واکنش ارقام پسته به *Phytophthora pistaciae* و اثر دما بر بیماری‌زایی آن *

REACTION OF PISTACHIO CULTIVARS TO *Phytophthora pistaciae* AND THE INFLUENCE OF TEMPERATURE ON ITS PATHOGENICITY

زهرا میرسلیمانی[۱]**، رضا مستوفی‌زاده قلمفرسا[۱]، امیرحسین محمدی[۲]، محمد جواهری[۱] و ضیاءالدین بنی‌هاشمی[۱]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۷/۱۱؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۱/۴)

چکیده

انگومک یا گموز مهم‌ترین بیماری پسته در ایران است که یکی از عوامل اصلی آن شبه‌قارچ اُمیست *Phytophthora pistaciae* می‌باشد. به منظور بررسی واکنش ارقام مختلف پسته ایرانی در برابر *P. pistaciae*، جدایه‌هایی از این بیمارگر از درختان پسته آلوده به انگومک از مناطق پسته‌کاری استان‌های یزد و کرمان در سال‌های ۱۳۸۸ و ۱۳۸۹ جداسازی شدند. این جدایه‌ها با استفاده از خصوصیات ریخت‌شناختی و ژنوم ریبوزومی شناسایی و بیماری‌زایی آنها تأیید گردید. گیاهچه‌های پنج ماهه ارقام پسته سرخس، بادامی ریز زرند، قزوینی، کله‌قوچی، احمدآقایی، اوحدی، خنجری دامغان و فندقی با جدایه‌های مختلف بیمارگر مایه‌زنی شدند. ارقام آلوده به منظور مشاهده علائم بیماری به مدت شش ماه مورد بررسی قرار گرفته، درصد نهال‌های مرده، وزن تر و خشک ریشه و شاخساره، ارتفاع گیاه و درصد کلنیزه شدن ریشه تعیین شد. نتایج این آزمایش با استفاده از آزمایش فاکتوریل با در نظر گرفتن دو فاکتور رقم و جدایه به ترتیب با هشت و سه سطح و سه تکرار برای هر ترکیب، در قالب یک طرح کاملاً تصادفی مورد واکاوی آماری قرار گرفت. هیچ تفاوت معنی‌داری در بین خصوصیات بیماری‌زایی جدایه‌های مطالعه شده بیمارگر مشاهده نگردید. مقایسه درصد مرگ و میر نشان داد که بیشترین درصد مرگ و میر مربوط به رقم سرخس (۸۰%) و کمترین آن مربوط به رقم بادامی ریز زرند (۱۵%) بود؛ در حالی که در رقم قزوینی هیچ مرگ و میری دیده نشد. مشاهدات نشان داد که ارقام مختلف از لحاظ حساسیت ریشه‌هایشان نسبت به کلنیزه شدن توسط بیمارگر متفاوت هستند و بیشترین و کمترین میزان آن به ترتیب مربوط به رقم سرخس و قزوینی است. رقم سرخس بیشترین (۴۵%) و رقم بادامی (۱۲%) و قزوینی کمترین (۸%) کاهش ارتفاع را نسبت به گیاهان شاهد داشتند. بررسی وزن تر و خشک شاخساره و ریشه گیاهان نیز نشان داد که بیمارگر توانایی کاهش وزن بافت گیاهی را داشته و این کاهش در مقایسه با شاهد در رقم سرخس نسبت به سایر ارقام بیشتر بود. در کل، بر اساس شاخص‌های مورد بررسی، ارقام پسته قزوینی و بادامی ریز زرند نسبت به سایر ارقام مقاومت بالاتری داشته، در مقابل، رقم سرخس بیشترین حساسیت را نشان داد. طبق نتایج به دست آمده گرچه دمای بهینه بیماری‌زایی در رقم حساس سرخس ۳۰ درجه سانتی‌گراد محاسبه شد، به نظر می‌رسد که دامنه دمایی ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد به خوبی در پیشرفت بیماری مؤثر است.

واژه‌های کلیدی: ارقام، دمای بیماری‌زایی، پسته، انگومک، گموز، *Phytophthora pistaciae*

---

*: بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول، ارائه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

**: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: rmostofi@shirazu.ac.ir

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

۲. استادیار پژوهش، مؤسسه تحقیقات پسته کشور، رفسنجان

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

مقدمه

پسته یکی از مهم‌ترین اقلام خشکبار صادراتی ایران است. سطح زیر کشت پسته در ایران بیش از ۲۵۰،۰۰۰ هکتار بوده، ایران، به عنوان اولین تولید کننده این محصول در جهان، وسیع‌ترین منطقه پسته‌کاری دنیا محسوب می‌شود (FAOSTAT 2012). از مهم‌ترین مسائلی که در زمان احداث هر باغ پسته باید به آن توجه شود، انتخاب پایه است؛ زیرا حساسیت پایه‌ها نسبت به خشکی، شوری و بیماری‌های ریشه و طوقه متفاوت می‌باشد (Mehrnejad & Javan Shah 2010). طبق سند راهبردی تحقیقات پسته کشور در بین بیماری‌های پسته گموز (انگومک)، یا پوسیدگی تنه، طوقه و ریشه ناشی از گونه‌های فیتوفتورا، مهم‌ترین بیماری پسته در ایران محسوب می‌شود (Mehrnejad & Javan Shah 2010). از درختان پسته مبتلا به انگومک تاکنون گونه‌هایی از بیمارگر فیتوفتورا شامل *Phytophthora citrophthora* Smith & Smith، *P. cryptogea* Pethybridge & Lafferm، *P. megasperma* Drechsler، *P. drechsleri* Tucker، *P. nicotianae* Breda، *P. melonis* Katsura و *P. pistaciae* Mostowfizadeh-Ghalamfarsa *et al.* جداسازی و اثبات بیماری‌زایی شده است (Ershad 1971; Mirabolfathy & Ershad 1987; Banihashemi 1984, 1995; Mirabolfathy 1988; Mirabolfathy *et al.* 1989; Aminaee & Ershad 1991; Mirabolfathi *et al.* 2001; Mostowfizadeh-Ghalamfarsa *et al.* 2008). بر اساس گزارش‌ها *P. drechsleri* و گونه تازه توصیف شده *P. pistaciae* نسبت به سایر گونه‌ها فراوانی بیشتری دارند (Mirabolfathi *et al.* 2001).

حساسیت ارقام پسته‌ای که به عنوان پایه استفاده می‌شوند، نسبت به عوامل ایجاد کننده بیماری انگومک متفاوت است. بنی هاشمی (Binihashemi 1995; 2004) در مطالعه تغییرات جمعیت گونه‌های فیتوفتورا در منطقه ریشه گونه‌های *Pistacia* در شرایط گلخانه، با استفاده از گونه‌های وحشی *P. atlantica*، *P. khinjuk* (کلخونگ)، *P. mutica* (بنه) و پایه محلی ممتاز *Pistacia vera* و مایه‌زنی آن‌ها با گونه‌های *P. citrophthora*، *P. cryptogea*، *P. drechsleri* (اکنون *P. melonis*) و *P. nicotianae* علائم بیماری را پس از یک هفته روی بنه و کلخونگ مشاهده کرد. جمعیت زئوسپور تولید شده در گلدان‌های حامل این پایه‌ها تا دو هفته بالا بود و در پایه ممتاز علائم پس از دو هفته ظاهر گردید، لیکن علائم بیماری در گونه وحشی *P. atlantica* مشاهده نشد. در مقایسه عکس‌العمل طوقه و ریشه دانهال‌های نه ماهه ارقام سرخس، بادامی و قزوینی به *P. drechsleri* (اکنون *P. melonis*) و *P. citrophthora*، رقم قزوینی مقاوم‌ترین و سرخس حساس‌ترین پایه گزارش گردید (Banihashemi & Moradi 2004). بنی‌هاشمی (Banihashemi 1998) واکنشِ گونه‌های *Pistacia* را به گونه‌های فیتوفتورا بررسی کرد و نشان داد که *P. atlantica* و دورگ UCB1 به تمام گونه‌های فیتوفتورا مقاوم هستند. بیماری‌زایی *P. citrophthora* از سایر گونه‌ها روی ارقام مختلف شدیدتر گزارش شد و گونه‌های *P. megasperma* و *P. nicotianae* بیماری‌زایی کمتری نشان دادند.

علاوه بر تأثیر پایه در میزان بیماری‌زایی بیمارگر، بی شک عوامل محیطی مانند دما یا رطوبت نیز روی تمام مراحل توسعه بیماری‌های ناشی از گونه‌های فیتوفتورا تأثیر دارد. دما یک عامل فیزیکی مهم و مؤثر در رشد، بیماری‌زایی و پیشرفت پوسیدگی ریشه و طوقه بسیاری از گونه‌های فیتوفتوراست (Zentmyer 1981). ریبیرو

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

(Ribeiro 1987) نشان داد که دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد ممکن است مانع از جوانه‌زنی زئوسپور *P. citrophthora* گردد و بنابراین از کلنیزه شدن ریشه‌های فرعی جلوگیری خواهد کرد. دما به عنوان یک عامل مهم روی رشد، تولید اُاُسپور و پوسیدگی طوقه و ریشه ناشی از *P. parasitica* و *P. citrophthora* نیز تأثیر می‌گذارد (Mathernon & Matejka 1993). با توجه به منابع موجود، تاکنون هیچ بررسی جامعی در مورد واکنش ارقام مختلف پسته در کشور نسبت به *P. pistaciae* صورت نگرفته است. هم‌چنین از آن‌جا که پسته محصولی گرمسیری است و *P. pistaciae* نیز یک شبه‌قارچ گرماپسند است، بررسی تأثیر دما در فرآیند بیماری‌زایی حائز اهمیت خواهد بود.

