ارزیابی درون شیشه‌ای مقاومت چند ژنوتیپ تجاری آلو به بیماری پوسیدگی فیتوفتورائی

In-vitro evaluation of resistance of some commercial plum genotypes to phytophthora rot disease

ساناز مقری[۱]، حمید صادقی‌گرمارودی[۲] و سید محمد اشکان[۳]

دریافت: ۱۳۹۳/۵/۲۶ پذیرش: ۱۳۹۳/۹/۱۰

چکیده

بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه ناشی از گونه‌های مختلف Phytophthora از مهم‌ترین عوامل زوال درختان میوه هسته‌دار محسوب می‌شود. در این تحقیق مقاومت نسبی هشت ژنوتیپ تجاری آلو به این بیمارگر بررسی شد. بدین منظور، ابتدا با استفاده از محیط‌کشت نیمه‌انتخابی آرد ذرت آگار حاوی پیماریسین، کاربندازیم و ریفامپیسین (۱۰ ppm از هر کدام) دو جدایه فیتوفتورا از درختان آلوده زردآلو و بادام واقع در ایستگاه تحقیقات باغبانی کمال‌شهر و مشگین‌دشت کرج متعلق به موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، جداسازی و با استفاده از مشخصات فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی به‌عنوان گونه *P. cactorum* شناسایی شدند. مواد گیاهی به صورت درون‌شیشه‌ای روی محیط کشت MS تکثیر و با یک دانه گندم حاوی توده میسلیومی جدایه زردآلو در پای هر شاخساره مایه‌زنی شدند. پس از ده روز نگهداری در ۲۴ درجه سانتی‌گراد در تاریکی، شاخص پیشرفت نکروز روی هر شاخساره محاسبه و با استفاده از یک مقیاس چهار قسمتی واکنش هر ژنوتیپ تعیین شد. بر اساس نتایج، ژنوتیپ‌ها در سطح احتمال ۵٪ تفاوت معنی‌داری با یک‌دیگر نشان دادند. همه ژنوتیپ‌ها در درجات مختلف به این بیماری آلوده شدند. ژنوتیپ‌ها با سری نام‌های ۳۵۴۷، ۳۵۵۴، ۳۵۵۳، ۳۵۴۲، ۳۵۳۸، ۳۵۱۵ و ۳۵۲۸ واکنش حساسیت نشان دادند. در حالی‌که درصد شاخص پیشرفت نکروز در ژنوتیپ ۳۵۱۲ کم‌تر از ۵۰ درصد بود بنابراین به‌عنوان نیمه مقاوم ارزیابی شد.

واژگان کلیدی: آلو و گوجه، کشت بافت، *Phytophthora cactorum*، نکروز شاخساره، واکنش به بیماری.

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

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

نویسنده مسئول مکاتبات: hsgarmaroodi@gmail.com

مقدمه

تولید آلو و گوجه در مقیاس جهانی بالغ بر ۱۱ میلیون تن برآورد شده است و کشور ایران با تولید ۲۸۸۲۰۵ تن در رتبه هفتم قرار دارد (Anonymous, 2014). تنوع قابل ملاحظه‌ای از نظر ژنوتیپ‌های بومی درختان میوه هسته‌دار به‌ویژه آلو-گوجه و آلبالو در ایران مشاهده می‌شود. پوسیدگی ریشه و طوقه ناشی از فیتوفتورا (Phytophthora) سالانه خسارات زیادی به باغ‌ها و مزارع وارد می‌کند (Erwin and Ribeiro, 1996)

با توجه به آبیاری غرقابی باغات و بافت سنگین خاک در اکثر مناطق کشور، پوسیدگی فیتوفتورایی از عوامل مهم زوال درختان مطرح شده است (بنی‌هاشمی و سرتیپی، ۱۳۸۳). این بیماری در باغات و نهالستان‌ها و در هر مرحله رشدی گیاه ممکن است مشاهده شود. آلودگی عموماً در زمان تکثیر نهال در نهالستان روی داده ولی علائم بیماری بعداً و زمانی که نهال در زمین اصلی مستقر و یا وارد مرحله باردهی شد، آشکار می‌گردد. در نهالستان‌ها کنترل بیماری‌های فیتوفتورایی مشکل است زیرا نهال‌ها به‌طور متراکم کاشته می‌شوند. به‌علاوه زمین تولید نهال در سال‌های متوالی مورد استفاده قرار می‌گیرد که باعث استقرار مایه قارچ می‌شود. همچنین استفاده زیاد از آب و کودهای حاصلخیز کننده به‌منظور تسریع رشد نهال‌ها، باعث آبدار شدن بافت‌ها و مستعد شدن گیاه به آلودگی می‌شود. عدم تشخیص بیماری در مراحل اولیه رشدی، آلوده بودن آب‌های آبیاری و انتقال قارچ به نقاط دیگر و عدم دسترسی به قارچ‌کش‌های موثر از دیگر علل گسترش بیماری‌های فیتوفتورائی در نهالستان‌ها هستند (Ribeiro and Linderman, 1991).

