مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی
سال دهم ـ شماره اول ـ بهار ۱۳۸۲
www.magiran.com/jasnr

تعیین گروه بیماریزایی جدایه‌های قارچ *Ascochyta rabiei* در ایران

فرهاد شکوهی‌فر[۱]، عبدالرضا باقری[۲]، ماهرخ فلاحتی رستگار[۲] و سعید ملک زاده[۲]
[۱]پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد، [۲]دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ دریافت: ۸۰/۱۲/۲۱ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۱/۵/۵

چکیده

به منظور تعیین گروه‌های پاتوتیپی قارچ عامل بیماری برق‌زدگی نخود *Ascochyta rabiei* (Pass) L. در ایران، ۲۶ جدایه از ۱۶ استان کشور انتخاب و آزمون بیماریزایی با استفاده از ۱۶ رقم افتراقی در شرایط گلخانه انجام شد و نتایج تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها حاکی از تأثیر معنی‌دار جدایه‌ها در بروز بیماری و وجود تنوع بیماریزایی در بین آنها بود. گروه‌بندی جدایه‌ها براساس الگوی بیماریزایی، قدرت بیماریزایی و تجزیه خوشه‌ای انجام شد. براساس الگوی بیماریزایی سه نژاد R1، R5، R6 و دو پاتوتیپ P1، P2 شناسایی شد، در حالیکه بر اساس قدرت بیماریزایی تنها سه گروه پاتوتیپی و بوسیلهٔ تجزیه خوشه‌ای دو گروه قوی و ضعیف به ترتیب با میانگین بیماریزایی ۶/۲۱ و ۳/۸۷ تعیین گردید. همچنین در این راستا روش ابداعی مبتنی بر تجزیه واریانس نیز مورد استفاده قرار گرفت. در این روش براساس نتایج مقایسه میانگین‌ها، کلیه ارقام افتراقی در شش سطح مقاومتی تفکیک و براساس قدرت بیماریزایی لازم جهت شکستن این سطوح کلیه جدایه‌ها در شش گروه پاتوتیپی P1، P2، P3، P4، P5 و P6 قرار گرفتند. این روش در مقایسه با سایر روشها قابلیت بهتری در تفکیک جدایه‌ها نشان داد و جدایه‌ها در گروه‌های پاتوتیپی تعیین شده بطور مطلوبتری توزیع شدند. در بین گروه‌های پاتوتیپی شناسایی شده، پاتوتیپ شش با سه جدایه از استانهای تبریز، مرکزی و همدان به دلیل قدرت بیماریزایی بسیار بالا حائز اهمیت بیشتری بود. قدرت بیماریزایی این پاتوتیپ به اندازه‌ای بود که ارقام مورد مطالعه در این بررسی هیچگونه مقاومتی در برابر آن نشان ندادند. لذا لازم است پروژه‌های اصلاحی جهت گزینش ارقام مقاوم متناسب با گروه‌های پاتوتیپی شناسایی شده در مناطق مختلف طراحی گردد.

واژه‌های کلیدی: *Ascochyta rabiei*، پاتوتیپ، نخود، ارقام افتراقی.

مقدمه

بیماری برق‌زدگی یکی از مخربترین بیماریهای نخود *Cicer aritinum* L. در بیشتر مناطق دنیا می‌باشد (۲). عامل بیماری قارچ *Ascochyta rabiei* (Pass) Lab. می‌باشد و تاکنون در ۳۱ کشور جهان از جمله ایران گزارش شده است (۱و۱۰). در مناطق دارای آب و هوای مدیترانه‌ای و کشت‌های زمستانه خسارت ناشی از این بیماری چندین برابر می‌شود (۱). استفاده از ارقام مقاوم یکی از ساده‌ترین و اقتصادی‌ترین راه‌های کنترل این بیماری است (۱۶). در این راستا همه ساله ارقام زیادی با سطوح مقاومتی مختلف اصلاح و معرفی می‌شوند، ولی مقاومت این ارقام در یک منطقه پایدار نیست و همچنین در مناطق مختلف واکنش متفاوتی نشان می‌دهند که مهمترین عامل آن اختلاف سطح بیماریزایی جمعیت این پاتوژن در مناطق مختلف و همچنین وجود تنوع در قارچ عامل بیماری می‌باشد (۱۳). بنابراین شناسایی پاتوتیپها و قدرت بیماریزایی هر یک در هر منطقه برای شناسایی و معرفی منابع مقاومت مناسب و ضروری است. بدین منظور با بکارگیری گروهی از ارقام افتراقی با سطوح مقاومتی مختلف، می‌توان جمعیت پاتوژن را در هر منطقه مورد بررسی قرار داد.

مطالعات زیادی برای تعیین تنوع بیماریزایی و گروه‌بندی جدایه‌ها با استفاده از ارقام افتراقی انجام شده است. بعضی از محققان براساس تعریف نژاد (نژاد، یک زیر گروه از یک پارازیت می‌باشد که بوسیله واکنش اختصاصی در مقابل ارقام مختلف از یک میزبان شناسایی می‌شود)، تنوع این پاتوژن را تقسیم‌بندی کردند. در این راستا با استفاده از چهار رقم دو نژاد و یک بیوتیپ از نژاد ۲ در جدایه‌های جمع‌آوری شده از هندوستان شناسایی شده است (۱۸). در سوریه نیز با استفاده از دستهٔ دیگری از ارقام افتراقی، جدایه‌ها در ٦ نژاد با الگوی بیماریزایی مختلف تقسیم شدند (١٤). در مطالعهٔ دیگری جدایه‌های پاکستان و ترکیه بر این اساس به سه نژاد و پنج گروه بیماریزا تفکیک شدند (۱۱). در اسپانیا الگوی بیماریزایی مشابه با نژاد ۱ در جدایه‌های جمع‌آوری شده مشاهده شد (۱۳). برخی دیگر از محققان با توجه به تعریف پاتوتیپ (گروه‌بندی جدایه‌ها بر اساس قدرت بیماریزایی آنها روی میزبان و شکستن سطوح مقاومتی آن) تنوع مشاهده شده در بیماریزایی این پاتوژن را گروه‌بندی کردند. بر این اساس جدایه‌های سوریه با استفاده از سه رقم ILC1929، ILC482 و ILC3279 به عنوان سطوح مقاومتی حساس، نیمه‌حساس و مقاوم در سه گروه پاتوتیپی تفکیک شدند (۱۷). این روش در پاکستان نیز جهت گروه‌بندی ۱۳۰ جدایه با موفقیت بکارگرفته شده است (۸) ولی در مطالعهٔ انجام شده در تونس ارقام ILC482 و ILC3279 نماینده مناسبی برای سطوح مقاومتی نبودند و نسبت به کلیه جدایه‌ها حساسیت نشان دادند (۷). در ایران نیز مطالعات متعددی در سالهای اخیر جهت شناسایی و گروه‌بندی تنوع این پاتوژن بعمل آمده است. در سال ۱۳۷۹ الگوی بیماریزایی ۱۱۸ جدایه از ایران با نژادهای رایج در سوریه مقایسه شد و ٦ نژاد فیزیولوژیک از این پاتوژن گزارش گردید (۵). همچنین در گزارش دیگری وجود نژادهای ٤ و ٦ مورد تأیید قرار گرفت (٤).

