

واکنش ارقام پسته به جدایه‌های *Verticillium dahliae*

عامل پژمردگی آوندی

Reaction of *Pistacia vera* cultivars to *Verticillium dahliae* the causal agent of vascular-wilt

ایمان هادی‌زاده، ضیاء‌الدین بنی‌هاشمی*

بخش گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

پذیرش ۱۳۸۴/۸/۲۵

دریافت ۱۳۸۳/۲/۳

چکیده

هفتاد جدایه *Verticillium dahliae* از درختان پسته دارای علائم پژمردگی ورتیسلیومی از استان کرمان جدا و شناسایی شدند. بذور ده رقم پسته تجاری از گونه *Pistacia vera* شامل قزوینی، بادامی ریز زرنده، بادامی راور، اکبری، سرخس، اوحدی، سبز پسته نوق، احمدآقایی، خنجری دامغان و کله‌قوچی در گلخانه و در خاک بکر کشت گردید. به‌منظور تهیه میکرواسکلروت قارچ، جدایه‌های *V. dahliae* بدست آمده از پسته به روش کشت در محیط مایع تولید و جهت مایه‌زنی دانه‌های شش ماهه ارقام، به میزان ۵۰ میکرواسکلروت در هر گرم خاک، استفاده شد. علائم پژمردگی ورتیسلیومی در همه ارقام تجاری پسته در طی ۶۷ تا ۹۵ روز پس از مایه‌زنی ظاهر گردید در بررسی واکنش ارقام به *V. dahliae*، سه گروه متمایز

* مسئول مکاتبه

تشخیص داده شد. ارقام اوحدی، بادامی راور و بادامی ریززرنده که دارای پائین‌ترین واکنش

سبز پسته نوق، خنجری دامغان و احمد آقایی که دارای بالاترین شاخص شدت بیماریزایی، شاخص قهوه‌ای شدن، درصد کاهش طول گیاه، درصد کلونیزاسیون ساقه و مرگ بودند به ترتیب بصورت گروه متحمل و بسیار حساس ارزیابی شدند. در مقابل، ارقام سرخس، اکبری و کله قوچی که از نظر آماری در حدواسط دو گروه قبل بودند بصورت حساس در نظر گرفته شدند. علاوه بر این بررسی همکنش بین جدایه‌های *V. dahliae* (با پاتوتیپ‌های متفاوت) و ارقام پسته که با سوسپانسیون اسپور به غلظت 10^7 کنیدیوم در هر میلی‌لیتر از هر یک از جدایه‌ها مایه‌زنی شده بود، نشان داد که شاخص شدت بیماریزایی و درصد کلونیزاسیون جدایه‌های برگریز از جدایه‌های غیر برگریز بیشتر است. بنابراین جدایه‌ها درجه متفاوتی از بیماریزایی را بر روی ارقام ایجاد نمودند.

واژه‌های کلیدی: پسته، *Verticillium dahliae*، پژمردگی ورتیسلیومی، میکرواسکلروت، کرمان

مقدمه

پسته درختی است که براساس یافته‌های معتبر از غرب آسیا و آسیای صغیر منشأ گرفته است (Padulosi et al. 1995, Raabe & Wilhelm 1978, Ashworth & Zimmerman 1976). این گیاه به‌عنوان یک محصول مهم و استراتژیک از دیرباز در نقاط مختلف ایران کشت می‌شده است. تصور شده که کشت پسته در کرمان با ورود بذرها یا نهال‌های آن از استان خراسان در زمان پادشاهی صفوی (۱۵۰ تا ۲۵۰ سال قبل) آغاز شده است. پسته از حدود ۷۰ سال پیش با شروع صادرات، ارزش اقتصادی و تجاری ویژه‌ای پیدا کرد و ایران به عنوان اولین و مهمترین صادرکننده پسته دنیا شهرت یافت (Abrishami 1995). نقش مهم پسته در اقتصاد و سازگاری آن با شرایط نامساعد محیطی از جمله شوری آب و خاک، مقاومت به خشکی و کم آبی، سبب گردیده تا جایگاه ویژه‌ای در مناطقی که برای کشت سایر محصولات مناسب نیست، پیدا نماید (Sheibani 1996). لذا جهت حفظ موقعیت جهانی باید میزان عملکرد محصول در واحد سطح در این مناطق افزایش یابد ولی عدم آگاهی از خصوصیات پایه‌ها و ارقام پسته، مدیریت صحیح، مکانیزاسیون و فن‌آوری تولید پسته سبب شده که اکثر تولید کنندگان پسته بدون توجه به آن به تولید حداقل محصول بسنده کنند.

تا کنون عوامل بیماریزای متعددی از قسمتهای مختلف درختان پسته گزارش شده‌اند (Teviotdale et al. 1993). در بین این عوامل، *Verticillium dahliae* Kleb. مولد بیماری پژمردگی، یکی از جدی‌ترین عوامل محدودکننده کشت درختان پسته در برخی کشورها می‌باشد. بیماری پژمردگی ورتیسیلیومی در نواحی معتدله دنیا پراکندگی وسیعی دارد و درختان پسته را در هر سن و سالی آلوده می‌سازد. اما اغلب متوجه باغ‌هایی است که قبل از پسته‌کاری، محصول زراعی حساس‌تری به این قارچ در آنها کاشته شده یا درختان دارای پایه‌های حساس و خاک دارای سطح ایناکولوم بالاست (Ashworth et al. 1985, Teviotdale et al. 2000).

اولین گزارش مربوط به وجود این بیمارگر روی پسته، در سال ۱۹۵۰ میلادی از ایالت کالیفرنای آمریکا می‌باشد. این بیماری از مهم‌ترین بیماری‌های پسته در این ناحیه بوده که سابقه طولانی در کشت پنبه همراه با آلودگی‌های بالا به این قارچ داشت (Ashworth & Zimmerman 1976, Raabe & Wilhelm 1978). در ایران وجود بیماری پژمردگی ورتیسیلیومی پسته توسط امینائی و ارشاد (Aminae & Ershad 1999) از استان کرمان و میرابولفتحی (تماس شخصی) از قزوین گزارش شده است. محمدی (Mohammadi 2000) این قارچ را از درختان پسته منطقه کرمان و رفسنجان جداسازی کرد.

استفاده از پایه‌های مقاوم و مناسب در هر منطقه راه اساسی مبارزه با بیماری پژمردگی ورتیسیلیومی است (Raabe & Wilhelm 1978, Schnathorst 1988, 1981). خسارت این بیماری نسبت به پایه‌های مختلف، متفاوت است (Krueger & Ferguson 1995, Morgan et al. 1992). Schnathorst 1988). پایه‌های مختلفی از گونه‌های جنس *Pistacia* در ارتباط با مقاومت به بیماری آوندی ناشی از *V. dahliae* گزارش شده است. اولین گزارش از حساسیت گونه‌های *P. vera* و *P. terebinthus*، *P. chinensis*، *P. atlantica* و Raabe و Wilhelm (1978) ارائه شد. آنها نشان دادند که درختان جوان علائم شدیدتری بروز داده و دو گونه *P. terebinthus* و *P. integerrima* بیشتر از سایر گونه‌ها از خود مقاومت نشان دادند. در آمریکا پایه *P. integerrima* تحت نام تجاری Pioneer Gold (PG) به‌عنوان پایه مقاوم دو جدایه غالب T-1 و V. *dahliae* SS-4 معرفی شده است (Schnathorst 1988, Morgan et al. 1992). این پایه ادامه تولید پسته را در خاک‌های آلوده کالیفرنیا که عمده‌ترین منطقه کشت پسته در آمریکا

