نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۴، شماره ۴، زمستان ۱۳۸۹، ص ۴۲۷-۴۱۹

Journal of Plant Protection
Vol. 24, No. 4, Winter 2011, p. 419-427

# شناسایی و تعیین حساسیت به متالاکسیل در جدایه‌های *Pythium ultimum* جمع‌آوری‌شده از استان‌های خراسان شمالی و رضوی

بهاره عظیمیان[1*]- حمید روحانی[2]- عصمت مهدیخانی مقدم[3]

تاریخ دریافت:۸۸/۷/۱
تاریخ پذیرش:۸۹/۱۲/۱۱

## چکیده

به منظور ارزیابی حساسیت درون گونه‌ای *Pythium ultimum* به متالاکسیل درشرایط آزمایشگاهی، نمونه برداری از مزارع استان‌های خراسان شمالی و رضوی و خالص سازی جدایه‌ها طی سال‌های ۸۵، ۸۶ و ۸۷ انجام شد. شناسایی به دو روش مرفولوژیکی، با استفاده از کلید شناسایی واندرپلانز-نیترینک و روش ملکولی براساس توالی اختصاصی ناحیه ITS ژنوم rDNA صورت گرفت. با بررسی‌های میکرومتری اندام‌های جنسی و غیرجنسی، شباهت ابعاد اندازه‌گیری شده با ابعاد ذکر شده در کلید واندرپلانز-نیترینک تأیید گردید. از بین ۴۰ جدایه *P. ultimum* تایید شده، ۱۴ جدایه به طور تصادفی انتخاب شد. غلظتی از متالاکسیل که سبب ۵۰ درصد کاهش رشد خطی (EC50) در جدایه‌ها شد، با استفاده از مدل لجستیکی ($I=kC(e^{rc})$) به دست آمد. دامنه EC50 بین i.e ۰/۰۴۴-۰/۰۲۲۸ $\mu g\ ml^{-1}$ به دست آمد. هرچند اختلاف بین جدایه‌ها از نظر حساسیت به متالاکسیل، با استفاده از طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی در سطح معنی دار ۰/۰۵ تأیید شد ولیکن هیچ یک از جدایه‌های مورد آزمایش نسبت به این قارچ‌کش مقاومت نشان ندادند.

**واژه های کلیدی:** پیتیوم اولتیموم، متالاکسیل، حساسیت، خیار، خراسان

## مقدمه

*P. ultimum* متعلق به رده اوومیست، یکی از مهمترین عوامل بوته‌میری گیاهچه در مزارع و گلخانه‌ها است و می تواند منجر به کاهش شدید محصول گردد. شناسایی دقیق عامل بیماری‌زا، تعیین نحوه ورود و توزیع آن، تعیین ویژگی‌های بیماری‌زایی و میزان حساسیت بیمارگر به آفت‌کش‌های شیمیایی موجود، از اقدامات موثر در مدیریت و کنترل دراز مدت بیمارگرها و ساخت فرمولاسیون‌های متناسب با آن می‌باشد. اولین قدم برای کنترل یک عامل بیماری، شناسایی دقیق آن است. امروزه یکی از قطعی‌ترین، مطمئن‌ترین و آسان‌ترین روش‌های شناسایی گونه‌های پیتیوم، استفاده از آغازگرهای اختصاصی گونه بویژه آغازگرهای اختصاصی ناحیه ITS[4] ژنوم rDNA می‌باشد، زیرا ثابت شده است این ناحیه از ژنوم DNA ریبوزومی در داخل یک گونه به خوبی حفاظت شده و کمتر دستخوش تغییرات قرار گرفته است در حالی که در بین گونه‌ها تفاوت دارد و لذا نشانگر مناسبی برای تمایز گونه‌ها از یکدیگر می‌باشد (۱۴،۹ و ۲۳).

به علت پایداری *P. ultimum* در خاک و سازگاری با تناوب‌های زراعی مختلف به علت دارا بودن تنوع ژنتیکی (۸) و دامنه میزبانی گسترده (۱۱)، در حال حاضر هنوز هم در کنار روش‌های کنترل بیولوژیکی و زراعی، از قارچ کش‌ها برای حفاظت گیاهان در برابر خسارت‌های ناشی از این بیمارگر استفاده می‌شود. در بین قارچ‌کش‌های موجود برای کنترل اوومیست‌ها، متالاکسیل (ریدومیل) رایج تر است. علیرغم مؤثر بودن این قارچ کش، در بسیاری از جمعیت‌های متعلق به این رده، مقاومت‌هایی به این قارچ کش مشاهده شده است (۱۲،۵،۳ و ۱۵).

مقاومت به متالاکسیل در پیتیوم‌ها برای اولین بار در ۱۹۸۴ در شمال آمریکا گزارش شد. در آن هنگام کنترل بلایت چمن[5] ناشی از *Pythium aphanidermatum* با استفاده از متالاکسیل با شکست مواجه شد (۱۹). همچنین جمعیت‌هایی از *P. ultimum* از سیب زمینی‌های آلوده به این قارچ جداسازی شده‌اند که نسبت به مفنوکسام (ایزومر متالاکیسل) مقاومت نشان داده‌اند (۲۰). به هر حال

۱،۲و۳- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار و استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email:bazimian@gmail.com)

4- Internal Transcribed Spacer

5- turf blight

Archive of SID
www.SID.ir

تنوع قابل توجهی از نظر مقاومت به متالاکسیل، در بین و درون گونه‌ها گزارش شده است و علیرغم این که این گونه عامل بسیاری از پوسیدگی‌های طوقه و ریشه در استان می‌باشد، و هنوز هم در کشور ما استفاده از این قارچ‌کش‌ها مهم‌ترین راه کنترل و جلوگیری از خسارت پیتیوم‌هاست، در این بررسی ما بر آن شدیم تا پس از شناسایی مرفولوژیکی و ملکولی، جدایه‌ها را از جهت مقاومت به متالاکسیل مورد بررسی قرار دهیم.

