وقوع نماتد سیست طلایی سیب‌زمینی (*Globodera rostochiensis*) و پراکنش آن در استان همدان

مزدشت گیتی[۱*]، زهرا تنها معافی[۲]، امیر ارجمندیان [۳] و شهرام پیشه‌ور[۴]

چکیده

سیب‌زمینی با سطح زیر کشت حدود ۲۶۰۰۰ هکتار در استان همدان دارای اهمیت ویژه‌ای بوده و سهم مهمی در اقتصاد منطقه و ملی دارد. طی بررسی‌هایی که در بهار و تابستان ۱۳۸۷ از مزارع سیب‌زمینی شهرستان بهار صورت گرفت، در قسمت‌هایی از مزارع با سطح حدود ۱۰ تا ۲۰۰ متر مربع به صورت لکه‌ای علامت‌های کم رشدی و کمبود شدید مواد غذایی مشاهده و برگ‌های گیاهان آلوده چرمی، زبر و دچار پیری زودرس و مرگ شده بودند. در نمونه‌برداری از گیاهان آلوده و بررسی ریشه‌ها، نماتدهای ماده به شکل سیست در سطح ریشه‌ها مشاهده شد. در آزمایشگاه لاروهای سن دو با استفاده از روش سانتریفوژ استخراج و سیست‌ها در زیر میکروسکوپ تشریح از سطح ریشه‌ها جدا شدند. پس از بررسی مشخصات ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی سیست‌ها و لاروهای سن دوم گونه *Globodera rostochiensis* (Wollenweber, 1923) Behrens,1975 در نمونه‌های آلوده تشخیص داده شد. شناسایی مولکولی نیز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی گونه‌های *G. rostochiensis* و *G. pallida* انجام گرفت که نتایج مطالعه میکروسکوپی را در تایید گونه *G. rostochiensis* تکمیل نمود. با توجه به اهمیت این نماتد قرنطینه‌ای و خسارت‌زا، بررسی و نمونه برداری از کلیه مزارع سیب‌زمینی استان انجام گرفت و پراکنش بیماری در منطقه تعیین گردید. از بیش از ۹۰ درصد بوته‌های آلوده به نماتد قارچ عامل بیماری شانکر رایزوکتونیایی جداسازی شده و میانگین شدت توسعه شانکر در ساقه‌های زیرزمینی براساس شاخص آلودگی(صفر تا چهار) ۲/۹ تعیین گردید که ممکن است مبین بر هم‌کنش مثبت بین دو عامل بیمارگر فوق باشد. میزان پراکنش نماتد در شهرستان بهار ۸۱ مزرعه آلوده به وسعت ۴۵۰ هکتار با تراکم آلودگی ۲۱۳ لارو و تخم در هر گرم خاک و در شهرستان همدان ۹ مزرعه آلوده به وسعت ۷۳ هکتار با تراکم ۱۰۰ لارو و تخم در هر گرم خاک بود.

واژه‌های کلیدی: سیب‌زمینی، نماتد سیست طلایی، *Globodera rostochiensis*، قرنطینه، استان همدان

۱ و ۳. مربیان پژوهشی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان همدان، همدان