در درختان آلوده، رشد انتهائی درخت کاهش یافته، برگ‌ها کوچک و زرد شده و تراکم برگ‌ها روی درختان کم می‌شود. خشکیدگی سرشاخه‌ها از دیگر علائم این بیماری است. در زمانی‌که بیماری شدت می‌یابد، شانکر یا زخم بر روی تنه درخت تشکیل شده که معمولاً منجر به تولید صمغ در طوقه و تنه (گموز) می‌گردد. لازم به ذکر است که این بیماری در بادام خسارت‌زاتر از سایر درختان میوه هسته‌دار است (Browne and Mircetich, 1995).

گونه‌های مختلفی از فیتوفتورا از ناحیه طوقه و ریشه درختان میوه هسته‌دار از جمله بادام، زردآلو و هلو در استان فارس جداسازی و اکثراً (۶۴٪) *P. cactorum* شناسائی شده‌اند. گونه *P. nicotiana* نیز از طوقه بادام و زردآلو جدا شد (بنی‌هاشمی و سرتیپی، ۱۳۸۳). در تحقیق یاد شده مقاومت نسبی تعدادی از ژنوتیپ‌های هسته‌داران به فیتوفتورا نیز ارزیابی گردید.

توسعه بیماری به عوامل مختلفی مثل حساسیت ارقام و پایه‌ها، شدت بیماری‌زائی جدایه‌های فیتوفتورا و شرایط محیطی بستگی دارد. از جمله شرایط موثر بر توسعه بیماری شرایط غرقابی و میزان رطوبت آزاد در اطراف طوقه است. دوره‌های متوالی اشباع رطوبتی خاک می‌تواند تولید، آزادسازی و حرکت زئوسپورهای بیمارگر را تسهیل نماید. مدت زمان غرقاب شدن خاک تأثیر اساسی در شدت بیماری‌های ریشه فیتوفتورائی دارد (Duniway, 1983). اگرچه غرقابی خاک نقش مهمی در شیوع این بیماری دارد ولی نمی‌توان با کاهش دور و میزان آبیاری و ایجاد تنش خشکی با این بیماری مقابله کرد (Ristaino and Duniway, 1989). استفاده از ارقام مقاوم از شناخته شده‌ترین روش‌های مقابله با بیماری‌های ریشه و طوقه است. تومیدیس (Thomidis, 2000) مقاومت نسبی چهار پایه مهم هلو به گونه‌های *P. syringae* و *P. citrophthora* را در شرایط باغی و گلخانه بررسی و مشاهده کرد که پایه‌های GF677 کم‌ترین حساسیت را به بیمارگر *P. syringae* نشان می‌داد ولی به گونه *P. citrophthora* بسیار حساس بود. پایه‌های KID I، GF305 و PR204 از نظر طول نکروز ناشی از هر دو گونه تفاوت معنی‌داری با یک‌دیگر نداشتند. در تحقیق مورد اشاره روش شاخه بریده با روش‌های مزرعه‌ای مطابقت می‌کرد. پایه نماگارد هلو یکی از پایه‌های مقاوم به گونه *P. cambivora* گزارش شده است. این پایه برای تکثیر ارقام هلو و بادام کاربرد وسیعی دارد.

در تحقیقات گازمن و همکاران (Guzman *et al*., 2007) که در کشور شیلی انجام گرفت، حساسیت پایه‌های رویشی وایکینگ: ([*P. persica* × *P. davidiana*] × [*P. dulcis Jordanolo* × *P. blireiana*])، نماگارد:

(*P. persica*×*P. davidiana*) ، کادمن-آویماگ: *P. persica*×*P. davidiana* و Mr.S 2/5: *P .cerasifera*×*P. spinosa* به پوسیدگی فیتوفتورائی ناشی از گونه *P. cryptogea* را بررسی کردند. بر اساس نتایج، Mr. S 2/5 مقاومت نسبی بالاتری نشان داد. اگرچه پایه نماگارد به دلیل مقاومت بالا به نماتد ریشه گرهی(Meloidogyne) و صفات مطلوب مورد استقبال باغداران در سراسر جهان واقع شده است ولی به نماتد مولد زخم، باکتری مولد گال و برخی از گونه‌های فیتوفتورا حساس است (Dozier *et al*., 1984).

