دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

غربال ارقام و لاین‌های امیدبخش گلرنگ به پوسیدگی فیتوفتورائی ریشه و طوقه

فریبا یغموری[۱]، حمید صادقی گرمارودی[۲]، غلامرضا بخشی خانیکی[۳]، رضا حاج حسینی[۳] و امیر حسن امیدی[۴]

۱ و ۳- دانشجوی کارشناسی ارشد و دانشیار، دانشگاه پیام نور تهران
۲- استادیار، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج، (نویسنده مسوول: hsgarmaroodi@spii.ir)
۴- استادیار، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج
تاریخ دریافت: ۹۲/۱/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۲/۹/۱۷

چکیده

پوسیدگی فیتوفتورائی ریشه و طوقه گلرنگ از مهم‌ترین بیماری‌های خاکزاد این محصول در ایران محسوب می‌گردد. نمونه‌برداری و جداسازی عامل بیماری از مزارع گلرنگ کرج، قزوین و اصفهان انجام و اوومیست *Phytophthora drechsleri* به‌عنوان عامل بیماری‌زای اصلی تعیین گردید. بیست ژنوتیپ مختلف گلرنگ با سه روش و در مرحله گیاهچه‌ای و بلوغ، با این بیمارگر آلوده شدند. برگ‌های لپه‌ای و محور زیرلپه در گیاهچه‌های ۱۰ روزه با قطعه کوچکی از پرگنه‌های جوان بیمارگر آلوده شدند. برگ‌های بریده تازه تهیه شده از بوته‌های بالغ نیز با همان زادمایه آلوده شدند. نتایج حاصل از مایه‌زنی با روش محور زیر لپه و برگ‌های لپه‌ای نشان دادند که به ترتیب ارقام و لاین‌های گل سفید اصفهان و KW10 در روش اول و ژنوتیپ محلی عجب شیر در روش دوم، دارای بالاترین سطوح مقاومت به این بیماری بودند. نتایج برگ‌های جداشده حاکی از آن بود که ژنوتیپ‌های محلی عجب شیر، KW6، گل سفید اصفهان، ورامین ۲۹۵ و زرقان ۲۷۹ به ترتیب بیشترین سطوح تحمل به بیماری را دارند. بر اساس این نتایج ژنوتیپ‌های محلی ایران دارای منابع خوبی از تحمل به بیماری‌ها می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: گلرنگ، پوسیدگی ریشه و طوقه، *Phytophthora drechsleri*

مقدمه

گیاه گلرنگ (*Carthamus tinctorius*) به‌عنوان یکی از محصولات دانه روغنی مهم در دنیا، احتمالاً از سواحل مدیترانه و یا خلیج فارس منشأ گرفته است. گلرنگ به دلیل تحمل بالا به خشکی، جایگاه خاصی در کشاورزی کشورهای خاورمیانه دارد. علاوه بر بذر گیاه گلرنگ و محتویات روغن آن، گلبرگ‌های رنگی این محصول نیز برای رنگرزی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۲).

پوسیدگی طوقه و ریشه گلرنگ از بیماری‌های مهم این محصول در ایران و جهان می‌باشد. علاوه بر قارچ خاکزی فوزاریوم، گونه‌های متعددی از اوومیست فیتوفتورا در ایجاد بوته میری گلرنگ نقش دارند. از جمله می‌توان به گونه‌های *P. cactorum*، *P.cryptogea* و *P. nicotiana* و *P. drechsleri* اشاره کرد. بر اساس بیماریزائی انتخابی جدایه‌های مختلف فیتوفتورا، وجود نژادهای فیزیولوژیک برای این بیمارگر پیشنهاد گردید (۲۰،۱۰).

در بین گونه‌های فیتوفتورا، گونه *Phytophthora drechsleri* Tucker (=*P. cryptogea* Pethyb and Laff.) از عوامل مهم بیماری‌زا و مرگ و میر بوته‌های گلرنگ بخصوص در مناطقی که زراعت این محصول آبیاری می‌گردد، محسوب می‌شود (۷). ریشه، طوقه و محور زیر لپه در گیاهچه‌ها براحتی توسط زئوسپورهای این بیمارگر مورد حمله قرار می‌گیرند. مشخص‌ترین علائم بیماری در زمان گیاهچه‌ای، به‌صورت مرگ و میر بوته‌ها و در زمان بلوغ به‌صورت پژمردگی بروز می‌نماید. آفتابگردان و خیار از میزبان‌های عمده این بیمارگر هستند که باید از برنامه تناوب زراعی کنار گذاشته شوند. علف هرز گلرنگ وحشی (*C. lanathus*) از میزبان‌های ثانویه این بیمارگر محسوب می‌گردد (۱۷).

در شرایط مساعد، بیماری می‌تواند بسیار مخرب بوده و تا ۱۰۰ درصد محصول را از بین ببرد (۲). اهمیت این بیماری در ایران بدرستی شناخته نشده است، زیرا گیاه میزبان، بومی ایران بوده و واریته‌های آن به نژادهای محلی بیمارگر متحمل هستند، به‌علاوه گلرنگ در مزارع مناطق خشک که خاک آن بخوبی زهکشی می‌شود، کاشته می‌شود. در این خاک‌ها بیمارگر فیتوفتورا غیرفعال می‌باشد. به‌هرحال به دلیل حساسیت بالای گیاهچه‌های گلرنگ به *P. drechleri*، از این گیاه به‌عنوان تله برای جداسازی این بیمارگر از خاک استفاده می‌شود (۱). علاوه بر این، بیماری‌زائی روی گلرنگ به‌عنوان معیار تشخیصی برای تفکیک دو گونه *P. drechsleri* و *P. melonis* بکار می‌رود (۵).

به‌منظـــور انجـــام مطالـعات روابـط بیـمارگر- میزبان، روش‌های متعددی برای آلوده کردن بوته‌های گلرنگ بکار رفته است. گیاهان ۶ هفته‌ای پرورش یافته در گلخانه برای استخراج ترکیبات پلی استیلنی که مانع از رشد و تکثیر فیتوفترا می‌شوند بکار رفته‌اند. در این روش، سوراخ سطحی روی اولین میانگره گیاه با کمک سوزن ایجاد و پس از قرار دادن توده هیفی جوان فیتوفتورا روی زخم، محل مایه‌زنی با نوارهای پلاستیکی پوشانده شد (۳).

