ارزیابی مقاومت تعدادی از ارقام توتون نسبت به پژمردگی فوزاریومی و نماتد ریشه‌گرهی در شرایط طبیعی مزرعه

Evaluation of the resistance of some tobacco cultivars to fusarium wilt and root-knot nematode under natural field infection conditions

مرضیه شازده احمدی[1*] و سید افشین سجادی[1]

دریافت: ۱۳۹۳/۹/۲۵ پذیرش: ۱۳۹۴/۲/۳

چکیده

قارچ عامل پژمردگی فوزاریومی توتون (*Fusarium oxysporum* f.sp. *nicotianae*) و نماتد ریشه‌گرهی (*Meloidogyne incognita*)، از عوامل بیماری‌زای خاکزی توتون در ایران و جهان هستند. کاشت ارقام مقاوم به این عوامل بیماری‌زا، مطمئن‌ترین و موثرترین روش کنترل خسارت آن در مناطق آلوده کشور می‌باشد. در این بررسی، مقاومت شش رقم توتون شامل BCE، K17، HBT8، Burley Geel3، Burley BB163 و Burley 21 در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در گرگان طی دو سال ۹۴-۱۳۹۳ انجام شد. ارزیابی مقاومت پژمردگی فوزاریومی بر اساس روش مورمان و همکاران با مقیاس ۴-۰ به طور هفتگی و ارزیابی مقاومت به نماتد ریشه‌گرهی در انتهای فصل زراعی بر اساس تعداد گال، تعداد توده تخم و متوسط تعداد تخم در هر توده با مقیاس ۱۰-۰ انجام شد. ارزیابی شدت و سیر پیشرفت هر دو بیماری در ارقام مختلف نشان داد که شیوع این بیماری‌ها با شروع فصل گرما و رطوبت هوا در مزرعه روندی افزایشی داشت. نتایج این تحقیق نشان داد که ارقام Burley 21، Burley Geel3، Burley BB163 با شاخص حساسیت ۸، ۶ و ۶ به ترتیب در گروه‌های حساس و نیمه‌حساس قرار گرفته، رقم K17 با شاخص حساسیت ۴ در گروه نیمه مقاوم و ارقام BCE و HBT8 با شاخص حساسیت ۲ نسبت به عوامل بیماری‌زای خاکزی در گروه مقاوم قرار گرفتند. بر این اساس ارقام BCE و HBT8 به عنوان مقاوم‌ترین ارقام در شرایط مزرعه شناخته شدند.

واژگان کلیدی: توتون، بیماری خاکزاد، مقاومت به بیماری‌ها، فوزاریوم، پژمردگی

۱- محققین مرکز تحقیقات و آموزش توتون تیرتاش، بهشهر، مازندران

مسئول مکاتبات: noshinshazdeahmadi@yahoo.com

مقدمه

توتون (*Nicotiana tabacum* L.) از تیره بادمجانیان و یکی از مهم‌ترین گیاهان زراعی است. سطح زیر کشت توتون سیگارت در سال ۱۳۹۳ در ایران ۶۱۰۰ هکتار و تولید برگ خشک آن ۱۱۰۰۰ تن بوده است (Anonymous, 2012).

شناخت و استفاده از توانایی‌های ذاتی گیاهان در مقابله با بیماری‌ها یا به عبارتی مقاومت آن‌ها در مقابل این عوامل خسارت‌زا و کاهش دخالت نامطلوب در اکوسیستم‌های طبیعی از اهمیت زیادی برخودار است (Ahmadi and Mortazavi bac, 2005). گرچه نظریه عدم استفاده از سموم در حال حاضر یک هدف آرمانی و دور از دسترس به نظر می‌رسد، ولی ایده استفاده تلفیقی از روش‌های مختلف با محوریت ارقام مقاوم راه حل نزدیک شدن به این آرمان است (Starr *et al*., 2002). گسترش یک گونه گیاهی جدید در هر منطقه همواره با خطراتی از جمله بیمارگرهای گیاهی مواجه است، لذا به منظور پیشگیری از وقوع خسارت، باید مقاومت ارقام مختلف در مناطق آلوده مورد ارزیابی و گزینش قرار گیرد. با توجه به اهمیت اقتصادی گیاه توتون و نقشی که در بالا بردن درآمد سرانه ایفا می‌نماید، بالا بردن کمیت و کیفیت آن دارای اهمیت زیادی است. توتون، مانند سایر محصولات زراعی مورد هجوم بسیاری از عوامل بیماری‌زا قرار می‌گیرد که قارچ‌های بیماری‌زای خاکزاد و نماتد ریشه‌گرهی، از عوامل محدودکننده کشت توتون در تمام مناطق توتون خیز دنیا بوده و موجب مرگ در خزانه‌ها و از بین رفتن بوته‌های توتون در مزرعه می‌شوند. مهم‌ترین قارچ‌های خاکزاد بیماری‌زای توتون گونه‌های *Rhizoctonia solani*، *Phytophthora nicotianae* و *Fusarium oxysporum* f.sp. *nicotianae* می‌باشند. نماتدهای ریشه‌گرهی از نظر اقتصادی مهم‌ترین نماتدهای پارازیت گیاهی در سطح جهان می‌باشند که به طیف وسیعی از گیاهان حمله می‌کنند. پراکندگی جهانی، دامنه میزبانی وسیع و اثرات هم‌افزایی با سایر بیمارگرهای گیاهی، آن‌ها را به عنوان یکی از پنج عامل درجه اول بیماری‌زا و در رده مهم‌ترین بیمارگرهای گیاهی قرار داده است (Lucas, 1975). این نماتدها انگل داخلی ساکن بوده و به بیش از ۲۰۰۰ گونه گیاهی حمله می‌کند. این عوامل به طور مستقیم و غیرمستقیم موجب خسارت به توتون و کاهش عملکرد محصول می‌گردند. علایم کلی گیاهان آلوده، کوتولگی و زردی است و بیش‌ترین خسارت آن مربوط به علایم کاهش کارایی سیستم ریشه گیاه می‌باشد که وجود گره‌ها یا گال‌هایی در ریشه از جمله مهم‌ترین نشانه‌های بیماری است (Lucas, 1975). بررسی‌ها نشان داد در صورت عدم مبارزه با این بیماری، تا ۷۰ درصد عملکرد محصول کاهش می‌یابد (Hosseini *et al*., 2007).

