

بررسی فعالیت آنزیم پراکسیداز با استفاده از مدل‌های رگرسیون چند متغیره، شبکه عصبی مصنوعی و نروفازی

در میوه سیب تیمار شده با عصاره گیاهی و عامل بیماری *Penicillium expansum*

جلال غلام نژاد^۱✉، روح اله تقی‌زاده مهرجردی^۱ و فاطمه ناصری‌نسب^۲

۱- به ترتیب استادیار و استادیار، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه اردکان، یزد، ایران

۲- دانش‌آموخته‌ی دکتری بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: دی ۱۳۹۵؛ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۹۷)

چکیده

استفاده از عصاره‌های گیاهی به عنوان یک جایگزین مناسب به جای مصرف سموم در رابطه با بیماری‌های بعد از برداشت و به خصوص بیماری کپک آبی مطرح بوده است. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های درگیر در فعالیت‌های دفاعی گیاهی روشی کارآمد و در عین حال هزینه بر در ارزیابی سطح بیماری می‌باشد. در این تحقیق ابتدا فعالیت آنزیم پراکسیداز در هشت روز متوالی در میوه سیب که تحت تیمارهای مختلف عصاره اسطوخودوس (*Lavandula officinalis*) و فارچ بیمارگر *Penicillium expansum* قرار گرفته بود بررسی شد. سپس بر اساس اطلاعاتی که از این آزمون به دست آمد با استفاده از مدل‌های رگرسیون چند متغیره خطی، شبکه عصبی مصنوعی و مدل نروفازی فعالیت آنزیم پراکسیداز در میوه سیب پیش‌بینی شد. نتایج نشان داد در روز پنجم بیشترین میزان فعالیت آنزیم همانند روزهای قبل در سیب‌های آلوده تیمار شده با عصاره مشاهده شد و این افزایش نسبت به تیمارهای دیگر معنی دار بود و بیشترین فعالیت آنزیم در همه تیمارها به غیر از شاهد سالم در این روز مشاهده شد. همچنین نتایج نشان داد که مدل نروفازی کارایی بالاتری را جهت پیش‌بینی فعالیت آنزیم پراکسیداز نسبت به سایر مدل‌ها دارد. لذا در تحقیقات آینده پیشنهاد می‌شود از مدل نامبرده جهت پیش‌بینی رفتار آنزیم‌ها استفاده شود، همچنین کاربرد چنین روش‌هایی هزینه و زمان آزمایش را کاهش می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم پراکسیداز، چند متغیره، رگرسیون شبکه عصبی، نروفازی، *Penicillium expansum*.

The evaluation of peroxidase using multivariate regression models, neural networks and neuro-fuzzy in apple fruit treated with plant extract and *Penicillium expansum*

J. GHOLAMNEZHAD¹✉, R. TAGHIZADEH-MEHRJARDI¹ and F. NASERINASAB²

1- Assistant Professor & Assistant Professor, Respectively; Faculty of Agriculture and Natural Resources, Ardakan University, Yazd, Iran; 2- Ph.D. Graduate, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Abstract

The use of plant extracts can consider as an alternative for pesticides, to control post-harvest diseases like apple blue mold. It was efficient method the measuring the enzymes activity involved in plant defense systems to evaluate the disease, but it was expensive method. At present research, the peroxidase activity in treated apple fruits with lavender extracts and pathogen during eight days was investigated. Then, we applied three common models (i.e. multiple linear regression models, neural networks and neuro-fuzzy) to predict the peroxidase activity based on the information of the previous test. The results showed the highest enzyme activity was observed in the infected apples treated with the extract in fifth days, as the days before and it was significant compared to other treatments. The most activity of peroxidase was observed in all treatments except control, was observed on the fifth day. Our constructed models revealed that neuro-fuzzy model had higher performance in the peroxidase activity prediction compared with the other models.

Key words: Neural network, Neuro-fuzzy, Multivariate regression, *Penicillium expansum*, Peroxidase, Systemic Acquired Resistance.

مقدمه

سفیدک پودری خیار توسط محققین مختلفی به اثبات رسیده است (Herger et al., 1988).

آنزیم‌های درگیر در فعالیت‌های دفاعی گیاهی، اولین جبهه دفاعی گیاهان در برابر عامل بیماری‌زا هستند و اندازه گیری فعالیت آنها روشی کارآمد در ارزیابی سطح بیماری است. اما معمولاً اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها در دوره زمانی فرآیندی وقت‌گیر و هزینه‌بر می‌باشد. لذا در سال‌های اخیر محققین تلاش دارند تا با استفاده از مدل‌های داده‌کاوی و پیش‌بینی کننده، اقدام به پیش‌بینی این پارامترها کنند. داده‌کاوی یک حوزه میان رشته‌ای و با رشد سریع است که حوزه‌های مختلفی همچون پایگاه داده، آمار، یادگیری ماشین و سایر زمینه‌های مرتبط را با هم تلفیق کرده است تا اطلاعات و دانش ارزشمند نهفته در حجم بزرگی از داده‌ها را استخراج نماید (Han et al., 2011). داده‌کاوی بخشی از فرآیند کشف دانش است. انواع روش‌های داده‌کاوی از قبیل رگرسیون چند متغیره، شبکه عصبی مصنوعی و رگرسیون درختی جهت پیش‌بینی آنزیم‌ها استفاده شده است. به عنوان مثال جواد زرین و متشعزاده جهت پیش‌بینی فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدان در شاخساره گندم نان از مدل‌های رگرسیون چند متغیره و شبکه عصبی مصنوعی استفاده کردند و بیان داشتند که مدل شبکه عصبی مصنوعی دارای کارایی بالاتری جهت پیش‌بینی آنزیم مورد نظر بوده است (Javad Zarin and Moteshare Zadeh, 2016). در تحقیق حاضر، در ابتدا فعالیت آنزیم پراکسیداز در هشت روز متوالی در میوه سیب که تحت تیمارهای مختلف عصاره بیمارگر و *Penicillium expansum* قرار گرفته بود بررسی و سپس براساس اطلاعاتی که از این آزمون به دست آمد با استفاده از مدل‌های رگرسیون چند متغیره خطی، شبکه عصبی مصنوعی و مدل نروفازی فعالیت آنزیم پراکسیداز تحت همین تیمارها در میوه سیب پیش‌بینی شد.

روش بررسی

عامل بیماری: در این بررسی قارچ بیمارگر *Penicillium* sp.

سیب یکی از مهم‌ترین محصولات باغی و کشاورزی در ایران محسوب می‌شود. بر اساس آمار وزارت جهاد کشاورزی، میزان تولید سیب در کشور طی پنج سال (۸۸ الی ۹۲) سالانه به طور متوسط ۱/۷ درصد رشد داشته و از ۲۸۵۴ هزار تن در سال ۱۳۸۸ به ۳۰۵۰ هزار تن در سال ۱۳۹۲ رسیده است. طی این سال‌ها، تولید سیب در بین محصولات باغی، همواره رتبه اول را داشته است. نظر به تولید زیاد این محصول در یک فصل، نیاز این محصول به انبارداری امری اجتناب ناپذیر است. از طرف دیگر به علت نبود انبارها با تکنولوژی به روز، این محصول در معرض خسارات زیادی از جمله بیماری‌های قارچی است (Janisiewicz and Korestent, 2002). یکی از مهم‌ترین بیماری‌هایی که در انبار به این محصول خسارت وارد می‌کند بیماری کپک آبی سیب با عامل گونه‌های مختلف جنس *Penicillium* Link (1809) است (Gholamnejad et al., 2009). استفاده از قارچ‌کش‌های شیمیایی یکی از سریع‌ترین راه‌های مبارزه با بیمارهای گیاهی است، اما آسیب به محیط زیست و سلامت انسان از یک طرف و مقاومت عوامل بیماری‌زا به ترکیبات شیمیایی از طرف دیگر، محققان را بر آن داشت که به دنبال روشی جهت جلوگیری از آثار مخرب این ترکیبات باشند (Gholamnejad et al., 2009).

استفاده از عصاره‌های ترکیباتی با منشأ طبیعی، یکی از روش‌هایی است که آثار سوئی بر سلامت انسان ندارد، سریع تجزیه می‌شود و تا کنون گزارشی مبنی بر مقاومت بیمارگرها نسبت به اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی گزارش نشده است (Bakkali et al., 2008). عصاره‌های گیاهی علاوه بر اینکه خاصیت ضد میکروبی دارند قادرند بعضی از مکانیسم‌های دفاعی گیاه را در برابر عوامل میکروبی از جمله قارچ‌ها فعال کنند. یکی از این مکانیسم‌های دفاعی افزایش فعالیت آنزیم‌های دفاعی از جمله آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند پراکسیداز و کاتالاز است (Daayf et al., 1997). اثر عصاره برگ گیاه *Reynoutria sachalinensis* در القا مقاومت و کنترل

کشت PDA تهیه شد. ابتدا یک لوپ از اسپور قارچ عامل بیماری از روی محیط کشت برداشته شد و بعد در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر سترون حاوی ۰/۰۵٪ (حجم به حجم) توئین ۲۰ غوطه‌ور شد. از سوسپانسیون حاصل جهت تهیه غلظت‌های مورد نیاز استفاده شد. غلظت مورد نیاز که 10^6 کنیدیوم در هر میلی لیتر آب مقطر سترون بود، با استفاده از لام هماسیتومتر و افزودن آب مقطر سترون به دست آمد (Batta, 2004). پس از گذشت یک ساعت و خشک شدن زخم‌ها، محل زخم با ۲۰ میکرولیتر سوسپانسیون قارچ بیمارگر، مایه‌زنی شد. پس از خشک شدن زخم‌ها میوه‌ها به وسیله محلول‌های تهیه شده از عصاره با غلظت چهار هزار محلول پاشی به صورتی که درون زخم‌ها نیز تیمار شدند و سپس در ظروف یکبار مصرف بسته بندی شده و به مدت یک هفته در اتاق کشت با دمای ۲۴ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۸۰٪ در شرایط سترون نگهداری شد. بعد از طی دوره نگهداری زخم‌ها از نظر ایجاد پوسیدگی چهار بار (هر پنج روز یکبار)، بررسی شده و قطر لکه‌ها با استفاده از کولیس اندازه‌گیری شد.

در این آزمایش برای هر تیمار چهار تکرار در نظر گرفته شد که هر تکرار شامل سه میوه و هر میوه دارای سه زخم بود. سیب‌های محلول‌پاشی شده با توئین ۸۰ بدون اسپور قارچ به عنوان شاهد سالم در نظر گرفته شد (Etebarian *et al.*, 2005).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز در سیب‌های

تیمار شده با قارچ عامل بیماری و عصاره در انبار در دمای چهار درجه سلسیوس: به منظور بررسی تغییرات آنزیم پراکسیداز از سیب‌هایی که در بند قبل در مورد آن‌ها توضیح داده شد نمونه برداری شد.

در این آزمایشات تیمارها شامل شاهد سالم (سیب‌های مایه زنی شده با آب مقطر سترون)، سیب‌هایی که تنها با عصاره مایه زنی شده بود، سیب‌های آلوده که فقط اینوکلوم قارچ عامل بیماری را دریافت کرده بود و سیب‌های که با قارچ عامل بیماری و عصاره مایه زنی شده بودند. برای هر

از سردخانه نعیم آباد شهر یزد از روی سیب آلوده به بیماری کپک آبی، جداسازی و در این مطالعه استفاده شد. قارچ عامل بیماری روی محیط PDA (Potato Dextrose Agar) در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. این قارچ بعد از جداسازی در حد گونه *Penicillium expansum* توسط کلیدهای مربوطه شناسایی شد.

مواد گیاهی: در این تحقیق، از عصاره گیاه اسطوخودوس

(برگ) (*Lavandula officinalis*) استفاده شد. این گیاهان ابتدا شستشوی سطحی شده و سپس به هیپوکلریت ۲٪ به مدت ۵ دقیقه ضدعفونی و سپس با آب مقطر سترون سه مرتبه شسته و در شرایط آزمایشگاه و دور از تابش مستقیم نور آفتاب خشک شد (Alam *et al.*, 2011)، سپس اندام‌های هوایی آنها به وسیله خردکن پودر شده و از الک یک مش عبور داده شد (Abdulaziz *et al.*, 2010).

عصاره‌های گیاهی با استفاده از آب به عنوان حلال

استخراج شد. در این روش پنج گرم از ماده خشک گیاهی در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر سترون خیسانده و پس از ۲۴ ساعت از پارچه ملامل عبور و سانتریفوژ شد. در این مرحله به منظور سترون نمودن عصاره آبی از صافی میکروبیولوژیک دو میکرونی استفاده شد (Azimi *et al.*, 2006).

بررسی اثر عصاره اسطوخودوس بر میزان فعالیت

آنزیم پراکسیداز روی میوه سیب در انبار چهار درجه سانتی‌گراد: در این آزمون از میوه‌های سالم و بدون زخم رقم Golden delicious که از میادین میوه شهرستان یزد تهیه شده بود استفاده شد و نهایت دقت در استفاده از رقم مشابه به عمل آمد. در این آزمایش‌ها سعی بر استفاده از میوه‌ها با اندازه یکسان بوده است. برای ضدعفونی سطحی، میوه‌ها در هیپوکلریت سدیم ۰/۱ درصد غوطه‌ور و سپس دوبار با آب سترون شستشو داده و در نهایت به مدت ۲۰ ثانیه در اتانول ۷۰٪ غوطه‌ور شد، سپس توسط یک سوزن سترون سه حفره به قطرهای ۱/۵ mm و عمق ۳ mm در هر سیب ایجاد شد. اسپورهای قارچ بیمارگر از کشت چهار روزه روی محیط

تیمار ۴ تکرار در نظر گرفته شد.

آزمایشات به صورت آزمایش فاکتوریل 4×8 که فاکتور A شامل ۴ تیمار ذکر شده و فاکتور B شامل (۸ زمان نمونه برداری یعنی هشت روز بعد از مایه زنی با قارچ عامل بیماری) بود در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی انجام شد.

ارزیابی میزان کل پروتئین قابل حل و سنجش پروتئین

استاندارد: به منظور ارزیابی میزان پروتئین موجود در عصاره مورد آزمایش جهت تعیین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز از روش برادفورد (Bradford, 1967) استفاده شد.

تهیه عصاره آنزیمی پراکسیداز: برای بررسی فعالیت

آنزیم پراکسیداز از روش Gong et al. (2001) با اندکی تغییر استفاده شد. ابتدا هاون چینی در ظرف یخ قرار داده شد. سپس یک گرم از بافت میوه در داخل هاون قرار داده شد و با سه میلی لیتر از بافر فسفات سدیم ۰/۰۵ مولار با pH برابر هفت کاملاً مخلوط شد. پس از به دست آمدن یک مخلوط هموژن، مخلوط حاصل بلافاصله به داخل ویال‌های دو میلی لیتری منتقل و در دستگاه میکروسانتریفیوژ در $14000g$ به مدت ۱۶ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد و محلول بالایی حاصل برای اندازه گیری فعالیت آنزیم در فریزر در $20-^{\circ}C$ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

ارزیابی میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (POX): ارزیابی

فعالیت پراکسیداز با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر Milton Roy Company-Unterfoehring-germany انجام شد. تغییرات جذب (در 485 nm با فواصل ۱۰ ثانیه به مدت یک دقیقه) در دقیقه در میلی گرم پروتئین به عنوان واحد فعالیت پراکسیداز در نظر گرفته شد.

پیش‌بینی میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (POX): در

تحقیق حاضر از انواع روش‌های داده کاوی از قبیل رگرسیون چند متغیره خطی، شبکه عصبی مصنوعی و نروفازی جهت پیش‌بینی آنزیم مورد نظر استفاده گردید. در تمام مدل‌های مورد بررسی میزان فعالیت آنزیم با تأخیر یک روز به عنوان

ورودی مدل و میزان آنزیم در فردای آن روز به عنوان خروجی مدل در نظر گرفته شد. بدین ترتیب به عنوان مثال میزان فعالیت آنزیم در روز ششم ورودی برای میزان آنزیم در روز هفتم قرار داده شد.

رگرسیون چند متغیره خطی: شکل کلی معادله رگرسیون

کلاسیک به صورت رابطه (۱) می باشد:

$$Y = a_0 + a_1x_1 + \dots + a_nx_n \quad (1)$$

که در آن، Y متغیر خروجی (فعالیت آنزیم)، x_i ها متغیر ورودی (میزان فعالیت آنزیم در روز بعد) و a ضرایب معادله به حساب می‌آیند. معمولاً با روش کمترین مربعات برای برآورد ضرایب رگرسیون خطی چندگانه استفاده می‌شود.

شبکه عصبی مصنوعی: در این پژوهش شبکه پرسپترون

با یک لایه مخفی که دارای تابع فعال‌سازی سیگموئید در لایه مخفی و تابع فعال‌سازی خطی در لایه خروجی بوده و تعداد نرون‌های آن از یک تا ۱۰ نرون متغیر بوده و بهترین تعداد نرون به صورت سعی و خطا تعیین شد، مورد بررسی قرار گرفت. همچنین، به علت کارایی، سادگی و سرعت بالا در این تحقیق الگوریتم آموزشی لونبرگ مارکوارت استفاده شد (Amini et al., 2005).

در پژوهش حاضر از نرم‌افزار نروسولوشین

(Neurosolutions) نسخه پنج برای طراحی شبکه عصبی مصنوعی و در نهایت پیش‌بینی میزان فعالیت آنزیم استفاده شد. در روش شبکه عصبی مصنوعی قبل از ورود داده‌ها به شبکه باید یکسری پیش پردازش‌ها روی داده‌های ورودی صورت گیرد. در صورتی که داده‌ها به صورت خام وارد شبکه شوند به علت تغییرات زیاد داده‌ها تأثیر متفاوتی بر روی شبکه گذاشته بطوری که برخی از نرون‌های خیلی زود به حد آتش^۱ رسیده در حالی که برخی دیگر از نرون‌ها حتی به آستانه فعالیت نیز نرسیده‌اند. لذا در ابتدا لازم است که داده‌ها معیار سازی شوند، یعنی بین یک دامنه عددی که معمولاً (۰ و ۱) می‌باشد قرار گیرند. اگر تابع سیگموئید را در نظر بگیریم

می‌کند. در چنین شرایطی بهترین گزینه برای اعتبارسنجی مدل نقشه‌برداری رقومی، اعتبارسنجی به روش حذف داده و پیش‌بینی آن است. پایگاه داده (n) به n-1 موقعیت برای واسنجی و یک موقعیت برای اعتبارسنجی تقسیم می‌شود. در هر تکرار، مدل برای موقعیت حذف شده اجرا می‌گردد و متغیر حذف شده پیش‌بینی می‌گردد. سپس با مقدار واقعی مقایسه می‌گردد و خطای پیش‌بینی محاسبه می‌شود. این فرآیند برای همه موقعیت‌های نمونه‌برداری انجام می‌شود. پس از تعیین مدل مناسب، با استفاده از ضریب تبیین بین مقادیر واقعی و برآورد شده فعالیت آنزیم و همچنین با استفاده از محاسبه شاخص‌های میانگین ریشه مربعات خطا و میانگین خطای مدل اعتبارسنجی شد. که در آن‌ها؛ X_0 و X_e به ترتیب فعالیت آنزیم اندازه‌گیری شده و تخمین زده شده، \bar{X}_0 و \bar{X}_e به ترتیب میانگین فعالیت آنزیم اندازه‌گیری شده و تخمین زده شده و n تعداد داده‌ها است.

$$RMSE = \left[\frac{\sum (X_0 - X_e)^2}{n} \right]^{1/2} \quad (۳)$$

$$R^2 = \left[\frac{\sum ((X_e - \bar{X}_e)(X_0 - \bar{X}_0))}{\sqrt{\sum ((X_e - \bar{X}_e)^2)(X_0 - \bar{X}_0)^2}} \right]^2 \quad (۴)$$

$$ME = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (X_0 - X_e) \quad (۵)$$

نتیجه و بحث

بررسی تغییرات آنزیم پراکسیداز: در روز اول سیب‌های آلوده تیمار شده با عصاره گیاه اسطوخودوس از نظر میزان فعالیت آنزیم در مقایسه با سیب‌های سالم شاهد و همچنین سیب‌های سالم تیمار شده با عصاره گیاهی تنها، افزایش معنی داری نشان دادند اما در مقایسه با سیب‌های آلوده با بیمارگر تنها اختلافی نشان ندادند. سیب‌های آلوده تیمار شده با عصاره در روز دوم با بقیه تیمارها در این روز دارای اختلاف معنی دار بود، و این اختلاف معنی‌دار تا پایان روز هشتم نمونه‌برداری وجود داشت. در روز پنجم بیشترین میزان فعالیت آنزیم همانند روزهای قبل در سیب‌های آلوده تیمار شده با عصاره دیده شد و این افزایش نسبت به تیمارهای

مشاهده می‌شود شیب این تابع در محدوده ۰ تا ۱ زیاد بوده، و به تدریج که به صفر و یک نزدیک می‌شود شیب آن کاهش پیدا می‌کند. در این ارتباط بخاطر اینکه مقادیر آستانه ۰ و ۱ را در داده‌های ورودی به شبکه نداشته باشیم داده‌ها با استفاده از رابطه (۲) که باعث می‌شود داده‌ها بین ۰/۱ و ۰/۹ قرار گیرند معیار سازی شد.

$$y = .8 * \frac{X_i - X_{\min}}{X_{\max} - X_{\min}} + .1 \quad (۲)$$

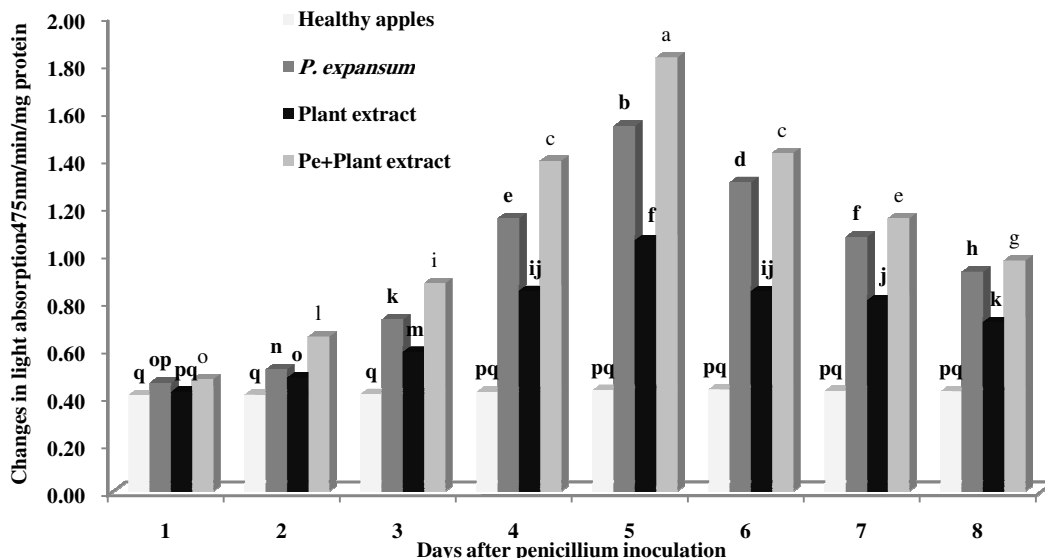
در این رابطه X_{\min} کوچک‌ترین داده و X_{\max} بزرگ‌ترین داده سری داده‌های می‌باشد. با استفاده از این رابطه داده‌های ورودی بین ۰/۱ و ۰/۹ قرار می‌گیرند.

نروفازی: در این روش برای فرآیند آموزش از روش‌های آموزش پس انتشار خطا و کمینه مربعات خطا بهره‌گیری شده و با استفاده از الگوریتم‌های آموزشی شبکه عصبی، بهینه‌سازی پارامترهای توابع عضویت صورت می‌گیرد. هر کدام از توابع عضویت (با تعداد مختلف تابع)، بر اساس مدل با کمترین میزان خطا به روش سعی و خطا آموزش دید. در نهایت تابع عضویت برگزیده خواهد شد. در این پژوهش با استفاده از محیط انفیس‌ادیت^۲ در نرم‌افزار متلب^۳، روش تطبیقی عصبی فازی با هشت نوع تابع عضویت (مثلثی، گوسی، زنگوله‌ای) با تعداد هر تابع بین یک تا نه عدد با روش بهینه‌سازی هیبرید به ترتیب مورد آزمون قرار گرفته و با استفاده از حداقل خطا، بهترین نوع تابع و تعداد آن به دست آمده است.

ارزیابی مدل‌ها: برای بررسی کارایی مدل به منظور میزان فعالیت آنزیم، اعتبارسنجی به روش حذف یک داده و پیش‌بینی آن انجام گرفت. در شرایطی که زمان و بودجه کافی برای برداشت نمونه احتمالی وجود ندارد، بهترین گزینه اعتبارسنجی به روش حذف داده است (Brus et al., 2011). برخلاف روش تقسیم داده‌ها، در این روش تقسیم کردن به طور تکرارپذیری انجام می‌شود که این روش را مؤثرتر

هفتم و هشتم نیز این روند کاهشی مانند روز ششم ادامه پیدا کرد (شکل ۱).

دیگر معنی دار بود و بیشترین فعالیت آنزیم در همه تیمار به غیر از شاهد سالم در این روز مشاهده شد. در روز ششم فعالیت آنزیم نسبت به روز قبل از خود کمتر شد. در روز



شکل ۱- تغییرات میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (POX) در میوه سیب در اثر مایه زنی با قارچ *Penicillium expansum* و عصاره گیاه اسطوخودوس

Fig. 1. Changes in the activity of peroxidase (POX) in inoculated apple fruit with *Penicillium expansum* and lavender extract

رگرسیونی می‌باشد که میزان فعالیت آنزیم را در تیمار توأم عصاره گیاهی و بیمارگر *P. expansum* پیش‌بینی می‌کند. نتایج تجزیه واریانس نیز از معنادار بودن در سطح ۰/۰۵ معادلات برآزش داده شده حکایت دارد ($p < 0.05$).

$$POX_t = 0.12 + 0.71 \times POX_{t-1} \quad (6)$$

$$POX_t = 0.43 + 0.61 \times POX_{t-1} \quad (7)$$

$$POX_t = 0.35 + 0.56 \times POX_{t-1} \quad (8)$$

$$POX_t = 0.56 + 0.56 \times POX_{t-1} \quad (9)$$

شبکه عصبی مصنوعی: در ابتدا داده‌های ورودی به شبکه، باید استانداردسازی گردد. در صورتی که داده‌ها به صورت خام وارد شبکه شود، به علت تغییرات زیاد داده‌ها، تأثیر متفاوتی بر روی شبکه گذاشته، به طوری که برخی از نرون‌ها خیلی زود به حد آتش رسیده، در حالی که برخی دیگر از نرون‌ها حتی به آستانه فعالیت نیز نرسیده‌اند (Amini et al., 2005). ساختار بهینه شبکه و همچنین تعداد تکرار یا اپوک به روش سعی و خطا با استفاده از معیارهای ریشه مربعات خطا

پیش‌بینی میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز:

رگرسیون چند متغیره خطی: برای تعیین رگرسیون چندمتغیره خطی میزان فعالیت آنزیم در روزهای مختلف (شاهد، بیمارگر *P. expansum*، عصاره گیاهی و تیمار توأم عصاره گیاهی و بیمارگر *P. expansum*) رابطه رگرسیونی مربوطه به صورت روابط (۶) تا (۹) برای ۴ تیمار بدست آمد. همانطوری که ملاحظه می‌شود نتایج ریشه مربعات خطا و ضریب تبیین به ترتیب ۰/۰۰۴ و ۰/۷۰ برای پیش‌بینی فعالیت آنزیم در شرایط شاهد و در شرایط بیمارگر *P. expansum*، عصاره گیاهی و تیمار توأم عصاره گیاهی و بیمارگر *P. expansum* به ترتیب ۰/۲۲ و ۰/۵۳، ۰/۱۳ و ۰/۴۶ و ۰/۳۳ و ۰/۴۵ بدست آمد (جدول ۱). کمترین میزان میانگین ریشه مربعات خطا و بالاترین میزان ضریب تبیین مربوط به مدل رگرسیونی می‌باشد که میزان فعالیت آنزیم را در تیمار شاهد پیش‌بینی می‌کند. به طور مشابه، بیشترین میزان میانگین ریشه مربعات خطا و کمترین دقت پیش‌بینی مربوط به مدل

و ضریب تبیین تعیین گردید. حداقل مقدار ریشه مربعات خطا در تیمار شاهد مربوط به شبکه با پنج نرون در لایه مخفی و تعداد تکرار ۸۰۰، برای میزان فعالیت آنزیم در تیمارهای دیگر (بیمارگر *P. expansum*، عصاره گیاهی و تیمار توأم عصاره گیاهی و بیمارگر *P. expansum*) به ترتیب مربوط به شبکه با ۷ و ۴ نرون در لایه مخفی و تعداد تکرار ۵۰۰، ۴۵۰ و ۷۸۰ می‌باشد. نتایج خطای این روش بر اساس مقدار ریشه مربعات خطا و ضریب تبیین به ترتیب ۰/۸۵ و ۰/۰۰۱ برای میزان فعالیت آنزیم در تیمار شاهد، ۰/۱۴ و ۰/۷۱ برای میزان فعالیت آنزیم در تیمار بیمارگر *P. expansum*، ۰/۰۹ و ۰/۷۵ و پیش‌بینی می‌کند.

برای میزان فعالیت آنزیم در تیمار عصاره گیاهی و ۰/۲۰ و ۰/۷۰ برای میزان فعالیت آنزیم در تیمار تیمار عصاره گیاهی+ بیمارگر *P. expansum* بدست آمد. کمترین میزان میانگین ریشه مربعات خطا و بالاترین میزان ضریب تبیین مربوط به مدل شبکه عصبی مصنوعی می‌باشد که میزان فعالیت آنزیم را در تیمار شاهد پیش‌بینی می‌کند. به طور مشابه، بیشترین میزان میانگین ریشه مربعات خطا و کمترین دقت پیش‌بینی مربوط به مدل شبکه عصبی مصنوعی می‌باشد که میزان فعالیت آنزیم را در تیمار توأم عصاره گیاهی و بیمارگر *P. expansum* پیش‌بینی می‌کند.

جدول ۱- مقایسه نتایج بدست آمده از مدل رگرسیون چندگانه خطی جهت پیش‌بینی میزان فعالیت آنزیم (تغییرات جذب در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین)

Table 1. Compare the results of multiple linear regression model to predict the enzyme activity

R ²	RMSE	ME	تیمار Treatment
0.70	0.004	0.009	شاهد Control
0.53	0.22	0.21	<i>P. expansum</i>
0.46	0.13	0.17	عصاره گیاهی Plant extract
0.45	0.33	0.28	عصاره گیاهی و قارچ بیمارگر Plant extract + Pathogen

RMSE: Root Mean Square Error

ME: Mean Error

R²: Coefficient of Determination

جدول ۲- مقایسه نتایج بدست آمده از مدل شبکه عصبی مصنوعی جهت پیش‌بینی میزان فعالیت آنزیم

Table 2. Compare the results of artificial neural network to predict the enzyme activity

R ²	RMSE	ME	تیمار Treatment
0.85	0.001	0.002	شاهد Control
0.71	0.14	0.13	<i>P. expansum</i>
0.75	0.09	0.11	عصاره گیاهی Plant extract
0.70	0.20	0.17	عصاره گیاهی و قارچ بیمارگر Plant extract + Pathogen

RMSE: Root Mean Square Error

ME: Mean Error

R²: Coefficient of Determination

مدل نروفازی: برای ایجاد این شبکه باید چند پارامتر بهینه شوند که شامل نوع تابع عضویت، تعداد تابع و روش یادگیری و تعداد اپوک (Epoch) می‌باشد. برای این کار تمام حالات بوسیله سعی و خطا بدست آمد، که نتایج خصوصیات مدل نروفازی به کار رفته برای پیش‌بینی میزان فعالیت آنزیم در تیمارهای مختلف در جدول (۳) نشان داده شده است. بهترین ساختار با توجه به معیار ریشه مربعات خطا تعیین گردید. به عنوان مثال بهترین نوع تابع، تابع گوسی انتخاب گردید. حداقل مقدار ریشه مربعات خطا در تیمار شاهد مربوط به مدل نروفازی با ۳ تابع عضویت و ۸۰ تکرار، برای میزان فعالیت آنزیم در تیمارهای دیگر (بیمارگر *P. expansum*، عصاره گیاهی و تیمار توأم عصاره گیاهی و بیمارگر *P. expansum*) به ترتیب مربوط به شبکه با ۴، ۳ و ۴ تابع عضویت و ۱۵۰ تکرار می‌باشد. نتایج خطای این روش بر

اساس مقدار ریشه مربعات خطا و ضریب تبیین به ترتیب ۰/۰۰۱ و ۰/۸۹ برای میزان فعالیت آنزیم در تیمار شاهد، ۰/۱۱ و ۰/۷۹ برای میزان فعالیت آنزیم در تیمار بیمارگر *P. expansum*، ۰/۰۵ و ۰/۷۸ برای میزان فعالیت آنزیم در تیمار عصاره گیاهی و ۰/۱۴ و ۰/۷۵ برای میزان فعالیت آنزیم در تیمار عصاره گیاهی و بیمارگر به صورت توأم *P. expansum* بدست آمد (جدول ۴). کمترین میزان میانگین ریشه مربعات خطا و بالاترین میزان ضریب تبیین مربوط به مدل عصبی مصنوعی می‌باشد که میزان فعالیت آنزیم را در تیمار شاهد پیش‌بینی می‌کند. به طور مشابه، بیشترین میزان میانگین ریشه مربعات خطا و کمترین دقت پیش‌بینی مربوط به مدل شبکه عصبی مصنوعی می‌باشد که میزان فعالیت آنزیم را در تیمار عصاره گیاهی و بیمارگر به صورت *P. expansum* پیش‌بینی می‌کند.

جدول ۳- ویژگی‌های مدل نروفازی انتخابی برای پیش‌بینی میزان فعالیت آنزیم

Table 3. The features of neuro-fuzzy model to predict the amount of enzyme activity

تیمار Treatment	تعداد توابع عضویت	تکرار	نوع تابع عضویت	روش یادگیری	روش دفازی کردن
شاهد Control	3	80	gaussmf	هیبرید Hybrid	میانگین وزنی Weighted Average
<i>P. expansum</i>	4	150	gaussmf	هیبرید Hybrid	میانگین وزنی Weighted Average
عصاره گیاهی Plant extract	3	150	gaussmf	هیبرید Hybrid	میانگین وزنی Weighted Average
عصاره گیاهی و قارچ بیمارگر Plant extract + Pathogen	4	150	gaussmf	هیبرید Hybrid	میانگین وزنی Weighted Average

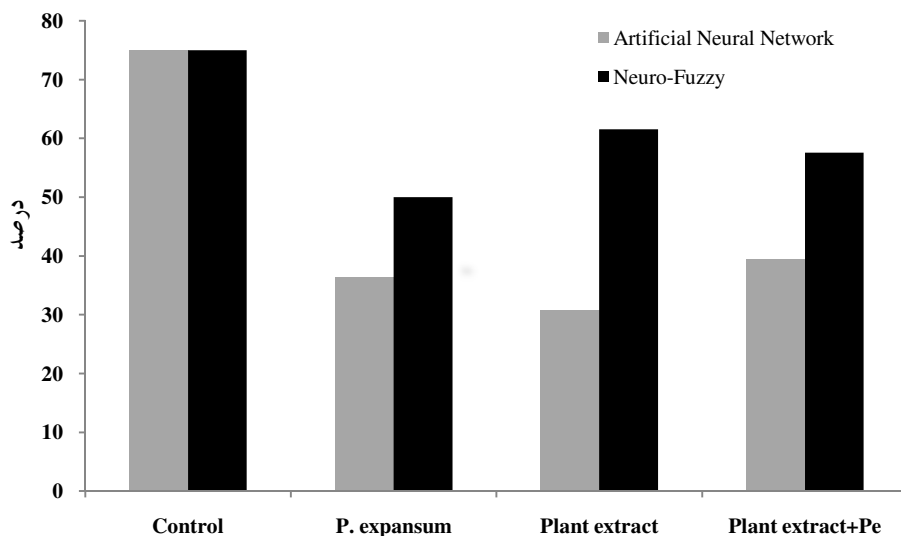
جدول ۴- ارزیابی معیارهای خطا مدل نروفازی جهت پیش‌بینی میزان فعالیت آنزیم

Table 4. Evaluation of error criteria for ANFIS model on prediction of enzyme activity

تیمار Treatment	R ²	RMSE	nRMSE
شاهد Control	0.89	0.001	0.002
<i>P. expansum</i>	0.79	0.11	0.10
عصاره گیاهی Plant extract	0.78	0.05	0.06
عصاره گیاهی و قارچ بیمارگر Plant extract + Pathogen	0.75	0.14	0.11

RMSE: Root Mean Square Error
R²: Coefficient of Determination

میزان کاهش خطا در مدل‌های نروفازی و شبکه عصبی نسبت به روش رگرسیون (بدترین مدل در این پژوهش) می‌باشد. به عنوان مثال، مدل نروفازی و شبکه عصبی مصنوعی دقت پیش‌بینی را نسبت به روش رگرسیون خطی چندگانه برای میزان فعالیت آنزیم در تیمار شاهد ۷۵ و ۷۵ درصد، برای تیمار بیمارگر *P. expansum* به میزان ۵۰ و ۳۶ درصد، برای تیمار عصاره گیاهی به میزان ۶۱ و ۳۰ درصد و برای تیمار توأم عصاره گیاهی و بیمارگر *P. expansum* به میزان ۵۷ و ۳۹ درصد، افزایش داده است.



شکل ۲- شاخص بهبود نسبی مدل‌ها نسبت به مدل رگرسیون خطی در پیش‌بینی میزان فعالیت آنزیم در چهار تیمار
Fig. 2. Index relative improvement of linear regression models to predict the enzyme activity in four treatments

پراکسیداز در ترکیبات ساختاری دیواره سلولی و پلی‌میراسیون لیگنین که باعث محکم شدن دیواره سلولی می‌شود، جلوگیری کند، در نتیجه سدهای مکانیکی افزایش یافته و سرعت نفوذ عامل بیماری زا کاهش می‌یابد و به سلول‌های گیاه اجازه می‌دهد که واکنش‌های دفاعی خود را که برای فعال شدن به زمان بیشتری نیاز دارد تنظیم کند (Durner et al., 1997).

ارتباط بین افزایش آنزیم‌های دفاعی و مقاومت بیشتر به عوامل بیماری‌زا توسط محققین دیگر نیز گزارش شده است. اثر سالیسیلیک اسید بر فعالیت فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در ساعات اولیه بعد از آلوده‌سازی به وسیله

ارزیابی مدل‌ها: نتایج مربوط به نروفازی، شبکه عصبی و رگرسیون چندگانه خطی مربوط به میزان فعالیت آنزیم اندازه‌گیری شده در جداول (۱، ۲ و ۴) آمده است. با توجه به این جداول بهترین عملکرد برای پیش‌بینی میزان فعالیت آنزیم مربوط به مدل نروفازی می‌باشد و از لحاظ هر سه معیار بهتر از دو مدل شبکه عصبی مصنوعی و رگرسیون چندگانه خطی است. بعد از مدل نروفازی، شبکه عصبی بهترین عملکرد را به خود اختصاص داده است. همچنین از شاخص بهبود نسبی برای ارزیابی کارایی مدل‌ها استفاده شد (شکل ۲). این آماره

نتایج این پژوهش نشان داد که عصاره گیاهی اسطوخودوس می‌تواند به عنوان یک محرک مناسب در القا و سنتز آنزیم پراکسیداز عمل کند، و به عنوان یک ماده محرک فعالیت‌های دفاعی باشد. از نتایج این آزمون چنین استنباط می‌شود که فعالیت آنزیم پراکسیداز در میوه‌های آلوده تیمار شده با عصاره گیاه اسطوخودوس نسبت به شاهد مایه زنی شده با آب مقطر سترون افزایش داشته است. پراکسیداز و کاتالاز آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی هستند که غلظت H_2O_2 را تنظیم می‌کنند (Barcelo, 1997). دی‌گارا و همکاران (De Gara et al., 2003) نشان دادند که H_2O_2 می‌تواند از ورود بیمارگر به داخل بافت از طریق تسهیل و کاتالیز کردن واکنش‌های

فعالیت آنزیم‌ها در زمان تنش نسبت به بیمارگرها، بسیار ضروری است. نتایج این تحقیقات اطلاعات مرتبط به مکانیسم تحمل و مقاومت به بیمارگرها را افزایش داده و تولید ارقام متحمل از راه روش‌های زیست فناوری را هموارتر می‌سازد. در واقع زمانی که بتوان فعالیت آنزیم‌ها را با استفاده از داده‌های یک روز برای ۲۴ ساعت آینده بدون اندازه‌گیری مقدار فعالیت آنزیم در روز بعد پیش‌بینی کرد، از طریق آن به وجود ارقام مقاوم و غیرمقاوم پی می‌بریم و به این وسیله در زمان و وقت صرفه جویی خواهیم کرد. روش‌های مختلفی جهت پیش‌بینی فعالیت آنزیم در سلول‌های گیاهی از جمله سیب وجود دارد، که از جمله آن‌ها می‌توان به رگرسیون چند متغیره، شبکه عصبی مصنوعی و نروفازی اشاره کرد. در کل مدل شبکه عصبی دارای دقت بالاتری نسبت به رگرسیون چندگانه خطی است زیرا ممکن است از یک طرف کارایی توابع انتقالی بدست آمده در مناطق مختلف با هم تفاوت داشته و از طرف دیگر طبق نظر (Schaap et al., 1998) که بر اساس پژوهشی با عنوان مدل‌سازی فازی و بهینه‌سازی تولید لیپاز توسط باکتری *Pseudomonas aeruginosa* حاصل شد، و در آن از روش‌های پاسخ سطحی (RSM) و طرح کامپوزیت مرکزی (CCD) استفاده شد، و مهم‌ترین هدف آن مطالعه به کار بردن RSM و GA برای بهینه‌سازی تولید لیپاز و مدل‌سازی تولید آنزیم لیپاز با استفاده از شبکه عصبی و روش‌های نروفازی بود، نشان داد که با استفاده از شبکه عصبی و نروفازی می‌توان پیش‌بینی دقیقی از تولید لیپاز داشت (Padmavathi, 2013).

در طراحی شبکه‌های عصبی نوع خاصی از معادلات لازم نبوده و با ایجاد رابطه مناسب بین داده‌های ورودی و خروجی می‌توان به نتایج مناسب دست یافت و به علت وجود روابط غیرخطی بین متغیرهای وابسته و پیش‌بینی شونده، شبکه عصبی عملکرد بهتری نسبت به مدل‌های رگرسیون داشته است. نتایج محققین مختلف کارایی بالاتر شبکه عصبی مصنوعی را نسبت به سایر توابع خطی تایید کرده‌اند

بیمارگر *Mycosphaerella graminicola* بررسی شده و نتایج آن نشان داده که فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، کاتالاز، پلی‌فنل اکسیداز و فنیل‌آلانین آمونیا لیاز در دو رقم حساس و مقاوم گندم به وسیله سالیسیلیک اسید در حضور و عدم حضور بیمارگر افزایش پیدا می‌کند (Gholamnezhad et al., 2016). اثر عصاره برگ کرفس نیز در القای مقاومت علیه سفیدک پودری خیار بررسی شده و مشخص شده کاربرد عصاره کرفس باعث القای سیستم دفاع گیاهی در گیاه خیار نسبت به بیماری سفیدک پودری می‌شود (Sirous and Jamali, 2014).

کارایی پایین روش‌های شیمیایی در کنترل بیماری‌های گیاهی مقاومت سویه‌های عامل بیماری در برابر قارچکش‌ها، به همراه مشکلات زیست‌محیطی و هزینه‌های ناشی از مصرف سموم موجب شده که بیشترین توجه محققین به سمت استفاده از ارقام مقاوم معطوف شود و این روش به عنوان بهترین روش کنترل بیماری مطرح گردد. (Gholamnezhad et al., 2016). یکی از بهترین راه‌های دسترسی به ارقام مقاوم شناسایی سریع آنها است. با حمله بیمارگرها به گیاه سامانه‌های دفاعی گیاه فعال شده و بعد از افزایش بیان ژن‌های دفاعی، پروتئین‌ها و آنزیم‌هایی که در ارتباط با فعالیت دفاعی گیاه هستند، مقدارشان افزایش پیدا می‌کند. میزان بیان ژن‌های دفاعی گیاه، و محصولات پروتئینی آن‌ها به عنوان یک عامل مهم در پاسخ‌های دفاعی SAR (Systemic Acquired Resistance) در گیاهان مختلف و علیه بسیاری از بیمارگرها انجام شده است (Gholamnezhad et al., 2016). در گیاهان حساس و مقاوم هر دو میزان آنزیم‌های مرتبط با فعالیت‌های دفاعی افزایش پیدا می‌کند، ولی میزان این افزایش در رقم مقاوم بسیار زودتر از رقم حساس اتفاق می‌افتد، به عبارت دیگر زمانی که بیمارگر به گیاه حمله می‌کند اگر مقدار آنزیم در همان ساعات اولیه پس از تهاجم افزایش پیدا نکند، گیاه نمی‌تواند به بیماری مقاومت نشان بدهد و بیمارگر آن را از بین خواهد برد. بررسی و پیش‌بینی

در برآورد میزان فعالیت آنزیم بود. مقدار ریشه مربعات خطای محاسبه شده مدل نروفازی در مورد تمام تیمارها کمتر از شبکه عصبی مصنوعی و رگرسیون بود که نشان دهنده دقت بالاتر این مدل در مقایسه با سایر مدل‌ها بود.

مدل‌های پیش بینی که در این تحقیق برای پیش بینی فعالیت آنزیم پراکسیداز به کار رفتند هر سه توانستند به میزان قابل قبولی میزان فعالیت آنزیم را در ۲۴ ساعت آینده پیش‌بینی کنند. نظر به نیاز به این چنین اطلاعاتی از سامانه دفاعی گیاه، استفاده بیش از پیش این مدل‌ها در پیش بینی فعالیت آنزیم‌ها و همچنین ژن‌های دفاعی و سایر فعالیت‌های فیزیولوژیکی که در ارتباط با دفاع گیاهی است، می‌تواند راه‌گشای محققین اصلاح نباتات و همچنین بیماری‌شناسی در جهت تولید و اصلاح گیاهان تراریخته باشد. لذا پیشنهاد می‌شود که تحقیقاتی از این دست با تعداد بیشتری داده در مورد هر آنزیم و همچنین با تعداد بیشتری آنزیم صورت گیرد، و همچنین پیشنهاد می‌شود آنزیم‌هایی را استفاده کرد که در مسیرهای متنوع فیزیولوژیکی شرکت دارند و با استفاده از اطلاعات حاصل از این پیش بینی‌ها مسیریایی که در سیستم‌های بیولوژیکی فعال هستند، با یکدیگر ارتباط داد. همچنین نتایج نشان داد که مدل نروفازی دارای کارایی بالاتری جهت پیش‌بینی فعالیت آنزیم پراکسیداز نسبت به سایر مدل‌ها است.

(Taghizadeh Mehrjardi et al., 2013).

تمامی این روش‌ها بر پایه فرض دقیق بودن متغیرهای مورد مطالعه و مشاهدات مربوط به آن‌ها استوار است و روابط بین متغیرها نیز دقیق فرض شده‌است. در حالی که در سیستم‌های زیستی مثل فعالیت آنزیم‌ها، معمولاً مشاهدات یا روابط ناشناخته‌ای بین متغیرها وجود دارد، در چنین شرایطی از مدل‌هایی می‌توان بهره گرفت که قادر به ارائه الگوهای مناسب‌تری از روابط بین متغیرها باشند، به گونه‌ای که این مدل‌ها بتوانند انطباق بیشتری با دنیای واقعی داشته باشند. بدین ترتیب با توجه به ماهیت ابهام‌دار پدیده‌های مرتبط با عوامل بیماری‌زا و میزان فعالیت آنزیم با تقریبی بودن مقادیر اندازه‌گیری شده میزان فعالیت آنزیم، به نظر می‌رسد کارایی بالاتر مدل مبتنی بر مجموعه‌های فازی در پیش‌بینی فعالیت آنزیم به همین علت باشد (Mohammadi, 2007). محققین نتیجه گرفتند که روش رگرسیون فازی در شرایطی که روابط ابهام‌دار بین متغیرها و به طور کلی در مواردی که با خطاهای ناشی از ابهام در ساختار معادلات رگرسیونی مطرح است، می‌تواند مکمل و جایگزین مناسبی برای روش رگرسیون آماری تلقی شود (Mohammadi and Taheri, 2005). در این تحقیق نیز نتایج مشابهی بدست آمد. به طوری که شبکه عصبی مصنوعی در مقایسه با نروفازی دارای کارایی کمتری

References

- ABDULAZIZ, A., Y. AL-ASKAR and M. RASHAD, 2010. Efficacy of some plant extracts against *Rhizoctonia solani* on Pea. *Journal of Plant Protection Research*, 50 (3): 239-243.
- AMINI, M., K. C. ABBASPOUR, H. KHADEMI, N. FATHIANPOUR, M. AFYUNI and R. SCHULIN, 2005. Neural network models to prediction exchange capacity in arid regions of Iran. *European Journal of Soil Science*, 53: 748-757.
- AZIMI, A. A., H. B. DELNAVAZ and G. A. MANSOUR, 2006. Antifungal effect of aqueous alcoholic and phenolic extracts of seed and leaves of Sorghum bicolor against *Fusarium solani*, *Fusarium poa* in Persian. *Journal of Medicinal Plants*, 6 (1): 26 - 32.
- BAKKALI, F., S. AVERBECK, D. AVERBECK and M. IDAOMAR, 2008. Biological effects of essential oils- A review. *Food Chemistry Toxicology*, 46: 446-475.
- BARCELO, A. R. 1997. Lignification in plant cell walls. *International Review of Cytology*, 176: 87-132.
- BATTA, Y. A. 2004. Effect of treatment with *Trichoderma harzianum* Rifia formulated in invert emulsion on postharvest decay of blue mold. *Food Microbiology*, 96: 281- 288.
- BRADFORD, M. M. 1967. A rapid sensitive method for the

- quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- BRUS, D. J., KEMPEN, B. and G. B. M. HEUVLINK, 2011. Sampling for validation of digital soil maps. *European Journal of Soil Science*, 62: 394-407.
- DAAYF, F., A. SCHMITT and R. R. BELANGER 1997. Evidence of phytoalexins in cucumber leaves infected with powdery mildew following treatment with leaf extracts of *Reynoutria sachalinensis*. *Plant Physiology*, 113: 719 – 727.
- DE GARA, L., M. C. DE PINTO and F. TOMMASI, 2003. The antioxidant systems visavis reactive oxygen species during plant-pathogen interaction. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41: 863-870.
- DURNER, J., J. SHAH and D. F. KLESSIG, 1997. Salicylic acid and disease in plants. *Trends in Plant Science*, 2: 266-274.
- ETEBARIAN, H. R., P. L. SHOLBERG, K. C. EASTWELL, and R. J. SAYLER, 2005. Biological control of apple blue mold with *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiology*, 51: 591-598.
- GHOLAMNEJAD, J., H. R. ETEBARIAN, A. ROUSTAEE, and N. A. SAHEBANI, 2009. Biological control of apples blue mold by isolates of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Plant Protection Research*, 49: 270-275.
- GHOLAMNEZHAD, J., F. SANJARIAN, E. M. GOLTAPPEH, N. SAFAEI and K. RAZAVI, 2016. Effect of salicylic acid on enzyme activity in wheat in immediate early time after infection with of salicylic acid *Mycosphaerella graminicola*. *Plant Sciences*, 47: 1-8.
- GONG, Y., P. M. A. TOIVONEN, O. L. LAU and P. A. WIERSMA., 2001. Antioxidant system level in 'Braeburn' apple is related to its browning disorder. *Academia Sinica Taipei Journal*, 42: 259-264.
- HAN, J., M. KAMBER and J. PEI, 2011. *Data mining: concepts and techniques*. Elsevier.
- HERGER, G., F. D. KLINGAUF, E. H. MANGOLD, P. POMMER and M. SCHERER, 1988. Efficacy of extracts of *Reynoutria sachalinensis* (F. Schmidt) Nakai against fungal diseases, especially powdery mildews. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes*, 40(4): 56 – 60.
- JANISIEWICZ, W. J. and L. KORESTENT, 2002. Biological control of postharvest disease of fruits. *Annual Review of Phytopathology*, 40: 411-441.
- JAVADZARIN, I. and B. MOTESHARE ZADEH, 2016. Evaluation of multivariate regression models and artificial neural network to predict the activity of antioxidant enzymes in wheat shoots (*Triticum aestivum*) under cadmium toxicity. *Iranian Journal of Soil and Water Research*, 46: 727-737. (In Persian)
- MOHAMMADI, J. 2007. Testing an artificial neural network for predicting soil water retention characteristics from soil physical and chemical properties. 17th World Congress of Soil Science, Thailand, Paper No 221.
- MOHAMMADI J. and M. TAHERI, 2005. Estimation of pedotransfer function using fuzzy regression. *Journal of Agriculture Science and Technology*, 2: 51-60. (In Persian)
- PADMAVATHI, M. 2013. Fuzzy modeling and optimization of lipase production using *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Current Biotechnology*, 2(1):1-6.
- SCHAAP, M. G., F. J. LEIJ and M. T. VAN GENUCHTEN, 1998. Neural network analysis for hierarchical prediction of soil hydraulic properties. *Journal of Soil Science Society of America*, 62: 847-855.
- SIROUS, A. and A. H. JAMALI ZAVAREH, 2014. Effectiveness of celery leaf extraction the induction of resistance against cucumber powdery mildew, 50(2): 151-161.
- TAGHIZADEH MEHRJARDI, R., F. SARMADIAN, G. R. SAVAGHEBI, M. OMID, N. TOMANIAN, M. G. ROUSTA and M. H. RAHIMIAN, 2013. Comparison of fuzzy techniques, genetic algorithms, neural networks and multivariate regression prediction of soil salinity (Case study: Ardekan city). *Journal of Range and Watershed Management*, 66: 207-222. (In Persian).

بررسی تأثیر تغذیه‌ای درختان سیب بر شدت بیماری شانکر سیتوسپورایی (*Cytospora cincta*) در باغ‌های سمیرم

احمد حیدریان✉ و مسعود تدین‌نژاد

به ترتیب مربی پژوهش بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی و مربی پژوهش بخش تحقیقات خاک و آب، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی اصفهان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اصفهان، ایران
(تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۹۵؛ تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۹۷)

چکیده

بررسی‌های مقدماتی در خصوص وضعیت تغذیه‌ای ۲۹ باغ سیب تجاری گلدن دلشز آلوده به شانکر سیتوسپورایی نشان داد که غالب باغ‌های آلوده کمبود عناصر معدنی پتاسیم و کلسیم و بیش‌بود نیتروژن دارند. در این راستا، آزمایش باغی بصورت فاکتوریل در قالب بلوک‌های کامل تصادفی با ۱۸ تیمار (نیتروژن و پتاسیم هر کدام در ۳ سطح و کلسیم در ۲ سطح) و ۳ تکرار روی رقم گلدن دلشز ۲۷ ساله در شهرستان سمیرم به‌منظور بررسی تأثیر متعادل عناصر معدنی نیتروژن، پتاسیم و کلسیم در پیش‌گیری از بروز و توسعه شانکر سیتوسپورایی ناشی از قارچ *Cytospora cincta* Fries در سال‌های ۹۴-۱۳۹۳ انجام شد. نتایج نشان دادند که، شاخص انحراف از درصد بهینه عناصر معدنی نیتروژن، پتاسیم و کلسیم گزینه‌ای مناسب برای پیش‌بینی بروز و توسعه شانکر سیتوسپورایی درختان سیب است. کمبود یا بیش‌بود هر کدام از عناصر غذایی مورد ارزیابی باعث عدم تعادل در غلظت دیگری شده و شدت بیماری را تحت تأثیر قرار داد. بیش‌ترین درصد سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری (AUDPC) در تیمارهایی دیده شد که مقدار نیتروژن مصرفی در آن‌ها کم‌تر یا بیش‌تر از مقدار بهینه بود. استفاده توأم از نیتروژن و پتاسیم باعث گردید پتاسیم تأثیر مستعد کنندگی نیتروژن به شانکر سیتوسپورایی را کاهش دهد. تأثیر کلسیم در کاهش بیماری نسبت به نیتروژن و پتاسیم کم‌تر بود. نتایج این پژوهش نشان داد که استفاده متعادل عناصر غذایی نیتروژن و پتاسیم در خاک و محلول‌پاشی کلسیم درختان سیب در منطقه سمیرم، بر اساس میزان توصیه شده، بیماری شانکر سیتوسپورایی را تا ۸۳/۷۹٪ کاهش می‌دهد.
واژه‌های کلیدی: سیب، سیتوسپورا، شانکر، عناصر غذایی.

Nutritional effects of apple trees on *Cytospora* canker severity (*Cytospora cincta*) in Semirom orchards

A. HEIDARIAN✉ and M. TADAYON NEJAD

MSc. Plant Protection Research Department & MSc. Soil and water Research Department; Respectively; Esfahan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Esfahan, Iran

Abstract

Preliminary studies on nutritional status of 29 commercial Golden Delicious orchards infected to *Cytospora* canker disease, showed deficiency of potassium and calcium and excess of nitrogen in most of infected orchard. In this regard, an orchard's trials was conducted to determine the effects of balanced potassium, nitrogen and calcium elements on prevention of incidence and development of *Cytospora* canker disease of 27 years apple Golden Delicious cultivar during 2014-15 in the commercial orchard at Semirom, Iran. Eighteen treatments (nitrogen and potassium at 3 levels and calcium at 2 levels) were designed in a factorial complete randomized block design with three replications. The results showed that deviation from optimum percentage index of nitrogen, potassium and calcium is proper option for predicting the occurrence and development of *Cytospora* canker disease of apple trees. Deficiency or excess of any nutrient caused imbalances in other elements and influenced the severity of the disease extensively. The highest percentage area under disease progress curve occurred in most of the treatments, that nitrogen rate was less or more than the optimal amount. Combined application of nitrogen and potassium in most of the treatments significantly reduced the predisposing effects of high nitrogen application. The impact of calcium on reducing disease was lower than nitrogen and potassium. This results of this study showed that, balance utility of nutrients such as nitrogen, potassium in soils of Semirom area orchards and spraying of calcium based on recommended manual reduced *Cytospora* canker disease at 83.79 percent.

Key words: Apple, *Cytospora*, canker, nutritional elements.

مقدمه

باکتری‌ها، قارچ‌ها و نماتدها تجمع پیدا می‌کنند غیر قابل دسترس برای گیاه هستند. محدودیت رشد ریشه در اثر عوامل بیماری‌زا، جذب مواد غذایی را تحت تأثیر قرار می‌دهد و گیاهان را مستعد به آلودگی شدیدتر با بیمارگرهای دیگر می‌کند. تغییر در نفوذپذیری غشای سیستم آوندی و یا تخریب آن باعث کمبود سیستمیک یا موضعی عناصر غذایی می‌شود. افزایش نفوذپذیری منجر به از دست دادن مواد غذایی از طریق تراوش‌های ریشه یا برگ می‌شود که نتیجه آن جذب عوامل بیماری‌زا و آلودگی‌های بیشتر است (Huber and Haneklaus, 2007).

عناصر غذایی به طور معمول برای افزایش محصول، سلامت و بهبود کیفیت گیاه استفاده می‌گردد. استفاده صحیح از آن‌ها در تولید محصولات زراعی و باغبانی برای بهبود بهره‌وری تولید و یک اکوسیستم پایدار زیست‌محیطی حیاتی است. تغذیه گیاه به مقدار زیادی مقاومت یا حساسیت آن را به بیماری، ساختار بافتی و مرفولوژیکی، شدت بیماری‌زایی بیمارگر و توانایی آن‌ها برای بقاء تحت تأثیر قرار می‌دهد. عناصر معدنی، در بسیاری از موارد، اولین و مهم‌ترین سد دفاعی در برابر بیماری‌های گیاهی هستند که تمام اجزاء هرم بیماری‌ها (میزبان، شرایط محیطی و بیمارگر) را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Huber and Haneklaus, 2007). علاوه بر آن، بیماری‌های گیاهی همچنان به‌صورت محدود کننده در تولید محصولات کشاورزی ایفای نقش می‌کنند. کنترل بیماری‌های گیاهی با استفاده از آفت‌کش‌ها، نه تنها باعث نگرانی‌های جدی در مورد ایمنی مواد غذایی و کیفیت محیط‌زیست گردیده است که مقاومت به آفت‌کش‌ها را نیز در پی داشته است. در این راستا، نیاز به روش‌های جایگزین در مدیریت بیماری‌ها است. به‌طور خاص، عناصر غذایی تحمل یا مقاومت گیاهان به عوامل بیماری‌زا را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Dordas, 2008).

مقاومت میزبان به بیماری به‌واسطه توانایی‌اش در نفوذ، گسترش و تولید مثل بیمارگرهای مهاجم است (Graham and

شانکر سیتوسپورایی ناشی از قارچ‌های *Valsa*، *Cytospora* و *Leucostoma* (Mehrabi et al., 2008) یکی از مهم‌ترین بیماری‌های درختان سیب (*Malus domestica* Borkh.) است که در سال‌های اخیر در باغ‌های شهرستان سمیرم توسعه پیدا کرده و خسارت ناشی از آن افزایش یافته است. دلایل این واقعیت پیچیده و نامشخص است، اما غالباً در ارتباط با محرک‌هایی مانند تغییرات دما و خشکسالی، عدم تعادل بین عناصر غذایی و برهم‌کنش بین آن‌ها اتفاق افتاده است.

استراتژی جدید در مدیریت تلفیقی، استفاده از ترکیبات شیمیایی زیست‌سازگار است که مقاومت به بیماری را در گیاهان از طریق مقاومت القایی افزایش می‌دهند (Altamiranda et al., 2008) در این بین، عناصر غذایی نیتروژن و پتاسیم به‌طور خاص مورد توجه قرار گرفته و استفاده متعادل از آن‌ها منجر به کنترل موفق بیماری‌های گیاهی ناشی از قارچ‌ها، ویروس‌ها و باکتری‌ها شده است (Veromann et al., 2013; Zafar and Atahar, 2013; Geary et al., 2014). عوامل بیماری‌زا، قابل دسترس بودن عناصر غذایی، جذب، توزیع یا استفاده از آن‌ها توسط گیاهان را کاهش می‌دهند. بنابراین، یکی از عوامل محدود کننده در بهبود بهره‌وری تولید و کیفیت محصول هستند. علائم بیماری اغلب بیانگر وضعیت تغذیه‌ای دگرسان شده گیاه است و غالباً تشخیص بین عوامل زنده و غیرزنده دخیل در بروز علائم بسیار مشکل است.

در یک پژوهش، مشخص گردیده است که عدم تحرک منگنز در مکان‌های آلوده به قارچ‌های *Gaeumannomyces grisea* و *graminis* var *tritici* در گندم و برنج آن‌ها را به‌ترتیب، مستعد به بیماری‌های پاخوره و بلاست می‌کند. توانایی اکسید کردن منگنز از فرم قابل دسترس گیاه به فرم اکسید شده غیر قابل دسترس یک سازوکار بیماری‌زایی بیمارگر است و جدایه‌هایی از این دو بیمارگر که نتوانند منگنز را اکسید کنند بیماری‌زا نخواهند بود (Thompson and Huber, 2006). عناصر غذایی که اطراف مکان‌های آلوده توسط

باعث بیان ژن‌ها در مقاومت افقی می‌شود بلکه موانع فیزیکی و شیمیایی در برابر آلودگی به بیمارگر نیز بهبود می‌یابد (Taiz and Zeiger, 2013; Marschner, 2012; Huber, 1980).

هدف از این پژوهش ارزیابی وضعیت تغذیه‌ای باغ‌های سالم و آلوده به شانکر سیتوسپورایی و بررسی تأثیر عناصر غذایی نیتروژن، پتاسیم و کلسیم و برهم‌کنش آن‌ها با میزبان در کاهش شدت بیماری شانکر سیتوسپورایی درختان سیب گلدن دلشز بود.