## مواد و روش‌ها

### نمونه برداری

در این بررسی از مزارع شهرستان‌های خراسان رضوی و شمالی (مشهد، تربت‌حیدریه، تربت‌جام، کاشمر، فریمان، چناران، قوچان، بجنورد، سرخس، فاروج) طی سالهای ۸۵، ۸۶ و ۸۷ به روش نمونه‌برداری تصادفی نمونه‌های خاک و بافت آلوده، جمع‌آوری گردید. پس از جداسازی قارچ از خاک یا گیاهان بیمار، با استفاده ازمحیط‌های کشت اختصاصی و شرایط دمایی مناسب (۱۳ و ۲۲)، کشت‌های خالص قارچ تهیه شده و در یخچال در دمای چهار درجه سانتیگراد نگهداری شدند. برای نگهداری طولانی مدت قارچ از شیشه‌های حاوی خاک و عصاره یولاف و یا لوله‌های آب مقطر استریل به همراه چند قطعه برگ چمن (۲۲) در دمای اتاق استفاده شد.

### شناسایی مرفولوژیکی

در این مطالعه شناسایی قارچ به دو روش مرفولوژیکی و ملکولی صورت گرفت. شناسایی اولیه قارچ با استفاده از کلید تشخیص گونه‌های پیتیوم (۲۲) انجام شد. به این ترتیب برای بررسی ویژگی‌های ریخت‌شناسی جدایه‌ها، محیط کشت ذرت-آگار[1] و دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به کار رفت. پس از تشخیص، یک تکه از محیط به تشتک‌های پتری ۹۰ میلی‌متری حاوی آب مقطر و شاهدانه استریل منتقل شد و در دمای اتاق تا زمان ظهور اندام‌های باردهی نگهداری شدند. سپس با استفاده از اکولر میکروسکوپ نوری، ابعاد اندام‌های جنسی و غیرجنسی شامل اوگونیوم، آنتریدیوم، اسپور و تورم‌های هیفی[2] مورد بررسی قرار گرفتند. به این ترتیب که در هر جدایه اندازه‌های ۲۰ مشاهده ثبت شد. نتایج مشاهدات با مقادیر کلید شناسایی واندر پلاتز-نیترینک مقایسه شد.

### شناسایی مولکولی با استفاده از آغازگرهای ویژه گونه و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

برای شناسایی ملکولی، ابتدا کل ژنوم هر جدایه استخراج شد. برای این منظور ابتدا، جدایه‌ها به مدت دو تا سه هفته در محیط کشت مایع سیب‌زمینی-دکستروز[3] کشت داده شد. سپس آبگیری شده و توسط ازت مایع با استفاده از هاون چینی سرد و استریل، هموژنیزه شد. استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج دی.ان.ای (Accuprep®GMO- Bioneer) و براساس دستورالعمل شرکت سازنده‌ی آن صورت گرفت. برای تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراجی از اسپکتروفتومتری استفاده شد.

تکثیر ناحیه ITS ژنوم با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *P. ultimum* (۹) انجام شد. واکنش PCR با استفاده از کیت PCR شرکت Bioneer صورت گرفت. در هر میکروتیوب ۱۰ میکرومولار از هر پرایمر و یک میکرومولار از نمونه DNA استفاده گردید. پس از آماده کردن میکروتیوب‌ها، واکنش تکثیر در دستگاه ترموسایکلر مدل Biometra (Germany) با برنامه حرارتی مطابق جدول-۱ انجام پذیرفت (۹).

پس از انجام واکنش، پنج میکرولیتر از هر یک از فرآورده‌های PCR به ژل آگاروز یک درصد (W/V) منتقل گردید و با ولتاژ ثابت ۸۵ به مدت یک ساعت الکتروفورز شدند. مارکر مورد استفاده GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder, ready-to-use ساخت شرکت Fermentase بود که به عنوان وزن مولکولی استاندارد مورد استفاده قرار گرفت. برای رنگ آمیزی ژل از محلول اتیدیوم بروماید با غلظت یک میکروگرم در میلی‌لیتر به مدت ۲۰ دقیقه استفاده شد و کار رنگ زدایی توسط آب مقطر به مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت. سپس ژل تحت نور ماوراء بنفش در دستگاه UV ترانسلومیناتور قرار داده شد و وجود یا عدم وجود قطعه تکثیر شده به صورت یک باند در ناحیه ۶۷۰ bp مورد بررسی قرار گرفت و عکس حاصل از آن توسط دستگاه ذخیره و در رایانه ثبت شد. با استفاده از PCR اختصاصی، ۴۰ جدایه *Pythium ultimum* شناسایی گردید که از بین آنها ۱۴ جدایه به طور تصادفی برای آزمایشات انتخاب شدند که در جدول-۲ آمده است.

### ارزیابی مقاومت به متالاکسیل در شرایط آزمایشگاهی

برای بررسی میزان حساسیت جدایه‌ها به متالاکسیل ابتدا دامنه غلظت مورد نیاز متالاکسیل در یک آزمون اولیه با استفاده از سه جدایه تخمین زده شد. بدین ترتیب که غلظت‌های ۰، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰و ۳۰۰ میکروگرم در میلی لیتر متالاکسیل (ماده موثره ) در محیط کشت با سه تکرار برای هر جدایه به کار رفت. برای این منظور ابتدا استوک متالاکسیل در اتانول ۷۰٪ تهیه شد و پس از اتوکلاو کردن محیط کشت در دمای ۶۰ مقدار مناسب به آن افزوده شد.

