیماری‌های گندم در تیمارهای مختلف خاک‌ورزی

تیمار	سفیدک پودری		لکه خرمایی		بلایت فوزاریومی سنبله	
	درصد وقوع	شدت	درصد وقوع	شدت	درصد وقوع	شدت
بی خاک‌ورزی	۹۴/۶۶a	۵۹/۴۰b	۹۱/۱۰a	۵۶/۷۶a	۲۴/۸۳a	۲۴/۵۲a
کم خاک‌ورزی	۹۸/۳۳a	۶۷/۹۶a	۹۰/۶۶a	۴۸/۱۶a	۲۲/۱۲b	۲۳/۶۵a
جوی و پشته	۸۵/۶۶b	۴۸/۵۳c	۴۷/۷۳c	۲۴/۴۳c	۱۵/۸۳c	۱۱/۳۲c
مرسوم	۹۶/۳۳a	۶۳/۵۳ab	۷۷/۴۶b	۳۵/۵۳b	۲۱/۲۰b	۲۳/۱۵b

اعداد با حروف مشابه در هر ستون بر اساس آزمون LSD اختلاف آماری معنی‌داری ندارند ($P \leq 0.05$).

اثر کشت کم‌خاک‌ورزی و بی‌خاک‌ورزی، مرسوم و تناوب محصولات پهن برگ بر وقوع و شدت بیماری‌های قارچی گندم و نخود در ساسکاچوان از سال ۱۹۹۱ الی ۱۹۹۸ مورد بررسی قرارگرفت. با توجه به نتایج بدست آمده در این طرح، تناوب و خاک‌ورزی نسبت به شرایط محیطی اثر کمی روی بیماری داشته است. با کاهش خاک‌ورزی افزایش شدت بیماری لکه برگی گندم و نخود قابل ملاحظه نبود در حالی‌که بیمارگرهای ریشه گندم تحت تاثیر قرار گرفتند، درکم خاک‌ورزی، بیمارگرهای *Bipolaris sorokiniana* و *Gaeumannomyces graminis* کاهش یافته و فوزاریوم ریشه در گندم افزایش یافت(۶). وقوع و شدت بیماری بلایت فوزاریومی سنبله گندم کشت شده با استفاده از گاوآهن برگردان دار(کشت مرسوم) کمتر از کشت با گاوآهن قلمی (کم‌خاک‌ورزی) و یا بی‌خاک‌ورزی بود. اگر چه تفاوت هایی میان کم‌خاک‌ورزی و بدون خاک‌ورزی آشکار نشد(۸).

یک مطالعه میدانی در منطقه نیمه خشک از دشت‌های غربی کانادا به منظور تعیین اثرات آیش تابستانه و عملیات شخم در بیماری‌های لکه برگی گندم بهاره انجام شد که شایع‌ترین آن‌ها لکه خرمایی بود. شدت بیماری مشابه در کم خاک‌ورزی و بدون خاک‌ورزی حفاظتی نشان می‌دهد که در سیستم بی‌خاک‌ورزی، محیط زیست برای توسعه بیماری مطلوب‌تر است و ممکن است مقدار مایه تلقیح اولیه را افزایش دهد (۱۱).

در سالهای کم بارش و خشک استفاده از بی‌خاک‌ورزی، باعث حفاظت از آب و خاک شده در حالی‌که شدت بیماری زیاد نبود(۱۳). در آرژانتین سطح بی‌خاک‌ورزی به جهت جلوگیری از فرسایش خاک افزایش یافته است. طرح آزمایشی در کرت‌های کوچک با عدم خاک‌ورزی حفاظتی و مرسوم صورت گرفت(۱۳). سوختگی فوزاریومی سنبله در تمام سه سال مشاهده شد. نتایج بدست آمده حاکی از آن است که شرایط آب‌وهوایی مطلوب برای توسعه بیماری احتمالا مهم‌تر از عملیات خاک‌ورزی و کود درمانی باشد(۱۴).

نتایج به‌دست آمده نشان داد که در تیمار جوی و پشته، درصد وقوع و شدت بیماری‌های سفیدک پودری، لکه خرمایی و بلایت فوزاریومی سنبله کمترین مقدار را داشت و مناسب‌ترین تیمار از نظر کاهش بیماری‌ها بود، در حالی‌که تیمار بی‌خاک‌ورزی بیشترین مقدار وقوع و شدت بیماری‌های لکه خرمایی و بلایت فوزاریومی سنبله و تیمار کم‌خاک‌ورزی بیشترین مقدار وقوع و شدت بیماری سفیدک پودری را داشتند و در نتیجه این تیمارها باعث افزایش بیماری‌های فوق شدند.

منابع

۱- آقاجانی، م.ع. ۱۳۹۲. راهنمای شناسایی و مدیریت بیماری‌های گندم در استان گلستان. انتشارات نوروزی گرگان، ۱۲۴ ص.

۲- آقاجانی، م.ع.، دهقان، م.ع.، ربانی نسب،ح.، رضوی، م.، کیا، ش. و کاظمی، ه. ۱۳۹۴. دستورالعمل پایش، یاداشت برداری وارزیابی بیماریهای مهم گندم و جو در مزرعه و گلخانه. بخش تحقیقات زراعی و باغی، گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان، گرگان. بخش تحقیقات بیماری‌های گیاهان، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، تهران، ۲۷ص.

۳- اگریوس، ج.، ن. ۱۳۸۹. بیماری شناسی گیاهی. (ترجمه: ایزد پناه، ک.، اشکان، م.، بنی هاشمی، ض.، رحیمیان، ح و میناسیان، و.). تهران. آییژ. ۱۰۲۶ ص.

۴- بی نام. ۱۳۹۳. دستورالعمل فنی کشاورزی حفاظتی. وزارت جهاد کشاورزی، ۷۵ص.

۵- مومنی، ح.، رضوی، م.، کاظمی، ه. ورعیت پناه،س. ۱۳۹۴ مدیریت بیماری لکه خرمایی گندم. موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور. شماره فروست ۴۷۶۳۰. ۹ص.

6- Bailey, K. L., Gossen, B. D., Lafond, G. P., Watson, P. R., and Derksen, D. A. 2001. Effect of tillage and crop rotation on root and foliar diseases of wheat and pea in Saskatchewan from 1991 to 1998: Univariate and multivariate analyses. Can. J. Plant. Sci, 81: 789–803.

7- Culley ,J., Fraser, K. , Hubbard ,S., and Miller, J. D. 1998. Effect of tillage practice on fusarium head blight of wheat. Can. J. Plant Path, 20:1, 95-10

8- Dill-Macky, R., and Jones, R. K. 2000. The effect of previous crop residues and tillage on fusarium head blight of wheat. Plant Dis, 84:71-76.

9- Eyal, Z., Scharen, A. L., Prescott, J. M., and Ginkel, M. V. 1987. The Septoria disease of wheat: concepts and methods of disease management. CIMMYT, Mexico, D.F.

10- Fowler, D. B., Tompkins. D. K., and Wright. A. T. 1992. Foliar disease development in no-till winter wheat: Influence of agronomic practices on powdery mildew development. Can. J. Plant Sci, 72: 965,972.
11- Fernandez, M. R., McConkey B. G., and Zentner, R. P.1998. Tillage and summerfallow effects on leaf spot diseases of wheat in the semiarid Canadian Prairies. Semiarid Prairie Agricultural Research Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, P.O. Box 1030. Can. J. Plant Pathology, 20:376-379. 1998
12- Ireta, M. J., and Gilchrist, S. 1994. Fusarium head scab of wheat (*Fusarium graminearum* Schwabe). CIMMYT, Mexico, D.F.
13-Krupinsky, J.M., Halvorson, A.D., Tanaka, D. L., and Merrill, S.D. 2007. Nitrogen and Tillage Effects on Wheat Leaf Spot Diseases in the Northern Great Plains. Agron. J., 99:562–569.
14- Lori, G. A., Sisterna, M. N., Sarandon, S. J., Rizzo, I., and Chidichimo, H. 2009. Fusarium head blight in wheat: Impact of tillage and other agronomic practices under natural infection. Crop Prot, 28: 495–502
15- Saari, E. E., and Prescott, J. M. 1975. A scale for appraising the foliar intensity of wheat diseases. Plant Dis, 59:377-380.

ارزیابی تاثیر ضدقارچی عصاره اتانولی گیاه گزنه در شرایط آزمایشگاهی

شیده موجرلو*[۱]، مهسا نصرتی[۲]، محبوبه عبداللهی[۳]

۱- *استادیارگروه گیاه‌پزشکی و باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران*
۲- *دانش آموخته کارشناسی گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران*
۳- *کارشناس ارشد بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران*
* نویسنده مسئول: *Shideh.mojerlou@shahroodut.ac.ir*

چکیده

به دلیل اثر سوء ترکیبات شیمیایی، در سال‌های اخیر توجه زیادی به استفاده از ترکیبات بیولوژیک درکنترل بیماری‌های گیاهی شده‌است. اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی از جمله ترکیباتی هستند که بسیار مورد توجه قرار گرفتند. با توجه به این‌که گیاه گزنه به فراوانی در مراتع وجود دارد و دارای خواص دارویی زیادی است در این تحقیق به بررسی تاثیر عصاره اتانولی گیاه گزنه بر رشد میسلیومی دو بیمارگر مهم گیاهی در شرایط آزمایشگاهی پرداخته‌شد. رقت‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ درصد عصاره اتانولی به محیط کشت عصاره سیب زمینی- دکستروز- آگار اضافه شد و درصد بازدارندگی از رشد میسلیومی دو بیماگر *Macrophomina phaseolina* و *Fusarium graminearum* هفت روز پس از کشت مورد بررسی قرار گرفت. محیط کشت بدون عصاره به عنوان شاهد در نظر گرفته‌شد. تاثیر رقت‌های مختلف اتانول نیز به عنوان حلال بر دو بیمارگر بررسی شد. نتایج نشان داد، در قارچ *M. phaseolina* غلظت ۱۵ درصد و بالاتر و در قارچ *F. graminearum* غلظت ۲۵ درصد عصاره اتانولی باعث بازدارندگی کامل (۱۰۰ درصد) از رشد میسلیومی شد. با افزایش غلظت اتانول به تدریج میزان بازدارندگی از رشد در هر دو بیمارگر افزایش یافت. اما در هیچ‌یک از بیمارگرها اتانول موجب بازدارندگی کامل (۱۰۰ درصد) رشد میسلیومی نشد. نتایج این پژوهش اثرات مثبت کاربرد عصاره‌های گیاهی در کنترل آلودگی‌های قارچی را تایید می‌نماید.

واژگان کلیدی: عصاره گیاهی، اتانول، قارچ بیماری‌زای گیاهی، گزنه.

مقدمه

درسال‌های اخیر به دلیل بروز برخی مشکلات و تهدیدهای ناشی از مصرف سموم شیمیایی در سیستم‌های کشاورزی، گرایش زیادی به استفاده از پتانسیل بالقوه مواد بیولوژیکی در کنترل آفات، بیماریها و علفهای هرز از جمله ترکیب‌های گیاهی ایجاد شده‌است (۴، ۹، ۱۳). درسال‌های اخیر اثرات ضد باکتریایی، ضد قارچی و حشره‌کشی اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی بطور وسیعی مورد توجه محققین قرار گرفت (۱۳). تقریبا۲۰ درصد از گیاهان شناخته شده درجهان در آزمون‌های زیستی مورد بررسی قرار گرفته‌اند (۱۴).

گزنه *Urtica dioica* از خانواده Urticacea گیاهی پایا، دو پایه، علفی، سبز، ایستاده، دارای کرک‌های گزنده که ارتفاع آن به ۵۰ تا ۱۲۰ سانتیمتر می‌رسد. منشأ این گیاه اروپا و آسیا گزارش شده است (۷). گزنه در اکثر کشورها از مراتع برداشت می‌شود. از این‌رو تاکنون در رابطه با تولید آن تحقیقات کمی صورت گرفته‌است (۱). گیاه گزنه در درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله استوآرتریت، آرتریت، سنگ کلیه، آسم، فشار خون، نارسایی قلبی و اختلالات کلیه و ... مؤثر است (۸ و ۱۲). هادی و

همکاران در سال ۲۰۱۳، تاثیر ضد قارچی گیاه گزنه، بابونه آلمانی، دارچین و نعناع روی *Penicillium digitatum* را بررسی کردند. نتایج این محققین نشان داد که گیاهان ذکر شده به ترتیب در ۵۰، ۲۵، ۵۰۰ و ۱۰۰ قسمت در میلیون موجب حداکثر بازدارندگی از رشد قارچ *P. digitatum* در محیط کشت PDA می‌شوند (۱۰). هادیزاده و همکاران در سال ۲۰۰۹، تاثیر ضد میکروبی عصاره اتانولی گیاه گزنه، هندوانه ابوجهل، خرزهره و کنار را بر روی قارچ‌های بیماریزای گیاهی از جمله، *Alternaria alternata*، *Fusarium oxysporum*، *F. solani* و *Rhizoctonia solani* با استفاده از روش زیست سنجی رقت در آگار بررسی کردند. از میان عصاره‌های بررسی شده، گزنه و هندوانه ابوجهل بیشترین اثر را روی *A. alternata* و *R. solani* داشتند. خرزهره بیشترین بازدارندگی از رشد میسلیومی روی *F. oxysporum* و *F. solani* و عصاره کنار بیشترین کاهش رشد میسیلیومی را در قارچ *R. solani* نشان دادند (۱۱).

عبدالملکی و همکاران (۱۳۹۰الف) تأثیر عصاره‌های مختلف گیاه نعناع فلفلی بر روی چهار گونه قارچ بیماریزای گیاهی، شامل *Bipolaris sorokiniana*، *Phytophthora drechsleri* و *Fusarium oxysporum* را به دو روش دیسک کاغذ و اختلاط با محیط کشت مورد بررسی قرار دادند. نتایج این تحقیق نشان‌داد که آب بهترین حلال برای استخراج مواد بازدارنده بوده است و عصاره استخراج شده با حلال متانول و استون تأثیر کمی بر رشد میسلیومی داشتند و عصاره اتانولی و کلروفرمی به کلی فاقد اثر قارچ ایستایی بودند (۲). عبدالملکی و همکاران (۱۳۹۰ب) اثر ضدقارچی عصاره اندام‌های مختلف گیاهان بابونه، اکالیپتوس، فرفیون، مارچوبه و گلرنگ وحشی علیه چهار گونه بیماریزای گیاهی شامل، *R. solani*، *F. oxysporum*، *Phytophthora dershleri* و *Bipolaris sorkiniana* را بررسی کردند. عصاره‌گیری با استفاده از سه حلال- آب مقطر، متانول و اتانول- صورت گرفت و اثر بازدارندگی بر اساس روش دیسک کاغذی بررسی شد. نتایج نشان‌داد که عصاره‌های متانولی گلرنگ وحشی در مرحله بذردهی و برگ اکالیپتوس، بیشترین تأثیر بازدارنده بر رشد *B. sorkiniana* را نشان دادند. در گونه *P. Drechsleri* بیشترین تأثیر بازدارنده مربوط به عصارهٔ آبی اندام هوایی و ریشه گلرنگ وحشی در مرحله بذردهی و عصاره آبی گل بابونه بود. عصاره متانولی برگ اکالیپتوس و عصاره اتانولی گلرنگ در مرحلهٔ بذردهی نیز بیشترین تأثیر بازدارنده را بر رشد میسیلیومی *F. oxsysporum* نشان دادند. در مورد قارچ *R. solani* نیز بیشترین اثر مربوط به عصاره اتانولی گلرنگ وحشی بود (۳). در تحقیق حاضر اثر ضد قارچی عصاره اتانولی گیاه گزنه و اتانول بر روی رشد میسلیومی دو بیمارگر مهم گیاهی *Macrophomina phaseolina* و *Fusarium graminearum* در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش

ساقه‌ها وسرشاخه‌های گیاه گزنه در شهریور ۱۳۹۵ از منطقه کیاسر استان مازندران، جمع آوری و به آزمایشگاه منتقل گردید. پس از تشخیص و تایید نمونه‌ها در آزمایشگاه گیاه شناسی، نمونه‌ها با آب روان شسته و در سایه خشک و سپس آسیاب شدند. به منظور تهیه عصاره اتانولی مقدار پنج گرم ازبافت آسیاب شده در۱۰۰ میلی لیتر اتانول به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد روی شیکر قرارداده شد. پس از این مدت به ۷۵ میلی لیتر از محلول فوق ۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه شد و حجم آن به ۱۰۰میلی‌لیتر رسانده شد، سپس این محلول به مدت دو ساعت روی شیکر قرار داده شد. پس از آن محلول جهت تبخیر اتانول و استحصال عصاره در زیر هود قرارگرفت (۵ و ۶). عصاره اتانولی باقی مانده، فیلتر شد و رقت-های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ درصد به محیط کشت عصاره سیب زمینی- دکستروز- آگار (PDA) اتوکلاو شده پس از اینکه دمای آن به ۴۳ تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد رسید، اضافه شد. سپس محیط‌های حاصل بلافاصله به پتری‌های استریل منتقل شدند. به منظور بررسی تاثیر اتانول به تنهایی بر روی بیمارگرهای گیاهی از رقت‌های ذکر شده از اتانول نیز مانند روش گفته شده برای عصاره اتانولی به محیط کشت اضافه شدند.

دو بیمارگر قارچی گیاهی *Macrophomina phaseolina* و *Fusarim graminearum* ازآزمایشگاه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود تهیه شد. از کشت شش روزه قارچ قرص‌هایی به قطر پنج میلی‌متر جدا نموده و بر روی محیط کشت‌های حاوی عصاره گیاهی، اتانول و پتری PDA خالص به عنوان شاهد قرار داده‌شد و به مدت یک هفته دردمای

۲± ۲۵ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور نگهداری شد. رشد شعاعی قارچ‌ها به فاصله هر دو روز ثبت شد و درصد بازدارندگی رشدی هریک از غلظت‌های عصاره با شاهد بدست آمد. برای هر رقت عصاره و اتانول در هر بیمارگر سه تکرار در نظر گرفته‌شد و آزمایش دو بار تکرار شد. داده‌ها با استفاده ازنرم افزار Statistix مورد تجزیه وتحلیل قرارگرفت و مقایسه میانگین به روش LSD انجام شد.

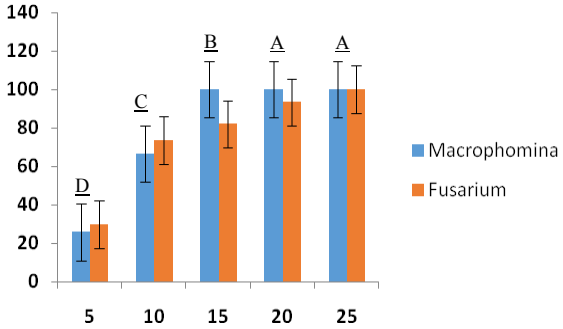
نتایج و بحث

نتایج تجزیه و تحلیل داده‌های عصاره اتانولی نشان‌داد تیمارهای مختلف عصاره اتانولی و اثر متقابل تیمارها- قارچ‌ها در سطح یک درصد ($P\leq0.01$) با هم اختلاف معنی‌دار داشتند، همچنین دو قارچ مختلف در سطح پنج درصد با هم اختلاف معنی‌دار داشتند ($P\leq0.05$). با افزایش غلظت عصاره اتانولی در محیط کشت، درصد بازدارندگی از رشد میسلیومی در هر دو بیمارگر افزایش یافت. در قارچ *M. phaseolina* غلظت ۱۵ درصد و بالاتر و در قارچ *F. graminearum* غلظت ۲۵ درصد عصاره اتانولی باعث بازدارندگی کامل (۱۰۰ درصد) از رشد میسلیومی شد (شکل ۱). تاثیر عصاره اتانولی گزنه بر بازدارندگی از رشد قارچ فوزاریوم در غلظت‌های ۵ و ۱۰ درصد بیشتر از قارچ ماکروفومینا بود اما در غلظت‌های ۱۵ و ۲۰ درصد تاثیر بازدارندگی در قارچ ماکروفومینا بیشتر بود. روند بازدارندگی از رشد در دو قارچ مورد بررسی، با هم تفاوت داشت (شکل ۱) که با توجه به متفاوت بودن دو قارچ، این تفاوت قابل انتظار بود.

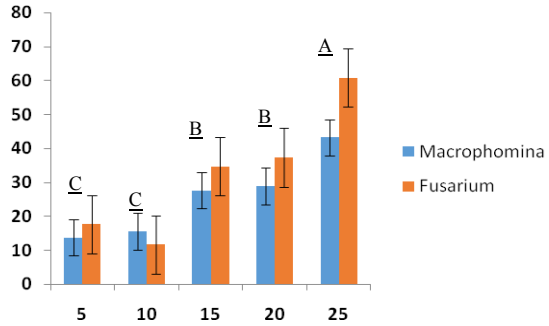
نتایج تجزیه و تحلیل داده‌های تیمار اتانول نشان داد غلظت‌های مختلف اتانول و دو قارچ مختلف در سطح یک درصد ($P\leq0.01$) با هم اختلاف معنی‌دار داشتند. اثر متقابل تیمار × قارچ با هم اختلاف معنی دار نداشتند. بررسی اثر اتانول به عنوان حلال در بازدارندگی از رشد میسلیومی نشان داد که با افزایش غلظت اتانول به تدریج میزان بازدارندگی از رشد در هر دو بیمارگر افزایش یافت. تاثیر اتانول در بازدارندگی از رشد قارچ *F. graminearum* بیشتر از *M. phaseolina* بود. اما در هیچ‌یک از بیمارگرها اتانول موجب بازدارندگی کامل (۱۰۰ درصد) رشد میسلیومی نشد و حداکثر بازدارندگی از رشد (۶۰ درصد) در قارچ فوزاریوم شش روز پس از کشت مشاهده شد (شکل ۲). میزان رشد میسیلیومی و بازدارندگی از رشد در تیمارهای عصاره اتانولی و اتانول در مقایسه با پتری شاهد هفت روز پس از کشت (پر شدن پتری شاهد) در شکل ۳ نشان داده شده است.

به منظور بررسی اثر قارچ‌کشی یا قارچ ایستایی عصاره اتانولی بر قارچ‌های مورد بررسی، قرص‌های آگار مربوط به تیمارهای رشد نیافته به محیط کشت PDA فاقد عصاره اتانولی منتقل شد. نتایج نشان داد قرص‌های آگار قارچ *M. phaseolina* پس از انتقال از محیط‌های حاوی ۱۵، ۲۰ و ۲۵ درصد عصاره اتانولی گیاه گزنه به محیط PDA، همگی قادر به رشد مجدد بودند. بنابراین می توان گفت غلظت‌های ذکر شده از عصاره اتانولی گیاه گزنه تاثیر قارچ ایستایی بر قارچ *M. phaseolina* داشتند. در مورد بیماگر *F. graminearum* قرص آگار انتقال یافته از محیط کشت حاوی ۲۰ درصد عصاره اتانولی قادر به رشد مجدد بود ولی در غلظت ۲۵ درصد عصاره اتانولی قرص آگار پس از انتقال به محیط PDA نتوانست رشد کند. بنابراین غلظت ۲۰ درصد عصاره اتانولی در مورد این بیمارگر خاصیت قارچ ایستایی و غلظت ۲۵ درصد عصاره اتانولی خاصیت قارچ‌کشی داشت. این آزمایش دو بار تکرار شد و نتایج مشابهی بدست آمد.

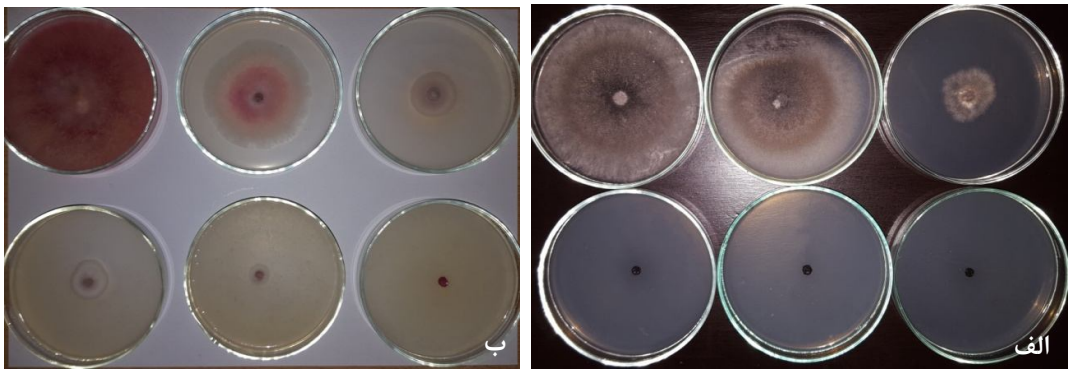
با توجه به اثرات سوء شیمیایی بر محیط زیست و سلامتی انسان و همچنین هزینه سنگین تهیه ارقام مقاوم و سموم شیمیایی و همچنین ایجاد مقاومت در عوامل بیماریزا نسبت به سموم شیمیایی، استفاده از مواد با منشاء طبیعی مثل عصاره-های طبیعی گیاهی در بیماری‌های گیاهی مناسب‌تر است. نتایج این پژوهش اثرات مثبت کاربرد عصاره الکلی گیاه گزنه در کنترل آلودگی‌های قارچی را تایید می‌نماید. این نتایج با یافته های سایر محققین (۱۰ و ۱۱) در مورد تاثیر عصاره الکلی گیاه گزنه روی قارچ‌های بیماریزای گیاهی مطابقت داشته‌است.



شکل۱- مقایسه تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی گیاه
و *Fusarium graminearum*گزنه بر دو قارچ
هفت روز پس از کشت*Macrophomina phaseolina*



شکل۲- مقایسه تاثیر غلظت‌های مختلف اتانول بر دو قارچ
Macrophomina phaseolina و *Fusarium graminearum*
شش روز پس از کشت



شکل ۳- بررسی بازدارندگی از رشد میسلیومی عصاره اتانولی گیاه گزنه بر قارچ *Macrophomina phaseolina* (الف) و *Fusarium graminearum* (ب) هفت روز پس از کشت. در هر دو شکل ردیف بالا به ترتیب از چپ غلظت‌های صفر، پنج و ده درصد عصاره اتانولی و ردیف پایین از سمت چپ به ترتیب غلظت‌های ۱۵، ۲۰ و ۲۵ درصد عصاره اتانولی می‌باشد.

منابع

۱- امید بیگی، ر. ۱۳۸۹. تولید و فرآوری گیاهان دارویی. انتشارات آستان قدس رضوی. جلد چهارم. ۴۲۳ ص.

۲- عبدالملکی، م .، بهرامی نژاد، ص.، سالاری، م.، عباسی، س.، پنجه‌که، ن. ۱۳۹۰الف. بررسی اثر ضد قارچی گیاه نعناع (*Mentha piperita* L.) برقارچ‌های بیماریزای گیاهی. فصلنامه گیاهان دارویی ۳۸: ۲۶-۳۴.

۳- عبدالملکی م، بهرامی نژاد ص.، عباسی س. ۱۳۹۰ب. بررسی اثرات ضد قارچی عصاره های برخی گیاهان علیه چهار قارچ بیماریزای گیاهی. فصلنامه گیاهان دارویی ۳۸: ۱۴۸-۱۵۵.

4-Alam, M. H., Murat, E., Siegfrie, N. and Hubert, K. 2007 Chemical composition and content of essential oil from the bud cultivated Turkish clove (*Syzygium aromaticum* L.). BioResources 2 (2): 265 - 69.

5-Bahraminejad, S., Asenntorfer, R. E., Riley, I. T., Zwer, P., Schultz, C. J. and Schmidt, O. 2008a. Genetic variation of flavonoid defense compound concentration in oat (*Avena sativa* L.) entries and testing of their biological activity. Proceedings of Australian Plant Breeding Conference, Christchurch, New Zealand, pp: 1127 - 32.

6-Bahraminejad, S., Asenstorfer, R. E., Riley, I. T. and Schultz, C. J. 2008b. Analysis of the antimicrobial activity of flavonoids and saponins isolated from the shoots oats (*Avena sativa* L.). Journal of Phytopathology 156: 1 - 7.

7-Bernath, J. 1993.Wild and Culivated Plants. (In Hangarian) Mezo, Pubi Budapest. Pp. 566.

8-Blumenthal, M. 2000. Herbal Medicine: Expanded Commission E Monographs. 1st ed. American Botanical council. Pp: 367 – 375 .

9-Edris, A. E. and Farrag E. S. 2003. Antifungal activity of peppermint and sweet basil essential oils and their major aroma constituents on some plant pathogenic fungi from the vapor phase. Nahrung/ Food 47: 117 - 21.

10-Hadi, M., Arab Sorkhi, M. R., Kashefi, B., Sobhanipur, A. and Shamsi, M. H. 2013. Investigation Antifungal Activity of Some Medicinal Plant Extracts on Growth and Spore Germination of *Penicilium digitatum* Sacc. *In vitro*. Middle-East Journal of Scientific Research 17 (12): 1701-1708.

11-Hadizadeh, I., Peivastegan, B. and Kolahi, M. 2009. Antifungal activity of Nettle (*Urtica dioica* L.), Colocynth (*Citrullus colocynthis* L. Schrad), Oleander (*Nerium oleander L.)* and Konar *(Ziziphus spina-christi L.)* extracts on plant pathogenic fungi. Pakistan Journal of Biological Sciences 12(1): 58-63.

12-Kelly, W. J. 2001. Nursing Herbal Medicine Handbook. Springhouse Corporation. Springhouse. Pp :309-310.

13-Muyima, N. Y. O., Nziweni, S. and Mabinya L. V. 2004 Antimicrobial and antioxidant activities of *Tagetes mimuta Lippia javanica* and *Foeniculum vulgar* essential oils from eastern cape province of south Africa. Journal of Essential Oil Breeding Plants 7: 68 - 78.

14-Sufferdini, J. B., Sader, H. S., Goncalves, A. G., Reis, A. O., Gales, A. C., Varella, A. D. and Younes, R. N. 2004 Screening of antimicrobial extracts from plants native to the Brazilian Amazon rainforest and Atlantic forest. Brazilian Journal of Medical Research 37: 379 - 84.

مقایسه دو روش استخراج RNA در شناسایی ویروس پژمردگی لکه ای گوجه فرنگی

سیده عاطفه حسینی
۱- استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند
** نویسنده مسئول ahosseini@birjand.ac.ir*

چکیده

ویروس پژمردگی لکه ای گوجه فرنگی در جنس توسپوویروس و خانواده بونیاویریده، جزو ده ویروس با اهمیت و خسارتزای دنیا است. ویروس مذکور دارای ژنوم RNA تک‌رشته منفی است که جهت شناسایی آن از روش‌های مولکولی و آزمون RT-PCR با آغازگر اختصاصی استفاده می‌گردد. بدین‌منظور در مرحله اول نیاز به استخراج RNA می‌باشد. با توجه به اهمیت استخراج RNA با غلظت بالا و خالص در بررسی‌های مولکولی، تحقیق حاضر به مقایسه دو روش تریازول و CTAB تغییریافته در ۲۰ نمونه گوجه‌فرنگی مشکوک به آلودگی با ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی پرداخته‌است. بدین‌منظور دو روش مذکور، بر اساس دستورالعمل‌های موجود در منابع انجام شد و غلظت RNA کل حاصل با دستگاه نانودراپ سنجیده شد. نتایج موید این مطلب بود که غلظت RNA با روش تریازول حداقل ۰/۰۰۱ و حداکثر ۰/۰۲۳ نانوگرم در میلی لیتر و در روش CTAB تغییریافته حداقل ۰/۲۳۴ و حداکثر ۰/۸۹۷ نانوگرم در میلی‌لیتر بر آورد شد. بنا براین روش CTAB تغییریافته، قابلیت استخراج RNA با غلظت بسیار بالاتری نسبت به روش تریازول از بافت‌برگی گوجه‌فرنگی دارد.

واژگان کلیدی: استخراج RNA، ویروس پژمردگی لکه ای گوجه فرنگی، PCR

مقدمه

ویروس پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی (*Tomato spotted wilt virus*) در جنس توسپوویروس و در خانواده بونیاویریده قرار دارد (8) ویروس مذکور اولین بار در سال ۱۹۱۹ از استرالیا روی گوجه فرنگی توسط بریتل بلنک گزارش شد (آدکین ۲۰۰۵) ویروسی بودن بیماری درسال۱۹۳۰ توسط ساموئل و همکاران به اثبات رسید و مشخص شد که ویروس مذکور توسط تریپس منتقل می شود (4). ویروس TSWV به دلیل دامنه میزبانی بالایی که دارد گسترش جهانی داشته خسارت آن در سرتاسر اروپا و آمریکا گزارش شده و جزو ۱۰ ویروس پر اهمیت دنیا می‌باشد (۵) اولین گزارش علمی در مورد وجود این ویروس درایران توسط بنانج وهمکاران در سال ۱۳۷۵روی گوجه‌فرنگی ارائه گردید. شوشتری و همکاران نیز در سال ۱۳۹۱ ویروس مذکور را از استان خراسان‌رضوی ردیابی کردند. این ویروس باعث ایجاد بیماری در بیش از ۸۰۰ گونه ی گیاهی در۷۰ خانواده ازگیاهان تک‌لپه و دولپه می‌شود (۱۱). میزبان‌های مهم زراعی شامل سیب‌زمینی، گوجه‌فرنگی، فلفل‌دلمه‌ای، توتون و بسیاری گیاهان زینتی از جمله بگونیا، داوودی، سیکلامن، گل‌حنا، کوکب و بسیاری ازعلف‌های هرز هستند. علائم در برگ‌ها شامل برنزه شدن، رشد یک طرفه، پیچیدگی، تغییر شکل برگ ها و ایجاد لکه‌های قهوه‌ای مایل به سیاه است. ویروس TSWV در طبیعت بوسیله تریپس‌ها به روش گردشی –تکثیری و بیشتر با دو گونه *Frankliniella occidentalis* و *Thrips tabaci* منتقل می‌شوند (۸) که مهمترین ناقل TSWVدر طبیعت هستند. مطالعات نشان می‌دهد که TSWV بوسیله بذر قابل انتقال نیست (۵). ویروس مذکور دارای ژنوم ssRNA منفی است که در سه بخش LRNA، MRNA و SRNA تقسیم‌شده‌است (10). به دست آوردن RNA خالص و با غلظت بالا برای مراحل شناسایی و بررسی مولکولی ویروس ها

ضروری است. در روش های استخراج RNA مراحل از هم پاشیدن بافت گیاهی، از هم جداسازی نوکلئوپروتئین و حذف پروتئین‌ها و نهایتا رسوب RNA انجام می گیرد. همچنین حذف DNA ضروری است. معمولا روش استخراج RNA به دلیل حساسیت بالای RNA نسبت به آنزیم‌های ریبونوکلئاز داخلی و خارجی بسیار مشکل و انتخاب روش مناسب بر روی دقت آزمون ردیابی ویروس بسیار اثرگذار است (9,10). با توجه به این که ویروس دارای ژنوم ssRNA منفی است، استخراج RNA آن با غلظت مناسب به منظور حصول بهترین نتیجه در واکنش RT-PCR با آغازگرهای اختصاصی ضروری می‌باشد. تحقیق حاضر به مقایسه دو روش استخراج با تریازول و CTAB تغییر یافته در شرایط آزمایش می‌پردازد.

مواد و روش ها

۱- نمونه برداری

در این مرحله از تعداد ۲۰ گیاه گوجه فرنگی مزارع شهرستان درمیان استان خراسان‌جنوبی که دارای علائم موزاییک، رشد یک طرفه، پیچیدگی، تغییرشکل برگ ها و کوتولگی بودند، نمونه برداری صورت گرفت و در شرایط خنک به آزمایشگاه منتقل گردید.

۲- استخراج RNA با تریازول

مقدار ۱۰۰ میلی گرم از بافت گیاهی دارای علائم در محلول(Triazol (Invitrogen, USA و با هاون چینی استریل هموژنیزه گردید، سپس ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید که سبب از هم پاشیدگی ساختار نوکلئو پروتئین شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر کلروفورم اضافه و به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس شد و ۳ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. نمونه ها ۱۵ دقیقه با حداکثر دور سانتریفوژ گردید. فاز رویی شفاف به تیوب جدید منتقل گردید و ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول به آن اضافه شد. سپس در دمای اتاق ۱۰ دقیقه انکوبه و سپس ۱۰ دقیقه سانتریفوز شد. رسوب RNA با اتانول ۷۰٪ شسته شد و سپس ۱۰ دقیقه روی دستمال کاغذی به حالت وارونه قرار گرفت تا الکل خشک شود و نهایتا در ۲۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل گردید (7).

۳- استخراج RNA با روش CTAB تغییر یافته

مقدار ۱۰۰ میلی گرم از بافت گیاهی با نیتروژن مایع در هاون استریل پودر گردید. سپس یک میلی لیتر از بافر Grinding (شامل 2 % CTAB، 100 mM Tris-HCl, pH 8، 100 mM Tris-HCl, pH 8، 1.4 M NaCl، 1.0 % Na sulphite، 2.0 % PVP-40) به آن اضافه شد. ۷۰۰ میکرولیتر از آن به تیوب جدید منتقل و در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه اینکوبه گردید. سپس ۷۰۰ میکرولیتر کلروفورم اضافه و مخلوط گردید و در حداکثر سرعت به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. فاز شفاف رویی به تیوب جدید منتقل و هم حجم آن کلروفورم اضافه و به خوبی مخلوط شد. لایه شفاف رویی حذف و به همان اندازه کلرید لیتیم ۴ مولار اضافه گردید و در دمای ۴ درجه سانتیگراد یک شب در یخچال نگهداری شد. روز بعد ۳۰ دقیقه در حداکثر سرعت سانتریفوژ شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از بافر TE اضافه و رسوب در آن حل شد. سپس۱۰۰ میکرولیتر از NaCl ۵ مولار و ۳۰۰ میکرولیتر از ایزوپروپانول اضافه شد و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه قرار گرفت و ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. رسوب حاصل با افزودن ۵۰۰ میکرولیتر اتانول شسته شد و به مدت ۱۰ دقیقه روی دستمال کاغذی به حالت وارونه خشک گردید. رسوب RNA در ۲۰ میکرولیتر آب حل شد (6).

۴- اندازه گیری غلظت RNA

به منظور اندازه گیری غلظت RNA های استخراج شده از دستگاه نانودراپ استفاده گردید.

۵- RT-PCR

به منظور ردیابی و شناسایی این ویروس، با استفاده از واکنش نسخه برداری معکوس و زنجیره ای پلیمراز (reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR) و آغازگرهای اختصاصی ژن N انجام شد. در واکنش نسخه برداری معکوس آنزیم شرکت پارس توس استفاده و سپس واکنش مرحله PCR با پرایمرهای اختصاصی و سایر مواد این واکنش برای دریافت بهترین باند صورت گرفت.

نتایج و بحث

نتایج ۲۰ نمونه گوجه فرنگی که به منظور ردیابی ویروس پژمردگی لکه ای گوجه فرنگی در آزمون RT-PCR، RNA آن با دو روش استخراج گردید، در جدول شماره یک آمده‌است.

جدول ۱- مقایسه نتایج بدست آمده از دستگاه نانودراپ در دو روش استخراج RNA در نمونه‌های گوجه‌فرنگی مشکوک به آلودگی با TSWV

شماره نمونه	روش تریازول (نانوگرم بر میکرولیتر)	روش CTAB تغییر یافته (نانوگرم بر میکرولیتر)
۱	۰/۰۰۳	۰/۴۵۳
۲	۰/۰۲۳	۰/۷۸۵
۳	۰/۰۰۴	۰/۳۴۲
۴	۰/۰۰۶	۰/۴۲۵
۵	۰/۰۰۱۲	۰/۸۹۷
۶	۰/۰۰۱	۰/۴۹۶
۷	۰/۰۰۳	۰/۶۳۲
۸	۰/۰۳۶	۰/۷۶۷
۹	۰/۰۰۲	۰/۲۳۴
۱۰	۰/۰۰۵	۰/۲۹۸
۱۱	۰/۰۱۱	۰/۳۷۵
۱۲	۰/۰۰۴	۰/۸۷۸
۱۳	۰/۰۰۱	۰/۹۹۲
۱۴	۰/۰۰۴	۰/۹۶۸
۱۵	۰/۰۰۶	۰/۸۴۵
۱۶	۰/۰۰۳	۰/۴۵۹
۱۷	۰/۰۰۵	۰/۵۵۳
۱۸	۰/۰۱۶	۰/۲۴۴
۱۹	۰/۰۰۲	۰/۸۷۶
۲۰	۰/۰۱۱	۰/۶۶۲

مقایسه غلظت RNA در دو روش تریازول و CTAB تغییریافته در جدول شماره یک بیان شده‌است. غلظت RNA با روش تریازول حداقل ۰/۰۰۱ و حداکثر ۰/۰۲۳ نانوگرم در میلی‌لیتر بر آورد گردید، در حالیکه در روش CTAB تغییریافته حداقل ۰/۲۳۴ و حداکثر ۰/۸۹۷ نانوگرم در میلی لیتر بر آوردشد. بنابر نتایج حاصل، روش CTAB تغییریافته قابلیت استخراج RNA بیشتری از بافت گوجه‌فرنگی نسبت به روش تریازول دارد. دلایل آن احتمالا استفاده از ماده کلرید لیتیم است که نقش رسوب دهنده قوی‌تری برای RNA دارد و همچنین کاربرد چندین مرحله شستشو در این روش، امکان حذف مواد گیاهی و استخراج حداکثری RNA را فراهم می‌سازد (9)

RT-PCR

با این روش باند مورد نظر با پرایمر اختصاصی برای این ویروس به طول ۷۸۰ جفت باز تکثیر شد. در این مرحله از RNA استخراج شده با روش CTAB استفاده گردید و باند موردنظر تکثیر شد.

منابع

۱- بنانج، ک.، آهومنش، ع.، شهرآئین، ن.. ۱۳۷۵ . جداسازی و تعیین خصوصیات ویروس پژمردگی گوجه فرنگی از مزارع ورامین .مجله بیماری های گیاهی جلد۳۲، شماره های (۱-۲) صفحات، ۴۲تا.۴۵

۲-شوشتری، س.، جعفرپور، ب.، فلاحتی رستگار، م.، ۱۳۹۱. بررسی سرولوژیکی و مولکولی ویروس پژمردگی لکه ای گوجه فرنگی در استان خراسان رضوی. حفاظت گیاهان ۲۶ (۴) صفحات ۳۴۸-۳۵۴

3-Adkins, S., Zitter, T. and Momol, T. 2005 . Tospoviruses (family Bunyaviridae , Genus Tospovirus). Institute of food and agriculture sciences university of florida . www.edis.ifas.ufl.edu/pp134.

4-Angle, J.S., Bridges, C.D. and Cherry, J. 2005 . Tospoviruses in solanaceae and others crops in the coastal plain of Georgia. The university of Georgia collage of agricultral and environmental sciences report number 704 . ISSN 0072-128 .40. 6

5-Broughton, S. and Spafford, H. 2007. Lettuce leaf national vegetable industry center newsletter . Department of agriculture and food. www.agric.nsw.gov.au

6-Chang A. Modified CTAB RNA extraction method. 1993. Plant Molecular Biology reporter. 11: 113-116

7-Zindovic,1 J., Ciuffo, M. and Turina, M. Molecular Characterization of Tomato spotted wilt virus in Montenegro. Journal of Plant Pathology 96 (1), 201-205

8-Kim, J.H., Choi, G.S., Kim, J.S. and Choi, J.K. 2004 . Charactrrization of Tomato Spotted Wilt Virus from Paprika in Korea . Journal of Plant Pathology 20: 297-301

9-Syrzyeki, S. 2000. Basic techniques in molecular biology. Springer Berlin Heidelberg. Pp120-122

10-Ramesh, S.V., Pappu, R. 2016.Sequence characterization, molecular phylogeny reconstruction and recombination analysis of the large RNA of Tomato spotted wilt virus (Tospovirus: Bunyaviridae) from the United States. .BMC Res Notes 9:200

11-Nascimento, L.C., Pensuk, V., Costa, N.P., Deom, C.M. and Sherwood, J. 2006 . Evalution of peanut genotypes for resistance to *Tomato Spotted Wilt Virus* by mechanical and thrips inoculation . Pesq. Agropec . bras , Brasilia 41 : 937-942

لکه برگی پامچال در استان گلستان

سمیرا شاملی[۱،*] و محمد علی آقاجانی[۲]

[۱]محقق بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات وآموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان،گرگان،

[۲]عضو هیات علمی بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان، گرگان

* نویسنده مسئول: Shameli61@gmail.com

چکیده

بیماری لکه برگی آلترناریایی یکی از بیماری‌های رایج گیاهان زینتی می‌باشد. در بازدیدهای انجام شده از گلخانه های شهرستان گرگان طی سال‌های اخیر، علایم نوعی بیماری لکه برگی درگیاه پامچال مشاهده گردید. علایم ابتدا بر روی برگ‌های پامچال و به صورت ایجاد لکه‌های کوچک زرد تا قهوه‌ای رنگ با هاله زرد رنگ مشاهده می‌شد. با پیشرفت بیماری لکه‌ها به هم متصل شده و سبب مرگ و ریزش برگ می‌شدند. به منظور شناسایی عامل‌بیماری، تعدادی ازنمونه‌های آلوده به آزمایشگاه منتقل و پس ازضدعفونی سطحی با هیپوکلریت‌سدیم در محیط کشت سیب زمینی دکستروزآگار(PDA) کشت شد. پس از یک هفته نگهداری تشتک‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد،پرگنه تیره رنگ قارچ به صورت منظم رشدکرد. بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی کنیدی و کنیدیوفورها ، بیمارگر به عنوان *Alternaria alternata* شناسایی شد که یک گونه قارچی با میزبان‌های متعدد می‌باشد. قرص‌های از کشت جدایه‌های خالص شده قارچ جهت آزمون بیماری‌زایی بر روی برگ‌های پامچال مایه‌زنی شد. علایم بیماری پس از ۱۲ روز در محل مایه‌زنی مشاهده شد و قارچ مورد نظر از لکه‌های جدید جداسازی گردید. این بیماری قبلاً از کشورهای آمریکا، لهستان و هند گزارش شده است و این نخستین گزارش از وجود این قارچ بر روی پامچال در استان گلستان می‌باشد.

واژگان کلیدی: آلترناریا، استان گلستان، پامچال ، لکه برگی

مقدمه

گیاه پامچال با نام علمی*Primula vulgaris*گیاهی زینتی وپوششی از خانواده Primulaceae می باشد. منشا آن اروپای مرکزی وآسیا است و بومی مناطق سرد و مرطوب یا معتدل شمالی است. غالباً یک ساله و علفی با ریشه ضخیم بوده، بعضی گونه ها دارای ساقه و بعضی بدون ساقه‌اند. برگ‌های آن کرک‌دار پرچین و بیضی شکل، گلها افتاده و به رنگ های مختلف است. ریشه، برگ و گل‌های پامچال خاصیت دارویی دارند و برای درمان برخی بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد (۳). تا کنون نزدیک به۳۰ عامل بیمارگر از نقاط مختلف دنیا، روی پامچال گزارش شده که هریک از این عوامل در شرایط خاص می تواند به گیاه خسارت وارد آورند (۲). از مهم‌ترین قارچ‌های بیماریزایی که در دنیا از پامچال گزارش شده است می‌توان به قارچ های‌عامل‌سفیدک‌پودری (*Erysiphe polygoni*)، زنگ (*Puccinia aristidae*)، پوسیدگی‌های‌فایتوفترایی‌وپی‌تیومی ریشه (*Phytophthora cactorum*، *Pythium irregulare*) و پوسیدگی رایزوکتونیایی طوقه و ریشه (*Rhizoctonia solani*) اشاره کرد(۲).

در بازدیدهای انجام شده از گلخانه‌های شهرستان گرگان طی سال‌های اخیر، لکه های تیره‌رنگی در برگ‌های این گیاه مشاهده گردید.علایم ابتدا به صورت لکه‌های‌کوچک زردرنگ بر روی برگ‌های پایینی بوته‌ها بود. لکه‌های بالغ به تدریج فرورفته و قهوه‌ای رنگ شده و گاهی اوقات هاله زردرنگی در اطراف لکه‌ها مشاهده می‌شد. در صورت پیشرفت بیماری لکه‌ها به هم متصل می‌شدند و لکه‌های بزرگتری به‌وجود می‌آوردند که سبب ایجاد حالت نکروز برگی و سرانجام ریزش برگ می‌شدند (شکل۱). این پژوهش با هدف شناسایی و بررسی عامل بیماری لکه برگی در پامچال انجام گردید.

شکل ۱- علایم بیماری روی برگ پامچال

مواد و روش‌ها

به منظور شناسایی عامل بیماری، تعدادی از نمونه‌های آلوده به آزمایشگاه منتقل و پس ازضدعفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم در محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار (PDA) کشت شد. پس از یک هفته نگهداری تشتک‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، پرگنه تیره رنگ قارچ به صورت منظم رشد کرد. شناسایی قارچ عامل بیماری بر اساس ویژگی های ریخت شناسی و با استفاده از کلیدهای معتبر قارچ شناسی انجام شد (۱و۷). جهت آزمون بیماری‌زایی قرص‌های ۸ میلی متری از کشت جدایه‌های خالص شده قارچ، بر روی برگ‌های پامچال مایه‌زنی شد. علایم بیماری پس از۱۲ روز در محل مایه-زنی مشاهده شد و قارچ عامل بیماری مجدداً از بافت های مایه زنی شده جداسازی گردید.

نتایج و بحث

قارچ آلترناریا یکی از بیمارگرهای مهم گیاهی می‌باشد که دارای گسترش جهانی است و سبب ایجاد لکه برگی در بسیاری از گیاهان می‌شود(۱).در بازدیدهای انجام شده از گلخانه‌های شهرستان گرگان طی سال‌های اخیر، لکه های تیره رنگی در برگ‌های این گیاه مشاهده گردید. علایم ابتدا به صورت لکه‌های کوچک آب سوخته بر روی برگ‌های پایینی بوته‌ها بود. لکه‌های بالغ به تدریج فرورفته و قهوه‌ای رنگ شده، در صورت پیشرفت بیماری لکه‌ها به هم متصل و سبب ایجاد حالت نکروز برگی و ریزش برگ می‌شدند. جهت شناسایی عامل بیماری، کشت و خالص سازی عامل بیماری صورت گرفت. پس از یک هفته نگهداری تشتک‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، پرگنه تیره رنگ قارچ به صورت منظم رشد کرد. پرگنه قارچ تیره رنگ، کنیدیوفورها ساده یا منشعب، راست و قهوه‌ای به طول حداکثر ۱۰۰ و عرض ۵-۲ میکرومتر بودند. کنیدی‌ها قهوه‌ای رنگ، گرزی تا گلابی شکل به ابعاد ۲۵- ۱۰ ×۲۰- ۵ میکرومتر، دارای۴-۱ دیواره عرضی و ۲-۱ دیواره طولی بودند.

با توجه به بررسی‌های به عمل آمده و مطابقت با منابع علمی قارچ *Alternaria alternata* شناسایی گردید و با انجام اصول‌کخ و مایه‌زنی عامل بیماری، بیماری‌زایی قارچ مذکور در گیاه پامچال به اثبات رسید. این بیماری قبلاً از کشورهای آمریکا، لهستان و هند گزارش شده است (۴و۵)و این نخستین گزارش از وجود این قارچ بر روی پامچال در استان گلستان می باشد.

منابع

1. Barnett, H.L. and B.B. Hunter. 1972. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Burgess Pub. 241pp.
2. Daughtrey, M.L., Wick, R.L., and Peterson, J.L. 1995. Compendium of Flowering Potted Plant Diseases. APS Press. St. Paul , MN. 90 pp.
3. Farr DF, Rossman AY, 2009. Fungal databases. Systematic Mycology andMicrobiology Laboratory, Agricultural Research Service, USDA. http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/
4. Hornok, L .1992. Cultivation and processing of medicinal plants, Academic Pup Budapest.
5. Mulenko, W., Majewski, T., and Ruszkiewicz-Michalska, M. 2008. A Preliminary Checklist of Micromycetes in Poland. Szafer, W. Institute of Botany, Polish Academy of Sciences 9: 752.
6. Saharan, G.S., Kaushik, J.C., and Kaushik, C.D. 1982. Two new host records of *Alternariabrassicae*. Indian Phytopathol. 35: 172
7. Simmons, E.G. 2007. Alternaria:an identification manual. ASM Press.775pp

مدیریت بیماری پوسیدگی ریشه چغندرقند در ایران

سیدباقر محمودی*[1]، اباذر رجبی[1]، نازنین علاقه بند زاده[2]، حسن ابراهیمی کولایی[3]

[1]*موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه چغندرقند، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران*

۲ *گروه زراعت و اصلاح نباتات، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران*

[3]*مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی همدان، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، ایران*

* *نویسنده مسئول : mahmoudi@sbsi.ir*

چکیده

پوسیدگی ریشه چغندرقند در ایران در اثر حمله بیمارگرهای قارچی در زراعت بهاره اهمیت نسبتا زیادی دارد. یکی از کارآمدترین و در عین حال ساده ترین روشهای کاهش خسارت این بیماری، استفاده از ارقام مقاوم به همراه تدابیر زراعی است. در این پژوهش، تعداد ۲۶ رقم چغندرقند با زمینه مقاومت به *Rhizoctonia solani* در برابر یک جدایه با بیماریزایی بالا از *R. solani* AG2-2 در شرایط میکروپلات ارزیابی شدند. همچنین با توجه به وجود بیمارگر *Pythium_aphanidermatum* در مناطق گرم چغندرکاری کشور، ابتدا روش ارزیابی مقاومت به این بیمارگر بهینه سازی شد. سپس ارقام چغندرقند در برابر آن در شرایط گلخانه ارزیابی شدند. نتایج نشان داد که ارقام مقاوم به ریزوکتونیا، درجاتی از مقاومت به بیمارگر پی تیوم را دارا هستند. لذا به منظور مدیریت بیماری پوسیدگی ریشه با توجه به وجود بیمارگرهای قارچی مختلف در ایران، کاربرد ارقام تجارتی مقاوم به ریزوکتونیا توصیه می شود.

واژگان کلیدی: مقاومت، ریزوکتونیا، پی تیوم، فیتوفتورا، میکروپلات

مقدمه

چغندر قند طی فصل رشد مورد حمله قارچهای مختلف قرار می گیرد و در اثر پوسیدگی کامل ریشه، بوته میری رخ می دهد. پس از برداشت نیز ریشه های سیلو شده توسط قارچهای مختلف دچار لهیدگی و فساد شده، در سیلو از بین می روند. عوامل قارچی مسبب پوسیدگی بذر و مرگ گیاهچه، باعث پوسیدگی ریشه، بوته میری و فساد پس از برداشت، نیز می شوند. به همین دلیل این عوامل اهمیت زیادی داشته و هر ساله خسارات زیادی را به بار می آورند. با توجه به این که امروزه بذر چغندر قند به صورت ضد عفونی شده در اختیار کشاورزان قرار می گیرد و کارخانه های قند، نیز سعی بر حداقل زمان نگهداری ریشه در سیلو دارند، لذا پوسیدگی ریشه و بوته میری ناشی از عوامل قارچی در غالب مناطق چغندر کاری در دنیا و در ایران از اهمیت بیشتری برخوردار است. عوامل بیماریزای مختلفی در ایران به عنوان مسببین مرگ گیاهچه و پوسیدگی ریشه و طوقه چغندر قند معرفی و گزارش شده اند (۲). با توجه به شرایط اقلیمی، شیوه کشت و آبیاری مزارع، عوامل پوسیدگی ریشه چغندر قند عمدتا قارچهای *Rhizoctonia solani*، *Pythium ahanidermatum* و *Phytophthora drechsleri* است (۳).

مواد و روش‌ها

ارزیابی مقاومت به ریزوکتونیا در شرایط میکروپلات

میکروپلاتها کرتهایی به انعاد یک در دو متر هستند که می توان ۴۰ بوته چغندر قند را در دو ردیف در داخل آنها کشت نمود. ابتدای بهار هر سال ارقام در این کرتها کشت می شوند. در این تحقیق، پس از تنک کردن و نگهداری ۴۰ بوته در هر کرت، حدود دو ماه پس از کاشت هر بوته با هفت عدد بذر ذرت آلوده به R.solani AG-2-2 مایه زنی شدند. جهت تهیه مایه قارچ ، ابتدا بذر ذرت دو مرتبه متوالی به فاصله ۲۴ ساعت سترون شد و جدایه مورد نظر (Rh133) روی آن به مدت ۲۱ روز در دمای ۲۷ - ۲۵ درجه سانتی گراد رشد داده شد. بذرهای آلوده ذرت در عمق سه سانتی متری خاک کنار ریشه قرار گرفتند (۴). آزمایش در قالب طرح بلوکهای کامل تصادفی با چهار تکرار برای هر رقم اجرا شد. میزان پوسیدگی ریشه هر بوته شش هفته پس از مایه زنی با استفاده از مقیاس ۱ تا ۹ (۶) یادداشت برداری شد. در این مقیاس به بوته های سالم نمره یک و به بوته های کاملا پوسیده نمره ۹ داده شد (۱).

ارزیابی مقاومت به پی تیوم در شرایط گلخانه

در این روش، تعداد ۱۲ رقم چغندرقند در گلدانهای حاوی خاک لومی رسی سترون کشت و در شرایط گلخانه نگهداری شدند. پس از گذشت ۱۵ هفته از رشد گیاهان، آلوده سازی توسط مایه تلقیح انجام شد. مایه تلقیح شامل یک ارلن محتوی ۱۰۰ سی سی سوسپانسیون برگ چمن بود. به منظور تهیه سوسپانسیون برگ چمن، ۱۰۰ سی سی آب مقطر به۰/۵ گرم برگ چمن اضافه گشته و سوسپانسیون موجود، دو روز متوالی اتوکلاو شد؛ سپس یک بلوک حاوی کشت دو روزه P. aphanidermatum روی محیط کشت CMA به هر شیشه حاوی سوسپانسیون برگ چمن افزوده شد؛ بدین منظور از جدایه PA-8 که در آزمایشات صورت گرفته در موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند به‌عنوان بیماری‌زاترین جدایه انتخاب شده بود استفاده گردید. به منظور تلقیح ریشه های چغندرقند در این آزمایش، اطراف ریشه را کمی کنار زده، مایه تلقیح با استفاده از اسکالپل سترون قطعه قطعه شده و مایه تلقیح در کنار ریشه قرار گرفت و روی آن با خاک سترون پوشانیده شد. آبیاری بلافاصله انجام شد. برای هر ژنوتیپ سه گلدان به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی با ده تکرار اجرا شد. یک ماه بعد از مایه زنی، تمامی ریشه‌ها از خاک خارج شده و پس از شستشوی سطحی بلافاصله مورد بررسی قرار گرفتند. ریشه ها برش طولی داده شدند و در صورت مشاهده علائم پوسیدگی و تغییر رنگ، میزان پوسیدگی در داخل بافت توسط مقیاس باتنر و همکاران (۶) اندازه گیری شد.

نتایج و بحث

نتایج ارزیابی مقاومت ارقام در برابر دو بیمارگر R.solani AG-2-2 و P. aphanidermatum در جدول ۱ خلاصه شده است. همچنین خصوصیات و ویژگیهای ارقام نیز در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- ارزیابی مقاومت ارقام تجارتی چغندرقند نسبت به بیماری پوسیدگی ریزوکتونیایی و پیتیومی

ردیف	نام رقم	کشور مبدا	خصوصیات ویژه رقم	سال معرفی	نام شرکت	شدت آلودگی به ریزوکتونیا	شدت آلودگی به پی تیوم
1	Dorotea	سوئد	مقاوم به ریزومانیا و متحمل به ریزوکتونیا	1379	Syngenta	1.96	4.68
2	Laetitia	آلمان	مقاوم به ریزومانیا و متحمل به ریزوکتونیا	1382	KWS	1.00	3.95
3	Magnolia	آلمان	مقاوم به ریزوکتونیا	1384	KWS		5.17
4	Flores	دانمارک	مقاوم به ریزومانیا و متحمل به ریزوکتونیا	1384	Maribo	2.50	2.72
5	Tous	سوئد	مقاوم به ریزومانیا و متحمل به ریزوکتونیا	1385	Syngenta	4.75	2.75
6	Ivano	سوئد	مقاوم به پوسیدگی ریزوکتونیائی	1387	Syngenta		2.58
7	Azar	بلژیک	مقاوم به ریزوکتونیا و متحمل به ریزومانیا	1388	SESVanderhave		4.25

8	Bumerang	بلژیک	مقاوم به ریزوکتونیا و متحمل به ریزومانیا	1388	SESVanderhave	7.43	2.65
9	Permeier	آلمان	مقاوم به ریزوکتونیا و متحمل به ریزومانیا	1388	Strube	4.89	4.1
10	Novodoro	سوئد	مقاوم به ریزومانیا و ریزوکتونیا	1389	Syngenta		3.82
11	Kermit	دانمارک	مقاوم به ریزوکتونیا	1390	Maribo	2.02	
12	Iris	هلند	مقاوم به ریزوکتونیا	1390	Kuhn&Co		
13	Pantera	بلژیک	مقاوم به ریزوکتونیا	1390	SESVanderhave	1.25	
14	Modex	دانمارک	مقاوم به پوسیدگی ریزوکتونیائی	1391	Maribo		
15	Efesos	دانمارک	مقاوم به ریزومانیا و ریزوکتونیا	1391	Maribo	4.72	
16	Ekbatan	ایران	مقاوم به پوسیدگی ریزوکتونیائی	1392	SCDCO-SBSI	3.64	4.76
17	Tourelle	فرانسه	مقاوم به ریزومانیا و ریزوکتونیا	1392	Florimond Desprez	2.81	
18	Aigrette	فرانسه	مقاوم به ریزوکتونیا	1393	Florimond Desprez	2.01	
19	Cadet	سوئد	مقاوم به ریزوکتونیا	1393	Syngenta	2.52	
20	Tabal	سوئد	مقاوم به ریزوکتونیا	1393	Syngenta	2.62	
21	BTS 233	آلمان	مقاوم به ریزومانیا و ریزوکتونیا	1393	Betaseed	2.08	
22	Loriquet	فرانسه	مقاوم به ریزومانیا و ریزوکتونیا	1393	Florimond Desprez	1.93	
23	Novella	دانمارک	مقاوم به ریزوکتونیا	1394	Maribo	3.32	
24	Karta	سوئد	مقاوم به ریزوکتونیا	1394	Syngenta	1.52	
25	Rosamina	هلند	مقاوم به ریزومانیا و ریزوکتونیا	1394	Kuhn&Co	1.91	
26	Motahar	ایران	مقاوم به ریزومانیا و متحمل به ریزوکتونیا	1394	SCDCO-SBSI		

شرکتهای تولید کننده ارقام چغندرقند، از این ارقام به عنوان ارقام مقاوم یا متحمل به ریزوکتونیا یاد کرده اند. نتایج اولیه ارزیابی مقاومت در جدول ۱ نیز صحت این ادعا را تایید کرد. در ارزیابی مقاومت با استفاده از مقیاس باتنر و همکاران (۶)، شدت آلودگی از یک تا ۹ طبقه بندی شده است که در آن نمره ۱ به بوته های سالم و نمره ۹ به بوته های کاملا پوسیده تعلق دارد. در این مقیاس نمره بین یک تا سه به عنوان مقاوم، سه تا پنج به عنوان نسبتا مقاوم، نمره پنج تا هفت به عنوان نسبتا حساس و هفت تا نه به عنوان حساس دسته بندی شدند. بر این اساس، کلیه ارقام مورد بررسی به جز رقم بومرنگ در گروه ارقام مقاوم یا نسبتا مقاوم به پوسیدگی ریزوکتونیایی طبقه بندی شدند. به عبارت دیگر، ادعای شرکتهای تولید کننده رقم مبنی بر مقاومت/ تحمل به ریزوکتونیا تایید شد.

در ارزیابی مقاومت به P. aphanidermatum نیز ارقام در دو گروه مقاوم و یا نسبتا مقاوم دسته بندی شدند. واکنش ارقام به دو عامل P. aphanidermatum و R.solani AG-2-2 نسبتا یکسان بود. به عبارت دیگر، رقم مقاوم به پوسیدگی ریزوکتونیایی به پوسیدگی پیتیومی نیز مقاوم/نسبتا مقاوم بود. این تحقیق برای اولین مرتبه نشان داد که مقاومت به این دو عامل مولد پوسیدگی ریشه در چغندرقند، با نتایج مشابهی همراه است. در مطالعات لوترباچر و همکاران (۷) نیز درجاتی از مقاومت در جنس Beta نسبت به P. ultimum و R. solani دیده شد. بنابراین، به نظر می رسد که مقاومت به بیمارگرهای پی تیوم و ریزوکتونیا در چغندرقند با مکانیسم های نسبتا مشابهی کنترل می شوند. اما اطلاعات چندانی در رابطه با مکانیسم مقاومت چغندرقند نسبت به بیمارگر پی تیوم وجود ندارد. با توجه به مکانیسم مقاومت به R. solani در چغندرقند که با تولید ماده پروتئینی از فعالیت آنزیم پکتین لیاز قارچ ریزوکتونیا جلوگیری می نماید (۵)، می توان مقاومت به پی تیوم را تا حدی به شباهت آنزیم های درگیر در فرایند بیماری‌زایی این دو بیمارگر (آنزیم های پکتین لیاز و اندوپلی گالاکتروناز) ارتباط داد. به این ترتیب، نتیجه کاربردی این پژوهش این است که در مناطقی مثل غرب و مرکز ایران که زراعت چغندرقند از این دو بیمارگر رنج می برد با کاشت رقم مقاوم به ریزوکتونیا تا حد زیادی از خسارت این بیمارگرها جلوگیری نمود.

منابع

۱. ابراهیمی کولایی، ح.، محمودی، س. ب.، و حسنی، م. ۱۳۸۹. ارزیابی مقاومت رگه های اصلاحی چغندر قند نسبت به پوسیدگی ریزوکتونیایی ریشه و طوقه. چغندر قند ۲۶: ۳۱-۴۳.

۲. ارشاد، جعفر. ۱۳۷۴. قارچ های ایران. سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی. ۸۷۴ صفحه.

۳. محمودی، س.ب.، سلطانی، ج. ۱۳۸۴. پوسیدگی ریشه چغندرقند در ایران. نشریه خبری-علمی مرکز بررسی و تحقیق و آموزش صنایع قند. ایران. شماره ۱۷۸. صفحه ۱۹-۱۴.

۴. محمودی، س.ب.، مصباح، م.، علیزاده، ع و ابراهیمی کولایی، ح. ۱۳۸۲. مقایسه روش های مختلف ارزیابی مقاومت به پوسیدگی ریزوکتونیایی ریشه و طوقه در ژنوتیپ های منتخب چغندرقند. مجله چغندرقند. جلد ۱۹. شماره ۱. صفحه ۲۲-۱.

5. Bugbee, W. M. 1993. A pectin lyase inhibitor protein from cell walls of sugar beet. Phytopathology. 83: 63-68.
6. Buttner, G. Pfahler, B. and Marlander, B. 2004. Greenhouse and field techniques for testing sugar beet for resistance to *Rhizoctonia* root and crown root. Plant breeding. 123: 158-166.
7. Luterbacher, M. C., Asher, M. J. C., Beyer, W., Mandolio, G., Scolten, O. E., Frees, L., Biancardi, E., Stevanato, P., Mechelke, W. and Slyvchenko, O. 2005. Source of resistance to disease of sugar beet in related beta germplasm: II. Soil-borne disease. Euphitica: 141: 49 – 63.

بررسی تغییرات آنزیم‌های آنتی اکسیدان در ارقام گندم حساس و مقاوم به قارچ عامل سفیدک سطحی

لیلا آهنگر[1]، غلامعلی رنجبر[2]، ولی الله بابایی زاد[3] ، حمید نجفی زرینی[4] و عباس بیابانی[5]*
۱و ۵ – استادیار و دانشیار دانشگاه گنبد کاووس
۲ و ۳ - دانشیار دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۴- استادیار دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری
نویسنده مسئول: L.ahangar63@gmail.com

چکیده

بیماری سفیدک سطحی که بوسیله یک قارچ انگل اجباری بنام *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* (*Bgt*) ایجاد می‌گردد، یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های گندم در شرایط آب و هوایی معتدل بوده که تولید این محصول را با چالش مواجه می‌کند. در این تحقیق به منظور بررسی تغییرات فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی در گندم، رقم فلات و تجن به ترتیب به عنوان ارقام حساس و مقاوم به قارچ *Bgt*، در معرض بیماری قرار گرفتند. سپس میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان پراکسیداز و کاتالاز در چهار بازه زمانی ۰، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از آلودگی در سه تکرار مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که رقم مقاوم فعالیت آنزیم پراکسیداز بالایی را نسبت به رقم فلات نشان داده در حالیکه فعالیت آنزیم کاتالازی آن به طور معنی‌داری کمتر از رقم حساس بود. بنابراین می‌توان چنین استنباط نمود که رقم تجن با توانایی بالا در فعالیت آنزیمی از پتانسیل بالایی برای اصلاح در زمینه مقاومت به سفیدک سطحی برخوردار می باشند.

واژگان کلیدی : آنزیم‌های آنتی اکسیدان، گندم ، بیماری و القای مقاومت

مقدمه

گندم یکی از مهمترین گیاهان تیره غلات است که سالیانه مقادیر زیادی از این محصول در اثر عوامل بیماریزای مختلف ازبین رفته یا غیر قابل مصرف می گردد. بیماری سفیدک سطحی که بوسیله یک قارچ انگل اجباری بنام *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* (*Bgt*) ایجاد می‌گردد، یکی از مخرب‌ترین بیماری‌ها در شرایط آب و هوایی معتدل بوده که تولید این محصول را با چالش مواجه می‌کند (۴). مطالعات نشان داده در پی شرایط تنش و فعالیت‌های اکسیداتیو قوی در گیاهان، گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) تولید می‌شود و یا میزان آن‌ها در گیاه افزایش می‌یابد تا اثرات زیان آور تنش را کاهش دهد (۶). گونه‌های اکسیژن فعال، نظیر سوپر اکسید و پراکسید هیدروژن برای سلول سمی بوده، لذا گیاهان توسط تولید انواع مختلفی از آنزیم های آنتی‌اکسیدان نظیر پراکسیداز (POX) و کاتالاز (CAT) قادر به حذف و سمیت زدایی آنها می‌باشند (۲). هاراچ و همکاران (۵) القای قابل ملاحظه‌ای از آنزیم پراکسیداز را در همان ساعات اولیه پس از آلودگی با سفیدک سطحی در لاین حساس و مقاوم جو مشاهده نمودند. مطالعات انجام شده توسط واناکر و همکاران (۱۴) نشان داد که فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت CAT در ۲۴ ساعت پس از آلودگی در برگ‌های آلوده جو حساس به سفیدک افزایش یافت. با توجه به مباحث ذکر شده، هدف از این مطالعه بررسی میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت کاتالاز و پراکسیداز در رقم حساس در مقایسه با رقم مقاوم گندم به بیماری سفیدک سطحی می باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و نگهداری قارچ سفیدک سطحی در این بررسی به منظور ارزیابی میزان فعالیت آنزیم‌های انتی اکسیدان ژنوتیپ‌های فلات و تجن گندم به ترتیب به عنوان ارقام حساس و مقاوم به سفیدک سطحی گندم مورد استفاده قرار گرفتند. جدایه قارچ عامل بیماری سفیدک سطح (*Bgt*) از بخش تحقیقات پاتولوژی غلات موسسه تهیه نهال و بذر کرج تهیه و در آزمایشگاه بر روی یکی از ارقام نسبتاً حساس گندم به نام بولانی دردمای۲۲ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۷۰٪ تکثیر و نگهداری شد.

مایه زنی گیاهان مقاوم و حساس با قارچ Bgt : در ابتدا بذور مورد نیاز رقم فلات و تجن با محلول ۱ درصد هیپوکلریت سدیم ضدعفونی شده و پس از جوانه زنی، به گلدان حاوی خاک (خاک مزرعه+ ماسه+ خاک برگ) منتقل شدند. سپس در اتاقک رشد با تناوب ۱۶ ساعت روشنایی با دمای ۲۲ درجه سلسیوس و ۸ ساعت تاریکی با دمای ۲۰ درجه سلسیوس با رطوبت نسبی ۷۰٪ نگهداری شدند. پس از گذشت دو هفته، گیاهچه‌ها بوسیله قارچ *Bgt* با غلظت ۵۰ کنیدیوم در میلیمتر مربع آلوده شدند.

تهیه عصاره گیاهی و سنجش فعالیت آنزیمی : در تمامی آزمایشات در زمان های ۰، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از آلودگی از ارقام کشت شده در گلدان، مجموعا ۴ برگ در هر مرحله انتخاب و در فریزر $-80^{\circ}C$ نگهداری شد. جهت استخراج عصاره سلولی، ۰/۵ گرم از بافت گیاهی در بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷) در دمای ۴ درجه سانتیگراد ساییده و عصاره‌گیری شد. سپس همگنای حاصل در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و محلول رویی برای سنجش فعالیت آنزیم مورد استفاده قرار گرفت.

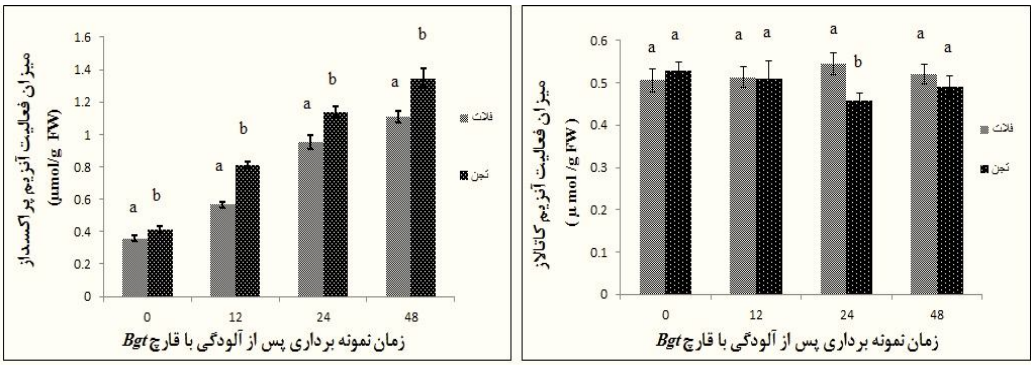
سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز (POX) با استفاده از روش این و همکاران (۸) در طول موج ۴۷۰ نانومتر بر حسب میکرومول بر گرم بافت تازه محاسبه شد. **سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT)** بر طبق روش لوک (۱۰) در طول موج ۲۴۰ نانومتر با ضریب خاموشی ($40\ mM^{-1}cm^{-1}$) بر حسب میکرومول بر گرم بافت تازه محاسبه شد. تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از آزمایش با نرم افزار SAS انجام گرفت و با مشاهده تفاوت معنی دار در آنالیز واریانس، مقایسه میانگین به روش حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) انجام گرفت.

نتیجه گیری

آنزیم پراکسیداز (POX)، اکسید و ردوکتازهایی هستند که در هنگام بروز آلودگی‌های بیوتروف از طرفی موجب جمع-آوری رادیکال‌های آزاد اکسیژنی تولید شده در اثر انفجار اکسیژنی از سلول می‌شوند و از طرف دیگر با تولید H_2O_2 در دفاع گیاهان در برابر آلودگی‌های بیوتروفی نقش دارند (۱). به طوریکه تولید این H_2O_2، برای تشکیل لیگنین در سلول به عنوان یک مکانیسم مهم مقاومت مورد نیاز می‌باشد (۳). علاوه بر این، آنزیم POX به دلیل تولید H_2O_2 در سلول در القای مرگ سلولی (HR) نیز بسیار موثر می‌باشد (۷). نتایج بررسی تغییرات آنزیم پراکسیداز این تحقیق حاکی از افزایش معنی‌دار این آنزیم قبل از آلودگی در رقم تجن نسبت به رقم فلات بود. علاوه براین، نتایج نشان داد که پس از اعمال آلودگی نیز هر دو گروه از گیاهان روند افزایشی از فعالیت آنزیم POX را نشان دادند. در حالیکه مقایسه میانگین بیانگر فعالیت بالای این آنزیم در ارقام مقاوم نسبت به رقم حساس پس از اعمال آلودگی بود. به طوریکه الگوی میزان فعالیت آنزیم POX نشان داد که میزان فعالیت این آنزیم در رقم مقاوم در ۱۲ ساعت پس از آلودگی با تفاوت معنی‌دار در سطح ۱ درصد نسبت به رقم حساس آغاز شد. سپس این افزایش فعالیت در ۲۴ ساعت پس از آلودگی همچنان روند افزایشی خود را حفظ نموده و در نهایت در ۴۸ ساعت پس از آلودگی به بیشترین میزان فعالیت خود در ارقام مقاوم رسید که تفاوت معنی‌داری را در سطح یک درصد با رقم فلات نشان داد (شکل۱a). لذا با توجه به نتایج حاصله فعالیت بالای این آنزیم در رقم مقاوم احتمالا می‌تواند به دلیل نقش این آنزیم در سنتز لیگنین در ساعات اولیه آلودگی و یا القای مرگ سلولی جهت ممانعت از پیشرفت بیماری در ساعات بعدی می-باشد که با نتایج کوواکس و همکاران (۹) منطبق می‌باشد.

آنزیم کاتالاز (CAT) یکی از آنزیم‌های کلیدی جاروب کننده H_2O_2 در گیاهان است. نتایج بررسی‌ها نشان داد که تفاوت معنی‌داری از نظر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در هیچکدام از بازه‌های زمانی به جزء ۲۴ ساعت پس از اعمال آلودگی در ارقام حساس و مقاوم مشاهده نگردید. در این بازه زمانی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در رقم فلات به طور معنی‌داری بیشتر از ارقام مقاوم بود (شکل b۱). واناکر و همکاران (۱۴) اظهار نمودند که جوهای حساس و مقاوم به *Bgh* از ۲۲-۱۲ ساعت پس از آلودگی تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند، در حالیکه در ۲۴ ساعت پس از آلودگی رقم حساس فعالیت سریع و بالایی از کاتالاز را نشان دادند آنها اظهار نمودند که افزایش فعالیت کاتالاز با افزایش حساسیت به بیماری همراه است که با نتایج رنارد-مرلیر و همکاران (۱۲) نیز منطبق بود. از سویی تحقیقات نشان داده اگرچه، H_2O_2 در غلظت‌های بالا برای گیاه می‌تواند سمی باشد اما می‌تواند نقش پیام‌آور در القای مسیرهای دفاعی را در گیاه داشته باشد. به طوریکه میتلر و همکاران (۱۱) نشان دادند کاهش آنزیم‌های کاتالاز سبب افزایش مرگ برنامه ریزی شده سلولی (PCD) تحت حمله بیمارگر می‌گردد. همچنین توتون‌های تراریخت با سطوح کمی از بیان کاتالاز، نواحی نکروزه توسعه یافته و مکانیسم‌های دفاعی فعال شده‌ای را نشان دادند (۱۳). بنابراین بر اساس نتایج این تحقیق استنباط می‌شود که رقم مقاوم با کاهش فعالیت آنزیم CAT پس از آلودگی با *Bgt* سبب افزایش سطح H_2O_2 در گیاه می‌گردند که این H_2O_2 می‌تواند به عنوان یک سیگنال عمل نموده و بوسیله القای مرگ سلولی و ژن‌های مرتبط با بیماری در گیاه، از آن در برابر بیمارگر محافظت نماید.

پیش نیاز تولید ارقام مقاوم، شناسایی مکانیسم‌های گیاهی درگیر در واکنش به عوامل بیماریزا است که منجر به ظهور مقاومت در ارقام مقاوم و حساسیت در ارقام حساس گیاهی می‌شود. به طوریکه بررسی الگوی فعالیت آنزیمی بیانگر این است که رقم تجن از طریق القای بالای آنزیم پراکسیداز و کاهش آنزیم کاتالاز نقش مهمی را در مقاومت نسبت به حمله بیمارگر در گیاه ایفا می‌نمایند. بنابراین بر اساس نتایج حاصله می‌توان چنین استنباط نمود که رقم مقاوم تجن از پتاسیل مقاومتی بالایی برای اصلاح در زمینه مقاومت به بیماری به خصوص *Bgt* برخوردار است.



شکل ۱- میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (POX) ، کاتالاز (CAT) و آسکوربات پراکسیداز (APX) بر حسب میکرومول بر گرم بافت تازه در دقیقه در رقم فلات و تجن پس از آلودگی با سفیدک سطحی گندم (*Bgt*). مقایسه میانگین‌ها در هر بازه زمانی بر اساس حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح ۵ درصد انجام گرفت.

منابع

۱. رخشنده‌رو، ف.، شاهسون بهبودی، ب و زمانی زاده، ح. ر. ۱۳۸۸. نقش آنزیم‌های ضد اکسیداتیو توتون در مقاومت گیاه در برابر آلودگی سیستمیک ویروس Y سیب زمینی (PVY). مجله علوم دانشگاه تهران. جلد ۳۵ (۱) : ۱۶-۹

2. Ashraf, M. 2009. Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. Biotechnol Adv. 27:84-93.
3. Asthir, B., Duffus, C.M., Smith, R and Spoor, W. 2002. Diamine oxidase is involved in H2O2 production in the chalazal cells during barley grain filling. Journal experimental Botany. 53: 677-682.

4. Conner, R.L., Kuzyk, A.D and Su, H. 2003. Impact of powdery mildew on the yield of soft white spring wheat cultivars. Canadian Journal Plant Science, 83: 725-728.
5. Harrach, B.D., Fodor, J., Pogány, M., Preuss, J and Barna, B. 2008. Antioxidant, ethylene and membrane leakage responses to powdery mildew infection of near-isogenic barley lines with various types of resistance. European Journal Plant Pathology. 121: 21–33
6. Hassibi, P., Moradi, F and Nabipour, M. 2007. Screening of rice genotypes for low temperature stress-using chlorophyll flourescence. Iranian Journal Crop Science. 9: 14-31.
7. Hückelhoven, R., Fodor, J., Preis, C and Kogel, K.H. 1999. Hypersensitive cell death and papilla formation in barley attacked by the powdery mildew fungus are associated with H2O2 but not with salicylic acid accumulation. Plant Physiology. 119: 1251-1260.
8. In, B.C., Motomura, S., Inamoto, K and Doi, M. 2007. Multivariente analysis of realation between preharvest environmental factors, postharvest morphological and physiological factors and vase life of cut Asomi Red Roses. Japanese Society for Horticultural Science. 76: 66-72.
9. Kovács, V., Pál, M., Vida, G., Szalai, G and Janda, T. 2011. Effect of powdery mildew infection on the antioxidant enzyme activities in different lines of Thatcher-based wheat. Acta Biologica Szegediensis. 55: 99-100.
10. Luck, H. 1974. Catalse in Methods of Enzymatic Analysis. Vol Π, edited by J Bergmeyer & M. Grabi. Academic Press. New York: Ed Bergmeyer; p 885-890
11. Mittler, R., Herr, E.H., Orvar, B.L., Van Camp, W., Willekens, H., Inze, D., Ellis, B.E. 1999. Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen intermediates are hyperresponsive to pathogen infection. Procceding Natural Academy Science USA.96:14165-70.
12. Renard-Merlier, D., Randoux, B., Nowak, E., Farcy, F., Durand, R and Reignault, P. 2007. Iodus 40, salicylic acid, heptanoyl salicylic acid and trehalose exhibit different efficacies and defence targets during a wheat/powdery mildew interaction. Phytochemistry. 68: 1156–1164.
13. Takahashi, H., Chen, Z., Du, H., Liu, Y and Klessig, D.F. 1997. Development of necrosis and activation of disease resistance intransgenic tobacco plants with severely reduced catalase levels.Plant Journal. 11: 993–1005.
14. Vanacker, H., Carver, T.L.W and Foyer, C.H. 2000. Early H_2O_2 accumulation in esophyll cells leads to induction of glutathione during the hyper-sensitive response in the barley-powdery mildew interaction. Plant Physiology, 123: 1289–1300.

گزارش تشخیص سرولوژیکی و بررسی دامنه میزبانی جدایه ویروس

Pea Seed Borne –PSbMV-Mosaic Virus از گیاه عدس (*Lens culinaris* Medik)

ترانه مسلم قشلاقی[1*] ,نوح شهرآیین[2] ,فرشاد رخشنده رو[1]

۱- *گروه بیماری شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی تهران*

۲- *بخش تحقیقات ویروس شناسی گیاهی, موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور،سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی (تات)*
۱۹۳۹۵-۱۴۵۴-،تهران- ایران.

* *نویسنده مسئول: Taranehm29@yahoo.com*

چکیده

عدس یکی از حبوبات مهم در برنامه اقتصاد مقاومتی و محصول دیم مناطق غربی کشور می باشد. بیماریهای ویروسی متعددی باعث کاهش تولید این محصول می شود.بیماریهای ویروسی از جمله ویروس بذرزاد نخودفرنگی دارای گستردگی جهانی می باشد. این ویروس *Pea Seed Borne Mosaic Virus*- PSbMV (genus-potyvirus) از طریق انتقال مکانیکی و بذر آلوده نخود فرنگی ,عدس ,نخود ,باقلا و سایر حبوبات با میزان متفاوتی قابل انتقال می باشد. بر اساس ایجاد علایم خفیف بر روی گیاه ، وجود پاتوتیپ های Pathotypes مختلفی از سایر نقاط دنیا از این ویروس در طبیت گزارش شده است. از مزارع زیر کاشت عدس منطقه کرمانشاه (و نزدیک به حومه استان لرستان)، گیاهان عدس با علائم زردی و موزائیک مشکوک به آلودگی ویروسی جمع آوری گردید. نمونه ها به دو روش الایزای غیر مستقیم و بلات بافتی با استفاده از آنتی سرم PSbMV (دریافتی از مرکز تحقیقاتی ایکاردا- سوریه) مورد آزمایش قرار گرفتند. افشره تهیه شده از نمونه ها در بافر فسفات پتاسیم ۰.۱ مولار با اسیدیته ۷.۲ روی گیاهان محک از جمله سلمه تره، باقلا، لوبیا چشم بلبلی، نخود فرنگی، خلر، ماشک برگ پهن، نخود، لوبیا چیتی و عدس به طور مکانیکی مایه زنی شد. واکنش گیاهان محک و میزبان ثبت گردید : علائم موضعی لکه ای کلروتیک روی سلمه تره قرمز، نخود با علائم سر خشکیدگی، باقلا با علائم سیستمیک موزائیک و برگ قاشقی، نخود فرنگی بدون علائم ولی آلوده به ویروس، خلر و ماشک با علائم زردی و موزائیک، لوبیا چشم بلبلی و لوبیا چیتی بدون آلودگی نشان دادند. بر اساس نتایج آزمون الایزای غیر مستقیم و بلات بافتی (TIBA) ،مقایسه و مطالعه ی علایم حاصل از انتقال مکانیکی بر روی گیاهان محک جدایه ویروس موزائیک بذر زاد نخود فرنگی در عدس PSbMV شناسایی گردید.تعیین و بررسی واکنش ارقام و گیاهان محک PSbMV دارای اهمیت ویژه ای در جهت شناخت پتوتیپ های موجود این ویروس در منطقه در جهت بکارگیری روشهای مناسب کنترل می باشد.

واژگان کلیدی: گیاه میزبان, عدس, تشخیص ,ویروسی, PSbMV

مقدمه:

در سالهای اخیر در مناطق مهم کاشت عدس علایم بیماری مشکوک به دخالت بیمارگر های ویروسی با علائم زردی، خشکیدگی نوک گیاه، کوتولگی و توقف رشد، سرخی و برنزه شدن حاشیه برگ، ریز برگی، قهوه ای شدن آوند آبکشی، در برخی از مناطق غربی از ایران گزارش شده است (۷). ویروس بذر زاد نخود فرنگی- *Pea seed borne mosaic virus*-PSbMV

(genus-potyvirus) دارای گستردگی جهانی می باشد. ویروس از طریق بذور محصول می شود. PSbMV همچنین باعث کاهش کیفیت بذور آلوده میگردد ، علایمی مانند لکه قهوه ای بر روی بذور و غلاف عدس و نخود فرنگی و سایر حبوبات ایجاد می کند. شناسایی ظاهری علایم گیاهان آلوده در شرایط مزرعه کار آسان و علمی نیست چونکه اغلب گیاهان آلوده علایم خاصی را نشان نمی دهند و ممکن است حالت های موزاییک خفیف از خود بروز دهند. برخی از حبوبات علایم متفاوتی از بروز آلودگی به ویروس از خود نشان می دهند. در گیاهان نخود و عدس بترتیب علایم زردی در جوانه های جدید، حالت پیسه ای برگها ،برگشتگی برگ به طرف پایین و توقف رشد است . گیاهان آلوده عدس ممکن است بدون علایم باشندو یا حالت کلروز در جوانه جدید، پیسه ای برگ و نکروز نوک جوانه ها و توقف رشد را نشان میدهند.میزبان های PSbMV به خانواده لگوم محدود میشود (۴). بر اساس ایجاد علایم خفیف بر روی گیاه ، وجود پاتوتایپ های Pathotypes مختلفی از ویروس در طبیت گزارش شده است (۲) .

از نظر اهمیت اقتصادی در بررسی های مرکز ایکاردا کشور سوریه ، در ارزیابی و مطالعات گلخانه ای نشان دادند که کاهش محصول بر اثر ویروس PSbMV بترتیب برای نخود۶۶٪ درصد باقلا ۴۱٪ ، عدس ۴۵٪ ، نخود فرنگی ۴۹٪ برآورد گردیده است. در جنوب استرالیا آزمایشات گلخانه ای نشان داد که پتوتیپ P1 ، و P4 ویروس باعث کاهش نهایی تولید (بذور) محصول بین ۸۵-۳۵٪ درصد میشود (۲). در منطقه NSW استرالیا در ارزیابی مقاومت ژرم پلاسم نخود فرنگی (Field pea) به ویروس در آخر فصل نشان داده شد که لاین های خیلی حساس به ویروس تا حدود ۱۰۰٪ آلودگی دارند. اریابی آلودگی حبوبات به آلوده نخود فرنگی، عدس ، نخود، باقلا و سایرحبوبات قابل انتقال به صورت اولیه می باشد و از طریق حشرات ، گونه های مختلف شته های ناقل نیز به صورت ثانویه در مزارع پراکنده میشود. ویروس همچنین از طریق مکانیکی قابل انتقال به برخی از میزبان های زراعی است. PSbMV در گیاه نخود فرنگی حدود ۱۰۰٪ درصد بذر زاد گزارش شده است (۳ و۶). آلودگی اولیه حبوبات از جمله نخود و عدس و نخود فرنگی باعث کاهش شدید ویروس در ۱۰ سال گذشته در جنوب شرقی استرالیا نشان داده شده است که ویروس PSbMV یکی از مهمترین ویروس های آلوده کننده حبوبات میباشد (۳).

مواد و روش ها

از مناطق و مزارع مهم کاشت عدس در برخی از مزارع استان کرمانشاه نمونه برداری شد. نمونه های گیاه عدس در شرایط قبل از گل دهی و ایجاد غلاف بازدید شدند، و از گیاهان مشکوک به بیماری ویروسی با علائم زردی ، توقف رشد ،پیچیدگی برگ و نکروز جوانه ها به صورت انتخابی و بعضا تصادفی نمونه برداری صورت گرفت. بر اساس روش توصیفی (۷،۸،۹) نمونه های گیاهی هر کدام با ثبت تاریخ، محل نمونه برداری و شرایط گیاه یادداشت برداری و درون کیسه های پلاستیکی داخل یخدان قرار داده شدند و به آزمایشگاه بخش تحقیقات ویروس شناسی، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور- تهران، منتقل شدند.

آزمون های سرولوژیکی الایزا و لکه گذاری بافتی-TIBA

از آزمون های سرولوژیکی الایزا، لکه گذاری بافتی جهت تعیین آلودگی عوامل ویروسی در گیاه عدس آلوده به علایم استفاده شد. تست های مکمل سرولوژیک با به کار گیری از آنتی سرم های چند همسانه ای اهدایی از مرکز ایکاردا کشور سوریه و مرکز DSMZ (آلمان) وبا استفاده از روش توصیفی (۱۱) انجام شد.خلاصه آزمون سرولوؤیک لکه گذاری بافتی به شرح زیر است.

آزمون لکه گذاری بافتی : Tissue- Blot

برگ، ساقه، دمبرگ را با تیغ بریده روی کاغذ نیترو سلولز زده شدو سه بار شستشو با بافرPBST به مدت ۵ دقیقه.(در بین تمان مراحل تکرار میشود).بلاکینگ با شیر خشک وPBST، به مدت یک ساعت در دمای اتاق قرار داده شدو آنتی سرم پلی کلونال به نسبت ۱ به ۵۰۰، ۱ به ۲۰۰۰ در بافر PBS اضافه شد و حدود یک ساعت در دمای اتاق قرار داده شدمرحله بعدی

آنتی بادی بز علیه خرگوش در بافر conjugate برای پلی کلونال یا انتی بادی خرگوش علیه موش در بافر conjugate برای مونوکلونال اضافه کردیم.در نهایت بافرSubstrateاضافه کردیم بعد از تغیر رنگ کاغذ را در آب مقطر گذاشته شد.
براساس نتایج آزمون سرم شناختی الایزا و لکه گذاری بافتی (TIBA) نمونه های دارای آلودگی به جنس پوتی ویروس بذر زاد نخود فرنگیPSbMV مورد بررسی شناسایی ، وضعیت و شدت آلودگی در مزارع یک منطقه (بر اساس نتایج آزمون های سرولوژیک) بررسی گردید.

تلقیح مکانیکی:

افشره تهیه شده از نمونه های برگی در بافر فسفات پتاسیم ۰.۱ مولار با اسیدیته ۷.۲ روی گیاهان محک از جمله سلمه تره ,باقلا ، لوبیا چشم بلبلی ,نخود فرنگی ,خلر ,ماشک برگ پهن ,نخود ,لوبیا چیتی و عدس به طور مکانیکی مایه زنی شد. واکنش گیاهان محک و میزبان ثبت گردید (جدول-۱)

نتایج و بحث

بر اساس نتایج آزمون های بیولوژیکی و سرولوژیکی ویروس موزائیک بذر زاد نخود فرنگی (Pea seed borne mosaic virus, PSbMV)، در برخی از نمونه های آلوده شناسایی گردید (شکل- ۱و۲). علائم موضعی لکه ای کلروتیک روی سلمه تره قرمز,نخود با علائم سر خشکیدگی ,باقلا با علائم سیستمیک موزائیک و برگ قاشقی ,نخود فرنگی بدون علائم (و در برخی از ارقام با علایم موزاییک و رکبرگ روشنی) ولی آلوده به ویروس ,خلر و ماشک با علائم زردی رگبرگی و موزائیک ,لوبیا چشم بلبلی و لوبیا چیتی بدون آلودگی نشان دادند(جدول-۱). بر اساس نتایج آزمون الایزای غیر مستقیم و بلات بافتی (TIBA) ،مقایسه و مطالعه ی علایم حاصل از انتقال مکانیکی بر روی گیاهان محک جدایه ویروس موزائیک بذر زاد نخود فرنگی در عدس PSbMV شناسایی گردید.تعیین و بررسی واکنش ارقام و گیاهان محک PSbMV دارای اهمیت ویژه ای در جهت شناخت پتوتیپ های موجود این ویروس در منطقه در جهت بکارگیری روشهای مناسب کنترل می باشد.

شکل-۱. گیاه عدس (سمت راست و چپ) در مزرعه با علایم زردی ، زردی رگبرگ و پیچیدگی برگ مشکوک به آلودگی به بیماری ویروسی

شکل-۲ گیاه ماشک برگ معمولی- *Lathyrus sativus* (سمت راست) و رقم نخود فرنگی (سمت چپ) با علایم موزاییک و رگبرگ روشنی، مایه زنی شده با ویروس موزاییک بذر زاد نخود فرنگی PSbMV

مطالعات تکمیلی با بکارگیری روش های مولکولی و تعیین توالی ، شناخت بیشتری از خصوصیات ویروس ، استرین و نژادهای وابسته را آشکار خواهد نمود . بررسی های مقدماتی نشان دهنده این موضوع است که جمعیت متفاوتی از عوامل بیمارگر ویروسی در مناطق دیم کاشت عدس (استان مورد بازدید) وجود داشته باشد که نیازمند بررسی مناطق و جمع آوری نمونه های بیشتری جهت مطالعات تکمیلی است. با توجه به ماهیت ویروس و سهولت انتقال آن با بذور آلوده و شته های ناقل ویروس ، همچنین گزارش وجود ویروس از روی میزبان اصلی و طبیعی آن در ایران (۶) وجود گیاهان عدس آلوده در مزرعه به عنوان منبع آلودگی ویروسی می توانند تحدیدی برای سایر بقولات زراعی در منطقه باشد.

جدول-۱ .نتایج آزمون تلقیح مکانیکی و بررسی گیاهان محک و میزبان ویروس PSbMV در شرایط گلخانه

گیاه میزبان **Indicator /Host rang**		علائم موضعی **Local symptoms**	علائم سیستمیک **Systemic symptoms**
- *Chenopodium amaranticolor*	سلمه تره	لکه های خفیف کلروتیک	-
- *Vicia faba*,	باقلا	-	موزائیک سبز-حالت خفیف قاشقی شدن، زردی بین رگبرگ
- *Pisum sativum*,	نخود فرنگی	-	-
- *Cicer arietinum*	نخود	-	سر خشکیدگی و زردی
Vigna unguicolata	لوبیا چشم بلبلی	-	-
Vigna radiata	ماش	-	-
- *Lens culinaris*	عدس	-	زردی
- *Vicia narbonensis*	ماشک برگ پهن	-	موزائیک سبز زردی
- *Lathyrus sativus*	خلر	-	موزائیک سبز زردی
- *Phaseolus vulgaris*	لوبیا چیتی	-	قرمزی رگبرگ ها

منابع:

۱- شهرآیین نوح ، آزاد بخت نادر ، یونسی حسن (۱۳۹۰). گزارشی از بیماریهای ویروسی حبوبات در ایران و بررسی روش های کنترل. چکیده مقالات چهارمین همایش ملی حبوبات در ایران - ۱۹ و ۲۰ بهمن ماه ۱۳۹۰- مرکز تحقیقات کشاورزی اراک-ایران.

2- Ali , A and Randles, J. W.(1998). An evaluation of the effects of infection with two pathotypes of *pea seed-borne mosaic virus* on the morphology and yield of pea. Australas. Plant Pathol. 27:226-233.

3- Anonymous (2013). Temprate pulse viruses: *Pea seed borne mosaic virus* (PSbMV). AgNote Australia, Note number, AG1267, Rev-2013.

4- Bos, L., Hampton, R., and Makkouk, K. (1988). Viruses and virus diseases of pea, lentil, faba bean and chickpea. World crops: Cool season food legumes, Spriner, pp.591-615.

5- Chen, W.,Sharma,H.C.,and Muehlbaur,F.J (2011). Compendium of chickpea and lentil diseases and pests. American Phytopathological Society-APS, Part – 1 , Diseases caused by viruses.

6- Esfandiari N, Kohi-habibi M and Mosahebi G (2006). Occurrence of viruses infecting pea in Iran. Commun. Agric. Appl.Bio Sci. 71 (3ptB):281-7

7- Heydari F , Shahraeen N , Maleki M (2013). Serological and molecular detection of two viruses from bromoviridae family infecting chickpea plant. The 8TH biotechnology symposium and fourth national biosecurity symposium of IR of Iran,6-8 July ,Tehran, Iran

8- Makkouk, K. M., M. Bashir, R.A.C. Jones and S.G. Kumari. (2001). Survey for viruses in lentil and chickpea crops in Pakistan. Journal of Plant Diseases and Protection 108:258-268.

9- Makkouk, KM., Kumari, S.G., Shahraeen, N., Fazali, Y., Farzadfar, S., Ghotbi, T., Reza, Mansouri, A. (2003). Identification and seasonal variation of viral disease of chickpea and lentil in Iran. Journal of Plant Disease and Protection 110 (2): 157-169.

10- Makkouk, KM, Fazlali Y, Kumari SG, Farzadfar S (2002) . First record of *Beet western yellows, Chickpea chlorotic dwarf, Faba bean necrotic yellow and Soybean dwarf viruses* affecting chickpea and lentil crops in Iran. P1 Path 51:387.

11- Shahraeen, N., Azadbakhat, N., Yunesi, H. (2012). Reports of viral diseases of cool season legumes in Iran and control managements strategies. In abstracts of the 4th Iranian Pulses crop symposium,8-9 Feb.2012,Arak, Iran.

12- Torrance, L. and Jones, R. A. C. (1981). Recent developments in serological methods suited for use in routine testing for plant viruses. Plant Pathology, 30: 1-24.

13- Vafaei S.H.,Azadbakht N.,Shahraeen N,and Haji M.(2008).Survey for virus diseases of chickpea and lentil in province of Lorestan.18th Iranian Plant Protection Congress,24-27 Aug. Hamadan, Iran.

نگاهی به وضعیت بیماری زنگ سیاه گندم و دودمان جدید Ug99 درایران

احسان فاطمی[1*] و رضا مستوفی‌زاده قلمفرسا[2]
[1،2]دانشجوی دکتری و استاد بیماری‌شناسی گیاهی، بخش گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز
* نویسنده مسئول: *esn.fatemi@yahoo.*

چکیده

گندم یکی از مهمترین غلاتی است که در تأمین غذای بسیاری از مردم دنیا نقش حیاتی دارد. در ایران هم گندم عمده‌ترین محصول زراعی کشور است و آفات و بیماری‌های آن علاوه بر خسارت‌های اقتصادی، تهدید کننده امنیت غذایی مردم نیز هستند. قارچ‌های ایجاد کننده‌ی زنگ در گندم از مهمترین عوامل بیماری‌زای این گیاه هستند. در اثر تولید مثل جنسی، نوترکیبی و ایجاد ترکیب‌های ژنتیکی جدید، مدام نژادهای جدیدی از این قارچ‌ها ظهور می‌کند که با غلبه بر مقاومت میزبان در سطح گسترده‌ای از مزارع گندم همه‌گیر می‌شوند. دودمان جدید زنگ سیاه (یا زنگ ساقه) گندم، موسوم به Ug99 که اولین بار در ۱۹۹۹ در اوگاندا شناسایی شد قدرت بیماری‌زایی در برابر بسیاری از ژن‌های مقاوم را داراست و تهدیدی برای بیش از ۹۰ درصد تولید گندم دنیا به شمار می‌رود. در ایران اگرچه وجود بیماری در سال ۲۰۰۸ تأیید شد و شواهدی از ورود آن به کشور پیش از آن تاریخ در دست است، اما خوشبختانه بیماری تثبیت نشد و گزارشی از گسترش آن در ایران ارائه نشده است. محتمل‌ترین راه ورود عامل بیماری‌زا به کشور جریان باد و جبهه‌های آب و هوایی است، لذا در این مقاله به بررسی جریان‌های عمده هوایی در سال‌های مقارن با شناسایی نژادهای این دودمان در ایران و همچنین عوامل مؤثر در همه‌گیر نشدن بیماری، پرداخته شده است. در انتها راه‌کارهایی برای مدیریت این بیماری پیشنهاد گردیده است.

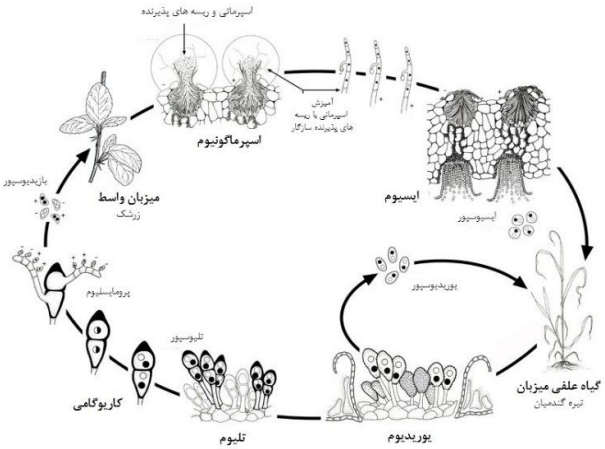
واژگان کلیدی: *Puccinia graminis*، *Triticum aestivum*، همه‌گیری‌شناسی

مقدمه

غلات دربسیاری ازکشورهای آسیایی و آفریقایی بیش از ۸۰ درصد غذای مردم را تأمین می‌کنند. دراروپا این سهم ۴۵ تا ۵۵ درصد و درآمریکا ۲۰ تا ۳۰ درصد است. گندم از استوا تا عرض‌های جغرافیایی ۶۰ درجه‌ی شمالی و ۴۴ درجه‌ی جنوبی کشت می‌شود. سالانه حدود ۶۳۰ میلیون تن گندم تولید می‌شود که تقریباً نیمی از آن تولید کشورهای درحال توسعه است (۱۰). در طول تاریخ همواره زنگ ساقه ناشی از *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* Erikss. & Henning 1894 تهدیدی جدی برای گندم بوده و خسارت‌های شدیدی وارد کرده است (شکل ۱). به عنوان یک مثال متأخر می‌توان به همه‌گیری زنگ ساقه در اتیوپی در سال ۱۹۹۳ اشاره نمود که تولید گندم این کشور را دچار خسارت شدیدی کرد (۱۴).

قارچ عامل این بیماری جزء زنگ‌های بلندچرخه است (شکل ۲) و دارای میزبان واسط و درنتیجه سازوکار نوترکیبی جنسی است. این سازوکار باعث می‌شود که تولید دودمان‌های جدید به مراتب بیش‌تر شود (۱).

شکل ۱- از راست به چپ: گندم مبتلا به زنگ سیاه (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*) (۶)، تلیوسپور (۶) و یوریدیوسپور (۶) قارچ مولد بیماری

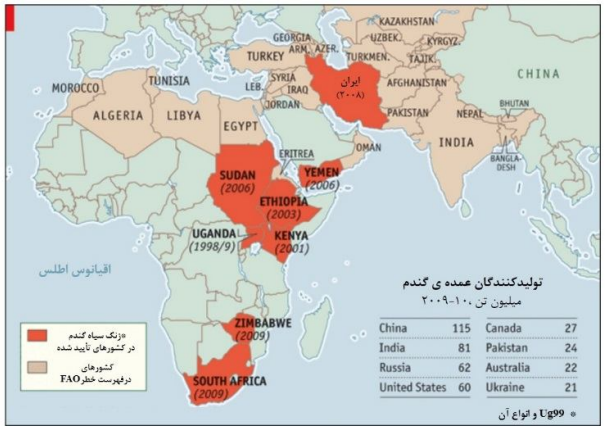


شکل ۲- چرخه‌ی زندگی قارچ *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* عامل بیماری زنگ ساقه (۶).

بر خلاف سایر بیماری‌های غلات که اقدامات هماهنگ بین‌المللی برای رصد وضعیت تحولات ژنتیکی و انتشار عوامل بیماری‌زا انجام نشده، در مورد زنگ‌های گندم از سال ۱۹۸۳ وضعیت کلی و تاریخچه‌ی زنگ‌های گندم با ادبیات مشترکی برای کل دنیا مدون شده است (۸). به دلیل چنین اقدامات و هماهنگی‌های بین‌المللی در اکثر نقاط جهان برای بیش ازسه دهه، ارقام گندم از این بیماری در امان بوده‌اند. وجود اطلاعات جامع در زمینه‌ی وضعیت زنگ‌های گندم و رصد تحولات ژنتیکی این بیماری، ظهور دودمان (lineage) Ug99 زنگ سیاه، که توان بیماری‌زایی بر روی ارقام مقاوم به زنگ سیاه را داشت، در مدت کوتاهی زنگ خطر را برای دنیا به صدا درآورد (۸). بر اساس گزارش سازمان خوار و بار جهانی اگر این دودمان به مناطق تولید عمده گندم برسد، تولید جهانی گندم به طور مستقیم تا ۳۷ درصد در خطر کاهش قرار می‌گیرد (۱). تاکنون هشت نژاد (race) از دودمان Ug99 شناسایی شده است که رابطه‌ی نزدیکی با هم دارند. ساختارهای ژنتیکی تقریباً مشابه و تفاوت کمی در نوع و شدت بیماری‌زایی این نژادها وجود دارد (۱۱).

شروع همه‌گیری عفونت شدید Ug99 درسال ۱۹۹۸ از اوگاندا بود (۱۴). در همان سال بود که پرآزاری آن روی رقم Sr13 گندم مشخص و نام‌گذاری شد (۱۲). گزارش‌ها حاکی از این بود که بیمارگر به سرعت در آفریقا درحال تغییر و گسترش است. در عرض ۱۰ سال این دودمان جدید سرتاسر شرق آفریقا را آلوده نمود و به آفریقای جنوبی (در جنوب قاره) هم سرایت کرد (۱۴). خسارت ناشی از این بیماری در بسیاری از مزارع کنیا تا ۱۰۰ درصد محصول بوده است (۱). فرایند دقیق انتقال بیماری بین شرق و جنوب آفریقا مشخص نشده است، اما دو امکان برای آن وجود دارد. سازوکار اول و محتمل‌تر عبارت است از انتشار عامل بیماری با جریان‌های هوا و سازوکار دوم انتقال تصادفی به واسطه‌ی انسان است. به دلیل تجارت گسترده و

ارتباط مسافرتی بین کنیا (در شرق آفریقا) و آفریقای جنوبی این روش انتقال بیماری هم محتمل است. حضور انواع Ug99 درجنوب آفریقا دارای پیامدهای بالقوه برای دیگر مناطق گندم‌خیز است، که اهمیت موضوع را دوچندان می‌کند. نگرانی اصلی از این است که این منطقه به عنوان یک منبع، قابلیت ایجاد نژادهای پرآزارتر را داشته باشد و امکان حرکت نژادهای موجود را به سمت استرالیا، آمریکا و سایر نقاط فراهم کند (۱۳). در شکل ۳ وضعیت شناسایی بیماری در نقاط مختلف دنیا و مناطق بالقوه انتشار بیماری نشان داده شده است.



شکل ۳- پراکندگی بیماری زنگ سیاه Ug99 تا پایان سال ۲۰۱۰ (۱۴).

حضور Ug99 در ایران

در بررسی‌هایی که درسال ۲۰۰۷ صورت گرفت، دودمان Ug99 زنگ سیاه در سودان و یمن دیده شد (۱۳). حضور این دودمان در یمن مبین آن بود که Ug99 درحال حرکت به مناطق مهم گندم‌خیز خاورمیانه و آسیا است. پس از آن در سال ۲۰۰۸ وجود این دودمان در ایران توسط سازمان خواروبار و کشاورزی ملل متحد (فائو) تأیید شد (۱۴). نمونه‌هایی که جواب مثبت حضورUg99 را در ایران دادند در واقع در سال ۲۰۰۷ از دو منطقه‌ی بروجرد و همدان جمع‌آوری شده بودند. بنابراین بیماری در سال ۲۰۰۷ در ایران حضور داشته است (۱). تنها نژادی از Ug99 که تا کنون از آفریقا خارج شده TTKSK است. این همان نژادی است که از این دودمان در ایران وجود دارد، اما انتظار می‌رود به مرور انواع دیگر هم به خارج از آفریقا منتشر شوند (۱۴).

چگونگی ورود عامل بیماری‌زا به ایران

ابتدا باید به این نکته توجه شود که بارش‌های شدید جنوب و غرب ایران فقط تحت تأثیر سامانه‌های مدیترانه‌ای نیست، بلکه از دو مرکز کم‌فشار سودان و منطقه‌ی همگرایی دریای سرخ هم متأثر می‌شود. مرکز کم‌فشار سودانی در شمال آفریقا تشکیل می‌شود. هر چقدر چرخنده‌های ایجاد شده توسط این کم‌فشار به عرض‌های ۳۰ درجه نزدیک‌تر شود، بیش‌تر در مسیر بادهای غربی قرار می‌گیرد و هرگاه سامانه‌های کم‌فشار سودانی و مدیترانه‌ای با هم مرتبط شوند مرکزکم‌فشاری درشرق مدیترانه به وجود می‌آید که موجب بارش‌های سنگین در اغلب نقاط ایران می‌شود. این جریان هوایی به عنوان یک راه احتمالی ورود بیمارگر به ایران درنظر گرفته می‌شود (۱۴).

به دنبال خشک‌سالی های سال ۲۰۰۸ موردی از بیماری زنگ سیاه در کشور گزارش نشد تا این‌که در سال ۲۰۰۹ بیماری از استان خوزستان گزارش شد. با توجه به خشک‌سالی‌ها و ضعف جریان‌های هوایی غرب کشور، احتمالاً این مورد جدید ناشی از ورود جریان‌های هوایی از یمن بوده است. این فرض بنا به دلایل زیر قابل قبول به نظر می‌رسد: معمولاً جریان‌های هوایی از یمن به سمت اردن و فلسطین اشغالی هستند اما درسال‌های ۲۰۰۹ و ۲۰۱۰ مدل‌های هوایی نشان

دهنده‌ی انحراف اندک جریان‌های هوایی از شمال‌غربی یمن به سمت شمال این کشور (به طرف ایران) بودند (۱۴). در این سال‌ها جریان‌های هوایی از یمن به طور منظم به سمت جنوب ایران درحرکت بودند. جالب اینکه درسال ۲۰۱۰ در فلسطین اشغالی و لبنان زنگ ساقه گزارش شد اما مشخص نشدکه Ug99 بوده است یا خیر (۱۴). البته این احتمال هم وجود دارد که درسال ۲۰۰۷ Ug99 درخوزستان وجود داشته اما تشخیص داده نشده است.

خروجی داده‌ها و مدل مسیر حرکت Ug99 که وجود بیمارگر را در لرستان و همدان تأیید کرده، این فرض را تقویت می‌کند که همانطور که انتظار می‌رفت این دودمان به سمت شرق در حال گسترش است. بنابراین ایران به عنوان دروازه‌ی ورود بیمارگر به سمت افغانستان، پاکستان، قفقاز و آسیای میانه عمل خواهد کرد. این پیش‌بینی‌ها باعث شد گزارشی از وقوع زنگ ساقه در پاکستان در سال ۲۰۰۹ باعث وحشت از همه‌گیری Ug99 در این کشور شود، اما خوشبختانه با بررسی‌ها و واکاوی دی‌اِن‌اِی قارچ بیماری‌زا مشخص شد که از دودمان Ug99 نیست (۱۴). بنابراین وضعیت فعلی بیمارگر با الگوهای پیش‌بینی شده تطابقی ندارند، اما نمی‌توان به دوام این وضعیت خوشبین ماند. آن‌چه که در این مرحله می‌توان گفت این است که این بیمارگر در ایران تثبیت نشده و خسارت قابل توجهی از ناحیه آن متوجه محصول گندم کشور نشده و نشانه‌ای از گسترش شدن این دودمان به مناطق فراتر از ایران هم مشاهده نشده است

علل احتمالی عدم استقرار و همه‌گیر نشدن Ug99 در ایران

با توجه به فقدان مطالعات در این زمینه، تنها با در نظر گرفتن کلیه‌ی احتمالات و اتخاذ رویکردی منطقی در بررسی علل مختلف توقف این دودمان در ایران، می‌توان محتمل‌ترین موانع استقرار Ug99 را در ایران شناسایی کرد. اگر به صورت کلاسیک وضعیت Ug99 را در ایران بررسی کنیم، باید گفت که اجزاء مثلث بیماری زنگ سیاه، بیمارگر (نژادهای جدید دودمان Ug99)، میزبان حساس و شرایط محیطی مساعد است. این بیمارگر به شدت پرآزار است به نحوی که اکثر ارقام مقاوم به سایر نژادهای پرآزار زنگ گندم به Ug99 حساس‌اند. در زمینه‌ی میزبان حساس به این نکته بسنده می‌کنیم که طی تحقیقی بر روی ۲۰۰ هزار رقم گندم مورد استفاده در ۲۲ کشور آفریقایی و آسیایی تنها پنج تا ده درصد از آن‌ها از مقاومت کافی در برابر Ug99 برخوردار بودند (۱۴). در نهایت شرایط محیطی مساعد برای یک بیمارگر پرآزار عمدتاً مشابه شرایط محیطی مساعد برای رشد میزبان است. علاوه بر این، حضور یا عدم حضور سایر میکروارگانیسم‌های رقیب و یا مضر برای رشد بیمارگر می‌تواند در میزان مساعد بودن شرایط محیطی برای بیمارگر نقش داشته باشد (۴). در ادامه محتمل‌ترین دلایل همه‌گیر نشدن Ug99 در ایران بررسی می‌شوند.

این احتمال وجود دارد که بیمارگر در زمان نامناسبی وارد شده و به علت شرایط نامساعد محیطی قادر به استقرار نبوده است و یا این‌که طی سال‌های پس از ورود، شرایط محیطی برای همه‌گیر شدن آن مناسب نبوده است. طبق آمار رسمی در سال‌های مقارن با شناسایی Ug99 در ایران (۲۰۰۸ و بعد از آن) خشک‌سالی بوده و این خشک‌سالی در کنار سایر عوامل باعث کاهش چشم‌گیر تولید گندم ایران شده که ممکن است برای عامل بیماری‌زای Ug99 هم شرایط نامساعدی را ایجاد کرده باشد (۹).

از طرفی در ایران کنترل خاصی بر روی ارقام کشت گندم نیست و طبعاً آمار روشنی هم در این زمینه وجود ندارد. ممکن است تصادفاً در سال ورود بیماری به کشور ارقامی از گندم کاشته شده باشند که به این دودمان مقاوم بوده‌اند. با وجود بررسی‌های به عمل آمده، هیچ‌گونه آماری در مورد کشت ارقام گندم در زمان ورود بیمارگر به دست نیامد.

نوع خاصی از رقابت بین بیمارگرهای مختلف را می‌توان با پدیده برازش توصیف کرد. بدین معنی که یک بیمارگر در یک منطقه بسیار پرآزار عمل می‌کند اما در منطقه‌ای دیگر قدرت رقابتی با سایر بیمارگرها را ندارد. مثلاً در آفریقا تلاش‌ها برای مقابله با زنگ سیاه منجر به ایجاد و گسترش کاشت ارقام مقاوم و پرمحصول در سطح وسیعی بوده است (۱۴). فشار ناشی از کاشت این ارقام محبوب بر عامل بیماری‌زای زنگ ساقه باعث شده که دودمان پرآزار Ug99 ایجاد شود، اما همین دودمان در

منطقه دیگری، مثلاً در ایران که به دلیل فقدان کنترل بر کاشت ارقام، جایگزینی ارقام زیاد است، احتمالاً قدرت رقابت با سایر زنگ‌ها را نداشته است.

آینده‌ی Ug99 در ایران

همان‌طور که به قطعیت نمی‌توان دلیلی برای همه‌گیر نشدن دودمان Ug99 زنگ ساقه در ایران بیان کرد و تنها محتمل‌ترین گزینه‌ها بر اساس شواهد و قراین بیان شدند، در زمینه آینده‌ی این بیماری در ایران هم با استناد به تاریخچه و الگوی انتشار بیمارگرهای مشابه، تنها می‌توان به احتمال همه‌گیر شدن Ug99 در آینده اشاره کرد. چه بسا که هم‌اکنون دودمان Ug99 روی میزبان‌های وحشی به صورت مخفی وجود داشته باشد و در آینده با یافتن میزبان یا شرایط مناسب در کشور استقرار یابد. چنانچه پیش‌تر گفته شد تغییرات سریع در ژنتیک زنگ ساقه و قابلیت ایجاد نژادهای پرآزارتر هم تهدید بالقوه دیگری است که با بازبینی دائم تحولات ژنتیکی و نحوه‌ی مهاجرت نژادهای مختلف زنگ می‌توان احتمال کشف به موقع و مقابله از طریق تولید ارقام مقاوم گندم را افزایش داد.

ایران به دلیل دارا بودن گنجینه‌ی متنوعی از گیاه *Aegilops tauschi*، قابلیت بسیار بالایی در ایجاد ارقام مقاوم دارد (۵). این گیاهی است که به دلیل اشتراکات ژنتیک با گندم، پیش از این کمک زیادی به تولید ارقام گندم مقاوم کرده است. محققین ژنتیک مؤسسه‌ی سیمیت (CIMIT) در زمینه‌ی تولید ارقام گندم مقاوم به زنگ نواری (زنگ زرد) و زنگ برگ (زنگ قهوه‌ای) برای نخستین بار از گروه ژن‌های کاهنده‌ی سرعت ابتلا به زنگ *APR* (Adult Plant Resistance) استفاده کرده‌اند. این ژن‌ها باعث تولید ارقامی با مقاومت طولانی مدت شده است (۳). این موفقیت مرهون رفتار کاملاً متفاوت این دسته از ژن‌های مقاوم با سایر ژن‌هایی است که پیش از این برای تولید ارقام مقاوم استفاده می‌شدند. انتظار می‌رود رویه‌ی مشابهی در زمینه تولید ارقام مقاوم به Ug99 اتخاذ شود. در پژوهشی که بر روی ۲۰۰ گونه *A. tauschi* برای شناسایی ژن‌های گروه *APR* مقاوم به زنگ ساقه انجام شد، بیش‌تر گونه‌های حاوی ژن‌های مناسب، از منطقه جنوب دریای خزر بودند. هنگام تحقیق برای شناسایی ژن‌های *APR* مقاوم به زنگ برگ هم موارد مشابهی گزارش شده‌اند. بنابراین ایران منبع بسیار با ارزشی از ژن‌های کمتر شناخته شده *APR* دارد که برای تولید ارقام گندم دارای مقاومت طولانی به Ug99 نقش محوری دارند (۵).

مبارزه با Ug99

دو دسته راه‌کار برای مبارزه با زنگ ساقه Ug99 باید ارائه شود؛ الف) روش‌هایی برای جلوگیری از همه‌گیری این بیماری در مزارع کشور. این دسته عمدتاً شامل تولید ارقام مقاوم، تعریف راه‌بردهای ملی برای تکثیر، توزیع و اجبار به کاشت این ارقام در مناطق با خطر بالای همه‌گیری زنگ سیاه، بازبینی دائمی وضعیت مهاجرت زنگ‌ها و تحولات ژنتیکی آن‌ها است (۷). ب) روش‌هایی برای مبارزه با زنگ سیاه Ug99 در صورت همه‌گیر شدن. این دسته شامل روش‌های مبارزه شیمیایی و زیستی است (۲).

تجربه نشان داده در شرایط همه‌گیری، در بیش‌تر مناطق آفریقا و آسیا کشاورزان از عهده‌ی هزینه‌های مبارزه شیمیایی برنمی‌آیند (۱۳). بنابراین بهترین راه‌برد برای کاهش تهدید Ug99 شناسایی یا تولید ارقام مقاوم است. مطالعات شبیه‌سازی نشان داده که با کاهش سطح زیر کشت گونه‌های حساس در مناطق با خطر همه‌گیری از فشار عامل بیماری‌زا کاسته شده و خطر انتقال به مناطق و کشورهای مجاور هم کاهش چشمگیری می‌یابد (۱۳). نظارت و بازبینی کردن تحولات ژنتیکی و شواهد مهاجرت Ug99 بنا به دلایل زیادی از اهمیت فوق‌العاده‌ای برخوردار است: هاگ‌های این قارچ می‌توانند مسافت‌های زیادی را با جریان باد طی کند. بسیاری از ارقام گندم در حال کشت نسبت به این عامل بیماری‌زا به شدت آسیب‌پذیرند (۱۷). همچنین عمده ارقام مقاوم موجود، حاوی ژن‌های مقاوم وابسته به نژادند و دوره‌ی زندگی کوتاهی دارند. از طرفی ارقام مشابهی در کشورهای مختلف کاشته می‌شوند (۱۵). از سوی دیگر حضور ژن‌های مشابه در ارقام گندم مقاوم در کشورهای

مختلف به آن‌ها کمک کرده تا در مقابل زنگ ساقه مقاوم باشند. به طور مثال در یک تحقیق مشخص شد ۶۰ رقم مختلف مقاوم به زنگ زرد که در نقاط مختلف دنیا با اسامی مختلف شناسایی شده‌اند همگی دارای ژن مقاوم *YR29* هستند (۱۷).

نگرانی‌ها از Ug99 فقط از بابت پرآزار بودن و حرکت مرحله به مرحله‌اش به سمت شمال آفریقا و خاورمیانه نیست. در کنیا نژادهای جدید این قارچ در برابر ژن‌های مقاوم *Sr24* و *Sr36* قدرت بیماری‌زایی کسب کرده‌اند (۸). این دو ژن پیش از این در مقیاس وسیعی برای تولید ارقام مقاوم استفاده می‌شدند و با تحولات اخیر، دست محققین در تولید ارقام مقاوم بسته‌تر شده است. با توجه به تغییرات شدید در ژنتیک زنگ ساقه و ایجاد نژادهای جدید پرآزار، اثرنگاری دی‌اِن‌اِی بیمارگر برای بررسی و پیش‌بینی تحولات آن‌ها بسیار ضروری است. به همین دلیل یک آزمایشگاه تخصصی مرجع زنگ غلات در دانمارک تأسیس شده است (۱۷).

همکاری‌های بین‌المللی

مبارزه با زنگ گندم و به ویژه دودمان پرآزار Ug99 را نمی‌توان محدود به داخل کشور نمود. به دلایل مختلفی که در ادامه به برخی از آنها اشاره می‌شود باید با مؤسسه‌های بین‌المللی همکاری نزدیکی داشت. نخست این که همه‌ی کشورها لزوماً زیرساخت‌های لازم برای شناسایی یا تولید ارقام مقاوم را در اختیار ندارند. با کاهش فشار بیمارگر در کشورهای مبدأ احتمال انتشار آن به سایر نقاط و کشور ما هم کاهش می‌یابد (۱۷). موانع سیاسی گاهی مانع همکاری محققین کشورهای در معرض خطر همه‌گیری می‌باشد اما از طریق سازمان‌های بین‌المللی غیرسیاسی نظیر سیمیت امکان همکاری بین این کشورها فراهم می‌شود. از طرفی لازم است ارقام مقاوم تولید شده در مناطق دیگر که در گذشته به عنوان مبادی گسترش و انتشار بیماری به کشور عمل کرده‌اند، مورد آزمایش قرارگیرند تا رفتار واقعی آن‌ها در محیط‌های با احتمال خطر بالای بیماری بررسی شود (۱۷).

ایران تاکنون در قالب همکاری‌های بین‌المللی در زمینه مبارزه با زنگ غلات و به طور خاص Ug99 فعالیت‌های قابل توجهی داشته است. بنا به درخواست سازمان خواربار و کشاورزی ملل متحد ظرفیت‌های تحقیقاتی کشور برای شناسایی و تولید ارقام مقاوم به Ug99 به کار گرفته شده و ارقام پارسی، سیوند، افق، ارگ، مروارید، سیستان و چند رقم دیگر به عنوان ارقام مقاوم و نیمه‌مقاوم شناسایی و معرفی شدند (۱). در راستای بازبینی تحولات زنگ غلات، شبکه‌ی ساوانا (CWANA) در سال ۱۹۸۰ تأسیس شد و ایران از اواسط دهه ۱۹۹۰ به عضویت این شبکه درآمده است (۱۶). همچنین با همکاری سازمان خواربار و کشاورزی ملل متحد چندین کارگاه آموزشی در زمینه ارتقاء کیفیت گندم در سطح کشور برگزار شده است (۱۶).

نتیجه‌گیری

ایران یکی از تولیدکنندگان گندم است اما مصرف گندم داخلی ایران حتی از تولیدات آن بیش‌تر است و هر عامل تهدید کننده تولید گندم، مستقیماً امنیت غذایی کشور را با مخاطره مواجه می‌کند. زنگ سیاه دودمان Ug99 بسیار پرآزار است و اگرچه در کشور ما مستقر و همه‌گیر نشده، در آینده امکان همه‌گیری و انتشار آن از طریق ایران همواره وجود دارد. پژوهش در زمینه‌ی روش‌های کنترل و همچنین عوامل محیطی محدود کننده‌ی این بیماری اگرچه در دراز مدت مفید خواهد بود اما با توجه به تهدید جدی این بیمارگر و اهمیت فوق‌العاده‌ی تولید گندم در ایران تنها راه‌برد کوتاه مدت، شناسایی و تولید ارقام مقاوم خواهد بود. شناسایی و تولید ارقام مقاوم، نظارت بر تحولات ژنتیکی بیمارگر و بررسی وضعیت انتشار بیماری، همکاری نزدیک با نهادهای بین‌المللی فعال در این زمینه‌ها را طلب می‌کند. همچنین با توجه به وجود بستر غنی از نمونه‌های مفید در تحقیقات ژنتیکی مرتبط با تولید ارقام مقاوم گندم و همچنین عوامل محیطی احتمالی که مانع همه‌گیر شدن این بیماری در کشور شده، زمینه‌های تحقیقاتی فراوانی در ایران وجود دارد که باید پروژه‌های تحقیقاتی در این زمینه‌ها تعریف شود. ارتباط دو سویه بین محیط‌های آکادمیک و پژوهش‌گران با کشاورزان و سازمان‌های دولتی متولی امر کشاورزی هم بسیار ضروری

است. لازم است بانک‌های اطلاعاتی از ارقام کشت شده، سموم استفاده شده و مانند آن ایجاد گردد و به ویژه ابزارهـای قـانونی برای نظارت و کنترل ارقام کشت شده ایجاد شود. همچنین باید نتایج پژوهش‌ها کاربردی و به نحو مناسبی عملیاتی شوند.

منابع

۱. افشاری، ف. ۱۳۹۱. ژنتیک بیماری‌زایی عامل بیماری زنگ سیاه گندم *Puccinia graminis* و واکنش ژنوتیپ‌های گنـدم نسـبت بـه بیماری. دانش گیاه‌پزشکی ایران ۴۳(۲): ۳۵۷-۳۶۵.

۲. دوگونچی، ع. و کمکی، الف. م. ۱۳۹۰. مدیریت پایدار مقاومت گندم در برابر بیماری‌زایی نژاد جدید زنگ ساقه گندم. همایش منطقه-ای دانش محوری در مدیریت پایدار کشاورزی و منابع طبیعی. دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگـان. گرگـان، ایـران. آنلایـن: http://www.civilica.com/Paper-RCKMSANR01-RCKMSANR01_084.htm.

3. Bariana, H. S. 2008. Stem rust resistance in wheat – The Australian experience. *Proceedings of International Conference on Wheat Stem Rust Ug99 – A Threat to Food Security*. New Delhi, India: 23-25.

4. Gordon, T. C. 2011. Overwintering Survival of Stem Rust on Perennial Ryegrass: Construction of a Simulation Model and Effects of the Mycoparasite *Sphaerellopisis filum*. *Master of Science Thesis, Oregon State University*. *Oregon, USA*. 123 pp.

5. Lagudah, E. 2008. Gene discovery diversity and molecular markers for stem rust resistance in wheat. *Proceedings of International Conference on Wheat Stem Rust Ug99 – A Threat to Food Security*. New Delhi, India: 39-42.

6. Leonard, K. J. 2001. Black stem rust biology and threat to wheat growers. *A Presentation to the Central Plant Board Meeting*. Lexington, KY. Online: http://www.ars.usda.gov/

7. Osborn, T. 2008. Seed production of UG 99 resistant varieties. *Proceedings of International Conference on Wheat Stem Rust Ug99 – A Threat to Food Security*. New Delhi, India: 48-53.

8. Pretorius, Z. A. and Park, R. F. 20008. Origin evolution distribution and virulence of Ug99 and the global stem rust monitoring system. *Proceedings of International Conference on Wheat Stem Rust Ug99 – A Threat to Food Security*. New Delhi, India: 85-88.

9. Shiao, J. T. and Modarres, R. 2009. Copula-based drought severity-duration-frequency analysis in Iran. *Meteorological Applications* 16: 481-489.

10. Singh, A. J. and Byerlee, D. 1990, Relative Variability in Wheat Yields across Countries and over Time. *Journal of Agricultural Economics*. 41: 21-23.

11. Singh, R. P., Hodson, D. P., Jin, Y., Huerta-Espino, J., Kinyua, M. G., Wanyera, R., Njau, P. and Ward, R. W. 2006. Current status likely migration and strategies to mitigate the threat to wheat production from race Ug99 (TTKS) of stem rust pathogen. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and natural resources* 54: 1-13.

12. Singh, R. P., Hodson, D. P., Huerta-Espino, J., Jin, Y., Njau, P., Wanyera, R., Herrera-Foessel, S. and Ward, R. W. 2008a. Will stem rust destroy the world's wheat crop? *Advances in Agronomy* 98: 272-309.

13. Singh, R. P., Hodson, D. P., Jin, Y., Njau, P., Wanyera, R., Foessel, H., Bhavani, S., Singh, D. and Singh, P. K. 2008b. Global status of Ug99 spread and efforts to mitigate the threat. *International Conference on Wheat Stem Rust Ug99 – A Threat to Food Security*. New Delhi, India: 1-11.

14. Singh, R. P., Hodson, D. P., Espino, J. H., Jin, Y., Bhavani, S., Najua, P., Foessel, S. H., Singh, P. K., Singh, S. and Govindan, V. 2011. The emergence of Ug99 races of the stem rust fungus is a threat to world wheat production. *Annual Review of Phytopathology* 49: 465-481.

15. Wanyera, R. 2008. Status and impact of TTKS (UG99) in Kenya. *Proceedings of International Conference on Wheat Stem Rust Ug99 – A Threat to Food Security*. New Delhi, India: 12-14.

16. Yahyaoui, A., Bishaw, Z. and Kosina, P. 2008a. Training, human resource development and setting up regional laboratories for detection of variance. *Proceedings of International Conference on Wheat Stem Rust Ug99 – A Threat to Food Security*. New Delhi, India: 74-79.

17. Yahyaoui, A., Nazari, K., Hodson, D., Cressman, K., Khoury, W. and Abdalla, O. 2008b. Disease surveillance concepts, practices including GIS imagery and tracking. *Proceedings of International Conference on Wheat Stem Rust Ug99 – A Threat to Food Security*. New Delhi, India: 15-22.

تعیین پنجره زمانی میزبانی برای بیماری لکه طاووسی زیتون در شهرستان طارم با استفاده از دستگاه‌های داده بردار[1]

شمس اله نجفی[۱و۲*]، حشمت اله امینیان[۱] و حسین جعفری[۲]

۱- *گروه حشره شناسی و بیماری‌های گیاهی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران*

۲- *مرکز تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی و منابع طبیعی زنجان*

* *نویسنده مسئول: Shnajafi@ut.ac.ir*

چکیده

بیماری لکه طاووسی زیتون بعنوان مهمترین بیماری شاخ و برگ زیتون در ایران و در سایر کشورهای زیتون-خیز جهان مطرح است. این بیماری عمدتا با ترکیبی از روش‌های بهداشت باغی، فعالیت‌های کشاورزی و نیز کاربرد قارچکش‌ها کنترل می‌شود. اطلاع از زمان صحیح استفاده از قارچکش‌ها برای کنترل موثر بیماری ضروری است. از طرف دیگر تصمیم در مورد نیاز به کاربرد قارچکش‌ها و تعیین زمان صحیح استفاده از آنها بر پایه اطلاعات جمع آوری شده از اپیدمیولوژی این بیماری، مدل‌سازی و بررسی‌های مزرعه‌ای ممکن می‌شود. در نبود سابقه مطالعات اپیدمیولوژیکی این بیماری در کشور، زیتون‌کاران کشور برای تعیین زمان سمپاشی باغات خود، تنها براساس توصیه‌های ترویجی عمل می‌کنند. حال آنکه بسیاری از باغات زیتون، بدلیل شرایط خاص منطقه‌ای و مدیریت مناسب، اصلا نیازی به استفاده از ترکیبات قارچکشی برای مدیریت این بیماری را در طول یکسال پیدا نمی‌کنند. در این تحقیق که به منظور ارزیابی کارایی آمار هواشناسی ثبت شده توسط ایستگاه‌های هواشناسی منطقه‌ای در پیش آگاهی بیماری لکه طاووسی زیتون انجام شد، مشخص گردید که آمار ایستگاه‌های هواشناسی مناطق، کارایی لازم برای پیش آگاهی اپیدمی این بیماری را ندارند و تعیین پنجره زمانی میزبانی[2] این بیماری در هر باغی، باید براساس داده‌های هواشناسی همان باغ انجام شود نه براساس آمار ایستگاه‌های هواشناسی منطقه‌ای. دستگاه‌های داده بردار، ساده‌ترین، کاراترین و دقیق‌ترین دستگاه‌ها برای این منظور در حال حاضر هستند. با کمک اطلاعات استخراجی از این دستگاه‌ها و با استفاده از اطلاعات موجود از اپیدمیولوژی بیماری لکه طاووسی زیتون، می‌توان زمان صحیح سمپاشی باغات زیتون را بطور دقیق مشخص نمود.

واژگان کلیدی: بیماری لکه طاووسی زیتون، پنجره زمانی میزبانی و داده بردار

مقدمه

زیتون (*Oleaeu ropaea*) مهمترین محصول باغبانی استان زنجان می‌باشد. باغات زیتون استان بطور کامل در شهرستان طارم قرار دارند و شهرستان طارم سال‌هاست که رتبه اول تولید زیتون کشور را به خود اختصاص داده است (۱) و در حال حاضر اقتصاد شهرستان با این محصول عجین شده است. بر اساس مطالعات چند سال اخیر، مهمترین بیماری شاخ و برگ درختان

[1] dataloggers
[2] Plant-host timing window

زیتون منطقه، بیماری لکه طاووسی[1] یا اسکب[2] زیتون است که به معضلی جدی برای باغات زیتون شهرستان تبدیل شده این بیماری، مهمترین بیماری برگی زیتون در سرتاسر جهان نیز می‌باشد (۳،۴،۵). هرچند برآورد دقیقی از سطح خسارت وارده توسط این بیماری در باغات زیتون صورت نگرفته است، اما حذف درختان زیتون در برخی از مناطق شهرستان طارم، تنها به دلیل خسارت همه ساله بیماری لکه چشم طاووسی زیتون، گواه سطح بالای خسارت و اهمیت این بیماری در منطقه است. عامل این بیماری، قارچ *Spilocaea oleagina* است. عنوان لکه طاووسی بخاطر فرم علائم تولیدی توسط قارچ عامل بیماری که تولید لکه‌های حلقه‌ای سبز تیره تا سیاه رنگی که هاله‌ای زردرنگ در سطح رویی برگ ایجاد می‌کند، اطلاق می‌شود (۳).

بیماری لکه برگی زیتون عمدتا با ترکیبی از روش‌های بهداشت باغی و فعالیت‌های کشاورزی و نیز کاربرد ترکیبات مسی کنترل می‌شود. زمان صحیح استفاده از ترکیبات مسی برای کنترل موثر ضروری است (۷). تصمیم در مورد نیاز به کاربرد قارچکش‌ها در برنامه مدیریت تلفیقی آفات زیتون بطورکل برپایه میزان اطلاعات جمع آوری شده از سطوح اینوکلوم موجود در سطح باغ می‌باشد، که با ردیابی[3]، مدل‌سازی[4] و مطالعات مزرعه‌ای[5] مشخص می‌شود (۲).

بخاطر اینکه شرایط آب و هوای مدیترانه‌ای با تابستان‌های گرم، خشک و طولانی و زمستان‌های مرطوب و نسبتا سرد مشخص می‌شود، تابستان‌ها برای قارچهای هوازاد زیتون در این منطقه مطلوب نمی‌باشد. محققین متعددی بیان داشته‌اند که *S. oleagina* به فرم میسلیوم در برگ‌های آلوده که بر روی شاخ و برگ درختان باقی مانده‌اند تابستانگذرانی می‌کند و در پاییز، میسلیوم‌ها مجددا از آلودگی‌های خفته که در اواخر بهار بر روی برگ‌های زیتون موجود در تاج درخت ایجاد شده‌اند رشد می‌کنند و کنیدی‌های جدید تولید می‌شوند که با بارش باران پخش می‌شوند و ازدیاد می‌یابند (۳،۴،۸).

چون برگ‌های بالغ زیتون یک مقاومت دوران بلوغ[6]نسبت به آلودگی در مقابل قارچ *S. oleagina*دارند، دوره‌های آلودگی اصلی در طول دوره رشد برگ اتفاق می‌افتد. در نیمکره شمالی، دوره رشد برگ زیتون عموماً از اواسط اسفند ماه تا اواخر تیر ماه ادامه پیدا می‌کند؛ یک رشد دوم و البته کم اهمیت‌تر هم معمولاًاز اواسط شهریور ماه تا اواخر مهر ماه اتفاق می‌افتد؛ همزمان با بارش‌های زود هنگام پاییزی. شرایط آب و هوایی و حضور برگ‌های در حال توسعه در ابتدای بهار، معمولا برای آلودگی برگ‌ها در مناطق پرورش زیتون در جنوب اسپانیا مناسب است (۶،۸،۱۰). بنابراین، آلودگی برگ‌ها به مایه تلقیح[7]موجود (کنیدی‌ها) بستگی دارد. بر اساس نتایج مطالعات ویروگا و همکاران (۱۲)، دوره خطر اصلی در ابتدای بهار اتفاق می‌افتد، همزمان با حضور کنیدی‌های بیمارگر، شرایط آب و هوایی مطلوب بیمارگر (دمای بین ۱۵ تا ۲۰ درجه سانتی‌گراد و دوره رطوبتی بیش از ۲۴ ساعت) و وجود برگ‌های در حال رشد (۶،۱۰،۱۱).

هرچند در منابع مختلف جهان (با آب و هوای مدیترانه‌ای) آلودگی فصل بهار درختان زیتون به بیماری اسکب زیتون مهمتر از میزان آلودگی آنها در پاییز ذکر شده است، اما بر اساس بررسی‌های صورت گرفته در شهرستان طارم استان زنجان، خسارت پاییزه اهمیت زیادی دارد و مدیریت این بیماری باید از فصل پاییز شروع شود. براساس آمار هواشناسی ۱۰ سال اخیر ایستگاه‌های سینوپتیک شهرستان طارم، ماه آبان، بهترین زمان شروع آلودگی پاییزه درختان زیتون به بیماری اسکب می‌باشد؛ چون میانگین دمایی به زیر ۲۰ درجه سانتیگراد می‌رسد و میزان بارندگی‌ها نبست به ماه قبل چندین برابر می‌شود و در واقع شرایط برای شروع اپیدمی این بیماری کاملا مهیا می‌گردد. با توجه به اینکه بیش از ۹۰٪ باغات زیتون شهرستان، رقم بومی منطقه (زرد) می‌باشند که از سطح مقاومت پایینی نسبت به بیماری اسکب برخوردارند، انتظار می‌رود که باغات شهرستان از درصد

[1] peacock spot
[2] scab
[3] scouting
[4] modeling
[5] fieldstudies
[6] ontogenic
[7] Inoculum

آلودگی مشابهی برخوردار باشند؛ اما اینچنین نیست و بررسی‌ها نشان می‌دهد که میزان اختلاف درصد آلودگی در باغات شهرستان بیش از ۹۰٪ است (نتایج منتشر نشده). هرچند تفاوت در نحوه مدیریت باغات (رعایت اصول بهداشت باغی، رعایت فاصله کشت، انجام هرس اصولی، بهبود سیستم آبیاری و مدیریت علف‌های هرز باغ) دلیل روشنی برای وجود این اختلاف است، اما باغداران منطقه، با توجه به توصیه‌های ترویجی، هر سال گاهاً تا چندین مرتبه نسبت به سمپاشی باغات خود اقدام می‌کنند. حال آنکه برخی از باغات منطقه، بخاطر موقعیت خاص جغرافیایی و مدیریت مناسب، گاها در طول یکسال، اصلا نیازی به سمپاشی ندارند. آلودگی محیط زیست به این سموم قارچکش و تحمیل هزینه‌های اضافی به باغداران، حداقل صدماتی است که باغداران منطقه متحمل می‌شوند. مدیریت بهینه باغات (خصوصا رعایت فاصله مناسب کشت و انجام هرس اصولی) سبب می‌شود تا علی‌رغم بارش باران و مناسب بودن شرایط دمایی برای بیماری و در دسترس بودن اینوکلوم قارچ، میزان دوام رطوبت آزاد در فضای تاج درختان کمتر از ۲۴ ساعت شود و عملاً کنیدی‌های عامل بیماریزا موفق به تکمیل فرآیند آلودگی نشوند (۶).

اما باغداران چگونه باید بدانند که مدیریت انجام شده توسط آنها صحیح بوده است یا نه؟ چه زمانی برای سمپاشی باغاتی که مدیریت ضعیفی دارند مناسب است؟ آیا می‌توان تنها به اطلاعات ایستگاه‌های هواشناسی نزدیک بسنده کرد و با اطلاعات اولیه که از اپیدمیولوژی این بیماری داریم، به تعیین زمان دقیق بیماری پرداخت و قبل از شروع آلودگی، از قارچکش‌های پیشگیری کننده استفاده نمود؟

مواد و روش‌ها

در این تحقیق ارتباط میان اطلاعات هواشناسی بدست آمده از ایستگاه‌های هواشناسی منطقه (چهار ایستگاه آببر، چورزق، دستجرده و گیلوان) در پاییز سال جاری (۱۳۹۵) با درصد آلودگی درختان زیتون مورد ارزیابی قرار گرفت. تعداد ۵ قطعه از باغات مجاور ایستگاه‌های هواشناسی مربوطه به تصادف (با فاصله شعاعی کمتر از سه کیلومتر) مورد ارزیابی و سنجش قرار گرفت. برای تعیین درصد آلودگی درختان، از هر باغی سه درخت از رقم بومی و غالب شهرستان (رقم زرد) با سن تقریبی ۱۵ تا ۲۰ سال، به تصادف انتخاب شد و از هر درخت تعداد ۱۰۰ برگ از منطقه میانی تاج درختان بصورت تصادفی چیده شد. برای تعیین درصد آلودگی برگ‌ها نیز از روش شابی و همکاران (۹) استفاده شد. برای مقایسه میانگین‌ها از محیط نرم افزار اکسل[1] استفاده شد و آنالیز آماری نتایج نیز با کمک نرم افزار SASانجام شد.