در مطالعات بعدی روش تجزیهٔ خوشه‌ای نیز مورد استفاده قرار گرفت و بر این اساس ٤٣ جدایه جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران در سه گروه تفکیک شدند (٤). در تمام روشهای بکارگرفته شده این نکته حائز اهمیت است که معمولاً آزمون بیماریزایی حساسیت بالایی به شرایط محیطی نشان می‌دهد و به همین دلیل توصیه شده است آزمون بیماریزایی در شرایط

محیطی تعریف شده و با بکارگیری یک روش استاندارد انجام شود تا نتایج بدست آمده قابل قیاس باشد (۱۳).

این مطالعه با هدف شناسایی گروه‌های پاتوتیپی جدایه‌های *A. rabiei* و تعیین الگوی پراکنش آنها در ایران به منظور طراحی برنامه‌های بهنژادی در نخود انجام شده است. در این مطالعه تلاش شده است با گروه‌بندی جدایه‌ها براساس روشهای مرسوم و آماری، قابلیت روشهای مختلف مورد ارزیابی قرار گیرد و ضمن معرفی روش مناسب، گروه‌های بیماریزایی این پاتوژن در کشور تعیین گردد.

مواد و روشها

این آزمایش در سال ۱۳۷۹ در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد بصورت آزمایش فاکتوریل با دو فاکتور شامل رقم افتراقی با ۱۶ سطح و جدایه‌های *A. rabiei* با ۲۶ سطح در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. مشخصات ارقام افتراقی و جدایه‌های مورد آزمایش در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱- مشخصات ارقام افتراقی نخود و ۲۶ جدایه قارچ ***A. rabiei*** جمع‌آوری شده از ایران.

ارقام افتراقی		جدایه‌های جمع آوری شده	
ردیف	نام رقم	شماره‌جدایه	منشاء
۱	ILC3279	۱، ۲	کرمانشاه
۲	ILC5928	۳، ٤	لرستان
۳	Pch-15	٥، ٦	فارس
٤	ILC1929	۷، ۸، ۹	ایلام
٥	ILC200	۱۰	تبریز
٦	ILC482	۱۱، ۱۲	مرکزی
۷	ILC202	۱۳، ۱٤، ۱٥	همدان
۸	ILC5127	۱٦	تهران
۹	ILC3996	۱۷	خراسان
۱۰	ILC194	۱۸	کردستان
۱۱	ILC72	۱۹	زنجان
۱۲	ILC7374	۲۰	قزوین
۱۳	ILC3856	۲۱، ۲۲	گلستان
۱٤	ILC215	۲۳	اردبیل
۱٥	ILC2956	۲٤، ۲٥	ارومیه
۱٦	ILC6260	۲٦	مازندران

آماده‌سازی مواد گیاهی: بذور ۱٦ رقم افتراقی از ایکاردا تهیه و با رعایت موارد قابل توجه در ازدیاد بذر، در مزرعه دانشکده تکثیر شد. بذور هم شکل و یکنواخت از هر رقم انتخاب و با استفاده از محلول هیپوکلریت سدیم ۱درصد به مدت ۲۰ دقیقه ضدعفونی سطحی شده و به مدت ۳٦ ساعت در شرایط مرطوب در دمای ۲۲° تا ۲٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. از هر رقم هفت

بذر جوانه زدهٔ همشکل در هر گلدان کشت و در قالب ۲۶ گروه ۱۶ گلدانی در دو تکرار در گلخانه با دمای متوسط ۲۴ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۶۰ درصد نگهداری شدند. پس از گذشت ۱۴ روز گیاهچه‌ها تا مرحلهٔ پنج تا هفت برگی رشد کرده و برای مایه‌زنی آماده شدند. در نهایت از هر رقم ۴ گیاهچه در هر گلدان انتخاب و برای آزمون بیماریزایی استفاده شد.

آماده‌سازی جدایه‌ها: ۲۶ جدایه به‌عنوان نمایندگان جدایه‌های جمع‌آوری شده از مناطق مختلف کشور براساس صفات ظاهری چون قطر کلنی، طول و قطر پیکنیدیوم از میان ۹۶ جدایه انتخاب و از اسپورهای حاصل از کشت ۱۴ روزهٔ آنها در محیط کشت جامد عصاره نخود[1] که در دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد و دورهٔ نوری ۱۴ ساعته نگهداری شده بود برای تهیه سوسپانسیون استفاده شد. از هر جدایه ۵۰۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون اسپور، با غلظت $1/6\times10^5$ اسپور در میلی‌لیتر تهیه شد.

مایه‌زنی: ۲۶ جدایه بطور تصادفی روی گروه‌های ۱۶ گلدانی در دو تکرار مایه‌زنی شدند. قبل از مایه‌زنی تمام گلدانها با پوششهای پلاستیکی پوشانده شدند و گلخانه در شرایط سایه با دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۹۰ درصد تنظیم و سوسپانسیون اسپوری روی گیاهچه‌ها تا ریزش اولین قطره از سطح برگ پاشیده شدند (۱۷). در کنار نمونه‌ها دو گروه نیز بطور تصادفی به‌عنوان شاهد نگهداری شد. به منظور عدم پراکنش اسپورها و فراهم کردن رطوبت مناسب برای جوانه‌زنی اسپورها به مدت ۷۲ ساعت روی گلدانها با پوشش پلاستیکی پوشانده شد و پس از برداشتن آنها از روی گلدانها، گلخانه در شرایط رطوبت ۹۰ درصد و دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. پس از گذشت یک هفته علائم بیماری روی برگها و دمبرگها مشاهده شد ولی ثبت شدت بیماری ۱۴ روز پس از مایه‌زنی هنگامیکه بیماری بخوبی پیشرفت کرده و تعدادی از ارقام حساس با مرگ کامل مواجه شده بودند بر اساس درجه‌بندی زیر انجام شد (۱۷):

۱. عدم مشاهده زخم
۲. نقاط رنگ پریده کوچک و محدود
۳. زخمهای طویل شده و بیضی شکل
۴. زخمهای طویل شده و محاط در دور ساقه
۵. ترد شدن ساقه در محل زخم
۶. شکستگی ساقه در محل زخم
۷. گسترش زخم‌ها به پایین ساقه
۸. مرگ نسبی گیاه
۹. مرگ کامل گیاه

تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها: تجزیه داده‌های حاصل بصورت آزمایش فاکتوریل و در قالب طرح کاملا تصادفی با دو تکرار بوسیلهٔ نرم افزار آماری MSTATC انجام شد و مقایسه میانگین سطوح رقم (فاکتور اول با ۱۶ سطح)، جدایه (فاکتور دوم با ۲۶ سطح) و اثر متقابل آنها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد.