مایه‌زنی ناحیه زیر لپه (هیپوکوتیل) گیاهچه‌های ۷ روزه از جمله روش‌های مرسوم در ارزیابی مقاومت ارقام به فیتوفتورا در محصولات سویا و گلرنگ بوده است (۲۱،۱۴). در این روش زخم سطحی روی هیپوکوتیل ایجاد، سپس قطعات توده هیفی زادمایه که با چوب‌پنبه سوراخ کن به قطعات مساوی تقسیم شده‌اند را روی محل زخم قرار می‌دهند. محل مایه‌زنی را در صورت لزوم می‌توان با نوارهای پلاستیکی مثل پارافیلم بست.

در روشی متفاوت، زئوسپورهای فیتوفتورا با غلظت $۱۰^{۴}\times۲-۱$ در هر میلی‌لیتر سوسپانسیون از کلنی‌های جوان غوطه‌ور در عصاره سترون خاک تهیه و روی سطح بستر کاشت گلدان‌های حاوی گیاه میزبان ۵-۳ هفته‌ای به‌طور یکنواخت پاشیده و پس از نفوذ کامل سوسپانسیون در گلدان، گلدان‌ها با مقادیر قابل توجهی آب اشباع شدند (۶). از آنجائیکه تهیه سوسپانسیون زئوسپور با دشواری‌های زیادی همراه است، برخی محققین توده هیفی فیتوفتورا را جایگزین سوسپانسیون زئوسپور کرده‌اند (۸). تهیه زادمایه فیتوفتورا روی ذرات ورمیکولایت آغشته به محیط کشت V8، اختلاط زادمایه با خاک استریل و افزودن آن به هر گلدان از دیگر روش‌های آلوده‌سازی ریشه می‌باشد (۷).

روش مایه‌زنی دیگر که مورد استفاده قرار گرفته است، مایه‌زنی برگ‌های بریده شده درون تشتک‌های پتری می‌باشد. در این روش اولین یا دومین برگ گیاه را بریده و درون تشتک‌های پتری حاوی کاغذ صافی مرطوب قرار داده سپس قطرات ۵۰ میکرولیتری حاوی ۲۵۰۰-۵۰ زئوسپور را روی برگ قرار دادند. برای توسعه آلودگی، ظروف را در دمای ۲۱ درجه نگهداری نمودند (۹).

در آخر می‌توان به مایه‌زنی برگ‌های لپه‌ای گیاهچه‌های گلرنگ اشاره نمود که در مواد و روش‌ها به تفصیل مورد اشاره قرار گرفته است (۱۹).

تلاش‌های زیادی در راستای معرفی ارقام مقاوم به فیتوفتورا صورت گرفته است. به‌دنبال خسارات شدید این بیماری در کالیفرنیا، لاین نسبتاً مقاوم (Gila) و به‌دنبال آن رقم US-10 پس از انجام ۶ تلاقی برگشتی معرفی گردیدند (۱۱،۴). سپس مقاومت کامل رقم USB (Biggs) در ایستگاه تحقیقاتی بیگز در کالیفرنیا و بواسطه آزمایشهای توماس و زیمر (۲۱) آشکار گردید. در رقم کاملاً مقاوم بیگز، حتی طی فرایند مایه‌زنی با روش زخمی کردن گیاهچه‌ها در شرایط گلخانه نیز علائم بیماری پدیدار نمی‌گردد. به‌هرحال رقم بیگز عملکرد مناسبی نداشت ولی به‌دلیل مقاومت بالا در برنامه‌های اصلاحی گلرنگ قرار گرفت. تحقیقات گروه نامبرده نشان داد که وراثت صفت مقاومت به‌صورت تک‌ژنی مغلوب می‌باشد. آزمایش‌های بیشتر توسط همان گروه پیشنهاد کرد که ژنهای مقاومت متعددی در ارقام گلرنگ وجود دارند که ممکن است فقط در اندام خاصی از گیاه بیان شوند.

در ادامه تلاش‌ها برای اصلاح مقاومت ارقام گلرنگ به فیتوفتورا، رقم VFR-1 گلرنگ که دارای سطوح بالای مقاومت به بیمارگرهای *Verticillium albo-atrum*، همچنین دارای مقاومت به همه نژادهای *Fusarium oxysporum* f.sp. carthami و بلایت رایزوکتونیائی *Rhizoctonia solani* بود، معرفی شد. نام رقم از ابتدای نام سه بیمارگر یاد شده، گرفته شده است. این رقم اگرچه مقاومت بالاتر از ژیلا و US-10 به فیتوفتورا نشان می‌داد ولی زمانیکه محور زیر لپه یا بالای لپه گیاهچه‌ها با روش‌های معمول با بیمارگر فیتوفتورا مایه‌زنی می‌شدند، مقاومت کامل شبیه به رقم بیگز نشان نمی‌دادند. برگ‌های لپه‌ای آن در دمای ۲۸-۲۹ درجه سانتی‌گراد به *P. drechsleri* مقاومت نشان می‌داد ولی در دمای بالای ۳۰ درجه سانتی‌گراد حساس بود. ظاهراً تنها یک ژن از دو ژن مغلوب که در رقم بیگز یافت شده است، در این رقم وجود دارد. با آزمایش‌های بیشتر چنین نتیجه‌گیری شد که رقم VFR-1 علاوه بر ژن مقاومت غالب، دارای یک ژن مقاومت مغلوب نیز می‌باشد (۲۱،۱۸،۱۰).

در سال ۱۹۸۱ داویا و همکاران (۷)، ۱۵۴۷ توده بومی که از نقاط مختلف جهان جمع‌آوری شده بودند را از لحاظ مقاومت به فیتوفتورا ارزیابی کردند. ۱۵ لاین با بالاترین سطوح مقاومت با نام‌های UC-150 تا UC-164 معرفی شدند. اگرچه این لاینها مقاومتی بالاتر از VFR-1 نداشتند ولی دارای تنوع ژنتیکی بسیار گسترده‌ای بودند که از لحاظ کارهای اصلاحی بسیار ارزشمند محسوب می‌شوند. ارقام بومی ایرانی هم در شرایط مزرعه در آزمایش‌های آنها از تحمل بالائی برخوردار بوده‌اند.

