بررسی بقا و دامنه میزبانی جدایه‌های *Phythophthora capsici* *

SURVIVAL AND HOST RANGE OF ISOLATES OF *Phytophthora capsici*

حمیده پاسندی و ضیاءالدین بنی‌هاشمی[۱]**

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۵/۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۹/۱۳)

چکیده

گونه *Phytophthora capsici* اولین بار توسط لئونیان در سال ۱۹۲۲ از فلفل در نیومکزیکو جداسازی و توصیف شد. در ایران اگرچه *P. capsici* از میزبان‌های مختلف گزارش شده است، اما اطلاعات دقیقی در خصوص تنوع جمعیت، دامنه میزبانی، ساختار بقا و تیپ آمیزشی این قارچ در دست نیست. این پژوهش به منظور تعیین دامنه میزبانی بیمارگر به ویژه روی گیاهان چوبی انجام شد. دمای بهینه رشد، فراوانی تیپ آمیزشی و تشکیل کلامیدوسپور در محیط زنده و غیر زنده با استفاده از ۲۰ جدایه *P. capsici* از میزبان‌های گیاهی مختلف شامل کدو، فلفل، گوجه‌فرنگی و علف هرز بررسی شد. نتایج نشان داد که هر دو تیپ آمیزشی بیمارگر با فراوانی تقریباً مساوی میان جدایه‌ها وجود داشت. بیمارگر کلامیدوسپورهای فراوانی روی محیط کشت هویج آگار، شاهدانه آگار و بافت ریشه و طوقه کدو تولید کرد. از بین شش گیاه چوبی مایه‌زنی شده، بادام، زردآلو و پسته رقم سرخس بالاترین میزان حساسیت را نشان دادند اما نهال‌های فندق، کیوی و ازگیل آلوده نشدند. تمام جدایه‌های آزمایش شده *P. capsici* روی کدو بیماری‌زا بودند اما فلفل به اکثر جدایه‌ها مقاوم بود.

واژه‌های کلیدی: *Phytophthora capsici*، تیپ آمیزشی، کلامیدوسپور، دامنه میزبانی، گیاه چوبی

---

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

**: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی zia1937@gmail.com

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

مقدمه

جنس *Phytophthora* متعلق به رده اُمیست‌ها بوده و با سایر اُمیست‌ها در سلسله Straminopila به همراه دیاتومه ها و جلبک‌های قهوه‌ای قرار می‌گیرد (Dick 2002). آنها اخیراً در Peronosporomycetes داخل Oomycota قرار گرفته‌اند، اگرچه روابط فیلوژنتیک داخل این گروه هنوز در ابهام باقی مانده است (Peterson & Rosenhal 2000). یکی از گونه‌های مهم اقتصادی در این جنس Leonian *Phytophthora capsici* می‌باشد که اولین بار توسط Leonian در سال ۱۹۲۲ روی فلفل چیلی گزارش شد (Leonian 1922). این بیمارگر موجب بیماری بلایت فیتوفتورایی بسیار مخرب روی محصولات کدوییان، بادنجانیان هم‌چنین محصولاتی مثل لوبیا ،چغندر، شلغم، کاکائو، پاپایا و بسیاری از دیگر محصولات مهم در جهان می گردد و به صورت یک تهدید جدی برای تولیدکنندگان محصولات زراعی در آمده است (Hausbeck & Lamour 2004). جدایه‌های مختلف *P. capsici* ممکن است از لحاظ پر آزاری و بیماری‌زایی روی تعدادی از میزبان‌ها با یکدیگر متفاوت باشند. *گرانک و همکاران* (Grank 2011)، تفاوت در پرآزاری جدایه‌های *P. capsici* را که از سراسر جهان جمع‌آوری شده بودند مورد بررسی قرار دادند. آنان در مطالعه خود از ۱۲۶ جدایه از ۱۲ کشور و ۶ تیره میزبانی شامل سبزیجات و میزبان‌های گرمسیری استفاده کردند. تفاوت در پر آزاری در بین جدایه‌ها روی میوه‌های خیار، گوجه فرنگی، کدو و فلفل قابل توجه بود. میوه‌های خیار، کدو، فلفل و گوجه‌فرنگی با این بیمارگر مایه‌زنی شدند و پر آزاری از طریق قطر زخم‌ها، قطر رشد بیمارگر و غلظت اسپورزایی بیمارگر، سه (کدو و خیار) یا ۴ (فلفل و گوجه فرنگی) روز بعد از مایه‌زنی تخمین زده شد. زمانی که جدایه‌ها به گروه‌های ژنتیکی گروه بندی شدند تفاوت‌های معنی‌داری در پر آزاری روی خیار و کدو دیده شد. روی گوجه فرنگی هیچ تفاوت معنی‌داری بین جدایه‌هایی که از لحاظ ژنتیکی گروه‌بندی شدند دیده نشد. اما جدایه‌های مربوط به میزبان‌های سبزیجات نسبت به جدایه‌های میزبان‌های گرمسیری پرآزارتر بودند. روی کدو، جدایه‌های مربوط به میزبان‌های سبزیجات بهتر از جدایه‌های مربوط به میزبان‌های گرمسیری اسپورزایی کردند. روی خیار، جدایه‌های مربوط به میزبان‌های خانواده باقلا بهتر از جدایه‌های سولاناسه اسپورزایی کردند. روی فلفل هیچ تفاوت معنی‌داری در قطر زخم‌ها بین جدایه‌هایی که از لحاظ مبدا میزبانی یا گروه‌های ژنتیکی متفاوت بودند دیده نشد اما تفاوت‌هایی از لحاظ اسپورزایی به واسطه خانواده میزبانی دیده شد.

بنابر نظر *توکر* (Tucker 1931)، جدایه‌های *P. capsici* از فلفل یک ساله، به ندرت در محیط کشت کلامیدوسپور تولید می‌کنند. البته تعدادی کلامیدوسپور توسط جدایه‌های فلفل یک ساله در ایران تولید شده است (Ershad 1972). *اسلام و همکاران* (Islam *et al.* 2004) برای ۹ جدایه از ۲۴ جدایه از *P. capsici* که از بافت کدو تنبل در ایلی‌نویز جمع‌آوری شده بودند در محیط کشت مایع تحت شرایط آزمایشگاهی کلامیدوسپور تولید کردند و این اولین گزارش از تولید کلامیدوسپور جدایه‌های کدو تنبل این بیمارگر در شرایط آزمایشگاهی بوده است. در حالی که هیچ گزارشی از تولید کلامیدوسپور توسط جدایه‌های *P. capsici* در کدوییان وجود نداشت.

