# بررسی برخی فاکتورهای موثر بر تولید و بیماریزایی زئوسپورهای *Phytophthora capsici* و *P.nicotianae* روی میوه‌ی گوجه فرنگی

علی اصغر داوری[۱]، کامران رهنما[۲] و حجت اله ربانی نسب[۳*]

۱- دانش آموخته ی کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گلستان، گرگان، ایران.
۲- دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده تولیدات کیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گلستان، گرگان، ایران.
۳- استادیار بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی گلستان، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان، ایران.
*مسئول مکاتبه : h.rabbani@ areeo.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۰/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۲/۴

**چکیده**

گونه‌هایی از جنس فایتوفتورا باعث پوسیدگی ریشه، طوقه و مرگ گیاهچه‌ی گوجه‌فرنگی می‌شوند. در صورت تماس میوه با خاک و فعال بودن بیمارگر، میوه در معرض پوسیدگی به نام پوسیدگی چشم گوزنی قرار می‌گیرد. در این تحقیق عوامل بیمارگر از خاک، ریشه و طوقه‌ی گوجه‌فرنگی در استان خراسان شمالی جداسازی شده و به‌عنوان گونه‌های *capsici Phytophthora* و *P.nicotianae* شناسایی و بیماری زایی هردو گونه روی نشاهای گوجه‌فرنگی به اثبات رسید. تولید زئوسپور در این گونه‌ها تحت تأثیر شرایط نوری و دمایی مختلف مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که از لحاظ واکنش به شرایط دمایی بین آنها اختلاف معنی داری وجود داشت. همچنین دما در آزادسازی زئوسپور هر دو گونه اثر معنی داری داشت. بیشترین تولید زئوسپور در یکی از جدایه‌های *P.capsici* در ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و در شرایط تاریکی اتفاق افتاد. در مورد *P.nicotianae* در ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و شرایط نوری بیشترین زئوسپور تولید شد. بیشترین طول زخم ایجاد شده توسط زئوسپورها در جدایه‌ی شماره‌ی دو مربوط به گونه‌ی *P.capsici* رخ داد که اندازه‌ی آن در ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و تاریکی پس از پنج روز به حدود ۵۰ میلی‌متر رسید. در مورد گونه‌ی *P.nicotianae* بیشترین بیماری‌زایی زئوسپورها در ۲۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و در شرایط نوری حادث شد.

**واژه‌های کلیدی**: فایتوفتورا، زئوسپور، گوجه‌فرنگی، خراسان شمالی.

**مقدمه**

در میان شبه‌قارچ‌ها، گونه‌های مختلف فایتوفتورا به خصوص در شرایط رطوبت بالا و اشباع بودن دائمی خاک می‌توانند خسارات زیادی به گوجه‌فرنگی وارد سازد. این شبه قارچ‌ها به عنوان عوامل بیماری‌های مختلف در بسیاری از گیاهان زراعی، صیفی و جالیز شناخته شده‌اند. آن‌ها در اثر حمله به گیاه علائمی مانند مرگ گیاهچه، سوختگی اندام‌های هوایی، پوسیدگی میوه، ساقه، طوقه و ریشه ایجاد کرده و در اکثر موارد هم منجر به مرگ میزبان می‌شوند (شکاری و همکاران ۲۰۰۵).

اطلاع از تأثیر دما بر اسپورزایی قارچ‌ها و شدت بیماری‌زایی آن‌ها منجر به درک صحیح از شرایط انتشار بیماری شده و پیش‌آگاهی بیماری به منظور مدیریت آن را امکان‌پذیر خواهد نمود. گونه‌های فایتوفتورا تولید اسپورهای تاژک‌دار متحرک به نام زئوسپور می‌کنند که درون کیسه‌های ویژه‌ای به نام اسپورانژیوم تولید می‌شوند. زئوسپورها در آب شنا کرده و به میزبان جدید حمله می‌کنند (بنی هاشمی و سرتیپی ۲۰۰۴).

زئوسپورها کموتاکسی[۱] داشته و به سمت مواد بیوشیمیایی مختلفی مانند ویتامین‌ها، ترکیبات فنولی، اسید نوکلئیک‌های نیتروژن‌دار، نوکلئوتیدها، تنظیم کننده‌های رشد، قندها، اسیدهای آلی و آمینواسیدها جذب می شوند (Khew and Zentmyer, 1973). گونه‌های *Phytophthora capcisi* Leonin و *P. palmivora* (E.J.Butler) E.J.Butler

[1]Chemotaxis

Butler نسبت به زئوسپرهای *P.cinnamomi* Rands و *P.citrophthora* (R.E.Sm &E.H.Sm) Leonian به چهار نوع اسید آمینه آرژینین، اسید آسپارتیک، اسید گلوتامیک و متیونین بیشتر جذب می‌شوند. زئوسپورها سپس با از دست دادن تاژک‌هایشان انکیسته (encyste) شده و به پروتئین‌های سطحی ریشه متصل می‌شوند (Tyler *et al*.1996).

در آزمایشی بر روی *P. megasperma* var. *sojae* A.A.Hildebr ، مشخص شد که سه فاکتور دما، سن محیط کشت و نور در تعداد زئوسپورهای تولید شده تاثیر زیادی دارند. دمای بهینه برای رهاسازی زئوسپورهای *P.capsici* ، ۲۰ درجه‌ی سانتیگراد تعیین شد و البته شوک سرمایی پنج درجه‌ای نیز موردنیاز بود (Andres *et al*.2005). سه عامل دما، نور و نوع محیط کشت مهم‌ترین عوامل تولید اسپورانژیوم و زئوسپور در فایتوفتورا گزارش شده اند (Alconero and Santiago 1972).

