دانشگاه یاسوج

دانش بیماری شناسی گیاهی

سال هشتم، جلد ۲، بهار و تابستان ۱۳۹۸(شاپاچ:۹۲۷۰-۲۲۵، شاپا ا:۶۲۹۰-۲۵۸۸)

دانش بیماری شناسی گیاهی

سال هشتم، جلد ۲، بهار و تابستان ۱۳۹۸

فهرست مطالب

عنوان — صفحه

۱- وقوع بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه سیاهدانه در جنوب غربی ایران
فریبا قادری.....۱

۲- پراکنش و تراکم جمعیت نماتد سیستی غلات در استان اردبیل
لاله ابراهیمی، زهرا تنهامعافی، حسین کربلائی خیاوی، قربان دیده باز مغانلو، یحیی آذرمی و رئوف زمانی.....۹

۳- مروری بر بیماری انگومک پسته
سید رضا فانی، محمد مرادی و منصوره میرابوالفتحی.....۱۶

٤- بیماری مرگ ناگهانی درختان مرکبات در جنوب استان کرمان
مهدی آزادوار، حمیدرضا علیزاده، موسی نجفی‌نیا، محمدرضا صفرنژاد و صمد اسفندیاری.....۳۱

۵- بیماری شانکر باکتریایی پوستی درخت گردو
میثم آزادی مقدم، ذبیح اله اعظمی ساردوئی و مهدی آزادوار.....۳۸

٦- بیماری سوختگی نخود
سید حسین وفائی.....٤۵

۷- مدیریت تلفیقی بیماری‌های ناشی از قارچهای گندمیان‌زی
سپیده فکری کهن و رضا مستوفی‌زاده قلمفرسا.....۵۸

۸- بیماری سرخشکیدگی زبان گنجشک
نوراله حسن‌پور و مهدی ارزنلو.....۷۰

۹- تکنیکِ نسل جدید توالی‌یابی و کاربرد آن در ویروس‌شناسی گیاهی
زهره داودی، جهانگیر حیدرنژاد و حسین معصومی.....۷۷

۱۰- برهمکنش‌های درون‌سلولی جمینی‌ویروس‌ها در گیاهان میزبان
سعید تابعین و سید علی اکبر بهجت‌نیا.....۸٦

۱۱- تاثیر نانوکیتوزان بر بیماری سوختگی زودهنگام گوجه‌فرنگی
آیدا احمدی زاده اصفهانی، مهدی صدروی و شعله کاظمی.....۱۰۲

۱۲- قارچ‌های مناطق کویری استان یزد
وحیده رفیعی و ضیاءالدین بنی هاشمی.....۱۱۰

Yasouj University

Plant Pathology Science

Volume 8(2), 2019 (pISSN:2251-9270, eISSN: 2588-6290)

Contents

Title — Page

1- Incidence of root and crown rot disease of black cumin in the southwest of Iran
F. Ghaderi.....1

2- Distribution and population density of cereal cyst nematode in Ardabil province
L. Ebrahimi, Z. Tanha Maafi., H. Karbalaei Khiavi, G. Didehbaz Moghanlo, Y. Azarmi & R. Zamani.....9

3- A review of the pistachio gummosis disease
S. R. Fani, M. Moradi & M. Mirabolfathy 16

4- Citrus sudden decline disease in the south of Kerman province
M. Azadvar, H. R. Alizadeh, M. Najafinia, M. Safarnejad & S. Esfandiari.....31

5- Bacterial bark canker disease of walnut Tree
M. Azadi Moghadam, Z. Azami Sardooei & M. Azadvar 38

6- Blight disease of chickpea
S. H. Vafaei.....45

7- Integrated management of diseases caused by graminicolous fungi
S. Fekrikohan & R. Mostowfizadeh-ghalamfarsa.....58

8-Ash dieback disease
N. Hasanpour & M. Arzanlou.....70

9-Next generation sequencing technique and its application in plant virology
Z. Davoodi, J. Heidarnejad & H. Masoumi.....77

10-Intracellular Interactions of geminiviruses in host plants
S. Tabein & S. A. A Behjatnia.....86

11-Effect of nano-chitosan on early blight disease of Tomato
A. Ahmadizadeh Esfahani1, M. Sadravi & S. Kazemi.....102

12-Fungi in desert areas of Yazd province
V. Rafiei1 & Z. Banihashemi.....110

دوفصلنامه علمی- ترویجی

دانش بیماری شناسی گیاهی

(سال هشتم، جلد ۲، بهار و تابستان ۱۳۹۸)

این نشریه بر اساس مجوز شماره ۲۳٤۷۵۵/۳ و تایید اعتبار علمی وزارت علوم، تحقیقات و فنآوری

و پروانه انتشار شماره ۱٤۸۳٦/۹۰ وزارت فرهنگ و ارشاد اسلامی منتشر می شود.

صاحب امتیاز: دانشگاه یاسوج **مدیر مسئول و سردبیر:** مهدی صدروی

گروه دبیران:

==========

۱- دکتر سید علی اکبر بهجت‌نیا استاد بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه شیراز
۲- دکتر سید محسن تقوی استاد بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه شیراز
۳- دکتر حبیب اله حمزه زرقانی دانشیار بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه شیراز
٤-دکتر مهدی صدروی دانشیار بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه یاسوج
۵- دکتر عباس صلاحی اردکانی دانشیار بیماری شناسی گیاهی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی تهران
٦- دکتر محمد عبداللهی استاد بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه یاسوج
۷- دکتر محمد رضا موسوی دانشیار بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت

داوران مقاله‌های این جلد:

لاله ابراهیمی، لیلا ابراهیمی، فائزه السادات ابطحی، امیررضا امیرمیجانی، سیده عاطفه حسینی، حبیب‌اله حمزه زرقانی، مریم خضری، مینا راستگو، مریم رستگار، سمانه سماوات، مهدی صدروی، عباس صلاحی اردکانی، محمد عبداللهی، سید محمدرضا موسوی، رضا مستوفی زاده قلمفرسا، صفرعلی مهدیان، محمدمهدی فقیهی، فریبا قادری، موسی نجفی نیا، علی ویانی

ویراستار و صفحه آرا: مهدی صدروی **ویراستار متن انگلیسی:** محمد عبداللهی

کارشناس: فاطمه جعفری

آدرس: یاسوج، بلوار دانشجو، دانشگاه یاسوج، دانشکده کشاورزی، دفتر مجله دانش بیماری شناسی گیاهی، صندوق پستی ۳۵۳، کد پستی : ۷۵۹۱۸۷٤۸۳۱

تلفن: ۰۷٤-۳۱۰۰٦۳۰۸ **پست الکترونیک:** ijplantpatholsci@yu.ac.ir

آدرس تارنمای نشریه: http://yujs.yu.ac.ir/pps

Semiannual Peer-Review Scientific Journal

Plant Pathology Science

Volume 8(2), 2019

Proprietor : Yasouj University

Executive Director & Editor in Chief : Mehdi Sadravi

Editorial Board:

==========

1- Dr. Seied Ali Akbar Behjatnia Professor of Plant Pathology, Shiraz University, Shiraz, Iran.
2- Dr. Seied Mohsen Taghavi Professor of Plant Pathology, Shiraz University, Shiraz, Iran.
3- Dr. Habibollah Hamzeh-Zarghani Associate Professor of Plant Pathology, Shiraz University, Shiraz, Iran.
4- Dr. Mehdi Sadravi Associate Professor of Plant Pathology, Yasouj University, Yasouj, Iran.
5- Dr. Abbas Salahi Ardakani Associate Professor of Plant Pathology, Tehran Research Center of Agriculture and Natural Resources, Tehran, Iran.
6- Dr. Mohammad Abdollahi Professor of Plant Pathology, Yasouj University, Yasouj, Iran.
7- Dr. Mohammad Reza Moosavi Associate Professor of Plant Pathology, Islamic Azad University, Marvdasht Branch, Marvdasht , Iran.

Persian Editor & Type Setting: M. Sadravi **English Editor:** M. Abdollahi

Address : Daneshju Ave., Yasouj University, Faculty of Agriculture, P. O. Box: 353, P. Code: 75918-74831, Yasouj, Iran. **Tel:** +98-74-31006308 **E. mail:** ijplantpatholsci@yu.ac.ir

Web Site: http://yujs.yu.ac.ir/pps

دانش بیماری‌شناسی گیاهی (شاپای ا: ۶۲۹۰-۲۵۸۸، شاپای چ: ۹۲۷۰-۲۲۵۱)
سال هشتم، جلد ۲، بهار و تابستان ۱۳۹۸
Plant Pathology Science (eISSN:2588-6290, pISSN:2251-9270)
Vol. 8(2), 2019

Research Article

Incidence of Root and Crown Rot Disease of Black cumin in the Southwest of Iran

FARIBA GHADERI✉
Department of Plant Protection, Yasouj University, Yasouj, Iran

Received: 16.06.2019 Accepted: 26.08.2019

Ghaderi F (2019) Incidence of root and crown rot disease of black cumin in the southwest of Iran. Plant Pathology Science 8(2):1-8. DOI: 10.2982/PPS.8.2.1

Abstract

Introduction: Black cumin, an annual flowering plant in the family *Ranunculaceae*, is a medicinal herb with many pharmacological properties. Crown and root rot disease of this plant has been reported in most countries worldwide. This study was conducted to investigate the occurrence of this disease and identifying the causal agent in southwest of Iran. **Materials and Methods:** Black cumin farms were visited in Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad province and southwest of Iran. Plants with crown and root rot were sampled. Pieces of infected root and crown were washed with tap water, dry blotted and plated on CMA-PARP. In total, 17 isolates of two different fungus-like species were isolated from rotted root and crown. Species identification was done based on morphological characteristics and temperature requirement. Pathogenicity test of the isolates were done on 3-week-old seedlings of Baft cultivar under greenhouse condition. **Results:** Eleven isolates were identified as *Pythium aphanidermatum* and six isolates as *Phytophthora drechsleri.* Both of these fungus-like species were pathogenic on the tested black cumin variety. **Conclusion:** Crown and root rot disease is present in the farms of black cumin in the southwest of Iran. The causal agents of this disease were identified as *Pythium aphanidermatum* and *Phytophthora drechsleri*. The black cumin cultivar Baft is susceptible to these pathogens.

Keywords: *Nigella sativa, Phytophthora , Pythium*

✉ fghaderi2003@yahoo.com

مقاله پژوهشی

وقوع بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه سیاهدانه در جنوب غربی ایران

فریبا قادری✉

گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه یاسوج

دریافت: ۱۳۹۸/۰۳/۲۶ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۶/۰۴

قادری ف (۱۳۹۸) وقوع بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه سیاهدانه در جنوب غربی ایران. دانش بیماری‌شناسی گیاهی ۸(۲):۸-۱. DOI: 10.2982/PPS.8.2.1

چکیده

مقدمه: سیاهدانه گیاهی دولپه‌ای، علفی، یکساله و متعلق به تیره آلاله است که از خواص دارویی بالایی برخوردار است. بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه این گیاه از بیشتر کشورهای جهان گزارش شده است. این پژوهش به منظور بررسی وقوع این بیماری و شناسایی عامل‌های آن در جنوب‌غربی ایران انجام شد. **مواد و روش‌ها:** مزرعه‌ها سیاهدانه در استان کهگیلویه و بویراحمد، جنوب‌غربی ایران، بازدید شد و بوته‌های دچار پوسیدگی طوقه و ریشه نمونه‌برداری شدند. بافت‌های بیمار طوقه و ریشه بعد از شستشو با آب و خشک کردن روی محیط کشت نیمه انتخابی آرد ذرت-آگار قرار داده شدند. هفده جدایه شبه‌قارچ از بافت‌های پوسیده طوقه و ریشه سیاهدانه جداسازی گردیدند. آزمون بیماریزایی این جدایه‌ها روی گیاهچه‌های سه هفته‌ای رقم بافت سیاهدانه تحت شرایط گلخانه انجام شد. **یافته‌ها:** مطالعه خصوصیات ریخت‌شناسی جدایه‌های بدست آمده نشان داد که ۱۱ جدایه *Pythium aphanidermatum* و شش جدایه *Phytophthora drechsleri* هستند. هر دو این شبه‌قارچها روی رقم بافت سیاهدانه بیماریزا بودند. **نتیجه‌گیری:** بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه در مزرعه‌های سیاهدانه در جنوب‌غربی ایران وجود دارد. عوامل این بیماری در این منطقه *Pythium aphanidermatum* و *Phytophthora drechsleri* هستند. رقم زراعی بافت سیاهدانه به این بیمارگرها حساس است.

واژگان کلیدی: *Nigella sativa*، *Phytophthora*، *Pythium*

مقدمه Introduction

پژوهشگران از اواخر قرن بیستم میلادی رویکردی به جایگزین کردن فراورده‌های دارویی گیاهان، به جای داروهای شیمیایی داشته است. به طوری که در مقیاس جهانی رشدی معادل ۸درصد را از دهه ۹۰ به بعد برای استفاده از گیاهان دارویی در درمان بیماری‌های مختلف در جهان شاهد بوده و به همین دلیل این گیاهان از اهمیت اقتصادی بسیار بالایی برخوردار بوده و تجارت آن‌ها تبدیل به یک تجارت بین‌المللی شده است (Omidbaigi 1995). سیاهدانه (*Nigella sativa* L.) گیاهی دارویی، دولپه، علفی، یکساله و متعلق به تیره آلاله است که در بعضی از نقاط ایران به صورت خودرو وجود داشته و در برخی نقاط دیگر به صورت زراعی کشت و کار می‌شود و مصارف گسترده‌ای در صنایع غذایی و دارویی کشور دارد (Zargari 1989). بیماری‌های ریشه و طوقه از عوامل محدودکننده توسعه کشت این گیاه هستند. علائم بیماری شامل زردی، پژمردگی یک‌طرفه همراه با پوسیدگی ریشه و طوقه و مرگ گیاه می‌باشد.

بیماری بوته‌میری یا مرگ گیاهچه یکی از بیماری‌های مهم خاک‌زاد این گیاه می‌باشد. نشانه اولیه این بیماری، سبز نشدن بذرها است. در واقع قارچ عامل بیماری از طریق پوسته خیس و متورم شده بذر یا از داخل شکاف‌های بذر مستقیماً وارد می‌شود. سپس از طریق تولید مواد آنزیمی باعث از بین رفتن بذرها می‌گردد که به این نوع مرحله از بیماری، مرگ گیاهچه قبل از خروج از خاک گفته می‌شود؛ اما در صورت حمله به گیاهچه،

✉ fghaderi2003@yahoo.com

محل حمله باریک و نرم می‌گردد، به طوری که قسمت نازک شده تحمل وزن اندام‌های هوایی گیاهچه را نخواهد داشت در نتیجه گیاهچه به زمین اُفتاده و می‌پوسد این نوع از بیماری مرگ گیاهچه بعد از خروج از خاک گفته می‌شود. در مراحل بعدی رشد، بوته‌ها پژمرده و در حالتی که برگ‌ها سبز هستند می‌خشکند که آن را سبزخشک می‌نامند. این بیماری یعنی مردن ناگهانی بوته‌ها اغلب چند روز بعد از آبیاری روی می‌دهد؛ زیرا فراهم شدن رطوبت کافی به رشد و نمو بیمارگر کمک فراوان نموده و باعث از بین رفتن آوندها و نهایتاً مرگ گیاهچه‌ها می‌گردد. بیماری‌های ریشه و طوقه سیاهدانه، برای اولین بار در سال ۱۹۹٤ از مصر گزارش شده، که مشخص شد عامل‌های بیماری: *Fusarium moniliforme* J. Sheld.، *F. oxysporum* Schltdl. ، *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid، *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn ، *Alternaria* spp. و *Nigrospora* spp. هستند (Hilal *et al*. 1994). سپس در سال ۱۹۹۵ در هند عامل پژمردگی سیاهدانه *F. oxysporum* f.sp. *nigella* و *F. oxysporum* f.sp. *cumini* تشخیص داده شده‌اند (Dubey 1995). قارچ‌های *F. oxysporum*، *F. solani* (Mart.) Appel and Wollenw، *F. moniliforme* و *Verticiilium* sp. نیز از بذرهای سیاهدانه در هند جداسازی و شناسایی گرده‌اند (Elwakil and Ghoneem 1999).

بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه سیاهدانه یکی از بیماری‌هایی است که خسارت به این محصول وارد می‌نماید، اما هیچ گزارشی از این بیماری در ایران وجود ندارد. در نتیجه، بایستی پژوهشی در این باره انجام می‌گرفت تا با شناسایی عامل‌های پوسیدگی طوقه و ریشه سیاهدانه در ایران، راهکارهای مناسبی برای مدیریت بیماری پیشنهاد گردد.

مواد و روش‌ها Materials and Methods

نمونه‌برداری و جداسازی بیمارگرها

طوقه و ریشه گیاهچه‌های مرده و یا در حال زوال سیاهدانه در مناطق مختلف استان کهگیلویه و بویراحمد (باشت، گچساران و دهدشت) نمونه‌برداری شد. نمونه‌ها درون کیسه‌های نایلونی در صندوق حاوی یخ به آزمایشگاه منتقل گردیدند. در آزمایشگاه بافت‌های بیمار زیر آب لوله به ملایمت شسته شدند تا ریزجانداران سطحی پوده‌زی و مواد اضافی در سطح بافت شسته شود. سپس آنها به قطعات ۵-۲ میلی‌متر مربع تقسیم شده و با حوله کاغذی خشک گردیدند و روی محیط‌های کشت نیمه انتخابی آرد ذرت- آگار (عصاره ٤٠ گرم دانه ذرت خرد شده، ۲۰ میلی‌گرم دلواسید (حاوی ۵۰ درصد پی‌مارسین)، ۲۵۰ میلی‌گرم آمپی‌سیلین، ۱۰ میلی‌گرم ریفامپیسین، ۱۰۰ میلی‌گرم پنتا کلرو نیترو بنزن، ۱۵ گرم آگار، یک لیترآب مقطر) کشت داده و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری گردیدند (Kannwischer and Mitchell 1981). برای مشاهده مقدماتی شبه-قارچ‌هایی که روی محیط کشت نیمه انتخابی رشد کرده بودند از تعدادی دانه شاهدانه استفاده شد. جهت خالص‌سازی پرگنه‌ها به روش نوک ریسه، بلوک‌های میسیلیومی ٦-۵ میلی‌متر مربع از حاشیه پرگنه‌های جوان در حال رشد روی محیط کشت نیمه انتخابی CMA-PARP به محیط آب آگار ۲ درصد انتقال داده شد (Ribeiro 1978).

شناسایی بیمارگرها

شناسایی جدایه‌ها بعد از خالص‌سازی، با استفاده از کلیدهای موجود بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی اسپورانژیوم، تولید یا عدم تولید اُاُسپور، شکل پرگنه، تورم ریسه، تولید یا عدم تولید کلامیدوسپور و اندازه‌گیری رشد در دماهای مختلف مورد بررسی قرار گرفتند. جهت تشکیل مراحل مختلف جنسی و غیرجنسی گونه‌های *Phytophthora* spp در آزمایشگاه از محیط کشت‌های اختصاصی آردذرت-آگار، شاهدانه-آگار و عصاره هشت سبزی-آگار استفاده شد (Erwin and Ribeiro 1996; Vander Plaasts-Niterink 1981).

اثبات بیماری‌زایی

برای پرورش گیاهچه، بذرهای سیاهدانه بعد از ۱۲ ساعت خیساندن، در گلدان‌های پلاستیکی در شرایط گلخانه کشت داده شدند. گلدان‌ها تا عمق ده سانتی‌متری با خاک لومی رسی سترون پُر شدند. بعد از آبیاری در گلدان‌ها بذر سیاهدانه رقم بافت کاشته و روی آن به ارتفاع نیم سانتی‌متر خاک ریخته شد. در کیسه‌های پلاستیکی مقاوم به حرارت اتوکلاو، ۲۰۰ میلی‌لیتر ورمی‌کولیت ریخته شد و به آن ۱۲۰ میلی‌لیتر عصاره شاهدانه (عصاره ٦٠ گرم دانه شاهدانه در لیتر) اضافه شد و به مدت یک ساعت در اتوکلاو سترون گردید. دو تا سه روز بعد از آن، از پرگنه جدایه موردنظر که قبلاً روی محیط کشت آرد ذرت- آگار رشد کرده بودند، هشت بلوک میسلیومی به قطر شش میلی‌متر به کیسه‌های پلاستیکی اضافه گردید. سپس کیسه‌های پلاستیکی به مدت چهار هفته در ۲۵ درجه سلسیوس و در تاریکی قرار داده شدند. از گیاهچه‌های سه هفته سیاهدانه برای مایه‌زنی استفاده گردید. خاک اطراف هر گیاهچه تا عمق سه سانتی‌متری کنار زده شد و ۱۰ میلی‌لیتر از زادمایه تهیه شده در اطراف طوقه و ریشه هر گیاهچه قرار داده شد.

برای تعیین حضور فعال شبه‌قارچ‌ها در خاک بلافاصله سوراخ زه آب گلدان‌ها با پارافین جامد بسته شده، خاک گلدان‌ها با آب اشباع گردید. بعد از ٢٤ ساعت سوراخ زه آب باز گردید و آب گلدان‌ها در لیوان‌هایی پلاستیکی استفاده نشده جمع‌آوری شد و از برگ لیموشیرین دایره‌هایی به قطر پنج میلی‌متر جدا و ۵۰ عدد از آن‌ها در هر نمونه قرار داده شد. بعد از ٢٤ ساعت نگهداری در محیط آزمایشگاه، قطعات برگ به مدت یک دقیقه با جریان آب معمولی شستشو داده شد و بعد از خشک شدن آن‌ها روی دستمال کاغذی، به محیط کشت آرد ذرت- آگار منتقل گردید. تشتک‌های پتری در ۲۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند. جهت مشاهده رشد قارچ، تشتک‌های پتری روزانه مورد بررسی قرار گرفتند. بعد از ظهور پرگنه‌ها و مشاهدات اولیه میکروسکوپی از بذر شاهدانه استفاده گردید. این عمل هر دو هفته یکبار انجام شد گیاهچه‌ها در فواصل بین غرقابی و در موقع لزوم با آب لوله، آبیاری شدند (Banihashemi 2004). گیاهان شاهد نیز با همین روش، ولی ورمی‌کولیت حاوی عصاره شاهدانه مایه‌زنی شدند.

یافته‌ها Results

معرفی بیمارگرها

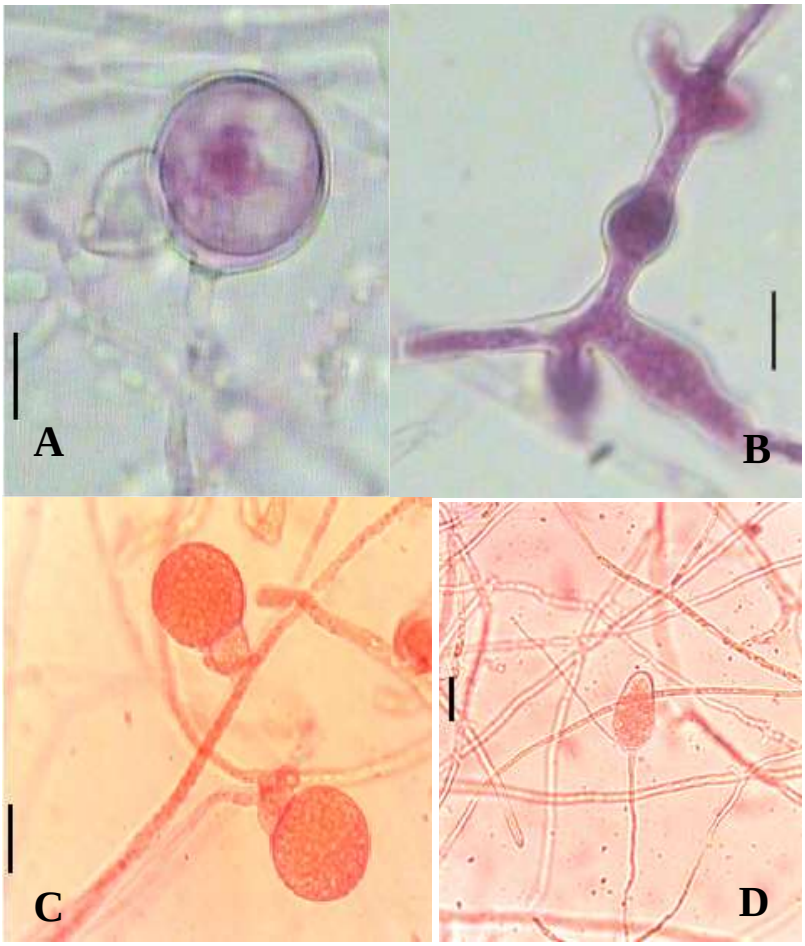
بر اساس نمونه‌برداری‌هایی که در مناطق مختلف استان کهگیلویه و بویراحمد انجام گرفت، ۱۷ جدایه از شبه‌قارچها از بافت‌های طوقه و ریشه پوسیده سیاهدانه جداسازی گردید. بر اساس خصوصیات ریخت-شناسی، جدایه‌های به دست آمده به دو گونه تعلق داشتند به طور کلی ۱۱ جدایه *Pythium* (Edson) Fitzp *aphanidermatum* و ۶ جدایه *Phytophthora drechsleri* Tucker به دست آمد. خصوصیات ریخت شناسی این بیمارگرها به این شرح است.

Pythium aphanidermatum (Edson) Fitzp.

پرگنه روی محیط کشت بذر شاهدانه-آگار فاقد ریسه‌های هوایی بود، ولی روی محیط کشت آرد ذرت-آگار تولید ریسه‌های هوایی پنبه‌ای شکل کرد. اسپورانژیوم انگشتی متورم با ابعاد مختلف، روی محیط‌های کشت به تعداد زیاد تشکیل شدند. اُاگونیوم کروی شکل و با دیواره صاف و به صورت انتهایی تشکیل شدند. آنتریدیوم پاراژن بود. اُاسپور کروی، دارای دیواره صاف و بدون تزیینات بوده و حجم اُاگونیوم را پُر نمی‌کرد (شکل ۱، A-B). میزان متوسط رشد روزانه ۳۰ میلی‌متر در ۲۵ درجه سلسیوس بود. دماهای رشد این بیمارگر شامل کمینه ۱۰ درجه سلسیوس، بهینه ۳۵ درجه سلسیوس و بیشینه ۴۰ درجه سلسیوس است (Vander Plaasts-Niterink 1981).

Phytophthora drechsleri Tucker

پرگنه روی محیط‌های کشت ذرت-آگار و بذر شاهدانه-آگار با ریسه‌های تخت و بی‌شکل بود. اسپورانژیوم‌ها بدون پاپیل، غیر ریزان، انتهایی و به شکل گلابی عریض تا کشیده در پایه اکثراً گرد و دارای رشد داخلی بودند.



شکل ۱. A-B: *Pythium aphanidermatum*؛ A- اُاُگونیوم با آنتریدیوم پاراژن، B-اسپورانژیوم، C-D: *Phythophthora drechsleri*؛ C- اُاُگونیوم با آنتریدیوم آمفی‌ژن D- اسپورانژیوم (خط‌های مقیاس=۱۰ میکرومتر).

Figure 1. A-B: *Pythium aphanidermatum*; A- Oogonium with paragynous antheridium B-Sporangium , C-D: *Phythophthora. drechsleri*; C- Oogonium with amphigynous antheridium, D- Sporangium (Bars=10µm).

متوسط ابعاد آنها ۲۱/۲۳×۳۴/۳ میکرومتر بود. اسپورانژیوم‌برها ظریف بوده و در زیر اسپورانژیوم کمی عریض‌تر بودند. اُاُگونیوم به شکل کروی و با دیواره صاف بوده و به صورت انتهایی تشکیل شدند. آنتریدیوم آمفی‌ژن کروی تا سیلندری بود. اُاُسپور کروی، دارای دیواره صاف و بدون تزیینات بود و تقریباً تمام فضای اُاُگونیوم را پُر نموده بود (شکل ۱،C-D). دماهای رشد این بیمارگر شامل کمینه ۵ درجه سلسیوس، بهینه ۲۵ درجه سلسیوس و بیشینه ۴۰ درجه سلسیوس است (Erwin and Ribeiro 1996).

اثبات بیماری‌زایی

اولین نشانه‌های بیماری یک هفته بعد از مایه‌زنی مشاهده گردید. گیاهچه‌های سیاهدانه در اثر مایه‌زنی با گونه‌های *P. aphanidermatum* و *P. drechsleri* علائم پوسیدگی طوقه و ریشه را نشان دادند (شکل ۲).

شکل ۲. A- پوسیدگی ریشه و طوقه گیاهچه‌های سیاهدانه در اثر *Phytophthora drechsleri*، B- پوسیدگی طوقه و ریشه در اثر *Pythium aphanidermatum* در شرایط گلخانه.

Figure 2. A) *Nigella sativa* seedlings*:* Declining is caused by *Phytophthora drechsleri*, B) Root and crown rot is caused by *Pythium aphanidermatum* in greenhouse**.**

بحث Discussion

در این پژوهش دو شبه‌قارچ *P. drechsleri* و *P. aphanidermatum* به عنوان عوامل پوسیدگی طوقه و ریشه سیاهدانه شناسایی شدند که براساس منابع در دسترس این اولین گزارش از بیمارگری این دو شبه قارچ در گیاه سیاهدانه می‌باشد. سایر عامل‌های پوسیدگی ریشه، طوقه و بذرها سیاهدانه، گونه‌های sp *Verticiilium*، *F. moniliforme* ، *Rhizoctonia solani*، *Macrophomina phaseolina*، *Nigrospora* spp.، *Alternaria* spp.، *F. oxysporum* f.sp. *nigella* و *F. oxysporum* f.sp. *cumini* معرفی شده‌اند (Dubey 1995). بنابراین ممکن است استفاده از محیط‌های کشت متنوع و روش‌های مورد استفاده در امر جداسازی اهمیت زیادی داشته باشند.

یافته‌های این پژوهش نشان دادند که دو شبه‌قارچ *P. drechsleri* و *P. aphanidermatium* بیمارگرهای مخربی در رقم بافت سیاهدانه هستند. پژوهش هی‌لال و همکاران (Hilal *et al*. 1994) در زمینه بررسی واکنش رقم‌های بومی سیاهدانه در مصر نشان داده که بیشترین شدت بیماری‌زایی مربوط به دو بیمارگر *F. oxysporum* و *M. phaseolina* وکمترین شدت بیماری‌زایی مربوط به *R. solani* در شرایط گلخانه می‌باشد. همچنین پژوهش الواکیل و قونیم (Elwakil and Ghoneem 1999) مشخص نموده که سه قارچ *F. oxysporum*، *F. solani*، *Verticillium* sp. باعث ایجاد پوسیدگی ریشه و طوقه سیاهدانه می‌شوند.

حرارت گلخانه در این پژوهش سعی شد، در زمان مایه‌زنی گیاهچه‌های سه هفته سیاهدانه بین ۲۲ تا ۲۸ درجه سلسیوس باشد، زیرا در دماهای پایین میزان فعالیت شبه‌قارچ‌ها بسیار کم می‌باشد و این نتیجه با نتیجه پژوهش هرو (۲۰۰۸) مطابقت دارد. وی تاثیر دما را در ایجاد و شدت بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه ناشی از *Phytophthora capsici* مورد برسی قرار داد و به این نتیجه رسید که ظهور نشانه‌ها بعد از مایه‌زنی در دمای ۲۴ درجه سلسیوس بعد از ۱۸ روز و در دمای ۱۹ تا ۲۹ درجه سلسیوس بعد از یک هفته است (Herrero 2008).

یافته‌ها نشان داد که هر دو شبه‌قارچ *P. aphanidermatum* و *P. drechsleri* از بافت‌های طوقه و ریشه گیاه سیاهدانه جداسازی شدند. پژوهشی نشان داده که در ابتدای شروع بیماری، طوقه حساس‌ترین قسمت گیاه است، اما اگر روش آبیاری به‌نحوی باشد که آب در تماس مستقیم با طوقه نباشد، پوسیدگی ریشه اصلی و محل انشعاب ریشه‌های فرعی موجب سبز خشکی بوته‌ها خواهد شد.

آب نقش بسیار مهمی در پراکندگی گونه‌های *Pythium* و *Phytophthora* دارد، زیرا جمعیت اسپورانژیوم در قسمت سطح آب بیشتر بوده و شرایط مناسب‌تری برای پژمردگی و پوسیدگی طوقه فراهم می‌نماید. در واقع آب رودخانه‌ها و کانال‌ها حاوی زادمایه این بیمارگرها، نقش مهمی را در آلودگی مزارع و باغ‌ها دارد. تحقیقات مشخص نمود که زئوسپورهای آزاد شده از گونه‌های محتلف *Phytophthora* و *Pythium* عامل اصلی انتشار آلودگی مخصوصاً در شرایط مرطوب می‌باشند. زئوسپورها توسط آب آبیاری، آب سطحی و یا از طریق منافذ پر از آب در خاک‌های مرطوب منتقل می‌گردند (Weste 1983). تاکنون روش‌های مختلفی جهت حذف بیمارگرها از آب آبیاری پیشنهاد شده است ولی اکثر آنها برای سیستم‌های آب‌کشتی (هیدروپونیک) است. کلوتز و همکاران (۱۹۵۹) ضدعفونی آب آبیاری را جهت استفاده در مزرعه‌ها و باغ‌ها، کاری مشکل، پرهزینه و غیر قابل اجرا می‌دانند. لذا انجام صحیح روش‌های زراعی مانند ایجاد زهکشی مناسب، جلوگیری از آبیاری فراوان و اجتناب از کوددهی زیاد را توصیه می‌کنند. آنها همچنین مشاهده کردند که در مخزن آب ساکنی که برای از بین بردن جلبک‌ها و خزه‌ها از سولفات‌مس استفاده شد، گونه‌های *Phytophthora* وجود ندارند ولی استفاده از آن (سولفات‌مس) در کانال‌ها (آب جاری)، هیچ ارتباطی بین حضور وعدم حضور گونه‌های *Phytophthora* و زمان مصرف و نوع ماده شیمیایی (سولفات‌مس) نشان نداد (Klotz *et al.* 1959). پرایس و دیکین‌سون (۱۹۸۰) قارچ‌کش‌های مختلفی را جهت مبارزه با *P. cryptogea* Pethybr. and Laff، *P. nicotianae* (Dastur) Waterhouse و برخی گونه‌های *Pythium* در سیستم‌های آب‌کشتی خیار و گوجه‌فرنگی مقایسه نمودند و مشاهده کردند اتریدیازول، فورالاکسیل و متالاکسیل در غلظت‌های پائین از تشکیل زئوسپور این بیمارگرها جلوگیری می‌کنند و ترکیبی از اتریدیازول و اکسینات‌مس بهترین اثر را داشت. البته متالاکسیل نیز موثر بود (Price and Dickinson 1980).

نتیجه‌گیری Conclusion

بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه سیاهدانه، یکی از بیماری‌های است که باعث ایجاد خسارت روی گیاه سیاهدانه می‌شود. در این پژوهش، هفده جدایه شبه‌قارچی از بافت‌های پوسیده طوقه و ریشه سیاهدانه جداسازی گردیدند، که ۱۱ جدایه به گونه *Pythium aphanidermatum* و شش جدایه به گونه *Phytophthora drechsleri* تعلق داشتند. یافته‌های آزمون بیماری‌زایی جدایه‌های دو شبه‌قارچ *Pythium aphanidermatum* و *Phytophthora drechsleri* روی گیاهچه‌های سه‌هفته‌ای رقم بافت سیاهدانه تحت شرایط گلخانه نشان داد که این رقم نسبت به هر دو شبه‌قارچ حساس می‌باشد. جهت مدیریت بیماری، روش‌های زراعی مانند انجام خاک‌ورزی و برقراری زهکشی مناسب خاک، کوددهی بهینه، شیوه صحیح آبیاری و استفاده از قارچ‌کش‌های پیشگیری‌کننده و درمان کننده مانند متالاکسیل (ریدومیل) در هنگام کاشت جهت به حداقل رساندن توان استقرار بیماری در گیاهچه‌های حساس پیشنهاد می‌شود.

منابع References

1. Banihashemi Z (2004) A method to monitor the activity of *Phytophthora* spp. in the root zone of *Pistaciae* spp. Phytopathologia Mediterranea 43:411-414.
2. Dubey SC (1995) New forma specialis of *Fusarium oxysporum* causing wilt of black cumin in India. Plant Disease Research 10:98-99.
3. Elwakil MA and Ghoneem KM (1999) Detection and Location of Seed-borne Fungi of Black Cumin and Their Transmission in Seedlings. Pakistan Journal of Biological Sciences 2:559-564.
4. Erwin DC and Ribeiro OK (1996) Phyophthora: Diseases World Wide. APS Press. Saint Paul Minneapolis. 562p.

5. Herrero ML (2008) First report of crown and root rot caused by *Phytophthora capsici* on hydrponically grown cucumbers in Norway. Plant Disease 92:1138.
6. Hilal AA, Alia AH, Soad AES , Shafie MSA (1994) Preliminary studies on root-rot of black-cumin (*Nigella sativa* L.) in Egypt. Egyptian Journal of Applied Sciences 9:149-157.
7. Kannwischer ME and Mitchell DJ (1981) Relationships of numbers of spores of *Phytophthora parasitica* var *nicotianae* to infection and mortality of tobacco. Phytophthology 71:69-73.
8. Klotz LJ, Wong PP and Dewolfe TA (1959) Survey of irrigation water for the pres ence of *Phytophthora* spp. pathogenic to citrus. Plant Disease Report 43:830-832.
9. McIntosh DL (1964) *Phytophthora* spp. in soil of the Okanagan and Similkameen valleys of British Columbia. Canadian Journal of Botany 42:1411-1415.
10. Omidbaigi R (1995) Approaches to Production and Processing of Medicinal Plants. Tarrahane Nashr Pub., Tehran, Iran. 283p.
11. Price D and Dickinson A (1980) Fungicides and the nutrient film technique. Acta Horticulturae 98:277-282.
12. Ribeiro OA (1978) A Source Book of the Genus Phytophthora. Vaduz: J. Cramer, 417p.
13. Vander Plaasts-Niterink AJ (1981) Monograph of the genus Pythium. Studies in Mycology 21:1-244.
14. Weste G (1983) Population Dynamics and Survival of *Phytophthora*. Pp. 237-259. In: *Phytophthora*: Its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology. Erwin DC, Bartnicki-Garcia S and Tsao PH (eds.). APS Press. 329 p.
15. Zargari A (1989) Medicinal Plants. Tehran University Publication, Tehran, Iran, Pp:318-320.

دانش بیماری‌شناسی گیاهی (شاپای ا: ۶۲۹۰-۲۵۸۸، شاپای چ: ۹۲۷۰-۲۲۵۱)
سال هشتم، جلد ۲، بهار و تابستان ۱۳۹۸
Plant Pathology Science (eISSN:2588-6290, pISSN:2251-9270)
Vol. 8(2), 2019

Research Article

Distribution and Population Density of Cereal Cyst Nematode in Ardabil Province

LALEH EBRAHIMI[1]✉, ZAHRA TANHA MAAFI[2], HOSSEIN KARBALAEI KHIAVI [3], GHORBAN DIDEHBAZ MOGHANLO [3], YAHYA AZARMI[4] , RAUF ZAMANI[4]

1- BioControl Research Department, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.
2- Nematology Research Department, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.
3- Plant Protection Research Department, Ardebil Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Moghan, Iran.
4- Ardebil Agricultural Jihad Organization, Ardebil, Iran.

Received: 18.06.2019 Accepted: 11.08.2019

Ebrahimi L, TanhaMaafi Z, KarbalaeiKhiavi H, DidehbazMoghanlo G, Azarmi Y and Zamani R (2019) Distribution and population density of cereal cyst nematode in Ardabil province. Plant Pathology Science 8(2):9-15. DOI:10.2982/PPS.8.2.9

Abstract

Introduction: Cereal cyst nematodes (CCN), *Heterodera* species, are important parasitic nematodes of cereal. Potato cyst nematodes (PCN), *Globodera* species, are also serious pests of potato world-wide. Continuous monitoring of these nematodes is necessary to prevent their damage to their host plants. This study was conducted to determine the distribution and density of these nematodes in Ardabil province, northwest of Iran, where potatoes are planted in rotation with cereals. **Materials and Methods:** One hundred and two soil samples were collected from potato fields in the suburbs of Ardebil, Nair and Namin cities in the first year, and 116 soil samples were collected from the wheat fields that were cultivated in the rotation with potato in the second year. The samples were transferred to the laboratory and examined for cyst nematodes. After isolating the cysts, identification of the species was performed based on morphological and morphometrical characteristics of the cysts and the second stage larvae. **Results:** Examination of the collected samples in both of two years indicated the presence of CCN in some soil samples, but PCN were not observed in none of the soil samples. The morphological and morphometrical data of isolated cereal cysts and comparison with valid identification keys led to the identification of *Heterodera filipjevi*. Mean numbers of the cysts with eggs and larvae in those samples that were collected in the first and second year were respectively 0.76 and 0.11 in 100 g of the soil. Wheat fields of Ardebil had the highest and fields of Nair had the least number of cyst nematode. **Conclusions:** The results of this study showed that some of the wheat fields in the province were infected with *H. filipjevi* and potato fields were not infected with any cyst nematode.

Key words: *Globodera*, *Heterodera* , Potato, Wheat

✉ Corresponding author: Ebrahimi.laleh@gmail.com

مقاله پژوهشی

پراکنش و تراکم جمعیت نماتد سیستی غلات در استان اردبیل

لاله ابراهیمی [۱]✉، زهرا تنهامعافی[۱]، حسین کربلائی‌خیاوی[۲]، قربان دیده‌باز مغانلو[۲]، یحیی آذرمی[۳] و رئوف زمانی [۳]

۱- موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران.

۲- بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان اردبیل، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مغان. ۳- سازمان جهاد کشاورزی استان اردبیل، اردبیل.

دریافت: ۱۳۹۸/۰۳/۲۸ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۵/۲۰

ابراهیمی ل، تنهامعافی ز، کربلائی‌خیاوی ح، دیده‌بازمغانلو ق، آذرمی ی و زمانی ر (۱۳۹۸) پراکنش و تراکم جمعیت نماتد سیستی غلات در استان اردبیل. دانش بیماری‌شناسی گیاهی ۸(۲): ۱۵-۹. DOI: 10.2982/PPS.8.2.9

چکیده

مقدمه: نماتدهای سیستی، گونه‌های *Heterodera* از نماتدهای مهم انگل غلات هستند. نماتدهای سیستی، گونه‌های *Globodera* ، نیز از خطرناکترین آفت‌های سیب‌زمینی در جهان هستند. پایش مداوم این نماتدها برای پیشگیری از بروز خسارت آنها ضروری است. این پژوهش برای تعیین پراکنش و تراکم این نماتدها در استان اردبیل در شمال‌غربی ایران، که در آن سیب‌زمینی در تناوب با غلات کشت می‌شود، انجام شد. **مواد و روش‌ها:** یک‌صدودو نمونه خاک مزرعه‌های سیب‌زمینی حومه شهرهای اردبیل، نیر و نمین در سال اول و ۱۱۶ نمونه خاک مزرعه‌هایی که در تناوب با سیب‌زمینی زیرکشت گندم بودند، در سال دوم جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل و از نظر وجود نماتدهای سیستی پژوهش شدند. پس از جداسازی سیست‌ها، شناسایی گونه براساس مشخصات مرفولوژی و مرفومتری سیست و لاروها انجام گردید. **یافته‌ها:** پژوهش نمونه‌های جمع‌آوری شده در هر دو سال نشان دهنده وجود نماتد سیستی غلات در بعضی نمونه‌ها بود، ولی نماتدهای سیستی سیب‌زمینی در هیچ یک از نمونه‌ها مشاهد نگردیدند. جمع‌بندی داده‌های ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی سیست‌های غلات جداسازی شده و مقایسه آن‌ها با کلیدهای معتبرشناسایی، منجر به تشخیص گونه*Heterodera filipjevi* گردید. میانگین سیست‌های دارای تخم و لارو در خاک‌های نمونه‌برداری شده در سال اول ۰/۷۶ و در سال دوم ۰/۱۱ در ۱۰۰ گرم خاک بود. مزرعه‌های گندم حومه اردبیل بیشترین و مزرعه‌های حومه نیر کمترین درصد آلودگی به نماتد سیستی غلات داشتند. **نتیجه‌گیری:** یافته‌های این پژوهش نشان دهنده آلودگی بعضی مزرعه‌های گندم استان به نماتد *H. filipjevi* و عدم آلودگی مزرعه‌های سیب‌زمینی به نماتدهای سیستی بود.

واژگان کلیدی: *Globodera*، *Heterodera*، سیب‌زمینی، گندم

مقدمه Introduction

نماتدهای سیستی غلات، گونه‌های *Heterodera* ، در شرایط کم باران و در خاک‌های فقیر از نظر مواد مغذی، می‌توانند خسارت شدیدی ایجاد نمایند، به‌طوری که در آلودگی‌های شدید قادر به کاهش تا ۹۰ درصد محصول هستند(Riley *et al.* 2009, Nicol and Rivoal 2008). گونه *Heterodera filipjevi* Madzhidov 1981

✉ مسئول مکاتبه : Ebrahimi.laleh@gmail.com

در ایران شایع‌ترین گونه است البته گونه‌های دیگری مانند Heterodera *avenae* Wollenweber, 1924 و *Heterodera latipons* Franklin, 1969 نیز با پراکنش کمتر وجود دارند. در استان خوزستان نیز نماتد سیستی غلات پراکنش بالایی دارد و ۳۷ درصد نمونه‌های مورد پژوهش از مزرعه ها گندم و ۳۵ درصد نمونه های مورد پژوهش از مزرعه ها جو آلوده به نماتدهای سیستی غلات بودند (Ahmadi and TanhaMaafi 2014). براساس تحقیق ایشان، گونه‌های شناسایی شده از این استان شامل *H. avenae*Type B و *H. filipjevi* بودند. براساس پژوهش‌های Hajihasani *et al.* (2010 a, b) گونه‌های *H. filipjevi* و *H. latipons* در تراکم‌های بالا (۲۰ تخم و لارو سن دوم نماتد به ازای گرم خاک) به‌ترتیب منجر به کاهش ٤٨ و ٥٥ درصدی محصول گندم زمستانه می‌گردند.

نماتد سیستی سیب‌زمینی یکی از نماتدهای خطرناک سیب‌زمینی در جهان است و قادر است باعث از بین رفتن کل محصول سیب‌زمینی شود (Brodie 1984). در سال ۱۳۸۷ وجود نماتد سیب‌زمینی برای اولین بار از استان همدان به صورت رسمی گزارش گردید (Gitty and Maafi 2010). بدیهی است که پس از ورود این نماتد به یک کشور رعایت قرنطینه داخلی ضروری است تا از پراکنده شدن بیشتر آن ممانعت به عمل آید. براساس گزارش Gitty *et al.* (2011) متوسط میزان آلودگی در بعضی مزرعه‌های سیب‌زمینی استان همدان در شهرستان بهار ۲۱۳ تخم و لارو در هر گرم خاک و در شهرستان همدان ۱۰۰ لارو و تخم در گرم خاک بود. پژوهش انجام شده در شیلی به صورت میکروپلات نشان داده، که نماتد سیستی سیب‌زمینی با جمعیت اولیه ۱۲، ۳۲ و ۱۲۸ تخم در گرم خاک در زمان کاشت، به ترتیب ۲۰،۵۰ و ۷۰ درصد کاهش عملکرد را باعث می‌گردد (Moreno *et al.* 1984). استان اردبیل یکی از استان‌های تولیدکننده سیب‌زمینی در کشور می‌باشد. در کنار رعایت قوانین قرنطینه داخلی، پایش مداوم خاک‌های مزرعه‌های سیب‌زمینی استان برای ردیابی و تشخیص این نماتد در جمعیت های بسیار پایین، اجازه اتخاذ روش‌های مدیریتی صحیح به منظور ممانعت از پراکندگی بیشتر آن را در صورت ورود این آفت به استان، فراهم خواهد آورد. پیش از این نیز ردیابی این نماتد در مزرعه ها سیب‌زمینی استان اردبیل انجام شده و عدم آلودگی به این نماتد در نمونه‌های مورد پژوهش گزارش شده است (Soheili and TanhaMaafi 2012). در کشور جمهوری آذربایجان که دارای مرز مشترک با استان اردبیل می‌باشد، نماتد سیستی سیب‌زمینی نیز گزارش نشده است (Dababat *et al.* 2019).

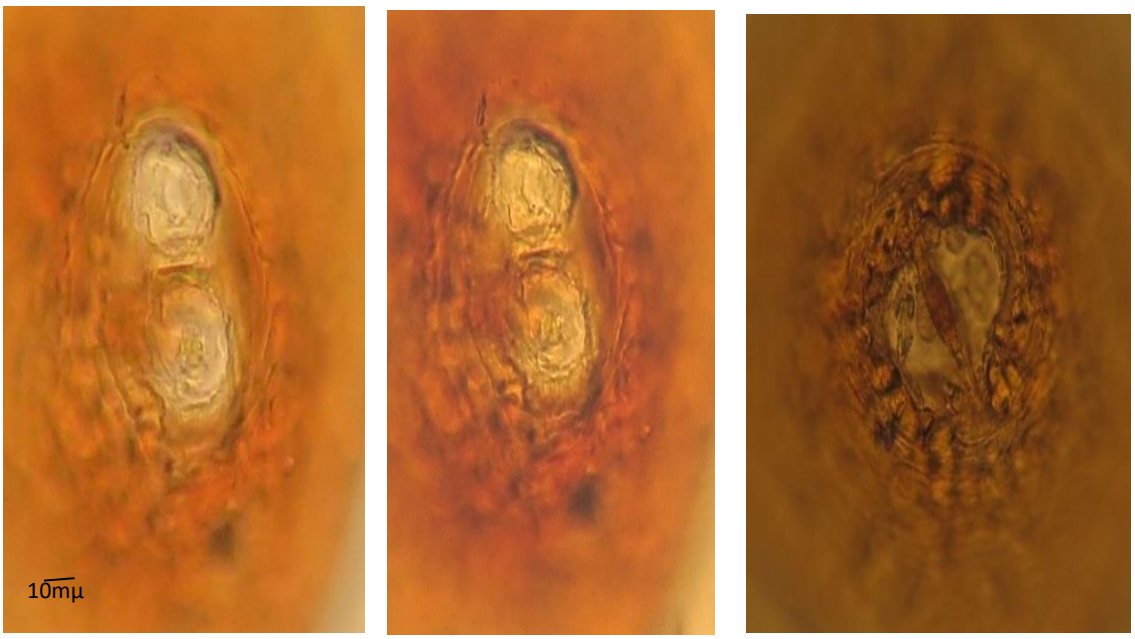
مواد و روش‌ها Materials and Methods

در مناطق مختلف استان اردبیل از مزرعه‌های غلات و سیب‌زمینی بازدید به‌عمل آمده و از تعدادی از مزرعه‌ها در هر منطقه نمونه‌برداری انجام شد. برای این منظور تعداد ۱۰۲ نمونه خاک در تیرماه ۱۳۹۵ و از مزرعه‌ها غلات تعداد ۱۱٦ نمونه خاک در خرداد ۱۳۹٦ از عمق صفر تا ۳۰ سانتی‌متری ریشه از مناطق مختلف تهیه گردید. از مقدار ۳۰۰ گرم از هر نمونه خاک با استفاده از الک‌های ٦۰ و ۳۵ مش سیست نماتد استخراج شد. به این ترتیب که ۱۰۰ گرم از هر نمونه خاک در مقداری آب ریخته شد و هم زده شد. پس از ۳۰ ثانیه آب روبی از الک ۳۵ مش و سپس ٦۰ مش عبور داده شد. این کار سه بار تکرار شد. محتویات الک ٦۰ مش از نظر وجود سیست‌ها پژوهش و سیست‌ها در صورت وجود جداسازی شدند. برای هر نمونه این کار سه بار تکرار شد و در نهایت ۳۰۰ گرم از هر نمونه خاک مورد پژوهش قرار گرفت. سیست‌های جدا شده، تعداد سیستی در هر نمونه و سپس تخم و لارو درون آن‌ها شمارش شد. بسیاری از نمونه‌ها دارای سیستی‌های خشک و چروکیده و توخالی بودند که در صورت وجود، تعداد آنها نیز در هر نمونه خاک شمارش گردید. از هر نمونه دارای سیست، تعداد پنج عدد از نظر مرفولوژی و مرفومتری بررسی شدند. برای این منظور مخروط سیست‌ها برش داده شدند و مشخصات مخروط انتهای بدن آنها شامل ولوا، شکل پنجره‌بندی، طول و عرض پنجره، وجود یا عدم وجود باندهای کوتیکولی و بوله بررسی و تعیین

گردید. لاروهای مربوط به هر سیست نیز با استفاده از مواد تثبیت کننده، کشته و به گلیسرین خالص منتقل شدند. پس از تهیه اسلایدهای میکروسکپی از آنها، مشخصات مرفومتری از قبیل طول بدن، طول استایلت، طول دم و نسبت‌های مربوطه اندازه‌گیری و تعیین گردید. براساس داده‌های بدست آمده و با استفاده از منابع معتبر تعیین گونه انجام شد. درصد نمونه‌های آلوده به تفکیک شهرستان و سهم آلودگی هر شهرستان از نمونه‌های کل استان محاسبه گردید.

یافته‌ها Results

مطالعه نمونه‌های جمع‌آوری شده در سال اول از مزرعه‌های سیب‌زمینی و در سال دوم از مزرعه‌های غلات در تناوب با سیب‌زمینی در استان اردبیل (شامل شهرستان‌های اردبیل، نیر و نمین) نشان‌دهنده وجود نماتد سیستی غلات در اغلب نمونه‌های خاک بود که با بدن لیمویی‌شکل در افراد ماده (سیست‌ها) در جنس *Heterodera* sp. مشخص می‌شود. نماتد سیستی طلایی سیب‌زمینی که دارای ظاهری کروی شکل و متعلق به جنس *Globodera* Skarbilovich, 1959 است، در هیچ یک از نمونه‌های مربوط به دو سال مطالعه مشاهد نگردید. برش انتهای سیست‌ها تهیه شد (شکل ۱) و مشخصات برش انتهای سیست‌ها اندازه‌گیری و در جدول ۱ خلاصه گردید. این ویژگی‌ها شامل طول پنجره، عرض پنجره، طول شکاف ولوا و وجود یا عدم وجود بوله بود. همچنین، تعداد تخم و لارو در داخل سیست‌ها شمارش گردید. مشخصات ریخت‌سنجی لاروهای سن دوم تفریخ شده در جدول ۲ و میانگین تعداد تخم به ازای هر سیست در جدول ۳ خلاصه شده است. همچنین میانگین تعداد سیست به ازای ۱۰۰ گرم خاک در سال اول و دوم در جدول ۴ ارائه شده است. جمع‌بندی داده‌های ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی و مقایسه آنها با کلیدهای معتبر شناسایی، منجر به تشخیص گونه *Heterodera filipjevi* گردید (Subbotin *et al.* 1999, Handoo 2002).



شکل ۱. انتهای بدن نماتد سیستی غلات *Heterodera filipjevi* (اصلی)

Figure 1. Terminal region of Cereal Cyst Nematode *Heterodera filipjevi*

جدول ۱. مشخصات ریخت سنجی برش انتهای بدن افراد ماده نماتد سیستی غلات
Table 1. Morphometrics of con-top of female Cereal Cyst Nematodes

Bullae	Vulval silt length (µm)±SE	Fenestral width (µm)±SE	Fenestral length (µm)±SE*	N
Present	8.88±1.73	23.53±3.66	45.47±4.33	16

*Standard Error

جدول ۲. مشخصات ریخت‌شناسی لاروهای سن دوم *Heterodera filipjevi* (بر حسب میکرومتر)
Table 2. Morphometrics of second stage juveniles of *Heterodera filipjevi* (µm)

Characters	Mean	SE
Body length	508	7.55
Body width	20.33	0.58
Stylet length	23.67	2.52
Hyaline	41	6.24
Tail length	55.67	6.11

جدول ۳. میانگین تعداد لارو و تخم به ازای هر سیست
Table 3. Mean of number of Larvae and eggs per cyst

Character	First Year (mean±SE)	Second Year (mean±SE)
Number of Larvae	14.96±10.14	4±5.9
Number of Eggs	188.85±99.54	133.1±62.26
Number of Larvae and Eggs	199±96.26	137±63.14
Examined Cyst Number	14	13

جدول ۴. میانگین تعداد سیست، تعداد سیست توخالی و سیست دارای تخم و لارو در ۱۰۰ گرم خاک
Table 4. Mean of number of cyst, empty cyst and cysts with eggs inside per 100g of soil

First Year			Second Year		
Number of Cysts with eggs and larvae*	Number of empty Cysts	Number of Cysts	Number of Cysts with eggs and larvae	Number of empty Cysts	Number of Cysts
0.76	1.73	2.49	0.11	0.74	0.85

*Number of cysts 100 g^{-1} soil

نماتد سیستی غلات در اکثر مناطق مورد مطالعه مشاهده گردید که پراکنش این نماتد در شکل ۲ آورده شده است.