P. capsici یک گونه هتروتالیک است و برای تشکیل اسپور جنسی وجود هر دو تیپ آمیزشی ضروری است. تیپ‌های آمیزشی ممکن است با نسبت‌های مختلفی وجود

داشته باشند مثلاً در برخی مناطق A1 وA2 با نسبت ۱ به ۱ ولی در برخی مناطق اکثرا A1 و یا A2 است. طی سال های ۲۰۰۵ تا ۲۰۰۷، ۲۲۷ جدایه از ۴ گونه فلفل و گوجه فرنگی در ۳۳ مزرعه در ۱۳منطقه از پرو جمع‌آوری شد که همه جدایه‌ها از تیپ آمیزشی A2 بودند (Hurtado-Gonzales *et al.* 2008). درایلی نویز ۵۷ جدایه از *P. capsici* از نظر تیپ آمیزشی مورد بررسی قرار گرفتند. ۳۱ جدایه از تیپ آمیزشی A1 و ۲۶ جدایه از تیپ آمیزشی A2 بودند (Islam *et al.* 2004). یکی از ویژگی‌های *P. capsici* رشد در دمای بالاتر از ۳۵ درجه سانتی‌گراد می باشد (Stamps 1985; Tsao 1991). بهینه دما برای رشد رویشی تعدادی از جدایه‌ها که در نیومکزیکوی جنوبی از فلفل جدا شدند بین ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد بوده است.

P.capsici در این تحقیق قادر به رشد در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد نیز بوده است اگرچه برخی جدایه‌ها در این دما روی محیط کشت CMA رشد ضعیفی داشتند اما بنابر گزارش *آراگاکی* و همکاران (Aragaki & Uchida 2001)روی محیط کشت V8 در این دما رشد خوبی مشاهده شده است. *P. capsici* غالباً از گیاهان یک ساله جدا شده و کمتر روی درختان چوبی وجود دارد و هم‌چنین در مورد بررسی نحوه زمستان گذرانی آن در استان فارس مطالعات چندانی نشده و به همین منظور حضور ااسپور و تشکیل کلامیدوسپور در جدایه‌های فارس و تعدادی از جدایه‌های موجود در بخش گیاه‌پزشکی باید مورد بررسی قرار گیرد. فراوانی تیپ آمیزشی *P. capsici* ممکن است به طور مساوی باشد. با استفاده از جدایه‌های موجود در بخش گیاه‌پزشکی که ممکن است مربوط به زیر گروه CAP1 تا CAP3 و یا فقط مربوط به زیر گروه CAP1 باشند باید فراوانی تیپ آمیزشی آنها مشخص شود. به علاوه مطالعه نحوه رشد روی محیط کشت در برخی از موارد برای گروه‌بندی جدایه‌ها ضروری است بنابراین مطالعه حاضر تعیین دامنه میزبانی بیمارگر روی برخی از گیاهان چند ساله، تعیین تیپ آمیزشی و فراوانی *P. capsici* در برخی از مناطق ایران، تشکیل کلامیدوسپور در محیط کشت و میزبان و در نهایت مقایسه جدایه‌ها بر اساس سرعت رشد و نیاز دمایی در محیط کشت را مورد بررسی قرار داد.

روش بررسی

جدایه‌های انتخاب شده برای انجام آزمون‌های زیستی

بیست جدایه *P. capsici* از کلکسیون بخش گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز گرفته شد و جهت انجام سایر آزمون‌های زیستی از آنها استفاده شد. این جدایه‌ها از میزبان‌های مختلف و مناطق مختلف ایران و امریکا جمع‌آوری شدند (کد جدایه‌ها به همراه نام میزبان، محل جمع‌آوری و سال جمع آوری در جدول ۱ آورده شده است).

تعیین دامنه دمایی و سرعت رشد روزانه

برای تعیین دامنه دمایی و سرعت رشد روزانه از حاشیه پرگنه‌های جوان رشد یافته روی محیط CMA، یک قطعه ۶-۵ میلی‌متر برداشته و در مرکز تشتک پتری حاوی عصاره ذرت آگار (CMA) قرار داده شد. برای هر جدایه در هر دما سه تکرار در نظر گرفته شد. دماهای مورد بررسی در این آزمون ۵، ۱۵ ،۲۰، ۲۵، ۲۸ ،۳۰، ۳۵، ۴۰ ̊C بود، میزان رشد شعاعی آنها پس از ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفت.

تشکیل کلامیدوسپور

استفاده از محیط کشت‌های جامد و مایع

در این مطالعه از محیط کشت‌های جامد و مایع مختلف شامل عصاره شاهدانه، V8(عصاره هشت سبزی) و عصاره

جدول ۱.جدایه‌های *Phytophthora capsici* مورد استفاده در این مطالعه

Table 1. Isolates of *Phytophthora capsici* used in this study

کد جدایه	میزبان	محل جمع‌وری	سال جمع‌آوری
Isolate code	Host	Location	Year
PH-2.5.82	هندوانه(watermelon)	مرودشت(Marvdasht)	۱۳۶۱(1982)
PH-2.8.87	فلفل(pepper)	شیراز(Shiraz)	۱۳۶۶(1987)
PH-2.3.81	فلفل(pepper)	خوزستان(Khuzistan)	۱۳۶۰(1981)
PH-2.7.86	تاجریزی(nightshade)	مرودشت(Marvdasht)	۱۳۶۵(1986)
PH-2.14.92	نامعلوم(?)	آمریکا(USA)	۱۳۷۱(1992)
PH-2.15.92	نامعلوم(?)	آمریکا(USA)	۱۳۷۱(1992)
PH-2.28.05	فلفل(pepper)	قزوین(Ghazvin)	۱۳۸۴(2005)
PH-2.30.05	فلفل(pepper)	قزوین(Ghazvin)	۱۳۸۴(2005)
PH-2.31.05	فلفل(pepper)	قزوین(Ghazvin)	۱۳۸۴(2005)
PH-2.32.05	گوجه فرنگی(tomato)	قزوین(Ghazvin	۱۳۸۴(2005)
PH-2.33.05	گوجه فرنگی(tomato)	قزوین(Ghazvin)	۱۳۸۴(2005)
PH-2.35.05	فلفل(pepper)	قزوین(Ghazvin)	۱۳۸۴(2005)
PH-2.36.05	فلفل(pepper)	قزوین(Ghazvin	۱۳۸۴(2005)
PH-2.37.05	فلفل(pepper)	قزوین(Ghazvin)	۱۳۸۴(2005)
PH-2.38.05	بادنجان(eggplant)	کرج(Karaj)	۱۳۸۴(2005)
PH-2.13.92	نامعلوم(?)	امریکا(USA)	۱۳۷۱(1992)
PH-2.19.92	نامعلوم(?)	آمریکا(USA)	۱۳۷۱(1992)
PH-2.27.05	فلفل(pepper)	قزوین(Ghazvin)	۱۳۸۴(2005)
PH-2.29.05	فلفل(pepper)	قزوین(Ghazvin	۱۳۸۴(2005)
PH-2.34.05	فلفل(pepper)	قزوین(Ghazvin)	۱۳۸۴(2005)

