آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ۷۱، شماره ۱، شهریور ۱۳۸۲

مقایسه روش‌های مختلف ارزیابی مقاومت به *Cercospora beticola* در چغندرقند تحت شرایط مزرعه، گلخانه و آزمایشگاه

Comparison of different methods for evaluating of resistance to *Cercospora beticola* in sugar beet under field, greenhouse and in *vitro* conditions

سعید عباسی[۱]، عزیزاله علیزاده[۱]، محمود مصباح[۲]، ابراهیم محمدی گل‌تپه[۱]
۱- گروه بیماری‌شناسی گیاهی دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس
۲- مؤسسهٔ تحقیقات اصلاح و تهیهٔ بذر چغندر قند
(تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۸۱، تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۸۲)

چکیده

به منظور مقایسه روش‌های مختلف ارزیابی مقاومت به *Cercospora beticola* عامل بیماری لکه‌برگی سرکوسپورایی، دوازده رقم چغندر قند با درجات مختلف مقاومت نسبت به عامل بیماری، تحت شرایط مزرعه، گلخانه و آزمایشگاه مورد ارزیابی قرار گرفتند. آزمایش‌های مزرعه‌ای در مناطق دزفول و قائم‌شهر به اجرا درآمد. در مطالعه گلخانه‌ای، پنج صفت شامل طول دورهٔ نهفتگی بیماری، درصد برگ‌های آلوده، تعداد لکه‌های آلوده در واحد سطح، قطر لکه‌ها و تعداد اسپورهای تولید شده در سطح یک لکه، مورد مقایسه قرار گرفت. در ارزیابی آزمایشگاهی مقاومت قطعات جداشدهٔ برگ، در محیط سترون در ظروف دردار مستطیل شکل از جنس پیرکس در سطح آب- آگار ۱/۵ ٪ مورد بررسی قرار گرفت.

براساس نتایج مطالعات گلخانه‌ای همه صفات مورد بررسی در مقاومت دخیل بوده و جز در موارد استثنایی در مجموع با افزایش درجهٔ مقاومت طول دورهٔ نهفتگی فزونی یافته و تراکم لکه در واحد سطح، قطر لکه، درصد برگ‌های آلوده و تعداد اسپور تولید شده در سطح

لکه کاهش می‌یابد. نتایج این مطالعه نشان داد که همبستگی بالایی بین ارزیابی‌های مزرعه‌ای، گلخانه‌ای و ارزیابی مقاومت از طریق برگ جداشده وجود دارد. بر این اساس ارزیابی مقاومت به هریک از روش‌های مزبور صورت گیرد، قابل اعتماد خواهد بود. از طرفی ارزیابی مقاومت در یک منطقه قابل تعمیم به مناطق دیگر بوده و لذا نیازی به تکرار ارزیابی در مناطق مختلف که مستلزم صرف وقت، هزینه و امکانات زیاد است، نمی‌باشد. بنابراین ارزیابی مزرعه‌ای مقاومت به بیماری لکه‌برگی سرکوسپورایی را می‌توان به یک منطقه که از شرایط محیطی مساعدی جهت آلودگی برخوردار باشد، محدود نمود. نتایج ارزیابی‌های انجام شده نشان می‌دهد که منطقهٔ قائم‌شهر، از این نظر شرایط بسیار مطلوبی دارا می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: چغندرقند، سرکوسپورا، *Cercospora beticola*، اجزای مقاومت

مقدمه

بیماری لکه‌برگی سرکوسپورایی چغندر قند (*Beta vulgaris* L.) که عامل آن *Cercospora beticola* Sacc. می‌باشد، مهمترین بیماری برگی این محصول است که تحت شرایط محیطی گرم و مرطوب، بیشترین خسارت را به محصول چغندر قند وارد می‌کند (Skaracis and Biancardi, 2000). در مزارع آلوده، عملکرد ریشه و عیار قند هر دو کاهش یافته و علاوه بر آن کیفیت فرآوری نیز به دلیل افزایش ناخالصی‌هایی نظیر سدیم، پتاسیم، نیترات و آمینواسیدها افت می‌کند، لذا عملکرد شکر قابل استحصال، به دلیل کاهش اجزاء اصلی عملکرد، کاهش می‌یابد (Rossi *et al.*, 2000; Shane and Teng, 1992). این بیماری انتشار جغرافیایی وسیعی داشته و در تمامی مناطق کشت میزبان اصلی آن یعنی چغندر قند، مشاهده می‌شود (Holtschulte, 2000). در ایران بیماری مزبور از خوزستان، کرانه‌های دریای خزر، اردبیل، ارومیه، خوی، بجنورد، بندرعباس و کازرون گزارش شده است (Ershad, 1995). استفاده از ارقام مقاوم در جهت کنترل بیماری به دلایل اقتصادی و زیست محیطی حائز اهمیت بوده و بر کنترل شیمیایی ارجحیت دارد (Koch and Jung, 2000; Miller *et al.*, 1999). به استثنای یک مورد مقاومت منوژنیک (Lewellen and Whitney, 1976) که به دلیل ناپایداری عملاً مورد استفاده بهنژادگران قرار نگرفت (Koch and Jung, 2000)، مقاومت به سرکوسپورا در ارقام تجاری چغندرقند از نوع کمّی است. منشأ این مقاومت در واقع به برنامه بهنژادی مونراتی