گروه‌بندی جدایه‌ها: به منظور گروه‌بندی جدایه‌ها چندین روش بکارگرفته شد. در ابتدا واکنش ارقام مطابق با روش ردی و کبابه (۱۴) بسته به شدت بیماری مشاهده شده تعیین شد و میزان خسارت کمتر از پنج به عنوان مقاوم (R) و بیشتر از آن

1- Chickpea Seed Meal Agar (CSMA).

تحت عنوان حساس در نظر گرفته شد. سپس جدایه‌ها به سه روش مرسوم یعنی براساس الگوی بیماریزایی، قدرت بیماریزایی و تجزیه خوشه‌ای گروه‌بندی شدند. در نهایت با استفاده از نتایج تجزیه واریانس روش جدیدی برای گروه‌بندی و تعیین گروه پاتوتیپی بکارگرفته شد.

گروه‌بندی جدایه‌ها بر اساس الگوی بیماریزایی: در این روش دو دسته از ارقام جهت شناسائی گروه‌های بیماریزایی بکارگرفته شد. در دستهٔ اول مطابق با گزارش ردی و کبابه (١٤) به ترتیب مقاومت از ارقام ILC1929، ILC5127، ILC3279 و ILC3996 استفاده شد و در دستهٔ دوم براساس نتایج سینگ و ردی (١٦) ارقام ILC1929، Pch15، ILC194، ILC3996، ILC72، ILC202 و ILC5928 بکار گرفته شدند.

گروه‌بندی جدایه‌ها بر اساس قدرت بیماریزایی: در این روش مطابق توصیه آدوپا و همکاران (١٧) سه رقم ILC1929، ILC482 و ILC3279 به ترتیب به عنوان سه سطح مقاومت (حساس، نیمه‌حساس و مقاوم) در نظر گرفته شدند و براساس قدرت بیماریزایی گروه پاتوتیپی جدایه‌ها تعیین شد. در این روش جدایه‌هایی که سطح مقاومت ١ را شکسته ولی قادر به شکستن سطح مقاومت ٢ نبودند در گروه پاتوتیپ I و در صورت شکستن سطح مقاوت ٢ و ٣ به ترتیب به‌عنوان پاتوتیپ II و III گروه‌بندی شدند.

گروه‌بندی جدایه‌ها براساس تجزیه خوشه‌ای: در این روش براساس شدت بیماری مشاهده شده روی ١٦ رقم افتراقی بکاربرده شده در آزمایش، فاصله جدایه‌ها با استفاده از فرمول زیر تعیین شد و ماتریس فاصله‌ها بدست آمد.

$$d_{ij} = [\ ?\ (X_{ik} - X_{jk})^2\ ]^{1/2}$$

که در آن d_{ij} فاصله اقلیدسی بین جدایه‌های i ، j ؛ k تعداد صفات مورد مطالعه ؛ X_{ik} و X_{jk} ارزش یک صفت در جدایه‌های i و j می‌باشد.

جهت تجزیه خوشه‌ای، از روش UPGMA[1] و برنامه آماری Statistica V.,5.5 استفاده شد و بر این اساس روابط خویشاوندی جدایه‌ها تعیین گردید. در این روش مبنای گروه‌بندی جدایه‌ها فاصله معادل سطح اطمینان ٩٠ درصد در نظر گرفته شد. برای تعیین فاصلهٔ معادل ٩٠ درصد، واریانس اعداد ماتریس فاصله‌ها محاسبه و با توجه به عدد معادل سطح ٩٠ درصد در منحنی استاندارد t از فرمول زیر استفاده شد. در این فاصله جدایه‌ها در گروه‌هایی با سطح اختلاف ٩٠ درصد گروه‌بندی شدند.

$$\text{فاصلهٔ معادل سطح اطمینان ٩٠درصد} = X + S\ .t_{\alpha=10\%}$$

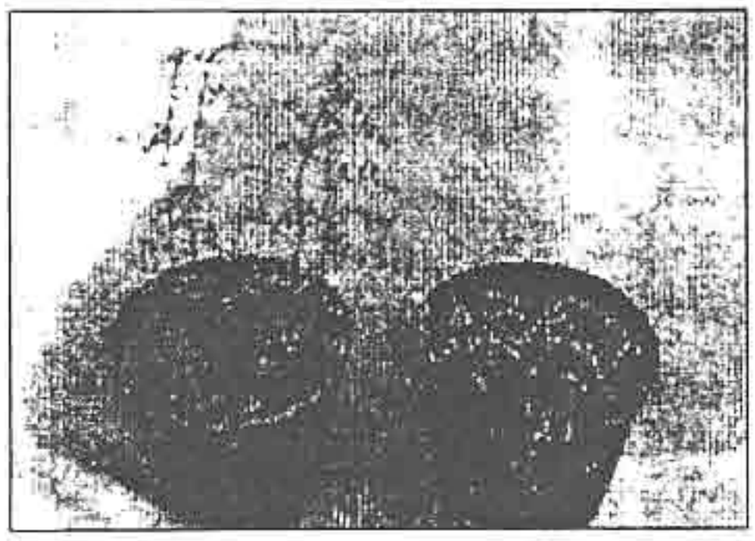
که در آن X میانگین ماتریس فاصله‌ها ، S انحراف معیار ماتریس فاصله‌ها و t عدد نشان دهنده سطح ٩٠ درصد در منحنی استاندارد.

گروه‌بندی جدایه‌ها براساس روش مبتنی بر تجزیه واریانس: در این روش ابتدا سطوح مقاومتی ارقام مقاوم براساس نتایج مقایسه میانگین‌ها تعیین شد و سپس میانگین قدرت بیماریزایی هر ایزوله روی ارقام مربوط به هر سطح مقاومتی مشخص گردید. میانگین بیماری کمتر از ٥ به عنوان مقاوم و بقیه به عنوان حساس در نظر گرفته شدند. بدین وسیله گروه‌های پاتوتیپی تعریف و جدایه‌های مربوط به هر گروه تعیین گردید.

