تفاوت‌های دامنه میزبانی، تکثیر و بذربردی جمعیت‌هایی از نماتود ساقه و پیاز *Ditylenchus dipsaci* در ایران *

HOST RANGES VARIABILITIES, MULTIPLICATION AND SEED-BORNE ABILITY OF SOME POPULATIONS OF STEM AND BULB NEMATODE, *Ditylenchus Dipsaci* IN IRAN

مریم فصیحی[۱]، زهرا تنها معافی[۲]**، اکبر کارگر بیده و علی اسکندری

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۲/۵؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۴/۱۶)

چکیده

نمونه‌های آلوده به نماتود ساقه و پیاز *Ditylenchus dipsaci* از گیاهان یونجه و بوته‌های سیر از تعدادی از مزارع استان‌های همدان، زنجان، تهران، اصفهان، مازندران و خراسان رضوی جمع‌آوری شد. پس از استخراج نماتود از اندام‌های گیاهی به منظور تهیه زادمایه مورد نیاز سه جمعیت جدا شده از سیر و چهار جمعیت از یونجه روی دیسک هویج کشت داده شدند. دامنه میزبانی جمعیت‌های سیر روی گیاهان سیر، پیاز، یونجه، لوبیا، باقلا، چغندرقند، نخودفرنگی و سویا بررسی شد. برای جمعیت یونجه از گیاهان یونجه، یونجه زرد، لوبیا، اسپرس، سیر، پیاز و شبدر استفاده گردید. گیاهچه‌ها با ۲۰۰ نماتود شناور در سوسپانسیون ۱۰ میکرولیتری کربوکسی‌متیل‌سلولز (CMC) که در زاویه برگی قرار داده شد مایه‌زنی شدند. مایه‌زنی با فاصله زمانی یک هفته تکرار شد. گیاهان به مدت هشت هفته در شرایط ۱۶ ساعت نور و هشت ساعت تاریکی در دمای ۲۰±۲ $^{\circ}C$ نگهداری شدند و پس از این مدت اندام‌های هوایی آنها بررسی شد. تمامی جمعیت‌ها توانستند روی دیسک هویج به خوبی رشد یافته و تکثیر شوند. نتایج نشان داد که گیاهان پیاز، سیر میزبان مناسب، گیاهان نخودفرنگی، چغندرقند و لوبیا (دو جمعیت) میزبان ضعیف برای جمعیت سیر بودند، ولی سویا، باقلا و یونجه میزبان این جمعیت نبودند. جمعیت یونجه بر روی لوبیا، یونجه و نیمی از موارد روی یونجه زرد به خوبی تکثیر یافته، در حالی که شبدر میزبان ضعیف و اسپرس و سیر غیرمیزبان بودند. بر اساس این بررسی وجود حداقل دو نژاد از این نماتود در ایران تأیید می‌شود. در آزمایشی دیگر آلوده شدن گل آذین و وجود نماتودهای بالغ و لارو سن چهارم در بذور پیاز، بذربرد بودن نماتود *D. dipsaci* را در پیاز نشان داد. در این بررسی هم‌چنین مشخص شد که نماتود *D. dipsaci* به طور وسیعی در مناطق تحت کشت سیر کشور گسترش داشته و می‌تواند به عنوان یکی از عوامل مؤثر در کاهش محصول این گیاه دخالت داشته باشد.

واژه‌های کلیدی بذربرد، پیاز، دامنه میزبانی، سیر، نماتود ساقه و پیاز، *Ditylenchus dipsaci*.

---

*: بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نویسنده اول ارائه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان

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

۱. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان

۲. دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور

۳. دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

۴. استادیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان

مقدمه

گونه *D. dipsaci* از نماتودهای انگل داخلی مهاجر است که قسمت‌های هوائی و پیاز حدود ۴۰۰ گونه گیاهی را مورد حمله قرار می‌دهد. تاکنون حدود ۳۰ نژاد بیولوژیکی برای این نماتودبا توجه به ترجیح میزبانی متفاوت شناسایی شده است (Sturhan & Brzeski 1991).

موقعیت تاکسونومی این جمعیت‌ها هنوز ناشناخته مانده، اگر چه تفاوت در تعداد کروموزم‌ها (2n = 12-60) مشخص شده است (Sturhan & Brzeski 1991). خصوصاً موقعیت نژاد غول‌آسا (Giant) که از نظر مرفولوژی نیز متفاوت است هنوز شرح داده نشده است (Esquibet *et al*. 2003).