1- Corn Meal Agar (CMA)
2- Hyphal swelling
3- Potato Dextrose Broth (PDB)

Archive of SID

www.SID.ir

**جدول ۱- برنامه حرارتی مورد استفاده در دستگاه ترموسایکلر Biometra برای انجام واکنش PCR اختصاصی**

| مرحله PCR | دمای واکنش (سانتیگراد) | زمان واکنش (دقیقه) | تعداد چرخه |
|---|---|---|---|
| واسرشته سازی اولیه | ۹۴ | ۳ | ۱ |
| واسرشته سازی | ۹۴ | ۱ | ۲۵ |
| هم سرشته سازی (اتصال آغازگرها) | ۵۵ | ۱ | ۲۵ |
| بسط آغازگرها | ۷۲ | ۲ | ۲۵ |
| بسط نهایی | ۷۲ | ۱۰ | ۱ |

**جدول ۲-فهرست نام، محل، میزبان و تاریخ جمع‌آوری جدایه‌های انتخاب شده برای آزمایشات گلخانه‌ای**

| جدایه | تاریخ | محصول کشت شده | محل جمع‌آوری |
|---|---|---|---|
| Pu002 | تیر ۸۶ | کشت مخلوط کدوئیان | سملقان (خراسان شمالی) |
| Pu002 | تیر ۸۶ | کشت مخلوط کدوئیان | فاروج(خراسان شمالی) |
| Pu005 | تیر ۸۶ | بادمجان | شاقه (خراسان شمالی) |
| Pu007 | تیر ۸۶ | گوجه فرنگی | گرمخان (خراسان شمالی) |
| Pu009 | مرداد ۸۶ | چغندر قند | چناران(خراسان رضوی) |
| Pu10 | اردیبهشت ۸۵ | گوجه فرنگی | قدمگاه (نیشابور) |
| Pu012 | اردیبهشت ۸۷ | خیار | رضوان (توابع مشهد) |
| Pu014 | خرداد ۸۶ | گوجه فرنگی | گلخانه دانشگاه مشهد |
| Pu015 | اسفند ۸۶ | خیار | محسن آباد (توابع مشهد) |
| Pu016 | تیر ۸۶ | هندوانه | حسن آباد (تربت جام) |
| Pu018 | اردیبهشت ۸۵ | خیار | فرهادگرد (فریمان) |
| Pu022 | اردیبهشت ۸۵ | بادمجان | فرهادگرد (فریمان) |
| Pu023 | تیر ۸۶ | خربزه | تربت حیدریه |
| Pu025 | بهمن ۸۶ | خیار | سرخس |

سپس آزمون اصلی با انتخاب تصادفی۱۴ جدایه انجام شد (جدایه‌ها در جدول ۳ ذکر شده اند). در این آزمون متالاکسیل با غلظت‌های صفر، ۰/۰۵ ، ۰/۱ ، ۱، ۱۰، ۲۰و ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر (ماده موثره) در محیط کشت ذرت-آگار درتشتک‌های پتری‌های ۹۰ میلی‌متری تهیه شد. سپس از حاشیه کشت ۳ روزه هر جدایه، یک دیسک به قطر پنج میلی‌متر به محیط کشت‌های حاوی متالاکسیل منتقل شد. برای هر تیمار از سه تکرار استفاده شد. سپس تشتک‌ها در یک آرایش تصادفی داخل اینکوباتور در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۶ ساعت نگه‌داری شدند. پس از این زمان، رشد شعاعی کلنی در هر پتری اندازه‌گیری شد.

## روش‌های آماری

در بررسی‌های مرفولوژیکی مقایسه میانگین اندام‌های جنسی و غیرجنسی در قالب یک طرح کاملا تصادفی با استفاده از آزمون تعقیبی مقایسات چند دامنه‌ای دانکن از طریق رویه GLM و نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ در سطح معنی‌دار ۰/۰۵ انجام شد. همچنین انحراف معیار ابعاد اندام‌ها برای هر جدایه محاسبه شد.برای محاسبه درصد بازدارندگی از رشد جدایه در هر غلظت متالاکسیل از فرمول زیر محاسبه شد:

[۱۰۰ × ( رشد خطی کلنی در پتری شاهد/ رشد خطی کلنی در پتری حاوی سم )-۱۰۰]

همچنین برای محاسبه غلظتی از متالاکسیل که به میزان ۵۰ درصد بازدارندگی رشد را در هر جدایه سبب شد (EC50) از معادله لجستیکی زیر توسط نرم افزار آماری SAS نسخه ۹/۱ و رویه NLIN استفاده گردید (۷ و ۲۰).

$$I=kc(e^{rc}) \qquad (0 \le C \le 1)$$

در این معادله ممانعت از رشد شعاعی با فراسنجه I و غلظت متالاکسیل با فراسنجه c نشان داده شدند. k و r ضرایب متغیر معادله رگرسیون غیرخطی و e عدد نپری می‌باشند.

برای تجزیه آماری اختلاف جدایه‌ها از لحاظ مقاومت به متالاکسیل، ابتدا نرمال بودن داده‌ها توسط آزمون‌های Shapiro-Wilk ، Kolmogorov-Smirnov ، Cramer-von Mises و Anderson-Darling (۱۷) در سطح معنی‌دار ۰/۰۵ مورد تایید قرار گرفت. سپس مقایسه میانگین جدایه‌ها، بر اساس غلظت‌های مختلف

Archive of SID

www.SID.ir

با استفاده از طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی و آزمون مقایسات چند دامنه ای دانکن در سطح معنی دار ۰/۰۵ توسط نرم افزار آماری SAS,V9.1 و رویه ANOVA انجام شد (۶). نتایج حاصل از این مقایسه با استفاده از نرم افزار NTSYS,V1.07 به روش UPGMA[1] به صورت دندروگرام نمایش داده شد.

## نتایج

### بررسی‌های مرفولوژیکی

ابعاد هر جدایه با اندازه‌گیری میانگین۲۰ عدد اندام در هر مورد، و محاسبه میانگین و انحراف معیار برای هر یک بررسی شد (جدول-۳). اختلافی بین ابعاد اندازه‌گیری شده با مقادیر ذکر شده در کلید واندرپلاتز-نیترینک، در سطح معنی‌دار ۰/۰۵ مشاهده نشد. در بین جدایه‌ها، اندازه‌های ااسپور و تورم‌های هیفی، به لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($p<۰/۰۵$). از نظر قطر ااوگونیوم تعدادی از جدایه‌ها با یکدیگر در سطح معنی‌دار ۰/۰۵ متفاوت بودند که در جدول-۳ با حروف الفبا مشخص شده است.

### شناسایی براساس آغازگر اختصاصی ناحیه ITS rDNA در سطح گونه

پس از رنگ آمیزی ژل آگارز الکتروفورز فراورده‌های واکنش تکثیر اختصاصی با اتیدیوم بروماید، ظهور باندها در ناحیه ۶۷۰ bp نشانگر شناسایی ناحیه اختصاصی ITS گونه *P. ultimum* توسط آغازگرهای ویژه گونه و تکثیر آن قطعه از ژنوم است (۹) (شکل-۱). به این ترتیب شناسایی۴۰ جدایه در این آزمایش با استفاده از توالی اختصاصی ناحیه ITS ژنوم rDNA در سطح گونه تایید شد.