سجادی و همکاران (Sajjadi *et al*., 2012)، ۲۴۴ نمونه خاک و ریشه را از مزارع توتون گرگان، علی‌آباد و مینودشت در استان گلستان بررسی و گونه‌های *M. incognita*، *M. arenaria*، *M. javanica* و *M. hapla* را شناسایی کردند. در بین گونه‌های شناسایی شده در این بررسی، گونه *M. incognita* بیش‌ترین فراوانی (۸۱/۹۳ درصد) را داشت (Sajjadi *et al*., 2012). تحقیقات انجام گرفته در زمینه‌ی تولید و استفاده از واریته‌های زراعی مقاوم به عوامل بیماری‌زای خاکزی، منجر به بهبود عملکرد محصول توتون شده است. به طوری‌که با بررسی واکنش توتون تیپ هواخشک به نماتد ریشه‌گرهی، سه رقم KY9, K17 و بارلی ارومیه ۳ را به عنوان ارقام مقاوم و ارقام Ergo وBurley TMV4 را به عنوان ارقامی که در بین ارقام مورد بررسی حساسیت بیش‌تری به این نماتد داشتند معرفی کردند (Hosseini *et al*., 2011).

در تحقیق دیگری سجادی و عاصمی (Sajjadi and Assemi, 2015) ارقام Bel 61-10، NC 100، بارلی ارومیه ۳ و HB4105P را در شرایط گلخانه به قارچ‌های خاکزی بیماری‌زا و نماتد مولد ریشه‌گرهی ارزیابی کردند (Sajjadi and Assemi, 2015). هنرنژاد و شعاعی دیلمی (۱۹۹۸)، مقاومت ۱۰ رقم توتون تیپ گرمخانه‌ای به نماتد ریشه‌گرهی را در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی بررسی نمودند. در این بررسی، مقاومت ژنوتیپی گیاهان به نماتد در سیستم ۱ تا ۵ ارزیابی شد. نتایج نشان داد که ارقام R30، Coker 258، Spieght G-28، کوکر ۳۴۷ و N2 به نماتد عامل بیماری مقاوم بوده و شاخص گال ۱/۶ تا ۲ بود در حالی‌که ارقام Virginia E1، Coker319، Mac Nair944، Coker411 و Perega حساس بوده و شاخص آلودگی ۴/۲ تا ۵ را نشان دادند. مطالعات آن‌ها نشان دا د که مقاومت به نماتد مولد گره با آلل غالب و حساسیت به این بیمارگر با آلل مغلوب کنترل می‌شود (Honarnejad and Shoai Deilami, 1998). سجادی و عاصمی (Sajjadi and Assemi, 2012) قارچ‌های *Rhizoctonia solani*، *Fusarium oxysporum* f.sp. *nicotianae*، *Phytophthora nicotianae*، *Macrophomina phaseolina*، *Pythium aphanidermatum* و P.*ultimum* var. *ultimum* را به ترتیب با فراوانی ۳۴/۹ ، ۳۱/۲ ، ۱۲/۸ ،۴/۶ ، ۲/۲ درصد از مزارع توتون استان گلستان جداسازی و شناسایی کردند (Sajjadi and Assemi, 2012). بررسی‌ها نشان

