غربال درون شیشه‌ای تعدادی از پایه‌های سیب برای مقاومت به بیماری پوسیدگی فیتوفترایی ریشه

In vitro screening of some apple rootstocks for resistance to phytophthora root rot

مهسا خاتمی[۱]، حمید صادقی گرمارودی[۲] و محمد ترابی[۱]

دریافت: ۱۳۹۳/۶/۱۰ پذیرش: ۱۳۹۳/۹/۱۰

چکیده

بیماری پوسیدگی فیتوفترائی ریشه و طوقه از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای درختان میوه سیب در ایران و سایر نقاط جهان است. هدف از انجام این تحقیق جداسازی گونه‌های اوومیست از طوقه و ریشه آلوده درختان سیب، استقرار روشی مطمئن برای ایجاد بیماری درون شیشه و ارزیابی مقاومت تعدادی از پایه‌های سیب با روش درون شیشه بود. نمونه‌های آلوده ازخاک و طوقه درختان سیب در کرج جمع‌آوری و از میان بیست نمونه آلوده، سه جدایه *Phytophthora cactorum* در محیط کشت نیمه اختصاصی جداسازی شدند. آزمون بیماری‌زائی و مقایسه قدرت بیماری‌زایی جدایه‌ها روی میوه‌های نارس گلابی انجام شد. ارزیابی مقاومت پایه‌های خارجی M9، M26، MM106، ژنوتیپ‌های بومی آزایش اصفهان و مربائی مشهد، و پنج هیبرید حاصل از تلاقی مربائی مشهد × M9 که با سری نام‌های H1 تا H5 مشخص شده اند انجام شد. گیاهچه‌های کشت بافتی با دانه‌های گندم آلوده به قارچ عامل بیماری در شرایط درون شیشه مایه‌زنی شده و پیشرفت نکروز روی شاخساره‌ها پس از ۱۸ روز یادداشت‌برداری گردید. بر اساس نتایج ژنوتیپ H5 با میانگین ۲۳/۶۵ میلی‌متر طول نکروز حساس‌ترین و H1 با میانگین ۵/۳۲ میلی‌متر طول نکروز به‌عنوان مقاوم‌ترین ژنوتیپ به *P. cactorum* شناسائی شدند.

واژگان کلیدی: *Phytophthora cactorum*، کشت بافت، پایه‌های سیب، نکروز شاخساره.

۱ و ۳- به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استاد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین- پیشوا، دانشکده کشاورزی، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، ورامین

۲- استادیار، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، بخش تحقیقات باغبانی، کرج

نویسنده مسئول مکاتبات: hsgarmaroodi@gmail.com

مقدمه

سیب درختی (*Malus domestica*) مساحتی در حدود ۲۶۶,۷۹۰ هکتار در ایران را به زیر کشت دارد و که تولیدی معادل ۱,۶۵۱,۸۳۹ تن از این سطح برداشت می‌شود (Anonymous, 2014). با توجه به اهمیت این محصول در کشور، باغداران کشور در تلاش مداوم برای اصلاح ارقام و پایه‌های سیب هستند. با ارائه پایه‌های پاکوتاه کننده سیب امکان افزایش تراکم درختان در باغ و عملیات زراعی مکانیزه فراهم شده است. یکی از معضلات کشت و کار این پایه‌ها، حساسیت آن‌ها به برخی بیماری‌های ریشه و طوقه می‌باشد، بنابراین اصلاح پایه‌های مناسب همچنان از نیازهای کشاورزان محسوب می‌شود. بیماری پوسیدگی فیتوفترائی طوقه و ریشه درختان سیب ناشی از گونه‌های مختلف قارچ Phytophthora از مهم‌ترین عوامل زوال این درختان در ایران و جهان است بافت سنگین خاک، کمبود مواد آلی در خاک و سیستم آبیاری غرقابی از مهم‌ترین عوامل تشدید کننده این بیماری محسوب می‌شوند (Nakova, 2010; Judelson and Blanco, 2005). به دلیل شباهت فیتوفتراها به قارچ‌ها، مدت‌های زیادی به عنوان قارچ شناخته می‌شد ولی به دلایل متعدد هم اکنون از قارچ‌ها منفک شده و در فرمانروی جدیدی به نام Stramenopila و شاخه Oomycota قرار گرفته‌اند (Patterson and Sogin, 1992).

گونه‌های متفاوتی از فیتوفترا از اندام‌های هوائی و ریشه سیب به عنوان عامل بیماری‌زا جدا شده‌اند. دو گونه نزدیک به هم *P. syringae* و *P. cactorum* باعث پوسیدگی طوقه و ریشه درختان سیب می‌شوند. این بیماری کم‌تر روی نهال‌های جوان دیده می‌شود. دمای بهینه رشد برای دو گونه *P. syringae* و *P. cactorum* به ترتیب ۲۰ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد است. نرخ گسترش زخم و آلودگی برای گونه *P. syringae* رابطه عکس با دمای تجمعی هوا دارد در حالی که برای گونه دیگر این رابطه مستقیم است (Sewell and Wilson, 1964). در تحقیقی در آدلاید استرالیا، گونه *P. cambivora* به عنوان عامل پوسیدگی طوقه و ریشه درختان سیزده ساله سیب رقم جاناتان معرفی گردید. سیستم آبیاری در این باغ به صورت قطره‌ای بوده ولی با این حال در طی یک دوره ۴-۲ ساله درختان دچار ضعف و زوال گردیدند (Bumbieris and Wicks, 1980). در تحقیقی که توسط همین گروه انجام شد (Bumbieris *et al*., 1982) گونه‌های *P. cryptogea*، *P. megasperma*، *P. cactorum* و *P. cambivora* به ترتیب بیش‌ترین فراوانی را در باغات سیب داشتند در حالی که گونه‌های *P. cambivora*، *P. cryptogea* و *P. megasperma* به ترتیب بیش‌ترین فراوانی را در باغات گیلاس نشان دادند. اگرچه مهم‌ترین گونه‌ای که از باغات آلوده سیب کرج و خراسان جدا شده است گونه *P. cactorum* ذکر گردیده (سروری و همکاران، ۱۳۸۹؛ دستجردی و دامیار، ۱۳۸۹) ولی قادری و همکاران (۱۳۸۸)گونه *P. citricola* را به عنوان گونه غالب بیماری‌زا در باغات این محصول در استان کهکیلویه و بویر احمد عنوان کرده‌اند.