روش بررسی

نمونه‌برداری و جداسازی بیمارگردر مناطق پسته‌کاری استان‌های یزد و کرمان از درختان پسته آلوده به انگومک و خاک اطراف ریشه آنها در سال‌های ۱۳۸۸ و ۱۳۸۹ انجام شد. به منظور جداسازی بیمارگر، از فاصله بین بافت سالم و آلوده ریشه و طوقه درختان پسته مشکوک به آلودگی به *Phytophthora* spp.، قطعات ۰/۵ سانتی‌متری جدا شده، روی محیط کشت CMA-PARPH (CMA حاوی ۰/۰۲ گرم در لیتر دلواسید، ۰/۵ گرم در لیتر آمپی‌سیلین، ۰/۰۱ گرم در لیتر ریفامپین و ۰/۱ گرم در لیتر PCNB، ۰/۰۲۵ گرم در لیتر هیمکسازول) کشت گردید (Jeffers & Martin 1986). برای جداسازی بیمارگر از خاک از روش طعمه‌گذاری با برگ مرکبات (Banihashemi 1983) و دایره‌های نیم سانتی‌متری از برگ پسته استفاده گردید و ظروف حاوی طعمه به مدت ۲۴ ساعت در ۲۰ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دمای اتاق قرار داده شد. پس از جداسازی و خالص‌سازی، جدایه‌ها روی محیط کشت CMA (عصاره ۴۰ گرم ذرت، ۱۶ گرم آگار و آب مقطر تا حجم یک لیتر) در ۱۵ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. تشخیص ابتدایی جدایه‌ها با استفاده از کلیدهای موجود (Stamps *et al.* 1990; Erwin & Ribeiro 1996; Gallegly & Hong 2008) انجام گرفت و جدایه‌های مشکوک به *P. pistaciae* برای تشخیص مولکولی روی محیط مورب CMA کشت داده شده، در ۱۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند.

شناسایی مولکولی جدایه‌های مشکوک به *P. pistaciae* استخراج دی‌اِن‌ای از بافت قارچ و میزبان مایه‌زنی شده

جدایه‌ها در ۲۵ میلی‌لیتر محیط راکد عصاره‌ی سیب‌زمینی (عصاره ۳۰۰ گرم سیب‌زمینی در یک لیتر آب مقطر) در ۲۰ درجه سانتی‌گراد کشت شده، پس از سه روز ریسه‌های به دست آمده با استفاده از کاغذ صافی (واتمن شماره یک) و پمپ خلاء از محیط کشت جدا شد. ریسه‌های به دست آمده، در ازت مایع قرار داده شده، پس از انجماد در دستگاه لیوفیلایزر سرماخشک (فریزدرای) گردید و برای استفاده‌های بعدی در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای تهیه عصاره یاخته‌ای به پنج میلی‌گرم از ریسه‌های سرماخشک شده هر جدایه ۵۰۰ میکرولیتر بافر سی‌تَب (CTAB = hexadecyltrimethylammonium bromide) (۰/۱۲۱ گرم تریس، ۰/۰۷۴ گرم ای‌دی‌تی‌آ، ۰/۸۱۸ گرم نمک‌طعام، ۰/۲ گرم سی‌تب، ۲۰۰ میکرولیتر ۲-مرکاپتواتانول، آب-مقطر تا حجم ۱۰ میلی‌لیتر) حاوی ۰/۲ درصد پروتئینازِکی (Proteinase K؛ فرمنتاز، بریتانیا) افزوده شده، ریسه‌ها با استفاده از هموژنایزر و چند دانه ماسه سترون به خوبی ساییده شد. عصاره به دست آمده به مدت یک ساعت در ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد و مایع رویی برداشته

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

شد. استخراج دی‌اِناِی از ۲۰۰ میکرولیتر عصاره یاخته‌ای به دست آمده با استفاده از کیت DNG™-PLUS (سیناژن، ایران) و به روش توصیه شده توسط تولید کننده انجام گرفت. رسوب دی‌اِناِی در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر سترون حل و پس از افزودن پنج میکرولیتر آرانایز ای (RNase A؛ فرمنتاز، بریتانیا) با غلظت پنج میلی‌گرم در میلی‌لیتر به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. دی‌اِناِی به دست آمده در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری گردید. کیفیت و کمیت دی‌اِناِی استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ مدل ام-دی۱۰۰۰ (نانودراپ تکنولوژی، ایالات متحد آمریکا) در طول موج ۲۶۰ نانومتر بررسی شد.

به منظور ردیابی و اثبات وجود بیمارگر، استخراج دی‌اِناِی از بافت‌های مایه‌زنی شده ارقام مختلف پسته نیز صورت گرفت. ریشه‌های گیاهان جمع‌آوری شده با آب کاملاً شسته شده، سپس به قطعاتی به بلندی ۵ میلی‌متر تقسیم و با حوله‌های کاغذی خشک گردید. پس از سرما خشک کردن بافت گیاهان آلوده دارای علائم، بدون علائم و گیاهان شاهد بدون آلودگی استخراج دی‌اِناِی از بافت‌های گیاهی مطابق روش استخراج دی‌اِناِی از بافت‌های بیمارگر صورت گرفت. بافت‌ها در هاون سترون با نیتروژن مایع ساییده و مدت زمان خرد کردن آنها با دستگاه هموژنایزر تا سه برابر افزایش داده شد تا بافت گیاهی به میزان کافی خرد شود. محصول به دست آمده به عنوان دی‌اِناِی قالب برای استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تو در تو استفاده شد (Mostowfizadeh-Ghalamfarsa & Mirsoleimani 2013).

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

مواد مورد استفاده مخلوطی حاوی۵۰ نانوگرم از دی‌اِناِی قالب، یک میکرومول از هر آغازگر، ۱۰۰میکرومول dNTPs، ۰/۴ میکرومول *Taq* DNA polymerase (فرمنتاز، بریتانیا)، ۱/۵ میکرومول $MgCl_2$، ۲/۵ میکرولیتر بافر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (۲۰۰ میلی‌مول Tris-HCl با pH ~۸ و ۵۰۰ میلی‌مول KCl) و ۱۰۰ میکرومول BSA (bovine serum albomine) برای واکنش‌های ۲۵ میکرولیتری تهیه شد. برای شناسایی جدایه‌های *P. pistaciae* از آغازگرهای اختصاصی ژن‌های ITS، شامل ITS-SF1 و ITS-SF2 طراحی شده توسط *مستوفی‌زاده قلم‌فرسا و میرسلیمانی* (۲۰۱۳) در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده شد. هم‌چنین سایر گونه‌های بدون پاپیلِ فیتوفتورای عامل انگومک توسط آغازگرهای اختصاصی خود شناسایی شد (Mostowfizadeh-Ghalamfarsa *et al*. 2007; Mostowfizadeh-Ghalamfarsa & Safaie-Farahani 2009; Mostowfizadeh-Ghalamfarsa 2011a, b). به منظور ردیابی بیمارگر در بافت آلوده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تودرتو به کمک آغازگرهای عمومی ITS4 و ITS6 (Cooke *et al*. 2000; White *et al*. 1990) به عنوان آغازگرهای خارجی، استفاده شد. کلیه واکنش‌های زنجیره-ای پلیمراز در یک چرخه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه، ۳۰ چرخه شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه، (۵۵ و ۶۹ درجه سانتی‌گراد به ترتیب برای آغازگرهای عمومی و اختصاصی) به مدت ۲۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و یک چرخه نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه با استفاده از دستگاه ترموسیکلر CG1-96 (کوربت ریسرچ، استرالیا) انجام شد.

نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با الکتروفورز در ژل یک درصد آگارز حاوی ۰/۰۰۵% اتیدیوم بروماید در بافر TBE (۱۰/۸ گرم تریس، ۰/۳۷ گرم EDTA، ۵/۵ گرم بوریک اسید، آب مقطر تا حجم یک لیتر) به مدت یک

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ساعت و در ولتاژ ۸۰ ولت تأیید شد و قطعات دی‌ان‌ای زیر پرتو فرابنفش با استفاده از دستگاه ژل‌داکیومنتر (سین‌ژن، ایالات متحد آمریکا) عکس‌برداری شده، اندازه باندهای به دست آمده در مقایسه با یک نشانگر دی‌ان‌ای ۱۰۰ جفت‌بازی (Gene Ruler؛ فرمنتاز، بریتانیا) تخمین زده شد.