داده‌اند که استفاده از تناوب زراعی باعث کاهش خسارات ناشی از قارچ خاکزی (*R. solani*) و نماتد ریشه‌گرهی (*M. incognita*) می‌گردد (Colin and Powel, 1971). محققان گزارش کرده‌اند که اثر متقابل نماتد ریشه‌گرهی توتون و بیماری‌های پیتیوم (Pythium)موجب افزایش خسارت گیاه توتون (C319) می‌شوند، نسبت به زمانی که هر کدام از عوامل بیماری به تنهایی حضور داشته باشند (Powel *et al*., 1971). در تحقیقی، اثرات متقابل بین نماتدها و قارچ‌ها در بیماری‌زایی توتون مورد بررسی قرار گرفت که نتایج نشان داد بافت‌های ریشه توتون آلوده به نماتد برای رشد قارچ‌های خاکزی بسیار مساعد است و ریسه‌های قارچ به سرعت در میان گال‌های نماتد رشد می‌کنند و باعث انتشار بیماری می‌گردند (Mai and Abawi, 1987) (Powel, 1971) اثرات متقابل بین نماتدهای ریشه‌گرهی و قارچ عامل پژمردگی فوزاریومی را در گیاهان میزبان بررسی نموده و گزارش کردند که تحت شرایط طبیعی مزرعه، ریشه‌های گیاهان به طور دائم در معرض بسیاری از میکروارگانیسم‌های خاک قرار می‌گیرند. تعدادی از این میکروارگانیسم‌ها قدرت بیماری‌زایی زیادی دارند و ایجاد اثرات متقابل زیادی با پاتوژن‌های گیاهی می‌کنند. وجود رطوبت زیاد در محیط اطراف ریشه، در فعالیت نماتدها و قارچ‌های خاکزی بیماری‌زا در گیاهان موثر می‌باشد. آن‌ها همچنین دریافتند که اکثر بیماری‌های ریشه گیاهان، به صورت کمپلکس هستند و توسط مجموعه‌ای از میکروارگانیسم‌های خاکزی به صورت کمپلکس بروز می‌کنند (Mai and Abawi, 1987). تحقیقات نشان داده که انتقال یک ژن (Php) از *Nicotiana Plumbaginifolia* به تعدادی از ارقام تجاری توتون هواخشک و گرمخانه‌ای موجب مقاومت به نژاد ۰ و ۳ عامل ساق سیاه و نماتد کیست توتون می‌شوند (Johnson and Reed, 2010). نظر به گسترش جغرافیایی، دامنه میزبانی و اهمیت قارچ‌های خاکزی و نماتدهای ریشه گرهی، مهار آن‌ها به دلیل خاکزی بودن مشکل می‌باشد. با توجه به این که مبارزه شیمیایی برای سلامتی انسان و محیط زیست خطرناک شناخته شده‌اند، بنابراین شناسایی و استفاده از ارقام مقاوم و متحمل مناسب‌ترین روش مهار و مقابله با این نماتد است (Starr *et al*., 2002). همان گونه‌که در منابع ذکر شده آمده است، اگرچه بررسی‌هایی در سطح آزمایشگاهی و گلخانه‌ای در رابطه با ارزیابی مقاومت ارقام مختلف توتون تیپ گرمخانه‌ای و هواخشک به عوامل بیماری‌زای خاکزی انجام شده، اما تاکنون پژوهشی به منظور شناسایی و معرفی رقم برتر توتون تیپ هواخشک مقاوم به این عوامل بیماری‌زا در شرایط آلودگی طبیعی مزرعه انجام نشده است و پژوهش حاضر، نخستین بررسی در این رابطه می‌باشد. هدف از اجرای این تحقیق، ارزیابی مقاومت تعدادی از ارقام توتون هواخشک به نماتد ریشه‌گرهی و قارچ عامل پژمردگی فوزاریومی توتون جهت شناسایی و معرفی رقم برتر در شرایط آلودگی طبیعی مزرعه می‌باشد. با استناد به نتایج این پژوهش، می‌توان به راهکارهایی در راستای استفاده از ارقام مقاوم در مزارع دارای آلودگی طبیعی در قالب برنامه‌های ICM (مدیریت تلفیقی محصولات زراعی) دست یافت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

بذر ارقام BCE، K17، HBT8، Burley Geel3، Burley BB163 و Burley 21 از بانک بذر موجود در مرکز تحقیقات و آموزش توتون تیرتاش تهیه گردید. برای این منظور بذور شش ژنوتیپ مختلف توتون شامل بی سی ای (BCE)، کا ۱۷ (K17)، هیبرید نر عقیم اصلاح شده توتون هواخشک تیرتاش هشت (HBT8)، بارلی گیل سه (Burley Geel3) و بارلی بی صد و شصت و سه (BB163) به همراه رقم بارلی ۲۱ به عنوان شاهد جهت ارزیابی دقیق‌تر مقاومت در شرایط مزرعه با آلودگی طبیعی انتخاب شدند.

آماده سازی بستر بذر و کاشت

بذر ارقام مورد بررسی در اسفندماه به روش خزانه شناور (فلوت سیستم) کشت شدند و خزانه با پوشش نایلونی محصور گردید. این پژوهش در دو سال زراعی ۹۴-۱۳۹۳ در مزرعه‌ای از توابع شهرستان گرگان با سابقه آلودگی طبیعی به نماتد ریشه‌گرهی و قارچ عامل پژمردگی فوزاریومی توتون و به مساحت ۱۵۰۰ متر مربع (با احتساب حاشیه‌ها و راهروها) اجرا گردید. بعد از مراقبت‌های زراعی لازم، در اواخر اردیبهشت ماه برای آماده‌سازی زمین از شخم عمیق استفاده شد و پس از آن برای از بین بردن کلوخه‌های خاک، دو بار دیسک عمود بر هم زده شد. بعد از آماده‌سازی زمین آزمایش، مزرعه به ۲۰ کرت ۴۰ مترمربعی (شش رقم در سه تکرار) تقسیم‌بندی شد. نشاهای مربوط به هر رقم به طور مجزا آماده و به زمین اصلی انتقال داده شدند. طرح آزمایشی به صورت