1- Unweighted Pair- Group Method for the Arithmatic Average

نتایج و بحث

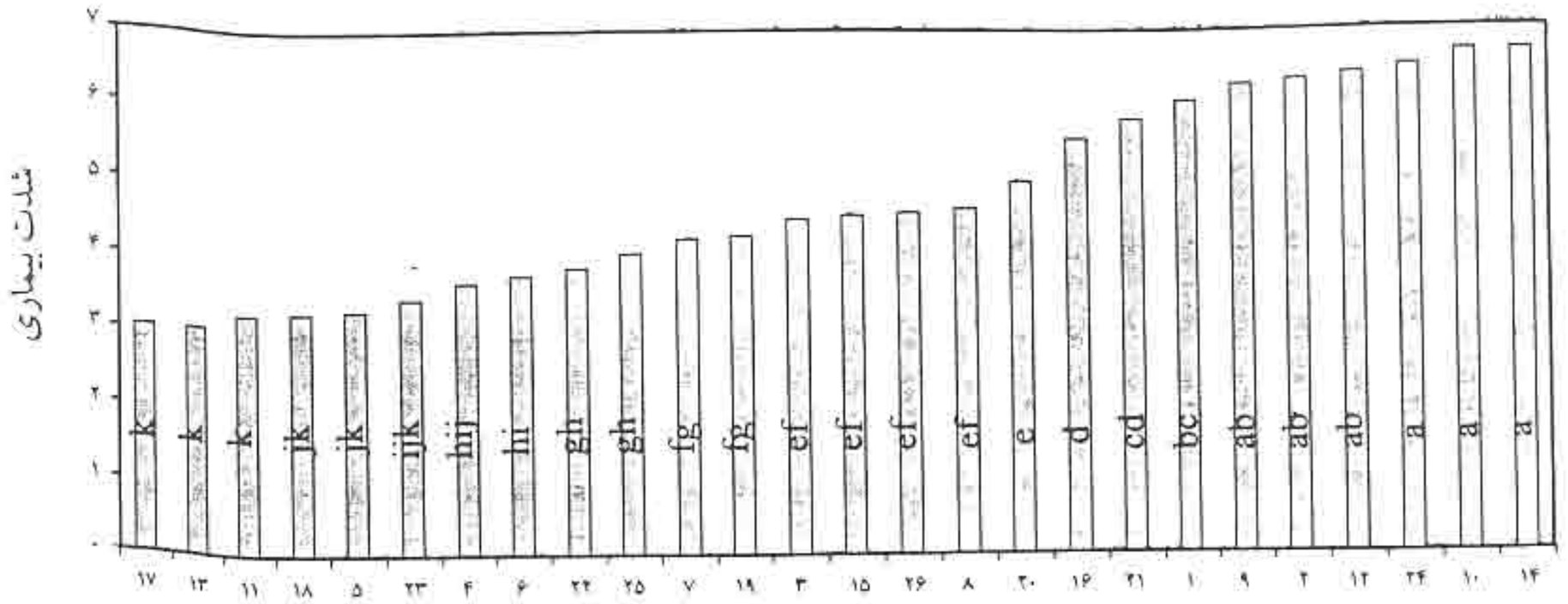
یک هفته پس از مایه‌زنی علائم بیماری روی برگ و دمبرگ گیاهچه‌های تیمار شده بصورت زخمهای تیره رنگ ریز مشاهده شد و با گذشت ۱٤ روز پس از مایه‌زنی بیماری بخوبی پیشرفت کرد و تعدادی از ارقام حساس با مرگ کامل مواجه شدند (شکل ۱) در حالیکه در بقیهٔ ارقام طیفی از خسارت قابل مشاهده بود.یک هفته پس از مایه‌زنی علائم بیماری روی برگ و دمبرگ گیاهچه‌های تیمار شده بصورت زخمهای تیره رنگ ریز مشاهده شد و با گذشت چهارده روز پس از مایه‌زنی بیماری بخوبی پیشرفت کرد و تعدادی از ارقام حساس با مرگ کامل مواجه شدند (شکل ۱) در حالیکه در بقیهٔ ارقام طیفی از خسارت قابل مشاهده بود.



شکل ۱- مقایسه اثر بیماری روی رقم ILC 482 (حساس) و ILC202 (مقاوم).

در طول آزمایش هیچگونه علائم بیماری در گلدانهای شاهد مشاهده نشد که نشان داد پوششهای پلاستیکی بخوبی گلدانها را از یکدیگر تفکیک نموده و رطوبت را در حد مطلوبی نگهداری کرده‌اند. جدایه شماره ۱٤ اولین جدایه‌ای بود که علائم را روی رقم حساس ILC1929 ظاهر ساخت و در نهایت نیز بیشترین قدرت تخریب را از خود نشان داد. در مقابل جدایه شماره ۱۷ که از خراسان منشاء گرفته بود علائم ضعیف‌تری نسبت به دیگر جدایه‌ها نشان داد.

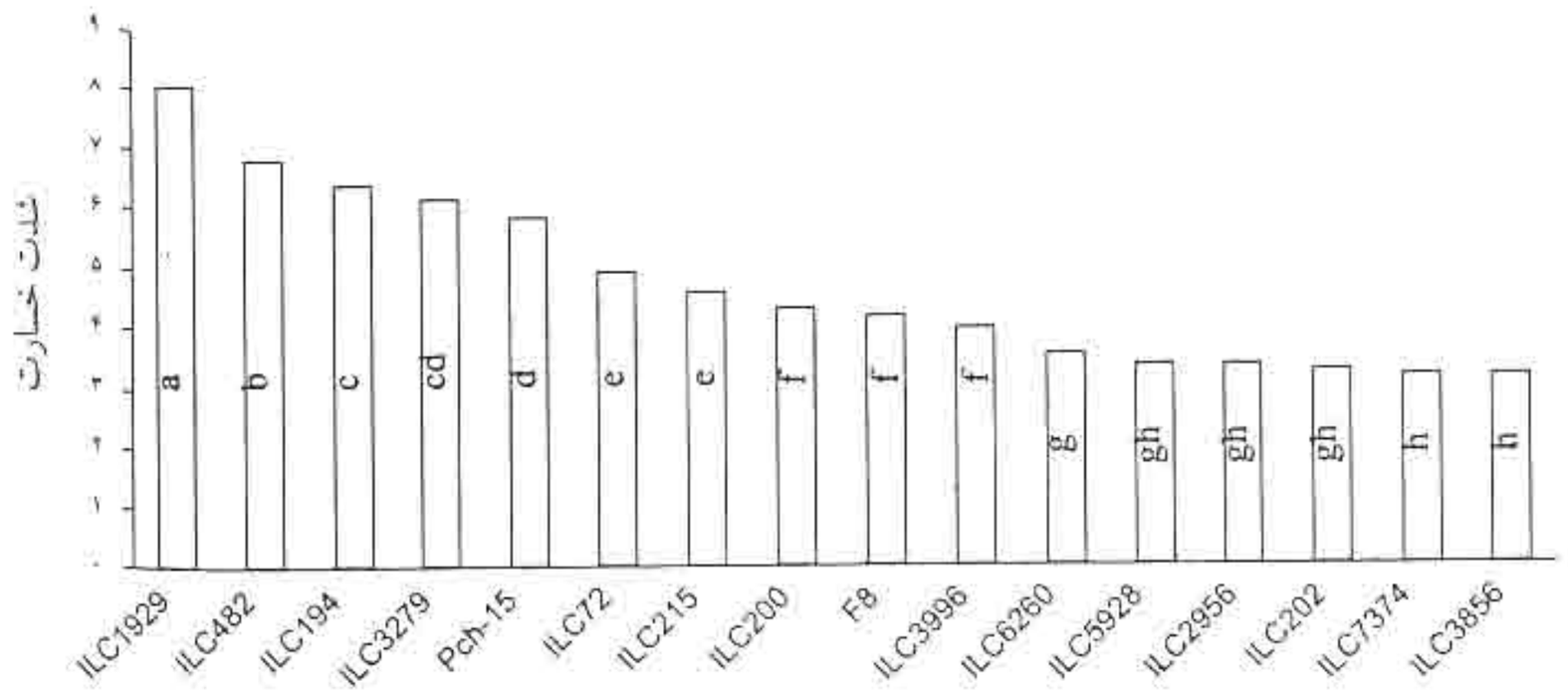
نتایج تجزیه آماری: بر اساس نتایج تجزیه واریانس اثر رقم، جدایه و اثر متقابل آنها معنی‌دار بود ($P<0.01$). این مسئله تأثیر هر یک از عوامل فوق را در بروز بیماری تأیید نمود. مقایسه میانگین‌ها اختلاف معنی‌داری در شدت بیماریزایی جدایه‌ها نشان داد (شکل ۲).