سازوکار بیماریزائی در مدل گلرنگ- فیتوفتورا نیز مورد مطالعه گسترده قرار گرفته است. پیشرفت عمده در مطالعه این مدل زمانی بدست آمد که ترکیباتی بنام سافینول (safynol) و دهیدروسافینول (dehydrosafynol)

در محور زیر لپه مایه‌زنی شده لاین مقاوم بیگز بدست آمدند (۳). غلظت این ترکیبات گیاهی در رقم حساس نبراسکا ۱۰ (Nebraska 10) به‌طور معنی‌داری پایین‌تر بود. مشابه سایر مدل‌های بیماریزائی، احتمالاً باید سازوکارهائی بیوشیمیائی در بیمارگر موجود باشد که آنتی بیوتیک‌های گیاهی (سافینول و دهیدروسافینول) تولید شده را سم‌زدائی و بی‌اثر می‌نماید.

غلظت یون سدیم در برگ‌های گلرنگ، ۳۵ روز بعد از آلودگی با *P. cryptogea* با شدت پوسیدگی ریشه همبستگی مستقیم داشت (P<۰/۰۰۱). در واقع آلودگی با فیتوفتورا نتیجه تغییر در نفوذپذیری سلول‌های ریشه نسبت به یون‌های سدیم است که این تغییر در اثر نفوذ بیمارگر ایجاد می‌گردد (۲۲).

در این تحقیق، سه روش متفاوت آلوده‌سازی ژنوتیپ‌های گلرنگ یعنی آلوده‌سازی برگ‌های بریده، برگ‌های لپه‌ای و محور زیر لپه، برای ارزیابی سطوح تحمل به بیماری در اندام‌های مختلف گیاهی، بکار گرفته شدند. مقایسه مقاومت به بیماری در اندام‌های مختلف و نیز دستیابی به روش آلوده‌سازی سریع، آسان و مطمئن از اهداف این پروژه بوده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های بیماری شامل ریشه و ساقه بوته‌های آلوده پس از شستشو و ضدعفونی سطحی با محلول رقیق شده سفیدکننده تجاری (حاوی هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد) روی محیط کشتهای نیمه اختصاصی PARPH[1] منتقل شدند. محیط پایه آن آرد ذرت-آگار CMA[2] بوده که حاوی ۱۳۰ میلی‌گرم در لیتر پنتاکلرونیتروبنزن ۷۵٪ (PCNB)، ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر آمپی‌سیلین، ۱۰ میلی‌گرم در لیتر ریفامپیسین، ۱۰ میلی‌گرم در لیتر پیماریسین و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر هایمکسازول بود. تمام ظروف محیط کشت در دمای ۲۸-۲۷ درجه سانتی‌گراد در تاریکی بمدت ۵-۴ روز قرار گرفتند. با میکروسکوپی کلنی‌های ظاهر شده، آنهائی را که فاقد دیواره عرضی بودند به محیط کشت‌های تازه تهیه شده آرد ذرت آگار منتقل و ۷-۵ روز در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد در تاریکی نگهداری شدند. برای اطمینان از اسپورانژیوم دهی کلنی‌ها که مهم‌ترین اندام تولید شده توسط فیتوفتوراها می‌باشد، چند قطعه برش داده شده از کلنی‌ها را به تشتک‌های پتری استریل حاوی آب مقطر استریل منتقل و به مدت ۲۴ ساعت زیر نور مهتابی در دمای اتاق نگهداری شدند. اندام‌های اسپورانژیوم تولیدی در شناسائی گونه فیتوفتراها بکار گرفته شدند. برای تعیین گونه از کلید استامپ (۱۶) استفاده گردید. در نهایت ۳۰ جدایه فیتوفتورا بدست آمدند. این جدایه‌ها با استفاده از روش تک ریسه (۱) خالص‌سازی گردیدند. کلیه جدایه‌ها به‌عنوان گونه *P.drechsleri* معرفی شدند. جدایه‌های تک ریسه شده روی محیط کشت آرد ذرت آگار در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در آزمون‌های گلخانه‌ای از طرح کاملاً تصادفی استفاده شد.

تهیه زاد مایه

از محیط کشت لیمابین آگار LBA[3] برای تکثیر بیمارگر و تولید زاد مایه استفاده شد. همه اندام‌های بیمارگر فیتوفتورا روی این محیط کشت تولید می‌شدند. کلیه جدایه‌هائی که به‌عنوان *Phytophthora drechsleri* تعیین گردیدند روی تشتک‌های LBA کشت و به‌مدت ۵ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در تاریکی نگهداری شدند.

مایه‌زنی برگ‌های لپه‌ای

روش توماس و هیل (۱۹) برای مایه‌زنی برگ‌های لپه‌ای گیاهچه‌های ۷ روزه بکار رفت. به‌طور خلاصه، بذرهای ضدعفونی شده با محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد روی کاغذ صافی وادار به جوانه‌زنی شدند. سپس ۱۵-۱۲ گیاهچه در گلدان‌های با قطر ۱۰ سانتی‌متر حاوی مخلوط خاک مزرعه کشت نشده و ماسه (۱:۱) کاشته شدند. این گلدان‌ها در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد گلخانه بدون نور مصنوعی به‌مدت یک هفته نگهداری شدند. با استفاده از سوزن، یک سوراخ سطحی کوچک روی سطح برگ‌های لپه‌ای ایجاد شد. پوشش میسلیومی موجود در سطح محیط کشت جوان یک هفته‌ای عامل بیماری، با استفاده از چوب‌پنبه سوراخ کن به قطعات مساوی با قطر ۳ میلی‌متر تقسیم شده و یک قطعه از محیط کشت به‌صورت واژگون روی سطح زخم ایجاد شده با سوزن قرار گرفت. گیاهچه‌های مایه‌زنی شده با آب پاش دستی حاوی آب مقطر سترون مه پاشی شدند. برای تسریع در بروز علائم بیماری، از درپوش‌های طلقی و پلاستیک مشکی به‌مدت ۲۴ ساعت استفاده گردید. علائم بیماری پس از ۵ روز یادداشت‌برداری گردیدند.

