# بیماری لکه بنفش نرگس در استان خوزستان*

Occurrence of narcissus purple blotch caused by *Physoderma narcissi* in Khuzistan

**حبیبه محمدی، واهه میناسیان**و سید علی موسوی جرف**

گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز

دریافت ۸۵/۱۲/۱۶ پذیرش ۸۶/۸/۲

**چکیده**

در یک نرگس‌زار قدیمی‌منطقه بهبهان، استان خوزستان علایمی‌بصورت لکه‌های قهوه‌ای پر رنگ، مایل به بنفش یا ارغوانی برروی برگ‌ها، ساقه و کاسبرگ‌ها مشاهده شد. در مراحل پیشرفته بیماری گاهی لکه‌هایی به طول ۱۰ سانتیمتر روی برگ‌ها مشاهده می‌گردید. ظهور علایم بیماری طی سال‌های مورد بررسی (۱۳۸۱-۱۳۸۳) اواسط آذر ماه بود. میزان آلودگی در اواخر دیماه (اواسط زمستان) تا ۷۰٪ برآورد گردید. برش بافت آلوده با میکروتوم دستی، یا بوسیله تیغ وجود اسپورهای استراحتی کروی شکل با دیواره ضخیم و به رنگ زرد طلایی تا قهوه‌ای تیره و ریزومیسیلیوم ظریف و شفاف را درون سلول‌های پارانشیم برگ و ساقه نشان داد. اسپورهای استراحتی به قطر ۲۴-۱۶ میکرومتر و رویه آنها با فرورفتگی‌های حفره مانند کم عمق می‌باشد. اسپورهای استراحتی دارای دریچه بودند که هنگام جوانه‌زنی این دریچه باز می‌شد. بر اساس مشخصات فوق و تخصص میزبانی، عامل بیماری *Physoderma narcissi* تشخیص داده شد. اسپورهای استراحتی پس از طی یک دوره دمای پائین (۶ °C و ۹ °C) و نگهداری در دمای بهینه (۲۳°C-۲۰) و در حضور نور تا ۸۰ درصد جوانه‌زنی داشتند. تشخیص، توصیف و بررسی خصوصیات عامل بیماری لکه بنفش نرگس برای اولین بار در ایران صورت گرفت. نمونه‌هایی از گیاه بیمار در مجموعه قارچهای هرباریوم وزارت جهاد

* بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول ارائه شده به دانشگاه شهید چمران

** مسئول مکاتبه

Archive of SID

www.SID.ir

کشاورزی تحت شماره دست‌یابی IRAn 2031 F ثبت و نگهداری شده است.

**واژه‌های کلیدی: نرگس ، *Physoderma narcissi* ، بهبهان**

**مقدمه**

نرگس جزو گل‌های بهاره است (حکمتی، ۱۳۷۲) که در مناطق گرم جهان می‌روید (صحت *نیاکی*، ۱۳۵۱). در ایران نرگس به صورت طبیعی در مناطق بهبهان، مسجد سلیمان، هفتگل، ایذه، کازرون، نورآباد، دهدشت، گچساران و قصرالدشت می‌روید. در منطقه بهبهان استان خوزستان چند نوع نرگس از جمله نرگس شهلا، مشکین و پرپر یافت می‌شود. پوشش غالب نرگس‌زار منطقه از نوع نرگس شهلا است (*تابان*، ۱۳۷۳).

نرگس میزبان تعدادی از بیماگرهای قارچی است که سبب لکه برگی، پوسیدگی طوقه و پیاز می‌گردند (*جهان آرا*، ۱۳۷۶).

پوسیدگی طوقه (basal rot) یکی از مهمترین بیماریهای نرگس ناشی از *Fusarium oxysporum* f. sp. narcissi می‌باشد (Hanks 1996). دو بیمارگر *Stagonospora curtisii* و *Physoderma narcissi* عوامل ایجاد لکه برگی نرگس می‌باشند. قارچ *S. curtisii* علاوه بر سوختگی برگ در برخی کولتیوارها سبب پوسیدگی پیاز نرگس نیز می‌شود (Bergman & Noordermeer 1975). از بین بیمارگرهای نرگس تا کنون فقط عامل بیماریزای *S. curtisii(Phoma narcissi)* از ایران گزارش شده است (*محمدی* و همکاران، ۱۳۸۳).