نتایج و بحث

نتایج بدست آمده از این ارزیابی نشان داد که ارتباط معنی‌داری (در سطح ۵٪) میان درصد آلودگی باغات زیتون به بیماری لکه طاووسی و داده‌های هواشناسی بدست آمده از ایستگاه‌های هواشناسی وجود ندارد. در این ارزیابی مشخص گردید که بر اساس داده‌های هواشناسی و با توجه به اطلاعات موجود از شرایط اپیدمیولوژی بیماری، باغات اطراف هر چهار ایستگاه مستعد بروز و گسترش بیماری در پاییز سال جاری بودند. اختلاف معنی‌داری میان آمارهای هواشناسی ثبت شده توسط هر چهار ایستگاه شامل پارامترهای میانگین دما (روزانه)، میانگین بارش (برای ماه) و میانگین رطوبت نسبی (روزانه) برای سه ماه پاییز سال جاری، در سطح ۵٪ وجود نداشت. میانگین بارش باران در ماه‌های مهر و آبان ماه سال جاری حدود ۳۳ میلیمتر بود و تعداد ساعات مناسب توسعه قارچ عامل بیماری در آبان ماه سال جاری بیش از ۱۵۰ ساعت بود. با این وجود درصد آلودگی در باغات مورد ارزیابی از ۱ ٪ تا ۷۶٪ متفاوت بود و اختلاف میانگین درصد آلودگی بدست آمده از ۲۰ قطعه باغ مورد بررسی در ۴ منطقه نزدیک ایستگاه‌های هواشناسی در سطح ۱٪ معنی‌دار بود. این نتایج بطور واضح نشان داد که جهت پیش‌آگاهی وقوع و

[1] Excel

گسترش بیماری لکه طاووسی زیتون، نمی‌توان از اطلاعات ایستگاه‌های هواشناسی منطقه‌ای بهره‌مند شد و باید اطلاعات هواشناسی دقیق‌تری را از فضای داخل شاخ و برگ درختان بدست آورد.

نتایج این تحقیق نشان داد که راهکار پیش‌آگاهی بیماری لکه طاووسی زیتون و تعیین زمان دقیق سمپاشی باغات زیتون، نصب و راه اندازی دستگاه‌های هواشناسی سینوپتیک[1] در فضای داخل باغات و میان درختان است. ایستگاه‌های هواشناسی می‌توانند از یک سیستم کامل و پیشرفته و هوشمند (سینوپتیک تکمیلی)، تا یک عدد دستگاه داده بردار ساده[2] متفاوت باشند. ثبت و یادداشت برداری سه پارامتر بارش، دما و رطوبت نسبی کاملا ضروری است. تنها با در دست داشتن اطلاعات این سه پارامتر هواشناسی، و با استفاده از اطلاعات موجود از اپیدمیولوژی قارچ عامل بیماری لکه طاووسی، می‌توان نسبت به تعیین بهترین زمان مبارزه و سمپاشی باغات زیتون اقدام نمود و از انجام سمپاشی‌های بی‌رویه و بی‌هدف و صرف هزینه‌های اضافی اجتناب نمود. حسن دستگاه‌های داده بردار جدید، کوچکی اندازه و راحتی استفاده آنهاست. چون براحتی می‌توان آنها را در فضای داخل تاج درختان مستقر کرد و اطلاعات هواشناسی درون تاج درختان را ثبت نمود و سپس این اطلاعات را با کمک حافظه خارجی نصب شده در دستگاه براحتی به کامپیوتر منتقل و مطالعات لازم را بر روی آنها انجام داد.

شرایط آب و هوایی مطلوب بیمارگر، دمای بین ۱۵ تا ۲۰ درجه سانتیگراد و دوره رطوبتی بیش از ۲۴ ساعت است (۱۲). با توجه به اینکه منبع اصلی اینوکلوم بیماری لکه طاووسی، برگ‌های آلوده داخل تاج درختان می‌باشد و با توجه به حساسیت برگ‌های در حال رشد نسبت به این بیماری (۶،۱۰،۱۲)، مهمترین عامل محدودیت شروع بیماری و گسترش اپیدمی در شهرستان طارم، مدت دوام دوره خیسی و رطوبت آزاد ۱۰۰٪ در فضای درون تاج درختان می‌باشد. براساس مطالعات اوبونار و همکاران (۶) حداقل مدت زمان لازم برای جوانه زنی کنیدی، تولید لوله تلقیح و میخ رخنه، در شرایط مطلوب عامل بیماریزا،۲۴ الی ۴۸ ساعت می‌باشد. چنانچه بعد از وقوع بارندگی در آبان ماه (و البته اواخر مهر ماه) و در فروردین ماه (و البته اواخر اسفند ماه)، یعنی زمانی که شرایط دمایی منطقه برای وقوع بیماری مناسب باشد (۱۵ تا ۲۰ درجه سانتیگراد) و مدت زمان بقا رطوبت نسبی (نزدیک ۱۰۰٪) در فضای میان شاخ و برگ درختان، بیش از ۴۸ ساعت ادامه داشته باشد، بطور یقین باید منتظر باز شدن پنجره زمانی میزبانی برای بیماری لکه طاووسی زیتون و وقوع بیماری و شروع اپیدمی بود. هرچند در صورت وجود دستگاه‌های تله اسپوری[3] می‌توان زمان دقیق رها شدن کنیدی‌ها و شروع اپیدمی را با استفاده از مدل‌های پیش-آگاهی پیش‌بینی نموده و تصمیمات دقیق‌تر و بهتری اتخاذ نمود؛ اما در نبود دستگاه تله اسپوری نیز می‌توان با اعتماد به اطلاعات دریافتی از دستگاه‌های داده بردار، نسبت به بررسی یا ردیابی مناسب شدن شرایط برای شروع اپیدمی بیماری اقدام نمود. بنابراین تنها کاری که باغداران شهرستان طارم باید انجام دهند این است که با شروع اولین بارش پاییزی در نیمه دوم مهر ماه هرسال (تا زمانی که میانگین دمای محیط به زیر ۱۵ درجه سانتیگراد برسد؛ یعنی حدود اوایل آذرماه هر سال) و بعد از نیمه دوم اسفند ماه هرسال (تا زمانی که میانگین دمای محیط به بیش از ۲۵ درجه سانتیگراد برسد؛ یعنی حدود اواسط اردیبهشت ماه هر سال)، اطلاعات دستگاه داده بردار خود را بصورت روزانه مورد بررسی قرار دهند و تنها در صورتی که شرایط آب و هوایی درون تاج درختان مناسب وقوع بیماری شد، نسبت به سمپاشی باغات خود اقدام کنند.

منابع

۱- بی نام. ۱۳۹۴. آمار نامه سازمان جهاد کشاورزی.
2. Aylor, D. E. 1999. Biophysical scaling and the passive dispersal of fungus spores: Relationship to integrated pest management strategies. Agric. For. Meteorol. 97:275-292.
3. Graniti, A. 1993. Olive scab: A review. EPPO Bull. 23:377-384.
4. Miller, H. N. 1949. Development of the leaf spot fungus in the olive leaf. Phytopathology 39:403-410.
5. Obanor, F. O., Jaspers, M. V., Jones, E. E., and Walter, M. 2008. Greenhouse and field evaluation of fungicides for control of olive leaf spot in New Zealand. Crop Prot. 27:1335-1342.

[1] synoptic
[2] datalogger
[3] spore trap

6. Obanor, F. O., Walter, M., Jones, E. E., and Jaspers, M. V. 2011. Effects of temperature, inoculum concentration, leaf age, and continuous and interrupted wetness on infection of olive plants by *Spilocaea oleagina*. Plant Pathol. 60:190-199.
7. Roca, L. F., Moral, J., Viruega, J. R., Ávila, A., Oliveira, R., and Trapero, A. 2007. Copper fungicides in the control of olive diseases. Olea 26:48-50.
8. Roubal, C., Regis, S., and Nicot, P. C. 2012. Field models for the prediction of leaf infection and latent period of *Fusicladiumoleagineum*on olive based on rain, temperature and relative humidity. Plant Pathol. Online publication. doi:10.1111/j.1365-3059.2012.02666.x
9. Shabi E, Birger R, Lavee S (1994). Leaf spot (*Spilocaea oleaginea*) on olive in Israel and its control. ActaHortic., 356: 390-39
10. Viruega, J. R., Roca, L. F., Moral, J., and Trapero, A. 2011. Factors affecting infection and disease development on olive leaves inoculated with *Fusicladiumoleagineum*. Plant Dis. 95:1139-1146.
11. Viruega, J. R., and Trapero, A. 1999. Epidemiology of leaf spot of olive tree caused by *Spilocaea oleagina* in southern Spain. ActaHortic. 474:531-534.
12. Viruega, J. R., Moral, J., Roca, L. F., Navarro, N., and Trapero, A. 2013. Spilocaea oleagina in olive groves of southern Spain: Survival, inoculum production, and dispersal. Plant Dis. 97:1549-1556.

آنالیز ترادف نوکلئوتیدی جدایه‌های ویروس S سیب‌زمینی (PVS) بر اساس توالی ژن پروتئین پوششی در استان اردبیل

نسیم احتشام رائی[1] ، احمد روحی بخش[2,*]

[1]دانشجوی کارشناسی ارشد رشته بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه گیلان، [2] استادیار گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان

** نویسنده مسئول : a_rouhibakhsh1966@yahoo.com*

چکیده

ویروس S سیب‌زمینی PVS از جمله ویروس‌های مهم خسارت‌زا در سیب‌زمینی می‌باشد. در تابستان سال‌های ۱۳۹۴ و ۱۳۹۵ از مزارع سیب‌زمینی استان اردبیل نمونه برداری انجام شد. برگ‌های دارای علائم مشکوک به ویروس با استفاده از روش‌های مولکولی از نظر آلودگی به ویروس PVS مورد بررسی قرار گرفتند. ترادف نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی دو جدایه Ag-9 و Os-11 ویروس S سیب‌زمینی (PVS) جدا شده از ارقام آگریا و اوشینا در استان اردبیل تعیین شد. توالی پروتئین پوششی دو جدایه PVS با یکدیگر و با توالی ژن پروتئین پوششی ۲۴ جدایه این ویروس مقایسه شد. درخت تبارزایی رسم شده نشان داد که جدایه‌ها به دو گروه اصلی I (زیرگروه های IA و IB) و II تقسیم شدند. دو جدایه Ag-9-PVS-F و Os-11-PVS-F در زیرگروه IB همراه با جدایه‌های گزارش شده از آذربایجان، همدان و اصفهان و جدایه‌هایی از مجارستان، اوکراین، اسکاتلند و هلند قرارگرفتند. جدایه Ag-9-PVS-F در نزدیکی جدایه‌هایی از اوکراین و مجارستان (به ترتیب LN851193.1 و LN794168.1) و همچنین جدایه ایرانی گزارش شده از آذربایجان (HQ875132.1) قرار داشت. جدایه Os-11-PVS-F بیشترین شباهت را با جدایه‌های ایرانی گزارش شده از همدان و اصفهان (به ترتیب HQ875135.1 و HQ875133.1) داشت. نتایج نشان‌دهنده وجود جدایه‌های متنوع این ویروس در کشور بوده و با توجه به اینکه سیب‌زمینی با غده بذری تکثیر می‌شود تولید و کشت غده سالم و عاری از آلودگی باید مورد توجه قرار گیرد.

واژگان کلیدی: اردبیل، ترادف نوکلئوتیدی، ویروس S سیب زمینی، RT-PCR.

مقدمه

سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) یکی از مهمترین منابع غذایی جهان و چهارمین محصول استراتژیک بعد از گندم، برنج و ذرت از نظر میزان تولید در بین محصولات زراعی است (۱). خسارت ناشی از بیماری‌های ویروسی بسته به نوع ویروس، رقم سیب‌زمینی و شرایط محیطی از ۱۰ تا ۹۰ درصد گزارش شده است (۴). ویروس S سیب‌زمینی (PVS)، اولین بار در سال ۱۹۵۲ از هلند گزارش شد (۵). به دلیل تکثیر غیرجنسی سیب‌زمینی، آلودگی‌های ویروسی از نسلی به نسل دیگر منتقل شده و با کشت متوالی ، درصد آلودگی افزایش یافته و عملکرد آن پس از چند سال شدیداً کاهش می‌یابد. این ویروس

دارای اهمیت اقتصادی است چون آلودگی به آن ممکن است به کاهش ۱۰ تا ۲۰ ٪ محصول منجر شود (۶). این ویروس برای اولین بار در ایران در سال ۱۳۵۳ از استان‌های فارس و آذربایجان شرقی گزارش شد سپس در چندین استان دیگر ایران شامل استان‌های اصفهان، خوزستان، همدان، خراسان، کرمان، و فارس شناسایی شد (۷). ویروس S سیب‌زمینی متعلق به جنس *Carlavirus* و خانواده *Betaflexiviridae* است. این ویروس دارای پیکره‌های میله‌ای شکل خمش‌پذیر به ابعاد ۱۲- ۱۵ ×۶۱۰-۷۰۰ نانومتر و یک مولکول RNA تک رشته‌ای مثبت است (۲). ویروس PVS توسط شته‌هایی مانند *Myzus persicae*، *Aphis fabae*، *A.nasturtii* و *Rhopalosiphum padi* به روش ناپایا منتقل می‌شود همچنین می‌تواند توسط غده آلوده و تلقیح مکانیکی نیز منتقل شود (۳).

نتایج وبحث

ردیابی مولکولی ویروس S سیب‌زمینی

استخراج RNA کل با استفاده از ستون استخراج RNA شرکت دنازیست انجام گرفت. جهت ردیابی ژن کد کننده پروتئین پوششی ویروس PVS، از یک جفت آغازگر اختصاصی PVS CP-F ('5'-CAGTCCGGCTAGTCAATTGC-3') و PVS CP-R ('5'-CTCTGACTTTGCACCATGGG-3') استفاده شد. قطعه اسیدنوکلئیک به طول ۱۱۱۸ نوکلئوتید با آزمون RT-PCR تکثیر، الکتروفورز و توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی توالی‌یابی شد.

آنالیز ترادف نوکلئوتیدی ویروس S سیب‌زمینی

نتایج حاصل از مقایسه توالی نوکلئوتیدی پروتئین پوششی ویروس PVS به دست آمده در مورد ۸ جدایه ایرانی و ۱۸ جدایه خارجی PVS با یکدیگر (جدول ۱) و درخت تبارزایی رسم شده بر این اساس نشان داد که این جدایه‌ها در دو گروه اصلی II و I قرار می‌گیرند. سه جدایه ایرانی گزارش شده از فارس، کرمان و خراسان به ترتیب با رس‌شمارهای (HQ875134.1، HQ875138.1، HQ875141.1) به همراه جدایه‌هایی از آمریکا، شیلی، تانزانیا، جزایر شتلند، استرالیا، کانادا و هلند در زیرگروه IA قرار گرفتند. در زیرگروه IB دو جدایه ایرانی Ag-9-PVS-F و Os-11-PVS-F همراه با جدایه‌های گزارش شده از آذربایجان، همدان و اصفهان به ترتیب با رس‌شمارهای (HQ875132.1، HQ875135.1، HQ875133.1) و جدایه‌هایی از مجارستان، اوکراین، اسکاتلند و هلند قرارگرفتند. جدایه Ag-9-PVS-F جدا شده از رقم اگریا در کنار جدایه‌هایی از اوکراین با رس‌شمار LN851193.1 و مجارستان با رس‌شمار LN794168.1 و همچنین جدایه ایرانی گزارش شده از آذربایجان قرار داشت. جدایه Os-11-PVS-F جدا شده از رقم اوشینا بیشترین شباهت را با جدایه‌های ایرانی گزارش شده از همدان و اصفهان داشت و در گروه II جدایه‌های چین، برزیل و چک قرار داشتند (شکل ۱).

دو جدایه Ag-9-PVS-F و Os-11-PVS-F از PVS در بین خود دارای ۸۷/۳ درصد یکنواختی توالی نوکلئوتیدی ژن CP بودند. جدایه Ag-9-PVS-F با جدایه ایرانی HQ875132.1 از آذربایجان وجدایه‌های خارجی از اوکراین و مجارستان و جدایه Os-11-PVS-F با جدایه ایرانی HQ875135.1 از همدان و جدایه‌های خارجی از اسکاتلند و جزایر شتلند بیشترین درصد یکنواختی توالی نولکلئوتیدی CP را نشان دادند. دو جدایه ایرانی گزارش شده از اردبیل در مجموع کمترین یکنواختی توالی CP را با جدایه‌هایی از برزیل و چین داشتند (جدول ۲).

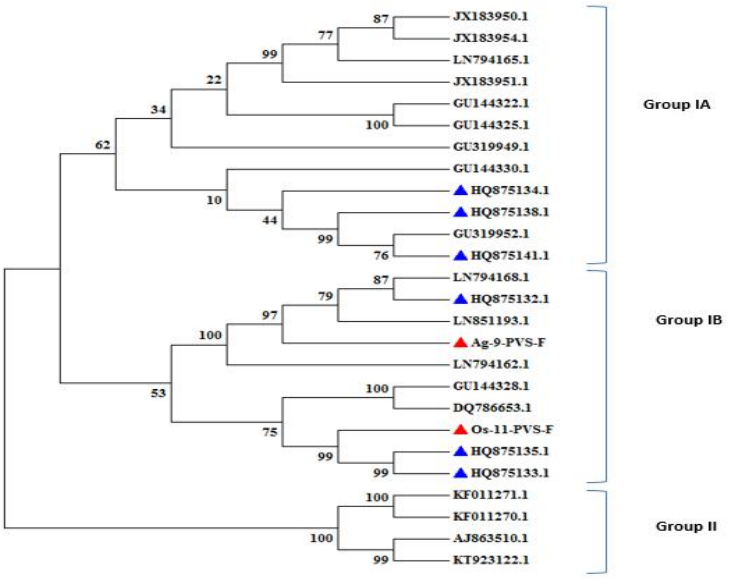
با توجه به نتایج حاصله، خصوصیات جدایه‌های مورد مطالعه در این تحقیق بیشترین مشابهت را با جدایه‌های زیرگروه IB این ویروس نشان می‌دهند. با توجه به اینکه معمولا توالی نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی این ویروس حفاظت شده است این مقدار تغییر نشان‌دهنده وجود تنوع در ناحیه پروتئین پوششی ویروس در نواحی مختلف جغرافیایی است که باید در برنامه‌های کنترل و تولید گیاهان تراریخته مقاوم به ویروس مورد توجه قرار گیرد.

جدول ۱- مشخصات جدایه‌های PVS که توالی نوکلئوتیدی ژن پروتئین پوششی آن‌ها در مطالعه تبارزایی مورد استفاده قرار گرفته است.

جدایه	کشور	میزبان اصلی	رس شمار	منبع
PVS-O, Papa negra	Hungary	*S. tuberosum cv.Papa negra*	LN794168.1	Pajtli et al., 2015
PVS-O, Kilimanjaro	Tanzania	*Solanum sp.*	LN794165.1	Pajtli et al., 2015
PVS-O, FabiolaA	Hungary	*S. tuberosum cv.Fabiola*	LN794162.1	Pajtli et al., 2015
PVS-O, Sam-24-PVS	Scotland	*S. tuberosum*	GU144330.1	Mortensen et al.,2010
PVS-O, Sam-13-PVS	Scotland	*S. tuberosum*	GU144328.1	Mortensen et al.,2010
PVS-O, 139-PVS	Shetlant	*S. tuberosum*	GU144325.1	Mortensen et al.,2010
PVS-O, 136-PVS	Shetlant	*S. tuberosum*	GU144322.1	Mortensen et al.,2010
strain PVS-O	India	*S. tuberosum*	DQ786653.1	Gawande et al., 2006
PVS-O, AZA.TA.6	Iran (Azarbaijan)	*S. tuberosum*	HQ875132.1	Salari et al., 2011
PVS-O, ESF.FA.19	Iran (Esfahan)	*S. tuberosum*	HQ875133.1	Massumi et al., 2011
PVS-O, FA.SI.14	Iran (Fars)	*S. tuberosum*	HQ875134.1	Salari et al., 2011
PVS-O, HAM.KA.2	Iran (Hamedan)	*S. tuberosum*	HQ875135.1	Salari et al., 2011
PVS-O, KHO.CH.3	Iran (Khorasan)	*S. tuberosum*	HQ875141.1	Massumi et al., 2011
PVS-O, KER.LA.12	Iran (Kerman)	*S. tuberosum*	HQ875138.1	Massumi et al., 2011
Cosimar	USA	*S. tuberosum*	JX183950.1	Lin et al., 2012
PVS-O, Exodus	Netherlands	*S. tuberosum*	GU319952.1	Dolby &Jones ,1987
PVS-O, WAPC	Australia	*S. tuberosum*	GU319949.1	Cox & Jones ,2010
-	Brazil	*S. tuberosum*	KT923122.1	Figueira et al., 2015
PVS-d	China	*S. tuberosum*	KF011271.1	Song et al., 2013
PVS-c	China	*S. tuberosum*	KF011270.1	Song et al., 2013
PVS-A, Vltava	czech	*S. tuberosum*	AJ863510.1	Matousek et al., 2004
Irena	Ukraine	*S. tuberosum cv.Finka*	LN851193.1	Pajtli et al., 2015
FL206- 1D	USA	*S. tuberosum*	JX183951.1	Lin et al., 2012
Q1(Q44843)	Chili	*S. tuberosum*	JX183954.1	Lin et al., 2012
Os-11	Iran (Ardabil)	*S. tuberosum cv.Oceana*	-	This study
Ag-9	Iran (Ardabil)	*S. tuberosum cv. Agria*	-	This study

جدول ۲- درصد یکنواختی توالی نوکلئوتیدی ژن CP بین ۸ جدایه ایرانی و ۱۸ جدایه خارجی ویروس PVS (جهت اطلاع از مشخصات جدایه‌ها به جدول ۱ مراجعه شود)

	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
1 Os-11- PVS-F	87.3	84.9	87.4	84.2	72.9	85.0	84.7	86.9	85.7	73.0	83.7	84.6	84.6	85.4	85.1	72.6	84.9	71.9	86.6	84.5	84.2	84.5	85.9	84.6	86.4	
2 Ag-9-PVS-F		87.3	83.8	83.3	72.9	87.2	86.1	83.5	83.6	73.0	81.7	83.0	82.8	83.7	83.6	72.4	87.3	71.2	84.4	83.1	82.7	83.3	84.5	83.3	85.1	
3 LN794168.1			94.9	94.1	82.0	98.9	97.5	94.3	94.6	82.1	92.6	93.7	93.5	95.0	91.3	81.4	99.3	80.1	92.0	93.6	93.4	93.8	94.4	94.1	93.0	
4 HQ875135.1				94.2	81.8	94.8	94.4	98.7	95.3	81.9	93.3	94.5	93.8	95.1	92.0	81.3	94.9	80.6	93.4	94.2	94.3	94.4	94.5	94.8	93.1	
5 GU319949.1					82.0	94.2	94.1	93.8	94.9	82.1	93.1	95.1	94.2	95.2	92.3	81.5	94.3	79.8	91.5	92.8	94.6	95.2	95.3	95.7	93.9	
6 KF011271.1						82.2	81.4	81.6	81.4	99.8	79.8	81.4	93.7	81.0	80.1	83.8	81.8	83.8	79.6	81.1	81.3	81.6	81.4	81.2	80.2	
7 LN851193.1							97.4	94.4	94.8	82.3	92.7	93.8	93.5	94.9	91.7	80.9	98.9	79.8	92.4	94.0	93.5	94.0	94.5	94.2	93.1	
8 LN794162.1								94.3	94.6	81.5	92.7	93.7	93.5	94.8	91.1	81.4	97.5	80.0	91.8	93.2	93.4	94.0	94.4	94.2	93.0	
9 HQ875133.1									95.4	81.8	93.4	94.2	95.7	95.0	91.7	81.6	94.3	80.7	93.2	94.1	94.0	94.3	94.4	94.4	93.0	
10 GU319952.1										81.5	96.4	95.8	81.8	98.6	92.6	81.0	94.6	80.1	92.3	93.4	95.2	95.5	95.8	96.2	94.4	
11 KF011270.1											80.0	81.5	93.8	81.1	80.2	83.8	81.9	83.8	79.7	81.2	81.4	81.8	81.5	81.3	80.3	
12 HQ875138.1												93.7	94.9	96.4	90.9	79.6	92.6	78.7	90.2	91.6	93.4	93.7	94.1	94.3	92.8	
13 JX183950.1													95.8	95.5	92.6	81.2	94.2	80.3	91.7	93.1	98.1	98.1	95.8	97.9	94.4	
14 HQ875134.1														95.8	92.3	82.0	93.7	80.6	90.9	92.3	94.3	94.5	94.5	95.4	93.1	
15 HQ875141.1															92.7	81.0	94.8	79.8	92.0	93.4	95.2	95.4	96.0	96.1	94.7	
16 GU144330.1																79.2	91.3	78.0	94.4	90.5	92.3	92.3	94.4	92.8	95.8	
17 AJ863510.1																	80.9	87.7	78.4	80.6	81.4	81.9	81.0	81.3	79.8	
18 HQ875132.1																		79.6	92.0	93.6	93.4	94.1	94.6	94.3	93.2	
19 KT923122.1																			78.9	81.1	80.7	80.7	79.7	80.1	78.6	
20 GU144328.1																				95.0	91.3	91.4	93.8	91.5	95.2	
21 DQ786653.1																					92.6	92.9	93.0	92.8	91.7	
22 JX183954.1																						97.5	95.0	97.2	93.7	
23 LN794165.1																							95.9	97.9	94.6	
24 GU144322.1																								95.7	98.5	
25 JX183951.1																									94.3	
26 GU144325.1																										



شکل ۱- درخت تبارزایی رسم شده با استفاده از توالی ژن پروتئین پوششی PVS مربوط به ۲۶ جدایه که با استفاده از روش (NJ) Neighbor Joining و ۱۰۰۰ مرتبه bootstrap به دست آمده است. جدایه‌های ایرانی با مثلث توپر نشان داده شده‌اند.

منابع

۱. مظفری، ج . و م. پژوهنده. ۱۳۷۹ . بیوتکنولوژی در مسیر ایجاد نخستین بانک ژرم پلاسم عاری از ویروس سیب‌زمینی در ایران . نشریه کمیسیون بیوتکنولوژی. شورای پژوهش‌های علمی کشور.

2. Adams, M. J., Candresse, T., Hammond, J., Kreuze, J. F., Martelli, G. P., Namba, S., & Yoshikawa, N. (2012). Family betaflexiviridae. Virus taxonomy: ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. Elsevier Academic Press, London, 920-941.
3. Brunt, A. A., & Loebenstein, G. (2001). The main viruses infecting potato crops. virus and virus-like diseases of potatoes and production of seed-potatoes. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 65-67.
4. De Bokx, J. A., & Van der Want, J. P. H. (1987). Viruses of potatoes and seed-potato production (No. Ed. 2). Centre for Agricultural Publishing and Documentation (Pudoc).
5. De Bruyn Ouboter, M.P. 1952. A new potato virus. pp. 83-84. In: Proc. Conf. on Potato Virus Diseases. Wageningen Lisse, The Netherlands.
6. Manzer, F. E., Merriam, D. C., & Hepler, P. R. (1978). Effects of potato virus S and two strains of potato virus X on yields of Russet Burbank, Kennebec, and Katahdin cultivars in Maine. American potato journal, 55(11), 601-609.
7. Salari, K., Massumi, H., Heydarnejad, J., Pour, A. H., & Varsani, A. (2011). Analysis of Iranian Potato virus S isolates. Virus genes, 43(2), 281-288.

شیوع شانکر بوتریوسفریایی روی درخت بید در نهالستان رشت

عادله عاشوری[1*]، سید اکبر خداپرست[2] و صدیقه موسی نژاد[3]

[1] *دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان*

[2] *دانشیار قارچ شناسی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان*

[3] *استادیار بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان*

[*] *نویسنده مسئول: Adelehashori@yahoo.com*

چکیده

شانکر بوتریوسفریایی یکی از بیماری‌های مهم درختان بید است. شانکرهای به وجود آمده روی درخت حاصل حضور مجموعه‌ی کمپلکسی از اعضای جنس *Botryosphaeria* می‌باشند. این قارچ‌ها به عنوان عوامل فرصت‌طلبی مطرح هستند که بر روی تنه، شاخه و جوانه‌ها شانکر ایجاد می‌کنند. علائم بیماری‌های ناشی از این قارچ‌ها زمانی بروز می‌یابند که درختان با استرس‌های محیطی مانند خشکی، سرما یا زخم مواجه می‌شوند. داده‌های مورد استفاده در این پژوهش از نهالستان صابری در شهر رشت در استان گیلان جمع‌آوری و مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌برداری در فصل بهار سال ۱۳۹۵صورت گرفت. ساقه و شاخه‌های آلوده از نهالستان جمع‌آوری و پس از بسته‌بندی و کدگذاری، برای جداسازی قارچ‌های احتمالی ایجادکننده‌ی آلودگی به آزمایشگاه منتقل شدند. بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی روی محیط کشت و میزبان مورد بررسی، قارچ همراه این بیماری گونه‌ای از *Botryosphaeria* شناسایی گردید. همچنین میزان وقوع بیماری در نهالستان شهر رشت ۳۹ درصد محاسبه شد.

واژگان کلیدی: شیوع بیماری، *Botryosphaeria*، *Salix* sp.

مقدمه

یکی از بیماری‌های مهم درختان بید، پوسیدگی بوتریوسفریایی است. اعضای جنس *Salix* به چندین بیماری که موجب بروز بلایت روی تنه و شاخه‌ها می‌شوند حساس هستند. شانکرهای به وجود آمده روی درخت حاصل حضور مجموعه‌ی پیچیده‌ای از اعضای جنس *Botryosphaeria* می‌باشند. این قارچ‌ها به عنوان عوامل فرصت‌طلبی مطرح هستند که بر روی تنه، شاخه و جوانه‌ها شانکر ایجاد می‌کنند. علائم بیماری‌های ناشی از این قارچ‌ها زمانی بروز می‌یابند که درختان با استرس‌های محیطی مانند خشکی، سرما یا زخم مواجه می‌شوند. در آمریکا دو گونه‌ای که عامل ایجاد بیماری روی درختان بید هستند *Botryosphaeria dothidea* و *B. ribis* می‌باشند (۲). اعضای این جنس دارای انعطاف‌پذیری مورفولوژیکی بسیار بالایی هستند و علی‌رغم شباهت زیادی که بین آن‌ها وجود دارد، برخی از پژوهشگران گونه‌های جدیدی را بر مبنای میزبان‌های جدید توصیف کرده‌اند (۱۱). هجده جنس میتوسپوریک در ارتباط با جنس *Botryosphaeria* شرح داده شده‌اند که مهمترین آنها شامل *Diplodia*، *Dothiorella*، *Fusicoccum*، *Lasiodiplodia*، *Phylosticta* و *Sphaeropsis* می‌باشند (۶،۵،۱۳). جنس *Botryosphaeria* دارای دامنه میزبانی وسیعی می‌باشد و می‌تواند بسیاری از درختان مثمر و گیاهان علفی را آلوده کند (۱۰).۲۰ خانواده گیاهی، ۳۴ جنس و ۵۰ گونه به گونه‌ی *B. dothidea* حساس هستند. خانواده گیاهی Rosaceae، Juglandaceae و Palmaceae به عنوان میزبان‌های شناخته‌شده این قارچ هستند (۱۲). *B. dothidea* یک آسکومیست رشته-

ای است. فرم غیرجنسی این قارچ *Fussicocum asculi* می‌باشد (۱). فرم جنسی این قارچ در طبیعت به ندرت یافت می‌شود. فرم غیرجنسی این قارچ به طور معمول روی بافت‌های آلوده مشاهده می‌شود و برای شناسایی نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۵). علاوه بر این گونه چند گونه‌ی دیگر موجود در جنس *Botryosphaeria* می‌توانند عامل ایجاد شانکر و بلایت در گیاهان از جمله در بید باشند. گونه *Botryosphaeriaribis* در ابتدا به عنوان عامل بلایت در گونه‌های جنس *Ribes* گزارش شد. سپس گزارشاتی از حضور این عامل روی دیگر گیاهان نیز ارائه شد تا در نهایت در سال ۱۹۲۶ در ایالت متحده از روی بید هم جدا گردید (۱۴). طی سال ۱۳۹۵ بیماری شانکر بید در یکی از مزارع صنعتی بید در استان گیلان مشاهده شد. بررسی‌های اولیه نشان می‌دهند که احتمالاً گونه (گونه‌هایی) از تیره *Botryosphaeriaceae* در این بیماری نقش دارند. با توجه به اینکه این بیماری برای منطقه جدید بوده و هیچ گونه اطلاعاتی در مورد عامل بیماری، زیست شناسی و چرخه آن وجود ندارد، این مطالعه به منظور پاسخگویی به این نیاز انجام گردید.

مواد و روش‌ها

داده‌های مورد استفاده در این پژوهش طی فصل زراعی سال ۱۳۹۵ از نهالستان بید صابری در شهر رشت که شامل گونه *Salix.cf.zygostemon* بود، جمع آوری شدند. نمونه‌برداری طی فصل بهار سال ۱۳۹۵ صورت گرفت. ساقه و شاخه‌های آلوده به صورت دوره‌ای جمع‌آوری و پس از بسته‌بندی و کدگذاری، برای جداسازی قارچ‌های احتمالی ایجادکننده‌ی آلودگی به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌ها به وسیله‌ی بینوکولار و میکروسکوپ نوری از نظر وجود اندام‌های بارده قارچی مورد بررسی قرار گرفتند. مرز میان نواحی سالم و آلوده‌ی قطعات مشکوک در محلول ۵ درصد سدیم هیپوکلریت برای یک دقیقه ضدعفونی و سپس در آب مقطر شستشو داده شده و در نهایت روی کاغذ صافی سترون خشک شدند و به محیط کشت حاوی عصاره‌ی ۲۰۰ گرم سیب‌زمینی، ۲۰ گرم دکستروز، ۱۶ گرم آگار و آب مقطر حجم یک لیتر (PDA) منتقل و در دمای اتاق (۲۵ درجه-ی سانتی گراد) نگهداری شدند. به منظور خالص‌سازی اولیه، از حاشیه‌ی کلنی‌های رشد کرده قطعه‌ای برداشته و به محیط PDA جدید منتقل شد (۸). برای تحریک اسپورزایی، قطعه‌ای از پرگنه برداشته و روی سوزن کاج بر روی محیط آب-آگار (WA) ۲ درصد به مدت ۶-۱ هفته قرار داده تا کنیدیوماتا تشکیل شود (۴). شناسایی گونه‌های جداسازی شده با استفاده ازکلید ارایه شده توسط فیلیپس و همکاران صورت گرفت (۹).

به منظور بررسی میزان وقوع بیماری (I) روی درختان بید، تعداد کل درخت‌های مورد بررسی و هم‌چنین تعداد درختان دارای علائم شانکر و بلایت روی تنه و شاخه به صورت جداگانه ثبت گردید و سپس وقوع بیماری با استفاده از معادله ۱ محاسبه شد که در آن X تعداد درختان بیمار و N تعداد کل درختان ارزیابی‌شده است. بدین منظور شش ردیف به صورت تصادفی انتخاب شدند. در هر ردیف شمارش تعداد لکه‌های مشکوک به شانکر در پنج گیاه که به صورت پشت سر هم قرار گرفته و با فاصله‌ی یک متر از یکدیگر جدا شده بودند صورت گرفت و این کار با فاصله پنج متر دوباره تکرار شد (۳).

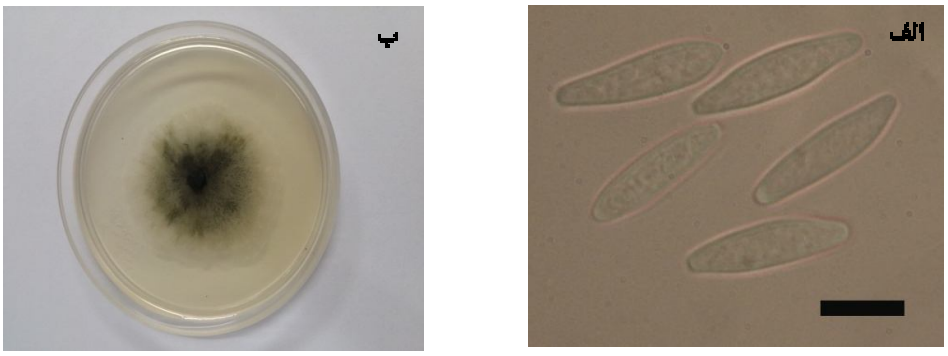
$$\sum X/N \qquad (۱)$$

نتایج و بحث

در بازدید از نهالستان صابری شاخه‌هایی از درختان بید (*salix.cf.zygostemon*) مشاهده شدند که دارای علائم تیره‌رنگ و زگیل‌مانند و شانکرهای خشک و ترک‌خورده بودند (شکل۱). بر اساس منابع، علائم تیپیک بیماری شانکر بوتریوسفریا، بصورت لکه‌های سیاه‌رنگ و شانکر عموماً تخم‌مرغی ، کشیده و حفره‌ای‌شکل است. پوست در نواحی دارای شانکر، خشک و ترک‌خورده می‌شود (۲).

شکل ۱_ علائم بیماری شانکر بوتریوسفریایی بصورت لکه‌ی سیاه رنگ (الف) و شانکر ترک خورده (ب) (عکس از نگارنده)

بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی، پیکنیدیوم‌های سطحی بر روی سوزنهای کاج تشکیل شد. کنیدیوم‌های درون پیکنیدها دوکی تا بیضوی شکل، شفاف، دارای دیواره نازک، به ابعاد (۶-)۵-۴× (۲۵-) ۲۴-۲۰ بودند شکل ۲(الف). و در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد بعد از ۴ روز پرگنه به رنگ زیتونی و به قطر ۵۱ میلی‌متر تشکیل شد شکل ۲(ب) که با استفاده از کلید ارایه شده توسط فلیپس و همکاران گونه *Botryosphaeria dothidea* شناسایی شد (۹).



شکل ۲_ کنیدیوم های دوکی تا بیضوی شکل *Botryosphaeria dothidea* (مقیاس=۱۰میکرومتر) (الف) پرگنه قارچ روی محیط PDA (ب)

در نهالستان مورد بازدید و بررسی، شش ردیف به صورت تصادفی انتخاب شدند و در هر ردیف شمارش تعداد لکه‌های مشکوک به شانکر در تعدادی درختان منتخب صورت گرفت. بر این اساس شیوع بیماری ۳۹ درصد محاسبه شد. چرخه بیماری و بیولوژی این قارچ در دست بررسی است. بر اساس تحقیقی که در مزرعه‌ی بید (*Salix gracilistyla*) در شهر ایلان[1] در کشور تایوان انجام شد، بیماری شانکر ساقه با عامل *Botryosphaeria dothidea* بسیار شایع بوده و شیوع بیماری ۳۴٪ تا ۶۵٪ گزارش شد (۷).

[1] Ilan county

منابع

1. Alexopoulos, C. J., Mims, C. N., & Blackwell, M. (1996). Introductory Mycology, John Willey & Sons Inc. *New York*.
2. Anonymous. 2010. Cankers caused by Botryosphaeria and related fungi. Fungal database: Plant Disease Diagnostic Clinic (sited in: http://plantclinic.cornell.edu/).
3. Cardoso, J. E., Santos, A. A., Rossetti, A. G., & Vidal, J. C. (2004). Relationship between incidence and severity of cashew gummosis in semiarid north-eastern Brazil. *Plant Pathology*, *53*(3), 363-367.
4. Crous PW, Gams W, Stalpers JA, Robert V, Stegehuis G (2004). MycoBank: an online initiative to launch mycology into the 21st century. Studies in Mycology, 50: 19–22.
5. Denman, S., Crous, P. W., Taylor, J. E., Kang, J. C., Pascoe, I., & Wingfield, M. J. (2000). An overview of the taxonomic history of Botryosphaeria and a re-evaluation of its anamorphs based on morphology and ITS rDNA phylogeny. *Studies in Mycology*, *45*, 129-140.
6. Jacobs, K. A., & Rehner, S. A. (1998). Comparison of cultural and morphological characters and ITS sequences in anamorphs of Botryosphaeria and related taxa. *Mycologia*, 601-610.
7. Ko, Y., Sun, S. K., and Lan, C. C. 2003. Stem canker of cat-tail willow caused by Botryosphaeria dothidea in Taiwan. *Plant Pathology Bulletin*, *12*(4), 269-272.
8. Michailides, T. 1991. Pathogenicity, distribution, source of inoculum, and infection courts of Botryosphaeria dothidae on Pistachio. Phytopathology, 81(5): 566-573.
9. Phillips, A. J. L., Alves, A., Abdollahzadeh, J., Slippers, B., Wingfield, M. J., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2013). The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. *Studies in mycology*, *76*, 51-167.
10. Sinclair, W.A. and Lyon, H.H. 2005. Diseases of Trees and Shrubs, 2nd ed. Ithaca, New York.: Cornell University Press.
11. Slippers, B., Johnson, G. I., Crous, P. W., Coutinho, T. A., Wingfield, B. D., & Wingfield, M. J. (2005). Phylogenetic and morphological re-evaluation of the Botryosphaeria species causing diseases of Mangifera indica. *Mycologia*, *97*(1), 99-110.
12. Smith, C.O. 1934. Inoculations showing the wide host range of Botryosphaeria ribis. Journal of Agricultural Research, 49: 467-476.
13. Smith, D. R., & Stanosz, G. R. (2001). Molecular and morphological differentiation of Botryosphaeria dothidea (anamorph Fusicoccum aesculi) from some other fungi with Fusicoccum anamorphs. *Mycologia*, 505-515.
14. Stevens, N. E. 1926. Occurrence of the currant cane blight fungus on numerous hosts in the southern states. Mycologia, 18: 278-282
15. Sutton, T.B. and Arauz, L.F. 1991. Influence of temperature and moisture on germination of ascospore and conidia of Botryosphaeria dothidea. Plant Disease, 75: 1156-1159.

استفاده از آزمون گلبرگ جهت ردیابی بیماری پوسیدگی اسکلروتینیایی ساقه کلزا در استان مازندران

رضاپور مهدی علمدارلو[۱*]، محمدعلی آقاجانی[۲]، محمد سالاری[۳]، ناصر پنجه‌که[۳] و سید کاظم صباغ[۴]

۱ و۲- دانشجوی دکتری تخصصی و دانشیاران گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

۳- بخش تحقیقات گیاه پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان، ایران

۴- دانشیار گروه زیست شناسی، مجتمع علوم، دانشگاه یزد، یزد، ایران.

** نویسنده مسئول: rezapoorma@gmail.com*

چکیده

پوسیدگی اسکلروتینیایی ساقه با عامل *Sclerotinia sclerotiorum*، یکی از بیماری‌های مهم کلزا می‌باشد که گیاه را در مرحله گلدهی آلوده می‌کند. استفاده از آزمون گلبرگ جهت ردیابی آسکوسپورهای قارچ بیمارگر، کاربرد زیادی در دنیا دارد. در این تحقیق جهت بررسی میزان آلودگی گلبرگ‌های کلزا به آسکوسپورهای بیمارگر، آزمون گلبرگ در ۵۰ مزرعه کلزا در مناطق مختلف استان مازندران طی سال ۹۵-۱۳۹۴ انجام گردید. دامنه آلودگی گلبرگ‌ها به اسپور بیمارگر ۸۸-۰درصد (میانگین ۳۳درصد) بود. رابطه بین درصد آلودگی گلبرگ‌ها با میزان وقوع و شدت متوسط نهایی بیماری، به کمک مدل‌های مختلف ریاضی بررسی شد. بر اساس آماره‌هایی مانند ضریب تبیین و خطای استاندارد برآوردها، مدل‌خطی برازش خوبی با داده‌ها داشت. معادله‌ی این مدل برای داده‌های وقوع و شدت بیماری به‌ترتیب به صورت DI=14.2 + 0.69*petal[۱] و DS=10.0 + 0.48*petal بود.

واژگان کلیدی: پوسیدگی اسکلروتینیایی، آزمون گلبرگ، آسکوسپور و *Sclerotinia sclerotiorum*.

مقدمه

یکی از بیماری‌های مهم کلزا در دنیا پوسیدگی اسکلروتینیایی ساقه توسط قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.1837) de Bary 1884 می‌باشد که در ایران نیز در برخی نواحی کلزاکاری خصوصاً مناطق مرطوب شمالی شیوع دارد و در برخی سال‌ها خسارت آن قابل توجه است (۱، ۲، ۳، ۴ و ۱۴). قارچ عامل بیماری دارای دامنه میزبانی وسیع بوده و گیاهان مختلف زراعی، سبزی و صیفی، زینتی، علوفه‌ای، باغی، دارویی و تعداد زیادی علف‌های هرز از خانواده‌های مختلف گیاهی را آلوده می‌کند (۷ و ۱۴). پایداری قارچ به صورت اسکلروت در خاک می‌باشد (۱۵). از جوانه‌زدن اسکلروت‌ها، اندام‌های جنسی به نام آپوتسیوم در سطح خاک تشکیل می‌شود. شرایط محیطی از جمله دما و رطوبت خاک تأثیر زیادی برجوانه‌زدن اسکلروت‌ها دارد (۱۷). آپوتسیوم‌ها، آسکوسپورها را به فاصله بیش از ۲۰ سانتیمتر به هوا پرتاب می‌کنند و انتشار آن‌ها توسط جریان هوا را آسان می‌نمایند. آزاد شدن آسکوسپورها اغلب در طول روز و بین ساعت نه صبح تا یک بعد ازظهر صورت می‌گیرد، ولی رهاسازی آسکوسپور توسط آپوتسیوم نیازی به نور نداشته و امکان وقوع آن در شب نیز وجود دارد (۱۲). آلودگی اولیه به

[۱]- percent of petal infestation

بیماری در کلزا و خیلی از میزبان‌های دیگر معمولاً توسط آسکوسپورهای قارچ که از آپوتسیوم‌ها آزاد می‌شوند، صورت می‌گیرد. آسکوسپورها ابتدا گلبرگ‌ها و اندام‌های گل را آلوده نموده، تولید ریسه در آنها می کنند و سپس با ریزش گلبرگ‌ها و اندام‌های گل آلوده روی برگ‌ها، سبب آلودگی آن‌ها از طریق میسلیوم قارچ می‌شوند که جهت جلوگیری از آلودگی سمپاشی با قارچکش‌ها نیز در این مرحله صورت می‌گیرد (۵ و ۹). تحقیقات انجام شده در کانادا نشان داده که همبستگی مثبت بین میزان آلودگی گلبرگ‌ها در اوایل دوره گلدهی و میزان وقوع بیماری در بعضی سال‌ها وجود دارد و پیش‌بینی بر اساس آلودگی گلبرگ‌ها در زمانی که خطر بیماری و وقوع آن پایین باشد، نسبتاً دقیق بوده ولی زمانی که خطر بیماری و وقوع آن متوسط یا بالا باشد، از دقت کمتری برخوردار است (۱۸). این روش بعداً توسعه بیشتری داده شد و تراکم مزرعه و شرایط جوی در دوره گلدهی نیز جهت پیش‌بینی بیماری در نظر گرفته شد (۱۹). در بررسی دیگری پیش‌بینی شدت بیماری بر اساس میزان آلودگی گلبرگ‌ها در ترکیب با رطوبت خاک دقت بیشتری نسبت به آلودگی گلبرگ‌ها به تنهایی داشته است (۸). همچنین جهت پیش‌بینی ریسک خطر آلودگی به بیماری، از ارقام کلزا تیپ بهاره و ارقام تیپ زمستانه زود گل‌ده در کشت پاییزه استفاده شده که همبستگی نسبتا خوبی بین میزان آلودگی گلبرگ‌ها و درصد آلودگی ساقه‌ها وجود داشته است (۶). در بررسی‌های انجام شده در استان مازندران، زمان شروع تشکیل آپوتسیوم‌ها و آزادسازی آسکوسپورهای قارچ، در اواخر بهمن‌ماه گزارش شده ولی دوره اوج ظهور آپوتسیوم‌ها در سطح خاک در اغلب سال‌ها در نیمه دوم اسفند و نیمه اول فروردین ماه بوده و از این جهت تاریخ کشت‌های دیرتر و ارقام دیررس‌تر میزان آلودگی بیشتری به بیماری داشته‌اند (۴). با توجه به اهمیت پیش‌آگاهی این بیماری و تعیین زمان دقیق سمپاشی در صورت نیاز به مبارزه شیمیایی، هدف از انجام این تحقیق دستیابی به روشی دقیق‌تر جهت ردیابی بیماری به کمک آزمون آلودگی گلبرگ‌های کلزا به اسپورهای قارچ بیمارگر و ارتباط آن با میزان آلودگی به بیماری می‌باشد تا از این طریق بتوان نسبت به پیش‌آگاهی به‌موقع بیماری اقدام نمود.

مواد و روش‌ها

جهت ردیابی قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* در مزارع کلزا استان مازندران در سال زراعی ۹۵-۱۳۹۴، تعداد ۵۰ مزرعه در مناطق مختلف کشت کلزا شامل ساری، دشت‌ناز، بابلسر، بهشهر و گلوگاه انتخاب شده و بازدیدهای دوره‌ای از آن‌ها از ابتدای بهمن ماه انجام گردید. پس از مشاهده آپوتسیوم‌های قارچ بیمارگر و در اوایل دوره گلدهی کلزا، آزمون گلبرگ در آن‌ها انجام گردید. ابتدا کیت‌های آزمون گلبرگ (petal test kits) که شامل ۵۰ عدد پتری حاوی محیط کشت مورد نظر (سیب‌زمینی دکستروز آگار+ استرپتوماسین + برمو فنل بلو) بود، آماده گردید و پس از شروع گلدهی کلزا، گل‌های تازه باز شده انتخاب و در هر پتری چهار گل روی محیط کشت قرار داده شده و اطراف پتری‌ها با پارافیلم مسدود شد. پتری‌ها در دمای حدود ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده و ۴-۳ روز بعد با توجه به تغییر رنگ حاصله در محیط کشت، وجود آلودگی به قارچ در آن‌ها تعیین گردید (۱۰). زمان انجام آزمون گلبرگ در بیشتر مزارع در دوره ۱۵ روزه نیمه اول اسفند ماه بود. با تجزیه‌ی واریانس و مقایسه‌ی میانگین داده‌های مربوط به درصد آلودگی گلبرگ‌ها، اختلاف بین مناطق تحت بررسی از این لحاظ مشخص گردید. میزان وقوع و شدت متوسط نهایی بیماری در مزارع فوق یک هفته قبل از برداشت کلزا تعیین شده و رابطه بین درصد آلودگی گلبرگ‌ها با میزان وقوع و شدت متوسط نهایی بیماری، از طریق تجزیه رگرسیون خطی و به کمک مدل‌های مختلف ریاضی بررسی شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار StatGraphics Centurion XV, Version 15.2.05 انجام گرفت.

نتایج و بحث

بررسی پتری‌های حاوی گل‌های کلزا نشان داد که در صورت آلوده بودن گلبرگ‌ها به آسکوسپور قارچ بیمارگر، سه روز پس از نگهداری پتری در انکوباتور، تغییر رنگ محیط کشت از آبی به زرد روشن بروز نمود، ولی در پتری‌های حاوی گل غیرآلوده، تغییر رنگ مشاهده نگردید. بر این اساس دامنه آلودگی گلبرگ‌های کلزا به آسکوسپورهای قارچ در مزارع مختلف

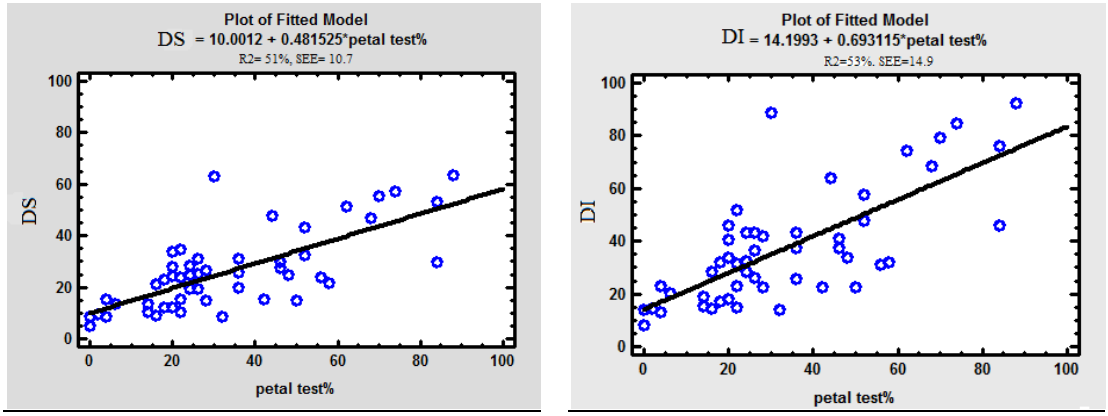
۸۸-۰درصد و با میانگین آلودگی ۳۳ درصد در کل مزارع بود. تجزیه‌ی واریانس و مقایسه‌ی میانگین داده‌های مربوط به درصد آلودگی گلبرگ‌ها نشان داد که از لحاظ درصد آلودگی گلبرگ‌ها، بین مناطق مورد بررسی اختلاف معنی‌دار ($P<0.05$) وجود داشته (جدول ۱) و منطقه ساری با کمترین میزان درصد آلودگی گلبرگ (۱۶درصد) در سطح B و بقیه مناطق با درصد آلودگی ۳۶ الی ۴۰ درصد در سطح A قرار داشتند.

جدول (۱) تجزیه‌ی واریانس درصد آلودگی گلبرگ‌ها به آسکوسپورهای قارچ بیمارگر اسکلروتینیا در مزارع کلزا مناطق مختلف استان مازندران در سال زراعی ۹۵-۱۳۹۴

ردیف	منابع تغییرات	درجه‌ی آزادی	میانگین مربعات
۱	منطقه	۴	۹۸۶*
۲	مزرعه	۹	۶۶۹/۲ns
۳	اشتباه آزمایشی	۳۶	۳۸۹/۶
۴	کل	۴۹	

* و ns به ترتیب به مفهوم معنی دار بودن در سطح احتمال ۹۵ درصد و غیر معنی دار بودن می باشند.

بررسی رابطه بین درصد آلودگی گلبرگ‌ها با میزان وقوع و شدت متوسط نهایی بیماری نشان داد که بر اساس آماره‌هایی مانند ضریب تبیین (R^2) و خطای استاندارد برآوردها، مدل‌خطی برازش خوبی با داده‌ها داشت. معادله‌ی این مدل برای داده‌های وقوع و شدت بیماری به‌ترتیب به صورت DI=14.2 + 0.69*petal و DS=10.0 + 0.48*petal بود شکل (۱).



شکل (۱) رابطه بین درصد آلودگی گلبرگ‌ها به اسپور قارچ اسکلروتینیا و میزان وقوع (DI) و شدت متوسط (DS) نهایی بیماری پوسیدگی اسکلروتینیایی ساقه کلزا در استان مازندران طی سال ۹۵-۱۳۹۴.

همانطور که اشاره شد در پتری‌هایی که گلبرگ‌های کلزا آلوده به اسپور بیمارگر بود، تغییر رنگ محیط کشت از آبی به زرد روشن مشاهده گردید که به علت تولید اکسالیک اسید توسط بیمارگر می‌باشد که این ماده یکی از فاکتورهای بیماری‌زایی قارچ نیز می‌باشد (۱۶). درصد آلودگی گلبرگ‌ها در منطقه ساری با اختلاف معنی‌دار کمتر از مناطق دیگر است که در این منطقه مزارع انتخابی بیشتر در تناوب با برنج کشت شده بود و به علت غرقاب شدن خاک سختینه‌های قارچ از بین رفته و از تشکیل آپوتسیوم جلوگیری می‌شود و در نتیجه وجود اسپور بیمارگر در سطح این نوع مزارع بسیار کمتر از مزارع کشت شده در زمین‌های خشکه‌زار است. همچنین معادله مربوط به رابطه درصد آلودگی گلبرگ‌ها با میزان وقوع و شدت بیماری نشان می‌دهد که هر یک درصد افزایش آلودگی گلبرگ‌ها می تواند سبب افزایش حدود ۰/۷ درصد در وقوع نهایی بیماری و ۰/۵ درصد در شدت متوسط نهایی بیماری گردد. با توجه به اینکه کنترل بیماری پوسیدگی اسکلروتینیایی کلزا در دنیا اغلب از طریق محلول‌پاشی با قارچ‌کش‌ها در مرحله گلدهی صورت می‌گیرد، جهت تعیین زمان دقیق سمپاشی و کاهش هزینه‌های

سمپاشی و خطرات زیست محیطی آن، سیستم‌های پیش‌آگاهی مختلفی در دنیا برای این بیماری ابداع شده است که اغلب آن‌ها بر اساس پارامترهای محیطی (دما، بارندگی، رطوبت نسبی، رطوبت خاک)، شرایط مزرعه و میزان زادمایه قارچ بیمارگر (تعداد آپوتسیوم، تعداد آسکوسپور شمارش شده توسط تله و میزان آلودگی گلبرگ‌ها به اسپور) بوده است (۸، ۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۹ و ۲۰). در این تحقیق نیز ارتباط خوبی بین درصد آلودگی گلبرگ‌ها به اسپور بیمارگر و میزان آلودگی به بیماری در مزرعه وجود داشته و امید است که با بررسی ثاثیر سایر عوامل دخیل در بیماری، بتوان سیستم پیش‌آگاهی بیماری در استان مازندران را توسعه داد.

منابع

۱. افشاری آزاد، ه. ۱۳۸۰. بیماری های مهم کلزا. نشر آموزش کشاورزی. ۹۹ص.
۲. آقاجانی، م.ع.، صفایی، ن. و علیزاده، ع. ۱۳۸۷. بررسی اپیدمیولوژی بیماری پوسیدگی اسکلروتینیایی ساقه کلزا در استان گلستان. پایان نامه دکتری تخصصی در رشته بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس. ۱۶۶ص.
۳. صانعی، س.ج.، قدیری راد، س.، نوری نیا، ع.، باقرانی، ن. و رضوی، س.ا. ۱۳۸۹. آسیب شناسی کلزا. نشر پیک ریحان. ۲۷۴ص.
۴. مهدی علمدارلو،ر. آقاجانی، م.ع. مهدیان،ص.ع. و براری، ح. ۱۳۹۱. بررسی وضعیت آلودگی به بیماری پوسیدگی اسکلروتینیایی ساقه کلزادر مناطق مختلف استان مازندران. بیماری‌های گیاهی ۴۸: ۲۴۷-۲۳۷.

5. Abawi, G.S. and Grogan, R.G. 1979. Epidemiology of diseases caused by *Sclerotinia* species. Phytopathology, 69: 899-904.
6. Becka, D., Prokinova, E., Simka, J., Cihlar, P., Beckova, L., Bokor, P. and Vasak, J. 2016. Use of petal test in early-flowering varieties of oilseed rape (*Brassica napus* L.) for predicting the infection pressure of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. Crop Protection, 80:127-131.
7. Boland, G. J. and Hall, R. 1994. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. Canadian Journal of Plant Pathology, 16: 93-108.
8. Bom, M. and Boland, G. L. 2000. Evaluation of disease forecasting variables for *sclerotinia* stem rot (*Sclerotinia sclerotiorum*) of canola. Canadian Journal of Plant Science, 80: 889-898.
9. Jamaux, I., Gelie, B., and Lamarque, C. 1995. Early stages of infection of rapeseed petals and leaves by *Sclerotinia sclerotiorum* revealed by scanning electron microscopy. Plant Pathology 44:22-30.
10. Morrall, R.A.A. and Thomson, J.R. 1991. Petal Test Manual for *Sclerotinia* in Canola. University of Saskatchewan, 27pp.
11. Parker, M.L., McDonald, M.R., and Boland, G.J. 2014. Evaluation of air sampling and detection methods to quantify airborne ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum*. Plant Disease, 98:32-42.
12. Qandah, I. S. and Del Río Mendoza, L. E. 2011. Temporal dispersal patterns of *Sclerotinia sclerotiorum* ascospores during canola flowering. Canadian Journal of Plant Pathology, 33:159-167.
13. Rogers, S.L., Atkins, S.D., and West, J.S. 2008. Detection and quantification of airborne inoculum of *Sclerotinia sclerotiorum* using quantitative PCR. Plant Pathology, 58:324-331.
14. Saharan,G.S., and Mehta,N. 2008. *Sclerotinia* disease of crop plants: Biology, ecology and disease management. Springer Science+Business Media B.V. 531pp.
15. Smith, M.E., Henkel, T.W. and Rollins, J. A. 2015. How many fungi make sclerotia? Fungal Ecology, 13:211-220.
16. Stephen, G. C., Valerie, E. S.,Martin, B. D. and Philip, S. L. 2000. Oxalic Acid, a Pathogenicity Factor for *Sclerotinia sclerotiorum,* Suppresses the Oxidative Burst of the Host Plant. The Plant Cell, 12: 2191–2199.
17. Sun, P. and Yang, X. B. 2000. Light, temperature and moisture effects on apothecium production of *Sclerotinia sclerotiorum*. Plant Disease, 84:1287-1293.
18. Turkington, T. K., Morrall, R. A. A. and Gugel, R. K. 1991. Use of petal infestation to forecast *Sclerotinia* stem rot of canola: evaluation of early bloom sampling 1985–90. Canadian Journal of Plant Pathology, 13: 50–59.
19. Turkington, T. K. and Morrall, R. A. A.1993. Use of petal infestation to forecast *Sclerotinia* stem rot of canola: the influence of inoculum variation over the flowering period and canopy density. Phytopafhology 83(6): 682-689.
20. Twengstrom, E., Sigvald, R., Svensson, C. and Yuen, J. 1998. Forecasting *Sclerotinia* stem rot in spring sown oilseed rape. Crop Protection, 17: 405-411.

ارزیابی مقاومت تعدادی از لاین های گندم به بیماری سفیدک پودری در مرحله گیاهچه ای و شناسایی نشانگرهای مرتبط با ژن های مقاومت

حوریه مسعودی*[۱]، حسین صبوری[۲]، فاختک طلیعی[۳]، جبار آلت جعفربای[۴]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه گنبدکاووس

۲و۳- گروه تولیدات گیاهی دانشگاه گنبدکاووس

۴- بخش تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر،مرکز تحقیقات وآموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان

نویسنده مسئول: H. masoudi77@yahoo.com

چکیده

به منظور تجزیه ارتباط بین نشانگرها و مقاومت به بیماری سفیدک پودری، واکنش ۶۰ ژنوتیپ گندم در برابر قارچ عامل بیماری سفیدک پودری در شرایط درون شیشه‌ای و با استفاده از ۸ نشانگر مولکولی مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی و با سه تکرار انجام شد. میانگین داده‌ها برای هر لاین محاسبه و براساس شدت آلودگی، لاین‌های حساس و مقاوم شناسایی شدند. تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که بین واکنش جدایه ها به بیماری در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌داری وجود دارد. تجزیه خوشه‌ای داده ها بر اساس فاصله اقلیدسیو با استفاده از الگوریتم UPGMA ، لاین‌ها را در سه گروه حساس، مقاوم و حدواسط قرار داد. نتایج مقایسه میانگین به روشLSD نشان داد که دو لاین ۱۲۷و ۸۰۱مقاوم‌ترین لاین‌ها بودند در حالی که لاین‌های ۳۹۰، ۵۱۵و ۸۳۳ بیشترین حساسیت را نسبت به بیماری نشان دادند. بر اساس نتایج تجزیه ارتباط بین نشانگرها و مقاومت به بیماری، تنها آلل PR46-5 با ضریب رگرسیون ۵/۰۹ ارتباط معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد بین بیماری و نشانگرها را نشان داد.با استفاده از نتایج این پژوهش، لاین‌های مقاوم می‌توانند به عنوان منابع مقاومت در برنامه‌های اصلاحی مورد استفاده قرار گرفته و یا برای مراحل بعدی به‌نژادی گزینش شوند.

واژگان کلیدی: مقاومت، سفیدک پودری، نشانگرهای مولکولی، گندم

مقدمه

بیماری سفیدک پودری گندم از مخرب‌ترین بیماری‌ها در آب و هوای معتدل و مرطوب می‌باشد، این بیماری از طریق کاهش فتوسنتز و افزایش تنفس و تعرق به گیاه صدمه می‌زند (۶) و با توجه به کاهش تعداد پنجه، تعداد دانه در هر سنبله و پر نشدن کامل دانه ها در گیاهان آلوده به سفیدک، خسارت عملکرد گاهی به ۲۰ درصد هم می‌رسد (۱۱). در ارزیابی واکنش ژنوتیپ‌های مقدماتی، پیشرفته و امیدبخش اقلیم شمال نسبت به بیماری سفیدک پودری، به‌دلیل غربال پی‌درپی لاین‌های امیدبخش (ERWYT) در سالهای مختلف، این لاین‌ها دارای مقاومت بالایی نسبت به این بیماری میباشند، ولی واکنش لاینهای مقدماتی نیمه‌حساس تا حساس بود (۴). درارزیابی تعداد ۲۴ رقم تجاری و لاین امیدبخش به پاتوتیپ برتر بیماری سفیدک پودری در مازندران، رقم شانگهای با بیشترین میزان آلودگی، حساس‌ترین و لاین MILAN/SHA7 با کمترین میزان آلودگی مقاومترین نسبت به بیماری گزارش شده است (۹). ارزیابی تنوع ۷۰ ژنوتیپ جو از لحاظ مقاومت به بیماری سفیدک پودری در گلخانه نشان داد که ارقام Afzal , Rihane, goharjow , EB-88-8 , 45-Motadel , EC-83-17 , Fajre-30 به ترتیب

بیشترین رتبه را از لحاظ آلودگی و شدت بیماری کسب کردند و به عنوان ژنوتیپ‌های حساس و نیمه‌حساس و ژنوتیپ‌های EB-86-6 , EB-87-20 , ,Aras , EB-88-2 , EBYT-W-89-4 , EB-88-13 , Dasht , MB-88-14 , EBYT-W-89-3 NB-17 EBYT-W-89-15 , EB-88-19 , 24Garm , و W-79-10 با اخذ پایین‌ترین رتبه‌ها، به عنوان مقاوم‌ترین ژنوتیپ‌ها به بیماری سفیدک در مرحله‌ی گیاهچه‌ای شناسایی شدند (۲). هدف این تحقیق شناسایی منابع مقاومت و کاربرد آن در برنامه-های اصلاحی می‌باشد.

مواد و روش

در این پژوهش واکنش تعداد ۶۰ ژنوتیپ انتخابی نسبت به بیماری سفیدک پودری گندم مورد ارزیابی قرار گرفت. جدایه قارچ عامل بیماری (*Blumeria graminis* f.sp. *tritici*) از بخش تحقیقات پاتولوژی غلات موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه و در آزمایشگاه روی رقم حساس گندم بولانی تکثیر و نگهداری شد (۱۰). برای ارزیابی ارقام گندم در مقابل عامل بیماری، بذور مورد نیاز هر رقم به مدت ۱۰ دقیقه با محلول ۱ درصد هیپوکلریت سدیم ضدعفونی شده و برروی کاغذ فیلتر مرطوب در تشتک پتری قرار داده شدند. پس از جوانه‌زنی، بذور به گلدان حاوی خاک منتقل شده و با تناوب ۱۶ ساعت روشنایی با دمای ۲۲ درجه سلسیوس و ۸ ساعت تاریکی با دمای ۲۰ درجه سلسیوس با رطوبت نسبی ۷۰ ٪ به مدت یک هفته نگهداری شدند. برای آلوده سازی ارقام گندم از روش آیشمن و همکاران (۵) استفاده شد. برگ اول گیاهچه‌هایی یک هفته‌ای بریده شد و در قالب طرح کاملا تصادفی و در سه تکرار روی محیط آب آگار ۵ درصد حاوی ۲۰ میلی گرم در لیتر بنزیمیدازول داخل تشتکهای پتری‌دیش قرار داده شدند. نمونه‌های آماده شده داخل اتاقک مکعبی بااسپورهای Bgt (به نسبت ۵ اسپور در میلیمتر مربع) آلوده شده و پس ازآن به اتاقک رشد منتقل شدند. یک هفته بعد ازآلوده سازی، تعداد کلنی رشد یافته در سطح ۲ سانتیمتر مربع هر برگ شمارش و داده ها در صفحهExcel ثبت شدند. آزمایش دو بار تکرار شد.استخراج DNA به روش CTAB انجام و نمایان سازی باندها به وسیله الکتروفوروز ژل اکریل‌آمید انجام شد. در این تحقیق از ۸ نشانگر IPBS, IRAP و ISSR استفاده شد که مشخصات آن‌ها در جدول ۱ آورده شده است.

جدول۱- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده

توالیآغازگر	دمای اتصال (تاچداوون)	نامآغازگر	نوعآغازگر
AGAGAGGCTCGGATACCA	۵۵ تا ۵۰ درجه سانتی گراد	PRI-59	IPBS
CACTTCAAATTTTGGCAGCAGCGGATC	۶۷ تا ۶۲ درجه سانتی گراد	PRI-50	IRAP
GTTGTTGTTGTTGTTGTTA	۴۷ تا ۴۲ درجه سانتی گراد	PRI-46	ISSR
CTTCTAAGCGCCA	۵۵ تا ۵۰ درجه سانتی گراد	PRI-44	IPBS
ATTCTCGTCCGCTGCGCCCCTACA	۶۷ تا ۶۲ درجه سانتی گراد	PRI-35	IRAP
GTGTGTGTGTGTGTGTT	۴۷ تا ۴۲ درجه سانتی گراد	PRI-28	ISSR
AGCCTGAAAGTGTTGGGTTGTCG	۶۷ تا ۶۲ درجه سانتی گراد	PRI-17	IPBS
CTCATGATGCCA	۵۵ تا ۵۰ درجه سانتی گراد	PRI-15	IPBS
ACCTAGCTCACGATGCCA	۵۵ تا ۵۰ درجه سانتی گراد	PRI-10	IPBS
AACCTGGCTCAGATGCCA	۶۰ تا ۵۵ درجه سانتی گراد	PRI-5	IPBS

نتایج و بحث

تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد (P<۰/۰۱) بین واکنش جدایه ها به بیماری وجود دارد (جدول ۲). تجزیه خوشه‌ای داده‌ها با استفاده از الگوریتم UPGMA و بر اساس فاصله اقلیدسی، لاین‌ها را در سه گروه حساس، مقاوم و حدواسط قرارداد (شکل۱). گروه اول شامل ژنوتیپ‌های ۳۹۰، ۵۱۵، ۸۳۳، ۱۱۳، ۷۵۴، ۶۸، ۴۸۱، ۵۷۳،

۹۰۷، ۵۴۳، ۵۷۷، ۹۹، ۵۱۶، ۷۳۷ بود، این گروه از لحاظ واکنش به بیماری سفیدک پودری نسبت به سایر گروه‌ها حساس‌تر بوده و تعداد کلنی بیشتری در واحد سطح نسبت به گروهای دوم و سوم بر روی سطح برگ ژنوتیپ‌های این گروه تشکیل شد. گروه دوم شامل ژنوتیپ‌های ۱۰۲، ۴۸۹، ۶۷۴، ۶۸۵، ۳۸، ۶۷۱، ۷۱۷ و ۶۵۵ بود که در برابر بیماری سفیدک پودری نیمه حساس بودند. گروه سوم که بزرگترین گروه نیز بود شامل ژنوتیپ‌های ۹۳۴، ۵۲۵، ۷۵۳، ۴۵۳، ۴۷۲، ۷۵۴، ۴۷۰، ۷۷۷، ۱، ۷۲۳، ۲، ۶۰، ۹۱۲، ۹۶، ۵۴۷، ۵۰۰، ۵۴۵، ۳۳۵، ۷۰۱، ۸۰۸، ۱۴۸، ۷۸۹، ۹۴۲، ۸۱، ۳۲۸، ۵۷۲، ۸۵۳، ۷۰۹، ۶۹۵، ۸۱۶، ۴۴، ۹۲۱، ۱۰۵، ۷۸، ۱۰۴، ۵۹۵، ۸۰۱ و ۱۲۷ بود، ژنوتیپ‌های این گروه نسبت به گروه‌های اول و دوم مقاومتر بودند. بر اساس نتایج مقایسه میانگین به روش LSD (جدول ۳)، دولاین ۱۲۷ و ۸۰۱ مقاوم‌ترین لاین‌ها بودند درحالی که لاین‌های ۳۹۰، ۵۱۵ و ۸۳۳ بیشترین حساسیت را نسبت به بیماری نشان دادند. بیشترین تعداد ژنوتیپ‌های گروه اول تجزیه خوشه‌ای براساس مقاومت به بیماری سفیدک پودری در گروه پنجم تجزیه خوشه‌ای بر اساس نشانگرها و در گروه دوم تجزیه خوشه‌ای حاصل از ژنوتیپ‌ها قرار داشت وژنوتیپ‌های ۴۸۱، ۵۷۷ و ۷۳۷ در گروه‌های ذکر شده مشترک بودند. از گروه دوم تجزیه خوشه‌ای بر اساس مقاومت به بیماری سفیدک پودری ژنوتیپ‌های ۶۵۵، ۷۱۷، ۶۸۵ و۶۷۴ در گروه سوم تجزیه خوشه‌ای حاصل از نشانگرهای مولکولی و در گروه اول تجزیه خوشه‌ای حاصل از ژنوتیپ‌ها قرار داشت. همچنین بیشترین تعداد ژنوتیپ-های گروه سوم تجزیه خوشه‌ای بر اساس به بیماری در گروه سوم تجزیه خوشه‌ای حاصل از نشانگرهای مولکولی و در گروه اول تجزیه خوشه‌ای حاصل از ژنوتیپ‌ها قرار داشت و ژنوتیپ‌های ۶۰، ۱۴۸، ۹۴۲، ۵۴۵، ۶۹۵، ۷۲۳، ۷۰۹، ۴۷۰ و ۷۰۱ بین گروه-های ذکر شده مشترک بودند. تعداد ۲۷ ژنوتیپ بزرگترین گروه (گروه سوم) از تجزیه کلاستر حاصل از بیماری سفیدک پودری شامل ۴۵۳، ۷۵۴، ۴۷۰، ۱، ۷۲۳، ۲، ۶۰، ۹۶، ۵۴۷، ۵۴۵، ۳۳۵، ۷۰۱، ۸۰۸، ۱۴۸، ۷۸۹، ۹۴۲، ۸۱، ۵۷۲، ۸۵۳، ۷۰۹، ۶۹۵، ۸۱۶، ۴۴، ۷۸، ۵۹۵، ۸۰۱ و ۱۲۷ مقاومت بالایی به بیماری سفیدک پودری نشان دادند.در حالی که ژنوتیپ‌های ۳۹۰، ۶۸، ۵۱۶، ۵۴۳، ۷۵۴ و ۸۳۳ نسبت به بیماری سفیدک پودری حساس بودند.

جدول۲- تجزیه واریانس بیماری سفیدک پودری روی ۶۰ ژنوتیپ گندم

منابع تغییر	درجه آزادی	بیماری سفیدک پودری گندم
رقم	۵۹	۱۲۷/۲۹**
خطا	۱۲۰	۲
ضریب تغییرات		۱۸

** : معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد

جدول ۲- مقایسه میانگین واکنش ۶۰ ژنوتیپ مختلف گندم در برابر بیماری سفیدک پودری

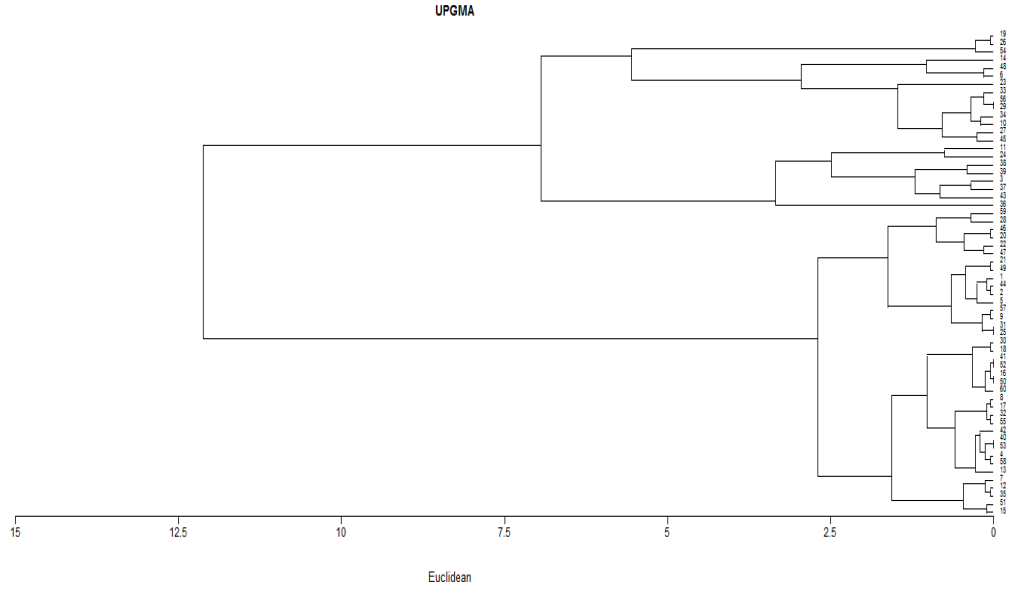
شماره لاین	تعداد کلنی	شماره لاین	تعداد کلنی	شماره لاین	تعداد کلنی	شماره لاین	تعداد کلنی
۳۹۰	۲۲/۵۵۰ a	۷۱۷	۹/۸۰۰ jk	۸۰۸	۳/۲۰۰ q-y	۴۸۹	۱۲/۹۵۰ ghi
۵۱۵	۲۲/۵۵۰ a	۶۵۵	۸/۲۰۰ kl	۷۰۱	۳/۲۰۰ q-y	۶۷۴	۱۱/۷۶۰ hij
۸۳۳	۲۹/۵۵۰ a	۹۳۴	۶/۷۵۰ lm	۱۴۸	۳/۱۵۰ q-y	۶۸۵	۱۱/۳۵۰ ij
۱۱۳	۱۹/۷۰۰ b	۵۲۵	۶/۴۰۰ lmn	۷۸۹	۳/۱۵۰ q-y	۳۸	۱۰/۸۰۰ j
۷۷۱	۱۸/۷۵۰ bc	۷۵۳	۵/۹۵۰ lmno	۹۴۲	۳/۰۵۰ r-z	۶۷۱	۱۰/۴۵۰ jk
۶۸	۱۸/۶۰۰ bcd	۴۵۳	۵/۹۰۰ mno	۸۱	۲/۶۵۰ s-z	۹۶	۴/۰۵۰ o-v
۴۸۱	۱۷/۳۵۰ cde	۴۷۲	۵/۵۵۰ mnop	۳۲۸	۲/۶۰۰ t-z	۵۴۷	۳/۹۰۰ o-w
۵۷۳	۱۶/۳۵۰ ed	۷۵۴	۵/۴۰۰ m-q	۵۷۲	۲/۵۵۰ t-z	۵۰۰	۳/۹۰۰ o-w
۵۴۳	۱۶/۲۰۰ e	۴۷۰	۴/۹۵۰ m-r	۸۵۳	۲/۵۰۰ t-z	۵۴۵	۳/۵۰۰ p-x
۹۰۷	۱۶/۲۰۰ e	۷۷۷	۴/۹۰۰ m-s	۷۰۹	۲/۲۰۰ u-z	۳۳۵	۳/۴۵۰ p-y
۵۷۷	۱۶/۰۰۰e	۱	۴/۶۳۳ m-t	۸۱۶	۲/۰۵۰ u-z	۷۸	۱/۳۵۰ xyz

۱/۲۵۰ xyz	۱۰۴	۲/۰۵۰ u-z	۶۹۵	۴/۵۵۰ m-t	۷۲۳	۱۵/۸۰۰ ef	۹۹
۱/۲۰۰ yz	۵۹۵	۱/۹۵۰ v-z	۴۴	۴/۵۰۰ m-t	۲	۱۵/۴۵۰ ef	۵۱۶
۰/۸۵۰ z	۸۰۱	۱/۹۰۰ v-z	۹۲۱	۴/۳۰۰ n-u	۶۰	۱۵/۲۰۰ efg	۷۳۷
۰/۷۵۰ z	۱۲۷	۱/۷۵۰ wxyz	۱۰۵	۴/۱۰۰ o-v	۹۱۲	۱۳/۷۰۰ fgh	۱۰۲

نتایج تجزیه ارتباط بین نشانگرها و بیماری سفیدک پودری نشان داد که فقط یک آلل ارتباط بین بیماری و نشانگرها را نشان می‌دهد. آلل PR46-5 که مربوط به نشانگر ISSR می‌باشد، با ضریب رگرسیون ۵/۰۹ و معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد این ارتباط را نشان داد (جدول۴). ژو و همکاران (۸) به منظور بررسی ۸ رقم گندم (*Triticum aestivum* L.) از ۵ آغازگر ISSR و ۲ آغازگر SSR استفاده کردند و از مجموع ۴۳ باند تکثیر شده توسط ۵ آغازگر ISSR، ۲۹باند (۶۷/۴۴ درصد) چندشکلی مشاهده شد. تعداد باندهای چندشکل تکثیر شده توسط هریک از آغازگرهای ISSR در دامنه ۳ تا ۸ باند بود و میانگین تعداد باندها برای هر پرایمر ۴/۸ بود و آغازگر UBC-849 قادر به تشخیص تمام ارقام مورد مطالعه بود که با نتایج حاضر در این تحقیق مطابقت دارد.

جدول ۴- تجزیه ارتباط نشانگرها و بیماری سفیدک پودری ۶۰ ژنوتیپ مختلف گندم

صفت	عرضازمبدا	پرایمر	خطای استاندارد	ضریب رگرسیون	F
سفیدک پودری	۶/۹۱۲	PR 46-5	۱/۸۹۱	۵/۰۹۰*	۷/۲۴۷



شکل ۱- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای واکنش ۶۰ ژنوتیپ گندم نسبت به بیماری سفیدک پودری

شجره ۶۰ ژنوتیپ گندم	
1	Nai 60/Hn7//Sy/3/MILAN/ATTILA//ATTILA-4Y
2	Nai 60/Hn7//Sy/3/MILAN/ATTILA//ATTILA-4Y
38	SW89.3064/STAR CMBW91Y01627S-13Y…/6/CATBIRD/NING8201/4/BLODAN/3/BB/7C*2//Y50E/KAL*3/5/TAJAN
44	SW89.3064/STAR CMBW91Y01627S-13Y…/6/CATBIRD/NING8201/4/BLODAN/3/BB/7C*2//Y50E/KAL*3/5/TAJAN
60	SW89.3064/STAR CMBW91Y01627S-13Y…/3/CHIL/CHUM18//MILAN
68	SW89.3064/STAR CMBW91Y01627S-13Y…//WBLL1*2/TUKURU
78	SW89.3064/STAR CMBW91Y01627S-13Y…//WBLL1*2/TUKURU
81	SW89.3064/STAR CMBW91Y01627S-13Y…//WBLL1*2/TUKURU
96	SW89.3064/STAR CMBW91Y01627S-13Y…//WBLL1*2/TUKURU
99	NG8319//SHA4/LIRA CMBW90M2302-6M-010M…/4/MERUA//TURACO/CHIL/3/TAJAN
102	NG8319//SHA4/LIRA CMBW90M2302-6M-010M…/4/MERUA//TURACO/CHIL/3/TAJAN
104	NG8319//SHA4/LIRA CMBW90M2302-6M-010M…/4/MERUA//TURACO/CHIL/3/TAJAN
105	NG8319//SHA4/LIRA CMBW90M2302-6M-010M…/4/MERUA//TURACO/CHIL/3/TAJAN
113	NG8319//SHA4/LIRA CMBW90M2302-6M-010M…/3/ALDAN/CIANO67//PASTOR
127	NG8319//SHA4/LIRA CMBW90M2302-6M-010M…/3/CHIL/CHUM18//MILAN
148	NG8319//SHA4/LIRA CMBW90M2302-6M-010M…/3/WBLL1*2/TUKURU
328	IRENAB/BABAX//PASTOR/3/CHIL/CHUM18//MILAN
335	IRENAB/BABAX//PASTOR/3/CHIL/CHUM18//MILAN
390	PARSI//SW89.3064/STAR CMBW91Y01627S-13Y...
453	PARSI/Catbird
470	PARSI//WBLL1*2/TUKURU
472	PARSI//WBLL1*2/TUKURU
481	SIVAND/3/Nai 60/Hn7//Sy
489	SIVAND/3/Nai 60/Hn7//Sy
500	SIVAND/3/Nai 60/Hn7//Sy
515	SIVAND/6/Luan/4/V763.23/3/V879.C8//Pvn/4//;Picus/5/Opata
516	SIVAND/6/Luan/4/V763.23/3/V879.C8//Pvn/4//;Picus/5/Opata
525	SIVAND/MORVARID
543	SIVAND//SW89.3064/STAR CMBW91Y01627S-13Y...
545	SIVAND//SW89.3064/STAR CMBW91Y01627S-13Y...
547	SIVAND//SW89.3064/STAR CMBW91Y01627S-13Y...
572	SIVAND/90-Zhong 87
573	SIVAND/90-Zhong 87
577	SIVAND/90-Zhong 87
595	SIVAND/3/IRENAB/BABAX//PASTOR
655	Milan/Sha7//Somai #3/3/MORVARID
671	Milan/Sha7//Somai #3/3/MORVARID
674	Milan/Sha7//Somai #3/3/MORVARID
685	Milan/Sha7//Somai #3/3/SW89.3064/STAR CMBW91Y01627S-13Y...
695	Milan/Sha7//Somai #3/3/SW89.3064/STAR CMBW91Y01627S-13Y...
701	Milan/Sha7//Somai #3/3/ALDAN/CIANO67//PASTOR

709	Milan/Sha7//Somai #3/3/MILAN/ATTILA//ATTILA-4Y
717	Milan/Sha7//Somai #3/3/MILAN/ATTILA//ATTILA-4Y
723	Milan/Sha7//Somai #3/3/MILAN/ATTILA//ATTILA-4Y
737	Milan/Sha7/4/OASIS/SKAUZ//4*BCN/3/2*PASTOR(514EB2th)/5/SW89.3064/STAR CMBW91Y01627S-13Y..
753	Milan/Sha7/4/OASIS/SKAUZ//4*BCN/3/2*PASTOR(514EB2th)/5/ATRAK/WANG-SHUI-BAI
754	Milan/Sha7/4/OASIS/SKAUZ//4*BCN/3/2*PASTOR(514EB2th)/5/ATRAK/WANG-SHUI-BAI
771	Milan/Sha7//WAXWING*2/KIRITATI(521EB2th)/3/SW89.3064/STAR CMBW91Y01627S-13Y...
777	SW89.3064/STAR CMBW91Y01627S-13Y…//Desconocido-7/3/MORVARID
789	SW89.3064/STAR CMBW91Y01627S-13Y…/4/ABAX/LR42//BABAX*2/3/VIVITSI(520EB2th)/5/MORVARID
801	SW89.3064/STAR CMBW91Y01627S-13Y…//Somai #3/3/MORVARID
808	SW89.3064/STAR CMBW91Y01627S-13Y…//Somai #3/3/MORVARID
816	SW89.3064/STAR CMBW91Y01627S-13Y…//Somai #3/3/MORVARID
833	Golestan/4/BABAX/LR42//BABAX*2/3/VIVITSI(520EB2th)/5/SW89.3064/STAR CMBW91Y01627S-13Y...
853	Golestan/4/BABAX/LR42//BABAX*2/3/VIVITSI(520EB2th)/5/ARTA
907	Ghahar/3/SHA7//HAHN"S"2/PRL"S"/ATTILA/KAUZ/4/MORVARID
912	Ghahar/3/SHA7//HAHN"S"2/PRL"S"/ATTILA/KAUZ/4/CHIL/CHUM18//MILAN
921	FONG CHAM/3/Shanghai 7//Hahn"S"*2/Prl"S"/4/MORVARID
934	Soisson/Pishtaz//Shiroodi /3/MORVARID
942	Soisson/Pishtaz/7/HD2206/Hork//Bul/6/CMH80A.253/2/M2A/CML//Ald/3/Ald*4/5/…/8/MORVARID

منابع

۱- صبوری، ع.، محمدی، ز. موسی‌نژاد، ص. بهار۱۳۹۴، بررسی تنوع ژنتیکی و گروه‌بندی ژنوتیپ‌های جو (*Hordeum vulgar* L.) از لحاظ مقاومت به بیماری سفیدک پودری (PowderyMildew) در مرحله گیاهچه‌ای. علوم گیاهان زراعی ایران. ۴۶(۱): ۸۱-۷۱.

2- Dehghan M. 2005. Genotype evaluation qualifying response, and advanced to the Caspian coast climate of hope powdery mildew in field conditions (Research ProjectFinal Report). Publication of Agriculture and Natural Resources, Research Center ofGolestan, 13 p.

3- Eichmann, R., and Hückelhoven, R. 2008. Accommodation of powdery mildew fungi in intact plant cells.Journal of Plant Physiology 165: 5-18.

4- Emami, K., and Hasanzadeh, J. 1994. Barley diseases guide (Translation). University Publication Center, Tehran.(InFarsi).

5- Molitor, A., Zajic, D,.Voll, L.M., Pons- Hückelhoven, J.,Samans, B., Kogel, H., and Waller, F. 2011. Barley LeafTranscriptome and Metabolite Analysis Reveals NewAspects of Compatibility and *Piriformosporaindica*–Mediated Systemic Induced Resistance to PowderyMildew. Molecular Plant-Microbe Interaction 24: 1427-1439.

6- Naghavi, M.R., Gganadha, M.R., Yazdisamadi, B., and Torabi, M. 2001. Inheritance of resistance tobarley powdery mildew at adult plant stage. Seed and Plant Improvement Journal, 17 (2), 140-150. (In Farsi)

7- Sofalian, O., Chaparzadeh, N., Javanmard, A., and Hejazi, M.S. 2008. study the genetic diversity of wheat landraces from Northwest of Iran based on ISSR molecular markers. International Journal of Agriculture & biology, 10(3) :466-468.

8- Zhu, Y.F., Hu, J., Han, R., Wang, Y., and Zhu, S. 2011. Fingerprinting and identification of closely related wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivarsusing ISSR and fluorescence-labeled TP-M13-SSR markers. Australian Journal of Crop Science 5(7): 846-850.

ارزیابی خسارت ناشی از بیماری بلاست در رقم برنج هاشمی بر اساس سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری

عباس احمدی[1*]، صدیقه موسی‌نژاد[2]، سید اکبر خداپرست[3] و سالار جمالی[4]

[1] *دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان*
[2] *استادیار بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان*
[3] *دانشیار قارچ شناسی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان*
[4] *استادیار نماتد شناسی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان*
[*] *نویسنده مسئول: abas.ahmadi88@yahoo.com*

چکیده

رقم برنج هاشمی در استان گیلان بسیار حساس به بیماری بلاست در مرحله بلاست برگ و خوشه می‌باشد. به منظور دستیابی به مدلی مناسب برای پیش بینی میزان خسارت عملکرد در سطوح مختلف بیماری، شش سطح مختلف بیماری به کمک قارچکش تری‌سیکلازول شبیه‌سازی شدند و رابطه این سطوح بیماری با میزان خسارت عملکرد مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تحقیق حاضر نشان‌دهنده ارتباط خوبی بین مقادیر AUDPC بلاست برگ و خوشه و خسارت عملکرد برنج رقم هاشمی در اثر بیماری بلاست می‌باشد. در ادامه تحقیق ارتباط آماری بین میزان خسارت عملکرد و سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری در مراحل بلاست برگ و خوشه به‌روش رگرسیون بررسی خواهد شد.

واژگان کلیدی: بلاست برگ، بلاست خوشه، AUDPC، خسارت عملکرد

مقدمه

نزدیک به ۲/۵ میلیارد نفر از جمعیت جهان به برنج وابسته هستند و از آن به‌عنوان غذای اصلی استفاده می‌کنند (۷). این گیاه در قاره‌ی آسیا و به‌ویژه در ایران یک محصول راهبردی است. تقریباً ۹۰ درصد تولید و مصرف برنج در قاره آسیا انجام می‌شود که ۹۶ درصد آن مربوط به کشورهای در حال توسعه می‌باشد (۲۰). بیماری بلاست برنج توسط قارچ B. C. Couch *Magnaporthe oryzae* به وجود می‌آید (۶). هرچند برخی از ارقام مقاوم برای این بیماری توسعه یافته‌اند، اما به‌دلیل انتخاب ارقام با کیفیت پخت بسیار بالا و حساس به بیماری بلاست توسط کشاورزان، هر ساله خسارت‌های زیادی به مزارع وارد می‌شود.

از AUDPC برای ارزیابی خسارت در بیماری‌های مختلف استفاده شده است. در سال ۲۰۰۶ مطالعه‌ای با هدف بررسی دزهای مختلف چهار قارچ‌کش جدید از گروه استروبیلورین‌ها شامل آزوکسی استروبین، کرزوکسیم متیل، پیراکلو استروبین و تریفلوکسی استروبین روی بیماری سفیدک پودری چغندرقند با عامل *Erisiphe betae* صورت گرفت (۹). در این تحقیق مشاهده شد که میان شدت بیماری که به صورت ارزش AUDPC بیان می‌شد و میزان کاهش عملکرد ریشه، ارتباط بالا و معنی‌داری وجود داشت، اما ارتباط معنی‌داری میان شدت بیماری و محتوای قند ریشه‌ها مشاهده نشد.

یکی دیگر از بیماری‌هایی که ارتباط بین AUDPC و میزان خسارت عملکرد در آن مورد بررسی قرار گرفت، بیماری آنتراکنوز لوبیا با عامل *Colletotrichum lindemuthianum* بود (۱۷). در این مطالعه و به‌منظور کمی‌سازی میزان خسارت ناشی از آنتراکنوز روی سه رقم لوبیا، آزمایشی در قالب طرح کرت‌های خرد شده صورت گرفت و مطالعات در سه فصل پشت سر هم در کشور اوگاندا انجام شد. نتایج به‌دست آمده نشان دادند که هم‌بستگی مثبت بین AUDPC و میزان کاهش عملکرد وجود دارد.

در تحقیقی که روی بیماری زنگ سیاه گندم (با عامل *Puccinia graminis* f.sp. *tritici*) به منظور پی بردن به میزان خسارت ناشی از این بیماری روی ۱۲ رقم گندم صورت گرفت، هم‌بستگی بالایی میان کاهش میزان محصول و شدت بیماری و هم‌چنین سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری یا همان AUPDC مشاهده گردید (۳).

در مطالعه‌ای که به‌منظور معرفی مدل‌های رگرسیونی بر اساس AUDPC برای ارزیابی خسارت ناشی از *Phytophthora infestans* روی سیب‌زمینی در اوتار پرادش هند صورت گرفت، ارتباط معنی‌داری بین میزان عملکرد و AUDPC مشاهده شد (۱۰). مطالعه مشابه آن در سال ۲۰۱۱ توسط سدلاکوا و همکاران صورت گرفته بود (۱۸).

همبستگی منفی بین میزان عملکرد و ارزش عددی AUDPC در مطالعات انجام شده روی بسیاری از بیماری‌های دیگر همانند بلایت آلترناریایی برگ خردل با عامل *Alternaria brassicae* (۱۹)، زنگ عدس با عامل *Uromyces viciae-fabae* (۱۶)، بیماری فرکل در موز با عامل *Phyllosticta musarum* (۵)، بیماری بلاست روی ارزن با عامل *Magnaporthe oryzae* (۱۳)، لکه زاویه‌ای برگ لوبیا با عامل *Phaeoisariopsis griseola* (۸)، بلایت شمالی برگ ذرت ناشی از *Exserohilum turcicum* (۱)، بیماری‌های مختلفی برگی در جو (۴)، لکه برگی آلترناریایی آفتابگردان با عامل *Alternaria helianthi* (۱۱)، بیماری‌های مختلف برگی در گندم (۲۱) و سفیدک پودری گندم با عامل *Erysiphe graminis* f.sp. *tritici* (۱۲) به اثبات رسیده است.

در ایران نیز مطالعاتی در همین زمینه توسط موجرلو و همکاران (۱۴) روی لکه برگی گندم ناشی از *Septoria tritici*، آقاجانی و همکاران (۲) روی بیماری پوسیدگی اسکلروتینیایی ساقه کلزا با عامل *Sclerotinia sclerotiorum* و موسی‌نژاد و همکاران (۱۵) روی بیماری بلاست برنج انجام شده است.

هدف از تحقیق حاضر بررسی ارتباط بین مقدار AUDPC و مقدار خسارت عملکرد در بیماری بلاست روی رقم برنج هاشمی به منظور پیش‌بینی میزان خسارت بر اساس AUDPC است که در قالب پایان نامه دانشجویی در حال انجام است.

مواد و روش‌ها

آزمایش روی رقم برنج هاشمی، در مزرعه آزمایشی دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان و در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار طی فصل زراعی سال ۱۳۹۵ به اجرا در آمد. با به‌کارگیری قارچ‌کش تریسیکلازول (75% WP) با غلظت ۰/۶ گرم در لیتر در فواصل زمانی مختلف (هر ۱۰ روز، هر ۱۴ روز، هر ۱۷ روز، هر ۲۱ روز و تیمار بدون سم‌پاشی) سطوح مختلف بیماری (پنج سطح شدت بیماری A تا E) شبیه‌سازی شدند. سطوح مختلف بیماری به‌عنوان تیمار در نظر گرفته شدند و تیمار شاهد هم به‌صورت کنترل کامل بیماری طی دوره رشدی بود (سم پاشی به‌صورت هفتگی). از زمان مشاهده اولین علایم بیماری در کرتهای آزمایشی، داده‌برداری از شدت بیماری آغاز شد و این کار تا زمان ابتدای خوشه‌دهی برای بلاست برگ و تا زمان رسیدگی خوشه‌ها برای بلاست خوشه با فواصل زمانی هفت روز ادامه یافت. ارزیابی شدت بیماری بر اساس مقیاس استاندارد بین‌المللی ارائه شده توسط موسسه بین‌المللی تحقیقات برنج (۱۵) انجام شد. با استفاده از شدت بیماری در زمانهای مختلف، منحنی پیشرفت بیماری ترسیم شد و سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری برای هر تیمار محاسبه گردید. در هنگام رسیدگی، محصول هر کرت با حذف ردیف‌های حاشیه‌ای برداشت و تا رسیدن رطوبت به ۱۴٪ خشک و سپس توزین گردید.

ارتباط آماری بین میزان عملکرد و سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری به‌روش رگرسیون بررسی شد. تجزیه و تحلیل آماری

داده‌ها به کمک نرم افزار SAS و آنالیز رگرسیون به‌کمک برنامه Statgraphics انجام شد. از آماره‌های r، R^2، aR^2، SE، F و دوربین-واتسون برای مقایسه مدل‌ها و انتخاب بهترین مدل استفاده شد.

نتایج و بحث

طی ۹ مرحله داده‌برداری از شدت بلاست برگ مشخص شد که تیمار F همیشه در کمترین سطح یا در سطح متوسطی از میزان شدت بیماری قرار داشت. این پایین بودن شدت بیماری به‌دلیل سمپاشی هفتگی بود. در تیمار A میزان شدت بیماری بتدریج افزایش می یافت. تیمار B در تمامی داده‌برداری‌ها در سطح متوسطی از میزان شدت بیماری قرار داشت. تیمار C همیشه در سطح پایین یا در سطح متوسطی از میزان شدت بیماری قرار داشت. تیمار C بعد از تیمار B و در جایگاه کمترین شدت‌ها قرار گرفت. تیمار D همیشه در سطح پایینی یا در سطح متوسطی از میزان شدت بیماری قرار گرفت. تیمار E در تمامی مراحل داده‌برداری در بالاترین سطح از میزان شدت بیماری قرار گرفت که به‌دلیل عدم سمپاشی در این تیمار در طی فصل زراعی بود، طوری که عامل بیماری بدون حضور هیچ‌گونه عامل کنترلی با حداکثر توان خود رشد نموده و بیشترین سطح از فضای برگ را آلوده کرد.

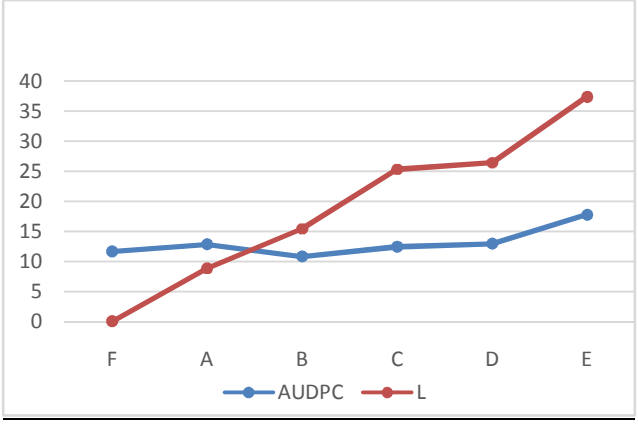
در طی ۴ مرحله داده‌برداری از بلاست خوشه تیمار F در مراحل ابتدایی دارای شدت کمی از میزان بیماری بود و به‌دلیل سمپاشی هفتگی که بر روی این تیمار در طی فصل زراعی صورت گرفت از میزان شدت کم نهایتاً به سطح متوسطی از شدت بیماری رسید و میزان شدت بیماری در همین سطح باقی ماند. تیمار D بعد از تیمار F قرار گرفت و در مراحل ابتدایی داده‌برداری دارای شدت کم و در مراحل انتهایی دارای شدت متوسط بود. دو تیمار A وC سطح متوسطی از میزان شدت بیماری را به خود اختصاص دادند، در حالی که تیمارهای B و E در مراحل ابتدایی داده‌برداری دارای سطح متوسطی از میزان شدت بیماری بودند و در مراحل انتهایی میزان شدت بیماری در این تیمارها نسبت به سایر تیمارها افزایش یافت و در سطوح بالاتری از میزان شدت بیماری نسبت به سایر تیمارها قرار گرفتند.

بیشترین مقدار AUDPC بلاست برگ مربوط به تیمار E بود که دارای بالاترین میزان خسارت عملکرد یا به عبارتی دارای کمترین مقدار وزن دانه‌ها در بین تیمارها نیز بود. تیمارهای D و C در جایگاه بعدی قرار گرفتند که از لحاظ مقدار AUDPC و هم از لحاظ میزان خسارت عملکرد اختلاف کمی از یکدیگر داشتند. تیمار A از لحاظ مقدار AUDPC با دو تیمار D و C اختلاف اندکی داشته، اما از لحاظ میزان خسارت عملکرد نسبت به دو تیمار D و C و حتی نسبت به تیمار B که از لحاظ AUDPC در جایگاه بعد از A قرار گرفته هم کمتر بود. تیمار B دارای AUDPC کمتری نسبت به تیمار A بوده، اما از لحاظ میزان خسارت عملکرد این تیمار در جایگاه بالاتر از تیمار A قرار گرفت و در نهایت تیمار F که از لحاظ مقدار AUDPC همانند تیمار B عمل کرده، اما دارای کمترین میزان خسارت عملکرد نسبت به تمامی تیمارها بود.

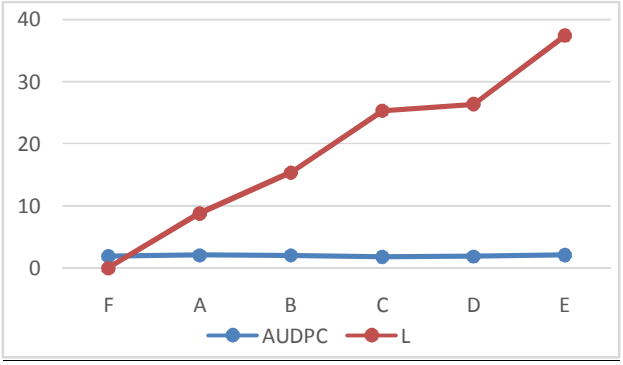
بیشترین مقدار AUDPC بلاست خوشه مربوط به تیمار E بود که از لحاظ میزان خسارت عملکرد هم بیشترین مقدار خسارت را نسبت به سایر تیمارها نشان داد. از لحاظ میزان AUDPC جایگاه‌های بعدی به‌ترتیب مربوط به تیمارهای A، B و C بود، اما این تیمارها دارای میزان خسارت عملکرد متفاوتی بودند، طوری که در این تیمارها بالاترین میزان خسارت عملکرد به‌ترتیب مربوط به تیمارهای D، B و A بود. تیمار C از لحاظ میزان خسارت عملکرد با تیمار D مشابه بوده، اما از لحاظ میزان AUDPC نسبت به همه تیمارها کمترین مقدار را نشان داد. در نهایت تیمار F که از لحاظ میزان AUDPC کمترین مقدار بعد از تیمار C را به خود اختصاص داد، اما از لحاظ میزان خسارت عملکرد این تیمار دارای کمترین میزان خسارت عملکرد یا به‌عبارتی دارای بالاترین مقدار وزن دانه نسبت به تمامی تیمارها بود.

نتایج آنالیز رگرسیون نشان داد که بهترین مدل ارزیابی خسارت بیماری بلاست در رقم هاشمی با توجه به آماره های مورد استفاده، مدل (R^2= ۶۰/۴۸) L = ۴/۷۶ LAUDPC -۳۲/۲۷ PAUDPC +۲۰/۸۸ است که در آن LAUDPC سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری بلاست در مرحله برگ و PAUDPC سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری بلاست در مرحله خوشه می باشند.

لذا نتایج تحقیق حاضر نشان‌دهنده ارتباط تقریباً خوبی بین مقادیر AUDPC بلاست برگ و خوشه و خسارت عملکرد برنج رقم هاشمی در اثر بیماری بلاست می باشد که در نتایج تحقیقات بسیاری از محققین مشاهده شده است (۱۵).



شکل ۱- مقادیر AUDPC بلاست برگ و خسارت عملکرد (L) در تیمارهای مختلف A تا F در رقم برنج هاشمی



شکل ۲- مقادیر AUDPC بلاست خوشه و خسارت عملکرد (L) در تیمارهای مختلف A تا F در رقم برنج هاشمی

منابع

1. Adipala, E., P.E. Lipps and L.V. Madden. 1993. Use of disease assessment methods in predicting yield loss due to northern leaf blight of maize. African Crop Science Journal, 1(2): 159-173.
2. Aghajani, M.A., N. Safaie and A. Alizadeh. 2013. Yield loss assessment of *Sclerotinia* stem rot of canola in Iran. Journal of Crop Protection, 2(2): 229-240.
3. Asmmawy, M.A., W.M. El-Orabey, M. Nazim and A.A. Shahin. 2013. Effect of stem rust infection on grain yield and yield components of some wheat cultivars in Egypt. ESci Journal of Plant Pathology, 2(3): 171-178.
4. Chogan, A., M.A. Aghajani and H.A. Fallahi. 2015. Crop loss assessment of diseases for various barley cultivars in Golestan Province, Iran. International Journal of Biosciences, 6(5): 136-146.
5. Corcolon, B.M. and A.D. Raymundo. 2008. Estimating yield losses in banana due to freckle disease caused by *Phyllosticta musarum* (Cke.) Vander Aa. Philippine Journal of Crop Science, 33(2): 75-85.
6. Couch, B. C. and Kohn, L. M. 2002. A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicates segregation of a new species, *Magnaportheoryzae*, from M. grisea. Mycologia 94(4): 683-693.
7. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2004. Women in agriculture, environment and rural production. Available online at www.FAO.org.
8. Jesus Junior, W.C., F.X.R. Vale, R.R. Coelho, P.A. Paul, B. Hau, A. Bergamin Filho, L. Zambolim and R.D. Berger. 2003. Relationships between angular leaf spot, healthy leaf area, effective leaf area and yield of *Phaseolus vulgaris*. European Journal of Plant Pathology,109: 625-632.

9. Karaoglanidis, G.S. and D.A. Karadimos. 2006. Control of sugar beet powdery mildew with strobilurin fungicides. Proceeding of National Science, Matica Srpska Novi Sad, 110: 133-139.
10. Lal, M., S. Sharma, I. Ahmad, B.P. Singh and S. Yadav. 2014. Development of yield loss assessment model for potato late blight disease in indo-gangetic plains. Potato Journal, 41(2): 130-136.
11. Leite R.M.V.B.C., L. Amorim and A. Bergamin Filho. 2006. Relationships of disease and leaf area variables with yield in the *Alternaria helianthi*-sunflower pathosystem. Plant Pathology, 55: 73-81.
12. Lipps, P.E. and L.V. Madden. 1989. Assessment of methods of determining powdery mildew severity in relation to grain yield of winter wheat cultivars in Ohio. Phytopathology, 79: 462-470.
13. Lule, D., S. Villiers, M. Fetene, T. Bogale, T. Alemu, G. Geremew, G. Gashaw and K. Tesfaye. 2014. Pathogenicity and yield loss assessment caused by *Magnaporthe oryzae* isolates in cultivated and wild relatives of finger millet (*Eleusine coracana*). Indian Journal of Agricultural Research, 48(4): 258-268.
14. Mojerlou, S., N. Safaie, A. Alizadeh and F. Khelghatibana. 2009. Measuring and modeling crop loss of wheat caused by *Septoria* leaf blotch in seven cultivars and lines in Iran. Journal of Plant Protection Research, 49(3): 257-262.
15. Mousanejad, S., A. Alizadeh and N. Safaie. 2010. Assessment of yield loss due to rice blast disease in Iran. Journal of Agricultural Science and Technology, 12: 357-364.
16. Negussie, T.G. and Z.A. Pretorius. 2008. Yield loss of lentil caused by *Uromyces viciae-fabae.* South African Journal of Plant and Soil, 25(1): 32-41.
17. Nkalubo, S., R. Melis, M.D. Laing and F. Opio. 2007. Yield loss associated with anthracnose disease on Ugandan market-class dry bean cultivars. African Crop Science Conference Proceedings, 8: 869-874.
18. Sedláková, V., J. Dejmalová, E. Hausvater, P. Sedlák, P. Doležal and J. Mazáková. 2011. Effect of *Phytophthorainfestans*on potato yield in dependence on variety characteristics and fungicide control. Plant Soil and Environment, 57(10): 486-491.
19. Shrestha, S.K., L. Munk and S.B. Mathur. 2005. Role of weather on *Alternaria* leaf blight disease and its effect on yield and yield components of mustard. Nepal Agricultural Research Journal, 6: 62-72.
20. USDA,2001. Rice situation and outlook yearbook. Economic Research Servis RCS.
21. Wegulo, S.N., J.A. Breathnach and P.S. Baenziger. 2009. Effect of growth stage on the relationship between tan spot and spot blotch severity and yield in winter wheat. Crop Protection, 28(8): 696-702.

ارزیابی تاثیر شیر ترش ۱۰ و ۱۵ درصد در مقایسه با مواد معدنی و قارچ کش اکویشن پرو در کنترل بیماری سفیدک کرکی خیار

ناهید خلخالی[۱]، سیاوش رعیت پناه[۲] و امیر ذوالفقاری[۳]

[۱]دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان

[۲]مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی مازندران، بخش تحقیقات گیاهپزشکی

[۳]دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان

** نویسنده مسئول: nahidkhalkhali71@gamil.com*

چکیده :

سفیدک کرکی خیار با عامل (*Pseudoperonospora cubensis*(Berkeley &Curtis) Rostovtsev) از مهمترین بیماری های مزارع خیار است. این تحقیق با استفاده از شیر ترش در دو سطح (۱۰ و ۱۵ درصد) در مقایسه با سیلیکات پتاسیم به میزان ۲ در هزار، سالیسیلیک اسید به میزان ۱در هزار، قارچ کش فاموکسادون + سیموگسانیل (اکویشن پرو WG 52.5%) به میزان ۴۰۰ گرم درهکتار و شاهد بدون استفاده از قارچ کش در شرایط مزرعه ای در قالب طرح بلوک های کامل تصادفی باسه تکرار اجرا شد. محلول پاشی با مشاهده اولین علائم بیماری سفیدک کرکی انجام گرفت. ارزیابی شدت بیماری در مرحله ۹۰ درصد وقوع بیماری در تیمار شاهد صورت گرفت. نتایج این تحقیق با استفاده از نرم افزار MSTATC نشان داد که بین تیمارهای مورد آزمایش از نظر کنترل درصد وقوع و شدت بیماری اختلاف معنی داری در سطح احتمال یک درصد (P<۰/۰۱) وجود داشته است. نتایج نشان داد که بیشترین شدت بیماری در تیمار شاهد با میانگین ۸۷/۷۷ درصد و کمترین در تیمار های اکویشن پرو و شیر ترشیده ۱۵ درصد به ترتیب با میانگین های ۴۰/۴ و ۵۰/۶۷ درصد محاسبه شد. بیشترین درصد وقوع بیماری در تیمار شاهد با میانگین ۸۹/۳۳ درصد و کمترین در تیمار اکویشن پرو با میانگین ۱۶ درصد مشاهده گردید. درصد وقوع بیماری در شیر ترش ۱۵ و ۱۰ درصد به ترتیب با میانگین های ۶۷/ ۵۷ و ۶۷ درصد تعیین گردید. نتایج نشان داد که قارچ کش اکویشن پرو و شیر ترشیده ۱۵ درصد کار آیی مناسبی در کنترل بیماری سفیدک کرکی خیار دارند.

واژگان کلیدی: سفیدک کرکی ، خیار، قارچ کش، سمپاشی و شیر ترشیده

مقدمه

سفیدک کرکی از مهمترین بیماریهای خیار در مناطق مختلف ایران است که با عث کاهش کیفیت و کمیت محصول خیار می گردد. در کشور های مختلف درصد زیادی از هزینه تولید مربوط به کنترل شیمیایی این بیماری است. به علت کمبود ارقام مقاوم به این بیماری کشاورزان از ارقام مختلف که دارای عکس العمل متفاوت به بیماری سفیدک کرکی بوده برای کاشت استفاده می نمایند. حساسیت بعضی از این ارقام به بیماری باعث کاهش عملکرد محصول میگردد. بکارگیری ترکیبات بی خطر ، مواد معدنی و قارچ کش های موثرکم خطر در پیش گیری از آلودگی به این بیماری و توسعه آن از اهمیت زیادی برخورداراست. سفیدک کرکی برای اولین بار در کوبا در سال ۱۹۶۸ وسپس از ژاپن گزارش شد. در ایران این بیماری در

سال ۱۳۴۲ از روی خیار و خربزه در استان های گیلان و مازندران و در سال ۱۳۵۹ در مزارع جالیز استان اصفهان مشاهده شد(۲). قارچ عامل بیماری زمستان را به صورت اسپور جنسی (اسپور) در بقایای برگ داخل خاک و یا به صورت غیرجنسی در روی گیاهان گلخانه‌ای یا خیارهای زیر پوشش پلاستیکی می گذراند. بیماری اولیه در بهار از جوانه زدن اسپورانژم ها ایجاد می شود. اسپورهای غیرجنسی می توانند به کمک باد از نواحی گرم به نواحی سرد نیز منتقل گردند (۱). چندین قارچ کش از جمله قارچ کش هایی از گروه های فنیل آمیدها[1]، دی تیو کاربامات ها[2]، ترکیبات مسی[3]، مشتقات کلرو بنزن[4]، فسفره آلی[5]، مورفولین ها[6] و فتالیمیدها[7] در کنترل بیماری موثر هستند. . اجرای این پروژه جهت تعیین تاثیر ترکیبات بی خطر برای کنترل بیماری سفیدک کرکی در مناطق تحت کشت خیار و کاهش استفاده از سموم شیمیایی پر خطر توسط کشاورزان از اهمیت زیادی برخورداراست.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در قطعه زمینی آلوده در ایستگاه زراعی فیروزکنده مازندران که سابقه کشت خیار و بروز بیماری هر ساله داشته در قالب طرح بلوک های کامل تصادفی باسه تکرار اجرا شد. تیمار های آزمایش شامل شیر ترش در دو سطح (۱۰ و ۱۵ درصد) در مقایسه با سیلیکات پتاسیم به میزان ۲ در هزار، سالیسیلیک اسید به میزان ۱ در هزار، قارچ کش فاموکسادون + سیموگسانیل (اکویشن پرو WG 52.5%) به میزان ۴۰۰ گرم در هکتار و شاهد بدون استفاده از قارچ کش بود . محلول پاشی تیمار ها در این آزمایش برای کنترل بیماری با مشاهده اولین علائم بیماری سفیدک کرکی انجام گرفت. ارزیابی شدت بیماری در مرحله ۹۰ درصد وقوع بیماری در تیمار شاهد صورت گرفت. در تعیین شدت بیماری از هر کرت ۵۰ برگ بطور تصادفی انتخاب و بر اساس روش توماس و همکاران (۶) با استفاده از شاخص ۱ تا ۹ رتبه بندی انجام شد. تجزیه و تحلیل با استفاده از نرم افزار MSTAT C انجام شد.

نتایج

نتایج این تحقیق که بین تیمارهای مختلف از نظر کنترل شدت بیماری سفیدک کرکی خیار اختلاف معنی داری در سطح احتمال یک درصد وجود دارد (جدول شماره ۱).

جدول ۱- تجزیه واریانس داده های حاصل از درصد شدت بیماری

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی D.F	مجموع مربعات S.S	میانگین مربعات MS	آماره F	cv
تکرار	۲	۸/۱۱	٤/۰٥	ns ۰/۴	۵/۰۶
تیمار	۵	۳۷۹۷/۳۲	۷٥۹/٤٦	** ۸۱/۰۱	
اشتباه	۱۰	۹۳/۷۳	۹/۳۷		
کل	۱۷	۳۸۹۹/۱۸			

ns از نظر آماری معنی دار نیست

** اختلاف بین داده ها در سطح یک درصد معنی داراست

مقایسه میانگین های شدت بیماری در تیمار های مختلف آزمایش نشان داد که بیشترین شدت بیماری در تیمار شاهد با میانگین شدت آلودگی ۸۷/۷۷ که در گروه a قرارگرفته است. کمترین شدت بیماری در تیمار های اکویشن پرو و شیر

[1]- Phenylamides
[2]- Dithiocarbamates
[3]- Copper composition
[4]- Cholobenzene derivates
[5]- Organophosphorus compoundes
[6]- Morpholines
[7]- Phthalimides

ترشیده ۱۵ درصد به ترتیب با میانگین های شدت بیماری ۴۰/۴ و ۵۰/۶۷ درصد محاسبه شد که در گروه های آماری d و c قرار گرفتند(جدول شماره ۲).

جدول ۲– مقایسه میانگین های درصد شدت بیماری و گروه بندی تیمارها

میانگین ٪	تیمار
۴۰/۴d	اکویشن پرو ۲۰۰ گرم درهکتار
۵۰/۶۷c	شیر ترش۱۵ درصد
۵۸/۰۳bc	شیر ترش۱۰ درصد
۶۲/۴۰b	سیلیکات پتاسیم به میزان ۲ در هزار
۶۳/۳۸b	سالیسیلیک اسید به میزان ۱در هزار
۸۷/۷۷a	شاهد بدون استفاده از قارچ کش

در این آزمایش قارچ کش اکویشن پرو و شیر ترشیده ۱۵ درصدبرای کنترل بیماری سفیدک کرکی خیار، در شرایط مازندران بیشترین کارآیی را نشان دادند. همچنین بین تیمار های مختلف قارچ کش ار نظر درصد وقوع بیماری سفیدک کرکی اختلاف معنی داری در سطح احتمال یک درصد وجود داشت (جداول ۳).

جدول۳ - تجزیه واریانس اثر تیمارها بر درصد وقوع بیماری

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی D.F	مجموع مربعات S.S	میانگین مربعات MS	آماره F	CV
تکرار	۲	۴۰/۷۰	۲۰/۳۸	۱۰/۳۶^{ns}	۶/۱۷
تیمار	۵	۹۴۱۸/۲۷	۱۸۸۳/۶۵	126.23**	
اشتباه	۱۰	۱۴۹/۲۲	۱۴/۹۲		
کل	۱۷				

ns از نظر آماری معنی دار نیست

** اختلاف بین داده ها در سطح یک درصد معنی دار است

مقایسه میانگین های اثر تیمار های آزمایش بر درصد وقوع بیماری نشان داد که تیمار های آزمایش در گروه های مختلفی قرار می گیرند. بیشترین درصد وقوع بیماری در تیمار شاهد با میانگین ۸۹/۳۳ درصد در گروه a و کمترین درصد وقوع بیماری در تیمار های اکویشن پرو و شیر ترشیده ۱۵ درصد به ترتیب با میانگین های ۱۶ و ۵۷/۶۷ درصد در گروه های e و d مشاهده گردید. میانگین های اثر سایر تیمار های آزمایش بر درصد وقوع بیماری دربین این دو گروه قرار گرفتند (جدول ۴).

جدول۴– مقایسه میانگین های درصد وقوع بیماری و گروه بندی اثر تیمارها

میانگین	تیمار
۱۶e	اکویشن پرو ۲۰۰ گرم درهکتار
۵۷/۶۷d	شیر ترش۱۵ درصد
۶۷c	شیر ترش۱۰ درصد
۷۲/۶۷b	سیلیکات پتاسیم به میزان ۲ در هزار
۷۳b	سالیسیلیک اسید به میزان ۱در هزار
۸۹/۳۳a	شاهد بدون استفاده از قارچ کش

بحث

بیماری سفیدک کرکی خیار *Pseudoperonospora cubensis* (Berkeley & Curtis) Rostovtsev از مهمترین بیماری‌های خیار در ایران و جهان می‌باشد. این بیماری در شرایط مساعد خسارت چشمگیری را به محصول وارد می کند. میزان خسارت بسته به زمان آلوده شدن گیاه، شرایط آب و هوایی و حساسیت گیاه میزبان از صفر تا ۱۰۰٪ متفاوت می باشد (۳). هزینه کنترل شیمیایی بیماری سفیدک کرکی خیار در سال ۱۹۹۱، حدود ۲۱ درصد از هزینه های تولید بوده است (۵).

استفاده از قارچ کش ها از روش های متداول مبارزه با این بیماری در اغلب مناطق تحت کشت این گیاه می باشد (۴). در این پروژه شیر ترشیده، دو ماده معدنی و قارچ کش با دوره پیش برداشت کوتاه شامل اکوایشن پرو برای کنترل بیماری سفیدک کرکی خیار در شرایط مزرعه مورد ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج این آزمایش نشان داد که بین تیمارهای مختلف و تیمار های سمپاشی شده نسبت به شاهد سمپاشی نشده است اختلاف معنی داری درسطح احتمال یک درصد وجود دارد. در تیمار شاهد که محلول‌پاشی بدون استفاده ازقارچ کش بوده، درصد وقوع و شدت بیماری ناشی از سفیدک کرکی در مقایسه با سایر تیمارها بیشترمشاهده گردید. قارچ کش اکویشن پرو و شیر ترشیده در این آزمایش از نظر کاهش درصد وقوع و شدت بیماری نسبت به شاهد و سایر تیمارهای مورد استفاده برتری نشان دادند.

منابع

۱. الهی نیا، س. ع. ۱۳۸۶. بیماریهای سبزی و صیفی و روش های مبارزه با آنها. انتشارات دانشگاه گیلان. ۵۸۲ ص.
۲. بهداد، ا. ۱۳۶۹. بیماریهای گیاهان زراعی ایران. چاپ نشاط اصفهان. ص۴۲۴.
۳. رنجبر، ع .،شهریاری، د و رافضی، ر. ۱۳۸۷. ارزیابی مقاومت ژرم پلاسم خیار نسبت به بیماری سفیدک داخلی کدوئیان ناشی از *Pseudoperonospora cubensis*، مجله حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی) جلد ۲۲، شماره ۲، صفحات: ۷۲-۷۱. ۱۳۸۵ . ص ۱۹۰.
4. Gisi, U., Chin, K. M., Knapova, G., Kung Farber, R., Mohr, U., Parisi, S., Sierotzki, H and Steinfeld, U. 2000.Recent developments in elucidating modes of resistance to phenylamide, DMI and strobilurin fungicides. Crop Prot. 19:863-872.
5. Schwinn, F. and Staub, T. 1995.*Oomycetes* Fungicides. Modern Selective Fungicides Properties, Applications, Mechanisms of Action. Gustav Fischer Verlag.pp 323-354.
6. . Thomas, C., Indadaba, T., and Cohen, Y. 1987.Physiological specialization in Pseudoperonospora cubensis. Phytopathlogy 77: 1621-1624.

پایش آلودگی گوجه فرنگی گلخانه‌ای نسبت به نماتد ریشه گرهی در استان گیلان

هوشیار اناری [۱]، سالار جمالی [۲*]، رضا ابراهیمی [۳]، حسن پدرام‌فر [۴]

۱، ۲ و ۴- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار و مربی گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

۳- استادیار گروه خاک‌شناسی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

** نویسنده مسئول jamali_s2002 @yahoo.com*

چکیده:

نماتدهای ریشه‌گرهی (*Meloidogyne* spp.) یکی از عوامل تقلیل دهنده عملکرد گوجه‌فرنگی درتمامی مناطق کشت این محصول در دنیا هستند. نظر به لزوم کسب اطلاعات کافی در خصوص میزان آلودگی و شناسایی دقیق گونه و نژاد نماتد جهت اتخاذ راهکارهای مناسب مدیریتی، پایشی در سطح گلخانه‌های استان گیلان صورت گرفت. بدین منظور، طی فصل زراعی سال ۱۳۹۵، در چندین مرحله تعداد ۵۰ نمونه خاک و ریشه از گلخانه‌های گوجه‌فرنگی استان جمع‌آوری گردید. نماتدهای موجود در خاک و ریشه استخراج و تعیین جمعیت گردیدند. نتایج بررسی‌ها نشان داد که نمونه‌های جمع‌آوری شده از گلخانه‌های پیربازار، دهسر و آستانه اشرفیه دارای بیشترین میزان آلودگی بودند. برش شبکه کوتیکولی انتهای بدن نماتد ماده (perineal pattern) و خصوصیات ریخت شناسی لارو سن دوم حکایت از غالبیت گونه *M. incognita* در نمونه‌ها داشت. همچنین آزمون میزبان‌های افتراقی جهت تعیین نژاد، نشان دهنده نژاد دوم این گونه در جمعیت‌های مورد مطالعه بود. بالاترین تعداد گال با ۸۱ گال به دهسر و کمترین آن با ۵۲ عدد در هر گرم ریشه، به سنگر تعلق داشت.

واژگان کلیدی: خسارت، میزبان‌های افتراقی، *Meloidogyne incognita*

مقدمه

گوجه‌فرنگی با نام علمی *Lycopersicon esculentum* با سطح زیر کشت معادل چهار میلیون هکتار و تولید سالانه ۱۲۵ میلیون تن در جهان؛ یکی از محصولات مهم کشاورزی محسوب می‌شود (۱۴). در ایران نیز، کشت گوجه‌فرنگی در بسیاری از نقاط کشور به عنوان یک محصول زراعی مهم و پربازده، متداول شده است (۱). این گیاه الگوی مناسبی برای تحقیقات فیزیولوژیکی، سلولی، بیوشیمیایی و ژنتیک مولکولی به‌شمار می‌رود. گوجه‌فرنگی و فرآورده‌های آن به دلیل میزان بالای ویتامین‌های گروه آ، ب، ث، کاروتن، لیکوپن‌ها، چربی پایین، کلسترول آزاد و کالری، از غذاهای سالم در سبد غذایی بشر به شمار می‌رود (۳). بنابر گزارش سازمان خواربار و کشاورزی ملل متحد، در حال حاضر بیش از چهار میلیون و ششصد هزار هکتار از اراضی دنیا به کشت گوجه‌فرنگی اختصاص دارد. ایران ۴/۷ درصد از تولید جهانی را به خود اختصاص داده است. متوسط عملکرد گوجه‌فرنگی در کشور، بالاتر از متوسط جهانی و در حدود ۳۸ تن در هکتار می‌باشد (۴). در بین نماتدهای انگل گیاهی، نماتدهای ریشه‌گرهی (*Meloidogyne* spp.) با توجه به اهمیت و تعامل با عوامل بیماری‌زا، از مهم‌ترین نماتدهای انگل گیاهی به شمار می‌روند (۱۳). این جنس اولین بار توسط برکلی در سال ۱۸۸۵ از گلخانه‌های خیار انگلستان معرفی شد (۱۷).

گونه‌های این جنس انگل‌های داخلی ساکن و اجباری ریشه بوده و دارای دامنه میزبانی وسیع می‌باشند (۵). این نماتدها با داشتن بیش از ۹۰ گونه، بیشتر از سه هزار گونه گیاهی را مورد حمله قرار داده و ارتباط غذایی پیچیده‌ای با میزبان خود برقرار می‌کنند. میزان خسارت ناشی از آن‌ها در بسیاری از کشورها، حدود ۱۵ درصد گزارش شده است (۱۵). این گروه قادرند حتی در شرایط مساعد، ۲۴ تا ۳۸ درصد خسارت روی گیاه گوجه‌فرنگی ایجاد کنند (۸). اما به طورکلی این گروه از نماتدها، سالانه باعث از دست رفتن حدود پنج درصد از محصولات کشاورزی جهان می‌شوند. این میزان خسارت، به عوامل متعددی از قبیل میزبان، شرایط آب‌وهوایی، نوع خاک و مهم‌تر از همه جمعیت نماتد بستگی دارد. سطح آستانه اقتصادی خسارت نماتدهای ریشه‌گرهی را در محصولات مختلف بین ۰/۵ تا ۱/۱ تخم در هر گرم خاک تعین کرده‌اند (۱۶).

در بررسی‌های صورت گرفته، نماتد عامل غده ریشه توتون در رشت، گونه‌های *M. incognita*, *M. javanica, M. arenaria,* *M. hapla* معرفی شده است (۱۸). همچنین گونه *M. javanica* از روی چای در لاهیجان و گونه‌های *M. incognita* و *M. arenaria* از روی توتون، کلم و کدو در منطقه احمد گوراب رشت گزارش شده‌اند (۱۰). نژاد دوم گونه *M. incognita* نیز از میزبان توتون، فلفل و گوجه‌فرنگی از منطقه احمدگوراب رشت و لاهیجان و نژاد دوم *M. arenaria* از روی خیار در حسن رود گیلان گزارش شده است (۲). با بررسی گونه و نژاد نماتد مواد غده ریشه، نژاد دوم *M. incognita* به عنوان گونه و نژاد غالب توتون در منطقه معرفی گردید (۱۱). هدف از این تحقیق، پایش مناطق آلوده به نماتد ریشه‌گرهی گوجه‌فرنگی در استان گیلان و تعیین گونه و نژاد غالب آن در منطقه می‌باشد.

مواد و روش ها

نمونه‌برداری: طی نمونه برداری‌های انجام شده در فصل زراعی سال ۱۳۹۵، تعداد ۵۰ نمونه خاک و ریشه گوجه‌فرنگی، از مناطق آستانه‌اشرفیه، بندرانزلی، رشت، لاهیجان، شفت، سنگر، کوچصفهان و فومن جمع‌آوری گردید.

نمونه‌ها به آزمایشگاه گیاه‌پزشکی منتقل و استخراج نماتدها از خاک با استفاده از روش جنیکنز (۹(انجام گرفت. جهت تثبیت و تهیه اسلاید از روش تکمیل شده سین هورست (۵) استفاده شد. ریشه‌های حاوی گال و کیسه تخم به قطعات ۳-۲ سانتی-متری تقسیم و به درون مخلوط کن ریخته شد. پس از آن محلول هیپوکلرایت سدیم ۰/۵ درصد تجاری افزوده و به مدت ۴۰ ثانیه مخلوط گردید تا تخم‌های درون کیسه ژلاتینی آزاد گردند. بلافاصله محتویات مخلوط کن روی الک ۲۰ مش قرار گرفته بر الک ۵۰۰ مش ریخته شد. سپس با آب سوسپانسیون تخم را شستشو داده تا هیپوکلریت سدیم به طور کامل از بین برود. در نهایت تخم‌های جمع‌آوری شده روی الک ۵۰۰ مش به را بشر شیشه‌ای انتقال داده و با استفاده از پتری شمارش، تعیین جمعیت گردید (۱۲).

جهت تهیه برش از کوتیکول انتهای بدن، نماتد ماده بالغ در داخل اسید لاکتیک ۴۵ درصد قرار داده شد. انتهای بدن به کمک تیغ اسکالپل برش تهیه و به داخل یک قطره گلیسرین انتقال داده شد. پس از تهیه اسلاید، برش انتهایی و اسلایدهای تهیه شده از لاروهای سن دوم به کمک میکروسکوپ نوری بررسی شد. مشخصات ریخت سنجی لازم در خصوص لارو سن دوم (طول دم، ناحیه شفاف انتهای دم و شکل دم) مورد مطالعه قرار گرفت و اقدام به شناسایی نماتد در سطح گونه گردید.

جهت تعیین نژاد از روش تیلور و ساسر استفاده شد (۱۹). به این ترتیب که میزبان‌های افتراقی (پنبه، توتون، هندوانه، فلفل، گوجه‌فرنگی و بادام‌زمینی) در ۴ تکرار در گلدان‌های ۴ کیلوگرمی حاوی خاک استریل کاشته شد. هر گلدان با ۲۰۰۰ لارو و تخم جمعیت خالص شده نماتد، مایه‌زنی گردید. بعد از گذشت ۶۰ روز، بوته‌ها را از خاک خارج وسیستم ریشه بر طبق روش توصیه شده بررسی و عکس العمل میزبان‌های افتراقی نسبت به آلودگی تعیین گردید.

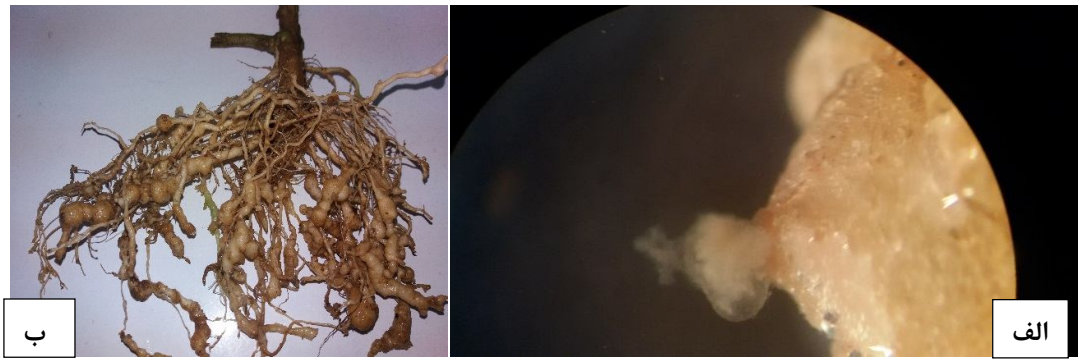
نتیجه و بحث

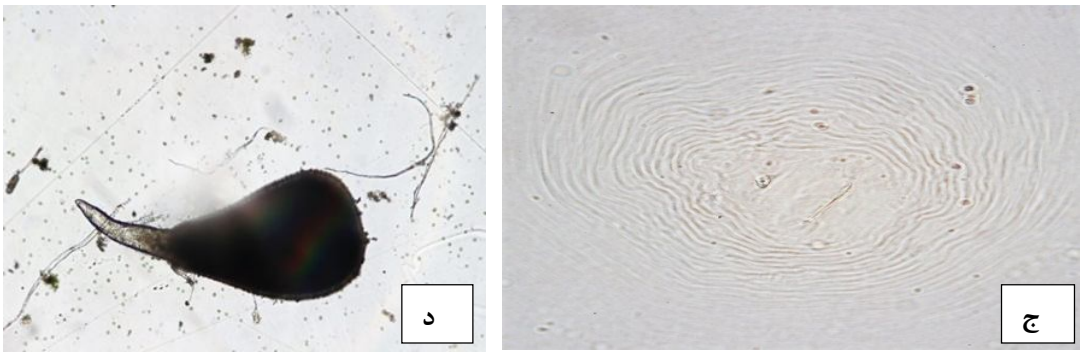
نماتد ریشه‌گرهی به‌طور مستقیم و غیر مستقیم موجب خسارت گوجه‌فرنگی و کاهش عملکرد می‌گردد. علائم آسیب نماتد می‌تواند قسمت‌های هوایی و زیرزمینی گیاه را شامل شود. مهم‌ترین و بارزترین نشانه فعالیت نماتدهای این جنس روی اندام-های زیرزمینی گیاه میزبان، ایجاد گال و گره روی ریشه می‌باشد (شکل۱- الف) که در نمونه‌های آلوده به وضوح مشاهده گردید. بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی برش انتهای بدن نماتدهای ماده بالغ و لاروهای سن دوم، گونه مورد مطالعه *M. incognita* تشخیص داده شد (شکل ۱ ب و ج و د). عکس‌العمل میزبان‌های افتراقی در برابر آلودگی نسبت به نماتد، نشان از وقوع نژاد دوم این گونه دارد. تکثیر جمعیت مورد آزمون روی پنبه و بادام‌زمینی منفی بود در صورتی که روی سایر میزبان‌ها به راحتی تکثیر یافته و گره تولید نمود.

جدول شماره ۱: تعداد نماتد در خاک مناطق نمونه‌برداری شده استان گیلان

مناطق	درصد وقوع بیماری	تعداد گال در یک گرم ریشه	تعداد تخم در یک گرم ریشه	تعدادلارو سن دوم در۳۰۰گرم خاک
آستانه اشرفیه	۵۰	۷۷	۱۰۹۸۷	۲۶
بندر انزلی	۲۵	۶۰	۷۸۰۰	۲۲
پیر بازار	۴۸	۷۲	۹۹۰۰	۲۵
دهسر	۵۵	۸۱	۱۱۴۰۰	۲۸
فومن	۳۲	۶۴	۷۹۸۲	۲۴
کوچصفهان	۲۰	۵۹	۶۵۰۰	۲۰
لاهیجان	۳۷	۶۲	۸۴۰۰	۲۳
سنگر	۲۰	۵۲	۶۰۰۰	۷

بیشترین درصد وقوع بیماری در دهسر و کمترین آن در کوچصفهان و سنگر به ثبت رسید. بالاترین تعداد گال با ۸۱ گال متعلق به دهسر و کمترین آن با ۵۲ عدد در سنگر مشاهده شد (جدول ۱). نتایج بدست آمده نشان داد که شهرستان-های دهسر، آستانه‌اشرفیه و پیربازار به ترتیب بالاترین تعداد نماتد در خاک را به خود اختصاص داده‌اند. این میزان جمعیت برای گوجه‌فرنگی خسارت‌زا بوده و موجب کاهش عملکرد و تقلیل کیفیت گوجه‌فرنگی می‌شود. با توجه به این‌که در این مناطق بیشتر از ارقام حساس به نماتد ریشه‌گرهی استفاده می‌گردد، کاربرد ارقام مقاوم یا متحمل نسبت به نماتد، می‌تواند یکی از راهکارهای توصیه‌ای باشد. شهرستان‌های کوچصفهان و سنگر دارای کمترین میزان آلودگی به نماتد ریشه‌گرهی بودند. با این‌حال، ضدعفونی خاک و ادوات کشاورزی می‌تواند در پیشگیری و کنترل آن مؤثر واقع شود.





شکل ۱: الف: ریشه آلوده به گال های نماتد ریشه گرهی گوجه فرنگی ب: کیسه تخم نماتد ج: نماتد ماده گلابی شکل د: شبکه کوتیکولی انتهای بدن نماتد ماده (اثر انگشت)

منابع

۱. طالب زاده، ز. ۱۳۸۳. بررسی اثرات شوری بر جوانه زنی و رشد گیاهچه های گوجه فرنگی. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه فردوسی مشهد.

2. Akhiani A, Mojtahedi H and Naderi A. 1984. Species and physiological races of root-knot nematodes in Iran. Paper presented at: 12th Iranian Plant Protection Congress; 2–7 September; Karaj, Iran.
3. Alam, M., M. Rahman, M. Mamun, and K. Islam. 2006. Enzyme activities in relation to sugar accumulation in tomato. Proceedings of Pakistan Academy of Science. 43: 241-248.
4. Anonymous, 2014. FAOstat. Available in: Fao.org/site/default.aspx.
5. De Grisse AT. 1969. Redescription ou modification de quelques techniques utilisées dans Létude des nematodes phytoparasitaires. Mededelingen Rijksfaculteit der Landbouwwetenschappen Gent 34: 351–369.
6. Devran Z. 2003. The screening of F2 plants for root-knot nematode resistance gene, Mi by PCR in tomato. Turkish Journal Agricultural, 28: 253-257.

Eisenback, J. D and H. H. Triantaphyllou. 1991. Root_knot nematodes: Meloidogyne species and races .7

8. Javed N., Gowen S.R., Inam-ul-haq M. and Anwar S.A. 2007. Protective and curative effect of Neem (*Azadirachta indica*) formulations on the development of root-knot nematode *Meloidogyne javanica* in roots of tomato plants. Crop Protec., 26: 530-534.
9. Jenkins WR. 1964. A rapid centrifugal flotation technique for extracting nematodes form soil. Plant Disease.
10. Kheiri A. 1972. Study of plant parasitic nematodes in some regions of Iran. Paper presented at; 7th Iranian Plant Protection Congress; 12-14 September; Isfahan, Iran.
11. Mahdavian H, Eshtiaghi H, Barooti S and Moidehi H. 2000. An effective method to control *Meloidogyne* incognita. On tobacco in greenhouse. Paper presentd at: 7th Iranian Plant Protection Congerss; 12-14 September; Isfahan, Iran.
12. Mc clure, T., A. Michael, H. Kruk and I. Misaghi. 1973. Method for obtaining Quanties of clean Meloidogyne eggs. Journal of Nematology, 5(3), P. 230.
13. Moens, M., R. N. Perry, and J. L. star. 2009. Meloidogyne species-a diverse group of novel and important plant parasites. In: Perry R. N. Moens M. Starr J. L. (eds). Root- Knot nematodes. CABI Publishing, Wallingford. Pp: 2-17.
14. Richard, A., and C. Eimilio. 2005. Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. CABI, 841p.
15. Sasser, J. N. and A. L. Taylor. 1978. Biology, identification, and control of root knot nematode (Meloidogyne species) Department of Plant Pathology, North Carolina State Univercity and the United States Agency for International Development 111 pp.
16. Sikora, R. A., and E. Frenandez. 2005. Nematode parasites of vegetables. In: M. Luc, R. A. Sikora, and J. Bridge (eds.), Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. CABI Publishing. Pp: 319-392.
17. Sirca S., Urek G. and Karssen G. 2000. The incidence of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* and *Meloidogyne hapla* in slovena. Acta agriculturae sloving, 83(1): 15-22.
18. Tanha Maafi Z and Mahdavian SE. 1997. Identification of species and races of root knot nematode (meloidogyne spp.) on kiwifruit and the effect of *M. incognita* (Kofoid & White) Chitwood 1949 on kiwifruit seedlings. Iranian Journal of plant pathology 65: 425-436 (in Persian).
19. Tylor AL and Sasser JN. 1978. Biology, idenfication and control of root knot nematode (Meloidogyne spp.) Raleigh: North Carolina State University Graphics. 111p.

بررسی ژنتیکی مقاومت به زنگ قهوه‌ای در تعدادی از ارقام گندم در شرایط مزرعه ای گرگان

سارا علی محمدزاده[۱]، علی اصغر نصرالله نژاد قمی[۲]، محمدعلی دهقان[۳]

[۱]-*دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات دانشگاه منابع طبیعی*

۲-*هیئت علمی دانشگاه علوم کشاورزی ومنابع طبیعی گرگان*

۳- *دکترا بیماری شناسی و عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی گلستان*

چکیده

بیماری زنگ قهوه‌ای گندم با عامل*Puccinia recondite f. sp.tritici* یکی از بیماری‌های مهم گندم در بسیاری از مناطق ایران و جهان محسوب می شود. خسارت بیماری بسته به میزان مقاومت یا حساسیت ارقام، زمان آلودگی، شرایط آب و هوائی و میزان بیماری زائی (ویرولانس عامل بیماری)، متفاوت است. در این پژوهش، ۳۲ رقم گندم به همراه رقم شاهد حساس (رقم بولانی) در قالب طرح بلوک های کامل تصادفی با سه تکرار در شرایط مزرعه ای گرگان کشت شدند. از زمان تورم خوشه (Booting) به فاصله هر دو هفته، ، تیپ آلودگی و شدت آلودگی در هر تیمار یادداشت برداری و در نهایت سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری برای هر ژنوتیپ تعیین شد. نتایج تجزیه واریانس داده های بدست آمده نشان داد، تفاوت معنی داری بین تیمارها در سطح ۱ درصد ($p<0/01$) وجود دارد بطوری که در تجزیه کلاستر، ارقام مورد بررسی از نظر مقاومت به زنگ قهوه ای در چهار گروه حساس، نیمه حساس، مقاوم و نیمه مقاوم به ترتیب با ۱۲، ۱، ۹ و ۱۲ ژنوتیپ قرار گرفتند.