کشت و نگه‌داری دانهال‌های پسته

بذرهای ارقام مختلف پسته اهلی (*Pistacia vera*) شامل سرخس، بادامی ریز زرند، قزوینی، کله‌قوچی، احمدآقایی، اوحدی، خنجری دامغان و فندقی از مراکز تحقیقات پسته کرمان و دامغان تهیه شد. پوسته سخت بذرها جدا و با آب شیر شستشو شدند. بذرهای پسته به روش *هادی‌زاده و بنی‌هاشمی* (Hadizadeh & Banihashemi 2005) به مدت ۱۲ تا ۴۸ ساعت در آب شیر خیسانده شد و سپس با هیپوکلریت سدیم ۲۰% به مدت یک ساعت ضدعفونی و مجدداً با آب مقطر سترون شستشو گردید. بذرهای ضدعفونی شده مجدداً به مدت ۲۴ ساعت در آب مقطر سترون حاوی آنتی‌بیوتیک (تتراسایکلین، ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر و آمپی‌سیلین، ۵۰۰ میلی گرم در لیتر) خیسانده شدند. پس از آن ضدعفونی بذرهای با PCNB (پودر وتابل ۷۵% تراکلر) یا بنومیل (پودر وتابل ۵۰% بنلیت) چهار در هزار خالص در آب مقطر سترون انجام شد. بذرهای ضدعفونی شده درون ظروف نشاء که قبلاً کف آنها با الکل ۷۵ درصد ضدعفونی شده است، در یک لایه ورمیکولایت سه بار اتوکلاو شده، قرار داده شد. روی بذور با افشانه مرطوب، با پلاستیک پوشانده و در اتاقک رشد در ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شد. بسته به سرعت جوانه‌زنی، بعد از سه تا هفت روز بذرهای جوانه زده با ضدعفونی مجدد درون گلدان‌های یک کیلوگرمی حاوی مخلوط خاک و ماسه (۱ : ۲) به فاصله چهار سانتی‌متر از هم کاشته شد. همه گلدان‌ها پس از آبیاری مختصر، در گلخانه با حداکثر دمای ۴۲-۳۷ درجه سانتی‌گراد و حداقل دمای ۲۰-۱۵ درجه سانتی‌گراد و میانگین دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بسته به دمای گلخانه آبیاری گلدان‌ها از دو تا چهار روز متغیر بود. هم‌چنین گلدان‌ها، سه بار در اردیبهشت، تیر و شهریور ماه با سم آمیتراز به نسبت یک در هزار در هنگام عصر علیه کنه تار عنکبوتی، سم‌پاشی شدند (Tabatabaee 1995).

تهیه مایه بیماری‌زا

برای تهیه مایه قارچ از عصاره شاهدانه و ورمی‌کولایت استفاده شد. ابتدا در کیسه‌های پلاستیکی مقاوم به اتوکلاو، ۲۰۰ میلی‌لیتر ورمی‌کولایت ریخته، به آن ۱۲۰ میلی‌لیتر عصاره شاهدانه (عصاره ۶۰ گرم شاهدانه در لیتر) اضافه شد و به مدت بیست دقیقه در ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد (سه مرتبه، یک روز در میان) سترون گردید. سپس از حاشیه‌ی پرگنه‌های جوان جدایه‌های SURf14، SUP.p6 و SUKAB که قبلاً روی محیط کشت CMA رشد کرده بودند، بلوک‌های میسلیومی به قطر ۱۰ میلی‌متر به کیسه‌های پلاستیکی اضافه شد. کیسه‌های پلاستیکی به مدت چهار هفته در ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی قرار داده شدند. هر هفته کیسه‌های حاوی مایه قارچ برای چند دقیقه تکان داده شد تا رشد قارچ در داخل کیسه‌ها یک‌نواخت صورت گیرد (Banihashemi & Fathi 1989).

بررسی واکنش ارقام پسته به جدایه‌های *P. pistaciae*

از گیاهچه‌های پنج ماهه ارقام پسته سرخس، بادامی ریز زرند، قزوینی، کله‌قوچی، احمدآقایی، اوحدی، خنجری

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

دامغان و فندقی استفاده شد. مایه بیمارگر با انتخاب سه جدایه منتخب SURf14، SUP.p6 و SUKAB در کیسه‌های حاوی ورمی‌کولایت ضدعفونی شده به روش پیش‌گفته، تهیه شد. خاک موجود در اطراف گیاهچه‌ها به آرامی تا عمق ۸-۱۰ سانتی‌متری کنار زده شد، سپس ۱۰ میلی‌لیتر مایه بیمارگر در اطراف طوقه هر گیاهچه پنج ماهه قرار داده و با خاک پوشانده شد. بلافاصله پس از مایه‌زنی و هر دو هفته یک‌بار گلدان‌ها غرقاب شدند. گلدان‌ها در گلخانه با حداکثر ۴۲-۳۷ درجه سانتی‌گراد و حداقل ۲۰-۱۵ درجه سانتی‌گراد و میانگین ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری و روزانه آبیاری شدند. دمای میانگین خاک نیز در این مدت ۳۰-۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد متغیر بود. ردیابی بیمارگر در گلدان‌ها هر ماه با استفاده از طعمه‌های برگ پسته شناور در زه‌آب گلدان‌ها انجام شد. پس از آن قطعات برگ پس از ۲۴ ساعت با استفاده از آب مقطر سترون شسته شده، پس از خشک شدن روی محیط CMA-PARP قرار داده شد و رشد بیمارگر روی محیط کشت بررسی شد. برای هر جدایه سه تکرار در نظر گرفته شد و مایه‌زنی در دو نوبت به فاصله شش ماه تکرار گردید. هم‌چنین از مخلوط سترون شده ورمیکولایت و عصاره شاهدانه به عنوان شاهد منفی استفاده گردید. گلدان‌ها به منظور مشاهده علائم شش ماه مورد بررسی قرار گرفتند. پس از شش ماه، گیاهان از خاک خارج شده، پس از شستشو زیر آب، درصد نهال‌های مرده، وزن تر و خشک ریشه و قسمت‌های هوایی، ارتفاع گیاه و درصد کلنیزه شدن ریشه تعیین گردید. برای تعیین درصد کلنیزه شدن بافت طوقه و ریشه، ۳۰ قطعه سه تا پنج میلی‌متری از بافت طوقه و ریشه بریده شد و پس از شستشوی مجدد و حذف آب اضافی آنها با استفاده از دستمال کاغذی روی محیط کشت نیمه انتخابی CMA-PARP در ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. از روز دوم به بعد، به مدت ده روز تشتک‌های پتری جهت ظهور پرگنه‌های قارچ فیتوفتورا مورد بررسی قرار گرفت (Afack *et al*. 1990). نتایج این آزمایش با استفاده از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم‌افزار SAS (SAS 1996) مورد واکاوی آماری قرار گرفت. داده‌های درصدی با استفاده از فرمول $\text{arc Sin}\sqrt{P}$ تبدیل شده و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد انجام شد.

بررسی اثر دما بر بیماری‌زایی و میزان تولید زئوسپور بیمارگر در شرایط آزمایشگاهی

به منظور تعیین اثر دما در بیماری‌زایی گونه *P. pistaciae* روی ارقام گوناگون پسته، پس از مشخص کردن حساس‌ترین پایه و کاشت آن به عنوان گیاه محک در شرایط گلخانه، گیاهان سه ماهه در گلدان‌های ۱/۵ کیلوگرمی به اتاقک‌های رشد تحت سه دمای ۲۰، ۲۵ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد انتقال داده شد. دمای خاک گلدان‌ها با دماسنج هر ۱۲ ساعت اندازه‌گیری شد. پس از برقراری تعادل دمایی بین خاک گلدان‌ها و اتاقک‌های رشد ۱۰ میلی‌لیتر مایه بیمارگر در اطراف طوقه گیاهچه‌ها قرار داده و با خاک پوشانده شد. گلدان‌ها به مدت ۲۴ ساعت غرقاب گردید و پس از ۲۴ ساعت آب اضافی موجود در هر گلدان با سوراخ کردن کف گلدان‌ها تخلیه شد. ردیابی بیمارگر در گلدان‌ها با استفاده از طعمه‌های برگ پسته شناور در زه‌آب گلدان‌ها انجام شد. پس از آن قطعات برگ پس از ۲۴ ساعت با استفاده از آب مقطر سترون شسته شده، پس از خشک شدن روی محیط CMA-PARP قرار داده شد و رشد بیمارگر روی محیط کشت بررسی شد. نتایج بعد از ۵ تا ۴۵ روز با بررسی ظهور علائم پژمردگی،

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

خشکیدگی، مرگ گیاهان و کشت بافت آلوده روی محیط‌های نیمه انتخابی CMA-PARP بررسی گردید. این آزمون سه بار تکرار شد. هم‌چنین از مخلوط سترون شده ورمیکولایت و عصاره شاهدانه به عنوان شاهد منفی استفاده گردید. هم‌چنین برای محاسبه تعداد زئوسپورها در دماهای مختلف مقداری از بذر شاهدانه را در آب مقطر سترون به مدت ۲۰-۱۰ دقیقه جوشانیده و پس از خنک شدن، ۳۰ عدد از آنها به مدت ۲۴ ساعت روی هر تشتک پتری ۸ سانتی‌متری حاوی پرگنه‌های جوان بیمارگر قرار گرفت. شاهدانه‌ها پس از ۲۴ ساعت به تشتک‌های پتری حاوی ۱۰ میلی‌لیتر عصاره خاک سترون منتقل شده، به مدت ۱۴ ساعت در سه دمای مورد آزمایش در اتاقک‌های رشد قرار داده شد. سپس تعداد زئوسپورها با استفاده از اسلاید گلبول‌شمار شمرده شد. برای هر جدایه ۱۰ تکرار در نظر گرفته شده و میانگین زئوسپورها در هر دما محاسبه گردید.