بیماری لکه بنفش نرگس ناشی از *P. narcissi* اولین بار از فرانسه در سال ۱۹۱۵ گزارش شد (Poirrault, 1915). در توصیف اصلی این بیماری پوآرو (۱۹۱۵) بیان می‌کند که " قارچ عامل بیماری سبب بروز لکه‌های قهوه‌ای مایل به بنفش روی برگ‌های نرگس (*Narcissus tazette*) می‌شود. پارانشیم برگ‌های آلوده مملو از اسپورهای استراحتی است که به رنگ قهوه‌ای، مدور یا بیضی شکل بوده، گاهی در یک طرف فشرده یا فرو رفته هستند. اسپورهای استراحتی با دیواره صاف و اندازه آنها ۲۶ تا ۳۰ میکرومتر است". و از نظر پوآرو این قارچ خیلی شبیه گونه *P. muscari* عامل لکه قهوه‌ای گیاه زینتی کلاغک (*Muscari sp.*) است. بر اساس منابع موجود این تنها گزارش از مشاهده و توصیف قارچ عامل بیماری در دنیا

Archive of SID

www.SID.ir

می‌باشد که ساکاردو در سال ۱۹۲۶ آن را به لاتین برگردانده است (Saccardo 1926). هیچکدام از دو گونه Physodermaitapic مذکور در منابع جدیدتر مربوط به قارچ‌های کیتریدیومیست ذکر نشده‌اند (Sparrow 1960, Karling 1977).

جنس *Physoderma* متعلق به راسته Blastocladiales و از رده کیتریومیست، شامل ۵۰ گونه است (Kirk *et al.* 2001). همه گونه‌های این جنس انگل گیاهان آوندی هستند (Alexopoulos *et al.* 1996). براساس توصیف *لانژ* و همکاران (۱۹۷۸) این جنس دارای اسپورهای استراحتی با دیواره ضخیم می‌باشد و هنگام جوانه‌زنی یک تکه بزرگ مدور از دیواره اسپور استراحتی به شکل درپوش از آن جدا شده و دیواره داخلی اسپورانژیوم از محل درپوش به بیرون می‌زند. زئوسپورها از یک منفذ در نوک یا در نزدیکی راس دیواره داخلی اسپورانژیوم رها می‌شوند (Lange *et al.* 1978). در سال‌های اخیر علایمی‌مشابه لکه بنفش نرگس در نرگس‌زار بهبهان مشاهده شد. پراکنش و اتیولوژی این بیماری موضوع مقاله حاضر است.

**روش بررسی**

۱- نمونه برداری و استخراج اسپورهای استراحتی از نمونه‌ها.

طی سال‌های ۸۳-۱۳۸۱ از نرگس‌زاری واقع در شمال بهبهان در چند مرحله بازدید شد و با شمارش تصادفی گیاهان سالم و آلوده از تمامی‌قسمت‌های نرگس زار، درصد آلودگی گیاهان تعیین شد. در هر بازدید از برگ و ساقه بوته‌های آلوده یا مشکوک به آلودگی نمونه برداری گردید. جهت جداسازی اسپورهای استراحتی از بافت‌های آلوده ابتدا نمونه‌ها با آب شسته شده و با اتانول ۷۰٪ ضدعفونی سطحی شدند و سپس به قطعات ۳-۲- سانتیمتری قطعه قطعه گردید و با مقدار مناسبی آب مقطر سترون در دستگاه مخلوط کن به مدت ۵-۲ دقیقه خرد شدند (محمودی و همکاران، ۱۳۷۶).

۲- مقطع گیری از بافت‌های آلوده گیاهی

جهت مشاهده اندام‌های قارچی درون بافت گیاه، برش‌هایی با تیغ یا میکروتوم دوار تهیه گردید. برای برش با میکروتوم بعد از تثبیت قطعات و آب گیری آنها، با قرار دادن نمونه‌ها در

Archive of SID

www.SID.ir

پارافین (Booth, 1987) بلوک‌های پارافین تهیه و برش‌هایی به ضخامت ۲۴-۱۰ میکرومتر تهیه شد.