بیشترین توسعه‌ی بیماری ناشی از *Phytophthora pistaciae* در مناطق پسته کاری توسط زئوسپورها در دمای ۳۰ درجه‌ی سانتیگراد مشاهده گردید. بیشترین میزان پیشرفت بیماری در آزمون‌های بیماری‌زایی در محدوده‌ی دمایی ۲۵ تا ۳۰ درجه‌ی سانتیگراد صورت می گیرد (میرسلیمانی و همکاران ۲۰۱۲). در مطالعات جوانه‌زنی *P. parasitica* Dastur مشاهده شد که تشکیل فراوان زئوسپورها از پنج درجه شروع شده و در دماهای بالاتر، حتی ۳۵ درجه‌ی نیز ادامه می‌یابد. جوانه‌زنی مستقیم از دمای ۱۰ تا ۳۷ درجه‌ی سانتیگراد مشاهده شد. با این حال بیشترین جوانه‌زنی در دمای ۳۰ درجه وجود داشت ( رآو ۱۹۷۰). در مورد *P. cryptogea* (FWDM4) بیشترین تولید زئوسپور در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتیگراد به میزان ۵۲ درصد و بیشترین تولید لوله تندش در دمای ۱۵ درجه‌ی سانتیگراد به میزان حدود ۶/۶ درصد انجام گرفت. اما در مورد *P. cryptogea* (*FDM51*) بیشترین درصد تولید زئوسپور در دمای ۳۰ درجه‌ی سانتیگراد به میزان حدود ۳۹ درصد و بیشترین درصد تولید لوله تندش در دمای ۳۰ درجه‌ی سانتیگراد به میزان حدود ۱۲ درصد گزارش شد.

در مورد *P. parasitica* بیشترین درصد زئوسپور در دمای ۲۰ درجه‌ی سانتیگراد و بیشترین درصد تولید لوله تندش در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتیگراد مشاهده گردید. در مورد *P. citrophthora* بیشترین درصد زئوسپور در دمای ۲۰ درجه‌ی سانتیگراد و بیشترین درصد لوله تندش در دمای ۳۰ درجه‌ی سانتیگراد انجام شد. در گونه *P. citricola* Sawada بالاترین درصد زئوسپور در دمای ۲۰ درجه‌ی سانتیگراد و بالاترین درصد لوله تندش در دمای ۱۵ درجه‌ی سانتیگراد اتفاق افتاد. در مجموع بهترین دما برای جوانه‌زنی کیست‌ها[1]بهترین دماها جهت بیماری‌زایی آن‌هاست (Daniel *et al*.2005). هدف از این تحقیق شناسایی گونه‌های خاکزاد فایتوفتورا عامل پوسیدگی ریشه، طوقه و میوه‌ی گوجه‌فرنگی در استان خراسان‌شمالی و مشخص شدن بهترین شرایط دمایی جهت تولید زئوسپور توسط این گونه‌ها و همچنین تعیین بهترین شرایط نوری و دمایی برای بیماری‌زایی زئوسپور بر روی میوه‌ی گوجه‌فرنگی است.

## مواد و روش‌ها

### نمونه‌برداری جدا سازی و شناسایی عامل بیماری

نمونه‌برداری، در دو مرحله انجام شد. مرحله‌ی اول یک هفته پس از نشاکاری گوجه‌فرنگی در اواسط اردیبهشت ماه و مرحله‌ی بعدی حدود اواخر مرداد که عوامل پوسیدگی طوقه و ریشه و حتی میوه فعال بودند. به این منظور در فصل رشد از میوه‌های آلوده و مقداری از خاک اطراف ریشه‌های آلوده تا عمق حدود ۱۵ سانتی‌متر، نمونه‌برداری شده و درون کیسه‌هایی به آزمایشگاه منتقل و تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شدند. به منظور جداسازی فایتوفتورا از خاک ، از روش به دام انداختن با میوه خیار اقدام شد (ارشاد ۱۹۹۲). همچنین جداسازی قارچ از میوه و سایر اندام های گیاه روی محیط کشت آرد ذرت- آگار همراه آنتی‌بیوتیک پیماریسین (۲۰ میلی گرم)، آمپی‌سیلین (۲۵۰ میلی‌گرم)، ریفامپیسین (۱۰۰ میلی‌گرم) و و قارچ‌کش پنتاکلرونیتروبنزن به میزان ۱۰ میلی‌گرم در یک لیتر از

[1]Cyst

محیط کشت پایه آرد ذرت- آگاراانجام گردید. خالص-سازی ریسه‌ها به روش نوک ریسه انجام شد (درنس و ساندل ۲۰۱۱). جهت شناسایی از کلید های معتبر استفاده گردید ( Gallegly, 2008 and Stamps, 1990) . آزمون بیماری‌زایی گیاهچه ها به روش خرسندی و همکاران انجام گردید (خرسندی و همکاران ۲۰۰۹).

## تحریک به تولید اندام‌های تولیدمثل غیرجنسی و جنسی

از مهم‌ترین اندام‌های تولیدمثل غیرجنسی اسپورانژیوم است که زئوسپورها در آن تولید می‌شوند. به منظور تحریک تولید اسپورانژیوم، تعدادی بذر شاهدانه به مدت حدود ۲۰ دقیقه در آب مقطر جوشانده شده، بعد خشک شده و سپس در اطراف پرگنه‌ی جوان قارچ در محیط کشت آرد ذرت- آگار یا سیب زمینی- دکستروز- آگار[2]قرار داده شد. پس از حدود ۲۴ ساعت وآلوده شدن بذور شاهدانه توسط قارچ، به منظور تولید اسپورانژیوم به آب مقطر سترون در زیر نور لامپ مهتابی در دمای اتاق منتقل شدند. به منظور تولید مثل جنسی از محیط کشت عصاره شاهدانه- آگار[3]و عصاره لوبیا- آگار[4] استفاده شد (بنی‌هاشمی و سرتیپی ۲۰۰۲). سپس از حاشیه‌ی ریسه‌های هر پرگنه قطعاتی توسط سوزن سترون برداشت شده و به این محیط کشت منتقل گردید و به منظور تولید اُاُسپور، آنتریدیوم و اُاُگونیوم (در صورت تشکیل) به مدت یک هفته به یک مکان تاریک منتقل شدند (سجادی‌نژاد و همکاران ۲۰۰۹). برای بررسی اثرات دما بر تولید اسپوراژیوم آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تیمار دمایی ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درجه‌ی سانتیگراد در سه تکرار برای هر گونه قارچی (درمجموع سه جدایه) انجام شد.