هویج برای تولید کلامیدوسپور استفاده شد. در استفاده از محیط کشت جامد، بلوک‌هایی از بیمارگر روی محیط کشت‌های مذکور گذاشته شد. پس از تهیه محیط‌های مایع به میزان ۲۵ میلی‌لیتر از هر کدام از محیط‌ها در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد پس از اتوکلاو کردن محیط‌ها و خنک شدن در اتاقک کشت، ۱۰ بلوک یک

میلی‌متری از قارچ رشد یافته روی محیط CMA به هر ارلن اضافه شد. به منظور تحریک تولید کلامیدوسپور در این جدایه‌ها ۳ میلی گرم در لیتر بتا سیسترول (Elliott *et al*. 1964) و یک گرم در لیتر کربنات کلسیم به کلیه محیط‌های کشت اضافه شد. کلیه تیمارها در دمای ۲۵ و ۴°C در روشنایی و تاریکی قرار داده شدند و به مدت چهار ماه به منظور تولید کلامیدوسپور بررسی شدند.

بررسی امکان تشکیل کلامیدوسپور در بافت گیاهی

به منظور تشکیل کلامیدوسپور در بافت آلوده، ابتدا طوقه و ریشه‌های آلوده شده در آزمون بیماری‌زایی کدوییان، پس از جداسازی از اندام‌های هوایی شستشو داده شد. مقداری ماسه ریز مرطوب در کیسه‌های قابل اتوکلاو، سه بار به صورت یک روز در میان سترون شد. طوقه و ریشه‌های آلوده به تفکیک درون هر کیسه گذاشته و در سردخانه با دمای ۴°C قرار داده شدند. تشکیل یا عدم تشکیل کلامیدوسپور هر ماه در زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت.

تشکیل اُاُسپور

برای تولید اُاُسپور و به منظور تعیین فراوانی تیپ آمیزشی از دو روش متداول مستقیم و ساندویچی با استفاده از محیط کشت عصاره شاهدانه آگار(HSA) استفاده شد. در روش مستقیم بلوک‌هایی به قطر پنج میلی‌متر از حاشیه پرگنه‌های جوان همه جدایه‌ها و تیپ آمیزشی A1 از جدایه PH-2-5-82 و A2 از جدایه *P. capsici* PH-2.15.92 بخش گیاه‌پزشکی دانشگاه شیراز برداشته و در دو طرف تشتک پتری شش سانتی‌متری محتوی محیط کشت HSA در مقابل هم قرار داده شد و در روش ساندویچی از حاشیه پرگنه‌های جوان همه جدایه‌های مورد نظر و تیپ‌های آمیزشی شناخته شده A1 و A2 بلوکی به قطر هفت میلی‌متر برداشته و در کف تشتک شش سانتی‌متری قرار داده شد، روی آن یک بلوک از محیط کشت HSA به همان اندازه و بلوک سوم از تیپ آمیزشی A1 یا A2 قرار داده شد. حاشیه تشتک‌ها با نوار پارافیلم بسته شد و تشتک‌های پتری به مدت یک ماه در تاریکی و در ۲۵° C نگه‌داری شدند.

تعیین دامنه میزبانی

تهیه مایه قارچ

برای تهیه مایه بیمارگر از عصاره شاهدانه و ورمی‌کولایت استفاده شد. ۱۲۰ میلی لیتر عصاره شاهدانه (عصاره ۶۰ گرم شاهدانه در یک لیتر آب مقطر) را با ۲۰۰ میلی‌لیتر ورمی‌کو لایت درون کیسه‌های پلاستیکی مقاوم به دمای اتوکلاو ریخته با هم مخلوط نموده و سه بار به صورت یک روز در میان به مدت نیم ساعت در اتوکلاو سترون شدند. پس از آن از پرگنه‌های قارچ مورد نظر که قبلاً روی محیط CMA رشد کرده اند ، بلوک‌هایی به قطر شش میلی‌متر از جدایه PH.2-15-92 (برای مایه‌زنی درختان) و همه جدایه‌های *P.capsici* (برای مایه‌زنی کدو و فلفل) جدا نموده و به کیسه‌های حاوی ورمی‌کولایت و شاهدانه اضافه شد. سپس کیسه‌ها به مدت چهار هفته در ۲۵°C و در تاریکی نگهداری شدند (بنی هاشمی و فاتحی ۱۳۶۸). هر هفته کیسه‌های حاوی مایه قارچ برای چند دقیقه تکان داده شد تا رشد قارچ داخل کیسه‌ها یکنواخت صورت بگیرد.