می‌باشد، ممکن ساخت. اما حساسیت این پایه به سرمای بهاره، کارآئی پائین آن در جذب عناصر بور و روی و تمایل به پیدا کردن پایه‌هایی با قدرت بیشتر و باردهی زودتر سبب شد تا دو پایه هیبرید بین گونه‌ای جدید به نام‌های PGII (Pioneer Gold II) با والد نر *P. atlantica* و والد ماده *P. integerrima* و UCB1 (University of California Berkley I) که والد نر آن *P. integerrima* و والد ماده *P. atlantica* می‌باشد معرفی گردد (Teviotdale 2001). مورکان و همکاران (Morgan et al. 1992) در دو سنجش مزرعه‌ای و گلخانه‌ای مقاومت به *V.dahliae* را در دو پایه هیبرید UCB-1 و PGII. در مقایسه با *P.integririma*(PG) (پایه مقاوم به *V.dahliae*) و *P. atlantica* Standard atlantica پایه حساس به *V. dahliae*) بررسی کردند و نشان دادند که پایه دو رگه UCB-1 در واکنش به قارچ، نیمه مقاوم تا مقاوم و پایه دو رگه PGII نیمه حساس تا حساس می‌باشد. ارزیابی واکنش پایه‌های *Pistacia* spp. که به آنها *P. vera* cv. Kerman پیوند زده شده بود به *V. dahliae* پس از دو سال، مشخص ساخت که میزان آلودگی و مرگ و میر در هیبرید *P. atlantica* × *P. integerrima* نسبت به هیبرید *P. atlantica* × *P. atlantica* کمتر بوده و این امر نشان دهنده نحوه متفاوت وراثت مقاومت و تحمل در این دو نوع هیبرید است (Teviotdale et al. 1995). به نظر می‌رسد مقاومت در پسته نسبت به *V. dahliae* با یک یا بیش از یک ژن غالب کنترل شود زیرا نسل F₁ حاصل از تلاقی ژنوتیپ‌های حساس و مقاوم، مقاوم می‌باشد (Parfitt 1995). در یک تحقیق جامع فرگسون و همکاران (Ferguson et al. 2000) در طی ۱۱ سال از ۱۹۹۰ تا ۲۰۰۱ حساسیت دو پایه *P. atlantica*، *P. integerrima* (PG) و دو هیبرید PGII و UCB-1 را تحت شرایط مزرعه‌ای در خاک‌های آلوده به ورتیسیلیوم (۴۰ میکرواسکروت در هر گرم خاک خشک) مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج بدست آمده حاکی از ارجحیت UCB-1 از نظر مقاومت به این بیماری نسبت به سایر ارقام بود.

ایران کشوری است که بیشترین تعداد ارقام پسته را در جهان دارا می‌باشد (Padulosi et al. 1995). ارقام باغی *P. vera* در ایران متنوع بوده و بیش از ۶۰ رقم از آن گزارش شده است (Abrishami 1995). با وجود داشتن این ذخایر ژنتیکی اعم از اهلی و وحشی تحقیقات چندانی در خصوص تعیین مقاومت پایه‌های مختلف جنس *Pistacia* spp. به *V. dahliae* صورت نگرفته است. محمدی (Mohammadi 2000) برهمکنش شوری و قارچ

V. dahliae را روی سه پایه متداول در ایران، ارقام سرخس، بادامی ریزرند و قزوینی مورد بررسی قرار داد. نتایج نشان داد که گرچه هر سه رقم در مقابل *V. dahliae* حساس بودند اما کمترین درصد آلودگی در رقم قزوینی (متحملترین پایه به شوری) و بیشترین آلودگی در رقم سرخس (حساسترین پایه به شوری) مشاهده شد.

پژوهش حاضر در جهت ارزیابی واکنش ارقام مهم *P. vera* به عامل بیماری با استفاده از میکرواسکلروت (ایناکولوم ثابت) و بررسی برهمکنش جدایه‌های *V. dahliae* و ارقام مختلف پسته صورت گرفت.

روش بررسی

نمونه‌برداری و جداسازی از درختان بیمار

از باغ‌های مناطق مختلف استان کرمان در طی سال‌های ۱۳۷۸-۱۳۸۰ بازدید بعمل آمد و قطعات ۲۰ تا ۳۰ سانتیمتری از شاخه‌های پسته با علائم پژمردگی و رتیسیلیومی جدا و به آزمایشگاه منتقل شد.

پوست سطحی شاخه‌های آلوده پس از ضدعفونی سطحی با الکل اتیلیک ۹۶٪ و عبور از روی شعله برداشته شد و قطعات ۱-۵ سانتی‌متری از بافت اطراف نواحی قهوه‌ای رنگ آوندهای چوبی جدا شد. این برش‌های کوچک چوب (wood chips) روی تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت عصاره سیب‌زمینی دکستروز آگار (PDA) آنتی‌بیوتیک‌دار (حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم سولفات استرپتومایسین و ۱۰ میلی‌گرم ریفامپین در لیتر) یا محیط تغییر یافته الکل-آگار (Ausher *et al.* 1975) کشت گردید. کشت‌ها از نظر وجود پرگنه‌های حاوی کنیدیوفورهای با انشعابات فراهم (verticillate) درون و اطراف قطعات بررسی شدند.

خالص‌سازی، تشخیص و نگهداری جدایه‌های قارچ

خالص‌سازی با روش تک‌اسپور روی محیط کشت آب-آگار حاوی ۲ میلی‌لیتر الکل اتیلیک ۹۶ درجه و ۰/۳ گرم سولفات استرپتومایسین در لیتر (Strep-Alcohol Agar) (Rowe *et al.* 2000) انجام شد.

برای تشخیص جدایه‌ها از کلیده‌های توصیفی موجود

براساس مشخصات کنیدیوفور و فیالیدها و در حد گونه براساس اندام استراحتی و اندازه کنیدیوم صورت گرفت.

جدایه‌ها به دو روش کشت روی PDA و CMA (Corn Meal Agar) بصورت مورب در لوله‌های آزمایش و در ظروف شیشه‌ای کوچک، حاوی مخلوط سترون شده‌ای از خاک، پرلایت و پیت‌ماس (به نسبت حجمی ۱:۱:۱) در دمای ۵°C نگهداری شد (Joaquim & Rowe 1990).

منابع، کشت بذور و تولید دانها

بذورده رقم پسته تجاری از گونه *P. vera* شامل قزوینی، بادامی ریز زرنند، بادامی راور، اکبری، سرخس، اوحدی، سبز پسته نوق، احمدآقایی، خنجری دامغان و کله‌قوچی از مؤسسه تحقیقات پسته کشور در رفسنجان تهیه شد.

پوست سخت و شاخی (اندوکارپ) بذرها از مغز جدا گردید. بذرها پس از ضدعفونی سطحی به مدت ۵ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد و شستشو با آب مقطر، به مدت دو شبانه روز در دمای اتاق در ظرف‌های شیشه‌ای سترون درون آب مقطر سترون حاوی آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین (۵۰۰ ppm) و کلرامفنیکل (۲۵۰ ppm) خیسانده شد. پس از این مدت بذور با پنتاکلو نیتروبنزن (PCNB 65% WP) و بنومیل (Benlate 50% WP) هر یک به میزان ۴ در هزار (از ماده تجارتي) ضدعفونی شده و در بین دو لایه پارچه لملل مرطوب و سترون در کف ظروف پلاستیکی سترون قرار گرفتند. بسته به سرعت جوانه‌نی، حدود ۱۰-۷ روز بعد، ۵ عدد بذر جوانه زده در کیسه‌ای پلاستیکی مشکی یک کیلویی حاوی خاک بکر نرم (الک شده) کاشته و سطح بذور با ماسه سترون پوشانده شد. پس از سبز شدن بذور، تعداد گیاهچه‌ها به ۴ عدد کاهش داده شد.