بلوک‌های کامل تصادفی با شش تیمار و در سه تکرار اجرا گردید. کرت‌ها به ابعاد ۸×۵ مترمربع بوده و نشاهای توتون با فاصله ۳۰ سانتی‌متر بین کرت‌ها و فاصله ۶۰ سانتی‌متر بین بلوک‌ها کاشته شدند. کود مصرفی مورد نیاز N: P: K بود که به ترتیب به میزان ۱۰: ۵ : ۱۰ کیلوگرم هم‌زمان با نشـاکاری به زمین داده شد. در مرحله بعد کرت‌ها آبیـاری شدند و در صورت لزوم، در بعضی از کرت‌ها عملیات واکاری انجام گرفت. کلیه عملیات زراعی از قبیل آبیاری، مبارزه با علف‌های هرز، مبارزه با آفات، وجین، کوددهی، سرزنی طبق توصیه کارشناسان مرکز تحقیقات و آموزش تیرتاش انجام شد. میزان ۱۰ کیلوگرم از کود نیتروژن، چهل روز بعد از نشاکاری به صورت سرک مصرف گردید. قبل از نشاکاری از هر کرت نمونه‌برداری خاک انجام شد تا جمعیت اولیه نماتد در خاک محاسبه شود.

ارزیابی بیماری

به منظور ارزیابی عکس‌العمل ارقام توتون به قارچ عامل پژمردگی فوزاریومی از یک ماه پس از نشاکاری، تعداد بوته‌های آلوده و سالم در هر کرت، به صورت هفتگی (به فاصله هر ۷ روز یکبار) شمارش گردید و تا انتهای فصل زراعی ادامه یافت تا سیر پیشرفت بیماری در هر کرت و هر رقم با توجه به شرایط آلودگی طبیعی مزرعه مشخص گردد. ارزیابی شدت بیماری پژمردگی فوزاریومی با استفاده از روش مورمان و همکاران (Moorman *et al*., 1980) بر اساس مقیاس (۴-۰) با علائم زردی، پژمردگی، بوته‌میری و نکروز بافت انجام شد (جدول ۱).

جدول ۱- ارزیابی بیماری پژمردگی فوزاریومی توتون بر اساس روش مورمان و همکاران

Table 1. Evaluation of Fusarium wilt severity according to (Moorman *et al*., 1980)

Symptoms	علائم	Scale مقیاس
No apparent disease	بدون علائم بیماری	1
Very slight vascular discoloration but no other symptoms	کمی تغییر رنگ آوندها بدون علائم	2
moderate to extensive vascular discoloration with slight leaf yellowing, wilting, and distortion	تغییر رنگ آوندها و زردی همراه با پژمردگی برگ‌ها	3
Extensive vascular discoloration with wilting distortion and pronounced leaf	تغییر رنگ زیاد آوندها همراه با پژمردگی و بدشکلی برگ‌ها	4
plant dead or permanently wilted	مرگ بوته یا پژمردگی دائم	5

میزان وقوع یا درصد آلودگی به بیماری پژمردگی فوزاریومی توتون که نشان‌دهنده تعداد بوته‌های بیمار نسبت به کل بوته‌های بررسی شده است با استفاده از فرمول $I=\Sigma x / N$ به دست آمد. که در این معادله I بیانگر میزان وقوع بیماری، **x** بیانگـر تعداد بوته‌های بیمار و N بیانگر تعداد کل بوته‌های ارزیابی شده می‌باشد (Cardoso *et al*. 2004). شاخص سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری پژمردگی فوزاریومی توتون نیز معیار خوبی برای مقایسه آلودگی ارقام مختلف به بیماری می‌باشد که این شاخص‌ها برای میزان وقوع بیماری و نیز شدت متوسط بیماری در ارقام مختلف تعیین گردید. 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.برای تعیین شدت بیماری از معادله زیر استفاده گردید که N بیانگر تعداد کل بوته شمارش شده، n_1 بیانگر تعداد بوته با درجه آلودگی ۱، n_2 بیانگر تعداد بوته با درجه آلودگی ۲، n_3 بیانگر تعداد بوته با درجه آلودگی ۳ و n_4 بیانگر تعداد بوته با درجه آلودگی ۴ می‌باشد.

$$\text{Disease severity} = \frac{[(1\times n_1) + (2\times n_2) + [(3\times n_3) + (4\times n_4)]}{4N} \times 100$$

برای ارزیابی مقاومت ارقام به نماتد ریشه‌گرهی، در انتهای فصل و پس از برداشت کلیه چین‌ها، عملیات درآوردن و خارج کردن ریشه‌های آلوده به نماتد از مزرعه انجام گرفت و نمونه‌ها به آزمایشگاه گیاه‌پزشکی مرکز تحقیقات و آموزش توتون تیرتاش منتقل شدند. ارزیابی ریشه‌ها بر اساس شاخص گال با مقیاس (۱۰-۰) انجام شد (جدول ۲)، بدین ترتیب که به ریشه بدون گال نمره صفر و به ریشه دارای ۱۰۰ درصد آلودگی به گال نماتد، نمره ۱۰ داده شد (Zeck, 1971) (جدول ۲).