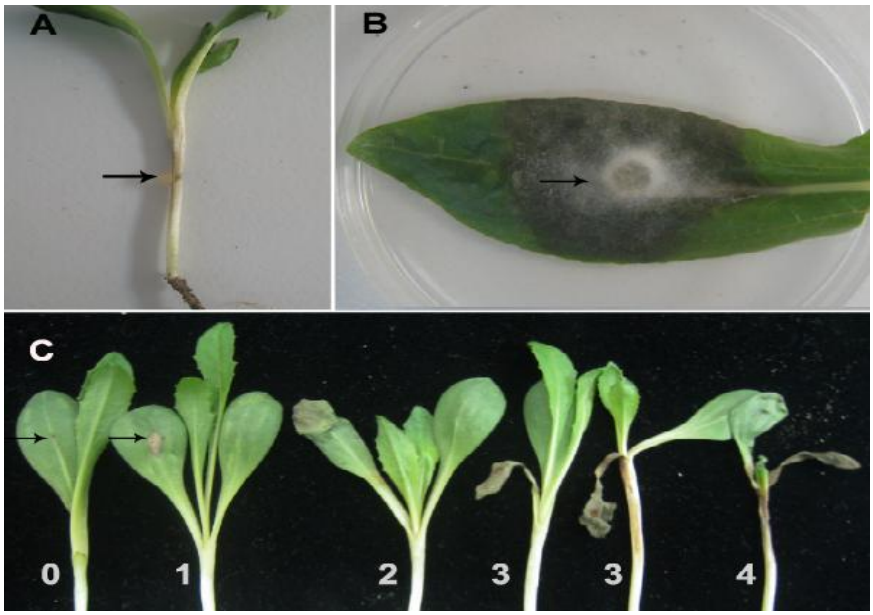
پاسخ ژنوتیپ‌ها به بیماری با استفاده از مقیاس زیر ثبت گردیدند: ۰= فاقد نکروز در محل مایه‌زنی (مقاوم، R). ۱= نکروز به‌صورت محدود در اطراف محل مایه‌زنی دیده می‌شود (متحمل، T). ۲= نیمی از سطح برگ لپه‌ای آلوده می‌شود (نسبتاً حساس، RS). ۳= تمام برگ لپه‌ای آلوده میشود (حساس، S). ۴= آلودگی از برگ‌های لپه‌ای به سمت محور زیر لپه گسترش می‌یابد، کل گیاهچه آلوده و در نهایت می‌میرد (فوق حساس، HS) (شکل ۱c).

1- Pimaricin-Ampicillin-Rifampicin-PCNB-Hymexasol
2- Corn meal agar
3- Lima bean agar

۱۰-۸ گیاهچه در آزمون بیماریزائی جدایه‌ها و نیز در آزمون غربال ارقام و ژنوتیپ‌ها به این بیماری آلوده شدند.

مایه‌زنی محور زیر لپه

از آنجائیکه محور زیرلپه یکی از نقاط اصلی برای ورود بیمارگرها به درون سیستم‌های گیاهی است، مایه‌زنی گیاهان از طریق محور زیرلپه یکی از روش‌های متداول برای آلوده‌سازی مصنوعی گیاهان است (۹). محور زیر لپه با همان روشی که در بخش قبل گفته شد، آلوده شدند. نکروز در محور زیر لپه به آسانی باعث مرگ و میر گیاهچه‌ها می‌گردید (شکل ۱). تعداد گیاهچه‌های مرده بعد از ۵ روز به‌عنوان معیاری از وقوع بیماری در هر تیمار در نظر گرفته شد. در هر دو روش یاد شده بالا، یک گلدان از هر ژنوتیپ با محیط کشت LBA فاقد بیمارگر مایه‌زنی شده و به‌عنوان واحد آزمایشی شاهد در نظر گرفته شدند.



شکل ۱- انواع روش‌های مایه‌زنی، A: محور زیر لپه، B: برگ‌های جدا شده، C: برگ‌های لپه‌ای. در شکل اخیر مقیاس بکار گرفته شده برای اندازه‌گیری شدت بیماری روی برگ‌های لپه‌ای نشان داده شده است. اعداد زیر هر گیاهچه شدت بیماری را در مقیاس ۴-۰ نشان می‌دهد. برای شرح مقیاس بکار رفته به متن مراجعه شود. نوک پیکان محل مایه‌زنی را نشان می‌دهد.

مایه‌زنی برگ‌های جدا شده

آلوده‌سازی برگ گیاهان بالغ در مرحله گلدهی نیز انجام شد. برگ‌های سالم و سبز از گره‌های بالائی بوته‌ها جدا و بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شدند. برگ‌ها با آب مقطر استریل شسته و در دستگاه لامینار خشک شدند. ۵ برگ از هر ژنوتیپ یا رقم روی تشتک‌های ۹ سانتی‌متری حاوی محیط کشت آب-آگار ۱٪ قرار گرفتند. زادمایه بیمارگر به همان روش ذکر شده در بالا تهیه و برش داده شده و یک قطعه در مرکز هر برگ قرار گرفت. برگ‌ها در انکوباتور در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد به‌مدت ۷۲ ساعت بدون نور مصنوعی قرار گرفتند. سپس قطر نکروز بر حسب میلی‌متر با استفاده از کولیس در دو جهت عمود بر هم اندازه‌گیری شدند.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

در آزمایش آلوده‌سازی برگ‌های لپه‌ای، آزمون مربع کای برای نکروز اندازه‌گیری شده در مقیاس ۴-۰ بکار گرفته شد. در آزمایش آلوده‌سازی برگ‌ها، داده‌های حاصل از اندازه‌گیری طول و عرض زخم، بعلاوه حاصل ضرب آنها با استفاده از آزمون توکی (Tukey's multiple range test) در نرم‌افزار SPSS 16 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. کلیه واحدهای آزمایشگاهی و گلخانه‌ای به‌صورت کاملاً تصادفی در محل قرار گرفتند. داده‌های حاصل از آلوده‌سازی محور زیر لپه نیز به همان روش یاد شده برای نکروز برگ‌های لپه‌ای تجزیه و تحلیل آماری گردیدند.

آزمون بیماری‌زائی

با استفاده از روش آلوده‌سازی برگ‌های لپه‌ای، بیماری‌زائی ۳۰ جدایه فیتوفتورای خالص شده روی رقم حساس ES68 انجام شد. کلیه جدایه‌های آزمایش شده قادر به ایجاد ۱۰۰-۸۰٪ بوته میری روی رقم یاد شده گلرنگ بودند. یک جدایه با بیماری‌زائی ۱۰۰٪ و داشتن خصوصیات بارز گونه *P. drechsleri* تحت نام G-15 انتخاب و برای آزمون‌های ارزیابی سطوح مقاومت ارقام و لاین‌های گلرنگ بکار گرفته شد.