نتایج

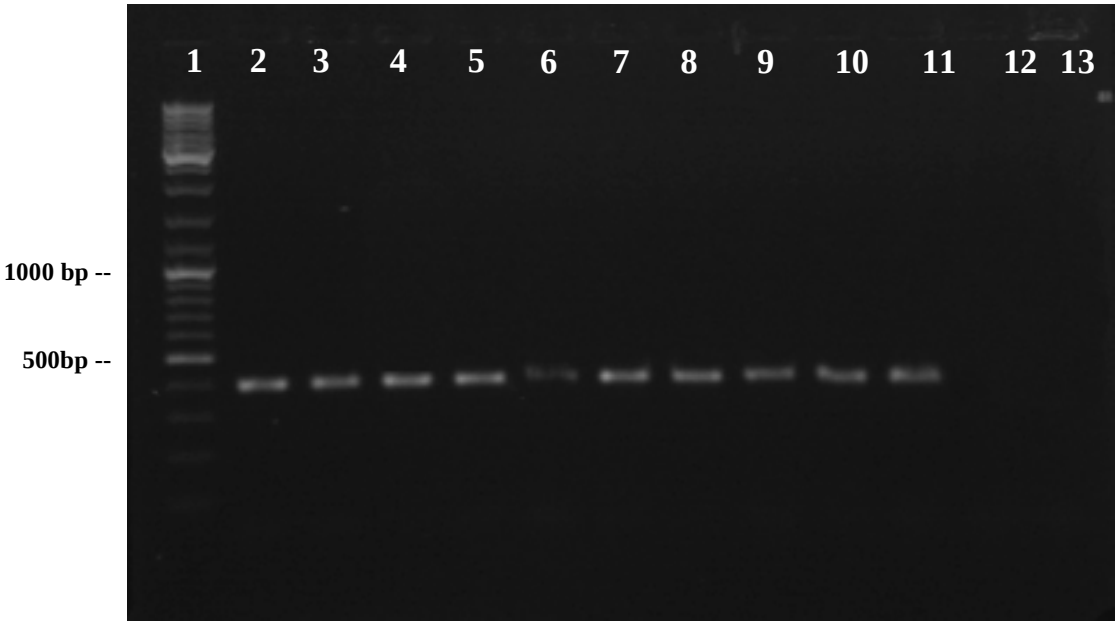
جداسازی عامل بیماری

در این بررسی در مجموع ۲۱۰ جدایه اُمیست از ریشه و طوقه درختان دارای علائم انگومک و خاک اطراف درختان آلوده از باغات پسته مربوط به منطقه پسته‌کاری استان‌های کرمان و یزد جداسازی شد. جدایه‌ها با توجه به خصوصیات ریخت‌شناسی و مولکولی شناسایی شده و در نهایت استفاده از آغازگرهای اختصاصی گونه‌های بدون پاپیل بیمارگر پسته منجر به شناسایی *P. pistaciae* (نُه جدایه) (شکل ۱)، *P. inundata* (سه جدایه)، *P. melonis* (دو جدایه)، *P. drechsleri* (چهار جدایه)، *P. parsiana* (هشت جدایه) شد. هم‌چنین با استفاده از خصوصیات ریخت‌شناختی *P. citrophthora* (سه جدایه) و ۱۶جدایه *Phytophthora* spp. پاپیل‌دار به همراه ۱۶۵ جدایه *Pythium* spp. نیز در بین جدایه‌ها شناسایی گردید. مشخصات جدایه‌های *P. pistaciae* در جدول ۱ آمده است.

بررسی واکنش ارقام پسته به جدایه‌های *P. pistaciae*

نتایج حاصل از اندازه‌گیری و مقایسه میانگین درصد نهال‌های مرده، وزن تر و خشک ریشه و قسمت‌های هوایی، ارتفاع و درصد کلنیزه شدن ریشه پس از مایه‌زنی تعیین و واکاوی آماری داده‌های فوق نیز در شکل‌های ۲ تا ۸ نشان داده شده است. این نتایج مربوط به میانگین اثر مایه‌زنی هر سه جدایه‌ی استفاده شده، روی صفات مورد آزمایش در هر رقم پسته می‌باشد. مقایسه اثر مایه‌زنی سه جدایه مختلف روی ارقام مختلف پسته نشان داد که اثر جدایه‌های مختلف در مورد هیچ یک از صفات معنی‌دار نبود (داده‌ها نشان داده نشده) و به منظور واکاوی‌های آماری فاکتور رقم، از میانگین تکرارهای سه جدایه استفاده شد. مقایسه کلیه ارقام مورد آزمایش از نظر میزان کاهش ارتفاع گیاه بر اثر مایه‌زنی با بیمارگر نشان داد که رقم سرخس بیشترین و رقم بادامی و قزوینی کمترین کاهش ارتفاع را نسبت به گیاهان شاهد داشتند (شکل ۲). مقایسه درصد مرگ و میر نهال‌های پنج ماهه نشان داد که بیشترین درصد مرگ و میر مربوط به رقم سرخس و کمترین آن مربوط به بادامی بوده و در رقم قزوینی هیچ مرگ و میری در نهال‌هایی که در پنج ماهگی مایه‌زنی شده بودند، دیده نشد. پس از رقم سرخس، ارقام احمدآقایی و خنجری دامغان دارای میزان معنی‌دار مرگ و میر نسبت به سایر ارقام بودند (شکل ۳). مقایسه میزان کلنیزه‌شدن بافت ریشه‌ها نشان داد که ارقام مختلف از لحاظ حساسیت ریشه‌هایشان نسبت به بیمارگر متفاوت هستند و بیشترین و کمترین میزان آن به ترتیب مربوط به رقم سرخس و قزوینی می‌باشد. ارقام احمدآقایی، خنجری دامغان و

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com



شکل ۱. نقوش الکتروفورز جدایه‌های *Phytophthora pistaciae* به دست آمده از باغات پسته استان کرمان و یزد پس از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ITS-SR1 و ITS-SF1 ۱- نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی، ۲- جدایه SUP.p6، ۳- جدایه SUP.p7، ۴- جدایه .SUP ۵- جدایه SUP.p27، ۶- جدایه SURno4، ۷- جدایه SURab6، ۸- جدایه SURka7، ۹- جدایه SUKAB، ۱۰- جدایه SUKAA، ۱۱- شاهد مثبت: جدایه SURf14 *P. pistaciae* ، ۱۲- شاهد منفی: *P. melonis*، ۱۳- آب HPLC.

Fig. 1. Gel electrophoresis of *Phytophthora pistaciae* isolates isolated from Kerman and Yazd province pistachio orchards after PCR with ITS-SF1 and ITS-SR1 specific primers. (1) 100 bp DNA ladder, (2) SUP.p6, (3) SUP.p7, (4) SUP.p26, (5) SUP.p27, (6) SURno4, (7) SURab6, (8) SURka7, (9) SUKAB, (10) SUKAA, (11) positive control with *P. pistaciae* SURf14 isolate, (12) negative control with *P. melonis* (13) negative control with HPLC water.

اوحدی نیز نسبت به یکدیگر و نسبت به سایر ارقام دارای سطوح معنی داری از درصد کلنیزه‌شدن بافت ریشه‌ها بودند. رقم بادامی ریز زرند نیز نسبت به رقم قزوینی دارای سطح بالاتر و نسبت به رقم اوحدی دارای سطح پایین‌تری از درصد کلنیزه‌شدن بافت ریشه‌ها بود (شکل ۴). بررسی وزن تر و خشک شاخساره نیز نشان داد که بیمارگر توانایی کاهش وزن بافت گیاهی را داشته و این کاهش در رقم سرخس به بیشترین مقدار خود رسیده است (شکل ۵ و ٦). در مورد وزن تر و خشک بافت ریشه گیاهان نیز بیشترین کاهش وزن مربوط به رقم سرخس و کمترین آن‌ها مربوط به ارقام بادامی ریز زرند و قزوینی می‌باشد. هم‌چنین رقم احمدآقایی و خنجری نسبت به کله‌قوچی و اوحدی نیز دارای سطوح معنی‌داری از کاهش وزن تر و خشک بافت ریشه بودند. رقم فندقی و اوحدی نیز کمتر از سایر ارقام، به جز رقم بادامی ریز زرند و قزوینی، کاهش وزن تر و خشک بافت ریشه را نشان دادند (شکل ۷ و ۸).

ردیابی بیمارگر در بافت آلوده گیاهی

برای اطمینان از وجود بیمارگر در بافت گیاهان آلوده دارای علائم و ریشه گیاهان کلنیزه شده، با استفاده از واکنش

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

جدول ۱. جدایه‌های *Phytophthora pistaciae* جداسازی شده از خاک و بافت آلوده درختان پسته

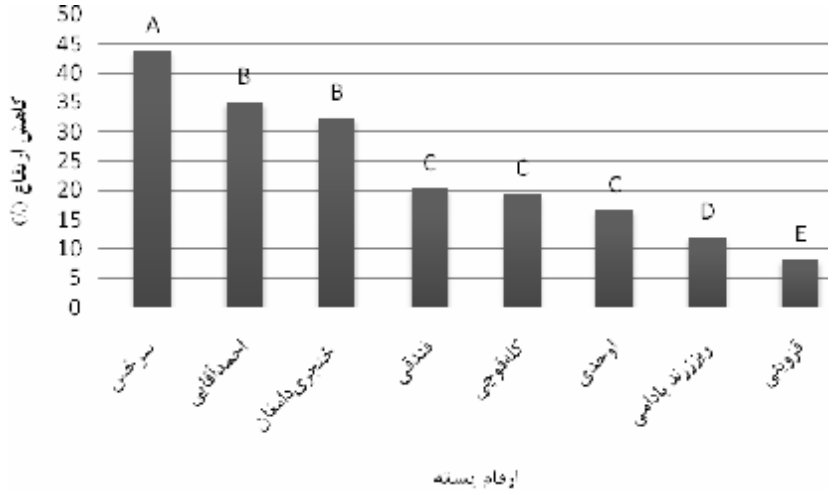
Table 1. Isolates of *Phytophthora pistaciae* recovered from infected tissues of pistachio trees or infested soil around the trees.

