

بورسی بیماری پوسیدگی ذغالی سویا در مازندران

*سیاوش رعیت پناه و سید وحید علوی

اعضای هیأت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی مازندران، ساری

تاریخ دریافت: ۸۴/۸/۹؛ تاریخ پذیرش: ۸۴/۸/۳۰

چکیده

بیماری پوسیدگی ذغالی با عامل *Macrophomina phaseolina* (M.p) یکی از مهمترین بیماری‌های سویا در شمال کشور (استان‌های گلستان و مازندران) بوده که در بعضی از سال‌ها آسیب زیانباری به این محصول وارد نموده است. در طی سال‌های ۱۳۷۰-۱۳۸۲ مزارع کشت سویا در استان مازندران مورد بازدید و بررسی قرار گرفت. از گیاهان واجد علائم مشکوک به آلدگی، پرگنه‌های قارچی جدا گردید که پس از اثبات بیماری‌زایی و جداسازی مجدد، قارچ M.P تشخیص داده شدند. جدایه‌های مختلف این قارچ از سویا، با سایر محصولات از نظر سرعت رشد، رنگ هیف‌ها، اندازه و تعداد سختینه تشکیل شده روی محیط کشت PDA متفاوت بودند. در بررسی عکس‌العمل ارقام و لاین‌ها، رقم ویلیامز بیشترین میزان آلدگی (۷۷ درصد) و رقم گرگان ۳ میزان آلدگی (۴۱/۵ درصد) را نشان داد. لاین‌های K.S-692 و B.P-692 و ۶۹۰۳۳ نیز کمترین آلدگی را نشان دادند. بالاترین میزان آلدگی (۵۰-۶۰ درصد) در مزارع شهرستان جویبار با خاک دارای بافت متوسط تا سبک و سابقه طولانی کشت سویا و کمترین میزان آلدگی (> ۱۰ درصد) در شهرستان آمل با بافت سنگین و سابقه کمتر کشت سویا مشاهده گردید. تعداد متوسط سختینه زنده در هر گرم از خاک مزارع کشت سویا در شهرستان جویبار ۳۲ عدد و در شهرستان قائم‌شهر ۱۴ عدد برآورد گردید.

واژه‌های کلیدی: سویا، پوسیدگی ذغالی

مقدمه

کاهش کمیت و کیفیت محصول گردیده و در حال حاضر از مهمترین بیماری قارچی آن به شمار می‌آید (*Macrophomina* رعیت‌پناه، ۱۳۷۵). قارچ *phaseolina* عامل سوختگی گیاهچه، پوسیدگی ریشه و پوسیدگی ذغالی بیش از ۵۰۰ گونه گیاهی غیرزراعی و زراعی شامل سویا، پنبه، کنجد، ذرت، آفتابگردان، سورگوم، توتون و غیره بوده (بیون، ۱۹۸۹) و اولین بار در ایران از مزارع خربزه اطراف اصفهان در سال ۱۳۴۸ توسط

استان مازندران دارای شرایط آب و هوایی مساعد برای کشت سویا در کشور بوده و هر ساله حدود ۳۰ هزار هکتار از اراضی آن به کشت سویا اختصاص می‌یابد که با توجه به متوسط عملکرد ۲۷۰۰ کیلوگرم در هکتار، این محصول نقش مهمی را در تأمین بخشی از نیاز کشور به دانه‌های روغنی تأمین می‌کند (رعیت‌پناه، ۱۳۸۲). بیماری پوسیدگی ذغالی^۱ هر ساله، بخصوص در سال‌های خشک و کم باران باعث آلدگی مزارع سویا و

*- مسئول مکاتبه: rayat_s_ag@yahoo.com

آلودگی خاک، استفاده از ارقام متحمل، تعیین تاریخ و تراکم مناسب کاشت و بهره‌گیری از سیستم آبیاری برای کنترل بیماری توصیه شده تحقیق شناسایی عامل و وضعیت پراکنش بیماری در مزارع سویا در مناطق مختلف استان، تعیین درصد آلودگی، تعیین میزان تحمل ارقام و لاینهای مختلف سویا و امکان بکارگیری آنها در مدیریت تلفیقی کنترل این بیماری بوده است.