۲. دانشیار، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، تهران

۴. کارشناس حفظ نباتات، مدیریت حفظ نباتات، سازمان جهاد کشاورزی استان همدان

*: نویسنده مسوول

مقدمه

محصول سیب‌زمینی با سطح زیر کشت ۶۷۱۱۸۹ هکتار و تولید ۴۸۳۰۱۲۰ تن و متوسط تولید ۲۵۷۶۳ کیلوگرم در هکتار سهم مهمی در اقتصاد کشاورزی ایران دارد (آمارنامه کشاورزی، ۱۳۸۳-۱۳۸۴). با توجه به ظرفیت‌های بالقوه مناسب از جمله اقلیم مطلوب، به‌نظر می‌رسد با فائق آمدن بر مشکلات و موانع موجود بر سر راه تولید امکان رسیدن به متوسط عملکرد بالاتر، به راحتی امکان‌پذیر می‌باشد. یکی از مهم‌ترین عواملی که باعث کاهش تولید و کیفیت سیب‌زمینی می‌شود، عوامل بیماری‌زای گیاهی هستند. سیب‌زمینی همواره در تمام نقاط دنیا در معرض حمله تعداد زیادی از عوامل بیمارگر گیاهی از جمله ویروس‌ها، باکتری‌ها، قارچ‌ها و نماتدهای انگل گیاهی قرار دارد. میزان خسارت ناشی از این عوامل به‌طور متوسط در حدود ۱۶٪ برآورد گردیده است (FAO, 2005; Evans *et al*. 1992). سیب‌زمینی با سطح زیر کشت حدود ۲۶۰۰۰ هکتار در استان همدان دارای اهمیت ویژه‌ای بوده و سهم مهمی در اقتصاد ملی و منطقه‌ای دارد. از این مقدار حدود ۹۰۰۰ هکتار در شهرستان‌های همدان و بهار با استفاده از ارقام زودرس مانند مارفونا به‌صورت کشت بهاره در اسفندماه انجام شده و به مصرف تازه‌خوری کشور می‌رسد. بقیه حدود ۱۷۰۰۰ هکتار در شهرستان‌های کبودرآهنگ، رزن، اسدآباد و فامنین به‌صورت کشت تابستانه از اواسط فصل بهار با هدف تولید بذر یا خوراکی انجام می‌شود. علاوه براین استان همدان با بیشترین عضو در کانون تولید کنندگان بذر سیب‌زمینی کشور از نظر تامین بذر دارای اهمیت ویژه‌ای می‌باشد (مدیریت طرح وبرنامه سازمان جهاد کشاورزی استان همدان، ۱۳۸۶).

نماتد سیستی سیب‌زمینی به نام‌های مختلفی از جمله نماتد طلایی سیب‌زمینی (Potato Golden Nematode)، نماتد سیست زرد سیب‌زمینی (Yellow Potato Cyst Nematode)، نماتد طلایی (Golden Nematode)، معروف است. این نماتد به‌عنوان مخرب‌ترین و خسارت‌زاترین بیمارگر محصول سیب‌زمینی در دنیا محسوب می‌گردد که می‌تواند تا ۱۰۰٪ باعث خسارت شود (Brodie, 1984)، و تاکنون از ۶۵ کشور دنیا در مناطق سیب‌زمینی کاری در قاره‌های مختلف شامل آفریقا، آمریکا، اقیانوسیه، اروپا و آسیا (هند، مصر، ژاپن، لبنان، مالزی، پاکستان، فیلیپین، سری‌لانکا و تاجیکستان) گزارش شده است. بر اساس مطالعات انجام شده در شیلی در میکروپلات با جمعیت اولیه ۱۲، ۳۲ و ۱۲۸ تخم در گرم خاک در زمان کاشت به‌ترتیب ۲۰، ۵۰ و ۷۰ درصد کاهش عملکرد اتفاق افتاد (Morino *et.al.* 1948)، در پرو ۵۸٪ -۱۳/۲٪، جمهوری چک ۷۰-۲۰٪، نیویورک ۷۹٪ (Brodie & Mai, 1989)، در پاناما ۵۰٪ کاهش تولید به بار آورده است. در اروپا میانگین خسارت نماتد نه درصد برآورد شده است که باید هزینه سنگین قرنطینه را به آن اضافه کرد. ولی در نواحی که هیچ کنترلی صورت نگرفته، محصول برداشت شده کمتر از بذر کاشته شده است (Mai, 1977). در هلند آستانه خسارت اقتصادی تحمل آلودگی ۱/۵ عدد تخم یا لارو سن دوم، در ایتالیا ۱/۷ و در انگلستان ۲۰ عدد تخم یا لارو سن دوم در گرم خاک ذکر شده است. بیشترین آلودگی به نماتد سیستی سیب‌زمینی در شمال کشور پاکستان در همسایگی ایران گزارش شده که ۶۱٪ از مزارع آلوده، دارای ۵/۴۶ سیست در کیلوگرم خاک هستند که منجر به ۹٪ کاهش تولید سیب‌زمینی کشور پاکستان و در مزارع آلوده رها شده کل محصول از بین می‌رود (Zabeer, 1998). در الجزایر نصف محصول سیب زمینی در مناطق آلوده به سیست از بین میرود (Schluter, 1979). کاربرد ۳۲۰ کیلوگرم نماتدکش 1, 3– Dichloropropene و ۶۰۰ کیلوگرم دازومت در هکتار در الجزایر منجر به کاهش ۵۹ درصدی جمعیت و افزایش ۹۴ درصدی محصول شده است (Marks & Brodie, 1998).