بحث Discussion

یافته‌های این پژوهش نشان داد که خوشبختانه مزرعه‌های مورد مطالعه هیچ گونه آلودگی به نماتد سیستی سیب‌زمینی ندارند. از طرف دیگر، علیرغم آلودگی خاک مزرعه ها استان به نماتد سیستی غلات، جمعیت این نماتد در خاک‌های مزرعه ها مورد مطالعه بسیار پایین می‌باشد. آستانه خسارت اقتصادی متفاوتی در نقاط مختلف جهان

شکل ۲. پراکنش نماند سیستی غلات در استان اردبیل طی دو سال پژوهش (▲:مشاهده شده در سال اول، ▲:مشاهده شده در سال دوم، ▲:عدم مشاهده).

Figure 2. Distribution of Cereal Cyst Nematode in Ardabil province during two years survey (▲: observed in the first year, ▲: observed in the second year, ▲: not seen).

در مقابل نماتد سیستی غلات گزارش شده است. در ایران پژوهش‌های کمی روی میزان خسارت نماتد سیستی غلات انجام پذیرفته است.

با این حال، پژوهشی در ایران روی تاثیر تراکم جمعیت اولیه گونه *H. filipjevi* در شرایط میکروپلات روی گیاه گندم نشان داده است که این نماتد در بیشترین تراکم (۲۰ تخم و لارو سن دوم در هر گرم خاک) منجر به خسارت ۴۸ درصدی روی عملکرد گندم می‌شود (Hajihasani *et al.* 2010b).

یکی از روش‌های زراعی کاهش جمعیت نماتد سیستی غلات استفاده از تناوب زراعی می‌باشد. البته تناوب بدون پوشش گیاهی و آیش منجر به کاهش جمعیت این نماتدها می‌گردد. با توجه به این که پژوهش حاضر در استان اردبیل در مزرعه‌های سیب‌زمینی که در تناوب با غلات کشت می‌شوند انجام پذیرفت، بنابراین کم‌بودن جمعیت نماتد سیستی غلات قابل پیش‌بینی بود. با این حال، پژوهش مزرعه‌ها گندم دیم در استان اطلاعات دقیق‌تری را پیرامون میزان آلودگی خاک‌های استان به نماتدهای سیستی غلات و تخمین میزان خسارت احتمالی آن فراهم خواهد آورد.

نتیجه‌گیری Conclusion

مطالعه نمونه‌های جمع‌آوری شده در هر دو سال نشان‌دهنده وجود نماتد سیستی غلات در برخی نمونه‌های بود و نماتد سیستی سیب‌زمینی متعلق به جنس *Globodera*، در هیچ یک از نمونه‌های جمع‌آوری شده در دو سال مشاهده نگردید. جمع‌بندی داده‌های ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی سیستی‌های غلات جداسازی شده و مقایسه آنها با کلیدهای معتبر شناسایی، منجر به تشخیص گونه *H. filipjevi* گردید. میانگین سیست‌های دارای تخم و لارو در خاک‌های نمونه‌برداری شده در سال اول ۰/۷۶ در ۱۰۰ گرم خاک و در سال دوم ۰/۱۱ در ۱۰۰ گرم خاک بود. از نظر پراکندگی، شهرستان اردبیل بیشترین درصد آلودگی و شهرستان نیر کمترین درصد آلودگی به نماتد سیستی غلات را نشان داد. با این حال پایش مداوم مزرعه‌های سیب‌زمینی و نیز سیب‌زمینی‌های بذری استان اردبیل به‌عنوان یکی از قطب‌های تولید سیب‌زمینی کشور از نظر آلودگی به نماتد سیستی سیب‌زمینی بسیار مهم می‌باشد و پیشنهاد می‌گردد.

همچنین پژوهش مزرعه ها گندم دیم اردبیل از نظر تعیین میزان آلودگی به نماتد سیستی غلات و تخمین خسارت احتمالی آن ارزشمند خواهد بود.

References **منابع**

1. Ahmadi AR and TanhaMaafi ZT (2014) Incidence of cereal cyst nematodes (*Heterodera avenae* type B and *H. filipjevi*) in southwestern Iran. Journal of Crop Protection 3:75-88.
2. Brodie BB (1984) Nematode parasites of potato. In: Nickle WR (ed.): Plant and Insect Nematodes. Marcell Dekker, Inc, New York and Basel. Pp. 169–181.
3. Dababat AA, Muminjanov H, Erginbas-Orakci G, Fakhraddin GA, Waeyenberge L, Yildiz Ş, Duman N and Imren M (2019) Distribution and diversity of cyst nematode (Nematoda: Heteroderidae) populations in the republic of Azerbaijan, and their molecular characterization using ITs-rDNA analysis. Nematropica 49:18-30.
4. Gitty M and TanhaMaafi Z (2010) First report of a potato cyst nematode, *Globodera rostochiensis*, on potato in Iran. Plant Pathology 59:412-412.
5. Gitty M, Tanha maafi Z, Arjmandian A and Pishevar S (2011) Occurrence of potato golden cyst nematode in Iran and its distribution in Hamadan Province. Agricultural Biotechnology 10:53–61. (In Persian).
6. Hajihasani A, TanhaMaafi Z, Nicol JM and Rezaee S (2010b) Effect of the cereal cyst nematode, *Heterodera filipjevi* on wheat in microplot trials. Nematology 12:357-363.
7. Hajihasani A, TanhaMaafi Z, Nicol JM and Seraji A (2010a) Relationships between population densities of the cereal cyst nematode, *Heteroderalatipons* and yield losses of winter wheat in microplots. Australasian Plant Pathology 39:330–355.
8. Handoo ZA (2002) A key and compendium to species of the *Heterodera avenae* group (Nematoda: Heteroderidae). Journal of Nematology 34:250-262.
9. Moreno I, Vovlas N and Lamberti F (1984) Species of potato cyst nematodes from Chile. Nematologia Mediterranea 12:247-252.
10. Nicol JM and Rivoal R (2008) Global Knowledge and Its Application for The Integrated Control and Management of Nematodes on Wheat. Pp.243–287. In: Ciancio A and Mukerji KG (eds.), Integrated Management and Biocontrol of Vegetable and Grain Crops Nematodes, Springer, Dordrecht.
11. Riley IT, Nicol JM and Dababat AA (2009) Cereal Cyst Nematodes: Status, Research and Outlook. CIMMYT, Ankara, Turkey.
12. Soheili B and Tanha maafi Z (2012) Detection of potato cyst nematode in potato fields of Ardabil. Proceedings of the 20th Iranian Plant Protection Congress, Shiraz University. P.358. (In Persian with English Abstract).
13. Subbotin SA, Waeyenberge L, Molokanova IA and Moens M (1999) Identification of *Heterodera avenae* group species by morphometric and rDNA-RFLPs. Nematology 1:195–207.

دانش بیماری‌شناسی گیاهی (شاپای ا: ۶۲۹۰-۲۵۸۸، شاپای چ: ۹۲۷۰-۲۲۵۱)
سال هشتم، جلد ۲، بهار و تابستان ۱۳۹۸
Plant Pathology Science (eISSN:2588-6290, pISSN:2251-9270)
Vol. 8(2), 2019

Review Article

A Review of the Pistachio Gummosis Disease

SEYED REZA FANI [1]✉, MOHAMMAD MORADI[2] , MANSOUREH MIRABOLFATHY[3]

1- Plant Protection Research Department, Yazd Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Yazd, Iran . 2- Pistachio Research Center, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rafsanjan, Iran. 3- Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.

Received: 01.06.2019 Accepted: 30.08.2019

Fani S R, Moradi M and Mirabolfathy M (2019) A review of the pistachio gummosis disease. Plant Pathology Science 8(2):16-30. DOI:10.2982/PPS.8.2.16

Abstract

Iranian Pistachio is one of the most important horticultural product in export market. Crown and root rot caused by *Phytophthora* species is the most serious disease of plant, which annually destroys a considerable number of mature and young trees. This disease has been reported from all provinces of Iran. The pathogen is soil-borne and is distributed by sporangia or the released zoospores and infects the healthy trees. In the most Pistachio orchards, the key factors of disease development are the sensitivity of pistachio crown to *Phytophthora* and the flooding method of irrigation. The symptoms of the disease are include blight in early spring, drying of the green leaves during the growing season, gum exudation from the crown of tree and the root rot. Gummosis can be successfully controlled by integrated disease management including orchard constructing in non-infected areas, using resistant or tolerant cultivars, using healthy rootstocks, improving the irrigation methods and avoiding the direct contact of water with tree crown, isolating the contaminated parts of the orchard from the healthy parts, using suitable fungicide, and biological control based on *Trichoderma* and *Bacillus* species.

Key words: Gummosis, Pistachio, *Phytophthora*, Root and crown rot

✉ Corresponding author: rezafani52@gmail.com

مقاله مروری

مروری بر بیماری انگومک پسته

سید رضا فانی[1]✉، محمد مرادی [2] و منصوره میرابوالفتحی[3]

۱- بخش تحقیقات گیاه‌پزشکي، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزي و منابع طبیعي استان یزد، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزي، یزد، ایران. ۲- پژوهشکده پسته، مؤسسه تحقیقات علوم باغباني، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزي، رفسنجان، ایران. ۳- مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

دریافت: ۱۳۹۸/۰۳/۱۱ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۶/۰۸

فانی س ر، مرادی م و میرابوالفتحی م (۱۳۹۸) مروری بر بیماری انگومک پسته. دانش بیماری‌شناسی گیاهی ۸(۲):۳۰-۱۶. DOI: 10.2982/PPS.8.2.16

چکیده

پسته ارزشمندترین محصول باغی صادراتی ایران است. پوسیدگی طوقه و ریشه ناشی از گونه‌های *Phytophthora* مهم‌ترین بیماری پسته است که سالیانه منجر به نابودی تعداد قابل توجهی درختان بارور و نابارور می‌گردد. عامل بیماری از تمامی استان‌های پسته‌خیز گزارش شده است. عامل بیماری خاک‌زاد است و با اسپورانژیوم یا زئوسپورانژیومهای رها شده از آن به کمک آب پخش شده و درختان سالم را به بیماری مبتلا می کند. حساسیت طوقه درختان پسته به فیتوفتورا و آبیاری به شیوه غرقابی در اغلب باغات از عوامل کلیدی توسعه بیماری است. سوختگی سرشاخه در اوایل بهار، سبزخشکی برگ‌ها در طول فصل رشد، خروج صمغ از ناحیه طوقه و پوسیدگی ریشه از جمله نشانه‌های بیماری است. مدیریت تلفیقی بیماری با احداث باغ در زمین‌های غیرآلوده، استفاده از رقم‌های مقاوم یا متحمل، استفاده از نهال‌های سالم، اصلاح روش آبیاری و پرهیز از تماس مستقیم آب با طوقه، جداسازی کرت‌های آلوده از سالم، استفاده از قارچ‌کش مناسب و مهار زیستی بر پایه گونه‌های *Trichoderma* و *Bacillus* است.

واژگان کلیدی: انگومک، پوسیدگی طوقه و ریشه، پسته، *Phytophthora*

مقدمه

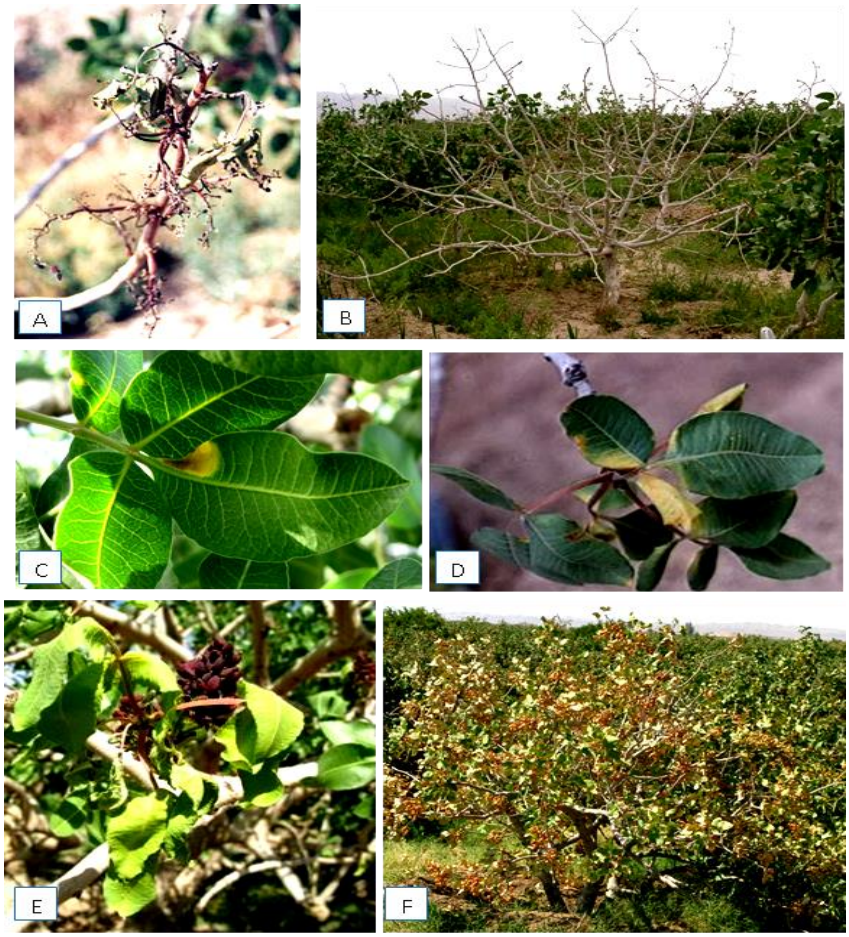
ایران یکی از مهمترین تولیدکنندگان پسته (*Pistacia vera* L.) در دنیا است که سابقه‌ای نزدیک به چهار هزار سال در کاشت پسته دارد، رویشگاه اصلی درختان پسته محسوب می‌شود و در دنیا معمولاً پسته را با نام ایران می‌شناسند. ایران سال‌ها بزرگ‌ترین تولیدکننده جهانی این محصول بود اما در حال حاضر بعضی از کشورهای دیگر نیز در زمینه تولید و تجارت پسته به فعالیت و رقابت با ایران پرداخته‌اند که عمده‌ترین آنها ایالات متحده آمریکا و ترکیه هستند. علی‌رغم سابقه طولانی کشت پسته در ایران، توسعه پسته‌کاری در نیم قرن گذشته بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. از دلایل اساسی این توسعه را می‌توان ارزش اقتصادی پسته، صادرات و نیز آشنایی با ویژگی‌های مطلوب این گیاه از قبیل مقاومت به شوری و خشکی نام برد. در حال حاضر بیش از ۴۰۰ هزار هکتار باغ پسته بارور در ایران موجود است. از مهم‌ترین بیماری‌های این محصول می‌توان به پوسیدگی طوقه و ریشه ناشی از گونه‌های شبه‌قارچ فیتوفتورا که از دیرباز به‌عنوان کلیدی‌ترین بیمارگر درخت پسته در ایران مطرح بوده و پژوهش‌های متعددی پیرامون آن در کشور صورت گرفته است، اشاره کرد. علاوه بر آن ضعف ناشی از نماتدهای ریشه گرهی، سرخشکیدگی درختان پسته را نیز می‌توان برشمرد (Abrishami 1994). علیرغم کشت نسبتاً وسیع پسته در سایر نقاط دنیا از جمله آمریکا و ترکیه، به دلیل استفاده از پایه‌های مقاوم، بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه در کشورهای اخیر اهمیت اقتصادی ندارند و از سایر کشورها نیز گزارش‌های پراکنده و معدودی وجود دارد. تاکنون در کشورهای پسته‌خیز جهان بیش از ۵۳ گونه قارچ و شبه‌قارچ

✉ مسئول مکاتبه: rezafani52@gmail.com

بیمارگر گزارش شده است که باعث ایجاد بیماری روی قسمت‌های مختلف درخت پسته شده و علائمی از قبیل لکه‌برگی، سوختگی، سرخشکیدگی، پوسیدگی میوه، پوسیدگی طوقه و ریشه، پژمردگی، شانکر، زنگ و سفیدک را ایجاد می‌کنند (Teviotdale *et al.* 2002). از بیماری‌های هوابرد پسته در کشور لکه‌برگی ناشی از قارچ *Alternaria alternata* است (Aminaee and Ershad 1989) و از بیماری‌های خاک‌برد به بیماری پژمردگی ورتیسیلیومی پسته ناشی از قارچ *Verticillium dahliae* می‌توان اشاره کرد (Aminaee and Ershad 1999). بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه که به نام‌های انگومک (Gummosis) و شیره سیاه نیز شناخته می‌شود برای اولین بار از باغ‌های پسته یونان گزارش شد و عامل آن شبه‌قارچ *Phytophthora parasitica* var. *parasitica* Dastur تشخیص داده شد (Kouyeas 1952). در پژوهش‌های بعدی گونه‌های *P. citricola* Sawada، *P. citrophthora* Leonian و *P. nicotianae* Breda de Haan از درختان پسته جداسازی و تشخیص داده شد (Kouyeas 1973). بیماری انگومک از باغ‌های پسته آمریکا نیز گزارش شده است اما به‌دلیل استفاده از پایه‌های مقاوم *Pistacia atlantica* Desf. و *P. integrima* J.L.Stewart ex Brandis اهمیت کمی دارد (MacDonald *et al.* 1992).

۱- نشانه‌های بیماری

نشانه‌های بیماری در باغ در فصول مختلف سال به شکل‌های گوناگونی دیده می‌شود. در اوایل فصل بهار سوختگی سرشاخه‌ها (شکل ۱A)، زوال سریع و مرگ درخت ممکن است (شکل ۱B) اتفاق افتد. با کامل شدن رشد رویشی گیاه، فعالیت بیمارگر به صورت کلروز (زردی) و نکروز (مرگ بافت) که از انتهای برگ شروع شده (شکل ۱C)، به تمام نقاط انتشار پیدا کرده و به تدریج تمام برگ را فرا گرفته و باعث ریزش آن می‌شود (شکل ۱E). پژمردگی ناگهانی و بدون نشان‌دادن هر گونه علایم قبلی بیماری، به صورت سبزخشکی درختان (شکل ۱F) و کاهش پوشش برگی نیز ممکن است مشاهده گردد. بعضاً رشد گیاه در نتیجه باردهی زیاد و غیرمعمول ناشی از بیماری نیز متوقف می‌شود. بررسی ناحیه طوقه و ریشه نشان می‌دهد در غالب موارد پوسیدگی طوقه و ریشه مشهود بوده و آلودگی‌ها از طوقه یا ریشه شروع می‌گردد، گرچه کامبیوم ناحیه آلوده درخت به رنگ تیره در می‌آید ولی آوند چوبی تغییر رنگ نمی‌دهد. درختان با آلودگی طوقه، بسته به بافت لایه‌های خاک، ممکن است نشانه‌های متفاوتی را نشان دهند، به‌طوری که در باغ‌های با بافت خاک همگن تا عمق ۱/۵ متری و یا زمانی که پایه پسته حساس باشد نشانه‌ها بیشتر به صورت سبزخشکی کل درخت به‌ویژه در تابستان است، اما چنانچه بافت خاک اطراف طوقه از نوع خیلی سنگین و در زیر آن یک لایه شنی قرار داشته باشد و یا اینکه درختان مقاومت بالایی به بیماری داشته باشد، نشانه بیماری بیشتر به صورت کاهش پوشش برگی، خشکیدگی سرشاخه، کم‌شدن میزان محصول، تغییر شکل برگ و مرگ تدریجی درخت، مشاهده می‌شود. در مواردی ممکن است این نشانه‌ها با پوسیدگی طوقه همپوشانی داشته باشد مخصوصاً زمانی که ریشه‌های اصلی آلوده باشند. حاشیه محل آلودگی طوقه و ریشه معمولاً با برداشتن پوست بافت آلوده مشخص می‌گردد. در محل طوقه و روی تنه در ارتفاع ۲۰ تا ۳۰ سانتی‌متری از سطح خاک قطرات صمغ به صورت ریز و درشت در سطح یا در شکاف‌های پوست درختان ظاهر می‌شود. چنانچه پوست قسمت آلوده برداشته شود، صمغ شیری رنگ به بیرون تراوش می‌کند که پس از گذشت مدت کوتاهی به رنگ خاکستری تا سیاه تغییر می‌یابد. رنگ بافت آلوده در طوقه از قهوه‌ای تا سیاه و در بافت ریشه به‌صورت قهوه‌ای روشن تا تیره دیده می‌شود. این موضوع می‌تواند به‌دلیل تولید مواد بازدارنده بیشتر در ناحیه طوقه باشد. سرعت مرگ درختان آلوده در اثر بیماری با سن آنها ارتباط دارد. درختان جوان دارای آلودگی شدید، سریعاً خشک شده، در حالی‌که درختان مسن آلوده ابتدا کاهش پوشش برگی و خشکیدگی سرشاخه‌ها را نشان داده و به تدریج بعد از یک تا سه سال از بین می‌روند. الگوی خشک شدن درختان آلوده در باغ متفاوت بوده و تا حد زیادی به مدیریت باغ در طول سال از جمله عملیات خاک‌ورزی، خصوصیات فیزیکی خاک (نفوذپذیری)، نحوه آبیاری و کنترل بیماری ارتباط دارد. در بیشتر موارد آلودگی از طوقه و یا ریشه‌های اصلی شروع شده و در جهت‌های مختلف روی آن توسعه می‌یابد. وجود لایه سخت زیرین



شکل ۱. نشانه‌های مختلف بیماری انگومک پسته، A - سوختگی سرشاخه‌ها، B- زوال سریع درخت در اوایل بهار، C و D -زردی انتهای برگ، E و F- سبزخشکی درخت (اصلی)

Figure 1. Various symptoms of pistachio gummosis disease. A- Shoot blight , B-Quick decline during early spring, C, D -Yellow end of leaf , E, F- Tree green drying (Original)

و عملیات خاک‌ورزی نامناسب باعث تشدید و انتشار بیماری می‌گردد. در فصل پاییز و زمستان نیز نشانه‌های بیماری به‌صورت باقی‌ماندن برگ‌های درختان بیمار و عدم خزان آنها دیده می‌شود (Moradi 1998, Moradi 2003, Fani *et al*. 2005).

۲- بیمارگرها

وجود انگومک برای اولین بار در ایران از رفسنجان (Sharif *et al*. 1960) گزارش شده و Venning در سال ۱۹۶۳ بدون اینکه عامل بیماری را از میزبان جدا نماید آن را *P. parasitica* var. *parasitica* دانسته است زیرا قبل از آن در یونان این شبه‌قارچ به عنوان عامل پوسیدگی طوقه گزارش شده بود (Ershad 1992). اولین گزارش مبتنی بر تحقیق با جداسازی *Phytophthora* از طوقه درختان پسته قزوین (Mostowfipour 1969) و تعیین گونه آن به عنوان *P. citrophthora* ارائه گردیده است (Ershad 1971).

بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه پسته به عنوان مهم‌ترین بیماری درختان پسته در منطقه رفسنجان گزارش شده و درصد مرگ و میر درختان در اثر این بیماری در باغ‌ها، به طور متوسط ۲/۷ درصد برآورد گردیده است و

عامل آن شبه‌قارچ Drechsler *P. megasperma* معرفی شد(Mirabolfathy 1987). بنی‌هاشمی (Banihashemi 1989)از رفسنجان و نیریز و میرابوالفتحی (Mirabolfathy 1987) از دامغان *P. citrophthora* را به‌عنوان عامل بیماری معرفی نمودند. امینی و ارشاد (Aminaee and Ershad1991) *P. drechsleri* Tucker، Banihashemi (1995) و *P. cryptogea* Ashkan *et al*. (1995) ، Pethybr. and Laff. را از استان کرمان و Fattahi Ardakani *et al*. (2000) و Fani *et al*. (2004) ، گونه *P. nicotianae* را به‌ترتیب از منطقه رباط کرمان، یزد و سیستان و بلوچستان گزارش نمودند. Fattahi Ardakani *et al*. (2000) گونه‌های *P. cryptogea* و *P. nicotianae* و *P. megasperma* به ترتیب فراوانی ۵۸، ۳۴ و ۸ درصد از استان یزد گزارش نمودند. Ashkan *et al*. (1995) پراکندگی گونه‌های *Phytophthora*، عامل پوسیدگی طوقه و ریشه درختان پسته را در رفسنجان و سیرجان مطالعه نموده، فراوانی گونه‌ها را برای *P. drechsleri*، *P. megasperma* و *P. cryptogea* به ترتیب ۴۲ درصد، ۲۶ درصد و ۲۶ درصد اعلام کرده‌اند و Moradi (1998) فراوانی گونه‌های *P. drechsleri*، *P. cryptogea* و *P.citrophthora* در استان کرمان را به ترتیب ۴۳ درصد، ۲۷ درصد و ۷ درصد اعلام نمود.

دو گونه اصلی عامل انگومک پسته یعنی *P. megasperma* و *P. drechsleri* از نظر مولکولی مورد بازبینی قرار گرفت و مشخص گردید هر دو گونه، خویشاوندی نزدیک‌تری به *P. sojae* Kaufm. and Gerd.، *P. cajani* K.S. Amin, Baldev and F.J. Williams، *P. vignae* Purss و *P. melonis* Katsura نسبت به جدایه‌های *P. megasperma* یا *P. drechsleri* به‌دست آمده غیر از میزبان پسته داشتند و جدایه‌های منسوب به *P. megasperma* جدا شده از پسته از نظر مرفولوژی، ترادف ITS و الگوهای AFLP متفاوت ازگونه‌های فوق بوده و گونه جدیدی را تحت عنوان *P. pistaciae* Mirab. شرح می‌دهند. در ضمن جدایه‌های منتسب به *P. drechsleri* جدا شده از پسته از نظر ترادف‌های ITS با *P. melonis*، *P. sinensis* Y.N. Yu and W.Y. Zhuang و *P. drechsleri* جدا شده از خیار شباهت داشته و نقوش AFLP در *P. melonis*، *P. sinesis* و جدایه‌های منتسب به *P. drechsleri* جدا شده از پسته عملاً شباهت داشتند (Mirabolfathy *et al*. 2001).

یافته‌های آزمایش‌های بیماری‌زایی و فراوانی گونه‌های مختلف در مناطق پسته‌کاری حاکی از آن است که شدت بیماری‌زایی روی رقم حساس سرخس به‌ترتیب در گونه‌های *P. citrophthora*، *P. drechsleri*، *P. pistaciae*، *P. cryptogea* و *P. nicotianae* و فراوانی به‌ترتیب در *P. drechsleri*، *P. pistaciae*، *P. cryptogea*، *P. citrophthora* و *P. nicotianae* کاهش می‌یابد. مهم‌ترین و شایع‌ترین عوامل پوسیدگی طوقه و ریشه در نواحی پسته‌کاری استان کرمان، *P. drechsleri* و *P. pistaciae* هستند که باعث پوسیدگی طوقه (با فراوانی بیشتر) و ریشه در خاک‌هایی که به‌طور طبیعی آلوده هستند می‌گردند. از نظر بیماری‌زایی این دو گونه تحت شرایط آزمایشگاهی و میزان خسارت در باغ از بقیه گونه‌ها با اهمیت‌تر هستند. تفاوت در فراوانی گونه‌های مختلف را می توان در ارتباط با دمای محیط خاک، هوا، قدرت سازگاری آنها با محیط، حجم و میزان حساسیت و یا مقاومت ریشه در برابر عامل بیماری، پایداری اندام های رویشی، فراوانی تشکیل اندام‌های مقاوم در قارچ و فعالیت انگلی و گندرویی آنها در خاک و یا گیاهان دیگر دانست (Moradi 1998, Moradi 2003, Mirabolfathy *et al*. 2000). در مطالعه‌ای دیگر جدایه‌های به‌دست آمده از پسته که از نظر ریخت‌شناسی شبیه به گونه‌های *P. cryptogea* و *P. drechsleri* بودند از نظر مولکولی بررسی شدند و بر اساس تجزیه و تحلیل‌های چندژنی فیلوژنتیکی مشخص شد این جدایه‌ها ارتباطی به دو گونه یادشده ندارند و به عنوان گونه جدید *P. parsiana* معرفی گردید (Mostowfizadeh-Ghalamfarsa *et al*. 2008).

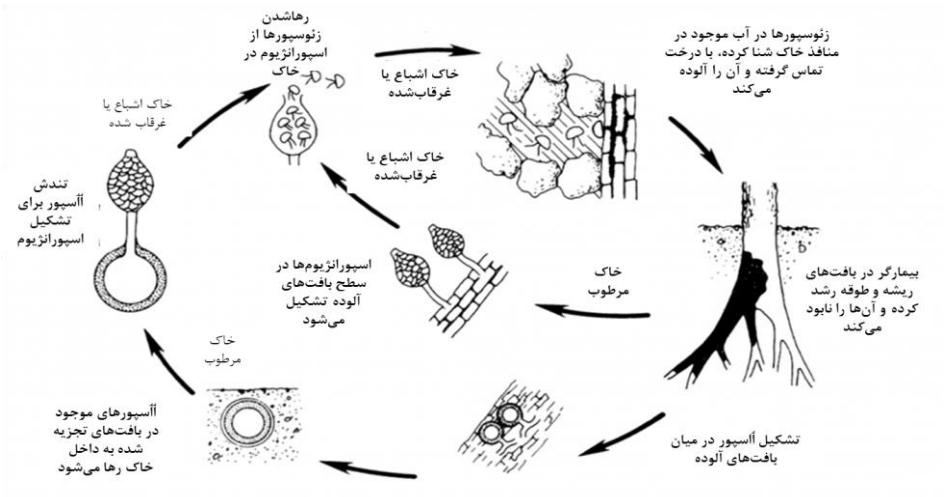
۲-۱- روش‌های شناسایی بیمارگرها

از نظر آرایه‌بندی جنس *Phytophthora* در سلسله *Chromista*، شاخه *Oomycota*، رده *Oomycetes*، راسته *Pythiales* و تیره *Pythiaceae* قرار دارد (Roy and Grünwald 2014). برای مدت‌های مدید، تشخیص و طبقه‌بندی گونه‌های این جنس بر پایه کلید تشخیص (1963) Waterhouse بود که بعداً توسط

Stamps *et al.* (1990) مورد بازبینی قرار گرفت، بوده است. اساس تشخیص در این کلیدها دامنه میزبانی، ریخت‌شناسی اسپورانژیوم، وجود یا عدم وجود کلامیدوسپور و تورم ریسه‌ای، دمای بهینه رشد پرگنه، حالت قرار گرفتن اگونیوم و آنتریدیوم، شکل پرگنه و اُگونیوم بود. در کنار ریخت‌شناسی، پارامترهای فیزیولوژی مانند روابط بین دما- رشد، رشد در حضور مالاشیت گرین (Malachite green) و الگوهای آیزوزایم (Isozyme pattern) نیز بررسی می‌شد. از زمانی که تشخیص براساس DNA رایج شد، نشان‌گرهای مولکولی با داده‌های ریخت‌شناسی ترکیب شدند (Kroon *et al.* 2012) . اعتبارسنجی آرایه‌های فیتوفتورا در سال‌های اخیر با پژوهش‌های نسب‌شناسی براساس تجزیه و تحلیل ترادف نواحی ITS (Internal transcribe spacer)، αtef 1 (Translation elongation factor)، β-tubulin و cox I, II(Cyrochrome oxidase) انجام می‌شود (Roy and Grünwald 2014). به‌طور کلی، دورگ‌های بین گونه‌ای در جنس *Phytophthora* بسیار غیرقابل پیش‌بینی هستند، آن‌ها ممکن است تهاجم بیشتری در مقایسه با والدین خود نشان دهند و یا قادر به اشغال زیستگاه‌های جدید و آلوده کردن میزبان‌های جدید باشند (Safaieefarahani and Mostowfizadeh-Ghalamfarsa 2017).

۳- چرخه بیماری

بیماری انگومک پسته خاک‌بُرد است. عامل بیماری می‌تواند با نهال یا خاک آلوده به باغ سالم وارد شود. این شبه‌قارچ‌ها بیشتر به صورت میسلیوم در بافت‌های آلوده ریشه و بعضاً به شکل کلامیدوسپور و یا اُاُسپور روی طوقه و ریشه بافت‌های آلوده و همچنین در خاک زمستان‌گذرانی می‌کنند (Moradi 1998). اُاُسپور می‌تواند مدت زمان مدیدی در خاک زنده بماند. در واقع زمانی که خاک مرطوب می‌شود، با تندش اُاُسپور و یا کلامیدوسپور و تولید اسپورانژیوم و رها شدن زئوسپورها، میسلیوم‌های جدیدی به وجود می‌آیند. زمانی که رطوبت به اندازه کافی نباشد، اسپورانژیوم جوانه‌زده و ایجاد آلودگی می‌کند (جوانه‌زنی مستقیم). اسپورانژیوم‌ها نیز حاوی اسپورهای تاژک‌داری به نام زئوسپور هستند. زئوسپورها به‌عنوان منبع زادمایه عامل انتقال و انتشار بیماری در باغ هستند. زئوسپورها صرفاً زمانی که خاک به طور کامل از آب اشباع شده باشد، آزاد می‌شوند، با استفاده از تاژک‌های خود به سمت بافت حساس گیاه حرکت کرده جوانه‌زده و باعث ایجاد آلودگی می‌گردد (جوانه‌زنی غیرمستقیم). این اسپورها با آب روان می‌توانند مسافت‌های طولانی را تا کیلومترها (انتقال غیرفعال) طی کنند(شکل ۲). دوره‌های طولانی اشباع خاک موجب بالا رفتن خطر آلودگی می‌شود. درختان معمولاً در طول بهار و تابستان حساس‌ترند و در فصل زمستان و یا دوره خواب حساسیت کمتری دارند (Ellis 2008). الگوی خشکیدگی درختان، میزان خسارت بیماری و چگونگی گسترش آن در باغ‌های آلوده متفاوت بوده و تا حد زیادی به مدیریت باغ در طول سال از جمله عملیات خاک‌ورزی، خصوصیات فیزیکی خاک (نفوذپذیری)، نحوه



شکل ۲. چرخه بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه، یا انگومک درختان میوه (Ellis 2008).

Figure 2. Disease cycle of root and crown rot or gummosis of fruit trees (Ellis 2008).

آبیاری و کنترل بیماری ارتباط دارد. انتقال غیرفعال عامل بیماری در یک باغ با عملیات خاک ورزی غلط، آب آبیاری، تماس ریشه‌ها با یکدیگر (به علت عدم رعایت فاصله کاشت)، ریختن خاک اطراف درختان آلوده در بین ردیف‌ها، انتقال خاک آلوده به باغ، آلوده بودن ادوات و وسایل کشاورزی صورت می‌گیرد. رطوبت در پوسیدگی طوقه و ریشه درختان پسته و چرخه زندگی عامل بیماری در باغ نقش اساسی دارد (Moradi 2003). دامنه دمایی بهینه برای رشد رویشی میسلیوم بیمارگر بسته به گونه ۳۰-۲۰ درجه سلسیوس است (Erwin and Ribeiro 1996).

۴- عوامل مؤثر در شیوع بیماری

۴-۱- خصوصیات فیزیکی خاک

بافت و ساختمان خاک و چگونگی قرارگرفتن لایه‌های خاک در یک باغ آلوده، شدت و خسارت بیماری را تحت تأثیر قرار می‌دهد. در باغ‌هایی که دارای بافت خاک رسی است و یا میزان رس خاک توأم با عمق خاک افزایش می‌یابد، باعث افزایش ظرفیت نگهداری آب در خاک، افزایش خفگی ریشه‌ها و حساس شدن ریشه‌ها به آلودگی می‌گردد. در چنین باغ‌هایی معمولاً نشانه‌های پوسیدگی ریشه به صورت ضعف و کمی شاخ و برگ، خشکیدگی سرشاخه، کم‌شدن میزان محصول، تغییر شکل برگ و مرگ تدریجی درخت مشاهده می‌شود. در صورت وجود یک لایه سنگین روی سطح خاک (عمق صفر تا ۴۰ سانتی‌متری) و همچنین در مواردی که درختان به صورت عمقی کاشته شده باشند، پوسیدگی طوقه بیشتر شایع است. وجود لایه سخت زیرین که در هنگام احداث باغ شکسته نشده باشد نیز باعث تشدید بیماری می‌گردد. در باغ‌هایی که طوقه درختان در زیر سطح خاک قرار دارد و یا دارای لایه سخت زیرین است، حفر یک کانال به عرض ۷۰ تا ۱۰۰ سانتی‌متر و عمق ۱ تا ۲ متر در فاصله بین ردیف‌ها، انتقال خاک به خارج از باغ و پرکردن کانال حفر شده با خاک بدون آلودگی و سبک به نحوی که شیب ردیف‌ها به سمت مرکز ردیف باشد باعث کاهش خسارت بیماری می‌گردد (مشاهدات نگارندگان).

۴-۲- اثر شوری

Banihashemi and Tabatabaee (2004) تأثیر سطوح مختلف شوری از منبع کلرید سدیم روی رشد رویشی *P. citrophthora* و آلودگی ریشه دو رقم پسته فندق و بادامی را بررسی نمودند و گزارش کردند که افزایش شوری تا سطح ۲۰۰۰ میلی گرم در لیتر کلرید سدیم موجب حداکثر رهایی زئوسپور و افزایش شوری تا ۳۶۰۰ میلی‌گرم در لیتر موجب افزایش میزان آلودگی ریشه می‌گردد. افزایش شوری تا ۴۰۰۰ و ۱۴۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر به ترتیب باعث افزایش تولید اسپوانژیوم و رشد رویشی *P. citrophthora* گردید و پس از آن روند کاهش را نشان داد. آنها همچنین بیان نمودند ریشه‌های پایه بادامی، در اثر تنش‌های شوری کمتر از رقم فندق مورد حمله *P. citrophthora* قرار می‌گیرد. تأثیر هدایت‌های الکتریکی مختلف براساس نمک‌های کلریدسدیم و کلریدکلسیم روی رشد رویشی میسلیوم *P. pistacia* نشان داد هدایت‌های الکتریکی ۲ و ۴ (ds/m) تأثیری روی رشد میسلیومی بیمارگر نداشته ولی در هدایت‌های الکتریکی ۸ و بیشتر از آن کاهش رشد رویشی میسلیوم عامل بیماری مشاهده به میزان ۳۷ تا ۹۸ درصد مشاهده می‌شود (Hajabdolahi *et al.* 2018).

۴-۲-۱- اثر نمک‌های کلسیمی

تأثیر هفت نمک (کلرید، نیترات، سولفات، اکسید، هیدروکسید، فسفات و کربنات) کلسیم با غلظت‌های مختلف (۲۵۰ تا ۳۰۰۰ ppm) روی رشد مسیلیومی، تولید اسپورانژیوم، زئوسپور و جوانه‌زنی سیست نشان داد، همه نمک‌های کلسیمی باعث کاهش رشد رویشی بیمارگر می‌شود و اکسید کلسیم در غلظت ۳۰۰۰ ppm به طور کامل از رشد رویشی عامل بیماری جلوگیری می‌کند. تمامی این نمک‌ها باعث کاهش تولید اسپورانژیوم و جوانه زنی سیست شدند. در بین نمک‌های کلسیمی، سولفات کلسیم به طور مؤثری باعث کاهش معنی‌دار رشد رویشی، تولید اسپورانژیوم و جوانه زنی سیست در غلظت ۳۰۰۰ ppm گردید که تأثیر آن روی تولید اسپوانژیوم و جوانه زنی مشهودتر و باعث جلوگیری کامل از جوانه‌زنی آن گردید (Najarpour *et al.* 2018). این امر شاید نقش مثبت کاربرد گچ در باغ‌های پسته برای مهار

بیماری پوسیدگی و طوقه ریشه پسته را توجیه کند. یکی از موادی که می‌تواند در مدیریت بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه پسته مورد استفاده قرار گیرد، کاربرد گچ معدنی است. این ماده در بسیاری از باغ‌های آلوده مورد استفاده قرار گرفته و باعث کاهش مرگ و میر در باغ‌های آلوده شده است (Moradi and Masoumi 2011). جنبه‌های مختلف املاح کلسیم برای مهار بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه روی محصولات مختلف توسط تعدادی از محققین مورد بررسی قرار گرفته است. استفاده از گچ به عنوان یکی از منابع کلسیم برای کمک به مهار بیماری باید براساس آزمایش خاک، آب و همچنین نظر کارشناسی انجام شود. مقدار گچ مورد استفاده در باغ ها از ۲۰ تا ۱۰۰ تن در هکتار متغیر است (Najarpour *et al.* 2018).

۴-۳- اثر دما و رطوبت خاک

دو گونه *P. drechsleri* و *P. pistaciae* بیشترین فراوانی را در مناطق مختلف پسته‌کاری به خود اختصاص داده‌اند. تفاوت در فراوانی گونه‌های مختلف را می‌توان در ارتباط با دمای خاک، هوا و قدرت سازگاری آنها با محیط دانست. دلیل فراوانی کم گونه *P. citrophthora* در مناطق مختلف پسته‌کاری (با توجه به بیماری‌زایی بالای آن) را می‌توان به دمای بالا در مناطق پسته‌کاری، پایداری کم اندام‌های رویشی و تشکیل کم اندام‌های مقاوم بیمارگر دانست (Moradi 1998).

۵- مدیریت بیماری

۵-۱- پایه‌های مقاوم

در اغلب مناطق پسته‌کاری ایران از رقمها مختلف *Pistacia vera* با تنوع ژنتیکی زیاد به‌عنوان پایه استفاده می‌شود ولی اغلب آنها به گونه‌های فیتوفتورا حساسند. تحقیقات انجام شده در خصوص مقاومت پایه‌های اهلی پسته به گونه فیتوفتورا نشان می‌دهد که طوقه و ریشه دو پایه قزوینی و بادامی ریز زرند از مقاومت بالایی نسبت به گونه‌های فیتوفتورا برخوردار است. بقیه پایه‌ها سطوح مختلف حساسیت را نسبت به عوامل بیماری انگومک نشان می‌دهند و رقم سرخس از سایر پایه‌ها حساس‌تر است. پسته وحشی *Pistacia atlantica* نسبت به تمامی گونه‌های فیتوفتورا مقاوم است (Moradi 1998). از طرف دیگر شدت بیماری‌زایی *P. citrophthora* نسبت به بقیه گونه‌ها، روی پایه‌های بذری پسته بیشتر بوده و گونه‌های *P. pistaciae* و *P. nicotianae* بیماری‌زایی کمتری روی پایه پسته نشان دادند. با توجه به اینکه درخت پسته دارای گرده افشانی آزاد است، تنوع ژنتیکی در نهال‌های حاصل از آنها ممکن است در بررسی صفات مختلف دیده شود. در یک تحقیق نتایج حاصل از گرده افشانی کنترل شده بین والدهای نر و ماده موجود در ایستگاه شماره دو پژوهشکده پسته نشان داد که والد مادری بادامی راور شماره ۲ در تلاقی با والد نر رفسنجان مقاومت بالایی نسبت به پوسیدگی طوقه و ریشه ناشی از گونه‌های مختلف فیتوفتورا دارند. تولید نهال‌های هیبرید حاصل از پایه‌های وحشی بنه و آتلانتیکا و پایه‌های معمولی و رایج پسته اهلی (قزوینی، بادامی زرند و اوحدی) با استفاده از عمل گرده افشانی کنترل شده نشان داد که تلاقی والد مادری قزوینی با والد نر آتلانتیکا بیشترین مقاومت را نسبت به سایر تلاقی‌ها داشتند (Moradi *et al.* 1998).

حساسیت شاخه‌های سال جاری، یک ساله و دو ساله پسته رقمها Kerman، Jolely و Ruehly نسبت به *P. parasitrca* و *P. cactorum* بررسی و گزارش شد این گونه‌های فیتوفتورا روی سه رقم پسته بیماری‌زا بودند، ولی دو رقم Ruehly و Joly نسبت به Kerman بطور معنی‌داری حساس‌تر بودند. آزمایش نهال‌های *P. integrrima*، *P. atlantica* و Pioneer GoldII نشان داد که هر چند این پایه‌ها در باغ به ظاهر مقاوم هستند ولی همه آنها در مایه‌زنی مصنوعی حساسیت نشان دادند (MacDonald *et al.* 1992).

Banihashemi (1989) گزارش کرده در آزمایشی گلخانه‌ای گونه‌های *Pistacia* Fisch. and C.A. Mey. *mutica* و *Pistacia khinjuk* Stocks از حساسیت بالایی برخوردار بوده و پایه *Pistacia atlantica* و هیبرید UCB # 1 (*Pistacia integerrima* × *Pistacia atlantica*) در مقابل تمام گونه‌های فیتوفتورای فوق‌الذکر مقاومت نشان می‌دهند. Mirabolfathy *et al.* (2000) مقاومت گیاهچه‌های ۱۵-۱۸ روزه پسته را در محلول هوگلند و نهال‌های ۴۰ روزه رقم‌های پسته اهلی و چند گونه وحشی در گلدان را نسبت به سه گونه *P. drechsleri*،

P. cryptogea و *P. megasperma* بررسی و گزارش نموده‌اند که تمام رقم‌ها و گونه‌های *Pistacia* از جمله *Pistacia atlantica* حساس هستند. Banihashemi and Gheisi (1996) گونه‌های پسته آتلانتیکا، بنه و پسته اهلی را از نظر مقاومت به بیماری انگومک به ترتیب مقاوم، نیمه مقاوم و حساس معرفی نمودند. در مورد مقاومت پایه هیبرید UCB#1 اختلاف نظر وجود دارد، بنی‌هاشمی (Banihashemi 1998) این پایه را نسبت به تمامی گونه‌های عامل انگومک مقاوم گزارش کرده، در صورتی که در مطالعه‌ای دیگر در کالیفرنیا این هیبرید، نسبت به سه گونه بیمارگر جدید عامل انگومک پسته یعنی *P. niederhauserii* Z.G. Abad and J.A. Abad، *P. cinnamomi* Rands و *P.* taxon walnut حساس اعلام شد (Nouri *et al.* 2017).

۵-۲- مدیریت آبیاری

یکی از مهم‌ترین پارامترهای مؤثر در کاهش آلودگی پوسیدگی طوقه و ریشه پسته (مخصوصاء پوسیدگی طوقه) مدیریت آبیاری است. به طور کلی استفاده از سیستم‌های تحت فشار آبیاری به لحاظ کاهش میزان آب مصرفی نسبت به آبیاری غرقابی، کاهش زمان تماس طوقه و ریشه با آب و عدم اشباع خاک به مدت طولانی، برتری دارند. تأثیر نوع آبیاری در کاهش شدت آلودگی در باغ‌ها با پوسیدگی طوقه مشهودتر و در بسیاری از موارد باعث متوقف شدن مرگ‌ومیر درختان می‌گردد. مدیریت آبیاری باید به نحوی باشد که طوقه و ریشه‌های درختان پسته در معرض کمترین میزان رطوبت ناشی از آبیاری و یا آب آزاد در خاک قرار گیرند. برای این منظور قراردادن درختان در روی پشته و یا شیب‌دار کردن محل آبیاری به نحوی که درختان بر روی پشته قرار گیرند، باعث کاهش شدت بیماری در باغ و جلوگیری از آلودگی‌های جدید می‌گردد (شکل ۳). در حالت شیب‌دار کردن باید بیشترین ارتفاع آب در مرکز ردیف و یا سایه‌انداز قرار گیرد و به سمت طوقه و ریشه‌های اصلی ارتفاع آب کاهش یابد. در موارد خسارت شدید بیماری، کاهش میزان و دور آبیاری مخصوصاً در اوایل بهار مفید است، البته در این صورت باید فاکتور رشدی گیاه نیز در نظر گرفته شود. اعمال مدیریت آبیاری در باغ‌های با شوری بالای خاک و آب باید بانظر کارشناسی انجام گیرد (Mohammadi Mohammadabadi 2015).

۵-۳- مبارزه شیمیایی

معالجه قسمت‌های آلوده طوقه و ریشه درختان با قارچ‌کش‌های مسی مانند مخلوط بردو (۴ درصد) و اکسی کلرور مس (۱ درصد) به طور معمول توسط باغداران استفاده می‌گردد (Sheikhi-Garjan *et al*. 2017). در بعضی از موارد از آهک نیز برای ضدعفونی طوقه و ریشه استفاده می‌گردد. یکی از روش‌هایی که همواره برای مهار بیماری پوسیدگی

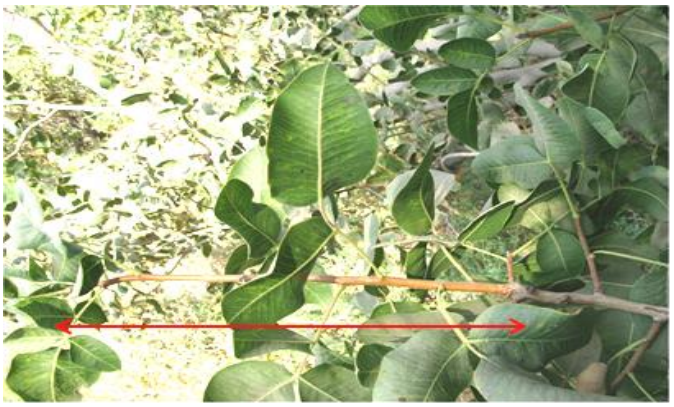
شکل ۳. قراردادن درختان در روی پشته و شیب‌دار کردن محل آبیاری به نحوی که درختان بر روی پشته قرار گیرند و از تماس مستقیم طوقه با آب جلوگیری شود (اصلی).

Figure 3. Planting trees on a ridge in a row or slight sloping the irrigation site to prevent direct contact of the crown with water (Original).

طوقه و ریشه ناشی از گونه‌های قارچ فیتوفتورا در درختان میوه توصیه شده استفاده از قارچ‌کش‌های جذبی و حفاظتی در محل طوقه و ریشه است ولی از آن جایی که درخت پسته بیشتر در مناطق کویری و یا حاشیه کویر کشت گردیده و دارای پوست نسبتاً سخت و غیر قابل نفوذ هستند، کاربرد قارچ‌کش‌ها روی طوقه و ریشه برای کنترل بیماری مؤثر نیست و این روش ممکن است صرفاً روی درختان جوان که پوست آنها نفوذپذیری بیشتری دارند مناسب باشد (Moradi 2018). محلول‌پاشی قارچ‌کش فستیل آلومینیوم (با نام تجاری اِلیت) تأثیر زیادی در کاهش آلودگی به عامل بیماری دارد. این ترکیب از مشتقات اسید فسفونیک است و بعد از استفاده، به سرعت جذب شده و در گیاه پخش می‌شود. اثرات پیشگیری و معالجه‌کنندگی این سم به صورت اثر مستقیم روی بیمارگر و فعال شدن مکانیسم‌های دفاعی گیاه در برابر گونه‌های فیتوفتورا است. رعایت الگو و زمان استفاده از این قارچ‌کش از فاکتورهای بسیار مهّم در خصوص میزان تأثیرگذاری آن روی بیماری است. به این ترتیب که با توجه به شدت‌های مختلف آلودگی در باغ بایستی انتخاب الگوی سم‌پاشی نیز بر همین اساس باشد. در محل‌هایی از باغ با آلودگی شدید و مرگ و میر بالا که درختان بیمار و آلوده و یا خشک شده در اثر بیماری وجود دارند (شکل ۴)، لازم است تا محلول‌پاشی با غلظت ۲/۵ در هزار و به تعداد حداکثر ۴ نوبت، ترجیحاً در فواصل یک تا دوهفته‌ای، مطابق الگوی ارایه شده در شکل ۳ تکرار گردد در حالی که در بقیه قسمت‌های باغ با خطر پایین که بیماری و یا وجود درختان آلوده در آن قسمت‌ها به راحتی قابل تشخیص نیست و یا بدون آلودگی هستند، فقط به یک نوبت محلول‌پاشی با غلظت ۲/۵ در هزار یا غلظت کمتر نیاز است. در سال‌های بعد، در باغ‌های محلول‌پاشی شده و آلوده فقط یک مرتبه سم‌پاشی کافی است. بهترین زمان سم‌پاشی مصادف با بازشدن کامل برگ‌ها و یا توقف رشد سرشاخه‌های جدید (شکل ۵) است. باید توجه داشت تا قبل از به مغز رفتن پسته، محلول‌پاشی‌ها بایستی قطع گردد (Moradi *et al*. 2015, Moradi 2018).

شکل ٤. محل‌هایی از باغ با خطر بالای بیماری (نوار قرمز سمت راست، محل وجود درختان آلوده) که نیاز به تکرار سم‌پاشی دارند. بقیه قسمت‌های باغ باخطر پایین‌تر بیماری (نوار زرد سمت چپ) فقط نیاز به یک مرتبه محلول‌پاشی قارچ‌کش فستیل آلومینیوم (اِلیت) دارند.

Figure 4. Orchard areas with a high disease risk (red stipe in the right side, the location of infected trees) requiring repeat spraying. The remaining parts of the orchard with lower risk of disease (yellow stripe in the left) require only a foliar application of aluminum Fosetyl (Elite®).



شکل ۵. با توقف رشد سرشاخه‌های جدید می‌توان محلول‌پاشی با قارچ‌کش فستیل آلومینیوم (الیت) را انجام داد.

Figure 5. By stopping the growth of new branches, the foliar spraying can be done with aluminum Fosetyl (Elite®).

۵-۴- مهار زیستی

تأثیر جانداران در مهار بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه گیاهان و انگومک پسته بررسی شده است. غربال ۱۱ سویه *Trichoderma harzianum* Rifai حاصل از ریزوسفر باغ‌های پسته کشور در آزمایشگاه به روش کشت متقابل، ارزیابی تداخل فیزیکی ریسه، تولید ترکیبات فرار و غیرفرار علیه *Phytophthora melonis* حاکی از پتانسیل قابل توجه آنها در بازدارندگی بیمارگر بوده است. برهمکنش آنها با عامل بیماری انگومک در آزمایشات گلخانه‌ای و سنجش پارامترهایی مانند ارتفاع نهال، طول و وزن خشک ریشه و اندام‌های هوایی و درصد مرگ و میر نشان دهنده کاهش رشد رویشی *P. melonis* به‌طور معنی‌داری بود (Fani *et al.* 2013). موفقیت جدایه‌های *Trichoderma harzianum* به عنوان عامل مهار زیستی به علت توانایی تکثیر و اسپورزایی بالا، بقاء تحت شرایط نامساعد، تحمل شوری و عناصر سنگین خاک، تغییر محیط ریزوسفر، توان بالای کلونیزاسیون ریشه و رقابت تغذیه‌ای قوی و قدرت تهاجمی بالا در تقابل با بیمارگرهای ریشه است. علاوه بر آن ترشح ترکیبهای شیمیایی مختلف مانند آنزیم‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها، قدرت تحمل و یا خنثی‌سازی ترکیبهای تولید شده توسط گیاهان و سایر ریزجانداران، ایجاد و القای مقاومت با تحریک گیاه به تولید زهرابه‌های سمی علیه بیمارگر و فعال نمودن سازوکارهای‌های دفاعی و رشدی گیاهان از دیگر عوامل موثر در موفقیت این قارچ است (Lorito *et al.* 2010). پژوهش‌ها نشان داده است مهم‌ترین باکتری‌های متعارض گونه‌های *Phytophthora*، از جنس‌های *Streptomyces* Waksman and Henrici و *Bacillus* Cohn. هستند. سازوکارهای باکتری‌ها در مهار بیمارگرهای گیاهی شامل کلنیزه‌کردن سطح ریشه، ورود به سیستم ریشه به عنوان اندوفیت، زندگی همزیستی با میزبان و بهبود رشد گیاه، رقابت با بیمارگرهای ناحیه ریشه با اشغال محل استقرار، تولید ترکیبات دورکننده شیمیایی (Allelochemical) و در نهایت القای مقاومت سیستمیک ISR (Induction of Systemic Resistance) در گیاه میزبان است (Compant *et al.* 2005). از میان ۴۰۰ جدایه باکتریهای بومی باغهای پسته استان کرمان، ۱۷۰ جدایه دارای اثر تعارضی روی بیمارگر بودند (Moradi *et al.* 2018). غربال بعدی نشان داد ۱۹ جدایه متعلق به گونه‌های Migula *Pseudomonas fluorescens* و *B. subtilis* Cohn. توانایی بازدارندگی از رشد *P. pistaciae* و کاهش مرگ و میر در نهال های شش ماهه را تا ۸۰ درصد دارند. با وجود این عموماً تنش های خشکی، دمای بالا و شوری کارایی آنها را کاهش می دهد. گسترش موفقیت آمیز سویه‌های *Bacillus* در باغ‌های تحت تنش منوط به توانایی آنها در مقاومت و ازدیاد جمعیت در این شرایط است (Moradi *et al.* 2018, Hajabdolahi *et al.* 2018).

