



ارزیابی مقاومت تعدادی از ژنوتیپ‌های گندم بومی ایران به نماتد سیستی گندم

ناصر پنجه که^۱، نجمه غزلباش^۲، زهرا تنها معافی^۳، سید کاظم صباغ^۴ و محسن اسماعیلزاده مقدم^۵

۱- دانشیار دانشگاه زابل، دانشکده کشاورزی (نویسنده مسوول: naserpanjehke@gmail.com)

۲- دانشجوی دکتری دانشگاه زابل

۳- دانشیار موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، تهران، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور

۴- دانشیار گروه زیست‌شناسی پردیس علوم دانشگاه یزد

۵- دانشیار مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۱/۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۴/۱۹

صفحه: ۴۱ تا ۴۸

چکیده

نماتدهای سیستی غلات یکی از مهم‌ترین عوامل بیمارگر غلات در جهان و ایران هستند. در این میان گونه *Heterodera filipjevi* دارای پراکنش گسترده‌ای در مزارع غلات کشور است. استفاده از ارقام مقاوم یکی از مناسب‌ترین روش‌های کنترل این بیمارگر به علت مقرون به صرفه بودن و عدم خسارت به محیط زیست شناخته شده است. در این تحقیق مقاومت نسبی ۱۳ ژنوتیپ گندم بومی کشور و هفت رقم رایج گندم نسبت به *H. filipjevi* در گلخانه در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار بررسی شد. با توجه به ضرورت تشخیص نماتد سیستی مورد استفاده در این بررسی، نمونه جمع‌آوری شده با استفاده از روش‌های کلاسیک و مولکولی شناسایی شد. بر اساس مشخصات ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی سیست‌ها و لارو سن دوم و هم‌چنین تکثیر ناحیه ITS-rDNA و برش آنزیمی ناحیه تکثیر شده گونه نماتد *H. filipjevi* تشخیص داده شد. تجزیه واریانس داده

سیست و انجام واکنش زنجیره‌ای پلی مرز و استفاده از آنزیم‌های برشی برای تفکیک گونه‌های نزدیک به هم صورت گرفت (۳۶).

کاشت گیاه و اعمال تیمارها

آزمایش گلخانه‌ای، در قالب طرح کاملاً تصادفی با بیست تیمار و ۴ تکرار انجام گرفت. در این بررسی تعداد سیزده ژنوتیپ گندم بومی ایران که از کلکسیون موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر فراهم شده بود و هفت رقم تجاری گندم مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۱).

بذور آزمایشی با محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد به مدت ۵ دقیقه ضدعفونی شدند و پس از ۶ بار شستشو با آب مقطر استریل به ظروف پتری استریل حاوی کاغذ صافی منتقل و جهت جوانه‌زنی به مدت ۴۸ ساعت در درجه حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. از بذور جوانه‌زده یک اندازه جهت کاشت استفاده گردید.

برای کاشت از لوله‌های پلاستیکی استاندارد با ارتفاع ۱۶ سانتیمتر و قطر ۲/۵ سانتیمتر که توسط یک صفحه مشبک در داخل سینی قرار می‌گرفتند استفاده شد. گلدان‌ها با خاک پاستوریزه با ترکیبی از خاک، کود حیوانی و ماسه با نسبت ۷۰:۲۹:۱ پر شده و در هر گلدان یک بذر گندم جوانه‌دار شده کشت شد. سه روز بعد از کاشت تعداد ۵۰۰ لارو سن دو نزدیک ریشه اضافه گردید. گلدان‌های لوله‌ای در اتاق حرارت ثابت با دمای 3 ± 22 و رطوبت نسبی ۷۰ درصد به مدت نه هفته نگهداری شدند. تیمار شاهد فقط با آب مایه‌زنی شد. گیاهان ۹ هفته پس از کاشت، برداشت شده و سیستم‌های تشکیل شده روی ریشه و خاک استخراج و شمارش شد (۶).

۹ هفته پس از تلقیح، گیاهان برداشت شده و ریشه‌ها به آرامی تحت جریان ملایم آب جهت جداسازی ماده‌های شیری و سیستم‌های قهوه‌ای متصل به ریشه قرار گرفتند. خاک کمی مرطوب لوله‌ها در سطل ریخته شد، به مدت ۱۰ ثانیه به هم زده و به خوبی مخلوط شد و برای حدود ۳۰ ثانیه صبر کرده و سپس محتویات رویی سطل از الک ۸۵۰ و سپس ۲۵۰ میکرومتر عبور داده شد. این فرآیند ۳ بار تکرار شد تا اطمینان حاصل شود که حداکثر ماده‌های شیری و سیستم‌های قهوه‌ای استخراج شده است. محتویات روی الک ۲۵۰ میکرومتر در داخل بشری جمع‌آوری شد. سپس نمادهای استخراج شده توسط استریومیکروسکوپ شمارش شدند (۵).

