بررسی اختلاف بیماری‌زائی جدایه‌های مختلف قارچ *Ascochyta fabae* Speg.، عامل برق‌زدگی باقلا و ارزیابی مقاومت ارقام باقلا نسبت به بیماری

Studies on pathogenicity differences of the fungus isolates of *Ascochyta fabae* Speg., the causal agent of *Ascochyta* blight and evaluating the resistance of the faba bean cultivars to disease

عاطفه شیروی[۱]، داریوش شهریاری[۲*] و فاطمه شیخ[۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۶/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۹/۱۰

چکیده

سوختگی آسکوکیتایی ناشی از قارچ *Ascochyta fabae* Speg.، به‌عنوان یک بیماری مخرب در سراسر جهان شناخته شده است. این بیماری سبب افت بیش از ۹۰ درصد عملکرد در ارقام حساس بخصوص در شرایط آب و هوایی سرد و مرطوب می‌باشد. کنترل بیماری از طریق تناوب زراعی، بذر پاک و ضدعفونی شیمیایی به طور کامل موثر نمی‌باشد. از این‌رو به کارگیری ارقام مقاوم به عنوان عامل کاهش‌دهنده شدت بیماری و نوع آلودگی در کنترل بیماری اهمیت فراوانی دارد. بدین منظور در این تحقیق ابتدا جدایه‌های مختلف قارچ از مناطق شمال کشور جمع‌آوری شد گردید، سپس خالص‌سازی و اثبات بیماری‌زایی روی رقم برکت حساس به بیماری با سوسپانسیون اسپور 10^6 اسپور در میلی‌لیتر روی برگ‌ها در گلخانه انجام شد. برای تعیین قدرت بیماری‌زایی جدایه‌ها، مایه‌زنی قارچ همانند روش اثبات بیماری‌زایی روی رقم حساس برکت صورت گرفت. شدت شاخص بیماری بعد از ظهور علائم، ۱۵ روز بعد از اسپورپاشی به روش سیلرو و روبیالس انجام شد. ارزیابی واکنش ۱۴ ژنوتیپ و رقم باقلا نسبت به بیماری در شرایط مزرعه در سه تکرار در قالب طرح بلوک کاملاً تصادفی اجرا شد. از کل نمونه‌برداری‌های مناطق مختلف، جمعاً ده جدایه خالص قارچ *A. fabae* با قدرت بیماری‌زایی متفاوت به‌دست آمد که حاکی از تنوع زیاد این قارچ در استان‌های مازندران و گلستان دارد. نتایج ارزیابی مقاومت ژتوتیپ‌ها و ارقام باقلا در شرایط مزرعه مشخص نمود که ژنوتیپ‌های G-faba-67، G-faba-95، G-faba-100، G-faba-133 و رقم زرشکی واکنش مقاومت با شدت شاخص بیماری بین ۲۵/۶۶ تا ۴۰/۳۳ درصد و بقیه (۶ ژنوتیپ و۳ رقم) برابر با ۶۴ درصدکل ارقام و ژنوتیپ‌های مورد آزمایش حساس یا خیلی حساس به بیماری می‌باشند..

واژگان کلیدی: سوختگی آسکوکیتایی، *Ascochyta fabae*، رقم مقاوم

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین- پیشوا، ورامین، ایران

۲- استادیار بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات وآموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان تهران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ورامین، ایران

۳- استادیار، بخش تحقیقات باغبانی و زراعت، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان، گرگان، ایران

نویسنده مسئول مکاتبات: dshahriari37@gmail.com

مقدمه

حبوبات بعد از غلات به عنوان مهم‌ترین منبع غذایی بشر به‌خصوص از نظر پروتئین به شمار می‌آیند. باقلا، *Vicia faba* L بومی جنوب غربی آسیا بوده (مجنون‌حسینی، ۱۳۸۷) و دانه آن سرشار از فسفر، کلسیم و آهن است و حدود ۲۵-۲۰ درصد پروتئین دارد (کوچکی و بنایان‌اول، ۱۳۸۳). این محصول در بیش از ۵۰ کشور جهان کشت می‌شود. ایران با تولید بیش از ۴۶ هزار تن باقلا در سطح ۳۶ هزار هکتار، اگرچه مقام دوازدهم تولید این محصول در جهان را به خود اختصاص داده است ولی با میانگین برداشت ۱۲۷۸ کیلوگرم باقلا در هر هکتار، ۵۰۰ کیلوگرم از میانگین عملکرد جهانی پائین‌تر است (FAOSTAS, 2012). از عوامل مهم در تولید عملکرد مطلوب باقلا، تاریخ کاشت، رقم مناسب و مقاومت به بیماری‌ها معرفی شده‌اند. سوختگی آسکوکیتایی ناشی از قارچ *A. fabae.* یکی از رایج‌ترین بیمارگرهای باقلا در چندین کشور تولیدکننده باقلا می‌باشد (Kharrat *et al.*, 2006). این بیماری به عنوان یکی از عوامل مؤثر در کاهش سطح زیر کشت باقلا در برخی از کشورها شناخته شده است (Hanounik, 1980). سوختگی آسکوکیتایی می‌تواند سبب کاهش قابل توجه محصول در طول فصول سرد و مرطوب شود (Hanounik and Robertson, 1989). کاشت ارقام حساس و شرایط آب و هوایی مساعد موجب گسترش بیماری و کاهش عملکرد محصول ناشی از حملات این قارچ تا ۹۰٪ می‌گردد (Hanounik, 1980). این بیماری در محصولات زراعی از لکه‌های کوچک ایجاد شده در بذرها آغاز شده و سپس آلودگی به برگ‌های فوقانی، ساقه و در نهایت به غلاف گیاه گسترش می‌یابد (Maurin and Tivoli, 1992). عامل بیماری روی تمام قسمت‌های هوایی گیاه (برگ، ساقه، غلاف و دانه) تأثیر می‌گذارد و در صورت بروز آلودگی در مراحل آغازین رشد محصول، ارزش تجاری بذرهای آلوده به طور کلی کاهش می‌یابد. علاوه بر این، در صورت گسترش مستقیم این بیماری بر روی بذور، تبدیل به یک منبع مناسب ماده اولیه تلقیحی برای فصل آینده می‌شوند. وجود و گسترش بیماری در کشور ما اکثراً در مناطق شمالی به‌ویژه در استان‌های مازندران وگلستان روی رقم برکت می‌باشد و به‌عنوان یکی از مهم‌ترین بیماری‌های باقلا محسوب می‌شود (آقاجانی و همکاران، ۱۳۸۸). یکی از مؤثرترین روش‌های کنترل بیماری استفاده از ارقام مقاوم است. بر این اساس در این تحقیق ابتدا مناطق آلوده و درصد آلودگی مشخص گردیده و سپس مشخصات قارچ و در نهایت واکنش لاین یا ارقام معرفی شده توسط مؤسسه اصلاح و تهیه بذر در برابر بیماری مورد ارزیابی قرار خواهند گرفت.

