

بررسی بیماری‌زایی جدایه‌هایی از *Phytophthora* و* *Pythium* (sensu lato) روی شاخه‌های بریده و دانه‌های بادامPATHOGENICITY OF SOME ISOLATES OF *PYTHIUM* AND *PHYTOPHTHORA* ON DETACHED SHOOTS AND SEEDLINGS OF ALMONDزینب عزیزی^۱، جهانشیر امینی^{۱*}، مهیار شیخ‌الاسلامی^۲ و سعید عباسی^۳

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱۲/۱۵؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۶/۱۵)

چکیده

در بازدهایی که طی سال‌های ۹۰-۱۳۸۹ از نهالستان‌ها و باغ‌های مختلف بادام در استان کرمانشاه به عمل آمد، از نهال‌ها و درختان بادام با علائم مشکوک به آلودگی به گونه‌های پیتیوم و فیتوفتورا و خاک همراه با طوقه و ریشه آلوده نمونه برداری شد. نمونه‌ها در محیط‌های کشت عمومی و نیمه انتخابی کشت و جدایه‌هایی از جنس‌های *Phytophthora*، *Ovatisporangium* و *Pythium* به دست آمده بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیک و پاره‌ای خصوصیات فیزیولوژیک مطالعه و شناسایی شدند. آزمون بیماری‌زایی جدایه‌ها روی شاخه‌های بریده در شرایط آزمایشگاه و هم‌چنین دانه‌های بادام در گلخانه انجام گرفت. در این تحقیق، دوازده جدایه، اکثراً از خاک همراه با طوقه و ریشه به دست آمد که متعلق به گونه‌های *Phytophthora cactorum*، *Pythium aphanidermatum*، *Ovatisporangium helicoides* و *Pythium group-G* بودند. در آزمون بیماری‌زایی روی شاخه‌های بریده از نظر میزان توسعه بیماری، بین تیمارهای مختلف اختلاف بسیار معنی‌داری در سطح آماری یک درصد دیده شد. در این آزمون بیشترین میزان توسعه بیماری توسط *P. cactorum* ایجاد شد و *O. helicoides* در مرتبه بعدی قرار گرفت. اختلاف میزان توسعه علائم بیماری توسط قارچ‌های *P. aphanidermatum* و *P. group-G* روی شاخه‌های بریده با شاهد معنی‌دار نبود. در آزمون بیماری‌زایی روی دانه‌های بادام در گلخانه جدایه‌های *P. cactorum* در مدت ۷ روز پس از مایه‌زنی سبب سبز خشکی و مرگ سریع نهال‌ها شدند. در مورد جدایه‌های *P. aphanidermatum* و *O. helicoides* پس از گذشت ۴۰ روز پس از مایه‌زنی علائم خشکیدگی روی دانه‌های بادام ایجاد شد، حال آن‌که *P. group-G* در هیچ شرایطی علائم بیماری را نشان نداد. این اولین گزارش از شناسایی و بیماری‌زایی گونه *O. helicoides* است.

واژه‌های کلیدی: بادام، استان کرمانشاه، بیماری‌زایی، *Phytophthora cactorum*، *Pythium aphanidermatum*،*Pythium Group-G*، *Ovatisporangium helicoides*

* بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول ارائه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان

** مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: aminij2002@yahoo.com

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان

۲. استادیار پژوهش بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه

۳. استادیار بیماری‌شناسی گیاهی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی، کرمانشاه

مقدمه

اند (Brown & Viveros 1999). بر اساس مطالعات انجام شده در سایر نقاط دنیا به نظر می‌رسد که هلو، بادام، زردآلو و گیلاس به طور کلی به گونه‌های مختلف فیتوفتورا حساس بوده و تنها آلو تا حدودی مقاوم است (Hudson et al. 1990). تعدادی از گونه‌های پیتيوم از جمله مخرب‌ترین بیمارگرهای گیاهی هستند و باعث بیماری بوته میری در گیاهان می‌شوند (Agrios 2005; Robertson 1980). در تحقیقی که به منظور شناسایی علت پوسیدگی ریشه‌های اولیه نهال سیب در استرالیا انجام شد معلوم شد که گونه‌های *P. sylvaticum*، *P. Ultimum* و *P. intermedium* بیمارگرهای قوی روی ریشه اولیه نهال سیب هستند (Mulder 2001). هدف از این تحقیق شناسایی عوامل بیماریزای فیتوفتورا و پیتيوم عامل پوسیدگی ریشه و طوقه بادام در استان کرمانشاه بود.