۳- بررسی اثر نور و دما در زئوسپور زایی عامل بیماری

جهت تعیین دمای مناسب برای جوانه زدن اسپورهای استراحتی دماهای ۴°C ، ۹°C و ۲۳°C مورد مطالعه قرار گرفتند. انتخاب این دماها متناسب با دمای متوسط ماهانه دوره‌ای بود که قارچ در شرایط طبیعی فعال بوده و علایم بیماری در مزرعه دیده می‌شد. برای این منظور از برگ‌ها و ساقه‌های دارای علایم، که از سال قبل در آزمایشگاه نگهداری و خشک شده بود سوسپانسیونی شامل $۱ \times ۱۰^{۶}$ اسپور در میلی لیتر از اسپورهای استراحتی در آب مقطر سترون تهیه شد. پانزده میلی لیتر از سوسپانسیون در هر تشتک پتری ریخته شد. برای هر دما دو تکرار در نظر گرفته شد. در آزمایش‌های اولیه هر نیم ساعت یکبار یک قطره از سوسپانسیون اسپور برای تعیین درصد جوانه زنی مورد بررسی قرار گرفت.

با توجه به این که تحت شرایط طبیعی نرگس‌زار، اسپورها در معرض دمای ثابت نیستند، آزمایشاتی طراحی شد که در آن اسپورهای استراحتی ابتدا در دمای پائین و سپس در دمای بالاتر قرار گیرند. بدین ترتیب سوسپانسیون اسپور ابتدا به مدت ۳ ساعت ، ۳ روز ، ۶ روز و ۲۰ روز در دمای ۹°C و سپس ۳ روز در دمای ۲۳°C در حضور نور لامپ فلورسنت قرار داده شد. در آزمایش دیگری سوسپانسیون اسپور به مدت ۳ ماه درون یخچال در دمای ۶°C نگهداری و در طول این مدت هفته‌ای یک یا چند بار با باز کردن کوتاه مدت در یخچال، اسپورها در معرض تابش نور متناوب قرار گرفتند.

**نتیجه**

۱- علایم بیماری

علایم بیماری بصورت لکه‌های بی شکل و نامنظم برروی تمام قسمت‌های هوایی گیاه دیده می‌شود ولی بیشتر تمرکز آنها در قسمت‌های پائین و نزدیک خاک بود. ظهور علایم بصورت لکه‌های کم رنگ یا بی رنگ به ابعاد ۲×۱ سانتیمتر بود که به مرور زمان بزرگتر شده و به ابعاد ۴×۲ سانتیمتر می‌رسید. با بزرگتر شدن لکه‌ها، اسپورهای استراحتی عامل بیماری

Archive of SID

www.SID.ir

تشکیل شده و رنگ لکه‌ها به قهوه‌ای پررنگ، قهوه‌ای مایل به بنفش یا ارغوانی تغییر می‌یافت. در مراحل پیشرفته بیماری، گاهی لکه‌های به طول ۱۰ سانتیمتر هم روی برگ‌ها تشکیل می‌شد. شکل ۱- مراحل پیشرفته علایم بیماری در شرایط طبیعی در نرگس‌زار بهبهان را نشان می‌دهد. در مواردی وجود علایم بیماری روی کاسبرگ‌ها مانع از باز شدن گل می‌شد. در طول دو سال متوالی مورد بررسی، ظهور علایم بیماری از اواسط آذرماه شروع و تا اوایل دی ماه بالغ بر ۵۰ درصد گیاهان نرگس آلودگی نشان دادند. درصد آلودگی تا اواخر بهمن ماه افزایش و بعد از آن کاهش داشت بطوریکه اواسط بهار و اوایل پائیز علایمی‌از بیماری در مزرعه مشاهده نمی‌شد. بیشترین درصد آلودگی در بهمن ماه سال ۱۳۸۲ اتفاق افتاد که ۷۰٪ نرگس‌زار علایم بیماری را نشان دادند. لازم به یادآوری است که متوسط دمای ماهانه در دو سال مورد بررسی در زمان ظهور علایم بیماری و توسعه آن $^{\circ}C$ ۱۵-۱۰ اندازه گیری شد. متوسط رطوبت نسبی ماهانه در این دوره بالای ۶۰٪ بود (جدول ۱).