مطالعه این بیماری از جنبه‌های مقاومت پایه و رقم در سطح وسیعی در دنیا انجام شده است. بر اساس گزارش ویلکاکس (Wilcox, 1992) پایه‌های M4، M9 و Ottawa-3 به عنوان مقاوم شناخته می‌شوند در حالی که پایه‌های M2، M7 و MM112 دارای سطوح متوسطی از مقاومت بودند. پایه‌های M25، M26، MM103، MM104، MM106، MM107، MM109، MM110، MM111، MM113 و MM115 در مقابل این بیماری نسبتاً حساس هستند. پایه‌های معرفی شده توسط ایستگاه مالینگ انگلستان با حرف M و پایه‌هائی که بعداً با همکاری ایستگاه مالینگ و مرکز John Inns معرفی شدند با حروف MM کدگذاری شدند.

پوسیدگی فیتوفترائی با توجه به سطوح مقاومت در بین ارقام و یا پایه ممکن است به بالای محل پیوند هم توسعه یابد یا فقط محدود به پایه‌ها شود. به علاوه اگر گونه مهاجم *P. syringae* باشد قطعاً به اندام‌های هوائی درختان نیز آسیب می‌زند. با توجه به شباهت‌های مورفولوژیکی دو گونه *P. syringae* و *P. cactorum*، احتمال وجود گونه *P. syringae* در باغات کشور بسیار زیاد است. همین گونه روی سیب‌های وحشی (crab apples) و یا روی گلابی‌های در حال گلدهی در نهالستان نوعی شانکر فرورفته سیاه رنگ به طول چندین سانتی‌متر بالای سطح خاک ایجاد می‌کند (Pscheidt and Ocamb, 2015) بابادوست (Babadoost, 1988) در توصیه‌های فنی برای کنترل بیماری علاوه بر پایه‌های مقاوم، ارقام مقاوم را نیز توصیه کرده است. ارقامی مثل Lodi، Grimes golden و Dutches

به عنوان ارقام خیلی حساس نام برده شده‌اند. پایه‌های بذری که از بذر ارقامی مثل McIntosh، Rome Beauy، Jonathan و Golden delicious به دست می‌آیند نسبتاً مقاوم گزارش شده‌اند. ارقام Melba، Winesap، Wealthy و Red delicious به عنوان ارقام مقاوم گزارش شده‌اند، بنابراین پیوند ارقام مقاوم روی پایه‌های مقاوم بهترین راهکار کنترل این بیماری عنوان شده است (Babadoost, 1988).

تحقیقاتی که در ایستگاه مالینگ انگلستان انجام شد نشان داد که قدرت القا رشد پایه با مقاومت آن به بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه ناشی از بیمارگر *P. cactorum* رابطه عکس دارد. پایه M9 که بیش از همه پاکوتاه کننده است و پایه‌های نیمه کوتاه کننده مثل M7، M26 و MM106 دارای مقاومت خوبی به بیماری هستند ولی پایه‌هائی که قدرت رشد زیادی را به پیوندک (رقم) القا می‌کردند مثل M25، MM104 و MM109 حساسیت بالائی به این بیماری نشان می‌دادند. هنگامی که رقم کاکس (Cox) روی پایه‌های MM104 پیوند زده شد در مقایسه با زمانی که روی پایه M9 پیوند زده شدند پنج تا هشت بار زخم‌های بزرگ‌تر ایجاد کردند. در این تحقیق مشخص شد که نوع پایه روی حساسیت رقم به عامل بیماری‌زای *P. syringae* تأثیری ندارد (Sewell and Wilson, 1973). استفاده از فناوری کشت بافت برای ارزیابی ارقام و پایه‌های محصولات مختلف به فیتوفترا کار جدیدی نیست. فناوری کشت بافت کاربردهای زیادی در اصلاح گیاهان به انواع بیماری‌ها دارد (van den Bulk, 1991). فناوری کشت بافت حتی برای غربال ارقام به تنش‌های غیر زنده مثل شوری هم مورد استفاده واقع شده است. (EL-Kazzaz and Ashour, 2004;) گزارش‌های منتشر شده (Pérez-demente and Gómez-candenas, 2012) Toyoda *et al*., 1991; Lindermann and Davis, 2007; Kurtz, 1988; Rosati *et al*., 1991; Helgeson *et al*., 1972; Huang *et al*., 2005;)، نمونه‌ای از کاربرد کشت بافت گیاهی برای ارزیابی سطوح مقاومت در گیاهان می‌باشند. لیندرمان و دیویس (۲۰۰۷) ظروف حاوی محیط کشت را با سوسپانسیون اسپورانژیوم در دو نقطه مقابل هم درون ظروف محیط کشت مایه‌زنی کردند. علائم بیماری روی گیاهچه‌های کشت بافتی را با مقیاس چهار قسمتی ثبت و در نتیجه واکنش درختان مختلف جنگلی را به بیمارگر *P. ramorum* تعیین کردند. نمونه‌های آلوده داخل شیشه‌های کشت بافتی بر روی محیط کشت نیمه انتخابی قرار گرفته و فیتوفترا از آن‌ها جدا گردید. برخی از درختان مثل گیلاس علیرغم ظاهر سالم، بیمارگر از بافت آن‌ها جدا گردید ولی برخی دیگر مثل برخی از ارقام افرا با وجود داشتن علائم بیماری، فیتوفترا از آن‌ها جدا نشد. بیمارگر روی انواع محیط کشت‌های بافتی آزمایش شده رشد نمود. این بیماری مهم‌ترین چالش در اصلاح پایه‌های سیب در کشور محسوب می‌گردد. بیش‌تر پایه های معرفی شده پا کوتاه کننده به این بیماری حساس هستند. بنابراین تحقیقات مفصلی در موسسه تحقیقات و تهیه نهال و بذر برای اصلاح پایه‌های موجود به این بیماری انجام می‌شود. این تحقیق در راستای انجام غربال پایه‌های هیبریدی تولید شده در بخش تحقیقاتی باغبانی موسسه نام برده انجام شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌های آلوده و جداسازی عامل بیماری

