نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد بیست و دوم، شماره سوم، ۱۳۹٤
http://jopp.gau.ac.ir

(گزارش کوتاه علمی)

واکنش تعدادی از ژنوتیپ‌های امیدبخش گندم نان به قارچ عامل لکه برگی سپتوریایی

***الهام محمودی[۱]، اکرم آق‌ملایی[۱]، شعبان کیا[۲] و سعید نصراله‌نژاد[۳]**

[۱]دانشجوی کارشناسی‌ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۲]مربی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی گلستان، گرگان، [۳]دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۰/۵ ؛ تاریخ پذیرش: ۹٤/۵/٤

چکیده

سابقه و هدف: بیماری لکه برگی سپتوریایی با عامل قارچی *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) J. Schroeter (Anamorph: *Septoria tritici* Roberge) یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های برگی گندم در دنیا به‌شمار می‌رود، که خسارت جهانی آن در سال‌های طغیان بالغ بر ۳۰ تا ۵۳ درصد است. قارچ عامل بیماری یک آسکومیست هتروتال دوقطبی است که چرخه جنسی آن در طول فصل زراعی، با توجه به شرایط محیطی مساعد، تکرار می‌شود. با توجه به ایجاد مقاومت نسبت به قارچ‌کش‌ها در سویه‌های قارچ عامل بیماری و نیز اثرات زیان‌بار این قارچ‌کش‌ها بر محیط‌زیست، مؤثرترین روش مقابله با این بیماری استفاده از ارقام مقاوم است. از طرفی طی دهه‌های اخیر این بیماری به‌دلیل استفاده از ارقام حساس، زودرس و نیمه پاکوتاه که به‌دلیل عملکرد بالا و مقاومت به برخی بیماری‌ها از جمله زنگ‌ها در سطح وسیع کشت شده‌اند، در نقاط مختلف دنیا گسترش و اهمیت زیادی پیدا کرده است. شناسایی منابع مقاومت به بیماری در ژنوتیپ‌های گندم و انتخاب لاین‌های مقاوم یکی از اساسی‌ترین مؤلفه‌ها در تدوین برنامه‌های موفق اصلاح برای مقاومت به بیماری است. هدف از این پژوهش مقایسه میزان مقاومت در لاین‌های مختلف گندم و شناسایی ارقام با بیشترین سطح مقاومت در برابر لکه برگی سپتوریایی می‌باشد.

*مسئول مکاتبه: elhammahmodi55@yahoo.com

مواد و روش‌ها: در این پژوهش واکنش ٤٠ لاین گندم مربوط به اقلیم مرطوب شمال و رقم تجن به عنوان شاهد، نسبت به بیماری لکه برگی سپتوریایی، در شرایط مزرعه در سال زراعی ۹۳-۱۳۹۲ با ایجاد آلودگی مصنوعی در مرحله پنجه‌زنی مورد ارزیابی قرار گرفت. به‌این منظور مراحل جداسازی و خالص‌سازی قارچ عامل بیماری و سپس تهیه زادمایه جهت مایه‌زنی انجام شد. سپس آلودگی مصنوعی ژنوتیپ‌های کشت شده، با پخش کردن برگ‌های آلوده و تلقیح سوسپانسیون اسپور صورت گرفت. در نهایت تجزیه آماری داده‌های یادداشت برداری شده با استفاده از نرم‌افزار SAS و مقایسه میانگین‌ها طبق آزمون LSD انجام شد. واکنش ژنوتیپ‌ها براساس میزان سطح نکروز برگ و محاسبه سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری (AUDPC) ارزیابی شد.

