دانش بیماری‌شناسی گیاهی (شاپای ا: ۶۲۹۰-۲۵۸۸، شاپای چ: ۹۲۷۰-۲۲۵۱)
سال یازدهم، جلد ۱، پاییز و زمستان ۱۴۰۰
Plant Pathology Science (eISSN:2588-6290, pISSN:2251-9270)
Vol. 11(1), 2022

Research Article

The reaction of thirteen peach and nectarine cultivars to Verticillium wilt

Hamid Sadeghi Garmaroodi [1]✉, Seyed Yaghob Seyed Masoumi [2], Ashraf Nankali [3]

1. Seed and Plant Improvement Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran, 2. Ardabil Agricultural and Natural Resources Research Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Ardebil, Iran, 3. Temperate Fruits Research Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Received: 03.09.2022 Accepted: 05.14.2022

Sadeghi Garmaroodi H, Seyed Masoumi SY, Nankali A (2022) The reaction of thirteen peach and nectarine cultivars to Verticillium wilt. Plant Pathology Science 11(1):60-73. Doi: 10.2982/PPS.11.1.60.

Abstract

Introduction: Verticillium wilt, caused by *Verticillium dahliae*, is one of the most important soil-borne diseases of stone-fruit trees. **Materials and Methods:** Samples showing evidence of Verticillium wilt were collected from stone fruit orchards in the suburbs of Shahroud and Damavand and four isolates of *V. dahliae* were obtained. The fungal inoculum was prepared on sterile wheat grains and the response of 13 peach and nectarine cultivars propagated by grafting on GF305 (almond-peach hybrid) rootstock was inoculated with it in the canopy area in the garden in early spring. Sixteen weeks after inoculation, disease severity was recorded on a three-point scale. **Results:** All peach and nectarine cultivars were classified as very susceptible, susceptible, or semi-susceptible and none of them showed resistance. The Nectarine Independence cultivar was highly susceptible to disease, while the peach cultivar had the lowest disease severity index and was therefore classified as semi-susceptible. **Conclusion:** Among these cultivars, the Romestar peach cultivar is less susceptible to the disease.

Keywords: Peach-Nectarine cultivars, Verticillium, Wilt

✉Corresponding author: h.sgarmaroodi@areeo.ac.ir

مقاله پژوهشی

واکنش سیزده رقم هلو و شلیل به پژمردگی ورتیسیلیومی

حمید صادقی گرمارودی[1]✉، سید یعقوب سید معصومی[2]، اشرف نانکلی[3]

۱. موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران، ۲. مرکز تحقیقات کشاوری و منابع طبیعی استان اردبیل، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اردبیل، ایران، ۳. پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری، موسسه علوم تحقیقات باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۱۸ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۲/۲۴

صادقی گرمارودی ح، سید معصومی س ی، نانکلی ا (۱۴۰۰) واکنش سیزده رقم هلو و شلیل به پژمردگی ورتیسیلیومی. دانش بیماری‌شناسی گیاهی ۱۱(۱): ۷۳-۶۰.

Doi: 10.2982/PPS.11.1.60.

چکیده

مقدمه: بیماری پژمردگی ورتیسیلیومی یکی از بیماری‌های مهم خاک‌زاد درختان میوه هسته‌داراست. *Verticillium dahliae* عامل این بیماری محسوب می‌گردد. **مواد و روشها:** نمونه‌های دارای نشانه های پژمردگی ورتیسیلیومی از باغ‌های زردآلو و هلو در شاهرود و دماوند جمع‌آوری و چهار جدایه *V. dahliae* به‌دست آمد. زادمایه قارچ روی دانه‌های گندم سترون تهیه شد و واکنش ۱۳ رقم هلو و شلیل که با روش پیوند روی پایه‌های GF305 (هیبرید بادام-هلو) تکثیر شده بودند، در شرایط باغی در اوایل بهار با آن در ناحیه طوقه مایه‌زنی شدند. شانزده هفته پس از مایه‌زنی شدت بیماری با یک مقیاس سه‌رتبه‌ای یادداشت‌برداری شد. **یافته ها:** واکنش این ۱۳ رقم به بیماری تفاوت معنی‌داری با یکدیگر داشتند. همه رقمهای هلو-شلیل ارزیابی شده خیلی‌حساس، حساس و یا نیمه‌حساس بودند و هیچ کدام مقاومت نشان ندادند. واکنش رقم شلیل ایندیپندنس به بیماری خیلی حساس بود، ولی رقم رم‌استار با کمترین شدت بیماری در گروه نیمه‌حساس جای گرفت. **نتیجه‌گیری:** هلوی رقم رم‌استار در بین این رقمهای تحت کشت حساسیت کمتری به بیماری دارد.

واژگان کلیدی: پژمردگی، رقم هلو-شلیل، Verticillium

مقدمه **Introduction**

هلو (*Prunus persica* (L.) Batsch) و واریته بدون کرک آن یعنی شلیل (*P. persica* var. nucipersica (Suckow) C.K. Schneid) از تیره گلسرخیان (*Rosaceae*) بوده که تولید جهانی آن در سال ۲۰۲۰ بالغ بر ۲۴/۵ میلیون تن بوده است که به ترتیب کشورهای چین، اسپانیا، ایتالیا، ترکیه، یونان، ایالات متحده آمریکا و ایران هفت کشور عمده تولید کننده این محصول بوده‌اند. کشور چین به

✉نویسنده مسئول: h.sgarmaroodi@areeo.ac.ir, 09358981156

تنهایی بیش از ۱۴ میلیون تن از این میوه را در این سال تولید کرده است. سهم ایران از تولید جهانی نزدیک به ۶۱۲ هزار تن بوده است که این مقدار از سطحی نزدیک به ۳۹ هزار هکتار برداشت شده است. سطح کشت این محصول باغبانی در کشور از سال ۲۰۱۶ تا سال ۲۰۲۰ به تدریج افزایش یافته است(FAOSTAT 2022) .