زودکاشت سیب زمینی رقم اهود (کاملا مقاوم به پاتوار شماره یک *G. rostochiensis* و حساس به پاتوار شماره سه *G. Pallida*) در اواخر فوریه در شرایط گلخانه منجر به کاهش شدید مقاومت، توقف رشد و کوتاه شدن دوره رشد در مقایسه با کشت در زمان معمول در آوریل شد (Seinhorst, 1996).

گریکو و همکاران (Greco *et.al.* 2000) گزارش کردند که نماتد سیستی سیب زمینی *G. rostochiensis* و *G. Pallida* مهم‌ترین عامل خسارت روی سیب‌زمینی‌های بهاره در جنوب ایتالیا است، در این مناطق تناوب زراعی می‌تواند نماتد را به‌خوبی کنترل نماید ولی زارعین برای سال-های متمادی در یک زمین سیب‌زمینی کشت می‌کنند که منجر به افزایش جمعیت و خسارت نماتد می‌شود

فلمینگ و ترنر (Fleming & Turner, 1998) از روش PCR-RFLP کمی ناحیه ITS 1 ریبوزومی برای تشخیص گونه‌ها و محاسبه اندازه تراکم جمعیت گونه‌های *Heterodera* و *Globodera* استفاده کردند و ثابت نمودند رابطه مثبتی بین تعداد لاروهای زنده موجود در سیست و میزان DNA استخراج شده وجود دارد. در مقایسه با روش‌های سنتی، PCR روشی با دقت اختصاصی و حساسیت بالا و سریع برای شناسایی نماتدهای سیستی است.

فولاندو و همکاران (Fulando *et.al*, 1999) با استفاده از قطعات مخصوص RAPD پرایمرهای اختصاصی برای تفکیک دو گونه *G. rostochiensis* و *G. Pallida* طراحی کردند که با حساسیت بسیار بالا توانست مخلوط گونه‌ها را نیز شناسایی و مشخص نماید. *پیلی‌پنکو* و همکاران (Pylypenko *et.al.* 2005) از روش PCR برای شناسایی گونه‌های نماتد سیست طلایی در نمونه های خاک اکراین استفاده کردند و نشان دادند که *G. Pallida* دارای پراکنش کمتر (۲-۵ درصد) نسبت به گونه شایع *G. rostochiensis* (۹۵-۹۸ درصد) می‌باشد. بررسی فیلوژنتیکی براساس DNA ریبوزومی نشان داد جمعیت اکراین دارای شباهت ۹۹٪ با جمعیت اروپایی *G. Pallida* Pa 2/3 است.

این عامل بیمارگر دارای قدرت تولید مثلی بالایی است به‌طوری‌که روی ریشه ارقام حساس در یک فصل زراعی جمعیت تا ۷۰ برابر زیاد می‌شود و سیست‌های حاوی تخم در خاک‌های آلوده به مدت ۳۰-۲۰ سال قدرت زندگی خود را حفظ می‌نمایند. به همین دلیل امکان کنترل آلودگی در سطوح وسیع بسیار مشکل، گران، آلوده کننده محیط زیست و عملا غیر ممکن است (Marks & Brodie, 1998). در صورت گسترش بیماری به سایر مناطق سیب‌زمینی کاری کشور، مبارزه با آن بسیار مشکل و گران بوده و علاوه بر آلودگی‌های زیست محیطی سالیانه میلیون‌ها ریال صرف مبارزه با آن خواهد شد. تا سال ۱۳۸۷ این نماتد جزء لیست آفات قرنطینه خارجی ایران بود و در کشور ما وجود نداشت (صلواتیان، ۱۳۷۵)، متاسفانه به‌دلیل واردات خارج از کنترل و غیر فنی غده‌های سیب‌زمینی بذری و خوراکی از کشورهای آلوده، این نماتد وارد کشور شده و آلودگی به آن برای اولین بار در تاریخ ۱۳۸۷/۳/۱۸ از تعدادی مزارع سیب‌زمینی شهرستان بهار در استان همدان مشاهده و تایید شد (گیتی و معافی، ۱۳۸۷). با توجه به اهمیت موضوع این پژوهش با هدف شناسایی دقیق گونه نماتد موجود و تعیین پراکنش بیماری در مزارع سیب‌زمینی بذری و تجاری استان همدان انجام گرفت.