جدول ۱- وقوع سالانه بیماری لکه بنفش نرگس در نرگس‌زار طبیعی بهبهان ۳-۱۳۸۱

Table 1. Annual incidence of purple blotch of *Narcissus* in its natural habitat in Behbahan, Khuzistan, 2002-2004

| No. | Observation date | % diseased plants | Mean monthly T.°C | Mean monthly R.H % | Hours of sunshine (monthly) |
|---|---|---|---|---|---|
| **1.** | Dec. 24, 2002 | 50 | 11.6 | 67.5 | 214 |
| **2.** | Jan. 14, 2003 | 60 | 11.6 | 67.5 | 214 |
| **3.** | March 9 2003 | 20 | 16.9 | 52 | 203.1 |
| **4.** | Oct. 22 2003 | - | 28.6 | 29 | 291 |
| **5.** | Nov. 18 2003 | - | 20 | 38 | 229 |
| **6.** | Dec. 7 2003 | - | 16.1 | 62.5 | 183 |
| **7.** | Dec. 17 2003 | - | 16.1 | 62.5 | 183 |
| **8.** | Dec. 31 2003 | 50 | 14.4 | 77.5 | 180 |
| **9.** | Jan. 18 2004 | 50 | 14.4 | 77.5 | 180 |
| **10** | Jan. 25 2004 | 60 | 14 | 65.5 | 180 |
| 11 | Dec. 8 2004 | 10 | 15 | 61 | 170 |

۲- عامل بیماری

در برش بافت گیاه بیمار، سلول‌های آلوده، مملو ازاسپورهای استراحتی قارچ بودند (شکل ۲)، در آلودگی‌های تازه ریزومیسیلیوم ظریف قارچ و سلول‌های فرفره‌ای مشاهده شد. اسپورهای استراحتی کروی شکل با دیواره ضخیم و به رنگ قهوه‌ای تیره بود (شکل ۳) اندازه

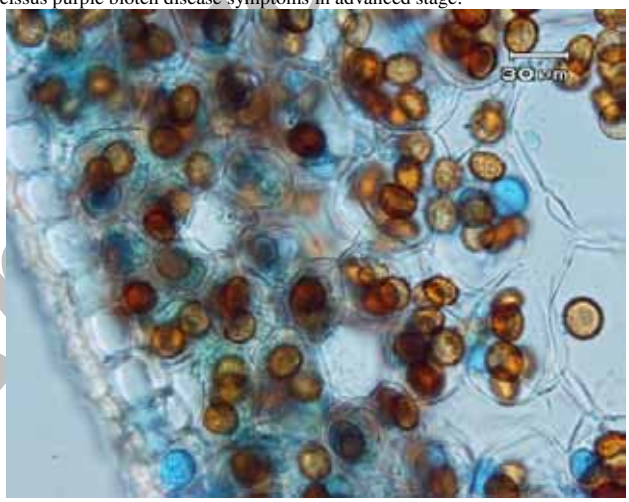
Archive of SID

www.SID.ir

آنها بین ۱۶/۵ تا ۲۴ میکرومتر بود. در رویه اسپورهای استراحتی فرورفتگی‌های مختصری شبیه حفره وجود داشت (شکل‌های ۳و۴). این اسپورها دارای دریچه (Operculum) بودند که هنگام جوانه‌زنی این دریچه باز می‌شد (شکل ۳). بر اساس مشخصات فوق و با استناد به گزارش پوآرو (۱۹۱۵) عامل بیماری *Physoderma narcissi*( G. Poirrault) Sacc. & Trotter, 1926 تشخیص داده شد.

شکل ۱ – مرحله پیشرفته علایم ظاهری بیماری لکه ارغوانی نرگس در مزرعه.