## تحریک به تولید زئوسپور

برای تحریک و رهاسازی زئوسپورها از روش ارشاد استفاده شد (ارشاد ۱۹۹۲). همچنین ازکشت یک هفته‌ای محیط کشت جامد مانند عصاره‌ی لوبیا- آگار به روش اندروس و همکاران به این منظور استفاده گردید (Andres *et al*. 2005). شمارش زئوسپورها با استفاده از لام هموسیتومتر انجام شد (رهنما و ممرآبادی ۲۰۰۹). برای بررسی اثرات دما بر آزاد سازی زئوسپورها آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با هشت تیمار شامل چهار تیمار دمایی ۱۰، ۱۵ ، ۲۰ و ۲۵ درجه‌ی سانتیگراد و دو تیمار نور و تاریکی بصورت ترکیبی، در سه تکرار برای هر گونه (سه جدایه) انجام شد.

## بررسی اثرات محیطی بر بیماری زایی

سوسپانسیون زئوسپور با غلظت $10^5$ عدد در میلی لیتر تهیه شده و به وسیله‌ی پیپت یک میلی‌لیتر از آن روی میوه‌های زخمی تلقیح شد و میوه‌ها در تیمارهای دمایی ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۲۷ و ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و هم‌چنین دو حالت نور و تاریکی در اتاقک رشد قرار داده شده و توسعه‌ی زخم‌ها و میزان فساد میوه ارزیابی شد. به عبارت دیگر تاثیر دو فاکتور نسبتا مهم شرایط مختلف دما و نور و تاریکی بر روی میزان بیماری‌زایی زئوسپورها اندازه‌گیری شد. آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار و ۱۰ تیمار برای هر گونه ( سه جدایه) انجام شد. تیمارها شامل ترکیبات دما و نور بودند: ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و نور، ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و تاریکی، ۱۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و نور، ۱۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و تاریکی، ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و نور، ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و تاریکی، ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و نور، ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و تاریکی، ۲۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و نور، ۲۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و تاریکی، ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و نور و ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و تاریکی. تجزیه واریانس و آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم-افزارMSTAT-C انجام شد. مقایسه میانگین ها به روش آزمون دانکن انجام شد.

## نتایج و بحث

### شناسایی و تعیین هویت جدایه ها

بر اساس خصوصیات ریخت شناختی، جدایه‌های مورد بررسی، به‌عنوان دو گونه *P.nicotianae* Breda de Haan. و *P.capsici* شناسایی شدند. از میان ۵۰ جدایه که از ریشه،

[1]Corn Meal Agar (CMA)
[2]Potato Dextrose Agar (PDA)
[3]Hempseed Agar ( HA)
[4]Lima Bean Agar (LBA)

طوقه و میوه به دست آمد، ۴۲ جدایه *P.capsici* و هشت جدایه *P.nicotianae* شناسایی شد. در شرایط مزرعه‌ای، گونه‌ی *P.capsici* بیماری‌زایی شدیدتری داشته و در رطوبت زیاد خاک، خسارات بیشتری به محصول وارد کرده بود. در هردو گونه، علائم پوسیدگی ریشه، طوقه و بوته‌میری مشاهده شد اما علائم مرتبط با پوسیدگی چشم‌گوزنی میوه در مورد گونه‌ی *P.capsici* بیشتر مشاهده شد. جدایه‌های *P.capsici* بیشتر در خرداد ماه و گونه‌ی *P.nicotianae* بیشتر در اواخر مرداد جداسازی گردید. برای ادامه آزمایش‌ها دو جدایه از *P.capsici* به نامهای Pc1 و Pc2 استفاده شدند. Pc1 در خرداد ماه از خاک وPc2 در انتهای فصل از میوه جداسازی شده بود. همچنین یک جدایه از *P.nicotianae* به نام Pn که در انتهای فصل از روی میوه جداسازی شده بود، انتخاب شدند.

**تعداد اسپورانژیوم‌ها در سه آزمون دمایی**

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بین سه جدایه از دو گونه‌ی مورد بررسی به لحاظ تاثیر پذیری از دما در تولید اسپورانژیوم اختلاف معنی داری وجود دارد ( جدول ۱). در مجموع گونه *P.nicotianae* اسپورانژیوم بیشتری نسبت به جدایه های گونه‌ی دیگر در تمام تیماری های دمایی تولید نمود. با افزایش دما و بدون تاثیر نور، میزان تولید اسپورانژیوم افزایش یافت و بیشترین تعداد اسپورانژیوم در ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد مشاهده شد (شکل ۱). اسپورانژیوم که محتوی زئوسپورهاست، هر چه تعدادش بیشتر باشد در شرایط ثابت، زئوسپور بیشتری نیز تولید خواهد نمود. در این آزمون هر سه جدایه مورد آزمایش، در ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد بیشترین اسپورانژیوم را تولید کردند.

**تاثیر دما بر تعداد زئوسپور**

نتایج تجزیه‌ی واریانس نشان داد که هم تیمار گونه‌ی قارچ و هم دما بر رها سازی زئوسپور اثر معنی‌داری داشته است ( جدول ۲). تیمار های ترکیبی گونه‌های قارچی و درجه‌ی حرارت نیز اختلاف معنی دای با یکدیگر داشتند. همچنین نتایج تجزیه واریانس نشان داد که نور به تنهایی اثر معنی داری بر رها سازی زئوسپور ها ندارد اما اثر ترکیبی آنها بر گونه قارچی یا شرایط دمایی بر رها سازی زئوسپور در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). شکل مقایسه میانگین‌ها نشان می دهد که بیشترین رهاسازی زئوسپور در مورد جدایه‌ی Pc2 و در دمای ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و در شرایط تاریکی بوده است. در این شرایط به میزان حدود $۱/۷\times۱۰^{۶}$ زئوسپور در سانتی-متر مکعب آب مقطر استریل تولید گردید ( شکل ۲). همچنین این شکل نشان می دهد که با افزایش دما جدایه های *P.capsici* بدون تاثیرپذیری از نور یا تاریکی ، تا ۲۰ درجه‌ی سانتیگراد رها سازی زئوسپور افزایش یافت.