مواد وروش‌ها

جمع‌آوری و تعیین درصد آلودگی

بدین منظور در سال‌های ۱۳۹۴ و ۱۳۹۵ از مزارع مختلف باقلا از حاشیه مزارع شهرهای ساری، نکا، بهشهر، گلوگاه، کردکوی و گرگان بازدید به عمل آمد. ابتدا بوته‌هائی‌که دارای لکه‌های مدور کوچک یا بزرگ خاکستری با پیکنیدیوم به‌صورت دانه‌های تیره در متن و یا لکه‌های بیضوی تا کشیده روی ساقه و شاخه، شناسایی شدند. برای تعیین درصد آلودگی روی قطرهای مزرعه در پنج نقطه در کادر یک مترمربعی، بوته‌های آلوده شمارش و سپس به کل بوته‌های موجود تقسیم شدند. برای جداسازی قارچ عامل بیماری از هر مزرعه چند برگ جمع‌آوری و نمونه‌ها درون کیسه‌های پاکتی به آزمایشگاه منتقل شدند. بعد از کدگذاری اقدام به جداسازی قارچ عامل بیماری گردید.

جداسازی و خالص‌سازی قارچ عامل بیماری

برای جداسازی بیمارگر، ابتدا لکه‌های برگی در زیر بینوکولر مورد بررسی قرار گرفت. پس از تأیید حضور قارچ در قطعه‌ای از برگ آلوده همراه با پیکنیدهای قارچ *A. fabae*، اسپورها با استفاده از آب مقطر استریل بعد از چند دقیقه از پیکنید خارج گردیدند، سپس سوسپانسیون اسپور حاصل با رقت مناسب بر روی محیط WA (واتر-آگار) ۱/۵٪ پخش

گردید. پس از جوانه زدن اسپورها، یک اسپور جوانه زده به محیط کشت PDA (سیب‌زمینی دکستروز آگار ساخت شرکت مرک) و محیط کشت FDA (Faba beans meal Dextrose Agar) شامل ۲۰ گرم پودر بذر باقلا، ۲۰ گرم دکستروز و ۲۰ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر استریل منتقل گردید. به این ترتیب یک جدایه تک اسپور خالص به دست آمد (Kaiser *et al.,* 1997).

اثبات بیماری‌زائی

انجام آزمون‌های گلخانه‌ای مستلزم تولید سریع و فراوان اسپور عامل بیماری است که با توجه به رشد بطئی تولید پیکنیدیوم روی محیط کشت PDA، به منظور دستیابی به بهترین روش تولید اسپور از محیط کشت FDA استفاده شد. بدین منظور دیسک پنج میلی‌متری از جدایه‌های بیمارگر جمع‌آوری شده از مناطق مختلف که قبلاً کدگذاری شده بودند، بر روی محیط کشت FDA پودر باقلا-دکستروز آگار کشت گردید و پس از دو هفته از متن محیط کشت حاوی پیکنیدیوم، قطعاتی به قطر ۰/۵ سانتی‌متر جدا و در لوله حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر ریخته و خوب بهم زده شد تا سوسپانسیون غلیظی به‌دست آید. سپس آن را در سطح تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت (FDA) پخش نموده و به مدت ۱۲ روز در دمای ۲۲ درجه سلسیوس و نور آزمایشگاه قرار داده شد. پس از تولید فراوان پیکنیدهای قارچ برروی محیط کشت، با اضافه نمودن آب مقطر سترون و مالش آرام سوزن بر روی سطح محیط کشت، سوسپانسیون اسپور قارچ پس از عبور از پارچه دو لایه ململ به‌دست آمد. سپس با استفاده از لام هموسیتومتر، محلول اسپور با رقت $۱-۲\times۱۰^{۶}$ اسپور در میلی‌لیتر تهیه و به طور یکنواخت روی گیاهچه‌های ۱۴ روزه باقلا تا مرحله ریزش اولین قطره از سطح برگ، پاشیده شد. سپس گلدان‌ها در محفظه‌ای با پوشش پلاستیکی در دمای ۲۲-۱۸ درجه سلسیوس و ۱۴-۱۲ ساعت نور و رطوبت نسبی۱۰۰-۹۵ درصد نگهداری شدند. در روز سوم، پوشش پلاستیکی برداشته شد و یک تیمار نیز به عنوان شاهد با آب مقطر استریل آب‌پاشی گردید. پس از ظهور علائم بیماری بر روی برگ‌ها، نمونه‌برداری صورت گرفت و مجدداً قارچ عامل بیماری جدا و خالص‌سازی گردید و برای اثبات بیماری‌زای، خصوصیات مرفولوژیکی آن‌ها با صفات جدایه‌های اولیه مطابقت داده شدند (Kaiser *et al.,* 1997).