نمونه‌های آلوده گیاهی و خاک اطراف طوقه درختان سیب در اوایل بهار و یا در اواسط پاییز سال‌های ۱۳۹۱ و ۱۳۹۲ از ایستگاه‌های تحقیقات باغبانی مشکین‌آباد و کمال‌شهر وابسته به مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر در اطراف کرج جمع‌آوری شدند. نمونه‌های آلوده گیاهی از محل طوقه و ریشه درختان سیب آلوده به همراه مقداری خاک و نمونه‌های خاک از عمق ۲ تا ۱۰ سانتی‌متری برداشته شدند و در کیسه‌های نایلونی به آزمایشگاه منتقل و تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

تهیه محیط کشت‌های مورد نیاز برای جداسازی عامل بیماری

محیط کشت‌های نیمه انتخابی حاوی آنتی بیوتیک پیماریسین (دلواسید) ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر، کاربندازیم۱۰ میلی‌گرم بر لیتر ، PCNB (پنتا کلرونیتروبنزن) ۱۳۰ میلی‌گرم بر لیتر و ریفامپیسین ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر در محیط

پایه آرد ذرت آگار بود. از آن جایی که آنتی‌بیوتیک پیماریسین به نور حساس است، تشتک‌های پتری حاوی این آنتی‌بیوتیک در تاریکی نگهداری شد. تمامی آنتی-بیوتیک-ها بعد از اتوکلاو محیط کشت و خنک شدن آن تا دمای ۵۰ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد اضافه گردیدند. مهم‌ترین محیط کشت عمومی برای رشد و نگهداری جدایه‌های فیتوفترا محیط کشت آب هویج آگار بود. برای تهیه این محیط، ۵۰ میلی‌لیتر آب هویج را به حجم ۱۰۰۰ میلی‌لیتر رسانده و پس از افزودن ۱۵ گرم آگار، اتوکلاو گردید. این محیط در تشتک‌های پتری و لوله‌های آزمایش ریخته و پس از اتوکلاو مورد استفاده قرار گرفت. محیط کشت آب آگار ۳٪ در تشتک‌های ۹ سانتی‌متری برای نوک ریسه کردن و خالص-سازی جدایه‌ها مورد استفاده قرار گرفت (ارشاد، ۱۳۷۱).

جداسازی فیتوفترا

قطعات کوچک پنج میلی‌متری از نمونه‌های آلوده گیاهی بریده و پس از شستشو با آب شهری، با محلول هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد به مدت پنج دقیقه ضدعفونی سطحی گردیدند. سپس سه بار متوالی با آب مقطر سترون شستشو داده و به محیط کشت‌های نیمه انتخابی منتقل شدند. تشتک‌های کشت داده شده در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰-۷ روز نگهداری شدند. برای جداسازی علاوه بر محیط کشت نیمه انتخابی، از محیط کشت‌های عمومی مثل سیب‌زمینی دکستروز آگار (PDA) و آرد ذرت آگار (CMA) که فاقد آنتی‌بیوتیک‌های ضد قارچی بودند نیز استفاده گردید. برای جداسازی از خاک از روش تله‌گذاری توسط گیاهان متعددی مثل میوه نارس توت فرنگی و میوه سیب و میوه نارس گوجه فرنگی (ارشاد، ۱۳۷۱) استفاده شد.

تهیه عصاره خاک (leachate water) برای تولید اسپورانژیوم

برای تهیه این عصاره، ۱۵ گرم خاک بکر که گیاهی در آن کشت نشده بود در هوای اتاق خشک گردید و به آن ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر افزوده شد. سپس به مدت چهار ساعت روی دستگاه مخلوط کن مغناطیسی قرار گرفته و به‌مدت یک شبانه روز در دمای اتاق قرار داده شد و روز بعد عصاره را با چند لایه پارچه نازک صاف و در بطری شیشه‌ای درون یخچال تا زمان مصرف نگهداری شد (ارشاد، ۱۳۷۱). پس از واکشت جدایه‌های شبیه فیتوفترا روی محیط کشت‌های عمومی، با استفاده از عصاره خاک، وادار به اسپورانژدهی گردیدند. قطعاتی از کشت‌های یک هفته-ای را به درون تشتک‌های سترون شش سانتی‌متری منتقل و در عصاره خاک غوطه‌ور شدند. تشتک‌ها در زیر نور فلورسنت در فاصله ۳۰ سانتی‌متری روی سکوی آزمایشگاه به مدت ۴۸-۲۴ ساعت قرار گرفتند (ارشاد، ۱۳۷۱). جدایه‌های خالص شده و اسپورانژیوم‌دار با استفاده از کلید اصلاح شده ارشاد (۱۳۷۱) تا سطح گونه شناسائی شدند.