روش بررسی

ارزیابی عناصر غذایی در برگ و خاک باغ‌های آلوده و

سالم: برای ارزیابی نقش عناصر غذایی در بروز و توسعه‌ی سیتوسپورای همراه درختان سیب در منطقه سمیرم، ۲۹ باغ آلوده و ۲۳ باغ سالم سیب دارای رقم گلدن دلشز (بیش‌ترین میزان آلودگی در منطقه روی این رقم مشاهده می‌شود) به‌طور تصادفی و به‌گونه‌ای انتخاب شد که نماینده باغ‌های منطقه باشند (تغذیه، شرایط اقلیمی، پستی و بلندی، بافت خاک و آبیاری، شاخص‌های هر محل نمونه‌برداری بودند). هر باغ حداقل ۵۰۰۰ مترمربع وسعت و درختان آن‌ها، بین ۲۵-۷ سال سن داشتند. در هر باغ ۵ درخت به‌صورت تصادفی انتخاب شد. تقریباً ۹۰ روز بعد از اتمام گل، از تعداد حداقل ۵۰ برگ توسعه‌یافته شاخسارهای سال نمونه‌برداری شد. نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل و پس از تهیه‌ی نمونه‌های مرکب برگ، کل عناصر غذایی آن‌ها به روش هضم تر (Wet Digestion) اندازه‌گیری شد. اعداد غلظت عناصر غذایی برگ به دست آمده به روش انحراف از درصد بهینه (Deviation from Optimum Percentage) یا DOP در برگ درختان باغ‌های آلوده نسبت به غلظت مرجع (C_{ref}) در برگ درختان باغ‌های سالم عاری از بیماری (۲۳ باغ) محاسبه و تفسیر گردید. شاخص DOP به‌صورت درصد انحراف از غلظت یک عنصر غذایی (بر اساس درصد ماده خشک) در مقایسه با مقدار بهینه به‌دست‌آمده تحت عنوان مقدار مرجع

(Webb, 1991). به عبارت دیگر، تحمل میزبان در ارتباط با توانایی آن در حفظ رشد و تولید مطلوب با وجود بیماری مشخص خواهد شد. مقاومت در ارتباط با ژنوتیپ بیمارگر، میزبان و شرایط محیطی است، با وجود این‌که مقاومت یا تحمل به بیماری به‌صورت ژنتیکی کنترل می‌شود (Agrios, 2005) اما تحت تأثیر محیط و به‌خصوص کمبود و بیش‌بود عناصر غذایی نیز قرار می‌گیرند (Krauss, 1999). عناصر غذایی گسترش یک بیماری را با تغییر فیزیولوژی گیاه یا بیمارگر یا هر دو تحت تأثیر قرار می‌دهند (Marschner, 1995). عناصر غذایی فیزیولوژی، بیوشیمیایی و سلامت دیواره‌های سلولی، نشأت‌غشایی و ترکیبات شیمیایی میزبان را تحت تأثیر قرار می‌دهند و علاوه بر آن، میزان رشد را در مراحل حساس میزبان به بیماری با فرار یا دوری‌جستن از بیماری تحت تأثیر قرار می‌دهند. همچنین، عناصر غذایی با تغییر در محیط خاک قادر هستند گسترش بیمارگر را تحت تأثیر قرار دهند (Dordas, 2008).

تغذیه متعادل گیاه یک فرایند اساسی در کشاورزی پایدار است، برای این‌که در اغلب موارد در کنترل بیماری‌های گیاهی مقرون به‌صرفه‌تر و سازگار با محیط زیست است. استفاده مطلوب از عناصر غذایی، بیماری را به کم‌ترین سطح قابل قبولی کاهش می‌دهد. در این‌حالت، کنترل آن با روش‌های مدیریتی دیگر یا آفت‌کش‌ها، موفق‌تر و از نظر اقتصادی توجیه‌پذیرتر است. تغذیه مطلوب یکی از روش‌های جایگزین کنترل بیماری‌های گیاهی است که در افزایش عملکرد و کیفیت محصول نیز تأثیر به‌سزایی دارد (Batish et al., 2007). عناصر غذایی در رشد و نمو گیاهان، میکروارگانیزم‌ها و کنترل بیماری‌های گیاهی نقش اساسی ایفا می‌کنند (Agrios, 2005).

بهترین روش مدیریت شانکر سیتوسپورایی درختان سیب مدیریت کنترلی چندگزینه‌ای است. در این بین، حفاظت گیاه با تغذیه مطلوب آن، یکی از اساسی‌ترین گزینه‌ها است. به نظر می‌رسد که روش چندگزینه‌ای در مدیریت بیماری‌ها نه‌تنها

بافت خاک مکان آزمایشی در عمق ۰ تا ۶۰ سانتی‌متر رسی‌سیلتی (جدول ۲) و سیستم آبیاری قطره‌ای بود. میزان و دور آبیاری با توجه به فصل به‌گونه‌ای تنظیم گردید که هیچ تنش آبی به درختان اعمال نشود.

طرح آماری: برای ارزیابی اثرات ممتد تیمارهای غذایی روی توسعه شانکر سیتوسپورایی، تیمارهای زیر روی درختان گلدن دلشیز انتخابی در اسفند سال‌های ۱۳۹۳ و ۱۳۹۴ قبل از بیدار شدن درختان انجام شد. هر تیمار دارای سه تکرار با هر واحد آزمایشی یک درخت بود (اطراف درختان هر واحد آزمایشی یک ردیف حاشیه در نظر گرفته شد). محلول‌پاشی کلسیم طبق توصیه موسسه خاک‌وآب در ۵ نوبت به فاصله ۸ روز (از زمان تشکیل میوه‌ها) با استفاده از کلرور کلسیم انجام شد.

این پژوهش به‌صورت طرح فاکتوریل در قالب بلوک‌های کامل تصادفی با سه تیمار شامل: نیتروژن در سه سطح (صفر (N_0) ، توصیه کود ازتی برای باغ‌های سمیرم (N_r) و دو برابر توصیه مذکور (N_{2r}))، پتاسیم در سه سطح (صفر (K_0) ، توصیه کود پتاسیمی برای باغ‌های سمیرم (K_r) و دو برابر توصیه مذکور (K_{2r}) و کلسیم در دو سطح (صفر (Ca_0) و محلول‌پاشی (Ca_r)) اجرا گردید. هر تیمار دارای سه تکرار و هر واحد آزمایشی شامل یک درخت بود (اطراف درختان هر واحد آزمایشی یک ردیف حاشیه در نظر گرفته شد).

میزان بهینه عناصر غذایی باغ‌های سیب براساس توصیه کودی درختان دانه‌دار (Malakouti, 2014) و پژوهش انجام شده توسط شهابی و همکاران (انتشار نیافته) در باغ‌های سیب سمیرم به ازای هر درخت شامل: ۷۰۰ گرم سولفات آمونیم، ۵۰۰ گرم سوپر فسفات تریپل، ۵۰۰ گرم سولفات پتاسیم، ۲۵۰ گرم سولفات آهن، ۳۵۰ گرم سولفات روی، ۸۰ گرم اسید بوریک می‌باشد. استفاده از این مقادیر، بستگی به میزان عناصر در خاک محل آزمایش دارد، از این‌رو نمی‌توان در مورد همه‌ی خاک‌های سمیرم تعمیم داد، ولی چون حدود بحرانی

(Montanes *et al.*, 1993) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

$$DOP = [(C \times 100) / C_{ref}] - 100$$

DOP = انحراف از درصد بهینه؛ C = غلظت هر عنصر؛

C_{ref} = غلظت متوسط در باغ‌های سالم.

نمونه‌برداری از خاک ۲۹ باغ آلوده و ۲۳ باغ سالم جهت انجام آزمایش‌های خاک در اواسط فصل رشد انجام شد. در هر باغ ۵ درخت به تصادف انتخاب و در سایه‌انداز هر درخت ۳ نمونه خاک از عمق ۰-۶۰ سانتی‌متری خاک با دستگاه چال‌زن (Auger) برداشته شد و نهایتاً در آزمایشگاه به‌صورت یک نمونه مرکب خاک از هر باغ برای تعیین بافت، هدایت الکتریکی، اسیدیته گل اشباع، کربن آلی، میزان گچ، مواد خثی شونده و برخی عناصر غذایی خاک آزمون شد.

جداسازی و انتخاب جدایه: در بهار و پاییز سال ۱۳۹۲

از ده باغ آلوده انتخابی، بین ۲۰ تا ۳۰ نمونه شاخه بیمار به آزمایشگاه انتقال داده شد و از حاشیه زخم‌های فعال و از پیکنیده‌های تشکیل‌شده روی چوب به روش Fotouhifar *et al.* (2007) قارچ عامل بیماری جدا و خالص‌سازی شد. شدت بیماری‌زایی جدایه‌های به‌دست‌آمده روی شاخه‌های بریده رقم گلدن دلشیز به روش Heidarian *et al.* (2001) بررسی شد. جدایه با فراوانی و شدت بیماری‌زایی بالاتر انتخاب و برای مایه‌زنی در آزمایش‌ها استفاده شد. بر اساس خصوصیات مورفولوژیک جدایه قارچ *Cytospora cincta* Fries تشخیص داده شد که به‌عنوان گونه غالب در منطقه سمیرم گزارش شده است (Mehrabi *et al.*, 2011).

اطلاعات مکان آزمایشی: آزمایش در یک باغ تجاری

گلدن دلشیز ۲۷ ساله آلوده در شهرستان سمیرم (مهرگرد) با عرض شمالی ۳۴' ۱۲" و طول شرقی ۳۱' ۴۸" ۵۱° اجرا گردید. این منطقه از نظر آب‌وهوایی جزو مناطق با تابستان گرم‌و‌خشک و زمستان‌های معتدل سرد است. متوسط میانگین دمای ماهیانه ۱۳ سال اخیر از ۷/۱۲ تا ۱۷/۶۴ درجه سلسیوس و میانگین بارندگی سالیانه در ۱۳ سال اخیر ۵۲۰/۷ میلی‌متر بوده است (جدول ۱).

بعد از تمام‌گل، نمونه‌برداری از حداقل ۵۰ برگ توسعه یافته (برگ ششم از انتهای شاخه) بر روی ساقه‌های سال جاری از هر تکرار تیمار انجام شد. نمونه‌های برگ در آزمایشگاه از نظر عناصر غذایی نیتروژن، پتاسیم و کلسیم تجزیه گردیدند.

نتیجه و بحث

ارزیابی عناصر غذایی در خاک و برگ باغ‌های آلوده و

سالم: بر اساس ارزیابی که روی خاک باغ‌های سالم در عمق ۰ تا ۶۰ سانتی متری انجام شد، $64/28\%$ باغ‌ها بافت خاک سیلتی رسی و $35/72\%$ بافت خاک رسی سیلتی داشتند. کربن آلی آن‌ها بین $1/77-0/33$ درصد، گچ بین ۱۵-۹ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم، هدایت الکتریکی بین $1/2-0/4$ دسی‌زیمنس بر متر و اسیدیته (pH) بین $7/8-7/4$ متغیر بود. درحالی‌که در باغ‌های آلوده $69/23\%$ باغ‌ها بافت خاک سیلتی رسی و $30/77\%$ آن‌ها بافت رسی سیلتی داشتند. کربن آلی آن‌ها بین $2/11-0/56$ درصد، گچ بین ۲۰-۹ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم، هدایت الکتریکی بین $1/1-0/51$ دسی‌زیمنس بر متر و اسیدیته (pH) بین $7/3-7/8$ متغیر بود (جدول ۳). آب آبیاری مورد استفاده در باغ‌های آلوده و سالم بدون محدودیت شوری، سدیم و کلر بود. همان‌گونه که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، دامنه تغییرات عناصر غذایی نیتروژن و پتاسیم در درختان سالم و آلوده هردو نسبتاً زیاد است اما فراوانی و نحوه توزیع آن‌ها به‌گونه‌ای است که در نهایت باعث بروز یا عدم بروز بیماری می‌شود.

برای مقایسه مقادیر غلظت عناصر غذایی در برگ درختان سیب به‌جای استفاده از غلظت‌های استاندارد از شاخص DOP که غلظت‌های مرجع محلی درختان سالم را مبنا قرار می‌دهد (Malakouti and Gheibi, 1997) استفاده شد. در این راستا، غلظت عناصر غذایی پرنیاز و کم‌نیاز در برگ درختان سالم رقم گلدن دلشیز مربوط به ۲۳ باغ با مدیریت مناسب تغذیه‌ای اندازه‌گیری شد و غلظت مرجع (C_{ref}) براساس میانگین غلظت‌ها در آن‌ها تعیین گردید که این نتایج در جدول ۴ ارائه گردیده است.

عناصر غذایی در خاک‌های سمیرم بررسی نشده است، بنابراین در شرایط کنونی نمی‌توان بر اساس آزمون خاک توصیه نمود و استفاده از توصیه موسسه خاک و آب معمول است. محلول‌پاشی کلسیم در تیمارهای خاص، طبق توصیه موسسه خاک و آب در ۵ نوبت به فاصله ۸ روز (از زمان تشکیل میوه‌ها) با استفاده از کلرور کلسیم با غلظت پنج در هزار انجام شد.

بر اساس نوع تیمار، عناصر معدنی با ۳۰ کیلوگرم کود حیوانی پوسیده مخلوط گردید و در انتهای سایه‌انداز درخت که ریشه‌های فعال قرار دارند در ۲ چال‌کود در جهت‌های شرقی‌غربی و در سال دوم در جهت‌های شمالی‌جنوبی در زیر قطره‌چکان‌ها قرار داده شد. قطر چاله‌ها بین ۴۰ تا ۵۰ سانتی‌متر و عمق آن‌ها بسته به پراکنش ریشه‌های درخت بین ۵۰ تا ۶۰ سانتی‌متر بود.

مایه‌زنی بیمارگر و ارزیابی بیماری: مایه‌زنی در دو فصل

رویشی و شش هفته پس از اعمال تیمارها با دیسک‌های به قطر ۵ میلی‌متر محیط غذایی سیب‌زمینی دکستروزآگار برداشتی از حاشیه کلنی‌های در حال رویش فعال انجام شد. به این ترتیب که، با چوب‌پنبه‌سوراخ‌کن دیسکی از پوست شاخه‌های انتخابی برداشته شد و طرف میسلیم‌دار دیسک را روی کامبیوم قرار داده و روی آن با دولایه پارافیلیم و دولایه چسب نواری کاغذی پوشانده شد. برای هر تیمار یک درخت در نظر گرفته شد و در سال اول روی دو شاخه با قطر تقریباً یکسان در ۴۰ تا ۵۰ سانتی‌متری محل اتصال به تنه در دو جهت جغرافیایی شرقی‌غربی و در سال دوم در دو جهت جغرافیایی شمالی‌جنوبی مایه‌زنی گردید. در هر تیمار یک شاخه با دیسک‌های سیب‌زمینی دکستروزآگار سترون به عنوان شاهد مایه‌زنی گردید. ارزیابی براساس اندازه‌گیری مساحت شانکر با استفاده از طلق شفاف (Heidarian *et al.*, 2001) در دو نوبت آخر خرداد و مهرماه هر سال آزمایشی بود.

تجزیه عناصر نیتروژن، پتاسیم و کلسیم در برگ

تیمارهای آزمایشی: در سال دوم آزمایشی و تقریباً ۹۰ روز

جدول ۱- مقایسه متوسط دمای ماهیانه و متوسط بارندگی سالیانه سمیرم در سال‌های ۱۳۹۴-۱۳۹۳ در مقایسه با سال‌های ۱۳۹۴-۱۳۸۱

Table 1. Mean monthly temperature and mean annual precipitation in 2014 and 2015 in Semirom compared to the same figures for 2002-2015

Year	Annual precipitation (mm)	Mean high Temperature (monthly) (°C)	Mean low Temperature (monthly) (°C)
2014	386.1	17.25	6.58
2015	370.1	17.97	7.43
Average (2002-15)	520.7	17.64	7.12

جدول ۲- ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک محل اجرای آزمایش

Table 2. Characteristics of the soil in the experimental site

Soil depth (cm)	Clay	Silt	Sand (%)	TNV	OC	EC (dS/m)	pH	P	K	Zn	Cu	Mn	Fe	Gypsum mg/100
0-60	55	37	8	55	1.03	1.04	7.5	43	29 5	2.2 6	0.6 8	12.6 6	6.5 2	15

جدول ۳- دامنه تغییرات ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک باغ‌های مورد آزمایش در عمق ۰ تا ۶۰ سانتی‌متری

Table 3. Ranges of physical and chemical properties of the soils (0-60 cm) in the experimental trial site

Depth cm	Orchards	Clay	Silt	Sand	K (ava.)	P (ava.)	TNV	OC	pH	EC	CaSO4
		%			mg/kg		%			dS/m	mg/100
0-60	Healthy	35-57	32-50	19-86	170-956	1.8-33.3	18-38	0.33-1.77	7.4-7.8	0.4-1.2	9-15
0-60	Infected	27-37	32-38	11-29	300-750	2.2-33.2	25.5-50.5	0.56-2.11	7.3-7.8	0.51-1.1	9-20

جدول ۴- غلظت مرجع عناصر غذایی پرنیاز و کم‌نیاز در باغ‌های گل‌دلیشز سالم ۹۰ روز بعد از تمام‌گل

Table 4. Concentration reference determined from leaf macro and micro nutrients contents at 90 DAFB in Golden Delicious cultivar in healthy orchards

N	P	K	Ca	Mg	Fe	Mn	Zn	Cu
		%			mg/kg			
1.89	0.17	1.37	2.06	0.96	88.12	27.04	16.87	11.13

بیماری‌زا دارند (Pozza and Pozza, 2012; Thompson and Huber, 2006; Biggs and Peterson, 1990; Zahoor et al., 2017)، انتخاب شد و در شرایط طبیعی تأثیر آن‌ها بر شدت بیماری شانکر سیتوسپورایی درختان سیب بررسی شد.

تجزیه عناصر نیتروژن، پتاسیم و کلسیم در برگ

تیمارهای آزمایشی: مقایسه میانگین غلظت عناصر غذایی مورد ارزیابی با استفاده از آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ در برگ درختان تیمار شده گل‌دلیشز در سال دوم آزمایشی، ۹۰ روز بعد از تمام‌گل، نشان داد که در تمام تیمارها با تغییر در میزان مصرف عناصر مورد ارزیابی مقدار آن‌ها در وزن خشک برگ نیز تغییر می‌کند و تیمارها از نظر آماری در گروه‌های مختلف قرار گرفتند (جدول ۶ و شکل ۱).

روش DOP به‌عنوان شاخصی برای تشخیص وضعیت تغذیه‌ای درختان و تعیین کمبود و بیش‌بود عناصر غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد. وقتی عناصر بر اساس مقادیر DOP اولویت‌بندی شوند، عنصر غذایی با شاخص DOP کوچک‌تر از صفر نشان‌دهنده‌ی نیاز بیش‌تر نسبت به سایر عناصر غذایی خواهد بود (جدول ۵). علاوه بر آن، شاخص تعادل تغذیه‌ای (ΣDOP) که از مجموع قدرمطلق‌های DOP به‌دست می‌آید نیز محاسبه گردید (جدول ۵). مقادیر بالاتر ΣDOP بیان‌گر عدم تعادل تغذیه‌ای بیش‌تر در گیاه خواهد بود. درصد بالای آهک در خاک‌های سمیرم (جدول ۳) می‌تواند یکی از دلایل کمبود و اختلالات تغذیه‌ای در این باغ‌ها باشد.

بر اساس شاخص‌های DOP و ΣDOP در باغ‌های آلوده (جدول ۵) سه عنصر نیتروژن، پتاسیم و کلسیم که در ساختار و استحکام بافت‌های گیاهی نقش کلیدی در برابر عوامل

جدول ۵- انحراف از درصد بهینه و شاخص تعادل تغذیه‌ای عناصر غذایی پرنیاز و کم‌نیاز در باغ‌های

گلدن دلیشز آلوده به *Cytospora cincta* Fries ۹۰ روز بعد از اتمام گل*

Table 5. DOP and Σ DOP index determined from leaf macro and micro nutrients contents at 90 days after full boom in Golden Delicious cultivar in infected orchards by *Cytospora cincta* Fries*

Lab. no.	Σ DOP	DOP								
		N	P	K	Ca	Mg	Fe	Mn	Zn	Cu
166	1376	-33	24	-31	-33	-53	-17	-66	180	939
167	618	-29	141	17	-58	-74	-2	-54	95	148
168	803	-29	253	-28	-30	-59	-9	-35	45	315
413	381	15	-24	-18	-56	-6	24	-23	167	-48
414	264	32	18	-5	-67	-28	30	-20	49	-55
415	423	30	12	-9	-55	-4	30	-2	231	-50
423	205	13	71	6	-32	46	22	2	9	4
424	232	47	41	-15	-50	7	44	-3	0	-25
428	224	-10	35	22	-41	27	-19	-9	-49	-12
429	277	-9	35	-24	-15	83	36	45	-16	-14
430	202	-19	29	17	-33	45	5	2	-44	8
431	143	0	29	-5	-35	39	12	0	-13	-10
432	217	4	76	7	-27	56	15	-4	-3	-25
433	212	5	24	11	-49	9	4	-49	-31	-30
437	285	-6	-24	-31	-17	79	11	37	-41	-39
438	311	-30	-29	-26	-33	44	-38	18	-36	-57
439	245	-10	29	7	-26	59	-17	8	-45	-44
211	354	55	6	-9	17	-15	-24	70	116	-42
212	414	13	-6	-33	68	15	-60	152	-37	-30
213	264	21	-6	-27	-11	-38	-54	48	-38	-21
214	292	11	-29	9	-18	-56	0	41	-68	-60
215	329	34	6	11	-33	-29	-3	100	-79	-34
216	471	25	-12	-15	-8	-42	-31	196	-100	-42
221	401	24	0	24-	-17	-42	-41	100	-100	-53
222	221	-2	-29	-16	-28	17	-31	86	-3	-9
223	331	17	6	17	-37	6	-24	177	-36	-11
226	246	4	-18	7	-24	40	-24	75	39	-15
227	300	51	-6	20	-35	17	-18	112	35	-6
228	285	30	-41	-18	-49	14	-17	59	-38	-19
Average	-	8.76	21.07	-6.31	-28.69	5.41	-6.76	36.656	6.52	8.76

*: استانداردهای مقایسه عناصر غذایی رقم گلدن دلیشز براساس نمونه‌برداری از ششمین برگ شاخساره‌های سال جاری، ۹۰ روز بعد از تمام‌گل

(Bergmann 1992). علامت‌های (-) و (+) به ترتیب بین‌گر بیش‌ترین و کم‌ترین مقدار نسبت به بهینه (۰) است.

*: Mineral leaf composition standards for Golden Delicious cultivar, based on sixth-shoot leaves sampled at 90 days after full bloom (Bergmann 1992). Sign (-) and (+) indicates lower and higher content than optimum (0) respectively.

تیمارهایی اتفاق افتاد که عدم تعادل در مقدار نیتروژن و پتاسیم مصرفی وجود داشت. بین میانگین‌های شدت نهایی بیماری در تیمارهای آزمایشی در سطح احتمال ۰.۵٪ اختلاف

ارزیابی عناصر معدنی نیتروژن، پتاسیم و کلسیم روی شدت شانکر سیتوسپورایی: اولین علائم بروز بیماری در هر دو سال آزمایشی حداقل سه هفته بعد از مایه‌زنی و در

معنی‌دار وجود داشت. تأثیر ممتد عناصر معدنی مورد ارزیابی سیب در جدول ۷ ارائه شده است. روند تغییرات شدت روی میانگین شدت بیماری شانکر سیتوسپورایی درختان بیماری با توجه به نوع تیمار متغیر است.

جدول ۶- میانگین مقدار عناصر غذایی نیتروژن، پتاسیم و کلسیم در برگ رقم گلدن دلشیز ۹۰ روز بعد از تمام‌گل در سال دوم آزمایشی*

Table 6. Mean contents of nitrogen, potassium and calcium in Golden Delicious cultivar leaves, at 90 DAFB in treatments at second year trial*

Treatment	N	K	Ca
	%		
N ₀ K ₀ Ca ₀	1.07e	0.88c	0.69g
N ₀ K ₀ Ca _r	1.08e	0.82cd	2.88a
N ₀ K _r Ca _r	1.01e	1.25b	2.14c
N ₀ K _r Ca ₀	0.99e	1.22b	0.98ef
N ₀ K _{2r} Ca _r	1.03e	1.77a	2.09c
N ₀ K _{2r} Ca ₀	0.97e	1.73a	1.03e
N _r K ₀ Ca _r	1.51d	0.84c	2.10c
N _r K ₀ Ca ₀	1.53d	0.77cd	1.30d
N _r K _r Ca _r	1.48d	1.23b	2.20bc
N _r K _r Ca ₀	1.45d	1.23b	1.04e
N _r K _{2r} Ca _r	1.52d	1.69a	2.17bc
N _r K _{2r} Ca ₀	1.50d	1.65a	0.87f
N _{2r} K ₀ Ca _r	1.56cd	0.76cd	2.30b
N _{2r} K ₀ Ca ₀	1.98a	0.68d	1.25d
N _{2r} K _r Ca _r	1.67bcd	1.25b	2.10c
N _{2r} K _r Ca ₀	1.93ab	1.25b	1.07e
N _{2r} K _{2r} Ca _r	1.70abcd	1.72a	2.15bc
N _{2r} K _{2r} Ca ₀	1.83abc	1.77a	1.10e
LSD	0.2922	0.1484	0.1574
CV(%)	12.33	6.99	5.74

*: در هر ستون میانگین‌ها با حروف مشابه براساس آزمون حداقل اختلاف در سطح احتمال ۰.۵٪ اختلاف معنی‌دار ندارند.

*: Means followed by the same letter in the column do not differ statistically through the test of LSD value, at 0.05 probability level.

جدول ۷- میانگین‌های شدت نهایی، سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری (AUDPC) و درصد کاهش بیماری

تحت تأثیر عناصر نیتروژن، پتاسیم و کلسیم در سال‌های ۱۳۹۳ و ۱۳۹۴*

Table 7. Means of final disease severity, area under disease progress curve (AUDPC) and disease reduced percent as affected by nitrogen, potassium and calcium fertilizer applications at 2014 and 2015 years*

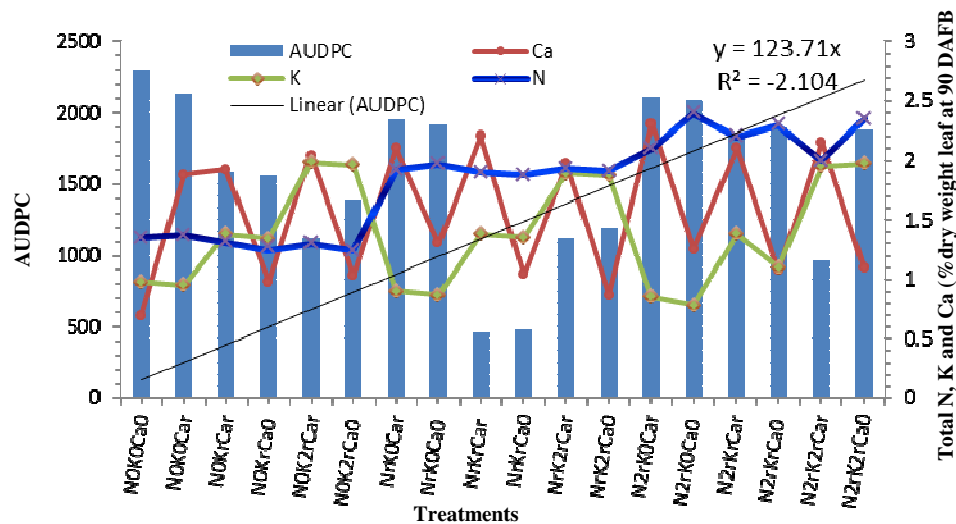
Treatments	Final mean canker lesion size (mm ²)		The Area Under the Disease Progress Curve (AUDPC)		Disease reduced (%)	
	2013	2014	2013	2014	2013	2014
	N ₀ K ₀ Ca ₀	1551.00a	985.00a	1425	2301	0.00
N ₀ K ₀ Ca _r	1491.00ab	879.00ab	1373	2130	4.62	10.76
N ₀ K _r Ca _r	1139.00fg	537.67hij	1035	1589	26.58	45.41
N ₀ K _r Ca ₀	1180.00f	580.33ghi	1065	1558	23.90	41.08
N ₀ K _{2r} Ca _r	949.70h	360.33k	810	1120	38.77	63.42
N ₀ K _{2r} Ca ₀	1092.00g	492.33ij	1036	1381	29.59	50.02
N _r K ₀ Ca _r	1358.00cd	778.67bcde	1323	1955	11.28	20.95
N _r K ₀ Ca ₀	1376.00c	759.00cdef	1253	1911	12.42	22.94
N _r K _r Ca _r (recommended)	342.00k	159.67l	247	458	77.95	83.79
N _r K _r Ca ₀	355.30k	177.67l	261	480	77.09	81.96
N _r K _{2r} Ca _r	837.30ij	454.67jk	737	1118	46.27	53.84
N _r K _{2r} Ca ₀	882.00i	496.33ij	781	1192	43.13	49.61
N _{2r} K ₀ Ca _r	1440.00b	826.67bcd	1370	2107	5.01	16.07
N _{2r} K ₀ Ca ₀	1473.00b	840.33bc	1345	2091	7.14	14.69
N _{2r} K _r Ca _r	1320.00d	722.00def	1225	1850	14.87	26.70
N _{2r} K _r Ca ₀	1350cd	750.33cdef	1250	1898	12.94	23.82
N _{2r} K _{2r} Ca _r	1250.00e	650.33fgh	1150	961	19.39	33.98
N _{2r} K _{2r} Ca ₀	1270.00e	670.33efg	1214	1880	14.87	31.95
LSD	46.85	115.8	-	-	-	-
CV(%)	12.46	11.29	-	-	-	-

*: در هر ستون میانگین‌ها با حروف مشابه براساس آزمون حداقل اختلاف در سطح احتمال ۰.۵٪ اختلاف معنی‌دار ندارند.

*: Means followed by the same letter in the column don't differ statistically through the test of LSD value, at 0.05 probability level.

مشخص کرد که تیمار شاهد (T_1) و پلات‌هایی که تنها نیتروژن (کمبود یا بیش‌بود) در آن‌ها اعمال گردیده است بیش‌ترین میزان بیماری را در مقایسه با پلات‌های دیگر داشتند (جدول ۷). استفاده از کلسیم به‌تنهایی کارایی معنی‌داری روی بیماری در مقایسه با تیمار بهینه و شاهد (T_1) نداشت. استفاده توأم از نیتروژن و پتاسیم به‌طور معنی‌داری (0.05) نسبت به شاهد تأثیر مستعدکنندگی افزایش نیتروژن بر بیماری را کاهش داد. بین تیمارها و AUDPC همبستگی منفی ($R^2 = -2/104$) وجود داشت (شکل ۱).

تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که برهم‌کنش میزبان و عناصر غذایی در سطح ۵٪ بر کارایی بیمارگر در دو سال آزمایشی اثر معنی‌دار دارند. با توجه به این‌که نتایج حاصل از مقایسه میانگین شدت نهایی بیماری در سال ۱۳۹۳ تفاوت قابل‌ملاحظه‌ای با سال ۱۳۹۴ نداشت لذا میانگین‌های سال ۱۳۹۴ ارزیابی شد (جدول ۷). سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری (AUDPC)، شدت نهایی و درصد کاهش بیماری برای ارزیابی استفاده شد. نتایج AUDPC نشان داد که برنامه‌های غذایی به‌طور معنی‌داری ($P \leq 0.05$) پیشرفت بیماری را تحت تأثیر قرار می‌دهند (جدول ۷). به‌طور کلی، مقایسه میانگین‌ها



شکل ۱- سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری شانکر سیتوسپورایی و میزان عناصر نیتروژن، پتاسیم و کلسیم در برگ درختان گلدن دلشز تحت تأثیر تیمارهای مختلف غذایی

Fig. 1. AUDPC of *Cytospora* canker and content elements of nitrogen, potassium and calcium in leaf of *Golden Delicious* plants as affected by different nutritional treatments

درصد AUDPC در تیمار بهینه نسبت به سایر تیمارها کم است که این نتیجه با پژوهش‌های انجام‌شده (Marschner, 2012; Taiz and Zeiger, 2013; Freitas *et al.*, 2015) در این زمینه مطابقت می‌نماید.

سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری بین تیمارهای مختلف نشان می‌دهد بیش‌ترین درصد AUDPC در اغلب تیمارهایی اتفاق افتاده است که مقدار نیتروژن مصرفی در آن‌ها کم‌تر یا بیش‌تر از مقدار بهینه بوده است و به همین دلیل در جدول ۳ میزان نیتروژن خاک (کربن آلی) در خاک باغ‌های آلوده، دامنه

اختلاف آماری بین میزان عناصر غذایی موجود در برگ ۹۰ روز بعد از تمام‌گل در تیمارهای مختلف (جدول ۶) بیان‌گر تأثیر تیمارهای مختلف روی عناصر غذایی موجود در برگ بود. میزان عناصر نیتروژن، پتاسیم و کلسیم نسبت به تیمار شاهد (T_1) به‌طور قابل‌توجهی بیش‌تر و نسبت به تیمار بهینه ($N_1K_1Ca_1$) متغیر بود (جدول ۶ و شکل ۱). میزان عناصر مورد ردیابی در تیمار بهینه به میزان غلظت‌های مرجع (جدول ۴) نزدیک بود. به‌علت این‌که، عناصر غذایی مسئول بیان مقاومت افقی به‌صورت فیزیکی یا شیمیایی در گیاه هستند لذا،

تیمار بهینه (N_rK₂Ca) از نظر مواد غذایی و تیمار (N_rK₂) کم‌ترین AUDPC را داشتند (شکل ۱) و از نظر آماری در یک گروه قرار گرفتند (جدول ۷). بالاترین مقدار AUDPC در تیمارهای عدم مصرف پتاسیم، نیتروژن و کلسیم به‌این‌علت است که این عناصر نسبت به سایر عناصر غذایی به میزان بیش‌تری در تغذیه درختان سیب لازم (Malakouti, 2014) و در کنترل بیماری‌های گیاهی (Heidarian and Tadayonnejad, 2009; Furtado et al., 2009; Belan et al., 2014) نقش کلیدی دارند. نقش این سه عنصر معدنی در بیماری‌های گیاهی خاص و بستگی به گونه میزبان و برهم‌کنش آن‌ها با بیمارگر و شرایط محیطی دارد. بسته به عنصر معدنی مورد استفاده و تعادل آن با عناصر غذایی دیگر، شدت بیماری ممکن است کاهش یا افزایش پیدا کند (Pozza and Pozza, 2012).

به طور کلی، در تیمارهایی که نیتروژن و پتاسیم مصرف نشده، یا پتاسیم مصرف نشده ولی نیتروژن در آن‌ها کم‌تر یا بیش‌تر از مقدار بهینه است، شدت نهایی بیماری و AUDPC حداکثر است (شکل ۱) و از نظر آماری تیمارها هم‌پوشانی گروهی نیز دارند (جدول ۷). این نتایج با یافته‌های قبلی در خصوص اثر نیتروژن روی توسعه شانکر سیتوسپورایی که در سیستم کشت بدون خاک در شرایط گلخانه مورد بررسی قرار گرفته بود مطابقت داشت (Burks et al., 1998). این محققین نشان دادند که عدم مصرف و استفاده بیش از اندازه نیتروژن منجر به تشکیل شانکرهای وسیع روی درختان سپیدار می‌شود، درحالی‌که، استفاده صحیح از کود نیتروژن، باعث شده که سپیدارها در مقابل شانکر سیتوسپورایی مقاومت کنند. زمانی که میزان نیتروژن قابل دسترس در گیاه افزایش یابد نسبت C:N در گیاه کاهش یافته (گیاه شاداب‌تر می‌شود) و این نگرانی را به وجود خواهد آورد که افزایش غلظت نیتروژن، حساسیت گیاهان به بیماری‌ها را در پی خواهد داشت (Agrios, 2005).

در تیماری که نیتروژن مطلوب بوده ولی دو عنصر دیگر وجود نداشته‌اند بیماری ۲۲/۹۴٪ نسبت به تیمار بهینه کاهش داشته است. با افزایش مقدار نیتروژن به دو برابر، بیماری

وسیعی را نشان می‌دهد. اثر نیتروژن روی حساسیت یا مقاومت گیاهان به بیماری متغیر است و بستگی به فاکتورهای دیگری مانند بیمارگر، ژنوتیپ، غلظت و منابع غذایی مورد استفاده و برهم‌کنش نیتروژن با عناصر غذایی دیگر دارد. غلظت مناسب نیتروژن به ساخته شدن لیگنین، فیتوالکسین و تانن‌ها کمک می‌کند و بیش‌بود آن باعث کاهش تولید این ترکیبات به‌واسطه تقاضا برای کربن در فتوسنتز از طریق چرخه کربس می‌شود که باعث اختلال در تولید متابولیت‌های ثانوی از طریق چرخه شیکیمیک اسید (shikimic acid cycle) می‌شوند که برای ایجاد مقاومت ضروری هستند. علاوه بر آن، زیادی نیتروژن به آزادسازی پلی‌ساکاریدها در سطح برگ نیز کمک می‌کند که به‌عنوان منبع انرژی برای تعداد زیادی از بیمارگرها مورد استفاده قرار می‌گیرد (Thompson and Huber, 2006). با این وجود، تأثیر نیتروژن روی بیماری‌های گیاهی را نمی‌توان تعمیم داد، به این دلیل که افزایش نیتروژن برای برخی بیماری‌ها مناسب و برای برخی نامطلوب است (Pozza and Pozza, 2012). برای مثال تعداد زیادی از درختان موز با علائم بیماری پانامایی، کمبود نیتروژن در برگ داشته‌اند (Furtado et al., 2009). بیماری چشم قهوه‌ای درختان قهوه با افزایش نیتروژن در محلول غذایی، ۲۰/۷٪ کاهش یافته است (Pozza et al., 2001). لکه‌های برگ‌ی ناشی از *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* در درختان هلو با کمبود نیتروژن، ۱۶٪ افزایش داشته است (Cao et al., 2011) در حالی که، استفاده از ۶۷/۲ کیلوگرم نیتروژن در هکتار در خاک مزارع گندم، ۱۴٪ بیماری‌های برگ‌ی را کاهش داده است (Krupinsky and Tanaka, 2001). مقایسه DOP برگ درختان گلدن دلشز سالم با درختان آلوده به شانکر سیتوسپورایی نشان داد که عنصر نیتروژن در غالب درختان آلوده بیش‌تر و عناصر پتاسیم و کلسیم کم‌تر است (جدول ۵) که احتمالاً به این علت است که، کمبود کلسیم باعث تجمع نیتروژن در بافت برگ به خاطر فروپاشی ساختار غشاء و از بین رفتن محفظه سلولی می‌شود (Marschner, 2012).

نفوذپذیری سلولی باعث حفظ فشار اسمزی می‌گردد و آب را برای فعالیت آنزیمی ضروری و چندین فرایند متابولیکی دیگر قابل دسترس می‌سازد (Marschner, 2012). این عنصر غذایی، تجمع فیتوالکسین‌ها و فنل‌ها را اطراف محل‌های آلودگی افزایش می‌دهد که با کاهش تکثیر و پیشرفت بیمارگر، مایه اولیه آن را کاهش می‌دهد (Huber and Army, 1985). علاوه بر آن، پتاسیم با تقویت و افزایش شکل‌گیری مواد داخل و بین سلولی در محل‌های آلودگی، نفوذ بیمارگر را سخت‌تر می‌کند (Pozza and Pozza, 2012). کمبود پتاسیم در برگ وقوع یا شدت بیماری‌های پانامایی موز ناشی از قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (Furtado et al., 2009; Silva and Rodrigues, 2013) و زنگ سویا ناشی از قارچ *Phakopsora pachyrhizi* (Doreto et al., 2012) را افزایش داده است. با افزایش مقدار پتاسیم (بیش‌تر از ۷ میلی‌مول در لیتر) در سیستم کشت بدون خاک، شدت بیماری‌های لکه برگی فومایی درختان قهوه ناشی از قارچ *Phoma tarda* (Lima et al., 2010) و لکه چشم قهوه‌ای درختان قهوه ناشی از قارچ *Cercospora coffeicola* (Garcia Junior et al., 2003) کاهش یافته و سرانجام شدت بیماری به‌علت عدم تعادل با عناصر غذایی دیگر افزایش یافته است. در گندم با مصرف ۶۰ کیلوگرم سولفات پتاسیم در هکتار، شدت بیماری سوختگی برگی ناشی از قارچ *Pyrenophora tritici-repentis* ۵۱٪ کاهش یافته است (Sharma et al., 2005).

بعد از نیتروژن و پتاسیم، درختان با کمبود کلسیم بیش‌ترین AUDPC را نسبت به تیمار تغذیه بهینه داشتند (شکل ۱). اگرچه AUDPC کلسیم نسبت به کمبود عناصر غذایی دیگر پایین‌تر است، اما اهمیت این عنصر غذایی در مدیریت بیماری‌های گیاهی مهم دانسته شده است (Pozza and Pozza, 2012). این عنصر به تشخیص آلودگی بیمارگر در غشای پلاسمایی، ثبات غشاءها و ساختار دیواره سلولی کمک می‌کند (Huber et al., 2012). بنابراین، گزارش‌های زیادی از کاهش بیماری‌ها در اثر مصرف کلسیم در خاک وجود دارد

۱۴/۶۹٪ کاهش یافت (جدول ۷). با اضافه نمودن مقدار پتاسیم تأثیر کمبود یا بیش‌بود نیتروژن در بروز بیماری کاهش یافته و گروه‌ها از همدیگر مجزا گردیده‌اند به‌گونه‌ای که، در تیماری که نیتروژن مطلوب بوده ولی دو عنصر دیگر وجود نداشته‌اند بیماری ۲۲/۹۴٪ نسبت به تیمار بهینه کاهش داشته است. با افزایش مقدار نیتروژن به دو برابر، شدت بیماری ۱۴/۶۹٪ کاهش یافت (جدول ۷). با اضافه نمودن مقدار پتاسیم در تیمار N_2K_r ، بیماری ۸۱/۹۶٪ و در تیمارهای N_2K_r و N_2K_2r به ترتیب ۲۳/۸۲ و ۳۱/۹۵ درصد کاهش یافت. به عبارت دیگر، با افزایش مقدار پتاسیم، تأثیر مستعدکنندگی نیتروژن در بروز و توسعه بیماری کم شده و شدت نهایی بیماری و AUDPC کاهش یافته است (شکل ۱ و جدول ۷) که بیان‌گر نقش کلیدی غلظت متعادل عناصر نیتروژن و پتاسیم در مدیریت این بیماری است که با پژوهش انجام شده در شرایط کشت بدون خاک مطابقت می‌نماید (Heidarian and Tadayonnejad, 2014). با اضافه نمودن کلسیم به تیمارهای فوق، در تیمار بهینه کاهش بیماری ۸۳/۷۹٪ بود، درحالی‌که، در تیمارهای N_2K_2Ca ، N_rK_2Ca و N_2K_rCa بیماری به ترتیب ۵۳/۸۴، ۲۶/۷۰ و ۳۳/۹۸ درصد کاهش یافته است که بیان‌گر تأثیر کم‌تر کلسیم نسبت به دو عنصر دیگر است. پژوهش‌های اخیر (Amarante et al., 2009; Miqueloto et al., 2014; Heidarian and Nematollahi, 2016) نشان می‌دهد که افزایش مقدار مصرف نیتروژن و پتاسیم بیش از نیاز بهینه گیاه، به‌علت تأثیر رقت نیتروژن و اثر آنتاگونیستی پتاسیم با کلسیم، باعث بروز اختلالات کلسیمی در میوه سیب می‌گردد و در بعضی موارد عارضه فوق به‌شدت در شرایط باغ بروز می‌نماید که از این‌نظر بایستی توجه خاصی به مقدار مصرفی این عناصر در مدیریت باغ و بیماری شانکر سیتوسپورایی درختان سیب شود.

حساسیت گیاهان با کمبود پتاسیم در ارتباط با چندین فعالیت سوخت و سازی مرتبط با این عنصر در گیاهان است (Amtmann et al., 2008; Marschner, 2012). پتاسیم با

(Peterson, 1990). در تیمارهایی که نیتروژن و پتاسیم مصرف نگردیده است نقش کلسیم نیز ناچیز است. اما با تغییر در میزان نیتروژن و پتاسیم روند تغییرات شدت بیماری با محلول‌پاشی کلسیم تغییر یافته و تیمارها از نظر آماری هم‌پوشانی کاملاً مشخصی را دارند که احتمالاً به‌خاطر برهم‌کنش آن با دو عنصر دیگر است. با توجه به درصدهای کاهش بیماری در تیمارهای مختلف (جدول ۷)، در مجموع به‌نظر می‌رسد با وجود این‌که، کلسیم نقش اساسی در دیواره سلولی در گیاهان دارد، احتمالاً نسبت به دو عنصر نیتروژن و پتاسیم نقش بارزی در کاهش بیماری شانکر سیتوسپورایی درختان سیب ندارد (Huber et al., 2012). اما نظریه‌این‌که، طبق توصیه موسسه خاک‌وآب محلول‌پاشی کلسیم بعد از استقرار و بروز بیمارگر انجام می‌شود، تأثیر کمی بر کاهش شدت بیماری دارد.

پتاسیم نسبت به سایر عناصر سریع‌تر جذب می‌شود (Demira and Koseoglu, 2005). نظریه‌این‌که، پتاسیم یک رقیب خیلی قوی است، اگر به‌طور نسبی، غلظت آن در مواد غذایی بالا باشد جذب سایر کاتیون‌ها مانند سدیم، کلسیم و منیزیم را تحت تأثیر قرار می‌دهد و اگر پتاسیم در محلول‌های غذایی وجود نداشته باشد کاتیون‌های دیگر به نسبت بالاتری جذب خواهند شد (Mengel, 2007). در پژوهش حاضر نیز با افزایش مصرف پتاسیم، مقدار کلسیم در برگ تغییر نشان نداد (شکل ۱) که این موضوع اهمیت و ضرورت محلول‌پاشی کلسیم (Palenciaa et al., 2010; Shahabi and Malakouti, 2000) درختان سیب را تأیید می‌نماید و به‌همین دلیل، بیش‌ترین مقدار کلسیم در تیمارهایی دیده شد که محلول‌پاشی صورت گرفته بود (جدول ۶). کاتیون‌های پتاسیم و منیزیم در اتصال به سایت‌ها در غشای پلاسمایی با کلسیم رقابت می‌کنند؛ بنابراین، زیادی پتاسیم و منیزیم، باعث جایگزینی آن‌ها در سطح غشای پلاسمایی خواهد شد که نقشی در ساختار و عملکرد غشای پلاسمایی ندارند، در نتیجه غشای پلاسمایی نشت خواهد کرد و باعث حساسیت بافت میوه به اختلالات

(Pozza and Pozza, 2012). بیماری سیگاتوگای زرد موز (Freitas et al., 2015)، بیمارگر *Cercospora coffeicola* روی قهوه (Garcia Junior et al., 2003)، قارچ *Mycosphaerella citri* روی مرکبات (Mondal and Timmer, 2003) و *Phytophthora cinnamomi* روی بلوط (Serrano et al., 2013) در نواحی که کلسیم به‌اندازه کافی در خاک وجود داشته، به‌خاطر نقش حیاتی کلسیم در بروز و توسعه لکه‌های ناشی از بیمارگر کم‌تر بوده است. یافته‌های حاضر نشان می‌دهد که غلظت کلسیم در بافت گیاه ممکن است سطح مقاومت را تنظیم کند. بنابراین، بروز و توسعه بیماری در ارتباط با غلظت متعادل نیتروژن، پتاسیم و کلسیم مورد استفاده بود. تعادل در نیتروژن، پتاسیم و کلسیم در برگ‌ها به میزان تعرق بستگی دارد که در ارتباط با دما و رطوبت نسبی است. لذا، با توجه به این‌که کلسیم در سیستم آوندهای چوبی حرکت می‌کند، لازم است از طریق محلول‌پاشی غلظت کلسیم را در برگ متعادل نگه‌داشت تا اثر آنتاگونیستی با دو عنصر پتاسیم و منیزیم پیدا نکند (Palenciaa et al., 2010). با وجود آهکی بودن خاک باغ‌های مورد مطالعه (جدول ۳)، به دلایل متعددی، کمبود کلسیم در محصولات باغی مشاهده می‌شود (جدول ۴). خشکی خاک‌ها و عدم وجود رطوبت کافی، تابستان‌های گرم با درجه حرارت بالا و رطوبت پایین (جدول ۱) که سبب می‌شود تعرق به حداقل کاهش یابد، در نتیجه، جریان مواد به‌خصوص کلسیم در آوندهای چوبی به حداقل می‌رسد (Shahabi and Malakouti, 2000) و به‌شدت کمبود آن در میوه و برگ‌ها مشاهده می‌گردد (جدول ۵)، بنابراین، استفاده از کلسیم به‌صورت محلول‌پاشی روی درختان سیب لازم و ضروری است (Shahabi and Malakouti, 2000).

کلسیم باعث بازدارندگی بیماری آنتراکنوز درخت سیب، ناشی از *Colletotrichum gloeosporioides* یا *C. acutatum* شده است (Biggs, 1999). کلسیم ممکن است نقش مهمی در جلوگیری از تجزیه دیواره‌های سلولی در اثر آنزیم‌های تولیدشده توسط عوامل بیماری‌زا داشته باشد (Biggs and

را کاهش دهد. بنابراین، از آنجایی که، در منطقه سمیرم حدود بحرانی عناصر غذایی در درختان سیب تعیین نشده است و نمی‌توان بر اساس آزمون خاک باغ‌ها، توصیه کودی نمود و از طرف دیگر، تیمار توصیه بهینه موسسه تحقیقات خاک و آب در این پژوهش نیز کم‌ترین میزان شدت بیماری را نشان داد، پیشنهاد می‌شود که در این منطقه، به‌منظور کاهش شدت و کنترل بیماری شانکر سیتوسپورایی درختان سیب، مصرف متعادل عناصر غذایی (بر اساس توصیه موسسه خاک و آب)، به ویژه نیتروژن و پتاسیم به صورت خاک کاربرد قبل از بیدار شدن درختان و کلسیم به‌صورت محلول پاشی در پنج نوبت بعد از ریزش گل‌ها به فاصله ۸ روز با کلرور کلسیم ۵ در هزار ترویج گردد. در این صورت، نه تنها، کمیت و کیفیت میوه‌ها بهبود می‌یابد که، بیماری شانکر سیتوسپورایی درختان سیب به خوبی کنترل می‌گردد.

References

- AGRIOS, N. G. 2005. Plant Pathology. 5th ed., Elsevier-Academic Press, p. 635.
- ALTAMIRANDA, E. A. G., A. B. ANDEREU, G. R. DALEO and F. P. OLIVIERI, 2008. Effect of *B*-aminobutyric acid (BABA) on protection against *Phytophthora infestans* throughout the potato crop cycle. Australas Plant Pathology, 37:421-427.
- AMARANTE, C. V. T., P. R. ERNANI and C. A. STEFFENS, 2009. Predição de "bitter pit" em maçãs 'Gala' por meio da infiltração dos frutos com magnésio. Revista Brasileira de Fruticultura, 31: 962-968. (in Portuguese).
- AMTMANN, A., S. TROUFFLARD and P. ARMENGAUD, 2008. The effect of potassium nutrition on pest and disease resistance in plants. Physiologia plantarum, 133: 682-691.
- BATISH, D. R., H. P. SINGH, N. SETIA, R. K. KOHLI, S. KAUR and S. S. YADAV, 2007. Alternative control of little seed canary grass using eucalypt oil. Agronomy for Sustainable Development, 27: 171-177.
- BELAN, L. L., E. A. POZZA, M. L. FREITAS, A. A. A. Yermiyahu et al., 1994; Elumalai et al., 2002; Freitas et al., 2010; Freitas and Mitcham, 2012.
- نتایج حاصل از این پژوهش اهمیت غلظت متعادل نیتروژن، پتاسیم و کلسیم را در کاهش بیماری شانکر سیتوسپورایی درختان سیب را نشان می‌دهد. به خاطر این که، AUDPC در درختان با تیمار بهینه کم‌ترین است و در تیمارهای با کمبود پتاسیم و بیش‌بود نیتروژن بیش‌ترین است (شکل ۱). همان‌گونه که عدم تعادل برخی عناصر غذایی حساسیت میوه در درختان سیب به اختلالات کلسیمی را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Heidarian and Nematollahi, 2016)، شانکر سیتوسپورایی درختان سیب نیز غالباً، متأثر از عدم تعادل عناصر غذایی نیتروژن، پتاسیم و کلسیم در برگ است.
- تعادل عناصر غذایی به‌ویژه نیتروژن و پتاسیم در باغ‌های سیب سمیرم در جهت کاهش بیماری شانکر سیتوسپورایی اهمیت زیادی دارد و کمبود یا بیش‌بود یک عنصر غذایی در خاک به‌تنهایی تعیین‌کننده بروز بیماری نیست، همان‌گونه که خاک باغ‌های آلوده و سالم هر دو دامنه تغییرات عناصر غذایی زیادی را نشان دادند. به‌بیان‌دیگر، علائم بیماری ابتدا در درختانی مشاهده شد که از نظر مصرف کودهای نیتروژن و پتاسیم متعادل نبودند. همچنین بیش‌ترین میزان بیماری در تیمار شاهد (بدون مصرف کود) و تیمارهایی که تنها نیتروژن (کم‌بود یا بیش‌بود) در آن‌ها به‌کار برده شده بود، مشاهده گردید. از طرف دیگر، کاربرد کود پتاسیمی به همراه کود نیتروژن اثر مستعدکنندگی زیادی نیتروژن را کاهش داد. با توجه به نتایج این پژوهش کم‌ترین مقدار AUDPC در تیمار مصرف بهینه مشاهده شد و غلظت عناصر غذایی در این تیمار به غلظت مرجع (Cref) در برگ درختان سالم، بسیار نزدیک بود. همچنین عدم مصرف نیتروژن و پتاسیم و یا مصرف و عدم مصرف نیتروژن بدون کاربرد پتاسیم باعث حداکثر شدت نهایی بیماری و AUDPC گردید و در صورت مصرف متعادل نیتروژن و پتاسیم، محلول‌پاشی کلسیم می‌تواند شدت بیماری

- POZZA, M. S. ABREU and E. ALVES, 2014. Nutrients distribution in diseased coffee leaf tissue. *Australas Plant Pathology*, 44: 105–111.
- BIGGS, A. R. 1999. Effects of calcium salts on apple bitter rot caused by two *Colletotrichum* spp. *Plant Disease*, 83: 1001–1005.
- BIGGS, A. R. and C. A. PETERSON, 1990. Effect of chemical applications to peach bark wounds on accumulation of lignin and suberin and susceptibility to *Leucostoma persoonii*. *Phytopathology*, 80: 861–865.
- BURKS, S., W. R. JACOBI and I. A. MCINTYRE, 1998. *Cytospora* canker development on *Aspen* in response to nitrogen fertilization. *Journal of Arboriculture*, 24: 28–34.
- CAO, T., B. C. KIRKPATRICK, K. A. SHACKEL and T. M. DEJONG, 2011. Influence of mineral nutrients and freezing-thawing on peach susceptibility to bacterial canker caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Fruits*, 66:441–452.
- DEMIRA, M. A. and T. KOSEOGLU, 2005. Effect of potassium on yield, fruit quality and chemical composition of green-house-grown of galia melon. *Journal of Plant Nutrition*, 28: 93–100.
- DORDAS, C. 2008. Role of nutrients in controlling plant diseases in sustainable agriculture. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 28: 33–76.
- DORETO, R. B. S., W. L. GAVASSONI, E. F. SILVA, M. E. MARCHETTI, L. A. BACCHI and F. F. STEFANELLO, 2012. Asian rust and soybean yield under potassium fertilization and fungicide, in the 2007/08 crop season. *Semin: Ciências Agrárias*, 33: 941–952.
- ELUMALAI, R. P., P. NAGPAL and J. W. REED, 2002. A mutation in the Arabidopsis KT2/KUP2 potassium transporter gene affects shoot cell expansion. *Plant Cell*, 14: 119–131.
- FOTOUHIFAR, K. H. B., G. H. A. HEDJARODE, D. J. ERSHAD, S. M. MOUSAVI, S. M. OKHOVAT and M. JAVANNIKKHAH, 2007. New information on the form-genus *Cytospora* in Iran. *Rostaniha*, 8 (2): 129–149 (in Persian).
- FREITAS, A. S., E. A. POZZA, M. C. ALVES, G. COELHO, H. S. ROCHA and A. A. A. POZZA, 2015. Spatial distribution of Yellow Sigatoka Leaf Spot correlated with soil fertility and plant nutrition, *Precision Agriculture*, pp. 1–15.
- FREITAS, S. T. D. and E. J. MITCHAM, 2012. Factors Involved in Fruit Calcium Deficiency Disorders. *Horticultural Reviews*, Volume 40, First Edition. Edited by Jules Janick. Wiley-Blackwell. Published by John Wiley & Sons, Inc.
- FREITAS, S. T. D., C. V. T. AMARANTE, J. M. LABAVITCH and E. MITCHAM, 2010. Cellular approach to understand bitter pit development in apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 57:6–13.
- FURTADO, E. L., C. J. BUENO, A. L. D. OLIVERIA, J. O. M. MENTEN and E. MALAVOLTA, 2009. Relationship between occurrence of Panama disease in banana trees of cv. Nanicão and nutrients in soil and leaves. *Tropical Plant Pathology*, 34: 201–215.
- GARCIA JUNIOR, D., E. A. POZZA, A. A. POZZA, P. E. SOUZA, J. G. CARVALHO and A. C. BALIEIRA, 2003. Incidence and severity of the brown eye spot of coffee according to supply of potassium and calcium in nutrient solution. *Fitopatologia Brasileira*, 28: 286 – 291.
- GEARY, B., J. CLARK, B. G. HOPKINS and V. D. JOLLEY, 2014. Deficient, adequate and excess nitrogen levels established in hydroponics for biotic and abiotic stress – interaction studies. *Potato Journal of Plant Nutrition*, 38:41–50.
- GRAHAM, D. R. and M. J. WEBB, 1991. Micronutrients and disease resistance and tolerance in lants, in: MORTVEDT, J. J., F. R. COX, L.M. SHUMAN and R. M. WELCH (Eds.), *Micronutrients in Agriculture*, 2nd ed., Soil Science Society of America, Inc. Madison, Wisconsin, USA, pp. 329–370.
- HEIDARIAN, A. and M. R. NEMATOLLAHI, 2016. Interrelation between mineral nutrients and calcium disorders in apple Red Delicious and Golden Delicious cultivars. *Plant Pathology*, 52(2): 267–278. (in Persian).
- HEIDARIAN, A. and M. TADAYONNEJAD, 2014. Effect of Different levels of Nitrogen and Potassium on Infection Severity of Canker of Apple Caused by

- Cytospora cincta* Feries in Hydroponic Condition. Seed and Plant Production Journal, 30-2(4): 473-485.
- HEIDARIAN, A., A. ALIZADEH and V. MINASIAN, 2001. The susceptibility of certain citrus cultivars to branch wilt and decline disease caused by *Nattractia mangiferae*. Iranian Journal of Plant Pathology, 37: 135-143. (in Persian).
- HUBER, D. M. 1980. The use of fertilizer and organic amendments in the control of plant disease, in: Pimental D. [Ed.] Handbook Series in Agriculture. Sect. D. CRC Press, Inc., West Palm Beach, FL, USA.
- HUBER, D. M. and D. C. ARNY, 1985. Interactions of potassium with plant disease. In: Munson RD (ed) Potassium in Agriculture. ASA, CSSA, SSA, Madison, pp. 467-488.
- HUBER, D. M. and S. HANEKLAUS, 2007. Managing Nutrition to Control Plant Disease. Landbauforschung Völkenrode, 4(57): 313-322.
- HUBER, D., V. ROMHELD and M. WEINMANN, 2012. Relationship between nutrition, plant diseases and pests. In: MARSCHNER H. (ed) Mineral nutrition of higher plants, 3rd edn. Academic Pres, San Diego, pp. 283-298.
- KRAUSS, A. 1999. Balanced Nutrition and Biotic Stress, IFA Agricultural Conference on Managing Plant Nutrition. 29 June-2 July 1999, Barcelona, Spain.
- KRUPINSKY, J. M. and D. L. TANAKA, 2001. Leaf spot diseases on winter wheat influenced by nitrogen, tillage, and haying after a grass-alfalfa mixture in the Conservation Reserve Program. Plant Disease, 85: 785-789.
- LIMA, L. M. D., E. A. POZZA, H. N. TORRES, A. A. POZZA, M. SALGADO and L. H. PFENNING, 2010. Relationship between nitrogen/potassium with Phoma spot and nutrition of coffee seedlings cultivated in nutrient solution. Tropical Plant Pathology, 35: 223-228.
- MALAKOUTI, M. J. 2014. Recommendations for Optimal Fertilizer Use in Agricultural Crops of Iran: Determination of Amount, Type and Time of Fertilizer Application for the Purpose of Achieving Self-Sufficiency, Food Security, Sustainable Agriculture and Increasing Farmers' Income. Mobaleghan Press, Second Edition 318p.
- MALAKOUTI, M. J. and M. N. GHEIBI, 1997. The determination of the critical nutrient elements of strategic products and advice on the proper fertilizer recommendations in Iran. Publication Agricultural Education, p. 54.
- MARSCHNER, H. 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. 2nd ed., Academic Press, London, p. 889.
- MARSCHNER, H. 2012. Mineral nutrition of higher plants, 3rd edn. Academic, San Diego, 643 p
- MEHRABI, M., F. MOHAMMADI GOLTAPPEH and B. FOTOUHIFAR, 2008. Report on fungi associated with *Cytospora* canker of apple trees in Semirrom region of Esfahan province. Proceeding if the 18th Iranian Plant Protection Congress, Bu Ali Sina University, Hamedan, Iran. P. 27 (in Persian).
- MEHRABI, M., F. MOHAMMADI GOLTAPPEH and B. FOTOUHIFAR, 2011. Studies on *Cytospora* canker disease of apple trees in Semirrom region of Iran. Journal of Agricultural Technology, 7(4): 967-982.
- MENGEL, K. 2007. Iron availability in plant tissue-iron chlorosis in calcareous soils. Iron Nutrition in Soils and Plants. Dodrecht, Netherlands, pp. 389-397.
- MIQUELOTO, A., C. V. T. AMARANTE, C. A. STEFFENS, A. D. SANTOS and E. MITCHAM, 2014. Relationship between xylem functionality, calcium content and the incidence of bitter pit in apple fruit. Scientia Horticulturae, 165: 319-323.
- MONDAL, S. N. and L. W. TIMMER, 2003. Effect of urea, CaCO₃, and dolomite on pseudothecial development and ascospore production of *Mycosphaerella citri*. Plant Disease, 87: 478-483.
- MONTANES, L., L. HERAS, J. ABADIA and M. SANZ, 1993. Plant analysis interpretation based on a new Index: Deviation from optimum percentage (DOP). Journal of Plant Nutrition, 16: 1289-1308.
- PALENCIAA, P., F. MARTINEZA, E. RIBEIROC, M. PESTANAC, F. GAMAC, T. SAAVEDRAC, A. D. VARENNESEB and P. J. CORREIAC, 2010. Relationship between tipburn and leaf mineral composition in strawberry. Scientia Horticulturae, 126:

242–246.

- POZZA, A. A. A., H. E. P. MARTINEZ, S. L. CAIXETA, A. A. CARDOSO, L. ZAMBOLIM and E. A. POZZA, 2001. Influence of the mineral nutrition on intensity of brown-eye spot in young coffee plants. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 36: 53–60.
- POZZA, E. A. and A. A. A. POZZA, 2012. Relação entre nutrição e as doenças de plantas: implicações práticas. *Simposio Avancos Na Otimizacao Do Uso De Defensivos Agrícolas No Manejo Fitossanitario*, 12., Lavras. *Anais Lavras: UFLA*, 2012. 1 CD-ROM. (in Portuguese).
- SERRANO, M. S., P. FERNÁNDEZ-REBOLLO, P. VITA and M. E. SANCHEZ, 2013. Calcium mineral nutrition increases the tolerance of *Quercus ilex* to *Phytophthora* root disease affecting oak rangeland ecosystems in Spain. *Agroforestry Systems* 87: 173–179.
- SHAHABI, A. and M. J. MALAKOUTI, 2000. Calcium sprays undeniable necessity to improve the qualitative properties of stored fruit in calcareous soils country. *Technical Bulletin No. 136*. Ministry of Agriculture. Karaj. Iran (In Persian).
- SHARMA, S., E. DUVEILLER, R. BASNET, C. B. KARKI and R. C. SHARMA, 2005. Effect of potash fertilization on *Helminthosporium* leaf blight severity in wheat, and associated increases in grain yield and kernel weight. *Field Crop Research* 93:142–150.
- SILVA, J. T. A. and M. G. V. RODRIGUES, 2013. Nutricional evaluation, production and incidence Panamá disease in banana 'Prata anã' fertilized with K, on the 4th cycle. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 35:1170–1177. doi:10.1590/S010029452013000400028.
- TAIZ, L. and E. ZEIGER, 2013. *Fisiologia vegetal*, 5th edn. Artmed, Porto Alegre, 918p.
- THOMPSON, I. A. and D. M. HUBER, 2006. The role of manganese. In L.E. Datnoff, W.E. Elmer, and D.M. Huber (eds.). *Mineral Nutrition and Plant Disease*. APS Press, St. Paul, MN.
- VEROMANN, E., M. TOOME, A. KANNASTE and R. KAASIK, 2013. Effects of nitrogen fertilization on insect pests, their parasitoids, plant diseases and volatile organic compounds in *Brassica napus*. *Crop Protection*, 43:79-88.
- YERMIYAHU, U., S. NIR, G. BEN-HAYYIM and U. KAFKAFI, 1994. Quantitative competition of calcium with sodium or magnesium for sorption sites on plasma membrane vesicles of melon (*Cucumis melo* L.) root cells. *The Journal of Membrane Biology*, 138: 55–63.
- ZAFAR, Z. and H. U. R. ATHAR, 2013. Reducing disease incidence of cotton leaf curl virus (CLCUV) in cotton (*Gossypium hisotum* L.) by potassium supplementation. *Pakistan Journal of Botany*. 45(3): 1029-1038.
- ZAHOOR, R., W. ZHAOL, M. ABID, H. DONG and Z. ZHOU, 2017. Potassium application regulates nitrogen metabolism and osmotic adjustment in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) functional leaf under drought stress. *Journal of Plant Physiology*, 215: 30–38.