جدول ۲- ارزیابی ریشه گیاه بر اساس شاخص گال (Zeck, 1971)

Table 2. Evaluation of root according to gall index (Zeck, 1971)

scale	نمره	Percentage of root infection to gall index	درصد آلودگی ریشه به گال نماتد
	0	no galling	ریشه بدون گره
	1	1-10% of root system galled	۱۰-۱٪ ریشه دارای گره
	2	11-20% of root system galled	۲۰-۱۱٪ ریشه دارای گره
	3	21-30% of root system galled	۳۰-۲۱٪ ریشه دارای گره
	4	31-40% of root system galled	۴۰-۳۱٪ ریشه دارای گره
	5	41-50% of root system galled	۵۰-۴۱٪ ریشه دارای گره
	6	51-60% of root system galled	۶۰-۵۱٪ ریشه دارای گره
	7	61-70% of root system galled	۷۰-۶۱٪ ریشه دارای گره
	8	71-80% of root system galled	۸۰-۷۱٪ ریشه دارای گره
	9	81-90% of root system galled	۹۰-۸۱٪ ریشه دارای گره
	10	91-100% of root system galled	۱۰۰-۹۱٪ ریشه دارای گره

برای شمارش توده‌های تخم، ریشه‌ها به قطعات ۴-۳ سانتی‌متری تقسیم شده و پنج گرم از آن‌ها انتخاب و در زیر بینوکولر تعداد توده تخم شمارش گردید و با توجه به وزن ریشه تعداد کل توده ریشه محاسبه گردید. برای شمارش تعداد تخم موجود در هر توده با استفاده از هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد به مدت یک دقیقه، کیسه ژلاتینی دور توده تخم حذف گردید. پس از آن برگرداندن ریشه‌ها روی الک ۵۰۰ مش، که محتویات روی الک به ظرفی منتقل و شمارش تخم‌ها در ۳ نوبت زیر میکروسکوپ انجام شد (Vovlas *et al*., 2004) محاسبه فاکتور تولیدمثل نماتد طبق فرمول RF= Pf/Pi انجام شد (Vovlas *et al*., 2004). که در آن RF (Factor reproduction) فاکتور تولیدمثل، Pf جمعیت نهایی و Pi جمعیت اولیه است. جمعیت نهایی مجموع جمعیت نماتد در خاک و ریشه است که استخراج نماتدها از خاک با استفاده از روش جنکینز (Jenkins, 1964) و از ریشه به روش کولن (Coolen, 1979) انجام شد. تعداد نماتدها (لارو و تخم) با اسلاید شمارش محاسبه شد. به منظور یکنواخت کردن صفات مورد ارزیابی مقاومت ارقام توتون، داده‌های بدست آمده با روش درجه‌بندی یا نمره‌دهی به کمک توزیع نرمال به شاخص‌های مقاومت تبدیل شدند. در این روش، میانگین $\bar{X}$ و انحراف معیار Sd هر صفت به طور جداگانه محاسبه گردید و سپس به ارقامی که شاخص مقاومت آن‌ها در دامنه $R \geq \bar{X} + Sd$، $\bar{X} - Sd \leq R \leq \bar{X}$ و $\bar{X} \leq R \leq \bar{X} + Sd$، $R \leq \bar{X} - Sd$ قرار داشتند، به ترتیب رتبه‌های ۸، ۶، ۴ و ۲ داده شد که رتبه کوچک‌تر بیانگر مقاومت بیش‌تر است. میانگین رتبه‌های به دست آمده برای نمره گال، درجه بیماری

و فاکتور تولید مثل به عنوان رتبه کل و شاخص مقاومت کل در نظر گرفته شد (Sajjadi and Assemi, 2014). ارقام توتونی که میانگین شاخص‌های مقاومت کل آن‌ها ۳/۵-۲ و ۵-۳/۵، ۶/۵-۵ و ۸-۶/۵ بودند به ترتیب در گروه مقاوم، نیمه مقاوم، نیمه حساس و حساس قرار گرفتند (Zali and Jafari Shabestari, 1991; Sajjadi and Assemi, 2014).

تجزیه و تحلیل آماری

در پایان ارزیابی‌ها، داده‌های جمع‌آوری شده در محیط نرم افزار Excel مرتب شده و سپس توسط نرم افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس صفات مورد بررسی در طی دو سال اجرای این تحقیق، نشان داد که بین تیمارها از نظر همه صفات مورد بررسی در سطح احتمال ۱ یا ۵ درصد اختلاف معنی‌دار وجود داشت. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که واکنش ارقام توتون به عوامل بیماری‌زای خاکزی از نظر کلیه صفات مورد ارزیابی بیماری در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بودند (جدول ۴). مقایسه میانگین ارقام مورد بررسی نشان داد که رقم بارلی ۲۱ با نمره گال ۸/۴، بیش‌ترین و ارقام BCE و HBT8 به ترتیب با نمره گال ۱/۳ و ۱/۶ کم‌ترین مقدار را داشتند. ضریب تولید مثل رقم بارلی ۲۱ با ۱۰۳/۴ بیش‌ترین و ارقام BCE و HBT8 به ترتیب با ۱۲/۵ و ۱۴ کم‌ترین مقدار را داشتند. همچنین رقم بارلی ۲۱ با میانگین ۱۷۵/۳ تخم، بیش‌ترین و ارقام BCE و HBT8 به ترتیب با میانگین ۷/۸ و ۸/۹ عدد کم‌ترین مقدار را داشتند. نتایج مقایسه میانگین تعداد تخم موجود در هر توده نشان داد که رقم بارلی ۲۱ با ۵۰۶ بیش‌ترین و ارقام BCE و HBT8 به ترتیب با میانگین ۴۳۳ و ۴۳۹ عدد کم‌ترین مقدار را داشتند. مقایسه میانگین درصد آلودگی به بیماری قارچی نشان می‌دهد که رقم بارلی ۲۱ با میانگین ۵۲/۱ درصد بیش‌ترین و ارقام BCE و HBT8 به ترتیب با میانگین ۵/۴ و ۶/۱ عدد کم‌ترین تعداد بوته آلوده را داشتند. بر اساس نتایج به دست آمده در ارزیابی ارقام فوق مشخص شد که رقم بارلی ۲۱ با شاخص مقاومت ۸ به عنوان رقم حساس و ارقام B Geel3 و BB163 با شاخص مقاومت ۶ نیمه حساس و رقم K17 با شاخص مقاومت ۴ نیمه مقاوم و ارقام BCE و HBT8 با شاخص مقاومت۲ به عنوان ارقام مقاوم شناسایی شدند (جدول ۴) (Hosseini *et al*., 2011; Sajjadi and Assemi, 2015). در تحقیقی در سطح گلخانه، رقم بارلی ۲۱ با نمره گال ۸ و ضریب تولید مثل ۴۶/۳ و شاخص مقاومت ۸ به عنوان رقم حساس و ارقام BCE و Burley Geel 3 با نمره گال ۳/۴ و شاخص مقاومت ۴ به عنوان نیمه مقاوم و ارقام K17 و BB163 با نمره گال ۵/۸ و شاخص مقاومت ۶ به عنوان ارقام نیمه حساس معرفی شدند که نشان دهنده تفاوت با نتایج قبلی است (Sajjadi and Assemi, 2015).