تهیه مایه قارچ

برای تهیه میکرواسکلروت بعنوان ایناکولوم پایدار جهت مایه‌زنی به دانها از روش تغییر یافته Hall و Ly (1972) استفاده شد. پانزده جدایه که پرگنه‌هایی سیاه‌رنگ و درجه تیرگی بالاتری روی محیط PDA نسبت به سایر جدایه‌ها داشتند انتخاب شدند. ابتدا ۷۰۰ میلی‌لیتر از

محیط مایع مخصوص تولید میکرواسکلروت به تشتک‌های پلاستیکی سترون مقاومت به حرارت (با ابعاد $13 \times 26 \times 40$ cm) ریخته و درب آنها با ورقه آلومینیوم پوشانده شد. سپس تشتک به همراه محیط کشت به مدت ۳۰ دقیقه در دمای 121°C اتوکلاو شد. از حاشیه پرگنه‌های ۱۰ روزه جدایه‌های مذکور روی محیط KDA (KNO₃-Dextrose-Agar) بلوک‌هایی به قطر یک سانتی‌متر به تشتک‌های حاوی محیط مایع منتقل و تشتک‌ها حدود ۸-۱۰ هفته در دمای $25-22^{\circ}\text{C}$ بدون تکان خوردن در تاریکی نگهداری شدند. پس از این مدت، توده میکرواسکلروت تشکیل شده پس از یک مرحله شست‌وشوی با آب مقطر سترون، خشک گردید و در یک هاون چینی به آرامی خرد و نرم شده و پس از عبور از الک ۳۲۵ مش در یک فلاسک سترون در جای خشک نگهداری شد.

مایه‌زنی دانه‌ها

از دانه‌های ۱۰ ماهه ارقام مختلف پسته و خاک حاوی حداقل ۵۰ میکرواسکلروت در هر گرم خاک استفاده شد. مقدار نهایی میکرواسکلروت مورد نیاز با توجه به درصد جوانه‌زنی میکرواسکلروت‌ها و کل خاک مورد نیاز جهت پرکردن گلدان‌های بزرگ (۴ کیلوگرمی) برای مایه‌زنی دانه‌ها، محاسبه گردید. این میزان میکرواسکلروت پس از تهیه، ابتدا به ۲ کیلوگرم ماسه بادی سترون (به قطر کمتر از ۲ میلی‌متر) افزوده شده و توسط دستگاه همزن غلتکی بطور کاملاً یکنواخت مخلوط گردید. سپس این مخلوط بتدریج به خاک بکر نرم و الک شده افزوده شد تا حجم نهایی کل خاک مورد نیاز حاصل گردد. جمعیت نهایی میکرواسکلروت این خاک به روش رقیق کردن (dilution method) ارزیابی شد. جهت مایه‌زنی، در کف گلدان‌های بزرگتر خاک حاوی میکرواسکلروت (۵۰ عدد در هر گرم خاک) ریخته و سپس دانه‌ها همراه با خاک اطراف ریشه بدون اینکه صدمه‌ای به آنها وارد شده باشد از داخل کیسه پلاستیکی خارج شده و به این گلدان‌ها انتقال داده شد. دانه‌های شاهد به داخل گلدان‌های حاوی خاک بکر فاقد میکرواسکلروت منتقل شدند. در طول آزمایش دمای گلخانه بین 20°C تا 30°C متغیر بود.

روش ارزیابی

گلدان‌ها روزانه مورد بازدید قرار گرفتند و زمان ظهور علائم، شدت علائم و میزان مرگ و

میر نهال‌ها تا انتهای دوره آزمایش (۱۲ ماه) یادداشت‌برداری گردید. در انتهای آزمایش صفاتی نظیر درصد کلونیزاسیون ساقه، شاخص قهوه‌ای شدن اوند و میزان کاهش ارتفاع اندام‌های هوایی گیاه در کلیه ارقام اندازه‌گیری شد.

الف- محاسبه شاخص شدت بیماری: بعد از مایه‌زنی گیاهان، بطور هفتگی شدت علائم بر روی ارقام مختلف با استفاده از شاخص ۴ درجه‌ای پیشنهاد شده توسط مورگان و همکاران (Morgan et al. 1992) با تغییراتی ارزیابی شد. $0 =$ هیچگونه علائمی دیده نمی‌شود. $1 =$ پژمردگی خفیف و زردی ۷ شکل در اغلب برگها. $2 =$ پژمردگی متوسط (۲۰ تا ۴۰٪ برگ‌ها)، نکروز برگ‌های پائینی گیاه و زردی شدید تا برگ‌های بالایی گیاه. $3 =$ پژمردگی شدید (بیش از ۴۰٪ برگ‌ها)، نکروز یا زردی شدید در کل گیاه. $4 =$ مرگ کل گیاه، گاه بصورت سبز خشکی. پس از ۱۲ ماه شاخص شدت بیماری به ازاء هر دانهال در هر رقم محاسبه شد.

ب- درصد کلونیزاسیون: کل طول ساقه به سه قسمت تحتانی، میانی و فوقانی تقسیم شد و از هر قسمت ۳۰ مقطع عرضی به ضخامت ۳ میلی‌متر از ساقه هر گیاه برداشته شد. مقطع‌های عرضی پس از ضدعفونی سطحی با الکل اتیلیک ۷۰٪ به مدت ۳ دقیقه، بر روی محیط PDA آنتی‌بیوتیک دار کشت داده شدند. کشت‌ها از نظر وجود *V.dahliae* بررسی و تعداد قطعات کلونیزه شده برحسب درصد محاسبه شد.

ج- شاخص قهوه‌ای شدن (Browning index): سنجش میزان تغییر رنگ آوندی (علائم داخلی) با تغییراتی در روش‌اروین و همکاران (Erwin et al. 1976) انجام شد. از ساقه هر گیاه در فواصل ۳ سانتی‌متری برش‌هایی عرضی به ضخامت ۳ میلی‌متر تهیه و میزان تغییر رنگ آوندی با استفاده از شاخص ۴ درجه‌ای زیر تعیین شد: $0 =$ بدون تغییر رنگ آوندی $1 =$ دو تا پنج ناحیه یا نقطه قهوه‌ای رنگ محدود به بافت آوندی در هر قطعه. $2 =$ وجود نواحی قهوه‌ای رنگ در کمتر از ۵۰٪ از مقطع عرضی ساقه، $3 =$ وجود نواحی قهوه‌ای رنگ در بیش از ۵۰٪ از مقطع عرضی ساقه تا قهوه‌ای شدن کامل حلقه آوندی. $4 =$ قهوه‌ای شدن بافت‌های آوندی و بافت‌های مجاور در تمام مقطع عرضی ساقه.

د- کاهش ارتفاع گیاه: در پایان آزمایش، ارتفاع گیاه از قسمت طوقه تا جوانه انتهایی اندازه‌گیری شد و اختلاف ارتفاع هر دانهال از میانگین ارتفاع دانهال‌های شاهد مایه‌زنی نشده در هر رقم

محاسبه گردید و بصورت درصد کاهش ارتفاع بیان شد.