واژگان کلیدی:گندم، زنگ قهوه ای، مقاومت

مقدمه

گندم نان *Triticum aestivum* از خانواده گرامینه جز مهم‌ترین گیاهان زراعی مناطق معتدل ایران و جهان به شمار می‌رود که بیش از ۳۰ درصد اراضی زیر کشت را به خود اختصاص داده است(۵). با توجه به وسعت سطح زیر کشت گندم و قدمت زراعت آن، این گیاه در طول دوره رشد مورد حمله بسیاری از عوامل بیماری‌زا از جمله زنگ‌ها قرار گرفته است. زنگ‌های گندم در بیشتر کشورهای جهان جزء مهم‌ترین بیماری‌های گندم محسوب می‌شود وهر جایی که گندم کشت می‌شود، *زنگ‌های گندم نیز وجود دارند(۶). بیماری* زنگ قهوه‌ای گندم *Brown or leaf rust* که عامل آن قارچ *Puccinia recondite* f. sp. *tritici* می‌باشد یکی ازمهم‌ترین بیماری‌های گندم است که این بیماری با توجه به شرایط فصل زراعی، زمان اپیدمی شدن بیماری و مرحله رشد گیاه باعث کاهش عملکرد به میزان ۵-۱۵ درصد می‌شود. خسارت زنگ قهوه‌ای در ایران بیش‌تر از زنگ سیاه و کمتر از زنگ زرد است (۸). میزان خسارت زنگ قهوه‌ای نسبت به زنگ زرد وسیاه کمتر است اما به دلیل فراوانی بیشتر و انتشار وسیع‌تر آن در دنیا در مجموع به نظر می‌رسد زنگ قهوه‌ای باعث کاهش محصول سالیانه بیشتری در دنیا نسبت به دیگر زنگ‌ها می‌شود(۳). در ارقام حساس میزان خسارت بیش از۵۰٪ برآورد شده است(۹). این بیماری در اروپای شرقی از مخرب‌ترین زنگ‌هاست به طوری که باعث کاهش سه تا پنج درصدی محصول می‌شود(۱). در یک اپیدمی زنگ قهوه‌ای در

کشور پاکستان در سال ۱۹۸۷ خسارت این بیماری برابر ۸۶ میلیون دلار آمریکا برآورد شد(۴). کاهش محصول گندم در اثر آلودگی به زنگ قهوه‌ای معمولا در اثر کاهش تعداد دانه در سنبله و وزن هزار دانه است(۱۰). با افزایش دمای جهانی شرایط برای گسترش و اپیدمی این بیماری فراهم شده است و بهترین و اقتصادی ترین روش مقابله با آن تولید و توسعه ارقام مقاوم به بیماری زنگ قهوه‌ای است، درعین حال ارقام مقاوم خطرات زیست محیطی ناشی از به کار بردن سموم شیمیایی را کاهش می‌دهد. مقاومت ژنتیکی تاثیرات محیطی مخرب و شناخته شده ای ندارند و از لحاظ اقتصادی به صرفه تر از کاربرد سموم شیمیایی می‌باشد. مطالعات ژنتیکی و دانستن نوع عمل ژن‌های دخیل در کنترل یک صفت و ترکیب پذیری در تعیین روش‌های اصلاحی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد. اگر چه تعدادی از ژن‌های مقاومت به زنگ قهوه‌ای در گندم شناسایی شده‌اند، اما مشکل عمده این است که اثر کوتاه مدت خود را با توجه به ظهور سریع نژادهای بدخیم از عوامل بیماری‌زا که قادر به غلبه بر مقاومت هستند، از دست می‌دهند. با این حال، حداقل چهار ژن *Lr34/Yr18*، *Lr46/Yr29*، *Sr2/Yr30* و *Lr67/Yr46* مقاومت نسبی اما پایدار برای مدت طولانی داشته‌اند(۲). برای تولید ارقام مقاوم به زنگ قهوه‌ای دو استراتژی اصلاحی عمده وجود دارد. یکی هرمی کردن (Pyramidization) ژن‌های مقاومت اصلی (ژن‌های *Lr*) که مقاومت کامل را ایجاد می‌کند و دیگر تجمع ژن‌های مقاومت فرعی که مقاومت کمی را سبب می شوند (۸).

مواد و روش‌ها

به منظور ارزیابی ۳۲ رقم گندم (جدول ۱) نسبت به زنگ قهوه¬ای این ارقام در ایستگاه تحقیقاتی عراق محله طبق طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار کشت شد. هر رقم در ردیفی به طول یک‌و نیم متر و تعداد ۴۰ بذر روی هر ردیف با فاصله‌ی ۷ سانتی مترکشت شد. فاصله‌ی دو ردیف از هم نیم‌متر است. . این ناحیه به لحاظ شیوع شدید آلودگی طبیعی به زنگ قهوه ای انتخاب گردید. اپیدمی طبیعی بیماری زنگ قهوه ای با آلودگی طبیعی نژاد های ناشناخته ای که در منطقه شایع بودند، ایجاد گردید. رقم بولانی نیز به عنوان رقم گسترش دهنده بیماری زنگ در حاشیه آزمایش و مابین ردیف ها کشت شد. صفات مورد مطالعه در مرحله گیاه بالغ و در مزرعه، نوع آلودگی، شدت آلودگی و سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری بود. یادداشت‌برداری‌ها در مرحله گیاه بالغ روی برگ پرچم انجام شد، بدین ترتیب بعد از مشاهده اولین علایم بیماری روی برگ پرچم یادداشت برداری برای شدت بیماری شروع و در سه نوبت با فاصله زمانی هفت روز انجام گردید. صفت دوم تیپ آلودگی می‌باشد که با مشاهده ۸۰ درصدی شدت بیماری روی رقم حساس بولانی براساس مقیاس ۰ تا ۹ به روش مک نیل(۱۹۷۱) ثبت شد. سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری با استفاده از فرمول ویلکاکسون و همکاران(۱۹۷۴)محاسبه گردید. تجزیه واریانس داده‌ها و آزمون مقایسه میانگین‌های دانکن(Duncan) و تجزیه کلاستر با استفاده از نرم افزار آماری SAS انجام گرفت.

$$AUDPC= \sum_{i=1}^{k} 1/2(S_i+S_{i-1})*d$$

Si:شدت آلودگی در مرحله iام، k: تعداد دفعات ارزیابی بیماری، d: فاصله بین دو ارزیابی

جدول ۱- ارقام گندم مورد بررسی نسبت به بیماری زنگ قهوه ای در شرایط مزرعه ای گرگان

ردیف	ارقام	ردیف	ارقام	ردیف	ارقام
۱	بولانی	۱۲	سومالی	۲۳	برکت
۲	آذر ۲	۱۳	سایسون	۲۴	الموت ۲
۳	سرخ تخم	۱۴	شعله	۲۵	اروندموتانت
۴	کرج ۱	۱۵	پاستور	۲۶	بولیوی
۵	بیستون	۱۶	دز	۲۷	سرداری
۶	آذر ۱	۱۷	آلموت ۱	۲۸	البرز

۷	کراس امید	۱۸	استار	۲۹	گوهردشت
۸	کراس شاهی	۱۹	مارکوئیس	۳۰	فرونتانا
۹	گوهر	۲۰	مرودشت	۳۱	مغان ۳
۱۰	طوس	۲۱	آرزانتین	۳۲	سومایتری
۱۱	اینیا	۲۲	شیرودی		

نتایج وبحث

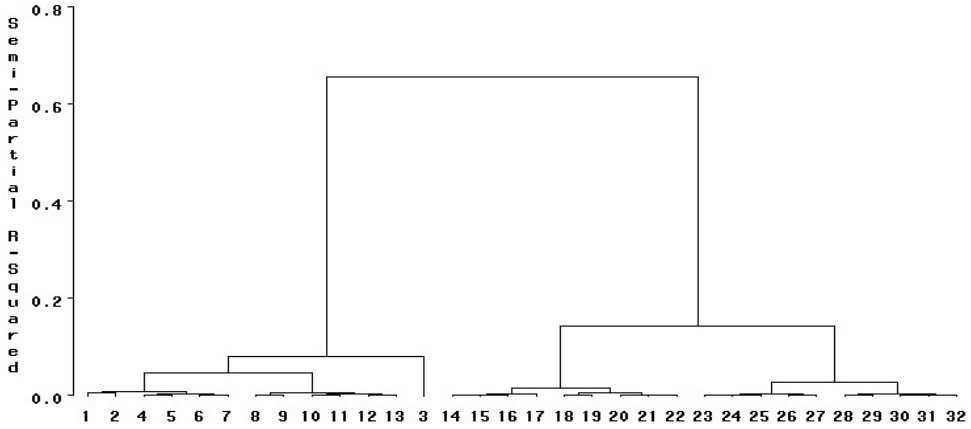
تجزیه واریانس برای صفات نوع آلودگی، شدت بیماری و شاخص سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری برای ۳۲ رقم گندم نان انجام شد. نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که ارقام از لحاظ صفات مورد بررسی تفاوت معنی داری در سطح احتمال یک درصد دارند و وجود تنوع ژنتیکی بین ارقام را تایید کرد. به منظور بررسی تنوع زنتیکی بین ارقام از لحاظ صفات مورد مطالعه در مزرعه، تجزیه کلاستر به روش ادغام متوسط انجام گرفت. درنتیجه تعداد مناسب گروه‌ها چهار درنظر گرفته شد(شکل۱) که می‌توان از لحاظ واکنش به زنگ قهوه‌ای به چهار گروه حساس، نیمه حساس، نیمه مقاوم و مقاوم دسته بندی کرد. در گروه‌های اول، دوم؛ سوم و چهارم به ترتیب ۱۲، ۱، ۹ و ۱۰ ژنوتیپ قرار گرفت. ژنوتیپ‌هایی مانند بولانی، بیستون، کراس امید، کراس شاهی، اینیا و سومالی در گروه حساس، و ژنوتیپ‌هایی مانند گوهردشت، البرز، بولیوی و مغان۳ در گروه مقاوم قرار گرفتند. بنابراین با توجه به هدف اصلاحی می‌توان ژنوتیپ‌های مربوطه را از درون هر گروه انتخاب کرد. این آزمایش نشان داد که ارقام از تنوع ژنتیکی نسبتا بالایی برخوردار هستند.

مقایسه میانگین‌ها در سطح احتمال پنج درصد برای سه صفت انجام گردید. نتایج نشان داد بیشترین نوع آلودگی با میانگین (۹) مربوط به ژنوتیپ بولانی بوده است که از لحاط آماری با ژنوتیپ‌های بیستون، آذر۱، کراس امید، کراس شاهی و کرج۱ و کمترین میزان آن با میانگین (۲/۳۳) مربوط به ژنوتیپ اینیا بوده است که با ژنوتیپ‌های سایسون، دز و الموت اختلاف معنی داری ندارند. بیشترین شدت آلودگی با میانگین(۹۶/۶۶) مربوط به ژنوتیپ بولانی بوده است که از لحاط آماری با ژنوتیپ‌های سرخ تخم، کرج۱ و بیستون و کمترین با میانگین(۴۵) مربوط به ژنوتیپ اینیا بوده است که با ژنوتیپ‌های استار۷ و مارکویس اختلاف معنی داری ندارند. بیشترین پیشرفت آلودگی با میانگین(۳۳۸/۳۳) مربوط به ژنوتیپ بولانی بوده است که از لحاط آماری با ژنوتیپ‌های کرج۱، بیستون و سرخ تخم و کمترین با میانگین(۵۷/۵۰) مربوط به ژنوتیپ اینیا بوده است که با ژنوتیپ‌های مغان۳،سومایتری و اختلاف معنی داری ندارند.

جدول۱- تجزیه واریانس صفات نوع آلودگی، شدت آلودگی و AUDPC

		میانگین مربعات		
منابع تغییرات	درجه آزادی	نوع آلودگی	شدت آلودگی	AUDPC
بلوک	۲	۰/۵۹۳^{ns}	۲۸/۹۰^{ns}	۸۱۶/۶۶۶^{ns}
تیمار	۳۱	۱۳/۳۰**	۶۰۲/۴۷**	۷۰۹۹/۳۱**
خطا	۶۲	۱/۳۸	۱۱۳/۳۱	۱۳۷۳/۱۸
ضریب تغییرات	-	۲۲/۰۵	۱۶/۶۵	۱۶/۴۷

^{**ns}: به ترتیب غیرمعنی دار ومعنی دار سطح پنج درصد



شکل ۱- تجزیه کلاستر به روش ادغام متوسط در ارقام مختلف گندم نسبت به بیماری زنگ قهوه‌ای

منابع

1. Dwurazna, M., M. Bialota., and Z, Gajdo. 1980. Resistance of wheat cultivars to rust in Poland. Proc. Eur. Mediterr. Cereal rust conf., 5th. pp. 147-150.
2. Herrera-Foessel, S. A., Lagudah, E. S., Huerta-Espino, J., Hayden, M., Bariana, H. S., Singh, D. and Singh, R. P. 2011. New slow rusting leaf rust and stripe rust resistance genes *Lr67* and *Yr46* are pleiotropic or closely linked. Theor Appl Genet 122:239-249.
3. Huerta-Espino, J., Singh, R. P., S. German, S., McCallum, B. D., Park, R. F., Chen, W. Q., Bhardwaj, S. C., and Goyeau, H. 2011. Global status of wheat leaf rust caused by *Puccinia triticina*. Euphytica 179:143–160.
4. Hussain, M., Hassan, S. F., and Kirmani, M. A. S. 1980. Virulence in *Puccinia recondite f. sp. Tritici* in Pakistan during 1978 and 1979. Proceedings of the Fifth European and Mediterranean Cereal Rusts Conference, Bari, Italy. pp. 179-184.
5. Karemi, H. 1993. Wheat. Tehran Univ. Press, 354p. (In Persian).
6. Knott, D.R. 1989. The wheat rusts-breeding for resistance. Springer-Verlag, Berlin, 201p.
7. McNeal, F. H., Konzak, C. F., Smith, E. P. Tate W. S., and Russell, T. S. 1971. Auniform system for recording and processing cereal research data. United State, Department of Agricultural Research Services, pp. 34-124.
8. Messmer, M. M., Seyfarth, R., Keller, M., Schachermayr, G., Winzeler, M., Zanetti, S., Fenillet, C., and keller, B., 2000. Genetic analysis of durable leaf rust resistance in winter wheat. Theoretical and Applied Genetics 100:419-431.
9. Ordoñez, M. E., Germán, S. E., and Kolmer, J. A. 2010. Genetic differentiation within the *Puccinia triticina* population in South America and comparison with the North American population suggests common ancestry and inter continental migration. Phytopathology 100:376-383.
10. Roelfs, A. P., Singh, R. P. and Sarri, E. E. 1992. Rust disease of wheat, concepts and methods of disease management. CIMMYT: Mxico. pp: 81.
11. Wilcoxson, R. D., Atif, A. H. and Skovmand, B. 1974. Slow rusting of wheat varieties in field correlated with stem rust severity on detached leaves in the greenhouse. Plant Disease, 58: 1058-1089.

ردیابی و تعیین ترادف یک استرین ویروس موزائیک کوتولگی ذرت (MDMV) از مزارع ذرت گنبد

آیدا میرقاسمی[1*]، سعید نصرالله‌نژاد[2]، عبدالقیوم ابراهیمی[3]

[1]دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان، گرگان، ایران
، [2]دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
[3]استاد گروه گیاهپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان، گرگان، ایران
** نویسنده مسئول: Aida.mirghasemi@gmail.com*

چکیده

طبق بررسی‌های انجام شده در طی سال‌های گذشته، ویروس موزائیک کوتولگی ذرت (*Maize dwarf mosaic virus*, MDMV) به‌عنوان یکی از مهم‌ترین ویروس‌های ذرت در گرگان شناخته شده است. با توجه به سطح کشت وسیع ذرت در گنبد، به منظور شناسایی و تعیین توالی استرین MDMV از مزارع ذرت نمونه‌برداری از گیاهان مشکوک با علائم موزائیک و کوتولگی صورت گرفت. سپس نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه با استفاده از آزمون الایزای غیرمستقیم (TAS-ELISA) با آنتی‌سرم چندهمسانه‌ای IgG-MDMV مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که نمونه‌ها با علائم نقوش سبز تیره و روشن (موزائیک) روی برگ‌های ذرت آلوده به MDMV بودند که جهت تایید آلودگی، بکمک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و رونوشت برگردان RT-PCR و با بکارگیری آغازگرهای اختصاصی MDMV برای تکثیر ناحیه ژن پروتئین پوششی MDMV مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج حاصل نشاندهنده یک قطعه DNA به طول مورد انتظار ۱۳۰۰ جفت باز روی ژل آگارز ۱٪ در نمونه‌های آلوده و تایید آلودگی آن‌ها به MDMV می‌باشد. محصول PCR تعیین ترادف شده و ترادف‌های حاصل در پایگاه اطلاعاتی NCBI با استفاده از نرم‌افزار جستجوگر BLAST مقایسه شدند و مشخص گردید که ترادف‌های حاصل به ویروس MDMV مربوط است. پس از انجام هم‌ردیف‌سازی چندگانه و حذف نواحی هم-پوشان در نهایت قطعات حاصل از تعیین ترادف استرین گنبد ۱۰۶۱ نوکلئوتید بدست آمد.

واژگان کلیدی: MDMV ، ذرت، TAS-ELISA، RT-PCR و BLAST

مقدمه

ذرت (*Zeamays*.L) از تیره‌ی Poaceae، سومین غله جهان می‌باشد که در سال‌های اخیر کشت آن از اهمیت زیادی برخوردار گردیده است. اهمیت محصول و بالابردن سطح زیر کشت این گیاه به علت قدرت تطابق آن با شرایط اقلیمی گوناگون می‌باشد، بدین جهت جزو عمده‌ترین محصولات مناطق معتدله، معتدله گرم، نیمه گرمسیر و مرطوب به شمار می‌رود (۷). پوتی‌ویروس‌ها[1] بزرگترین جنس در خانواده پوتی‌ویریده و نیز از نظر اقتصادی از مهم‌ترین ویروس‌های گیاهان تک لپه و دو لپه به شمار می‌روند (۱۲).

1. Potyviruses

ویروس موزائیک کوتولگی ذرت (*Maize dwarf mosaic virus*, MDMV) عضو جنس پوتی‌ویروس، یک بیماری ویروسی مهم ذرت با پراکنش وسیع است که در اکثر کشورهایی که ذرت و سورگوم کشت می‌شود وجود دارد (۱۱) و باعث بیماری موزاییک و افت محصول از ۸۰-۲۰٪ می‌شود (۱۰). MDMV یک ویروس با RNA تک رشته ای مثبت با پیکره‌ایی به ابعاد ۷۵۰×۱۳ نانومتر می باشد و به طور طبیعی با شته‌های سه زیرخانواده Lachininae، Drephonsiphinae و Aphidinae منتقل می‌شود. این ویروس با مایه‌زنی مکانیکی و بذر نیز انتقال می‌یابد اما با تماس دو گیاه و دانه‌های گرده منتقل نمی‌شود (۱۲). علائم بیماری خیلی متفاوت است، در قاعده برگ‌های جوان نقوش نامنظم سبز روشن و تیره یا موزاییک ایجاد می‌شود که ممکن است به صورت خطوط باریک سبز روشن یا زرد در امتداد رگبرگها جلوه کند. حالت موزاییک گاهی به شکل لکه-های سبز تیره در متن زرد است، بوته‌ها کمی کوتوله شده و اندازه خوشه و بذر کاهش می‌یابد. با رشد گیاه و افزایش حرارت، علائم موزاییکی ناپدید می‌شود و برگ‌های جوان بیشتر زرد می‌گردد (۱).

ویروس موزائیک کوتولگی ذرت اولین بار در جنوب اوهایو در سال ۱۹۶۳گزارش شد (۱۳). در ایران اولین‌بار در سال ۱۳۷۹ از مزارع ذرت دشت ناز ساری (مازندران) و علف‌های هرز قیاق ویروسی با علائم موزائیک مشاهده شد که معینی و ایزدپناه آن را پوتی ویروس شبیه MDMV نامیدند. این پوتی ویروس براساس آزمون‌های سرولوژیکی با IJMV و SCMV به ترتیب رابطه دور و ضعیف داشت ولی با SrMV و JGMV هیچ رابطه‌ای نداشت (۵).

معصومی و همکاران (۱۳۸۲) با بررسی‌های مولکولی قسمتی از ژن CP عوامل مولد موزائیک در ذرت ساری و اصفهان را MDMV تشخیص دادند. این ویروس بصورت گسترده در استان‌های گلستان و مازندران وجود دارد. همچنین از استان اصفهان نیز گزارش شده است (۴).

زارع و همکاران در سال ۱۳۸۳ با استفاده از روش‌های سرولوژیک و ترادف نوکلئوتیدی ناحیه CP-UTR، MDMV جدا شده از ذرت و قیاق مناطق دشت ناز ساری و اصفهان را با سایر پوتی‌ویروس‌های غلات مقایسه کردند و ارتباط سرولوژیک آنها را با یکدیگر گزارش کردند و نشان دادند کهMDMV از مازندران با ویروس موزاییک در مرغ جیرفت[1] و MDMV-G از آلمان ارتباط سرولوژیک نزدیک دارد و ارتباط ضعیفی با ویروس موزاییک ایرانی قیاق (IJMV) دارد و از ویروس موزاییک مرغ (BGMV) کاملا متفاوت است (۳). از بین پوتی‌ویروس‌های غلات در ایران دو ویروس موزائیک کوتولگی ذرت (*Maize dwarf mosaic virus*,MDMV) و موزائیک جنوبی مرغ BgSMV (*Bermuda grass southern mosaic,* از لحاظ بیولوژیکی، سرولوژیکی و مولکولی شباهت زیادی بهم دارند. ذاکری و همکاران (۱۳۹۱) بیان کردند این دو ویروس با هم رابطه دگرپادی دارند و ممکن است دو ویروس با رابطه بسیار نزدیک به هم و یا استرین‌های یک ویروس باشند که بین آنها مکانیزم دگرپادی عمل می‌کند (۲).

اطلاعات ترادف نوکلئوتیدی برای درک بیولوژی، تنوع و تاریخچه تکامل یک ویروس و نیز برای کشف راهبردهای جدید کنترلی و ارزیابی خطرات آن ضروری می‌باشد (۸).

مواد و روش‌ها

در تابستان۱۳۹۳-۱۳۹۲ نمونه‌برداری از مزارع ذرت گنبد دارای علائم کوتولگی به همراه موزائیک در پهنک برگ‌ها صورت گرفت و نمونه‌ها برای انجام آزمایش‌های سرولوژیکی و مولکولی به آزمایشگاه منتقل شدند. جهت شناسایی آن از آزمون الایزای غیرمستقیم TAS-ELISA (۹) با آنتی بادی چند همسانه‌ای IgG-MDMV استفاده گردید. بعد از شناسایی نمونه‌های آلوده به MDMV، تعداد ۴ استرین که بیشترین غلظت ویروس را در آزمون الایزا دارا بود انتخاب و از آن‌ها در آزمون PCR استفاده شد. آر.ان.ای این نمونه‌ها با استفاده از کیت mRNA capture (Roche) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج و پس از انجام واکنشRT و ساخت cDNA جهت تکثیر، واکنش PCR انجام شد. از آغازگرهای اختصاصی استفاده گردید. در دستگاه PCR پروفیل حرارتی به شکل زیر برنامه‌ریزی شد: ۴ دقیقه در ۹۴°C برای واسرشتگی اولیه، یک دقیقه در ۹۴°C ، ۴۵ ثانیه

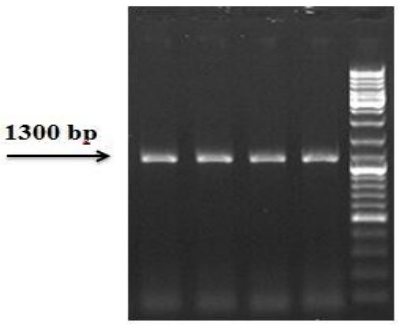
2- *Bermuda grass Jiroft virus, BJV*

در۵۵°C ، ۱دقیقه در ۷۲°C و در نهایت ۱۵ دقیقه در ۷۲ درجهت نشر قطعات ناتمام مورد استفاده قرار گرفت. محصول واکنش پی.سی.آر در ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد و قطعات تکثیری ژنوم بکمک رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید توسط دستگاه ثبت ژل مورد مشاهده و عکسبرداری قرار گرفتند. در نهایت محصول PCR برای تعیین ترادف به شرکت ماکروژن (کره جنوبی) ارسال شد. ترادف به دست آمده در بانک ژن (GenBank) بلاست گردیدند.

نتایج و بحث

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که نمونه‌ها با علائم تیپیک موزائیک و کوتولگی در آزمون الایزا آلودگی به MDMV را نشان دادند (شکل۱). جهت تایید آلودگی در این نمونه‌ها، با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی، قطعه DNA بطول حدود۱۳۰۰جفت باز مربوط به ناحیه ژن پروتئین پوششی MDMV تکثیر گردید که در نمونه‌های شاهد سالم (منفی) باندی مشاهده نگردید (شکل ۲).

شکل ۱- علائم بیماری ویروسی موزائیک کوتولگی ذرت روی پهنک برگ ذرت (موزائیک) (اصلی).



شکل۲- قطعات نوکلئوتیدی حاصل از الکتروفورز محصول **PCR** (۱۳۰۰ جفت باز): راهک‌های ۱تا ۴ سمت چپ: نمونه‌های ذرت مشکوک به ویروس **MDMV** و راهک سمت راست: **M**، نشانگر **1000bp**.

پس از تعین ترادف، ترادف به دست آمده با ترادف‌های موجود در بانک Genbank مقایسه گردید که مشخص شد که ترادف به دست آمده مربوط به ویروس موزاییک کوتولگی ذرت می‌باشند. پس از انجام هم‌ردیف‌سازی چندگانه و حذف نواحی هم‌پوشان در نهایت قطعات حاصل از تعیین ترادف استرین گنبد ۱۰۶۱ نوکلئوتید بدست آمد.

در سال‌های اخیر علائم بیماری ویروسی مانند موزائیک منجر به کاهش رشد و کاهش محصول در سطح زیادی از مزارع ذرت گرگان شده بود که آلودگی آن‌ها با روش‌های سرولوژیکی و مولکولی تایید شد (۶). در تحقیق حاضر استرین MDMV گنبد با روش‌های سرولوژیکی و مولکولی شناسایی شد. این اولین گزارش از ردیابی سرولوژیکی و مولکولی ویروس موزائیک کوتولگی در مزارع ذرت گنبد می‌باشد.

منابع

۱. اخوت، س.م. ۱۳۷۸. بیماری‌های غلات. انتشارات دانشگاه تهران، تهران، ۴۸۱ ص.

۲. ذاکری، ع.، معصومی، م.، نصرالله‌نژاد، س.، قهرمانی، ط.، و ایزدپناه، ک. ۱۳۹۱. بررسی رابطه دگرپادی بین ویروس‌های موزائیک کوتولگی ذرت و موزائیک جنوبی مرغ. بیماری‌های گیاهی. (۳) ۴۸: ۳۴۳-۳۵۲.

۳. زارع، آ.، معصومی، م.، حیاتی، ج.، و ایزدپناه، ک. ۱۳۸۳. خصوصیات سرولوژیکی و بیولوژیکی MDMV در ایران. خلاصه مقالات شانزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. تبریز. صفحه ۱۱۰.

۴. معصومی، م.، زارع، آ.، و ایزدپناه، ک. ۱۳۸۲. تأئید وجود ویروس موزائیک کوتولگی ذرت (MDMV) در ایران بر اساس مقایسه ترادف ناحیه ´۵ ژن پروتئین پوششی ویروس. خلاصه مقالات دومین کنگره ویروس شناسی ایران. تهران. صفحه‌های ۳۶۹-۳۷۰.

۵. . معینی، ع. ا.، و ایزد پناه، ک. ۱۳۸۰. تشخیص و خالص سازی پوتی ویروس شبیه ویروس موزائیک کوتولگی ذرت (MDMV) در مازندران. مجله بیماری‌های گیاهی. ۳۷: ۱۴۷-۱۵۹.

۶. نصرالله‌نژاد، س، ذاکری، ع.، و مصطفوی نیشابوری، ف. س. ۱۳۹۳. ردیابی سرولوژیکی و مولکولی دو ویروس مولد موزائیک در مزارع ذرت استان گلستان. ژنتیک نوین. (۲) ۹:۲۳۹-۲۲۴.

۷. نورمحمدی، ق.، سیادت، س.ع. و کاشانی، ع. ۱۳۷۶. زراعت غلات. دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ۴۴۶ ص.

8. Akan, K.U., Martin, R., and Shukla, D. 2007. Coat protein of potyviruses and Comparison of the four Australian strains of *Sugarcane mosaic virus*. Virology 111:455-462.

9. Converse, R.H., and Martin, R.R. 1990. ELISA methods for plant viruses. APS Press. 179-196.

10. Cheng, J., Chen, J., and Chen, J. 2002. The complete sequence of a Sugarcane mosaic virus isolate causing Maize dwarf mosaic disease in China. Journal of Science in China 45: 322-330.

11. Gordon, D. T., Bradfute, O.E., Gingery, R.E., Knoke, J.K., Louie, R., Nault, L.R., and Scott, G. E. 1981. Introduction : History. Geographical distribution , pathogen characteristics and economic importance. Pp. 1-12.. In: Viris and Viruslike diseases of maize in the United states. Eds. Gordon, D. T., Knoke, J. K., Scott, G. E. South. Coop. Ser. Bull. 247. Ohio Agriculture Researcher Developing. 110P.

12. Shukla, D.D., and Ward C.W. 1989. Identification of potyviruses on the basis of coat protein sequence data and serology. Archives Virology 106171-200.

13. Wiliams, L.E., and Alexander, L.J. 1965. Maize dwarf mosaic, a new corn disease. Phytopathology 55: 802-804.

تعیین جایگاه فیلوژنی و بررسی تغییرات نوکلئوتیدی استرین MDMV گنبد

آیدا میرقاسمی[1*]، سعید نصرالله‌نژاد[2]، عبدالقیوم ابراهیمی[3]

[1]دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان، گرگان، ایران

[2]دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

[3]استاد گروه گیاهپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان، گرگان، ایران

** نویسنده مسئول: Aida.mirghasemi@gmail.com*

چکیده

ویروس موزائیک کوتولگی ذرت (*Maize dwarf mosaic virus*, MDMV) از نظر اقتصادی یکی از مهم‌ترین ویروس‌های ذرت به شمار می‌آید. در ایران نیز این ویروس از اهمیت زیادی برخوردار است. هدف از انجام این تحقیق تعیین جایگاه فیلوژنی و بررسی تغییرات نوکلئوتیدی در ترادف ویروس مذکور استرین گنبد با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده و مقایسه آن با ترادف سایر استرین‌های این ویروس موجود در بانک ژن بود. بدین منظور در تابستان ۱۳۹۳ از مزارع ذرت استان گلستان (گنبد) بازدید بعمل آمد و از گیاهان مشکوک دارای علائم موزائیک و کوتولگی نمونه‌برداری صورت گرفت و نمونه‌ها به منظور انجام آزمون PCR به آزمایشگاه منتقل شدند. بعد از تکثیر قطعات در پی‌سی‌آر برای بدست آوردن توالی ناحیه پروتئین پوششی ویروس، جفت آغازگرهای عمومی پوتی‌ویروس‌ها (Pot1/Pot2) به کار برده شد. نتیجه مقایسه ترادف ناحیه ژن پروتئین پوششی استرین گنبد با سایر استرین‌های MDMV در جهان که با نرم افزار Blast صورت گرفت نشان داد که این استرین‌ها در دو گروه قرار می‌گیرند: در گروه اول استرین‌های گنبد، آلمان، آمریکا و مجارستان با شباهت ۸۶ تا ۸۹٪ وجود دارد و جهش در توالی نوکلئوتیدی آن‌ها از نوع جانشینی اتفاق افتاده است و در گروه دوم شامل استرین‌های اسپانیا با شباهت ۸۶٪، جهش از سه نوع مختلف جانشینی، حذف و اضافه شدن اتفاق افتاده است. تعیین جایگاه تاکسونومیکی استرین ایرانی MDMV و مقایسه آن با سایر استرین‌های دنیا می‌تواند منشاء تکاملی و پیدایش این ویروس را در ایران روشن سازد. شباهت زیاد این استرین با استرین‌های اروپایی و آمریکائی این فرضیه را مطرح می‌کند که احتمالا MDMV در ایران منشا خارجی داشته و از طریق بذور آلوده وارد ایران شده است.

واژگان کلیدی: ویروس موزائیک کوتولگی ذرت، جدایه گنبد، ژن ناحیه کد کننده پوشش پروتئینی

مقدمه

پوتی‌ویریده بزرگترین و از لحاظ اقتصادی مهم‌ترین تیره ویروس‌های گیاهی می‌باشد .این تیره داری ۲۰۰ گونه است که نزدیک به ۲۵ درصد کل ویروس‌های گیاهی را شامل می‌شود و تقریبا روی اکثر گیاهان بیماری ایجاد می‌کنند. خانواده پوتی-ویروس جزو مهم‌ترین و بزرگ‌ترین جنس بیماری‌زای گیاهی آن‌ها است. در ۲۰ سال اخیر، در میان پوتی‌ویروس‌های آلوده-کننده ذرت، ویروس موزائیک کوتولگی ذرت یکی از مخرب‌ترین بیمارگرهای مزارع ذرت می‌باشد و اقداماتی مانند اصلاح رقم-های مقاوم با روش‌های کلاسیک ژنتیکی، کنترل ناقلین با استفاده از راهبردهای مختلف، تولید بذور و اندام‌های رویشی

ازدیادی عاری از ویروس و تولید گیاهان تراژن مقاوم به ویروس بیشترین سهم را در مدیریت آن به خود اختصاص داده‌اند (۱). ویروس موزائیک کوتولگی ذرت توسط شته‌های *Rhopalosiphummaidis*، *R. padi* و *Schizaphisgraminum* منتقل می‌شود (۲ و ۴). علف‌های هرز خانواده غلات ممکن است بقاء ویروس در شرایط نبود میزبان، و در نتیجه انتقال آن به کشت‌های جدید را موجب شوند.

با فراهم شدن امکان تعیین ترادف و تغییرات نوکلئوتیدی، مناسب ترین معیار برای تمایز و طبقه بندی گونه‌ها و جدایه‌ها میزان تشابه نوکلئوتیدی و آمینواسیدی تعیین شد. تلاش‌های اولیه برای تعیین ارتباط پوتی‌ویروس ها ۵۰ سال قبل با استفاده از روش‌های سرولوژیکی انجام گرفت، اگرچه این روش‌ها برای اغلب ویروس‌های گیاهی نتیجه داد اما در مورد پوتی‌ویروس ها چندان رضایت‌بخش نبود که اخیرا معلوم شده است علت اشتباهات سرولوژیک این بود که ناحیه انتهای آمینی پروتئین پوششی پوتی‌ویروس‌ها در سطح پیکره کامل ویروس است و در اثر خالص‌سازی و نگهداری ویروس به طور دائمی از بین می‌رود (۵). ترادف‌های نوکلئوتیدی اطلاعاتی برای مقایسه ترادف‌های مرتبط و تخمین سرعت تکاملی بخش‌های کوچک و تاریخ آنها فراهم می‌کند. تغییر آرایش ژنومی، تکرار ژن، نوترکیبی، تکامل و وارد شدن ترادف میزبان و ناقل درون ژنوم ویروسی از راه‌های احتمالی تکامل پوتی‌ویروس‌ها می‌باشند که این موارد در ویروس‌های RNA دار مهم است و تفسیر فیلوژنی را پیچیده می‌کند (۶). مقایسه‌های ترادف نوکلئوتیدی تعداد زیادی از مشکلات تاکسونومیکی را حل کرده است و مباحثی را درباره چگونگی بهتر شدن تشخیص گونه‌ها و گروه‌های ویروسی ارائه نموده است (۵).

تعیین ترادف و تغییرات نوکلئوتیدی می‌تواند در تحقیقات آینده در کارهای به نژادی و انتخاب ارقام مقاوم مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

در طی فصل زراعی ۱۳۹۳ به منظور تعیین جایگاه فیلوژنی و تغییرات نوکلئوتیدی استرین MDMV در گنبد، نمونه‌هایی با علائم موزاییک جمع‌آوری شدند. نمونه ها بعد از جمع‌آوری، جهت تعیین ترادف ویروس از آزمون RT- PCR استفاده شد. آر.ان.ای این نمونه‌ها با استفاده از کیت mRNA capture (Roche) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج و پس از انجام واکنشRT و ساخت cDNA جهت تکثیر، واکنش PCR با مواد واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای عمومی Pot1 و Pot2 (جدول۲) (۷) و در دستگاه PCR پروفیل حرارتی به شکل زیر برنامه‌ریزی شد: ۴ دقیقه در ۹۴°C برای واسرشتگی اولیه، یک دقیقه در ۹۴°C ، ۴۵ ثانیه در۵۵°C ، ۱دقیقه در ۷۲°C و در نهایت ۱۵ دقیقه در ۷۲ درجهت نشر قطعات ناتمام مورد استفاده قرار گرفت. محصول واکنش پی.سی.آر در ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد و قطعات تکثیری ژنوم بکمک رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید توسط دستگاه ثبت ژل مورد مشاهده و عکسبرداری قرار گرفتند. در نهایت محصول PCR برای تعیین ترادف به شرکت ماکروژن (کره جنوبی) ارسال شد. ترادف به دست آمده با ۱۰ ترادف انتخاب شده از GenBank مقایسه گردیدند. همردیف‌سازی چندگانه Multiple alignment با برنامه Clustal X انجام و با استفاده از نرم افزار Mega5 درخت فیلوژنتیکی به روش maximum parsimony (MP) ترسیم شد.

جدول ۲- آغازگرهای مورد استفاده در واکنش **PCR** و دمای اتصال آن‌ها

نام آغازگر	جهت	ترادف آغازگرها*	منبع	دمای اتصال(°C)
Oligo1n	Forward	5´-ATg gTH Tgg TgY ATH gAR AAY gg-3´	ماری-جین و همکاران، ۲۰۰۰	۵۵
Oligo2n	Reverse	5´-TgC TgC KgC YTT CAT YTg-3´	ماری-جین و همکاران، ۲۰۰۰	۵۵

* در این آغاز گرها کدهای دژنره عبارتند از: R= (A/G)، Y= (C/T)، K=(G/T) و H=(A/C/T)

نتایج و بحث

نتایج بدست آمده از آزمون RT-PCR و الکتروفورز نشان‌دهنده تکثیر قطعه‌ای به اندازه ۱۳۰۰ جفت باز بود. با مقایسه ناحیه ژن پروتئین پوششی استرین گنبد با سایر استرین‌های MDMV در جهان، استرین‌ها در دو گروه قرار گرفتند: در گروه اول که شامل استرین‌های آلمان، آمریکا و مجارستان با شباهت ۸۶ تا ۸۹٪ می‌باشند، جهش در توالی نوکلئوتیدی از نوع جانشینی و در گروه دوم شامل استرین‌های اسپانیا با شباهت ۸۶٪ که جهش از نوع جانشینی و حذف اتفاق افتاده است. همردیف‌سازی و مقایسه توالی نوکلئوتیدی استرین گنبد با استرین آلمان (AJ001691.1) نشان داد که در ۱۱۴ ناحیه ژنوم پروتئین پوششی ویروس موزائیک کوتولگی ذرت جهش از نوع جانشینی اتفاق افتاده است که برای مثال در جایگاه‌های شماره‌های ۱۸، ۲۸، ۶۶ و۱۳۳، باز آلی تیمین بجای سیتوزین و در جایگاه شماره‌های ۷۱، ۱۰۳و ۱۲۹ باز آلی آدنین بجای گوانین قرار گرفته است. همردیف‌سازی و مقایسه توالی نوکلئوتیدی استرین گنبد با جدایه اسپانیا (HE573808.1) نشان داد که در توالی ژنوم جدایه گنبد نه تنها جهش از نوع جانشینی اتفاق افتاده است بلکه در ناحیه ۶۷۱، حذف باز آلی آدنین و در ناحیه ۶۷۷، اضافه شدن باز آلی گوانین اتفاق افتاده است. اگر جهش به صورت جانشینی باز G با A و یا باز C با A باشد، جانشینی از نوع هم‌معنی است. همردیف‌سازی و مقایسه توالی نوکلئوتیدی جهش‌های جانشینی با تعداد محدود، به دگرگونی اسید آمینه نمی‌انجامد. به این جهش‌ها، جهش‌های خاموش یا مترادف می‌گویند وقتی یک جهش به جایگزینی یک اسید آمینه می‌انجامد جهش غیرخاموش یا نامترداف گفته می‌شود.

تعیین جایگاه تاکسونومیکی جدایه ایرانی MDMV و مقایسه آن با سایر جدایه‌های دنیا می‌تواند منشا تکاملی و پیدایش این ویروس را در ایران روشن سازد. شباهت زیاد این جدایه با جدایه‌های اروپایی (بیش از ۹۰ درصد) و آمریکائی این فرضیه را مطرح می‌کند که احتمالا MDMV در ایران منشا خارجی داشته باشد. مقایسه جدایه‌های موجود MDMV در ایران نشان داد که فاصله ژنتیکی کمی بین آنها و جدایه‌های اروپایی وجود دارد و میزان شباهت ژنتیکی بین آنها زیاد (بالای ۹۰٪) است (۳).

منابع

۱- پوررحیم، ر.، فرزادفر، ش.، و گلنراقی، ع. ۱۳۸۱. مبانی ویروس‌شناسی گیاهی (ترجمه). شرکت سامان پیشه‌گر، ۴۵۷ صفحه.

۲- زارع، آ.، معصومی، م.، حیاتی، ج.، و ایزدپناه، ک. ۱۳۸۳. خصوصیات سرولوژیکی و بیولوژیکی MDMV در ایران. خلاصه مقالات شانزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. تبریز. صفحه ۱۱۰.

۳- معصومی، م.، زارع، آ.، و ایزدپناه، ک. ۱۳۸۲. تأئید وجود ویروس موزائیک کوتولگی ذرت (MDMV) در ایران بر اساس مقایسه ترادف ناحیه ´۵ ژن پروتئین پوششی ویروس. خلاصه مقالات دومین کنگره ویروس شناسی ایران. تهران. صفحات ۳۶۹-۳۷۰.

۴- معصومی، م.، زارع، آ.، و ایزدپناه، ک. ۱۳۹۰. مقایسه بیولوژیکی، سرولوژیکی و مولکولی پوتی‌ویروس‌های گیاهان تیره غلات در ایران. بیماری‌های گیاهی. (۱) ۴۷ : ۴۷-۶۶.

5. Gibs, A., and Oshima, G.E. 2010. Introduction: History. Geographical distribution, pathogen characteristics and economic importance. Pp. 1-12. In: Gordon, D. T., Knoke, J. K. and Scott, G. E. Virus and Viruslike Diseases of Maize in the United States. 423p.
6. Li, H. and Shirako, Y. 2015. Association of VPg and eIF4E in the host tropism at the cellular level of *Barly yellow mosaic virus* and *Wheat yellow mosaic virus* in the genus. Bymovirus.Virology 476: 159-167.
7. Marei-Jeanne, V., Loos, R., Peyre, J., Alliot, B., and Signoret, P. 2000. Differentiation of poaceae potyviruses by reverse transcription-polymerase chain reaction and restriction analysis. Journal Phytopathol 148: 141-151.

بررسی صمغ‌زدگی درختان بادام ناشی از قارچ *Phoma* sp، در بیرجند

هادی سهرابی [۱]، مهدی جهانی [۲]، سعید مودی [۳]
[۱]دانشجوی کارشناسی ارشد رشته بیماری شناسی گیاهی دانشگاه بیرجند
[۲]دانشیار دانشکده کشاورزی دانشگاه بیرجند، [۳]استادیار دانشکده کشاورزی دانشگاه بیرجند
* نویسنده مسئول: *ss.sohrab69@gmail.com*

چکیده

یکی از مهم‌ترین بیماری‌های درختان بادام در استان خراسان جنوبی صمغ‌زدگی و شانکر ناشی از قارچ است. پاتوژن‌های قارچی از عوامل مهم در ایجاد این بیماری به شمار می‌روند. گونه‌های قارچی *Phoma* دارای دامنه میزبانی وسیع در سراسر دنیا می‌باشند. یکی از بیماری‌های ناشی از این قارچ شانکر و ترشح صمغ در محل ایجاد زخم، روی درختان بادام در این مناطق است. قارچ *Phoma* sp از طریق زخم‌های ناشی از هرس، عملیات کشاورزی و حشرات وارد بافت درخت شده و ایجاد بیماری می‌کند. طی سال‌های ۹۴ و ۹۵ نمونه‌برداری‌هایی از درختان بادام آلوده به این بیماری در بیرجند انجام شد. نمونه‌ها در آزمایشگاه ضدعفونی و روی محیط کشت PDA کشت، جداسازی و خالص‌سازی شدند. جدایه‌های حاصله بر اساس روش‌های مرفولوژیکی و مولکولی شناسایی گردیدند. آزمون بیماری‌زایی این قارچ روی دو رقم از ارقام بادام کشت شده در منطقه (سنگک و شاهرودی۱۶) انجام گرفت و بیمارگری قارچ *Phoma* sp به اثبات رسید. در این بررسی عامل قارچی *Phoma* sp به عنوان عامل بیمارگر قارچی در باغ‌های درختان بادام این شهرستان جداسازی، خالص‌سازی، شناسایی و گزارش گردید.

واژگان کلیدی: صمغ‌زدگی، بادام، *Phoma*، بیرجند

مقدمه

درختان میوه هسته‌دار از مهم‌ترین درختان باغی مناطق سردسیر و نیمه سردسیر ایران و جهان هستند. ایران در تولید محصولات مهم کشاورزی از جمله میوه‌های هسته‌دار، در بین هفت کشور نخست جهان قرار دارد (۱۷). سطح زیر کشت باغ-های درختان میوه هسته‌دار در شهرستان بیرجند زیاد است و سالانه مقدار زیادی از محصولات آن‌ها تولید و به بازار عرضه می‌شود. درختان میوه هسته‌دار از خانواده گل‌سرخیان هستند که درخت بادام از اعضای این خانواده و جنس آلوسانان است (۳). از بیماری‌های مهم درختان میوه هسته‌دار صمغ‌زدگی ناشی از عوامل قارچی در آن‌ها است. بیماری صمغ‌زدگی، تمام هسته‌دارها را تحت تأثیر قرار می‌دهد و با ایجاد این بیماری سیخک‌ها از بین می‌روند و تولید میوه کاهش می‌یابد (۱). بر اثر این بیماری روی شاخه‌های جوان و تنه درختان بیمار زخم‌های شانکر مانند ایجاد می‌شود و از این محل مقدار زیادی صمغ ترشح می‌شود. درختان آلوده به تدریج ضعیف شده و در موارد شدت بیماری از بین می‌روند (۱). یکی از عوامل ایجاد کننده این بیماری قارچ *Phoma* sp می‌باشد. این قارچ متعلق به خانواده *Didymellaceae* و از عوامل خاکزاد و بیمارگر گیاهان می-باشد (۱۰). این جنس با حدود ۳۰۰۰ گونه، یکی از پرجمعیت‌ترین جنس‌های قارچی را شامل می‌شود (۸). اسپورهای این جنس تک‌سلولی، بی‌رنگ و اندازه آن‌ها معمولاً از ۱۵ میکرومتر کمتر است. پیکنیدهای آن سیاه رنگ و در بافت میزبان نفوذ می‌کنند (۱۲). در این شهرستان بیماری صمغ‌زدگی روی درختان میوه هسته‌دار بخصوص بادام مشکلات و خسارات زیادی را

به وجود آورده است. در خصوص نقش عوامل قارچی بیماری شانکر و صمغ‌زدگی در منطقه بیرجند مطالعاتی مشاهده نشده است. لذا این بررسی با هدف شناسایی عوامل مؤثر در ایجاد این عارضه انجام گرفت. کنترل موفق بیماری صمغ‌زدگی به دلیل فقدان سموم مؤثر یا عوامل بیوکنترل مناسب و شرایط خاص پاتوژن‌های عامل، معمولاً قابل حصول نیست. از بهترین راه‌های کنترل این بیماری استفاده از ارقام مقاوم است (۹). از آنجایی‌که شناسایی عوامل مولد و همراه هر بیماری، اولین قدم در جهت کنترل آن محسوب می‌گردد، بنابراین لزوم شناسایی این عوامل در راستای کنترل و جلوگیری این بیماری ضروری می‌باشد.

مواد و روش‌ها

به منظور شناسایی عوامل مولد و همراه عارضه صمغ‌زدگی درختان میوه هسته‌دار طی سال‌های ۱۳۹۴ و ۱۳۹۵ نمونه‌برداری‌هایی در باغ‌های میوه هسته‌دار شهرستان بیرجند صورت گرفت. نمونه‌برداری‌ها بسته به نیاز و شناسایی عوامل ایجادکننده بیماری، در چندین نوبت مختلف انجام شد. نمونه‌ها در درون نایلون به آزمایشگاه انتقال یافتند. نمونه‌ها در قالب قطعات تقریباً ۴-۴ میلیمتری و ضخامت یک میلیمتر در حدفاصل بین قسمت سالم و آلوده برش و در زیر جریان شیر آب با یک قطره مایع ظرف‌شویی ۱۰ دقیقه شست‌وشو داده شدند. پس از آن با محلول نیم درصد هیپوکلرید سدیم به مدت دو دقیقه غوطه‌ور و ضدعفونی شدند. سپس در آب مقطر سترون سه بار شست‌وشو و در نهایت قطعات روی کاغذ صافی سترون گذاشته شده تا خشک شدند. نمونه‌های خشک شده داخل تشک‌های پتری حاوی محیط کشت PDA انتقال داده شدند. نمونه‌ها در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی نگهداری شدند (۴). قارچ‌های به‌دست‌آمده به روش تک اسپور کردن روی محیط کشت آب - آگار خالص‌سازی شدند. قارچ‌های جداشده و خالص شده مجدداً کشت داده شد و میزان رشد آن‌ها اندازه‌گیری گردید. تشخیص و شناسایی ویژگی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی این گونه قارچی با استفاده از کلید شناسایی هومبر انجام شد (۱۱). استخراج DNA از ریسه‌های جوان قارچ کشت شده روی محیط کشت جدید PDA و با روش استخراج کلکس (Chelex ۸٪) انجام گرفت (۱۳).

مواد و مراحل لازم برای استخراج DNA به روش Chelex ۸٪ به شرح زیر انجام شد

۱. تهیه سوسپانسیون ۸ درصد از Chelex در آب مقطر استریل.
۲. خرد کردن میسیلیوم به وسیله ازت مایع در تیوب آزمایش.
۳. اضافه کردن ۲۰۰ میکرو لیتر از Chelex ۸٪ به هر تیوب.
۴. به هم زدن نمونه‌ها و Chelex به وسیله شیکر به صورت مختصر.
۵. گذاشتن نمونه‌ها به مدت یک شب (Over night) در دمای ۵۶ درجه سلسیوس.
۶. تکان دادن نمونه‌ها در حین قرار داشتن در دمای ۵۶ درجه سلسیوس.
۷. گذاشتن تیوب‌های حاوی نمونه در آب جوش به مدت ۸ دقیقه.
۸. هم زدن نمونه‌ها با شیکر.
۹. قرار دادن دوباره تیوب‌ها در آب‌جوش به مدت ۷ دقیقه.
۱۰. سانتری‌فیوژ نمونه‌ها با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه.
۱۱. برداشتن لایه رویی و رقیق کردن آن به نسبت ۱ به ۱۰ با آب مقطر استریل.

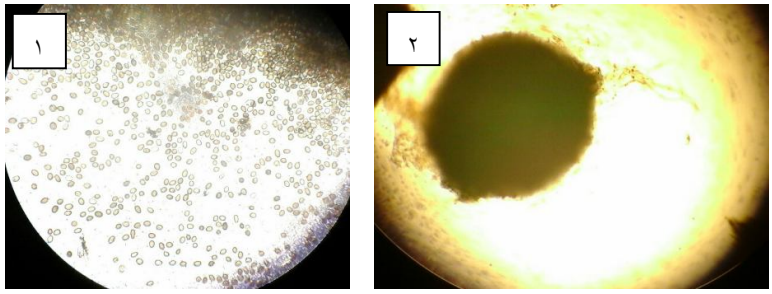
به منظور انجام فرایند PCR برای تکثیر ناحیه ITSr DNA[1] از آغازگرهای ITS4 & ITS5 استفاده گردید. مواد، مقادیر حجمی و چرخه‌های دمایی در واکنش PCR برای تکثیر ناحیه ITS از روش پیشنهاد شده وایت و همکاران در سال ۱۹۹۰ استفاده شد (۱۶). برای بررسی آزمون بیماری‌زایی، از نهال‌های دوساله بادام دو رقم شاهرودی ۱۶ و سنگک استفاده شد. برای هر رقم سه تکرار اعمال گردید. روش کار بدین ترتیب بود که از کشت جوان قارچ روی PDA دیسک‌های ۱×۱ سانتی‌متری به وسیله اسکالپل زیر پوست نهال قرار داده و محل تلقیح با پارافیلم به‌طور کامل پوشانده شد. برای تیمارهای شاهد از محیط

[1] Internal transcribed spacer

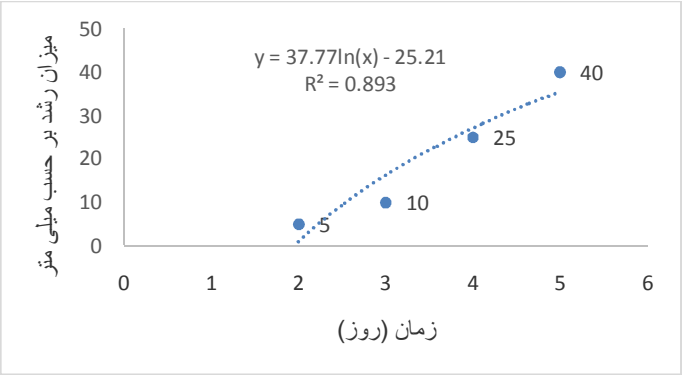
کشت PDA استفاده شد. نهال‌ها در شرایط باغ و داخل گلدان‌های پلاستیکی دارای قطر ۴۰ و ارتفاع ۵۰ سانتی‌متری نگهداری شد. برای کشت نهال‌ها در گلدان‌ها، از مخلوط خاک مزرعه استفاده و کف گلدان‌ها جهت تهویه مناسب، تا ارتفاع ۱۵ سانتیمتری با شن پر شد. میزان پیشروی قارچ‌ها در بافت چوبی بعد از ۱۰ روز اندازه‌گیری و نتایج حاصله یادداشت شدند.

نتایج و بحث

رنگ پرگنه این قارچ سفید و شفاف بوده و سرعت رشد این قارچ طی روزهای ۲، ۳، ۴ و ۵ روی محیط PDA و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس اندازه‌گیری و نمودار آن توسط نرم‌افزار اکسل رسم و مدل رشدی آن تا ۵ روز به صورت $y = 37.779\ln(x) - 25.217$ و $R^2 = 0.8935$ پردازش گردید (شکل۱-۲). قارچ *Phoma* sp روی سطح محیط، داخل بافت محیط کشت و روی پرگنه، دانه‌های سیاه رنگ پیکنید به صورت پراکنده تولید کرد. پیکنیدیوسپورها در این‌گونه قهوه‌ای، گرد و تخم‌مرغی شکل بودند. اندازه پیکنیدیوسپورهای کروی ۷/۵ میکرومتر و در پیکنیدیوسپورهای بیضی شکل ۵ × ۱۰ میکرومتر بود. ریسه‌ها شفاف و قطر آن ۱ × ۲/۵ میکرومتر بود (شکل ۱-۱). گونه *Phomo* sp بر اساس خصوصیات مورفولوژی و مولکولی شناسایی گردید. نتایج مقایسه داده‌های توالی ناحیه ITSr DNA جدایه موجود در بانک ژن، شباهت ۹۵ درصدی با قارچ *Phoma* داشت.



شکل ۱-۱- قارچ *Phoma* sp، ۱ پیکنیدیوسپور. ۲- پیکنید.



شکل ۱-۲- منحنی رشد قارچ *Phoma* sp روی محیط کشت PDA در دمای ۲۵ درجه سلسیوس تا ۵ روز

مراحل اثبات بیماری‌زایی و بررسی میزان ترشح صمغ در شاخه‌های تلقیح شده نهال‌های دو ساله بادام انجام شد. علائم بیماری ۷- ۱۰- ۱۵ روز پس از تلقیح مشاهده گردید (شکل ۱-۳). پیشروی این قارچ در بافت چوبی شاخه به طور میانگین به قطر ۵/۵ سانتیمتر بود. اولین نشانه ظاهر شده در شاخه مورد تلقیح، نکروز برگ‌ها بعد ۵ روز و نیز پس از ۱۰ روز ترشح صمغ

شدید در محل تلقیح مشاهده گردید. بعد از ۱۵ روز سرشاخه‌های تلقیح شده خشک شدند (شکل ۱- ۳). رنگ چوب در قسمت‌هایی که قارچ نفوذ کرده بود به رنگ قهوه‌ای تیره درآمد. پیشروی قارچ در هر دو جهت شاخه مشاهده شد. تیمارهای شاهد هیچ‌گونه علائمی نشان ندادند.

شکل ۱-۳- صمغ‌زدگی گونه قارچی *phomo* روی درخت بادام

سال ۲۰۱۷ از گونه‌های جنس *phoma* به عنوان عوامل قارچی مرتبط با پوسیدگی ریشه کاساوا در برزیل توسط بوآس و همکاران گزارش گردید (۶). سال ۲۰۱۱ گونه *Phoma glomerata* در کشور یونان برای اولین بار در دنیا به عنوان عامل صمغ‌زدگی هلو و شلیل توسط تومیدیس و همکاران گزارش گردید (۱۵). قارچ *Phoma* به عنوان عامل شانکر روی گیاه کلزا از کشور چین توسط ژانگ و همکاران (۲۰۱۴) گزارش گردید (۱۸). قارچ *Phoma* از عوامل قارچی بیماری شانکر و سرخشکیدگی انبه در شیلی توسط پرز (۲۰۱۴) گزارش شد (۱۴). قارچ *Phoma* به‌عنوان یکی از بیمارگرهای بالقوه درخت گوجه‌سبز در کشور افریقای جنوبی توسط دام و همکاران شناخته شد (۷). قارچ *Phoma* sp از عوامل مرتبط با بیماری‌های تنه و شاخه درختان میوه هسته‌دار در استان‌های آذربایجان شرقی و غربی توسط دخانچی و همکاران (۱۳۹۲) شناسایی و معرفی گردید (۲). عامل قارچی *Phoma* sp. در استان خراسان رضوی به عنوان مولد بیماری غربالی درختان میوه هسته‌دار در این استان، توسط یوسفی و همکاران شناسایی و گزارش شد (۵).

منابع

۱- حکیمی، ج.، ۱۳۷۵. پرورش درختان زردآلو، آلو و گوجه. انتشارات جهاد دانشگاهی ارومیه. ۱۵۲ ص.
۲- دخانچی، ه. و ارزنلو، م. اهری، ا.، ۱۳۹۲. شناسایی قارچ‌های همراه با تنه درختان میوه هسته‌دار در استان‌های آذربایجان شرقی و غربی، پژوهش‌های کاربردی در گیاه‌پزشکی، جلد ۲، شماره ۲، سال ۱۳۹۲.
۳- درویشیان، م.، ۱۳۷۹. بادام، کشت و تولید. شرکت انتشارات فنی ایران. ۱۵۴ ص.
۴- ذکائی رستگار, ف و جعفرپور, ب.، ۲۰۱۳. تعیین تنوع ژنتیکی جدایه‌های *Fusarium oxysporum f. sp. ciceri* عامل پژمردگی و زردی نخود با استفاده از دو نشانگر RAPD و PCR-RFLP در استان‌های خراسان رضوی و شمالی. پژوهش‌های حبوبات ایران. ۱۳۹۱.
۵- یوسفی، ا.، پنجه که، ن.، شهری، م.، سالاری، م. و فلاحتی، م.، ۱۳۹۲. بررسی عوامل قارچی مولد بیماری غربالی درختان میوه هسته‌دار در استان خرسان رضوی. نشریه حفاظت گیاهان. ۲۴(۴):۴ ص.

بررسی اثر بازدارندگی مخمرهای *Saccharomyces cerevisiae* و *Candida glabrata* روی قارچ عامل بیماری بلاست برنج

خدیجه دوستدار کل کناری، صفرعلی مهدیان* و محمدعلی تاجیک قنبری
به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار و دانشیار دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
* *نویسنده مسئول : safaralim@gmail.com*

چکیده

موضوع باقیمانده‌ی سموم روی گیاهان زراعی به ویژه برنج نگرانی‌هایی در جوامع علمی ایجاد نموده است. اکنون کنترل بیولوژیک به عنوان یک روش جایگزین برای سموم شیمیایی مطرح هست و موفقیت‌هایی در زمینه استفاده از میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست علیه بیمارگرها به دست آمده است. در این پژوهش مخمرهای *Saccharomyces cerevisiae* و *Candida glabrata* به جای قارچ‌کش‌های متداول برای کنترل بیماری بلاست برنج *Pyricularia grisea* مورد استفاده قرار گرفتند. پس از تهیه قارچ عامل بیماری و مخمرهای ذکر شده با استفاده از روشهای کشت متقابل، تولید مواد فرار و تولید آنتی بیوتیک در آزمایشگاه، قدرت بیوکنترلی مخمرها مورد ارزیابی قرار گرفت. نتیجه نشان داد که هر دو مخمر، رشد قارچ بیمارگر را کاهش دادند. در مخمر ساکارومایسس سرویزیه میزان کاهش رشد قارچ در آزمون کشت متقابل ۳۴ درصد، در تولید مواد فرار ۸۰ درصد و در تولید آنتی بیوتیک ۳۳/ ۹۳ درصد بود. در مخمر کاندیدا گلابراتا میزان کاهش رشد قارچ در آزمون کشت متقابل، تولید مواد فرار و تولید آنتی بیوتیک به ترتیب ۷۵/۳۳، ۴۰/۶۶ و ۸۹/۶۶ درصد بوده است که با هم تفاوت معنی دار داشتند. مخمرهای مورد استفاده در این تحقیق علیه بیماری بلاست برنج اثر کنترلی داشتند.

واژگان کلیدی: برنج، کنترل بلاست، مخمر، *Saccharomyces cerevisiae* ، *Candida glabrata*

مقدمه

در مناطق برنجکاری شمال کشور، بیماری‌های قارچی مهمی همچون بیماری بلاست، لکه قهوه‌ای، پوسیدگی طوقه و سوختگی غلاف همه ساله خسارت بسیاری را باعث می‌گردند که در برخی از سالها، در صورت مساعد بودن شرایط محیطی به صورت اپیدمی در می‌آیند. در بین بیماری‌های قارچی برنج، بلاست بیشترین اهمیت اقتصادی را دارد. بیماری بلاست یکی از مهم‌ترین بیماری‌های برنج در سراسر جهان است (۱). روش متداول کنترل بیماری بلاست استفاده از سموم شیمیایی است. در کنترل شیمیایی علاوه بر آلودگی های زیست محیطی و مشکلات اقتصادی ناشی از کاربرد سموم شیمیایی، این بیماری به طور کامل کنترل نشده و به صورت یکی از مشکلات عمده در مزارع برنج ایران است. توسعه سیستم های بیوکنترلی، روشی موثر جهت کاهش آلودگی محیط زیست و خطر ایجاد مقاومت ناشی از قارچ کش های شیمیایی محسوب می شود (۵). مخمرها با داشتن ویژگی هایی چون عدم تولید مایکوتوکسین ها، داشتن نیازهای غذایی ساده، دامنه‌ی تحمل بالا نسبت به تغییرات درجه حرارت، سرعت رشد بالا در سوبستراهای با ارزش غذایی کم، و همچنین دارا بودن مقادیر زیادی ویتامین، عناصر معدنی و همچنین تاثیرات مفید آنها در تغذیه به عنوان یکی از عوامل بیوکنترل موفق در کنترل بیماری های بعد از

برداشت مورد توجه قرار گرفته اند (۳). هدف از این پژوهش بررسی اثر بازدارندگی مخمرهای *Saccharomyces cerevisiae* و *Candida glabrata* روی قارچ عامل بیماری بلاست برنج به منظور دستیابی به یک عامل کنترل زیستی بوده است.

مواد و روش ها

در این پژوهش نژاد غالب *Prycularia grisea* با شماره ۸۰۹۷ از بخش بیماری شناسی موسسه تحقیقات برنج آمل تهیه گردید. مخمر *Saccharomyces cerevisiae* PTCC 5052 و *Candida glabrata* PTCC 5297 از مرکز منطقه‌ای کلکسیون قارچ ها و باکتری‌های صنعتی ایران تهیه گردیدند. به منظور بررسی تاثیر این مخمرها روی قارچ عامل بلاست آزمایش هایی به شرح زیر انجام شد.

آزمون کشت متقابل (Dual culture)

این آزمون بر اساس روش دنیس و وبستر (۱۹۷۱) انجام شد (۲). در این روش پس از اینکه قطر رشد رویشی قارچ در تیمار شاهد به خط وسط تشتک پتری رسید، اندازه‌گیری رشد شعاعی جدایه‌ی قارچ در تیمارها متوقف شد. درصد بازدارندگی تیمارها پس از تصحیح با فرمول ابوت (۱۹۲۵) [الف]، محاسبه گردید.

$$IP = \frac{C-T}{C} \times 100 \qquad \text{[الف]}$$

که در آن؛ IP = درصد بازدارندگی؛ C = میانگین قطر رشد هاله قارچ در تیمار شاهد و T = میانگین قطر رشد هاله قارچ در تیمار مورد نظر است.

آزمون تولید مواد فرار ضد قارچی توسط جدایه های آنتاگونیست

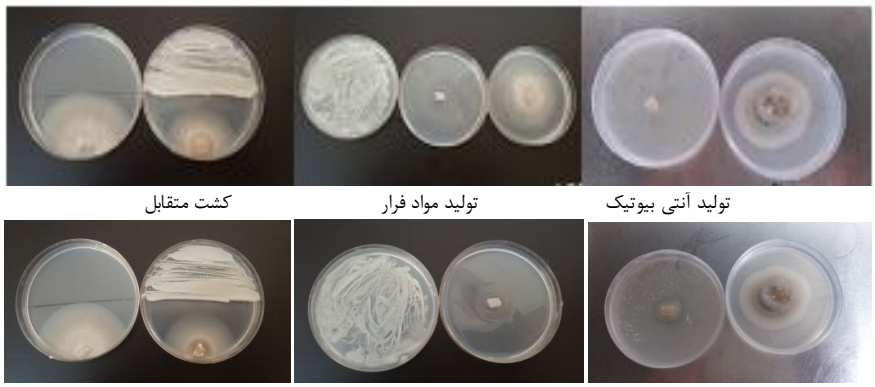
این آزمون مطابق روش لیلبرو (۲۰۰۵) انجام شد (۴). دو لوپ از سوسپانسیون کشت ۲۴ ساعته سلول‌های مخمر از محیط YMB برداشته شد و روی محیط کشت MEA (Malt Extract Agar) کاملاً پخش شد. سپس در پتری دیگر حاوی محیط PDA و غلظت های مختلف نانوذرات سیلیس پلاگی از قارچ (محیط کشت ۶ روزه) به قطر نیم سانتی‌متر در وسط این محیط کشت قرار داده شد. سپس در کنار شعله و در شرایط استریل تشتک‌های حاوی قارچ عامل بیمارگر و مخمر روی هم قرار داده شد و لبه های آنها به کمک پارافیلم پوشانیده شد. بعد از ۷ روز قطر کلونی‌های قارچ اندازه‌گیری گردید و طبق فرمول ذکر شده در صد کاهش رشد مسیلیومی قارچ به دست آمد.

آزمون تولید آنتی بیوتیک توسط جدایه های آنتاگونیست

این آزمون مطابق روش وللر (۱۹۸۸) انجام شد (۶). ابتدا سوسپانسیون جدایه‌های آنتاگونیست که در محیط YMB به روش گفته شده تهیه شده بودند در روی محیط PDA و غلظت‌های مختلف نانو ذرات به صورت یکنواخت کشت داده شدند. سپس تشتک‌های پتری به مدت ۹۶ ساعت در انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. بعد از این مدت در شرایط استریل زیر هود، کلونی‌های مخمر با کمک پنبه استریل از سطح محیط پاک شدند. سپس پتری ها وارونه شده و یک پنبه آغشته به کلروفرم در درون پتری و بر روی درب آن قرار داده شد تا باقیمانده‌های مخمر نیز در معرض بخار کلروفرم قرار گیرند و به طور کامل کشته شوند. بعد از مدت ۲۵ دقیقه درب پتری‌ها را به صورت نیمه باز کرده تا بخار کلروفرم به طور کلی خارج شود. سپس یک پلاگ از کشت ۴۸ ساعته قارچ عامل بیماری در وسط پتری ها قرار داده شد این پلاگ به منظور جلوگیری از پخش شدن اسپور از روی محیط WA برداشته شد. بعد از ۷ روز قطر کلونی قارچ اندازه گیری شد و طبق فرمول [الف] درصد کاهش رشد محاسبه گردید. این آزمون‌ها هر کدام به صورت جداگانه در قالب طرح کاملا تصادفی و با ۳ تکرار انجام شدند.

نتایج و بحث

نتایج بدست آمده نشان داد که رشد قارچ عامل بلاست برنج پس از ۷ روز در محیط حاوی مخمر ساکارومایسس سرویزیه و محیط حاوی مخمر کاندیدا گلابراتا کمتر شده است (شکل ۱).



شکل ۱- اثر ساکارومایسس سرویزیه (بالا) و کاندیدا گلابراتا (پایین) روی قارچ عامل بلاست برنج

نتیجه آزمون کشت متقابل نشان داد که مخمر *S. cerevisiae* نسبت به شاهد (آب مقطر استریل) باعث کاهش رشد میسیلیوم قارچ شد. در نتیجه اثر بازدارندگی بر روی قارچ بیمارگر دارد. در این آزمون ایزوله مخمر، ۳۴ درصد از رشد میسیلیوم قارچ بیمارگر بازداری کرد. در آزمون تولید مواد فرار ایزوله مخمر ۸۰ درصد باعث کاهش رشد قارچ بیمارگر شد و نسبت به شاهد تفاوت معنی دار از خود نشان داد. در آزمون تولید آنتی بیوتیک ایزوله مخمر با ۹۳/۳۳ درصد باعث کاهش رشد قارچ بیمارگر شد و با شاهد تفاوت معنی دار داشت (جدول ۱).

جدول ۱- نتیجه آنالیز آماری اثر ایزوله‌های *S. cerevisiae* و *C. glabrata* روی قارچ عامل بلاست برنج

تیمار	کشت متقابل	تولید مواد فرار	تولید آنتی بیوتیک	شاهد
مخمر *S. cerevisiae*	34^{c}	80^{b}	93.33^{a*}	0^{d}
مخمر *C. glabrata*	40.66^{c}	75.33^{b}	89.66^{a}	0^{d}

*حروف غیر مشابه روی اعداد نشان دهنده تفاوت معنی داری در سطح ۰/۰۵ درصد به روش دانکن می باشد.

نتایج آزمون کشت متقابل نشان داد که ایزوله مخمر *C. glabrata* نسبت به شاهد (آب مقطر استریل) باعث کاهش رشد میسیلیوم قارچ شده است. در نتیجه اثر بازدارندگی بر روی قارچ بیمارگر دارد. در این آزمون ایزوله مخمر ۴۰/۶۶ درصد از رشد میسیلیوم قارچ بیمارگر بازداری کرد. در آزمون تولید مواد فرار ایزوله مخمر با ۷۵/۳۳ درصد باعث کاهش رشد قارچ بیمارگر شد و نسبت به شاهد تفاوت معنی دار از خود نشان داد. در آزمون تولید آنتی بیوتیک ایزوله مخمر با ۸۹/۶۶ درصد باعث کاهش رشد قارچ بیمارگر شد و با شاهد تفاوت معنی دار داشت.

در مقایسه رشد کلونی قارچ عامل بلاست برنج در مقابل مخمر *S. cerevisiae* در آزمون کشت متقابل، تولید مواد فرار و تولید آنتی بیوتیک، مشخص شد رشد کلونی قارچ بیمارگر در هر سه تیمار نسبت به شاهد کاهش یافته امّا در تیمار تولید آنتی بیوتیک بیشتر از سایر تیمارها بوده است. این نتیجه در آزمایش با مخمر *C. glabrata* نیز به دست آمد و مشخص شد رشد کلونی قارچ بیمارگر در هر سه تیمار نسبت به شاهد کاهش یافته و در تیمار تولید آنتی بیوتیک بیشتر از سایر تیماره بوده است.

منابع

۱. دودابی نژاد، ا. ۱۳۸۷. بررسی بلاست برنج و روش های کنترل آن. انتشارات مقالات کشاورزی و علوم وابسته

2. Dennis, C. and Webster, J. 1971. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. I. production of non volatile antibiotics. Trans Brit Mycol Soc. 57:25-39.
3. Druvefors, U. A. 2004. Yeast biocontrol of grain spoliage moulds–mode of action of *Pichia anomala*. Doctor's dissertation, performed at the Department of Microbiology Swedish University of Agriculture Science. 44pp.
4. Lillbro, M. 2005. Biocontrol of *Penicillium roqueforti* on graina comparison of mode of action of several yeast species [dissertation]. Swedish University of Agricultural Sciences.
5. Rezende, D. C., Rodrigues, F. Á., Carré-Missio, V., Schurt, D. A., Kawamura, I. K. and Korndörfer, G. H. 2009. Effect of root and foliar applications of silicon on brown spot development in rice. Australasian Plant Pathology. 38: 67–73.
6. Weller, D. M. 1988. Biological control of soil borne plant pathogens, in the rhizosphere with bacteria. Annu Rev. Phytopathol. 26:379-407.

اثر کنترلی چند نانوذره فلزی در مقایسه با قارچکش های مانکوزب و کلروتالونیل روی قارچ عامل سوختگی شمشاد جنگلی *Calonectria pseudonaviculata*

صفرعلی مهدیان[1*] مهسا خاکساری[2]

[1] *استادیار گروه گیاهپزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری*

[2] *دانش آموخته کارشناسی ارشد رشته بیماری شناسی گیاهی*

[*] *نویسنده مسئول : safaralim@gmail.com*

چکیده

سوختگی شمشاد با عامل *Calonectria pseudonaviculata* از مهمترین بیماری‌های شمشاد جنگلی محسوب می‌شود. به منظور کنترل این قارچ، میزان رشد میسلیوم و جوانه زنی اسپور با سه نانوذره فلزی و دو قارچکش مانکوزب و کلروتالونیل، آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار در شرایط آزمایشگاه به اجرا در آمد. نتایج نشان داد قارچکش مانکوزب در ۱۳ غلظت (۱/۵، ۱، ۰/۵، ۰/۳، ۰/۱، ۰/۰۷، ۰/۰۵، ۰/۰۳، ۰/۰۱، ۰/۰۰۵، ۰/۰۰۳، ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۰۱ در هزار) به ترتیب در پنج غلظت اول کنترل کنندگی کامل داشته و در سه غلظت بعدی اثر کنترلی متوسط و در غلظت های پایین تر بازدارندگی جزیی داشته است. قارچکش کلروتالونیل با همان غلظت‌ها به ترتیب در سه غلظت اول کنترل کنندگی کامل، در چهار غلظت بعدی ممانعت از رشد بالای ۵۰ درصد و در غلظت های پایین تر اثر کنترلی جزیی داشته است. نانوذرات در هفت غلظت (۱۰۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۳۰، ۱۰، ۵ پی پی ام) بررسی شدند که نانو ذرات مس فقط در سه غلظت بالا تاثیرگذار بوده و نانوذره نقره اثر بازدارندگی نداشت. قارچکش‌های مانکوزب و کلروتالونیل برای مهار بیماری سوختگی شمشاد مؤثرتر واقع شدند. نانو ذره مس در ردیف بعد از آنها می‌تواند جایگزین مناسبی برای این قارچکش‌های شیمیایی باشد.

واژگان کلیدی: سوختگی شمشاد، قارچکش مانکوزب، نانوذرات، قارچکش کلروتالونیل

مقدمه

جنگل همواره توسط فاکتورهایی نظیرتغییر آب و هوا، آلودگی محیطی، جدا شدن زیستگاه، وقوع بلایای طبیعی و حمله آفات و بیماری ها در معرض تهدید بوده و اکوسیستم‌های آن در حال تخریب است. شمشاد جنگلی (*Buxus hyrcana* Pojark) گونه پهن‌برگ همیشه سبز جنگل‌های هیرکانی هست که در مناطق جلگه‌ای با بلوط بلندمازو تشکیل جامعه جنگلی می‌دهد (۸). بیماری سوختگی شمشاد به نام سوختگی سرشاخه شمشاد یا بلایت شمشاد نیز نامیده می‌شود. عامل این بیماری قارچی با نام علمی *Calonectria pseudonaviculata* و با مرحله غیرجنسی *Cylindrocladium pseudonaviculata* Morgan است. نام مترادف مرحله غیر جنسی آن *Cylindrocladium buxicola* Henricot است (۵). نشانه‌های بیماری شامل ایجاد لکه برگی پیشرفته و حالت سوختگی در برگها و سرشاخه‌ها است که می‌تواند بسیار سریع رخ دهد (۳،۴). با پیشرفت بیماری ریزش برگ‌ها و خزان یکنواخت نهال‌ها، درختچه ها و درختان شمشاد قابل پیش بینی است. این حالت معمولا از قسمت تحتانی گیاه شروع و به سمت تاج درخت پیش می‌رود و در آخرین مرحله سبب سرخشکیدگی درخت می‌شود. استمرار بیماری در چند

سال متوالی منجر به خشکیدگی کامل آنها می‌شود. این بیماری برای اولین بار در جهان در سال ۱۹۹۰ از کشور انگلیس گزارش شد (۵). در ایران رضایی و همکاران اولین بار در سال ۲۰۱۲ این بیماری را از نواحی دریای کاسپین گزارش کرده‌اند (۱۰). مدیریت بیماری سوختگی شمشاد در مناطق غیر جنگلی متکی بر حفاظت، رعایت اصول بهداشتی و استفاده از قارچکش‌ها است. با توجه به این که بیمارگرها با ایجاد نوترکیبی و تنوع ژنتیکی می‌توانند راهی برای گریز از سموم ایجاد کنند، مسأله مقاومت به قارچ‌کش می تواند مورد توجه باشد.

نانوذرات نقره و مس به طور عمده، به دلیل خواص فیزیکی و شیمیایی ویژه ای که از خود نشان می دهند در عرصه های مختلف پزشکی، صنایع مختلف از جمله کشاورزی و علوم دام و بسته بندی و لوازم خانگی کاربرد دارد (۶،۱۱). نانوذرات مس تاثیر ضد قارچی زیادی بر روی قارچ های بیماری زای گیاهی دارد (۲). هدف این پژوهش تأثیر نانوذرات مس، نانوذرات نقره و قارچکش های مانکوزب و کلروتالونیل علیه بیماری سوختگی شمشاد است که علاوه بر تعیین بهترین غلظت مصرف سموم، با توجه به آلودگی‌های زیست محیطی ناشی از استفاده از قارچ‌کش‌ها و نیز بروز مقاومت نسبت به این سموم در بیمارگرها، بتوان جایگزین مناسبی برای سموم شیمیایی جستجو کرد.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری از درختان شمشاد با علایم مشکوک به سوختگی انجام گرفت. برای جداسازی عامل بیماری از برگ ها و شاخه های نمونه برداری شده، این اندام ها پس از شستشوی سطحی با آب مقطر سترون، با استفاده از هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد ضدعفونی شده و با آب مقطر سترون ۳ بار شستشو گردیدند .پس از رطوبت گیری قطعاتی به اندازه تقریبی ۱ سانتی مترمربع از قسمت های آلوده به محیط کشت PDA منتقل شدند و در دمای ۲۵-۱۸ درجه سلسیوس در انکوباتور نگهداری شدند. قارچ های رشد کرده دوباره در محیط کشت WA خالص سازی شدند و از نمونه های خالص شده حلقه ای به قطر ۷ میلی متر از حاشیه محیط کشت ، قارچ عامل سوختگی شمشاد انتخاب و در مرکز پتری حاوی محیط کشت PDA بعلاوه قارچ کش ها و نانو ذرات موردنظر کشت گردید و در انکوباتور در دمای۲۳ درجه سلسیوس نگهداری شد. از قارچ کش های مورد استفاده به غلظت دو در هزار از ماده تجارتی در آب مقطر تهیه شد . سپس غلظت های رقیق تر بر اساس آن به دست آمد و با محیط کشت PDA مخلوط گردید و از هر غلظت در ۴ تکرار استفاده گردید. پس از ۲۴ ساعت قطر رشدی پرگنه‌ها روی تیمارها در دو جهت عمود بر هم اندازه‌گیری شد و تا کامل شدن رشد قارچ در تشتک شاهد اندازه‌گیری ادامه یافت. درصد بازدارندگی تیمارها پس از تصحیح با فرمول ابوت (۱) [الف]، محاسبه گردید.

$$IP = \frac{C-T}{C} \times 100 \qquad [\text{الف}]$$

که در آن؛

IP = درصد بازدارندگی؛

C = میانگین قطر رشد هاله قارچ در تیمار شاهد

T = میانگین قطر رشد هاله قارچ در تیمار مورد نظر است.

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۲۹ تیمار و هر تیمار در ۴ تکرار در شرایط آزمایشگاه اجرا شد .تیمارهای آزمایش شامل سموم مانکوزب وکلروتالونیل در۲۶ غلظت و نانومس و نانو سیلور در ۸ غلظت و تیمار شاهد(بدون سم) بودند. تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار آماری SAS، صورت گرفت.

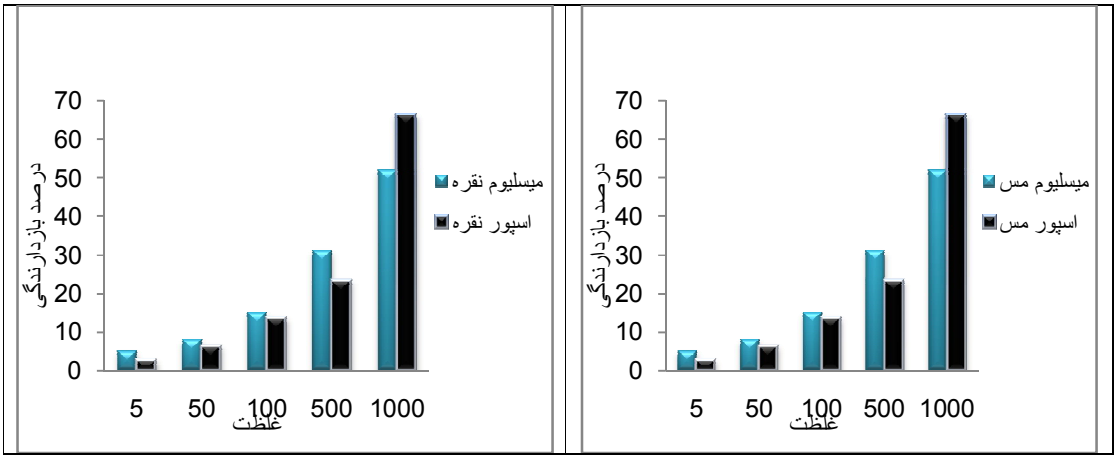
نتایج و بحث

نتایج نشان داد که بین تیمارهای اعمال شده از نظر آماری اختلاف معنی داری وجود دارد. (جدول ۱) قارچکش مانکوزب در ۱۳ غلظت (۱/۵، ۱، ۰/۵ ، ۰/۰،۱/۳، ۰/۰۷، ۰/۰۵، ۰/۰۳، ۰/۰۱، ۰/۰۰۵، ۰/۰۰۳، ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۰۱ گرم در هزارمیلی لیتر)

به ترتیب به میزان (۱۰۰،۱۰۰، ۱۰۰، ۱۰۰، ۱۰۰، ۶۶، ۶۲، ۵۸، ۳۴، ۲۶، ۱۲، ۱۰ و ۳ درصد) و قارچکش کلروتالونیل به ترتیب به میزان (۱۰۰،۱۰۰، ۸۱، ۷۵، ۵۸، ۵۱، ۳۸، ۲۶،۲۰، ۱۷، ۹،۴، ۲ درصد) و نانو مس در ۷ غلظت ۵، ۱۰، ۳۰، ۵۰، ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ پی پی ام به ترتیب در صد، نانو نقره به ترتیب درصد مانع از رشد میسلیوم قارچ عامل بلایت شمشاد شد. میزان جوانه زنی اسپور با میزان رشد میسلیوم تطابق داشته است(شکل ۱). بین نانوذرات مس و سموم مانکوزب و کلروتالونیل اختلاف معنی داری در سطح ۱ درصد از نظر جلوگیری از رشد کلنی دیده شده است و اما بین تیمار شاهد با قارچ کش نانوسیلور در غلظت پایین اختلاف معنی دار در سطح ۱ درصد وجود ندارد، بین تیمار شاهد و قارچ کش نانومس در غلظت های ۵۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ پی پی ام اختلاف معنی دار در سطح ۱ درصد مشاهده شد.

جدول ۱. مشخصات سموم مورد استفاده در آزمایش

تیمار	درجه سمیت (LD50)	دوز توصیه شده (در هزار)	فرمولاسیون	نوع فعالیت
۱- مانکوزب	۴۵۰۰	۱- ۱/۵	Dithane 75 DF	حفاظتی
۲- کلروتالونیل	۴۳۰۰	۱- ۳	Daconil 54 F	حفاظتی



شکل ۱. تاثیر نانو ذره مس (راست) و نانوذره نقره (چپ) بر رشد میسیلیوم و جوانه زنی اسپور قارچ عامل سوختگی شمشاد

نتیجه این پژوهش نشان داد که قارچکش‌های مانکوزب و کلروتالونیل در برابر قارچ *C. pseudonaviculata* کاملاً موثر هستند. نانو مس و نانو نقره از مواد مؤثر و پر مصرف در کشاورزی شناخته شده‌اند. در پژوهش‌های بسیاری خواص ضدقارچی و ضدباکتریایی نانو ذرات مورد بررسی قرار گرفته است که نتایج قابل توجهی از تأثیر ترکیبات نانو بر عامل بیماری مشاهده شده است (۱۲). نتایج بررسی قابلیت ضد قارچی نانوذرات نقره و روی بر رشد میسیلیومی قارچ *Aspergillus flavus* در شرایط درون شیشه ای نشان داد که نانوذره بسته به دز مصرفی، به طور قابل ملاحظه ای از رشد قارچ جلوگیری می کند، نانوذره نقره در غلظت ۱۰۰۰ پی پی ام مؤثر بوده و تا ۵۰ درصد بازدارندگی رشد را سبب شد (۱۰).

در بررسی اثر نانو نقره بر روی رشد ریسه های قارچ *Fusarium moniliforme* مشخص شد که تیمارهای ۲۰ پی پی ام حدود ۵۰ درصد باعث کاهش رشد ریسه های قارچ پس از ۴ روز شده است و نیز وجود خاصیت بازدارندگی نانو سیلور بر علیه عامل بیماری نشان داده شد (۷). نتایج کاربرد سموم نشان داد که نانو مس در غلظت ۱۰۰ پی پی ام با ۹۳درصد کاهش بیماری بیش ترین اثر را با پایین ترین غلظت داشته است در حالیکه سم مانکوزب در همان غلظت تنها توانایی بازدارندگی ۱۰ درصدی را داشته است یا سم کلروتالونیل تنها ۱۷ درصد کاهش بیماری داشته است و به طور کلی دو قارچ کش مانکوزب و کلروتالونیل در

غلظت پایین در مقایسه با نانوذرات مس تاثیر چندانی در بیماری نداشته اند. اما سموم کلروتالونیل و مانکوزب در غلظت های بالا به خوبی توانایی کنترل قارچ مورد نظر را داشته است. در بین دو سم مانکوزب و کلروتالونیل در غلظت های مشابه به طور مثال ۰/۱ در هزار مانکوزب به طور کامل توانایی کنترل را دارد در حالیکه کلروتالونیل تنها ۵۸ درصد از بازدارندگی قارچ مورد نظر جلوگیری می کند، با توجه به اینکه میزان LD50 تقریبی هر دو آنها ۴۵۰۰ است سم مانکوزب از نظر عملکردی بالاتر از کلروتالونیل است. علی رقم تاثیر بسیار خوب نانو مس، نانو نقره تاثیری در کاهش بیماری نداشته است. نتایج به دست آمده در این بررسی مشابه نتایج پژوهش های دیگر، تأثیر مطلوب ترکیبات نانو را در جلوگیری از رشد عامل بیماری نشان می دهد و نیز مشخص شد که نانومس در مدت زمان کوتاه کاهش چشم گیری در رشد این قارچ دارد .بنابراین با توجه به تأثیر قابل توجه نانو مس و نانوسیلور درجلوگیری از رشد قارچ عامل بیماری سوختگی شمشاد در مقایسه با سموم، می توان با انجام بررسی های بیش تر در مورد تأثیر این سموم به عنوان یک گزینه مناسب در دستور کار باغ داران برای جایگزینی مناسب سموم قرار گیرد. البته در نظر گرفتن این نکته ضروری است که با وجود تأثیرات بیشتر ترکیبات نانومس نسبت به نانونقره و خطرات زیست محیطی کمتر ناشی از آن، مصرف این نانو ذره بیشتر قابل توصیه است.

منابع

1. Abbott, W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. Journal of Economic Entomolgy 18: 265-267.
2. Giannossa, L. C., Longano, D., Ditaranto N. 2013. Metal nanoantimicrobials for textile applications," *Nanotechnology Reviews*, vol. 2, no. 3, pp. 307–331.
3. Henricot, B. and Culham, A. 2002. *Cylindrocladium buxicola,* a new species affecting *Buxus* spp. and its phylogenetic status. Mycologia 94:980-997.
4. Henricot, B., Gorton, C., Denton, G. and Denton, J. 2008. Studies on the control of *Cylindrocladium buxicola* using fungicides and host resistance. Plant Dis. 92:1273-1279.
5. Henricot, B., Perez Sierra, A. and Prior, C. 2000. A new blight disease on *Buxus* in the UK caused by the fungus *Cylindrocladium.* Plant Pathol. 49:80
6. Ji J. H., Bae G. N., Yun S. H., Jung J. H., Noh H. S., Kim S. S. 2007. Evaluation of a silver nanoparticle generator using a small ceramic heater for inactivation of *S. epidermidis* bioaerosols. Aerosol Sci. Technol. 41:786–93.
7. Katuli, N., and Rahnama, K. 2007. The effects of nano silver on growth of mycelia fungus Fusarium moniliforme the causl agent of rice and maize head and root rot. J. Plant Prot. Food, 1:6-14.
8. Marvie Mohadjer, M. R., 2011. Silviculture. University of Tehran press. 3nd Edition. 418p.
9. Rezaee, S., Kiadali, H., Sharifi, K., Ahangaran Y. and Hajmansoor, S. 2013. Boxwood blight caused by Cylindrocladium buxicola in Tonekabon forest. Applied Entomology and Phytopathology, 80:197-198.
10. Rostami, F., Molaii, S., Sedaghati, E. and Alaii, H. 2011. Survey of antifungal potential of silver-zinc nanoparticles on the growth of fungal mycelium of Aspergillus flavus in vitro. In: Proceeding of the First National Conference on Modern Agricultural Sciences and Technologies. Iran, Zanjan. (In Persian).
11. Shah M. A. 2008. Formation of zinc oxide nanoparticles by the reaction of zinc metal with methanol at very low temperature. Afr. Phys. Rev. 2:106–9.
12. Zhang, X., Yan, S., Tyagi, R. D. and Surampalli, R. Y. 2011. Synthesis of nanoparticles by microorganisms and their application in enhancing microbiological reaction rates, *Chemosphere*, vol. 82, no. 4, pp. 489–494.

خاصیت قارچ‌کشی اسانس های آویشن شیرازی و دو گونه مرزه درکنترل قارچ عامل پوسیدگی خاکستری انگور (*Botrytis cinerea*)

مسعود ذاکر[۱]*، علیرضا بلند نظر[۲] و علیرضا محمدی [۳]

۱- بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی سمنان (شاهرود)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
۲- بخش تحقیقات گیاهان دارویی، شرکت داروسازی باریج اسانس، کاشان
۳- بخش تحقیقات بذر و نهال، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی سمنان (شاهرود)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
** نویسنده مسئول : masoudzaker35@gmail.com*

چکیده

در طی چند دهه اخیر خاصیت قارچ‌کشی عصاره و اسانس بسیاری از گیاهان برای مبارزه با بیماری‌های گیاهی مورد توجه محققان بسیاری از کشورها قرار گرفته است. تحقیقات فراوان نشان داده است که اسانس برخی از گیاهان که حاوی ترکیبات تیمول و کارواکرول می باشند، دارای خاصیت قارچ‌کشی مناسبی در مقابل طیف وسیعی از قارچ‌های عامل بیماری های گیاهی از جمله پوسیدگی خاکستری انگور می‌باشند. در این تحقیق تاثیر ضد قارچی سه اسانس گیاهی آویشن شیرازی، مرزه وحشی و مرزه معمولی در غلظت های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ پی‌پی‌ام بر رشد پرگنه و جوانه زنی هاگ قارچ *B. cinerea* عامل پوسیدگی خاکستری انگور در شرایط آزمایشگاه مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که اسانس های آویشن شیرازی و مرزه وحشی در غلظت ۲۰۰ پی پی ام در مقایسه با شاهد در سطح آماری ۱٪ به طور کامل (۱۰۰٪) از رشد پرگنه و جوانه زنی هاگ این قارچ جلوگیری نمودند در حالی که در همین میزان از اسانس مرزه یکساله رشد میسلیومی برابر با ۲/۴۰ سانتیمتر و میزان جوانه زنی اسپوری ۳۷/۳۳ ٪ مشاهده گردید. نتایج همچنین نشان داد که اسانس‌های آویشن شیرازی و مرزه وحشی که دارای میزان بیشتری از ترکیبات تیمول و کارواکرول می‌باشند، بهترین تاثیر بازدارندگی را در مقابل این قارچ از خود نشان دادند.

واژگان کلیدی: خاصیت قارچ کشی، اسانس، انگور، پوسیدگی خاکستری.

مقدمه

بیماری پوسیدگی خاکستری انگور با عامل *Botrytis cinerea* Pers. Ex. Fr. یکی از مهمترین بیماری‌های انگور در مزرعه و انبار در سراسر جهان به حساب می آید که قادر است حتی در دمای صفر درجه سانتی‌گراد رشد و گسترش یافته و با کاهش کیفیت بازارپسندی این محصول باعث ایجاد خسارت گردد (۳).

عصاره و اسانس تعداد بسیار زیادی از گیاهان حاوی موادی از قبیل آلکالوئیدها، تنین‌ها، کوئینون‌ها، ترکیبات فنولیک و فیتوآلکسین‌ها می باشند که خاصیت قارچ‌کشی آنها به اثبات رسیده است (۵). بر اساس نتایج حاصل از یک تحقیق، از بین ۲۱ اسانس گیاهی، اسانس آویشن (*Thymus capitatus*) به نسبت ۰/۱٪ به طور کامل از رشد پرگنه و همچنین جوانه زنی اسپورهای *B. cinerea* در شرایط آزمایشگاهی جلوگیری نمود (۱). طی تحقیقی در ایران، از بین ۱۳ اسانس مورد آزمایش علیه قارچ *B. cinerea* عامل پوسیدگی خاکستری سیب، اسانس‌های آویشن، رازیانه، زیره سبز، زیره سیاه، نعناع فلفلی و دارچین در

غلظت‌های ۵۰، ۲۵۰ و۵۰۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر به طور موثری در شرایط محیط کشت از رشد این قارچ جلوگیری نمودند (۲). در یک تحقیق دیگر اثر ترکیبات تیمول و لینالول به صورت بخار بر رشد پرگنه و جوانه زنی اسپور قارچ *B. cinerea* عامل پوسیدگی خاکستری انگور مورد نشان داد که ترکیب تیمول به نسبت ۳۰ پی‌پی‌ام قادر به جلوگیری از رشد پرگنه و جوانه زنی اسپور این قارچ به طور کامل در ارقام Campbell early, Muscat Bailey, Sheridan, Geobong بود در حالی که این حالت با غلظت ۱۲۰ پی‌پی‌امی ترکیب لینالول به دست آمد ضمن این‌که ترکیب تیمول هیچگونه تاثیر منفی در میزان قند این ارقام نیز نداشت (Shin *et al,* 2014). اعتمادی و همکاران در تحقیقی اسانس سه گیاه مرزه (*Satureja hortensis*)، آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) و زنیان (*Carum copticom*) را در نسبت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ پی‌پی‌ام برای جلوگیری ازرشد پرگنه *B. cinerea* عامل پوسیدگی خاکستری توت فرنگی آزمایش نمودند و نتیجه گیری کردند که نسبت ۲۰۰ پی‌پی‌ام هر سه اسانس به میزان موثری باعث جلوگیری از رشد کلنی این قارچ گردیدند (۴).

مواد و روش‌ها

تهیه اسانس های گیاهی مورد آزمایش

اسانس های مورد نیاز از بخش تحقیقات شرکت داروسازی باریج اسانس کاشان تهیه گردید که به عنوان اسانس ۱۰۰٪ و خالص مورد استفاده قرار گرفتند .

تهیه قارچ عامل بیماری

یک جدایه بیماریزا از کلکسیون بخش تحقیقات گیاهپزشکی مرکز شاهرود تهیه و یک هفته پس از کشت مجدد در درون لوله های آزمایش حاوی PDA در دمای ۵ درجه سانتیگراد برای آزمایشات نگهداشته شدند.

بررسی تاثیر اسانس‌های گیاهی بر رشد پرگنه قارچ *B. cinerea*

جهت ارزیابی میزان تاثیر غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ پی‌پی‌امی اسانس‌های مورد آزمایش در جلوگیری از رشد پرگنه قارچ *B. cinerea* از روش اختلاط اسانس با محیط کشت (poisoned food technique) استفاده شد (۱۱). در زیر هود استریل مقدار مورد نیاز از محلول استاندارد اسانس‌ها برای تهیه غلظت مورد نظر به فلاسک‌های حاوی محیط کشت نیمه گرم اضافه گردیده وبه آرامی تکان داده شدند. برای درآمیختن کامل اسانس‌های روغنی با محیط کشت، مقدار ۰/۵٪ از ماده Tween-80 نیز به فلاسک‌ها اضافه و به آرامی تکان داده شدند. سپس مقدار ۱۵ میلی لیتر از محیط کشت آماده شده درون ظروف پتری ریخته و پس از سرد شدن با استفاده از کورک بورر استریل از کناره‌های کشت ۷ روزه قارچ قرص‌هایی به قطر ۵ میلیمتر جدا و در مرکز ظروف پتری قرار داده شدند. برای شاهد از محیط کشت حاوی Tween-80 بدون اسانس استفاده شد. برای هر تیمار تعداد ۳ ظرف پتری در نظر گرفته شده و ظروف مذکور در درون انکوباتور در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. پس از ۶ روز که ظروف پتری شاهد از رشد قارچ کاملا پوشانیده شد، رشد پرگنه این قارچ در تیمارهای مختلف (کمترین و بیشترین قطر) اندازه گیری و یادداشت گردید.

بررسی تاثیر اسانس‌های گیاهی بر روی جوانه زنی و رشد لوله تندش اسپور *B. cinerea*

در این آزمایش از روش سنجش جوانه زنی اسپور (Spore germination assay) استفاده شد (۱۱) ، بدین صورت که لایه نازکی از محیط کشت حاوی نسبت‌های مورد نظر از اسانس‌ها و Tween-80 (۰/۵٪) در شرایط سترون درون ظروف پتری ریخته شد و با استفاده از میکروپیپت مقدار ۱۵۰ میکرولیتر از محلول اسپوری *B. cinerea* به غلظت 10^4 اسپور در میلی‌لیتر به هر کدام از ظروف پتری اضافه شد. پس از آن ظروف پتری در درون انکوباتور در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد قرار داده شده و پس از ۱۲ ساعت برای متوقف نمودن جوانه زنی و اندازه گیری دقیق، ۳ قطره از محلول لاکتوفنل به ظروف پتری اضافه گردید. پس از آن به صورت تصادفی از هر کدام از ظروف پتری تعداد ۱۰۰ اسپور مورد بررسی قرار گرفت و درصد جوانه زنی اسپورها اندازه گیری و یادداشت گردید. برای هر تیمار ۳ تکرار در نظر گرفته شد و به محیط کشت شاهد تنها ماده Tween-80 اضافه گردید.

تجزیه داده های حاصل از آزمایشات:

آزمایشات در قالب طرح کاملا تصادفی با ۱۶ تیمار و ۳ تکرار انجام شد (جدول ۱). داده ها با استفاده از برنامه آماری Mstat-C تجزیه واریانس گردیده و میانگین تیمارها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۱ و ۵٪ مورد مقایسه قرار گرفتند.

جدول ۱ – تیمارهای استفاده شده به همراه کد و غلظت مربوطه به تفکیک

کد تیمار	اسانس	غلظت (ppm)	کد تیمار	اسانس	غلظت (ppm)
۱	آویشن شیرازی	۵۰	۶	مرزه یکساله	۱۰۰
۲	مرزه وحشی	۵۰	۷	آویشن شیرازی	۲۰۰
۳	مرزه یکساله	۵۰	۸	مرزه وحشی	۲۰۰
۴	آویشن شیرازی	۱۰۰	۹	مرزه یکساله	۲۰۰
۵	مرزه وحشی	۱۰۰	۱۰	شاهد	۰/۰

نتایج:

ترکیبات اصلی موجود در اسانس‌ها

برای انجام آزمایشات از اسانس‌های خالص آویشن شیرازی، مرزه وحشی و مرزه یکساله که توسط شرکت داروسازی باریج اسانس (کاشان) ارسال گردیده بود به عنوان محلول ۱۰۰ ٪ استفاده شد. درصد ترکیبات اصلی موجود در اسانس های مذکور پس از استخراج توسط بخش تحقیقات گیاهان دارویی شرکت مذکور به تفکیک تعیین گردید (جدول ۲).

جدول ۲- لیست اسانس‌های مورد استفاده در آزمایشات و درصد ترکیبات اصلی آن‌ها

نام اسانس	نام انگلیسی	نام علمی	درصد ترکیبات
آویشن شیرازی	Wild marjoram	*Zataria multifolia*	Thymol: 31.10, Carvacrol: 27.49
مرزه وحشی	Wild Savory	*Satureja mutica*	Thymol: 4.04, Carvacrol: 44.10
مرزه یکساله	Savory	*Satureja hortensis*	Thymol: 0.66, Carvacrol: 50.46

بررسی تاثیر اسانس های گیاهی بر روی رشد پرگنه قارچ *B. cinerea*

همانگونه که درجدول ۴ نشان داده شده است، تمامی تیمارها جز مرزه یکساله ۵۰ پی پی ام در سطح آماری ۱٪ با شاهد دارای اختلاف معنی دار بودند. تیمارهای آویشن شیرازی و مرزه وحشی دارای اختلاف فاحش با مرزه یکساله بودند. در این آزمایش نسبت ۲۰۰پی پی امی اسانس آویشن شیرازی و مرزه وحشی به طور کامل رشد پرگنه *B. cinerea* را متوقف نمودند در حالیکه همین میزان از اسانس مرزه یکساله فاقد این توانایی بود.

بررسی تاثیر اسانس های گیاهی بر روی جوانه زنی و رشد لوله تندش اسپور *B. cinerea*

بر اساس نتایج حاصل از این آزمایش نسبت های ۱۰۰ و ۲۰۰ پی پی امی هردو اسانس آویشن شیرازی و مرزه وحشی در سطح آماری ۱٪ در اختلاف با شاهد به طور کامل باعث توقف در جوانه زنی اسپورهای *B. cinerea* گردیدند، در حالیکه درصد جوانه زنی در نسبت ۲۰۰ پی پی امی مرزه یکساله ۳۷/۳۳ ٪ برآورد گردید (جدول ۴).

جدول ۳ – تجزیه واریانس داده های حاصل از تاثیر تیمارها بر رشد پرگنه و درصد جوانه زنی اسپور قارچ *B. cinerea*

منبع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	
		رشد میسلیومی (cm)	جوانه زنی اسپور (%)
تیمار	9	34.947**	4983.911**
خطا	20	0.080	0.833
مجموع	29	-----	-----
ضریب تغییرات		9.03%	2.24%

** = معنی دار در سطح آماری ۱٪

جدول ۴- مقایسه میانگین تاثیر تیمارها بر رشد پرگنه، جوانه زنی و رشد لوله تندش قارچ *B. cinerea* در محیط‌کشت PDA

تیمار	میانگین رشد میسلیومی (cm)	میانگین جوانه زنی اسپور (%)
شاهد	9.00 a	100 a
مرزه یکساله- 50 ppm	8.56 a	100 a
مرزه یکساله- 100 ppm	5.21 b	75.00 b
مرزه وحشی - 50 ppm	3.70 c	50.80 c
مرزه یکساله- 200 ppm	2.40 d	37.33 d
آویشن شیرازی- 50 ppm	0.98 e	45.00 e
مرزه وحشی - 100 ppm	0.81 e	0.00 f
آویشن شیرازی- 100 ppm	0.66 e	0.00 f
مرزه وحشی - 200 ppm	0.00 f	0.00 f
آویشن شیرازی- 200 ppm	0.00 f	0.00 f

اعداد موجود در هر ستون با حروف متفاوت در سطح احتمال ۱٪ با آزمون LSD دارای اختلاف معنی دار می باشند.

بحث:

تحقیقات فراوان نشان داده است که تیمول (Thymol) و کارواکرول (Carvacrol) جزء موثرترین ترکیبات گیاهی هستند که خاصیت قارچ‌کشی آن‌ها به اثبات رسیده است و آن دسته از گیاهانی که حاوی این مواد هستند خاصیت ضد قارچی مناسبی در مقابل طیف وسیعی از قارچ های بیماری‌زای گیاهی و آلوده کننده‌های مواد غذایی از خود نشان می دهند (۶، ۸، ۹ و ۱۰). مکانیزم عمل این ترکیبات به طور کامل مشخص نگردیده است لکن اعتقاد بر این است که آن‌ها قادرند در اعمال حیاتی دیواره سلولی قارچ‌ها اختلال ایجاد کرده و یا باعث از بین رفتن دیواره سلولی آنها شوند (۷).

در این تحقیق اسانس‌های آویشن و مرزه وحشی که به میزان قابل توجهی حاوی ترکیبات ذکر شده می باشند خاصیت قارچ‌کشی بسیار مناسبی در کنترل رشد پرگنه و جوانه زنی اسپور قارچ *B. cinerea* در محیط کشت PDA از خود نشان دادند.. نتایج حاصل از تحقیقات صورت گرفته توسط بسیاری از محققان بیانگر نتایج حاصل از تحقیق حاضرمی‌باشد، برای مثال، در تحقیقی که با ۲۱ اسانس گیاهی جهت بررسی تاثیر آنها بر جوانه زنی اسپورهای *B. cinerea* صورت گرفت، اسانس آویشن (*Thymus capitatus*) با نسبت ۰/۱٪ توانست به طور کامل (۱۰۰٪) از جوانه زنی اسپورهای آن جلوگیری نماید، در حالی که اسانس میخک (*Syzygium aromaticum*) بین ۶۷ تا ۹۳٪ و نوعی نعناع استرالیایی (*Prostanthera rotundifolia*) حدود ۶۵٪ کنترل داشتند (۱). همچنین از آنجا که گروهی دیگر از محققان گزارش کردند به‌ترتیب غلظت های ۳۰ و ۱۲۰ میکروگرم در میلی لیتری از ترکیبات تیمول و لینالول به صورت بخار به یک اندازه قادر به جلوگیری از رشد پرگنه و جوانه زنی هاگ قارچ *B. cinerea* عامل پوسیدگی خاکستری در ۴ رقم انگور بودند، نسبت یک به چهار برابری ترکیب تیمول به لینالول در این رابطه خود نشانگر خاصیت قارچ‌کشی بهتر ترکیب تیمول می‌باشد (Shin *et al*, 2014). همچنین در تحقیقی که

در ارتباط با تاثیر اسانس‌های مرزه، آویشن شیرازی و زنیان در سه غلظت بر رشد پرگنه *B. cinerea* عامل پوسیدگی خاکستری توت فرنگی مورد بررسی قرار گرفت این نتیجه حاصل گردید غلظت ۲۰۰ پی‌پی‌امی هر سه اسانس به میزان قابل قبولی در این رابطه موثر بودند (۴).

بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق از میان سه اسانس مورد آزمایش، اسانس‌های آویشن شیرازی و مرزه وحشی خاصیت ضد قارچی قابل قبولی در کنترل قارچ *B. cinerea* از خود نشان دادند. در حال حاضر برای کنترل بیماری پوسیدگی خاکستری انگور در سردخانه‌ها از مقادیر بسیار زیادگوگرد به صورت دود So2 استفاده می‌شود که علاوه بر مضرات زیست محیطی برای مصرف کننده نیز خالی از خطر نیست. با توجه به اینکه براساس نتایج حاصل از این تحقیق اسانس‌های آویشن شیرازی و مرزه وحشی خاصیت کنترل کنندگی مناسبی علیه این قارچ از خود نشان دادند، بنابراین می‌توان با تهیه فرمولاسیون‌های مناسب از آن‌ها به عنوان جایگزینی بی خطر برای گوگرد درکاهش ضایعات ناشی از این بیماری در سردخانه-ها و همچنین تولید محصولات سالم‌تر در خصوص انگور استفاده نمود.

منابع

1- Antonov, A., Stewart, A. and Walter, M. 1998. Inhibition of conidium germination and mycelial growth of *Botrytis cinerea* by natural products. Journal of Food Microbiology. 23: 13-33.

2 - Behdani, M., Pooyan, M. and Abbasi, S. 2012. Evaluation of antifungal activity of some medicinal plant essential oils against *Botrytis cinerea*, causal agent of postharvest apple rot, *in vitro*. International Journal of Agriculture and Crop Sciences. 4(14): 1012-1016.

3 - Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. and Delen, N. 2007. *Botrytis*: Biology, Pathology and Control. Springer, The Netherlands. 393 pp.

4 - Etemadi, N.A., Behdad, M. and Zeinali, H. 2012. Antifungal effects of three plant essential oils against *Botrytis cinerea*: The cause of gray mold on strawberry. Journal of Research in Agricultural Science. 8(2): 165-170.

5 - Fawcett, C.H. and Spencer, D.M. 1966. Antifungal phenolic acids in apple fruits after infection with *Sclerotinia fructigena*. Annals of Applied Biology. 60: 87-96.

6 - Gavaric, N., Mozina, S.S., Kladar, N. and Bozin, B. 2015. Chemical profile, antioxidant and antibacterial activity of Thyme and Oregano essential oils, Thymol and Carvacrol and their possible synergism. Journal of Essential Oil Bearing Plants. 18(4): 1013-1021.

7 - Isman, M.B. and Machial, C.M. 2006. Pesticides based on plant essential oils: From traditional practice to commercialization. pp. 29-44. In: Rai, M. and Carpinella, M.C. (eds.), Naturally occurring bioactive compounds. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.

8 - Lee, S.O., Choi, G.J., Jang, K.S., Lim, H.K. Cho, K.Y. and Kim, J.C. 2007. Antifungal activity of five plant essential oils as fumigant against postharvest and soilborne plant pathogenic fungi. Plant Pathology Journal. 23(2): 97-102.

9 - Numpaque, M.A., Oviedo, L.A., Gil, J.H., García, C.M. and Durango, D.L. 2011. Thymol and carvacrol: biotransformation and antifungal activity against the plant pathogenic fungi *Colletotrichum acutatum* and *Botryodiplodia theobromae*. Tropical Plant Pathology. 36 (1): 3-13.

10 -Shin, M.H., Kim, J.H., Choi, H.W., Keum Y.S. and Chum S.C. 2014. Effect of Thymol and Linalool fumigation on postharvest diseases of table grapes. Mycobiology. 42(3): 262–268.

11 -Soylu, E.M., Kurt, S. and Soylu, S. 2010. *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. International Journal of Food Microbiology. 143(3): 183-189.

بررسی تاثیر اسانس مرزه دائمی و آویشن شیرازی

در کنترل قارچ *Aspergillus flavus* مولد آفلاتوکسین

فرخنده امتی[*1]، سید علیرضا حسینی[2]، امید فوقانی[3] و علیرضا محمدی[4]

[1] *عضو هیئت علمی بخش تحقیقات گیاهپزشکی مرکز آموزش و تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان سمنان(شاهرود)*

[2] *کارشناس گیاهان دارویی مرکز آموزش و تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان سمنان(شاهرود)*

[3] *کارشناس تعاونی روستایی شهرستان دامغان*

[4] *عضو هیئت علمی بخش تحقیقات زراعی و باغی مرکز آموزش و تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان سمنان(شاهرود)*

* *نویسنده مسئول: far_omat@yahoo.com*

چکیده:

قارچ *Aspergillus flavus* قادر به تولید سم آفلاتوکسین در مواد غذایی است. این سم با اثرات آلرژی زایی و عفونت می تواند ایجاد بیماری در انسان نماید. در ایران کنترل این قارچ معمولاً با استفاده از ترکیبات سنتزی شیمیایی که اغلب اثرات جانبی مثل سرطا نزایی و تومورزایی دارند انجام می شود. امروزه برای کنترل این قارچ روش زیست فناوری و گیاهان داروئی توصیه میشود. این تحقیق بمنظور بررسی امکان استفاده از اسانس مرزه دائمی (*Satureja mutica*) و آویشن شیرازی (*Zataria multifolia*) در جلوگیری ازرشد قارچ *A. flavus* مولد آفلاتوکسین در مرکز تحقیقات آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان سمنان (شاهرود) طی سال ۱۳۹۵ اجرا شد. در این آزمایش اسانس های دو گیاه با غلظتهای ۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میکرولیتر در لیتر (ppm) به همراه شاهد علیه قارچ آسپرژیلوس فلاووس در محیط کشت PDA استفاده شد . آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با چهار تکرار انجام و رشد پرگنه قارچ عامل بیماری و درصد بازدارندگی در تیمارهای مختلف اندازه گیری شد. داده های حاصل از آزمایش با استفاده از نرم افزار MSTAT-C تجزیه و میانگینها با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن مقایسه شد. نتایج نشان داد سطوح مختلف اسانس دو گیاه اثر بسیارمعنی داری (در سطح ۱٪) درکاهش رشد پرگنه قارچ و درصد بازدارندگی داشتند. اسانس مرزه دایمی نسبت به اسانس آویشن شیرازی قدرت بازدارندگی بیشتری در کاهش رشد پرگنه قارچ داشت. با افزایش غلظت اسانس، فعالیت ضد قارچی افزایش یافت. حداقل غلظت بازدارندگی کامل از رشد قارچ برای اسانس مرزه دایمی و آویشن شیرازی بترتیب ۴۰۰ و۵۰۰ میکرولیتر در لیتر بود.

واژگان کلیدی: اسانس، مرزه دایمی، آویشن، *A. flavus*

مقدمه:

اهمیت قارچ *A. flavus* از دیدگاه بهداشتی و بیماریزایی بدلیل تولید زهرابه (میکوتوکسین) آفلاتوکسین میباشد. شرایط نامطلوب نگهداری و انبار اقلام غذایی و همچنین سازگاری اکثریت قارچها با این شرایط و به ویژه قارچهای جنس آسپرژیلوس، میتواند سبب رشد قارچ بر روی موادی همانند سویا، ذرت، گندم و سایر کنجاله ها و خوراک حیوانات گردیده و در این شرایط، قارچها سمومی از خود ترشح نموده که عموماً به نام آفلاتوکسینها شناخته میشوند. از بین مایکوتوکسینهای

شناخته شده، آفلاتوکسین ها جزو معروفترین و اولین سموم قارچی بوده اند که بررسیهای متعددی بر روی آنها صورت پذیرفته است. از اثرات مخرب و آسیب رسان آفلاتوکسینها می توان به جلوگیری از سنتز RNA، DNA، پروتئین و تولید رادیکال های آزاد، سرطانزایی و مسمومیت سیستم گردش خون اشاره نمود. آلودگی برخی محصولات کشاورزی، غذایی و خوراک دام به آفلاتوکسین معمولا اجتناب ناپذیر است، از این رو چندین استراتژی سم زدایی و غیرفعال کردن سم شامل روشهای فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی برای پیشگیری از بروز مسمومیت با آفلا توکسین در حیوانات و انسان پیشنهاد شده است. اما محدودیت های پاکسازی فیزیکی و شیمیایی از قبیل کاهش کیفیت و خواص تغذیه ای محصول، تاثیرات نامطلوب روی سلامت انسان و محیط زیست و گرانی تجهیزات مورد نیاز موجب شده است که به سمت روش های بیولوژیکی سوق د اده شود. از بین روشهای بیولوژیک، علاقه زیادی پیدا شده است تا از ترکیبات بیولوژیکی فعال طبیعی که از گیاهان مشتق می شوند استفاده شود به طوری که در سالهای اخیر برخی تحقیقات روی کاربرد گیاهان دارویی به ویژه اسانس و عصارهٔ این گیاهان جهت جلوگیری از رشد قارچ ها و ممانعت از تولید توکسین متمرکز شده است. در کاهش آلودگی آفلاتوکسین B1 و مهار رشد *A. flavus* توانایی تعداد معدودی از گونه های گیاهی شناخته شده است (۸). بنابراین، دستیابی به منابع جدید زیستی، ارزان، کارآمد، دوستدار محیط زیست و با خاصیت دارویی به عنوان کاندیدهای بالقوه برای کاهش رشد قارچ *A. flavus* مولد آفلاتوکسین در محصولات کشاورزی، مواد غذایی و خوراک دام و ماهیان از مهمترین اهداف خواهد بود. در این تحقیق با بررسی اثر بخش بودن اسانس مرزه چندساله در مقایسه با آویشن شیرازی در مهار قارچ آسپرژیلوس فلاوس و تجزیه آفلاتوکسین میتوان امیدوار شد که در آینده با تخلیص ماده موثره گیاه فوق و روی آوردن به تحقیقات بیشتر به تولید صنعتی ترکیبی با تاثیرات ضد آفلاتوکسین با عوارض جانبی کم دست یافت. گیاه مرزه متعلق به خانوده نعنا شامل گونه‌های یک‌ساله و اغلب چندساله می‌باشد. این جنس در ایران ۱۵ گونه دارد که ۹ گونه آن اندمیک می‌باشند. گونه‌های مختلف جنس مرزه عمدتا به دلیل دارا بودن ترکیبات فنلی کارواکرول و تیمول در صنعت مورد استفاده قرار می‌گیرند. مرزه زمستانه گیاهی چندساله است که به صورت وحشی در اروپا می‌روید. این گونه در فلور ایران هم وجود دارد ولی در اروپا برای مصارف مشابه مرزه تابستانه کشت و تولید می شود. هدف از انجام این تحقیق بررسی اثر بخشی اسانس مرزه چند ساله و مقایسه آن با آویشن شیرازی در جلوگیری از رشد میسلیومی قارچ *A. flavus* عامل تولید آفلاتوکسین روی مواد غذایی انسان و حیوانات بود.

مواد و روش‌ها

استخراج اسانس از گیاهان مورد آزمایش

استخراج اسانس ها به روش تقطیر با آب و به کمک دستگاه کلونجر (Clevenger apparatus) به مدت ۵ ساعت صورت گرفت. برای تعیین ترکیبات موجود در اسانس‌ها از دستگاه GC/MS (گازکروماتوگرافی همراه با طیف سنجی جرمی) استفاده خواهد شد. به این صورت که اسانس ها به دستگاه GC/MS تزریق شده و طیف جرمی ترکیبات آن ها تعیین گردید.

تهیه سوش قارچ *Aspergillus flavus*

قارچ پاتوژن آسپرژیلوس فلاووس با کد PTCC5004 که ایزوله ای از مغز پسته بود و در بخش کلکسیون قار چها و باکتر یهای سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران توسط متدهای مورفولوژیک استاندارد شناسایی و تحت عنوان قارچ با توکسین زایی بالا و بصورت لیوفیلیزه برای انجام طرح تهیه گردید.

بررسی تاثیر اسانس های گیاهی بر روی رشد پرگنه قارچ *Aspergillus flavus*

برای ارزیابی میزان تاثیر غلظتهای ۰، ۱۰۰، ، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ پی‌پی‌ام از اسانس گیاهان مورد آزمایش در جلوگیری از رشد پرگنه قارچ عامل بیماری از روش (Poisoned food technique) استفاده شد. پس از ۷ روز که ظروف پتری

شاهد از رشد قارچ کاملا پوشانیده شد، قطر پرگنه قارچ عامل بیماری در تیمارهای مختلف اندازه گیری و درصد بازدازدارندگی با استفاده از رابطه ۱ تعیین گردید:

رابطه ۱: درصد بازدارندگی= {(قطر کلنی شاهد – قطر کلنی تیمار)/ (قطر کلنی شاهد) × ۱۰۰

این تحقیق در قالب طرح کاملا تصادفی با چهار تکرار انجام و داده های حاصل از آزمایش با استفاده از نرم افزار MSTAT- C تجزیه و مقایسه میانگینها با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن انجام شد.

نتایج و بحث:

بررسی اثر اسانس مرزه دایمی و آویشن شیرازی در بازدارندگی از رشد قارچ *A. flavus*

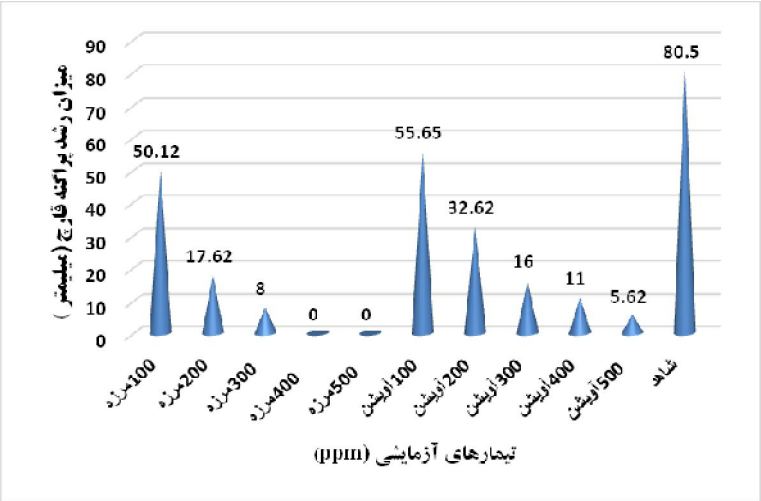
تأثیر اسانس دو گیاه دارویی مرزه دایمی و آویشن شیرازی بر رشد قارچ *A. flavus* نشان میدهد که بین سطوح مختلف اسانس دو گیاه تفاوت معنی داری در سطح ۱٪ وجود دارد. بر اساس نتایج حاصل از آزمایش مشخص گردید با افزایش غلظت اسانس، فعالیت ضد قارچی افزایش می یابد(گراف ۱ و ۲). نتایج همچنین نشان میدهد که اسانس مرزه دایمی در مقایسه با اسانس آویشن شیرازی قدرت بازدارندگی بیشتری در کاهش رشد پرگنه قارچ دارد. حداقل غلظت بازدارندگی کامل از رشد قارچ برای اسانس مرزه دایمی و آویشن شیرازی بترتیب ۴۰۰ و۵۰۰ میکرولیتر در لیتر ارزیابی شد(گراف ۱).

اسانس مرزه دایمی با غلظت ۴۰۰ میکرولیتر در لیتر توانست ۱۰۰ درصد از رشد قارچ *A. flavus* مولد آفلا توکسین ممانعت بعمل آورد که نشان از فعالیت بالای ضد قارچی اسانس مرزه دایمی میباشد (گراف 2 و شکل ۱). عمده ترین ترکیب مرزه دایمی کارواکرول به میزان ۵۴/۶۰ درصد میباشد(جدول ۱). کارواکرول یک ماده فنولیک بوده و مکانیسم احتمالی اثر این اسانس میتواند همانند ترکیبات فنولیک ناشی از تخریب دیواره سلولی و سیستم های آنزیمی باشد (2). کارواکرول با فرمول بسته $C_{10}H_{14}O$ با بوی تند و گرم استوایی است که به طور طبیعی در برخی از گیاهان خانواده نعنا ازجمله مرزنجوش (Origamum)، آویشن (Thymus) و مرزه (Satureja) وجود دارد (۳). کارواکرول از فعالیت سوشهای متعددی ازباکتریها جلوگیری میکند و دارای اثر قوی ضدباکتریایی است .به طوری که اثر سمیت پایین همراه با طعم مطبوع و عطر و خواص آنتی اکسیدانی، این ماده را به عنوان یک افزودنی نگهدارنده مواد غذایی مطرح میکند تا از آلودگیهای میکروبی مواد غذایی جلوگیری کند (۷). در تحقیقی مشخص گردید مرزه یکساله قادر به کنترل رشد میسلیومی قارچ *A. flavus* در شرائط آزمایشگاه بوده و توانست در غلظت ۵۰۰ پی پی ام بطور موثری تولید آفلاتوکسین را در خوراک ماهی کنترل نماید و این اثرات ضد قارچی را به تاثیر دو ماده کارواکرول و تیمول نسبت دادند (۱).

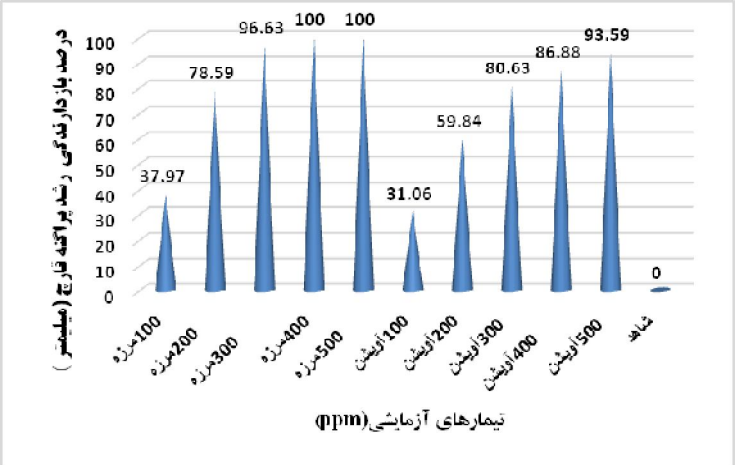
نس لیهان و همکاران (۵) تاثیر اسانس و عصاره متانولی مرزه یکساله را بر علیه قارچ A. flavus در شرائط آزمایشگاه بررسی نموده و از اسانس این گیاه دارویی بعنوان ترکیبی با توانایی ضد قارچی بالا و دوستدار محیط زیست نام برده اند. در تحقیقی دیگر تاثیر چند گیاه دارویی ایرانی در کنترل قارچهای عامل کپک و پوسیدگیپس از برداشت بررسی و نتایج نشان داد گونه های آویشن، نعنا و مرزه از جمله مرزه دائمی از توانایی بسیار بالایی در کنترل عوامل قارچی برخوردار بودند (۴). نتایج حاصل از این مطالعه نیز بیانگر توانایی بالای مرزه دائمی S. mutica در مقابل آویشن شیرازی در کنترل رشد قارچ A. flavus مولد آفلاتوکسین در محصولات کشاورزی و دامی بوده و میتوان امیدوار شد که بتوان در آینده با روی آوردن به تحقیقات بیشتر ترکیبی با تاثیرات ضد تولید آفلاتوکسین با عوارض جانبی کم دست یافت .

جدول ۱- اسانس های مورد آزمایش و میزان مواد موجود در آنها

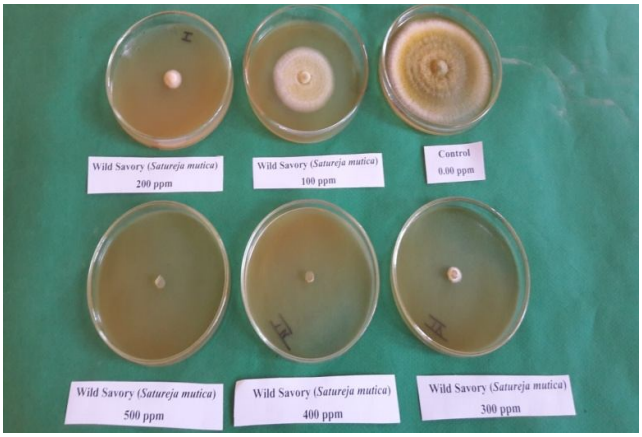
نام اسانس	نام انگلیسی	نام علمی	مواد موجود (٪)
آویشن شیرازی	Wild marjoram	*Z. multifolia*	Thymol: ۳۱.۱۰ Carvacrol: 27.94
مرزه دائمی (کالپوش شاهرود)	Wild Savory	*S. mutica*	Carvacrol: 54.60 Thymol: 4.04



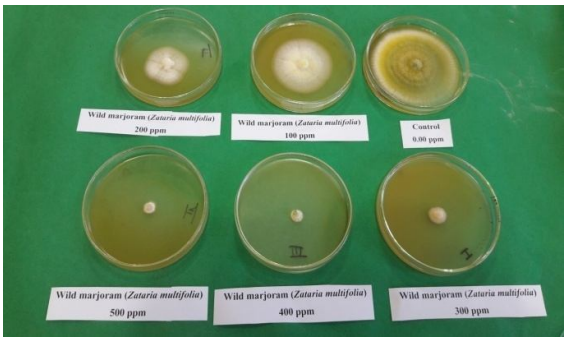
نمودار ۱) تاثیرغلظتهای مختلف اسانس مرزه دایمی و آویشن شیرازی در کنترل رشد پرگنه قارچ *A. Flavus*



نمودار ۲) تاثیرغلظتهای مختلف اسانس مرزه دایمی و آویشن شیرازی بر درصد بازدارندگی رشد پرگنه قارچ *A. flavus*



شکل ۱) تاثیرغلظتهای مختلف اسانس مرزه دایمی(*S. mutica*) در کنترل رشد پرگنه قارچ قارچ*A. Flavus*



شکل ۲) تاثیرغلظتهای مختلف اسانس آویشن شیرازی (*Z. multifolia*) در کنترل رشد پرگنه قارچ قارچ*A. flavus*

منابع

۱. یزدان پناه گوهرریزی، ل. ا. سپهداری، ع. شریف پور، م. شریف روحانی، و د. درویشی.1391. میزان تاثیر اسانس مرزه در جلوگیری از تولید سم آفلاتوکسین در غذای آبزیان. مجله علمی شیلات ایران. ۲۱:۳.

2. Lokman A., 2010. Inhibitory effect of essential oil on aflatoxin activities. African Journal of Biotechnology Vol. 9(17), pp. 2474-2481.
3. Mirza, M., Sefidkon, F. and Ahmadi, L., 1996. Natural Essential Oils, Extraction, Quantitative and Qualitative Analysis and Application. Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, 205p.
4. Mohammadi,P., N. Lotfi , L. Naseri and H. R. Etebarian.2013. Antifungal activities of essential oils from some Iranian medicinal plants against various post harvest moulds. Journal of Medicinal Plant Research. Vol. 7(23), pp. 1699-1708.
5. Neslihan D., R. Kotan,, F. Dadasoglu, F. Sahin .۲۰۰۸. Control of *Aspergillus flavus* with essential oil and methanol extract of Satureja hortensis. International Journal of Food Microbiology 124 (2008) 179–182
6. Orner, G,A. Donohoe, R.M. Hendricks, J.D.Curtis, L.R (1996). Comparison of the enhancing effects of Dehydroepiandrosterone with the structural analog 16-fluoro-5-androsten-17-one on aflatoxin B1 hepatocarcinogenesis in Rainbow trout. Fundamental and applied toxicology. (34) 132-140.
7. Özkan, A. and Erdoğan, A., 2011. A comparative evaluation of antioxidant and anticancer activity of essential oil from *Origanum onites* (Lamiaceae) and its two major phenolic components. Turkish Journal of Biology, 35: 735-742.
8. Rasooli a,I.and, M. R. Abyaneh b.2004. Inhibitory effects of Thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. Food Control 15(2004) 479–483.

بررسی اثر الکترومغناطیس در کنترل بیماریهای گیاهی

امین رادمردتیتکانلو[۱*]- سعید نصراله نژاد[۲]- رحیم احمدوند[۳]- عباس رضایی اصل[۴]
فروه سادات مصطفوی نیشابوری[۵]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی
[۲] *دانشیار گروه گیاهپزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان*
[۳] *استادیار موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال کرج*
[۴] *استادیار گروه مکانیک بیوسیستم دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان*
[۵] *دانش آموخته کارشناسی ارشد دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان*
* نویسنده مسئول: *amin.radmard70@gmail.com*

چکیده

بیمارگرهای گیاهی باعث از بین رفتن بسیاری از محصولات زراعی و باغی در دنیا شده است. یکی از روش های نوین برای کنترل یبمارگرها استفاده از میدان الکترومغناطیسی می‌باشد و نتایج زیادی در رابطه با تاثیر میدان الکترومغناطیسی بر روی بیمارگرهای گیاهی بدست آمده است. مکانیسمی که باعث ایجاد مقاومت در گیاه میزبان تحت تاثیر میدان شد، با توجه به اثرات میدان الکترومغناطیسی بر روی برخی خصوصیات گیاهان به ویژه آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز، اورنیتین دکربوکسیلاز، مسیر پیام رسان Ca^{2+}، اسید سالیسیلیک، رادیکال-های آزاد و آنزیم‌های اکسیدانت و احتمالا تأثیری که ممکن میدان بر روی بیمارگرهای گیاهی ایجاد کند، می-باشد.

واژگان کلیدی: الکترومغناطیس، بازدارنده‌ها، کنترل

مقدمه

تشعشعات الکترومغناطیسی نوعی موج است که در فضا یافته و دارای ماهیت و سرعت یکسان هستند و فقط از لحاظ فرکانس یا طول موج با هم تفاوت دارند. در امواج طولی سرعت انتشار موج، موازی با حرکت نوسانی آن است، در حالی که در امواج عرضی این سرعت عمود بر آن می‌باشد. میدان‌های مغناطیس از نوع امواج عرضی است و در هر فرکانس مشخص شدت جریان متفاوتی دارند که به مقدار بار الکتریکی خالصی که در واحد زمان از سطح مقطع خاصی از رسانا عبور می‌کند، بستگی دارد (۱۳). تاخیر معنی‌دار اولین علایم ظهور بیماری‌های ویروسی و آلترناریا را در مرحله رویشی در اثر پیش تیمار بذور گوجه‌فرنگی با مغناطیس گزارش شده است (۱۲). همچنین پژوهشگران به این نتیجه دست یافتند که فرکانس مغناطیسی خیلی پایین باعث مقاومت توتون به TMV شده است (۱۰). در بررسی که توسط محققین بر روی اثر آنتی‌باکتریایی میدان الکترومغناطیسی بر روی *Serratia marcescens* انجام گرفت، مشاهده گردید که قرار گرفتن در معرض یک میدان ۸/۲ میلی-تسلا منجر به مهار رشد این باکتری می‌گردد (۲۳). نتیجه یک تحقیق بیان می‌کند، میدان الکترومغناطیسی سبب مهار شدن جوانه‌زنی کنیدی *Alternaria alternate* در شدت ۱/۵ و ۱ میلی‌تسلا تا ۸۰ درصد می‌گردد اما زمانی که همین قارچ در

معرض میدان ۰/۱، ۰/۵، ۳/۵ و ۲ میلی‌تسلا قرار می‌گیرد جوانه‌زنی ۱۷۰ و ۱۲۰ درصد تحریک می‌شود. همچنین قارچ *Curvularia inaequalis*هنگامی که در معرض میدان الکترومغناطیسی ۰/۵ و ۱/۵ میلی‌تسلا قرار گرفت نسبت جوانه‌زنی ۱۴۰ و ۱۲۰ درصد تحریک شد این در حالی بود که زمانی که در معرض میدان ۳/۵ و ۲ میلی‌تسلا قرار می‌گرفت نسبت جوانه‌زنی ۸۰ و۴۰ درصد کاهش را در مقیاس با شاهد نشان می‌داد. همچنین میدان الکترومغناطیسی سبب کاهش ۱۵ و ۱۰ درصدی سرعت رشد میسیلیوم در ۶ گونه قارچ *Alternaria alternate, Curvularia inaequalis, Fusarium oxysporum, Macrophomina phaseolina, Trichoderma sp.* و *Sclerotinia sclerotirum* می‌شود (۱۹).

مکانیسم بازدارندگی

در بسیاری از گزارش‌ها درباره‌ی سازکار و اثر میدان‌های مغناطیسی به اثر این میدان‌ها در تأثیر روی کانال‌های غشائی به ویژه کانال‌های انتقال کلسیم اشاره شده است که این میدان‌ها باعث باز شدن این کانال‌ها و افزایش کلسیم درون سلولی می‌شود. در نهایت کلسیم به عنوان پیام آور ثانویه باعث فعال شدن بسیاری از عوامل بیان ژن می‌شود و تغییراتی در سنتز پروتئین‌ها ایجاد می‌کند (۱۰). در سطح سلولی هدف اصلی مغناطیس را، درگیر کردن مسیر پیام رسانی Ca^{2+} مشخص کردند (۵، ۹). از آنجایی که در فوق حساسیت[1] ورود Ca^{2+} به مایع درون‌سلولی مشاهده شده و نتیجتاً باعث افزایش مقاومت شده، پس به دلیل تحریکی که مغناطیس برروی شار Ca^{2+} داشته و متعاقباً ورود ویروس به گیاه احتمالاً سبب مقاومت در گیاه می‌شود (۱۰). همچنین گرازیا و همکاران (۱۰) مقاومت توتون به TMV را احتمالاً به دلیل درگیر کردن مسیر پیام رسانی Ca^{2+} و افزایش هورمون‌های PAL [2]و ODC [3]در گیاه بیان کردند (۱۰). افزایش ODC در طی استرس‌های زنده و غیر زنده به خوبی مستند شده است. تولید ODC باعث افزایش فراورده‌های پوترسین (نوعی پلی‌آمین) می‌شود. زمانی که سطح پوترسین در گیاه بالا رود گیاه به نحو مطلوبی با تنش‌ها مقابله می‌کند، به عنوان مثال روی درمان نهال صنوبر که در آن پوترسین انباشته شده باعث پاسخ گیاه به استرس موجود شد (۱۰).

مطالعات زیادی نشان می‌دهد که بیان ژن PAL پاسخگو به تنوعی از محرک‌های محیطی شامل عوامل بیماری‌زا، زخم، فقر مواد غذایی، اشعه فرابنفش، دماهای بالا و دیگر شرایط تنشی است. مطالعات ملکولی و ژنتیکی خاموش کردن یا آسیب این ژن جهت مطالعه‌ی عملکرد این خانواده ژنی در پدیده‌های رشد و نمو و پاسخ به تنش‌های محیطی صورت گرفته است (۱۲). PAL یکی از اولین ژن‌های تدافعی گیاهان تشخیص داده شده است که به وسیله تنش‌های محیطی و عوامل بیماریزا تحریک می‌شود، همچنین نور، فیتوکروم و تنظیم کننده‌های رشد بیان این ژن را تحت تأثیر قرار می‌دهند (۱۵). در مسیر فنیل پروپانوئیدی آنزیم فنیل آلانین امونیالیاز، دآمیناسیون فنیل آلانین به ترانس سینامیک و در ادامه دو مسیر متفاوت، که در یکی از مسیرها یون آمونیوم را کاتالیز که اولین گام از مسیر فنیل پروپانوئیدی است و به عنوان منبع غنی از متابولیت‌های گیاهی برای سنتز چوب و تولید فلاونوئیدها است. در مسیر بعدی ترانس سینامیک، بنزوئیک اسید و نهایتاً تولید اسید سالیسیلیک را به همراه دارد. متابولیت‌های ثانویه مانند پلی‌مر ساختاری دیواره سلولی، چوب، رنگیزه فلاونوئیدی، مواد حفاظتی و در مقابل اشعه فرابنفش، استرهای سینامیک اسید محافظت کننده زخم و آنتی‌بیوتیک‌های فیتوآلکسین، فورانوکومارین و ایزوفلاونوئید از مسیر فنیل پروپانوئیدی تولید می‌شوند. مشتقات مسیر فنیل پروپانوئیدی در گیاهان منحصر به فرد هستند و نقش حیاتی در نمو و تمامیت ساختار گیاه و همچنین به عنوان تنظیم‌گر سیگنال سلول‌های گیاهی دارند. علاوه بر این فنیل پروپانوئیدها به عنوان تعدیل‌گرهای شیمیایی در ارتباط گیاه با دیگر موجودات نقش دارند. تغییرات بیان ژن PAL در طی رشد و نمو گیاهان، سنتز چوب، و دیگر ترکیبات فنیل پروپانوئیدی را تنظیم می‌کند (۱۲، ۱۶). همچنین PAL باعث کاهش علایم در منطقه ضایعه در برگ‌ها می‌شود و نهایتاً مقاومت به TMV را به همراه دارد (۱۰). کاربرد خارجی PAL

[1] Hypersensitive response
[2] phenylalanine ammonia-lyase
[3] ornithine decarboxylase

باعث شکل‌گیری گره‌های آوندی حاوی آوند چوب و آبکش در محیط کشت و خاک می‌شود. در ساقه‌های چوبی PAL در تمایز چوب و اشعه پارانشیمی فعالیت اساسی دارد. فعالیت PAL نشانه خوبی از تمایز عناصر چوبی است (۲۰).

کاهش مقاومت گیاه به وسیله ممانعت بیان ژن PAL همراه با کاهش تجمع اسید سالیسیلیک در برگ‌ها می‌باشد. براساس اطلاعات بدست آمده محققان حدس می‌زنند که تولید پیش سازهای اسید سالیسیلیک عملکرد اصلی ژن PAL در مقاومت آرابیدوپسیس به زنگ است (۲۸). اسیدسالیسیلیک نیز به عنوان یک محرک طبیعی سبب سنتز آنزیمهای دفاعی گیاه از قبیل بتا ۱ و۳- گلوکوناز (هضم دیواره سلولی قارچها) و لیپواکسیژناز (آنزیم اصلی مسیر بیوسنتزی اسید جاسمونیک) (آبشار پیام رسانی وابسته به یون‌ها Ca^{++} و MaP کینازها) می‌شود. اسید سالیسیلیک یک عملکرد ثابت در طول SAR دارد. توانایی اسید سالیسیلیک برای القا SAR علیه ویروس‌ها موقعی که اسید سالیسیلیک به صورت آسپرین استفاده شد، باعث شد که اندازه لکه‌های HR تا ۹۵ درصد در یک پاسخ دفاعی ایجاد شده توسط گیاه مقاوم به ویروس موزائیک توتون کاهش یابد (۲۴). ولی برای ایجاد مقاومت اکتسابی سیستمیک در برگ‌های سالم ضروری است. تحقیقات گذشته نشان داد که اسید سالیسیلیک با افزایش میزان بیان ژن RDR6 می‌تواند موجب تکثیر بیش از اندازه توالی ژنتیکی مهاجم شده و از این طریق موجب فعال شدن فرایند ذاتی-دفاعی خاموشی ژن بعد از رونوشت برداری (PTGS) گردد (۶، ۲۷). انفجار اکسایشی که در پاسخ به اسید سالیسیلیک القا می‌شود نه تنها سلول را از آسیب اکسایشی حفاظت می‌کند بلکه باعث احیا شدن سلول می‌شود که منجر به فعال شدن مکانیسم‌های آنتی اکسیدانت و در نهایت فعال شدن مقاومت اکتسابی سیستمیک می‌شود. بعضی از ژن‌ها نظیر گلوتاتیون S- ترانسفراز که به میزان بالایی بعد از انفجار اکسایشی توسط اسید سالیسیلیک بیان می‌شوند در حفاظت گیاه علیه استرس اکسایشی لازم‌اند (۲۳).

اسید سالیسیلیک بیان پروتئین‌های مرتبط با بیماریزایی را از طریق یک مسیر وابسته به NPR1 در طول HR و SAR القا می‌کند، بدین صورت که اسید سالیسیلیک باعث القای استقرار NPR1 در هسته سلول شده و اتصال NPR1 به فاکتورهای رونویسی TGA باعث افزایش بیان ژن‌های مرتبط با بیماریزایی یا ژن‌های دفاعی می‌گردد (۸). در پایین دست اسید سالیسیلیک مسیر انتقال سیگنال دفاعی به دو شاخه تقسیم می‌شود. یک شاخه منجر به القای پروتئین‌های PR و مقاومت اکتسابی سیستمیک می‌شود که علیه قارچها و باکتری‌ها عمل می‌کنند. شاخه دیگر منجر به القای مقاومت به همانندسازی یا حرکت در مسافت طولانی ویروس‌ها می‌شود. این شاخه مختص ویروس می‌تواند توسط سیانید (CN) و آنتی مایسین (AAA)، فعال و توسط سالیسیل هیدروکسامیک اسید (SHAM) ممانعت شود. احتمالاً اسید سالیسیلیک می‌تواند سه مرحله همانندسازی، حرکت سلول به سلول و حرکت طولانی مسافت را توسط کاهش بیان ژن‌های گیاهی کدکننده (فاکتورهای میزبانی) که همانندسازی و حرکت ویروس را حمایت می‌کنند مورد هدف قرار دهد. همچنین اسید سالیسیلیک ممکن است تجمع بازدارنده‌های همانندسازی و حرکت ویروس را القا کند. به طور مثال اسید سالیسیلیک همانندسازی ویروس موزائیک یونجه را در پروتوپلاست لوبیا چشم بلبلی ممانعت کرده و باعث اختلال همانندسازی ویروس موزائیک توتون و ویروس ایکس سیب‌زمینی در توتون می‌شود (۱۷). تیمار اسید سالیسیلیک از ورود ویروس موزائیک خیار به آوند آبکشی جلوگیری می‌کند. البته قابل ذکر است که در میان ویروس‌ها ممکن است درجات متفاوتی از حساسیت به اثرات اسید سالیسیلیک وجود داشته باشد. برای مثال آلودگی ویروس وای سیب‌زمینی در توتون توسط کاربرد اسید سالیسیلیک تحت تأثیر قرار نمی‌گیرد (۲۱). اسید سالیسیلیک در مواجهه با تنش از طریق اتصال به پروتئین‌های مقاومتی باعث تغییر در ساختار سوم این پروتئین‌ها می‌شود، همچنین پروتئین‌های مقاومتی به عنوان یک پل ارتباطی بین مولکول علامت دهنده اسید سالیسیلیک و فعال‌سازی ژن-های دفاعی عمل می‌کنند (۲). تحقیقات نشان می‌دهند که اسید سالیسیلیک اثر ضدقارچی ندارد بلکه باعث فعال شدن مسیر SAR و القای PRها می‌شود که مستقیما رشد قارچ را تحت تأثیر قرار می‌دهند (۸). نتایج بدست آمده بیان کننده‌ی آن است که میدان مغناطیسی ایستا می‌تواند در سیستم دفاعی آنتی اکسیدان اختلال مثبت ایجاد کند و باعث ایجاد استرس اکسیداتیو در گیاه گردد (۱).