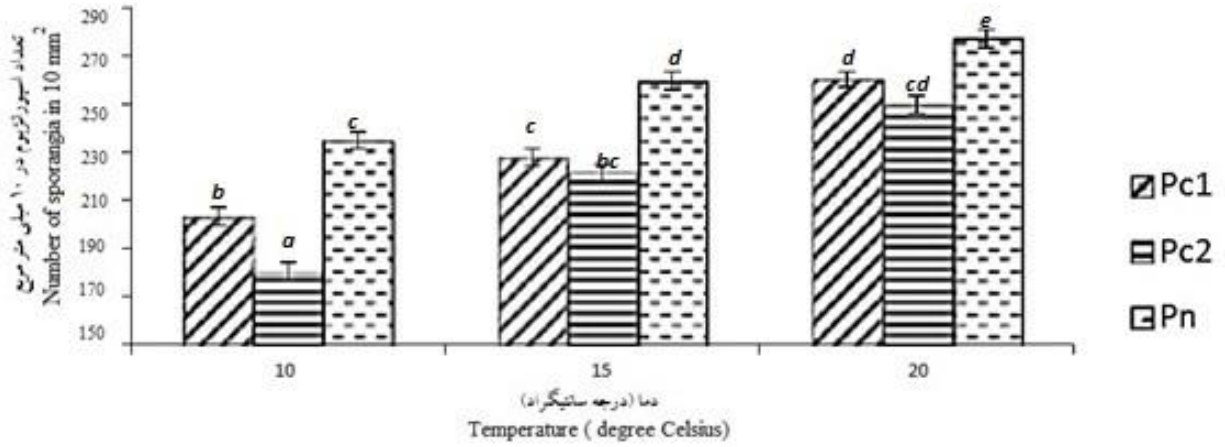
جدول ۱- تجزیه واریانس اثر گونه‌ی فایتوفتورا و درجه حرارت بر تعداد اسپورانژیوم.

Table 1. Analysis of variance of Phytophthora effect and temperature on number of sporangia.

| (منابع تغییرات) Sources of variations | (درجه آزادی) Degrees of feedom | (میانگین مربعات) Mean squares تعداد اسپورانژیوم Number of Sporangium |
|---|---|---|
| (گونه های فایتوفتورا) Phytophthora species | 2 | 3773.44** |
| (دما) Temperature | 2 | 7124.11** |
| (گونه های فایتوفتورا × دما) Temperature×Phytophthora species | 4 | 164.55* |
| (خطای آزمایش) Experimentl error (%) | 18 | 53.48 |
| (ضریب تغییرات ٪) Coefficient of variabilities | - | 3.11 |

*: معنی دار در سطح 5٪ ، **: معنی دار در سطح 1٪ و ns: غیرمعنی دار

*Significant level of 5% ** Significant level of 1% ns. Not significant




**شکل۱- مقایسه میانگین اثر دما بر تولید اسپورانژیوم در محیط کشت ۱۴ روزه ی دو جدایه *Phytophthora capsici* (Pc1 و Pc2) و یک جدایه *P.nicotianae* (Pn) روی عصاره لوبیا- آگار**

**Figure1- Temperature effect on sporangium production of *Phytophthora capsici*(Pc1&Pc2) and *P.nicotianae* (Pn) in bean agar medium**

در دمای بالاتر از ۲۰ درجه‌ی سانتیگراد رها سازی زئوسپور توسط *P.nicotianae* بیشتر از گونه دیگر بود. در مورد جدایه‌ی *P.nicotianae* بیشترین زئوسپور در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد ونور به غلظت حدود ۱/۳×۱۰$^{۶}$ زئوسپور در سانتی‌متر مکعب آب تولید شد. نتایج تجزیه‌ی واریانس همچنین نشان داد که نور به تنهایی اثر معنی داری بر رها سازی زئوسپور ها ندارد اما بصورت ترکیبی با سایر تیمار های موجود در سطح یک درصد معنی دار است ( جدول ۲). اما هر دو مورد با نتایج تحقیقات مطابقت دارد که دمای مورد نیاز جهت تولید بهینه‌ی زئوسپورها حدود ۸ تا ۱۰ درجه کمتر از دمای بهینه‌ی رشد پرگنه آن‌ها می‌باشد (ارشاد ۱۹۹۹).

**بررسی اثرات محیطی بر بیماری زایی**

هر دو گونه روی نشاهای دو هفته‌ای گوجه‌فرنگی بیماری‌زا بودند. اما میزان بیماری‌زایی آن‌ها در دو گونه تفاوت داشت. علائم بیماری شامل پوسیدگی ریشه و مرگ گیاهچه بود. با کشت مجدد قطعات ریشه بر روی محیط کشت، حضور بیمارگر شناسایی و تایید شد. در مورد جدایه‌های *P.capsici* آلودگی در تیمارهای تاریکی بهتر از نور بود ولی در مورد *P.nicotianae* آلودگی از جهتی که نور تابیده شده، آغاز می‌شود. همچنین وجود زخم یا خراش جهت آلودگی لازم بود که در غیر این صورت آلودگی از طریق گل‌گاه میوه که دارای زخم طبیعی است صورت خواهد گرفت. به طور کلی زخم بیمارگر، از نقاطی که دارای خراش یا زخم اولیه باشد، ظاهر می‌شود. شکل سه نشان می‌دهد که بیشترین بیماری‌زایی زئوسپورها در جدایه‌ی شماره دو گونه‌ی *P.capsici* (Pc2) بوده که در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتیگراد پس از پنج روز به حدود ۵۰ سانتی‌متر و تحت شرایط تاریکی بوده است.