در ایران، قادری (۱۳۸۹) واکنش تعدادی از ارقام و ژنوتیپ‌های هلو به *P. cactorum* را بررسی کرد و نشان داد که تفاوت معنی‌داری در سطوح مقاومت ارقام مختلف هلو وجود دارد و رقم تلخه به‌عنوان رقم مقاوم شناخته شد. با توجه به اهمیت استفاده از ارقام مقاوم، در این مطالعه برای نخستین بار سطوح مقاومت ژنوتیپ‌های آلو به *P. cactorum* بررسی شد.

در مجموع، نتایج این تحقیق نشان داد که می‌توان از روش‌های درون‌شیشه‌ای برای ارزیابی واکنش ژنوتیپ‌های مختلف آلو و گوجه که تکثیر رویشی آن‌ها با سختی و با صرف وقت و هزینه زیاد انجام‌پذیر است استفاده کرد. روش مورد استفاده در این تحقیق جهت بهینه شدن نیاز به تکرارهای بیش‌تری دارد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: کلیه مواد گیاهی ارزیابی شده در این تحقیق از کلکسیون منحصر به فرد آلو و گوجه بخش تحقیقات باغبانی موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر واقع در مشگین‌دشت کرج جمع‌آوری شدند. این ژنوتیپ‌ها علاوه بر داشتن صفات مطلوب در میوه خود، به دلیل سهل ریشه‌زائی قابلیت استفاده به‌عنوان پایه را نیز دارند. سری نام‌های این ژنوتیپ‌ها به شرح زیر بودند: ۳۵۴۷، ۳۵۵۴، ۳۵۵۳، ۳۵۴۲، ۳۵۳۸، ۳۵۱۵، ۳۵۱۲، ۳۵۲۸.

نمونه‌برداری از درختان آلوده: هشت نمونه گیاهی آلوده از درختان میوه هسته‌دار شامل هلو، شلیل، زردآلو، آلو، بادام و گیلاس از ایستگاه‌های تحقیقات باغبانی کمال‌شهر و مشگین‌دشت در بهار ۱۳۹۲ جمع‌آوری شدند. در درختان آلوده، خاک اطراف طوقه و یقه تا سطح ریشه‌ها کنار زده و از بافت چوب در مرز ناحیه سالم و آلوده قطعاتی برش داده و به آزمایشگاه بخش تحقیقات باغبانی مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر منتقل گردیدند.

جداسازی و شناسائی عامل بیماری: بافت‌های گیاهی آلوده زیر جریان ملایم شیر آب شسته و پس از ضدعفونی سطحی با الکل ۷۵٪ به مدت ۵-۳ دقیقه، از حد فاصل بافت آلوده و سالم قطعاتی بریده و روی محیط کشت نیمه انتخابی CMA-PCRP کشت شدند. این محیط کشت شامل پیماریسین (دلواسید)، کاربندازیم و ریفامپیسین هر کدام به مقدار ppm ۱۰ و گاهی پنتاکلرونیتروبنزن (PCNB) به مقدار ppm ۱۷۵ در محیط پایه آرد ذرت آگار (CMA) بود. ترکیبات یاد شده بعد از اتوکلاو کردن محیط کشت پایه و خنک شدن آن تا دمای ۶۰-۵۰ درجه سانتی‌گراد، اضافه شدند. محلول مادری پیماریسین در آب مقطر سترون، کاربندازیم در حلال DMSO ، ریفامپیسین و PCNB در الکل ۹۶ درجه تهیه و در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (ارشاد، ۱۳۷۱).

از آن جا که بسیاری از گونه‌های فیتوفتورا در محیط کشت، نسبت به قارچ‌های دیگر رشد کندتری دارند، بنابراین از ۴۸ ساعت تا ۱۰-۷ روز پس از کشت تشتک‌ها به طور مداوم بررسی شدند تا ریسه‌ها ردیابی شوند. پس از مشاهده ریسه، تشتک‌ها زیر میکروسکوپ بررسی و در صورت وجود ریسه‌های فیتوفتورا، قطعاتی از حاشیهٔ پرگنه برداشته و به محیط کشت‌های آب هویج-آگار یا آب-آگار منتقل شدند. خالص‌سازی جدایه-ها با روش نوک‌ریسه انجام شد. نگهداری طولانی مدت درون شیشه‌های مک‌کارتی حاوی آب مقطر سترون در دمای اتاق صورت گرفت. به‌منظور تولید اسپورانژیوم برای شناسائی و تعیین گونه از عصاره خاک (Soil leachate water) استفاده گردید. قطعات کوچکی از کشت‌های جوان در تشتک‌های حاوی عصاره خاک غوطه‌ور شده و به‌مدت ۴۸-۲۴ ساعت در زیر نور مهتابی در دمای اتاق قرار گرفتند. شکل

اسپورانژ، وجود یا عدم وجود پاپیل، ریزان یا غیرریزان بودن اسپورانژ ، نحوهٔ استقرار اسپورانژیوم‌ها روی اسپورانژیوفور و یا نوع اسپوراژیوفور و آماس ریسه بررسی شدند (ارشاد،۱۳۷۱) .