پژمردگی آوندی ناشی از (*Verticillium* spp.) از عوامل مهم خشکی این درختان در ایران و جهان محسوب می‌گردد. پنج گونه مهم بیماری‌زای آن در منابع شرح داده شده‌اند (Zare 2003, Barbara and Clews 2003). دو گونه بیماری‌زای معروف آن عبارتند از *V. dahliae* Klebahn و *V. albo-atrum* Reink & Berthold که از نظر دامنه میزبانی و نوع زمستانگذرانی با یکدیگر تفاوت دارند. گونه *V. dahlia* بیش از ۴۰۰ میزبان حساس دارد (Carroll et al. 2018).

مهم‌ترین سازوکار بیماری‌زایی در این قارچهای خاکزی، تولید آنزیم‌های هضم‌کننده دیواره سلولی (پکتین‌استراز، پلی‌گالاکتوروناز، پکتات‌لیاز و سلولاز) و فیتوتوکسین‌ها هستند که باعث بروز نشانه زردی، پژمردگی و نکروز دستجات آوندی و در نهایت مرگ گیاه می‌شوند. آنزیم پلی‌گالاکتوروناز که باعث هضم پکتین در دیواره سلولی می‌شود از مهمترین سازوکارهای بیماری‌زایی آنها محسوب می‌گردد. در مقابل، نوعی پروتیین‌های دفاعی در گیاهان تکامل یافته‌اند که از فعالیت این آنزیم‌ها ممانعت می‌کنند. این دسته از ترکیبهای گیاهی، پروتیین‌های ممانعت کننده پلی‌گالاکتوروناز (Polygalacturonidase inhibiting proteins, PGIPs) نامیده شده‌اند. پروتیینی از درخت سیب، از فعالیت آنزیم پلی‌گالاکتورناز *V. dahliae* که بر روی محیط کشت پکتین‌دار رشد کرده بود، ممانعت به‌عمل آورد(Gazendam et al. 2004). آنزیم‌های خارج سلولی در گیاهان همانند کیتیناز با هضم کیتین که ماده اصلی در دیواره سلولی قارچها است، نقش مهمی در ایجاد ایمنی نسبت به نفوذ قارچها دارند (Song et al. 2020). به نظر می‌رسد جدا کردن گروه‌های استیل (Deacetylation) از کیتین، راهکاری مشترک در بین سلول‌های گیاهی است که با این روش از هجوم بیمارگرها به‌خصوص انواع خاکزی در امان می‌مانند (Zhang et al. 2022).

توکسین‌های قارچی نیز از مهمترین عامل بروز پژمردگی، نکروز و خشکیدگی بافت‌های گیاهی هستند. توکسین ترشحی شامل یک ترکیب اسیدی پروتیین-لیپوپلی‌ساکاریدی است که به‌شدت بر روی سوخت و ساز گیاه، فرآیند تثبیت نیتروژن، تجزیه اسید فسفریک و در نهایت مرگ گیاه مؤثر است. در مقابل، گیاهان نیز به سازوکارهای مختلفی برای مقابله با اثرهای مخرب بیمارگر دست یافته‌اند. از جمله اینکه دارای گیرنده‌هایی در سطح سلول‌های خود هستند که به‌محض شناسایی قارچ

بیمارگر *Verticillium* sp. نوعی سامانه ایمنی در گیاه فعال می‌گردد که به مدل زیگزاگ (Zig-zag) معروف شده است که در آن تعداد زیادی ژن فعالیت می‌کنند (Song et al. 2020).

ماده شیمیایی گوسیپول و مشتقات آن در پنبه نوعی فیتوآلکسین محسوب می‌شوند که برای بی‌اثر کردن سازوکار بیماری‌زایی *V. dahliae* تولید می‌شوند. انتقال ژن‌های تولیدکننده این مواد شیمیایی به سایر میزبان‌ها، مورد توجه برخی از محققان بوده است (Pegg 1989). هورمون گیاهی براسینولید نیز در افزایش مقاومت گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی به پژمردگی ورتی‌سیلیومی مؤثر بوده است (Tahmasebi and Parizipour 2020).

کاربرد سمهای شیمیایی به دلیل رشد قارچ درون آوندهای چوبی، تاثیر لازم را ندارند، بنابراین شناسایی رقمهای مقاوم مهم‌ترین روش مدیریت بیماری است (Lopez-Escudero et al. 2007). مقاومت به بیماری در میزبان‌های مختلفی گزارش شده‌اند (Hayes et al. 2007, Rygulla et al. 2008).