جدول تجزیه واریانس نشان می‌دهد که تاثیر شرایط نور بر تولید زئوسپور معنی‌دار نبود. اما تاثیر دما و تاثیر دما به همراه نور در سطح یک درصد معنی‌دار بود. همچنین در مورد گونه *P.nicotianae* در دمای ۲۷ درجه‌ی سانتیگراد بیشترین بیماری‌زایی زئوسپورها اتفاق افتاده که نشانگر بهترین دما جهت جوانه‌زنی کیست‌های زئوسپورها نیز می‌باشند. به‌طور کلی در مورد جدایه *P.capsici* بیماری‌زایی زئوسپورها در شرایط تاریکی و در مورد جدایه *P.nicotiana* شرایط نور تاثیر نسبی بهتری در توسعه‌ی لکه‌های بیمارگر داشتند. بهترین جوانه‌زنی کیست‌های حاصل از زئوسپورهای *P.parasitica* در دمای ۳۰ درجه‌ی سانتیگراد گزارش شده است (رآو ۱۹۷۰). نتایج تجزیه‌ی واریانس اثر گونه بیمارگر، دما و نور بر اندازه‌ی زخم قارچ روی میوه‌ی گوجه‌فرنگی نشان می‌دهد که اثر گونه‌ی بیمارگر ودما در سطح یک درصد و همین طور شرایط نوری بر توسعه‌ی زخم بیمارگر در سطح پنج

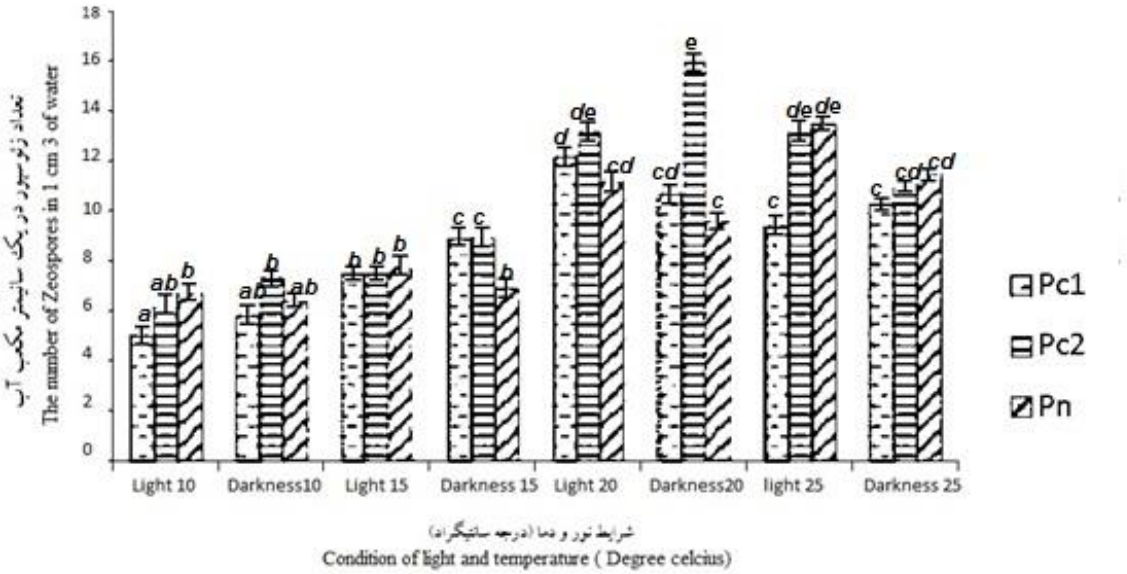
**جدول ۲- تجزیه واریانس اثر گونه‌های Phytophthora، دما و نور بر تعداد زئوسپور.**

**Table 2- Analysis variance of Phytophthora species, temperature and light effect on zoospore number**

| (میانگین مربعات) Mean squares (تعداد زئوسپور) Zoospore number | (درجه آزادی) Degrees of freedom | (منابع تغییرات) Sources of variation |
|---|---|---|
| 18.21 ** | 2 | (A) (فایتوفتورا) **Phytophthora** |
| 141/64** | 3 | (B)( دما) Temperature |
| 8/96** | 6 | A×B |
| 0.006 ns | 1 | (C) (شرایط نوری) Light condition |
| 6.67** | 2 | A×C |
| 3.04** | 3 | B×C |
| 3.58** | 6 | A×B ×C |
| 0.45 | 48 | (خطای آزمایش) Experiment error |
| 7.12 | - | (ضریب تغییرات) (٪) Coefficient of variabilities |

*: معنی دار در سطح ۵٪ ، **: معنی دار در سطح ۱٪ و ns: غیرمعنی دار

***Significant level of 5%  ** Significant level of 1%  ns. Not significant**




**شکل ۲- مقایسه میانگین اثر دما و نور بر تعداد زئوسپور در یک سانتی‌متر مکعب آب مقطر استریل در دو جدایه از *Phytophthora capsici* (Pc1 و Pc2) و یک جدایه از *P.nicotianae* (Pn).**

**Figure 2- Comparison of mean of Temperature and light effect on zoospore number of *Phytophthora capsici*(Pc1&Pc2) and *P.nicotianae* (Pn) in a $cm^3$ of distilled water**

درصد معنی‌دار بود. تاثیر گونه بیمارگر به همراه دما بر توسعه‌ی زخم در سطح پنج درصد معنی‌دار بود. ترکیب هر سه تیمار نیز معنی دار بود اما اثر ترکیبی نور و درجه-ی حرارت اثر معنی داری بر اندازه‌ی زخم روی میوه نداشتند ( جدول ۳).

با توجه به شکل چهار و تاثیر شرایط نور و تاریکی در توسعه‌ی زخم‌های حاصل از بیمارگر، به نظر می‌رسد جداسازی *P.nicotianae* در فصل تابستان از میوه در مزارع گوجه‌فرنگی شهرستان بجنورد، علاوه بر دمای

بهینه رشد بالای این گونه، به علت طولانی بودن روزها و طول دوره‌ی روشنایی بیشتر نیز باشد و در نتیجه غالبیت بیشتری در فصل تابستان داشته باشد.