شکل ۲- نتایج مقایسه میانگین بیماریزایی جدایه‌ها روی لاین‌های افتراقی

بیشترین قدرت بیماریزایی با میانگین حدود ۷ مربوط به جدایه شمارهٔ ۱٤ از استان همدان بود در حالیکه جدایه شماره ۱۷ با میانگین بیماریزایی نزدیک به ۳ کمترین قدرت بیماریزایی را داشت و از استان خراسان جمع‌آوری شده بود. بیست و چهار جدایه دیگر حد واسط این محدوده قرار گرفتند.

مقایسه میانگین‌ها اختلاف معنی‌داری بین شدت بیماری مشاهده شده روی ارقام افتراقی نشان داد ($p<0.01$). این نتیجه بدان معنی است که ارقام افتراقی انتخاب شده از سطوح مقاومت متفاوتی تشکیل شده‌اند. وجود این تنوع در ارقام افتراقی برای شناسایی و تفکیک سطوح بیماریزایی جدایه‌ها ضروری می‌باشد، در واقع انتخاب ارقام افتراقی باید بگونه‌ای باشد که ژنهای مختلف مقاومت را شامل شود. نتایج مقایسهٔ میانگین شدت بیماری مشاهده شده روی ارقام افتراقی در شکل ۳ نشان داده شده است.



شکل ۳- نتایج مقایسه میانگین قدرت بیماری روی ارقام افتراقی.

با توجه به این نتایج مشاهده می‌شود که بیماری بخوبی روی رقم LC1929 (شاهد حساس) گسترش یافته و بیشترین میزان خسارت با میانگین حدود ۸ به این رقم وارد شده است. در

مرحلهٔ بعد رقم ILC482 که در حال حاضر به‌عنوان یک رقم مقاوم در ایران شناخته می‌شود با میانگین نزدیک به ۷ نسبت به دیگر رقمها خسارت بیشتری را متحمل شده است. در این مطالعه کمترین خسارت (نزدیک به ۳) روی رقم ILC3856 مشاهده شد. باید توجه داشت اعداد به میانگین خسارت ارقام در مقابل کلیهٔ جدایه‌ها مربوط می‌باشد.

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر متقابل بین جدایه و رقم نیز معنی‌دار می‌باشد ($P<0.01$)، یعنی ترکیب جدایه و ارقام مختلف در بروز بیماری و شدت آن مؤثر می‌باشد، به عبارت دیگر معنی‌دار شدن اثر متقابل رقم و جدایه مؤید این نکته است که همپوشانی ژنهای بیماریزا و مقاوم در جدایه‌ها و ارقام در بروز بیماری تأثیر مهمی دارد. در واقع دو جدایه که در یک گروه بیماریزایی قرار دارند در مقابل دو رقم که آنها نیز در یک گروه مقاومتی هستند قدرت بیماری متفاوتی نشان می‌دهند.

نتایج گروه‌بندی جدایه‌ها: نتایج گروه‌بندی بسته به ارقام افتراقی بکاربرده شده بسیار متغیر بود. گروه‌بندی جدایه‌ها براساس الگوی بیماریزایی بر روی ارقام افتراقی معرفی شده توسط ردی و کبابه(۱٤) نشان داد که کلیه جدایه‌ها در پنج گروه قابل تفکیک می‌باشند (جدول۲).

جدول۲ـ گروه‌بندی ۲٦ جدایه براساس الگوی بیماریزایی شش نژاد معرفی شده توسط ردی و کبابه (۱٤).

گروه	شماره جدایه	نژاد	ارقام افتراقی			
			ILC3996	ILC3279	ILC5127	ILC1929
۱	۲۳ ،۱۸ ،۱۷ ،۱۳ ،۱۱ ،۵	R1	R	R	R	S
۲	۲٦،۲۵،۲۲،۱۹،۱۵،۸،۷،٦،٤،۳	P1	R	S	R	S
۳	۲۰	P2	S	S	R	S
٤	۱٦	R5	R	S	S	S
۵	۲٤،۲۱،۱٤،۱۲،۱۰،۹،۲،۱	R6	S	S	S	S

نتایج حاصل نشان داد که علاوه بر نژادهای ۱، ۵ و ٦ دو پاتوتیپ P1 و P2 با قدرت بیماریزایی حد واسط نژادهای ۱و ۵ در کشور وجود دارد. در این روش اکثر جدایه‌ها در گروه نژادهای ۱ و ٦ و پاتوتیپ ۱ قرار گرفتند و پاتوتیپ ۲ تنها جدایه شمارهٔ ۲۰ را شامل شد. با توجه به الگوی بیماریزایی آن مشاهده می‌شود تنها رقمILC5127 که به عنوان یک رقم نیمه‌حساس در این گروه از رقمها بکارگرفته شده، در برابر این جدایه مقاومت نشان داده است. در توضیح این روند باید اشاره کرد که ارقام ILC3279 و ILC3996 هرچند از سطح مقاومت بالاتری نسبت به ILC5127 برخوردار می‌باشند ولی جمعیت پاتوژنی بکاربرده شده جهت گزینش این ارقام در روند اصلاح آنها با جمعیت این پاتوژن در کشور ما یکسان نمی‌باشد و به همین دلیل گروه‌های بیماریزایی در ایران مشاهده می‌شود که واکنشهای متضادی نسبت به سطوح مقاومتی ارقام نشان می‌دهند. این اختلافات در مطالعات دیگری نیز گزارش شده است (۹).