با توجه به اثرات مخرب زیست محیطی سموم شیمیایی و نیز مقاومت احتمالی عوامل بیماری‌زا به سموم شیمیایی، جایگزینی سایر روش‌های ایمن، مانند استفاده از ارقام مقاوم، بهترین و موثرترین روش کنترل بوده و حائز اهمیت بسیار زیاد می‌باشد و روش بسیار مناسبی در حفظ تراکم جمعیت این عوامل بیماری‌زا زیر آستانه خسارت اقتصادی است. البته دراین مقوله شرایط محیطی تاثیر زیادی بر مقاومت گیاه دارد به طوری‌که دما یکی از مهم‌ترین عوامل محیطی پاسخ گیاه نسبت به عوامل بیماری‌زای خاکزی است. دما بر شیوع، بقا، پراکنش، مهاجرت و نفوذ این عوامل بیماری‌زای خاکزی در خاک و ریشه، مراحل تکاملی و بیان علائم در گیاه تاثیر دارد (Ahmadi and Mortazavi, 2005). تاثیر دما بر روی مقاومت گیاه بدین صورت بروز می‌کند: ۱- مقاومت گیاه به عوامل بیماری‌زای خاکزی در خاک با دمای بیش‌تر از ۳۰ درجه سانتی‌گراد کاهش یافته و شکسته می‌شود. ۲- افزایش دما در شرایط مزرعه، گیاهان را به حمله توسط عوامل بیماری‌زای خاکزی حساس‌تر می‌سازد. ۳- با افزایش دما و رطوبت محیط و به موازات آن رشد فنولوژیکی و بیولوژیکی

گیاه توتون، شیوع و گسترش این بیماری‌های خاکزی نیز تسریع شده و تراکم آن‌ها در واحد سطح افزایش می‌یابد (Powel, 1971).

جدول ۳- تجزیه واریانس مرکب صفات مختلف مربوط به ارزیابی بیماری پژمردگی فوزاریومی و نماتد ریشه‌گرهی توتون در دو سال ۱۳۹۳ و ۱۳۹۴

Table 3. Combined variance analysis of different factors related to evaluation of fusarium wilt disease and root knot nematode of tobacco in 2014-2015.

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df.	میانگین مربعات Mean of squares					
		درصد آلودگی Infection Percent	سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری *AUDPC*	شاخص گال Gall index	ضریب تولید مثل Factor reproduction	تعداد توده تخم Number of egg mass	متوسط تخم در هر توده average of eggs per egg mass
سال year	1	719.2 *	203.5*	1.04 ns	0.19 *	51.04 ns	19.2 ns
خطا (۱) Error 1	4	46.9	20.21	0.27	1.2	28.2	45.7
ارقام cultivar	5	2839.4 **	4088693**	60.2 **	10127 **	35615.7 **	5768 **
سال × ارقام year × cultivar	5	490.8 **	10.9ns	0.8 ns	26.4 ns	62.3 ns	50.3 ns
خطا (۲) Error 2	20	12.08	6.8	0.27	8.1	41.5	25.06
ضریب تغییرات (درصد) cv%		17.5	0.37	12.9	6.5	9.7	1.07

**، * و ns : به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد، ۵ درصد و غیر معنی‌دار.

* ns,** non-significant and significant at 1% level of probability, respectively.

جدول ۴- مقایسه میانگین دوساله صفات مختلف مربوط به ارزیابی بیماری پژمردگی فوزاریومی و نماتد ریشه‌گرهی توتون در دو سال ۱۳۹۳ و ۱۳۹۴

Table 4. Average comparison of different factors related to evaluation of fusarium wilt disease and root knot nematode of tobacco in 2014-2015.