روش بررسی

طی ماه‌های اردیبهشت تا شهریور ماه سال‌های ۹۰-۱۳۸۹ از نهالستان‌ها و باغ‌های بادام در مناطق مختلف استان کرمانشاه به ویژه شهرستان صحنه که قطب تولید نهال و میوه در استان به شمار می‌رود بازدید و از قسمت‌های طوقه، ریشه و خاک همراه با ریشه درختان نمونه برداری انجام شد. نمونه‌ها پس از شستشو و ضدعفونی روی محیط کشت عمومی آرد ذرت-آگار (CMA) به همراه آنتی بیوتیک کشت و پس از رشد به روش نوک ریشه خالص سازی گردید (Erwin & Ribeiro 1996; Ershad 1992). شناسایی نمونه‌های قارچ بر اساس شکل و اندازه اسپورانژ، شکل اندام جنسی نر و ماده (آنتزیدی و اگونیموم)، شکل اسپور جنسی و میزان رشد در دماهای مختلف انجام گردید (Ershad 1992). آزمون بیماری‌زایی جدایه‌های قارچ با استفاده از دو روش مایه‌زنی شاخه‌های بریده (Detached shoots) و ریشه دانهال‌های دو ماهه بادام استفاده شد. در آزمون بیماری‌زایی روی شاخه‌های بریده شده از شاخه‌های یک ساله درختان بادام به طول ۲۰ تا ۲۵ سانتی‌متر و قطر حدود یک سانتی‌متر استفاده گردید. بدین صورت بعد از حذف شاخه‌های فرعی و برگ‌های اضافی،

بادام با نام علمی *Prunus amygdalus* از تیره Rosaceae بوده و در اکثر کشورهای آسیایی و حوزه مدیترانه کشت می‌گردد (Grasselly & Duval 1997). ایران دارای مقام چهارم تولید بادام در سطح جهان است و در اکثر استان‌های کشور کشت می‌گردد (Anonymous 2010). متوسط عملکرد بادام در کشور در مقایسه با سایر کشورهای جهان بسیار کم بوده و کاهش عملکرد باغ‌های بادام تا حدی ناشی از بیماری‌هایی است که منجر به بروز علائمی چون ضعف، زوال و در نهایت خشکیدگی درخت می‌شود. مرگ نهال‌ها و درختان بارور توسط قارچ‌های بیماری‌زای خاک‌زاد یکی از مشکلات تولیدکنندگان این گونه محصولات هستند. از بین قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی گونه‌های *Phytophthora* و *Pythium* که موجب پوسیدگی ریشه و طوقه درختان میوه هسته‌دار در جهان و ایران می‌شوند از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند. بیش از یازده گونه فیتوفتورا از درختان میوه هسته‌دار گزارش شده است (Erwin & Ribeiro, 1996) که از بین آنها *P. cactorum* اهمیت بیشتری داشته و از تمام درختان بجز بادام جداسازی شده است. در کشور ما نیز با مطالعات انجام شده روی درختان میوه، تاکنون شش گونه فیتوفتورا شامل *P. cryptogea* از روی بادام و گلابی، *P. cactorum* از روی زردآلو، گیلاس، گردو و سیب، *P. citrophthora* از روی بادام، زردآلو، گیلاس، گردو و سیب، *P. citricola* از روی بادام و گیلاس، *P. drechsleri* از روی هلو و *P. capsici* از روی گیلاس و هلو و *P. iranica* از روی آلو و بادام گزارش شده است (Banihashemi 1986 & 1991 & 1995, Zaki & Ershad 1994, Afzali & Khabbaz Jolfai 2004, Behrouzin & Ershad 1989, Alizadeh & Agharafee 1997, Ershad 1998). تحقیقات انجام شده در کالیفرنیا نشان می‌دهد که دو گونه *P. cactorum* و *P. citricola* عامل بیماری شانکر و پوسیدگی طوقه درختان بادام می‌باشد (Brown & Viveros 1998) به طوری که گونه *P. citricola* اکثراً از شانکرهای بالای سطح خاک و گونه *P. cactorum* اکثراً از شانکرهای محدود به زیر سطح خاک جداسازی شده