ارزیابی سطوح مقاومت

الف: محور زیر لپه (هیپوکوتیل)

۲۰ رقم، لاین و ژنوتیپ امیدبخش گلرنگ تهیه شده از بخش تحقیقات دانه‌های روغنی موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر با روش آلوده‌سازی محور زیر لپه به بیماری یاد شده آلوده شدند. از وضعیت حساسیت و مقاومت به بیماری این ارقام و لاین‌ها هنوز گزارشی منتشر نشده است. سلول مردگی ناشی از بیماری بعد از ۲۴ ساعت قابل تشخیص بود. آنالیز واریانس درصد بوته میری گیاهچه‌ها نشان داد که واکنش ژنوتیپ‌های مایه‌زنی شده متفاوت بوده است (جدول ۱). سپس میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی در دسته‌های مختلف گروه‌بندی شدند.

تمام ژنوتیپ‌ها با این روش به بیماری آلوده شدند و هیچ کدام از ژنوتیپ‌ها مصون از بیماری نبودند. به‌هرحال، ارقام KW10 و گل سفید اصفهان دارای بالاترین سطوح تحمل به این بیماری بودند (جدول ۲). بقیه ارقام و لاین‌ها به میزان بالائی به این بیماری آلوده شدند.

جدول ۱- آنالیز واریانس درصد بوته میری ناشی از مایه‌زنی هیپوکوتیل ارقام گلرنگ در مرحله گیاهچه‌ای

منابع تغییرات	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F
رقم	۲۶۲۴۳/۹۷۳	۲۱	۱۲۴۹/۷۱۳	۷۳/۱**
خطا	۷۵۲/۵۲۷	۴۴	۱۷/۱۰۳	
کل	۲۶۹۹۶/۵۰۰	۶۵		

**: تفاوت معنی‌دار در سطح ۱٪.

جدول ۲- آزمون تفاوت حقیقی معنی‌دار توکی (Tukey's HSD) برای مقایسه میانگین درصد آلودگی ژنوتیپ‌ها و ارقام که بافت محور زیر لپه آنها مایه‌زنی شده است

رقم یا لاین	درصد آلودگی	رقم یا لاین	درصد آلودگی
محلی عجب شیر	۸۸/۱^{ab}	ورامین۲۹۵	۶۵/۶^{c}
KW3	۸۱/۶^{ab}	Mex190	۸۶/۴^{ab}
KW4	۸۵/۲^{ab}	KW13	۸۹/۰^{a}
KW5	۷۸/۰^{abc}	گلدشت	۸۱/۳^{ab}
KW6	۷۴/۴^{bc}	Mex145	۷۴/۳^{bc}
Mex184	۸۷/۷^{ab}	Mex110	۸۷/۸^{ab}
Mex248	۶۷/۲^{c}	Mex163	۸۱/۹^{ab}
Mex143	۸۹/۳^{a}	زرقان۲۷۹	۹۰/۳^{a}
گل سفید اصفهان	۵۰/۲^{d}	Mex117	۸۴/۰^{ab}

ب: سطوح تحمل به بیماری در برگ‌های لپه‌ای

از آنجائیکه تحمل به بیماری در برگ‌های لپه‌ای ممکن است با فاکتورهای ژنتیکی متفاوتی کنترل شوند (۱۹)، برگ‌های لپه‌ای همان ارقام و لاین‌ها مایه‌زنی شدند. به‌منظور ارزیابی کمی میزان آلودگی، روش استفاده شده در بالا، با کمی تغییر و به‌صورت یک مقیاس ۴-۰ استفاده شد. پاسخ ۲۰ رقم و لاین امید بخش گلرنگ در مقابل بیماری با استفاده از این روش ارزیابی گردیدند. همه ژنوتیپ‌ها با این روش به بیمارگر آلوده شدند. سلول مردگی، ۳۶ ساعت پس از مایه‌زنی روی برگ‌های لپه‌ای مشاهده شد. آزمون مربع کای نشان داد که اکثر ژنوتیپ‌ها در سطح دوم مقیاس قرار دارند. به این معنی که همه سطح برگ لپه‌ای دچار سلول مردگی می‌شود (جدول ۳). آزمون مربع کای برای شماره‌های صفر و چهار مقیاس، به‌طور یکنواختی تفاوت معنی‌داری بین مشاهدات و مقیاس مورد انتظار نشان می‌داد، بنابراین این دو مقیاس در جدول ۳ نشان داده نشده‌اند. برخی از ژنوتیپ‌ها تفاوت معنی‌داری از دو شماره متوالی مقیاس نشان ندادند، بنابراین بین دو مقیاس قرار گرفتند. محلی عجب شیر به‌عنوان متحمل‌ترین ژنوتیپ‌ها، بین دو مقیاس ۱ و ۲ قرار گرفت. این ژنوتیپ در روش قبلی مایه‌زنی به‌عنوان متحمل شناخته شد. KW10 و گل سفید اصفهان که با

روش مایه‌زنـی محور زیر لپه سطـوح مقاومت بالائی از خود نشان می‌دادند، به‌نظر می‌رسد که در روش مایه‌زنی برگ لپه‌ای حساسیت بالائی شبیه به اکثر ژنوتیپ‌ها دارند.