نتیجه‌گیری

انگومک، ناشی از *Phytophthora pistaciae*، بیماری نوظهوری در باغ‌های پسته کشور نیست ولی به‌دلیل تنوع نشانه‌های آن برای باغداران و حتی مروجین و کارشناسان کشاورزی کاملاً شناخته شده نیست. این بیماری به دلیل

خاک‌بُرد بودن عامل بیماری از زمان تهیه نهال می‌تواند خسارت خود را شروع کند و با استقرار در باغ، هم‌زمان با کشت رقم‌های حساس و مدیریت نادرست خاک و آب موجب خسارت زیادی برای درختان بارور و نابارور شود. لذا آموزش مستمر و اطلاع رسانی کافی برای کاهش خسارت ضروری است. روش مدیریت تلفیقی بیماری احداث باغ در زمین‌های غیرآلوده، استفاده از رقم‌های مقاوم یا متحمل، استفاده از نهال‌های سالم، اصلاح روش آبیاری و پرهیز از تماس مستقیم آب با طوقه، جداسازی کرت‌های آلوده از سالم، استفاده از قارچ‌کش مناسب و مهار زیستی بر پایه گونه‌های *Trichoderma* و *Bacillus* است.

References منابع

1. Abrishami MH (1994) Iranian Pistachio: Historical Knowledge. Iranian University Publication, Iran, 669p. (In Persian).
2. Aminaee MM and Ershad D (1989) Etiology of pistachio leaf spot in Kerman province. Proceeding of the 9th Iranian Plant Protection Congress, Mashhad, Iran, p.81.
3. Aminaee MM and Ershad D (1991) Isolation of *Phytophthora drecshleri* from infected pistachio trees with gummosis symptoms in Kerman. Proceeding of the 10th Iranian Plant Protection Congress, Kerman, Iran, p.106.
4. Aminaee MM and Ershad D (1999) Occurrence of *Verticillium* wilt on pistachio trees in Kerman Province (Iran). Iranian Journal of Plant Pathology 35(1-4):59. (In Persian with English Abstract).
5. Ashkan M, Abusaidi D and Banihasheni Z (1995) Distribution of *Phytophthora* species causing crown and root rot of pistachio in Rafsanjan. Proceeding of the 12th Iranian Plant Protection Congress, Karaj, Iran, p.218. (In Persian with English Abstract).
6. Banihashemi Z (1989) Study of gummosis disease in southern provinces of Iran. Proceeding of the 9th Iranian Plant Protection Congress, Mashhad, Iran, p.92. (In Persian with English Abstract).
7. Banihashemi Z (1995) Identification of *Phytophthora* species associated with pistachio gummosis in Iran. Acta Horticulture 419:349–352.
8. Banihashemi Z (1998) Assessment of *Pistacia* rootstocks to *Phytophthora* spp. The causal agents of pistachio gummosis. Iranian Journal of Plant Pathology 34:213-224. (In Persian with English Abstract).
9. Banihashemi Z and Gheisi K (1996) Evaluation of *Pistacia* rootstocks to *Phytophthora* gummosis. Iranian Journal of Plant Pathology 32:104-105. (In Persian with English Abstract).
10. Banihashemi Z and Tabatabaee SAR (2004) Interaction between salinity and *Phytophthora citrophthora* in pistachio seedlings under hydroponic system. Iranian Journal of Plant Pathology 40: 159-178. (In Persian with English Abstract).
11. Compant S, Duffy B, Nowak J, Clément C and Barka EA (2005) Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. Applied and Environmental Microbiology 71(9):4951-4959.

12. Ellis MA (2008) *Phytophthora* root and crown rot of fruit trees. The Ohio State University Extension Factsheet HYG-3029, 8p.
13. Ershad D (1971) Beiteag zur Kenntnis der *Phytophthora* Arten in Iran undihrer phtopathologischra Bedeutung. Mitt Boil Bund Anst Ld. Forstwirtsch, 140p.
14. Ershad D (1992) *Phytophthora* species in Iran (Isolation, Purification, Identification). Iranian Agricultural Research, Education and Extension Organization Press, 217p. (In Persian).
15. Erwin DC and Ribeiro OK (1996) Phytophthora diseases worldwide. American Phytopathological Society Press, USA, 562p.
16. Fani SR, Ghahderijani MM, Moghaddam MA, Sherafati AB, Moghaddam MM, Sedaghati EB, Khodaygan PE (2013) Efficacy of native strains of *Trichoderma harzianum* in biocontrol of pistachio gummosis. Iranian Journal of Plant Protection Science, 44(2): 243-252. (In Persian with English Abstract)
17. Fani SR, Mirabolfathy M and Zamanizadeh HR (2004) Etiology of Pistachio Gummosis in Sistan-Baluchistan Province. Proceeding of the 16th Iranian Plant Protection Congress, Tabriz, Iran, p.382.
18. Fani SR, Zamanizadeh HR and Mirabolfathy M (2005) Isolation and identification of the causal agents of root and crown rot of pistachio trees in the Sistan and Baluchistan provinces. Proceeding of IV International Symposium on Pistachios and Almonds 726: 647-650.
19. Fattahi Ardakani M, Ershad D. and Mirabolfathy M (2000) Study of pistachio gummosis in Yazd Province. Province. Proceeding of the 14th Iranian Plant Protection Congress, Isfahan, Iran, p.126.
20. Hajabdolahi M, Moradi M. and Fani SR (2018) Effects of Bacterial Strains to Inhibit Growth of *Phytophthora pistaciae* under Different Electrical Conductivities. Journal of Nuts 9: 21-30.
21. Kouyeas V (1952) The foot rot of pistachio tree (*Pistacia vera* L.) Annales de l'Institut Phytopathologique Benaki 6:81-87.
22. Kouyeas H (1973) Pathogenicity of *Phytophthora* species to pistachio tree. Proceedings of the Annales de l'Institut Phytopathologique Benaki 10(4): 333-41.
23. Kroon LP, Brouwer H, de Cock AW and Govers F (2012) The genus Phytophthora anno 2012. Phytopathology 102(4): 348-364.
24. Lorito M, Woo SL, Harman GE and Monte E (2010) Translational research on *Trichoderma*: from omics to the field. Annual Review of Phytopathology 48: 395-417.
25. MacDonald JD, Banihashemi Z, Mircetich SM, Browne G and Bolkan L (1992) Trunk and branch canker of pistachio caused by *Phytophthora* spp. Phytopathology 82(10): 1084.
26. Mirabolfathy M (1987) Study of pistachio crown and root rot. Plant Pathology M.Sc. thesis, Tehran University, Tehran, Iran, 140p. (In Persian with English Abstract).

27. Mirabolfathy M, Alizadeh A and Rahimian H (2000) Morphological, physiological and isoenzymic comparison of *Phytophthora megasperma* from pistachio and other hosts. Iranian Journal of Plant Pathology 36:31-45. (In Persian with English Abstract).
28. Mirabolfathy M, Cooke DE, Duncan JM, Williams NA, Ershad D and Alizadeh A (2001) *Phytophthora pistaciae* sp. nov. and *P. melonis*: the principal causes of pistachio gummosis in Iran. Mycological Research 105:1166-1175.
29. Mohammadi Mohammadabadi A (2015) Study on changing irrigation system from surface to subsurface method with cement pipe on pistachio orchards. Agricultural Scientific Information and Documentation Center (ASIDC), Tehran, Iran, 47780, 32p. (In Persian with English Abstract).
30. Moradi M (1998) Isolation and identification of *Phytophthora* species from crown and root of pistachio trees in Kerman and Fars provinces and determination of relative resistance of common pistachio rootstocks of the pathogen. Plant Pathology M.Sc. thesis, Shiraz University, Shiraz, Iran, 116p. (In Persian with English Abstract).
31. Moradi M (2003) Study on the biology of *Phytophthora* spp., the causal agent of crown and root rot of pistachio trees; and their biological control. Agricultural Scientific Information and Documentation Center (ASIDC), Tehran, Iran, 82/1000, 29p. (In Persian with English Abstract).
32. Moradi M (2018) Effects of postharvest of Elit on pistachio crown and root rot. Agricultural Scientific Information and Documentation Center (ASIDC), Tehran, Iran, 54685, 30p. (In Persian with English Abstract).
33. Moradi M and Masoumi H (2011) Pistachio crown and root rot. Journal of Iranian Pistachio Association, 70:28-30. (In Persian)
34. Moradi M, Mohammadi A and Haghdel M (2015) Application of Elite (Fungicides) to manage pistachio gummosis in the orchards. Agricultural Scientific Information and Documentation Center (ASIDC), Tehran, Iran, 47146, 5p. (In Persian)
35. Moradi M, Nejad FJ, Bonjar GHS, Fani SR, Mimand BM, Probst C and Madani M (2018) Efficacy of *Bacillus subtilis* native strains for biocontrol of *Phytophthora* crown and root rot of pistachio in Iran. Tropical Plant Pathology 21:1-8.
36. Moradi M, Tajabadipour A, Farivarmahin H and Esmailpour A (1998) Study of preparation resistant hybrid rootstock to *Phytophthora drecshleri* and root-knot nematode of pistachio Agricultural Scientific Information and Documentation Center (ASIDC), Tehran, Iran, 83/766, 22p. (In Persian with English Abstract).
37. Mostowfipour P (1969) New hosts for Phytophthora. Iranian Journal of Plant Pathology 5:23. (In Persian with English Abstract).
38. Mostowfizadeh-Ghalamfarsa R, Cooke D and Banihashemi Z (2008) *Phytophthora parsiana* sp. nov., a new high-temperature tolerant species. Mycological Research 112:783-94.

39. Najarpour H, Hasanzadeh-Davarani F and Moradi M (2018) Efficacy of calcium salts on controlling *Phytophthora pistaciae*, the cause of Pistachio (*Pistacia vera* L.) gummosis. Journal of Nuts 9:23-134.
40. Nouri MT, Holland LA, Doll D, Kallsen CE, Michailides TJ and Trouillas FP (2017) Investigating canker and soil borne diseases of pistachio in California. Proceeding of VII International Symposium on Almonds and Pistachios 1219:295-302.
41. Roy SG and Grünwald NJ (2014) The plant destroyer genus *Phytophthora* in the 21st century. Annual Review of Plant Pathology 6:388-412.
42. Safaieefarahani B and Mostowfizadeh-Ghalamfarsa R (2017) *Phytophthora* spp. Interspecific Hybrids and Their Danger for Agriculture. Plant Pathology Science 6:33-46. (In Persian with English Abstract).
43. Sharif G, Barbod D and Taghizadeh F (1960) Disease that dries pistachio trees. Iranian Agricultural Research, Education and Extension Organization Press. 4p.
44. Sheikhi-Garjan A, Najafi H, Abbasi S, Saberfar F, Rashid M and Moradi M (2017) Guideline of chemical and organic pesticides in Iran. Rahdan Publisher, Tehran, Iran, 695p. (In Persian).
45. Stamps DJ, Waterhouse GM, Newhook FJ and Hall GS (1990) Revised tabular key to the species of *Phytophthora*, CAB International, 28 p.
46. Teviotdale BL, Michailides TJ and Pscheidt JW (2002) Compendium of nut crop diseases in temperate zones. American Phytopathological Press, USA, 262p.
47. Waterhouse GM (1963) Key to the species of *Phytophthora* de Bary. Mycological Paper 92:1–22.

دانش بیماری‌شناسی گیاهی (شاپای ا: ۶۲۹۰-۲۵۸۸، شاپای چ: ۹۲۷۰-۲۲۵۱)
سال هشتم، جلد ۲، بهار و تابستان ۱۳۹۸
Plant Pathology Science (eISSN:2588-6290, pISSN:2251-9270)
Vol. 8(2), 2019

Extensional Article

Citrus Sudden Decline Disease in the South of Kerman Province

MEHDI AZADVAR[1]✉, HAMIDREZA ALIZADEH[2], MOUSA NAJAFINIA[1], MOHAMMADREZA SAFARNEJAD[3] , SAMAD ESFANDIARI[4]

1. Plant Protection Department, South Kerman Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Jiroft, Iran. 2. Department of Plant Protection, University of Jiroft, Jiroft, Iran. 3. Department of Plant Virology, Iran Research Institute of Plant Protection, AREEO, Tehran, Iran. 4. Razavi Khorasan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Mashhad, Iran

Received: 25.10.2018 Accepted: 14.04.2019

Azadvar M, Alizadeh HR, Najafinia M, Safarnejad MR and Esfandiari S (2019) Citrus sudden decline disease in the south of Kerman province. Plant Pathology Science 8(2): 31-37. DOI: 10.2982/PPS.8.2.31

Abstract

During recent years, the newly emerging disease, citrus sudden decline (CSD) has destroyed many of citrus trees grafted onto bael rootstock in the south of Kerman Province. The disease is caused by *Candidatus* Liberibacter asiaticus and its simultaneous infection to soil born pathogens or *Ca.* Phytoplasma aurantifolia, or heat and drought stresses can increase the disease severity and appearance of the decline symptoms. Using the healthy and certified rootstock, using the Sour Orange or Volkamer Lemon as rootstock, control of the sucking insects at the time of flushing, optimum irrigation with appropriate distribution especially during the summer season, control of soil born fungi and nematodes, avoiding stress to plant and appropriate pruning are recommended for prevention and management of CSD disease in the south of Kerman Province.

Key words: Bael, Decline, Liberibacter, Phytoplasma

✉ Corresponding author: mehdiazadvar@gmail.com

مقاله ترویجی

بیماری مرگ ناگهانی درختان مرکبات در جنوب استان کرمان

مهدی آزادوار[1]✉، حمیدرضا علیزاده [2]، موسی نجفی‌نیا [1]، محمدرضا صفرنژاد [3]و صمد اسفندیاری [4]
۱. بخش گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی جنوب کرمان ص پ ۱۱۵-۷۸۶۱۵
۲. گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه جیرفت ، ۳. بخش تحقیقات ویروس‌شناسی، موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور
٤. مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی

دریافت: ۱۳۹۷/۰۸/۰۳ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۱/۲۵
آزادوار م، علیزاده ح ر، نجفی‌نیا م، صفرنژاد م ر و اسفندیاری ص (۱۳۹۸) بیماری مرگ ناگهانی درختان مرکبات در جنوب استان کرمان. دانش بیماری‌شناسی گیاهی ۸(۲):۳۷-۳۱. DOI: 10.2982/PPS.8.2.31

چکیده

بیماری نوظهور مرگ ناگهانی درختان مرکبات طی سال‌های اخیر تعداد زیادی از درختان مرکبات با پایه بکرایی در جنوب استان کرمان را از بین برده است. این بیماری ناشی از همراهی باکتری *Candidatus* Liberibacter asiaticus است و عوامل دیگری از جمله آلودگی هم‌زمان به بیمارگرهای خاکزی یا *Ca.* Phytoplasma aurantifolia و وجود تنش‌های گرمایی و خشکی سبب تشدید بیماری و بروز زوال در این درختان می‌شود. استفاده از نهال سالم و گواهی شده، استفاده از پایه نارنج یا ولکامرلمون بجای بکرایی و لیموترش، مبارزه با حشرات مکنده هم‌زمان با بروز جست‌های جدید، تغذیه مناسب، آبیاری بهینه و با توزیع مناسب بویژه در فصل تابستان، مبارزه با نماتدها و قارچ‌های بیمارگر خاکزی، خودداری از ایجاد هرگونه تنش در گیاه و هرس مناسب از جمله اقداماتی است که برای پیشگیری و مدیریت بیماری مرگ ناگهانی درختان مرکبات در جنوب استان کرمان توصیه می‌شود.

واژگان کلیدی: بکرایی، زوال، فیتوپلاسما، Liberibacter

مقدمه

ایران با دارا بودن بیش از ۳۰۰ هزار هکتار سطح زیر کشت و تولید بیش از پنج میلیون تن مرکبات، در بین ۱۰ کشور تولیدکننده عمده مرکبات دنیا قرار دارد (FAOSTAT, 2016). استان‌های مازندران، فارس، هرمزگان و جنوب کرمان مقام اول تا چهارم تولید مرکبات در ایران را به خود اختصاص می‌دهند. جنوب استان کرمان با بیش از ۳۲۶۱۰ هکتار سطح زیرکشت و تولید ۴۹۸۲۸۳ تن، سهم مهمی در تامین مرکبات کشور دارد. سطح زیرکشت پرتقال در جنوب استان کرمان ۲۳۱۸۴ هکتار و میزان متوسط تولید آن ۳۴۵۳۰۸ تن است (آمارنامه کشاورزی ۱۳۹۶).

۱-بیماری‌های مهم مرکبات

تولید مرکبات در دنیا تحت تاثیر عوامل زنده و غیر زنده متعددی قرار می‌گیرد. در این میان بیماری‌های گیاهی ناشی از قارچ‌ها، باکتری‌ها، نماتدها، ویروس‌ها و شبه ویروس‌ها نقش مهم‌تری ایفا می‌کنند. بیماری‌های قارچی پوسیدگی طوقه و ریشه مرکبات، سرخشکیدگی مرکبات، کپک آبی و سبز میوه، بیماری‌های باکتریایی شانکر، سبزردی ابلقی و میوه سبز، بیماری فیتوپلاسمایی جاروک، بیماری اسپیروپلاسمایی استابورن، بیماری‌های ویروسی تریستزا و مرگ ناگهانی (Sudden death) بیماری‌های ناشی از ویروئیدها و بیماری نماتد ریشه سالانه خسارت زیادی را به باغ‌های مرکبات در نقاط مختلف دنیا وارد می‌کنند (نجفی‌نیا و همکاران ۱۳۹۵، Azadvar 2016).

✉ مسئول مکاتبه: mehdiazadvar@gmail.com

۲- زوال درختان مرکبات در دنیا و عوامل آن

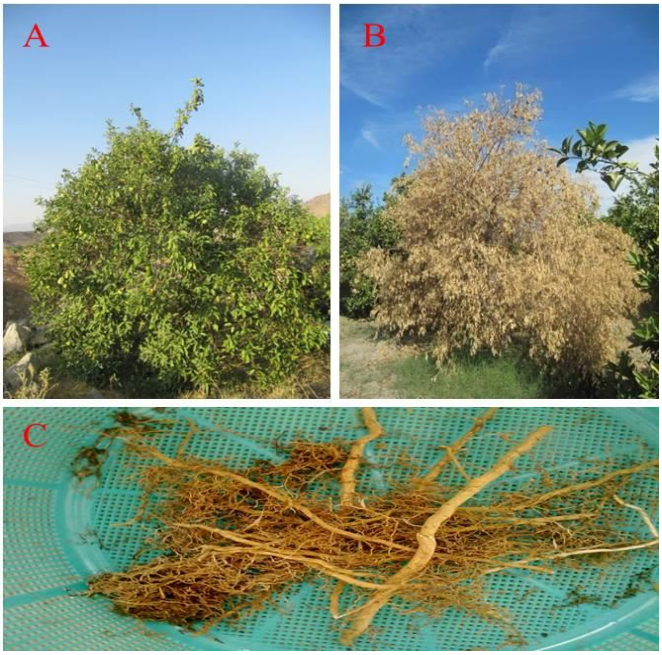
اصطلاح زوال (Decline)، به مفهوم مرگ تدریجی یا سریع، به‌عنوان نشانه ظاهری تعداد زیادی از بیماری‌های گیاهان گزارش شده‌است (Agrios 2005). در درختان مرکبات نیز بیماری‌های متعددی (ناشی از عوامل زنده و غیرزنده) با نشانه‌های ظاهری زوال گزارش شده‌است (Seriwastava and Singh 2009). از جمله بیمارگرهایی که در نقاط مختلف دنیا به‌عنوان عوامل مرگ ناگهانی یا تدریجی درختان مرکبات گزارش شده‌اند می‌توان به سویه زوال سریع ویروس تریستزا (Maccheroni *et al.* 2005)، ویروس عامل بیماری مرگ ناگهانی مرکبات (Citrus sudden death) (Maccheroni *et al.* 2005, Muller *et al.* 2002)، قارچ‌های *F. semitectum*, *Fusarium solani* و .*Phytophthora* spp به عنوان عوامل پوسیدگی ریشه (Asma *et al.* 2010, Verdejo-lucas and McKenry 2004, Ippolito *et al.* 1990, Grech and Rijkenberg 1992, Kotze 1982, Safdar *et al.* 2010)، استرینی از فیتوپلاسمای گروه 16SrII (Alhudaib *et al.* 2009)، نماتد ریشه (Ahmad *et al.* 2004, Safdar *et al.* 2010)، بیماری میوه‌سبز ناشی از *Candidatus Liberibacter* spp. (Wang and Trivedi 2013)، سبزردی ابلقی ناشی از *Xylella fastidiosa* (Bove and Ayres 2007) و هم‌چنین عوامل غیرزنده از جمله تنش دمایی، خشکی و آبیاری بیش از حد (Garcia-Sanches *et al.* 2007) اشاره نمود. پراکنش جغرافیایی و میزان خسارت بیماری‌های ناشی از این عوامل در کشورهای مختلف متفاوت بوده و به میزان زیادی متاثر از شرایط آب و هوایی، رقم و پایه مرکبات مورد استفاده می باشد.

۳-بیماری مرگ ناگهانی درختان مرکبات با پایه بکرایی در جنوب کرمان

بیماری‌های شانکر باکتریایی، جاروک و میوه‌سبز در سه دهه گذشته تولید مرکبات در نواحی جنوبی ایران و بطور خاص جنوب استان کرمان را به چالش کشیده‌اند (Azadvar 2016). در سال‌های اخیر، عارضه ناشناخته و نوظهور مرگ ناگهانی، به تهدیدی برای مرکبات این منطقه تبدیل شده است. عارضه مرگ ناگهانی مرکبات که از آن بنام بیماری "بلایت جیرفتی مرکبات" یا "Ji-blight" نیز نام برده شده است (Najafinia and Azadvar 2016) اولین بار در سال ۱۳۸۹ در جنوب استان کرمان مشاهده شد. این بیماری به جهت اینکه سبب مرگ کامل و ناگهانی درخت می‌شود، در مقایسه با بیماری‌های قبلی از اهمیت بیشتری برخوردار است و تاکنون موجب مرگ تعداد زیادی از درختان پرتقال با پایه بکرایی و عمدتا در نواحی کوهپایه‌ای این منطقه شده و خسارت اقتصادی چشمگیری را به باغداران وارد کرده است. بکرایی از ارقام بومی مرکبات می‌باشد که دارای ریشه‌های سطحی بوده و در مناطق کوهپایه‌ای که از خاک عمقی کمتری برخوردار هستند به‌عنوان پایه استفاده می‌شود (Golein *et al.* 2012). درصد آلودگی باغ‌های مرکبات به این بیماری در نواحی کوهپایه‌ای جنوب استان کرمان تا ۱۰ گزارش شده است (Passera *et al.* 2018, Najafinia and Azadvar 2016).

۳-۱-نشانه‌های بیماری

نشانه‌های بیماری مرگ ناگهانی مرکبات در جیرفت به صورت رنگ پریدگی و لوله‌ای شدن برگ‌ها (مشابه علائم کمبود آب)، عدم جوانه‌زنی و توقف رشد، پوسیدگی ریشه‌ها و نهایتا مرگ کامل درخت طی ۲ تا ۳ هفته مشاهده می‌شود. در تمام درختان مبتلا به این بیماری علائم بارز پوسیدگی ریشه مشاهده شده و بخش عمده‌ای از موی ریشه‌های جذب کننده آب و مواد غذایی از بین می‌رود (Najafinia and Azadvar 2016, Passera *et al.* 2018) (شکل ۱**شکل**).



شکل ۱- نشانه‌های بیماری زوال مرکبات در جنوب استان کرمان: A- درخت دارای نشانه‌های اولیه بیماری، B- درخت دارای نشانه‌های شدید بیماری و مرگ درخت، C- پوسیدگی ریشه‌ها در درخت مبتلا به زوال(اصلی).

Figure 1. Symptoms of citrus sudden decline (CSD) disease in the south of Kerman province: A- A tree showing primary CSD disease symptoms, B- A tree showing severe CSD disese symptoms and decline, C- Root rot symptoms in a CSD infected plant. (original)

این بیماری فقط در درختان مثمر و بارده ارقام و گونه‌های پرتقال، نارنگی و گریپ‌فروت با پایه بکرایی و گاهی لیموترش مشاهده می‌شود. گسترش بیماری و میزان خسارت در مناطق کوهپایه‌ایی که غالبا از پایه بکرایی استفاده می‌شود، بیشتر از نواحی دشت است. شدت بیماری در فصل تابستان بیشتر بوده و با خنک شدن هوا (از نیمه دوم مهرماه به بعد) کاهش می‌یابد (Najafinia and Azadvar 2016).

۳-۲- عامل بیماری

بررسی همراهی پروکاریوت‌های بیماری‌زای گیاهی با انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای عمومی و اختصاصی و هم‌چنین توالی‌یابی نسل بعدی (next generation sequencing) با استفاده از سیستم Miseq شرکت Illumina نشان دهنده همراهی باکتری *Ca.* liberibacter asiaticus با بیماری مرگ ناگهانی درختان مرکبات با پایه بکرایی در جنوب استان کرمان می‌باشد (Alizadeh *et al.* 2017, Passera *et al.* 2018). آلودگی همزمان درختان مذکور به عوامل دیگری از جمله *Ca.* Phytoplasma aurantifolia یا برخی بیمارگرهای خاکزی، از بین رفتن حجم عمده‌ای از ریشه‌های تغذیه‌کننده گیاه و وجود تنش های گرمایی و خشکی باعث می شود که این درختان، بدون تظاهر زردی شاخه‌ها و ابلقی شدن برگ‌ها، دچار مرگ ناگهانی شوند. باکتری *Ca.* Liberibacter asiaticus فقط در سیستم آوندی ریشه (پایه درختان) ردیابی می‌شود (Alizadeh *et al.* 2017, Passera *et al.* 2018). بنظر می‌رسد بدلیل پوسیدگی موی‌ریشه ها و انسداد و تخریب آوندها، تامین آب مورد نیاز اندام‌های هوایی دچار مشکل شده و درخت بیمار بطور ناگهانی دچار مرگ می‌شود.

۳-۳- مدیریت بیماری

۱. نهال آلوده، یکی از روش‌های گسترش باکتری *Ca.* Liberibacter asiaticus است. لذا توصیه

می‌شود در توسعه باغ های جدید مرکبات و یا جایگزینی درختان بیمار از نهال‌های سالم، گواهی‌شده و عاری از بیماری استفاده شود.

۲. از آنجا که این بیماری بطور عمده در درختان مرکبات با پایه بکرایی ایجاد خسارت می‌کند توصیه می‌شود در احداث باغ جدید از پایه نارنج یا ولکامرلمون استفاده شود. پایه لیموترش نیز به دلیل حساسیت به بیمارگرهای Ca. phytoplasma aurantifolia و *Ca.* Liberibacter asiaticus قابل توصیه نمی‌باشد.

۳. انتقال باکتری *Ca.* Liberibacter asiaticus توسط پسیل آسیایی مرکبات (*Diaphorina citri*) انجام می‌شود و لذا به منظور کنترل این حشره و سایر حشرات مکنده توصیه می‌شود سمپاشی درختان مرکبات با سموم سیستمیک حداقل دوبار در سال و هم‌زمان با ظهور جست‌های جدید انجام گیرد.

٤. از آنجا که این احتمال وجود دارد که آلودگی پایه درختان به باکتری *Ca.* Liberibacter asiaticus از طریق نرک‌های حاصل از پایه صورت گیرد، توصیه می‌شود عملیات حذف نرک‌ها در باغ بصورت مستمر انجام گیرد.

۵. درجه حرارت مطلوب برای رشد مرکبات حدود ١٦ تا ٢٠ درجه سلسیوس می‌باشد. در فصل تابستان بدلیل گرمای شدید و کاهش رطوبت هوا، میزان تبخیر و تعرق درختان مرکبات و در نتیجه نیاز آنها به آب افزایش می‌یابد. براین اساس توصیه می‌شود میزان آب مصرفی در فصل گرما به ۱۰ تا ۱۵ درصد بیش از نیاز گیاه افزایش یابد تا از ایجاد تنش خشکی در درختان جلوگیری شود.

٦. در سیستم آبیاری قطره‌ای باغ های مرکبات از آرایش دو ردیفه (دو حلقه‌ای) با حداقل ١٤ قطره چکان به ازاء هر درخت استفاده شود تا حجم پیاز رطوبتی بیشتری ایجاد شده، توزیع ریشه‌ها متناسب‌تر شده و آب مورد نیاز درخت بطور یکنواخت در سایه انداز آن توزیع گردد.

۷. دقت شود در هنگام حذف علف‌های‌هرز در فصل تابستان، قطره چکان‌ها دوباره در محل اولیه خود قرار گیرند تا آسیبی به ریشه‌های فعال وارد نشده و درختان دچار تنش خشکی نشوند.

۸. تغذیه بهینه درختان بویژه با کودهای حاوی پتاسیم و کلسیم سبب افزایش مقاومت درختان مرکبات در برابر تنش‌های زنده و غیرزنده و از جمله باکتری *Ca.* Liberibacter asiaticus می‌شود.

۹. اقدامات مناسب برای پیشگیری و کنترل بیمارگرهای خاکزی انجام گیرد تا از پوسیدگی بیشتر ریشه درختان مبتلا به باکتری *Ca.* Liberibacter asiaticus جلوگیری شود.

۱۰. هرس مناسب در زمان بروز نشانه‌های اولیه بیماری (رنگ پریدگی و پژمردگی برگ‌ها) به تعادل بین ریشه و اندام‌های هوایی کمک کرده و از مرگ درخت جلوگیری می‌کند.

نتیجه‌گیری

بیماری مرگ ناگهانی درختان مرکبات با پایه بکرایی در جنوب استان کرمان که بنام بیماری بلایت جیرفتی مرکبات یا جی‌بلایت نیز از آن نام برده می‌شود، اولین بار در سال ۱۳۸۹ در نواحی کوهپایه‌ای شهرستان جیرفت مشاهده شد. نشانه‌های این بیماری به صورت رنگ پریدگی و لوله‌ای شدن برگ‌ها (مشابه علائم کمبود آب)، عدم جوانه‌زنی و توقف رشد، پوسیدگی ریشه‌ها و نهایتا مرگ کامل درخت مشاهده می‌شود. بررسی‌های انجام گرفته نشان داد که این بیماری ناشی از باکتری *Ca.* Liberibacter asiaticus است. اگرچه بطور معمول این بیمارگر سبب مرگ سریع درخت میزبان نمی‌شود اما توام شدن عوامل دیگری ازجمله آلودگی هم‌زمان به برخی بیمارگرهای خاکزی و یا *Ca.* Phytoplasma aurantifolia و وجود تنش‌های گرمایی و خشکی سبب افزایش حساسیت درختان مبتلا به این بیمارگر و در نهایت مرگ ناگهانی درختان بیمار بویژه در فصل تابستان می‌شود. برای مدیریت این بیماری توصیه می‌شود که در توسعه باغ های جدید از نهال‌های سالم با پایه نارنج به جای پایه بکرایی استفاده شود. تغذیه و آبیاری بهینه، کنترل پسیل آسیایی و سایر حشرات مکنده، حذف مداوم نرک‌ها، انجام عملیات صحیح به‌باغی و خودداری از ایجاد هرگونه تنش در گیاه و هم‌چنین هرس مناسب در زمان بروز نشانه‌های اولیه بیماری از سایر روش‌های موثر در پیشگیری و کاهش خسارت این بیماری می‌باشند.

References **منابع**

۱. نجفی‌نیا م.، باقری ع.، آزادوار م. و صالحی م (۱۳۹۵) موقعیت بیماری جاروک لیموترش در ایران. دانش بیماری شناسی گیاهی ۵(۲): ۳۱-۲۳.

2. Agrios G N (2005) Plant Pathology. 5th Edn. Academic press, New York, USA, 952p.
3. Ahmad MS, Mukhtar T and Ahmad R (2004) Some studies on the control of citrus nematode (*Tylenchulus semipenetrans*) by leaf extracts of three plants and their effects on plant growth variables. Asian Journal of Plant Sciences 36:544-548.
4. Alhudaib A, Arocha Y, Wilson M and Jones P (2009) Molecular identification, potential vectors and alternative hosts of the phytoplasma associated with a lime decline disease in Saudi Arabia. Crop Protection 28:13-18.
5. Alizadeh H, Quaglino F, Azadvar M, Kumar S, Casati P and Bianco PA (2017) First report of a new citrus decline disease (CDD) in association with double and single infection by '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' and '*Candidatus* Phytoplasma aurantifolia' related strains in Iran. Plant Disease 101:2145-2145.
6. Asma S, Nazir J, Khan SA, Khan H, Rehman A and Haq I (2010) Survey and investigation of different citrus growing areas for citrus sudden death syndrome. Pakistanian Journal of Phytopathology 22:71-78.
7. Azadvar M. 2016. Citrus associated phytoplasmas: new findings and challenges. Pp.153-165. In: P Chowdappa P Sharma D Singh and AK Misra (eds.). Perspectives of Plant Pathology in genomic era. Today and Tomorrow's Printers and Publishers, New Delhi.
8. Bove JM and Ayres AJ (2007) Etiology of three recent diseases of citrus in Sao Paulo state: sudden death, variegated chlorosis and huanglongbing. IUBMB Life 59:346-354.
9. Garcia-Sánchez F, Syvertsen JP, Gimeno V, Botia P and Perez-Perez JG (2007) Responses to flooding and drought stress by two citrus rootstock seedlings with different water-use efficiency. Physiologia Plantarum 130:532-542.
10. Golein B, Bigonah M, Azadvar M and Golmohammadi M (2012) Analysis of genetic relationship between 'Bael' (*Citrus* sp.) and some known Citrus genotypes through SSR and PCR-RFLP markers. Scientia Horticulturae 148:147-153.
11. Grech NM and Rijkenberg FH J (1992) Injection of electrolyticaly generated chlorine into citrus micro irrigation systems for control of certain waterborne root pathogens. Plant Disease 76:457-461.
12. Ippolito A, Decicco V, Cicco E and Salerno M (1990) Role of *Phytophthora* spp. in citrus decline in Apulia and Basilicata, Italy. EPPO Bulletin 20:91-94.
13. Kotze JM (1982) Root rot of citrus. Citrus and Subtropical Fruit Journal 5:583-583.
14. Maccheroni W, Alegria M C, Greggio CC, Piazza JP, Kamla RF, Zacharias PR and Cardozo J (2005) Identification and genomic characterization of a new virus (Tymoviridae family) associated with citrus sudden death disease. Journal of Virology 79:3028-3037.

15. Muller GW, De Negri JD, Vildoso CIA, Mattos JR, Pompeu J, Teofilo JS, Machado MA, Carvalho SA and Girotto LF (2002) A new citrus disease in Brazil. In International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings P.15.
16. Najafinia M and Azadvar M (2016) Citrus sudden decline disease in Iran. Indian Phytopathology 69:41-13.
17. Najafiniya M, Bagheri A, Azadvar M and Salehi M (2016) The situation of witches broom disease of sour lime in Iran. Plant Pathology Science 5:23-31. (In Persian with English Abstract).
18. Passera A, Alizadeh H, Azadvar M, Quaglino F, Alizadeh A, Casati P and Bianco PA (2018) Studies of microbiota dynamics reveals association of *Candidatus* Liberibacter asiaticus infection with citrus (*Citrus sinensis*) decline in south of Iran. International Journal of Molecular Sciences 19:1817
19. Safdar A, Javed N, Khan SA, Khan, H, Rehman A and Haq IU (2010) Survey and investigation of different citrus growing areas for citrus sudden death syndrome. Pakestanian Jornal of Phytopathology 22:71-78.
20. Seriwastava AK and Singh S (2009) Citrus decline: soil fertility and plant nutrition. Journal of Plant Nutrition 32:197-245.
21. Verdejo-Lucas S and Mckenry MV (2004) Managment of the citrus nematode *Tylenchulus semipenetrans*. Journal of Nematology 36:424.
22. Wang N, Trivedi P (2013) Citrus huanglongbing: a newly relevant disease presents unprecedented challenges. Phytopathology 103:652-665.

دانش بیماری‌شناسی گیاهی (شاپای ا: ۶۲۹۰-۲۵۸۸، شاپای چ: ۹۲۷۰-۲۲۵۱)
سال هشتم، جلد ۲، بهار و تابستان ۱۳۹۸
Plant Pathology Science (eISSN:2588-6290, pISSN:2251-9270)
Vol. 8(2), 2019

Extensional Article

Bacterial Bark Canker Disease of Walnut Tree

MEYSAM AZADI MOGHADAM[1], ZABIHOLLAH AZAMI SARDOOEI [1]✉, MEHDI AZADVAR [2]

1- Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Jiroft, Jiroft, Iran. 2- Department of Plant Protection, South Kerman Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Jiroft, Iran

Received: 25.10.2018 Accepted: 14.04.2019

AzadiMoghadam M, AzamiSardooei Z and Azadvar M (2019) Bacterial bark canker disease of walnut tree. Plant Pathology Science 8(2):38-44. DOI: 10.2982/PPS.8.2.38

Abstract

Bacterial canker disease is one of the most destructive diseases of walnut trees that causes die back and plant decline and also great damages to quality and quantity of fruits. The disease can be observed in two forms, at depth and the surface of the bark which cause by two bacteria, *Brenneria nigrifluens* and *B. rubrifaciens*, respectively. The most important way of the pathogen penetration is the wounds in the trunk and branches which are occurred due to human activities or mechanical harvesting equipment. The disease becomes severe with the deep irrigation and when the nutrition is insufficient and temperature and humidity are high. Current paper explains history, importance, symptoms, biology, host range, sampling and isolation method also differential characteristics of bacteria and methods of disease management.

Key words: Bacterium, *Brenneria*, Canker, Walnut

✉ Corresponding author: zabih.azami@gmail.com

مقاله ترویجی

بیماری شانکر باکتریایی پوستی درخت گردو

میثم آزادی مقدم [۱]، ذبیح اله اعظمی ساردوئی [۱]✉ و مهدی آزادوار [۲]

۱-گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت، ۲- بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی جنوب استان کرمان، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، جیرفت.

دریافت: ۱۳۹۷/۰۸/۰۳ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۱/۲۵

آزادی‌مقدم م، اعظمی ساردوئی ذ و آزادوار م. ۱۳۹۸. بیماری شانکر باکتریایی پوستی درخت گردو. دانش بیماری‌شناسی گیاهی ۸(۲):۴۴-۳۸. DOI: 10.2982/PPS.8.2.38

چکیده

بیماری شانکر باکتریایی یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های گردو است که باعث کاهش کمیت و کیفیت محصول، خشکیدگی شاخه‌ها و زوال درختان گردو می‌شود. این بیماری به دو شکل عمقی و سطحی به ترتیب توسط دو باکتری *Brenneria nigrifluens* و *B. rubrifaciens* ایجاد می‌شود. مهم‌ترین راه ورود بیمارگرها در تنه و شاخه‌ها، زخم‌های ناشی از فعالیت‌های انسانی یا وسایل برداشت مکانیکی می‌باشد. این بیماری با افزایش درجه حرارت، رطوبت بالای ناشی از آبیاری کرتی یا غرقابی و تغذیه ناکافی شدت می‌یابد. در مقاله حاضر تاریخچه، اهمیت، نشانه‌ها، زیست‌شناسی و دامنه میزبانی باکتری‌ها، نحوه نمونه‌برداری، جداسازی و خصوصیات افتراقی باکتری‌ها و روش‌های مدیریت بیماری بیان شده است.

واژگان کلیدی: باکتری، شانکر، گردو، *Brenneria*

مقدمه

گردو از محصولات مهم خشکباری دنیا است که در بعضی از کشورهای صنعتی به‌عنوان یک درخت روغنی بسیار مهم محسوب می‌شود (Fruto 2010). ایران با ۱۲۰۲۷۹ هکتار سطح زیر کشت بارور و تولید ۲۶۱۳۴۰۹ تن رتبه سوم تولید گردو دنیا را به خود اختصاص داده است. استان‌های مهم تولیدکننده گردو شامل کرمان، همدان، لرستان، کرمانشاه، مازندران، اصفهان، گیلان و اردبیل می‌باشند (آمارنامه وزارت جهاد کشاورزی ۱۳۹۶). یکی از بیماری‌های مهم گردو در دنیا، بیماری شانکر پوستی گردو ناشی از باکتری *Brenneria nigrifluens* Wils. است که اولین بار از ایالات‌متحده (Wilson *et al*. 1957) و پس‌ازآن از اسپانیا (Lopez *et al*. 1994)، ایران (Harighi and Rahimian 1997, Rahimian 1989)، ایتالیا (Morone *et al*. 1998, Saccardi *et al*. 1998, Scortichini 1999, Carella *et al*. 2003)، فرانسه (Menard *et al*. 2004)، صربستان (Popovic *et al*. 2013, Anguiano-Castellano *et al*. 2016) و مجارستان (Vegh *et al*. 2014) گزارش‌شده است. در ایران این بیماری اولین بار در سال ۱۳۶۸ در ایران از استان مازندران (منطقه زاغمرز و نکا) (Rahimian 1989) و در سال‌های اخیر از استان‌های کردستان، فارس، کهگیلویه و بویراحمد، گیلان، گلستان، کرمان و لرستان گزارش‌شده است (Bakhtiari and Qasemi 2007, Jamalzadeh *et al*. 2009, Amirsardari *et al*. 2015). ویلسون و همکاران (۱۹۶۷) شانکرهایی عمیق‌تر و شدیدتر از شانکرهای ایجادشده توسط *B. nigrifluens* را روی تنه درختان گردو گزارش کردند و آن را تحت نام شانکر عمقی پوست گردو نامیده و عامل آن را *B. rubrifaciens* توصیف نمودند. بیماری شانکر عمقی

✉ مسئول مکاتبه: zabih.azami@gmail.com

پوست گردو ناشی از گونه باکتری *B. rubrifaciens* Wils. در سال ۱۳۹۶ از ایران اولین بار توسط امیرسرداری و همکاران شناسایی و گزارش گردید (Amirsardari *et al*. 2017).

۱- نشانه‌های بیماری

نشانه‌های اولیه بیماری شانکر سطحی پوستی گردو با شکاف‌های طولی کوچک روی تنه و شاخه‌ها که در طول بهار و تابستان شیره قهوه‌ای تا سیاه از آن‌ها خارج می‌شود، بروز می‌کند. با حذف قسمت سطحی پوست، ناحیه نکروتیک قهوه‌ای تا سیاه آشکار می‌شود. در این بیماری نکروز معمولاً سطحی است اما گاهی اوقات به‌طرف کامبیوم و آوند چوبی خارجی نیز پیشروی می‌کند. در شانکر باکتریایی عمقی، شکاف‌ها عمیق‌تر بوده و قسمت‌ها چوبی نکروز می‌شود (Wilson *et al*. 1957, Loreti *et al*. 2006). اکثر رقمها گردو به شانکر باکتریایی حساس هستند و نشانه‌های بیماری ممکن است زمانی که درخت گردو تحت تنش‌های محیطی قرار گیرد توسعه یابند (Teviotdale and Panopoulos 1994). ردیابی باکتری عامل بیماری به علت مشهود نبودن نشانه‌ها خارجی و چرخه زندگی درون‌رستی آن مشکل می‌باشد. دستیابی به روش‌های سریع، ارزان و قابل‌اعتماد برای امکان ردیابی آلودگی از درختان بدون نشانه‌ها بیماری جهت توسعه مؤثر راهبردهای مدیریتی این بیمارگر لازم است (McClean and Kluepfel 2009) .

۲- روش نمونه‌برداری و جداسازی بیمارگر

برای جداسازی باکتری عامل بیماری ابتدا پوست قسمت آلوده دارای نشانه ها شانکر، زیر جریان آب به‌خوبی شسته و سپس قطعه‌هایی از بافت آلوده با محلول هیپوکلرید سدیم و آب مقطر سترون به نسبت ۹: ۱ برای مدت ۱ دقیقه ضدعفونی می‌شوند. پس از شستشوی مجدد با آب مقطر سترون قطعاتی از بافت آلوده را توسط تیغ سترون جدا کرده و در ۳-۲ میلی‌لیتر آب مقطر سترون خرد نموده و پس از ۲۰ دقیقه، یک قطره از سوسپانسیون به‌دست‌آمده روی محیط کشت ائوزین متیلن بلو (EMB) به‌صورت پنج‌ضلعی (مخطط) کشت داده می‌شود. تشتک‌های پتری کشت‌شده به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس درون انکوباتور نگهداری می‌شوند. تک پرگنه‌های باکتری غالب از هر تشتک پتری انتخاب و در محیط کشت نوترینت آگار سوکروز (NAS) کشت داده می‌شوند. درنهایت تک پرگنه‌های حاصل خالص‌سازی می‌شوند (Taghipour *et al*. 2015).

۳- خصوصیات باکتری‌های عامل بیماری

گونه‌های *Brenneria* گرم منفی، میله‌ای شکل، فاقد اندوسپور یا کپسول، منفرد و به‌ندرت جفتی، متحرک با تاژک‌های محیطی هستند. در اعضای این جنس آزمون‌های اکسیداز، لوان، لسیتیناز، هیدرولیز ژلاتین، کازئین، نشاسته و فوق حساسیت در توتون منفی می‌باشد. این باکتری‌ها در محیط کشت EMB پرگنه‌های سبز براق تولید می‌کنند (Yousefi Kopaei *et al*. 2007). شایان‌ذکر است که این باکتری‌ها قبلاً در جنس *Erwinia* قرار می‌گرفتند اما پس از تقسیم جنس *Erwinia* بر اساس توالی 16S rDNA به جنس‌های *Brenneria*، *Erwinia* و *Pectobacterium* در سال ۱۹۹۸، به جنس *Brenneria* منتقل شدند (Hauben *et al*. 1998). خصوصیات افتراق فنوتیپی و تغذیه‌ای گونه‌های باکتری عامل این بیماری در جدول ۱ آورده شده است.

۴- چرخه بیماری

بیماری شانکر باکتریایی در درختان گردو توسط دو گونه باکتری *B. rubrifaciens* (عامل شانکر عمقی پوست) و *B. nigrifluens* (عامل شانکر سطحی پوست) ایجاد می‌شود. شانکر عمقی خطرناک‌تر از شانکر سطحی است ولی هیچ‌کدام به‌تنهایی کشنده نیستند(Keshavarzi 2011). هر دو گونه باکتری در حاشیه شانکرها و یا تراوش‌های آن‌ها زمستان‌گذرانی می‌کنند و در بهار با جاری شدن تراوشات، به بیرون راه می‌یابد.

جدول ۱. خصوصیات فنوتیپی و تغذیه‌ای افتراق *Brenneria. nigrifluens* و *B. rubrifaciens* (Yousefi Kopaei *et al*. 2007).

Table 1. Differential phenotypic and nutritional characteristics of *B. nigrifluens* and *B. rubrifaciens* (Yousefi Kopaei *et al*. 2007).

Characteristic	*B. nigrifluens*	*B. rubrifaciens*
Tolerance of NaCl 5%	+	-
Urease production	+	-
Acetoin production	+	-
Growth at 40˚C	+	-
Pink pigment on YDC	-	+
Acid production from:		
meso erithritol	-	+
myo inositol	+	-
Trehalose	+	-
D (+) cellobiose	+	-
D- sorbitol	+	-
D- fructose	+	-
D (+) mannose	+	-
Utilization of:		
Asparagine	+	-
Salicine	+	-

سپس به کمک باد و باران و از راه زخم‌های موجود در پوست به درخت نفوذ می‌کنند. زمانی که درخت در معرض تنش‌های محیطی قرار گیرد، شدت بیماری افزایش می‌یابد (Teviotdale and Panopoulos 1994).

باکتری *B. nigrifluens* در طول ماه‌های گرم فعال‌تر و در ماه‌های سرد غیرفعال است، بنابراین، جداسازی باکتری در طول ماه‌های گرم موفقیت‌آمیزتر است (Wilson *et al*. 1957). تکثیر شدید باکتری *B. nigrifluens* در هوای مرطوب و دمای ۲۰ تا ۲۹ درجه سلسیوس اتفاق می‌افتد (Falahi Charkhabi *et al*. 2011). این باکتری در شرایط آزمایشگاه به گردو و آفتابگردان حمله می‌کند (Hassan Zadeh 1996) ولی تاکنون درخت گردو تنها میزبان شناخته‌شده آن در شرایط طبیعی شناخته شده است (Keshavarzi 2011).

باکتری *B. rubrifaciens* به‌وسیله دستگاه‌های برداشت کننده مکانیکی و یا چوب زدن در هنگام برداشت محصول و با ایجاد زخم‌های عمیق روی پوست درخت انتشار می‌یابد. همچنین بیمارگر ممکن است به‌وسیله پیوند چوبی منتقل شود (Teviotdale and Panopoulos 1994). باکتری *B. rubrifaciens* به دلیل داشتن زندگی درون‌رستی (Thapa *et al*. 2010) دارای دوره کمون می‌باشد به‌طوری‌که در درختان ضعیف نشانه ها زودتر نمایان می‌شود ولی در درختان قوی‌تر بعد از چندین سال نشانه ها بیماری پدیدار می‌گردد. شدت این بیماری در فصول بهار و تابستان بیشتر است (Keshavarzi 2011).

۵- مدیریت بیماری

۵-۱- رقم‌های مقاوم

استفاده از رقم‌های مقاوم، نهال سالم و عاری از آلودگی جهت احداث باغ ضروری است زیرا وجود چند درخت آلوده در درازمدت باعث آلودگی تمام باغ می‌شود (Bakhtiari and Qasemi 2007). باکتری *B. rubrifaciens* اغلب روی گردو رقم هارتلی (Hartley) شایع است، اگرچه، اکثر رقم‌های گردو به این

باکتری حساس هستند (Teviotdale and Panopoulos 1994). هم‌چنین تمام رقم‌های گردوی تجاری ایرانی به باکتری *B. nigrifluens* حساس هستند ولی پایه تجاری پارادوکس به این باکتری مقاوم بوده و دچار بیماری شانکر پوستی نمی‌شود (Keshavarzi 2011).

۵-۲- عملیات به‌باغی

زخم‌ها و شکاف‌های ایجادشده در تنه و شاخه درختان ناشی از فعالیت‌های انسانی مانند چوب زدن در هنگام برداشت و یا استفاده از دستگاه مکانیکی تکان‌دهنده و هم‌چنین حمله پرندگان و حشرات، راه نفوذ باکتری عامل شانکر پوستی را به درختان گردو مستعد می‌سازد. براین اساس لازم است تا حد امکان مانع صدمه به درختان گردو شد (Bakhtiari and Qasemi 2007). حذف قسمت‌های آلوده درخت و سوزاندن آن‌ها در جلوگیری از توسعه بیماری مؤثر است (Amirsardari *et al*. 2015). با بالا رفتن درجه حرارت، بارندگی و آبیاری و تغذیه ناکافی در باغات گردو، شیوع بیماری شانکر پوستی باکتریایی شدت می‌یابد. آبیاری باغ‌ها به‌صورت متعادل و در صورت امکان به‌صورت قطره‌ای انجام شود (Bakhtiari and Qasemi 2007). برای تقویت درخت استفاده از کودهای فسفاته و پتاسه (۱- ۰/۵ کیلوگرم به ازای هر درخت، بسته به سن درخت) در اسفندماه و کود ازته (۱- ۰/۵ کیلوگرم به ازای هر درخت، در دو نوبت نیمی در فروردین و نیم دیگر یک ماه بعد) توصیه می‌شود. همچنین در زمستان از کود دامی (۴۰-۳۰ تن در هکتار، هر ۳-۲ سال یک‌بار) به‌صورت برگرداندن به عمق ۳۰ سانتی متری خاک استفاده شود (Keshavarzi 2011).

۵-۳- مبارزه شیمیایی

در مراحل اولیه نفوذ باکتری عامل شانکر پوستی، با چاقوی باغبانی ضدعفونی شده قسمت‌های آلوده را حذف نموده، سپس در دو الی سه نوبت محل تراشیده شده را با اکسی کلرور مس ۳-۵ در هزار و یا مخلوط بردو چهار درصد پانسمان کرده تا از نفوذ عمقی بیمارگر ممانعت شود (Bakhtiari and Qasemi 2007). شانکر باکتریایی پوستی درختان گردو با سموم شیمیایی رایج یا تزریق آنتی‌بیوتیک قابل‌کنترل نیست. فقط در مراحل اولیه ظهور نشانه‌های بیماری، تراشیدن شانکر و ضدعفونی محل آن با سموم مسی یا هیپوکلریت سدیم می‌تواند مؤثر باشد؛ اما این کار در شانکرهای پیشرفته نه‌تنها باعث ریشه‌کنی باکتری نمی‌شود بلکه به تضعیف درخت و تشدید بیماری می‌انجامد (Keshavarzi 2011).

نتیجه‌گیری

بروز و شیوع بیماری شانکر پوستی باعث کاهش کمیت و کیفیت در تولید گردو می‌شود. اجرای برنامه مدیریت کارآمد بیماری، نیازمند آگاهی کامل از بیمارگر، ازجمله شناسایی دقیق، بقا، بررسی تنوع ژنتیکی، چرخه زندگی و دامنه میزبانی آن می‌باشد. مدیریت بیماری از طریق رعایت بهداشت باغ، روش‌های به‌باغی، استفاده از نهال سالم و عاری از بیماری، استفاده از رقم‌های مقاوم و ضدعفونی زخم‌ها با سموم مسی صورت می‌گیرد.

منابع References

1. Amirsardari V, Darvishniya M and Mirzaei H (2015) Isolation and molecular identification of bacterial bark canker in walnut and evaluation of bacteria pathogenicity on the seedling and immature walnuts fruits in Lorestan province. Journal of Microbial World 8:120-129. (In Persian with English Abstract).
2. Amirsardari V, Sepahvand Sh and Madani M (2017) Identification of deep bark canker agent of walnut and study of its phenotypic, pathogenic, holotypic and genetic diversity in Iran. Journal of Plant Interactions 12:340-347.
3. Anguiano-Castellano J., Arredondo-Valdés R., Cerna-Chávez E., Beltran-Beache M., Delgado-Ortiz JC and Ochoa-Fuentes YM (2016) Review of diagnosis techniques for

Brenneria spp in walnut (*Juglans regia*). Revista Mexicana de Fitopatología 34:158-172.

4. Bakhtiari MH and Qasemi A (2005) Shallow bark bacterial canker of walnut trees in Hamadan province. 4th Congress of Horticultural Sciences, Tehran, Iran, 23p. (In Persian).
5. Carella D, Spigno P and de Vita N (2003) Occurrence of trunk canker of walnut in Campania region (Italy). Informatore Fitopatologico 53:32-33.
6. Falahi Charkhabi N, Shams-Bakhsh M, Rahimian H and Khodayegan P (2011) Identification of *Brenneria nigrifluens* isolates. Iranian Journal of Plant Pathology 7:263-277. (In Persian with English Abstract).
7. Fruto D (2010) Bacterial diseases of walnut and hazelnut and genetic resources. Journal of Plant Pathology 92:79-85.
8. Harighi B and Rahimian H (1997) Widespread occurrence of shallow bark canker of walnut trees in Mazandaran province. Iranian Journal of Plant Pathology 33:48-50. (In Persian with English Abstract).
9. Hassan Zadeh N (1996) The study of a few bacterial diseases in Iran. Applied Entomology and Phytopathology 63:14-15.
10. Hauben L, Moore ER, Vauterin L, Steenackers M, Mergaert J, Verdonck L and Swings J (1998) Phylogenetic position of phytopathogens within the Enterobacteriaceae. Systematic and Applied Microbiology 21:384-397.
11. Jamalzadeh A, Shams-Bakhsh M and Rahimian H (2009) Occurrence and distribution of shallow bark canker of walnut trees in Northern provinces of Iran. Journal of Plant Production 2:16.
12. Keshavarzi M (2011) Walnut diseases in Iran, diagnosis and management. Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Karaj, Iran, 135 p. (In Persian).
13. Lopez MM, Marti R, Morente C, Oreliana N, Ninot T and Aleta N (1994) Phytopathogenic bacteria identified in walnut in Spain. Investigacion Agraria, Produccion y Proteccion Vegetale Fuera de Serie 2:307-314.
14. Loreti S, Gallelli A, Piccirilloand P and Belisario A (2006) Bacterial Bark canker on English walnut. 5th International Walnut Symposium, Sorrento, Italy, pp. 433- 436.
15. McClean AE and Kluepfel DA (2009) Genetic loci involved in rubrifacine production in the walnut pathogen *Brenneria rubrifaciens*. Phytopathology 99:145-151.
16. Menard M, Delort F, Baudry A and Le Saux M (2004) First report of bacterial canker of walnut caused by *Brenneria nigrifluens* in France. Plant Disease 88:220.
17. Morone C, Janse JD and Scortichini M (1998) Bark canker of Persian walnut (*Juglans regia*) tree incited by *Erwinia nigrifluens* in Italy. Journal of Phytopathology 146:637-639.