بررسی اثر جدایه‌های مختلف *V.dahliae* روی ارقام تجاری پسته

از ۴ جدایه *V.dahliae* شامل D-5 (پاتوتیپ برگریز-پنبه)، CS-26 (پاتوتیپ غیربرگریز-پنبه)، tom-1 (پاتوتیپ غیربرگریز-گوجه‌فرنگی) و Se-4 (پاتوتیپ برگریز-کنجد) جهت تهیه مایه قارچ استفاده گردید. براساس نتایج قسمت (۶) سه رقم اوحدی، سرخس و سبزیسته نوق که به ترتیب متحمل، حساس و بسیار حساس ارزیابی شده بودند، جهت این آزمون انتخاب گردیدند. برای این منظور از دانه‌های ۱۰ ماهه ارقام استفاده شد. دانه‌ها همراه با خاک اطراف ریشه بدون اینکه صدمه‌ای به آنها وارد شود از داخل کیسه‌های پلاستیکی خارج شده و ۲۴ میلی‌لیتر سوسپانسیون کنیدیوم به غلظت 10^7 کنیدیوم در هر میلی‌لیتر روی ریشه‌هایی که در ته کیسه‌های پلاستیکی جمع شده بودند پاشیده شده و به گلدان‌های بزرگتر انتقال داده شدند. دانه‌های داخل گلدان‌های شاهد به تنهایی و بدون مایه‌زنی با قارچ به گلدان‌های بزرگتر انتقال داده شدند. از هر رقم ۲۴ دانه‌ها به ازاء هر جدایه در ۶ تکرار (۴ دانه‌ها در هر گلدان) در نظر گرفته شد. شش ماه پس از مایه‌زنی درصد کلونیزاسیون قسمت فوقانی ساقه دانه‌ها و شاخص شدت بیماری مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتیجه

جداسازی از بافت و خاک آلوده و تشخیص عامل بیماری

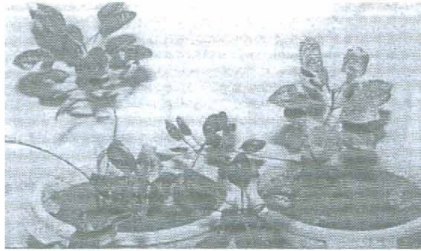
در مجموع ۷۰ جدایه *Verticillium dahliae* از درختان پسته باغ‌های کرمان و رفسنجان جدا شد در تمامی جدایه‌ها کنیدیوفورها دارای فیالیدهای فراهم و در انتها نوک تیز و کنیدیوم‌ها، بیضوی و تک سلولی بودند که در مراحل اولیه تشکیل بصورت توده‌ای در انتهای فیالید متمرکز بودند. اندازه کنیدیوم در محدوده $2/5-5/2 \times 3/2-1/4$ میکرومتر بود که آنرا از *V.longisporum* با کنیدیوم‌هایی به ابعاد $3/4-1/6 \times 12/5-5$ میکرومتر (Zare 2003) جدا می‌ساخت. شکل عمومی میکروواسکلروتها (بجز در دو جدایه) تقریباً کروی بود.

واکنش ارقام پسته به *Verticillium dahliae*

جدایه‌ها از لحاظ میزان تولید میکروواسکلروت متفاوت بودند. بسته به نوع جدایه، میزان

تولید میکرواسکلروت بین ۰/۸ تا ۴ گرم به ازاء هر تشتک پتری پلاستیکی (به قطر ۸ سانتیمتر) متغیر بود. اولین علائم پژمردگی ۶۲ روز پس از مایه‌زنی در رقم خنجری دامغان به صورت زردی برگ‌ها ظاهر شد و پس از آن در رقم احمدآقایی (۷۰ روز بعد) و در ارقام سبز پسته نوق، سرخس، کله‌قوچی (پس از ۷۵ روز) دیده شد. در ارقام اکبری، بادامی ریز زرنند، بادامی راور، قزوینی و اوحدی به ترتیب ۸۰، ۸۲، ۹۳، ۹۵ و ۹۸ روز پس از مایه‌زنی علائم اولیه بیماری ظاهر گردید. گیاهانی که فاقد علائم بودند تا مدت ۴ ماه یا بیشتر پس از اتمام آزمایش علائمی نشان ندادند. تشکیل مقادیر فراوان میکرواسکلروت روی شاخه دانهال‌های مرده (شدت علائم درجه ۴) که به کاغذ صافی مرطوب انتقال داده شده بودند، دلالت بر مرگ آنها در اثر *V. dahliae* داشت. علائم بیماری ابتدا بصورت زردی (اغلب ۷ - شکل ۱- الف) از حاشیه برگ‌ها شروع شده و به طرف رگبرگ میانی پیشرفت کرد و پس از ظهور زردی، حالت بافت مردگی نیز در برگ‌ها مشاهده شد. این زردی و سپس بافت مردگی بتدریج در کلیه برگ‌ها بصورت پژمردگی گسترش یافت (شکل ۱- ب). در وضعیت پژمردگی شدید، رشد جوانه انتهایی متوقف شده و علائم بیماری بصورت بافت مردگی شدید برگ‌های انتهایی گیاه و خشکیدگی شاخه‌ها (و گاه سبز خشکی) ظاهر گردید (شکل ۱- ج).

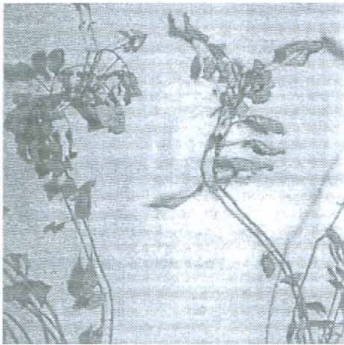
نتایج حاصل از مقایسه شدت بیماریزایی ارقام مختلف نشان داد که بین ارقام از نظر واکنش به بیمارگر تفاوت معنی‌داری ($P=0.01$) وجود دارد. (شکل ۲- A). بدین ترتیب که ارقام خنجری دامغان، احمدآقایی و سبز پسته نوق در یک گروه با شدت بیماریزایی بالا (0.75 - $DSI = 0.70$)، ارقام سرخس، کله‌قوچی و اکبری از لحاظ این صفت در یک سطح آماری حدواسط ($0.45 - 0.30$ - $DSI = 0.30$) و ارقام اوحدی، بادامی راور، بادامی ریز زرنند و قزوینی نیز در یک گروه با کمترین سطح بیماریزایی ($0.12 - 0.07$ - $DSI = 0.12$) جای گرفتند. ارقام پسته از نظر صفت کاهش ارتفاع گیاه ناشی از آلودگی به *V. dahliae* در سه گروه کاملاً متمایز در سطح ۱٪ قرار گرفتند. در گروه اول شامل ارقام سبز پسته نوق، احمد آقایی، خنجری دامغان، سرخس و کله‌قوچی، دامنه پیوسته‌ای از تغییرات مشاهده شد. این گروه نسبت به گروه



الف- زردی V-shape در برگها
(پژمردگی خفیف)
A- V-shape yellowing in
leaves (mild wilting)



ب- بافت مردگی برگهای پائینی
و زردی در کل گیاه
B- Lower leaves necrosis
and plant chlorosis