جدول ۳- آزمون مربع کای برای مقایسه سطوح تحمل برگ‌های لپه‌ای در ژنوتیپ‌های مختلف

رقم یا لاین	میانگین	درجه آزادی	χ^2-1†	χ^2-2†	χ^2-3†	شاخص آلودگی	واکنش ارقام[a]
محلی عجب شیر	۱/۵۲	۲۳	۳/۷۵^{ns}	۳/۸۲^{ns}	۳۵/۷۵**	۱-۲	T to RS
KW3	۱/۶۹	۲۷	۶/۰۸**	۲/۳۳^{ns}	۱۲/۸۱**	۲	RS
KW4	۲/۰۰	۲۸	۷ ۶۴**	۰/۲۲^{ns}	۶/۷۵**	۲	RS
KW5	۲/۰۰	۲۴	۶/۵۹**	۲/۶۹^{ns}	۱۲/۳۱**	۲	RS
KW6	۲/۳۷	۲۵	۸/۴۳**	۳/۳۹^{ns}	۱۱/۸۸**	۲	RS
Mex184	۲/۳۲	۲۶	۸/۶۷**	۱/۰۳^{ns}	۵/۱۹**	۲	RS
Mex248	۲/۵۰	۲۶	۹/۳۶**	۸/۲۵**	۳/۱۳^{ns}	۳	S
Mex143	۲/۰۰	۲۵	۷/۱۷**	۰/۶۷^{ns}	۶/۶۱**	۲	RS
گل سفید اصفهان	۱/۹۷	۲۸	۷/۲۶**	۳/۷۲^{ns}	۱۷/۳۸**	۲	RS
KW10	۱/۷۹	۲۷	۶/۲۵**	۲/۰۰^{ns}	۱۴/۲۵**	۲	RS
ورامین ۲۹۵	۲/۳۸	۲۴	۸/۴۵**	۱/۳۹^{ns}	۵/۴۲**	۲	RS
Mex 190	۲/۳۵	۲۹	۹/۶۶**	۱/۳۱^{ns}	۵/۹۵**	۲	RS
KW13	۲/۱۰	۲۷	۷/۸۶**	۲/۷۸^{ns}	۱۱/۷۵**	۲	RS
گلدشت	۲/۶۳	۲۸	۹/۹۸**	۲/۵۰^{ns}	۳/۷۱^{ns}	۲-۳	RS to S
Mex145	۲/۳۳	۲۵	۸/۳۸**	۳/۵۰^{ns}	۱۱/۳۸**	۲	RS
Mex110	۲/۴۰	۲۸	۹/۸۸**	۱/۶۱^{ns}	۲/۸۸^{ns}	۲-۳	RS to S
Mex163	۲/۰۷	۲۶	۷/۷۳**	۰/۹۲^{ns}	۱۲/۴۲**	۲	RS
زرقان۲۷۹	۲/۳۷	۲۸	۹/۳۳**	۱/۳۳^{ns}	۶/۴۴**	۲	RS
Mex117	۲/۴۸	۲۷	۹/۵۹**	۱/۶۹^{ns}	۳/۷۷^{ns}	۲-۳	RS to S
پدیده	۲/۶۳	۳۰	۹/۸۸**	۳/۵۰^{ns}	۳/۵۷^{ns}	۲-۳	RS to S

†: 1-χ^2، 2-χ^2 , 3-χ^2: به ترتیب اشاره به شماره‌های ۳،۲،۱ مقیاس دارد که در آزمون مربع کای مبنای مورد انتظار بوده است.
a: تحمل (T)، نسبتاً حساس (RS)، حساس (S). برای توضیح کامل به متن مراجعه شود.
**: تفاوت معنی‌دار در سطح ۱٪. ns: تفاوت‌ها معنی‌دار نیستند.

ج: غربال ارقام و ژنوتیپ‌ها با استفاده از مایه‌زنی برگ‌های جدا شده

اگرچه مرحله گیاهچه‌ای حساس‌ترین مرحله گیاه به بیماری یاد شده است، برگ‌های بریده شده گیاهان بالغ در مرحله گلدهی نیز به بیمارگر مایه‌زنی شدند. علاوه بر تجزیه واریانس طول و عرض سلول مردگی روی سطح برگ، حاصل ضرب این دو کمیت هم محاسبه و تجزیه و تحلیل گردید. همه کمیت‌های محاسبه شده تفاوت‌های معنی‌داری با یکدیگر داشتند (جدول ۴).

جدول ۴- آنالیز واریانس سه صفت اندازه‌گیری یا محاسبه شده در آزمون مایه‌زنی برگ‌های جدا شده از ارقام و ژنوتیپ‌های گلرنگ در مرحله بلوغ

صفات مورد بررسی	منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F
طول زخم	رقم	۱۹	۲۷۲۵/۴۳۴	۱۴۳/۴۴۴	۳۸/۱**
	خطا	۶۴	۲۴۰/۷۰۱	۳/۷۶۱	
	کل	۸۳	۲۹۶۶/۱۳۶		
عرض زخم	رقم	۱۹	۶۶۳/۴۶۳	۳۴/۹۱۹	۱۰/۳**
	خطا	۶۴	۲۱۷/۱۹۹	۳/۳۹۴	
	کل	۸۳	۸۸۰/۶۶۲		
طول زخم×عرض زخم	رقم	۱۹	۹۰۶۸۵۹۱	۴۷۷۲۹۴/۲۳۹	۳۱/۴**
	خطا	۶۴	۹۷۳۳۶۹/۸	۱۵۲۰۸/۹۰۳	
	کل	۸۳	۱۰۰۴۱۹۶۰		

**: تفاوت معنی‌دار در سطح ۱٪.

برای تعیین ژنوتیپ‌های متفاوت و گروه‌بندی آنها بر اساس سطوح مقاومت، آزمون مقایسه چندگانه توکی بین داده‌های حاصل از مایه‌زنی برگ‌ها بکار گرفته شد (جدول ۵). محلی عجب شیر، KW6، گل سفید اصفهان، ورامین ۲۹۵ و زرقان ۲۷۹ سطح سلول مردگی کوچکتری نشان دادند. به‌عبارت بهتر، این ژنوتیپ‌ها و ارقام با استفاده

از آزمون مقایسه میانگین‌های توکی، سطوح مقاومت بالاتری از خود بروز دادند. داده‌های حاصل از طول و عرض سلول مردگی با استفاده از آزمون آماری یاد شده بالا، الگوی یکسانی نشان می‌دادند. به‌نظر می‌رسد که ارقام بومی ایرانی (محلی عجب شیر، گل سفید اصفهان، ورامین ۲۹۵ و زرقان ۲۷۹) دارای سطوح بالائی از مقاومت در برگ‌های خود باشند.

حاصل ضرب طول و عرض سلول مردگی (L*W) که به‌عنوان تخمینی از مساحت سلول مردگی روی برگ‌ها در نظر گرفته می‌شود کمیت بهتری از طول یا عرض سطح سلول مردگی بود زیرا این کمیت جدید می‌تواند ژنوتیپ‌ها را در ۱۰ (a-j) گروه متفاوت دسته‌بندی نماید در حالیکه با استفاده از طول و عرض سطح سلول مردگی ژنوتیپ‌ها به ترتیب به ۹ (a-i) و ۵ (a-e) گروه متفاوت دسته‌بندی شدند (جدول ۵).

