مجله به‌نژادی نهال و بذر
جلد ۱-۳۰، شماره ۱، سال ۱۳۹۳

تنوع بیماری‌زائی جدایه‌های *Macrophomina phaseolina* و مقاومت ژنوتیپ‌های سویا نسبت به این قارچ در شرایط درون شیشه ای و گلخانه

Pathogenic Variation of *Macrophomina phaseolina* Isolates and Resistance of Soybean Genotypes to the Fungus *In vitro* and Greenhouse Conditions

پریسا همتی[۱]، دوستمراد ظفری[۲]، سیدباقر محمودی[۳] و مجید هاشمی[۴]

۱ و ۲- به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشیار، گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان
۳- دانشیار، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندر قند، کرج
۴- استادیار، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۴/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۰/۵

چکیده

همتی، پ.، ظفری، د.، محمودی، س. ب. و هاشمی، م. ۱۳۹۳. تنوع بیماری‌زائی جدایه‌های *Macrophomina phaseolina* و مقاومت ژنوتیپ‌های سویا نسبت به این قارچ در شرایط درون شیشه ای و گلخانه. **مجله به‌نژادی نهال و بذر ۱-۳۰:** ۲۲۰ - ۲۰۷.

بیماری پوسیدگی ذغالی سویاکه توسط قارچ *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid ایجاد می‌شود، یکی از بیماری‌های مهم سویا در ایران است. برای شناسایی ژنوتیپ‌های مقاوم به بیمارگر جدایه‌هائی با بیماریزایی بالا و روش‌های مطمئن ارزیابی مقاومت لازم است. در این تحقیق بیماری‌زایی ۳۲ جدایه عامل این بیماری در شرایط درون شیشه‌ای مورد بررسی قرار گرفت و جدایه So. 3 به عنوان بیماری‌زاترین جدایه شناخته شد. مقاومت هفت ژنوتیپ سویا نسبت به جدایه انتخاب شده در شرایط درون شیشه‌ای و گلخانه و به دو روش آلوده‌سازی متفاوت برش ساقه و ایجاد زخم ارزیابی شد. ژنوتیپ‌های سویا، در هر دو روش از نظر شاخص بیماری‌زائی اختلاف معنی‌داری در سطح ۱٪ نشان دادند. در هر دو روش، ارقام هاچستون، ساری، همیلتون و کتول در مقایسه با سایر ارقام آلودگی کمتری نشان دادند. ژنوتیپ هاچستون با کمترین شاخص بیماری‌زائی در مرحله گیاهچه‌ای، به عنوان مقاوم‌ترین ژنوتیپ به بیمارگر شناسائی شد. ژنوتیپ‌های L.17 و ویلیامز هم با بالاترین میزان آلودگی به عنوان حساس‌ترین ژنوتیپ‌ها ارزیابی شدند.

واژه‌های کلیدی: سویا، ژنوتیپ‌ها، پوسیدگی ذغالی، مقاومت، شاخص بیماری‌زائی، روش آلوده‌سازی.

نویسنده مسئول: zafari_d @yahoo.com تلفن: ۰۸۱۱۴۴۲۴۱۹۱

مقدمه

پوسیدگی ذغالی یکی از بیماری‌های مهم سویا است که سبب بروز خسارات اقتصادی زیادی به سویا می‌شود. این بیماری به خصوص در سال‌های خشک و کم باران، باعث آلودگی مزارع سویا و کاهش کیفیت و کمیت محصول آن می‌شود(Smith and Wyllie, 1999).

تمام اندام‌های سویا به آلودگی ناشی از بیمارگر حساس هستند. علایم بیماری پوسیدگی ذغالی در اندام‌های هوائی سویا، بعد از مرحله گل‌دهی و خصوصاً در مراحل زایشی R_5، R_6 و R_7 (مراحل تشکیل غلاف و دانه‌ها) مشاهده می‌شود (Wyllie, 1989). این علائم شامل پژمردگی گیاه و افتادگی شاخه‌ها است که به علت مسدود شدن آوندهاتوسط اندام‌های قارچی ایجاد می‌شود. نکروز بافت‌های آلوده از دیگر علائم این بیماری است (Smith and Wyllie, 1999).

جدایه‌های مختلف *M. phaseolina* تنوع مورفولوژیکی، بیماری‌زایی، فیزیولوژیکی و ژنتیکی بالایی نشان می‌دهند، به همین خاطر می‌توانند شرایط مختلف محیطی، را تحمل و دامنه وسیعی از گیاهان را آلوده کنند. عواملی از قبیل خاکزاد بودن بیمارگر، توانائی بالای تولید میکرواسکلروت ودامنه میزبانی بالا، کنترل این بیمارگر را با مشکل مواجه کرده است و اغلب روش‌های کنترلی آن به شکست منتهی می‌شوند. به همین دلیل استفاده از روش‌های کنترل زراعی مانند تناوب و اعمال اقدامات بهداشت کشت در بیشتر موارد تاثیری در کاهش خسارت ناشی از این قارچ ندارد (Smith and Wyllie, 1999). استفاده از قارچ‌کش‌ها نیز علاوه بر افزایش خطر ظهور نژادهای متحمل بیمارگر و آلودگی محیط زیست، اثر ناچیزی بر کنترل این بیماری داشته‌اند (Siddiqui and Mahmood, 1993)، بنابراین مقاومت ژنتیکی میزبان تنها روش موثر برای کنترل این بیماری است (Smith and Wyllie, 1999). با توجه به ماهیت خاکزاد و بذرزاد بودن بیمارگر (Mihail and Alcorn, 1987)، شناسایی و کشت ارقام متحمل، می‌تواندجمعیت آن را به میزان زیادی کاهش داده و بیماری را تا حد زیادی کنترل کند.