(Munerati)در ایتالیا باز می‌گردد که در آن برنامه *Beta vulgaris* sub sp. *maritima* به عنوان منبع مقاومت مورد استفاده قرار گرفت (Panella and Frese, 2000; Bilgen *et al*., 1969) و بعداً ماهیت پلی ژنیک آن به اثبات رسید (Smith and Gaskil, 1970 ; Saito, 1966). به دلیل ماهیت کمی مقاومت به سرکوسپورا، انتخاب منابع مقاومت تنها در جمعیت‌های بزرگ و تحت شرایط استاندارد موفقیت‌آمیز خواهد بود و در این راستا، اعتبار، صحت و سهولت ارزیابی یک ضرورت به شمار می‌رود (Koch and Jung, 2000). اغلب پژوهشگران برای ارزیابی مقاومت به سرکوسپورا به اپیدمی‌های طبیعی بیماری متکی بوده‌اند (Panella and Frese, 2000). اما به تدریج روش‌هایی برای ایجاد آلودگی مصنوعی در مزرعه ابداع گردیده است (Smith and Gaskill, 1970; Pfleiderer and Schaufele, 2000; Adams *et al*.,1995) همچنین ارزیابی مقاومت تحت شرایط کنترل شده در گلخانه نیز به منظور مطالعهٔ دقیق اجزاء مقاومت انجام شده است (Rossi *et al*., 1999). اخیراً نیز روش جدیدی برای ارزیابی مقاومت گیاهان انفرادی با استفاده از دیسک برگی تحت شرایط کنترل شده در ظروف پتری ارائه گردیده است (Koch and Jung, 2000).

از آنجایی که ارزیابی معتبر، صحیح و آسان مقاومت، لازمهٔ اجرای هر برنامه بهنژادی است و با توجه به این که در کشور ما تحقیقات جامعی در این خصوص صورت نگرفته است، لذا در این پژوهش، روش‌های مختلف ارزیابی مقاومت به سرکوسپورا در مزرعه، گلخانه و آزمایشگاه با استفاده از دوازده ژنوتیپ چغندر قند، با درجات مختلف مقاومت که قبلاً تحت شرایط آلودگی طبیعی در آزمایش‌های مزرعه‌ای انتخاب شده بودند مورد مقایسه قرار گرفت.

روش بررسی

۱- ارقام چغندر قند

در این مطالعه از دوازده رقم چغندرقند با درجات مختلف مقاومت به بیماری لکه‌برگی سرکوسپورایی که قبلاً تحت شرایط آلودگی طبیعی در آزمایش‌های مزرعه‌ای انتخاب شده بودند استفاده گردید. ارقام انتخابی عبارت بودند از:

پنج رقم از شرکت هیلزوک سوئد شامل Dorothea, Monodoro, Monatunna, HM 1836 و Eudora

سه رقم از شرکت دپره فرانسه شامل Monohikari, FD0018 و Ranger .

رقم Puma از شرکت دانیسکو دانمارک.

رقم Kaweintermono از شرکت KWS آلمان.

و دو رقم ایرانی شامل رسول و 191 .

۲ـ جداسازی و تخلیص جدایه‌های بیمارگر

نمونه‌های آلوده به بیماری لکه‌برگی سرکوسپورایی طی سال ۱۳۸۰ از مناطق آلوده در استان‌های خوزستان، اردبیل (منطقه دشت مغان) و مازندران (منطقه قائم‌شهر) جمع‌آوری گردید. به منظور جداسازی بیمارگر قطعه‌هایی از برگ‌های آلوده که اسپورهای قارچ *Cercospora beticola* در سطح لکه‌های آن تشکیل شده بود با استفاده از آب مقطر سترون شستشو داده شده و سوسپانسیون اسپور حاصل با رقت مناسب برروی محیط آب-آگار ۱/۵ درصد پخش گردید. پس از جوانه‌زدن اسپورها، یک اسپور جوانه‌زده به محیط کشت عصارهٔ تجارتی سبزیجات V8 juice Agar (۲۰۰ میلی‌لیتر عصارهٔ هشت سبزی V8 در یک لیتر آب، ۳گرم CaCO3 و ۲۰ گرم آگار) منتقل شده و بدین ترتیب یک جدایهٔ تک اسپور خالص بدست آمد. جدایه‌های بیمارگر سپس برای نگهداری بلند مدت به محیط کشت PDA (Potato Dextrose Agar) در لولهٔ آزمایش انتقال داده شده و در ٤ °C نگهداری شدند. به منظور جلوگیری از کاهش قدرت بیماری‌زایی جدایه‌های بیمارگر، کلیهٔ جدایه‌ها قبل از انجام آزمایش تحت شرایط گلخانه بر روی رقم حساس مایه‌زنی گردیده و پس از ظهور علائم آلودگی، جداسازی و تخلیص بیمارگر مجدداً به ترتیبی که قبلاً ذکر گردید صورت پذیرفت.