خالص‌سازی، نگهداری و شناسائی جدایه‌های فیتوفترا

خالص‌سازی جدایه-های به دست آمده فیتوفترا با استفاده از روش نوک ریسه کردن زیر بینوکولار دو چشمی روی تشتک‌های آب-آگار ۳٪ انجام شد. نوک هیف در حال رشد را به لوله‌های مورب حاوی محیط کشت‌های عمومی منتقل نموده و در دمای ۲۵ درجه در تاریکی نگهداری شدند. به منظور نگهداری طولانی مدت جدایه‌های فیتوفترا و برای انجام بررسی‌های بعدی و همچنین ممانعت از انتقال پی در پی جهت حفظ ویژگی‌های ریخت شناسی و زیستی، از ظروف درب پیچی حاوی آب مقطر سترون (ظروف مک کارتی) و نیز لوله‌های آزمایش حاوی محیط کشت شیب‌دار استفاده گردید. ظروف آب مقطر حاوی قطعات پرگنه فیتوفترا در شرایط دمای اتاق و در تاریکی و لوله‌های مورب در دمای ۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد درون انکوباتور نگهداری شدند.

تهیه زاد مایه

تکثیر فیتوفترا روی بذر گندم روش ساده و موثری بود که برای مایه‌زنی گیاهچه‌ها در محیط کشت QL بسیار مناسب تشخیص داده شد. برای این منظور، دانه‌های گندم را پس از شستشو با آب لوله‌کشی، درون شیشه‌های

مربائی به ارتفاع ۱/۵-۱ سانتی‌متر ریخته و در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار psi ۱۵ به مدت ۲۰ دقیقه سترون کرده و این کار را در روز بعد نیز تکرار شد. (سترون‌سازی به روش تندالیزاسیون). پس از خنک شدن ظروف، دو یا سه قطعه از کلنی فعال، جوان و در حال رشد را به دانه‌های سترون گندم افزوده و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

آزمون بیماری‌زائی جدایه‌ها

برای مقایسه بیماری‌زائی نسبی جدایه‌ها با یک دیگر و انتخاب یک جدایه برای آزمون‌های ارزیابی مقاومت ارقام، آزمون بیماری‌زائی روی میوه-های نارس گلابی انجام شد. این آزمون روی میوه‌های سبز گلابی از یک ژنوتیپ واحد انجام شد. سه میوه گلابی برای هر جدایه در نظر گرفته شد. روی هر کدام سه الی چهار سوراخ با استفاده از چوب پنبه سوراخ کن به قطر ۷ میلی‌متر ایجاد شد. قطعات مساوی از کشت یک هفته‌ای فیتوفترا با استفاده از چوب پنبه سوراخ کن به قطر ۵ میلی‌متر تهیه و هر کدام در سوراخ ایجاد شده روی میوه قرار گرفتند. محل مایه‌زنی با یک نوار چسب شفاف پوشانیده شد. گلابی‌های مایه‌زنی شده به تفکیک هر جدایه درون کیسه‌های پلاستیکی یک بار مصرف قرار گرفته و یک پنبه خیس درون هر کیسه قرار گرفت. کیسه‌ها در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد در تاریکی قرار داده شدند. یادداشت‌برداری‌ها سه روز بعد انجام شد. برای این منظور قطر نکروز اطراف هر سوراخ با استفاده از خط‌کش اندازه‌گیری شد. در گلابی‌های شاهد از محیط کشت فاقد قارچ استفاده گردید (ارشاد، ۱۳۷۱).

ریزازدیادی ژنوتیپ‌ها

پایه‌های MM106، M26، M9، ژنوتیپ‌های بومی آزایش اصفهان و مربایی مشهد و نیز هیبریدهای حاصل از تلاقی M9 و مربایی مشهد با سری نام‌های H1، H2، H3، H4 و H5 (آتشکار،گزارش منتشر نشده) با روش کشت بافت تکثیر شدند. این مواد در نهالستان بخش تحقیقات باغبانی واقع در موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کلکسیون‌های سیب در مزرعه ۴۰۰ هکتاری و ایستگاه تحقیقات کمال شهر نگهداری می‌شدند. برای جمع‌آوری نمونه‌ها، در آغاز فصل بهار سرشاخه‌های نورسته را در آزمایشگاه به قطعات تک جوانه تقسیم، سپس با آب روان شستشو و در محلول هیپوکلریت سدیم ۱٪ به‌مدت ۱۰ دقیقه ضد عفونی سطحی شدند. نمونه‌های خشک شده تحت شرایط سترون به محیط کشت‌های MS (Murashige and Skoog, 1962) یا QL (Quoirin and Lepovire, 1977) منتقل گردیدند. در مواردی که احتمال آلوده شدن نمونه‌ها با قارچ‌های ساپروفیت زیاد بود، در محیط کشت‌ها قارچ‌کش کاربندازیم به میزان ۱۰ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد. یک ماه پس از استقرار اولیه، ریزنمونه‌های تکثیر شده را به قطعات مختلف تقسیم و هر کدام به محیط کشت تازه منتقل و در اتاق رشد با دوره نوری ۱۶ ساعت نور، ۸ ساعت تاریکی ایجاد شده با لامپ فلورسنت سفید در دمای شبانه روزی ۲۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

واکنش پایه‌های سیب به فیتوفترا

مایه‌زنی شاخساره‌های کشت بافتی با جدایه منتخب *P. cactorum* در شرایط درون شیشه انجام شد. در پای هر شاخساره سالم، یک عدد گندم که حاوی هیف‌های رشد کرده فیتوفترا بود قرار داده شد. شیشه‌های مایه‌زنی شده در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در تاریکی قرار گرفتند و بعد از یک هفته طول نکروز روی شاخساره‌ها ثبت گردید. علاوه بر طول نکروز روی شاخساره‌ها، طول کل شاخه نیز اندازه‌گیری شده و با تقسیم طول نکروز روی طول کل، درصد نکروز هر شاخساره به دست آمد. این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار و پنج مشاهده (شاخه) در هر تکرار (شیشه) برای هر رقم یا ژنوتیپ اجرا گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها و رسم نمودارها با استفاده از نرم افزارهای آماری SAS و Excel انجام و میانگین‌ها بر اساس روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه شدند. صفت درصد نکروز ابتدا از طریق تبدیل جذری نرمال شده و بعد از آن تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها انجام شد.

