Archive of SID

"نهال و بذر"
جلد ۲۰، شماره ۱، سال ۱۳۸۳

ارزیابی مقاومت لاین‌های برگزیده ذرت نسبت به قارچ *Ustilago maydis* (DC.) Corda عامل سیاهک معمولی

Evaluation of Resistance of Selected Corn Lines to Common Smut, *Ustilago maydis* (DC.) Corda

صادق جلالی و محمد حسین سبزی

مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی اصفهان

تاریخ دریافت: ۸۱/۳/۲۰

چکیده

جلالی، ص.، و سبزی، م. ح. ۱۳۸۳. ارزیابی لاین‌های برگزیده ذرت نسبت به قارچ *Ustilago maydis* (DC.) Corda عامل سیاهک معمولی. نهال و بذر ۲۰: ۵۶-۴۹.

به منظور ارزیابی عکس‌العمل لاین‌های برگزیده ذرت به بیماری سیاهک معمولی (Common smut) و شناسایی ژنوتیپ‌های مقاوم یا متحمل، آزمایشی در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار و سی تیمار که شامل لاین‌های مختلف ذرت بود از طریق آلودگی مصنوعی با ایجاد زخم (Cut cob injection) در ایستگاه تحقیقاتی کبوترآباد اصفهان اجرا گردید. برای ایجاد آلودگی دو تا سه روز پس از تشکیل کاکل‌ها (Silks) دو سانتی‌متر از انتهای هر بلال با قیچی باغبانی بریده (Cut cob) و سه میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپور قارچ به غلظت 10^6 اسپوریدی در هر میلی‌لیتر در محل زخم توسط سرنگ تزریق شد. در زمان رسیدگی فیزیولوژیک دانه‌ها، درصد آلودگی بلال‌ها و شدت بیماری براساس پیشرفت بیماری (درصد آلودگی دانه در هر بلال) تعیین و محاسبات آماری پس از تبدیل داده‌ها به آرکسینوس جذر اعداد انجام شد . مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن (P=1%) نشان داد که اختلاف بین لاین‌ها از نظر میزان آلودگی معنی‌دار است. غربال کردن لاین‌ها براساس شدت آلودگی (Scale 0-7) روی بلال‌های آلوده شده انجام گرفت که بر این اساس لاین‌های آزمایشی در چهار گروه شامل سه لاین بدون آلودگی، دو لاین با تحمل زیاد، پانزده لاین از کمی متحمل تا کمی حساس و ده لاین از حساس تا حساسیت زیاد قرار گرفتند.

واژه‌های کلیدی: ذرت، سیاهک معمولی ذرت، *Ustilago maydis* ، مقاومت.

این مقاله براساس نتایج به دست آمده از اجرای طرح تحقیقاتی شماره ۷۸۰۳۷-۱۲-۱۱-۱۰۳ مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی اصفهان تهیه گردیده است.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

عامل بیماری سیاهک معمولی ذرت (Corn common smut) قارچی است با نام علمی *Ustilago maydis* (DC.) Corda (Syn. *U. zeae* Ung.).

این بیماری اول بار در سال ۱۷۵٤ از اروپا و به دنبال آن در سال ۱۸۲۳ از آمریکا گزارش شده است (Ullstrup, 1978). سیاهک معمولی ذرت امروزه در اکثر مناطقی که ذرت کشت می‌گردد از جمله مکزیک، آرژانتین، فرانسه، ایتالیا، روسیه سفید، چین و ناحیه وسیعی از استرالیا و نیوزلند وجود داشته و همه ساله موجب خسارت در عملکرد دانه و علوفه می‌گردد (Agrios, 1990). اسپوریدی‌های قارچ که توسط جریانات هوا انتشار می یابند پس از تماس با بافت حساس میزبان و تشکیل هیف‌های دیکاریوتیک، قادرند تمام اندام‌های هوایی گیاه میزبان را آلوده نمایند، آلودگی ممکن است از طریق زخم یا به واسطه نفوذ مستقیم هیف‌های دیکاریوتیک به داخل بافت انجام گیرد (Immer and Christensen, 1931). خسارت ناشی از این بیماری بسته به نژاد عامل بیماری، میزان حساسیت میزبان، عملیات زراعی (زخمی شدن بوته‌ها توسط آفات یا ادوات کشاورزی) و میزان مصرف کودهای شیمیائی متغییر است، میزان خسارت در ارقام حساس تا ۵۰ درصد نیز گزارش شده است (Shurtleff, 1980). کاهش عملکرد دانه بستگی به محل آلودگی و اندازه گال و میزان حساسیت میزبان دارد، به طوری که اگر اندازه گال‌ها بزرگ باشد و یا در روی بلال‌ها تشکیل شوند خسارت ناشی از آن بین ٤۰ تا ۱۰۰ درصد خواهد بود. خسارت سالیانه ناشی از بیماری در ایالات متحده آمریکا معمولاً بین یک تا پنج درصد و در شرایط محیطی مساعد تا ده درصد گزارش شده است (Johnson and Christensen,1935).