تهیه مایه تلقیح: از کشت‌های جوان فیتوفتورا بر روی محیط کشت MS برای مایه‌زنی شاخساره‌های آلو استفاده گردید. برای این منظور دانه‌های گندم خیس خورده به‌مدت ۱۰ دقیقه در آب شهری جوشانده و سپس گندم‌ها درون ظروف ارلن‌مایر یک لیتری در دو روز متوالی اتوکلاو شدند. پس از مایه‌زنی گندم‌ها با جدایه منتخب فیتوفتورا، ظروف ارلن مایر در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در تاریکی نگهداری شدند تا پرگنه قارچ همه دانه‌ها را بپوشاند. از دانه‌های حاوی پرگنه قارچ برای مایه‌زنی محیط‌های MS حاوی شاخساره‌ها استفاده گردید.

ارزیابی مقاومت در شرایط درون شیشه: با توجه به زمان بر بودن تکثیر ژنوتیپ‌های آلو در شرایط گلخانه، از روش‌های درون شیشه‌ای و با استفاده از محیط کشت MS (Murashige and Skooge, 1962) حاوی ppm ۱۰ قارچ‌کش کاربندازیم استفاده شد. در اواخر فروردین و یا اواسط شهریور، شاخه‌های جوان و سالم یک ساله از ژنوتیپ‌های مختلف جمع‌آوری شدند. شاخه‌ها به قطعات کوچک ۲ سانتی‌متری هر یک حاوی ۲-۳ جوانه بریده شده و پس از شستشو با مایع شوینده ظرفشویی، به‌مدت ۱۵ دقیقه در محلول سفید کننده ۲۰ درصد (حاوی هیپوکلریت سدیم ۵ درصد) ضدعفونی سطحی شدند. سایر مراحل شستشو، خشک کردن و انتقال به محیط کشت MS در زیر هود لامینار انجام شد.

پس از استقرار ریزنمونه‌ها و پُرآوری، شاخساره‌ها واکشت شدند و دو هفته بعد، با استفاده از دانه‌های گندم پوشیده شده با فیتوفتورا، مایه‌زنی شدند. یک عدد گندم آلوده در پای هر گیاهچه قرار داده شد. شیشه‌های مایه‌زنی شده به اتاق رشد مخصوص با دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی به‌مدت ده روز قرار گرفتند تا علائم نکروز روی شاخساره‌ها پدیدار شود. در تکرار شاهد، از دانه‌های گندم سترون در پای شاخساره‌ها استفاده گردید.

طول نکروز روی هر شاخه ۱۰ روز بعد از مایه‌زنی با استفاده از کولیس دیجیتال اندازه‌گیری شد. با اندازه‌گیری طول کل شاخساره، نسبت طول نکروز به طول کل شاخساره به‌عنوان شاخص پیشرفت نکروز محاسبه و با محاسبه درصد آن، واکنش هر شاخساره با استفاده از یک مقیاس چهار تائی به شرح زیر تعیین گردید. مقاوم (R): ۳۰-۰ درصد؛ نیمه مقاوم (MR): ۵۰-۳۱ درصد؛ نیمه حساس (MS): ۷۰-۵۱ درصد؛ و حساس (S): ۱۰۰-۷۱ درصد (Lindermann and , 2007 Davis). آزمایش شامل پنج تکرار (شیشه مربائی) برای هر ژنوتیپ (چهار تکرار برای تیمار و یک تکرار برای شاهد) و پنج شاخساره در هر تکرار بود. شاخص پیشرفت نکروز (نسبت طول نکروز به طول کل شاخساره) بر اساس طرح کاملاً تصادفی نامتعادل با نرم‌افزار آماری SAS تجزیه و تحلیل آماری و میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه شدند.

نتایج

نمونه‌برداری از درختان آلوده: درختان آلوده در اوایل بهار دیرتر سبز شده و برگ آن‌ها کوچک‌تر از سایر درختان بوده و دچار زردی و تنکی تاج شده و در برخی از درختان، شانکر روی تنه و طوقه قابل مشاهده بود. معمولاً خاک اطراف ریشه نیز دارای بافت کاملاً سنگین و رسی بود و درختان آلوده در گودی داخل جوی آب قرار داشتند. در مواردی که توسعه بیماری شدید بود، میوه‌ها در آخر فصل روی درخت باقی می‌ماندند درحالی‌که برگ‌ها کاملاً خزان می‌کردند.