کاهش جمعیت *V. dahliae* در خاک به‌دلیل دامنه وسیع میزبانی، عدم اختصاص میزبانی و زنده‌مانی طولانی مدت ریزسختینه‌های آن، به‌سختی انجام می‌گیرد (Subbarao et al. 1995). بهرحال در مدیریت این بیماری همانند بسیاری از بیماری‌های تک‌چرخه‌ای، لازم است جمعیت اولیه بیمارگر کاهش یابد تا شروع اپیدمی به‌تأخیر افتد و حجم و شدت آن نیز کاهش یابد. سابقاً از تدخین خاک با استفاده از متیل بروماید و کلروپیکرین برای ضدعفونی خاک استفاده می‌شد ولی کاربرد این سمها دیگر مجاز نیستند. کشت کلم بروکلی در باغ‌ها یکی از راه‌های کاهش جمعیت ریزسختینه‌ها در خاک است. تراوشهای ریشه این گیاه باعث جوانه‌زنی ریزسختینه‌ها در خاک شده ولی روند آلودگی پس از مدتی متوقف می‌شود. کشت پنبه، سیب زمینی، کلم، توت فرنگی، اسفناج و کاهو در باغهای درختان میوه حساس به بیماری باید پرهیز شود، زیرا به شدت به این قارچ حساس هستند (Carroll et al. 2018). افزودن مواد آلی به خاک از دیگر روش‌های مدیریت بیماری، است. این مواد به‌دلیل ارزان بودن، امکان استفاده در مزرعه، تقویت رشد گیاه و بی‌خطر بودن برای محیط زیست در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته‌اند و در دو دسته کلی ترکیبات پروتیینی و ترکیبهای دارای اسیدهای چرب فرار قرار می‌گیرند که نحوه تأثیر این دو دسته مواد با یکدیگر متفاوت هستند (Conn et al. 2005). روش‌های دیگری مثل آفتاب‌دهی خاک و حرارت‌درمانی اندام‌های گیاهی مثل غده‌ها و قلمه‌ها و سوزاندن بقایای گیاهی هم در مدیریت بیماری مؤثر تشخیص داده شده‌اند. درجه حرارت‌های مختلفی به‌عنوان نقطه مرگ حرارتی برای گونه‌های Verticillium گزارش شده‌اند که به‌مدت زمان تیمار و استرین قارچ بستگی دارد (Okhovvat et al. 2010).

مواد و روش‌ها Materials and Methods

جمع آوری نمونه‌ها

نمونه‌های بیمار طی چندین سال از باغ‌های درختان میوه هسته‌دار در اطراف کرج، شاهرود و دماوند جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. نشانه بیماری در درختان آلوده شامل زردی و رنگ‌پریدگی درخت، ریزش برگ‌ها از قسمت پایین درخت به سمت بالا، وجود حلقه‌های قهوه‌ای رنگ در مقطع عرضی شاخه‌های بریده و تغییررنگ پوست درخت از قهوه‌ای روشن به سیاه می‌باشد.

جداسازی، خالص‌سازی و نگهداری قارچ عامل بیماری

قطعاتی از شاخه‌های آلوده پس از ضدعفونی سطحی با محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد و شستشو با آب مقطر سترون، بر روی کاغذ صافی سترون خشک شده و به تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت آرد ذرت آگار (Corn meal agar, CMA) منتقل شدند. تشتک‌های پتری در اتاقک رشد در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت پنج روز قرار گرفتند. قارچ‌های ورتی‌سیلیوم رشدیافته به محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار (Potato dextrose agar, PDA) منتقل شدند. برای خالص‌سازی قارچ‌ها از روش تک هاگ استفاده شد (Sadeghi Garmaroodi and Mansuri 2016). جدایه‌های تک هاگ شده در لوله‌های مورب حاوی محیط کشت PDA در دمای ۴ درجه سلسیوس در یخچال نگهداری شدند. درب لوله‌ها با نوار پلاستیکی پارافیلم بسته شدند تا از خشک شدن محیط کشت و نفوذ آلودگی‌های قارچی و کنه‌ها جلوگیری شود.

شناسایی عامل بیماری

صفات ریخت‌شناسی و فیزیولوژیک قارچ مثل قطر ریسه، فیالید، هاگ، ریزسختینه‌ها، ویژگی‌های پرگنه و تعیین دمای بهینه قارچ برای شناسایی آن مطالعه شدند.

تهیه زادمایه قارچ بیمارگر

برای تولید انبوه قارچ، از بذرهای گندم سترون شده استفاده گردید. دانه های گندم پس از سرد شدن با قطعاتی از پرگنه جوان جدایه هلو (ST136) مایه‌زنی شدند. فلاسک‌ها در اتاقک رشد در دمای ۲۵ درجه سلسیوس در تاریکی نگهداری شدند تا سطح بذرها با توده تیره رنگ قارچ پوشیده شوند.

تولید و مایه‌زنی نهال‌های هلو و شلیل

برای تکثیر نهال‌های هلو، بذور رقم GF305 که نوعی هیبرید بادام-هلو است به‌عنوان پایه مورد استفاده قرار گرفت. پایه‌های یک‌ساله GF305 با رقمهای مختلف هلو و شلیل پیوند زده شدند. رقمهای مورد ارزیابی شامل فایت (هلو)، می‌کرست (هلو)، بیگ‌تاپ (شلیل)، اسپرینگ بل (هلو)،