آنالیز داده‌ها

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار MSTATC تجزیه شد و میانگین‌ها با استفاده از آزمون حداقل اختلاف معنی‌داری (LSD) مقایسه و بر اساس میانگین تعداد ماده‌های جوان و شیری و سیستم‌های تشکیل شده روی ریشه‌های هر ژنوتیپ به همراه

نتایج و بحث

گونه نماتد سیست غلات

مشخصات ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی سیست و لارو سن دوم سیست‌های جمع‌آوری شده از مزرعه آلوده در استان همدان آلودگی به نماتد سیستی غلات را در این مزرعه تایید کرد. این مشخصات با ویژگی‌هایی که برای گونه *Heterodera filipjevi* (Madzhidove, 1981) Stelter, 1984 توصیف شده بود، مطابقت نشان داد.

مشخصات سیست: سیست‌ها به رنگ قهوه‌ای روشن تا تیره، لیمویی شکل بعضاً کروی، دارای مخروط کوتاه در انتها، آرایش پنجره‌ها به صورت دو نیم‌دایره، پل شکاف تناسلی باریک، باندهای کوتیکولی دارای رشد ظریف تا متوسط، معمولاً در انتها دو شاخه‌ای. شکاف تناسلی کوتاه، بوله‌ها به تعداد کم تا زیاد به اشکال مختلف درست زیر شکاف تناسلی پراکنده‌اند.

لارو سن دوم: کرمی شکل که بعد از تثبیت به طرف شکم خم می‌شود. سر گرد، کوتاه، دارای دو حلقه و یک دیسک لبی، سر نسبت به بقیه بدن فرورفته. استایلت قوی، گره‌های استایلت بزرگ، متمایل به طرف جلو و کمی مقعر، محل ریزش غده پستی مری ۴-۵ میکرومتر زیر استایلت. حباب میانی مری گرد تا کمی کشیده، غده‌های مری از سمت شکمی روی روده می‌افتند. منفذ دفعی-ترشچی بلافاصله بعد

از همیزونید، همیزونید به طول دو شیار عرضی، کوتیکول این ناحیه کمی متورم. سطح جانبی دارای چهار شیار طولی، فاسمیدها بزرگ، ۲-۳ حلقه پایین‌تر از مخرج. دم به تدریج باریک شده و به انتهای گرد ختم می‌شود. مشخصات ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی مذکور با مشخصات ارائه شده برای گونه *H. filipjevi* مطابقت داشت (۱۵،۱۱).

شناسایی کلاسیک *H. filipjevi* با استفاده از روش مولکولی بکار گرفته شده شامل تکثیر ناحیه ITS-rDNA و برش آنزیمی ناحیه تکثیر شده تایید شد. استفاده از مارکر مولکولی rRNA-RFLP تایید گونه *H. filipjevi* را امکان‌پذیر کرد و آن را از گونه *H. avenae* که از نظر مورفولوژی و مورفومتری خیلی به گونه *H. filipjevi* نزدیک است از هم تفکیک کرد. تکثیر نواحی ITS آر آن ای ریبوزومی توسط واکنش زنجیره‌ای PCR یک قطعه به‌میزان تقریبی ۱۰۰۰ جفت باز را برای گونه *H. filipjevi* ایجاد کرد که نتیجه برش آن با آنزیم برشی Hinf I دو قطعه ۸۰۰ و حدود ۲۰۰ جفت باز، با آنزیم PstI سه قطعه با طول به ترتیب ۷۰۰، حدود از ۲۰۰ و ۱۰۰ جفت باز و با آنزیم RsaI دو

جدول ۲- مشخصات ریخت سنجی ناحیه مخروط انتهایی سیست در نماتد سیستی غلات *Heterodera filipjevi* (اندازه‌های به میکرومتر، میانگین $\pm$ انحراف معیار (حداقل - حداکثر اندازه))

Table 2. Morphometric characters of vulval cone area of *Heterodera filipjevi* (measurements in μm , mean $\pm$ SD (min-max))

Character	Vulval plate	Madzhidov, 1981
n	6	25
Fenestral length	49 $\pm$ 4.6 (43 - 45)	51.5 (41-64)
Semifenestral length	20.7 $\pm$ 2.9 (18 - 26)	
Semifenestral width	25 $\pm$ 2.4 (22 - 28)	27.5 (21-33)
Vulval slit length	10.12 $\pm$ 3 (8 - 14)	7.7 (6.3-9.4)
Vulval bridge width	7.7 $\pm$ 1.6 (6 - 10)	
Underbridge length	82 $\pm$ 5.4 (75 - 88)	82 (82-108)