زئوسپورها فقط در صورت ایجاد زخم روی سطح میوه بیماری‌زایی دارند و در صورتی که زخم نباشد، بیماری‌زایی نداشته و یا بسیار دیرتر بروز خواهد نمود که این مورد به علت کموتاکسی[1] زئوسپورها می‌تواند باشد که زئوسپورها به قندها، اسیدهای آلی یا آمینواسیدهایی که در سطح زخم وجود دارند، جذب شده و در آن‌جا تجمع می‌یابند. سپس در این نواحی کیست شده و پس از مدتی با جوانه زنی آن‌ها و تولید لوله تندش، آلودگی از سر گرفته خواهد شد. این مورد با تحقیقات خیو و زنتمایر (Khew and Zentmyer, 1973) مطابقت دارد. هم-چنین از موارد جالب توجه مشاهده شده این بود که کپک عامل بیمارگر در گونه *P.nicotianae* از سطح بالایی یعنی آن سمت از میوه که در مقابل نور قرار داشت، ظاهر شد. این نشان می‌دهد که نور حتی در جهت و میزان تحرک زئوسپورها اثر دارد. در مزرعه بیشتر آلودگی روی میوه-هایی که به تازگی از رنگ سبز به رنگ نارنجی تغییر یافته-اند ایجاد می‌شود اما در شرایط آزمایشگاه تفاوتی از این حیث وجود نداشت. از تفاوت‌های دیگر آلودگی میوه در مزرعه نسبت به شرایط آزمایشگاه این است که در مزرعه علایم آلودگی میوه‌ها توسط گونه‌های خاکزی فایتوفتورا به صورت پوسیدگی چشم آهویی یا Buckeye rot می‌باشد اما در آزمایشگاه به دلیل رطوبت بالا در بست پلاستیکی، علائم بیماری بلافاصله به صورت کپک سفید رنگ، میوه را احاطه می‌کند. البته در مزرعه نیز اگر شرایط رطوبت بالا فراهم باشد، به خصوص در میوه‌های رسیده، بیمارگر به سرعت سطح میوه را از جهت تماس با خاک در بر خواهد گرفت.

**جدول ۳- تجزیه واریانس اثر گونه‌ی بیمارگر، درجه حرارت و نور بر اندازه‌ی زخم روی میوه‌ی گوجه‌فرنگی.**

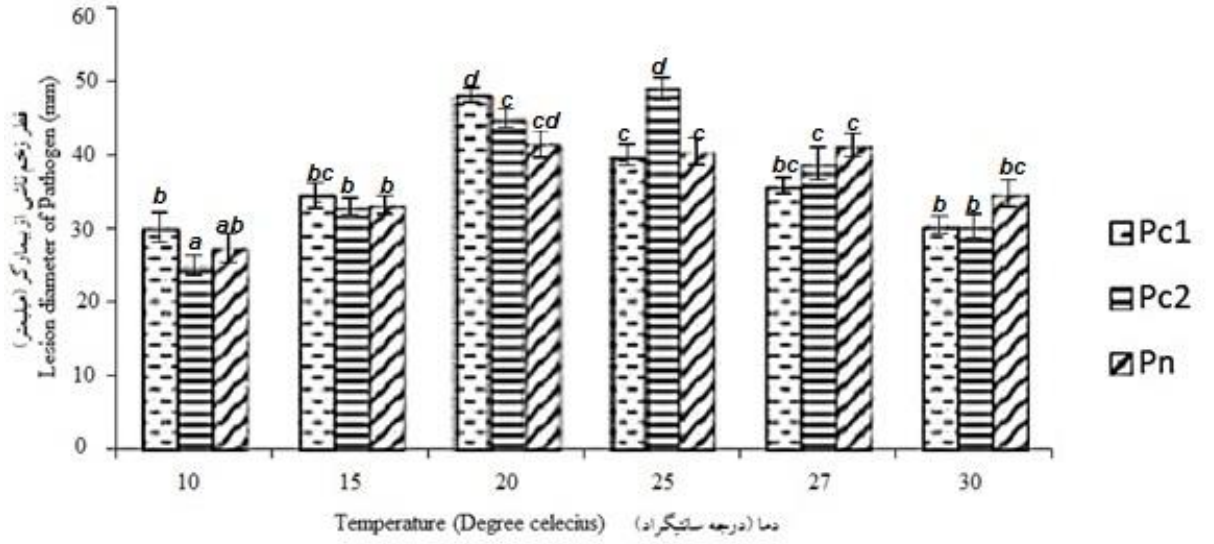
**Table 3- Analysis variance of pathogen species, temperature and light effect on lesion size on tomato fruit**

| (میانگین مربعات) Mean squares | (درجه آزادی) Degrees of freedom | منابع تغییرات) Sources of variation |
|---|---|---|
| Lesion diameter (اندازه زخم) | | |
| 1.75** | 2 | **Phytophthora**(فایتوفتورا) (A) |
| 829.33 ** | 2 | Temperature (دما )(B) |
| 69.45* | 10 | A×B |
| 56.33** | 1 | Light condition (شرایط نوری)(C) |
| 308.66** | 2 | A×C |
| 22.53 ns | 5 | B×C |
| 33.82** | 10 | A×B ×C |
| 10.61 | 72 | Experiment error (خطای آزمایش) |
| 8.90 | - | Coefficient of variabilities (ضریب تغییرات) (٪) |

*: معنی دار در سطح ۵٪ ، **: معنی دار در سطح ۱٪ و ns: غیرمعنی دار

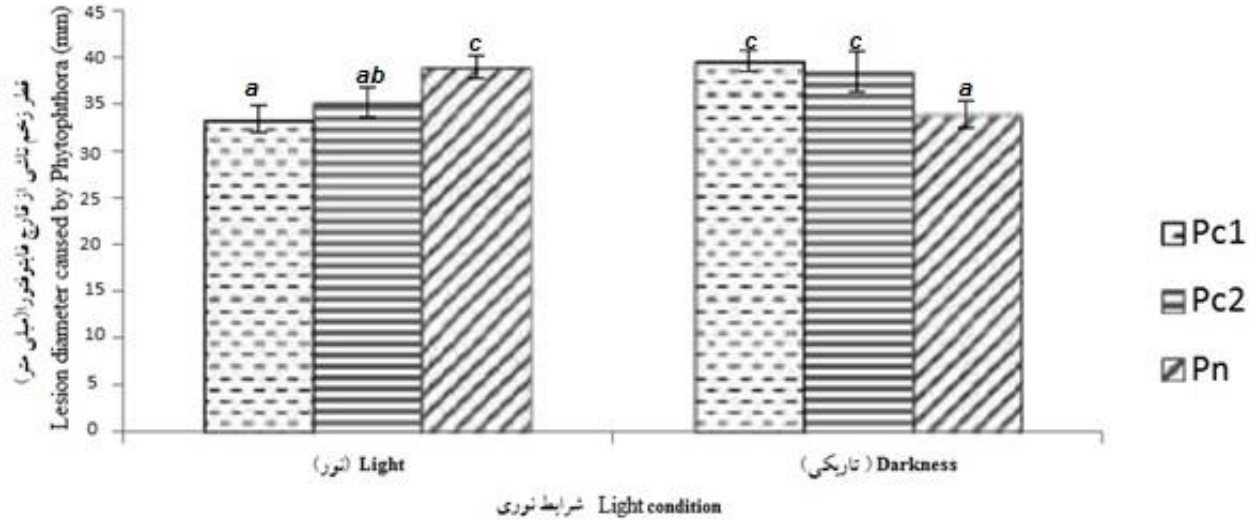
***Significant level of 5%  ** Significant level of 1%  ns. Not significant**