تعیین دامنه میزبانی در گیاهان چوبی و چند ساله

برای تعیین دامنه میزبانی بیمارگر روی گیاهان چند ساله و چوبی، بذوری از درختان شامل پسته (ارقام سرخس و

قزوینی)، بادام، فندق، زردآلو، نهال ازگیل و کیوی استفاده شد. ابتدا بذرها به مدت دو ساعت در آب خیسانده شدند و به مدت یک ساعت زیر جریان مداوم آب لوله شستشو داده شد. سپس با بنومیل چهار در هزار ضدعفونی شدند. بذرها در کیسه‌های حاوی ورمی کولایت سترون مرطوب که با بنومیل مخلوط شده بود قرار گرفتند و کیسه‌ها به مدت دو ماه در ۴̊C قرار گرفتند. پس از دو ماه بذرها در گلدان‌هایی به ابعاد۲۰×۲۰ ×۱۹ سانتی‌متر حاوی مخلوط خاک و ماسه (نسبت دو به یک) سترون به فاصله پنج سانتی‌متری از یکدیگر کاشته شدند. در هر گلدان سه گیاه کاشته شد. برای کاشتن بذرهای پسته از روش *هادی‌زاده* (۱۳۸۱) استفاده شد. همه گلدان‌ها پس از آبیاری مختصر، در گلخانه با دمای کمینه ۱۵، بیشینه ۴۲ و میانگین ۲۸̊C نگه‌داری شدند. بعد از ۴ ماه وقتی که گیاهان به اندازه کافی رشد کردند مایه زنی انجام شد. پس از آماده‌سازی مایه قارچ،۷۰ میلی‌لیتر از جدایه مورد نظر پای طوقه نهال‌ها ریخته شد روی آن با ماسه سترون پوشانیده شد. گلدان‌ها در گلخانه با حداکثر دمای ۴۲-۳۷ و حداقل دمای ۲۰-۱۵̊C قرار داده شدند و روزانه آبیاری شدند. ردیابی بیمارگر در گلدان‌ها هر ماه با استفاده از قطعات دایره‌ای شکل برگ لیمو شیرین انجام شد (Banihashemi 2004). نتایج تا پنج ماه بعد از مایه‌زنی مورد بررسی قرار گرفت. برای تأیید حضور فیتوفتورای عامل بیماری و تکمیل اصول کخ، جداسازی مجدد از ریشه و طوقه گیاه صورت گرفت.

تفکیک جدایه‌های مختلف *P. capsici* از یکدیگر

عکس‌العمل کدو نسبت به جدایه‌های مختلف *P. capsici* متفاوت بوده و از آن جایی که جدایه‌های *P.capsici* از کدوییان، هم روی کدو و هم روی فلفل بیماری‌زا هستند به همین منظور از فلفل نیز برای تفکیک جدایه‌های مختلف این بیمارگر استفاده شد. برای این کار اقدام به مایه‌زنی گیاهان کدو (رقم قلمی خورشی) و فلفل (رقم فلفل تند هندی) و مقایسه نتایج آنها با هم گردید. ابتدا بذرهای این گیاهان با وایتکس ۱۰ درصد به مدت پنج دقیقه ضدعفونی سطحی گردید و چندین بار با آب مقطر شستشو داده شد. پس از جوانه‌زنی بذرها در گلدان‌های پلاستیکی حاوی مخلوط خاک و ماسه (نسبت دو به یک) سترون درشرایط گلخانه کشت داده شدند. برای کدو در هر گلدان ۵ بذر و برای فلفل ۱۰ بذر کاشته و روی آن به ارتفاع نیم سانتی‌متری خاک ریخته شد. گلدان‌ها در گلخانه با حداکثر دمای ۴۲-۳۷ و حداقل دمای ۱۵- ۲۰̊C قرار داده شدند و روزانه آبیاری شدند. پس از دو ماه و بالغ شدن گیاهان، به روش قبلی اقدام به مایه‌زنی گردید.

نتیجه

تعیین دامنه دمایی و سرعت رشد روزانه در جدایه‌های *P. capsici*

دمای بهینه رشد برای تمام جدایه‌های *P. capsici*، حدود ۲۸̊C و حداقل دمای رشد برای اکثر جدایه‌ها کمتر از ۱۵̊C بود. اما شش جدایه قادر به رشد در این دما نبودند و حداقل دمای رشد برای آنها بین ۱۵ و ۲۰̊C و حداکثر دمای رشد تمام جدایه‌ها بالای ۳۵̊C بود. هیچ یک از جدایه‌ها قادر به رشد در دمای ۵ و ۴۰ ̊C نبودند.

تشکیل کلامیدوسپور

استفاده از محیط کشت‌های جامد و مایع

در بررسی ماهیانه تشتک‌های پتری حاوی جدایه‌های مختلف *P. capsici* روی محیط کشت‌های عصاره دانه شاهدانه –آگار (HSA) و هویج آگار (CA) نگهداری شده

در دمای ۴°C ، بیمارگر پس از یک ماه کلامیدوسپورهای گرد با دیواره ضخیم و میانگین اندازه ۲۵/۵۳ میکرومتر تولید کرد. در حالی که در تیمارهای *P. parsiana* که به عنوان کنترل مثبت استفاده شده بود تعداد معدودی کلامیدوسپور روی محیط کشت CA تولید شد ولی هیچ کلامیدوسپوری روی محیط کشت V8 دیده شد. هم‌چنین در بررسی ارلن‌های حاوی محیط مایع پس از گذشت یک ماه و چهار ماه از انجام آزمون، هیچ کلامیدوسپوری دیده شد.

بررسی امکان تشکیل کلامیدوسپور در بافت گیاهی

پس از بروز علائم در گیاهان کدو و نگه‌داری طوقه‌ها و ریشه‌های آلوده در ماسه مرطوب سترون در دمای چهار درجه سانتی‌گراد، کیسه‌های حاوی ماسه و بافت آلوده هر ماه مورد بررسی قرار گرفت. پس از پنج ماه از تیمارهای مختلف به تفکیک اسلاید میکروسکوپی تهیه شد و در تمام تیمارهای ریشه و طوقه آلوده به جدایه‌های *P.capsici* زیر میکروسکوپ کلامیدوسپورها دیده شد. این اندام‌ها به تعداد کم در قسمت‌های مختلف ریشه و طوقه در تمامی گیاهان آلوده به جدایه‌های مورد نظر بیمارگر مشاهده گردید در ریشه گیاهان شاهد هیچ کلامیدوسپور یا اندام مشکوک به کلامیدوسپور هم دیده نشد.