مقدمه

غیر فعال نمودن ترشحات محرک یا مضر بیمارگر، اثرات آن را خنثی نموده و محصول خوبی تولید می‌کند. گیاهان متحمل در واقع به بیمارگر حساس هستند ولی توسط آن از بین نرفته و عموماً آسیب اندکی می‌بینند. در حالی که هدف مقاومت کاهش رشد بیمارگر در داخل گیاه می‌باشد. تحمل عواقب و پیامدهای ناشی از صدمات بیمارگر را محدود می‌کند. تحمل خسارت و آسیب بیمارگر در تولید محصول گیاه را کاهش می‌دهد. این آسیب به طور معمول از مقایسه کاهش عملکرد گیاهان آلوده و گیاه شاهد فاقد آلودگی بدست می‌آید.

زنگ قهوه‌ای باعث کاهش جدی تولید سالانه محصول گندم تقریباً در تمام مناطق تولید گندم ایالات متحده آمریکا می‌گردد. از سال ۲۰۰۰ تا سال ۲۰۰۴، خسارت زنگ قهوه‌ای در آمریکا بالغ بر سه میلیون تن، به ارزش ۳۵۰ میلیون دلار تخمین زده شد (Appel et al., 2009). در سال ۲۰۰۷ زنگ قهوه‌ای باعث کاهش ۱۴٪ محصول در گندم‌های زمستانه کانزاس شد که تولید محصول گندم آمریکا را تحت تاثیر خود قرار داد. در ارقام حساس میزان خسارت بیش از ۵۰٪ برآورد شده است (Ordonez et al., 2010). در مناطق با شرایط آب و هوایی مناسب توسعه زنگ قهوه‌ای همانند جنوب آمریکای لاتین (آرژانتین، شیلی، اروگوئه، پارگوئه و برزیل)، اگر قارچکش استفاده نشود کاهش عملکرد بالقوه می‌تواند بیش از ۵۰٪ بالغ گردد.

کاهش بیماری با توسعه ارقام مقاوم گندم و ژرم پلاس‌هایی که در آن‌ها از مقاومت اختصاصی استفاده شده صورت می‌گیرد. این قبیل ارقام سرانجام با ایجاد نژاد جدید، مقاومت آنها معمولاً شکسته شده و در نهایت حفاظت ناپایداری ایجاد می‌کنند. عدم پایداری طولانی مدت ارقام دارای مقاومت به نژاد اختصاصی و ناپایداری مقاومت این ارقام در برابر نژادهای جدید زنگ باعث ناپایداری عملکرد گندم در کشور می‌گردند.

توانایی ارقام در تحمل به شدت آلودگی بالای زنگ بدون کاهش شدید محصول سبب یک نوع حفاظت پایدار

زنگ‌ها همواره به عنوان بیمارهای مهم گندم، دارای خسارت اقتصادی قابل توجهی در سطح جهان بوده‌اند. زنگ برگ (Leaf rust) یا قهوه‌ای گندم (Brown rust) که توسط قارچ *Puccinia triticina* Eriks ایجاد می‌شود از مهم‌ترین بیماری‌های گندم می‌باشد. در ایران این بیماری از نظر اهمیت پس از بیماری زنگ زرد قرار دارد ولی در استان خوزستان اهمیت آن بیشتر از زنگ زرد است در سال‌هایی که به صورت همه‌گیر ظاهر شده باعث کاهش چشمگیر محصول در مناطق جنوب، غرب و شمال کشور می‌گردد. دانه‌های گندم مبتلا به بیماری چروکیده، کوچک و نامرغوب بوده و در اثر حمله بیماری وزن محصول تا ۹۰٪ کاهش می‌یابد. زنگ قهوه‌ای خصوصاً در سال‌هایی که ارقام بومی و حساس مانند شعله و اروند در خوزستان کشت می‌شد بشدت گسترش می‌یافت و در برخی مزارع محصولی برداشت نمی‌گردید (Torabi et al., 2001; Torabi et al., 2003; Dadrezaei and Aslahi, 2004; Dadrezaei et al., 2012). اکنون زنگ قهوه‌ای به عنوان یک بیمارگر بسیار مهم در کاهش تولید محصول جهانی گندم شناخته شده است که باعث کاهش چشمگیر محصول در مناطق جغرافیایی وسیعی از دنیا می‌شود. کاهش محصول گندم در اثر آلودگی به زنگ قهوه‌ای معمولاً در اثر کاهش تعداد دانه در سنبله و وزن هزار دانه می‌باشد (Kolmer, 2005; Marasas et al., 2004; Roelfs et al., 1992; Huerta-Espino, 2011). خسارت این بیماری از مناطق مختلف دنیا گزارش شده است. همه ساله این بیماری در اواخر فصل رویش گندم در مزارع ظاهر شده، باعث کاهش نسبی محصول می‌شود. وقتی که بیماری قبل از مرحله گلدهی به گندم حمله نماید خسارت چشمگیری به محصول وارد می‌نماید.

تحمل به بیماری، توانایی تولید محصول خوب توسط گیاه است حتی در شرایطی که به بیمارگر آلوده شده باشد. تحمل نتیجه فعالیت و ویژگی‌های وراثتی گیاه میزبان است که ضمن اجازه دادن به بیمارگر برای رشد و تکثیر در میزبان یا

مناسبی نشان داد. رقم Butler خصوصاً وقتی که پس از به سنبله رفتن آلوده شود متحمل بوده اما زمانی که قبل از سنبله رفتن باشد متحمل به بیماری نمی‌باشد. برعکس رقم Seneca فقط در زمان قبل از سنبله رفتن متحمل بود و در زمان پس از سنبله رفتن متحمل به بیماری نبود. در این مطالعات این فرضیه تقویت شد که تحمل نسبی ارقام در آلودگی‌های زمان گیاه کامل نسبت به آلودگی‌های زمان پنجه‌زنی متفاوت می‌باشد (Roberts *et al.*, 1984).

عملکرد دانه و پایداری آن در مناطق متعددی که تنش‌های محیطی وجود دارد به عنوان معیار مهم در گزینش و معرفی ارقام مورد استفاده قرار گرفته است. تا کنون روش‌های متعددی برای ارزیابی پایداری عملکرد ارقام گیاهی در دامنه وسیعی از شرایط آب و هوایی ارائه شده‌اند. مقایسه عملکرد در شرایط محیطی متضاد (تنش و بدون تنش) و گزینش ژنوتیپ‌هایی که به هر دو محیط سازگار باشند، هدف اصلی این گونه پژوهش‌ها بوده است (Clarke *et al.*, 1992; Ehdai *et al.*, 1988).

فیشر و مارور (Fisher and Maurer, 1978) شاخص حساسیت به تنش (SSI^۱) را برای اولین بار معرفی کردند که فقط می‌تواند گیاهان با عملکرد بالا در محیط تنش آبی را انتخاب کند و ژنوتیپ‌های انتخابی تظاهر خوبی در محیط بدون تنش نخواهند داشت و این ایرادی بود که بر آن وارد شد. فرناندز (Fernandez, 1992) شاخص‌های میانگین هندسی GMP^۲ و شاخص تحمل به تنش STI^۳ را که می‌تواند ژنوتیپ‌های متحمل و پرعملکرد تحت دو شرایط محیط متمایز کنند را معرفی کرد. با توجه به مساله بیماری و حساس شدن ارقام موجود، پژوهش‌های لازم به منظور شناخت ارقام متحمل و درک ساز و کارهای تحمل به بیماری در کشور ضروری است. تحقیق روی میزان تحمل ارقام به زنگ در

کاهش محصول در برابر بیماری‌ها می‌شود، چرا که فشاری به عنوان گزینش طبیعی در جمعیت بیمارگر ایجاد نمی‌کند (Caldwell *et al.*, 1958)، هر چند گزارش‌های معدودی در ارتباط با تحمل به زنگ در غلات وجود دارد تحمل به بیماری قدمت زیادی دارد، Cobb (1894) واژه rust-enduring را برای توصیف یک تیپ از گندم (که هر چند آلوده به زنگ‌ها شده بودند اما عملکرد خوبی داشتند) بکار برد. نامبرده همچنین توضیح داد که این گونه گندم‌ها بسیار نادر می‌باشند. بولی و پریچارد (Bolley and Pritchard, 1906) پیشنهاد دادند که با گزینش ارقام با وزن دانه بالا در شرایط شدید زنگ می‌توان ارقام متحمل به زنگ را انتخاب نمود. در بررسی (Martinez *et al.*, 2012) تحمل رقم Amilcar در آلودگی قبل از ظهور برگ پرچم نسبت به زنگ قهوه‌ای تنها ۳۶ درصد از عملکرد را از دست داد در حالی که شاهد حساس حدود ۶۰ درصد از عملکرد را از دست داد. در مقابل، تحمل رقم Avispa^۱ بعد از ظهور برگ پرچم تنها ۲۳ درصد از عملکرد را از دست داد در حالی که شاهد حساس در حدود ۵۰ درصد، این نتایج نشان داد که کنترل ژنتیکی متفاوتی از تحمل در هر دو رقم وجود دارد. تلاقی بین دو رقم (با ترکیب آلل مطلوب در هر دو رقم) ممکن است منجر به افزایش سطح تحمل شود (Martinez *et al.*, 2012).

مطالعات تحمل به زنگ قهوه‌ای تحت شرایط کنترل شده در گلخانه با استفاده از ده رقم گندم نان نسبت به نژادهای ۷۶ و ۸۲ توسط Roberts *et al.* (1984) پس از همه‌گیری شدید و یکنواخت بیماری انجام شد. مقایسه اثر زنگ قهوه‌ای روی عملکرد دانه، تعداد و وزن دانه نشان داد که بیشترین کاهش میانگین کل ۵۶ درصد و مربوط به آلودگی‌های قبل از به سنبله رفتن می‌باشد. متوسط کاهش عملکرد نیز حدود ۱۵ درصد و مربوط به آلودگی‌های بعد از به سنبله رفتن می‌باشد. رقم Fulhard متحمل‌ترین رقم و سطح بالایی از حفاظت در برابر کاهش و آسیب عملکرد در برابر زنگ را داشت. تحمل رقم Kanqueen، اگر چه کمتر از رقم Fulhard بود اما تحمل

۱- شاخص حساسیت به تنش = SSI = Stress Susceptibility Index

۲- شاخص تحمل به تنش = STI = Stress Tolerance Index

۳- میانگین هندسی بهره‌وری = GMP = Geometric Mean Productivity

روی این ژنوتیپ‌ها بررسی شد. هر ژنوتیپ در ۶ خط به طول ۶ متر و فاصله ۲۰ سانتی متر و تراکم بذر ۴۰۰ بذر در متر مربع در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با سه تکرار در دو شرایط بیماری و بدون بیماری در اهواز به مدت سه سال ارزیابی شد. سال اول تکثیر بذر و بررسی مقدماتی ژنوتیپ‌ها و سال دوم و سوم اجرای آزمایش فوق‌الذکر در نظر گرفته شد.

این پژوهش در ایستگاه گلستان اهواز در مزرعه‌ی آزمایشی اجرا شد. در این پژوهش مایه‌زنی بیماری قبل از ظهور برگ پرچم انجام شد و تیمار بدون مایه‌زنی با قارچکش محافظت گردید و به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. برای حفاظت تیمارهای شاهد از قارچکش پروپیکونازول با نام تجاری تیلت و فرمولاسیون EC 25% به میزان نیم لیتر در هکتار قبل از ظهور جوش زنگ قهوه‌ای استفاده شد و به فاصله سه هفته یکبار سمپاشی تکرار شد. در شرایط ایجاد بیماری دور تا دور آزمایش به پهنای دو و طول ۶ متر رقم حساس بولانی کشت شد. در شرایط حفاظت از بیماری به همین ترتیب دور تا دور آزمایش حفاظت از بیماری، رقم مقاوم کرخه کشت گردید. مایه‌زنی مصنوعی، با استفاده از جدایه‌های زنگ منطقه (بصورت مخلوطی از اسپور زنگ و پودر تالک به نسبت یک به ده) به کمک گرد پاش دستی در هوای آرام و در غروب انجام گردید. در هنگام اسپور پاشی دور تا دور کرت توسط یک پلاستیک به ارتفاع یک و نیم متر محصور شد. کلیه عملیات زراعی اعم از تهیه زمین، تامین نیازهای کودی و آبی و مبارزه با علف‌های هرز براساس عرف منطقه و توصیه‌های فنی انجام شد. یادداشت‌برداری از شدت بیماری از برگ پرچم و پس از یکنواختی در ظهور بیماری روی رقم حساس هر ده روز یکبار از طریق تعیین درصد پوشش آلوده سطح برگ (۱۰۰-۰) بر اساس روش اصلاح شده کوب (Peterson *et al.*, 1948) و به صورت تیپ آلودگی بر اساس روش (Roelfs *et al.*, 1992) به شرح ذیل انجام شد:

O= مصون: بدون هیچگونه علائم.

ایران وجود ندارد. تحمل به بیماری می‌تواند یکی از ویژگی‌های مهم برای هر ژنوتیپ باشد و تعیین تحمل نسبی هر ژنوتیپ به زنگ‌ها امری ضروری است. اگر بتوان این گونه ارقام متحمل حساس و پرتانسیل را جایگزین ارقام حساس به عنوان والد گیرنده ژن‌های مقاومت در تلاقی‌های اصلاحی نمود می‌توان برای مناطقی که احتمال همه‌گیری‌های شدید در اثر جهش و یا ورود بیمارگرهای جدید و امکان شکستن مقاومت وجود دارد با اطمینان بیشتری به کشت ارقام مورد نظر اقدام نمود. همچنین در نواحی گسترده‌ای از کشور گندم در معرض تنش‌های غیر زنده می‌باشد و برای این مناطق ارقام متحمل به تنش محیطی وجود دارد اما به دلیل حساس بودن به بیماری زنگ ممکن است از چرخه تولید حذف شوند در صورتی که این ارقام ممکن است به بیماری متحمل باشند.

در این پژوهش میزان تحمل ژنوتیپ‌های گندم در مزرعه آزمایشی مرکز تحقیقات کشاورزی خوزستان (اهواز) که به زنگ قهوه‌ای آلوده می‌شوند، بررسی شد. شناسایی ژنوتیپ‌های پرتانسیل متحمل به بیماری و معرفی متحمل‌ترین رقم با هدف کاربرد آن‌ها در اصلاح گندم و بررسی شاخص‌های کارآمد برای غربالگری تحمل به بیماری از جمله اهداف اجرای این پژوهش بود.

روش بررسی

در این پژوهش برای ارزیابی و تعیین میزان تحمل ارقام نسبت به آلودگی زنگ قهوه‌ای گندم ۲۰ ژنوتیپ سیروان، استار، افلاک، چمران ۲، کویر، شهریار، روشن، توس، ویریناک، بهار، شیراز، الوند، افق، سیستان، چمران، بم، اینیا، نیشابور، شیرودی و بولانی بررسی شدند (این ژنوتیپ‌ها، ارقام پرتانسیل و با ویژگی‌های بسیار مطلوب مانند تحمل به تنش‌های غیر زنده همانند گرما و شوری بوده که غالباً به زنگ قهوه‌ای و یا زرد حساس می‌باشند). اثر زنگ قهوه‌ای بر عملکرد محصول گندم در دو شرایط بیماری شدید و در شرایط حفاظت شده (با استفاده از سم قارچکش) از بیماری

(درصد خسارت)

SI = Stress Intensity = $[1 - (s/p)]$ (Fisher and Maurer, 1978)

در این روابط Y_s و Y_p به ترتیب عملکرد دانه هر ژنوتیپ در شرایط بیماری (تنش) و بدون بیماری (بدون تنش) و s و p به ترتیب میانگین عملکرد دانه کل ژنوتیپ‌ها در شرایط بدون بیماری و در شرایط بیماری می باشد. تجزیه واریانس ساده در هر سال و در پایان سال دوم تجزیه واریانس مرکب روی صفات کمی انجام شد.

نتیجه و بحث

مشخصات و واکنش ژنوتیپ‌های مورد بررسی نسبت به زنگ قهوه‌ای در جدول ۱ ارائه شده است. در اهواز همه‌گیری شدید و یکنواخت زنگ قهوه‌ای در مزرعه آزمایشی غلات ایجاد گردید. مدت استقرار و زمان فعالیت زنگ قهوه‌ای در حدود ۶۰ روز و همزمان با ظهور سنبله همراه بود. بدین ترتیب ژنوتیپ‌های مورد بررسی در پروژه تحمل نسبت به زنگ قهوه‌ای هم به لحاظ شدت و هم به لحاظ مدت فعالیت عامل بیماری و هم یکنواختی بیماری در شرایط بسیار مطلوب همه‌گیری قرار گرفتند و مقاومت و تحمل ارقام به این بیماری در شرایط حداکثری فعالیت بیماری ارزیابی گردید.

نتایج تجزیه واریانس مرکب عملکرد دانه در جدول ۲ نشان داده شده است. بر اساس نتایج بین عملکرد دانه در تکرارهای مختلف تیمار آلوده و فاقد آلودگی از نظر میزان عملکرد دانه تفاوت بسیار معنی داری (در سطح یک درصد) وجود داشت. عملکرد دانه تحت تأثیر متقابل عدم آلودگی و آلودگی و رقم نیز تفاوت بسیار معنی داری نشان داد.

از معنی دار بودن تفاوت عملکرد دانه و وزن هزار دانه در سال‌های مختلف اجرای آزمایش می‌توان نتیجه گرفت که تفاوت ناشی از اثر سال فقط در واریانس سال اثر داشته و در واریانس تیمار تغییری بوجود نیاورده است.

میانگین شدت تنش (SI) دو ساله زنگ قهوه‌ای ۰/۲۵۲۴ محاسبه شد. همچنین بر اساس نتایج دو ساله شاخص‌های

R = مقاوم: ظهور لکه‌های نواری نکروتیک و کلروتیک،

بدون ظهور اسپور، یا جوش‌های ریز و پراکنده.

MR = نیمه مقاوم: ظهور جوش‌های کوچک زنگ که

بوسیله لکه‌های نکروتیک احاطه شده‌اند.

MS = نیمه حساس: ظهور جوش‌هایی به اندازه متوسط،

بدون لکه نکروتیک، گاهی همراه با لکه‌های کلروتیک.

S = حساس: وجود جوش‌های بزرگ زنگ به مقدار

فراوان و بدون لکه‌های کلروتیک، گاهی همراه با این لکه‌ها.

میانگین شدت بیماری در مزرعه با در نظر گرفتن شدت

بیماری در همه کرت ارزیابی شد. ژنوتیپ‌ها بر اساس شدت

آلودگی به سه گروه آلودگی با شدت بالا (شدت $6.0S$ و

بالتر)، آلودگی با شدت متوسط ($4.0S$ و کمتر از $6.0S$) و

آلودگی با شدت پایین (کمتر از $4.0S$) تقسیم شدند. در زمان

برداشت عملکرد دانه هر کرت و وزن هزار دانه اندازه‌گیری

شد. پس از برداشت ارزیابی ژنوتیپ‌ها برای تحمل به تنش

بیماری انجام شد. بدین منظور با استفاده از میانگین عملکرد

دانه هر ژنوتیپ در شرایط بیماری (تنش) و بدون بیماری

(بدون تنش) شاخص‌های تحمل به تنش بیماری (STI)،

حساسیت به تنش (SSI)، شاخص تحمل (TOL)، میانگین

بهره‌وری (MP)، میانگین هندسی بهره‌وری (GMP)، شاخص

عملکرد (YI)، شاخص پایداری عملکرد (YSI)، درصد

تغییرات عملکرد هر رقم (PYV) و شدت تنش (SI) در ارقام

به شرح ذیل محاسبه شد:

SSI = Stress Susceptibility Index = $\frac{1-(Y_s/Y_p)}{1-(s/p)}$ (Fisher and Maurer, 1978)

STI = Stress Tolerance Index = $\frac{Y_s \times Y_p}{p^2}$ (Fernandez, 1992)

TOL = Tolerance Index = $Y_p - Y_s$ (Rosiellev and Hamblin, 1981)

MP = Mean Productivity = $\frac{Y_p + Y_s}{2}$ (Rosiellev and Hamblin, 1981)

GMP = Geometric Mean Productivity = $\sqrt{Y_p \times Y_s}$ (Fernandez, 1992)

YSI = Yield Stability Index = $\frac{Y_s}{Y_p}$ (Bouslama and Schapaugh, 1984)

YI = Yield Index = $\frac{Y_s}{\bar{Y}}$ (Gavuzzi et al., 1997)

PYV = Percentage yield variations of each cultivar = $\left[\frac{(Y_p - Y_s)}{Y_p} \right] \times 100$

ارقام با شدت متوسط آلودگی (۴۰S و کمتر از ۶۰S):

متوسط آلودگی هفت رقم سیستان، چمران، بم، اینیا، نیشابور، شیروزی و شیراز در سه تکرار بالاتر از ۴۰S و کمتر از ۶۰S یادداشت گردید. شیروزی با ۵/۹۱٪، شیراز با ۸/۱۸٪، اینیا با ۱۲/۵۹٪، سیستان با ۲۰/۵٪ و چمران با ۲۳/۱۴٪ کاهش عملکرد به ترتیب ارقام متحمل‌تری نسبت به نیشابور که بالغ بر ۴۰٪ خسارت و کاهش عملکرد داشت بودند. نیشابور پس از بولانی بالاترین درصد خسارت را داشت. نیشابور از لحاظ میزان کاهش در هر سال، با کاهش سالیانه ۱۸۶۲ کیلوگرم در هکتار بیشترین میزان خسارت را دارا بود. شیروزی با کاهش سالیانه حدود ۱۸۰ کیلوگرم در هکتار کمترین میزان کاهش عملکرد دانه را در شرایط آلودگی به زنگ قهوه‌ای داشت. وزن هزار دانه ارقام اینیا و شیروزی ۱۰/۴ درصد و چمران ۱۲/۳ درصد نسبت به شرایط عدم آلودگی کاهش نشان دادند. از نظر عملکرد دانه در محیط بیماری ارقام شیراز با ۳۰۹۳ کیلوگرم، سیستان با ۳۰۱۴ کیلوگرم، اینیا با ۲۹۷۴ کیلوگرم در هکتار و چمران با ۲۹۳۵ کیلوگرم در هکتار بیشترین عملکرد را داشتند (جدول ۴).

جدول ۱- واکنش ژنوتیپ‌های گندم نسبت به بیماری زنگ قهوه‌ای

در ایستگاه اهواز در سال‌های زراعی ۱۳۹۳-۱۳۹۴ و ۱۳۹۴-۱۳۹۵

Table 1. Wheat genotyp reactions to leaf rust in 2015 to 2016 in

Ahvaz station

	Wheat genotypes	2015	Wheat genotypes	2016
1	Neyshabur	50S	Neyshabur	50S
2	Kavir	80S	Kavir	90S
3	Shirodei	10MS	Shirodei	50S
4	Shiraz	40MS	Shiraz	50S
5	Shahriar	80S	Shahriar	70S
6	Sistan	40MS	Sistan	50S
7	Sirvan	0	Sirvan	30S
8	Star	TMS	Star	5MS
9	Aflak	5MS	Aflak	20R
10	Roshan	60S	Roshan	90S
11	Chamran	30MS	Chamran	50S
12	Toos	70S	Toos	60S
13	Veerynak	60S	Veerynak	70S
14	Bahar	30MS	Bahar	60S
15	Bolany	80S	Bolany	80S
16	Bam	50S	Bam	50S
17	Inia	30S	Inia	50MS
18	Alvand	60MS	Alvand	60S
19	Ofogh	30S	Ofogh	70S
20	Chamran 2	10MS	Chamran 2	20MS

تنش، کمترین تغییرات عملکرد محصول نسبت به بیماری زنگ قهوه‌ای به ترتیب مربوط به ارقام شیروزی، افلاک، سیروان، شیراز، اینیا و افق با درصد کاهش بین ۶ الی ۱۶/۵ درصد بود که به ترتیب ارقام مذکور نسبت به زنگ قهوه‌ای در اهواز بیشترین پایداری عملکرد را داشتند (جدول ۵).

بر اساس همین محاسبات بیشترین تغییرات عملکردی با حدود ۳۰ الی ۵۰ درصد کاهش محصول به ترتیب ارقام بولانی، نیشابور، توس، الوند، روشن، استار، شهریار و ویریناک بیشترین خسارت و کمترین پایداری عملکرد را نسبت به زنگ قهوه‌ای داشتند. در مجموع میانگین درصد کاهش عملکرد ژنوتیپ‌های مورد بررسی در دو سال نسبت به زنگ قهوه‌ای در اهواز ۲۵/۲۴ درصد برآورد گردید (جدول ۵). بر اساس شدت آلودگی به بیماری زنگ قهوه‌ای، ژنوتیپ‌ها در سه گروه ذیل قرار گرفتند:

ارقام با شدت بالای آلودگی (شدت ۶۰S و بالاتر):

ارقام کویر، شهریار، روشن، توس، ویریناک، بهار، بولانی، الوند و افق در سه تکرار با متوسط آلودگی بالای ۶۰S در این گروه قرار داشتند. ارقام افق و بهار به ترتیب با ۱۶/۵۲٪ و ۲۱/۸٪ کاهش عملکرد کمترین کاهش را داشتند و متحمل‌ترین ارقام این گروه بودند.

از نظر میانگین عملکرد ارقام در دو محیط بیماری و بدون بیماری در مدت دو سال زراعی رقم افق با میانگین عملکرد ۳۸۹۴.۴ کیلو در هکتار در رتبه اول و بهار با عملکرد ۳۷۹۹ کیلو در هکتار پس از افلاک در رتبه سوم میانگین عملکرد در دو محیط قرار گرفتند (جدول ۳). رقم افلاک در این آزمایش در گروه ارقام مقاوم قرار داشت. وزن هزار دانه رقم افق نسبت به زنگ قهوه‌ای کمتر از ۱۲٪ و رقم بهار کمتر از ۱۷٪ کاهش نشان دادند.

بولانی با ۴۶ درصد و نیشابور و توس با ۴۱ درصد کاهش عملکرد نسبت به شاهد بیشترین کاهش عملکرد را نسبت به این بیماری داشتند.

جدول ۲- تجزیه واریانس مرکب عملکرد دانه ارقام در شرایط تنش و عدم تنش بیماری زنگ قهوه‌ای (۱۳۹۳-۹۵)

Table 2. Combined analysis of variance for grain yield in non-stress and stress of leaf rust condition (2015 to 2016)

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی Degrees of Freedom	مجموع مربعات Sum of Squares	میانگین مربعات Mean Square	
Year	سال	1	22503862.84	22503862.84**
Stress	محیط (مکان)	1	62384226.34	62384226.34**
YS	مکان×سال	1	8144218.84	8144218.84**
Rep(YS)	تکرار درون سال و مکان	8	1916803.03	239600.38**
Genotype	ژنوتیپ	19	27525069.55	1448687.87**
YG	ژنوتیپ×سال	19	19722392.41	1038020.65**
SG	ژنوتیپ×مکان	19	13250524.25	697396.01**
YSG	ژنوتیپ×مکان×سال	19	5660097.75	297899.88**
Error	خطا	152	18340270.30	120659.67
Total		239	179447465.3	

CV=11.08%؛ ** Significant at 1% / معنی‌دار در سطح ۱٪

جدول ۳- مقایسه میانگین دو ساله عملکرد دانه ژنوتیپ‌های گندم در هر دو شرایط غیر بیمار و بیمار زنگ قهوه‌ای (سال‌های زراعی ۱۳۹۵-۱۳۹۳)

Table 3. Mean comparison grain yield of wheat genotypes in both condition under non-stress and stress of leaf rust (2015 to 2016 cropping seasons)

ردیف NO	ژنوتیپ های گندم Wheat genotypes	میانگین عملکرد دانه Mean grain yield (tha ⁻¹)	وزن هزار دانه 1000 grain weight(g)
1	Ofogh	3894.4a	33hi
2	Aflak	3845.1ab	38c
3	Bahar	3798.9abc	35fg
4	Alvand	3738.1abcd	34gh
5	Star	3708.3abcd	42b
6	Neyshabur	3619.6abcd	37cde
7	Sirvan	3593.9abcd	43a
8	Veerynak	3535.6abcd	34ghi
9	Sistan	3482.1abcde	38cd
10	Chamran	3377.1abcde	38cd
11	Chamran 2	3334.6abcde	37cde
12	Bam	3283.3bcde	35fg
13	Toos	3276.1bcde	29j
14	Shiraz	3230.9cdef9	33hi
15	Inia	3187.8defg	34ghi
16	Kavir	3187.6defg	32i
17	Shahriar	3150.6defg	29j
18	Shirodei	2947.0efg	37de
19	Bolany	2713.9fg	29j
20	Roshan	2665.2G	36EF

جدول ۴- میانگین دو ساله عملکرد دانه ژنوتیپ‌های گندم در شرایط غیر بیمار و بیمار زنگ قهوه‌ای (سال‌های زراعی ۱۳۹۵-۱۳۹۳)

Table 4. Mean comparison grain yield of wheat genotypes in both condition under non-stress and stress of leaf rust (2015 to 2016 cropping seasons)

ژنوتیپ های گندم Wheat genotypes	غیر بیمار without leaf rust		ژنوتیپ های گندم Wheat genotypes	بیمار under leaf rust	
	میانگین عملکرد دانه Mean grain yield (tha ⁻¹)	وزن هزار دانه 1000 grain weight(g)		میانگین عملکرد دانه Mean grain yield (tha ⁻¹)	وزن هزار دانه 1000grain weight(g)
Alvand	4631.0	38.4	Aflak	3706.9	38.4
Neyshabur	4550.8	41.7	Ofogh	3543.7	31.1
Star	4397.9	43.9	Sirvan	3448.8	40.5
Bahar	4263.5	38.1	Bahar	3334.3	31.7
Ofogh	4245.1	35.3	Shiraz	3093.1	28.9
Veerynak	4153.4	37.4	Sistan	3084.4	33.5
Toos	4110.7	32.6	Star	3018.7	39.4
Aflak	3983.4	38.0	Inia	2973.6	32
Sistan	3879.8	42.4	Chamran	2935.3	35.3
Chamran 2	3828.2	39.7	Veerynak	2917.9	30.4
Chamran	3819.0	40.3	Shirodei	2857.2	34.6
Bam	3752.1	39.8	Alvand	2845.2	29.6
Sirvan	3738.9	46.0	Chamran 2	2841.0	34.7
Shahriar	3724.6	32.1	Bam	2814.5	30.1
Kavir	3697.8	36.0	Neyshabur	2688.4	33
Bolany	3525.0	35.1	Kavir	2677.4	28.9
Inia	3402.0	35.7	Shahriar	2576.5	25.5
Shiraz	3368.7	36.3	Toos	2441.6	25.5
Roshan	3221.7	40.2	Roshan	2108.8	32.1
Shirodei	3036.8	38.6	Bolany	1902.9	23.1

جدول ۵- میانگین عملکرد دانه ژنوتیپ‌های گندم در هر دو شرایط بیماری زنگ قهوه‌ای و بدون بیماری و

شاخص‌های حساسیت و تحمل به آن‌ها (سال‌های زراعی ۱۳۹۵-۱۳۹۳)

Table 5. Mean grain yield of wheat genotypes in both condition under non-stress and stress of leaf rust and their susceptibility and tolerance indices (2015 to 2016 cropping seasons)

Wheat genotypes	Stress indexes under disease condition							
	SSI	TOL	STI	MP	GMP	YSI	YI	PYV
1 Shirodei	0.23	179.61	0.58	2946.97	2945.60	0.94	0.99	5.9145
2 Aflak	0.27	276.50	0.99	3845.14	3842.65	0.93	1.28	6.9413
3 Sirvan	0.31	290.11	0.86	3593.89	3590.96	0.92	1.19	7.7592
4 Shiraz	0.32	275.67	0.70	3230.89	3227.95	0.92	1.07	8.1831
5 Inia	0.50	428.44	0.68	3187.78	3180.57	0.87	1.03	12.594
6 Ofogh	0.65	701.39	1.01	3894.36	3878.54	0.83	1.23	16.522
7 Sistan	0.81	795.39	0.80	3482.14	3459.35	0.79	1.07	20.501
8 Bahar	0.86	929.25	0.95	3798.88	3770.35	0.78	1.15	21.795
9 Chamran	0.92	883.72	0.75	3377.14	3348.11	0.77	1.02	23.14
10 Bam	0.99	937.61	0.71	3283.31	3249.66	0.75	0.97	24.989
11 Chamran 2	1.02	987.22	0.73	3334.61	3297.87	0.74	0.98	25.788
12 Kavir	1.09	1020.39	0.66	3187.64	3146.54	0.72	0.93	27.594
13 Veerynak	1.18	1235.50	0.81	3535.64	3481.25	0.70	1.01	29.747
14 Shahriar	1.22	1148.11	0.64	3150.56	3097.82	0.69	0.89	30.825
15 Star	1.24	1379.28	0.89	3708.31	3643.61	0.69	1.04	31.362
16 Roshan	1.37	1112.89	0.45	2665.22	2606.49	0.65	0.73	34.544
17 Alvand	1.53	1785.78	0.88	3738.11	3629.91	0.61	0.98	38.561
18 Toos	1.61	1669.17	0.67	3276.14	3168.05	0.59	0.84	40.605
19 Neyshabur	1.62	1862.39	0.82	3619.64	3497.81	0.59	0.93	40.924
20 Bolany	1.82	1622.11	0.45	2713.94	2589.92	0.54	0.66	46.017

SSI = Stress Susceptibility Index = شاخص حساسیت به تنش; TOL = Tolerance Index = شاخص تحمل; STI = Stress Tolerance Index = شاخص

شاخص; YSI = Yield Stability Index = شاخص پایداری عملکرد; MP = Mean Productivity = میانگین بهره‌وری; GMP = Geometric Mean Productivity = میانگین هندسی بهره‌وری; PYV = Percentage yield variations of each cultivar = درصد تغییرات عملکرد هر رقم

ارقام با شدت پایین آلودگی (کمتر از ۴۰S): ارقام

سیروان، استار، افلاک و چمران ۲ با آلودگی کمتر از ۴۰S کمترین شدت آلودگی و بالاترین واکنش مقاومت را نشان دادند. رقم افلاک حدود ۶/۹۴٪، سیروان ۷/۷۶٪، چمران ۲ ۲۵/۸٪ و استار ۳۱/۴٪ کاهش عملکرد داشتند. این ارقام در شرایط بیماری به ترتیب ۳۷۰۷، ۳۴۴۹، ۲۸۴۱ و ۳۰۱۹ کیلوگرم در هکتار عملکرد داشتند (جدول ۴). وزن هزار دانه ارقام استار، سیروان و چمران ۲ در شرایط آلودگی به بیماری به ترتیب ۱۰/۳، ۱۲ و ۱۲/۴ درصد نسبت به شرایط عدم آلودگی کاهش نشان داد ولی وزن هزار دانه رقم افلاک در همین شرایط کاهشی نشان نداد. استار از نظر تیپ واکنش به زنگ قهوه‌ای مقاوم‌ترین واکنش را نشان داد اما از نظر درصد کاهش عملکرد بیشترین درصد کاهش عملکرد را در گروه ارقام مقاوم داشت و در بین ارقام مورد مطالعه پس از رقم حساس روشن استار با ۳۱/۴٪ کاهش عملکرد در رتبه ششم قرار داشت (جدول ۵).

نکته قابل توجه در نتایج اجرای آزمایش ثبات نسبی عملکرد دانه رقم سیروان در هر دو سال اجرای آزمایش و در هر دو شرایط عدم آلودگی و آلودگی می‌باشد (جدول ۴). بنابراین با توجه به نتایج این آزمایش می‌توان رقم سیروان را به عنوان رقمی پر پتانسیل با سازگاری بالا نسبت به شرایط تنش و عدم تنش بیماری زنگ قهوه‌ای دانست. رقم سیروان بیشترین وزن هزاردانه را در هر دو شرایط عدم آلودگی و آلودگی داشته است ولی تفاوت وزن هزار دانه این رقم در دو شرایط عدم آلودگی و آلودگی معنی دار بود. در بین ارقام مورد بررسی فقط تفاوت وزن هزار دانه رقم افلاک در دو شرایط عدم آلودگی و آلودگی معنی دار نبود بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که در این رقم وضعیت بیماری کمترین تأثیر را بر عملکرد دانه از طریق وزن هزار دانه دارد.

زنگ‌ها مهم‌ترین عامل تنش زنده گندم در مقیاس جهانی هستند. این تنش زنده باعث کاهش عملکرد گندم بویژه در شرایط همه‌گیری می‌شود. این تنش ناشی از عوامل بیولوژیک

بیشترین تأثیر را روی صفات عملکرد محصول داشته است. خسارت سنگین زنگ‌ها تاریخچه طولانی دارد و همواره به عنوان بیماری‌های مهم گندم، دارای خسارت اقتصادی قابل توجهی در سطح جهان بوده‌اند. به عنوان مثال در همه‌گیری سال ۷۱-۷۲ میزان خسارت زنگ زرد در ایران حدود ۱/۵ میلیون تن کاهش تولید برآورد شده بود. استفاده از ارقام مقاوم مؤثرترین و اقتصادی‌ترین روش کنترل زنگ‌ها است. اما بدلیل تغییر پذیری عوامل بیماری‌زای زنگ‌ها و توانایی ایجاد نژادهای جدید، ژنوتیپ‌های پر پتانسیلی که پس از سال‌ها تلاش و تحقیق به عنوان ارقام مقاوم معرفی می‌شوند عموماً در عرصه کشت پس از مدتی مقاومت آن‌ها به زنگ‌ها شکسته شده و در صورت مساعد بودن شرایط محیط به دلیل قدرت تکثیر و تولید مثل سریع زنگ‌ها باعث همه‌گیری گسترده بیماری می‌شوند و تولید محصول دچار خسارت و ناپایداری خواهد شد. لذا برای حفاظت از عملکرد و ژریپلاس‌های با ارزش کشور باید راهبرد حذف و نگهداری ارقام تجاری به گونه‌ای اعمال گردد که تنها به ارقامی اجازه ادامه کشت داده شود که به بیماری متحمل باشند به همین دلیل نیاز است که ارقام متحمل به بیماری، شناسایی و نگه داشته شوند و ارقام حساس که خسارت شدیدی به آن‌ها وارد می‌شود از گردونه کشت و تولید خارج گردند تا پایداری عملکرد در شرایط همه‌گیری زنگ حفظ شود. عدم مبارزه با زنگ‌ها در زمان مناسب باعث خسارت قابل توجهی به محصول می‌شود. در چنین شرایطی تحمل گزینه مناسبی در مدیریت بیماری در صورت شکسته شدن مقاومت می‌باشد که از خسارت سنگین به محصول و کاهش شدید تولید و ناپایداری بالای عملکرد جلوگیری می‌کند.

هدف اصلی در انتخاب گیاهان متحمل به بیماری نیز تولید بالا و پایداری عملکرد در شرایط بیماری می‌باشد. وجود ارقام با میانگین عملکرد بالا در شرایط تنش به بیماری در این پژوهش نشان داد که شناسایی این ارقام و معرفی و توسعه آن باعث پایداری عملکرد در مناطق پر خطر بیماری

خواهد شد.

تحمل به بیماری علاوه بر اینکه یک راه بسیار مناسب برای جلوگیری از حذف ارقام پر پتانسیلی که مقاومت آن‌ها به دلیل استفاده از تک ژن‌های مقاومت شکسته شده می‌باشد. مشکل ایجاد و تولید سریع نژادهای جدید زنگ‌ها را که در شرایط رقابت در محیط‌های زنده و طبیعی همواره در طبیعت بین گندم و عامل زنگ در چرخه boom and bust cycle وجود دارد را نیز ارقام متحمل با اجازه رشد طبیعی و عادی به همه نژادهای بیمارگر فشار جهش‌ها بر جمعیت این عوامل را کاهش می‌دهد، لذا باعث حفظ تعادل طبیعی شده و در نتیجه، از ظهور نژاد بیماری‌زای جدید نیز جلوگیری می‌نماید.

در بررسی تحمل ژنوتیپ‌ها به تنش‌ها با درک صحیح از تعامل بین بیمارگر، میزبان و محیط می‌توان برای بیماری زنگ نیز شاخص مناسبی از میان شاخص‌های تنش انتخاب نموده و رتبه بندی تحمل به بیماری ارقام را انجام داد. شاخص حساسیت به تنش SSI در مقایسه با سایر شاخص‌ها برای غربال و شناسایی ژنوتیپ‌های حساس به بیماری مناسب‌تر است. هر چه مقدار این شاخص کمتر باشد پایداری عملکرد ژنوتیپ در شرایط تنش بیشتر خواهد بود اما این شاخص نمی‌تواند نشانگر عملکرد بالا در شرایط بدون تنش (ظرفیت بالای عملکردی) باشد زیرا این شاخص و همچنین شاخص TOL دو شاخصی هستند که تاثیر پذیری کمی از میزان عملکرد بهینه دارند و بیشتر از میزان عملکرد گیاه در شرایط تنش تاثیر پذیرفته‌اند. شاخص حساسیت به تنش (SSI) و درصد تغییرات عملکرد هر رقم (PYV) می‌توانند شاخص‌های مناسبی برای انتخاب ارقام متحمل به زنگ در مناطق پر خطر زنگ زرد مانند مناطق شمال و دشت مغان باشند اما شاخص تحمل به تنش STI در مقایسه با سایر شاخص‌ها، شاخص مناسب برای شناسایی ژنوتیپ‌ها با عملکرد مطلوب در دو شرایط تنش و بدون تنش می‌باشد. این شاخص برای مناطق کم خطرتر زنگ نیز مانند مناطق مرکزی و مناطق نیمه خشک کشور مناسب‌تر است. ارقام مقاوم گندم از تکثیر زنگ و

گسترش و شدت خسارت در منطقه می‌کاهند و عموماً خود دچار خسارت ناچیز می‌شوند اما ممکن است ارقام مقاوم و یا نیمه مقاوم و حتی نیمه حساس با وجود مقاومت کامل و یا مقاومت نسبی دچار خسارت قابل توجهی شوند (به عنوان مثال رقم استار و چمران ۲ در مقابل زنگ قهوه‌ای) اما چون روی هم رفته خسارت آن‌ها از ارقام حساس کمتر بوده و گسترش زنگ‌ها و شدت آن را کاهش می‌دهند و از ایجاد همه‌گیری بیماری جلوگیری می‌کنند وجود آن‌ها در منطقه مفید می‌باشد. برای حفظ پایداری عملکرد و مدیریت بیماری باید روی ارقام حساس متمرکز بود. ارقام حساسی که عملکرد آن‌ها شدیداً تحت تاثیر قرار گرفته و کاهش شدید داشتند را حذف و ارقامی که عملکرد آن‌ها کمتر تحت تاثیر بیماری بودند و عملکرد قابل قبولی داشتند را برای استمرار کشت در منطقه نگه داری کرد و بهره برداری نمود تا ارقام مناسب‌تر جایگزین شوند. ژنوتیپ‌های متحمل ژنوتیپ‌های هستند که عملکرد آن‌ها در شرایط تنش نسبت به میانگین افت عملکرد کلیه ژنوتیپ‌ها در شرایط تنش کمتر باشد. بر این اساس ژنوتیپ‌های که در این آزمایش افت عملکرد آن‌ها در شرایط تنش زنگ قهوه‌ای از ۲۵٪ کمتر بود متحمل به زنگ قهوه‌ای هستند.

بر اساس معیار SSI می‌توان تحمل ژنوتیپ‌ها را بر اساس پایداری عملکرد، رتبه بندی کرد. به این منظور از راهبرد گزینش بر اساس مقادیر عملکرد ژنوتیپ‌ها در هر دو محیط تنش و بدون تنش استفاده می‌شود. به منظور شناسایی و کنار گذاشتن ژنوتیپ‌های حساس به تنش از میان ژنوتیپ‌های متحمل میزان آستانه کمی شاخص SSI را تعیین می‌کنیم. بدین ترتیب عمل می‌شود که میزان SSI معیار را از رابطه (شدت تنش - ۱) بدست آورده (جدول ۵) و ژنوتیپ‌های دارای مقدار SSI مساوی یا بیشتر از SSI معیار در شرایط آزمایش را حساس به بیماری در نظر گرفته و از میان ژنوتیپ‌های موجود حذف می‌گردد.

بر اساس SSI معیار $(0.75 = \text{شدت تنش} - 1)$ در نتایج

تلاقی در صورت شکسته شدن مقاومت به دلیل تحمل این ارقام میزان خسارت کاهش یافته و پایداری عملکرد در شرایط همه‌گیر شدن بیماری تامین می‌گردد. بر اساس نتایج بدست آمده از این پژوهش می‌توان با کمی اغماض، رقم بهار و سیستان را برای تحمل به زنگ قهوه‌ای به خزانه تلاقی اضافه کرد.

دو ساله اهواز نسبت به زنگ قهوه‌ای (جدول ۵) ارقام شیرودی، افلاک، سیروان، شیراز، اینیا و افق که SSI معیار آن‌ها کمتر از ۰/۷۵ بود انتخاب و بقیه حذف شدند. در این میان ارقام حساس افق و اینیا به عنوان ارقام متحمل به زنگ قهوه‌ای در خزانه تلاقی ارقام معرفی می‌شوند. تا جایگزین ارقام حساس به عنوان والد گیرنده ژن‌های مقاومت در تلاقی‌های اصلاحی شوند، با استفاده از این ارقام در خزانه

References

- APPEL, J. A., E. DEWOLF, W. W. BOCKUS and T. TODD, 2009. Preliminary 2009 Kansas wheat disease loss estimates. Kansas : Kansas cooperative plant disease survey report.
- BOLLEY, H. L. and F. J. PRITCHARD, 1906. Rust problems: Facts, observations and theories; possible means of control. North Dakota Agricultural Experiment Station. Bulletin 69.
- BOUSLAMA, M. and W. T. SCHAPAUGH, 1984. Stress tolerance in soybean. Part I: Evaluation of three screening techniques for heat and drought tolerance. *Crop Science* 24: 933-937.
- CALDWELL, R. M., J. F. SCHAFER, L. E. COMPTON, and F. L. PATTERSON, 1958. Tolerance to cereal leaf rusts. *Science*, 128(3326): 714-715.
- CLARKE, J. M., R. M. DEPAUW and T. F. TOWNLEYSMITH, 1992. Evaluation of methods for quantification of drought tolerance in wheat. *Crop Science*, 32: 723-728.
- COBB, N. A. 1894. Contributions to an economic knowledge of the Australian rusts (Uredinae). *The Agricultural Gazette of New South Wales*, 3:181-212 and 5:239-252.
- DADREZAEI, S. T., E. MOHAMMADI GOLTAPPEH, F. AFSHARI and K. NAZARI, 2012. Pathotypes and physiologic races of *Puccinia triticina* Erik's. The causal agent of wheat leaf rust and their distribution in Iran in 2009 and 2010. *Seed and Plant Improvement Journal*, 28-1:685-715 (in Persian with English summary).
- DADREZAIE, S. T. and R. ASLAHI, 2004. Evaluation of resistance in some wheat cultivars and advanced lines to Leaf Rust, Yellow Rust and Septoria Leaf Blotch in Khuzestan province. *Proceedings of the 16th Iranian plant protection congress Volume 2: Plant Diseases and Weeds 28 August -1 September 2004*. University of Tabriz.
- EHDAIE, B., J. G. WAINS and A. E. HALL, 1988. Differential response of landrace and improved spring wheat genotypes to stress environments. *Crop Science*, 28: 838-842.
- FERNANDEZ, G. C. 1992. Effective selection criteria for assessing plant stress tolerance. *Proceedings of the International Symposium on Adaptation of Vegetables and other Food Crops to Temperature and Water Stress*. Taiwan, 1992. pp: 257-270. In: Kuo, C.G. (ed.).
- FISHER, R. A. and R. MAURER, 1978. Drought resistance in spring wheat cultivars. I. Grain yield responses. *Australian Journal of Agricultural Research*, 29: 897-912.
- GAVUZZI, P., F. RIZZA, M. PALUMBO, R. G. CAMPALINE, G. L. RICCIARDI and B. BRGHI, 1997. Evaluation of field and laboratory of drought and heat stress in winter cereals. *Canadian Journal of Plant Science* 77 (4): 523-531.
- HUERTA-ESPINO, J., R. P. SINGH, S. GERMAN, B. D. MCCALLUM, R. F. PARK, W. Q. CHEN, S. C. BHARDWAJ and H. GOYEAU, 2011. Global status of wheat leaf rust caused by *Puccinia triticina*. *Euphytica*, 179:143-160.

- KOLMER, J. A. 2005. Tracking wheat rust on a continental scale. *Current Opinion in Plant Biology*, 8: 441-449.
- MARASAS, C. N., M. SMALE and R. P. SINGH, 2004. The Economic Impact in Developing Countries of Leaf Rust Resistance Breeding in CIMMYT related Spring Bread Wheat. CIMMYT, Mexico D.F.
- MARTINEZ, F., A. CASTILLA and L. BARRIO, 2012. Tolerance to leaf rust (*Puccinia triticina*) in durum Wheat. 13-16 Jun. 11th International Congress of Spanish Association animal reproduction. Cordoba.
- ORDONEZ, M. E., S. E. GERMÁN and J. A. KOLMER, 2010. Genetic differentiation with in the *Puccinia triticina* population in South America and comparison with the North American population suggests common ancestry and inter continental migration. *Phytopathology*, 100: 376-383.
- PETERSON, R. F., A. B. CAMPBELL and A. E. HANNAH, 1948. A diagrammatic scale for estimating rust intensity of leaves and stems of cereals. *Canadian Journal of Research*, 26: 496-500.
- ROBERTS, J. J., L. T. HENDRICKS and F. L. PATTERSON, 1984. Tolerance to leaf rust in susceptible wheat cultivars. *Phytopathology*, 74:349-351.
- ROELFS, A. P., R. P. SINGH and E. E. SAARI, 1992. Rust Disease of wheat: Concepts and Methods of Disease Management. CIMMYT. Mexico.
- ROSIELLE, A. and J. HAMBLIN, 1981. Theoretical aspects of selection for yield in stress and non-stress environment. *Crop Science* 21: 943-946.
- TORABI, M., V. MARDOUKHI, A. FROUTAN, M. A. RAMAEI, S. T. DADREZAEI, H. AKBARI MOGHADDAM, S. RAJAEI and H. AZIMI, 2003. Virulence genes of *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*, the causal gent of wheat leaf rust in some regions of Iran during 1995-1999. *Seed and Plant*, 18: 432-449 (in Persian with English summary).
- TORABI, M., K. NAZARI and F. AFSHARI, 2001. Genetic of pathogenicity of *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*, the causal gent of leaf rust of wheat. *Iranian Journal of Agricultural Science*, 32: 625-635 (in Persian with English summary).

تنوع غذایی جغد گوش دراز در استان‌های البرز، اصفهان و همدان از طریق بررسی ریمه با تاکید بر جوندگان

ابوالقاسم خالقی زاده^۱ و مریم امیدی^۲

۱- استادیار، بخش تحقیقات جانورشناسی کشاورزی، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران؛ ۲- کارشناس ارشد محیط طبیعی، اداره کل حفاظت محیط زیست استان اصفهان، اصفهان، ایران
(تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۹۶؛ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۶)

چکیده

جغد گوش دراز (*Asio otus* (Linnaeus, 1758) (Aves: Strigidae) در گذشته به عنوان یکی از جغدهای کمیاب ایران مطرح بود اما خوشبختانه جمعیت آن در سال‌های گذشته در نقاط مختلف کشور در حال افزایش بوده است. پرندگان شکاری از جمله جغدها، بقایای غیرقابل هضم طعمه‌های بلعیده شده را به صورت گلوله‌های استوانه‌ای شکل از دهان خود خارج می‌کنند که به آن ریمه (pellet) گفته می‌شود. در این پژوهش از مناطق مهرشهر کرج، اصفهان و بهار همدان، ۷۴۴ ریمه جمع‌آوری شد. ریمه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه، ابتدا، تمیز، شماره‌گذاری، اندازه‌گیری و توزین شد. سپس با خیساندن ریمه‌ها توسط الکل، طعمه‌های قابل شناسایی آن تفکیک و شناسایی شدند. به طور کلی، جوندگان در ۵۵۱ ریمه (۷۴/۰۶٪)، پرندگان در ۲۱۱ ریمه (۲۸/۳۶٪)، حشره‌خوارها در ۲۰ ریمه (۲/۶۹٪) و حشرات در ۱۳ ریمه (۱/۷۵٪) وجود داشتند. از کل ۵۸۳ طعمه شناسایی شده جوندگان، ۲۳۱ طعمه از جنس موش‌ها *Mus* (۳۹/۶۲٪)، ۱۵۲ طعمه از جنس ول‌ها *Microtus* (۲۶/۰۷٪)، ۱۳۳ طعمه از جنس هامسترها *Cricetulus* (۲۲/۸۱٪)، ۴۷ طعمه از جنس مریون *Meriones* (۸/۰۶٪) و جنس‌های *Rattus*، *Nesokia* و *Rhombomys* سهم بسیار کمی داشتند (به ترتیب ۲/۴۰٪، ۰/۶۹٪ و ۰/۳۴٪). گونه غالب در اصفهان جنس هامسترها *Cricetulus* (۳۵/۱۵٪)، در همدان جنس موش‌ها *Mus* (۴۳/۸۰٪) و در کرج ول‌ها *Microtus* (۵۴/۳۷٪) بود. به علت عدم هراس نه چندان زیاد جغد گوش دراز از انسان و حضور آن در کنار زمین‌های کشاورزی در آینده نزدیک می‌توان اقدام به جلب آن‌ها برای استفاده در کنترل تلفیقی جوندگان در مزارع کشاورزی نمود.
واژه‌های کلیدی: جغد گوش دراز، جوندگان، ریمه، کشاورزی ارگانیک، کنترل بیولوژیک.

Diet of the Long-eared Owl in Alborz, Esfahan and Hamedan provinces through pellet analysis with emphasis on rodents

A. KHALEGHIZADEH¹ and M. OMIDI²

1- Assistant Professor, Agricultural Zoology Research Department, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran; 2- Senior Expert on Natural Environment, Esfahan Provincial Office of the Department of the Environment, Esfahan, Iran

Abstract

The Long-eared Owl *Asio otus* (Linnaeus, 1758) (Aves: Strigidae) was previously considered as a rare bird species in Iran but its population has increased in recent years. Raptors, in particular owls regurgitate undigested remains in the form of cylinder called pellet. In this study, 744 pellets were collected from Karaj, Esfahan and Hamedan areas. After collection of pellets and transferring them to the laboratory, they were cleaned, numbered, measured and weighed. Then, these pellets were wetted by alcohol. Pellets were dissected and skulls and other animal remains were extracted, labeled and identified. In total, rodents were present in 551 pellets (74.06%), birds in 211 pellets (28.36%), Insectivora in 20 pellets (2.69%) and insects in 13 pellets (1.75%). Among 583 rodent prey items identified, 231 items were from the genus *Mus* (39.62%), 152 items from *Microtus* (26.07%), 133 items from *Cricetulus* (22.81%), 47 items from *Meriones* (8.06%) but less item numbers were from the genera *Rattus*, *Nesokia* and *Rhombomys* (2.40%, 0.69% and 0.34%, respectively). The dominant prey in Karaj was *Microtus* (54.37%), in Hamedan was *Mus* (43.80%) and in Esfahan was *Cricetulus* (35.15%). Because the Long-eared Owl can inhabit in agricultural ecosystems and near human settlements, it can be recruited to control rodents in agricultural fields.

Key words: Biological control, Long-eared Owl, Organic agriculture, Pellet, Rodents.

مقدمه

روابط طعمه-طعمه‌خوار از انواع مهم مطالعات اکولوژیک در اکوسیستم‌های مختلف هستند. یکی از راه‌های بررسی طعمه‌خواری، مطالعه محتویات معده است که خود ممکن است از طریق تفکیک محتویات سنگدان یا از طریق بررسی محتویات ریمه انجام شود. ریمه‌ها گلوله‌های عمدتاً استوانه‌ای شکل شامل بخش هضم نشده حیوانات خورده شده پرنندگان شکاری و حاوی جمجمه و دندان‌های طعمه‌ها می‌باشند. زمان تجمع مواد هضم نشده و بیرون دادن ریمه‌ها چندین ساعت و بر حسب گونه و نوع و میزان محتویات غذایی متفاوت است. مطالعه ریمه‌ها می‌تواند داده‌های مهمی درباره رژیم غذایی پرنندگان شکاری ارائه کند. با بررسی ریمه‌ها می‌توان به تنوع گونه‌ای خورده شده، تعداد و درصد هر یک از گونه‌ها در رژیم غذایی، تفاوت ترکیب گونه‌ای و درصد طعمه‌ها در مناطق مختلف، نوسانات جمعیت طعمه‌های خورده شده در طول سال و حتی تغییر رژیم غذایی بین سال‌های مختلف پی برد. مطالعه ریمه‌ها می‌تواند حتی اطلاعاتی مانند تنوع و پراکنش پستانداران کوچک در یک محدوده یا منطقه مشخص و پویایی فصلی آن‌ها را نیز نشان دهد.

جغد گوش دراز (*Asio otus* L.) از امریکای شمالی تا اروپا، آسیا و شمال آفریقا پراکنش دارد. این پرنده شکاری شب فعال در اراضی باز زیست می‌کند. جغد گوش دراز اصولاً از پستانداران کوچک تغذیه می‌کند (Del Hoyo *et al.*, 1999). جغدها به علت‌های همزمانی فعالیت با جوندگان، جنه نسبتاً کوچک، امکان صید سریع و نیاز به میزان پروتئین زیاد، عمدتاً از جوندگان تغذیه می‌نمایند. بنابر این، نقش مهمی در کنترل جوندگان دارند (Nisteanu, 2007; Seckin and Coskun, 2006). جغد گوش دراز (*Asio otus*) در گذشته به عنوان یکی از جغدهای کمیاب ایران مطرح بود (Mansoori, 2008) اما خوشبختانه در سال‌های اخیر تعداد آنها در نقاط مختلف کشور در حال افزایش است (Khaleghizadeh *et al.*, 2015).

در سال‌های اخیر اطلاعات در مورد وضعیت پراکنش، جمعیت و تغذیه جغدها در ایران در حال افزایش است (Osaei *et al.*, 2007; Obuch, 2011; Obuch and Khaleghizadeh, 2011; Khaleghizadeh *et al.*, 2015).

جوندگان در جهان و ایران از آفات مهم کشاورزی محسوب می‌شوند. به علاوه باعث بروز مشکلات بهداشتی و شیوع بیماری‌های خطرناک می‌شوند. به همین دلیل، کنترل جوندگان در بسیاری از مناطق امری ضروری است. سالیانه هزینه‌های هنگفتی برای استفاده از انواع روش‌های کنترل جوندگان پرداخت می‌شود که بخش اعظم آن‌ها در مزارع کشاورزی به صورت مواد شیمیایی و سموم جونده‌کش می‌باشد. همین سموم نیز باعث ایجاد انواع اثرات اولیه و ثانویه در انسان، محصولات کشاورزی، گیاهان، جانوران و اکوسیستم‌های طبیعی می‌گردند. بنابر این ضروری است که از عناصر کنترل‌کننده بیولوژیک در جهت توسعه کشت ارگانیک اقدام گردد. در مورد کنترل بیولوژیک جوندگان، جغدها از مهم‌ترین جانوران شکارچی آن‌ها هستند.

هدف این تحقیق، تعیین طعمه‌های تشکیل دهنده محتویات ریمه جغد گوش دراز، تعیین در صد جوندگان در محتویات غذایی جغد گوش دراز، بررسی تنوع گونه‌ای جوندگان مناطق مورد مطالعه بر اساس ریمه آنها و تعیین آنها از دید آفت کشاورزی و تعیین تفاوت‌های محتویات غذایی جغدها بخصوص جوندگان در مناطق مختلف بود.

مناطق مورد مطالعه: در استان‌های البرز، اصفهان و

همدان، ابتدا بررسی میدانی به منظور یافتن محل‌های استراحت دائمی یا دوره‌ای جغد گوش دراز انجام شد. در استان‌های البرز (در کنار فاز ۴ مهرشهر) و اصفهان (اطراف شهر اصفهان)، این محل‌ها بر اساس محل‌های تعیین شده قبلی توسط پرنده شناسان ایرانی انجام شد. در استان همدان، محل گزارش شده قبلی یافت نشد اما محل جدیدی از تجمع و استراحت آن‌ها در اطراف شهر بهار پیدا شد.

در همه این نقاط، ابتدا موقعیت دقیق محل استراحت و

(طعمه‌ها) تفکیک شدند. بقایای جوندگان بر اساس فرمول‌های دندان، مقطع دندان‌ها و شکل استخوان‌های فک و جمجمه با دو روش مقایسه با منابع (Etemad, 1978; Morowati et al., 2010) و نمونه‌های موجود در موزه جانورشناسی کشاورزی ایران و همچنین تجربه مطالعات قبلی مجری و همکاران مورد بررسی و شناسایی قرار گرفتند. به طور میانگین کل زمان صرف شده برای تفکیک و اندازه‌گیری‌های مختلف برای هر ریمه ۱۰ دقیقه به طول انجامید که شامل تمیز کردن، تفکیک، شماره‌گذاری، اندازه‌گیری، توزین، خیساندن، جدا کردن محتویات جمجمه و دندان‌ها، و شناسایی محتویات قابل شناسایی در هر ریمه بود. برای بررسی میزان تغذیه این پرندگان از جوندگان و پرندگان، بر اساس روش معمول بررسی ریمه‌های پرندگان شکاری یعنی درصد وجود هر ماده غذایی در میان کل ریمه‌ها برای هر مکان محاسبه شد. نسبت طعمه‌ها در میان گونه‌های مختلف جوندگان در طول کل بررسی نیز براساس تعداد جمجمه یافت شده انجام شد.

نتیجه و بحث

شکل ریمه‌های جمع‌آوری شده یکسان نبوده، از استوانه‌ای بلند تا دایره‌ای بودند (شکل ۲). در کل سه منطقه کرج، اصفهان و همدان، ۷۴۴ ریمه جمع‌آوری شد. جوندگان در ۵۵۱ ریمه (۷۴/۰۶٪)، پرندگان در ۲۱۱ ریمه (۲۸/۳۶٪)، حشره‌خوارها در ۲۰ ریمه (۲/۶۹٪) و حشرات در ۱۳ ریمه (۱/۷۵٪) حضور داشتند. از کل ۵۸۳ طعمه جونده، ۲۳۱ طعمه از جنس *Mus* (۳۹/۶۲٪)، ۱۵۲ طعمه از جنس *Microtus* (۲۶/۰۷٪)، ۱۳۳ طعمه از جنس *Cricetulus* (۲۲/۸۱٪)، ۴۷ طعمه از جنس *Meriones* (۸/۰۶٪) بودند اما جنس‌های *Nesokia*، *Rattus* و *Rhombomys* سهم بسیار کمی داشتند (به ترتیب ۲/۴۰٪، ۰/۶۹٪ و ۰/۳۴٪) (جدول ۱).

تجمع جغد با استفاده از آثار و علائم حضور یعنی فضله و ریمه جغدها (شکل ۱) تعیین شد. هر سه محلی تجمع جغدها در کنار زمین‌های کشاورزی قرار داشتند. در مهرشهر کرج (مختصات "۳۵°۴۸'۰۷" شمالی و "۵۰°۵۴'۵۶" شرقی)، از اوایل پاییز جغدهای گوش دراز در ناحیه‌ای مسکونی که در کنار آن زمین‌های وسیع کشاورزی و مزارع تحقیقاتی موسسه تحقیقات تهیه و اصلاح نهال و بذر قرار دارد، به این محل مهاجرت کرده و تا پایان فصل زمستان روی درختان کاج واقع در این محل اقامت می‌گزینند. تعداد آن از ۲ فرد در ابتدا و انتهای این دوره تا ۱۱ فرد در اوج جمعیت در ماه‌های دی و بهمن متغیر بود. در اصفهان (مختصات "۳۲°۳۲'۵۱" شمالی و "۵۲°۰۱'۱۴" شرقی)، در اطراف روستای تیمارت واقع در ۳۰ کیلومتری جنوب شرق شهر اصفهان، جغدهای گوش دراز در طول سال بر روی درختان کنار مزارع اقامت دارند. جمعیت آن به ۱۰ فرد بالغ می‌شود که دارای دو آشیانه بوده و به جوجه‌آوری می‌پردازند. در بهار همدان (مختصات "۳۴°۵۴'۵۸" شمالی و "۴۸°۲۷'۵۱" شرقی)، جغدهای گوش دراز روی درختان سرو محوطه منابع طبیعی اقامت دارند که در بازدید صحرائی حداقل سه فرد دیده شدند. در هیچ یک از نقاط مورد اشاره گونه دیگری از جغدها، همراه با این گونه تجمع نداشته و صرفاً محل تجمع این گونه می‌باشد.