جدول ۳- مشخصات ریخت‌سنجی لارو سن دوم نماتد سیستی غلات *Heterodera filipjevi* (اندازه‌های به میکرومتر، میانگین $\pm$ انحراف معیار (حداقل اندازه - حداکثر اندازه))

Table 3. Morphometric characters of second stage juveniles of *Heterodera filipjevi* (measurements in μm , mean $\pm$ SD (min-max))

مشخصات Character	لارو سن دوم Second stage juvenile
n	10
L (Body Length)	514 $\pm$ 32 (452-562)
a (L/Maximum Body Width)	26 $\pm$ 1.7 (23.8-29.37)
c (L/tail length)	9.10 $\pm$ 0.59 (7.93-10.15)
c' (tail length/body width at anus)	4 $\pm$ 0.42 (3.67-5)
Stylet length	24.9 $\pm$ 1.2 (23-26)
Lip region height	4
Lip region width	8.5 $\pm$ 0.53 (8-9)
D.G.O. (Dorsal Oesophageal Gland Orifice)	6.2 $\pm$ 0.8 (5-7)
Anterior to exp	106 $\pm$ 8 (95-123)
Median bulb length	72 $\pm$ 7 (62-87)
Body Width	19.7 $\pm$ 0.5 (19-20)
Body Width at anus	14 <

حاضر به عنوان ژنوتیپ‌های نسبتاً مقاوم شناسایی شده‌اند، انجام تحقیقات تکمیلی در زمینه شناسایی ژنوتیپ‌های مقاوم و نسبتاً مقاوم با ارزیابی جامع ارقام و لاین‌های موجود در کشور در مقابل *H. filipjevi* می‌تواند به کنترل این نماتد در مناطق آلوده بیانجامد.

منابع موثری از مقاومت به نماتدهای سیستمی غلات در غلات شناسایی شده‌اند، اما تاثیرپذیری و قابلیت استفاده از آن‌ها به چگونگی تعامل بین مقاومت ژنوتیپ و پاتوتیپ هر منطقه وابسته است (۶). بنابراین در برنامه ارزیابی ژنوتیپ‌های گندم کشور ارزیابی مقاومت در مقابل جمعیت‌های مختلف *H. filipjevi* می‌بایست مد نظر قرار گیرد.

در مقایسه با رقم شاهد حساس Bezostaya، به جدایی ترکیه‌ای (TK1) گونه *H. filipjevi* مشخص شد که در تمامی ارقام نسبتاً مقاوم، یک واکنش ناسازگار (Incompatibility reaction) وجود دارد که این واکنش به صورت سطح پایین نفوذ لاروهای سن دوم در هفته دوم را با تاخیر مواجه کرده و تکمیل آن‌ها در طول چهار هفته نسبت به رقم حساس بزوستایا کمتر بوده، به طوری که بعد از هفته چهارم در ریشه ارقام نسبتاً مقاوم پس از رنگ‌آمیزی، فقط لاروهای سن سوم مشاهده گردید، در حالی که در رقم حساس بزوستایا نماتد بالغ بعد از سه هفته در ریشه مشاهده شد (۲۸). بنابراین با توجه به نتایج این تحقیقات و همچنین با توجه به اینکه ۱۸ ژنوتیپ از ۲۰ ژنوتیپ بررسی شده در تحقیق

جدول ۴- تجزیه واریانس عکس‌العمل ژنوتیپ‌های مختلف گندم به *Heterodera filipjevi* در شرایط گلخانه

منابع تغییر SV	درجه آزادی DF	جمع مربعات SS	میانگین مربعات MS
ژنوتیپ‌های گندم	۲۳	۸۴۰/۳۳۳	*۳۶/۵۳۶
خطا	۷۲	۵۴۹	۷/۶۲۵
کل	۹۵	۱۳۸۹/۳۳۳	
ضریب تغییرات CV(%)	۴۰/۴۱		

** معنی‌دار در سطح یک درصد

جدول ۵- مقایسه میانگین تعداد سیست و ماده بالغ *Heterodera filipjevi* در ژنوتیپ‌های مختلف گندم و گروه‌بندی آن‌ها براساس واکنش به *Heterodera filipjevi* در شرایط گلخانه

Table 5. Comparison of mean number of cysts and adult females of *Heterodera filipjevi* in different wheat genotypes and grouping of gen