اُاُسپور

بررسی تولید اُاُسپور به روش مستقیم در محیط کشت HSA

در این آزمون همه جدایه‌های *P. capsici* در مقابل تیپ آمیزشی A1 جدایه PH-2.5.82 و A2 جدایه PH-2.15.92 از *P. capsici* قرار گرفتند. این آزمون در سه نوبت تکرار شد و نتایج مشابهی به دست آمد. تمام جدایه‌ها هتروتال بوده و دارای اُاُگونیوم گرد با دیواره صاف، آنتریدیوم آمفی‌ژینوس و کروی تا بیضی شکل و اُاُسپور کروی و پلروتیک و بی‌رنگ هستند. در جدایه‌های ایران فراوانی تیپ آمیزشی A1 (۹جدایه) از تیپ آمیزشی A2 (۶ جدایه) بیشتر بوده است و در جدایه‌های امریکا نسبت A1:A2، ۱:۳می‌باشد. نتایج در جدول۲ آورده شده است.

تولید اُاُسپور به روش ساندویچ

در این آزمون همه جدایه‌های *P. capsici* در مقابل تیپ آمیزشی A1 جدایه PH-2.5.82 و A2 جدایه PH-2.15.92 از *P. capsici* قرار گرفتند، نتایج مشابهی به دست آمد.

دامنه میزبانی

تهیه مایه بیمارگر

یک ماه پس از مایه‌زنی کیسه‌های حاوی ورمی کو لا یت و عصاره شاهدانه با بیمارگر *P. capsici* و به منظور تأیید رشد بیمارگر درون کیسه‌ها، همه مایه اینوکولوم‌ها مورد بررسی قرار گرفت. در اتاقک رشد، کیسه‌ها باز و مقداری از محتویات با پنس سترون به تشتک‌های پتری حاوی محیط CMA انتقال داده شد. پس از ۲۴ ساعت، تشتک‌ها مورد بررسی قرار گرفت و پرگنه‌هایی از بیمارگر دیده شد.

تعیین دامنه میزبانی در گیاهان چوبی و چند ساله

نهال‌های چهار ماهه بادام، فندق، زردآلو، پسته (دو رقم شامل رقم سرخس و قزوینی)، ازگیل و کیوی در تیر ماه سال ۱۳۹۱ با *P. capsici* جدایه‌ی PH-2.15.92 مایه‌زنی شدند.

بررسی نتایج مایه‌زنی نهال‌ها از یک هفته پس از مایه زنی با بررسی علائم آغاز شد. نهال‌های زردآلو و بادام ده روز و پسته رقم سرخس یک ماه پس از مایه‌زنی بیمارگر

علائم بیماری را نشان دادند. زردآلو و بادام به عنوان علائم بیماری شامل: سبز خشکی ناگهانی، پژمردگی حساس‌ترین میزبان چوبی این بیمارگر شناخته شدند.

جدول ۲. تشکیل اُاُسپور توسط جدایه‌های (1)*Phytophthora capsici* به روش مستقیم و ساندویچی روی محیط کشت HSA

Table 2 . Formation of oospore by isolates of *Phytophthora capsici* in the culture by standard and Sandwich method

تشکیل اُاُسپور با تیپ آمیزشی Oospore formation with mating types		
A2	A1	کد جدایه Isolate code
+	−	PH-2.3.81
−	+	PH-2.7.86
+	−	PH-2.5.82
−	+	PH-2.8.87
−	+	PH-2.14.92
−	+	PH-2.15.92
−	+	PH-2.28.05
+	−	PH-2.30.05
−	+	PH-2.31.05
+	−	PH-2.32.05
+	−	PH-2.33.05
+	−	PH-2.35.05
+	−	PH-2.36.05
−	+	PH-2.37.05
−	+	PH-2.38.05
−	+	PH-2.13.92
+	−	PH-2.19.92
+	−	PH-2.27.05
−	−	PH-2.29.05
+	−	PH-2.34.05

و ریـزش بـرگ‌هـا در انـدام‌هـای هـوایی و پوسـیدگی و سیاه‌دگی خفیف در ناحیه طوقه بود .در بین دو رقـم پسـته سرخس و قزوینی تنها رقم سرخس علائم بیماری را نشان داد. البته بیماری‌زایی بیمارگر روی این رقم پسـته کمتـر از سایر درختان بـوده و پوسـیدگی خفیفـی در ناحیـه طوقـه مشاهده گردید. در سایر تیمارها هـم علائمـی دیـده نشـد. عامل بیماری از مرز بین ناحیه سالم و آلـوده همـه گیاهـان بیمار جداسازی شد. هم چنین ردیابی جدایه‌ها در گلـدان-های تیمار شـده نشـان داد کـه جدایـه‌هـا در تمـام مـدت آزمایش در گلدان فعـال بـوده، امکـان جداسـازی آنهـا بـا استفاده از طعمه برگ مرکبات وجود دارد.