روش بررسی

در مناطق مورد بررسی ابتدا ریمه‌ها جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. ریمه‌های جغد گوش دراز بیضوی یا سیلندری شکل، به رنگ خاکستری و فشرده هستند. پس از انتقال ریمه‌ها به آزمایشگاه، ابتدا ریمه‌ها در محیط آزمایشگاه تمیز و خشک شدند. هر یک از ریمه‌ها در کیسه‌های نایلونی جداگانه شماره‌گذاری شد. سپس طول و قطر آن‌ها با کولیس (با دقت ۰/۰۲ میلی‌متر) اندازه‌گیری و با ترازوی دیجیتالی (با دقت ۰/۱ گرم) توزین شدند. در مرحله بعد، ریمه‌ها با خیساندن در الکل صنعتی از هم باز شده، بقایای اندام‌های مختلف جوندگان و پرندگان و دیگر بقایای جانوری موجود



شکل ۱- آثار ریمه‌ها و فضله‌ها، الف) زیر درختان کاج در کرج، ب) زیر درختان سرو در همدان

Fig. 1. Signs of pellets and faeces, right) bellow pine trees in Mehr-Shahr, Karaj, left) bellow cypress trees around Bahar, Hamedan



شکل ۲- شکل‌های مختلف ریمه جغد گوش دراز جمع‌آوری شده از اصفهان

Fig. 2. Different shapes of Long-eared Owl pellets collected around Esfahan city



شکل ۳- یک جغد گوش دراز روی درختان سرو در بهار، استان همدان (عکس از ا. خالقی‌زاده)

Fig. 3. A Long-eared Owl on a Cypress tree in Bahar, Hamedan province (photo by A. Khaleghizadeh)



شکل ۴- موقعیت محل تجمع جغد گوش دراز و مزارع اطراف آن، شهر بهار، استان همدان

Fig. 4. Location of roosting site of Long-eared Owls and its adjacent agricultural lands, Bahar city, Hamedan province

طور متوسط طول ریمه‌ها ۳۸/۹ (N=71)، قطر بزرگ ۱۹/۷ (N=82) و قطر کوچک ۱۶/۳ میلی‌متر (N=82) و وزن متوسط آن‌ها ۲/۵۰ گرم (N=55) بود (جدول ۲).

در اصفهان در بین ۱۹۴ ریمه، جوندگان در ۱۶۰ ریمه (۸۲/۴۷٪)، پرندگان در ۵۳ ریمه (۲۷/۳۲٪)، حشره‌خوارها در ۵ ریمه (۲/۵۸٪) و حشرات در ۱۲ ریمه (۶/۱۸٪) حضور داشتند. از کل ۱۶۵ طعمه جونده، ۵۸ طعمه از جنس *Hamster* *Mus* (۳۵/۱۵٪)، *Cricetulus* (۳۱/۵۱٪) و جنس مریون‌ها *Meriones* در ۴۶ طعمه (۲۷/۸۸٪) بودند اما موش‌های بزرگ از جنس *Rattus* و *Nesokia* سهم بسیار ناچیزی داشتند (به ترتیب ۴/۸۵٪ و ۰/۶۱٪) (جدول ۱).

همدان: در اطراف شهر بهار استان همدان تعداد ۲۵۰ ریمه جمع‌آوری شد. در این محل، جغدها روی درختان سرو خمره‌ای قدیمی به ارتفاع تقریباً ۸ متر استراحت می‌کردند (شکل ۳). در همدان، به طور متوسط طول ریمه‌ها ۳۳/۹ (N=32)، قطر بزرگ ۱۶/۹ (N=121) و قطر کوچک ۱۲/۷ میلی‌متر (N=128) و وزن متوسط آن‌ها ۱/۹ گرم (N=40) بود (جدول ۲).

در همدان در بین ۲۵۰ ریمه، جوندگان در ۲۱۶ ریمه (۸۶/۴٪)، پرندگان در ۳۶ ریمه (۱۴/۴٪)، حشره‌خوارها و حشرات هر کدام تنها در یک ریمه (۰/۴٪) حضور داشتند. از

کرج: در مهرشهر کرج ۳۰۰ ریمه جمع‌آوری شد. تعداد جغدها در زمان‌های مختلف سال متغیر بود. در فصول پاییز و زمستان ۳ تا ۱۱ جغد مشاهده شد اما در فصول بهار و تابستان هیچ جغد گوش درازی مشاهده نشد. در این محل، جغدها در طول روز روی درختان کاج بلند به ارتفاع تقریباً ۱۲ متر استراحت می‌کردند. در کرج، به طور متوسط طول ریمه‌ها ۳۳/۰۹ (N=55)، قطر بزرگ ۱۸/۰۸ (N=54) و قطر کوچک ۱۴/۹۲ میلی‌متر (N=46) و وزن متوسط آن‌ها ۱/۶۹ گرم (N=75) بود (جدول ۲).

در کرج در بین ۳۰۰ ریمه، جوندگان در ۱۷۵ ریمه (۵۸/۳۳٪)، پرندگان در ۱۲۰ ریمه (۴۰/۰۰٪)، حشره‌خوارها در ۱۴ ریمه (۴/۶۶٪) حضور داشتند اما حشرات در هیچ یک از ریمه‌ها وجود نداشت. از کل ۱۶۰ طعمه، ۸۷ طعمه از جنس ول‌ها *Microtus* (۵۴/۳۷٪)، ۶۶ طعمه از جنس موش‌ها *Mus* (۴۱/۲۵٪) بودند اما موش‌های بزرگ از جنس *Rattus* و *Nesokia* سهم بسیار ناچیزی داشتند (به ترتیب ۲/۵۰٪ و ۱/۸۷٪) (جدول ۱).

اصفهان: در اطراف شهر اصفهان ۱۹۴ ریمه جمع‌آوری شد. جغدها در این محل، جوجه‌آوری نیز داشتند و ۳ آشیانه در این محل مشاهده شد که در بهار ۱۳۹۴ یکی از این آشیانه‌ها فعال بود. در این محل، جغدها روی درختان نارون به ارتفاع تقریباً ۵-۶ متر استراحت می‌کردند. در اصفهان، به

طیف غذایی آن خیلی متنوع و از ۲۶ گونه پرنده و پستاندار تشکیل شده بود. ول معمولی با ۵۸/۳ درصد در ریمه‌های منطقه Cluj-Napoca و ۷۸/۷ درصد در منطقه Cojocna، مهم‌ترین بخش غذایی در رژیم غذایی این جغد بودند. موش جنگلی با ۱۱/۲ درصد در رتبه دوم ریمه‌های منطقه Cluj-Napoca و ول صحرایی با ۱۲/۳ درصد در رتبه دوم ریمه‌های منطقه Cojocna جای داشتند. در هر دو منطقه ول معمولی (*Microtus arvalis*)، فراوان‌ترین گونه در ریمه‌های جغد گوش دراز بود (Nistoreanu, 2007). در جنوب شرق لهستان، جوندگان کوچک در ۹۹٪ از ریمه‌ها وجود داشتند.

کل ۲۵۸ طعمه، ۱۱۳ طعمه از جنس موش‌ها (*Mus* ۴۳/۸۰٪)، ۷۵ طعمه از جنس هامسترها (*Cricetulus* ۲۹/۰۷٪) و ۶۵ طعمه از جنس ول‌ها (*Microtus* ۲۵/۱۹٪)، موش‌های بزرگ از جنس *Rattus*، *Rhombomys* و *Meriones* سهم بسیار ناچیزی داشتند (به ترتیب ۰/۷۷٪، ۰/۷۷٪ و ۰/۳۹٪) (جدول ۱).

طبق بررسی انجام شده، ول‌ها که جوندگانی با دم خیلی کوتاه هستند مهم‌ترین طعمه این جغد می‌باشند (۵۳/۷٪ از کل طعمه‌ها در اروپا و آمریکا از جنس *Microtus* بودند) (Marti, 1976). ریمه‌های این جغد در سال‌های ۱۹۹۴ تا ۱۹۹۶ در دو منطقه رومانی جمع‌آوری و بررسی شد (Nistoreanu, 2007) که

جدول ۱- تعداد و نوع محتویات شناسایی شده در ریمه‌های جغد گوش دراز

Table 1. Number and type of identified prey in pellets of the Long-eared Owl

مکان Place	تعداد Number	حشرات Insects	پرندگان Birds	<i>Rhombomys</i>	<i>Meriones</i>	<i>Microtus</i>	<i>Nesokia</i>	<i>Rattus</i>	<i>Cricetulus</i>	<i>Mus</i>	تعداد کل طعمه جوندگان No. of prey items of rodents	تعداد ریمه دارای طعمه جوندگانه No. of pellets containing rodents	حشره خوارها Insectivora
Karaj	تعداد ریمه No. of pellets	0	120	0	0	76	3	4	0	54	NA	175	14
Karaj	تعداد طعمه No. of prey item	0	1 Quail, 81 Sparrow	0	0	87	3	4	0	66	160	175	17
Esfahan	تعداد ریمه No. of pellets	12	53	0	42	0	1	8	51	44	NA	160	5
Esfahan	تعداد طعمه No. of prey item	12	1 cf. White-eared Bulbul, 1 Myna or Starling, 6 sparrow	0	46	0	1	8	58	52	165	160	5
Hamedan	تعداد ریمه No. of pellets	1	36	2	1	58	0	2	71	93	NA	216	1
Hamedan	تعداد طعمه No. of prey item	1	1 Budgriegar, 15 sparrow	2	1	65	0	2	75	113	258	216	1 Crocidura
Total	تعداد ریمه No. of pellets	13	211	2	43	134	4	14	122	191	NA	551	20
Total	تعداد طعمه No. of prey item	12 Coleoptera	1 Quail, 1 Budgriegar, 1 White-eared Bulbul, 1 Myna or Starling, 102 sparrow	2	47	152	4	14	1333	231	583	551	22

NA= Not available because some pellets were damaged.

جدول ۲- اندازه گیری ریمه‌های جغد گوش دراز جمع آوری شده از کرج، اصفهان و همدان

Table 2. Measurements of pellets collected from Karaj, Esfahan and Hamedan

عنوان Title	وزن Weight	قطر کوچک Lesser diameter	قطر بزرگ Greater diameter	طول Length
Karaj				
تعداد ریمه No. of pellets	N=75	N=46	N=54	N=55
حداکثر Maximum	0.2 g	10.0 mm	10.3 mm	14.0 mm
حداقل Minimum	4.9 g	21.4 mm	25.5 mm	64.0 mm
متوسط Average	1.69 g	14.92 mm	18.08 mm	33.09 mm
Esfahan				
تعداد ریمه No. of pellets	N=55	N=82	N=82	N=71
حداکثر Maximum	5.0 g	22.8 mm	28.0 mm	73.0 mm
حداقل Minimum	0.9 g	10.8 mm	14.3 mm	21.7 mm
متوسط Average	2.50 g	16.3 mm	19.7 mm	38.9 mm
Hamedan				
تعداد ریمه No. of pellets	N=40	N=128	N=121	N=32
حداکثر Maximum	4.3 g	19.6 mm	51.9 mm	61.0 mm
حداقل Minimum	0.6 g	5.2 mm	10.7 mm	18.3 mm
متوسط Average	1.9 g	12.7 mm	16.9 mm	33.9 mm

تابستان در این مطالعه ثبت شد. در پاییز-زمستان درصد ول معمولی در رژیم غذایی در مقایسه با فصل بهار- تابستان ۱۵ درصد کمتر بود. در زمستان جغدها مجبور می‌شوند که رژیم غذایی خود را به طعمه‌های جایگزین تغییر دهند (Romanowski and Żmihorski, 2008). در غرب فنلاند زیستگاه‌های انتخاب شده شامل ۷۶ درصد اراضی کشاورزی و بایر، ۱۸ درصد جنگل، ۵ درصد مرداب و ۱ درصد اراضی رها شده (غیر مسکونی) بود. در رژیم غذایی جغد گوش دراز، ول مهم‌ترین طعمه است. نتایج تحقیق در غرب فنلاند نشان

ول معمولی مهم‌ترین گونه در جیره غذایی این گونه بود که حدود ۸۰٪ از کل طعمه‌ها در ماه‌های دسامبر و مارس را تشکیل می‌داد (Dziemian *et al.*, 2012). در بخش مرکزی لهستان، همانند مطالعات قبلی در مورد رژیم غذایی جغد گوش دراز در اروپای گرمسیری، خانواده هامسترهای طلایی و ول‌ها به ویژه ول معمولی به عنوان با اهمیت‌ترین طعمه در فصل پاییز- زمستان و بهار- تابستان شناسایی شدند. موش‌ها دومین گروه مهم از طعمه‌ها بودند. تفاوت معنی‌دار بین رژیم غذایی جغد گوش دراز در فصول پاییز- زمستان و بهار-

می‌دهد که نسبت ول شکار شده در فنلاند (۷۱ درصد)، بیش از مطالعات اروپا و امریکای شمالی (به ترتیب ۴۸ و ۶۱ درصد) بود و بیشترین فراوانی طعمه شکار شده مربوط به *Microtus epiroticus* بود (Korpimaki, 1992). مطالعه ریمه‌های جمع‌آوری شده در شمال شرقی استان دیاربکر ترکیه در سال ۲۰۰۰-۲۰۰۱ انجام شد. در منطقه مطالعاتی درختان کاج، پوشش غالب بودند. نمونه‌ها از محل‌هایی که توسط درختان کاج احاطه و کمترین تخریب توسط فعالیت‌های انسانی صورت گرفته بود، جمع‌آوری شد که ریمه‌ها اغلب دربر گیرنده پستانداران کوچک بودند. جوندگان با ۹۵/۴۸ درصد طعمه غالب بودند. ول‌های *Microtinae* مهم‌ترین بخش غذایی این جغد بودند. ول گونتر ۷۱/۲۹ درصد از بقایای یافت شده در درون ریمه‌ها را تشکیل می‌دادند. موش خانگی، دومین گونه فراوان شکار شده بود که ۱۹/۳۵ درصد از بقایا را تشکیل می‌داد (Seckin and Coskun, 2006). در فلسطین اشغالی، ریمه‌های جمع‌آوری شده در فاصله سال‌های ۱۹۹۵ تا ۲۰۰۴ نشان داد که ۹۶٪ از طعمه‌ها، ول صحرایی بودند (Yosef, 2009). در ایران، ریمه‌های جغد گوش دراز از زابل جمع‌آوری شد (Khaleghizadeh et al., 2009) که جوندگان در ۹۹ درصد از ۲۵۰ ریمه وجود داشتند. بر اساس ۲۵۸ طعمه شناسایی شده، ترکیب زیر وجود داشت: جوندگان ۴۷/۷ درصد (در سطح گونه شناسایی نشده)، گونه‌های جریبل ۲۶/۷ درصد و جریبل هندی *Tatera indica* ۱۷/۸ درصد و بقیه پستانداران شناسایی شده شامل موش ورامین *Nesokia indica* و گونه‌های جرد، جریبل و حشره‌خورها، هر کدام کمتر از ۱ درصد از کل تعداد طعمه‌های یافت شده در ریمه‌ها بودند. گونه‌های جریبل کوچک جثه‌ای که شناسایی نشدند، احتمالاً جریبل بلوچی (*Gerbillus nanus*) می‌باشند. (Khaleghizadeh et al., 2009). همچنین ریمه‌های جمع‌آوری شده از سه نقطه ایران (تخت جمشید، انار و یزد)، نشان داد که از ۱۰۷ طعمه به دست آمده، جوندگان تقریباً ۵۰٪ از کل طعمه‌ها را تشکیل می‌دادند و گونه‌های ول اجتماعی (*Microtus socialis*; ۲۳/۴٪) و موش

(*Mus cf. abboti*; ۱۱/۲٪) مهم‌ترین گونه‌های جوندگان بودند (Obuch, 2011).
بر اساس نتایج به دست آمده در این پژوهش، طعمه غالب جغد گوش دراز در اصفهان جنس هامسترها *Cricetulus* (۳۵/۱۵٪)، در همدان جنس موش‌ها *Mus* (۴۳/۸۰٪) و در کرج ول‌ها *Microtus* (۵۴/۳۷٪) بود (جدول ۱). نتایج به دست آمده از کرج شبیه نتایج ترکیه، فلسطین اشغالی، اروپا و آمریکا بود (Marti, 1976; Seckin and Coskun, 2006; Dziemian et al., 2012; Yosef, 2009; Nistreanu, 2007). نتایج به دست آمده از اصفهان مشابه نتایج منطقه مرکزی اروپا بوده است (Romanowski and Zmihorski, 2008). در زابل اساساً جوندگان بزرگ جثه (بیش از ۱۵۰ گرم) شامل جریبل هندی و موش ورامین، ۷۲/۹ درصد از کل زیست توده در رژیم غذایی جغد گوش دراز را تشکیل می‌دادند. به هر حال ترکیب طعمه‌های صید شده توسط جغد گوش دراز زمستان‌گذران در زابل، مانند طعمه‌هایی است که توسط جغد گوش دراز زمستان‌گذران در بسیاری از مناطق دیگر شکار شده است. بخش عمده طعمه در زابل، جوندگان بزرگ جثه به ویژه جریبل هندی بود (Khaleghizadeh et al., 2009). برخلاف نتایج زابل، طعمه‌های به دست آمده در پژوهش حاضر عمدتاً از جوندگان دارای جثه کوچک‌تر همانند موش خانگی، همستر و ول‌ها *Mus*، *Cricetulus* و *Microtus* بودند (جدول ۱) که همه آنها جزو جوندگان مهم در اراضی کشاورزی محسوب می‌شوند (Ziaie, 2008; Morowati et al., 2010).
پرنده‌ها در ریمه‌های رومانی، فراوانی بسیار کمی را تشکیل می‌دادند. در کل ۱۰ گونه پرنده درون ریمه‌ها شناسایی شد و همه آنها از راسته گنجشک‌سانان بودند. از میان پرنده‌ها، گنجشک درختی (*Passer montanus*) و گنجشک خانگی (*Passer domesticus*) فراوان‌ترین گونه بودند و ۷۰ درصد از پرنده‌ها را شامل می‌شدند (Nistreanu, 2007). بر اساس نتایج پژوهش حاضر، پرنده‌ها در ۴۰/۰٪ از ریمه‌های کرج، در ۲۷/۳٪ از ریمه‌های اصفهان و ۱۴/۴٪ از ریمه‌های

حمایت جغدها در مزارع نمود (Wood and Fee, 2003). ترکیب رژیم غذایی و انتخاب طعمه در میزان جوجه‌آوری جغد گوش دراز نیز موثر است (Korpimaki, 1992). به علت عدم هراس نه چندان زیاد جغد گوش دراز از انسان نصب آشیانه چوبی یا سبد آشیانه‌ای در مزارع (Charter et al., 2009) با هدف افزایش جوجه‌آوری و افزایش تعداد جغدها انجام می‌شود. این آشیانه‌های مصنوعی حداقل در ارتفاع ۴-۵ متری نصب می‌شوند که از دسترس انسان نیز به دور هستند.

در صورت تغذیه مناسب از جمعیت‌های جوندگان آفت و پاسخ مناسب به آشیانه‌های مصنوعی، می‌توان از این گونه در جهت کنترل بیولوژیک جوندگان استفاده کرد و از ورود یا تولید سموم جونده‌کش در کشور کاست که خود می‌تواند به عنوان یکی از گزینه‌های اقتصاد مقاومتی مطرح شود. بنابر این می‌توان امیدوار بود تا در آینده نزدیک راهکارهای عملی مناسب برای جلب آن‌ها برای استفاده در کنترل بیولوژیک و تلفیقی جوندگان در مزارع کشاورزی به دست آید.

بر اساس نتایج به دست آمده، پیشنهادات زیر مطرح می‌شود:

۱- نوسانات ماهیانه فراوانی طعمه‌های مختلف جوندگان در مناطق مورد مطالعه بررسی و همچنین جیره غذایی در زمان جوجه‌آوری نیز بررسی گردد. ۲- اثر نوع، شکل، اندازه و همچنین ارتفاع مناسب برای نصب آشیانه‌های مصنوعی در جلب جغد گوش دراز و تاثیر آن بر افزایش جمعیت جغد گوش دراز بررسی گردد. ۳- بررسی اقتصادی مقایسه‌ای استفاده از روش‌های شیمیایی کنترل جوندگان و استفاده از جغد گوش دراز در کاهش جمعیت جوندگان نیز توصیه می‌گردد.

سپاسگزاری

از موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور برای حمایت‌های مالی و تدارکاتی در اجرای پروژه مصوب ۹۳۱۷۱-۱۶-۱۶-۲ قدردانی می‌گردد.

همدان حضور داشتند. در زابل، تعداد کمی از طعمه‌ها پرندگان بودند (Khaleghizadeh et al., 2009). در تخت جمشید ۴۳/۵ درصد از طعمه‌ها را پرندگان و گنجشک خانگی ۷۸/۴ درصد از طعمه‌های پرندگان را تشکیل می‌داد (Obuch, 2011). در این پژوهش، اندازه‌های ریمه در اصفهان از بقیه مناطق بزرگتر بود (جدول ۲). وزن ریمه‌های اصفهان مشابه ریمه‌های زابل ۲/۵۰ گرم بود (Khaleghizadeh et al., 2009). طول ریمه‌های اصفهان (۳۸/۹ میلی‌متر) حتی از ریمه‌های زابل (۳۷/۵ میلی‌متر) هم بیشتر بود (Khaleghizadeh et al., 2009) اما ریمه‌های کرج و همدان در محدوده ۳۳ میلی‌متر بودند (جدول ۲). در هر صورت قطر ریمه‌های زابل (۲۱/۰ میلی‌متر) از قطر ریمه‌های هر سه منطقه در پژوهش حاضر بیشتر بود (Khaleghizadeh et al., 2009).

با توجه به حضور جمعیت‌های مناسب جوندگان در اکثر زمین‌های کشاورزی، و اینکه جوندگان نقش غالب را در تغذیه جغدهای گوش دراز تشکیل می‌دهند، مناطق مورد نظر (یعنی اصفهان، همدان و کرج) توسط این گونه جغد انتخاب شدند (شکل ۴). نسبت بالای جوندگان، مخصوصاً ول معمولی در رژیم غذایی جغد گوش دراز اهمیت این پرنده را در کنترل جوندگان در زیستگاه‌های باز آشکار می‌سازد (Nistreanu, 2007). بنابر این، جغد گوش دراز در مناطق کشاورزی ایران می‌تواند در کنار سایر روش‌ها مانند استفاده از روش‌های مکانیکی، استفاده از ترکیبات گیاهی و طعمه‌گذاری با سموم کم‌خطر در کنترل جوندگان کوچک جثه مورد استفاده قرار گیرد. استفاده از جغدها در نواحی که طعمه‌گذاری نشده است، بیشتر می‌تواند موجب حفظ جمعیت جغدها شود اما در هر صورت، تلفیق استفاده از جغدها و طعمه‌گذاری محدود می‌تواند در عمل به کاربرد جغدها در کنترل جوندگان بینجامد. همچنین سموم جایگزین مانند جونده‌کش‌های بیولوژیک، عقیم‌کننده‌ها و فرومون‌ها باید بیشتر مورد بررسی قرار گیرند. بر این اساس، در کنترل تلفیقی جوندگان در مزارع کشاورزی می‌توان اقدام به جلب و

References

- CHARTER, M., Y. LESHEM and S. HALEVI, 2009. Use of nest baskets by Long-eared Owls *Asio otus* in Israel, *Sandgrouse*, 31: 36-37.
- DEL HOYO, J., A. ELLIOT and J. SARGATAL, (Eds.), 1999. *Handbook of the Birds of the World*, vol. 5, Barn-owls to Hummingbirds, Lynx Edicions, Barcelona, Spain.
- DZIEMIAN, S., B. PIACIŃSKA and G. PITUCHA, 2012. Winter diet composition of urban long-eared owls (*Asio otus*) in Rzeszów (SE Poland), *Biological Letters*, 49 (2): 107-114.
- ETEMAD, E. 1978. *Mammals of Iran*, Vol. 1, National Society for protection of natural and human environment, Tehran, 288 pp.
- KHALEGHIZADEH, A., M. TOHIDIFAR, S. B. MUSAVI, A. HASHEMI, A. KHANI and M. OMIDI, 2015. Population increase of the Long-eared Owl *Asio otus* (Linnaeus, 1758) in Iran (Aves: Strigidae), *Zoology in the Middle East*, 61(3): 215-219.
- KHALEGHIZADEH, A., T. ARBABI, G. NOORI, M. JAVIDKAR and A. SHAHRIARI, 2009. Diet of wintering Long-eared Owl *Asio otus* in Zabol, southeastern Iran, In: Johnson D. H., Van Nieuwenhuyse D. and Duncan J. R. (Eds.), *Proc. Fourth World Owl Conf. Oct–Nov 2007, Groningen, The Netherlands*. *Ardea*, 97(4): 631-633.
- KORPIMAKI, E. 1992. Diet composition, prey choice, and breeding success of Long-eared Owls: effects of multiannual fluctuations in food abundance, *Canadian Journal of Zoology* 70: 238-273.
- MANSOORI, J. 2008. *A Guide to the Birds of Iran*, Farzaneh Publishing Co., 513 pp. (In Persian).
- MARTI, C. D. 1976. A review of prey selection by the Long-eared Owl, *Condor* 78: 331-336.
- MOROWATI, M., F. NAZARI and V. MALIKOV, 2010. Important rodents in Agriculture, Iranian research Institute of Plant Protection, 136 pp.
- NISTREANU, V. 2007. The importance of the Long-eared Owl (*Asio otus otus* L.) in rodent control, *Bulletin USAMV-CN* 63.
- OBUCH J. and A. KHALEGHIZADEH, 2011. Spatial variation in the diet of the Barn Owl *Tyto alba* in Iran, *Podoces* 6(2): 103–116.
- OBUCH, J. 2011. Diet of Long-eared Owl in the Middle East, Abstract- International Conference on the Survey, Monitoring and Conservation of the Long-eared Owl *Asio otus*, 1-5 November 2011, Kikinda, Serbia.
- OSAEI, A., A. KHALEGHIZADEH and M. E. SEHHATISABET, 2007. Range extension of the Barn Owl *Tyto alba* in Iran, *Podoces* 2 (2): 106–112
- ROMANOWSKI, J. and M. ŽMIHORSKI, 2008. Effect of season, weather and habitat on diet variation of a feeding specialist: a case study of the long-eared owl, *Asio otus* in Central Poland, *Folia Zoologica*, 57(4): 411-419.
- SEÇKIN, S. and Y. COŞKUN, 2006. Small mammals in the diet of the Long-eared Owl, *Asio otus*, from Diyarbakir, Turkey, *Zoology in the Middle East*, 35: 102-103.
- TOHIDIFAR, M., A. KHALEGHIZADEH and S. B. MUSAVI, 2011. Recent status of the Long-eared Owl with first breeding records in Iran, *International Conference on the Survey, Monitoring and Conservation of the Long-eared Owl *Asio otus**, 1-5 November 2011, Kikinda, Serbia.
- WOOD, B. J. and C. G. FEE, 2003. A critical review of the development of rat control in Malaysian agriculture since the 1960s, *Crop Protection*, 22: 445-461.
- YOSEF, R. 2009. Further on the diet of wintering Long-eared Owl *Asio otus* in northern Israel, *Sandgrouse*, 31: 106-108.
- ZIAIE, H. 2008. *The Mammals of Iran*, 2nd edition, Wildlife Club, Tehran, 420 pp. (In Persian).

تأثیر برخی بسترهای غذایی جامد در اسپورزایی جدایه *Streptomyces carpaticus* UTS49

و کنترل نماتد ریشه‌گرهی *Meloidogyne javanica* در گوجه‌فرنگی

نیلوفر محمدی فشارکی، کیوان بهبودی✉ و رامین حیدری

به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشیار و دانشیار؛ گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
(تاریخ دریافت: شهریور ۱۳۹۶؛ تاریخ پذیرش: فروردین ۱۳۹۷)

چکیده

نماتدهای ریشه‌گرهی به عنوان انگل اجباری گیاهان دارای پراکنش وسیع در جهان هستند. اعضای این جنس به بیش از ۳۵۰۰ گونه‌ی مختلف از گیاهان آوندی حمله می‌کنند. گونه‌های *Streptomyces* از جمله باکتری‌های گرم مثبتی هستند که خاصیت نماتدکشی آن‌ها در چندین مورد به اثبات رسیده است. در این تحقیق تأثیر بسترهای غذایی جامد (دانه ارزن و دانه گندم) بر توان اسپوردهی *Streptomyces carpaticus* UTS49، میزان کلونیزاسیون ریزوسفر گیاهچه گوجه‌فرنگی و توانایی کنترل نماتد ریشه‌گرهی *Meloidogyne javanica* بررسی شد. نتایج نشان داد جدایه *S. carpaticus* UTS49 قادر به کنترل نماتد ریشه‌گرهی در شرایط آزمایشگاه بود و بررسی برای امکان انبوه‌سازی آن با مواد ارزان قیمت انجام شد. در این بررسی بهترین بستر غذایی *Streptomyces*، دانه گندم تعیین شد که این بستر علاوه بر افزایش قدرت کنترلی آنتاگونیست علیه نماتد (۷۱٪ مرگ‌ومیر لارو سن دوم و ۲۲/۳۳٪ کاهش تفریح تخم)، باعث افزایش رشد گیاه و قدرت کلونیزاسیون ریشه گوجه‌فرنگی توسط باکتری نیز شد. همچنین دانه گندم-استریتومایسس بر رشد هوایی و ریشه‌دهی گیاه گوجه‌فرنگی اثر مثبت داشت. **واژه‌های کلیدی:** اسپوردهی، انبوه‌سازی، آنتاگونیست، دانه گندم، کلونیزاسیون.

Effect of some solid nutrient state substrates on sporulation of *Streptomyces carpaticus* UTS49 and control of *Meloidogyne javanica* in tomatoes

N. MOHAMMADI FESHARAKI, K. BEHBOUDI✉ and R. HEYDARI

M.Sc. Student of Plant Pathology, Associate professor & Associate professor, Respectively;
Department of Plant Pathology, College of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran

Abstract

Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) are obligate plant parasites distributed worldwide. The genus almost parasitize about 3500 species of different vascular plants. The gram-positive bacteria of the genus *Streptomyces* have nematicide trait. The effects of millet and grain substrates on the sporulation of *Streptomyces carpaticus* UTS49, antagonistic ability on *Meloidogyne javanica*, the growth of tomato seeding and colonization of the rhizosphere were studied. As a result, the antagonists were able to control of root-knot nematode in vitro. Mass production of antagonists conducted with the cheap materials. The result indicated that the best substrate for *S. carpaticus* was wheat grain. This substrate showed high biocontrol ability against nematode with 71% mortality of the second stage juveniles (J2), reduction of 22/33% of eggs hatching, strong ability of colonization and growth-promotion on tomato. Wheat grain-*Streptomyces* had a positive effect on shoots and root growth of tomato.

Key words: Antagonists, colonization, mass production, sporulation, wheat grain.

مقدمه

نماتدهای ریشه‌گرهی *Meloidogyne* spp. از مهم‌ترین عوامل خسارت‌زا به گوجه‌فرنگی می‌باشد. این عامل بیماری‌زا، سالانه به تنهایی موجب خسارت بیش از ۱۰۰ میلیارد دلار به بخش کشاورزی می‌شود (Huang et al., 2004). کنترل نماتد ریشه‌گرهی به دلیل دامنه وسیع میزبانی، دوره کوتاه چرخه زندگی، تولیدمثل زیاد و نیز انگل داخلی بودن آن دشوار می‌باشد (Lopez-Illorca et al., 2008). علیرغم تنوع روش‌های کنترل این نماتدها، به دلیل محدودیت‌هایی که هر یک از روش‌های مذکور دارند، هیچ یک روش قاطع و مؤثری برای مبارزه محسوب نمی‌شوند. یکی از روش‌هایی که در سال‌های اخیر همانند سایر عوامل بیماری‌زا برای کنترل مورد توجه قرار گرفته است استفاده از عوامل مهار زیستی می‌باشد. میکروارگانسیم‌های متنوعی در خاک به نماتد ریشه‌گرهی حمله می‌کنند و موجب کاهش جمعیت آنها می‌شوند که قارچ‌ها، باکتری‌ها و نماتدها مهم‌ترین آنها محسوب می‌شوند.

کاربرد میکروارگانسیم‌های مفید خاک به‌ویژه باکتری‌ها، یکی از گزینه‌های مطرح در مدیریت صحیح این عوامل هستند. اکتینوباکترها از جمله باکتری‌های گرم مثبتی هستند که خاصیت نماتدکشی آن‌ها در چندین مورد به اثبات رسیده است (Dimkpa et al., 2008). این گروه حدود ۴۰ درصد از جمعیت باکتریایی را در محیط‌های خاکی تشکیل می‌دهند (Takatsu et al., 2003). *Streptomyces* spp. گروهی از اکتینوباکترها هستند که علاوه بر اینکه جمعیت بالایی در خاک را تشکیل می‌دهند، قادر به تحمل شرایط اسیدی نیز می‌باشند. یکی از مکانیسم‌های تاثیر باکتری‌های *Streptomyces* spp. تولید آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد. از جمله این موارد می‌توان به آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین، تتراسایکلین، سیکلوهگزامید و سایر متابولیت‌های ثانویه اشاره کرد (Malkawi et al., 1999). برخی از استرپتومایسس‌ها به دلیل تولید متابولیت‌های کشنده، جهت کنترل نماتدهای انگل گیاهی استفاده می‌شوند (Schaad et al., 2001). در شرایط گلخانه فعالیت بالقوه نماتدکشی

S. hydrogenans بررسی شده است و نتایج آن نشان داد که *S. hydrogenans* strain DH16 و متابولیت‌های آن را می‌توان به عنوان نماتدکشی ایمن استفاده نمود، علاوه بر این، برای افزایش رشد گیاه نیز مورد استفاده قرار داد (Kaur and Manhas, 2014). کیم و همکاران (Kim et al., 2011) استرین *Streptomyces sampsonii* KK1024 را به عنوان یکی از عوامل موفق در کنترل زیستی معرفی کردند. تأثیر جدایه‌ها بر وزن ریشه نیز قابل توجه بوده است. تولید ریشه سبب رشد اندام‌های هوایی و در نتیجه افزایش مقاومت گیاه در برابر حمله عوامل بیماری‌زا از جمله نماتدها شده است.

توانایی میکروارگانسیم‌های مختلف برای تولید انواع ترکیبات آنتاگونیستی و تنظیم‌کننده‌های رشدی گیاه به افزایش کارایی بیوکنترلی آن‌ها وابسته است. فعالیت آنتاگونیست‌ها به عنوان عامل بیوکنترل، تحت تأثیر فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی محیط زیست قرار می‌گیرد. تحقیقات نشان داده است محیط کشت یکی از فاکتورهای مؤثر بر میزان رشد، تولید ترکیبات آنتاگونیستی، ترکیبات افزایش‌دهنده‌ی رشد گیاه و کارایی قدرت بیوکنترلی عامل کنترل بیولوژیک است. هزینه‌های بالای اقتصادی یکی از محدودیت‌های اساسی تولید است که برای غلبه بر این محدودیت و افزایش کمیت و کیفیت بیوکنترلی عامل بیولوژیک، می‌توان از محیط‌های کشت مناسب و ارزان قیمت به عنوان یکی از فاکتورهای مؤثر در تولید انبوه استفاده کرد (Verma et al., 2007). به‌طورکلی، فرمتاسیون جامد و فرمتاسیون مایع دو روش عمده‌ی تولید مایه آنتاگونیست‌ها هستند. در فرمتاسیون جامد، آنتاگونیست روی انواع دانه‌های غلات، حبوبات و ضایعات جامد کشاورزی رشد می‌کند. محصول نهایی این سیستم بیشتر به صورت مستقیم در خاک خزانه یا مزرعه‌ی اصلی برای کاهش و جلوگیری از رشد مایه بیمارگرهای خاکزاد به آن اضافه می‌گردد (Ramanujam et al., 2010).

هدف از این تحقیق بررسی اثر کنترل‌کنندگی جدایه *Streptomyces carpaticus* UTS49 روی نماتد ریشه‌گرهی

Barker, 1973). جدا سازی لارو سن دوم، به روش Barker (1985) انجام شد. لاروها روزانه پس از تفریح تخم به وسیله الک ۵۰۰ مش جدا سازی شد.

برای انجام آزمایش به چاهک‌های ظروف کشت بافت ۲۴ خانه‌ای، پنج میلی‌لیتر سوسپانسیون حاوی ۱۰۰ عدد لارو نماتد اضافه شده و سپس پنج میلی‌لیتر سوسپانسیون اسپور آنتاگونیست به غلظت $4/5 \times 10^6$ اضافه شد. برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد. برای نمونه شاهد پنج میلی‌لیتر آب مقطر سترون اضافه شد. آزمایش در دمای ۲۵ درجه سلسیوس انجام شد. مرگ و میر لارو سن دوم پس از ۷۲ ساعت شمارش شد.

بررسی اثر جدایه باکتری بر میزان تفریح تخم نماتد با سه تکرار برای هر تیمار پس از ۷۲ ساعت به روش Meyer et al. (2004) و در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شد.

تهیه محیط جامد و مایه‌زنی باکتری: محیط کشت جامد حاوی ۱۰۰ گرم دانه‌ی گندم و ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر و محیط کشت جامد حاوی ۱۰۰ گرم بذر ارزن و ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر تهیه شد.

پس از تهیه محیط کشت، ارلن‌های حاوی محیط کشت در دو روز متوالی به فاصله ۲۴ ساعت و به مدت ۳۰ دقیقه در اتوکلاو سترون شدند.

برای تهیه محیط از کشت باکتری سوسپانسیون $4/5 \times 10^6$ به میزان ده میلی‌لیتر به هر یک از ارلن‌های حاوی محیط‌های کشت اضافه و سپس ارلن به مدت ده روز در دمای ۲۸ درجه سلسیوس و ۱۲ ساعت روشنایی قرار گرفت (Zhang et al., 2014).

تعیین جمعیت اسپور بسترهای جامد: یک گرم از محیط را داخل فالكون سترون ریخته و سپس ده میلی‌لیتر آب مقطر سترون به هر فالكون اضافه کرده و به مدت سه دقیقه روی ورتکس با دور بالا قرار داده سپس اسپورهای حاوی محیط کشت از پارچه ملامل عبور داده شد. اسپور هر محیط به وسیله لام هماسیتومتر با سه بار تکرار شمارش شد (Sargin et al.,

Meloidogyne javanica و امکان تولید مقرون به صرفه با حداکثر میزان اسپورزایی و حداکثر کارایی کنترل بیولوژیکی روی نماتد ریشه گرهی است.

روش بررسی

تهیه و تکثیر نماتد: نماتد ریشه گرهی از مزارع کاشان تهیه شد. با استفاده از مشخصات الگوی انتهای بدن ماده (Pereneal pattern) شناسایی شد. گونه مورد آزمایش *M. javanica* تشخیص داده شد (Sasser and Carter, 1985). پس از تهیه نمونه گیاهی آلوده به نماتد، با استفاده از روش توده تخم منفرد و تکثیر متوالی آن روی گیاهچه‌های رقم حساس ارلی اوربانا گوجه فرنگی انجام شد. گیاهچه‌ها به مدت ۴۵ الی ۶۰ روز در دمای ۲۶-۲۸ درجه سلسیوس و رطوبت ۶۰-۶۵ درصد گلخانه نگهداری شدند. برای انجام آزمایش‌ها، استخراج تخم و لارو سن دوم از روش هوسی و بارکر استفاده شد (Hussey and Barker, 1973).

تهیه و تکثیر باکتری: جدایه باکتری *Streptomyces carpaticus* UTS49 از کلکسیون آزمایشگاه کنترل بیولوژیک بیماری‌های گیاهی دانشگاه تهران تهیه شد این جدایه توسط عینی از ریشه‌های خیار مزارع کرج جداسازی شده بود و توانست در گیاه خیار علیه *Sclerotinia sclerotiorum* عملکرد بیوکترلی مؤثری نشان دهد (Eini, 2013). به منظور کشت باکتری از محیط کشت SCA استفاده گردید و ظرف پتری‌دیش داخل انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۲۰ ساعت قرار داده شد (Kaura et al., 2016).

اثر جدایه باکتری روی مرگ‌ومیر لارو سن دوم و تفریح تخم نماتد *Meloidogyne javanica*: برای جدا سازی تخم، ریشه آلوده به نماتد به قطعات دو الی سه سانتی‌متری خرد شده و سپس در ۲۰ میلی‌لیتر محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد قرار داده شده و به مدت یک الی دو دقیقه به شدت تکان داده شد. پس از آن روی الک ۵۰۰ مش ریخته شد و با آب مقطر سترون شستشو داده شد (Hussey and

(2013).

(2001) استفاده شد.

تعیین زنده‌مانی نگهداری اسپورها: پس از تهیه محیط کشت‌ها در ارلن، محتویات ارلن در داخل کاغذ صافی سترون ریخته و سپس هر کاغذ صافی استریل داخل فویل آلومینیومی سترون قرار داده و به مدت دو ساعت در دمای ۵۰ درجه سلسیوس در آن قرار داده، پس از خشک شدن محیط‌ها به وسیله آسیاب محیط‌های حاوی اسپور پودر شده، سپس هر محیط در دمای چهار درجه سلسیوس قرار داده شد. پس از یک، سه و شش ماه زنده‌مانی محیط‌ها بررسی شد.

یک گرم پودر به فالکون‌های سترون منتقل شده به هر فالکون نه میلی‌لیتر آب مقطر سترون اضافه شده و به مدت سه دقیقه با دور بالا ورنکس شده و از هر کدام سریال رقت گرفته و در محیط SCA کشت شده و زنده‌مانی هر محیط به وسیله کلنی شمار محاسبه شد (Witkowska et al., 2016).

اثر محیط کشت مختلف روی مرگ و میر لارو سن

دوم و تفریح تخم نماتد ریشه‌گرهی: در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتر مانند روش‌های قبل به میزان پنج گرم محیط کشت‌های مختلف تهیه شد. پس از رشد آنتاگونیست‌ها، ده برابر وزن محیط‌ها (۵۰ میلی‌لیتر)، به هر محیط آب مقطر سترون اضافه شد سپس ارلن‌ها با دور ۱۸۰ دور در دقیقه به مدت پنج دقیقه تکان داده و پس از آن محلول حاوی سوسپانسیون اسپور حاوی محیط کشت از پارچه ملامل عبور داده شده تا تنها سوسپانسیون اسپور باقی بماند.

به منظور بررسی اثر محیط کشت‌های مختلف بر میزان مرگ‌ومیر لارو سن دوم و تفریح تخم نماتد، از روش Meyer et al. (2004) استفاده شد و درصد مرگ‌ومیر لارو سن دوم و در صد تفریح تخم نماتد پس از ۷۲ ساعت محاسبه شد. برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شد.

بررسی میزان توانایی جدایه‌های باکتری در کنترل نماتد

ریشه گرهی در گلخانه: برای بررسی میزان تأثیر جدایه‌ی باکتری مورد نظر در کنترل این نماتد از روش Siddiqui et al.

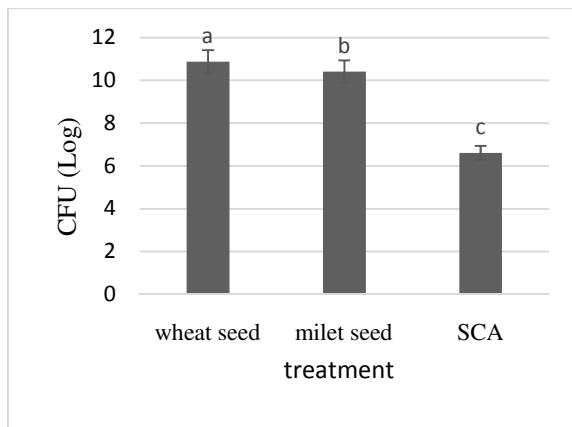
ابتدا ده گرم بسترهای غذایی همراه با اسپور آنتاگونیست به غلظت $4/5 \times 10^6$ با خاک لومی-شنی سترون مخلوط و به گلدان یک کیلویی اضافه و سپس یک عدد نشاء گوجه‌فرنگی در مرحله‌ی چهار برگی به هر گلدان منتقل شد. پس از گذشت یک هفته از تاریخ مایه‌زنی بوته‌ها، در اطراف طوقه‌ی هر بوته سه سوراخ به عمق پنج سانتی‌متر ایجاد و به هر گلدان ۲۰۰۰ عدد لارو سن دوم اضافه شد. تیمارها در دمای ۲۶-۲۸ درجه سلسیوس و و رطوبت ۶۰-۶۵ درصد نگه داشته شدند.

۴۵ روز بعد از مایه زنی نماتد، تمام گیاهان از ریشه بطور کامل خارج و ریشه‌ها توسط جریان آب با دقت شسته شد، شاخه‌ها از ریشه‌ها جدا شد، وزن تر ریشه و ساقه و طول آنها اندازه‌گیری شد. قبل از خشک کردن ریشه‌ها تعداد گال‌های تولید شده بر روی تمام سیستم ریشه‌ای شمارش شد.

به منظور تعیین تعداد لارو در خاک، ۲۰۰ گرم خاک هر گلدان جدا شده و لاروهای سن دوم به روش Barker (1985) جداسازی و شمارش شدند. تعداد تخم ریشه براساس روش Hussey and Barker (1973) شمارش شد. محاسبه فاکتور تولید مثل بر اساس تقسیم جمعیت نهایی به جمعیت اولیه تعیین شد. همچنین شاخص گال به روش Hussey and Janssen (2002) تعیین شد. هر تیمار دارای پنج تکرار و آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شد.

بررسی میزان کلونیزاسیون ریزوسفر گوجه فرنگی

توسط جدایه‌ی باکتری: پس از گذشت ۴۵ روز از مایه زنی گیاه توسط آنتاگونیست‌ها، به منظور بررسی میزان کلونیزه شدن ریشه توسط آنتاگونیست‌ها، خاک شش ناحیه اطراف ریشه (دو سانتی‌متری ریشه) گوجه‌فرنگی برداشته با هم مخلوط کرده و سپس یک گرم از خاک مخلوط شده داخل فالکون ریخته و با نه میلی‌لیتر آب مقطر سترون مخلوط و به مدت سه دقیقه بادور بالا روی ورتکس قرار داده شد. سپس از سوسپانسیون حاصله سریال رقت 10^{-3} — 10^{-8} تهیه شده و روی محیط آب-آگار کشت داده شده و در دمای ۲۸ درجه



شکل ۱- اثر بسترهای جامد دانه گندم و ارزن بر میزان تولید اسپور در سطح ۱٪

Fig. 1. The effect of millet and grain solid state substrates on the production of spores at 1%

سوآرز و همکاران با هدف تولید اسپوردهی بیش تر، برنج سترون را با جدایه *Streptomyces griseus*، *S. purpurascens* و N0035 و *S. thermotolerans* مایه زنی کردند. نتایج نشان داد جمعیت اسپور باکتری حدود $1.4 \times 10^9 - 1.47 \times 10^9$ در هر گرم برنج است. بنابراین برنج سترون یک بستر غذایی مناسب برای تولید انبوه استرپتومایسس با هزینه پایین بود (Soares et al., 2007).

ماهیت پیچیده دانه و سبوس گندم در ترکیب مواد مغذی منحصر به فرد آن است. دانه گندم حاوی نشاسته بالا یعنی ۷۵/۶ درصد در مقایسه با دیگر بقایای گیاهی و صنعتی از قبیل سبوس برنج ۵۵/۸٪، را می توان برای تولید آنزیم استفاده کرد (Ellaiah et al., 2002). در این تحقیق نیز به منظور تولید انبوه استرپتومایسس با هزینه پایین، مایه زنی استرپتومایسس روی بسترهای جامد مختلف انجام شد و نتایج نشان داد بهترین بستر برای تولید اسپور استرپتومایسس، دانه گندم و دانه ارزن ($8/3 \times 10^{10}$ و $2/7 \times 10^{10}$ در یک گرم محیط کشت) بوده است (شکل ۱).

تعیین زنده‌مانی و نگهداری اسپورها: زنده‌مانی اسپور *Streptomyces carpaticus* UTS49 پس از یک ماه تغییر قابل توجهی نداشت اما به مرور زمان جمعیت اسپور کاهش یافته

سلسیوس به مدت ۲۴-۷۲ ساعت قرار داده و پس از رشد کلنی‌ها میزان CFU هر آنتاگونیست با دستگاه کلونی‌کانتر بررسی شد.

به منظور بررسی میزان جمعیت آنتاگونیست‌ها در خاک، پس از خروج کامل ریشه‌های گوجه‌فرنگی از هر گلدان، خاک گلدان‌ها به خوبی با هم مخلوط شده و از هر گلدان یک گرم (با سه تکرار) خاک برداشته و مانند روش فوق CFU هر آنتاگونیست بررسی شد (Papavizas and Lumsden, 1982).

آنالیزهای آماری: تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار Spss (16.0) انجام شد. میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن مقایسه شد.

نتیجه و بحث

اثر اسپور *Streptomyces carpaticus* UTS49 در مرگ‌ومیر لارو سن دوم و تفریح تخم نماتد *Meloidogyne javanica*: بررسی نتایج پس از ۷۲ ساعت نشان داد جدایه *Streptomyces carpaticus* قادر به کاهش جمعیت لارو سن دوم نماتد ریشه‌گرهی به میزان ۷۰/۳۳٪ درصد و کاهش تفریح تخم نماتد به میزان ۲۳٪ درصد شد (جدول ۱).

در پژوهشی که توسط Zahed (2016) انجام شد، کارایی *Streptomyces carpaticus* UTS49 علیه قارچ عامل بیماری *Fusarium oxysporum* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد این باکتری به میزان ۹۱ درصد از جوانه‌زنی اسپور قارچ جلوگیری کرد.

تعیین جمعیت اسپور در بسترهای جامد: نتایج حاصله پس از ده روز نشان داد بسترهای غذایی بر تولید اسپور و افزایش جمعیت باکتری اثر داشته است. دانه گندم و دانه ارزن بدون هیچ نیازی به اضافه کردن مواد غذایی بستری مناسب برای رشد باکتری ست. نتایج نشان داد دانه گندم و دانه ارزن منجر به افزایش اسپور باکتری (به ترتیب $8/3 \times 10^{10}$ و $2/7 \times 10^{10}$ در یک گرم محیط کشت) نسبت تیمار شاهد (SCA) $5/5 \times 10^6$ شدند (شکل ۱).

تخم و مرگومیر لارو) شدند. جدایه *Streptomyces avermitilis* Manp سبب کاهش تفریح تخم به میزان ۱۵/۳۳ درصد و افزایش مرگ و میر لارو به میزان ۶۸/۵۸ درصد شده است (Jayakumar, 2009).

بررسی میزان توانایی جدایه‌ی باکتری در کنترل نماتد

ریشه گرهی در گلخانه: نتایج آزمایش گلخانه‌ای نشان داد کاربرد بسترهای غذایی مختلف باعث کاهش خسارت نماتد ریشه‌گرهی روی گوجه‌فرنگی شده است. بررسی‌ها نشان داده تیمار دانه گندم همراه با اسپور باکتری در مقایسه با تیمارهای دانه ارزن همراه با اسپور باکتری و SCA اثر بهتری بر کاهش تعداد تخم نماتد و شاخص گال و تعداد گال روی ریشه گیاه نسبت به تیمار شاهد داشته است. شاخص‌های رشدی گیاه (طول و وزن گیاه) در تیمار دانه گندم همراه با اسپور باکتری افزایش نشان داد (جدول ۳).

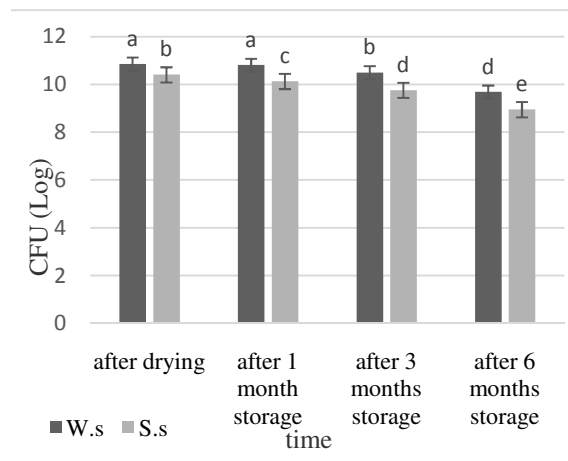
در پژوهشی Kaura *et al.* (2016) فعالیت بالقوه نماتدکشی *S. hydrogenans* در شرایط گلخانه را بررسی کردند. نتایج بررسی نشان داد *S. hydrogenans* strain DH16 و متابولیت‌های آن می‌تواند به عنوان نماتدکشی ایمن استفاده شود و علاوه بر این، این جدایه باعث افزایش رشد گیاه نیز شده است.

همچنین در بررسی Kim *et al.* (2011) استرین KK1024 *Streptomyces sampsonii* به عنوان یکی از عوامل موفق در کنترل زیستی معرفی شد. تأثیر جدایه‌ها بر وزن ریشه نیز قابل توجه بوده است تولید ریشه سبب رشد اندام‌های هوایی و در نتیجه افزایش مقاومت گیاه در برابر حمله عوامل بیماری‌زا از جمله نماتدها می‌شود.

کلونیزاسیون منطقه ریزوسفر توسط جدایه باکتری:

نتایج این تحقیق نشان داد که زمانی که استریتومایسس روی بسترهای جامد کشت داده شد نسبت به حالتی که روی SCA کشت داده شده قدرت کلونیزه کنندگی بالاتری داشته است. بهترین کلونیزه کننده منطقه ریشه توسط تیمار دانه گندم همراه با اسپور باکتری بود (جدول ۴).

است. در آزمایشی که روی زنده‌مانی *Streptomyces carpaticus* UTS49 انجام شد، بستر دانه گندم-استریتومایسس توانایی بالاتری در نگهداری اسپور باکتری پس از شش ماه نسبت به دانه ارزن دارا بود (شکل ۲).



شکل ۲- بررسی اثر بسترهای جامد دانه گندم و ارزن بر زنده‌مانی

نگهداری اسپور *Streptomyces carpaticus* UTS49 در سطح ۵٪

Fig. 2. The effect of millet and grain solid substrates on viability and spores maintenance of *Streptomyces carpaticus* UTS 49 at 5%.

اثر بسترهای غذایی مختلف روی مرگومیر لارو سن

دوم و تفریح تخم نماتد ریشه‌گرهی: این بررسی نشان داد مایه زنی جدایه *Streptomyces carpaticus* UTS49 روی بسترهای جامد بر خاصیت نماتدکشی آن اثر مثبت داشته است. دانه گندم و دانه ارزن بستری مناسب برای افزایش خاصیت نماتدکشی این باکتری بودند (جدول ۲).

در پژوهشی پتانسیل نماتدکشی عصاره باکتری *Streptomyces hydrogenans* در برابر نماتد *Meloidogyne incognita* به طور قابل توجهی باعث کاهش تفریح تخم (تقریباً ۱۰۰ درصد) و مرگومیر لارو سن دوم بیش از ۹۵٪ بعد از ۹۶ ساعت شد (Kaura *et al.*, 2016).

همچنین Ruanpanun *et al.* (2011) نشان دادند که جدایه *Streptomyces* sp. CMU-MH021 سبب کاهش تفریح تخم به میزان ۳۳/۱ درصد و افزایش مرگومیر به میزان ۸۲ درصد در مقایسه با شاهد (به ترتیب با میزان ۷۹/۶ و ۳/۶ درصد تفریح

جدول ۱- اثر سوسپانسیون اسپور *S. carpaticus* UTS49 بر کنترل نماتد *Meloidogyne javanica* در شرایط آزمایشگاه

Table 1. The effect of spore suspension of *S. carpaticus* UTS49 on *Meloidogyne javanica* in vitro

Treatment	Egg hatch (%)	J2 mortality (%)
<i>Streptomyces carpaticus</i> UTS49	23 b	70.33 a
control	83 a	11.6 b

جدول ۲- اثر بسترهای کشت دانه گندم و ارزن حاوی جدایه *Streptomyces carpaticus* UTS49 بر نماتد *Meloidogyne javanica* در شرایط آزمایشگاه

Table 2. The effect of millet and grain solid substrate containing *Streptomyces carpaticus* UTS49 on *Meloidogyne javanica* in vitro

Treatment	Egg hatch (%)	J2 mortality (%)
Wheat seed	11.3 d	78 b
Millet seed	16.6 b	84 a
SCA	23 b	71.3 b
Control	83 a	11.6 c

جدول ۳- اثر بسترهای کشت دانه گندم و ارزن حاوی جدایه *Streptomyces carpaticus* UTS49 بر نماتد *Meloidogyne javanica* در شرایط گلخانه

Table 3. The effect of millet and grain solid substrate containing *Streptomyces carpaticus* UTS49 on *Meloidogyne javanica* in vivo

Treatment	second stage juvenile/(kg soil)	Reproduction factor	The number of egg	The number of gall	Gall Index	Root fresh weight (g)	Fresh weight of aerial parts (g)	root length (cm)	shoot length (cm)
Wheat seed + <i>S. carpaticus</i> UTS49	5114 e	2.9 e	650 e	5.8 e	0.8 e	1.5 a	6.7 a	15 a	28.8 a
Millet seed + <i>S. carpaticus</i> UTS49	5900 d	3.3 d	730 d	6.6 d	1 d	1.5 b	6.5 b	14.8 a	28.1 a
SCA + <i>S. carpaticus</i> UTS49	7360 c	4.3 c	1240 c	10.4 c	1.4 c	1.2 c	6.2 c	14.2 b	27.5 b
Spore of <i>S. carpaticus</i> UTS49	8000 b	4.7 b	1500 b	11.5 b	1.8 b	1.1 d	5.8 d	13.9 b	26.5 b
control	13912 a	8.5 a	3114 a	29.4 a	2.6 a	0.7 e	4.6 e	8.2 c	19.1 c

جدول ۴- اثر بسترهای کشت دانه گندم و ارزن حاوی جدایه *Streptomyces carpaticus* UTS49 بر میزان کلونیزاسیون منطقه ریشه گوجه فرنگی

Table 4. The effect of millet and wheat grain solid substrate containing *Streptomyces carpaticus* UTS49 on colonization of tomato rhizosphere

Treatment	Root colonization	CFU
Wheat seed + <i>S. carpaticus</i> UTS49	105 ax 2.5	108 ax 8.9
Millet seed + <i>S. carpaticus</i> UTS49	105 bx 1.2	108 abx 6.5
SCA + <i>S. carpaticus</i> UTS49	104 cx 5.5	107cx 1.2
spore of <i>S. carpaticus</i> UTS49	105 cx 4.8	107 cx 0.9
Control	d 0	d 0

Streptomyces spp. با تثبیت نیتروژن، حلالیت مواد معدنی و تولید سیدروفور یا هورمون‌های گیاهی سبب افزایش رشد گیاه می‌شوند (Dimkpa et al., 2008).

کلونیزه شدن سطح ریشه‌ی گیاه توسط آنتاگونیست‌ها می‌تواند با ایجاد مقاومت القایی سیستمیک منجر به کاهش حمله‌ی مستقیم عوامل بیماری‌زا شود (Kloepper et al., 1992).

References

- BARKER, K. R. 1985. Nematode extraction and bioassays, In: Barker KR, Carter CC and JN Sasser (eds), An advance treatise on Meloidogyne, Vol. ii, Methodology. North Carolina State University Graphics, pp. 19–35.
- DIMKPA, C., A. SVATOŠ, D. MERTEN, G. BÜCHEL and E. KOTHE, 2008. Hydroxamate siderophores produced by *Streptomyces acidiscabies* E13 bind nickel and promote growth in cowpea (*Vigna munguiculata* L.) under nickel stress. Canadian Journal of Microbiology, 54 (4): 163-172.
- EINI, S. 2013. Assesment of rhizosphere *Streptomyces* of cucumber for biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum* [Dissertation].Karaj: Tehran Univ,
- ELLAIAH, P., K. ADINARAYANA, Y. BHAVANI, P. PADMAJA and B. SRINIVASULU, 2002. Optimization of process parameters for glucoamylase production under solid state fermentation by a newly isolated *Aspergillus* species. Process Biochemistry, 38 (4): 615–620.
- HUANG, X., N. ZHAO and K. ZHANG, 2004. Extracellular enzymes serving as virulence factors in nematophagous fungi involved in infection of the host. Research in Microbiology, 155 (10): 811-816.
- HUSSEY, R. S. and K. R. BARKER, 1973. A comparison of method of collecting inoculation for *Meloidogyne* spp. including a new technique. Plant Disease, 57: 1025-1028.
- HUSSEY, R. S. and G. J. W. JANSSEN, 2002. Root-Knot Nematodes: *Meloidogyne* species, In: Starr, J. L, Cook,R and Bridge,J (eds), Plant resistance to parasitic nematodes. CAB International, Wallingford, Oxon, UK, pp. 43-70.
- JAYAKUMAR, J. 2009. *Streptomyces avermitilis* as a biopesticide for the management of root knot nematode, *Meloidogyne incognita* in tomato. Karnataka Journal of Agricultural Science, 22:564-566.
- KAUR, T. and R. K. MANHAS, 2014. Antifungal, insecticidal, and plant growth promoting potential of *Streptomyces hydrogenans* DH16. Journal of Basic Microbiology, 54 (11): 1175–1185.
- KAURA, T., S. JASROTIAB, P. OHRIB, M. KUMARI, 2016. Revaluation of in vitro and in vivo nematocidal potential of amultifunctional streptomycete, *Streptomyces hydrogenans* strain DH16against *Meloidogyne incognita*. Microbiological Research, 192: 247–252.
- KIM, S., S. KANG, J. KIM, Y. LEE and S. HONG, 2011. Biological control of root-kont nematode by *Streptomyces sampsonii* KK1024. Korean Journal of Soil Science Fertility, 44 (6): 1150-1157.
- KLOEPPER, J., S. TUZUN and J. KUC, 1992. Proposed definitions related to induced disease resistance. Journal of Biocontrol Science and Technology, 2 (4): 349-351.
- LOPEZ-ILORCAL, V., J. G. MACIA-VICENTE and H. B. JANSSON, 2008. Mode of action and interaction of nematophagous fungi. In: Ciancio A. and Mukerji K. G. (eds) Integrated Management and Biocontrol of Vegetable and Grain Crops Nematodes, pp. 51-76.
- MALKAWI, H. I., I. SAADOUN, F. A. MOUMANI and M. M. MEQDAM, 1999. Use of rapid PCR fingerprinting to detect genetic diversity of soil *Streptomyces* isolates. New Microbiology, 22 (1): 53-58.
- MEYER, S. L. F., R. N. HUETTEL, X. Z. LIU, R. A. HUMBER, J. JUBA and J. K. NITAO, 2004. Activity of fungal culture filtrates against soybean cyst nematode and root-knot nematode egg hatch and juvenile motility. Nematology, 6: 23–32.
- PAPAVIZAS, G. C. and R. D. LUMSDEN, 1982. Improved medium for isolation of *Trichoderma* spp. from soil. Plant Disease, 66: 1019–1020.