خارج شده و بعد از شست و شو در زیر شیر آب و ضدعفونی با الکل اتیلیک ۷۰ درصد، بافت‌های بیمار روی محیط کشت نیمه انتخابی کشت داده شدند. داده‌های حاصل در قالب طرح کامل تصادفی توسط نرم افزار SAS 9.1 تحلیل شدند.

نتیجه و بحث

در این بررسی، دوازده جدایه قارچ از نقاط مختلف استان بیشتر از باغ‌های محدوده شهرستان صحنه جمع‌آوری گردید که بر اساس ویژگی‌های مشاهده شده به چهار گروه تقسیم شدند: از گروه اول سه جدایه مطالعه شد. اعضای این گروه با استفاده از کلیدهای شناسایی معتبر (Waterhouse 1963, Stamps et al 1992, Ershad 1990) تحت نام *Phytophthora cactorum* تشخیص داده شدند. ریزان بودن اسپورانژیوم‌ها و رشد در دماهای ویژه آنها را از دیگر گونه‌های این گروه مجزا می‌سازد. تاکنون بیش از ۱۱ گونه فیتوفتورا از درختان میوه هسته‌دار از سایر کشورها گزارش شده است که اکثر گونه‌ها از زردآلو و بادام جداسازی و تنها ۴ گونه از هلو گزارش شده است (Erwin & Ribiero 1996). در کالیفرنیا جداسازی و بیماری‌زایی گونه *P. cactorum* روی بادام، توت‌فرنگی و گردو آزمایش و به اثبات رسیده است (Bhat 2006). در بررسی علل مرگ و میر درختان بادام در استان‌های آذربایجان شرقی، چهارمحال و بختیاری، کرمان و شاهرود گونه *P. cactorum* را به عنوان یکی از عوامل زوال درختان بادام در این استانها گزارش نمودند (Zaker & Zare 2005).

از گروه دوم دو جدایه از روستای عبدالمحمد شهرستان صحنه و از خاک همراه ریشه درختان بادام بیمار جدا گردید. اعضای این گروه با استفاده از کلیدهای شناسایی معتبر (Van der plats-Niterink 1981, Dick, 1990) تحت نام *Ovatispora (Pythium) helicoides* تشخیص داده شدند. این گونه با داشتن آنتریدیوم‌های منظم و بدون شیار در سطح و پیچیدگی ساقه اوگونیموم در اطراف انشعابات اوگونومیوم از گونه‌های نزدیک به آن تفکیک می‌شود. این اولین گزارش از