### آزمون متالاکسیل

تمامی ۱۴ جدایه به کار رفته در این آزمون به سم متالاکسیل حساس بودند و در بیش از۵۰ درصد از جدایه‌ها، EC50 معادل ۰/۰۲۷۵ -۰/۰۳۷۵ میکروگرم در میلی لیتر متالاکسیل (ماده مؤثره) به دست آمد (شکل ۲ و۳). از آنجا که مقدار EC50 بین دو نقطه صفر و ۰/۰۵ منطبق بر مدل خطی غیر برازش داده شده بر نقاط حاصل از آزمون حساسیت می‌باشد، و از جهتی خطای برآورد پارامترهای مدل بسیار ناچیز است (جدول-۴)، به نظر می‌رسد خروجی مدل منطبق بر روند مشاهدات است. جدایه Pu005 با بالاترین میزان EC50، (۰/۰۴۴ µg/ml) و Pu023 با کمترین مقدار EC50 (۰/۰۲۲۸ µg/ml) کمترین و بیشترین حساسیت را در بین جدایه‌های مورد آزمایش داشتند (شکل-۴). مقایسه میانگین جدایه‌ها در سطح معنی دار ۰/۰۵ نشان داد که اختلاف جدایه‌ها از نظر حساسیت به متالاکسیل معنی‌دار می باشد.

## بحث

در این مطالعه اندازه گیری‌های به دست آمده از اندام‌های تکثیری جدایه‌های مورد آزمایش با مقادیر ذکر شده در منبع (کلید شناسایی واندر پلاتز نیترینک، ۱۹۸۱) مطابقت دارد. در هر یک از جدایه‌ها اندازه تغییرات ااوسپور در مقایسه با ااوگونیوم و تورم هیفی کمتر است (انحراف معیار کمتر از ۱/۷۱) و لذا در یک گونه از ثبات نسبتاً بیشتری برخوردار است. در مقایسه جدایه‌ها با یکدیگر نیز تفاوت‌هایی مشاهده می‌شود. جدایه‌های Pu005، Pu06، Pu008، Pu014، Pu019، Pu020 و Pu021 نسبت به سایر جدایه‌ها، اندام‌های بزرگتری تولید کرده اند. توجو و همکاران در ۱۹۹۷ جدایه‌های *P. ultimum* جدا شده از مزارع سبزیجات در ژاپن را از جهت ریخت‌شناسی اندام‌های تکثیری مورد مطالعه قرار دادند و نشان دادند که جدایه‌ها به دو گروه تقسیم شدند: گروه اول آنهایی که اندام‌های کوچکتری تولید می کردند (میانگین قطر ااوگونیوم ۱/۸±۱۹/۵، ااسپور ۱/۵±۱۶/۵ و تورم هیفی ۴/۱±۱۲/۱) و دارای رشد سریع‌تر در دماهای پایین‌تر (۱۵-۴ درجه سانتیگراد) بودند. گروه دوم جدایه‌هایی را در برمی‌گرفت که اندام‌های بزرگتری تولید می‌کردند (میانگین قطر ااوگونیوم ۲/۱±۲۳/۳، ااسپور ۱/۶±۲۰/۴ و تورم هیفی ۵/۶±۱۷/۴) و دارای رشد بیشتر در دماهای بالاتر (۳۷-۲۵درجه سانتیگراد) بودند. با وجود اختلاف بین اندازه اندام‌های تکثیری جدایه‌ها در این مطالعه، نظر قطعی نیاز به بررسی‌های بیشتر در مورد نیازهای دمایی و خصوصیات رشدی هر جدایه دارد.

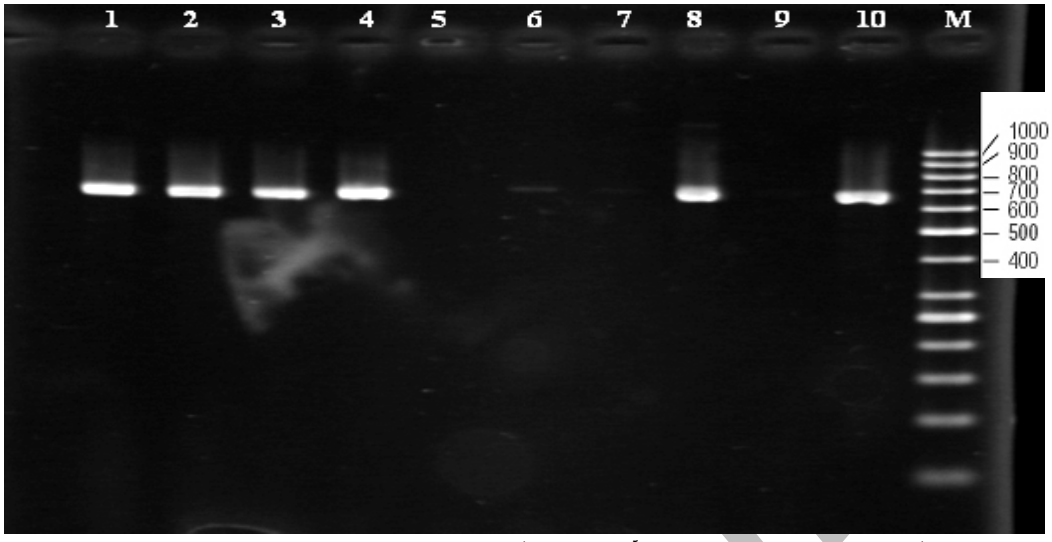
موفقیت انجام یک برنامه مدیریت مقاومت قارچ‌کش، باید شامل یک ارزیابی از سطح اولیه[2] حساسیت به قارچ‌کش در جمعیت پاتوژن باشد. متالاکسیل به طرز بسیار اختصاصی عمل می‌کند[3] طوری که بر روی فعالیت آر ان ای پلیمراز[4]ها در سنتز آر.ان.ای اثر می‌گذارد. دیویدز و همکاران (۴) نشان دادند که متالاکسیل سنتز آر ان ای هایی را که فاقد توالی پلی-آ[5] هستند، بیشتر از آنهایی که دارای این توالی هستند تحت تأثیر قرار می‌دهد. اما تأثیری روی آر ان ای پلیمرازهای آزاد داخل هسته ای ندارد. همین اثر اختصاصی قارچ‌کش خطر ایجاد مقاومت به آن در پاتوژن هدف را زیاد می‌کند.