کد جدایه Isolate	بستره Matrix	تاریخ جداسازی Year of isolation	محل جداسازی Location	رس‌شمار Accession number*
SURf14**	T	1993	Kabootarkhan, Kerman	AY659415
SURab6	S	2009	Abbasabad, Kerman	HM585361
SUP.p6	T	2009	Azadegan, Kerman	HM585362
SUP.p7	T	2009	Azadegan, Kerman	HM585363
SUP.p24	T	2009	Azadegan, Kerman	HM585364
SUP.p26	S	2009	Azadegan, Kerman	-
SUKAA	S	2010	Yazd	HM585365
SUKAB	S	2010	Yazd	HM585360
SURno4	T	2009	Noogh, Kerman	HM585366
SURka7	T	2009	Kabootarkhan, Kerman	HM585367

T = Infected trees. S = Infested soil around the infected trees.

T = بافت آلوده درخت. S = خاک آلوده در اطراف درختان بیمار.

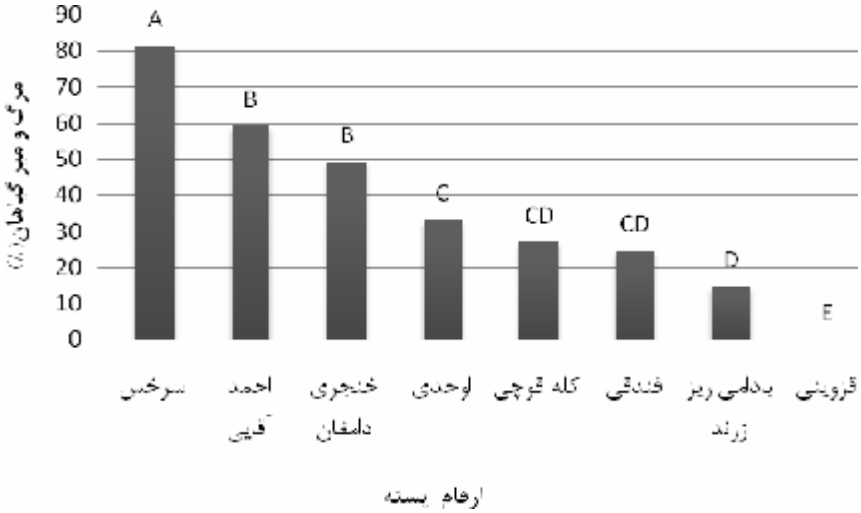
*: GeneBank Accession number for ITS region of rDNA (Mirsoleimani & Mostowfizadeh-Ghalamfarsa, 2011)
**: From Department of Plant Protection, Shiraz University, Shiraz, Iran



شکل ۲. تأثیر مایه‌زنی جدایه‌های *Phytophthora pistaciae* بر کاهش ارتفاع ارقام مختلف پسته. حروف نامتشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱% در آزمون دانکن می‌باشند.

Fig. 2. The effect of *Phytophthora pistaciae* inoculation on height of various pistachio cultivars. Mean values within a column head followed by the same letter are not significantly different at $P \leq 0.01$ by Duncan's test.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com



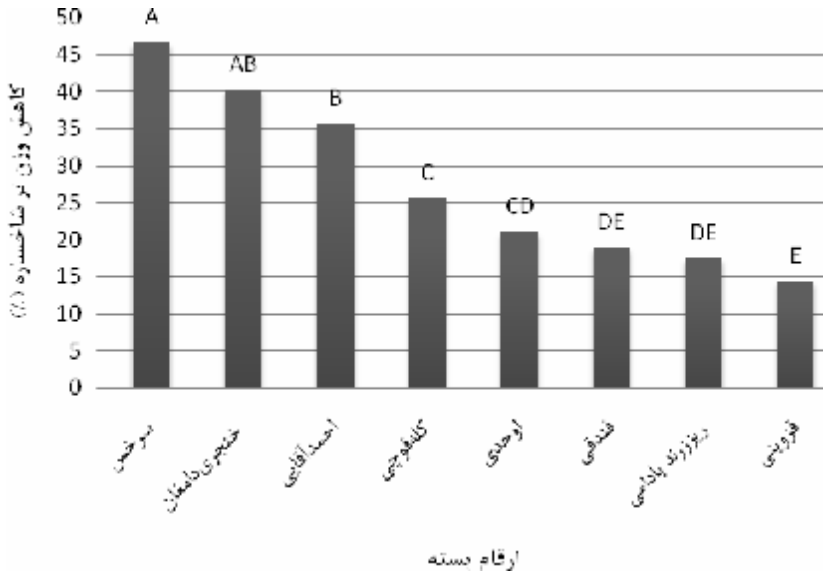
شکل ۳. تأثیر مایه‌زنی جدایه‌های ***Phytophthora pistaciae*** بر درصد مرگ و میر ارقام مختلف پسته. حروف نامتشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ می‌باشند.

Fig. 3. The effect of *Phytophthora pistaciae* inoculation on percentage of dead of various pistachio cultivars. Mean values within a column head followed by the same letter are not significantly different at P ≤ 0.01 by Duncan's test.

شکل ۴. تأثیر مایه‌زنی جدایه‌های ***Phytophthora pistaciae*** بر درصد کلنیزه شدن ریشه ارقام مختلف پسته. حروف نامتشابه نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ در آزمون دانکن می‌باشند.

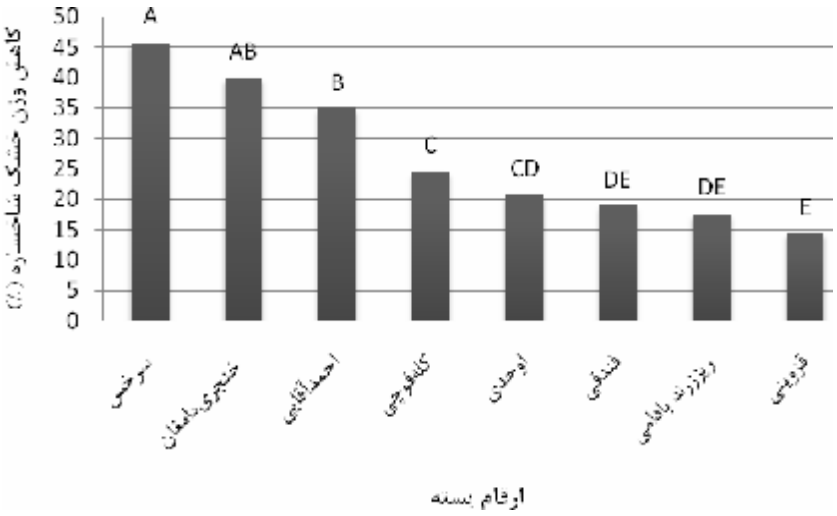
Fig. 4. The effect of *Phytophthora pistaciae* inoculation on root colonization of various pistachio cultivars. Mean values within a column head followed by the same letter are not significantly different at P ≤ 0.01 by Duncan's test.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com



شکل ۵. تأثیر مایه‌زنی جدایه‌های ***Phytophthora pistaciae*** بر کاهش وزن تر شاخساره در ارقام مختلف پسته. حروف نامتشابه نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ در آزمون دانکن می‌باشند.

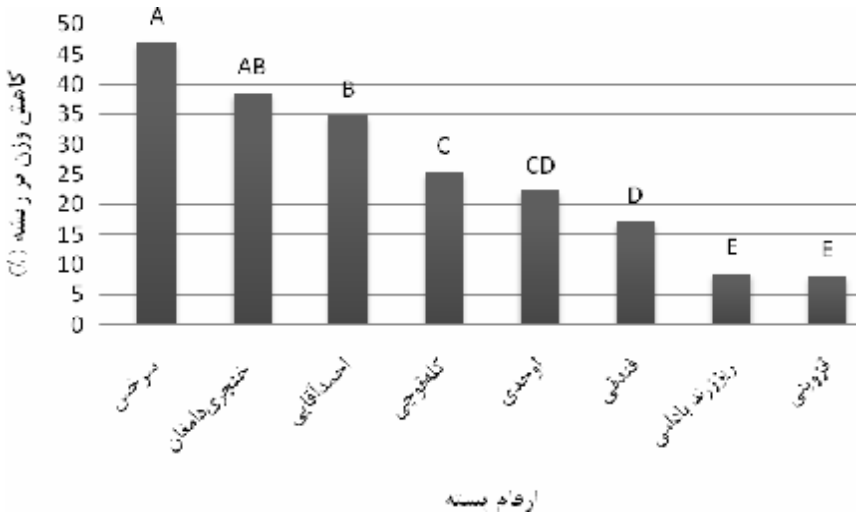
Fig. 5. The effect of *Phytophthora pistaciae* inoculation on fresh weight of shoots of various pistachio cultivars. Mean values within a column head followed by the same letter are not significantly different at $P \leq 0.01$ by Duncan's test.



شکل ۶. تأثیر مایه‌زنی جدایه‌های ***Phytophthora pistaciae*** بر کاهش کاهش وزن خشک شاخساره در ارقام مختلف پسته. حروف نامتشابه از نظر آزمون دانکن نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ می‌باشند.