ارزیابی اختلاف بیماری‌زائی جدایه‌های *A. fabae* و تعیین جدایه‌های با قدرت بیماری‌زائی بالا

در این مرحله بعد از اثبات بیماری‌زائی جدایه‌ها، قدرت بیماری‌زائی آن‌ها مطابق روش ذکر شده در قسمت اثبات بیماری‌زائی در شرایط گلخانه مورد آزمایش قرار گرفت. یادداشت‌برداری از علایم بیماری روی ساقه و برگ چهارده روز پس از مایه‌زنی با مقیاس آلودگی (۰-۹) که از ادغام دو روش ICARDA (Bernier *et al.,* 1984) و سیلرو و همکاران (Sillero *et al.,* 2001) با کمی تغییرات دست آمد، به شرح جدول ۱ صورت گرفت (Sillero and Rubiales, 2014).

این آزمایش بر اساس طرح آماری کاملاً تصادفی در گلخانه بیماری‌شناسی گیاهی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان تهران در ورامین و با چهار تکرار انجام شد. تعداد تیمارها به تعداد جدایه‌های تهیه شده قارچ *A. fabae* بود و یک تیمار شاهد بدون آلودگی نیز منظور شد. در پایان آزمایش جدایه‌ای که بیش‌ترین شاخص شدت بیماری را داشت به عنوان جدایه برتر برای آزمایش‌های گلخانه‌ای انتخاب شد.

جدول ۱- یادداشت‌برداری از تیپ آلودگی (درجه آلودگی) باقلا نسبت به بیماری برق‌زدگی(Sillero and Rubiales, 2014)

Table 1. Recording of the infection type of faba bean (infection degree) to Ascochyta blight (Sillero and Rubiales, 2014)

درجه آلودگی Infection degree	توصیف علائم بیماری بر روی هرگیاه	Symptoms description on each plant
0	بدون لکه	No lesions
1	لکه‌ها خیلی کوچک، بدون اسپور و اندازه لکه‌ها کم‌تر از ۰/۵ میلی‌متـر روی برگ، بدون علائم روی ساقه	Very small non-sporulating flecks and diameter less than 0.5 mm on leaves, with no symptoms on stems
2	مقداری لکه روی برگ با قطر بین (۰/۵-۲) میلی‌متر بدون پیکنید	Some lesions in diameter (0.5-2) mm on leaves, without pycnida
3	چند لکه کوچک با قطر (۲-۳) میلی‌متر، تیره رنگ روی برگ، بدون پیکنید و بدون علائم روی ساقه	Few small in diameter (2-3) mm, dark lesions on leaves, without pycnidia and no symptoms on stems
4	لکه‌ها قدری بزرگ‌تر به قطر (۴-۵) میلی‌متر روی برگ‌ها بـا پیکنیـد بـدون علائم روی ساقه	Lesions slightly larger with diameter (4-5) mm on leaves with pycnidia without symptoms on the stem
5	لکه‌های مدور گاهی بهم پیوسته با پیکنید روی برگ‌هـا و مقـداری ریـزش برگ بدون علائم روی ساقه	Circular lesions, sometimes coalescing, with pycnidia on leaves and little defoliation ,no symptoms on stems
6	لکه‌های مدور مکرراً بهم پیوسته با پیکنید روی برگ‌ها، ریزش برگ با علائم روی ساقه	Circular lesions, frequently coalescing, with pycnidia on leaves, some defoliation and symptoms on stems
7	لکه‌های بهم پیوسته خیلی بزرگ، نامنظم با پیکنید فراوان روی برگ، غلاف و ساقه	Many large, coalescing, irregular lesions with abundant pycnidia on leaves, pods and stems
9	لکه‌ها توسعه یافته، بزرگ شده و بهم پیوسـته، اسـپوردهـی لکـه‌هـای روی برگ، غلاف و ساقه، ریزش شدید برگ‌ها، حلقه و فرورفتگی دور ساقه ایجاد شده و مرگ بسیاری از گیاهان	Extensive, large, coalescing, lesions, the sporulating lesions on leaves, pods and stems, severe defoliation, stem constriction and gridling and many dead plants.

و شاخص شدت بیماری DSI با استفاده از فرمول: $DSI = \frac{\sum i \times P_i}{i_{max} \times P_{total}} \times 100$ تعیین شد

i= نرخ شدت بیماری	i= Disease-severity rate
P_i= تعداد گیاهان با نرخ i (مشابه)	P_i= The number of plant in i rate (identical)
i_{max}= بالاترین نرخ بیماری	i_{max}=Highest disease rate
P_{total}= تعداد کل گیاهان مایه‌زنی شده	P_{total}=The total number of inoculated plants

بررسی واکنش ژنوتیپ‌ها و ارقام باقلا نسبت به قارچ عامل بیماری در شرایط گلخانه‌ای

به منظور بررسی واکنش ژنوتیپ‌ها و ارقام مختلف باقلا نسبت به قارچ عامل بیماری برق‌زدگی، بذر ده ژنوتیپ شامل G-faba-1-1، G-faba-95، G-faba-100، G-faba-62، G-faba-67، G-faba-13، G-faba-16، G-faba-159، G-faba-133 و G-faba-1-2 و چهار رقم محلی برکت، سرازیری، زرشکی و بلوچی باقلا تهیه شده از بخش تحقیقات اصلاح و تهیه نهال بذر مرکز تحقیقات و آموزش منابع طبیعی استان گلستان در سال زراعی ۹۵-۱۳۹۴ در ایستگاه تحقیقات کشاورزی گرگان مورد مطالعه قرار گرفتند. ژنوتیپ‌ها وارقام فوق، در قالب طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی با سه تکرار تحت آزمایش