جداسازی فیتوفتورا

جداسازی بیمارگر فیتوفتورا از بافت‌های پوسیده به‌دلیل حضور قارچ‌های ساپروفیت مشکل بوده و نیاز به محیط کشت انتخابی دارد. هیف‌های بدون دیواره اُمیست‌ها (Oomycetes) از پرگنه‌های رشد کرده روی محیط کشت‌های نیمه انتخابی (CMA-PCRP) به محیط کشت‌های عمومی به‌ویژه آب هویج آگار (Carrot Juice Agar, CA) منتقل شدند.

لازم است فرآیند جداسازی در روزهای نخست صورت بگیرد تا محیط کشت توسط قارچ‌های گندرو پوشیده نشود. محیط کشت آب هویج آگار به دلایل متعدد، بهترین محیط کشت برای تکثیر و مطالعه فیتوفتوراها تشخیص داده شد. زیرا رشد هیف‌ها روی آن در حالت حد واسط محیط کشت‌های عمومی دیگر مثل آرد ذرت- آگار و سیب زمینی-دکستروز-آگار بود. به‌علاوه روش تهیه آن ساده‌تر از دو محیط دیگر و هزینه تهیه آن نیز پایین‌تر بود.

جداسازی فیتوفتورا از ریشه‌های پوسیده درختان هسته‌دار دشوار بود زیرا قارچ پی‌تیوم حضوری فعال در این بافت‌ها داشت. علاوه بر اُمیست‌ها، قارچ‌های ناقص مثل Fusarium، Macrophomina و Rosellinia نیز از ریشه برخی از درختان میوه هسته‌دار جدا شد.

پنتاکلرونیتروبنزن (PCNB) تأثیری در ممانعت از رشد فوزاریوم‌ها نداشت. بهترین غلظت PCNB در ممانعت از رشد ساپروفیت‌های Penicillium، Alternaria و Aspergillus، ppm ۱۷۵ تعیین شد (داده‌ها نشان داده نشده‌اند). پیماریسین بر ساپروفیت‌ها و گونه‌های مختلف فوزاریوم موثر بود ولی اثری روی زیگومیست‌های سریع‌الرشد نداشت. از قارچ‌کش هایمکسازول که معمولاً برای ممانعت از رشد پی‌تیوم‌ها در محیط‌کشت‌های نیمه‌انتخابی اضافه می‌گردد، استفاده نشد زیرا بر رشد برخی گونه‌های فیتوفتورا مثل گونه *P. cactorum* اثر منفی دارد (Drenth and Sendall, 2001). در نهایت دو جدایه فیتوفتورا به شرح جدول ۱ به‌دست آمدند.

جدول ۱- جدایه‌های فیتوفتورای به‌دست آمده از درختان میوه هسته‌دار ایستگاه تحقیقاتی کمال‌شهر

Table 1. Isolates of Phytophthora obtained from stone fruit trees in Kamalshahr Research Station

شماره جدایه	نام جدایه	گونه	میزبان		بافت گیاهی کشت شده	
Isolate No.	Isolate name	Species	Host		Cultured tissue	
1	ST107	*P. cactorum*	Apricot	زردآلو	Crown	طوقه
2	ST153	*P. cactorum*	Almo	بادام	Root	ریشه

ریخت هر دو پرگنه بر روی محیط کشت CA نامنظم یا بدون ساختار بود که با کلید ارشاد (۱۳۷۱) مطابقت داشت. هر دو جدایه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد رشد مناسبی داشته و سطح تشتک نه سانتی‌متری را در عرض ده روز پر کردند. جدایه‌ها جور ریسه (Homothallic) بودند و هر کدام به‌تنهائی روی محیط کشت‌های جامد مثل CA تعداد زیادی ااسپورهای جنسی ااسپور تولید کردند. دیواره اووگونیوم صاف و شفاف بود و میانگین قطر ۲۹ میکرومتر بود. آنتریدی‌ها عموماً به صورت پاراژن (Paragyneous) بوده ولی گاهی به صورت آمفیژن (Amphygyneous) هم مشاهده شدند. قطر ااوسپورها در حدود ۲۵-۲۳ میکرومتر بود. اسپورانژیوم‌ها معمولاً بیضوی ولی گاهی کروی و دارای پاپیل برجسته (Papillate) بودند (شکل ۱). با در نظر گرفتن مشخصات یادشده هر دو گونه به‌عنوان *P. cactorum* شناسائی گردیدند.