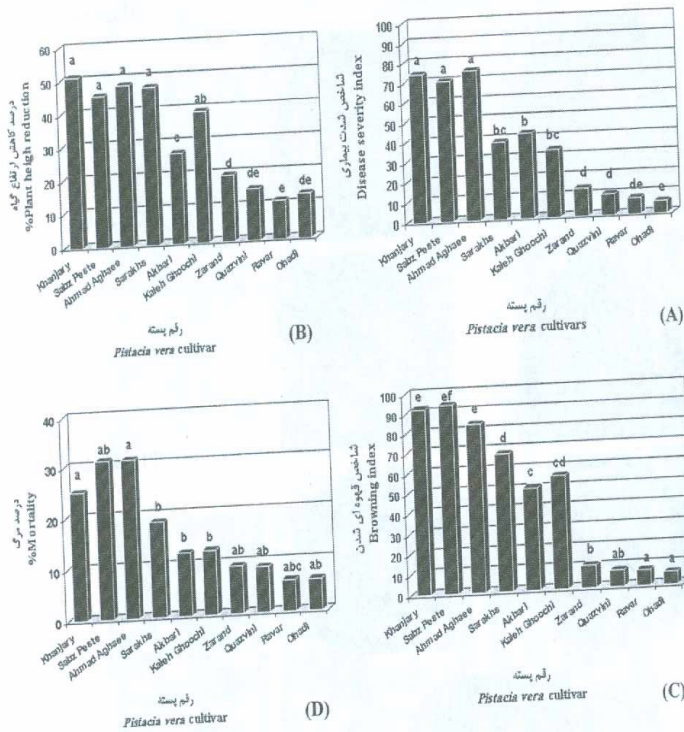
ج- پژمردگی شدید و سبزشکی
C-Severe wilting and sudden
death

شکل ۱- تیپ علائم بیماری پژمردگی ورتیسلیومی در دانه‌ال‌های پسته مایه‌زنی شده به
با *Verticillium dahliae* تراکم ۵۰ میکرواسکلروت در هر گرم خاک گلدان .

Fig. 1 Symptoms of *Verticillium* wilt disease in pistachio seedlings inoculated with *Verticillium dahliae*
(50 microsclerotia /g soil).

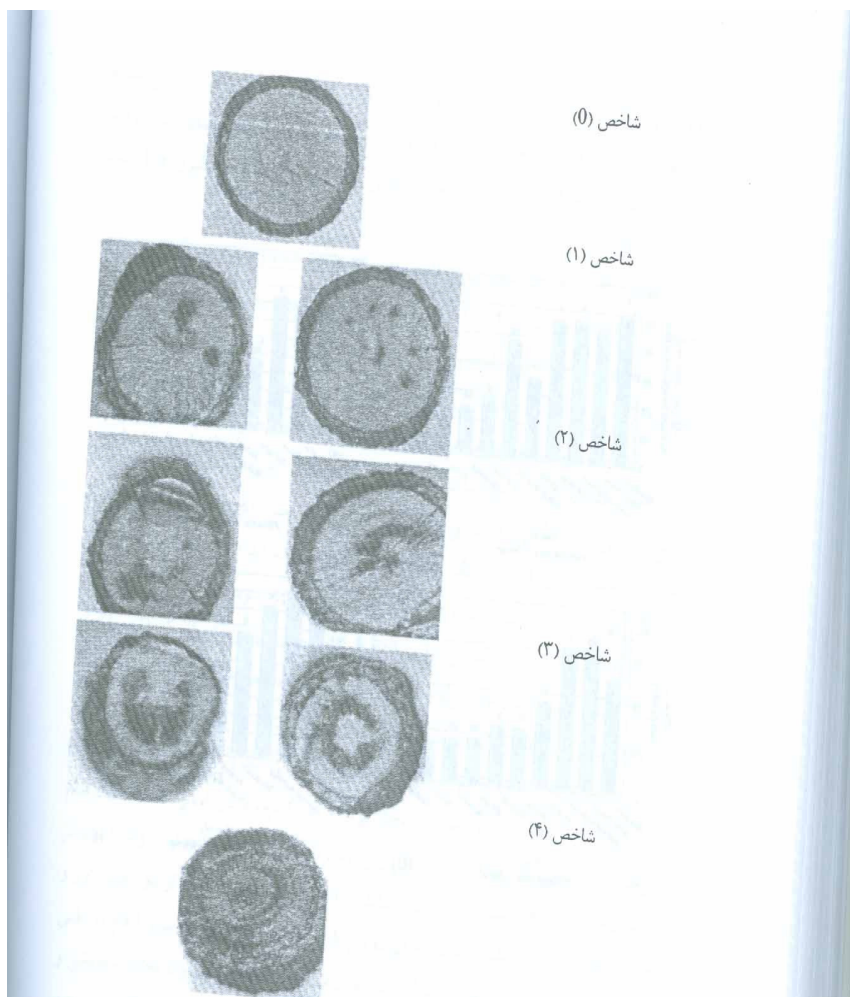
دوم شامل ارقام اوحدی، قزوینی، بادامی راور و ریز زرنند، از لحاظ درصد کاهش ارتفاع ساقه در سطح پایین تری قرار داشته و کاهش ارتفاع بیشتری در مقایسه با شاهد نشان دادند. رقم اکبری در گروهی مجزا قرار گرفت و از لحاظ کاهش ارتفاع در حدواسط دو گروه قبل بود (شکل ۲- B).

بررسی شاخص قهوه‌ای شدن بین ارقام مختلف نیز نشان دهنده وجود سه گروه آماری مشخص ($P=0.01$) بود (شکل ۲- C). ارقام خنجری دامغان، سبز پسته نوق و احمد آقایی که شاخص قهوه‌ای شدن بالایی داشتند یک گروه آماری تشکیل دادند. میزان تغییر رنگ آوندی در مقاطع عرضی دانه‌های این گروه اغلب درجه‌های ۲، ۳ و ۴ را شامل می‌شد (شکل ۳). گروه دیگر، ارقام اوحدی، بادامی راور، قزوینی و بادامی ریز زرنند را شامل می‌شد که شاخص قهوه‌ای شدن پایینی نسبت به سایر گروهها داشته و تغییر رنگ آوندی کمتری در مقطع عرضی آنها دیده می‌شد (شکل ۴). هرچند در ارقام سرخس، اکبری و کله قوچی (گروه سوم) درجات متفاوتی از تغییر رنگ آوندی (صفر تا ۴) مشاهده شد (شکل ۴)، با این وجود شاخص قهوه‌ای شدن این گروه در حدواسط دو گروه قبل بود (شکل ۲- C). اختلاف معنی داری از لحاظ درصد مرگ بین ارقام مختلف پسته وجود نداشت (شکل ۲- D). با این وجود، بررسی تعداد دانه‌های مرده و زمان مرگ و میر آنها در هر رقم (در طی ۴ ماه، ۸ ماه و ۱۲ ماه) نشان داد که تفاوت‌هایی در الگوی منحنی‌های مرگ و میر ارقام مختلف وجود دارد (شکل ۵). در ارقام خنجری دامغان، سبز پسته نوق، احمد آقایی الگوی منحنی‌ها تشابه بیشتری داشته و به تعداد زیادتر و زمان سریع‌تر دچار مرگ و میر گشته‌اند در حالی که برای ارقام سرخس، کله قوچی، اکبری، قزوینی، بادامی ریز زرنند، بادامی راور و اوحدی این روند با تأخیر بیشتری صورت گرفته است. در پایان آزمایش (۱۲ ماه) تنها یک نهال از دو رقم راور و اوحدی علائم مرگ را نشان دادند در حالی که بین ۹ تا ۱۳ درصد دانه‌های سایر ارقام در طی این مدت از بین رفتند. از مقایسه میانگین داده‌ها براساس درصد کلونیزاسیون تختانی، فوقانی و میانی ساقه مشخص گردید که ارقام اوحدی و بادامی راور کمتر از همه ارقام همگروه خود و ارقام خنجری دامغان، احمد آقایی و سبز پسته نوق بیش از همه ارقام نسبت به پیشروی قارچ در بافت‌هایشان آمادگی داشتند (شکل ۶).