تنوع بیماریزایی بالای موجود در بین جدایه‌های مختلف *M. phaseolina* امکان شناسائی ژنوتیپ‌های مقاوم به بیماری پوسیدگی ذغالی را با مشکل مواجه کرده است (Todd *et al.*, 1987). هر گونه برنامه مدیریتی برای کاهش خسارت بیماری‌های خاکزاد از جمله استفاده از ارقام مقاوم، نیاز به شناخت کافی از ساختار ژنتیکی، رفتار بیماری‌زایی (Mahmoodi *et al.*, 2004) و تشخیص پراکنش جمعیتی (Ryes-Franco *et al.*, 2006) بیمارگر دارد. در صورت وجود تنوع در بیماری‌زایی، نیاز به انتخاب جدایه‌های نماینده غالب هست تا بتوان از آن‌ها در برنامه‌های به‌نژادی و

انتخاب ژرم‌پلاسم مقاوم بهره جست (Mahmoodi *et al.*, 2004).

یافتن منابع جدید مقاومت به بیمارگرهای گیاهی، نیازمند استفاده از روش‌های کارآمد برای سنجش بیماری است. تا به امروز، اغلب مطالعات سنجش مقاومت ژرم‌پلاسم سویا به *M. phaseolina*در مزرعه انجام شده است (Mengistu *et al.*, 2007, 2011؛ Smith and Carvil, 1997؛ Bowen and Schapaugh, 1989؛ Bristow and Wyllie, 1984). در اغلب ارزیابی‌های مزرعه‌ای، به علت تنوع موجود در بین مزارع مختلف از نظر خصوصیات خاک زراعی، میکروفلور متنوع در خاک‌های گوناگون که می‌توانند با قارچ عامل بیماری برهمکنش داشته باشند و همچنین اختلافات میکروکلیمائی در مزارعی که در مناطق دور از هم واقع شده‌اند، نتایج متفاوتی حاصل می‌شود (Twizeyimana *et al.*, 2012). به دلیل عدم وجود یک روش استاندارد برای آلوده‌سازی گیاهان در مزارع، در آزمایش‌های مزرعه‌ای اغلب از کشت گیاهان در خاک‌های آلوده استفاده می‌شود.آزمایش‌های مزرعه‌ای که بر پایه زادمایه موجود در خاک انجام می‌شوند، فاقد دقت کافی در تشخیص اختلافات حقیقی موجود بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی هستند. تراکم ناهمگون و پراکنش غیر تصادفی زادمایه بیماری بین و درون مزارع از مهم‌ترین علل این کاهش دقت هستند (Mihail and Alcorn, 1987).

در ارزیابی‌های مزرعه‌ای ژنوتیپ‌های سویا، بلوغ (رسیدگی) گیاه در زمان بروز علائم موثر است و اغلب این بررسی‌هادر مرحله رشدی R_7 انجام می‌شوند (Fehr *et al.*, 1971). در ارزیابی‌های مزرعه‌ای، تعداد زیادی ژنوتیپ گیاهی با هم در یک زمان کاشته می‌شوند و تمامی این ژنوتیپ‌ها در زمان یکسان مورد ارزیابی قرار می‌گیرند.این در حالی است که اغلب این ژنوتیپ‌ها زمان رسیدگی مشابهی ندارند و ممکن است ژنوتیپ‌های متفاوت در مراحل رشدی مختلفی آلوده شوند و واکنش‌های نامناسبی در برابر عامل بیماری از خود نشان دهند. همچنین در اغلب موارد، تنها امکان انجام یک آزمایش مزرعه‌ای در هر فصل وجود دارد. بنابراین اغلب نتایج حاصل تحت این شرایط، متغییر و غیرقابل استنادخواهد بود (Twizeyimana *et al.*, 2012). این قبیل محدودیت‌های موجود در آزمایش‌های مزرعه‌ای، ممکن است فرآیند تشخیص منابع گیاهی مقاوم به بیماری پوسیدگی ذغالی را با اشکال مواجه کند.

ارزیابی‌هایی که در شرایط کنترل شده محیطی انجام می‌شوند، می‌توانند محدودیت‌های آزمایش مزرعه‌ای را برطرف کنند. ارزیابی مقاومت ژنوتیپ‌های سویا به بیماری پوسیدگی ذغالی در گلخانه با استفاده از گیاهان بالغ (Surrette *et al.*, 2006) و یا گیاهچه‌های سویا

(Bristow and Wyllie, 1984)انجام شده ولی تاکنون به طور گسترده مورد استفاده قرار نگرفته‌اند (Twizeyimana *et al.*, 2012).