نتایج

جداسازی و شناسائی عامل بیماری

از بیست نمونه ریشه درختان سیب و خاک آلوده جمع‌آوری شده از ایستگاه‌های تحقیقاتی کمال‌شهر و مشگین‌آباد کرج، سه جدایه *P. cactorum* به دست آمد (جدول ۱). مهم‌ترین معیارهای مورد استفاده برای تعیین گونه عبارت بودند از شکل اسپورانژیوم، اندازه پاپیل، دمای بهینه رشدی، تشکیل اسپورهای جنسی در محیط کشت و نحوه آمیزش آنتریدی و اووگون (ارشاد، ۱۳۷۱). نمونه‌هایی از قارچ‌های جنس Pythium، Fusarium، Macrophomina و تعدادی قارچ‌های ناشناخته دیگر نیز جداسازی شدند. محیط کشت آب هویج آگار بهترین محیط برای تکثیر فیتوفتراها تشخیص داده شد.

جدول ۱- جدایه‌های فیتوفترا به دست آمده از طوقه و ریشه درختان سیب آلوده و خاک در ایستگاه کمال‌شهر

Table 1. Phytophthora isolates obtained from infected crown and root apple trees and soil in Kamalshahr Station

کد جدایه Isolate Code	آرایه تشخیص داده شده Recognized taxon	Sample	نمونه
PO56	*P. cactorum*	Soil (tomato bait)	خاک (طعمه گوجه فرنگی)
PO66	*P. cactorum*	Crown	طوقه
PO67	*P. cactorum*	Soil (strawberry bait)	خاک (طعمه توت فرنگی)

آزمون بیماری‌زائی

مقایسه قدرت بیماری‌زایی نشان داد که جدایه‌های خاک نکروز بزرگ‌تری روی میوه‌های نارس ایجاد کردند (جدول ۲). جدایه PO66 که از طوقه و مستقیماً از بافت‌های آلوده گیاهی جدا شده بود برای تولید زادمایه مورد استفاده قرار گرفت.

جدول ۲- مقایسه میانگین قطر نکروز ایجاد شده توسط جدایه‌های مختلف فیتوفترا روی میوه نارس گلابی

Table 2. Mean necrosis diameter induced by different isolates of Phytophthora on unriped pear fruits

جدایه Isolates	میانگین قطر نکروز Mean necrosis diameter (mm)
PO56	22.0±9.39
PO66	15.5± 3.24
PO67	22.0±5.07

واکنش پایه‌ها به جدایه *P. cactorum*

تکثیر رویشی پایه‌های سیب با استفاده از محیط کشت MS با وجود تکرارهای متعدد با مقادیر مختلف هورمون‌ها موفقیت‌آمیز نبود. بنابراین از محیط کشت QL استفاده گردید. تجزیه واریانس درصد نکروز در شاخساره‌های کشت بافت رویشی پایه‌های سیب نشان داد که بین پایه‌های مختلف اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد وجود داشت (جدول ۳). مقایسه میانگین درصد نکروز پس از آلوده‌سازی گیاهچه‌های کشت بافتی با دانه‌های گندم آلوده به جدایه PO66۰(شکل ۱) نشان داد که از نظر صفت طول نکروز هیبرید H5 با میانگین ۲۳/۶۵ میلی‌متر بیش‌ترین و هیبرید H1 با میانگین ۵/۳۲ کم‌ترین طول نکروز را نشان دادند. از نظر درصد

نکروز نیز ژنوتیپ H5 با میانگین ۷۹/۱۱ درصد بیش‌ترین و ژنوتیپ H1 با میانگین ۲۱/۵۲درصد کم‌ترین درصد نکروز را داشتند (جدول ۴). نتایج تجزیه کلاستر (شکل ۲) بر اساس صفات مورد ارزیابی نشان داد که ارقام و ژنوتیپ‌ها در سه گروه قرار گرفتند. گروه اول (A) شامل ارقام و ژنوتیپ‌های آزایش آزاد گرده‌افشان، هیبرید شماره یک (H1)، مربائی آزاد گرده‌افشان، M9 و M26 بودند. این گروه کم‌ترین درصد نکروز و طول نکروز را داشتند و می‌توان آن‌ها را به عنوان پایه‌های مقاوم معرفی کرد. در گروه دوم (B)، هیبریدهای شماره دو (H2) و سه (H3) قرار داشتند که به عنوان ارقام نیمه مقاوم شناسائی شدند و در گروه سوم (C) هیبرید شماره ۵ (H5)، MM106 و هیبرید شماره چهار (H4) قرار داشتند که به عنوان پایه‌های حساس ارزیابی شدند.

شکل ۱- شاخساره‌های کشت بافتی پایه‌های سیب مایه‌زنی شده با دانه‌های گندم آلوده به جدایه قارچ *P. cactorum*

Fig. 1. *In -vitro* shoots of apple rootstocks inoculated with wheat grains colonozide by *P. cactorum* isolate

جدول ۳- تجزیه واریانس درصد نکروز در پایه‌های سیب مایه‌زنی شده با *P. cactorum*

Table 3. Analysis of variance of percentage of necrosis induced on apple rootstocks inoculated with *P. cactorum*

S.O.V	منابع تغییرات	درجه آزادی df .	درصد نکروز Percentage of necrosis
Cultivar	رقم	9	3.15**
Error	خطای آزمایشی	70	1.06
CV%	درصد ضریب تغییرات	-	24.08