مواد و روش‌ها

جداسازی، خالص نمودن و شناسایی عامل بیماری: طی سال‌های ۱۳۸۲-۱۳۷۰ مزارع سویا در مناطق مختلف استان مازندران مورد بازدید قرار گرفتند. نمونه‌برداری براساس علائم مشکوک به بیماری صورت گرفت. هر نمونه جداگانه در کیسه پلاستیکی قرار داده شده و پس از ثبت مشخصات به آزمایشگاه منتقل گردید. ریشه و طوقه هر نمونه در زیر شیر آب شسته شد و به طور جداگانه با محلول هیپوکلریت سدیم نیم درصد ضد عفونی سطحی گردیدند. قطعات ضد عفونی شده در آب مقطر سترون شستشو، سپس در روی کاغذ صافی سترون خشک شدند. قطعات کوچکی از بافت آوندی به همراه قسمتی از بافت کورتکس و اپیدرم جدا و درون طشتک پتی حاوی محیط کشت PDA منتقل و در شرایط تاریکی و دمای ۲۸-۳۰ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. در این شرایط پس از ۲۴ ساعت پرگنه قارچ عامل بیماری در روی محیط کشت ظاهر گردید. شناسایی قارچ عامل بیماری با استفاده از علائم مشخص بیماری، شکل و ابعاد اسکلروت، نحوه رشد قارچ روی محیط کشت و با تهیه مقطع و مقایسه آنها با مشخصات داده شده در منابع انجام گرفت (سینکلیر و بکمن، ۱۹۸۹).

اثبات بیماری‌زایی: ماسه و آرد ذرت را به نسبت حجمی ۹۰۰ به ۱۰۰ مخلوط کرده و ۱۰۰ گرم از آن در ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد. ده میلی‌لیتر آب مقطر سترون جهت تأمین رطوبت به آن اضافه و پس از دو بار سترون کردن متواالی به فاصله ۲۴ ساعت، از کشت پنج روزه قارچ قطعاتی به قطر ۲۰ میلی‌متر به ارلن مذکور اضافه شد و در

شريف گزارش شده است (غفاريان، ۱۳۷۹). میزان آلودگی بسته به حساسیت رقم، شرایط آب و هوایی مناسب (دمای بالا و رطوبت پایین)، میزان آلودگی خاک و سیستم آبیاری متغیر است. قارچ عامل بیماری در خاک و روی بقایای سویا به صورت سختینه‌های (اسکلروت) سیاهرنگ باقی می‌ماند. این سختینه‌ها در طول فصل زمستان در اثر پوسیده شدن بقایای سویا و شخم بهاره در داخل خاک مزارع پخش شده و منبع اولیه آلودگی بشمار می‌آید. اسکلروت‌ها دارای ظاهري مشبک بوده و از اتصال ۵۰-۲۰۰ سلول هیف دارای ملاتین تشکیل می‌شوند (سینکلیر و بکمن، ۱۹۸۹). اسکلروت‌ها در داخل خاک تا چندین سال زنده باقی می‌مانند (رادر و همکاران، ۱۹۹۸). این بیماری علاوه‌بر ایران در نقاط مختلف سویا کاری دنیا نظیر آرژانتین، بربازیل، کانادا، پاراگوئه و امریکا شیوع داشته و گاهی با شدت بالا مشاهده شده است تا حدی که کاهش محصول بر اثر این بیماری در کشورهای فوق در سال ۱۹۹۴ در مجموع ۱/۲۱ میلیون تن با ارزشی معادل ۲۷۲/۲۶ میلیون دلار گزارش شده است (رادر و همکاران، ۱۹۹۸). در مناطق شمالی آمریکا بیماری پوسیدگی ذغالی از نظر اهمیت در رتبه چهارم بعد از بیماری‌های نماتد سیست سویا، پوسیدگی فیتوفترایی ریشه و بیماری‌های مرگ گیاهچه قرار دارد (اسمیت و کارویل، ۱۹۹۷). آلودگی اولیه بیماری در مرحله گیاهچه اتفاق افتاده و معمولاً به صورت پنهان باقی مانده و علائم در اواسط تابستان در شرایط دمایی بالای ۲۸-۳۰ درجه سانتی گراد و رطوبت پایین خاک ظاهر می‌شود. این علائم به صورت پژمرده شدن بوته‌ها قبل از رسیدن، پاره پاره شدن بافت پوست در پائین ساقه، تشکیل اسکلروت‌ها در آوندهای آبکش و زیر پوست بوده که با تشکیل آنها بافت‌های داخلی برنگ سیاه در می‌آید (سینکلیر و بکمن، ۱۹۸۹). برای کنترل شیمیایی بیماری پوسیدگی ذغالی سویا با توجه به بیولوژی قارچ عامل بیماری و زمان ظهور علائم بیماری محدودیت‌های خاصی وجود دارد. در سال‌های اخیر توجه ویژه‌ای به بکارگیری روش‌هایی که شرایط را به نفع میزان تغییر دهد، به عمل آمده است. به همین منظور در بسیاری از نقاط دنیا روش‌هایی جهت کاهش