یافته‌ها: طبق نتایج، ژنوتیپ‌ها از نظر میزان سطح نکروز برگ در سطح احتمال ۱ درصد باهم اختلاف معنی‌دار داشتند. این اختلاف بیانگر تفاوت‌های ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها از نظر حساسیت و مقاومت به بیماری می‌باشد. مقایسه میانگین سطح نکروز برگ در ژنوتیپ‌های مورد بررسی براساس آزمون LSD، آن‌ها را در گروه‌های مختلف قرار داد. بررسی مقایسه میانگین‌ها نشان داد که لاین‌های شماره ۲۷(N-91-6) و ۱۰(N-92-9) به‌ترتیب حساس‌ترین و مقاوم‌ترین ژنوتیپ‌ها از نظر سطح نکروز برگ و شدت آلودگی بودند. از نظر سطح زیرمنحنی پیشرفت بیماری، بیشترین مقدار AUDPC مربوط به لاین شماره ۲۷ و کمترین مقدار مربوط به لاین شماره ۱۰ بود. همچنین نتایج تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های مورد بررسی، بر اساس میانگین درصد پوشش پیکنید سطح برگ‌ها، آن‌ها را در دو گروه قرار داد. ژنوتیپ‌هایی با واکنش حساس در گروه اول قرار گرفتند و گروه دوم نیز شامل ژنوتیپ‌هایی با واکنش نیمه مقاوم بود.

نتیجه‌گیری: طبق نتایج به‌دست آمده از تحقیق حاضر، از بین لاین‌های مورد استفاده دو لاین شماره ۱۰(N-92-9) و ۱۹(N-92-18)، نسبت به بیماری لکه برگی سپتوریایی واکنش نیمه مقاوم نشان دادند و سایر لاین‌ها در گروه‌های حساس و نیمه‌حساس قرار گرفتند. بنابراین می‌توان در برنامه‌های بهنژادی و ایجاد ارقام مقاوم به بیماری لکه برگی سپتوریایی از دو لاین شماره ۱۰ و ۱۹ استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: گندم، سپتوریوز برگی، مقاومت، نکروز برگ، *Mycosphaerella graminicola*

مقدمه

بیماری لکه برگی سپتوریایی یا سپتوریوز برگی[1] با عامل قارچی *Mycosphaerella graminicola* یکی از مهم‌ترین بیماری‌های گندم در دنیا به‌شمار می‌رود (۸). این بیماری با کاهش سطح فتوسنتز و میزان جذب کربوهیدرات‌ها طی پر شدن دانه، باعث کاهش کیفیت دانه‌ها شده و خسارت آن ممکن است تا ۵۰ درصد هم برسد (۹). طی سال‌های اخیر، به‌دلیل کشت متراکم و ارقام حساس گندم، کم توجهی به مدیریت بقایا و افزایش مصرف کودهای نیتروژنه، این بیماری در سرتاسر جهان گسترش یافته است (۵). با توجه به دلایل اقتصادی، زیست‌محیطی و نیز مقاومت بیمارگر نسبت به قارچ‌کش‌ها، بهترین روش کنترل این بیماری استفاده از ارقام مقاوم می‌باشد (۷). اخیراً ۱۸ ژن بزرگ اثر[2] برای مقاومت به *M. graminicola* با نام‌های *Stb1* تا *Stb18* شناسایی شده‌اند (۱۱). تحقیقات نشان داده که رشد زیتوده قارچی در رقم مقاوم دارای ژن‌های *Stb*، پس از ۱۵-۱۲ روز متوقف می‌شود (٦). در سال زراعی ۸۲-۱۳۸۱ این بیماری در اکثر مناطق استان گلستان به‌صورت همه‌گیری شدید ظاهر شد. با توجه به اهمیت شناسایی منابع مقاومت، این پژوهش جهت ارزیابی نوع واکنش (حساسیت یا مقاومت) ژنوتیپ‌های پیشرفته گندم نسبت به‌این بیماری در شرایط مزرعه انجام شد.

مواد و روش‌ها

در سال زراعی ۹۳-۱۳۹۲، تعداد ٤٠ ژنوتیپ گندم مربوط به اقلیم شمال و رقم تجن به‌عنوان شاهد، در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی و در سه تکرار در ایستگاه تحقیقات کشاورزی عراقی محله گرگان نسبت به بیماری لکه برگی سپتوریایی ارزیابی شدند. جداسازی قارچ با استفاده از روش مستقیم ایال و همکاران (۱۹۸۷) صورت گرفت. تکه‌های برگ آلوده دارای پیکنید روی لام شیشه‌ای چسبانده و در پتری محتوی کاغذ صافی استریل مرطوب قرار داده دمای ٢٤ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. فتیله (اوز) خارج شده از دهانه پیکنیدها به محیط کشت سیب زمینی، دکستروز، آگار (PDA) حاوی آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل منتقل شد. پس از ۵-۳ روز کلنی‌های کوچک جهت خالص‌سازی قارچ، به محیط PDA منتقل شدند. برای تهیه زادمایه جهت مایه‌زنی، محیط کشت مایع عصاره مخمر، عصاره مالت، سوکروز (YMS) تهیه و تکه‌هایی از پرگنه خالص قارچ به آن منتقل شد. پس از ۱۰-۷ روز، سوسپانسیون اسپور داخل ارلن‌ها از پارچه ململ دو لایه گذرانده شد تا سوسپانسیون صاف و یکنواخت به‌دست آید. سپس تعداد اسپورها در هر میلی‌لیتر شمارش و غلظت آن بر اساس میزان