**: معنی‌داری در سطح احتمال 1٪.

**: significant at 1% level of probability.

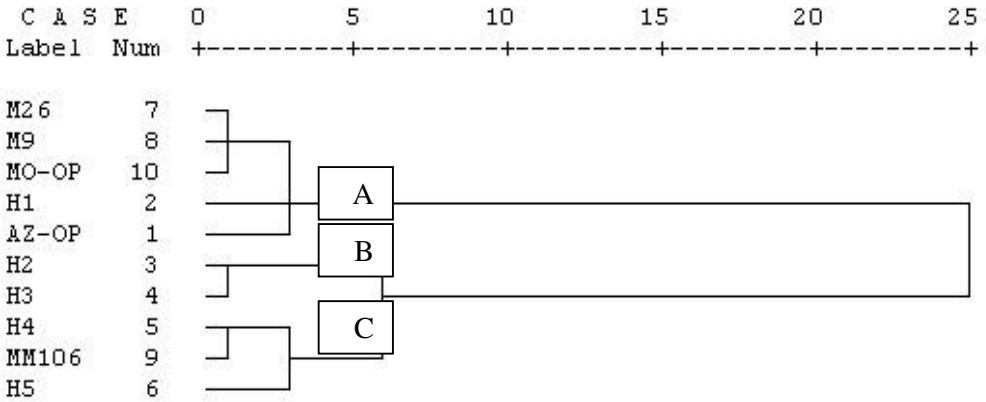
جدول ۴- مقایسه میانگین طول نکروز و درصد نکروز (طول نکروز به کل) در پایه‌های سیب مایه‌زنی شده با *P.cactorum*

Table 4. Mean Comparison of necrosis length and necrosis percentage (necrosis length to total length) induced on apple rootstocks inoculated with *P. cactorum*

پایه‌های سیب Apple rootstocks	میانگین طول نکروز Necrosis length (mm)	میانگین درصد نکروز Necrosis percentage
Azayesh OP	12.30 bcd	36.42 bcd
H_4	18.99 ab	67.24 ab
H_1	5.31 d	21.52 d
H_5	23.65 a	79.11 a
H_3	15.90 abc	49.11 abcd
M26	8.13 cd	35.42 bcd
M9	9.62 bcd	34.09 bcd
Morabbai OP	6.37 cd	28.13 cd
MM106	16.85 abc	67.55 ab
H2	15.35 abcd	60.61 abc

میانگین‌ها با حروف مشابه در هر ستون، بر اساس آزمون چند دامنه دانکن فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ هستند.

Means with similar letters in each column are not significantly different at 1% level of probability, according to Duncan's multiple range test.



شکل ۳- تجزیه کلاستر پایه‌های سیب بر اساس صفات طول نکروز و درصد نکروز با استفاده از روش UPGMA و محاسبه مجذور فاصله اقلیدسی

Fig. 3. Cluster analysis of apple rootstocks based on length and percentage of necrosis using UPGMA and squared Euclidean distance

گروه A: پایه‌های متحمل — Group A: Resistant rootstocks

گروه B: پایه‌های نیمه مقاوم — Group B: Moderately resistant rootstocks

گروه C: پایه‌های حساس — Group C: Susceptible rootstocks

همبستگی صفات طول شاخه، طول نکروز و درصد نکروز با یک دیگر با استفاده از آزمون همبستگی پیرسون مقایسه شدند (جدول ۵). طول شاخه با درصد نکروز همبستگی معنی‌داری نشان داد، اما طول نکروز و درصد نکروز با طول شاخه ارتباط معنی‌داری نداشتند، بنابراین صرف نظر از طول شاخساره درون محیط کشت طول نکروز معیار خوبی برای ارزیابی بیماری است و شاخساره‌ها چه کوتاه باشند و چه بلند، تأثیری بر طول نکروز ندارد.

جدول ۵- ضرایب همبستگی بین طول شاخه، طول نکروز و درصد نکروز

Table 5. Correlation coefficients between shoot length, necrosis length and necrosis percentage.

		طول شاخه shoot length	طول نکروز Necrosis length
shoot length	طول شاخه	-	-
Necrosis length	طول نکروز	0.17^{ns}	-
Necrosis percentage	درصد نکروز	-0.07^{ns}	0.94^{**}

**: معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد، ns: عدم اختلاف معنی‌دار.

**: Significiant at 1% probability level, ns: Not significant.

بحث

علیرغم پیشرفت‌های به دست آمده در سال‌های اخیر در ارتباط با بهبود سیستم‌های آبیاری و کاشت پایه‌های جدید سیب مقاوم به بیماری، بیماری پوسیدگی فیتوفترائی ریشه و طوقه سیب همچنان یکی از چالش‌های مهم در باغات دانه‌دار از جمله سیب محسوب می‌شود. درگذشته تصور بر این بود که درختان جوان سیب از حمله این بیمارگر در امان هستند ولی مشاهدات اخیر و نیز گزارش‌های موجود (Babadoost, 1988)، حاکی از حمله این بیمارگر به سیب در تمام مراحل رشدی درختان می‌باشد. به‌هر حال در اوایل زمان بلوغ و میوه‌دهی حداکثر خسارت به درختان سیب وارد می‌شود.

گونه‌های متعددی از فیتوفترا به عنوان بیمارگر از سیب گزارش شده‌اند ولی آن چه در اغلب این گزارش‌ها عمومیت دارد این است که گونه *P. cactorum* به عنوان گونه غالب بیماری‌زا روی سیب معرفی شده است. اگرچه گونه‌های *P. megasperma*، *P. cambivora*، *P. cryptogea* و *P. citrophthora* نیز از نمونه‌های سیب آلوده جداسازی شده‌اند (Ellis, 2008; Nakova, 2010; Matheron *et al.*, 1988) ولی در نمونه‌های محدود جمع‌آوری شده از ایستگاه‌های کمال‌شهر و مشکین‌آباد این گونه‌ها مشاهده نشدند. تاکنون میزبان اختصاصی برای این بیمارگر گزارش نشده است. به‌هر حال توت فرنگی و درختان میوه هسته‌دار از جمله میزبان‌های مهم دیگر این بیمارگر به شمار می‌آیند (Ellis, 2008).