بعضی گزارش‌ها نشان داده است که میدان‌های مغناطیسی سبب استرس اکسیداتیو می‌شوند (۳، ۱۴). اثر میدان‌های مغناطیسی بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، شامل پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز، سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز در سلول-های گیاهی مطالعه شده و نشان داده است که نظیر جانوران و انسان (۱۷) در سلول‌های گیاهی نیز میدان مغناطیسی می‌تواند بر سیستم آنتی‌اکسیدان و افزایش فعالیت رادیکال‌های آزاد در سلول تأثیر بگذارد (۲۲). رادیکال‌های آزاد اکسیژنی به عنوان مولکول پیامبر سیگنال عمل نموده و موجب تحریک فاکتورهای رونویسی در هسته سلول می‌شوند. فاکتورهای رونویسی تحریک شده مسئول بیان ژن‌های مقاومت و جلوگیری کننده از تکثیر بیمارگر در گیاهان مقاوم می‌شوند. از نظر ماهیت، مهارکننده مذکور می‌توانند متابولیت‌های ثانویه ضد میکروبی معروف به فایتوالکسین‌ها و یا ترکیبات فنلیک متفاوت باشند (۱۱). با حضور رادیکال‌های آزاد اکسیژنی ترکیبات فنلی اکسید شده و موجب تخریب پروتئینی پاتوژن مهاجم و سلول می-شوند. همچنین پروتئین‌های اختصاصی ضد میکروبی مانند Pathogen related protein (PR-Proteins) و Inhibitor of (IVR) viral replication proteins نیز در موضع مورد تهاجم گیاه تولید می‌شوند که موجب مهار اختصاصی ویروس‌ها می‌شوند (۴). در این زمان توازن فعالیت‌های متابولیکی سلول شامل فعالیت‌های کاتابولیسمی (تنفس) و آنابولیسمی (فتوسنتز) سلول به‌هم‌خورده و نرخ تنفس افزایش پیدا کرده و در نتیجه اکسیدازهای پایانه ثانوی در چرخه تنفسی مانند Alternative (AOX) Oxidase تولید می‌شوند که برای تولید اسید سالیسیلیک سیگنال می‌دهند و موجب فعال شدن دفاع اکتسابی سیستمیک Systemic Acquired Resistance (SAR) از طریق چرخه‌ای موسوم به Sham pathway می‌شوند (۲۶).

با توجه به اثرات میدان الکترومغناطیسی بر روی برخی خصوصیات گیاهان به ویژه PAL، ODC، Ca^{2+}، اسید سالیسیلیک، رادیکال‌های آزاد و آنزیم‌های اکسیدانت و تأثیر آن‌ها بر روی بیمارگرهای گیاهی، می‌توان این‌گونه پیشنهاد کرد که الکترومغناطیس به عنوان یک کنترل غیرشیمیایی در برابر بیمارگرها معرفی شود.

منابع

۱. جوانی جونی، ف.، عبدالمالکی، پ. و قناتی، ف. ۱۳۸۷. بررسی اثر میدان مغناطیسی بر فعالیت آنزیم¬های آنتی اکسیدانت و محتوای فلاوونوئیدی در گیاه باقلا. مجله علمی پژوهشی دانشگاه اصفهان (علوم پایه). ۳۵ (۶): ۱۹۵-۲۰۸.

۲. طهماسبی، ا.، دیزجی، ا.، زنگنه، م. و کوهی حبیبی، م. ۱۳۹۰. مسیرهای ترارسانی علامت (پیام مولکولی) در مقاومت به ویروس گیاهی. ژنتیک در هزاره سوم. ۹(۳): ۲۵۰۷-۲۵۲۰

3. Aladjadjiyan A. 2002. Study of the influence of magnetic field on some biological characteristics of Zea mais. Journal of Central European Agriculture 3(2).89-94.
4. Akad, F., Teverovsky, E., David, A., Czosnek, H., Gidoni, D., Gera, A., & Loebenstein, G. (1999). A cDNA from tobacco codes for an inhibitor of virus replication (IVR)-like protein. Plant molecular biology, 40(6), 969-976.
5. Bauréus Koch C. L. M., Sommarin M., Persson B. R. R., Salford L. G. & Eberhardt J. L. 2003. Interaction between weak low frequency magnetic fields and cell membranes. Bioelectromagnetics 24(6), 395-402.
6. Coey J. M. D. & Stephen Cass. 2000. "Magnetic water treatment. Journal of Magnetism and Magnetic Materials 209.1: 71-74.
7. De Souza A., Garcí D., Sueiro L., Gilart F., Porras E. & Licea L. 2006. Pre-sowing magnetic treatments of tomato seeds increase the growth and yield of plants. Bioelectromagnetics 27:247-257.
8. Durrant WE. & Dong X. 2004. Systemic acquired resistance. Annu. Rev. Phytopathol 42: 185– 209.
9. Gartzke, J., and Lange, K. 2002. Cellular target of weak magnetic fields: ionic conduction along actin filaments of microvilli. American Journal of Physiology-Cell Physiology. 283:C1333-C1346.
10. Grazia T., Francesco B., Lisa L., Patrizia T., G.Lorenzo C. & Lucietta B. 2007. Extremely Low FrequencyWeak Magnetic Fields Enhance Resistance of NN Tobacco Plants toTobacco MosaicVirus and Elicit Stress-Related Biochemical Activities. Bioelectromagnetics 28: 214-223.
11. Goodman RN., Kira´ly Z. & Wood KR. 1986. ThebBiochemistry and Physiology of Plant Disease, University of Missouri Press USA, p. 433.
12. Huang J., Gu M., Lai Z., Fan B., Shi K., Zhou YH., Yu ZQ. & Chen Z. 2010. Functional analysis of the ArabidopsisPAL gene family in plant growth, development, and response to environmental stress. Journal of Plant Physiology 153(4):1526-1538.
13. JIA H. L., Chao W. A. N. G., Yue L. I., Yan L. U., WANG P. P., PAN W. D. & Tao S. O. N. G. 2014. Combined effects of 50 Hz magnetic field and magnetic nanoparticles on the proliferation and apoptosis of PC12 cells. Biomedical and Environmental Sciences 27(2), 97-105.
14. Kabuto I. Yokoi N. Ogawa A. Mori R. & P. Liburdy. 2001. Effects of magnetic fields on the accumulation of thiobarbituric acid reactive substances induced by iron salt and H2O2 in mouse brain homogenates or phosphot idylchol ine. Pathophysiology 7:283-288.

15. Kang TS. & Wang L. 2010. Converting an injectable protein therapeutic into an oral form: phenylalanine ammonia lyase for phenylketonuria. Molecular and Genetic Metabolism 99(1): 4-9.
16. MacDonald MJ. & D'Cunha GB, 2007. A modern view of phenylalanine ammonia lyase. Biochemistry and Cell Biology 85(3): 273-282.
17. Murphy AM., Chivasa S., Singh DP. & Carr JP. 1999. Salicylic acid-induced resistance to viruses and other pathogens: a parting of the ways? Trends plant sci, 4: 155-160.
18. Moustafa Y. M., Moustafa R. M A. & Belacy S. H. 2001. Abou-EI-Ela, Effects of acute exposure to the radiofrequency fields of cellular phones on plasma lipid peroxide and antioxidase activities in human erythrocytes. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 26: 605- 608.
19. NAGY P. 2003. The effect of light and low frequency magnetic fields on microscopic fungi (Doctoral dissertation, Hungarian Academy of Sciences).
20. Ortega-García, F., and Peragón, J. (2009). The response of phenylalanine ammonia-lyase, polyphenol oxidase and phenols to cold stress in the olive tree (Olea europaea L. cv. Picual). Journal of the Science of Food and Agriculture, 89(9), 1565-1573.
21. Pennazio S, Roggero P and Gentile IA (1985) Effects of salicylate on virus-infected tobacco plants. Phytopathol, 114, 203–213.
22. Piacentini M. P. D., Fraternale E., Piatti D. & Ricci F. 2001. Vetrano, Senescence delay and change of antioxidant enzyme levels in Cucumis sativus L. etiolated seedling by ELF magnetic fields. Plant Science 16: 145-53.
23. Piatti E., Albertini M.C., Baffone W., Fraternale D., Citterio B., Piacentini M.P., Dachà M., Vetrano F. & Accorsi A. 2002. Antibacterial effect of a magnetic field on Serratia marcescens and related virulence to Hordeum vulgare and Rubus fruticosus callus cells. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology 132(2): 359-365.
24. Uquillas C, Letelier I, Blanco F, Jordana X and Holuigue L (2004) NPR1-independent activation of immediate early salicylic acid-responsive genes in Arabidopsis. Mol. Plant.- Microb. Interact, 17: 34- 42.
25. White RF. 1979. Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus. Virology 99: 410- 412.
26. Yang YO. & Klessig DF. 1996. Isolation and characterization of a tobacco mosaic virus-inducible myb oncogene homolog from tobacco. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 14972-14977.
27. Xu Q, Wen X and Deng X (2005) Isolation of TIR and nonTIR NBS–LRR resistance gene analoguesand identification of molecular markers linked to a powdery mildew resistance locus in chestnut rose (Rosa roxburghii Tratt). Theor. Appl. Genet, 111: 819–830.
28. Zhanga L. & M. J. McCarthya. 2012. Black heart characterization and detection in pomegranate using NMR relaxometry and MR imaging. Postharvest Biology and Technology 67: 96-101.

تشخیص بیماری‌های برگی گیاه گوجه فرنگی از روی تصویر با استفاده از یادگیری عمیق

حبیب الله آق آتابای[۱،*]، محمدجواد شیخ زاده[۲]، مهدی ترشیزی[۳]
[۱و۲و۳] گروه کامپیوتر، دانشگاه گنبد کاووس
* نویسنده مسئول: atabay@gonbad.ac.ir

چکیده

گیاهان بخش مهمی از زندگی انسان هستند. چندین نوع بیماری وجود دارد که بر روی گیاهان تاثیر می گذارند و مضرات اقتصادی، اجتماعی و زیست محیطی فراوانی به همراه دارند. به همین دلیل تشخیص بیماری ها به شیوه ای دقیق و به موقع از اهمیت فراوانی برخوردار است. در چند سال اخیر، روشهای یادگیری عمیق به عنوان روشی قدرتمند برای بازنمایی داده ها و تشخیص اشیا از تصاویر، ظهور کرده است. در این مقاله، شبکه های عصبی در هم پیچیده[۳] (CNN) برای تشخیص نوع بیماری در برگ های گیاه گوجه فرنگی در تصاویر طبیعی، به کار برده شده است. برای این منظور، یک معماری ساده و ویژه برای CNN ارائه شده و روی زیرمجموعه ای از پایگاه داده تصاویر بیماری گیاهان، PlantVillage آزمایش می شود. برای سرعت بخشیدن به فرایند یادگیری، تصاویر ابتدا تبدیل به تصاویر سطح خاکستری شده و تغییر اندازه می یابد. در معماری ارائه شده اندازه ورودی (تصاویر) برابر با متوسط اندازه تمام تصاویر به کاربرده شده، در نظر گرفته شده است. نتایج این روش بیش از ۹۰٪ کیفیت کلاس بندی را بر روی داده های آزمون بدست می آورد که نشان از کارایی این روش در کلاس بندی تصاویر بیماری های برگ گیاهان دارد.

واژگان کلیدی: یادگیری عمیق، شبکه های عصبی در هم پیچیده (CNN)، گیاه گوجه فرنگی، تشخیص بیماری برگ

مقدمه

گیاهان بخش مهمی از زندگی انسان هستند. بیماری‌های گیاهی اغلب روی گیاهان تاثیر می گذارند و مضرات اقتصادی، اجتماعی و زیست محیطی فراوانی به همراه دارند. بیشتر بیماری‌ها نشانه‌هایی بر روی بافت ظاهری گیاهان از خود برجای می‌گذارند. تشخیص درست یک بیماری، به ویژه در هنگام شروع آن، یکی از گام های اساسی برای مدیریت مناسب بیماری می‌باشد. در بسیاری از موارد، تشخیص، یا حداقل حدس اولیه درباره بیماری، به صورت بصری توسط انسان انجام می‌شود. افراد آموزش دیده ممکن است در تشخیص و اندازه‌گیری بیماری‌ها کارآمد باشند اما با مشکلاتی روبرو هستند که سبب بروز خطا در اندازه‌گیری بیماری می‌گردد. در این موارد تشخیص خودکار بیماری‌ها به روش دقیق و سریع از اهمیت فراوانی برخوردار است (۲۶).

در حال حاضر گوجه فرنگی ها یکی از سرآمدترین محصولات باغی با توجه به ارزش و فراوانی آنهاست (۱). تقریبا ۸۰۰۰ گونه شناخته شده گوجه فرنگی وجود دارد که برخی از آنها با محتوای سخت رشد می کنند و مناسب برای پردازش صنعتی

[3] Convolutional Neural Network

هستند که به آنها گوجه فرنگی های پردازشی نیز می گویند (۲). گونه های مختلفی از بیماری وجود دارد که به کیفیت گوجه فرنگی ها صدمه می‌زند. برخی از آنها نشانه های قابل رویت بر روی برگ های گیاه باقی می‌گذارند مانند Early Blight, Late Blight, Septoria leaf spot و ...(۳).

روش مرسوم برای دسته بندی خودکار داده های تصویری، استخراج ویژگی های مهندسی شده دستی مانند (۴) SIFT (۵) HoG, و SURF (۶) و استفاده از الگوریتم های یادگیری بر روی این ویژگی هاست. در این روش، کارایی سیستم وابستگی زیادی به ویژگی های به کار برده شده دارد. در تشخیص بیماری‌ها، این روش در کارهایی مانند کلاس بندی برگ‌های گوجه فرنگی های مبتلا به کپک پودری در برابر گوجه فرنگی های سالم با استفاده از تصاویر استریو و گرمایی (۷)، تشخیص ویروس برگ زرد گوجه فرنگی با استفاده از مجموعه ای از مراحل استخراج ویژگی کلاسیک و دسته بندی با استفاده از کلاس بندی ماشین بردار پشتیبان (SVM) (۸) و ... به کار برده شده است. یک مقاله مروری (۹) اخیرا استفاده از یادگیری ماشین بر روی ویژگی های قابل مشاهده گیاهان را به صورت جامعی بحث کرده است.

انتخاب و مهندسی ویژگی های کارا، فرایندی پیچیده و طاقت فرساست و هر هنگام که مسئله تحول می یابد یا پایگاه داده مورد نظر تغییر می کند نیاز به بررسی مجدد دارد. یادگیری نمایشی مطمئن و مقاوم در برابر تغییرات، یکی از اهداف همیشگی در بینایی ماشین بوده است. در مقایسه با ویژگی های بصری کشف شده دستی، ویژگی های یادگرفته شده توسط شبکه های عصبی عمیق (DNN ها) اخیرا توانایی بیشتری در استخراج مفاهیم ثابت در مقابل بسیاری از پدیده ها در جهان بصری از خود نشان داده است (۱۰ و ۱۱).

در سال های اخیر، شبکه های عصبی درهم پیچیده (CNN)، یک گونه بخصوص از DNN ها، به عنوان یک پلتفرم قدرتمند برای نمایش و تشخیص ویژگی ها در بسیاری از کاربردهای تصویری ظهور کرده است (۱۲). CNN ها در زمینه های بینایی ماشین بسیار بررسی و استفاده شده است. بیش از یک دهه قبل لکان و همکاران (۱۳) شبکه های عصبی چندلایه را با الگوریتم یادگیری انتشار به عقب و روش یادگیری گرادیان آموزش داده و کارایی آن را در تشخیص دست نوشته ها نشان داده اند. CNN های عمیق قدرت تعمیم خوبی در کاربردهای مبتنی بر تصویر از خود نشان داده است. اخیرا کریشوسکی و همکاران (۱۰) به یک نقطه عطف دست یافته و از ویژگی های کشف شده موجود در رقابت "چالش تشخیص بصری در اندازه بزرگ[1]-(ILSVRC)" (۱۴) در سال ۲۰۱۲، که شامل تشخیص ۱۰۰۰ دسته از اشیا است پیشی گرفته است. از سال ۲۰۱۲، CNN ها انقلاب گسترده ای در جلب توجه به موضوعات تشخیص بصری گوناگون مانند کلاس بندی تصویر (۱۰و ۱۵)، بخش بندی معنایی تصاویر (۱۶)، تشخیص شی (۱۷)، آنالیز ویدیو (۱۸) و غیره ایجاد کرده است. اخیرا شبکه ها در حال عمیق تر شدن است مانند GoogLeNet (۱۵) که چاش دسته بندی ILSVRC 2014 (۱۴) را با بکار بردن ۲۲ لایه فتح کرده است.

روش های یادگیری عمیق، به ویژه CNN های عمیق، اخیرا در دسته بندی تصاویر گیاهان به کاربرده شده است. در (۱۹)، این روش برای تشخیص انواع گیاهان بر اساس الگوهای رگه های برگ استفاده شده است. جدید ترین مقاله در این رابطه (۲۰) است که در آن معماری های CNN مشهور، AlexNet(۱۰)، GoogLeNet (۱۵) و VGGNet (۱۱) برای شناسایی گونه های گیاهان تصویر برداری شده در عکسها به کار برده شده است. در این مقاله فاکتورهای متفاوتی که روی کارایی این شبکه ها تاثیر می گذارد ارزیابی شده است. انتقال یادگیری برای تصحیح مدل های از پیش آموزش داده شده، روی پایگاه داده گیاهان LifeCLEF 2015 استفاده شده است. برای کاهش احتمال overfitting (تطبیق بیش ازحد مدل آموزش داده شده به داده های یادگیری)، روشهای افزایش داده ها[2] بر اساس تبدیل تصاویر مانند چرخش، انتقال، بازتابش و تغییر اندازه استفاده شده است. علاوه بر این پارامترهای شبکه تنظیم شده و کلاس بند های متفاوتی با هم ترکیب شده تا کارایی کلی بهبود یابد. اخیرا CNN های عمیق در تشخیص بیماری در برگهای محصولات به کار برده شده است (۲۱) جایی که دسته بندی ۲۶ بیماری در ۱۴ محصول با استفاده از ۵۴،۳۰۶ تصویر از پایگاه داده PlantVillage (۲۲) با استفاده از دو معماری

[1] Large Scale Visual Recognition Challenge
[2] Data Augmentation

CNN محبوب یعنی AlexNet و GoogLeNet گزارش شده است. در کار آنها سه نسخه متفاوت از کل پایگاه داده استفاده شد. آنها را پایگاه داده PlantVillage همانطور که هست در حالت رنگی شروع کرده سپس تجربیات خود را بر روی نسخه سطح خاکستری تصاویر آزمایش کرده و در نهایت کل تجربیات را بر روی تصاویر پس از جداسازی پس زمینه از آنها انجام دادند.

در این مقاله، کاربردی از شبکه های عصبی در هم پیچیده (CNN) در تشخیص بیماری در برگ ها تجربه شده است. به طور خاص یک معماری CNN برای دسته بندی برگ های گیاه گوجه فرنگی که مبتلا به بیماری های گوناگون از جمله Bacterial spot، Early blight، Late blight، Septoria leaf spot، Spider mites (Two-spotted spider mite)، Tomato mosaic virus، Leaf Mold، Target Spot و Tomato Yellow Leaf Curl disease هستند پیشنهاد شده است. تصاویر استفاده شده بخشی از پایگاه داده PlantVillage (۲۲) هستند. ابتدا تصاویر پایگاه داده با استخراج کانال قرمز از هر تصویر به سطح خاکستری تبدیل می شود به این دلیل که در این کانال از تصویر، سرایت بیماری مشخص تر از سایر کانال ها و نیز تصاویر خاکستری شده معمولی است. این تصاویر سپس به اندازه متوسط تمام تصاویر که نزدیک به ۲۸۰×۱۸۰ است، تغییر اندازه پیدا می کنند. سپس نمونه ها به سه دسته تقسیم می شوند؛ ۷۰٪ یادگیری، ۱۰٪ ارزیابی و ۲۰٪ آزمایش، و مجموعه یادگیری به CNN پیشنهاد شده وارد می شود. معماری CNN پیشنهاد شده به طور ویژه برای این اندازه از تصاویر سطح خاکستری طراحی شده است. CNN ارائه شده دقت دسته بندی بیش از ۹۰٪ را روی مجموعه آزمون بدست آورده است. این نتایج نشان از کارایی کلاس بندی مبتنی بر CNN حتی بر روی پایگاه داده های نسبتا کوچک و بدون انجام فرایند هایی مانند افزایش داده ها و ... دارد.

ادامه مقاله به صورت زیر سازمان دهی شده است. در بخش دوم CNN به صورت خلاصه معرفی شده و معماری پیشنهادی ارائه می شود. در فصل سوم نتایج کاربردی و بحث ارائه خواهد شد. فصل چهارم مقاله را جمع بندی می کند.

مواد و روش‌ها

در این بخش شبکه های عصبی در هم پیچیده به صورت خلاصه معرفی شده و معماری پیشنهادی ارائه می شود.

شبکه های عصبی در هم پیچیده

یک شبکه عصبی در هم پیچیده (CNN) یک نوع از شبکه های عصبی عمیق (DNN) است که از سیستم بصری انسان الهام گرفته و برای درک تصاویر استفاده می شود. یک CNN ترکیبی از لایه های در هم پیچنده[1] جایگزین و لایه های تجمیع فضایی[2] است. لایه در هم پیچنده برای استخراج نقشه های ویژگی به وسیله فیلترهای در هم پیچنده خطی و سپس اعمال توابع غیرخطی فعال سازی (برای مثال rectifier، sigmoid، tanh و غیره) به کار می رود. لایه تجمیع فضایی برای گروه بندی ویژگی های محلی از پیکسل های نزدیک به هم استفاده می شود، که معمولا برای بهبود مقاومت در برابر تغییرات کوچک اشیا به کار می رود. این مراحل نمایش های خلاصه شده افزایشی از الگوی ورودی ایجاد می کنند؛ اولین لایه احتمالا حساس به لبه هاست لایه دوم حساس به گوشه ها و تقاطعات و لایه های بعدی نیز به هم ترتیب. ایده این است که این نمایش ها هر چقدر داد های بیشتری به CNN وارد شود، در نهایت چکیده تر ، مجرد تر و نامتغیر تر می شود. خروجی لایه آخر معمولا یک بردار است (نه یک تصویر) که به یک پرسپترون چندلایه (MLP) وارد می شود که خروجی نهایی شبکه را که معمولا دسته پیش بینی شده است تولید می شود.

معماری CNN پیشنهاد شده

معماری های CNN زیادی برای استفاده در تشخیص اشیا ارائه شده است. در میان آنها LeNet [13] وAlexNet [10] به عنوان پایه برای کار های گوناگون مورد توجه قرار گرفته است. اولی برای دسته بندی تصاویر بسیار کوچک (۲۸×۲۸

[1] Convolutional Layer
[2] Spatial Pooling Layers

پیکسل) از ارقام دست نوشته به کاربرد شده است در حالیکه دومی پیچیده تر بوده و به عنوان انقلابی در تشخیص شی در تصاویر رنگی با اندازه متوسط (۲۵۶×۲۵۶ پیکسل) شناخته می شود. AlexNet در جریان مسابقات [14] ILSVRC برای پایگاه داده [23] ImageNet طراحی شد. در این مقاله یک معماری CNN برای دسته بندی تصاویر سطح خاکستری به اندازه ۱۸۰×۲۸۰ پیکسل (که متوسط اندازه تصاویر پایگاه داده است) طراحی شده است. این معماری از سه لایه Conv تشکیل می شود که بر روی هر کدام تابع غیرخطی ReLU اعمال شده و پس از هر لایه یک لایه تجمیع ماکزیمم قرار می گیرد، سپس یک لایه تماما متصل در نقش MLP قرار گرفته و در نهایت یک لایه هزینه softmax قرار داده شده است که خروجی نهایی را مشخص می کند. جزئیات مدل ارائه شده در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱. معماری CNN ارائه شده

Layers / Attributes	L1		L2		L3		L4	L5
Type	Conv+ReLU	Pool	Conv+ReLU	Pool	Conv+ReLU	Pool	Conv	
Filter Size	7×7	3×3	5×5	3×3	9×3	3×3	1×1	
Stride	2	2	2	2	2	2	1	SoftMax
Number of Filters	64	64	256	256	256	256	128	
Output Size	137×87	68×43	32×20	15×9	4×4	2×2	2×2	

لایه تماما متصل، به صورت یک لایه در هم پیچنده (Conv) با اندازه فیلتر ۱×۱ تعریف می شود همانطور که در [24] MatConvNet، فریمورک یادگیری عمیق که در این کار از آن استفاده شده است، رایج است. لایه آخر ۱۰ خروجی دارد که متناظر به دو دسته نمونه های پایگاه داده است.

نتایج کاربردی

در این بخش، کلاس بند تصاویر برگ مبتنی بر CNN ارائه شده، بر روی زیر مجموعه ای از تصاویر پایگاه داده PlantVillage، به طور مشخص تصاویر بیماری گیاه گوجه فرنگی مورد آزمایش قرار می گیرد. پایگاه داده انتخابی تشکیل شده از عکس های برگ مربوط به ۹ بیماری گیاه گوجه فرنگی شامل Bacterial Spot، Early Blight، Late Blight، Septoria Leaf Spot، (Two-Spotted Spider Mite) Spider Mites، Tomato Mosaic Virus، Leaf Mold ، Target Spot و Tomato Yellow Leaf Curl disease. با افزودن تصاویر برگ های سالم پایگاه داد شامل ۱۹۷۴۲ تصویر در ۱۰ دسته خواهد بود. چند نمونه از تصاویر پایگاه داده در تصویر شماره ۱ آورده شده است.

تصویر شماره ۱: نمونه هایی از پایگاه داده

برای طراحی معماری برای دسته بندی تصاویر، اندازه متوسط تمام تصاویر که برابر است با ۱۸۰×۲۸۰ به عنوان اندازه ورودی CNN در نظر گرفته شده است. تصاویر با استخراج کانال قرمز از هر تصویر به سطوح خاکستری تبدیل می شود. در این کار از افزایش داده ها[1] (که معمولا جهت تولید نمونه های بیشتر برای کاهش overfitting در کاربرد های یادگیری عمیق)

[1] Data Augmentation

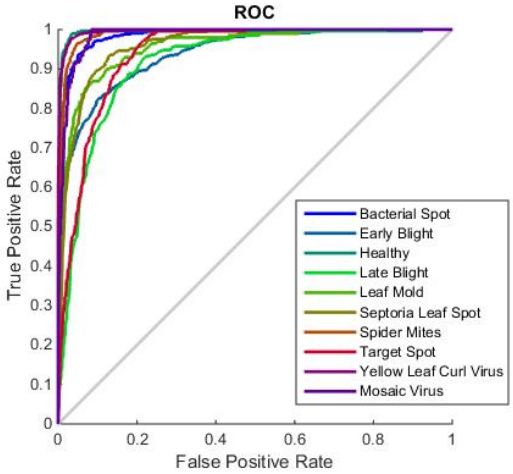
به کار برده می شود استفاده نشده است. داده ها به طور تصادفی به سه دسته، ۷۰٪ یادگیری برای آموزش شبکه، ۱۰٪ ارزیابی برای انتخاب و تنظیم پارامترهای مدل و ۲۰٪ آزمون برای تولید نتایج نهایی مدل تقسیم می شود.

در ادامه مقادیر فوق پارامترهای CNN ارائه شده ذکر می شود. شبکه بر اساس کاهش گرادیان تصادفی[1] با مقدار جنبش[2] 0.9 آموزش داده می شود. نرخ یادگیری برابر است با 0.001. پارامتر میرایی وزن به 0.0005 تنظیم می شود. وزن های اولیه به صورت تصادفی با استفاده از توزیع نرمال استاندارد گرفته شده و در ضریب 0.01 ضرب می شود. اندازه mini-batch و تعداد دور[3] ماکزیمم به مقدار ۱۰۰ تنظیم می شود.

نتایج نهایی دسته بندی و منحنی های ROC از نتایج به ترتیب در جدول ۲ و تصویر ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲. نتایج دسته بندی؛ بر روی هر دسته و در مجموع

Class	Bacterial Spot	Early Blight	Late Blight	Septoria Leaf Spot	Spider Mites	Tomato Mosaic Virus	Leaf Mold	Target Spot	Yellow Leaf Curl	Healthy	Average
Top 1 Accuracy	94.90%	86.56%	74.07%	85.87%	95.42%	86.30%	85.93%	85.61%	97.78%	95.13%	90.43%
Top 3 Accuracy	99.30%	99.60%	94.57%	97.87%	100%	100%	95.98%	99.62%	99.61%	99.35%	98.73%



تصویر ۲. منحنی های ROC از نتایج کلاس بندی

دقت کلاس بندی بر اساس قرار گرفتن کلاس هر نمونه در یک یا سه نتیجه اول (top 1, top 3) نشان داده شده است. مدل ارائه شده دسته های Bacterial Spot، Spider Mites، Yellow Leaf Curl disease و تصاویر برگ های سالم را بهتر تشخیص داده است. به طور خاص بهترین و بدترین دقت کلاس بندی به ترتیب متعلق به بیماری های Yellow Leaf Curl و Late Blight بوده است. متوسط دقت های کلاس بندی top1 و top3 به ترتیب برابر است با ۹۰.۴۳٪ و ۹۸.۷۳٪.

جمع بندی

در این مقاله یک معماری شبکه عصبی در هم پیچیده برای تشخیص بیماری برگ های گیاه گوجه فرنگی ارائه شده است. پایگاه داده مورد استفاده برای ارزیابی مدل یک زیر مجموعه از تصاویر برگ گیاهان بیمار، PlantVillage است که شامل ۱۹۷۴۲ تصویر در ۱۰ دسته می باشد. معماری پیشنهاد شده مخصوص به این پایگاه داده با اندازه ورودی ۲۸۰×۱۸۰ و

[1] Stochastic Gradient Descent
[2] Momentum
[3] Epoch

تصاویر سطح خاکستری است که از سه لایه در هم پیچیده که در ادامه هر کدام یک لایه تجمیع ماکزیمم قرا گرفته، تشکیل شده و در ادامه با یک لایه تماما متصل تکمیل شده است. نتایج کلاس بندی مدل ارائه شده نشان دهنده کارایی CNN ها برای کلاس بندی تصاویر با استفاده از پایگاه داده های نسبتا کوچک است. در این کار نتایج نسبتا خوبی با استفاده از یک PC معمولی و آموزش در مد CPU بدون نیاز به تجهیزات سخت افزاری خاص بدست آمده است.

منابع

1. FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations FAOSTAT: Production-Crops. 2013; Available from: http://faostat3.fao.org/.
2. Quezado-Duval, A.M., et al., Outbreaks of bacterial spot caused by Xanthomonas gardneri on processing tomato in central-west Brazil. Plant disease, 2004. 88(2): p. 157-161.
3. Borges, D.L., et al., Detecting and grading severity of bacterial spot caused by Xanthomonas spp. in tomato (Solanum lycopersicon) fields using visible spectrum images. Computers and Electronics in Agriculture, 2016. 125: p. 149-159.
4. Lowe, D.G., Distinctive image features from scale-invariant keypoints. International journal of computer vision, 2004. 60(2): p. 91-110.
5. Dalal, N. and B. Triggs. Histograms of oriented gradients for human detection. in 2005 IEEE Computer Society Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR'05). 2005. IEEE.
6. Bay, H., et al., Speeded-up robust features (SURF). Computer vision and image understanding, 2008. 110(3): p. 346-359.
7. Prince, G., J.P. Clarkson, and N.M. Rajpoot, Automatic detection of diseased tomato plants using thermal and stereo visible light images. PloS one, 2015. 10(4): p. e0123262.
8. Mokhtar, U., et al., Identifying two of tomatoes leaf viruses using support vector machine, in Information Systems Design and Intelligent Applications. 2015, Springer. p. 771-782.
9. Singh, A., et al., Machine learning for high-throughput stress phenotyping in plants. Trends in plant science, 2016. 21(2): p. 110-124.
10. Krizhevsky, A., I. Sutskever, and G.E. Hinton. Imagenet classification with deep convolutional neural networks. in Advances in neural information processing systems. 2012.
11. Simonyan, K. and A. Zisserman, Very deep convolutional networks for large-scale image recognition. arXiv preprint arXiv:1409.1556, 2014.
12. Yu, S., S. Jia, and C. Xu, Convolutional neural networks for hyperspectral image classification. Neurocomputing, 2017. 219: p. 88-98.
13. LeCun, Y., et al., Gradient-based learning applied to document recognition. Proceedings of the IEEE, 1998. 86(11): p. 2278-2324.
14. Russakovsky, O., et al., Imagenet large scale visual recognition challenge. International Journal of Computer Vision, 2015. 115(3): p. 211-252.
15. Szegedy, C., et al. Going deeper with convolutions. in Proceedings of the IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition. 2015.
16. Havaei, M., et al., Brain tumor segmentation with deep neural networks. Medical image analysis, 2017. 35: p. 18-31.
17. Alexandre, L.A., 3D object recognition using convolutional neural networks with transfer learning between input channels, in Intelligent Autonomous Systems 13. 2016, Springer. p. 889-898.
18. Xue, H., et al., Tracking people in RGBD videos using deep learning and motion clues. Neurocomputing, 2016. 204: p. 70-76.
19. Grinblat, G.L., et al., Deep learning for plant identification using vein morphological patterns. Computers and Electronics in Agriculture, 2016. 127: p. 418-424.
20. Mehdipour Ghazi, M., B. Yanikoglu, and E. Aptoula, Plant identification using deep neural networks via optimization of transfer learning parameters. Neurocomputing.
21. Mohanty, S.P., D.P. Hughes, and M. Salathé, Using Deep Learning for Image-Based Plant Disease Detection. Frontiers in Plant Science, 2016. 7.
22. Hughes, D.P. and M. Salathé, An open access repository of images on plant health to enable the development of mobile disease diagnostics. CoRR abs/1511.08060, 2015. 1.
23. Deng, J., et al. Imagenet: A large-scale hierarchical image database. in Computer Vision and Pattern Recognition, 2009. CVPR 2009. IEEE Conference on. 2009. IEEE.
24. Vedaldi, A. and K. Lenc. Matconvnet: Convolutional neural networks for matlab. in Proceedings of the 23rd ACM international conference on Multimedia. 2015. ACM.
25. Zeiler, M.D. and R. Fergus. Visualizing and understanding convolutional networks. in European conference on computer vision. 2014. Springer.
26. Jones, D.G. 1998. The Epidemiology of Plant Diseases. Springer. 444p.

تفرق صفت مقاومت نسبت به پاتوتایپ های ویژه بیماری سفیدک پودری در یک جمعیت رز دیپلوئید

حسین حسینی مقدم[۱] ، آنجلو دویت[۲]، اریک ون بوکستاله[۴]، یوهان ون هویلنبروک[۳]، لین لیوس[۳]

۱- گروه تولیدات گیاهی دانشگاه گنید کاووس،

۲- کاتو، ویلجن استریت، بلژیک

۳- انستیتوی تحقیقات کشاورزی و شیلات، ژنتیک کاربردی و اصلاح، بلژیک

۴- دانشکده مهندسی علوم طبیعی دانشگاه گنت، بلژیک

** نویسنده مسئول: hhm548@yahoo.com*

چکیده

خواسته اصلی اصلاح‌گران در پرورش رز ایجاد مقاومت به بیماری‌ها می باشد. در اصلاح رزهای باغی، تلاش اصلاح‌گران بر انتخاب گونه هایی با مقاومت بالا به سفیدک پودری می باشد. علی‌رغم تشریح پاتوتایپ‌های مختلف بیماری سفیدک‌پودری، بیماری‌زایی پاتوتایپ‌های مخصوص و مکانیسم مقاومت به سفیدک پودری بخوبی شناخته نشده است. در این مطالعه دو ژنوتیپ رز شامل *Rosa wichurana* و رقم تجاری یستردی، رفتار متفاوتی به پاتوتایپ‌های ویژه سفیدک پودری (R-E, R-P) نشان دادند. رقم یستردی با وجود حساسیت به R-P به وسیله توقف قارچ بعد از جوانه زدن به R-E مقاومت نشان داد. از تلاقی *R. wichurana* و رقم یستردی یک جمعیت به تعداد ۹۰ ژنوتیپ در نسل اول ایجاد شد. این جمعیت نسبت به مقاومت به هر دو پاتوتایپ قارچ مورد غربال‌گری قرار گرفتند. نتایج نشان داد تفاوت زیادی بین نتاج دیده می شود. بر اساس نتایج بدست آمده واکنش‌های مقاومت به سفیدک پودری در رز نه تنها به مکانیسم مقاومت مربوط می شود بلکه به بیماری زایی پاتوتایپ‌ها نیز بستگی دارد.

واژگان کلیدی: مقاومت به بیماری، تفرق صفات، سفیدک پودری، *Podosphaera pannosa, R. wichurana*

Introduction

Roses are the most important ornamental crop in the floriculture industry (3). Powdery mildew, caused by *Podosphaera pannosa* (Wallr.:Fr.), is the most commonly occurring disease on roses cultivated in greenhouses (6) and is also important on field grown roses. For powdery mildew several pathotypes have been described on roses (5;4). In roses morphological barriers, papillae formation, induced single cell and multicell reactions with or without cell collapse and the formation of abnormal haustoria upon powdery mildew infection have been shown by Dewitte et al. (2007) together with rose genotype dependent reactions.

The aim of the current study was to gain insight into the segregation of resistance and the underlying mechanisms in roses. For this purpose, a diploid segregating population was made. Resistance in parent plants and offspring was tested with 2 well characterized powdery mildew pathotypes in order to study pathotype specific resistance. The pathotypes used have been described by Leus et al. (2006). R-E is virulent on rose, while, R-P is virulent on both *Prunus avium* and rose.

Materials and methods

A diploid (2n=2x=14) rose population, derived from a cross between the cultivar 'Yesterday' (seed donor) and the species *R. wichurana* Crep. (pollen donor) was used for the inoculation tests and study of the segregation of resistance in the progeny. The population consisted of 90 individual genotypes planted in the field. The plants were more than 2 years old at the start of the experiments. Experimental inoculations were made with 2 pathotypes of *Podosphaera pannosa*, R-P and R-E. The two monoconidial isolates were chosen from the powdery mildew collection described by Leus et al. (2006). We aimed to inoculate with about 60 conidia/cm². The number of conidia/cm² was counted microscopically after tower inoculation on a control dish with the agar medium but without leaves and varied between 30 to 80 conidia/cm². The pathotypes were multiplied by dusting conidia on in vitro rose plantlets of the susceptible rose cultivar 'Gomery'. All experiments were performed with both pathotypes separately. For microscopic evaluation, 7 leaves (49 leaflets) were observed per genotype–isolate combination using a light microscope (Leica DMIRB; magnifications: 100x-200x).

Results

Based on the scores of the parents and F1 plants inoculated using the inoculation tower, resistance classes (1=resistant to 5=susceptible) were assigned to every genotype for the pathotypes R-E and R-P separately. Parent *R. wichurana* was scored class 2 for pathotype R-P and class 1 for pathotype R-E. Parent 'Yesterday' showed to be very susceptible (scoring class 5) to pathotype R-P and was profoundly resistant to pathotype R-E with no observed fungal development. In total 64 (71%) and 76 (84%) of the F1 genotypes belonged to class 2 or 3 for pathotype R-P and R-E respectively (Figure 3). Of 90 genotypes, 40 individuals obtained the same class for both pathotypes. For both pathotypes some genotypes belonged to different classes when inoculated with a different pathotype. Nine genotypes had more than 1 class difference between both pathotypes. Only 2 F1 genotypes showed more resistance than the parent *R. wichurana* for R-P. Only a weak correlation was observed between the classes attributed to the two pathotypes on the individual genotypes (Spearman's rho = 0.33; $p < 0.05$). There was no significant difference between the total mean DIs for the F1 population when both pathotypes were compared (Mann-Whitney U test; $p < 0.05$).

The inoculation was done with 30-80 conidia per cm^2 (focusing to achieve around 60 conidia per cm^2).

Sporulation was scored at 10 dai (days after inoculation) with, 35 leaflets evaluated per plant genotype and per pathotype. Normal abundant sporulation (score 3 or 4) was only observed for R-P on 'Yesterday' that developed and covered almost 20% to 100% of the leaflet surface while on *R. wichurana,* the development of conidia was limited to score 2 to 4 that covered only 10-35% of the leaflet surface. Pathotype R-E could only infect and sporulate on *R. wichurana* (5-25% of the leaflet surface), resulting in a score of 1 to 2.

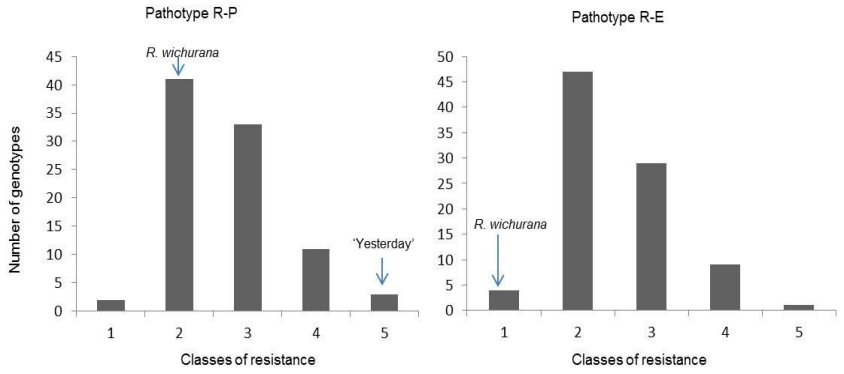


Figure 1. Classes of resistance obtained based on mean DI as scored for each individual F1 rose genotype (90 genotypes) from the tower inoculation for both powdery mildew pathotypes. Conidial density: 60 conidia/cm² (on average) with at least five repeated inoculations. Class: 1 = very resistant, 2 = partial resistant, 3 = medium resistant, 4 = susceptible, 5 = very susceptible. Pathotype R-E did not develop secondary mycelium on parent 'Yesterday' (only can germinate)

Discussion

The 2 pathotypes of *P. pannosa* used in this study were characterized by Leus et al. (2006). While the pathotype R-E is only virulent on roses, R-P can infect roses and *Prunus*. In our study, differences between the two pathotypes used were confirmed as differential reactions in the parents *R. wichurana* and 'Yesterday'.

For macroscopic evaluation of the parents and F1 population inoculations were performed with an inoculation tower, resulting in a relatively homogeneous distribution of the conidia over the leaf material as previously shown by Linde and Debener (2003) and Leus et al. (2003). The homogeneous distribution of the conidia is essential for the evaluation of plant disease with a quantitative inheritance. It is a key factor for genetic studies to measure the contribution of minor genes for resistance (7).

Different resistance classes were found for the parents by tower inoculation. Variable microscopic reactions were observed in both parents to both fungal isolates. Microscopic evaluation revealed more detailed information on resistance mechanisms in the parent plants. Remarkably immediately after germination of the R-E conidia on 'Yesterday', fungal development was arrested and no secondary mycelium development was recorded by microscopic evaluation. Usually 1 cell reaction (hypersensitive response or HR) was observed under the arrested conidia. To pathotype R-P in spite of high cell reactions, this parent plant showed high susceptibility (class 5). In a former study by Leus et al. (2006) where they tested R-E and R-P, no fungal development was observed for both pathotypes on *R. wichurana*. Leus et al. (2006) used in vitro plantlets with the aim of distinguishing fungal pathotypes. In the study of Dewitte et al. (2007) very few conidia of R-E developed secondary mycelium on *R. wichurana* and no sporulation occurred. At 48 hours after inoculation only 1.7% of the conidia showed cell reactions beneath the germ tube on *R. wichurana*. Dewitte et al. (2007) found that in *R. wichurana* inoculated with R-E, resistance mainly happens based on papilla formation and formation of abnormal haustoria. Cell collapse, characterized as necrotizing cells, was often seen when the fungus started to produce secondary mycelium. The results in the study presented here contrast with those obtained by Dewitte et al. (2007) but this can be explained by the difference in leaf age.

After the tower test only 4 plants showed a higher resistance (class 1) to R-E compared to the resistance in the parents. In the study presented here many genotypes showed raised susceptibility to one or both pathotypes. we concluded that this specific resistance segregated in the progeny. In some

genotypes there were a lot of conidia that did not form secondary mycelium similar what observed in parent 'Yesterday'. The segregation in the offspring points to monogenic resistance or as it is called race-specific resistance to R-E. In such cases, a resistance gene in the host has a specific interaction with an avirulence gene of the pathogen (3).

For the R-P isolate, the formation of secondary mycelium was much lower on most plants compared to both parents. Only 1 plant developed more secondary mycelium, although the number of cellular reactions was higher. Furthermore, the number of cellular reactions depends on the expansion of the fungus. In conclusion, our results show that resistance reactions to powdery mildew in roses do not only result in different resistance mechanisms depending on the rose genotype but are also pathotype dependent.

References

1.Dewitte A, Leus L, Van Huylenbroeck J, Van Bockstaele E, Höfte M (2007). Characterization of reactions to powdery mildew (*Podosphaera pannosa*) in resistant and susceptible rose genotypes. J Phytopathol 155: 264-272

2.Flor HH (1955) Host-Parasite interaction in Flax Rust - its genetics and other implications. Phytopathology 85: 680-685

3.Heinrichs F (2008) International statistics flowers and plants. AIPH/Union Fleurs 56: 16-90.

4.Leus L, Dewitte A, Van Huylenbroeck J, Vanhoutte N, Van Bockstaele E, Höfte M (2006) *Podosphaera pannosa (syn. Sphaerotheca pannosa)* on *Rosa* and *Prunus* spp.: characterization of pathotypes by differential plant reactions and ITS-sequences. J Phytopathol 154: 23-28

5.Linde M, Debener T (2003) Isolation and identification of eight races of powdery mildew of roses *(Podosphaera pannosa)* (Wallr.:Fr.) de Bary and the genetic analysis of the resistance gene Rpp1. Theor Appl Gen 107: 256-262

6.Linde M, Hattehdorf A, kaufmann H, Debener T (2006) powdery mildew resistance in roses: QTL mapping in different environments using selective genotyping. Theor Appl Gen 113: 1018-1092

7.Yan Z, Dolstra O, Prins TW, Stam P, Visser PB (2006) Assessment of partial resistance to powdery mildew (*Podosphaera pannosa*) in a tetraploid rose population using a spore-suspension inoculation method. Eur J Plant Pathol 114: 301-308

تعیین پراکنش نماتدهای انگل گیاهی مزاع یونجه شهرستان خرم‌آباد

عیدی بازگیر[۱] ، زهرا میرزایی‌پور[۲*]، عارف مرادپور[۳]
[1]استادیار گروه گیاه‌پزشکی، بیماری‌شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان
[2]مربی گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان
[3]دانشجوی کارشناسی گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان
*نویسنده مسئول: *bimarielorestan@gmail.com*

چکیده

به منظور شناسایی نماتدهای انگل گیاهی مزارع یونجه شهرستان خرم‌آباد ۵۰ نمونه خاک و ریشه از مناطق مختلف یونجه‌کاری این شهرستان در سال ۱۳۹۴ طی فصول رشد گیاه، جمع‌آوری گردید. پس از شستشو و استخراج نماتدها از خاک و ریشه‌ها، تثبیت و انتقال آنها به گلیسیرین با استفاده از روش دگریسه انجام پذیرفت. بعد از تهیه اسلایدهای میکروسکوپی دائم و با استفاده از میکروسکوپ نوری مجهز به لنز دیجیتال بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی و با استفاده از منابع و کلیدهای معتبر شناسایی گونه‌ها انجام گرفت. همچنین به منظور تعیین پراکنش و درصد فراوانی گونه‌ها، شمارش جمعیت گونه‌های مختلف در هر مزرعه صورت گرفت و مزارع آلوده به هر نماتد مشخص گردید. در این پژوهش ۱۹ گونه متعلق به۱۴جنس درفوق بالا خانواده Tylenchomorpha به شرح زیر شناسایی شد. ۱- Aphelenchus avenae ، ۲- Boleodorus thylactus ، ۳- Ditylenchus medicaginis ، ۴- D. myceliophagus ، ۵- Geocenamus rugosus ، ۶- Helicotylenchus digonicus ، ۷- H. vulgaris ، ۸- Irantylenchus vicinus ، ۹- Merlinius brevidens ، ۱۰- Microdorus ، ۱۱- M. sp. Mesocriconema ۱۲- Neopsilenchus magnidens، ۱۳- Pratylenchoides ritteri ، ۱۴- Pratylenchus neglectus ، ۱۵- P. thornei، ۱۶- Pratylenchus sp.، ۱۷- Psilenchus hilarulus، ۱۸- Tylenchorhynchus dubius، ۱۹- Zygotylenchus quevaria شناسایی شد. نتایج این مطالعه نشان داد که گونه‌ی Pratylenchus neglectus با داشتن ۷۲ درصد بیشترین میزان فراوانی و گونه‌ی Tylenchorhynchus dubius با ۲ درصد کمترین میزان پراکنش را در بین مزارع مختلف یونجه شهرستان خرم‌آباد به خود اختصاص داده‌اند.

واژگان کلیدی: پراکنش، خرم‌آباد، نماتد، یونجه

مقدمه

یونجه با نام انگلیسی (Alfalfa) و اسم علمی(Medicago sativa L.) ، گیاهی چند ساله و یکی از قدیمی‌ترین و متداول‌ترین گیاهان علوفه‌ای است که در اکثر نقاط جهان کشت می‌شود. عملکرد این گیاه علوفه‌ای در ایران، نزدیک به سه تن یونجه خشک در هکتار است. احتمال داده می‌شود قسمت زیادی از محصول یونجه در اثر عوامل مختلف از بین می‌رود (۲). سطح زیر کشت یونجه در مزارع آبی و دیم ایران در سال زراعی۹۲ـ۱۳۹۱، حدود ۶۱۱۹۶۶ هکتار با تولید ۵۱۹۹۹۹۷ تن و متوسط

عملکرد آن ۲۷۰۰۰۴ کیلوگرم در هکتار بوده است(۱). بر اساس آمار وزارت کشاورزی در سال زراعی ۹۲-۹۱ سطح زیر کشت یونجه در استان لرستان ۱۴۵۰۰هکتار با تولید ۱۲۲۷۱۹ تن و عملکرد ۸۴۶۳۴۹ کیلوگرم در هکتار می‌باشد(۱).

این گیاه همواره در تمام نقاط دنیا در معرض حمله تعداد زیادی از آفات و همچنین عوامل بیماری‌زای گیاهی از جمله قارچ ها، باکتری‌ها، ویروس‌ها و نماتدهای انگل گیاهی قرار می‌گیرد. نماتدهای پارازیت گیاهی جز عوامل بیماری‌زای گیاهی هستند که می‌توانند خسارات قابل توجهی را روی یونجه ایجاد کنند.گونه‌های زیادی از نماتدهای انگل گیاهی گزارش شده که روی یونجه خسارت‌زا می‌باشند. از جمله می‌توان به نماتد ساقه Ditylenchus dipaci گونه‌های مختلف نماتد ریشه گرهی.Meloidogyne spp و همچنین گونه‌های مختلف نماتد مولد زخم .Pratylenchus spp اشاره کرد. علاوه بر این نماتدها تعداد دیگری از نماتدها مثل گونه‌های مختلف جنس‌های Aphelenchoides spp, Paratrichodorus spp, Tylenchorhynchus spp و Xiphinema spp یونجه را مورد حمله قرار می‌دهند(۵).

نماتد ساقه Ditylenchus dipsaci یکی از نماتدهای خسارت‌زا روی یونجه می‌باشد. که برای اولین بار از مزارع یونجه امریکا شناسایی و گزارش شد. این نماتد خسارت‌زا در سال ۱۹۷۲ باعث از بین رفتن ۱۰ هکتار از مزارع یونجه اکبرآباد (روستایی واقع در ۵۰ کیلومتری شیراز) شد (۳).

روش تحقیق

از مناطق مختلف کشت یونجه سطح شهرستان خرم‌آباد، تعداد ۵۰ نمونه خاک و ریشه در سال۱۳۹۴ طی فصول رشد گیاه جمع‌آوری گردید. تعداد نمونه‌ها با توجه به میزان سطح زیر کشت یونجه در شهرستان خرم‌آباد و همچنین چگونگی پراکنش مزارع یونجه در مناطق مختلف این شهرستان تعیین گردید. نمونه‌برداری از خاک و ریشه یونجه به طور تصادفی انجام گرفت. به این صورت که در هر مزرعه، نمونه‌برداری از چندین نقطه با پراکندگی مناسب و براساس مساحت مزرعه صورت می‌گرفت. بدین منظور، بر اساس مساحت، به ازای هر هکتار تعداد ۱۰ تا ۱۵ نمونه کوچک از عمق ۵ تا ۳۰ سانتی‌متری برداشته و پس از مخلوط کردن به آزمایشگاه انتقال داده شد. نماتدهای خاک و ریشه گیاهان با استفاده از روش سینی(۶) استخراج و طبق روش تکمیل شده دگریسه(۴) تثبیت و به گلیسیرین منتقل شدند.

ضمن تهیه اسلایدهای میکروسکوپی دائم با روش حلقه پارافین و گلیسرین از تمام نماتدهای کرمی شکل، در صورت لزوم برش‌های عرضی از بدن تعدادی از نماتدهای کرمی شکل در گلیسیرین ژل تهیه شد. سپس با استفاده از میکروسکوپ نوری مجهز به لنز دیجیتال اندازه‌گیری و خصوصیات ریخت شناسی و ریخت‌سنجی جمعیّت‌های جمع‌آوری شده مورد بررسی قرار گرفت، بعد از انجام اندازه‌گیری، با استفاده از منابع و کلیدهای موجود شناسایی گونه انجام شد. پس از تعیین گونه‌های هر مزرعه جهت تعیین فراوانی یا پراکنش گونه‌های شناسایی شده از فرمول زیر استفاده شد.

$$AA= IF/TF$$

که در این رابطه A فراوانی مطلق، IF مزارع آلوده و TF کل مزارع نمونه برداری شده

نتایج:

بررسی نمونه‌های خاک و ریشه جمع‌آوری شده از مزارع مختلف یونجه شهرستان خرم‌آباد نشان دهنده‌ی گسترش متفاوت گونه‌های مختلف نماتدها در مزارع یونجه این شهرستان بود. در این تحقیق تعداد ۱۹ گونه متعلق به ۱۴ جنس از زیر راسته Tylenchina شناسایی و درصد فراوانی آنها در منطقه تعیین گردید (جدول شماره۱). از بین ۵۰ نمونه خاک و ریشه جمع‌آوری شده از مزارع یونجه شهرستان خرم آباد نماتدهایی از خانواده‌های Anguinidae، Aphelenchidae، Belonolaimidae، Criconematidae، Hoplolaimidae، Pratylenchidae و Tylenchidae جمع‌آوری و شناسایی گردید. در بین نماتدهای شناسایی شده تعداد ۷ گونه برای فون نماتدهای یونجه ایران جدید بوده. در این پژوهش گونه‌های Pratylenchus

neglectus، Aphelenchus avenae و Merlinius brevidens به ترتیب با داشتن۷۲، ۵۰ و ۴۲ درصد، بیشترین میزان فراوانی را در بین مزارع مختلف یونجه شهرستان خرم‌آباد به خود اختصاص داده‌اند و رایج‌ترین نماتدها در مزارع یونجه این شهرستان بودند. و در بین نماتدهای موجود در۵۰ مزارع نمونه‌برداری شده گونه‌ی Tylenchorhynchus dubius با داشتن۲ درصد کمترین میزان پراکنش و فراوانی را در بین مزارع مختلف یونجه شهرستان خرم‌اباد به خود اختصاص داده‌اند. همچنین این تحقیق نشان داد بیشترین گونه‌های نماتد شناسایی شده به خانواده Pratylenchidae تعلق دارد و گونه‌ی Pratylenchus neglactus بیشترین میزان فراوانی(۷۲ درصد) را به خود اختصاص داده و با جمعیت بالایی از مزارع یونجه شهرستان خرم‌آباد در خاک اطراف ریشه‌های یونجه جمع‌آوری و شناسایی شد.

جدول۱- درصد فراوانی گونه‌های مختلف در مزارع یونجه شهرستان خرم‌آباد

NO	Species	RA%
۱	Aphelenchus avenae Bastian, 1865	۵۰
۲	Boleodorus thylactus Thorne, 1941	۱۰
۳	Ditylenchus medicaginis Wasilewaska, 1965	۳۲
۴	D. myceliophagus Goodey, 1958	۴
۵	Geocenamus rugosus (Siddigi, 1963) Brzeski, 1991	۶
۶	Helicotylenchus digonicus Perry in perry, Darling & Thorne, 1959	۳۰
۷	H.vulgaris Yuen, 1964	۴
۸	Irantylenchus vicinus(Szczygiel, 1970) Samenkova, 1984	۸
۹	Merlinius brevidens (Allen, 1955) Siddiqi, 1970	۴۲
۱۰	Merlinius microdorus(Geraert, 1966) Siddiqi, 1970	۱۸
۱۱	Mesocriconema sp.	۱۰
۱۲	Neopsilenchus magnidens (Thorne, 1949) Thorne & Malek, 1968	۸
۱۳	Pratylenchoides ritteri Sher, 1970	۱۲
۱۴	Pratylenchus neglectus (Rensch, 1924) Filipjev & Schuurmans Stekhoren, 1941	۷۲
۱۵	P. thornei Sher & Allen, 1953	۱۴
۱۶	Prartylenchus sp.	۴
۱۷	Psilenchus hilarulus de Man, 1921	۱۶
۱۸	Tylenchorhynchus dubius (Butschli, 1873) Filipjev, 1936	۲
۱۹	Zygotylenchus quevaria (Tobar Jimenez, 1963) Braun & Loof, 1966	۶

منابع

۱. بی نام. ۱۳۹۲ . آمار نامه کشاورزی. جلد اول. محصولات زراعی ۹۲ـ۱۳۹۱ . دفتر آمار و فناوری وزارت جهاد کشاورزی ۱۱۴ صفحه.

۲. کریمی، ح. ۱۳۸۳. یونجه. چاپ دوم، انتشارات دانشگاه تهران. ۳۷۶ صفحه.

3. Abivardi, C., M.Sharafeh. 1973. The Alfalfa stem nematode, Ditylenchus dipsaci (Kuhn 1857) Filipjev 1936 as an important threat for cultivation of Alfalfa in Iran.department of plant protection- college of agriculture university- Shiraz- Iran. Pp. 22- 27.
4. De Griss, A.T. 1969**.** Redescription ou modification de quelques techniques utilisees dans Letude des Nematodes phytoparasitaries. Mededelingen Rijksfaculteit Landbouwweteschappen Gent, 34: 351-369
5. Griffin. G.D., E.C.Bernard, G.A.Pederson, G.L.Windham, K.H.Quesenberry and R.A.Dunn. 1996**.** Nematode pathogens of Amarican pastur/forage. American society of agronomy . p. 257.
6. Whitehead. A. G and J.R. Heming. 1965. A comparison of some quantitative methods of extracting small vermiform nematodes from soil. Annals of Applied Boil. 55:25-38.

ردیابی ویروس وای سیب‌زمینی در شته *Therioaphis trifolii* با استفاده از روش RT-PCR

رضا پوررحیم [1] *، شیرین فرزادفر [1]

[1] *بخش تحقیقات ویروس‌شناسی گیاهی، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران*

* *نویسنده مسئول: pourrahim@yahoo.com*

چکیده

ویروس وای سیب زمینی (*Potato Y virus*-PVY) بعنوان یکی از مهمترین ویروس‌های مزارع سیب‌زمینی ایران هر ساله خسارت قابل توجهی را به این محصول وارد می‌سازد. در مدیریت بیماری ناشی از این ویروس، پایش شته‌های ناقل در مزرعه و نیز آگاهی از وضعیت شته‌ها از نظر همراه داشتن آلودگی ویروسی، نقش مهمی در اتخاذ تدابیر مدیریتی موفق دارد. در اواسط شهریور ۱۳۹۳ تعدادی بوته سیب‌زمینی با علائم موزائیک و حامل شته خالدار یونجه (*Therioaphis trifolii*) از یک مزرعه در استان مرکزی جمع‌آوری و آلودگی بوته-ها به ویروس PVY به کمک آزمون الایزا تایید گردید. جهت ردیابی آلودگی PVY در بدن این شته‌ها از آزمون آر.تی.پی.سی.آر با بکارگیری آغازگرهای اختصاصی برای بخشی از ژن پروتئین پوششی این ویروس استفاده شد. بر اساس نتایج حاصل، امکان ردیابی PVY در بدن تک شته حتی تا ۲ ماه پس از نگهداری آن در اتانول ۷۰ درصد مقدور بود. با توجه به گسترش حضور شته خالدار یونجه در مناطق کشت سیب‌زمینی در مرکز و غرب کشور، این نتایج در مطالعات اپیدمی و کنترل انتشار PVY بویژه در مزارع تولید سیب‌زمینی بذری دارای اهمیت کاربردی بوده و امکان ردیابی شته‌های واجد آلودگی PVY را در برنامه‌های پایش و کنترل جمعیت ناقلین فراهم می‌نماید.

واژگان کلیدی: پایش، سیب‌زمینی بذری، شته خالدار یونجه، ناقل، ویروس.

مقدمه

ویروس وای سیب زمینی (*Potato virus Y*-PVY) گونهٔ تیپ جنس *Potyvirus* از خانواده *Potyviridae*، ویروسی است با پراکنش وسیع که خسارت شدیدی را در محصولات مهم اقتصادی مانند سیب زمینی،گوجه‌فرنگی، فلفل و توتون ایجاد میکند (۹). بعلاوه بیش از ۶۰ گونه گیاهی مختلف از خانواده *Solanaceae* و تعدادی از گونه‌های گیاهی خانواده‌های چغندریان و بقولات نیز میزبان این ویروس میباشند (۸). این گونه ویروسی از لحاظ اقتصادی و گسترش مهمترین ویروس بیماریزای سیب زمینی محسوب میشود و برحسب نوع نژاد ویروس و رقم سیب زمینی در آلودگی اولیه تا ۸۰ درصد و در آلودگی ثانویه بین ۱۵ تا ۷۰ درصد محصول را کاهش میدهد. از طرفی PVY اثر تشدید کنندگی روی همانندسازی ویروس ایکس سیب زمینی (*Potato X virus*-PVX) داشته و در آلودگی توام با PVX میزان همانند سازی آن را تا سه برابر افزایش میدهد و بدین ترتیب سبب افزایش خسارت این ویروس نیز میگردد (۵).

این ویروس توسط شته‌ها به طریق ناپایا منتقل میگردد. حداقل ۲۵ گونه شته که قادر به انتقال PVY میباشند شناسایی شده‌است که کارآترین آنها شته سبز هلو میباشد (۱۲). نژادهای مختلفی از این ویروس در طبیعت سیب زمینی را آلوده میکنند و بر اساس نحوه ایجاد علائم روی ارقام سیب زمینی و توتون، سرولوژی و تحریک پاسخ‌های مقاومتی و توانایی انتقال

با شته در سه گروه متفاوت طبقه‌بندی شده‌اند: گروه PVYn (نژاد ایجاد کننده علائم نکروز رگبرگی در توتون)، گروه PVYo (نژاد معمولی یا عمومی) و گروه PVYc (نژاد ایجادکننده علائم خط و نقطه) (۷). جدایه‌ای از گروه نژادی PVYn تحت عنوان PVYntn عامل بیماری لکه حلقوی نکروتیک غده سیب زمینی (potato tuber necrotic ring spot disease-PTNRD) بوده، بشدت سبب کاهش کیفیت غده سیب زمینی میگردد. علائم مشخصهٔ این بیماری نکروز سطحی غده‌های سیب زمینی در فصل برداشت میباشد که در طول انبارداری توسعه می‌یابد (۹) و در شرایط گرم و خشک علائم زودتر بروز میکند (۴).

در بررسی‌های بعمل آمده تا کنون ۴۳ گونه شته به عنوان ناقل بیماریهای ویروسی سیب زمینی شناسائی و گزارش شده‌است (۱۱). در ایران تاکنون حداقل پنج گونه شته متعلق به خانواده *Aphididae* روی سیب زمینی جمع‌آوری و شناسائی شده‌اند که از نظر انتقال بیمایهای ویروسی مهم هستنـــــد (۲ و ۳). با توجه به اهمیت شته‌ها در انتقال ویروس PVY، پایش جمعیت و فعالیت این آفت در مزارع سیب‌زمینی از اهمیت خاصی برخوردار بوده و یکی از نکات مهم در این بررسی‌ها، آگاهی از وضعیت آلودگی شته به ویروس PVY می‌باشد. در پایش جمعیت شته‌ها بویژه در مزارع تولید سیب‌زمینی بذری، علاوه بر تعیین نوسانات جمعیتی شته‌ها، مشخص شدن احتمال همراه بودن آلودگی ویروسی با شته‌های وارد شده به مزرعه نیز مورد توجه می‌باشد. برای این منظور روش‌های سرولوژیکی و مولکولی متعددی جهت ردیابی آلودگی ویروسی در بدن شته توسعه داده شده و مورد استفاده قرار گرفته‌اند. در این تحقیق امکان استفاده از روش مولکولی رونوشت برداری برگردان و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (RT-PCR) جهت ردیابی آلودگی ویروسی PVY در بدن شته خالدار یونجه (*Therioaphis trifolii*) مورد بررسی قرار گرفته است. این شته از جمله شته‌های شایع در مناطق کشت سیب‌زمینی در نواحی مرکزی تا غرب ایران می‌باشد.

مواد و روش‌ها

منابع ویروس و شته: در اواسط شهریور ۱۳۹۳ تعداد پنج بوته سیب‌زمینی با علائم موزائیک و بدشکلی برگ همراه با شته در روی آنها از یک مزرعه در استان مرکزی جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل گردید. شته‌های موجود در روی نمونه‌های برگی به درون شیشه‌های محتوی اتانول ۷۰ درصد منتقل شده و مشخصات نمونه، روی آنها یادداشت شد. نمونه‌های برگی با استفاده از آزمون الایزا از نظر احتمال آلودگی به ویروس PVY با استفاده از روش DAS-ELISA و به کمک آنتی‌بادی اختصاصی (تهیه شده از شرکت بیوربا سوئیس) طبق غلظت و روش توصیه شده توسط شرکت سازنده مورد آزمون قرار گرفتند (۶). نمونه‌هایی که ۶۰ دقیقه بعد از افزودن محلول سوبسترا به چاهک مربوطه، میزان جذب نوری آنها مساوی یا سه برابر میانگین جذب نوری چاهک شاهد سالم بود، بعنوان نمونه‌های با واکنش مثبت (آلوده) ارزیابی شدند.

استخراج نوکلئیک اسید از شته‌ها: بدن یک شته منفرد، درون یک میکروتیوب روی یخ قرار داده شده و با استفاده از یک میله شیشه‌ای استریل در ۱۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (شامل تریس ۰/۱ مولار، اسیدیته ۷/۴، حاوی ۲/۵ میلی‌مولار کلریدمنیزیم و ۲۰ واحد آنزیم دی.ان.ایز-۱) عصاره‌گیری شد و به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. از محلول‌های SDS به میزان غلظت نهایی یک درصد و پروتئیناز-K به مقدار ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به میکروتیوب افزوده شده و ۱۰ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. به هم حجم محتویات میکروتیوب از فنل اشباع شده با آب افزوده شده و بعد از چند مرتبه تکان، میانگریز در ۱۰ هزار جی بمدت ۲۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد. فاز فنل حذف شده و رونشین در هم حجم خود از مخلوط کلروفورم:ایزوآمیل الکل (۱:۲۴) شستشو داده شده و مجددا میانگریز گردید. به میزان ۲/۵ برابر حجم رونشین از اتانول مطلق و یک دهم حجم آن از استات سدیم ۳ مولار افزوده شده و پس از یک شب نگهداری در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد، میانگریز شد. رسوب آر.ان.ای با اتانول ۷۰ درجه شستشو داده شده و در نهایت در ۵ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز حل گردید تا برای آزمون RT-PCR مورد استفاده قرار گیرد.

آزمون RT-PCR: در این مطالعه از آغازگرها و روش رونوشت برداری برگردان و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (RT-PCR) توصیفی توسط نی و سینگ در ۲۰۰۱ برای تکثیر قطعه‌ای از ژن پروتئین پوششی ویروس PVY بطول ۴۸۰ جفت‌باز استفاده شد (۱۰). بطور خلاصه ابتدا ۴ میکرولیتر از آموده آر.ان.ای استخراج شده از بدن شته همراه با یک میکرولیتر از آغازگر پایین-

دست (۲۰ پیکومول بر میکرولیتر) و پنج میکرولیتر آب تیمار شده با DEPC، بمدت ۱۰ دقیقه در ۶۵ درجه قرار گرفته و بلافاصله به روی یخ منتقل شدند. به این میکروتیوب مقدار ۲ میکرولیتر بافر 10X RT، یک میکرولیتر معادل ۲۰۰ واحد آنزیم رونوشت برداری‌برگردان RevertAid (سیناکلون، ایران)، دو میکرولیتر از مخلوط dNTP (غلظت نهایی ۱ میلی‌مولار)، نیم میکرولیتر (معادل ۲۰ واحد) از بازدارندهٔ ریبونوکلئاز (سیناکلون، تهران) افزوده و حجم آن با آب به ۲۰ میکرولیتر رساند شد. واکنش بمدت یک ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد در دستگاه ترموسایکلر مدل پریموس (ساخت MWG، آلمان) انجام شده و سپس میکروتیوب بمدت ۱۰ دقیقه در ۷۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد. واکنش مرحله پی.سی.آر در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد و اجزا آن شامل ۴ میکرولیتر از محصول مرحله RT، یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای بالا و پایین دست (۲۰ پیکومول در میکرولیتر)، ۲/۵ میکرولیتر از بافر 10X PCR، یک میکرولیتر از کلرید منیزیم ۵۰ میلی‌مولار، یک میکرولیتر از آنزیم دی.ان.ای پلیمراز Taq (معادل ۵ واحد) (سیناکلون، ایران) بود. برنامه واکنش شامل دو دقیقه در ۹۴ درجه، سپس ۳۵ چرخه ۹۲ درجه یک دقیقه، ۵۸ درجه یک دقیقه و ۷۲ درجه یک دقیقه بود که در نهایت میکروتیوب بمدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه قرار گرفت. در آزمون RT-PCR، بعنوان شاهد مثبت از آمودهٔ ریبونوکلئیک اسید کل استخراج شده از بافت گیاه توتون رقم سامسون آلوده به PVY (تایید شده با الایزا) استفاده شد. پس از اتمام واکنش، ۸ میکرولیتر از محصول واکنش در ژل آگارز یک درصد حاوی یک میکروگرم در میلی‌لیتر اتیدیوم برماید در ۸۰ ولت ثابت بمدت ۴۰ دقیقه الکتروفورز شده و ژل در نور ماورابنفش توسط دستگاه UV-ایلومنیتر (مدل ایماکو، ساخت هلند) مورد مشاهده و تصویربرداری قرار گرفت.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از آزمون الایزا روی ۵ نمونه برگی تهیه شده از گیاهان سیب‌زمینی جمع‌آوری شده از استان مرکزی نشان داد که تمام آنها دارای آلودگی به ویروس PVY می‌باشند. مایه‌زنی تعدادی از این نمونه‌ها روی گیاهان محک سلمه‌تره سفید (*Chenopodium quinoa*) و گیاه توتون رقم سامسون (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun) در گلخانه منجر به بروز علائم لکه‌های موضعی در سلمه‌تره و پیسک در توتون گردید که با خصوصیات زیستی توصیفی در مورد این ویروس مطابقت داشته (۷) و بعلاوه با استفاده از آزمون الایزا، سیستمیک شدن ویروس PVY در گیاهان توتون مایه‌زنی شده تایید گردید.

گونه شته حاضر در هر پنج بوته سیب‌زمینی جمع آوری شده از مزرعه مورد بازدید در استان مرکزی، شته خالدار یونجه (*Therioaphis trifolii*) تشخیص داده شد. این شته در غالب مناطق کشت بهاره سیب‌زمینی در مناطق مرکزی تا غرب کشور حضور داشته و با فعالیت خود در سطح مزارع سیب‌زمینی، احتمال انتقال ویروس PVY در بین مزارع سیب‌زمینی را افزایش می‌دهد (۳ و ۱).

نتایج حاصل از آزمون RT-PCR روی آموده‌های استخراج شده از شته، نشان دهنده تکثیر یک قطعه دی.ان.ای با طول مورد انتظار حدود ۴۸۰ جفت باز در شته‌های جداشده از هر هشت نمونه برگی مورد آزمون بود. شدت باند دی.ان.ای تکثیر شده طی آزمون RT-PCR تفاوت چندانی در بین شته‌های سبز هلو جدا شده از نمونه‌های مزرعه‌ای فوق (آلوده به PVY) نشان نداد. همچنین آزمون RT-PCR مورد اشاره، قادر به ردیابی ویروس PVYدر شته‌هایی که بمدت ۲ ماه در الکل ۷۰ درجه در یخچال نگهداری شدند نیز بود، ولی بعد از گذشت ۲ ماه شدت باند دی.ان.ای در برخی نمونه‌ها ضعیف شده بود. در نمونه-های شته نگهداری شده در شرایط منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد، قطعه دی.ان.ای مورد انتظار تکثیر نگردید که احتمالا ناشی از تخریب پیکره ویروس طی این شرایط بوده است.

در این تحقیق، برای اولین بار امکان ردیابی PVY در شته خالدار یونجه (*Therioaphis trifolii*) با استفاده از روش مولکولی RT-PCR مورد بهینه‌سازی و توسعه قرار گرفت. با توجه به وسعت مناطق زیر کشت یونجه و سایر لگوم‌های زراعی و علوفه‌ای در کشور، شته خالدار یونجه از جمعیت و فعالیت بیشتری در این مناطق برخوردار بوده و یک خطر مهم از نظر انتقال و انتشار PVY در مزارع سیب‌زمینی این نواحی محسوب می‌شود. یکی از اقدامات مهم در مدیریت بیماری ناشی از PVY در

مزارع سیب زمینی بویژه بذری، پایش جمعیت شته‌ها و متعاقبا اتخاذ تدابیر مدیریتی در برابر نوسانات و فعالیت این گروه از حشرات ناقل بیماریهای ویروسی می‌باشد. در این نوع مطالعات پایشی، علاوه بر اینکه آگاهی از زمان و فراوانی ورود شته به مزرعه حائز اهمیت است، اطلاع یافتن از وضعیت شته‌های وارد شده از نظر داشتن آلودگی ویروسی نیز بسیار مفید و کارآمد خواهد بود. این موضوع بویژه در مطالعات اپیدمی ویروس PVY از جمله در تعیین فواصل ایزولاسیون مزارع سیب زمینی بذری (حداقل فاصله امن بین مزارع خوراکی و بذری سیب‌زمینی) و نیز تعیین بهترین زمان سرزنی از اهمیت کاربردی خاصی برخوردار می‌باشد.

منابع

۱. پوررحیم، ر. ۱۳۸۹. ارزیابی و تعیین رابطه بین فراوانی آلودگی به ویروس شته‌زاد PVY با جمعیت شته‌ها در مزارع سیب زمینی بذری. گزارش نهایی پروژه پژوهشی شماره ۸۶۱۲۲، انتشارات موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ۷۲ ص.
۲. رضوانی، ع.؛ ترمه، ف. و موسوی، م. ۱۳۷۳. شته‌های ایران و میزبان‌های آنها. موسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی.
۳. سلطانی، هرمز. ۱۳۸۰. بررسی‌جنبه‌های فونستیک و تغییرات جمعیت شته‌ها در مزارع سیب‌زمینی بذری و اثر آنها روی تباهی ویروسی ارقام در استان همدان. پایان‌نامهٔ کارشناسی ارشد رشتهٔ حشره‌شناسی کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران.

4. Boonham, N., Walsh, K., Hims, M., Preston, S., North, J., and Barker, I. 2002. Biological and sequence comparisons of potato virus Y isolates associated with potato tuber necrotic ringspot disease. Plant Pathology 51: 117-126.
5. Bowmn Vance, V. 1991. Replication of potato virus X is altered in coinfections with potato virus Y. Virology 182: 486-494.
6. Clark, M. F., and Adams, A. N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 34: 475-483.
7. De bokx, J. A. and Huttinga, H. 1981. Potato virus Y. CMI/AAB Descriptions of plant viruses, No. 242.
8. Hooker, A. J. 1981. Compendium of potato diseases, APS press.
9. Moravec, T., Cerovska, N., and Boonham, N. 2003. The detection of recombinant, tuber necrosing isolates of potato virus Y(PVYntn) using a three primer PCR based in the coat protein gene. Journal of Virological Methods 109: 63-68.
10. Nie, X., and Singh, R. P. 2001. A novel usage of random primers for multiplex RT-PCR detection of virus and viroid in aphids, leaves, and tubers. Journal of Virological Methods 91: 37-49.
11. Salazar, L. F. 1996. Detection of potato viruses with ELISA. Series II : Potato virus and viroid detection methods, Guide book II/3, CIP, Lima, Peru, 13pp.
12. Varveri, C. 2000. Potato virus Y detection by immunological and molecular techniques in plants and aphids. Phytoparasitica 28: 2.

پایش جمعیت شته‌ها و فراوانی آلودگی ویروس وای سیب‌زمینی در مزارع سیب‌زمینی بذری فیروزکوه

رضا پوررحیم [1] *، شیرین فرزادفر [1]

[1] بخش تحقیقات ویروس‌شناسی گیاهی، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران

* نویسنده مسئول: pourrahim@yahoo.com

چکیده

در روند تولید غده‌های بذری سالم سیب‌زمینی، اطلاع از وضعیت شته‌های ناقل در مناطق تولید سیب‌زمینی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشند. در این پژوهش، فراوانی و نوسانات جمعیت شته‌ها و میزان آلودگی ویروس PVY، در یک مزرعه تولید سیب‌زمینی بذری در شهرستان فیروزکوه در سال‌های ۱۳۸۶ و ۱۳۸۷ با استفاده از تله تشتک زرد، مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌برداری از بوته‌های سیب زمینی بلافاصله پس از سبز شدن و نیز اواخر فصل انجام شده و این نمونه‌ها از نظر آلودگی به ویروس PVY مورد آزمون الایزا قرار گرفتند. نتایج حاصل نشان داد که شته سیب‌زمینی *Macrosiphum euphorbiae* ، شته سبز هلو *Myzus persicae* ، شته نخودفرنگی *Aphis cracivora* ، شته دم‌روباهی *Aulacorthum solani* و شتهٔ خالدار یونجه *Therioaphis trifolii* از مهمترین گونه‌های شته شکار شده در مزرعه مورد بررسی بودند. اولین اوج جمعیت شته‌ها در اوایل فصل (حدود نیمه اول تا دوم تیرماه) و دومین اوج جمعیت در حدود نیمه دوم شهریور ماه تعیین گردید. کمترین جمعیت شته‌ها در مرداد ماه مشاهده شد. بین افزایش جمعیت شته‌ها و افزایش آلودگی به PVY رابطه خطی با ضریب همبستگی مثبت قابل توجهی (۰/۷ تا ۰/۹) وجود دارد. در بین شته‌های شکار شده شته-های *T. trifolii* و *Aphis* sp. بترتیب در رتبه اول و دوم قرار داشته و پس از آنها شته‌های *M. euphorbiae* ، *M. persicae* و *A. solani* در مرتبه‌های بعدی قرار داشتند.

واژگان کلیدی: ویروس وای سیب‌زمینی، شته، ناقل، غده بذری.

مقدمه

در حدود ۵۰ نوع ویروس مختلف با سویه‌های متفاوت از سیب زمینی در جهان گزارش گردیده است که ویروس وای سیب زمینی (*Potato virus Y*-PVY) یکی از مهمترین آنها محسوب می‌شود. این ویروس بهمراه چندین ویروس مهم بیمارگر دیگر، از مزارع سیب‌زمینی کشور شناسایی و گزارش شده‌اند (۱۰). ویروس PVYتوسط چندین گونه شته و به روش ناپایا در طبیعت منتقل می‌شود. در مورد تغییرات جمعیت شته‌های ناقل و نیز تغییرات فراوانی آلودگی‌های ویروسی شته‌زاد بررسی‌های متعددی انجام شده است (۶، ۸ و ۱۱). در مطالعه‌ای با شمارش شته‌ها روی ۱۰۰ برگ سیب‌زمینی بطور تصادفی می‌توان یک رابطه همبستگی بین فراوانی شته ها با آلودگی های ویروسی بدست آورد (۱۲). طی بررسی که بمدت ۸ سال در استان ورتمبرگ در آلمان انجام شده، مشخص شد افزایش تعداد شته سبز هلو دارای رابطه مستقیم با افزایش فراوانی آلودگی‌های ویروسی بوده است (۹). در بررسی بعمل آمده در اسکاتلند مشخص شد که در بین شته‌های شکار شده شته سبز هلو بیشترین تاثیر را در افزایش آلودگی PVY داشته است (۶). همچنین در بررسی در منطقهٔ ارز روم ترکیه طی سالهای ۱۹۹۰ –

۱۹۹۲ افراد بالدار ۳۴ گونه شته شکار شد که ۱۴ گونه از آنها ناقل بیماری PVY بودند و آستانه خسارت اقتصادی برای شتهٔ سبز هلو در صورتی که ظهور آن بعد از شهریور ماه باشد ۲۰ شته در هر تله تعیین گردید (۱۳). با توجه به اینکه انتشار ویروسهای سیب زمینی در ارتباط با جمعیت شته‌های ناقل می‌باشد، بنابراین انتخاب مناطق مناسب جهت تولید سیب زمینی بذری بایستی بر اساس مطالعهٔ جمعیت شته‌ها باشد. بنابر این جهت ساماندهی برنامهٔ تولید بذر مناسب در مناطق مورد نظر به مجموعهٔ اطلاعاتی در زمینهٔ فون شته‌های مزارع سیب زمینی، تنوع گونه‌های ناقل، تغییرات جمعیت شته‌ها در طول فصل رشد و آگاهی از مناطق و دوره‌هائی از سال که جمعیت شته‌ها پائین است حائز اهمیت می‌باشد. در این تحقیق شته‌های مزارع سیب‌زمینی بذری و فراوانی آنها در طول فصل رشد همراه با فراوانی آلودگی PVY در یک واحد تولید سیب‌زمینی بذری در شهرستان فیروزکوه سیب‌زمینی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

بررسی جمعیت شته‌های بالدار: برای مطالعهٔ تنوع، تراکم و روند تغییرات جمعیت شته‌های بالدار در طول فصل رشد در این بررسی از تله‌های زرد رنگ محتوی آب (Yellow Water Traps) استفاده شد. یک مزرعه به مساحت حدود پنج هکتار که وابسته به یک کشت و صنعت بزرگ بود، انتخاب شده و پنج عدد تله زرد رنگ در نظر گرفته شد. تله ها شامل سینی‌های فلزی گالوانیزه رنگ آمیزی شده با رنگ زرد به طول ۵۰ و عرض ۳۰ و عمق ۸ سانتی متر با لبه‌های شیب‌دار به سمت بیرون بودند. تله‌ها از اردیبهشت تا پایان مهر ماه در مزارع انتخابی نصب و هر هفته یک بار با استفاده ازقلم مو اقدام به جمع‌آوری نمونه‌های شکار شده در شیشه‌های حاوی الکل ۷۵ درصد به اضافه ۵ درصد گلیسیرین گردید. پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه و بااستفاده از روش توصیفی توسط رضوانی و همکاران (۱۳۷۳) اسلایدهای میکروسکوپی تهیه (۱) و برای شناسائی شته‌ها از کلیدهای توصیفی توسط بلکمن و ایستوپ در سال ۲۰۰۰ (۳) و کلید شناسائی شته‌های ایران (۱) استفاده شد.

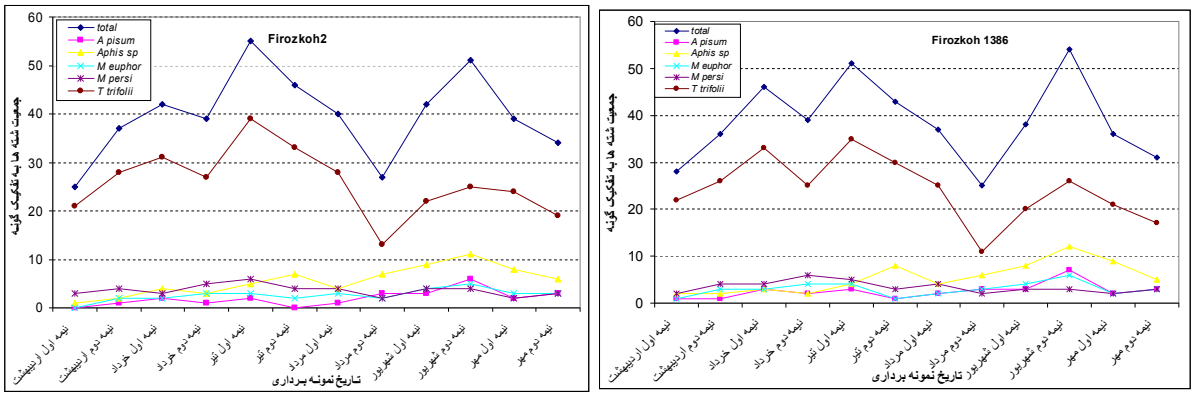
سنجش فراوانی آلودگی PVY: برای تعیین ارتباط بین فعالیت ناقلین و میزان آلودگی بوته‌ها به **PVY**، مزرعه دو بار مورد بازرسی و نمونه‌برداری قرار گرفت. نمونه برداری اول بلافاصله پس از سبز شدن بوته‌ها و به منظور برآورد آلودگی های اولیه ناشی از غده‌های بذری صورت گرفت (به تعداد ۲۰۰ نمونه برگی به ازای هر هکتار). برای نمونه‌برداری دوم، در پایان فصل زراعی تعداد ۲۰۰ غده تصادفی بازای هر هکتار از هر مزرعه جمع‌آوری گردید و گیاهچه‌های حاصل از رشد آنها در شرایط گلخانه تحقیقاتی مورد آزمون قرار گرفتند. برای ردیابی ویروس از روش DAS- ELISA و به کمک آنتی‌بادی تهیه شده از شرکت بیوربا سوئیس و طبق غلظت و مراحل توصیه شده توسط آن شرکت استفاده شد (۴).

تعیین رابطه همبستگی بین فراوانی شته‌ها و آلودگی PVY: داده‌های بدست آمده در مورد فراوانی هریک از شته‌ها، از نظر رابطه همبستگی با فراوانی آلودگی به PVY در طول فصل رشد، بررسی و مشخص گردید و در نهایت ضریب همبستگی بین فراوانی شته‌ها و فراوانی آلودگی PVY و معادله رابطه خطی بین آنها تعیین گردید (۲).

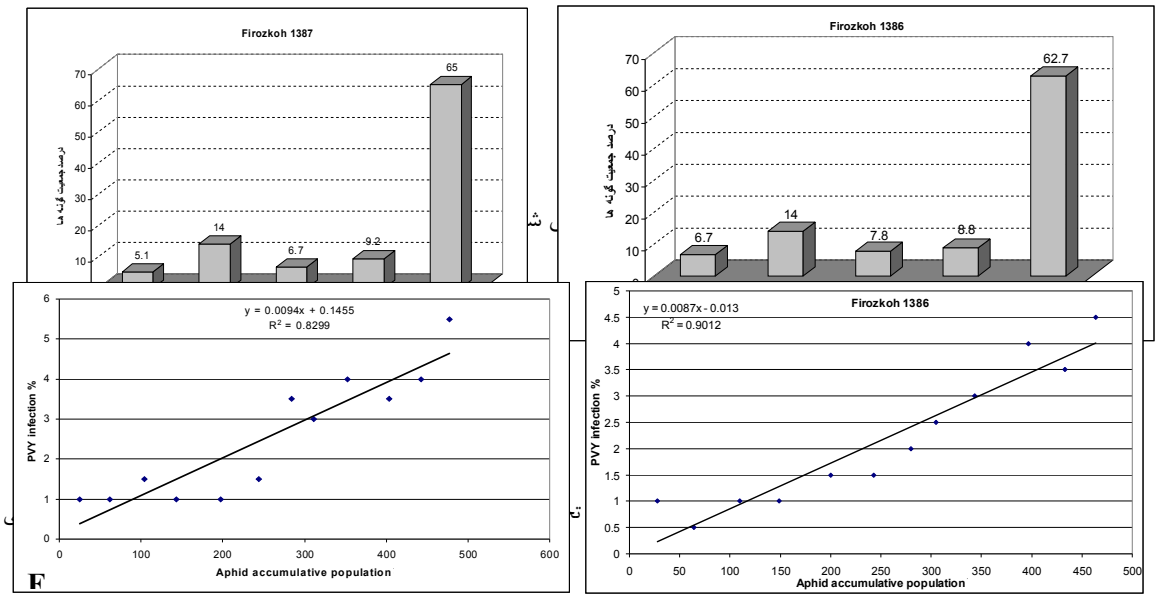
نتایج و بحث

شته‌های ناقل و روند تغییرات جمعیت آنها: رقم مورد کشت در مزرعه آزمایشی، رقم اگریا بود. میزان آلودگی اولیه به PVY در سال اول آزمایش برابر با ۰/۵ درصد و در سال دوم برابر با یک درصد بود. در بررسیهایی که در طول فصل زراعی انجام گردید در مجموع تعداد ۵ گونه شته (*Macrosiphum euphorbiae*, *Myzus persicae*, *Aphis cracivora*, *Aulacorthum solani* and *Therioaphis trifolii*) در مزرعه مورد بررسی شناسایی گردید. نوسانات جمعیت هر گونه از شته‌ها در شکل ۱ و فراوانی نسبی آنها در شکل ۲ نشان داده شده است.

فراوانی آلودگی PVY: نتایج حاصل از بررسی نمونه‌های برگی تهیه شده در طول سال در فیروزکوه در جدول شماره یک ارائه شده است. در پایان فصل زراعی بر اساس بررسی بعمل آمده روی آخرین نمونه‌های برگی تهیه شده از مزارع در مهرماه، بیشترین میزان آلودگی به PVY در دو سال آزمایش بترتیب ۴/۵ و ۵/۵ درصد تعیین شد. رابطه خطی و معادله مربوطه بین جمعیت تجمعی شته‌ها و فراوانی آلودگی PVY در مزرعه مورد بررسی در طول فصول زراعی سال اول و دوم آزمایش در شکل ۳ ارائه شده است. ضریب همبستگی بین فراوانی جمعیت شته‌ها و میزان آلودگی به PVY، در هر دو سال حدود ۰/۹ بود.



شکل ۱- نوسان جمعیت شته‌های شکار شده در تله های زرد در مزرعه آزمایشی (فیروزکوه)



جدول ۱– نتایج آزمون الایزا روی نمونه‌های برگی و غده‌ای جمع‌آوری شده از مزرعه (فیروزکوه)

۱۳۸۶			۱۳۸۷		
تاریخ نمونه‌برداری	نوع نمونه	درصد آلودگی	تاریخ نمونه‌برداری	نوع نمونه	درصد آلودگی
۸۶/۲/۲۰	برگ	۰/۵	۸۷/۲/۲۲	برگ	۱
۸۶/۲/۳۰	برگ	۰/۵	۸۷/۲/۳۰	برگ	۱
۸۶/۳/۱۶	برگ	۱	۸۷/۳/۱۵	برگ	۱/۵
۸۶/۳/۳۱	برگ	۱	۸۷/۳/۲۹	برگ	۱
۸۶/۴/۱۴	برگ	۱/۵	۸۷/۴/۱۵	برگ	۱
۸۶/۴/۳۰	برگ	۱/۵	۸۷/۴/۳۱	برگ	۱/۵
۸۶/۵/۱۵	برگ	۲	۸۷/۵/۱۴	برگ	۳/۵
۸۶/۵/۳۰	برگ	۲/۵	۸۷/۵/۳۱	برگ	۳
۸۶/۶/۱۶	برگ	۳	۸۷/۶/۱۶	برگ	۴
۸۶/۶/۳۰	برگ	۴	۸۷/۶/۳۰	برگ	۳/۵
۸۶/۷/۱۴	برگ	۳/۵	۸۷/۷/۱۵	برگ	۴
۸۶/۷/۳۰	برگ	۴/۵	۸۷/۷/۳۰	برگ	۵/۵
۸۶/۸/۲۰	غده	۷	۸۷/۸/۵	غده	۹

در مزرعه سیب‌زمینی بذری مورد بررسی در این تحقیق، در سطح پوشش گیاهی مزرعه و بکمک روش شمارش شته از روی برگهای بوته‌ها، جمعیت بسیار اندکی جمعیت شته مورد مشاهده قرار گرفت، در حالی‌که در همان مزرعه با مستقر نمودن تله-های تشتک زرد آبی و بررسی شته‌های بالدار شکار شده در آنها، مشخص شد که تعداد بیشتری شته در سطح مزرعه قابل ردیابی هستند(حداقل ۵ تا ۱۰ برابر تعداد حاصل از روش شمارش برگی شته‌ها). اگرچه تعداد قابل توجهی از این شته‌ها در پوشش گیاهی مزرعه مستقر نشده و کلنی تشکیل نمی‌دهند، ولی بدلیل گذر از روی مزارع سیب‌زمینی و عمل پروب نمودن روی بوته‌های سیب‌زمینی بخوبی موجب انتقال سریع PVY به بوته‌های سیب‌زمینی میگردند.

منحنی جمعیت شته‌ها در مزرعه آزمایشی در فیروزکوه نشان می‌دهد که ظهور حداکثر جمعیت شته‌ها در این منطقه در حدود نیمه اول تیرماه اتفاق افتاده است. شرایط آب و هوایی نسبتا سردتر فیروزکوه، موجب شده است تا ظهور شته‌های بالدار در این مناطق با تاخیر انجام گردد. جمعیت تمامی گونه‌های شته شکار شده در تله‌های مستقر در سطح مزرعه آزمایشی، در طول تابستان بویژه در مرداد ماه روند تقریبا نزولی داشته و مجددا در نیمه دوم مردادماه شروع به افزایش نمود. اوج جمعیت شته‌های شکار شده در تله‌ها در اوایل فصل با مقادیر شکار شده در اواخر فصل تقریبا نزدیک به هم بود.

بر اساس نتایج پژوهشهای انجامی توسط محققان دیگر، میزان آلودگی غده‌های سیب زمینی به ویروس PVY، بستگی به سن گیاه در زمان آلودگی دارد بطوریکه آلودگی بوته‌ها در سنین ۲۰ تا ۳۰ روزگی باعث آلودگی تمام غده‌های تشکیل شده در گیاه خواهد شد(۷). در صورتیکه آلودگی بوته‌ها در سن ۶۰ روزگی باعث آلوده شدن ۲ تا ۴ درصد غده‌های بوجود آمده در گیاهان آلوده گردیده است.

به کمک پایش جمعیت شته‌ها در مزارع تولید سیب‌زمینی بذری و تعیین ارتباط آن با فراوانی آلودگی PVY، می‌توان در گام اول اطلاعات مفیدی در مورد فراوانی ناقلین پرخطر در مر منطقه کسب نمود. بدین ترتیب مناطق پرخطر شناسایی شده و از فهرست اولویت سرمایه‌گذاری برای احداث چنین مزارعی حذف می‌شوند و در گام دوم با شناسایی زمان ظهور و اوج فعالیت ناقلین اصلی می‌توان اقدامات مبارزی با ناقلین یا عملیات سرزنی بوته‌های سیب‌زمینی در مزارع بذری را با هدفمندی بالاتری هدایت نمود.

منابع

۱. رضوانی، ع.؛ ترمه، ف. و موسوی، م. ۱۳۷۳. شته‌های ایران و میزبان‌های آنها. موسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی.

۲. سرافرازی، علی‌اکبر و بزرگ‌نیا، ابوالقاسم (ترجمه). ۱۳۷۰. طرح و تحلیل آزمایش‌های کشاورزی. تالیف: لیتل توماس مورتن، انتشارات جهاد دانشگاهی دانشگاه مشهد.

3. Blackman, R. L. and Eastop, V. F. 2000. Aphids on the world's crops. An identification and information guide. Department of entomology, The natural history museum, Second edition. John Wiley and Son's 46 pp.
4. Clark, M. F., and Adams, A. N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 34: 475-483.
5. Holling, M. 1955. Aphid movement and virus spread in seed potato fields of England and Wales. Plant Pathology, 4: 813-820.
6. Holmes, I. R. and Teakle, D. S. 1980. Incidence of potato viruses S, X, and Y in potatoes in Queensland. Australian plant pathology 9: 3-4.
7. Karppa, A. and Hassi, A. 1989. Reaction of four table potato to primary and secondary infection by potato viruses Yo and Yn. Annals of agriculture Feniae, 28: 297-307.
8. Lal, L. and Verma, K. D. 1987. Seasonal incidence and over seasoning of the aphid *Myzus persicae* on potato in Meghalya. Indian Journal of Hill Farming 1, 1: 35-39.
9. Muller, H. L. 1987. Yellow water traps support for monitoring aphid flights in seed potatoes in Baden-Wurttemberg. *in*: Aphid migration and forecasting Euroaphid system in European Community countries. pp: 169-171.
10. Pourrahim, R., Farzadfar, Sh., Golnaraghi, A. R., and Ahoonmanesh, A., 2007. Incidence and distribution of important viral pathogens in some Iranian potato fields. Plant Disease 91: 609-615.
11. Rongai, D. and Cerato, C. 1997. Forecasting the best time for the desiccation of seed potato. Information Agrario 53, 17:51-56.
12. Sigvald, R. 1985. Forecasting potato virus Y. Vautskyds Notister 59, 4: 116-120.
13. Tahtacioglu, L. and Ozbek, H. 1997. Monitoring aphid species and their population changes on potato crop in Erzurum province, Turkey throughout the growing season. Turkey Entomology Dergisi East Anatoli, 21 (1), 9-25.

بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد باکتریایی عصاره برخی از گیاهان دارویی

سلیمه عوض پور*[1]، سید کمال کاظمی تبار[2]، غفار کیانی[3]

[1]دانشجوی کارشناسی ارشد بیو تکنولوژی گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی ومنابع طبیعی ساری
[2]دانشیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
[3]استادیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
*نویسنده مسئول: avazpoursalimeh@yahoo.com

چکیده

با توجه به خواص ضد میکروبی که در عصاره و اسانس بعضی از گیاهان داروئی وجود دارد می‌توان از این فرآورده ها به عنوان جایگزین طبیعی برای آنتی بیوتیک ها استفاده نمود. همچنین برای حفاظت مواد داروئی و غذایی در برابر فساد میکروبی از آن‌ها بهره گرفت. در این پژهش، خاصیت ضد میکروبی عصاره متانولی گیاهان داتوره *Datura stramonium* L.، زوفا *Hyssopus afficinalis*، سرخارگل *Echinacea purpurea* L. و علف چشمه *Nasturtium officinale* L در ۴ غلظت ۲۵ و ۵۰ و ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر روی باکتری‌های Pseudomonas syringae pv. Syringae عامل بیماری شانکر درختان میوه هسته دار، Rathayibacter tritici عامل خوشه صمغی گندم و E.coli به عنوان میکروارگانیسم مدل به روش انتشار روی دیسک در آگار Agar disk diffiusion مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که در بررسی اثر متقابل سه گانه گیاه، غلظت و باکتری، با افزایش غلظت عصاره‌ها اثر ضد میکروبی و قطر هاله ها افزایش می یابد به جز داتوره که در غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر هاله ای به قطر ۱۲/۶۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر روی باکتری *E.coli* و عصاره متانولی برگ سرخارگل و زوفا با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر روی باکتری *E.coli* با قطر هاله ۱۳/۸ میلی متر تشکیل دادند. در نتیجه شاید بتوان پیشنهاد کرد که این گیاهان منابع جدید ضد میکروبی در صنایع دارویی، غذایی و کشاورزی استفاده شوند.

واژگان کلیدی: عصاره متانولی، اثر ضد باکتریایی، داتوره، زوفا، سرخارگل، علف چشمه

مقدمه

بی شک توسل به گیاهان دارویی کهن ترین رهیافت بشر برای درمان بیماری ها بوده است و در خلال توسعه تمامی تمدن های بشری همواره ارتباطی تنگاتنگ و نزدیک میان آدمی و گیاه وجود داشته است (۱). استفاده از گیاهان دارویی برای درمان بیماریها سابقه طولانی دارد، امروزه با اینکه قسمت عمده داروها منشاء شیمیایی دارند، اما برآورد شده است که حدود یک سوم کلیه فرآورده های دارویی منشاء گیاهی داشته یا پس از استخراج ازگیاه تغییر شکل یافته اند (۲). با این حال هنوز بیشتر گونه‌های گیاهی بررسی نشده و ناشناخته مانده اند. از ۳۵۰ هزار گونه گیاهی که تاکنون بر روی کره زمین شناسایی گردیده است، تنها حدود ۱۰ هزار گونه از لحاظ دارویی بررسی شده اند و هنوز زمان زیادی مانده است تا منابع جدید و با ارزش گیاهی کشف شوند. به این ترتیب گیاهان را می‌توان به عنوان منبعی از مواد شیمیایی بالقوه مفید دانست که تنها بخشی از آن مورد بهره برداری قرار گرفته است (۱). اسانس‌های گیاهی و ترکیبات تشکیل دهنده آن‌ها بیشتر ترکیبات فنولی هستند که

دارای اثرات شناخته شده ضد باکتریایی و آنتی‌اکسیدانی می باشند (۳). استفاده از اثرات ضد میکروبی گیاهان دارویی در بیماری های باکتریایی از گذشته های دور مورد نظر بوده است. از طرفی مطالعات نشان داده که درمان با آنتی بیوتیک ها مسائل دیگری چون مقاومت دارویی و بروز عوارض جانبی را مطرح می کند. لذا استفاده از داروهای گیاهی جدید با عوارض جانبی کمتر می‌تواند کمک شایانی در درمان این نوع عفونت ها باشد (۴). حضور میکروارگانیسم‌ها و به ویژه باکتری ها در مواد غذایی اهمیت فراوانی از نظر بهداشت و سلامت عمومی جامعه و همچنین کنترل کیفیت مواد غذایی برخوردار است. میکروارگانیسم های بیماری زایی موجود در مواد غذایی، هر ساله خسارات مالی و جانی بسیاری را در جهان به جای می گذارند (۵). در طول دهه گذشته وقوع بیماری های میکروبی ناشی از مواد غذایی نه تنها در کشورهای در حال توسعه، با فقر بهداشتی بلکه در کشورهای توسعه یافته با استانداردهای بالای بهداشتی نیز رو به افزایش بوده است (۶). بنابراین در سال های اخیر با توجه به ویژگی های گیاهان دارویی، مطالعات زیادی در خصوص استفاده از اسانس ها و عصاره‌های گیاهی به عنوان مواد ضد میکروبی افزایش چشمگیری داشته است. عامل اصلی اثر ضد باکتریایی عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی ترکیبات شیمیایی تشکیل دهنده ی آن‌ها است (۵). در واقع ترکیبات ضدمیکروبی مشتق شده از گیاهان منبع وسیع دست نخورده ای است که می‌تواند مقدمه کشف داروها و آنتی بیوتیک های جدید شود. امروزه تلاش ها برای پیشرفت در زمینه شناخت ترکیبات مؤثره و استفاده از این گیاهان در درمان بسیاری از بیماری ها رو به افزایش است (۷).

مواد و روش ها:

تهیه نمونه

نمونه های گیاهی در اردیبهشت ۱۳۹۴ از مناطق مرتعی و جنگلی استان مازندران جمع آوری گردید و سپس به آزمایشگاه دانشگاه علوم کشاورزی ساری انتقال داده شدند. این نمونه ها به دور از تابش مستقیم نور خورشید خشک گردید. سپس اندام‌های هوایی گیاهان به وسیله آسیاب پودر شدند و پودر حاصله در ظروف شیشه ای دربسته، جهت آزمایش‌ها بعدی در یخچال نگهداری گردیدند.

جدول (۱) مشخصات گیاهان مورد آزمایش

نام فارسی	نام انگلیسی	خانواده	اندام مورد استفاده
سرخارگل	*Echinacea purpurea* L.	Asteracea	گل و برگ
داتوره	*Datura stramonium* L.	Solanaceae	برگ، ساقه، ریشه، میوه
زوفا	*Hyssopus afficinalis*	Lamiaceae	اندام هوایی
علف چشمه	*Nasturtium officinale* L.	Brassicoceae	اندام هوایی

عصاره گیری با متانول

مقدار ۱۰ گرم گیاه پودر شده به ۱۰۰ میلی‌لیتر حلال متانول از شرکت MERK آلمان اضافه و به مدت ۴۸ ساعت روی شیکر با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد قرار داده و سپس طی سه مرحله بر روی کاغذ واتمن عصاره گیری عبور داده تا عصاره بدست آید.

تهیه استرین باکتری

باکتری‌های مورد مطالعه با خصوصیلت زیر از آزمایشگاه میکروبیولوژی پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری طبرستان تهیه گردید.

جدول (۲) مشخصات پاتوژن های ایزوله شده مورد مطالعه

نوع میزبان پاتوژن	نوع پاتوژن	نام ایزوله
پاتوژن گیاهی	گرم مثبت	Rathyibacter tritici
پاتوژن انسانی	گرم منفی	Escherichia coli
پاتوژن گیاهی	گرم منفی	Pseudomonas syringae. Pv syringae

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی

به‌منظور ارزیابی فعالیت ضد باکتریای، به روش سنجش انتشار دیسک (Disc- Diffusion assay) بصورت زیر انجام گرفت. ۵۰ میکرولیتر ازسوسپانسیون ۵/۰ مک فارلند باکتری بر روی محیط کشت باکتری با نام عمومی NAS (Nutrient Agar Socurose) اضافه گردید. دیسک هایی به قطر ۶ میلی متر ۲۰ میکرولیتر از عصاره گیاهان مختلف آغشته گردید و روی محیط مورد نظرقرار داده شدند. آنتی بیوتیک تتراسایکلین یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به اندازه ۲۰ میکرولیتر برداشته و به عنوان شاهد مثبت و حلال متانول به عنوان شاهد منفی آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی گراد قطر هاله عدم رشد را از پشت پلیت با کولیس دیجیتال اندازه گیری کرده و نتایج حاصله برای مقایسه ثبت گردید. آزمایش‌ها در غالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. میانگین نتایج محاسبه گردید، تفاوت اثر ضد باکتریایی عصاره‌های مختلف توسط SAS و آنالیز داده ها با آزمون دانکن انجام گردید. نتایج به صورت جدول و نمودار زیر به دست آمد. (در نمودار تره همان تره آب یا علف چشمه می باشد.)

نتایج تجزیه واریانس اثرات بازدارندگی عصاره متانولی

نتایج تجزیه واریانس اثرات بازدارندگی عصاره گیاهان در غلظت‌های مختلف نشان داد که حلال ها و غلظت‌های مختلف عصاره و نوع باکتری و اثرات متقابل دوگانه و سه گانه این سه مؤلفه از لحاظ اثر بازدارندگی بر رشد باکتری‌های مورد مطالعه تفاوت معنی داری ($P<0.001$) وجود دارد.

(جدول ۳) تجزیه واریانس تاثیر علظت‌های مختلف عصاره های گیاهی بر رشد باکتری‌ها

تیمار	درجه آزادی	میانگین مربعات
عصاره گیاهی	9	145.7***
باکتری	2	53.1***
غلظت	3	8.9***
عصاره گیاهی* غلظت	18	17.1***
عصاره گیاهی * باکتری	27	12.7***
باکتری * غلظت	6	0.8***
عصاره گیاهی * باکتری* غلظت	54	2.8***
خطا	240	0.03

(جدول۴) مقایسه میانگین تاثیر غلظت های مختلف عصاره های گیاهی بر به باکتری **E.coli**

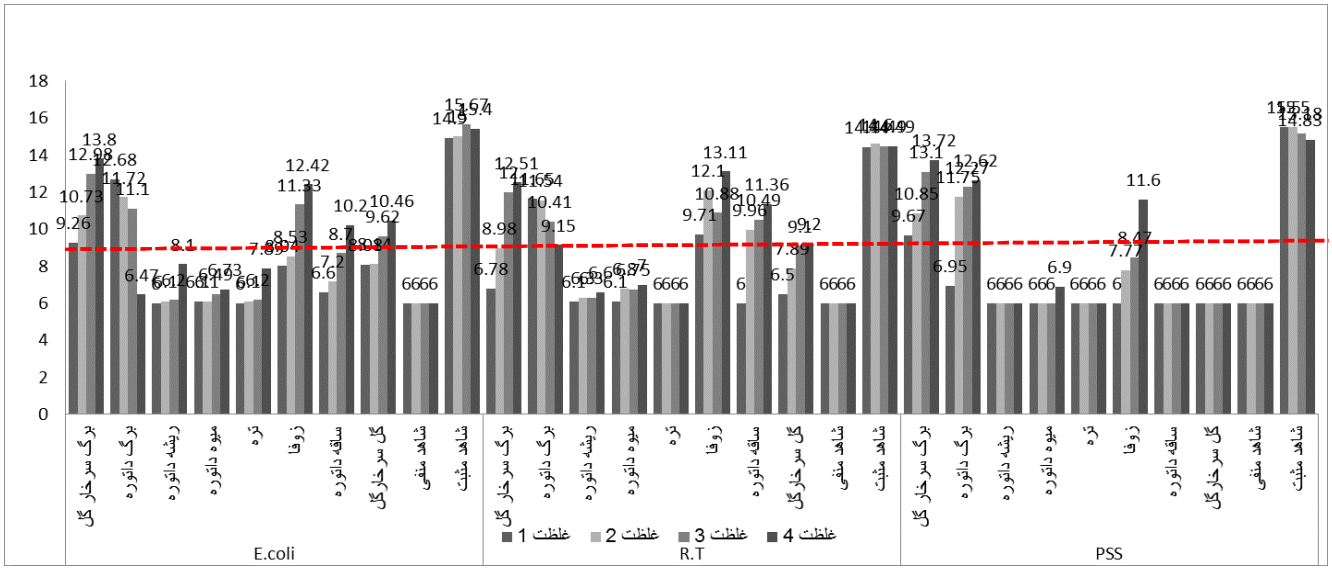
	۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۱۰۰میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۲۰۰میلی‌گرم بر میلی‌لیتر
برگ سرخارگل	۹/۲۶	۱۰/۷۳	۱۲/۹۸	۱۳/۸
برگ داتوره	۱۲/۶۸	۱۱/۷۲	۱۱/۱	۶/۴۷
ریشه داتوره	۶	۶/۱	۶/۲	۸/۱
میوه داتوره	۶/۱	۶/۱	۶/۴۹	۶/۷۳
علف چشمه	۶	۶/۱	۶/۲	۷/۸۹
زوفا	۸/۰۴	۸/۵۳	۱۱/۳۳	۱۲/۴۲
ساقه داتوره	۶/۶	۷/۲	۸/۷	۱۰/۲
گل سرخارگل	۸/۰۸	۸/۱۴	۹/۶۲	۱۰/۴۶
شاهد منفی	۶	۶	۶	۶
شاهد مثبت	۱۴/۹	۱۵	۱۵/۶۷	۱۵/۴

(جدول۵) مقایسه میانگین تاثیر غلظت های مختلف عصاره های گیاهی بر به باکتری **Rathyibacter tritici**

	۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۱۰۰میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۲۰۰میلی‌گرم بر میلی‌لیتر
برگ سرخارگل	۶/۷۸	۸/۹۸	۱۲	۱۲/۵۱
برگ داتوره	۱۱/۶۵	۱۱/۵۴	۱۰/۴۱	۹/۱۵
ریشه داتوره	۶/۱	۶/۳	۶/۳	۶/۶
میوه داتوره	۶/۱	۶/۸	۹/۱	۹/۲
علف چشمه	۶	۶	۶	۶
زوفا	۹/۷۱	۱۲/۱	۱۰/۸۸	۱۳/۱۱
ساقه داتوره	۶	۹/۹۶	۱۰/۴۹	۱۱/۳۶
گل سرخارگل	۶/۵	۷/۸۹	۹/۱	۹/۲
شاهد منفی	۶	۶	۶	۶
شاهد مثبت	۱۴/۴۴	۱۴/۶	۱۴/۴۹	۱۴/۴۹

(جدول۶) مقایسه میانگین تاثیر غلظت های مختلف عصاره های گیاهی بر به باکتری **Pseudomonas syringae. Pv syringae**

	۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۱۰۰میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۲۰۰میلی‌گرم بر میلی‌لیتر
برگ سرخارگل	۹/۶۷	۱۰/۸۵	۱۳/۱	۱۳/۷۲
برگ داتوره	۶/۹۵	۱۱/۷۵	۱۲/۲۷	۱۲/۶۲
ریشه داتوره	۶	۶	۶	۶
میوه داتوره	۶	۶	۶	۶/۹
علف چشمه	۶	۶	۶	۶
زوفا	۶	۷/۷۷	۸/۴۷	۱۱/۶
ساقه داتوره	۶	۶	۶	۶
گل سرخارگل	۶	۶	۶	۶
شاهد منفی	۶	۶	۶	۶
شاهد مثبت	۱۵/۵	۱۵/۵	۱۵/۱۸	۱۴/۸۳



نمودار (۱) مقایسه میانگین قطر هاله بازدارندگی رشد با اثر متقابل سه گانه (گیاه، غلظت، باکتری)

بحث و نتیجه‌گیری

به‌طورکلی خواص ضد میکروبی عصاره متانولی برگ سرخارگل و اندام هوایی زوفا بر روی هر سه باکتری مورد مطالعه هاله‌های بزرگی در غلظت‌های بالا تشکیل دادند ولی عصاره متانولی برگ داتوره در غلظت‌های پایین توانست هاله بزرگ در اطراف باکتری E.coli و Rathayibacter tritic تشکیل دهد. مهسا محمدی و همکاران (۱۳۹۲)، به بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی و آنتی میکروبی عصاره‌های هگزانی، دی کلرومتانی و متانولی دو گیاه اویارسلام *(Cyperus longus)* و داتوره *(Datura stramonium)* پرداخت. با توجه به نتایج، بهترین اثر مربوط به عصاره متانولی گیاه داتوره بر روی B.cereus بوده است (۹). اندرگانی و همکاران (۱۳۹۳)، اثر ضد باکتریایی اسانس گل و عصاره اندام‌های گیاهی سرخارگل بر باکتری Pectobacterium caratovorum subSP. Caratovorum در شرایط آزمایشگاه را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج نشان داد که حساسیت باکتری به اسانس گل بیش از عصاره‌های سایر اندام‌ها بود(۸). که این نتایج آزمایش‌ها با نتایج تحقیق مورد مطالعه مطابقت دارد. همچنین اثر ضد میکروبی متوسط عصاره متانولی گل سرخارگل و ساقه داتوره می‌تواند ناشی از ناکافی بودن مواد مؤثره در اندام این گیاهان باشد البته عوامل متعددی در اثرات ضد میکربی یک گیاه مؤثر هستند. عواملی چون میزان اسانس، روش عصاره گیری، نوع حلال مورد استفاده، نوع محیط کشت و مواد موجود در آن و غلظت عصاره می‌تواند، بر اثرات ضد میکروبی گیاه اثر بگذارند.

به‌طورکلی باکتری E.coli بیشترین حساسیت را نسبت به عصاره‌ها داشت. خیلی از مطالعات انجام شده در خصوص اثر اسانس و عصاره‌ها بر روی میکروارگانیسم‌ها نشان می‌دهد که اثر اکثر اسانس و عصاره‌ها بر روی باکتری گرم مثبت قدری بیشتر از تأثیر آن‌ها بر روی باکتری‌های گرم منفی است. دلیل این امر وجود غشاء خارجی در باکتری‌های گرم منفی باشد که سبب محدود شدن انتشار اجزاء هیدروفوبیک اسانس و عصاره به لایه‌ی لیپو پلی ساکارید می‌شود. بااین‌حال گزارش‌هایی هم وجود دارد که برخی باکتری‌های گرم منفی هم به انواعی از اسانس‌های گیاهی حساسیت نشان می‌دهند. شاید با توجه به اثراتی که عصاره سرخارگل، داتوره و زوفا روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی داشته‌اند، می‌توان نتیجه‌گیری نمود که از این گیاهان می‌توان استفاده‌های فراوانی در صنایع داروئی یا غذایی، آرایشی بهداشتی نمود همچنین بررسی گیاهان مورد مطالعه بر روی گونه‌های بیماری‌زای دیگر ضروری و قابل تأمل است به دلیل اینکه این احتمال وجود دارد که عصاره‌های فاقد

خاصیت ضد باکتری در این مطالعه علیه باکتری‌های دیگر مؤثر باشند. انجام مطالعات گسترده در این زمینه راهی جهت دست‌یابی به روش‌های جدیدتر و ایمن‌تر به‌منظور کنترل عوامل بیماری‌زای گیاهی خواهد بود.

منابع

۱- جودی ل. خیامی م. رضوی روحانی م. (۱۳۸۲). بررسی خواص ضدمیکروبی و ترکیبات شیمیایی مهم عصاره و اسانس گیاهان مرزنجوش، پونه و نعناع فلفلی از خانواده نعناع. پایان‌نامه ارشد. دانشکده علوم دانشگاه ارومیه. سال دوم. ص ۲۷۹

۲- ناصری فر ر. دلیمی اصل ع.ح. احمدی ن.ع. (۱۳۹۱). بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره آبی گیاه Scopphularia straiata بر رشد لیشمانیا ماژور در ماکروفاژهای صفاق موش (BALB/c) و در شرایط Invitro . پژوهش در پزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی. دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی. جلد اول. شماره ۳۶. ص ۱۲-۱۸

۳- شرافتی چالشتری ر. رفیعیان کوپائی م. شرافتی چالشتری ع. صالحی ا. (۱۳۹۳). خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد باکتریایی اسانس جعفری بر روی تعدادی از باکتری‌های عامل فساد و بیماریزایی غذایی. مجله میکروب‌شناسی مواد غذایی. سال اول. ص ۹-۱۵

۴- رسولی ا. گچ کار ل. یادگاری نیا د. رضایی م.ب. تقی زاده م. فکور م.ه. علامه ع.ا. (۱۳۸۶). رابطه فعالیت های ضد میکروبی روغن‌های اسانسی *Mentha spicata L.* و *Chenopodium ambrosioides* با خواص آنتی‌اکسیدانی و رادیکال زدایی آن‌ها. فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران. جلد چهارم. شماره ۲۳. ص ۴۹۲-۵۰۳

۵- نصیرپور م. یاورمنش م. محمدی ثانی ع. محمدزاده مقدم م. (۱۳۹۴). بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره درمنه کوهی، درمنه دشتی و زوفا بر برخی از باکتری‌های بیماریزا با منشاء غذایی. فصلنامه علوم و صنایع غذایی. دوره۱۲. شماره۴۶. ص ۱۶

۶-پور مقدس م. بنیادیان م. (۱۳۸۳). بررسی تأثیر عصاره روغنی گیاه نعناء بر روی بقاء و رشد برخی از باکتری‌های بیماری‌زای مواد غذایی. پایان‌نامه دکترای حرفه‌ای. دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد

۷- پوربرات ف. صبورا ع. محمدی پ. (۱۳۹۰). بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی گیاه مرزنگوش. پایان‌نامه ارشد. دانشکده علوم پایه دانشگاه الزهرا

۸- اندرگانی س. جمشیدی س. اورعی م. (۱۳۹۳). اثر ضد باکتریایی اسانس گل و عصاره اندام‌های گیاهی سرخارگل بر باکتری Pectobacterium caratovorum subsp. Caratovorum در شرایط آزمایشگاه. فصلنامه تحقیقات بیماری‌های گیاهی. سال دوم. شماره ۳. ص ۲۵-۳۴

۹- محمدی م. کاظمی تبار س.ک. اصیلی ج. کمالی ح. (۱۳۹۲). بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی و آنتی میکروبی عصاره‌های هگزانی، دی کلرومتانی و متانولی دو گیاه اویارسلام (Cyperus longus) و داتوره (Datura stramonium). پایان‌نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی. دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

ردیابی ویروس زردی چغندرقند در شته سیاه باقلا با استفاده از روش RT-PCR

شیرین فرزادفر [1] *، رضا پوررحیم [1]

[1] *بخش تحقیقات ویروس‌شناسی گیاهی، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران*

* *نویسنده مسئول: farzadfar2002@yahoo.com*

چکیده

ویروس زردی چغندرقند (*Beet yellows virus*-BYV) از جمله ویروس‌های مهم عامل زردی و کاهش محصول در زراعت چغندرقند محصوب می‌شود. این ویروس توسط چندین گونه شته منتقل می‌شود و از اینرو پایش جمعیت شته‌ها و توصیه زمان مناسب برای مبارزه با ناقلین یکی از روش‌های موثر جهت کاهش خسارت ناشی از این ویروس است. در پایش جمعیت شته‌ها، آگاهی از فراوانی شته‌های حامل ویروس، اطلاعات ارزشمندی برای توصیه اقدامات مدیریتی از جمله مبارزه شیمیایی فراهم می‌نماید. در این تحقیق، کلنی‌های شته سیاه باقلا (*Aphis faba*) بهمراه بوته‌های چغندرقند با علائم زردی و کاهش رشد از مزارع چغندرقند استان آذربایجان‌غربی جمع‌آوری شد. آلودگی بوته‌های چغندرقند به ویروس BYV با استفاده از آزمون الایزا مورد تایید قرار گرفت. برای ردیابی BYV در بدن شته ناقل، یک روش رونوشت برداری برگردان و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (RT-PCR) با بکارگیری آغازگرهای اختصاصی برای ناحیه‌ای از ژن پروتئین پوششی ویروس با موفقیت توسعه داده شد. یک گروه ۲۲ تایی از شته‌های تغذیه کرده از بوته‌های آلوده، بطور انفرادی مورد بررسی قرار گرفتند که نتایج حاصل نشان دهنده ردیابی ویروس در ۱۴ مورد از ۲۲ شته بود. شته سیاه باقلا یکی از شته‌های شایع در بسیاری از مناطق کشت چغندر کشور می‌باشد. با استفاده از روش RT-PCR توسعه داده شده در این تحقیق می‌توان آلودگی ویروسی BYV را در این شته ردیابی نموده و از اطلاعات حاصله در تدوین برنامه‌های پیش‌آگاهی برای مبارزه با ناقلین استفاده نمود.

واژگان کلیدی: زردی، کلسترووویروس‌ها، ناقلین، اپیدمیولوژی.

مقدمه

چغندرقند (*Beta vulgaris* L.) یکی از مهم‌ترین محصولات صنعتی در دنیا است که در تامین فرآورده‌های غذایی، انسانی و دامی نقش مهمی دارد. از حدود یک قرن قبل، بیماری‌های ویروسی چغندرقند که موجب خسارت زیادی به این محصول می‌گردند، مورد توجه قرار گرفته‌اند (۱۲). در حال حاضر بیش از ۱۰۰ ویروس، که می‌توانند چغندرقند را بطور طبیعی یا در شرایط آزمایشی آلوده نمایند، گزارش شده‌است.

ویروس BYV (*Beet yellows virus*)، متعلق به جنس *Closterovirus* می‌باشد. کلسترووویروس‌ها یک گروه خسارتزا از ویروس‌های گیاهی هستند که ۱۰ عضو مشخص و ۱۲ عضو احتمالی دارند (۷). اعضای این جنس دارای یک پیکره رشته ای انعطاف پذیر با تقارن مارپیچی بوده و ژنوم آن‌ها از آر.ان.ای تک رشته‌ای تشکیل شده است (۲). اندازه ژنوم ویروس BYV معادل ۱۴/۵ کیلوباز است (۸). این ویروس تقریبا در هر جایی که چغندرقند کشت می‌شود (اروپا، آسیا، شمال و جنوب آمریکا، آفریقا و استرالیا) گزارش شده است. تاکنون چندین اپیدمی از این ویروس در اروپا و در مناطق اصلی کشت چغندرقند رخ داده

است. این ویروس یکی از مهمترین ویروس‌های عامل زردی در چغندرقند از نظر اقتصادی می‌باشد، بطوریکه میزان قند را تا حدود ۵۰ درصد کاهش می‌دهد (۱۴). خسارت ناشی از BYV مربوط به کاهش تدریجی وزن ریشه و برگ چغندرقند، میزان شکر و کیفیت شکر استحصالی می‌باشد. این ویروس می‌تواند ۲۹ درصد میزان محصول، ۲۱ درصد میزان برگ سبز، ۱/۴ درصد میزان شکر را کاهش دهد. همچنین در اثر ابتلا به این ویروس میزان تولید بذر و وزن هزار دانه به ترتیب ۴۷ و ۱۶ درصد کاهش دهد. بسته به زمان وقوع آلودگی در هر مزرعه و در هر سال، میزان خسارت وارد شده توسط این ویروس متفاوت می‌باشد. برخلاف دیگر زردی‌های ویروسی، علائم BYV ابتدا روی برگ‌های مسن تر ظاهر می‌شود. تا به حال چندین استرین از این ویروس در چغندرقند گزارش شده است که علائم زرد شدید تا خفیف و نیز نکروز برگ را ایجاد می‌نمایند (۱۱).

تا به حال ۲۴ گونه شته به عنوان ناقل یا ناقل احتمالی شناخته شده‌اند. ولی دو شته *Myzus persicae* و *Aphis fabae*، در انتقال این ویروس به روش نیمه‌پایا نقش اصلی را به عهده دارند. طی ۲۵ سال گذشته در برخی مناطق آمریکا تغییری در جمعیت ناقل مؤثر از *M. persicae* به *A. fabae* صورت گرفته‌است و اخیرا در کالیفرنیا برخی از جمعیت‌های منطقه‌ای *A. fabae* درمقایسه با *M. persicae* کارایی انتقال بیشتری از خود نشان داده‌اند (۹).

حضور ویروس BYVدر ایران اولین بار در سال ۱۳۴۸ گزارش شد (۶). در یک بررسی در طول سالهای ۱۳۸۳ تا ۱۳۸۵ فراوانی آلودگی این ویروس در مزارع چغندرقند ۱۰ استان کشور حدود ۱۴/۳ درصد برآورد شده است (۱). شته‌ها در انتشار این ویروس نقش مهمی دارند و پایش جمعیت آنها یکی از نیازهای مهم برای تدوین برنامه‌های مدیریت این بیماری است. تمامی شته‌های وارد شده به یک مزرعه همیشه آلودگی ویروسی را همراه ندارند و از اینرو روشی که امکان ردیابی شته‌های آلوده به ویروس را فراهم نماید، این فرصت را فراهم می‌آورد تا قضاوت بهتری در مورد داده‌های حاصل از پایش فراوانی شته‌ها ارائه نمود. با استفاده از سیستم RT-PCRبهینه‌سازی شده در این تحقیق، امکان تمایز بین ورود شته‌های فاقد آلودگی و ورود شته‌های حاوی آلودگی ویروسی (تهدید اصلی و پرخطر) فراهم می‌گردد که از این مزیت می‌توان در تدوین برنامه‌های پیش آگاهی و هدفمندی بیشتر کنترل شیمیایی ناقلین استفاده نمود.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه‌های گیاهی و شته: در تابستان ۱۳۹۴ تعداد ۷ بوته چغندرقند با علائم سبزردی، زردی و کاهش رشد از مزارع چغندرقند آذربایجانغربی جمع‌آوری شد. در روی این بوته‌ها کلنی‌هایی از شته سیاه باقلا (*Aphis faba*) حضور داشتند. بوته‌ها در گلدان‌های بزرگ همراه با کلنی‌های شته روی آنها کشت شده و در شرایط گلخانه تحقیقاتی (دمای ۲۲ تا ۲۶ درجه سانتیگراد، نور طبیعی ۱۲ تا ۱۴ هزار لوکس با تناوب ۱۲ تا ۱۴ ساعت روشنایی و رطوبت ۶۰ تا ۷۰ درصد) نگهداری شدند. همچنین، تعدادی کلنی شته سیاه باقلا از روی زراعت‌های لوبیا و باقلا در استان قزوین بعنوان شاهد منفی جهت استفاده در آزمون RT-PCR جمع‌آوری شده و در زیر توری در گلخانه نگهداری شد.

شکل ۱- علائم زردی در برگ چغندرقند آلوده به BYV

ارزیابی آلودگی ویروسی BYV: برای ردیابی آلودگی ویروسی در گیاهان چغندر از آزمون الایزا با بکارگیری آنتی‌بادی اختصاصی BYV (شرکت Loewe، آلمان) و طبق غلظت‌ها و روش توصیه شده توسط سازنده آنتی‌بادی استفاده شد (۴). بر اساس نتایج آزمون الایزا، بوته‌هایی که آلوده به BYV بودند، مشخص شده و برای ادامه کار انتخاب شدند. شته‌های مستقر در روی این بوته‌ها و نیز تعدادی از شته‌هایی که بعنوان شاهد منفی از روی لوبیا جمع‌آوری شده بودند، بطور تکی به داخل میکروتیوب منتقل شده و هر شته در ۲۰۰ میکرولیتر از بافر عصاره‌گیری (شامل ۰/۱ مولار NaCl، ۰/۱ مولار گلایسین و ۱۰ میلی‌مولار از EDTA با اسیدیته ۹/۵) له شد. هم حجم عصاره حاصله از مخلوط فنل-کلروفورم-ایزوآمیل الکل (۱:۲۴:۲۵) افزوده و با حداکثر دور بمدت ۲۰ دقیقه در ۴ درجه‌سانتیگراد میانگریز شد. رونشین حاصله (حدود ۳۰۰ میکرولیتر) به میکروتیوب جدید منتقل و سه برابر حجم آن از اتانول مطلق سرد و ۳۰ میکرولیتر از استات سدیم ۳ مولار افزوده شده و بمدت ۵ ساعت در منفی ۲۰ درجه‌سانتیگراد نگهداری شد. میکروتیوب با حداکثر دور بمدت ۳۰ دقیقه میانگریز شده و رسوب بعد از شستشو با اتانول ۷۰ درصد، در ۵ میکرولیتر آب تیمار شده با DEPC حل شد. مقداری از بافت چغندرقند آلوده به BYV (بر اساس آزمون الایزا) انتخاب شده و آر.ان.ای کل آنها طبق روش توصیفی قبلی (۱) استخراج شده و از این آموده بعنوان شاهد مثبت در آزمون RT-PCR استفاده شد.

برای انجام آزمون رونوشت برداری برگردان و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (RT-PCR)، از روش و آغازگرهای توصیفی توسط استونس و همکاران (۱۹۹۷) استفاده شد (۱۱). این جفت آغازگر برای تکثیر ناحیه‌ای از ژن پروتئین پوششی BYV طراحی شده است. بطور خلاصه، ۳ میکرولیتر از آر.ان.ای استخراجی از شته، یک میکرولیتر از آغازگر BYV-B پایین دست (غلظت ۲۰ پیکومول بر میکرولیتر) همراه با ۶ میکرولیتر آب دوبار تقطیر استریل مخلوط و بمدت ۱۰ دقیقه در ۶۵ درجه قرار گرفته و بلافاصله به روی یخ منتقل شد. سپس سایر اجزا واکنش مرحله RT شامل ۲ میکرولیتر بافر 10X RT، یک میکرولیتر از آنزیم رونوشت‌برداری برگردان RevertAid (سیناکلون، ایران)، دو میکرولیتر از dNTPmix (غلظت نهایی یک میلی مولار)، نیم میکرولیتر از آر.ان.آ.زین (ترکیب بازدارنده فعالیت ریبونوکلئاز) (معادل ۲۰ واحد-سیناکلون، ایران) به میکروتیوب افزوده شده و حجم با آب دوبار تقطیر به ۲۰ میکرولیتر رساند شد. واکنش بمدت یک ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد در دستگاه ترموسایکلر مدل Primus (شرکت MWG، آلمان) انجام شده و متعاقبا میکروتیوب بمدت ۱۰ دقیقه در ۷۰ درجه انکوبه شد.

مرحله واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد که شامل چهار میکرولیتر محصول مرحله RT، یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای بالا و پایین دست (هر یک ۲۰ پیکومول در میکرولیتر)، ۲/۵ میکرولیتر از بافر 10X PCR، یک میکرولیتر از محلول MgCl2 ۵۰ میلی‌مولار، یک میکرولیتر (معادل ۵ واحد) از آنزیم دی.ان.ای پلیمراز Taq (سیناکلون، ایران) بود. برنامه واکنش PCR شامل پنج دقیقه در ۹۴ درجه و متعاقبا ۳۰ چرخه ۹۴ درجه یک دقیقه، ۵۱ درجه یک دقیقه و ۷۲ درجه یک دقیقه بود که در نهایت میکروتیوب در ۷۲ درجه بمدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت. در آزمون RT-PCR، بعنوان شاهد مثبت از آمودهٔ ریبونوکلئیک اسید کل استخراج شده از بافت گیاه چغندر آلوده به BYV (تایید شده با الایزا) استفاده شد. پس از اتمام واکنش، محصول واکنش در ژل آگارز یک درصد حاوی یک میکروگرم در میلی‌لیتر اتیدیوم برماید در ۸۰ ولت ثابت بمدت ۴۰ دقیقه الکتروفورز شده و ژل در نور ماورابنفش توسط دستگاه UV-ترانس‌ایلومنیتر (مدل ایماکو، ساخت هلند) مورد مشاهده و تصویربرداری قرار گرفت.

نتایج و بحث

در آزمون الایزا نمونه‌هایی که میزان جذب نوری چاهک مربوط به آنها، مساوی یا بیش از سه برابر میانگین جذب نوری چاهک‌های مربو ط به شاهد سالم (منفی) بود، بعنوان نمونه آلوده (مثبت) در نظر گرفته شدند. بر این اساس از ۷ بوته چغندرقند با علائم زردی و کاهش رشد جمع آوری شده از استان آذربایجان‌غربی، ۵ نمونه دارای واکنش مثبت و آلودگی به BYV بودند. این نمونه‌ها علائم بارز زردی و کاهش رشد را داشتند.

نتایج حاصل از بررسی شته‌های موجود در روی پنج بوته چغندری که آلودگی آنها به BYV تایید شده بود، نشان داد که این شته‌ها از نوع شته سیاه باقلا (*Aphis faba*) می‌باشند. این شته یکی از شته‌های شایع در بسیاری از زراعت‌ها از جمله مزارع

چغندرقند می‌باشد. این شته دارای تنوع میزبانی نسبتا بالایی بوده و قادر به انتقال تعداد قابل توجهی از بیماریهای ویروسی از جمله ویروس BYV است (۱۰).

نتایج آزمون RT-PCRروی آموده‌های RNA استخراج شده از ۲۲ شته جمع‌آوری شده از روی پنج بوته‌ی آلوده به BYV نشان دهنده تکثیر قطعه دی.ان.ای با طول مورد انتظار ۳۳۲ جفت باز در ۱۴ شته از ۲۲ شته مورد بررسی بود. در آموده تهیه شده از شته‌های شاهد منفی هیچ قطعه دی.ان.ای تکثیر نشده بود در حالیکه در آموده تهیه شده از بافت چغندرقند آلوده به BYV (شاهد مثبت)، قطعه دی.ان.ای مورد انتظار تکثیر شده بود.

گزارش شده است که آزمون RT-PCR قادر به ردیابی مقادیر کوچکی از ویروس تا حد ۱۱ فمتوگرم در بدون شته‌ها می‌باشد (۳). از طرف دیگر در آزمایشات بعمل آمده توسط محققان دیگر در زمینه انتقال ویروس توسط شته‌ها، گزارش شده است که تمامی شته‌های منتقل شده از روی گیاهان آلوده به روی گیاهان سالم، موفق به انتقال آلودگی نمی‌گردند (۵، ۱۳). این احتمال وجود که بدلیل دقت بالای روش RT-PCR در ردیابی ویروس، حتی پیکره‌های ویروسی غیرقابل انتقال و موجود در معده شته‌های تغذیه کرده از گیاهان آلوده نیز توسط این تکنیک ردیابی شده باشد در حالیکه این پیکره‌ها قادر به عبور در لنف شته و رسیدن به غدد بزاقی و تکمیل چرخه گردش داخلی در بدن ناقل نشده‌اند. به نظر می‌رسد در مورد رابطه ویروس BYV با شته سیاه باقلا، تعداد شته‌هایی که توسط روش RT-PCR بعنوان آلوده به ویروس تشخیص داده می‌شوند، از تعداد شته‌هایی که در عمل واقعا قادر به انتقال BYVمی‌باشند، بیشتر بوده و نوعی تخمین بیش از واقعیت (over estimation) ارائه می‌شود. از اینرو، در صورت استفاده از روش RT-PCRجهت ردیابی شته‌های آلوده به BYV و استفاده از این داده‌ها در برنامه-های پیش آگاهی و مدیریت مبارزه با ناقلین، توجه به این نکته ضروری است.

منابع

۱.فرزادفر، ش. ۱۳۸۹. شناسایی و تعیین پراکنش کلسترووویروس‌های بیماریزای چغندرقند در ایران، گزارش نهایی پروژه پژوهشی شماره ۸۳۰۵۰، انتشارات موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ۲۸ ص.

2. Bar-Joseph, M. and Murant, A. F. 1982. Closterovirus group. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses. No. 260.
3. Canning, E. S. G., Penrose, M. J., Barker, I., Coates, D. 1996. Improved detection of *Barley yellow dwarf virus* in single aphids using RT-PCR. Journal of Virological Methods 56: 191-197.
4. Clark, M. F. and Adams, A. N. 1977. Characteristics of microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of plant viruses. Journal of General Virology 34:475-483.
5. Heathcote, G. D., Cockbain, A. J. 1964. Transmission of Beet yellows virus by alate and apterous aphids. Annals of Applied Biology 53: 259-266.
6. Hemmati, K. 1969. The role of aphids in transmission of beet yellows virus and beet mosaic virus. Proceeding of the second plant medicine congress of Iran, Tehran, Iran, p432-439.
7. King, A. M., Lefkowitz, E., Adams, M. J., & Carstens, E. B. (Eds.). 2011.*Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier.
8. Karassev, A. V., Nikolaeva, O. V., Koonin, E. V., Gumpf, D. J. and Garnsey, S. M. 1994. Screening of the closterovirus genome by degenerate primer-mediated polymerase chain reaction. Journal of General Virology 75: 1415-1422.
9. Limburg, D. D., Mauk, P. A. and Godfrey, L. D. 1997. Characteristics of Beet yellows closterovirus transmission to sugar beets by *Aphis fabae*. Plant Disease 69: 243-248.
10. Russell, G. E. 1970. *Beet yellows virus*. AAB Description of Plant Viruses, No. 53.
11. Stevens, M., Hull, R. and Smith, H. G. 1997. Comparision of ELISA and RT-PCR for detection of beet yellows closterovirus in plants and aphids. Journal of Virological Methods. 68, 9-16.
12. Sutic, D. D., Ford, R. E. and Tosic, M. T. 1999. Handbook of Plant Virus Diseases. CRC Press, Boca Raton, FL.
13. Watson, M. A. 1977. Transmission of plant viruses by aphids. In: Kado, C. I., Agrawal, H. O. (Eds.), Principles and Techniques in Plant Virology, Van Nostrand Reinhold, New York, pp 131-167.
14. Wisler, G. C., Duffus, H. Y. and Li, R. H. 1998. Ecology and Epidemiology of whitefly-transmitted closteroviruses. Plant Disease 82: 270-280.

ارزیابی مقاومت ۲۰ ژنوتیپ جو دیم نسبت به بیماری قارچی لکه توری در منطقه گنبدکاووس

الهام گرگیج*[۱]، امیر ذوالفقاری[۲]، رحمت اله محمدی گنبد [۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، گروه کشاورزی، واحد گرگان، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان
۲- عضو هیأت علمی گروه کشاورزی، واحد گرگان، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان (نویسنده مسئول)
۳- بخش تحقیقات علوم زراعی- باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی گرگان- ایران
** نویسنده مسئول: Gorgij.elham68@gmail.com*

چکیده

به منظور بررسی واکنش ۲۰ ژنوتیپ جو در برابر بیماری برگی مهم لکه توری جو در شهرستان گنبد کاووس واقع در شمال شرق استان گلستان، آزمایشی در قالب طرح بلوک های کامل تصادفی در ۴ تکرار در سال زراعی ۹۴-۱۳۹۳ انجام گردید. معیارهای نتیجه گیری برای ارزیابی حساسیت یا مقاومت ژنوتیپ‌ها نسبت به بیماری‌های مختلف شامل سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری (AUPPC) و مقدار استاندارد شده‌ی سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری (SAUDPC) سطح زیر منحنی پیشرفت نسبی بیماری (rAUDPC) و شدت نهایی بیماری (FDS) بود. با توجه به نتایج حاصل از مقایسه میانگین ژنوتیپ های مورد بررسی مشخص گردید که، بیشترین شاخص درصد شدت بیماری لکه توری درششمین بار نوبت اندازه گیری در ژنوتیپ ۱۸ و کمترین آن در ژنوتیپ ۱۰مشاهده گردید. بیشترین مقدار سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری لکه توری در ژنوتیپ ۱۵ و کمترین آن در ژنوتیپ۱۱مشاهده گردید. بیشترین بیشترین مقدار سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری لکه توری در ژنوتیپ ۲ و کمترین آن در ژنوتیپ۲۰مشاهده گردید.

واژگان کلیدی: ارزیابی‌مقاومت، جو، لکه توری

مقدمه

غلات یکی از مهم‌ترین تولیدات غذایی برای انسان می باشد. بطور تقریبی، ٪۵۵ از پروتئین‌ها، ۱۵ درصد چربی، ۷۰ درصد گلوسید و به طورکلی ۵۰_۵۵ درصد کالری مصرف شده توسط انسان در دنیا توسط غلات تامین می‌گردد (۲). جو گیاهی یکساله است که به خانواده گندمیان تعلق دارد. در مقایسه با سایر غلات دارای دامنه ی سازگاری اکولوژیک وسیعی است. این محصول اغلب در مناطقی از جهان تولید میشود که غلات مثل ذرت و برنج کشت نمی شود(۲).

این گیاه نسبت به گیاه زراعی در محدوده‌ی وسیع تری از شرایط محیطی رشدونمو می نماید.بیش ترین تولید جو در مناطقی انجام می گیرد که برای تولید غلات عمده دیگر آب و هوایی نامساعد تر دارند.این گیاه در محدوده وسیعی از فتوپریودها رشد می کند و طی دودهه گذشته سطح زیر کشت آن سریع تر از گندم و برنج و عملکرد آن بیش تر ازبرنج افزایش یافته است (۵).

با هدف مطالعه‌ی واکنش ژنوتیپ‌های مختلف به بیماری لکه توری جو ۱۵ جدایه قارچ عامل بیماری را روی ۳۸ لاین جو در مراحل گیاهچه‌ای و بلوغ در شرایط گلخانه و مزرعه مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که هیچ یک از لاین‌های مورد بررسی نسبت به همه‌ی جدایه‌های بیماری مقاوم نبودند. اما برای هر یک از جدایه‌ها سطوح بالایی از مقاومت در یک یا چند

لاین یافت شد. همچنین واکنش گیاهچه‌ها و گیاهان بالغ در برابر یک جدایه خاص متفاوت بود. (۱)، با مطالعه‌ی واکنش ۲۰ لاین و رقم امید بخش جو نسبت به بیماری لکه قهوه‌ای توری جو نشان دادند که تنها شش لاین مقاوم به بیماری لکه توری بودند و بقیه ارقام حساس به بیماری لکه توری بودند. با بررسی ۶۱۷۴ ژنوتیپ جو نسبت به بیماری لکه توری نشان دادند که ۴۰ ژنوتیپ که ۱۷ ژنوتیپ آن منشا اتیوپیایی داشتند در مرحله‌ی گیاهچه‌ای به نژاد بسیار قوی قارچ عامل بیماری که در ایالات مختلف آمریکا شیوع دارد مقاوم بوده‌اند. این ژنوتیپ‌ها همچنین دز آزمایشات مزرعه‌ای که در ۳ نقطه از غرب کانادا انجام شد مقاومت بالایی را نشان دادند(۳).این پژوهش با هدف بررسی ارزیابی مقاومت بیست ژنوتیپ جدید جو دیم نسبت به بیماری قارچی لکه توری در منطقه گنبدکاووس صورت پذیرفت.