با توجه به اهمیت بیماری پوسیدگی ذغالی در ایران (Raeyatpanah *et al.*, 2002) و دامنه میزبانی وسیع آن روی گیاهان زراعی، این تحقیق با هدف بررسی تنوع بیماریزائی جدایه‌های مختلف *Macrophomina phaseolina* روی سویا وواکنش ژنوتیپ‌های سویابه آن با دو روش گلخانه‌ای (برش ساقه و ایجاد زخم روی ساقه گیاه) و یک روش درون شیشه انجام شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و خالص‌سازی جدایه ها

گیاهان سویا، آفتابگردان، کنجد و چغندرقند دارای علائم بیماری (سیاه شدن پائین ساقه، پژمردگی و وجود میکرواسکلروت روی سطح پوست طوقه و ریشه)، از واحد بیماری‌شناسی بخش تحقیقات دانه‌های روغنی موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذردریافت شدند. برای جداسازی قارچ، بافت‌های آلوده به قطعات کوچک ۱۰-۶ میلی‌متری بریده شده و برای ضدعفونی سطحی به مدت پنج دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۵٪ قرار گرفتند. به منظور حذف ماده ضدعفونی کننده از سطح بافت‌ها، قطعات گیاهی سه مرتبه درآب مقطراستریل شستشو داده شدند، سپس آب اضافی بافت‌ها با کاغذ خشک‌کن استریل حذف و به محیط کشت سیب‌زمینی- دکستروز- آگار (PDA) منتقل شدند.

برای خالص‌سازی جدایه‌های قارچ از روش تک‌اسکلروت کردن (Barnet and Hanter, 1972) استفاده شد.

بررسی تنوع بیماری‌زایی جدایه‌های مختلف در شرایط درون شیشه‌ای

بیماری‌زایی جدایه‌ها در تشتک پتری و با استفاده از بذرهای سویا رقم حساس ویلیامز مورد بررسی قرار گرفت (Manici *et al.*,1995) و شدت بیماری‌زائی جدایه‌ها با بررسی تاثیر آن‌ها روی جوانه‌زنی بذرها، اندازه‌گیری شد.به این منظور، یک پلاگ ۵ میلی‌متری از حاشیه کشت هفت روزه جدایه‌ها روی محیط‌های کشت PDA قرار داده شد. کشت‌ها در انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت پنج روز نگهداری شدند. سپس ده بذر ضدعفونی شده از هر ژنوتیپ، در حاشیه محیط کشت و در شعاع ۶ سانتی‌متری از مرکز تشتک‌های پتری قرار داده شد. تشتک‌هابه مدت پنج روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بعد از این مدت، بذرها از نظر علایم ایجاد شده توسط بیمارگر بررسی و این علائم در مقیاس ۵-۰ به شرح زیر اندازه‌گیری شدند: صفر: بذر سالم؛ ۱:بی‌رنگی قسمتی از جوانه در تماس با قارچ؛ ۲: پوشش سطح بذر با میسلیوم و میکرواسکلروت‌های قارچ و سالم بودن جوانه؛ ۳: پوسته بذر عاری از قارچ و آلوده

بودن جوانه؛ ۴:آلوده بودن پوسته بذر و جوانه و ۵: آلوده بودن کامل بذر و عدم جوانه‌زنی آن(Manici *et al.*, 1995). در انتها نیز شاخص بیماری‌زائی(Pathogenicity Index: PI) برای هر جدایه با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$PI = \sum_{i=0}^{n} (I \times Xi) / \sum_{i=0}^{n} Xi$$

در این فرمول، I: درجه بیماری‌زایی(۵-۰) یادداشت‌برداری شده وXi: تعداد بذرهای آلوده هستند.

در این ارزیابی2 ≤PI: بیماری‌زائی پائین، 4 < PI ≤ 5 و 2<I ≤ 4 : بیماری‌زائی متوسط بیماری‌زائی بالا در نظر گرفته شد.

یک تشتک پتری حاوی محیط کشت و فاقد پلاگ قارچ به عنوان شاهد برای هر تیمار استفاده شد و ده بذر از رقم حساس ویلیامز به روش قبلی روی سطح تشتک پتری قرار گرفت و تشتک‌ها در شرایط محیطی مشابه قرار داده شدند.

ارزیابی مقاومت ژنوتیپ‌های مختلف سویا به قارچ *M. phaseolina*

واکنش هفت ژنوتیپ سویا، با استفاده از یک روش درون شیشه و دو روش گلخانه‌ای نسبت به *M. Phaseolina* مورد بررسی قرار گرفت.

ارزیابی مقاومت ژنوتیپ‌ها در شرایط درون شیشه

برای سنجش مقاومت ژنوتیپ‌های مختلف در شرایط درون شیشه، از روش مانی چی و همکاران(Manici *et al.*, 1995) با کمی تغییرات استفاده شد. به این منظور، یک پلاگ ۵ میلی‌متری از کشت پنج روزه بیماری‌زاترین جدایه (S0.3) در مرکز تشتک‌های حاوی محیط کشت PDA قرار داده شد. کشت‌ها درانکوباتور و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و هفت روز بعد، ده بذر از ژنوتیپ های مورد بررسی، پس از ضدعفونی در شعاع ۵ سانتی‌متری از مرکز پرگنه قارچ به صورت دایره‌ای چیده شدند.آزمایش برای هر ژنوتیپ در سه تکرار انجام شد. سپس تشتک‌های حاوی بذر و قارچ به مدت پنج روز، در انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

در روز پنجم شاخص بیماریزائی جدایه ها با روش Manici *et al.* (1995) محاسبه شد.