بر اساس الگوی بیماریزایی جدایه‌ها روی دسته دوم از ارقام افتراقی، کلیه جدایه‌ها در ۱۰

گروه تفکیک شدند (جدول۳). در این بین الگوی بیماریزایی پنج گروه با نژادهای R1، R2، R3، R5 و R6 گزارش شده از سوریه (١٤) مشابه بود ولی گروه‌های بیماریزایی حد واسطی نیز مشاهده شد که بیشتر آنها تک عضوی بودند.

جدول ۳- گروه‌بندی جدایه‌ها بر اساس الگوی بیماریزایی شش نژاد معرفی شده توسط سینگ و ردی (١٦).

گروه	شماره جدایه	نژاد	ارقام افتراقی						
			ILC5928	ILC202	ILC72	ILC3996	ILC194	PCH15	ILC1929
١	١٨،١٧،١٣،١١	R1	R	R	R	R	R	R	S
٢	٤	P1	R	R	R	R	S	R	S
٣	٢١	P2	R	R	S	S	S	R	S
٤	٥	R2	R	R	R	R	R	S	S
٥	٢٥،٢٣،٢٢،١٩،١٥،٦	R3	R	R	R	R	R	S	S
٦	٢٦،١٦،٨،٧،٣	P3	R	R	S	R	S	S	S
٧	١٢ ،٩	R5	R	R	S	S	S	S	S
٨	٢٤،٢٠،١٠ ،٢	P4	S	R	S	S	S	S	S
٩	١	R6	R	S	S	S	S	S	S
١٠	١٤	P5	S	S	S	S	S	S	S

ترتیب گروه‌های بیماریزایی تعیین شده در این روش (R1<P1<P2<R3<P3<R5<P4<R6<P5) با روند قدرت بیماریزایی در نژادهای سوریه مطابقت دارد. مشاهده ۵ پاتوتیپ حد واسط می‌تواند دلیلی بر تنوع بالای این پاتوژن در ایران باشد. گروه‌بندی جدایه‌های موجود در این آزمایش با استفاده از این روش نشان داد که اکثر جدایه‌ها جزء نژادهای R1، R3، R6 و پاتوتیپ ۳ هستند که در مقایسه با روش قبل تفاوتهای بارزی دارند. به‌عنوان مثال جدایه‌های ۵ و۲۳ که در روش اول جزء نژاد۱ تعریف شده بودند در این روش به ترتیب به‌عنوان نژاد ۲و۳ معرفی شدند. نکته قابل توجه دیگر این است که در مطالعات قبلی وجود نژادهای ٤ و٦ در ایران گزارش شده بود (۵و٦) ولی در نتایج حاصل با استفاده از هر دو روش معمول هیچ جدایه‌ای الگوی بیماریزایی مشابه با نژاد ٤ نشان نداد. این نتیجه نشان می‌دهد که احتمالاً در بین جدایه‌های مورد بررسی نماینده‌ای از این نژاد وجود نداشته است یا اینکه به دلایلی مثل تکرارپذیری پائین، نتایج تغییر کرده است. هرچند در منابع علمی پیدایش نژادهای جدید در یک منطقه در اثر وجود عوامل تأثیرگذار در ایجاد تنوع گزارش شده است ولی حذف یک نژاد در طول چند سال تنها می‌تواند به دلیل گزینش شدید میزبان مقاوم رخ دهد. ولی باید توجه کرد که کاربرد ارقام اصلاح شده در کشور ما خیلی مورد توجه کشاورزان نبوده است و نمی‌توان فشار گزینشی میزبان را دلیل حذف یک نژاد دانست. وجود این اختلافات از دیگر کشورها نیز گزارش شده است (۷و۹). آزمون مجدد ٦ نژاد رایج در سوریه در شرایط کاملاً کنترل شده (اتاقک رشد) نشان داده است که قدرت

بیماریزایی این نژادها تغییر کرده است (۹). بنظر می‌رسد همانگونه که پورتا ـ پوگلیا (۱۳) اظهار داشته است یکسان بودن شرایط آزمایش یکی از عوامل اساسی در تکرارپذیری نتایج بیماری‌سنجی باشد. همچنین نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که این روشهای آزمون بیماریزایی بسیار تحت تأثیر ارقام افتراقی مورد استفاده است. بنابراین ارقام افتراقی باید متناسب با جمعیت پاتوژن در هر منطقه انتخاب گردند و نمی‌توان از ارقام یکسانی جهت گروه‌بندی جدایه‌های این قارچ در تمام کشورها استفاده نمود.