18. Popovic T, Ivanovic Z, Zivkovic S, Trkulja N and Ignjatov M (2013) First report of *Brenneria nigrifluens* as the causal agent of shallow-bark canker on walnut trees (*Juglans regia*) in Serbia. Plant Disease 97:1504
19. Rahimian H (1989) Bactrial canker of walnut trees in Sari. Proceedings of 9th Congress of Plant Protection, Mashhad, Iran, p.150. (In Persian with English Abstract)
20. Rahimian H. 1368. Bacterial bark canker disease of walnut in Sari. 9th Iranian Plant Protection Congress, Ferdowsi University of Mashhad, p.150.
21. Saccardi A, Bonetti V, Melegatti A and Cristanini M (1998) Occurrence of *Erwinia nigrifluens* on English walnut (*Juglans regia*) tree in the Veneto region (Northern Italy). Journal of Plant Pathology 80:63-65.
22. Scortichini M (1999) Rinvenimento di *Erwinia nigrifluens* su noce da legno nel Lazio. Informatore Fitopatologico 49:52-54.
23. Taghipour M, Rahimian H and Babaizad V (2015) Genetic diversity of strains of *Acidovorax oryzae* causal agent of brown stripe of rice in Mazandaran province. Iranian Journal of Plant Pathology 51:11-25. (In Persian with English Abstract).
24. Teviotdale BL and Panopoulos N (1994) Development of a polymerase chain reaction (PCR) protocol to detect the deep bark canker pathogen, *Erwinia rubrifaciens*, in walnut tissue. Walnut Research Reports P: 279.
25. Thapa SP, Lim CK, Kim SK, Cho JM, Hur JH and Park DH (2010) Direct detection of *Brenneria rubrifaciens* by polymerase chain reaction (PCR-based assay) using rubrifacine synthetic gene. African Journal of Microbiology Research 4:1754-1757.
26. Vegh A, Toth A, Zambo A, Borsos G and Palkovics L (2014) First Report of Bacterial Bark Canker of Walnut Caused by *Brenneria nigrifluens* in Hungary. Plant Disease 98:988.
27. Wilson EE, Starr MP and Berger JA (1957) Bark canker, a bacterial disease of the Persian walnut tree. Phytopathology 47:669-673.
28. Yousefi Kopaei F, Taghavi M and Banihashemi Z (2007) Occurrence of shallow bark canker of walnut (*Juglans regia*) in southern provinces of Iran. Pakistan Journal of Biological Sciences 10:1507-1512.

دانش بیماری‌شناسی گیاهی (شاپای ا: ۶۲۹۰-۲۵۸۸، شاپای چ: ۹۲۷۰-۲۲۵۱)
سال هشتم، جلد ۲، بهار و تابستان ۱۳۹۸
Plant Pathology Science (eISSN:2588-6290, pISSN:2251-9270)
Vol. 8(2), 2019

Review Article

Blight Disease of Chickpea

SEYED HOSSEIN VAFAEI✉
Department of Plant Pathology, Khorramabad Branch,
Islamic Azad University, Khorramabad, Lorestan, Iran.

Received: 12.01.2019 Accepted: 29.05.2019

Vafaei S H (2019) Blight disease of chickpea. Plant Pathology Science 8(2):45-57. DOI: 10.2982/PPS.8.2.45

Abstract

Blight disease caused by *Mycosphaerella rabiei* is the major constraint for chickpea production worldwide. Pathogenicity of pathogen and the analysis of its genetic diversity in pathogen population are necessary for management of the disease. Different strategies such as seed treatment, application of resistant cultivars, adjustment sowing date and integration of resistant genotype with post-infection application of fungicides have been recommended to reduce the losses caused by the disease. The use of resistant cultivars is the best management strategy to minimize yield losses due to blight. But because of the considerable variation in pathogenicity of the fungal population and partial resistance in germplasm of chickpea the effectiveness of resistant cultivars is limited. Different aspects of the biology, pathogenic and genetic diversity, resistance inheritance and the management options are discussed in this paper.

Key words: Blight, Chickpea, Fungicide, Seed treatment, *Mycosphaerella*

✉ Vafaei_h1353@yahoo.com

مقاله مروری

بیماری سوختگی نخود

سید حسین وفائی✉
گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد خرم آباد

دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۲۲ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۳/۰۸

وفائی س ح (۱۳۹۸) بیماری سوختگی نخود. ۸(۲): ۵۷-۴۵. DOI: 10.2982/PPS.8.2.45

چکیده

بیماری سوختگی ناشی از *Mycosphaerella rabiei* مهمترین عامل محدودکننده تولید نخود در دنیا است. بررسی جمعیت قارچ از نظر بیماریزایی و ژنتیکی برای مدیریت بیماری ضروری می‌باشد. راهبردهای مختلفی از قبیل تیمار بذر با قارچکش‌ها، استفاده از رقمها مقاوم، تنظیم تاریخ کاشت و تلفیق مقاومت با کاربرد قارچکش‌ها پس از آلودگی برای مدیریت این بیماری توصیه شده است. استفاده از رقم‌های مقاوم بهترین ساز و کار مدیریتی جهت کاهش خسارت ناشی از سوختگی است ولی اثربخشی رقم‌های مقاوم به دلیل مقاومت ناقص ژرم پلاسم نخود و تغییرپذیری بیماریزایی جمعیت بیمارگر دارای محدودیت می‌باشد. در این مقاله زیست‌شناسی، تنوع بیماریزایی و ژنتیکی بیمارگر، توارث مقاومت در میزبان و مدیریت بیماری بیان شده است.

واژگان کلیدی: سوختگی، نخود، قارچکش، تیمار بذر، *Mycosphaerella*

مقدمه

بیماری سوختگی (Blight) در میان تنش‌های زیستی محصول نخود، مهم‌ترین عامل محدودکننده تولید نخود در بیشتر مناطق دنیا از جمله غرب آسیا، شمال آفریقا، جنوب و غرب اروپا، شبه قاره هند و برخی نواحی آمریکای شمالی و جنوبی است. بیماری اولین بار از شمال غربی ایالت‌های مرزی هندوستان گزارش شده است (Pande *et al*. 2005). این بیماری تاکنون در بیش از ۴۰ کشور از ۶ قاره گزارش شده است (Pande *et al*. 2013). اولین گزارش این بیماری در ایران منسوب به زالپور در سال ۱۳۴۲ از مزرعه‌های قزوین می‌باشد (Pouralibaba *et al*. 2008). وقوع بیماری در بیشتر استان‌های شمالی، شمال غرب، مرکز و جنوب غرب ایران گزارش شده‌است (Shokouhifar *et al*. 2006, Naghed *et al*. 2016). نشانه‌های بیماری روی تمام بخش‌های هوایی گیاه ظاهر می‌شود (شکل ۱).

شکل ۱. نشانه‌های بیماری سوختگی روی اندام‌های مختلف گیاه نخود (اصلی)

Figure 1. Symptoms of blight disease on different organs of chickpea (Original).

✉ Vafaei_h1353@yahoo.com

۱-عامل بیماری

قارچ عامل بیماری *Mycosphaerella rabiei* Kovatsch. ex Gruyter است. تولیدمثل غیرجنسی بیمارگر با پیکنیدیوم‌های کروی تا گلابی شکل به قطر ۶۵ تا ۲۵۴ میکرومتر با یک روزنه و در محیط کشت غذایی یا بافت گیاهی به صورت فرو رفته، به رنگ روشن تا قهوه‌ای است. کنیدیوم‌ها تخم‌مرغی تا مستطیلی شکل، مستقیم تا کمی خمیده در یک یا دو انتها، شفاف، به اندازه ۵/۴- ۴/۲×۱۰-۸/۲ میکرومتر می‌باشند. اندازه آنها روی میزبان ۵/۶-۳/۴×۱۲-۶ میکرومتر و در روی محیط غذایی مصنوعی ۵/۲-۳/۲×۱۴-۴/۸ میکرومتر گزارش شده‌است (Singh *et al*. 1997). تولیدمثل‌جنسی یا آسکوکارپ‌های بیمارگر اولین‌بار از روی بقایای غلاف نخود در کشور بلغارستان (Kovachevski 1936) و سپس از روسیه، یونان، مجارستان، ایران، سوریه، ترکیه و ایالات متحده امریکا گزارش شده است (Gan *et al*. 2006). آسکوستروما‌ی بزرگ قارچ با لایه منظم آسک‌های غیر انعطاف‌پذیر، وجود پارافیز کاذب و ساختار آسکوسپورها شناخته می‌شود (Wilson and Kaiser 1995). قارچ برای تولید مثل جنسی به دو تیپ سازگار (Mating Type) MAT1-1 وMAT1-2 نیاز دارد. سودوتسیوم‌ها قهوه‌ای تیره تا سیاه رنگ، بطور تقریبی کروی و ۱۲۰ تا ۲۷۰ میکرومتر قطر با یک روزنه نامشخص دارند. آسک‌ها استوانه‌ای تا نسبتاً چماقی، دو جداره به ابعاد ۱۲-۱۰×۸۰-۵۰ میکرومتر و دارای ۸ آسکوسپور بی‌رنگ دو سلولی به ابعاد ۷-۴/۵ ×۱۶-۹/۵ میکرومتر هستند. پیکنیدیوم‌ها و سودوتسیوم‌ها به‌طور معمول به‌صورت توأم در بقایای بوته‌های بیمار زمستان‌گذرانی می‌کنند، در حالی که تعداد پیکنیدیوم‌ها به مراتب بیشتر از سودوتسیوم‌ها است (Wilson and Kaiser 1995).

۲-چرخه بیماری

قارچ عامل بیماری بذرزاد بوده و یا در بقایای بوته‌های بیمار زمستان‌گذرانی می‌کند. زمستان‌گذرانی روی بقایای گیاهی اصلی‌ترین منبع زادمایه (Inoculum) برای شروع بیماری در فصل بعد است. آسکوسپورها از روی بقایای گیاهی در اواخر اسفندماه و طی فصل بهار آزاد می‌شوند و در شرایط رطوبتی مناسب به‌همراه باد تا چندین کیلومتر (حداکثر ۱۵ کیلومتر) طی مسافت، موجب شیوع بیماری می‌شوند. گسترش آلودگی توسط بارندگی، ماشین‌آلات کشاورزی و بذر آلوده نیز گزارش شده‌است. قارچ می‌تواند در دمای ۳۵-۱۰ ^{o}C ، به مدت ۸ ماه در بقایای گیاهی (غلاف و برگ)، ۲۰ ماه روی ساقه آلوده و ۵ ماه روی سطح بذر نخود زنده بماند. در نگهداری بقایای آلوده در دمای ۴ ^{o}C، بقای قارچ به مدت بیش از ۵ سال با توانایی ایجاد بیماری گزارش شده‌است (Gan *et al*. 2006). خسارت بیماری در دمای بین ۲۵-۱۵ ^{o}C با دمای بهینه ۲۰ ^{o}C و رطوبت بالا (۷۵درصد<) شدید است (Pande *et al*. 2005).

۳-تنوع بیماریزایی بیمارگر

با توجه به اینکه تولید رقم‌های مقاوم با مقاومت چندژنی مؤثرترین و اقتصادی‌ترین روش مدیریت این بیماری است لذا پیش نیاز موفقیت در مدیریت، بررسی تنوع بیماریزایی جمعیت این قارچ است. احتمال وجود نژادهای مختلف بیمارگر به دلیل تغییر در برهمکنش‌های بین میزبان-بیمارگر همیشه مورد پژوهش بوده‌است. قارچ عامل بیماری هتروتال است و ممکن است هردو تیپ آمیزشی برای امکان پذیرشدن تولیدمثل جنسی به طور هم‌زمان در همه مناطق وجود نداشته‌باشند. گزارش وقوع مرحله جنسی در برخی مناطق علیرغم عدم وجود هر دو تیپ آمیزشی، احتمال سازگاری هموتالیک را تقویت می‌کند که می‌تواند باعث ایجاد تنوع گردد (Pande *et al*. 2005). تفاوت بیماریزایی جدایه‌ها با مطالعه شدت بیماریزایی آنها روی گروهی از ژنوتیپ‌های افتراق نخود مشخص می‌شود (شکل ۲). با گزارش چند نژاد، اولین گزارش از تنوع بیماریزایی بیمارگر از هندوستان ارائه شده‌است (Vir and Grewal 1974). امروزه به دلیل حجم بالای کارهای انجام شده در این مورد، اطلاعات مفید و مناسبی از پراکنش و تنوع جدایه‌های قارچ عامل بیماری سوختگی نخود در دسترس است (جدول ۱). چالش اساسی به اختلاف در نتایج این پژوهشهای مربوط می‌شود که به‌دلیل در دسترس نبودن روش‌های یکنواخت برای تعیین نژاد، استفاده از روش بررسی متفاوت و عدم وجود اطلاعات کافی در مورد

شکل ۲. شدت بیماریزایی یک جدایه از قارچ عامل سوختگی روی سه رقم افتراق نخود (اصلی)

Figure 2. Disease severity of one isolate of blight agent on three chickpea differential lines.

برهمکنش بین بیمارگر و میزبان، در مورد معرفی نژاد در این قارچ اتفاق نظر وجود ندارد و محققین برای بیان نتایج از واژه‌های مختلفی (نژاد، پاتوتیپ فرم یا گروه بیماریزا) جهت تعریف تفاوت سطح بیماریزایی استفاده کرده‌اند. مطالعه تنوع جمعیت قارچ با استفاده از مارکرهای مولکولی جهت حمایت از وجود تنوع در بین جدایه‌های قارچ نیز انجام شده‌است (جدول ۲) اما در همه این پژوهشها ارتباطی بین مارکرهای مولکولی مورد مطالعه و تفاوت بیماریزایی قارچ به دست نیامده‌است. در بیشتر این پژوهشها تغییرپذیری بیماریزایی در جمعیت‌های قارچ را دلایلی از قبیل: ۱- انتقال مواد آلوده گیاهی (بذر و بقایا) بین مناطق مختلف، ۲- وقوع تولید مثل جنسی در چرخه زندگی قارچ و ایجاد نوترکیبی جدید، ۳- بقای قارچ روی میزبان‌هایی غیر از نخود و پایداری قارچ روی این میزبان‌ها در غیاب میزبان اصلی، ۴- فشار انتخابی بوسیله کولتیوارهای مقاوم و اصلاح شده، ذکر کرده‌اند (Atik *et al*. 2013).

جدول ۱. خلاصه پژوهشهای بررسی تنوع بیماریزایی قارچ *Mycosphaerella rabiei*

Table 1. Summery of pathogenic diversity studies of *Mycosphaerella rabiei*

کشور Country	تعداد جدایه No. Isolate	نژاد/پاتوتیپ Race/ Pathotype	منبع Reference
India	268	2 race	Vir and Grewal 1974
Syria, Lebanon	50	6 race	Reddy and Kabbabeh 1985
USA	39	11 virulent form	Jan and Wiese 1991
Italy	41	2 pathogenic group	Porta-Puglia *et al*. 1996
Syria, Lebanon	52	3 race	Udupa *et al.* 1998
Most of Countries	44	11 pathogenic group	Navas-Cortes *et al.* 1998
Most of Countries	58	14 pathogenic group	Chongo *et al.* 2004
Canada	64	25 pathotype	Ahmed *et al.* 2007
Canada	100	-------	Vail and Banniza 2008
Pakistan	10	9 pathogenic group	Ali *et al*. 2009
Iran	100	8 virulent form	Noorollahi *et al*. 2000
Iran	26	6 pathotype	Shokoohifar *et al*. 2003
Turkey	64	6 race	Turkkan and Dolar 2009
Australia	24	-	Elliott *et al.* 2011
Syria	133	4 pathotype	Atik *et al*. 2013
Iran	40	6 pathogenic group	Vafaei *et al*. 2016

جدول ۲. خلاصه پژوهشهای بررسی تنوع ژنتیکی قارچ *Mycosphaerella rabiei* با استفاده از مارکرهای مولکولی

Table 2. Summery of molecular markers used for genetic diversity studies in *Mycosphaerella rebiei*

کشور Country	تعداد جدایه No. Isolate	مارکر مولکولی Molecular Marker	منبع Reference
Most of Countries	48	RAPD	Navas-Cortes *et al.* 1998
Most of Countries	47	RAPD	Santra *et al.* 2001
Australia	-	STMS fingerprinting	Phan *et al.* 2003
Most of Countries	68	RAPD	Chongo *et al.* 2004
Turkey	64	SSR	Bayraktar *et al*. 2007
Canada	58	RAPD	Chang *et al*. 2008
Tunisia	114	SSR	Rhaiem *et al*. 2008
Iran	103	SSR	Nourollahi *et al*. 2011
Pakistan, Syria	24	URP	Ali *et al.* 2013
Syria	133	SSR	Atik *et al*., 2013
India	25	SSR	Baite *et al.* 2017
Iran	56	RAPD	Hosseinzadeh Kolagar and Barzegar 2008
Iran	30	RAPD	Ghiai *et al*. 2011
Iran	53	SSR	Rahimi *et al*. 2013

۴-مدیریت بیماری

۴-۱-عملیات زراعی

بقایای بوته‌های سوخته نخود عامل اصلی تولید زادمایه بیماری در فصل بعد می‌باشد، حتی با کاربرد بذر سالم و ضد عفونی شده، اگر بقایای سال قبل وجود داشته باشد نمی توان به عدم وقوع بیماری اطمینان داشت (Gan *et al*. 2006). در صورتی که بقایا با روش‌های معمول شخم دفن شوند، مدت زمان بقای بیمارگر می‌تواند به یک‌سال کاهش یابد در حالی‌که دوام عامل بیماری در بقایای موجود در سطح خاک (دفن نشده) بیش از دو سال گزارش شده است. دفن بقایا از تشکیل مرحله جنسی قارچ جلوگیری می‌نماید و در نتیجه امکان گسترش به دوردست و توسعه همه‌گیری را کاهش می‌دهد (Gan *et al*. 2006). مطالعه‌ای در کشور کانادا نشان داد که شدت سوختگی نخود در رقم حساس با تناوب زراعی یک‌ساله بین دو کشت نخود ۸۱درصد بود در حالی‌که این میزان هنگامی‌که تناوب زراعی سه‌ساله بین دو کشت نخود برقرار باشد به ۱۵٪ کاهش یافت (Gan *et al*. 2006).

راهبرد کاشت گیاه در یک مزرعه، به‌دلیل تأثیر روی ساختار تاج پوشه گیاه (Canopy architecture)، شرایط اقلیمی حاکم بر مزرعه از جمله رطوبت نسبی، خیس بودن سطح برگ، دمای گیاه و گردش هوای داخل مزرعه را تحت تأثیر قرار می‌دهد. در جنوب اسپانیا با عقب انداختن تاریخ کاشت از همزمانی محصول با دوره حداکثر ظهور اسپور اجتناب گردید (Gan *et al*. 2006). اثر تاریخ کاشت برروی شدت بیماری سوختگی در کشورهایی مثل ترکیه، تونس، استرالیا، لبنان و سوریه بررسی شد و نتایج نشان داد که تأخیر در تاریخ کاشت

باعث کاهش شدت بیماری می‌شود (Lobna Ben *et al*. 2010). گسترش بیماری به‌صورت شدید بیشتر در زمستان در نواحی مدیترانه‌ای رخ می‌دهد. به منظور اجتناب از بیماری کشاورزان اقدام به تأخیر در کاشت نخود می‌کنند که ممکن است به دلیل برخورد دوره گلدهی به گرما و خشکی، در عملکرد دانه تأثیر داشته‌باشد در حالی‌که در کاشت زمستانه نسبت به بهاره عملکرد محصول بهتر و حتی تا دو برابر نیز قابل دسترس است (Lopez-Bellido *et al*. 2008). کاشت نخود در عمق ۲۰cm-۵ خاک، تولید هیپوکوتیل بلند و قوی می‌کند که گیاهچه نخود را تا زمان خروج از خاک، از خسارت علف‌کشها محافظت می‌کند. همچنین کاشت بذرهای نخود آلوده به سوختگی در عمق بیشتر از ۱۵ سانتی متر خاک، وقوع آلودگی روی بخش‌های بالایی را به طور معنی‌داری کاهش داده‌است. بنابراین کشت عمیق بذور می‌تواند به عنوان یکی از اجزای برنامه مدیریت تلفیقی به کار گرفته‌شود اگرچه ممکن است باعث عدم رشد برخی گیاهان و کاهش تراکم محصول شود (Gan *et al*. 2006). قارچ عامل بیماری در دمای ۳۵ درجه سلسیوس به مدت ۲ سال و در دمای ۵-۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ سال قادر به بقا روی بذر آلوده است (Gan *et al*. 2006).

۴-۲- شناسایی و کشت رقم‌های مقاوم

دسترسی به دانش مربوط به تعداد، طبیعت و تفرق ژن‌های مقاومت پیش نیاز اصلاح نباتات موفق است. بر همین اساس گزارش‌های زیادی در مورد پایه و اساس ژنتیکی مقاومت به سوختگی در ژنوتیپ‌های نخود وجود دارد. اولین آنالیز ژنتیکی در سال ۱۹۵۲ نشان داد که مقاومت بوسیله دو ژن غالب کنترل می‌شود. پژوهشهای بعدی نشان داد که مقاومت در نخودهای دسی به‌وسیله یک ژن منفرد غالب کنترل می‌شود (Hafiz and Ashraf 1953). بدنبال آن فرضیه یک ژن غالب و یک ژن مغلوب در پژوهشهای متعددی حمایت شده‌است. پژوهشهای اخیر، توارث پذیری مقاومت بصورت کمی و دخالت ژن‌های متعددی را نشان داده‌اند (Hamwieh *et al*. 2013, Labdi *et al*. 2013, Li *et al*. 2017,Bhardwaj *et al*. 2010). طبیعت پیچیده مقاومت در گیاه میزبان، اطلاعات ناقص مربوط به ژنتیک، ژنومیکس و بیوتکنولوژی حبوب و دانش محدود مربوط به زیست‌شناسی و برهمکنش‌های میزبان و عامل بیماری، موجب شده‌است که اصلاح مقاومت برای معرفی رقمها به بیماری از پیشرفت کندی برخوردار باشد (Rubiales and Fondevilla 2015).

توسعه ژنوتیپ‌های مقاوم این امکان را ایجاد کرده‌است که محصول در طول زمستان کاشته شود تا بدین وسیله پتانسیل عملکرد نخود افزایش یابد. اولین گزارش از مقاومت به سوختگی در اوایل ۱۹۳۰ میلادی در هند بود که اولین کولتیوار مقاوم معرفی شد. گزارشات بعدی ۳ کولتیوار مقاوم دیگر به سوختگی را معرفی کرد (Singh and Reddy 1990). اکنون پژوهشهای غربالگری ژنوتیپ‌های نخود جهت گزینش منابع مقاومت جزو اصلی برنامه مدیریت بیماری سوختگی است. چالش اساسی در برنامه‌های غربالگری با وجود حجم زیاد نمونه‌های بررسی شده، فراوانی پایین نمونه‌های مقاوم و متحمل در مقایسه با تعداد کل نمونه بررسی شده‌است (جدول شماره ۳). علاوه بر این، چالش‌هایی از قبیل: ۱- فقدان ژن مؤثر با مقاومت کامل در خزانه ژنی نخود، ۲- اساس ژنتیکی پیچده مقاومت که به وسیله چندین QTL کنترل می‌شود و ۳- ظهور پاتوتیپ یا نژادهای جدید قارچ به دلیل نوترکیبی در اثر وقوع تولید مثل جنسی در چرخه زندگی قارچ، توسعه واریته‌های نخود با سطوح بالای مقاومت را مشکل کرده‌است (Rubiales and Fondevilla 2015).

۴-۳- مبارزه شیمیایی

به دلیل عدم وجود رقمهای با سطح بالای مقاومت در کشت و کار محصول نخود، ضدعفونی بذر و پاشش قارچکش ها روی اندام های گیاه بخش مهمی از مدیریت بیماری است. گزارش‌های متعددی از کاربرد و تأثیر قارچکش‌های مختلف در مدیریت بیماری سوختگی نخود وجود دارد (جدول‌های ۴ و ۵). کارایی قارچکش به استفاده همزمان (ترکیبی) از قارچکش‌ها، مکانیسم عمل قارچکش و سطح مقاومت میزبان نیز بستگی دارد. بطور مثال استفاده از ترکیب کلروتالونیل (تماسی) با آزوکسی‌استروبین (جذبی) و آزوکسی‌استروبین با دیفنوکونازول

جدول ۳. یافته‌های غربالگری ژرم پلاسم‌های نخود جهت انتخاب رقمهای مقاوم به بیماری سوختگی

Table 3. The results of Screening Chickpea germ plasm for selection resistant accessions to blight disease of chickpea

مکان غربالگری Location	تعداد ژنوتیپ غربالگری شده No. Genotype	تعداد ژنوتیپ مقاوم No. Resistance	منبع Reference
Turkey	41	7	Toker and Canci 2003
USA	48	3	Chen *et al.* 2004
ICARDA	25000	14	Pande *et al*. 2005
Canada	19	2	Ahmed *et al.* 2007
ICRISAT	424	29	Pande *et al.* 2013
Kenia	36	7	Kimurto *et al.* 2013
Pakistan	48	10	Ahmad *et al.* 2013
Iran	517	9	Shokouhifar *et al*. 2006
Iran	50	11	Alipour *et al*. 2015
Iran	210	10	Vafaei *et al*. 2017

(جذبی) کارآیی مهار بیماری را تا ۳۰درصد بهبود داده‌است (Ejeta *et al.* 2017). کاربرد قارچکش‌های تماسی روی رقمهای حساس در همه‌گیری (Epidemy) متوسط بیماری تا ۸۰درصد، و در همه‌گیری شدید بیماری کمتر از ۲۰درصد کارآیی داشته‌است (Sharma *et al.* 2011). در صورت استفاده از قارچکش‌های آزوکسی‌استروبین و پیراکلواستروبین در زمان همه‌گیری شدید بیماری تا حداکثر ۵۰درصد کاهش شدت بیماری با ۳ تا ۴ بار پاشش قارچ‌کش در طول دوره همه‌گیری گزارش شده‌است (Chang *et al*. 2007)، ولی باید مراقب افزایش ریسک بروز مقاومت در برخی جدایه‌های بیمارگر به‌این قارچکش‌ها بود (Wise *et al*. 2009).

جدول ۴. نتایج تیمار بذر با استفاده از سمهای شیمیایی در مدیریت سوختگی نخود

Table 4. Chemical seed treatment used for management of blight in chickpea (Gan *et al*. 2006, Kiersten *et al*. 2011, Harveson and Urrea 2017)

نام ماده شیمیایی Chemical compound	کارایی Efficacy	مکان Location
Copper compound	Poor ضعیف	India
Thiram	Good خوب	India
Benomyl	Very good خیلی خوب	India
Maneb	Excellent عالی	ICARDA
Benomyl+Thiram	Excellent عالی	Turkey
Tridemorph+Maneb	Excellent عالی	India
Thiabendazol	Excellent عالی	ICARDA
Ipconazole, Thiabendazole	Good خوب	USA
Thiabendazole	Good خوب	USA

جدول ۵. نتایج کاربرد قارچکش‌ها روی گیاه در مبارزه با بیماری سوختگی نخود در نواحی مختلف دنیا

Table 5. Fungicides used for foliar applications in control of blight disease of chickpea in different areas of the world (Gan *et al*. 2006, Shtienberg *et al*. 2006, Armstrong-Cho *et al*. 2008, Harveson and Urrea 2017, Ejeta *et al*. 2017)

ترکیب شیمیایی Chemical compound	کشور Country	کارایی Efficacy
Chlorothalonil	Many country	عالیExcellent
Azoxystrobin, Pyraclostrobin	Canada	عالیExcellent
Mancozeb	Canada, Pakistan	ضعیف Poor
Mancozeb	Australia	خوب Good
Mancozeb	Iran	خوب Good
Tebuconazole	Palestine	خیلی خوب Very Good
Tebuconazole	Canada	ضعیفPoor
Thiabendazole	Egypt	خوب Good
Thiabendazole	Pakistan	عالی Excellent
Carbendazim	Iran	خیلی خوب Very Good
Carbendazim	India	خوب Good
Carbendazim	Australia, India	ضعیف Poor
Zineb	India	عالی Excellent
Prothioconazole, Thiabendazole	USA	خوب Good
Mancozeb, Top*	Turkey, Ethiopia	خوب Good

*Azoxysrobin+ Difenoconazole

۴-۴-مدیریت تلفیقی بیماری

با توجه به چرخه بیماری سوختگی نخود و عدم وجود رقمهای با مقاومت کامل، بیماری با یک روش خاص به تنهایی قابل مدیریت نیست. اغلب تلفیقی از چند روش مناسب جهت کاهش خسارت بیماری موفق گزارش شده‌است (Akem *et al*. 2004). در استرالیا تلفیقی از کاربرد قارچکش‌ها و رقمهای نسبتاً مقاوم، باعث کاهش معنی‌دار بیماری گردیده است (Bretage *et al*. 2008). بر اساس پژوهشهای انجام‌شده تلفیقی از ضدعفونی بذر، تغییر تاریخ کاشت، محلول‌پاشی با قارچکش‌ها و کاشت واریته مقاوم بهترین روش مدیریت این بیماری گزارش شده‌است (Davidson and Kimber 2007). همچنین کاربرد قارچکش‌ها روی رقمهای با سطح مقاومت نسبی در همه‌گیری متوسط بیماری تا ۹۵درصد و در همه‌گیری شدید بیماری تا ۶۵درصد کارآیی داشته‌است. در رقمهای با سطح مقاومت بالا، کاربرد قارچکش‌ها توصیه نمی‌شود (Shtienberg *et al*. 2006). در سوریه مدیریت تلفیقی بیماری سوختگی نخود با تلفیقی از کولتیوارهای مقاوم، تیمار بذر (ضدعفونی) و تنظیم تاریخ کاشت مورد بررسی قرار گرفت و یافته‌ها نشان داد که تغییر تاریخ کاشت و مقاومت میزبان اثر معنی‌داری بر شدت بیماری دارند ولی تیمار بذر اثر معنی‌داری نشان نداد (Akem *et al*. 2004). به نظر می‌رسد که به دلیل وجود مقاومت ناقص در خزانه ژنی نخود تا زمان معرفی رقم مقاوم، تلفیق مقاومت‌های نسبی با استفاده از قارچکش‌ها ضروری باشد (Sharma *et al*. 2011).

نتیجه‌گیری

بیماری سوختگی نخود مهمترین عامل محدودیت کشت و کار نخود در دنیا است. پیشرفت‌های چشم‌گیری در طی دهه‌های اخیر در زمینه آسیب‌شناسی و زیست‌شناسی بیمارگر، بررسی تغییرات بیماریزایی جمعیت قارچ، ژنتیک مقاومت میزبان و روش‌های مدیریتی حاصل شده است. خسارت بیماری با استفاده از کولتیوارهای با مقاومت نسبی همراه با سایر روش‌ها از جمله ضدعفونی بذر، تناوب زراعی و کاربرد قارچکش‌ها مخصوصاً در

شرایط محیطی خنک و مرطوب قابل کاهش است. همچنین دیده‌بانی مداوم بر تغییرات بیماریزایی جمعیت بیمارگر در مناطق مختلف و غربالگری پیوسته ژرم‌پلاسم‌های نخود جهت معرفی منابع جدید مقاومت و استفاده از این منابع در برنامه به‌نژادی نخود مهم خواهد بود.

References **منابع**

1. Ahmad S, Khan MA, Sahi ST and Ahmad R (2013) Evaluation of Chickpea Germplasm against *Ascochyta rabiei* (Pass) Lab. Journal of Animal and Plant Sciences 23:440-443.
2. Ahmed HU, Chang KF, Hwang SF, Strelkov SE, Bing DJ and Turnbull GD (2007) Pathogenic diversity of *Didymella rabiei* isolates from southern Alberta, Canada. Journal of Plant Disease and Protection 114:189-195.
3. Akem CN, Kabbabeh S and Ahmed S (2004) Integrating Cultivar Resistance and Seed Treatment with Planting Dates to Manage Chickpea Ascochyta Blight. Plant Pathology Journal 3:111-117.
4. Ali SR, Iqbal MSH, Iqbal U, Ghafoor A and Akram A (2009) Pathogenic Diversity in *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. of Chickpea. Pakistan Journal of Botany 41:413-419.
5. Alipour S, Ashrafi J and Kheirgoo M (2015) Evaluation of chickpea lines reaction to Ascochyta blight disease at international nursery. Proceeding of 2th national Conference on Applied Researches in Agriculture Sciences, Tehran, Iran, p.7.
6. Armstrong- Cho C, Wolf T, Chongo G, Gan Y, Hogg T, Lafond G, Johnson E and Banniza S (2008) The effect of carrier volume on ascochyta blight (*Ascochyta rabiei*) control in chickpea. Crop Protection 27:1020–1030.
7. Atik O, Seid A, Mathew MA, Muhammad I, Aladdin H, Michael B, Ahmed EA, Samer M and Mohammad MY (2013) Pathogenic and genetic diversity of *Didymella rabiei* affecting chickpea in Syria. Crop Protection 46:70-79.
8. Baite MS, Dubey SC and Upadhyay BK (2017) Genetic diversity of *Ascochyta rabiei* causing blight of chickpea in India. Research Journal of Biotechnology 12:29-37.
9. Bayraktar H, Dolar FS and Tör M (2007) Determination of genetic diversity within *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. the cause of Ascochyta blight of chickpea in Turkey. Journal of Plant Pathology 89:341-347.
10. Bhardwaj R, Sandhu JS, Kaur L, Gupta SK, Gaur PM and Varshney R (2010) Genetics of ascochyta blight resistance in chickpea. Euphytica 171:337–343.
11. Bretage TW, MacLeod WJ, Kimber RBE, Moore KJ, Knights EJC and Davidson JA (2008) Management of Ascochyta blight in Chickpeas in Australia. Australian Plant Pathology 37:486-497.
12. Chang KF, Ahmed HU, Hwang SF, Gossen BD, Strelkov SE and Turnbull GD (2007) Sensitivity of field populations of *Ascochyta rabiei* to chlorothalonil, mancozeb and pyraclostrobin fungicides and effect of strobilurin fungicides on the progress of ascochyta blight of chickpea. Canadian Journal of Plant Science 87:937-944.

13. Chen W, Coyne CJ, Peever TL and Muehlbaur FJ (2004) Characterization of chickpea differentials for pathogenicity assay of Ascochyta blight and identification of chickpea accessions resistant to *Didymella rabiei*. Plant Pathology 53:759-769.
14. Chongo G, Gossen BD, Buchwaldt L, Adhikari T and Rimmer SR (2004) Genetic diversity of *Ascochyta rabiei* in Canada. Plant Disease 88:4-10.
15. Davidson JA and Kimber RBE (2007) Integrated disease management of Ascochyta blight in pulse crops. European Journal of Plant Pathology 119:99-110.
16. Ejeta A, Selvaraj T, Lencho A and Getanah W (2017) Evaluation of fungicides sprays frequency for the management of chickpea *Ascochyta* blight (*Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab.) in Alemtena, East Showa, Ethiopia. International Journal of Life Sciences 5:527-542
17. Elliott VL, Taylor PWJ and Ford R (2011) Pathogenic variation within the 2009 Australian *Ascochyta rabiei* population and implications for future disease management strategy. Australasian Plant Pathology 40:568–574.
18. Ghiai S, Razavi M and Shahriyari D (2011) Study on Pathogenic and molecular variability in some isolates of *Ascochyta rabiei* causal agent of Ascochyta blight of chickpea in Iran. Entomology and Phytopathology 79:199-218. (In Persian with English Abstract).
19. Gan YT, Siddique KHM, MacLeod WJ and Jayakumar P (2006) Managment options for minimizing the damage by Ascochyta blight (*Ascochyta rabiei*) in chickpea. Field Crops Research 97:121-134.
20. Hafiz A and Ashraf M (1953) Studies on the inheritance of resistance to Mycosphaerella blight in gram. Phytopathology 43:580–581.
21. Hamwieh A, Imtiaz M, Hobson K and Kemal SA (2013) Genetic diversity of microsatellite alleles located at quantitative resistance loci for Ascochyta blight resistance in a global collection of chickpea germplasm. Phytopathologia Mediterranea 52:183−191.
22. Hosseinzadeh Kolagar A and Barzegar A (2008) *Ascochyta rabiei* Genetic Diversity by Using of RAPD Standardization. Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources 15:62-70. (In Persian with English Abstract).
23. Harveson RM and Urrea CA (2017) Ascochyta Blight of Chickpeas in Nebraska. Life Sciences 5:527-542.
24. Jan H and Wiese MW (1991) Virulence forms of *Ascochyta rabiei* affecting chickpea in the Palouse. Plant Disease 75:904-906.
25. Kiersten AW, Carl AB, Samuel M, Julie P, Javier AD, Rubella SG and Neil CG (2011) Sensitivity of Ascochyta rabiei populations to prothioconazole and thiabendazole. Crop Protection 3:1000-1005.
26. Kimurto PK, Towetti BK, Mulwa RS, Njogui N, Jeptanui L, Gangarao NVPR, Silim S, Kaloki P, Korir P and Macharia J. K (2013) Evaluation of chickpea genotypes for resistance to Ascochyta blight (*Ascochyta rabiei*) disease in the dry highlands of Kenya. Phytopathologia Mediterranea 52:212−221.

27.Kovachevski IC (1936) The blight of Chickpea, *Mycosphearella rabiei*. Applied Mycology 15:700-701.
28.Labdi M, Malhotra R, Benzohra I and Imtiaz M (2013) Inheritance of resistance to *Ascochyta rabiei* in 15 chickpea germplasm accessions. Plant Breeding 132:197–199.
29.Li Y, Ruperao P, Batley J, Edwards D, Davidson J, Hobson K and Sutton T (2017) Genome Analysis Identified Novel Candidate Genes for Ascochyta Blight Resistance in Chickpea Using Whole Genome Re-sequencing Data. Frontiers in Plant Science 8:1-13.
30.Lobna Ben M, Cherif M, Harrabi M, Galbraith R F and Strange R N (2010) Effects of sowing date on severity of blight caused by Ascochyta rabiei and yield components of five chickpea cultivars grown under two climatic conditions in Tunisia. European Journal of Plant Pathology 126:293–303.
31.Lopez- Bellido FJ, Lopez-Bellido RJ, Khalil SK and Lopez-Bellido L (2008) Effect of planting date on winter kabuli chickpea growth and yield under rainfed Mediterranean conditions. Agronomy Journal 100:957-964.
32. Naghed N, Sadravi M and Kazemi S (2016) Biological control of chickpea blight with some isolates of three species of *Trichoderma* . Biological Control of Pests and Plant Diseases 5(1): 123-127. (In Persian with English abstract)
33.Navas-Cortes JA, Perez-Artes E, Jimenez-Diaz RM, Lobell A, Bainbridge BW and Heale JB (1998) Mating Type, Pathotype and RAPDs Analysis in *Didymella rabiei*, the Agent of Ascochyta Blight of Chickpea. Phytoparasitica 26:199-212.
34.Noorollahi K, Falahati Rastegar M and Jafarpour B (2000) Identification of Physiology Races of *Ascochyta rabiei* of the cause of Ascochyta Blight in a few Regions of Iran. Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources 4:127-136. (In Persian with English Abstract).
35.Nourollahi K, Javannikkhah M, Naghavi MR, Lichtenzveig J, Okhovat SM, Oliver RP and Ellwood SR (2011) Genetic diversity and population structure of *Ascochyta rabiei* from the western Iranian Ilam and Kermanshah provinces using MAT and SSR markers. Mycological Progress 10:1–7.
36.Pande S, Siddique KHM, Kishor GK, Bayaa B, Gaur PM, Gowda CLL, Bretag TW and Crouch JH (2005) Ascichyta blight of chickpea (*Cicer arietinum* L.): a review of biology, pathogenecity, and disease management. Australian Journal of Agricultural Research 56:317–332.
37.Pande S, Sharma M, Gaur PM, Basandrai AK, Kaur L, Hooda KS, Basandrai D, Kiran BT, Jain SK and Rathore A (2013) Biplot analysis of genotype × environment interactions and identification of stable sources of resistance to Ascochyta blight in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Australasian Plant Pathology 42:561–571.
38.Phan HTT, Ford R and Taylor PWJ (2003) Population structure of *Ascochyta rabiei* in Australia based on STMS fingerprints. Fungal diversity13:111-129.
39.Porta-Puglia A, Crino P and Mosconi C (1996) Variability in virulence to chickpea of an Italian Population of *Ascochyta rabiei.* Plant Disease 80:39-41.

40. Pouralibaba H, Mahmodi F, Keshavarz K, Nourollahi KH (2008) Identification of pathotypes of *Didymella rabiei* causing agent of chickpea blight disease in different parts of Iran using trap nursery. Iranian Journal of Plant Pathology 44:170-175. (In Persian with English Abstract).
41. Rahimi M, Sabbagh SK, Javan-Nikkhah M, Soltanloo H, Salari M and Panjehkeh N (2013) Study on the genetic diversity of *Ascochyta rabiei* isolates cause of chickpea blight disease in Lorestan Province using SSR marker. Iranian Journal of Plant Protection Science 44:273-282. (In Persian with English Abstract).
42. Rhaiem A, Chérif M, Peever TL and Dyer PS (2008) Population structure and mating system of *Ascochyta rabiei* in Tunisia: evidence for the recent introduction of mating type 2. Plant Pathology 57:540–551.
43. Reddy MV and Kabbabeh S (1985) Pathogenic variability in *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab. In Syria and Lebanon. Phytopathologia Mediterranea 24:265-266.
44. Rubiales D and Fondevilla S (2015) Future prospects for ascochyta blight resistance breeding in cool season food legumes. Frontier Plant Science 3:1-5.
45. Santra DK, Singh G, Kaiser WJ, Gupta VS, Ranjekar PK and Muehlbauer FJ (2001) Molecular analysis of *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. the pathogen of ascochyta blight in chickpea. Theoretical and Applied Genetics 102:676–682.
46. Sharma KD, Sharma V, Singh R and Nayyar H (2011) Control of chickpea blight disease caused by *Didymella rabiei* by mixing resistance inducer and contact fungicide. Crop Protection 30:1519-1522.
47. Shokoohifar F, Bagheri A, Falahati Rastegar M, Malekzadeh S (2003) Pathotyping of *Ascochyta rabiei* isolates in Iran. Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources 10:217-232. (In Persian with English Abstract).
48. Shokouhifar F, Bagheri AR and Fallahati Rastegar M (2006) Identification of resistant chickpea lines against pathotypes causing Ascochyta blight disease in Iran. Iranian Journal of Biology19:29-42. (In Persian with English Abstract).
49. Shtienberg D, Kimber RBE, McMurray L and Davidson JA (2006) Optimisation of the chemical control of ascochyta blight in chickpea. Australasian Plant Pathology 35:715-724.
50. Singh KB and Reddy MV (1990) Patterns of Resistance and Susceptibility to Races of *Ascochyta rabiei* Among Germ Plasm Accessions and Breeding Lines of Chickpea. Plant Disease 74:127-129.
51. Singh PJ, Pal M and Prakash N (1997) Ultrastructural studies of conidiogenesis of *Ascochyta rabiei*, the causal organism of chickpea blight. Phytoparasitica 25:291-304.
52. Toker C and Canci H (2003) Selection of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Genotypes for Resistance to Ascochyta Blight *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. Yield and Yield Criteria. Turkish Journal of Agriculture and Forestry 27: 277-283
53. Turkkan M and Dolar FS (2009) Determination of pathogenic variability of *Didymella rabiei*, the agent of ascochyta blight of chickpea in Turkey. Turkish Journal of Agriculture and Forestry 33:585-591.

54. Udupa SM, Weigand F, Saxena MC and Kahl G (1998) Genotyping with RAPD and microsatellite markers resolves pathotype diversity in the Ascochyta blight pathogen of chickpea. Theoretical Applied Genetics 97:299-307.
55. Vafaei SH, Rezaee S, Abbasi Moghadam A and Zamanizadeh HR (2016) Virulence diversity of *Ascochyta rabiei* the causal agent of Ascochyta blight of chickpea in the western provinces of Iran. Archives of Phytopathology and Plant Protection 48:921–930.
56. Vafaei SH, Rezaee S, Abbasi Moghadam A and Zamanizadeh HR (2017) Screening of Chickpea germ plasms for selection of resistant genotypes to Ascochyta blight. Entomology and Phytopathology 85:97-110. (In Persian with English Abstract).
57. Vail S and Banniza S (2008) Structure and pathogenic variability in *Ascochyta rabiei* populations on chickpea in the Canadian prairies. Plant Pathology 57:665-673.
58. Vir S and Grewal JS (1974) Physiological specialization in *Ascochyta rabiei*, the causal organism of gram blight. Indian Phytopathology 27:265–266.
59. Wilson A and Kaiser W (1995) Cytology and genetics of sexual incompatibility in *Didymella rabiei*. Mycologia 87:795-804.
60. Wise KA, Bradley CA, Pasche JS and Gudmestad NC (2009) Resistance to QoI Fungicides in *Ascochyta rabiei* from Chickpea in the Northern Great Plains. Plant Disease 93:528-536.

دانش بیماری‌شناسی گیاهی (شاپای ا: ۶۲۹۰-۲۵۸۸، شاپای چ: ۹۲۷۰-۲۲۵۱)
سال هشتم، جلد ۲، بهار و تابستان ۱۳۹۸
Plant Pathology Science (eISSN:2588-6290, pISSN:2251-9270)
Vol. 8(2), 2019

Extensional Article

Integrated Management of Diseases Caused by Graminicolous Fungi

SEPIDEH FEKRIKOHAN, REZA MOSTOWFIZADEH-GHALAMFARSA✉
Department of Plant Protection, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran

Received: 07.03.2019 Accepted: 30.07.2019

Fekrikohan S and MostowfizadehGhalamfarsa R (2019) Integrated management of diseases caused by graminicolous fungi. Plant Pathology Science 8(2):58-69. DOI: 10.2982/PPS.8.2.58

Abstract

Wheat is one of the most important cereals grown as human and animal food in the world, including Iran. This crop is infected by various pathogens such as fungi. Graminicolous fungi are important pathogens which cause root and crown rot, leaf blight and black spot on wheat. Some methods, with high efficiency and safety for human and environment, have been employed for controlling these diseases. Since the activity of these fungi depends on some factors such as soil temperature, pH, moisture and nutrients, the proper agricultural practices before planting and suitable irrigation and good fertilization would be effective in pathogen control. Various species of *Trichoderma*, arbuscular endomycorrhizal fungi and some bacterial species may control the disease through some mechanisms such as biofilm production, plant growth promotion and enzyme production. Generally, integrated management with the aid of simultaneous application of several control measures would give the best results.

Key words: Wheat, *Pleosporaceae*, Root rot, leaf spot

✉ Corresponding author: rmostofi@shirazu.ac.ir

مقاله ترویجی

مدیریت تلفیقی بیماری‌های ناشی از قارچ‌های گندمیان‌زی

سپیده فکری‌کهن و رضا مستوفی‌زاده قلمفرسا✉
بخش گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۱۶ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۵/۰۸
فکری کهن س و مستوفی‌زاده‌قلمفرسا ر (۱۳۹۸) مدیریت تلفیقی بیماری‌های ناشی از قارچ‌های گندمیان‌زی. دانش بیماری‌شناسی گیاهی ۸(۲):۶۹-۵۸. DOI: 10.2982/PPS.8.2.58

چکیده

گندم یکی از مهم‌ترین گیاهان زراعی است که به طور گسترده در ایران و جهان برای غذای انسان و دام کشت می‌شود. این محصول توسط عوامل مختلفی از جمله قارچ‌ها مورد حمله قرار می‌گیرد. قارچ‌های گندمیان‌زی بیمارگران مهمی هستند که در گندم پوسیدگی ریشه و طوقه، لکه برگی و نقطه سیاه ایجاد می‌کنند. روش‌هایی با کارایی زیاد و ایمن برای انسان و محیط زیست برای مبارزه با آن‌ها به کار گرفته شده است. از آن‌جا که فعالیت این قارچ‌ها به عواملی مانند دما، اسیدیته، رطوبت و مواد غذایی موجود در خاک بستگی دارد، انجام درست عملیات زراعی قبل از کاشت و آبیاری و کوددهی مناسب، در مهار این عوامل بسیار مؤثر خواهد بود. از طرف دیگر انواعی از گونه‌های *Trichoderma* و قارچ‌ریشه‌های آربوسکولی و برخی باکتری‌ها به روش‌هایی مانند تولید بیوفیلم، افزایش رشد گیاه و تولید آنزیم بیماری را مهار می‌کنند. به طور کلی مبارزه تلفیقی با استفاده از چند روش به طور هم‌زمان بهترین نتیجه را می‌دهد.

واژگان کلیدی: گندم، *Pleosporaceae*، پوسیدگی ریشه، لکه‌برگی

مقدمه

گندم (*Triticum aestivum* L.) از محصولات مهمی است که به طور وسیع در ایران و جهان به دو صورت آبی و دیم کشت می‌شود. این گیاه غذای بیش از یک سوم مردم دنیا را تأمین می‌کند. گندم چه از نظر تولید و چه از نظر تغذیه از سایر گندمیان مهم‌تر است. گیاه گندم در درجه اول برای تغذیه انسان و در درجه دوم برای تغذیه دام و مصارف صنعتی کاربرد دارد. میزان سالانه تولید گندم در ایران ۱۴ میلیون تن است (FAOSTAT 2017). تاکنون بیماری‌های مختلفی شامل زنگ‌ها، سیاهک‌ها، سفیدک پودری، سفیدک کرکی، لکه‌برگی‌ها، سوختگی برگ، نقطه سیاه و پوسیدگی ریشه و طوقه روی این گیاه گزارش شده است. قارچ‌های گندمیان‌زی (Graminicolous) مانند گونه‌های *Alternaria*, *Bipolaris*, *Cladosporium*, *Curvularia* و *Exserohilum* از بیمارگرهای مهم گندم هستند(Mirabolfathy and Ershad 2006) . این قارچ‌ها اغلب فقط با تولیدمثل غیرجنسی و تشکیل کنیدیوم تکثیر می‌یابند. کنیدیوم‌برهای این قارچ‌ها تیره‌رنگ و به صورت مستقیم به حالت منفرد یا خوشه‌ای تشکیل می‌شوند. کنیدیوم‌ها روی کنیدیوم‌برها به صورت جانبی رشد می‌کنند و حالت انفرادی داشته و به صورت استوانه‌ای خمیده و یا گرزی وارونه تشکیل می‌شوند. این قارچ‌ها در هر دو حالت پوده‌رُست و انگل در طبیعت وجود دارند. در حالت انگلی موجب سوختگی برگ‌ها و کله‌برگی و پوسیدگی طوقه و ریشه در تیره گندمیان می‌شوند (Alcorn 1988, Shoemaker 1959).

۱- میزبان‌های قارچ‌های گندمیان‌زی

مهم‌ترین میزبان قارچ‌های گندمیان‌زی گندمیان زراعی و وحشی هستند. از جمله گیاهانی که به عنوان میزبان

✉ مسئول مکاتبه:rmostofi@shirazu.ac.ir

برای این قارچ‌ها شناخته شده‌اند، علاوه بر گندم، جو، برنج، ذرت، ذرت‌خوشه‌ای و نیشکر، می‌توان به تعدادی از علف‌های هرز مانند اویارسلام (*Cyperus* sp. L.)، سوروف (*Echinochloa crus-galli* L.)، سورگوم (*Sorghum* spp. L.)، علف باغ (Dactylis spp. L.)، قمیش (*Arundo donax* L.)، قیاق (*Sorghum halepence* L.)، گل خرچنگی آویزان (*Heliconia rostrata* L.)، لویی (*Typha latifolia* L.)، مرغ (*Cynodon dactylon* L.)، علف ستاره (*Heteranthera zosterifolia* L.)، برخی از درختان مثل کاج (*Pinus* spp. L.) و برخی از گیاهان خوراکی مانند بامیه (*Abelmoschus esanlentus* (L.) Moench)، خیار (*Cucumis sativus* L.)، موز (*Musa sapientum* L.)، میوه اژدها (*Hylocereus undatus* L.) (*Saccharum officinarum* L.) و گیاهانی از تیره‌های *Anacardiaceae*، *Uforbiaceae*، *Malvaceae*، *Rutaceae* و *Zingiberaceae* اشاره کرد (Ellis 1971, Ahmadpour *et al.* 2011, Manamgoda *et al.* 2011 and 2014, Oeurn *et al.* 2015, Singh *et al.* 2016).

۲-بیماری‌های ناشی از قارچ‌های گندمیان‌زی در گندم

این گروه از قارچ‌ها بیماری‌های نقطه سیاه بذر، مرگ بذر، پوسیدگی ریشه و طوقه و لکه برگی را روی گندم ایجاد می‌کنند (Shamim *et al.* 2008, Matusinsky *et al.* 2010). همچنین می‌توانند به سنبله حمله کرده، باعث سیاه شدن پوسته دانه شوند. در آلودگی‌های شدید دانه چروکیده و لاغر شده و یا اصلاً تشکیل نمی‌شود (Etebarian and Mohammadifar 2007). نتیجه بیمار شدن گیاه توسط آن‌ها کاهش کیفیت و کمیت دانه و حتی کاهش کیفیت علوفه تولید شده خواهد بود. معمولاً بوته‌های بیمار در مزرعه کوتاه‌تر از سایرین هستند. علاوه بر این آلودگی شدید ممکن است منجر به مرگ گیاهچه یا حتی مرگ بذر قبل از خروج از خاک شود. در نتیجه کچلی در مزرعه مشاهده می‌شود. جدول ۱ گونه‌های قارچ گندمیان‌زی ایجاد کننده بیماری در گندم در ایران را نشان می‌دهد. با توجه به اهمیت زیاد و اقتصادی بودن گندم و شدت خسارت وارد شده به آن توسط قارچ‌های گندمیان‌زی، بررسی روش‌های مهار و مبارزه با بیماری اهمیت قابل توجهی دارد. هدف از نگارش این مقاله بررسی روش‌های مهار بیماری‌های ناشی از این قارچ‌ها و ارائه مناسب‌ترین راه‌کار در شرایط ایران است.

۳-مدیریت بیماری‌های ناشی از قارچ‌های **گندمیان‌زی در گندم**

بیماری‌های ایجاد شده توسط این گروه از قارچ‌ها در گندم ممکن است توسط گونه‌های مختلف و یا حتی ترکیبی از چند گونه یا چند جنس ایجاد شود (Hashemi Alizadeh *et al.* 2013) از این رو روش‌های متفاوتی برای مهار آن‌ها وجود دارد. این روش‌ها به طور کلی در چهار دسته روش‌های زراعی، کشت رقم‌های مقاوم، مبارزه زیستی و مبارزه شیمیایی قرار می‌گیرند.

۳-۱- روش‌های زراعی

۳-۱-۱- مبارزه با علف‌های هرز : علف‌های هرز تیره گندمیان از میزبان‌های این قارچهای بیمارگر و محل زمستان‌گذرانی آنها هستند، بنابراین از بین بردن آنها پیش از کاشت گندم تاثیر زیادی در کاهش بروز و شیوع این بیماریها دارد.