ارزیابی مقاومت ژنوتیپ‌های سویا در شرایط گلخانه

در گلخانه دو روش مایه‌زنی شامل آلوده‌سازی ساقه بریده و آلوده‌سازی ساقه با خلال دندان‌های آلوده برای ارزیابی مقاومت ژنوتیپ‌های سویا استفاده شد. در روش ساقه بریده، محور ساقه گیاهان دو تا سه هفته‌ای سویا در مرحله رشدی V_2 (مرحله ظهور دو برگ سه برگچه‌ای) از ناحیه ۲۵میلی‌متری بالای گره‌ای که اولین برگ سه برگچه‌ای از آن خارج شده بود، بریده شد. یک سر سمپلر ۲۰۰ -۱۰

میکرولیتری، در حاشیه محیط کشت PDA حاوی پرگنه در حال رشد قارچ *M. phaseolina* قرار داده شد و یک قطعه دایره‌ای حاوی میسلیوم‌های قارچ و آگار بریده و جدا شد. قطعه حاوی آگار و میسلیوم‌های قارچ، در بالای برش ساقه قرار گرفت به طوری‌که ساقه کاملاً توسط محیط کشت و قارچ پوشیده شود (Twizeyimana *et al.*, 2012). سه روز بعد از آلوده‌سازی، قطعه آگار از روی ساقه گیاهان برداشته و هفت روز بعد از آلودگی نکروز طولی ایجاد شده در نتیجه آلودگی توسط بیمارگر، با خط‌کش اندازه‌گیری شد.

در روش آلوده‌سازی ساقه گیاهان با خلال دندان‌های آلوده، یک قطعه پنج میلی‌متری از کلنی پنج روزه قارچ روی محیط کشت PDA قرار گرفت. چهار روز بعد، خلال دندان‌های استریل روی سطح محیط کشت قرار داده شد. برای این منظور، ابتدا خلال دندان‌ها در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۵ دقیقه در فشار ۱/۵ بار استریل (Edmonds, 1964) و هفت روز روی سطح محیط کشت نگهداری شدند. خلال دندان‌های حاوی میکرواسکلروت‌های قارچ حدود ۱۰ سانتی‌متربالای سطح خاک، در ساقه گیاهان یک ماهه فرو برده شدند(Singleton *et al.*, 1992). هفت روز بعد از آلوده‌سازی، طول زخم ایجاد شده با استفاده از خط‌کش اندازه‌گیری شد.

داده‌های به دست آمده از آزمایش‌ها به روش تجزیه واریانس (ANOVA) تجزیه شدند و میانگین تیمارها به کمک آزمون دانکن، با نرم‌افزارSAS و تجزیه کلاستر با استفاده از روش Single Linkage و نرم‌افزار SPSS ver.17 انجام شد.

نتایج و بحث

در این بررسی در مجموع ۳۲ جدایه قارچ *M. phaseolina* جداسازی شدند (جدول۱). از این تعداد، ۱۲ جدایه از سویا، هفت جدایه از کنجد، ۱۱ جدایه از آفتابگردان و دوجدایه از چغندرقند تهیه شدند.

بررسی تنوع بیماری‌زائی جدایه‌ها

در بین جدایه‌های مختلف *M. phaseolina* از نظر شاخص بیماری‌زایی، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ وجود داشت (جدول ۲). در روش درون شیشه‌ای، جدایه‌های با شاخص بیماری‌زائی بالاتر، قدرت کلنیزه کردن بالاتری داشتند و کاملاً سطح بذرها را توسط ریسه‌های خود پوشاندند، در نتیجه بذرها قدرت جوانه‌زنی خود را از دست دادند. در مقابل جدایه‌های با قدرت بیماری‌زائی کمتر تنها سبب بی‌رنگ شدن قسمتی از جوانه شدند ولی مانع جوانه‌زنی بذر نشدند. به عبارت بهتر در مقایسه با جدایه‌های با شاخص بیماریزائی بالاتر، این جدایه‌ها قدرت کلنیزاسیون کمتری داشتند.