[1]Chemotaxis




شکل ۳- مقایسه میانگین تاثیر دما بر توسعه‌ی زخم حاصل از بیمارگر بعد از پنج روز از زمان تلقیح زئوسپورها در سطح میوه‌ی گوجه-فرنگی دو جدایه **Pc1** و **Pc2** از ***Phytophthoracapsici*** و جدایه‌ی **Pn** از ***P.nicotianae***

**Figure3- Temperature effect on Lesion development by pathogen, 5 days after Zoospore inoculation time on tomato fruit surface by *Phytophthora capsici*(Pc1&Pc2) and *P.nicotianae* (Pn)**




شکل۴- مقایسه میانگین تاثیر نور و تاریکی بر توسعه‌ی زخم بیمارگر دو جدایه‌ی **Pc1** و **Pc2** از ***Phytophthoracapsici*** و جدایه‌ی **Pn** از ***P.nicotianae*** روی میوه گوجه فرنگی

**Table 4- Light and Darkness effect on Lesion development by *Phytophthora capsici*(Pc1&Pc2) and *P.nicotianae* (Pn) on tomato fruit surface**

از طرفی در مزرعه به محض این که بخشی از میوه آلوده شد، سایر بیمارگرها شامل قارچ‌های ساپروفیت و باکتری‌ها نیز در سطح میوه مستقر شده و آن بخش را آلوده می‌نماید و فایتوفتورا بلافاصله پس از اسپورزایی مجددا به رشد خود ادامه می‌دهد که آلودگی به صورت موجی در سطح میوه ظاهر می‌شود.

به نظر می‌رسد که تغییرات دما تاثیرات معنی‌داری در تولید تعداد زئوسپور و بیماری‌زایی آن‌ها در هر دو گونه فایتوفتورا دارد. اما نور و تاریکی در مورد جدایه‌های

*P.capsici* تاثیر معنی‌داری ندارد. از این رو آگاهی از قدرت بیماری‌زایی زئوسپور به عنوان مهم‌ترین اندام عامل انتشار بیمارگر، می‌تواند به درک صحیح از همه‌گیر شناسی این بیماری در برخی مناطق به ویژه مناطق مرطوب منجر شود. به عنوان مثال در بهار و تابستان سال ۱۳۹۰ در استان خراسان شمالی بارش‌های قابل توجهی که برخی از آن‌ها با سیل همراه بود وجود داشت و در بسیاری از مزارع و باغات باعث انتشار نسبتا بالای بیماری‌های با عامل شبه قارچ‌های رده Oomycetes گردید. پوسیدگی‌های طوقه و ریشه صیفی‌جات و جالیز با عوامل پی تیوم و فایتوفتورا از نمونه‌های تاثیر شرایط محیطی بر همه‌گیر شدن بیماری‌هاست. محدوده‌ی دمایی و نوری در مورد دو گونه از این عوامل جهت بیماری‌زایی و انتشار بیماری در استان خراسان شمالی در این مطالعه مشخص شد و از آن‌جا که دماهای ۲۰ درجه جهت تولید زئوسپورها در مورد همه‌ی جدایه‌ها و بیماری‌زایی زئوسپورها در دمای ۲۵ درجه در مورد ایزوله‌های *P.capsici* و دمای ۲۷ درجه در مورد *P.nicotianae* مناسب‌اند و این دماها در اوایل اردیبهشت تا اواسط خرداد در استان خراسان شمالی رخ می‌دهد و از طرفی نشاهای گوجه‌فرنگی که به تازگی در زمین اصلی مستقر شده‌اند، در شرایط رطوبت بالا، این بیماری می‌تواند به صورت همه‌گیر باعث مرگ گیاه‌چه‌ها شوند. لازم است کشاورزان در این ماه‌ها نسبت به بروز این بیماری حساسیت بیشتری نشان دهند و اقدامات پیش‌گیرانه را انجام دهند. از موارد مهم دیگر در این تحقیق، وجود اسپورانژیوم فراوان در سطح میوه‌ی گوجه‌فرنگی توسط هر دو گونه است. لازم است تحقیق شود که چه موادی در میوه گوجه-فرنگی وجود دارد که موجب تحریک به تولید اسپورانژیوم فراوان می‌شود و از این مواد در محیط کشت‌ها استفاده شده و اثر آن‌ها بر تولید اسپورانژیوم و رهاسازی زئوسپور بررسی شود. هم‌چنین لازم است سایر عوامل مثل رطوبت نسبی هوا و میزان و توزیع بارش نیز به همراه دما و نور در شرایط مزرعه در بروز و انتشار بیماری بررسی شود. گونه‌هایی از جنس فایتوفتورا باعث پوسیدگی ریشه، طوقه و مرگ گیاهچه‌ی گوجه‌فرنگی می‌شوند. میوه هایی که با خاک در تماس هستند در صورت وجود بیمارگر، در معرض نوعی پوسیدگی به نام پوسیدگی چشم گوزنی قرار می‌گیرد. در این تحقیق عوامل بیمارگر از خاک، ریشه و طوقه گوجه‌فرنگی در استان خراسان شمالی جداسازی شده و به‌عنوان گونه‌های *Phytophthora capsici* و *P.nicotianae* شناسایی شدند. بیماری زایی هردو گونه روی نشاهای گوجه‌فرنگی به اثبات رسید. تولید زئوسپور در این گونه‌ها تحت تأثیر شرایط نوری و دمایی مختلف مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که از لحاظ واکنش به شرایط دمایی بین آنها اختلاف معنی داری وجود داشت. همچنین دما در آزاد سازی زئوسپور هر دو گونه اثر معنی داری داشت. بیشترین تولید زئوسپور در یکی از جدایه‌های *P.capsici* در ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و در شرایط تاریکی اتفاق افتاد. در مورد *P.nicotianae* در ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و شرایط نوری بیشترین زئوسپور تولید شد. بیشترین طول زخم ایجاد شده توسط زئوسپورها در جدایه Pc2 مربوط به گونه *P.capsici* رخ داد. اندازه‌ی آن در ۲۵ درجه‌ی سانتی-گراد و شرایط تاریکی پس از پنج روز به حدود ۵۰ میلی‌متر رسید. در مورد گونه *P.nicotianae* بیشترین بیماری‌زایی زئوسپورها در ۲۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و در شرایط نوری حادث شد.