منابع

1. Anonymous. 2016. Agricultural statistics yearbook. Ministry of Jihad-E-Agriculture, Statistical and Information Technology Unit, Tehran, 403 pp.
2. Abdollahi, M. 2008. Morphology and morphometrics of *Heterodera filipjevi* (Madzhidov, 1981) steller, 1984 from Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad province, Iran. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 11(14): 1864.
3. Baldwin, J.G. and M.A.N.U.E.L. Mundo-Ocampo. 1991. *Heteroderinae*, cyst-and non-cyst-forming nematodes. *Manual of agricultural nematology*. New York: Marcel Dekker, 275-362.
4. Bekal, S., J.P. Gauthier and R. Rivoal. 1997. Genetic diversity among a complex of cereal cyst nematodes inferred from RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer region. *Genome*, 40(4): 479-486.
5. Dababat, A.A., S.R. Pariyar, J.M. Nicol and E. Duveiller. 2011. Cereal cyst nematodes: An unnoticed threat to global cereal production.
6. Dababat, A.A., G.E. Orakci, H. Toktay, M. Imren, B. Akin, H.J. Braun, S. Dreisigacker, I.H. Elekcioglu and A.I. Morgunov. 2014. Resistance of winter wheat to *Heterodera filipjevi* in Turkey. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 38(2): 180-186.
7. Dababat, A.A., M. Imren, G. Erginbas-Orakci, S. Ashrafi, E. Yavuzaslanoglu, H. Toktay, S.R. Pariyar, H.I. Elekcioglu, A. Morgounov and T. Mekete. 2015. The importance and management strategies of cereal cyst nematodes. *Heterodera* spp., in Turkey. *Euphytica*, 202(2): 173-188.
8. Fenwick, D.W. 1940. Methods for the recovery and counting of cysts of *Heterodera schachtii* from soil. *Journal of helminthology*, 18(4): 155-172.
9. Goli, A., I. Jorjani, H. Sabouri and H.A. Fallahi. 2019. Assessment of Genetic Diversity of Facultative wheat Genotypes Belong to North of IRAN using ISSR Markers. *Journal of Crop Breeding*, 8: 165-74 (In Persian).
10. Hajihassani, A., Z.T.M.A. Ahmadi and M. Taji. 2011. Survey and biology of cereal cyst nematode, *Heterodera latipons*, in rain-fed wheat in Markazi Province, Iran. *International Journal of Agriculture and Biology*, 13(4).
11. Handoo, Z.A. 2002. A key and compendium to species of the *Heterodera avenae* group (Nematoda: Heteroderidae). *Journal of Nematology*, 34(3): 250.
12. Holgado, R., S. Andersson, J.A. Rowe and C. Magnusson. 2004. First record of *Heterodera filipjevi* in Norway. *Nematologia Mediterranea*, 32(2).
13. Karimipour Fard, H. and Z. Tanha Maafi. 2010. Three years studies on distribution and population density of *Heterodera filipjevi* in cereal fields of Isfahan province, Iran. In *Proceedings of 30th International Symposium of the European Society of Nematologists*.
14. Karimipour Fard, H. 2017. Distribution and Population Density of Cereal Cyst Nematodes in Wheat Fields of Isfahan and Chahar Mahal Va Bakhtiari Provinces, Determination the Yield Loss and Assessment of some Cultivars Reaction