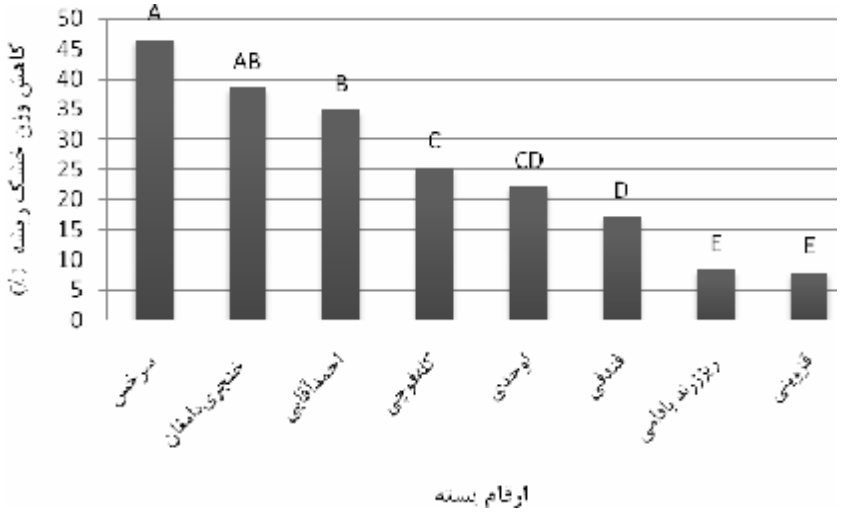
Fig. 6. The effect of *Phytophthora pistaciae* inoculation on dry weight of shoots of various pistachio cultivars. Mean values within a column head followed by the same letter are not significantly different at $P \leq 0.01$ by Duncan's test.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com



شکل ۷. تأثیر مایه‌زنی جدایه‌های ***Phytophthora pistaciae*** بر کاهش وزن تر ریشه در ارقام مختلف پسته. حروف نامتشابه از نظر آزمون دانکن نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱% در آزمون دانکن می‌باشند.

Fig. 7. The effect of *Phytophthora pistaciae* inoculation on fresh weight roots of various pistachio cultivars. Mean values within a column head followed by the same letter are not significantly different at $P \leq 0.01$ by Duncan's test.



شکل ۸. تأثیر مایه‌زنی جدایه‌های ***Phytophthora pistaciae*** بر کاهش وزن خشک ریشه در ارقام پسته. حروف نامتشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱% در آزمون دانکن می‌باشند.

Fig. 8. The effect of *Phytophthora pistaciae* inoculation on dry weight roots of various pistachio cultivars. Mean values within a column head followed by the same letter are not significantly different at $P \leq 0.01$ by Duncan's test.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

زنجیره‌ای پلیمراز تو در تو بیمارگر در بافت‌های ریشه کلیه گیاهان مورد نظر ردیابی شد. میانگین درصد کلنیزه شدن ریشه‌های ارقام مختلف نشان داد که این شاخص در رقم سرخس ۸۶%، در رقم بادامی ریز زرند ۳۲% و در رقم قزوینی ۱۰/۵% می‌باشد. پس از ردیابی بیمارگر در بافت گیاهی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تو در تو بیمارگر در بافت‌های ریشه گیاهان آلوده دارای علائم و گیاهان آلوده فاقد علائم ردیابی شد (شکل ۹).

محاسبه دمای بهینه تولید زئوسپور

نتایج شمارش تعداد زئوسپورها در دماهای ۲۰، ۲۵ و ۳۰ درجه‌سانتی‌گراد نشان داد که دمای بهینه تولید زئوسپور ۳۰ درجه‌سانتی‌گراد است. میانگین تعداد زئوسپورهای شمارش شده در تیمارهای دمایی پس از طی دوره نوری در جدول ۲ نشان داده شده است. شمارش زئوسپورها نشان داد که بین تولید شدن زئوسپورها در طیف دمایی ۲۰ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد تفاوت وجود دارد. بیشترین تعداد زئوسپور در ۳۰ درجه سانتی‌گراد و کمترین تعداد در ۲۰ درجه سانتی‌گراد دیده شد.

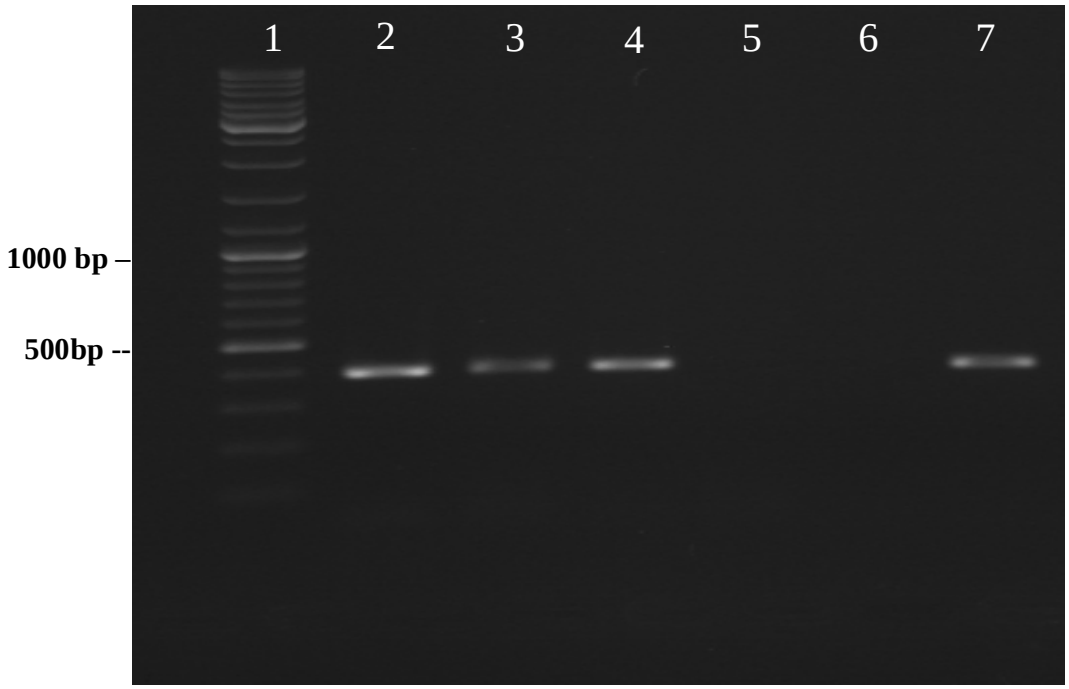
بررسی اثر دما بر بیماری‌زایی بیمارگر در شرایط آزمایشگاهی

پس از مشخص شدن پسته رقم سرخس به عنوان حساس‌ترین پایه، از این پایه به عنوان گیاه محک برای انجام این آزمون استفاده شد. گیاهچه‌های سه ماهه مایه‌زنی شده با جدایه‌های منتخب بیمارگر اولین علائم پژمردگی و سبزخشکی را در ۳۰ درجه سانتی‌گراد، شش روز پس از مایه‌زنی نشان دادند و پس از گذشت تنها یک هفته بیش از نیمی از گیاهچه‌ها در این دما سبزخشک شده، مرگ کلیه گیاهچه‌ها به وسیله کلیه جدایه‌ها تا پایان هفته سوم دیده شد. بروز علائم در ۲۵ درجه‌سانتی‌گراد نیز در هفته اول پس از مایه‌زنی مشاهده شد با این تفاوت که در هفته اول پس از مایه‌زنی کمتر از نیمی از گیاهچه‌ها از بین رفته، هم‌چنین مرگ گیاهچه در کلیه تکرارها تا پایان هفته چهارم دیده شد. ۲۱ روز بعد از مایه‌زنی نیز در ۲۰ درجه سانتی‌گراد، مرگ گیاهچه در ۳۰% از گیاهان دیده شد. شروع علائم به کندی و سرعت مرگ و میر در تیمار ۲۰ درجه سانتی‌گراد بسیار کندتر از تیمارهای ۲۵ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد بود. با گذشت چهار هفته پس از مایه‌زنی تنها ۳۵% از گیاهان در این دما مرگ گیاهچه‌ها را نشان داده و ۶۵% آنها پس از طی دوره چهار هفتگی آزمایش سالم بودند. بین جدایه‌های منتخب در ایجاد مرگ و میر در دماهای گوناگون تفاوت معنی‌داری دیده نشد (جدول ۳).

بحث

گونه‌های جنس فیتوفتورا دارای قدرت پوده‌رَستی و رقابتی کم بوده، در غیاب میزبان و وجود آنتاگونیست‌ها و تداخل میکوفلور ثانویه با رشد سریع، جمعیت‌شان در خاک و بافت‌های پوسیده و خشک به شدت کاهش می‌یابد (Erwin & Ribeiro 1996). از این‌رو در جداسازی آنها از بافت آلوده، آب و خاک از روش طعمه‌گذاری بافت‌های حساس و محیط کشت انتخابی استفاده گردید. در این بررسی از طعمه برگ پسته برای جداسازی گونه‌های فیتوفتورا عامل انگومک پسته استفاده شد. طبق مشاهدات انجام شده در این پژوهش این طعمه نسبت به طعمه برگ مرکبات (Banihashmi 1983)، که به‌طور رایج استفاده می‌شود، در جداسازی عامل بیماری برتری نسبی داشت. هرچند اثبات این برتری نیاز به کار آماری دقیق دارد، با

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com



شکل ۹. نقوش الکتروفورز حاصل از ردیابی ***Phytophthora pistaciae*** با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تو در تو با آغازگرهای اختصاصی **ITS-SR1** و **ITS-SF1** در بافت ریشه ارقام پسته مایه‌زنی شده دارای علائم و فاقد علائم. ۱- نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی ۲- بافت ریشه آلوده دارای علائم در رقم سرخس با ۸۶% آلودگی ریشه، مایه‌زنی شده با جدایه **SUKAB** ۳- بافت ریشه آلوده فاقد علائم رقم قزوینی با ۱۰/۵% آلودگی ریشه، مایه‌زنی شده با جدایه **SURf14** ۴- بافت ریشه آلوده دارای علائم رقم بادامی ریز زرند با ۳۲% آلودگی ریشه، مایه‌زنی شده با جدایه **SUP.p6** ۵- بافت سالم ریشه پسته ۶ - آب مقطر ۷- دی‌ان‌ای خالص جدایه ***P. pistaciae*** **SURf14**.