نماتود *D. dipsaci* در ایران از خاک اطراف گیاهان چای، چغندرقند، یونجه، نخود، شبدر، گندم و هم‌چنین از گیاه یونجه و سیر گزارش شده است و گسترش نسبتاً وسیعی در تعدادی از مناطق دارد (Kheiri 1972، شرفه ۱۹۸۶، *اخیانی و همکاران* ۱۹۹۳، *باروتی و همکاران* ۲۰۰۰، *گیتی و باروتی* ۲۰۰۴).

در دنیا تحقیقات فراوانی روی این نماتود انجام شده است. در مطالعه دامنه میزبانی و رشد دو جمعیت از نماتود ساقه و پیاز روی پیاز، سیر، تره‌فرنگی اسفناج و کرفس، مشاهده شد که نماتودهای جمعیت کرفس روی پیاز و تره‌فرنگی و هم‌چنین جمعیت سیر روی اسفناج و تره‌فرنگی دوام نیاوردند (Douda 2005). در تحقیقی دیگر، با استفاده از الکتروفورز پروتئین (SDS-Electrophores) تفاوت‌هایی بین دو جمعیت *D. dipsaci* جدا شده از سیر و پیاز مشاهده شد که این امر می‌تواند حاکی از وجود ژنوتیپ های متفاوت در آنها باشد (Palazova & Baicheva 2002). در آزمایش دیگری ۲۲ جمعیت *D. dipsaci* جمع‌آوری شده از نقاط مختلف جغرافیایی تفاوت مشخصی را بین جمعیت‌های نژاد معمول و نژاد غول‌آسا با استفاده از روش RFLP نشان دادند (Esquibet *et al*. 2003).

هدف از انجام این تحقیق بررسی کشت این نماتد روی دیسک هویج، تعیین دامنه میزبانی تعدادی از جمعیت‌های نماتود *D. dipsaci* جدا شده از گیاهان سیر و یونجه و مشخص کردن نژادهای موجود این نماتود در کشور و هم‌چنین تعیین بذربردی نژاد سیر در پیاز بود.

روش بررسی

چهار نمونه گیاه یونجه آلوده به *D. dipsaci* از استان‌های همدان، تهران، زنجان و اصفهان و سه نمونه گیاه سیر آلوده از استان‌های خراسان رضوی، زنجان و همدان جمع‌آوری گردید. نماتودها با استفاده از روش سینی (Whitehead & Hemming 1965) از بافت‌های گیاهی استخراج شدند. به منظور تأمین جمعیت مورد نیاز، نماتودها روی دیسک هویج کشت شدند (Kühnhold *et al*. 2006) و تشتک‌ها به مدت چهار ماه در انکوباتور با دمای ۱±۲۰°C نگهداری شدند. بعد از سپری شدن این مدت زمان نماتودها با روش تغییر یافته بیرمن از دیسک‌های هویج استخراج شده و تا زمان انجام آزمایش در دمای ۴°C نگهداری شدند.

با توجه به منبع (Sturhan & Brzeski 1991) برای هر جمعیت گیاهان میزبان افتراقی مشخص شد. بذرهای گیاهان سیر، پیاز، باقلا، لوبیا، سویا، نخودفرنگی، چغندرقند و یونجه برای جمعیت سیر، و یونجه، شبدر، یونجه زرد، اسپرس، لوبیا، سیر و پیاز برای جمعیت یونجه در گلدان‌هائی با حجم ۲۵۰ سانتی‌متر مکعب حاوی خاک

سترون، شامل دو قسمت خاک مزرعه، یک قسمت پرلیت کشت گردید. گیاهان در مرحله دو تا سه برگی با استفاده از روش *پلورایت و همکاران* (Plowright *et al*. 2002) مایه‌زنی شدند. برای هر گیاه تعداد ۱۰۰ عدد نماتود (بالغ و مراحل لاروی) در سوسپانسیونی حاوی ۱۰ ماکرولیتر کربوکسی متیل سلولز ۲٪ (CMC) در زاویه برگی قرارداده شد. یک‌نواختی سوسپانسیون با شمارش اولین و آخرین قطره تأیید و برای دستیابی به این امر در تمام مدت مایه‌زنی، سوسپانسیون به هم زده شد. برای تامین رطوبت مورد نیاز، به مدت یک هفته از دستگاه رطوبت ساز و پلاستیک شفاف استفاده گردید. برای جلوگیری از فرار گیاهان از آلودگی، یک هفته بعد مجدداً مایه‌زنی گیاهان تکرار شد. گیاهان به مدت هشت هفته در اتاقک رشد با شرایط ۱۶ ساعت نور، هشت ساعت تاریکی و دمای ۲°C ±۲۰ و رطوبت مناسب نگهداری شدند. برای بررسی علائم ناشی از آلودگی از هفته سوم به بعد علائم مشاهده شده در اندام‌های هوایی یادداشت‌برداری شد. بعد از هشت هفته قسمت‌های هوایی گیاهان از قسمت طوقه به بعد برداشت شده و نماتودها با روش‌های ذکر شده جداسازی شدند و میزان جمعیت نماتود به تفکیک لارو، ماده و نر بالغ تعیین شدند.