- RAMANUJAM, B., R. D. PRASAD, S. SRIRAM and R. RANGESWARAN, 2010. Mass production, formulation, quality control and delivery of *Trichoderma* for plant disease management. *Journal of Plant Protection Sciences*, 2 (2): 1-8.
- RUANPANUN, P., N. TANGCHITSOMKID, K. D. HYDE and S. LUMYONG, 2011. Actinomycetes and fungi isolated from plant-parasitic nematode infested soils: screening of the effective biocontrol potential, indole-3-acetic acid and siderophore production. *World Journal of Microbiology Biotechnology*, 27: 1373-1380.
- SASSER, J. N. and C. C. CARTER, 1985. An advance treatise on *Meloidogyne*. North Carolina State University Graphics, pp. 422
- SARGIN, S., Y. GEZGIN, R. ELTEM and F. VARDAR, 2013. Micropropagule production from *Trichoderma harzianum* EGE-K38 using solid-state fermentation and a comparative study for drying methods. *Turkish Journal of Biology*, 37: 139-146.
- SCHAAD, N. W., J. B. JONES and W. CHUN, 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3rd Ed. APS Press.
- SIDDIQUI, I. A., M. AMER ZAREEN, M. JAVAD ZAKI, and S. S. SHAUKAT, 2001. Use of *Trichoderma* species in the control of *Meloidogyne javanica*, Root-rot nematode in the Okra and Mungbean. *Pakistan journal of Biological sciences*, 4(7): 846-848.
- SOARES, A. C. F., C. S. SOUSA, M. S. GARRIDO and J. O. PEREZ, 2007. Production of *Streptomyces* inoculum in sterilized rice. *Scientia Agricola*, 64: 641-644.
- TAKATSU, T., N. HORIUCHI, M. ISHIKAWA, K. WANIBUCHI, T. MORIGUCHI and S. TAKAHASHI, 2003. A novel nematocide from *Streptomyces lavendulae* SANK 64297. *Journal of Antibiotics*, 56: 306-309.
- VERMA, M., K. B. SATINDER, R. D. TYAGI, R. Y. SURAMPALLI and J. R. VALERÓ, 2007. Starch industry wastewater as substrate for antagonist, *Trichoderma viride* production. *Bioresource Technology*, 98: 2154-2162.
- WITKOWSKA, D., A. KANCELISTA, A. WILCZAK, R. STEMPNIEWICZ, M. PASŁAWSKA, M. PIEGZA W. ŁABA and M. SZCZECHE, 2016. Survivability and storage stability of *Trichoderma atroviride* TRS40 preserved by fluidised bed drying on various agriculture by-products. *Biocontrol Science and Technology*, 12(26): 1591-1604.
- ZAHED, M. J. 2016. Assesment of rhizosphere *Streptomyces* of tomato for biocontrol of *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* [Dissertation]. Karaj: Tehran Univ.
- ZHANG, S. W., Y. T. GAN and B. L. XU, 2014. Efficacy of *Trichoderma longibrachiatum* in the control of *Heterodera avenae*. *Biocontrol*, 59: 319-331.

ردیابی و بررسی روابط تبارزایی جدایه‌های ایرانی ویروس موزائیک انجیر بر اساس ژن کد کننده نوکلئوکپسید پروتئین

مرتضی شاه میرزائی^۱، فرشاد رخشنده‌رو^۱، محمدرضا صفرنژاد^۲✉، حمیدرضا زمانی‌زاده^۱ و توفیک البیانو^۳

۱- به ترتیب دانشجوی دکتری، استادیار و استاد، گروه بیماری شناسی گیاهی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران،

ایران؛ ۲- دانشیار، بخش تحقیقات ویروس‌های گیاهی، موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و

ترویج کشاورزی، تهران، ایران؛ ۳- پژوهشگر، مرکز بین المللی مطالعات پیشرفته زراعی حوزه مدیترانه، باری، ایتالیا

(تاریخ دریافت: آذر ۱۳۹۶؛ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۶)

چکیده

ویروس موزائیک انجیر (*Fig mosaic emaravirus* (FMV) یکی از مهم‌ترین عوامل ایجاد کننده بیماری موزائیک انجیر می باشد. این تحقیق به منظور شناسایی و ردیابی FMV در مناطق مختلف کشور و همچنین مطالعه روابط تبارزایی بر مبنای ژن کد کننده پروتئین نوکلئوکپسید (NP) صورت پذیرفت. برای این منظور تعداد ۵۴ نمونه برگ انجیر دارای علائم موزائیکی و کلروز از مناطق مختلف کشت انجیر در شمال، مرکز و جنوب ایران جمع آوری گردید. ردیابی اولیه از طریق آزمون الیزا با استفاده از آنتی بادی اختصاصی ویروس FMV انجام گرفت. آزمون RT-PCR به منظور تأیید نتایج ردیابی اولیه با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن (NP) صورت پذیرفت. همسانه سازی، تعیین توالی نوکلئوتیدی و رسم درخت تبارزایی ۱۴ جدایه منتخب از مناطق جغرافیایی مختلف انجام گرفت. نتایج ردیابی سرولوژیکی و آزمون مولکولی حاکی از میزان ۵۵/۵٪ آلودگی در نمونه های مورد بررسی بود. نتایج مطالعات تبارزایی نشان داد که تمامی جدایه های مربوط به مناطق شمال و مرکز کشور به همراه جدایه های گزارش شده از سایر کشورها در گروه I قرار می گیرند در حالی که جدایه های استان فارس (استهبان و جهرم) در یک گروه تبارزایی جدا، گروه II، دسته بندی شدند. نتایج حاصله حاکی از وجود ارتباط معنی داری بین شدت علائم و گروه بندی تبارزایی می باشد. جدایه جهرم، JA2، از گروه II با داشتن بیشترین میزان تفاوت با سایر جدایه های کشور و دنیا، بنظر می رسد که دارای خصوصیات بیماری زایی و بیولوژیکی منحصر بفردی باشد که تعیین این خصوصیات در مطالعات تکمیلی ضروری می باشد.

واژه‌های کلیدی: تبارزایی، نوکلئوکپسید پروتئین، ویروس موزائیک انجیر، DAS-ELISA، RT-PCR.

Detection and phylogenetic analysis of Iranian *Fig mosaic emaravirus* isolates on the basis of the gene encoding Nucleocapsid protein (NP)

M. SHAHMIRZAEI¹, F. RAKHSHANDEHROO¹, M. R. SAFARNEJAD²✉, H. R. ZAMANIZADEH¹ and T. ELBEAINO³

1-PhD. Student, Assistant Professor & Professor, Respectively; Department of Plant Pathology, Science and Research Branch,

Islamic Azad University, Tehran, Iran; 2- Associate Professor, Department of Plant viruses, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran;

3- Research Scientist Istituto Agronomico Mediterraneo di Bari, Via Ceglie 9, 70010 Valenzano (BA), Italy

Abstract

Fig mosaic emaravirus (FMV) is considered as one of the main causal agents of Fig Mosaic Disease complex (FMD). In order to detection and identification of FMV in different regions of Iran and better understanding of the phylogenetic relationships between isolates, a number of 54 symptomatic fig leaves with chlorosis and mosaic symptoms were collected from different fig-growing areas in the center, north and south of Iran. Primary detection for all collected samples performed by DAS-ELISA using polyclonal AP-conjugated antibody which was raised against nucleocapsid protein of FMV positive samples in DAS-ELISA were checked by RT-PCR using NP gene specific primers. The amplified fragments of 14 isolates were cloned and sequenced. DAS-ELISA results indicated to a 55.5% FMV infection of collected isolates. Phylogenetic analysis on the basis of nucleotide sequences categorized the isolates in two main groups in which isolates from the center and northern regions of Iran placed in a separate subgroup beside other isolates from other countries which their complete coding sequences were available in GenBank of NCBI whereas the isolates from south of Fars province (Estahban and Jahrum districts) clustered in a separate phylogenetic group distinct from other Iranian and the world isolates which may show that genetic makeup of FMV may be affected by geographical isolation. A significant correlation between symptoms severity and phylogenetic groups observed that may put forward the probability of having a new viral strains in Fars province

Key words: DAS-ELISA, *Fig mosaic emaravirus* (FMV), Nucleocapsid protein, Phylogenetic analysis, RT-PCR.

مقدمه

گیاه انجیر (*Ficus carica* L.) یکی از قدیمی‌ترین گیاهان بومی ایران بوده که در برخی مناطق جهان از جمله خاورمیانه می‌روید. این گیاه به جهت ارزش غذایی و دارویی بسیار زیاد آن از دیرباز در بسیاری از فرهنگ‌ها و کشورها مورد توجه بوده است. گیاه انجیر می‌تواند در شرایط مختلف آب و هوایی از جمله در مناطق خشک و نیمه خشک رشد و پرورش یابد (Stover *et al.*, 2007). بر اساس آمارنامه منتشر شده سازمان خواروبار جهانی ملل متحد FAO در سال ۲۰۱۶ ایران با تولید سالیانه ۷۰۱۷۸ تن مقام چهارم را در بین کشورهای تولید کننده انجیر به خود اختصاص داده است و استان فارس با تولید ۳۶۰۶۱ تن انجیر در سال به دو صورت آبی و دیم بیشترین سهم تولید انجیر را به خود اختصاص داده است (Anonymous, 2015; Anonymous, 2016). یکی از مهم‌ترین و مخرب‌ترین بیماری‌های ویروسی در انجیر، بیماری موزائیک انجیر (Fig mosaic Disease (FMD می‌باشد که امروزه در بیشتر کشورهای انجیر در آنها کشت می‌شود گسترش یافته است (Blodgett and Gomec, 1967). این بیماری اولین بار از ساحل غربی کالیفرنیا در آمریکا توسط Condit and Horne (1933) گزارش گردید. علائم در این بیماری گسترده و متنوع بوده و درختان آلوده الگوی خاصی از رنگ پریدگی اندام‌های هوایی شامل علائم موزائیکی و پیسه‌ای و همچنین بدشکلی برگ‌ها و وجود لکه‌های نکروز روی برگ‌ها و میوه‌ها به همراه ریزش پیش از موعد میوه‌ها را نشان می‌دهند، در مواردی هم در تعدادی از برگ‌ها علائم دیده می‌شود در حالی که بقیه برگ‌ها حتی روی همان شاخه بدون علائم هستند. میوه‌ها در برخی درختان انجیر آلوده ممکن است کوچک‌تر از اندازه معمول و بدشکل شوند، که این امر از لحاظ کمی و کیفی کاهش عملکرد را به دنبال خواهد داشت (Blodgett and Gomec, 1967). تا کنون چندین گروه ویروسی با ژنوم از نوع RNA و DNA مربوط به جنس‌های مختلف از جمله *Trichovirus* *Alphacryptovirus* *Maculavirus* *Ampelovirus*

Badnavirus و *Closterovirus* در ایجاد این علائم ویروسی دخیل بوده‌اند و در درختان انجیر دارای علائم موزائیکی در کشورهای مختلف شناسایی و معرفی شده‌اند (Gattoni *et al.*, 2009; Elbeaino *et al.*, 2011a, b; Elbeaino *et al.*, 2007; Laney *et al.*, 2012). در گذشته مطالعات فراساختاری توسط میکروسکوپ الکترونی در این بیماری همواره حضور یکسری اندامک‌هایی با غشاء دو لایه Double membrane bodies (DMBs) گرد تا تخم مرغی شکل را در سلول‌های پارانشیمی برگ‌های دارای علائم نشان می‌داد که بعدها ماهیت ویروسی بودن و نقش آنها در سبب شناسی این بیماری مشخص شد (Caglayan *et al.*, 2010; Nolasco and de Sequeira, 1991). این اندامک‌های با غشاء دو لایه پیکره‌های ویروسی ایزومتریکی ویروس موزائیک انجیر (*Fig mosaic emaravirus* (FMV می‌باشند. در مطالعات تبارزایی این ویروس در جنس ویروسی *Emaravirus* (خانواده Fimoviridae) طبقه‌بندی شده است. علاوه بر ویروس *Fig mosaic emaravirus* چهار ویروس *Pigeonpea sterility mosaic virus* *Rose rosette virus* *Raspberry leaf blotch virus* و *European mountain ash ringspot associated virus* نیز در این جنس طبقه‌بندی شده‌اند (Elbeaino and Digiario, 2009; Mielke-Ehret and Mühlbach, 2012). این بیماری در طبیعت از طریق اندام‌های رویشی، پیوند و کنه (*Aceria ficus* (Family: Eriophyidae) قابل انتقال به گیاهان سالم می‌باشد (Flock and Wallace, 1955). ژنوم ویروس FMV که بطور کامل توالی یابی شده است بصورت شش قطعه RNA تک رشته‌ای منفی می‌باشد که هر کدام از این قطعات ژنومی دارای یک قاب خواندنی باز تک ژنی (Monocistronic) می‌باشد که RNA3 در این ساختار ژنومی با طول ۱۴۹۰ جفت باز پروتئینی را با وزن مولکولی ۳۵ کیلوالتون به عنوان نوکلئوکپسید پروتئین Nucleocapsid protein (NP) ویروس تولید می‌کند (Elbeaino *et al.*, 2009; Elbeaino *et al.*, 2012). در واقع NP یک پروتئین

میوه خصوصاً انجیر، به دلیل غلظت پائین ویروس و همچنین وجود متابولیت‌های ثانویه مانند تانین‌ها و پلی‌ساکاریدها در بافت‌های گیاهی لزوم استفاده از روش‌های تشخیصی که با دقت و حساسیت توانایی ردیابی ویروس را داشته باشند ضروری به نظر می‌رسد (Shahmirzaie *et al.*, 2012; Danesh- Amuz *et al.*, 2014; Ale-Agha and Rakhshandehroo, 2014; Khoshkhatti *et al.*, 2016; Ghorbani *et al.*, 2016). از این رو بکارگیری روش‌های شناسایی مولکولی و توالی‌یابی علاوه بر شناسایی و تشخیص دقیق عامل ویروسی می‌تواند در بررسی تنوع ژنتیکی و روابط تبارزایی بین جدایه‌ها و مطالعه ژنتیکی جمعیتی و تنوع ژنتیکی ویروس در مناطق مختلف بسیار سودمند بوده و نتایج حاصل از آن در درک پیچیدگی اپیدمیولوژی بیمارگر و تولید ارقام مقاوم بر مبنای ژن مقاومت جهت ارائه استراتژی کنترل سودمند باشد (Desbiez *et al.* 1996). ویروس‌های دارای ژنوم RNA به دلیل جهش بالا، تکثیر سریع و اندازه بالای جمعیت قابلیت تغییرات ژنومی در سطح وسیع را دارند و این تغییرات می‌تواند منجر به ظهور واریانت‌های جدید ویروس شود که ممکن است سبب غلبه بر ژن‌های مقاومت، آلوده کردن میزبان‌های جدید و پراکنش با ناقل‌های جدید شود. در این تحقیق ابتدا شناسایی و ردیابی ویروس موزائیک انجیر FMV در نمونه‌های دارای علائم بیماری موزائیک انجیر در مناطق مختلف ایران انجام شد و همچنین روابط تبارزایی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی جدایه‌های ایرانی با سایر جدایه‌های گزارش شده در جهان بر مبنای ژن تولید کننده نوکلئوکسپید پروتئین بررسی شد.

روش بررسی

نمونه برداری: در طی فصول بهار و تابستان ۱۳۹۵ تعداد ۵۴ نمونه برگ انجیر که دارای علائم شاخص موزائیکی، شامل حاشیه زنگار نکروزه، کلروز و همچنین بد شکلی برگ‌ها و میوه‌ها از باغات انجیر خودرو، تجاری و تحقیقاتی،

اصلی ساختاری است که هر قطعه RNA توسط چندین نسخه از نوکلئوکسپید پروتئین‌ها پوشش داده می‌شود و تشکیل مجموعه‌های ریونوکلئوپروتئین^۲ را می‌دهد که این مجموعه‌ها در فرآیندهای نسخه‌برداری، همانندسازی و گردایش پیکره ویروسی نقش مهمی را ایفا می‌کنند، در واقع ژن NP اولین ژن ویروسی می‌باشد که در فرآیند همانند سازی، نسخه‌برداری از آن صورت پذیرفته و به عنوان فراوان‌ترین نسخه ژنی در سلول‌های آلوده وجود دارد و به دلیل امکان وقوع تنوع در طی فرآیند نسخه‌برداری همانند پروتئین‌های پوششی به عنوان کاندید مناسبی جهت بررسی تنوع ژنتیکی در ویروس‌ها مطرح می‌باشند (Shi *et al.*, 2007; Överby *et al.*, 2007; Callaghan and Dietzgen, 2005). در سال ۲۰۱۰ این ویروس توسط شاه میرزائی و همکاران از استان‌های تهران (شهرستان ورامین) و لرستان (شهرستان خرم آباد) بر مبنای شناسایی مولکولی بخشی از ژن رمزکننده آنزیم RNA پلی مرز ویروسی (RdRp) گزارش گردید (Shahmirzaie *et al.*, 2010). مطالعات تبارزایی روی جدایه‌های ویروس FMV از استان‌های مازندران، تهران، خراسان رضوی، مرکزی و لرستان بر مبنای ژن گلیکوپروتئین انجام شده است. نتایج حاصله حاکی از عدم تفاوت مشخص بین جدایه‌های مورد بررسی در کشور می‌باشد. تمامی سویه‌های مورد مطالعه به همراه سویه‌های گزارش شده از کشور ترکیه در یک زیرگروه قرار گرفته‌اند (Danesh-Amuz *et al.*, 2014). همچنین مطالعات تبارزایی سویه ایرانی ویروس موزائیک انجیر بر اساس ژن پلی مرز حاکی از عدم تفاوت در این سویه‌ها بوده و تمامی آنها به همراه سویه‌های مدیترانه‌ای در یک زیر گروه قرار گرفته‌اند (Shahmirzaie *et al.*, 2012). این نتایج می‌تواند نشان دهنده احتمال ورود استرین‌های این ویروس از کشور ترکیه به مناطق شمالی ایران و داشتن منشاء تکاملی مشترک باشد.

با توجه به گسترش فراگیر و غیرمنتظره ویروس موزائیک انجیر (FMV) و همچنین مشکلات ردیابی ویروس در درختان

^۲-Ribonucleoprotein complexes (RNPs)

حجم بافر عصاره گیری (X۱ PBS pH ۷/۵ EDTA ۵ میلی مولار، ۲ درصد PVP-40) در هاون چینی سرد روی یخ عصاره‌گیری شد و پس از انجام مراحل الیزا، نتایج با استفاده از دستگاه الیزا خوان مدل BioTeck instrument EL800 در طول موج ۴۰۵ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفتند.

استخراج RNA کل: جهت ردیابی ویروس موزائیک انجیر، استخراج RNA کل از نمونه‌هایی که در آزمون ELISA نسبت به آلودگی مثبت تشخیص داده شده بودند، بوسیله کیت استخراج HiYield™ Total RNA Mini Kit (Plant), RNA استخراج (Real-Biotech, Taiwan) از بافت گیاهی بر اساس دستورالعمل شرکت مربوطه انجام شد. بررسی کیفیت و کمیت RNA استخراج شده بوسیله الکتروفورز در ژل آگارز ۱٪ و همچنین توسط اسپکتوفتومتری با دستگاه نانودراپ NanoDrop™1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) انجام شد و نمونه‌ها جهت نگهداری به فریزر ۲۰- درجه سلسیوس منتقل شدند.

آزمون رونوشت برداری معکوس-واکنش زنجیره ای پلی مرارز (RT-PCR): در این بررسی آغازگرهای رفت FMV-NP (Forward) و برگشت FMV-NP (Reverse) (جدول ۲)، جهت تکثیر طول کامل قطعه ژنی نوکلئوکسپید پروتئین ویروس موزائیک انجیر توسط نرم افزار Clone Manager Professional (Scientific and Educational Software, USA) طراحی شد و سنتز آنها توسط شرکت MWG آلمان انجام شد.

به منظور تأیید نتایج آزمون‌های سرولوژیکی توسط آزمون RT-PCR، ابتدا ساخت دی.ان.ای مکمل^۳ با استفاده از ۵-۱۰ میکروگرم از RNA استخراج شده به همراه ۱۰ پیکومول از آغازگر اختصاصی برگشتی FMV-NP (Reverse) و همچنین ۲۰۰ واحد از آنزیم نسخه بردار معکوس^۴ در حجم

استان‌های تهران (ورامین)، مازندران (تنکابن)، گیلان (لاهیجان و آستارا)، مرکزی (ساوه)، یزد (زارچ)، کرمان (سیرچ) و فارس (جهرم، استهبان، ایچ و کرفت) جمع‌آوری و تا زمان انتقال به آزمایشگاه روی یخ نگهداری شد (جدول ۱ و شکل ۱).



شکل ۱- علائم بیماری موزائیک انجیر FMD در برگ‌های آلوده به ویروس موزائیک انجیر. (A): نمایی از درخت آلوده دارای علائم موزائیکی و ریزش پیش از موعد میوه‌ها، (B) و (C): موزائیک و کلروز در فواصل بین رگبرگ‌ها به همراه زنگار نکروزه، (D): بدشکلی برگ‌ها و کلروز.

Fig. 1. Symptoms of Fig Mosaic Disease (FMD) in FMV-infected leaves. (A): Infected fig tree showing mosaic, chlorosis and premature fruit drop. (B) and (C): interveinal mosaic and chlorosis associated with rust-color necrosis bands. (D): Deformity and chlorosis in fig leaves.

آزمون‌های سرولوژیک جهت تعیین آلودگی نمونه‌ها

به FMV: به منظور شناسایی اولیه و ردیابی FMV در نمونه‌های دارای علائم، آزمون الیزای مستقیم (DAS-ELISA) (Clark and Adams, 1977) با استفاده از آنتی بادی چند همسانه‌ای نشان دار شده با آنزیم آلکالین فسفاتاز که علیه پروتئین نوکلئوکسپید جدایه ایرانی ویروس موزائیک انجیر (FMV) تهیه شده بود انجام شد (Unpublished Data). بدین منظور تعدادی از برگ‌های انجیر دارای علائم در سه برابر

^۳-cDNA

^۴-Moloney murine leukaemia virus (MMLV)

حرارتی و با استفاده از سلول‌های مستعد *E. coli* K12 DH5 α به همراه ناقل همسانه‌ساز نو ترکیب حامل ژن نوکلئوکسپید انجام شد. پس از کشت باکتری روی محیط LB (Luria-Bertani) حاوی آنتی بیوتیک آمپی‌سیلین (50 μ g/ml)، X-Gal (40 μ g/ml) و IPTG (0.2 mM) استخراج پلاسمید نو ترکیب از پرگنه‌های سفید رنگی که آزمون کلنی PCR صحت فرآیند همسانه‌سازی را در آنها تأیید کرده بود، با استفاده از کیت High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche, Germany) انجام شد. تعیین توالی پلاسمیدهای نو ترکیب توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی با استفاده از آغازگرهای عمومی M13 انجام شد و سپس توالی‌ها با ۱۷ توالی کامل ژن نوکلئوکسپید پروتئین ویروس FMV موجود در بانک ژن NCBI توسط نرم افزار BLAST مقایسه شد (جدول ۳). پس از همردیف سازی توالی‌های نوکلئوتیدی توسط نرم افزار Clustal X، بررسی روابط تبارزایی و رسم درخت فیلوژنتیکی بصورت Bootstrap بر مبنای الگوی Neighbor joining با ۱۰۰۰ تکرار توسط نرم افزار Mega 6 (MEGA Software, USA) انجام شد.

نتیجه و بحث

این تحقیق به منظور ردیابی ویروس موزائیک انجیر در درختان دارای علائم در مناطق مختلف کشور و همچنین بررسی تبارزایی سویه‌های جمع‌آوری شده بر اساس ژن نوکلئوکسپید صورت پذیرفت. برای این منظور از درختان دارای علائم موزائیک و زردی در باغات مناطق مختلف کشور نمونه برداری شد و وجود آلودگی با آزمون الیزا با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی ویروس انجام شد. نتایج آزمون‌های سرولوژیکی حاکی از آلوده بودن ۳۰ نمونه از مجموع ۵۴ نمونه (۵۵/۵ درصد)، به ویروس موزائیک انجیر بود. با توجه به نتایج تشخیص اولیه، این ویروس در نمونه‌های دارای علائم جمع‌آوری شده از استان‌های کرمان (سیرج) و یزد (زارج) ردیابی نشد. در این تحقیق نمونه‌های مورد بررسی از

۲۰ میکرولیتر بر اساس دستورالعمل کیت سنتز cDNA (Thermo Fisher Scientific, USA) صورت پذیرفت.

جهت تکثیر ژن NP به منظور ردیابی ویروس FMV، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز PCR با استفاده از آنزیم تک پلیمرز^۵ (Fermentas Inc, Germany) (5Unit/ml) به میزان ۰/۳ میکرولیتر، ۳ میکرولیتر از cDNA، ۱/۲ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای رفت و برگشتی با غلظت ۱۰ پیکومولار، ۲/۵ میکرولیتر از بافر PCR X ۱۰، ۱ میکرولیتر از ۵۰ میلی مولار MgCl₂، ۰/۵ میکرولیتر از dNTPs ۱۰ میکرومولار در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. برنامه دمایی PCR شامل یک مرحله واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴ دقیقه به همراه ۳۰ چرخه دمایی شامل واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال آغازگر به رشته الگو در دمای ۵۷ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، تکثیر قطعه مورد نظر در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه و در پایان یک مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه بود. برای همانند سازی قطعه تکثیر شده ابتدا الکتروفورز محصول PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد به همراه بافر TAE1X (۴۰ میلی مولار Tris pH 7.6، ۲۰ میلی مولار Acetic acid، ۱ میلی مولار EDTA) انجام شد. پس از تأیید نتایج ردیابی اولیه نمونه‌های آلوده به FMV در آزمون RT-PCR، تعداد ۱۴ جدایه بر مبنای تفاوت جغرافیایی انتخاب گردید.

همسانه سازی ژن نوکلئوکسپید پروتئین و تعیین توالی:

قطعه ژنی تکثیر یافته از جدایه‌های منتخب حاوی طول کامل توالی نوکلئوکسپید پروتئین جهت همسانه‌سازی و تعیین توالی ابتدا با استفاده از کیت Ultra-Clean purification kit بر اساس پروتوکل شرکت سازنده Gene JET TM Gel Extraction Kit (Fermentas Inc, Germany) از ژل آگاروز خالص سازی گردید و سپس در ناقل همسانه ساز pTZ57R/T (Thermo Fisher Scientific, USA) قرار داده شد. عمل انتقال به روش شوک

استان‌های فارس (استهبان، جهرم، کرفت و ایچ) و مازندران (تنکابن) به ترتیب با ۸۲/۳ و ۷۷/۷ درصد، بیشترین آلودگی و نمونه‌های استان گیلان (آستارا و لاهیجان) با ۳۰/۷ درصد، کمترین آلودگی را به ویروس موزائیک انجیر نشان دادند (جدول ۱).

جدول ۱- نتایج ردیابی اولیه ویروس FMV در نمونه‌های جمع‌آوری شده در آزمون سرولوژی DAS-ELISA و RT-PCR.

به همراه تعداد جدایه‌های توالی یابی شده منتخب از هر منطقه جغرافیایی

Table 1. Results of FMV primary detection in collected samples using serological assay DAS-ELISA and RT-PCR and number of sequenced isolates which were selected from each geographical region

Province	Region	Collected and Tested samples	Infected samples		Sequenced isolates
		No	No	%	No
Tehran	Varamin	3	2	66.6	1
	Jahrom	7	4	57.1	3
Fars	Estahban	4	4	100	4
	Iej	3	3	100	-
	Karft	3	3	100	-
Kerman	Sirch	3	-	-	-
Gilan	Astara	7	2	28.5	1
	Lahijan	6	2	33.3	2
Mazandaran	Tonekabon	9	7	77.7	2
Markazi	Saveh	5	3	60	1
Yazd	Zarch(Sarcheshmeh)	4	-	-	-
Total		54	30	55.5	14

جدول ۲- توالی آغازگرهای مورد استفاده در تکثیر ژن رمز کننده نوکلئوکپسید پروتئین ویروس موزائیک انجیر

Table 2. Sequences of the primers used in amplification of FMV nucleocapsid protein

Primer name	Nucleotide sequence of primer	Expected size	Annealing region
FMV-NP(Forward)	5' CCATGGCACCTAAGAGTAAGACTAC 3'	950	Nucleocapsid Protein
FMV-NP(Reverse)	5' CTCGAGAACATGAGCACTTGCAATC 3'		

در این نمونه‌ها می‌تواند ناشی از وجود سایر ویروس‌های بیماری‌زای انجیر باشد از قبیل:

Fig latent virus-1 (FLV-1), *Fig leaf mottle associated virus-1* (FLMaV-1) (Shahmirzaie *et al.*, 2012), *FLMaV-2* (Danesh-Amuz *et al.* 2014), *FLMaV-3* (Norozian *et al.*, 2014), *Fig fleck associated virus* (FFKaV), *Fig cryptic virus* (FCV) (Ale-Agha & Rakhshandehroo, 2014), *Fig badnavirus-1* (FBV-1) (Alishiri *et al.*, 2016; Alimoradian *et al.*, 2014).

در تعدادی از نمونه‌ها با وجود علائم موزائیکی و کلروز، آلودگی آنها در آزمون الیزا مشخص نگردید ولی پس از انجام آزمون RT-PCR با آغازگرهای اختصاصی، ویروس FMV در آنها ردیابی گردید، که این موضوع ممکن است در اثر کم بودن غلظت ویروس در گیاه و یا ویژگی‌های متفاوت سرولوژیکی در جدایه‌های ویروسی باشد. در برخی دیگر از نمونه‌ها با وجود علائم، ویروس FMV با هیچ یک از آزمون‌های الیزا و RT-PCR در آنها ردیابی نشد. وجود علائم

جدول ۳- رس شماره‌ها، منشأ و میزبان جدایه‌های ویروس موزائیک انجیر (FMV)، مورد بررسی در این تحقیق

Table 3. Accession numbers, hosts and origins of *Fig mosaic emaravirus*(FMV) isolates/strains analyzed in this study

Origin (Number of isolates)	Nucleotide Accession Numbers	Protein-ID	Isolate Name/strain	Host
Australia(1)	KU674950	AQR59327	Aust	<i>Ficus carica</i>
Canada(1)	HQ703345	AEI98678	CAN01	<i>F.carica</i>
	MG880766, MG880758, MG880759, MG880760, MG880754, MG880753,	-	VA22, JA1, JA2, JA3, ES1, ES2,	<i>F.carica</i>
Iran(14)	MG880755, MG880756, MG880757, MG880761, MG880762, MG880764, MG880765, MG880763		ES3, ES4, AS1, LA2, LA4, TO4, TO7, SA5	
Italy(2)	FM991954, LC002800	CAX21211, BAU20387	GR10, IR-1	<i>F.carica</i>
	AB697843, AB697844, AB697846, AB697847,	BAM13802, BAM13803, BAM13805, BAM13806,	JS1, JF1, JTT-Au, JTT-Ki,	<i>F.carica</i> cv. Hourashi, <i>F.carica</i> cv. Hourashi,
Japan(7)	AB697848, AB697849, AB697850	BAM13807, BAM13808, BAM13809	JTT-Li, JTT-Pa, JTT-Vi	<i>F.carica</i> cv. Athenes, <i>F.carica</i> cv. King, <i>F.carica</i> cv. Lisa, <i>F.carica</i> cv. Panachee, <i>F.carica</i> cv. Violette de Sollies
	AB697851, AB697852,	BAM13810, BAM13811,	SB1, SB2-2,	<i>F.carica</i>
Serbia(6)	AB697853, AB697854, AB697855, AB697856	BAM13812, BAM13813, BAM13814, BAM13815	SB2-3, SB2-4, SB2-5, SB2-6	

در میکروولتر محاسبه شد. نتایج آزمون RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن کد کننده نوکلئوکپسید، حاکی از تکثیر قطعه ژنی به طول ۹۵۰ جفت باز در نمونه‌های آلوده بود، که این قطعه با اندازه ژن مورد نظر تطابق داشت (شکل ۲).

به منظور همسانه سازی ژن نوکلئوکپسید، باند مورد نظر در جدایه‌های منتخب از روی ژل آگارز جداسازی شد و در ناقل pTZ57R /T وارد گردید. صحت همسانه سازی با آزمون کلنی پی سی آر تأیید شده و پس از استخراج پلاسمید از کلنی‌های منتخب، تعیین توالی قطعه ژنی با استفاده از پرایمرهای یونیورسال صورت پذیرفت. پس از بررسی، توالی‌ها با رس شماره‌های 66-66 MG880753 در بانک جهانی ژن (NCBI) ثبت شدند. نتایج آنالیز BLAST و همچنین هم ردیفی توالی‌های مورد بررسی، مشابهت ۹۲-۹۶ درصد را با توالی نوکلئوتیدی و مشابهت ۹۱-۹۸ درصد با توالی آمینواسیدی ژن نوکلئوکپسید (N-gene) مربوط به توالی رفرانس (رس شماره FM991954.1) نشان داد.

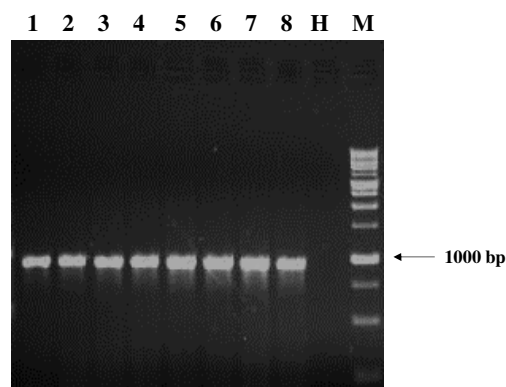
این نتایج نشان می‌دهد که به منظور اطمینان از سلامت درختان، استفاده از روش‌های سرولوژیک و مولکولی ضروری می‌باشد. با توجه به امکان وجود آلودگی همزمان یک گیاه به چند ویروس، استفاده از روش‌های مکمل از قبیل multiplex-PCR و یا روش‌های مبتنی بر نسل جدید توالی‌یابی^۶ پیشنهاد می‌گردد. نتایج تحقیقات گذشته در ایران نشان می‌دهد که FMV به عنوان مهم‌ترین ویروس درختان انجیر دارای علایم بیماری موزائیک وجود دارد (Danesh-Amuz et al., 2014).

در این تحقیق پراکندگی و تنوع ژنتیکی ویروس موزائیک انجیر بر پایه توالی کامل ژن رمزکننده نوکلئوکپسید پروتئین FMV در بین جدایه‌های جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران انجام شد. برای این منظور ابتدا RNA از نمونه‌ها استخراج شد.

مشاهده باندهای RNA ریوزومی در ژل آگارز حاکی از خلوص بالای اسید نوکلئیک حاصله می‌باشد و غلظت RNA کل استخراج شده توسط دستگاه ناندراپ حدود ۲/۳ نانوگرم

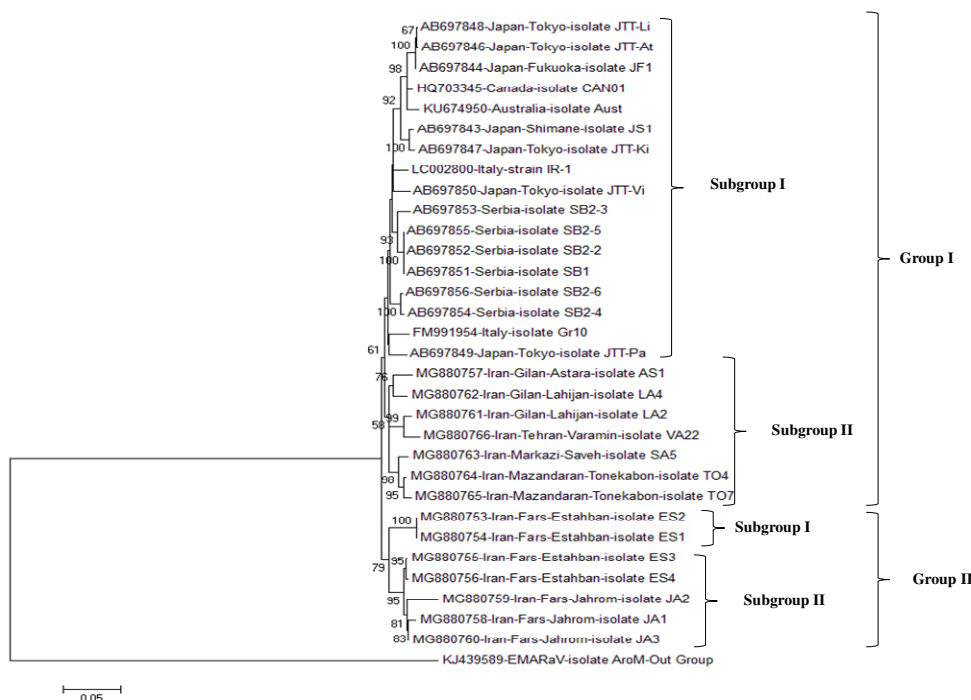
^۶-Next generation sequencing (NGS)

در بررسی روابط تبارزایی بر مبنای توالی نوکلئوتیدی، جدایه‌های مورد بررسی و جدایه‌های سایر کشورها در دو گروه فیلوژنتیکی مجزا دسته‌بندی شدند. بر اساس این گروه‌بندی، تمامی جدایه‌های مربوط به مناطق مرکزی و شمالی ایران به همراه جدایه‌های گزارش شده از سایر مناطق جهان در گروه I دسته بندی شدند. مجموعه جدایه‌های مربوط به استان فارس (استهبان و جهرم) بصورت مجزا در گروه فیلوژنتیکی II قرار گرفتند. در این گروه دو جدایه ES2 و ES3 مربوط به شهرستان استهبان در زیرگروه I و جدایه‌های ES4 و ES3 (شهرستان استهبان) به همراه جدایه‌های شهرستان جهرم در زیرگروه II دسته‌بندی شدند. (شکل ۳).



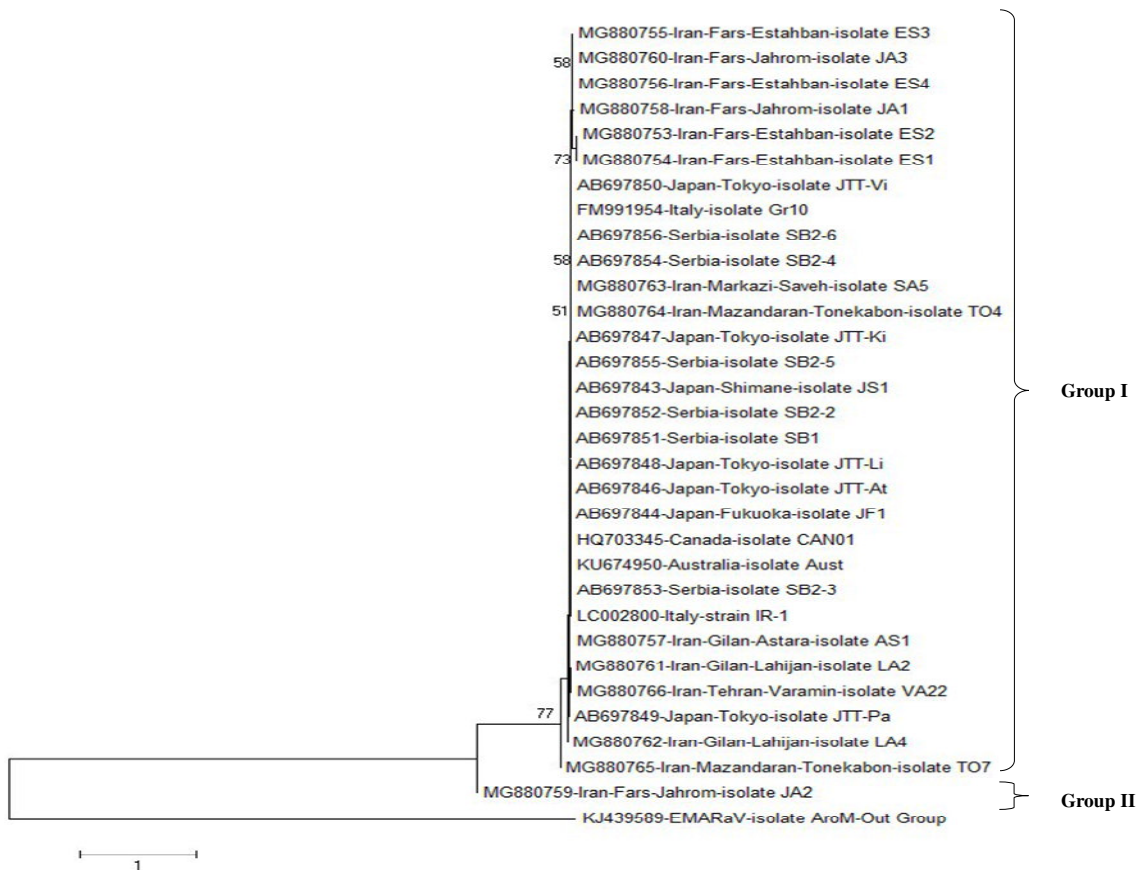
شکل ۲- محصول PCR حاصل از تکثیر ژن رمزکننده Nucleocapsid Protein ویروس *Fig mosaic emaravirus*(FMV) استفاده از آغازگرهای اختصاصی FMV-NP(Forward) و FMV-NP(Reverse) روی ژل آگارز ۱/۵ درصد. M: 1Kb DNA ladder (Excel Band, SMOBIO); H: گیاه سالم انجیر، 1-8: گیاه انجیر آلوده به FMV

Fig. 2. PCR Amplification of Nucleocapsid Protein Gene of *Fig mosaic emaravirus* (FMV) Using FMV-NP (Forward) and FMV-NP (Reverse) Primers. M, 1Kb DNA ladder (Excel Band, SMOBIO); H, healthy fig plants; 1-8: FMV infected fig plants.



شکل ۳- درخت تبارزایی حاصل از بررسی توالی های نوکلئوتیدی منطقه رمز کننده نوکلئوکپسید پروتئین FMV که در آن ۱۴ جدایه منتخب ایرانی با ۱۷ جدایه از جهان که در بانک ژن NCBI توالی کامل آنها ثبت شده بود بررسی شد. فاصله ژنتیکی ۰/۰۵، خط برش ۸۰ درصد، ارزش‌های کمتر از ۵۰ درصد از روی گره ها حذف شدند. ویروس *European mountain ash ring spot associated virus* (EMARaV)(KJ439589) به عنوان outgroup انتخاب گردید.

Fig. 3. Phylogenetic tree constructed using nucleotide sequences of FMV nucleocapsid protein coding region of 14 Iranian isolates in comparison with 17 related FMV isolates in NCBI. Genetic distance and Cut off are 0.05 and 80% respectively. Bootstrap values less than 50% are omitted. *European mountain ash ring spot associated virus* (EMARaV) (Accession No. KJ439589) is selected as an out-group species.



شکل ۴- درخت تبارزایی حاصل از بررسی توالی‌های آمینواسیدی منطقه رمز کننده نوکلئوکسپید پروتئین FMV که در آن ۱۴ جدایه منتخب ایرانی با ۱۷ جدایه از جهان که در بانک ژن NCBI توالی کامل آنها ثبت شده بود بررسی شد. فاصله ژنتیکی ۱، خط برش ۸۰ درصد، ارزش‌های کمتر از ۵۰ درصد از روی گره‌ها حذف شدند. ویروس *European mountain ash ring spot associated virus* (EMARaV) (KJ439589) به عنوان outgroup انتخاب گردید.

Fig. 4. Phylogenetic tree constructed using amino acid sequences of FMV nucleocapsid protein coding region of 14 Iranian isolates in comparison with 17 related FMV isolates in NCBI. Genetic distance and Cut off are 1 and 80% respectively. Bootstrap values less than 50% are omitted. *European mountain ash ring spot associated virus* (EMARaV) (Accession No. KJ439589) is selected as an out-group species

NP در فرآیندهای نسخه‌برداری، همانندسازی و گردایش پیکره ویروسی این تفاوت‌ها می‌تواند موجب بهبود سطح عملکردی پروتئین به منظور ارتقا بیماری‌زایی در سویه ویروسی گردد (Garcia-Arenal *et al.*, 2001). مقایسه نتایج گروه‌بندی جدایه‌ها بر مبنای توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی نشان می‌دهد که در هر دو مورد جدایه‌های مورد بررسی در دو گروه جداگانه قرار می‌گیرند. همانطور که اشاره گردید در گروه‌بندی بر مبنای ترادف نوکلئوتیدی ژن NP تمامی جدایه‌های استان فارس در یک گروه مجزا قرار گرفتند در حالیکه در گروه‌بندی بر مبنای ترادف آمینواسیدی ژن مربوطه

همچنین بررسی روابط تبارزایی بر مبنای توالی‌های آمینواسیدی ژن کد کننده نوکلئوکسپید پروتئین نشان داد جدایه‌های مورد بررسی در ۲ گروه مجزا دسته‌بندی می‌گردند. در این گروه‌بندی تنها یک جدایه مربوط به استان فارس (جهرم)، JA2، به صورت مجزا در یک گروه فیلوژنتیکی قرار می‌گیرد که نشان دهنده فاصله ژنتیکی دورتر آن نسبت به سایر جدایه‌ها می‌باشد (شکل ۴).

به نظر می‌رسد فشار انتخاب مثبت (positive selection) موجب گردیده تا تنوع نوکلئوتیدی موجب تنوع آمینواسیدی در جدایه جهرم (JA2) گردد. با توجه به نقش ژن

ترکیه، در این تحقیق امکان مقایسه آن با جدایه‌های ایرانی امکان پذیر نبود. نتایج این تحقیق نشان داد که تمامی جدایه‌های مربوط به مناطق شمالی و مرکز ایران (استان‌های گیلان، مازندران، تهران و مرکزی) به همراه جدایه‌های مربوط به کشورهای ایتالیا، ژاپن، صربستان، کانادا و استرالیا در یک گروه فیلوژنتیکی قرار می‌گیرند که این امر حاکی از تشابه بالای این جدایه‌ها می‌باشد. نتایج یک تحقیق بر مبنای قطعه ژنومی ۳ (NP-gene) جدایه ویروس موزائیک انجیر از استان لرستان حاکی از نزدیکی این جدایه با جدایه‌هایی از صربستان و ژاپن می‌باشد (Ghorbani *et al.*, 2016).

در این تحقیق برای اولین بار مطالعه تبارزایی جدایه‌های استان فارس صورت پذیرفت. با وجود سطح زیر کشت بالای انجیر در این استان و وجود گزارشات متعدد از بروز خسارات فراوان بیماری موزائیک انجیر در این گیاه، تاکنون در خصوص تنوع ژنتیکی جدایه‌های این استان بررسی صورت نگرفته است. نتایج بررسی روابط تبارزایی در سطح نوکلئوتیدی (شکل ۳) نشان داد که تمامی جدایه‌های استان فارس (استهبان و جهرم) در یک گروه فیلوژنتیکی مستقل از سایر جدایه‌های ایران و جهان می‌باشد. این تفاوت در جدایه‌های استان فارس، احتمال حضور یک سویه جدید را برای آن منطقه مطرح می‌سازد. فرآیندهایی مانند همانندسازی مستعد خطا^۷ که در اثر خطای آنزیم آر.ان.ای پلی‌مراز وابسته به آر.ان.ای^۸ ایجاد می‌گردد و رخدادهایی نظیر نوترکیبی^۹، نوجوری ژنتیکی^{۱۰} و همچنین اثرات متقابل میزبان-پاتوژن از طریق ناقلین و عوامل محیطی می‌توانند در ایجاد تنوع ژنتیکی موثر باشند (Zarghani *et al.*, 2013; Schneider and Roossinck, 2001). از آنجا که هر کدام از این عوامل می‌توانند در ایجاد تنوع ژنتیکی در بین جدایه‌های مناطق شمال و مرکز با

تنها یک جدایه از استان فارس (جدایه جهرم JA2) در گروه دوم قرار گرفت. با توجه به وجود کدان‌های متفاوت برای قرار گیری یک اسید آمینه در فرایند ترجمه، در بسیاری از موارد، تغییر در ترادف نوکلئوتیدها منجر به تغییر در ترادف آمینواسید مربوطه نمی‌گردد. این وضعیت سبب می‌گردد که در بسیاری از موارد تشابه جدایه‌ها در سطح آمینواسیدی با یکدیگر بیشتر بوده و تفاوت‌هایی در گروه بندی جدایه‌ها مشاهده گردد (Alishiri *et al.*, 2013). در بررسی انجام شده بر اساس ترادف نوکلئوتیدی، جدایه‌های گروه I به میزان ۹۲ تا ۹۶ درصد با جدایه‌های گروه II شباهت داشتند. با مقایسه ترادف آمینواسیدی، میزان شباهت بین این دو گروه در حدود ۹۰ تا ۹۸ درصد تعیین گردید. جدایه جهرم JA2 از گروه II با ۹۰ درصد تشابه با اعضا گروه I دارای کمترین میزان شباهت در سطح آمینواسیدی می‌باشد. این جدایه با داشتن بیشترین میزان تفاوت با سایر جدایه‌های کشور و دنیا، بنظر می‌رسد که دارای خصوصیات بیماری زایی و بیولوژیکی منحصر بفردی باشد که تعیین این خصوصیات در مطالعات تکمیلی ضروری می‌باشد.

در گذشته مطالعات تبارزایی جدایه‌های ویروس FMV از باغات انجیر استان‌های خراسان رضوی، مازندران و تهران بر مبنای توالی‌های نوکلئوتیدی و آمینواسیدی ژن گلیکوپروتئین و همچنین پلی‌مراز صورت گرفته بود (Danesh-Amuz *et al.*, 2014; Shahmirzaie *et al.*, 2012; Ale-Agha and Rakhshandehroo, 2014). نتایج این تحقیقات نشان می‌دهد که تمامی جدایه‌های ایرانی به همراه جدایه‌های گزارش شده از کشور ترکیه در یک زیر گروه جداگانه قرار می‌گیرند که این امر می‌تواند نشان دهنده سازگاری جغرافیایی این جدایه‌ها با یکدیگر نسبت به سایر جدایه‌های گزارش شده از جهان باشد. از آنجا که منشاء گیاه انجیر منطقه غرب آسیا می‌باشد داشتن منشاء تکاملی مشترک جدایه‌های گزارش شده از کشور ترکیه با جدایه‌های مناطق شمالی ایران دور از انتظار نمی‌باشد. توجه به عدم ثبت توالی ژن نوکلئوکپسید پروتئین جدایه‌های کشور

۷- error-prone replication

۸- RdRp

۹- Recombination

۱۰- Genetic reassortment

تفاوت‌های ژنتیکی مشاهده شده می‌تواند منجر به تفاوت در خصوصیات ویروسی از جمله میزان و شدت بیماری‌زایی در جدایه‌های مربوطه گردد که این تفاوت ژنتیکی و بروز سویه جدید بیماری‌زا می‌تواند به عنوان عامل شدت بالای علائم و بروز خسارت عمده در منطقه مطرح باشد.

در طی سالیان اخیر موارد متعددی از بروز خسارت بالا توسط بیماری موزائیک انجیر در استان فارس گزارش شده است. با توجه به اهمیت این استان از جهت تولید انجیر در کشور و همچنین تفاوت مشاهده شده در سویه‌های ویروسی این منطقه با سایر مناطق کشور، بنظر می‌رسد که نوع سویه‌های ویروسی موجود در منطقه نقش مستقیمی در شدت بیماری‌زایی داشته باشد که تأیید این نظریه احتیاج به انجام مطالعات تکمیلی در این خصوص دارد.

References

- ALE-AGHA, G. N. and F. RAKHSHANDEHROO, 2014. Detection and Molecular Variability of Fig Fleck-Associated Virus and Fig Cryptic Virus in Iran. *Journal of Phytopathology*, 162 (7-8), pp. 417-425.
- ALIMORADIAN, P., F. RAKHSHANDEHROO and M. SHAMS-BAKHS, 2014. First record of Fig Badnavirus-1 in fig trees in Iran. *Journal of Plant Pathology*, 96 (4SUP), pp. 4-124.
- ALISHIRI, A. F. RAKHSHANDEHROO, G. H. SALEHI JOUZANI and M. SHAMS-BAKHS, 2016. Detection and Molecular Characterization of Fig badnavirus-1 Iranian isolates on the Basis of the Protease Gene. *Applied Entomology and Phytopathology*, 84(1), pp.119-130.
- ALISHIRI, A., F. RAKHSHANDEHROO, H. R. ZAMANIZADEH and P. PALUKAITIS, 2013. Prevalence of tobacco mosaic virus in Iran and evolutionary analyses of the coat protein gene. *The Plant Pathology Journal*, 29(3), pp. 260-273
- ANONYMOUS, 2014. Preliminary 2014 Production Data. Statistical Data. FAOSTAT. Available at: <http://www.fao.org/faostat>.

جدایه‌های مربوط به استان فارس (شهرستان استهبان و جهرم)، موثر باشند، بنابراین مطالعات تکمیلی در این خصوص ضروری می‌باشد. در گذشته وقوع فرآیند نوجوری ژنتیکی در ایجاد تنوع ژنتیکی در ویروس‌های گیاهی دارای ژنوم چند بخشی از نوع آر.ان.ای تک رشته‌ای منفی از جمله *Tomato spotted wilt virus (TSWV)* گزارش شده است (Tentchev *et al.*, 2011). این فرآیند به عنوان عامل محتمل در ایجاد تنوع و ایجاد سویه‌های جدید در جدایه‌های ویروس موزائیک انجیر نیز گزارش شده است (Walia *et al.*, 2014). مطالعات قبلی صورت گرفته در ترکیه نشان داده است که نوع سویه‌های ویروسی جدا شده از ارقام مختلف انجیر متفاوت می‌باشد. این امر می‌تواند حاکی از نقش ارقام بومی منطقه در ایجاد تنوع و توسعه نژادهای جدید ویروس موزائیک انجیر باشد (Elçi *et al.*, 2013). از آنجا که ارقام کشت شده در استان فارس (خصوصاً شهرستان استهبان) عمدتاً رقم سبز و بومی منطقه بوده و متفاوت از ارقام عمده در شمال کشور مانند (سیاه، زرد، منجیفی و کشانی) می‌باشند، لذا نقش ارقام بومی در ایجاد تفاوت‌های ژنتیکی و سویه‌های جدید ویروس دور از انتظار نیست. البته مطالعات تکمیلی و دقیق‌تر در مورد نقش سویه‌های بومی در شدت بیماری‌زایی و علائم و همچنین توانایی انتقال روی ارقام بومی منطقه باید صورت پذیرد. با توجه به نزدیکی جغرافیایی دو منطقه جهرم و استهبان در استان فارس و وجود تبادلات گسترده نهال و مواد تکثیری گیاهی در بین این دو منطقه، تشابه در جدایه‌های مربوط به این مناطق منطقی بنظر می‌رسد. قرار گرفتن جدایه‌های مربوط به استان فارس (جنوب کشور) در یک گروه مجزا نشان دهنده اثر جدایی جغرافیایی در ایجاد تنوع ژنتیکی و تکامل است و می‌تواند نشان دهنده وجود ژنوتیپ‌های مختلف و اگر در منطقه باشد. در گذشته نیز وجود ژنوتیپ‌های واگرا جمعیت‌های ویروس برگ باد بزنی مو^{۱۱} در مناطق جنوب غربی کشور گزارش گردیده است (Kargar *et al.*, 2016).

- ANONYMOUS, 2015. Statistical annual report of Iranian agricultural crops.
- BLODGETT, E. C. and B. GOMEZ, 1967. Fig mosaic. *Plant Disease Reports*, 51, pp.893–896.
- CAGLAYAN, K., C. U. SERCE, E. BARUTCU, K. KAYA, V. MEDINA, M. GAZEL, S. SOYLU and O. CALISKAN, 2010. Comparison by Sequence-Based and Electron Microscopic Analyses of Fig mosaic virus Isolates Obtained from Field and Experimentally Inoculated Fig Plants. *Plant Disease*, 94(12), pp.1448–1452.
- CALLAGHAN, B. and R. G., DIETZGEN, 2005. Nucleocapsid gene variability reveals two subgroups of Lettuce necrotic yellows virus. *Archives of Virology*, 150(8), pp. 1661–1667. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00705-005-0528-7>.
- CLARK, M. F. and A. N. ADAMS, 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of general virology*, 34(3), pp. 475–483.
- CONDIT, I. J. and W. T. HORNE, 1933. A mosaic of the fig in California. *Phytopathology*, 23(11), pp. 887–896.
- DANESH-AMUZ, S., RAKHSHANDEHROO, F. and S. REZAEI, 2014. Prevalence and genetic diversity of fig mosaic virus isolates infecting fig tree in Iran. *Acta Virologica*, 58(3), pp. 245–252.
- DESBIEZ, C., C. WIPF-SCHEIBEL, F. GRANIER, C. ROBAGLIA, T. DELAUNAY and H. LECOQ, 1996. Biological and molecular variability of zucchini yellow mosaic virus on the Island of Martinique. *Plant disease*, 80(2), pp. 203–207.
- ELBEAINO, T., M. DIGIARO, A. DE STRADIS and G. P. MARTELLI, 2007. Identification of a second member of the family Closteroviridae in mosaic-diseased figs. *Journal of Plant Pathology*, pp.119–124.
- ELBEAINO, T., M. DIGIARO and G. P. MARTELLI, 2011b. Complete sequence of Fig fleck-associated virus, a novel member of the family Tymoviridae. *Virus Research*, 161(2), pp. 198–202.
- ELBEAINO, T., M. DIGIARO, A. ALABDULLAH, A. DE STRADIS, A. MINAFRA, N. MIELKE, M. CASTELLANO and G. P. MARTELLI, 2009. A multipartite single-stranded negative-sense RNA virus is the putative agent of fig mosaic disease. *Journal of General Virology*, 90, pp.1281–1288.
- ELBEAINO, T., M. DIGIARO and G. P. MARTELLI, 2009. Complete nucleotide sequence of four RNA segments of fig mosaic virus. *Archives of virology*, 154(11), p.1719.
- ELBEAINO, T., M. DIGIARO and G. P. MARTELLI, 2012. RNA-5 and -6, two additional negative-sense RNA segments associated with fig mosaic virus. *Journal of Plant Pathology*, 94(2), pp. 421–425.
- ELBEAINO, T., R. A. KUBAA, M. DIGIARO, A. MINAFRA and G. P. MARTELLI, 2011a. The complete nucleotide sequence and genome organization of Fig cryptic virus, a novel bipartite dsRNA virus infecting fig, widely distributed in the Mediterranean basin. *Virus Genes*, 42(3), pp. 415–421.
- ELÇI, E., Ç. U. SERÇE and K. ÇAĞLAYAN, 2013. Phylogenetic analysis of partial sequences from Fig mosaic virus isolates in Turkey. *Phytoparasitica*, 41(3), pp. 263–270.
- FLOCK, R. A. and J. M. WALLACE, 1955. Transmission of fig mosaic by the eriophyid mite *Aceria ficus*. *Phytopathology*, 45(1), pp.52–54.
- GARCÍA-ARENAL, F., A. FRAILE and J. M. MALPICA, 2001. Variability and genetic structure of plant virus populations. *Annual review of phytopathology*, 39(1), pp. 157–186.
- GATTONI, G., A. MINAFRA, M. A. CASTELLANO, A. DE STRADIS, D. BOSCIA, T. ELBEAINO, M. DIGIARO and G. P. MARTELLI, 2009. Some properties of Fig latent virus 1, a new member of the family Flexiviridae. *Journal of Plant Pathology*, pp. 555–564.
- GHORBANI, A., K. IZADPANA, R. A. AFSHARIFA and F. MEHDINIA, 2016. Phylogenetic study of Fig mosaic virus Lorestan isolate and detection of Closteroviruses associated. In *Proceedings of 22nd Iranian Plant Protection Congress*. p. 26.
- KARGAR, M. M. ZAKIAGHL, M. MASOUMI, M. MEHRVAR and K. IZADPANA, 2016. Analysis of genetic diversity of Grapevine fanleaf virus isolate

- from Fars and Kohgiluyeh-Boyer Ahmad provinces. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 52(3).
- KHOSHKHATTI, N., M. ABADKHAH and D. E. O. KOOLIVAND, 2016. Occurrence of Fig mosaic virus in fig orchards from Tarom region in Zanjan province. In *Proceedings of 22nd Iranian Plant Protection Congress*. p. 28.
- LANEY, A. G., M. HASSAN and I. E. TZANETAKIS, 2012. An integrated badnavirus is prevalent in fig germplasm. *Phytopathology*, 102(12), pp.1182–1189.
- MIELKE-EHRET, N. and H. P. MÜHLBACH, 2012. Emaravirus: a novel genus of multipartite, negative strand RNA plant viruses. *Viruses*, 4(9), pp.1515–1536.
- NOLASCO, G. and O. A. DE SEQUEIRA, 1991. Double-stranded RNA (dsRNA) associated with fig mosaic disease. In *Proceedings of the 4th Portuguese-Spanish Biochemistry Congress*, Lisbon, 1991.
- NOROZIAN, E., F. RAKHSHANDEHROO and M. SHAMS-BAKHS, 2014. Presence of fig leaf mottle-associated virus 3 in an Iranian fig Orchard. *Journal of Plant Pathology*, 96(4SUP), pp.4–131.
- ÖVERBY, A. K., R. F. PETTERSSON, and E. P. A. NEVE, 2007. The glycoprotein cytoplasmic tail of Uukuniemi virus (Bunyaviridae) interacts with ribonucleoproteins and is critical for genome packaging. *Journal of virology*, 81(7), pp.3198–3205.
- SCHNEIDER, W. L. and M. J. ROOSSINCK, 2001. Genetic diversity in RNA virus quasispecies is controlled by host-virus interactions. *Journal of virology*, 75(14), pp. 6566–6571.
- SHAHMIRZAIE, M. M., F. RAKHSHANDEHROO, H. R. ZAMANIZADEH and T. ELBEAINO, 2012. Current status of fig mosaic disease in Iran. *Journal of Phytopathology*, 160(7-8), pp.324–330.
- SHAHMIRZAIE, M., F. RAKHSHANDEHROO, H. R. ZAMANIZADEH, T. ELBEAINO and G. P. MARTELLI, 2010. First report of Fig mosaic virus from fig trees in Iran. *Journal of Plant Pathology*, 92(4), pp.S120–S120.
- SHI, X., A. KOHL, P. LI and R. M. ELLIOTT, 2007. Role of the cytoplasmic tail domains of Bunyamwera orthobunyavirus glycoproteins Gn and Gc in virus assembly and morphogenesis. *Journal of virology*, 81(18), pp.10151–10160.
- STOVER, E., M. ARADHYA, L. FERGUSON and C. H. CRISOSTO, 2007. The fig: overview of an ancient fruit. *HortScience*, 42(5), pp.1083–1087.
- TENTCHEV, D., E. VERDIN, C. MARCHAL, M. JACQUET, J. M. AGUILAR and B. MOURY, 2011. Evolution and structure of Tomato spotted wilt virus populations: evidence of extensive reassortment and insights into emergence processes. *Journal of general Virology*, 92(4), pp.961–973.
- WALIA, J. J., A. WILLEMSSEN, E. ELICI, K. CAGLAYAN, B. W. FALK and L. RUBIO, 2014. Genetic Variation and Possible mechanisms driving the evolution of worldwide Fig mosaic virus Isolates. *Phytopathology*, 104(1), pp. 108–114.
- ZARGHANI, S. N., M. SHAMS BAKHS, N. S. BASHIR, and T. WETZEL, 2013. Molecular characterization of whole genomic RNA2 from Iranian isolates of Grapevine fanleaf virus. *Journal of Phytopathology*, 161(6), pp.419–425.

تعیین ویژگی‌های مولکولی سه جدایه ویروس زردی بافت مرده‌ی باقلا به دست آمده از نخود در ایران

یلدا سخن سنج^۱، کاوه بنانج^۲✉، فرشاد رخشنده رو^۱ و علی آهون منش^۳

۱- به ترتیب دانشجوی دکتری و استادیار، گروه بیماری شناسی گیاهی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران؛

۲- استاد، بخش تحقیقات ویروس‌شناسی گیاهی، موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج

کشاورزی، تهران، ایران؛ ۳- استاد، موسسه آموزش عالی صنعتی فولاد، فولادشهر، اصفهان، ایران

(تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۹۶؛ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۶)

چکیده

زردی از علائم شایع در مزارع نخود در دنیا و ایران می باشد. ویروس زردی بافت مرده باقلا (*Faba bean necrotic yellows virus*, FBNYV) از جنس *Nanovirus* تیره *Nanoviridae* از عوامل ویروسی همراه با عارضه زردی می باشد. در سال‌های ۱۳۹۵-۱۳۹۴ نمونه‌های نخود با علائم زردی از استان‌های لرستان و کرمانشاه جمع آوری و پس از استخراج دی‌ان‌ا، آلودگی به نانو ویروس با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی در آنها ردیابی گردید. دی‌ان‌ا نمونه‌های آلوده از طریق روش دایره غلطان (RCA) تغلیظ و با انجام هضم آنزیمی محصول (RCA) توسط آنزیم برشی *Aat II* قطعات مختلف ژنومی ویروس با اندازه حدود یک کیلو جفت باز جداسازی گردید. قطعه ژنومی با اسامی DNA-R, DNA-S, DNA-C, DNA-U1, DNA-U2, DNA-N, DNA-M, DNA-U4 و DNA-U4 با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی FBNYV. تکثیر و تعیین ترادف گردید. مقایسه ترادف قطعات ۸ گانه در سه جدایه ایرانی FBNYV با ترادف‌های موجود در بانک ژن GenBank نشانگر شباهت زیاد جدایه‌های ایرانی با دو جدایه [FBNYV-[AZ; 12] و [FBNYV-[AZ; 13.5] از آذربایجان بود. درخت تبارزایی‌های رسم شده برای قطعات DNA-S, C, U1 نشانگر شباهت زیاد آنها با قطعات مشابه در جدایه آذربایجان [FBNYV-[AZ;12] و در گروه مستقل (II) از سایر جدایه‌های دنیا قرار گرفتند. ترادف قطعات DNA-R, M, N, U2, U4 جدایه‌های ایرانی با جدایه دیگری از آذربایجان [FBNYV-[AZ;13.5] بسیار شباهت داشته و در گروه مستقل (I) قرار گرفتند. تفاوت ژنتیکی بین دو جدایه آذربایجان در بین جدایه‌های ایرانی نیز مشاهده شد. نتایج بدست آمده فرضیه وقوع نوجوری بین جدایه‌های ایران و آذربایجان را حمایت می‌کند.