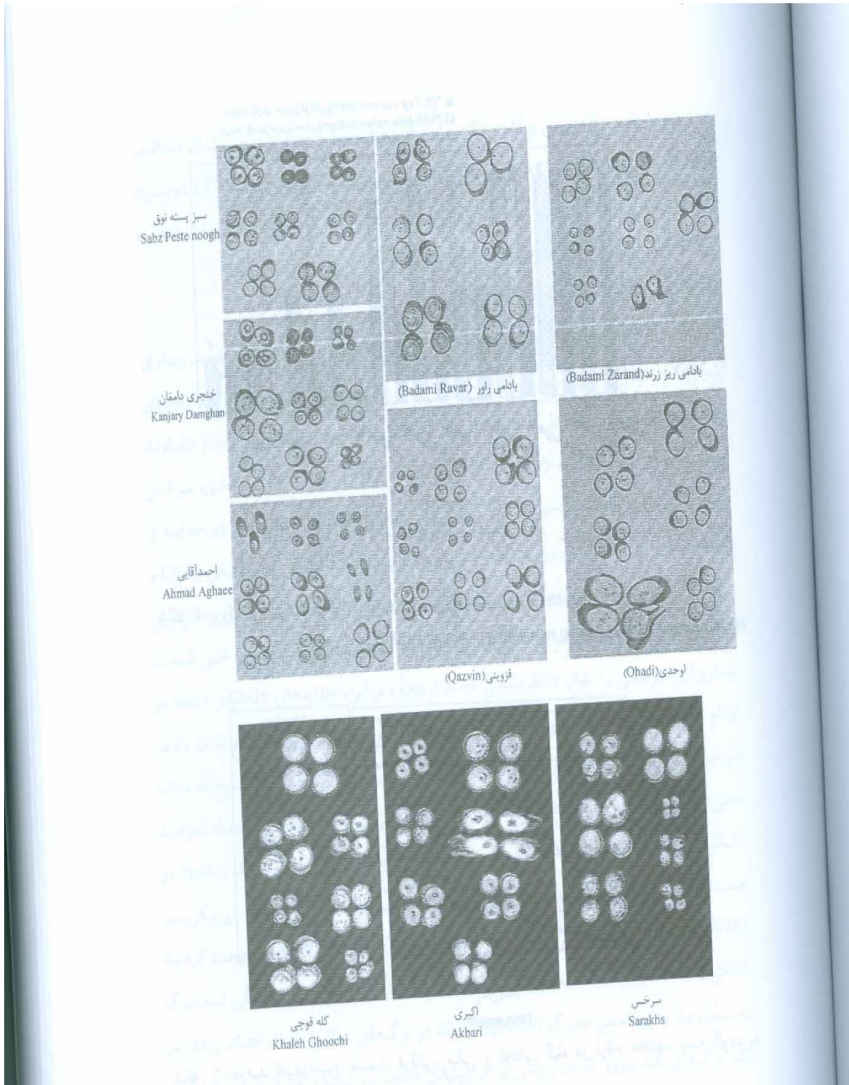
شکل ۲- شاخص شدت بیماری (A)، میزان کاهش ارتفاع گیاه (B)، شاخص قهوه‌ای شدن (C) و درصد مرگ و میر دانه‌ها (D) در ارقام مختلف پسته آلوده به *Verticillium dahliae*.

Fig. 2. Disease severity index (A), Plant height reduction (B), Browning index (C), and Percent of plant mortality (D) in different cultivars of *Pistacia vera* inoculated with *Verticillium dahliae*.



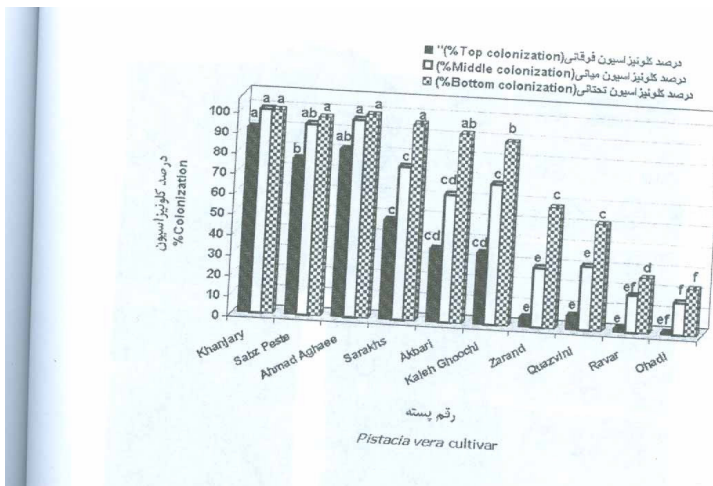
شکل ۳- شاخص پنج درجه‌ای مورد استفاده جهت سنجش تغییر رنگ آوندی (قهوه‌ای شدن) در مقاطع عرضی ساقه دانه‌های پسته.

Fig. 3. Five grade index used for assessment of vascular discoloration in cross section of pistachio 3 stem seedling.



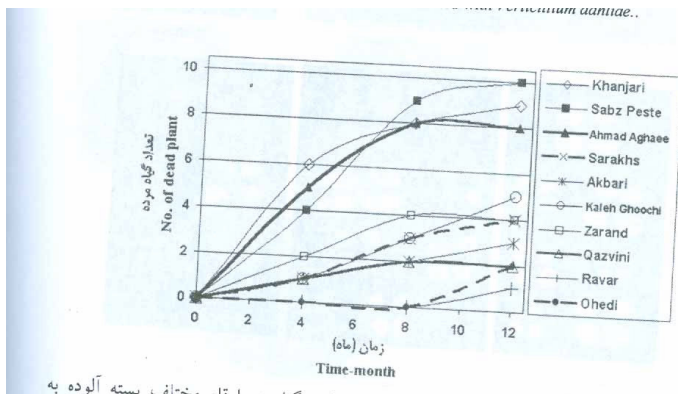
شکل ۴- میزان تغییر رنگ آوندی در مقاطع عرضی ساقه ارقام مختلف پسته.

Fig. 4. Degree of discoloration in stem crosses of different *Pistacia vera* cultivars.



شکل ۵- روند مرگ و میر در ارقام مختلف پسته آلوده به *Verticillium dahliae*.

Fig. 5. Mortality trend in *Pistacia vera* cultivars inoculated with *Verticillium dahliae*.



شکل ۶- درصد کلونیزاسیون قسمت فوقانی، میانی و تحتانی گیاه در ارقام مختلف پسته آلوده به

Verticillium dahliae

Fig. 6. Percent of colonization of stem (top, middle and bottom) of *Pistacia vera* infected with *Verticillium dahliae*.

ارقام سرخس، کله قوچی و اکبری ظاهراً به یک میزان به قارچ حساسیت نشان داده‌اند. میزان کلونیزاسیون در قسمت تحتانی ساقه شاخص مناسبی جهت بررسی واکنش ارقام نبود، چرا که ارقامی که از نظر سایر صفات در گروه‌هایی متفاوتی قرار داده شده بودند با توجه به این شاخص در یک گروه جای گرفتند (شکل ۶).