در ایران این بیماری اول بار در سال ۱۳٦۰ از یک مزرعه کوچک در سمنان و سپس در سال ۱۳٦۲ از گرگان و ورامین گزارش شده است (مهریان، ۱۳٦۳). در استان اصفهان بیماری اول بار در سال ۱۳۷۲ در کاشان مشاهده شد (شریف‌نبی و نکوئی، ۱۳۷۳). از نظر حساسیت واریته‌های مختلف ذرت به سیاهک معمولی مشخص گردیده که ارقام مختلف ذرت شیرین (Sweet corn) در مقایسه با ذرت آجیلی (Pop corn) و ذرت سخت (Flint corn) به مراتب حساس‌تر است (Christensen, 1963).

گزارش‌های متعددی جهت کاربرد روش‌های مختلف ایجاد آلودگی مصنوعی برای بررسی عکس‌العمل ارقام مختلف ذرت نسبت به بیماری وجود دارد، هر چند که مراحل مختلف رشد گیاه و شرایط محیطی نیز روی بیماریزایی قارچ مؤثر بوده‌اند (Thakur *et al.*,1989). از نظر توارثی، مقاومت به بیماری مذکور چند ژنی (Polygenic) است و توصیه می‌شود که در برنامه‌های اصلاحی بایستی از روش تلاقی لاین‌های مقاوم با یک محک حساس استفاده

www.SID.ir

Archive of SID

شود و ارزیابی هیبریدهای حاصل از این تلاقی‌ها در نسل‌های F1 و F2 دنبال گردد (Pop and McCarter, 1992 a). برای ایجاد بیماری و تشکیل گال در نقاط مختلف گیاه مانند ساقه، گل تاجی، جوانه، بلال و حتی ریشه‌ها هم توسط تلیوسپور و هم اسپوریدی با روش‌های مختلفی از قبیل: اسپور پاشی، سندبلاست کردن، گردپاشی، پوشش دادن اندام گیاه با اسپور، فرو بردن اندام در سوسپانسیون اسپور،تزریق اسپوریدی به داخل بافت گیاه آزمایش شده است (Zimmerman and Pataky, 1992).

مطالعات جامعی توسط پاپ و مک کارتر (Pope and McCarter, 1991)، تحت عنوان ارزیابی روش‌های مختلف مایه‌زنی جهت ایجاد آلودگی در بلال‌های ذرت با هدف دستیابی به یک روش قابل اعتماد برای ایجاد گال و شناسائی مکانیزم مقاومت انجام گرفته است. در این مطالعات مایه قارچ شامل مخلوطی از اسپوریدی‌های حاصل از ٦ جدایه مختلف قارچ بود که بعد از ظهور کاکل‌ها و قبل از خشک شدن آن‌ها ۳ میلی‌لیتر از سوسپانسیون حاوی 10^6 اسپوریدی در هر میلی‌لیتر را از طریق تزریق در انتهای پوشش بلال و هم‌چنین تزریق در انتهای بلال‌هائی که ۱/۵ سانتی‌متر آن قطع شده بود انجام و نتیجه‌گرفته شد زمانی که از ترکیب‌های سازگار جدایه‌های قارچ استفاده شود در ۹۷ درصد از موارد مایه‌زنی، گال تشکیل یافته است، بنابراین با استفاده از این روش می‌توان مقاومت را در لاین‌های مختلف شناسائی نمود (Pop and McCarter, 1991).