واژه‌های کلیدی: زردی، نخود، ویروس زردی بافت مرده‌ی باقلا.

Molecular characterization of three *Faba bean necrotic yellows virus* (FBNYV)

isolates, originated from chickpea in Iran

Y. SOKHANSANJ¹, K. BANANEJ²✉, F. RAKHSHANDEHROO¹ and A. AHOONMANESH³

1-PhD Student & Assistant Professor, Respectively; Department of Plant Pathology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran; 2- Professor, Department of Plant Virus Research, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran; 3- Professor, Foulad Institute Technology (FIT), Foulad-shahr, Isfahan-Iran

Abstract

Yellowing is one of the most prevalent symptoms in chickpea fields, worldwide and Iran. *Faba bean necrotic yellows virus* (FBNYV, genus *Nanovirus*, family *Nanoviridae*) is associated with the yellowing symptoms in the chickpea fields. During the survey of the Lorestan and Kermanshah provinces in May 2015-2016, chickpea plants showing yellowing symptoms were collected and total DNAs were extracted. The samples were checked for nanovirus infection by PCR, using nanovirus-specific degenerate primers. Total DNA preparations from the nanovirus-positive samples were used for RCA, using $\phi 29$ polymerase and restriction endonuclease *Aat II* digests yielding products of ~1kb corresponding to linearized nanovirus DNA components. FBNYV genomic components were amplified using RCA products and specific primers of eight different U1, M, N, C, S, R, U2, and U4 components. The amplified fragments were purified and sequenced. Nucleotide sequences of the eight different components of three Iranian isolates of FBNYV (Lor-28, Lor-1, and Ker-21) were compared with FBNYV sequences in GenBank. Sequence comparison indicated that Iranian isolates of FBNYV are most similar to Azerbaijan isolates of FBNYV: FBNYV-[AZ; 12], and FBNYV-[AZ; 13.5]. Phylogenetic analyses of nucleotide and deduced amino acid sequences of DNA-S, C, and U1 revealed that Iranian FBNYV isolates clustered with Azerbaijan isolate FBNYV-[AZ;12] (group II), while DNA-R, DNA-M, DNA-N, DNA-U2, and DNA-U4 clustered with FBNYV-[AZ; 13.5], (group I). Considering the genomic differences between two Azerbaijan isolates, which can be expected among Iranian isolates. These results may provide evidence of the reassortment occurrence among Iranian and Azerbaijan FBNYV isolates.

Key words: Chickpea, *Faba bean necrotic yellows virus*, yellowing

مقدمه

حبوبات یکی از منابع اصلی تأمین پروتئین در دنیا و ایران به شمار می‌آید. نخود *Cicer arietinum* از خانواده بقولات (*Fabaceae*) می‌باشد و یکی از مهم‌ترین منابع غذایی سرشار از پروتئین (۱۸ تا ۲۳ درصد) می‌باشد (Parsa and Bagheri, 2008). بر اساس آخرین آمارنامه سازمان خوار و بار کشاورزی سازمان ملل متحد (FAOSTAT, 2014)، کشور ایران از نظر میزان تولید نخود بعد از کشورهای هند، استرالیا، پاکستان و میانمار در مقام پنجم جهان قرار دارد (FAO, 2014). کشت نخود در اکثر مناطق ایران به استثنای سواحل دریای خزر کم و بیش معمول است و مهم‌ترین مناطق کشت آن عبارتند از: آذربایجان شرقی و غربی، قزوین، فارس، خراسان، کرمان، لرستان، کردستان و استان مرکزی. بر مبنای آخرین آمارنامه وزارت جهاد کشاورزی در سال‌های زراعی ۹۴-۱۳۹۳ نخود با ۴۶۳۰۰۰ هکتار (۷۲۶۹ هکتار آبی و ۴۵۵۷۳۱ هکتار دیم) بالاترین سطح زیر کشت را در میان سایر حبوبات دارا بوده است که از آن میزان ۱۹۳۰۰۰ تن نخود (۱۰۰۹۴ تن از زمین‌های کشت شده به صورت آبی و ۱۸۲۹۰۶ تن از زمین‌های کشت شده به صورت دیم) برداشت شده است (Anonymous, 2015).

ویروس‌های گیاهی از عوامل اصلی و محدود کننده کشت حبوبات در دنیا به شمار می‌آیند. ویروس زردی بافت مرده باقلا (FBNYV) از ویروس‌های شایع و خسارت‌زای مزارع حبوبات در غرب آسیا و شمال آفریقا می‌باشد و در سال‌های اپیدمی، ویروس زردی بافت مرده باقلا سبب خسارت‌های سنگین می‌شود. به عنوان مثال در کشور مصر در سال‌های ۱۹۹۲، و ۱۹۹۸ میلادی باعث کاهش میزان محصول به میزان بیش از ۹۰ درصد شده است (Makkouk and Kumari, 2009). ویروس زردی بافت مرده باقلا (FBNYV)، مهم‌ترین ویروس خسارت‌زا در مزارع عدس (*Lens culinaris* Medik.)، نخود (*C. arietinum* L.) و لوبیا (*Phaseolus vilgaris*) در بسیاری از کشورهای غرب آسیا و شمال آفریقا می‌باشد (Katul et al.,

1993; Makkouk et al., 1994; Makkouk et al., 1998a; 1998b; (Najar et al., 2000).

ویروس زردی بافت مرده باقلا اولین بار در سال ۱۹۸۸ از میزبان باقلا (*V. faba*) در منطقه Lattakia در سوریه گزارش شد و پس از آن در تعداد زیادی از کشورهای عربی غرب آسیا و شمال آفریقا نظیر اردن، اتیوپی، مصر، الجزیره و مراکش ثبت شد (Katul et al., 1993; Franz et al., 1995; 1996). تا چندی پیش تصور می‌شد این ویروس تنها در غرب آسیا و شمال آفریقا حضور دارد اما در سال ۲۰۰۰ این ویروس برای اولین بار در اروپا از اسپانیا (Babin et al., 2000) و پس از آن در سال ۲۰۰۹ (Kumari et al., 2009) از آذربایجان گزارش شد. ویروس زردی بافت مرده باقلا FBNYV یکی از اعضای جنس نانوویروس (*Nanovirus*) در تیره نانوویریده (*Nanoviridae*) می‌باشد. نانوویروس‌ها دارای ژنوم تک لای حلقوی از جنس دی‌ان‌ای (+SSDNA) و بصورت چند قطعه‌ای می‌باشند (multiple circular ssDNAs) که هر کدام بطور جداگانه در پیکره‌های چند وجهی (Small isometric virions) بسته‌بندی می‌شوند. ژنوم این ویروس از ۸ قطعه حلقوی تشکیل شده است، که تمامی این قطعات قطری در حدود ۲۰-۱۷ نانومتر دارند. پوشش پروتئینی این ویروس شامل یک پروتئین تک لایه ۲۰ کیلو دالتون است. قطعات ژنوم اندازه‌ای در حدود ۹۵۸ تا ۱۰۱۴ جفت باز دارند و شامل یک قاب خواندنی باز اصلی و یک ناحیه غیرکدکننده می‌باشند. ناحیه کد کننده دارای یک توالی پرموتر با TATA box می‌باشد و همچنین یک سیگنال پلی‌آدنین در انتها دارند و یک پروتئین را رمزگذاری می‌کنند. پروتئین آغاز کننده تکثیر و پروتئین اصلی همانندسازی، پروتئین پوششی، پروتئین تعدیل کننده سیکل سلولی، پروتئین انتقال هسته‌ای و پروتئین حرکتی (به ترتیب) توسط قطعات DNA-C، DNA-S، DNA-R، DNA-M و DNA-N بیان می‌شوند همچنین قطعات DNA-U1، DNA-U2 و DNA-U4 سه پروتئین با عملکرد ناشناخته را رمزگذاری می‌کنند (Aronson et al., 2000; Timchenko

باقلا و عدس در استان‌های کرمانشاه، کردستان، لرستان، مرکزی، اصفهان و چهارمحال و بختیاری توسط منصورپور و همکاران با استفاده از روش Nested-PCR و قطعه‌ای با اندازه ۳۸۷ جفت باز مربوط به DNA-1 تکثیر و تعیین ترادف گردید (Mansourpour *et al.*, 2010). علوی‌نژاد و همکاران در سال ۲۰۱۱ وجود این ویروس را در مزارع باقلا، لوبیا، یونجه، عدس و نخود در چند استان کشور ردیابی نموده و با تعیین ترادف بخشی از پروتئین پوششی (DNA-S) این ویروس نشان دادند که تنوع مولکولی قابل توجهی در این بخش از ژنوم ویروس در بین جدایه‌های ایرانی FBNYV مشاهده نمی‌شود (Alavinejad *et al.*, 2011). تا قبل از انجام این تحقیق، قطعه DNA-S جدایه نخود (Acc. No. AM493899) و جدایه باقلا فرامان (به ترتیب) و قطعه DNA-N جدایه نخود (Acc. No. AM493900) از لرستان (الشر) و کرمانشاه (درود AM493898) از لرستان (الشر) و جدایه باقلا کرمانشاه (درود فرامان) (Acc. No. AM493901) تعیین ترادف و در بانک ژن ثبت شده‌اند (بنانج و همکاران، داده‌های منتشر نشده).

در این تحقیق توالی قطعات ۸ گانه ژنوم ۳ جدایه ایرانی ویروس زردی بافت مرده باقلا تعیین و ارتباط و قرابت جدایه‌های ایرانی با سایر جدایه‌های FBNYV در دنیا بررسی شد.

روش بررسی

نمونه برداری: در سال زراعی ۹۵-۹۴ از برخی مزارع نخود در استان لرستان (الشر، نورآباد، خرم آباد، فیروزآباد، زاغه و بروجرد) و کرمانشاه (روانسر، کنگاور، هرسین، سرارود، کرند و اسلام آباد) بازدید و نمونه‌هایی با نشانه‌های زردی و کوتولگی (شکل ۱) (لرستان ۷۰ نمونه و کرمانشاه ۸۰ نمونه) جمع‌آوری و پس از ثبت مشخصات هر نمونه از قبیل نشانه‌های مشاهده شده، محل و تاریخ جمع‌آوری، نمونه‌های جمع‌آوری شده روی یخ به آزمایشگاه انتقال داده شد و در شرایط دمایی ۴ درجه سلسیوس تا هنگام انجام آزمایش‌های مربوطه نگهداری شد.

انتقال ویروس زردی بافت مرده باقلا توسط شته‌ها چرخشی (غیر تکثیری) می‌باشد (Franz *et al.*, 1999; Franz *et al.*, 1998). نشانه‌های ایجاد شده توسط ویروس زردی بافت مرده باقلا در نواحی سردسیر غالباً شامل زردی، کوتولگی و اختلال در تشکیل غلاف می‌باشد. ویروس زردی بافت مرده باقلا دارای دامنه میزبانی نسبتاً محدودی می‌باشد که اکثر آن‌ها گونه‌های مختلف لگوم‌ها می‌باشند. این ویروس بیش از ۵۰ گونه لگوم و تنها تعداد بسیار محدودی از گیاهان غیر لگوم (*Amaranthus spp.*, *Stellaria media*, *Arabidopsis thaliana* و *Malva spp.*) را در شرایط آزمایشگاهی و طبیعی آلوده می‌کند.

باقلا میزبان اصلی این ویروس است اما نخودفرنگی، لوبیا فرانسوی، لوبیا چشم بلبلی، نخود و عدس به صورت طبیعی توسط FBNYV آلوده می‌شوند (Makkouk *et al.*, 1992; Katul *et al.*, 1993; Franz *et al.*, 1995; Horn *et al.*, 1995). تا به حال ویروس زردی بافت مرده باقلا از کشورهای آذربایجان، اسپانیا، مراکش، مصر، سوریه، اتیوپی، تونس و ایران گزارش و تعیین ترادف شده است (جدول ۳). در ایران ویروس زردی بافت مرده باقلا از برخی مزارع نخود و عدس در پنج استان کشور (کرمانشاه، لرستان، کردستان، آذربایجان شرقی و غربی) و تعدادی از مزارع باقلا در یک منطقه از استان کرمانشاه (منطقه‌ای بین کرمانشاه و فرامان) گزارش شده است (Makkouk *et al.*, 2002). این ویروس در سال ۱۳۸۷ از مزارع نخود و عدس در استان‌های قزوین، کرمانشاه، کردستان، آذربایجان شرقی و غربی با استفاده از روش Tissue blot immunoassay (TBIA) گزارش شد (Vafaei *et al.*, 2008). در سال ۱۳۸۹ تعداد ۳۳۰ نمونه از مزارع نخود، لوبیا،

ستون اضافه و پس از گذشت ۲ دقیقه، میان‌گریز شد. نمونه‌های دی.ان.ای استخراج شده در دمای منفی ۲۰ درجه سلسیوس تا هنگام استفاده نگهداری شدند.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) با استفاده از نمونه‌های دی.ان.ای استخراج شده و جفت آغازگر اختصاصی جنس نانویروس (Kumari *et al.*, 2009) انجام شد (جدول ۱). واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر (10X)، یک میکرولیتر $MgCl_2$ ۵۰ میلی‌مولار، یک میکرولیتر dNTPs ده میلی‌مولار، یک میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای اختصاصی نانویروس‌ها، یک میکرولیتر از آنزیم (Taq DNA polymerase, 5u/μl) و ۲ میکرولیتر دی.ان.ای بود که با افزودن آب مقطر دوبار تقطیر به حجم رسانده شد. برنامه PCR برای ردیابی نانویروس‌ها شامل واسرشته‌سازی اولیه به مدت ۱ دقیقه در دمای ۹۵°C، و برنامه ۳۰ چرخه‌ای شامل دمای ۹۵°C به مدت ۴۵ ثانیه، دمای اتصال ۴۴°C به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه و سپس یک چرخه در دمای ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه بود. محصول PCR با الکتروفور در ژل آگارز یک درصد حاوی اتیدیوم برماید (به نسبت یک میکروگرم در میلی‌لیتر) در ۸۰ ولت ثابت به مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه بررسی، مشاهده و عکس برداری از قطعات تکثیر شده دی.ان.ای طی واکنش PCR با استفاده از دستگاه UV illuminator مدل ایماکو (هلند) انجام شد.

تغلیظ دی.ان.ای به روش دایره غلطان (RCA): در این تحقیق تغلیظ دی.ان.ای با استفاده از DNA پلیمرز باکتروفاز 29 (Rolling Circle Amplification, RCA) و بر اساس توصیه شرکت تولید کننده کیست (Amersham biosciences Templiphi™ 100 Amplification Kit) به شرح زیر انجام شد:

یک میکرولیتر از دی.ان.ای استخراج شده به عنوان الگو با ۴ میکرولیتر از بافر نمونه (Sample buffer) مخلوط و به مدت ۳ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس نگهداری و سپس مخلوط به مدت یک تا دو دقیقه روی یخ نگهداری و بعد از



شکل ۱- (A) مزرعه نخود فاقد علائم زردی (B و C) علائم زردی

و کوتولگی مشاهده شده در مزرعه نخود در استان لرستان منطقه نورآباد

Fig. 1. Noninfected chickpea field (A). Yellowing and dwarfing symptoms in the chickpea fields in Noorabad region, Lorestan province (B and C).

استخراج DNA و تعیین آلودگی نمونه‌های جمع‌آوری

شده با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR): استخراج دی.ان.ای کل گیاهی (Total DNA) با استفاده از کیت استخراج (Vivantis) GF-1 Plant DNA Extraction Kit بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده به شرح زیر انجام گرفت:

ده تا سی میلی‌گرم از بافت برگ‌های نخود با استفاده از ازت مایع در یک هاون له شده و پودر بدست آمده به لوله پلاستیکی انتقال و ۲۸۰ میکرولیتر از بافر PL اضافه و به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس گردید. ۲۰ میکرولیتر از پروتئیناز K به لوله پلاستیکی اضافه و پس از نگهداری مخلوط به مدت ۱ تا ۲ ساعت در دمای ۶۵ درجه، بلافاصله به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۶۰۰۰g میان‌گریز گردید. فاز رویی با ۲ حجم از بافر PB مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۵ درجه سلسیوس نگهداری شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از اتانول مطلق اضافه و بعد از انجام چند نوبت ورتکس، ۶۵۰ میکرولیتر از نمونه به ستون‌های تعبیه شده در کیت منتقل و به مدت ۱ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰g میان‌گریز و پس از حذف مایع زیری مجدداً میان‌گریز شد. سپس ستون با ۶۵۰ میکرولیتر از بافر شست‌وشو برای ۱ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰g میان‌گریز و پس از حذف مایع زیری مجدداً میان‌گریز شد. سپس ستون به یک لوله پلاستیکی جدید منتقل و ۳۰ میکرولیتر از آب سترون به

از مرحله قبل با استفاده از کیت DNA Recovery Kit-Vivantis از ژل استخراج و خالص سازی شد و جهت تعیین ترادف نوکلئوتیدی به شرکت MacroGen کشور کره جنوبی (توسط شرکت پیشگام) ارسال شد.

آنالیز فیلوژنتیکی: شباهت قطعات تعیین توالی شده با سایر توالی‌های موجود در بانک ژن GenBank با استفاده از موتور جستجوگر nBlast انجام شد. قطعات ژنومی جدایه ایرانی و سایر جدایه‌های ثبت شده در بانک ژن با استفاده از نرم افزار ClustalW هم‌ردیف سازی و پس از حذف نوکلئوتیدهای پوچ از درون توالی، درخت فیلوژنتیکی با استفاده از نرم افزار Mega6 (Tamura *et al.*, 2013) و به صورت neighbor-joining (Saitou and Nei, 1987) با ۵۰۰ بار تکرار ترسیم گردید. ویروس Banana bunchy top virus به عنوان عضو خارج از گروه (outgroup) تعیین شد. جدایه‌های مورد استفاده در مقایسه‌های نوکلئوتیدی و آمینواسیدی در این تحقیق در جدول ۳ ارائه شده است.

نتیجه و بحث

ردیابی نانوویروس‌ها: نتایج بدست آمده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز PCR با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی جنس نانوویروس (Kumari *et al.*, 2009)، نشانگر آلودگی ۱۳ و ۱۴ نمونه جمع‌آوری شده (به ترتیب کرمانشاه و لرستان) به جنس نانوویروس بود و قطعه‌ای با اندازه حدود ۷۵۰ جفت باز (bp) در ژل الکتروفورز مشاهده گردید (شکل ۲). آلودگی در تمام مناطق نمونه برداری به استثنا منطقه کرند (کرمانشاه) ردیابی شد.

تغلیظ دی.ان.ای به روش دایره غلطان (RCA): در این تحقیق تغلیظ دی.ان.ای با استفاده از روش دایره غلطان (RCA) انجام شد و مشاهده پلیمرهای خطی بر روی ژل الکتروفورز نشانگر تغلیظ دی.ان.ای در نمونه‌های آلوده به نانوویروس‌ها و مطابق با نتایج بدست آمده توسط Grigoras *et al.* (2009) بود (شکل ۳).

خنک شدن مخلوط، پنج میکرولیتر از بافر (Reaction buffer) و ۰/۲ میکرولیتر از محلول (Enzyme mix) که حاوی $\Phi 29$ DNA Polymerase بود به مخلوط سرد اضافه و مرحله بسط با نگهداری در دمای 30°C به مدت ۱۸ ساعت انجام شد. به منظور غیر فعال کردن آنزیم DNA Polymerase مخلوط در دمای 65°C به مدت ۱۰ دقیقه نگهداری شد.

هضم آنزیمی محصولات RCA: پس از مشاهده محصولات RCA در ژل آگارز ۱٪ و حصول اطمینان از انجام تغلیظ نمونه دی.ان.ای استخراج شده، محصول آر.سی.ای (RCA) با آنزیم برشی *Aat II* (Fermentas Co., Germany) که دارای یک جایگاه برشی برای جنس نانوویروس می‌باشد (Grigoras *et al.*, 2009)، طبق دستورالعمل شرکت سازنده مورد هضم آنزیمی قرار گرفته و قطعات حاصله پس از انجام الکتروفورز بررسی شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با هدف تعیین ماهیت قطعات

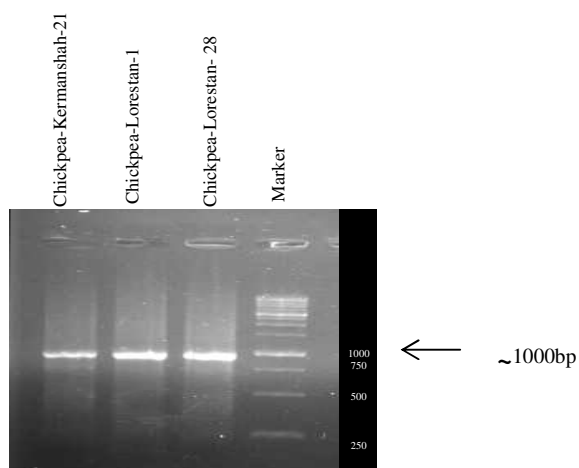
حاصله از هضم آنزیمی با آنزیم برشی *Aat II* با استفاده از هشت جفت آغازگر اختصاصی مربوط به قطعات ۸ گانه ژنوم FBVNYV (R,S,C,M,N,U1,U2,U4) (جدول ۲)، آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) برای قطعات حاصله از هضم آنزیمی با آنزیم برشی *Aat II* انجام شد. برنامه PCR شامل یک مرحله ابتدایی به مدت ۵ دقیقه در دمای 95°C جهت واسرشت سازی اولیه دی.ان.ای و یک برنامه ۳۵ چرخه‌ای شامل دمای 95°C به مدت ۳۰ ثانیه، دمای 55°C به مدت ۹۰ ثانیه و دمای 72°C به مدت ۲ دقیقه و سپس یک چرخه در دمای 72°C به مدت ۵ دقیقه بود.

محصول PCR در ژل آگارز یک درصد حاوی اتیدیوم برماید (به نسبت یک میکروگرم در میلی‌لیتر) در ۸۰ ولت ثابت به مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه الکتروفورز شد. مشاهده و عکس برداری از قطعات دی.ان.ای تکثیر یافته طی واکنش PCR با استفاده از دستگاه UV illuminator مدل ایماکو (هلند) انجام شد.

خالص سازی و تعیین توالی: محصول PCR بدست آمده

هضم آنزیمی دی‌ان‌ای تغلیظ شده با آنزیم برشی

Aat II: آنزیم برشی *Aat II* دارای یک جایگاه اختصاصی برشی در نانوویروس‌ها می‌باشد و هضم آنزیمی محصول RCA باعث برش قطعاتی با اندازه یک کیلو جفت باز هم اندازه با قطعات ژنومی در نانوویروس‌ها می‌شود (Grigoros *et al.*, 2009). نتایج بدست آمده از هضم آنزیمی محصول RCA در این تحقیق نیز مشابه با نتایج بدست آمده توسط Grigoros *et al.* (2009) بود و قطعاتی با اندازه‌ای حدود یک کیلو جفت باز (1kb) در ژل آگاروز یک درصد مشاهده و هم چنین نتایج PCR تأیید شد (شکل ۴) و بدین ترتیب آلودگی نمونه‌های جمع آوری شده با نشانه‌های زردی و کوتولگی به نانوویروس‌ها تأیید شد.

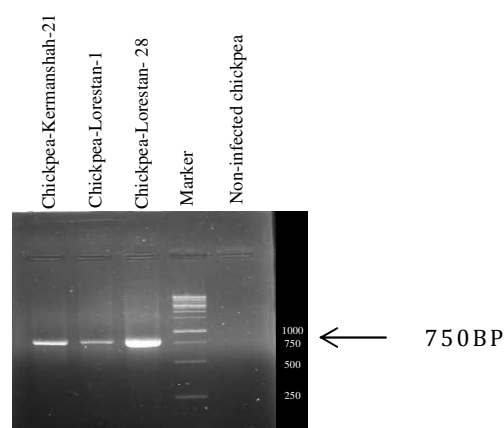


شکل ۴- نقوش الکتروفورزی هضم آنزیمی محصول RCA سه جدایه ایرانی FBNYV با آنزیم برشی *Aat II* قطعاتی به اندازه 1kb در هر راهک مشاهده می‌شود. نام میزبان و جدایه در بالای هر راهک نوشته شده است؛ نشانگر: DNA ladder mix (SMOBio, 1 Kb).

Fig. 4. Electrophoresis pattern of RCA products digestion using *AatII* restriction enzyme of 3 Iranian FBNYV isolates. Name of the host and isolate typed at the top of the each lane, Marker: DNA ladder mix (SMOBio, 1 Kb).

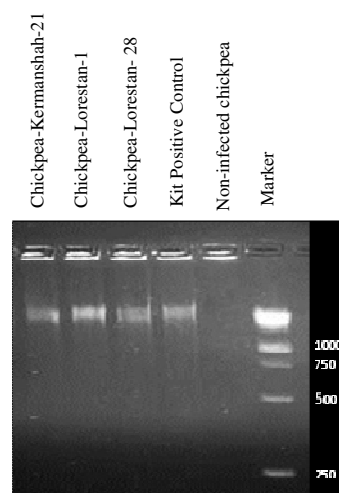
واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از ۸ جفت آغازگر

اختصاصی مربوط به قطعات ۸ گانه ژنوم جدایه ایرانی FBNYV: نتایج بدست آمده از PCR با استفاده از هشت جفت



شکل ۲- نقوش الکتروفورزی محصول PCR نمونه‌های نخود آلوده به نانوویروس تکثیر شده با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی جنس نانوویروس. نام میزبان و جدایه در بالای هر راهک نشان داده شده است؛ N: نمونه نخود سالم (عاری از ویروس)؛ نشانگر: DNA ladder mix (SMOBio, 1 Kb).

Fig. 2. Electrophoresis pattern of PCR product from Nanovirus-infected chickpea samples using Nanovirus specific primers. Name of the host and province and non-infected chickpea were typed at the top of each lane, Marker: DNA ladder mix (SMOBio, 1 Kb).



شکل ۳- نقوش الکتروفورزی دی‌ان‌ای تغلیظ شده با استفاده از روش دایره غلطان RCA مربوط به ۳ جدایه ایرانی FBNYV. نام میزبان و جدایه در بالای هر راهک نشان داده شده است؛ N: نمونه نخود سالم (عاری از ویروس)؛ شاهد مثبت: Kit positive control؛ نشانگر: DNA ladder mix (SMOBio, 1 Kb).

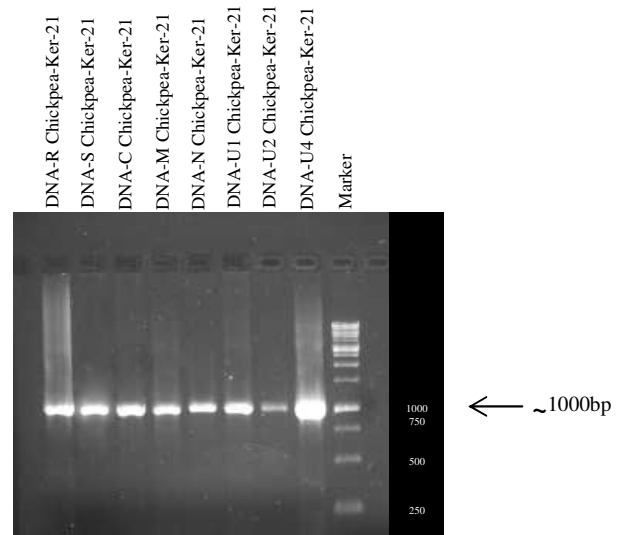
Fig. 3. Electrophoresis pattern of RCA product of 3 Iranian FBNYV isolates. Name of the host and isolate. None-infected chickpea typed at the top of each lane, Marker: DNA ladder mix (SMOBio, 1 Kb).

توالی و گزارش شده است (جدول ۳). FBNYV در ایران تا به حال از لوبیا، عدس، نخود، یونجه و باقلا گزارش شده است (Vafaei *et al.*, 2008; Mansourpour *et al.*, 2010; Alavinejad *et al.*, 2011). قطعه DNA-R با اندازه ۳۸۷ جفت باز تعیین توالی و گزارش شده است (Mansourpour *et al.*, 2010) با توجه به اطلاعات فوق و نتایج بدست آمده در این تحقیق، ۸ قطعه ژنوم جدایه ایرانی ویروس FBNYV برای اولین بار در ایران تکثیر و تعیین توالی شد. با توجه به اطلاعات موجود در GenBank تکثیر و تعیین توالی ۸ قطعه ژنوم FBNYV از میزبان نخود (*C. arietinum*) برای اولین بار در دنیا در این تحقیق انجام گرفت (جدول ۳).

موقعیت تاکسونومیکی جدایه‌های ایرانی ویروس

زردی بافت مرده باقلا: ترادف نوکلئوتیدی و آمینو اسید قطعات ۸ گانه ژنوم جدایه ایرانی با ترادف‌های ثبت شده در GenBank (جدول ۳) مقایسه گردید. نتایج بدست آمده نشانگر بیشترین میزان تشابه قطعه DNA-R جدایه‌های ایرانی (به ترتیب Lor-1, Lor-28 و Ker-21) به ترتیب $99/1\%$ ، $99/3\%$ و $99/3\%$ در ترادف نوکلئوتیدی و $98/7\%$ ، $98/8\%$ و $98/3\%$ در ترادف آمینواسیدی) با جدایه اتیوپی (Acc. No. HE663168) و جدایه آذربایجان (KC979009 و KC979000) به میزان $98/4\%$ تا $99/1\%$ در ترادف نوکلئوتیدی و 95% تا $97/4\%$ در ترادف آمینواسیدی) بود. قطعه DNA-S جدایه‌های نخود لرستان (Lor-1 و Lor-28) بیشترین تشابه نوکلئوتیدی ($99/1\%$ و $99/2\%$ به ترتیب) و آمینو اسیدی ($98/1\%$) را با جدایه ایرانی (لرستان) (Acc. No. AM493899) داشتند. جدایه کرمانشاه (Ker-21) بیشترین میزان تشابه نوکلئوتیدی و آمینواسیدی (به ترتیب $97/6\%$ و $93/9\%$) را با جدایه ایرانی کرمانشاه (Acc. No. AM493900) داشت همچنین این سه جدایه ایرانی (Ker-21 و Lor-1, Lor-28) به میزان $95/5\%$ تا $95/6\%$ در توالی نوکلئوتیدی و $89/9\%$ تا $90/2\%$ در توالی آمینواسیدی با جدایه آذربایجان (Acc. No. KC979001) شباهت داشتند. قطعه DNA-N در ۳ جدایه مورد بررسی

آغازگر اختصاصی قطعات ۸ گانه (R,S,C,M,N,U1,U2,U4) ژنوم FBNYV (Grigoras *et al.*, 2014)، نشانگر تکثیر قطعات ۸ گانه ژنوم جدایه‌های ایرانی ویروس زردی بافت مرده باقلا FBNYV بود و آلودگی نمونه‌های جمع آوری شده با نشانه‌های زردی و کوتولگی به FBNYV به اثبات رسید (شکل ۵). قطعات ۸ گانه ژنومی در هر سه جدایه نخود (کرمانشاه-۲۱)، جدایه نخود (لرستان-۱) و جدایه نخود (لرستان-۲۸) تکثیر گردید. تعیین ترادف قطعات ۸ گانه ژنوم ۳ جدایه ایرانی FBNYV نشان داد که طول قطعات بین ۹۸۷ تا ۱۰۰۵ نوکلئوتید می باشد (جدول ۴).



شکل ۵- نقوش الکتروفورزی محصول PCR قطعات ۸ گانه ژنوم

جدایه ایرانی FBNYV با استفاده از ۸ جفت آغازگر اختصاصی (Grigoras *et al.*, 2014). نام هر کدام از قطعات ۸ گانه، میزبان و جدایه در بالای هر راهک نشان داده شده است؛ نشانگر: DNA ladder mix (SMOBio, 1 Kb).

Fig. 5. Electrophoresis pattern of PCR products of 8 components of Iranian FBNYV isolate (ker-21) using specific primers (Grigoras *et al.*, 2014), name of the amplified fragments, host, and isolate typed at the top of the each lane. Marker: DNA ladder mix (SMOBio, 1 Kb).

بر اساس اطلاعات موجود در GenBank قطعات ۸ گانه ژنوم FBNYV تنها از کشورهای آذربایجان، اسپانیا، مراکش، مصر، سوریه، و تونس و از میزبان باقلا (*Vicia Faba*) (به جز یک جدایه عدس از آذربایجان (Acc. No. GQ351600)) تعیین

۹۸/۲٪ و ۹۸/۲٪ به ترتیب) و آمینواسیدی (۹۵/۱٪) را با جدایه آذربایجان (Acc. No. KC979005) داشتند. بیشترین میزان تشابه قطعه DNA-U2 در جدایه‌های لرستان (Lor-1) و Lor-28) و جدایه کرمانشاه (Ker-21) به میزان ۹۵/۹٪ تا ۹۷/۲٪ در توالی نوکلئوتیدی و ۸۸/۳٪ تا ۹۱/۹٪ در توالی آمینواسیدی با جدایه ویروس زردی بافت مرده باقلا از کشور آذربایجان (Acc.No. KC979006) و جدایه کشور اتیوی (Acc.No. HE663171) بود (جدول ۳). بیشترین میزان تشابه قطعه DNA-U4 در ۳ جدایه مورد بررسی (Lor-1، Lor-28، Ker-21) از لحاظ ترادف نوکلئوتیدی (۹۶/۳٪ تا ۹۹/۲٪) و از لحاظ ترادف آمینواسیدی (۹۲/۵٪ تا ۹۸/۴٪) با ۲ جدایه از کشور آذربایجان (Acc. No. KC979007, KC979017) بود (جدول ۳). درخت تبارزایی حاصل از مطالعات تبارزایی نشان داد که قطعه R جدایه‌های ایرانی مورد بررسی در این تحقیق به همراه جدایه‌های آذربایجان، اتیوی، تونس و اسپانیا در گروه I و جدایه‌های مراکش، تونس (یک جدایه)، سوریه و مصر در گروه II قرار گرفتند (شکل ۶).

(Lor-1، Lor-28 و Ker-21) دارای تشابه نوکلئوتیدی (۹۹/۵٪، ۹۹/۴٪ و ۹۷/۹٪ به ترتیب) و آمینواسیدی (۹۸/۷٪ و ۹۴٪ به ترتیب) با جدایه ایرانی (لرستان) (Acc. No. AM493898) بودند؛ هم‌چنین این سه جدایه از لحاظ ترادف نوکلئوتیدی (۹۶/۸٪، ۹۶/۹٪ و ۹۹٪ به ترتیب) و آمینواسیدی (۹۱/۳٪ و ۹۷/۳٪ به ترتیب) با جدایه ایرانی کرمانشاه (Acc. No. AM493901) مشابه بودند. قطعه DNA-C در جدایه‌های لرستان و کرمانشاه (Lor-1، Lor-28، Ker-21) بیشترین میزان تشابه از لحاظ ترادف نوکلئوتیدی (۹۵/۸٪، ۹۵/۷٪ و ۹۶/۱٪ به ترتیب) و از لحاظ ترادف آمینواسیدی (۸۸/۹٪، ۸۸/۵٪ و ۹۰/۲٪ به ترتیب) را با جدایه FBNYV از کشور آذربایجان (Acc. No. KC979002) داشتند. قطعه DNA-M در جدایه‌های (Lor-28 و Lor-1، Ker-21) بیشترین میزان تشابه را از لحاظ ترادف نوکلئوتیدی (۹۰/۸٪ تا ۹۳٪) و آمینواسیدی (۸۰/۴٪ تا ۸۶/۹٪) با ۳ جدایه از کشور آذربایجان (Acc. No. KC979018، KC 979003، KC 979012) داشتند. قطعه DNA-U1 در ۳ جدایه مورد بررسی در این تحقیق (Lor-1، Lor-28، Ker-21) بیشترین میزان تشابه از لحاظ ترادف نوکلئوتیدی (۹۸/۳٪،

جدول ۱- آغازگرهای استفاده شده در این تحقیق برای ردیابی نانویروس‌ها

Table 1. List of primer used in this study for detection of Nanoviruses

Primer	Sequence	Size (bp)	Reference
Nano_F103	5'-ATTGTATTTGCTAATTTA-3'	776	Kumari <i>et al.</i> , 2009
Nano_R101	5'-TTCCCTTCCACCTTGT_3'		

جدول ۲- آغازگرهای استفاده شده در این تحقیق برای تکثیر قطعات ژنومی ویروس زردی بافت مرده باقلا

Table 2. List of primer used in this study for detection of FBNYV

Primer	Sequence	Size(bp)	Reference
R-F	5'-CGAAGCTTCGAGGAGTATGTTAATTACGG-3'	~1000	Grigoras <i>et al.</i> , 2014
R-R	5'- TCGAAGCTTCGTGGAAAGTCGAAGAGCACT-3'		
S-F	5'- CTGTTCTAGAACACAGAGTTTATGT -3'	~1000	Grigoras <i>et al.</i> , 2014
S-R	5'-GTGTTCTAGAACAGCTTTAAGAGCA-3'		
C-F	5'- ATTGTCAACTGCAGTGAATTGGATAAATTA-3'	~1000	Grigoras <i>et al.</i> , 2014
C-R	5'- GCAGTTGACAATCATACCGTCTTCGTATGT-3'		
M-F	5'-TTGCGTCAACTGACCAGAACTCC-3'	~1000	Grigoras <i>et al.</i> , 2014
M-R	5'-CAGTGTGACGCAACTTCTCTC-3'		
N-F	5'-TGGATCTCGAGTCTCAGTACTTGAAGAAGG-3'	~1000	Grigoras <i>et al.</i> , 2014
N-R	5'-TGAGACTCGAGATCCAGGTTGAATGTCCTT-3'		
U1-F	5'-GTCTGAATTCGTTGAAGAGTCTTCTCC-3'	~1000	Grigoras <i>et al.</i> , 2014
U1-R	5'- TCAACGAATTCAGACTTGTGTTCTTCA-3'		
U2-F	5'- TATGAAGCTTTCGATGAGAGAATTG-3'	~1000	Grigoras <i>et al.</i> , 2014
U2-R	5'- TCGAAAGCTTCATACGCCTAATCGA-3'		
U4-F	5'- GACTTGATTCAAAGGTCGATGAAG-3'	~1000	Grigoras <i>et al.</i> , 2014
U4-R	5'- CAAGCGTCTTYAAATGCTGCATAAC-3'		

جدول ۳- درصد شباهت نوکلئوتیدی و آمینواسیدی قطعات هشت گانه جدایه‌های ایرانی ویروس زردی بافت مرده باقلا با سایر جدایه‌های ثبت شده در GenBank

(نمونه‌های C-Lor-1، C-Lor-28، و C-Ker-21 به ترتیب نخود ۱ لرستان، نخود ۲۸ لرستان و نخود ۲۱ کرمانشاه)

Table 3. Percentage of amino acid and nucleotide sequence identity of 8 genomic DNA of Iranian FBNYV isolates in compare of other FBNYV isolates available in GenBank (C-Lor-1: Chickpea of Lorestan No.1, C-Lor-28: Chickpea of Lorestan No.28, C-Ker-21: Chickpea of Kermanshah No.21)

Genome component	FBNYV Isolates			Iranian FBNYV Isolates					
	Host	Country	Acc. number	C-Lor-1		C-Lor-28		C-Ker-21	
				Nt (%)	aa (%)	nt (%)	aa (%)	nt (%)	aa (%)
DNA-C	<i>V. faba</i>	Azerbaijan	KC979011	94.3	85.6	94.4	85.9	94.7	87.0
	<i>V. faba</i>	Azerbaijan	KC979002	95.8	88.9	95.7	88.5	96.1	90.2
	<i>V. faba</i>	Spain	KC979021	93.5	84.6	93.4	84.3	93.2	83.4
	<i>V. faba</i>	Spain	KC979029	93.3	84.3	93.2	84.0	93.0	83.1
	<i>V. faba</i>	Spain	KC979037	93.6	85.0	93.5	84.6	93.0	82.4
	<i>V. faba</i>	Morocco	GQ274023	92.6	82.4	92.5	82.0	92.4	82.1
	<i>V. faba</i>	Egypt	NC003559	89.9	79.4	89.8	79.1	89.7	78.5
	<i>V. faba</i>	Egypt	AJ132179	89.8	79.4	89.7	79.1	89.5	77.9
	<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431393	92.5	82.0	92.4	81.7	92.4	81.4
	<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431392	92.6	82.0	92.5	81.7	92.7	82.1
	<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431391	92.5	82.0	92.4	81.7	92.6	82.1
	<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431390	92.5	82.0	92.4	81.7	92.4	81.4
	<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431389	93.1	83.3	93.0	83.0	92.6	81.4
	<i>V. faba</i>	Syria	KX431388	91.6	78.4	91.5	78.1	91.4	77.9
	<i>V. faba</i>	Syria	KX431387	91.6	78.4	91.5	78.1	91.2	76.5
DNA-M	<i>V. faba</i>	Spain	KC979022	89.4	74.4	89.2	74.4	90.4	78.8
	<i>V. faba</i>	Spain	KC979038	89.2	76.0	89.2	76.0	90.6	77.2
	<i>V. faba</i>	Spain	KC979030	89.5	75.4	89.5	75.4	90.9	78.8
	<i>V. faba</i>	Azerbaijan	KC979003	91.0	80.8	91.2	80.8	90.8	80.4
	<i>V. faba</i>	Azerbaijan	KC979018	93.5	86.9	93.8	86.9	93.0	85.2
	<i>V. faba</i>	Azerbaijan	KC979012	90.9	80.5	91.1	80.5	91.0	80.4
	<i>V. faba</i>	Morocco	GQ274027	89.4	73.4	89.6	73.4	91.0	76.8
	<i>V. faba</i>	Ethiopia	AF159705	81.0	69.9	81.2	73.4	80.8	72.3
	<i>V. faba</i>	Egypt	NC_003562	80.4	62.3	80.6	62.3	82.4	65.9
	<i>V. faba</i>	Egypt	AJ132182	80.2	60.1	80.4	60.1	82.2	63.0
	<i>V. faba</i>	Syria	Y11407	83.2	65.5	83.4	65.5	84.9	69.5
	<i>V. faba</i>	Syria	KX431394	82.1	58.1	82.3	58.1	83.2	61.1
	<i>V. faba</i>	Syria	KX431395	82.2	58.8	82.4	58.8	83.3	61.7
	<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431400	89.0	76.4	89.0	76.4	90.3	77.2
	<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431399	89.1	74.8	88.9	74.8	89.8	75.6
	<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431398	89.1	77.3	89.1	77.3	90.5	78.5
	<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431397	88.9	75.7	88.9	75.7	90.3	76.8
<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431396	88.4	75.6	88.4	75.6	89.4	75.9	
DNA-N	<i>Cicer arietinum</i>	Iran	AM493898	99.5	98.7	99.4	98.7	97.9	94.0
	<i>V. faba</i>	Iran	AM493901	96.8	91.3	96.9	91.3	99.0	97.3
	<i>V. faba</i>	Azerbaijan	KC979004	92.2	81.5	92.3	81.5	93.3	87.5
	<i>V. faba</i>	Azerbaijan	KC979013	91.4	84.9	91.5	84.9	92.9	86.0
	<i>V. faba</i>	Spain	KC979023	91.8	82.9	91.9	82.9	92.9	85.2
	<i>V. faba</i>	Spain	KC979031	91.8	82.6	91.9	82.6	92.9	84.9
	<i>V. faba</i>	Spain	KC979039	91.8	82.2	91.9	82.2	93.0	85.2
	<i>V. faba</i>	Morocco	GQ274030	92.4	84.0	92.5	84.0	93.4	86.3
	<i>V. faba</i>	Egypt	NC_003566	92.2	79.8	92.3	79.8	93.5	82.5
	<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431403	92.2	83.9	92.3	83.9	93.3	86.2
	<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431404	92.2	84.3	92.3	84.3	92.9	85.0
	<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431405	92.2	83.9	92.3	83.9	93.3	86.2
	<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431406	92.3	83.9	92.4	83.9	93.4	86.2
	<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431407	92.2	83.6	92.3	83.6	93.3	85.9

	<i>V. faba</i>	Syria	KX431402	90.9	78.3	91.0	78.3	93.2	82.3
	<i>V. faba</i>	Syria	KX431401	90.9	78.0	91.0	78.0	93.2	82.0
DNA-R	<i>V. faba</i>	Azerbaijan	KC979000	98.8	96.7	99.0	97.4	98.4	95.0
	<i>V. faba</i>	Azerbaijan	KC979009	98.9	96.7	99.1	97.4	98.5	95.0
	<i>V. faba</i>	Spain	KC979019	97.5	92.4	97.3	91.7	97.1	90.7
	<i>V. faba</i>	Spain	KC979027	97.7	93.0	97.5	92.4	97.3	91.4
	<i>V. faba</i>	Spain	KC979035	97.7	93.0	97.5	92.4	97.3	91.4
	<i>V. faba</i>	Ethiopia	HE663168	99.3	98.7	99.1	98.0	99.3	98.3
	<i>V. faba</i>	Morocco	GQ274025	97.5	93.7	97.5	93.7	97.4	92.0
	<i>V. faba</i>	Egypt	NC_003560	96.0	89.4	96.0	89.4	96.2	89.4
	<i>V. faba</i>	Egypt	AJ132180	95.9	88.1	95.9	88.1	96.1	88.4
	<i>V. faba</i>	Syria	Y11407	96.2	90.1	96.2	90.1	96.4	90.1
	<i>V. faba</i>	Syria	KX431380	96.2	90.6	96.2	90.6	96.5	90.3
	<i>V. faba</i>	Syria	KX431381	96.1	90.3	96.1	90.3	96.4	89.9
	<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431382	97.4	92.4	97.2	91.7	97.0	90.7
	<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431383	97.2	90.7	97.0	90.1	96.6	89.1
	<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431384	95.8	87.7	95.8	87.7	95.9	86.8
	<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431385	97.3	91.7	97.1	91.0	96.7	90.0
	<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431386	97.2	91.4	97.0	90.7	96.8	89.7
DNA-S	<i>Cicer arietinum</i>	Iran	AM493899	99.1	98.1	99.2	98.1	96.6	92.7
	<i>V. faba</i>	Iran	AM493900	94.7	87.3	94.8	87.3	97.6	93.9
	<i>V. faba</i>	Azerbaijan	KC979001	95.5	89.9	95.6	89.9	95.6	90.2
	<i>V. faba</i>	Azerbaijan	KC979010	87.9	72.8	87.8	72.8	90.3	77.0
	<i>V. faba</i>	Azerbaijan	GQ371215	89.3	81.0	89.1	81.5	92.2	88.3
	<i>Lens culinaris</i>	Azerbaijan	GQ351600	89.0	81.3	88.9	81.2	92.3	88.5
	<i>V. faba</i>	Spain	KC979020	87.8	72.5	87.9	72.5	90.4	77.3
	<i>V. faba</i>	Spain	KC979028	87.8	72.5	87.9	72.5	90.4	77.3
	<i>V. faba</i>	Spain	KC979036	87.4	72.1	87.5	72.1	89.9	76.9
	<i>V. faba</i>	Spain	DQ830990	91.6	85.4	91.7	85.6	93.2	87.0
	<i>V. faba</i>	Ethiopia	HE663169	87.2	70.4	87.3	70.4	89.7	75.5
	<i>V. faba</i>	Morocco	GQ274028	87.7	71.9	87.6	71.9	90.2	76.7
	<i>V. faba</i>	Egypt	NC_003563	88.2	73.9	88.3	73.9	90.4	78.0
	<i>V. faba</i>	Egypt	AJ132183	88.3	73.9	88.4	73.9	90.5	77.7
	<i>V. faba</i>	Syria	Y11408	88.0	74.0	88.1	74.0	90.3	78.8
	<i>V. faba</i>	Syria	KX431408	85.5	70.4	85.6	70.4	87.4	73.9
	<i>V. faba</i>	Syria	KX431409	86.2	72.0	86.3	72.0	88.1	75.5
	<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431410	87.9	72.8	88.0	72.8	90.5	77.9
	<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431411	87.6	71.8	87.7	71.8	90.2	76.9
	<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431412	87.7	72.8	87.8	72.8	90.3	77.9
	<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431413	87.5	71.8	87.5	71.8	90.0	76.9
	<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431414	87.8	73.1	87.9	73.1	90.4	78.2
DNA-U1	<i>V. faba</i>	Azerbaijan	KC979005	98.3	95.1	98.2	95.1	98.2	95.1
	<i>V. faba</i>	Azerbaijan	KC979014	89.8	76.8	89.9	76.5	89.8	75.8
	<i>V. faba</i>	Spain	KC979024	89.2	75.5	89.1	76.1	89.6	76.8
	<i>V. faba</i>	Spain	KC979032	89.1	75.2	89.0	75.8	89.5	76.5
	<i>V. faba</i>	Spain	KC979040	89.4	74.8	89.3	75.5	89.8	76.1
	<i>V. faba</i>	Ethiopia	HE663170	88.8	72.9	88.9	72.5	88.8	72.5
	<i>V. faba</i>	Morocco	GQ274026	87.9	69.6	87.8	70.3	88.1	70.3
	<i>V. faba</i>	Egypt	NC_003561	87.1	69.3	87.4	68.6	87.1	68.3
	<i>V. faba</i>	Egypt	AJ132181	87.1	69.3	87.4	68.6	87.1	68.3
	<i>V. faba</i>	Syria	Y11406	87.8	73.9	87.9	73.9	87.8	73.2
	<i>V. faba</i>	Syria	KX431415	87.4	73.9	87.5	73.9	87.2	72.5
	<i>V. faba</i>	Syria	KX431416	87.2	72.5	87.3	72.5	87.0	71.6
	<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431417	89.4	75.2	89.3	75.8	89.8	76.8
	<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431418	88.9	73.2	88.8	73.9	89.3	74.5
	<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431419	88.8	73.5	89.1	72.9	88.8	72.5
<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431420	89.0	73.9	88.9	74.5	89.4	75.2	
<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431421	89.0	73.5	88.9	74.2	89.4	74.8	
DNA-U2	<i>V. faba</i>	Azerbaijan	KC979006	97.1	91.6	97.1	91.6	97.2	91.9

<i>V. faba</i>	Azerbaijan	KC979015	92.3	80.6	92.3	80.6	92.6	81.9
<i>V. faba</i>	Spain	KC979025	91.4	77.9	91.4	78.3	91.7	78.9
<i>V. faba</i>	Spain	KC979033	91.3	77.5	91.3	77.9	91.5	78.2
<i>V. faba</i>	Spain	KC979041	91.7	79.2	91.7	79.5	92.0	79.9
<i>V. faba</i>	Ethiopia	HE663171	96.1	89.0	95.9	88.3	96.4	89.6
<i>V. faba</i>	Morocco	GQ274029	90.6	77.6	90.4	77.3	90.6	77.5
<i>V. faba</i>	Egypt	NC_003564	79.0	59.2	79.0	58.9	79.3	59.7
<i>V. faba</i>	Egypt	AJ132184	79.1	59.2	79.1	58.9	79.4	60.1
<i>V. faba</i>	Syria	Y11409	85.4	69.1	85.6	69.5	85.7	69.1
<i>V. faba</i>	Syria	KX431422	87.5	73.2	87.6	73.2	87.8	73.2
<i>V. faba</i>	Syria	KX431423	90.4	77.5	90.6	78.5	90.9	78.9
<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431424	90.9	77.2	91.1	77.9	91.4	78.5
<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431425	90.7	78.5	90.9	79.5	91.2	79.8
<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431426	87.6	73.2	87.7	73.2	87.9	73.2
<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431427	90.1	76.1	90.3	76.8	90.6	78.1
<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431428	90.9	79.2	91.1	80.2	91.4	80.5
<i>V. faba</i>	Azerbaijan	KC979007	99.1	98.4	99.2	98.4	98.4	96.1
<i>V. faba</i>	Azerbaijan	KC979016	93.4	88.4	93.5	88.4	93.7	87.5
<i>V. faba</i>	Azerbaijan	KC979017	96.6	93.5	96.5	93.5	96.3	92.5
<i>V. faba</i>	Spain	KC979034	89.4	78.2	89.3	78.2	89.4	79.4
<i>V. faba</i>	Spain	KC979042	89.3	78.2	89.2	78.2	89.3	79.4
<i>V. faba</i>	Spain	KC979026	89.3	78.2	89.2	78.2	89.3	79.4
<i>V. faba</i>	Morocco	GQ274024	88.0	78.2	87.9	78.2	88.3	77.8
<i>V. faba</i>	Egypt	NC_024457	83.2	67.8	83.1	67.8	83.3	68.6
<i>V. faba</i>	Egypt	AJ749902	83.2	67.8	83.1	67.8	83.3	69.0
<i>V. faba</i>	Syria	AJ749903	84.2	70.7	84.1	70.7	84.3	72.5
<i>V. faba</i>	Syria	KX431429	86.0	71.3	85.9	71.3	86.1	72.9
<i>V. faba</i>	Syria	KX431430	86.2	72.6	86.1	72.6	86.3	74.2
<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431431	89.0	77.9	89.1	77.9	89.3	79.4
<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431432	88.9	77.9	89.0	77.9	89.2	79.4
<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431433	88.9	77.9	89.0	77.9	89.2	79.4
<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431434	88.6	77.9	88.7	77.9	88.9	79.4
<i>V. faba</i>	Tunisia	KX431435	89.1	77.9	89.2	77.9	89.4	79.4

DNA-U4

آذربایجان (Acc. No. KC979003, Acc. No. KC979018) و Acc. No. KC979012) با هم در یک زیر گروه از گروه I قرار گرفتند (شکل ۶).

در درخت تبارزایی قطعه U1 جدایه‌های ایرانی مورد بررسی در این تحقیق به همراه یک جدایه از کشور آذربایجان (Acc. No. KC979005) با هم در یک زیر گروه از گروه II قرار گرفتند (شکل ۶). درخت تبارزایی قطعه U2 نشان داد که ۳ جدایه ایرانی FBNYV مورد بررسی با جدایه کشور آذربایجان (Acc. No. KC979006) و جدایه اتیوپی (Acc. No. HE663171) در یک زیر گروه از گروه I قرار گرفتند (شکل ۶). درخت تبارزایی قطعه U4 نشان داد که ۳ جدایه ایرانی FBNYV مورد بررسی با ۲ جدایه از کشور آذربایجان (Acc. No. KC979007, Acc. No. KC979017) در یک زیر گروه از گروه I قرار گرفتند (شکل ۶).

درخت تبارزایی قطعه S نشان داد که ۳ جدایه ایرانی FBNYV مورد بررسی در این تحقیق با دو جدایه ایران (لرستان (Acc. No. AM493899) و کرمانشاه (Acc. No. AM493900) و جدایه آذربایجان (Acc. No. KC979001) در یک گروه (گروه II) قرار گرفتند (شکل ۶).

در درخت تبارزایی قطعه N جدایه‌های ایرانی مورد بررسی در این تحقیق به همراه جدایه‌های ایرانی (Acc. No. AM493898 و Acc. No. AM493901) با هم در یک زیر گروه از گروه I قرار گرفتند (شکل ۶).

درخت تبارزایی قطعه C نشان داد که ۳ جدایه ایرانی FBNYV مورد بررسی در این تحقیق با جدایه کشور آذربایجان (Acc. No. KC979002) در یک گروه (گروه II) قرار گرفتند (شکل ۶). در درخت تبارزایی قطعه M جدایه‌های ایرانی مورد بررسی در این تحقیق به همراه ۳ جدایه از کشور



شکل ۶- درخت تبارزایی حاصل از تطابق ترادف نوکلئوتیدی قطعات ژنوم جدایه‌های ویروس زردی بافت مرده باقلا (FBNYV) با سایر ترادف‌های نوکلئوتیدی ثبت شده از این ویروس با استفاده از نرم افزار MEGA6. اعداد کنار شاخه‌ها درصد ارزش Bootstrap در میان ۱۰۰ تکرار را نشان می‌دهند. از ویروس Banana bunchy top virus (BBTV) به عنوان ویروس خارج از گروه (outgroup) استفاده شد.

Fig. 6. Phylogenetic tree obtained from the alignment of nucleotide sequences of Faba bean necrotic yellow virus (FBNYV) isolates compare with other isolate of this virus using MEGA6 program. Numbers on the branches indicate bootstrap percentage. In Phylogenetic analysis Banana bunchy top virus (BBTV) were used as outgroup.

(گروه II) قرار گرفته‌اند اما قطعه (DNA-N) در سه جدایه ایرانی بیشترین شباهت را با دو جدایه ایرانی FBNYV-[IR;1] و FBNYV-[IR;2] (بنانج و همکاران، داده‌های منتشر نشده) داشته و تشکیل یک زیرگروه مستقل در گروه I را داده‌اند (شکل ۶). قطعات (R، M، U2 و U4) در ۳ جدایه ایرانی با هر دو جدایه آذربایجان FBNYV-[AZ;12] و FBNYV-[AZ;13.5] مشابهت داشته و در یک زیرگروه در گروه I قرار گرفته‌اند (شکل ۶). گریگورایس و همکاران گزارش کرده‌اند که احتمالاً جدایه FBNYV-[AZ;13.5] تیپ معمولی FBNYV (type common) در منطقه دریای خزر و ایران می‌باشد (Grigoras *et al.*, 2014) درحالی که درخت تبارزایی‌های ترسیم شده خلاف مطلب فوق می‌باشد به‌طوری‌که قطعات (S، C و U1) بیشترین شباهت را با جدایه FBNYV-[AZ;12]، قطعات (R، M، U2 و U4) در ۳ جدایه ایرانی با هر دو جدایه آذربایجان FBNYV-[AZ;12] و FBNYV-[AZ;13.5] مشابهت داشته و قطعه N در سه جدایه ایرانی مورد بررسی در این تحقیق بیشترین شباهت را با دو جدایه ایرانی FBNYV-[IR;1] و FBNYV-[IR;2] داشته و در یک زیرگروه از گروه I قرار گرفته‌اند. علت وجود تنوع قطعات در جدایه‌های ایرانی را می‌توان به وقوع پدیده نوجوری (reassortment) نسبت داد. حضور هم‌زمان جدایه‌های مختلف یکی از پیش شرط‌های وقوع نوجوری و نوترکیبی (recombination) در میان جدایه‌های ویروسی خصوصاً در تیره ویروس‌های دوقلو *Geminiviridae* و تیره نانوویریده *Nanoviridae* می‌باشد. با توجه به تشخیص آلودگی در ایران (Makkouk *et al.*, 2002) در مقایسه با آذربایجان (Grigoras *et al.*, 2009) و هم چنین سابقه کشت نخود در ایران می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که احتمالاً جدایه‌های مختلفی از ویروس زردی بافت مرده باقلا در ایران وجود دارد و برای دستیابی به وضعیت چگونگی تکامل طبیعی، تعیین منشأ ویروس و ارتباط آن با جدایه‌های آذربایجان نیاز به انجام نمونه‌برداری‌های بیشتر می‌باشد.

جدول ۴- اندازه قطعات مختلف ژنوم جدایه‌های ایرانی ویروس

زردی بافت مرده باقلا

Table 4- Genomic Fragments size of Iranian isolates of Faba bean necrotic yellows virus

Isolate	Component	Size of DNA (nts)
	R	1003
	S	1005
	C	993
Chickpea-Lor-1,	M	992
Chickpea-Lor-28,	N	987
Chickpea-Ker-21	U1	987
	U2	987
	U4	989

مقایسه ترادف ۳ جدایه از اسپانیا و یک جدایه از مراکش نشانگر شباهت زیاد آنها با یکدیگر و احتمال انتقال آن از مراکش به جنوب اروپا می‌باشد. علاوه بر این، این جدایه‌ها ممکن است نمایانگر تیپ معمولی FBNYV (type common) در مراکش و جنوب غربی اروپا باشد (Grigoras *et al.*, 2014). تاکنون قطعات ۸ گانه ژنوم دو جدایه FBNYV از کشور آذربایجان به نام‌های FBNYV-[AZ;12] و FBNYV-[AZ;13.5] تعیین ترادف شده‌اند. جدایه‌های آذربایجان در یک گروه مستقل بین جدایه‌های خاورمیانه (سوریه و مصر) از یک طرف و اسپانیا و مراکش از طرف دیگر قرار گرفته‌اند. تفاوت ژنتیکی دو جدایه مذکور بیش از تفاوت ژنتیکی جدایه‌های اسپانیا و مراکش با یکدیگر می‌باشد در حالیکه فاصله محل نمونه برداری دو جدایه آذربایجان تنها ۵۰۰ متر بوده است. مقایسه ترادف قطعات (DNA-S و DNA-N) جدایه آذربایجان FBNYV-[AZ;12] نشانگر شباهت زیاد با جدایه ایران FBNYV-[IR;1] (لرستان-الشترا، Acc. No. AM493899 and Acc. No. AM493898) بود در حالیکه جدایه FBNYV-[AZ;13.5] بیشترین شباهت را با جدایه ایران FBNYV-[IR;2] (کرمانشاه) (Acc. No. AM493900) و Acc. No. AM493901 داشت (Grigoras *et al.*, 2014). درخت تبارزایی‌های حاصل از تطابق ترادف نوکلئوتیدی قطعات ژنوم ۳ جدایه ایرانی FBNYV (شکل ۶) نشانگر آن است که علاوه بر قطعه (DNA-S)، قطعات (C و U1) جدایه‌های ایرانی مورد مطالعه در این تحقیق نیز بیشترین شباهت را با جدایه FBNYV-[AZ;12] از آذربایجان داشته و در یک گروه مستقل

References

- ALAVINEJAD, E., S. A. A. BEHJATNIA, K. IZADPANAH and M. MASOUMI, 2011. Molecular detection of *Faba bean necrotic yellows virus* in legume fields of some North, North West and South provinces of Iran. The 7th National Biotechnology Congress of I. R. Iran. 6 pp. (in Persian with English summary).
- ANONYMOUS, 2015. Statistical annual report of Iranian agricultural crops (in Persian).
- ARONSON, M. N., A. D. MEYER, J. GYRGYEV, L. KATUL, H. J. VETTEN, B. GRONENBORN and T. TIMCHENKO, 2000. Clink, a nanovirus-encoded protein, binds both pRB and SKP1. *Journal of Virology*, No. 74: 2967-2972.
- BABIN, M., V. ORTIZ, S. CASTRO and J. ROMERO, 2000. First detection of *faba bean necrotic yellows virus* in Spain. *Plant Dis*, No.84: 707.
- FAOSTAT, 2014. Prunus production: National Agricultural statistics Service, USDA.
- FRANZ, A., K. M. MAKKOUK and H. J. VETTEN, 1995. *Faba bean necrotic yellows virus* naturally infects Phaseolus bean and cowpea in the coastal area of Syria. *Journal of Phytopathology*, No. 143(5):319-320.
- FRANZ, A., K. M. MAKKOUK, L. KATUL and H. J. VETTEN, 1996. Monoclonal antibodies for the detection and differentiation of *faba bean necrotic yellows virus* isolates. *Ann Appl Biol.*, No.128: 255-268.
- FRANZ, A., K. M. MAKKOUK and H. J. VETTEN, 1998. Acquisition, retention and transmission of faba bean necrotic yellows virus by two of its aphid vectors, *Aphis craccivora* (Koch) and *Acyrtosiphon pisum* (Harris). *Journal of Phytopathology*, NO. 146(7): 347-355.
- FRANZ, A., F. VAN DER WILK, M. VERBEEK, A. M. DULLEMANS and J. F. J. M. VAN DEN HEUVEL, 1999. Faba bean necrotic yellows virus (genus Nanovirus) requires a helper factor for its aphid transmission. *Virology*, NO. 262: 210-219.
- GRONENBORN, B. 2004. *Nanoviruses: genome organization and protein function*. *Veterinary Microbiology*, NO. 98: 103- 109.
- GRIGORAS, I., A. L. GINZO, D. P. MARTIN, A. VARSANI, J. ROMERO, V. A. CH. MAMMADO, I. M. HUSEYNOVA, J. A. ALIYEV, A. KHEYRPOUR, H. HUSS, H. ZIEBELL, T. TIMCHENKO, H. J. VETTEN, and B. GRONENBORN, 2014. Genome diversity and evidence of recombination and reassortment in nanoviruses from Europe. *Journal of General Virology*, NO.95:1178-1191.
- GRIGORAS, I., T. TIMCHENKO, L. KATUL, A. GRANDE-PEREZ, H. J. VETTEN and B. GRONENBORN, 2009. Reconstitution of authentic nanovirus from multiple cloned DNAs. *Journal of Virology* .NO.83: 10778-10787.
- HORN, N. M., K. M. MAKKOUK, S. G. KUMARI, J. F. VAN DEN HEUVEL and D. V. R. REDDY, 1995. Survey of chickpea (*Cicer arietinum* L.) for chickpea stunt disease and associated viruses in Syria, Turkey and Lebanon. *Phytopathologia Mediterranea*, NO. 34: 192-198.
- KATUL, L., H. J. VETTEN, E. MAISS, K. M. MAKKOUK, D. E. LESEMANN and R. CASPER, 1993. Charecteristics and serology of virus-like particles associated with faba bean necrotic yellows. *Annals of Applied Biology*, NO. 123: 629- 647.
- KOONIN, E. V. and T. V. ILYINA, 1992. Geminivirus replication proteins are related to prokaryotic plasmid rolling circle DNA replication initiator proteins. *Journal of General Virology*, NO. 73(10):2763-2766.
- KUMARI, S. G., N. ATTAR, E. MUSTAFAYEV and Z. AKPAROV, 2009. First report of *faba bean necrotic yellows virus* affecting legume crops in Azerbaijan. *Plant Disease*, NO. 93: 1220.
- MAKKOUK, K. M., S. G. KUMARI and R. AL-DAOUD, 1992. Survey of viruses affecting lentil (*Lens culinaris* Med.) in Syria. *Phytopathologia Mediterranea*, NO.31(3): 188-190.
- MAKKOUK, K. M., Y. FAZLALI, S. G. KUMARI and S. FARZADFAR, 2002. First record of *Beet western yellows virus*, *Chickpea chlorotic dwarf virus*, *Faba bean necrotic yellows virus* and *Soybean dwarf virus* infecting chickpea and lentil crops in Iran. *Plant*

- Pathology, NO. 51: 387-387.
- MAKKOUK, K. M., L. RIZKALLAH, M. MADKOUR, M. EL-SHERBEENY, S. G. KUMARI, A. W. AMRITI and M. B. SOHL, 1994. Survey of faba bean (*V. faba* L.) for viruses in Egypt. *Phytopathologia Mediterranea*, NO. 33(3): 207-211.
- MAKKOUK, K. M., B. M. MUHAMMAD and R. JONENS, 1998a. First Record of *Faba Bean Necrotic Yellow Virus* and *Beet Western Yellow Luteovirus* Affecting Lentil and Chickpea in Pakistan. *Plant disease of APS. Journals*. NO. 5:591.
- MAKKOUK, K. M., L. KATUL, S. G. KUMARI and H. J. VETTEN, 1998b. Characterization and control of faba bean necrotic yellows nanovirus affecting legume crops in west Asia and North Africa. In: *Proceedings of the Eighth Turkish Phytopathological Congress*, 21-25 September, 1998. Turkey: Ankara University. NO. 210-217.
- MAKKOUK, K. and S. KUMARI, 2009. Epidemiology and integrated management of persistently transmitted aphid-borne viruses of legume and cereal crops in West Asia and North Africa *Virus Research* Vol.141 (2), Pages, 29-218.
- MANSOURPOUR, M., A. MASSAH, A. AHOONMANESH and M. R. LAK, 2010. Detection and determination of certain molecular properties of *Faba bean necrotic yellows virus* in central and western provinces of Iran. 19th Iranian Plant Protection Congress, Karaj, Iran, p 769, (in Persian with English summary).
- NAJAR, A., K. M. MAKKOUK and S. G. KUMARI, 2000. First record of *faba bean necrotic yellows virus* and *beet western yellows virus* infecting faba bean in Tunisia. *Plant Disease*, NO. 84(9):1046.
- PARSA, M. and A. BAGHERI, 2008. *Pulses*. Jihad Daneshgahi Publication. 522p.(in Persian).
- SAITOU, N. and M. NEI, 1987. The neighbour-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. NO.4: 406-425.
- TAMURA, K., G. STECHER, D. PETERSON, A. FILIPSKI and S. KUMAR, 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. NO.30(12): 2725-2729.
- TIMCHENKO, T., L. KATUL, Y. SANO, F. DE KOUCHKOVSKY, H. J. VETTEN and B. GRONENBORN, 2000. The master Rep concept in nanovirus replication: identification of missing genome components and potential for natural genetic reassortment. *Virology*, NO. 274: 189-195.
- VAFAEI, S. H., N. AZADBAKHT, N. SHAHRAEEN and N. HAJI, 2008. Survey virus disease of chickpea and lentil in province of Lorestan. 18th Iranian Plant Protection Congress, Hamedan, Iran.525. (In Persian with English summary).