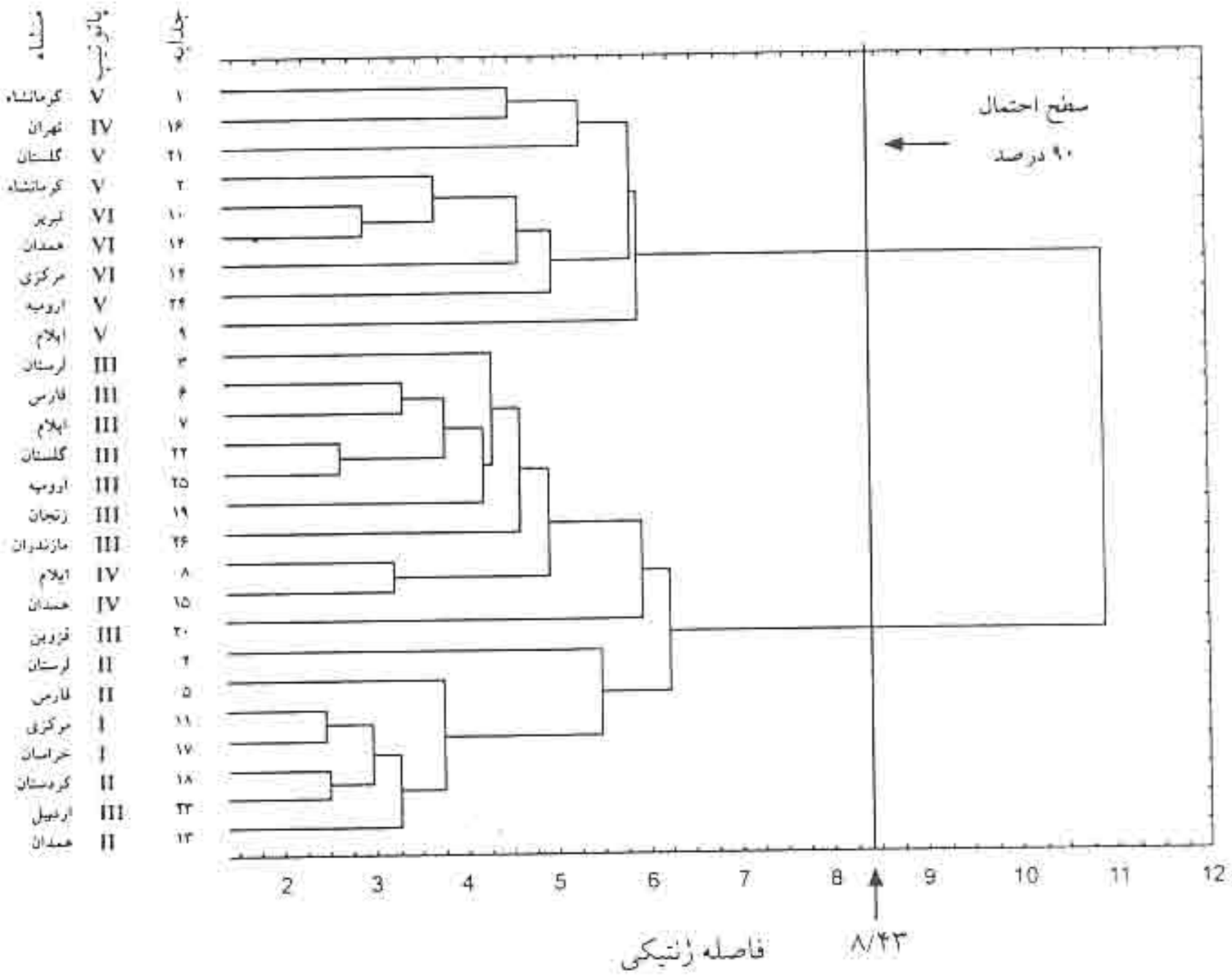
گروه‌بندی جدایه‌ها براساس قدرت بیماریزایی با ارقام معرفی شده توسط آدوپا و همکاران (۱۷) نیز کارآئی خوبی نشان نداد (جدول٤). هرچند آنها با بکارگیری سه رقم افتراقی (ILC1929، ILC482 و ILC3279) به عنوان نماینده سه سطح مقاومتی (به ترتیب حساس، نیمه‌مقاوم و مقاوم) روند کار را ساده کردند ولی مشکل عمده روش قبل همچنان وجود داشت. باید توجه داشت که این سه سطح مقاومتی با توجه به جمعیت این پاتوژن در سوریه تعیین شده است. لذا با تغییر جمعیت پاتوژن امکان تفاوت سطوح بیماریزایی وجود دارد زیرا سطوح مقاومت در کنار سطوح بیماریزایی معنی پیدا می‌کند و به دلیل تفاوت سطوح بیماریزایی در مناطق مختلف امکان تغییر سطوح مقاومت نیز وجود خواهد داشت. این تفاوت در گزارش حمزه و همکاران(۷) نیز مشاهده می‌شود. آنها اظهار داشتند رقم ILC3279 که توسط آدوپا و همکاران به‌عنوان سطح سوم مقاومت در نظر گرفته شده بود در مقابل جدایه‌های تونس حساسیت نشان داده است.

جدول٤- تعیین گروه پاتوتایپی جدایه‌ها بر اساس روش آدوپا و همکاران (۱۷).

پاتوتیپ	شماره جدایه	ارقام معادل سه سطح مقاومتی		
		ILC3279	ILC484	ILC1927
۱	۱۷،۱۱	R	R	S
۲	۲۳،۱۸،۱۳،۵	R	S	S
۳	۲۶،۲۵،۲٤،۲۲،۲۱،۲۰،۱۹،۱٦،۱۵،۱٤،۱۲،۱۰،۹،۸،۷،٦،٤،۳،۲،۱	S	S	S

در این روش اکثر جدایه‌های مورد مطالعه (۷۷ درصد) در گروه پاتوتیپ ۳ قرار گرفتند. نتایج بدست آمده از روشهای مختلف نشان می‌دهد که نمی‌توان رقم مشخصی را برای تمام مناطق، بکار برد. به عنوان مثال رقم ILC3279 نمی‌تواند به عنوان یک رقم مقاوم در کشور شناخته شود. حمزه و همکاران (۷) نیز از بکارگیری ارقام ILC482 و LC3279 به‌عنوان ارقام مقاوم در تونس خودداری کردند. سطوح بیماریزایی جمعیت این پاتوژن در کشور با سطوح مقاومتی سه رقم افتراقی که توسط آدوپا و همکاران (۱۷) پیشنهاد شده قابل تفکیک نیست و به همین دلیل تعداد زیادی از جدایه‌ها در گروه پاتوتایپی III قرار گرفته‌اند.

روابط خویشاوندی جدایه‌ها براساس تجزیه خوشه‌ای نشان داد که جدایه‌های ۲۰و ۲۲ در کمترین فاصله و دو جدایه ۱۲ و ۲٦ در دورترین فاصله از یکدیگر قرار گرفته‌اند (شکل٤).



شکل ٤- فنوگرام نشان‌دهنده روابط خویشاوندی جدایه‌ها بر اساس قدرت بیماریزایی.

در این روش کلیهٔ جدایه‌ها در فاصلهٔ ۸٫٤۳ (معادل سطح ۹۰ درصد)، در دو گروه قوی و ضعیف قابل تفکیک بودند (جدول۵). گروه اول با میانگین ٦٫۲۱ از شدت بیماریزایی بالاتری نسبت به گروه دوم (میانگین۳٫۸۷) برخوردار بود و تنها ۹ جدایه از ۲٦ جدایه را شامل شد. جدایه‌های مربوط به استانهای غربی کشور مثل کرمانشاه، آذربایجان غربی و شرقی و همدان در این گروه قرار دارند، در مقابل اکثر جدایه‌ها در گروه دوم قرار گرفتند. نتایج این گروه‌بندی با نتایج بدست آمده از مقایسه میانگین‌ها کاملاً انطباق داشت (شکل۲).

جدول ۵- گروه‌بندی جدایه‌ها بر اساس نتایج بدست آمده از مقایسه میانگین‌ها.

گروه بیماریزایی	میانگین بیماریزایی	شماره جدایه
الف	٦٫۲۱	۲٤،۲۱،۱٦،۱٤،۱۲،۱۰،۹،۲،۱
ب	۳٫۸۷	۲٦،۲۵،۲۳،۲۲،۲۰،۱۹،۱۸،۱۷،۱۵،۱۳،۱۱،۸،۷،٦،٤،۳

این روش توسط حمزه و همکاران (۷) نیز برای گروه‌بندی جدایه‌های تونس بکارگرفته شده بود و در سطح احتمال ۵۰ درصد جدایه‌ها را در شش گروه تفکیک کردند.