۳- تهیهٔ مایهٔ قارچ

در این مطالعه، جهت انجام آزمایش‌های گلخانه‌ای و آزمایشگاهی از مخلوط هفت جدایهٔ عامل بیماری شامل سه جدایه از خوزستان، سه جدایه از منطقه مغان و یک جدایه از منطقه قائم‌شهر استفاده گردید. به منظور تهیه اسپور، جدایه‌های مذکور بر روی محیط کشت V & A کشت داده شده و پس از دو هفته نگهداری در شرایط روشنایی دائم و دمای ۲۰ °C، سطح پرگنه‌های قارچ خراش داده شده و پس از افزودن آب مقطر سترون، سوسپانسیون حاصل مجدداً بر روی محیط V & A پخش گردید و نهایتاً پس از گذشت چهار روز نگهداری در شرایط روشنایی دائم و دمای ۱۵ °C، سطح پرگنهٔ قارچ با استفاده از مه‌پاش دستی شستشو

داده شده و غلظت سوسپانسیون حاصل پس از صاف کردن در حد ۳×۱۰^{۵} اسپور در میلی لیتر جهت آزمایش مایه‌زنی و ۳×۱۰^{٤} اسپور در میلی لیتر برای ارزیابی مقاومت قطعات جداشده برگ تنظیم گردید. مایه قارچ با اختلاط مقادیر مساوی از سوسپانسیون جدایه‌های مورد استفاده بدست آمد. در مورد آزمایش‌های مزرعه‌ای مایه‌زنی مصنوعی فقط در مزرعه آزمایشی دزفول اعمال گردید. به این منظور یک سوسپانسیون اسپور شامل مخلوطی از جدایه‌های همان منطقه تهیه شده و مایه‌زنی مزرعه با کمک سمپاش مزرعه با احتساب یک پتری دیش ۹ سانتی‌متری از کشت قارچ به ازای هر ۱۰ متر مربع از مساحت مزرعه صورت گرفت (Adams *et al*., 1995).

٤- نحوهٔ اجرای آزمایش‌های مزرعه‌ای

آزمایش‌های مزرعه‌ای طی فصول زراعی ۸۱-۸۰ در مناطق دزفول (مرکز تحقیقات کشاورزی صفی‌آباد) و قائم‌شهر (ایستگاه تحقیقاتی قراخیل) به اجرا در آمد. ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با شش تکرار مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای هر کرت آزمایشی یک خط کاشت به طول هشت متر در نظر گرفته شد و فاصلهٔ بین خطوط کاشت ۵۰ سانتی‌متر منظور گردید. با توجه به اهمیت رطوبت در جوانه‌زنی کنیدی و نفوذ عامل بیماری هیچ گونه فاصله اضافی در بین کرت‌ها اعمال نشد تا بدین ترتیب تراکم پوشش گیاهی شرایط مساعدتری برای گسترش بیماری ایجاد نماید. همچنین به منظور توزیع یکنواخت آلودگی در سطح مزرعه آزمایشی، رقم حساس 191، در سه خط کاشت در اطراف مزرعه کشت گردید. مزارع آزمایشی به طور مرتب در طی فصل مورد بازدید قرار گرفته و در منطقهٔ دزفول همزمان با ظهور اولین علائم آلودگی در مزرعه، مایه‌زنی مصنوعی انجام شد. در منطقهٔ قائم‌شهر به دلیل وجود شرایط مناسب محیطی، بیماری به سرعت گسترش یافت و از آنجا که افزایش شدت آلودگی در چنین شرایطی احتمالاً تفکیک درجات مقاومت را مشکل می‌نمود، اسپورپاشی صورت نگرفت. یادداشت برداری درجهٔ آلودگی براساس دستورالعمل تصویری نه‌گانه (۹ - ۱) KWS (Anonymous,1970) تقریباً هر دو هفته یک بار، به صورت زیر صورت گرفت و به هر کرت بصورت مشاهده‌ای نمره داده شد.

برگ‌ها، کاملاً سالم (۱)

وجود لکه‌های آلوده بر روی برگ‌های خارجی (۳)