Fig. 9. Gel electrophoresis of *Phytophthora pistaciae* detection in plant tissue using nested-PCR with ITS-SF1 and ITS-SR1 specific primers in inoculated pistachio cultivars with and without symptoms. (1) 100 bp DNA ladder, (2) infested pistachio roots in Sarakhs cultivar with symptoms showing 86% colonization, inoculated with SUKAB, (3) infested pistachio roots in Ghazvini cultivar without symptoms showing 10.5% colonization, inoculated with SURf1, (4) infested pistachio roots in Badami-Rize-Zarand cultivar with symptoms showing 32% colonization, inoculated with SUP.p6, (5) healthy pistachio tissue, (6) HPLC water, (7) purified DNA of *P. pistaciae* SURf14 isolate.

جدول ۲. میانگین تولید زئوسپور (در میلی‌لیتر آب) در جدایه‌های ***Phytophthora pistaciae*** در دماهای مختلف

Table 3. Average number of zoospore production (ml^{-1} water) in isolates of *Phytophthora pistaciae* at different temperatures.

جدایه Isolate			دما (درجه سانتی‌گراد) Temperature (°C)
SUKAB	SURf14	SUP.p6	
$4.1\times10^{2}\pm10$	$3.2\times10^{2}\pm15$	$2.7\times10^{2}\pm10$	20
$1\times10^{3}\pm15$	$1.5\times10^{3}\pm10$	$1.4\times10^{3}\pm20$	25
$1.5\times10^{3}\pm20$	$1.6\times10^{3}\pm15$	$1.5\times10^{3}\pm25$	30

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

جدول ۳. میانگین درصد مرگ و میر گیاهان سه ماهه رقم پسته سرخس مایه‌زنی شده با جدایه‌های منتخب ***Phytophthora pistaciae*** در دماهای مختلف

Table 4. Average percentages of plants mortality in the three months pistachio trees cv. Sarakhs inoculated with isolates of *Phytophthora pistaciae* at different temperatures.

دما (درجه سانتی‌گراد) Temperature (°C)	هفته پس از مایه‌زنی Week after inoculation			
	اول First	دوم Second	سوم Third	چهارم Fourth
20	0	0	30	35
25	40	60	80	100
30	60	70	100	100

استفاده از این طعمه از برخی خاک‌های آلوده که طعمه برگ مرکبات قادر به جداسازی فیتوفتورا نبود، جداسازی انجام گرفت. موفقیت در روش طعمه گذاری، به حساسیت طعمه و شرایط جداسازی بستگی دارد. در روش طعمه گذاری از قدرت بیماری‌زایی گونه‌های فیتوفتورا نسبت به یک میزبان خاص استفاده می‌شود، زیرا زئوسپورها معمولاً به طرف منبع غذایی، یا همان طعمه، شیمی‌گرایی دارند. استفاده از دیسک برگ مرکبات طبق نظر بنی‌هاشمی (Banihashmi 1982) برای جداسازی *P. citrophthora* از خاک باغات مرکبات نیز بیانگر این مطلب است که انتخاب نوع طعمه در جداسازی گونه‌های مختلف فیتوفتورا اثرگذار است.

از مجموع ۲۵۰ جدایه‌ی به دست آمده از باغات پسته استان کرمان و یزد تنها ۴۵ جدایه فیتوفتورا بوده که از میان آن نُه جدایه *P. pistaciae* تشخیص داده شد. در مقابل تعداد گونه‌های *Pythium* جداسازی شده در حدود ۱۶۵ جدایه بود. گونه‌های پیتیوم در خاک و محیط اطراف ریشه گیاهان بسیار فعال هستند و رشد سریع پرگنه‌های پیتیوم در محیط CMA–PARP می‌تواند مانع رشد پرگنه‌های فیتوفتورا شود. استفاده از محیط‌های کشت انتخابی علاوه بر گونه‌های فیتوفتورا به گونه‌های پیتیوم اجازه رشد می‌دهد، ولی قراردادن بافت‌های کشت شده در ۲۰ درجه سانتی‌گراد یا کمی پایین‌تر تا حدودی این مشکل را برطرف کرده، باعث جداسازی بهتر گونه‌های فیتوفتورا گردید. در بعضی موارد برای جداسازی گونه‌ها فیتوفتورا از پیتیوم از میزان نفوذ آنها بعد از ۷۲-۴۸ ساعت در محیط کشت نیمه انتخابی PARP-CMA استفاده گردید. مشاهدات نشان داد که قارچ فیتوفتورا نسبت به پیتیوم موجود در مناطق نمونه‌برداری شده در محیط‌کشت بیشتر نفوذ کرده، در حالی که پیتیوم ابتدا سطحی و بعد به داخل محیط کشت نیمه انتخابی نفوذ می‌کند. از آنجا که افزودن هیمکسازول به محیط کشت نیز مانع رشد برخی از گونه‌های پیتیوم می‌شود، برای حل مشکل جداسازی گونه‌های فیتوفتورا طبق نظر بنی‌هاشمی (Banihashmi 1982) از این ماده در محیط کشت PARP-CMA به میزان ۲۵ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد. اگر چه این ماده در جلوگیری از رشد برخی از گونه‌ها مانند *Pythium aphanidermatum* مؤثر نبود.

از ۱۲ منطقه پسته‌کاری استان کرمان و یزد که نمونه‌برداری از آنها صورت گرفت گونه مورد نظر، از

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

چهار منطقه از این استان کرمان و هم‌چنین از استان یزد جدا شد. هر چند ممکن است که آلودگی به این بیمارگر در سایر نقاط نیز وجود داشته باشد و محدود بودن نمونه‌های برداشته شده سبب عدم جداسازی این بیمارگر از این نقاط شده باشد. بیمارگر هم از بافت ریشه و طوقه آلوده و هم از خاک اطراف آنها جداسازی شد. این نخستین گزارش پس از توصیف این گونه جدید از کرمان و خارج از این استان می‌باشد. اما تاکنون هیچ گونه گزارشی از حضور این بیمارگر خارج از ایران وجود ندارد و این گونه به عنوان یک بیمارگر بومی و قرنطینه در ایران محسوب می‌شود و در نتیجه تشخیص صحیح آن ضروری است. در مورد سایر گونه‌های فیتوفتورا مانند *P. parsiana* (Mostowfizadeh-Ghalamfarsa *et al*. 2008) که منشأ آنها ایران بوده است چنین حالتی وجود نداشته و این گونه در سایر نقاط دنیا مانند آمریکا و یونان نیز وجود دارد (Mostowfizadeh-Ghalamfarsa *et al*. 2008). هم‌چنین سایر گونه‌های جداسازی شده مانند *P. citrophthora*، *P. melonis*، *P. drechsleri*، *P. inundata* و *P. parsiana* نیز که در این بررسی جداسازی شد قبلاً توسط سایر محققین گزارش شده بود (Ershad 1971; Mirabolfathy & Ershad 1987; Banihashemi 1984, 1995; Mirabolfathy 1988; Mirabolfathy *et al*. 1989; Aminaee & Ershad 1991; Fattahi *et al*. 2000; Mostowfizadeh-Ghalamfarsa *et al*. 2008).

شناسایی مولکولی کلیه جدایه‌ها با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *P. pistaciae* انجام شد. بر اساس توصیف اولیه *میرابولفتحی و همکاران* (Mirabolfathy *et al*. 2001) شناسایی مولکولی گونه فیلوژنتیکی *P. pistaciae* بر اساس توالی ناحیه ITS به عنوان یکی از معیارهای شناسایی این گونه ذکر شده است. بررسی نتایج نشان داد که در تمام جدایه‌های مشکوک به *P. pistaciae* و جدایه SURf14 موجود در بخش گیاه‌پزشکی دانشگاه شیراز که به عنوان شاهد مثبت به کار رفته بود با استفاده از ITS-SF1 و ITS-SRI نواری به طول ۳۹۵ جفت باز تکثیر شد، در حالی‌که در شاهد منفی چنین نواری دیده نشد (Mostowfizadeh-Ghalamfarsa & Mirsoleimani 2011). بررسی‌های مولکولی پیشین (Mirsoleimani & Mostowfizadeh-Ghalamfarsa 2011) نشان داد که جدایه‌های این گونه بیمارگر از نظر ژنتیکی بسیار همگن هستند و به همین دلیل در طول این بررسی از سه جدایه منتخب بیمارگر *P. pistaciae* استفاده شد. نتایج به دست آمده از واکاوی‌های آماری نیز نشان داد که فاکتور جدایه بیمارگر معنی‌دار نمی‌باشد و واکنش ارقام مختلف نسبت به جدایه‌های متفاوتِ بیمارگر یکسان است.