تعیین درصد آلوودگی مزارع سویا به بیماری پوسیدگی ذغالی: جهت تعیین درصد آلوودگی بیماری در مزارع سویا، روستاهای شهرستان قائمشهر، جویبار، ساری و بهشهر از اول خرداد تا ۱۵ شهریور مورد بازدید قرار گرفتند. در هر یک از روستاهای ذکر شده، ۴ مزرعه یک هکتاری انتخاب شد. در هر مزرعه در مرحله R7 سویا، با حرکت در مسیری به شکل S در هر ۵۰ متر یک کادر مربع در ابعاد ۱×۱ متر به صورت تصادفی انداخته شد و تعداد گیاهان بیمار تعیین گردید. بوتهای بیمار در مرحله R7 با مشاهده اسکلروت‌ها در نوک ریشه سویا با استفاده از روش اسمیت مشخص گردیدند (اسمیت و کارویل، ۱۹۹۷).

تعیین میزان تحمل ارقام و لاین‌های سویا به بیماری: از طریق بخش تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر استان مازندران ۱۲۱ رقم و لاین سویا تأمین و در اردیبهشت ماه سال‌های ۱۳۷۹-۸۱ در منطقه جویبار کشت شدند. تعداد اسکلروت‌های زنده موجود در خاک این منطقه برابر با ۳۲ عدد در هر گرم خاک برآورد گردید. هر رقم و لاین سویا در چهار خط چهار متری به فاصله ۵۰ سانتی‌متر از یکدیگر و در قالب طرح لاتیس مربع ساده کاشته شد. یادداشت‌برداری در مرحله R7 سویا با مشاهده اسکلروت‌ها در نوک ریشه با روش اسمیت صورت گرفت (اسمیت و کارویل، ۱۹۹۷).

نتایج و بحث

مشخصات قارچ عامل بیماری: جدایهای به دست آمده از گیاهان آلووده سویا در مناطق مختلف مازندران تولید پرگنهایی به رنگ سفید شیری تا خاکستری کم رنگ نمودند. پس از مدتی زمینه قهوه‌ای کم رنگ پرگنهای از پشت پتی قابل روئیت گردید و سپس اسکلروت‌های سیاه‌رنگ در سطح پرگنهای تشکیل شد.

هیف‌ها بر حسب اندازه سلول‌های تشکیل‌دهنده دارای اندازه‌های متفاوتی بودند. ریسه جوان دارای سیتوپلاسم دانه دانه^۳ بوده که با افزایش سن ریسه حفره‌دار می‌گردد. هیف‌های بزرگ‌تر در محل دیواره عرضی باریک شده و ریسه حالت بندبند پیدا می‌نمود (شکل‌های ۱، ۲ و ۳).

داخل انکوباتور در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ماه نگهداری گردید.