عکس‌العمل فلفل و کدو به جدایه‌های *P. capsici*

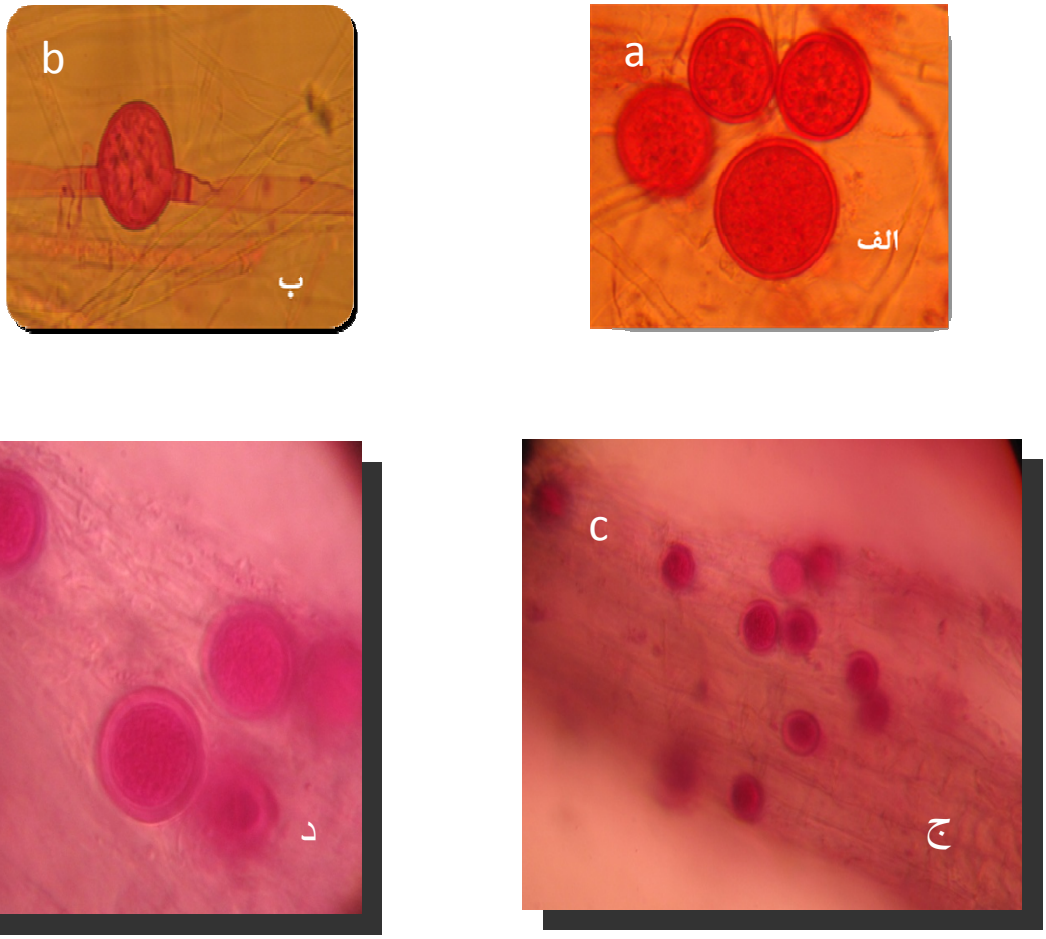
از بیست جدایه از ایـن بیمـارگر بـرای مایـه‌زنـی اسـتفاده گردید. علائم روی فلفل و کدو یک هفته پس از مایـه‌زنـی مشخص شـد. علائـم آلـودگی روی کـدو شـامل زردی و پژمردگی اندام‌های هوایی به همراه پوسـیدگی، لهیـدگی و سیاه‌شدگی ناحیه طوقه و ریشه‌های فرعی دیده شد، که در نهایت موجب بوته‌میری و از پاافتادگی گیاهـان گردیـد در فلفـل علائـم بـه صـورت پژمردگـی انـدام‌هـای هـوایی و پوسیدگی و لهیدگی ناحیه طوقه و در نهایت بوتـه‌میـری و از پاافتادگی دیده شد. نتایج تا یـک مـاه پـس از مایـه‌زنـی مورد بررسی قرار گرفت. از بین ۲۰ جدایـه‌ای کـه در ایـن آزمون استفاده شد فقط ۸ جدایـه قـادر بـه ایجـاد بیمـاری روی هر دو گیاه کدو و فلفل بودند. گیاهان کـدو بـه اکثـر جدایه‌ها حساس بودند ولی گیاهان فلفل مقاومت بیشـتری را در برابر جدایه‌ها نشان دادنـد. نتـایج درجـدول ۳ آورده شده است.

بحث

تمـام گونـه‌هـای جـنس *Phytophthora* قـادر بـه تولیـد کلامیدوسپور نبوده و این ویژگی تنها در برخی از گونه‌هـا دیده می‌شود (Stamps *et al*. 1990). تشکیل کلامیدوسپور تحت تأثیر عوامل مختلفی از جمله نوع مواد تشکیل‌دهنـده محیط، دما و رطوبت بهینه و سـایر شـرایط محیطـی ماننـد pH است. گزارش‌های مختلفی وجود دارد کـه نشـان مـی دهد، افزودن مقدار کافی بتا سیسترول یا کربنات‌کلسـیم بـه محیط کشت سبب افزایش تولید کلامیدوسـپور مـی شـود (Englander & Roth 1980).

در این مطالعه به دلیـل مشـخص نبـودن شـرایط بهینـه برای تولید کلامیدوسپور تیمارهایی در محـیط‌هـای کشـت جامد و مایع، در تاریکی و روشنایی و در دمـای ۲۵ و ۴°C گذاشته شد. هم چنـین از *P. parsiana* بـه عنـوان کنتـرل مثبت استفاده شـد. در بررسـی ماهیانـه شـتک‌هـای پتـری حاوی جدایه‌های بیمارگر، در هـیچ یـک از محـیط کشـت های مـایع در تیمارهـای دمـایی مختلـف کلامیدوسـپوری مشاهده نشد در حالی که در محیط کشـت جامـد عصـاره شاهدانه –آگار (HSA) و عصـاره هـویج آگـار(CA) و در بافت گیاهی آلوده در دمـای ۴ درجـه سـانتی‌گـراد مقـدار زیادی کلامیدوسپور به صورت بین ریسه‌ای یـا انتهـایی بـا میانگین قطر (۳۱/۸۷– ۱۸/۷۵) میکرومتر تولیـد شـد. اکثـر مطالعـــــات حـــــاکی از آن اســـــت کـــــه *P. capsici* قادر به تولید کلامیدوسپور نمـی باشـد یـا بـه نـدرت تولیـد کلامیدوسـپور مـی کنـد. بـه عنـوان مثـال گـــزارش شـــده در *P. capsici* هـــیچ کلامیدوســـپوری به طور طبیعی تولید نمی شود مگر برای جدایـه‌هـایی کـه بعـداً بـــه عنـــوان *P. tropicalis* طبقـــه‌بنـــدی شـــدند (French-Monar *et al*. 2006). طی مطالعه‌ای کـه توسـط *باورز و همکـاران* (Bowers 2007) روی تنـوع ژنتیکـی و ریخـت‌نـاختی ۱۴ جدایـه گرمسـیر (*P. tropicalis*) و ۲۸

جدایه معتدل (*P. capsici*) صورت گرفت دو ویژگی برای جداسازی این دو گونه شناسایی شد که شامل رشد در دمای ۳۵°C و دیگری تشکیل کلامیدوسپور است. تمام جدایه‌های *P. capsici* قادر به رشد در دمای ۳۵°C بودند



شکل ۱. شکیل کلامیدوسپور *Phytophthora capsici* در محیط عصاره هویج آگار (الف و ب) و در ریشه بادام(ج و د)

Fig. 1. Formation of chlamydospore of *Phytophthora capsici* on carrot juice agar (a & b) and almond root (c & d)

در حالی که هیچ یک از جدایه‌های *P. tropicalis* در این دما رشد نکردند و هم چنین تشکیل کلامیدوسپور فقط در جدایه‌های *P. tropicalis* دیده شد. عدم حضور کلامیدوسپور در جدایه‌های فلفل، کدو تنبل و سایر میزبان‌های تیره بادنجانیان، حبوبات و کدوییان توسط لئونیان و سایرین گزارش شده است (Aragaki & Uchida 1985).