۳-۱-۲-تنظیم تاریخ کاشت : خسارت این گروه از قارچ‌ها در مناطق گرم و خشک و در فصل‌های گرم سال افزایش می‌یابد. بهترین شرایط برای بروز لکه‌برگی ناشی از این قارچ‌ها دمای ۲۹ درجه سلسیوس و رطوبت بالای ۹۰% است (Viani 2014). بررسی فکری‌کهن و مستوفی‌زاده قلمفرسا (۱۳۹۸) نشان داد که گونه‌های مختلف جنس‌های گندمیان‌زی حداکثر رشد خود را در دماهای ۲۵ تا ۳۵ درجه سلسیوس دارند. قدرت خسارت‌زایی آن‌ها در خاک‌های خشک و دارای تنش به مراتب بیش‌تر است (HashemiAlizadeh *et al.* 2013) به همین دلیل کشت پاییزه گندم در مناطق گرمسیر نقش مهمی در مهار بیماری‌های ناشی از این قارچ‌ها دارد. تنظیم تاریخ کشت در مهار پوسیدگی ریشه مؤثر است. کشت دیر هنگام به دلیل فراهم کردن زمان بیش‌تر برای از بین رفتن

جدول ۱- گونه‌های گندمیان‌زی بیمارگر گندم در ایران

Table 1. Graminicolous wheat pathogene species in Iran

بیماری ایجاد شده	گونه	محل گزارش بیماری	منابع
پوسیدگی ریشه و طوقه			
	Bipolaris sorokiniana	آذربایجان غربی، ایلام، خراسان شمالی، زنجان، فارس، کرمان، گلستان، لرستان، مرکزی	Irani and Ershad 2000, Mansouri *et al*. 2001, Mirabolfathy and Ershad 2006, Safaei *et al.* 2008, Abbasi and Aliabadi 2009, Ershad 2009, Amarloo *et al.* 2012, Dehghan *et al*. 2015, Mehraabi *et al*. 2015
	Curvularia australiensis	آذربایجان شرقی، فارس	Mohammadipour and Ershad 2002
	C. papendorfi	فارس	
	C. spicifera	آذربایجان غربی، آذربایجان شرقی، فارس، گلستان	Irani and Ershad 2000, Mohammadipour and Ershad 2002, Saaneei *et al.* 2011
	C. verruculosa	فارس	
	Exserohilum rostratum	فارس	
لکه‌برگی			
	B. sorokiniana	آذربایجان غربی، ایلام، خراسان شمالی، زنجان، فارس، کرمان، لرستان، مرکزی	Irani and Ershad 2000, Mansouri *et al*. 2001, Mirabolfathy and Ershad 2006, Ershad 2009, Safaei *et al.* 2008, Abbasi and Aliabadi 2009, Amarloo *et al.* 2012, Mehraabi *et al.* 2015,
	B. spicifera	آذربایجان غربی، آذربایجان شرقی، گلستان	Irani and Ershad 2000, Mohammadipour and Ershad 2002, Saaneei *et al.* 2011
	C. australiensis	فارس	
	C. papendorfi	فارس	
	E. rostratum	فارس	

عامل بیماری در بقایا و باقی گذاشتن زمان کم‌تر برای نفوذ ریشه‌های تازه به اعماق خاک و در نتیجه، آلوده شدن کمتر آن‌ها توسط عامل بیماری می‌تواند مفید باشد. به طور کلی باید از کاشت بذر در عمق زیاد خودداری کرد. البته در این مورد توجه به آب‌وهوای منطقه بسیار مهم است. بنابراین توصیه می‌شود برای تعیین بهترین تاریخ کشت از اطلاعات مراکز مربوطه در منطقه استفاده شود (Adesemoye *et al*. 2015).

۳-۱-۳- برقراری تناوب زراعی : یکی از راه‌های مهار بیماری پوسیدگی ریشه در گندم برقراری تناوب است. به این منظور می‌توان از گیاهانی غیر از گندمیان مانند آفتاب‌گردان (*Helianthus annuus* L.)، باقلا (*Vicia faba* L.)، چغندر (*Beta vulgaris* L.)، خردل (*Sinapis arvensis* L.)، سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.)، سورگوم (*Sorghum bicolor* (L.) Moench)، کلزا (*Brassica napus* L.)، ماش (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek) و نخودفرنگی (*Pisum sativum* L.) استفاده کرد. در سال‌های اخیر استفاده از کلزا در تناوب با گندم بسیار رایج شده است، زیرا این گیاه، میزبان عامل بیماری نبوده و علاوه بر این

می‌تواند موادی ترشح کند که رشد عامل بیماری را سرکوب کند (Fernandez and Conner 2011a). بهترین دوره تناوب با این گیاه، تناوب دو ساله است. آیش گذاشتن زمین به مدت یک سال نیز می‌تواند مفید باشد (Moore and Conner 2011a, Fernandez *et al.* 2005, Mansouri 2012). البته در هنگام به کار بردن تناوب یا آیش گذاشتن زمین باید دقت زیادی در حذف علف‌های هرز یا استفاده از گیاهان فاقد بذر علف هرز در تناوب نشان داد، زیرا این علف‌های هرز نیز می‌توانند میزبان مناسبی برای عامل بیماری باشند. از طرفی وجود آن‌ها در زمین می‌تواند به عنوان منبع زادمایه عمل کرده و منجر به افزایش احتمال آلودگی شود (Adesemoye *et al.* 2015). چنانچه تناوب امکان‌پذیر نباشد می‌توان با زیر خاک کردن بقایا، پایداری تابستانه عامل بیماری را کاهش داد، زیرا این کار باعث سرعت بخشیدن به تجزیه بقایا می‌شود. علاوه بر این وقتی زمین خالی از بقایا باشد نور خورشید بیش‌تری را جذب کرده، گرم‌تر شده و میزان رطوبت آن کاهش می‌یابد، در نتیجه شرایط برای بقای عامل بیماری نامساعد خواهد شد (Mansouri 2012، Burrows 2013).

۳-۱-۴- آبیاری بهینه: میزان و زمان آبیاری بسیار مهم است. آبیاری مناسب پس از مرحله خوشه‌دهی می‌تواند بیماری ریشه و طوقه را تا حد زیادی مهار کند؛ زیرا بیش‌ترین خسارت در شرایط تنش آبی در این مرحله به همراه گرمای شدید هوا دیده شده است. به طور کلی کشت گیاه در بستر دارای زهکشی مناسب و رعایت فاصله مناسب در کشت رطوبت را مهار کرده و باعث جلوگیری از بروز بیماری‌های ناشی از گندمیان‌زی‌ها خواهد شد. از طرف دیگر با توجه به گرم و خشک بودن اکثر مناطق گندم‌کاری در ایران، آبیاری منظم و کافی نقش مهمی در مهار بیماری ناشی از گونه‌های گندمیان‌زی خواهد داشت. البته نکته‌ای که باید مورد توجه قرار بگیرد عدم آبیاری به صورتی است که منجر به تراکم بیش از حد گیاه شود؛ زیرا در غیر این صورت برگ‌های بزرگ گیاه باعث سایه‌اندازی شده و شرایط رطوبتی مناسب را برای رشد قارچ و خسارت‌زایی ایجاد خواهند کرد (HashemiAlizadeh *et al.* 2013).

۳-۱-۵- کوددهی بهینه: کاهش استفاده از کودهای نیتروژنه تا حد امکان می‌تواند در مهار پوسیدگی معمولی ریشه و طوقه گندم مؤثر باشد. علاوه بر این استفاده از کودهای فسفاته به دلیل تولید ریشه‌های زیادتر به جبران خسارت ناشی از این بیماری کمک می‌کند (Moore *et al.* 2005, Adesemoye *et al.* 2015).

۳-۲- کشت رقم مقاوم

راه‌حل دیگر برای مبارزه با این بیماری‌ها کشت رقم مقاوم است. تاکنون بررسی‌هایی در دنیا انجام شده و ارقام یا رگه (line) هایی به عنوان مقاوم، نیمه‌مقاوم یا حساس معرفی شده‌اند. منظور از ارقام نیمه‌مقاوم آن‌هایی هستند که توسط این گروه از قارچ‌ها خسارت می‌بینند، اما میزان کاهش کیفیت و کمیت محصول در آن‌ها کمتر از ارقام حساس است. بررسی مقاومت چند رقم به پوسیدگی ریشه و طوقه ناشی از قارچ *Bipolaris sorokiniana* در ایران نشان داده رقم‌های سبلان، زرین و نیک‌نژاد مقاوم، ارقام پیشتاز، الوند، گاسپارد، الموت، داراب، مرودشت و لاین‌های C-78-14 و M-79-6 نیمه مقاوم و ارقام مارون، بک کراس روشن و کویر حساس هستند (Samiei *et al.* 2008). پژوهش لی و همکاران نشان داده که رقم‌های گندم دارای دوره پر شدن دانه کوتاه‌تر و تحمل بالاتر نسبت به سرمازدگی، مقاومت بیشتری به بیماری نقطه سیاه نشان می‌دهند (Li *et al.* 2019).

۳-۳-مبارزه زیستی

۳-۳-۱-استفاده از قارچ‌های متعارض : تاکنون قارچهای متعددی به عنوان عامل مهار زیستی گونه‌های مختلف *Bipolaris* (از جمله *B. ellisi* (Danquah) Alcorn، *B. hawaiiensis* (Bugnic. ex M.B. Ellis) J.Y. Uchida and Aragaki، *B. sorokiniana* و *B. spicifera*) شناخته شده‌اند. از جمله آن‌ها می‌توان به بعضی قارچ‌ریشه‌های آربوسکولی و گونه‌های *Trichoderma* (از جمله *T. harzianum* J.H. Rifai 1969، *T. virens* (Giddens Mill. and A.A. Foster) Arx و *T. viride* Pers. 1794) اشاره کرد (Etebarian and Mohammadifar 2007, HashemiAlizadeh *et al.* 2013, Singh *et al.* 2016). روش اثر هر

یک از مهارکننده‌های زیستی متفاوت است. قارچ‌های آربوسکولی با بهبود روابط خاک و گیاه، جذب آب و عناصر مهم (مانند روی، فسفر و مس) و موادغذایی، تغییرات در مواد شیمیایی بافت‌های گیاه، تغییر ساختار ریشه، کاهش تنش‌های محیطی، رقابت با سایر بیمارگرها بر سر محل استقرار و موادغذایی و افزایش جمعیت باکتری‌های مفید خاک به کاهش و مهار بیماری کمک می‌کند (Hashemi Alizadeh *et al*. 2013). گونه‌های مختلف *Trichodeerma* نیز با کاهش یا حتی توقف رشد ریسه قارچ و فعال کردن مسیر مقاومت سیستمیک اکتسابی (با اثر افزایش در تولید آنزیم‌هایی مانند فنیل پروپانوید، آمونیالایز، پراکسیداز، کیتیناز و سایر آنزیم‌های مرتبط با این مقاومت) مشابه با شرایط حمله بیمارگر در گیاه در مهار بیماری‌های ناشی از قارچ‌های *Bipolaris* مؤثر هستند (Singh *et al*. 2016). گونه *T. viride* با تولید مواد فرار مانند استالدئید باعث مهار بیمارگرها می‌شود (Dennis and Webster 1971). میزان اثرگذاری گونه‌های مختلف *Trichoderma* روی گونه‌های مختلف بیمارگرها متفاوت است. برای مثال بررسی اعتباریان و محمدی‌فر (2007) نشان داده که سویه M *T. harzianum* بیش‌ترین اثر را روی *B. spicifera* دارد. همچنین جدایه *T. harzianum* UBSTH-501 بالاترین بازدارندگی از رشد ریسه *B. sorokiniana* داشته است (Singh *et al*. 2016). لازم به ذکر است که غلظت قارچ مورد استفاده نیز اهمیت زیادی دارد. برای مثال کم‌ترین غلظت لازم برای مهار زیستی به‌وسیله سوسپانسیون اسپورهای *T. harzianum* ۱×۱۰^{۵} اسپور در میلی‌لیتر است (Etebarian and Mohammadifar 2007).

۳-۳-۲-استفاده از باکتری‌های متعارض : تاکنون باکتری‌های متعددی از جمله *Bacillus* sp.، *Escherichia* sp.، *Paenibacillus* sp.، *Pseudomonas* sp.، *Achromobacter* sp. و *Stenotrophomonas* sp. به عنوان عامل مهار زیستی معرفی شده‌اند (Gozari *et al*. 2018, Villa-Rodríguez *et al*. 2019). از میان آن‌ها بررسی‌های زیادی در مورد گونه‌های مفید *Bacillus* و *Pseudomonas*، نحوه اثر آن‌ها و جدایه‌های مؤثرتر انجام شده است (Dal Belo 2003, Mohammadi *et al*. 2005, Hashemi Alizadeh *et al*. 2013, Khezri 2016, 2017, Singh *et al*. 2016, Gozari *et al*. 2018, Minaeva *et al*. 2018, Villa-Rodriguez 2019). باکتری *P. fluorescens* Flügge با تولید موادی مانند سیدروفور، سیانید هیدروژن، پروتئاز، فنازین، اسید کربوکسیلیک و اسید آنترالینیک روی رشد پوده‌رُستی و انگلی بیمارگر اثر گذاشته و باعث مهار بیماری می‌شود (Hashemi Alizadeh *et al*. 2013). این باکتری با تأثیر بر فعالیت آنزیم‌های اکسیداز و پراکسیداز در گیاه باعث مهار بیماری از طریق فعال کردن مقاومت سیستمیک اکتسابی می‌شود. میزان پراکسیداز بعد از تلقیح تا ۴۰% ممکن است افزایش یابد (Maksimov *et al*. 2015, Minaeva and Akimova 2013, Minaeva *et al*. 2018, Chowdhury *et al*. 2015). جدایه‌های مختلفی از *Bacillus subtilis* Ehrenburg و *B. amyloliquefaciens* Priest به عنوان عامل مهار زیستی گونه‌های *Bipolaris* شناخته شده‌اند (Singh *et al*. 2016). این باکتری‌ها با تولید بیوفیلم، افزایش طول ریشه و سرعت رشد گیاه و ممانعت از رشد ریسه قارچ بیمارگر باعث مهار آن می‌شوند (Singh *et al*. 2016). مهار بیماری از طریق بیوفیلم در پنج مرحله اتفاق می‌افتد. در ابتدا باکتری به صورت برگشت‌پذیر به ریشه متصل می‌شود. به مرور این اتصال برگشت‌ناپذیر خواهد شد. پس از آن باکتری بالغ شده، شروع به ایجاد بیوفیلم می‌کند. در نهایت باکتری پس از تکمیل ساختار بیوفیلم از ریشه جدا و در محیط خاک منتشر می‌شود (Sauer 2003). میزان بیوفیلم تولید شده توسط باکتری با قدرت آن برای مهار بیماری‌های ناشی از قارچ‌های گندمیان‌زی رابطه مستقیم دارد. بررسی‌هایی در مورد میزان بیوفیلم تولید شده در جدایه‌های مختلف *B. subtilis* و عوامل مؤثر در تولید آن صورت گرفته است (Khezri 2015,2017). جدایه‌های مختلف *B. subtilis* از طریق تولید مواد فرار ضدقارچی، آنزیم‌ها، ترشحات خارج سلولی و بیوفیلم باعث افزایش رشد گیاه و عبور آن از مرحله حساس می‌شوند (Bais *et al*. 2004, Fiddaman and Rosal, 1994, Jamil *et al*. 2007, Kloepper *et al*. 2004, Ongena *et al*. 2007, Zhao *et al*. 2014). بررسی خضری (2017) نشان داد که میزان تولید بیوفیلم به عواملی چون دما، فشار اسمزی، اسیدیته و میزان مواد موجود در خاک

بستگی دارد. طبق این بررسی بیش‌ترین مقدار بیوفیلم در دمای ۳۰ درجه سلسیوس، اسیدیته ۷ و فشار اسمزی ۷۵% سوکروز اتفاق می‌افتد. لازم به ذکر است که افزایش گلیسرول موجب افزایش تولید بیوفیلم و کمبود آهن منجر به کاهش آن خواهد شد (Oglesby-Sherrouse 2006, Morikawa *et al*. 2014). با وجود لازم بودن قندهای متنوع برای تولید بیوفیلم، مقدار قند رامنوز و گالاکتوز موجود در محیط تأثیری در تولید بیوفیلم ندارد (Khezri 2015). با توجه به موارد ذکر شده احتمال می‌رود که استفاده از باکتری *B. subtilis* در اکثر مناطق کشت گندم در ایران کارایی داشته باشد. البته این موضوع مشروط به خنثی بودن خاک از لحاظ اسیدیته و کافی بودن آهن در آن است. بررسی خضری (2017) روی جدایه‌های *B. subtilis* نشان داد که بیش‌ترین میزان تولید بیوفیلم در جدایه‌های B1، B3 و B4 اتفاق می‌افتد. که از میان آن‌هاجدایه‌های B3 و B4 ریشه را بهتر کلونیزه کرده، در نتیجه در مهار بیماری‌های ناشی از گندمیان‌زی مؤثرتر عمل می‌کنند.

۳-۴- مبارزه شیمیایی

قارچ‌های گندمیان‌زی ساکن خاک هستند. به همین دلیل مبارزه شیمیایی با آن‌ها مشکل خواهد بود. از طرف دیگر به دلیل اثرات زیان‌آور این روش برای محیط زیست و انسان در سال‌های اخیر سعی بر آن بوده که به جز مواقع اضطراری از این روش مهار استفاده نشود. برای مبارزه شیمیایی سموم متفاوتی معرفی شده است. از جمله می‌توان به کربوکسین + تیرام (به نسبت یک به یک)، وایتاواکس ۱ گرم در لیتر، کاربندازیم و تریادیمنول برای ضدعفونی بذر و پروپیکونازول، تیلت، تبوکونازول به صورت محلول‌پاشی روی برگ اشاره کرد (Sharma-Poudyal *et al*. 2016, Singh *et al*. 2014). در میان قارچ‌کش‌های بذری وایتاواکس به میزان ۲/۵ گرم در کیلوگرم علیه *B. sorokiniana* بهترین نتیجه را داشته است (Singh *et al*. 2014) اما در مورد بیماری نقطه سیاه با وجود افزایش رشد گیاه و وزن محصول، اثری در مهار بیماری نداشت. در این مورد، تیلت به میزان ۰/۵ گرم در لیتر بهترین نتیجه را داشت (Malaker and Mian 2009). لازم به ذکر است از آن‌جایی که قارچ‌های گندمیان‌زی ایجادکننده پوسیدگی معمولی ریشه و طوقه می‌توانند باعث ایجاد لکه‌برگی نیز شوند، سموم مورد استفاده قادر به مهار هر دو دسته بیماری هستند. در بررسی اثر قارچ‌کش‌های مختلف در مهار بیماری پوسیدگی معمولی ریشه و لکه‌برگی مشخص شده که روش اثرگذاری سموم متفاوت است. برای مثال تبوکونازول باعث کاهش شدت سوختگی و کاهش تعداد گیاهچه بیمار می‌شود. تریادیمنول و ترکیب کربوکسین با تیرام علاوه بر آن باعث افزایش تولید جوانه در گیاه می‌شوند. از طرف دیگر استفاده از قارچ‌کش برگی پروپیکونازول علاوه بر کاهش بیماری، وزن ۱۰۰۰ دانه را نیز افزایش می‌دهد (Sharma-Powdial *et al.* 2016). اثر قارچ‌کشی روغن ریحان (*Ocimum basilicum* L.) در مهار گونه‌های *Bipolaris* و *Cochliobolus* به اثبات رسیده است. این مورد نیز همانند سایر روش‌ها تأثیرات متفاوتی روی گونه‌های مختلف قارچ بیمارگر می‌گذارد. برای مثال ۸۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آن باعث توقف کامل رشد ریسه در تمام جدایه‌ها به خصوص جدایه‌های *B. ellisi* شد. همچنین این ماده با غلظت ۴۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر جوانه‌زنی اسپورهای *B. hawaiiensis* را به طور کامل متوقف کرد (Azzaz *et al*. 2018). یکی دیگر از مواد شیمیایی قابل استفاده بنزوتیادیازول است. این ماده اثر قارچ‌کشی مستقیم ندارد؛ اما در فعال شدن مقاومت سیستمیک اکتسابی در گیاه نقش دارد (Azami-sardooei *et al*. 2017). این ماده را می‌توان پای گیاه همراه با آب آبیاری و یا پاشیدن روی اندام هوایی گیاه استفاده کرد (Desmond *et al*. 2008).

نتیجه‌گیری

یافته‌های حاصل از بررسی‌های محققین نشان می‌دهد که روش‌های متنوعی برای مبارزه با بیماری‌های ناشی از قارچ‌های گندمیان‌زی در گندم وجود دارد که علاوه بر کارایی بالا (حتی مهار ۱۰۰ درصدی بیمارگر)، اثرهای سوء مواد شیمیایی برای محیط زیست و انسان را ندارند. مهم‌ترین روش‌هایی که می‌تواند مانع از بروز این بیماری‌ها در مزرعه شوند، روش‌های زراعی(تنظیم تاریخ کاشت، مبارزه با علف‌های هرز قبل از کشت و آبیاری و کوددهی مناسب)، کشت رقم مقاوم، استفاده بهینه از مهارکننده‌های زیستی و ضدعفونی بذر و خاک با سم-

های شیمیایی قبل از کاشت نیز می‌تواند بسیار مؤثر باشد. در صورت امکان‌پذیر نبودن سایر روش‌های غیرشیمیایی، استفاده از سم‌های شیمیایی جذبی به صورت محلول‌پاشی روی برگ نیز برای مبارزه به عنوان آخرین راه‌کار توصیه می‌شد. البته لازم به ذکر است که انتخاب یک روش به تن‌هایی معمولاً بیماری را مهار نکرده و یا نتیجه مطلوبی ندارد. به همین دلیل بهترین توصیه استفاده از چندین روش مبارزه به صورت تلفیقی است.

References منابع

1. Abbasi M and Aliabadi F (2009) The List of Fungi Reported in Proceedings of 12th to 18th Iranian Plant Protection Congress. Elm and Honar Publication, Tehran.
2. Adesemoye TO, Wegulo SN and Klein RN (2015) Common root rot and Fusarium foot rot of wheat. Available online at: http://extensionpublications.unl.edu/ assets/ pdf/g1998.pdf
3. Ahmadpour A, Donyaadust Chelaan M, Heydarian Z and Javan-Nikkhah M (2011) New species of *Bipolaris* and *Curvularia* on grass species in Iran. Rostaniha 12:39-49.
4. Alcorn JL (1988) The taxonomy of "*Helminthosporium*" species. Annual Review of Phytopathology 26:37-56.
5. Amarloo A, Ruhaani H and Mehdikhaani-Moghadam E (2012) Identification of basic stem rot and root rot fungi on wheat in Khorasan. Iranian Journal of Plant Protection 25:332-340.
6. Azami-sardooei Z, Fekrat F and Ghalavand F (2017) A review on the application of Benzothiadiazol in plant diseases management. Plant pathology science 6(2):33-42 (In Persian). Azzaz NA, Elsherbiny EA and El-Khateeb AY (2018) Chemical composition and fungicidal effects of *Ocimum basilicum* essential oil on *Bipolaris* and *Cochliobolus* species. Journal Agriculture Science Technology 18:1143-1152.
7. Bais HP, Fall R and Vivanco JM (2004) Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of arabidopsis roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. Plant Physiology 134:307-319.
8. Burrows M (2013) Guide to common root and crown diseases of cereal crops in Montana. Available online at: http://plantpath.msuextension.org/pdfs/crown-root.pdf
9. Chowdhury S, Singh K, Kumar J, Deepshikha KS, Vaish S, Chand R ... and Karwasra S (2015) Evaluation of sources of resistance to leaf blight (*Bipolaris sorokiniana* and *Alternaria triticina*) in wheat (*Triticum aestivum*) and Triticale. Indian Phytopathology 68:221-222.
10. Dal Bello GM, Sisterna MN and Monaco CI (2003) Antagonistic effect of soil rhizosphere microorganisms on *Bipolaris sorokiniana*, the causal agent of wheat seedling blight. International Journal of Pest Management 49:313-317.
11. Dehghan M, Ebrahim Nejad Sh and Barari H (2015) Identification of causing pathogens and associate of wheat root and crown rots in Gorgan region. Plant pathology 7:73-82. (In Persian with English Abstract).

12. Dennis C and Webster J (1971) Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*: III. Hyphal interaction. Transactions of the British Mycological Society 57:363-369.
13. Desmond OJ, Manners JM, Schenk PM, Maclean DJ and Kazan K (2008) Gene expression analysis of the wheat response to infection by *Fusarium pseudograminearum*. Physiological and Molecular Plant Pathology 73:40-47.
14. Ellis MB (1971) *Dematiaceous Hyphomycetes*. England: Commonwealth Mycological Institute.
15. Ershad D (2009) Fungi of Iran. 3rd ed. Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, Iran. (In Persian).
16. Etebarian H and Mohammadifar M (2007) Evaluation of some *Trichoderma* isolates for biological control of crown and root rot of wheat caused by *Bipolaris spicifera* (Bainier) Subram. Seed and Seedlings 32:343-356. (In Persian with English Abstract).
17. FAOSTAT (2017) FAO statistics Division 2016. Online: http://faostat.fao.org /en/data/QC.
18. Fernandez MR and Conner RL (2011a) Root and crown rot of wheat. Prairie Soils and Crops 4:151-157.
19. Fernandez MR and Conner RL (2011b) Black point and smudge in wheat. Prairie Soils and Crops 4:158-164.
20. Fiddaman PJ and Rossall S (1994) Effect of substrate on the production of antifungal volatiles from Bacillus subtilis. Journal of Applied Bacteriology 76:395-405.
21. Gozari M, Mohamaizadeh M, Gozari M and Rafati M (2018) Isolation, identification and evaluation of the Actinobacteria derived from wheat farms to perform for biological control of fungal diseases. Journal of Invironmental Science and Technology 20:11-25. (In Persian with English Abstract).
22. Hashemi Alizadeh S.K, Roohani H and Tarighi S (2013) Evaluation of Mutual effect of Mycorhizal fungi *Pseudomonas fluorescens* and *Glomus fluorescens* in biological control of common root rot of wheat by *Bipolaris sorokiniana*. Plant Protection 27:142-148. (In Persian with English Abstract).
23. Hernández-Restrepo M, Madrid H, Tan YP, da Cunha KC, Gene J, Guarro J and Crous PW (2018) Multi-locus phylogeny and taxonomy of *Exserohilum*. Persoonia 41:71-108.
24. Irani H. and Ershad D. 2000. Identification and prevalation of *Bipolaris* species the casual agents o foot and root rot of winter wheat in west Azarbaijan. Proceedings of the 14th Iranian Plant Protection Congress, Isfahan, P.221.
25. Jamil B, Hasan F, Hameed A and Ahmed S (2007) Isolation of *Bacillus subtilis* MH-4 from soil and its potential of polypeptidic antibiotic production. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences 20:26-31.

26. Khezri M (2016) Influence of some environmental and nutritional conditions on biofilm formation of probiotic *Bacillus subtilis* strains. Biological Control of Plant and Pest Diseases 4:157-165. (In Persian with English Abstract).
27. Khezri M (2017) Effect of biofilm by plant probiotic rhizobacteria on root colonization and growth of wheat. 6:93-102. (In Persian with English Abstract).
28. Kloepper JW, Ryu CM, Zhang SA (2004) Induced system resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. Phytopathology 94:1259-1266.
29. Li QY, Xu QQ, Jiang YM, Niu JS, Xu KG and He RS (2019) The correlation between wheat black point and agronomic traits in the North China Plain. Crop Protection 119:17-23.
30. Maksimov IV, Veselova SV, Nuzhnaya, TV, Sarvarova, ER and Khairullin, RM (2015) Plant growth promoting bacteria in regulation of plant resistance to stress factors, Russian Journal Plant Physiology 62:715-726.
31. Malaker PK and Mian IH (2009) Effect of seed treatment and foliar spray with fungicides in controlling black point disease of wheat. Bangladesh Journal of Agricultural Research 34:425-434.
32. Manamgoda DS, Cai L and Bahkali AH (2011) *Cochliobolus*: an overview and current status of species. Fungal Diversity 51:3-42.
33. Manamgoda DS, Rossman AY, Castlebury AL, Crous PW, Madrid H, Chukeatirote E, and Hyde KD (2014) The genues *Bipolaris*. Studies in Mycology 79:221-288.
34. Mansouri B, Ravanloo A, Noor Allahi Kh, Azarbakht N, Jafari H and Ghalandar M (2001) Common root and stem rot of wheat in west Azarbaijan, Ilam, Lorestan, Zanjan and Markazi provinces. Proceeding of the 15th Iranian Plant Protection Congress, Kermanshah, Iran.
35. Mansouri B (2012) Common root and stem rot and control management in wheat farms in Iran. Available online at https://www.agrilib.ir/book_3597.pdf
36. Mathre DE, Johnston RH and Grey WE (2003) Diagnosis of common root rot of wheat and barley. Plant Health Progress 4:11.
37. Matusinsky P, Frei P, Mikolasova R, Svacinova I, Tvaruzek L and Spitzer T (2010) Species-specific detection of Bipolaris sorokiniana from wheat and barley tissues. Crop Protection 29:1325-1330.
38. Mehraabi R, Toraabi M, Rajabpour M, Karami N, Hasani A and Ebraahimi A (2015) Molecular identification of *Cochliobolus sativus*, the causal agent of wheat spot blotch disease, using its sequencing and its phylogenetic relationships with other *Cochliobolus* species. Seed and Plant Improvement Journal 2:399-417.
39. Minaeva O M, Akimova E E, Tereshchenko N N, Zyubanova TI, Apenysheva M V, and Kravets A V (2018) Effect of Pseudomonas Bacteria on Peroxidase Activity in Wheat Plants when Infected with *Bipolaris sorokiniana*. Russian Journal of Plant Physiology 65:717-725.
40. Minaeva OM and Akimova EE (2013) Effectiveness of applying bacteria *Pseudomonas* sp., strain B-6798, for anti-phytopathogenic protection of crops in Western Siberia, Vestn. Tomsk Gos. Universal, Biology 3:19–37.

41. Mirabolfathy M and Ershad D (2006) *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera* and *Exserohilum* diseases of turfgrass in Iran. Iranian Journal of Plant Pathology 42:83-85.
42. Mohammadi K, Rahimian H, Etebarian H.N and Ghalandar M (2005) Biological Control of Common Root Rot of Wheat by Antagonistic Bacteria Isolated from Wheat Rhizosphere. Iranian Journal of Plant Pathology 41:383-402. (In Persian with English Abstract).
43. Mohammadipour M and Ershad DD (2002) Identification of *Bipolaris* species the causal agent of root and foot rot of wheat in east Azarbaijan. Proceedings of the 15th Iranian Plant Protection Congress, Kermanshah, Iran. (In Persian with English Abstract).
44. Moore K, Manning B, Simpfendorfer S and Verrell A (2005) Root and crown diseases of wheat and barley in Northern NSW. Available online at: https://www.dpi.nsw. gov.au/__data/assets/pdf_file/0019/159031/root-crown-rot-diseases.pdf.
45. Morikawa M (2006) Beneficial biofilm formation by industrial bacteria *Bacillus subtilis* and related species. Journal of Bioscience and Bioengineering 101:1-8.
46. Oeurn S, Jitjak W and Sanoamuang N (2015) Fungi on dragon fruit in Loei Province, Thailand and the ability of *Bipolaris cactivora* to cause post-harvest fruit rot. Asia-Pacific Journal of Science and Technology 20:405-418.
47. Oglesby-Sherrouse AG, Djapgne L, Nguyen AT, Vasil A and Vasil ML (2014) The complex interplay of iron, biofilm formation, and mucoidy affecting antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa.* Pathogens and Disease 70:307-320.
48. Ongena M, Jourdan E, Adam A, Paquot M, Brans A, Joris B, Arpigny JL and Thonart P (2007) Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. Environmental Microbiology 9:1084-1090.
49. Saaneei J, Razavi E and Okhovat M (2011) Rice brown spot disease and identification of the causal agent fungi in Golestan province. Creal Research 1:65-74.
50. Safaei D, Okhovat M, Hajaroud Gh and Yunesi H (2008) Identification, comparison in pathogenisity and transmitance of *Bipolaris* sp. the factor of root rot and stem rot of wheat in Kermanshah province. Journal of Science and Technology of Agriculure and Natural Resources 12:207-214.
51. Samiei F, Javan-nikkhah M, Zamani Zadeh HR and Rafiei-Karahrudi Z (2008) Reaction of some wheat cultivars to *Bipolaris sorokiniana* the causal agent of common root rot. Journal of Plant Protection 22:211-219. (In Persian with English Abstract).
52. Sauer K (2003) The genomics and proteomics of biofilm formation. Genome Biology 4: 219.
53. Shamim I, Shahzad A, Anjum M and Iftikhar A (2008) Selection of in vitro technique for pathogenicity and screening of wheat cultivares agaist *Bipolaris sorokiniana*. Pakistan Journal of Botany 40:415-420.

54. Sharma-Poudyal D, Sharma RC and Duveiller E (2016) Control of *Helminthosporium* leaf blight of spring wheat using seed treatments and single foliar spray in Indo-Gangetic Plains of Nepal. Crop Protection 88:161-166.
55. Shoemaker RA (1959) Nomenclature of *Drechslera* and *Bipolaris*, grass parasites segregated from *Helminthosporium*. Canadian Journal of Botany 37:879-887.
56. Singh DP, Kumar A, Solanki IS, Singh SP, Verma J, Mahapatra S, and Dutta S (2014). Management of spot blotch of wheat caused by *Bipolaris sorokiniana* in wheat using fungicides. Indian Phytopathology 67:308-310.
57. Singh UB, Malviya D, Singh S, Imran M, Pathak N, Alam M, and Sharma AK (2016) Compatible salt-tolerant rhizosphere microbe-mediated induction of phenylpropanoid cascade and induced systemic responses against *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker causing spot blotch disease in wheat (*Triticum aestivum* L.). Applied Soil Ecology 108:300-306.
58. Viani A (2014) Forecasting potential distribution of spot blotch in wheat under climate change scenario in Indo-Gangetic plains. Ph.D. thesis, Plant Pathology, Indian Agricultural Research Institute, New Delhi, India.
59. Villa-Rodríguez E, Parra-Cota F, Castro-Longoria E, López-Cervantes J and Santos-Villalobos SDL (2019) *Bacillus subtilis* TE3: a promising biological control agent against *Bipolaris sorokiniana*, the causal agent of spot blotch in wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. durum). Biological Control 132:135-143.
60. Zhao Y, Selvaraj JN, Xing F, Zhou L, Wang Y, Song Y, Tan X, Sun L, Sangare L, Folly YME and Liu Y (2014) Antagonistic action of *Bacillus subtilis* strain SG6 on *Fusarium graminearum*. PLoS ONE 9:e92486.

دانش بیماری‌شناسی گیاهی (شاپای ا:۶۲۹۰-۲۵۸۸، شاپای چ: ۹۲۷۰-۲۲۵۱)
سال هشتم، جلد ۲، بهار و تابستان ۱۳۹۸
Plant Pathology Science (eISSN:2588-6290, pISSN:2251-9270)
Vol. 8(2), 2019

Extensional Article

Ash Dieback Disease

NOORALLAH HASANPOUR , MAHDI ARZANLOU✉

Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Tabriz University, Tabriz, Iran

Received: 06.05.2019 Accepted: 12.08.2019

Hasanpour N and Arzanlou M (2019) Ash dieback disease. Plant Pathology Science 8(2):70-76. DOI:10.2982/PPS.8.2.70

Abstract

Ash tree is an important symbol of the urban green space in the world, which is also used in the construction of home and sport equipment. Ash dieback disease caused by *Hymenoscyphus fraxineus* is widespread in the most forests and green areas of the European countries. The disease was first observed in Poland and Lithuania in the early 1990s. The geographical spread of the pathogen has increased in the last two decades and so it is now is considered as a serious threat to the Ash trees. Initial infection is caused by ascospores released from apothecia formed on the previous year's leaves dropped. Disease management can be achieved by prevention and quarantine methods, sanitation, identification and cultivation of resistant cultivars and the use of chemical fungicides. The disease has not been reported from Iran so far, however, the possibility of entering the disease in the future is unclear. Therefore in this article we discuss the various aspects related to this disease including symptoms, pathologic biology, and management methods.

Key words: Ash, Dieback, Management, *Hymenoscyphus*

✉ Corresponding author: arzanlou@tabrizu.ac.ir

مقاله ترویجی

بیماری سرخشکیدگی زبان گنجشک

نوراله حسن‌پور و مهدی ارزنلو✉
گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

دریافت: ۱۳۹۸/۰۲/۱۶ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۵/۲۱
حسن‌پور ن و ارزنلو م (۱۳۹۸) بیماری سرخشکیدگی زبان‌گنجشک. دانش بیماری‌شناسی گیاهی ۸(۲): ۷۶-۷۰.
DOI:10.2982/PPS.8.2.70

چکیده

درخت زبان گنجشک نماد مهمی از فضای سبز شهری در دنیا هست که از چوب آن در ساخت لوازم خانگی و ورزشی نیز استفاده می‌شود. بیماری سرخشکیدگی زبان گنجشک، ناشی از قارچ *Hymenoscyphus fraxineus* در اکثر کشورهای اروپایی در پهنه‌های جنگلی و فضای سبز شایع شده است. این بیماری برای اولین بار در اوایل سال ۱۹۹۰ در کشورهای لهستان و لیتوانی مشاهده گردید. پراکنش جغرافیایی عامل بیماری در دو دهه اخیر وسیعتر شده و به عنوان یک تهدید جدی برای زبان گنجشک به حساب می‌آید. آلودگی اولیه توسط آسکوسپورهای آزاد شده از آپوتسیوم‌های تشکیل شده روی برگ‌های ریخته شده از سال قبل به وجود می‌آید. مدیریت بیماری با روش‌های پیشگیری و قرنطینه، اقدامات بهداشتی، شناسایی و کشت رقمهای مقاوم و استفاده از سمهای شیمیایی عملی است. این بیماری تاکنون از ایران گزارش نشده است، با این وجود احتمال ورود بیماری به کشور در آینده دور از ذهن نیست، لذا در این مقاله جنبه‌های مختلف بیماری شامل نشانه‌ها، زیست‌شناسی بیمارگر و روش‌های مدیریت آن شرح داده شده‌اند.

واژگان کلیدی: زبان‌گنجشک، سرخشکیدگی، مدیریت، *Hymenoscyphus*

مقدمه

زبان‌گنجشک (*Fraxinus excelsior* L.) درخت خزان‌کننده از تیره *Oleaceae*، با دامنه پراکنش گسترده در اروپا، آسیا و آمریکای شمالی است(Wallander 2008, Dobrowolska *et al*. 2011, Clark 2013). زبان گنجشک از جنبه‌های مختلف برای انسان اهمیت دارد که از این بین می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: ۱- برگ خشک درختان زبان گنجشک در مناطق روستایی پوشیده شده از درخت در طول خشکسالی برای تغذیه دام استفاده می‌شود (Haas 2002) و آنها نماد مهمی از فضای سبز شهری هستند (Paltto *et al.* 201l, Moe and Botnen 1997, Jüriado *et al*. 2009a).۲- چوب سخت زبان گنجشک اروپایی این درخت را برای ساخت لوازم خانگی، روکش، ابزارهای دستی و لوازم ورزشی ارزشمند کرده است. ۳- درختان زبان‌گنجشک مخصوصا *F. excelsior* ماده شکری به نام مانا تولید می‌کند (Phillips *et al.* 2013, Ballian *et al*. 2008).

درخت زبان‌گنجشک در برابر طیف وسیعی از عوامل بیماری‌زا مانند قارچ‌ها، باکتری‌ها، فیتوپلاسماها و همچنین آفات حساس هستند که در این بین قارچ‌ها خسارت زیادی به آنها وارد می‌کنند. از بیماری‌های قارچی می‌توان به آنتراکنوز، زوال، زنگ و پوسیدگی ریشه اشاره کرد. پسیل، سفید بالک، شته گال‌زا، زنجره، سوسک پوست خوار و سوسک *Agrilus planipennis* نیز از آفات این درخت می‌باشند (Ziems *et al*. 2007).

از اوایل سال ۱۹۹۰ میلادی سرخشکیدگی شدید درختان *F. excelsior* در لهستان و لیتوانی مشاهده شده است (Kowalski 2001, Przybyl 2002, Lygis *et al*. 2005). سپس بیماری در مناطق جنوبی، غربی و شمالی اروپا گسترش یافت و از آلمان، سوئد، نروژ، جمهوری چک، دانمارک، مجارستان و اتریش گزارش شد

✉ مسئول مکاتبه: arzanlou@tabrizu.ac.ir

(Husson *et al*. 2011, Timmerman *et al*. 2011, Pautasso *et al*. 2013, Gross *et al*. 2014).
سپس در انگلستان، ولز، اسکاتلند و ایرلندشمالی مشاهده شده است (Halmschlager and Kirisits 2008). بیماری در کشورهای کره، ژاپن و چین هم دیده شده است (Han *et al*. 2014).

۱- نشانه‌های بیماری

بیماری سرخشکیدگی زبان‌گنجشک نه تنها در جنگلها بلکه در مناطق شهری هم دیده شده است. اگرچه همه رده‌های سنی این درخت تحت تاثیر قرار می‌گیرند، مرگ و میر در بین نهال‌ها بیشتر شایع است. در بعضی مناطق با تاریخچه طولانی سرخشکیدگی مانند کشور لیتوانی درختان زبان گنجشک بالغ به اندازه نهال‌ها از بین می‌روند. تاثیر تجمعی آلودگی‌های یکساله در میزبان باعث کاهش رشد می‌شود و درختان را در مقابل دیگر عوامل مستعد می‌سازد (Cleary 2015). نشانه‌های اولیه بیماری شامل لکه برگی، نکروز رگبرگی در جهت دمبرگ، نکروز دمبرگ و پژمردگی کامل یا بخشی از برگها را شامل می‌شود. پس از این، لکه‌های نکروتیک کوچک روی ساقه‌ها و شاخه‌ها ظاهر می‌شوند. این زخم‌های نکروتیک سپس توسعه می‌یابند و ممکن است شاخه‌ها را احاطه کنند که در نتیجه باعث پژمردگی و ریزش زودرس برگ‌ها، سرخشکیدگی شاخه‌ها و مخصوصا مرگ نوک تاج درخت می‌شود(شکل ۱). تغییر رنگ مایل به قهوه ای متمایل به خاکستری روی پوست چوب در دو جهت طولی مناطق نکروزه شده توسعه می‌یابد که در اتریش دیده شده است (Halmschlager and Kirisits 2008). علاوه بر نشانه‌های فوق نکروزه شدن طوقه نیز در درختان بیمار دیده می‌شود که فرآیند زوال را به طور چشمگیری تسریع می‌کند (Husson *et al*. 2012, Enderle *et al*. 2013).

۲- ریخت‌شناسی بیمارگر

بیمارگر قارچ *Hymenoscyphus fraxineus* (T. Kowalski) Baral, Queloz and Hosoya است . رنگ پرگنه آن روی محیط کشت عصاره مالت آگار در شرایط تاریکی سفید خاکستری تا قهوه‌ای تیره است.

شکل ۱. نشانه‌های بیماری سرخشکیدگی زبان گنجشک، a: سرخشکیدگی روی درختان زبان گنجشک، b: زخم‌های نکروزه شده روی شاخه‌های درختان زبان گنجشک، c: شانکر روی درختان زبان گنجشک، d: نکروزه شدن رگبرگ برگ روی درختان زبان گنجشک.

Figure 1. Symptoms of ash dieback disease, a: Dieback on the ash trees, b: Necrosis lesion on the ash trees branches, c: Canker on the ash trees, d: Leaf vein necrosis on the ash trees.

ریسه‌ها نیمه شفاف تا قهوه‌ای مایل به سبز زیتونی، صاف و بنددار هستند. فیالیدها نیمه استوانه‌ای تا نیمه چماقی شکل هستند. کنیدیوم‌ها استوانه‌ای کوتاه، با دو انتهای گرد یا خمیده، تک سلولی، شفاف تا نیمه شفاف می‌باشند. تعداد زیادی آپوتسیوم‌های پایه‌دار سفید رنگ قارچ روی برگ‌های خشک ریخته شده از سال قبل تشکیل می‌شوند. هیمنیوم از پارافیزهای استوانه‌ای شکل و آسک‌های استوانه‌ای تا چماقی شکل تشکیل شده است. آسکوسپورها شفاف و تک سلولی می‌باشند (Gross *et al*. 2014).

۳- فیزیولوژی بیمارگر

جدایه‌های قارچ *H. fraxineus* دارای فعالیت اکسیدازی بیرون سلولی متفاوت هستند (Schumacher *et al*. 2009). کووالسکی و بارتنیک در سال ۲۰۱۰ گزارش کردند که پرگنه این قارچ در دمای ۵ تا ۳۰ درجه سلسیوس رشد می‌کند و دمای بهینه برای رشد اغلب جدایه‌ها ۲۰ درجه سلسیوس می‌باشد. فیتوتوکسین ویریدیول و متابولیت‌های ثانویه مرثر در بیماری‌زایی این قارچ شناخته شده‌اند (Grad *et al*. 2009, Andersson *et al*. 2010).

۴- زیست‌شناسی بیمارگر

H. fraxineus قارچی هتروتال است و تولیدمثل جنسی را روی برگ‌های ریخته شده درختان زبان گنجشک در طول یک سال تکمیل می‌کند. آسکوسپورها توسط باد پراکنده می‌شوند و برگهای این درخت را در طول تابستان آلوده می‌کنند (Gross *et al*. 2014). چرخه زندگی کامل این قارچ در برگ‌های درختان *Fraxinus* sp. تکمیل می‌شود. آپوتسیوم‌ها درطول تابستان روی برگ‌های ریخته شده از سال قبل تولید می‌شوند. اغلب آپوتسیوم‌ها روی دمبرگ‌ها تشکیل می‌شوند. اما گاهی اوقات آپوتسیوم‌ها بر روی ساقه‌های کوچک افتاده شده روی زمین پیدا می‌شوند. دوره اسپوردهی اصلی از تیر تا اوایل مهر است ولی تحت شرایط مناسب اسپوردهی می‌تواند زودتر شروع شود و تا آبان طول بکشد. آسکوسپورهای پراکنده شده به وسیله باد توسط ماده لعاب ترشح شده به سطح برگ می‌چسبند. آسکوسپورها توسط اپرسوریوم به کوتیکول برگ نفوذ می‌کنند. در محیط‌های مرطوب، زخم‌های اولیه بر روی برگ گیاهچه‌های زبان گنجشک در طول دو هفته بعد از تلقیح به وجود می‌اید (Cleary *et al*. 2013b). قارچ *H. fraxineus* احتمالاً می‌تواند از طریق هوا پراکنده شود اما بیشتر می‌تواند از طریق خاک، آب، گیاه هنگام کاشت یا استفاده به عنوان چوب پراکنده شود. بزرگترین خطر پراکنش آن ازطریق دمبرگ‌های آلوده شده است. گروس و همکاران درسال ۲۰۱۲ هشت ژنوتیپ متفاوت از یک دمبرگ زبان گنجشک پیدا کردند. بنابراین، یک قطعه کوچک از دمبرگ ممکن است کافی باشد تا اپیدمی جدیدی دریک محل شروع شود. این قطعات می‌توانند ازطریق خاک، آب یا گیاهان آلوده جابجا شوند. پراکندگی خطرناک دیگر ازطریق چوب آلوده صورت می‌گیرد. بذرهای آلوده هم به طور جزئی باعث پراکندگی این بیمارگر می‌شوند (Husson *et al*. 2011).

۵- مدیریت بیماری

۵-۱-پیشگیری: از آنجایی که نهال‌های این درخت ممکن است آلوده شوند بدون اینکه نشانه‌ای داشته باشند قرنطینه کردن می‌تواند از انتشار بیماری از نهالستان‌های آلوده به دیگر مناطق جلوگیری کند (Nappo 2009).

۵-۲- اقدام‌های بهداشتی: از بین بردن برگ‌های ریخته شده آلوده از اسپور دهی قارچ جلوگیری می‌کند (Cooke *et al*. 2013). جلوگیری از ایجاد زخم و از بین بردن گیاهان یا بخش‌هایی از گیاهان می‌تواند به مهار بیماری کمک کند (Kile 1993). از آنجایی که درختان *F. excelsior* می‌توانند دمای بیشتری را نسبت به بیمارگر تحمل کنند، تیمار با آب گرم نهال این درختان به مدت ده ساعت در دمای ۳۶ یا ۴۰ درجه سلسیوس باعث از بین بردن بیمارگر داخل بافت زبان گنجشک می‌گردد (Hauptman *et al*. 2013).

۵-۳- مبارزه زیستی: پادزیستی دو طرفه بین *H. fraxineus* و قارچ‌های اندوفیت‌های زبان گنجشک سبب کاهش غلظت توکسین‌های تولید شده توسط *H. fraxineus* می‌گردد (Schulz *et al*. 2015). اغلب

قارچ‌های اندوفیت جداسازی شده از ساقه‌های درختان *F. excelsior* از رشد قارچ *H. fraxineus* جلوگیری کرده‌اند (Hanackova *et al*. 2017). اندوفیت‌های برگ درختان زبان گنجشک از جوانه‌زنی آسکوسپورهای *H. fraxineus* جلوگیری می‌کنند (Schlegel *et al*. 2016). در بعضی جدایه‌های اروپای مرکزی *H. fraxineus* ویروس HfMV1 و در بعضی دیگر ویروس‌های RNA دار دو رشته‌ای مشاهده شده‌اند (Cermakova *et al*. 2017).

۴-۵- مبارزه شیمیایی: تیمار برگ‌های آلوده با اوره برای کاهش اسپوردهی بیمارگر موثر است (Sutton *et al*. 2000, Bengtsson *et al*. 2006, Green *et al*. 2006). قارچکش‌های بنزیمیدازول مانند کاربندازیم و تیابندازول می‌توانند باعث کاهش اسپوردهی بیمارگر گردند (Cooke *et al*. 2013). ترکیب قارچکش‌های کلروتالونیل-کاربندازیم در مبارزه با سرخشکیدگی زبان‌گنجشک موثر است (Hauptman *et al*. 2014).

نتیجه‌گیری

بیماری مخرب سرخشکیدگی زبان‌گنجشک، ناشی از قارچ *Hymenoscyphus fraxineus*، در اکثر کشورهای اروپایی و بعضی کشورهای آسیایی شیوع یافته است. نظر به اهمیت این درخت در فضای سبز شهرهای ایران، پژوهش‌های بیشتری برای بررسی وقوع بیماری در ایران، روش‌های انتقال و انتشار بیمارگر در منطقه آلوده و شکل تولیدمثلی بیمارگر ضروری است. برای مدیریت بیماری قرنطینه کردن، اقدام‌های بهداشتی و استفاده از قارچ‌کش‌های مناسب پیشنهاد می‌شود.

References منابع

1. Andersson PF, Johansson SBK, Stenlid J and Broberg A (2010) Isolation, identification and necrotic activity of viridiol from *Chalara fraxinea*, the fungus responsible for dieback of ash. Forest Pathology 40:43-46.
2. Ballian D, Monteleone I, Ferrazzini D, Kajba D and Belletti P (2008) Genetic characterization of common ash (*Fraxinus excelsior* L.) populations in Bosnia and Herzegovina. Periodicum Biologorum 10:323–328.
3. Bengtsson M, Green H, Leroul N, Pedersen HL and Hockenhull J (2006) Effect of autumn application of urea on saprotrophic fungi in off-season leaf litter of sour cherry and evaluation of fungal isolates to reduce primary inoculum of *Blumeriella jaapii*. Journal of Plant Diseases and Protection 113:107-112.
4. Cermakova V, Eichmeier A, Herrero N and Botella L **(**2017) HfMV1 and other putative mycoviruses in Central European populations of *Hymenoscyphus fraxineus*, the causal agent of ash dieback in Europe. Baltic Forestry 23:107-115.
5. Clark JR (2013) Adaptation of ash (*Fraxinus excelsior* L.) to climate change. Dissertation, Bangor University, UK.
6. Cleary M, Nguyen D, Marčiulynienė D, Berlin A, Vasaitis R and Stenlid J (2015) *Hymenoscyphus fraxineus* on *Fraxinus mandshurica* in Far East Russia: genetic diversity, evidence of endophytic behaviour and associated foliar fungal community. Fungal Diversity.
7. Cleary MR, Daniel G and Stenlid J (2013b) Light and scanning electron microscopy studies of the early infection stages of *Hymenoscyphus pseudoalbidus* on *Fraxinus excelsior*. Plant Pathology 62:1294-1301.

8. Cooke L, Fleming C and McCracken A (2013) Efficacy of biocides, disinfectants and other treatments to limit the spread of ash dieback caused by *Chalara fraxinea*. Agri-Food and Bioscience Institute, p.37.
9. Dobrowolska D, Hein S, Oosterbaan A, Wagner S, Clark J and Skovsgaard JP (2011) A review of European ash (*Fraxinus excelsior* L.): implications for silviculture. Forestry 84:133-148.
10. Enderle R, Peters F, Nakou A and Metzler B (2013) Temporal development of ash dieback symptoms and spatial distribution of collar rots in a provenance trial of *Fraxinus excelsior*. European Journal of Forest Research 132:865-876.
11. Grad B, Kowalski T and Kraj W (2009) Studies on secondary metabolite produced by *Chalara fraxinea* and its phytotoxic influence on *Fraxinus excelsior*. Phytopathologia 54:61-69.
12. Green H, Bengtsson M, Duval X, Pedersen HL, Hockenhull J and Larsen J (2006) Influence of urea on the cherry leaf spot pathogen, *Blumeriella jaapii*, and on microorganisms in decomposing cherry leaves. Soil Biology and Biochemistry 38:2731-2742.
13. Haas JN (2002) 6000 years of tree pollarding and leaf-hay foddering of livestock in the Alpine area. Journal of Forest Science 119:231-240.
14. Halmschlager E and Kirisits T (2008) First report of the ash dieback pathogen *Chalara fraxinea* on *Fraxinus excelsior* in Austria. Plant Pathology 57:1177.
15. Han JG, Bhushan S, Hosoya T, Lee KH, Sung GH and Shin HD (2014) First report of the ash dieback pathogen *Hymenoscyphus fraxineus* in Korea. Mycobiology 42:391-396.
16. Hanackova Z, Havrdova L, Černý L, Zahradník D and Koukol O **(**2017) Fungal endophytes in ash shoots–diversity and inhibition of *Hymenoscyphus fraxineus*. Baltic Forestry 23:89-106.
17. Hauptman T, Celar FA, de Groot M and Jurc D (2014) Application of fungicides and urea for control of ash dieback. Biogeosciences and Forestry 8:165-171.
18. Hauptman T, Piskur B, Groot M, Ogris N, Ferlan M and Jurc D (2013) Temperature effect on *Chalara fraxinea*: heat treatment of saplings as a possible disease control method. Forest Pathology 43:360-370.
19. Husson C, Caël O, Grandjean JP, Nageleisen LM and Marcais B (2012) Occurrence of *Hymenoscyphus pseudoalbidus* on infected ash logs. Plant Pathology 61:889-895.
20. Husson C, Scala B, Cael O, Frey P, Feau N, Ioos R and Marcais B (2011) *Chalara fraxinea* is an invasive pathogen in France. European Journal of Plant Pathology 130:311-324.
21. Jüriado I, Liira J and Paal J (2009a). Diversity of epiphytic lichens in boreo-nemoral forests on the North-Estonian limestone escarpment: the effect of tree level factors and local environmental conditions. The Lichenologist 41:81–96.

22. Kile G.A. (1993). Plant diseases caused by species of Ceratocystis sensu stricto and Chalara. *Ceratocystis* and *Ophiostoma*: Taxonomy, Ecology and Pathogenicity 173-183.
23. Kowalski T (2001) On the ash dieback. Trybuna Les´nika Nr 6–7.
24. Kowalski T (2006) *Chalara fraxinea* sp. nov. associated with dieback of ash (*Fraxinus excelsior*) in Poland. Forest Pathology 36:264–270.
25. Lygis V, Vasiliauskas R, Larsson KH and Stenlid J (2005) Wood inhabiting fungi in stems of *Fraxinus excelsior* in declining ash stands of northern Lithuania, with particular reference to *Armillaria cepistipes*. Scandinavian Journal of Forest Research 20:337–346.
26. Moe B and Botnen A (1997) A quantitative study of the epiphytic vegetation on Npollarded trunks of *Fraxinus excelsior* at Havra, Osteroy, western Norway. Plant Ecology 129:157–177.
27. North American Plant Protection Organization (NAPPO) (2009) Chalara fraxinea Kowalski. Phytosanitary alert system.
28. Paltto H, Nordberg A, Norden B and Snall T (2011) Development of secondary woodland in oak wood pastures reduces the richness of rare epiphytic lichens. Plose One 6:e24675.
29. Phillips AJL, Alves A, Abdollahzadeh J, Slippers B, Wingfield MJ, Groenewald JZ and Crous PW (2013) The *Botryosphaeriaceae*: genera and species known from culture. Studies in Mycology 76:51–167.
30. Przybyl K. (2002). Fungi associated with necrotic apical parts of *Fraxinus excelsior* shoots. Forest Pathology 32:387–394.
31. Schlegel M, Dubach V, von Buol L and Sieber TN **(**2016) Effects of endophytic fungi on the ash dieback pathogen. FEMS Microbiology Ecology 92:142.
32. Schulz B, Haas S, Junker C, Andrée N and Schobert M **(**2015) Fungal endophytes are involved in multiple balanced antagonisms. Current Science 109:39–45.
33. Schumacher J, Kehr R and Leonhard S (2009) Mycological and histological investigations of Fraxinus excelsior nursery saplings naturally infected by Chalara fraxinea. Forest Pathology 40:419-429.
34. Sutton DK, MacHardy WE and Lord WG (2000) Effects of shredding or treating apple leaf litter with urea on ascospore dose of *Venturia inaequalis* and disease buildup. Plant Disease 84:1319-1326.
35. Wallander E (2008) Systematics of *Fraxinus* (Oleaceae) and evolution of dioecydioecism. Plant Systematic Evolution 273:25–49.
36. Ziems AD, Giesler LJ and Wegulo N (2007) Pesticide Selection Guide for Plant Diseases Affecting Woody Ornamentals and Herbaceous Perennials in Nebraska. Historical Materials from University of Nebraska-Lincoln Extension.