ارقام Cultivar	درصد آلودگی Infection Percent	سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری *AUDPC*	شاخص گال Gall index	ضریب تولید مثل Factor reproduction	تعداد توده تخم در ۵۰۰ گرم ریشه Number of egg mass in 500 g of root	متوسط تخم در هر توده Average of eggs per egg mass	واکنش Response
BCE	5.4 d	88.3 d	1.3 d	12.5d	7.8 d	433 d	Resistant
HBT8	6.1 d	92.5d	1.6 d	d 14	8.9 d	439 d	Resistant
K17	9.4 c	178.5c	2.3 c	23.2 c	16.3 c	450 c	Semi Resistant
BGeel3	12.2 b	786.5b	4 b	b 35.4	64 b	464 b	Semi Susceptible
BB163	13.5 b	796.1b	5.1 b	41.8b	79.1 b	475 b	Semi Susceptible
Burley 21	52.1 a	2235.2a	8.4 a	103.8 a	175.3 a	506 a	Susceptible

در هر ستون میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ ندارند.

Means followed by same letter in each column are not significantly different at 0.01 of probability level according to DMRT test.

ترکیبات شیمیایی مسئول ایجاد نکروز سلولی مانند ترکیبات فنلی در دمای بالا یا تولید نمی‌شوند و یا ممکن است به محض تولید، خنثی و بی‌اثر شوند. احمدی و مرتضوی بک (۲۰۰۵) واکنش تعدادی از ارقام گوجه‌فرنگی به نماتد مولد گره ریشه (*M. javanica*) در گلخانه و مزرعه بررسی نمودند و نتایج آن نشان داد که عکس‌العمل برخی از ارقام به نماتد در گلخانه و شرایط مزرعه متفاوت بوده و این اختلاف را ناشی از تفاوت شرایط دمایی، شکسته شدن مقاومت توسط جمعیت‌های طبیعی و تراکم جمعیت نماتد اشاره کردند.

بررسی‌ها نشان داد که در تعیین عکس‌العمل ارقام مختلف توتون نسبت به مجموعه بیماری‌های خاکزی، مقایسه درصد آلودگی ارقام، مشخصه پایداری برای ارزیابی لاین‌ها است، زیرا مقاومت ژنتیکی میزبان را بر اساس مقاومت فعال درگیرشده تعیین می‌کند (Mai and Abawi, 1987). به دلیل ماهیت کمی مقاومت به عوامل بیماری‌زای خاکزی در توتون، هر چه تعداد ژن‌های مقاومت افزایش یابد، سطح مقاومت گیاه نیز افزایش می‌یابد (Lannon *et al*., 2012). به این ترتیب انتخاب ارقام مقاوم به این عوامل بیماری‌زای خاکزی با توجه به شدت آلودگی منطقه مورد مطالعه و ظرفیت عملکرد رقم در شرایط آلوده اهمیت بالایی دارد. عملکرد، کیفیت و مقاومت به عوامل بیماری‌زا از جمله عوامل موثر و مهم در انتخاب ارقام مناسب برای کشت در هر منطقه می‌باشند. با توجه به این‌که عملکرد، بستگی به ظرفیت ژنتیکی و عکس‌العمل آن‌ها در شرایط محیطی مختلف دارد، لازم است برای استفاده بهتر از ارقام متحمل، در هر منطقه، ارقام برتر و مناسب‌تری که دارای پتانسیل عملکرد و کیفیت بالاتر و سازگارتر نسبت به این عوامل بیماری‌زا، مشخص و معرفی گردند (Batten and Powel, 1971). لذا ارزیابی گلخانه‌ای معیار مناسبی برای انتخاب ارقام مقاوم در مورد این بیماری‌ها محسوب نمی‌شود و حتما باید ارزیابی مقاومت ارقام در مزارع آلوده مورد بررسی قرار گیرد. ارزیابی مزرعه ای مقاومت به این بیماری‌ها را می‌توان در یک منطقه خاص که شرایط محیطی برای آلودگی مساعد است متمرکز نمود (Monfared *et al*., 2003). نتایج این تحقیقات نشان از مقاومت بالای برخی ارقام نسبت به قارچ عامل پژمردگی فوزاریومی و نماتد ریشه گرهی توتون دارد. همچنین مشخص شد که اکثر بوته‌هایی که دارای آلودگی به قارچ‌های خاکزی بودند، ریشه‌های آن‌ها به نماتد ریشه‌گرهی نیز آلوده شده بود که نتایج این تحقیق با نتایج به دست آمده از سایر محققان مطابقت داشت (Powel, 1971; Colin and Powel, 1971). همچنین لازم است در طرح‌های آتی، این ارقام از نظر عملکرد کمی و کیفی و سازگاری و پایداری عملکرد نیز در این منطقه مورد بررسی قرار گیرند.

در این مطالعه مشخص گردید که ارقام BCE و HBT8 به عنوان مقاوم‌ترین، رقم K17 به عنوان نیمه مقاوم و ارقام Burley 21، Burley Geel 3 و Burley BB163 به ترتیب به عنوان ارقام در گروه‌های حساس و نیمه حساس نسبت به قارچ عامل پژمردگی فوزاریومی و نماتد ریشه‌گرهی در شرایط آلودگی طبیعی مزرعه شناخته شدند. ارقام BCE و HBT8 مقاوم‌تر و بهتر از بقیه بوده و به عنوان رقم برتر به توتون‌کاران برای کشت در مناطق دارای آلودگی طبیعی استان گلستان توصیه می‌گردد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از مدیریت و معاونت محترم پژوهشی مرکز تحقیقات و آموزش توتون تیرتاش به خاطر مساعدت و فراهم نمودن امکانات مالی در اجرای این تحقیق، نهایت تشکر و قدردانی می‌شود.