قرار گرفتند. برای هر کرت آزمایشی شش خط کاشت به طول چهار متر در نظر گرفته شد و فاصله بین خطوط کاشت ۶۰ سانتی‌متر منظور گردید. با توجه به اهمیت رطوبت در جوانه‌زنی کنیدی و نفوذ عامل بیماری هیچ‌گونه فاصله اضافی در بین کرت‌ها اعمال نشد تا به این ترتیب تراکم پوشش گیاهی شرایط مساعدتری برای گسترش بیماری ایجاد نماید. همچنین به منظور توزیع یکنواخت آلودگی در سطح مزرعه آزمایشی، رقم حساس برکت، در سه خط کاشت در اطراف مزرعه کشت گردید. مزرعه آزمایشی به طور مرتب در طی فصل مورد بازدید قرار گرفت. به دلیل وجود شرایط مناسب محیطی در منطقه گرگان، بیماری به سرعت گسترش یافت و از آن‌جا که افزایش شدت آلودگی در چنین شرایطی احتمالاً تفکیک درجات مقاومت را مشکل می‌نمود، اسپورپاشی صورت نگرفت. پس از ظهور علائم بیماری در فروردین و اردیبهشت ماه، وضعیت آلودگی بوته‌ها بررسی و شدت شاخص بیماری برق‌زدگی در ارقام کشت شده هنگامی‌که میزان آلودگی در رقم حساس برکت به ۵۰٪ و ۹۰٪ رسید، در دو مرحله انجام شد. سپس ارزیابی مقاومت ژنوتیپ‌ها و ارقام بر اساس مقیاس سیلرو و رابیالس (۲۰۱۴) انجام گرفت. داده‌های به‌دست آمده مربوط به هر یک از صفات تحت آزمون تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن مورد آنالیز آماری بااستفاده از نرم‌افزار SPSS قرار گرفتند. در این بررسی ارقامی که دارای درجه آلودگی کم‌تر از چهار بودند به‌عنوان رقم مقاوم انتخاب شدند.

نتایج

جداسازی عوامل قارچی از برگ باقلا آلوده به بیماری بلایت اسکوکیتایی باقلا

از مزارع باقلا مناطق مختلف مازندران و گلستان با علائم بیماری شامل لکه‌های مدور خاکستری روشن کوچک به قطر ۲-۵ میلی‌متر روی برگ‌ها که در آلودگی‌های گسترده، به‌هم پیوسته بودند به همراه پیکنیدیوم مشاهده شد. اغلب این لکه‌ها روی ساقه گسترش یافته و سبب شکستگی ساقه و یا خشکیدگی و مرگ بوته می‌شدند از لکه‌های مذبور روی برگ ده جدایه *A. fabae* روی محیط PDA و FDA جدا وخالص‌سازی گردید و به شرح جدول ۲ بر حسب منطقه جمع‌آوری کدگذاری شدند.

جدول ۲- مناطق جمع‌آوری نمونه‌های باقلا آلوده به بیماری بلایت اسکوکیتایی در سال‌های ۱۳۹۴ و ۱۳۹۵

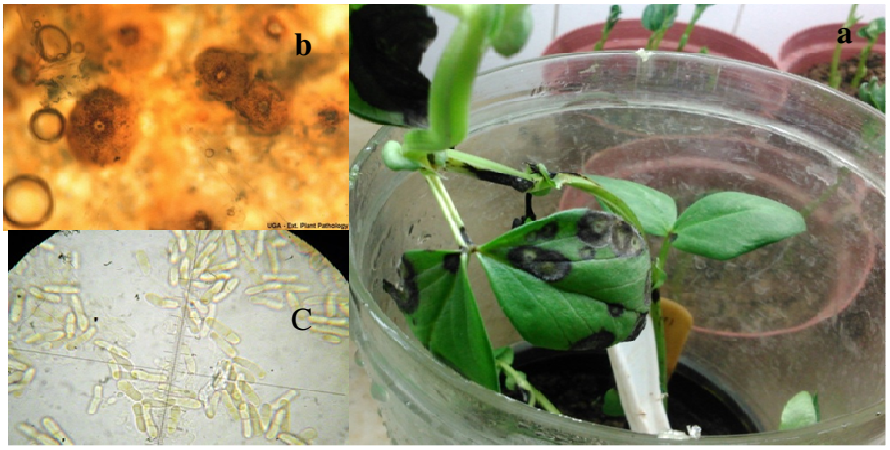
Table 2. Samples of faba bean collected from areas that infected by Ascochyta blight in the years 1394 and 1395

ردیف No.	کد نمونه Isolates	درصد آلودگی (%) (%) Infection percentage	City	شهرستان	Region	منطقه
1	af-1	21	Sari	ساری	Lamras	لمراس
2	af-2	24	Sari	ساری	Badeleh	بادله
3	af-18	17	Neka	نکا	The suburbs	حومه شهر
4	af-24	34	Behshahr	بهشهر	Koohestan	کوهستان
5	af-6	32	Behshahr	بهشهر	Gorji mahaleh	گرجی محله
6	af-17	43	Behshahr	بهشهر	Tirtash	تیرتاش
7	af-11	39	Behshahr	بهشهر	Khalil mahalleh	خلیل محله
8	af-12	41	Galoogah	گلوگاه	Khoorshid kola	خورشید کلا
9	af-16	27	Bandar e gaz	بندرگز	Gaz e sharghi	گز شرقی
10	af-21	34	Kordkooy	کردکوی	Rode side	کنار جاده

اثبات بیماری‌زایی و شناسایی

ده جدایه *A. fabae* به‌دست آمده، روی گیاه باقلا رقم برکت (حساس به بیماری) اثبات بیماری‌زایی شدند. علایم بیماری یک هفته بعد از مایه‌زنی با علائم لکه‌های مدور خاکستری روشن کوچک در سطح برگ‌ها مشاهده شد و بعد از

دو هفته، با پیوستن لکه‌ها، سطح وسیعی از برگ را فرا گرفتند و پیکنیدیوم‌ها در متن لکه‌ها ظاهر شدند. بیماری‌زائی قارچ جدا شده پس از تطبیق با قارچ اولیه آن، به اثبات رسید. شناسایی قارچ با استفاده ازکلید (Punithalingam and Holliday, 1975) بر اساس مشخصات ریخت‌شناسی به شرح ذیل صورت گرفت. پرگنه‌های *Ascochyta fabae* روی محیط PDA، به رنگ سفید تا خاکستری-سفید، به‌صورت پراکنده با پیکنیدهای فراوان می‌باشند، پشت پرگنه‌ها کرم تا قهوه‌ای روشن، پیکنیدها تا حدودی غوطه‌ور، زرد تا قهوه‌ای، تقریباً کمی کروی تا کروی، قطر ۲۰۰-۲۵۰ میکرومتر و معمولاً دارای یک دهانه برجسته می‌باشند. سلول‌های تولید کنیدیوم، شفاف، تقریباً کروی و کوتاه تا استوانه‌ای که از لایه داخلی سلول‌های احاطه‌کننده دهانه پیکنیدی به وجود می‌آیند. کنیدی‌ها شفاف، راست یا اندکی انحنادار، پایه تا حدودی سربریده یا گرد، یک یا گاهی اوقات دو یا سه دیواره ۱۶-۲۴× ۳/۵-۶ میکرومتری که در دیواره‌ها جمع نمی‌شوند.