1- Septoria tritici/ leaf blotch
2- Major gene

استاندارد به تعداد 10^6 اسپور در هر میلی‌لیتر تنظیم شد (۱). آلودگی مصنوعی ژنوتیپ‌ها با پخش کردن برگ‌های آلوده و تلقیح سوسپانسیون اسپور انجام شد. یادداشت‌برداری از بیماری سه بار و به فاصله هفت روز بر اساس درصد سطح نکروز برگ و پوشش پیکنید و با روش ساری و پرسکات (۱۹۷۵) تغییر یافته توسط ایال و همکاران (۱۹۸۷) و در مقیاس ۹۹-۰۰ انجام شد. رقم اول (سمت چپ) بیان کننده ارتفاع نسبی بیماری و رقم دوم (سمت راست) بیان کننده میزان شدت بیماری (سطح نکروز برگ حاوی پیکنید) است. داده‌های به‌دست آمده که شامل اعداد کیفی و معیاری برای بیان شدت بیماری بود، توسط $Arcsinx^{1/2}$ +0.5 به اعداد کمی تبدیل شدند. سپس تجزیه آماری با استفاده از نرم‌افزار SAS، و مقایسه میانگین‌ها با آزمون LSD انجام شد. سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری (AUDPC[1]) با استفاده از فرمول زیر برای صفت سطح نکروز برگ محاسبه شد:

$$AUDPC=\sum_i^{n-1}[\frac{y_i+y_{i+1}}{2}](t_{i+1}-t_i)$$

که در آن n تعداد دفعات یادداشت‌برداری، y مقدار بیماری و t زمان (روز) پس از یادداشت‌برداری هستند.

نتایج و بحث

تجزیه واریانس صفات مورد بررسی نشان داد که ژنوتیپ‌ها از نظر میزان سطح نکروز برگ در سطح احتمال ۱ درصد با یکدیگر اختلاف معنی‌دار داشتند (جدول ۱). مقایسه میانگین‌ها براساس آزمون LSD نیز، آن‌ها را در گروه‌های مختلف قرار داد (جدول ۲). لاین‌های شماره ۲۷ و ۲۱ با ۷٦ درصد سطح نکروز برگ بیشترین شدت آلودگی را داشتند. لاین‌های شماره ۱۰ و سپس ۱۹ با کمترین میزان آلودگی و نکروز سطح برگ بالاترین مقاومت را داشتند. از نظر سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری، لاین‌های شماره ۲۷ و ۱۰ به‌ترتیب با مقادیر ۷۳٦ و ٤۸۰، بیشترین و کمترین مقدار AUDPC را داشتند (جدول ۲). با توجه به مطالعات انجام شده در ایران و همه‌گیری بیماری در برخی استان‌های کشورمان، به‌نظر می‌رسد در حال حاضر اغلب ارقام گندم رایج در کشور به‌این بیماری حساس می‌باشند (۳). در تحقیق حاضر نیز بیشتر لاین‌های مورد بررسی در گروه‌های حساس و نیمه‌حساس قرار گرفتند، در نتیجه بیشتر ژنوتیپ‌های گندم مربوط به اقلیم شمال فاقد مقاومت به جدایه گرگان می‌باشند. نتایج به‌دست آمده با نتایج گزارش شده توسط دالوند و روح‌پرور (۲۰۱۳) مطابقت دارد. می‌توان نتیجه گرفت حساسیت برخی ارقام و لاین‌های گندم ناشی از حساسیت به یک یا چند جدایه خاص است، در حالی‌که همان ارقام ممکن است به سایر جدایه‌ها مقاومت نشان دهند.