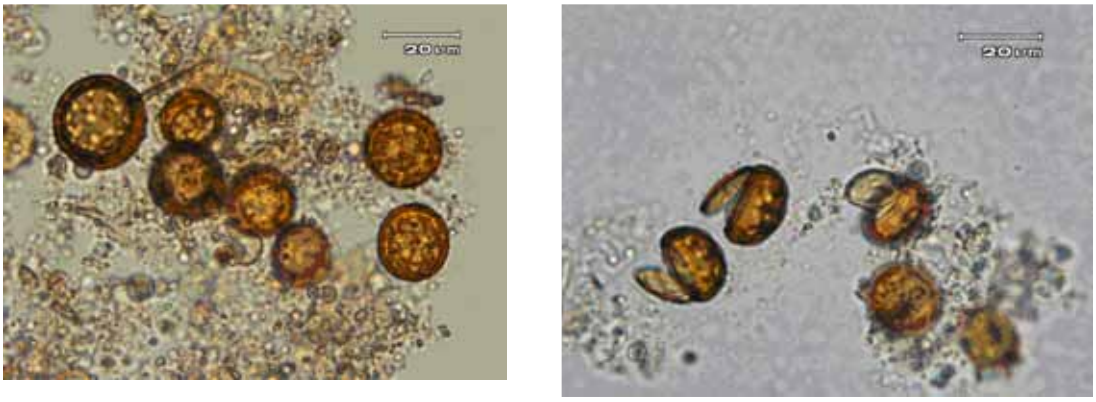
Fig. 1. Narcissus purple blotch disease symptoms in advanced stage.




شکل ۲- برش بافت برگ حاوی اسپورهای استراحتی *Physoderma narcissi* درون سلول‌ها.

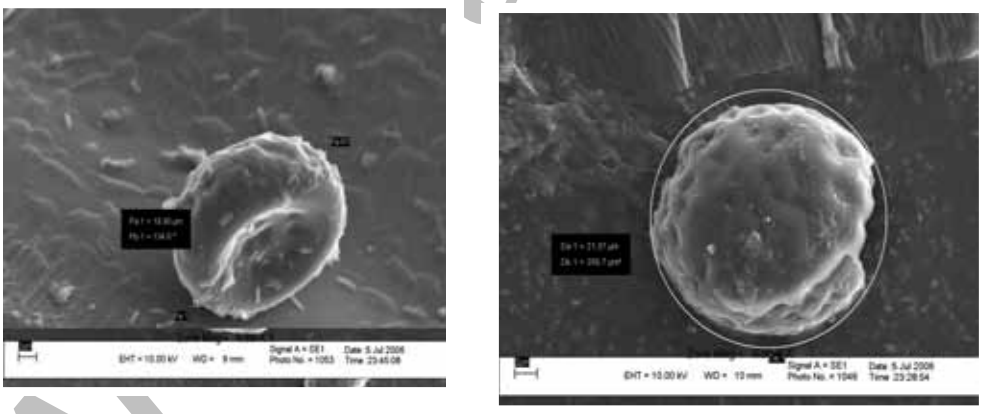
Fig. 2. Cross section of diseased leaf showing cells filled with resting spores of *P. nareissi.*

www.SID.ir



شکل ۳ – الف و ب – اسپورهای استراحتی *P. narcissi* با دریچه‌های باز شده (Operculum).

Fig. 3. Resting sporangia showing discharged and attached operculum.



شکل ۴ – الف و ب – عکس میکروسکوپ الکترونی نگاره از اسپورهای استراحتی *P. narcissi* خوزستان. نشان دهنده ناصافی و حفره‌های سطح اسپور

Fig. 4. SEM of *P. narcissi* sporangia showing slight depressions on the surface giving them rough or pitted appearance.

www.SID.ir

۳- اثر نور و دما بر زئوسپورزایی عامل بیماری

در این قسمت از برگهای آلوده که از یکسال قبل در آزمایشگاه نگهداری شده بود استفاده شد. نتایج آزمایش‌ها نشان داد وقتی سوسپانسیون اسپور به مدت ۳ ساعت در دمای $9^{\circ}C$ و سپس به مدت ۳-۱ روز در دمای $^{\circ}C$ ۲۳ نگهداری شدند، درصد کمی‌از اسپورها (۲٪) جوانه زدند ولی هنگامی‌که آنها مجدداً به مدت ۳ ماه در دمای $^{\circ}C$ ۶ و در معرض نور متناوب قرار گرفتند ۸۰٪ اسپورها جوانه زدند. در دیگر روش‌هایی که اسپورها به مدت ۳، ۶ و ۲۰ روز در دمای $^{\circ}C$ ۹ قرار گرفته بودند تنها ۲ درصد جوانه‌زنی مشاهده شد.