شکل ۱- اثبات بیماری‌زایی بیماری بلایت اسکوکیتایی باقلا *A. fabae* (a) علائم بیماری روی برگ (b).پیکنیدیوم (c) اسپورها

Fig. 1. Ascochyta blight Pathogenicity of faba Bean, *A. fabae* (a) symptoms on leaves. (b) pycnidia (c) spores

ارزیابی اختلاف بیماری‌زائی جدایه‌های *A. fabae* و تعیین جدایه‌های با قدرت بیماری‌زائی بالا

در این آزمایش ده جدایه *A. fabae* که اثبات بیماری‌زائی شده بودند روی باقلا رقم برکت حساس به بیماری مایه‌زنی شدند. علایم همانند مرحله اثبات بیماری‌زائی یک هفته بعد ظاهر شد. یادداشت‌برداری دو هفته بعد با پیشرفت بیماری مطابق روش سیلرو و روبیالس (۲۰۱۴) انجام شد و شاخص شدت بیماری محاسبه گردید. داده‌های به‌دست آمده با نرم‌افزار SPSS تجزیه واریانس و میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ مقایسه شدند. نتایج حاصله نشان داد جدایه‌ها در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌دار با هم دارند (جدول ۳).

در بررسی مقایسه میانگین‌ها مشخص شد جدایه af-12 با شدت شاخص بیماری۹۷/۲ در گروه آماری a، سپس af-19 با شدت شاخص بیماری ۷۹/۳۵ در گروه آماری b قرار گرفتند. در ادامه جدایه‌های مناطق جمع‌آوری af-2، af-21، af-18 ، af-16، af-6، af-11، af-24، af-17 به ترتیب در گروه‌های آماری c، d، e، f، fg و g با مقدار شدت شاخص بیماری بین ۷۵/۱۸ تا ۲۹/۵۳ قرار گرفتند (جدول ۴).

جدول ۳- تجزیه واریانس شاخص شدت بیماری جدایه‌های *A. fabae* روی باقلا رقم حساس برکت

Table 3. Variance analysis of disease severity index of *A. fabae* isolates on the faba bean, susceptible cultivar of Barkat

S.O.V.	منابع تغییر	درجه آزادی df.	میانگین مربعات MS.
Replication	تکرار	3	0.608
Treatment	تیمار	10	27158.4**
Error	اشتباه	30	133.02
CV%	درصد ضریب تغییرات	-	3.7

ns و **: به ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪

ns and **: Respectively non-significant and Significant at 1% probability level

جدول ۴- مقایسه میانگین شاخص شدت بیماری جدایه‌های *A. fabae* روی باقلا رقم حساس برکت

Table 5. Mean comparison of disease severity index of *A. fabae* isolates on the faba bean, susceptible cultivar of Barkat

نام جدایه Isolate	شدت شاخص بیماری (درصد) Disease severity index (%)
af-12	97.2a
af-2	75.18c
af-18	66.2d
af-24	33.4fg
af-6	46.5e
af-17	29.53g
af-11	35.75f
af-19	79.35b
af-16	65.65d
af-21	72.03c
check(شاهد)	11.10h

میانگین‌ها با حروف مشابه در هر ستون فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ هستند.

Mean with similar letters in each column is not significantly different at 1% probability level

ارزیابی مقاومت ژنوتیپ‌های باقلا در شرایط مزرعه

در این آزمایش مقاومت ۱۴ ژنوتیپ و رقم باقلا در مقابل قارچ عامل بلایت اسکوکیتایی باقلا مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصله از تجزیه واریانس شاخص شدت بیماری ارقام در دو مرحله زمانی با فاصله یک ماه، اوایل فروردین و اردیبهشت نشان داد که بین این ارقام از نظر صفت اندازه‌گیری شده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ وجود دارد (جدول ۵).

جدول ۵- تجزیه واریانس شاخص شدت بیماری در ارقام باقلا در مرحله اول و دوم (فروردین و اردیبهشت-۹۵) نسبت به بیماری بلایت اسکوکیتایی باقلا *A. fabae*

Table 5- Variance analysis of disease severity index of faba bean cultivars (April and May-95) against Ascochyta blight of faba bean *A. fabae*

S.O.V.	منابع تغییر	درجه آزادی df.	میانگین مربعات MS	
			May اردیبهشت	April فروردین
Replivation	تکرار	2	69.1	645.3
Treatment	تیمار	13	16190.95**	17619.9**
Error	اشتباه	26	2512.19	5162.6
CV٪	درصد ضریب تغییرات	-	32.8	17.3

ns و **: به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪

ns and **: Respectively non-significant and significant at 1% probability level

ارزیابی‌ها بر اساس مقایسه میانگین شاخص شدت بیماری در دو مرحله یاداشت‌برداری اویل فروردین همزمان با شروع بیماری و اوسط اردیبهشت مصادف با پیشرفت و افزایش حداکثری بیماری را نشان می‌دهد. درفروردین ماه تنها در رقم برکت و سرازیری و ژنوتیپ‌های G-faba-13، G-faba-16 و G-faba-159 شدت بیماری بیش از ۵۰٪ بوده است در حالی‌که در مرحله دوم یاداشت‌برداری در اوایل اردیبهشت ماه در سه رقم برکت، بلوچی و سرازیری و ژنوتیپ‌های G-faba-1-1، G-faba-13، G-faba-16، G-faba-62، G-faba-159 شدت بیماری به بیش از ۵۰٪ رسید. این نتیجه بیانگر گسترش بیماری در مدت زمان کوتاه (یک‌ماه) در شرایط مساعد محیطی است (جدول ۶).