جدایه‌های Se.11، Se.17، Su.22، Sb.31 و

جدول ۱- مشخصات جدایه‌های مختلف قارچ *Macrophomina phaseolina*

Table 1. Characteristics of different isolates of *Macrophomina phaseolina*

شماره No.	نام جدایه Isolate name	محل جمع‌آوری Location		میزبان Host	
1	So.1	Gorgan	گرگان	*Glycine max*	سویا
2	So.2	Ghaemshahr	قائم‌شهر	*Glycine max*	سویا
3	So.3	Babolsar	بابلسر	*Glycine max*	سویا
4	So.4	Joybar	جویبار	*Glycine max*	سویا
5	So.5	Sari	ساری	*Glycine max*	سویا
6	So.6	Gorgan	گرگان	*Glycine max*	سویا
7	So.7	Gonbad	گنبد	*Glycine max*	سویا
8	So.8	Karaj	کرج	*Glycine max*	سویا
9	So.9	Karaj	کرج	*Glycine max*	سویا
10	So.10	Mazandaran	مازندران	*Glycine max*	سویا
11	Se.11	Karaj	کرج	*Sesamumindicum*	کنجد
12	Se.12	Borazjan	برازجان	*Sesamumindicum*	کنجد
13	Se.13	Joybar	جویبار	*Sesamumindicum*	کنجد
14	Se.14	Gorgan	گرگان	*Sesamumindicum*	کنجد
15	Se.15	Varamin	ورامین	*Sesamumindicum*	کنجد
16	Se.16	Ramhormoz	رامهرمز	*Sesamumindicum*	کنجد
17	Se.17	Karaj	کرج	*Sesamumindicum*	کنجد
18	Su.18	Varamin	ورامین	*Helianthus annuus*	آفتابگردان
19	Su.19	Varamin	ورامین	*Helianthus annuus*	آفتابگردان
20	Su.20	Karaj	کرج	*Helianthus annuus*	آفتابگردان
21	Su.21	Gonbad	گنبد	*Helianthus annuus*	آفتابگردان
22	Su.22	Gonbad	گنبد	*Helianthus annuus*	آفتابگردان
23	Su.23	hehr	بوشهر	*Helianthus annuus*	آفتابگردان
24	Su.24	Kermanshah	کرمانشاه	*Helianthus annuus*	آفتابگردان
25	Su.25	Gonbad	گنبد	*Helianthus annuus*	آفتابگردان
26	Su.26	Gonbad	گنبد	*Helianthus annuus*	آفتابگردان
27	Su.27	Karaj	کرج	*Helianthus annuus*	آفتابگردان
28	Su. 28	Mazandaran	مازندران	*Helianthus annuus*	آفتابگردان
29	So.29	Mazandaran	مازندران	*Glycine max*	سویا
30	So.30	Joybar	جویبار	*Glycine max*	سویا
31	Sb.31	Ghazvin	قزوین	*Beta vulgaris*	چغندرقند
32	Sb. 32	Ghazvin	قزوین	*Beta vulgaris*	چغندرقند

جدول ۲- تجزیه واریانس شاخص بیماری‌زائی جدایه‌های مختلف *M. phaseolina*

Table 2. Analysis of variance for pathogenicity index (PI) of different isolates of *M. phaseolina*

S.O.V.	منابع تغییرات	درجه آزادی df.	میانگین مربعات MS
Isolate	جدایه	31	0.356**
Error	خطا	64	0.009
C.V. (%)	درصد ضریب تغییرات	19.07	

**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.
**: Significant at 1% probability level.

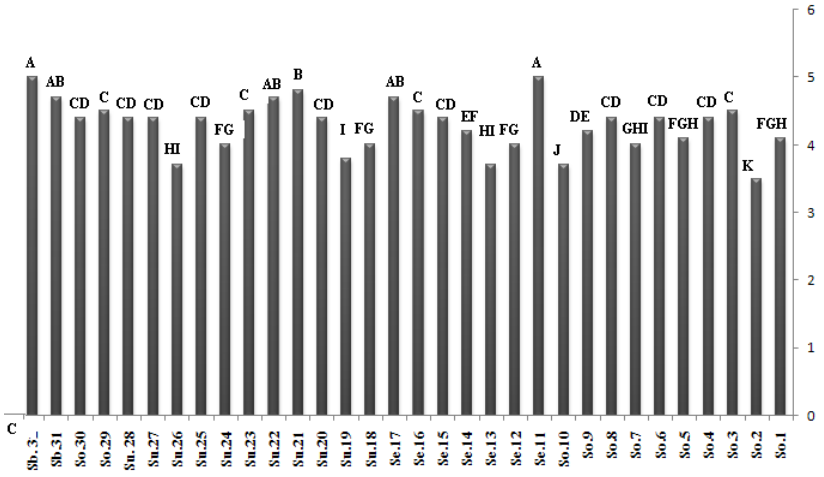
Sb.32 بالاترین و جدایه So.2 کمترین شاخص بیماری‌زائی را نشان دادند(شکل ۱). این جدایه‌ها از کنجد، آفتابگردان و چغندرقند جدا شده بودند. در بین جدایه‌های سویا، جدایه So.3شدت‌بیماری‌زائی بالاتری داشت ولی هیچ‌کدام از جدایه‌های سویا در گروه بیماری‌زاترین جدایه‌ها قرار نگرفتند.

نتایج تجزیه کلاستر جدایه‌های قارچ عامل بیماری در شکل ۲ نشان داده شده است. در این شکل، جدایه‌ها بر اساس شاخص بیماریزائی، در سه گروه کلی (دارای بیماریزائی بالا، متوسط و پائین) دسته‌ندی شدند. جدایه So.2 با کمترین شاخص بیماریزائی در یک شاخه جدا و دور از سایر جدایه‌ها قرار گرفت. جدایه‌های Se.11، Sb.32، Se.17، Sb.31 و Su.22 با بیشترین شاخص بیماریزائی، در یک شاخه قرار گرفتند.

مقاومت ژنوتیپ‌های مختلف سویا به *M. phaseolina*

تجزیه واریانس شاخص بیماریزائی در ژنوتیپ‌های سویا برای سه روش به کار برده شده در جدول ۳ نشان داده شده است. در هر سه روش بین ژنوتیپ‌ها از نظر شاخص بیماریزائی اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ وجود داشت.