شکل ۱- پاپیل برجسته در نوک اسپورانژیوم *P. cactorum*

Fig. 1. Papillate sporangium in *P. cactorum*

از شاخه‌های‌هوائی درختان آلوده نیز نمونه‌برداری گردید ولی فیتوفتورا جداسازی نگردید. برای ارزیابی سطوح مقاومت در شرایط درون شیشه‌ای از جدایه ST107 استفاده گردید.

نتایج حاصل از مایه زنی گیاهچه‌های کشت بافتی

اندازه‌گیری طول نکروز (شکل ۲) ده روز پس از مایه‌زنی نشان داد که شاخص پیشرفت نکروز در ژنوتیپ‌ها متفاوت بود (جدول ۲). براساس مقیاس چهار تایی، هفت ژنوتیپ ۳۵۴۷، ۳۵۵۴، ۳۵۵۳، ۳۵۴۲، ۳۵۳۸، ۳۵۲۸ و ۳۵۱۵ با بیش از ۷۰ درصد آلودگی به‌عنوان حساس، و ژنوتیپ ۳۵۱۲ به عنوان نیمه مقاوم دسته‌بندی شدند (جدول ۳).

به‌دلیل آلودگی باکتریائی و یا فنله شدن برخی از شاخساره‌ها، امکان یادداشت‌برداری از آن‌ها وجود نداشت و داده‌های مربوط به آن‌ها حذف گردیدند. بنابراین از طرح کاملاً تصادفی نامتعادل استفاده گردید.

شکل۲- نکروز شاخساره آلوی کشت بافتی آلوده شده با *P. cactorum*

Fig. 2. Necrosis of plum shoot infected with *P. cactorum*

جدول ۲- تجزیه واریانس شاخص پیشرفت نکروز (طول شاخساره / طول نکروز) ایجاد شده توسط جدایه *P. cactorum* ST107 روی شاخساره‌های هشت ژنوتیپ آلو

Table 2. Analysis of variance of necrosis extension index (necrosis length/shoot length) induced by *P. cactorum* isolate ST107 on shoots of eight plum genotypes

S.O.V.	منبع تغییرات	درجه آزادی df.	میانگین مربعات MS
Genotype	ژنوتیپ	7	2.204*
Error	خطا	107	12.386
Total	کل	114	14.590
CV.%	درصد ضریب تغییرات		45.000

*: Significant difference at 5% level of probability. *: معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪.

با محاسبه میانگین درصد شاخص پیشرفت نکروز برای هر ژنوتیپ و استفاده از مقیاس چهار قسمتی، واکنش هر ژنوتیپ تعیین گردید (جدول ۳). همه ژنوتیپ‌ها به این بیماری در شرایط درون شیشه آلوده شدند و هفت ژنوتیپ با درصد میانگین شاخص بالای ۷۰ درصد واکنش حساسیت نشان دادند. تنها ژنوتیپ ۳۵۱۲ با میانگین شاخص ۴۷ درصد واکنش نیمه مقاوم نشان داد (جدول۳). بروز واکنش‌های دو حالتی صفر (شاخساره بدون نکروز) یا یک (بروز نکروز در تمام طول شاخساره) در بسیاری از مشاهدات، ممکن حاکی از وجود مقاومت عمودی در ژنوتیپ‌های آلو به این بیماری باشد.

جدول ۳- مقایسه میانگین شاخص پیشرفت نکروز ایجاد شده توسط جدایه *P. cactorum* ST107 روی شاخساره‌های هشت ژنوتیپ آلو و واکنش آن‌ها به بیماری

Table 3. Mean comparison of necrosis extension index (necrosis length/shoot length) induced by *P. cactorum* isolate ST107 on shoots of eight plum genotypes and their response to disease

کد ژنوتیپ Genotype code	میانگین شاخص پیشرفت نکروز Necrosis extension index mean	واکنش Reaction	
3547	0.96a	S	حساس
3554	0.88a	S	حساس
3553	0.79a	S	حساس
3542	0.73ab	S	حساس
3538	0.72ab	S	حساس
3515	0.71ab	S	حساس
3528	0.70ab	S	حساس
3512	0.47b	MR	نیمه مقاوم

S: Susceptible; MR: Moderately Resistant.

میانگین‌ها با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن هستند.

Mean with different letters are significantly different at 5% level of probability according to Duncan's multiple range test.