خاک گلدان شامل ماسه، کود پوسیده دامی و خاک به نسبت ۱:۱:۱ کاملاً مخلوط و بعد از مرطوب کردن درون کیسه‌های پلاستیکی ریخته و مانند روش بالا سترون گردید. مایه قارچ تهیه شده به نسبت وزنی ۱۰ گرم به ۱۰۰ گرم با خاک سترون مخلوط گردید. ده گلدان انتخاب و هر یک با ۱۰۰۰ گرم از مخلوط فوق پرشد. در هر گلدان ۵ عدد بذر سالم سویا رقم هیل کاشته، در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری و هر دو روز گلدان‌ها مورد بررسی و نتایج ثبت شد.

تعیین جمعیت اسکلروت‌های قارچ در خاک: برای جداسازی و تعیین اسکلروت‌های قارچ *M.phaseolina* در نمونه‌های خاک، از روش سینگ و همکاران (سینگ و همکاران، ۱۹۹۰) همراه با تغییراتی به شرح زیر استفاده شد:

نمونه‌های خاک از عمق ۰-۳۰ سانتی‌متر در آون با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت خشک، سپس آنها را خرد و از الک ۲ میلی‌متر عبور داده شد. یک گرم از خاک نرم شده هر نمونه در ۲۵۰ میلی‌لیتر محلول ۰/۵۲۵ درصد هیپوکلریت سدیم ریخته و مخلوط حاصل در داخل دستگاه مخلوط کن^۱ سه بار به فواصل سه دقیقه و هر بار به مدت ۳۰ ثانیه به منظور حذف آلوودگی‌های باکتریایی و قارچی خاک مخلوط گردید. مخلوط حاصل روی الک ۴۵ میکرون قرار گرفته، سپس با جریان آب مقطر سترون شستشو، در داخل یک ظرف ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری جمع‌آوری و حجم نهایی آن با آب مقطر سترون به ۵-۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. به این مخلوط مقدار ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت انتخابی حاوی آنتی بیوتیک Rifampin و ماده مؤثر متالاکسین اضافه گردید (کلد و روپی، ۱۹۹۰). مخلوط حاصل در ۵-۶ عدد تستک پتی ریخته شده در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در تاریکی به مدت ۴-۵ روز نگهداری، سپس پرگنهای زنده قارچ شمارش و تعداد آن در هر گرم نمونه خاک محاسبه شد.

بودند. گیاهچه‌های آلوده ابتدا علائم بیماری را به صورت نکروز قهوه‌ای در روی طوقه و کمی بالاتر از ساقه نشان دادند. در آزمایشگاه از بوته‌های دارای علائم بیماری *Macrophomina phaseolina* برروی محیط غذایی PDA قارچ *phaseolina* دوباره جدا گردید. حدود ۲ هفته پس از ظهر علائم، بیماری باعث خشکیدن بوته‌های آلوده گردید.

متوجه رشد روزانه پرگنه قارچ در محیط غذایی PDA و دمای ۲۸ درجه سانتی گراد، ۱/۵ سانتی متر بود که در ۷۲ ساعت کل سطح پتری را می‌پوشاند. ابعاد سختینه هست $140/94 \times 46/98 - 156/6$ میکرومتر اندازه‌گیری گردید. براساس مشخصات به دست آمده از پرگنه‌های قارچی جدایه‌ها، همگی قارچ *Macrophomina phaseolina* شناسایی شدند (سینکلیر و بکمن، ۱۹۸۹).

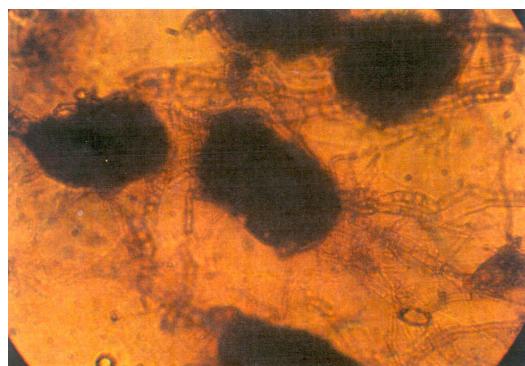
بیماریزایی: بذور کشت شده در گلدان‌های سالم و آلوده با تأمین رطوبت و گذشت سه تا چهار روز جوانه‌زده