1- Unweighted pair group method with arithmetic average

2- baseline
3- Specific mode of action
4- RNA polymerase
5- Poly-A

Archive of SID

www.SID.ir




**شکل ۱- یک نمونه از عکس ژل آگارز ذخیره شده توسط دستگاه UV ترانسلومیناتور؛**

ظهور باند در ناحیه ۶۷۰bp در لاین‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ، ۸ و ۱۰ نشان می‌دهد که دی.ان.ای موجود در این چاهک متعلق به گونه *P. ultimum* است. دی.ان.ای چاهک‌های دیگر که هیچ باندی در آنها ظاهر نشده است مربوط به *Pythium* spp. به جز گونه *P. ultimum* می‌باشد.

**جدول ۳- مقایسه میانگین ابعاد اندام‌های جنسی و غیرجنسی جدایه‌ها**

| جدایه | تورم هیفی[n.s] (میانگین±انحراف معیار) | اوگونیوم[*] (میانگین±انحراف معیار) | اسپور[n.s] (میانگین±انحراف معیار) |
|---|---|---|---|
| **Pu004** | ۲۲/۳۹±۲/۳۵ | ۲۱/۹۱±۱/۱۶$^{ab}$ | ۱۸/۵۴±۱/۰۱ |
| **Pu005** | ۲۲/۰۸±۲/۶۶ | ۲۲/۱۳±۲/۶۵$^{ab}$ | ۱۸/۴۱±۱/۳۵ |
| **Pu006** | ۲۴/۳۲±۲/۵۳ | ۲۳/۰۹±۱/۵۵$^{ab}$ | ۱۸/۸۸±۱/۷۱ |
| **Pu007** | ۲۱/۱۵±۱/۶۶ | ۲۱/۰۸±۱/۱۳$^{ab}$ | ۱۷/۱۸±۰/۸۹ |
| **Pu008** | ۲۳/۹۶±۱/۸۷ | ۲۳/۵۵±۱/۱۴$^{ab}$ | ۱۸/۵۶±۱/۶۵ |
| **Pu009** | ۲۳/۳۵±۱/۹۰ | ۲۲/۰۶±۱/۳۵$^{ab}$ | ۱۷/۷۱±۱/۳۴ |
| **Pu014** | ۲۲/۸۱±۲/۵۱ | ۲۳/۲۳±۱/۵۳$^{ab}$ | ۱۸/۰۸±۰/۹۰ |
| **Pu016** | ۲۲/۳۰±۲/۳۱ | ۲۰/۷۹±۱/۸۲$^{b}$ | ۱۷/۰۰±۱/۵۱ |
| **Pu017** | ۲۲/۲۱±۲/۹۱ | ۲۰/۷۰±۱/۸۸$^{b}$ | ۱۶/۹۱±۱/۴۰ |
| **Pu019** | ۲۱/۶۲±۲/۸۵ | ۲۳/۷۱±۱/۳۷$^{a}$ | ۱۸/۷۶±۱/۲۸ |
| **Pu020** | ۲۲/۷۱±۲/۷۵ | ۲۳/۴۲±۱/۸۷$^{ab}$ | ۱۸/۴۳±۱/۵۰ |
| **Pu021** | ۲۳/۱۶±۲/۳۸ | ۲۲/۲۰±۲/۳۴$^{ab}$ | ۱۸/۲۸±۱/۳۳ |
| **Pu025** | ۲۱/۸۳±۱/۳۱ | ۲۳/۱۵±۱/۷۹$^{ab}$ | ۱۸/۶۸±۱/۶۲ |
| **Reference data (van der Plaats-Niterink, 1981)** | ۲۰–۲۵(–۲۹) | (۱۴–)۲۰–۲۴(–۲۵) (میانگین ۲۱/۵)$^{ab}$ | (۱۲–)۱۷–۲۰(–۲۱) (میانگین ۱۸) |

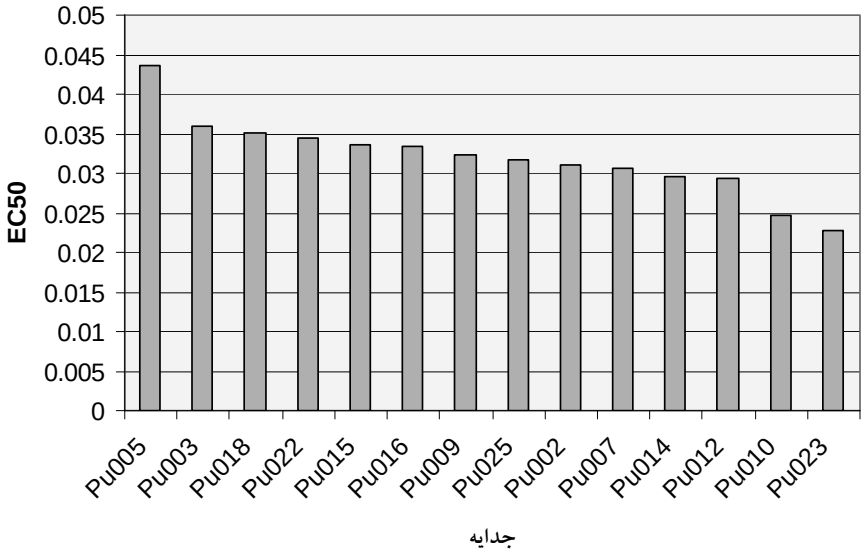
ابعاد ذکر شده در کلید واندر پلاتز–نیترینک، در ردیف آخر جدول آورده شده است.

مقایسه میانگین به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح معنی دار ۰/۰۵ انجام شده است .