بحث

جداسازی اُاُمیست فیتوفتورا از درختان میوه به دلیل مشکلات نمونه‌برداری و مشابهت علائم با سایر بیماری‌ها، حضور قارچ‌های گندرو و گونه‌های پی‌تیوم و ریسک استفاده از قارچکش‌هایمکسازول (به دلیل اثر ممانعت کنندگی که روی رشد برخی از گونه‌های فیتوفتورا دارد)، همواره با مشکلات جدی همراه است. آنتی‌بیوتیک یاد شده که برای جلوگیری از رشد پی‌تیوم‌ها و سایر اُاُمیست‌ها به محیط کشت‌های نیمه انتخابی افزوده می‌شود، می‌تواند از رشد برخی از گونه‌های فیتوفتورا از جمله *P. cactorum* جلوگیری نماید (Kato *et al*., 1990; Jeffers and Aldwinckle, 1987). بنابراین در محیط کشت‌های مورد استفاده در این تحقیق، از این ماده استفاده نشد. علاوه‌براین، فیتوفتورا در رقابت با سایر قارچ‌های گندرو بسیار کند رشد می‌کند بنابراین جداسازی آن کار ساده‌ای نیست. جداسازی مکرر گونه‌های متعدد پی‌تیوم از درختان میوه هسته‌دار می‌تواند دلیلی بر نقش آن‌ها در ایجاد بیماری باشد که نیاز به تحقیق و بررسی بیش‌تری دارد. یکی از اهداف مهم در اصلاح درختان میوه هسته‌دار دستیابی به یک پایه هیبرید بین‌گونه‌ای با زمینه ژنتیکی آلو و گوجه

است که قابلیت پیوند با اکثر هسته‌داران را داشته باشد. پایه‌های آلو و گوجه نسبت به شرایط کم آبی، خاک‌های قلیائی و بسیاری از بیماری‌های خاکزی تحمل بالائی نشان داده و در خاک‌های ایران بسیار سازگار هستند (رادنیا، ۱۳۷۵). ژنوتیپ‌های موجود در کلکسیون آلو و گوجه واقع در ایستگاه تحقیقات باغبانی مشکین‌دشت کرج مجموعه منحصر به فردی را تشکیل می‌دهند که شامل تعدادی رقم، پایه و رقم-پایه است. مقاوم بودن به بیماری‌های خاکزی از جمله فیتوفتورا از مهم‌ترین ویژگی‌های یک پایه خوب به حساب می‌آید. اگرچه در برخی منابع عنوان شده است که پایه‌های آلو و گوجه در بین هسته‌داران دارای تحمل نسبی بالاتری به فیتوفتورا هستند (Browne and Mircetich, 1995) ولی ارزیابی‌های آزمایشگاهی قبل از معرفی ژنوتیپ‌های امیدبخش امری لازم است.

یکی دیگر از چالش‌های اصلی در ارزیابی مقاومت پایه‌ها به فیتوفتورا، انتخاب گونه مورد نظر فیتوفتورا برای مایه‌زنی پایه‌هاست. در این تحقیق صرفاً نمونه‌های آلوده باغ کمال‌شهر و مشگین‌دشت مورد بررسی واقع شدند و در بررسی‌های محدود انجام شده در این تحقیق، گونه *P. cactorum* به دست آمد؛ ولی تنوع گونه‌های فیتوفتورا در منطقه و کشور هنوز بر ما آشکار نشده است. به‌عنوان مثال در ایالات متحده آمریکا، گونه‌های متعددی از فیتوفتورا به‌عنوان عامل بیماری‌زای پوسیدگی فیتوفتورائی ریشه و طوقه گردو معرفی می‌شوند و برنامه‌های اصلاحی برای برخی از گونه‌های مهم هم‌زمان انجام می‌شود (Mircetich and Matheron, 1983). در اروپا گونه *P. cinnamomi* به‌عنوان گونه اصلی مخرب گردو معرفی شده و ارزیابی‌های اصلاح به بیماری نسبت به گونه یاد شده انجام می‌شود (Vettraino *et al*., 2003). بنابراین مطالعات گسترده در سطح کشور لازم است تا گونه‌های اصلی فیتوفتورای بیماری‌زا روی پایه‌های هسته‌داران تعیین گردند.

تاکنون ارزیابی مقاومت ارقام و پایه‌های آلو و گوجه در کشور به این بیماری به‌خصوص با استفاده از گیاهچه‌های کشت بافتی انجام نشده است. روش مورد استفاده در این تحقیق بسیار سریع و آسان انجام شد. به خصوص این‌که ریزازدیادی ژنوتیپ‌های آلو و گوجه روی محیط کشت MS و امکان گسترش تعداد ژنوتیپ‌ها به بیش از ۲۰ عدد به راحتی امکان‌پذیر بود. فناوری کشت بافت کاربردهای زیادی در اصلاح گیاهان به انواع بیماری‌ها دارد (van den Bulk, 1991). لیندرمان و دیویس (Lindermann and Davis, 2007) علائم بیماری روی گیاهچه‌های کشت بافتی را با مقیاس چهار تایی بررسی و واکنش درختان مختلف جنگلی را به بیمارگر *P. ramorum* ثبت کردند. پایه‌های آووکادو نیز در شرایط درون شیشه به بیمارگر *P. cinnamomi* غربال شدند (Kurtz, 2012). تعداد گیاهان سالم، تعداد و اندازه زخم‌های ریشه برای رده‌بندی سطوح مقاومت به کار گرفته شدند. پایه‌های سیب MM106 و M26 نیز در شرایط درون‌شیشه‌ای با عصاره *P. cactorum* غربال شدند که برخی مقاومت بالائی نشان دادند. این عصاره برای غربال کلون‌های توت فرنگی در محیط کشت بافتی نیز با موفقیت به‌کار برده شد (Rosati *et al*., 1990).