شکل ۱- رنگ سفید شیری هیف‌ها پس از ۲۴ ساعت در محیط غذایی PDA



شکل ۲- رنگ قهوه‌ای کم رنگ هیف‌ها پس از ۴۸ ساعت در محیط غذایی PDA



شکل ۳- اسکلروت‌های تشکیل شده برروی محیط غذایی PDA

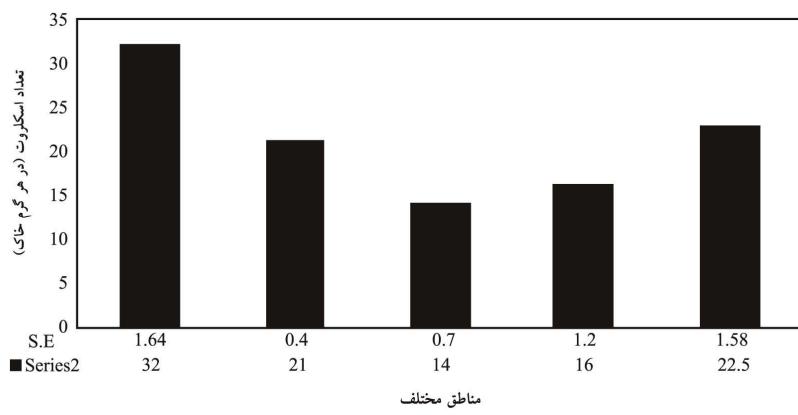
جویبار با ۳۲ عدد در هر گرم خاک و کمترین تعداد در منطقه علی‌آباد قائمشهر با ۱۴ عدد در هر گرم خاک تعیین گردید (شکل ۴).

در خاک‌های سبک (Lsl) متوسط اسکلروت‌های زنده برابر با $27/5$ عدد و در خاک‌های سنگین برابر با $14/6$ عدد در هر گرم خاک بود. (شکل ۵).

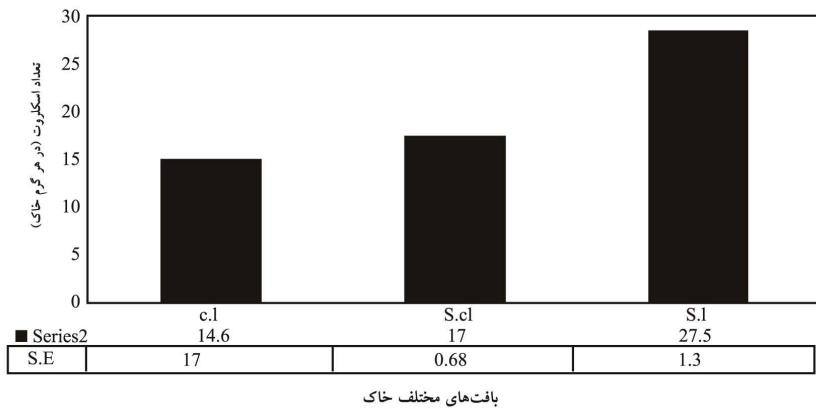
در صد آلودگی مزارع سویا به بیماری پوسیدگی ذغالی: در صد آلودگی مزارع در منطقه جویبار دارای میانگین ۴۵ درصد، منطقه کیاکلا ۳۵ درصد، منطقه جنوبی شهرستان قائمشهر $12/5$ درصد و ساری $11/25$ درصد بود. (شکل ۶).

جمعیت اسکلروت‌های قارچ عامل بیماری در خاک: بررسی‌های انجام گرفته نشان داد که جمعیت زنده و غیرزنده اسکلروت در مناطق مختلف استان مازندران دارای تفاوت زیادی است. مناطق شمالی استان مازندران با بافت سبک خاک، بارندگی کمتر و سابقه طولانی تر کشت سویا دارای جمعیت بیشتر و مناطق جنوبی استان با بافت سنگین، بارندگی بیشتر و سابقه کمتر کشت سویا دارای جمعیت کمتری از اسکلروت‌های زنده و غیرزنده قارچ عامل بیماری بودند.