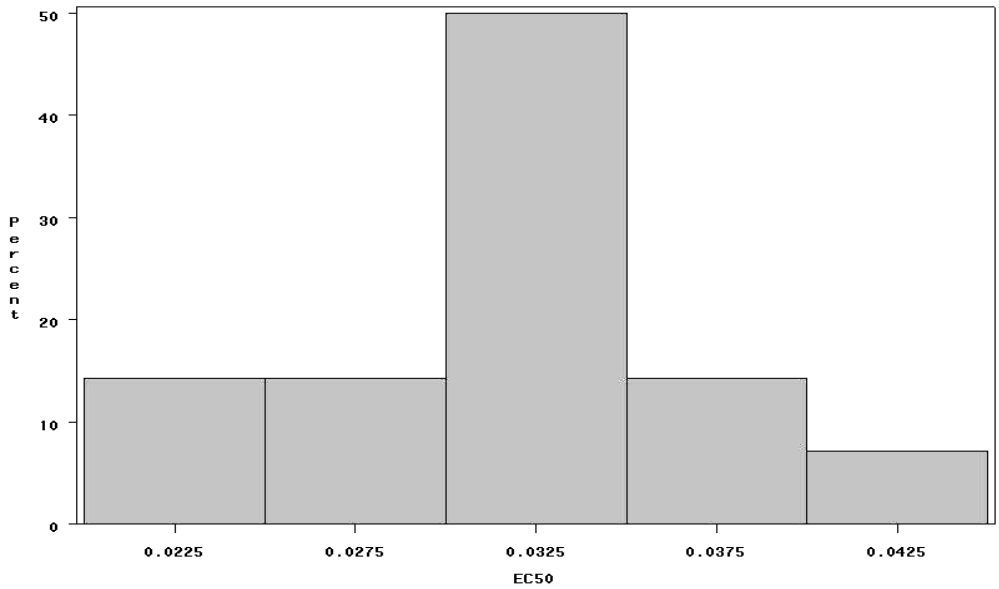
اندازه‌ها بر حسب میکرومتر می‌باشد. عدم وجود اختلاف معنی‌دار با n.s و اختلاف معنی‌دار با * مشخص شده است. اعداد دارای حروف الفبای مشترک اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

Archive of SID

www.SID.ir




**شکل۲- مقایسه EC50 جدایه‌های مورد آزمایش**

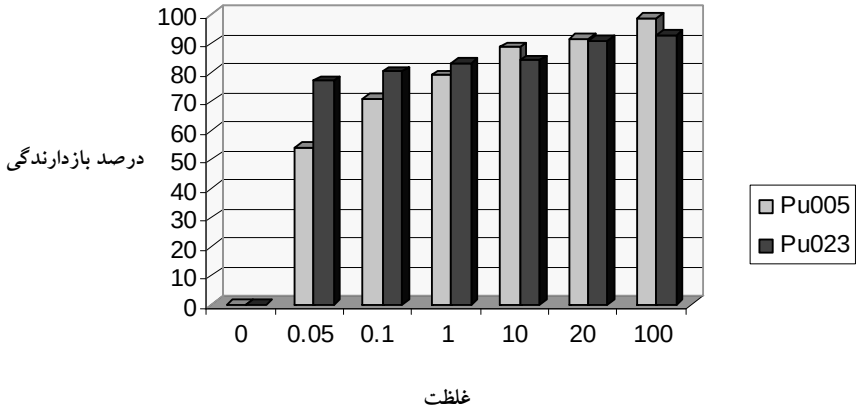



**شکل۳- درصد فراوانی جدایه‌ها با توجه مقادیر EC50 مختلف** (محور افقی EC50 و محور عمودی فراوانی جدایه‌ها را بر حسب درصد نشان می دهد.)

به همین خاطر طی دو سال اول از زمان معرفی آن در اواخر دهه ۱۳۷۰، گزارش‌هایی مبنی بر ایجاد جدایه‌های غیرحساس به متالاکسیل در *Pseudoperonospora cubensis* روی خیار در اسرائیل (رو ایونی و همکاران، ۱۹۸۰) و جدایه‌های *Phytophthora infestans* غیرحساس در محصول سیب زمینی در ایرلند (داولی و همکاران، ۱۹۸۱) و در هلند (۴) منتشر شد. مقاومت به متالاکسیل در پیتیوم‌ها برای اولین بار در ۱۹۸۴ در *Pythium aphanidermatum* عامل بلایت چمن[1] در شمال آمریکا گزارش شد (۱۸). همچنین جمعیت‌هایی از *P. ultimum* نسبت به مفنوکسام و متالاکیسل مقاومت نشان داده‌اند؛ برانتنر و همکاران در ۱۹۹۸ نشان دادند که *P. ultimum* var. *sporangiiferum* جدا شده از گیاهچه‌های چغندر قند از نظر حساسیت به متالاکسیل دارای تنوع معنی‌داری می‌باشند.

1- turf blight

www.SID.ir




**شکل٤- مقایسه عکس العمل دو جدایه Pu023 و Pu005 در برابر غلظت‌های متفاوت متالاکسیل**

(محور افقی غلظت‌های مورد آزمایش متالاکسیل (میکروگرم بر میلی‌لیتر ماده موثره) و محور عمودی درصد بازدارندگی از رشد کلنی را در مقایسه با تیمار شاهد نشان می‌دهد.)