## منابع


Alconero R, and Santiago A, 1972. Charactristics of asexual sporulation in *Phytophthora palmivora* and *Phytophthora parasitica nicotianae*. Phytopathology 62:993-997.

Andrés Ares JL, Rivera Martìnez A, and Fernández Paz J, 2005. Resistance of pepper germplasm to *Phytophthora capsici* isolates collected in northwest Spain. Spanish Journal of Agriculture Research 3(4): 429-436.

Banihashemi Z and Sartipi A, 2004. Identification of *Phytophthora* species associated with stone fruits crown rot in Fars Province and reaction of certain rootstock to *P.cactorum*. Journal of Sciences and Technology of Agriculture *and* Natural Resources 8(3): 241-249.

Daniel OO, 2005. Repeated emergence, motility and autonomus dispersal by sporangial and cyst derived zoospores of Phytophthora.Document type. OSU Dissertations [8892].

Ershad Dj, 1992. Phytophthora Species in Iran, 217pp. (in farsi)

Gallegly ME.ChuanXue H. and Hong C. 2008. *Phytophthora:* identifying species by morphology and DNA fingerprints. APS Press, 158 pp. USA.

Khew K and Zentmyer L, 1973. Chemotactic response of zoospores of five spiecies of *Phytophthora*. Phytopathology 63:1511-1517.

Khorsandi S, Baba ahari A, Rezaei S, and Mohammadi pour M, 2009. Identification of fungal disease agents of root and crown rot of tomato in East Azarbayjan. Scientific Journal of Agricultural Sciences, Islamic Azad University, Tabriz Branch, 12:79-93.

Mirsoleimani Z, Mostowfizadeh-Ghalamfarsa R, Mohammadi AH, Djavaheri M and Banihashemi Z, 2013. Reaction of pistachio cultivars to *Phytophthora pistaciae* and the influence of temperature on its pathogenicity. Iranian Journal of Plant Pathology 49(3): 279-296.

Rahnama K and Mamar abadi M, 2009. Herbal Clinic Guide, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources Press 138pp.

Rao VG, 1970. Influence of temperature upon growth and sporulation in two species of Phytophthora. Mycopathologia et Mycologia Applicata 42(1-2): 39-48.

Tyler BM, Wu M, Wang J, Cheung W and Morris PF, 1996. Chemotactic preferences and strain variation in the response of *Phytophthora sojae* zoospores to host isoflavones. Applied and Environmental Microbiology 62(8): 2811-2817.

Sajadi nejad M, Ershad D, Mirabolfathy M and Zamanizadeh H, 2010. Identification of Phytophthora species the causing root and crown rot of cherry trees in Trhran Province. Iranian Journal of Plant Pathology 45: 70-74

Shekari A, Mirabolfathy M, Mohammadi-pour M, Zad J and Okhovvat M, 2006. Phytophthora root and crown rot of several field, summer and patch crops in East Azarbaijan province. Iranian Journal of Plant Pathology 42(2): 293- 308

Stamps DJ, Waterhouse GM, Newhook FJ, and Hall GS, 1990. Revised tabular key to the species of Phytophthora, Mycological Paper. No 62. C.A.B. International Mycological Institute 28p.

# Investigation of Some Effective Factors on Production and Pathogenicity of Zoospores of *Phytophthora capsici* and *P.nicotianae* on Tomato Fruit

**A A Davari[1], K Rahnama[2] and H Rabbani nasab[3*]**

[1]Graduated Student, Department, of Plant Protection Plant Production College, Universit of Agriculture and Natural Resource of Gorgan, Gorgan, Golestan, Iran.
[2]Associate Professor, Department, of Plant Protection Plant Production College, Universit of Agriculture and Natural resource of Gorgan, Gorgan, Golestan, Iran.
[3]Assistant Professor, Plant Protection Research Division, Golestan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Gorgan, Iran.
*Corresponding author: h.rabbani@areeo.ac.ir
Received: 13 January 2019 Accepted: 22 February 2020

**Abstract**

Some species of *Phytophthora* genuse cause crown and root rot, and damping off of tomato seedlings. Fruits that contact with soil containing pathogen are affected by a type of decay called buckeye rot of tomato. In this research Pathogens were isolated from soil, tomato root and crown in North Khorasan province and identified as *Phytophthora capsici* and *P.nicotianae* . Pathogenicity of both species were demonstrated on tomato seedlings.The production Zoospores was investigated under different light and temperature conditions. The results showed that there was a significant differences between species in reaction to temperature condition. Temperature also had significant effect on the release of zoospore in both species. The highest release of zoospores occured in one of the *P.capsici* isolates at 20°C under dark conditions.In the case of *P.nicotianae at* 25°C and light conditions the highest zoospore were released. The largest wound length occurred in isolate Pc2 of *P.capsici* . It reached to 50 mm at 25°C and dark condition after 5 days. In the case of *P.nicotianae* the highest pathogenicity of zoospores occured at 27°C under light condition.

**Keywords:** Phytophthora, Zoospores, Tomato, North Khorassan.