نتایج این تحقیق با توصیف(Uchida 1985) که کلامیدوسپور را در *P. capsici* به شکل کروی، انتهایی یا بین ریسه‌ای و به رنگ زرد کمرنگ تا طلایی گزارش کرده بود مطابقت دارد. Ristaino (1990) گزارش کرد که هیچ یک از جدایه‌های *P. capsici* از فلفل و کدو، در محیط کشت قادر به تولید کلامیدوسپور نبودند در حالی که ارشاد در جدایه‌های فلفل یک ساله در ایران تولید کلامیدوسپور را گزارش کرد (Ershad 1971). او هیچ کلامیدوسپوری در محیط کشت مایع مشاهده نکرد در صورتی که *ایسلام و همکاران* (۲۰۰٤) در جدایه‌های کدو تنبل، تولید کلامیدوسپور را در محیط‌های مایع گزارش کردند و این

اولین گزارش از تولید کلامیدوسپور توسط این بیمارگر در کدو تنبل بوده است. در مورد تشکیل کلامیدوسپور در بافت گیاهی بررسی انجام نشده بود. رشد بیمارگر در محیط طبیعی بافت گیاهی و قرار گرفتن در دمای ٤٠C

جدول۳. بیماری‌زایی جدایه‌های مختلف *Phytophthora capsici* در کدو و فلفل پس از یک ماه

Table 2. pathogenicity of different isolates of *Phytophthora capsici* in squash and pepper one month after inoculation

کد جدایه	درصد گیاهان بیمار روی کدو	درصد گیاهان بیمار روی فلفل
Isolate code	% Diseased squash	% Diseased pepper
PH-2.5.82	55.5	0
PH-2.8.87	0	0
PH-2.14.92	100	86.6
PH-2.15.92	55.5	66.6
PH-2.28.05	11.11	0
PH-2.30.05	44.4	40
PH-2.31.05	0	20
PH-2.32.05	0	66.6
PH-2.33.05	0	0
PH-2.35.05	22.2	0
PH-2.36.05	55.5	60
PH-2.37.05	100	100
PH-2.38.05	11.11	0
PH-2.3.81	66.6	0
PH-2.7.86	22.2	0
PH-2.13.92	33.3	100
PH-2.19.92	88.8	0
PH-2.27.05	33.3	26.6
PH-2.29.05	0	100
PH-2.34.05	33.3	66.6

سبب تولید این اندام شده است.

تشکیل اُاُسپور در گونه‌های فیتوفتورا تحت تأثیر فاکتورهای محیطی مختلفی از جمله نور و دما قرار دارد (Manohara 2007). *P. capsici* یک گونه هتروتال است و برای تشکیل اسپور جنسی وجود هر دو تیپ آمیزشی ضروری است. همه جدایه‌های مورد بررسی در این تحقیق هتروتال بوده و پس از دو تیپ آمیزشی مختلف (A1 و A2) قادر به تولید اُاُسپور در محیط HSA بودند. Leonian (1922) اُاُسپورهای قهوه-ای رنگ با قطر ۲۵ تا ۳۵ میکرومتر به همراه آنتریدیوم‌های آمفی‌ژینوس در محیط کشت مشاهده کرد. *گالگلی و همکاران* (Gallegly & Hong 2008) گزارش کردند که *P. capsici* دارای اُاُگونیم‌های کروی با اندازه ۳۵ میکرومتر، آنتریدیوم آمفی‌ژینوس با اندازه ۱۴ میکرومتر و اُاُسپورهای پلروتیک با اندازه حدود ۲۹ میکرومتر می باشد. آنها اعلام کردند که اندازه اندام‌های جنسی در جدایه‌های مختلف متفاوت است. در میشیگان تیپ‌های آمیزشی A1 و A2 با نسبت ۱:۱ در یک مزرعه وجود داشتند (Lamour & Hausbeck 2003). هفتاد و یک جدایه از *P. capsici* از لحاظ تیپ آمیزشی در ۴ مزرعه کدو در فلوریدا مورد بررسی قرار گرفت. تیپ‌های آمیزشی A1 و A2 در تمام مزارع وجود داشتند. با این که نسبت‌ها در سه مزرعه متفاوت بودند به این صورت که یکی از تیپ‌های آمیزشی دو تا سه برابر از تیپ آمیزشی دیگر بیشتر وجود داشت ولی زمانی که در تمام مزارع محاسبه شد تیپ‌های آمیزشی به نسبت ۱:۱ وجود داشتند. تیپ‌های آمیزشی A1 و A2 برای هشت مزرعه در میشیگان برای جدایه‌های فلفل و کدو با نسبت تقریباً ۱ به ۱ به دست آمد (Butler & Satour 1967 ,Lamour & Hausbeck 2000) نسبت ۲:۱ از تیپ‌های آمیزشی A1:A2 در *P.capsici* گزارش کردند. بنابر گفته *تیمر و همکاران* (Timmer *et al.* 1970) نسبت بین تیپ‌های آمیزشی A1 و A2 تقریباً همیشه متمایل به A1 است. در نیو مکزیکو وجود هر دو تیپ آمیزشی، با فراوانی بیشتر تیپ آمیزشی A1 (با نسبت ۲:۱) در یک مزرعه دیده شد اما هیچ ااسپوری تشکیل نشد. وجود هر دو تیپ آمیزشی و تغییرپذیری در یک مزرعه فلفل در نیومکزیکو نشان می دهد که نوترکیبی جنسی در جمعیت این بیمارگر اتفاق می‌افتد و نژادهای جدید قادر به ایجاد بیماری روی ارقام مقاوم فلفل می باشند (Fernandez-Pavia 2004).

در اکثر گزارش‌های موجود فراوانی تیپ آمیزشی A1 از تیپ آمیزشی A2 بیشتر بوده، نتایج این تحقیق (در مورد جدایه‌های ایران) با گزارش‌های موجود مطابقت دارد. بنابراین با وجود حضور هر دو تیپ آمیزشی تشکیل اُاُسپور در شرایط طبیعی امکان پذیر می‌باشد. وجود هر دو تیپ آمیزشی در یک منطقه باعث افزایش پتانسیل تولید اُاُسپور و نوترکیبی ژنتیکی در جمعیت *P. capsici* می‌ود.