به منظور بررسی بذربرد بودن نماتود ساقه در پیاز، سه عدد پیاز انباری سالم درون گلدان‌های ۵۰۰ سانتی‌متر مکعب حاوی سه قسمت خاک مرزعه سترون، یک قسمت پرلیت کشت داده شد. پس از ظاهر شدن برگ‌ها گیاهان توسط ۵۰ عدد نماتود از جمعیت جدا شده از سیر مطابق روش مورد استفاده برای آزمون تعیین دامنه میزبانی مایه‌زنی شدند. پیازها پس از پنج ماه به گل رفته و بذرهای آنها برای تعیین وجود نماتود بررسی شد.

نتایج

تمامی جمعیت‌ها توانستند بر روی دیسک هویج به خوبی رشد یافته و تکثیر شوند. نتایج آزمایش نشان داد که هر سه جمعیت سیر جمع‌آوری شده از خراسان رضوی، زنجان و همدان پس از هشت هفته روی همه گیاهان مورد مطالعه، به جز سویا تکثیر شدند (جدول ۱).

در آزمایش میزبانی جمعیت یونجه به دلیل آلودگی گیاهان آزمایشی دو جمعیت همدان و تهران به کنه دو نقطه‌ای و عدم استفاده از سموم حشره‌کش در کنترل آن به سبب آسیب‌پذیر بودن احتمالی نماتود، اجباراً در هفته چهارم، برداشت صورت گرفت. دو جمعیت همدان (1A) و تهران (2A) بیشترین تکثیر را روی لوبیا داشتند، جمعیت‌های زنجان (3A) و اصفهان (4A) نیز روی گیاه لوبیا به خوبی تکثیر یافتند، این جمعیت‌ها روی گیاهان یونجه و یونجه زرد نیز با میانگین تولیدمثل بیشتر از یک افزایش یافتند (جدول ۲).

علائم آلودگی روی گیاهان پیاز، یونجه و لوبیا به خوبی بعد از چهار هفته قابل مشاهده بود. گیاهان پیاز مایه‌زنی شده با جمعیت سیر دارای کم رشدی، بدشکلی، پایین آمدن میزان تورژسانس در برگ‌ها و پوسیدگی فلس‌ها بودند. علائم در یونجه آلوده شده با جمعیت یونجه به صورت کوتاهی و کم شدن فاصله میان‌گره‌ها دیده شد. گیاهان لوبیا مایه‌زنی شده با جمعیت جدا شده از یونجه دارای بدشکلی برگ‌ها و نکروز دمبرگ در محل مایه‌زنی و هم‌چنین ایجاد حالت روزت و کم شدن فاصله میان‌گره‌ها در همان محل بودند.

نتایج آزمون بذربردی نماتود *D. dipsaci* در پیاز نشان داد که گل آذین پیاز آلوده به نماتود ساقه شده و نماتودهای بالغ و لارو سن چهارم از بذرهای پیاز جدا شدند.

بحث

تکثیر نماتود *D. dipsaci* معمولاً روی بافت کالوس یونجه انجام می شود (Faulkner *et al*. 1974) اما این روش مشکل و پرهزینه است. در این آزمایش از دیسک هویج به عنوان محیط رشد و تکثیر نماتود استفاده شد، که روشی نسبتا ساده و کم هزینه و دارای راندمان تکثیر بالائی است، به علاوه سوسپانسیون نماتود را پس از استخراج می‌توان در دمای ۴ °C به مدت ۴-۶ هفته نگهداری کرد بدون اینکه قابلیت زیستی و بیماری‌زایی آن کاهش یابد (Kühnhold *et al*. 2006).