سان‌کرست (هلو)، ردتاپ (هلو)، ردهون (هلو)، فانتازیا (شلیل)، دکسیرد (هلو)، رم‌استار (هلو)، اسپرینگ‌کرست (هلو)، ایندیپندس (شلیل) و هیبرید هلو-بادام GF305 بودند که پیوندک‌ها از کلکسیون هلو-شلیل واقع در ایستگاه تحقیقات باغبانی کمالشهر کرج تهیه و در نهالستان ۴۰۰ هکتاری موسسه تحقیقات علوم باغبانی روی پایه‌های بذری یکنواخت پیوند زده شدند. تعداد نهال‌های مایه‌زنی‌شده برای رقمهای یادشده به‌ترتیب شامل ۷، ۱۲، ۹، ۱۰، ۱۰، ۱۷، ۱۲، ۱۳، ۱۳، ۱۰، ۱۸، ۱۰ و ۱۱ نهال بودند. داده‌های حاصل با استفاده از روش ناپارامتری در نرم افزار SAS تجزیه و تحلیل آماری شدند. نهال‌های پیوندی در بهار سربرداری شده و در زمستان همان سال به باغ بیماری‌شناسی پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری منتقل و به‌طور تصادفی در سه خط کاشته شدند. آبیاری نهال‌ها به‌طور معمول هفته‌ای یک‌بار صورت گرفت. مایه‌زنی نهال‌های هلو-شلیل در بهار سال بعد صورت گرفت. برای این منظور خاک اطراف طوقه را کنار زده و پس از ایجاد یک برش سطحی یک سانتی‌متری با اسکالپل تیز، تعداد ده دانه گندم حاوی اندام‌های قارچ ورتی‌سیلیوم جدایه ST136 در اطراف طوقه قرار داده شدند. روی محل زخم دوباره با خاک پوشانده شد. یادداشت‌برداری از نهال‌های هلو-شلیل ۱۶ هفته پس از مایه‌زنی صورت گرفت. برای این منظور از مقیاس سه درجه‌ای برای یادداشت‌برداری نهال‌ها استفاده شد (Guzmán et al. 2006) (جدول ۱).

جدول ۱. مقیاس مورد استفاده برای اندازه‌گیری شدت بیماری نهال‌های هلو-شلیل مایه‌زنی شده با *V. dahliae* در شرایط طبیعی.

Table 1. The scale used to measure disease severity of peach and nectarine cultivars inoculated with *V. dahliae* in natural condition.

Scale No.	Description
1	No symptoms
2	Partial wilting, die-back of twigs, faint growth
3	Whole wilting or death of the plant

دادهها طبق فرمول زیر به شاخص شدت بیماری (Disease Severity Index) تبدیل شد.

$$\text{شاخص شدت بیماری (DSI)} = \frac{\text{مجموع (درجه آلودگی} \times \text{تعداد نهال در آن درجه)}}{\text{(تعداد بوته میری} \times \text{بالاترین درجه مقیاس)}}$$

در صورتیکه این شاخص بین ۵-۰ باشد، واکنش مقاوم، بین ۵/۱ تا ۲۵ نیمه مقاوم، بین ۲۵/۱ تا ۵۰ نیمه حساس، بین ۵۰/۱ تا ۷۵ حساس و از ۷۵/۱ تا ۱۰۰ به عنوان خیلی حساس در نظر گرفته می‌شود (Madden et al. 2007).

یافته‌ها Results

نشانه‌های بیماری

نشانه بارز بیماری در درختان آلوده شامل زردی، رنگ‌پریدگی، پژمردگی و وجود حلقه‌های قهوه‌ای رنگ در مقطع عرضی شاخه‌های بریده و تغییر رنگ پوست درخت از قهوه‌ای روشن به سیاه می‌باشد (شکل ۱). خشک شدن تنها بخشی از درخت در حالی‌که بقیه درخت سبز و سالم هستند، از نشانه مشخص این بیماری است. خشک شدن تنها یک بازوی درخت به‌کرات در باغ‌های آلوده مشاهده می‌گردید.

جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی قارچ عامل بیماری

بیش از ۵۰ نمونه گیاهی آلوده از هسته‌داران (هلو، شلیل، بادام، زردآلو و گیلاس) مناطق مختلف کشور جمع‌آوری گردید. تنها چهار جدایه ورتی‌سیلیوم شامل سه جدایه از زردآلو و یک جدایه از هلو به‌دست آمد. متأسفانه جداسازی این قارچ از بافت‌های آلوده به‌سختی انجام می‌گیرد؛ زیرا از بیش از ۵۰ نمونه، تنها چهار جدایه به‌دست آمد. ظاهراً یکی از مشکلات جداسازی این قارچ، غیرفعال شدن آن در بافت‌های گیاهی است که امر جداسازی را با مشکل مواجه می‌کند. در برخی موارد حتی بهبودی درختان آلوده به ورتی‌سیلیوم هم گزارش شده است (Gubler 1988). قارچ عامل در اکثر

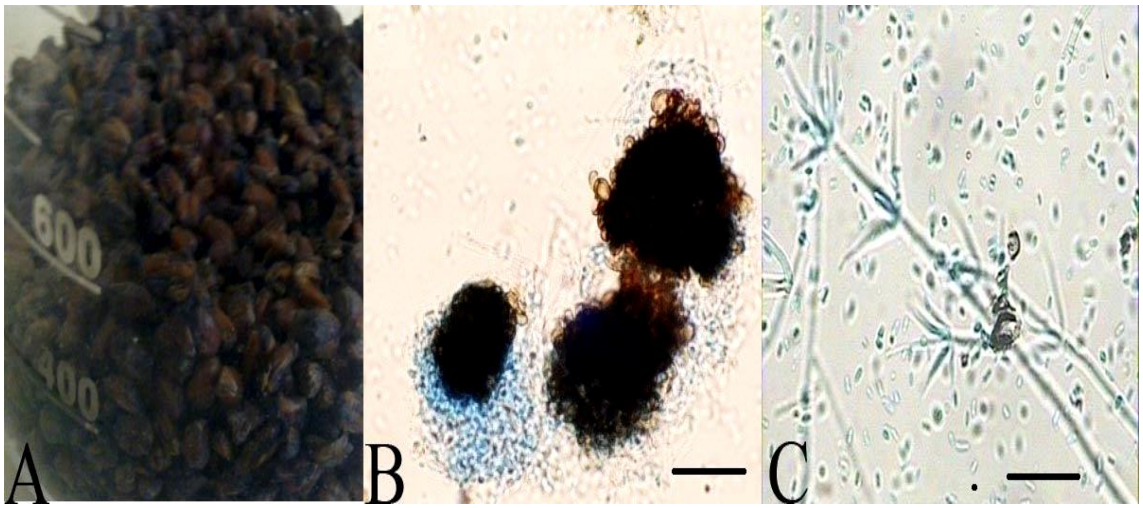
شکل ۱. نشانه‌های مهم بیماری پژمردگی آوندی ورتیسیلیومی نهال‌های هلو-شلیل مایه‌زنی‌شده در شرایط طبیعی. A- شاخه سبزخشک نهال آلوده در کنار یک نهال سالم. B- مراحل اولیه پژمردگی نهالها. C, D- نکروز مقطع عرضی شاخه‌های آلوده.