جدول ۵- اندازه‌گیری طول نکروز ناشی از مایه‌زنی برگ‌های بریده گیاهان بالغ گلرنگ در شرایط درون شیشه

رقم یا لاین	طول زخم (L) ، میلی‌متر	عرض زخم (W)، میلی‌متر	L×W
محلی عجب شیر	۴۳/۱^{hi}	۳۳/۳^{e}	۱۴۳۵/۱^{ij}
KW3	۴۹/۹^{e}	۳۴/۴^{de}	۱۷۱۹/۰^{fg}
KW4	۴۴/۶^{gh}	۳۴/۴^{de}	۱۵۳۱/۳^{hi}
KW5	۵۵/۲^{bc}	۴۴/۰^{a}	۲۴۳۰/۱^{a}
KW6	۴۰/۵^{hi}	۳۳/۲^{e}	۱۳۵۱/۳^{ij}
Mex184	۵۱/۹^{de}	۳۷/۷^{bc}	۱۹۵۷/۹^{de}
Mex248	۵۳/۴^{cd}	۳۴/۵^{de}	۱۸۴۵/۲^{ef}
Mex143	۵۰/۵^{de}	۳۷/۲^{bcd}	۱۸۷۹/۶^{ef}
گل سفید اصفهان	۴۲/۲ ^{hi}	۳۴/۵^{de}	۱۴۵۷/۴^{ij}
KW10	۵۰/۹ ^{de}	۳۹/۲^{b}	۱۹۹۴/۱^{de}
ورامین ۲۹۵	۴۲/۱^{hi}	۳۳/۹^{e}	۱۴۲۶/۲^{ij}
Mex 190	۵۳/۴^{cd}	۳۳/۹^{b}	۲۱۳۲/۶^{cd}
KW13	۵۲/۰^{de}	۳۵/۶^{cde}	۱۸۴۳/۴^{ef}
گلدشت	۵۰/۶^{de}	۳۹/۱^{b}	۱۹۷۷/۶^{de}
Mex145	۵۸/۷^{a}	۳۹/۹^{b}	۲۳۴۰/۹^{ab}
Mex110	۴۹/۱^{ef}	۳۷/۱^{bcd}	۱۸۲۶/۲^{ef}
Mex163	۵۷/۰^{ab}	۳۸/۷^{b}	۲۲۰۵/۲^{bc}
زرقان۲۷۹	۳۸/۷^{i}	۳۳/۲^{e}	۱۲۸۷/۰^{j}

نتایج و بحث

انجام یک روش سریع، ساده و دقیق با نتایج قابل تکرار برای مایه‌زنی گیاهان با بیمارگر مورد نظر یکی از چالش‌های اصلی در اصلاح گیاهان به بیماری است. اگر چه معمولاً از یک روش برای کارهای اصلاح مقاومت به بیماری استفاده می‌گردد، گاهی لازم است روش‌های مختلف آلوده‌سازی با یکدیگر مقایسه شوند تا بهترین روش برای آلوده‌سازی گیاهان انتخاب گردد. به‌علاوه ممکن است سازوکارهای ژنتیکی متفاوتی مقاومت به بیماری را کنترل نمایند، لذا لازم است تا روش‌های مختلفی آلوده‌سازی بررسی گردند. به‌عنوان مثال، بر اساس تحقیقات توماس و هیل (۱۹) پیشنهاد شده که دو سازوکار ژنتیکی متفاوت مقاومت گیاه گلرنگ، بیمارگر فیتوفتورا را در برگ‌های لپه‌ای و محور زیر لپه کنترل می‌نمایند. پس نتایج آلوده‌سازی دو اندام گیاهی یاد شده لزوماً با یکدیگر همبستگی نخواهند داشت.

از نکات مهم دیگر در تکرارپذیری نتایج حاصل از آلودگی، نقش دما در بروز علائم بیماری است. تغییرات دمائی میتواند منجر به تولید داده‌های غیرقابل تکرار شوند. بنابراین دمای بیشینه و کمینه گلخانه باید مرتباً رصد شود. احتمالاً استقرار یک روش درون شیشه و نگهداری گیاهان در دمای تحت کنترل اتاق‌های رشد برای رفع این مشکل مناسب‌تر است. اگرچه بیماری پوسیدگی فیتوفتورائی ریشه و طوقه گلرنگ از نظر اهمیت بعد از پوسیدگی فوزاریومی ریشه و طوقه قرار داده شده است (۱۵)، ولی قدرت تخریبی فوق‌العاده‌ای دارد و هنوز رقم و یا ژنوتیپ مقاوم و ایمن از بیماری، مشابه لاین بیگز (Biggs) آمریکا، در ایران معرفی نشده است.

کاربرد سه روش مختلف مایه‌زنی باعث تولید نتایج غیریکنواخت می‌گردد. نتایج حاصل از مایه‌زنی محور زیر لپه حاکی از سطوح بالای تحمل در گل سفید اصفهان و KW10 بود درحالیکه مایه‌زنی برگ‌های لپه‌ای نشان از حساسیت آنها داشت. داده‌های حاصل از مایه‌زنی برگ‌ها بدلیل اینکه واحدهای آزمایشی (تشتک‌های پتری) در شرایط دمائی کنترل شده قرار داشتند تکرارپذیر بودند. رقم گل سفید اصفهان و ژنوتیپ محلی عجب شیر در هر

سه روش مایه‌زنی برگ‌های لپه‌ای، محـور زیر لپه و برگ‌هـای بالغ سطوح بالای تحمل از خود نشان دادند. به‌نظر میرسد که ارقام و ژنوتیپ‌های محلی ایرانی نسبت به نوع خارجی دارای سطوح بالاتری از تحمل به بیماری هستند. نتایج مشابه‌ای نیز در کارهای مزرعه‌ای داویا (۷) بدست آمده است. لاین زرقان ۲۷۹ یکی از ژنوتیپ‌هائی است که در آزمون مایه‌زنی برگ گیاهان بالغ تحمل بالائی از خود نشان میداد. این لاین در آزمایش‌های ارزیابی مقاومت به بیماری خاکزی فوزاریومی هم دارای سطوح بالائی از مقاومت بوده است (۱۳).