1- Area Under the Disease Progress Curve

جدول ۱- تجزیه واریانس درصد سطح نکروز برگ همراه با پیکنید در ژنوتیپ‌های گندم در شرایط مزرعه.

Table 1. Analysis of variance for leaf necrose area with pycnidia on wheat genotypes in field.

منابع تغییرات S.O.V	میانگین مربعات MS			
	درجه آزادی df	سطح نکروز Necrosis area	F	Pr>F
رقم Cultivar	40	0.011**	2.89**	<0.001
تکرار Replication	2	0.036		
خطا Error	80	0.0040		

ضریب تغییرات =۲/٦٤، ** در سطح آماری ۱ درصد معنی‌دار

CV=2.64, **: Significant at 1% probability level.

جدول ۲- مقایسه میانگین درصد سطح نکروز برگ و AUDPC در ژنوتیپ‌های گندم در شرایط مزرعه.

Table 2. Mean comparison of leaf necrosis area and AUDPC on wheat genotypes in field.

شماره ژنوتیپ Genotype No.	ژنوتیپ Genotype	درصد سطح نکروز برگ Leaf necrosis (%) area	AUDPC Necrose	واکنش Reaction	شماره ژنوتیپ Genotype No.	ژنوتیپ Genotype	درصد سطح نکروز برگ Leaf necrosis (%) area	AUDPC Necrose	واکنش Reaction
1	Tajan	77^{a}	766	S	21	N-92-20	76^{a}	721	S
2	N-92-1	72^{abc}	672	S	22	N-91-1	66^{abcd}	660	MS
3	N-92-2	65^{abcd}	648	MS	23	N-91-2	73^{ab}	700	S
4	N-92-3	73^{ab}	681	S	24	N-91-3	66^{abcd}	676	MS
5	N-92-4	60^{abcdef}	607	MS	25	N-91-4	60^{abcde}	583	MS
6	N-92-5	65^{abcd}	651	MS	26	N-91-5	74^{ab}	721	S
7	N-92-6	65^{abcd}	635	MS	27	N-91-6	76^{a}	736	S
8	N-92-7	73^{ab}	704	S	28	N-91-7	74^{ab}	0 7	S
9	N-92-8	73^{ab}	668	S	29	N-91-8	65^{abcd}	646	MS
10	N-92-9	47^{f}	480	MR	30	N-91-9	74^{ab}	722	S
11	N-92-10	55^{cdef}	571	MS	31	N-91-10	74^{ab}	724	S
12	N-92-11	58^{bcdef}	592	MS	32	N-91-11	74^{ab}	717	S
13	N-92-12	74^{ab}	715	S	33	N-91-12	60^{abcdef}	542	MS
14	N-92-13	52^{def}	531	MS	34	N-91-13	73^{ab}	691	S
15	N-92-14	53^{def}	506	MS	35	N-91-14	74^{ab}	714	S
16	N-92-15	65^{abcd}	622	MS	36	N-91-15	65^{abcd}	643	MS
17	N-92-16	72^{abc}	696	S	37	N-91-16	68^{abcd}	675	MS
18	N-92-17	74^{ab}	690	S	38	N-91-17	58^{bcdef}	579	MS
19	N-92-18	50^{ef}	531	MR	39	N-91-18	66^{abcd}	654	MS
20	N-92-19	66^{abcd}	654	MS	40	N-91-19	60^{abcdef}	607	MS
					41	N-91-20	66^{abcd}	669	M

LSD= ۰/۱۰۲۹، میانگین‌ها با حروف مشابه بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

Mean in each column followed by similar letter(s) is not significantly different at 5% probability level, using LSD test.