جهت تعیین تاثیر نور در زئوسپورزایی، سوسپانسیون اسپور که قبلاً به مدت ۶ روز در دمای ۹ $^{\circ}C$ نگهداری شده بود به دو قسمت تقسیم گردید. یک پتری حاوی اسپور را در دمای ۲۳ درجه سانتیگراد و زیر نور مداوم مهتابی و دیگری در تاریکی در همان دما نگهداری شد. بعد از ۲۴ ساعت ۵ درصد اسپورهای استراحتی در نور مداوم جوانه زدند. حال آنکه ۲ درصد از اسپورهای استراحتی که در تاریکی نگهداری شده بودند جوانه‌زنی داشتند. بعد از گذشت ۴ روز میزان جوانه‌زنی اسپورها در تاریکی و نور به ترتیب به ۵ و ۳۰ درصد افزایش یافت.

**بحث**

بیمارگر *P. narcissi* اولین بار توسط پوآرو (Poirrault, 1915) ازفرانسه گزارش شد. توصیف علایم بیماری بصورت لکه‌های قهوه‌ای مایل به بنفش مملو ازاسپورهای استراحتی عامل بیماری نیز توسط نامبرده ارایه شده است. بر اساس منابع موجود، این تنها گزارش از مشاهده و توصیف این بیمارگر در دنیا بوده است.

پوآرو در توصیف بیمارگر، وجود اسپورهای استراحتی با سطح صاف و به قطر ۳۰-۲۶ میکرومتر گزارش کرده بود حال آنکه اندازه اسپورهای استراحتی در این تحقیق ۲۴-۱۶ میکرومتر بدست آمد و سطح اسپورها نیز ناصاف و دارای فرورفتگی‌های حفره مانند بود. عدم وجود امکانات میکروسکوپی مناسب در زمان *پوآرو* (Poirrault 1915) می‌تواند یکی از دلایل این اختلافات باشد. اعضای جنس *Physoderma* بیشتر باعث ایجاد لکه برگی روی میزبان می‌شوند. گونه *P. maydis* عامل لکه قهوه‌ای ذرت ایجاد لکه‌های قهوه‌ای مایل به قرمز روی

Archive of SID

www.SID.ir

پهنک برگ و ساقه ذرت می‌نماید. در درون لکه‌ها اسپورهای استراحتی قارچ به قطر ۲۵-۲۰ میکرومتر دیده می‌شوند (Lal & Chakravarti 1979). گونه *P. muscari* روی گیاه زینتی کلاغک (*Muscari sp.*) ایجاد لکه‌های تیره با هاله زرد رنگ می‌نماید (Poirrault 1915).