استفاده از پایه‌های مقاوم، اقتصادی‌ترین روش برای کنترل بیماری است. مقاومت ارقام در محدود کردن توسعه بیماری نقش مهمی دارد و می‌تواند زوال درختان آلوده را به تأخیر بیندازد. توصیه شده در صورتی که طوقه و تنه درخت سیب درصد ناچیزی از علائم را نشان می‌دهد، ارقام مقاوم یاد شده را روی آن‌ها پیوند زد تا درخت کاملاً از بین نرود. مشاهدات نشان داده که استفاده از پایه‌های بذری اگرچه می‌تواند از همه‌گیر شدن بیماری جلوگیری کند ولی زمانی که ارقام حساس مثل Grimes golden روی پایه‌های بذری پیوند زده شوند فرقی با پایه‌های رویشی حساس نخواهند داشت (Babadoost, 1988). تاکنون روش‌های متعددی برای ارزیابی سطوح مقاومت در درختان سیب مورد بررسی قرار گرفته‌اند. مایه‌زنی شاخه بریده (Jeffers and Aldwinckle, 1987) دانهال‌ها (سروری و

همکاران، ۱۳۸۹؛ Aldewinckle and Cummins, 1974) و قلمه ریشه‌دار (دستجردی و دامیار، ۱۳۸۹) مهم‌ترین روش‌های مورد استفاده برای ارزیابی سطوح مقاومت سیب به فیتوفترا بوده‌اند. به کارگیری روش‌های درون شیشه‌ای قابل تکرار می‌توانند جایگزین مناسبی برای عملیات گلخانه‌ای در انتخاب منابع مقاومت به فیتوفترا باشد.

به‌عنوان مثال می‌توان از مطالعات هلگسون و همکاران (Helgesson *et al*., 1972) نام برد که دو لاین حساس و مقاوم تنباکو به بیمارگر *P. parasitica* var. *nicotiana* در شرایط درون شیشه را مورد بررسی قرار دادند و در نهایت سامانه‌ای برای ارزیابی ارقام مختلف توتون به این بیمارگر را معرفی کردند. آن‌ها در مطالعات خود از کشت کالوس و نیز شاخساره‌های تولید شده کشت بافتی استفاده کردند. از یک مقیاس پنج قسمتی برای ارزیابی سطوح مختلف بیماری بهره بردند.

در یکی از تحقیقات پر استناد، کلون‌های مختلف تولید شده از پایه‌های سیب MM106 و M26 روی محیط کشت بافت حاوی ۲۵ یا ۱۰ درصد عصاره بیمارگر *P. cactorum* غربال شدند. برخی از کلون‌ها مقاومت بالائی به بیماری در مقایسه با شاهد نشان دادند. همین گروه تحقیقاتی، عصاره بیمارگر یاد شده را برای غربال کلون‌های توت فرنگی در محیط کشت بافتی با موفقیت به کار گرفتند (Rosati *et al*., 1988).

مایه‌زنی کلون‌های کشت بافتی توت فرنگی با قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *fragaria* ، *P. cactorum* و *Verticillium dahliae* نیز انجام شده است (Toyoda *et al*., 1991; Sowik *et al*., 2001). سلول‌های باززائی شده از سلول‌های برگی توت فرنگی با کاربرد مستقیم قارچ عامل در محیط کشت نسبت به عامل بیماری غربال شدند. این روش مشابه روش مورد استفاده در این تحقیق است. با توجه به مشکلات متعدد تکثیر رویشی ارقام و پایه‌های درختان میوه، استفاده از این روش منطقی‌ترین، سریع‌ترین و مطمئن‌ترین روش برای فراهم کردن مواد گیاهی درختان میوه برای اصلاح به بیماری محسوب می‌شود.

استفاده از کشت بافت برای تکثیر رویشی مواد گیاهی برای اصلاح به بیماری‌ها علاوه بر انجام آزمایش‌های در شرایط به شدت کنترل شده، هر نوع آلودگی موجود در بافت‌های گیاهی مزارع و باغات را نیز آشکار می‌کند. همان طور که در گزارش لیندرمان و دیویس (Lindermann and Davis, 2007) آمده است، آلودگی‌های پنهان در نمونه‌های گیاهی با این روش به سهولت رویت و حذف خواهند شد. روش استفاده شده در این تحقیق جهت غربال پایه‌ها در شرایط کنترل شده، می‌تواند به حذف سایر آلودگی‌های پنهان در پایه ها نیز کمک کند.

برای جمع‌بندی باید عنوان کرد روش استفاده مستقیم از قارچ برای آلوده‌سازی گیاهچه‌های کشت بافتی سیب که برای اولین بار در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفته در سایر محصولات و برای سایر بیمارگرها مورد استفاده قرار گرفته و نتایج قابل قبولی داشته است. همان‌طور که در سایر منابع نشان داده شده است پایه‌های تجاری M9، M26، ارقام بومی آزایش و مربائی دارای سطوح مقاومت بالائی هستند که در این تحقیق نیز کم‌ترین میزان آلودگی را از خود نشان دادند. بنابراین استفاده مستقیم از قارچ در محیط کشت بافتی می‌تواند به‌عنوان جایگزینی برای آزمون‌های گلخانه‌ای مطرح باشد.

منابع References

ارشاد، ج. ۱۳۷۱. گونه‌های فیتوفترا در ایران، چاپ اول. انتشارات سازمان تحقیقات کشاورزی، تهران. ۲۱۷ صفحه.

دستجردی، ر. و دامیار، س. ۱۳۸۹. ارزیابی مقاومت نسبی یازده پایه سیب به پوسیدگی طوقه ناشی از قارچ *Phytophthora cactorum* مجله به نژادی نهال و بذر ۱-۲۶(۳): ۳۱۱-۲۹۷.