Figure 1. The major symptoms of Verticillium wilt of peach and nectarine inoculated under natural conditions. A- The dead twigs of inoculated plant adjacent to a healthy plant. B- Primitive stage of wilting on the peach tree. C, D- Necrosis on the cross-section of the twigs.

نمونه‌های کشت شده در محیط کشت PDA ریزسختینه‌های سیاه رنگ تولید می‌کرد. پرگنه قارچ‌های ورتی‌سیلیوم در اوایل دوره رشدی خود کندرشد بوده و سفیدرنگ هستند ولی به‌تدریج تیره می‌شدند. یکی دیگر از دلایل دشواری جداسازی شاید کندی رشد این قارچ باشد که توسط قارچ‌های ساپروفیت سریع‌الرشد پوشانده می‌شود.

پس از انجام بررسی‌های میکروسکوپی پرگنه‌ها و شناسایی جدایه‌ها تا سطح سرده (جنس)، تک هاگ جدایه‌ها روی محیط کشت آب- آگار جدا شد. برای تعیین گونه از شرح گونه‌های *Verticillium* (Inderbitzin et al. 2011, Zare 2003) استفاده گردید. با توجه به مشخصات ریختشناسی هرچهارجدایه تک‌هاگ شده *V. dahliae* شناسایی شدند. میسلیوم‌های هوایی معمولاً به‌وفور تشکیل می‌شدند. دیواره هیف‌ها صاف، کنیدی‌ها استوانه‌ای شکل و هر دو بی‌رنگ بودند. طول هاگ‌های تک‌سلولی اندازه‌گیری شدند، اگرچه کنیدی‌های دوسلولی نیز وجود داشتند. گاهی اوقات کنیدی‌ها در دستجات کروی شکل در یک لعاب موسیلاژی بر روی فیالیدها قرار می‌گرفتند. فیالیدهای کوزه‌ای شکل، معمولاً در دسته‌های ۳-۲ تایی روی محور کنیدیوفور دیده شدند (شکل 2C). قطر قاعده فیالیدها بیشتر از نوک آنها بود. ساختار ریزسختینه‌ها که از سلول‌های کروی تیره‌رنگ تشکیل شده بودند به‌فراوانی در محیط کشت PDA یا WA مشاهده گردیدند (شکل 2B). برای اندازه‌گیری قطر آنها، قطر این اندام‌ها در دو جهت عمود بر هم اندازه‌گیری شده و میانگین گرفته شد. نتایج کلیه اندازه‌گیریهای انجام شده بر روی اندام‌های قارچی در جدول ۲ خلاصه شده‌اند. اندازه‌گیری‌های انجام شده برای هاگ، فیالید و قطر ریزسختینه‌ها با مشخصات ذکر شده در منابع (Inderbitzin et al. 2011, Zare 2003) مطابقت داشت.

برای اندازه‌گیری رشد قارچ جدایه هلو سه تکرار از جدایه منتخب درنظر گرفته شد. رنگ پرگنه در هشت روز اول سفید شیری بوده و از روز هشتم تا شانزدهم به رنگ سفید کرمی درآمد که در مرکز نقاط تیره‌رنگی تولید می‌شدند. از روز ۱۶ ام تا روز ۲۰ ام، نقاط سیاه‌رنگ روی پرگنه‌های سفید کرمی مشاهده گردیدند. پرگنه تمام سطح تشتک را پوشانده و ریزسختینه‌ها به‌فراوانی مشاهده شدند. اندازه‌گیری‌ها هر دو روز یکبار انجام گردید. در هربار طول و عرض کنیدی بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد. میانگین طول و عرض پرگنه در نه مشاهده انجام شده برای سه تکرار ۱۹/۲ ± ۴۰/۳۸ میلی متر بود. با توجه به مشاهدات میکروسکوپی و ماکروسکوپی این قارچ کندرشد به‌عنوان گونه *V. dahliae* تشخیص داده شدند.



شکل ۲. تولید زادمایه قارچ *V. dahliae* و مشخصات میکروسکوپی آن. A- تولید انبوه ریزسختینه‌های قارچ ورتی‌سیلیوم بر روی دانه‌های گندم، یک ماه پس از مایه‌زنی. B- ریزسختینه‌های *V. dahliae*. C- فیالیدهای فراهم و هاگهای *V. dahliae*. خط مقیاس ۲۰ میکرومتر است.

Figure 2. inoculum production of *V. dahliae* and its microscopic features. A- Mass production of the Verticillium fungus on wheat grains, one month after inoculation. B- *V. dahliae* microsclerotes. C- Verticillate phialids and spores of *V. dahliae*. The scale bar is 20 µm.

جدول ۲. اندازه‌گیری اندام‌های قارچ *V. dahliae* برای تعیین گونه.

Table 2. Measurement of the bodies of *V. dahliae* to determine the species.