مواد و روش

به منظور بررسی واکنش ۲۰ ژنوتیپ جو نسبت به بیماری قارچی برگی لکه توری تحقیقی در سال ۹۴-۱۳۹۳ در ایستگاه تحقیقات کشاورزی گنبد وابسته به مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان اجرا گردید. برای ارزیابی دقیق‌تر مقدار (شدت و پیشرفت عمودی بیماری) بیماری‌های برگی (به جز زنگ‌ها) در گندم، تریتیکاله و جو مقیاس SP به صورت یک مقیاس دو رقمی (۹۹-۰۰) در آمده است.در این سیستم تغییر یافته، اولین رقم (D1) نشان دهنده‌ی روند توسعه بیماری در طول سایه انداز گیاه (کانوپی) گیاه از سطح زمین و دومین رقم (D2) میزان شدت بیماری روی سطح برگ آلوده است. پس از ظهور بیماری هر هفته شدت بیماری مورد ارزیابی قرار گرفت. برای هر ارزیابی درصد شدت بیماری بر اساس فرمول زیر محاسبه شد

$$\text{Severity (\%)} = (D1/9)\times(D2/9)\times 100$$

ترسیم منحنی پیشرفت بیماری و محاسبه سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری (AUDPC) و مقایسه‌ی ژنوتیپ‌ها بر این اساس از روش‌های بررسی مقاومت ژنوتیپ‌ها در برابر بیمارگرها است (۹). کاربرد AUDPC در مقایسه‌ی ژنوتیپ‌ها به این دلیل مورد تأکید است که یک معیار کمی از کل مقاومت هر ژنوتیپ است و تمام مؤلفه های مقاومت نظیر فراوانی آلودگی، زمان ظهور آلودگی و دوره‌ی زمانی آلودگی را دربرگرفته و مشخص میکند (۹).

ژنوتیپ‌های دارای AUDPC کمتر از مقاومتی پایدارتر برخوردار هستند. در کل، AUDPC شاخص کارآمدی در تمایز واکنش ژنوتیپ‌ها و ارقام نسبت به یک بیماری است (۱۰). شاخص AUDPC با اندازه گیری درصد شدت بیماری در طی چند مرحله از فصل رشد و نمو گیاه، رسم نمودار درصد شدت بیماری بر حسب واحد زمان در صفحه‌ی محورهای مختصات عمود برهم و سپس محاسبه‌ی سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری به دست می‌آید (۶).

شاخص سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری (AUDPC) و مساحت زیر منحنی پیشرفت بیماری استاندارد شده (sAUDPC) برای هر ژنوتیپ بر اساس رابطه‌ی ریاضی زیر محاسبه می شود (۵).

$$\underline{\mathrm{AUDPC} = \sum_{i=1}^{n} \frac{1}{2}(Y_{i+1} + Y_i)(X_{i+1} + X_i)}$$

همچنین مساحت زیر منحنی پیشرفت بیماری نسبی (rAUDPC) با تقسیم مقدار AUDPC بر مقدار AUDPC در حساس‌ترین ژنوتیپ محاسبه گردید. داده‌های آزمایش به صورت بلوک در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با استفاده از نرم

افزار آماری SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مقایسات میانگین وگروه‌بندی تیمارها بر اساس صفات مورد مطالعه با استفاده از آزمون LSD انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه‌ی واریانس داده‌های شاخص درصد شدت بیماری، مقدار سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری (AUDPC) و مقدار سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری استاندارد شده (sAUDPC) مندرج در جدول یک نشان می‌دهد، این صفت بین ۲۰ ژنوتیپ جدید کاشته شده و مورد آزمایش، برای هر نوبت اندازه‌گیری (شش نوبت) در سطح احتمال آماری ($p<0.01$)دارای اختلاف معنی‌دار است.

جدول ۱- تجزیه‌ی واریانس داده‌های مربوط به صفت‌های بیماری‌شناختی لکه توری

منبع تغییرات	درجه آزادی	fDS	AUDPC	sAUDPC
بلوک	۳	۹۸/۲۳ ns	ns۱۶۲۴/۵۰	۷۸/۲۱ ns
ژنوتیپ	۱۹	۲۰۲/۳۳**	۲۴۶۵۰/۸۱**	۲۱۶/۴۵**
اشتباه آزمایش	۵۷	۱۶/۶۸	۱۸۳۹۹/۸۶	۳۱/۹۳
ضریب تغییرات(CV%)	---	۱۴/۷۱	۳۲/۶۲	۱۰/۲۶

**: نشان‌دهنده‌ی معنی‌دار بودن در سطح احتمال آماری ($p<0.01$).

ns: نشان‌دهنده‌ی معنی‌دار نبودن در سطح احتمال آماری ($p<0.05$).

با توجه به نتایج حاصل از مقایسه میانگین ژنوتیپ های مورد بررسی مشخص گردید که، بیشترین شاخص درصد شدت بیماری لکه توری درششمین بار نوبت اندازه گیری در ژنوتیپ ۱۸ و کمترین آن در ژنوتیپ ۱۰مشاهده گردید.
بیشترین مقدار سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری لکه توری در ژنوتیپ ۱۵ و کمترین آن در ژنوتیپ۱۱مشاهده گردید.
بیشترین بیشترین مقدار سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری لکه توری در ژنوتیپ ۲ و کمترین آن در ژنوتیپ۲۰مشاهده گردید.
با هدف مطالعه‌ی واکنش ژنوتیپ‌های مختلف به بیماری لکه توری جو ۱۵ جدایه قارچ عامل بیماری را روی ۳۸ لاین جو در مراحل گیاهچه‌ای و بلوغ در شرایط گلخانه و مزرعه مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که هیچ یک از لاین‌های مورد بررسی نسبت به همه‌ی جدایه‌های بیماری مقاوم نبودند. اما برای هر یک از جدایه‌ها سطوح بالایی از مقاومت در یک یا چند لاین یافت شد. همچنین واکنش گیاهچه‌ها و گیاهان بالغ در برابر یک جدایه خاص متفاوت بود(۶).

جدول ۲-مقایسه‌ی میانگین داده‌های مربوط به صفت‌های بیماری‌شناختی لکه توری

ژنوتیپ	fDS	AUDPC	sAUDPC
۱	۱٤.۸۱c	٥۷.٤۱c	۱.۳۷b
۲	۲٤.۳۸ab	۱۰۰.۰۰a	۲.۳۸ab
۳	۲٥.۳۱ab	۹٤.۱٤ab	۲.۲٤ab
۴	۲۱.۳۰ab	۸۳.۳۳ab	۱.۹۸b
۵	۲٥.٦۲ab	۹۳.۸۳AB	۲.۲۳ab
۶	۱۲.٦٥	٤۹.۳۸d	۱.۱۸b
۷	۱۷.۲۸b	۸۳.٦٤ab	۱.۹۹b

۸	۱۵.۵۲ab	۷۷.۷۸b	۱.۸۵b
۹	۱۹.۴۴ab	۸۷.۹۶AB	۲.۰۹ab
۱۰	۱۱.۱۱d	۵۵.۵۶c	۱.۳۲b
۱۱	۱۲.۹۶d	۵۰.۹۳c	۱.۲۱b
۱۲	۱۸.۸۲b	۷۲.۲۲b	۱.۷۲b
۱۳	۱۵.۷۴b	۷۵.۰۰b	۱.۷۹b
۱۴	۱۳.۸۹b	۶۲.۹۶b	۱.۵۰b
۱۵	۲۸.۷۰b	۱۰۱.۲۳a	۳.۸۴a
۱۶	۲۶.۸۵ab	۸۷.۳۵AB	۲.۰۸ab
۱۷	۲۰.۶۸ab	۸۰.۲۵AB	۱.۹۱b
۱۸	۳۵.۱۹a	۹۴.۴۴B	۲.۲۵ab
۱۹	۲۳.۴۶ab	۶۵.۴۳b	۱.۵۶b
۲۰	۱۷.۲۸b	۵۶.۷۹c	۱.۳۵b

حروف مشترک در مجاورت اعداد متعلق به هر صفت و در هر ستون نشان‌دهنده‌ی عدم تفاوت آماری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ($p<0.05$) است.

منابع

۱. افشاری، و. ۱۳۹۳. ارزیابی ارقام مختلف جو نسبت به بیماری‌های سیاهک آشکار و لکه قهوه‌ای تحت شرایط آلودگی طبیعی در اصفهان. پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت.ص۲۰.

۲. نور محمدی، ق.، سیادت، س ع.، و کاشانی، ع. ۱۳۸۰. زراعت (جلد اول- غلات). چاپ سوم، انتشارات دانشگاه شهید چمران. ۲۷ (۱۰۲): ۱۳۰-۱۲۴ صفحات.

3. Blum, A. 1988. Plant Breeding for Stress Environment. CRC Press Boca Raton, Floria.421-430.

5.D a n i e l s e n S . , M e y e r U . M . , F u n c k J e n s e n D . 1998: *Genetic characteristics of Fusarium verticillioides isolates from maize in Costa Rica*. Plant Pathology 47: 615-622.

6.Draper, S.R., 1985**.** seed science and technology . international seed testing association (ISTA).

7. Gubis, J., Masar, S. and Gubisova, M. 2010. Resistance of spring barley genotypes to *Bipolaris sorokiniana*. Agriculture 56(1): 3-8.

8.Iftikhar, SH., Asad, SH., Rattu, A. U., Fayyaz, M., and Munir, A. 2009. Selection of barley germplasm resistant to spot blotch. Pak. J. Bot., 41 (1): 309-314.

9.Maiti RK, Raju PS and Bidinger FR. 1985. Studies on germinability and some aspects of pre-harvest physiology of sorghum grain. Seed Science and Technology 13:27-35.

10.Moseman, J.C., Nevo, E., and Zohary, D. 1983. Resistance of *Hordeum spontaneum* collected in Israel to infection with *Erysiphe graminis hordei*. Crop Science 23: 6, 1115 - 1119 .

ارزیابی مقاومت ۲۰ ژنوتیپ جو دیم نسبت به بیماری قارچی سفیدک پودری در منطقه گنبدکاووس

الهام گرگیج[۱]، امیر ذوالفقاری*[۲]، رحمت اله محمدی گنبد [۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، گروه کشاورزی، واحد گرگان، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان
۲- عضو هیأت علمی گروه کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان
۳- بخش تحقیقات علوم زراعی- باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی گرگان- ایران
** نویسنده مسئول: amir.zolfaghary@gmail.com*

چکیده

به منظور بررسی واکنش ۲۰ ژنوتیپ جو در برابر بیماری برگی مهم سفیدک پودری در شهرستان گنبد کاووس واقع در شمال شرق استان گلستان، آزمایشی در قالب طرح بلوک های کامل تصادفی در ۴ تکرار در سال زراعی ۹۴-۱۳۹۳ انجام گردید. معیارهای نتیجه گیری برای ارزیابی حساسیت یا مقاومت ژنوتیپ‌ها نسبت به این بیماری شامل سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری (AUPPC) و مقدار استاندارد شده‌ی سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری (SAUDPC) سطح زیر منحنی پیشرفت نسبی بیماری (rAUDPC) و شدت نهایی بیماری (FDS) بود. با توجه به عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین صفات مورد بررسی مقایسه میانگین بین داده‌ها صورت نگرفت. با توجه به نتایج حاصل از جدول مقایسه میانگین ۲۰ ژنوتیپ مورد بررسی نشان داد که، بیشترین درصد شاخص درصد شدت بیماری سفیدک پودری درششمین بار نوبت اندازه گیری در ژنوتیپ۱۸ و کمترین آن در ژنوتیپ ۱۰ مشاهده گردید.بیشترین مقدار سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری در ژنوتیپ۲ و کمترین آن در ژنوتیپ ۱۱ مشاهده گردید.بشترین مقدار سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری در ژنوتیپ ۱۵ و کمترین آن در ژنوتیپ۲۰ مشاهده گردید.

واژگان کلیدی: ارزیابی‌مقاومت، جو، سفیدک پودری

مقدمه

جو (*Hordeum vulgare* L.) بعد از گندم از مهم‌ترین گیاهان زراعی به شمار می‌آید. به دلیل شرایط خواص آب و هوایی و بالا بودن رطوبت نسبی و گسترش بیماری‌های قارچی در مناطق مختلف کشت جو در ایران ارزیابی دقیق واکنش ژنوتیپ های مختلف نسبت به این بیماری‌ها، اهمیت به‌سزایی دارد. این گیاه نسبت به گیاه زراعی در محدوده‌ی وسیع تری از شرایط محیطی رشدونمو می نماید.بیش ترین تولید جو در مناطقی انجام می گیرد که برای تولید غلات عمده دیگر آب و هوایی نامساعد تر دارند.این گیاه در محدوده وسیعی از فتوپریودها رشد می کند وطی دودهه گذشته سطح زیر کشت آن سریع تر از گندم وبرنج وعملکردآن بیش تر ازبرنج افزایش یافته است (۵).

واکنش ۹۰لاین دابل هاپلوئید جو نسبت به بیماری سفیدک پودری در شرایط مزرعه مطالعه شد. نتایج نشان داد که ۶۲ لاین به این بیماری، مقاومت مناسب و قابل قبولی داشتند و ۲۸ لاین نیز به عنوان حساس یا نیمه حساس شناسایی شدند (۳).واکنش۲۷۸ نمونه جو ِدو ردیفه ازهشت استان مختلف را در دو منطقه کرج و گرگان بررسی کردند. در هر دو منطقه بیشترین فراوانی مربوط به تیپ آلودگی ۸ (حساس) بود. در کرج ۲/۶ درصد و در گرگان ۰/۴ درصد از نمونه ها مقاوم به سفیدک بودند و نتایج حاکی از آن است که منابع مقاومت در جوهای دو ردیفه بررسی شده بسیار محدود است. واکنش به بیماری در هر دو منطقه با زمان گلدهی همبستگی منفی و معنی داری نشان داد(۸).در یک مطالعه، واکنش ۱۲۰ ژنوتیپ جو نسبت به سفیدک سطحی در دو سال زراعی ۱۳۸۳-۱۳۸۲ و ۱۳۸۴-۱۳۸۳ ارزیابی شد. نتایج نشان داد که در هر دو سال بیشترین فراوانی مربوط به تیپ آلودگی ۴ بود. در این مطالعه، ژنوتیپ های پاکوتاه بیشتر از ژنوتیپ های پابلند در معرض بیماری قرار گرفتند و به آن حساسیت بیشتری نشان دادند. بین صفات واکنش به سفیدک و عملکرد دانه همبستگی منفی و معنی دار وجود داشت که نشان می دهد بیماری سفیدک تأثیر بسزایی در کاهش عملکرد دارد (۴). این پژوهش با هدف بررسی ارزیابی مقاومت ۲۰ ژنوتیپ جو دیم نسبت به بیماری قارچی سفیدک پودری در منطقه گنبدکاووس صورت پذیرفت.

مواد و روش

به منظور بررسی واکنش ۲۰ ژنوتیپ جو نسبت به بیماری قارچی برگی لکه توری تحقیق در سال ۹۴-۱۳۹۳ در ایستگاه تحقیقات کشاورزی گنبد وابسته به مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان اجرا گردید. برای ارزیابی دقیق‌تر مقدار (شدت و پیشرفت عمودی بیماری) بیماری‌های برگی (به جز زنگ‌ها) در گندم، تریتیکاله و جو مقیاس SP به صورت یک مقیاس دو رقمی (۹۹-۰۰) در آمده است (۲). در این سیستم تغییر یافته، اولین عدد (D1) نشان دهنده‌ی روند توسعه بیماری در طول سایه انداز گیاه (کانوپی) گیاه از سطح زمین و دومین عدد (D2) میزان شدت بیماری روی سطح برگ آلوده است. پس از ظهور بیماری هر هفته شدت بیماری مورد ارزیابی قرار گرفت. برای هر ارزیابی درصد شدت بیماری بر اساس فرمول زیر محاسبه شد

$$\text{Severity (\%)} = (D1/9)\times(D2/9)\times 100$$

ترسیم منحنی پیشرفت بیماری و محاسبه سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری (AUDPC) و مقایسه‌ی ژنوتیپ‌ها بر این اساس از روش‌های بررسی مقاومت ژنوتیپ‌ها در برابر بیمارگرها است (۱). کاربرد AUDPC در مقایسه‌ی ژنوتیپ‌ها به این دلیل مورد تأکید است که یک معیار کمی از کل مقاومت هر ژنوتیپ است و تمام مؤلفه های مقاومت نظیر فراوانی آلودگی، زمان ظهور آلودگی و دوره‌ی زمانی آلودگی را دربرگرفته و مشخص میکند (۶).

ژنوتیپ‌های دارای AUDPC کمتر از مقاومتی پایدارتر برخوردار هستند. در کل، AUDPC شاخص کارآمدی در تمایز واکنش ژنوتیپ‌ها و ارقام نسبت به یک بیماری است (۵). شاخص AUDPC با اندازه گیری درصد شدت بیماری در طی چند مرحله از فصل رشد و نمو گیاه، رسم نمودار درصد شدت بیماری بر حسب واحد زمان در صفحه‌ی محورهای مختصات عمود برهم (منحنی پیشرفت بیماری (DPS) و سپس محاسبه‌ی سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری به دست می‌آید (۳).

شاخص سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری (AUDPC) و مساحت زیر منحنی پیشرفت بیماری استاندارد شده (sAUDPC) برای هر ژنوتیپ بر اساس رابطه‌ی ریاضی زیر محاسبه می شود (۲).

$$\underline{\text{AUDPC}} = \sum_{i=1}^{n} \frac{1}{2}(Y_{i+1} + Y_i)(X_{i+1} + X_i)$$

$$\text{sAUDPC} = \frac{\text{AUDP}}{}$$

همچنین مساحت زیر منحنی پیشرفت بیماری نسبی (rAUDPC) با تقسیم مقدار AUDPC بر مقدار AUDPC در حساس‌ترین ژنوتیپ محاسبه گردید. داده‌های آزمایش به صورت بلوک در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با استفاده از نرم افزار آماری SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مقایسات میانگین وگروه‌بندی تیمارها بر اساس صفات مورد مطالعه با استفاده از آزمون LSD انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه‌ی واریانس داده‌های شاخص درصد شدت بیماری، مقدار سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری (AUDPC) و مقدار سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری استاندارد شده (sAUDPC) مندرج در جدول ۴-۱ نشان می‌دهد، این صفت بین ۲۰ ژنوتیپ جدید کاشته شده و مورد آزمایش، برای هر نوبت اندازه‌گیری (شش نوبت) در سطح احتمال آماری ($p<0.01$)دارای اختلاف معنی‌دار است. اثر بلوک برروی صفات بیماری شناسی معنی دار نشده است و این به این معنی که زمین انجام تحقیق از یکنواختی در بخش های مختلف برخوردار بود.

جدول ۱-تجزیه‌ی واریانس داده‌های مربوط به صفت‌های بیماری‌شناختی سفیدک پودری

منبع تغییرات	درجه آزادی	fDS	AUDPC	sAUDPC
بلوک	۳	۷۲/۱۲ ns	۱۶۲۴/۵۰ ns	۲۳/۳۴ ns
ژنوتیپ	۱۹	۳۱۲/۶۸**	۳۳۴۸۰۷۷/۳۷**	۳۱۳/۹۲**
اشتباه آزمایش	۵۷	۳۶/۲۲	۱۸۳۹۹/۸۶	۲۱/۸۷
ضریب تغییرات(CV%)	---	۱۰/۵۵	۲۱/۰۲	۱۸/۰۶

fDS: شدت نهایی بیماری ارزیابی شده در نوبت آخر
AUDPC: سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری
sAUDPC: سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری استاندارد
ns: نشان‌دهنده‌ی معنی‌دار نبودن در سطح احتمال آماری ($p<0.05$).
**: نشان‌دهنده‌ی معنی‌دار بودن در سطح احتمال آماری ($p<0.01$).

با توجه به نتایج حاصل از جدول مقایسه میانگین ۲۰ ژنوتیپ مورد بررسی نشان داد که، بیشترین درصد شاخص درصد شدت بیماری سفیدک پودری درششمین بار نوبت اندازه گیری در ژنوتیپ۱۸ و کمترین آن در ژنوتیپ ۱۰ مشاهده گردید.بیشترین مقدار سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری در ژنوتیپ۲ و کمترین آن در ژنوتیپ ۱۱ مشاهده گردید. بیشترین مقدار سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری در ژنوتیپ ۱۵ و کمترین آن در ژنوتیپ۲۰ مشاهده گردید. در یک تحقیق برای بررسی توارث پذیری و نحوهٔ عمل ژن برای مقاومت به بیماری سفیدک پودری در جو، دو رقم مقاوم و یک رقم حساس به سفیدک تلاقی داده شده و والدین و نسل های هر تلاقی در شرایط مزرعه بررسی شدند. نتایج بیانگر این بود که تفکیک متجاوز برای هر دو نوع تلاقی، اغلب به طرف تیپ آلودگی و پیشرفت آلودگی کمتر است که نشان دهندهٔ شراکت ژن ها در هر دو والد برای افزایش مقاومت است. مطالعه نحوهٔ عمل ژن با استفاده از تجزیه میانگین نسل ها نشان داد که علاوه بر تأثیرات افزایشی و غالبیت، تأثیرات اپیستازی نیز عامل مهمی در کنترل صفات به شمار می روند، ولی واریانس غالبیت نسبت به واریانس افزایشی تأثیر بیشتری درکنترل صفات داشت. تعداد ژن بسته به نوع صفت و تلاقی بین یک تا دو ژن برآورد شد (۷).

جدول ۲-مقایسه میانگین داده‌های مربوط به صفت‌های بیماری‌شناختی سفیدک پودری

ژنوتیپ	fDS	AUDPC	sAUDPC
۱	۱۴.۸۱ bc	۵۷.۴۱ b	۱.۳۷ b
۲	۲۴.۳۸ab	۱۰۰.۰۰a	۲.۳۸ab
۳	۲۵.۳۱ab	۹۴.۱۴ab	۲.۲۴ab
۴	۲۱.۳۰ab	۸۳.۳۳ab	۱.۹۸b
۵	۲۵.۶۲ab	۹۳.۸۳ab	۲.۲۳ab
۶	۱۲.۶۵c	۴۹.۳۸c	۱.۱۸b
۷	۱۷.۲۸bc	۸۳.۶۴ab	۱.۹۹b
۸	۱۸.۵۲bc	۷۷.۷۸ab	۱.۸۵b
۹	۱۹.۴۴bc	۸۷.۹۶ab	۲.۰۹ab
۱۰	۱۱.۱۱c	۵۵.۵۶b	۱.۳۲b
۱۱	۱۲.۹۶c	۵۰.۹۳b	۱.۲۱b
۱۲	۱۸.۵۲	۷۲.۲۲ab	۱.۷۲b
۱۳	۱۵.۷۴bc	۷۵.۰۰ab	۱.۷۹b
۱۴	۱۳.۸۹c	۶۲.۹۶b	۱.۵۰b
۱۵	۲۸.۷۰ab	۱۰۱.۲۳a	۳.۸۴a
۱۶	۲۶.۸۵ab	۸۷.۳۵ab	۲.۰۸ab
۱۷	۲۰.۶۸ab	۸۰.۲۵ab	۱.۹۱b
۱۸	۳۵.۱۹a	۹۴.۴۴ab	۲.۲۵ab
۱۹	۲۳.۴۶ab	۶۵.۴۳b	۱.۵۶b
۲۰	۱۷.۲۸bc	۵۶.۷۹b	۱.۳۵b

منابع

1.D a n i e l s e n S . , M e y e r U . M . , F u n c k J e n s e n D . 1998: Genetic characteristics of Fusarium verticillioides isolates from maize in Costa Rica. Plant Pathology 47: 615-622.

2.Draper, S.R., 1985**.** seed science and technology . international seed testing association (ISTA).

3.Hayatmoghadam, M., Bakhtyar, F., Bozorgipoor, R. & Nikkhah, H. R. 2011. Evaluation of resistanceto powdery mildew and some agronomic traits of barley doubled haploid lines. *Seed and PlantImprovement Journal*, 27 (3), 441-443. (In Farsi).

4.Kheyri, A., Khani, M., Jabbari, M. & Barati, V. 2007. Study of reaction oto powdery mildew (*Blumeria graminis f. sp. hordei*) in field. *2nd Natio Agriculture*, 17-18 October., University of Gorgan, 2386-2396. (In Farsi).

5.Manners, J. G. & Hossain, M. M. 1963. Effect of temperature and humidity on conidial germination.*Transactions of the British Mycological Society,* 46, 225-234.

6.Monazzah, M., Torabi, M., Rezaie, S., Razavi, M. & Dehghan, M. A. 2009. Evaluation of resistanceof some wheat advanced lines to pathotypes of wheat powdery mildew at seedling and adult plantstages. Seed and Plant Improvement Journal, 25 (1), 33-49. (In Farsi).

7.Naghavi, M. R., Gganadha, M. R., Yazdi samadi, B. & Torabi, M. 2001. Inheritance of resistance to barley powdery mildew at adult plant stage. *Seed and Plant Improvement Journal*, 17 (2), 140-150. (In Farsi).

8.Shaffaaedin, S., Torabi, M., Dehghan, M. A. & Patpoor, M. 1998. Evaluation of landraces of barley innorthern parts of Iran for their resistance to powdery mildew. *Iranian Journal of Agriculture Science*,29(4), 859-867. (In Farsi)

مطالعه ی اثر فاصله ی بین ردیف و تراکم بوته بر سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری

فاطمه شیخ[1*]، صفورا جافرنوده[2]

۱. استادیار و عضو هیأت علمی پژوهشی مرکز تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی و منابع طبیعی گلستان

۲. دانش آموخته کارشناسی‌ارشد رشته زراعت، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

** نویسنده مسئول: sheikhfatemeh@yahoo.com*

چکیده

این تحقیق در سال زراعی ۹۴-۱۳۹۳ در ایستگاه تحقیقات کشاورزی گرگان با هدف مطالعه‌ی اثر فاصله‌ی بین ردیف و تراکم بوته بر سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری باقلا انجام شد. آزمایش با دو فاکتور فاصله‌ی بین ردیف (۳۰، ۴۵، ۶۰ و ۷۵ سانتی‌متر) و تراکم بوته (۱۳۰۰۰۰، ۱۴۵۰۰۰، ۱۶۰۰۰۰ و ۱۷۵۰۰۰ بوته در هکتار)، با ۱۶ تیمار و در ۳ تکرار در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی، در کرت‌های مزرعه‌ی آزمایشی ایستگاه تحقیقات کشاورزی گرگان به مساحت ۱۲ متر مربع و بر روی ژنوتیپی از باقلا از مرکز بین‌المللی تحقیقات کشاورزی در مناطق خشک، ایکاردا (ICARDA) به نام G-Faba-332 انجام شد. در اواسط فروردین‌ماه، پس از مشاهده‌ی علایم اولیه‌ی بیماری‌ها بر روی بوته‌ها در شرایط آلودگی طبیعی، درصد شدت بیماری بر اساس مقیاس ۹ نمره‌ای ایکاردا طی بازدیدهای منظم یک بار در هفته در کرت‌ها تا اوایل خردادماه اندازه‌گیری و یادداشت‌برداری شد. نتایج حاصل از تجزیه‌ی واریانس داده‌های به‌دست آمده نشان داد، در بیماری سوختگی برگ استمفیلیومی، اثر فاصله‌ی بین ردیف و تراکم بوته بر AUDPC و اثر متقابل آنها در سطح یک درصد معنی‌دار بود. کم‌ترین مقدار (۵۳/۵۸) AUDPC در فاصله‌ی ردیف ۳۰ سانتی‌متر و تراکم ۱۳۰۰۰۰ بوته و بیش‌ترین (۷۲/۸۵) در فاصله‌ی ردیف ۷۵ سانتی‌متر و تراکم ۱۷۵۰۰۰ بوته در هکتار محاسبه شد. بنابر این، کاشت ژنوتیپ G-Faba-332 باقلا با فاصله‌ی بین ردیف ۳۰ سانتی‌متر و تراکم ۱۳۰۰۰۰ بوته در هکتار در منطقه‌ی گرگان، در شرایط آلودگی طبیعی، سبب بروز بیماری سوختگی برگ استمفیلیومی باقلا با کم‌ترین مقدار شدت آلودگی می‌گردد.

واژگان کلیدی: باقلا، تراکم بوته، فاصله‌ی بین ردیف، AUDPC.

مقدمه

بیماری‌ها یکی از مهم‌ترین عوامل زیستی بازدارنده تولید حبوبات در دنیا به شمار می‌روند. این عوامل روی کمیت و کیفیت محصول اثر گذاشته و خسارت سنگینی را به کشاورزان وارد می‌سازد. وقوع و میزان خسارت این عوامل تا حد زیادی تحت تأثیر شرایط محیطی است. اجتناب از شیوع این عوامل تا حد زیادی به دانش ما از علایم و شرایط مساعد توسعه این عوامل بیماری‌زا بستگی دارد (۲). رطوبت نسبی بالاتر از ۷۰ درصد و درجه حرارت های در دامنه ۱۵ تا ۲۲ درجه، واگیر بودن عامل بیماریزا، حساسیت رقم، تراکم بالای ماده بیماری‌زا، سن گیاه و بعضی از عملیات زراعی سبب توسعه بیماری‌های گیاهی می‌شوند (۵).

سوختگی استمفیلیومی یکی از بیماری‌های برگی باقلا است. این بیماری تنها از دو کشور عربستان و جزیره موریس گزارش شده بود که به تازگی از استان گلستان نیز گزارش شده است (۱). عامل بیماری سوختگی استمفیلیومی چند گونه از قارچ Stemphylium ،از گروه قارچ‌های ناقص، هستند. گونه‌های *S. botryosum* و *S. Solani* به ترتیب از عربستان سعودی و جزیره موریس گزارش شده‌اند و گونه‌های *S. botryosum* و *S. vesicarium* نیز به عنوان عامل بیماری از ایران گزارش شده‌اند (۱). عملیات زراعی مانند تناوب، شخم، سوزاندن بقایای محصول، تنظیم تراکم، تاریخ کاشت مناسب، نوع تغذیه و خاک و کنترل شیمیایی تا حدودی کنترل بیماری می‌گردد. این آزمایش به منظور بررسی ارتباط بین آرایش کاشت و فاصله ردیف بر روی شدت بیماری در باقلا در منطقه گرگان انجام شد.

مواد و روش‌ها

این طرح در سال زراعی ۹۴-۱۳۹۳ در ایستگاه تحقیقات کشاورزی گرگان واقع در ۵ کیلومتری شمال گرگان به‌اجرا در آمد. فاکتور اول فاصله خطوط کاشت در ۴ سطح شامل ۳۰، ۴۵، ۶۰ و ۷۵ سانتی‌متر و فاکتور دوم تراکم بوته در ۴ سطح شامل ۱۳۰۰۰۰، ۱۴۵۰۰۰، ۱۶۰۰۰۰ و ۱۷۵۰۰۰ بوته در هکتار در نظر گرفته شد. ژنوتیپ مورد استفاده در این آزمایش G-FABA-332 بود. یادداشت برداری از مقدار بیماری در مزرعه از اردیبهشت‌ماه ۱۳۹۴ صورت پذیرفت. کرت‌های یادداشت برداری شده بر اساس یک برنامه‌ی زمانی مشخص (یک بار در هر هفته) مورد بازدید قرار گرفت و مقدار بیماری در مزرعه ثبت گردید. برای این منظور، در هر یادداشت برداری، با استفاده از فرم مخصوص یادداشت برداری، تعداد ۱۰ بوته در هر کرت به طور تصادفی انتخاب و نسبت به تعیین شدت و درصد آلودگی اقدام شد. وجود یا عدم وجود بیماری در آنها (به عنوان درصد یا میزان وقوع بیماری) و مقدار بیماری در بوته‌های بیمار (به عنوان شدت بیماری) ثبت شد. در این آزمایش آلوده‌سازی صورت نگرفت. تجزیه واریانس داده‌ها، تجزیه رگرسیون و مقایسه میانگین‌ها به روش LSD با استفاده از نرم افزار SAS انجام شد.

نتایج و بحث

طبق نتایج تجزیه واریانس اثر فاصله ردیف و تراکم بوته و همچنین اثر متقابل آنها بر AUDPC و sAUDPC بیماری سوختگی استمفیلیومی معنی دار بود (جدول ۱). طبق نتایج مقایسه میانگین‌ها (جدول ۲) دامنه تغییرات AUDPC بین ۵۸/۵۳ تا ۷۲/۸۵، و دامنه تغییرات sAUDPC بین ۲/۰۹ و ۲/۶۰ بود. در این بیماری نیز با افزایش فاصله ردیف و تراکم بوته مقدار پیشرفت بیماری افزایش پیدا کرد.

میزان AUDPC در فاصله ردیف ۳۰ سانتی‌متر و تراکم‌های ۱۳۰۰۰۰، ۱۴۵۰۰۰، ۱۶۰۰۰۰ و ۱۷۵۰۰۰ بوته به ترتیب ۵۸/۵۳، ۶۰/۶۹، ۶۱/۴۴ و ۶۵/۴۰ بود. در فاصله ردیف ۴۵ سانتی‌متر کم‌ترین (۶۱/۲۱) و بیش‌ترین (۶۹/۴۹) میزان AUDPC در تراکم‌های ۱۳۰۰۰۰ و ۱۷۵۰۰۰ بوته مشاهده گردید و میزان AUDPC در تراکم‌های ۱۴۵۰۰۰ و ۱۶۰۰۰ بوته مشابه بود به طوری که بین این دو تراکم تفاوت معنی‌داری به لحاظ آماری وجود نداشت. از طرفی درفاصله ردیف ۶۰ سانتی‌متر هر دو تراکم ۱۶۰۰۰۰ و ۱۷۵۰۰۰ بوته به طور مشترک بالاترین میزان میزان AUDPC را داشتند و پس از آن تراکم بوته ۱۴۵۰۰۰ با ۶۵/۲۳ و ۱۳۰۰۰۰ با ۶۲/۹۵ در رتبه‌های بعدی قرار داشتند. در فاصله ردیف ۷۵ سانتی‌متر تراکم ۱۳۰۰۰۰ و ۱۴۵۰۰۰ کم‌ترین و تراکم ۱۶۰۰۰ و ۱۷۵۰۰۰ بوته به ترتیب با ۷۱/۲۴ و ۷۲/۸۵ بیش‌ترین میزان AUDPC را به خود اختصاص دادند.

در رابطه با مقادیر sAUDPC نیز نتایج مشابه با AUDPC مشاهده شد به طوری که افزایش فاصله ردیف و تراکم به افزایش و پیشرفت بیماری سوختگی استمفیلیومی منتهی شد. میزان sAUDPC در فاصله ردیف ۳۰ سانتی‌متر و تراکم بوته های ۱۳۰۰۰۰، ۱۴۵۰۰۰، ۱۶۰۰۰۰ و ۱۷۵۰۰۰ بوته به ترتیب برابر با ۲/۰۹، ۲/۱۷، ۲/۱۹ و ۲/۳۳ بود و تراکم ۱۴۵۰۰۰ و ۱۶۰۰۰۰ در یک گروه آماری قرار گرفتند و به عبارتی اختلاف بین این دو تراکم در این فاصله ردیف معنی‌دار نبود. در فاصله ردیف ۶۰ سانتی‌متر و برای تراکم‌های ۱۳۰۰۰۰، ۱۴۵۰۰۰، ۱۶۰۰۰۰ و ۱۷۵۰۰۰ به ترتیب ۲/۲۴، ۲/۳۲، ۲/۳۶ و ۲/۳۸ بود (جدول ۲). میزان sAUDPC در فاصله ردیف ۷۵ سانتی‌متر و تراکم‌های بوته ۱۳۰۰۰۰، ۱۴۵۰۰۰ به ترتیب با ۲/۲۷ و ۲/۳۱

کم‌ترین، و تراکم‌های ۱۶۰۰۰۰ و ۱۷۵۰۰۰ بوته با ۲/۵۴ و ۲/۶۰ بیش‌ترین مقدار را به خود اختصاص دادند (جدول ۲). مشابه این نتایج توسط سایر محققان نیز گزارش شده است. آنها معتقدند با افزایش تراکم گیاهی و به علت بالا رفتن رطوبت نسبی در داخل جامعه گیاهی، شدت و امکان شیوع بیماری افزایش می‌یابد (۳و ۶). افزایش رطوبت محیط مناسبی را جهت رشد و توسعه بیماری‌های گیاهی به وجود می‌آورد. بنابراین بالا بودن AUDPC و sAUDPC در تراکم‌های بالای بوته امری طبیعی به نظر می‌رسد (۴ و ۷).

جدول ۱- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) برای صفات بیماری مرتبط با مقاومت به بیماری‌های باقلا.

منابع تغییرات	درجه آزادی	سوختگی استمفیلیومی (Stem)	
		AUDPC	sAUDPC
بلوک	۲	۹/۰۵	۰/۰۱
فاصله بین ردیف	۳	۸۹/۲۳**	۰/۱۱**
تراکم بوته	۳	۱۱۱/۵۷**	۰/۱۴**
فاصله ردیف × تراکم بوته	۹	۷/۸۷**	۰/۰۱**
خطا	۳۰	۲/۰۵	۰/۰۰۲
ضریب تغییرات (درصد)		۲/۲۰	۲/۲۰

ns.*. ** به‌ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

جدول ۲- مقایسه میانگین‌های† اثرات متقابل فاصله بین ردیف و تراکم بوته بر AUDPC و sAUDPC بیماری سوختگی استمفیلیومی

فاصله بین ردیف	تراکم بوته	AUDPC	sAUDPC
۳۰ سانتی‌متر	۱۳۰۰۰۰ بوته در هکتار	۵۸/۵۳ c	۲/۰۹ c
	۱۴۵۰۰۰ بوته در هکتار	۶۰/۶۹ b	۲/۱۷ b
	۱۶۰۰۰۰ بوته در هکتار	۶۱/۴۴ ab	۲/۱۹ b
	۱۷۵۰۰۰ بوته در هکتار	۶۵/۴۰ a	۲/۳۳ a
۴۵ سانتی‌متر	۱۳۰۰۰۰ بوته در هکتار	۶۱/۲۱ c	۲/۱۸ c
	۱۴۵۰۰۰ بوته در هکتار	۶۲/۳۳ b	۲/۲۲ bc
	۱۶۰۰۰۰ بوته در هکتار	۶۴/۰۰ b	۲/۲۸ b
	۱۷۵۰۰۰ بوته در هکتار	۶۹/۴۹ a	۲/۴۸ a
۶۰ سانتی‌متر	۱۳۰۰۰۰ بوته در هکتار	۶۲/۹۵ b	۲/۲۴ b
	۱۴۵۰۰۰ بوته در هکتار	۶۵/۲۳ ab	۲/۳۲ ab
	۱۶۰۰۰۰ بوته در هکتار	۶۶/۲۵ a	۲/۳۶ a
	۱۷۵۰۰۰ بوته در هکتار	۶۶/۸۰ a	۲/۳۸ a
۷۵ سانتی‌متر	۱۳۰۰۰۰ بوته در هکتار	۶۳/۶۸ b	۲/۲۷ b
	۱۴۵۰۰۰ بوته در هکتار	۶۴/۹۵ b	۲/۳۱ b
	۱۶۰۰۰۰ بوته در هکتار	۷۱/۲۴ a	۲/۵۴ a
	۱۷۵۰۰۰ بوته در هکتار	۷۲/۸۵ a	۲/۶۰ a

† در هر گروه میانگین‌هایی که در یک حرف مشترک هستند فاقد تفاوت آماری معنی‌دار براساس LSD در سطح احتمال پنج درصد می‌باشد.

نتیجه‌گیری

به طور کلی در هر چهار فاصله بین ردیف مورد مطالعه در این آزمایش، کم‌ترین AUDPC در تراکم‌های پایین‌تر و بیش‌ترین میزان آن نیز در تراکم‌های بالاتر مشاهده شد. در تراکم‌های بالا فاصله بوته‌ها در روی ردیف کاشت به هم نزدیک‌تر بودند، به همین علت جریان هوا در مجاورت بوته‌ها کاهش یافت. این عامل (نزدیک بودن بوته‌ها در تراکم‌های بالاتر) سبب افزایش رطوبت بین بوته‌ها شد. در فاصله ردیف ۳۰ سانتی‌متر بوته‌ها به طور یکنواخت‌تری قرار داشتند و آرایش کاشت مربع بود به طوری که در فاصله ردیف ۳۰ سانتی‌متر، فاصله بوته روی خطوط کاشت برای تراکم‌های ۱۳۰۰۰۰، ۱۴۵۰۰۰، ۱۶۰۰۰۰ و ۱۷۵۰۰۰ به ترتیب برابر با ۲۵/۶، ۲۲/۹، ۲۰/۸ و ۱۹/۰۴ سانتی‌متر بود. در فاصله بین ردیف‌های ۴۵ و ۶۰ و ۷۵ این فواصل بوته روی ردیف کاهش یافت، به طوری که در فاصله ردیف ۷۵ سانتی‌متر فاصله بوته روی ردیف کاشت برای تراکم‌های ۱۳۰۰۰۰، ۱۴۵۰۰۰، ۱۶۰۰۰۰ و ۱۷۵۰۰۰ به ترتیب برابر با ۱۰/۲، ۹/۱، ۸/۳۳ و ۷/۶۱ سانتی‌متر بود. به بیانی دیگر فاصله بوته‌ها روی خطوط کاشت در تراکم ۱۳۰۰۰۰ بوته در فاصله ردیف ۳۰ سانتی‌متری بیش‌تر از فاصله ردیف ۷۵ بود. به همین علت صرف نظر از تراکم بوته، بالاترین شدت بیماری در فاصله ردیف ۷۵ مشاهده شد. نزدیک شدن بوته‌ها به همدیگر با ایجاد محیط مرطوب، شرایط مساعدی را برای رشد و توسعه بیماری به وجود آورد. لازم به ذکر است که کم‌ترین بیماری نیز در فاصله ردیف ۳۰ سانتی‌متر و تراکم ۱۳۰۰۰۰ بوته مشاهده شد و از طرفی شدت بیماری در فاصله ردیف ۷۵ سانتی متر و تراکم ۱۷۵۰۰۰ بوته بیش‌تر بود. به طوری که با افزایش فاصله ردیف و در تراکم‌های بالای بوته شدت بیماری نیز روندی افزایشی داشت. فاصله ردیف ۳۰ سانتی‌متر و تراکم ۱۳۰۰۰۰ بوته در هکتار به دلیل داشتن بیش‌ترین عملکرد و کم‌ترین بیماری در این منطقه توصیه می‌شود.

منابع

۱. آقاجانی، م، ع.؛ رضی‌نتاج، م.؛ محمودی، ح. ۱۳۸۸. راهنمای شناسایی و مدیریت بیماری های باقلا. گرگان، انتشارات ارشاد. ص: ۸۷ .

۲. پارسا، م.، و باقری، ع. ۱۳۸۷. حبوبات. جهاد دانشگاهی مشهد. ۵۲۲ صفحه.

۳. فرجی، ا. و آقاجانی، م. ع. ۱۳۸۵. اثر فاصله ردیف، میزان بذر و ژنوتیپ بر وقوع بیماری پوسیدگی اسکلروتینیایی ساقه کانولا. خلاصه مقالات نهمین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران، دانشگاه تهران، پردیس ابوریحان. صفحه ۴۷۵.

4.Edossa, T. K., R. V. Cherukuri, A. Chavhan and I. Hamza. 2015. Effect of faba bean (*Vicia faba* L.) genotypes, plant densities and phosphous on productivity, nutrients uptake, soil fertility changes and economics in Central high lands o Ethiopia. Int. J. of Life Sciences, Vol. 3(4): 287-305.

5.Harrison, J.G., 1988. The biology of Botrytis spp. on Vicia beans and chocolate spot disease -a review. Plant Pathol. 37, 168–201.

6.Phipps, P.M. 1987. An evaluation of cultural and chemical practice for management of Sclerotinia blight of peanut in Virginia. Biological and cultural tests. Am . Phytopatol. Soc. St. Paul MN.

7.Samuel S., Chemeda. F, Sakhujaa, P.K., and Seid, A. 2008. Effect of mixed cropping and fungicides on chocolate spot (Botrytis fabae) of faba bean (*Vicia faba* L.) in Ethiopia. Crop Protection, 27: 275–282.

بررسی واکنش ژنوتیپ‌های مختلف جو نسبت به بیماری‌های مهم برگی در منطقه گنبد

عاطفه شکی*[1]، فاختک طلیعی[2]، رحمت اله محمدی گنبد[3]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد رشته بیماری شناسی گیاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان

۲- عضو هیأت علمی دانشگاه گنبد کاووس

۳- بخش تحقیقات علوم زراعی- باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی گرگان- ایران

نویسنده مسئول: ali.vatani782@gmail.com

چکیده

هدف این مطالعه، ارزیابی واکنش ژنوتیپ‌های مختلف جو با خصوصیات مورفولوژیک و زراعی متفاوت، نسبت به بیماری‌های لکه قهوه‌ای، لکه توری و سفیدک پودری در شرایط اقلیمی گنبدکاووس واقع در شمال شرق ایران می‌باشد. برای دست‌یابی به هدف مذکور، آزمایشی در سال زراعی ۹۴-۱۳۹۳ با استفاده از ۱۶ ژنوتیپ جو در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۴ تکرار در مزرعه تحقیقاتی ایستگاه کشاورزی گنبد اجرا شد. یادداشت‌برداری از مقدار بیماری در کرت‌های آزمایشی، در بهار ۱۳۹۴ با استفاده از مقیاس ۹ درجه‌ای (ساری و پرسکات، ۱۹۷۵)، در ۵ نوبت و در فواصل زمانی یک هفته‌ای انجام شد و میزان شدت متوسط بیماری ثبت گردید. سپس پارامترهای بیماری‌شناختی شامل AUDPC و FDS محاسبه شدند. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که تفاوت بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی از نظر هر دو شاخص بیماری‌شناختی مربوط به بیماری سفیدک‌پودری معنی‌دار (P<۰/۰۱) بود. اما در بیماری‌های لکه قهوه‌ای و لکه توری جو، ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، تنها از نظر صفت شدت نهایی بیماری، اختلاف معنی‌داری (به ترتیب در سطوح احتمال ۵ و یک درصد) مشاهده شد. مقایسه میانگین (LSD) داده‌ها نشان داد، بیشترین میزان شدت نهایی لکه قهوه‌ای در بین ژنوتیپ‌های مورد آزمایش به ژنوتیپ‌های شماره urbyt93-12 و urbyt93-13 و کمترین مقدار آن به ژنوتیپ urbyt93-3 تعلق داشت. همچنین در بیماری لکه‌توری بیشترین مقاومت شدت نهایی را ژنوتیپ urbyt93-10 به خود اختصاص داد. در مورد بیماری سفیدک‌پودری از نظر هر دو شاخص مورد بررسی، ژنوتیپ urbyt93-2 به عنوان مقاوم‌ترین و ژنوتیپ urbyt93-16 حساس‌ترین ژنوتیپ نسبت به بیماری معرفی گردید.

واژگان کلیدی: جو، لکه‌قهوه‌ای، لکه‌توری، سفیدک پودری، گنبد کاووس

مقدمه

جو با نام علمی *Hordeum vulgare* L. یکی از سازگارترین و ساده‌ترین زراعت‌ها در جهان، از جمله ایران است. از جمله عوامل مخرب موثر بر این محصول، بیماری‌های گیاهی هستند. بیماری‌های گیاهی و خسارت آن‌ها برای انسان از مسائل بسیار با اهمیتی بوده و نقش اساسی را در حیات بشر ایفا می‌نمایند. بیماری سفیدک سطحی در گیاه جو که توسط قارچ *Blumeria. graminis f. sp. hordei* به‌وجود می‌آید، یکی از بیماری‌های مهم غلات در نواحی مرطوب، نیمه مرطوب و نیمه خشک دنیا است. این بیماری از طریق کاهش فتوسنتز و افزایش تنفس و تعرق به گیاه صدمه می‌زند (۳) حداکثر کاهش محصول در اثر

بیماری سفیدک پودری در جو هنگامی است که بوته‌ها در مرحله‌ی گیاهچه‌ای آلوده شوند و گسترش بیماری تا گلدهی ادامه داشته باشد (۳). معمولا مدیریت بیماری سفیدک پودری جو با استفاده از ارقام مقاوم،تناوب زراعی،کشت با تاخیروکنترل شیمیایی صورت می‌گیرد(۸). لکه‌قهوه‌ای معمولی جو به‌وسیله قارچ *Bipolaris sorokiniana* به‌وجود می‌آید (۷). خسارت این بیماری در مناطقی که اقلیم گرم و مرطوب دارند مهم است و به ندرت در شرایط نیمه‌خشک مسئله‌ساز می‌شود. کاهش عملکرد ناشی از این بیماری ۱۶ تا ۳۳ درصد گزارش شده است (۶). معمولا مدیریت بیماری لکه قهوه‌ای معمولی جو با استفاده از بذر عاری از پاتوژن یا بذر تیمار شده،تناوب با گیاهان غیر حساس،استفاده از قاچ‌کش‌های سیستمیک و محافظتی و استفاده از ارقام مقاوم که دردر حال حاضر چند رقم زراعی مقاوم، از جمله مورکس در دسترس‌اند (۳).صورت می‌گیرد. بیماری لکه توری جو توسط قارچ *Pyrenophora teres*. f. sp. *teres*. (مرحله‌ی غیرجنسی *Drechslera teres* f. sp. *teres*) ایجاد می‌گردد. لکه توری جزء بیماری‌های شایع در نقاط کشت جو می‌باشد و در صورتی‌که میزان رطوبت و بارندگی بالا باشد، اهمیت می‌یابد. در صورت ابتلا جو به این بیماری هم میزان محصول دانه و هم وزن هزار دانه کاهش می‌یابد، در حالی که به نظر می‌رسد در تعداد دانه‌ها تغییر چندانی رخ نمی‌دهد. (۱). یکی از کارآمدترین روش‌های مدیریت بیماری‌ها استفاده از ارقام مقاوم می‌باشد که ضمن کاهش خسارت ناشی از بیماری‌ها، سبب کاهش مصرف سموم و مضرات آن‌ها می‌گردد. بنابراین لازم است مقاومت ژنوتیپ‌های جدید همواره مورد بررسی و ارزیابی قرار گیرد. هدف این مطالعه ارزیابی واکنش ژنوتیپ‌های مختلف جو نسبت به بیماری‌های برگی در شرایط دیم شهرستان گنبد می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در سال ۹۴-۱۳۹۳ به منظور بررسی واکنش ۱۶ ژنوتیپ جو نسبت به بیماری های قارچی برگی (لکه قهوه‌ای معمولی جو، لکه توری و سفیدک پودری به مدت یک سال زراعی در شرایط مزرعه‌ای در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی و در چهار تکرار در ایستگاه تحقیقات کشاورزی گنبد انجام شد. هر کرت آزمایشی در ۶ خط ۶/۶۶ متری به فاصله خطوط ۲۰ سانتی متر بر اساس میزان تراکم بذر ۲۷۰ دانه در متر مربع با توجه به وزن هزار دانه کشت گردید. آلودگی از طریق کشت ارقام حساس در حاشیه مزرعه و مابین ژنوتیپ‌های کشت شده صورت گرفت. یادداشت‌برداری از عکس‌العمل ژنوتیپ‌های مورد آزمایش در ۵ نوبت و همزمان با شیوع بیماری با استفاده از مقیاس ۹۹-۰۰ ساری و پرسکات انجام گرفت (۹). سپس مساحت زیر منحنی پیشرفت بیماری (AUDPC) محاسبه می‌گردد. داده‌های آزمایش با استفاده از نرم افزار SAS 9.3 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مقایسات میانگین وگروه‌بندی تیمارها بر اساس صفات مورد مطالعه با استفاده از آزمون LSD انجام شد.

جدول ۱- رگه (لاین) های امیدبخش جو دیم از آزمایشات یکنواخت سراسری (۹۶-۹۳)

نام	شجره
Mahoor	Mahoor as check
Khorram	Khorram as check
urbyt93-3	Vixen/Pamir-147- ICBH95-0686-OAP-OAP-9AP-OAP
urbyt93-4	RD2668
urbyt93-5	Moroc9-75
urbyt93-6	Harmal02/ArabiAbiad*2/4/Soufara02/3/RM1508/Por//WI2269 -ICB91-0343-OAP-OAP-OAP-91AP-OAP
urbyt93-7	Moroc9-75/WI2291/CI01387/3/ER/Apm//Akrash -ICB01-0182-0AP-07AP-0AP
urbyt93-8	SHENMAINO.3/EX70246/3/MERIT,B//CANELA/ZHEDAR#2 -CBSS04M00265T-0M-0Y-0M-0Y-2M-0AP
urbyt93-9	LENT/LACEY - CBSS04M00117S-0M-0Y-0M-0Y-1M-0AP
urbyt93-10	CANELA/CI4196 -CBSS04M00006S-7M-1Y-2M-0Y-5M-0AP
urbyt93-11	CANELA/CI4196-CBSS04M00006S-7M-1Y-1M-0Y-2M-0AP
urbyt93-12	CANELA/CI4196 -CBSS04M00006S-7M-1Y-1M-0Y-3M-0AP
urbyt93-13	CANELA/CI4196 -CBSS04M00006S-7M-1Y-2M-0Y-4M-0AP
urbyt93-14	H.spont.41-1/WI3257 -ICB02-1070-0AP-13AP-0AP
urbyt93-15	Rihane03/3/As46/Aths*2//Aths/Lignee686/6/M6476/Ben//Jo/York/3/M5/Galt//As46/4/Hj3480/Astrix/5/M6/Robur-35-6-3 ICB05-0420-0AP-OG-OG-OG-OG-OG
urbyt93-16	Rihane03/3/As46/Aths*2//Aths/Lignee686/4/Alanda - ICB05-0426-0AP-OG-OG-OG-OG-OG

نتایج وبحث

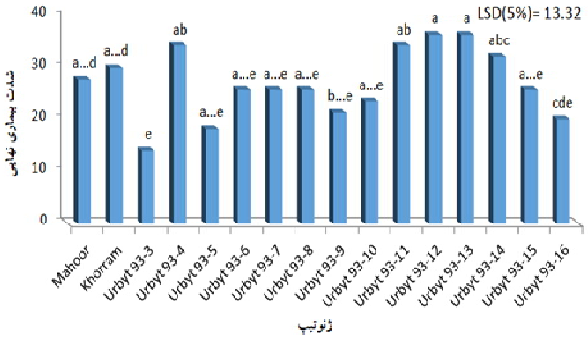
نتایج حاصل از تجزیه‌ی واریانس داده‌های شدت نهایی بیماری لکه قهوه‌ای، (جدول ۲) نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری بین ۱۶ ژنوتیپ جدید کاشته شده و مورد آزمایش، برای آخرین نوبت اندازه‌گیری (در مجموع ۵ نوبت) در سطح احتمال ($p<0.05$) وجود دارد. از بررسی میزان سطح زیرمنحنی پیشرفت AUDPC بیماری لکه قهوه‌ای بر روی درصد آلودگی تیمارها در بیماری مورد نظر اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید.

جدول ۲- تجزیه واریانس صفات مربوط به بیماری های برگی جو مورد ارزیابی

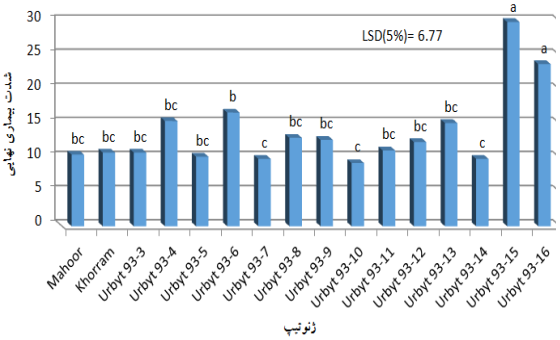
		میانگین مربعات					
		لکه قهوه‌ای		**لکه توری**		**سفیدک پودری**	
منابع تغییر	درجه آزادی	AUDPC	FDS	AUDPC	FDS	AUDPC	FDS
بلوک	۳	۳۹۹۲۸/۰۸۴۷	۱۶۹/۰۱۴۸	۹۲۴۰/۹۴۵۶	۱۲/۱۵۳۶	۱۱۱۶۶۰/۳۵۶	۱۷۹/۶۵۴۳
تیمار	۱۵	۱۵۷۳۸/۹۵۵۸^{ns}	۱۷۸/۱۳۴۳*	۸۳۷۲/۵۹۱۵^{ns}	۱۲۷/۲۲۷۵**	۱۰۸۸۷۸/۲۳۱**	۱۲۶/۰۷۹۰**
خطا	۴۵	۱۳۴۵۵/۱۸۹۴	۸۷/۴۸۹۳	۴۷۸۴/۴۰۱۰	۲۲/۵۶۸۶	۹۸۷۶/۳۸۰۰	۲۲/۷۸۷۶
C.V		۲۱/۵۴	۳۴/۳۶	۲۳/۸۴	۳۴/۳۴	۲۲/۴۷	۳۱/۱۲

نتایج حاصل از تجزیه‌ی واریانس داده‌های شدت نهایی بیماری لکه توری نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری بین ۱۶ ژنوتیپ مورد آزمایش، برای آخرین نوبت اندازه‌گیری در سطح احتمال ($p<0.01$) وجود دارد. اما از نظر میزان سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری (AUDPC) لکه توری بر روی درصد آلودگی بیماری‌ها در بیماری مورد نظر اختلاف معنی‌دار مشاهده نگردید. همچنین نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مربوط به بیماری سفیدک‌پودری، (جدول ۱) نشان می‌دهد، که از نظر هر دو صفت شدت نهایی بیماری و سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد بین زنوتیپ‌ها وجود دارد.

بنابراین با توجه به معنی‌دار شدن این شاخصه‌ها مقایسه میانگین بین داده‌های بدست آمده جهت تعیین و معرفی بهترین ژنوتیپ جو با کمترین شدت بیماری صورت گرفت. با توجه به نتایج مقایسه میانگین داده‌ها مشخص شد که از نظر مقدار بیماری لکه قهوه‌ای بر اساس شدت نهایی بیماری در ۷ گروه آماری قرار گرفتند. بیشترین درصد شدت نهایی بیماری در بین ژنوتیپ‌های مورد آزمایش به ژنوتیپ‌های شماره (urbyt93-13) و (urbyt93-12) با شدت نهایی برابر با ۳۶/۷۳ ٪ تعلق داشت که هردو در یک گروه آماری قرار گرفتند. کمترین درصد شدت نهایی بیماری لکه قهوه‌ای جو در بین ژنوتیپ‌های مورد آزمایش، به شماره (urbyt93-3) با شدت نهایی برابر با ۱۴/۲۰ تعلق داشت. در بین زنوتیپ‌های مورد آزمایش در این صفات بیماری‌شناختی، ژنوتیپ شماره (urbyt93-12) با بیشترین مقدار سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری به عنوان حساس‌ترین ژنوتیپ و ژنوتیپ شماره (urbyt93-3) با کمترین مقدار سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری به عنوان مقاوم‌ترین ژنوتیپ شناخته شدند که با نتایج به دست آمده از شدت نهایی بیماری منطبق بود. قزوینی (۲۰۱۷) به منظور شناسایی منابع مقاومت به بیماری لکه قهوه‌ای جو در TR251، ۲۲۶ لاین دابل‌هاپلوئید به دست آمده از تلاقی TR251*CDC را با استفاده از مارکرهای ملکولی مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که مقاومت قابل ملاحظه‌ای بین لاین‌ها از نظر واکنش به بیماری وجود ندارد. بنابراین احتمالا مقاومت به وسیله‌ی بیش از یک یا دو ژن کنترل می‌گردد.



شکل ۱- مقایسه میانگین شدت نهایی بیماری لکه‌قهوه‌ای در ژنوتیپ‌های مختلف جو

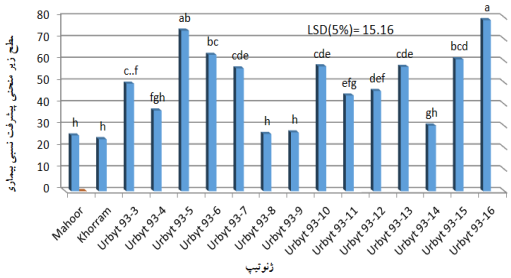


شکل ۲- مقایسه میانگین شدت نهایی بیماری لکه توری در ژنوتیپ‌های مختلف جو

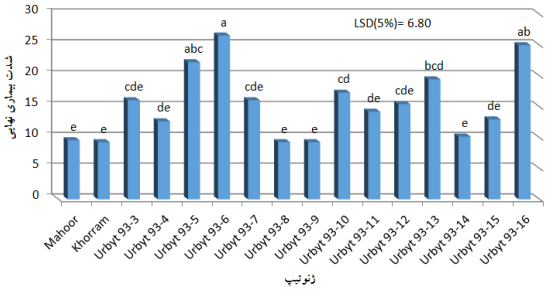
با توجه به نتایج مقایسه میانگین داده‌ها مشخص شد که ژنوتیپ‌هادر بیماری لکه توری از نظر شدت نهایی بیماری در ۴ گروه آماری قرار گرفتند. بیشترین درصد شدت نهایی بیماری در بین ژنوتپ‌های مورد آزمایش به ژنوتیپ شماره (urbyt93-15) با شدت نهایی برابر با ۲۹/۹۴ ٪ تعلق داشت .کمترین درصد شدت نهایی بیماری لکه توری جو در بین ژنوتیپ‌های مورد آزمایش، به شماره (urbyt93-10) با شدت نهایی برابر با ۹/۲۶ تعلق داشت. همچنین مقایسه میانگین تیمارها نشان داد که تنوع در گروه‌بندی بیماری لکه توری در مقدار سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری AUDPC پایین و همه‌ی ژنوتیپ‌ها در یک گروه آماری قرار گرفتند. در بین زنوتیپ‌های مورد آزمایش در این صفت ژنوتیپ شماره (urbyt93-15) با بیشترین مقدار سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری به عنوان حساس ترین ژنوتیپ و ژنوتیپ شماره (urbyt93-10) با کمترین مقدار سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری به عنوان مقاوم ترین ژنوتیپ شناخته شد. دویسی و همکاران (۱۹۹۸) با هدف مطالعه‌ی واکنش ژنوتیپ‌های مختلف به بیماری لکه توری جو ۱۵ جدایه قارچ عامل بیماری را روی ۳۸ لاین جو در مراحل گیاهچه‌ای و بلوغ در شرایط گلخانه و مزرعه مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که هیچ یک از لاین‌های مورد بررسی نسبت به جدایه‌های عامل بیماری مقاوم نبودند.

بر اساس نتایج مقایسه میانگین تیمارها مشخص شد که ژنوتیپ‌ها از نظر شدت نهایی بیماری سفیدک پودری در ۸ گروه آماری قرار گرفتند. بیشترین شدت نهایی بیماری در بین ژنوتیپ‌های مورد آزمایش، به ژنوتیپ شماره (urbyt93-6) با شدت نهایی بیماری برابر با ۲۶/۵۴ تعلق داشت. کمترین شدت نهایی بیماری سفیدک پودری در بین ژنوتیپ‌های مورد آزمایش به شماره‌های (urbyt93-1) و (urbyt93-2) و (urbyt93-8) و (urbyt93-9) با شدت نهایی ۹/۲۶ تا ۹/۵۷ تعلق داشت و همه در یک گروه آماری (e) قرار گرفتند. حساسیت بالای این رقم را می‌توان بر اساس نتایج سایر محققان روی گندم، بر اساس ارتفاع بالاتر این ژنوتیپ نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها چنین توجیه نمود که هر چه ارتفاع گیاه بلندتر باشد، میزان تحمل به خوابیدگی کمتر و حساسیت آن به بیماری سفیدک پودری بیشتر است(۵).

با وجود کاهش عملکرد و خسارت بیماری‌های مختلف جو، اجرای برنامه‌های جامع و هدفمند در زمینه شناسایی منابع مقاومت و یا تولید ارقام مقاوم ضروری است و اجرای این تحقیق، گام مهمی در این جهت بوده است و سبب به کارگیری ارقام مقاوم، افزایش عملکرد و حفظ و پایداری محصول در مناطق آلوده خواهد شد.



شکل ۳- مقایسه میانگین سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری سفیدک پودری در ژنوتیپ‌های مختلف جو



شکل ۴- مقایسه میانگین شدت نهایی بیماری سفیدک پودری در ژنوتیپ‌های مختلف جو

منابع:

1. Brahim E. Y. and Brahim E. 2002. Net blotch in semi-arid regions of Morocco II. Yield and Yield-loss modeling.Field Crops Research. 73: 81-93.
2. Douiyssi, A., Rasmusson, D.C., and Roelfs,A.P. 1998. Responses of barley cultivars and lines to isolates of pyrenophora teres.plant Disese 82:316-321.
3. .Emami, K., and Hasanzadeh, J. 1994. *Barley diseases guide*. University Publication Center, Tehran. (In Farsi).
4. .Ghazvini, H. 2017.Ideatiti cation by selective genotyping of quantitative traite loci conterring resistance to cochlibolus satives in barley line TR 251.Crop Breeding gournal 4(1):35-45.
5. Grausgruber, H., Oberforster, M., Ghambashidze, Gand Rckenbauer., P. 2005. Yield and agronomic traits of khorasan whewt(Triticum tuanicum jakubz).fied crops 91:319-327.
6. Iftikhar, SH., Asad, SH., Rattu, A. U., Fayyaz, M., and Munir, A. 2009. Selection of barley germplasm resistant to spot blotch. Pak. J. Bot., 41 (1): 309-314.
7. .Mathre, D. E. 1985. Compendium of Barley Diseases. A. P. S. 78pp
8. Gullino, M. L., and Kuijpers, L. A. M. 1994. Social and political implications of managing plant diseases with restricted fungicides in Europe. *Annual Review of Phytopathology*, 32, 559-579.
9. Sarri, E. E. and Prescot, J. M. 1975. A scale for appraising the foliar intensity of wheat diseases. Plant Dis. Rep. 59:377-380

شناسایی باکتری‌های اپی‌فیت بلوط در استان کرمانشاه با تاکید بر باکتری‌های بیماری‌زا

حسنا الوندی[۱] و علیرضا معرفت[۲*]

۱- *دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی کرمانشاه*
۲- *دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه رازی، کرمانشاه*
* *نویسنده مسئول: marefat@ razi.ac.ir*

چکیده

ضعف و خشکیدگی درختان بلوط در چند سال اخیر در مناطق شمال و شمال غرب کشور از اهمیت خاصی برخوردار است. عوامل مختلفی به عنوان عوامل موثر در این عارضه مطرح شده است که نقش هیچ یک از آن‌ها به طور صدر در صد مشخص نشده است. هدف از این تحقیق جداسازی و شناسایی باکتری‌ها و بررسی نقش آن‌ها در این عارضه بوده است. بدین منظور از پنج شهرستان استان کرمانشاه طی سال‌های ۹۳، ۹۴ و ۹۵ از قسمت‌های هوایی درختان سالم و دارای علایم خشکیدگی نمونه‌برداری شده است. برای شناسایی باکتری‌های جدا شده، آزمون‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مختلف و آزمون بیماری‌زایی و همچنین تعیین توالی قطعه 16S rRNA با دو آغازگر 27F و 1592R انجام شد. براساس نتایج باکتری‌های اپی‌فیت بلوط در دو گروه بیماری‌زا و غیر بیماری‌زا قرار گرفتند. گروه یک که شامل باکتری‌های بیماری‌زا می‌باشند که به جنس‌های *Xanthomonas* و *Pseudomonas* بیشترین شباهت را داشتند. دو جدایه g1 و Ae2.3 به عنوان نماینده از گروه اول برای بررسی مولکولی و همچنین آزمون اثبات بیماری‌زایی انتخاب شدند اما همین دو جدایه در ظهور علایم خصوصیات متفاوتی را نشان دادند. براساس بررسی مولکولی جدایه g1 شبیه، *Xanthomonas spp.* و جدایه Ae2.3 به یک گروه ناشناخته از *Xanthomonas* ها شباهت داشت. در بررسی اثر آنتاگونیستی بین دو جدایه شناسایی شده و باکتری‌هایی با ویژگی‌های مشابه *Pseudomonas fluorescens* این باکتری‌ها بطور قابل توجهی از رشد جدایه g1 جلوگیری کرده اما روی رشد جدایه Ae2.3 اثری نگذاشته بودند. همچنین از آنجایی‌که در منابع *Xylella* شد به عنوان یک عامل بیماری‌زا مهم شناخته شده نمونه‌برداری با هدف ردیابی این باکتری در پاییز ۹۵ انجام شد سپس از پرایمر و محیط کشت اختصاصی برای شناسایی باکتری‌های جداسازی شده استفاده شد که حضور این باکتری محرز نگردید.

واژگان‌کلیدی: بلوط، توالی16SrRNA، *Xanthomonas*، *Pseudomonas*، *Xylell*

مقدمه

بلوط(Quercus) درختی بزرگ از خانواده Fagaceae می‌باشد (۱و ۳). در ایران بلوط مهم‌ترین و فراوان‌ترین گونه‌ی درختی موجود در غرب کشور، به ویژه در منطقه زاگرس است (۹). این درختان دارای مزایای زیست محیطی مانند مبارزه با فرسایش و حفظ و تولید خاک، تأثیر در تعدیل آب و هوای یک منطقه، نقش اقتصادی جنگل، جلوگیری از رانش زمین، جذب گرد و غبار، تولید اکسیژن و تقلیل درجه حرارت می‌باشند (۴). بروز خشکسالی‌های مستمر طی دو دهه اخیر ناشی از تغییر اقلیم و افزایش شدت گرما، افزایش تنش‌های محیطی همچون پدیده ریز گردها، تخریب مستمر عرصه‌های طبیعی بوسیله

انسان و دام و ضعف فیزیولوژیک درختان بلوط شرایط را برای بروز و طغیان گروه‌های خاصی از آفات و بیماری‌های فرصت طلب مهیا کرده و نتیجه آن بروز پدیده‌ها و بیماری نوظهور در عرصه‌های جنگلی است، که خشکیدگی و زوال بلوط در جنگل‌های غرب و شمال کشور طی سه سال اخیر یکی از پیامدهای آن می‌باشد(۲). هرچند عامل اصلی خشکیدگی بلوط شناخته نشده است و احتمالا مخلوطی از عوامل زنده و غیر زنده دخیل می‌باشند، عوامل بیماری‌زا اعم از باکتری‌ها و قارچ‌های مختلفی ذکر شده اما تاکنون تحقیق جامعی در زمینه شناسایی باکتری‌های بلوط در ایران صورت نگرفته است ولی باکتری‌هایی همچون *Xylella fastidiosa* و *Brenneria quercina* از کشورهای ژاپن، آمریکا و اسپانیا از روی درختان بلوط گزارش شده‌اند. بسیاری از باکتری‌های بیماری‌زا قبل از ورود به فاز بیمارگری می‌توانند بصورت اپی‌فیت درسطح گیاه به سر ببرند، همچنین گروهی از باکتری‌های اپی‌فیت می‌توانند نقش عمده‌ای در کنترل زیستی عوامل بیماریزای گیاهی مختلف اعم از قارچ‌ها و باکتری‌ها داشته باشند. طی سالهای گذشته گزارش‌های متعددی از زوال و مرگ تعداد زیادی از درختان جنگلی و خسارت بالای آن در غرب کشور واصل شده است. بیماری به سرعت در جنگل‌های رشته کوه زاگرس انتشار یافته است. در طی سال‌های ۲۰۱۲-۲۰۰۹ چندین گزارش در مورد خسارت شدید و مرگ درختان بلوط منتشر شد که بیان می‌کند بیماری زوال درختان بلوط در جنگل‌های زاگرس در حال گسترش است (۵).

ایشارا و همکاران (۱۱) یک بیماری باکتریایی روی *Quercus myrsinifolia* در منطقه Kyshu در ژاپن گزارش کرده اند که علایم اصلی آن شامل ریختن و سوختگی شاخه‌ها می‌باشد که با نواحی نکروتیک سیاه شروع می‌شوند. سال‌هاست حضور *Xylella fastidiosa* در جنگل‌های فلوریدا به ثبت رسیده است. اخیرا نیز این بیمارگر همراه با زوال درختان بلوط در جنوب فلوریدا گزارش شده است. در سال‌های ۱۹۹۲ و ۱۹۹۳ E. L. Barnard و همکاران بیش از ۲۰۰ درخت بلوط را برای حضور *X.fastidiosa*مورد بررسی قرار داده‌اند (۶). همچنین *Brenneria quercina*به عنوان عامل ریزش میوه بلوط در دو گونه *Q.wislizenii* و *Q.agrifolia* در کوه‌های مرکزی و شمالی کالیفرنیا شناسایی شده است (۱۰). به نظر می‌رسید این باکتری تنها متعلق به این گونه‌های بلوط در کالیفرنیا می‌باشد تا زمانیکه از روی *Q.pyreaica* و *Q.ilex* در اسپانیا به عنوان عامل شانکر پوست گزارش شد (۱۶ و۷). شیوع بیماری زوال درختان بلوط در جنگل‌های ایلام و لرستان در سال ۱۳۸۷ توسط کارشناسان محلی گزارش شد، و از آن زمان تاکنون عامل بیماری مشخص نشده است. درسال۱۳۸۸ نیز گزارش‌های جدیدی از زوال درختان بلند مازو در گرگان به ویژه درپارک جنگلی قرق واصل گردید. طی سالهای گذشته گزارش‌های متعددی از زوال و مرگ تعداد زیادی از درختان جنگلی و خسارت بالای آن در غرب کشور واصل شده است. بیماری به سرعت در جنگل‌های رشته کوه زاگرس انتشار یافته است. نشانه‌های بیماری به صورت زوال و مرگ درختان، قهوه‌ای شدن و خزان بی‌هنگام، تراوش صمغ سفید در محل شروع آلودگی روی شاخه‌ها و خروج حجم زیادی صمغ تیره از تنه درختان مسن، قهوه‌ای شدن نسوج چوب و دسته‌های آوند چوبی در سرتاسر ارتفاع تنه به سمت بالا و پایین درخت که نشان دهنده آلودگی نسوج می‌باشد، دیده شد (۱۴).

مواد و روش‌ها

در پاییز و بهار سال‌های۹۳ و ۹۴ و ۹۵ همزمان با باز شدن جوانه‌های درختان بلوط، از پنج شهرستان کرمانشاه، اسلام‌آبادغرب، سرپل ذهاب، گیلان‌غرب و ماهیدشت از درختان بلوط آلوده و درختان سالم نمونه‌هایی جمع‌آوری شد. نمونه‌ها از قسمت شاخه‌ها، برگ‌ها و پوست تنه که دارای علایم خشکیدگی شامل شانکر، قهوه‌ای شدن و خزان بی‌هنگام، تراوش صمغ سفید در محل آلودگی روی شاخه‌ها و خروج حجم زیادی صمغ تیره از تنه درختان مسن به صورت تصادفی برداشته شد. نمونه‌ها در کیسه‌های پلاستیکی داخل جعبه پر از یخ قرار داده شد و پس از درج مشخصات شامل زمان و مکان نمونه برداری به آزمایشگاه بیماری‌شناسی گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه رازی منتقل و تا زمان جداسازی باکتری‌ها، در یخچال نگهداری شدند. از حد فاصل قسمت آلوده و سالم قطعاتی تهیه و در چند میلی لیتر آب مقطر سترون خرد شد. پس از ۱۵-۱۰ دقیقه، یک یا دو لوپ از سوسپانسیون روی محیط کشت آگار غذایی [nutrient agar(Na)] به روش خطی کشت داده شد. پس از ۴۸ ساعت

در دمای ۲۵ °C تک کلون‌هایی با رنگ‌های مختلف ظاهر شد که روی محیط NA به صورت لکه‌ای کشت داده شدند. آزمون‌های تعیین نوع گرم، آزمون فوق حساسیت روی شمعدانی (HR) آزمون پوسیدگی نرم در قطعات سیب‌زمینیی، آزمون اکسیداز، آزمون هیدرولیز نشاسته، بررسی مورفولوژی جدایه‌ها روی محیط کشت Yeast Extract Dextrose calcium carbonat(YDC)، آزمون لوان، آزمون تجزیه بی‌هوازی گلوکز، آزمون کاتالاز، آزمون اثرروی شیر لیتموس،آزمون تحمل نمک طعام، آزمون ذوب ژلاتین، آزمون لیستیناز، رشد در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، کشت روی محیط حاوی توین ۸۰، آزمون مصرف منبع کربن و آزمون King B با روش‌های ذکر شده توسط شاد و همکاران (۱۵) انجام گردید. برای انجام آزمون بیماری‌زایی و اصول کخ، ۳ نهال ۲ ساله بلوط (گونه *Qurecus brantii*) از اداره منابع طبیعی استان ایلام اخذ شد و درون گلدان‌های بزرگ تحت دما، نور و رطوبت طبیعی و در شرایط گلخانه‌ای نگهداری گردید. این دو جدایه به دو روش به این نهال‌ها تلقیح شد: در روش اول با استفاده از سوسپانسیون رقیقی از آن‌ها و تزریق آن‌ها به برگ و شاخه نهال‌ها، در روش دوم با استفاده از پودر کاربراندوم در سطوح برگ و شاخه خراش‌هایی ایجاد کرده و سوسپانسیون را روی خراش‌ها قرار داده شد. تلقیح باکتری‌ها دو بار و به فاصله یک ماه در شرایط گلخانه‌ای انجام گرفت. بعد از شش ماه علایم خشکیدگی، تغییر رنگ آوندهای و ریختن نا به هنگام برگ‌ها روی نهال‌ها مشاهده شد. همچنین در روشی دیگر، برگ‌هایی از سرشاخه‌های سالم درختان در پتری دیش حاوی آب مقطر استریل و کاغذ صافی قرار داده شد و با اسکالپل خراش‌هایی رو قسمت‌های مختلف برگ ایجاد کرده و سوسپانسیون باکتری‌ها روی آن قرار داده شد. از قسمت‌های دارای علایم باکتری مورد نظر مجددا جداسازی و با باکتری اولیه مقایسه گردید و آزمون‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی کلیدی روی آن‌ها انجام شد.

برای شناسایی دقیق‌تر باکتری‌ها چون در خصوصیات بیوشیمایی با باکتری‌های شناخته شده تطابق کمتری داشته تعیین توالیی16SrRNA با دو آغازگر Bac27F (5-AGAGTTTGGATCMTGGCTCAG-3) و Univ 1429 (5-CGGTTACCTTGTTACGACTT-3) انجام شد. حجم نهایی واکنش ۲۵ µl حاوی ۱ µl از هر آغازگر، ۱۲/۵ µl از مستر میکس (۲Xسینا ژن)، ۷/۵ µl آب مقطر استریل و ۳ µl نمونه بود. PCR در دستگاه ترموسایکلر PC320 (Japon) با برنامه شامل ۵ دقیقه ۹۵ °C سانتی‌گراد (مرحله واسرشت‌سازی اولیه)، ۳۵ سیکل از ۳۰ ثانیه ۹۴°C (مرحله واسرشت‌سازی)، ۳۰ ثانیه ۵۵ °C (مرحله اتصال) و ۲ دقیقه ۷۲ °C (مرحله طویل شدن) و نهایت ۷ دقیقه ۷۲ °C (مرحله طویل شدن نهایی) انجام شد. شش میکرولیتر از محصول PCR روی ژل آگارز ۱/۵ ٪ داخل بافر TBE، بارگذاری شد. سپس ژل آگارز با جریان ۸۵ ولت الکتروفروز شد(Jiang et al., 2006). رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید ۱٪ به مدت ۱۵ دقیقه و آشکار سازی تحت نورر UV صورت گرفت. از آنجاییکه در منابع *Xylella* شد به عنوان یک عامل بیماری‌زا مهم شناخته شده نمونه‌برداری با هدف ردیابی این باکتری در پاییز ۹۵ از شهرستان کرمانشاه انجام شد سپس از آغازگرهای (CAGCACATTGGTAGTAATAC) XF-1 و (ACTAGGTATTAACCAATTGC) XF-6 برای تکثیر ناحیه16S rDNA استفاده شد. حجم نهایی واکنش ۲۵ µl حاوی ۱ µl از هر آغازگر، ۱۲/۵ µl از مستر میکس (سینا ژن)، ۷/۵ µl آب مقطر استریل و ۳ µl نمونه بود. PCR در دستگاه ترموسایکلر PC320 (Japon) با برنامه شامل ۵ دقیقه ۹۵ °C سانتی‌گراد (مرحله واسرشت‌سازی اولیه)، ۳۵ سیکل از ۳۰ ثانیه ۹۴°C (مرحله واسرشت‌سازی) و ۳۰ ثانیه ۵۰ °C (مرحله اتصال) و ۴۰ ثانیه ۷۲ °C (مرحله طویل شدن) و نهایت ۷ دقیقه ۷۲ °C (مرحله طویل شدن نهایی) انجام شد. تهیه ژل و رنگ آمیزی مانند مورد قبل انجام شد (۸ و ۱۳). همچنین محیط کشت اختصاصی PW برای شناسایی باکتری‌های جداسازی شده تهیه شد (۱۵).

نتایج و بحث

طی چند سال اخیر، عارضه زوال و خشکیدگی درختان بلوط در غرب کشور به عنوان یک فاجعه زیست محیطی مطرح شده است. عوامل زنده وغیر زنده متنوعی در کشورهای مختلف به عنوان عامل اصلی و یا عوامل موثر در ضعف، خشکیدگی و مرگ درختان بلوط شناسایی و معرفی شده اند، اما در ایران هنوز تحقیقی منسجم در این مورد انجام نشده است به طوری که هنوز عامل و یا عوامل اصلی خشکیدگی درختان بلوط در حوزه زاگرس به طور دقیق معلوم نشده‌اند.

هدف از این تحقیق بررسی نقش باکتری‌ها در این عارضه و همچنین از آنجایی که تا کنون شناسایی در مورد باکتری‌های بلوط انجام نشده است، جداسازی و شناسایی باکتری‌ها مدنظر بوده است. بدین منظور از پنج شهرستان‌کرمانشاه طی سال‌های ۹۳، ۹۴ و ۹۵ از قسمت‌های هوایی درختان سالم و دارای علایم خشکیدگی نمونه‌برداری شده است. برای شناسایی باکتری‌های جدا شده، آزمون‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مختلف و آزمون بیماری‌زایی انجام شد. بیماری‌زایی جدایه‌ها در نهال‌های بلوط گونه *Quercus brantii* که بیشترین کشت را در این مناطق دارد، در گلدان در شرایط گلخانه‌ای مورد بررسی قرارگرفت. نتایج این آزمون‌ها نشان داد که باکتری جدا شده از نهال همان جدایه تلقیح شده است.

براساس نتایج آزمون‌های انجام گرفته باکتری‌های اپی‌فیت بلوط در دو گروه بیماری‌زا و غیر بیماری‌زا قرار گرفتند. دو جدایه g_1 و $Ae_{2.3}$ به عنوان نماینده از گروه اول برای بررسی مولکولی و همچنین آزمون اثبات بیماری‌زایی انتخاب شدند اما همین دو جدایه در ظهور علایم خصوصیات متفاوتی را نشان دادند. جدایه g_1 علایم لکه برگی روی برگ‌های سرشاخه‌های سالم که در شرایط ازمایشگاهی در پتری همراه با آب مقطر نگه‌داری شدند و جدایه $Ae_{2.3}$ علایم خشکیدگی و نکروز آوندی روی نهال‌ها، نشان دادند. براساس بررسی مولکولی جدایه g1 شبیه، *Xanthomonas spp.* می‌باشد و جدایه Ae2.3 با هیچ یک از باکتری‌های شناخته شده مطابقت نداشت که احتمالا به یک گروه ناشناخته از *Xanthomonas* تعلق دارد. همچنین تعدادی از باکتری‌های گروه اول در آزمون‌ها به عنوان باکتری‌هایی با پتانسیل بیماری‌زایی شناسایی شدند، باکتری‌های این گروه از نظر خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مختلف بوده و به باکتری‌های شناخته شده شبیه نبودند لذا برای شناسایی تکمیلی در کلکسیون قرار گرفتند. گروه دوم از باکتری‌های جداسازی شده باکتری‌هایی بودند که در هیچ یک از آزمون‌ها اعم از HR و Soft rot و بیماری‌زایی روی نهال بلوط پتانسیل بیماری‌زایی نداشتند. این گروه به دلیل توانایی رشد زیاد و پراکندگی در اکثر مناطق برای بررسی‌های بیشتر از جمله امکان استفاده از آنها در کنترل بیولوژیک باکتری‌های بیماری‌زا نگه‌داری شدند.

در بررسی اثر آنتاگونیستی بین دو جدایه شناسایی شده و باکتری‌هایی با ویژگی‌های مشابه *Pseudomonas fluorescens* این باکتری‌ها بطور قابل توجهی از رشد جدایه g1 جلوگیری کرده اما روی رشد جدایه Ae2.3 اثری نگذاشته بودند. یافتن باکتری‌های بیماری‌زایی که متعلق به گروه‌های مختلف اعم از *Xanthomonas* و شبه *Pseudomonas* و همچنین باکتری‌هایی با پتانسیل استفاده در کنترل بیولوژیک باکتری‌های بیماری‌زا نیازمند بررسی‌های بیشتر در این بخش می‌باشد. هرچند در این مطالعه در نمونه‌های بررسی شده با پرایمر اختصاصی *Xylella* حتی محیط کشت اختصاصی حضور *Xylella* محرز نگردید اما توصیه می‌شود نمونه‌های بیشتری از مناطق مختلف مورد آزمون قرار بگیرد.

منابع

۱. ثابتی، ح. ۱۳۸۷. جنگل‌ها، درختان و درختچه‌های ایران. چاپ پنجم، دانشگاه یزد، صفحه ۵۷۳.

۲. توکلی، م.، پیروزی، ف.۱۳۹۰. همایش ملی جنگل‌های زاگرس مرکزی بررسی مقدماتی علل خشکیدگی بلوط در جنگل‌های منطقه بلوران کوهدشت.

۳. صداقت حور، ش. ۱۳۹۰. گیاهشناسی(سیستماتیک)، موسسه فرهنگی دیباگران تهران، چاپ اول. صفحه۸۰.

۴. طباطبایی، م و قصریانی، ف. ۱۳۷۱. منابع طبیعی کردستان (جنگلها و مراتع). انتشارات بخش فرهنگی دفتر مرکزی جهاد دانشگاهی. ۷۶۷ صفحه

5. Ahmadi., R., Kiadaliri.,H, Mataji.,A, Kafaki.,S. 2014. Annual ring analysis of Persian oak *(Quercus Brantii*) to determine periods of stress and tensions on Zagros Forests. Journal of Biodiversity and Environmental Sciences (JBES), 5: 378-384.
6. Barnard, E., E. C. Ash, D. L. Hopkins;R. J. McGovern. 1998. *Distribution of Xylella fastidiosa i*n oaks in Florida and its association with growth decline in *Quercus laevis.* Plant Disease, 82: 569-572.
7. Biosca E. G., Gonzalez, R. and Lopez, M. J. 2003. Isolation and characterization of *Brenneria quercina,* causal agent for bark canker and drippy nut of *Quercus* spp. in Spain. Phytopathology, 93: 485-492.
8. Cariddi, C., et al. (2014). "Isolation of a Xylella fastidiosa strain infecting olive and oleander in Apulia, Italy." Journal of Plant Pathology 96(2): 425-429.
9. Fatahi, M. 1994. Zagros Oak Forests and the Most Important Degradation Factors. Research Institute of Forests and Rangelands Publicate. Tehran, 324.

10 Hildebrand, D. C. and M. Schroth (1967). "A new species of Erwinia causing the drippy nut disease of Live Oaks." Phytopathology 57(3): 250-253.
11. Ishihara, M., Y. Takikawa, M. Akiba and Y. Kawabe., 2015. A new bacterial disease observed on *Quercus myrsinifolia.* Forest Pathology, 45: 459-466.
12. Jiang, H., et al. (2006). "Microbial diversity in water and sediment of Lake Chaka, an athalassohaline lake in northwestern China." Applied and Environmental Microbiology 72(6): 3832-3845.
13. Loconsole, G., et al. (2014). "Detection of Xylella fastidiosa in olive trees by molecular and serological methods." Journal of Plant Pathology 96(1): 7-14.
14. Mirabolfathy, M. 2013 Outbreak of charcoal disease on *Ouercus*,*spp* and *Zelkova carpinifolia* trees in forests of Zagros and Alborz mountains Iran. Plant Disease, 95: 876 .
15. Schaad, N. W., jones. J. B. and Chun, W., eds. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. American Phytopathological Society. Saint Paul, Minnesota, 396.
16. Soria, S., Lopez, M. M. and Lopez, M. J. 1997. Presencia, sintomatologia y danos de *Erwinia quercina* en Espana y su posible relacion con la 'seca de la encina'. *Ecologia* 11, 295-301.

بررسی روابط عملکرد و برخی صفات زراعی ژنوتیپ‌های مختلف جو تحت تنش بیماری

عاطفه شکی*[۱]، فاختک طلیعی[۲]، رحمت اله محمدی[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد رشته بیماری شناسی دانشگاه آزاد اسلامی گرگان

۲- عضو هیأت علمی دانشگاه گنبد کاووس

۳- بخش تحقیقات علوم زراعی- باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی گرگان- ایران

نویسنده مسئول: ali.vatani782@gmail.com

چکیده

بیماری‌های لکه قهوه‌ای، لکه توری و سفیدک پودری از مهم‌ترین بیماری‌های جو در مناطق مرطوب‌اند که سبب کاهش کمی و کیفی عملکرد جو می‌گردند. هدف از انجام این تحقیق، ارزیابی عملکرد و برخی صفات زراعی ژنوتیپ‌های مختلف جو در شرایط آلودگی به بیماری‌های لکه قهوه‌ای، لکه توری و سفیدک پودری می‌باشد. برای دست‌یابی به هدف مذکور، آزمایشی در سال زراعی ۹۴-۱۳۹۳ با استفاده از ۱۶ ژنوتیپ جو در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۴ تکرار در مزرعه تحقیقاتی ایستگاه کشاورزی گنبد اجرا شد. یادداشت‌برداری از مقدار بیماری در کرت‌های آزمایشی، در بهار ۱۳۹۴ با استفاده از مقیاس ۹ درجه‌ای (ساری و پرسکات ،۱۹۷۵)، در ۵ نوبت و در فواصل زمانی یک هفته‌ای انجام شد و میزان شدت متوسط بیماری ثبت گردید. صفات زراعی شامل عملکرد دانه، وزن هزار دانه، ارتفاع گیاه، تعداد روز تا سنبله‌دهی و تعداد روز تا رسیدگی فیزیولوژیک اندازه‌گیری گردید. نتیجه تجزیه واریانس صفات زراعی مورد ارزیابی نشان داد که، ژنوتیپ‌های مورد بررسی از نظر همه صفات زراعی به غیر از عملکرد دانه اختلاف معنی‌داری (P<۰/۰۱) با یکدیگر نشان دادند. مطالعه همبستگی بین صفات نشان داد که هیچ‌یک از شاخص‌های مربوط به دو بیماری لکه قهوه‌ای و لکه توری همبستگی معنی‌داری با عملکزد و وزن هزار دانه نداشتند. اما همبستگی منفی و معنی‌داری (r= -۰/۴ و P<۰/۰۱) بین AUDPC مربوط به بیماری سفیدک پودری و وزن هزار دانه مشاهده شد. مقایسات نهایی نشان داد که ژنوتیپ urbyt93-6 اگرچه از نظر میزان حساسیت به سفیدک پودری از نظر همه شاخص‌ها رتبه‌های اول و دوم را داشت اما از وزن هزار دانه و عملکرد مطلوبی برخوردار بود. لذا به عنوان متحمل‌ترین ژنوتیپ معرفی می‌گردد. بر اساس نتایج این تحقیق تنها ۱۰ درصد صفات مورفولوژیک، فیزیولوژیک و عملکردی مورد مطالعه همبستگی معنی‌داری (P<۰/۰۱) با یکدیگر نشان دادند. صفت عملکرد با هیچ‌یک از صفات بیماری شناسی همبستگی معنی‌داری نداشت.

واژگان کلیدی: جو، لکه‌قهوه‌ای، لکه‌توری، سفیدک پودری، گنبد کاووس

مقدمه

جو از قدیمی ترین گیاهانی است که در ایران مورد بهره برداری قرار گرفته است. این گیاه در مناطقی که غلات دیگر به دلیل بارندگی کم، خاک و یا ارتفاع زیاد، سرما و گرمای هوا به خوبی رشد نمی‌کنند، کشت می‌شود. عوامل متعددی تولید این محصول را تحت تاثیر قرار می‌دهند. توانایی ژنوتیپ‌های مختلف برای تولید عملکرد بالا و قابل قبول تحت شرایط تنش‌های زنده و غیرزنده در انتخاب آن‌ها اهمیت بالایی دارد. نصری و همکاران طی تحقیقی بر روی عملکرد و اجزای عملکرد بر روی ۱۰ رقم جو نشان دادند که وزن سنبله در واحد سطح همبستگی مثبت و معنی‌داری با عملکرد دانه داشت که استنباط نمودند

لاین‌هایی با وزن سنبله در واحد سطح بالا دارای عملکرد دانه بالاتری هستند. شاخص برداشت نیز همبستگی مثبت و معنی‌داری با عملکرد دانه داشت و لاین‌هایی که شاخص برداشت بیش‌تری داشته باشند عملکرد دانه بیش‌تری خواهند داشت(۲). نیستانی و همکاران در تحقیقی بر روی ۱۰ رقم مختلف جو طی بررسی تجزیه علیت و برآورد وراثت‌پذیری عملکرد و اجزای آن نشان دادند که تفاوت بین ارقام از نظر درصد پوشش، تعداد روز تا جوانه زدن، تعداد روز تا گل‌دهی، تعداد روز تا رسیدن، ارتفاع بوته، تعداد سنبله در متر مربع، تعداد دانه در سنبله، وزن هزار دانه و عملکرد معنی‌دار است به طوری که صفت تعداد دانه در سنبله بیش‌ترین اثر مستقیم را بر عملکرد دانه داشت. اثر مستقیم وزن هزار دانه بر عملکرد تا حدودی به‌دلیل اثر غیر مستقیم و منفی از طریق تعداد دانه در سنبله کاهش یافت (۱).

بیماری‌های گیاهی و خسارت آن‌ها برای انسان از مسائل بسیار با اهمیتی بوده و نقش اساسی را در حیات بشر ایفا می‌نمایند. از جمله بیماری‌های مهم قارچی جو، لکه‌قهوه‌ای معمولی جو است که به‌وسیله قارچ *Bipolaris sorokiniana* به‌وجود می‌آید (۶). همچنین دو بیماری سفیدک سطحی در گیاه جو که توسط قارچ *Blumeria. graminis f. sp. hordei* به وجود می‌آید (۴) و بیماری لکه توری جو (توسط قارچ *Pyrenophora teres*. f. sp. *teres*. –مرحله‌ی غیرجنسی *Drechslera teres* f. sp. *teres*) (۵) از دیگر بیماری‌های مهم جو در استان گلستان هستند. در استرالیا، کاهش عملکرد ناشی از بیماری لکه توری را بین ۳۵-۲۵ درصد گزارش کرد که به‌طور معنی‌داری ناشی از کاهش وزن هزار دانه بود. در حالی که خسارت این بیماری را روی عملکرد گیاهان حساس در غرب کانادا حدود ۳۰-۲۰٪ گزارش شده است. بیماری لکه قهوه ای جو نیز در سال ۱۹۷۹ در کانادا ۲۶-۱۶٪ کاهش محصول و در آمریکا ۴۶-۳۶٪ کاهش وزن هزار دانه جو را سبب شده است (۳). هدف این تحقیق، ارزیابی عملکرد و برخی صفات زراعی ژنوتیپ‌های مختلف جو در شرایط آلودگی به بیماری‌های لکه قهوه‌ای، لکه توری و سفیدک پودری در شرایط اقلیمی گنبدکاووس واقع در شمال شرق ایران می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در سال ۹۴-۱۳۹۳ به منظور بررسی عملکرد برخی صفات زراعی مختلف ژنوتیپ‌های جو تحت تنش بیماری‌های قارچی برگی (لکه قهوه ای معمولی جو، لکه توری و سفیدک پودری) به مدت یک سال زراعی در شرایط مزرعه ای در چهار تکرار در ایستگاه تحقیقات کشاورزی گنبد انجام گرفت. هر کرت آزمایشی در ۶ خط ۶/۶۶ متری به فاصله خطوط ۲۰ سانتی متر بر اساس میزان تراکم بذر ۲۷۰ دانه در متر مربع با توجه به وزن هزار دانه کشت شد. آلودگی از طریق کشت ارقام حساس در حاشیه مزرعه و مابین ژنوتیپ‌های کشت شده صورت گرفت. یادداشت‌برداری از عکس‌العمل ژنوتیپ‌های مورد آزمایش در ۵ نوبت و همزمان با شیوع بیماری با استفاده از مقیاس ۹۹-۰۰ ساری و پرسکات انجام شد (۸). سپس مساحت زیر منحنی پیشرفت بیماری (AUDPC) محاسبه گردید. در نهایت، وزن هزار دانه، ارتفاع بوته، مدت روز تا ظهور سنبله، مدت روز تا رسیدگی فیزیولوژیکی و عملکرد نهایی اندازه‌گیری شد. با در نظر گرفتن واکنش‌های مقاومت در مرحله گیاه کامل، ضمن مقایسه عملکرد و اجزای آن، ارزیابی مناسبی از میزان مقاومت و حساسیت ژنوتیپ‌ها به دست آمد تا بدین ترتیب در فرآیند معرفی رقم از بررسی ژنوتیپ‌های حساس جلوگیری گردد. داده‌های آزمایش با استفاده از نرم افزار SAS 9.3 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مقایسات میانگین وگروه‌بندی تیمارها بر اساس صفات مورد مطالعه با استفاده از آزمون LSD انجام شد.

نتایج وبحث

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مربوط به صفات زراعی ژنوتیپ‌های مختلف جو نشان می‌دهد که از نظر عملکرد دانه اختلاف معنی‌دار بین ژنوتیپ‌ها مشاهده نشد. اما اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ($p<0.01$) از نظر سایر صفات بین ۱۶ ژنوتیپ جدید مورد آزمایش وجود دارد.

جدول۱- تجزیه واریانس صفات زراعی اندازه گیری شده در ژنوتیپ‌های جو

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات				
		عملکرد دانه	تعداد روز تا سنبله‌دهی	تعداد روز تا رسیدگی فیزیولوژیک	ارتفاع گیاه	وزن هزار دانه
بلوک	۳	۲۸۵۳۲۹/۸۶۶	۲/۲۲۹۲	۰/۸۷۵۰	۸۱/۸۰۷۳	۶/۰۵۷۱
تیمار	۱۵	۱۴۱۲۹۹/۳۱۱ ns	۱۵/۷۹۵۸ **	۱۰/۵۵۰۰ **	۲۱۲/۰۴۰۶ **	۷۱/۰۵۷۹ **
خطا	۴۵	۱۰۹۱۷۷/۹۷۱	۰/۹۶۲۵	۰/۹۵۲۸	۱۴/۰۷۳۹	۷/۱۸۲۶
CV		۱۱/۳۷۶۶	۰/۹	۰/۷۱	۳/۹۳۶۷	۷/۲۴

* ، ** و ns: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد، ۱ درصد و غیرمعنی‌دار

بررسی روابط همبستگی نشان داد که همبستگی بین شاخص عملکرد با ارتفاع گیاه و وزن هزاردانه در سطح احتمال ($p<0.05$) معنی‌دار بود. همچنین همبستگی تعداد روز تا رسیدگی فیزیولوژیک با وزن هزار دانه و ازتفاع گیاه معنی‌دار بود.

جدول ۲- جدول همبستگی بین صفات زراعی اندازه‌گیری شده در ژنوتیپ‌های جو

	عملکرد دانه	تعداد روز تا سنبله‌دهی	تعداد روز تا رسیدگی فیزیولوژیک	ارتفاع گیاه	وزن هزار دانه
عملکرد دانه	۱				
تعداد روز تا سنبله‌دهی	-۰/۰۳ ns	۱			
تعداد روز تا رسیدگی فیزیولوژیک	-۰/۴۳ ns	۰/۶۹ **	۱		
ارتفاع گیاه	-۰/۵۲ *	۰/۰۷ ns	۰/۶۱ *	۱	
وزن هزار دانه	-۰/۵۱ *	-۰/۴۶ ns	-۰/۵۷ *	-۰/۴۴ ns	۱

* ، ** و ns: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد، ۱ درصد و غیرمعنی‌دار

بیماری سفیدک پودری: ارزیابی روابط همبستگی بین صفات زراعی و بیماری سفیدک پودری نشان داد که بین عملکرد دانه با AUDPC و FDS همبستگی منفی و غیر معنی‌دار است. صفت فنولوژیک تعداد روز تا سنبله‌دهی همبستگی مثبت و غیرمعنی‌دار با صفات بیماری‌شناختی داشت. همچنین صفت تعداد روز تا رسیدگی فیزیولوژیک با AUDPC همبستگی معنی‌دار در سطح احتمال ($p<0.05$) داشت .صفت مورفولوژیک ارتفاع گیاه نیز همبستگی معنی‌دار با AUDPC در سطح احتمال ($p<0.01$) داشت.

بیماری لکه قهوه‌ای: ارزیابی روابط همبستگی بین صفات زراعی و بیماری‌شناختی مربوط به بیماری لکه قهوه‌ای نشان داد که بین عملکرد و هیچکدام از صفات بیماری‌شناختی مورد بررسی در این جدول همبستگی معنی‌دار وجود ندارد. این در حالی است که در صفت فنولوژیک تعداد روز تا سنبله‌دهی با صفات مورد ارزیابی همبستگی منفی و معنی‌دار در سطح احتمال ($p<0.01$) وجود دارد. همچنین در مورد دیگر صفت فنولوژیک تعداد روز تا رسیدگی فیزیولوژیک نیز می‌توان چنین گفت که با هردو صفت اندازه گیری شده مربوط به بیماری مورد بررسی همبستگی منفی و در سطح احتمال ($p<0.01$) معنی‌دار است. در بقیه صفات زراعی شامل صفات ارتفاع گیاه و وزن هزار دانه با صفات بیماری‌شناختی ضریب همبستگی پیرسون غیر معنی‌دار است.

جدول ۲- همبستگی صفات اندازه گیری شده مربوط به بیماری‌های سفیدک پودری، لکه قهوه‌ای و لکه توری و صفات زراعی

		عملکرد دانه	تعداد روز تا سنبله‌دهی	تعداد روز تا رسیدگی فیزیولوژیک	ارتفاع گیاه	وزن هزار دانه	AUDPC	FDS
سفیدک پودری	AUDPC	$-۰/۴۸^{ns}$	$۰/۲۳^{ns}$	$۰/۵۷^{*}$	$۰/۶۳^{**}$	$-۰/۴۰^{ns}$	۱	
	FDS	$-۰/۲۳^{ns}$	$۰/۱۹^{ns}$	$۰/۳۳^{ns}$	$۰/۳۹^{ns}$	$-۰/۲۳^{ns}$	$۰/۸۹^{**}$	۱
لکه قهوه‌ای	AUDPC	$-۰/۰۴^{ns}$	$-۰/۸۶^{*}$	$-۰/۶۷^{**}$	$-۰/۱۱^{ns}$	$۰/۴۰^{ns}$	۱	
	FDS	$-۰/۰۴^{ns}$	-۰.۸۴^{**}	$-۰/۶۹^{**}$	$-۰/۲۳^{ns}$	$۰/۴۸^{ns}$	$۰/۸۲^{**}$	۱
لکه توری	AUDPC	$-۰/۲۹^{ns}$	$۰/۱۱^{ns}$	$-۰/۳۶^{ns}$	$۰/۵۴^{*}$	$-۰/۱۴^{ns}$	۱	
	FDS	$-۰/۲۹^{ns}$	$۰/۱۸^{ns}$	$-۰/۴۹^{ns}$	$۰/۵۶^{*}$	$-۰/۳۴^{ns}$	$۰/۸۴^{**}$	۱

*، ** و ns: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد، ۱ درصد و غیرمعنی‌دار

FDS = شدت نهایی بیماری ارزیابی شده در نوبت آخر

AUDPC = سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری

بیماری لکه توری: نتایج حاصل از بررسی روابط صفت عملکرد دانه با صفات بیماری‌شناختی بیماری لکه توری نشان داد که همبستگی معنی‌داری بین صفات مورد ارزیابی وجود ندارد همچنین در رابطه با صفات فنولوژیک تعداد روز تا سنبله‌دهی و تعداد روز تا رسیدگی فیزیولوژیک همبستگی معنی‌داری مشاهده نشد. اما صفت مورفولوژیک ارتفاع گیاه با صفات بیماری‌شناختی تعیین شده همبستگی مثبت و معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد ($p<0.05$) دارا می‌باشد یعنی هرچه ارتفاع گیاه افزایش می‌یابد میزان تجمعی بیماری و شدت نهایی آن افزایش می‌یابد. در مورد بررسی دیگر صفت عملکردی، وزن هزار دانه با صفات بیماری‌شناختی نیز همبستگی غیرمعنی‌دار ($p<0.05$) می‌باشد.

بحث

در این تحقیق همبستگی معنی‌داری بین صفات بیماری شناختی مربوط به هیچیک از بیماری‌ها و عملکرد مشاهده نشد. در حالی که زادوکس (۱۹۸۷) و پریگو و همکاران (۱۹۸۶) گزارش کردند که کاهش عملکرد ۲۲ درصد، به ترتیب ناشی از شدت بیماری ۱۳، ۲۹، ۲۶، ۵۰، ۷۵ و ۷۶ درصدی در مراحل پنجه‌دهی، طویل شدن ساقه، غلاف سنبله، سنبله دهی، گلدهی و مرحله توسعه شیری بوده است. همچنین براهیم و براهیم عزاهیری (۲۰۰۲) نتیجه گرفتند که شدت بیماری و سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری (AUDPC) با عملکرد دانه، ارتباط مستقیم داشتند. بیماری در کاهش عملکرد اثر دارد و رابطه نزدیکی با پتانسیل عملکرد در هر مرحله از رشد دارد. کاهش عملکرد توسط بیماری لکه‌توری در شرایط عدم کنترل بیماری بین ۱۴ تا ۲۹ درصد در ارقام مقاوم و ۳۹ درصد در ارقام حساس تخمین‌زده شده است. بین تیمارهای استفاده از پروپیکونازول و تیمارهای آلوده به بیماری *P. teres* اختلاف بسیار معنی‌داری از لحاظ صفات ماده خشک (بیوماس)، عملکرد دانه، میانگین وزن دانه وجود دارد و غالباً اثر بیماری لکه توری بر روی شاخص برداشت، تعداد سنبله در مترمربع و تعداد دانه در سنبله معنی‌دار نمی‌باشد.

منابع

۱. نیستانی، ا.، محمودی، ع.، رحیم‌نیا، ف. ۱۳۸۴. تجزیه علیت و برآورد وراثت‌پذیری عملکرد و اجزای آن در ارقام مختلف جو. کشاورزی. ۷(۲): ۶۶ – ۵۵.

۲. نصری، ر.، پاک‌نژاد، ف.، صادقی شجاع، م.، قربانی، ص.، فاطمی، ز.۱۳۹۱. مطالعه همبستگی صفات و تجزیه علیت تنش خشکی بر روی عملکرد و اجزای عملکرد جو در منطقه کرج. زراعت و اصلاح نباتات، ۸ (۴): ۱۶۵-۱۵۵.

3. Brahim E. Y. and Brahim E. 2002. Net blotch in semi-arid regions of Morocco II. Yield and Yield-loss modeling.Field Crops Research. 73: 81-93.
4. Emami, K., and Hasanzadeh, J. 1994. *Barley diseases guide* (Translation). University Publication Center, Tehran. (In Farsi).
5. KHAN, T.N. 1987. Relationship between net blotch and losses in grain yield of barley in western Australia. Austr. J. Agric. Res. 38 (4): 671–679.
6. .Mathre, D. E. 1985. Compendium of Barley Diseases. A. P. S. 78pp
7. Pergiuo, J., Romagosa, I., and Araus, J.L. 1987. Growth and final weight of centeral and lateral barley grains under Mediterranean conditions as influenced by sink strength. Crop Sci., 38: 84-89
8. Sarri, E. E. and Prescot, J. M. 1975. A scale for apprising the foliar intensity of wheat diseases. Plant Dis. Rep. 59:377-380.
9. Zadoks, J.C.,Chang,T.T.,and Konzak,C.F.1974.A decimal.code for the growth stages of cereals.Weed Res.14:415-421.

القای مقاومت در برنج نسبت به قارچ *Fusarium fujikoroi*، با استفاده از اسید سالیسیلیک

احمد ابراهیمی تودرواری*[۱]، فاختک طلیعی [۲]، امیر ذوالفقاری [۳]
[۱] *دانشجو کارشناسی ارشد گیاه پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان،*
[۲] *گروه تولیدات گیاهی دانشگاه گنبدکاووس،*
[۳] *گروه کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان*
*نویسنده مسئول : *Ahmad.Ebrahimi@gmail.com*

چکیده

یکی از بیماری‌های مهم برنج پوسیدگی ریشه و طوقه می‌باشد که توسط قارچ *Fusarium fujikoroi* ایجاد می‌شود و خسارت زیادی به این محصول در سراسر دنیا وارد می‌کند. در این تحقیق از الیسیتور سالیسیلیک اسید در غلظت‌های ۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ پی‌پی‌ام به صورت اسپری برگی بر روی رقم طارم محلی (ژنوتیپ حساس)، برای القای مقاومت سیستمیک در برابر بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه استفاده شد. به منظور بررسی امکان القای مقاومت در رقم حساس تحت تاثیر تیمارهای مورد استفاده میزان فعالیت دو آنزیم کاتالاز و پراکسیداز در زمان های ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۹۶، ۱۴۴ و ۲۸۸ ساعت پس از آلودگی اندازه‌گیری شد. در روز دوازدهم پس از تیمار برخی صفات زراعی نیز اندازه گیری شدند. نتایج نشان داد که میزان فعالیت کاتالاز و پراکسیداز در گیاهان کنترل و پیش تیمار شده متفاوت بود. بررسی میزان فعالیت آنزیمی در گیاهان تیمار شدهنشان داد که بیشترین میزان فعالیت آنزیم‌ها، ۹۶ ساعت پس از آلودگی و در تیمار ۲۰۰ پی پی ام سالیسیلیک اسید بود و پس از آن کاهش یافت. همچنین فعالیت آنزیم پراکسیداز تحت تاثیر تیمار سالیسیلیک اسید در گیاه به تدریج افزایش یافت و بیشترین میزان فعالیت آن، ۹۶ ساعت پس از آلودگی و در تیمار سالیسیلیک اسید ۲۰۰ مشاهده شد. در مجموع نتایج نشان داد سالیسیلیک اسید قادر است مقاومت نسبی را در گیاه القا نماید و لذا در حفاظت از گیاه برنج دربرابر بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه موثر می‌باشند.

واژگان کلیدی: پوسیدگی ریشه و طوقه برنج، سالیسیلیک اسید، کاتالاز، پراکسیداز

مقدمه

برنج از مهم‌ترین گیاهان زراعی دنیا می‌باشد که سطح وسیعی از اراضی زراعی قابل کشت را به خود اختصاص داده است. حداقل ۵۰ درصد جمعیت دنیا ۴۰ درصد از انرژی مورد نیاز خود را از دانه برنج و فرآورده‌های حاصل از آن تأمین می‌کنند(۲). یکی از بیماری‌های مهم برنج، پوسیدگی ریشه و طوقه (باکانه) می‌باشد که خسارت زیادی به این محصول در سراسر دنیا وارد می‌کند. بیش از ۹۰٪ برنج در آسیا کشت می‌گردد لذا بیماری فوق در این مناطق اهمیت ویژه‌ای دارد (۷). امروزه توجه به کاربرد کم قارچ‌کش‌ها در کنترل بیماری‌های گیاهی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. مواد شیمیایی القا کننده مقاومت که قادرند مقاومت را علیه طیف وسیعی از بیماری‌ها القاء کنند، فرصت و ابزار مناسبی برای کشاورزان ایجاد کرده و کامل کننده مقاومت ژنتیکی گیاهان به بیماری‌ها هستند. در مطالعه‌ای، تاثیر خارجی سالیسیلیک اسید را با کاربرد آسپرین روی برگ‌های

توتون آلوده به ویروس موزاییک توتون مورد بررسی قرار گرفت، نتایج نشان داد تزریق آسپرین یا سالیسیلیک اسید به برگ‌های کولتیوار مقاوم توتون (Xanthi-nc) قبل از آلودگی، تعداد لکه‌های تشکیل شده را تا ۹۰ درصد کاهش می‌دهد. این تیمار همچنین افزایش تجمع PR -پروتئین‌ها را القا می‌کند (۹). مصرف خارجی سالیسیلیک اسید با غلظت ۲۰۰ میلی‌مولار از طریق ریشه یا اسپری برگی، سبب افزایش مقاومت گوجه فرنگی در برابر پژمردگی فوزاریومی ناشی از *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* می‌گردد، که با اندازه‌گیری میزان سالیسیلیک اسید تولید شده در ریشه گیاه با استفاده از HPLC نشان داده شد که ۱۶۸ ساعت بعد از تیمار ریشه میزان این ترکیب تا ده برابر گیاهان شاهد افزایش می‌یابد. اما در تیمار اسپری برگی مقدار سالیسیلیک اسید تولید شده ۸/۷ برابر بیشتر از گیاهان شاهد است (۸). آزمایش حاضر با هدف بررسی تاثیر سالیسیلیک اسید در القای مقاومت رقم حساس برنج به بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

با هدف بررسی امکان القای مقاومت در گیاه برنج نسبت به بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه، رقم طارم محلی (به عنوان رقم حساس به بیماری) انتخاب شده و در شرایط گلخانه با سه تکرار، کاشته شد. طبق روش ماندال و همکاران (۸) گیاهچه‌های دو هفته‌ای سه بار به صورت یک روز در میان با محلول‌های سالیسیلیک اسید (در سه غلظت ۰، ۲۰۰، ۴۰۰ پی‌پی‌ام) تا قبل از جاری شدن آب از سطح برگ‌ها اسپری شدند. ۴۸ ساعت بعد از آخرین اسپری، مایه‌زنی با قارچ عامل بیماری با سوسپانسیون اسپور حاوی ۵×۱۰^{۴} اسپور در میلی‌لیتر روی گیاهچه‌های دو هفته‌ای انجام گرفت(۳). ۱۲ ساعت پس از تلقیح گیاهان با سوسپانسیون اسپوری قارچ عامل بیماری، گیاهچه‌های هر تیمار به گلدان‌های جداگانه منتقل شدند. سپس میزان فعالیت آنزیم‌های دفاعی پراکسیداز و کاتالاز در گیاهان کنترل و پیش تیمار شده با غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید در فواصل زمانی ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۹۶، ۱۴۴، ۲۸۸ ساعت بعد از مایه‌زنی اندازه‌گیری شد. همچنین در روز دوازدهم، صفات زراعی شامل وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه، ارتفاع گیاه و حجم ریشه و طول ساقه و ریشه در هر تیمار جداگانه اندازه‌گیری شد. آزمایشات به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی برای هر القاکننده اجرا گردید. تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Minitab 16 انجام شده و میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی($p<0.05$) مورد مقایسه قرار گرفت. سطوح مختلف هر تیمار با تیمار شاهد مقایسه شده و موثرترین سطوح معرفی شدند.

نتایج

بررسی صفات زراعی در گیاهان تیمار شده با سالیسیلیک اسید: نتایج تجزیه واریانس حاکی از تفاوت معنی دار بین تیمارهای مورد بررسی بود. همچنین مقایسه میانگین تیمارها نشان داد که تیمار شاهد از نظر تمامی صفت به جزء وزن خشک ریشه و ساقه بیشتر از گیاهان بیمار و پیش تیمار شده با SA بود (جدول ۱). اتفاع گیاهچه‌های سالم بیشتر از گیاهان بیمار بود اما اختلاف معنی‌داری بین ارتفاع گیاهان بیمار تیمار شده با سالیسیلیک اسید مشاهده شد.

جدول ۱- مقایسه میانگین صفات مورد بررسی در دو تیمار شاهد بیمار و سالم و مایه‌زنی شده با سالیسیلیک اسید

تیمار	طول ریشه (cm)	حجم ریشه (cm^3)	وزن تر ساقه (g)	وزن تر ریشه (g)	وزن خشک ساقه (g)	وزن خشک ریشه (g)	ارتفاع گیاه (cm)
شاهد سالم	۲۳/۷ a	۱/۶۸ a	۲/۶۲ a	۲/۰۱ a	۳/۲ a	۰/۹۳ c	۳۵/۵۳ a
شاهد بیمار	۱۱/۵ c	۰/۹ c	۱/۸۷ c	۱/۳۹ c	۲/۸۹ a	۱/۳۸ c	۱۶/۷ c
سالیسیلیک اسید ۲۰۰	۱۶/۶۷ b	۱/۲ b	۲/۲۲ b	۱/۷۲۶ b	۲/۶۸ a	۰/۹۷ c	۲۷/۵ b
سالیسیلیک اسید ۴۰۰	۱۲/۰۰ c	۰/۹ c	۲/۲۴ b	۱/۷۳۴ b	۲/۶۸ a	۱/۰۸ c	۲۷/۵ b

میانگین‌هایی که با حروف مشابه نشان داده شده اند، اختلاف معنی داری در سطح احتمال ۵ درصد ندارند.

سنجش فعالیت آنزیمی

آنزیم کاتالاز (CAT): مقایسه میانگین تیمارها نشان می‌دهد که پیش تیمار گیاهان با سالیسیلیک اسید، سبب کاهش محسوس در میزان فعالیت این آنزیم می‌گردد. اسید سالیسیلیک یک ترکیب پیغام دهنده ثانوی در گیاهان است که با اتصال و ممانعت از فعالیت آنزیم کاتالاز سبب افزایش مقدار H2O2 در سلول‌ها شده و ژن‌های مرتبط با دفاع گیاهان را فعال می‌سازد (۱۱). کمترین میزان آنزیم، ۱۲ ساعت پس از آلوده‌سازی گیاهان در تیمار سالیسیلیک اسید ۲۰۰ مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری ($P<0.05$) با سایر تیمارها داشت (جدول ۲). بیشترین میزان فعالیت این آنزیم، ۹۶ ساعت پس از آلودگی و در تیمار سالیسیلیک اسید ۲۰۰ ثبت گردید.

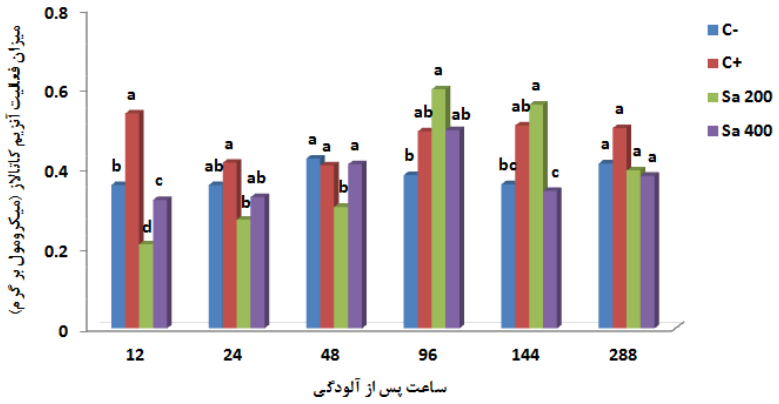
جدول ۲- مقایسه میانگین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاهان شاهد و تیمار شده با سالیسیلیک اسید پس از آلودگی

تیمار	ساعت پس از آلودگی					
	۱۲	۲۴	۴۸	۹۶	۱۴۴	۲۸۸
شاهد سالم	۰/۳۶ fgh	۰/۳۶ fgh	۰/۴۲۶ bcdefg	۰/۳۸۵ defgh	۰/۳۶۲ efgh	۰/۴۱۴ cdefgh
شاهد بیمار	۰/۵۳۹ abc	۰/۴۱۶ cdefg	۰/۴۰۹ cdefgh	۰/۴۹۵ abcdef	۰/۵۰۳ abcd	۰/۵۰۹ abcde
سالیسیلیک اسید ۲۰۰	۰/۲۱۱ i	۰/۲۷۳ hi	۰/۳۰۵ ghi	۰/۶۰ a	۰/۵۶۲ ab	۰/۳۹۶ defgh
سالیسیلیک اسید ۴۰۰	۰/۳۲۳ ghi	۰/۳۲۹ ghi	۰/۴۱۲ cdefgh	۰/۴۹۷ abcdef	۰/۳۴۵ ghi	۰/۳۸۳ defgh

میانگین‌هایی که با حروف مشابه نشان داده شده اند، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد ندارند.

در تیمار شاهد سالم، میزان فعالیت آنزیم کاتالاز، نوسان فاحشی طی زمان نداشت. اما در تیمار شاهد آلوده، ۱۲ ساعت پس از مایه‌زنی، میزان این آنزیم تحت تنش بیماری افزایش یافته و اختلاف معنی‌داری ($p<0.05$) با شاهد سالم نشان می‌دهد. در مجموع همه زمان‌های نمونه‌برداری به جز روز چهارم پس از آلودگی، میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در شاهد آلوده بیشتر از سایر تیمارها بود (شکل ۱).

کاربرد سالیسیلیک اسید ۲۰۰، سبب کاهش میزان تولید آنزیم نسبت به تیمارهای شاهد شد. همچنین مقدار آنزیم در این تیمار طی زمان تا روز دوم پس از آلوده‌سازی اختلاف چندانی را نشان نداد. اما در ۹۶ ساعت پس از مایه‌زنی، میزان فعالیت این آنزیم به اوج خود رسید (۰/۶ میکرومول بر گرم بافت تازه گیاه) که اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد سالم در آن زمان داشت. میزان آنزیم در این ساعت تفاوتی بین تیمار سالیسیلیک اسید ۴۰۰ و تیمار شاهد بیمار نداشت. میزان این آنزیم در روز دوازدهم پس از مایه‌زنی، تفاوتی بین تیمارها نشان نداد (شکل ۱).



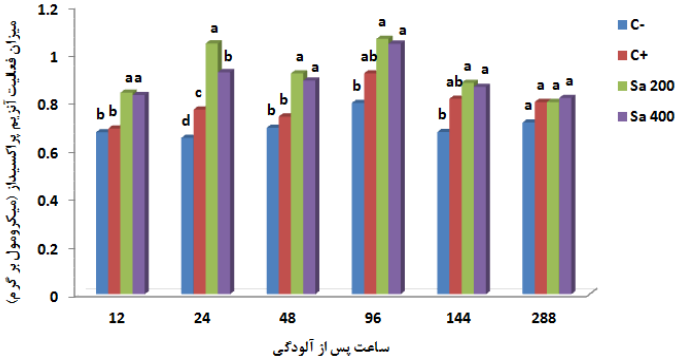
شکل ۱- میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) بر حسب میکرومول بر گرم بافت تازه گیاه شاهد سالم (C-)، شاهد بیمار (C+)، گیاه تیمار شده با سالیسیلیک اسید ۲۰۰ (sa200) گیاه تیمار شده با سالیسیلیک اسید ۴۰۰ (sa400) پس از آلودگی با قارچ *F. fujikuroi*.

آنزیم پراکسیداز (POX): مقایسه میانگین تیمارها نشان می‌دهد که پیش تیمار گیاهان با سالیسیلیک اسید در هر دو غلظت، افزایش میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز را ۱۲ ساعت پس از آلودگی نسبت به تیمار شاهد بیمار و سالم به دنبال دارد. بیشترین میزان فعالیت این آنزیم، ۹۶ ساعت پس از آلودگی و در دو تیمار سالیسیلیک اسید ۲۰۰ و پس از آن سالیسیلیک اسید ۴۰۰ ثبت گردید. در حالیکه تیمار شاهد کمترین میزان آنزیم را نشان داد (جدول ۳). در تیمار شاهد بیمار، میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز، ۹۶ ساعت پس از آلودگی به اوج خود رسید و سپس کاهش یافت. روند مشابهی در مورد دو تیمار سالیسیلیک اسید مشاهده شد. میزان این آنزیم در روز دوازدهم پس از مایه‌زنی، تفاوتی بین تیمارها نشان نداد (شکل ۲). پراکسیدازها به دنبال تحریک القاگرهای زنده یا غیرزنده، در گیاهان افز ایش می‌یابند و به دنبال آن مقاومت گیاه نسبت به عوامل بیماری‌زا نیز افزوده می‌شود. آنزیم پراکسیداز با تولید H2O2 در جهت تشکیل لیگنین و اتصالات عرضی در دیواره سلولی از نفوذ قارچ در دیواره سلول گیاه جلوگیری می‌کند. در عین حال این آنزیم نیز نقش جاروکنندگی برای H2O2 نیز دارا می‌باشد (۱۰). نتایج مشابهی توسط ضیغمی نژاد و شریفی شیرچی (۴) آهنگر و همکاران (۱) و ولادی و همکاران (۵) گزارش شده است.

جدول ۳- مقایسه میانگین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاهان شاهد و تیمار شده با سالیسیلیک اسید پس از آلودگی

تیمار	ساعت پس از آلودگی					
	۱۲	۲۴	۴۸	۹۶	۱۴۴	۲۸۸
شاهد سالم	۰/۶۷۶ ij	۰/۶۵۲ j	۰/۶۹۴ ghij	۰/۷۹۸ cdefghi	۰/۶۷۶ ij	۰/۷۱۶ fghij
شاهد بیمار	۰/۶۹۱ hij	۰/۷۷۰ defghij	۰/۷۴۱ efghij	۰/۹۲۱ bc	۰/۸۱۵ cdefgh	۰/۸۰۲ cdefghi
سالیسیلیک اسید ۲۰۰	۰/۸۴۱ cdef	۱/۰۴۶ ab	۰/۹۲۱ bc	۱/۰۶۵ a	۰/۸۸۲ cd	۰/۸۰۲ cdefghi
سالیسیلیک اسید ۴۰۰	۰/۸۳۱ cdefg	۰/۹۲۶ bc	۰/۸۹۱ cd	۱/۰۴۵ ab	۰/۸۶۵ cde	۰/۸۱۸ cdefgh

میانگین‌هایی که با حروف مشابه نشان داده شده اند، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد ندارند.



شکل ۲- میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (POX) بر حسب میکرومول بر گرم بافت تازه گیاه شاهد سالم (-C)، شاهد بیمار (+C)، گیاه تیمار شده با سالیسیلیک اسید ۲۰۰ (sa200) گیاه تیمار شده با سالیسیلیک اسید ۴۰۰ (sa400) پس از آلودگی با قارچ *F. fujikuroi*.

حفاظت از گیاه در برابر تنش حاصل تحریک پاسخهای مختلف دفاعی است. سیستم یکپارچه دفاعی با تحریک همزمان چندین آنزیم دفاعی توسط الیسیتور به‌کار رفته، آغاز میشود .البته طبیعت تحریک و تولید ترکیبات و آنزیمهای دفاعی جهت مقاومت به بیماریها و آفات گیاهی است اما در مورد نتیجه حاصل از تولید یا افزایش این ترکیبات در میزبان‌های آلوده، نتایج متفاوتی از تحقیقات مختلف به دست آمده است (۶). در این تحقیق در مجموع غلظت ۲۰۰ سالیسیلیک اسید کارایی بالاتری در فعال کردن سیستم دفاعی گیاه از طریق ایجاد تغییر در میزان بیان آنزیم‌های آنتی اکسیدانت نشان داد.

منابع

۱. آهنگر، ل.، بابایی‌زاد، و.ا.، رنجبر، غ.ع.، نجفی زرینی، ح.، و بیابانی، ع. ۱۳۹۵. بررسی الگوی بیان ژنهای مرتبط با بیماریزایی در القای مقاومت به بیماری سفیدک سطحی در رقم حساس گندم پس از تیمار با اسید سالسیلیک. پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی ۸ (۱۷): ۲۰۸-۲۱۸.

۲. تاج‌بخش، م. و پورمیرزا، ع. ا. ۱۳۸۶. زراعت غلات. انتشارات جهاد دانشگاهی آذربایجان غربی. چاپ دوم. ۳۱۴ ص.

۳. حاجی پور باقری، ع.، سوهانی، م.م.، حسنی، س.ح.، بابایی‌زاد، و.ا.، و علوی، س.م. ۱۳۹۴. اثر همزیستی قارچ *Piriformospora indica* بر واکنش گیاه برنج (*Oryza sativa*) به بیماری پوسیدگی طوقه. تحقیقات غلات ۵(۳): ۲۱۹-۲۳۰.

۴. ضیغمی‌نژاد، ر.، و شریفی سیرچی ، غ.ر. ۱۳۹۲. بررسی بیان ژن های مرتبط به بیمارگر و فعالیت آنزیم های موثر در القای مقاومت به سفیدک پودری کدو توسط اسید سالیسیلیک. بیوتکنولوژی کشاورزی ۵ (۱): ۹۷-۱۰۹.

۵. ولادی، س.، سلیمانی پری، م.ج.، خداکرمیان، غ. و قیاسوند، ط. ۱۳۹۲. تأثیر سالیسیلیک اسید و کیتوزان بر القای مقاومت در نخود علیه عامل بیماریهای پژمردگی و پوسیدگی فوزاریومی. بیماریهای گیاهی ۴۹(۲): ۱۸۱-۱۹۹.

6. Agrawal, G. K., Rakwal, R., Tamogami, M. , Yonekura, A. and Saji, H. 2002. Chitosan active defense/stress response in the leaves of Oryza sativa seedlings. Plant Physiol. Biochem. 40: 1061-1069
7. Burgess, L.W., Trimioli, S., Jeffery, S., and Hanson, F. 1986. Thea association of Fusarium moniliforme with diseases of grain Sorghum in New soth Wales. Proceedings of the first Australian Sorghum Conference, P.341-349.
8. Mandal, S., Mallick, N., and Mitra, A. 2009. Salicylic acid-induced resistance to Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici in tomato. Plant Physiol. Biochem. 47: 642-649.
9. White, R. F. 1979. Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. Virology 99: 410-412.
10. Raju, S. , Jayalakshmi, S. K. and Sreeramulu, K. 2008. Comparative study on the induction of defense related enzymes in two different cultivar of chickpea genotypes by alicylic acid, spermin and F. oxysporum f. sp. ciceri . Aust. J. Crop Sci . 2(3): 121-140.
11. Ruffeer, M., Steipe, B., and Zenk, M.H. 1995. Evidence against specific binding of salicylic acid to plant catalase. FEBS letters 377:175-180.

بررسی امکان القای مقاومت توسط کیتوزان در برنج نسبت به بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه

احمد ابراهیمی تودرواری*[1]، فاختک طلیعی [2]، امیر ذوالفقاری [3]

[1] *دانشجو کارشناسی ارشد گیاه پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان*

[2] *گروه تولیدات گیاهی دانشگاه گنبدکاووس*

[3] *گروه کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان*

نویسنده مسئول: Ahmad.Ebrahimi@gmail.com

چکیده

قارچ *Fusarium fujikuroi* که عامل بیماری پوسیدگی طوقه در گیاه برنج است علاوه بر کاهش رشد عملکرد گیاه سبب تولید زهرابه‌هایی می‌شود که برای انسان و دام سمی است. در این پژوهش از کیتوزان در غلظت‌های ۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ پی‌پی‌ام به صورت اسپری برگی طی دو نوبت بر روی گیاهچه‌های دو هفته‌ای رقم حساس (طارم محلی)، برای بررسی امکان القای مقاومت سیستمیک در برابر بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه استفاده شد. سپس به منظور بررسی امکان القای مقاومت در برنج تحت تاثیر تیمارهای مورد استفاده، میزان فعالیت دو آنزیم کاتالاز و پراکسیداز در زمان های ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۹۶، ۱۴۴ و ۲۸۸ ساعت پس از آلودگی اندازه‌گیری شد. بررسی میزان فعالیت آنزیمی در گیاهان تیمار شده با غلظت‌های مختلف طی زمان نشان داد که کمترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز، ۴۸ ساعت پس از آلوده‌سازی گیاهان و در تیمار کیتوزان ۴۰۰ مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با گیاه شاهد بیمار داشت. همچنین مزان بیان آنزیم پراکسیداز در گیاهان تیمار شده روند افزایش داشت و ۹۶ ساعت پس از آلودگی در همه تیمارها به اوج خود رسید. در مجموع نتایج نشان داد کیتوزان قادر است مقاومت نسبی را در گیاه القا نمایند و لذا در حفاظت از گیاه برنج دربرابر بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه موثر می‌باشد.

واژگان کلیدی: پوسیدگی ریشه و طوقه برنج، کیتوزان، کاتالاز، پراکسیداز

مقدمه

تیمار گیاهان با محرکهای زنده و غیر زنده اختصاصی باعث تقویت مقاومت حقیقی آنها می شود که به عنوان مقاومت القایی تعریف میشود. مقاومت به طور موضعی در محل آلودگی القاء میشود اما به طور سیستمیک نیز در سایر بخشهای سالم القاء شده که اصطلاحاً مقاومت سیستمیک القایی نامیده میشود. استفاده از مواد شیمیایی که مکانیزم‌های دفاعی گیاه را قبل از رویارویی با پاتوژن فعال می کنند و فاقد اثرات زیست محیطی زیان آور هستند در سال‌های اخیر به میزان زیادی مورد استقبال قرار گرفته و سبب انجام تحقیقات گسترده ای در این زمینه شده است (۶). کیتوزان یک پلیمر پلی کاتیونی از β-۱و۴ D-گلوکوز آمین و از مشتقات کیتین بوده که با فرآیند دی استیلاسیون کیتین به‌دست می‌آید. صنایع از جمله خصوصیات مهم کیتوزان آثار ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی آن است که امروزه به‌عنوان ماده افزایش دهنده قدرت دفاعی گیاهان علیه انواع تنش‌های زیستی و غیرزیستی از جمله علیه آلودگی‌های قارچی گیاهان به‌کار می‌رود (۲).

ولادی و همکاران (۱۳۹۲) امکان القای مقاومت میزبانی در نخود علیه این بیماری‌های پوسیدگی ریشه فوزاریومی و پژمردگی فوزاریومی را با استفاده از محلول‌های ۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ پی‌پی‌ام کیتوزان به صورت اسپری برگی مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که غلظت ۲۰۰ پی‌پی‌ام کیتوزان باعث کاهش نسبی پوسیدگی ریشه و غلظت ۴۰۰ پی‌پی‌ام آن باعث کنترل پژمردگی گردیدند. همچنین مقایسه اثر ترکیب کیتوزان-مس و کیتوزان به تنهایی بر بازداری از توسعه پوسیدگی خیار به وسیله قارچ Botrytis cinerea روی گیاهچه‌های چهاربرگی خیار نشان داده شد که غلظت بهینه برای بیشترین بازداری از توسعه قارچ، ۰/۲ گرم بر لیتر کیتوزان و ۱/۶ میلی‌مولار مس می‌باشد، همچنین ۱۲ روز پس از تلقیح، میزان بازداری از توسعه بیماری در تیمار مس-کیتوزان (۷۵ درصد) به وضوح بیشتر از تیمار کیتوزان به تنهایی بود (۴). القای مقاومت در آفتابگردان علیه سفیدک داخلی پس از تیمار با کیتوزان را مورد بررسی قرار گرفت، تیمار بذر آفتابگردان با کیتوزان ۵ درصد سبب کاهش ۴۶ و ۵۲ درصدی شدت بیماری در شرایط گلخانه و آزمایشگاه گردید. بررسی تغییرات آنزیمی نشان داد که افزایش میزان فعالیت دو آنزیم کاتالاز و فنیل‌آلانین‌آمینولیاز، به ترتیب، ۶ تا ۹ ساعت پس از آلوده‌سازی قابل مشاهده است در حالی که در کورد آنزیم پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز، بیشترین سطح آنزیم ۱۲ ساعت پس از آلوده‌سازی مشاهده شد. همچنین سبب افزایش بیان پنج ژن PR1، β-1,3گلوکاناز، کیتیناز، پراکسیداز و چالکون سنتتاز در این گیاهچه‌ها شد (۸). هدف این مطالعه بررسی امکان القای مقاومت توسط کیتوزان در برنج در برابر بیماری پوسیدگی طوقه با استفاده از کیتوزان است.

مواد و روش‌ها

با هدف بررسی امکان القای مقاومت در گیاه برنج نسبت به بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه، رقم طارم محلی (به عنوان رقم حساس به بیماری) انتخاب شده و در شرایط گلخانه با سه تکرار، کاشته شد. تیمار با کیتوزان به صورت اسپری برگی، طی دو روز روی گیاهچه‌های دو هفته‌ای با محلول‌های کیتوزان (در سه غلظت ۰، ۲۰۰، ۴۰۰ پی‌پی‌ام) تا قبل از جاری شدن آب از سطح برگ‌ها انجام شد. در روز دوم علاوه بر اسپری برگی مقدار ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول پای بوته‌های هر گلدان ریخته شد. مایه‌زنی گیاهان به روش حاجی‌پور باقری و همکاران (۱) و روی گیاهچه‌های دو هفته‌ای با سوسپانسیون اسپور حاوی ۵×۱۰۴ اسپور در میلی‌لیتر انجام شد. در نهایت میزان فعالیت آنزیم‌های دفاعی پراکسیداز و کاتالاز تحت شرایط تیمارهای القایی در فواصل زمانی ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۹۶، ۱۴۴، ۲۸۸ ساعت بعد از تیمار اندازه‌گیری شد. همچنین در روز دوازدهم، صفات زراعی شامل وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه، ارتفاع گیاه و حجم ریشه و طول ساقه و ریشه و طول و عرض برگ در هر تیمار جداگانه اندازه‌گیری شد. آزمایشات به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی برای هر القاکننده اجرا گردید. تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Minitab 16 انجام شده و میانگین‌ها با استفاده از آزمون Tukey ($p<0.05$) مورد مقایسه قرار گرفت. سطوح مختلف تیمار با تیمار شاهد سالم و بیمار مقایسه شده و موثرترین سطوح معرفی شدند.

نتایج

بررسی صفات زراعی در گیاهان تیمار شده با کیتوزان: تجزیه واریانس صفات زراعی مورد بررسی در گیاهان تیمار شده با غلظت‌های متفاوت کیتوزان و تیمارهای شاهد نشان داد که اختلاف بین تیمارها برای دو صفت وزن خشک ریشه و ساقه معنی‌دار نبود. اما بین گیاهان تیمار شده با غلظت‌های ۲۰۰ و ۴۰۰ کیتوزان و تیمارهای شاهد اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد ($p<0.01$) از نظر سایر صفات مورد بررسی شامل ارتفاع گیاه، طول ریشه، حجم ریشه، طول بلندترین برگ و وزن تر ریشه مشاهده شد. در حالیکه مقایسه میانگین تیمارها نشان داد که تیمار شاهد از نظر صفت ارتفاع بوته و سایر صفات زراعی بیشترین میزان را نسبت به دو تیمار کیتوزان ۲۰۰ و ۴۰۰ دارا بود(جدول ۱). لذا به نظر می رسد کیتوزان نقش چندانی در افزایش صفات زراعی نداشته است.

جدول ۱- مقایسه میانگین صفات مورد بررسی در دو تیمار شاهد بیمار و سالم و مایه‌زنی شده با کیتوزان

تیمار	میانگین						
	طول ریشه (cm)	حجم ریشه (cm^3)	وزن تر ساقه (g)	وزن تر ریشه (g)	وزن خشک ساقه (g)	وزن خشک ریشه (g)	ارتفاع گیاه (cm)
شاهد سالم	۲۳/۷ a	۱/۶۸ a	۲/۶۲ a	۲/۰۱ a	۳/۲ a	۰/۹۳ c	۳۵/۵۳ a
شاهد بیمار	۱۱/۵ c	۰/۹ b	۱/۸۷ c	۱/۳۹ c	۲/۸۹ a	۱/۳۸ c	۱۶/۷ c
کیتوزان ۲۰۰	۱۷/۳۳ b	۰/۹ b	۱/۸۸ c	۱/۴۱ c	۲/۶ a	۰/۷۹ c	۲۷/۵ b
کیتوزان ۴۰۰	۱۷/۶۷ b	۱/۰ b	۲/۲۲ b	۱/۷۳ b	۲/۷۸ a	۱/۱۷ c	۲۹/۵ b

میانگین‌هایی که با حروف مشابه نشان داده شده اند، اختلاف معنی داری در سطح احتمال ۵ درصد ندارند.

سنجش فعالیت آنزیمی

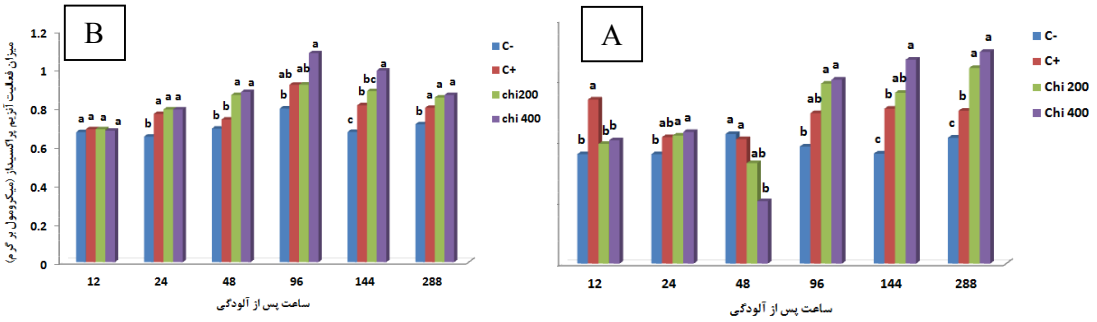
آنزیم کاتالاز (CAT): بر اساس نتایج تجزیه واریانس، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد بین تیمارها مشاهده می‌شود. همچنین تفاوت معنی‌داری ($P<0.01$) در میزان فعالیت این آنزیم در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری مشاهده گردید. مقایسه میانگین تیمارها نتایج مقایسات نشان می‌دهد که تیمار گیاهان با کیتوزان، سبب کاهش میزان فعالیت این آنزیم نسبت به تیمار شاهد آلوده می‌گردد. به طوریکه کمترین میزان فعالیت آنزیمی، ۴۸ ساعت_پس از آلوده‌سازی گیاهان و در تیمار کیتوزان ۴۰۰ پی پی ام مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با گیاه شاهد بیمار و کیتوزان ۲۰۰ نشان داد. پس از این زمان میزان آنزیم روند افزایشی داشته به طوریکه بیشترین میزان فعالیت این آنزیم، در روزهای ششم و دوازدهم پس از آلودگی و در تیمار کیتوزان ۴۰۰ ثبت گردید(جدول ۲).

مقایسه میانگین بین تیمارها در زمان‌های مختلف نشان می‌دهد که در ساعت ۱۲، گیاهان بیمار فعالیت بالایی از آنزیم را نشان می‌دهند که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها دارد (شکل ۱). میزان فعالیت آنزیم در این تیمار تا روز دوم پس از آلودگی کاهش یافته و سپس افزایش می‌یابد. اما اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد در ساعات بعدی نمونه‌برداری مشاهده نشد. همچنین روند مشابهی در دو تیمار کیتوزان ۲۰۰ و ۴۰۰ مشاهده شد. میزان تولید کاتالاز در روز پایانی آزمایش در دو تیمار کیتوزان در بالاترین سطح بوده و تفاوت معنی‌داری با تیمارهای شاهد داشت (شکل ۱).

جدول ۲- مقایسه میانگین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاهان شاهد و تیمار شده با کیتوزان پس از آلودگی

تیمار	ساعت پس از آلودگی					
	۱۲	۲۴	۴۸	۹۶	۱۴۴	۲۸۸
شاهد سالم	۰/۳۶ h	۰/۳۶ h	۰/۴۲۶ efgh	۰/۳۸۵ gh	۰/۳۶۲ h	۰/۴۱۴ fgh
شاهد بیمار	۰/۵۳۹ cde	۰/۴۱۶ efgh	۰/۴۰۹ fgh	۰/۴۹۵ defg	۰/۵۰۹ def	۰/۵۰۳ defg
کیتوزان ۲۰۰	۰/۳۹۳ fgh	۰/۴۲۳ efgh	۰/۳۳۰ h	۰/۵۹۲ abcd	۰/۵۶۳ bcd	۰/۶۴۴ abc
کیتوزان ۴۰۰	۰/۴۰۵ fgh	۰/۴۳۳ efgh	۰/۲۰۵ i	۰/۶۰۵ abcd	۰/۶۷۱ ab	۰/۶۹۷ a

میانگین‌هایی که با حروف مشابه نشان داده شده اند، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد ندارند.



شکل ۱- میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (A) و پراکسیداز (B) بر حسب میکرومول بر گرم بافت تازه گیاه شاهد سالم (-C)، شاهد بیمار (+C)، گیاه تیمار شده با کیتوزان ۲۰۰ (chi 200) گیاه تیمار شده با کیتوزان ۴۰۰ (chi 400) پس از آلودگی با قارچ *F. fujikuroi*.