References

Ahmadi, R. and Mortazavi Bac, A. 2005. Reaction of some tomato cultivars to root – knot nematode (*Meloidogyne javanica*). Iranian Journal of Plant Pathology 41 (3): 403-414. (In Persian).

Anonymous. 2012. Statistical Report of Iranian Tobacco Company, Tehran, Iran. 52 pp (In Persian).

Batten, C. K. and Powell, N.T. 1971. The Rhizoctonia-meloidogyne disease complex in flue-cured tobacco. Journal of Nematology 3(2): 164-169.

Colin, K. and Powell, N. T. 1971. The Rhizoctonia–Meloidogyne disease complex in air-cured tobacco. Journal of Nematology 3: 110-117.

Coolen, W. A. 1979. Methods for the extraction of *Meloidogyne* spp. and other nematodes form roots and soil. Pp. 317-329. In: Lamberti, F, Taylor C.E. (eds.) Root-knot nematodes (*Meloidogyne* species) systematics, biology and control, Academic Press, London & New York.

Hosseini, A., Moarefzadeh, N., and Salavati, M.R. 2011. Studying the reaction of air-dried tobacco varieties to root knot nematode. 20th Iranian Plant Protection Congress p. 672.

Hosseini, A., Sahebani, N., Moarefzadeh, N., and Khatheri, H 2007. Studing of changes in phenylalanine ammonialyase (PAL) activity in resistant and susceptible tobacco cultivars to *Meloidogyne incognita*. 18th Iranian Plant Protection Congress 179-192.

Honarnejad, R. and Shoai Deilami, M. 1998. Genetic of resistance of tobacco germplasm to *Meloidogyne incognita*. Coresta meet, p. 144.

Jenkins, W. R. 1964. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. Plant Disease Reporter, 48: 692.

Johnson, C.S. and Reed, T. D. 2010. Impact of resistance associated with php gene on management of tobacco black shank and tobacco cyst nematode in Virginia. CORESTA congress, Edinbargh. 10 pp.

Lannon, K. R., Lewis, R. S., and Shew, H. D. 2012. Quantifying components of resistance to *Phytophthora nicotianae* in tobacco double haploid lines possessing a novel source of resistance. Crop Science, 55: 210-218.

Lucas, G. B. 1975. Disease of Tobacco, 3rd, edition, Biological Consulting Associates, Releight, North Carolina USA, 621pp.

Mai, W. F. and Abawi, G. S. 1987. Interactions among root-knot nematodes and Fusarium wilt fungi on host plants. Phytopathology 72: 317-338.

Monfared, A., Moharramipour, S and Fathipour, Y. 2003. An evaluation of resistance to cabbage aphid (*Brevicoryne brassicae* L.) in Rapeseed (*Brassica napus* L.) Lines, Hybrids and varieties under natural field infestation conditions. Iranian Journal Agricalcur Science 34(4): 987-994.

Moorman, G.W, Huang, J.S and Powell, N.T. 1980. Localized influence of *Meloidogyne incognita* on Fusarium wilt resistance of flue-cured tobacco. Phytopathology 70: 969-970.

Powell, N.T., Melendez, P. L and Batten, C. K. 1971. Disease complexes in tobacco involving *Meloidogyne incognita* and certain soil-borne fungi. Phytopathology 61: 1332-1337.

Powell, N. T. 1971. Interactions between nematodes and fungi in disease complexes. Phytopathology 9: 253-274.

Sajjadi, A., Hosseininejad, A. and Assemi, H. 2012. Determination of damage of root knot nematode (*Meloidogyne incognita*) on some of tobacco commercial cultivar. Iranian Journal of Plant Pathology 80 (1): 13-22.

Sajjadi A, and Assemi, H. 2012. Identification of pathogenic soilborne fungi of tobacco in Golestan province fields. Applied Plant Protection 1 (3). 233-248.

Sajjadi, A. and Assemi, H. 2014. The reaction of flue-cured tobacco varieties to root- knot nematode (*Meloidogyne incognita*) Modern Sustainable Agriculture Science 10 (3): 13-25.

Sajjadi, A. and Assemi, H. 2015. The reaction of some of tobacco varieties to Fusarium wilt (*Fusarium oxysporum* f.sp. *nicotianae*), root knot nematode (*Meloidogyne incognita*) and their interaction. Research in Plant Pathology 3 (2): 69-86.

Starr, J. L. Bridge, J. and Cook, R. 2002. Resistance to plant-parasitic nematodes: History, current use and future potential. Starr J. L., Bridge J., Cook R. (eds). Plant resistance to parasitic nematodes. CABI Publishing, Wallingford, UK. pp: 1-22.

Vovlas, N. Simoes, N. J. O., and Sasanellia, N. 2004. Host-Parasite relationships in tobacco plants infected with a Root-Knote Nematode (*Meloidogyne incognita*) Population from the Azores. Phytoparasitica 32(2):167-173.

Zali, A. and Jafari Shabestari, J. 1991. Introduction to Probability and Statistics. University of Tehran Publication, Tehran, Iran. 474pp. (in persian).

Zeck, W. M. 1971. A rating scheme for field evaluation of root knot nematode infestations. Pflanzenschutz- Nachrichten, Bayer AG. 24: 141-144.