تشکر و قدردانی

این تحقیق با استفاده از حمایت‌های مالی سازمان تحقیقات کشاورزی در قالب پروژه مصوب به شماره ۸۱۰۲۳-۱۲۰۰۰۰-۱۰۷-۲ انجام شده است.

منابع

1. Allen, E.H. and C.A. Thomas.1971. Relationship of safynol and dehydrosafynol accumulation to Phytophthora resistance in safflower Phytopathology, 62: 471-474.
2. Anonymous. 1959. New Gila Safflower. Gila safflower for southwest is now available. Plant Breeding Abstracts. 29: 2991 pp.
3. Banihashemi, Z. and M. Mirtalebi. 2008. Safflower seedling a selective host to discriminate *P. melonis* from *P. drechsleri*. Journal of Phytopathology. 156: 499-501.
4. Duniway, J.M. 1977. Predisposing effect of water stress on the severity of Phytophthora root rot in safflower Physiopathology, 67: 884-889.
5. DaVia, D.J., P.F. Knowels and J.M. Klisiewicz. 1981. Evaluation of the world safflower collection for resistance to Phytophthora. Crop Science, 21: 226-229.
6. Ershad, J. 1992. Phytophthora species in Iran. Agricultural Research Organization. 217 pp. (In Persian)
7. Harrigan, E.K.S. and Barrs, H.D. 1985. Safflower breeding for disease resistance in Australia. In: Ashri, A. (ed.). Sesame and Safflower: Status and Potentials. 66: 211-215. FAO Plant Production and Protection. Rome, Italy.
8. Johnson, L.B. 1970. Symptom development and resistance in safflower hypocotyls to *P.drechsleri*. Phytopathology. 60: 534-537.
9. Klisiewicz, J.M. 1977. Identity and relative pathogenicity of some heterothallic Phytophthora species associated with root and stem rot of safflower. Phytopathology. 67: 1174-1177.
10. McGuire, P.E., A.B. Damania and C.O. Qualset (eds.). 2012. Safflower in California. The Paulden F. Knowles personal history of plant exploration and research on evolution, genetics, and breeding. Agronomy Progress Report No. 313, Dept. of Plant Sciences. University of California. Davis CA USA.44 pp.
11. Nagaraj, G. 2009. Oilseeeds, properties, processing, products and procedures. New Delhi, New India Publishing Agency. 601 pp.
12. Nasehi, A., S. Shafizadeh, S. Rezaii and M.R. Shahsavari. 2010. Evaluation of relative resistance of Safflower (*Carthamus thinctorius*, L.) genotypes to Fusarium root rots disease in Isfahan province. Seed and Plant Improvement Journal. 25-1: 623-634. (In Persian)
13. Sadeghi Garmaroodi, H. 2009. Evaluation of reaction of spring and winter safflower cultivars to Phytophthora root rot. Research report published by Seed and Plant Improvement Institute, Karaj, Iran. (In Persian)
14. Sadeghi Garmaroodi, H. M. Mirabolfathy, H. Babai and H. Zeinali. 2007. Physiologic races of *Phytophthora soja* in Iran and race specific reaction of some soybean cultivars. Journal of Agricultural Science and Technology. (JAST) 9: 243-249. (In Persian)
15. Sharifnabi, B. and G. Saeidi. 2004. Preliminary evaluation of different genotypes of safflower to Fusarium root rots disease. Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Research. 8: 227-234. (In Persian)
16. Stamps, D.J., G.M. Waterhouse, F.J. Newhook and G.S. Hall. 1990. Revised tabular key to the species of Phytophthora. Mycological Papers, No. 62. CAB. International Mycological Institute. 28 pp.
17. Stovold, G. 1973. *Phytophthora drechsleri* Tucker and *Pythium spp*. as pathogens of safflower in New South Wales. Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry. 13: 455-459.
18. Thomas, C.A. 1976. Resistance of VFR-1 safflower to Phytophthora root rot and its inheritance. Plant Disease Reporter. 60: 123-125.
19. Thomas C.A. and R.F. Hill. 1977. Reaction of cotyledons of safflower cultivars to *Phytophthora drechsleri*: effect of temperature and inheritance. Phytopathology. 67: 698-699.
20. Thomas C.A. and J.M. Klisiewicz. 1963. Selective pathogenesis within *Phytophthora drechsleri*. Phytopathology. 53: 368 pp.
21. Thomas, C.A. and D.E. Zimmer. 1969. Resistance of Biggs safflower to Phytophthora root rot and its inheritance. Phytopathology. 60: 63-64.
22. Weicht, T.R. and J.D. McDonald. 1992. Effect of Phytophthora root rot on Na^+ uptake and accumulation by safflower. Physiopathology, 82: 520-526.

Screening of Promising Lines and Cultivars of Safflower to Phytophthora Root and Crown Rot

Fariba Yaghmori[1], Hamid Sadeghi Garmaroodi[2], Gholamreza Bakhshi Khaniki[3], Reza Haj Hosseini[3] and Amir Hasan Omidi[4]

1 and 3- M.Sc. Student and Associate Professor, Payame Noor University of Tehran
2- Assistant Professor, Seed and Plant Improvement Institute, Karaj
(Corresponding author: hsgarmaroodi@spii.ir)
4- Assistant Professor, Seed and Plant Improvement Institute, Karaj
Received: April 15, 2013 Accepted: December 8, 2013

Abstract

Phytophthora root and crown rot of safflower (*Carthamus tinctorius*) is regarded as one of the main soilborn diseases of this crop in Iran. Sampling and isolating of the causal agent was performed from farms in Ghazvin, Karaj and Isfahan. A frequently isolated oomycete called *Phytophthora drechsleri* was determined as the major pathogen of the disease. Twenty different genotypes of safflower were inoculated in mature and seedling stages using three different methods. Hypocotyls and cotyledons of 10-days seedlings were inoculated by putting a small disk of freshly prepared mycelial mat of pathogen. The results of two inoculation methods suggested that cultivars and lines including Gol sefid-e-Esfahan and KW10 in the hypocotyle method and local Ajabshir line in the second method of cotyledon inoculation had the highest level of tolerance to the pathogen. Results of detached leaf method indicated that the lines local Ajabshir, KW6, Golsefid Esfahan, Varamin295 and Zarghan279 have the highest level of tolerance to disease, respectively. The results suggest that local Iranian lines should have higher level of tolerance to the disease.

Keywords: Safflower, Crown and root rot, *Phytophthora drechsleri*