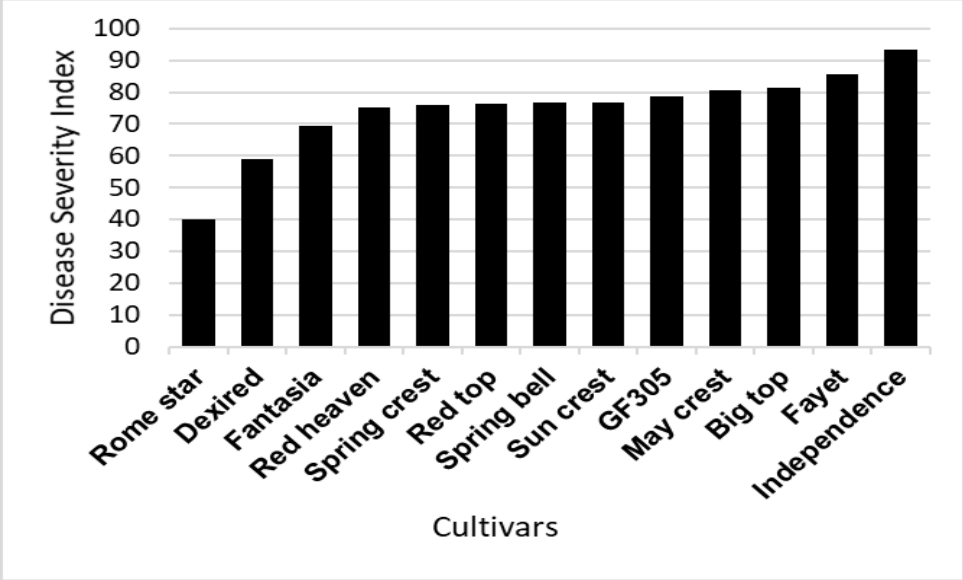
	اندام‌های قارچی مورد اندازه گیری Measured bodies of the fungus	میانگین به میکرومتر ± انحراف معیار Means in micrometer$^{\beta}$
1	Spores $^{\alpha}$	3.57
2	Phyalids	22.5
3	Length and width mean of microsclerotes	35.73

α- صرفاً هاگ‌های تک‌سلولی اندازه‌گیری شدند. α -only one cellular spores were measured.

β -۵۰ مشاهده برای هر اندازه‌گیری. β - 50 observations per each measurement.

تهیه زادمایه و استقرار بیماری برای ارزیابی واکنش رقمها

جدایه هلو، ST136 به‌خوبی بر روی دانه‌های گندم سترون رشد نمود. رشد هیفی سفید رنگ در هفته اول به خوبی مشاهده شد، ولی به‌تدریج رنگ آن تیره شد که ناشی از تولید ریزسختینه‌ها روی بذرهای گندم بود. اولین نشانه آلودگی که شامل پژمردگی برگ‌ها بود، در پایان هفته دوم در برخی رقمها مشاهده گردید. با گذشت زمان نشانه خشکیدگی تمام گیاه را فرا گرفت و نکروز آوندی قابل مشاهده بود. در مجموع نشانه بیماری در خزانه نهالستان در شرایط طبیعی به خوبی استقرار یافت (شکل 1A,B).



شکل ۳. مقایسه شاخص شدت بیماری رقمهای مختلف هلو-شلیل مایه‌زنی شده با *V. dahliae*.

Figure 3. Comparison of disease severity index of different peach and nectarine cultivars inoculated with *V. dahliae*.

بیماری در درجات مختلف در تمام رقمها مشاهده شد. نتایج تجزیه و تحلیل ناپارامتری داده‌ها نشان داد که تفاوت معنی‌داری در واکنش رقمها به آلودگی ورتی‌سیلیومی وجود دارد. این تفاوت در سطح معنی‌دار ۵٪ مشاهده گردید (p=0.014, df= 12).

بیشتر رقمها (۹ رقم از ۱۳ رقم) واکنش خیلی حساس، سه رقم واکنش حساس و یک رقم (رقم هلوی رم استار) واکنش نیمه حساس نشان دادند. بیشترین شاخص شدت بیماری در شلیل رقم ایندیپندنس (DSI = 93.3) و کمترین مقدار آن در رقم هلوی رم‌استار (DSI= 40.0) ثبت گردید (شکل ۳). رقم هلوی دکسیرد با وجود اینکه درصد آلودگی زیر ۵۰ درصد داشت (داده‌های درصد آلودگی نشان داده نشده‌اند) ولی به‌دلیل شاخص شدت بیماری بالای ۵۰ در گروه رقمها حساس قرار گرفت. برای اطمینان از بیماریزایی ورتی‌سیلیوم، قطعاتی از ساقه و ریشه نکروزه نهال‌های آلوده به محیط کشت PDA منتقل و قارچ عامل از بافت‌های آلوده بازیابی گردید.

بحث Discussion

اگرچه گونه *V. dahliae* به‌عنوان گونه غالب بیماری‌زای درختان هسته‌دار در استان‌های کرمان و سمنان شناسایی شده (Irani et al. 2003) ولی در ایران تاکنون ارزیابی رقمها هلو-شلیل به بیماری پژمردگی ورتی‌سیلیومی صورت نگرفته است. استقرار بیماری روی رقمهای درختان میوه همواره با چالش‌های زیادی همراه بوده است. از یکطرف تکثیر رویشی رقمها درختان میوه به‌دلیل درصد بالای

دگرگرده افشانی در آنها با استفاده از بذر امکان‌پذیر نیست. استفاده از قلمه هم برای اکثر درختان میوه موفقیت آمیز نبوده و حتی در یک گونه درصد موفقیت از یک رقم به رقم دیگر متفاوت است. تنها روش مرسوم و رایج، پیوند رقمها بر روی پایه‌های رویشی یا بذری است که این روش اخیر نیاز به ۲-۳ سال زمان دارد. از طرف دیگر، استقرار بیماری بر روی نهال‌های جوان نیاز به فراهم کردن شرایط آب و هوایی خنک و مرطوب برای مدت طولانی دارد. در این تحقیق، استقرار بیماری در مدت ۱۶ هفته به‌خوبی صورت گرفت.