پاسخ بویایی زنبور پارازیتوئید *Habrobracon hebetor* به مواد فرار حشره میزبان و میوه انار در شرایط آزمایشگاهی

فاطمه شفق^۱، سید حسین گلدان‌ساز^۱✉ و آرمان آوند فقیه^۲

۱- به ترتیب دانشجوی دکتری و دانشیار، گروه گیاهپزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران؛

۲- دانشیار، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۹۶؛ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۹۷)

چکیده

رفتارهای جستجوگری دشمنان طبیعی مانند شناسایی و پذیرش میزبان به مواد فرار شیمیایی ترشح و متصاعد شده از مجموعه گیاه-میزبان ارتباط دارد. شناسایی چنین ترکیباتی در درک و تفسیر پاسخ‌های رفتاری پارازیتوئیدها نقش مهمی را ایفا می‌نمایند. در مطالعه حاضر، پاسخ‌های بویایی ماده‌های پارازیتوئید *Habrobracon hebetor* به بوهای مرتبط با میزبان شامل کرم گلوگاه انار، میوه انار و مواد فرار استخراج شده از آن‌ها با روش هوادهی در بویایی سنج دوطرفه Y شکل مورد بررسی قرار گرفت. تیمارها شامل لارو سن آخر کرم گلوگاه، فضولات لاروی، انار آلوده به کرم گلوگاه و انار با صدمه مکانیکی، بودند. نتایج نشان داد که لارو سن آخر و فضولات لاروی از بیشترین جلب‌کنندگی برای پارازیتوئید برخوردار بودند. از نظر مدت زمان سپری شده تا انتخاب یکی از تیمارها توسط زنبور، بین انار ترکیده (مکانیکی) با سایر تیمارها اختلاف معنی‌دار وجود داشت. همچنین در بررسی رایحه‌ی ناشی از ترکیبات استخراج شده از تیمارهای مختلف توسط حلال هگزان، تیمارهای همراه با لارو سن آخر کرم گلوگاه انار، فضولات لارو و انار آلوده اختلاف معنی‌داری را در جلب زنبور در مقایسه با شاهد (هوای پاک) نشان دادند. بر اساس نتایج تحقیق حاضر و اطلاعات تکمیلی در زمینه شناسایی ترکیب (ترکیبات) موثر در جلب زنبور پارازیتوئید امکان افزایش کارایی زنبور در شرایط طبیعی فراهم می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: انار، بویایی سنج، پیام رسان‌های شیمیایی، کرم گلوگاه، *Habrobracon hebetor*.

Olfactory responses of parasitoid wasp *Habrobracon hebetor* to volatile compounds of host insect and pomegranate fruit under laboratory conditions

F. SHAFAGHI¹, S. H. GOLDANSAZ¹✉ and A. AVAND FAGHIH²

1. PhD. Student & Associate Professor, Respectively; Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran; 2-Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

Abstract

Foraging natural enemies rely on semiochemicals from a plant-host complex for recognition and acceptance of host, thus, key compounds that mediate behavioral response of parasitoids must be identified. We studied the choice time and olfactory responses of *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae) females to the host odors, the Carob moth *Ectomyelois ceratoniae*, pomegranate fruit and extracted hexane associated with them performed by passing a stream of air in a Y-shaped olfactometer. The treatments were last instar larvae of carob moth, its faeces, infested pomegranate and pomegranate with mechanical damages. The results showed that *H.hebetor* preferred carob moth larvae and its faeces. There was significant difference of parasitoids choice time between pomegranate with mechanical damages and other treatment. The results of extracted hexane odor indicated that, the odors spread from the larvae, its faeces and infested pomegranate exhibited significant differences in wasp attraction, compared with the clean air. Based on the results and complementary information on detection of the effective attractants of the parasitoid wasps, the efficacy of the wasp can be increased in the field.

Key words: Carob moth, *Habrobracon hebetor*, olfactometer, pomegranate, semiochemical.

مقدمه

کرم گلوگاه انار *Ectomyelois ceratoniae* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae)، یک آفت مهم میوه و خشکبار با دامنه میزبانی وسیع، در سراسر دنیا می‌باشد (Al-Izzi *et al.*, 1985). این حشره، به خرما، پسته، انار، بادام، انجیر، مرکبات و سیب در دنیا خسارت وارد می‌کند (Warner *et al.*, 1990; Shakeri, 1993; Vetter *et al.*, 1997; Mehrnejad, 2002) و به عنوان مهم‌ترین آفت انار در ایران شناخته شده است (Shakeri, 1993). دشمنان طبیعی نسبتاً فعالی در باغ‌های انار ایران وجود دارند (Kishani-Farahani *et al.*, 2010; Poorjavad *et al.*, 2012; Saadat *et al.*, 2014; Nobakht *et al.*, 2015). زنبور *Habrobracon hebetor* (Say) (Hymenoptera: Braconidae) یک اکتوپارازیتوئید لاروی همه جازی است که به عنوان یکی از عوامل کنترل بیولوژیک این آفت، در باغ‌های انار ایران حضور دارد (KiShani-Farahani *et al.*, 2010; Nobakht *et al.*, 2015).

پارازیتوئیدها و شکارگرهای گیاه‌خوار برای فعالیت در یک محیط چندمنظوره تکامل یافته‌اند، در نتیجه فیزیولوژی و رفتارشان تحت تاثیر چند سطح تغذیه‌ای قرار دارد که شامل گیاهخواران (سطح دوم تغذیه) و گیاهان مورد تغذیه گیاهخواران (سطح اول تغذیه) می‌باشد، از این رو، دشمنان طبیعی جستجو برای یافتن میزبان را بر اساس اطلاعاتی که از این منابع به دست می‌آورند، پایه‌گذاری می‌نمایند (Vet and Dicke, 1992). بنابراین، اثر بخش بودن استفاده از زنبور پارازیتوئید در برنامه کنترل بیولوژیک تا اندازه زیادی به روابط متقابل بین محیط، گیاه و حشره آفت بستگی دارد. این روابط به واسطه مواد شیمیایی ایجاد می‌شوند (Colazza *et al.*, 1997). طی جستجو برای یافتن میزبان، پارازیتوئیدها عموماً از مواد شیمیایی مترشحه توسط گیاه میزبان، میزبان و مواد همراه با میزبان، تأثیر می‌پذیرند (Madden, 1968; Godfray, 1994; Colazza *et al.*, 2004). از جمله این مواد شیمیایی، ترکیبات آلی فراری هستند که از گیاهان آسیب‌دیده توسط گیاه‌خواران متصاعد می‌شوند (سینومون‌ها) و می‌توانند پارازیتوئیدها را به

سمت میزبان‌شان هدایت کنند (Tumlinson *et al.*, 1992; Fadamiro, 2014; Godfray, 1994; Ode, 2006; Morawo and Hilker and Fatouros, 2015). از طرف دیگر، تعداد زیادی از پارازیتوئیدها، میزبان‌های متناسب با خود را از طریق جهت‌یابی به سمت طیفی از سیگنال‌های شیمیایی که اساساً در ارتباط با میزبان هستند (کایرومون‌ها) پیدا می‌کنند. در برخی موارد، این پیام‌رسان‌ها به طور مستقیم با مرحله زندگی میزبان مرتبط نیستند، اما به محدود نمودن حوزه مورد جستجوی پارازیتوئیدها کمک می‌کنند (Godfray, 1994). از جمله این منابع می‌توان فضولات میزبان را نام برد. در توانایی حشرات پارازیتوئید برای استفاده از فضولات میزبان، به عنوان یک جلب‌کننده و یا متوقف‌کننده، تفاوت‌هایی دیده می‌شود (Mandour, 2014). با این حال، گزارش‌های متعددی وجود دارند، مبنی بر این‌که فضولات آفات یک عامل قوی در جلب دشمنان طبیعی می‌باشند (Tang, 2016; Mandour, 2014; Tang *et al.*, 2009). شناسایی پیام‌رسان‌های شیمیایی مانند کایرومون‌ها، سینومون‌ها و غیره، نخستین و اصلی‌ترین مرحله تحقیقات در زمینه اکولوژی شیمیایی حشرات می‌باشد. تحقیق حاضر به بررسی مواد فراری می‌پردازد که سبب جلب زنبور پارازیتوئید *H. hebetor* به سمت کرم گلوگاه انار می‌شود تا بر مبنای اطلاعاتی که حاصل می‌شود بتوان موفقیت‌های بیشتری را در کنترل این آفت در باغ‌های انار کشور به دست آورد.

روش بررسی

جمع‌آوری و پرورش حشرات: انارهای آلوده به کرم گلوگاه انار (رقم ملس ساوه) از باغ‌های انار ساوه جمع‌آوری و به آزمایشگاه بخش حشره‌شناسی موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور (تهران) منتقل شد. در آزمایشگاه انارها بررسی و لاروها، جدا شده و به داخل ظروف پلاستیکی شفاف به ابعاد $13 \times 19 \times 6$ Cm که درب آن‌ها جهت تهویه هوا به ابعاد 1×2 Cm سوراخ و با پارچه توری پوشانده شده‌بود، منتقل شد. تغذیه و پرورش لاروها، با پسته رقم فندق و در

لاروی، انارهای آلوده به لارو و انار بدون لارو ولی ترکیده به صورت مکانیکی، با استفاده از روش هوادهی (Rochat et al., 2004) به مدت سه روز انجام شد. دستگاه استخراج به ترتیب شامل پمپ تولید هوا، ذغال فعال، ظرف شیشه‌ای حاوی آب اسمز، ظروف شیشه‌ای حاوی تیمارها، لوله‌های شیشه‌ای حاوی پلیمر جذب کننده بوهای شیمیایی و دبی سنج فشار هوا بود که توسط شیلنگ‌های تفلون به یکدیگر متصل شده بودند. جریان هوا پس از عبور از روی ذغال فعال برای فیلتراسیون و نیز عبور از روی آب به منظور مرطوب سازی از طریق شیلنگ‌های پلاستیکی تفلونی وارد ظروف شیشه‌ای حاوی تیمارها می‌شد. جریان هوای مرطوب سبب می‌شد بوهای متصاعد شده از لاروها، فضولات و میوه‌های انار وارد لوله‌های شیشه‌ای حاوی پلیمر جذب کننده، شوند. جهت استخراج، تیمارهای مذکور به تفکیک درون ظروف شیشه‌ای مخصوص که به شکل استوانه و دارای دو انتهای باریک برای اتصال شلنگ و لوله‌های شیشه‌ای باریک بودند، قرار گرفتند. سپس پلیمر جذب کننده بوهای شیمیایی (ماده ساپلپاک تی ام-۲ ساخت شرکت ساپلکو آمریکا) داخل لوله‌های شیشه‌ای باریک (مقدار ۳۰۰ میلی‌گرم در هر لوله) ریخته شد. در دو انتهای لوله‌های شیشه‌ای مقداری پشم شیشه سترون قرار داده شد به طوری که جریان هوا قادر به عبور از آن باشد. لوله‌های شیشه‌ای از یک طرف به ظروف شیشه‌ای حاوی تیمارها و از طرف دیگر به شیلنگ‌های خروجی دستگاه اندازه‌گیری جریان هوا متصل و در اتاق پرورش حشرات در دمای 25 ± 1 درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۶۰-۵۰ درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی به ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. فشار جریان هوا روی ۱۵۰ میلی لیتر در دقیقه تنظیم شد. پس از گذشت سه روز، لوله‌های شیشه‌ای حاوی پلیمر جذب کننده باز شدند و به هر کدام از آن‌ها یک میلی لیتر حلال هگزان با درجه خلوص ۹۸ درصد (ساخت شرکت مرک آلمان) اضافه شد. حلال با عبور از پلیمر جذب کننده، سبب شسته شدن مواد جذب شده می‌گردید. محلول‌های به دست آمده در

اتاقی با شرایط ثابت (دمای 28 ± 1 درجه سلسیوس، رطوبت نسبی 60 ± 10 درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی به ۸ ساعت تاریکی) انجام شد.

به منظور پرورش زنبور پارازیتوئید *H. hebetor* در شرایط آزمایشگاهی، از لاروهای سن آخر شب‌پره مدیترانه‌ای آرد *Ephestia kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) به عنوان میزبان جایگزین استفاده شد. کلنی اولیه‌ی شب‌پره مدیترانه‌ای آرد از آزمایشگاه حشره‌شناسی گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه تهران (پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج) به دست آمد و در شرایط ثابت (دمای 28 ± 1 درجه سلسیوس، رطوبت نسبی 60 ± 10 درصد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی به ۸ ساعت تاریکی) نگهداری شد. غذای مورد استفاده برای پرورش این شب‌پره شامل یک کیلوگرم آرد کامل گندم و سه گرم مخمر آبجو (ناب مایه، ساخت ایران) بود (Attaran, 1996). برای جمع‌آوری زنبور، انارهای پای درختان از باغ‌های جلال‌آباد واقع در نجف‌آباد اصفهان ($32.611558\text{ N}, 51.313986\text{ E}$) جمع‌آوری و به آزمایشگاه انتقال داده شدند. لاروهای فلج شده کرم گلوگاه انار که حاوی تخم پارازیتوئید مورد نظر بودند، درون ظروف پلاستیکی شفاف استوانه‌ای به قطر ۸ و ارتفاع ۱۲ سانتی‌متر قرار گرفتند و روی ظروف تا زمان ظهور حشرات کامل پارازیتوئید با پارچه توری پوشانده شد. زنبورها جهت شناسایی به بخش رده‌بندی موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور فرستاده شد. جهت پرورش زنبورها، ده عدد لارو سن آخر شب‌پره مدیترانه‌ای آرد به همراه یک جفت زنبور نر و ماده یک روزه، به داخل ظروف شفاف به قطر ۸ و ارتفاع ۱۲ سانتی‌متر منتقل و دهانه ظروف با پارچه‌ی توری مسدود شد. جهت افزایش جمعیت پارازیتوئید، لاروهای شب‌پره‌ی مدیترانه‌ای آرد یک روز در میان تعویض می‌شدند. تغذیه حشرات کامل زنبور، به وسیله پنبه آغشته به آب و عسل ۲۰ درصد انجام شد.

استخراج ترکیبات فرار: عملیات استخراج ترکیبات فرار تولیدی توسط لاروهای سن آخر کرم گلوگاه انار، فضولات

شیشه‌های دیگر جمع‌آوری و تا زمان انجام آزمایش در ۱۸- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

شرایط آزمایش و مشخصات بویایی سنج: برای انجام این آزمایش‌ها از یک بویایی‌سنج Y شکل استفاده شد که جنس آن از شیشه پیرکس به قطر داخلی ۲۸ میلی‌متر بود. بازوی اصلی ۱۶ سانتی‌متر و هریک از بازوهای فرعی ۲۱ سانتی‌متر طول داشتند. بازوهای فرعی به منبع رایحه متصل شدند. جریان هوا معادل ۱۵۰ میلی‌لیتر در دقیقه توسط پمپ باد، ایجاد شد (Dweck *et al.*, 2010) و پس از تصفیه توسط ذغال فعال، توسط آب اسمز مرطوب گردید و در هر دو بازوی بویایی‌سنج جریان یافت. پس از هر پنج تست، بازوهای بویایی‌سنج جابه‌جا می‌شد تا عدم تقارن سبب خطای احتمالی نشود. پس از ۱۵ آزمایش، محفظه‌های نگهداری رایحه‌ها جابه‌جا می‌شدند. تمامی آزمایش‌ها بین ساعت ۹ صبح تا ۵ بعد از ظهر انجام شدند. ساعت انجام هر تکرار، به صورت چرخشی بین تیمارها تغییر می‌کرد. زنبورهایی که پس از ورود به بویایی‌سنج، حداقل پنج دقیقه در بازوی اصلی می‌ماندند و هیچکدام از بازوهای فرعی را انتخاب نمی‌کردند، از آزمایش حذف می‌شدند. دمای اتاق بویایی‌سنجی 25 ± 1 درجه سلسیوس و رطوبت نسبی بین ۵۰ تا ۷۰ درصد تنظیم شد.



شکل ۱- بویایی‌سنج Y شکل مورد استفاده در آزمایش‌ها
Fig. 1. Y-tube olfactometer used in the experiments

بودند، ولی لارو آفت جهت تخم‌ریزی در اختیارشان قرار داده نشده بود. تیمارهای مورد بررسی عبارت بودند از:

الف- لارو سن آخر کرم گلوگاه در یک بازو قرار گرفت و به تناوب با فضولات لاروی، انار آلوده به لارو، و انار بدون لارو ولی ترکیده به صورت مکانیکی به عنوان سه تیمار در بازوی دیگر بویایی‌سنج مقایسه شد.

ب- فضولات لارو سن آخر کرم گلوگاه در یک بازو قرار گرفت و به تناوب با انار آلوده به لارو و انار بدون لارو ولی ترکیده به صورت مکانیکی به عنوان دو تیمار در بازوی دیگر بویایی‌سنج مقایسه شد.

ج- انار آلوده به لارو با انار بدون لارو ولی ترکیده به صورت مکانیکی مقایسه شد.

۲- زمان دسترسی به بوی جلب‌کننده‌ها: زمان لازم جهت انتخاب هر یک از بازوهای بویایی‌سنج همانند آزمایش قبلی، توسط زنبور با یکدیگر مورد مقایسه قرار گرفت. زمان، توسط کرنومتر دستی ثبت شد. زمان از لحظه‌ای که زنبور وارد بویایی‌سنج می‌شد تا زمانی که وارد یکی از بازوها می‌گردید و حداقل ۱۱ سانتی‌متر به جلو می‌رفت، محاسبه شد. برای اطمینان از عدم انتخاب تصادفی، نصف به علاوه ۱ سانتی‌متر از طول بازوی فرعی به عنوان معیار انتخاب گردید. هر آزمایش شامل ۴۵ تکرار بود.

۳- بررسی تاثیر مواد فرار استخراج شده روی واکنش‌های رفتاری زنبور *H. hebetor*: این بخش از آزمایش‌های بویایی‌سنجی با یک میکرولیتر از محلول حاصل از استخراج هریک از تیمارها، به ازای هر تکرار روی کاغذ صافی به ابعاد ۱×۱ Cm در مقایسه با هوای پاک، با ۳۰ زنبور ماده جفت‌گیری کرده در بویایی‌سنج انجام شد.

تجزیه‌های آماری: داده‌های مربوط به بویایی‌سنجی به کمک آزمون χ^2 و داده‌های مربوط به زمان جستجوگری با تبدیل لگاریتمی و با استفاده از رویه ANOVA یک طرفه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون Tukey-HSD انجام شد. نرم‌افزار SAS Ver. 9.1 برای تجزیه و

۱- واکنش رفتاری زنبور پارازیتوئید به لاروهای میزبان، فضولات لاروی و میوه‌های انار: هر آزمایش با ۴۵ زنبور ماده‌ی جفت‌گیری کرده انجام شد که حداکثر ۷۲ ساعت از ظهورشان گذشته بود. این زنبورها با آب عسل تغذیه شده

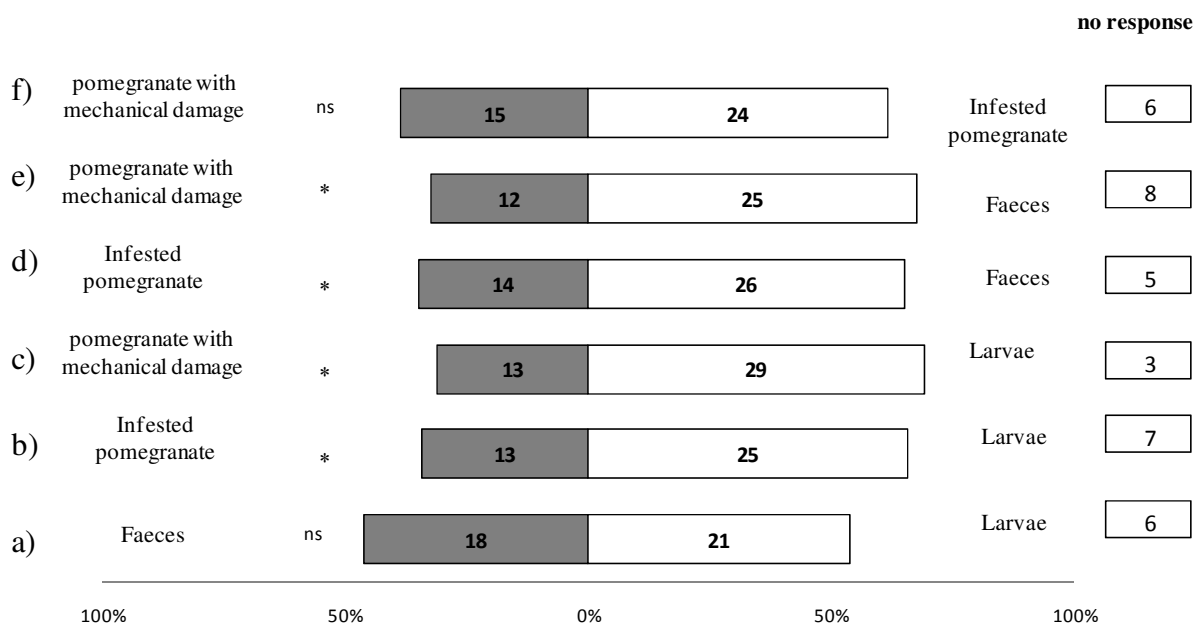
سمت بازویی که لارو در آن قرار داشت، جلب شدند (به ترتیب $Z=2.46, P=0.0136$ و $Z=2.137, P=0.032$) (شکل‌های ۲c و ۲b).

مقایسه زوج فضولات لارو سن آخر کرم گلوگاه و انار آلوده به لارو نشان دهنده اختلاف معنی دار بین دو تیمار بود به طوری که ۶۵٪ زنبورها (۲۶ عدد) فضولات را انتخاب نمودند ($Z=2.0817, P=0.0374$) (شکل ۲d) مقایسه پاسخ بویایی به فضولات و انار دچار آسیب مکانیکی نشان دهنده اختلاف معنی دار بین دو تیمار بود به طوری که $Z=2.137, P=0.032$ (۶۸٪ زنبورها به فضولات پاسخ دادند) (شکل ۲e). مقایسه بین دو تیمار انار آلوده به لارو با انار دارای آسیب مکانیکی نشان دهنده تفاوت معنی دار بین دو تیمار نبود هرچند که ۶۲٪ یعنی ۲۴ عدد زنبورها، بازوی منتهی به انار آلوده را برگزیدند ($Z=1.622, P=0.1048$) (شکل ۲f).

تحلیل آماری داده‌ها استفاده شد (SAS Institute, 2001). نمودارها با کمک نرم‌افزار Microsoft Excel 2007 رسم شدند.

نتیجه و بحث

۱- پاسخ بویایی زنبور پارازیتوئید *H. hebetor* به لاروهای میزبان، فضولات لاروی و میوه انار: مقایسه واکنش زنبور پارازیتوئید به لاروهای سن آخر کرم گلوگاه انار و فضولات این آفت نشان داد که ۵۴ درصد از زنبورهای ماده (۲۱ عدد) بازوی منتهی به لاروهای سن آخر و ۴۶ درصد از آن‌ها (۱۸ عدد) بازوی منتهی به فضولات را انتخاب نمودند که از نظر قدرت جلب‌کنندگی، بین این دو تیمار اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($Z=0.4804, P=0.639$) (شکل ۲a). مقایسه بین لاروهای سن آخر کرم گلوگاه انار با انارهای آلوده به این لارو، و همچنین لاروهای سن آخر با انار دچار آسیب مکانیکی، نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین آنها بود به طوری که به ترتیب ۶۶ و ۶۹ درصد (۲۵ و ۲۹ عدد) از زنبورها به



شکل ۲- درصد پاسخ‌های زنبورهای پارازیتوئید ماده *Habrobracon hebetor* به هریک از بازوهای بویایی سنج حاوی تیمارهای مختلف (اعداد نوشته شده روی هر بازو، تعداد افراد جلب شده به آن تیمار را نشان می‌دهد)

Fig. 2. The percentage responses of female parasitoid wasps *Habrobracon hebetor* to either olfactometer arm contain different treatments (Numbers in bars are the total numbers of parasitoids responding to each odor source)

و انار با آسیب مکانیکی دارای اختلاف معنی‌دار بودند و زنبورها در زمان کوتاه تری بازوی منتهی به لارو را انتخاب نمودند ($F_{40}=5.29, P = 0.026$) (جدول ۱).

مقایسه زمان انتخاب بین دو بازوی بویایی سنج حاوی دو تیمار فضولات لاروهای سن آخر کرم گلوگاه انار و انارهای آلوده به لاروها نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار بود ($F_{38}=0.03, P = 0.873$)، در حالی که بین دو تیمار فضولات لاروها و انارهای دچار صدمه مکانیکی، زمان انتخاب زنبورها برای رسیدن به بازوی فضولات به صورت معنی‌داری از زمان انتخاب بازوی مقابل کوتاه‌تر بود ($F_{35}=4.58, P = 0.039$) (جدول ۱). در بین دو تیمار انارهای آلوده به لارو و انارهای دارای صدمه مکانیکی، پارازیتوئیدها با اختلاف معنی‌دار در زمان کوتاه‌تری انارهای آلوده را انتخاب نمودند ($F_{38}=9.57, P = 0.038$) (جدول ۱).

همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، در مدت زمان انتخاب بازوهای از بویایی سنج که حاوی بوی جلب‌کننده برای زنبور بود، بین انارهای دچار آسیب مکانیکی و سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود داشت، اما بین سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. این رفتار زنبور، شاید بدین دلیل باشد که سایر تیمارها به نوعی با لاروهای کرم گلوگاه انار در ارتباط بوده‌اند و رایحه‌های ناشی از وجود لاروها، چه به صورت مستقیم (لاروهای سن آخر و انارهای آلوده به لارو) و چه به صورت غیرمستقیم (فضولات لاروهای سن آخر) سبب تسریع در جلب شدن و انتخاب بازوی مورد نظر زنبور شده است.

نتایج به دست آمده تا حدی مشابه تحقیقات انجام شده توسط Mandour (2014) و Mbata *et al.* (2017) می‌باشند. ماندور ثابت کرد که پارازیتوئید *Cotesia kariyai* Watanabe (Hymenoptera: Braconidae) از نظر زمانی، در انتخاب بین دو تیمار گیاه سالم و گیاه سالم به همراه فضولات میزبان *Mythimna separata* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) و دو تیمار گیاه آلوده به لارو بدون حضور فضولات، در مقایسه با

یافته‌های این تحقیق نقش بالقوه ترکیبات شیمیایی فرار را در جلب دشمنان طبیعی نشان دادند. زنبورهای پارازیتوئید در مسیر میزبان‌یابی در طبیعت، هم به ترکیبات فرار میزبان‌های گیاهی حشره آفت و هم به ترکیبات فرار حشره‌ی آفت جلب می‌شوند. معمولاً، ترکیبات شیمیایی متصاعد شده از میزبان یا بقایای آن (کایرومون‌ها) برای پارازیتوئیدها نسبت به ترکیبات فرار ناشی از گیاه، مانند ترکیباتی که از گیاهان خسارت دیده از آفت، متصاعد شده باشند (سینومون‌ها)، جلب‌کننده‌تر هستند (Godfray, 1994). نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهند که در شرایط انجام آزمایش، بوهای ناشی از لاروهای سن آخر کرم گلوگاه انار و همچنین فضولات آن‌ها در مقایسه با بوهای ناشی از انار آلوده به آفت و یا انار دچار صدمه مکانیکی، می‌توانند عوامل موثرتری در جلب زنبور *H. hebetor* به سمت حشره میزبان باشند. حتی به نظر می‌آید در تیمار انار آلوده به لارو، خود انار تاحدی حالت پوشانندگی روی لارو و فضولات ایجاد کرده و باعث کمتر جلب شدن پارازیتوئید گردیده است. بنا به گزارش Manrique *et al.* (2005) زنبور پارازیتوئید *Anaphes iole* (Hym.: Mymaridae) در بویایی سنج، به بوهای گیاهانی که توسط حشره میزبان این زنبور مورد تغذیه و یا تخم‌ریزی قرار گرفته بودند جلب شد اما به بوهای ناشی از گیاه آسیب دیده به صورت مکانیکی پاسخی نشان نداد. همچنین، پارازیتوئید *Goniozus legneri* (Hym.: Bethyidae) از سیگنال‌هایی مانند حضور خود میزبان یا فضولات آن که از یک فاصله مناسب قابل تشخیص هستند، به عنوان نشانه‌ای خوب جهت یافتن میزبان استفاده می‌کند و به ویژه، فضولات لاروی برای این پارازیتوئید از جذابیت بالایی برخوردار هستند (Aleosfoor *et al.*, 2014).

۲- زمان دسترسی به بوی جلب‌کننده‌ها: یافته‌های

حاصل از این آزمایش‌ها نشان داد زمان انتخاب بین دو تیمار لارو و فضولات و همچنین تیمار لارو و انار آلوده اختلاف معنی‌داری نداشتند به ترتیب ($F_{36}=0.58, P = 0.4511; F_{38} = 0.93, P = 0.342$) در حالی که زمان انتخاب بین دو تیمار لارو

جدول ۱- میانگین (\pm خطای معیار) مدت زمان (ثانیه) انتخاب زنبورهای ماده *Habrobracon hebetor* به سمت تیمارهای مورد بررسی در بویایی سنج

Table 1. Mean (\pm SE) of choice time(s) of *Habrobracon hebetor* females to tested treatments on olfactometer.

Exprimt no.	Treatments	Choice time (S)
1	Larvae	110.04 \pm 19.04a
	Faeces	124.32 \pm 16.9a
2	Larvae	116.20 \pm 15.28a
	Infested pomegranate	143.07 \pm 23.54a
3	Larvae	60.20 \pm 5.45 a
	pomegranate with mechanical damages	111.23 \pm 19.45 b
4	Faeces	97.69 \pm 17.30a
	Infested pomegranate	96. 9 \pm 11.7a
5	Faeces	86.88 \pm 13.86 a
	pomegranate with mechanical damages	137.75 \pm 19.04 b
6	Infested pomegranate	66.35 \pm 17.9 a
	pomegranate with mechanical damages	119.29 \pm 12.82 b

*میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر خانه فاقد اختلاف معنی‌دار با یکدیگر هستند (آزمون توکی، $P < 0.05$)

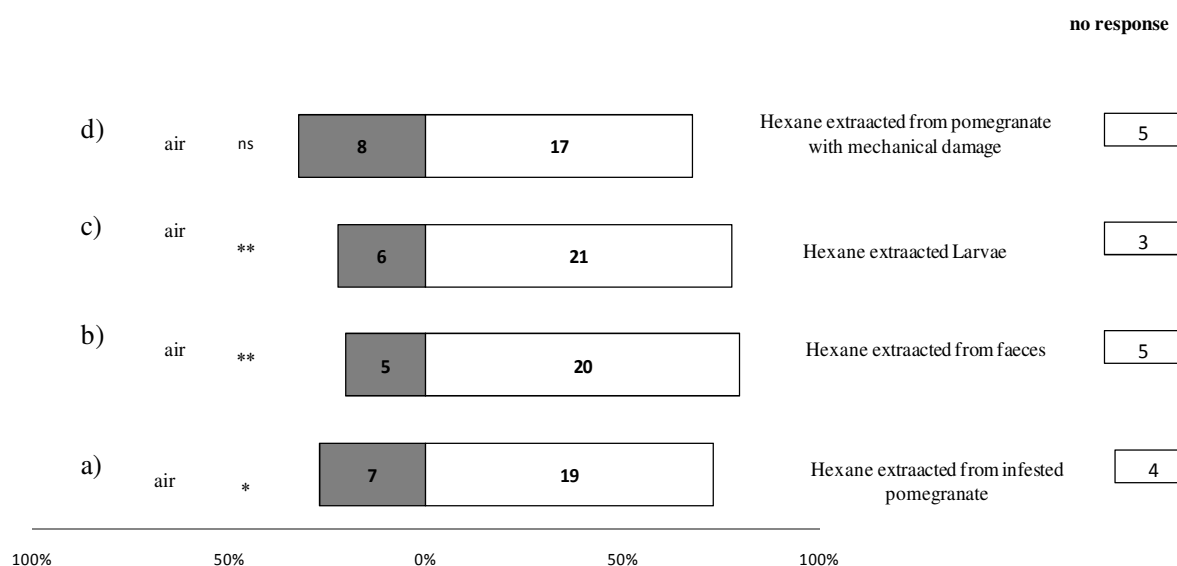
* Means in a cell followed by the same letters are not significantly different ($P < 0.05$; Tukey-HSD)

درصد زنبورهای ماده یعنی ۱۹ عدد، رایحه ناشی از مواد فرار استخراج شده از انارهای آلوده را بر هوای پاک ترجیح دادند (شکل ۳a). مقایسه بین رایحه هگزانی استخراج شده از فضولات و همچنین لاروهای سن آخر کرم گلوگاه انار در مقایسه با هوای پاک نشان داد که به ترتیب ۸۰ و ۷۹ درصد معادل ۲۰ و ۲۱ عدد از زنبورها تیمارهای مورد بررسی را ترجیح دادند (شکل‌های ۳b و ۳c). در نهایت، ۶۸ درصد یعنی ۱۷ عدد از زنبورها به سمت رایحه استخراج شده از انار ترکیده (به صورت مکانیکی) جلب شدند (شکل ۳d). در مقایسه با هوای پاک، رایحه‌های استخراجی از لاروهای سن آخر کرم گلوگاه ($Z = -2.85$, $P = 0.0043$ ، فضولات آن - $Z = -2.29$, $P = 0.0218$) و انارهای آلوده ($Z = -2.29$, $P = 0.0218$) اختلاف معنی‌داری را در جلب کردن زنبور نشان دادند در حالی که بین رایحه‌های استخراجی از انارهای آسیب‌دیده به روش مکانیکی ($Z = -1.70$, $P = 0.881$) در مقایسه با هوای پاک اختلافی مشاهده نشد. نتایج به دست آمده نشان دادند که به غیر از تیمار عصاره انارهای ترکیده به صورت مکانیکی، سایر تیمارها برای زنبور جلب کننده بودند.

گیاه آلوده به همراه فضولات میزبان، اختلاف معنی‌داری را نشان نمی‌دهد اما این زمان، در تیمارهای در برگ‌برنده فضولات، تا حدی از سایر تیمارها کوتاه‌تر است (Mandour, 2014).

همچنین مشخص شده زمان پاسخ برای پارازیتوئیدهای *H. hebetor* که تجربه‌ی تماس قبلی با میزبان را نداشته‌اند وقتی کوتاه‌تر می‌شود که حشرات ماده شب‌پره هندی *Plodia interpunctella* در بویایی سنج قرار بگیرند، در حالی که کوتاه‌ترین زمان انتخاب برای ماده‌های با تجربه قبلی تماس با میزبان، وقتی است که لاروهای زنده و یا فرمون جنسی منبع محرک باشند (Mbata et al., 2017). نشانه‌های مربوط به مکان میزبان که مستقیماً از بدن حشرات میزبان پارازیتوئید منشا می‌گیرند، احتمالاً در طبیعت کمیاب‌تر هستند و این موضوع می‌تواند دلیل انتخاب طبیعی قوی‌تر میزبان‌هایی باشد که چنین نشانه‌هایی را تولید می‌کنند (Mandour, 2014).

۳- پاسخ بویایی زنبور *H. hebetor* به مواد فرار استخراج شده از لارو کرم گلوگاه انار و میوه انار: با بررسی مواد فرار استخراج شده از تیمارهای مورد آزمایش روی پاسخ‌های بویایی زنبور پارازیتوئید مشخص گردید که ۷۳



شکل ۳- درصد پاسخ‌های زنبورهای پارازیتوئید ماده *Habrobracon hebetor* به هریک از بازوهای بویایی سنج دربرگیرنده مواد فرار استخراج شده از لارو کرم گلوگاه انار و میوه انار در در مقایسه با هوا (اعداد نوشته شده روی هر بازو، تعداد افراد جلب شده به آن تیمار را نشان می‌دهد)

Fig. 3. The percentage responses of female parasitoid wasps *Habrobracon hebetor* to either olfactometer arm contain extracted volatile of *Ectomyeloid ceratoniae* larve and pomegranate fruit vs. air (Numbers in bars are the total numbers of parasitoids responding to each odor source)

یافت.

در بررسی حاضر زمانی که از میوه‌ی انار چه به صورت آسیب مکانیکی و چه انار آلوده استفاده کردیم به لحاظ حجم بوهای دریافتی بالاتر، هر دو تیمار برای پارازیتوئید جلب کننده بودند و اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها به دست نیامد، هرچند که تعداد زنبورهای جلب شده به سمت انار آلوده بیشتر بود. اما زمانی که از رایحه‌ی استخراجی استفاده شد این مواد فرار رقیق شده و حجم مواد دریافتی پایین آمد و شاید این حجم برای جلب زنبور در تیمار انار با آسیب مکانیکی کافی نبود اما از آن‌جایی که انار آلوده برای پارازیتوئید جذاب‌تر بود در این‌جا نیز تا حدی قادر به جلب زنبور گردید هرچندکه این تیمار نیز نسبت به تیمار لارو و فضولات قدرت جلب‌پایین‌تری نشان داد با توجه به این نتایج، به نظر می‌رسد از دیدگاه کاربردی در جلب پارازیتوئیدها، کایرومون‌ها نسبت به سینومون‌ها قابل اطمینان‌تر می‌باشند.

شناخت بهتر از سازو کارهایی که سبب به حداکثر رساندن قدرت کاوشگری شکارگرها و پارازیتوئیدها می‌شوند،

در تحقیقات خود نشان دادند

(Fazeli-Dinan *et al.* (2015) در تحقیقات خود نشان دادند که زنبور *Encarsia formosa* (Hym.: Aphelinidae) به گیاهان خیار سالم بدون حضور میزبان نیز جلب گردید. وی بیان نمود که زنبور رایحه ناشی از گیاه را تشخیص داده و در نتیجه، از نظر تکاملی با دریافت این رایحه‌ها احتمال حضور سفیدبالک را روی گیاه متصور می‌شود. این نتیجه با نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر مغایرت دارد. این تفاوت ممکن است به این دلیل باشد که اولاً دو زنبور دو گونه متفاوت و با شرایط اکولوژیک متفاوت هستند و در ضمن، احتمال دارد که وجود هگزان در تیمار مورد بررسی در این تحقیق بر واکنش زنبور نسبت به بوی گیاه تأثیرگذار بوده است. با وجود این بررسی (Silva *et al.* (2006) نشان داد که مواد هگزانی استخراج شده از نرهای میزبان (*Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) توانست ماده‌های زنبور پارازیتوئید تخم *Telenomus podisi* Ashmead (Hym.: Scelionidae) را در داخل بویایی سنج جلب کند. همچنین، زمانی که رایحه هگزانی با تخم میزبان همراه شد، تمایل پارازیتوئید به انتخاب افزایش

جلب‌کننده در شرایط میدانی چه اندازه کارایی دارند، به تحقیقات تکمیلی نیاز می‌باشد که پس از مشاهده پاسخ‌های مثبت قابل توجه، می‌توان با سنتز ماده‌ی اصلی جلب‌کننده و اطمینان از عدم مخاطرات زیست محیطی این ترکیبات، از آن‌ها برای بهینه‌سازی کنترل بیولوژیک در باغ‌ها استفاده نمود.

سپاسگزاری

بدین وسیله از جناب آقای دکتر کاظم محمدپور عضو هیات علمی موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور و آقایان مهندس مهران فرقانی‌پور و مهندس خسرو قهرمانی در مرکز حفظ نباتات شهرستان ساوه که در این تحقیق ما را یاری نمودند، قدردانی می‌گردد.

References

- ALEOSFOOR, M., F. EHTESHAMI and L. FEKRAT, 2014. A six-arm olfactometer for analysing olfactory responses of *Goniozus legneri* Gordh (Hymenoptera: Bethyridae), the larval ectoparasitoid of carob moth, Journal of Entomological and Acarological Research, No. 46: 119-122.
- AL-IZZI, M. A. J., S. K. AL-MALIKY and N. F. JABBO, 1985. Bionomics of *Ectomyelois ceratoniae* (Lepidoptera: Pyralidae) on pomegranates in Iraq, Journal of Environmental Entomology, No. 14: 149-153.
- ATTARAN, M. R. 1996. Effect of laboratory hosts on biological attributes of parasitoid wasp *Bracon hebetor* Say, M. Sc. Thesis of Tarbiat Modares University, Tehran, 77 pp. (in Persian with English Summary).
- COLAZZA, S., M. C. ROSI and A. CELEMENTE, 1997. Response of egg parasitoid *Telenomus busseolae* to sex pheromone of *Sesamia nonagrioides*, Journal of Chemical Ecology, No. 23(11): 2437-2444.
- COLAZZA, S., G. P. MCELFFRESH and J. G. MILLAR, 2004. Identification of volatile synomones, induced by *Nezara viridula* feeding and ovipositing on bean spp. that attracts the egg parasitoid *Trissolucis basalidis*, Journal of Chemical Ecology, No.30: 945-964.
- DWECK, H. K. M., G. P. SVENSSON, E. A. GUNDUZ and O. ANDERBRANT, 2010. Kairomonal Response of the Parasitoid, *Bracon hebetor* Say, to the Male-Produced Sex Pheromone of Its Host, the Greater Waxmoth, *Galleria mellonella* (L.), Journal of Chemical Ecology, No.36: 171-178.
- FAZELI-DINAN, M. R., R. TALAEI-HASSANLOUI, H. ALLAHYARI, A. KHARAZIPAKDEL and H. MOHAMMADI, 2015. Olfactometric responses of *Encarsia formosa* (Hym.: Aphelinidae) to odors of infested greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* (Hem.: Aleyrodidae), by *Lecanicillium longisporum* treated on cucumber leaves. Plant Pests Research, No. 5(1): 1-12. (in Persian with English Summary).
- GODFRAY, H. C. J. 1994. Parasitoids: Behavioral and Evolutionary Ecology. Princeton, University Press, Princeton, New Jersey, 473pp.
- HILKER, M. and N. E. FATOUROS, 2015. Plant responses to insect egg deposition, Annual Review of Entomology, No. 60: 493-515.
- KISHANI-FARAHANI, H., S. H. GOLDANSAZ, O.

می‌تواند در موفق‌تر اجرا نمودن برنامه‌ی کنترل بیولوژیک آفات موثر باشد (Kishani-Farahani et al., 2017). استفاده موثر از کایرومونها می‌تواند کارایی پارازیتوئیدها را در برنامه‌های کنترل بیولوژیکی افزایش دهد (Vet et al., 1995; Phillips, 2002; Scholler and Prozell, 1997). این مطالعه، *H. hebetor* عمدتاً از نشانه‌های بویایی مربوط به لاروهای کرم گلوگاه انار برای پیدا کردن میزبان خود استفاده نمود. در تمام آزمایش‌هایی که در آن‌ها عصاره‌های شیمیایی مرتبط با لاروها یا خود لاروها وجود داشتند، پاسخ پارازیتوئید از سایر تیمارها بیشتر بود. این نتایج نشان دادند که کایرومون‌ها سیگنال اصلی مورد استفاده توسط این زنبور برای بروز رفتار جستجوگری آن بوده‌اند. برای این که مشخص شود این ترکیبات

- SABAHI and M. SHAKERI, 2010. Larval parasitoids of the carob moth *Ectomyelois ceratoniae* in three regions of Iran Varamin Qom and Saveh. Iranian Journal of plant protection science, No. 41(2): 337-344. (in Persian with English Summary).
- KISHANI-FARAHANI, H., Y. MOGHADASI, P. ABRUN, and A. ASHOURI, 2017. Olfactory learning and memory retention in *Venturia canescens* (Hym.: Ichneumonidae). Journal of Entomological Society of Iran, 37(1): 15-26. (in Persian with English Summary).
- MADDEN, J. L. 1968. Behavioural responses of parasites to the symbiotic fungus associated with *Sirex noctilio* F, Nature, No. 218: 189-190.
- MANDOUR, N. S. 2014. Effect of Host Frass on Searching Behavior and Parasitization of *Cotesia kariyai* Watanab, Egyptian journal of pest control, No. 24 (1): 183-189.
- MANRIQUE, V., W. A. JONES, L. H. WILLIAMS and J. S. BERNAL, 2005. Olfactory Responses of *Anaphes iole* (Hymenoptera: Mymaridae) to Volatile Signals Derived from Host Habitats. Journal of Insect Behavior, No. 18 (1): 89-104
- MBATA, G. N., T. SHU, W. PHILLIPS and S. B. RAMASWAMY, 2017. Semiochemical cues used by *Pteromalus cerealellae* (Hymenoptera: Pteromalidae) to locate its host, *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae), Annals of the Entomological Society of America, No. 97: 353-360.
- MEHRNEJAD, M. 2002. Biology of carob moth, *E. ceratoniae* new pest on pistachio in Rafsanjan, Applied Entomology and Phytopathology, No. 60: 1-11.
- MORAWO, T. and H. FADAMIRO, 2014. Duration of Plant Damage by Host Larvae Affects Attraction of Two Parasitoid Species (*Microplitis croceipes* and *Cotesia marginiventris*) to Cotton: Implications for Interspecific, Journal of Chemical Ecology, No. 40 (11): 1176-1185.
- NOBAKHT, Z., J. KARIMZADEH and S. SHAHKARAM-JAFARI, 2015. Identification of parasitoids of *Apomyelois ceratoniae* (Zeller) (Lepidoptera, Pyralidae) on pomegranate in Isfahan province, Journal of Entomology and Zoology Studies, No. 3 (1): 287-289.
- ODE, P. J. 2006. Plant chemistry and natural enemy fitness: Effects on herbivore and natural enemy interactions, Annual Review of Entomology, No. 51: 163-185.
- PHILLIPS, T. W. 1997. Semiochemicals of stored-product insects: research and application, Journal of Stored Products Research, No. 33: 17-30.
- POORJAVAD, N., S. H. GOLDANSAZ, T. MACHTELINCKX, L. TIRRY, R. STOUTHAMER, and T. V. LEEUWEN, 2012. Iranian *Trichogramma*: ITS2 DNA characterization and natural *Wolbachia* infection, BioControl, No. 57(3): 361-374.
- ROCHAT, D., K. MOHAMMADPOOR, C. MALOSSE, A. AVAND-FAGHIH, M. LETTERE, J. BEAUHAIRE, J. P. MORIN, A. PEZIER, M. RENOU and G. A. BBDOLLAHI, 2004. Male aggregation pheromone of date palm fruit stalk borer *Oryctes elegans*, Journal of Chemical Ecology, No. 30(2): 387-407.
- SAADAT, D., A. A. SERAJ, S. H. GOLDANSAZ and J. KARIMZADEH, 2014. Environmental and maternal effects on host selection and parasitism success of *Bracon hebetor*, BioControl, No. 59: 297-306.
- SAS INSTITUTE INC. 2001. SAS/ Stat users Guide, version 9.1 SAS Institute Inc, Cary, NC.
- SCHOLLER, M. and S. PROZELL, 2002. Response of *Trichogramma evanescens* to main sex pheromone component of *Ephesia* spp. and *Plodia interpunctella*, (Z,E)-9, 12-tetra-decadenyl acetate (ZETA), The Journal of Stored Products Research, No. 38: 177-184.
- SHAKERI, M. 1993. First report of attack of *spectrobates ceratoniae* Zell. To figs in Iran, Applied Entomology and Phytopathology, No. 60: 29-32.
- SILVA, C. C., M. C. B. MORAES, R. A. LAUMANN and M. BORGES, 2006. Sensory response of the egg parasitoid *Telenomus podisi* to stimuli from the bug *Euschistus heros*, Pesquisa Agropecuária Brasileira, No. 41(7): 1093-1098.
- TANG, Q. 2016. Olfactory responses of *Theocolax elegans* (Hymenoptera, Pteromalidae) females to volatile signals derived from host habitats, Journal of Hymenoptera Research, No. 49: 95-109.

- TANG, Q. F., Y. J. WU, B. M. LIU and Z. L. YU, 2009. Olfactory responses of *Lariophagus distinguendus* (Hymenoptera: Pteromalidae) to volatile signals derived from host habitats, *Philippine Agricultural Scientist*, No. 92(2): 133–142.
- TUMLINSON, J. H., T. C. J. TURLINGS and W. J. LEWIS, 1992. The semiochemical complexes that mediate insect parasitoid foraging, *Agricultural Zoology Reviews*, No. 5: 221–252.
- VET, L. E. M. and M. DICKE, 1992. Ecology of Infochemical Use by Natural Enemies in a Tritrophic Context, *Annual Review of Entomology*, No. 37: 141-172.
- VET, L. E. M., W. J. LEWIS and R. T. CARDE, 1995. Parasitoid foraging and learning. In: Carde RT, Bell WJ (eds) *Chemical ecology of insects II*. Chapman & Hall, New York, pp 65–101.
- VETTER, R. V., S. TATEVOSSIAN and T. B. BAKER, 1997. Reproductive behaviour of the female carob moth (Lepidoptera: Pyralidae), *Pan-pacific entomologist*, No 73(1):28-35.
- WARNER, R., L. M. BARNES, E. F. LAIRD and M. D. LANHAM, 1990. Chemical control of carob moth, *Ectomyelois ceratoniae* (Lepidoptera: Pyralidae), and various nitidulid beetles (Coleoptera) on 'Deglet Noor' dates in California, *Journal of Economy and Entomology*, No.83: 2357-2361.

مقایسه دوام اسانس گیاه پونه *Mentha longifolia* (Lamiaceae) و نانوامولسیون آن

علیه شب‌پره آرد *Ephestia kuehniella* (Lep.: Pyralidae)

مژده لونی^۱، مریم نگهبان^۲✉ و جهانشیر شاکرمی^۱

۱- به ترتیب دانشجوی دکتری و دانشیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران؛ ۲- استادیار، بخش تحقیقات آفت‌کش‌ها، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
(تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۹۶؛ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۹۷)

چکیده

در این مطالعه نانوامولسیون حاوی اسانس پونه *Mentha longifolia* به روش هموژنایزر با فشار بالا تولید و سمیت تنفسی آن در مقایسه با اسانس معمولی پونه روی مراحل مختلف شب‌پره آرد *Ephestia kuehniella* بررسی شد. شرایط آزمایشگاهی شامل دمای 27 ± 1 درجه سلسیوس، رطوبت نسبی 70 ± 5 درصد و تاریکی بود. غلظت‌های ۱۱۱۱/۱-۱۱۱/۱ و ۹۲/۶-۶۲/۹ میکرولیتر بر لیتر هوا از اسانس به ترتیب برای کنترل مرحله لاروی و تخم به کار رفت. در مورد نانوامولسیون غلظت‌های ۱۱۱۱/۱-۱۲۲/۲ میکرولیتر بر لیتر هوا در آزمایش لاروکنشی و غلظت‌های ۸۱/۴-۱۱۴/۸ میکرولیتر بر لیتر هوا در تخم‌کنشی بررسی شد. مقدار PT₅₀ در غلظت ۱۱۱۱/۱ میکرولیتر بر لیتر هوا برای نانوامولسیون و اسانس در آزمایش لاروکنشی به ترتیب برابر ۱۵/۱۸ و ۳/۶۹ روز تعیین شد. این مقادیر در غلظت ۹۲/۶ میکرولیتر بر لیتر هوا روی تخم آفت به ترتیب برابر ۱۴/۴۴ و ۲/۵۸ روز بود. میزان سمیت نسبی (RMP) نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار میان مقادیر PT₅₀ اسانس پونه و نانوامولسیون آن روی هر دو مرحله آفت بود. مطابق یافته‌های حاضر نانوامولسیون حاوی اسانس پونه با خاصیت رهایش تدریجی باعث حفظ سمیت تنفسی اسانس و افزایش دوام آن در طولانی مدت شده و می‌تواند به عنوان یک گروه جدید از آفت‌کش‌های دوست‌دار محیط زیست در برنامه‌های کنترل آفات در نظر گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: اسانس، پونه، دوام، شب‌پره آرد، نانوامولسیون.

Comparison of durability of *Mentha longifolia* (Lamiaceae) essential oil and its nanoemulsion against *Ephestia kuehniella* (Lep.: Pyralidae)

M. LOUNI¹, M. NEGAHBAN²✉ and J. SHAKARAMI¹

1- Ph.D. Student & Associate Professor, Respevtively; Department of Plant protection, Faculty of Agriculture Science, University of Lorestan, Khorramabad, Iran; 2. Assistant Professor, Pesticide Research Department, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (ARREO), Tehran, Iran

Abstract

In this study, the nanoemulsion containing *Mentha longifolia* essential oil was produced by using high-pressure homogenization method and its fumigant toxicity was compared with ordinary *M. longifolia* essential oil on different stages of *Ephestia kuehniella*. Experimental conditions were as follows; 27 ± 1 °C, 70 ± 5 % relative humidity in total darkness. Concentrations of 111.1-1111.1 and 62.9-92.6 $\mu\text{l/l}$ air of oil have been used to control larva and eggs, respectively. Nanoemulsion concentrations were studied at 122.2-1111.1 $\mu\text{l/l}$ air for larvicide experiment and 81.4-114.8 $\mu\text{l/l}$ air for ovicidal stage. PT₅₀ value at 1111.1 $\mu\text{l/l}$ air as a larvicide for nanoemulsion and oil was estimated about 15.18 and 3.69 days, respectively. This value, at 92.6 $\mu\text{l/l}$ air on egg was 14.44 and 2.58 days, respectively. The relative median potency parameter (RMP) showed that there was significant difference between PT₅₀ values of essential oil and its nanoemulsion on both of the two stages of pest. Results showed that nanoemulsion containing *M. longifolia* oil can release slow properties lead to durability of fumigant toxicity of oil in the long term. Therefore, this new formulation could be considered as a new and ecofriendly biopesticide in pest control.

Key words: *Ephestia kuehniella*, Essential oil, Durability, *Mentha longifolia*, Nanoemulsion.

مقدمه

شب‌پره مدیریت‌ناهنای آرد *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) یکی از آفات مهم و اقتصادی آرد در شرایط آب و هوایی معتدل می‌باشد (Jemaa et al., 2013). علاوه بر آرد و سبوس به عنوان میزبان ترجیحی، لاروهای این آفت با تغذیه و تجمع فضولات لاروی باعث کاهش کمی و کیفی گندم، ذرت، برنج و میوه‌های خشک می‌شود (Hill, 2002). استفاده روز افزون از آفت‌کش‌های شیمیایی جهت کنترل آفات انباری منجر به مشکلات متعددی از جمله، آلودگی آب و محیط زیست، آلودگی گیاهان و اثرات سمی روی پستانداران شده است (Boyer et al., 2012). با توجه به معایب آفت‌کش‌های شیمیایی، امروزه نیاز ضروری به توسعه روش‌های ایمن کنترل آفات که از نظر اقتصادی مقرون به صرفه و سازگار با محیط زیست باشند، می‌باشد (Moharrampour and Negahban, 2014). بسیاری از گونه‌های گیاهی و اسانس‌های آن‌ها تاثیر بسزایی در محافظت از محصولات در مقابل آفات انباری دارند (Isman, 2000).

گیاه پونه *Mentha longifolia* L. متعلق به خانواده نعناعیان در حاشیه رودخانه‌ها و در شرایط آب و هوایی معتدل مرکز و جنوب اروپا، استرالیا و جنوب آسیا رشد می‌کند (Seveg et al., 2012). هم‌چنین این گیاه از گونه‌های فراوان در بسیاری از نقاط ایران می‌باشد که اثرات حشره‌کشی آن توسط محققین مختلفی گزارش شده است (Shakarami et al., 2008; Akrami et al., 2011). وجود ترکیبات فرار با قدرت تبخیر بالا و تجزیه‌پذیری در مقابل نور خورشید از محدودیت‌های استفاده از اسانس‌های گیاهی می‌باشد. یکی از راه‌های افزایش ثبات و بهبود عملکرد این ترکیبات گیاهی فرموله کردن آن‌ها است (Majeed et al., 2015). انتخاب نوع فرمولاسیون به عوامل مختلفی از جمله خواص زیستی، فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی اسانس، نحوه اثر و نوع محصول بستگی دارد (Negahban et al., 2013a). بسیاری از اسانس‌های گیاهی چربی دوست بوده و انحلال‌پذیری اندکی در آب دارند. بنابراین نیاز

به یک سیستم انتقال جهت کپسوله کردن، حفاظت و بهبود اثر این ترکیبات به‌وسیله رهایش کنترل شده‌ی آن‌ها وجود خواهد داشت (Donsi et al., 2011). تلاش برای توسعه اسانس‌های گیاهی به عنوان آفت‌کش منجر به ایجاد یک فرمولاسیون محلول در آب مثل نانومولسیون شده است (Nuchuchua et al., 2009). نانومولسیون‌ها شامل ذرات امولسیون‌ی به قطر ۵۰-۱۰۰۰ نانومتر می‌باشند که در آن‌ها معمولاً ذرات روغن به‌وسیله آب احاطه شده است (Gupta et al., 2016). این فرمولاسیون به دلیل اندازه بسیار کوچک ذرات، یک روش موثر در بهبود ثبات فیزیکی مواد زیستی نانوکپسوله شده و افزایش پراکندگی عوامل حشره‌کشی در ماده غذایی است (Topuz et al., 2016). گلیسرول مونواسیتارات (GMS) یکی از انواع رایج مونوگلیسرول‌ها می‌باشد که معمولاً برای تولید نانومولسیون‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. این ترکیب به عنوان متعادل کننده، امولسیفایر و عامل رهایش کنترل شده در فرمولاسیون‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد (Kavadia et al., 2017). مورتی و همکاران میکروکپسوله کردن را یک تکنیک مناسب جهت محافظت و رهایش تدریجی اسانس *Rosmarinus officinalis* L. علیه ابریشم باف ناجور بیان کردند (Moretti et al., 2002). مطالعه اثر نانوذرات لیپید جامد اسانس *Artemisia arborescence* L. روی سفیدبالک *Bemesia tabaci* G. نشان داد این روش باعث ثبات فیزیکی بالای اسانس در دماهای مختلف (۴-۴۰ درجه سلسیوس) در مدت زمان ۶۰ روز شده است (Lai et al., 2006).

نگهبان و همکاران اثر دورکنندگی اسانس نانوکپسوله شده گیاه *Artemisia sieberi* Besser و هم‌چنین اثر آن بر شاخص‌های تغذیه‌ای شب‌پره پشت‌الماسی (*Plutella xylostella* L.) را بررسی کردند (Negahban et al., 2013a;b). نتایج این تحقیق نشان داد این فرمولاسیون قابلیت بالایی در کنترل این شب‌پره نسبت به اسانس معمولی دارد. رهاسازی کنترل شده و تدریجی اسانس بذر زنیان *Carum copitum*

حذف شد و گیاه خشک و پودر شد. در هر نوبت اسانس‌گیری، ۱۰۰ گرم پودر گیاهی همراه با ۱۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر با استفاده از دستگاه اسانس‌گیر شیشه‌ای Clevenger در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس به روش تقطیر با آب اسانس‌گیری شد. زمان اسانس‌گیری برای هر نمونه ۴ ساعت بود. اسانس‌های جمع‌آوری شده با کمک سولفات سدیم آب‌گیری شد و درون ظروف شیشه‌ای به حجم ۲ میلی‌لیتر با روکش آلومینیومی و پارافیلیم در یخچال و در شرایط دمایی ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد (Negahban et al., 2007).

تهیه نانوامولسیون اسانس گیاهی: به منظور تهیه فاز آبی نانوامولسیون حاوی اسانس پونه، ۹۰ میلی‌لیتر آب و ۳ گرم توین ۸۰ (به نسبت ۳۰:۱) (Tween®80, Ph Eur, JP, NF,) (1130 g/M, Merck, GER Hei-TORQUE, Heidolph, Germany) با سرعت ۵۰۰-۱۰۰۰ دور در دقیقه (۱۵ دور در دقیقه در هر ۳ دقیقه) درون ظرفی با حجم ۳۰۰ میلی‌لیتر در دمای ۵-۱۰ درجه سلسیوس مخلوط شد. سپس ۲ گرم گلیسرول مونواستراتات (GMS) (99%, 358.56 g/M, Merck, GER basic 2, IKA, GER) با سرعت ۲۰۰-۱۰۰ دور در دقیقه (۵۰ دور در دقیقه در هر ثانیه) در دمای ۸۰ درجه سلسیوس تا مرحله ذوب شدن حرارت داده شد. در مرحله بعد ۲ گرم توین ۸۰ به GMS ذوب شده اضافه شد و دما به ۲۰ درجه سلسیوس کاهش داده شد (۱ درجه سلسیوس در هر ۱۵ ثانیه). سپس ۵ گرم اسانس خالص پونه به صورت قطره قطره به ترکیب GMS و توین ۸۰ اضافه شد. ترکیب به دست آمده به صورت قطره قطره به فاز آبی اضافه و با کمک دستگاه هم‌زنایزر (مدل package, IKA, T 18 basic ULTRA-TURRAX, GER) با سرعت ۱۰۰۰-۲۰۰۰ دور در دقیقه برای مدت ۳۰ دقیقه مخلوط شد.