دانش بیماری‌شناسی گیاهی (شاپای ا:۶۲۹۰-۲۵۸۸، شاپای چ: ۹۲۷۰-۲۲۵۱)
سال هشتم، جلد ۲، بهار و تابستان ۱۳۹۸
Plant Pathology Science (eISSN:2588-6290, pISSN:2251-9270)
Vol. 8(2), 2019

Extension Article

Next Generation Sequencing Technique and Its Application in Plant Virology

ZOHREH DAVOODI, JAHANGIR HEIDARNEJAD✉, HOSSEIN MASOUMI
Department of Plant Pathology, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

Received: 25.12.2018 Accepted: 04.08.2019

Davoodi Z, Heidarnejad J and Masoumi H (2019) Next generation sequencing technique and its application in plant virology. Plant Pathology Science 8(2):77-85. DOI:10.2982/PPS.8.2.77

Abstract

DNA sequencing is used by virtually all branches of biological research. Among the first advanced sequencing technologies, scientists were able to elucidate genetic information from any particular biological system using the Sanger sequencing method. Although Sanger sequencing generates high quality sequencing data, its limitations such as scalability, speed and resolution often preclude scientists from obtaining the essential information. To overcome these barriers, next generation sequencing technique (NGS) was introduced at the beginning of the 21st century. This technique provided a highly efficient, rapid, and low cost DNA sequencing platform beyond the reach of the standard and traditional DNA sequencing technologies that developed in late 1970s. In 2009, NGS technologies began to be applied to several areas of plant virology including virus/viroid genome sequencing, discovery and detection, ecology, epidemiology and replication. It is expected that NGS plays very significant roles in many plant virology researches.

Key words: DNA sequencing, Viroid, Virus, Illumina/Solexa

✉ Corresponding author: jheydarnejad@uk.ac.ir

مقاله ترویجی

تکنیکِ نسل جدید توالی‌یابی و کاربرد آن در ویروس‌شناسی گیاهی

زهره داودی، جهانگیر حیدرنژاد ✉ و حسین معصومی
بخش گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان
دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۰۴ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۵/۱۳
داودی ز، حیدرنژاد ج و معصومی ح (۱۳۹۸) تکنیکِ نسل جدید توالی‌یابی و کاربرد آن در ویروس‌شناسی گیاهی. دانش بیماری‌شناسی گیاهی ۸(۲):۸۵-۷۷. DOI: 10.2982/PPS.8.2.77

چکیده
تعیین توالی دی‌اِن‌اِ در همه شاخه‌های علوم زیستی کاربرد دارد. در میان اولین فن‌آوری‌های پیشرفته نسل توالی‌یابی، دانشمندان با ظهور توالی‌یابی سنگر، توانستند اطلاعات ژنتیکی گونه‌ها را در هر سیستم بیولوژیکی مشخص کنند. اگرچه هنوز هم این تکنیک به‌دلیل کیفیت توالی‌های خوانده شده، مورد توجه است، اما محدودیت هایی چون مقیاس کار، سرعت و تفکیک‌پذیری موانعی است که مانع دسترسی دانشمندان به اطلاعات اساسی مورد نیاز شده است. برای غلبه بر این موانع، فنآوری توالی‌یابی نسل جدید (NGS) در شروع قرن ۲۱ ارائه شد. این فن‌آوری، توالی‌یابی بسیار کارآمد، سریع و کم هزینه را نسبت به فن‌آوری استاندارد و سنتی توسعه یافته در اواخر دهه ۱۹۷۰، فراهم نمود. در سال ۲۰۰۹ فن‌آوری NGS برای چندین جنبه ویروس‌شناسی گیاهی از جمله توالی‌یابی ژنوم، کشف و ردیابی، اکولوژی، اپیدمولوژی و تکثیر ویروس‌ها و ویروئیدها استفاده شد. انتظار می‌رود که فن‌آوری NGS نقش بسیار مهمی در بسیاری از تحقیقات ویروس‌شناسی گیاهی داشته باشد.

واژگان کلیدی: توالی‌یابی دی‌اِن‌اِ، ویروئید، ویروس، Illumina/Solexa

مقدمه

روش اولیه بسیار پرزحمت توالی‌یابی دی‌اِن‌اِ در اوایل دهه ۱۹۷۰، توسط فردریک سنگر (Frederick Sanger) در دانشگاه کمبریج (Cambridge) انگلستان و هم‌چنین والتر گیلبرت (Walter Gilbert) و آلن ماکسام (Allan Maxam) در دانشگاه هاروارد (Harvard) ابداع شد (Maxam and Gilbert 1977). فن‌آوری توالی‌یابی اولیه، پژوهش‌های گروه‌های سنگر و گیلبرت بود که دو روش متمایز برای شناسایی نوکلئوتیدها در قطعه دی‌اِن‌اِ در اواخر دهه ۱۹۷۰ ارائه دادند. در میان این روش‌ها، روش سنگر که به‌عنوان روش خاتمه دهنده زنجیره شناخته می‌شود، تجاری شده و مورد استفاده قرار گرفته است. حداکثر طول قطعات قابل توالی‌یابی با سنگر حدود ۱۰۰۰ جفت باز است و هزینه این روش برای هر یک کیلو باز حدود نیم دلار است که برای تعیین توالی ژنوم انسان بسیار پرهزینه می‌باشد. هدف فن‌آوری‌های ارائه شده در سال ۲۰۰٤، توسعه فن‌آوری‌های پیشرفته و قادر به توالی‌یابی ژنوم انسان با کاهش هزینه‌ها و فقط در چند روز می‌باشند. از آن زمان، بسیاری از گروه‌های تحقیقاتی در حال توسعه سیستم‌های تعیین توالی می‌باشند. ابتدا در سال ۲۰۰٤، روش 454 Life Science معرفی شد که بر اساس روش پایروسکونسینگ (Pyrosequensing) می‌باشد. در اوایل سال ۲۰۰۷، روش محبوب Illumina معرفی شد که بر اساس تشکیل پل است. در همان سال، سیستم دیگری تحت عنوان SOLiD بر اساس اتصال معرفی شد. همه این تکنیک‌های بالا نیاز به تکثیر قبل از توالی‌یابی دارند که مرحله پرهزینه و وقت‌گیر آن می‌باشد. به همین دلیل، از سال ۲۰۰۸ فن‌آوری‌های جدید دیگر معرفی شدند (Masoudi-Nejad *et al*. 2013).

✉ مسئول مکاتبه:jheydarnejad@uk.ac.ir

به‌دلیل تولید سریع و نرخ بالای جهش اکثر ویروس‌ها، جمعیت ویروس‌های آلوده کننده گیاهان می‌توانند تنوع ژنتیکی قابل توجهی در طول دوره آلودگی ایجاد کنند. ظهور فنآوری توالی‌یابی نسل جدید (Next generation sequencing=NGS) با توانایی بالقوه برای بررسی هزاران توالی ویروس از یک میزبان، به‌طور چشمگیری توانایی ما را در توصیف تنوع توالی در میزبان آلوده به ویروس، افزایش داد (Nelson and Hughes 2015).

در مقاله حاضر، ابتدا روش‌های تعیین توالی سنگر و چالش‌های موجود در این زمینه بررسی می‌شود. سپس نسل بعدی روش‌های تعیین توالی با توان عملیاتی بالا و مواردی که امروزه به‌صورت تجاری در دنیای ژنتیک کاربرد بیشتری دارد به اختصار معرفی می‌شود. سپس، اشاره‌ای به برنامه‌های کاربردی نسل بعدی توالی‌یابی و در نهایت نقش آن در کشف و تعاملات مولکولی ویروس‌های گیاهی ارائه می‌شود.

۱-نسل‌های مختلف فنآوری توالی‌یابی

۱-۱-نسل اول توالی‌یابی: روش سنگر (Chain-termination)

مبنای روش سنگر کاربرد دی دئوکسی نوکلئوزید تری فسفات (ddNTPs) به‌عنوان ختم کننده زنجیر دی‌اِن‌ا است. روش کلاسیک ختم زنجیرسازی نیاز به دی‌اِن‌ای تک رشته‌ای به‌عنوان الگو، آغازگر، دی‌اِن‌ای پلیمراز، دئوکسی نوکلئوزید تری فسفات (dNTPs) و نوکلئوتیدهای تغییر یافته (dideoxyNTPs) برای ختم طویل شدن رشته دی‌اِن‌ا دارد. در این روش دی دئوکسی نوکلئوزید تری فسفات به‌وسیله رادیواکتیو نشاندار شده (معمولا با S^{32}) و روی ژل اکریل آمید، الکتروفورز و سپس ژل از لایه شیشه‌ای جدا شده و یک فیلم رادیولوژی روی ژل قرار می‌گیرد و بعد از اثرگذاری رادیواکتیو روی فیلم، نتایج تفسیر می‌شوند. مدتی بعد از روش دی دئوکسی نوکلئوزید تری فسفات نشاندار شده با فلورسنس استفاده شد. روش تعیین توالی ختم زنجیرسازی، همراه با آنالیز توالی دی‌اِن‌ا با توان عملیاتی بالا در حال حاضر در اکثر پروژه‌های تعیین توالی استفاده می‌شود (Murphy *et al*. 2005, Herzyk 2014).

چالش‌های روش سنگر

۱- هزینه: پس از گذشت سه دهه، هزینه توالی‌یابی روش سنگر حدود ۰/۵ دلار برای هر کیلو باز می‌باشد که هنوز هم برای بسیاری از پروژه‌های تحقیقاتی بالا می‌باشد.

۲- اندازه کوتاه قطعات: این روش تن‌ها توانایی توالی‌یابی قطعات نسبتا کوتاه (۳۰۰ تا ۱۰۰۰ نوکلئوتید) را دارد. مانع اصلی برای تعیین توالی قطعات بزرگ‌تر دی‌اِن‌ا، توان ناکافی برای جداسازی قطعات بزرگ دی‌اِن‌ا در هنگام الکتروفورز است که لازم است به طریقی از هم جدا شوند که تفکیک در حد یک نوکلئوتید میسر باشد.

۳- نیاز برای اتوماسیون کامل: برای اتوماسیون کامل آماده‌سازی نمونه مشکلاتی وجود دارد. تعیین توالی سنگر تن‌ها در زمانی می‌تواند انجام شود که غلظت بالایی از دی‌اِن‌ا در دسترس باشد که تولید جمعیت زیاد از قطعات دی‌اِن‌ا، از طریق همسانه‌سازی باکتریایی امکان‌پذیر است که این کار به تن‌هایی زمان زیادی را طلب می‌کند (Shendure *et al*. 2004, Masoudi-Nejad *et al*. 2013)

۱-۲- نسل دوم (جدید) توالی‌یابی (Deep/next-generation sequencing)

پس از تعیین توالی به روش سنگر، نسل بعدی از فنآوری توالی‌یابی به نام توالی‌یابی نسل جدید (NGS) توسط جامعه علمی معرفی شد. این نسل برخی از موانع مهم را برطرف کرده و حوزه‌هایی از علوم تحقیقات در مورد بیماری‌های انسان تا کشاورزی و علوم تکاملی را توسعه داده است. اساسا مفهوم فنآوری NGS شبیه به سنگر می‌باشد. بازهای قطعات کوچک دی‌اِن‌ا به‌وسیله سیگنال‌های منتشر شده در زمان سنتز هر قطعه تشخیص داده می‌شود. روش NGS این فرآیند را به‌جای یک یا تعداد کمی از قطعات دی‌اِن‌ا با میلیون‌ها واکنش موازی انجام می‌دهد.

۱-۳- نسل سوم توالی‌یابی (Next-next-generation sequencing)

در حال حاضر جدیدترین سیستم توالی‌یابی که به نسل سوم توالی‌یابی معروف است، توسط شرکت

Helicos Bioscience معرفی شده و قادر به توالی‌یابی یک مولکول منفرد می‌باشد. ویژگی برتر این فنآوری در مقایسه با تکنیک‌های NGS، عدم نیاز به تکثیر دی‌اِن‌اِ با واکنش PCR می‌باشد که باعث افزایش دقت و کاهش زمان لازم برای توالی‌یابی شده است و هم‌چنین دارای قابلیت شناسایی نوکلئوتید اضافه شده به زنجیره در حال ساخت، در زمان واقعی و بلافاصله پس از اضافه شدن است. هم‌چنین طول متوسط توالی‌های قرائت شده توسط این سیستم ۱۳۰۰ جفت باز است که از طول توالی‌های خوانده شده توسط تمام دستگاه‌های نسل دوم بیشتر است، البته میزان توالی‌های قرائت شده در مقایسه با سیستم‌های نسل دوم کمتر است. این فنآوری شامل تکنیک‌های Helicos و PacBio می‌باشد (Gupta and Gupta 2014).

۱-٤- نسل چهارم توالی‌یابی (Other/ fourth generation sequencing)

انواع مختلفی از فنآوری‌های دیگر وجود دارد تحت عنوان Oxford Nanopore، Polonator و ژنومیک کامل که توسط نسل دوم و سوم تعریف نشده‌اند و می‌توانند به‌عنوان نسل بالاتر از فن‌آوری توالی‌یابی قرار بگیرند. البته موفقیت این فن‌آوری‌های جدید در مقایسه با فن‌آوری‌های موجود، باید به اثبات برسند (Gupta and Gupta 2014).

۲- فن‌آوری‌های نسل جدید یا نسل دوم توالی‌یابی

در اواخر دهه ۱۹۹۰، نسل جدید دستگاه‌های توالی‌یابی توسط شرکت‌های Roche/454 Life Science، Illumina/Solexa و ABI/SOLiD ایجاد و در سال‌های ۲۰۰۵ و ۲۰۰۶ تجاری‌سازی شدند. این دستگاه‌های توالی‌یابی از نظر طول خوانش‌ها، اطلاعات توالی‌های تولید شده و کیفیت داده‌ها با یکدیگر متفاوت می‌باشند که در ادامه شرح داده می‌شوند (Gupta and Gupta 2014).

۲-۱-فنآوری Roche/454 Life Science

در اواخر دهه ۱۹۹۰ برای اولین‌بار فنآوری موسوم به پایروسکونسینگ برای تعیین توالی دی‌اِن‌اِ در مقیاس وسیع توسط شرکت آمریکایی 454 Life Sciences پیشنهاد و سپس این روش توسط شرکت سوئیسی رش (Roche) خریداری شد. در این سیستم ابتدا نمونه دی‌اِن‌اِ به قطعات کوچک با طول تقریبا ۱۰۰ جفت باز شکسته و سپس دو آداپتور A و B به دو انتهای قطعات متصل می‌شود، این آداپتورها محل اتصال آغازگرهای لازم برای تکثیر و توالی‌یابی هستند. این قطعات با ذرات کوچکی که پوششی از استرپتاویدین در سطح خود دارند، مخلوط و به کمک آداپتور B خود به این ذرات متصل می‌شوند. سپس قطعات دو رشته‌ای، واسرشته و تک رشته‌ای می‌شوند. این مخلوط به اندازه کافی رقیق می‌باشد، به‌طوری که به هر ذره منفرد تن‌ها یک رشته دی‌اِن‌اِ متصل است. سپس با اضافه کردن ترکیبات لازم برای تکثیر قطعات دی‌اِن‌اِی متصل به ذرات، این مخلوط به امولسیون تبدیل می‌شود، به این ترتیب هر ذره با رشته دی‌اِن‌اِ متصل به آن در یک قطره امولسیون به دام افتاده و واکنش PCR به‌طور مستقل در هر قطره انجام می‌شود (Emulsion PCR). در مرحله بعد به‌منظور تعیین توالی، ذرات حاوی دی‌اِن‌اِ بر روی یک صفحه سیلیکونی متشکل از تعداد زیادی چاهک منظم با حجمی در حد پیکولیتر پخش می‌شوند. سپس آنزیم‌های لازم یعنی دی‌اِن‌اِ پلیمراز، سولفوریلاز و لوسیفراز به چاهک‌ها اضافه می‌شوند. در این مرحله چاهک‌ها به‌طور جداگانه ومتوالی در معرض dNTP های مختلف قرار می‌گیرند و بین هر بار افزودن سوبسترای دئوکسی نوکلئوتیدی یک مرحله شستشو انجام می‌شود. با ورود هر نوکلئوتید مکمل، یک مولکول پیروفسفات آزاد شده و آنزیم سولفوریلاز این مولکول پیروفسفات را با استفاده از آدنوزین فسفوسولفات (APS) به ATP تبدیل می‌کند. آنزیم لوسیفراز نیز به کمک ATP تولید شده لوسیفرین را به اکسی‌لوسیفرین تبدیل می‌کند که این واکنش همراه با ساطع شدن نور است. نور ساطع شده توسط دوربین‌های متصل به صفحه سیلیکونی ثبت شده و به‌صورت پیک در یک گراف نمایان می‌شود. در آخرین نسخه ارائه شده از سوی شرکت Roche، این فنآوری می‌تواند تا ۱۴ گیگا باز توالی با طول متوسط ۷۰۰ جفت باز تولید کند (Masoudi-Nejad *et al*. 2003, Gupta and Gupta 2014).

۲-۲- فنآوری Illumina/Solexa

در سال ۲۰۰۶ شرکت Solexa دستگاه Genome Analyzer را به بازار ارائه کرد که در سال ۲۰۰۷ توسط کمپانی Illumina خریداری و از آن زمان به بعد با نام Illumina/Solexa شناخته می‌شود. این روش تعیین توالی با استفاده از خاصیت رنگ‌های پایان دهنده ولی برگشت‌پذیر طراحی شده است. برای انجام توالی‌یابی، ابتدا دی‌اِن‌اِ مورد نظر به قطعاتی با طول کمتر از ۸۰۰ جفت باز شکسته می‌شود. این قطعات با انتهای صاف بوده و دارای یک نوکلئوتید اضافه A در انتهای ۳ً می‌باشند. سپس این قطعات از دو انتها به آداپتورهایی که در انتهای خود دارای یک نوکلئوتید اضافی T هستند، متصل می‌شوند. فرآورده‌های حاصل پس از واسرشته شدن از یک انتها با آغازگرهای متصل و مکمل با توالی آداپتور به یک سطح جامد به نام Flow cell متصل شده و بر روی این سطح تثبیت می‌شوند و از انتهای دیگر آزاد خود با دیگر توالی‌های مکمل موجود در سطح Flow cell متصل شده و به این ترتیب یک ساختار پل مانند تشکیل می‌شود که الگوی تکثیر در واکنش PCR می‌باشد (Bridge PCR). پس از انجام واکنش PCR تعداد زیادی نسخه از قطعات دی‌اِن‌اِ دو رشته‌ای بر روی سطح جامد تولید می‌شوند که به آنها اصطلاحا خوشه گفته می‌شود. در مرحله بعد به‌منظور تعیین توالی قطعات، مولکول‌های دی‌اِن‌اِ تک رشته‌ای و خطی می‌شوند، پس از هیبریداسیون، آغازگر مخصوص توالی‌یابی به توالی مکمل آداپتوری در انتهای هر رشته Flow cell برای تعیین توالی در دستگاه مربوطه آماده است. در هر سیکل توالی‌یابی، مخلوطی از چهار نوکلئوتید که هر کدام با یک رنگ فلورسانت مختلف نشانه‌گذاری شده‌اند به سطح Flow cell اضافه می‌شود. پس از شناسایی نوکلئوتید اضافه شده به رشته دی‌اِن‌اِی در حال سنتز، رنگ فلورسانت به همراه گروه خاتمه دهنده از انتهای ۳ً باز برداشته شده و با اضافه شدن مخلوط نوکلئوتیدی به سطح، سیکل بعدی آغاز می‌گردد. طول متوسط توالی‌های خوانده شده توسط این فنآوری ۳۵-۱۵۰ جفت باز است (Masoudi-Nejad *et al*. 2013, Gupta and Gupta 2014).

۲-۳- فنآوری ABI/SOLiD

در سال ۲۰۰۶ کمپانی SOLiD فنآوری توالی‌یابی از طریق اتصال را به بازار معرفی کرد و در همین سال توسط شرکت Applied Biosystems(ABI) خریداری شد. مراحل آماده‌سازی نمونه دی‌اِن‌اِ تقریبا مشابه با سیستم توالی‌یابی ۴۵۴ می‌باشد، به‌طوری که نمونه دی‌اِن‌اِ موردنظر به قطعات کوچک شکسته و پس از اتصال آداپتور به انتهای قطعات حاصل، این قطعات از طریق Emulsion PCR تکثیر می‌شوند. در مرحله تعیین توالی، آغازگر توالی‌یابی که مکمل توالی آداپتور در انتهای قطعات دی‌اِن‌اِ است به این قطعات متصل می‌شود، سپس یکسری اکتامرهای الیگونوکلئوتیدی نشاندار شده با رنگ‌های فلورسانت برای اتصال به آغازگر با یکدیگر رقابت می‌کنند که در این اکتامر دو باز وسط (بازهای ٤ و ٥) با یکی از چهار رنگ فلورسانت نشاندار شده است، به این ترتیب پس از اتصال اکتامر به آغازگر، این بازها شناسایی خواهند شد. اکتامر اولیگونوکلئوتیدی پس از باز پنجم شکسته و رنگ فلورسانت رها می‌شود. سپس با اتصال سایر اکتامرها، چرخه‌های هیبریداسیون و اتصال تکرار می‌شوند. پس از یکسری چرخه‌های اتصال، قطعه مورد نظر با آغازگر مخصوص توالی‌یابی دیگری که مکمل موقعیت n-1 است هیبرید شده و مجددا چرخه‌های اتصال اکتامر اولیگونوکلئوتیدی به آغازگر تکرار شده تا بازهای دیگر توالی‌یابی شوند. پس از پنج دور هیبریداسیون آغازگرهای توالی‌یابی مختلف با قطعه موردنظر و تکمیل چرخه‌های اتصال برای هر اکتامر الیگونوکلئوتیدی نشاندار، هر باز با استفاده از دو آغازگر مختلف و در طی دو واکنش مستقل توالی‌یابی می‌شود. با استفاده از این فنآوری، توالی‌هایی به طول ۳۵-۷۵ جفت باز خوانده می‌شود (Masoudi-Nejad *et al*. 2003, Gupta and Gupta 2014).

۳-کاربردهای متنوع نسل جدید توالی‌یابی

سرعت بالا و هزینه پایین توالی‌یابی با استفاده از روش نسل جدید در مقایسه با روش تعیین توالی سنگر

کاربردهای فراوانی را برای آن ایجاد کرده است. از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به توالی‌یابی دوباره کل ژنوم، توالی‌یابی مجدد ژنوم‌های شناخته شده، توالی‌یابی مجدد هدفدار، توالی‌یابی ترانسکریپتوم، توالی‌یابی آرِاناِی کوچک، برهمکنش پروتئین- دی‌اِناِ و متاژنومیکس اشاره نمود (Gupta and Gupta 2014).

۳-۱- توالی‌یابی نسل جدید (NGS) در تشخیص ویروس‌ها

در ابتدا برای تعیین توالی ویروس‌های گیاهی از روش سنگر استفاده می‌شد؛ مانند سایر علوم، ظهور فنآوری توالی‌یابی نسل جدید منجر به انقلابی در کشف ویروس و فرصت‌های جدیدی برای تشخیص ویروس شد. برای اولین بار تعدادی از محققین ویروس‌شناس، استفاده از فنآوری NGS را در سال ۲۰۰۹ منتشر کردند (Adams *et al*. 2009, Al Rwahnih *et al*. 2009) که از روش‌های توالی‌یابی مختلفی استفاده کرده‌اند (عمدتا Roche 454 و Illumina). مطالعات گسترده‌ای با تعیین توالی mRNA با موفقیت انجام شده است (Wylie *et al*. 2013). با این حال اشکال این روش به‌خصوص برای ویروس‌های با غلظت پایین این می‌باشد که بخش عظیمی از توالی از دست رفته است به این دلیل که اکثر توالی مربوط به آرِاناِ میزبان می‌باشد. یکی دیگر از روش‌های غالب استفاده شده، جداسازی dsRNA است (Roossinck *et al*. 2010, Al Rwahnih *et al*. 2011). با توجه به اینکه آرِاناِهای داخلی گیاه ساختار دو رشته‌ای تشکیل نمی‌دهند اما تکثیر به واسطه ویروس‌های آرِاناِ دار انجام می‌شود، در نتیجه این روش به شدت توسط اسیدهای نوکلئیک ویروسی غنی می‌شود. البته با توجه به این‌که برخی ویروس‌ها مانند ویروس‌های دی‌اِناِ دار، dsRNA کم یا اصلا ندارند، در نتیجه این روش برای این ویروس‌ها قابل استفاده نمی‌باشد. یک عملکرد ویژه تشخیص ویروس بر اساس NGS، روش Vector-enabled metagenomics (VEM) می‌باشد که در آن حشرات برای شناسایی ویروس‌های موجود در محیط نمونه‌برداری می‌شوند (Ma *et al*. 2011, Rosario *et al*. 2013).

۳-۲- توالی‌یابی نسل جدید و آشکارسازی علت بیماری‌های ناشناخته و آلودگی‌های پنهان

استفاده از فن‌آوری‌های توالی‌یابی نسل جدید در ویروس‌شناسی گیاهی نشان داد که برخی بیماری‌ها با علت ناشناخته در میزبان‌های علفی یا عامل نهفته آلودگی در گونه‌های مختلف میزبانان وحشی توسط ویروس‌های جدید و ناشناخته ایجاد می‌شوند. تاکنون بر اساس این روش، ویروس‌های جدید زیر شناخته شده‌اند: ۱- در گل تکمه‌ای (*Gomphrena globosa*) یک کوکوموویروس موقت به نام Gayfeather mild mottle virus، ۲- در سیب‌زمینی شیرین دو ویروس dsDNA دار (بادناویروس) و یک ویروس ssDNA دار (مستروویروس)، ۳- در فلفل و بادمجان به ترتیب ویروس لکه حلقوی زرد فلفل (*Pepper yellow leaf curl virus*) و پیسک خفیف بادمجان (*Eggplant mild leaf mottle*) ۴- در فلفل سیاه، دو ویروس دی‌اِناِی‌دار با نام پیشنهادی DNA virus 1 و DNA virus 2 ۵- در چمن وحشی ویروس کوتولگی غلات (*Cereal dwarf virus*). اکثر بیماری‌های با علت ناشناخته آلوده کننده محصولات هسته‌داران، سیب و مرکبات که با پیوند قابل انتقال هستند، عوامل بیماری‌زای سیستمیکی را نشان می‌دهند که با استفاده از سیستم نسل جدید توالی‌یابی، به مطالعه آن‌ها پرداخته‌اند (جدول ۱). فنآوری NGS هم‌چنین گزینه خوبی برای بررسی بیماری‌هایی با علت ناشناخته در انگور می‌باشد. یک مارافی‌ویروس جدید (*Grapevine Syrah 1 virus*) در ارتباط با کاهش انگور syrah شناسایی شده است. هم‌چنین، ویروس‌های آرِاناِی‌دار جدید با نام‌های موقتی Grapevine Pinot gris virus و Grapevine virus F. (*Vitivirus*) و دو ویروس دی‌اِناِی‌دار که اولی متعلق به جنس بادناویروس با نام موقتی Grapevine vein clearing virus، و دومی یک جمینی‌ویروس با نام موقتی Grapevine red-blotch-associated virus یا Grapevine red-leaf-associated virus کشف شده‌اند (Barba *et al*. 2014).

جدول ۱. نتیجه نسل جدید توالی‌یابی ویروس گیاهی از siRNA، RNA کل یا dsRNA میوه‌های معتدله، مرکبات یا انجیر آلوده (Barba *et al*. 2014).

Table 1. Next-generation sequencing of plant viral siRNA, total RNA or dsRNA from virus-infected temperate fruit crop, citrus or fig hosts (Barba *et al*. 2014).

Host	Study finding	Sample preparation/target	Sequencing platform
Raspberry	A novel virus isolated from infected raspberry plants was completely sequenced and characterized. It was designated as *Raspberry latent virus*. The virus is a novel dicot-infecting reovirus in the family *Reoviridae*, subfamily *Spinareovirinae.*	dsRNA	Illumina
Citrus	In *Citrus tristeza virus* (CTV) infected citrus plants It was shown that the citrus homologues of Dicer-like ribonucleases mediate the genesis of the 21 and 22 nt CTV siRNAs and that the ribonucleases act not only on the genomic RNA but also on the 30 co-terminal subgenomic RNAs and, particularly, on their dsRNA forms. A novel citrus miRNAs was also indentified and how CTV influences their accumulation was determined.	CTV sRNAs, gRNA sgRNAs	Illumina
Citrus	A novel DNA virus species, member of the family *Geminiviridae*, was identified and associated with citrus chlorotic dwarf disease. A provisional name of Citrus chlorotic dwarf-associated virus was proposed.	siRNAs and total DNA	Illumina HiSeq2000
Apple, Citrus, Grapevine	Detected ASPV, ACLSV and an unknown mycovirus. Detected two variants of CTV and ASGV. Detected variants of GLRaV-3, GVA and an unknown mycovirus.	siRNAs	Illumina
Apple	Identified agents associated with green crinkle disease of apple trees. The disease is a complex one as the following viruses were identified associated with it: ASGV, ASPV, ACLSV, ApLV, ApPCLSV and PCMV.	siRNAs	Illumina HiSeq2000
Fig	Detected *Fig mosaic virus* and *Fig latent virus*-1 for their elimination from infected clones. It is the first application of next-generation sequencing technology to detect an identify known and new species of viruses infecting fig trees.	DsRNAs	Illumina
Citrus	A novel virus was discovered by analysis of the contigs assembled from the virus siRNAs sequences which showed similarity with luteovirus sequence, particularly with *Pea enation mosaic virus*, the type member of the genus *Enarnovirus*. The complete genome of the virus was determined and the new virus was provisionally named Citrus vein enation virus.	siRNAs	Solexa-Illumina

ACLSV=*Apple chlorotic leaf spot virus*, ApLV=*Apricot latent virus*, ApPCLSV= *Apricot pseudo-chlorotic leaf spot virus*, ASGV=*Apple stem grooving virus*, ASPV= *Apple stem pitting virus*, CTV=*Citrus tristeza virus*, GLRaV-3=*Grapevine leaf roll associated virus* 3, GVA=*Grapevine virus* A, PCMV=*Peach chlorotic mottle virus*, PNRS=*Prunus necrotic ring spot virus*, PPV=*Plum pox virus*.

۴-چالش‌های فنآوری NGS

بزرگترین مزیت فنآوری NGS، توانایی تولید حجم انبوهی از اطلاعات در زمان کوتاه، خود به یک محدودیت بزرگ تبدیل می‌گردد. تجزیه، تفسیر و نتیجه‌گیری خروجی‌های به‌دست آمده فراتر از مهارت‌های انسانی است و نیاز به کمک سیستم‌های پیشرفته کامپیوتری و یا سیستم‌های محاسبه‌گر پیچیده دارند. هم‌چنین حجم بالای اطلاعات تولید شده توسط این فنآوری نیاز به ذخیره‌سازی و قابلیت کنترل کیفیت دارد و ممکن است هزینه‌های مربوط به ذخیره‌سازی و آنالیز داده‌ها بالاتر از هزینه‌های مربوط به تولید داده‌های توالی باشد. اگر چه چالش‌های زیادی در ارتباط با فن‌آوری NGS وجود دارد ولی مزایای استفاده از این فن‌آوری بیشتر از معایب آن می‌باشد (Herzyk 2014).

نتیجه‌گیری

روش تشخیص ویروس‌ها در آزمایشگاه‌ها با معرفی روش الایزا در سال ۱۹۷۰ پیشرفت عظیمی نمود و برای طیف وسیعی از ویروس‌های مختلف با تغییر بسیار کمی استفاده شد، الایزا روش آسانی است و نیاز به تخصص بالایی ندارد و با هزینه پایین و مواد در دسترس در آزمایشگاه‌های معمول در سراسر جهان در حال استفاده می‌باشد. در دو دهه اخیر روش‌های توالی‌یابی دی‌اِن‌اِی به دلیل صرفه‌جویی در زمان و هم‌چنین در زمان زیاد بودن نمونه‌ها و در دسترس نبودن آنتی‌بادی کافی، به‌عنوان اولین جایگزین الایزا مورد توجه قرار گرفته‌اند. از بین این روش‌ها بدون شک فن‌آوری NGS به محققین فرصت‌های زیادی برای انجام آسان تحقیقات با درک بهتر مسائل علمی در سطح کل ژنوم و نه تنها در سطح خاصی از بافت یا یک اندام را فراهم نموده است. البته عامل اصلی در توسعه این تکنیک علم پزشکی است که خواستار تعیین توالی کل ژنوم انسان با هزینه بسیار کم می‌باشد. در حال حاضر فنآوری NGS، کشف و شناسایی سریع ویروس‌ها را در آزمایشگاه‌ها امکان‌پذیر کرده است و تاکنون با استفاده از این تکنیک توانسته‌اند برخی از بیماری‌های ناشناخته در میزبان‌های علفی، ویروس‌های جدید و ناشناخته موجود در گیاهان وحشی و هم‌چنین ویرس‌های آلوده کننده درختان مانند انگور، توت و مرکبات را شناسایی کنند.

References منابع

1. Adams IP, Glover RH, Monger WA, Mumford R, Jackeviciene E and Navalinskiene M (2009) Next-generation sequencing and metagenomic analysis: a universal diagnostic tool in plant virology. Molecular Plant Pathology 10:537-545.
2. Al Rwahnih M, Daubert S, Golino D and Rowhani A (2009) Deep sequencing analysis of RNAs from a grapevine showing Syrah decline symptoms reveals a multiple virus infection that includes a novel virus. Virology 387:395-401.
3. Al Rwahnih M, Daubert S, Urbez-Torres JR, Cordero F and Rowhani A (2011) Deep sequencing evidence from single grapevine plants reveals a virome dominated by mycoviruses. Archives of Virology 156:397-403.
4. Barba M, Czosnek H and Hadidi A (2014) Historical perspective, development and applications of next-generation sequencing in plant virology. Viruses 6:106-136.
5. Boonham N, Kreuze J, Winter S, Vlugt R and Bergervoet J (2014)Methods in virus diagnostics: From ELISA to next generation sequencing. Virus Research 96:1-12.
6. Gupta A K and Gupta UD (2014) Next Generation Sequencing and Its Applications. Pp.345-367. In: Verma AS and Singh A (eds.). Animal Biotechnology Models in Discovery and Translation. Academic Press, Elsevier Science.

7. Herzyk P (2014) Next-Generation Sequencing. Pp. 125-145. In: Padmanabhan S (ed.). Handbook of Pharmacogenomics and Stratified Medicine. Academic Press, Elsevier Science.
8. Ma M, Huang Y, Gong Z, Zhuang L, Li C and Yang H (2011) Discovery of DNA viruses in wild-caught mosquitoes using small RNA high throughput sequencing. PLoS One 6:e24758.
9. Mardis ER (2007) The impact of next-generation sequencing technology on genetics. Trends in Genetics 24:131-141.
10. Masoudi-Nejad A, Narimani Z and Hosseinkhan N (2013) Next Generation Sequencing and Sequence Assembly: Methodologies and Algorithms. Springer, New York, 86p.
11. Maxam A M and Gilbert W (1977) A new method for sequencing DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 74:560-564.
12. Murphy KM, Berg KD and Eshleman JR (2005) Sequencing of genomic DNA by combined amplification and cycle sequencing reaction. Clinical Chemistry 51:35-39.
13. Nelson CW and Hughes AL (2015) Within-host nucleotide diversity of virus populations: Insights from next-generation sequencing. Infection, Genetics and Evolution 30:1-7.
14. Roossinck MJ, Saha P, Wiley GB, Quan J, White JD and Lai H (2010) Ecogenomics: using massively parallel pyrosequencing to understand virus ecology. Molecular Ecology 19:81-88.
15. Rosario K, Padilla-Rodriguez M, Kraberger S, Stainton D, Martin DP and Breitbart M (2013) Discovery of a novel mastrevirus and alphasatellite-like circular DNA in dragonflies (Epiprocta) from Puerto Rico. Virus Research 171:231-237.
16. Shendure J, Mitra RD, Varma C and Church GM (2004) Advanced sequencing technologies: methods and goals. Nature Reviews Genetics 5:335-344.
17. Wylie SJ, Li H, Dixon KW, Richards H and Jones MGK (2013) Exotic and indigenous viruses infect wild populations and captive collections of temperate terrestrial orchids (Diuris species) in Australia. Virus Research 171:22-32.

دانش بیماری‌شناسی گیاهی (شاپای ا:۶۲۹۰-۲۵۸۸، شاپای چ: ۹۲۷۰-۲۲۵۱)
سال هشتم، جلد ۲، بهار و تابستان ۱۳۹۸
Plant Pathology Science (eISSN:2588-6290, pISSN:2251-9270)
Vol. 8(2), 2019

Extensional Article

Intracellular Interactions of Geminiviruses in Host Plants

SAEID TABEIN[1], SEYED ALIAKBAR BEHJATNIA✉ [2]

1- Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. 2- Department of Plant Protection, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.

Received: 15.04.2019 Accepted: 16.09.2019

Tabein S and Behjatnia SAA (2019) Intracellular interactions of geminiviruses in host plants. Plant Pathology Science 8(2):86-101. DOI:10.2982/PPS.8.2.86

Abstract

Geminiviruses (*Geminiviridae* family) with small circular ssDNA genome are encoding just four to seven proteins on virion and complementary-sense strands of their genomes. To have a progressive infection, they are dependent mostly on host cellular machineries and interact with wide range of different host plants factors and processes. Geminiviruses alter the cell cycle in infected plants and they can support replication of viral DNA. They change host gene expression patterns, inhibit cell death pathways, alter macromolecule trafficking and interfere with protein modification to redirect or suppress host defenses and hormones signaling. Geminiviruses encode gene silencing suppressors to interfere with post-transcriptional gene silencing and alter plant DNA methylation and microRNA (miRNA) pathways, often causing developmental abnormalities. Here, the geminiviruses are discussed as one of the most destructive plant viruses and their proteins interactions with host cell factors and pathways are described.

Key Words: Geminivirus, Cell cycle, Protein, ssDNA

✉ Corresponding author: Akbar_behjatnia@hotmail.com

مقاله ترویجی

برهمکنش‌های درون‌سلولی جمینی‌ویروس‌ها در گیاهان میزبان

سعید تابعین [۱] و سید علی‌اکبر بهجت‌نیا ✉ [۲]
۱- گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز
۲- گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

دریافت: ۱۳۹۸/۰۱/۲۶ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۶/۲۵

تابعین س و بهجت‌نیا س ع ا (۱۳۹۸) برهمکنش‌های درون‌سلولی جمینی‌ویروس‌ها در گیاهان میزبان. دانش بیماری‌شناسی گیاهی ۸(۲):۱۰۱-۸۶. DOI: 10.2982/PPS.8.2.86

چکیده

جمینی‌ویروس‌ها دارای ژنومِ دی‌ان‌ا تک‌لای حلقوی کوچک با ظرفیت بیان پروتیین محدود هستند. ژنوم این گروه از ویروس‌ها با بیان چهار تا هفت پروتیین و از طریق ایجاد تغییر در فرآیندها و مسیرهای زیستی مختلف در سلول باعث ایجاد آلودگی می‌شوند. از جمله تغییرات به وجود آمده به هنگام آلودگی توسط جمینی‌ویروس‌ها می‌توان به تحریک و تغییر چرخه سلول‌های آلوده برای ورود به فاز تکثیری به منظور حمایت از القای همانندسازی دی‌ان‌ا ویروسی اشاره نمود. جمینی‌ویروس‌ها به منظور تغییر یا متوقف کردن واکنش‌های دفاعی میزبان و مسیرهای پیام‌رسانی هورمون‌ها، الگوی بیان ژن‌های میزبان را تغییر می‌دهند، از مسیرهای مرگ سلولی ممانعت به عمل می‌آورند، رفت‌وآمد مولکول‌های بزرگ را تغییر داده و در مسیرهای پیام‌رسانی سلول و اصلاح پروتیین‌ها مداخله می‌کنند. علاوه‌براین، جمینی‌ویروس‌ها چندین سرکوب‌گر خاموشی ژن را بیان می‌کنند که نحوه تولید آران‌اهای کوچک مداخله‌گر، متیلاسیون دی‌ان‌ا گیاه و مسیرهای میکرو آران‌ا را تغییر می‌دهند و به همین دلیل در اغلب موارد سبب نمو غیر عادی گیاه می‌شوند. در این مقاله علاوه بر معرفی جمینی‌ویروس‌ها، به نقش هر کدام از پروتیین‌های بیان شده توسط ژنوم آنها و نیز برهمکنش این پروتیین‌ها با مسیرها و فرآیندهای مختلف سلول میزبان جهت ایجاد یک آلودگی پایدار، پرداخته می‌شود.

واژگان کلیدی: جمینی‌ویروس، چرخه سلولی، پروتیین، دی‌ان‌ا تک‌لا

مقدمه

اعضای مختلف تیره *Geminiviridae* به عنوان گروهی از مخرب‌ترین عوامل بیماری‌زای گیاهی، محصولات کشاورزی و علف‌های هرز را در سراسر دنیا آلوده نموده و در مناطق مختلف باعث بروز خسارت‌های شدید اقتصادی می‌شوند. در طی دهه‌های اخیر، گسترش این ویروس‌ها به واسطه بروز و گسترش بیوتیپ‌های کارآمد حشرات ناقل آنها از شدت بیشتری برخوردار شده است (Mansoor *et al*. 2006, Navas-Castillo *et al*. 2011) در آفریقا و آسیا که بیماری‌های ناشی از جمینی‌ویروس‌ها کشاورزی را به شدت تحت تأثیر قرار می‌دهند، آلودگی ویروس‌هایی نظیر ویروس رگه‌ای ذرت (*Maize streak virus*, MSV)، ویروس موزاییک آفریقایی کاساوا (*African cassava mosaic virus*, ACMV) و ویروس پیچیدگی برگ پنبه (*Cotton leaf curl virus*, CLCV)، در مواردی تخریب کامل مزارع آلوده را به همراه داشته است (Legg *et al*. 2004, Shepherd *et al*. 2010). همچنین ویروس پیچیدگی برگ زرد گوجه‌فرنگی (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV) از عمده‌ترین عوامل محدودکننده تولید این محصول در سراسر دنیا و به خصوص در مناطق با شرایط آب و هوای مدیترانه‌ای محسوب می‌شود (Scholthof *et al*. 2011). امکان انتقال برخی از اعضای تیره *Geminiviridae* از طریق بذر نیز از تأثیر به

✉ مسئول مکاتبه: Akbar_behjatnia@hotmail.com

سزایی در گسترش روزافزون آلودگی‌های ناشی از این ویروس‌ها به مناطق جدید برخوردار بوده است (Anabestani *et al*. 2017, Kil *et al*. 2016, Kim *et al*. 2015).

جمینی‌ویروس‌ها در اغلب موارد به صورت کمپلکس‌های بیماری به وقوع می‌پیوندند که در این حالت گیاهان مجزا به طور همزمان به وسیله چندین ویروس آلوده می‌شوند (Nawaz-ul-Rehman *et al*. 2009). ژنوم این ویروس‌ها به منظور افزایش تنوع می‌تواند سطوح بالایی از جهش، نوترکیبی و بازآرایی (Rearrangment) را متحمل شود (Lima *et al*. 2012). توسعه و تکامل بیوتیپ‌های جدید ناقل که به سموم حشره‌کش مقاوم هستند به خصوص در مورد سفیدبالک *Bemisia tabaci*، به جمینی‌ویروس‌ها این اجازه را داده است که به نواحی جدید هجوم آورده و در ترکیب با یکدیگر، کمپلکس‌های جدید بیماری را به وجود آورند (Lefeuvre *et al*. 2010).

کمیته بین‌المللی نامگذاری ویروس‌ها (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV)، جمینی‌ویروس‌ها را بر اساس سازمان‌دهی ژنوم، دامنه میزبانی و نوع حشرات ناقل در نه جنس *Begomovirus*، *Becurtovirus*، *Curtovirus*، *Capulavirus*، *Eragrovirus*، *Grabluvirus*، *Mastrevirus*، *Topocuvirus* و *Turncurtovirus* طبقه‌بندی کرده است. علاوه‌براین، چند گونه طبقه‌بندی نشده نیز که دارای ویژگی‌های ژنتیکی متمایزی هستند در این تیره جای گرفته است (Adams *et al*. 2013, Brown *et al*. 2012, Varsani *et al*. 2017). ژنوم تمام جمینی‌ویروس‌ها از نوع دی‌انا تک‌لای حلقوی است که در پیکره‌های جورترای (Isometric) دوقلو کپسیدپوشی می‌شوند. همانند سازی ژنوم این ویروس‌ها در هسته سلول‌های آلوده به واسطه تولید دی‌ان‌اهای حدواسط دولای تکثیری به انجام می‌رسد. این ویروس‌ها دارای ترانویسی دوجهته (Bidirectional transcription) هستند و از این طریق چهار تا هفت پروتیین مستقر بر روی هر دو رشته ویروسی و مکمل ژنوم خود را بیان می‌کنند. این چارچوب‌های خوانش به وسیله یک یا دو ناحیه بین ژنی (Intergenic region, IR) از یکدیگر مجزا می‌شوند (Brown *et al*. 2012). ناحیه بین ژنی (بزرگ) دربردارنده محل شروع همانندسازی (Origin of replication, *ori*) است که توالی‌های اختصاصی محل اتصال پروتیین همراه با همانندسازی (رپ، Rep) جمینی‌ویروس‌ها را در بر می‌گیرد. یک ترادف نه نوکلئوتیدی محافظت‌شده در ساختار ساقه-حلقه مستقر در ناحیه بین ژنی اعضای هر جنس، محل مورد نیاز برای شروع فعالیت پروتیین همراه با همانندسازی را فراهم می‌آورد (Behjatnia *et al*. 1998). به استثنای آنزیم پلی‌مراز که در همانندسازی ژنوم جمینی‌ویروس‌ها توسط سلول میزبان تأمین می‌شود، پروتیین‌های بیان‌شده توسط ژنوم آنها، تمامی عملکردهای ضروری برای ویروس را فراهم می‌آورند و برای این منظور با طیف متنوعی از عوامل و مسیرهای درون سلولی میزبان برهمکنش برقرار می‌کنند. جمینی‌ویروس‌ها به صورت طبیعی در سلول‌هایی همانندسازی می‌کنند که از فاز تکثیری خارج شده و از این‌رو فاقد فاکتورهای لازم جهت همانندسازی دی‌انا (از قبیل دی‌انا پلی‌مرازها) هستند. بنابراین، جمینی‌ویروس‌ها برای ایجاد یک آلودگی مؤثر باید چنین محیط‌های نامساعدی را به شرایطی مناسب جهت تکثیر ژنوم خود تغییر دهند. بر این اساس، جمینی‌ویروس‌ها مسیرهای دفاعی گیاه میزبان را به منظور حمایت از ژنوم خود سرکوب کرده و برای تنظیم مراحل رشد و نمو گیاه با مسیرهای مختلفی از جمله مسیرهای هورمونی برهمکنش بر قرار می‌کنند و همچنین از فرآیندهای اصلاح پروتیین میزبان برای بهبود عملکرد پروتیین‌های خود بهره می‌برند (Hanley-Bowdoin *et al*. 2013).

۱-پروتیین‌های جمینی‌ویروس‌ها و عملکرد آنها

ژنوم ویروس‌های تیره *Geminiviridae* یک‌بخشی یا دوبخشی و دارای توانایی بیان کردن ۴ تا ۷ پروتیین است که در همانندسازی، حرکت در گیاه میزبان، انتقال و بیماری‌زایی این ویروس‌ها نقش دارند. برخی پروتیین‌های ویروس نظیر پروتیین همراه با همانندسازی در بین اعضای تیره بسیار حفاظت شده هستند در حالی‌که دیگر پروتیین‌ها نظیر پروتیین پوششی (که اختصاصیت انتقال توسط حشره ناقل را تعیین می‌کند)

خصوصیات نسبتاً همانندی را در سطح اعضای یک جنس به نمایش می‌گذارند. پروتیین‌های بیان‌شده توسط ژنوم جمینی‌ویروس‌ها چندکاره هستند و برخی از آنها کارکردهای مختلفی را برای ویروس‌های متفاوت به نمایش می‌گذارند (Fondong 2013, Varsani *et al*. 2017).

ژنوم جمینی‌ویروس‌ها دارای ترانویسی دوجهته و یک یا دو ناحیه بین ژنی است. ناحیه بین ژنی بزرگتر (در آنهایی که دو ناحیه بین ژنی دارند) حاوی مبدأ شروع همانندسازی و دو پیش‌بر آرانا پلی‌مراز II است که در ترانویسی دوجهته نقش دارند (Hanley-Bowdoin *et al*. 2000). پروتیین پوششی که به وسیله چارچوب خوانش V1 بر روی رشته ویروسی (virion strand) بیان می‌شود، کپسید ویروس را تشکیل می‌دهد و تنها پروتیین ساختاری جمینی‌ویروس‌ها است که تنظیم انتقال توسط ناقل را نیز بر عهده دارد (Briddon *et al*. 1990). این پروتیین در ویروس‌های یک بخشی به عنوان پروتیین رفت‌وآمد هسته‌ای (Nuclear shuttle protein, NSP) نیز عمل می‌کند (Liu *et al*. 2001). پروتیین پوششی در بین اعضای جنس *Mastrevirus*، تعادل بین سطح تجمع دی‌انا تک‌لا و دولا را نیز تنظیم می‌کند (Stenger *et al*. 1991) و در کورتوویروس‌ها و بگموویروس‌ها درگیر حرکت ویروس در گیاه است (Brown *et al*. 2012). تمام جمینی‌ویروس‌های یک‌بخشی در بالادست ژن پروتیین پوششی، چارچوب خوانش کوچکی به نام V2 دارند. پروتیین V2 به عنوان یک پروتیین ضد دفاعی، در سرکوب سازوکار خاموشی ژن پس از ترانویسی میزبان نقش دارد. این پروتیین در جمینی‌ویروس‌های یک‌بخشی حرکت ویروس در گیاه میزبان را نیز تأمین می‌کند. در اعضای جنس *Capulavirus*، بیان چارچوب خوانش V2 از طریق یک آرانای پیک به هم‌چسبان با ترانوشت چارچوب خوانش V4 که منحصراً در ژنوم این جنس حضور دارد، انجام می‌شود (Varsani *et al*. 2017). پروتیین V3 تنها در گونه‌های *Curtovirus* و *Capulavirus* قابل ردیابی است که در تنظیم سطح نسبی دی‌انا تک‌لا و دولا دخالت دارد (Hanley-Bowdoin *et al*. 2000, Varsani *et al*. 2017).

پروتیین همراه با همانندسازی که توسط چارچوب خوانش C1 بر روی رشته مکمل (Complementary strand) بیان می‌شود، عامل اصلی در شروع همانندسازی ژنوم جمینی‌ویروس‌ها است. این پروتیین با ایجاد یک برش در موتیف نه نوکلئوتیدی ساختار ساقه-حلقه ژنوم، محل لازم برای شروع فعالیت آنزیم پلی‌مراز میزبان را برای تکثیر ژنوم ویروس فراهم می‌آورد (Behjatnia *et al*. 1998). بیان این پروتیین تحت کنترل یک پیش‌بر در سمت چپ ناحیه بین ژنی قرار دارد. در جنس‌های *Becurtovirus*، *Capulavirus*، *Grablovirus* و *Mastrevirus*، بیان پروتیین همراه با همانندسازی به واسطه ایجاد یک آرانا پیک به هم‌چسبان متشکل از ترانوشت چارچوب‌های خوانش C1 و C2 صورت می‌پذیرد. در ماستری‌ویروس‌ها چارچوب خوانش C2 بیان‌کننده پروتیین RepA است. این پروتیین به پروتیین رتینوبلاستوما (Retinoblastoma, RBR) گیاه میزبان متصل می‌شود تا چرخه سلولی را تنظیم کند و محیط سلول‌های تمایزیافته را تغییر می‌دهد تا بارگذاری عوامل میزبان را که از همانندسازی دی‌انا ویروس پشتیبانی می‌کنند فراهم نماید (Brown *et al*. 2012). اعضای سایر جنس‌ها، پروتیین همراه با همانندسازی را در یک چارچوب خوانش منفرد بیان می‌کنند و فاقد RepA هستند و نقش RepA برعهده خود رِپ است (Brown *et al*. 2012).

جمینی‌ویروس‌ها سه چارچوب خوانش دیگر را نیز روی رشته مکمل ژنوم بیان می‌کنند. پروتیین فعال‌کننده ترانویسی که توسط چارچوب خوانش C2 بیان می‌شود، در سرکوبگری خاموشی ژن به هنگام ترانویسی و خاموشی ژن پس از ترانویسی عمل می‌کند. این پروتیین همچنین در بگموویروس‌های دوبخشی به عنوان یک فاکتور ترانویسی مورد نیاز برای القای بیان ژن‌های *CP* و *NSP* عمل می‌کند. چارچوب خوانش C3 بیان‌کننده پروتیین افزاینده همانندسازی است و در همانندسازی ویروس دخالت دارد. پروتیین بیان شده توسط چارچوب خوانش C4، یک تعیین‌کننده مهم علایم است که در کنترل چرخه سلولی دخیل است. پروتیین AC4 در بگموویروس‌های دوبخشی می‌تواند پاسخ میزبان به بیان رِپ ویروس را متقابلاً پاسخ دهد. همچنین پروتیین C4 به عنوان یک سرکوبگر خاموشی ژن شناخته شده است و می‌تواند خاموشی ژن پس از ترانویسی را سرکوب کند.

بگوموویروس‌های دوبخشی پروتیین حرکتی و پروتیین رفت‌وآمد هسته‌ای خود را بر روی جز ژنومی DNA-B بیان می‌کنند (Brown *et al*. 2012).

در آلودگی‌های ایجاد شده توسط جمینی‌ویروس‌ها علاوه بر ژنوم ویروس، تعدادی دی‌ان‌ا همراه و وابسته به ویروس نیز در کمپلکس‌های بیماری قابل ردیابی هستند که با بیان پروتیین‌های خود بر ایجاد بیماری اثرگذارند (Tabein and Behjatnia 2014). از این بین، بتاستلایت‌ها با بیان یک پروتیین (βC1) در القای علایم بیماری و نیز سرکوب مسیر خاموشی ژن به هنگام ترانویسی نقش دارند (Saeed *et al*. 2005). از سوی دیگر، آلفاستلایت‌ها نیز پروتیین همراه با همانندسازی خود را بیان می‌کنند که یک پروتیین ضد خاموشی ژن نیز به حساب می‌آید (Briddon *et al*. 2004).

۲-برهمکنش‌های جمینی‌ویروس‌ها- گیاهان میزبان

پروتیین‌های بیان شده توسط ژنوم جمینی‌ویرس‌ها می‌توانند در خلال آلودگی بر سطح بیان ژن‌ها، همانندسازی دی‌ان‌ا و فعال‌سازی چرخه سلولی میزبان اثر بگذارند و مسیرهای کینازی، پیام‌رسانی هورمون، اصلاح پروتیین و دفاع گیاه را دچار تغییر کنند (Hanley-Bowdoin *et al*. 2013). در ادامه به بررسی هر کدام از برهمکنش‌های ذکر شده در خلال فرآیند آلودگی جمینی‌ویروس‌ها پرداخته می شود.

۲-۱- فاکتورهای دخیل در همانندسازی

در جمینی‌ویروس‌ها پروتیین همراه با همانندسازی تنها پروتیین ویروس است که برای همانندسازی ژنوم ویروس ضروری است (Bahjatnia *et al*. 1998). این پروتیین در به کار گرفتن و مونتاژ ریلیزوم (Replisome) ویروس نقشی کلیدی دارد. ریلیزوم، کمپلکسی از پروتیین‌های ویروس و فاکتورهای میزبانی است که در همانندسازی و اصلاح دی‌ان‌ا و دیگر عملکردهای هسته‌ای دخالت دارد. احتمالاً پروتیین افزاینده همانندسازی نیز که سبب افزایش سطح تجمع دی‌ان‌ا بگوموویروس‌ها و کورتوویروس‌ها در گیاه می‌شود و با پروتیین همراه با همانندسازی و فاکتورهای همانندسازی میزبان برهمکنش می‌دهد، جزیی از ریلیزوم جمینی‌ویروس‌ها است (Settlage *et al*. 2005). هر دو پروتیین همراه و افزاینده همانندسازی به عامل پی‌سی‌ان‌ا (Proliferating cell nuclear antigen, PCNA) متصل می‌شوند که یک فاکتور کلیدی در عملکرد دی‌ان‌ا پلی‌مراز سیگمای (DNA polymerase-δ) میزبان است (Castillo *et al*. 2003, Bagewadi *et al*. 2004). عامل پی‌سی‌ان‌ا در بین یوکاریوت‌ها از حفاظت‌شدگی بالایی برخوردار است و با طیفی از پروتیین‌های دخیل در چرخه سلولی، همانندسازی و اصلاح دی‌ان‌ا برهمکنش برقرار می‌کند (Nagar *et al*. 1995, Egelkrout *et al*. 2001). بنابراین به نظر می‌رسد که این برهمکنش پروتیینی به عنوان یکی از مسیرهای اثرگذار جمینی‌ویروس‌ها بر چرخه سلول میزبان عمل می‌کند.