زوال زودهنگام هلو-شلیل یکی از معضلات تولید این محصول در کشور است. عوامل مختلفی مثل ناسازگاری پایه و پیوندک، عدم هرس به‌موقع و انجام نادرست آن، قلیایی بودن خاک‌ها، پایین بودن سطح مواد آلی در خاک، سرمای شدید زمستانه و آفات و بیماری‌های گیاهی از جمله مهمترین موارد ذکر شده برای این چالش ذکر شده است. نشانه نکروز شاخه‌ها به‌دلیل کاهش ناگهانی دما در اواخر پاییز و زمستان بسیار شبیه به نشانه بیماری ورتی‌سیلیومی است (Tatari et al. 2019) بنابراین این نوع شاخه‌ها را نباید برای جداسازی قارچ استفاده کرد.

در این تحقیق از جدایه ورتی‌سیلیوم هلو برای مایه‌زنی استفاده گردید ولی با توجه به اختصاص میزبانی در جدایه‌های *V. dahliae* گزارش نشده است در بسیاری از موارد از جدایه پنبه برای ارزیابی مقاومت رقمها درختان میوه مثل زیتون استفاده شده است (Lopez-Escudero et al. 2004). استفاده از جدایه‌های پنبه که شدت بیماری‌زایی بالاتری داشته باشند برای ارزیابی‌های بیشتر در سال‌های آینده توصیه می‌گردد. به‌علاوه از آنجایی‌که جدایه‌های *V. dahliae* به دو دسته کلی برگ‌ریز و غیر برگ‌ریز تقسیم می‌شوند و در این تحقیق ریزش برگ‌ها پس از ۱۶ هفته مشاهده نشد، بنابراین جدایه مورد استفاده احتمالاً از نوع غیربرگ‌ریز بوده و لازم است یک جدایه برگ‌ریز هم در ارزیابی‌ها استفاده گردد.

متأسفانه منابع مقاومت به ورتی‌سیلیوم در بین رقمها درختان میوه بسیار کم هستند. به‌عنوان مثال اکثر رقمها و ژنوتیپ‌های زیتون در ارزیابی به این بیماری حساس بوده‌اند (Lopez-Escudero et al. 2004) در حالیکه موارد زیادی از مقاومت به بیماری در بین رقمها زراعی به‌خصوص در پنبه گزارش شده‌اند؛ بنابراین لازم است پایه‌های بیشتری از هسته‌داران به‌خصوص گونه‌های وحشی مورد ارزیابی قرار گیرند تا منابع مقاومت مشخص گردند. در این تحقیق از پایه‌های بذری GF305 استفاده شد تا واکنش متقابل پایه و پیوندک به‌حداقل برسد. برهم کنش پایه و پیوند در گسترش بیماری پوسیدگی فیتوفترایی در سیب گزارش شده است (Sewell and Wilson 2007). علاوه بر پایه یادشده، همچنین هیبریدهای بین گونه‌ای هلو-بادام مثل GF556 و GF677 که در فرانسه تولیدشده‌اند، سازگاری خیلی

خوبی به خاک‌های قلیایی و نیز شرایط خشک و مرطوب دارند و برای واکاری در باغ‌های هلو بسیار مناسب هستند، برای این منظور مناسب هستند. پایه‌های آلو و هیبریدهای آن در خاک‌های سنگین و مرطوب که پایه‌های هلو عملکرد خوبی ندارند، نمایش بهتری دارند ولی عدم سازگاری پایه و پیوندک، کوتاهی عمر درختان، تولید پاجوش و باروری کم از جمله مشکلات آن ذکر شده‌اند (Felliciano 1988).

روش‌های مایه‌زنی متعددی برای آلوده‌سازی نهال‌ها با ورتیسیلیوم در درختان میوه مورد استفاده قرار گرفته‌اند. به‌عنوان مثال غوطه‌ور کردن ریشه‌ها در سوسپانسیون هاگ به‌مدت نیم‌ساعت (Lopez-Escudero et al. 2004)، زخمی‌کردن شاخه‌ها و قرار دادن قطعه‌ای از پرگنه قارچ روی زخم (Lopez-Escudero et al. 2007)

نتیجه‌گیری Conclusion

عامل پژمردگی درختان میوه هسته‌دار در باغ‌های اطراف کرج، شاهرود و دماوند قارچ خاکزی *Verticillium dahliae* تشخیص داده شد. هرچند که سیزده رقم هلو و شلیل ارزیابی شده در این پژوهش به بیماری پژمردگی آوندی ورتیسیلیومی بر اساس شاخص عددی شدت بیماری خیلی حساس، حساس و یا نیمه‌حساس بودند ولی هلوی رقم رم‌استار در بین این رقمهای تحت کشت حساسیت کمتری به بیماری نشان داد. شیوع پژمردگی ورتیسیلیومی روی درختان میوه هسته‌دار در این مناطق و واکنش سیزده رقم تحت کشت هلو و شلیل به این بیماری برای نخستین بار گزارش می‌شوند.

سپاسگزاری Acknowledgement

این تحقیق با حمایت مالی ارائه شده به پروژه مصوب با شماره ۹۱۱۵۹-۰۳-۰۳-۲ در سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی انجام شده است.