آنزیم پراکسیداز (POX): مقایسه میانگین تیمارها نشان می‌دهد که پس از مایه‌زنی گیاهان با بیمارگر، میزان فعالیت پراکسیداز افزایش می‌یابد. این افزایش تدریجی بوده و ۹۶ ساعت پس از آلودگی در همه تیمارها به اوج خود می‌رسد. بیشترین میزان فعالیت این آنزیم، ۹۶ ساعت پس از آلودگی و در تیمار کیتوزان۴۰۰ ثبت گردید که اختلاف معنی‌داری ($P<0.05$) با فعالیت آنزیم در تیمار شاهد بیمار داشت. پس از آن روند کاهشی تدریجی در فعالیت آنزیم در همه تیمارها مشاهده شد.
روند مشابهی در مورد دو تیمار کیتوزان مشاهده شد و میزان این آنزیم در روز دوازدهم پس از مایه‌زنی، در تیمار شاهد سالم کمتر از سایر تیمارها بود (شکل ۲). مقایسه میانگین بین تیمارها در زمان‌های مختلف نشان می‌دهد که در ساعت ۱۲، اختلاف معنی‌داری در میزان تولید پراکسیداز در تیمارهای مختلف وجود ندارد. همچنین میزان فعالیت این آنزیم در تیمار شاهد بیمار، دو روز پس از آلودگی تا انتهای آزمایش کمتر از گیاهان تیمار شده با کیتوزان بود(شکل ۲).

جدول ۳- مقایسه میانگین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاهان شاهد و تیمار شده با کیتوزان پس از آلودگی

تیمار	ساعت پس از آلودگی					
	۱۲	۲۴	۴۸	۹۶	۱۴۴	۲۸۸
شاهد سالم	۰/۶۷۶ ij	۰/۶۵۲ j	۰/۶۹۴ ghij	۰/۷۹۸ cdefghi	۰/۶۷۶ ij	۰/۷۱۶ fghij
شاهد بیمار	۰/۶۹۱ hij	۰/۷۷۰ defghij	۰/۷۴۱ efghij	۰/۹۲۱ bc	۰/۸۱۵ cdefgh	۰/۸۰۲ cdefghi
کیتوزان ۲۰۰	۰/۶۹۰ gh	۰/۷۹۳ cdefgh	۰/۸۶۸ bcde	۰/۹۲۲ bc	۰/۸۸۹ bcde	۰/۸۵۵ bcdef
کیتوزان ۴۰۰	۰/۶۸۳ gh	۰/۷۹۳ cdefgh	۰/۸۸۴ bcde	۱/۰۸۵ a	۰/۹۹۵ ab	۰/۸۶۸ bcde

میانگین‌هایی که با حروف مشابه نشان داده شده اند، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد ندارند.

کیتوزان یک مجرک برون زاد پاسخ‌های دفاعی میزبان است که سبب تجمع کیتینازها، لیگنینی شدن بافت می‌گردد (۱۱). کاربرد کیتوزان در افزایش فعالیت آنزیمی گیاهان در میزبان‌های مختلف توسط قاضی محسنی و صباغ (۳)، ولادی وهمکاران (۲) و رودریگز و همکاران (۱۰) گزارش شده است. همچنین این الگوی نوسانات میزان فعالیت آنزیم‌های دفاعی توسط جایاراجو همکاران (۵) و راجو و همکاران (۹) تایید شده است. لذا با توجه به نوسانات آنزیم کاتالاز و پراکسیداز در تیمار کیتوزان ۴۰۰ پی پی ام نشان داد که کیتوزان می تواند به عنوان یک السیتور فعال نقش بسزایی را در حمایت از برنج در برابر فوزاریوم ایفا نماید.

منابع

۱. حاجی پور باقریف ع.، سوهانی، م.م.، حسنی، س.ح.، بابایی‌زاد، و.ا.، و علوی، س.م. ۱۳۹۴. اثر همزیستی قارچ *Piriformospora indica* بر واکنش گیاه برنج (*Oryza sativa*) به بیماری پوسیدگی طوقه. تحقیقات غلات ۵(۳): ۲۱۹-۲۳۰.

۲. ولادی، س.، سلیمانی پری، م.ج.، خداکرمیان، غ. و قیاسوند، ط. ۱۳۹۲. تأثیر سالیسیلیک اسید و کیتوزان بر القای مقاومت در نخود علیه عامل بیماریهای پژمردگی و پوسیدگی فوزاریومی. بیماریهای گیاهی ۴۹(۲): ۱۸۱-۱۹۹.

۳. قاضی محسنی، و.، و صباغ، س.ک. ۱۳۹۴. اثر کیتوزان در بیان ژن و فعالیت آنزیم های مؤثر در القای مقاومت به بلایت فوزاریومی خوشهٔ گندم. دانش گیاهپزشکی ایران ۶۴ (۲): ۳۶۳-۳۷۱.

4. Ben-Shalom, N., and Fallik, E. 2003. Further suppression of *Botrytis cinerea* disease in cucumber seedling by chitosan-copper complex as compared with chitosan alone. Phytoparasitica 31: 99-102.
5. Jayaraj, J., Rahman, M., WAN, A., and Punja, Z. K. 2008. Enhanced resistance to foliar fungal pathogens in carrot by application of elicitors. Ann. Appl. Biol. 155: 71-80.
6. Hummerschmid,T. R. , Metraux, J-P. and Van Loon, L.C. 2001. Inducing resistance: a summary International Rice Research Institute. 2014. Standard evaluation system for rice. (5th ed.). International Rice Research Institute, Los Baños, Philippines
7. Kumar, M.N. 2000. Areview of chitin and chitosan applications. Reactive and Functional Polymers. 46:1-2
8. Nandeeshkumar, P., Sudisha, J., Ramachandra, K.K., Prakash, H.S., Niranjana, S.R., and Shekar, S.H. 2008. Chitosan induced resistance to downy mildew in sunflower caused by *Plasmopara halstedii*. Physiol. Mol. Plant Pathology 72: 188-194.
9. Raju, S. , Jayalakshmi, S. K. and Sreeramulu, K. 2008. Comparative study on the induction of defense related enzymes in two different cultivar of chickpea genotypes by alicylic acid, spermin and *F. oxysporum f. sp. ciceri* . Aust. J. Crop Sci . 2(3): 121-140.
10. Rodriguez, A. T. , ramirez, M. A. , cardenas, R. M. , hernandez, A. N. , velazquez, M. G. And bautista, S. 2007. Induction of defense response of Oryza sativa against *Pyrcularia grisea* by treating seeds with chitosan and hydrolyzed chitosan. Pest. Biochem. Physiol. 89: 206-215.
11. Zhang, H., Li, G. Li, W. and Song, F. 2009. Transgenic strategies for improving rice diseaseresistance. Afric. J. Biotech. 8: 1750-1757.

ارزیابی ژنوتیپ‌های جدید باقلا برای مقاومت به بیماری‌های لکه برگی در گرگان

فاطمه شیخ*[1]، محمد علی آقاجانی[2]

۱. استادیار بخش تحقیقات زراعی و باغی، مرکز تحقیقات وآموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان ،سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

۲. استادیار و عضو هیأت علمی بخش تحقیقات گیاهپزشکی. مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی گلستان. سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی

** نویسنده مسئول: sheikhfatemeh@yahoo.com*

چکیده

مقاومت به بیماری، ۳۶ ژنوتیپ باقلا به همراه رقم شاهد (برکت) در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در ایستگاه تحقیقات کشاورزی گرگان در سال زراعی ۱۳۹۳-۹۴ مورد بررسی قرار گرفت. سطوح مقاومت نسبت به بیماری‌های لکه برگی باقلا با استفاده از متغیرهای شدت بیماری، سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری (AUDPC) و سطح زیر منحنی استاندارد شده پیشرفت بیماری (sAUDPC) ارزیابی گردید. نتایج تجزیه واریانس صفات نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین ژنوتیپ‌ها از لحاظ مقاومت به بیماری وجود دارد. حساس ترین ژنوتیپ‌ها نسبت به بیماری‌های لکه شکلاتی، لکه برگی آلترناریایی و سوختگی استمفیلیومی با دارا بودن بیشترین مقدار AUDPC به ترتیب G-faba-31، G-faba-515 و رقم برکت و مقاوم‌ترین ژنوتیپ‌ها نسبت به بیماری‌های لکه شکلاتی، لکه برگی آلترناریایی و سوختگی استمفیلیومی با داشتن کمترین مقدار AUDPC به ترتیب G-faba-517، G-faba-10 و G-faba-332 تشخیص داده شدند.

واژگان کلیدی: باقلا، سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری (AUDPC)، شدت نهایی بیماری، عملکرد

مقدمه

برق‌زدگی (Ascochyta fabae)، لکه‌شکلاتی (Botrytis fabae Sard)، لکه برگی آلترناریایی (Alternaria spp.) و سوختگی استمفیلیومی (Stemphylium vesicarium) مهم‌ترین بیماری‌های لکه‌برگی باقلا هستند (تصویر ۱) که با خسارت زدن به برگ و محدود نمودن فتوسنتز، تولید باقلا در واحد سطح را کاهش می‌دهند (۵، ۱۰ و ۱۴). اگر چه عملیات زراعی مانند تناوب، شخم، سوزاندن بقایای محصول، تنظیم تراکم، تاریخ کاشت مناسب، نوع تغذیه و خاک و کنترل شیمیایی تا حدودی موجب حفاظت گیاهان می‌گردد، کنترل شیمیایی نیز یکی از راه‌های مبارزه با بیماری‌ها محسوب می‌شود، در این روش بیماری به طور کامل کنترل نمی‌شود و گران است (۹)، همچنین استفاده از سموم شیمیایی به محیط زیست (۸) و به سلامت انسان آسیب می‌رساند. بنابراین مناسب‌ترین روش کنترل بیماری‌ها در راستای تولید عملکرد قابل قبول، استفاده از ارقام مقاوم به بیماری است (۷، ۱۲ و ۱۴).

(الف) (ب) (ج) (د)

تصویر ۱- علایم بیماری‌های لکه‌شکلاتی (الف)، برق‌زدگی (ب)، سوختگی استمفیلیومی (ج) و لکه‌برگی آلترناریایی (د) (۱)

مواد و روش‌ها

به منظور بررسی عکس‌العمل عکس‌العمل ژنوتیپ‌های جدید باقلا نسبت به بیماری‌های لکه شکلاتی، لکه برگی آلترناریایی و سوختگی استمفیلیومی ۳۶ ژنوتیپ مختلف باقلا به همراه شاهد برکت در ایستگاه تحقیقات کشاورزی گرگان در قالب طرح بلوک کامل تصادفی در سه تکرار ارزیابی شدند. جهت ایجاد آلودگی با توجه به مستعد بودن منطقه برای گسترش بیماری به آلودگی طبیعی اکتفا شد، تنها برای حصول اطمینان بیشتر از وجود بیمارگرها و گسترش بیماری اطراف آزمایش، لاین حساس ILB 365 (۲) کشت شد. یادداشت برداری از مقدار بیماری در مزرعه از اردیبهشت‌ماه ۱۳۹۴ صورت پذیرفت. کرت‌های یادداشت برداری شده بر اساس یک برنامه‌ی زمانی مشخص (یک بار در هر هفته) مورد بازدید قرار گرفت و مقدار بیماری در مزرعه ثبت گردید. برای این منظور، در هر یادداشت برداری، با استفاده از فرم مخصوص یادداشت برداری، تعداد ۱۰ بوته در هر کرت به طور تصادفی انتخاب و نسبت به تعیین شدت و درصد آلودگی اقدام شد. وجود یا عدم وجود بیماری در آنها (به عنوان درصد یا میزان وقوع بیماری) و مقدار بیماری در بوته‌های بیمار (به عنوان شدت بیماری) ثبت شد. با توجه به درصد وقوع بالای بیماری در شاهد حساس در این آزمایش آلوده‌سازی صورت نگرفت و تنها به آلودگی طبیعی اکتفا شد. اپیدمی بیماری‌های گیاهی با اندازه‌گیری شدت یا درصد وقوع بیماری در ۶ مرحله طی فصل رشد ارزیابی شد. سپس مقادیر سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری (AUDPC)، سطح زیر منحنی استاندارد شده پیشرفت بیماری sAUDPC به صورت زیر به دست آمد (۱۶).

$$\mathrm{AUDPC} = \sum_{i=1}^{n} \frac{1}{2}(Y_{i+1} + Y_i)(X_{i+1} + X_i) \qquad \mathrm{sAUDPC} = \mathrm{AUDPC}/T$$

در فرمول‌های فوق Yi، شدت بیماری در ارزیابی iام؛ Xi، زمان برحسب روز از کاشت؛ T طول مدت زمان یادداشت‌برداری و n تعداد مراحل یادداشت‌برداری می‌باشد. تجزیه واریانس داده‌ها، تجزیه رگرسیون و مقایسه میانگین‌ها به روش LSD در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از نرم افزارSAS Ver. 9.2 انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه واریانس برای متغیرهای DS، AUDPC و sAUDPC نشان داد، تنوع بالایی برای عکس‌العمل ژنوتیپ‌های مورد بررسی نسبت به بیماری‌ها وجود دارد (جدول ۱). بر اساس مقادیر سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری (AUDPC)، لاین‌های G-faba-331، G-faba-235، G-faba-94 و G-faba-148 نسبت به بیماری‌های لکه شکلاتی، لاین‌های G-faba-515، G-faba-175، G-faba-522، G-faba-520 و رقم Barekat نسبت به لکه‌برگی آلترناریایی، لاین‌های G-faba-235 و رقم برکت نسبت به سوختگی استمفیلیومی حساسیت نشان دادند. لاین‌های G-faba-24، G-faba-57 و G-faba-332 نسبت به بیماری‌های لکه شکلاتی، لکه برگی آلترناریایی و سوختگی استمفیلیومی مقاوم بودند. بالاترین شدت نهایی بیماری لکه شکلاتی، لکه برگی آلترناریایی و سوختگی

استمفیلیومی در لاین G-faba-333، G-faba-247 و G-faba-522 مشاهده شد. پایین‌ترین شدت نهایی بیماری لکه شکلاتی در لاین G-faba-24 و بعد از آن دو لاین G-faba-519 و G-faba-10، پایین‌ترین شدت نهایی لکه برگی آلترناریایی در لاین G-faba-517، G-faba-524 و G-faba-235 و پایین‌ترین شدت نهایی بیماری سوختگی استمفیلیومی در لاین G-faba-522 مشاهده شد (جدول ۲).

روند پیشرفت بیماری در ماه‌های آذر، دی و اوایل بهمن در منطقه کند بود و در یک بوته، بافت‌های جوان علائم بیماری کمتری نسبت به بافت‌های مسن‌تر بروز دادند. رطوبت و دمای بالای ماه‌های بهمن و اسفند شرایط مناسبی را برای رشد و توسعه‌ی بیماری‌ها در منطقه ایجاد نمود که با اظهارات سایر محققان مطابقت داشت (۱۳). وجود تنوع برای صفات مورفولوژیک، عملکرد، اجزای عملکرد و صفات مرتبط با بیماری در بین ژنوتیپ های مورد بررسی، به انتخاب همزمان برای عملکرد و مقاومت کمک خواهد (۶). در مجموع با استفاده از نتایج حاصله می‌توان ژنوتیپ‌های برتر را معرفی و در برنامه های بِه‌نژادی با ترکیب و انتخاب صفات مطلوب به اهداف موردنظر دست یافت. مقاومت به بیماری های قارچی در ده ژنوتیپ شامل G-faba-1-1، G-faba-95، G-faba-100، G-faba-62، G-faba-67، G-faba-13، G-faba-16، G-faba-159، G-faba-133، G-faba-1-2 در گرگان مطالعه شد، نتایج نشان داد، تفاوت معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی از لحاظ شدت نهایی بیماری وجود دارد. کم‌ترین شدت نهایی بیماری در تمام ژنوتیپ‌ها مربوط به بیماری لکه برگی آلترناریایی بوده و بیش‌ترین شدت نهایی بیماری در تمام ژنوتیپ‌ها مربوط به بیماری سوختگی استمفیلیومی بوده است (۳). به طور کلی نتایج چندین ساله مطالعه مقاومت به بیماری های قارچی باقلا در گرگان نشان داد ارقام دانه ریز مقاومت بیشتری نسبت به بیماری ها دارند (۴).

جدول ۱- تجزیه واریانس میانگین مربعات برای صفات مرتبط با مقاومت به بیماری‌های لکه شکلاتی، لکه آلترناریایی و سوختگی استمفیلیومی

منابع تغییرات	درجه آزادی	DS6 (B)	DS6 (Al)	DS6 (S)	AUDPC(B)	AUDPC (Al)	AUDPC(S)
تکرار	۲	۲/۱۸ ns	۲۰/۵۲ ns	۱۵/۹۱ ns	۶۶۳۵۴/۴ ns	۳۶۴۰۳/۱ ns	۶۳۸۹۴ ns
تیمار (رقم)	۳۶	۸۸/۰۴ **	۶۸/۱۵ **	۷۷ **	۸۰۲۹۸/۹ **	۹۹۲۷۶/۴ *	۶۶۳۲۹/۸ *
اشتباه آزمایش	۷۲	۶/۱۲	۱۱/۶۴	۲۳/۳۱	۳۷۱۷۷/۷	۴۸۱۵۸/۵	۳۶۵۲۰/۲
ضریب تغییرات ٪		۸/۱۵	۸/۱۹	۱۰/۴۷	۸/۰۱	۸/۹۷	۹/۸۳

ns، * و ** به ترتیب بیانگر غیر معنی‌دار بودن، معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد خطا.

***متغیرهای مورد استفاده جهت ارزیابی بیماری‌ها عبارتند از: DS (B): (میانگین شدت بیماری نهایی لکه‌شکلاتی)، DS (A): (میانگین شدت بیماری نهایی لکه برگی آلترناریایی)، DS (S): (میانگین شدت نهایی بیماری سوختگی استمفیلیومی)، AUDPC(B): (دامنه‌ی تغییرات سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری لکه شکلاتی)، AUDPC(A): (دامنه‌ی تغییرات سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری لکه برگی آلترناریایی)، AUDPC (S): (دامنه‌ی تغییرات سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری سوختگی استمفیلیومی)

جدول ۲- میانگین داده‌های مرتبط با مقاومت به بیماری‌های لکه شکلاتی، لکه آلترناریایی و سوختگی استمفیلیومی

ژنوتیپ	DS (B)	DS (A)	DS (S)	AUDPC(B)	AUDPC (A)	AUDPC (S)	sAUDPC (B)	sAUDPC(A)	sAUDPC (S)
G-faba-10	۶۰/۷۴	۵۹/۰۷	۵۹/۲۵	۲۱۰۱/۴۳	۲۴۹۸/۵۶	۲۰۹۸/۴۸	۲۸/۰۱	۳۳/۳۱۴۲	۲۷/۹۷۹۷
G-faba-12	۶۸/۷۴	۶۰/۷۳	۵۷/۰۳	۲۶۷۲/۲	۲۸۳۰/۰۶	۲۰۸۰/۶۷	۳۵/۶۲۹۳	۳۷/۷۳۴۱	۲۷/۷۴۲۳
G-faba-57	۶۷/۹۵	۵۹/۲۵	۵۸/۷۳	۲۷۲۴/۲۳	۲۵۱۷/۹۸	۲۱۹۸/۵۵	۳۶/۳۲۳۱	۳۳/۵۷۳۱	۲۹/۳۱۴
G-faba-94	۶۹/۸۸	۶۶/۱۰	۶۴/۴۴	۳۰۵۴/۱۳	۲۶۱۸/۳	۲۲۹۲/۵۷	۴۰/۷۲۱۸	۳۴/۹۱۰۷	۳۰/۵۶۷۷
G-faba-96	۶۴/۴۴	۶۴/۵۱	۶۰/۶۳	۲۷۷۷/۶۸	۲۶۵۳/۹	۲۱۰۳/۳۱	۳۷/۰۳۵۷	۳۵/۳۸۵۴	۲۸/۰۴۴۲
G-faba-98	۷۴/۸۸	۶۷/۴۰	۵۷/۰۳	۲۹۵۹/۹۲	۲۸۲۸/۰۹	۲۱۰۱/۴۳	۳۹/۴۶۵۶	۳۷/۷۰۷۹	۲۸/۰۱۹۱
G-faba-104	۷۱/۲۵	۶۹/۱۸	۶۱/۴۸	۲۸۴۴/۲۶	۲۹۱۰/۱۸	۲۱۲۱/۲۳	۳۷/۹۲۳۵	۳۸/۸۰۲۴	۲۸/۲۸۳۱
G-faba-173	۷۴/۸۸	۷۳/۹۲	۶۲/۵۸	۲۹۵۰/۵۵	۲۷۵۴/۶۴	۲۳۴۶/۰۵	۳۸/۷۷۲۲	۳۶/۸۷۹۸	۳۱/۱۹۳۸
G-faba-115	۷۵/۵۵	۶۷/۹۹	۵۷/۷۷	۲۹۵۹/۹۲	۲۸۲۸/۰۹	۲۳۳۹/۴۳	۳۹/۴۶۵۶	۳۷/۷۰۷۹	۲۸/۰۱۹۱
G-faba-145	۷۳/۶۲	۵۹/۰۷	۶۰/۷۳	۲۹۰۷/۹۲	۳۰۵۹/۴۸	۲۰۳۱/۸۲	۳۸۷۷/۲۲	۳۵/۹۲۷۶	۲۷/۰۹۰۹
G-faba-148	۷۰/۵۱	۵۹/۰۷	۶۰/۷۳	۳۰۰۵/۰۴	۲۶۹۴/۵۷	۲۱۶۰/۱۴	۴۰/۰۶۷۲	۴۰/۶۷۷۵	۲۹/۰۵۰۹

G-faba-161	۵۹/۱۸	۶۹/۴۰	۶۱/۴۰	۲۷۸۸/۱	۲۸۰۵/۲۹	۲۰۷۹/۴۶	۳۳/۱۷۴۷	۳۶/۰۷۰۶	۲۸/۳۳۶۶
G-faba-175	۷۰/۱۰	۶۷/۴۰	۶۷/۴۰	۲۷۴۳/۷۴	۳۱۰۷/۴۵	۲۳۳۹/۵۴	۳۶/۵۸۳۲	۴۱/۴۳۲۷	۳۱/۱۹۳۸
G-faba-180	۶۷/۴۳	۶۲/۹۶	۶۴/۴۴	۲۸۶۲/۵۸	۲۷۶۵/۹۹	۲۰۹۸/۴۸	۳۸/۱۶۷۷	۳۶/۸۷۹۸	۲۷/۹۷۹۷
G-faba-514	۶۸/۱۴	۶۸/۲۹	۶۵/۹۲	۲۶۳۳/۱۹	۲۸۷۳/۴۶	۲۲۷۵/۹۱	۳۵/۱۰۹۲	۳۸/۳۱۲۷	۳۰/۳۴۵۴
G-faba-515	۷۴/۸۸	۷۴/۸۸	۶۵/۵۵	۲۸۵۸/۸۸	۳۱۸۹/۶۷	۲۲۲۱/۶۱	۳۸/۱۱۸۴	۴۲/۵۲۹	۲۹/۶۲۱۴
G-faba-517	۷۱/۴۴	۶۲/۵۶	۵۲/۶۶	۲۳۸۲/۰۴	۲۵۳۶/۰۵	۲۳۳۷/۱۶	۳۱/۶۶۵۶	۳۷/۷۷۲۲	۳۰/۸۸۲۲
G-faba-518	۷۴/۴۴	۶۷/۴۷	۵۷/۰۳	۲۶۹۱/۰۴	۲۹۹۸/۰۵	۲۳۳۷/۱۶	۳۵/۸۸۰۶	۳۹/۹۷۴۱	۳۱/۱۶۲۲
G-faba-519	۶۱/۵۵	۶۳/۶۷	۵۹/۳۳	۲۸۸۸/۵۶	۲۹۶۶/۸۱	۲۰۵۵/۳۳	۳۲/۶۵۵۵	۳۸/۲۲۷۵	۲۷/۸۰۱۹
G-faba-520	۵۹/۶۲	۶۹/۷	۶۲/۵۸	۲۶۹۲/۴۶	۳۰۵۰/۸۱	۲۱۶۰/۱۴	۳۵/۸۹۹۵	۴۰/۶۷۷۵	۲۸/۸۰۱۹
G-faba-521	۷۳/۲۵	۷۳/۹۲	۵۱/۳۴	۲۹۰۷/۹۲	۲۹۵۶/۵	۲۱۷۸/۸۲	۳۸/۷۷۲۲	۳۹/۴۱۹۹	۲۹/۰۵۰۹
G-faba-522	۷۰/۵۱	۶۹/۷۳	۴۸/۵۱	۲۵۸۷/۷۸	۳۰۵۹/۴۸	۲۱۷۴/۲۳	۳۴/۵۰۳۷	۴۰/۷۹۳۱	۲۸/۹۸۹۷
G-faba-523	۷۶/۵۱	۶۹/۸۱	۵۹/۲۵	۲۹۳۲/۶۳	۲۹۱۷/۵۸	۲۰۲۱/۰۹	۳۹/۱۰۱۷	۳۸/۹۰۱۱	۲۶/۹۴۷۹
G-faba-524	۶۳/۷	۵۹/۹۹	۵۴/۲۵	۲۷۷۷/۶۵	۲۵۲۶/۵۸	۲۱۵۳/۳۶	۳۷/۰۳۵۴	۳۳/۶۸۷۷	۲۸/۷۱۱۴
G-faba-525	۷۱/۱۰	۵۸/۸۸	۶۸/۸۸	۲۹۲۴/۶۱	۲۶۸۶/۰۷	۲۱۵۵/۲۹	۳۸/۹۹۴۹	۳۵/۸۱۴۲	۲۸/۷۳۷۲
G-faba-247	۷۰/۳۲	۷۵/۰۳	۶۲/۵۸	۲۹۲۹/۹۴	۲۹۶۸/۹۳	۲۴۹۸/۵۶	۳۹/۰۶۵۹	۳۹/۵۸۵۷	۳۳/۳۱۴۲
G-faba-249	۷۴/۲۵	۷۳/۰۷	۶۴/۴۴	۲۹۵۰/۵۵	۲۷۵۴/۶۴	۲۳۴۶/۰۵	۳۹/۳۴۰۷	۳۶/۷۲۸۵	۳۱/۲۸۰۷
G-faba-256	۶۰/۳۳	۶۰/۹۹	۵۵/۶۷	۲۶۵۵/۸۱	۲۵۹۱/۸	۱۹۶۷/۰۳	۳۵/۴۱۰۹	۳۴/۵۵۷۳	۲۶/۲۲۷
G-faba-257	۶۴/۸۱	۷۰/۴۰	۶۰/۰۳	۲۸۶۴/۱۵	۲۸۱۲/۲۶	۲۲۳۶/۹۱	۳۸/۱۸۸۶	۳۷/۴۹۶۷	۲۹/۸۲۵۴
G-faba-288	۷۶/۵۱	۶۹/۸۱	۵۹/۲۵	۲۹۸۶/۲۶	۲۵۹۱/۰۶	۲۴۱۴/۶۲	۳۵/۸۱۶۸	۳۶/۵۵۵۶	۳۲/۱۹۴۹
G-faba-333	۷۷/۰۳	۶۷/۴۷	۶۰/۳۶	۲۹۷۳/۹۷	۲۶۸۳/۶۵	۲۱۷۰/۸۷	۳۹/۶۵۲۹	۳۵/۷۸۲	۲۸/۹۴۴۹
G-faba-331	۷۶/۳۶	۶۱/۴۸	۵۵/۹۲	۳۱۶۶/۹۵	۲۶۰۰/۸۱	۱۹۷۱/۰۸	۴۲/۲۲۶	۳۴/۶۷۷۵	۲۶/۲۸۱
G-faba-332	۶۳/۳۳	۶۴/۹۹	۵۹/۶۲	۲۶۵۵/۸۱	۲۵۹۱/۸	۱۹۶۷/۰۳	۳۵/۴۱۰۹	۳۴/۵۵۷۳	۲۶/۲۲۷
شاهد	۷۵/۸۴	۷۱/۱۰	۶۳/۵۵	۲۹۸۶/۲۶	۳۰۰۳/۹۸	۲۸۱۴/۶۲	۳۹/۸۱۶۸	۴۰/۰۵۳	۳۶/۱۹۴۹
G-faba-24	۵۵/۱۸	۶۷/۴۰	۶۲/۴۰	۲۴۸۸/۱	۲۷۰۵/۲۹	۲۲۷۹/۴۶	۳۳/۱۷۴۷	۳۶/۰۷۰۶	۳۰/۳۹۲۸
G-faba-235	۷۴/۵۸	۶۸/۵۱	۴۹/۲۵	۲۸۰۳/۴۲	۲۶۸۷/۴۹	۲۱۰۰/۸۲	۳۷/۳۷۸۹	۳۵/۸۳۳۲	۲۸/۰۱۱
G-faba-31	۶۹/۲۵	۶۹/۴۰	۶۴/۰۷	۳۱۲۱/۰۶	۲۸۵۲/۶۳	۲۵۸۱/۲۲	۴۱/۶۱۴۱	۳۸/۰۳۵۱	۳۴/۴۱۶۳
LSD	۵/۳۳	۷/۴۴	۱۰/۵۲	۴۲۰/۳۴	۴۷۳/۴۱	۴۱۶/۶۱	۵/۶۰	۶/۳۱	۵/۵۱

متغیرهای مورد استفاده جهت ارزیابی بیماری‌ها عبارتند از: DS (B): (میانگین شدت بیماری لکه‌شکلاتی)، DS (A): (میانگین شدت بیماری لکه برگی آلترناریایی)، DS (S): (میانگین شدت بیماری سوختگی استمفیلیومی)، AUDPC(B): (دامنه‌ی تغییرات سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری لکه شکلاتی)، AUDPC(A): (دامنه‌ی تغییرات سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری لکه برگی آلترناریایی)، AUDPC (S): (دامنه‌ی تغییرات سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری سوختگی استمفیلیومی)، SAUDPC(B):(دامنه‌ی تغییرات سطح استاندارد شده‌ی زیر منحنی پیشرفت بیماری لکه شکلاتی)، SAUDPC(A): (دامنه‌ی تغییرات سطح استاندارد شده‌ی زیر منحنی پیشرفت بیماری لکه برگی آلترناریایی،(SAUDPC (S): (دامنه‌ی تغییرات سطح استاندارد شده‌ی زیر منحنی پیشرفت بیماری سوختگی استمفیلیومی)

منابع

۱- آقاجانی، م. ع.، نتاج، ر و ح. محمدی. ۱۳۸۸. راهنمای شناسایی و مدیریت بیماری‌های باقلا. انتشارات رشاد گرگان،۸۷ ص.

۲- شیخ، ف، دهقانی، ح. ۱۳۹۳. بررسی مقاومت ژنوتیپ‌های باقلا به بیماری لکه‌شکلاتی (*Botrytis fabae* sard.) در منطقه گرگان. نشریه پژوهش‌های ایران. جلد ۵، شماره ۱. صفحه ۱۳۹-۱۵۰.

۳-شیخ، ف.، سخاوت، ر.، آسترکی، ح.، میری، خ و م. ع. آقاجانی. ۱۳۹۵. گزارش نهایی پروژه تحقیقاتی "ارزیابی سازگاری ارقام امید بخش باقلا در ایران. سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی.

۴- کوهکن، ب.، ذولفقاری، ا. و ف. شیخ. ۱۳۹۴. ارزیابی مقاومت ژنوتیپ های مختلف باقلا نسبت به بیماری قارچی لکه شکلاتی در منطقه ی گرگان. دومین همایش ملی کشاورزی و توسعه. تهران. ایران.

5- Aghajani, M. A. 2009. Stemphylium leaf blight of broad bean in Iran. Journal of plant pathology, 91:4-5.

6- Anastasios S.L., G.R. Dimitrios and A. D. Christos. 2004. Evaluation of faba beans for resistance to sclerotinia stem rot caused by Sclerotinia trifoliorum. Phytoprotection, 85: 89-94.

7- Bouhassan, A., Sadiki, M. and Tivoli, B. (2004). Evaluation of a collection of faba bean *(Vicia faba* L.*)* genotypes originating from the Maghreb for resistance to chocolate spot (*Botrytis fabae*) by assessment in the field and laboratory. Euphytica, 135: 55–62.

8- Brown, J. K. M. (2006). Surveys of variation in virulance and fungicide resistance and their application to disease control. In: B. M. Cooke, D. G. Jones, B. Kaye (eds) the epidomology of plant disease. Dordrecht, The Netherland. 136P.

9- Egan, J., McMurray, L., Paull, J., Davidson, J. and Crouch, J. 2006. Reducing management inputs and maximising seed quality in faba bean throught improved varieties. In proceedings of the 13th Agronomic Society of Australia Conference perth, pp: 46-55.
10- Farag, H. I. A. and S. A. Afiah. 2012. Analysis of gene action in diallel crosses among some Faba bean (*Vicia faba* L.) genotypes under Maryout conditions. Annals of Agricultural Science, 57: 37–46.
11- Jelenic, S., P. T. Mitrikeski, D. Papes and S. Jelaska. 2000. Agrobacterium-mediated transformation of broad bean (*Vicia faba* L.). Food. Tec. Bio. 38: 167-172.
12- Patrick, J.W., and F. L. Stoddard. 2009. Physiology of owering and grain lling in faba bean. Field Cro. Res. No of pages.
13- Roman. B., Satovic, Z., Avila, C. M., Rubiales, D., Moreno, M. T. and Torres, A. M. 2003. Locating genes associated with Ascochyta fabae resistance in *Vicia faba* L. Australian Journal of Agricultural Research, 54: 85-90.
14- Stoddard, F.L., A. H. Nicholas, D. Rubiales, J. Thomas and A. M. Villegas-Fernandez. 2010. Integrated pest management in faba bean. Field Crop Research, 115: 308-318.
15- Tivoli, B., A. Baranger, C. M., Avila, S. Banniza, M. Arbetti, W. Chen, J. Davidson, K. Lindeck, M. Kharrat, D. Rubiales, M. Sadiki, J. C. Sillero, M. Sweetingham, and F. J. Muehlbauer. 2006. Screening techniques and sources of resistance to foliar diseases caused by major necrotrophic fungi in grain legumes. Euphytica, 147: 223–253.
16- Villegas-Fernandez, A. M., Sillero, J. C. and Rubiales, D. (2011). Screening faba bean for chocolate spot resistance: evaluation methods and effects of age of host tissue and temperature. European Journal of Plant Pathology, 132: 443-453.

ارزیابی مقاومت ژنوتیپ های جدید جو دیم نسبت به بیماری قارچی لکه قهوه‌ای در منطقه گنبدکاووس

فائزه وطنی*[1]، فاختک طلیعی[2]، رحمت اله محمدی گنبد [3]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، گروه کشاورزی، واحد گرگان

۲-عضو هیأت علمی دانشگاه گنبد کاووس

۳- بخش تحقیقات علوم زراعی- باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی گرگان- ایران

** نویسنده مسئول: Faezeh.vatani2017@gmail.com*

چکیده

به منظور بررسی واکنش ۱۸ ژنوتیپ جو در برابر بیماری‌های برگی مهم لکه قهوه ای در شهرستان گنبد کاووس واقع در شمال شرق استان گلستان، آزمایشی در قالب طرح بلوک های کامل تصادفی در ۴ تکرار در سال زراعی ۹۴-۱۳۹۳ انجام گردید. آلودگی در مزرعه به صورت مصنوعی از طریق کشت ارقام حساس ایجاد شد. معیارهای نتیجه گیری برای ارزیابی حساسیت یا مقاومت ژنوتیپ‌ها نسبت به بیماری‌های مختلف شامل سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری (AUPPC) و مقدار استاندارد شده‌ی سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری (SAUDPC) سطح زیر منحنی پیشرفت نسبی بیماری (rAUDPC) و شدت نهایی بیماری (FDS) بود. نتایج نشان داد که دامنه‌ی تغییرات مقادیر شاخص درصد شدت بیماری در هر نوبت اندازه‌گیری و شدت نهایی بیماری از ۴۴/۷۵ درصد در ژنوتیپ ۱۵ تا ۱۶/۹۷ درصد در ژنوتیپ ۱۴ در نوسان بود. نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌داری از نظر این صفت بین ژنوتیپ‌ها مشاهده نشد. بیشترین مقدار سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری در ژنوتیپ ۴ و ۵ با ۷۰۳/۲ و کمترین مقدار آن در ژنوتیپ ۱۴ با ۳۷۸/۱ مشاهده گردید. مقدار سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری از ۲۰/۸۶۴ و ۲۰/۰۹ در ژنوتیپ‌های ۵ و ۴ تا ۱۱/۹۷ در ژنوتیپ شماره ۷ در نوسان بود.

واژگان کلیدی: ارزیابی‌مقاومت، جو، لکه قهوه ای

مقدمه

غلات مهم‌ترین گیاهان غذایی و تأمین کننده‌ی ۷۰ درصد غذای مردم کره‌ی زمین می‌باشند. دانه‌ی جو هم در تغذیه‌ی انسان و هم در تغذیه‌ی دام به کار می‌رود و مقدار کمی هم به صورت تازه و در مرحله‌ای که هنوز دانه ها نرسیده، مورد تغذیه‌ی دام قرار می‌گیرد. شیوع بیماری لکه قهوه‌ای معمولی جو در مزارعی که به طور مداوم جو کاشته می‌شود، بسیار بالا می‌باشد. عامل بیماری ممکن است بذر زاد بوده و یا به صورت میسلیوم و کنیدیوم در بقایای گیاهی به سر برد و یا و یا کنیدی‌ها در سطح خاک پراکنده شده باشد. هوای مرطوب (بیشتر از ۱۶ ساعت) و حرارت بالای ۲۰ درجه سانتی‌گراد برای توسعه بیماری مناسب است (۲). قارچ عامل بیماری سبب پوسیدگی ریشه و طوقه جو نیز می‌گردد (۱۰). این بیماری باعث کاهش کمی و کیفی محصول جو شده است. کاهش عملکرد ناشی از این بیماری ۱۶ تا ۳۳ درصد گزارش شده است (۴). مقاومت ارقام رایج جو را نسبت به این بیماری، ارقام جو با نام‌های یوسف، فجر ۳۰، ریحان ۰۳ و رقم نصرت (کارون در کویر) در اصفهان مورد بررسی قرار داد. نتایج نشان داد که واکنش ارقام مورد آزمون به بیماری لکه قهوه‌ای جو در در دو منطقه اصفهان و اردستان

متفاوت بود و اختلاف معنی‌داری بین ارقام مشاهده شد. بر اساس اطلاعات به‌دست آمده از منطقه کبوترآباد (اصفهان) و بررسی‌های آماری مشاهده شد که فاکتور رقم اثر معنی‌داری ($P<0.01$) بر اساس بیماری داشته است. نتایج نشان داد که بر اساس آلودگی به بیماری لکه قهوه‌ای، ارقام در در دو گروه قرار گرفت. رقم یوسف با ۰/۳۷ درصد بیشترین آلودگی و رقم ریحان ۰۳ با ۰/۲۱ درصد کمترین آلودگی به بیماری را نشان داده‌اند.گوبیس و همکاران طی یک آزمایش مقاومت ۴۳ ژنوتیپ جوبهاره را نسبت به قارچ *B. sorkiniana* مورد ارزیابی قرار دادند شدت بیماری از ۶۲/۱ الی ۷۸/۲ متغیر بود. تعداد ۶ ژنوتیپ حساس و ۳۷ ژنوتیپ مقاوم به بیماری لکه قهوه‌ای معمولی جو بودند(۳). قزوینی و همکاران ، منابع مقاومت به بیماری لکه قهوه‌ای جو را در TR251، ۲۲۶ لاین دابل‌هاپلوئید به دست آمده از تلاقی TR251× CDC Bold با استفاده از مارکرهای مولکولی مورد بررسی قرار داد. نتایج نشان داد که مقاومت قابل ملاحظه‌ای بین لاین‌ها از نظر واکنش به بیماری وجود ندارد. بنابراین احتمالا مقاومت به وسیله‌ی بیش از یک یا دو ژن کنترل می‌گردد(۶). این پژوهش با هدف بررسی ارزیابی مقاومت ژنوتیپ های جدید جو دیم نسبت به بیماری قارچی لکه قهوه ای در منطقه گنبدکاووس صورت پذیرفت.

مواد و روش

به منظور بررسی واکنش ۱۸ ژنوتیپ جو نسبت به بیماری قارچی برگی لکه قهوه‌ای تحقیق در سال ۹۴-۱۳۹۳ در ایستگاه تحقیقات کشاورزی گنبد وابسته به مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان اجرا گردید. برای ارزیابی دقیق‌تر مقدار (شدت و پیشرفت عمودی بیماری) بیماری‌های برگی (به جز زنگ‌ها) در گندم، تریتیکاله و جو مقیاس SP به صورت یک مقیاس دو رقمی (۹۹-۰۰) در آمده است (۸). در این سیستم تغییر یافته، اولین رقم (D1) نشان دهنده‌ی روند توسعه بیماری در طول سایه انداز گیاه (کانوپی) گیاه از سطح زمین و دومین رقم (D2) میزان شدت بیماری روی سطح برگ آلوده است. پس از ظهور بیماری هر هفته شدت بیماری مورد ارزیابی قرار گرفت. برای هر ارزیابی درصد شدت بیماری بر اساس فرمول زیر محاسبه شد

$$\text{Severity (\%)} = (D1/9)\times(D2/9)\times 100$$ معادله‌ی ۱

شاخص سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری (AUDPC) برای هر ژنوتیپ بر اساس رابطه‌ی ریاضی زیر محاسبه می شود

$$\text{AUDPC} = \sum_{i=1}^{n} \frac{1}{2}(Y_{i+1} + Y_i)(X_{i+1} + X_i)$$ معادله‌ی ۲

همچنین مساحت زیر منحنی پیشرفت بیماری استاندارد شده (sAUDPC) از تقسیم مقدار AUDPC بر زول دوره اپیدمی و مساحت زیر منحنی پیشرفت بیماری نسبی (rAUDPC) با تقسیم مقدار AUDPC بر مقدار AUDPC در حساس‌ترین ژنوتیپ محاسبه گردید. داده‌های آزمایش به صورت بلوک در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با استفاده از نرم افزار آماری SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مقایسات میانگین وگروه‌بندی تیمارها بر اساس صفات مورد مطالعه با استفاده از آزمون LSD انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه‌ی واریانس داده‌های شاخص درصد شدت بیماری، مقدار سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری، مقدار سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری استاندارد شده و مقدار سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری نسبی شده مندرج در جدول ۴-۳ نشان می‌دهد، این صفت بین ۱۸ ژنوتیپ جدید کاشته شده و مورد آزمایش، برای آخرین نوبت اندازه‌گیری اختلاف معنی‌داری در

سطح احتمال یک درصد ($p<0.01$) مشاهده نگردید . اما در سایر صفات مورد بررسی دارای اختلاف معنی داری در سطح ۵ درصد مشاهده گردید.

جدول ۱- تجزیه واریانس صفات مربوط به بیماری لکه قهوه‌ای در ۱۸ ژنوتیپ جو

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		AUDPC	rAUDPC	sAUDPC	FDS
بلوک	۳	۱۵۱۲۸/۵۵	۱۳۲/۸۱	۱۲/۳۵	۵۳/۶۸
تیمار	۱۷	۴۳۰/۴۹*	۴۳۰/۴۹*	۴۰/۰۳*	۲۳۸/۴۴ ns
خطای آزمایش	۵۱	۲۲۲/۰۸	۲۲۲/۰۸	۲۰/۶۵	۱۹۲/۴۳
C.V		۳۱/۸۹	۳۱/۸۹	۳۱/۸۹	۴۶/۸۱

* ، ** و ns: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد، ۱ درصد و غیرمعنی‌دار

AUDPC = سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری

rAUDPC = سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری نسبی

sAUDPC = سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری استاندارد شده

FDS = شدت نهایی بیماری ارزیابی شده در نوبت آخر

نتایج حاصل از مقایسه‌ی میانگین داده‌های شاخص درصد شدت بیماری و به‌ویژه شاخص درصد شدت نهایی بیماری، مقدار سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری، مقدار سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری استاندارد شده و مقدار سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری نسبی شده بر اساس آزمون آماری LSD در سطح احتمال آماری ($p<0.05$) در جدول ۴-۴ آمده است. دامنه‌ی تغییرات مقادیر شاخص درصد شدت بیماری در هر نوبت اندازه‌گیری و شدت نهایی بیماری از ۴۴/۷۵ درصد در ژنوتیپ ۱۵ تا ۱۶/۹۷ درصد در ژنوتیپ ۱۴ در نوسان بود. نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌داری از نظر این صفت بین ژنوتیپ‌ها مشاهده نشد. بیشترین مقدار سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری در ژنوتیپ ۴ و ۵ با ۷۰۳/۲ و کمترین مقدار آن در ژنوتیپ ۱۴ با ۳۷۸/۱ مشاهده گردید. مقدار سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری از ۲۰/۸۶۴ و ۲۰/۰۹ در ژنوتیپ‌های ۵ و ۴ تا ۱۱/۹۷ در ژنوتیپ شماره ۷ در نوسان بود.

نتایج حاصل از تجزیه‌ی خوشه‌ای داده‌های صفات بیماری شناختی مربوط به بیماری لکه قهوه‌ای با استفاده از روش UPGMA و ضریب تشابه فاصله اقلیدسی، نشان داد که ژنوتیپ‌ها از نظر نوع واکنش به این بیماری در سه گروه عمده تقسیم شدند (شکل ۱). گروه اول با سه ژنوتیپ که با بیشترین مقدار برای صفات اندازه‌گیری شده، حساس ترین گروه شناخته شدند و مقدار متوسط سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری در این گروه، ۷۰۳/۹۳ بود. گروه دوم، با متوسط سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری ۴۱۱/۶۶ و ۸ عضو مقوم‌ترین گروه به بیماری بود. و گروه سوم با ۷ عضو و میانگین ۵۱۹/۰۸ حالت حدواسط داشتند. نتایج این تحقیق با نتایج گوبیس و همکاران (۲۰۱۰) که طی یک آزمایش مقاومت ۴۳ ژنوتیپ جو بهاره را نسبت به قارچ *B. sorkiniana* مورد ارزیابی قرار دادند مطابقت دارد. نتایج ایشان نشان داد که شدت بیماری از ۶۲/۱ الی ۷۸/۲ متغیر بود. تعداد ۶ ژنوتیپ حساس و ۳۷ ژنوتیپ مقاوم به بیماری لکه قهوه‌ای معمولی جو بودند.

جدول دو-مقایسه میانگین مقادیر اندازه‌گیری شده برای بیماری لکه قهوه‌ای بین ۱۸ ژنوتیپ جو

تیمارها	AUDPC	rAUDPC	sAUDPC	fDS
۱	۵۳۶/۹ abc	۵۰/۳۰ abc	۱۵/۳۴ abc	۳۴/۵۷ a
۲	۴۹۲/۶ bc	۴۶/۱۵ bc	۱۴/۰۷ bc	۲۶/۲۳ a
۳	۴۵۱/۱ c	۳۷/۹۶ c	۱۱/۵۷ c	۲۸/۰۹ a
۴	۷۰۳/۲ ab	۶۵/۸۹ ab	۲۰/۰۹ ab	۴۱/۰۵ a
۵	۷۳۰/۲ a	۶۸/۴۲ a	۲۰/۸۶۴ a	۳۶/۷۳ a
۶	۴۴۴ c	۴۱/۶۰ c	۱۲/۶۸ c	۳۶/۷۳ a
۷	۴۱۹/۱ c	۳۹/۲۷ c	۱۱/۹۷ c	۲۹/۳۲ a
۸	۵۵۵/۲ abc	۵۲/۰۲ abc	۱۵/۸۶ abc	۳۰/۸۶ a
۹	۵۴۸/۸ abc	۵۱/۴۲ abc	۱۵/۶۸ abc	۳۴/۵۷ a
۱۰	۴۰۸/۳ c	۳۸/۲۶ c	۱۱/۶۷ c	۲۵ a
۱۱	۴۸۶/۱ bc	۴۵/۵۵ bc	۱۳/۸۹ bc	۳۰/۸۶ a
۱۲	۴۲۷/۸ c	۴۰/۰۸ c	۱۲/۲۲ c	۱۹/۴۴ a
۱۳	۳۸۱/۳ c	۳۵/۷۳ c	۱۰/۸۹ c	۲۵ a
۱۴	۳۷۸/۱ c	۳۵/۴۳ c	۱۰/۸۰ c	۱۶/۹۷ a
۱۵	۶۷۸/۴ ab	۶۳/۵۶ ab	۱۹/۳۸ ab	۴۴/۷۵ a
۱۶	۴۷۹/۶ bc	۴۴/۹۴bc	۱۳/۷۰ bc	۲۱/۳۰ a
۱۷	۳۸۴/۶ c	۳۶/۰۳ c	۱۰/۹۹ c	۱۹/۴۴ a
۱۸	۵۱۶/۴ abc	۴۸/۳۸ abc	۱۴/۷۵ abc	۳۲/۴۱ a
LSD۰/۰۵	۳۱/۸۷	۳۶/۵۲	۹/۸۰	۳۲/۱۴

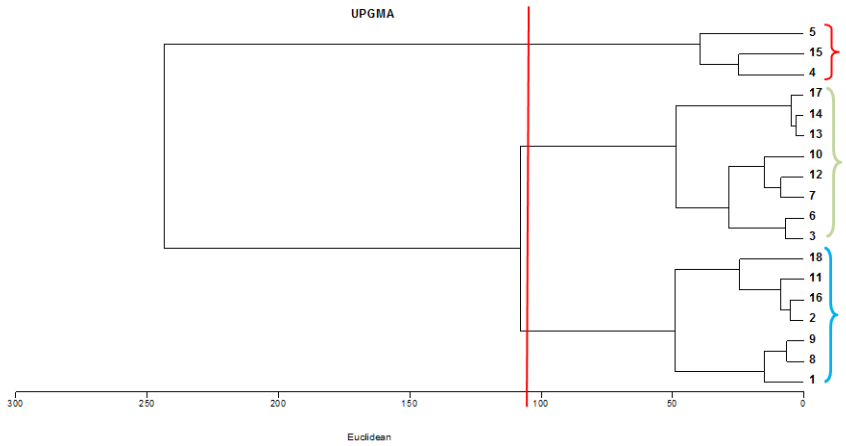
- اعدادی که دارای حروف مشترک هستند دارای اختلاف معنی‌داری نمی‌باشند.

AUDPC = سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری

rAUDPC = سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری نسبی

sAUDPC = سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری استاندارد شده

FDS = شدت نهایی بیماری ارزیابی شده در نوبت آخر



شکل ۱- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای مربوط به صفات بیماری شناختی بیماری لکه قهوه‌ای جو

ترسیم منحنی پیشرفت بیماری و محاسبه سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری (AUDPC) و مقایسه‌ی ژنوتیپ‌ها بر این اساس از روش‌های بررسی مقاومت ژنوتیپ‌ها در برابر بیمارگرها است. کاربرد AUDPC در مقایسه‌ی ژنوتیپ‌ها به این دلیل مورد تأکید است که یک معیار کمی از کل مقاومت هر ژنوتیپ است و تمام مؤلفه های مقاومت نظیر فراوانی آلودگی، زمان ظهور آلودگی و دوره‌ی زمانی آلودگی را دربرگرفته و مشخص میکند (۷). در کل، AUDPC شاخص کارآمدی در تمایز واکنش ژنوتیپ‌ها و ارقام نسبت به یک بیماری است (۹). با وجود کاهش عملکرد و خسارت بیماری‌های مختلف جو، اجرای برنامه‌های جامع و هدفمند در زمینه شناسایی منابع مقاومت و یا تولید ارقام مقاوم ضروری است و اجرای این تحقیق، گام مهمی در این جهت بوده است و سبب به کارگیری ارقام مقاوم، افزایش عملکرد و حفظ و پایداری محصول در مناطق آلوده خواهد شد.

منابع

1. Behrvazin, M. and Forotan, A. R. 2002. Study on the role of some factors affecting the epidemics of wheat powdery mildew in mazandaran province. Seed and Plant Improvement Journal, 18 (4), 450-469. (In Farsi)
2. Blum, A. 1988. Plant Breeding for Stress Environment. CRC Press Boca Raton, Floria.421-430
3. Gubis, J., Masar, S. and Gubisova, M. 2010. Resistance of spring barley genotypes to *Bipolaris sorokiniana*. Agriculture 56(1): 3-8.
4. Iftikhar, SH., Asad, SH., Rattu, A. U., Fayyaz, M., and Munir, A. 2009. Selection of barley germplasm resistant to spot blotch. Pak. J. Bot., 41 (1): 309-314.
5. Jordan, V.W., and Allen, E.C. 1984. Barely net blotch: Influence of straw disposal and cultivation methods on inoculums potential, and on incidence and severity of autumn disease. Plant Pathology 33:547-559.
6. Ghazvini, H. 2017.Ideatiti cation by selective genotyping of quantitative traite loci conterring resistance to cochlibolus satives in barley line TR 251.Crop Breeding gournal 4(1):35-45.
7. Rossi, V. 1999. Effect of host resistance and fungicide sprays against cercospora leaf spot in different sgar beet – growing areas of the Mediterranean basin. phytopathologia mediterranea, 38:465-470.
8. Sharma, R. C and Duveiller, E. 2006. Spot blotch continues to cause substantral grain yield reductions under resource limited farming conditions. Journal Phytopathology. 154:482-488.
9. Singh,A., and Rao, M.V.1989. Area under disease progress curre: its reliability as a measure of slow-rusting resistance. p; ant Breeding,103: 319 - 323.
10. Wordell, J.A., Vale, F.X.R., PRESTES, A. M. and ZAM Bolim, L. 2005. Resistance of barley genotypes to brown leaf spot. Euphytica, 142. 217-225.

تأثیر عوامل زراعی در بروز بیماری ساق زخم توتون در استان گلستان

بهاره بزازی*[۱]، امیر ذوالفقاری[۲]، سید افشین سجادی[۳]
۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان، ایران
۲- استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان، ایران
۳- محقق، بخش گیاه‌پزشکی مرکز تحقیقات و آموزش تیرتاش
** نویسنده مسئول: B.bazzazi@gmail.com*

چکیده

عامل ساق زخم توتون (*Rhizoctonia solani*)، از عوامل بیماری‌زای گیاهی با اهمیت می‌باشد که در تمام نقاط دنیا پراکنده بوده و می‌تواند موجب خسارت محصول در کشورهای تولیدکننده توتون گردد. جهت بررسی تأثیر عوامل مهم زراعی در بروز این بیماری در مزارع توتون استان گلستان، تعداد ۴۵ مزرعه توتون در پنج روستا مختلف منطقه گرگان و چهار روستا مختلف منطقه علی‌آباد در سال زراعی ۱۳۹۵، انتخاب و از زمان ظهور علایم بیماری طی بازدیدهای منظم هفتگی، میزان وقوع بیماری روی اندام‌های هوایی توتون در طول دوره آلودگی در مزارع یادداشت‌برداری شد. بررسی تجزیه‌های زمانی اپیدمی با استفاده از پنج مدل رشد نشان داد مدل گومپرتز، مناسب‌ترین مدل رشد برای توصیف پیشرفت این بیماری در شرایط استان گلستان می‌باشد. جمعیت قارچ و نماتد در خاک، تعداد دفعات سمپاشی در مزرعه و خزانه، مدت آبیاری، تناوب و بافت خاک مهم‌ترین متغیرها در بروز شدت بیماری ساق زخم در استان گلستان در سال زراعی ۱۳۹۵ بودند.

واژگان کلیدی: مدل گومپرتز، وقوع بیماری، سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری، دوره آلودگی

مقدمه

قارچ عامل بیماری ساق زخم توتون *Rhizoctonia solani* Kuhn (تلئومورف *Thanatephorus cucumeris* (Frank A. B) Donk است (۶). در سال‌های اخیر به دلایلی از قبیل وجود زادمایه کافی، کشت ارقام حساس و شرایط مساعد جوی این بیماری در استان گلستان به صورت یک بیماری جدی درآمده است. تحقیقات وسیعی برای مدیریت این بیماری از طریق به‌کارگیری ارقام مقاوم، استفاده از قارچ‌کش‌ها و عصاره‌های گیاهی انجام شده و یا در حال اجرا است (۲). یکی از ابزارهای مهم مدیریت بیماری، مطالعات اپیدمیولوژیک می‌باشد. یکی از جنبه‌های بررسی‌های کمّی اپیدمی‌ها، آنالیز زمانی آن‌ها و انتخاب یک مدل مناسب جهت توصیف داده‌های پیشرفت بیماری است. انتخاب مدل از این جهت مهم است که پارامترهای محاسبه شده مدل، پایه‌ی آنالیز آماری را تشکیل داده و مقایسه منحنی‌های پیشرفت بیماری را ممکن می‌سازند. منحنی پیشرفت بیماری با اندازه‌گیری مقدار بیماری موجود در یک جمعیت گیاهی در زمان‌های مختلف بدست می‌آید (۳).

از جمله مدل‌هایی که برای آنالیز داده‌های پیشرفت بیماری گیاهی بکار رفته‌اند، مدل نمایی (exponential)، تک مولکولی (monomolecular)، لوجستیک (logistic)، گومپرتز (Gompertz)، لوگ-لوجستیک (log-logistic)، ویبول (Weibull)، فون برتالانفی-ریچارد (Von Bertalanffy-Richards)، و پلی‌نومیال (polynomial) می‌باشند (۴). مدل نمایی که واندرپلانک (Vanderplank, 1963) آن را مدل لگاریتمی نیز نامیده است یکی از ساده‌ترین مدل‌هاست. این مدل وقتی کارآیی

خواهد داشت که هیچ محدودیتی در افزایش بیماری وجود نداشته باشد. واندرپلانک پیشنهاد کرده است که مدل نمایی ممکن است به منظور توصیف مراحل اولیه اپیدمی‌های چند چرخه‌ای (Polycyclic) مناسب باشد (۸). مدل لوجستیک به خاطر کارآیی بالا و کاربرد وسیعش در تشریح بسیاری از اپیدمی‌ها، احتمالا" مهم‌ترین مدل جهت آنالیز زمانی پیشرفت بیماری‌ها است (۴).

در تحقیقی تأثیر دما و بارندگی بر روی پیشرفت بیماری ساق سیاه توتون در کارولینای شمالی بررسی نمودند. آن‌ها گزارش نمودند که بیماری ساق سیاه توتون ۸-۶ هفته بعد از نشاکاری در کارولینای شمالی در مزارع توتون کارولینای شمالی مشاهده می‌شود (۵). دمای هوای روزانه، بارندگی و تعداد روزهای خشک در سرعت پیشرفت بیماری با اهمیت است. توسعه یک سیستم پیش‌آگاهی مطمئن به طور قابل توجهی توانایی توتون‌کاران برای مدیریت بیماری را افزایش داده و کاهش مصرف سم و سمپاشی را به دنبال دارد و ضمن حفظ محیط زیست، موجب کاهش هزینه و افزایش درآمد توتون‌کاران خواهد شد. هدف از این تحقیق بررسی عوامل مهم زراعی در بروز بیماری ساق زخم توتون در منطقه‌ی علی‌آباد و گرگان بود.

مواد و روش‌ها

به منظور بررسی وضعیت آلودگی به بیماری ساق زخم توتون در استان گلستان، طی سال زراعی ۱۳۹۵، تعداد ۴۵ مزرعه توتون در پنج منطقه مختلف گرگان (تقرتپه، جعفرآباد، قرق، نوده ملک و والش‌آباد) و چهار منطقه مختلف علی‌آباد (پیچک‌محله، برفتان، فاضل‌آباد و الازمن) انتخاب و از زمان ظهور علایم بیماری طی بازدیدهای منظم هفتگی، میزان بیماری روی اندام‌های هوایی توتون در طول دوره آلودگی در مزارع یادداشت‌برداری شد. مشخصات هر مزرعه شامل موقعیت جغرافیایی، نام روستا و توتون‌کار و ...) ثبت شد. متغیرهای زراعی کمّی شامل تاریخ نشاکاری، تاریخ کوددهی، تاریخ وجین، تعداد سمپاشی در خزانه و مزرعه، جمعیت قارچ و نماتد در خاک، تعداد و زمان آبیاری، تعداد شخم و دیسک و چین بود. متغیرهای زراعی کیفی شامل واریته دو سطح حساس و مقاوم به بیماری، میزان کود شامل دو سطح کوددهی کم و زیاد، تناوب و علف هرز دو سطح گیاهان میزبان و غیرمیزبان قارچ، و بافت خاک چهار سطح سبک (شنی)، نیمه سبک (سیلتی-لومی)، نیمه سنگین (لومی- رسی) و سنگین (رسی) بود. اطلاعات آب و هوایی (دما، رطوبت نسبی، بارش، تبخیر و تعرق، روزهای بارانی و ...) از ایستگاه‌های هواشناسی گرگان و علی‌آباد تهیه شد. با نمونه‌برداری خاک و انتقال آن به بخش گیاه-پزشکی مرکز تحقیقات و آموزش تیرتاش میزان جمعیت اینوکلوم قارچ و نماتد شمارش و ثبت شد.

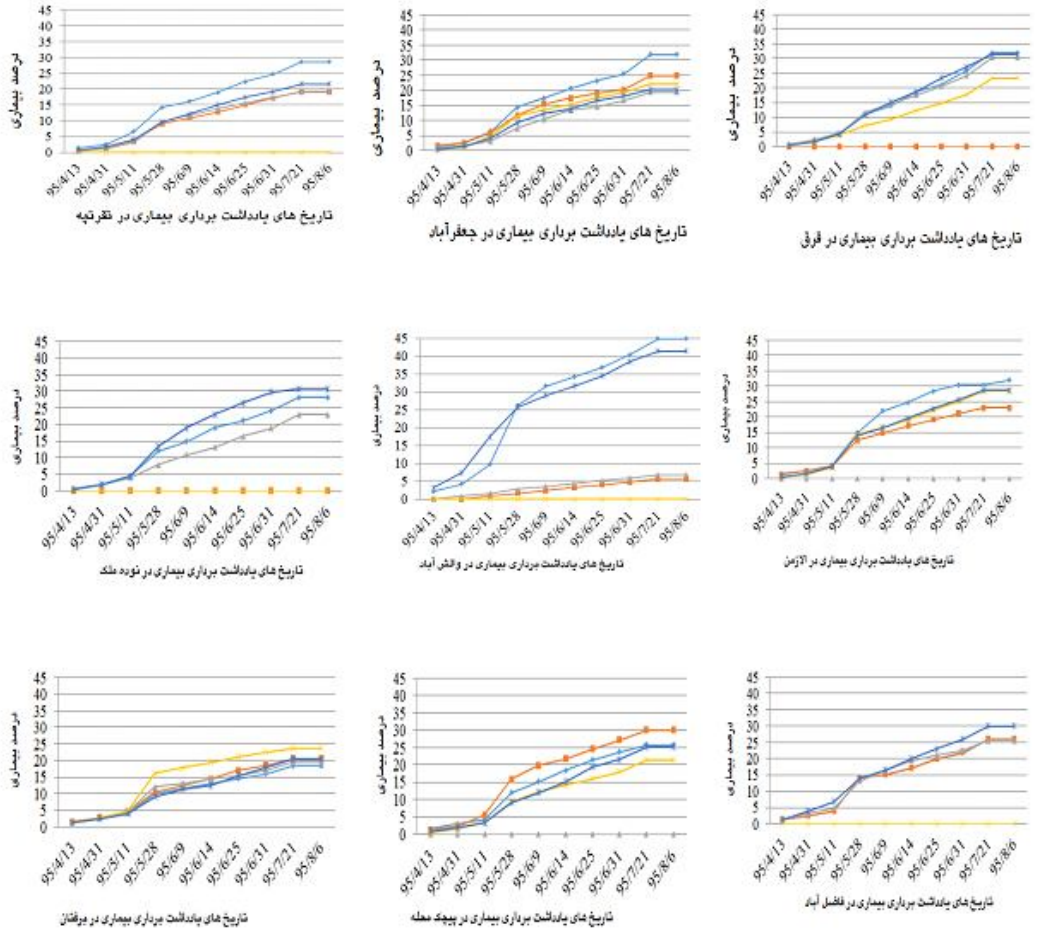
تجزیه‌ی آماری داده‌ها با استفاده از از نرم‌افزار StatGraphics Centurion XV, Version 15.2.05 (شرکت StatPoint) و رسم نمودارهای پیشرفت بیماری با استفاده از نرم افزار Harward Graphics صورت پذیرفت. با استفاده از دو روش آماری تجزیه تابع تشخیص (Discriminant analysis) و رگرسیون لجستیک (Logistic regression) عوامل تأثیر گذار بر وقوع همه‌گیری بیماری تعیین گردید. این مزارع در محدوده جغرافیایی بین عرض‌های ۳۶ درجه و ۵۱ دقیقه تا ۳۶ درجه و ۵۴ دقیقه شمالی و طول ۵۴ درجه ۳۷ دقیقه تا ۵۴ درجه و ۵۰ دقیقه شرقی واقع شده بودند. ارتفاع مزارع از سطح دریا نیز از ۱۰۱ تا ۲۳۶ متر بود.

نتایج و بحث

بررسی وقوع اپیدمی بیماری

از نظر درصد آلودگی اختلاف معنی‌داری بین مناطق و روستاهای مختلف در استان گلستان وجود نداشت و این نشان می‌دهد که شرایط آب و هوایی در بین دو منطقه و روستاهای مختلف تفاوت ندارد ولی با توجه به اینکه درصد آلودگی بین مزارع مختلف از نظر درصد آلودگی معنی‌دار است نشان می‌دهد که عوامل زراعی بین مزارع توتون‌کاران متفاوت بوده که درصد آلودگی بصورت متفاوت بروز داده است. در نمودار یک وضعیت بیماری ساق زخم توتون در روستاهای مختلف گرگان و

علی‌آباد در استان گلستان در سال ۱۳۹۵ را نشان می‌دهد. در تحقیقی از ۳۴/۹ درصد از مزارع توتون استان گلستان عامل ساق زخم توتون جداسازی و شناسایی شد. (۱).



نمودار ۱- وضعیت بیماری ساق زخم توتون در روستاهای مختلف گرگان و علی‌آباد در استان گلستان در سال ۱۳۹۵

در جدول یک بهترین مدل برای برازش اپیدمی‌های بیماری ساق زخم توتون در استان گلستان با توجه به همبستگی (۰/۸۹)، ضریب تبیین (۸۲/۹) و ضریب تبیین تعدیل شده (۸۱/۷) مدل گومپرتز بهترین مدل معرفی می‌گردد. در جدول دو نتایج مدل‌سازی اپیدمی بیماری ساق زخم توتون در استان گلستان بر اساس متغیرهای زراعی با استفاده از روش آماری تجزیه تابع تشخیص آمده است که فاکتورهای جمعیت قارچ و نماتد در خاک، تعداد دفعات سمپاشی در خزانه و مدت و تعداد آبیاری با ۱۰۰ درصد حساسیت پیش‌بینی صحیح بروز اپیدمی بیماری ساق زخم توتون می‌کند و فاکتورهای جمعیت قارچ و نماتد در خاک، تعداد دفعات سمپاشی در مزرعه و مدت آبیاری با ۱۰۰ درصد و فاکتورهای تعداد دفعات سمپاشی در خزانه با ۸۷/۵ و مدت و تعداد آبیاری با ۷۵ درصد پیش بینی صحیح عدم بروز اپیدمی بیماری ساق زخم توتون می‌کند. در تحقیقی عوامل مهم زراعی مانند مایه تلقیح قارچ در خاک، ارقام حساس و عدم کنترل شیمیایی در بروز بیماری گزارش شد (۱). در جدول سه وضعیت معنی‌داری متغیرهای کیفی زراعی در بروز بیماری ساق زخم توتون در استان گلستان را نشان می‌دهد که متغیرهای میزان کود، نوع تناوب، علف هرز و بافت خاک در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شده است و متغیر واریته از لحاظ درصد آلودگی در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار شده است. متغیر نوع خزانه معنی‌دار نشد. نمودار دو نشان می‌دهد

که در این تحقیق در بافت خاک سبک (شنی) بیماری ساق زخم توتون بروز نکرد. در بافت خاک نیمه سبک (سیلتی- شنی) بیماری بین صفر تا ۲۰ درصد بروز نمود. در بافت خاک نیمه سنگین (لومی-رسی) بیماری بین ۲۰ تا ۳۰ درصد بروز کرد و در خاک سنگین (رسی) بیماری ساق زخم توتون بیش از ۳۰ درصد بروز نمود.

جدول۱- خلاصه آماره‌های تجزیه رگرسیون خطی برای برازش مدل‌های اپیدمی بیماری ساق زخم توتون در استان گلستان در سال ۱۳۹۵

مدل	سطح احتمال	همبستگی	ضریب تبیین	ضریب تبیین تعدیل شده	میانگین مربعات خطا	عرض از مبدا	شیب خط
خطی	۰	۰/۷۱	۵۱/۴	۵۱/۱۵	۰/۸۳	-۰/۰۴۸	۰/۰۲۶
تک مولکولی	۰	۰/۷۱	۵۳/۹	۵۳/۲	۰/۰۴	-۰/۰۴۵	۰/۰۰۲۳
لجستیک	۰	۰/۷۳	۷۶/۴	۷۶/۱	۰/۸۵	-۴/۵۶	۰/۰۲۹
لاگ لجستیک	۰	۰/۸۶	۷۹/۴	۷۹/۳	۰/۸۶	-۱۰/۸	۲/۰۱
گومپرتز	۰	۰/۸۹	۸۲/۹	۸۱/۷	۰/۳۳	-۱/۶	۰/۰۱

جدول۲- نتایج مدل‌سازی اپیدمی بیماری ساق زخم توتون در استان گلستان بر اساس متغیرهای زراعی با استفاده از روش آماری تجزیه تابع تشخیص در سال ۱۳۹۵

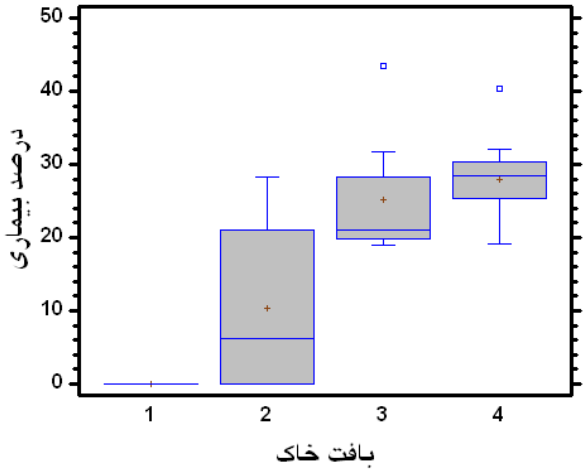
متغیر وابسته	متغیر مستقل	نام متغیر	سطح احتمال	همبستگی کانونی	درصد موارد صحیح	اختصاصی	حساسیت
		جمعیت قارچ در خاک	۰	۰/۸۵	۷۱/۱۱	۱۰۰	۱۰۰
		تعداد سمپاشی در خزانه	۰	۰/۸۴	۵۷/۷۸	۸۷/۵	۱۰۰
		جمعیت نماتد در خاک	۰	۰/۷۱	۵۱/۱	۱۰۰	۱۰۰
		مدت آبیاری	۰	۰/۷	۴۶/۶۷	۷۵	۱۰۰
		تعداد سمپاشی در مزرعه	۰	۰/۶۹	۵۵/۵۶	۱۰۰	۰
		تاریخ وجین	۰/۰۰۳	۰/۵۳	۳۵/۵۶	۰	۵۰
اپیدمی بیماری	**درصد آلودگی**	تعداد آبیاری	۰/۰۵	۰/۴	۳۵/۵	۷۵	۱۰۰
		تاریخ کوددهی	۰/۰۹	۰/۳۷	۴۰	۳۷/۵	۱۰۰
		تاریخ نشاکاری	۰/۱۷	۰/۳۳	۳۵/۵۶	۰	۵۰
		تعداد شخم	۰/۲۲	۰/۳۱	۲۸/۹	۰	۱۰۰
		تعداد دیسک	۰/۲۴	۰/۳	۳۷/۸۷	۷۵	۰
		تعداد چین	۰/۷۵	۰/۱۶	۳۱/۱۱	۰	۱۰۰
		واریته	۰/۶۷	۰/۱۳	۴۲/۲	۶۲/۵	۵۶

اختصاصی: پیش بینی صحیح عدم وقوع اپیدمی حساسیت: پیش بینی صحیح وقوع اپیدمی

جدول۳- وضعیت معنی‌داری متغیرهای کیفی زراعی در دوره زمانی اپیدمی بیماری ساق زخم توتون در استان گلستان بر اساس ANOVA در سال ۱۳۹۵

متغیر وابسته	متغیر مستقل	تعداد سطح	سطح احتمال	F-Ratio
واریته	درصد آلودگی	۲	۰/۰۳	۴/۹۳
	سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری	۲	۰/۰۶	۳/۷
نوع خزانه	درصد آلودگی	۲	۰/۱۲	۲/۴۵
	سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری	۲	۰/۲۳	۱/۴۸
میزان کود	درصد آلودگی	۲	۰	۶۳/۸
	سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری	۲	۰	۵۹/۶

نوع تناوب	درصد آلودگی	۲	۰	۲۳/۹
	سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری	۲	۰/۰۰۰۴	۱۵/۰۱
علف هرز	درصد آلودگی	۲	۰/۰۰۰۷	۱۳/۲۳
	سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری	۲	۰/۰۰۵	۸/۴۹
بافت خاک	درصد آلودگی	۴	۰	۱۷/۲۶
	سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری	۴	۰	۱۶/۴۱



نمودار ۲- نمودار جعبه‌ای رابطه بافت خاک و درصد بیماری بیماری ساق زخم توتون طی سال ۱۳۹۵ در استان گلستان

منابع

۱. سجادی، ا.، عاصمی، ه. ۱۳۹۱. شناسایی قارچهای خاکزی بیماری‌زای توتون در مزارع استان گلستان. گیاه‌پزشکی کاربردی ۱(۳): ۲۳۳-۲۴۸.

۲. سجادی، ا.، عاصمی، ه. ۱۳۹۳. بررسی تاثیرات ضدقارچی عصاره‌های گیاهی نعناع گربه‌ای، توتون و آویشن کوهی بر قارچهای بیماری‌زای توتون. کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی ۳ (۱): ۴۱-۵۲.

3. Campbell, C. L., Jacobi, W. R., Powell, N. T., and Main, C. E. 1984. Analysis of disease progression and the randomness of occurrence of infected plants during tobacco black shank epidemics. Phytopathology. 74: 230-235.
4. Campbell C L and Madden L V, 1990. Introduction to plant Disease Epidemiology. John Wiley & Sons, M. C. N. Y. 532 pp.
5. Jacobi, W. R., Main, C. E., and Powell, N. T. 1983. Influence of temperature and rainfall on the development of tobacco black shank. Phytopathology. 73: 139-143.
6. Lucas G B, 1975. Disease of Tobacco, 3rd, edition, Biological consulting Associates, Releight, north Carolina. 621pp.
7. Van der plank, J. E. 1963. Plant disease: epidemics and control. Academic Press, New York.

بررسی وضعیت آلودگی به بیماری ساق زخم توتون در استان گلستان

بهاره بزازی*[۱]، امیر ذوالفقاری[۲]، سید افشین سجادی[۳]
۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان، ایران
۲- استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان، ایران
۳- محقق، بخش گیاه‌پزشکی مرکز تحقیقات و آموزش تیرتاش
** نویسنده مسئول: B.bazzazi@gmail.com*

چکیده

عامل ساق زخم توتون (*Rhizoctonia solani*)، از عوامل بیماری‌زای گیاهی با اهمیت می‌باشد که در تمام نقاط دنیا پراکنده بوده و می‌تواند موجب خسارت محصول در کشورهای تولیدکننده توتون گردد. برای مبارزه با این بیمارگر در اغلب محصولات گیاهی از روش‌های متفاوتی نظیر کنترل شیمیایی، کنترل بیولوژیک، استفاده از عصاره‌های گیاهی و روغن‌ها، ارقام مقاوم و غیره بهره برده شده است. جهت بررسی وضعیت آلودگی به این بیماری در مزارع توتون استان گلستان، در سال زراعی ۱۳۹۵، تعداد ۴۵ مزرعه توتون در پنج منطقه مختلف گرگان (تقرتپه، جعفرآباد، قرق، نوده ملک و والش‌آباد) و چهار منطقه مختلف علی‌آباد (پیچک‌محله، برفتان، فاضل‌آباد و الازمن) انتخاب و از زمان ظهور علایم بیماری طی بازدیدهای منظم هفتگی، میزان بیماری روی اندام‌های هوایی توتون در طول دوره آلودگی در مزارع یادداشت‌برداری شد. تجزیه‌ی آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Statsgraphic 16.0 از لحاظ حداکثر وقوع بیماری در مناطق مختلف اختلاف معنی‌داری وجود نداشت اما در مزارع مختلف یک روستا اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود داشته است. حداکثر میزان آلودگی مزرعه‌ای با ۴۴/۸ درصد آلودگی در روستای والش آباد بود. از لحاظ سطوح زیر منحنی-های پیشرفت بیماری نیز بین مناطق اختلاف معنی‌داری وجود نداشت اما در مزارع مختلف یک روستا اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود داشته است. حداکثر سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری در یکی از مزارع روستای والش‌آباد (۲۶۴۷) بود. نتایج حاصل از این بررسی نشان می‌دهد بیماری ساق زخم توتون در تمام مناطق توتون‌کاری استان گلستان با میزان وقوع متفاوت گسترش دارد.

واژگان کلیدی: *Rhizoctonia solani*، وقوع بیماری، سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری، دوره آلودگی

مقدمه

توتون (*Nicotiana tabacum* L.) گیاهی از خانواده بادمجانیان یکی از مهم‌ترین گیاهان زراعی است که در اقتصاد کشورهای تولیدکننده مانند چین، یونان، ترکیه، برزیل، ژاپن و آمریکا نقش مهمی دارد. در ایران سطح زیر کشت توتون و سایر محصولات دخانی (توتون و تنباکو) در سال ۱۳۹۳ برابر با ۸۱۰۰ هکتار بوده که سطحی معادل ۶۱۰۰ هکتار مربوط به کشت توتون سیگارت بود. در همین سال تولید کل محصولات دخانی بالغ بر ۱۲۶۰۰ تن و تولید سیگارت برابر با ۱۱۰۰۰ تن بوده است (۱).

اولین گزارش از بروز بیماری ساق زخم توتون ناشی از *Rhizoctonia solani* در سال ۱۹۰۴، از ایالات متحده امریکا بر روی خزانه نشا توتون توسط Selby گزارش شد. قارچ عامل ساق زخم توتون از عوامل محدودکننده کشت آن در تمام مناطق توتون‌خیز دنیا می‌باشد. علائم بیماری ابتدا لکه‌های آبسوخته کوچک در طوقه مشاهده شده و این ناحیه به سرعت قهوه‌ای تیره و گود می‌شود. این قارچ به صورت ریسه در مواد آلی خاک و یا اسکلروت (عضو مقاوم در شرایط نامساعد) زمستانگذرانی می‌کند. قارچ عامل بیماری ساق زخم توتون *Rhizoctonia solani* Kuhn (تلئومورف *Thanatephorus cucumeris* (Frank A. Donk (B است. این قارچ ازگروه قارچهای ناقص دئوتروميستها[1] که کنیدی تولید نمی‌کنند[2]. بیمارگری پلی‌فاژ که دامنه میزبانی وسیعی داشته و به انواع محصولات باغبانی، زراعی، علوفه‌ای، غلات، درختان میوه، علف‌های هرز و ... حمله می‌کند. دامنه میزبانی این بیمارگر حدود ۶۶ خانواده، ۱۱۸ جنس و ۲۳۰ گونه تعیین شده است (۷). در حال حاضر مبارزه با بیماری ساق زخم توتون به صورت کنترل شیمیایی با استفاده از قارچ‌کش تیوفانات متیل (توپسین‌ام پودر وتابل ۷۰ درصد) صورت می‌گیرد که با توجه به خاکزی بودن قارچ مدیریت آن مشکل است (۳). هدف از اجرای این تحقیق، بررسی وضعیت بیماری ساق زخم توتون در سطح دو شهرستان شامل نه روستای استان گلستان و تعیین اهمیت و پراکنش بیماری در نقاط مختلف استان بوده است.

مواد و روش‌ها

به منظور بررسی وضعیت آلودگی به بیماری ساق زخم توتون در استان گلستان، طی سال زراعی ۱۳۹۵، تعداد ۴۵ مزرعه توتون در پنج منطقه مختلف گرگان (تقرتپه، جعفرآباد، قرق، نوده ملک و والش‌آباد) و چهار منطقه مختلف علی‌آباد (پیچک‌محله، برفتان، فاضل‌آباد و الازمن) انتخاب و از زمان ظهور علایم بیماری طی بازدیدهای منظم هفتگی، میزان بیماری روی اندام‌های هوایی توتون در طول دوره آلودگی در مزارع یادداشت‌برداری شد. این مزارع در محدوده جغرافیایی بین عرض-های ۳۶ درجه و ۵۱ دقیقه تا ۳۶ درجه و ۵۴ دقیقه شمالی و طول ۵۴ درجه ۳۷ دقیقه تا ۵۴ درجه و ۵۰ دقیقه شرقی واقع شده بودند. ارتفاع مزارع از سطح دریا نیز از ۱۰۱ تا ۲۳۶ متر بود.

علایم بیماری

طی بازدیدهای مستمر هفتگی، مقدار بیماری در مزارع و مناطق مختلف یادداشت شد. در هر مزرعه ۵۰۰ بوته در ۵ ردیف کاشت ۱۰۰ بوته‌ای در نقاط مختلف مزرعه در نظر گرفته شد و وجود یا عدم وجود علایم بیماری در آن‌ها طی مراحل مختلف ثبت شده و میزان وقوع بیماری (درصد بوته‌های دارای علایم) تعیین گردید. از این طریق زمان شروع، پایان و بیشترین میزان تشکیل علایم مشخص شد. با تجزیه واریانس و مقایسه میانگین داده‌های مربوط به بیشترین وقوع علایم بیماری، اختلاف مزارع و مناطق تحت بررسی از این لحاظ در طی فصل زراعی مشخص شد.میزان وقوع یا درصد آلودگی به بیماری که نشان‌دهنده تعداد بوته‌های بیمار نسبت به کل بوته‌های بررسی شده است با استفاده از فرمول $I=\Sigma x/N$ به‌دست آمد. که در این معادله **I** بیانگر میزان وقوع بیماری، **x** بیانگر تعداد بوته‌های بیمار و **N** بیانگر تعداد کل بوته‌های ارزیابی شده می‌باشد (۵).

سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری

جهت محاسبه سطوح زیر منحنی پیشرفت بیماری از معادله $AUDPC=\Sigma_i^{n-1}[((x_i + x_{i+1})/2)(t_{i+1} + t_i)]$ استفاده گردید که در این معادله *AUDPC* بیانگر سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری، n بیانگر تعداد ارزیابی، x_i بیانگر وقوع یا شدت متوسط بیماری در i امین ارزیابی و t_i بیانگر زمان i امین ارزیابی می‌باشد. با تجزیه واریانس و مقایسه میانگین داده‌های مربوط به سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری، اختلاف بین مزارع و مناطق تحت بررسی از این لحاظ نیز در طی فصل زراعی مشخص

[1]. Deuteromycetes
[2]. Mycelia Sterilia

شد. تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار StatGraphics Centurion XV, Version 15.2.05 (شرکت StatPoint) صورت گرفت.

نمونه‌برداری، جداسازی، شناسایی، تهیه زادمایه عامل بیماری و اثبات بیماری‌زایی

در طی بازدیدهای مختلف از توتون‌های بیمار با علائم بیماری نمونه‌برداری به عمل آمد. بافت آلوده طوقه و ریشه توسط محلول یک درصد هیپوکلریت سدیم برای مدت سه دقیقه، چند بار در آب مقطر سترون شست و شو داده شده و سپس روی کاغذ صافی سترون خشک گردید. نمونه‌ها در محیط کشت آب آگار[1] و سیب زمینی دکستروز آگارکشت شد. ظروف پتری در دمای ۲۵°C نگهداری و پس از مشاهده رشد قارچ، به روش کشت از نوک ریسه خالص‌سازی شد (۶). شناسایی گونه‌های مختلف رایزوکتونیا بر اساس شکل و رنگ پرگنه و سایر خصوصیات مورفولوژیک با استفاده از کلید اسنه و همکاران صورت گرفت (۸). برای تهیه مایه تلقیح حدود ۲۵۰ گرم دانه گندم را داخل ارلن نیم لیتری ریخته و دو بار، هر بار به مدت ۳۰ دقیقه درون اتوکلاو و به فاصله ۲۴ ساعت در دمای ۱۲۱°Cو فشار ۱/۱ اتمسفر سترون گردید. بعد از خارج کردن ارلن‌ها از اتوکلاو و سرد شدن آن‌ها، تحت شرایط سترون زیر هود، قطعاتی از حاشیه کشت ۷ روزه جدایه R24 قارچ *R. solani* روی محیط کشت PDA به ارلن‌های حاوی گندم اتوکلاو شده اضافه شد. ارلن‌ها به مدت ۲۱ روز در انکوباتور با دمای ۲۴°C نگهداری شد. برای مایه‌زنی، ۲ گرم دانه گندم حاوی قارچ در محل طوقه گیاهچه‌های توتون رقم کا ۳۲۶ که در ۵ گلدان یک کیلوگرمی نشا شده بود قرار داده شد (۲).

نتایج و بحث

علایم بیماری

ظهور اولین علایم بیماری روی بوته توتون از تاریخ ۹۵/۴/۱۲ در روستای والش‌آباد گرگان و سپس در مناطق دیگر مشاهده شد. از لحاظ حداکثر وقوع بیماری در مناطق مختلف اختلاف معنی‌داری وجود نداشت اما در مزارع مختلف یک روستا اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود داشته است (جدول یک). تغییرات درصد آلودگی بین صفر (یک مزرعه در همه روستاها بجز روستاهای برفتان و جعفرآباد) تا حداکثر مزرعه‌ای با ۴۴/۸ درصد آلودگی در روستای والش‌آباد بود. نتایج حاصل از این بررسی نشان می‌دهد بیماری ساق زخم توتون در تمام مناطق توتون‌کاری استان گلستان با میزان وقوع متفاوت گسترش دارد. در تحقیقی از ۳۴/۹ درصد از مزارع توتون استان گلستان عامل ساق زخم توتون جداسازی و شناسایی شد (۲).

سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری

تجزیه واریانس سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری بر اساس طرح آشیانه‌ای در جدول ۱ آمده است. نتایج تجزیه واریانس نشان می‌دهد که بین مناطق اختلاف معنی‌داری وجود نداشته اما در مزارع مختلف یک روستا اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود داشته است. حداکثر سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری مزرعه‌ای در روستای والش‌آباد (۲۶۴۷) بود (جدول دو).

شناسایی و اثبات بیماری‌زایی

این قارچ روی محیط PDA در دمای ۲۸°C رشد سریعی دارد، به طوری‌که ۳ تا ۴ روز بعد از کشت، تمام سطح پتری را می‌پوشاند. میسلیوم‌ها هم در سطح محیط کشت و هم بصورت هوایی رشد می‌کنند.کلنی قارچ در ابتدا بی‌رنگ و بعداً به رنگ کرم مایل به قهوه‌ای تغییر می‌یابد (شکل ۴). از روز هفتم به بعد در سطح کلنی، اسکلروت‌ها ظاهر می‌شوند که سفید رنگ هستند اما به تدریج بزرگ و فشرده‌تر شده و ظرف ۲ تا ۳ روز تبدیل به اسکلروت‌های قهوه‌ای رنگ می‌شوند. انشعابات هیف‌ها با زاویه قائمه است در قاعده انشعابات فرورفتگی مشخص وجود دارد و کمی بالاتر از آن دیوار عرضی تشکیل می‌شود (شکل

[3]. WA

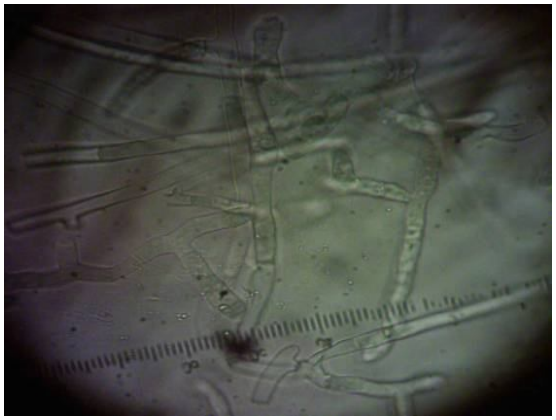
۵). تعداد هسته‌ها در سلول‌های هیف ۱۱-۳ و قطر هیف ۱۱-۶ میکرون بود. فاصله دیواره عرضی از محل فرورفتگی در انشعابات در جدایه مورد بررسی ۲۵-۳ میکرون بود. در اثبات بیماری‌زایی همه توتون‌های ۵ گلدان آلوده شدند و در جداسازی مجدد قارچ *R. solani* مجددا" جداسازی گردید که با خصوصیات قارچ اولیه مطابقت داشت. پس از مایه‌زنی ابتدا لکه‌های آبسوخته‌ی کوچک در طوقه مشاهده شد و به سرعت این ناحیه قهوه‌ای تیره و گود گردید. (شکل ۶).

شکل ۱- علائم ساق زخم روی رقم کا ۳۲۶

تصویر ۲- علایم مرگ گیاهچه ناشی از قارچ عامل *R. solani*

تصویر ۳- میسلیوم قارچ رایزوکتونیا در منافذ سینی نشا

شکل ۴- پرگنه‌ی دو جدایه‌ی *R. solani*



شکل ۵- ریسه‌های قطور همراه با انشعابات قائمه *R. solani*

شکل ۶- نشانه‌ی بیماری در اثبات بیماری‌زایی روی رقم کا ۳۲۶

جدول۱- تجزیه واریانس وقوع بیماری ساق زخم در مزارع توتون استان گلستان در سال ۱۳۹۵

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		یادداشت برداری هشتم	یادداشت برداری نهم	یادداشت برداری دهم	سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری
منطقه	۱	۲۴/۳^{ns}	۹/۲^{ns}	۹/۲^{ns}	۳۳۳۲۲۷^{ns}
روستا	۸	۹/۹^{ns}	۱۸/۵^{ns}	۱۸/۵^{ns}	۱۰۰۰۵۶^{ns}
مزرعه	۴۰	۴۱۲/۰۹**	۴۹۹/۹**	۴۹۹/۹**	۱۷۲۹۵۶۰**
خطا	۱۵۰	۷	۱۱۳/۰۳	۱۱۳/۰۳	۳۹۸۶۹۹
کل	۱۹۹				
ضریب تغییرات (درصد)		۱۶/۳	۱۸/۴	۱۸/۴	۱۵/۴

**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد ^{ns}: غیر معنی‌دار

جدول۲- درصد آلودگی و سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری به بیماری ساق زخم توتون در روستاهای مختلف استان گلستان در سال ۱۳۹۵

نام روستا	شماره مزرعه	درصد آلودگی	سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری	نام روستا	شماره مزرعه	درصد آلودگی	سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری
	۱	۲۸/۶±۶/۷^{fg}	۱۵۴۴±۱۶۳^{k}	والش‌آباد	۲۴	۰±۰^{s}	۰±۰^{z}
	۲	۱۹/۲±۰/۴۴^{pq}	۱۰۰۸/۵±۹۵^{x}		۲۵	۲۱/۶±۰/۵^{mno}	۱۱۶۶/۶±۱۲۰^{t}
تقرتپه	۳	۱۹±۱/۵۸^{pq}	۱۰۵۸/۹±۷۶/۵^{w}		۲۶	۳۰/۴±۴/۸^{cde}	۱۹۹۵/۶±۲۷۰/۲^{c}
	۴	۰±۰^{s}	۰±۰^{z}		۲۷	۲۳±۱/۵^{klm}	۱۳۲۱/۴±۱۲۷/۹^{op}
	۵	۲۱/۶±۰/۵^{mno}	۱۱۶۶/۶±۱۲۰^{t}	الازمن	۲۸	۰±۰^{s}	۰±۰^{z}
	۶	۳۱/۸±۴/۱^{c}	۱۹۶۹±۲۱۳^{d}		۲۹	۲۸/۶±۱/۷^{fg}	۱۵۰۷/۹±۳۷/۱^{l}
	۷	۲۴/۸±۴/۲^{hij}	۱۳۴۷±۲۶۳^{no}		۳۰	۲۸/۸±۰/۷^{efg}	۱۵۱۶/۲±۳۰/۵^{kl}
جعفرآباد	۸	۱۹/۴±۲/۳^{pq}	۱۰۰۹±۱۳۹^{x}		۳۱	۱۸/۴±۲/۵^{q}	۱۲۳۱/۳±۱۸۳/۹^{r}
	۹	۲۲±۲/۹^{lmn}	۱۱۹۷±۲۵۰^{s}		۳۲	۲۰/۶±۱/۵^{nop}	۱۳۶۵/۶±۱۸۵/۱^{n}
	۱۰	۲۰/۲±۱/۷^{op}	۱۰۸۸/۶±۱۳۱^{v}	برفتان	۳۳	۱۹/۶±۱/۵^{pq}	۱۳۴۵/۶±۱۶۰/۹^{no}
	۱۱	۳۲±۲/۹^{c}	۱۸۱۸±۵۵۴^{e}		۳۴	۲۳/۸±۳/۱^{ijk}	۱۷۲۶/۱±۱۵۱/۸^{g}
	۱۲	۰±۰^{s}	۰±۰^{z}		۳۵	۲۰/۴±۱/۱^{nop}	۱۲۷۶/۷±۸۰/۹^{q}
قرق	۱۳	۳۰/۶±۳/۷^{cde}	۱۵۲۹±۹۶/۲^{kl}		۳۶	۲۵/۸±۱/۳^{h}	۱۶۸۵/۶±۲۰۹/۱^{hi}
	۱۴	۲۳/۴±۲/۵^{jkl}	۱۲۷۹/۲±۱۴۴^{q}	پیچک‌محله	۳۷	۳۰±۱/۵^{def}	۱۷۰۴/۹±۱۳۰/۷^{gh}
	۱۵	۳۱/۶±۲/۳^{cd}	۱۵۲۳±۱۰۹^{kl}		۳۸	۰±۰^{s}	۰±۰^{z}

	۱۶	۲۸/۲±۱/۷^{g}	۱۴۳۲±۱۱۶^{m}		۳۹	۲۱/۴±۲/۳^{mno}	۱۱۱۵/۹±۱۴۲/۱^{u}
	۱۷	۰±۰^{s}	۰±۰^{z}		۴۰	۲۵/۲±۱/۹^{hi}	۱۲۱۶/۹±۸۷/۹^{rs}
نوده-	۱۸	۲۳±۱/۵^{klm}	۱۳۳۷±۱۱۸^{no}		۴۱	۲۶±۱/۲^{h}	۱۶۶۴/۸±۱۱۹/۱^{j}
ملک	۱۹	۰±۰^{s}	۰±۰^{z}		۴۲	۲۶±۱/۲^{h}	۱۶۶۵/۶±۱۱۸/۷^{j}
	۲۰	۳۰/۸±۳/۷^{cd}	۱۷۸۵±۱۴۷^{f}	فاضل‌آباد	۴۳	۲۵/۶±۲/۷^{h}	۱۷۲۴/۹±۱۵۲/۱^{g}
	۲۱	۴۴/۶±۸/۳^{a}	۲۶۲۶±۷۰۳^{b}		۴۴	۰±۰^{s}	۰±۰^{z}
والش-	۲۲	۵/۶±۳/۲^{r}	۳۵۹/۲±۱۷۸^{y}		۴۵	۳۰±۴/۱^{def}	۱۶۸۲/۸±۲۷۳/۲^{hi}
آباد	۲۳	۶/۸±۳/۹^{r}	۳۷۰/۶±۲۲۵/۸^{y}				

در هر ستون میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ ندارند.

منابع

۱. بی‌نام. ۱۳۹۳. کارنامه آماری. انتشارات شرکت دخانیات ایران، تهران، ۵۲ ص.

۲. سجادی، ا.، عاصمی، ه. ۱۳۹۱. شناسایی قارچهای خاکزی بیماری‌زای توتون در مزارع استان گلستان. گیاه‌پزشکی کاربردی ۱(۳): ۲۳۳-۲۴۸.

۳. سجادی، ا.، عاصمی، ه. ۱۳۹۳. بررسی تاثیرات ضدقارچی عصاره‌های گیاهی نعناع گربه‌ای، توتون و آویشن کوهی بر قارچهای بیماری-زای توتون. کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی ۳ (۱): ۴۱-۵۲.

4. Campbell C L and Madden L V, 1990. Introduction to plant Disease Epidemiology. John Wiley & Sons, M. C. N. Y. 532 pp.
5. Cardoso J E, Santos AA, Rossetti A G and Vidal J C, 2004. Relationship between incidence and severity of cashew gummosis in semiarid north-eastern Brazil. Plant Pathology. 53: 363-367.
6. Chehri, K., Abbasi. S., Reddy, K. R., and Salleh, B. 2010. Occurrence and pathogenicity of various pathogenic fungi on cucurbits from Kermanshah province, Iran. African. J. Microb. Research. 12 (4): 1215-1223.
7. Lucas G B, 1975. Disease of Tobacco, 3rd, edition, Biological consulting Associates, Releight, north Carolina. 621pp.
8. Sneh, B., Burpee. B., and Ogoshi. A. 1991. Identification of *Rhizoctonia* species. APS Press Inc., St Paul, Minnesota. USA. 133pp.

شناسایی منابع مقاوم در لاین‌های مختلف گندم در برابر قارچ عامل بیماری سفیدک پودری

سمیه سراوانی*[1]، حسین صبوری[2]، فاختک طلیعی[2]، عباس بیابانی[2]، علی راحمی کاریزکی[2]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه گنبدکاووس

۲ گروه تولیدات گیاهی دانشگاه گنبدکاووس

نویسنده مسئول: saravani.somayeh@gmail.com

چکیده

بیماری سفیدک پودری با عامل *Blumeria graminis* f. sp. *Tritici* در سال‌های اخیر در بعضی از مناطق کشور بویژه استان‌های شمال خسارت قابل توجهی را به گندم وارد می‌نماید و مناسب‌ترین و موثرترین راه برای مدیریت و کنترل بیماری، استفاده از ارقام مقاوم است. این آزمایش به منظور بررسی مقاومت ۵۰ ژنوتیپ مختلف گندم در برابر سفیدک پودری، در سال ۱۳۹۳ انجام گردید. به منظور شناسایی لاین‌های مقاوم به عامل بیماری سفیدک پودری بر روی ۵۰ ژنوتیپ در سال ۹۴-۱۳۹۳ و در دانشگاه گنبد کاووس انجام شد. نتایج تجزیه واریانس اختلاف معنی‌داری را در سطح یک درصد نشان داد. بر اساس نتایج مقایسه میانگین به روش LSD، دو ژنوتیپ ۶۰ و ۷۸۶ نسبت به بیماری مقاومت بیشتری داشتند و ژنوتیپ‌های ۳۲۰، ۹۳۰ و ۷۷۳ مقاومت کمتری نسبت به بیماری نشان دادند و جزو ارقام حساس بودند. با استفاده از نتایج این پژوهش، لاین‌های مقاوم میتوانند به‌عنوان منابع مقاوم در برنامه‌های اصلاحی مورد استفاده قرار گیرند و یا برای مراحل بعدی به‌نژادی گزینش شوند.

واژگان کلیدی: گندم، سفیدک پودری، مقاومت ارقام

مقدمه

گندم اصلی‌ترین ماده غذایی مردم در کشور محسوب میشود، ۴۰ درصد مصرف سرانه کالری به گندم اختصاص دارد. بنابراین، افزایش تولید آن یکی از چالش‌های مهم و از اهداف اصلی بخش کشاورزی در کشور می‌باشد. با توجه به محدودیت‌های افزایش سطح زیرکشت گندم و پایین بودن میانگین عملکرد گندم در کشور افزایش عملکرد میتواند یکی از راه کارهای عملی برای پاسخگویی به نیازهای کشور باشد. از عواملی که باعث کاهش عملکرد در واحد سطح میگردند، می‌توان به تنش‌های غیرزیستی و تنش‌های زیستی مانند آفات و بیماری‌ها اشاره نمود. بیماری سفیدک سطحی گندم یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های گندم در شرایط آب و هوایی معتدل است. در ایران برای اولین بار در سال ۱۳۲۶ این بیماری توسط اسفندیاری گزارش شد و در تمام مناطق کشور کم و بیش شیوع دارد (۲).

این بیماری توسط یک پارازیت اجباری بنام *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* (*Bgt*) ایجاد می‌شود که برای رشد و انتشار به بافت زنده میزبان نیاز دارد (۱۰). قارچهای مولد سفیدک پودری ازمهم‌ترین انگل‌های اجباری گیاهان هستند، که باعث بوجود آمدن پوشش سفیدرنگ روی قسمت‌های هوایی آنها می‌شوند، که به زردی، خشکی ویا کاهش کمی وکیفی محصول می‌انجامد. سفیدک پودری خسارت قابل توجهی به محصولات کشاورزی وارد می‌کند. سفیدک پودری در مزارع گندم استان‌های گلستان و مازندران باعث آلودگی ۸۵ درصد بوته‌ها، کاهش ۲۰ درصدی تولید گندم در انگلستان و ۲۵ درصدی در

مزارع گندم آمریکا شده است. (۱، ۲). این آزمایش به‌منظور شناسایی لاین‌های مقاوم جهت استفاده در برنامه‌های اصلاحی وگزینش در به‌نژادی انجام شد.

مواد و روش‌ها

به منظور بررسی لاین‌های مقاوم به بیماری سفیدک پودری ۵۰ ژنوتیپ گندم در دانشگاه گنبدکاووس و در طول جغرافیایی ۵۵ درجه و ۱۲ دقیقه طول شرقی و ۳۷ درجه و ۱۶ دقیقه عرض شمالی مورد بررسی قرار گرفت. جدایه قارچ عامل بیماری (*Blumeriagraminisf.sp. tritici*) از بخش تحقیقات پاتولوژی غلات موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه و در آزمایشگاه روی رقم حساس گندم بولانی در دمای ۲۲ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۷۰ درصد در طول مدت این بررسی تکثیر و نگهداری شد (۹).

برای آلوده‌سازی ارقام گندم از روش آیشمن وهمکاران (۵) و بابایی زاد و همکاران (۶) پیروی شد. برگ اول گیاهچه‌های یک هفته‌ای بریده شد و در سه تکرار و در دو زمان متفاوت در قالب طرح بلوک کاملا تصادفی روی محیط آب آگار ۵ درصد حاوی ۲۰ میلی‌گرم در لیتر بنزیمیدازول داخل تشتک‌های پتری‌دیش پخش شدند. نمونه‌های آماده شده داخل اتاقک مکعبی با اسپورهای Bgt (به نسبت ۵ اسپور در میلیمتر مربع) آلوده شده و پس از آن به اتاقک رشد منتقل شدند. یک هفته بعد از آلوده سازی، تعداد کلنی رشد یافته در سطح ۲ سانتیمترمربع هر برگ شمارش و داده هادر صفحه Excel ثبت شدند.

برای آنالیز داده‌ها به‌منظور به‌دست آوردن تجزیه واریانس از نرم افزار SAS نسخه ۹ و برای بررسی رگرسیون و تجزیه کلاستر بین صفات از نرم افزار SPSS نسخه ۲۴ استفاده شده است.

نتایج وبحث

طبق نتایج تجزیه واریانس(جدول ۱) بین واکنش جدایه‌های بیماری اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد ($P<۰/۰۱$) وجود داشت. تجزیه خوشه‌ای داده‌ها با استفاده از الگوریتم UPGMA و بر اساس متوسط فاصله، لاین‌ها را در سه گروه مقاوم، حدواسط و حساس قرار داد (شکل ۱).گروه اول نسبت به دو گروه دیگردر برابر بیماری مقاوم‌تر بود و تعداد کلنی کمتری نسبت به گروه‌های دیگر بر روی سطح برگ تشکیل داد، این گروه شامل ژنوتیپ‌های ۹۱۰، ۹۳۰، ۷۷۳، ۳۲۰، ۳۲۴، ۷۶۲، ۳۹۵ و ۲۴۵ بود. گروه دوم با ژنوتیپ‌های ۹۲۹، ۷۸۷، ۲۷۹، ۲۵۸، ۲۲۷، ۸۳۱ و ۱۵۶ در برابر بیماری نیمه‌حساس بود. گروه سوم که بزرگ‌ترین گروه بود با ژنوتیپ‌های ۵۷۹، ۳۱۸، ۲۲۹، ۲۷۵، ۲۷۱، ۲۳۳، ۲۱۹،۲۳۵، ۳۳۳، ۱۸۴، ۳۲۳، ۳۵۲، ۳۱۷، ۲۷۲، ۱۵۱، ۳۴۲، ۳۹۷، ۲۷۳، ۲۶۳، ۲۶۵، ۱۷۰، ۱۹۷، ۲۲۸، ۲۸۶، ۱۷۲، ۱۵۴، ۱۵۲، ۲۸۳، ۲۸۲، ۱۳۸، ۲۴۶، ۵۶۶، ۱۸۹،۷۸۶ و ۶۰ بود که این ژنوتیپ‌ها واکنش بیشتری نسبت به بیماری داشت وتعداد کلنی بیشتری در سطح برگ تشکیل داده و جزو ارقام حساس بودند. بر اساس نتایج مقایسه میانگین به روشLSD ، دو ژنوتیپ ۶۰ و ۷۸۶ نسبت به بیماری مقاومت بیشتری داشتند و ژنوتیپ‌های ۳۲۰، ۹۳۰ و ۷۷۳ مقاومت کمتری نسبت به بیماری نشان دادند و جزو ارقام حساس بودند.

در سال ۱۹۹۵، در چین برای دست‌یابی به منابع مقاومت به بیماری سفیدک پودری گندم، تعداد ۲۰۳ ژنوتیپ گندم در منطقه بیجینگ با استفاده از مایه‌زنی مصنوعی با ۱۱ نژاد از عامل سفیدک پودری گندم مورد بررسی قرار گرفت که تعداد ۱۵ ژنوتیپ نسبت به نژادهای مورد استفاده، مقاوم معرفی گردیدند (۸). همچنین در سال ۱۳۸۸ با مطالعه بر روی ۶۰ لاین امیدبخش گندم برای مقاومت به سفیدک پودری گندم نشان داده شد که از۶۰ لاین مورد آزمایش ۳۳ لاین نسبت به عامل بیمار مقاوم و بقیه لاین‌ها نیمه حساس بودند و مقاوم‌ترین لاین، N-83-13 بود (۴). در بررسی‌های کریمی و همکاران، لاین‌های امیدبخش N-78-8، C-73-5، N-80-16، N-80-19 و M-81-13 نسبت به ۴ جدایه قارچ عامل بیماری به‌عنوان مقاوم‌ترین و سایر ارقام و لاین‌ها، نیمه حساس و یا حساس بودند (۷). با توجه به نتایج به دست آمده از این تحقیق و مقایسه

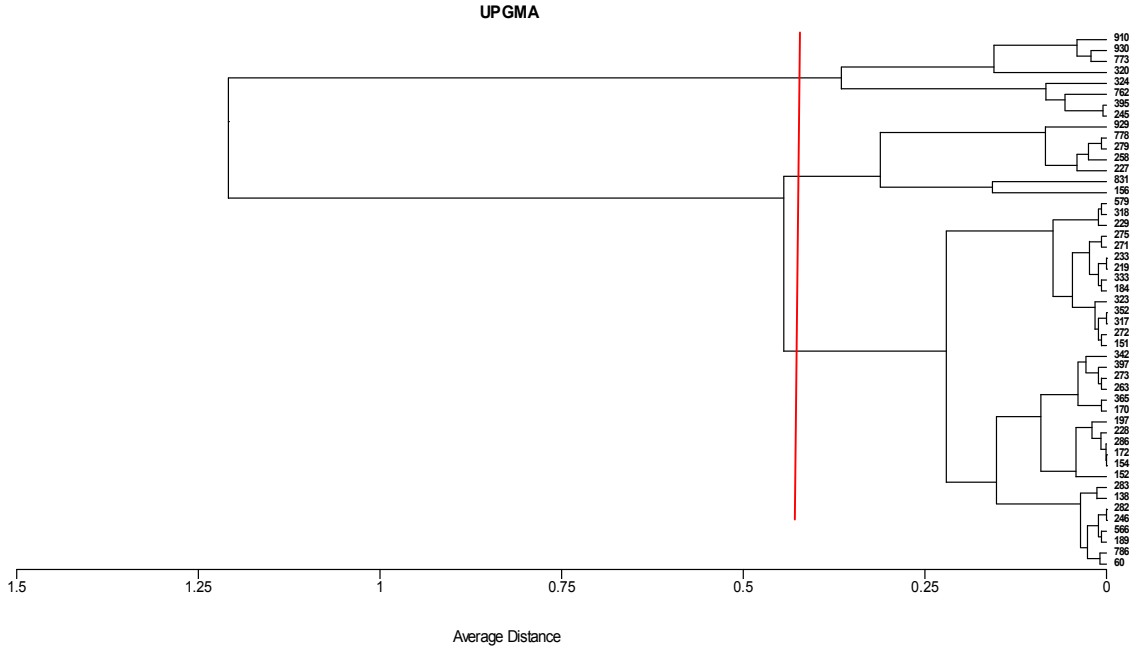
با سایر تحقیقات انجام شده، تکرار آزمایش در شرایط مزرعه‌ای و در مناطق با اقلیم متفاوت برای انتخاب مقاوم‌ترین ژنوتیپ‌ها توصیه می‌گردد.

جدول ۱- تجزیه واریانس بیماری ۵۰ ژنوتیپ گندم

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات واکنش به بیماری سفیدک پودری
ژنوتیپ	۴۹	۳۶/۵۳**
خطا	۱۰۰	۲
ضریب تغییرات		۲۴/۲۹

جدول ۲- مقایسه میانگین بیماری ۵۰ ژنوتیپ مختلف گندم

ژنوتیپ	تعداد کلنی	ژنوتیپ	تعداد کلنی	ژنوتیپ	تعداد کلنی	ژنوتیپ	تعداد کلنی
۳۲۰	۱۴/۱۱۶ a	۳۳۳	۳/۷۵۰ def	۷۷۸	۵/۶۰۰ def	۲۶۳	۲/۵۵۰ f
۹۳۰	۱۳/۲۰۰ a	۲۱۹	۳/۷۰۰ ef	۲۵۸	۵/۴۵۰ def	۲۷۳	۲/۵۰۰ f
۷۷۳	۱۳/۰۵۰ a	۲۳۳	۳/۷۰۰ ef	۹۲۹	۵/۰۵۰ def	۱۷۰	۲/۳۵۰ f
۹۱۰	۱۲/۸۴۱ a	۲۷۵	۳/۶۰۰ ef	۲۲۹	۴/۴۰۰ def	۳۶۵	۲/۳۰۰ f
۳۲۴	۱۱/۱۸۳ ab	۲۷۱	۳/۵۵۰ ef	۵۷۹	۴/۳۵۰ def	۱۳۸	۲/۰۰۰ f
۲۴۵	۱۰/۷۵۰ ab	۱۵۲	۳/۳۸۳ ef	۳۱۸	۴/۳۰۰ def	۲۸۳	۱/۹۰۵ f
۳۹۵	۱۰/۷۱۶ ab	۱۹۷	۳/۲۰۰ ef	۳۲۳	۴/۱۰۰ def	۲۸۲	۱/۸۰۰ f
۷۶۲	۱۰/۳۳۳ abc	۲۲۸	۳/۱۰۰ ef	۲۷۲	۴/۰۵۰ def	۲۴۶	۱/۸۰۰ f
۱۵۶	۸/۲۵۰ bcd	۱۵۴	۳/۰۵۰ ef	۱۵۱	۴/۰۰۰ def	۵۶۶	۱/۷۵۰ f
۸۳۱	۷/۱۵۰ bcde	۱۷۲	۳/۰۵۰ ef	۳۱۷	۳/۹۵۰ def	۱۸۹	۱/۷۰۰ f
۲۳۵	۵/۹۳۳ cdef	۲۸۶	۳/۰۴۴ ef	۳۵۲	۳/۹۵۰ def	۶۰	۱/۶۱۱ f
۲۲۷	۵/۸۵۰ cdef	۳۴۲	۲/۷۵۰ ef	۱۸۴	۳/۸۰۰ def	۷۸۶	۱/۵۵۰ f
۲۷۹	۵/۶۵۰ def	۳۹۷	۲/۶۰۰ f				



شکل ۱- دندروگرام حاصل ازتجزیه خوشه‌ای ۵۰ ژنوتیپ در واکنش نسبت به قارچ عامل سفیدک پودری

جدول ۳- شجره مقاومترین و حساسترین ژنوتیپ‌ها

۶۰	SW89.3064/STAR CMBW91Y01627S-13Y…/3/CHIL/CHUM18//MILAN
۷۸۶	SW89.3064/STAR CMBW91Y01627S-13Y…/4/ABAX/LR42//BABAX*2/3/VIVITSI(520EB2th)/5/MORVARID
۳۲۰	IRENAB/BABAX//PASTOR/6/CATBIRD/NING8201/4/BLODAN/3/BB/7C*2//Y50E/KAL*3/5/TAJAN
۹۳۰	Soisson/Pishtaz//Shiroodi /3/MORVARID
۷۷۳	Milan/Sha7//WAXWING*2/KIRITATI(521EB2th)/3/SW89.3064/STAR CMBW91Y01627S-13Y

منابع

۱- اشکان، س، م. ۱۳۸۵. درسنامه بیماری‌های مهم درختان میوه در ایران. آییژ، ۴۲۷ص.

۲- بهداد، ا. ۱۳۶۹. بیماری‌های گیاهان زراعی ایران. انتشارات نشاط اصفهان. ۴۲۵ ص.

۳- قاسم زاده، ر. ۱۳۸۵. بررسی تنوع ژنتیکی گند مهای وحشی آجیلوپس تاوشی (*Aegilops tauschii*) ایران با استفاده از صفات مورفولوژیکی والکتروفورز پروتئین های ذخیره ای دانه. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشکده علوم زراعی ودامی. دانشگاه تهران.

۴- منزه، م.، ترابی، م.، رضائی، س.، رضوی، م.، و دهقان، م.ع. ۱۳۸۸. ارزیابی مقاومت تعدادی از لاین های امیدبخش گندم نسبت به پاتوتیپ های قارچ عامل بیماری سفیدک پودری در مرحله گیاهچه ای و گیاه کامل .مجله به‌نژادی نهال و بذر۲۵-۱ ، ۴۹-۳۳.

5- Babaeizad V, Imani JG, Kogel KH, Eichmann R, Hückelhoven R 2009. Over-expression of the cell death regulator *BAX inhibitor*-1 in barley confers reduced or enhanced susceptibility to distinct fungal pathogens. Theoretical and Applied Genetics 118: 455-463.

6- Eichmann R, Hückelhoven R 2008. Accommodation of powdery mildew fungi in intact plant cells. Journal of Plant Physiology 165: 5-18.

7- Karimi jashni, M. Torabi, M. Roustaee, A. Etebarian, H. R. Okhovat, M. andYazdanpanah, F. 2005. Evaluation of resistance of some wheat Commercial Kultivars andavanced Lines to Four Pathotypes of Blumeria graminis (Dc Ex Mert) Speer f.sp. tritici ingreenhouse. Seed and Plant. 21(3): 411-424.

8- LI, W. M., J. Q. YAO, and B. Q. SHENG, 1995. Brief report on the evaluation of disease resistance in wheat germplasm from Tibet. Crop Gen. Res. 101: 32-33.

9- Molitor A, Zajic D. Voll L .M. Pons- Hückelhoven J.Samans B. Kogel H. and Waller F 2011. Barley LeafTranscriptome and Metabolite Analysis Reveals NewAspects of Compatibility and *Piriformospora indica*–Mediated Systemic Induced Resistance to PowderyMildew. Molecular Plant-Microbe Interaction 24: 1427-1439.

10- Oberhaensli, S., Parlange, F., Buchmann, J.P., Jenny, F.H., Abbott, J.C., Burgis, T.A., Spanu, P.D., Keller, B., and Wicker, T. 2011. Comparative sequence analysis of wheat and barley powdery mildew fungi reveals gene colinearity, dates divergence and indicates host-pathogen coevolution. Fungal Genetic Biology 48: 327-334.

شناسایی نشانگرهای پیوسته با ژن‌های مقاومت به سفیدک پودری در گندم با استفاده از دو نشاگر ISSR و IRAP

سمیه سراوانی[۱]، حسین صبوری[۲]، فاختک طلیعی[۲]، عباس بیابانی[۲]، علی راحمی کاریزکی[۲]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه گنبدکاووس

۲- گروه تولیدات گیاهی دانشگاه گنبدکاووس

**نویسنده مسئول: saravani.somayeh@gmail.com*

چکیده

گندم مهم‌ترین گیاه زراعی کشور می‌باشد که خود کفایی در آن یکی ازسیاست‌های کلی بخش اقتصادی و تامین امنیت غذایی کشور است.. بیماری سفیدک سطحی با عامل *Blumeria graminis* f. sp. *Tritici* یکی ازبیماری‌های مهم گندم بشمار می‌رود. این مطالعه به منظور شناسایی نشانگرهای پیوسته با ژنهای مقاومت به این بیماری سفیدک پودری در گندم انجام شد. نتایج تجزیه واریانس اختلاف معنی‌داری را در سطح احتمال یک درصد نشان داد. نتایج تجزیه ارتباط بین صفت بیماری و پرایمرها نشان داد که از ۹ نشانگر دارای ارتباط با صفت بیماری ۷ نشانگر PRI50-3، PRI20-1، PRI50-1، PRI7-1، PRI45-1، PRI50-5 و PRI50-2 در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بودند و دو نشانگر PRI37-2 و PRI 42-1 در سطح احتمال ۵ معنی‌دار بودند.

واژگان کلیدی: گندم، سفیدک پودری، نشانگرها

مقدمه

سفیدک پودری گندم یکی از بیماری‌های مهم گندم خصوصاً در مناطق مرطوب و خشک است. عامل بیماری قارچ *Blumeria graminis* f.sp. tritici با فرم غیرجنسی Oidium moniliodes است (۸). در سال ۱۳۷۳ در ۸۵ درصد از مزارع گندم مازندران آلودگی نسبتا شدید به این بیماری مشاهده شد و در همین سال در کرج، میزان آلودگی در مزارع آزمایشی روی ارقام حساس سرخ تخم و مورکو صد درصد گزارش شد(۷). اگرچه کنترل شیمیایی موثرترین روش مبارزه با این بیماری می‌باشد، ولی کاربرد آن در سطح وسیع اقتصادی نبوده و همچنین اثرات نامطلوبی بر محیط زیست دارد. از این‌رو لازم است تا از منابع مقاومت به عنوان یکی از روش‌های موثر و مقرون به صرفه، در تلفیق با دیگر روش‌ها، برای کنترل بیماری استفاده کرد. خصوصیات ژنتیکی ۶۸ جدایه از قارچ *P. graminea* را با استفاده از نشانگرهای RFLP و ISSR مطالعه شده و همچنین واکنش چند رقم جو به بیماری لکه‌نواری را در شرایط گلخانه‌ای بررسی شد. تجزیه و تحلیل با نشانگر RFLP الگوهای باندی یکسانی را نشان داد. تجزیه و تحلیل با نشانگر ISSR نیز تنوع کمی را بیان کرد و جدایه‌ها را با ۱۱ درصد تفاوت در چهار گروه قرار داد(۲). به منظور بررسی ۸ رقم گندم (*Triticum aestivum L.*) از ۵ آغازگر ISSR و ۲ آغازگر SSR استفاده شد و از مجموع ۴۳ باند تکثیر شده توسط ۵ آغازگر ISSR، ۲۹ باند (۶۷/۴۴ درصد) چندشکلی مشاهده شد. تعداد باندهای چند شکل تکثیر شده توسط هر یک از آغازگرهای ISSR در دامنه ۳ تا ۸ باند بود و میانگین تعداد باندها برای هر پرایمر ۴/۸ بود و آغازگر UBC-849 قادر به تشخیص تمام ارقام مورد مطالعه بود(۹). به‌منظور ارزیابی سودمندی نشانگرهای ISSR برای شناسایی ۳۰

رقم و ۲۰ لاین اصلاحی گندم دوروم ایتالیایی که با ۹ آغازگر صورت گرفت، به این نتیجه رسیدند که آغازگرهای مورداستفاده برای متمایز کردن همه ارقام گندم دوروم مورد بررسی مناسب بودند و حتی دو آغازگر هم برای تشخیص ۵۲ رقم و لاین اصلاحی گندم دوروم کافی است که دلالت بر توانایی تمایز خیلی خوب تکنیک ISSR دارد (۴). این تحقیق با هدف افزایش مقاومت گندم به بیماری سفیدک پودری در برنامه‌های اصلاحی و به‌نژادی می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

ارزیابی فنوتیپی

به منظور بررسی لاین‌های مقاوم به بیماری سفیدک پودری ۵۰ ژنوتیپ در دانشگاه گنبدکاووس واقع در ۱۰۰ کیلومتری شمال شرق گرگان و در ۵۵ درجه و ۱۲ دقیقه طول شرقی و ۳۷ درجه و ۱۶ دقیقه عرض شمالی مورد بررسی قرار گرفت. جدایه قارچ عامل بیماری (*Blumeriagraminisf.sp. tritici*) از بخش تحقیقات پاتولوژی غلات موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه و در آزمایشگاه روی رقم حساس گندم بولانی در دمای ۲۲ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۷۰ درصد در طول مدت این بررسی تکثیر و نگهداری شد (۵).

برای آلوده‌سازی ارقام گندم از روش آیشمن وهمکاران (۳) و بابایی زاد و همکاران (۱) پیروی شد. برگ اول گیاهچه‌های یک هفته‌ای بریده شد و در سه تکرار و در دو زمان متفاوت در قالب طرح بلوک کاملا تصادفی روی محیط آب آگار ۵ درصد حاوی ۲۰ میلی‌گرم در لیتر بنزیمیدازول داخل تشتک‌های پتری‌دیش پخش شدند. نمونه‌های آماده شده داخل اتاقک مکعبی با اسپورهای Bgt (به نسبت ۵ اسپور در میلیمتر مربع) آلوده شده و پس از آن به اتاقک رشد منتقل شدند. یک هفته بعد از آلوده سازی، تعداد کلنی رشد یافته در سطح ۲ سانتیمترمربع هر برگ شمارش و داده هادر صفحه Excel ثبت شدند.

ارزیابی ژنوتیپی

نمونه‌های برگی با قیچی استریل شده نمونه‌برداری شد. در مرحله بعد DNA ژنومی آن‌ها استخراج گردید و درنهایت کیفیت و کمیت DNA استخراج‌شده تعیین شد. استخراج DNA ژنومی در این تحقیق با تغییر در روش CTAB انجام شد (۶). برای تعیین غلظت و کیفیت DNA استخراج‌شده از الکتروفورز ژل آگارز استفاده می‌شود. پس از تعیین کیفیت DNA، PCR بر روی DNAهای باکیفیت صورت گرفت. در این تحقیق از ۱۰ نشانگر جهت تجزیه ارتباط صفت بیماری و پرایمر استفاده شد (جدول ۱). سپس محصولات PCR در دستگاه الکتروفورز که حاوی ژل آگارز ۲ درصد و با ولتاژ ۷۵ و به مدت ۱۰۰ دقیقه مورد بررسی قرار گرفت. پس از اتمام عمل الکتروفورز و رنگ‌آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید، ژل با آب مقطر شسته شده و DNA در زیر نور UV در دستگاه Geldoc، مشاهده و عکس‌برداری شده و فایل‌های ایجاد شده جهت آنالیز با نرم‌افزار ذخیره‌سازی گردیدند.

برای آنالیز داده‌ها به‌منظور به‌دست آوردن تجزیه واریانس از نرم افزار SAS نسخه ۹ و برای بررسی رگرسیون و تجزیه کلاستر بین صفات از نرم افزار SPSS نسخه ۲۴ استفاده شده است.

جدول۱- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده

نام آغازگر	تاچداوون (درجه سانتی‌گراد)	توالی آغازگر
ISSR- PRI-7	50-55	5-ACACACACACACACACC-3
ISSR- PRI-13	50-55	5-GAGAGAGAGAGAGAGAA-3
ISSR- PRI-14	50-55	5-CACACACACACACACAA-3
ISSR- PRI-20	54-59	5-TCTCTCTCTCTCTCTCG-3
ISSR- PRI-31	50-55	5-GAGAGAGAGAGAGAGAT-3
ISSR- PRI-37	54-59	5-CACACACACACACACAG-3
ISSR- PRI-42	54-59	5-CACACACACACACACAT-3
ISSR- PRI-43	50-55	5-AGAGAGAGAGAGAGAGC-3
ISSR- PRI-45	50-55	5-GTCGTCGTCGTCGTCGTCA-3
IRAP- PRI-50	62-67	5-CACTTCAAATTTTGGCAGCGGATC-3

نتایج و بحث

طبق نتایج تجزیه واریانس (جدول ۲) بین واکنش جدایه‌های بیماری اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد(P<۰/۰۱) وجود داشت. نتایج تجزیه ارتباط (جدول ۳) بین صفت بیماری با نشانگرها نشان داد که ۹ آلل با بیماری ارتباط داشت. نشانگرهای PRI 50-3، PRI 45-1، PRI 50-5 و PRI 50-2 بترتیب با ضریب رگرسیون ۰/۵۲۴**، ۰/۵۶۶**، ۰/۲۰۴** و۰/۲۳۵** درسطح احتمال ۱ درصد ارتباط مثبت و معنی‌داری را نشان دادند و نشانگرهای PRI 20-1، PRI 50-1 و PRI 7-1 بترتیب با ضریب رگرسیون ۰/۳۹۸**-، ۰/۱۷۳**- و۰/۲۳۵**- در سطح احتمال ۱ درصد دارای ارتباط منفی و معنی‌داری بود.دو نشانگر PRI 37-2 و PRI 42-1 با ضریب رگرسیون۰/۰۹۹* و۰/۱۶۲* در سطح احتمال ۵ درصد ارتباط مثبت ومعنی‌داری نشان داد.

جدول ۱- تجزیه واریانس بیماری ۵۰ ژنوتیپ گندم

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات واکنش به بیماری سفیدک پودری
ژنوتیپ	۴۹	۳۶/۵۳**
خطا	۱۰۰	۲
ضریب تغییرات		۲۴/۲۹

جدول ۲- تجزیه ارتباط بین نشانگها و بیماری سفیدک پودری گندم

پرایمر	ضریب رگرسیون	خطای استاندارد	f
PR 50-3	۰/۵۲۴**	۰/۴۴۸	۷۷/۸۹۶
PR 45-1	۰/۵۶۶**	۰/۵۱۶	۱۰۶/۸۲۷
PR 20-1	-۰/۳۹۸**	۰/۵۲۰	۸۹/۷۴۵
PR 50-5	۰/۲۰۴**	۰/۴۳۶	۷۸/۶۱۲
PR 50-1	-۰/۱۷۳**	۰/۳۳۱	۷۰/۳۸۹
PR 7-1	-۰/۲۳۵**	۰/۵۱۵	۶۷/۵۸۶
PR 37-2	۰/۰۹۹*	۰/۲۲۸	۶۴/۷۶۱
PR 50-2	۰/۲۳۵**	۰/۵۳۳	۶۳/۵۶۱
PR 42-1	۰/۱۶۲*	۰/۴۹۰	۶۳/۸۴۷
عرض از مبدا	۲/۵۴۷		

منابع

1. Babaeizad V, Imani JG, Kogel KH, Eichmann R, Hückelhoven R 2009. Over-expression of the cell death regulator *BAX inhibitor*-1 in barley confers reduced or enhanced susceptibility to distinct fungal pathogens. Theoretical and Applied Genetics 118: 455-463.
2. Bayratkar, H. & Akan, K. (2012). Genetic characterization of Pyrenophora graminea isolates and the reactions of some barley cultivars to leaf stripe disease under greenhouse conditions. *Turkish Journal* of *Agriculture and Forestry*, 36, 329-339.
3. Eichmann R, Hückelhoven R 2008. Accommodation of powdery mildew fungi in intact plant cells**.** Journal of Plant Physiology 165: 5-18.
4 . Pasqualone, A., C. Lotti, A. Bruno, P. De Vita, N. Di Fonzo and A. Blanco. 2000. Use of ISSR markers for cultivar identification durum wheat. Mediterraneennes. Ressources ciheam. Org, Pp:157-161.
5 . Rajabi, Gh. and Behruzin, M. 2004. The Guidance of pests and deseases of wheat fields in Iran .N.18, Introduction, Publishing Organization of Agriculture Research and Education.
6. Saghai Maroof, MA, Biyashev RM, Yang GP, Zhang Q, Allard RW.1994. Extraordinarily polymorphic microsatillate DNA in barely species diversity, choromosomal location, and population dynamics, Proceeding of the National Academy of Sceinces. USA. 91: 5466-5570.

7. Salari, M. Yazdani, D. Okhovvat, M. and Akbari, A. 2002. Evaluation of resistance of some wheat cultivars to powdery mildew in Mazandaran. Applied Entomology and Phytopathology 70: 25–36
8. Wiese, M.V. 1987. Compendium of Wheat Diseases, 2nd ed. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA. 107 pp.
9. Zhu, Y. F., J. Hu., R. Han., Y. Wang and Zhu, S. 2011. Fingerprinting and identification of closely related wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivarsusing ISSR and fluorescence-labeled TP-M13-SSR markers. Australian Journal of Crop Science 5(7): 846-850.

مکانیسم‌های قارچ‌های اندوفیت در کنترل زیستی بیماری‌های گیاهی

فائزه السادات ابطحی[1*] و سیده لاوین نورانی[2]

[1] *دانشگاه اراک، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه گیاهان داروئی و معطر، کدپستی ۸۳۴۹-۸-۳۸۱۵۶.*

[2] *گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران.*

* *نویسنده مسئول: faeze.abtahi@gmail.com*

چکیده

قارچ‌های اندوفیت به عنوان یکی از عوامل کنترل بیولوژیک در برابر آفات و عوامل بیماری‌زای گیاهی مطرح هستند. این موجودات برای رشد گیاهان سودمندند، از آن‌ها در برابر عوامل آسیب‌رسان دفاع می‌کنند و سبب تقویت تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان می‌شوند. مقاومت سیستمیک اکتسابی در گیاهان که توسط اندوفیت‌ها القاء می‌شود، ناشی از ژن‌های مرتبط با بیماریزایی است. مکانیسم تولید متابولیت‌های ثانویه توسط محرک‌های اندوفیتی شبیه به تحریک مقاومت گیاه می‌باشد. قطعات اندوفیت‌های قارچی که به عنوان محرک عمل می‌کنند، با عمل هیدرولیز شدن توسط سلول گیاهی تولید می‌شوند. هایپرپارازیتیسم یکی دیگر از استراتژی‌های اکولوژیکی است که توسط اندوفیت‌ها به وجود می‌آید. در این استراتژی، بیمارگر قارچی مستقیماً توسط یک اندوفیت خاص مورد حمله قرارگرفته و از بین می‌رود. شکارگرهای میکروبی به عنوان یک راه عمومی‌تر جهت سرکوب بیمارگرهای گیاهی، محسوب می‌شوند. برخی قارچ‌های اندوفیت توانایی تولید یک یا چند نوع آنتی‌بیوتیک را دارا می‌باشند، که بیمارگرهای گیاهی نسبت به آن‌ها حساس هستند. تعداد مطالعات متمرکز بر اندوفیت‌های قارچی به دلیل سودمندی آن‌ها در رشد و حفاظت گیاه در حال افزایش است. با این حال برخی از مشکلات بالقوه بوم‌شناسی نیاز به ارزیابی دقیق‌تری دارد.

واژگان کلیدی: قارچ‌های اندوفیت، عوامل بیماری‌زای گیاهی، کنترل زیستی.

مقدمه

قارچکش‌های شیمیایی مختلفی به منظور کنترل بیماری‌های گیاهی معرفی و استفاده شده‌اند، اما افزایش نگرانی‌ها درباره تأثیر منفی آنها بر سلامت انسان، آلودگی‌های زیست محیطی و ظهور نژادهای مقاوم بیمارگرها، استفاده از آن‌ها را با محدودیت روبه‌رو ساخته و توجه همگان را به سمت یافتن روش‌های کنترل غیر شیمیایی از جمله کنترل زیستی معطوف کرده است (۳ و ۵). اهداف مهم دانش کنترل بیماری‌های گیاهی نیز بر اساس برنامه‌های توسعه و سند چشم انداز بیست ساله کشور کاهش مصرف سموم شیمیایی در اکوسیستم‌های زراعی و تولید غذای سالم است. قارچ‌های اندوفیت به عنوان یکی از عوامل کنترل بیولوژیک در برابر عوامل بیماری‌زای گیاهی مطرح هستند. آن‌ها گروهی از میکروارگانیسم‌های همراه گیاهان هستند که گیاه‌شناسان، میکروبیولوژیست‌ها و اکولوژیست‌ها را مجذوب خود کرده‌اند. قارچ‌های اندوفیت‌های در فضای بین سلول‌های میزبان در بافت گیاهی زندگی می‌کنند، رشد کرده و تشکیل کلنی می‌دهند و هیچ نشانه‌ای در گیاه ایجاد نمی‌کنند (۱۴) .احتمال آن می‌رود که در طول تکامل قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی که توانایی بیماریزایی خود را از دست داده‌اند به

صورت قارچ‌های اندوفیت درآمده‌اند (۱۰). این موجودات برای رشد گیاهان سودمندند، از آن‌ها در برابر عوامل آسیب‌رسان دفاع می‌کنند و سبب تقویت تولید متابولیت‌های ثانویه از جمله فیتوالکسین‌ها در گیاهان می‌شوند، از این رو خیل عظیم مطالعات به سوی شناسایی و تولید این میکروارگانیسم‌های مفید در حال جریان است. اگرچه هنوز ناشناخته‌های زیادی در مورد ارتباط بین گیاه و قارچ اندوفیت و همچنین چگونگی محافظت گیاهان در برابر عوامل بیماریزا وجود دارد. امروزه اعتقاد بر این است که قارچ‌های اندوفیت با القا تولید فیتوالکسین‌ها و اشغال فضای اکولوژیکی مانع از ایجاد بیماری در گیاهان می‌شوند (۴ و ۱۷).

مکانیسم‌های قارچ‌های اندوفیت در راستای محافظت از گیاهان

القای مقاومت در گیاهان

مقاومت سیستمیک اکتسابی (SAR) و مقاومت سیستمیک القایی (ISR) دو شکل از مقاومت القایی هستند. مقاومت سیستمیک اکتسابی که توسط بیمارگر القاء می‌شود، به واسطه سالیسیلیک اسید و با تجمع پروتئین‌های مرتبط با بیماریزایی(PR پروتئین‌ها) به وجود می‌آید. مقاومت سیستمیک القاء شده توسط قارچ‌های اندوفیت ناشی از ژن‌های مرتبط با بیماریزایی است. قارچ *Fusarium solani* جدا شده از بافت‌های ریشه گوجه‌فرنگی، مقاومت سیستمیک القایی را علیه *Septoria lycopersici* برانگیخت، همچنین سبب بیان ژن‌های PR، PR5 و PR7 در ریشه‌ها شد (۹). گیاهانی که با اندوفیت‌ها کلونیزه شده‌اند با سرعت بیشتری در برابر عوامل آسیب‌رسان پاسخ دفاعی می‌دهند. زمانی که دو گیاه هندوانه و خیار در معرض جهش‌یافته‌های غیربیماریزای قارچ *Colletotrichum magna* قرار داده شدند، سطوح بالایی از رسوب لیگنین، فعالیت پراکسیدازی و فعالیت فنیل آلانین آمونیالیاز در آن‌ها مشاهده شد و در مقابل گونه‌های قارچی *C. orbiculare* و *F. oxysporum* مصون شدند (۱۴). در مطالعه‌ای دیگر قارچ اندوفیت *Neotyphodium lolii* با افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و پراکسیداز (POD) سبب کاهش لکه برگی ناشی از آلودگی به عامل بیماریزا شد. احتمالاً سیستم‌های آنتی اکسیداتیو شامل SOD و POD خطرات اکسیداسیون (ROS) القاء شده فعالیت عامل بیمارگر را کنترل می‌کنند (۱۲ و ۱۸).

قارچ اندوفیت *Piriformospora indica* متعلق به راسته *Sebacinales* که اولین بار از ریزوسفر درختچه های بیابان تار در شبه قاره هند جداسازی شد، در دهه اخیر توجهات زیادی را به خود جلب کرده است (۲۰). این قارچ به عنوان یک واسطه در جذب فسفر و نیتروژن از خاک نقش بسزایی دارد لذا سبب افزایش بیومس محصولات کشاورزی می شود و از طرفی با القاء مقاومت سیستمیک (ISR) سبب ارتقاء سطح سلامت گیاهان نیز می‌شود. آزمون real-time PCR کمّی نشان داد که در گیاه مدل *Arabidopsis thaliana* کلنیزاسیون ریشه توسط *P.indica*، سبب فعال شدن پاسخ‌های شدید دفاعی گیاه و افزایش بیان ژن‌های PR1, CBP60, WRKY22, MYB51, OXI1, VSP2, ERF1, ExpPTI, MPK3 و MPK6 شد (۱۳).

تحریک متابولیت های ثانویه گیاه

متابولیت‌های ثانویه گیاهی نقش مهمی در عملکردهای اساسی گیاه ایفا نمی‌کنند، اما در سازگاری گیاهان نسبت به محیط زیست پیرامونشان بسیار مؤثر می‌باشند. در میان این ترکیبات، گیاهان، مولکول‌های ضد میکروبی با وزن مولکولی کم موسوم به فیتوالکسین‌ها را تولید می‌کنند، که شامل مواد متعدد از جمله فلاونوئید، ترپونوئید و غیره می‌باشند. مطالعات نشان دادند که قارچ های اندوفیت *Fusarium* spp. (E4 و E5) سبب افزایش رشد گیاه *Euphorbia pekinensis*، تولید دیترپن و تریترپن در کشت‌های سلولی*E. pekinensis* شده و موجب القاء فعالیت آنزیم‌های دفاعی مانند PAL، POD و CAT می‌شود. مکانیسم تولید متابولیت‌های ثانویه توسط محرک‌های اندوفیتی شبیه به تحریک مقاومت گیاه می‌باشد. پیامدهای کلونیزه کردن گیاه توسط اندوفیت‌های قارچی و ترشح آنزیم هیدرولاز توسط سلول گیاهی در جهت محدود کردن رشد قارچ می‌باشد، بنابراین می‌توان گفت که قطعات اندوفیت‌های قارچی که به عنوان محرک عمل می‌کنند، با عمل هیدرولیز شدن تولید می‌شوند. محرک‌هایی مانند لیپوپلی‌ساکاریدها، پلی‌ساکاریدها و گلیکوپروتئین‌ها سبب تحریک دفاع گیاه و نیز تولید

متابولیت‌های ثانویه می‌شوند که در نهایت سبب سرکوب حمله مؤثر بیمارگر می‌شوند. با این حال تعیین این‌که چطور اندوفیت‌ها در غلظت بالای متابولیت‌های ثانویه میزبان گیاهی زنده می‌مانند، هنوز ناشناخته است (۲۱).

هایپرپارازیت‌ها (Hyperparasite) و شکارگری

هایپرپارازیتیسم یکی دیگر از استراتژی‌های بوم‌شناسی است که توسط اندوفیت‌ها به وجود می‌آید. در این استراتژی، بیمارگر قارچی مستقیماً توسط یک اندوفیت خاص مورد حمله قرارگرفته و از بین می‌رود (۱۹). اندوفیت‌های قارچی، اطراف میسلیوم بیمارگر را با روش‌های مختلفی مانند پیچش، رخنه به میسلیوم بیمارگر و ترشح آنزیم جهت هضم و تجزیه دیواره سلولی احاطه می‌کنند. به عنوان مثال قارچ *Trichoderma* قادر به انگلی کردن هیف بیمارگر گیاهی *Rizoctonia solani* است (۷). در مقابل هایپرپارازیتیسم، شکارگرهای میکروبی به عنوان یک راه عمومی‌تر جهت سرکوب بیمارگرهای گیاهی، محسوب می‌شوند. برخی از اندوفیت‌ها تحت شرایط کمبود مواد غذایی، رفتار شکارگری از خود نشان می‌دهند. قارچ *Trichoderma* طیفی از آنزیم‌ها را تولید می‌کند که مستقیماً علیه دیواره‌های سلولی قارچ‌های بیمارگر و برای خرد کردن آن‌ها عمل می کند (۲).

آنتی بیوتیک‌های تولید شده توسط اندوفیت‌ها

بسیاری از قارچ‌های اندوفیت، متابولیت‌های ثانویه‌ای تولید می‌کنند که شامل ترکیبات ضدقارچی و ضدباکتریایی هستند و به شدت مانع رشد میکروارگانیسم‌ها از جمله بیمارگرهای گیاهی می‌شوند (۸). برخی عوامل کنترل زیستی توانایی تولید یک یا چند نوع آنتی‌بیوتیک از جمله ترپنوئیدها، آلکالوئیدها، ترکیبات معطر و پلی پپتایدها را دارا می‌باشند، که بیمارگرهای گیاهی نسبت به این ترکیبات حساس هستند. پنج نوع از مشتقات cadinane sesquiterpenes از قارچ *Phomopis cassiae* (اندوفیت گیاه *Cassia spectabilis*)، جداسازی شده است، همچنین ترکیب 3,11,12-trihydroxycadalene به عنوان ترکیب ضد قارچی فعال علیه *Cladosporium sphaerospermum* و *Cladosporiumclad sporioides* شناخته شده است (۱۶). اسانس یکی دیگر از ترکیباتی است که دارای فعالیت آنتی‌بیوز می‌باشد. قارچ اندوفیت *Muscodor albus* جداسازی شده از گونه‌های درختان گرمسیری توانایی تولید چندین ترکیب آلی فرار را دارا می‌باشد. ترکیبات Tetrohydofuran، 2-methyl furan، 2-butanone و Aciphyllene دارای فعالیت آنتی‌بیوتیکی می‌باشند (۱). در شرایط *in vitro*، قارچ اندوفیت جدا شده از گیاه *Artemisia annua* ماده ای را تولید کرد که مانع رشد چندین یا تمامی بیمارگرهای گیاهی مورد آزمایش شد، لذا ترکیبات اصلی ضد قارچی شامل EtOAc و N-butanol بودند (۱۱). در شرایط *in vitro* کشت همزمان قارچ اندوفیت *Penicillium oxalicum* B4 با گیاه *A. annua* منجر به افزایش تولید آرتمیزین در گیاه شد (۲۲). طی تحقیقات انجام شده، مشخص شده است که اندوفیت های قارچی، آنتی بیوتیک هایی تولید می کنند که در شرایط آزمایشگاهی بیمارگرها را مهار می کند. اما مقادیر پایین این مواد در گیاه و تاثیرشان برروی بیمارگرها در شرایط *in vivo* نیاز به ارزیابی دارد.

نتایج و بحث

میکروارگانیسم‌های همزیست گیاهان در رابطه‌ای قرار دارند که هر دو موجود زنده شریک در همزیستی از آن سود می‌برند، لذا میکروارگانیسم فرصت بیشتری برای زنده ماندن در محیط دارند، به اینگونه روابط اصطلاحاً همیاری اطلاق می‌شود. یکی از موفق‌ترین همیاری‌ها، همزیستی باکتری ریزوبیوم و ریشه حبوبات است. تعداد مطالعات متمرکز بر اندوفیت‌های قارچی به دلیل سودمندی آن‌ها در رشد و حفاظت گیاه در حال افزایش است. همانگونه که در مثال ذکر شد، تلقیح گیاه با قارچ اندوفیت سبب ارتقاء رشد و مقاومت آن در برابر عوامل بیماریزا شد (۹). مقاومت گیاه به عوامل بیماریزا به واسطه قارچ‌های اندوفیت، سیستم‌های چمن و درختان جنگلی (۶) مورد استفاده قرار گرفته است. مزیت استفاده از خاک‌های سرکوب‌گر بیماری که با میکروارگانیسم‌های مفیدی نظیر اندوفیت‌ها غنی شده‌اند بر هیچکس پوشیده نیست با این حال برخی از مشکلات بالقوه بوم‌شناسی نیاز به ارزیابی دارد: نخست، زمانی که از اندوفیت برای تلقیح گونه گیاهی که میزبان آن نیست استفاده می‌شود، متابولیت‌های تولید شده ممکن است به طور قابل ملاحظه‌ای تغییر کنند. دوم این‌که، یک برهم‌کنش سه

جانبه، همزیستی گیاه و میکروارگانیسم را تحت تأثیر قرار می‌دهد. تلقیح با اندوفیت‌ها می‌تواند سبب تغییر در رشد، فیزیولوژی و دگرگشت (سوخت وساز) سایر باکتری‌ها و قارچ‌های مفید شود که این مسئله می‌توانند منجر به برهم زدن تعادل بین گیاه میزبان و اندوفیت شود. سوم اینکه، آیا استفاده از اندوفیت‌ها به منظور افزایش عملکرد محصول و یا محافظت دربرابر عوامل بیماری‌زا ارزش اقتصادی و سودآوری دارد؟ به نظر می‌رسد مطالعات عمیق و وسیع‌تری برای درک چگونگی برهم کنش بین اندوفیت‌ها و گیاه میزبان نیاز است به ویژه در زمینه شناسایی مکانیسم‌هایی که گیاهان برای افزایش جمعیت میکروارگانیسم‌های القاء کننده ISR در میکروبوم (microbome) خود از آن استفاده می‌کنند.