مواد و روش‌ها

کاشت لاین‌های برگزیده ذرت در مزرعه

این بررسی در مزرعه آزمایشی ایستگاه تحقیقاتی کبوترآباد اصفهان در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار و سی لاین برگزیده ذرت شامل K3859، B73، MO17/11-1، MO17، K1259/4، K1515، K17/2-3، K17/2-5، K18، K3218، K74/1، K1254/2، K144، K1369/4، K1263/1، K1264/1، K12/8-2، K1728/8، K2817/1، K3063/3، K36/8، K3199، K2816، K1259، K1717/3-1، K2818، K3165/2، K33، S61 و TVA926 اجرا شد. قبل از اجرای طرح آماده‌سازی زمین انجام و میزان کودهای مورد نیاز بر اساس تجزیه خاک تعیین و برای مبارزه با علف‌های هرز از علف‌کش‌های آترازین و آلاکلر به میزان ۱/۲ کیلوگرم و ۵ لیتر در هکتار استفاده شد. تعداد خطوط کاشت برای هر لاین در هر تکرار دو خط ۷ متری به فاصله ۷۵ سانتی‌متر بود و تعداد ۳۰ بوته در هر خط نگهداری شد.

تهیه مایه قارچ

جهت تولید اسپوریدی قارچ با استفاده از روش Thaku *et al.* (1989) تلیوسپورهای سیاهک تشکیل شده روی بلال‌های آلوده که از نقاط مختلف استان

www.SID.ir

Archive of SID

جمع‌آوری شده بودند با یکدیگر مخلوط و به مدت ۱۲ ساعت در سولفات مس ۱/۵ درصد در آب مقطر استریل حاوی چند قطره روغن توین ۸۰ (Tween 80) روی شیکر ضدعفونی و پس از شستشو با آب مقطر استریل روی محیط کشت PD A حاوی ۱۰ گرم در لیتر دکستروز کشت گردیدند. محیط‌های کشت به مدت ۵ روز در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد در اینکوباتور نگهداری شدند. پس از تندش تلیوسپورها و تولید اسپوریدی، سطح محیط کشت را پس از خراش دادن با اسکالپل با استفاده از آب مقطر استریل شسته و پس از عبوردادن از پارچه ململ استریل اقدام به جمع‌آوری اسپوریدی‌ها گردید. جدایه برخوار که بیشترین اسپوریدی را تولید نموده بود برای مایه‌زنی به بوته‌های ذرت انتخاب شد. به منظور ایجاد آلودگی مصنوعی از طریق ایجاد زخم، پس از تشکیل کاکل (Silk stage) و انجام عمل گرده‌افشانی تا قبل از خشک شدن آن‌ها، انتهای هر بلال به میزان ۲ سانتی‌متر توسط قیچی باغبانی بریده شد و ۳ میلی لیتر از سوسپانسیون حاوی 10^6 اسپوریدی در محل قطع شده تزریق گردید (۱۰ بوته از هر لاین در هر تکرار).

ارزیابی لاین‌های ذرت

برای ارزیابی، پس از رسیدن فیزیولوژیک بوته‌های ذرت و سفت شدن دانه در انتهای فصل، بلال‌های مایه‌زنی شده هر لاین به طور جداگانه برداشت و درصد آلودگی هر تیمار و شدت آلودگی آن‌ها براساس درصد آلودگی تعداد دانه در هر بلال با روش امتیازدهی (Scale) بین صفر (بدون‌آلودگی) و هفت (۱۰۰٪ آلودگی) تعیین شد. محاسبات آماری پس از تبدیل داده‌ها به آرکسینوس جذر درصدها انجام و برای مقایسه میانگین‌ها از روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن استفاده شد (Pop and McCarter, 1992 b).

نتایج و بحث

مقایسه میانگین درصد آلودگی بلال‌ها در این آزمایش که در جدول ۱ ملاحظه می‌گردد بیان‌گر آن است که از نظر مقاومت به بیماری مذکور بین لاین‌های مورد مطالعه هم از نظر درصد آلودگی و هم شدت بیماری اختلاف معنی‌داری (P=%1) وجود دارد. بر اساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها و استفاده از روش آزمون چنددامنه ای دانکن مشاهده گردید که لاین‌های مورد مطالعه از نظر میزان حساسیت به بیماری عکس‌العمل‌های متفاوتی از خود نشان داده‌اند (جدول ۲). سه لاین K1254/2، K1369 و K3199 که به بیماری مقاومت کامل داشتند در یک گروه و دو لاین TVA926 و K2818 با تحمل بسیار زیاد (Scale 0.25) در گروه دیگر و لاین‌های K12/8-2، K1364/1، S61، K1365/2، K2816، K33 و K1263/1 در سه گروه از تحمل زیاد (Scale 1) تا نسبتاً متحمل (Scale 1.25-1.50) و لاین‌های K3063/3،