23. Riley, I.T., J.M. Nicole and A.A. Dababat. 2009. Cereal cyst nematodes: Status, Research and Outlook. CIMMYT .Ankara, Turkey.
24. Rivoal, R. and R. Cook. 1993. Nematode pests of cereals. In: Evans, K., D.L. Trudgill and J.M. Webster (Eds). Plant parasitic nematodes in temperate agriculture. Wallingford. CABI Publishing, UK, 259-303.
25. Rivoal, R., S. Valette, S. Bekal, J.P. Gauthier and A. Yahyaoui. 2003. Genetic and phenotypic diversity in the graminaceous cyst nematode complex, inferred from PCR-RFLP of ribosomal DNA and morphometric analysis. European Journal of Plant Pathology, 109(3): 227-241.
26. Rumpfenhorst, H.J., I.H. Elekçioğlu, D. Sturhan, G. Öztürk and S. Enneli. 1996. The cereal cyst nematode *Heterodera filipjevi* (Madzhidov) in Turkey. Nematologia mediterranea, 24(1): 135-138.
27. Saberi, M., E. Arazmjoo and A. Amini. 2016. Assessment of Diversity and Identifying of ffective Traits on Grain Yield of bread wheat Promised Lines under Salt Stress Conditions. Journal of Crop Breeding, 8: 31-40 (In Persian).
28. Sağlam, H.D., S. Çobanoğlu, W. Wesemael, J.M. Nicol, N. Viaene and A.A. Dababat. 2009. Preliminary investigation of resistance in winter wheat to *Heterodera filipjevi* under controlled conditions. In Cereal cyst nematodes: status, research and outlook. Proceedings of the First Workshop of the International Cereal Cyst Nematode Initiative, Antalya, Turkey, 21-23 October 2009. International Maize and Wheat Improvement Centre (CIMMYT), 172-176.
29. Sharma, M., M. Saini, G. Prakash, G. Nupur, K.S. Arun, S. Rajan, T. Vinod and S. Indu. 2013. Tracking of cereal cyst nematode resistance genes in wheat using diagnostic markers. Journal of Wheat Research, 5(1).
30. Singh, A.K., A.K. Sharma and S. Jag. 2009. *Heterodera avenae* and its management on wheat in India. In Cereal cyst nematodes: status, research and outlook. Proceedings of the First Workshop of the International Cereal Cyst Nematode Initiative, Antalya, Turkey, 21-23 October 2009. International Maize and Wheat Improvement Centre (CIMMYT), 17-22.
31. Smiley, R.W., J.M. Marshall, J.A. Gourlie, T.C. Paulitz, S.L. Kandel, M.O. Pumphrey, K. Garland-Campbell, G. Yan, M.D. Anderson, M.D. Flowers and C.A. Jackson. 2013. Spring wheat tolerance and resistance to *Heterodera avenae* in the Pacific Northwest. Plant disease, 97(5): 590-600.
32. Sturhan, D.I.E.T.E.R. 1996. Occurrence of *Heterodera filipjevi* (Madzhidov, 1981) Stelter, 1984 in Iran. Pakistan Journal of Nematology, 14(2): 89-93.
33. Subbotin, S.A., H.J. Rumpfenhorst and D. Sturhan. 1996. Morphological and electrophoretic studies on populations of the *Heterodera avenae* complex from the former USSR. Russian Journal of Nematology, 4(1): 29-38.
34. Subbotin, S. A., L. Waeyenberge, I. A. Molokanova and M. Moens. 1999. Identification of *Heterodera avenae* group species by morphometrics and rDNA-RFLP. Nematology, 1: 195-207.
35. Subbotin, S.A., L. Waeyenberge and M. Moens. 2000. Identification of cyst forming nematodes of the genus *Heterodera* (Nematoda: Heteroderidae) based on the ribosomal DNA-RFLP. Nematology, 2: 153-164.
36. Tanha Maafi, Z. 2002. Morphological and molecular identification of cyst-forming nematodes from Iran . Ph.D Thesis, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Gent, Belgium.
- 37

Evaluation of the Resistance of Some Indigenous Wheat Genotypes to Cereal Cyst Nematode, *Heterodera Filipjevi*

Naser Panjeke¹, Najmeh Ghazalbash², Zahra Tanhamaafi³, Seyed Kazem Sabbagh⁴ and Mohsen Esmaeilzadeh Moghaddam⁵

1- Associate Professor University of Zabol, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture
(Corresponding author: naserpanjehke@gmail.com)

2- Ph.D. Student University of Zabol

3- Associate Professor Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

4- Associate Professor Department of Biology, Campous of Sciences, Yazd University

5- Associate Professor Seed and Plant Improvement Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

Received: January 28, 2019 Accepted: July 10, 2019

Abstract

Cereal cyst nematode (CCN) is one of the most deleterious pathogens of cereal crops worldwide including Iran. The species *Heterodera filipjevi* is widely distributed in the fields of wheat. Growing the resistant cultivars is a suitable environmental friendly and cost-saving procedure for nematode control. In current research, the resistance of 13 indigenous wheat genotypes and seven common cultivars of bread wheat to *H. filipjevi* were investigated in a completely randomized design with four replicates, under greenhouse conditions. Regarding to identification of the cyst nematode used in this study, the collected specimen was diagnosed through classical and molecular methods. Based on morphological and morphometric characters of cyst and second stage juvenile, amplification of rDNA-ITS regions and restriction fragment length polymorphism (RFLP), the studied cereal cyst nematode was identified as *H. filipjevi*. According to the analysis of variance, the effect of total numbers of cysts and females on the cultivars was significant at 1% level. The cultivars of Bezostaya and Katae, showed the highest and lowest mean total population in soil and root, respectively. Bezostaya showed susceptible reaction, katae, Lines 84 and 85 were grouped as resistant whilst, the other cultivars and lines showed moderately resistance reactions.

Keywords: Infection, *Heterodera filipjevi*, Disease, Identification