P. capsici غالباً از گیاهان یک ساله جدا شده و بیماری‌زایی آن روی درختان چوبی و گیاهان چند ساله زیاد مورد بررسی قرار نگرفته است. به همین دلیل در این پژوهش بیماری‌زایی *P. capsici* روی درختان چوبی مورد بررسی قرارگرفت. نهال‌های زردآلو و بادام ده روز بعد از مایه‌زنی آلوده شدند. در بین دو رقم پسته سرخس و قزوینی تنها رقم سرخس یک ماه بعد از مایه‌زنی علائم بیماری را نشان داد. در نهال‌های فندق، کیوی، ازگیل و پسته رقم قزوینی هیچ علائمی دیده نشد. بیماری‌زایی *P.*

capsici در نهال‌های زردآلو و بادام در ایران برای اولین بار در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفت اما بیماری‌زایی *P. capsici* روی درختان تاکنون از تنه پسته گزارش شده بود (MacDonald *et al*. 1992). *علیزاده و اقارفیعی* (Alizadeh & Agharafee 1998)، علت زوال درختان هسته‌دار مثل هلو و گیلاس را در تهران گونه‌هایی از فیتوفتورا چون *P. capsici* معرفی کردند. *کواسدا و همکاران* (Quesada- Ocampo *et al*. 2009)، *P. capsici* را در میشیگان از صنوبر گزارش کردند. بنابر گفته محققان کدو و فلفل از حساس‌ترین میزبان‌های *P. capsici* می‌باشند (Erwin & Ribeiro 1996; Lee *et al*. 2001; Hwang *et al*. 1996). عکس‌العمل کدو نسبت به جدایه‌های مختلف *P. capsici* متفاوت بوده و از آن جایی که جدایه‌های *P. capsici* از کدوییان، هم روی کدو و هم روی فلفل بیماری‌زا هستند به همین منظور از فلفل نیز برای تفکیک جدایه‌های مختلف این بیمارگر استفاده شد.

نتایج بیماری‌زایی جدایه‌های مختلف *P. capsici* روی کدو (رقم قلمی خورشی) و فلفل (رقم تند هندی) در این آزمون مقداری متفاوت بودند. اکثر جدایه‌ها روی کدو بیماری‌زا بودند به جز پنج جدایه که سه جدایه از فلفل سبز و دو جدایه از گوجه‌فرنگی جداسازی شده بودند. گیاهان فلفل برعکس کدو به ۹ جدایه از ۲۰ جدایه مقاومت کامل نشان دادند. از بین جدایه‌هایی که قادر به ایجاد بیماری روی فلفل رقم تند هندی نبودند چهار جدایه از فلفل سبز جدا شده بودند. علت عدم بیماری‌زایی جدایه‌های فلفل روی فلفل رقم تند هندی ممکن است متفاوت بودن گونه فلفل‌ها و یا مقاومت رقم فلفل مورد استفاده به برخی جدایه‌های فیتوفتورا باشد. گزارش‌هایی مبنی بر وجود تفاوت در بیماری‌زایی میان جدایه‌های *P. capsici* وجود دارد. *لی و همکاران* (Lee *et al*. 2001) قدرت تهاجم جدایه‌های فلفل و کدو تنبل را روی ورایته‌های کدو تنبل بررسی کردند و تفاوت‌هایی در پرآزاری میان جدایه‌ها مشاهده کردند.

اوئلکه و همکاران (Oelke *et al* 2003)، نژادهای فیزیولوژیکی میان جدایه‌های *P. capsici* گزارش کردند. *هوانگ و همکاران* (Hwang *et al*. 1996) گزارش کردند جدایه‌های *P. capsici* از نظر پرآزاری تفاوت‌هایی با هم دارند. مطالعات قبلی نشان داده که *P. capsici* از یک میزبان حساس مثل گوجه‌فرنگی، می تواند روی سایر میزبان‌های حساس مثل فلفل نیز بیماری‌زا باشد (Ristaino 1990). در این تحقیق هم دو جدایه از گوجه‌فرنگی برای مایه‌زنی استفاده شد که کدو به هر دو جدایه مقاومت نشان داد در حالی که یکی از جدایه‌ها قادر به ایجاد بیماری روی فلفل بود. در واقع گیاهان فلفل در برابر جدایه‌های گوجه‌فرنگی حساس‌تر از گیاهان کدو بودند. از آن جایی که فلفل و گوجه‌فرنگی متعلق به یک تیره گیاهی هستند بنابراین این احتمال وجود دارد که مکانیسم مقاومت و حساسیت این دو گیاه شبیه به هم باشد.

هوسبک و فوستر (Hausbeck & Foster 2004) گزارش کردند که تفاوت‌هایی بین پرآزاری جدایه‌های *P. capsici* و حساسیت گیاهان فلفل وجود دارد. جدایه‌های فلفل که در آزمایش آنان استفاده شدند روی ریشه، طوقه و میوه فلفل بیماری‌زایی شدیدی داشتند اما این موضوع الزاماً بیانگر این نیست که جدایه‌های فلفل از جدایه‌های کدو پرآزارترند. یکی دیگر از محققین سطوح مختلفی از پرآزاری میان جدایه‌های *P. capsici* را مشاهده کردند و سایرین هم مشاهدات مشابهی در رابطه با جدایه‌های فلفل در مطالعات قبلی به دست آوردند. *اسلام و همکاران* تفاوت‌های معنی‌داری میان جدایه‌های کدو تنبل در ایلی

نویز مشاهده کردند. مشاهدات ایشان با یافته‌های *ریستانو و لی*(Ristaino 1990 & Lee *et al.* 2001) مبنی بر وجود تفاوت در پرآزاری میان جدایه‌های فلفل و کدو مطابقت دارد.

در نهایت می توان این گونه بیان کرد که *P. capsici* دارای جمعیت‌های متنوع ژنتیکی و دامنه میزبانی وسیعی است. از این رو بررسی دقیق ویژگی‌های این بیمارگر از جمله نحوه زمستان‌گذرانی، تشکیل کلامیدوسپور، فراوانی تیپ آمیزشی و شناسایی میزبان‌های آن الزامی است.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (49-47) متن انگلیسی مراجعه شود.