www.SID.ir

Archive of SID

K1278/8، K74/1 ، K1717/3-1 ، K18 ، K1259/4 ، M017/11-1 و K1259 در دو گروه کمی متحمل (Scale 1.75) تا کمی حساس (Scale 2.25) و لاین‌های K144 ، M017 ، K3218 ، K36/8 ، K2817/1 ، B73، K3859 ، K1515 و K17/2-5 در سه گروه نسبتاً حساس (Scale 3-3.5)، حساس (Scale 6.57) وحساسیت زیاد (Scale 5.5) و لاین K17/2-3 در گروه حساسیت خیلی زیاد (Scale 6.75) قرار گرفتند (شکل ۱). رنفرو (Renfro, 1983) با تلاقی بین لاین‌های مقاوم و حساس به بیماری و سپس با تلاقی برگشتی (Back cross) هیبریدهای حاصل با هر دو والد مشاهده نمود که هیبریدهای حاصل از تلاقی بین لاین‌های مقاوم با مقاوم (R x R) همگی در برابربیماری مقاوم بودند. از تلاقی بین لاین‌های حساس با حساس (S x S) همگی در برابر بیماری حساس و میزان آلودگی ۶۰ درصد بود. تلاقی بین یک لاین مقاوم و یک لاین حساس و سپس تلاقی برگشتی با والد حساس منجر به تولید یک هیبرید با ۳۰ درصد آلودگی گردید و از تلاقی یک لاین حساس با یک لاین مقاوم و سپس تلاقی با والد مقاوم تولید هیبریدی با حدود ۱۰ درصد آلودگی بوده است. تفاوت‌های مشاهده شده در میزان حساسیت یا مقاومت لاین‌ها را می‌توان به خصوصیات میزبان و روش‌های مایه‌زنی نسبت داد به طوری که در روش زخم کردن بلال‌ها مقاومت فیزیکی برداشته شده و تنها مقاومت فیزیولوژیک بررسی می‌گردد. دریپر و رنفرو (Drepper and Renfro, 1990) در مورد روش‌های مختلف مایه‌زنی عامل پوسیدگی فوزاریومی بلال عقیده دارند زمانی که مایه‌زنی با ایجاد زخم در بلال انجام شود، ابتدا مقاومت فیزیولوژیک ارزیابی می‌شود و سپس میزان آلودگی دانه‌های سالم نشان دهنده میزان مقاومت فیزیکی میزبان است و بنابراین روش ایجاد زخم را برای مطالعه وراثت مقاومت به بیماری مفید و قابل توصیه می‌دانند.

Pop and McCarter (1992b) و Zemmerman and Pataky (1992) با به کارگیری روش‌های مختلف ایجاد آلودگی بوته‌های ذرت به سیاهک معمولی، روش ایجاد آلودگی از طریق تزریق در چوب بلال (Cut cob injection) را روش مطمئنی برای ارزیابی مقاومت می‌دانند به طوری که با این روش آلودگی در ۹۷ درصد بلال‌های مایه‌زنی شده با اسپور قارچ ایجاد گردید.

زمانی و چوکان (۱۳۷۹) نیز با استفاده از روش تزریق در چوب بلال مقاومت ۶۰ ترکیب از تلاقی اینبرد لاین‌های خالص از مواد برگزیده را نسبت به سیاهک معمولی بررسی نموده و ترکیب K3165/2 × Mo17 را به عنوان ترکیب حساس و K1259/3 × B73 را به عنوان ترکیب مقاوم معرفی نمودند. رنفرو (Renfro, 1983) از نظر توارثی، مقاومت در برابر بیماری سیاهک معمولی را چند ژنی می‌داند و توصیه می‌نماید که در برنامه‌های اصلاحی بایستی از روش

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- تجزیه واریانس عکس‌العمل لاین‌های ذرت نسبت به بیماری سیاهک معمولی *U. maydis*

Table 1. Variance analysis of corn lines interaction to corn common smut, *U. maydis*

S. O. V.	منابع تغییرات	درجه آزادی d. f.	میانگین مربعات M. S. شدت آلودگی D. S.	درصد آلودگی D. I. %
Replication	تکرار	3	0.17974^{ns}	2.37^{ns}
Treatment (Line)	تیمار (لاین)	29	0.36788**	431.52**
Error	خطای آزمایش	87	0.06966	6.77
C.V. %		—	12.42	11.61

ns and ** : Non significant and significant at 1%, respectively. ns و **: به ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح یک درصد.