روش تحقیق

جمع‌آوری نمونه خاک و گیاهان آلوده

به‌دنبال مشاهده علایم بیماری در خرداد ماه سال ۱۳۸۷ در سه مزرعه سیب‌زمینی واقع در منطقه بهار نمونه برداری از خاک و ریشه انجام گرفت. در قسمت‌هایی از مزارع مذکور لکه‌هایی با سطح از چند تا ۲۰۰ مترمربع مشاهده شد که بوته‌ها دچار علائم زردی کم رشدی، کمبود شدید مواد غذایی و توقف رشد شده بودند. برگ‌های گیاهان آلوده چرمی و زبر و دچار پیری زودرس و مرگ شده بودند. روی ریشه‌های آلوده، پوسیدگی شدید و زخم‌های ناشی از قارچ رایزوکتونیا نیز مشهود بود. به کمک بیلچه بوته سیب‌زمینی همراه ریشه و خاک اطراف ریشه برداشته و در داخل کیسه پلاستیکی دارای برچسب مشخصاتی شامل: نام روستا و زارع، محل مزرعه، تاریخ نمونه برداری، تاریخ کاشت، رقم، سابقه کشت از پنج سال قبل، منشاء تامین بذر، منبع تامین آب و نوع آبیاری، علف‌های هرز شایع و عملیات زراعی و گیاهپزشکی انجام شده، ریخته و به آزمایشگاه بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات کشاورزی همدان منتقل گردید.

جداسازی و تشخیص نماتد

در آزمایشگاه، لاروهای سن دوم و نرها با استفاده از روش الک‌ها و شناورسازی در سانتریفوژ استخراج و با روش تکمیل شده دگریسه (De Grisse, 1969) تثبیت و به گلیسرین خالص منتقل شدند. سپس از نماتدها اسلایدهای میکروسکپی تهیه شد. ماده‌های نماتد و سیست‌های سطح ریشه نیز در زیر میکروسکپ تشریح از ریشه‌ها جدا و در پتری جمع‌آوری شدند و با استفاده از محلول‌های ثابت کننده، ثابت و به گلیسرین خالص منتقل گردیدند، سپس از انتهای بدن سیست‌ها برش تهیه و روی اسلاید میکروسکپی ثابت گردید. مشخصات ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی نمونه‌ها با میکروسکوپ مجهز به لوله ترسیم و دوربین دیجیتالی (Motic cam) مطالعه، اندازه گیری و عکس‌برداری شدند. با مقایسه مشخصات و اندازه‌های نمونه‌ها با منابع موجود، گونه مورد نظر شناسایی شد.

بررسی‌های مولکولی جهت تکمیل شناسایی گونه با استخراج DNA از تک سیست بر اساس روش تنهامعافی و همکاران (Tanha Maafi *et al*. 2003) و PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی گونه‌های *G. rostochiensis* و *G. pallida* (Fullaondo *et al.* 1999) انجام گرفت. سپس محصول تکثیر قطعه DNA در PCR روی ژل ۱/۵ درصد آگارز جداسازی و با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد. پرایمرهای استفاده شده شامل RoR ، RoF ، PaF و PaR با توالی زیر بودند:

RoF : 5'- GCAAGCCCAGCGTCAGCAAC- 3'
RoR : 5'- GAACATCAACCTCCTATCGG- 3'
PaF : 5'- TGTCCATTCCTCTCCACCAG- 3'
PaR : 5'- CCGCTTCCCCATTGCTTTCG- 3'