ضدعفونی سطحی با الکل اتیلیک ۹۶ درصد انجام شد و سپس شاخه‌ها را روی دستمال کاغذی استریل پهن کرده تا کاملاً خشک شدند، شکاف‌هایی به صورت اریب، با طول تقریبی سه سانتی‌متر توسط چاقوی سترون در پوست آنها ایجاد گردید. و قرصی از حاشیه پرگنه‌ی در حال رشد قارچ به قطر ۸ میلی‌متر در زیر پوست قرار داده شده و پس از برگرداندن پوست روی آن توسط پارافیلیم پوشانده شد. شاخه‌های مایه‌زنی شده هریک به صورت جداگانه در یک لوله آزمایش حاوی آب مقطر سترون و در دمای 25 ± 1 درجه سانتی‌گراد در داخل انکوباتور قرار گرفت. جهت جلوگیری از تبخیر، انتهای شاخه‌ها با استفاده از پارافیلیم پوشانده شدند. در مورد شاهد از قطعات محیط کشت بدون قارچ استفاده شد. در مورد هر جدایه از ۴ شاخه بریده استفاده گردید. پس از ۲۱ روز شاخه‌ها از نظر پیدایش علائم بیماری در مقایسه با شاهد مورد بررسی و بافت آلوده در هر مورد اندازه‌گیری شد. برای رعایت اصول کخ قطعاتی از بافت که دارای علائم بیماری بودند جداسازی و بعد از ضدعفونی سطحی روی محیط کشت نیمه انتخابی قرار گرفت. اما در روش دوم در آزمون بیماری‌زایی روی دانهال‌ها در شرایط گلخانه‌ای از دانهال‌های دو ماهه بادام برای مایه‌زنی استفاده گردید. بدین صورت بذرهای بادام در داخل گلدان‌هایی به قطر ۱۰ و ارتفاع ۱۵ سانتی‌متر حاوی مخلوطی از خاک زراعی و ماسه به نسبت مساوی (۱:۱) کاشته شده و دانهال‌های دو ماهه با استفاده از مایه قارچ تولید شده بر روی قطعات برگ قیاق مایه‌زنی شدند. به این منظور، خاک کنار ساقه گیاهان جوان کنار زده شده و پس از افزودن دو گرم مایه قارچ روی آن مجدداً با خاک پوشانده شد. گلدان‌ها سپس به مدت ۴۸ ساعت غرقاب شده (هر ۳ تکرار در یک سطل) و پس از این مرحله در شرایط معمولی نگه داری شدند. در تیمار شاهد از برگ‌های قیاق استریل بدون مایه قارچ استفاده شد. گلدان‌ها در دمای ۱۸ تا ۳۵ درجه سانتی‌گراد، شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و رطوبت نسبی ۷۰ درصد در گلخانه نگه داری شدند. بعد از پیدایش علائم بیماری، نهال‌ها به دقت از خاک

خزانه‌های شاه‌رود معرفی و گزارش کردند.

از گروه چهارم پنج جدایه از شهرستان کرمانشاه (دهستان بیلوار- روستای کمشور) و روستای درویشان شهرستان صحنه از خاک همراه ریشه درختان بادام آلوده جداسازی شد که بر اساس منابع فوق *Pythium Group-G* شناسایی گردید.

نتایج اثبات بیماری‌زایی دو جدایه از *P. cactorum* از دو منطقه جغرافیایی مختلف و سه جدایه از گونه‌های *P. aphanidermatum*، *O. helicoides* و *P. group-G* از نظر میزان توسعه بیماری روی شاخه‌های بریده آزمایش نشان داد که بین تیمارهای مختلف در سطح آماری یک درصد اختلاف معنی‌دار بود. هم‌چنین آزمون مقایسه‌ای دانکن، قارچ‌ها را از این نظر در گروه‌های مختلف قرار داد. بر این اساس قارچ *P. cactorum* (جدایه شماره یک) بیشترین میزان توسعه بیماری را به خود اختصاص داد. سایر تیمارها شامل *P. cactorum* (جدایه شماره دو) و *O. helicoides* در مراتب بعدی قرار گرفتند اما اختلاف آنها از نظر میزان توسعه بیماری با شاهد در سطح آماری یک درصد معنی‌دار بود (شکل ۲). شکل ۳ علائم پدید آمده توسط *O. helicoides* را روی شاخه‌های بریده بادام در مقایسه با شاهد نشان می‌دهد. تأثیر قارچ‌های *P. group-G* و *P. aphanidermatum* از نظر آماری تفاوتی با شاهد نداشتند و به این ترتیب تأثیر این گونه‌ها از نظر ایجاد علائم روی شاخه بریده معنی‌دار نبود.