منابع References

1. Barbara DJ, Clewes E (2003) Plant pathogenic Verticillium species: how many of them are there? Molecular Plant Pathology 4:297-305.
2. Carroll CL, Carter CA, Goodhue RE, Lawell CYCL, Subbarao KV (2018) A review of control options and externalities for Verticillium wilts. Phytopathology 108:160-171.

3. Conn KL, Tenuta M, Lazarovits G (2005) Liquid swine manure can kill *Verticillium dahliae* microsclerotia in soil by volatile fatty acid, and ammonia toxicity. Phytopathology 95:28-35.

4. FAOSTAT-fao.org (2020). Production of Peach and nectarine by country 2016-2020. Retrieved date, February, 20, 2022.

5. Felliciano AJ (1988) Peach and Nectarine. Pp.2-3. In: JM Ogawa, EI Zehr, GW Bird, DF Ritchie, K Uriu, JK Uyemoto (eds) Compendium of stone fruit diseases. American Phytopathological Society Press.

6. Gazendam I, Oelofse D, Berger DK (2004) High-level expression of apple *PGIP1* is not sufficient to protect transgenic potato against *Verticillium dahliae*. Physiological and Molecular Plant Pathology 65:145–155.

7. Gubler WD (1988) Verticillium wilt. Pp.40-41. In: JM Ogawa, EI Zehr, GW Bird, DF Ritchie, K Uriu, JK Uyemoto (eds.). Compendium of stone fruit diseases. American Phytopathological Society Press.

8. Guzmán G, Latorre BA, Torres R, Wilcox WF (2007) Relative susceptibility of peach rootstocks to crown gall and Phytophthora root and crown rot in Chile. Cienciae Investigacion Agraria 34:31-40.

9. Hayes RJ, Vallad GE, Qin QM, Grube RC, Subbarao KV (2007) Variation for resistance to Verticillium wilt in lettuce (*Lactuca sativa*). Plant Disease 91:439-445.

10. Inderbitzin P, Bostock RM, Davis RM, Usami T, Platt HW, Subbarao KV (2011) Phylogenetics and taxonomy of the fungal vascular wilt pathogen *Verticillium*, with the descriptions of five new species. PLoS One 6:e28341.

11. Irani H, Ommati F, Kumarsi S, Ershad D (2003) Etiological study of stone fruit dieback and decline in West Azarbaijan, Semnan and Kerman provinces. Iranian Journal of Plant Pathology 39:57-72. (In Persian with English Abstract).

12. Lopez-Escudero FJ, del Rio C, Caballero JM, Blanco-Lopez MA (2004) Evaluation of olive cultivars for resistance to *Verticillium dahliae*. European Journal of Plant Pathology, 110:79-85.

13. Lopez-Escudero FJ, Blanco-Lopez MA, Ricon CDR, Reig JMC (2007) Response of olive cultivars to stem puncture inoculation with a defoliating pathotype of *Verticillium dahliae*. HortScience 42: 294-298.

14. Madden LV, Hughes G, van den Bosch F (2007) The study of plant disease epidemics. APS Press, USA. 432p.

15. Magharri S, Sadeghi Garmaroodi H, Ashkan SM (2014) *In-vitro* evaluation of resistance of some commercial plum genotypes to phytophthora rot disease. Applied Plant Protection 3:215-223. (In Persian with English Abstract).

16. Okhovvat SM, Sanei SJ, Pahlevani MH, Razavi SE (2010) Verticillium wilts. Published by Peyke Reyhan, Gorgan, Iran. 652p. (In Persian).

17. Pegg GF (1989) Pathogenesis in vascular diseases of plants. PP.51-95. In: EC Tjamos, CH Beckman (eds.). Vascular Wilt Diseases of Plants, Basic Studies and Control. NATO ASI series H: Cell Biology.

18. Rygulla W, Snowdon RJ, Freidt W, Happstadius I, Cheung WY, Chen D (2008) Identification of quantitative trait loci for resistance against *Verticillium longisporum* in oilseed rape. Phytopathology 98:215-221.

19. Sadeghi Garmaroodi H, Mansuri S (2016) Reaction of improved sesame lines and cultivars to fusarium wilt at *in vitro* and greenhouse conditions. Journal of Applied Research in Plant Protection 5:59-70. (In Persian with English Abstract).

20. Sewell GWF, Wilson JF (2007) Phytophthora collar rot of apple influence of the rootstock on scion variety resistance. Annals of Applied Biology 74:159-169.

21. Song R, Li J, Xie C, Jian W, Yang X (2020) An overview of the molecular genetics of plant resistance to the Verticillium wilt pathogen, *Verticillium dahliae*. International Journal of Molecular Sciences 21:1120.

22. Subbarao KV, Chassot A, Gordon TR, Hubbard JC, Bonello P (1995) Genetic relationships and cross pathogenicities of *Verticillium dahliae* isolates from cauliflower and other crops. Phytopathology 85:1105-12.

23. Tahmasebi A, Parizipour MHG (2020) The role of brassinosteroid hormones in plant response to pathogens. Plant Pathology Science 9:108-117.

24. Tatari M, Jalali S, Bouzari N (2019) Factors causing short life of peach and nectarine trees and control methods. Extensional magazine 385. Agricultural Research, Education and Extension Organization, Education and Extension Institute, Karaj, 48p. (In Persian).

25. Zare R (2003) A revision of plant-associated Verticillium species. Rostaniha 4:29-54.

26. Zhang Y, Zhou J, Zhao L, Feng Z, Wei F, Bai H, Feng H, Zhu H (2022) A review of the pathogenicity mechanism of *Verticillium dahliae* in cotton. Journal of Cotton Research 5:1-13.