برهمکنش ارقام پسته و جدایه‌های *V. dahliae*

مقایسه برهمکنش میزان-بیمارگر با استفاده از نتایج بدست آمده از شاخص شدت بیماری (شکل ۷ - A) و درصد کلونیزاسیون (شکل ۷ - B) ارقام پسته مایه‌زنی شده با جدایه‌های مختلف *V. dahliae* در شرایط گلخانه نشان داد که واکنش جدایه‌های مختلف با ارقام متفاوت است. به طوری که دو جدایه D-5 و Se-4 با پاتوتیپ برگریز، در ارقامی چون اوحدی، سرخس و سبزپسته نوق از لحاظ شاخص شدت بیماری‌زایی تفاوتی نشان ندادند و هر دو جدایه از شدت بیماری‌زایی بالایی بر روی هر سه رقم برخوردار بودند. برعکس در جدایه‌های CS-26 و tom-1 با پاتوتیپ غیربرگریز، بالاترین شاخص بیماری متعلق به رقم سبزپسته نوق و کمترین شاخص بیماری متعلق به رقم اوحدی بود در حالی که هر دو جدایه روی رقم سرخس شدت بیماری‌زایی متوسطی را نشان دادند (شکل ۷ - A). علاوه بر این، جدایه‌های CS-26 و tom-1 در ارقام اوحدی، سرخس و سبزپسته نوق به ترتیب میزان کلونیزاسیونی از زیاد تا کم نشان دادند. در حالی که جدایه‌های D-5 و Se-4 از نظر صفت مذکور بر روی هر سه رقم هیچ اختلاف معنی‌داری در سطح ۱٪ نداشتند و در همه ارقام میزان بالایی از کلونیزاسیون را ایجاد نمودند (شکل ۶ - B). شدت علائم ایجاد شده توسط جدایه‌هایی با پاتوتیپ برگریز (D-5 و Se-4) در همه ارقام بسیار شدید بود (شکل ۷ - B). اما جدایه‌های غیربرگریز (CS-26 و tom-1) بسته به نوع واکنش رقم، علائم متغیری از شدید تا خفیف ایجاد کردند (شکل ۷ - A). اولین نشانه بیماری در آلودگی ارقام به جدایه‌های برگریز، پیچیدگی لبه برگ به سمت بالا و روخمشی دمبرگ (epinasty) بود که در برگ‌های بالایی اتفاق افتاد. زردی در اکثر برگ‌های گیاه بروز کرده و پس از آن ریزش شدید برگ‌ها و مرگ از انتهای گیاه (die back) رخ داد. در مواردی آلودگی به این جدایه‌ها منجر به مرگ گیاه نمی‌شد و پس از مدتی جوانه‌های پائینی ساقه رشد کرده و گیاهی با علائم کمبود مواد غذایی ظاهر شد تغییر

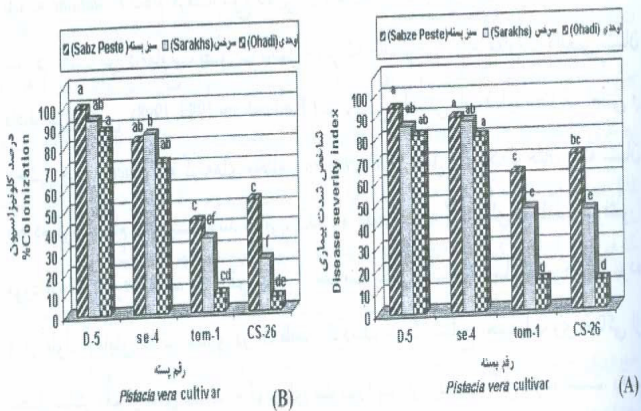
رنگ آوندی در ساقه اصلی همه ارقام مایه‌زنی شده با جدایه‌های برگریز و جدایه‌های غیر برگریز مشاهده شد. اما این تغییر رنگ آوندی در همه ارقام مایه‌زنی شده با جدایه‌های برگریز تا انتهای گیاه ولی در جدایه‌های غیربرگریز و در ارقام متحمل مثل اوحدی تا نیمه پائینی گیاه و در دو رقم حساس و بسیار حساس سرخس و سبز پسته نوق تا بالای گیاه مشاهده شد. میزان قهوه‌ای شدن بافت آوندی در مقاطع عرضی ساقه دانه‌های ارقام مختلف مایه‌زنی شده با جدایه‌های غیربرگریز متفاوت بود، بطوریکه در رقم خنجری دامغان شدت تغییر رنگ آوندی نسبت به دو رقم دیگر بیشتر بود.

بحث

در اکثر مطالعات بیماری‌زایی، جهت مایه‌زنی گیاهان با ایناکولوم پایدار، از خاک‌های زراعی با آلودگی طبیعی و جمعیت مشخصی از میکرواسکلروت قارچ استفاده شده است (MacDonald *et al.* 1992, Ashworth 1983)، تولید فراوان میکرواسکلروت در محیط‌کشت (در آزمایشگاه) اغلب وقت‌گیر و دشوار بوده و تحت تأثیر عوامل مختلف محیطی و تغذیه‌ای می‌باشد (Heale & Isaac 1965, Hall & Ly 1972). در این تحقیق، جمعیت فراوان و پایداری از میکرواسکلروت‌های *V. dahliae* بدست آمد. در روش بکار گرفته شده، امکان جداسازی میکرواسکلروت‌ها از سایر اندامهای قارچی (ریسه و کنیدیوم) و نگهداری طولانی مدت آنها بدون از دست دادن قدرت جوانه‌زنی وجود داشت. نگهداری توده میکرواسکلروتی حاصله به مدت چهار ماه در محیط آزمایشگاه موجب کاهش میزان جوانه‌زنی آنها نگردید.

بر اساس نوع واکنش ارقام پسته به *V. dahliae* سه گروه متمایز بسیار حساس، حساس و متحمل تشخیص داده شد. ارقام اوحدی، بادامی راور، بادامی ریز زرد و قزوینی که کمترین درصد کلونیزاسیون ساقه، شاخص بیماری، شاخص قهوه‌ای شدن و کاهش ارتفاع گیاه را دارا بودند، نسبت به بقیه ارقام از حساسیت بسیار کمتری در مقابل *V. dahliae* برخوردار بوده و بصورت گروه نسبتاً متحمل در نظر گرفته شدند. در حالی که ارقام سبز پسته نوق، خنجری دامغان و احمدآقایی با بالاترین درصد کلونیزاسیون ساقه، شاخص بیماری، میزان تغییر رنگ آوندی و کاهش ارتفاع گیاه از حساسیت بیشتری در مقایسه با سایر ارقام برخوردار بوده و

بصورت گروهی بسیار حساس تلقی شدند. در مقابل، سه رقم باقیمانده سرخس، اکبری و کله قوچی که در اغلب موارد از نظر صفات مورد بحث در حدواسط دو گروه قبل قرار داشتند بصورت گروه حساس طبقه‌بندی شدند.



شکل ۷- اثر متقابل چهار جدایه *Verticillium dahliae* بر سه رقم پسته براساس شاخص شدت بیماریزایی (A) و درصد کلونیزاسیون (B).

Fig. 7. Interaction of *Verticillium dahliae* and three *Pistacia vera* cultivars on the basis of disease severity index (A) and % colonization (B).