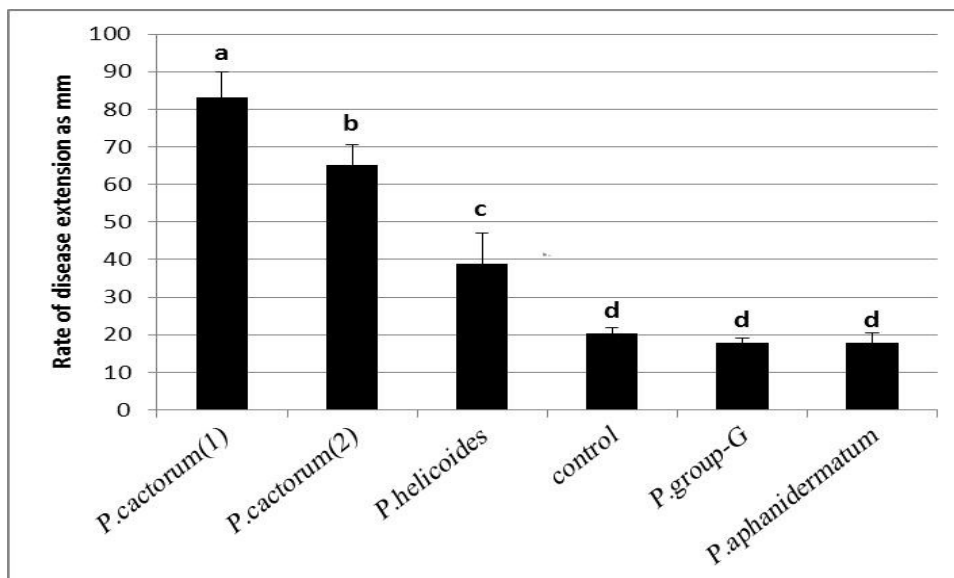
هم‌چنین بیماری‌زایی جدایه‌های چهار گونه قارچی روی دانه‌های دو ماهه بادام در شرایط گلخانه نیز آزمایش شد. جدایه‌های *P. cactorum* بعد از گذشت هفت روز از مایه‌زنی سبب سبز خشکی و مرگ کامل دانه‌ها شدند (شکل ۴). در مورد گونه‌های *O. helicoides* و *P. aphanidermatum* بعد از گذشت چهل روز از مایه‌زنی علائم پژمردگی و مرگ روی دانه‌ها ظاهر شد ولی در مایه‌زنی توسط گونه *P. group-G* در هیچ شرایطی علائم بیماری پدید نیامد. گونه *P. aphanidermatum* محدود به مناطق گرم است و به عنوان عامل اصلی پوسیدگی ریشه و پژمردگی کامل و مرگ گیاه در

وجود این گونه در ایران است. کلنی روی محیط کشت CMA بسیار کند رشد و تولید ریشه‌های کرکی و هوایی کرد. اما روی محیط کشت PCA دارای الگوی پراکنده و رزتی شکل بود (شکل ۱- c). عرض هیف‌های اصلی بین ۵-۸ میکرومتر می‌باشد. اسپورانژیوم‌ها به شکل کروی و معمولاً انتهایی اما بیشتر تخم مرغی و دارای پاییل بودند (شکل ۱- a). در حدود ۲۷-۳۸ میکرومتر ضخامت داشتند و دارای پرولیفراسیون بودند. طول لوله تخلیه ۹/۵-۳-۴۰ میکرومتر و ضخامت زئوسپورهای سیست شده نیز ۱۵-۱۰ میکرومتر است. اوگونیم‌ها دارای دیواره صاف، و به صورت انتهایی یا میانی و دارای ضخامت ۳۸-۱۳ میکرومتر و معمولاً ۴-۱ آنتریدی به هر اوگونیم متصل بودند (شکل ۱- b). ساقه اوگونیم منشعب یا ساده بود. آنتریدی‌ها پیچ خورده، ۹-۶-۴۲-۲۰ میکرومتر، دارای طول کشیده، و در امتداد خود پیوسته و ممتد بودند و یک لوله تلقیح را تشکیل می‌دادند. اسپورها کروی که اغلب تمام حجم اوگونیم را پر کرده بودند و بیشتر اوقات به رنگ زرد دیده می‌شود و ۲۷-۳۲ میکرومتر ضخامت دارد و ضخامت دیواره اوسپور ۶-۴ میکرومتر می‌باشد. حرارت‌های ویژه شامل کمینه ۵ درجه سانتی‌گراد، بهینه ۲۵ درجه سانتی‌گراد، و بیشینه ۳۰ درجه سانتی‌گراد بود. *O. helicoides* جزء مهم‌ترین بیمارگرهایی است که باعث پوسیدگی ریشه در محصولات مختلف در کشت هیدروپونیک و در جریان سیستم آبیاری غرقابی می‌شود که می‌توانند در درجه حرارت‌های بالای ۴۰ درجه رشد کرده و باعث ایجاد بیماری شوند (Kageyama et al. 2007). هم‌چنین این گونه در رطوبت‌های بسیار بالا سبب ایجاد پوسیدگی ریشه و ساقه روی گیاه بادام می‌گردد (Hideki et al 2007).