**جدول٤- EC50 به دست آمده برای هر جدایه با استفاده از مدل$I=kc(e^{rc})$ و مقادیر تخمینی و خطای استاندارد فراسنجه‌های k و r (اعداد ثابت)**

| جدایه | EC50 µg/ml | فراسنجه‌های مدل$I=kc(e^{rc})$ | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | r | | k | |
| | | تخمین | خطای استاندارد | تخمین | خطای استاندارد |
| Pu005 | ۰/۰۴۳۶ | −۸/۵۴۰۲ | ۳/۶۳۳×۱۰$^{-۷}$ | ۱۶۶۴/۴ | ۵/۱ ×۱۰$^{-۵}$ |
| Pu003 | ۰/۰۳۶۰ | −۱۱/۹۲۰۹ | ۸/۱۲×۱۰$^{-۹}$ | ۲۱۳۴/۲ | ۱/۴۱۱ ×۱۰$^{-۶}$ |
| Pu018 | ۰/۰۳۵۱ | −۱۳/۵۵۷۴ | ۱/۳۶۳×۱۰$^{-۸}$ | ۲۲۹۲/۵ | ۲/۴۸۱ ×۱۰$^{-۶}$ |
| Pu022 | ۰/۰۳۴۵ | −۱۱/۵۱۰۳ | ۹/۸۵۲×۱۰$^{-۸}$ | ۲۱۵۵/۲ | ۱/۷ ×۱۰$^{-۵}$ |
| Pu015 | ۰/۰۳۳۵ | −۹/۷۴۲۹ | ۳/۹۶×۱۰$^{-۱۰}$ | ۲۰۶۷/۰ | ۶/۸۵۸ ×۱۰$^{-۸}$ |
| Pu016 | ۰/۰۳۳۴ | −۱۳/۳۱۲۰ | ۲/۱۶×۱۰$^{-۱۰}$ | ۲۳۳۴/۶ | ۴/۰۱۶ ×۱۰$^{-۸}$ |
| Pu009 | ۰/۰۳۲۳ | −۱۲/۰۱۹۴ | ۹/۵۲۹×۱۰$^{-۹}$ | ۲۲۸۳/۷ | ۱/۷۶۷ ×۱۰$^{-۶}$ |
| Pu025 | ۰/۰۳۱۷ | −۱۱/۶۰۹۵ | ۵/۷۲×۱۰$^{-۱۲}$ | ۲۲۷۸/۹ | ۱/۰۶۴ ×۱۰$^{-۹}$ |
| Pu002 | ۰/۰۳۱۱ | −۱۲/۸۵۲۷ | ۳/۴۷۷×۱۰$^{-۸}$ | ۲۳۹۶/۹ | ۶/۶۸۷ ×۱۰$^{-۶}$ |
| Pu007 | ۰/۰۳۰۶ | −۱۳/۲۱۲۴ | ۴/۳۵×۱۰$^{-۱۴}$ | ۲۴۴۶/۳ | ۸/۴۹ ×۱۰$^{-۱۲}$ |
| Pu014 | ۰/۰۲۹۶ | −۱۲/۸۰۴۰ | ۱/۴۷×۱۰$^{-۱۲}$ | ۲۴۶۶/۵ | ۲/۹۱ ×۱۰$^{-۱۰}$ |
| Pu012 | ۰/۰۲۹۵ | −۱۱/۹۳۶۴ | ۱/۵×۱۰$^{-۱۲}$ | ۲۴۱۲/۳ | ۲/۹۳ ×۱۰$^{-۱۰}$ |
| Pu010 | ۰/۰۲۴۸ | −۱۳/۷۱۳۷ | ۲/۶۷×۱۰$^{-۱۱}$ | ۲۸۳۵/۸ | ۶/۰۰۹ ×۱۰$^{-۹}$ |
| Pu023 | ۰/۰۲۲۸ | −۱۳/۰۲۰۱ | ۲/۱۷×۱۰$^{-۱۰}$ | ۲۹۵۳/۱ | ۵/۱۲۵ ×۱۰$^{-۸}$ |

I، درصد بازدارندگی از رشد کلنی (متغیر وابسته) و C، غلظت سم (متغیر مستقل) است. محاسبات به روش NLIN با استفاده از نرم‌افزار SAS,V9.1 می باشد.

در مطالعات ایشان دامنه EC50 جدایه‌ها بین ۱/۱۹ تا ۳/۱۲ میکروگرم در میلی‌لیتر متالاکسیل (ماده موثره) بود و جدایه‌ها در سطح معنی‌دار ۰/۰۵ از نظر حساسیت به متالاکسیل اختلاف داشتند. در این بررسی نیز اختلاف جدایه‌ها با یکدیگر معنی‌دار بود. ولیکن تمام جدایه‌ها در گروه حساس به متالاکسیل (EC50<0.05) قرار می‌گیرند. با این حال وجود اختلاف بین جدایه ها از نظر حساسیت به متالاکسیل می‌تواند بیانگر ویژگی بالقوه آنها در کسب صفت غیرحساس بودن به متالاکسیل تلقی شود. ارزیابی حساسیت پاتوژن‌های مهم در هر منطقه نسبت به قارچ کش‌های مورد استفاده به عنوان یکی از برنامه‌های مدیریت پایدار ضروری می‌نماید.

تیلور و همکاران، ۲۰۰۲، جدایه‌های *P. ultimum* غیرحساس به مفنوکسام (ایزومر متالاکسیل) را از غده‌های پوسیده سیب زمینی در آمریکای شمالی جداسازی کردند ایشان نشان دادند که منحنی حساسیت هر جدایه به صورت سیگموئیدی می‌باشد، مگر این که آن

Archive of SID

www.SID.ir

جدایه به شدت غیرحساس یا مقاوم باشد. لذا مجموعه داده‌ها تنها از یک تابع غیرخطی مثل مدل گمپرتز و یا لجستیکی تبعیت می‌کند. جدایه‌های به کار رفته در این آزمایش نیز تنها از یک مدل لجستیکی تناسب و همخوانی داشتند و مدل $I=kC(e^{rc})$ بیشترین تطابق را با داده ها نشان می داد .

در بررسی حاضر همبستگی روشنی بین میزان حساسیت به سم متالاکسیل و میزبان جدایه یافت نشد.

ال-سعدی و همکاران، ۲۰۰۸، جدایه‌های *P. spinosum* جدا شده از خیار از کشور عمان را از جهت خصوصیات بیماری‌زایی روی گیاهچه خیار و حساسیت به متالاکسیل در شرایط آزمایشگاهی بررسی کردند. نتیجه مطالعه ایشان نشان می‌داد که همه جدایه‌ها نسبت به متالاکسیل حساس بودند و همگی به شدت بر روی گیاهچه خیار بیماری‌زا بودند. اما ایشان هیچ همبستگی بین حساسیت جدایه‌ها به متالاکسیل با قدرت بیماری‌زایی آنها پیدا نکرد. البته تیلور و همکاران، ۲۰۰۲، نوعی رابطه منفی را در تعدادی محدود از جدایه‌های *Pythium* ، بین حساسیت به متالاکسیل در شرایط آزمایشگاهی و قدرت بیماری‌زایی بر روی چغندرقند در گلخانه مشاهده کرد. نتیجه‌گیری کلی در مورد ارتباط مقاومت به متالاکسیل و قدرت بیماری‌زایی هنوز کاملاً روشن نیست و به بررسی‌های بیشتری در شرایط آزمایشگاهی و زیستی نیاز دارد.