پروتیین همراه با همانندسازی همچنین با زیرواحد بزرگ نوعی از کمپلکس همانندسازی که عامل پی‌سی‌ان‌ا را بر روی دی‌ان‌ا بارگذاری می‌کند و نیز با زیرواحدهای نوعی از پروتیین همانندسازی که به دی‌ان‌ای‌های تک‌لا متصل می‌شود، برهمکنش می‌دهد (Luque *et al*. 2002). علاوه بر این، پروتیین همراه با همانندسازی به RAD54 نیز متصل می‌شود. این پروتیین در روند نوترکیبی همولوگ در سلول دخالت دارد و بنابراین ممکن است در همانندسازی ویروس به شیوه وابسته به نوترکیبی نیز اثرگذار باشد. به عنوان یک نکته قابل توجه، برهمکنش با RAD54 و عامل پی‌سی‌ان‌ا دارای اثراتی معکوس بر فعالیت پروتیین همراه با همانندسازی در شرایط درون‌شیشه‌ای است که به طور بالقوه می‌توانند دو شیوه همانندسازی ژنوم ویروس را در شرایط درون‌زیوه‌ای تنظیم کنند (Kaliappan *et al*. 2012).

جمینی‌ویروس‌ها معمولاً سلول‌هایی از بافت برگ یا بافت‌های آوندی را آلوده می‌کنند که از مرحله تکثیر چرخه سلولی خارج شده‌اند و در نتیجه دی‌ان‌ا پلی‌مرازهای مورد نیاز برای تکثیر ژنوم را بیان نمی‌کنند. بنابراین، جمینی‌ویروس‌ها به منظور القای ماشین سنتز دی‌ان‌ا سلول باید بر تنظیم‌کننده‌های ترانویسی میزبان اثر بگذارند (Hanley-Bowdoin *et al*. 2013). یک تنظیم‌کننده کلیدی در چرخه سلولی گیاه، پروتیین رتینوبلاستوما

است. همانند پروتیین مشابه در حیوانات، رتینوبلاستومای گیاهی نیز چرخه سلولی، بقای سلول، اختصاصیت و تمایز آن را تحت کنترل خود دارد. به منظور سرکوب بیان ژن‌های بیان کننده پروتیین‌های همانندسازی در حین چرخه سلول، رتینوبلاستوما به فاکتور ترانویسی E2F متصل می‌شود (Arguello-Astorga *et al*. 2004). در حین یک چرخه سلول طبیعی، عملکرد رتینوبلاستوما به وسیله فرآیند فسفوریلاسیون تنظیم می‌شود. فسفوریلاسیون سبب جدا شدن رتینوبلاستوما از فاکتور ترانویسی E2F می‌شود و در نتیجه ترانویسی ژن‌های هدف E2F در فاز G1 ثانویه و آماده‌سازی سلول برای فاز S (تکثیر و دوتایی شدن کروموزوم‌ها) چرخه سلول را به دنبال دارد. در بسیاری از ویروس‌های کوچک دی‌ان‌ادار گیاهی و جانوری، غیرفعال‌سازی رتینوبلاستوما که منجر به ورود به فاز S چرخه سلول می‌شود و آنزیم‌های مورد نیاز برای همانندسازی دی‌ان‌ا را فراهم می‌آورد، یک خصوصیت محافظت شده است. جمینی‌ویروس‌ها از طریق اتصال پروتیین‌های RepA، رِپ و پروتیین افزاینده همانندسازی به رتینوبلاستوما، ایجاد کمپلکس‌های رتینوبلاستوما-فاکتور ترانویسی (RBR-E2F) را مختل می‌سازند و از این طریق منجر به ورود به فاز S چرخه سلول و مهیا شدن آنزیم‌های تکثیری مورد نیاز برای همانندسازی ژنوم خود می‌شوند (Kong *et al*. 2000, Desvoyes *et al*. 2006).

پروتیین همراه با همانندسازی اولین پروتیین جمینی‌ویروس‌ها است که به هنگام آلودگی سلول میزبان بیان می‌شود و شروع تکثیر ژنوم را فراهم می‌آورد. از طرفی، با در نظر گرفتن برهمکنش‌های متعددی که این پروتیین با عوامل مختلف همانندسازی دی‌ان‌ا در سلول میزبان برقرار می‌کند، می‌توان اظهار داشت که این پروتیین می‌تواند مهم‌ترین پروتیین جمینی‌ویروس‌ها در القا و تنظیم همانندسازی ژنوم آنها باشد.

۲-۲- مسیرهای کینازی

پروتیین کینازها (Protein kinases) از طریق برهمکنش با مسیرهای پیام‌رسانی هورمون‌ها در شناسایی بیمارگرها و واکنش‌های دفاعی حائز اهمیت هستند و علاوه بر این در رشد و نمو گیاه نیز از نقش‌های حیاتی برخوردارند. جمینی‌ویروس‌ها به منظور به کار گرفتن فرآیندهای میزبان در جهت گسترش آلودگی و مداخله با واکنش‌های دفاعی، با مسیرهای کینازی مختلفی واکنش می‌دهند که عبارتند از:

۲-۲-۱- کینازهای شبه گیرنده (Receptor-like kinases): برخی از کینازهای شبه گیرنده میزبان، بیمارگرهای ویروسی را شناسایی می‌کنند و منجر به راه‌اندازی یک سری واکنش‌های دفاعی ضدویروس در گیاه می‌شوند. بهترین نمونه از کینازهای شبه گیرنده شناخته شده در ارتباط با جمینی‌ویروس‌ها سه کیناز تکراری غنی از لوسین (Leucine rich repeat, LRR) هستند که به عنوان کینازهای واکنش‌دهنده با پروتیین رفت‌وآمد هسته‌ای (با نام‌های NIK1، NIK2 و NIK3، NSP interacting kinase) شناخته می‌شوند. این کینازها، پروتیین‌هایی غشایی هستند که دچار فسفوریلاسیون خودی شده و قادر به افزودن گروه‌های فسفات (فسفوریله کردن) به مواد زمینه‌ای خارجی نیز هستند. پروتیین رفت‌وآمد هسته‌ای جمینی‌ویروس‌ها به دامانه کینازی این پروتیین‌ها متصل می‌شود و با فسفوریلاسیون خودی آنها به عنوان فرآیندی که برای فعالیت کینازی مورد نیاز است، مداخله می‌کند (Fontes *et al*. 2004, Santos *et al*. 2009). بنابراین، کینازهای واکنش‌دهنده با پروتیین رفت‌وآمد هسته‌ای قادر به فسفوریله کردن تغییرگر (Effector) پایین‌دستی خود (پروتیین ریبوزومی rpL 10A) و نیز تغییر موقعیت به سمت هسته یعنی محلی که با آلودگی ویروس مداخله می‌کنند، نخواهند بود (Rocha *et al*. 2008, Carvalho *et al*. 2008). به همین دلیل برهمکنش پروتیین رفت‌وآمد هسته‌ای جمینی‌ویروس با این گروه از کینازها، سبب محافظت از تکثیر ویروس در طی دوره آلودگی می‌شود.

برهمکنش پروتیین C4 جمینی‌ویروس‌ها با کینازهای شبه گیرنده موجود در غشای پلاسمایی سلول‌های میزبان، در فرآیند انتقال سیگنال‌های بین سلولی مداخله می‌کند (Zeng *et al*. 2018). این نتایج می‌تواند سازوکار جمینی‌ویروس‌ها در ایجاد آلودگی‌های سیستمیک در گیاه میزبان را مشخص کند و چگونگی انتقال سیگنال‌های بین سلولی در زمان بروز مقاومت یا گسترش آلودگی را تعیین نماید.

۲-۲-۲- آبشار کینیازی *GRIK–SNRK1*: پروتیین همراه با همانندسازی با دو پروتیین کیناز نزدیک به هم به نام کینازهای برهمکنش‌دهنده با پروتیین همراه با همانندسازی جمینی‌ویروس برهمکنش می‌دهد (Kong and Hanley-Bowdoin 2002, Shen and Hanley-Bowdoin 2006). مسیر یوبیکوئیتین پروتئازوم (Ubiquitin proteasome)، تنظیم‌کننده سطح بیان این کینازها است که در بافت‌های جوان گیاهی، سلول‌های رشد یافته در محیط کشت و سلول‌های آلوده به جمینی‌ویروس‌ها تجمع دارند. کینازهای برهمکنش‌دهنده با پروتیین همراه با همانندسازی جمینی‌ویروس‌ها، فعال‌کننده‌های بالادستی گروه دیگری از پروتیین کینازها (کیناز SNRK1) هستند که به عنوان تنظیم‌کننده‌های کلیدی در متابولیسم گیاهی، نمو و واکنش به تنش‌های زیستی و غیرزیستی در گیاه به ایفای نقش می‌پردازند (Shen *et al*. 2009). کینازهای مذکور از گروه کینازهای سرین/ترئونین است که در واکنش به تنش‌های محیطی فعال می‌شوند و مسیرهای بیوسنتزی مصرف‌کننده انرژی را متوقف و از سوی دیگر سیستم‌های تولیدکننده آدنوزین مونو فسفات را فعال می‌کنند. این فرآیند ممکن است انرژی لازم برای همانندسازی ژنوم ویروس را تأمین کند اما نقش دقیق این آبشار کینازی در بروز بیماری ناشی از جمینی‌ویروس‌ها چندان مشخص نیست (Hanley-Bowdoin *et al*. 2013).

پروتیین فعال‌کننده ترانویسی جمینی‌ویروس‌ها و نیز پروتیین βC1 بیان‌شده توسط بتاستلایت نیز دارای توانایی اتصال به پروتیین کیناز SNRK1 هستند. فسفوریلاسیون پروتیین βC1 توسط این گروه از کینازها سبب به تأخیر افتادن بروز آلودگی توسط بگموویروس کمکی می‌شود (Shen *et al*. 2003, Hao *et al*. 2011). این موضوع می‌تواند نشان‌دهنده تداخل فسفوریلاسیون βC1 توسط SNRK1 در فرآیند آلودگی باشد.

۲-۲-۳- *Shaggy related kinases*: این کینازها به واسطه برهمکنش‌های مختلف با مسیر پیام‌رسانی براسینوستروئید در فرآیندهای نموی متنوعی از جمله تقسیم سلولی و طویل شدن سلول دخالت دارند. پروتیین C4 جمینی‌ویروس‌ها با این گروه از کینازها برهمکنش می‌دهد به نحوی که در جمینی‌ویروس‌های یک و دوبخشی، به ترتیب سبب سرکوب و القای بیان ژن‌های واکنش‌دهنده به براسینوستروئید می‌شوند (Piroux *et al*. 2007, Dogra *et al*. 2009). این در حالی است که سرکوب بیان این کینازها در گیاه میزبان سبب تأخیر در ایجاد آلودگی می‌گردد (Lozano-Duran *et al*. 2011a).

۲-۳- مسیرهای پیام‌رسانی هورمون‌های گیاهی

جمینی‌ویروس‌ها با طیفی از مسیرهای هورمونی گیاه میزبان از جمله مسیرهای اسیدسالیسیلیک، اتیلن، اسید جاسمونیک و مسیر براسینوستروئید برهمکنش می‌دهند. برخی از این ویروس‌ها، مسیرهای اسید سالیسیلیک و اتیلن را فعال می‌کنند، مسیرهایی که هر دو در واکنش دفاعی میزبان مشارکت دارند (Ascencio-Ibanez *et al*. 2008). بر همین اساس گیاهانی که سطوح اسید سالیسیلیک در آنها افزایش یافته و یا دارای سطح بالایی از بیان اجزای دخیل در این مسیر هستند، در برابر آلودگی مقاوم خواهند بود (Chen *et al*. 2010, Garcia-Neria *et al*. 2011). ژن‌های موجود در مسیر اسید جاسمونیک به طور معمول در خلال آلودگی جمینی‌ویروس‌ها سرکوب می‌شوند (Ascencio-Ibanez *et al*. 2008). بیان برخی از پروتیین‌های ویروس در گیاه می‌تواند مسیر اسید جاسمونیک را فعال یا سرکوب کند اما با این وجود، تغییرات زیست‌شناختی ناشی از بیان این پروتیین‌ها همچنان ناشناخته باقی مانده است. جمینی‌ویروس‌ها همچنین با مسیرهای سیتوکینین و اکسین نیز برهمکنش می‌دهند، هورمون‌هایی که تکثیر سلولی را افزایش داده و فرآیند تمایز گیاه را تنظیم می‌نمایند (Lozano-Duran *et al*. 2011b, Soitamo *et al*. 2012). در آلودگی همزمان بتاستلایت و بگموویروس کمکی، پروتیین بیان‌شده توسط بتاستلایت سبب سرکوب مسیر دفاعی اسید جاسمونیک در گیاه می‌شود. افزایش و کاهش فعالیت این مسیر می‌تواند سبب سرکوب یا افزایش فعالیت سفیدبالک ناقل بیماری شود (Zhang *et al*. 2012). بنابراین، سرکوب این مسیر دفاعی توسط بتاسلایت سبب افزایش جمعیت ناقل و قدرت انتقال کمپلکس بیماری خواهد شد.

۲-۴- مسیرهای اصلاح پروتیین

اصلاح مولکول‌های پروتیین توسط یوبیکوئیتین (Ubiquitylation) و مولکول‌های شبه یوبیکوئیتین، وقایع پس از ترجمه‌ای هستند که عملکرد پروتیین‌ها را تعدیل نموده و بسیاری از فرآیندهای گیاهی همانند نمو، چرخه سلولی و واکنش به تنش‌های زیستی و غیرزیستی را تنظیم می‌کنند. مولکول یوبیکوئیتین از طریق یک سری وقایع پشت سر هم آنزیمی (شامل فعالیت آنزیم فعال یوبیکوئیتین E1، آنزیم اتصال به یوبیکوئیتین E2 و لیگاز یوبیکوئیتینی E3) به صورت کووالانت به دنباله‌های لایزینی موجود در پروتیین هدف متصل می‌گردد. فرآیند Sumoylation نیز که پروتیین‌های تعدیل‌کننده شبه یوبیکوئیتینی کوچکی (SUMO، سومو) را به پروتیین هدف خود متصل می‌نماید به گروه آنزیم‌های اختصاصی خود نیازمند است. اتصال چند مولکول یوبیکوئیتین به پروتیین هدف، آنها را برای تخریب به سمت کمپلکس پروتئازوم پیش می‌برد. در حالی‌که اتصال یک مولکول یوبیکوئیتین می‌تواند فعالیت‌های پروتیین، الگوهای برهمکنش آن و یا موقعیت استقرار درون سلولی پروتیین‌ها را تغییر دهد (Castro *et al*. 2012, Marino *et al*. 2012). برخی از پروتیین‌های ویروسی به وسیله پروتیین‌های یوبیکوئیتین یا شبه یوبیکوئیتین اصلاح می‌شوند و برخی می‌توانند به عنوان آنزیم‌هایی در مسیر اتصال یوبیکوئیتین عمل کنند (Alcaide-Loridan and Jupin 2012). جمینی‌ویروس‌ها به منظور دست یافتن به یک آلودگی موفق، سازوکارهای اتصال یوبیکوئیتین و مولکول‌های شبه یوبیکوئیتین را دچار تغییر می‌کنند. پروتیین بیان‌شده توسط بتاستلایت، به آنزیم E2 متصل شده و تجمع کلی پروتیین‌هایی که چند مولکول یوبیکوئیتین به آنها متصل شده است را کاهش می‌دهد و از این طریق سبب ایجاد علایم شدید در میزبان می‌شود (Bachmair *et al*. 1990, Eini *et al*. 2009). پروتیین‌های C2 و C4 نیز از طریق برهمکنش با اجزای مختلف مسیر یوبیکوئیتیلاسیون به ترتیب سبب تغییر در واکنش‌های هورمونی و القای تکثیر سلول‌های گیاهی می‌شوند (Lai *et al*. 2009, Lozano-Duran *et al*. 2011b). پروتیین همراه با همانندسازی نیز با آنزیم E2 متصل‌شونده به گروه سومو برهمکنش می‌دهد و به نظر می‌رسد که این برهمکنش برای ایجاد آلودگی توسط جمینی‌ویروس‌ها، امری ضروری است (Castillo *et al*. 2004).

۲-۵-مسیرهای خاموشی ژن در گیاه

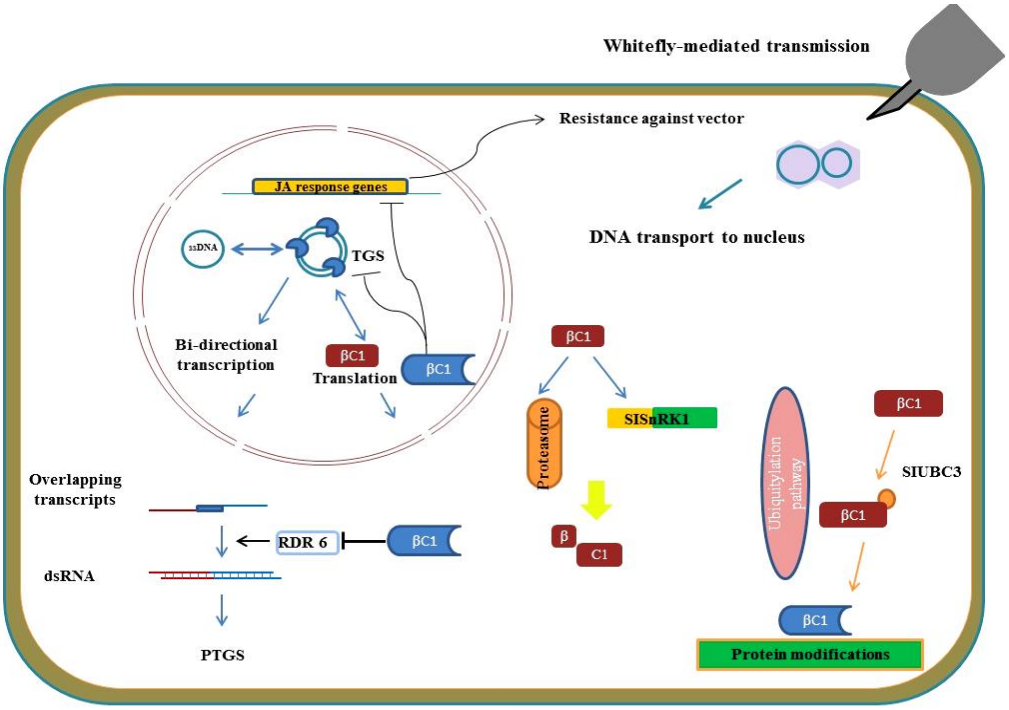
خاموشی ژن (آرانا)، یک واکنش دفاعی ضدویروسی و مسیر تنظیم بیان ژن در سلول‌های یوکاریوتی است که در سلول‌های گیاهی از آران‌های کوچک مداخله‌گر (small interfering RNA, siRNA) برای هدف قرار دادن ژنوم ویروس‌ها و ترانسپوزون‌ها استفاده می‌کند (Pooggin 2018). ویروس‌ها این واکنش را با استفاده از پروتیین‌های ضدخاموشی بیان شده توسط ژنوم خود سرکوب می‌کنند. پروتیین‌هایی که سرکوب‌گرهای ویروسی خاموشی آرانا (Viral suppressor of RNA silencing, VSRs) نامیده می‌شوند، در مراحل مختلفی از واکنش خاموشی آرانا مداخله می‌کنند. موقعیت درون‌هسته‌ای جمینی‌ویروس‌ها و شباهت ژن‌های آنها به تراریخت‌های مهندسی شده که دارای پیش‌برهایی کوچک با فعالیت بالا بوده و اغلب فاقد اینترون هستند، این ویروس‌ها را به فرصت‌های منحصر به فردی به منظور فهم چگونگی شناسایی همانندسازی ژنوم گیاهان و دفاع آنها در برابر دی‌ان‌های بیگانه تبدیل کرده است (Hanley-Bowdoin *et al*. 2013).

پژوهش‌ها اثر پروتیین‌های جمینی‌ویروس‌ها را در سرکوب مسیرهای خاموشی آرانا به اثبات رسانده است. جمینی‌ویروس‌ها بر خلاف ویروس‌های آران‌ادار فاقد حدواسط‌های آرانا دولا هستند. با وجود این در سلول‌های آلوده، پروتیین‌های شبه دایسر بر علیه این جمینی‌ویروس‌ها فعال می‌شوند. در مورد جمینی‌ویروس‌ها ترانویسی دو جهته دی‌ان‌های حدواسط دولا در هسته (Raja *et al*. 2009). ترانویسی به شیوه پیوسته‌خوانی نابجا (Shivaprasad *et al*. 2005) و وجود چارچوب‌های خوانش نابجا منجر به ایجاد ترانوشت‌های همپوشان ناقص می‌شود (Ramesh *et al*. 2017) پس از ورود این ترانوشت‌ها به سیتوپلاسم، آران‌اپلی‌مراز میزبانی آنها را به آران‌های دولای کاملی تبدیل می‌کند که کلید راه‌اندازی سازوکار خاموشی ژن پس از ترانویسی محسوب می‌شوند (Shrama and Ikegami 2008). پروتیین بیان‌شده توسط بتاستلایت‌ها (βC1) از طریق

جلوگیری از تولید آرانا پلی‌مراز دخیل در این فرآیند (RDR6)، سبب سرکوب خاموشی ژن پس از ترانویسی می‌شود. همچنین پروتیین βC1 اثری منفی بر اس-آدنوزیل هموسیستئین هیدرولاز (S-adenosyl homocystein hydrolase) به جای می‌گذارد، عاملی که مسئول تولید SAM (S-adenosyl methionine) (عامل دهنده گروه متیل و کوفاکتور آنزیم متیل ترانسفراز) به حساب می‌آید. از اینرو، پروتیین βC1 با جلوگیری از چرخه متیلاسیون سبب سرکوب سازوکار خاموشی ژن به هنگام ترانویسی و پایداری کمپلکس‌های جمینی‌ویروس/بتاستلایت نیز می‌شود (Yang *et al*. 2011). پروتیین C4 بیان‌شده توسط جیمین‌ویروس‌های مختلف نیز توانایی اتصال به توالی‌های آرانا و دی‌انا کوچک را داراست. همچنین قدرت سرکوب‌گری این پروتیین در مسیر خاموشی ژن پس از ترانویسی نیز به خصوص در مورد بگوموویروس‌های مختلف به اثبات رسیده است (Saeed *et al*. 2015, Vanitharani *et al*. 2004). پروتیین‌های TrAP/C2 جمینی‌ویروس نیز با آدنوزین کیناز (Adenosine kinase, ADK) میزبانی برهمکنش داده و آن را غیر فعال می‌سازند (Wang *et al*. 2005). این مولکول کیناز در حالت طبیعی برای سنتز SAM مورد نیاز است، بنابراین غیرفعال‌سازی آن بر چرخه متیل اثر می‌گذارد و در نتیجه سبب کاهش متیلاسیون دی‌انا و سرکوب خاموشی ژنوم جمینی‌ویروس‌ها به هنگام ترانویسی خواهد شد(شکل ۱). نقش سرکوب‌گری پروتیین V2 در آلودگی بگوموویروس یک‌بخشی پیچیدگی برگ پاپایا (*Papaya leaf curl virus*, PaLCuV) در هر دو مسیر خاموشی ژن به هنگام ترانویسی و نیز خاموشی ژن پس از ترانویسی با استفاده از ناقلین GFP و مطالعات بیان گذرا (Transient expression) به اثبات رسیده است (Mubin *et al*. 2018). در مورد جمینی‌ویروس سیب (Apple geminivirus, AGV) نیز که توانایی آلوده‌کنندگی آن به تازگی در درختان سیب گزارش شده است، پروتیین V2 علاوه بر فعالیت به عنوان یک تعیین‌کننده علایم در سرکوب خاموشی ژن پس از ترانویسی نیز عمل می‌کند (Zhan *et al*. 2018). در تولید گیاهان تراریخت مقاوم به جمینی‌ویروس‌ها نیز به طور معمول از اصول خاموشی ژن پس از ترانویسی استفاده می‌شود به این صورت که توالی‌های آرانا دولا همسان با توالی ژنوم ویروس در گیاه سنتز می‌شود. بنابراین در زمان ورود ویروس، سازوکار خاموشی ژن پس از ترانویسی امکان شناسایی ترانوشت‌های ویروس و سرکوب هر چه بیشتر بیان ژن‌های ویروس را خواهد داشت. با وجود این، در تولید گیاهان تراریخت مقاوم به جمینی‌ویروس‌ها به این شیوه تردیدهایی وجود دارد که کارآیی و ایمنی این روش را با چالش مواجه کرده است. زمانی‌که برای اولین بار لاین‌های گوجه‌فرنگی تراریخت دربردارنده توالی ژن پروتیین همراه با همانندسازی TYLCV، تحت شرایط مزرعه‌ای مورد ارزیابی قرار گرفتند نشان داده شد که پروفایل ترانوشت‌های ژن‌های میزبان نیز پس از چند نسل تحت تأثیر سازه بیان‌کننده آرانا دولا ویروس قرار گرفتند. این موضوع خود باعث ایجاد فنوتیپ‌های غیرطبیعی در بوته‌های گوجه‌فرنگی شد (Fuentes *et al*. 2016). علاوه‌براین، ایجاد سازه‌های مقاومت در گیاهان باعث تحریک جمعیت جمینی‌ویروس‌ها به سمت غالب شدن سویه‌هایی می‌شود که از همانندی کمتری با توالی آران‌اهای دولای بیان شده توسط سازه‌های مقاومت، برخوردار باشند (Fuentes *et al*. 2016, Mehta *et al*. 2018).

نتیجه‌گیری

جمینی‌ویروس‌ها به دلیل ژنوم کوچک‌شان تنها چهار تا هفت پروتیین را بیان می‌کنند. این پروتیین‌ها، پروتیین‌هایی چندکاره هستند که تا حدودی محدودیت‌های این ژنوم کوچک را جبران کرده‌اند. بسیاری از برهمکنش‌های درون سلولی این ویروس‌ها با گیاهان میزبان، مانند تاثیر بر فاکتورهای همانندسازی میزبان، مسیرهای کینازی، مسیرهای پیام‌رسانی هورمون‌های گیاهی، مسیرهای اصلاح پروتیین و مسیرهای خاموشی ژن در گیاه شناخته شده‌اند. یافته‌های به‌دست آمده از این پژوهش‌ها فرصت‌های جدیدی را در طراحی روش‌های مدیریت جمینی‌ویروس‌های انگل گیاهان فراهم آورده‌اند.



شکل ۱. مولکول‌های بتاستلایت همراه با پیکره‌های دوقلوی بگوموویروس‌ها، به هنگام انتقال توسط مگس سفید به سلول‌های گیاهی وارد می‌شوند. بتاستلایت‌ها از طریق تأثیرگذاری بر مسیرها و سازوکارهای مختلف در سلول، منجر به بیان علایم آلودگی ویروس‌های همراهِ خود می‌شوند. پروتیین βC1 کد شده توسط این مولکول‌ها، از طریق جلوگیری از بارگذاری گروه‌های متیل بر روی دی‌ان‌ای‌های دوررشته‌ای در هسته سلول‌های آلوده منجر به سرکوب مسیر خاموشی ژن به هنگام ترانویسی می‌شود. این پروتیین همچنین از طریق ممانعت از فعالیت آنزیم آران‌ا پلی‌مراز میزبانی (RDR6) منجر به جلوگیری از سنتز مولکول‌های آران‌ا دولا شده و مسیر خاموشی ژن پس از ترانویسی را در سیتوپلاسم سرکوب می‌نماید. اثرگذاری مسیرهای پروتئازوم و یوبیکوئیتیناسیون بر پروتیین βC1 به ترتیب سبب تخریب و اصلاح ساختار این پروتیین در سلول‌های آلوده می‌شود. TGS: خاموشی به هنگام ترانویسی، PTGS: خاموشی پس از ترانویسی.

Figure 1. Betasatellites, encapsidated in twinned particles of helper begomoviruses, are transmited by whitefly. After transport of viral ssDNA molecules to the nucleus, dsDNA intermediates are produced. Methyl groups binds to dsDNAs and represses their transcription, referred as TGS. βC1 through effect on SAHH (methyl donor groups) leads to suppression of TGS. On the other hands, suppression of JA responsing specific genes leads to susceptibility against whitefly. RDR6 is a host RNA polymerase that converts overlapping transcripts of geminiviruses to dsRNA and initiates PTGS. βC1 interacts with cellular down-regulators of RDR6 (Nbrgs-CaM) and inhibits function of this RNA polymerase resulting to suppression of PTGS. In the cytoplasm, βC1 interacts with ubiquitin conjugating enzyme, SIUBC3, that necessary for induction of symptoms and functions. SISnRK1 and proteasome complex would be able to suppress βC1 function through disrupt of protein structure. TGS: transcriptional gene silencing, PTGS: post-transcriptional gene silencing.

References منابع

1. Adams MJ, King AM and Carstens EB (2013) Ratification vote on taxonomic proposals to International Committee on Taxonomy of Viruses. Archives of Virology 158:2023-2030.
2. Alcaide-Loridan C and Jupin I (2012) Ubiquitin and plant viruses, let’s play together! Plant Physiology 160:72–82.

3. Anabestani A, Behjatnia SAA, Izadpanah K, Tabein S and Accotto GP (2017) Seed transmission of Beet curly top virus and Beet curly top Iran virus in a local cultivar of petunia in Iran. Viruses 9:299-311.
4. Arguello-Astorga G, Lopez-Ochoa L, Kong LJ, Orozco BM, Settlage SB and Hanley-Bowdoin L (2004) A novel motif in geminivirus replication proteins interacts with the plant retinoblastoma-related protein. Journal of Virology 78:4817-4826.
5. Ascencio-Ibanez JT, Sozzani R, Lee TJ, Chu TM, Wolfinger RD, Cella R and Hanley-Bowdoin L (2008) Global analysis of *Arabidopsis* gene expression uncovers a complex array of changes impacting pathogen response and cell cycle during geminivirus infection. Plant Physiology 148:436–454.
6. Bachmair A, Becker F, Masterson RV and Schell J (1990) Perturbation of the ubiquitin system causes leaf curling, vascular tissue alterations and necrotic lesions in a higher plant. EMBO Journal 9:4543–4549.
7. Bagewadi B, Chen S, Lal SK, Choudhury NR and Mukherjee SK (2004) PCNA interacts with Indian mung bean yellow mosaic virus rep and downregulates Rep activity. Journal of Virology 78:11890–11903.
8. Behjatnia SAA, Dry IB and Rezaian MA (1998) Identification of the replication-associated protein binding domain within the intergenic region of tomato leaf curl geminivirus. Nucleic Acids Research 26:925–931.
9. Briddon RW, Bull SE, Amin I, Mansoor S, Bedford ID, Rishi N, Siwatch SS, Zafar Y, Abdel-salam AM and Markham PG (2004) Diversity of DNA 1: A satellite molecule-like molecule associated with monopartite begomovirus-DNA β complexes. Virology 324:462-74.
10. Briddon RW, Pinner MS, Stanley J and Markham PG (1990) Geminivirus coat protein replacement alters insect specificity. Virology 177: 85–94.
11. Brown JK, Fauquet CM, Briddon RW, Zerbini M, Moriones E and Navas-Castillo J (2012) *Geminiviridae*. Pp. 351-373. In: Virus taxonomy, ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. AMQ King MJ Adams EB. Carstens and EJLefkowitz (Eds.). London, Elsevier/Academic Press.
12. Carvalho CM, Machado JP, Zerbini FM and Fontes EPB (2008a) NSP-interacting GTPase: a cytosolic protein as cofactor for nuclear shuttle proteins. Plant Signalling and Behavior 3:752-754.
13. Castillo AG, Collinet D, Deret S, Kashoggi A and Bejarano ER (2003) Dual interaction of plant PCNA with geminivirus replication accessory protein (REn) and viral replication protein (Rep). Virology 312:381-394.
14. Castillo A. G., Kong L. J., Hanley-Bowdoin L. and Bejarano E. R. 2004. Interaction between a Geminivirus Replication Protein and the Plant Sumoylation System. Journal of Virology 78:2758-2769.
15. Castro PH, Tavares RM, Bejarano ER and Azevedo H (2012) SUMO, a heavyweight player in plant abiotic stress responses. Cell and Molecular Life Sciences 69:3269–3283.

16. Chen H, Zhang Z, Teng K, Lai J, Zhang Y, Huang Y, Li Y, Liang L, Wang Y, Chu C, Guo H (2010) Up‐regulation of LSB1/GDU3 affects geminivirus infection by activating the salicylic acid pathway. Plant Journal 62:12–23.
17. Desvoyes B, Ramirez-Parra E, Xie Q, Chua NH and Gutierrez C (2006) Cell type-specific role of the retinoblastoma/E2F pathway during *Arabidopsis* leaf development. Plant Physiology 140:67–80.
18. Dogra SC, Eini O, Rezaian MA and Randles JW (2009) A novel shaggy-like kinase interacts with the Tomato leaf curl virus pathogenicity determinant C4 protein. Plant Molecular Biology 71:25-38.
19. Egelkrout EM, Robertson D and Hanley-Bowdoin L (2001) Proliferating cell nuclear antigen transcription is repressed through an E2F consensus element and activated by geminivirus infection in mature leaves. Plant Cell 13:1437–1452.
20. Eini O, Dogra S, Selth LA, Dry IB, Randles JW and Rezaian MA (2009) Interaction with a Host Ubiquitin-Conjugating Enzyme Is Required for the Pathogenicity of a Geminiviral DNA β Satellite. Molecular Plant Microbe Interaction 22:737-746.
21. Etessami P, Saunders K, Watts J and Stanley J (1991) Mutational analysis of complementary-sense genes of *African cassava mosaic virus* DNA-A. Journal of General Virology 72:1005–1012.
22. Fondong VN (2013) Geminivirus protein structure and function. Molecular Plant Pathology 14:635-649.
23. Fontes EP, Santos AA, Luz DF, Waclawovsky AJ and Chory J (2004) The geminivirus nuclear shuttle protein is a virulence factor that suppresses transmembrane receptor kinase activity. Genes and Development 18:2545–2556.
24. Fuentes A, Carlos N, Ruiz Y, Callard D, Sánchez Y, Ochagavía ME, Seguin J, Malpica-López N, Hohn T, Lecca MR, Pérez R, Doreste V, Rehrauer H, Farinelli L, Pujol M. and Pooggin MM (2016) Field trial and molecular characterization of rnai-transgenic tomato plants that exhibit resistance to Tomato yellow leaf curl geminivirus. Molecular Plant Microbe Interaction 29:197-209.
25. Garcia-Neria MA and Rivera-Bustamante RF (2011) Characterization of geminivirus resistance in an accession of *Capsicum chinense* Jacq. Molecular Plant Microbe Interaction 24:172–182.
26. Hanley-Bowdoin L, Bejarno ER, Robertson D and Mansoor S (2013) Geminiviruses: masters at redirecting and reprogramming plant processes. Nature Reviews Microbiology 11:777-788.
27. Hanley-Bowdoin L, Settlage SB, Orozco BM, Nagar S and Robertson D (2000) Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology 35:105–10.
28. Hao L, Wang H, Sunter G and Bisaro DM (2003) Geminivirus AL2 and L2 proteins interact with and inactivate SNF1 kinase. The Plant Cell 15:1034-1048.

29. Kaliappan K, Choudhury NR, Suyal G and Mukherjee SK (2012) A novel role for RAD54: this host protein modulates geminiviral DNA replication. The journal of the federation of America Societies for Experimental Biology 26:1142-1160.
30. Kil EJ, Kim S, Lee YJ, Byuan HS, Park J, Seo H., Kim CS, Shim JK, Lee JH, Kim J K, Lee KY, Choi HS and Lee S (2016) Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV-IL): a seed transmissible geminivirus in tomatoes. Scientific Reports 6:19013.
31. Kim J, Kil EJ, Kim S Seo H, Byun HS, Park J, Chung MN, Kwak HR Kim MK, Kim CS, Yang JW, Lee KY, Choi HS and Lee S (2015) Seed transmission of *Sweet potato leaf curl virus* in sweet potato (*Ipomoea batatas*). Plant Pathology 64:1284-1291.
32. Kong LJ and Hanley-Bowdoin L (2002) A geminivirus replication protein interacts with a protein kinase and a motor protein that display different expression patterns during plant development and infection. Plant Cell 14:1817–1832.
33. Kong LJ, Orozco B, Roe JL, Nagar S, Ou S, Feiler HS, Durfee T, Miller AB, Gruissem W, Robertson D and Hanley-Bowdoin L (2000) A geminivirus replication protein interacts with the retinoblastoma protein through a novel domain to determine symptoms and tissue specificity of infection in plants. The EMBO Journal 19:3485-3495.
34. Lai J, Chen H, Teng K, Zhao Q, Zhang Z, Li Y, Liang L, Xia R, Wu Y, Gou H and Xie Q (2009) RKP, a RING finger E3 ligase induced by BSCTV C4 protein, affects geminivirus infection by regulation of the plant cell cycle. The Plant Journal 57:905-917.
35. Lefeuvre P, Martin DP, Harkins G, Lemey P, Gray AJ, Meredith S, Lakay F, Monjane A, Lett JM, Varsani A, Heydarnejad J (2010) The spread of tomato yellow leaf curl virus from the Middle East to the world. PLoS Pathogens 6:e1001164.
36. Legg JP and Fauquet CM (2004) Cassava mosaic geminiviruses in Africa. Plant Molecular Biology 56:585-599.
37. Lima AT, Sobrinho RR, Gonzalez-Aguilera J, Rocha CS, Silva SJ, Xavier CA, Silva FN, Duffy S, Zerbini FM (2012) Synonymous site variation due to recombination explains higher variability in begomovirus populations infecting non-cultivated hosts. Journal of General Virology 94:418–431.
38. Liu H, Lucy AP, Davies J and Boulton MI (2001) A single amino acid change in the coat protein of *Maize streak virus* abolishes systemic infection, but not interaction with viral DNA or movement protein. Molecular Plant Pathology 2:223-228.
39. Lozano-Duran R, Rosas-Díaz T, Gusmaroli G, Luna AP, Taconnat L, Deng XW, Bejarano ER (2011b) Geminiviruses subvert ubiquitination by altering CSN-mediated derubylation of SCF E3 ligase complexes and inhibit jasmonate signaling in *Arabidopsis thaliana.* Plant Cell 23:1014-1032.

40. Lozano-Duran R, Rosas-Diaz T, Luna AP and Bejarano ER (2011a) Identification of host genes involved in geminivirus infection using a reverse genetics approach. PLoS ONE 6:e22383.
41. Luque A, Sanz-Burgos AP, Ramirez-Parra E, Castellano MM and Gutierrez C (2002) Interaction of geminivirus Rep protein with replication factor C and its potential role during geminivirus DNA replication. Virology 302:83-94.
42. Mansoor S, Zafar Y and Briddon RW (2006) Geminivirus disease complexes: the threat is spreading. Trends of Plant Science 11: 209-212.
43. Marino D, Peeters N and Rivas S (2012) Ubiquitination during plant immune signaling. Plant Physiology 160:15-27.
44. Mehta D, Mehta D, Hirsch-Hoffmann M, Were M, Patrignani A, Zaidi SS, Were H, Gruissem W, Vanderschuren H (2018) A new full-length circular DNA sequencing method for viral-sized genomes reveals that RNAi transgenic plants provoke a shift in geminivirus populations in the field. Nucleic Acids Research 47:e9-e9.
45. Mubin M, Briddon RW and Mansoor S (2018) The V2 protein encoded by a monopartite begomovirus is a suppressor of both post-transcriptional and transcriptional gene silencing activity. Gene 686:43-48.
46. Nagar S, Pedersen TJ, Carrick KM, Hanley-Bowdoin L and Robertson D (1995) A geminivirus induces expression of a host DNA synthesis protein in terminally differentiated plant cells. Plant Cell 7:705-719.
47. Navas-Castillo J, Fiallo-Olive E and Sanchez-Campos S (2011) Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. Annual Review of Phytopathology 49:219-248.
48. Nawaz-ul-Rehman MS and Fauquet C (2009) Evolution of geminiviruses and their satellites. Federation of European Biochemical Societies 583:1825-1832.
49. Piroux M, Saunders K, Page A and Stanley J (2007) Geminivirus pathogenicity protein C4 interacts with Arabidopsis thaliana shaggy-related protein kinase AtSKη, a component of the brassinosteroid signaling pathway. Virology 362:428-440.
50. Pooggin MM (2018) Small RNA-omics for plant virus identification, virome reconstruction and antiviral defense characterization. Frontiers in Microbiology 9:2779.
51. Raja P, Wolf JN and Bisaro DM (2009) RNA silencing directed against geminiviruses: Post-transcriptional and epigenetic components. Biochimica et Biophysica Acta 1799:337-351.
52. Ramesh SV, Sahu P, Prasad M, Prasad M, Praveen S, Pappu HR (2017) Geminiviruses and Plant Hosts: A Closer Examination of the Molecular Arms Race. Viruses 9:256.
53. Rocha CS, Santos AA, Machado JP and Fontes EP (2008) The ribosomal protein L10/QM-like protein is a component of the NIK-mediated antiviral signaling. Virology 380:165-169.

54. Saeed M, Behjatnia SAA, Mansoor S, Zafar Y, Hasnain S and Rezaian MA (2005) A single complementary sense transcript of a geminiviral DNA β satellite is determinant of pathogenicity. Molecular Plant Microbe Intraction 18:7-14.
55. Saeed M, Briddon RW, Dalakouras A, Krczal G and Wassenegger M (2015) Functional analysis of Cotton leaf curl kokhran virus/Cotton leaf curl Multan betasatellite RNA silencing suppressors. Biology 4:697-714.
56. Santos AA, Carvalho CM, Florentino LH, Ramos HJ and Fontes EP (2009) Conserved threonine residues within the A‑loop of the receptor NIK differentially regulate the kinase function required for antiviral signaling. PLoS ONE 4:e5781.
57. Scholthof KB Scholthof KB, Adkins S, Czosnek H, Palukaitis P, Jacquot E, Hohn T, Hohn B, Saunders K, Candresse T, Ahlquist P, Hemenway C (2011) Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. Molecular Plant Pathology 12:938–954.
58. Settlage SB, See RGand Hanley-Bowdoin L (2005) Geminivirus C3 protein: replication enhancement and protein interactions. Journal of Virology 79:9885-9895.
59. Shen Q, Liu Z, Song F, Xie Q, Hanley-Bowdoin L and Zhou X (2011) Tomato SISnRK1 protein interacts with and phosphorylates βC1, a pathogenesis protein encoded by a geminivirus β-satellite. Plant Physiology 157:1349-1406.
60. Shen W and Hanley-Bowdoin L (2006) Geminivirus infection up‑regulates the expression of two *Arabidopsis* protein kinases related to yeast SNF1- and mammalian AMPK-activating kinases. Plant Physiology 142:1642-1655.
61. Shen W, Reyes MI and Hanley-Bowdoin L (2009) *Arabidopsis* protein kinases GRIK1 and GRIK2 specifically activate SnRK1 by phosphorylating its activation loop. Plant Physiology 150:996-1005.
62. Shepherd DNShepherd DN, Martin DP, Van der Walt E, Dent K, Varsani A, Rybicki EP (2010) Maize streak virus: an old and complex ‘emerging’ pathogen. Molecular Plant Pathology 11:1-12.
63. Shivaprasad PV, Akbergenov R, Trinks D, Rajeswaran R, Veluthambi K, Hohn T and Pooggin MM (2005) Promoters, transcripts, and regulatory proteins of mungbean yellow mosaic geminivirus. Journal of Virology 79:8149-8163.
64. Shrama P and Ikegami M (2008) RNA–silencing suppressors of geminiviruses. Journal of General Plant Pathology 74:189-202.
65. Soitamo AJ, Jada B and Lehto K (2012) Expression of geminiviral AC2 RNA silencing suppressor changes sugar and jasmonate responsive gene expression in transgenic tobacco plants. BMC Plant Biology 12:204.
66. Stenger DC, Revington GN, Stevenson M and Bisaro DM (1991) Replicational release of geminivirus genomes from tandemly repeated copies: evidence for rolling-circle replication of a plant viral DNA. Proceeding of National Academy of Science of the United States of America 88:8029-8033.
67. Tabein S and Behjatnia SAA (2014) Defective and satellite dnas of plant dna viruses. Plant Pathology Science 3:21-32. (In Persian with English Abstract).

68. Vanitharani R, Chellappan P, Pita JS and Fauquet CM (2004) Differential roles of AC2 and AC4 of cassava geminiviruses in mediating synergism and suppression of posttranscriptional gene silencing. Journal of Virology 78:9487-9498.
69. Varsani A, Roumagnac P, Fuchs M, Navas-Castillo J, Moriones E, Idris A, Briddon RW, River-Bustamante R, Zerbini FM and Martin DP (2017) *Capulavirus* and *Grablovirus*: two new genera in the family *Geminiviridae*. Archives of Virology 162:1819-1831.
70. Wang H, Buckley KJ, Ynag X, Buchmann RC and Bisaro DM (2005) Adenosine kinase inhibition and suppression of RNA silencing by geminivirus AL2 and L2 proteins. Journal of Virology 79:7410-7418.
71. Yang X, Xie Y, Raja P, Li S, Wolf JN, Shen Q, Bisaro DM, Zhou X. Suppression of methylation-mediated transcriptional gene silencing by βC1-SAHH protein interaction during geminivirus-betasatellite infection. PLoS Pathogens **7**:e1002329.
72. Zeng R, Liu X, Yang C and Lai J (2018) Geminivirus C4: Interplaying with Receptor-like Kinases. Trends in Plant Science 23:1044-1046.
73. Zhan B, Zhao W, Li S, Yang X and Zhou X (2018) Functional scanning of apple geminivirus proteins as symptom determinants and suppressors of posttranscriptional gene silencing. Viruses 10:488.
74. Zhang T, Luan JB, Qi JF, Huang CJ, Li M, Zhou XP and Liu SS (2012) Begomovirus-whitefly mutualism is achieved through repression of plant defenses by a virus pathogenicity factor. Molecular Ecology 21:1294-1304.

دانش بیماری‌شناسی گیاهی (شاپای ا: ۶۲۹۰-۲۵۸۸، شاپای چ: ۹۲۷۰-۲۲۵۱)
سال هشتم، جلد ۲، بهار و تابستان ۱۳۹۸
Plant Pathology Science (eISSN:2588-6290, pISSN:2251-9270)
Vol. 8(1), 2019

Research Article

Effect of Nano-Chitosan on Early Blight Disease of Tomato

AIDA AHMADIZADEH ESFAHANI[1], MEHDI SADRAVI[1]✉ , SHOLEH KAZEMI[2]

1- Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Yasouj University, Yasouj, Iran. 2- Fars Plant Protection Organization, Shiraz, Iran.

Received: 09.06.2019 Accepted: 04.09.2019

Ahmadizadeh Esfahani A, Sadravi M and Kazem S (2019) Effect of nano-chitosan on early blight disease of tomato. Plant Pathology Science 8(2):102-109. DOI: 10.2982/PPS.8.2.102.

Abstract

Introduction: Early blight caused by *Alternaria* species is one of the most important tomato diseases in the world. The disease has been reported from most areas in Iran with up to 90% infection. This study was conducted to investigate the effect of nano-chitosan on the severity of the disease and its use as a replacement of the chemical fungicide, chlorothalonil. **Materials and Methods:** Diseased tomato plants of fields and greenhouses of Fars province in southern Iran were sampled. Pathogens were isolated from diseased tissues, purified and identified by studying their morphological characteristics. The effect of nano-chitosan at three concentrations of three, five and seven grams per liter and the fungicide chlorothalonil were tested before and after inoculation of two pathogens. The disease severity indexes were measures in Sunseed and 16 cultivars of tomato under greenhouse conditions using a factorial experimental in completely randomized design with four replications. The data were analyzed with comparing the means. **Results:** The isolated pathogens were identified as *A. solani* and *A. alternata*. Results of the greenhouse experiment showed that *A. solani* was more aggressive than *A. alternata* and the cultivar 16 was more resistant to the disease. Nano-chitosan at 5 and 7 mg/ l significantly reduced disease severity indexes when use before pathogen inoculation, and at 7 mg/l when use after pathogen inoculation. **Conclusion:** Nano-chitosan can be used as a bio-fungicide to replace chlorothalonil as a chemical fungicide for disease management.

Key words: Blight, Nano-chitosan, Tomato, *Alternaria*.

✉ Corresponding author: msadravi@yu.ac.ir

مقاله پژوهشی

تاثیر نانوکیتوزان بر بیماری سوختگی زودهنگام گوجه‌فرنگی

آیدا احمدی‌زاده اصفهانی[۱]، مهدی صدروی[۱]✉ و شعله کاظمی[۲]
۱- گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه یاسوج، یاسوج
۲- اداره حفظ نباتات استان فارس، شیراز

دریافت: ۱۳۹۸/۰۳/۱۹ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۶/۱۵
احمدی‌زاده اصفهانی آ، صدروی م و کاظمی ش (۱۳۹۸) تاثیر نانوکیتوزان بر بیماری سوختگی زودهنگام گوجه‌فرنگی. دانش بیماری‌شناسی گیاهی ۸(۲):۱۰۹-۱۰۲. DOI: 10.2982/PPS.8.2.102

چکیده

مقدمه: سوختگی زودهنگام ناشی از گونه‌های *Alternaria* یکی از بیماری‌های مهم گوجه‌فرنگی در جهان است. این بیماری از بیشتر مناطق ایران با آلودگی تا ۹۰ درصد گزارش شده است. این پژوهش به منظور بررسی تاثیر نانوکیتوزان بر شدت بیماری برای استفاده از آن به عنوان جایگزین قارچکش شیمیایی کلروتالونیل انجام شد. **مواد و روش‌ها:** مزرعه‌ها و گلخانه‌های تولید گوجه‌فرنگی استان فارس، در جنوب ایران، بازدید و از بوته‌های بیمار نمونه‌برداری شد. بیمارگرها از بافت‌های بیمار جداسازی، خالص‌سازی وبا مطالعه خصوصیات ریخت‌شناسی شناسایی گردیدند. تاثیر نانوکیتوزان در سه غلظت سه، پنج و هفت گرم بر لیتر قبل و بعد از تلقیح دو بیمارگر و قارچکش کلروتالونیل بر شاخص‌های شدت بیماری در رقم‌های Sunseed و ۱۶، در شرایط گلخانه در قالب طرح آزمایشی- فاکتوریل با طرح آماری کاملاً تصادفی با چهار تکرار برای هر تیمار آزمایش شدند. داده‌های حاصله مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و میانگین‌ها مقایسه شدند. **یافته‌ها:** بیمارگرها *A. solani* و *A. alternata* شناخته شدند. نتیجه آزمایش گلخانه‌ای نشان داد که قدرت بیماریزایی *A. solani* بیشتر از *A. alternata* است، رقم ۱۶ مقاومت نسبی بیشتری به بیماری دارد و نانوکیتوزان در ۵ و ۷ میلی‌گرم در لیتر قبل از تلقیح بیمارگرها و در غلظت ۷ میلی‌گرم بعد از تلقیح بیمارگرها شاخص‌های شدت بیماری را به طور معنی‌داری بیشتر از سایر تیمارها کاهش می‌دهد. **نتیجه‌گیری:** نانوکیتوزان می‌تواند به عنوان یک قارچکش زیستی جایگزین مناسب قارچکش شیمیایی کلروتالونیل برای مدیریت بیماری باشد.

واژگان کلیدی: سوختگی، نانوکیتوزان، گوجه‌فرنگی، *Alternaria*

مقدمه Introduction

سوختگی زودهنگام (Early Blight) ناشی از گونه‌های *Alternaria* یکی از بیماری‌های مهم قارچی گوجه‌فرنگی به خصوص در مناطق گرم و مرطوب جهان است. نشانه‌های بیماری به شکل لکه‌های قهوه‌ای تیره تا سیاه‌رنگ با دوایر متحدالمرکز و هاله زردرنگ روی اندام‌های هوایی گیاه هستند، که به بوته‌های بیمار ظاهری سوخته می‌دهند. افزایش یک درصد شدت بیماری، موجب کاهش ۱/۳۶ درصد محصول می‌شود (Jones *et al.* 1993).

بیشترین خسارت بیماری در مناطقی با باران یا رطوبت زیاد و دمای بین ۲۴ تا ۲۹ درجه‌سلسیوس روی می‌دهد. اپیدمی بیماری همچنین می‌تواند در مناطقی با آب و هوای خشک که شبنم‌های طولانی و مکرر در شب‌ها دارند نیز اتفاق افتد (خنشا و همکاران ۱۳۹۱, Khansha *et al.* 2012). کاهش محصول تا ۷۹ درصد از کانادا، هند، آمریکا و نیجریه گزارش شده است که ۴۰-۲۰ درصد این خسارت مربوط به سوختگی کامل نشاها در مزرعه بوده است (Chaerani and Voorrips 2006).

✉ مسئول مکاتبه : msadravi@yu.ac.ir

بیماری سوختگی زودهنگام گوجه‌فرنگی در تمام مناطق کشت این گیاه در ایران شیوع دارد و خسارت آن روی ارقام زودرس گوجه‌فرنگی که در نواحی دزفول، بوشهر و بندرعباس کشت می‌شود حدود ۹۰-۶۰ درصد برآورد شده است (Sufejalian 1991, Ershad 2009).

کیتوزان یک پلی‌مر طبیعی زیست تخریب‌پذیر، گرفته شده از پوست خرچنگ‌ها و میگو است. تاثیر کیتوزان بر رشد میسلیوم گونه‌هایی از *Alternaria*، *Botrytis*، *Colletotricum*، *Fusarium* و *Rhizopus* بررسی شده است (Propagdee *et al.* 2006, ElGhaouth *et al.* 1992). تاثیر نانوکیتوزان نیز بر رشد میسلیوم گونه‌هایی از *Candida*، *Fusarium* و *Aspergillus* مطالعه شده است (Ing *et al.* 2012).

نظربه اهمیت اقتصادی گوجه‌فرنگی، تحت کشت در مزرعه‌ها و گلخانه‌های استان فارس و مشاهده شیوع و خسارت شدید بیماری در این استان انجام این تحقیق برای بررسی امکان مدیریت بیماری با استفاده از نانو کیتوزان که یک ماده زیستی و سالم برای مصرف‌کننده و محیط زیست است، به عنوان جایگزین سم شیمیایی کلروتالونیل ،که در این منطقه برای مبارزه با بیماری مصرف می‌شود، ضروری به نظر رسید.

مواد و روش‌ها Materials and Methods

نمونه‌برداری، جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی بیمارگرها

مزرعه‌ها و گلخانه‌های تولید گوجه‌فرنگی در شهرستان‌های مرودشت، زرقان و بیدزرد استان فارس بازدید شدند و از بوته‌های بیمار با نشانه‌های سوختگی نمونه‌برداری شد. نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل و بیمارگر از بافت‌های بیمار پس از ضدعفونی سطحی آنها با محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد به مدت ۳۵ ثانیه و شست‌وشو با آب مقطر سترون و قرار دادن روی محیط سیب‌زمینی/دکستروز/آگار (PDA) در دمای ۲۵ درجه سلسیوس جداسازی شدند. قارچ‌ها به روش تگ هاگ روی محیط (Potato Carrot Agar=PCA) در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و دوره‌ی نوری شش ساعت روشنایی و ۱۸ ساعت تاریکی برای مدت پنج روز خالص‌سازی شدند (Pandey *et al.* 2003). خصوصیات پرگنه، ریسه، کنیدیوم‌بر و کنیدیوم قارچ‌ها با بینوکولر Zeiss مدل STEMI-SV8 و میکروسکوپ زمینه‌روشن Zeiss مدل Axiostar plus مطالعه و اندازه‌گیری شدند و با توصیف‌های گونه‌های *Alternaria* مقایسه و شناسایی گردیدند (Thomma 2003).