از گروه سوم چهار جدایه از خاک اطراف ریشه بادام آلوده در کشت و صنعت گره بان در شهرستان هرسین و روستای قیطول در شهرستان صحنه جدا گردید که بر اساس منابع فوق *Pythium aphanidermatum* شناسایی گردید. ذاکر و زارع ۲۰۰۵ این قارچ را عامل اصلی خشکیدگی نهال‌های زردآلو در



شکل ۱. a: اسپورانژیوم، b: تماس اگونیوم و آنتریدیوم و آنتریدی c: کلنی قارچ در *Ovatisporangium helicoides* روی محیط کشت CMA
 Fig. 1. a: sporangium, b: connection between Oogonium and Anthridium, c: colony of *Ovatisporangium helicoides* on CMA



شکل ۲. نتیجه تأثیر بیماری‌زایی قارچ‌های مختلف روی شاخه‌های بریده بادام
 Fig. 2. Results of the pathogenesis effect of various fungi on almond detached shoots

سایر شرایط نامساعد، به عنوان عوامل ثانویه، عامل مرگ گیاه باشند. با توجه به نتایج آزمون بیماری‌زایی روی شاخه‌های بریده و هم‌چنین آزمون گلخانه‌ای و این نکته که جدایه‌های *P. cactorum* از بافت‌های آلوده و هم‌چنین از مراحل مختلف نهال و گیاه بارور به دست آمدند، به نظر می‌رسد که این گونه عامل اصلی زوال و مرگ درختان بادام در استان کرمانشاه باشد. این گونه از ۲۰۰ گونه گیاهی متعلق به ۱۵۰ جنس جداسازی (Browne *et al.* 1995) و در اکثر موارد به عنوان عامل مرگ

خربرزه درختی (Clovis *et al.* 2010) و مرگ گیاهچه‌های خیار در گلخانه‌ها گزارش شده است (Drenth *et al.* 2007). این گونه به عنوان عامل اصلی پوسیدگی ریشه و کلونیزه کردن گیاهچه‌های فلفل در گلخانه‌های کانادا معرفی و شناسایی شده است (Owen *et al.* 2003). نتایج تحقیق نشان می‌دهد که گونه‌های *O. helicoides* و *P. aphanidermatum* پس از مدت نسبتاً طولانی توانستند علایم بیماری را روی دانه‌های بادام ایجاد کنند که ممکن است در صورت ضعف میزبان و تأثیر



شکل ۳. علائم بیماری حاصل از مایه‌زنی *Ovatisporangium helicoides* روی شاخه بریده بادام در مقایسه با شاهد (سمت چپ)
Fig. 3. Symptoms of *Ovatisporangium helicoides* inoculation on detached shoots of almond in comparison with control (left)



شکل ۴. علائم بیماری توسط قارچ *Phytophthora cactorum* روی دانه‌های بادام در مقایسه با شاهد (سمت چپ) بعد از گذشت هفت روز از مایه‌زنی

Fig. 4. The symptoms of disease on almond seedlings inoculated with *Phytophthora cactorum* in comparison with control (left) after 7 days inoculation

آماري و از کارکنان مرکز خدمات کشاورزي شهرستان صحنه به خاطر همکاري در جمع‌آوری نمونه‌ها قدرداني می‌شود.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (11-13) متن انگلیسی مراجعه شود.

درختان بادام معرفی و گزارش شده است (Zaker & Zare 2005). این بیماری در باغاتی با بافت سنگین خاک به چشم می‌خورد. آبیاری‌های غرقابی سنگین و با فواصل زمانی کم، شرایط مناسبی را برای ایجاد و توسعه این بیماری و رشد قارچ مهیا می‌کند.

سپاسگزاری

از آقای مهندس جهان‌شاه بساطی به خاطر انجام تجزیه‌های