جداسازی قارچ های بیمارگر ریشه

به منظور جداسازی قارچ‌های ریشه، در آزمایشگاه ریشه‌های آلوده به مدت ۳۰ دقیقه روی صافی و زیر شیر آب سشتو شو داده شدند. قطعه‌های کوچک چند میلی‌متری از محل لکه‌های روی ریشه بریده و به مدت دو دقیقه در محلول ده درصد هیپوکلریت سدیم تجارتی ضدعفونی شدند و در محیط استریل دوبار در آب مقطر استریل شست و شو داده شده و به‌منظور خشک شدن چند دقیقه روی کاغذ صافی استریل در داخل هود قرار داده شدند. بعد از خشک شدن کامل، قطعات مورد نظر روی محیط کشت سترون PDA قرار داده شدند. پتری‌ها به مدت یک هفته در انکوباتور با دمای ۱ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند. خالص سازی جدایه‌ها به روش نوک هیف انجام گرفت و شناسایی جدایه‌های خالص با روش *سنه* و همکاران (Sneh *et al*. 1991) انجام شد. برای تعیین تعداد هسته در جدایه‌های خالص، ریسه‌های رشد یافته روی لام با استفاده از سافرانین او (Safranin-o) رنگ آمیزی و با بزرگنمایی ۴۰ میکروسکپ تعداد هسته‌ها شمارش گردید. تعیین گروه آناستوموزی جدایه‌ها با استفاده از جدایه‌های گروه‌های آناستوزی محک موجود و به روش *پارمتر* و همکاران (Parmeter *et al*. 1969) انجام شد. برای تعیین شدت آلودگی نمره‌دهی میانگین توسعه شانکرهای سطح ریشه ۱۰۰ بوته آلوده بر اساس یک شاخص آلودگی صفر تا چهار انجام گرفت.

تعیین پراکنش نماتد در استان

به‌منظور تعیین پراکنش نقاط آلوده به نماتد در یک دوره سه ماهه کلیه مزارع سیب زمینی تجاری شهرستان‌های بهار و همدان (کشت بهاره استان) در روی نقشه تقسیم‌بندی و با حرکت در سطح مزرعه به‌صورت موزاییکی مورد بررسی مشاهده‌ای قرار گرفت و در کلیه نواحی با علایم زردی و کم رشدی جهت تایید وجود نماتد، ریشه‌ها از خاک خارج شده و از نظر مشاهده سیست با ذره‌بین دستی بررسی گردید، در موارد مشکوک نمونه خاک و ریشه به آزمایشگاه منتقل و بررسی دقیق بعد از استخراج نماتد از خاک و ریشه و تشخیص با میکروسکپ تشریح انجام می‌شد. در سایر مزارع سیب زمینی خوراکی و بذری استان ردیابی و نمونه برداری در ۱۰٪ از مزارع هر منطقه به‌صورت تصادفی و کلیه مزارعی که علایمی از زردی یا کم رشدی داشتند انجام گرفت. در صورت مشاهده آلودگی در هر مزرعه و تایید آلودگی در آزمایشگاه، مراجعه مجدد به مزرعه جهت نمونه برداری تکمیلی، تعیین مساحت لکه آلوده و تراکم آلودگی انجام گرفت.