منابع

1. Atmosukarto, I., Castillo, U., Hess, W. M., Sears, J. and Strobel, G. 2005. Isolation and characterization of *Muscodor albus* I-41.3s, a volatile antibiotic producing fungus. Plant Science, 169: 854-861.
2. Benhamou, N., and Chet, I. 1997. Cellular and molecular mechanisms involved in the interaction between Trichoderma harzianum and Pythium ultimum. Applied and Environmental Microbiology, 63: 2095-2099.
3. Bouchra, C, Achouri, M, Idrissi Hassani, L. M. and Hmamouchi, M. 2003. Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* . Journal of Ethnopharmacology, 89: 165-169.
4. Dai, C. C., Yu B. Y. and Li, X. 2008. Screening of endophytic fungi that promote the growth of *Euphorbia pekinensis*. African Journal of Biotechnology, 7: 3505-3509.
5. Droby, S., Wisniewski, M., Macarisin, D. and Wilson, C. 2009. Twenty years of postharvest biocontrol research: is it time for a new paradigm? Postharvest Biology and Technology. 52: 137-145.
6. Ganley, R. J., Sniezko, R. A. and Newcombe, G. 2008. Endophyte-mediated resistance against white pine blister rust in *Pinus monticola*. Forest Ecology and Management, 255: 2751-2760.
7. Grosch, R., Scherwinski, K., Lottmann, J. and Berg, G. 2006. Fungal antagonists of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*: selection, control efficacy and influence on the indigenous microbial community. Mycological Research, 110: 1464-1474.
8. Gunatilaka, A. A. L. 2006. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. Journal of Natural Products, 69: 509-526.
9. Kavroulakis, N. S., Zervakis, G. I., Ehaliotis, C., Haralampidis, K. and Papadopoulou, K. K. 2007. Role of ethylene in the protection of tomato plants against soil-borne fungal pathogens conferred by an endophytic *Fusarium solani* strain. Journal of Experimental Botany, 58: 3853-3864.
10. Kogel K. H., Franken P. and Huckelhoven, R. 2006. Endophyte or parasite what decides? Current Opinion in Plant Biology. 9: 358-363.
11. Liu, C. H., Zou, W. X., Lu, H. and Tan, R. X. 2001. Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi. Journal of Biotechnology, 88: 277-282.
12. McGovern R. J. 2015. Management of tomato diseases caused by Fusarium oxysporum. Crop Protection. 73: 78–92.
13. Pedrotti, L., Mueller, M. J., Waller, F. 2013. Piriformospora indica root colonization triggers local and systemic_root responses and inhibits secondary colonization of distal roots. PLoS ONE 8:e69352.
14. Redman, R. S., Freeman, S., Clifton, D. R., Morrel, J., Brown, G. and Rodriguez, R. J. 1999. Biochemical analysis of plant protection afforded by a nonpathogenic endophytic mutant of *colletotrichum magna*. Plant physiology, 119 (2):795-804.
15. Saikkonen, K., Faeth, S. H., Helander, M. and Sullivan, T. J. 1998. Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 29: 319-343.
16. Silva, G. H., Teles, H. L., Zanardi, L. M., Marx Young, M. C., Eberlin, M. N., Hadad, R., Pfenning, L. H., Costa-Neto, C. M., Castro-Gamboa, I., Bolzani, Y. S. and Araújo, A. R. 2006. *Cadinane sesquiterpenoids* of *Phomopsis cassiae*, an endophytic fungus associated with *Cassia spectabilis* (*Leguminosae*). Phytochemistry, 67: 1964-1969.
17. Tanaka, A., Tapper, B. A., Popay, A., Parker, E. J. and Scott, B. 2005. A symbiosis expressed non-ribosomal peptide synthetase from a mutualistic fungal endophyte of perennial ryegrass confers protection to the symbiotum from insect herbivory. Molecular Microbiology, 57: 1036-1050.
18. Tian, P., Nan, Z. and Li, C. 2008. Effect of the endophyte *Neotyphodium lolii* on susceptibility and host physiological response of perennial ryegrass to fungal pathogens. European Journal of Plant Pathology, 122: 593-602.
19. Tripathi, S., Kamal, S., Sheramati, I., Oelmuller, R. and Varma, A. 2008. Mycorrhizal fungi and other root endophytes as biocontrol agents against root pathogens. Mycorrhiza, 3th edition, pp. 281-306.
20. Verma, S., Varma, A., Rexer, K. H., Hassel, A., Kost, G., Sarbhoy, A., Bisen, P., Butehorn, B., and Franken, P. 1998. Piriformospora indica, gen. et sp. nov., a new root-colonizing fungus. Mycologia, 90:896-903.
21. Yong, Y. H., Dai, C. C., Gao, F. K., Yang, Q. Y.and Zhao, M. 2009. Effects of endophytic fungi on growth and two kinds of terpenoids for *Euphorbia pekinensis*. Chinese *Traditional* and *Herbal Drugs*, 40: 18-22.
22. Zheng, L.P., Tian, H., Yuan, Y.F. Wang J.W. 2016. The influence of endophytic Penicillium oxalicum B4 on growth and artemisinin biosynthesis of in vitro propagated plantlets of *Artemisia annua* L. Plant Growth Regulation. 80(1): 93–102.

توسعه یک روش متکی بر IC-RT-PCR جهت ردیابی ویروس ArMV در انگور

شیرین فرزادفر [1] *، رضا پوررحیم [1]

[1] *بخش تحقیقات ویروس‌شناسی گیاهی، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران*

* *نویسنده مسئول: farzadfar2002@yahoo.com*

چکیده

ویروس موزائیک آرابیس (*Arabis mosaic virus*-ArMV) از جمله ویروس‌های با دامنه میزبانی نسبتا گسترده می‌باشد که موجب بروز علائم متنوعی از جمله ضعف و زوال تدریجی در گیاهان آلوده می‌شود. تعدادی نمونه انگور با علائم پیسک، سبزردی و کاهش رشد در تاکستانی در استان قزوین مشاهده شد. با توجه به نوع علائم و احتمال دخالت عوامل ویروسی، این نمونه‌ها با استفاده از روش سرولوژیکی الایزا و با کمک آنتی‌بادی اختصاصی، از نظر احتمال آلودگی به ویروس ArMV مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج آزمون الایزا نشان دهنده واکنش مثبت ضعیف یک مورد از سه نمونه با آنتی‌بادی اختصاصی ArMV بود. جهت ردیابی دقیق ArMV در این نمونه‌ها، یک روش مولکولی متکی بر IC-RT-PCR (immuno capture-reverse transcription-polymerase chain reaction) توسعه داده شد. از آنتی‌بادی اختصاصی ArMV برای به دام انداختن پیکره‌های ویروس و جداسازی آنها از عصاره گیاهی، استفاده شد و سپس با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ناحیه‌ای از ژن پروتئین پوششی ویروس طی واکنش RT-PCR تکثیر گردید. نتایج این بررسی نشانداد روش IC-RT-PCR در مقایسه با روش الایزا، از دقت بالاتری در ردیابی ویروس ArMV بدون نیاز به مراحل استخراج اسید نوکلئیک از بافت گیاهی برخوردار است. در برنامه‌های تولید نهال سالم مو، روش ردیابی دقیق و حساس IC-RT-PCR توسعه داده شده در این تحقیق می‌تواند برای تشخیص آلودگی ArMV مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، تشخیص، ویروس موزایک آرابیس.

مقدمه

ویروس موزاییک آرابیس متعلق به خانواده ی *Secoviridae* و جنس *Nepovirus* می باشد. ویروس موزاییک آرابیس برای نخستین بار از انگلستان در سال ۱۹۴۴ گزارش شد (۱۲). ویروس از دامنه ی پراکنش گسترده ای در نواحی شرق آسیا، آمریکای شمالی، اقیانوس آرام، استرالیا، بلژیک، روسیه، ترکیه، کانادا، دانمارک، مجارستان، فرانسه، آلمان، ایتالیا، ایرلند، ژاپن، هلند، لهستان، بلغارستان، چکسلواکی سابق، سوئد، رومانی و مناطق اوراسیا برخوردار است (۷). شایع ترین علائم ناشی از آلودگی به ویروس ArMV، شامل رگه رگه شدن برگ، پیسک، انواع حالات کوتولگی و بدشکلی برگ می‌باشد. این علائم بسته به نوع گیاه میزبان، رقم، زمان و همچنین سویه (نژاد) ویروس می تواند متفاوت باشد.

ویروس ArMV دامنه میزبانی نسبتا وسیعی داشته و ۹۳ گونه گیاهی متعلق به ۲۸ خانواده از گیاهان دولپه ای را آلوده می کند (۷). گیاهان زینتی از جمله رز، درختان میوه هسته دار و مو، تمشک، توت‌فرنگی، تعدادی از گیاهان زراعی مانند چغندر و شبدر میزبان این ویروس می باشند (۷). علاوه بر ArMV، ویروس لکه‌حلقوی گوجه‌فرنگی (*Tomato ring spot virus*-ToRSV) نیز از جمله نپوویروس‌های مهم بیمارگر در بسیاری از گیاهان می‌باشد.

اگرچه مشاهدات غیر قاطعی مبنی بر انتقال مشکوک ArMV توسط چندین نماتد *Dorylaimid* از خانواده ی *Longidoridae* وجود دارد، اما تنها شواهد قاطع، درمورد انتقال ArMV توسط نماتد *Xiphinema diversicatum* ارائه شده است (۱۳). اگر چه این نماتد در توانایی انتقال در گونه های مختلف متفاوت است، ولی در بسیاری از موارد انتقال ویروس با موفقیت رخ می دهد. هنگامی که نماتد ویروس را از طریق تغذیه بر روی ریشه های یک گیاه آلوده بدست می آورد می تواند به مدت یک ماه در خاک بدون حضور میزبان، قدرت آلوده کنندگی خود را حفظ کند.(۷). تکثیر رویشی مواد گیاهی موثرترین روش گسترش ArMV است. انتقال ویروس ArMV توسط بذر یکی از ویژگی های مشترک غالب ویروسهای عضو جنس *Nepovirus* می باشد. این ویروس در حداقل ۱۵ گونه از ۱۲ خانواده گیاهی تا نزدیک ۱۰۰٪ با بذر انتقال می یابد (۱).

این ویروس دارای پیکره ایزومتریک با قطر ۳۰ نانومتر است. ژنوم این ویروس از دو مولکول آر.ان.ای تک رشته ای با مجموع طول ۱۳/۱ kb تشکیل شده است که دارای ساختمان VPg در قسمت ´۵ و دنباله پلی‌آدنینی در ناحیه ´۳ آنها می باشد (۱۴). با استفاده از آنتی سرم پلی‌کلونال مشخص شده است که همه ی سویه (نژاد)های شناخته شده ArMV دارای رابطه ی سرولوژیکی نزدیک با یکدیگر دارد (۴). روش RT-PCR جهت ردیابی آلودگی ArMV در گیاه انگور با موفقیت بهینه سازی و بکارگرفته شده است (۵).

ویروس ArMV در ایران از پراکندگی بالایی برخوردار است. این ویروس اولین بار در ایران در سال ۲۰۰۴ از روی مو در تاکستانهای شمال‌غرب کشور گزارش شد (۹) و سپس از سایر گیاهان مانند گیاه زینتی رز گزارش گردید (۱۱). در ضمن این ویروس قادر است بر روی گوجه فرنگی، انگور، و تعداد زیادی از علف‌های هرز نیز مستقر شود (۱۰). همچنین به تازگی موزائیک آرابیس از گوجه فرنگی کاریهای استان‌های جنوبی ایران جداسازی شده است (۶). روش اساسی برای مدیریت و کنترل ArMV متکی بر استفاده از مواد تکثیری و ازدیاد گیاهی سالم و دارای گواهی سلامت می باشد.

در تاکستانی در استان قزوین، تعدادی تاک (*Vitis vinifera*) با علائم پیسک و کاهش رشد مشاهده شد. با توجه به مشابهت علائم این نمونه‌ها با علائم توصیف شده در مورد بیماریهای ناشی از نپوویروس‌ها، احتمال آلودگی آن‌ها با دو نپوویروس شایع بیمارگر در گیاهان شامل ArMV و ToRSV مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌هایی از انگور با علائم پیسک،کاهش رشد و ضعف از یک تاکستان در استان قزوین در تابستان ۱۳۹۳ مورد مشاهده و جمع‌آوری قرار گرفت. با توجه به مشابهت علائم این نمونه‌ها با علائم توصیف شده در مورد بیماریهای ناشی از نپوویروس‌ها (Nepoviruses)، نمونه‌های برگی از نظر احتمال آلودگی به ویروس‌های ArMV و ToRSV با استفاده از روش الایزا (۳) و به کمک آنتی بادی اختصاصی (شرکت بیوربا سوئیس و طبق رقت توصیه شده توسط سازنده آن) مورد آزمون قرار گرفت. حدود ۶۰ دقیقه بعد از افزودن محلول سوبسترا به چاهک‌ها، میزان جذب نوری چاهک‌های بشقابک توسط دستگاه ELISA reader مدل ELX800 (ساخت BioTek، آمریکا) در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه گیری شدند. هر نمونه‌ای که میزان جذب نوری چاهک آن مساوی یا بیش از سه برابر میانگین جذب نوری مربوط به نمونه شاهد منفی (سالم) بود بعنوان نمونه آلوده ارزیابی شد.

با توجه به غلظت پایین ویروس ArMV در بافتهای گیاهی، در این تحقیق روش مولکولی IC-RT-PCR جهت ردیابی ویروس ArMV مورد استفاده قرار گرفت. برای این منظور از روشهای توصیفی قبلی (۲، ۵) با اندکی تغییرات استفاده شد. ابتدا چاهک بشقابک الایزا که از قبل با ۱۰ میکرولیتر از محلول آنتی‌بادی ArMV در بافر کربنات پوشش داده شده بود (یک میکروگرم در میلی‌لیتر)، عصاره نمونه گیاهی افزوده و بمدت یک شب در یخچال نگهداری‌شد. عصاره بافت گیاهی در بافر فسفات ۰/۱ مولار با اسیدیته ۷/۲ به نسبت ۱ گرم بافت در ۵ میلی‌لیتر بافر تهیه شده بود. بعنوان شاهد سالم از بافت انگور عاری از ویروس و بعنوان شاهد آلوده از بافت فریزی انگور آلوده به ArMV بدست آمده در تحقیقات قبلی استفاده شد (۸).

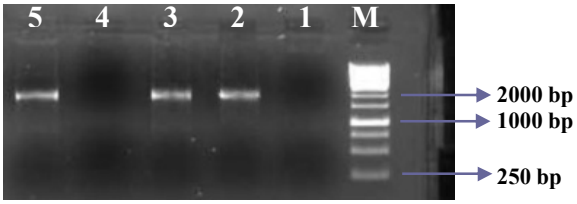
پس از شستشوی چاهک‌ها، واکنش RT-PCR با استفاده از روش توصیفی قبلی (۱۵) با اندکی تغییرات و آغازگرهای طراحی شده در این تحقیق برای ناحیه ژن پروتئین پوششی (CP) ویروس ArMV انجام شد. آغازگر بالادست (Ar-F) شامل 5'-AATCCTTTTGGAATGCCAGGCAATCC-3' (از نوکلئوتیدهای 1554-1529) و آغازگر پائین‌دست (Ar-R) شامل 5'- ACAAGCTAAATATAAATATAATACA-3' (از نوکلئوتیدهای 3695-3671) بود که طول قطعه دی.ان.ای مورد انتظار از واکنش آنها در RT-PCR حدود ۲۰۰۰ جفت‌باز مربوط به ناحیه ژن CP ویروس ArMV بود. برای این منظور واکنش RT-PCR در دو مرحله انجام شد. مرحله اول شامل ساخت رشته اول دی.ان.ای مکمل (first strand cDNA) ژن پروتئین پوششی ArMV بود. در این واکنش ابتدا یک میکرولیتر آغازگر پایین دست (down primer) از غلظت ۲۰ پیکومول در میکرولیتر، پنج میکرولیتر از آر.ان.ای استخراجی به همراه چهار میکرولیتر آب دو بار تقطیر عاری از RNase در یک میکروتیوب عاری از RNase اضافه شد و میکروتیوب بمدت ۵ دقیق در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد نگهداری و سپس بلافاصله به روی یخ منتقل گردید. سپس دو میکرولیتر بافر MMuLV-10x، دو میکرولیتر dNTP mix (۱۰ میلی مولار)، چهار میکرولیتر آب دوبار تقطیر عاری از RNase (تیمار شده با DEPC)، یک میکرولیتر RNase inhibitor و یک میکرو لیتر آنزیم رونوشت برداری برگردان (Revert Aid M-MuLV) (ساخت سیناکلون، ایران) به میکروتیوب اضافه شده و به مدت ۱ ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد در دستگاه ترموسایکلر مدل Primus (ساخت MWG، آلمان) قرار گرفت. در نهایت میکروتیوب بمدت ۱۰ دقیقه در ۷۰ درجه سانتیگراد انکوبه شد.

مرحله دوم شامل واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر بود. مواد واکنش شامل ۵ میکرولیتر بافر 10X، یک میکرولیتر آنزیم Taq DNA poly، ۱/۵ میکرولیتر MgCl2، یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای ۵ پیکومول در میکرولیتری، ۵ میکرولیتر محصول cDNA و یک میکرولیتر dNTPmix بود. پس از افزودن اجزا واکنش، میکروتیوب‌ها در دستگاه ترموسایکلر (PCR) مدل Primus (ساخت MWG آلمان) قرار داده شد. واکنش PCR طبق برنامه دمایی ۳ دقیقه در ۹۲ درجه سانتیگراد، ۳۰ چرخه در ۹۲ درجه سانتیگراد بمدت یک دقیقه، ۵۵ درجه بمدت یک دقیقه و ۷۲ درجه بمدت یک دقیقه، و در نهایت تکثیر نهایی بمدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد بود. پس از خاتمه واکنش PCR، بمنظور بررسی محصول واکنش از روش الکتروفورز در ژل آگارز استفاده شد.

نتایج و بحث

بر اساس نتایج حاصل از آزمون سرولوژیکی الایزا، از تعداد ۳ نمونه مو علائم‌دار، یک نمونه دارای واکنش نسبتا ضعیفی با آنتی‌بادی اختصاصی ویروس ArMV بودند ولی هیچ یک از این نمونه‌ها واکنشی با آنتی‌بادی ویروس ToRSVنشان ندادند. در این آزمون مقادیر عددی جذب نوری چاهک‌ها در ۴۰۵ نانومتر، در مورد سه نمونه مو بترتیب برابر با ۰/۰۷۵، ۰/۱۳۳ و ۰/۰۶۴ و در مورد شاهد سالم و شاهد آلوده بترتیب برابر با ۰/۰۳۵ و ۰/۸۲۵ بود. در این آزمون، عدد حدآستانه (cut off) برابر با ۰/۱۰۵ (سه برابر میانگین شاهد سالم) تعیین شد. از جمله علائم همراه با این نمونه‌ها پیسک و سبزردی بوده و بوته‌های آنها علائم کاهش رشد و ضعف داشتند.

سه نمونهٔ مذکور، با استفاده از تلفیق روش الایزا و آزمون رونوشت برداری برگردان و سپس واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز از نظر احتمال آلودگی به ArMV مورد بررسی قرار گرفتند. با استفاده از آغازگرهای طراحی شده در این تحقیق، کل ناحیه ژن پروتئین پوششی ویروس ArMV بهمراه بخشی از توالی‌های پیرامون آن تکثیر می‌گردد. نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات واکنش پی.سی.آر نشان دهنده تکثیر یک قطعه دی.ان.ای بطول حدود ۲۰۰۰ جفت باز در تمامی سه نمونه علائم دار مورد بررسی بود که با اندازه قطعه مورد انتظار مطابقت داشت. در آزمون‌های RT-PCR انجامی، در هیچیک از نمونه‌های تهیه شده از گیاهان فاقد علائم (شاهد منفی) قطعه دی.ان.ای تکثیر نشد ولی در شاهد مثبت (نمونه دارای آلودگی به ArMV) قطعه دی.ان.ای با طول مورد انتظار حدود ۲۰۰۰ جفت بازی تکثیر شده بود که نشان دهنده اختصاصی عمل نمودن آغازگرها و عدم وقوع واکنش غیراختصاصی بود (شکل ۱).



شکل ۱- نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات واکنش آر.تی.پی.سی.آر روی نمونه‌های انگور که نشان دهنده تکثیر یک قطعه دی.ان.ای با طول مورد انتظار حدود ۲۰۰۰ جفت باز در نمونه‌های آلوده می‌باشد. M: نشانگر وزن مولکولی یک کیلوبازی (فرمنتاس، لیتوانی)، ۱: نمونه فاقد علائم، ۲ و ۳: نمونه‌های علائم‌دار، ۴: شاهد سالم، ۵: شاهد آلوده.

در این تحقیق، به منظور ردیابی ویروس ArMV در مو از روش سرولوژیکی الایزا و نیز روش مولکولی IC-RT-PCR استفاده شد. نتایج حاصل از آزمون سرولوژیکی الایزا نشان‌دهنده پایین بودن حساسیت این روش در ردیابی ویروس موزائیک آرابیس در نمونه‌های مو مورد بررسی بود. ویروس ArMV معمولا در گیاهان چوبی و درختچه‌ای مانند مو بویژه در ماه‌های گرم سال غلظت پایینی داشته و از اینرو ردیابی آن به کمک تکنیک الایزا از دقت کمتری برخوردار است. در این تحقیق نیز مشخص شد که از سه نمونه مورد بررسی، آزمون الایزا قادر به ردیابی آلودگی ArMV در یک نمونه، آنهم بصورت واکنش ضعیف بود در حالیکه با استفاده از آزمون IC-RT-PCR، آلودگی به ArMVدر هر سه نمونه ردیابی شد. بعلاوه پایین بودن اعداد حاصل از آزمون الایزا در نمونه‌های مورد بررسی تایید کننده احتمال بروز خطا و افزایش تعداد موارد "نتیجهٔ منفی اشتباه" (false negative) می‌باشد. در روش RT-PCRمعمول، نیاز به انجام استخراج RNA از بافت گیاهی می‌باشد که معمولا پردردسر، هزینه‌بر و زمان‌بر می‌باشد و غالبا در صورت حضور مقادیر ناچیزی از ترکیبات آلکالوئیدی و بازدارند (inhibitor) همراه با RNA استخراجی بویژه در گیاهان درختی و درختچه‌ای، واکنش آنزیمی پلیمراز در RT-PCR دچار اختلال می‌شود. درحالیکه در روش IC-RT-PCRT، بدلیل اینکه نیازی به استخراج RNA از بافت گیاهی نمی‌باشد، بخش زیادی از مشکلات فوق حذف شده و نیز احتمال حضور مواد بازدارنده و بروز اختلال در کارکرد آنزیم‌های واکنش برطرف شده است. این موضوع ضرورت بکارگیری روش IC-RT-PCR را در برنامه‌های سنجش سلامت و صدور گواهی سلامت برای نهال مو مورد تاکید قرار می‌دهد.

منابع

1. Anonymous. (1992) . Arabis mosaic nepovirus. In Quarantine pests for Europe (Ed. By Smith, I.M.; McNamara, D.G.;Scott, P.R.; Harris, K.M.). CAB International, Wallingford, UK.
2. Bertolini, E., Olmos, A., Lopez, M. M., and Cambra, M.(2003). Multiplex nested reverse transcription-polymerase chain reactionin a single closed tube for sensitive and simultaneous detection of four RNA viruses and *Pseudomonas savastanoi* pv. *Savastanoi* in olive trees. Phytopathology 93: 286-292.
3. Clark, M.F. and Adams, A.N. (1977).Characterization of the microplate methods of enzyme linke dimmunosorbentassay (ELISA) for the detection of plant viruses. Journal of General Virology, 34: 475-483.
4. Hewitt, W.B. (1985). From virus-like to virus diseases of grapevines: some unresolved problems including immunity and ideas for researching them. Phytopathologia Mediterranea, 24: 1-7.
5. Ipach, U., Altayer, B. and Eichhorn, K. W. (1992). Detection od *Arabis mosaic virus* using the polymerase chain reaction (PCR). Vitis 31: 213-219.
6. Massumi, H., Shaabanian, M., Hosseini Pour, A., Heydarnejad, J. and Rahimian, H. (2009). Incidence of viruses infecting tomato and their natural hosts in the southeast and central regions of Iran. Plant Disease, 93: 67-72.
7. Murant, A. F. (1970). *Arabis mosaic virus* . CMI/AAB Descriptions of plant viruses No 16.Association of Applied Biologists, Wellesbourne, UK.
8. Pourrahim, R. (2013) Elimination of GFLV and ArMV nepovirus infections from two Iranian grapevine cultivars (Yagoti and Soltani) by tissue culture. Research Report, Publication of Iranian Research Institute of Plant Protection, Registration No. 44611, Tehran, 54 p.
9. Pourrahim, R., Ahoomanesh, A., Farzadfar, SH and Rakhshandehro, F. (2004). Occurrence of *Arabis mosaic virus* and *Grapevine leaf roll associated virus-3* on Grapevines in Iran. Journal of Plant Disease, 88: 424.1-424.1

10. Rakhshandehroo, F., Pourrahim, R., Zamanizadeh, H., Rezaee, S. and Mohammadi, M. (2005). Incidence and Distribution of viruses Infecting Iranian vineyards. Journal of Phytopathology, 153: 480- 484.
11. Rakhshandehroo, F., Zamanizadeh, H., Modarresi, A. and Hajmansour, SH. (2006). Occurrence of *Prunus necrotic ring spot virus* and *Arabis mosaic virus* on Rose in Iran. Plant Disease, 90: 975-976.
12. Smith, KM., Markham, R. (1944). The new viruses affecting tobacco and other plants. Phytopathology 34: 32.
13. Trudgill, D. L., Brown, D. J. F., McNamara, D. G. (1983). Methods and criteria for assessing the transmission of plant viruses by longidorid nematodes. Revue de Nématologie, 6: 133-141.
14. Wetzel, T., Fuehs, M., and Krezal, G. (2001). Size and sequence variability of the *Arabis mosaic virus* protein 2A. Journal of General Virology, 147: 1643-1653.
15. Wetzel, T., Jardak, R., Meunier, L., Ghorbel, A., Reustle, G. M. and Krczal, G. (2002) Simultaneous RT/PCR detectioin and differentiation of arabis mosaic and grapevine fanleaf nepoviruses in grapevine with a single pair of primers. Journal of Virological Methods 101: 63-69.

وقوع سفیدک پودری کنجد ناشی از *Leveillula taurica* در استان خراسان جنوبی

هادی محمودی[۱]، محمد سالاری[۲]، محمد رضا میرزائی [۱]

[۱]کارشناس و عضو هیئت علمی بخش تحقیقات گیاه پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان جنوبی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بیرجند، [۲]دانشیار گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل

**نویسنده مسئول: Mirzaee_mrz@yahoo.com*

چکیده

کنجد یکی از مهمترین گیاهان زراعی روغنی کشور است که در اکثر مناطق کشور با سطح بالغ بر ۴۰۰۰۰ هکتار کشت می شود. در تابستان ۱۳۹۴ علایم سفیدک پودی شامل لکه های نکروتیک زاویه دار حاوی میسلیوم و کنیدی های قارچ در منطقه محمدیه بیرجند، استان خراسان جنوبی، روی برخی از لاین های کنجد مشاهده گردید. مشخصات ریخت شناسی جدایه مورد بررسی بدین شرح بود که کنیدیوفور های قارچ به شکل منفرد یا منشعب معمولا در گروهای دو تا سه تایی از داخل روزنه ها به خارج مشاهده گردید. کنیدی های اولیه نیزه ای شکل با نوک متمایز با اندازه ۲۲-۱۲×۷-۴۶ میکرومتر و کنیدی های ثانویه استوانه ای شکل و شفاف با اندازه ۲۶-۱۰×۷۰-۴۳ میکرومتر مشاهده شد. براساس خصوصیات مرفولوژیک گونه مورد بررسی فرم غیر جنسی*Leveillula taurica* (Lev.)Arnaud تشخیص داده شد. فرم جنسی قارچ عامل بیماری مشاهده نشد. این دومین گزارش از قارچ روی کنجد در ایران و اولین گزارش از آن روی این میزبان در استان خراسان جنوبی است.

واژگان کلیدی: کنجد، سفیدک پودری،*Leveillula taurica*

مقدمه

کنجد یکی از مهمترین و قدیمی ترین دانه روغنی در جهان است که در اکثر مناطق کشور با سطح بالغ بر ۴۰۰۰۰ هکتار کشت می شود. کنجد گیاهی مقاوم به خشکی است و کشت آن در مناطق گرمسیری کشور مانند استان های سیستان و بلوچستان، جیرفت و فارس متداول است. این گیاه به علت محتوی روغن بالا و کیفیت آن به عنوان منبع غذایی برای انسان از اهمیت بالایی برخوردار است.سفیدک پودری کنجد ناشی از گونه *Leveillula taurica (Lev.)Arnaud* یکی از بیماری های رایج این محصول مخصوصا در اقلیم های خشک جهان است که با توجه به سطح آلودگی بین ۲۵ تا ۵۰ درصد می تواند خسارت وارد نماید (۱۷). گونه های *Erysiphe cichorecearum* (۱۴)، *Erysiphe orontii* (۱۳)، *Sphaerothica fuliginea*، (۶)، *Leveillula taurica* (۱۱)، *Oidium erysiphoides* (۷)، *Oidium sp* (۱۶)، *Oidium sesame* (۱۲) در نقاط مختلف جهان به عنوان عامل سفیدک پودری کنجد گزارش شده اند. در بین قارچهای عامل سفیدک گونه*L.tauric a* پراکنش میزبانی زیادی داشته و خسارت زیادی را به انواع مختلف گیاهان وارد می سازد. علایم بیماری ناشی از این قارچ روی گیاه کنجد به صورت لکه های نکروتیک زاویه دار با پوشش سفید رنگ میسیلیوم و کنیدی های قارچ در سطح زیرین برگ است(۲). از آنجایی که پخش اسپور های هوازاد قارچ های مولد سفیدک پودری جریانی پویاست (۱۸) پایش مستمر این بیماری ها روی میزبان های جدید در نواحی مجاور مناطق آلوده ضروری به نظر می رسد.

مواد و روش

در تابستان ۱۳۹۴ از گیاهان دارای لکه های نکروتیک زاویه دار حاوی مسیسلیوم و کنیدی های قارچ در منطقه محمدیه بیرجند(32°52N/59°13E) نمونه برداری شد. با تهیه اسلاید بخشی از ساختارهای قارچی روی لام محتوی اسید لاکتیک یا آب قرار گرفته، اندام رویشی و کنیدی های قارچ، نحوه قرارگیری کنیدیوفور، شکل و اندازه کنیدی ها با میکروسکوپ نوری بررسی و بر اساس کلید Braun(1987) (۴) عامل بیماری شناسایی گردید.

نتایج و بحث:

مشخصات ریخت شناسی نمونه مورد بررسی بدین شرح بود: کنیدیوفور ها به شکل منفرد یا منشعب معمولا در گروه های دو تا سه تایی از داخل روزنه های میزبان به بیرون خارج شده و کنیدی ها دارای دوشکلی مشخص بودند. کنیدی های اولیه سر نیزه ای شکل با انتهای نوک تیز و متمایز با اندازه ۲۲-۱۲×۴۶-۷۳ میکرومتر و کنیدی های ثانویه استوانه ای شکل و شفاف با انتهای گرد با اندازه ۲۶-۱۰×۷۰-۴۳ میکرومتر اندازه گیری شد (شکل ۱). فرم جنسی قارچ عامل بیماری مشاهده نشد.

بر اساس خصوصیات ریخت شناسی جدایه عامل بیماری سفیدک پودری روی میزبان کنجد، فرم غیر جنسی گونه *Leveillula taurica* (Lev.)Arnaud تشخیص داده شد. جنس *Leveillula* اساسا در مناطق گرم و خشک دنیا از مدیترانه تا آسیای مرکزی انتشار دارد و به نظر می رسد از این مناطق به سایر نقاط دنیا گسترش یافته است (۱). گونه *L. taurica* دامنه میزبانی وسیعی دارد و از روی کنجد تاکنون از افغانستان، استرالیا ، هندوستان، ایتالیا، مصر، سودان، ونزوئلا (۳)، کره جنوبی(۱۵)، بلغارستان (۵) گزارش شده است. این آرایه قارچی روی کنجد از استان یزد گزارش شده است (۲). این دومین گزارش از قارچ *L. taurica* روی کنجد در ایران و اولین گزارشات آن روی این میزبان در استان خراسان جنوبی است.

این قارچ به عنوان عامل بیماری سفیدک پودری چای ترش (۹)، کرچک (۸) و پیاز (۱۰) اولین بار از استان خراسان جنوبی گزارش شده است که روی این میزبان ها برای ایران نیز گزارشات جدیدی بوده است. این گونه بر خلاف سایر گونه های مولد سفیدک پودری به صورت اندوفیت داخل بافت مزوفیل برگ نفوذ می کند (۱۹). بر اساس مشاهدات اولیه، شدت بیماری ایجاد شده توسط این قارچ بین لاین های مختلف کنجد در مزارع آزمایشی تفاوت داشت (اطلاعات منتشر نشده). بررسی تحمل نسبی یا مقاومت لاین های رایج یا امید بخش به بیماری نیاز به مطالعات تکمیلی دارد تا در صورت همه گیر شدن بیماری از آنها در برنامه مدیریت تلفیقی بیماری استفاده شود. استراتژی استفاده از ارقام مقاوم می تواند روشی برای پیشگیری از وقوع بیماری باشد. استان های خراسان، سیستان و بلوچستان، کرمان و فارس که مناطق عمده کشت کنجد در کشور هستند در مجاورت هم قرار داشته (شکل ۱) و از آنجایی که شیوع این بیماری بعد از استان یزد در خراسان جنوبی گزارش می گردد، پراکنش این عامل بیمارگر به استان های مجاور در راستای اهداف پایش و پیش آگاهی بیماری باید مورد توجه قرار گیرد.

شکل ۱) نقشه مناطق کاشت کنجد در کشور(رنگ سبز) و مناطق گزارش بیماری(رنگ قرمز)(تصویر سمت راست)، علایم بیماری سفیدک پودری روی برگ کنجد (تصویر وسط) و کنیدی های استوانه ای و نیزه ای L. taurica (تصویر چپ)

منابع

۱. خداپرست، ا.، عباسی، م.، صمدی، س و فتحی، ف.۱۳۸۹. جنس *Leveillula* روی گیاهان تیره Asteraceae در ایران. بیماری های گیاهی. جلد۴۶ : ۱۲۱.

2. Abbasi, M., Esmilzadeh-Hosseini and Khodaparast S. A. 2003. First report of powderey mildew of sesame caused by *Leveillula taurica* in Iran. Iranian Journal Plant Patology: 39:80-81.
3. Amano, K. (Hirata) 1986. Host range and geographical distribution of the powdery mildew fungi. Japan Sci. Soc. Press, Tokyo, 741 pages.
4. Braun, U. 1987. A monograph of the *Erysiphales* (powdery midew). Beihefte zur Nova Hedwigia 89:1-700
5. Braun, U. 1995. The Powdery mildews (*Erysiphales*) of Europe. Gustav Fischer Verlag, 337 pages
6. Gemawat, P.D., Verma, O.P., 1972. A new powdery mildew of *Sesamum indicum* incited by Spaerotheca fuliginea. Phytopathological Notes 2, 94.
7. Mehta, P.R., 1951. Observations on new and known diseases.Plant Protection Bulletin 3: 7-12
8. Mirzaee ,M.R., Khodaparast, S. A., Mohseni, M., Ramazani , H., Soltani-Najafabadi, M. 2011. First record of powdery mildew of castor- oil plant (*Ricinus communis*) caused by the anamorphic stage of *Leveillula taurica* in Iran. Australasian Plant Dis. Notes. 6: 36–38.
9. Mirzaee, M.R., Abbasi,M., Nakhei, A. 2007. First report of powdery mildew on roselle caused by *leveillula taurica* in iran. Iranian journal of plant pathology 43: 158-158.
10. Mirzaee, M.R., and Mohammadi A. 2010. Occurrence of Powdery Mildew Caused by *Leveillula taurica* on Onion (*Allium cepa*) in Iran. Plant Disease. 94: 280.
11. Patel, M.K., Kamat, M.N., Bhinde, U.P., 1949. Fungi of Bombay, Supplement-I. Indian Phytopathology. 2:142-155.
12. Puzari, K.C., Sarbhoy, A.K., Ahmad, N., Agarwal, D.K., 2006. New species of powdery mildews from north eastern region of India. Indian Phytopathology 59(1), 72-7
13. Rajpurohit, T.S., 1993. Occurrence, varietal reaction and chemical control of new powdery mildew (*Erysiphe orontii*) of sesame. Indian Journal of Mycology and Plant Pathology 23(2), 207-209.
14. Reddy, C.D., Haripriya, S., 1990. Heterosis for tolerance of powdery mildew in *sesame. Indian* Journal of Mycology and Plant Pathology 20(2), 160-161
15. Shin, H.D.1990.identifacation of casual fungus of sesame powdery mildew in korea.j.plant pathol. 6 (1):8-12
16. Venkatakrishnaiya, N.S., 1958. Powdery mildew on some new hosts in Mysore. Mysore Agricultural Journal 33, 5-6.
17. Ventaka, R., Anuradha, G., Prasuna, K., Gouri., Vand Siddiq, E.A. 2013. Inheritance of powdery mildew resistans in sesame (*Sesamum indicum*). A review. International Journal of Bio-resource and Stress Management. 4(4):614-619
18. Willocquet, L.,, Berud, F., L. Raoux, L and Clerjeau, M.1998. Effects of wind, relative humidity, leaf movement and colony age on dispersal of conidia of *Uncinula necator*, causal agent of grape powdery mildew. Plant Pathology. 47: 234–242
19. Zheng, Z., Nonomura, T., Appiano, M., Pavan, S and Matsuda, Y. 2013. Loss of Function in Mlo Orthologs Reduces Susceptibility of Pepper and Tomato to Powdery Mildew Disease Caused by *Leveillula taurica*. PLoS ONE 8(7): 70723

گزارش بیماری پوسیدگی گل آذین خرما (خامج) از خراسان جنوبی

محمد رضا میرزائی[۱]، سید علی-جواد موسوی[۲]، الهام عدل[۲]، حسین عسکری[۲]

[۱] *عضو هیات علمی بخش تحقیقات گیاه پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان جنوبی- سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بیرجند*

[۲] *کارشناسان معاونت سازمان و مدیریت جهاد کشاورزی شهرستان طبس، طبس*

نویسنده مسئول: reza.mirzaee.mrz@gmail.com

چکیده

بیماری پوسیدگی گل آذین خرما (خامج) در صورت مساعد بودن شرایط محیطی از مهمترین بیماری های نخیلات در دنیا محسوب می شود. طی بازدید های بعمل آمده در فروردین ماه ۹۴ و ۹۵ از نخیلات منطقه طبس استان خراسان جنوبی، علایم پوسیدگی گل آذین خرما مشاهده شد. از بافت های با علایم بیماری پس از ضدعفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم یک درصد و شستشو با آب مقطر سترون، قطعاتی روی محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار (PDA) در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سلسیوس کشت داده شد. جدایه ها بر اساس خصوصیات ریخت شناسی آرایه قارچی *Mauginiella scaettae* شناسائی شدند. اثبات بیماری زائی با رعایت اصول کخ روی اسپات های بریده سالم در شرایط آزمایشگاهی انجام شد. این اولین گزارش از بیماری پوسیدگی گل آذین خرما (خامج) از خراسان جنوبی است.

واژگان کلیدی: بیماری قارچی، طبس، نخل

مقدمه

کشور ایران به دلیل داشتن شرایط آب و هوایی متنوع از مهمترین کشورهای تولید کننده محصولات کشاورزی به ویژه خرما محسوب می شود. این محصول به دلیل داشتن مقادیر زیاد قند، ویتامین و مواد معدنی یک ماده ارزشمند غذایی است (۶). ایران یکی از قطب‌های تولید خرما در جهان محسوب می‌شود. استان خراسان جنوبی سهمی بالغ بر ۳۵۰ تن را از کل محصول تولید شده در ایران به خود اختصاص داده است. بر اساس ارزیابی تیموری و همکاران، ۱۳۸۷، ظرفیت استان بسیار فراتر از این میزان تولید بوده و شهرستان‌های فردوس، بشرویه و خور شرایط مطلوبی برای پرورش نخل دارند (۲). بیماری پوسیدگی گل آذین خرما (خامج) از مهمترین بیماری های نخیلات در دنیا محسوب می شود. عامل بیماری پوسیدگی گل آذین خرما پس از بیمارگر عامل بیماری بایود، دومین عامل خسارت زا به خرما در جهان شناخته می شود.

عامل بیماری ناشی از قارچ *Mauginiella scaettae* Cav. اولین بار توسط کاوارا (۱۹۲۵) از لیبی گزارش شده است. این بیماری از الجزایر، مصر، شبه جزیره عربستان، عراق و اسپانیا گزارش شده است (۸ و ۹). خسارت سالیانه بیماری در عراق (بصره) تا ۸۰ درصد و در عربستان تا ۷۰ درصد محصول در برخی سالها ارزیابی شده است (۷، ۸ و ۹). عامل بیماری از مناطق حاجی آباد، بلوچستان، استان های فارس، اصفهان و خوزستان در ایران گزارش شده است (۱).

علایم بیماری خامج در اوائل فصل بهار در زمان ظهور اسپات ها به صورت زخم های قهوه ای رنگ بروز می کند. در زمان باز شدن آنها، علایم بیشتر در انتها بروز نموده که پوسیدگی گلها نیز قابل مشاهده است. در صورت شدت خسارت بیماری در مراحل اولیه، اسپات ها باز نمی شوند و خشک می شوند. معمولا گل آذین های نر بیش از گل آذین های ماده به بیمارگر

آلوده می شوند. بیماری با از بین بردن تمام یا قسمتی از گل آذین های نر و ماده و کاهش کمیت و کیفیت دانه گرده موجب خسارت می شود (۵ و ۸).

خسارت این بیماری در مناطق گرم و مرطوب یا مناطق با دوره های بارندگی طولانی تر دو تا سه ماه قبل از ظهور اسپات ها جدی تر است. آلودگی اولیه توسط بیمارگر احتمالا ناشی از میسیلیوم درون بافت های گل آذین های باقیمانده از قبل می باشد. شدت بیماری در نخلستان های با خاکهای غرقابی، زمینهای شور و سنگین، مناطق با زمستان های طولانی و پر باران در بهار و متروک و باغهایی که اصول بهداشتی باغ رعایت نمی شود، بسیار شدید گزارش شده است. همچنین بیماری در نخلستان هایی که از تغذیه خوبی برخوردارنیستند خسارت قابل توجهی را به دنبال دارد (۵، ۷ و ۸).

گرچه قارچ *M. scaettae* Cav. به عنوان عامل اصلی بیماری خامج شناخته می شود، آرایه های قارچی دیگر مانند *Thielaviopsis paradoxa*, *Acremonium*, *F.oxysporum* , *F.moniliforme*, *Fusarium solani*, *Trichothecium roseum*, به عنوان قارچ های همراه با بیماری گزارش شده اند که حائز اهمیت نیستند (۸).

مواد و روش ها

طی بازدید های بعمل آمده در فروردین ماه ۹۴ و ۹۵ از نخیلات منطقه طبس استان خراسان جنوبی، علایم پوسیدگی گل آذین خرما مشاهده شد شکل های ۱و ۲). نمونه هائی از بافت های دارای علایم به آزمایشگاه منتقل شد. قطعاتی از بافت ها پس از شستشوی اولیه با آب به مدت ۵ دقیقه و ضدعفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم یک درصد با آب مقطر سترون شستشو شده، پس از خشک کردن روی محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار (PDA) در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد کشت داده شد. شناسایی جدایه های خالص شده با استفاده از منابع معتبر و توصیف های موجود در منابع قارچ شناسی انجام شد (10).

سوسپانسیونی از کنیدی ها با غلظت 10^5 اسپور در میلی لیتر درون آب مقطر سترون تهیه شد. سوسپانسیون اسپوری به گلهای اسپات ها ی بریده در سه تکرار مایه زنی شد. تیمار شاهد (آب مقطر سترون بدون کنیدی) اعمال شد. اسپات های تلقیح شده به مدت سه روز درون پلاستیک در شرایط تاریکی قرار گرفتند و ارزیابی بیماری زائی پس از ۵ روز انجام شد. در صورت بروز علایم جداسازی مجدد به منظور رعایت اصول کخ انجام شد.

نتایج و بحث

از بافت های دارای علایم پوسیدگی جدایه های قارچی با خصوصیات آرایه *Mauginiella scaettae* Cav. روی محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار جداسازی شد. پرگنه ها روی محیط کشت کند رشد، سفید رنگ، پودری و اسپورزائی فراوان داشت. آرتروکنیدی ها یک تا چند سلولی، شفاف با شکل و اندازه های متغیر، کنیدی های تک سلولی کروی تا استوانه ای شکل و با ابعاد متوسط ۷.۵ × ۱۲.۵ میکرومتر اندازه گیری شدند (شکل ۳).

علایم بیماری ۵ روز پس از مایه زنی گل آذین ها ظاهر شد. در گل آذین هائی که با آب مقطر سترون تیمار شده بودند، هیچ گونه علائمی مشاهده نشد.

خصوصیات ریخت شناسی جدایه های قارچی این مطالعه با گونه *Mauginiella scaettae* Cav. مطابقت داشت (۷ و ۱۰). بر اساس بررسی های تبارزائی مبتنی بر توالی یابی بخشی از ناحیه ژنی rDNA، جدایه های این آرایه بیشترین شباهت را به *Phaeosphaeria* دارند. در نتیجه احتمالا جدایه های این آرایه فرم غیر جنسی متعلق به جنس *Phaeosphaeria* باشند (۷).

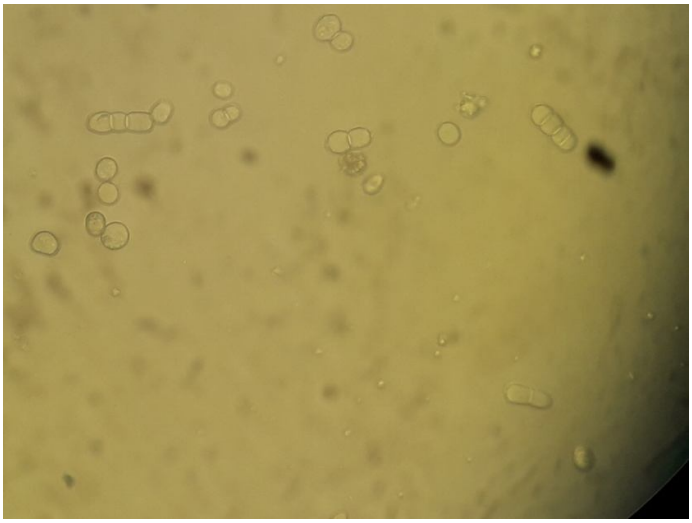
آرایه های قارچی دیگر شامل گونه هائی از جنس *Fusarium*، *Ceratocystis paradoxa* و *Trichothecium roseum* به عنوان بیمارگرهای عامل پوسیدگی گل آذین خرما با اهمیت کم از دنیا گزارش شده است (۷). این اولین گزارش از بیماری پوسیدگی گل آذین خرما (خامج) از خراسان جنوبی است. گزارش این بیماری، اطلاعات بیشتری را در خصوص مناطق انتشار آن در ایران در دسترس قرار می دهد.

بیماری خامج مهمترین بیماری خرما در استان خوزستان محسوب می شود. بر اساس نتایج مطالعه تاثیر چند قارچکش در کنترل بیماری روی رقم استعمران خرما در خوزستان، کنترل مؤثر بیماری پوسیدگی گل آذین خرما با دو بار سمپاشی به میزان ۲/۵ لیتر برای هر نخل با قارچ کش تیوفانات متیل ۷۰٪ به غلظت ۱ گرم در لیتر از ماده تجارتی و یا غلظت ۱/۵ گرم در لیتر بنومیل ۵۰٪ ممکن است. همچنین بر اساس تحقیقی دیگر تلفیق قارچکش تری دمورف با قارچ آنتاگونیست *Trichoderma koningii* بهترین تاثیر را در کنترل بیماری در خوزستان داشته است (۳ و ۴).

اعمال مدیریت بهینه نخلستان شامل هرس برگها و حذف و نابودی گل آذین های آلوده و در صورت نیاز به مبارزه شیمیائی کاربرد قارچ کش تیرام ۴ درصد در کنترل بیماری در عراق توصیه شده است (۸). عوامل مدیریتی به ویژه تغذیه می تواند روی کاهش بیماری خامج بسیار موثر باشد (۵). اطلاعات مستندی در خصوص خصوصیات ریخت شناسی قارچ در ایران منتشر نشده است. این تحقیق اطلاعاتی در زمینه منطقه جدید انتشار بیمارگر و خصوصیات ریخت شناسی جدایه های این آرایه قارچی در ایران ارائه می دهد. ارزیابی مقاومت ارقام خرما به بیمارگر قارچی و بررسی های مولکولی روی جدایه های ایرانی قارچ *M. scaettae* جهت تعیین حدود و ثغور گونه در راستای بررسی های تکمیلی توصیه می شود.

شکل ۱. علایم اولیه بیماری پوسیدگی گل آذین خرما (خامج) در منطقه طبس

شکل ۲. علایم بیماری پوسیدگی گل آذین خرما (خامج) در منطقه طبس در مراحل پیشرفته بیماری



شکل ۳. آرتروکنیدیوم های یک تا چند سلولی قارچ *M. scaettae*

منابع

۱. ارشاد، ج. ۱۳۸۸. قارچهای ایران. انتشارات سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی. ۵۳۱ صفحه.

۲. تیموری، م.، مظفر امینی، ا.، حاضری، م. ۱۳۸۷. بررسی جایگاه خرما و اهمیت توسعه‌ی آن در استان خراسان جنوبی . خلاصه مقالات کنفرانس ملی خرما، چالشها و پتانسیلهای تولید و صادرات خرما در ایران. زاهدان.

۳. شتاب بوشهری، س.م.، اشکان، س.م. ۱۳۷۷. کنترل شیمیائی بیماری پوسیدگی گل آذین خرما (خامج) در خوزستان. خلاصه مقالات سیزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. کرج.

۴. شتاب بوشهری، س.م.، حجارود، ق.، زاد، س.ج.، اخوت، س.م.، فرخی نژاد، ر. ۱۳۷۷. بررسی اثر چند قارچ کش و قارچ آنتاگونیست (*Trichoderma spp.*)روی قارچ *Mauginiella scaettae* عامل بیماری پوسیدگی گل آذین خرما. خلاصه مقالات سیزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. کرج.

۵. راه خدائی، ا. ۱۳۸۹. گزارش نهائی بررسی نقش کاربرد بهینه تغذیه نخل خرما بر روی بیماری پوسیدگی گل آذین خرما (خامج). موسسه تحقیقات خرما و میوههای گرمسیری کشور. ۲۵ صفحه.

۶. نیک نامی، م.، تقی زاده، م. و امیدی نجف آبادی، م. ۱۳۹۱. نقش آموزش های ترویجی بر کاهش ضایعات خرما در شهرستان بم . مجله پژوهش های ترویج و آموزش کشاورزی. شماره ۵، ۹۱-۸۱.

7. Abdullah, S.K., Asensio, L., Monfort, E., Gomez-Vidal, S., Palma-Guerrero, J., Salinas, j., Lopez-Lrca, L.V., Jansson, H.B. and Guarro, J. 2005. Occurrence in Elx ,SE Spain of inflorescence rot disease of date palm caused by *Mauginiella scaettae.* Journal of Phytopathology. 153:417-422.
8. Abdullah, S.K., Lopez-Lorca, L.V. and Janssonm, H.B. 2010. Diseases of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). Basrah Journal for Date Palm Researches. 9: 1-43.
9. Elhassan, A.M. 2016. Isolation, identification and characterization of *Fusarium oxysporum*, the causal agent of *Fusarium* wilt disease of date palm *Phoeniex dactylifera* L. in northern state, Sudan. *International Journal of Current Microbiology* and *Applied* Sciences. 5: 381-386.
10. Rattan, S.S. and Al-Dboon AHA. 1980. Notes on fungi associated with date palm I. Sydowia. 32:246–273.

اولین گزارش از قارچ اندوفیت *Trichoderma* sp. از روی انار در استان خراسان جنوبی

ابراهیم واحدی درمیان[۱]، مهدی جهانی[۲*] ، محمد رضا میرزائی[۳] و بیتا عسگری[۴]

[۱]*دانشجوی کارشناسی ارشد و [۲] دانشیار گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه بیرجند، بیرجند*

[۳]*عضو هیات علمی بخش تحقیقات گیاه پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان جنوبی- سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بیرجند*

[۴]*عضو هیات علمی بخش تحقیقات رستنی ها، موسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور، تهران*

* *نویسنده مسئول : mjahani@birjand.ac.ir*

چکیده

اندوفیت ها میکرو ارگانیسم هایی هستند که در بافت های داخلی گیاهان زندگی می کنند بدون اینکه باعث ایجاد هر گونه علایم آشکار شوند.گونه های تریکودرما دارای پراکنش جهانی، خاکزی و حتی به صورت اندوفیت روی گیاهان مختلف یافت می شوند. در این بررسی قارچهای اندوفیت از میزبان انار در منطقه فردوس خراسان جنوبی پس از خالص سازی، خصوصیات مورفولوژیکی آنها روی محیط کشت مالت آگار مورد بررسی قرار گرفت. براساس خصوصیات موفولوژیکی، جدایه ای از آرایه *Trichoderma*، متعلق به بخش *Longibrachiatum* شناسائی شد. این اولین گزارش از قارچ اندوفیت تریکودرما بر روی انار در دنیا می باشد.

واژگان کلیدی: انار، اندوفیت قارچی، تریکودرما

مقدمه

انار (*Punica granatum* L., Lythraceae) بومی ایران بوده و یکی از قدیمی ترین میوه های خوراکی شناخته می شود (۲۰). در بسیاری از کشور های نیمه گرمسیری بویژه در نواحی دریای مدیترانه هم چنین در ایران، هند، پاکستان، افغانستان، عربستان سعودی و در نواحی گرمسیر آمریکای جنوبی رشد می کند (۴). ایران یکی از مهم ترین تولید کننده و صادر کننده های انار در جهان با تولید سالانه حدود ۹۰۰/۰۰۰ تن (۱) و صادرات بیش از ۱۵۰/۰۰۰ تن به حساب می آید (۲۱).

اندوفیت ها میکرو ارگانیسم هایی هستند که در بافت های داخلی گیاهان زندگی می کنند بدون اینکه باعث ایجاد هر گونه علایم آشکار شوند (۱۹). اندوفیت های قارچی بافت های گیاهی را بدون اینکه باعث ایجاد اثرات منفی شوند کلونیزه می کنند (۹)، عموما به دلیل پتانسیل در کنترل بیولوژیک بیماریهای گیاهی اهمیت دارند (۲۴).

در ابتدا مطالعه قارچ های اندوفیت عمدتا بر روی گیاهان معتدله صورت گرفت. تنوع گیاهان در این مناطق زیاد است، و این گیاهان می توانند پناهگاه یک گروه بزرگتر و اجتماع متنوع قارچی باشد. بنابراین توجه بیشتری به اندوفیت های قارچی گیاهان گرمسیری شده است و بیشتر مطالعات نشان می دهد که اندوفیت های قارچی از این گیاهان دربرگیرنده اجتماعی از قارچ های با تنوع زیاد و گونه های غنی می باشد (۲، ۱۶، ۲۲).

تقریبا تمام گیاهان آوندی پناهگاه اندوفیت های قارچی بوده که در بیشتر بافت ها و اندام های گیاهی دیده می شوند. تعدادی از تاکسون های قارچ های اندوفیت به عنوان اندوفیت های بذر زاد در نظر گرفته می شوند (۱۱).

با این حال، برآورد بیش از ۵۰۰۰۰۰ گونه گیاهی در کره زمین ، تاکنون کمتر از ۰.۰۲ درصد اجتماع میکروبی اندوفیت گیاهان مورد مطالعه قرار گرفته است. قارچ های اندوفیت میزبانشان را در برابر حشرات، پاتوژن و علف خوار ها حفاظت می کنند. در حدود یک میلیون گونه قارچ اندوفیت در تمام گیاهان وجود دارد.

قارچ های *Phomopsis* sp. ,*Colletotrichum* sp. ,*Penicillium glabrum* ,*Neofusicoccum parvum*، *Nigrospora* sp, *Phyllostica* sp, به عنوان اندوفیت از روی انار گزارش شده است (۶، ۱۰، ۱۴).

جنس *Trichoderma* Pers. در سال ۱۷۹۴ توسط پرسون (Persoon ۱۷۹۴) معرفی گردید (۱۵). جنس تریکودرما (شاخه Ascomycota، زیر شاخه Peziziomycotina، رده Sordariomycetes، راسته Hypocreales، خانواده Hypocreaceae) از سال ۱۹۲۰ توانایی آن به عنوان عوامل بیوکنترل علیه بیمار گر های گیاهی شناخته شد (۱۷). عموما گونه های تریکودرما به عنوان ساپروفیت های ساکن خاک شناخته می شوند اما تعدادی از انها به صورت فرصت طلب، همزیست های ناپرازا گیاه زندگی می کنند (۷ و ۲۳). گونه های تریکودرما بیشتر به صورت ساکن خاک، ساپروفیت و بیمارگر سایر قارچ ها وجود دارد.

با توجه به اینکه تاکنون در استان خراسان جنوبی مطالعه ای در مورد قارچ های اندوفیت صورت نگرفته است هدف از این بررسی جداسازی و شناسایی اندوفیت های قارچی انار بود.

مواد و روش ها:

به منظور جداسازی قارچهای اندوفیت درختان انار استان خراسان جنوبی، نمونه گیاهی از شاخه های گیاهان کاملا سالم و بدون هیچ گونه نشانه بیماری، از باغهای زیر کشت انار در شهرستان فردوس به صورت تصادفی جمع آوری شد. نمونه های جمع آوری شده درون پاکتهای کاغذی جداگانه قرار داده شدند و سپس به آزمایشگاه منتقل و در یخچال با دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند.

برای جداسازی قارچهای اندوفیت از نمونه های گیاهی از روش شولز و همکاران (۱۸)، سرشاخه های یک ساله بطور کامل زیر آب شیر شستشو داده شدند. عمل ضدعفونی سطحی بافتها با قرار دادن آنها ابتدا در محلول هیپوکلریت سدیم نیم درصد به مدت ۲ دقیقه قرار گرفت و سپس در محلول اتانول ۷۵ درصد به مدت دو دقیقه انجام گرفت (۱۳ و ۱۸) و بافتها بلافاصله سه بار با آب مقطر سترون شسته شدند. قطعات برای خشک کردن روی کاغذ صافی سترون قرار داده شد و سپس به محیط کشت PDA همراه سولفات استرپتوماسین 0.5 گرم در لیتر منتقل و به مدت ۵ تا ۷ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و تاریکی نگهداری گردید. خالص سازی از طریق تک اسپور انجام گرفت.

مطابق Bisset & Gams ، جهت شناسایی روی محیط های MA (مالت آگار)، OA (آرد یولاف آگار) و PDA (سیب زمینی دکستروز آگار) در دمای ۱±۲۰ کشت داده شدند. مشخصات ماکروسکوپی پرگنه و میکروسکوپی شامل شکل و اندازه کنیدیوم فیالید کنیدیوفور و ریسه ها مورد مطالعه قرار گرفت. شرح خصوصیات با مشاهده روی محیط مالت آگار صورت گرفت (۵).

نتایج و بحث:

بر اساس جداسازی جدایه ها مبتنی بر روش جداسازی آرایه های قارچی اندوفیت (۱۸) در این بررسی یک جدایه از قارچ تریکودرما بدست آمد که توصیف آن به شرح زیر بود:

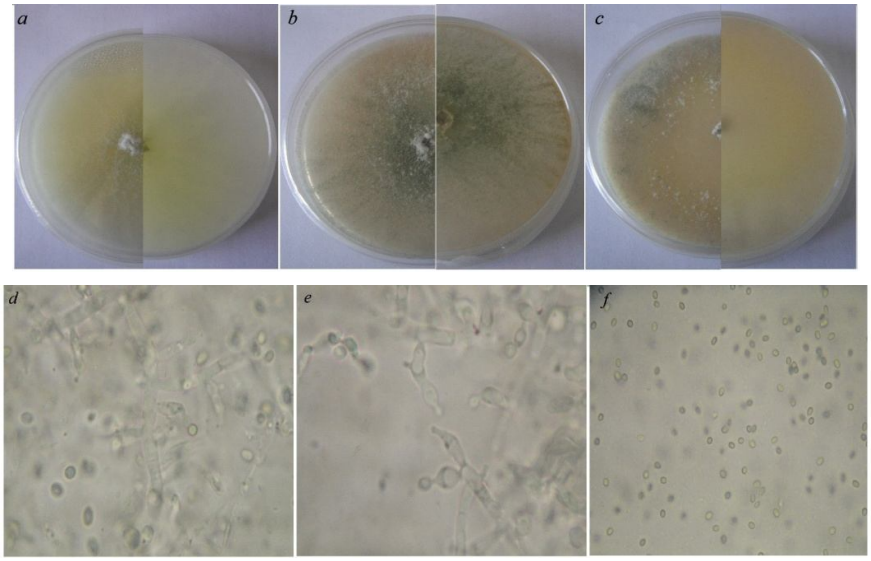
پرگنه قارچ پس از گذشت ۴ روز بر روی محیط کشت مالت آگار[1] در دمای۱±۲۰ درجه سلسیوس قطر آن به ۹-۸ سانتی متر می رسد.کنیدیوم زایی روی محیط کشت مالت به صورت یکنواخت و چسبیده به محیط است. ریسه ها بی رنگ، دارای دیواره صاف و تا ۸ میکرومتر قطر دارند. کنیدیوفورها قطر آنها در قسمت پایه به ۵ میکرومتر میرسد ولی به تدریج به طرف نوک باریکتر میشوند. کنیدیوم بیضوی تا تخم مرغی، دارای دیواره صاف، سبز روشن می باشد. اندازه کنیدیوم ها۳-۲×۵-۳ میکرومتر می رسد. فیالیدها روی شاخه های فرعی غالباً به صورت منفرد و به ندرت به صورت دسته های دو تا سه تایی شکل

[1] Malt Extract Agar (MEA)

می گیرند.فیالیدها تنگی شکل و آمپولی شکل، اندازه آنها۳-۲× ۱۲-۶ میکرومتر می رسد.قسمت انتهایی کنیدیوفور بارور می باشد.پرگنه قارچ پس از گذشت ۴ روز بر روی محیط کشت غذایی سیب زمینی دکستروز آگار[1] در دمای ۱±۲۰ درجه سلسیوس قطر آن به ۹-۸ سانتی متر رسید.کنیدیوم زائی نسبت به محیط مالت آگار کمتر بود و در ابتدا تولید ریسه های هوایی پنبه ای به رنگ سفید کرد،کنیدیوم زایی از مرکز پتری به سمت حاشیه کاهش یافت. تولید رنگدانه سبز مایل به زرد در سطح زیری پتری می کند.پرگنه قارچ بر روی محیط کشت آرد یولاف آگار[2] پس از گذشت ۴ روز در دمای ۱±۲۰ درجه سلسیوس قطر آن به ۹-۸ سانتی متر رسید کنیدی زایی نسبت به دو محیط کشت قبلی بیشتر بود.بر اساس مشخصات مورفولوژی قارچ اندوفیت جدا شده از سرشاخه انار تریکودرما شناسایی شد.

براساس کلید Bisset & Gams این جدایه مربوط به بخش Longibrachiatum بود (۵). این اولین گزارش از حضور قارچ اندوفیت تریکودرما بر روی انار می باشد. روش های مرسوم شناسایی جدایه های تریکودرما فقط برپایه ی ریخت شناسی گونه ها بود(5). شناسایی برپایه ریخت شناسی می تواند منجر به نتایج اشتباه بدلیل سختی و تخصص ویژه گردد(۸). معرفی رویکرد های مولکولی موجب شد تا محققین با اطمینان بیشتری گونه های تریکودرما را شناسایی کنند. ناحیه ITS rDNA اولین ژن مورد مطالعه بود (۱۲). بنابراین جهت شناسایی دقیق گونه نیازمند مطالعات تکمیلی بیشتری می باشد.

علیرغم اینکه پتانسیل کنترل بیولوژیک تریکودرما به طور گسترده بررسی شده، تریکودرمای اندوفیت اخیرا از این نظر مورد توجه قرار گرفته است (۳). از فواید برهمکنش گیاه /تریکودرما می توان به القای مقاومت به بیماری،محرک رشد گیاه و تحمل تنش های غیر زنده از قبیل خشکی را اشاره نمود. طبق گزارشهای موجود، قارچ تریکودرما خطرهای ناشی از تنشها را کاهش میدهد و باعث افزایش تحمل گیاه در برابر تنشهای زنده و غیرزنده می شود (۷).



شکل۱.a.پرگنه قارچ روی محیط PDA b.پرگنه قارچ روی محیط MEA C.پرگنه قارچ روی محیط OA d,e.فیالید f.کنیدی

منابع

[1] Potato Dextrose Agar (PDA)
[2] Oat meal agar (OA)

1. Anonymous, 2013. Agricultural Statistics.Center for Information,Technology and Communication,Iranian Ministry of Agriculture, p. 138.
2. Arnold, A.E. and Lutzoni, F. 2007. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: Are tropical leaves biodiversity hotspots? Ecology 88: 541–549.
3. Bailey, B. A., Bae, H., Strem, M.D., Crozier, J., Thomas, S.E., Samuels, G.J., Vinyard, B.T. and Holmes, K.A. 2008. Antibiosis, mycoparasitism,and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in Theobroma cacao. Biological Control. 46: 24-35.
4. Elyatem, S.M., Kader, A., 1984. Postharvest physiology and storage behaviour of pomegranate fruits. Sci. Hortic. 24, 287-298.
5. Gams, W. and Bissette, J. 1998. Morphology and identification of Trichoderma. In: Kubicek, C. P. & Harman, G.E. (Eds.). Trichoderma and Gliocladium, Basic Biology (Vol. 1). London: Taylor & Francis.
6. Hammerschmidt, L.,Wray, V., Lin, W., Kamilova, E., Proksch, P., Aly, A.H. 2012. New styrylpyrones from the fungal endophyte Penicillium glabrum isolated from Punica granatum. Phytochemistry. Letters 5: 600–603
7. Harman, G.E., Howell, C.R, Viterbo, A., Chet, I. 2004.*Trichoderma* spp.:opportunistic avirulent plant symbionts. Nature Reviews. 2: 43–56.
8. Hatvani, L., Vágvölgyi, C., Kredics, L. and Druzhinina, I. S. 2014. DNA barcode for species identification in *Trichoderma*. In: Gupta, V. K., Schmoll, M., Herrera-Estrella A., Upadhyay, R. S., Druzhinina, I. S. and Tuohy, M.G. Biotechnology and biology of Trichoderma. Elsevier.
9. Hirsch, G.U. and Braun, U. 1992. Community of endophytic microfungi. Kluwer, Dordrecht.
10. Huang, C.L., Wang, Y.Z. 2011. New Records of Endophytic Fungi Associated with the Araucariaceae in Taiwan. Collection and Research. 24: 87-95.
11. Hyde, K.D. and Soytong, K. 2008. The fungal endophyte dilemma. Fungal Diversity 33: 163–173.
12. Kindermann, J., El-Ayouti, Y., Samuels, G. J. & Kubicek, C. P. 1998. Phylogeny of the genus *Trichoderma* based on sequence analysis of the internal transcribed spacer region 1 of the rDNA cluster. Fungal Genetics and Biology. 24: 298-309.
13. Li, H.Y., Shen, M., Zhou, Z.P., Li, T., Wei, Y.L., Lin, L.B. 2012. Diversity and cold adaptation of endophytic fungi from five dominant plant species collected from the Baima Snow Mountain, Southwest China. Fungal Diversity. 54:79–86.
14. Mussi-Dias, V., Araújo, A.C.O., Silveira, S.F., Rocabado, J.M.A., Araújo, K.L. 2012. Endophytic fungi associated with medicinal plants. Rev. Bras. Pl. Med. Botucatu. 14: 261-266.
15. Persoon,C.H.1794. Neuer Versuch einer systematischen Eintheilung der Schwämme (Dispositio methodica fungorum). R ̈mer's Neues Magazin fur die Botanik in ihrem ganzen Umfange 1: 63–128.
16. Rungjindamai, N., Pinruan, U., Choeyklin, R., Hattori, T. and Jones, E.B.G. 2008. Molecular characterization of basidiomycetous endophytes isolated from leaves, rachis and petioles of the oil palm, Elaeis guineensis, in Thailand. Fungal Diversity. 33: 139–162.
17. Samuels, G.J. 1996. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. Mycological Research. 100: 923–935.
18. Schulz, B., Wanke, U., Draeger, S. and Aust, HJ. 1993. Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectivenses of surfuse sterilization methods. Mycological Research. 97: 1447-1450. medicinal plants of Malnad region, Western Ghats, Southern India. Fungal Ecology 1: 89–93.
19. Stone, J.K., Bacon, C.W., White, J.F. 2000. An overview of endophytic microbes: endophytism defined. In: Bacon, C.W., White JF (eds.), Microbial endophytes, Marcel Dekker Inc., New York, 3-29.
20. Stover, E., Mercure, E.W. 2007. The pomegranate: a new look at the fruit of paradise. Science Horticulture. 42: 1088-1092.
21. Tehranifar, A., Zarei, M., Nematia, Z., Esfandiyaria, B.,Vazifeshenas,M.R.,2010.Investigation of physico-chemical properties and antioxidant activity of twenty Iranian pomegranate (Punica granatum L.) cultivars. Sci. Hort. 126, 180-185.
22. Tejesvi, M.V., Tamhankar, S.A., Kini, K.R., Rao, V.S. and Prakash, H. S. 2009. Phylogenetic analysis of endophytic Pestalotiopsis species from ethnopharmaceutically important medicinal trees. Fungal Diversity. 38: 167–183.
23. Wilson M. 1997.Biocontrol of aerial plant diseases in agriculture and horticulture: current approaches and future prospects. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 19, 188–191.
24. Zabalgogeazcoa, I. 2008. Fungal endophytes and their interaction with plant pathogens. Spanish Journal of Agricultural Research. 6: 138–146.

استفاده از نشانگرهای ISSR، IRAP و IPBS در بررسی تنوع ژنتیکی ۶۰ ژنوتیپ گندم

حوریه مسعودی[۱]، حسین صبوری[۲]، فاختک طلیعی[۳]، جبار آلت جعفربای[۴]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه گنبدکاووس

۲و۳- گروه تولیدات گیاهی دانشگاه گنبدکاووس

۴- بخش تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر،مرکز تحقیقات وآموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان

**نویسنده مسئول: H. masoudi77@yahoo.com*

چکیده

شناخت تنوع ژنتیکی و طبقه‌بندی ذخایر توارثی یکی از فعالیت‌های مهم درزمینه‌ی به نژادی و حفظ ذخایر ژنتیکی در گیاهان است. به‌منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی در ۶۰ ژنوتیپ گندم، تکثیر مکان‌های ژنی با استفاده از ۸ آغازگر ISSR , IPBS و IRAP انجام شد. از تعداد ۶۱ قطعه‌ای که تکثیر یافته بود، ۴۷ قطعه چند شکل بودند. تعداد باندهای چند شکل از ۲ تا ۱۴ به ازای هر آغازگر متفاوت بود. بیشترین باندهای چند شکل مربوط به آغازگر PRI-50 (IRAP) بود. مقادیر PIC بین ۰/۳۱ تا ۰/۴۱ و شاخص نشانگری MI هم بین ۰/۳۱ تا ۴/۴۹ در هر آغازگر متغیر بود. بیشترین درصد چندشکلی به آغازگر PRI-46 (ISSR) با ۱۰۰ درصد و کمترین درصد چندشکلی به آغازگرهای PRI-59 (IPBS)، PRI-5 (IPBS) و PRI-10 (IPBS) با ۵۰ درصد تعلق داشت. از نتایج این بررسی می‌توان در برنامه به‌نژادی برای افزایش عملکرد و بالا بردن مقاومت به بیماری سفیدک پودری با استفاده از نشانگرهای مولکولی استفاده نمود.

واژگان کلیدی: تنوع ژنتیکی، نشانگرهای مولکولی، گندم

مقدمه

ارزیابی تنوع به روش‌های مختلفی انجام می‌شود، اما در این میان روش‌هایی که در سطح مولکولی و بر اساس ماده ژنتیکی صورت می‌گیرد، جدیدتر، آسانتر، سریعتر و شاید قابل اعتمادتر از سایر روش‌ها می‌باشد (۶). به منظور بررسی ۸ رقم گندم (*Triticum aestivum* L.) از ۵ آغازگر ISSR و ۲ آغازگر SSR استفاده گردید و از مجموع ۴۳ باند تکثیر شده توسط ۵ آغازگر ISSR، ۲۹ باند (۶۷/۴۴ درصد) چندشکلی مشاهده شد (۷). تعداد باندهای چند شکل تکثیر شده توسط هر یک از آغازگرهای ISSR در دامنه ۳ تا ۸ باند بود و میانگین تعداد باندها برای هر پرایمر ۴/۸ بود و آغازگر UBC-849 قادر به تشخیص تمام ارقام مورد مطالعه بود. شباهت ژنتیکی بین ذخایر هیبریدهای تریتیکاله با استفاده از ۱۴ نشانگر ISSR بررسی گردید و گزارش گردید که نشانگر ISSR یک روش قابل‌اعتماد برای شناسایی کروماتین *A.juvenalis* در تریتیکاله و هم‌چنین تخمین شباهت ژنتیکی بین هیبریدها و فرم‌های والدی است (۳). اهداف این مطالعه، بررسی تنوع ژنتیکی ارقام گندم از طریق نشانگرهای مولکولیISSR, IPBS IRAP و تعیین روابط ژنتیکی آن‌ها جهت شناسایی والدین مناسب برای برنامه‌های اصلاحی و ژنتیکی بود.

مواد و روش

تعداد ۶۰ ژنوتیپ از ایستگاه تحقیقات کشاورزی گنبد کاووس تهیه شد. استخراج DNA به روش CTAB (۵) و تعیین کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از ژل آگارز ۰/۸ درصد انجام شد. پس از انجام واکنش PCR الکتروفورز DNA تکثیری روی ژل اکریل‌آمید ۶ درصد انجام گرفت و رنگ آمیزی به روش رنگ آمیزی سریع نیترات نقره (۱ و ۲) صورت گرفت. تنوع ژنتیکی برای صفات مورفوفنولوژیک ارقام با استفاده از مارکرهای ترانسپوزونی IPBS، IRAP و مارکرهای ISSR شناسایی شدند. داده-های مولکولی بعد از امتیازبندی باندها به‌صورت صفر و یک، با استفاده از نرم‌افزارهای Popgene و تجزیه ارتباط داده‌های مورفولوژیکی و داده‌های حاصل از نشانگرها از نرم‌افزار SPSS انجام شد.

جدول۱- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده

نوع آغازگر	نام آغازگر	توالی آغازگر	دمای اتصال (تاج داوون)
IPBS	PRI-59	AGAGAGGCTCGGATACCA	۵۵ تا ۵۰ درجه سانتی گراد
IRAP	PRI-50	CACTTCAAATTTTGGCAGCAGCGGATC	۶۷ تا ۶۲ درجه سانتی گراد
ISSR	PRI-46	GTTGTTGTTGTTGTTGTTA	۴۷ تا ۴۲ درجه سانتی گراد
IPBS	PRI-44	CTTCTAAGCGCCA	۵۵ تا ۵۰ درجه سانتی گراد
IRAP	PRI-35	ATTCTCGTCCGCTGCGCCCCTACA	۶۷ تا ۶۲ درجه سانتی گراد
ISSR	PRI-28	GTGTGTGTGTGTGTGTT	۴۷ تا ۴۲ درجه سانتی گراد
IPBS	PRI-17	AGCCTGAAAGTGTTGGGTTGTCG	۶۷ تا ۶۲ درجه سانتی گراد
IPBS	PRI-15	CTCATGATGCCA	۵۵ تا ۵۰ درجه سانتی گراد
IPBS	PRI-10	ACCTAGCTCACGATGCCA	۵۵ تا ۵۰ درجه سانتی گراد
IPBS	PRI-5	AACCTGGCTCAGATGCCA	۶۰ تا ۵۵ درجه سانتی گراد

نتایج و بحث

معیارهایی برای تنوع مولکولی: نتایج مربوط به معیارهای تعیین میزان چندشکلی برای هر جایگاه (جدول۲) آورده شده است. آغازگرهای مورد استفاده در مجموع توانستند ۶۱ مکان را شناسایی کنند که ۴۷ مکان از آن‌ها چندشکلی را نشان دادند. از ۶۱ باند تشکیل شده ۷۷/۰۵ درصد از باندها چندشکل بودند و ۳۳/۹۵ درصد از باندها یک‌شکل بودند و نیز میانگین درصد چندشکلی ۷۲/۶۰ درصد بود. نشانگر PRI-50 با ۱۵ باند بیشترین تعداد باند و ترکیب نشانگری PRI-10 با ۴ باند کمترین تعداد باند را داشتند. آلل‌های چندشکل شناسایی شده برای هر نشانگر از ۲ تا ۱۴ آلل متغیر بود و به طور متوسط ۵/۸۷۵ آلل بود. محتوای اطلاعات چندشکل نیز بین ۰/۳۱ تا ۰/۴۱ متغیر بود و به‌طور متوسط ۰/۳۶۱ بود. بیشترین مقدار شاخص شانون برای ترکیب نشانگری PRI-5 با مقدار ۰/۵۵۰ به‌دست آمد، هر چند اختلاف چندانی با سایر آغازگرها نداشت. برآورد شاخص نی نشان داد میزان تنوع از ۰/۳۴ تا ۰/۳۶ متغیر است و آغازگر PRI-5 با مقدار ۰/۳۶ بیشترین و ترکیب آغازگری PRI-5 با مقدار ۰/۳۴ کمترین مقدار شاخص نی را داشتند و نیز میانگین این شاخص ۰/۳۶۵ برآورد شد. آغازگرهای PRI-46 با داشتن بالاترین میزان درصد چندشکلی، ۱۰۰ درصد نشانگرهای مناسبی برای بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های گندم بودند. میانگین محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC)، ۰/۳۶۱ برآورد شد که نشانگر PRI-28 با ۰/۴۱ بیشترین و PRI-10 با ۰/۳۱ کمترین PIC را نشان دادند. هم‌چنین کمترین شاخص نشانگری MI به نشانگر PRI-10 با مقدار ۰/۳۱ و بالاترین شاخص نشانگری MI هم با مقدار ۴/۴۹ به نشانگر PRI-50 تعلق گرفت. آغازگر PRI-50 بیشترین مقدار شاخص شانون را با مقدار ۰/۵۵ و آغازگر PRI-10 با مقدار ۰/۵۲ کمترین میزان شاخص شانون را داشتند. بیشترین میزان شاخص نشانگری در آغازگر PRI-50 با مقدار ۴/۴۹ مشاهده شد که نشان‌دهنده قدرت تفکیک بالاتر این آغازگر نسبت به سایر آغازگرها است و کمترین شاخص نشانگری هم مربوط به آغازگرPRI-10 بود. در آزمایشی از نشانگر ISSR برای شناسایی تنوع ژنتیکی ارقام و لاین های اصلاحی گندم استفاده

کردند، در این آزمایش از ۱۰ آغازگر ISSR استفاده شد که مجموعاً ۸۶ نوار تولیدشده، ۶۹ نوار از بین آن‌ها چندشکلی نشان دادند (۸۰/۲ درصد) (۴). با توجه به نتایج حاصل می‌توان بیان داشت که جایگاه ژنی PRI-50 به دلیل داشتن درصد چندشکلی، شاخص نشانگری و محتوای اطلاعات چندشکلی بیشتر، بیشترین تنوع را بر روی جمعیت مورد مطالعه داشته است.

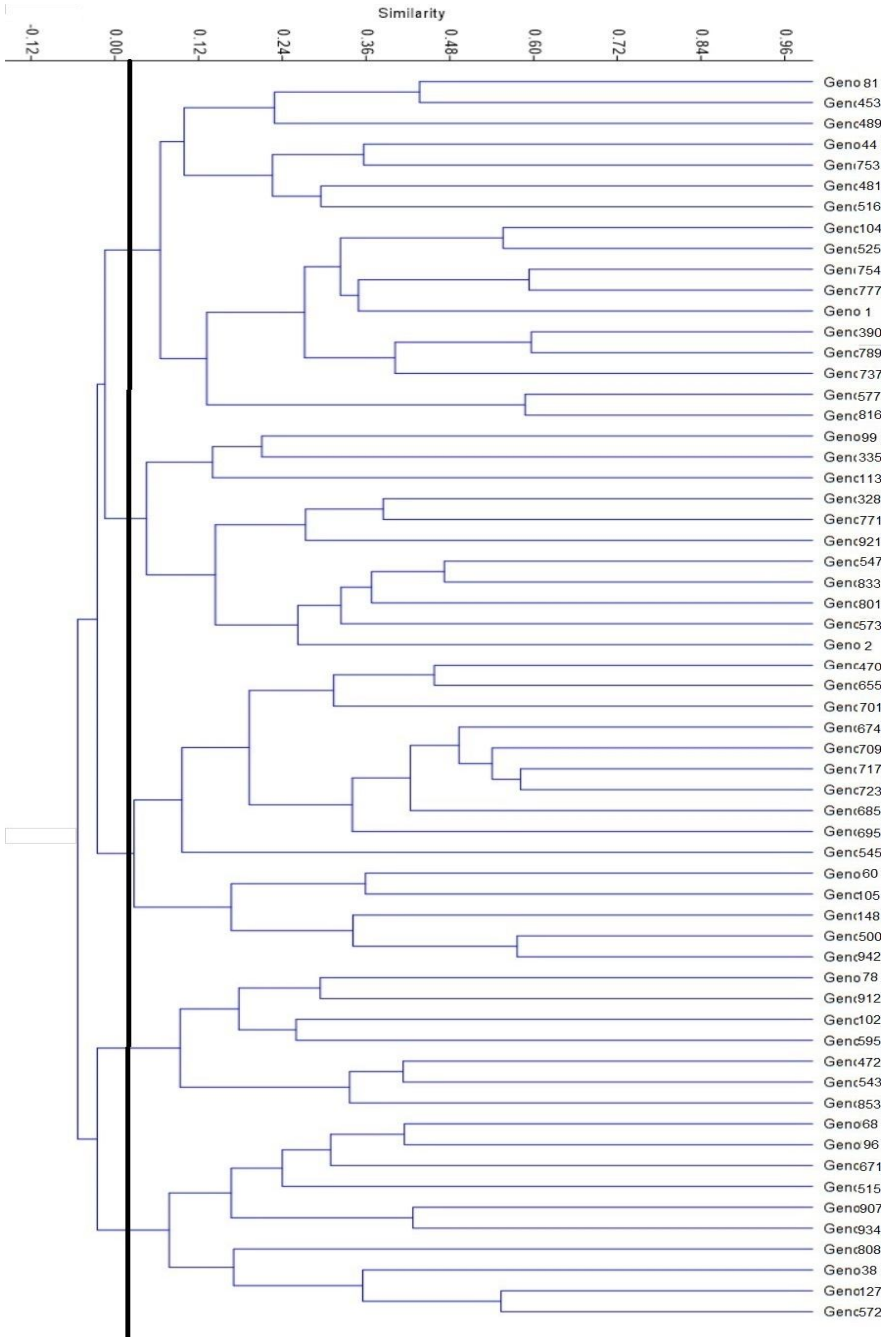
جدول ۲- نتایج حاصل از بررسی ۶۰ ژنوتیپ گندم با استفاده از نشانگرهای **ISSR** و **IPBS** و **IRAP**

نام آغازگر	تعداد کل باندها	تعداد باندهای چندشکل	درصد چندشکلی	شاخص نشانگری MI	محتوای اطلاعات چندشکلی PIC	شاخص شانون I	شاخص تنوع ژنتیکی نی H_E	تعداد الل موثر N_E
PRI-28	۸	۷	۸۷/۵۰	۲/۵۱	۰/۴۱	۰/۵۴۳۳	۰/۳۵۷۸	۱/۵۵۷۰
PRI-46	۶	۶	۱۰۰	۲/۲۲	۰/۳۷	۰/۵۴۳۳	۰/۳۵۷۸	۱/۵۵۷۱
PRI-50	۱۵	۱۴	۹۳/۳۳	۴/۴۹	۰/۳۹	۰/۵۴۴۶	۰/۳۵۷۸	۱/۵۶۰۱
PRI-17	۸	۶	۷۵	۱/۶۲	۰/۳۶	۰/۵۴۴۴	۰/۳۵۷۸	۱/۵۵۷۱
PRI-59	۶	۳	۵۰	۰/۵۲	۰/۳۵	۰/۵۴۹۱	۰/۳۶۳۰	۱/۵۶۹۹
PRI-15	۸	۶	۷۵	۱/۵۳	۰/۳۴	۰/۵۳۹۱	۰/۳۵۰۹	۱/۵۵۰۴
PRI-5	۶	۳	۵۰	۰/۵۴	۰/۳۶	۰/۵۵۰۹	۰/۳۶۴۸	۱/۵۷۵۴
PRI-10	۴	۲	۵۰	۰/۳۱	۰/۳۱	۰/۵۲۶۰	۰/۳۴۲۵	۱/۵۲۲۱
میانگین	۷/۶۲۵	۵/۸۷۵	۷۲/۶۰	۱/۷۱	۰/۳۶	۰/۵۴۲	۰/۳۶۵	۱/۵۵۶

تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها بر اساس نشانگرهای ISSR، IRAP و IPBS

گروه‌بندی ۶۰ ژنوتیپ با تجزیه کلاستر بر اساس روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد انجام شد و برش دندروگرام ژنوتیپ‌ها را به پنج گروه تقسیم کرد (شکل۱). در گروه یک ژنوتیپ‌های ۵۷۲، ۱۲۷، ۳۸، ۸۰۸، ۹۳۴، ۹۰۷، ۵۱۵، ۶۷۱، ۹۶ و ۶۸ قرار داشتند. در گروه دوم ژنوتیپ‌های ۸۵۳، ۵۴۳، ۴۷۲، ۵۹۵، ۱۰۲، ۹۱۲ و ۷۸ قرار داشتند. گروه سوم شامل ژنوتیپ‌های ۹۴۲، ۵۰۰، ۱۴۸، ۱۰۵، ۶۰، ۵۴۵، ۶۹۵، ۶۸۵، ۷۲۳، ۷۱۷، ۷۰۹، ۶۷۴، ۷۰۱، ۶۵۵ و ۴۷۰ بودند. در گروه چهارم ژنوتیپ‌های ۲، ۵۷۳، ۸۰۱، ۸۳۳، ۵۷۴، ۹۲۱، ۷۷۱، ۳۲۸، ۱۱۳، ۳۳۵ و ۹۹ و در گروه پنجم ژنوتیپ‌های ۸۱۶، ۵۷۷، ۷۳۷، ۷۸۹، ۳۹۰، ۱، ۷۷۷، ۷۵۴، ۵۲۵، ۱۰۴، ۵۱۶، ۴۸۱، ۷۵۳، ۴۴، ۴۸۹، ۴۵۳ و ۸۱ قرار داشتند. گروه پنجم و گروه دوم به ترتیب با دارا بودن تعداد ۱۷ و ۷ ژنوتیپ بزرگترین و کوچکترین گروه بودند. نتایج نشان داد، ژنوتیپ‌هایی که در یک گروه قرار گرفته‌اند باوجود تفاوت‌های ظاهری دارای تعداد توالی‌های تکراری مشابه هستند. افراد داخل گروه‌ها دارای شباهت‌هایی بودند، برای مثال در بزرگترین گروه یعنی گروه پنجم ژنوتیپ‌های ۸۱۶، ۷۸۹، ۷۷۷، ۷۳۷، ۷۵۳، ۷۵۴، ۵۲۵، ۵۷۷، ۵۱۶، ۴۸۹، ۴۸۱، ۳۹۰، ۴۵۳، ۴۴ و ۸۱ دارای شجره مشابه بودند.

نتایج این مطالعه بیانگر کارآمدی نشانگرهای مورد استفاده در بررسی تنوع ژنتیکی میان رقم‌های گندم مورد مطالعه می‌باشد که وجود این تنوع می‌تواند در برنامه‌های به‌نژادی گندم در جهت بهبود کمیت و کیفیت پیشنهاد شود.



شکل ۱- تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها بر اساس نشانگرهای ISSR ، IRAP و IPBS

منابع

1- An, Z.W., Xie, L.L, Cheng H., Zhou, Y., Zhang, Q., and He, X.G. 2009. A silver staining procedure for nucleic acids in polyacrylamide gels without fixation and pretreatment. Analytical Biochemistry. Aug. 391(1):77-9.
2- Byun., S.O. Fang., Q. Zhou., H. and Hickford, J.G. 2009. An effective method for silver-staining DNA in large numbers of polyacrylamide gels. Analytical Biochemistry. 385(1):174-5.
3- Gradzielewska, A. 2012. Identification of hybrids between triticale and aegilops juvenalis (Thell) eig and determination of Jeuetic similwity with ISSR. Genetic Mol Res. 13.11(3):2147-55.
4- Najaphy, A., Ashrafi Parchin, R., and Farshadfar, E. 2011. Evaluation of genetic diversity in wheat cultivars and breeding lines using inter simple sequence repeat markers. Biotechnology and Biotechnology Equipment.10: 2634-2638.
5- Saghi Maroof, M.A., Biyaoshev, R.M., Yang, G.P., Zhang, Q., and Allard, R.W. 1994. Extra ordinarily polymorphic microsatellites DNA in barly species diversity, chromosomal location, and population dynamics. Processing of the academy of sciences, USA, 91: 4566-5570.
6- Tian, Q., Zhou, R., and Jia., J. 2005. Genetic diversity trend of common wheat (Triticum aestivum L.) in China revealed with AFLP markers. Journal of Genetic Resources and Crop Evolution, 52 (3): 325-331.
7- Zhu, Y.F., Hu, J., Han, R., Wang, Y., and Zhu, S. 2011. Fingerprinting and identification of closely related wheat (Triticum aestivum L.) cultivarsusing ISSR and fluorescence-labeled TP-M13-SSR markers. Australian Journal of Crop Science 5(7): 846-850.

پایش بیماری‌های رایج کلزا در استان مازندران

رضاپور مهدی علمدارلو[1*]، محمد سالاری[2]، محمدعلی آقاجانی[3]، ناصر پنجه‌که[2] و سید کاظم صباغ[4]

۱ و۲- دانشجوی دکتری تخصصی و دانشیاران گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

۳- بخش تحقیقات گیاه پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان، ایران

۴- دانشیار گروه زیست شناسی، مجتمع علوم، دانشگاه یزد، یزد، ایران.

** نویسنده مسئول: rezapoorma@gmail.com*

چکیده

جهت پایش بیماری‌های رایج کلزا در مناطق مختلف استان مازندران، بازدیدهای دوره‌ای از مزارع کلزا در سال‌های ۹۴-۱۳۹۳ و ۹۵-۱۳۹۴ انجام گرفت. در هر سال ۶۰ مزرعه کلزا در مناطق ساری، بابلسر،میاندرود، بهشهر و گلوگاه در مراحل مختلف رشدی کلزا بازدید شده و شناسایی و ارزیابی بیماری‌های مختلف در آن‌ها انجام گردید. رایج‌ترین بیماری‌ها، پوسیدگی اسکلروتینیایی و ساق سیاه فومایی بود که علایم آن‌ها در تمام مزارع مشاهده گردید و دامنه‌ی وقوع آن‌ها به‌ترتیب ۹۲/۴-۳ و ۵۲/۸-۲/۲ درصد بود. سایر بیماری‌ها شامل مرگ گیاهچه، سفیدک داخلی، سفیدک پودری، سوختگی آلترناریایی، پژمردگی ورتیسلیومی و لکه باکتریایی بود که به ترتیب در ۳۸، ۵۶، ۲۱، ۲۷، ۲۹ و ۶ درصد مزارع مشاهده شده و دامنه وقوع آنها نیز به ترتیب ۳۶/۸-۰، ۵۴/۲-۰، ۸۶/۴-۰، ۶۶-۰، ۴۶-۰ و ۲۶/۲-۰درصد بود. توصیه های مهم جهت جلوگیری از توسعه این بیماری‌ها شامل تاریخ کشت مناسب، بکارگیری تناوب زراعی، مدیریت بقایای گیاهی، کاشت بذر سالم و تیمار بذر با قارچ‌کش مناسب می‌باشد.

واژگان کلیدی: بیماری‌های کلزا ، ارزیابی، پایش و وقوع.

مقدمه

کلزا یکی از دانه‌های روغنی مهم بوده و با بیش از ۷۲ میلیون تن تولید جهانی، بعد از سویا و نخل روغنی جایگاه سوم را از لحاظ تولید روغن در دنیا دارد (۹). کشت کلزا در ایران نیز از اواخر دهه ۱۳۶۰ شروع شده و در برنامه‌های وزارت کشاورزی جهت خودکفایی در تولید روغن، کلزا به عنوان مهمترین گزینه انتخاب شده که به راحتی می‌تواند در تناوب کشت با غلات قرار گیرد (۲). بیماری های زیادی در دنیا ، بسته به شرایط اقلیمی، گیاه کلزا را مورد تهدید قرار می دهد و باعث وارد آمدن خسارت اقتصادی به آن می‌گردد که در اغلب نقاط دنیا بیماری‌های قارچی از اهمیت بیشتری برخوردار می‌باشند. بیش از ۲۵ بیماری قارچی، شش بیماری باکتریایی، حدود ۱۰ بیماری ویروسی و تعداد کمی بیماری نماتودی گیاه کلزا را آلوده می‌نماید (۱،۷،۱۰و۱۱).

در ایران نیز بیماری‌های قارچی به‌ویژه پوسیدگی اسکلروتینیایی ساقه و ساق سیاه در سال‌های اخیر از اهمیت بالاتری برخوردار می‌باشد و برخی دیگر از آنها مانند مرگ گیاهچه در اثر قارچ‌های مختلف، لکه سیاه آلترناریایی، سفیدک داخلی و سفیدک پودری به طور پراکنده در برخی نقاط کشور وجود دارند و در یک مورد نیز از لکه برگی و شانکر ساقه کلزا، باکتری

سودوموناس جداشده است (۳، ۴، ۵ و ۶). در این تحقیق پایش بیماری‌های مهم کلزا در مراحل مختلف رشدی آن طی دو سال متوالی انجام شده تا از این طریق بتوان راهبردهای بهتری را برای مدیریت این بیماری‌ها و کاهش خسارت آن‌ها به‌کار گرفت.

مواد و روش‌ها

جهت پایش بیماری‌های رایج کلزا در استان مازندران، بازدیدهای دوره‌ای از مزارع کلزا در مناطق مختلف استان طی سال‌های زراعی ۹۴-۱۳۹۳ (سال اول) و ۹۵-۱۳۹۴ (سال دوم) انجام گرفت. در هر سال ۶۰ مزرعه کلزا در مناطق ساری، بابلسر، میاندرود، بهشهر و گلوگاه (۱۲ مزرعه در هر منطقه) انتخاب شده و بازدید از آن‌ها در مراحل مختلف رشدی کلزا صورت گرفته و علایم بیماری‌های مهم در هر مزرعه بررسی و ثبت گردید. شناسایی بیماری‌ها بر اساس علایم آن‌ها در مزرعه و در صورت نیاز به کمک روش‌های آزمایشگاهی انجام گردید. میزان وقوع هر کدام از بیماری‌ها در انتهای دوره آلودگی، با انتخاب ۵۰۰ بوته کلزا در هر مزرعه و با استفاده از معادله ۱ تعیین گردید.

$$I = \sum x / N \qquad \text{(معادله ۱)}$$

در این معادله I بیانگر میزان وقوع بیماری، x بیانگر تعداد بوته های بیمار وN بیانگر تعداد کل بوته های ارزیابی شده می‌باشد (۸). در نهایت درصد مزارع آلوده به هر بیماری، دامنه وقوع بیماری و میانگین وقوع هر کدام از بیماری‌ها در کل مزارع تعیین گردید.

نتایج و بحث

بیماری‌های مختلف که در مراحل گوناگون رشدی کلزا در مزارع مشاهده گردید به شرح زیر می‌باشد:

۱- پوسیدگی اسکلروتینیایی: عامل بیماری قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary می‌باشد. علایم برگی بیماری به صورت لکه‌های خاکستری آبسوخته، در سال اول از ۱۳۹۳/۱۲/۲۸ و در سال دوم از ۱۳۹۴/۱۲/۱۴ در مزارع مشاهده گردید. علایم بیماری روی ساقه نیز به صورت لکه‌های کشیده خاکستری و سفید، در سال‌های اول و دوم به ترتیب از ۱۳۹۴/۱/۱۶ و ۱۳۹۵/۱/۲ مشاهده شد.

۲- ساق سیاه فومایی: عامل بیماری قارچ *Leptosphaeria maculans* (Desmaz.) Ces. & de Not. (فرم غیر جنسی *Phoma lingam* (Tode:Fr.) Desmaz.) می‌باشد. علایم برگی بیماری به صورت لکه‌های سفید خاکستری و با حاشیه زرد رنگ که پکنیدیوم های قارچ بیمارگر نیز در مرکز لکه‌ها وجود داشت در سال اول از ۱۳۹۳/۸/۱۲ و در سال دوم از ۱۳۹۴/۷/۲۶ در مزارع مشاهده گردید. علایم بیماری روی ساقه نیز به صورت لکه‌های خاکستری رنگ کشیده و با حاشیه تیره، در سال‌های اول و دوم به ترتیب از ۱۳۹۴/۱/۸ و ۱۳۹۴/۱۲/۲۴ مشاهده شد.

۳- مرگ گیاهچه: عامل بیماری در بیشتر موارد قارچ *Rhizoctonia solani* Kuhn و در موارد کمی نیز شبه قارچ *Pythium sp.* می‌باشد. علایم بیماری به صورت فساد بذر، از بین رفتن گیاهچه‌های تازه سبز شده، تغییر رنگ هیپوکوتیل و باریک شدن آن، از اواسط مهر ماه تا اواخر آذر ماه در مزارع کلزا طی دو سال مشاهده شد.

۴- سفیدک داخلی: عامل بیماری قارچ *Peronospora parasitica (Pers. ex Fr.) Fr.* می‌باشد. علایم بیماری به صورت لکه‌های کلروز نامنظم روی برگ و تشکیل توده قارچ بیمارگر به صورت پوشش نمدی به رنگ سفید خاکستری در پشت برگ، از نیمه اول آبان ماه روی برگ‌های اولیه کلزا در هر دو سال مشاهده گردید. علایم بیشتر روی کوتیلدون‌ها و برگ‌های پایینی کلزا بروز نموده و به برگ‌های بالایی گسترش نیافت. در مواردی که کوتیلدون‌ها در ابتدای کشت کلزا آلوده شده بود، مرگ گیاهچه‌ها بروز نمود.

۵- سفیدک پودری: عامل بیماری قارچ *Erysiphe cruciferarum Opiz ex L. Junel* می‌باشد. علائم بیماری به صورت نقاط سفید پودری روی برگ، در سال اول از ۱۳۹۴/۱/۱۶ و در سال دوم از ۱۳۹۵/۲/۳ مشاهده گردید. در ادامه فصل پوشش پودری روی دو سطح برگ و سپس روی ساقه، شاخه‌ها و غلاف‌ها توسعه پیدا نمود. در مراحل بعد لکه های قهوه ای رنگ در زیر

کلونی قارچ در محل آلودگی ایجاد شده و در انتهای دوره آلودگی اندام جنسی قارچ (کلیستوتسیوم‌ها) روی قسمت‌های آلوده تشکیل گردید.

۶- سوختگی آلترناریایی: عامل بیماری قارچ *Alternari brassicae (Berk) Sacc.* می‌باشد. اولین علایم بیماری به صورت لکه‌های گرد تیره رنگ با هاله زرد روی برگ‌ها، در سال اول از ۱۳۹۳/۱۲/۲۴ و در سال دوم از ۹۴/۱۲/۸ مشاهده گردید. علایم بعدی به صورت لکه‌های تیره رنگ گرد تا کشیده روی سرشاخه‌ها و غلاف‌ها بروز نمود. توسعه علایم بیماری بیشتر در اردیبهشت ماه رخ داده و در سال دوم شیوع بیشتری داشت.

۷- پژمردگی ورتیسلیومی: عامل بیماری قارچ *Verticillium dahliae Kleb.* می‌باشد. علایم بیماری به صورت زردی برگ‌ها و پژمردگی کلی یا جزئی بوته‌ها بعد از آن، در سال اول از ۱۳۹۳/۱۲/۲۴ و در سال دوم از ۱۳۹۴/۱۲/۲۸ مشاهده گردید. در اواخر دوره آلودگی، سختینه‌های ریز قارچ بیمارگر درون ساقه‌ها و شاخه‌های آلوده کلزا تشکیل گردید.

۸- لکه باکتریایی: عامل بیماری باکتری *Pseudomonas syringae pv. maculicola (McCulloch) Young, Dye & Wilkie* می‌باشد. علایم بیماری به صورت لکه‌های قهوه‌ای تا تیره و با هاله روشن روی برگ در سال اول از ۱۳۹۴/۱/۲۳ (تنها در یک مزرعه کلزا در شهرستان ساری) و در سال دوم از ۱۳۹۴/۱/۸ (در چند مزرعه واقع در ساری و دشت ناز) مشاهده شد. در سال دوم علایم بیماری روی سرشاخه و غلاف‌ها نیز به صورت لکه‌های کشیده قهوه‌ای و آبسوخته توسعه داشته و در مواردی پوسیدگی غلاف‌ها را به دنبال داشت.

وضعیت آلودگی به بیماری‌های مختلف در دو سال بررسی شده، در جدول ۱ درج شده است.

جدول (۱) وضعیت آلودگی به بیماری‌های مختلف در مزارع کلزا استان مازندران طی سال‌های ۹۴-۱۳۹۳ و ۹۵-۱۳۹۴

نام بیماری	سال زراعی					
	۱۳۹۳-۹۴			۱۳۹۴-۹۵		
	درصد مزارع آلوده	دامنه وقوع بیماری	میانگین وقوع بیماری	درصد مزارع آلوده	دامنه وقوع بیماری	میانگین وقوع بیماری
پوسیدگی‌اسکلروتینیایی	۱۰۰	۳-۴۲/۶	۱۲/۹	۱۰۰	۸/۲-۹۲/۴	۳۴
ساق سیاه فومایی	۱۰۰	۲/۲-۳۱/۴	۱۱/۶	۱۰۰	۴/۲-۵۲/۸	۲۸/۴
مرگ گیاهچه	۳۰	۰-۱۸/۶	۲/۶	۴۷	۰-۳۶/۸	۵/۶
سفیدک داخلی	۴۷	۰-۳۴/۲	۹/۴	۶۵	۰-۵۴/۲	۲۱/۶
سفیدک پودری	۳۲	۰-۸۶/۴	۱۲/۶	۱۰	۰-۳۱/۲	۱/۶
سوختگی آلترناریایی	۱۲	۰-۱۱/۴	۱/۴	۴۲	۰-۶۶	۷/۴
پژمردگی ورتیسلیومی	۴۳	۰-۴۶	۵/۲	۱۵	۰-۲۱	۱/۸
لکه باکتریایی	۲	۰-۶	۰/۰۹	۱۰	۰-۲۶/۲	۰/۶۷

همانطور که در جدول۱ مشخص است، بیماری‌های ساق سیاه و پوسیدگی اسکلروتینیایی در استان مازندران فراگیر بوده و بقیه بیماری‌ها نیز در صورت افزایش مایه بیماری و مساعد بودن شرایط، پتانسیل وقوع بالا را دارند. آمار هواشناسی در دو سال تحقیق نشان داد که در بهار سال دوم شرایط محیطی از لحاظ دما و بارندگی برای شیوع بیشتر بیماری‌ها مساعدتر بوده و در ماه‌های فروردین و اردیبهشت میانگین دمای ماهانه، میزان بارندگی ماهانه و تعداد روزهای بارانی بیشتر از سال اول بوده (جدول۲) که در نتیجه آن میانگین وقوع بیماری‌های پوسیدگی اسکلروتینیایی، ساق سیاه، سوختگی آلترناریایی، سفیدک داخلی و لکه باکتریایی بیشتر از سال اول بوده است.

جدول(۲) میانگین آمار هواشناسی مربوط به دما و بارندگی ماه‌های فروردین و اردیبهشت طی دو سال

ماه	سال زراعی					
	۱۳۹۳-۹۴			۱۳۹۴-۹۵		
	میانگین دما	بارندگی	روزهای بارانی	میانگین دما	بارندگی	روزهای بارانی
فروردین	۱۳/۸	۱۵	۶/۸	۱۴/۷	۹۸	۱۱/۲
اردیبهشت	۱۸/۸	۴	۲/۸	۲۰/۴	۲۸	۸/۸

بنابراین امکان شیوع بیشتر بیماری‌ها در استان مازندران وجود داشته و با توجه به برنامه‌های وزرات کشاورزی جهت توسعه کشت کلزا، باید به کمک راهبردهای مدیریتی مناسب و اقدامات پیشگیرانه از جمله رعایت تناوب زراعی، کشت به موقع، مدیریت بقایای گیاهی، کنترل مطلوب علف‌های هرز، استفاده از بذر سالم و تیمار نمودن بذور با قارچ‌کش‌های مناسب، از توسعه بیماری‌های مختلف جلوگیری نمود.

منابع

۱. افشاری آزاد، ه. ۱۳۸۰. بیماری های مهم کلزا. نشر آموزش کشاورزی. ۹۹ص.
۲. آلیاری، ه.، و شکاری، ف. ۱۳۷۹. دانه‌های روغنی: زراعت و فیزیولوژی. انتشارات عمیدی. ۱۸۲ ص.
۳. دهقانی، ع.، صالحی، م.، طبیب، م.ح. و ارشاد، ج. ۱۳۸۷. شناسایی و پراکنش بیماری‌های قارچی و فیتوپلاسمایی کلزا در خوزستان. خلاصه مقالات هجدهمین کنگره گیاهپزشکی (جلد ۲)، همدان، ص ۸۵.
۴. نیکروش، ز.، عربی، ف.، رضاییان، و. و رحیمیان،ح. ۱۳۸۴ .جداسازی چند سودوموناس از لکه برگی و شانکر ساقه کلزا. بیماری‌های گیاهی ۴۲: ۴۷۷-۴۷۶.
۵. صانعی، س.ج.، قدیری راد، س.، نوری نیا، ع.، باقرانی، ن. و رضوی، س.ا. ۱۳۸۹. آسیب شناسی کلزا. نشر پیک ریحان. ۲۷۴ص.
۶. مهدی علمدارلو،ر. آقاجانی، م.ع. مهدیان،ص.ع. و براری، ح. ۱۳۹۱. بررسی وضعیت آلودگی به بیماری پوسیدگی اسکلروتینیایی ساقه کلزادر مناطق مختلف استان مازندران. بیماری‌های گیاهی ۴۸: ۲۴۷-۲۳۷.
7. Bhowmik, T. P. 2003. Oilseed brassicas, constraints and their management. CBS publishers and distributers, India, Delhi. 272 p.
8. Cardoso, J. E., Santos, A. A., Rossetti, A. G., and Vidal, J. C. 2004. Relationship between incidence and severity of cashew gummosis in semiarid north-eastern Brazil. Plant Pathology 53:363-367.
9. -Food and agriculture organization statistics. [Online] <http://faostat.fao.org/> [15 march 2015].
10. -Kharbanda, P.D., Fitt, B.D.L., Lange, R.M., West, J.S., Lamey, A.H. and Phillips, D.V. 2002. Diseases of rapesed=canola (Brassica napus L. and Brassica rapa L=B. campestris L). [Online] <http://www.apsnet.org/ publications/commonnames/Pages/ Rapeseed.aspx> [15 Feb. 2017].
11. Roger Rimmer, S., Shattuck, V. I. and Buchwaldt L.2007. Compendium of Brassica Diseases. APS press. 117p.

بررسی وضعیت آلودگی مزارع باقلا شهرستان گرگان به بیماری‌های مختلف

نسیم شیخ‌نظری‌کتولی[۱]، محمدعلی آقاجانی[۲] و فاطمه شیخ[۳]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان، ایران

۲. بخش تحقیقات گیاه پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان، ایران

۳. بخش تحقیقات زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان، گرگان، ایران

* نویسنده مسئول: *n.sheikhnazari@yahoo.com*

چکیده

به‌منظور بررسی وضعیت آلودگی (میزان وقوع و شدت) بیماری‌های لکه‌شکلایی، لکه‌برگی *آلترناریایی*، سوختگی *استمفیلیومی* برگ، لکه‌برگی *سرکوسپورایی*، پوسیدگی طوقه و ریشه، بیماری‌های ویروسی و زنگ، ۲۷ مزرعه باقلا در سطح شهرستان گرگان طی سال زراعی ۹۴-۱۳۹۳ در مرحله‌ی گلدهی یادداشت‌برداری شدند و میزان وقوع و شدت بیماری‌های مختلف در هر مزرعه برای تجزیه و تحلیل آماری استفاده شد. نتایج تجزیه‌ی واریانس نشان داد که براساس میزان وقوع و شدت بیماری‌های مختلف، اختلاف بین مزارع در سطح ۹۹ درصد معنی‌دار بود؛ به‌جز بیماری زنگ که اختلاف معنی‌داری دیده نشد. درصد آلودگی مزارع به بیماری‌های لکه‌شکلاتی، لکه‌برگی *آلترناریایی*، سوختگی *استمفیلیومی* برگ و لکه‌برگی *سرکوسپورایی* معادل ۱۰۰ درصد، برای پوسیدگی طوقه و ریشه ۷۴/۸ درصد، بیماری‌های ویروسی ۷۳/۳ درصد و زنگ ۱۰/۴ درصد بود. ضمناً مشخص شد که درصد متوسط وقوع بیماری‌های لکه‌شکلاتی ۱۰۰-۵۹ (متوسط ۹۵/۲) درصد، لکه‌برگی *آلترناریایی* ۹۸-۴۸ (متوسط ۸۰/۷) درصد، سوختگی *استمفیلیومی* برگ ۸۲-۱۵ (متوسط ۴۹/۸) درصد، لکه‌برگی *سرکوسپورایی* ۷۴-۲۴ (متوسط ۵۱/۲) درصد، پوسیدگی طوقه و ریشه ۲۵-۱ (متوسط ۹) درصد، بیماری‌های ویروسی ۳۶-۱ (متوسط ۱۳/۶) درصد و زنگ ۱۷-۲ (۶/۷) درصد بود و شدت متوسط بیماری‌های لکه‌شکلاتی ۵۵/۵-۲۲/۲ (متوسط ۳۵/۶) درصد، لکه‌برگی *آلترناریایی* ۷۷/۸-۱۱/۱ (متوسط ۴۱/۲) درصد، سوختگی *استمفیلیومی* برگ ۶۶/۷-۲۲/۲ (متوسط ۴۱/۶) درصد و لکه‌برگی *سرکوسپورایی* ۵۵/۵-۱۱/۱ (متوسط ۳۵/۸) درصد بوده است. نتیجه کلی نشان داد که بالاترین میانگین وقوع مربوط به بیماری لکه‌شکلاتی و کمترین میانگین وقوع مربوط به بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه است و بالاترین میانگین شدت مربوط به بیماری سوختگی *استمفیلیومی* و کمترین میانگین مربوط به بیماری لکه‌شکلاتی بوده است.

واژگان کلیدی: باقلا، بیماری لکه‌شکلاتی، لکه‌برگی آلترناریایی، سوختگی استمفیلیومی برگ، لکه‌برگی سرکوسپورایی

مقدمه

بیماری‌ها یکی از مهم‌ترین عوامل زیستی بازدارنده‌ی تولید حبوبات در دنیا به‌شمار می‌روند. این عوامل روی کمیت و کیفیت محصول اثر گذاشته و خسارت سنگینی را به کشاورزان وارد می‌سازد. وقوع و میزان خسارت این عوامل تا حد زیادی تحت تاثیر شرایط محیطی است (۲). بیماری لکه‌شکلاتی نخستین بار توسط Berkeley (1983) گزارش شد (۵). در ایران از

استان‌های شمالی و استان خوزستان گزارش شده است (۱). بیماری لکه‌برگی *آلترناریایی* یکی از بیماری‌های کم‌اهمیت باقلا در دنیاست که از سال‌های نسبتاً دور در مناطق مختلف استان گلستان و مازندران مشاهده شده است (۴). قارچ *Stemphylium* spp. بیمارگری است که در بسیاری از محصولات سراسر جهان یافت می‌شود و ضرر و زیان‌های متفاوتی را در محصولات مختلف به‌وجود می‌آورد (۷). این بیماری تنها در دو کشور عربستان و موریس گزارش شده بود و در ایران، تنها از استان گلستان گزارش شده است. لکه‌برگی *سرکوسپورایی* بر اساس آخرین منابع، از ۱۷ کشور دنیا از جمله ایران (سواحل خزر و استان خوزستان) گزارش شده است. این بیماری در هوای خنک و مرطوب اوایل بهار بیشتر دیده می‌شود. پوسیدگی ریشه، یک بیماری بسیار گسترده و خسارت‌زا است و در چین، ژاپن و سودان خسارت‌های بیش از ۴۰ درصد ایجاد کرده است (۱). عامل بیماری ویروس لکه‌ای باقلا (BBSV) *Broad bean stain virus* عملکرد این گیاه را تحت تاثیر قرار می‌دهند (۲). بیماری زنگ در ایران، از استان‌های شمالی و استان خوزستان گزارش شده است (۱). ارزیابی بیماری‌های گیاهی، یکی از مهم‌ترین و اغلب مشکل‌ترین کارها در اپیدمیولوژی بیماری‌های گیاهی است. ارزیابی مقدار بیماری و شدت بیماری در یک زمان خاص، محور اصلی تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها، مدل‌سازی و تفسیر پدیده‌های یک محقق، کارشناس و مسئول در امر پژوهش می‌باشد. بنابراین لازم است وضعیت آلودگی بیماری‌های قارچی و ویروسی باقلا همواره مورد بررسی و ارزیابی قرار گیرد. هدف از انجام این تحقیق، بررسی وضعیت آلودگی (میزان وقوع و شدت) بیماری‌های باقلا در سطح مزارع شهرستان گرگان بوده است.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در فصل زراعی ۹۴-۱۳۹۳ به‌منظور یادداشت‌برداری از مقدار بیماری در ۲۷ مزرعه باقلا، از اواسط فروردین تا اواسط اردیبهشت ماه (در مرحله‌ی گلدهی باقلا) در شهرستان گرگان صورت پذیرفت. مزارع یاد شده بر اساس یک برنامه‌ی زمانی منظم (یک بار در هفته) مورد بازدید قرار گرفته و مقدار بیماری در هر مزرعه ثبت گردید. برای این منظور، در هر یادداشت‌برداری، با استفاده از فرم مخصوص یادداشت‌برداری و اندازه‌گیری شدت بیماری با استفاده از مقیاس‌های استاندارد بین‌المللی، در هر مزرعه تعداد ۵ ردیف که روی هر ردیف به فاصله‌ی ۵ ردیفی ۱۰۰ بوته انتخاب گردید. تعداد ۵۰۰ بوته در هر مزرعه مورد بررسی قرار گرفت، که در هر ردیف تعداد کل بوته‌ها و بوته‌های بیمار بر اساس علایم بیماری شمارش شد و نسبت به تعیین شدت و درصد آلودگی اقدام گردید. جهت ارزیابی بیماری با توجه به شرایط مساعد آب و هوایی جهت استقرار بیماری تنها به آلودگی طبیعی اکتفا گردید (۸). علایم بیماری‌های باقلا در در مزارع مورد بازدید، بر اساس میزان حساسیت و تحمل نسبت به بیماری نمره‌دهی شد: بیماری‌های لکه‌شکلاتی، لکه‌برگی *آلترناریایی* و لکه‌برگی *سرکوسپورایی* بر اساس مقیاس‌های ۹ نمره‌ای موجود آقاجانی و همکاران (۱) و بیماری سوختگی *استمفیلیومی* برگ بر اساس مقیاس ۹-۰ ایکاردا (۸) صورت گرفت. میزان وقوع بیماری با استفاده از معادله‌ی زیر به‌دست آمد:

$$I=\sum(x/N) * 100 \quad (۱$$

این متغیر شامل تعداد بوته‌های بیمار (x) تقسیم بر تعداد کل بوته‌های ارزیابی شده (N) می‌باشد. جهت محاسبه‌ی شاخص درصد شدت بیماری‌های باقلا از رابطه‌ی ریاضی زیر استفاده شد (۶).

$$\text{شدت بیماری ٪}(DS):\frac{score}{9}\times 100 \quad (۲$$

مرتب‌کردن داده‌ها و ترسیم برخی نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Microsoft Excel 2013 (شرکت Microsoft) و داده‌های آزمایش با استفاده از نرم افزار StatGraphics (شرکتStatPoint) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج و بحث

بر اساس نتایج تجزیه‌ی واریانس (آنووا)، از نظر درصد وقوع و شدت بیماری‌های لکه‌شکلاتی، لکه‌برگی *آلترناریایی*، سوختگی *استمفیلیومی* برگ، لکه‌برگی *سرکوسپورایی*، پوسیدگی طوقه و ریشه و بیماری‌های ویروسی، اختلاف بسیار معنی‌داری ($P \leq 0/01$) بین مزارع تحقیق مشاهده شد؛ به‌جز بیماری زنگ که اختلاف معنی‌داری دیده نشد. در ردیف‌های کشت مزارع از نظر درصد وقوع بیماری‌های لکه‌شکلاتی، لکه‌برگی *آلترناریایی*، سوختگی *استمفیلیومی*، لکه‌برگی *سرکوسپورایی*، بیماری‌های ویروسی و زنگ اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. از نظر درصد وقوع بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه اختلاف معنی‌داری ($P \leq 0/05$) بین ردیف‌ها رویت گردید. از نظر شدت بیماری‌های لکه‌شکلاتی، لکه‌برگی *سرکوسپورایی*، بیماری‌های ویروسی و زنگ اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. از نظر شدت بیماری لکه‌برگی *آلترناریایی* اختلاف بسیار معنی‌داری ($P \leq 0/01$) در ردیف‌های مورد تحقیق مشاهده شد. همچنین در بیماری سوختگی *استمفیلیومی* اختلاف معنی‌داری ($P \leq 0/05$) در ردیف‌ها وجود داشت (جدول ۱).

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس داده‌های مربوط به بیماری‌های مختلف باقلا در شهرستان گرگان

منابع تغییرات	درجه آزادی	لکه‌شکلاتی		لکه‌برگی آلترناریایی		سوختگی استمفیلیومی برگ		لکه‌برگی سرکوسپورایی		پوسیدگی طوقه و ریشه	زنگ	بیماری‌های ویروسی
		وقوع	شدت	وقوع	شدت	وقوع	شدت	وقوع	شدت	وقوع	وقوع	وقوع
مزارع	۲۶	۳۳۳/۹۹**	۱۴۷/۱۶**	۷۲۵/۹۰**	۳۳۶/۸۱**	۵۷۳/۸۵**	۴۳۲/۲۷**	۳۹۱/۷۵**	۲۳۰/۴۵**	۶۲/۹۳**	۲۸/۴۸ns	۱۳۷/۷۱**
ردیف	۴	۱۴/۳۴ns	۱۲/۸۰ns	۹۲/۹۱ns	۵۵۴/۱۸**	۲۹/۲۲ns	۹۹/۲۲*	۵۶/۹۳ns	۱۰۰/۵۹ns	۵۹/۵۱*	۵/۹۹ns	۶/۲۳ns
خطا	۱۰۴	۱۹/۴۷	۲۲/۲۹	۳۹/۵۸	۷۹/۳۵	۴۳/۷۲	۳۴/۶۴	۴۴/۱۷	۶۸/۳۰	۱۹/۶۵	۱۴/۰۷	۲۹/۰۹
کل	۱۳۴											

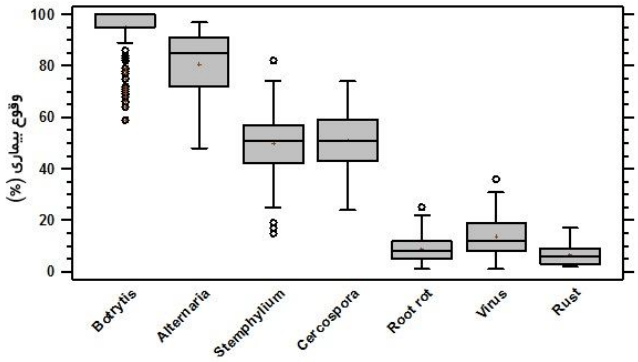
*، ** و ns به ترتیب بیانگر معنی‌دار بودن درصد احتمال ۹۵ درصد و معنی‌دار بودن درصد احتمال ۹۹ درصد و غیر معنی‌دار بودن می‌باشد.

طی یادداشت‌برداری‌های انجام شده در سطح مزارع، داده‌های کلی یادداشت‌برداری شده نشان داد که درصد آلودگی مزارع به بیماری‌های لکه‌شکلاتی، لکه‌برگی آلترناریایی، سوختگی استمفیلیومی برگ و لکه‌برگی سرکوسپورایی معادل ۱۰۰ درصد، و برای پوسیدگی طوقه و ریشه ۷۴/۸ درصد، بیماری‌های بیماری‌های ویروسی ۷۳/۳ درصد و زنگ ۱۰/۴ درصد بوده است (جدول ۲). بالاترین میانگین وقوع بیماری در وضعیت آلودگی مزارع مربوط به بیماری لکه‌شکلاتی (۹۵/۱۷ درصد) و کمترین میانگین وقوع بیماری مربوط به بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه (۸/۹۸ درصد) است. بالاترین میانگین شدت مربوط به بیماری سوختگی استمفیلیومی برگ (۴۱/۶۴ درصد) و کمترین میانگین شدت بیماری مربوط به بیماری لکه‌شکلاتی (۳۵/۶۳ درصد) بوده است (جدول ۱). به‌طور کلی در مورد وضعیت آلودگی درصد وقوع و شدت بیماری‌های باقلا می‌توان اظهار داشت: یکی از بیماری‌های مورد ارزیابی، بیماری لکه‌شکلاتی بود که دامنه‌ی تغیرات وقوع آن در داده‌های یادداشت‌برداری شده، از ۵۹ تا ۱۰۰ درصد در نوسان بوده و میانگین آن ۹۵/۱۷ درصد بوده است، در صورتی که شدت بیماری لکه‌شکلاتی از ۲۲/۲۲ تا ۵۵/۵۵ درصد در تغییر بوده و میانگین آن ۳۵/۶۳ درصد بوده است (جدول ۲ و نمودار ۱ و ۲). درصد وقوع بیماری لکه‌برگی آلترناریایی از ۴۸ تا ۹۷ درصد در نوسان بوده و میانگین آن ۸۰/۷۴ درصد بود، در صورتی که شدت این بیماری از ۱۱/۱۱ تا ۷۷/۷۷ درصد در تغییر بوده و میانگین آن ۴۱/۲۳ درصد بوده است (جدول ۲ و نمودارهای ۱ و ۲). درصد وقوع بیماری سوختگی استمفیلیومی برگ از ۱۵ تا ۸۲ درصد در نوسان بوده و میانگین آن ۴۹/۸۰ درصد بوده است، در صورتی که شدت

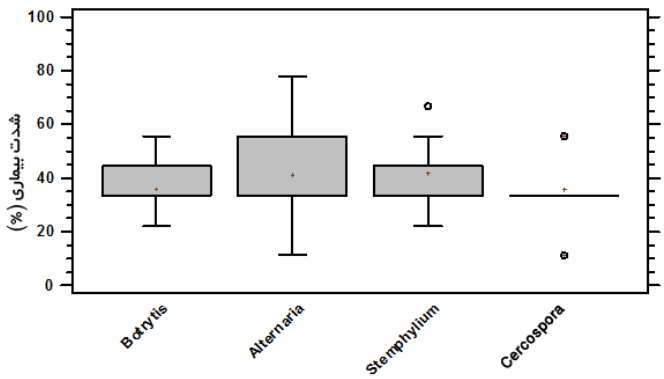
این بیماری از ۲۲/۲۲ تا ۶۶/۶۶ درصد در تغییر بوده و میانگین آن ۴۱/۶۴ درصد بوده است (جدول ۲ و نمودارهای ۱ و ۲). درصد وقوع بیماری لکه‌برگی *سرکوسپورایی* ۲۴ تا ۷۴ درصد در نوسان بوده و میانگین آن ۵۱/۲ درصد بوده است، در صورتی که شدت این بیماری از ۱۱/۱۱ تا ۵۵/۵۵ درصد در تغییر بوده و میانگین آن ۳۵/۸۰ درصد بوده است (جدول ۲ و نمودارهای ۱ و ۲). درصد وقوع بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه از ۱ تا ۲۵ درصد در نوسان بوده و میانگین آن ۸/۹۸ درصد بوده است. مقدار متوسط درصد وقوع بیماری بیماری‌های ویروسی از ۱ تا ۳۶ درصد در نوسان بوده و میانگین آن ۱۳/۵۹ درصد بوده است. مقدار متوسط درصد وقوع بیماری زنگ از ۲ تا ۱۷ درصد در نوسان بوده است و میانگین آن ۶/۷۱ درصد بوده است (جدول ۲ و نمودار ۱). همچنین پنیره (۱۳۹۱) بررسی‌هایی که در گرگان داشت بیان کرد که مقدار متوسط درصد وقوع بیماری لکه شکلاتی با میانگین ۶۳/۹۹ درصد، در صورتی که شدت بیماری لکه‌شکلاتی با میانگین ۳۴/۹۹ درصد بوده است. مقدار متوسط درصد وقوع بیماری لکه‌برگی آلترناریایی با میانگین ۴/۳ درصد، در صورتی که میانگین شدت این بیماری ۱/۷۸ درصد بوده است. مقدار متوسط وقوع بیماری سوختگی استمفیلیومی برگ با میانگین ۶۳/۲۲ درصد، در صورتی که شدت این بیماری از با میانگین ۴۰/۵۲ درصد می‌باشد. مقدار متوسط درصد وقوع بیماری لکه‌برگی سرکوسپورایی در مزارع گرگان با میانگین ۴/۹ درصد، در صورتی که شدت این بیماری با میانگین ۱/۵۵ درصد بوده است (۳). مقدار متوسط درصد وقوع بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه در مزارع با میانگین ۵/۳۸ درصد بوده است و مقدار متوسط درصد وقوع بیماری ویروسی با میانگین ۲/۹۱ درصد بوده است (۳). بیشتر اپیدمی‌های بیماری پس از دوره‌ی گلدهی، مخصوصاً در کشت پاییزه رخ می‌دهد (۱). نتایج حاصل از این تحقیق نیز این یافته‌ها را تائید می‌کند که بیش‌ترین آلودگی مربوط به بیماری‌های لکه‌شکلاتی، لکه‌برگی آلترناریایی، سوختگی استمفیلیومی و لکه‌برگی سرکوسپورا می‌باشد.

جدول ۲- وضعیت کلی درصد وقوع و شدت بیماری‌های مزارع باقلا در شهرستان گرگان

بیماری	درصد مزارع آلوده	متغیر	میانگین	انحراف معیار	حداقل	حداکثر
لکه‌شکلاتی	۱۰۰	درصد وقوع	۹۵/۱۷	۰/۷۷	۵۹	۱۰۰
		شدت	۳۵/۶۳	۰/۵۸	۲۲/۲۲	۵۵/۵۵
لکه‌برگی آلترناریایی	۱۰۰	درصد وقوع	۸۰/۷۴	۱/۱۳	۴۸	۹۷
		شدت	۴۱/۲۳	۱/۰۳	۱۱/۱۱	۷۷/۷۷
سوختگی استمفیلیومی	۱۰۰	درصد وقوع	۴۹/۸۰	۱/۰۴	۱۵	۸۲
		شدت	۴۱/۶۴	۰/۹۱	۲۲/۲۲	۶۶/۶۶
لکه‌برگی سرکوسپورا	۱۰۰	درصد وقوع	۵۱/۲	۰/۹۱	۲۴	۷۴
		شدت	۳۵/۸۰	۰/۸۶	۱۱/۱۱	۵۵/۵۵
پوسیدگی طوقه و ریشه	۷۴/۸	درصد وقوع	۸/۹۸	۰/۵۴	۱	۲۵
زنگ	۱۰/۴	درصد وقوع	۶/۷۱	۱/۱۵	۲	۱۷
بیماری‌های ویروسی	۷۳/۳	درصد وقوع	۱۳/۵۹	۰/۷۲	۱	۳۶



نمودار ۱- دامنه‌ی تغییرات درصد وقوع بیماری‌های مختلف مزارع باقلا در شهرستان گرگان



نمودار ۲- دامنه‌ی تغییرات درصد شدت بیماری‌های مختلف مزارع باقلا در شهرستان گرگان

منابع

۱. آقاجانی، م. ع.؛ محمدی، ح. ۱۳۸۸. راهنمای شناسایی و مدیریت بیماری‌های باقلا. گرگان، انتشارات ارشاد. ۸۷ ص.

۲. پارسا، م.؛ باقری، ع.، ر. ۱۳۸۷. حبوبات، انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد. چاپ اول، شماره ۳۵۵،۵۲۲ ص.

۳. پنیره، ن. ۱۳۹۱. بررسی پراکنش و اهمیت بیماری‌های باقلا در شهرستان گرگان. پایان نامه کارشناسی ارشد رشته بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان. ۱۶۰ ص.

۴. طاهرپورکلائی، ص.؛ تاجیک قنبری، م. ع.؛ بابایی‌زاد، و. ا.؛ موجرلو، ش. ۱۳۹۳. ارزیابی مقاومت نسبی نه رقم باقلا در برابر گونه *Alternaria alternata*، اولین کنگره سراسری فناوری‌های نوین ایران با هدف دستیابی به توسعه پایدار، تهران، مرکز راهکارهای دستیابی به توسعه پایدار، موسسه آموزش عالی مهر اروند.

5- Berkely, M.G. 1983. Gardners Chronicle. In: P.D. Hebblethwaite (Ed.). The Faba Bean (*Vicia faba* L.). A Basic for Improvement. Cambridge, UK. 573p.

6. Campbell, C. L. and Modden, L. V. 1990. Introduction to plant disease epidemiology. John Willey and Sons, New York, 532 p.

7. Polfliet, M. 2002. Infection of Stemphylium increases every year. Fruitteelt (Den Haag), 92: 16-17.

8. Tivoli, B., Baranger, A., Avila, C. M., Banniza, S., Barbetti, M., Chen, W., Davidson, J., Lindeck, K., Kharrat, M., Rubiales, D., Sadiki, M., Sillero, J. C., Sweetingham, M. and Muehlbauer, F. J. 2006. Screening techniques and sources of resistance to foliar diseases caused by major necrotrophic fungi in grain legumes. Euphytica, 147: 223–253.

مطالعه تفاوت‌های مرفولوژیکی دو گونه‌ی *Stemphylium botryosum* و *Stemphylium vesicarium* عامل سوختگی استمفیلیومی برگ باقلا

نسیم شیخ‌نظری‌کتولی[۱]، دکتر محمدعلی آقاجانی‌نسب‌افروزی[۲]، دکتر فاطمه شیخ[۳]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان، ایران

۲. بخش تحقیقات گیاه پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان، ایران

۳. بخش تحقیقات زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان، گرگان، ایران

** نویسنده مسئول: n.sheikhnazari@yahoo.com*

چکیده

به‌منظور بررسی اختلافات خصوصیات ریخت‌شناسی دو گونه‌ی *Stemphylium botryosum* و *Stemphylium vesicarium*، عامل بیماری سوختگی *استمفیلیومی* برگ باقلا، نمونه‌برداری به‌صورت تصادفی از ۲۷ مزرعه باقلا از برگ‌های آلوده به بیماری انجام گردید. ویژگی‌هایی از قبیل اندازه‌گیری ابعاد کنیدی‌ها و تعداد دیواره‌های عرضی، طولی و مورب، رنگ کلنی، شکل و نوع رشد پرگنه‌ها روی محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار (PDA) پس از ۶ روز نگهداری در دمای ۲۵ درجه ثبت شد. مقایسه میانگین اندازه‌گیری‌های میکروسکوپی نشان داد که در گونه‌ی *S. botryosum* طول کنیدی ۳۴-۸ (با متوسط ۱۸/۹۶) میکرومتر و عرض کنیدی ۲۵-۵ (با متوسط ۱۲/۴۳) میکرومتر بود. در گونه‌ی *S. vesicarium* طول کنیدی ۴۴-۱۳ (با متوسط ۲۵/۹۰) میکرومتر و عرض کنیدی ۱۷-۷ (با متوسط ۱۱/۵۸) میکرومتر بود. تعداد حفره‌های گونه‌ی *S. botryosum*، ۱۴-۲ (با متوسط۶/۰۷) و تعداد حفره‌های گونه‌ی *S. vesicarium*، ۱۶-۳ (با متوسط ۷/۷۹) بود. کنیدی‌ها در گونه *S.botryosum*، مکعبی و در گونه *S. vesicarium* کشیده و بیضی و به رنگ قهوه‌ای تیره هستند. پرگنه‌ی قارچ *S. botryosum* بر روی PDA به‌صورت بافت مخملی تا پنبه‌ای به رنگ خاکستری با حاشیه پنبه‌ای کرم و در پشت قهوه‌ای تیره با حاشیه قهوه‌ای روشن است. پرگنه‌ی قارچ *S. vesicarium* به‌صورت بافت کرکی به رنگ خاکستری روشن با حاشیه‌ی کرم روشن و در پشت در مرکز خاکستری تا سیاه و حاشیه‌ی خاکستری تیره می‌باشد. نتایج میکرومتری بر روی دوگونه‌ی نشان داد که اندازه‌ی طول کنیدی و تعداد حفره‌ی گونه‌ی *S. vesicarium* بیش‌تر است ولی اندازه‌ی عرض کنیدی *S. botryosum* بیشتر از گونه‌ی *S. vesicarium* است.

واژگان کلیدی: *باقلا*، سوختگی استمفیلیومی برگ، *Stemphylium bptryosum*، *Stemphylium vesicarium*، ریخت‌شناسی، کنیدی

مقدمه

باقلا در زمره‌ی مهم‌ترین بقولات دانه‌ای جهان رده‌بندی می‌شود (۲). که به طور وسیعی در سر تا سر دنیا به‌عنوان یک منبع غنی پروتئین، سلولز و مواد معدنی در کشورهای در حال توسعه برای انسان و در کشورهای صنعتی برای حیوانات استفاده

می‌شود (9). باقلا با توجه به داشتن توانایی تثبیت نیتروژن دارای اثر تناوبی بسیار خوبی بوده (۷) و باعث تقویت و حاصلخیزی شیمیایی و بیولوژیکی خاک می‌گردد. گونه‌های *Stemphylium botryosum* و *Stemphylum solani* به‌ترتیب از عربستان و جزیره‌ی موریس گزارش شده‌اند و گونه‌های *S. botryosum* و *S. vesicarium* از ایران گزارش شده‌اند. در سال‌های اخیر با توجه به تغییرات آب و هوایی این بیماری، بیماری غالب مزارع باقلا در شمال کشور بوده است (۱). قارچ عامل این بیماری به خانواده‌ی Pleosporales و شاخه‌ی Pleosporacea تعلق دارد (۵). سوختگی *استمفیلیومی* با خسارت‌زدن به برگ و محدود نمودن فتوسنتز، باعث کاهش تولید باقلا در واحد سطح می‌شود (۳). خصوصیات ریخت‌شناسی و خصوصیاتی نظیر اندازه و شکل کنیدی‌ها و کنیدیوفور و آسکوسپورها نقش مهمی در پراکنش این بیماری در گونه‌های مختلف دارد (۱۲). شناسایی گونه‌های مختلف *Stemphylium* بر اساس ریخت‌شناسی کنیدی، کنیدیوفور و آسکوسپور بسیار دشوار است، اما می‌توان با شناسایی مولکولی بهبود یابد. کنیدی‌ها کوتاه هستند و به‌صورت منفرد یا گروهی با ابعاد ۱۳×۸ تا ۷۸×۲۴ و رنگ زیتونی روشن قابل مشاهده هستند (۶). گونه‌های مختلف سوختگی *استمفیلیومی* در برخی گیاهان زراعی به‌صورت بیمارگر عمل کرده و سطوح مختلف کاهش عملکرد را موجب می‌شود (۱۱). خصوصیات ریخت‌شناسی و خصوصیاتی نظیر اندازه و شکل کنیدی‌ها و کنیدیوفور و آسکوسپورها نقش مهمی در پراکنش این بیماری در گونه‌های مختلف دارد. گونه‌های مختلف سوختگی استمفیلیومی در برخی گیاهان زراعی به‌صورت بیمارگر عمل کرده و سطوح مختلف کاهش عملکرد را موجب می‌شود. با توجه به تحقیقات گسترده از ریخت‌شناسی این دو گونه بر روی محصولات مختلف در سطح جهان، گزارش دقیقی از بررسی ریخت‌شناسی این دو گونه بر روی باقلا وجود ندارد. بنابراین هدف از تحقیق، تعیین اختلافات ریخت‌شناسی دو گونه‌ی *S. botryosum* و *S. vesicarium* بود.

مواد و روش‌ها

جهت نمونه‌برداری، در مرحله گلدهی باقلا (اواسط فروردین تا اواسط اردیبهشت ماه)، ۲۷ مزرعه باقلا در شهرستان گرگان مورد بازدید قرار گرفت. ضمن بازدید، به‌صورت تصادفی اقدام به نمونه‌برداری از برگ‌های آلوده به بیماری سوختگی *استمفیلیومی* برگ باقلا گردید. برگ گیاهان بیمار، پس از جمع‌آوری و در پاکت‌های کاغذی با ثبت اطلاعات ضروری سریعاً به آزمایشگاه قارچ‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان منتقل گردید. پس از انتقال نمونه‌های آلوده به آزمایشگاه، نمونه برگ‌های آلوده از حاشیه‌ی نواحی آلوده بریده شدند. نمونه‌ها پس از ضدعفونی سطحی بافت برگ با الکل ۷۰ درصد و محلول هیپوکلرایت سدیم ۵ درصد به مدت ۳۰ ثانیه تا ۱ دقیقه انجام گرفت و سپس با آب مقطر استریل شستشوی داده شدند. بافت برگ آلوده داخل اتاقک مرطوب به مدت ۴۸-۲۴ ساعت قرار داده شد تا بیمارگر بتواند رشد کند. نمونه‌ها در زیر هود استریل و در کنار شعله، با استفاده از قطعه‌ای از محیط کشت دکستروز آگار PDA ریسه‌های موجود بر روی سطح برگ‌های داخل اتاقک مرطوب برداشته و به داخل پتری حاوی محیط کشت PDA انتقال داده شد. پس از انجام کشت، نگهداری پتری‌های کشت به مدت ۲ تا ۳ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، در انکوباتور نگهداری شد. از پرگنه‌ی قارچ رشد یافته بر روی و در حاشیه‌ی نواحی آلوده در زیر هود استریل اسلایدهای میکروسکوپی تهیه شد (۴). پس از شناسایی میکروسکوپی، خالص‌سازی بر اساس روش تک‌اسپور (Single spore) صورت گرفت (۱۰) و شناسایی گونه‌ی قارچ با استفاده از کلیدهای قارچ‌شناسی (۸) انجام شد. در این کلیدها، با استفاده از ویژگی‌های ریخت‌شناسی میکروسکوپی قارچ نظیر ابعاد و تعداد دیواره‌های عرضی کنیدی‌ها، اقدام به تعیین گونه‌ی قارچ شد (۸). ویژگی‌های ریخت‌شناسی دو گونه‌ی قارچ *S. botryosum* و *S. vesicarium* بر روی محیط کشت PDA پس از ۶ روز از نگهداری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد. به‌منظور بررسی ریخت‌شناسی دو گونه‌ی قارچ *S. botyosum* و *S. vesicarium* اعمال زیر اجرا شد: طول و عرض کنیدی و تعداد حفره با استفاده از میکروسکوپ مجهز به عدسی چشمی مدرج اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری کنیدی دو گونه‌ی قارچ، ابتدا به وسیله‌ی سوزن استریل کنیدی‌ها بر روی لام حاوی یک قطره لاکتوفنل منتقل شدند و سپس با بزرگنمایی ۱۰۰× طول و عرض کنیدی اندازه‌گیری شد و پس از آن با بزرگنمایی ۴۰۰× تعداد حفره مشخص گردید. اندازه‌گیری‌ها بر روی ۵۰ کنیدی (هر گونه ۲۵ کنیدی) در هر مزرعه انجام

شد و این اندازه‌گیری‌ها در برنامه‌ی آماری StatGraphics با هم مقایسه شدند. ویژگی‌های ریخت‌شناسی از قبیل ابعاد کنیدی‌ها و تعداد دیواره‌های عرضی، طولی و مورب و رنگ پرگنه، شکل و نوع رشد پرگنه‌ها و ... ثبت شد (۱۰).

نتایج و بحث

اختلافات ریخت‌شناسی کنیدی دو گونه در زیر میکروسکوپ نشان داد که کنیدی قارچ سوختگی *استمفیلیومی* برگ در گونه *S.botryosum*، مکعبی و تخم‌مرغی شکل و در گونه *S. vesicarium* کشیده و بیضی‌شکل و به رنگ قهوه‌ای تیره هستند. کنیدی‌ها داری دیوارهای عرضی و طولی می‌باشد که باعث ایجاد حفره می‌شود (تصویر ۱). بر روی محیط کشت، تفاوت‌هایی از جمله رنگ پرگنه، شکل، بافت مشاهده شد. جدایه قارچ *S. botryosum* بر روی محیط کشت PDA، به‌صورت بافت مخملی به پنبه‌ای به رنگ خاکستری تیره با حاشیه پنبه‌ای کرم و در پشت قهوه‌ای تیره با حاشیه قهوه‌ای روشن و کرم ایجاد می‌شود. جدایه قارچ *S. vesicarium* به‌صورت بافت کرکی به رنگ خاکستری روشن با حاشیه‌ی کرم روشن و در پشت در مرکز خاکستری رو به سیاه و حاشیه‌ی خاکستری تیره همراه با کرم روشن ایجاد می‌کند (تصویر ۲). همچنین لارون (۲۰۰۲) در اکثر کشت‌ها مشاهده کرد که پرگنه‌ی قارچ بر روی محیط کشت به‌صورت بافت مخملی به پنبه‌ای با رنگ خاکستری، قهوه‌ای یا قهوه‌ای سیاه و سفید و در پشت کنیدی رنگ سیاه و سفید ایجاد می‌شود.

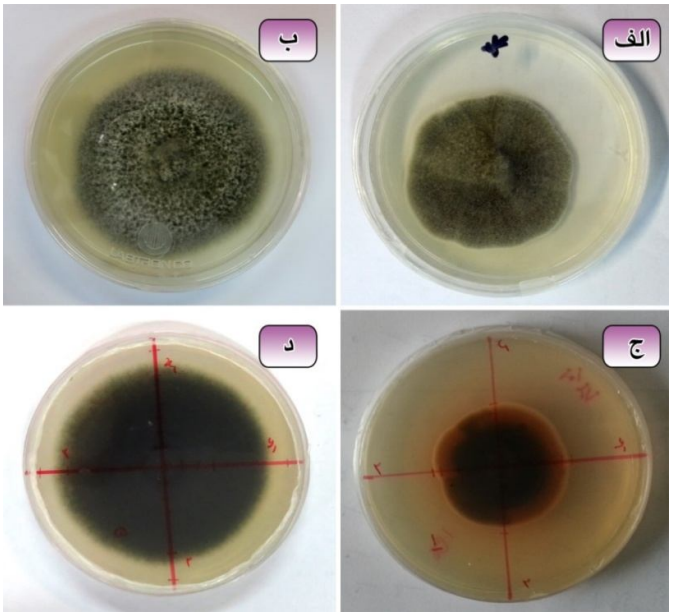
تصویر ۱- کنیدی قارچ بیماری سوختگی استمفیلیومی باقلا در زیر میکروسکوپ: الف) گونه *Stemphylium botryosum*، ب) گونه *Stemphylium vesicarium*، ج) هر دو گونه

نتایج میکرومتری بر روی دوگونه‌ی قارچ استمفیلیوم جداسازی شده از ۲۷ مزرعه باقلا نشان داد که اندازه‌ی طول کنیدی و تعداد حفره‌ی گونه‌ی *S. vesicarium* بیش‌تر است ولی اندازه‌ی عرض کنیدی *S. botryosum* بیشتر از گونه‌ی *S. vesicarium* است. نتایج اندازه‌گیری‌های کنیدی‌های گونه *S. botryosum* در مقایسه میانگین به روش LSD در سطح ۹۹ درصد نشان داد که میانگین طول کنیدی ۱۸/۹۶ میکرومتر و عرض کنیدی ۱۲/۴۳ میکرومتر بود. حداکثر طول کنیدی ۳۴ میکرومتر و حداقل ۸ میکرومتر بوده و بیشترین میانگین عرض کنیدی ۲۵ میکرومتر و کمترین ۵ میکرومتر بوده است. میانگین تعداد حفره‌های کنیدی گونه‌ی *S. botryosum*، ۶/۰۷ بود و میانگین حداکثر حفره ۱۴ و حداقل ۲ بوده است. نتایج اندازه‌گیری‌های کنیدی گونه *S. vesicarium* در مقایسه میانگین به روش LSD در سطح ۹۹ درصد نشان داد که میانگین طول کنیدی ۲۵/۹۰ میکرومتر و عرض کنیدی ۱۱/۵۸ میکرومتر بود. میانگین حداکثر طول کنیدی ۴۴ میکرومتر و حداقل ۱۳ میکرومتر و بیشترین میانگین عرض کنیدی ۱۷ میکرومتر و حداقل ۷ میکرومتر بوده است. میانگین تعداد حفره‌های کنیدی گونه‌ی *S. vesicarium*، ۷/۷۹ بود و میانگین حداکثر حفره ۱۶ و حداقل ۳ بوده است (جدول ۱). همچنین کامارا و همکاران (۲۰۰۲) بیان کردند که در عدس گونه‌های مختلف *Stemphylium* اندازه‌ی کنیدی از ۱۳×۸ به ۷۸×۲۴ میکرومتر بود. در حالی که اندازه کنیدیوفور از ۲۵×۲ به ۲۸۵×۶ میکرومتر متفاوت است (۶). تفاوت‌هایی که در خصوصیات ریخت‌شناسی بر

روی محیط کشت‌ها و خصوصیاتی نظیر اندازه و شکل کنیدی‌ها وجود داشت. بیانگر آن است که این دو گونه تفاوت‌های بسیاری برای شناسایی از هم دارند. زیرا این تفاوت‌ها نقش مهمی در پراکنش این بیماری دارد.