در مطالعه حاضر نشان داده شد که تمامی جدایه‌های مورد آزمایش که از استان‌های خراسان شمالی و رضوی جمع‌آوری شده بودند، به مقادیر کم قارچ‌کش متالاکسیل حساس می‌باشند. البته از آنجا که رفتار *P. ultimum* در شرایط آزمایشگاهی و در محیط کشت مسلما با رفتار آنها در شرایط زیستی خاک و در حضور میزبان و دیگر میکروارگانیسم‌ها متفاوت خواهد بود، مقدار سم مورد نیاز برای کنترل *P. ultimum* در خاک با مقدار به دست آمده در نتایج آزمایشگاهی نیز متفاوت می‌باشد. قارچ‌کش متالاکسیل برای مبارزه با بوته‌میری در جالیز ۲۵-۲۰ کیلوگرم در هکتار توصیه شده است که میزان آن بسته به شرایط فیزیک و شیمی و میزان مواد آلی خاک تفاوت دارد.

## منابع


1- Al-Sa'di A.M., Drenth A., Deadman M., and Aitken E.A.B. 2008. Genetic diversity, aggressiveness and metalaxyl sensitivity of *Pythium aphanidermatum* populations infecting cucumber in Oman. Plant Pathology 57: 45–56.
2- Al-Sa'di A.M, Drenth A., Deadman M., De Cock A.W.A., Al-Said F.A., and Aitken E.A.B. 2008. Genetic Diversity, Aggressiveness and Metalaxyl Sensitivity of *Pythium* spinosum Infecting Cucumber in Oman. Phytopathology 156:29–35.
3- Brantner J.R., and Windels C.E. 1998. Variability in sensitivity to metalaxyl in vitro, pathogenicity, and control of *Pythium* spp. on sugar beet. Plant Dis. 82:896-899.
4- Davidse L.C., Hofman A.E., and Velthuis G.C.M. 1983. Specific interference of metalaxyl with endogenous RNA polymerase activity in isolated nuclei from Phytophthora megasperma f. sp.medicaginis, Experimental Mycology, 7:344-361.
5- Deahl K.L., Inglis D.A., and DeMuth S.P. 1993. Testing for resistance to metalaxyl in Phytophthora infestans isolates from northwestern Washington. American Potato Journal, 70:779-795.
6- Der G., and Everitt B.S. 2007.Basic Statistics Using SAS ®Enterprise Guide: A Primer. Cary, NC: SAS Institute Inc.
7- Dmitrienko A., Chuang-Stein C., and D'Agostino R. 2007. Nonlinear Regression Models with a Continuous Response in: Pharmaceutical Statistics Using SAS®: A Practical Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc.
8- Francis D.M., and St. Clair D.A. 1997. Population Genetics of *Pythium ultimum*. Phytopathology 87:454-461.
9- Kageyama K., Ohyama A., and Hyakumachi M. 1997. Detection of *Pythium ultimum* using polymerase chain reaction with species-specific primers. Plant Dis. 81:1155-1160.
10- Lĕvesque C.A., Varin T.C., and De Boer S.H. 1994. Development of a species-specific prob for *Pythium ultimum* using amplified ribosomal DNA. Phytopathology 84:474-478.
11- Martin F.N., and English J.T. 1997. Population Genetics of Soilborne Fungal Plant Pathogens. Phytopathology 87(4):446-447.
12- Mazzola M., Andrews P.K., Reganold J.P., and Lévesque C.A. 2002. Frequency, virulence, and metalaxyl sensitivity of *Pythium* spp. isolated from apple roots under conventional and organic


Archive of SID

www.SID.ir

production systems. Plant Dis. 86:669-675.
13- Mircetich S.M., and Kraft J.M. 1973. Efficiency of various selective media in determining *Pythium* populations in soil. Mycopathol. Mycol. Appl. 50:151-161.
14- Moorman G.W., Kang S., Geiser D.M., and Kim S.H. 2002. Identification and characterization of *Pythium* species associated with greenhouse floral crops in Pennsylvania. Plant Dis. 86:1227-1231.
15- Moorman G.W., and Kim S.H. 2004. Species of *Pythium* from greenhouses in Pennsylvania exhibit resistance to propamocarb and mefenoxam. Plant Dis. 88:630-632.
16- Tojo M., Nakazono E., Tsushima S., Morikawa T. and Matsumoto N. 1998. Characterization of two morphological groups of isolates of *Pythium ultimum* var. ultimum in a vegetable field. Mycoscience 39:135-144.
17- Refaat M. 2007, Exploratory Data Analysis/Testing Normality in: Data preparation for data mining using SAS, San Francisco,Elsevier Inc.
18- Sanders P.L. 1984. Failure of metalaxyl to control *Pythium* blight on turf grass in Pennsylvania. Plant Dis. 68:776-777.
19- Taylor R.J., Salas B., Secor G.A., Rivera V., and Gudmestad N.C. 2002. Sensitivity of North American isolates of Phytophthora erythroseptica and *Pythium ultimum* to mefenoxam (metalaxyl). Plant Dis. 86:797-802.
20- Tojo M., Hoshino T., Herrero M.L., Klemsdal S.S., and Tronsmo A.M. 2001. Occurrence of *Pythium ultimum* var. ultimum in a greenhouse on Spitsbergen Island, Svalbard. European Journal of Plant Pathology 107: 761–765.
21- Van Der Plaats-Niterink, A.J. 1981. Monograph of the genus *Pythium*. Studies in Mycology 21:1–242.
22- Wang P.H., Wang Y.T., and White J.G. 2003. Species-specific PCR primers for *Pythium* developed from ribosomal ITS1 region. Letters in Applied Microbiology 37:127–132.

Archive of SID

www.SID.ir