اگرچه ارقام درون یک گروه (متحمل، حساس و یا بسیار حساس) از لحاظ آماری تفاوت قابل ملاحظه‌ای با یکدیگر نداشتند ولی در مجموع و بخصوص با توجه به نتایج بدست آمده از بررسی برخی صفات از قبیل شاخص شدت بیماری، میانگین درصد کلونیزاسیون بافت‌های آوندی در قسمت فوقانی ساقه، شاخص قهوه‌ای شدن، زمان ظهور علائم و روند مرگ و میر مشخص شد که ارقام اوحدی و بادامی راور در این آزمایش نسبت به سایر ارقام پسته همگروه خود از تحمل بهتری در برابر *V. dahliae* برخوردار بوده‌اند. نتایج حاصل از مشاهدات در این تحقیق نشانگر وجود اختلافات ذاتی موجود در بین ارقام پسته گونه *P. vera* می‌باشد. بنابراین بنظر می‌رسد که در ارقام مختلف *P. vera* ایران منابع مقاومت به قدر کافی وجود دارد که بستری مناسب برای اصلاح ارقام تجاری پسته ایجاد کند. این تنوع در میزان حساسیت ارقام مختلف نسبت به *V. dahliae* توسط محققان دیگر مورد بررسی و تأیید قرار گرفته است. در تحقیق گسترده‌ای که توسط Wilhelm و Taylor (1965) بر روی درختان زیتون از نظر مقاومت پایه به *V. dahliae* انجام گرفت، تنوع بالایی در دانه‌های آن از نظر مقاومت به بیماری دیده شد. در اغلب موارد مقاومت بصورت تحمل ظاهر شده اما برخی پایه‌ها مقاومت واقعی نشان دادند. بنی‌هاشمی (1989, 1998) در بررسی واکنش پایه‌های مختلف اهلی و وحشی جنس *Pistacia* به گونه‌های مختلف *Phytophthora* عامل انگومک درختان پسته نشان داد که گرچه تمام ارقام پسته مانند بادامی، فندق و کله‌قوچی به گونه‌های مختلف فیتوفتورا مورد آزمایش آلوده شدند، ولی رقم بادامی از مقاومت بیشتری نسبت به سایرین برخوردار بوده و در طول آزمایش علائم بیماری در آن ظاهر نگردیده است. نتایج تحقیقات وی حاکی از تحمل بیشتر رقم اوحدی نسبت به گونه‌های فیتوفتورا پس از ارقام بادامی بوده است. رقم اوحدی پسته‌ای است مطبوع، پربار، درشت با ظاهری جالب توجه که بیش از ۶۰٪ از اراضی زیرکشت پسته در رفسنجان را به خود اختصاص داده است (Sheibani 1996). با توجه به ویژگی‌های فوق و تحمل نسبتاً بالای آن در مقابل دو بیمارگر (Banihashemi 1998) *Phytophthora* و *V. dahliae* این رقم یک موفقیت تصادفی برای منطقه محسوب می‌شود.

انتخاب پایه از مهمترین مسائلی است که در زمان احداث هر باغ پسته باید به آن توجه داشت. ارقام بادامی، قزوینی و سرخس از پایه‌های متداول پسته در ایران می‌باشند. در تحقیق

موجود، ارقام بادامی (ریز ززند و راور) و قزوینی بیشترین تحمل را در میان پایه‌های مورد بررسی نشان دادند. پایه بادامی و قزوینی ضمن داشتن مقاومت خوبی به شوری (Mohammadi 2000, Sepaskhah & Maftoun 1988)، تحمل بالایی نیز به عوامل انگومک ناشی از گونه‌های فیتوفتورا دارند (Banihashemi 1998). لذا استفاده از این پایه‌ها در زمین‌های آلوده به عوامل پوسیدگی طوقه و ریشه و عامل پژمردگی ورتیسیلیومی با در نظر گرفتن سایر تدابیر بهداشتی و زراعی قابل توصیه است. عکس العمل انواع بادامی (ریز ززند و راور) نسبت به *V. dahliae* یکسان نبود. این تنوع غیر قابل انتظار نیست، چرا که پسته درختی دو پایه است و بذور حاصل خلوص ژنتیکی چندانی ندارند و ممکن است واکنش‌های متفاوتی نشان دهند. این نتایج در سایر تحقیقات نیز حاصل شده است مورگان و همکاران (Morgan et al. 1992) نشان دادند که KAC-atlantica در مقایسه با Standard-atlantica بطور معنی‌داری در مقابل پژمردگی ورتیسیلیومی مقاوم‌تر است. بطور مشابه رابع و ویلهلم (Raabe & Wilhelm 1978) نشان دادند که از نظر مقاومت به پژمردگی ورتیسیلیومی در ارقام *P. atlantica* و ارقام *P. terebinthus* تنوع وجود دارد. یکی از نتایج این تنوع تولید هیبریدهای بین گونه‌ای است که گاه طبقه‌بندی افراد را مشکل می‌سازد. بعنوان مثال، قبلاً والد ماده UCB-1 به جای *P. atlantica*، *P. terebinthus* و *P. lentiscus* شناخته شده بود (Teviotdale 1995). نکته قابل توجه این است که تنوع موجود در این جنس حاکی از وجود گنجینه ژنتیکی بزرگی است که می‌توان از آن برای اصلاح و کمبود و بهبود ویژگیهای این گیاه بهره جست.

برای بدست آوردن نتایج قابل اعتماد در انتخاب ارقام، توجه به تغییرپذیری بیمارگر ضروری است. لذا قبل از اقدام برای تهیه ارقام مقاوم باید ویژگی‌های ژنتیکی و بیماریزایی جدایه‌ها و پراکنندگی پاتوتیپ‌های بیماریزای هر گونه تعیین گردد. براساس نتایج بدست آمده از برهمکنش میزبان - بیمارگر بر روی ارقام تجاری پسته، شدت علائم، شاخص بیماری و درصد کلونیزاسیون جدایه‌های برگریز بر روی ارقام مختلف نسبت به جدایه‌های غیربرگریز بیشتر بود. علاوه بر این بر اساس نتایج حاصله مشخص شد که واکنش جدایه‌های پسته بر روی ارقام مختلف همانند جدایه‌های غیربرگریز از دیگر میزبان‌ها بوده، و در جدایه‌هایی با پاتوتیپ برگریز این گروه‌بندی در بین ارقام دیده نشد. لذا تقسیم بندی ارقام در سه گروه

حساس، بسیار حساس و متحمل تنها در برهمکنش جدایه‌های غیربرگریز با ارقام پسته قابل توجه است. این امر توسط سایر محققین نیز تأیید شده است. در مطالعه‌ای که توسط لینارد/کیس و همکاران (Linardakis *et al.* 1980) در یونان انجام شد رقم Manzanillo زیتون که توسط ویلهلم و تیلور (Wilhelm & Taylor 1965) در کالیفرنیا بسیار حساس به *V.dahliae* شناخته شده بود، در بین ۵ رقم مورد آزمایش، بیشترین مقاومت را داشت. این مسئله اهمیت پاتوتیپ، منشاء و میزان ویرولانس قارچ مورد استفاده در آزمون‌های غربال‌گری جهت مقاومت را نشان می‌دهد.

طولانی بودن چندین دو رگ‌گیری (زمان زاد و ولد)، دو پایه بودن و دگرگشن‌گیری، از نظر زیست‌شناسی، برنامه‌های اصلاحی گیاه پسته را دچار محدودیت کرده است (Ferguson *et al.* 1995). دو پایه بودن و دگرگشنی (out crossing)، حد بالایی از ناخالصی جنسی (هتروزیگوتی) را اجتناب‌ناپذیر می‌سازد. علاوه بر این در هر نسل نیمی از نتاج از جنس نر بوده و نمی‌توان آنها را از نظر هر خاصیت مربوط به باردهی مورد ارزیابی قرار داد و این خود باعث کاهش کارایی در امر انتخاب می‌شود (Perfitt 1995). با وجود این مشکلات و به سبب شناخته نشدن ژنهای پرارزش در پسته شاید نتوان کاربرد شیوه اصلاح گیاهان بوسیله بک کراس (back cross) یا شجرهای (pedigree) را در این محصول مناسب دانست. بنابراین ازدیاد نهال پسته بصورت غیرجنسی و از طریق کشت بافت جایگزین بهتری در جهت یافتن ترکیب‌های برتر ژنتیکی تثبیت شده در این محصول می‌باشد.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (233-236) متن انگلیسی مراجعه شود.

نشانی نگارندگان: ایمان هادی‌زاده، دکتر ضیاء‌الدین بنی‌هاشمی، بخش گیاهپزشکی، دانشکده
کشاورزی، دانشگاه شیراز