روش معمول مایه‌زنی گیاهان با نماتود، افزودن آن به خاک است اما در مورد این نماتود قرار دادن آن در زاویه برگی گیاهچه موجب نفوذ سریع و مؤثرتر نماتود می‌شود، به طوری که درصد نفوذ نماتود به گیاه در مایه‌زنی اندام هوایی ۳۴-۹۶٪ و در کاربرد در خاک ۴-۱۱٪ مشاهده شده است (Kühnhold *et al*. 2006). در این بررسی نیز با مایه زنی نماتد در زاویه برگی و تامین رطوبت در هفته اول تلقیح موجب نفوذ سریعتر و بهتر نماتد فراهم گردید.

در مایه‌زنی گیاهان در آزمایشات تعیین دامنه میزبانی از CMC (کربوکسی متیل سلولز) استفاده گردید، رشد و تکثیر نماتود در گیاهان میزبان مایه‌زنی شده، نشان دهنده استفاده از روش مایه‌زنی صحیح و تأمین شرایط محیطی مناسب بود. این روش توسط تعدادی از محققین توصیه شده است (Plowright *et al*. 2002, Douda 2005, Kühnhold *et al*. 2006). این ترکیب در مقایسه با آب با دارا بودن خاصیت چسبندگی خود به خوبی نماتودها را در سطح گیاه نگهداری کرده و چون کشش سطحی پایینی دارد نماتودها در آن به راحتی در زاویه برگی ته نشین شده و به تدریج به گیاه نفوذ می‌کنند، هم‌چنین نسبت به آب دیرتر خشک شده در نتیجه به نماتودها فرصت بیشتری برای نفوذ می‌دهد.

در آزمایش‌های تعیین دامنه میزبانی گیاهان پیاز، سیر و لوبیا میزبان مناسب، گیاهان نخود فرنگی، چغندر قند و لوبیا (در مورد دو جمعیت) میزبان ضعیف برای جمعیت سیر می‌باشند، اما سویا میزبان این جمعیت نبود. گرچه تأثیر و اهمیت نماتود ساقه روی این گیاهان نامشخص بوده و نیاز به تحقیقات بیشتری دارد ولی آنچه مسلم است استفاده از پیاز و سیر و لوبیا در گردش زراعی باعث افزایش جمعیت نژاد سیر نماتود *D. dipsaci* در مزارع خواهد شد.

افزایش جمعیت نماتود در گیاهان لوبیا و یونجه نشان داد که این گیاهان میزبان مناسب برای نژاد یونجه، در حالی که گیاه یونجه زرد و شبدر میزبان ضعیف و اسپرس میزبان این نژاد نبود. با توجه به قدرت تکثیر بالای نژاد یونجه و هم‌چنین یکی از نژادهای سیر در گیاه لوبیا این گیاه به عنوان میزبان حساس به این نژادها معرفی می‌گردد و پیشنهاد می‌شود تحقیقاتی از جمله بررسی عکس‌العمل ارقام معمول لوبیا نسبت به هر دو نژاد در شرایط گلخانه و مزرعه انجام و اهمیت این نماتود روی این محصول بررسی گردد.

در این تحقیق عکس‌العمل گیاه یونجه نسبت به جمعیت سیر منفی بود و جمعیت نژاد سیر نیز نتوانست در این میزبان زنده مانده و تکثیر گردد و هم‌چنین جمعیت یونجه نیز نتوانست روی گیاه سیر تکثیر یابد، بر اساس این دست آوردها لازم است بررسی‌های مزرعه‌ای در ارتباط با کاشت این دو گیاه در مزارع آلوده به نماتود ساقه انجام شود. وجود نماتودهای بالغ و لارو سن چهارم در بذرهای پیاز حاکی از بذرزاد بودن نژاد سیر نماتود *D. dipsaci* در

این میزبان بود. بذربرد بودن این نماتود و قابلیت انتقال آن از طریق بذر پیاز به خصوص در مزارع پیاز بذری علاوه بر تولید گیاه ناسالم از نظر انتشار و گسترش این عامل به عنوان منبع آلودگی اولیه حائز اهمیت است. در این بررسی مشخص شد که نماتود *D. dipsaci* به طور وسیعی در مناطق تحت کشت سیر و یونجه کشور گسترش داشته و می‌تواند به عنوان یکی از عوامل مؤثر در کاهش محصول این گیاهان دخالت داشته باشد.با توجه به نتایج آزمایش و تکثیر نماتود بر روی گیاهان میزبان می‌توان وجود حداقل دو نژاد یونجه و پیاز را در ایران تأئید کرد.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (52-51) متن انگلیسی مراجعه شود.