منابع References

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

بنی‌هاشمی، ض. و سرتیپی، ا. ۱۳۸۳. شناسائی گونه‌های Phytophthora همراه با پوسیدگی طوقه درختان میوه هسته‌دار در استان فارس و عکس‌العمل برخی پایه‌ها به *P. cactorum*. علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی ۸: ۲۴۸-۲۴۱.

رادنیا، ح. ۱۳۷۵. پایه‌های درختان میوه (ترجمه). نشر آموزش کشاورزی، کرج.

قادری، ف. ۱۳۸۹. علل خشکیدگی و زوال درختان هلو در استان کهگیلویه و بویراحمد. خلاصه مقالات نوزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، تهران.صفحه ۳۱۰.

Anonymous, 2014. FAO Statistics of Agricultural Crops in the World. Available: www.fao.org.

Browne, G. T. and Mircetich, S. M. 1995. Phytophthora root and crown rot. pp 38-40. In: Ogawa, J.M., Zehr, E.I., Bird, G.W., Ritchie, D.F., Uriu, K. and Uyemoto, J.K. (eds.) Compendium of Stone Fruit Diseases. American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota, USA.

Dozier, W. A. J., Knowles, J. W., Carlton, C. C., Rom, R. C., Arrington, E. H., Wehunt, E. J., Yadava, U. L., Doud, S. L., Ritchie, D. F., Clayton, C. C., Zehr, E. I., Gambrell, C. E., Britt, J. A. and Lockwood, D. W. 1984. Survival, growth and yield of peach trees as affected by rootstocks. HortScience 19: 26-30.

Drenth, A. and Sendall, B. 2001. Practical Guide to Detection and Identification of Phytophthora. CRC for Tropical Plant Protection, Brisbane, Australia.

Duniway, J. 1983. Role of physical factors in the development of phythophthora diseases. pp: 175-187. In: Erwin, D.C. (ed.) Phytophthora: Its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology. American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota, USA.

Erwin, D. C. and Ribeiro, O. K. 1996. Phytophthora Diseases Worldwide. University of California Press, California, USA. 562 pp.

Guzmán, G., Latorre, B. A., Torres, R. and Wilcox W. F. 2007. Relative susceptibility of peach rootstocks to crown gall and Phytophthora root and crown rot in Chile. Ciencia e Investigacion Agraria 34: 23-32.

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

Kato, S., Coe, R., New, L. and Dick, M. W. 1990. Sensitivities of various oomycetes to hymexasol and metalaxyl. Journal of General Microbiology 136: 2127-2134.

Kurtz, S. L. 2012. 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.

Mircetich, S. M. and Matheron, M. E. 1983. Phytophthora root and crown rot of walnut trees. Phytopathology 73: 1481-1488.

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

Ribeiro, O. K. and Linderman, G. 1991. Chemical and biological control of Phytophthora species in woody plants. pp. 299-410. In: Lucas, J.A., Shattock, R.C., Shaw, D.S. and Cook, L.R. (eds.) Phytophthora. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Ristaino, J. B. and Duniway, J. M. 1989. Effect of preinoculation and postinoculation water stress on the severity of Phytophthora root rot in processing tomatoes. Plant Disease 73: 349-352.

Rosati, P., Mezzetti, B., Ancherani, Foscolo, S., Predieri, S. and Fasolo, F. 1990. *In vitro* selection of apple rootstock somaclones with *Phytophthora cactorum* culture filtrate. Acta Horticulturae 280: 409-416.

Thomidis, T. **2000.** Field susceptibility of four peach rootstocks to *Phytophthora citrophthora* and *Phytophthora syringae*. Phytopathologia Mediterranea 39: 404-409.

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.

Vettraino, A. M., Belisario, A., Maccaroni, M. and Vannini, A. 2003. Evaluation of root damage to English walnut caused by five Phytophthora species. Plant Pathology 52**:** 491–495.