ژنوتیپ‌های مختلف سویا با سه روش مختلف ارزیابی، در گروه‌های مختلفی دسته‌بندی شدند (جدول ۴).تمامی ژنوتیپ‌های سویا، بعد از آلوده شدن با زادمایه قارچ، علائم نکروز ساقه را نشان دادند. بنابراین مشابه سایر تحقیقات انجام شده تا به امروز (Twizeyimana *et al.*, 2012)، مقاومت کامل به بیماری در بین ژنوتیپ‌های سویای بررسی شده در این آزمایش نیز مشاهده نشد و تمامی ژنوتیپ‌های مورد بررسی در این مطالعه، به بیماری آلوده شدند. هر سه روش آلوده سازی در تفکیک ارقام با یک‌دیگر تفاوت‌هائی داشتند. برای مقایسه نتایج به دست آمده و میزان دقت روش‌های بررسی شده در تشخیص مقاومت ژرم‌پلاسم سویا، در مرحله گیاهچه ای



شکل ۱- مقایسه میانگین شاخص بیماری‌زائی جدایه‌های مختلف *M. phaseolina*

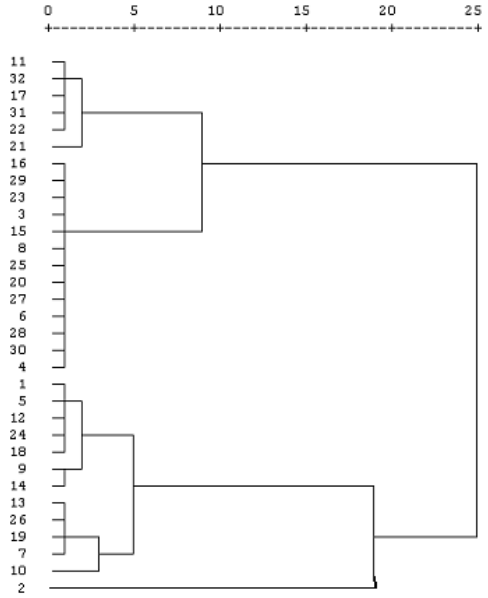
C (شاهد)، جدایه شاهد کشت بذر روی محیط فاقد قارچ

Fig.1.Comparison of mean pathogenicity index of different isolates of *M. phaseolina*

C (Control), culturing seed on fungus free plate.

ستون‌ها با حروف مشابه فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ هستند (آزمون چند دامنه دانکن).

Bars with similar letters are not significantly different of 1% probability level (Duncan's multiple range test).



شکل ۲- دندروگرام به دست آمده از تجزیه خوشه‌ای جدایه‌های مختلف *M. phaseolina* بر اساس شاخص بیماریزائی

Fig. 2. Dendrogram of different isolates of *M. phaseolina* based on pathogenicity index by cluster analysis

برای مشخصات جدایه‌ها به جدول ۱ مراجعه شود.

For characteristics of isolates see Table 1.

جدول ۳- تجزیه واریانس صفات اندازه‌گیری شده برای بیماری در ژنوتیپ‌های سویا در سه روش آلوده‌سازی

Table 3. Analysis of variance for disease characteristics in soybean genotypes in three inoculation methods

			میانگین مربعات MS		
S.O.V.	منابع تغییرات	درجه آزادی df.	درون شیشه‌ای *In vitro*	ساقه بریده Cut-stem	خلال دندان Toothpick
Genotype	ژنوتیپ	6	0.0484**	646.821**	902.726**
Error	خطا	12	0.0450	24.548	7.833
C.V.%	ضریب تغییرات		4.9	13.26	8.37

**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

**: Significant at 1% probability level.

جدول ۴- مقایسه میانگین صفات اندازه‌گیری شده برای بیماری در ژنوتیپ‌های سویا در سه روش آلوده‌سازی

Table 4. Means of different disease characteristics in soybean genotype in three inoculation methods

روش خلال دندان **Toothpick**		روش ساقه بریده **Cut- stem**		روش درون شیشه ای ***Invitro***	
ژنوتیپ Genotype	شاخص بیماریزائی Pathogenicity Index	ژنوتیپ Genotype	طول نکروز Length of necrosis(mm)	ژنوتیپ Genotype	طول نکروز Length of necrosis(mm)
Hacheston	14.50f	Hacheston	17.00c	Hacheston	3.787 c
Hamilton	23.75e	Sari	30.00b	Hamilton	4.160 b
Sari	27.00de	Hamilton	31.00b	L.17	4.202 b
Katol	27.50d	Katol	31.25b	Gorgan 3	4.457 b
Williams	37.50c	Gorgan 3	34.25b	Williams	4.470 b
Gorgan3	42.00b	Williams	49.50a	Sari	4.495 b
L.17	60.75a	L.17	49.50a	Katol	4.915 a

در هر ستون، میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک فاقد تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد هستند (آزمون چند دامنه دانکن)

Means with at least one similar letter in each column are not significantly different at 1% probability level (Duncan's multiple range test).

با نتایج مزرعه‌ای، یافته‌ها با نتایج مزرعه‌ای Rayeatpanah *et al*. (2002) مقایسه شد. در بررسی‌های انجام شده توسط آن‌ها، ارقام ویلیامز و ساری به ترتیب با بیشترین و کمترین میزان آلودگی،به عنوان ارقام حساس و مقاوم به بیماری پوسیدگی ذغالی معرفی شده‌اندکه تا حد زیادی با نتایج این تحقیق مطابقت دارد.