نتایج

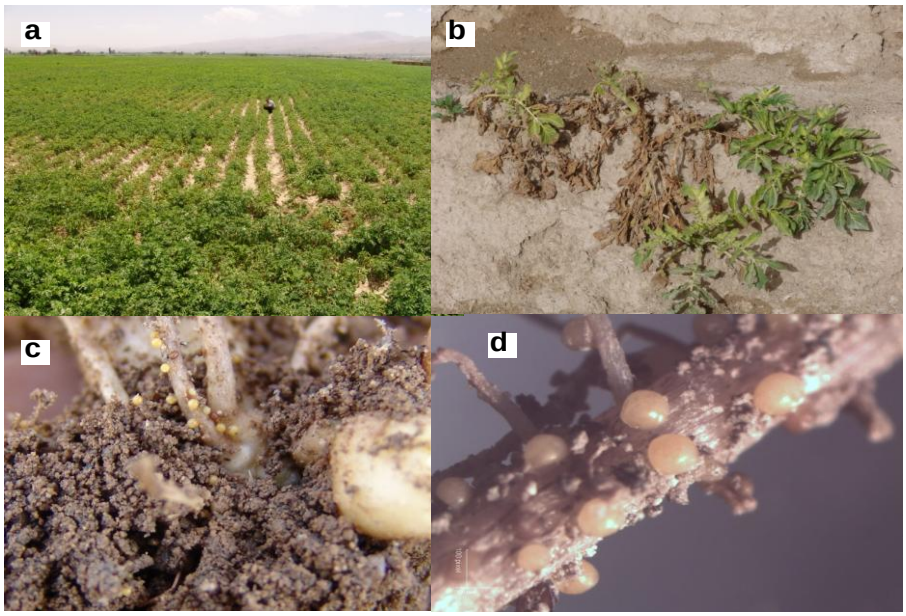
علایم بیماری

خسارت نماتد طلایی در مزرعه سیب‌زمینی بیشتر شبیه علایم کمبود مواد غذایی است و شامل لکه‌های کوچک تا بزرگ با مساحت ۱۰ تا ۲۰۰۰ متر مربع و دچار کم رشدی محصول، ضعف و زردی، پژمردگی کم یا زیاد به‌خصوص در زمان گرمای هوا (شکل a-۱)، زردی و خشک شدن برگ‌های پایینی و در نهایت مرگ بوته است. (شکل b-۱). غده‌های بوته آلوده ریز و کوچک و غیر طبیعی بوده یا اصلا تشکیل نمی‌شوند. ریشه‌های آلوده دارای انشعابات فرعی و ریشک‌های فرعی زیاد و ریشکی هستند و دچار پوسیدگی‌ها و شانکرهای شدید بوده و با ذره بین معمولی تعداد زیادی سیست‌های شیری تا طلایی رنگ و مشخص در سطح ریشه دیده می‌شود (شکل c-۱و d-۱).

شناسایی گونه نماتد عامل بیماری

با بررسی مشخصات ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی سیست‌ها و لاروهای سن دوم نماتد و مقایسه آن‌ها با منابع موجود (Wouts &Baldwin, 1998, OEPP/EPPO. 2004) نماتد سیست طلایی سیب‌زمینی، گونه *Globodera rostochiensis* Wollenweber, 1923 تشخیص داده شد. ماده‌های جوان این گونه در ابتدای تشکیل شیری رنگ بوده سپس زرد رنگ شده و تبدیل به سیست‌های طلایی تا قهوه‌ای می‌شوند. سیست‌ها گرد و بدون برجستگی مخروطی در انتهای بدن هستند (شکل c-۲). در سیست‌ها گسیختگی و تخریب غشای کوتیکولی ناحیه اطراف شکاف تناسلی تشکیل پنجره‌ای دایره‌ای شکل (Circumfenestrate) داده است که از مشخصات جنس *Globodera* است. مخرج زیرانتهایی (subterminal) بوده و فاصله آن تا لبه محدوده شکاف تناسلی (Vulval basin) (۶۸-۴۲) ۸/۶ ± ۵۲ میکرومتر، قطر Vulval basin (۱۹-۱۴) ۱/۴۵ ± ۱۵/۹ میکرومتر (شکل a-۲) و نسبت Granek (۳/۶-۲/۸) ۰/۳ ± ۳/۱۶ بود (جدول ۱). در لاروهای سن دوم استایلت به طول (۲۳-۲۰) ۰/۹ ± ۲۱/۲ میکرومتر و دارای گره‌های گرد است، شبکه کوتیکولی سر رشد کرده و مشخص (شکل b-۲). کوتیکول دارای حلقه های عرضی مشخص و چهار خط طولی در سطح جانبی است. دم لارو مخروطی و

دارای هیالین در انتها است. نماتد نر کرمی شکل به طول ۸۹۰ تا ۱۲۷۰ میکرمتر ، نر دارای شبکه کوتیکولی سر قوی و استایلت رشد کرده به طول ۲۵ تا ۲۷ میکرمتر و دارای دم کوتاه و گرد که آلت نرینگی (Spicule) در انتهای آن واقع شده است. تخم‌ها بیضی شکل و به تعداد زیاد در داخل سیست‌های بالغ موجودند (شکل d-۲). گونه *G. rostochiensis* با مشخصات فوق از گونه *G. pallida* که قرابت مرفولوژی و مرفومتری بسیار نزدیکی با آن دارد قابل تفکیک است.