S: Susceptible حساس؛ MS: Moderately Susceptible نیمه حساس؛ MR: Moderately Resistance نیمه مقاوم

نتایج تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های مورد بررسی، بر اساس میانگین درصد پوشش پیکنید سطح برگ‌ها، آن‌ها را در دو گروه قرار داد (شکل ۱). گروه اول به دو زیر گروه تقسیم شد که در زیر گروه اول ژنوتیپ‌های شماره ۱، ۱۳، ۳۵، ۳۲، ۲۱، ۲٦، ۲۸، ۳۰، ۳۱ و ۲۷ با واکنش حساس و در زیر گروه دوم ژنوتیپ‌های شماره ۲، ۹، ٤۱، ٤، ۲٤، ۳۷، ۸، ۲۳، ۱۷، ۱۸، ۳٤، ۳، ۲۹، ۳٦، ٦، ۲۰، ۳۹ و ۲۲ با واکنش حساس تا نیمه‌حساس بودند. گروه اصلی دوم نیز به دو زیر گروه تقسیم شد که ژنوتیپ‌های شماره ۵، ٤۰، ۱۲، ۱۱، ۲۵ و ۳۸ با واکنش نیمه‌حساس در زیر گروه اول و ژنوتیپ‌های شماره ۱۰، ۱۵، ۱٤، ۱۹ و ۳۳ با واکنش نیمه مقاوم در زیر گروه دوم قرار گرفتند.

منابع

1. Brading, P.A., Verstappen, E.C.P., Kema, G.H.J., and Brown, J.K.M. 2002. A gene- for- gene relationship between wheat and *Mycosphaerella graminicola*, the septoria tritici blotch pathogen. Phytopathol. 92: 439-445.
2. Dalvand, M., and Roohparvar, R. 2013. Evaluation of Iranian wheat cultivars reaction to *Septoria Tritici* Blotch and virulence Survey of *Mycosphaerella graminicola* in Khuzestan province. Int. Res. J. Appl. Basic. Sci. 5: 9. 1097-1100.
3. Davari, M., Abrinbana, M., Asgharizakaria, R., and Arzanlou, M. 2012. Assessment of wheat varieties resistance to *Mycosphaerella graminicola* isolates of Moghan plain in seedling stage in greenhouse condition. Iranian J. Plant Protec. Sci. 43: 2. 379-389. (In Persian)
4. Eyal, Z., Scharen, A.L., Prescott, J.M., and Van Ginkel, M. 1987. The Septoria Diseases of Wheat: Concepts and Methods of Disease Management. Mexico, CIMMYT. 52p.
5. Ghaneie, A., Mehrabi, R., Safaie, N., Abrinbana, M., Saidi, A., and Aghaee, M. 2012. Genetic variation for resistance to *Septoria tritici* Blotch in Iranian tetraploid wheat landraces. Eur. J. Plant Pathol. 132: 191-202.
6. Habibi, M., Mirakhorli, N., Shiran, B., and Mardi, M. 2014. Study of resistance related gene expression pattern to septoria tritici blotch (STB) in wheat (*Triticum aestivum*). Modern Gen. 8: 2. 149-158. (In Persian)
7. Khodaii, L., Taleii, A.R., Mardi, M., Naghavi, M.R., Karimifarsad, L., and Sedaghatfar, E. 2012. Expression pattern of genes involved in Septoria Leaf Blotch resistance in Bread Wheat (*Triticum aestivum*). Agric. Biotech. 11: 2. 51-59. (In Persian)

8. Kia, Sh., and Soughi, H. 2012. Reaction of Bread Wheat Advanced Genotypes to *Mycosphaerella graminicola* the Causal Agent of Septoria tritici Leaf Blotch in Greenhouse and Field Conditions. Seed Plant Improv. J. 28: 1. 133-147. (In Persian)
9. Mergoum, M., Harilal, V.E., Singh, P.K., Adhikari, T.B., Kumar, A., Ghavami, F., Elias, E., Alamri, M.S., and Kianian, S.E. 2013. Genetic analysis and mapping of seedling resistance to *Septoria Tritici* Blotch in 'Steele-ND'/'ND735'. Cereal Res. Commun. 41: 2. 199-210.
10. Saari, E.E., and Prescott, J.M. 1975. A scale for apprasing the foliar intensity of wheat disease. Plant Dis. Rep. 59: 377-380.
11. Tabib Ghaffary, S.M., Faris, J.D., Friesen, T.L., Visser, R.G.F., Van der Lee, T.A.J., Robert, O., Kema, G.H.J. 2012. New broad-spectrum resistance to septoria tritici blotch derived from synthetic hexaploid wheat. Theor. Appl. Gen. 124: 125-142.