D. S. = disease severity
D. I. = disease incidence

جدول ۲- مقایسه میانگین درصد آلودگی و شدت بیماری سیاهک معمولی *U. Maydis* در لاین‌های ذرت

Table 2. Comparison of average diseases incidence and severity of corn common smut, *U. maydis*, on corn lines

لاین Line	درصد آلودگی D. I. %	شدت آلودگی D. S.	لاین Line	درصد آلودگی D. I. %	شدت آلودگی D. S.	لاین Line	درصد آلودگی D. I. %	شدت آلودگی D. S.
K17/2-3	96.4	6.75 a	K1259	32.1	2.25 f	K12/8-2	21.4	1.50 gh
K17/2-5	78.4	5.50 b	K1717/3-1	31.4	2.25 f	K33	21.2	1.50 gh
K3218	77.6	5.50 b	MO17/11-1	25.7	1.75 g	K2816	17.9	1.25 gh
MO17	60.7	4.25 c	K1259/4	25.0	1.75 g	K3165/2	14.6	1.00 I
K144	53.6	3.75 d	K18	24.6	1.75 g	S61	14.3	1.00 I
K1515	50.0	3.50 d	K74/1	24.3	1.75 g	K2818	3.6	0.25 jk
K3859	48.6	3.25 de	K1728/8	24.1	1.75 g	TVA926	3.4	0.25 jk
B 73	47.9	3.25 de	K3063/3	23.9	1.75 g	K1254/2	0.0	0.00 k
K2817/1	46.4	3.25 de	K1263/1	21.9	1.50 gh	K1369/4	0.0	0.00 k
K36/8	42.9	3.00 e	K1264/1	21.6	1.50 gh	K3199	0.0	0.00 k

میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه شده‌اند و میانگین‌ها با حروف مشابه در هر ستون فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح ۱٪ می‌باشند.

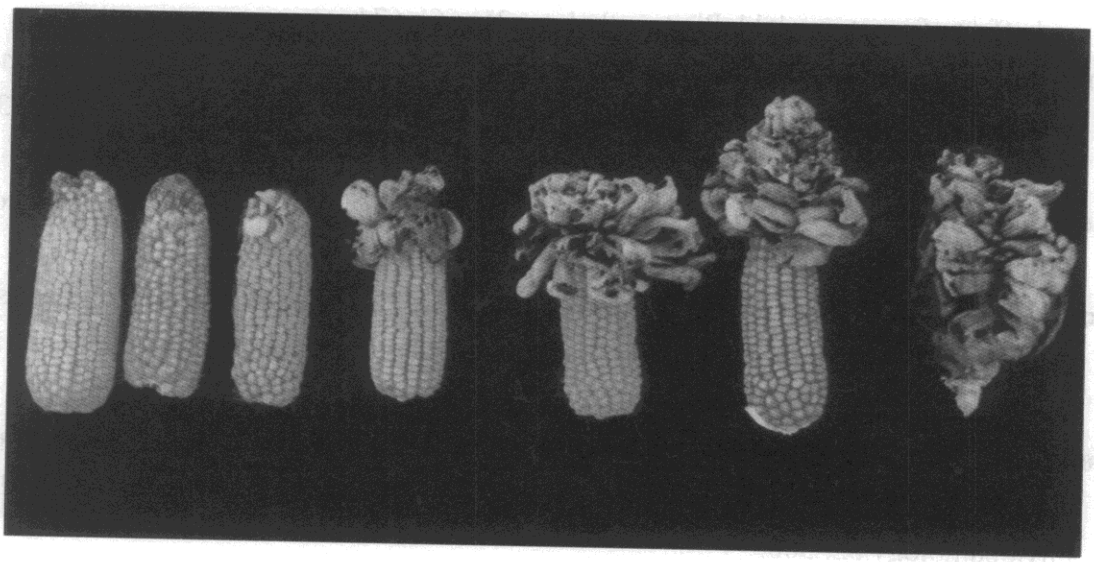
Means comparison with Dancan's multiple range test, means with similar letters in each column are not significantly different at 1% level.