بررسی مورفولوژی سطح نانوامولسیون با میکروسکوپ الکترونی: شکل‌شناسی دیواره‌ها و مشاهده سطح نانوامولسیون با استفاده از دستگاه میکروسکوپ

C. B. Clarke و اثرات ضدتغذیه‌ای قوی آن علیه لارو شب‌پره پشت‌الماسی نیز توسط Jamal et al. (2012) بیان شده است. در مطالعه‌ی دیگری، اثر قوی نانوزل تهیه شده از اسانس *C. copitum* روی دوگونه آفت انباری گزارش شده است (Ziaee et al., 2014). امام جمعه و همکاران سمیت تماسی و دوام نانوامولسیون اسانس آویشن شیرازی *Zataria multiflora* Boiss را روی لارو ۱۴-۷ روزه شب‌پره آرد بررسی کردند (Emamjomeh et al., 2017). نتایج این بررسی نشان دهنده افزایش خاصیت سمی اسانس بعد از فرمولاسیون و حفظ سمیت تماسی در طولانی مدت بود. تا کنون مطالعه‌ای روی خواص نانوامولسیون اسانس پونه علیه شب‌پره آرد انجام نشده است، در این پژوهش سمیت تنفسی نانوامولسیون اسانس پونه روی مراحل مختلف زیستی شب‌پره آرد و دوام اسانس در این فرمولاسیون بررسی شد.

روش بررسی

پرورش حشره: شب‌پره آرد از انسکتاریوم واقع در شهرستان خرم‌آباد تهیه شد و درون ظروف پلاستیکی با طول ۳۴ سانتی‌متر و قطر ۲۰ سانتی‌متر روی مخلوط آرد گندم، سبوس گندم و مخمر (۱:۵:۱۰) پرورش یافت. شرایط آزمایشگاهی جهت پرورش این آفت شامل دمای 27 ± 2 درجه سلسیوس و رطوبت نسبی 70 ± 5 درصد تحت شرایط تاریکی بود. از تخم یک روزه و لارو سن پنجم این آفت برای انجام آزمایش‌های زیست‌سنجی استفاده شد.

جمع‌آوری گیاه مورد مطالعه: در اوایل مرداد ماه هم‌زمان با گلدهی، گیاه پونه *M. longifolia* از اطراف شهرستان خرم‌آباد (در ۲۱ دقیقه و ۴۸ درجه طول جغرافیایی و ۴۳ دقیقه و ۳۰ دقیقه عرض جغرافیایی) جمع‌آوری شد. اندام‌های هوایی گیاه شامل گل، برگ و ساقه‌های نازک در شرایط سایه و تهویه مناسب خشکانده شدند. سپس داخل پاک‌های کاغذی در فریزر و در دمای ۲۴- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

استخراج اسانس: جهت تهیه اسانس شاخه‌های چوبی

۱۰ عدد تخم یک‌روزه شب‌پره آرد قرار داده شد. سپس غلظت‌های مختلف اسانس معمولی و نانومولسیون ۵ درصد آن در تکرارهای جداگانه مشابه روش قبل روی کاغذهای صافی درون درپوش ظروف ریخته شد و درپوش ظروف محکم بسته شد. غلظت‌های مورد استفاده در آزمایش تخم‌کشی برابر با ۱/۷، ۱/۸۷، ۲/۰۶، ۲/۲۶ و ۲/۵ میکرولیتر (معادل ۶۲/۹، ۶۹/۲، ۷۶/۲، ۸۳/۷ و ۹۲/۶ میکرولیتر بر لیتر هوا) برای اسانس معمولی و ۲/۲، ۲/۳، ۲/۶، ۲/۸ و ۳/۱ میکرولیتر (معادل ۸۱/۴، ۸۵/۱، ۹۶/۲، ۱۰۳/۷ و ۱۱۴/۸ میکرولیتر بر لیتر هوا) برای نانومولسیون ۵ درصد بر حسب میزان ماده موثره تخمین زده شد. بعد از ۲۴ ساعت و پنج روز به ترتیب تعداد لاروها و تخم‌های مرده شمارش و درصد مرگ و میر از طریق فرمول (Abbott 1925) محاسبه شد. کلیه آزمایش‌ها برای هر تیمار در ۵ تکرار انجام شد. برای هر تیمار، شاهد تکرار مشابه منظور شد. آب مقطر و نانومولسیون بدون اسانس به عنوان شاهد نانومولسیون در نظر گرفته شدند.

بررسی دوام سمیت تنفسی نانومولسیون و اسانس پونه

روی شب‌پره آرد: دوام سمیت تنفسی نانومولسیون ۵ درصد و اسانس پونه براساس روش (Negahban 2012) در دو غلظت (LC₅₀ و LC₈₀) به دست آمده از سمیت تنفسی اسانس پونه انجام شد. با کمک میکروبیپیت غلظت‌های تعیین شده از اسانس معمولی و نانومولسیون حاوی اسانس روی کاغذ صافی به قطر دو سانتی‌متر ریخته شد و پس از قرارگیری درون درپوش ظروف، درپوش ظروف شیشه‌ای محکم بسته شد. پس از یک روز از تاریخ اسانس‌دهی تعداد ۱۰ عدد لارو سن پنجم شب‌پره آرد درون ظروف ریخته شد و پس از ۲۴ ساعت تعداد لاروهای مرده شمارش شد. همین روند برای ۳، ۵، ۷، ۹، ۱۱ و تا هر دو روز یکبار تا حداکثر زمانی که پس از اسانس‌دهی هیچ مرگ و میری مشاهده نشود؛ ادامه یافت. به عنوان مثال برای آزمایش سه روزه نیز پس از آغشته نمودن کاغذ صافی به غلظت معینی از نانومولسیون و اسانس

الکترونی عبوری (TEM (Transmission electron microscope)، Philips, Model CM 120) انجام شد. جهت مشاهده توزیع اندازه ذرات از دستگاه Laser light scattering (SEMATech) استفاده شد.

آزمایش‌های زیست‌سنجی: کلیه آزمایشات زیست‌سنجی

در آزمایشگاه سم‌شناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان انجام شد. شرایط آزمایشگاهی شامل دمای 27 ± 1 درجه سلسیوس، رطوبت نسبی 70 ± 5 درصد و شرایط تاریکی بود. هم‌چنین، کلیه مراحل مربوط به تهیه فرمولاسیون در آزمایشگاه تحقیقات فرمولاسیون و کنترل کیفی آفت‌کش‌ها واقع در موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور انجام شد.

بررسی سمیت تنفسی نانومولسیون و اسانس پونه روی

شب‌پره آرد: برای به دست آوردن سمیت تنفسی اسانس پونه و نانومولسیون ۵ درصد حاوی اسانس پونه روی لارو و تخم شب‌پره آرد ابتدا محدوده غلظت‌ها با انجام آزمایشات مقدماتی تعیین شد. روش آزمایش برای هر دو تیمار (اسانس پونه و نانومولسیون حاوی اسانس) روی مراحل مختلف زیستی آفت مشابه بود. پس از تعیین غلظت‌ها، براساس روش (Negahban et al. 2007) کاغذهای صافی به قطر دو سانتی‌متر به عنوان محل آغشته کردن به اسانس در نظر گرفته شد. کاغذهای صافی درون درپوش ظروف شیشه‌ای به حجم ۲۷ میلی‌لیتر قرار داده شد. سپس، تعداد ۱۰ عدد لارو سن پنجم شب‌پره آرد (یک روزه) به درون ظروف منتقل شد. با کمک میکروبیپیت غلظت‌های مختلف اسانس شامل ۳، ۵/۲، ۹/۳، ۱۶/۶ و ۳۰ میکرولیتر (معادل ۱۱۱/۱، ۱۹۲/۶، ۳۴۴/۴، ۶۱۴/۸ و ۱۱۱۱/۱ میکرولیتر بر لیتر هوا) روی کاغذ صافی ریخته شد. غلظت‌های نانومولسیون ۵ درصد در آزمایش لاروکشی نیز برابر با ۳/۳، ۵/۷، ۹/۹، ۱۷/۲ و ۳۰ میکرولیتر (معادل ۱۲۲/۲، ۲۱۱/۱، ۳۶۶/۶، ۶۳۷ و ۱۱۱۱/۱ میکرولیتر بر لیتر هوا) بر حسب میزان ماده موثره (اسانس) نانومولسیون تخمین زده شد. سپس درپوش ظروف شیشه‌ای پس از انتقال لاروهای آفت محکم بسته شد. در آزمایش بعدی، در ظروف جداگانه

نتیجه و بحث

مورفولوژی سطح نانوامولسیون با میکروسکوپ

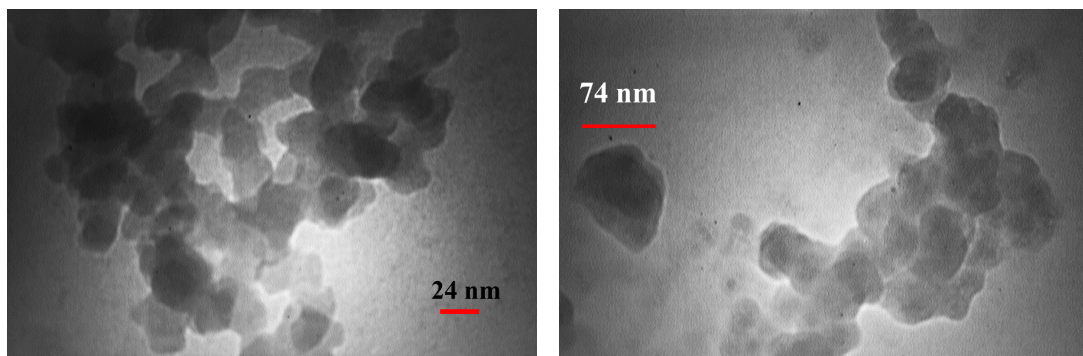
الکترونی: ساختار دیواره‌ها و مورفولوژی سطح ذرات نانوامولسیون در شکل ۱ نشان داده شده است. میانگین اندازه ذرات نانوامولسیون توسط میکروسکوپ الکترونی حدود ۴۹ نانومتر برآورد شد. در حالی که این مقدار با استفاده از دستگاه Laser light scattering (SEMATEch) حدود ۲۳۴ نانومتر تخمین زده شد. هم‌چنین توزیع اندازه ذرات توسط این دستگاه تعیین شد (شکل ۲).

سمیت تنفسی اسانس پونه و نانوامولسیون حاوی

اسانس روی شب‌پره آرد: نتایج حاصل از آزمایش‌ها، نشان دهنده سمیت تنفسی اسانس پونه و نانوامولسیون حاوی اسانس روی مراحل مختلف شب‌پره آرد می‌باشد. مطابق با شکل‌های ۳ و ۴، لگاریتم غلظت و پروبیت درصد مرگ‌ومیر لاروهای سن پنجم و تخم شب‌پره آرد نشان می‌دهد که تلفات مراحل مختلف آفت تحت تاثیر غلظت‌های مختلف اسانس پونه و نانوامولسیون آن روند افزایشی یکنواختی داشته است. میزان LC_{50} اسانس معمولی و نانوامولسیون ۵ درصد تهیه شده از آن روی لارو سن پنجم و تخم شب‌پره آرد با تجزیه پروبیت داده‌های مربوط به هر مرحله تخمین زده شد (جدول‌های ۱ و ۲).

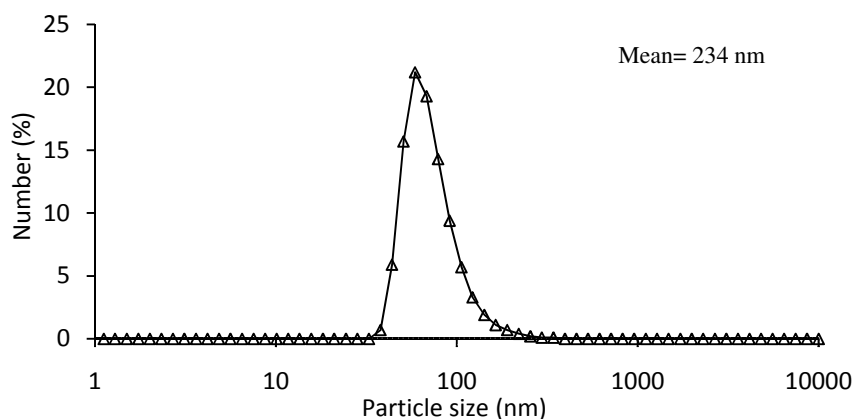
درپوش ظروف محکم بسته شد به مدت سه روز بسته باقی ماند و پس از این مدت لاروهای آفت اضافه شدند و درپوش ظروف مجدداً بسته شد و بعد از گذشت ۲۴ ساعت تعداد لاروهای مرده شمارش و درصد مرگ و میر محاسبه شد. همین روند برای همه فاصله‌های زمانی آزمایش دوام انجام شد. در مرحله تخم این آفت نیز شرایط و روش آزمایش مشابه بالا بود. به این ترتیب که پس از تعیین دو غلظت مورد نظر و یک روز پس از اسانس‌دهی تعداد ۱۰ عدد تخم یک روزه شب‌پره آرد به داخل ظروف منتقل شد و پنج روز بعد (Brindley, 1930) تعداد تخم‌های تفریخ نشده شمارش و درصد مرگ و میر محاسبه شد. روند هر دو روز یکبار برای تخم آفت نیز جهت بررسی دوام اسانس و نانوامولسیون به طور جداگانه انجام شد. درپوش ظروف قبل از انتقال مراحل مختلف آفت کاملاً بسته بوده و پس از اینکه نمونه‌ها به داخل ظروف ریخته شد درپوش ظروف مجدداً بسته شد و در تمام طول این مدت مسدود باقی ماند. آزمایش‌ها برای هر تیمار (اسانس و نانوامولسیون) به همراه شاهد‌ها برای هر روز به طور جداگانه در ۵ تکرار انجام شد.

محاسبات آماری: محاسبه مقادیر LC_{50} و PT_{50} مربوط به هر یک از مراحل آزمایش به روش پروبیت صورت گرفت و هم‌چنین مقایسه این مقادیر با استفاده از محاسبه پارامتر سمیت نسبی (Relative median potency) از نرم‌افزار SPSS 16 استفاده شد (SPSS, 2007).



شکل ۱- تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری از ساختار نانوامولسیون اسانس پونه

Fig. 1. Transmission microscope images of *Mentha longifolia* oil nanoemulsion



شکل ۲- میانگین اندازه و توزیع ذرات نانوامولسیون حاوی اسانس پونه
 Fig. 2. Mean of particle size and distribution of *Mentha longifolia* oil nanoemulsion

جدول ۱- مقادیر LC₅₀ سمیت تنفسی اسانس پونه و نانوامولسیون حاوی اسانس روی لارو سن پنجم شب‌پره آرد

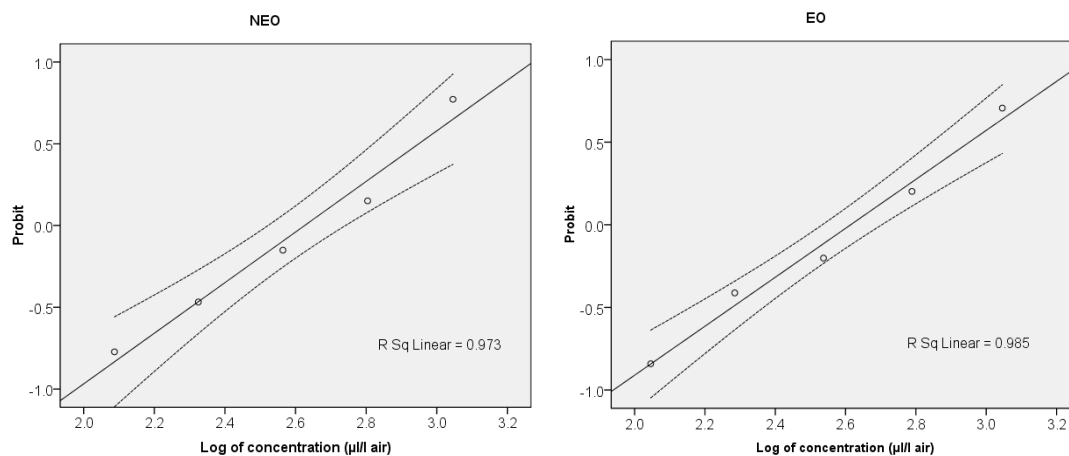
Table 1. LC₅₀ values for fumigant toxicity of *Mentha longifolia* oil and its nanoemulsion against *Ephestia kuehniella* 5th instar larva

Compound	LC ₅₀ (µl/l)	Chi-square	n	df	Intercept	Slope±SE	P-value	Confidence limit 95%	
								Lower	Upper
Essential oil	413.69	0.63	250	3	-3.86±0.62	1.47±0.24	0.88	319.7	554.1
Nanoemulsion	427.05	1.06	250	3	-4.04±0.66	1.53±0.25	0.78	334.4	563.7

جدول ۲- مقادیر LC₅₀ سمیت تنفسی اسانس پونه و نانوامولسیون حاوی اسانس روی تخم شب‌پره آرد

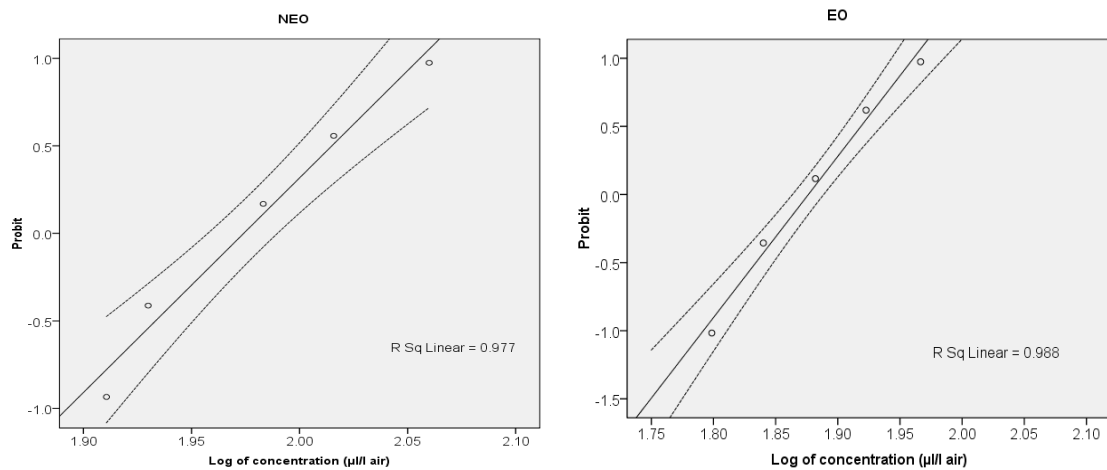
Table 2. LC₅₀ values for fumigant toxicity of *Mentha longifolia* oil and its nanoemulsion against *Ephestia Kuhniella* egg

Compound	LC ₅₀ (µl/l)	Chi-square	n	df	Intercept	Slope±SE	P-value	Confidence limit 95%	
								Lower	Upper
Essential oil	75.03	0.69	250	3	-22.08±3.05	11.77±1.62	0.87	72.2	77.6
Nanoemulsion	93.98	1.21	250	3	-24.02±3.38	12.17±1.71	0.74	90.6	97.1



شکل ۳- پروبیت مرگ و میر اثر اسانس پونه و نانوامولسیون آن روی لارو سن پنجم شب‌پره آرد

Fig. 3. Probit of mortality of *Mentha longifolia* oil and its nanoemulsion effects on *Ephestia Kuhniella* 5th instar larva



شکل ۴- پروبیت مرگ و میر اثر اسانس پونه و نانوامولسیون آن روی تخم شب‌پره آرد

Fig. 4. Probit of mortality of *Mentha longifolia* oil and its nanoemulsion effects on *Ephestia Kuhnii* egg

جدول ۳- مقایسه LC_{50} محاسبه شده در بررسی سمیت تنفسی اسانس پونه و نانوامولسیون حاوی اسانس روی مراحل مختلف شب‌پره آرد در غلظت‌های مختلف

Table 3. Comparison of estimated LC_{50} for fumigant toxicity of *Mentha longifolia* oil and its nanoemulsion on different stages of *Ephestia kuehniella* at different concentrations

Stages	Exposure time (day)	LC_{50} (μ l/l) (NEO ²)	LC_{50} (μ l/l) (EO ³)	RMP ¹	95% Confidence limits
Larva	1	427.05	413.69	1.03	0.72-1.50
Egg	5	93.98	75.03	1.25	1.15-1.40

1- RMP= Relative Median Potency

2- Nanoemulsion

3- Essential oil

نانوامولسیون به میزان قابل توجهی از اسانس بالاتر بود. رهایش اسانس به عنوان ماده موثره نانوامولسیون در هر دو غلظت تدریجی و طولانی بود. اما در رابطه با اسانس این روند سریع و کوتاه بود (شکل ۵). در غلظت بالا (LC_{80})، دوام سمیت تنفسی نانوامولسیون علیه لاروهای سن پنجم شب‌پره آرد ۳۱ روز به طول انجامید در حالیکه این مقدار برای اسانس ۹ روز بود. در غلظت ۴۱۳/۷ میکرولیتر بر لیتر هوا اسانس برخلاف نانوامولسیون دوامی نداشت. میان آب و نانوامولسیون بدون اسانس به عنوان شاهد‌های نانوامولسیون هیچ تفاوتی مشاهده نشد. میزان PT_{50} برای نانوامولسیون و اسانس معمولی در جدول ۴ آمده است.

بر اساس محاسبه سمیت نسبی (RMP)، بین LC_{50} به دست آمده از اسانس معمولی و نانوامولسیون روی لارو آفت بعد از گذشت ۲۴ ساعت اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. اما این میزان در آزمایش تخم‌کشی نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین مقادیر LC_{50} به دست آمده از این دو ترکیب پس از ۵ روز از زمان آزمایش بود و اسانس کشندگی بیش‌تری نسبت به نانوامولسیون داشت (جدول ۳).

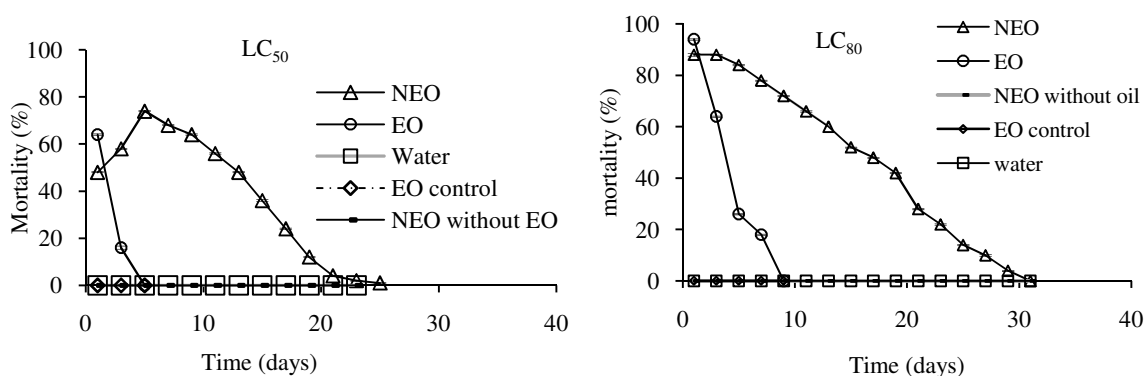
دوام سمیت تنفسی اسانس پونه و نانوامولسیون حاوی

اسانس روی شب‌پره آرد: دوام اسانس معمولی و نانوامولسیون حاوی اسانس روی لاروهای سن پنجم در دو غلظت $LC_{80}=1111/1$ میکرولیتر بر لیتر هوا و $LC_{50}=413/7$ میکرولیتر بر لیتر هوا انجام شد. نتایج نشان داد که در هر دو غلظت دوام

جدول ۴- مقادیر PT_{50} سمیت تنفسی اسانس پونه و نانوامولسیون حاوی اسانس علیه لارو سن پنجم شب‌پره آرد

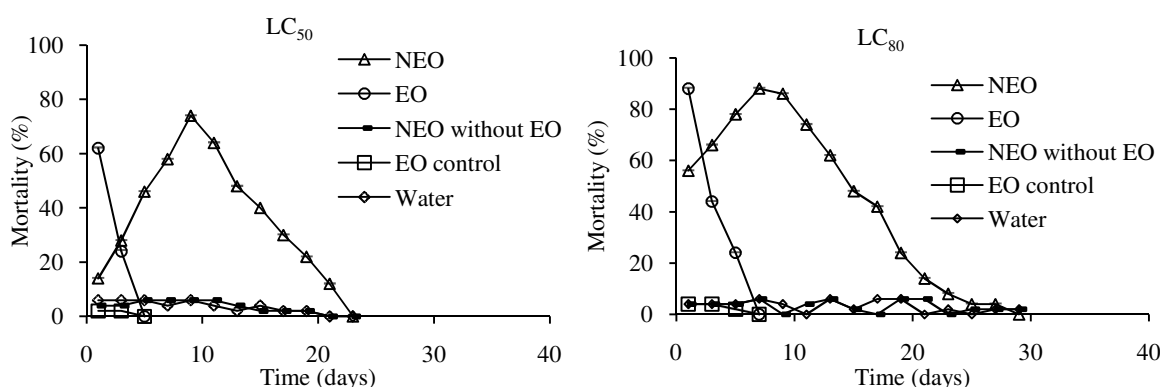
Table 4. PT_{50} values for fumigant toxicity of *Mentha longifolia* oil and its nanoemulsion against *Ephestia kuehniella* 5th instar larva

Concentration (μl/l)	compounds	PT_{50} (day)	Chi-square	n	df	Intercept	slope±SE	P-value	Confidence limit 95%	
									Lower	Upper
1111.1	Nanoemulsion	15.18	3.00	450	7	2.79±0.37	-2.36±0.33	0.88	13.46	17.70
413.7		11.45	2.86	350	5	2.31±0.41	-2.18±0.40	0.72	9.92	13.62
1111.1	Essential oil	3.69	0.7	200	2	1.65±0.25	-2.94±0.40	0.71	3.13	4.33



شکل ۵- دوام سمیت تنفسی اسانس پونه و نانوامولسیون حاوی اسانس به همراه تیمارهای شاهد علیه لارو شب‌پره آرد در دو غلظت LC_{50} و LC_{80}

Fig. 5. Durability for fumigant toxicity of *Mentha longifolia* essential oil and its nanoemulsion of oil with controls on *Ephestia kuehniella* larva at LC_{50} and LC_{80}



شکل ۶- دوام سمیت تنفسی اسانس پونه و نانوامولسیون حاوی اسانس به همراه شاهد روی تخم شب‌پره آرد در دو غلظت LC_{50} و LC_{80}

Fig. 6. Durability for fumigant toxicity of *Mentha longifolia* essential oil and its nanoemulsion with controls on *Ephestia kuehniella* egg at LC_{50} and LC_{80}

جدول ۵- مقدار PT_{50} سمیت تنفسی اسانس پونه و نانوامولسیون حاوی اسانس روی تخم شب‌پره آرد

Table 5. PT_{50} values for fumigant toxicity of *Mentha longifolia* oil and its nanoemulsion against *Ephestia Kuhlmei* egg

Concentration (μ l/l)	compounds	PT_{50} (day)	Chi-square	n	df	Intercept	slope \pm SE	P-value	Confidence limit 95%	
									Lower	Upper
92.6	Nanoemulsion	14.44	1.04	300	4	6.19 \pm 0.87	-5.34 \pm 0.76	0.90	13.49	15.57
75.03		12.60	0.28	300	4	5.03 \pm 0.81	-4.55 \pm 0.73	0.99	11.49	13.63
92.6	Essential oil	2.58	0.01	150	1	1.14 \pm 0.22	-2.78 \pm 0.44	0.91	2.10	3.16

جدول ۶- مقایسه PT_{50} محاسبه شده در بررسی سمیت تنفسی اسانس پونه و نانوامولسیون حاوی اسانس روی مراحل مختلف شب‌پره آرد

Table 6. Comparison of PT_{50} of fumigant toxicity of *Mentha longifolia* oil and nanoemulsion of oil on different stages of *Ephestia kuehniella*

Stages	PT_{50} (day) (EO ²)	PT_{50} (day) (NEO ³)	RMP ¹	95% Confidence limits
Larva	3.69	15.18	4.04	2.56-7.74
egg	2.58	14.44	5.10	2.82-12.73

1- RMP= Relative Median Potency

2- Essential oil

3- Nanoemulsion

در سال‌های اخیر گرایش رو به افزایشی برای کاربرد تکنیک‌های نانوکپسوله کردن به عنوان روش‌های جدید فرمولاسیون در جهت بهبود عملکرد اسانس‌های گیاهی و دیگر ترکیبات ایجاد شده است (Majeed et al., 2015). در این مطالعه نانوامولسیون ۵ درصد حاوی اسانس پونه با استفاده از یک روش جدید تولید شد و اثرات آن روی سمیت و دوام اسانس پونه بررسی شد. اسانس پونه به عنوان ماده موثره فرمولاسیون، GMS و مواد همراه به کار رفته در تولید این ترکیب همگی با محیط زیست سازگار بوده و برای پستانداران بی‌خطر می‌باشند (Anandharamakrishnan, 2014). با توجه به رهایش تدریجی ماده موثره نانوامولسیون، ترکیب تولید شده سمیت تنفسی قابل قبولی روی لاروها و تخم‌های شب‌پره آرد از خود نشان داد. میزان LC_{50} برآورد شده در مرحله لاروکشی با استفاده از اسانس معمولی و نانوامولسیون حاوی اسانس بسیار به یکدیگر نزدیک و به ترتیب برابر با ۴۱۳/۶۹ و ۴۲۷/۰۵ میکرولیتر بر لیتر هوا بود. بالاترین غلظت به کار رفته در این مرحله برای هر دو ترکیب مشابه و معادل ۱۱۱۱/۱ میکرولیتر بر لیتر هوا تخمین زده شد. از نتایج فوق چنین

غلظت‌های مورد استفاده از اسانس پونه و نانوامولسیون تهیه شده از آن برای مرحله تخم آفت معادل $LC_{50}=75/03$ و $LC_{80}=92/6$ میکرولیتر بر لیتر هوا بود. مطابق با شکل ۶، در آزمایش تخم‌کشی نیز مانند آزمایش قبل در هر دو غلظت روند مرگ‌ومیر تخم‌ها بعد از استفاده از نانوامولسیون تدریجی و رهایش اسانس کنترل شده بود. مدت زمانی که طول کشید تخم‌ها بر اثر نانوامولسیون به ۵۰ درصد مرگ و میر در غلظت ۹۲/۶ میکرولیتر بر لیتر هوا برسند، ۱۴/۴۴ روز تعیین شد. برای اسانس معمولی این پارامتر برابر با ۲/۵۸ روز بود. در این مرحله نیز تفاوتی میان مرگ‌ومیر حاصل از آب و نانوامولسیون بدون اسانس مشاهده نشد. میزان PT_{50} نانوامولسیون در غلظت ۷۵/۰۳ میکرولیتر بر لیتر هوا، ۱۲/۶۰ روز برآورد شد. برخلاف نانوامولسیون اسانس معمولی در این غلظت فاقد دوام بود و پس از گذشت پنج روز میزان تلفات تخم‌های شب‌پره آرد به صفر رسید (جدول ۵). محاسبه میزان سمیت نسبی نشان داد میان مقادیر PT_{50} اسانس و نانوامولسیون حاوی اسانس پونه در هر دو مراحل لاروکشی و تخم‌کشی آفت اختلاف معنی‌دار وجود دارد (جدول ۶).

درصد) رهایش اسانس میکروکپسوله شده *R. officinalis* در طول ۲۵ روز رخ داده است (Passino et al., 2004). دوام بالای نانومولسیون اسانس سه گیاه (*Ocimum americanum* (L.)، *Citronella nardus* (L.) و *Zizanioides Vetiveria* (L.) علیه پشه *Aedes aegypti* L. (Nuchuchua et al., 2009)، نانوژل اسانس *C. copitum* روی شیشه گندم *Sitophilus granarius* L. و شیشه آرد *Tribolium confusum* Jacquelin du Val (Ziaee et al., 2014) و ماندگاری طولانی بیونانوفیبر اسانس زنیان علیه شب‌پره هندی، *Plodia interpunctella* (Hübner) (Allahvaisi et al., 2017) مشخص شده است. فرمولاسیون نانومولسیون باعث افزایش دوام سمیت تماسی اسانس آویشن شیرازی *Zataria multiflora* علیه لاروهای ۱۴-۷ روزه شب‌پره آرد شده است (Emamjomeh et al., 2017). این محققین بیان کردند نانوکپسوله کردن اسانس گیاهی باعث می‌شود ماده موثره به صورت کنترل شده آزاد شده و اثر آن در طولانی مدت حفظ می‌شود که با نتایج بررسی حاضر مطابقت دارد. چوپانیان و همکاران نیز نشان دادند نانومولسیون اسانس گیاه چریش (neem oil) در دمای ۲۵ درجه سلسیوس دارای ثبات فیزیکی بالایی بود و به مدت ۹۰ روز بدون هیچ گونه تغییری باقی ماند (Choupanian et al., 2017). اسانس نانوکپسوله شده *Rosmarinus officinalis* نیز باعث رهایش تدریجی و حفظ خاصیت تنفسی اسانس علیه شیشه آرد *T. castaneum* در طولانی مدت شد (Khoobdeli et al., 2017). گیاه پونه دارای پراکنش زیاد در نواحی مختلف ایران می‌باشد. اثرات حشره‌کشی اسانس این گیاه مانند تخم‌کشی، دورکنندگی، بازدارندگی تخم‌ریزی و سمیت تنفسی تاکنون روی آفات مختلفی گزارش شده است (Shakarami et al., 2010; Akrami et al., 2011; Saeidi and Moharramipour, 2013). تا کنون هیچ مطالعه‌ای روی تهیه فرمولاسیون اسانس پونه و اثر آن روی شب‌پره آرد انجام نشده است. اثر قابل قبول این نانومولسیون روی کنترل مراحل مختلف شب‌پره آرد می‌تواند امکان تولید انبوه این فرمولاسیون را فراهم نماید. به طور کلی با توجه به

برمی‌آید که اسانس بعد از فرمولاسیون توانست خاصیت حشره‌کشی خود را حفظ کند. در مرحله تخم‌کشی میزان ۵۰ درصد از تلفات تخم هنگام استفاده از اسانس در غلظت پایین‌تری (۷۵/۰۳ میکرولیتر بر لیتر هوا) نسبت به نانومولسیون (۹۳/۹۸ میکرولیتر بر لیتر هوا) به دست آمد. در این رابطه مطالعات مشابهی وجود دارد که نشان می‌دهد اسانس نانوکپسوله شده نسبت به اسانس معمولی سمیت تنفسی کم‌تری در زمان اولیه پس از آزمایش از خود نشان می‌دهد. نگهبان و همکاران سمیت تنفسی بالاتر (LC₅₀= 3.78 ppm) اسانس درمنه را در مدت زمان ۲۴ ساعت پس از انجام آزمایش نسبت به اسانس نانوکپسوله شده (LC₅₀= 11 ppm)، علیه شب‌پره پشت الماسی گزارش کردند (Negahban, 2012). در مطالعات دیگری نیز مانند بررسی اثر اسانس نانوکپسوله شده *Carum copitum* روی آفت شیشه‌برنج، *Sitophilus oryzae* (L.) (Jamal et al., 2012) و فرمولاسیون لیپیدی جامد اسانس زنیان روی شیشه آرد، *Tribolium castaneum* (H.) (Khademi, 2012) یافته‌های مشابهی به دست آمد. براساس یافته‌های حاضر اگرچه در مدت زمان کوتاه اسانس معمولی نسبت به نانومولسیون حاوی اسانس دارای سمیت بیش‌تری بود، اما با گذشت زمان میزان کشندگی اسانس معمولی نسبت به اسانس فرموله شده کاهش چشم‌گیری یافت. بنابراین تکنیک نانومولسیون علاوه بر حفظ ماهیت سمی اسانس در مدت زمان کوتاه، باعث افزایش قابل توجه ماندگاری و دوام آن شد. نانومولسیون تولید شده طبق روش مطالعه حاضر می‌تواند باعث بهبود عملکرد و حفظ خواص اسانس در طولانی مدت شود. مطابق با یافته‌های حاضر، (Negahban 2012) روند نزولی و تدریجی کاهش نرخ مرگ‌ومیر شب‌پره پشت الماسی را تحت تاثیر غلظت بالای اسانس نانوکپسوله شده درمنه (۱۰ پی‌پی‌ام) تایید کردند. در این غلظت دوام اسانس معمولی درمنه و اسانس نانوکپسوله شده به ترتیب برابر با ۱۳ و ۵۱ روز تعیین شد. همچنین، پاسیون و همکاران نشان دادند بیش‌ترین میزان (۷۵

دهد. بنابراین می‌توان در طرح‌های آینده با استفاده از تکنیک نانو و همچنین استفاده از اسانس‌هایی با اثرات کشندگی بالاتر در جهت کنترل سایر آفات اقدام نمود و بر بسیاری از محدودیت‌های استفاده از اسانس در کنترل آفات غلبه کرد.

نتایج فوق می‌توان گفت اگر چه اسانس معمولی پونه در غلظت تقریباً بالایی توانست خاصیت کشندگی روی شب پره آرد داشته باشد؛ اما فرموله کردن آن به صورت نانوآمولسیون توانست با حفظ اثرات کشندگی اسانس دوام آن را نیز افزایش

References

- ABBOTT, W. S. 1925. A method for computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18: 265-267.
- AKRAMI, H., S. MOHARRAMIPOUR and S. IMANI, 2011. Comparative effect of *Thymus kotschyanus* and *Mentha longifolia* essential oils on oviposition deterrence and repellency of *Callosobruchus maculatus* F. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 27: 2-10.
- ALLAHVAISI, S., K. TALEBI JAHROMI, S. IMANI and M. KHANJANI, 2017. Efficacy of electrospun bionanofibers as fumigant pesticides in foodstuff storage. *Journal of Plant Protection Research*, 57: 72-80.
- ANANDHARAMAKRISHNAN, C. 2014. Techniques for Nanoencapsulation of Food Ingredients. *Springer Briefs in Food, Health, and Nutrition* pp. 1-69.
- BOYER, S., H. ZHANG and G. LEMPERIERE, 2012. A review of control methods and resistance mechanisms in stored-product insects. *Bulletin of Entomological Research*, 102: 212-229.
- BRINDLEY, T. A. 1930. The growth and development of *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera) and *Tribolium confusum* Duval (Coleoptera) under controlled conditions of temperature and relative humidity. *Annals of Entomological Society of America*, 23: 741-757.
- CHOUPIANIAN, M., D. OMAR, M. BASRI and N. ASIB, 2017. Preparation and characterization of neem oil nanoemulsion formulations against *Sitophilus oryzae* and *Tribolium castaneum* adults. *Journal of Pesticide Science*, 42: 158-165.
- DONSI, F., M. SESSA, H. MEDIOUNI, A. MGAIDI and G. FERRARI, 2011. Encapsulation of bioactive compounds in nanoemulsion based delivery systems. *Procedia Food Science*, 1: 1666-1671.
- EMAMJOMEH, L., S. IMANI, KH. TALEBI, S. MOHARRAMIPOUR and K. LARIJANI, 2017. Preparation of nanoemulsion formulation of essential oil of *Zataria multiflora* and comparison of contact toxicity with pure essential oil on *Ephestia kuehniella*. *Entomology and Phytopathology*, 85: 181-190.
- GUPTA, A., H. B. ERAL, T. A. HATTON and P. S. DOYLE, 2016. Nanoemulsions: formation, properties and applications. *Royal Society of Chemistry*, 12: 2826-2841.
- HILL, D. S. 2002. Pests: class insecta. p. 135-316. In: "Pests of Stored Foodstuffs and Their Control". Kluwer Academic Publishers, Springer, Malaysia, 453 pp.
- ISMAN, M. B. 2000. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection*, 19 (8-10): 603-608.
- JAMAL, M., S. MOHARRAMIPOUR, M. ZANDI and M. NEGAHBAN, 2012. Efficacy of nanoencapsulated formulation of essential oil from *Carum copticum* seeds on feeding behavior of *Plutella xylostella* (Lep: Plutellidae). *Journal of Entomological Society of Iran*, 33: 23-31.
- JEMAA, J. M., N. TERSIM and E. BOUSHIH, 2013. Fumigant control of the mediterranean flour moth *Ephestia kuehniella* with the noble laurel *Laurus nobilis* essential oils. *Tunisian Journal of Plant Protection*, 8: 33-44.
- KAVADIA, M. R., M. G. YADAV, A. A. ODANETH and A. M. LALI, 2017. Production of glycerol monostearate by immobilized *Candida antarctica* B lipase in organic media. *Journal of Applied Biotechnology and Bioengineering*, 2: 1-7.
- KHOODELI, M., M. AHSAEI and M. FARZANEH, 2017. Insecticidal activity of polycaprolactone nanocapsules loaded with *Rosmarinus officinalis* essential oil in

- Tribolium castaneum* (Herbst): Insecticidal activity of nanocapsules. *Entomological Research*, 47: 175-184.
- LAI, F., S. A. WISSING, R. H. MULLER and A. M. FODDA, 2006. *Artemisia arborescens* L. essential oil-loaded solid lipid nanoparticles for potential agricultural application: preparation and characterization. *American Association of Pharmaceutical Scientists*, 7: 1-9.
- MAJEED, H., Y. Y. BIAN, B. ALI, A. JAMIL, U. MAJEED, Q. FARID, K. J. IQBAL, C. F. SHOEMAKER and ZH. FANG, 2015. *Essential Oil Encapsulations: Uses, Procedures, and Trends*. The Royal Society of Chemistry, 5: 58449-58463.
- MOHARRAMIPOUR, S. and M. NEGAHBAN, 2014. Basic and applied aspects of biopesticides. *Plant Essential Oil and Pest Management*. In: Sahayaraj, K. (eds) *Basic and Applied Aspects of Biopesticides*. Springer, New Delhi, India, 384 pp.
- MORETTI, M. D. L., G. SANNA-PASSINO, S. DEMONTIS and E. BAZZONI, 2002. Essential oil formulations useful as a new tool for the insect pest control. *American Association of Pharmaceutical Scientists*, 3: 1-11.
- NEGAHBAN, M. 2012. Insecticidal properties of nanocapsulated essential oil of *Artemisia sieberi* Besser on *Plutella xylostella* and *Tribolium castaneum*. Ph.D. thesis, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University. 173 pp.
- NEGAHBAN, M., S. MOHARRAMIPOUR and F. SEFIDKON, 2007. Fumigant toxicity of essential oil from *Artemisia sieberi* Besser against three stored-product insects. *Journal of Stored Products Research*, 43: 123-128.
- NEGAHBAN, M., S. MOHARRAMIPOUR, M. ZANDI and S. A. HASHEMI 2013a. Efficiency of nanoencapsulated essential oil of *Artemisia sieberi* Besser on nutritional indices of *Plutella xylostella*. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 29: 692-708.
- NEGAHBAN, M., S. MOHARRAMIPOUR, M. ZANDI and S. A. HASHEMI 2013b. Repellent activity of nanoencapsulated essential oil of *Artemisia sieberi* Besser on *Plutella xylostella* L. larvae. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 29: 909-924.
- NUCHUCHUA, O., S. USAWADEE, N. UAWONGYART, S. PUTTIPIATKHACHORN, A. SOOTTITANTAWAT and U. RUKTANONCHAI, 2009. In vitro characterization and mosquito (*Aedes aegypti*) repellent activity of essential-oils-loaded nanoemulsions. *American Association of Pharmaceutical Scientists*, 10: 1234-1242.
- PASSINO, G. S., E. BAZZONI and M. D. L. MORETTI, 2004. Microcapsulated essential oils active against Indian meal moth. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*, 30: 125-132.
- SAEIDI, M. and S. MOHARRAMIPOUR, 2013. Insecticidal and repellent activities of *Artemisia khorassanica*, *Rosmarinus officinalis* and *Mentha longifolia* essential oils on *Tribolium confusum*. *Journal of Crop Protection*, 2: 23-31.
- SEVEG, D., N. NITZAN, D. CHAIMOVITSH, A. ESHEL, and N. DUDAI, 2012. Chemical and morphological diversity in wild populations of *Mentha longifolia* in Israel. *Chemistry and Biodiversity*, 9: 577-587.
- SHAKARAMI, J., M. FALAHZADEH and S. ALMASI, 2010. Fumigation toxicity and oviposition deterrence of four plant essential oils on cowpea beetle. *Plant Protection Journal*, 2: 265-276.
- SHAKARAMI, J., L. POURHOSSEINI, R. VAFAEI-SHOUSHTARI and S. GOLDASTEHEH, 2008. Ovicidal effect of three plant essential oils on *Callosobruchus maculatus* F. (Col., Bruchidae). *Journal of Entomological Research*, 3: 221-228.
- SPSS, 2007. *SPSS 16 for Windows User's Guide Release*, Spss Inc, Chicago.
- TOPUZ, O. K., E. B. OZVURAL, Q. ZHAO, Q. HUANG, M. CHIKINDAS and M. GULUKCU, 2016. Physical and antimicrobial properties of anise oil loaded nanoemulsions on the survival of foodborne pathogens. *Food Chemistry*, 203: 117-123.
- ZIAEE, M., S. MOHARRAMIPOUR and A. MOHSENI FAR, 2014. Toxicity of *Carum copitum* essential oil-loaded nanogel against *Sitophilus granarius* and *Tribolium confusum*. *Journal of Applied Entomology*, 138, 763:771.

ارزیابی رابطه درصد عددی و وزنی سن‌زدگی در دانه‌های گندم توسط *Eurygaster integriceps*

جعفر محقق نیشابوری✉ و آسیه ابوالحسنی

به ترتیب استاد و کارشناس، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۳۹۷؛ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۹۷)

چکیده

یکی از زیان‌های عمده سن معمولی گندم *Eurygaster integriceps*، اثرات مخرب آن بر کیفیت دانه گندم است که به صورت درصد سن‌زدگی دانه‌ها بیان می‌شود. پوره‌ها و حشره کامل سن با فرو بردن قطعات دهانی خود در دانه و انتقال آنزیم‌های بزاقی به درون آن سبب می‌شوند که گلوتن دانه گندم تجزیه شود. بدنبال آن کیفیت خمیر و خواص نانوائی آن کاهش می‌یابد. درصد سن‌زدگی دانه‌ها به دو روش عددی و وزنی محاسبه می‌شود. در این بررسی، آزمایشی برای مقایسه و رابطه میان این دو روش انجام شد. تعداد ۲۲۵ نمونه ده‌گرمی از نمونه‌های گندم سن‌زده متعلق به سه مرکز خرید واقع در استان‌های اراک (۳ × ۳۰)، قزوین (۳ × ۲۰) و لرستان (۳ × ۲۵) آزمایش شد. در توزین دانه‌ها از ترازوی با دقت ۰/۱ میلی گرم استفاده و به تفکیک تعداد و وزن دانه‌های سن‌زده و سالم یادداشت شد. به‌طور کلی دانه‌های سالم با میانگین وزن ۳۴ میلی گرم از دانه‌های سن‌زده با میانگین وزن ۳۰ میلی گرم سنگین‌تر بودند. با وجود تفاوت معنی‌دار درصد سن‌زدگی دانه‌ها بین روش عددی و وزنی، همبستگی مثبت معنی‌داری میان این دو روش وجود داشت ($r = 0.98, P < 0.0001$). با استفاده از معادله $y = 0.8374x + 0.02$ ، که در آن x درصد عددی و y درصد وزنی سن‌زدگی است، امکان تبدیل هریک از روش‌های تعداد و وزن دانه‌های سن‌زده به روش دیگر وجود دارد. به‌رحال در مقایسه دو روش یادشده، شیوه وزنی به لحاظ سادگی و سرعت برتری دارد.

واژه‌های کلیدی: دانه سن‌زده، گندم، *Eurygaster integriceps*

Evaluation of the relationship between numerical and weight percentage of kernel damaged by sunn pest, *Eurygaster integriceps*

J. MOHAGHEGH✉ and A. ABOLHASSANI

Professor & Technician, Respectively; Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (ARREO), Tehran, Iran

Abstract

One of the major damage of sunn pest, *Eurygaster integriceps*, is its destructive effects on the quality of wheat grains, which is known as sunn pest kernel damaged. Nymphs and adult of the bugs inject salivary glands enzymes by piercing-sucking mouthparts into the grains, which degrade glutes, reduce dough and bread wheat quality. Grain damage percentage is calculated by the both numerical and weighing methods. In this research, an experiment was conducted to compare the relationship between these two methods. We measured 225 damaged wheat grain samples delivered from Arak ($n = 30 \times 3$), Ghazvin ($n = 20 \times 3$) and Lorestan ($n = 25 \times 3$). A digital scale with 0.1 mg precision was used to weigh kernels. For these samples, the number and weight of damaged and undamaged grains were recorded. In general, undamaged kernels with an average weight of 34 mg were heavier than damaged ones with average weight of 30 mg. Although, there was a significant difference between the numerical and the weight values, a significant positive correlation ($r = 0.98; P < 0.0001$) was detected between the two methods. By using the equation $y = 0.8374x + 0.02$, where x and y are the numerical and weight values, respectively, we are able to convert values from a given method to another one. However, the weighing method is advantageous in terms of simplicity and speed.

Key words: Damaged kernel, *Eurygaster integriceps*, wheat.

مقدمه

یکی از زیان‌های آشکار سن معمولی گندم *Eurygaster integriceps* اثرات مخرب آن به کیفیت دانه گندم است. پوره‌ها و حشرات کامل سن با فرو بردن قطعات دهانی خود در دانه و انتقال آنزیم‌های بزاقی سبب می‌شوند که گلوتهن دانه گندم کیفیت ذاتی خود را به لحاظ خواص نانوائی از دست بدهد (Kretovich, 1944; Paulian and Popov, 1980; Dizlek, 2017). واضح است که همراه با آسیب کیفی به دانه‌های گندم به لحاظ وزنی اگر تغذیه از دانه شدید باشد، به لحاظ کمی هم اثرات مخرب قابل ملاحظه‌ای را خواهد گذاشت (Paulian and Popov, 1980).

از نظر اثرات زیان‌آور سن، آنچه کشاورزان هنگام تحویل گندم به مراکز خرید و سیلو با آن مواجه هستند، درصد سن‌زدگی دانه‌هاست. مطابق موازین استاندارد ملی شماره ۱۰۴، سن‌زدگی دانه‌های گندم تا میزان ۲٪ قابل قبول بوده و ضرری را متوجه تولیدکنندگان نمی‌کند (INSO-104, 2012). مطالعات عسکریان‌زاده و همکاران در مقایسه درصد‌های سن‌زدگی: ۰، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶ و ۱۲ درصد، برای ارقام گندم سرداری، امید، روشن و مارون حد قابل قبول سن‌زدگی دانه‌ها را دو درصد گزارش کرده‌اند (Askarianzadeh et al., 2008).

چگونگی تعیین درصد، یکی از مسائل مورد توجه در مقوله سن‌زدگی دانه‌های گندم است. آنچه عسکریان‌زاده و همکاران در بررسی‌های خود مشخص کردند بر اساس درصد عددی دانه‌های سن‌زده بود. اما آنچه که مبنای عملی در شاخص‌های استاندارد ملی ۱۰۴ و محاسبات مراکز خرید گندم و سیلوه‌ها قرار دارد، درصد وزنی دانه‌های سن‌زده نسبت به وزن کل دانه‌های گندم است (INSO-104, 2012). همچنین دیزلک بیش از دو درصد سن‌زدگی را سبب از بین رفتن خواص نانوائی گندم بیان نموده است (Dizlek, 2010). جان‌هلال و همکاران نیز میزان ۱/۲٪ و الحرمین بین ۲ تا ۳ درصد سن‌زدگی دانه‌ها را حد قابل قبول معرفی نموده‌اند (El-Haramein et al., 1984; Canhilal et al., 2005). اما برخی از

پژوهندگان میزان سن‌زدگی دانه را تا ۵٪ هم قابل پذیرش می‌دانند (Critchley, 1998). در مطالعات مربوط به تاثیر سن‌زدگی در کیفیت دانه گندم، چه در مورد سن معمولی گندم و چه در سایر سن‌های گندم، روش اصلی محاسبه، درصد عددی است (Every, 1992; Karababa and Ozan, 1998; Askarianzadeh, 1999; Bahrami et al., 2003; Ghannadha and Ayeeneh, 2003; Dizlek, 2017). اکنون این سوال مطرح است که آیا تفاوتی در میزان و روند در صد وزنی و عددی سن‌زدگی وجود دارد؟ این پژوهش به دنبال پاسخی برای این پرسش است.

روش بررسی

از هریک از نمونه‌های گندم سن‌زده متعلق به سه مرکز خرید واقع در استان‌های اراک، قزوین و لرستان به ترتیب ۳۰، ۲۰ و ۲۵ نمونه یکصد گرمی تهیه شد. از هر نمونه صدگرمی، به نوبه خود تعداد سه نمونه ۱۰ گرمی گرفته شد، به طوری که مجموعاً تعداد ۲۲۵ نمونه به دست آمد. این نمونه‌ها مربوط به محموله‌های جداگانه در سال ۱۳۹۶ بودند. از نمونه‌های ده‌گرمی، ابتدا خاشاک و دانه‌های غیر گندم جدا سپس به تفکیک دانه‌های سن‌زده و سالم شمارش و یادداشت شد. همچنین دانه‌های یاد شده، به کمک ترازوی Sartorius TE214S (Goettingen, Germany) با دقت یک ده‌هزارم گرم توزین و ثبت شد.

مطابق تعریف دانه سن‌زده، دانه‌ای است که در محل تغذیه سن، دارای لکه مدور رنگ پریده بوده که در وسط لکه نیز دارای یک نقطه سیاه‌رنگ که همان محل تغذیه سن است، می‌باشد (Kretovich, 1944; Paulian and Popov, 1980; Javahery, 1995; Critchley, 1998). درصد وزنی و عددی دانه‌های سن‌زده، به ترتیب از تعداد و وزن آن‌ها به مجموع تعداد و وزن دانه‌های سالم و سن‌زده به دست آمد.

برای تعیین رابطه درصد‌های وزنی و عددی سن‌زدگی از تجزیه آماری همبستگی - روش Pearson - و نرم افزار SAS

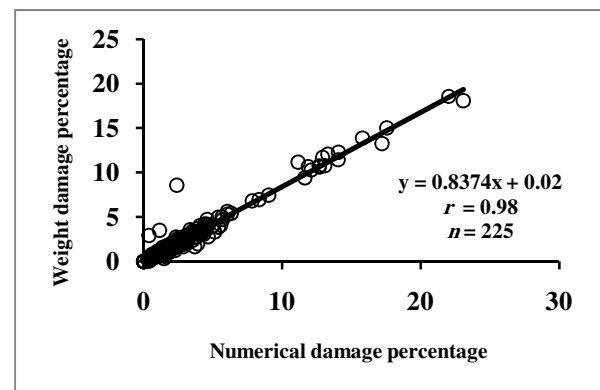
مقایسه آماری بین دانه‌های سالم و سن‌زده در جدول ۱ نشان داده شده است. به‌طور کلی دانه‌های سالم با وزن ۳۴ میلی‌گرم نسبت به دانه‌های سن‌زده با میانگین وزن ۳۰ میلی‌گرم سنگین‌تر بودند. برآورد درصد سن‌زدگی در دو روش عددی و وزنی با یکدیگر یکسان نبود، به‌طوری‌که آزمون *t* جفت‌شده (paired sample *t*-test) بین این دو روش تفاوت معنی‌داری را نشان داد ($P < 0.001$) (جدول ۱). برآورد درصد سن‌زدگی در روش عددی همواره کمی بیشتر از برآورد آن در روش وزنی است. این مورد در بررسی‌های مردوخسی و حیدری (Mardoukhi and Heidari, 1993) و همچنین دیزلک و اسلام‌وقلو مشاهده شده است (Dizlek and Islamoğlu, 2010). معادله رگرسیون خطی بین درصد سن‌زدگی در دو روش عددی و وزنی به‌صورت $y = 0.8374x + 0.02$ که در آن *x* درصد عددی و *y* درصد وزنی سن‌زدگی است.

درصد عددی که در مطالعات پژوهشگران مبنای تعیین سن‌زدگی بوده است، روش شناخته‌شده و مورد پذیرش است. با این وجود سهولت روش وزنی، کاربرد آن را در مراکز خرید و سیلوها تسهیل نموده است. در ترکیه نیز با وجود مقایسه این دو روش و شباهت آن‌ها با یکدیگر، روش عددی قابل اعتمادتر بیان شده است (Dizlek and Islamoğlu, 2010).

استفاده شد. در مقایسه آماری بین دانه‌های سالم و سن‌زده از آزمون *t* و برای مقایسه آماری بین درصد عددی و درصد وزنی سن‌زدگی، از paired *t*-test استفاده شد. لازم به ذکر است که محموله‌های اصلی گندم فاقد مشخصات رقم بود.

نتیجه و بحث

رابطه بین درصد عددی و وزنی سن‌زدگی مثبت، قوی و معنی‌دار ($r = 0.98$; $P < 0.0001$) بدست آمد. شکل ۱ بیانگر این رابطه می‌باشد. در نمونه‌های مورد بررسی فراوانی سن‌زدگی دانه‌ها بیشتر در محدوده نزدیک صفر تا هفت درصد بود.



شکل ۱- همبستگی میان درصد عددی و وزنی سن‌زدگی دانه‌های گندم.
Fig. 1. Correlation between numerical and weight damage percentage in wheat kernels.

جدول ۱- مقایسه وزن دانه سالم و سن‌زده گندم و درصد عددی و وزنی سن‌زدگی.

Table 1. Comparison between the weight of undamaged and damaged wheat kernels, and numerical and weight damage percentages.

وضعیت دانه Kernel type	میانگین Mean ± SE	<i>t</i> -value	df	<i>P</i>	
سن‌زده Damaged	30.1 ± 0.25 (n=210)	3.192	227.6	0.002	
وزن دانه (میلی‌گرم) Kernel weight (mg)	سالم Undamaged				34.7 ± 0.25 (n=225)
درصد سن‌زدگی Damaged %	درصد عددی Numerical %	3.28 ± 0.25 (n=210)	8.258	209	<0.001
	درصد وزنی Weight %	2.77 ± 0.22 (n=210)			

روش وزنی به لحاظ سهولت و زمان مورد نیاز، به نسبت وقت کمتری از عوامل اجرایی در مراکز خرید و سیلوها صرف برآورد سن زدگی می‌شود، استفاده از این روش با در نظر داشتن موارد یادشده اطمینان بخش است.

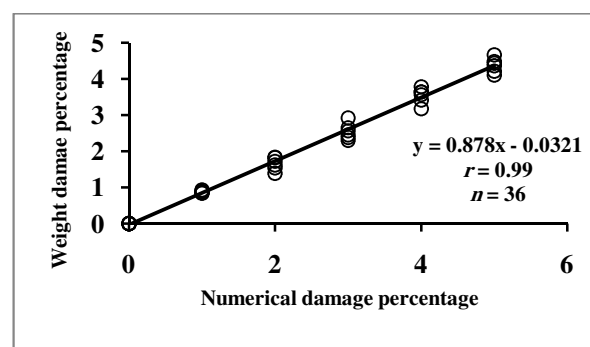
سپاسگزاری

بدین وسیله از همکاری آقای مهندس معین نمینی (از سازمان حفظ نباتات کشور) تشکر و قدردانی می‌شود.

References

- ASKARIANZADEH, A. R. 1999. An investigation on protein, reology and baking quality of improved wheat varieties damaged by cereal sunn pest *E. integriceps*. MS thesis Tarbiat Modarres University.
- ASKARIANZADEH, A., N. RAJABZADEH and A. ABDOLLAHI, 2008. Injury effects of cereal sunn pest *Eurygaster integriceps* Put. in wheat varieties on the baking properties and suggested methods to improve their quality. *Journal of Agronomic Science* 1: 45-56 (In Persian with English summary).
- BAHRAMI, N., GH. RADJABI, M. REZABEIGI and K. KAMALI, 2003. Study on economic injury level of Sunn pest (*Eurygaster integriceps* Put.) on wheat in rainfed field of Kermanshah province. *Applied Entomology and Phytopathology* 70:29-44 (In Persian with English summary).
- CANHILAL, R., H. KUTUK, A. D. KANAT, M. ISLAMULU, F. EL-HARAMEIN and M. EL-BOUHSSINI, 2005. Economic threshold for the sunn pest, *Eurygaster integriceps* Put. (Hemiptera: Scutelleridae), on wheat in southeastern Turkey. *Journal of Agricultural and Urban Entomology* 22: 191-201.
- CRITCHLEY, B. R. 1998. Literature review of sunn pest *Eurygaster integriceps* Put. (Hemiptera, Scutelleridae). *Crop Protection* 17: 271-287.
- DIZLEK, H. 2010. A study on the determination of the some characteristics of sunn pest damaged bread wheats and

دیزلک و اسلاموقلو در مقایسه میان درصد وزنی و عددی سن زدگی (دانه‌های سن زده از ۱ تا ۵ درصد) در شش رقم گندم دریافتند که برآورد درصد وزنی همواره کمتر از میزان درصد عددی است. با استفاده از داده‌های ارائه شده آن‌ها معادله $y = 0.878x - 0.0328$ (به دست آمد x درصد عددی و y درصد وزنی سن زدگی) (شکل ۲).



شکل ۲- همبستگی میان درصد عددی و وزنی سن زدگی دانه‌های گندم (داده‌ها از Dizlek and Islamoğlu, 2010).

Fig. 2. Correlation between numerical and weight damage percentage in wheat kernels (data from Dizlek and Islamoğlu, 2010).

همانگونه که ملاحظه می‌شود این معادله بسیار مشابه معادله حاصل از پژوهش حاضر است. البته باید توجه داشت برخی از تفاوت‌ها می‌تواند به سبب تفاوت بین موقعیت طبیعی نمونه برداری از مراکز خرید (مطالعه حاضر) در برابر تنظیم درصدهای سن زدگی در دانه‌های کامل در آزمایشگاه (مطالعه دیزلک و اسلاموقلو) باشد. مهم‌تر آن‌که داده‌های پژوهشگران یادشده بر مبنای میانگین درصدهای سن زدگی بود، حال آنکه در پژوهش حاضر از داده‌های اصلی استفاده شده است.

با وجود تفاوت معنی‌دار درصد سن زدگی دانه‌ها میان روش عددی و وزنی، همبستگی مثبت قوی و معنی‌داری بین این دو روش وجود داشت. بنابراین از منظر کاربردی در صد وزنی می‌تواند به خوبی بیانگر درصد عددی سن زدگی باشد. از طرفی با استفاده از معادله بالا امکان تبدیل هر یک از روش‌های سن زدگی به روش دیگر وجود دارد. از آنجا که در

- possibility of improving conditions. Ph. D. Dissertation, University of Çukurova, Turkey.
- DIZLEK, H. 2017. The effects of sunn pest (*Eurygaster* spp.) sucking degree in grain on wheat quality characteristics. Romanian Agricultural Research, No. 34: 1-11.
- DIZLEK, H. and M. ISLAMOĞLU, 2010. Comparison of methods for determination of sunn bug damage ratio in wheat commodity used in our country. Ziraat Fakültesi Dergisi, Uludağ Üniversitesi 24: 81-90.
- EL-HARAMEIN, F. J., P. WILLIAMS and A. RASHWANI, 1984. A simple test for the degree of damage caused in wheat by sunn bug (*Eurygaster* spp.) infestation. Rachis 3: 11-12.
- EVERY, D. 1992. Relationship of bread baking quality to levels of visible wheat-bug damage and insect proteinase activity in Wheat. Journal of Cereal Science 16: 183-193.
- GHANNADHA, M. R. and S. AYEENEH, 2003. Evaluation of sunnpest resistance in wheat. Iranian Journal of Agricultural Sciences 34: 769-783. (In Persian with English Abstract).
- INSO-104, 2012. Cereal and cereal products, wheat, specification and test methods. Retrieved May 7, 2018, from <http://standard.isiri.gov.ir/StandardView.aspx?Id=36452>.
- JAVAHERY, M. 1995. A technical review of sunn pests (Heteroptera: Pentatomioidea) with special reference to *Eurygaster integriceps* Puton. FAO/RNE.
- KARABABA, E. and A. N. OZAN, 1998. Effect of wheat bug (*Eurygaster integriceps*) damage on quality of a wheat variety grown in Turkey. Journal of the Science Food and Agriculture 77: 399-403.
- KRETOVICH, V. L. 1944. Biochemistry of the damage to grain by the wheat-bug. Cereal Chemistry 21: 1-16.
- MARDOUKHI, V. and M. HEIDARI, 1993. Study on variations of population density and damage of sunn pest (*Eurygaster integriceps* Put.) in dry rain-fed area of Kurdistan. Applied Entomology and Phytopathology 60: 29-41 (In Persian with English summary).
- PAULIAN, F. and C. POPOV, 1980. Sunn pest or cereal bug. Pp. 69-74 in Ciba-Geigy. Wheat documenta. Basle, Switzerland.