در ارزیابی مقاومت ژنوتیپ‌هادر شرایط درون شیشه ای،ژنوتیپ‌های مورد بررسی در سه گروه دسته‌ندی شدند. در این روش، ژنوتیپ هاچستون کمترین و ژنوتیپ کتول بیشترین شاخص بیماری‌زائی را نسبت به دیگر

ژنوتیپ‌ها داشتند و به غیر از ژنوتیپ هاچستون، شاخص بیماری‌زائی برای سایر ارقام بیشتر از ۴، (PI ≥ 4) بود. بر اساس مقایسه میانگین‌ها، ارقام ساری و ویلیامز در یک گروه قرار گرفتند و واکنش یکسانی در برابر عامل بیماری از خود نشان دادند. به نظر می‌رسد که صرفاً نتایج این روش، برای تشخیص میزان مقاومت ژرم‌پلاسم سویا کافی نباشد. ارزیابی مقاومت در مرحله بذری یکی از اشکالات وارده به این روش است. زیرا در مرحله بذری تنها مقاومت فیزیکی گیاه مطرح است و مقاومت ژنتیکی و رفتار فیزیولوژیکی نقش چندانی در بروز مقاومت ندارد. در صورتی‌که در شرایط طبیعی علائم قابل مشاهده بیماری در مرحله بلوغ ظاهر می‌شوند که در این مرحله، مقاومت ژنتیکی قابل اهمیت است. در نتیجه، بهتر است که واکنش ژنوتیپ‌های سویا در هر دو مرحله گیاهچه‌ای و گیاه کامل بررسی شود.

در دو روش دیگر آلوده‌سازی یعنی ساقه بریده و آلوده‌سازی ساقه با خلال دندان، واکنش ژنوتیپ‌های مختلف در مرحله گیاهچه‌ای و بعد از خروج آن‌هااز خاک اندازه‌گیری می‌شود که حدودی معایب روش قبلی را برطرف می‌کند. نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها در این دو روش، تا حد زیادی با یک‌دیگر مشابه بود. در هر دو روش، ژنوتیپ هاچستون با کمترین طول نکروز در ساقه‌های مایه‌زنی شده، مقاوم‌ترین ژنوتیپ بود. این ژنوتیپ در مرحله بذری (روش درون شیشه) هم کمترین شاخص بیماری‌زائی را داشت. بنابراین ژنوتیپ هاچستون به عنوان یک ژنوتیپ با مقاومت بالا به بیماری پوسیدگی ذغالی سویا، در مرحله بذری و در مرحله گیاهچه‌ای شناسائی شد. ارقام همیلتون، ساری و کتول بعد از ژنوتیپ هاچستون، طول نکروز کمتری روی ساقه‌های مایه‌زنی شده نشان دادند و به عنوان ارقام با مقاومت نسبی به بیمارگر ارزیابی شدند.

ژنوتیپL.17 در هر دو روش گلخانه‌ای با بالاترین طول نکروز روی ساقه‌های مایه‌زنی شده، به عنوان حساس‌ترین ژنوتیپ در بین ارقام مورد بررسی شناخته شد، بنابراین در مناطق دارای سابقه آلودگی به منظور ممانعت از افزایش مقدار زادمایه قارچ، توصیه می‌شود از کشت این ژنوتیپ خودداری شود. ارقام ویلیامز و گرگان۳ هم بعد از ژنوتیپL.17 طول نکروز بیشتری روی ساقه‌های مایه‌زنی شده، ایجاد کردند و به عنوان ارقام حساس شناسائی شدند.

از آن‌جائی‌که در بین نتایج بررسی‌های گلخانه‌ای این تحقیق و نتایج مزرعه‌ای رعیت‌پناه و همکاران (۲۰۰۲)تشابه نسبی وجود دارد، توصیه می‌شود تا با بررسی‌های دقیق‌تر، این روش‌ها مورد مقایسه مطمین‌تری قرار بگیرند. با توجه به معایب ذکر شده برای بررسی‌های مزرعه‌ای، ضروری است تا با بررسی‌های بیشتر،روش‌های غیرمزرعه‌ای مطمئنی برای سنجش مقاومت ژنوتیپ‌های سویا به *M. phaseolina*، به کار گرفته شوند.

در سال‌های اخیر، روش ساقه بریده

(Cut – stem) به عنوان یک روش جدید برای بررسی واکنش ژنوتیپ‌های مختلف سویا به بیمارگر *Phomopsis longicolla* و سایر گیاهان (آفتابگردان، سویا، کنجد و لوبیا) به بیمارگر *Sclerotinia sclerotiorum* مورد استفاده قرار گرفته است (Li *et al.*, 2010؛ Voung *et al.*, 2004). این روش در تشخیص مقاومت نسبی به این دو بیماری موثر بوده است. روش ساقه بریده توسط Twizeyimana *et al.*(2012) برای بررسی مقاومت ژنوتیپ‌های مختلف گیاه سویا به بیماری پوسیدگی ذغالی ساقه ناشی از *Macrophomina phaseolina* و همچنین بررسی بیماری‌زائی جدایه‌های مختلف قارچ عامل بیماری نیز مورد استفاده قرار گرفته است و به دلیل سادگی استفاده و مزایای متعدد در مقایسه با روش‌های مزرعه‌ای، به عنوان یک روش کارآمد توصیه شده است. در این بررسی هم این روش با روش گلخانه‌ای آلوده‌سازی ساقه گیاه با خلال دندان‌های آلوده مقایسه شد. با توجه به تشابه موجود در بین نتایج این دو روش گلخانه‌ای توصیه می‌شود تا بعد از بررسی‌های بیشتر این روش برای ارزیابی ژنوتیپ‌های مختلف گیاهی در شرایط گلخانه به کار گرفته شود.