سروری، س.، حاج نجاری، ح.، رضایی، س. و زمانی‌زاده، ح.ر. ۱۳۸۹. ارزیابی دانهال‌های ارقام پاکوتاه سیب جهت گزینش پایه‌های متحمل به قارچ عامل بیماری پوسیدگی طوقه *Phytophthora cactorum*. مجله به نژادی نهال و بذر ۱-۲۶ (۲): ۲۰۴-۱۹۳.

قادری، ف.، عسگری، ش. و عبداللهی، م. ۱۳۸۸. بررسی بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه در زوال درختان سیب در استان کهکیلویه و بویر احمد. مجله پژوهش‌های تولید گیاهی ۱۶(۴): ۱۶۷-۱۵۱۰

Anonymous. 2014. FAOSTAT, Production of Apple by Countries. Available at : www. Faosat.fao.org

Aldwinckle, H.S. and Cummins, J.N. 1974. Familial differences in reaction to flood inoculation of young apple seedlings by zoospore suspension of *Phytophthora cactorum*. Proceedings of the 19th International Horticultural Congress, Warsaw, Poland. p. 328.

Babadoost, M. 1988. Phytophthora collar rot of apple. Report on Plant Disease, No. 812. College of Agriculture, Consumer and Environmental Sciences, University of Illinois Extension, Illinoise, USA.

Bumbieris, M. and Wicks, T.J. 1980. *Phytophthora cambivora* associated with apple trees in South Australia. Australasian Plant Pathology 9: 114.

Bumbieris, M., Wicks, T. J. and Windle, B. E. 1982. Phytophthora species in apple and cherry orchards in South Australia. Australasian Plant Pathology 11: 28-29.

El-Kazzaz, A. A. and Ashour, A. M. A. 2004. Genetically resistant cucumber plants to wilt pathogen via tissue cultures. Egyptian Journal of Phytopathology 32: 1-10.

Ellis, M.A. 2008. Phytophthora root and crown rot of fruit trees. Fact Sheet of Agriculture and Natural Resources, HYG-3029-08. The Ohio State University Extension, USA. 3pp.

Helgeson, J. P., Kemp, J. D., Haberlach, G.T. and Maxwell, D. P. 1972. A tissue culture system for studying disease resistance: the back shank disease in tobacco callus cultures. Phytopathology 62: 1439-1443.

Jeffers, S.N. and Aldwinckle, H. S. 1987. Enhancing detection of *Phytophthora cactorum* in naturally infested soil. Phytopathology 77: 1475-1482.

Judelson, H.S. and Blanco, F.A. 2005. The spores of Phytophthora weapons of the plant destroyer. Nature Review of Microbiology 3: 47-58.

Kurtz, S. L. 1988. Generation and selection of *Phytophthora cinnamomi* resistant avocado rootstocks through somaclonal variation. California Avocado Society Yearbook 72: 4750.

Linderman, R. G. and Davis, E. A. 2007. Evaluation of *Phytophthora ramorum* in nursery crop tissue culture propagation. Plant Health Progress. Doi:10.1094/PHP-2007-0822-01-RS.

Matheron, M. E., Young, D. J. and Matejka, J. C. 1988. Phytophthora root and crown rot of apple trees in Arizona. Plant Disease 72: 481-484.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.

Nakova, M. 2010. Phytophthora root and crown rot on apples in Bulgaria. Pesticides and Phytomedicine. Belgrade 25: 43-50.

Patterson, D. J. and Sogin, M. L. 1992. Eukaryote origins and protistan diversity. pp. 13-46. In: Harman, H., and Matsuno, K. (eds.) Origin and Evolution of Prokaryotic and Eukaryotic Cells. World Scientific Publications, Singapore.

Pérez-Clemente, R. M. and Gómez-Cadenas, A. 2012. *In vitro* tissue culture, a tool for the study and breeding of plants subjected to abiotic stress conditions. pp. 91-108. In: Leva, A. and Rinaldi, L.M.R. (eds.) Recent Advances in Plant *In vitro* Culture. In Tech Press (free online access).

Pscheidt, J.W. and Ocamb, C.M. 2015. Diagnosis and Control of Phytophthora Diseases**.** Plant Disease Management Handbook. Pacific Northwest Plant Disease Handbook, Extension Plant Pathology Specialist. Oregon State University, USA.

Quoirin, M. and Lepoivre, P. 1977. Etude de milieux adaptes aux cultures *in vitro* de Prunus. Acta Horticulturae 78: 437-442.

Rosati, P., Gaggioli, D., Lovato, A. and Mezzetti, B. 1988. Screening for *Phytophthora cactorum* resistance with cultural filtrate of the fungus. Abstract Book of International Straberry Symposium, Cesena, Italy. page 26.

Sewell, G.W.F. and Wilson, J.F. 1964. Death of maiden apple trees caused by *Phytophthora syringae* Kleb. and a comparison of the pathogen with *P. cactorum* (L. & C.) Schroet. Annals of Applied Biology 53(2): 275–280.

Sewell, G.W.F. and Wilson, J. F. 1973. Phytophthora collar rot of apple: influence of the rootstock on scion variety resistance. Annals of Applied Biology 74: 159–169.

Sowik, I., Bielenin, A., Michalczuk, L. 2001. *In vitro* testing of strawberry resistance to *Verticillium dahlia* and *Phytophthora cactorum*. Scientia Horticulturae 88: 31-40.

Toyoda, H., Horikoshi, K., Yamano, Y. and Ouchi, S. 1991. Selection for fusarium wilt disease resistance from regenerants derived from leaf callus of strawberry. Plant Cell Reports 10: 167-170.

Van den Bulk, R. W. 1991. Application of cell and tissue culture and *in vitro* selection for disease resistance breeding- a review. Euphytica 56: 269-285.

Wilcox, W.F. 1992. Fruit crops IPM disease identification sheet No. 7, New York State Agricultural Experimental Station, Cornell University Extension, USA.