جدول ۱- نتایج اندازه‌گیری ابعاد کنیدی‌های دو گونه *Stemphylium botryosum* و *Stemphylium vesicarium*.

گونه	متغیرها	میانگین	انحراف معیار	حداقل	حداکثر
	طول	۱۸/۹۶	۴/۲۲	۸	۳۴
S. boryosum	عرض	۱۲/۴۳	۲/۲۷	۵	۲۵
	تعداد سلول	۶/۰۷	۲/۰۱	۲	۱۴
	طول	۲۵/۹۰	۵/۲۲	۱۳	۴۴
S. vesicarium	عرض	۱۱/۵۸	۱/۸۸	۷	۱۷
	تعداد سلول	۷/۷۹	۲/۱۷	۳	۱۶



تصویر ۲- پرگنه‌ی قارچ سوختگی استمفیلیومی بر روی PDA: الف و ج) گونه *Stemphylium botryosum*، ب و د) گونه *Stemphylium vesicarium*

منابع

۱. آقاجانی، م. ع.؛ محمدی، ح. ۱۳۸۸. راهنمای شناسایی و مدیریت بیماری‌های باقلا. گرگان، انتشارات ارشاد. ص ۸۷ .

۲. پارسا، م.؛ باقری، ع.، ر. ۱۳۸۷. حبوبات، انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد. چاپ اول، شماره ۳۵۵، ص ۵۲۲.

۳. مقسم، م.۱۳۹۱. ارزیابی ژنوتیپ‌های مختلف باقلا نسبت به بیماری‌های برگی در منطقه گرگان. پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان .ص: ۷۰-۵۵

4. Barnett, H. L. and B. B. Hunter. 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. APS press, Minnesota, USA. 218pp.
5. Bayaa, B., Erskine, W., 1998. Lentil Pathology. Pages 423-472, in: Pathology of Food and Pasture Legumes (eds D. Allen and J. Lenne), Commonwealth Agricultural Bureaux International, U.K in association with: International Crop Research Center for the Semi-Arid Tropics, Patancheru 502 324. Andhra Pradesh, India.
6. Camara, M.P.S., O'Neill, N.R. and Van Berkum, P. 2002. Phylogeny of Stemphylium spp. based on ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. Mycologia 94:660-672.

7. Dahmarde, M., Ramroodi, M. and Valizadeh, J. 2010. Effect of plant density and cultivars on growth, yield and yield components of faba bean (*Vicia faba* L.). African Journal of Biotechnology, 9: 8643-8647.
8. Ellis, M. B, Gibson, I. A. S. 1971. *Stemphylium solani*. C.M.I. Descript Pathog. Fungi and Bact. 472:1–2.
9. Haciseferogullari, H., Gezer, I., Bahtiyarca, Y. and Menges, H. O. (2003). Determination of some chemical and physical properties of Sakiz faba bean (*Vicia faba* L. var major). Journal of Food Engineering, 60: 475-479.
10. Hosen, M. I., Ahmed, A.U., Zaman, J., Ghosh, S. and Hossain, K.M K. 2009. Cultural and physiological variation between isolates of Stemphylium botryosum the Causal of Stemphylium Blight Disease of Lentil (*Lens culinaris*). World Journal of Agricultural Sciences. 5(1):94-98.
11. Polfliet, M. 2002. Infection of Stemphylium increases every year. Fruitteelt (Den Haag), 92: 16-17.
12. Wu, P.C., Tsai, J. C., Li, S. C., Lung, F. C. and Su, H. J. 2004. Increased levels of ambient fungal spores in Taiwan are associated with dust events from China. Atmospheric Environment, 38: 4879-4886.

مدلی برای پیش‌آگاهی شدت بیماری لکه‌قهوه‌ای گندم بر اساس دما و ساعات مرطوب بودن برگ‌ها

علی ویانی[۱،*]، پاریمال سینها[۲]

[۱] استادیار گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز، [۲] استاد پژوهشی موسسه تحقیقات کشاورزی هند، دهلی‌نو، هند

* نویسنده مسئول : viani@tabrizu.ac.ir

چکیده

لکه‌قهوه‌ای یکی از مهم‌ترین بیماری‌های گندم در مناطق گرم و مرطوب جهان محسوب می‌شود. در این تحقیق، تاثیر تیمارهای مختلف ترکیبی از دما و مدت زمان مرطوب بودن برگ‌ها (رطوبت نسبی ۹۵٪ یا بیشتر) روی شاخص آلودگی (در مقیاس۰ تا ۱) بررسی گردید. تاثیر دما به طور مشخص به حالت تک نمایی بود و دماهای بیشینه، بهینه و کمینه برای ایجاد بیماری به ترتیب برابر۳۴، ۲۹ و۱۸°C تعیین شد. با افزایش مدت زمان مرطوب بودن برگ‌ها، افزایشی غیر خطی در شاخص آلودگی مشاهده گردید. بعد از تلقیح گیاهان با قارچ عامل بیماری، یک مدت زمان حداقل از مرطوب بودن برگ‌ها تعیین شد (متغیر m در مدل پیش‌آگاهی) که در آن، شاخص آلودگی صفر بوده و در مدتی بیش از این زمان، آلودگی گیاهان روی می‌دهد. با افزایش دما از ۱۸تا ۲۹°C، این زمان به تدریج کاهش و سپس دوباره با افزایش دما تا ۳۴°C افزایش یافت. معادلات ریاضی توسعه بیماری بر اساس متغیرهای دما (T) و مدت زمان مرطوب بودن برگ‌ها (D) و متغیر (m) برای ایجاد منحنی‌های سطح پاسخ و نشان دادن تغییرات شاخص آلودگی (Y) مورد استفاده قرار گرفته و بر این اساس، مدل زیر ارائه گردید: $Y = \left(\frac{36-T}{7}\right) \times \left(\frac{T-16}{13}\right)^{2.6} \times \left(1 - 0.8114^{(D-m)}\right)$ ، برای اعتبارسنجی مدل، مایه‌زنی با عامل بیماری در کرت‌های آزمایشی در شرایط محیطی مختلف انجام گردید که طی آن، نمودار سطح پاسخ مشاهده شده و سطح پاسخ پیش‌بینی شده با استفاده از مدل، از الگوی تقریبا یکسانی برخوردار بوده و رگرسیون خطی شاخص آلودگی، با ضریب تبیین (R^2) ۰/۹۶۳ مطابقت آنها با یکدیگر و معتبر بودن مدل پیش‌آگاهی را نشان داد.

واژگان کلیدی: پیش‌آگاهی، دما، رطوبت نسبی، گندم، لکه‌قهوه‌ای، مدل سازی

مقدمه

گندم مهم‌ترین محصول غذایی در ایران و بسیاری از کشورهای دیگر می‌باشد و یکی از عوامل موثر در کاهش عملکرد آن، قارچ *Cochliobolus sativus* (Ito & Kuribayashi) Drechsl. ex Dastur است که علائم بیماری را به صورت بلایت گیاهچه، پوسیدگی ریشه، لکه‌قهوه‌ای در برگ‌ها و نقطه سیاه در دانه‌ها ایجاد می‌کند (۳). در شرایط گرم و مرطوب، اغلب بیماری لکه‌قهوه‌ای به صورت گسترده‌ای شیوع داشته و حدود ۲۵ میلیون هکتار از مناطق تحت کشت گندم را در جهان تحت تاثیر خود قرار می‌دهد (۱و۵). خسارت ناشی از این بیماری۲۰-۸۰ درصد برآورد شده است (۴). دما و رطوبت نسبی، عمده‌ترین عوامل آب و هوایی تاثیرگذار در بروز بیماری هستند (۹). بارندگی ممتد به مدت ۵-۶ روز و به دنبال آن دمای بالا

(متوسط دمای روزانه ۲۰-۳۰°C) شرایط مناسب برای توسعه همه‌گیری بیماری هستند (۱۳). بالاترین میزان توسعه لکه‌قهوه‌ای گندم در دمای حدود ۲۸°C و رطوبت نسبی ۹۲٪ گزارش شده و در میانگین دمای پایین‌تر از ۱۸°C بیماری مشاهده نشده است (۱۷). رطوبت نسبی بالا به مدت ۷۲ ساعت برای ایجاد بیماری کافی بوده و زمانی که دما بالاتر از ۳۰°C باشد آلودگی اندک دیده می‌شود (۱۵). ریس (۱۴) اظهار داشته که برای ایجاد بیماری، برگ‌های گندم باید بیش از ۱۸ ساعت خیس باقی بمانند و میانگین دما باید ۱۸°C یا بالاتر باشد. پیش‌بینی آلودگی بر اساس مدل‌های پیش‌آگاهی عاملی ضروری در برآورد پیشرفت زمانی بیماری در جمعیت‌های گیاهی و نیز روشی برای ارزیابی تاثیر تغییرات اقلیمی بر بیماری می‌باشد. در مورد همه‌گیری‌شناسی بیماری لکه‌قهوه‌ای گندم، تحقیقات ناچیزی در جهان صورت گرفته است و مطالعات اولیه تماما بر بررسی‌های تجربی بدون در نظر گرفتن اثرات متقابل عوامل آب و هوایی متمرکز بوده است. با توجه به اینکه چنین اطلاعاتی لازمه ایجاد مدل‌های پیش‌آگاهی می‌باشد در تحقیق حاضر چگونگی ایجاد مدلی برای پیش‌آگاهی بیماری لکه‌قهوه‌ای گندم بر اساس عوامل مهم آب و هوایی مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

قارچ *Cochliobolus sativus* از یکی از مزارع دارای آلودگی شدید جداسازی شده و بیماری‌زایی آن طبق اصول کخ مورد تائید قرار گرفت. با کشت قارچ به مدت ده روز در محیط آب آگار در دمای ۲۴°C ، سوسپانسیون اسپورها تهیه و غلظت آن با کمک لام هماسیتومتر به ۳×۱۰^{۴} اسپور در هر میلی‌لیتر تنظیم شد (۱۶). برای تولید گیاهان گندم، گلدان‌های پلاستیکی به قطر ۱۵ سانتیمتر با مخلوطی از خاک، ماسه و کمپوست (به نسبت ۱:۱:۱) پر شده و رقم حساس آگرالوکال در آنها کشت گردید. گلدان‌ها در اتاقک‌های رشدی در دمای ۲۲±۲°C و با دوره نوری۱۲ساعته نگهداری شدند. گیاهان۳۰ روزه گندم با استفاده از یک اتومایزر کوچک دستی با سوپانسیون اسپورها و به میزان ۵ میلی‌لیتر به ازای هر گلدان تلقیح شده و در داخل انکوباتور مرطوب قرار داده شدند. برای ایجاد رطوبت از یک دستگاه رطوبت‌ساز (Donewell Rotaries, Mombai, India) استفاده شد. هر طول مدت زمانی (بر حسب ساعت) با رطوبت نسبی ۹۵٪ یا بیشتر به عنوان مدت زمان مرطوب بودن برگ‌ها در نظر گرفته شد. سطوح دمایی۱۶، ۱۸، ۲۰، ۲۳، ۲۶، ۲۹، ۳۲، ۳۴ و ۳۶°C با سطوح زمانی۶، ۸، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۴ و ۳۰ ساعت مرطوب بودن برگ‌ها ترکیب و به عنوان تیمارهای آزمایشی انتخاب شدند. اندازه‌گیری دما و رطوبت نسبی با استفاده از دستگاه ثبت اطلاعات هواشناسی Kestrel®4000 NV pocket weather tracker (Nielsen-Kellerman Co., USA) صورت گرفت. بعد از قرارگیری گیاهان در معرض تیمارهای مختلف، گلدان‌ها از انکوباتور اولیه مرطوب خارج شده و به انکوباتور دیگری با همان دما اما با رطوبت نسبی۶۰-۷۰ ٪ منتقل گردید. پس از ظهور کامل علائم بیماری، سه برگ به صورت تصادفی از هر گلدان (۱۵ برگ برای هر تکرار) انتخاب و جدا شد. برگ‌ها اسکن شده و سپس با استفاده از نرم‌افزار آنالیز تصویر Assess 2.0 (۱۰)، تعداد دقیق لکه‌ها، میانگین مساحت هر لکه و مساحت دقیق برگ‌ها اندازه‌گیری گردید. برای اندازه‌گیری مساحت لکه‌ها، حداقل بیست لکه در هر برگ بررسی شد. با ضرب تعداد لکه‌ها در میانگین مساحت هر لکه و تقسیم حاصل‌ضرب بر مساحت هر برگ، درصد سطح نکروزه برگ‌ها محاسبه شده و به‌صورت شاخص آلودگی در مقیاس۰-۱ نشان داده شد. تاثیر دما و ساعات با رطوبت نسبی بالا در توسعه بیماری به صورت یک طرح کرت‌های خرد شده (دما به عنوان کرت اصلی و مدت زمان رطوبت نسبی بالا به عنوان کرت فرعی) با سه تکرار (هر تکرار شامل سه گلدان) مورد آزمایش قرار گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها و مقایسه میانگین‌ها (با آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد) با استفاده از نرم افزار SPSS 16 صورت گرفت.

در راستای ایجاد مدل پیش‌آگاهی، برای نشان دادن ارتباط بین دما و شاخص آلودگی، معادله دمایی (۱۹) و منحنی پاسخ کلاسیک در سیستم‌های بیولوژیکی (۲) که از دماهای اصلی مربوط به بیمارگر استفاده می‌کند به‌کار گرفته شد:

$$f(T) = [(T_{max} - T)/(T_{max} - T_{opt})]\times[(T - T_{min})/(T_{opt} - T_{min})]^{(Topt - Tmin)/(Tmax - Topt)} \quad (۱)$$

f(T) برابر شاخص آلودگی در مقیاس۰-۱، T معادل دما (°C) در طول آزمایش، T_{min} برابر کمترین دمایی که در آن، شاخص آلودگی صفر بوده و بروز علائم بیماری مربوط به دمای اندکی بالاتر از آن است (در این آزمایش ۱۶°C)، T_{max} معادل بالاترین

دمایی که در آن، بیماری بروز نیافته و اندکی پایین‌تر از آن، لکه‌های بیماری روی برگ‌ها ظاهر می‌شود (در این آزمایش C ۳۶°) و بالاخره T_{opt} برابر دمای بهینه برای آلودگی (در این آزمایش C ۲۹°) در نظر گرفته شد.

رابطه بین شاخص بیماری (Y) و مدت زمان مرطوب بودن برگ‌ها (D) با معادله زیر به‌دست آمد (۲):

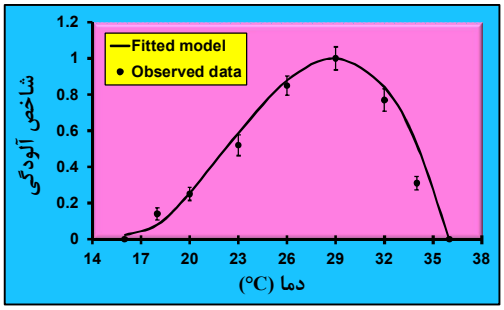
$$Y = Y_{max} \{ 1 - \exp [-b (D - m)]\} \quad (۲)$$

Y_{max} برابر حداکثر میزان آلودگی، b نرخ تغییر آلودگی در اثر تغییرات D و m معادل حداقل ساعات مرطوب بودن برگ‌هاست که در آن، شاخص بیماری صفر بوده و در اندک مدتی بیش از آن، آلودگی رخ می‌دهد. مقادیر عددی f(T) در دماهای مختلف حاصل از فرمول۱ به عنوان Y_{max} در معادله۲ جای‌گذاری شده و به عنوان حداکثر ممکن از آلودگی در دمای انتخاب شده محسوب گردید. مقادیر m و b با استفاده از روش رگرسیون غیرخطی و در نرم‌افزار SPSS 16 برآورد و در معادله ۲ قرار گرفت.

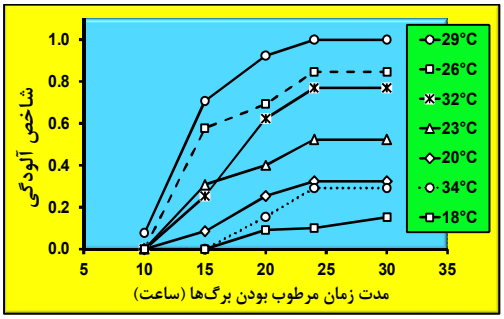
برای اعتبار سنجی مدل پیش‌آگاهی، طی دو سال زراعی۱۳۹۲ و ۱۳۹۳، بذور گندم رقم حساس آگرالوکال در ۲۴ کرت به ابعاد ۱×۲ متر در شرایط مکانی و زمانی مختلف و با مقادیر متفاوت آبیاری کاشته شد تا امکان بررسی شدت بیماری در شرایط مختلف دمایی و رطوبتی فراهم باشد. پس از آلوده‌سازی مصنوعی گیاهان، برای اندازه‌گیری دقیق عوامل آب و هوایی، دستگاه ثبت اطلاعات هواشناسی (Kestrel®4000 NV pocket weather tracker (Nielsen-Kellerman Co., USA) در داخل پوشش گیاهی قرار داده شد. از زمان تلقیح گیاهان تا زمان ظهور نخستین علائم بیماری، دما و رطوبت نسبی ثبت شده به صورت ساعتی، با استفاده از یک رابط مخصوص (Interface) و نرم افزار مربوطه (Kestrel 4000 Interface Software) به کامپیوتر منتقل گردید. شاخص آلودگی یادداشت برداری شده و سپس با شاخص آلودگی برآورد شده با استفاده از مدل پیش‌آگاهی (بر اساس اطلاعات هواشناسی ثبت شده با دستگاه) مقایسه گردید. نمودار سطح پاسخ سه بعدی نیز در هر دو حالت رسم شده و مورد مقایسه قرار گرفت. برای سنجش اعتبار و دقت مدل ارائه شده از ضریب تبیین (R^2) رگرسیون خطی استفاده شد.

نتایج و بحث

بین شاخص آلودگی و دما (با ۲۴ ساعت مرطوب بودن برگ‌ها) رابطه‌ای تک نمایی (unimodal) مشاهده شده و برای برآورد آستانه‌های دمایی (کمینه، بهینه و بیشینه) مربوط به بیمارگر مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۱). در دمای۱۶و C ۳۶° با اینکه گیاهان در معرض دوره‌های مختلف رطوبتی قرار گرفتند اما علائم بیماری ظاهر نشده و بروز بیماری فقط مربوط به محدود دمایی C ۱۸°-۳۴ بود بنابراین دو حد پایینی و بالایی ذکر شده به عنوان دمای کمینه و بیشینه لازم برای ظهور بیماری تعیین گردید (شکل ۱). حداکثر تعداد لکه‌ها در دمایC ۲۹° با ۲۴ ساعت مرطوب بودن برگ‌ها مشاهده شد بنابراین دمای ذکر شده، به‌عنوان دمای بهینه برای توسعه بیماری شناخته شد. در دماهای۲۰، ۲۳، ۲۶ و C ۳۲° برای ایجاد آلودگی، حداقل ۱۵ ساعت و در دماهای کمینه و بیشینه، حداقل۲۰ ساعت مرطوب بودن برگ‌ها ضروری بود و تنها در دمای بهینه (C ۲۹°) با ۱۰ ساعت مرطوب بودن برگ‌ها نیز علائم اندک بیماری مشاهده گردید (شکل۲). با ۶ و ۸ ساعت مرطوب بودن برگ‌ها هیچ‌گونه علائم بیماری در دماهای مختلف مورد آزمایش وجود نداشت. پاسخ گیاهان به بیماری در زمان‌های مختلف رطوبتی و سطوح دمایی، به شکل سیگموئیدی بود و در بالاتر از ۲۴-۳۰ ساعت مرطوب بودن برگ‌ها حالت اشباع وجود داشت و هیچ افزایشی در شاخص آلودگی مشاهده نگردید. مقادیر برآورد شده Y_{max} ، b و m در سطوح مختلف دمایی با روش رگرسیون غیرخطی در جدول۱ نشان داده شده است.



شکل ۱- تاثیر دما بر شاخص بیماری لکه‌قهوه‌ای گندم بر اساس مدل دمایی (معادله ۱) با مدت زمان ۲۴ ساعت مرطوب بودن برگ‌ها



شکل ۲- پاسخ مدت زمان مرطوب بودن برگ‌ها برای شدت بیماری لکه‌قهوه‌ای گندم در سطوح مختلف دمایی

جدول (۱) مولفه‌های* برآورد شده به همراه خطاهای استاندارد مربوطه (S.E.) برای اندازه گیری شاخص آلودگی در بیماری لکه‌قهوه‌ای گندم با استفاده از معادله شماره ۲ در دماهای مختلف مورد آزمایش.

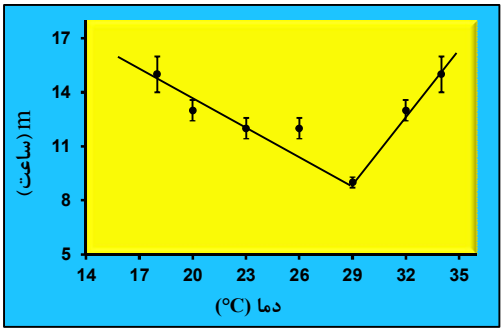
دما (°C)	Y_{max} مشاهده شده	Y_{max} برآورد شده	S.E.	b	S.E.	m (ساعت)	S.E.	R^2
۱۸	۰/۱۵۴	۰/۱۷۹	۰/۰۵۰	۰/۱۱۶	۰/۰۶۴	۱۵	۱/۰۰۰	۰/۹۶۲
۲۰	۰/۳۲۳	۰/۳۵۶	۰/۰۳۲	۰/۱۷۳	۰/۰۴۳	۱۳	۰/۵۷۷	۰/۹۷۴
۲۳	۰/۵۲۳	۰/۵۲۱	۰/۰۴۲	۰/۲۵۶	۰/۰۷۵	۱۲	۰/۵۷۷	۰/۸۶۴
۲۶	۰/۸۴۶	۰/۸۲۲	۰/۰۵۰	۰/۳۶۴	۰/۱۰۰	۱۲	۰/۵۷۷	۰/۸۱۰
۲۹	۱/۰۰۰	۱/۰۳۴	۰/۰۲۰	۰/۱۹۷	۰/۰۱۴	۹	۰/۲۸۸	۰/۹۸۵
۳۲	۰/۷۶۹	۰/۸۲۰	۰/۰۴۱	۰/۲۰۴	۰/۰۳۱	۱۳	۰/۵۷۷	۰/۹۸۷
۳۴	۰/۲۹۲	۰/۳۴۴	۰/۰۷۷	۰/۱۵۰	۰/۰۷۷	۱۵	۱/۰۰	۰/۹۵۹

* Y_{max} : حداکثر شدت بیماری، b : نرخ تغییرات شاخص بیماری با افزایش مدت زمان مرطوب بودن برگ‌ها، m : حداقل ساعات مرطوب بودن برگ‌ها که در آن، شاخص بیماری صفر بوده و در مدت زمانی بیشتر از این مقدار، آلودگی گیاهان رخ می‌دهد.

در این آزمایش، مقادیر Y_{max} برآورد شده، خیلی نزدیک به مقادیر Y_{max} مشاهده شده بود و ضریب تبیین بالا تطابق زیاد آنها را نشان داد. مقادیر m به صورت خطی از دمای ۱۸ تا ۲۹°C کاهش یافته و پس از آن، با افزایش دما تا ۳۴°C به صورت خطی افزایش نشان داد (شکل۳).

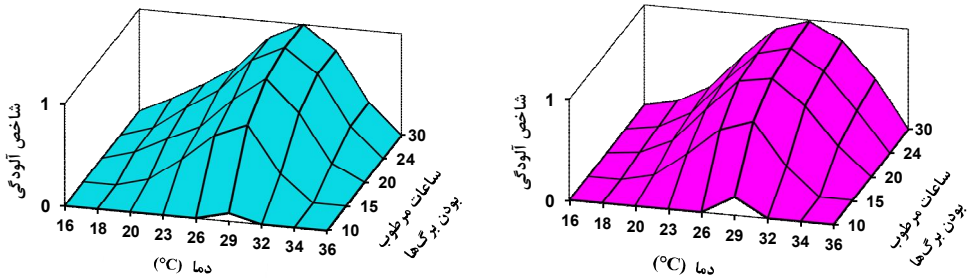
با استفاده از معادله‌های ریاضی ۱ و ۲ و بعد از جایگذاری متغیرهای آن، مدل شبیه‌سازی شده برای پیش‌آگاهی و پیش‌بینی شاخص آلودگی (Y در مقیاس ۰-۱) پس از ظهور علائم بیماری در درجات مختلف میانگین دمایی مزرعه (T) و در زمان‌های مختلف (D) مرطوب بودن برگ‌ها (پس از نفوذ بیمارگر و شروع آلودگی) به شرح زیر ارائه گردید:

Y (۳)



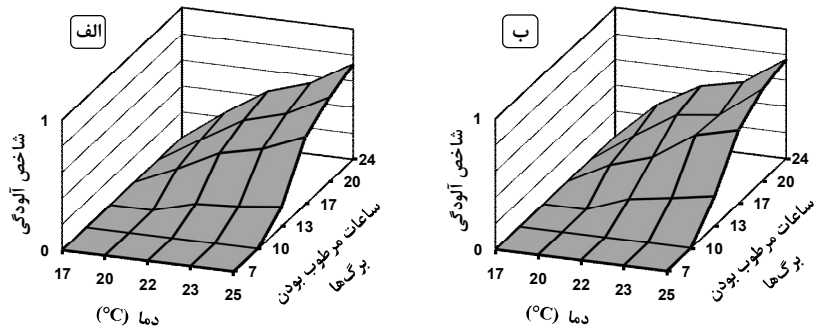
شکل ۳- تاثیر دما بر متغیر m در معادله شماره ۲: m کمترین مدت زمان مرطوب بودن برگ‌ها (بر حسب ساعت) است که در آن شاخص بیماری صفر بوده و ایجاد آلودگی نیازمند وقوع اندک مدتی بیش از این مقدار زمانی می‌باشد

نمودار سطح پاسخ شبیه سازی شده بر اساس مدل پیش آگاهی ارائه شده در این تحقیق، الگویی مشابه از شاخص بیماری را با آنچه که در شرایط آزمایشی کنترل شده د داخل اتاقک‌های رشدی به‌صورت مشاهده‌ای بدست آمده است نشان داد (شکل ۴).



شکل ۴- نمودار سه بعدی سطح پاسخ که نشانگر رابطه متقابل بین دما و مدت زمان مرطوب بودن برگ‌ها و شاخص آلودگی به بیماری لکه‌قهوه‌ای گندم می‌باشد و بر اساس مشاهدات و اندازه‌گیری‌ها در آزمایشات کنترل شده (سمت چپ) و یا بر اساس شبیه‌سازی با استفاده از مدل پیش‌آگاهی (سمت راست) ارائه شده در این تحقیق (معادله۳) به‌دست آمده است.

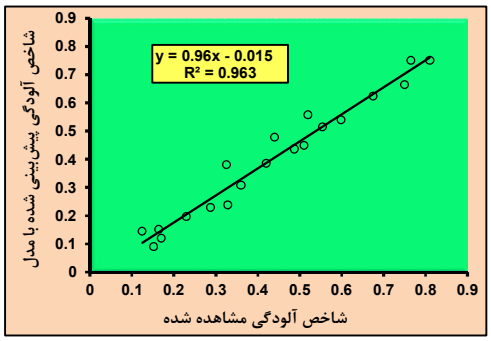
در ارزیابی دقت و صحت مدل پیش‌آگاهی ارائه شده در شرایط طبیعی و مزرعه‌ای، نمودار سطح پاسخ رسم شده بر اساس مشاهدات مزرعه‌ای برای شاخص آلودگی به بیماری لکه‌قهوه‌ای گندم با نمودار سطح پاسخ بدست آمده از مدل در شکل ۵ آورده شده است که در این شکل، الگوی هر دو نمودار تقریبا مشابه بود.



شکل ۵- سطح پاسخ پیش‌بینی شده برای شاخص آلودگی به بیماری لکه‌قهوه‌ای گندم بر اساس مدل پیش‌آگاهی ارائه شده (الف) و سطح پاسخ مشاهده شده (ب) در شرایط مزرعه‌ای (در دمای شایع در مزرعه و در مدت زمان‌های مختلف مرطوب بودن برگ‌ها) با آلوده سازی مصنوعی توسط قارچ *Cochliobolus sativus* در ۲۴ کرت آزمایشی طی سال‌های ۱۳۹۲-۱۳۹۳.

رگرسیون خطی با ضریب تبیین (R^2) بالا یعنی۰/۹۶۳ توانست تطابق خوب بین شاخص آلودگی مشاهده شده و برآورد شده با مدل را نشان دهد (شکل ۶). رابطه بین این دو شاخص آلودگی به صورت زیر مشخص و تعیین شد:

معادله ۴ **شاخص آلودگی مشاهده شده = {۰/۹۶×(شاخص آلودگی برآورد شده با مدل)} – ۰/۰۱۵**



شکل ۶- رگرسیون خطی بین شاخص آلودگی مشاهده شده برای بیماری لکه‌قهوه‌ای گندم در آزمایشات مزرعه‌ای و شاخص آلودگی پیش‌بینی شده با مدل پیش‌آگاهی به همراه معدله خط رگرسیون و ضریب تبیین مربوطه. هر کدام از دایره‌ها در اطراف خط رگرسیون نشانگر نتیجه مشاهدات در ۲۴ کرت آزمایشی طی سال‌های ۱۳۹۲-۱۳۹۳ می‌باشد.

تعیین مدل آلودگی در بیماری‌های قارچی یکی از مهم‌ترین مولفه‌ها در پیش‌آگاهی بیماری‌های گیاهی است و فرآیند آلودگی عموما به دلیل کوتاه بودن طول مدت رطوبت نسبی یا خیس بودن سطح اندام‌ها در بیشتر شرایط آب و هوایی محدودیت پیدا می‌کند (۱۱و۱۲). فرآیند آلودگی روی برگ‌های مرطوب در دمای بالا خیلی سریع پیشرفت می‌کند بنابراین، دمای مذکور در طول دوره خیس بودن همینطور مدت زمان خیس بودن بایستی مورد توجه قرار گیرد (۸ و۱۸). در اغلب موارد این دو عامل با هم ترکیب می‌شوند تا شاخصی را برای وقوع بیماری ایجاد نمایند (۷ و۱۲). در این تحقیق برای اولین بار یک مدل برای پیش‌آگاهی شدت آلودگی به بیماری لکه‌قهوه‌ای در گندم بر اساس دما و مدت زمان مرطوب بودن برگ‌ها ارائه شد. مدل ذکر شده بر پایه دو فرض بنا نهاده شد یکی اینکه مایه تلقیح بیماری‌زا به اندازه کافی در مزرعه وجود دارد و دوم اینکه عوامل آب و هوایی مساعد برای وقوع بیماری، در منطقه حاکم هستند. بر پایه این فرضیات در این تحقیق سعی شد برای ایجاد یک مدل پیش‌آگاهی، مهم‌ترین و تاثیرگذارترین عوامل آب و هوایی که باعث شروع بیماری می‌شوند همچنین روابط متقابل آنها شناخته شود. مدل‌سازی‌های مشابهی در مورد سطح پاسخ به شدت بیماری در سایر بیماری‌های قارچی مناطق گرمسیری نیز مورد استفاده قرار گرفته است (۷ و۱۲). دما یکی از مهم‌ترین مولفه‌های توسعه بیماری لکه‌قهوه‌ای گندم

می‌باشد. در گزارشات قبلی بیان شده است که آلودگی سریع و شدید به این بیماری در دمای ۲۸°C رخ می‌دهد (۱۵و۱۷) همچنین لزوم دمای ۱۸°C-۳۲ برای بروز بیماری‌های مختلف روی اندام‌های هوایی گندم از کشور برزیل گزارش شده است (۱۴). نتایج این تحقیق نیز مطابقت زیادی با گزارشات موجود نشان داد. در تمامی گزارشات قبلی، نقش دماهای اصلی (کمینه، بهینه، بیشینه) در توسعه بیماری مورد توجه قرار نگرفته است بنابراین نتوانسته‌اند فرآیند آلودگی را در شرایط آب و هوایی متغیر مزرعه‌ای توصیف کنند. در پژوهش حاضر، یک نمودار دمایی تک نمایی برای بیماری لکه‌قهوه‌ای گندم بدست آمد که برای مشخص کردن دماهای اصلی بیمارگر، سودمند بوده و روش خوبی برای توصیف آلودگی در شرایط مزرعه‌ای می‌باشد. مدت زمان خیس بودن برگ‌ها می‌تواند با استفاده از تجهیزات خاص خود و یا به‌طور نزدیک به یقین از روی مدت زمان وقوع رطوبت نسبی بالاتر از۹۰ درصد برآورد شود (۶ و۸). در واقع، مدت زمان رطوبت نسبی بالا برای شرح فرآیند آلودگی برای بسیاری از بیماری‌های قارچی در مزرعه مورد استفاده قرار گرفته است (۶ و۱۸). در این تحقیق نیز هر طول مدت زمانی (بر حسب ساعت) با رطوبت نسبی ۹۵٪ یا بیشتر به عنوان مدت زمان مرطوب بودن برگ‌ها در نظر گرفته شد. اطلاعات موجود نشان می‌دهد که خیس بودن برگ‌ها برای بیش از ۱۸ساعت با دمای۱۸°C-۳۲ (۱۴) و یا بارندگی متوالی در ۵-۶ روز و بدنبال آن دمای ۲۰°C-۳۰ (۱۳) برای گسترش سریع بیماری لکه‌قهوه‌ای، موثر دانسته شده است. با این حال هیچ کدام از این تحقیقات، مدت زمان دقیق لازم برای بروز بیماری را مورد توجه قرار نداده‌اند. در تحقیق حاضر، تاثیر مقدار رطوبت نسبی و مدت زمان وقوع آن بر شاخص آلودگی با جزئیات آن مورد بررسی قرار گرفت تا بتوان تمام تغییرات را طی نمودارهای پاسخی ارائه شده نشان داد. سومین عامل مهم در توسعه لکه‌قهوه‌ای، رابطه متقابل (Interaction) بین دما و مدت زمان مرطوب بودن برگ‌هاست و هیچ‌کدام از تحقیقات قبلی، این قضیه را مورد توجه قرار نداده‌اند بنابراین در این تحقیق، برای اولین بار تعامل این دو عامل آب و هوایی مد نظر قرار گرفته و اطلاعات بسیار مهمی بدست آمد. مدل پیش‌آگاهی ارائه شده توانست در آزمایشات مزرعه‌ای، به خوبی دقت و صحت خود را نشان دهد و ضریب تبیین بالای بدست آمده با رگرسیون خطی توانست مطابقت شاخص آلودگی اندازه‌گیری شده در کرتهای آزمایشی را با شاخص آلودگی شبیه سازی شده بر اساس مدل در شرایط مختلفی از دما و رطوبت نشان دهد. این اطلاعات می‌تواند برای تعیین شدت بیماری در مزارع به‌کار رفته و نیز مقدمه‌ای برای تحقیقات بیشتر در خصوص تعیین زمان دقیق بروز بیماری در مزارع باشد و در صورت لزوم، امکان برنامه‌ریزی برای استفاده دقیق و به موقع از قارچ‌کش‌ها را فراهم نماید.

منابع

1. Acharya, K., Dutta, A. K. and Pradhan, P. 2011. *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem.: The most destructive wheat fungal pathogen in the warmer areas. Australian Journal of Crop Science 5(9):1064-1071.
2. Butler, D. R. and Jadhav, D. R. 1991. Requirements of leaf wetness and temperature for infection of groundnut rust. Plant Pathology 40: 395-400.
3. Chowdhury, A. K., Singh, G., Tyagi, B. S., Ojha, A., Dhar, T. and Bhattacharya, P. M. 2013. Spot blotch disease of wheat - a new thrust area for sustaining productivity. Journal of Wheat Research 5(2):1-11.
4. Duveiller, E. M. and Sharma, R. C. 2009. Genetic improvement and crop management strategies to minimize yield losses in warm non-traditional wheat growing areas due to spot blotch pathogen *Cochliobolus sativus*. Journal of Phytopathology 157: 521-534.
5. Duveiller, E., Kandel, Y. R., Sharma, R. C. and Shrestha, S. M. 2005. Epidemiology of foliar blights (spot blotch and tan spot) of wheat in the plains bordering the Himalayas. Phytopathology 95:248-256.
6. Gleason, M. L., Taylor, S. E., Loughin, T. M., and Koehler, K. J. 1994. Development and validation of an empirical model to estimate the duration of dew periods. Plant Disease 78:1011-1016.
7. Guyader, S., Crombez, J., Salles, M., Bussiere, F. and Bajazet, T. 2013. Modelling the effects of temperature and leaf wetness on monocyclic infection in a tropical fungal pathosystem. Europian Journal of Plant Pathology 136: 535-545.
8. Huber, L. and Gillespie, T. J. 1992. Modelling leaf wetness in relation to plant disease epidemiology. Annual Review of Phytopathology 30: 553-577.
9. Juroszek, P. and von Tiedemann, A. 2013. Climate change and potential future risks through wheat diseases: a review. European Journal of Plant Pathology 136: 21-33.
10. Lakhdar, L. 2008. Assess 2.0. Image analysis software for plant disease quantification. St. Paul. Mn. USA, APS Press.
11. *Madden, L. V., Hughes, G. and van den Bosch, F. 2007. The study of plant disease epidemics. St. Paul,* Mn. USA, APS Press.*, p241.*

12. Magarey, R. D., Sutton, T. B. and Thayer, C. L. 2005. A simple generic infection model for foliar fungal pathogens. Phytopathology 95: 92-100.
13. Mehta, Y. R. 1998. Constraints on the integrated management of spot botch of wheat. In: Duveiller, E., Dubin, H. J., Reeves, J. & McNab, A. (eds). Proc. Int. Workshop on Helminthosporium Diseases of Wheat: Spot Blotch and Tan Spot, pp. 18-27, CIMMYT, El Batan, Mexico DF, Mexico.
14. Reis, E. M. 1991. Integrated disease management: The changing concept of controlling head blight and spot blotch. In: Saunders, D. A., Hettel, G. P. (eds). Wheat in Heat- Stressed Environments: Irrigated, Dry Areas and Rice- Wheat Systems. pp. 165-177, CIMMYT, El Batan, Mexico DF, Mexico.
15. Senthil, P. C. 2004. Epidemiological studies on spot blotch of wheat caused by *Bipolaris sorokiniana*, Ph.D Thesis, IARI, New Delhi, India.
16. Shamim, I., Shahzad, A., Anjum, M. and Iftikhar, A. 2008. Selection of in vitro technique for pathogenicity and screening of wheat cultivares agaist *Bipolaris sorokiniana*. Pakistan Journal of Botany 40: 415-420.
17. Singh, R. V., Singh, A. K., Ahmad, R. and Singh, S. P. 1998. Influence of agronomic practices on foliar blight, and identification of alternate hosts in rice-wheat cropping system. In: Duveiller, E., Dubin, H. J., Reeves, J. & McNab, A. (eds). Proc. Int. Workshop on Helminthosporium Diseases of Wheat: Spot Blotch and Tan Spot, pp. 346-348, CIMMYT, El Batan, Mexico DF, Mexico.
18. Wilks, D. S. and Shen, K. W. 1991. Threshold relative humidity duration forecasts for plant disease prediction. Journal of Applied Meteorology 30: 463-477.

Yan, W. and Hunt, L. A. 1999. An equation for modelling the temperature response of plants using only the cardinal temperatures. Annals of Botany 84: 607-614

کاهش میزان خسارت پس از برداشت پوسیدگی خاکستری میوه کیوی فروت

فرید بیکی*[1] ، ستاره حبیب زاده[2]

۱- عضو هیات علمی موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

۲- عضو هیات علمی دانشکده علوم پایه، دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل، ایران

** نویسنده مسئول : F.beiki@gmail.com*

چکیده

بیماری کپک خاکستری میوه در کیوی‌فروت، یکی از مهم‌ترین بیماری‌های پس از برداشت حتی در شرایط سردخانه می‌باشد که توسط بیمارگر *Botrytis cinerea* ایجاد می‌شود. امروزه روند مصرف سموم شیمیایی بدلیل اثرات سوء زیست محیطی و نیز بروز مقاومت، روند نزولی یافته و به خصوص برای صادارات این محصول می بایست روش‌های جایگزین نظیراستفاده از عوامل بیوکنترل، ایجاد موانع برای ورود و توسعه بیمارگر و ... استفاده شود. در این بررسی به منظور کاهش میزان توسعه بیماری، از روش‌های سرمادهی، استفاده از روغن و قارچکش کاربندازیم در مرحله قبل از ورود بیمارگر به میوه و نیز روش تغییرشرایط دمایی در زمان بعد از ورود بیمارگر، استفاده شدند. بدین منظور میوه‌های کیوی رقم هایوارد در هفته دوم آبان ماه از موسسه تحقیقات مرکبات کشور برداشت شدند به طوری که در زمان برداشت، میزان ماده جامد محلول آن (Total solid solution) هفت تعیین شد. نتایج آماری این بررسی نشان می‌دهد هر چند نگهداری میوه‌ها پس از آلوده‌سازی در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد، سبب خسارت ۱۰۰ درصدی میوه‌ها گردیده، اما می توان با کاهش دمای نگهداری به دو درجه سانتی‌گراد، میزان خسارت را به ۱۴ درصد تقلیل داد. استفاده از روغن پارافین، سم کاربندازیم و سرمادهی در زمان قبل از ورود بیمارگر به میوه، به‌ترتیب سبب کاهش میزان خسارت تا حد ۸، ۷ و صفر درصد شده است. بر اساس این نتایج کشاورزها قادرند تا بهترین تصمیم را در تیمارهای قبل از برداشت انجام دهند.

واژگان کلیدی: کیوی‌فروت، بوتریتیس، کپک خاکستری، سردخانه

مقدمه

کیوی با نام علمی *Actinidiae deliciosa* گیاهی پر رشد و رونده بوده (۲) که کشت آن در سال‌های اخیر در استان‌های شمالی توسعه خوبی پیدا کرده است. سطح زیر کشت این محصول ۱۰۵۸۴ هکتار بوده و با تولید ۳۰۵۶۵۲ تن تولید، در مجموع ۱.۶ درصد از تولید محصول باغی کشور را به خود اختصاص داده است (۱). در اوایل کشت، این گیاه عاری از بیماری معرفی شده بود اما به تدریج با توسعه سطح زیرکشت، تعداد آفات و بیماریهای این محصول نیز افزایش یافته است. پوسیدگی خاکستری میوه کیوی یکی از مهمترین بیماریهای پس از برداشت میوه کیوی فروت محسوب می‌گردد که توسط قارچ *Botrytis cinerea* ایجاد می‌شود(۳). سالانه میزان زیادی میوه کیوی براثر پوسیدگی‌های قارچی درانبارها و سردخانه‌ها ازبین می‌روند و با افزایش دوره انبارداری میزان خسارت بیشتر می‌شود. این بیماری در باغات کیوی ایالت کالیفرنیا تا حدود ۲۰٪ خسارت وارد می‌سازد (۴) در نیوزیلند تا ۳۰٪ نیز خسارت گزارش شده است (۵). در ایران نیز طاهری و همکاران در ۱۳۸۳ بیماری کپک خاکستری کیوی را از ایران گزارش کردند(۶). ولیکن تاکنون از میزان خسارت آن گزارشی ارائه نشده است.. عمدتا علائم کپک خاکستری میوه کیوی در مزرعه بر روی میوه ظاهر نخواهد شد، اما در صورت وجود

آلودگی در مراحل قبل از برداشت، ۴-۳ هفته پس از نگهداری در محیط سردخانه، علائم بر روی میوه ظاهر می‌شود (۸;۷). اسپورهای بیمارگر از طریق زخمهای وارده بر روی میوه در مراحل قبل و یا حین برداشت وارد میوه می‌شود. همچنین در مراحل پس از برداشت، بافتهای آوندی انتهای میوه نیز منافذ خوبی برای ورود اسپورهای قارچ به داخل میوه محسوب می‌شود. در صورت ورود عامل بیماری از انتهای میوه، بافتهای انتهای میوه بصورت آبسوخته و تیره رنگ می‌گردند که می‌توان آنرا از سایر بافت سالم که به رنگ سبز روشن هستند، متمایز کرد. در صورت شرائط مطلوب، بیماری از انتهای میوه بسوی گل‌گاه میوه پیشرفت خواهد کرد و در نهایت کنیدیوفورهای همراه با اسپور و نیز اسکلرت را می‌توان بر روی سطوح خارجی و داخلی میوه مشاهده نمود (۹).این قارچ پس از ریزش گلبرگ‌ها و در اثر زخم‌های ایجاد شده نیز تا حدی قادر است وارد گیاه شود، اما عمدتاً بیمارگر از راه زخم در زمان قبل و پس از برداشت وارد بافت میوه می‌شود، لذا مصرف سموم حفاظتی در زمان ریزش گلبرگ‌ها، در کاهش میزان اسپورها موثر خواهد بود اما میوه در طی مدت پس از برداشت نیز همچنان به بیماری حساس است(۹). در کالیفرنیا سامر وهمکاران(۱۰) و نیز سادی (۱۱) مشخص نمودند که دو بار سمپاشی با وینکلوزولین در زمان گلدهی و به تعداد دو بار و یا بیشتر، سمپاشی در زمان قبل از برداشت، موثرترین روش برای کنترل پوسیدگی خاکستری میوه در طی دوره انبار داری است. اما تحقیقات دیگر مشخص نمود که یک بار سمپاشی با وینکلوزولین در مرحله قبل از برداشت، بطور معنی داری وقوع بیماری را کاهش خواهد داد(۸). ولی در صورت وجود آلودگی بالا، مصرف بیش از حد سموم شیمیائی سبب بروز مقاومت می‌شود که در کالیفرنیا نیز در باغات کیوی چنین مقاومتی نسبت به *Botrytis cinerea* رخ داده است. مثلاً مقاومت این قارچ نسبت به سموم دی‌کربوکسامید از مناطق مختلفی از دنیا نظیر اروپا (۱۲)، نیوزیلند (۱۳) و... گزراش شده است. این موضوع مقاومت از یک طرف و از طرف دیگر به‌خاطر بروز انواع سرطان‌ها در انسانها ناشی از تغذیه مواد خوراکی آلوده به سم و یا تماس مستقیم بدن با سم، دلیلی شده تا تحقیقات آتی بسوی استراتژی کاهش مصرف سم و یا یافتن موارد جایگزین سم، معطوف گردد. به این خاطر در نیوزیلند یک سیستم مدیریت تلفیقی آفات وبیماریها تحت عنوان کیوی‌سبز، تشکیل و مصرف هر گونه سموم دی کربوکسامید را در مرحله قبل از برداشت، برای باغات کیوی، کاملاً ممنوع سازد (۱۰) در نتیجه امروزه استراتژی‌های مدیریت بصورت کاهش بیماری با کمک کنترل بیولوژیک و ایجاد افزایش مقاومت دفاعی انتهای میوه در مدت ۲-۱ ساعت پس از برداشت میوه، می‌باشد (۱۴). که چنین مقاومتی تا ۳-۲ روز پس از برداشت میوه نیز ادامه پیدا خواهد کرد (۱۵). لذا کاهش مصرف سموم به عنوان فصل نوین و مهمی در توسعه کشاورزی پایدار محسوب می‌گردد و بنظر می‌رسد این‌نوع استراتژی در خصوص کنترل پوسیدگی خاکستری میوه کیوی‌فروت، نقش مهمی در سیستم مدیریت تلفیقی جهت کنترل این بیماری، ایفا کند.

مواد و روش‌ها

تهیه بیمارگر

از حد فاصل بافت سالم و آلوده میوه‌های دارای علائم که از مناطق مختلف جمع‌آوری شده بودند، تکه‌هائی جدا و با استفاده از محیط کشت PDA با روش نوک هیف خالص سازی شد. پس از اثبات بیماری‌زایی، مهاجم‌ترین بیمارگر برای بررسی‌های آتی انتخاب شدند. به‌منظور تولید تعداد زیاد اسپور، از دو محیط کشت پایه Malt Agar و PDA استفاده شد. پس از کشت پتری‌ها به‌مدت ۴ روز در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد و تحت شرائط تاریکی نگهداری شدند. سپس به ازاء هر نوع محیط کشت، تعدادی به مدت ۴ روز تحت تناوب ۱۲ ساعته با نور فلورسنت و تعدادی دیگر تحت تناوب ۱۲ ساعته با نور UV قرار داده شدند، تا در نتیجه این آزمایش، بهترین شرائط برای تولید اسپور بالاتر تعیین گردد. برای انجام آزمون، سوسپانسیونی با غلظت $۱/۵ \times ۱۰^{۶}$ اسپور در هر میلی لیتر آب مقطر استریل با کمک هماسیتومتر(Hemacytometer)تهیه شد

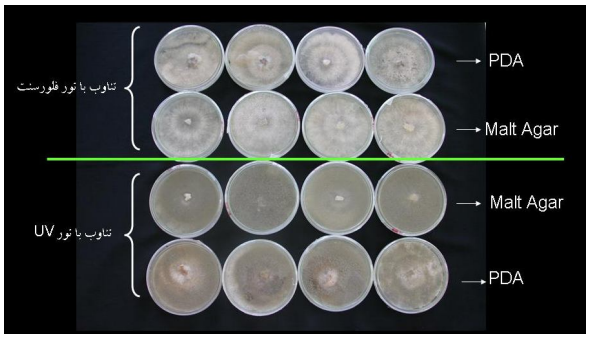
انجام آزمایشات سرد خانه‌ای

میوه کیوی رقم هایوارد از پژوهشکده مرکبات و میوه های نیمه گرمسیری تهیه شد. در زمان برداشت مواد جامد محلول (TSS) میوه، بر کمک دستگاه رفرکتومتر چشمی مدل Atago-ATC-20E در دامنه ۲۰-۰ اندازه‌گیری شد که معادل ۷ بودند. پس از انتقال میوه ها به آزمایشگاه کنترل‌بیولوژیک آمل، دم میوه‌ها در زمان آزمایش از میوه‌ها جدا شدند بعد از برداشتنن دم میوه، مقدار ۱۰ میکرولیترسوسپانسیون بیمارگر در انتهای دم میوه قرار داده و میوه‌ها به مدت ۱۲ هفته در دمای ۲۵ درجه سانیگراد بعنوان تیمار شاهد نگهداری شدند. سایر تیمارها عبارتند از: آلوده سازی و نگهداری در دمای دو درجه سانتی‌گراد، استفاده از تیمارهای سم کاربندازیم، روغن و سرمادهی به مدت ۹۶ ساعت در دمای ۱۰درجه سانتیگراد قبل از آلوده سازی و انتقال به سردخانه با دمای دو درجه سانتیگراد به مدت ۱۲ هفته بودند. برای هر تیمار ، ۶۰ میوه با سه تکرار در قالب طرح بلوک کامل تصاوفی در نظر گرفته شد

نتایج وبحث

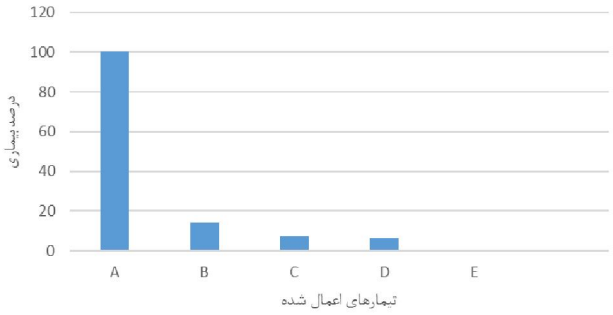
پس از جداسازی و خالص سازی بیمارگر، برای اثبات بیماریزائی مجدداً آزمایش بیماریزائی بر روی میوه‌های سالم انجام شده، که بطورموفقیت آمیزی علائم بیماری مشاهده شد. بیماری از انتهای میوه به‌سمت داخل، پیشروی داشته و تولید بافت قهوه‌ای می‌کند که از سایر بافتهای سبزرنگ متمایز می‌باشد (شکل ۱). برای تولید اسپور نیز نتایج نشان می‌هد در محیط کشت مالت آگار و در تناوب با نور فلورسنت، میزان اسپور بیشتری تولید می‌شود (شکل ۲).

شکل ۱- پیشرفت علایم بیماری به درون میوه کیوی با آلوده سازی در انتهای دم میوه



شکل۲- تولید اسپور بر روی محیط کشت مالت آگار و PDA در تناوب نوری فلورسنت و UV

پس از ثبت نتایج، داده‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی و با نرم‌افزار SAS تجزیه وتحلیل آماری انجام شد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که بین تیمارهای اعمال شده اختلاف معنی داری در سطح ۱٪ وجود دارد. با توجه به معنی‌دار شدن داده‌ها در سطح احتمال ۱٪ ، می‌توان گفت تیمارهای اعمال شده از نظر توان بازدارندگی از رشد قارچ بوتریتیس و یا ایجاد مقاومت القائی بر روی میوه کیوی فروت با یکدیگر متفاوتند. از این‌رو میتوان آنها را با روش دانکن، گروه‌بندی نمود که نمودار ۱ مبین این گروه‌بندی می‌باشد.



نمودار ۱- مقایسه بازدارنگی از توسعه بیمارگر بر حسب درصد بیماری به مدت ۱۲ هفته به ترتیب:

A- نگهداری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد پس از آلوده‌سازی

B- نگهداری در دمای ۲ درجه سانتی‌گراد پس از آلوده‌سازی

C- مصرف پارافین قبل از آلوده‌سازی و نگهداری در دمای ۲ درجه سانتی‌گراد

D- مصرف سم کاربندازیم قبل از آلوده‌سازی و نگهداری در دمای ۲ درجه سانتی‌گراد

E- سرمادهی به در دمای ۲ درجه سانتی‌گراد قبل از آلوده سازی و نگهداری در ۲ درجه سانتی‌گراد

بر اساس نتایج به‌دست آمده هر چند نگهداری میوه در دمای دو درجه‌سانتیگراد در مقایسه با دمای ۲۵ درجه سانتیگراد، میزان خسارت را تا ۱۴ درصد کاهش داده اما با مصرف روغن پارافین و یا سموم کازبندازیم می‌توان آن را تا حد ۸ و ۷ درصد کاهش داد که با توجه به خطرات سوء زیست محیطی سم کاربندازیم ، استفاده از آن توصیه نمی‌گردد. همچنین نتایج این بررسی نشان می‌دهد حتی اگر سه روز بعد از انبارداری در دمای دو درجه سانتیگراد ، اگر بر روی دم میوه‌ها بیمارگری قرار گیرد، میزان احتمال بروز بیماری بسیار ضعیف خواهد بود.

منابع

۱- بی نام ، ۱۳۹۴. آمارنامه کشاورزی. جلد سوم، محصولات باغبانی. معاونت برنامه ریزی و اقتصادی، مرکز فناوری اطلاعات و ارتباطات. ۲۵۳ص.

2. Ferguson, A. R. 2011. Kiwifruit: A Botanical Review. In: Horticultural Reviews. John Wiley & Sons. 1-64 pp.
3. Brook, P. 1991. *Botrytis* stem-end rot and other storage diseases of kiwifruit-a review. *Proceeding II International Symposium on Kiwifruit*. *297*.
4. Sommer, N. F., Fortlage, R. J. and Edwards, D. C. 1983. *California agriculture*. 37:16-8
5. Pyke, N., Elmer, P., Tate, K., Wood, P., Cheah, L., Harvey, L., Boyd-Wilson, K. and Balasubramanian, R. 1996. Biological control of *Botrytis cinerea* in Kiwifruit: Problems and Progress. Biological Fruit Production. In: Wearing H. (Ed.). Contrib. Pap. IFOAM Conf. Short Research Special Publocation. Lincoln, New Zeland, pp. 45-53.
6. Taheri, H, Fifaii, R, Ershad, J. 2009. Identification of fungus agents that cause kiwi fruit rots in cool storages. Agronomy and Horticulture Journal. 81: 34- 39.
7. Michailides, T. J. and Morgan, D. P. 1996. incidence of *Botrytis cinerea* in kiwifruit sepals and receptacles to predict gray mold decay in storage. Plant disease 80:248-54
8. Cost,a G., Kukuriannis, B. and Monet R. 1991. Kiwifruit production in Europe. Proceeding II International Symposium on Kiwifruit. 141-50
9. Michailides, T.J. and Elmer, P. A. G. 2000. Botrytis Gray Mold of Kiwifruit Caused by *Botrytis cinerea* in the United States and New Zealand *Plant Disease* 84:208-23
10. Sommer, N., Suadi, J. and Fortlage, R. 1994. Postharvest storage diseases. P. 116-122. In: Hasey, J., Johnson, R. S., Grant, J. A. and Reid, W. O. (eds). Kiwifruit Growing and Handling. University of California, Oakland, Canada. Publication Number 3349:116-22.
11. Suadi-Hasbun, J. 1987. Pathological and physiological interactions between Actinidia deliciosa (kiwifruit) and *Botrytis cinerea* in low temperature environments. Ph. D. thesis. University of California, Davis
12. Lorenz, G. and Pommer, E. H. 1985. EPPO Bulletin 15:353-60
13. Manning, M., Pak, H. and Popay, A. *Botrytis* storage rot of kiwifruit: efficacy of pre-harvest sprays in orchards with dicarboximide-resistant botrytis populations. *Proc*. Proceedings of the new zealand plant protection conference, 1995:22-6.

14. Poole, P. R. and McLeod, L. C. 1994. Development of resistance to picking wound entry *Botrytis cinema* storage rots in kiwifruit. New Zealand journal of crop and horticultural science. 22:387-9215.
15. Pennycook, S. and Manning, M. 1992. Picking wound curing to reduce *Botrytis storage* rot of kiwifruit. New Zealand journal of crop and horticultural science. 20:357-60

بررسی واکنش لاینهای پیشرفته جو نسبت به بیماریهای مهم لکه برگی در شرایط مزرعه

معصومه خیرگو*، شعبان کیا، حسین بهلول
مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی گلستان
نویسنده مسئول: m.kheirgoo@gmail.com

چکیده

استفاده از ارقام مقاوم بهترین و راحت ترین روش کنترل بیماریها محسوب می شود. وجود آلودگی طبیعی این امکان را می دهد که بتوان با بررسی ارقام از بین آنها منابع مقاومت را جستجو و مشخص کرد. به همین منظور در سال زراعی ۹۴-۱۳۹۳ تعداد ۳۴ لاین جو در شرایط مزرعه در ایستگاه تحقیقات کشاورزی گرگان مورد ارزیابی قرار گرفتند. هر لاین در دو خط یک متری و به فاصله ۳۰ سانتی متر از یکدیگر کاشته شدند. به فاصله هر ۱۰ لاین و نیز در حاشیه خزانه رقم حساس افضل کاشته شد. خزانه مورد نظر با استفاده از برگهای آلوده سال قبل آلوده شد. یادداشت برداری از واکنش لاینها بر اساس روش ساری و پرسکات تغییر یافته توسط ایال و همکاران در مقیاس ۹۹-۰۰ و شدت آلودگی به زنگ قهوه ای بر اساس مقیاس اصلاح شده کاب و همچنین تیپ آلودگی R (مقاوم)، MR (نیمه مقاوم)، MS (نیمه حساس) و S (حساس) بر اساس روش رولفز و همکاران انجام شد. نتایج بدست آمده نشان داد بیماری زنگ قهوه ای، سفیدک پودری، لکه توری و لکه قهوه ای معمولی جو در بین ژنوتیپ های مختلف ظاهر گردید. نتایج عکس العمل گیاه کامل نسبت به بیماری زنگ قهوه ای جو در منطقه گرگان نشان داد که همه لاینها واکنش حساسیت از خود نشان دادند و ۶۶ درصد لاینهای مورد بررسی نیمه مقاوم تا مقاوم به عامل بیمای سفیدک پودری بودند و ۲۴ درصد نیمه حساس به این بیماری بودند. نسبت به بیماری لکه توری تعداد ۷ لاین مقاوم، ۲ لاین نیمه مقاوم، ۱ لاین حساس، ۷ لاین نیمه حساس و مابقی لاینها بدون علایم بودند. نسبت به بیماری لکه قهوه ای معمولی جو تعداد ۱۳ لاین مقاوم، ۷ لاین نیمه مقاوم، ۱۲ لاین نیمه حساس و ۲ لاین حساس برآورد شد.

واژگان کلیدی: جو، زنگ قهوه ای، لکه توری، لکه قهوه ای، سفیدک سطحی

مقدمه

امروزه جو در سطح جهانی، به عنوان چهارمین محصول زراعی مهم، نقش با ارزشی را در تغذیه انواع دام، صنایع مالت و تامین غذای بشر بازی می کند. توان سازگاری به محدوده وسیعی از شرایط آب و هوائی، گیاه جو را به تولید اقتصادی در مناطقی که این امکان برای تولید سایر گیاهان زراعی وجود ندارد، قادر می سازد (۴). بیماری سفیدک پودری جو از مهمترین بیماریهای جو در دنیا به شمار می رود، آلودگی بیش از ۷۰ درصد سطح برگ به بیماری سفیدک پودری جو سبب کاهش ۶۰-۴۰ درصد عملکرد دانه می شود که این کاهش به دلیل کاهش تعداد پنجه های بارور در اثر آلودگی در طول دوره پنجه زنی و یا آلودگی در زمان ظهور سنبله که درصورت شدید بودن باعث کاهش اندازه دانه و تعداد دانه می گردد (۳). سفیدک پودری یکی از مهم ترین بیماری های خسارت زا در نواحی تولید جو در شمال آمریکا، مرکز و شمال اروپا می باشد. در حالت اپیدمی، همه قسمت های هوایی گیاه به وسیله پودر سفید رنگ که حاوی کنیدی و کنیدی بر های عامل بیماری است پوشیده می شود، در

نتیجه اثر منفی روی فعالیت های فتوسنتزی گیاهان دارد که این امر باعث کاهش عملکرد و زیان اقتصادی می شود (۶). در یک بررسی در سالهای ۱۳۸۳-۱۳۸۱ از مجموع ۴۰ لاین جو پیشرفته مورد ارزیابی درایستگاه تحقیقاتی طرق مشهد تعداد۳ لاین مقاوم،۷ لاین نیمه مقاوم،۳ لاین نیمه حساس و۲۷لاین حساس به بیماری بودند و درایستگاه عراقی محله گرگان از مجموع ۳۶ لاین تعداد ۸ نیمه مقاوم ،۲۳ نیمه حساس و۵ حساس و در ایستگاه میا ندوآب از مجموع ۳۹ لاین تعداد ۳۵ ژنوتیپ مقاوم و۳ ژنوتیپ نیمه حساس و یک ژنوتیپ حساس به بیماری بودند (۱). لکه قهوه ای معمولی جو به وسیله قارچ *Bipolaris sorokiniana* به وجود می آید. لکه ها در هر مرحله ای از رشدگیاه روی برگها و غلاف برگها تشکیل می شوند. اگر شرایط محیطی مساعد باشد بادزدگی دانه و خوشه بروز خواهد کرد(۹). شیوع بیماری لکه قهوه ای معمولی جو در مزارعی که به طور مداوم جو کاشته می شود، بسیار بالا می باشد (۱۲). قارچ عامل بیماری سبب پوسیدگی ریشه و طوقه و لکه سوخته ای جو می گردد(۱۱). کاهش عملکرد ناشی از این بیماری ۱۶ تا ۳۳ درصد گزارش شده است (۹). گوبیس و همکاران (۲۰۱۰)، طی یک آزمایش مقاومت ۴۳ ژنوتیپ جو بهاره را نسبت به قارچ *B. sorokiniana* مورد ارزیابی قرار دادند شدت بیماری از ۱/۶۲ الی ۲/۷۸ متغیر بود تعداد ۶ ژنوتیپ حساس و ۳۷ ژنوتیپ مقاوم به بیماری لکه قهوه ای معمولی جو بودند.

مواد و روش ها

در سال زراعی ۱۳۹۴-۱۳۹۳ تعداد ۳۴ لاین جو پیشرفته دیم به مدت یک سالدر ایستگاه تحقیقات کشاورزی گرگان جهت ارزیابی مقاومت به بیماریهای مهم لکه برگی (سفیدک پودری، لکه قهوه ای معمولی و زنگ قهوه ای جو و ...) در دو خط یک متری به فاصله ۳۰ سانتی‌متر روی یک پشته و فاصله پشته ها ۶۰ سانتی‌متر از هم در مزرعه کشت شدند. به منظور تسهیل در ایجاد آلودگی و توسعه بیماری، ما بین لاینهای کشت شده، ارقام حساس به بیماری کشت می شوند. طرح در شرایط آلودگی طبیعی انجام شد (با توجه به حساسیت ارقام حساس که به عنوان شیوع‌دهنده در لابلای مواد آزمایشی کشت شدند و سابقه بیماری در مناطق زیر کشت ضرورتی برای مایه‌کوبی مصنوعی وجود ندارد). یادداشت برداری از واکنش گیاهان در سه نوبت بر اساس روش ساری و پرسکات (۱۰) تغییر یافته توسط ایال و همکاران (۵) در مقیاس ۰۰-۹۹ که رقم اول بیان کننده ارتفاع نسبی بیماری یا پیشرفت آن از برگهای پایین به طرف سنبله است و رقم دوم آن میزان شدت بیماری (درصد، تراکم کلنی قارچ روی برگ) می باشد، انجام گرفت.

نتایج و بحث

مشخصات ژنوتیپ ها و عکس العمل آنها در شرایط مزرعه ای مناطق مورد آزمایش نسبت به بیماریهای لکه برگی در جدول ۱ پیوست درج شده است. بر اساس این نتایج در منطقه گرگان بیماری زنگ قهوه ای، سفیدک پودری، لکه توری و لکه قهوه ای معمولی جو در بین ژنوتیپ های مختلف ظاهر گردید. نتایج عکس العمل گیاه کامل نسبت به بیماری زنگ قهوه ای جو در منطقه گرگان نشان داد که همه لاینها واکنش حساسیت از خود نشان دادند. حداکثر بیماری ثبت شده از عکس العمل ژنوتیپ ها در شرایط مزرعه ای گرگان۸۰s و حداقل تیپ آلودگی ثبت شده ۴۰s بود.با توجه به تنوع ژنتیکی قارچ *Pucciniahordei* مطالعات به صورت مداوم باید در مناطق مختلف کشور انجام شود و اطلاعات بیشتری در مورد تغییرات ژنتیکی این قارچ حاصل شود. تعیین پاتوتیپ های عامل بیماری در مناطق مختلف کشور جهت تهیه و تولید ارقام مقاوم می تواند از راهکارهای کنترل زنگ قهوه ای جو باشد. پایداری مقاومت ارقام چند ژنی از نظر تاخیر در بروز اپیدمی بیماری مناسب تر از ارقام با مقاومت تک ژنی، احتمال بروز اپیدمی بیشتر می شود. در ارزیابی شدت بیماری سفیدک پودری جو، تعداد ۲۰ لاین مقاوم، ۶ لاین نیمه مقاوم و ۸ لاین نیمه حساس بر آورد شد. نسبت به بیماری لکه توری تعداد ۷ لاین مقاوم، ۲ لاین نیمه مقاوم، ۱ لاین حساس، ۷ لاین نیمه حساس و مابقی لاینها بدون علایم بودند نسبت به بیماری لکه قهوه ای معمولی جو تعداد ۱۳ لاین مقاوم، ۷ لاین نیمه مقاوم، ۱۲ لاین نیمه حساس و ۲ لاین حساس برآورد شد.

با توجه به گسترش بیماری در سال های اخیر یافتن منابع با ژن های مقاومت نسبی و مقاومت گیاه کامل ضروری به نظر می رسد. جمعیت عامل بیماری همواره در حال تغییر است و این تغییرات موجب به وجود آمدن نژادهای جدید می شود. نژادهای

جدید قادر به زنده ماندن بر روی گیاه مقاوم بوده و بدون هیچ گونه رقابت، رشد و تکثیر شده، جمعیت بزرگی تولید و پس از انتشار در محیط رقم مقاوم را نابود می کنند، به این ترتیب مقاومت رقم گیاه میزبان شکسته می شود (۲). با تعیین ژنهای مقاومت موجود در ارقام و لاینهای مختلف می توان از آنها در جهت ایجاد مقاومت و تولید ارقام مقاوم به این بیماری ها استفاده کرد.

جدول ۱-عکس‌العمل ژنوتیپ‌هایپیشرفته جو دیم نسبت به بیماری های مهم لکه برگی سال زراعی(۱۳۹۴-۱۳۹۳)

شماره ژنوتیپ	پدیگری	سفیدک پودری	لکه قهوه ای	لکه توری	زنگ قهوه ا
۱	Abidar	39	36	0	60S
۲	Yea 168.4/Yea 605.5 Yea206-4A-3	34	51	31	70S
۳	Local	53	52	51	40S
۴	Aday-6/4/A109-SA-706-79//4341N/Ot/3/Roho//Alger/ Ceres362-1-1 ICB02-1728-0AP-5AP-0AP	33	72	71	50S
۵	Skorohod/Tirchmir-22//Aday-7 ICB03-1989-0AP-7AP-0AP	38	71	31	50S
۶	Aday-6/5/ChiCm/An57//Albert/3/ICB-102379/4/GkOmega ICB02-1656-38AP-0AP	54	51	51	50S
۷	BKFMaguelone1604/Lignee640//Grivita /3/Tokak ICB01-1745-38AP-0AP	53	52	51	80S
۸	Cumra 2001	35	51	0	70S
۹	Durusu	53	51	51	50S
۱۰	Arende	54	51	51	50S
۱۱	Efes98	39	51	51	80S
۱۲	Cumhariyet50	51	31	31	70S
۱۳	Tokak157/37	33	37	37	50S
۱۴	Catalhuyuk2001	38	35	35	70S
۱۵	Catalhuyuk2001	34	35	35	60S
۱۶	Anadolu86	33	38	38	40S
۱۷	Bulbul89	34	35	35	50S
۱۸	Keser	33	34	0	80S
۱۹	Abidar	35	37	31	60S
۲۰	local	36	37	51	70S
۲۱	Makoie/Dicktoo	33	35	0	
۲۲	GaraArpa/Icb-111-1059	33	31	0	40S
۲۳	GaraArpa/Icb-111-1059	34	33	0	50S
۲۴	Yesevi/Sahand	33	34	0	40S
۲۵	Antares/Ky36-1294//SlrIcbh /3/ Icb-111-1067-	33	38	0	40S
۲۶	Yea168.4/Ywa605.5/5/ 4673Juliat/..../4/615Guzak//935/B/xemus	36	34	0	40S
۲۷	Yea168.4/Ywa605.5//Radical	33	33	0	80S
۲۸	Yea168.4/Ywa605.5//Radical	35	51	0	40S
۲۹	PAMIR-158/ZDM1454 ICBH95-0211-0AP-0Shi-0Shi-0Shi-5Shi	31	51	0	50S
۳۰	TOKAK//WKN 5185/5/4673Juliat/..../4/615Guzak//935/ B/xemus	35	52	0	50S
۳۱	Unknown-F6-88-9	52	36	0	70S
۳۲	Unknown-F6-88-9	33	31	0	50S
۳۳	Unknown-F6-88-9	35	34	0	60S
۳۴	Unknown-F6-88-9	54	51	0	40S
	Afzal (Susceptible check)	55	75	73	90S

منابع

۱. پاتپور، م.، عطاحسینی، س. م.، ترابی، م.، کیا، ش. و هوشیار، ر. ۱۳۸۳. ارزیابی مقاومت ارقام و لاینهای امیدبخش جو نسبت به بیماری سفیدک سطحی جو در مناطق مختلف کشور. گزارش سالیانه بیماریهای غلات. موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر. ص. ۴۰۴.

2. Agrios, G. N. 1997. Plant Pathology. 4 th edition. Academic Press. New Yourk, USA. 635 pp.
3. Chan, K. C., Boyd, W.J. R. and Khan, T. N. 1990. Distribution, Severity and economic importance of powdery mildew of barley in western Australia. Austrlian J. Exp. Agr. 30: 379 - 385 .
4. Chopra, V. L., and Prakash, S. 2002. Evolution and adaptation of cereal crops. Science Publishers, Enfield, N. H. USA. 295 pp.
5. 5-Eyal, Z., Scharen, A. L., Prescott, J. M. and Ginkel, M. 1987. The Septoria Diseases of wheat: Concepts and Methods of Disease Management. Mexico, D. F. CIMMYT.
6. Gawande, V. L. and Patil, J. V. 2003. Genetics of powdery mildew resistance in mungbean (Vigna radiate L.). Crop Protection, 22: 567-571.
7. Gubis, J., Masar, S. and Gubisova, M. 2010. Resistance of spring barley genotypes to Bipolarissorokiniana. Agriculture 56(1): 3-8.
8. Iftikjar, SH., Asad, SH., Rattu, A. U., Fayyaz, M., and Munir, A. 2009. Selection of barley germplasm resistant to spot blotch. Pak. J. Bot., 41 (1): 309-314.
9. Mathre, D. E. 1985. Compendium of Barley Diseases. A. P. S. 78pp.
10. Saari, E. E. and Prescott, J. M., 1975. A Scale for appraising the foliar intensity of wheat disease. Plant Dis. Report. 59: 377 - 380.
11. Wordell, J. A., Vale, F. X.R., PRESTES, A. M. and ZAM Bolim, L. 2005. Resistance of barley genotypes to brown leaf spot. Euphytica, 142. 217-225.

12- Yahyaoui, A. 2002. Occurrence of barley leaf blight disease in CWANA. In: Meeting the challenges of barley blights. Proceeding of the Second International Workshop on Barley Leaf Blights. 7-11 April 2002. ICARDA, Aleppo, Syria.

ارزیابی واکنش لاینهای پیشرفته نخود به بیماری برق زدگی نخود در مناطق دیم

معصومه خیرگو[۱]، فرشید محمودی[۲]، جواد اشرفی[۳]

۱- محقق بیماری گیاهی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی گلستان

۲- استاد یار پژوهش معاونت موسسه تحقیقات کشاورزی دیم

۳- محقق بیماری گیاهی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی ایلام

** نویسنده مسئول: m.kheirgoo@gmail.com*

چکیده

در این تحقیق به منظور ارزیابی مقاومت لاینهای پیشرفته نخود به قارچ *Ascochyta rabiei* عامل برق زدگی نخود در مناطق دیم، ۴۴ لاین پیشرفته نخود همراه با یک شاهد حساس به بیماری (ILC 263) در خطوط ۳ متری با فاصله خطوط ۳۰ سانتی متر و فاصله بذور ۱۰ سانتی متر از هم در مزارع آزمایشی ایستگاه تحقیقاتی سرارود (کرمانشاه)، ایلام و گلستان (گنبد) با دو تکرار کشت گردیدند. کاشت رقم حساس بعد از هر دو ردیف و همچنین به صورت یک نوار ۲ متری در اطراف خزانه انجام گردید. کاشت با دست بروی خطوط ایجاد شده در نیمه دوم آبانماه ۱۳۹۳ انجام گرفت. برای ایجاد آلودگی مصنوعی از بقایای نخود آلوده شده سال قبل و پخش یکنواخت آنها در محل کشت لاینها و بین ردیفها استفاده گردید. در طول ماهها و روزهای خشک از سیستم مه پاش به مدت سه ساعت در روز جهت تامین رطوبت نسبی استفاده گردید. پس از مشاهده علائم بیماری، ارزیابی لاینها در سه مرحله با استفاده از سیستم مقیاس نمره ای انجام گرفت. نتایج حاصله نشان داد که در ایستگاه سرارود، ۴ ژنوتیپ نسبتا حساس، یک لاین متحمل، ۲۷ لاین نسبتا مقاوم و ۱۲ لاین مقاوم، در ایلام لاین Flip-03-134 حساس، ۸ لاین نسبتا حساس، ۲ لاین متحمل، ۷ لاین نسبتا مقاوم، ۲۶ لاین مقاوم و در ایستگاه گنبد کل لاینها نسبتا حساس بودند. واکنش متفاوت لاینهای مورد آزمایش، دلالت بر تنوع بیماریزایی جدایه های قارچ عامل بیماری برق زدگی نخود را دارد.

واژگان کلیدی: بیماری برق زدگی، مقاومت، نخود

مقدمه

بیماری برق زدگی در ایران، در استانهای آذربایجان، کرمانشاه، فارس، کهکیلویه، تهران، قزوین،ورامین، زنجان، گرگان، مازندران، کردستان، لرستان و خوزستان روی نخود مشاهده شده است(۱). طبق برآوردی که شریف و همکاران در سال ۱۳۴۵ نمودند، میزان کاهش محصول نخود در اثر بیماری برق زدگی در کشور ۱۵٪ کل محصول بوده است(۲) شرایط محیطی، زمینهٔ ژنتیکی جمعیت پاتوژن و زمینهٔ محصول زراعی در یک ناحیه عوامل مهمی در توسعهٔ اپیدمی بیماری هستند. هنگامیکه رطوبت نسبی بالای ۶۰٪ و دما بین ۱۰ تا ۲۰ درجه سانتیگراد باشد، بیماری به صورت همه گیر ظاهر می‌شود(۶ و ۷). علائم این بیماری روی تمامی قسمتهای هوایی می‌تواند مشاهده شود و شامل لکه‌های تیره کشیده روی ساقه، دمبرگ و طوقه و دایره‌ای روی برگ و غلاف می‌باشد که با نقاط ریز و سیاهرنگ پیکنیدهای قارچ پوشیده میشوند. توسعه لکه‌ها روی ساقه منجربه احاطه شدن و شکستگی ساقه در آن ناحیه و خشک شدن قسمتهای بالای آن میگردد. در صورتیکه طوقه آلوده شود کل گیاه خشک میگردد. در ابتدای آلودگی معمولا بیماری به صورت لکه لکه در مزرعه پدیدار می‌شود که با افزایش رطوبت

هوا و بارندگی بیشتر مزرعه را فرا میگیرد. برگها در اثر آلودگی زرد و خشک میگردند. بذر غلافهای آلوده ریز و چروکیده بوده و لکه‌های قهوه‌ای نا منظم روی آنها مشاهده می‌شود. بذور آلوده سبز نشده و درصورتیکه جوانه بزنند گیاهچه حاصل آلوده بوده و منبع آلودگی میباشد(۵). در یک بررسی از چهل جدایه قارچ*Ascochytarabiei* (Anamorph: *Didymellarabiei*)جمع آوری شده از مزارع نخود آلوده به بیماری برق زدگی در مناطق مختلف استان فارس جهت تعیین تیپ آمیزشی سازگاری جنسی (Mating typ)، 95 درصد جدایه ها از تیپ آمیزشی MAT-1 و ۵ درصد ازتیپ آمیزشی MAT-2 بودند. تفاوت زیادی در خصوصیات کشت شامل رشد میسلیوم، ظهور کلنی واسپور دهی در میان جدایه ها مشاهده گردید. همچنین آسکوکارپ‌های بارور *D. rabiei*روی غلافهای آلوده نخود در شرایط مزرعه‌ای مشاهده گردیدند(۳). آزمایشات بررسی خزانه های بین المللی در ایکاردا و ایستگاههای مرتبط، همه ساله اجرا می‌گردد. که در طی سالهای ۷۸-۱۳۷۷ از ۴۰ لاین مورد استفاده در ایستگاه تحقیقات کشاورزی سرارود، ۱۳ لاین کاملا" مقاوم و بدون آلودگی، ۱۲لاین نسبتا" مقاوم و بقیه لاینها متحمل بودند(۵). همچنین در طی سالهای۸۱-۱۳۸۰ از۴۰ لاین مورداستفاده،۱۳ لاین FLIP95-51C, F95-58C, F95-68C, F96-47C, F96-76C, F97-121C) (F97-132C, F97-191C, F98-233C, F98-232 ,F98-231C,F98-204C,F97-195C مقاوم (Resistant)، 25 لاین متحمل(Tolerant)،که از این میان فقط لاین Flip 98-229 در هر دو مرحله رویشی و غلاف دهی متحمل و بقیه لاینها در مرحله رویشی مقاوم و در مرحله غلاف دهی متحمل بودند) و دو لاین Flip 97-208 و Flip 98-106 حساس(Susceptible) بودند که هردو لاین در مرحله رویشی متحمل و در مرحله غلاف دهی حساس بودند. رقم شاهد نیز کاملا" حساس (Highly susceptible) بود که در همان مرحله اولیه رشد از بین رفت(۴).

مواد و روش ها

در این تحقیق واکنش۴۴ لاین پرمحصول و پیشرفتهٔ نخود حاصل از آزمایشات بهزراعی داخلی ، در سه منطقه سرارود، ایلام و گنبد نسبت به قارچ *Ascochyta rabiei*، عامل بیماری برق زدگی، ارزیابی گردید. آزمایش در قالب طرح بلوکهای کامل تصادفی در ۲ تکرار اجرا شد. هر تیمار شامل یک خط ۴ متری بوده، فاصله خطوط از هم ۳۰ سانتیمتر، فاصله بذور ۱۰ سانتیمتر و در فاصلهٔ هر دو تیمار یک خط کور (نکاشت) در نظر گرفته شد. کاشت با دست بروی خطوط ایجاد شده انجام گرفت. کاشت رقم حساس محلی بعد از هر دو ردیف و به صورت یک تیمار مجزا و همچنین بصورت یک نوار ۲ متری در اطراف خزانه انجام گرفت. برای ایجاد آلودگی مصنوعی از بقایای نخود آلوده شده سال قبل و پخش آنها در محل کشت لاینها و بین ردیفها استفاده گردید. عملیات آماده سازی زمین شامل شخم و دیسک در پاییز صورت گرفت. کود مورد نیاز شامل ۲۰ کیلوگرم ازت خالص در هکتار، که از منابع اوره تأمین گردید، استفاده شد. در طول ماهها و روزهای خشک از سیستم مه پاش(Mist system) بمدت سه ساعت در روز جهت تامین رطوبت نسبی و شرایط مناسب فعالیت عامل بیماری استفاده گردید. در طول فصل رشد از درصد سبز زمان گلدهی، ارتفاع بوته و زمان رسیدن لاینها یاداشت برداری به عمل آمد علائم بیماری و میزان آلودگی مشاهده شده با استفاده از مقیاس نمره ای Singh and Reddy (۸) در سه مرحله قبل از گلدهی، گلدهی و غلافدهی بشرح ذیل ارزیابی شدند.

۱- بدون هیچگونه علائم روی گیاه (بسیار مقاوم) HR.

۳- علائم کم و پراکنده روی برگها و ساقه‌ها، بطوریکه با بررسی دقیق بتوان علایم بیماری را دید(مقاوم) .R

۵- زخمهای مشخص بیماری روی برگها، ساقه‌ها و غلافها به سادگی قابل مشاهده بوده و تعداد کمی از ساقه‌ها (۱۰ تا ۳۰ درصد) شکسته‌اند (نیمه مقاوم) .MR

۷- علائم و لکه‌ها روی برگها، ساقه‌ها و غلافها خیلی مشخص و منجر به خسارت شده‌اند (بیش از ۵۰ درصد ساقه‌ها شکسته‌اند)، (حساس) S.

۹- علائم و لکه‌های بیماری بزرگ بطوریکه باعث از بین رفتن تعداد زیادی از بوته ها شده است (حساسیت بالا) .HS

نتایج و بحث

اولین علائم بیماری برق زدگی بصورت لکه های قهوه ای کمرنگ تا قهوه ای تیره در روی برگها، دمبرگها و ساقه ها در نیمه دوم اسفند ماه و اوایل فروردین در روی تعدادی از لاینها، بالاخص لاینهای شاهد مشاهده گردیدند. با فعالیت سیستم مه پاش، بیماری در ژنوتیپهای حساس توسعه یافت و به مرگ کامل ژنوتیپهای حساس منتهی شد. در اواسط اردیبهشت ماه میزان گسترش علائم بیماری روی لاینهای حساسبه حد نهایت رسیده بود، به طوری که اکثر لاینهای حساس در همان مراحل اولیه رویشی از بین رفتند. نتایج حاصله نشان داد که در ایستگاه سرارود، ۴ ژنوتیپ نسبتا حساس، یک لاین متحمل، ۲۷ لاین نسبتا مقاوم و ۱۲ لاین مقاوم، در ایلام لاین Flip-03-134 حساس، ۸ لاین نسبتا حساس، ۲ لاین متحمل، ۷ لاین نسبتا مقاوم، ۲۶ لاین مقاوم و در ایستگاه گنبد کل لاینها نسبتا حساس بودند. واکنش متفاوت لاینهای مورد آزمایش، دلالت بر تنوع بیماریزایی جدایه های قارچ عامل بیماری برق زدگی نخود را دارد.

نتیجه قابل تامل در این آزمایش، حساسیت نسبی ارقام معرفی شده آزاد در ایلام و گنبد و رقم عادل در گنبد می باشد، که به نظر می رسد به دلیل بروز نژادها و پاتوتیپ های جدید، تنوع بیماریزایی جدایه های قارچ عامل و اختلاف در شرایط آب و هوایی می باشد. اجرای برنامه های ارزیابی لاینها نسبت به بیماریها در مناطق مختلف به شناسایی لاینهایی با طیف وسیع مقاومت کمک می کند. در تحقیق حاضر از بقایای آلوده خزانه سال های قبل که دارای چندین ژنوتیپ با سطوح مختلف حساسیت به بیماری بودند استفاده گردید، که شامل یک جمعیت مخلوط از پاتوتیپ های بیماریزا بوده در نتیجه منابع مقاومت شناسایی شده مطمئن تر و بادوام تر هستند. اکثر گزارشات قبلی در مورد منابع مقاومت بر اساس ارزیابی لاینهای نخود در مرحله رویشی بوده است. نظر به اینکه اکثر ارقام محلی از جمله بیونیج، جم، وروش و سایر ارقام محلی به بیماری برق زدگی حساس می باشند، شناسایی منابع مقاومت با پایداری بالا می تواند یک راهکار مطمئن برای کنترل بیماری باشد.

جدول ۱: ارزیابی واکنش لاینهای پیشرفته نخود نسبت به بیماری برق زدگی در مزارع آزمایشی ایستگاههای سرارود، ایلام و گنبد

No	Name	Kermanshah			Ilam			Gonbad		
		Range	Mean	Reaction	Range	Mean	Reaction	Range	Mean	Reaction
1	SAR8.J109K11	3-3	3	R	3-5	4.3	MR	5-7	6.3	MS
2	SAR8.J32K2	5-7	6.3	MS	5-7	6.3	MS	5-7	6.3	MS
3	SAR8.J57K1	3-5	4.3	MR	5-7	6.3	MS	5-7	6.3	MS
4	SAR8.J57K9	3-5	4.3	MR	3-5	4.3	MR	5-7	6.3	MS
5	SAR8.J78K2	3-5	4.3	MR	5-7	6.3	MS	5-7	6.3	MS
6	SAR8.J21K1	3-5	4.3	MR	3-5	4.3	MR	5-7	6.3	MS
7	SAR8.J21K11	3-5	4.3	MR	3-5	4.3	MR	5-7	6.3	MS
8	SAR8.J21K8	3-5	4.3	MR	5-7	6.3	MS	5-7	6.3	MS
9	SAR8.J21K13	3-5	4.3	MR	3-5	4.3	MR	5-7	6.3	MS
10	SAR8.J21K17	3-5	4.3	MR	5-7	6.3	MS	5-7	6.3	MS
11	SAR8..J13K9	3-5	4.3	MR	5-7	6.3	MS	5-7	6.3	MS
12	SEL.SPL.K1	5-7	6.3	MS	5-7	6.3	MS	5-7	6.3	MS
13	F-03-134	5-7	6.3	MS	7-9	7.6	S	5-7	6.3	MS
14	AZAD	5-5	5	T	5-7	6.3	MS	5-7	6.3	MS
15	ADEL	3-5	4.3	MR	5-5	5	T	5-7	6.3	MS
16	(S00787*Flip98-28C)*ILC1929	1-3	2.3	R	3-3	3	R	5-7	6.3	MS
17	(ILC4291*Flip98-129C)*S98008	3-3	3	R	1-3	2.3	R	5-7	6.3	MS
18	Flip98-138c*SEL99TH15039	1-3	2.3	R	3-3	3	R	5-7	6.3	MS
19	Flip97-220C*Flip98-178c	3-3	3	R	1-3	2.3	R	5-7	6.3	MS
20	Flip98-130C*Flip97-23C	3-5	4.3	MR	3-3	3	R	5-7	6.3	MS
21	(Flip97-81c*Flip97-25c)*ICCV2	3-5	4.3	MR	3-5	4.3	MR	5-7	6.3	MS
22	Gazvin-IDKUr-2011-3Ur-1	3-5	4.3	MR	3-3	3	R	5-7	6.3	MS
23	Gazvin-IDKUr-2011-13Ur-3	3-3	3	R	3-3	3	R	5-7	6.3	MS
24	Gazvin-IDKUr-2011-45Ur-7	3-5	4.3	MR	3-3	3	R	5-7	6.3	MS
25	Gazvin-IDKUr-2011-50Ur-8	3-5	4.3	MR	3-3	3	R	5-7	6.3	MS
26	Gazvin-IDKUr-2011-59Ur-10	3-5	4.3	MR	۳-۳	3	R	5-7	6.3	MS
27	Gazvin-IDKUr-2011-67Ur-11	3-5	4.3	MR	۳-۳	3	R	5-7	6.3	MS
28	Gazvin-IDKUr-2011-715Ur-13	3-5	4.3	MR	3-3	3	R	5-7	6.3	MS
29	Gazvin-IDKUr-2011-72Ur-14	1-3	2.3	R	3-3	3	R	5-7	6.3	MS
30	Gazvin-IDKUr-2011-93Ur-15	3-5	4.3	MR	3-3	3	R	5-7	6.3	MS
31	ILC72	1-3	2.3	R	3-5	4.3	MR	5-7	6.3	MS

32	ILC484	3-5	4.3	MR	3-3	3	R	5-7	6.3	MS
33	ILC482	3-5	4.3	MR	1-3	2.3	R	5-7	6.3	MS
34	Flip 84- 92c	3-5	4.3	MR	1-3	2.3	R		6.3	MS
35	Flip 84-182C	3-5	4.3	MR	1-3	2.3	R	5-7	6.3	MS
36	Flip 85-01C	3-5	4.3	MR	1-3	2.3	R	5-7	6.3	MS
37	Flip86-05C	1-3	2.3	R	1-3	2.3	R	5-7	6.3	MS
38	Flip86-06C	3-5	4.3	MR	1-3	2.3	R	5-7	6.3	MS
39	Flip87-45C	1-3	2.3	R	3-3	3	R	5-7	6.3	MS
40	Flip 88-85C	1-3	2.3	R	1-3	2.3	R	5-7	6.3	MS
41	Flip 93-58C	1-3	2.3	R	1-3	2.3	R	5-7	6.3	MS
42	Flip98-121C	3-5	4.3	MR	1-3	2.3	R	5-7	6.3	MS
43	Flip 01-29C	3-5	4.3	MR	1-3	2.3	R	5-7	6.3	MS
44	Jam	5-7	6.3	MS	5-5	5	T	5-7	6.3	MS
45	Bivanij	7-9	7.6	S	7-9	7.6	S	7-9	7.6	S

منابع

۱- ارشاد، ج. ۱۳۷۴ . قارچهای ایران. سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی. وزارت کشاورزی. تهران: ۸۷۴.

۲- شریف، قوام الدین.، امیل نیمان و محمد قانع. ۱۳۴۵. بیماری برق زدگی نخود ایرانی. مجله بیماریهای گیاهی. تهران. اوین. شماره ۳۱-۵۷-۲۵.

۳- محمودی، ف و بنی هاشمی، ض. ۱۳۷۹. بررسی تشکیل فرم جنسی و پراکندگی تیپهای آمیزش سازگاری جنسی(mating type) قارچ *Didymellarabiei*، عامل برق زدگی نخود در استان فارس. خلاصه مقالات چهاردهمین کنگره گیاهپزشکی ایران.، اصفهان:

۴- محمودی، ف، ۱۳۸۲. گزارش نهایی طرح بررسی در آزمایش بین المللی خزانه بیماری برق زدگی نخود. انتشارات معاونت مؤسسه تحقیقات کشاورزی دیم، کرمانشاه-سرارود. شماره ۶۷ .

5- Hajedorn, D.J. 1989. Compendium of pea Diseases.APS Press. Minnesota. USA. 57 PP.

6- Kaiser, W. J. 1973. Factors affecting growth, sporulation, pathogenicity and survival of*Ascochytarabiei*.Mycologia., 65(2):444-457.

7- Sabaghpour, S.H. 2001. Major disease for chickpea in Iran, in proceeding of symposium for Grain Legumes in The Mediterranean Agriculture(LEGMED): 25-27. Oct, 2001,Rabot, Moroco.

8- Singh, K.B., and Reddy, M.V. 1991. Advances in disease resistance breeding in chickpea.Advancesin Agronomy. Vol. 45: 191-222.

کارایی مدل GolPhyto

برای پیش‌آگاهی طغیان بیماری بادزدگی فیتوفترایی سیب‌زمینی در گرگان

محمدعلی آقاجانی

بخش تحقیقات گیاه پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان، ایران

* نویسنده مسئول: *maaghajanina@yahoo.com*

چکیده

بادزدگی فیتوفترایی ناشی از *Phytophthora infestans*، یکی از بیماری‌های مهم سیب‌زمینی در دنیا و ایران، به ویژه در استان گلستان می‌باشد. یکی از موثرترین روش‌های مدیریت بیماری، استفاده از مدل‌های پیش‌آگاهی است. به تازگی، با استفاده از داده‌های آب و هوایی و وقوع بیماری طی ۱۴ سال گذشته، یک مدل پیش‌آگاهی با نام GolPhyto ساخته شد که از داده‌های دما، رطوبت نسبی و بارش روزانه‌ی فروردین‌ماه، در قالب چهار متغیر nTRH10،nTRHPR10، nTRHPR10 و nTRHP20 استفاده می‌کند. با محاسبه‌ی مقدار این متغیرها برای فروردین‌ماه سال ۱۳۹۵، مشخص شد که احتمال وقوع بیماری به‌صورت طغیانی بسیار بالاست. مقدار متغیر پیشگوی nPR10 (تعداد روزهای دارای شرایط بارانی مناسب برای بیماری) در فروردین ماه سال‌های بدون طغیان و دارای طغیان بیماری به‌ترتیب کمتر از ۱۷ (متوسط ۱۵/۶) و بیشتر از ۲۵ (متوسط ۳۲/۵) بود، اما مقدار آن در فروردین سال ۱۳۹۵ برابر با ۳۵ بوده است. بنابراین، پیش‌بینی وقوع بیماری انجام شد و اطلاع‌رسانی در سطح منطقه صورت پذیرفت. در نتیجه، کشاورزان با آمادگی قبلی توانستند سمپاشی به‌موقع انجام داده، از طغیان بیماری جلوگیری نمایند.

واژگان کلیدی: سیب‌زمینی، بیماری بادزدگی، *Phytophthora infestans*، پیش‌آگاهی، متغیرهای آب و هوایی

مقدمه

بیماری بادزدگی، ناشی از شبه‌قارچ *Phytophthora infestans*، مهم‌ترین بیماری سیب‌زمینی در دنیا، به‌ویژه در مناطق خنک و مرطوب است. در مورد اهمیت این بیماری، تنها کافی است که به قحطی ایرلند شاره شود. همه‌گیری‌های بیماری بادزدگی در دهه‌ی ۱۸۴۰، قحطی سیب‌زمینی در ایرلند را به‌وجود آورد که بر اثر آن حدود ۱/۵ میلیون نفر از مردم این کشور از بین رفتند و همین تعداد نیز کشور را (غالباً به مقصد آمریکا) ترک کردند (۴ و ۸).

داده‌های دما، رطوبت نسبی و ریزش باران طی هر فصل زراعی، برای پیش‌بینی طغیان بیماری مورد استفاده قرار گرفته است. استفاده از قارچکش‌ها، بر اساس پیش‌بینی مدل پیش‌آگاهی و اطلاع رسانی به کشاورزان صورت می‌پذیرد. سیستم‌های اولیه‌ی پیش‌آگاهی مورد استفاده در بادزدگی عبارتند از: سیستم هایر (۵، ۶ و ۸)، سیستم والین (۱۰، ۱۱ و ۱۲) و بلایت کست (که دو سیستم قبلی را در هم ادغام کرده است) (۷). در وب سایت مدیریت تلفیقی آفات (IPM) دانشگاه کالیفرنیا، دیویس، ۱۶

مدل پیش‌آگاهی برای بیماری بادزدگی سیب‌زمینی شرح داده شده است که دما و رطوبت نسبی هوا و مقدار بارش، مهم‌ترین متغیرهای استفاده شده در آن‌ها بوده است (۹).

از وضعیت بیماری در نقاط مختلف کشور، اطلاع دقیقی در دست نیست، اما بر اساس اطلاعات موجود در نزد کشاورزان قدیمی، این بیماری از سال‌های دور در منطقه‌ی گرگان وجود داشته، خسارت‌های شدیدی را به محصول سیب‌زمینی وارد کرده است و موجب شده تا حتی بیش از سه مرتبه سمپاشی برای کنترل بیماری انجام شود. تحقیق در رابطه با پیش‌آگاهی بیماری، از سابقه‌ی چندانی برخوردار نیست. آقاجانی (۱) برای بررسی احتمال وقوع بیماری، ۲۴ متغیر آب و هوایی طی ۶ دوره‌ی زمانی (تمام فروردین ماه، دهه‌ی اول، دهه‌ی دوم، دهه‌ی سوم، بیست روز اول و بیست روز آخر آن) را مورد مطالعه قرار داد. پس از مقایسه‌ی مدل‌های آماری ساخته شده، مشخص شد که استفاده از تمام فروردین ماه نسبت به سایر دوره‌ها برای مدل سازی مناسب‌تر است و چهار مدل دومتغیره با استفاده از متغیرهای میزان بارندگی (P)، تعداد روزهای بارانی (R)، حداکثر نسبی دما (Tax) و رطوبت نسبی هوا (RHax) ساخته شد که از صحت کلی ۱۰۰-۸۰ درصد و ضریب تبیین ۹۹/۹۹ درصد برخوردار بودند (۲).

آقاجانی (۳) مدلی با عنوان GolPhyto را ارایه نمود که از چهار متغیر nTRH10،nTRHPR10،nRH10 و nTRHP20 برای پیش‌بینی احتمال وقوع بیماری استفاده می‌کند. از میان این چهار متغیر، nTRH10 قوی‌ترین رابطه را با وقوع یا عدم وقوع بیماری نشان داده است، به‌طوری‌که میانگین مقدار این متغیر در سال‌های بدون بیماری و دارای بیماری به ترتیب ۴۵ و ۱۱۸/۷۵ بوده و درجه‌ی صحت پیش‌بینی مدل نهایی صد در صد بود.

هدف از انجام این تحقیق، بررسی کاربردی چهار شکل مختلف مدل GolPhyto و تعیین کارایی آن در منطقه‌ی سرخنکلاته‌ی گرگان بر اساس شرایط آب و هوای فروردین‌ماه بود به‌طوری‌که بتوان وقوع بیماری را قبل از وقوع پیش‌بینی کرد و آمادگی لازم جهت مقابله با بیماری را در کشاورزان ایجاد نمود. بی‌تردید، پیش‌بینی درست عدم وقوع، مانع سمپاشی‌های غیر ضروری شده، پیش‌بینی درست وقوع بیماری نیز آمادگی قبلی را در کشاورزان جهت مقابله‌ی بهتر با بیماری فراهم خواهد نمود.

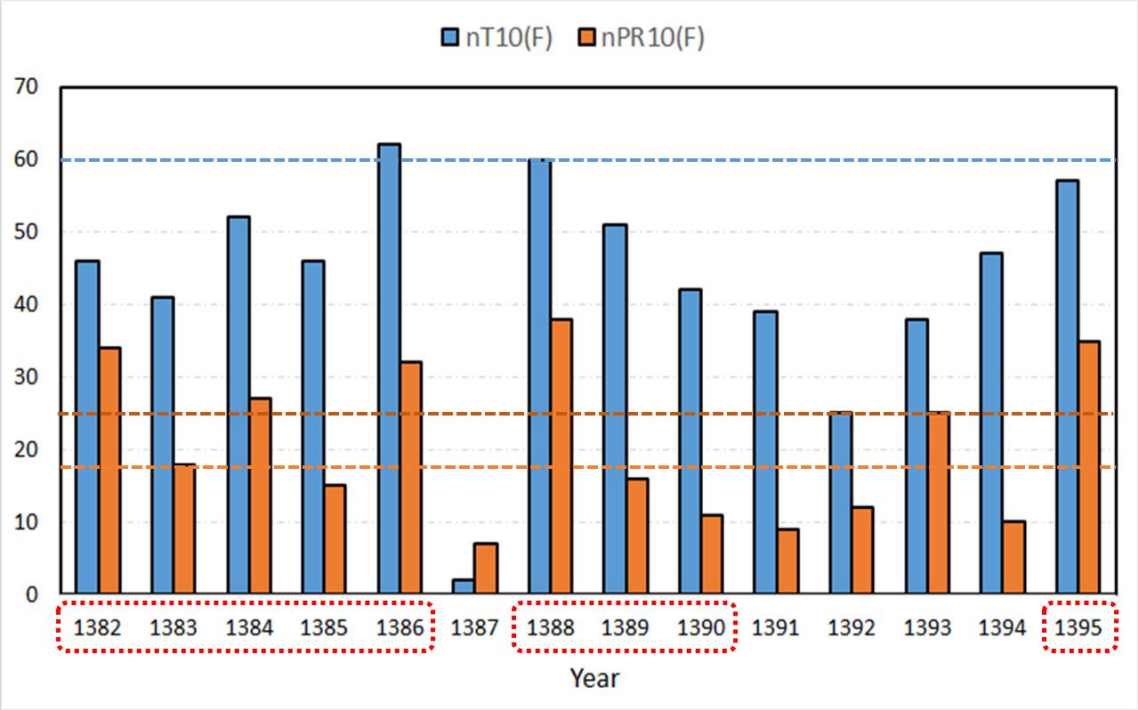
مواد و روش‌ها

مدل GolPhyto بر اساس وضعیت همه‌گیری بیماری بادزدگی فیتوفترایی سیب‌زمینی در منطقه‌ی سرخنکلاته در شرق شهرستان گرگان طی ۱۰ سال (از ۱۳۸۲ تا ۱۳۹۱) و داده‌های آب و هوایی منطقه طی ده سال اخیر از ایستگاه هواشناسی هاشم آباد گرگان واقع در فاصله‌ی ۲۰ کیلومتری منطقه‌ی مورد نظر که دارای عرض جغرافیایی و شرایط محیطی مشابه با منطقه‌ی یادشده است، ساخته شد. با در نظر گرفتن وضعیت بیماری در سال‌های ۱۳۹۳ و ۱۳۹۴، مدل اصلاح گردید و برای ارزیابی توان پیش‌بینی مدل در سال ۱۳۹۵، داده‌های آب و هوایی از ایستگاه هواشناسی هاشم آباد دریافت شد و پس آماده‌سازی با استفاده از نرم‌افزار Microsoft Excel 2013 انجام شد. تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار آماری StatGraphics Centurion XVI (شرکت StatPoint Technologies, Inc. 2010) صورت پذیرفت.

نتایج و بحث

بر اساس مدل GolPhyto، کلیه‌ی متغیرهای آب و هوایی مساعد برای وقوع اپیدمی بیماری در بهار سال ۱۳۹۵ فراهم شده بود؛ به‌عنوان مثال مقدار nT10 (تعداد روزهای دارای شرایط دمایی مناسب برای بیماری) در فروردین‌ماه، در سال‌های بدون طغیان و دارای طغیان بیماری به ترتیب کمتر از ۶۰ (متوسط ۴۳/۶) و بیشتر از ۶۰ (متوسط ۶۶/۹) بود و مقدار این متغیر در فروردین‌ماه سال جاری برابر با ۵۷ بوده است. متغیر دیگر پیشگو برای اپیدمی بیماری، nPR10 (تعداد روزهای دارای شرایط بارانی مناسب برای بیماری) بود که مقدار آن در فروردین ماه سال‌های بدون طغیان و دارای طغیان بیماری به ترتیب کمتر از ۱۷ (متوسط ۱۵/۶) و بیشتر از ۲۵ (متوسط ۳۲/۵) بود، اما مقدار آن در فروردین امسال برابر با ۳۵ بوده است. بنابراین شرایط

آب و هوایی برای وقوع اپیدمی بیماری در اردیبهشت‌ماه سال جاری، کاملاً فراهم بود. با نگاهی به تاریخچه‌ی بیماری در سال‌های قبل، مشخص شد که از اولین هفته‌ی اردیبهشت‌ماه می‌توان انتظار ظهور بیماری را داشت.



شکل ۱- وضعیت دو متغیر nT10 و nPR10 مورد استفاده در مدل‌سازی اپیدمی‌های بیماری بادزدگی فیتوفترایی سیب‌زمینی طی سال‌های ۱۳۸۲ تا ۱۳۹۵ در منطقه‌ی گرگان. خطوط خط‌چین روی ستون‌ها، مرز سال‌های طغیانی و غیر طغیانی دو متغیر را نشان می‌دهد و کادرهای نقطه‌چین اطراف سال‌ها در زیر ستون‌ها، سال‌های دارای بیماری را نشان می‌دهد.

متغیر پیش‌گو	دوره	مقدار (میانگین ۱۳۸۲ تا ۱۳۹۴)		مقدار سال ۱۳۹۵
		سال غیر اپیدمی	سال اپیدمی	
nT	پاییز قبل	< 75 (68.8)	> 76.5	66
minT	زمستان	< -3.5 (-5.9)	> -2.5 (-1.7)	-1.8
RD	زمستان	< 26 (23.8)	> 29 (31.2)	30
nT10	کل دوره	< 260 (246)	> 260 (264.3)	259
nPR10	کل دوره	< 83 (78)	> 88 (113)	117
ATmax	فروردین	> 20 (21.0)	< 20 (18.6)	19.5
AT	فروردین	> 14.6 (15.3)	< 14.6 (13.6)	13.9
P	فروردین	< 30 (24.9)	> 25 (48.3)	38.7
HD	فروردین	> 7 (8.6)	< 6.5 (4.6)	2
nT10	فروردین	< 60 (43.6)	> 60 (66.9)	57
nPR10	فروردین	< 17 (15.6)	> 25 (32.5)	35

با عنایت به این پیش‌بینی، پیشنهاد گردید که کارشناسان و کشاورزان آشنا با علایم بیماری، به‌محض مشاهده‌ی اولین علایم (به‌خصوص در ارقام حساس نظیر آلمرا، آریندا و اسپرینت) اقدام به سمپاشی مزرعه نمایند. برای این منظور، قارچکش‌های مانکوزب، داکونیل، اکروبات ام زد، اگریفوس، نوردوکس، ران من و پروکسانیل به‌صورت پیشگیری توصیه شد. در صورت مساعد بودن شرایط آب و هوایی و ادامه‌ی پیشرفت علایم بیماری، بعد از ۱۴-۱۰ روز (بسته به دوره‌ی کارنس قارچکش) توصیه گردید که با یکی از قارچکش‌های اکوایشن پرو، رزالاکسیل یا اینفینیتو سمپاشی مجدد انجام گردد.

منابع

۱. آقاجانی، م. ع. ۱۳۹۱. بررسی احتمال وقوع بیماری بادزدگی فیتوفترایی سیب‌زمینی در گرگان بر اساس شرایط آب و هوایی. پژوهش‌های کاربردی در گیاهپزشکی ۱: ۸۰-۶۷.

۲. آقاجانی، م. ع. ۱۳۹۳. بررسی کارآیی مدل‌های هایر و والین در پیش آگاهی بیماری بادزدگی فیتوفترایی سیب‌زمینی در گرگان. تحقیقات بیماری‌های گیاهی ۳: ۱۶-۱.

۳. آقاجانی، م. ع. ۱۳۹۳. مدلی برای پیش آگاهی بیماری بادزدگی فیتوفترایی سیب‌زمینی در گرگان. پژوهش‌های تولید گیاهی ۲۱: ۱۱۶-۹۹.

4. Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology. Elsevier Academic Press, the United States of America.
5. Hyre, R. A. 1954. Progress in forecasting late blight of potato and tomato. Plant Disease Reporter 38:245-253.
6. Hyre, R. A. 1955. Three methods of forecasting late blight of potato and tomato in northeastern United States. American Potato Journal 32:362-371.
7. Krause, R. A., Massie, L. B., and Hyre, R. A. 1975. BLITECAST, a computerized forecast of potato late blight. Plant Disease Reporter 59:95-98.
8. Schumann, G. L., and D'Arcy, C. J. 2005. Late blight of potato and tomato. in: The Plant Health Instructor. APS Press.
9. UC IPM Online, 2012. Models: Potato late blight. University of California, Davis. URL: http://www.ipm.ucdavis.edu/DISEASE/DATABASE/potatolateblight.html.
10. Wallin, J. R. 1951. Forecasting tomato and potato late blight in the northcentral region. Phytopathology 41:37.
11. Wallin, J. R. 1962. Summary of recent progress in predicting the late blight epidemics in United States and Canada. American Potato Journal 39:306-312.
12. Wallin, J. R., and Waggoner, P. E. 1950. The influence of climate on the development and spread of *Phytopthora infestans* in artificially inoculated potato plots. Plant Disease Reporter 190 (Suppl.):19-33.

معرفی باکتری *Serratia nematidifila* به عنوان عامل موثر در القاء مقاومت در مرکبات نسبت به بیماری بلاست

فرید بیکی*[۱]، آنتونی بوسکت[۲]، ستاره حبیب زاده[۳]، محمد ادبی[۴]

۱- موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

۲-گروه میکروبیولوژی دانشگاه UIB، اسپانیا

۳- بابل- خیابان شریعتی- دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل- دانشکده دانشکده علوم پایه، کدپستی: ۴۷۱۴۸۷۱۱۶۷

۴-دانش‌آموخته کارشناسی ارشد دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان، ایران

** نویسنده مسئول : F.beiki@gmail.com*

چکیده

بیماری بلاست مرکبات یکی از مهمترین بیماری‌های مرکبات در استان‌های شمالی کشور می‌باشد که به وسیله جدایه سودوموناس(*Pseudomonas*) ایجاد می‌شود. به‌دلیل شرائط اقلیمی مساعد، خسارت‌های زیادی را به باغات مرکبات، وارد می‌سازد. برای پیشگیری از این بیماری، از ترکیبات شیمیائی استفاده می‌شود، که ضمن خطر برای انسان و محیط زیست، احتمال بروز جدایه‌های مقاوم باکتری نسبت به سموم را نیز افزایش می‌دهد. در این بررسی، سعی شد تا از مناطق شمال کشور، باکتری‌هائی جداسازی و معرفی شوند که دارای برترین توان کنترل بیولوژیک بر علیه این بیمارگر باشند. ارزیابی در شرائط گلخانه‌ای و بر روی نهال نارنج صورت گرفت. پاشش باکتری سه بار و به فواصل دو روزه انجام شده پس از مایه‌زنی بیمارگر صورت گرفت. جدایه‌های برتر در یک طرح بلوک‌های کامل تصادفی و مقایسه میانگین تاثیر کاهش بیماری به روش دانکن، انتخاب شدند. برای شناسائی، با کمک دو پرایمر F27 و R1492 ، ناحیه16s rDNA آنها، تکثیر و تعیین ترادف شد. با مقایسه نتایج در پایگاه اینترنتی BLAST، کلیه جدایه‌های برتر به عنوان *Serratia nematidifila* شناسائی شدند.

واژگان کلیدی: بلاست مرکبات، کنترل بیولوژیک، *Serratia, Pseudomonas*

مقدمه

مرکبات با تولید سالانه حدود ۴ میلیون تن، یکی از مهم‌ترین محصولات باغبانی در کشور می‌باشد (۱). بسیاری از بیماگرهای ویروسی، قارچی و باکتریایی سبب ایجاد بیماری و خسارت‌های قابل توجهی بر روی این گیاه می‌شوند. یکی از مهمترین بیماری‌های باکتریایی آن می‌توان به بیماری بلاست مرکبات اشاره نمود که از جمله بیماری شایع در اکثر نقاط مرکبات‌خیز دنیا به استثنای مناطق گرمسیر می‌باشد (۲). در شرائط اقلیمی شمال ایران، به دلیل وجود رطوبت بالا و دمای مناسب، بیماری بلاست خسارت قابل توجهی را بصورت پژمردگی و خشکیدگی سرشاخه‌ها ایجاد می‌کند. در دنیا باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* به عنوان عامل بیماری معرفی شد(۲). در ایران، بررسی‌های اولیه نشان داد باکتری عامل بیماری در بعضی از نقاط مازندران *P. s.* pv. *syringae* و در نواحی دیگری از استان *Pseudomonas viridiflava* Dowson 1939 (Burkholder 1930) می‌باشد (۳). بررسی‌های اخیر نیز نشان می‌دهد باکتری‌های دیگری از جنس سودوموناس نیز سبب این بیماری می‌شوند، من جمله: *P. lurida*، *P. monteilii*، *P. moraviensis*، *P. orientalis.*

و *P. simiae* که تاکنون به عنوان عوامل بیماری‌زای این بیماری نیز معرفی شده‌اند (۴). در جنوب ایران، تاکنون گزارشی از وجود بیماری ارایه نشده است (۵; ۶). برای کنترل این بیماری معمولاً استفاده از سموم شیمیائی توصیه می‌شود (۷)، اما با مصرف مداوم این ترکیبات، ضمن خطر گیاه‌سوزی، احتمال بروز جدایه‌های مقاوم باکتری(۸)، خطرات سوء زیست محیطی را نیز به‌دنبال خواهد داشت. بنابراین در سال‌های اخیر تلاش بر این بوده است تا با کاهش مصرف سموم شیمیایی، استفاده از سایر روش‌های جایگزین برای کاهش خسارت‌های بیماری‌ها، افزایش یابد. روش‌هایی نظیر استفاده از ارقام مقاوم، رعایت بهداشت زراعی، کنترل بیولوژیکی و نیز روش مبارزه تلفیقی. از میان آن‌ها استفاده از کنترل بیولوژیکی به دلیل عدم خطرات زیست محیطی از جایگاه ویژه‌ای برخوردار می‌باشد. القاء مقاومت و به‌دنبال آن بیان پاسخ‌های دفاعی در اثر محرک‌های آنتاگونیست‌های میکروبی نیز به عنوان نوعی دیگر از مکانیسمهای بیوکنترل معرفی شده است (۹). گیاهان بطور مداوم در تماس با طیف گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌ها قرار می‌گیرند، علی رغم این، تنها تعداد معدودی از این عوامل میکروبی قادرند تا در گیاه بیماری را ایجاد نمایند. این پدیده تحت عنوان مقاومت غیر میزبانی نامیده می‌شود (۱۰). مقاومت ایجاد شده شامل ایجاد سدهای ساختاری و نیز تولید ترکیبات ضدمیکروبی مستمر می‌باشد. تحریک پاسخ‌های دفاعی مشتمل بر تجمع سیگنال‌های مولکولی مرتبط با استرس یعنی سالیسیلیک اسید (SA) و جاسمونییک اسید (JA)، بیان مولکول‌های ضد میکروبی و تولید ترکیبات فنله نظیر فیتوالکسین و تقویت سدهای دیواره سلولی خواهد بود (۱۱). نه تنها تماس با موجودات زنده سبب تحریک بیان چنین مکانیسم‌های دفاعی خواهد شد بلکه چندین ترکیبات مشتق یافته از عوامل بیمارگرها نیز سبب القاء بیان مکانیسم‌های دفاعی خواهند شد که به آن محرک‌های عمومی (General elicitor) و یا مولکول‌های مرتبط با بیمارگرها نامیده می‌شوند (Pathogen-associated molecular patterns-PAMP) و مشتمل بر پپتیدها، گلیکوپروتئین‌ها، الیگوساکاریدها و یا چربی‌ها می‌باشند (۱۲). اصولاً افزایش مقاومت در گیاهان برای کشاورزی کاربردی جالب، قابل توجه و ارزشمند می‌تواند باشد. محرک‌ها می‌بایست غیرسمی، قابل تجزیه در محیط و نیز ارزان قیمت باشند. برخی از عوامل میکروبی این مزایا را داشته و از این‌رو در بررسی‌های مختلف به منظور تحریک مقاومت گیاهی بر علیه عوامل بیماریزا، کاربرد روزافزونی پیدا نموده‌اند. تا کنون باکتری‌های متنوعی به عنوان عامل القاء مقاومت در برابر گیاهان مختلف معرفی شده‌اند(۱۳; ۱۴). برخی از گونه‌های جنس سراشیا نیز دارای چنین توانایی‌ای هستند، نظیر *Serratia* marcescens موثر در القاء مقاومت در گیاه برنج بر علیه بیماری بلاست برنج (۱۵)، *Serratia plymuthica* موثر در القاء مقاومت در بوته خیار نسبت به بیمارگر پی‌تیوم(۱۶). این امید نیز متصور است تا بتوان با استفاده از این عوامل میکروبی، سبب کاهش بیمارگرها شد. لذا کاهش مصرف سموم به عنوان فصل نوین و مهمی در توسعه کشاورزی پایدار محسوب می‌گردد و بنظر می‌رسد این‌نوع استراتژی در خصوص کنترل بیماری بلاست مرکبات، نقش مهمی در سیستم مدیریت تلفیقی جهت کنترل این بیماری، ایفا کند.

مواد و روش‌ها

جداسازی باکتری آنتاگونیست

برای جدا سازی باکتری‌های آنتاگونیست، از باغات متروکه‌ای که معمولا سم‌پاشی در آن‌ها انجام نمی‌گرفت و در ضمن درختان آن، فاقد هرگونه علائم بیماری بلاست بوده‌اند، نمونه‌هائی از برگ و میوه جمع‌آوری گردید. باکتری‌ها در آزمایشگاه با کمک محیط کشت نوترینت اگار، جداسازی شدند. برای ثبت موقعیت جغرافیائی جدایه‌های جمع‌آوری شده، از دستگاه موقعیت‌یاب جهانی (Global Positioning System)با مدل GPS Etrex Vista HCx استفاده شد.

ارزیابی توان بیوکنترلی باکتری در گلخانه

برای ارزیابی امکان القاء مقاومت در گیاه، درخت ۲ ساله نارنج تهیه و ۴ هفته قبل از بررسی در شرائط گلخانه‌ای، کلیه آنها سربرداری شدند تا در زمان آزمون، کلیه گیاهان دارای برگ‌های تازه و تقریباً هم سنی نیز باشند. در این مدت ضمن آبیاری مداوم، از مصرف هرگونه کود و یا سموم شیمیائی به گیاه خودداری شد

برای تهیه باکتری از کشت ۲۴ ساعته جدایه *Pseudomonas syringae* FBF65 که پیشتر مشخصات و بیماری‌زایی آن اثبات شده بود استفاده شد(۴). با کمک اسپکتروفوتومتر سوسپانسیونی معادل $۱۰^{۸}$ سلول در هر میلی‌لیتر از این باکتری، تهیه شد.

بررسی امکان القاء مقاومت در گیاه با کمک پاشش سوسپانسون باکتری آنتاگونیست

برای بررسی امکان القاء مقاومت در گیاه بر علیه بیمارگر بلاست مرکبات، به ازاء هر تیمار باکتری انتاگونیست، ۴ نهال نارنج با برگ‌های جوان و تقریباً هم سن، در نظر گرفته شد. سوسپانسیون باکتری‌ها با غلظت $۱۰^{۱۰}$ سلول در هر میلی‌لیتر، بر روی گیاه اسپری شدند. اسپری باکتری‌های آنتاگونیست به فواصل ۲ روز، مجدداً تکرار گردید. پس از طی ۶ روز از اولین پاشش باکتری‌ها، بیمارگر بلاست غلظت $۱۰^{۱۰}$ سلول در هر میلی‌لیتر، بر روی هر برگ تزریق شده و دور ناحیه آبسوخته شده در اثر تزریق سوسپانسیون بیمارگر، علامت‌گذاری شد. پس از یک هفته نگهداری در دمای ۱۵ درجه سانتیگراد با رطوبتی در حد اشباع، میزان گسترش علائم و نیز ناحیه اولیه تزریق بیمارگر، با کمک دستگاه Dino Capture بر حسب میلی‌متر مربع ثبت گردید. این آزمون به ازاء هر تیمار، از ۲۵ برگ استفاده شد که بر روی هر دو سمت آن آزمون انجام شد بطوریکه در مجموع به ازاء هر تیمار، با ۵۰ تکرار، انجام شد.

شناسایی آنتاگونیست

تکثیر ژن 16s rDNA

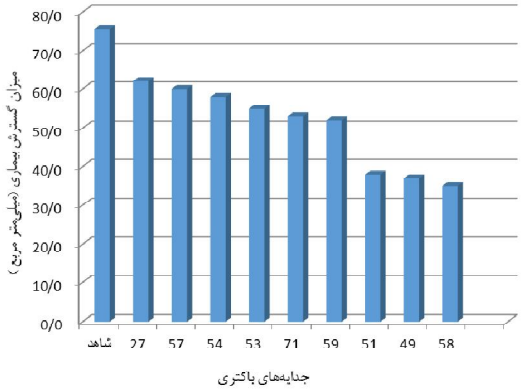
واکنش در حجم نهائی ۵۰ میکرولیتر و با استفاده از آغازگرهای زیر انجام شد (۱۷)

F27 : 5´-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG- 3´
R1492: 5´-TACGGYTACCTTGTTACGACTT- 3´

مخلوط واکنش شامل ۱ میکرولیتر DNA، ۲/۵ میکرولیتر PCR buffer 10X، ۰/۵میکرومولار از هر نوع آغازگر، ۰/۵ میلی مولار dNTPs و ۱/۵ واحد *Taq* پلی‌مراز بود. مرحله واسرشته‌سازی اولیه در دمای $۹۴^{o}c$ به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۵ چرخه مجزا (شامل واسرشته سازی در دمای $۹۴^{o}c$ به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگر به DNA ژنومی به مدت یک دقیقه در دمای $۵۵^{o}c$ و تکثیر DNA در دمای $۷۲^{o}c$ به مدت ۹۰ ثانیه) و در آخر یک مرحله بسط نهائی در دمای $۷۲^{o}c$ به مدت ۱۰ دقیقه در نظر گرفته شد.

نتایج وبحث

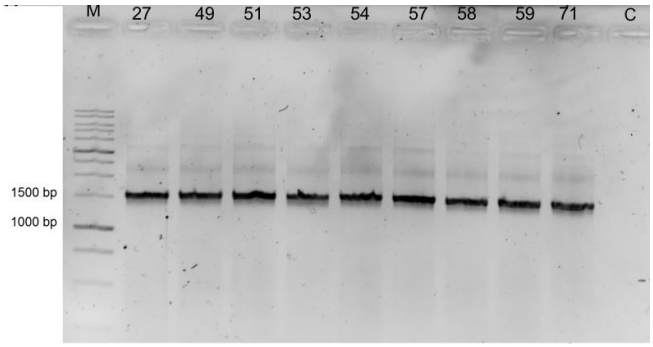
در بررسی امکان القاء مقاومت بر روی نهال مرکبات با استفاده از پاشش سوسپانسیون باکتری‌های آنتاگونیست، بر روی شاخ و برگ نهال مرکبات، ۷ روز پس از تلقیح بیمارگر به برگ نارنج، میزان گسترش بیماری بر حسب میلی‌مترمربع و با کمک دستگاه Dino capture ثبت گردید. کلیه داده‌ها، بصورت طرح بلوک کاملاً تصادفی با استفاده از نرم‌افزار SAS تجزیه و تحلیل آماری شدند. نتایج نشان می‌دهد بین تیمارها در مقایسه با شاهد اختلاف معنی‌داری در سطح ۱٪ وجود دارد. مقایسه میانگین‌ها با روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح ۱٪، بیانگر این مطلب می باشد (شکل ۱).



شکل ۱- مقایسه میانگین گسترش بیماری (بر حسب میلی‌متر مربع) ناشی از القاء مقاومت توسط پاشیدن باکتری بر روی نارنج و گروه‌بندی آنها بر اساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۱٪

شناسایی باکتری‌های موثر بر اساس خصوصیات ژنتیکی

برای شناسایی باکتریها، ناحیه 16s rDNA آنها تعیین ترادف شد. با PCR این ناحیه، باندهایی در حدود ۱۵۰۰bp تولید شد(شکل۲)



شکل۲- قطعه تکثیر شده ITS در۹ جدایه‌های باکتری آنتاگونیست، M نشانگر جرم مولکولی و C کنترل منفی.

نتایج حاصل از تعیین ترادف، با کمک پایگاه Standard Nucleotide BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) تحت عنوان *Serratia nematidifila* شناسایی شدند. در سال‌های گذشته، در خصوص توانایی آنتاگونیستی باکتری‌ها تحقیقات بسیاری انجام شده است. این بررسی نیز به منظور یافتن باکتری‌های مفیدی است که دارای توان نسبتاً خوبی در بیوکنترل بیماری بلاست مرکبات باشند. نتایج نشان می‌دهد، برخی از این باکتری‌های به‌دست آمده از نواحی شمالی کشور، قادرند تا شدت بروز بیماری بلاست مرکبات را، کاهش دهند و به نوعی در کنترل بیولوژیکی آن موثر واقع شوند. پیشتر نیز گزارش‌های متنوعی مبنی بر موثر بودن این گونه‌ها یا گونه‌های دیگر، از این جنس در محصولات دیگر ارایه شده است. نظیر *Serratia* marcescens موثر در القاء مقاومت در گیاه برنج بر علیه بیماری بلاست برنج، توتون و خیار (۱۵; ۱۸)، *Serratia plymuthica* موثر در القاء مقاومت در بوته خیار نسبت به بیمارگر پی‌تیوم(۱۶). افزایش مقاومت در گیاهان برای کشاورزی کاربردی بسیار جالب و جذاب می‌باشد و در صورت داشتن خصوصیاتی نظیر غیرسمی بودن و قابل تجزیه بودن در محیط و نیز در صورت قیمت ارزان، می‌توان از آنها بطور گسترده در کشاورزی استفاده نمود. از این رو برای باکتری‌های مفید می‌توان آینده‌ای درخشان را در مبحث مدیریت بیماری‌های گیاهی متصور شد.

منابع

۱- بی نام ، ۱۳۹۴. آمارنامه کشاورزی. جلد سوم، محصولات باغبانی. معاونت برنامه ریزی و اقتصادی، مرکز فناوری اطلاعات و ارتباطات. ۲۵۳ص.

2. Whiteside L., Garnesy S. and Timmer L. 1989. Campendium of Citrus Disease. Minnesota: American Phytopathology Society Press. 80 pp.
3. Shams-Bakhsh M. and Rahimian H. 1997. Comparative study on agents of citrus blast and bacterial canker of stone fruits in Mazandaran. Iranian Journal of Plant Pathology 33:132-43
4. Beiki F., Busquets A., Gomila M., Rahimian H., Lalucat J. and García-Valdés E. 2016. New Pseudomonas spp. are pathogenic to citrus. PloS one. 11:e0148796
5.Razinataj M. and Taghavi S. 2004. A comparison of Pseudomonas viridiflava isolates from different hosts by phenotypic characteristics and pathogenicity in Fars Province. Iranian Journal of Agricultural Sciences. 35:253-63
6. Taghavi S. and Ziaee M. 2003. Comparison of Pseudomonas syringae pv. syringae Van Hall isolates from different hosts based on phenotypic characteristics, serological properties and pathogenicity. Journal of Science and Technology of Agricultureand Natural Resources 7:199-213
7. Klotz L. 1978. Fungal, bacterial, and non parasitic diseases and injuries originating in the seedbed, nursery, and orchard. In The Citrus Industry: IV. Crop Protection, ed. W. Reuther, E. C. Calavan, G. E. Carman:1-66. Berkely: University of California Press. Number of 1-66 pp.
8. Gnanamanickam S. S. 2007. Plant Aassociated Bacteria. Dordrecht: Springer. 722 pp.
9. Arras G. 1996. Mode of action of an isolate of Candida famata in biological control of Penicillium digitatum in orange fruits. Postharvest Biology and Technology 8:191-8
10. Heath M. C. 2000. Current Opinion in Plant Biology 3:315-9
11. Dangl J. L, Jones J. 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. Nature 411:826-33
12.Nurnberger T., Brunner F., Kemmerling B. and Piater L. 2004. Immunological Reviews 198:249-66
13. Zehnder G., Murphy J., Sikora E. and Kloepper J. 2001. Application of rhizobacteria for induced resistance. European Journal of Plant Pathology. 107:39-50
14. Bakker P.A., Pieterse C. M. and Van Loon L. 2007. Induced systemic resistance by fluorescent Pseudomonas spp. Phytopathology 97:239-43
15. Someya N., Nakajima M., Tadaaki H., Yamaguchi I. and Akutsu K. 2002. Induced resistance to rice blast by antagonistic bacterium, Serratia marcescens strain B2 Journal of general plant pathology 68:177-82
16. Benhamou N., Gagné S., Le Quéré D. and Dehbi L. 2000. Bacterial-mediated induced resistance in cucumber: beneficial effect of the endophytic bacterium Serratia plymuthica on the protection against infection by Pythium ultimum . Phytopathology 90:45-56
17. Lane D. J. 1991. 16S-23S rRNA sequencing. In Nucleic acid techniques in bacterial systematics ed. E Stackebrandt, M Goodfellow:115-75. Chichester: John Wiley & Sons. Number of 115-75 pp.
18. Press C., Wilson M., Tuzun S. and Kloepper J. 1997. Salicylic acid produced by *Serratia marcescens* 90-166 is not the *primary determinant* of induced systemic resistance in cucumber or tobacco. Molecular Plant-Microbe Interactions 10:761-8.

بررسی فعالیت ضد قارچی کیتوزان و سالیسیلیک اسید روی قارچ عامل بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه برنج

احمد ابراهیمی تودرواری*[۱]، فاختک طلیعی [۲]، امیر ذوالفقاری [۳]

[۱] *دانشجو کارشناسی ارشد گیاه پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان*
[۲] *گروه تولیدات گشاهی دانشگاه گنبدکاووس*
[۳] *گروه کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان*
* *نویسنده مسئول: Ahmad.Ebrahimi@gmail.com*

چکیده

بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه برنج که توسط قارچ *Fusarium fujikuroi* ایجاد می‌شود، یکی از بیماری‌های مهم خاکزاد برنج است. کنترل بیماری اغلب به صورت ضدعفونی بذر با قارچ‌کش‌ها انجام می‌شود. در این پژوهش تاثیر غلظت‌های مختلف (۰، ۲۰۰، ۴۰۰ پی‌پی‌ام) کیتوزان (*Medium molecular Weight*- ساخت *Sigma–Aldrich*) و سالیسیلیک اسید (ساخت *Merk*) به صورت اختلاط با محیط کشت بر رشد میسلیومی قارچ عامل بیماری مورد بررسی قرار گرفت. پس از تهیه محیط کشت حاوی علظت‌های مختلف دو تیمار، دیسک‌هایی از حاشیه پرگنه جوان و فعال قارچ *F. fujikuroi* به قطر ۵ میلی‌متر بر روی آن کشت گردید. پتری‌ها در دمای ۲۵ درجه قرار داده شده و بعد از ۷۲ ساعت میزان رشد قارچ و درصد بازدارندگی از رشد مورد مقایسه قرار گرفت. بیشترین میزان بازداری از رشد میسلیومی قارچ مربوط به تیمار ۴۰۰ پی‌پی‌ام سالیسیلیک اسید و برابر ۳۵/۵۷ درصد بود که تفاوت معنی‌داری با میانگین درصد بازدارندگی در تیمار ۲۰۰ پی‌پی‌ام سالیسیلیک اسید (۲۵/۳۷ درصد) داشت.

واژگان کلیدی: پوسیدگی ریشه و طوقه برنج، کیتوزان، اسید سالیسیلیک

مقدمه

برنج از مهم‌ترین گیاهان زراعی دنیا می‌باشد که سطح وسیعی از اراضی زراعی قابل کشت را به خود اختصاص داده است. تولید برنج همواره با انواع تنش‌های زنده و غیرزنده مواجه می‌باشد یکی از مهم‌ترین این تنش‌ها بیمارگرهای گیاهی می‌باشند (۱). یکی از بیماری‌های مهم برنج پوسیدگی ریشه و طوقه (باکانه) می‌باشد که خسارت زیادی به این محصول در سراسر دنیا وارد می‌کند. روش متداول کنترل بیماری پوسیدگی طوقه استفاده از قارچ‌کش‌ها است که هزینه بالایی دارد و نیز دارای آثار زیست محیطی نامطلوب است. همچنین ارقام مقاوم تولید شده برای مدت محدودی کاربرد دارند زیرا در برابر تنوع بالای جمعیت بیمارگر معمولا مقاومت شکسته می‌شود.

ماده اولیه تولید کیتوزان، کیتین می‌باشد. از جمله خصوصیات مهم کیتوزان آثار ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی آن است که امروزه به‌عنوان ماده افزایش دهنده قدرت دفاعی گیاهان علیه انواع تنش‌های زیستی و غیرزیستی از جمله علیه آلودگی‌های قارچی گیاهان به‌کار می‌رود (۲). سالیسیلیک اسید در پوست درخت بید وجود دارد اسید سالیسیلیک با تحریک واکنش‌های

فوق‌حساسیت سبب جلوگیری از گسترش بیماری‌ها می‌شود. از آنجا که عوامل بیماری‌زا می‌توانند در سلول‌های زنده گسترش پیدا کنند، لذا گیاه با در پیش گرفتن این سیاست سعی در کنترل گسترش بیماری می‌کند (۸).

مطالعات چندانی روی تاثیر مستقیم این مواد بر رشد قارچ ها انجام نشده است. ولادی و همکاران (۲) نشان دادند که در مورد دو قارچ Fusarium oxysporumf. sp. ciceri و F. solani بیشترین میزان بازدارندگی از رشد قارچ در تیمار سالیسیلیک اسید ۴۰۰ دیده می شود اما اختلاف معنی‌داری با سالیسیلیک اسید ۲۰۰ ندارد. خیرالدین و همکاران (۵) در مطالعه تاثیر کاربرد غلظت‌های مختلف این دو ماده بر روی رشد میسلیومی ده قارچ بیماری‌زای گیاه گوجه‌فرنگی بر روی محیط PDA نشان دادند که میزان بازداری از رشد قارچ‌ها وابسته به غلظت بوده و بیشترین درصد بازدارندگی در بالاترین غلظت سالیسیلیک اسید و کیتوزان مشاهده گردید. نتایج مشابهی توسط باتاچاریا (۴) بر روی قارچ F. solani گزارش شده است.

مواد و روش‌ها

به منظور بررسی تاثیر مستقیم کیتوزان و اسیدسالیسیلیک بر رشد بیمارگر، محیط کشت PDA به همراه غلظت‌های مختلف (۰، ۲۰۰، ۴۰۰ پی‌پی‌ام) کیتوزان (*Medium molecular Weight*- ساخت *Sigma–Aldrich*) و سالیسیلیک اسید (ساخت Merk) تهیه شد. سپس یک دیسک از محیط کشت حاوی قارچ از حاشیه پرگنه جوان و فعال قارچ *F. fujikuroi* به قطر ۵ میلی‌متر بر روی آن کشت گردید. پتری‌ها در دمای ۲۵ درجه قرار داده شده و بعد از ۷۲ ساعت میزان رشد قارچ و درصد بازدارندگی از رشد مورد مقایسه قرار گرفت. درصد بازدارندگی از رشد میسلیوم قارچ در غلظت‌های مختلف بر اساس رابطه زیر محاسبه گردید:

$$MGI= (dc-dt)/dc\times 100$$ معادله ۱

که در آن *MGI*، متوسط درصد بازدارندگی از رشد قارچ و dt وdc به ترتیب قطرپرگنه‌ی اندازه‌گیری‌شده در نمونه‌ی تیمار و شاهد می‌باشند. آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی و با چهار تکرار اجرا شد و نتایج با استفاده از نرم‌افزار *SPSS 19* مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج و بحث

تعیین اثر مستقیم سالیسیلیک اسید و کیتوزان بر رشد میسیلیومی بیمارگر

سالیسیلیک اسید بر رشد میسیلیومی بیمارگر: بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف محلول اسیدسالیسیلیک در محیط کشت و تعیین درصد بازدارندگی آن بر میزان رشد پرگنه قارچ بیمارگر در ظروف پتری و روی محیط کشت PDA انجام گرفت. نتایج آزمایش‌ها نشان داد بین اثر غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید در میزان رشد پرگنه و بازدارندگی از رشد میسلیومی قارچ بیمارگر در مقایسه با شاهد، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود دارد (جدول ۱).

جدول ۱- تجزیه واریانس میزان رشد پرگنه قارچ و درصد بازدارندگی از رشد قارچ تحت تاثیر کاربرد سالیسیلیک اسید و کیتوزان در محیط کشت

		میانگین مربعات			
		سالیسیلیک اسید		کیتوزان	
منابع تغییرات	درجه آزادی	رشد پرگنه (mm)	درصد بازدارندگی (٪)	رشد پرگنه (mm)	درصد بازدارندگی (٪)
بین گروه‌ها	۲	۹۳۱/۰۱۷**	۱۶۷۷/۵۷۱**	۴۵۲/۰۱۷**	۸۱۴/۳۳۹**
درون گروه‌ها	۱۲	۸/۱۴۲	۱۴/۶۶۸	۶/۹۵۰	۱۲/۵۲۱
کل	۱۴				
CV%		٪۱۹/۹	٪۲۱/۸	٪۱۳/۲	٪۲۱/۷

** وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد را نشان می دهد.

بیشترین میانگین رشد پرگنه قارچ در تیمار شاهد مشاهده شد (۶۴/۵ میلی‌متر). با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید به کار رفته در محیط کشت، میانگین رشد پرگنه قارچ کاهش معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد نشان داد (جدول ۲). بیشترین میزان بازداری از رشد میسلیومی قارچ مربوط به تیمار ۴۰۰ پی‌پی‌ام سالیسیلیک اسید و برابر ۳۵/۵۷ درصد بود که تفاوت معنی‌داری با میانگین درصد بازدارندگی در تیمار ۲۰۰ پی‌پی‌ام سالیسیلیک اسید (۲۵/۳۷ درصد) داشت.

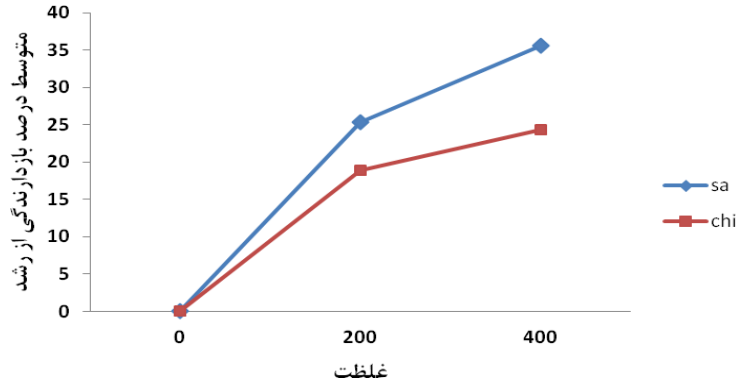
جدول -۳ مقایسه میانگین میزان رشد پرگنه قارچ و درصد بازدارندگی از رشد قارچ تحت تاثیر کاربرد سالیسیلیک اسید و کیتوزان در محیط کشت

تیمار	سالیسیلیک اسید		کیتوزان	
	رشد پرگنه (mm)	درصد بازدارندگی (٪)	رشد پرگنه (mm)	درصد بازدارندگی (٪)
شاهد	۶۴/۵ a	۰/۰ a	۶۴/۵ a	۰/۰ a
غلظت ۲۰۰	۴۵/۶۰ b	۲۵/۳۷ b	۵۰/۴۰ b	۱۸/۹۳ b
غلظت ۴۰۰	۳۸/۰۱ c	۳۵/۵۷۲ c	۴۶/۴ b	۲۴/۲۹۴ b

حروف متفاوت، وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد را نشان می دهد.

تعیین اثر مستقیم کیتوزان بر رشد میسیلیومی بیمارگر: تأثیر غلظت‌های مختلف محلول کیتوزان بر رشد میسلیومی قارچ در محیط کشت و تعیین درصد بازدارندگی آن بر میزان رشد پرگنه قارچ بیمارگر نشان داد که کاربرد غلظت‌های مختلف کیتوزان در میزان رشد پرگنه و بازدارندگی از رشد میسلیومی قارچ بیمارگر در مقایسه با شاهد، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد دارد (جدول ۲).

همچنین بیشترین میزان رشد شعاعی پرگنه قارچی پس از ۷۲ ساعت در تیمار شاهد (۶۴/۵ میلی‌متر) مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با تیمارهای ۲۰۰ و ۴۰۰ پی‌پی‌ام کیتوزان داشت. کمترین مقدار رشد پرگنه قارپی در تیمار ۴۰۰ پی‌پی‌ام کیتوزان (۴۶/۴ میلی‌متر) مشاهده شد. اما مقایسه میانگین نشان داد که مقدار رشد میسلیومی قارچ و درصد بازدارندگی از رشد قارچ در دو تیمار ۲۰۰ و ۴۰۰ پی‌پی‌ام کیتوزان اختلاف معنی‌داری ($p<0.01$) با یکدیگر نداشتند (جدول ۲).



شکل ۱- مقایسه درصد بازدارندگی از رشد میسلیومی قارچ بیمارگر در غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید و کیتوزان

نتایج نشان داد که دو قارچ *Fusarium oxysporumf.* sp. *ciceri* و *F. solani* بیشترین میزان بازدارندگی از رشد قارچ در تیمار سالیسیلیک اسید ۴۰۰ دیده می شود (۲) اما اختلاف معنی‌داری با سالیسیلیک اسید ۲۰۰ ندارد. نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر با نتایج مطالعه ماندال و همکاران (۶) مشابه بود. در این تحقیق افزایش غلظت کیتوزان در محیط کشت، تاثیر معنی‌داری بر میزان بازداری از رشد قارچ نداشت. نتایج مشابهی گزارش شده است (۲). آمبوراب و همکاران (۳) بیان کردند که کیتوزان باعث تخریب ساختمان سلولی و تراوش الکترولیت‌ها و پروتئین‌ها می‌شود که این به‌دلیل ماهیت پلی‌کاتیونی آن است. این ماده باعث تشکیل روزنه و سوراخ‌هایی در غشاء سلولی و تأثیر برآن از طریق اثر مستقیم بر H+-ATPase می‌شود. همچنین اثرات ضدقارچی سالیسیلیک اسید به تغییر دادن بسیاری از اجزای میکروسکوپی سلول خصوصا میتوکندری نسبت داده شده است (۳).

منابع

۱. اخوت، س.م. ۱۳۷۸. بیماری‌های غلات. انتشارات دانشگاه تهران. ۴۷۵ ص.

۲. ولادی، س.، سلیمانی پری، م.ج.، خداکرمیان، غ. و قیاسوند، ط. ۱۳۹۲. تأثیر سالیسیلیک اسید و کیتوزان بر القای مقاومت در نخود علیه عامل بیماریهای پژمردگی و پوسیدگی فوزاریومی. بیماریهای گیاهی ۴۹(۲): ۱۸۱-۱۹۹.

3. Amborabe, B. E., Fleurat-Lessard, P., Chollet, J. F. and Roblin, G. 2002. Antifungal effects of salicylic acid and other benzoic acid derivatives towards Eutypa lata: structure activity relationship. Plant Physiol. Biochem. 40: 1051-1060.
4. Bhattacharya, A. 2013. Fungicidal potential of chitosan against phytopathogenic Fusarium solani. Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences 1(4):259-263.
5. Khiareddine, H.J., El-Mohamedy, R.S., Abdel-Kareem, F., Ben Abdallah, R.A., Gueddes-Chahed, M., and Daami-Remadi, M. 2015. Variation in Chitosan and Salicylic Acid Efficacy Towards Soil-borne and Air-borne Fungi and their Suppressive Effect of Tomato Wilt Severity. Plant Pathology and Microbiology 6:11
6. Mandal, S., Mallick, N., and Mitra, A. 2009. Salicylic acid-induced resistance to Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici in tomato. Plant Physiol. Biochem. 47: 642-649.
7. Nandeeshkumar, P., Sudisha, J., Ramachandra, K.K., Prakash, H.S., Niranjana, S.R., and Shekar, S.H. 2008. Chitosan induced resistance to downy mildew in sunflower caused by Plasmopara halstedii. Physiol. Mol. Plant Pathology 72: 188-194.