آزمایش تاثیر نانوکیتوزان بر شدت بیماری در شرایط گلخانه

این آزمایش به صورت طرح آزمایشی فاکتوریل با فاکتور اول: دو بیمارگر، فاکتوردوم: دو رقم گوجه‌فرنگی به نام‌های Sunseed و ۱۶، فاکتورسوم: کاربرد مواد شیمیایی شامل: سه غلظت نانوذره کیتوزان در قبل و بعد تلقیح بیمارگرها و پاشیدن سم کلروتالونیل به همراه شاهدهای سالم و بیمار برای هر بیمارگر، با طرح آماری کاملاً تصادفی با چهار تکرار برای هر تیمار انجام گرفت. بذرهای هر دو رقم گوجه‌فرنگی با محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد به مدت دو دقیقه و سه بار شست‌وشو با آب مقطر سترون ضدعفونی سطحی شدند و در گلدان‌های پلاستیکی حاوی یک کیلوگرم مخلوط خاک، شن و کود دامی سترون شده به نسبت مساوی ۱:۱:۱ کشت و هفته‌ای دوبار آبیاری شدند. پنجاه روز بعد برگ‌های بوته‌ها ابتدا به وسیله سوزن خراش داده شد و سپس با ۵۰ میلی‌لیتر هاگ‌های کشت خالص قارچ‌های بیمارگر به غلظت^{۶}۱۰ در میلی‌لیتر برای هر بوته تلقیح شدند. تیمارهای شاهد با آب مقطر سترون تلقیح شدند. همه بوته‌ها پس از تلقیح در محیطی با رطوبت نسبی بیش از ۹۵ درصد (گلدان‌ها با استفاده از مه‌پاش و آب مقطر سترون مرطوب شدند و برای حفظ رطوبت با پلاستیک پوشانده شدند) و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت پنج روز متوالی نگهداری شدند. بعد از سه روز نشانه‌های اولیه بیماری قابل مشاهده بودند. بوته‌ها با غلظت‌های سه، پنج و هفت گرم در لیتر نانوکیتوزان (Sigma Aldrich) همراه با یک درصد اسید استیک یک هفته قبل از تلقیح بیمارگرها و به محض مشاهده نشانه‌های بیماری به میزان ۵۰ میلی‌لیتر روی برگ‌های هر بوته پاشیده شدند. به محض مشاهده اولین نشانه‌های بیماری از سم کلروتالونیل (75%WP) در غلظت دو در هزار و به فاصله هر ده روز به میزان ۵۰

میلی‌لیتر برای هر بوته در سه نوبت روی برگ‌های آن تیمار پاشیده شد . همزمان با زرد و نزدیک به خشک شدن بوته‌های شاهد بیمار شاخص‌های شدت بیماری در هر بوته (درصد برگ‌های بیمار، تعداد و قطر لکه‌ها) یادداشت‌برداري گردیدند (Pandey *et al.* 2003). بافت‌های بیمار در همه تیمارها نمونه‌برداری شدند و پس از جداسازی و خالص‌سازی قارچ‌ها ، خصوصیات ریختی آنها با قارچ‌های تلقیح شده مقایسه شدند.

یافته‌ها Results

نشانه‌های بیماری

نشانه‌های بیماری در مزرعه‌ها و گلخانه‌ها روی برگ و میوه گوجه‌فرنگی به صورت لکه‌های زرد روی برگ‌های مسن پایین بوته‌ها بود، که با افزایش قطر آنها بزرگ‌تر و قهوه‌ای رنگ با دوایر متحدالمرکز زرد و قهوه‌ای شده بودند (شکل ۱). این لکه‌ها گاهی تمام سطح پهنک برگ را فراگرفته و باعث خشک شدن و ریزش برگ‌ها شده بودند.

بیمارگرها

دو گونه *Alternaria* به عنوان بیمارگرها شناسایی شدند که خصوصیات ریختی آنها به این شرح بود.

۱- *Alternaria solani* (Ellis and G. Martin) L.R. Jones: پرگنه تیره رنگ، ریسه منشعب با دیواره‌های عرضی، کنیدیوم‌برها کوتاه،کنیدیوم‌ها، قهوه‌ای رنگ تقریباً گلابی شکل به ابعاد ۲۰-۱۸×۲۸۸-۱۵۳ میکرومتر، چند سلولی با دیواره‌های عرضی و طولی و با نوکی مشخص و نسبتا بلند بودند.

۲- *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl.: پرگنه قهوه‌ای تیره‌رنگ، کنیدیوم‌برها کوتاه، کنیدیوم‌ها به رنگ زیتونی تیره مایل به قهوه‌ای، گرد، بیضی تا تخم‌مرغی شکل به ابعاد ٤-۱۲×۲۲-۳۰ میکرومتر و اغلب به صورت زنجیری تشکیل شده بودند. کنیدیوم‌های این گونه در مقایسه با *A. solani* کوچکتر با نوک کوتاه‌تری هستند.

شکل ۱. نشانه‌های بیماری سوختگی زودهنگام گوجه‌فرنگی در جنوب ایران، A- لکه‌های سوخته روی برگ و میوه در مزرعه، B- لکه‌های سوخته روی برگ‌ها در گلخانه.

Figure 1. Symptoms of early tomato blight disease in southern Iran, A- Scorched spots on leaves and fruit in the farm, B- Scorched spots on leaves in the greenhouse.

تاثیر نانوکیتوزان بر شدت بیماری در شرایط گلخانه

نتیجه تجزیه واریانس داده‌های این آزمایش نشان داد که در سطح احتمال یک درصد بین تیمارها اختلاف معنی‌دار وجود دارد. نشانه‌های بیماری روی برگ‌های بوته‌های تلقیح شده با بیمارگرها کاملا مشهود بود (شکل ۲).

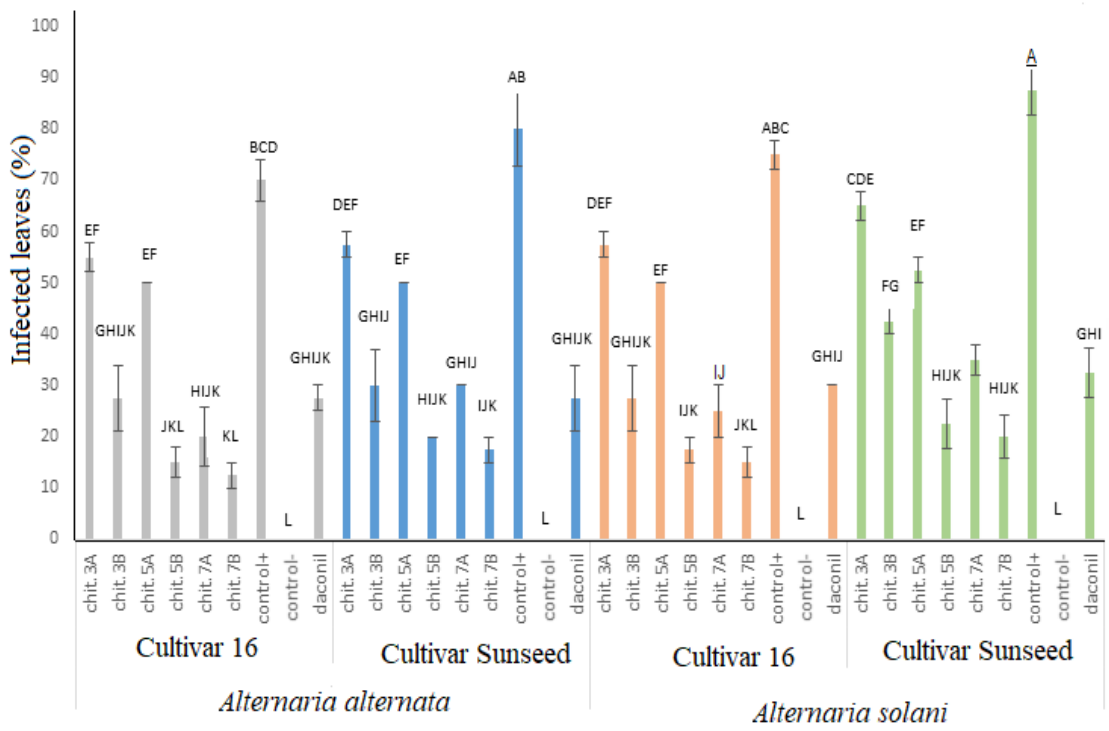
مقایسه میانگین‌ها درصد برگ‌های آلوده، نشان داد، که تمامی تیمارها با شاهدهای مثبت اختلاف معنی‌داری دارند (شکل ۳) . درصد برگ‌های آلوده در بوته‌های تلقیح شده هر دو رقم با *A. solani* بیشتر از بوته‌های تلقیح شده با *A. alternata* بود، که این حاکی از قدرت بیماری‌زایی بیشتر این قارچ بود. هم‌چنین درصد برگ‌های آلوده بین دو رقم Sunseed و ۱۶ نیز دارای اختلاف معنی‌داری بودند و در رقم Sunseed تلقیح شده با دو بیمارگر بیشتر از رقم ۱۶ بود و با هم اختلاف معنی‌دار داشتند، که این حالت حاکی از مقاومت نسبی رقم ۱۶ در مقابل دو بیمارگر است. غلظت‌های ۷ و ۵ گرم‌برلیتر نانوکیتوزان به صورت تیمار قبل از تلقیح بوته‌ها با بیمارگرها بیشترین اثر را در کاهش درصد برگ‌های آلوده داشتند. پس از این دو، تیمارهای سم کلروتالونیل و غلظت ۷ گرم بر لیتر نانوکیتوزان به صورت تیمار بعد از آلودگی توسط بیمارگرها بیشترین اثر را در کاهش درصد برگ‌های آلوده داشتند و هر سه در یک گروه آماری قرار گرفتند. مقایسه میانگین‌های تعداد و قطرلکه‌ها در تیمارهای مختلف نیز نتیجه مشابهی با مقایسه میانگین‌های درصد برگ‌های آلوده نشان دادند.

بحث **Discussion**

قارچ *A. solani* به عنوان عامل سوختگی زودهنگام گوجه‌فرنگی در بیشتر نقاط دنیا شناخته شده است (Jones 1993 *et al.*). این قارچ در ایران از استان‌های خوزستان، فارس، کرمان، تهران و آذربایجان غربی از روی گوجه‌فرنگی گزارش شده است (Ershad 2009). قارچ *A. alternata* نیز از روی گوجه‌فرنگی، در ایران از استان‌های خوزستان، بوشهر، اصفهان و سمنان گزارش شده است (Ershad 2009). بنابراین حضور *A. alternata* روی گوجه‌فرنگی در استان فارس برای نخستین بار گزارش می‌شود.

شکل ۲. نشانه‌های بیماری سوختگی زودهنگام روی رقم Sunseed گوجه‌فرنگی تلقیح شده با *Alternaria solani* در گلخانه.

Figure 2. Symptoms of early blight disease on tomato Sunseed cultivar, inoculated with *Alternaria solani* in greenhouse.



شکل ۳. تاثیر نانو کیتوزان و سم کلروتالونیل بر درصد برگهای آلوده دو رقم گوجه‌فرنگی به بیماری سوختگی زودهنگام ناشی از دو گونه*Alternaria* در گلخانه.

Figure 3. The effect of nano-chitosan and chlorotalonil on the percentage of infected leaves of two tomato cultivars due to early blight disease caused by two *Alternaria* species in greenhouse.

بررسی تاثیرکیتوزان بر میسلیوم و کنیدیوم‌های *Alternaria alternata*، تجزیه دیواره سلولی، انقباض غشای پلاسمایی، کج و کولگی سلولی، جدا شدن نوک کنیدیوم‌ها و تحلیل سلول‌های قارچ را نشان داده است (Bautista-Baños *et al.* 2011). کیتوزان باعث کاهش رشد میسلیوم گونه‌هایی از *Botrytis*، *Colletotricum*، *Fusarium* و *Rhizopus* می‌شود (ElGhaouth *et al.*1992، Propagdee *et al.* 2006). نانوکیتوزان نیز باعث کاهش رشد میسلیوم گونه‌هایی از *Candida*، *Fusarium* و *Aspergillus* شده است (Ing *et al.*2012). نتایج این پژوهش نیز نشان داد، که نانوکیتوزان میتواند در به طور معنی‌داری شدت بیماری سوختگی زودهنگام گوجه‌فرنگی ناشی از قارچ‌های *Alternaria solani* و *A. alternata* را کاهش دهد و این تاثیر با افزایش غلظت آن افزایش می‌یابد. طرز تاثیر کیتوزان و نانوکیتوزان بر میسلیوم و هاگ قارچ‌ها، به تحریک فعالیت آنزیم کیتین‌دی‌استیلاز توسط آنها، که منجر به تجزیه دیواره سلولی کیتینی قارچ‌ها و خارج شدن مواد درون سلولی آنها می‌انجامد نسبت داده شده است (Bautista-Baños *et al.* 2011) . تاثیر کیتوزان در القای مقاومت در گندم به بیماری سفیدشدن فوزاریومی سنبله به توانایی آن در فعال‌سازی آنزیم‌های پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز و افزایش بیان ژنهای بتا-۱و۳ گلوکاناز و اگزالات اکسیداز نسبت داده شده است (Ghazimohseni and Sabagh 2016).

نتیجه‌گیری Conclusion

بیماری سوختگی زودهنگام در مزرعه‌ها و گلخانه‌های تولید گوجه‌فرنگی شهرستان‌های مرودشت، زرقان و بیدزرد استان فارس شایع است و خسارت زیادی به این محصول وارد می‌کند. عوامل بیماری در این منطقه قارچ‌های *Alternaria solani* و *A. alternata* هستند. آزمایش تاثیر غلظت‌های مختلف نانوکیتوزان و سم

کلروتالونیل بر شدت بیماری ناشی از این دو بیمارگر در رقم‌های تجارتی Sunseed و ۱۶ نشان داد که قدرت بیماری‌زایی *Alternaria solani* بیشتر از *A. alternata* است، رقم ۱۶ مقاومت نسبی بیشتری نسبت به رقم Sunseed دارد و نانوکیتوزان در ۵ و ۷ میلی‌گرم در لیتر قبل از تلقیح بیمارگرها و در غلظت ۷ میلی‌گرم بعد از تلقیح بیمارگرها شدت بیماری را به طور معنی‌داری بیشتر از سایر تیمارها کاهش می‌دهد، بنابراین می‌توان از نانوکیتوزان به عنوان یک قارچ‌کش زیستی مناسب برای مبارزه با این بیماری استفاده کرد.

منابع References

۱. خنشا م، برزگر ف و حمزه‌زرقانی ح (۱۳۹۱) معرفي سامانه پیش‌آگاهی تام‌کست براي مبارزه شیمیایی با بیماری سوختگی زودهنگام گوجه‌فرنگی. دانش بیماري‌شناسی گیاهی ۱(۲):۲۰-۱۰.

2. Bautista-Baños S, Ramos-García M, Zavala-Padilla G, Castillo-Ocampo P, Ríos MY, Sánchez-Domínguez D (2011) Cytological and biochemical changes induced by chitosan in the pathosystem *Alternaria alternata*–tomato. Pesticide Biochemistry and Physiology 99:250-255.

3. Chaerani R, Voorrips R E (2006) Tomato early blight(*Alternaria solani*): The pathogen, genetics and breeding for resistance. Journal of General Plant Pathology 72:335-347.

4. ElGhaouth A, Arul J, Asselin A and Benhamou N (1992) Antifungal activity of chitosan on post-harvest pathogens: induction of morphological and cytological alterations in *Rhizopus stolonifer*. Mycological Research 96:769-779.

5. Ershad D (2009) Fungi of Iran. Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, Iran, 558p.

6. Ghazimohseni V, Sabagh SK (2016) Effect of chitosan on gene expression and enzymes involved in resistant induction to fusariuse of wheat. Iranian Journal of Plant Protection Science 46:363-371. (In Persian with English abstract).

7. Ing LY, Zin NM, Sarwar A, Katas H (2012) Antifungal activity of chitosan nanoparticles and correlation with their physical properties. International Journal of Biomaterials, Article ID 632698, 9 pages, http://dx.doi.org/10.1155/2012/632698

8. Jones JB, Jones JP, Stall RE, Zitter TA (1993) Compendium of Tomato Diseases. APS Press, USA, 73p.

9. Khansha M, Barzegar F, Hamzehzarghani H (2012) Introduction TOMCAST forecasting system for chemical control of tomato early blight disease. Plant Pathology Science 1:10-20.

10. Pandey KK, Pandey PK, Kalloo G, Banerjee MK (2003) Resistance to early blight of tomato with respect to various parameters of disease epidemics. Journal of General Plant Pathology 69:364-371.

11. Propagdee B, Kotchdat-Kumsopa A, Visarathanonth N (2006) The role of chitosan in protection of soybean from suolden death syndrome caused by *Fusarium solani* f. sp. *glycines*. Bioresource Technology 98:1353-1358.

12. Sufejalian N K (1991) Early blight of tomato and its chemical control in Jiroft and Bam area. Abstract book of Tenth Iranian Plant Protection Congress, Ferdowsi University of Mashhad, Iran, p: 118.

13. Thomma BPHJ (2003) *Alternaria* spp: from general saprophyte to specific parasite. Molecular Plant Pathology 4:225-236.

دانش بیماری‌شناسی گیاهی (شاپای ا: ۶۲۹۰-۲۵۸۸، شاپای چ: ۹۲۷۰-۲۲۵۱)
سال هشتم، جلد ۲، بهار و تابستان ۱۳۹۸
Plant Pathology Science (eISSN:2588-6290, pISSN:2251-9270)
Vol. 8(2), 2019

Research Article

Fungi in Desert Areas of Yazd Province

VAHIDEH RAFIEI[1]✉ , ZIA BANIHASHEMI[2]

1-Plant Protection Research Department, Agricultural and Natural Resources Research and Education Center of Semnan Province, AREEO, Shahrood, Iran.

2-Department of Plant Protection, Collage of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.

Received: 24.06.2019 Accepted: 30.07.2019

Rafiei V and Banihashemi Z (2019) Fungi in desert areas of Yazd province. Plant Pathology Science 8(2):110-121. DOI:10.2982/PPS.8.2.110.

Abstract

Introduction: The Fungi which are able to grow at the temperatures above 40 degrees Celsius are known as thermophilic fungi. So far, no study has been carried out on fungi in desert areas of Iran so the present study was aimed to isolate and identify the fungi in desert areas of Yazd province. **Materials and Methods:** Four desert regions of Yazd province were visited and samples were taken from soil and plant roots. The fungi were isolated by soil dilution method and were cultured on potato-agar extract medium. Genus and species of fungi were identified by valid identification keys. **Results:** Eighteen fungi from eight genera *vs. Aspergillus, Penicillium, Alternaria, Ulocladium, Stemphylium, Paecilomyces, Rhizopus* and *Fusarium* were identified in this study. **Conclusion:** The species of *Penicillium* and *Aspergillus* were the most abundant species in desert soils of this province. All fungi identified in this study are reported for the first time from Iranian desert soils.

Keywords: Desert soil, Thermophilic fungi, *Penicillium* , *Aspergillus*

✉ Corresponding author: v.rafiei@areeo.ac.ir

مقاله پژوهشی

قارچ‌های مناطق کویری استان یزد

وحیده رفیعی[1]✉ و ضیاءالدین بنی‌هاشمی[2]

۱-بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی شاهرود، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شاهرود. ۲- بخش گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز

دریافت: ۱۳۹۸/۰٤/۰۳ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۵/۰۸

رفیعی و و بنی‌هاشمی ض (۱۳۹۸) قارچ‌های مناطق کویری استان یزد. دانش بیماری‌شناسی گیاهی ۸(۲): ۱۲۱-۱۱۰.
DOI: 10.2982/PPS.8.2.110.

چکیده

مقدمه: قارچ‌هایی که قادر به رشد در دمای بالاتر از ٤۰ درجه سلسیوس هستند به عنوان قارچ‌های گرمادوست شناخته می‌شوند. پژوهش‌ای روی قارچ‌های مناطق بیابانی ایران تاکنون صورت نگرفته است، بنابراین پژوهش حاضر با هدف جداسازی و شناسایی قارچ‌های موجود در مناطق کویری استان یزد انجام شد. **مواد و روش‌ها:** چهار منطقه کویری استان یزد بازدید و از خاک و ریشه گیاهان نمونه‌برداری شد. قارچها به روش تهیه رقت از خاک روی محیط کشت عصاره سیب‌زمینی-آگار جداسازی شدند. تشخیص جنس و گونه‌های قارچها بر اساس کلیدهای معتبر شناسایی موجود صورت گرفت. **یافته‌ها:** هیجده قارچ از هشت جنس *Aspergillus* ، *Penicillium*، *Alternaria*، *Ulocladium*، *Stemphylium*، *Paecilomyces* ، *Rhizopus* و *Fusarium* در این پژوهش شناسایی شدند. **نتیجه‌گیری**: بیشترین فراوانی در خاک‌های کویری این استان را گونه‌های *Penicillium* و *Aspergillus* دارند. تمام قارچ‌های شناسایی شده برای اولین بار از خاک‌های کویری ایران گزارش می‌شوند.

واژگان کلیدی: مناطق بیابانی، قارچ‌های گرمادوست، *Aspergillus*، *Penicillium*

مقدمه Introduction

دما یکی از عامل‌های تعیین‌کننده حیات روی زمین است. در میان قارچها تنها تعداد کمی از گونه‌ها توانایی رشد و بقا در دماهای بالا بین ٥٥-٤٥ درجه سلسیوس را دارند. چنین قارچ‌هایی به دو دسته گرمادوست (Thermophilic) و متحمل به گرما (Thermotolerant) بسته به حداقل و حداکثر دمای موردنیاز برای رشدشان طبقه‌بندی می‌شوند (Crisan 1956, Mouchacca 1997). اولین قارچهای گرمادوست از مواد آلی نگهداری شده در دماهای بالا گزارش شده‌اند (Maheshwari *et al.* 2000). قارچ‌های گرمادوست به واسطه تولید بافت‌ها یا هاگ‌های مقاومی مثل اسکلروت یا کلامیدوسپور قادر به غلبه بر تنش‌های محیطی هستند. با این حال، حتی در میان قارچ‌های گرمادوست، برخی خصوصیات رشدی، تغییرات وابسته به دما را نشان می‌دهد. برای مثال بعضی گونه‌های *Chaetomium* و *Thermoascus* در دماهای ٤٥-٤۰ درجه سلسیوس تولید آسکوکارپ‌های بارور می‌کنند اما در دماهای بالاتر از ٤٥ درجه سلسیوس تنها قادر به تولید آسکوکارپ‌های عقیم و سترون و یا رشد رویشی بسیار کم هستند (Johri *et al.* 1999, Dose *et al.* 2001). تاکنون ٥۰ قارچ گرمادوست و متحمل به دما توصیف شده که بیشتر این قارچها از منابع مختلف شامل کودها، کمپوست، شن‌های ساحل و خاک کویرها جداسازی شده‌اند (Redman *et al.* 1999). قارچ‌های گرمادوست به دلیل تحمل بالا به حرارت، ابزار بسیار ارزشمندی برای پژوهشهای زیست‌شناسی سلولی و مولکولی محسوب می‌شوند و در صنایع پزشکی، دارویی و صنعت حائز اهمیت

✉ مسئول مکاتبه : v.rafiei@areeo.ac.ir

هستند. با توجه به اهمیت زیاد این گروه از قارچ‌ها تاکنون پژوهشهایی در مورد جداسازی آن‌ها از نواحی کویری و بیابانی جهان صورت گرفته است. پژوهشی در مورد شناسایی قارچ‌های گرمادوست در کویرهای عربستان سعودی، حضور ٤٨ گونه از قارچ‌های گرمادوست متعلق به ٢٦ جنس در این خاک‌ها را نشان داده است (Abdel Hafez 1982). پژوهش دیگری روی قارچ‌های کویرهای کویت، حاکی از فراوانی بیشتر گونه‌های *Aspergillus* در این مناطق بوده است (Moustafa *et al.* 1973). همچنین گونه‌های *Aspergillus* ، *Rhizopus*، *Mucor* و *Paecilomyces* بیشترین فراوانی را در خاک‌های کویری مصر داشته‌اند (Abdel-Fattah *et al.* 1982). در پژوهش دیگری در خاک‌های کویری در هند، ١٩ گونه متعلق به ١٤ جنس از قارچ‌های گرمادوست شناسایی شده‌اند. بیشترین فراوانی متعلق به بعضی گونه‌های *Penicillium*و *Rhizopus* بوده است (Salar and Aneja 2006). همچنین بیشترین قارچ‌های موجود در کویرهای عراق متعلق به جنس‌های *Aspergillus*، *Drechslera*، *Alternaria*، *Ulocladium*، *Rhizopus*، *Penicillium* گزارش شده است (Abdullah 1982). در تمام پژوهشهای انجام شده، گونه‌های *Aspergillus* و *Penicillium* به عنوان فراوانترین قارچها حضور داشته‌اند. همچنین جنس‌های *Drechslera*، *Alternaria*، *Ulocladium* نیز به وفور از خاک‌های نواحی کویری جهان گزارش شده‌اند (Sterflinger *et al.* 2012, Abdel Hafez 1982).

بیش از نیم میلیون کیلومتر مربع از خاک ایران را مناطق کویری تشکیل می‌دهند، که تراکم مناطق کویری در استان‌هایی نظیر سیستان و بلوچستان (کویر لوت)، خراسان (کویر نمک)، کرمان (کویر رفسنجان) و استان یزد (کویر بافق و اردکان) بیشتر از سایر مناطق است (Farifteh 1987). گیاهان رشد یافته در این مناطق بیابانی را غالبا گیاهان مقاوم در مقابل شوری و خشکی تشکیل می‌دهند که از این میان می‌توان به انواع گز، نی بیابانی، شیرین‌بیان، تاغ، شور، اشنان، خارشتر، قیچ و گیاهانی از تیره اسفناج اشاره کرد (Badiei 1998). تاکنون پژوهشی در زمینه قارچ‌های موجود در مناطق کویری ایران صورت نگرفته است. با توجه به اهمیت قارچ‌های گرمادوست در صنایع پزشکی، دارویی و صنعت و با توجه به مساحت گسترده نواحی خشک و کویری در ایران، در این پژوهش خاک‌های چهار منطقه کویری در استان یزد به منظور شناسایی قارچهای آنها مورد مطالعه قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها Materials and Methods

توصیف نواحی کویری مورد پژوهش

از خاک چهار منطقه خشک و کویری استان یزد شامل مناطق بیابانی در شهرستان‌های اردکان، خرانق، بافق و ابرکوه (با طول و به ترتیب با عرض جغرافیایی ٣٢/٣١ درجه شمالی و ٥١/٠٤ شرقی، ٣٢/٣٤ درجه شمالی و ٥٤/٦٦ درجه شرقی، ٣١/٥٨ درجه شمالی و ٥٥/٤ درجه شرقی، ٣١/١٢ درجه شمالی ٥٣/٢٨ درجه شرقی)، مقدار ١٠٠ گرم از عمق ٣٠-١٥ سانتی‌متری خاک نمونه‌های مختلف گرفته و به آزمایشگاه منتقل شدند. میانگین حداقل و حداکثر دما برای مناطق بیابانی مورد پژوهش ٦ درجه سلسیوس و ٤٨ درجه سلسیوس بود (سازمان هواشناسی ایران). ریشه و ساقه گیاهان نواحی بیابانی (تاغ، شیرین بیان، جغجغک و خارشتر) نیز نمونه‌برداری شدند.

جداسازی قارچها

روش رقیق‌سازی خاک با غلظت‌های ١:١٠، ١:١٠٠ و ١:١٠٠٠ از نمونه‌های خاک در آب مقطر سترون، روی محیط عصاره سیب‌زمینی-آگار جهت جداسازی قارچها استفاده گردید (Johnson *et al.* 1959). همچنین نمونه‌های گیاهی (گونه‌هایی از تاغ، شیرین بیان، جغجغک و خارشتر با ظاهر سالم و بدون نشانه بیماری) جمع‌آوری شده از مناطق کویری پس از شست و شو و خشک کردن، به قطعات ٦-٥ میلیمتری تقسیم شده و بدون ضدعفونی سطحی روی محیط کشت عصاره سیب زمینی-آگار کشت داده شدند. همه محیط‌های کشت در انکوباتور در دمای

۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۷ روز نگهداری شدند. پس از رشد پرگنه‌ها، از دو روش تک هاگ و نوک ریسه جهت خالص‌سازی جدایه‌ها استفاده گردید.

شناسایی قارچها

ویژگی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی قارچها مورد مطالعه قرار گرفتند. تشخیص جنس و گونه‌های قارچها با توجه به کلیدهای شناسایی معتبر در دسترس انجام گرفت.

شناسایی گونه‌های *Aspergillus*

جدایه های مربوط به جنس *Aspergillus* تا سطح گونه بر اساس منبع معتبر تشخیص گونه شناسایی شدند (Klich and Pitt 1988). پس از خالص‌سازی جدایه‌ها، ابتدا از کشت سه روزه پرگنه قارچ روی محیط عصاره سیب‌زمینی-آگار جهت شناسایی استفاده گردید. جهت اندازه‌گیری میانگین رشدی و قطر پرگنه‌ها در دماهای مختلف و نیز رنگ پرگنه، بلوک‌هایی به قطر ٦-٥ میلی‌متر روی سه محیط کشت Czapek Yeast autolysate agar (CYA)، Malt extract agar (MEA) و Czapek's yeast autolysate agar with 20% sucrose (CY20S) کشت داده شدند. برای این منظور سه بلوک از قارچ مورد نظر در سه طرف تشتک‌های پتری حاوی محیط CYA کشت گردیدند و به دو دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سلسیوس انتقال داده شدند. همچنین سه بلوک از قارچ در سه طرف پتری‌دیش‌های حاوی محیط‌های MEA و CY20S کشت گردیدند و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. تندش هاگ و قطر پرگنه در دمای ۵ درجه سلسیوس نیز روی محیط CYA مورد بررسی قرار گرفت. جهت بررسی مشخصات کنیدیوموم‌بر و کنیدیوموم‌ها از کشت‌های دو محیط CYA و MEA و با استفاده از رنگ اسیدفوشین لاکتوفنل اسلایدهایی تهیه شد و زیر میکروسکوپ ویژگی‌های میکروسکوپی جدایه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. جهت تشخیص گونه‌ها قطر و رنگ پرگنه، مشخصات کنیدیوموم‌بر(قطرحباب و طول کنیدیوموم‌بر)، تعداد ردیف‌های فیالیدها، اندازه فیالیدها، متولا، رنگ کنیدیوموم، اندازه، قطر و آرایش زنجیره کنیدیوموم‌ها مطالعه شدند (Klich and Pitt 1988).

شناسایی گونه‌های *Penicillium*

جدایه‌های گونه‌های *Penicillium* ،جهت تشخیص رنگ و نیز اندازه‌گیری میانگین رشدی و قطر پرگنه‌ها در دماهای مختلف برای هر گونه از محیط‌های کشت CYA، MEA و G25N به روش توضیح داده شده در بالا استفاده گردید. قطر پرگنه‌ها در دمای ۵ درجه سلسیوس روی محیط CYA تعیین شد. تمام کشت‌ها به مدت هفت روز در دماهای ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۴۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند. برای تشخیص گونه‌ها ، صفاتی نظیر قطر پرگنه، رنگ رو و پشت پرگنه، ساختار کنیدیوموم‌بر، طول و شکل فیالیدها و متولا، تعداد متولا در هر پایه، قطر پرگنه روی محیط G25N، شکل و اندازه کنیدیوم و آرایش زنجیره کنیدیومی، رنگ کنیدیوموم، وجود قطرات ترشحی به خصوص روی محیط کشت CYA، رنگ و مقدار قطرات ترشحی، بافت پرگنه، رنگ پرگنه و رنگ پشت پرگنه مورد مطالعه قرار گرفتند (Pitt 1998 ,Samson and Pitt 1986).

شناسایی گونه‌های *Fusarium*

شناسایی های گونه‌های *Fusarium* با استفاده از محیط PDA و برگ‌میخک-آگار بر اساس معیارهای مختلفی از جمله شکل و اندازه کنیدیوموم‌بر، کنیدیوم و فیالیدها، تعداد کنیدیوم‌های قرار گرفته روی فیالیدها، وجود یا عدم وجود میکروکنیدیوم، رنگ اسپرودوکیوم، وجود یا عدم وجود کلامیدوسپور، رشد قطری پرگنه، رنگ و حالت پرگنه صورت گرفت(Nelson *et al.*1983, Lesli and Summerell 2006, Burgess *et al*. 1994)

سایر قارچ‌ها تنها تا سطح جنس شناسایی شدند. برای شناسایی جنس آنها، پس از خالص سازی جدایه‌ها، ویژگی‌های ریخت‌شناسی آن‌ها بر اساس منابع معتبر موجود مورد مطالعه قرار گرفتند (Barnett and Hunter 1998, Domsch *et al.* 2007).

یافته‌ها Results

هیجده قارچ متعلق به هشت جنس از خاک و ریشه گیاهان بیابانی استان یزد در این پژوهش جداسازی و شناسایی شدند (جدول ۱).

جدول ۱. قارچ‌های جدا شده از نواحی کویری استان یزد ایران.

Table 1. Isolated fungi from desert areas of Yazd province, Iran.

	Fungus	Number of isolate	Location	Soil or infected root
1.	*Aspergillus flavus*	4	Ardakan, Bafgh, Kharanagh	Soil
2.	*A.nidulans*	3	Abarkooh, Bafgh	Soil
3.	*A. niger*	5	Bafgh, Ardakan, Kharanagh	Soil and roots
4.	*A. terreus*	5	Ardakan, Abarkooh, Bafgh	Soil and roots
5.	*Alternaria* sp.	2	Abarkooh, Bafgh	Soil
6.	*Fusarium proliferatum*	1	Abarkooh	Soil
7.	*F. solani*	1	Abarkooh	Soil
8.	*Paecilomyces* sp.	4	Bafgh, Ardakan, kharanagh	Soil
9.	*Penicillium aurantigriseum*	2	Kharanagh	Soil
10.	*P. chrysogenum*	3	Kharanagh, Bafgh	Soil
11.	*P. commune*	1	Abarkooh	Soil
12.	*P. expansum*	4	Bafgh, Ardakan, Kharanagh	Soil
13.	*P. minoluteum*	5	Ardakan, Bafgh, Kharanagh	Soil
14.	*P. pinophilum*	1	Abarkooh	Soil
15.	*P. waksmani*	2	Kaharnagh, Abarkooh	Soil
16.	*Rhizopus* sp.	7	Bafgh, Ardakan, Kharanagh, Abarkooh	Soil and roots
17.	*Stemphylium* sp.	4	Bafgh, Ardakan, Abarkooh	Soil
18.	*Ulocladium* sp.	6	Bafgh, Abarkooh	Soil

توصیف گونه‌های *Aspergillus* و *Penicillium*

بر اساس ویژگی‌های ریختی جدایه‌ها روی محیط‌های کشت اختصاصی و دماهای مختلف چهار گونه از جنس *Aspergillus* شامل *A. terreus*، *A. niger*، *A. flavus* و *A. nidulans* ، از مناطق کویری مورد پژوهش جداسازی و شناسایی شدند (جدول ۲). گونه *A. nidulans* ، بیشتر در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری حضور دارد. جدایه‌های به دست آمده از این گونه رشد بسیار سریعی در دماهای بالا ۴۲-۴۰ درجه سلسیوس داشته به طوری که پس از دو روز به رشد کامل در سطح پتری‌دیش می‌رسیدند. این گونه پس از یک هفته کلیستوتسیوم‌هایی به شکل دانه‌های زرد رنگ روی سطح پرگنه تولید کرد.

جدول ۲. ویژگی‌های گونه‌های *Aspergillus* روی محیط‌های کشت اختصاصی

Table 2. Features of *Aspergillus* species on selective media

Species	Microscoipc features	Shape	Length	Width	تک ردیفه یا دو ردیفه بودن فیالیدها *	Chain of conidia
Aspergillus flavus Link	ساقه (Stipes)	سطح صاف smooth	45-85 µm	4.2 µm 3.4-	(Biseriate)	شعاعی (Radiate)
	حباب (Vesicles)	گرد تا کشیده Subglobose	6.7-10.7 µm	3-4 µm		
	متولا (Metulae)	حدود نیمی از حباب را می‌پوشاند Covering half of vesicule	5.5 -6.8 µm	1.8-2 µm		
	فیالیدها (Phialides)	فلاسکی شکل Flask shape	5.2-6 µm	2-2.4 µm		
	کنیدیوم (Conidia)	گرد و سطح صاف Globose, smooth	--	3.5-5 µm		
Aspergillus nidulans (Eidam) G. Winter	ساقه (Stipes)	سطح صاف Smooth	40-87 µm	4.2 µm 3.4-	(Biseriate)	شعاعی (Radiate)
	حباب (Vesicles)	گرد Globose	9.6-10.7 µm	3.2-4.5 µm		
	متولا (Metulae)	حدود نیمی از حباب را می‌پوشاند Covering half of vesicule	5.7 -6.8 µm	1.8-2.3 µm		
	فیالیدها (Phialides)	Flask shape	5.2-6.5 µm	2-2.7 µm		
	کنیدیوم (Conidia)	Globose, smooth	--	3.5-5.5 µm		

Table 2- Continue **جدول ۲.** ادامه

Species	Microscopic features	Shape	Length	Width	تک ردیفه یا دو ردیفه بودن فیالیدها *	Chain of conidia
Aspergillus terreus Thom	ساقه (Stipes)	دیواره صاف smooth	140-212µm	4-5.7 µm	(Biseriate)	ستونی (Columnar)
	حباب (Vesicles)	گرد کمی کشیده subglobose	14-16 µm	5.4-6.7 µm		
	متولا (Metulae)	نصف حباب را می‌پوشاند Covering half of vesicule	5.2-6.4 µm	2-2.5 µm		
	فیالیدها (Phialides)	فلاسکی شکل Flask shape	6.3-7 µm	1.6-2µm		
	کنیدیوم (Conidia)	گرد Globose	--	1.8-2 µm		
Aspergillus niger Tiegh.	ساقه (Stipes)	دیواره ناصاف Rough	324-450µm	6-7.7µm	(Biseriate)	شعاعی (Radiate)
	حباب (Vesicles)	گرد Globose	35-45 µm	20-25 µm		
	متولا (Metulae)	کل حباب را می‌پوشاند Covering the entire of vesicule	13-17 µm	3.6-5.1 µm		
	فیالیدها (Phialides)	فلاسکی شکل Flask shape	10-11 µm	3.9-4.2 µm		
	کنیدیوم (Conidia)	گرد و ناصاف Globose, rough	--	3-4.4 µm		

*Uniseriate or Biseriate

همچنین در این پژوهش هفت گونه *Penicillium* از نواحی مختلف مناطق کویری استان یزد جداسازی شدند که با توجه به ویژگی‌های ریختی گونه‌های *Penicillium aurantigriseum*، *P. chrysogenum*، *P. citrinum*، *P. commune*، *P.expansum*، *P.minoloteum*، *P.pinophilum* و *P.waksmanii* تشخیص داده شدند (جدول ۳).

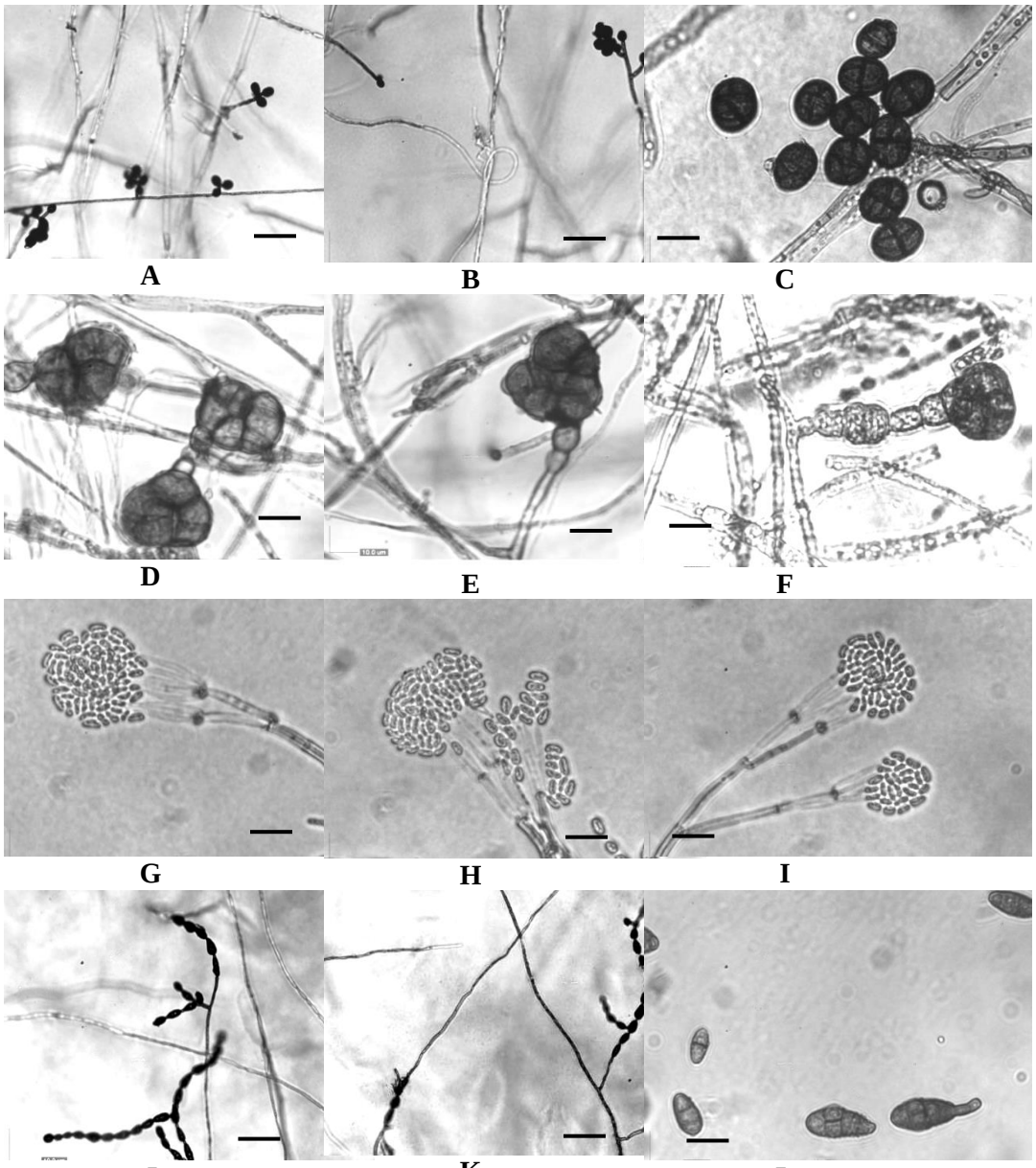
گونه‌های *Fusarium* جداسازی شده از نواحی کویری

از قارچ‌های خاکزاد در این بررسی تن‌ها دو جدایه از جنس *Fusarium* از خاک کویر جداسازی و بر اساس کلیدهای شناسایی به عنوان گونه‌های *F. proliferatum* (Matsush.) Nirenberg و *F. solani* (Mart.) Sacc. تشخیص داده شدند.

جدول ۳. ویژگی‌های گونه‌های *Penicillium* جدا شده روی محیط‌های کشت اختصاصی

Table 3. Features of *Penicillium* species on selective media

Species	Microscopic features	Wall	Length	Species	Microscopic features	Wall	Length(µm)
Penicillium chrysogenum	ساقه (Stipes)	دیواره صاف Smooth	210-332 µm	***Penicillium citrinum***	ساقه (Stipes)	دیواره صاف Smooth	170-230
	نوع پنسیلی (Penicilli)	سه شاخه Triverticillate	--------		نوع پنسیلی (Penicilli)	دوشاخه (Biverticillate)	--------
	rami	دارای دو rami	20-22 µm		rami	-	-
	متولا (Metulae)	Short	10-12 µm		متولا (Metulae)	بلند Long	13-16
	فیالیدها (Phialides)	Flask shape	7-10 µm		فیالیدها (Phialides)	Flask shape	6-8
	کنیدی (Conidia)	گرد globose	2.3-2.9 µm		کنیدی (Conidia)	دیواره صاف Smooth	2.5-3
Penicillium minioloteum	ساقه (Stipes)	دیواره صاف Smooth	120-180 µm	***Penicillium expensum***	ساقه (Stipes)	دیواره صاف Smooth	290-340
	نوع پنسیلی (Penicilli)	Biverticillate	--------		نوع پنسیلی (Penicilli)	Triverticillate	--------
	متولا (Metulae)	بلندLong	11.9-12.6 µm		Rami	2-3	17-21
	فیالیدها (Phialides)	Flask shape	11.3-12 µm		متولا (Metulae)	بلند Long	15.3-17.2
	کنیدی (Conidia)	ellipsoid	2.7-3.8 µm		فیالیدها (Phialides)	Flask shap	8.2-10
					کنیدی (Conidia)	Smooth and ellipsoide	2.9-3.3
Penicillium aurantigriseum	ساقه (Stipes)	smooth	210-330 µm	***Penicillium pinophilum***	ساقه (Stipes)	Smooth	145-164
	نوع پنسیلی (Penicilli)	Triverticillate	--------		نوع پنسیلی (Penicilli)	Biverticillate	--------
	rami	دارای دو rami	20-22 µm		rami	-	-
	متولا (Metulae)	Short	10-12 µm		متولا (Metulae)	بلند Long	10-12
	فیالیدها (Phialides)	Flask shape	7-10 µm		فیالیدها (Phialides)	Flask shape	8-11
	کنیدی (Conidia)	گرد globose	2.3-2.9 µm		کنیدی (Conidia)	گرد globose	2.3-2.6 µm
Penicillium commune	ساقه (Stipes)	rough	250-320 µm	***Penicillium waksmanii***	ساقه (Stipes)	smooth	109-168 µm
	نوع پنسیلی (Penicilli)	سه شاخه Triverticillate	--------		نوع پنسیلی (Penicilli)	دو شاخهBiverticillate	--------
	rami	1-2	16.2-18.2 µm		rami	-	-
	متولا (Metulae)	بلند Long	8-11.4 µm		متولا (Metulae)	3-5	11.3-15 µm
	فیالیدها (Phialides)	Flask shape	9.3- 13 µm		فیالیدها (Phialides)	Flask shape	6.1-7.4 µm
	کنیدی (Conidia)	Smooth and globose	3.4-4.1 µm		کنیدی (Conidia)	Smooth and globose	3-4 µm



شکل ۱. سایر قارچ‌های جداسازی شده از مناطق کویری استان یزد: A-C. کنیدیوم و کنیدیومبر در *Ulocladium* sp.، E-F. کنیدیوم و کنیدیومبر در *Stemphylium* sp.، G-I. تشکیل کنیدیومبرهای فیالیدیک منشعب و فیالوسپورها در *Paecilomyces* sp.، J-L: زنجیره‌های کنیدیومی و کنیدیوم‌ها در *Alternaria* sp. (خطهای مقیاس= ۱۰ میکرومتر).

Figure 1. Other isolated fungi from Yazd province deserts. A-C: Conidia and conidiophores in *Ulocladium* sp., E-F: Conidia and conidiophores in *Stemphylium* sp., G-I: Phialidic conidiophores and oval phialospores in *Paecilomyces* sp., J-L: Conidial chain and conidia in *Alternaria* sp. (Bars =10 µm).

توصیف سایر قارچ‌های جداسازی شده

سایر قارچ‌های جداسازی شده که زندگی گندرویی داشتند شامل *Alternaria* sp.، *Ulocladium* sp.، *Stemphylium* sp. بودند (شکل ۱، به ترتیب A-C و D-F و J-l) . میان آنها جنس *Ulocladium* فراوانی نسبتا زیادی در این مناطق داشت و به طور مکرر از خاک جداسازی شد. همچنین سه جدایه *Peacillomyces* sp. و هفت جدایه *Rhizopus* sp. جداسازی شدند. پرگنه *Paecilomyces* sp. به رنگ سفید و پنبه‌ای شکل و دارای رشد بسیار سریعی در دمای بالا ۳۵-۳۰ درجه سلسیوس بود (شکل ۱).

بحث Discussion

براساس یافته‌های این پژوهش، گونه‌های *Penicillium* و *Aspergillus* در تمامی مناطق نمونه‌برداری شده با فراوانی زیاد از خاک و گیاهان مناطق کویری جداسازی شدند. این یافته‌ها با پژوهشهای انجام گرفته در نواحی کویری عربستان، مصر و عراق مطابقت دارد (Abdel Hafez 1982, Sterflinger *et al.* 2012, Abdullah 1982). بیشترین فراوانی از حضور گونه‌های *Aspergillus* در کویرهای عربستان سعودی گزارش گردیده است. همچنین در کویرهای عراق و مصر نیز بیشترین تعداد جدایه به دست آمده مربوط به گونه‌های *Aspergillus*، *Mucor*، *Rhizopus* گزارش شده است (Abdullah 1982, Abdel Hafez 1982) با توجه به یافته‌های به دست آمده در این پژوهش به نظر می‌رسد بیشترین قارچ‌های موجود در کویر استان یزد را گونه‌های *Penicillium* و پس از آن گونه‌های *Aspergillus* تشکیل می‌دهند. در میان گونه‌های *Penicillium* جداسازی شده، بیشترین گونه‌هایی که در تمام مناطق کویری نمونه‌برداری شده وجود داشته و رایج‌تر از بقیه بودند *P. Chrysogenum* و *P. minoluteum* بودند. گونه *P. minoluteum* اولین بار توسط شاکری و ارشاد به عنوان قارچ انباری انار از استان یزد گزارش شد (Shakeri and Ershad 2000). میان گونه‌های *Aspergillus* نیز بیشترین فراوانی به ترتیب مربوط به *A. niger*، *A.tereus*، *A. falvus* و *A.nidulans* بود. گونه‌های *A. terreus* و *A. nidulans* به عنوان گونه‌های گرمادوست در بیشتر مناطق کویری دنیا گزارش شده‌اند (Crisan 1956, Abdel Hafez 1982, Salar and Anej 2006).

تمامی جدایه‌های به دست آمده از گونه‌های *Penicillium* و *Aspergillus* در این پژوهش قادر به رشد در دمای ۳۷-۳۵ درجه سلسیوس بودند اما در رشد بالاتر از دمای ٤٠ درجه سلسیوس تفاوت نشان می‌دادند. در این میان گونه‌های *A. nidulans*، و *A. terreus* دارای رشد بسیار زیادی در دمای ٤٠ درجه سلسیوس بودند. در این بررسی تنها دو جدایه از جنس *Fusarium* از خاک کویر جداسازی شد. در بررسی میکروفلور مناطق کویری عراق نیز فقط دو گونه *F. solani* و *F. oxysporum* از خاک جداسازی شدند (Abdel Hafez 1982).

جدایه‌های *Rhizopus* sp. نیز فراوانی زیادی در خاک‌های کویری داشتند. گونه‌های این جنس دامنه پراکنش بسیار زیادی در جهان داشته اما در نواحی گرمتر رایج‌تر هستند و به طور مکرر از زیستگاه‌های گرم و خشک جهان گزارش شده‌اند. جداسازی گونه‌هایی از جنس‌های *Alternaria*، *Ulocladium* و *Paecillomyces* و *Rhizopus stolonifer* نیز از نواحی کویری دنیا گزارش شده‌اند(Johri 1999 , Abdel Hafez 1982).

نتیجه‌گیری Conclusion

بررسی انجام گرفته روی خاک‌ها و بافت گیاهان چهار منطقه کویری استان یزد، حضور ٦٠ قارچ متعلق به ۱۳ گونه و هشت جنس*Aspergillus* ، *Penicillium*، *Alternaria*، *Ulocladium*، *Stemphylium*، *Paecilomyces* ، *Rhizopus* و *Fusarium* را نشان داد. تمامی قارچ‌های شناسایی شده برای اولین بار از کویرهای ایران گزارش می‌شوند. بین قارچهای به دست آمده بیشترین فراوانی را گونه‌های *Penicillium* و پس از آن گونه‌های

Aspergillus داشتند. با توجه به گستردگی نواحی کویری در ایران و اهمیت جداسازی و تشخیص قارچ‌های گرمادوست، پژوهشها بیشتری در زمینه قارچ‌های بیابانی ایران به خصوص مناطق کویری با درجه حرارت بالاتر (نظیر کویر لوت و دشت کویر) پیشنهاد می‌گردد.

References منابع

1. Badiei R (1998) Geography of Iran. Tehran. Eghbal publisher, 272 p. (In Persian).
2. Abdel Fathah HM and Swelim MA (1982) Studies on airborne fungi at Gen (Egypt). Mycopathologia 80:107-112.
3. Abdel Hafez SII (1982) Thermophilic and thermotolerant fungi in the desert soils of Saudi Arabia. Mycopathologia 80:15-20
4. Abdel Hafez SII, Aboel-Hafez AH and Abdel-kader MIA (1983) Composition of fungal flora of Sgrien-soils 4, Thermophilic fungi, Mycopathologia 81:177-182.
5. Abdullah SK (1982) Coprophilous microflorae on different dung types in southern desert of Iraq-Sydowia 35:1-5.
6. Barnett HL and Hunter BB (1998) Illustrated Genera of imperfect Fungi 4th. Ed. APS Press, St. Paul, 218p.
7. Burgess LW, Summerell BA, Bullock S, Gott KP, Backhouse D (1994) Laboratory manual for fusarium research, 3rd edn. Department of Crop Science, University of Sydney/Royal Botanic Gardens, 134p.
8. Crisan EV (1956) Current concepts of thermophilism and thermophilic fungi. Mycologia 63:1171-1198.
9. Domsch KH, Gams W and Anderson TH (2007) Compendium of soil fungi. IHW-Verlag, Eching. Germany, 672 p.
10. Dose K, Bieger-Dose A, Ernst B, Feister U, Gomez-Silva B, Klein A, Risi S and Stridde C (2001). Survival of microorganisms under the extreme conditions of the Atacama Desert. Origins of Life and Evolutions of the Biosphere 31:287-303.
11. Farifteh J (1987) Climate classification system with emphasis on arid and semi-arid regions of Iran. Iran Desert Research Center, 223 p.
12. Johnson LE, Curl EA, Bond JH and Fribourgh HA (1959) Methods for Studying Soil Microflora-Plant Disease Relationships. Burgess Publishing Company, Minneapolis,178 p.
13. Johri BN Satyanarayana T and Olsen J (1999) Thermophilic Molds in Biotechnology. Kluwer Academic Publisher, 354 p.
14. Huang LN, Zhou WH, Hallberg KB, Wan CY, Li J and Shu WS (2011) Spatial and temporal analysis of the microbial community in the tailings of a Pb/Zn mine generating acid drainage. Applied and Environmental Microbiology 77:5540-5544.
15. Klich MA and Pitt JI (1988) A Laboratory Guide to Common *Aspergillus* Species and Their Teleomorph. Common wealth Scientific and Industrial Research Organization, UK, 116p.

16. Leslie JF and Summerell BA (2006) The *Fusarium* Laboratory Manual. Black Well, 388 p.
17. Maheshwari R, Bharadwal G and Bhat M K (2000) Thermophilic Fungi: Their physiology and enzymes. Microbiology and Molecular Biology Review 64:461-488.
18. Mouchacca J (1997) Thermophilic fungi: biodiversity and taxonomic status. Cryptogamie Mycologie 18:19-69.
19. Moustafa AP, Sharkas MS and Kamel SM (1976) Thermophilic and thermotolerant in desert and salt marsh soil of Kuwait. Norwegian Journal of Botany 23:213-220.
20. Nelson PE, Toussoun TA and Marasas WFO (1983) Fusarium Species. In: An Illustrated Manual for Identification. Pennsylvania State University Press, University Park, 193p.
21. Pitt JI (1988) A laboratory guide to common *Penicillium* species. North Ryde, N.S.W.: CSIRO Division of Food Processing, 185 p.
22. Redman RS, Litvintseva A, Sheehan KB, Henson JM and Rodriguez RJ (1999) Fungi from geothermal soils in Yellowstone National Park. Applied and Environmental Microbiology 65:5193-5197.
23. Salar RK and Aneja KR (2006) Thermophilous fungi from temperate soils of northern India. Journal of Agricultural Technology 2:49-58.
24. Samson RA and Pitt JI (1986) Advances in *Penicillium* and *Aspergillus* systematics. Springer Silences, New York, 464 p.
25. Shakeri M and Ershad D (2000) Pomegranate storage fungi. Proceeding of the 14th Iranian Plant Protection Congress. Vol II, 5-8 sept. Esfahan, Iran, 335p. (In Persian).
26. Sanchez AI, Rodriguez N, Amils R and Sanz JL (2011) Microbial diversity in anaerobic sediments at Rio Tinto, a naturally acidic environment with a high heavy metal content. Applied and Environmental Microbiology 77:6085-6093.
27. Sterflinger K, Tesel D and Zakharova K (2012) Fungi in hot and cold deserts with particular reference to microcolonial fungi. Fungal Ecology 5:453-462.