جدول ۶- مقایسه میانگین شاخص شدت بیماری بلایت اسکوکیتایی باقلا در ارقام مختلف باقلا تحت شرایط مزرعه (ایستگاه کردکوی) -۱۳۹۵

Table 6. Mean comparison of disease severity index of Ascochyta blight on faba bean cultivars under field conditions (Kordkooy station)-1395

ارقام Cultivars	دفعات مختلف یادداشت‌برداری در مزرعه No. of recording in field			
	(یادداشت‌برداری اول) (First recording)		(یادداشت‌برداری دوم) (Second recording)	
G-faba-1-1	47.67[1]	ab	62.33	bcd
G-faba-95	18.33	b	33	ef
G-faba-100	25.67	b	40.33	dcf
G-faba-62	47.67	ab	62.33	bcd
G-faba-67	18.33	b	40.33	def
G-faba-13	55.0	ab	69.67	abc
G-faba-16	69.67	a	77.00	ab
G-faba-159	69.67	a	77.00	ab
G-faba-133	18.33	b	33.00	ef
G-faba-1-2	33.00	b	47.67	cdef
Barkat برکت	69.67	a	77.00	ab
Saraziri سرازیری	69.67	a	91.67	a
Zereshki زرشکی	18.33	b	25.67	f
Baloochi بلوچی	40.33	ab	55.00	bcde

* اعداد متن جدول بر اساس درصد شدت شاخص بیماری می‌باشد.

* The context numbers is based on the percentage of disease severity index.

** میانگین‌ها با حروف مشابه در هر ستون فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ هستند.

** Mean with similar letters in each column is not significantly different at 1% probability level.

بر اساس میانگیـن شاخص شدت بیماری، رقـم یا ژنوتیپـی با شدت آلودگـی کم‌تر از ۲۵ درصد مشاهده نشد. در حالی‌که در چهار ژنوتیپ G-faba-67، G-faba-95، G-faba-100، G-faba-133 و رقم زرشکی واکنش مقاومت به بیماری با درجه آلودگی بین ۴-۰ وشدت شاخص بیماری بین ۲۵/۶۶ تا ۴۰/۳۳ درصد ثبت شد ولی در بقیه ارقام (۶ ژنوتیپ و۳ رقم) برابر با ۶۴ درصد کل ارقام و ژنوتیپ‌های مورد آزمایش واکنش حساس یا خیلی حساس به بیماری مشاهده گردید (جدول ۷).

جدول ۷- مقایسه میانگین شاخص شدت بیماری و واکنش ارقام مختلف باقلا نسبت به قارچ *A. fabae*

Table 7. Mean comparison of disease severity index and different cultivars of faba bean against the fungus *A. fabae*

شماره No.	ارقام Cultivars	شدت شاخص بیماری(٪) Disease severity index (%)		درجه آلودگی Infection degree	واکنش Response	
1	G-faba-1-1	62.33	bcd	5.7	S	حساس
2	G-faba-95	33	ef	3	R	مقاوم
3	G-faba-100	40.33	dcf	3.7	R	مقاوم
4	G-faba-62	62.33	bcd	5.7	S	حساس
5	G-faba-67	40.33	def	3.7	R	مقاوم
6	G-faba-13	69.67	abc	6.4	S	حساس
7	G-faba-16	77.00	ab	7	S	حساس
8	G-faba-159	77.00	ab	7	S	حساس
9	G-faba-133	33.00	ef	3	R	مقاوم
10	G-faba-1-2	47.67	cdef	4.3	S	حساس
11	Barkat برکت	77.00	ab	7	S	حساس
12	Saraziri سرازیری	91.67	a	8.3	S	حساس
13	Zereshki زرشکی	25.67	f	2.3	R	مقاوم
14	Baloochi بلوچی	55.00	bcde	5	S	حساس

میانگین‌ها با حروف مشابه در هر ستون فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ هستند.

Mean with similar letters in each column are not significantly different at 1% probability level

بحث

این بیماری در ایران در مناطق و کرانه‌های دریای خزر و کازرون گسترش دارد (ارشاد، ۱۳۸۸). در این بررسی نیز از نمونه‌های جمع‌آوری شده از مناطق شمال کشور شامل ساری، نکا، بهشهر، کردکوی و گرگان وجود و گسترش بیماری بلایت آسکوکیتایی باقلا را با بیش از ۹۵ درصد آلودگی تأیید می‌کند. کایسر (۱۹۹۷) نشان داد که منشأ این قارچ و شیوع آن از جنوب غربی آسیا، مرکز اصلی گیاه میزبان می‌باشد. این بیماری در مناطق رویش باقلا از گونه faba bean به عنوان محصول زمستانی با آب و هوای مدیترانه‌ای یا معتدل اقیانوسی بیش‌ترین شیوع را دارد (Stoddard *et al.,* 2010).

در بخش دوم بررسی‌ها، قارچ *A. fabae* روی رقم حساس برکت اثبات بیماری‌زایی شد. نتیجه حاصله با تحقیقات انجام گرفته توسط مائورین و همکاران (Maurin *et al.,* 1993) که بر روی هیستوپاتولوژی اثر متقابل بین قارچ *A. fabae* و گیاه باقلا و مقایسه واکنش رقم حساس با مقاوم، کار کردند، مطابقت دارد. در این بررسی در شرایط تلقیح مصنوعی در دمای ۱۵ درجه سلسیوس، نکـروزها هشت روز پس از مایه‌زنی ظاهر شدند و علایم روی لاین حساس 48B، با تشکیل لکه‌های تخریب شده با قطر ۵-۳۵ میلی‌متر، خاکستری رنگ حاوی پیکنیدهای برجسته مشاهده شدند و بافت‌های تخریبی همانند موارد مشاهده شده در مزرعه بودند (Maurin *et al.,* 1993).