سپاسگزاری

از مسئولین بخش تحقیقات دانه‌های روغنی موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال به خاطر تهیه بذر ارقام سویا و نمونه‌های آلوده و از مسئولین موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند که امکان انجام این تحقیق را فراهم کردند تشکر می‌شود. همچنین از آقایان دکتر حمید رضابابائی و دکتر مسعود سلطانی نجف‌آبادی که در تجزیه و تحلیل آماری و تفسیر نتایج راهنمائی‌های لازم را انجام دادند سپاسگزاری می‌شود.

References

Barnett, H.L., and Hunter, B.B. 1972. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Burgess Publishing Company, Minneapolis, Minnesota, USA.

Bowen, C., and Schapaugh, W. 1989. Relationships among charcoal rot infection, yield, and stability estimates in soybean blends. Crop Science 29: 42-46.

Bristow, W. E., and Wyllie, T. 1984. Reaction of soybean cultivars to *Macrophomina phaseolina* as seedlings in the growth chamber and field. Transactions of the Academy of Science, USA 18: 5-10.

Edmunds, L. 1964. Combined relation of plant maturity, temperature, and soil moisture

to charcoal stalk rot development in grain sorghum. Phytopathology 54: 514-517.

Fehr, W. R., Caviness, C. E., Burmood, D. T., and Pennington, J. S. 1971. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merr. Crop Science 11: 929-931.

Li, S., Hartman, G. L., and Boykin, D. L. 2010. Aggressiveness of *Phomopsis longicolla* and other *Phomopsis* spp. on soybean. Plant Disease 94: 1035-1040.

Mahmoodi, S. B., Mesbah, M., and Alizadeh, A. 2004. Pathogenicity variation among *Rhizoctoniai- solani* solates in sugar beet. Iranian Journal of Plant Pathology 40(3 & 4): 253-280 (in Persion).

Manici, L. M., Caputo, F., and Cerato, C. 1995. Temperature responses of isolates of *Macrophomina phaseolina* from different climatic regions of sunflower production in Italy. Plant Disease 79: 834-838.

Mengistu, A., Arelli, P., Bond, J. P., Shannon, J. G., Wrather, J. A., Rupe, J. C., Chen, P., Little, C., Canaday, C., Newman, M., and Pantalone, V. 2011. Evaluation of soybean genotypes for resistance to charcoal rot. Plant Health Progress. Online Publication. doi: 10. 1094/PHP-2010-0926-01-RS.

Mengistu, A., Ray, J. D., Smth, G. D., and Paris, R. L. 2007. Charcoal rot disease, assessment of soybean genotypes using colony-forming units index. Crop Science 47: 2453-2461.

Mihail, J. D., and Alcorn, S. M. 1987. *Macrophomina phaseolina*: spatial patterns in a cultivated soil and sampling strategies. Phytopathology 77: 1126-1131.

Raeyatpanah, S., Foroutan, A., and Oladi, M. 2002. Evaluation of soybean cultivars to charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid in Mazandaran. Proceedings of the 15th Iranian Plant Protection Congress, Isfahan, Iran. Page 117 (in Persian).

Reyes-Franco, M., Hernandez-Delgado, S., Beas-Fernandez, R., Medina-Fernandez, M., Simpson, J., and Mayek-Perez, N. 2006. Pathogenic and genetic variability within *Macrophomina phaseolina* from Mexico and other countries. Journal of Phytophathology 154: 446-453.

Siddiqui, Z. A., and Mahmood, I. 1993. Biological control of *Meloidogyne incognita* race 3 and *Macrophomina phaseolina* by *Paecilomyces lilacinus* and *Bacillus subtilis* alone and in combination in chickpea. Fundamental and Applied

Nematology 16: 215-218.

Singleton, L. L., Mihail, J. D., and Rush, C. M. 1992. Methods for Research on Soil-Borne Phytopathogenic Fungi. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.

Smith, G. S., and Carvil, O. N. 1997. Field screening of commercial and experimental soybean cultivars for their reaction to *Macrophomina phaseolina*. Plant Disease 81: 363-368.

Smith, G. S., and Wyllie, T. 1999. Charcoal rot. pp.29-31. In: Hartman, G. L., Sinclair, J. B., and Rupe, J. C. (eds.). Compendium of Soybean Diseases. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA.

Surrette, S. B., Meints, P. D., and Trevathan, L. E. 2006. Evaluation of two methods to infect soybean with *Macrophomina phaseolina* (Deuteromycota) under controlled environmental conditions. Journal of Missessory Academy of Science 51: 134-139.

Todd, T., Pearson, C., and Schwenk, F. 1987. Effect of *Heterodera glycines* on charcoal rotseverity in soybean cultivars resistant and susceptible to soybean cyst nematode. Journal of Nematology 19: 35-39.

Twizeyimana, M., Hill, C. B., Pawlowski, M., Paul, C., and Hartman, G. L. 2012. A cut-stem inoculation technique to evaluate soybean for resistance to *Macrophomina phaseolina*. Plant Disease 96: 1210-1215.

Wyllie, T. 1989. Charcoal rot. pp. 30-32. In: Sinclair, J.B., and Backman, P.A. (eds.) Compendium of Soybean Diseases, 3rd ed. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA.

Vuong, T. D., Hoffman, D. D., Diers, B. W., Miller, J. F., Steadman, J. R., and Hartman, G. L. 2004. Evaluation of soybean, dry bean, and sunflower for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. Crop Science 44: 777-783.