در این مطالعه روش دیگری برای گروه‌بندی جدایه‌ها طراحی شد. براساس نتایج مقایسهٔ میانگین شدت بیماری مشاهده شده، ارقام افتراقی در شش سطح مقاومتی قرار گرفتند. به‌گونه‌ای که رقم IILC1929 با درجه بیماری ۸ به عنوان

مرکزی و همدان با وجود پاتوتیپ ٦ امکان بروز و شیوع بیماری در شرایط محیطی مساعد وجود دارد. بنابراین اجرای طرحهای اصلاحی جهت گزینش ارقام مقاوم در مقابل این پاتوتیپ ضروری می‌باشد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی و معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد که امکانات اجرایی این مطالعه را فراهم نمودند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمائیم.

منابع

۱. باقری، ع.، آ. نظامی و م. سلطانی. ۱۳۷۹. اصلاح حبوبات سرمادوست برای تحمل به تنشها. انتشارات سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی.

۲. باقری، ع.، آ.نظامی، ع. گنجعلی و م. پارسا. ۱۳۷٦. زراعت و اصلاح نخود. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد.

۳. بهداد، ا. ۱۳۵۹. بیماریهای گیاهان زراعی. چاپ نشاط اصفهان.

٤. حسین زاده، ا.، ح. یونسی، م. اخوت، م. مطلبی و م. ر. زمانی. ۱۳۷۹. ارزیابی شدت بیماریزایی قارچ *Ascochyta rabiei* در نخود براساس روش آزمایشگاهی و گلخانه‌ای. چکیده مقالات چهاردهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. ص ۸۰.

۵. شهریاری، د. و م. ایزدیار. ۱۳۷۹. گروههای ویرولانس فرم *Ascochyta rabiei* روی نخود ایران. چکیده مقالات چهاردهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران. ص ۸۱.

٦. نورالهی، خ.، م. فلاحتی رستگار و ب. جعفرپور. ۱۳۷۹. تشخیص نژادهای فیزیولوژیک *Ascochyta rabiei* عامل بیماری برق‌زدگی نخود، در چند منطقه کشور.مجله علوم و فنون کشاورزی. جلد ٤، شماره ۱ :۱۲۷-۱۳٦.

7. Hamza, S., S. Samir, A. Rebai, R. Salah, and H. Moncef. 2000. Pathotype variation of representetive genotypes of *Ascochyta rabiei* in the Beja region. J.of Plant Pathol. 82:23-28.

8. Jamil, F.F., N. Sarwar, M. Sarvar, J.A. Khan, J. Geistlinger, and G. Khal. 2000. Genetic and pathogenic diversity within *Ascochyta rabiei* (Pass.) L. populations in Pakistan causing blight of chickpea (*Cicer arietinum L.*). Physiol. Mole. Plant pathol. 57: 243-254.

9. Jan, H., and M.V. wiese.1991. Virulence forms of *Ascochyt rabiei* affecting chickpea in the Palouse. Plant Dis. 75:904-906.

10. Kaiser, W.J. 1997. The teleomorph of *Ascochyta rabiei* and its significance in breeding chickpea. p. 3-21. In S.M. Udupa and F. Wigand (eds.) DNA Markers and Breeding for Resistance to Ascochyta Blight in Chickpea. Proceedings of the Symposium on "Application of DNA Fingerprinting for Crop Improvement: Marker assisted selection of Chickpea for Sustainable Agriculture in the Dry Areas," 11-12 April 1994, Aleppo, Syria. ICARDA, Aleppo, Syria.

11. Nene, Y.L., and M.V. Reddy. 1987. Chickpea diseases and their control. p. 233-270. In M.C. Saxena and K.B. Singh (eds.) The Chickpea. CAB Internatinal, OXON, U.K.

12. Nunez-Canete, R., A. Trapro-Casas, and R.M. Jimenez-Diaz. 1990. Virulence and mating type in isolates of Ascochyta rabiei in Spain. p.291-292. In Proceedings of the 8th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union, 28 Oct to 3 Nov 1990, Agadir, Morocco.

13. Porta-Puglia, A. 1992. Variability in *Aschochyta rabiei*. p.135-143. In K.B. Singh and M.C. Sexxena (eds.) Disease-Resistance Breeding in chickpea. ICARDA, Aleppo, Syria.

14. Reddy, M.V., and S. Kabbabeh. 1985. Pathogenic variability in *Aschochyta rabiei*. p.135-143. In K.B. Singh and M.C. Sexxena (eds.) Disease-Resisance Breeding in Chickpea. ICARDA, Aleeppo, Syria.

15.Singh K.B., G.C. Hawtin, Y.L. Nene, and M.V. Reddy. 1981. Resistance in chickpeas to ascochyta blight. Plant Dis. 65:586-587.
16.Singh, K.B., and M.V. Reddy. 1990. Patterns of resistance and susceptibility to races of *Ascochyta rabiei* among germplasm accession and breeding lines of chickpea. Plant Dis. 74: 127-129.
17.Udupa, S. M., F. Wigand, M.C. Saxena, and G. Kahl. 1998. Genotyping with RAPD and microsatelite markers resolves pathotype diversity in the ascochyta blight pathogen of chickpea. Theor. Appl. Genet. 97: 299-307.
18.Vir, S., and J.S. Grewal. 1974. Physiological specialization in Ascochyta rabiei the causal organism of gram blights. Ind. Phytopathol. 27: 255-360.

J. Agric. Sci. Natur. Resour., Vol. 10(1), Spring 2003
www.magiran.com/jasnr

Pathotyping of *Ascochyta rabiei* isolates in Iran

F.Shokoohifar[1], A.Bagheri[2], M. Falahati Rastegar[2], S.Malekzadeh[2]
[1]Ferdowsi University of Mashhad, Research Center for Plant Science, Mashhad, Iran; [2]Fredowsi University of Mashhad, College of Agricultere, Mashhad, Iran.

Abstract
Pathogenicity of twenty-six isolates of ascochyta blight fungus, *Ascochyta rabiei*, from 16 provinces of Iran was evaluated using 16 differential cultivars in greenhouse condition. Variance analysis revealed that affect of isolates, cultivars and their interaction were significant. Isolates were grouped on the basis of pathogenecity pattern, virulence intensity and cluster analysis. Pathogenecity test identified three races (R1, R2, and R3) and two pathotypes (P1, P2), but on the base of virulence intensity all the isolates were divided into three pathotypes (P1, P2, P3). Cluster analysis distinguished two virulence groups with the averages 6.21 (highly virulence) and 3.87 (weakly virulence). In the study, a new method was used for pathotyping of isolates. At first, the cultivars divided into six resistance levels then all the isolates resolved into six pathotypes (P1, P2, P3, P4, P5, P6). The new method had more ability for grouping of isolates. The results showed pathotype 6, includes three isolates from Tabriz, Markazi and Hamedan provinces, is very aggressive and all the used cultivars are sensitive against it. Thus it looks that it is necessary to design programs for breeding resistance lines in different areas.

Keywords: *Ascochyta rabiei*; Pathotype; Chickpea; Differential lines.