DS = Disease severity (Scale 0-7)
DI = Disease incidence

www.SID.ir

Archive of SID

تلاقی لاین‌های مقاوم با یک لاین حساس استفاده شود و ارزیابی مقاومت در هیبریدهای حاصل در نسل‌های F1 و F2 بررسی گردد. در ضمن وجود تعداد زیاد بیوتیپ‌های هاپلوئید و دیپلوئید قارچ عامل بیماری در طبیعت که از بیوتیپ‌های جدید از طریق هیبرید شدن و انجام موتاسیون در مراحل هاپلوئیدی و دیپلوئیدی به وجود می‌آیند (Christensen, 1963)، سبب می‌شود ارزیابی ژنوتیپ‌های برگزیده ذرت در برابر بیماری در مناطقی که شیوع آلودگی بالا است به طور مستمر صورت گیرد.



شکل ۱- مقایسه شدت آلودگی در بلال‌های مایه‌زنی شده با اسپور قارچ *U. maydis*

Fig. 1. Comparison of disease severity in inoculated ears with spores of *U. maydis* (Scale: 0-7)

سپاسگزاری

از مسئولین بخش تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی و بخش تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر اصفهان به خاطر اختیار گذاشتن مواد لازم و زمین انجام آزمایش و خانم مؤذنی به خاطر همکاری در این بررسی تشکر می‌نماید.

منابع مورد استفاده

References

زمانی، م.، و چوکان، ر. ۱۳۷۹. ارزیابی مقاومت ترکیبات هیبرید ذرت به مهمترین عوامل بیماریزای قارچی ذرت. ششمین کنگره زراعت و اصلاح نبات ایران، دانشگاه مازندران. صفحه ۲۰۱.

شریف نبی، ب.، و نکوئی، ا. ۱۳۷۲. بروز سیاهک معمولی ذرت در استان اصفهان. بیماری‌های گیاهی ۲۹ (۱ و ۲): ۸۱-۸۰.

www.SID.ir

Archive of SID

مهریان، ف. ۱۳۶۳. پیدایش سیاهک معمولی ذرت در ایران. بیماری‌های گیاهی ۲۰ (٤-۱): ۵۱-٤٦.

Agrios, G. N. 1990. Plant Pathology, 3th. ed. Academic Press, 803 pp.

Christensen, J. J. 1963. Corn smut caused by *Ustilago maydis*. American Phytopathological Society. Monograph No. 2. 41pp.

Drepper, W. J., and Renfro, B. L. 1990. Comparison of methods for inoculation of ears stalks of maize with *Fusarium moniliforme*. Plant Disease 74: 952-956.

Immer, F. R., and Christensen, J. J. 1931. Further studies on reaction of corn to smut and effect of smut on yield. Phytopathology 21: 661-674.

Johnson, I. J., and Christensen, J. J. 1935. Relation between number, size, and location of smut infections to reduction in yield of corn. Phytopathology 25: 223-233.

Renfro, B. L.1983. Genetic Resistance to Diseases in Maize. CIMMYT, Mexico. 74pp.

Pope, D. D., and McCarter, S. M. 1991. The effect of inoculation menthod on disease incidence and severity of the corn smut caused by *U. maydis*. Phytopathology 81: 814.

Pope, D. D., and McCarter, S. M. 1992 a. Smut incidence and severity after inoculation developing corn ears with *U. maydis* using different methods. Phytopathology 82: 500.

Pop, D. D., and McCarter, S. M. 1992 b. Evaluation of inoculation methods for inducing common smut on corns. Phytopathology 82: 950-955.

Shurtleff, M. C. 1980. Compendium of Corn Diseases. American Phythopathological Society, St. Paul, Minnesota. 105 pp.

Thakur, R. P., Leonard, K. J., and Pataky, J. K. 1989. Smut gall development in adult corn plants inoculated with *U. maydis*. Plant Disease 73:921-925.

Ullstrup, A. J. 1978. Corn Diseases in the United State and their Control. Agricultural Handbook No.199. 21 pp.

Windels, C. E. 1977. Fusarium stalk rot and common smut in corn fields of southern Minnesota in 1976. Plant Disease Reporter, 61: 259-261.

Zimmerman, S. A., and Pataky, J. K.1992. Inoculation techniques to produce galls of common smut on ears of sweet corn. Phytopathology 82: 995.

آدرس نگارندگان:

صادق جلالی- بخش تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی اصفهان، صندوق پستی ۱۹۹-۸۱۷۸۵ اصفهان.

محمدحسین سبزی- بخش تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی اصفهان، صندوق پستی ۱۹۹-۸۱۷۸۵ اصفهان

www.SID.ir