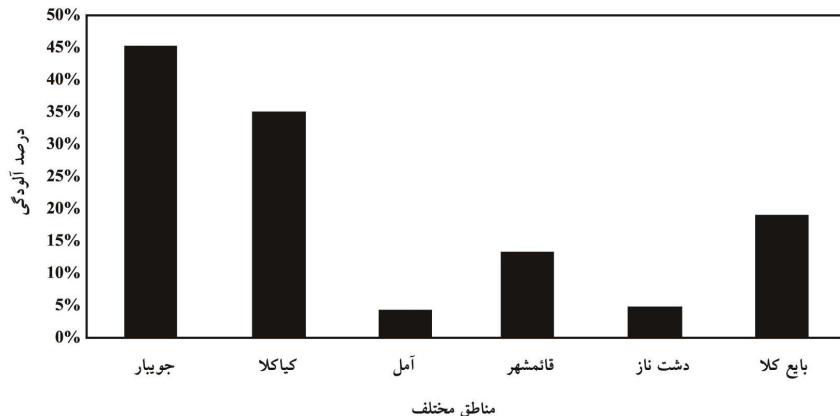
بیشترین تعداد اسکلروت زنده در خاک از منطقه



شکل ۴- میانگین تعداد اسکلروت‌های زنده در مناطق مختلف مازندران (سال ۱۳۸۲).



شکل ۵- میانگین تعداد اسکلروت‌های زنده در بافت‌های مختلف خاک در مناطق مختلف مازندران (در سال ۱۳۸۲).



شکل ۶- میانگین درصد آلودگی مزارع سویا به بیماری پوسیدگی ذغالی در مناطق مختلف (در سال ۱۳۷۰).

آلودگی به بیماری پوسیدگی ذغالی بودند.

با توجه به سایر خصوصیات زراعی بررسی شده توسط محققین بهنژادی و بهزراعی و تلفیق آن با اطلاعات بهدست آمده از این بررسی دو لاین B.P-692 و J.K-695 با بالاترین راندمان تولید (به ترتیب ۵/۲۰۰ و ۴/۹۰۰ تن در هکتار) و بالاترین سطح تحمل نسبت به بیماری پوسیدگی ذغالی در بین ارقام و لاین‌های مورد بررسی، به ترتیب با نام رقم ساری و رقم تلار جهت کشت در مزارع استان مازندران توصیه و معروفی شدند.

تحمل ارقام و لاین‌ها در برابر بیماری پوسیدگی ذغالی: بررسی‌های سه ساله به عمل آمده نشان داد که رقم گرگان ۳ (دیررس) دارای کمترین آلودگی و رقم ویلیامز (زودرس) دارای بیشترین میزان آلودگی بود. رقم‌های هیل، دیر، اجبشن، پرشینگ و KW 505 به ترتیب بعد از گرگان ۳ قرار گرفتند (جدول‌های ۱ و ۲).
لاین‌های KS-69035، JK-695، B.P-692 و ۶۹۰۵۷- K27 به ترتیب دارای کمترین و لاین‌های ۶۹۰۰۳- K27 و K17-69003 دارای بیشترین میزان

جدول ۱- تجزیه واریانس مرکب میزان آلودگی ارقام مختلف سویا به پوسیدگی ذغالی.

متابع تغییر	درجه آزادی	مجموعه مربعات	میانگین مربعات	FS
سال	۲	۷۷۸۱/۳۰۴	۳۸۹۰/۶۵۲	۳۳/۲۰۳۵**
اشتباه	۹	۱۰۵۴/۵۸۴	۱۱۷/۱۷۶	۱۷/۰۵۳۸**
ارقام	۶	۱۰۵۱۲/۶۰۰	۱۷۵۲/۱۰۰	۹/۸۱۱۶**
سال × ارقام	۱۲	۱۲۰۹۶/۴۴۵	۱۰۰۸/۰۳۷	۱۰۲/۷۳۹
اشتباه	۵۴	۵۵۴۷/۹۲۱	۵۵۴۷/۹۲۱	۴۱/۵۰ D

جدول ۲- آزمون مقایسه میانگین درصد آلودگی (دانکن) ارقام مختلف سویا.