در تفکیک جدایه‌ها از نظر قدرت بیماری‌زایی، تفاوت‌های زیادی بین جدایه‌های *A. fabae* استان گلستان و مازندران روی رقم برکت مشاهده شد. باتوجه به تنوع در بیماری‌زایی جدایه‌ها، می‌توان احتمال وجود گروه‌های بیماری‌زا، پاتوتیپ و یا نژادهای فیزیولوژیک در جمعیت‌های قارچ منطقه را گزارش نمود. در تحقیقات کاربانده و برنیر (Kharbanda and Bernier, 1980) نیز بسیاری از بیوتیپ‌های *A. fabae* با اختلاف معنی‌دار در ویژگی‌های کشت از قبیل نرخ رشد میسلیوم، تولید اسپور و اندازه کنیدی‌ها شناخته شده است و همچنین سیلرو وهمکاران (۲۰۰۱)، تنوع قابل ملاحظه‌ای را در میان جمعیت‌های *A. fabae* گزارش کردند که حاکی از وجود نژادهای متنوعی از این قارچ بوده است (Ali and Bernier, 1985; Hanounik and Robertson, 1989; Rashid *et al.,* 1991) که به عنوان عامل مهمی در برنامه‌های اصلاحی برای مقاومت به این بیماری به حساب می‌آیند (Sillero *et al.,* 2001). در بررسی دیگر، طیف وسیعی از تنوع بیماری‌زایی این قارچ در مؤسسه تحقیقاتی ICARDA در سوریه (Hanounik and Maliha, 1984) و در کانادا (Rashid and Bernier, 1985) شناسایی و همچنین مجموعه‌ای از میزبان‌های افتراقی در سوریه (Hanounik and Robertson, 1989) توسعه یافتند. متعاقباً در ICARDA واکنش لاین‌های افتراقی فوق در مقابل قارچ *A. fabae*، از منطقه مدیترانه گزارش شده است. شیوع نژادهای ۲، ۳ و ۴ از ایتالیا، نژادهای ۳ و ۴ از فرانسه و نژادهای ۲ و ۴ از تونس و سوریه گزارش شده است. با توجه به اینکه پاسخ لاین BPL 471 در بسیاری از کشورها مقاوم بود، اما وجود یک واکنش حساس در ایتالیا، یک عامل بیماری‌زای جدید را نشان داد (Anon, 1990). بر اساس ارزیابی مقاومت ۱۴ ژنوتیپ و رقم باقلا در ایستگاه عراقی محله گرگان، چهار ژنوتیپ G-faba-95، G-faba-100، G-faba-67، G-faba-133 و رقم زرشکی واکنش مقاومت با درجه آلودگی بین ۴-۰ و شدت شاخص بیماری بین ۲۵/۶۶ تا ۴۰/۳۳ را نشان دادند ولی در بقیه ارقام (۶ ژنوتیپ و ۳ رقم) برابر با ۶۴ درصد کل ارقام و ژنوتیپ‌های مورد آزمایش واکنش حساس یا خیلی حساس به بیماری ثبت گردید. در تحقیقات مشابه در لهستان، که بر روی مقاومت باقلا به سوختگی آسکوکیتایی در مؤسسه اصلاح نباتات در رادزیکو Radzików (IHAR) از سال ۱۹۸۰به بعد انجام شده است (Zakrzewska, 1985a, b, 1988)، تغییرات قابل توجهی در خصوص مقاومت به بیماری در میان ارقام و گونه‌های به‌نژادی مشاهده شده است. در مطالعات انجام شده آلودگی *A. fabae* و *B. fabae* روی اقسام گوناگون باقلا مزرعه‌ای، ارتباط واکنش گیاه به بیمارگر با ساختار ریخت شناسی آن اثبات شد (Zakrzewska, 1997). مقاومت هم به عنوان عامل کاهنده تعداد ضایعات (Ondrej, 1993)، کاهنده در نوع آلودگی (Rashid *et al.,* 1991) یا کاهنده در هر دو عامل شدت بیماری و نوع آلودگی (Hanounik and Robertson, 1989; Maurin and Tivoli, 1992) توصیف شده است. بعلاوه کاهش آلودگی می‌تواند برخاسته از ویژگی‌های مورفولوژیکی گیاه مانند طول گیاه باقلا باشد که موجب تسهیل در فرآیند گریز از بیماری می‌شود (Jellis *et al.,* 1985; Lockwood *et al.,* 1985; Maurin and Tivoli, 1992). اطلاعات به‌دست‌آمده نشان می‌دهد که مقاومت به *A. fabae* به‌صورت اختصاص-نژادی (race-specific) می‌باشد. مقاومت به بیش از یک جدایه توسط برخی از لاین‌ها به وجود چندین ژن مقاوم در این لاین‌ها مرتبط می‌باشد (Ellingboe, 1981, Nelson, 1978).

منابع Refrences

آقاجانی، م. ع.، رضی نتاج، م. و محمدی، ح. ۱۳۸۸. راهنمای شناسایی و مدیریت بیماری‌های باقلا. انتشارات رشد گرگان. ۸۷ صفحه.

ارشاد، ج. ۱۳۷۴. قارچ‌های ایران. انتشارات سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی. ۸۴۷ صفحه.

کوچکی، ع. و بنایان‌اول، م. ۱۳۸۳. زراعت حبوبات، انتشارات جهاد کشاورزی دانشگاهی مشهد، ۲۳۶ صفحه.

مجنون‌حسینی، ن. ۱۳۸۷. زراعت و تولید حبوبات (ویرایش جدید حبوبات در ایران). انتشارات جهاد دانشگاهی تهران، ۲۴۰ صفحه.

Ali, F. H. and Bernier, C. 1985. Evaluation of components of resistance to *Ascochyta fabae* on faba beans, Phytopathology 75: 962pp.