نتایج مطالعات انگیزش اسپورهای استراحتی جهت تولید زئوسپور نشان داد که دو فاکتور نور و دما در این پدیده اهمیت ویژه‌ای دارند. اسپورهای استراحتی این قارچ دارای دوره خواب بوده و تنها پس از طی این دوره قادر به جوانه‌زنی هستند. اسپورهایی که از برگ‌های تازه نرگس استخراج شدند قادر به جوانه‌زنی نبوده ولی زمانی که این اسپورها از برگ‌های خشک سال قبل استخراج شدند یا تحت شرایط دمای پائین قرار داده شدند قادر به جوانه‌زنی بودند. در این بررسی زمانی که سوسپانسیون اسپور به مدت سه ماه در دمای ۶ $^{\circ}C$ و با نور متناوب قرار گرفت حدود ۸۰ درصد اسپورها جوانه زدند. زمانی که سوسپانسیون اسپورها به مدت ۶ روز در ۹ $^{\circ}C$ و سپس ۴-۱ روز در معرض نور مداوم مهتابی یا در تاریکی قرار گرفتند درصد جوانه‌زنی از ۵-۲ درصد در تاریکی به ۵ تا ۳۰ درصد در روشنایی رسید. ولی در سایر روش‌های مورد بررسی درصد جوانه زنی از ۲ درصد فراتر نرفت. نتایج بیانگر آن است که نور و دمای پائین (۶$^{\circ}C$) در مدت طولانی همراه با نور متناوب روز سبب انگیزش اسپورهای استراحتی به تولید زئواسپور می‌شود. بنظر می‌رسد بیواکولوژی این بیمارگر مشابه عامل بیماری گال زگیلی چغندر قند (*Urophlyctis leproides*) می‌باشد که در استان خوزستان اهمیت ویژای دارد (محمودی و همکاران، ۱۹۹۷). در بیمارگر *U. leproides* زمانی که اسپورهای تازه تشکیل شده در شرایط مساعد قرار گرفتند تولید زئوسپور، نکردند حال آنکه اسپورهای استخراج شده از سال قبل، پس از قرار گرفتن در نور مداوم ۱۰۰۰ لوکس و دمای ۲۲ $^{\circ}C$ پس از ۷ روز جوانه زدند (محمودی و همکاران، ۱۹۹۷a). همزمانی پیدایش دو بیماری لکه بنفش نرگس و گال چغندر قند (پائیز و زمستان)، نیاز به سرما جهت شکستن دوره خواب اسپورهای استراحتی و افزایش جوانه‌زنی اسپورهای استراحتی هر دو بیمارگر در حضور نور و دماهای یکسان از شباهت‌های بیولوژیکی این دو بیمارگر می‌باشد. دو جنس *Physoderma* و *Urophlyctis* از رده کیتریدیومیست بوده (Alexopoulos *et al.* 1996) و از بیمارگرهای یک چرخه‌ای می‌باشند.

Archive of SID

www.SID.ir

نور و دما از عوامل مهم در جوانه‌زنی اسپورهای استراحتی *P. maydis* نیز عنوان شده است (Hebert *et al.* 1958). لانژ و اولسون (Lange & Olson 1980) در آزمایشاتی که روی *P. maydis* انجام داده بودند نتیجه گرفتند که اسپورهای استراحتی در *P. maydis* در نور مداوم ۱۵۰۰ لوکس و دمای ۲۵°C–۲۰ بعد از ۷۲–۲۴ ساعت جوانه می‌زنند.

در اعضای جنس *Physoderma* اسپورهای استراحتی دارای درپوشی هستند که هنگام جوانه‌زنی و قبل از تخلیه زئوسپورها باز می‌شوند (Lange &lson 1980). در گونه *P. narcissi* نیز هنگام جوانه‌زنی درپوش باز شده و در برخی از اسپورها در یک طرف دیواره متصل بوده و کاملاً از اسپور جدا نشده بود (شکل ۳). در گونه *P. maydis* نیز هنگام جوانه‌زنی اسپور استراحتی در اثر بیرون زدن دیواره داخلی اسپورانژیوم، درپوش به تدریج با فشار باز شده و ممکن است کاملاً از اسپور جدا شود و یا در یک طرف دیواره متصل باقی بماند (Lange& Olson 1980).

تشخیص، توصیف و بررسی خصوصیات بیولوژیکی عامل بیماری لکه بنفش نرگس در خوزستان برای اولین بار در ایران صورت گرفت و نشان داد که بیماری در نرگس‌زارهای طبیعی بهبهان به صورت اندمیک وجود دارد، مطالعات بیشتری جهت تعیین اهمیت و کاهش خسارت آن نیاز می‌باشد.

**تشکر و قدردانی**

از آقای مهندس غلامحسین مکی به خاطر فراهم نمودن امکانات بازدید از نرگس‌زارهای بهبهان و تهیه نمونه گیاهان آلوده سپاسگزاری می‌گردد.

**منابع**

جهت ملاحظه به صفحات (83-81) متن انگلیسی مراجعه شود.

آدرس نگارندگان: حبیبه محمدی، دکتر واهه میناسیان و دکتر سید علی موسوی جرف، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز

Archive of SID

www.SID.ir