نتایج حاصل از اندازه‌گیری و مقایسه درصد نهال‌های مرده، وزن تر و خشک ریشه و قسمت‌های هوایی، ارتفاع و درصد کلنیزه شدن ریشه پس از مایه‌زنی نهال‌های پنج ماهه ارقام پسته اهلی ایران، در مجموع نشان داد که رقم قزوینی و بادامی ریز زرند مقاومت بالایی داشته و رقم سرخس بیشترین حساسیت را نشان داد. ارقام خنجری دامغان و احمدآقایی نیمه حساس و ارقام اوحدی، کله‌قوچی و فندقی نیز نیمه مقاوم بودند. هر چند ممکن است در برخی از صفات مانند وزن تر و خشک ریشه و اندام‌های هوایی در ارقام بادامی و قزوینی تفاوت‌های معنی‌داری قابل ملاحظه نباشد (شکل ۵ تا ۸) ولی در مجموع و به خصوص با توجه به درصد کلنیزه شدن ریشه‌ها و درصد مرگ و میر (جدول ۲ و ۳) این نتیجه‌گیری به خوبی دیده می‌شود. *بنی‌هاشمی و غیثی* (۱۹۹۵) مقاومت گونه‌ها و ارقام مختلف پایه‌های پسته را

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

در برابر گونه‌های مختلف *P. citrophthora*، *P. cryptogea*، *P. drechsleri* (اکنون *P. melonis*) و *P. nicotianae* مورد ارزیابی قرار دادند. در مطالعه آنها رقم بادامی ریز زرند مقاوم و ارقام جندقی و اوحدی نیمه مقاوم بودند. در بین گونه‌های وحشی پسته *P. mutica* و *P. khinjuk* حساس و در ارقام اهلی، موسی‌آبادی و امیری، حساس، هراتی، لوک، ممتاز و بادامی ریزقزوین نیمه حساس بودند. هم‌چنین در بین ارقام اهلی، سرخس حساس‌ترین پایه نسبت به انگومک گزارش شد. نتایج به دست آمده در این تحقیق، تأییدی بر بررسی مذکور است. در شرایط گلخانه نیز واکنش طوقه و ریشه دانهال‌های نه ماهه‌ی ارقام سرخس، بادامی و قزوینی به *P.melonis* و *P. citrophthora* مورد مطالعه قرار گرفته است که براساس نتایج به دست آمده، رقم قزوینی مقاوم‌ترین و سرخس حساس‌ترین می‌باشد (Banihashemi & Moradi 2004) که با نتایج این بررسی هم‌خوانی دارد. *میرابوالفتحی و همکاران* (Mirabolfathy *et al*. 2000; 1990) مقاومت ارقام بادامی ریز زرند، بادامی قزوین، سرخس، ممتاز، کله‌قوچی، سفیدپسته، فندقی و گونه‌های خنجک و آتلانتیکای محلی را با استفاده از زئوسپور گونه‌های *P. megasperma* (اکنون *P. pistaciae*)، *P. drechsleri* (اکنون *P. melonis*) و *P. cryptogea* در محلول هوگلند مورد مطالعه قرار دادند. همه گیاهچه‌های ارقام و گونه‌ها حساسیت نشان دادند.

تحقیقات انجام شده توسط *طباطبایی* (۱۹۹۵) روی مقاومت در برابر شوری پایه‌های متداول پسته نشان داده که پایه قزوینی نسبت به بادامی ریز زرند و سرخس مقاومت بیشتری در برابر شوری دارد. اما در شرایط پرآبی، پایه‌ی سرخس نسبت به بادامی ریز زرند و قزوینی مقاومت بیشتری در برابر شوری نشان می‌دهد (Mehrnejad & Javan Shah 2010). ولی حساسیت رقم سرخس به تمام گونه‌های فیتوفتورا از جمله *P. pistaciae* بسیار زیاد می‌باشد، بنابراین طبق نظر *مهرنژاد و جوانشاه* (۲۰۱۰) استفاده از این پایه در زمین‌های آلوده به عوامل پوسیدگی طوقه و ریشه قابل توصیه نیست و از سوی دیگر نیز پایه‌ی سرخس کمترین رشد را از نظر قطر و شعاع تنه و ارتفاع درخت پس از پیوندزنی دارد. در مورد پایه‌های بادامی ریز زرند و قزوینی که مقاومت بالایی نسبت به تمام گونه‌های فیتوفتورا از جمله *P. pistaciae* دارند، با توجه به این‌که پسته درختی دو پایه است و بذور حاصل خلوص ژنتیکی چندانی ندارند طبق نظر *مهرنژاد و جوانشاه* (۲۰۱۰) ممکن است پایه‌های حاصل از رشد بذور واکنش‌های متفاوتی نشان دهند و در نتیجه انتخاب بذور مقاوم و تکثیر غیرجنسی آنها با روش‌هایی مانند کشت بافت منجر به تولید پایه‌های یک‌نواخت و مقاوم خواهد گردید. در نهایت پایه قزوینی ضمن داشتن مقاومت بیشتر در برابر شوری و هم‌چنین مقاومت بالا نسبت به *P. pistaciae* از یک‌سو و سازگاری با پیوند تمامی ارقام و پس از آن پایه بادامی ریز زرند به دلیل مقاوت نسبتاً بالا به شوری و عوامل پوسیدگی طوقه و ریشه و هم‌چنین بیشترین رشد از نظر قطر و شعاع تنه و ارتفاع درخت به عنوان پایه قابل توصیه هستند.

پس از مشخص شدن پسته رقم سرخس به عنوان حساس‌ترین پایه، از این پایه به عنوان گیاه محک برای انجام آزمون اثر دما بر بیماری‌زایی بیمارگر استفاده شد. گیاهچه‌های سه ماهه مایه‌زنی شده با جدایه‌های منتخب بیمارگر اولین علائم پژمردگی و سبزخشکی را در ۳۰ درجه‌سانتی‌گراد، شش روز پس از مایه‌زنی نشان دادند و پس از گذشت تنها یک هفته بیش از نیمی از گیاهچه‌ها در این دما سبزخشک شده و مرگ کلیه گیاهچه‌ها به وسیله

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

کلیه جدایه‌های منتخب تا پایان هفته سوم دیده شد. بر طبق نتایج، دمای بهینه بیماری‌زایی ۳۰ درجه سانتی‌گراد است و نتایج شمارش تعداد زئوسپورها در دماهای مختلف نیز نشان داد که دمای بهینه تولید زئوسپور ۳۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. شمارش زئوسپورها مشخص نمود که بین تولید شدن زئوسپورها در طیف دمایی ۲۰ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد تفاوت وجود دارد و این تفاوت در تولید زئوسپور را می‌توان احتمالاً عامل مؤثری در تفاوت موجود در شدت بیماری در دماهای مختلف دانست. طبق بررسی‌های به عمل آمده بهینه رشد قطری پرگنه‌های جدایه‌های مختلف این گونه ۳۰ درجه سانتی‌گراد است، اما جدایه‌ها در ۳۵ درجه سانتی‌گراد به شدت دچار کاهش رشد می‌شود (Mirsoleimani 2011). نتایج تحقیقات مشابه نیز نتایج بررسی فوق را تا حدودی تأیید می‌کند، به عنوان مثال بررسی آثار دما روی آلودگی *P. palmivora*، عامل پوسیدگی قهوه‌ای مرکبات، نشان داد که *P. palmivora* یک گونه‌ی گرماپسند با بهینه دمای رشد ۳۰ درجه سانتی‌گراد و بهینه دمای آلودگی و پیشرفت بیماری از ۳۰-۲۷ درجه سانتی‌گراد می‌باشد (Timmer & Menge 1988). اما نتایج به دست آمده همواره به این ترتیب نیست، به عنوان مثال *P. citrophthora* در ۳۰ درجه سانتی‌گراد قادر به تولید اسپورانژیوم بوده ولی در همین دما در خاک‌هایی که به طور طبیعی آلوده هستند، بیماری ایجاد نمی‌شود (Mathernon & Matejka 1992). یا دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد نسبت به دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد که دمای بهینه رشد برای *P. cryptogea* است، برای تشدید پوسیدگی ریشه و طوقه گوجه‌فرنگی مناسب‌تر است (Kennedy & Pegg 1990). در آزمایش کندی و پگ (۱۹۹۰) تمام گیاهان گوجه‌فرنگی در ۱۵ درجه سانتی‌گراد بعد از ۱۵ روز از بین رفتند، در حالی که در ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت سه ماه بدون علائم باقی ماندند. هنگامی که دمای خاک بین ۲۷-۱۵ درجه سانتی‌گراد باشد، گونه *P. cinammomi* می‌تواند رشد ریشه و قسمت‌های هوایی آووکادو را به طور مؤثری کاهش دهد اما موقعی که دمای خاک به ۳۳ درجه سانتی‌گراد برسد، این گونه روی آووکادو بیماری‌زا نمی‌باشد (Zentmyer *et al.* 1976; Zentmyer 1981). این در حالی است که مشاهدات نشان می‌دهند که در ۲۲ درجه سانتی‌گراد و پایین‌تر پوسیدگی قهوه‌ای مرکبات توسط *P. palmivora* ایجاد نمی‌شود (Timmer & Menge 1988).

با توجه به یافته‌های مشاهده شده پیشنهاد می‌شود که مطالعات بیشتری در زمینه بررسی واکنش پایه‌های دورگ پسته نسبت به این بیمارگر صورت گیرد. هم‌چنین بررسی اثرات سایر عوامل محیطی مانند pH خاک، میزان رطوبت و سایر عوامل شیمیایی و فیزیکی بر روند بیماری‌زایی *P. pistaciae* نیز می‌تواند در زمینه مدیریت بیماری گموز پسته مفید باشد.

سپاسگزاری

نگارندگان برخود لازم می‌دانند که از همکاری آقای مهندس مجتبی حسین‌زاده قاسم‌آباد در مراحل مقدماتی پژوهش حاضر قدردانی نمایند. این پژوهش با حمایت صندوق حمایت از پژوهشگران کشور طبق تفاهم نامه شماره ۸۶۰۱۵/۰۳ انجام گرفته است.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (93-91) متن انگلیسی مراجعه شود.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com