Anonymous, 1990. Food legume improvement program. ICARDA Annual report, Aleppo, Syria.

Bernier, C. C., Hanounik, S. B., Hussen, M. M. and Mohamed, H. A. 1984. Field manual of common bean diseases in the Nile Valley. ICARDA Information. Bulletin. 3: 40.

Ellingboe, A. H. 1981. Changing concepts in host-pathogen genetics. Annual review of phytopathology 19: 125-143.

Food and Argiculture Organization (FAOSTAT). 2012. World Agriculture Datam. Available at Web site http://www.fao.org/.

Hanelt, P., Schäfer, H. and Schultze-Motel, J. 1972. Die Stellung von *Vicia faba* L. in der GattungVicia L. und Betrachtungen zur Entstehung dieser Kulturart. Die Kulturpflanze 20: 263-275.

Hanounik, S. 1980. Effect of chemical treatments and host genotypes on disease severity/yield relationships of Ascochyta blight in faba beans. Faba Bean Information Service Newsletter: 50pp.

Hanounik, S. B. and Maliha, N. F. 1984. Resistance in *Vicia faba* to *Ascochyta fabae*. FABIS Newsletter (ICARDA) 9: 33-36.

Hanounik, S. B. and Robertson, L. D. 1989. Resistance in *Vicia faba* germ plasm to blight caused by *Ascochyta fabae*. Plant Disease 73: 202-205.

Jellis, G. J., Bond, D. A. and Boulton, R. E. 1998. Diseases of faba bean. Pp. 371-410. In*:* Allen, D. J. and Lenne, J. M. (eds.) The Pathology of Food and Pasture Legumes. Allen CAB International wallingford, Oxon, UK.

Kaiser, W. J., Wang, B. C. and Rogers, J. D. 1997. *Ascochyta fabae* and *A. lentis*: Host specificity, teleomorphs (*Didymella*), hybrid analysis, and taxonomic status. Plant Disease 81: 809-816.

Kharbanda, P. D. and Bernier, C. C. 1980. Cultural and pathogenic variability among isolates of *Ascochyta fabae*. Canadian Journal of Plant Pathology 2:139-142.

Kharrat, M., Le Guen, J. and Tivoli, B. 2006. Genetics of resistance to 3 isolates of *Ascochyta fabae* on faba bean (*Vicia faba* L.) in controlled conditions. Euphytica 151: 49-61.

Lockwood, G., Jellis, G. J. and Aubury, R. G. 1985. Genotypic influences on the incidence of infection by *Ascochyta fabae* in winter-hardy faba beans (*Vicia faba*). Plant pathology 34: 341-346.

Maurin, N., Gourret, J. P. and Tivoli, B. 1993. Histopathology of the interaction between *Ascochyta fabae* and *Vicia faba*: comparison of susceptible and resistant reactions. Agronomie 13: 921-927.

Maurin, N. and Tivoli, B. 1992. Variation in the resistance of *Vicia faba* to *Ascochyta fabae* in relation to disease development in field trials. Plant Pathology 41: 737-744.

Nelson, R. 1978. Genetics of horizontal resistance to plant diseases. Annual Review of Phytopathology 16: 359-378.

Ondrej, M. 1993. Response of resistant lines of horse bean to pathogenic fungus *Ascochyta fabae* Speg. Plant Genetic Resources, Annual Report. 45-48.

Punithalingam, E. and Holliday, P. 1975. *Ascochyta fabae*.[Descriptions of Fungi and Bacteria]. IMI Descriptions of Fungi and Bacteria.

Rashid, K. Y. and Bernier, C. C. 1985. Race identification in *Ascochyta fabae*.(Abstr.). Canadian Journal of Plant Pathology, Vol. 7. pp.448.

Rashid, K. Y., Bernier, C. C. and Conner, R. L. 1991. Evaluation of faba bean for resistance to *Ascochyta fabae* and development of host differentials for race identification. Plant Disease 75: 852-855.

Sillero, J. C., Avila, C. M., Moreno, M. T. and Rubiales, D. 2001. Short Communication Identification of resistance to *Ascochyta fabae* in *Vicia faba* germplasm. Plant breeding 120: 529-531.

Sillero, J. C. and Rubiales, D. 2014. Response of Vicia Species to *Ascochyta fabae* and *Uromyces viciae-fabae*. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding 50: 109-115.

Stoddard, F. L., Nicholas, A. H., Rubiales, D., Thomas, J. and Villegas-Fernández, A. M. 2010. Integrated pest management in faba bean. Field Crops Research 115: 308-318.

Zakrzewska E. 1985a. Chorobotwórcze oddziaywanie grzyba *Ascochyta fabae* Speg. na roliny ró¿nych odmian i mutantów *Vicia faba* L. Czêæ I. Niektóre zagadnienia biologii patogena.[Pathogenic effect of the *Ascochyta fabae* Speg. fungus on plants of different varieties andmutants of *Vicia faba* L. Part I. Some problems of biology of the pathogen]. Hodowla Roslin Aklimatyzacja i Nasiennictwo 29(5/6):1-22.

Zakrzewska E. 1985b. Reakcja odpornosciowa bobiku (*Vicia faba* L. var. minor Harz.) i bobu (*Vicia faba* L. var. faba) na pora¿anie grzybem Ascochyta fabae Speg. [Pathogenic action of the fungus *Ascochyta*

fabae Speg. on different varieties and mutants of *Vicia fab*a L.]. Materia³y XXV Sesji Naukowej Instytutu Ochrony Rolin. pp. 295-318.

Zakrzewska E. 1988. Variability in the resistance of *Vicia faba* L. to *Ascochyta fabae* Speg. Hodowla Rolin Aklimatyzacja i Nasiennictwo 32(1/1): 311-317.

Zakrzewska, E. 1997. Study on the influence of *Ascochyta fabae* and *Botrytis fabae* on two growing types of faba bean. Diagnosis and Identification of Plant Pathogens. Springer.