درصد آلودگی	A	۷۷/۸۳	۷۷/۲۲ AB	B	۵۹/۶۷	BC	۵۷/۵۱	CD	۴۷/۸۰	D	گرگان ۳	هیل	اجیشین	دیر	RW	پرشینگ	ویلیامز	تیمار

منابع

۱. رعیت پناه، س. ۱۳۸۲. بررسی مناطق آلوده و تعیین جهت زنده قارچ عامل بیماری پوسیدگی ذغالی سویا *Macrophomina phaseolina* در مازندران. گزارش پژوهشی بخش تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی مازندران.
۲. رعیت پناه، س. ۱۳۸۲. بررسی میزان تحمل لاین‌های خالص سویا به بیماری پوسیدگی ذغالی در مازندران. گزارش نهایی بخش تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی مازندران.

۳. رعیت پناه، س. ۱۳۷۵. بررسی میزان تفاوت آلدگی ارقام مختلف سویا به بیماری پوسیدگی ذغالی و بررسی میزان آلدگی خاک‌های استان مازندران به اسکلروت‌های گزارش نهایی بخش تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی مازندران.

۴. غفاریان، ا. ۱۳۷۹. مبارزه بیولوژیک با *Macrophomina phaseolina* عامل بیماری ساق سیاه خربزه توسط قارچ‌های آنتاگونیست تریکودرما و گلیوکلادیوم. پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه اهواز.

5. Barnett, H.L., and Hunter, B. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi.
6. Bowen, C.R., and Schafraugh Jr, W.T. 1989. Relationships among charcoal Rot Infection, yield and stability estimates in soybean blends. *Crop Sci.* 29: 42 – 46.
7. Clad, G.L., and Rupe, J.C. 1990. A comparison of three selective media for enumeration of sclerotia of *Macrophomina phaseolina*. *Phytopathology*, 80: 1060.
8. Sinclair, J.B., and Backman, P.A. 1989. Compendium of soybean diseases. The American Phytopathological society. pp30-33.
9. Singh, S.K., Nene, Y.L., and Reddy, M.V. 1990. Influence of cropping systems of *Macrophomina phaseolina* population in soil. *Plant Disease*: 74: 812-814.
10. Smith, G.S., and Carvil, O.N. 1997. Field screening of commercial and experimental soybean cultivars for their reaction to *Macrophomina phaseolina*. *Plant Dis.* 81:363 – 368.
11. Su, G., Suh, S.O., Schneider, R.W., and Russin, J.S. 2001. Host specialization in the charcoal rot fungus *Macrophomina phaseolina*. *Phytopathology*. 91:120 – 126.
12. Wrather, J.A., S.R., and Tyler, D.D. 1998. Tillage effects on *Macrophomina phaseolina* population density and soybean yields. *Plant Dis.* 82:241 – 250.

Study on soybean charcoal Rot Disease in Mazandaran

S. Rayatpanah and S.V. Alavi

Faculty members of Mazandaran Research Center of Agricultural and Natural Resources, Sari

Abstract

Charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina* is one of the most prevalent and destructive disease of soybean in Mazandaran and Golestan provinces. During 1991-2003, soybean fields of Eastern Mazandaran were surveyed and collected samples showed signs on the stems and roots. The suspected samples were cultured on PDA medium. All of the isolated colonies were identified as *Macrophomina phaseolina*. The pathogenicity tests were carried out under greenhouse conditions, using artificially infested soil by the fungus propagules (sclerotia) and the fungus was pathogenic on soybean. Various isolates of soybean, sunflower, and sesame had different growth, colour, size, and number of sclerotia on PDA medium. Reaction of the cultivars and advanced lines of soybean were evaluated by fungus infection under field conditions. The results showed that Gorgan3 cultivar and J.K-695 and B.P-692 lines had minimum infection. The infection rates of the disease were 50-60% in Goibar , and less than 10% in Amol regions. Average numbers of the fungus sclerotia were rated equal to 32 in Goibar , and 14 in Ghaemshar regions.

Keywords: Soybean; Charcoal Rot (*Macrophomina phaseolina*)