شکل ۱: a-۱، لکه‌های آلوده به نماتد سیستی طلایی در مزرعه؛ b-۱ بوته آلوده در مزرعه سیب زمینی رقم مارفونا ۸۰ روز پس از کاشت، c-۱و d-۱ سیست‌های کروی سفید تا طلایی رنگ روی سطح ریشه

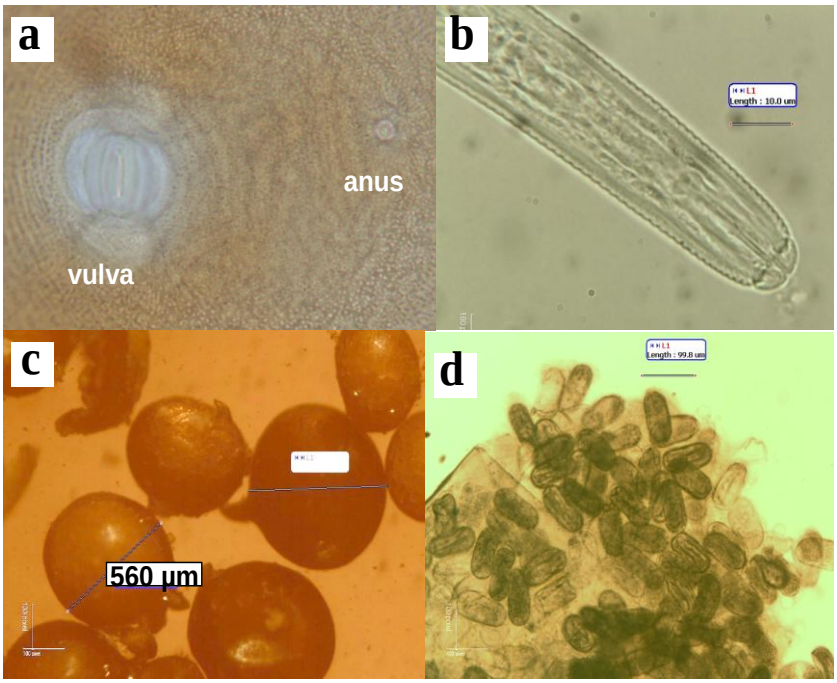
Fig 1: a, patches of infestation with PCN in field ; b, an infected potato plant of *Marfona* var. 80 dayes after planting; c & d, spherical white to golden cysts on root surface.

جدول ۱: مقایسه مشخصات به‌دست آمده از جمعیت *G. rostochiensis* جمع‌آوری شده از مزارع سیب‌زمینی استان همدان در مقایسه با منابع علمی (Wouts &Baldwin, 1998, OEPP/EPPO. 2004)

Table 1: Measurements from Hamedan population of *G. rostochiensis* in comparison with *G. rostochiensis* and *G. Palida* from reffrences (Wouts &Baldwin, 1998, OEPP/EPPO. 2004)

گونه species	مشخصات استایلت لارو سن دوم J2 stylet knob		مشخصات سیست بالغ Adult cyst	
	شکل سطح جلویی گره anterior surface of knob	طول استایلت (میکرمتر) Stylet length (µm)	تعداد برآمدگی کوتیکولی بین مخرج و فرج Number of cuticular ridges between anus & vulval basin	نسبت گرانک Granek's ratio*
G. Palida	تیز به سمت جلو Pointed forward	22-24(23.8)	8-20(<14)	1.2-3.5(< 3)
G. rostochiensis	گرد Rounded	19-23(21.8)	12-31(>14)	1.3-9.5 (> 3)
جمعیت همدان Hamedan population	گرد Rounded	20-23(21.2)	15-26(19.2)	2.8-3.6(3.16)

نسبتGranek: نسبت فاصله بین مخرج تا نزدیکترین لبه فرج (Vulval Basin)، بر اندازه قطر شکاف فرج

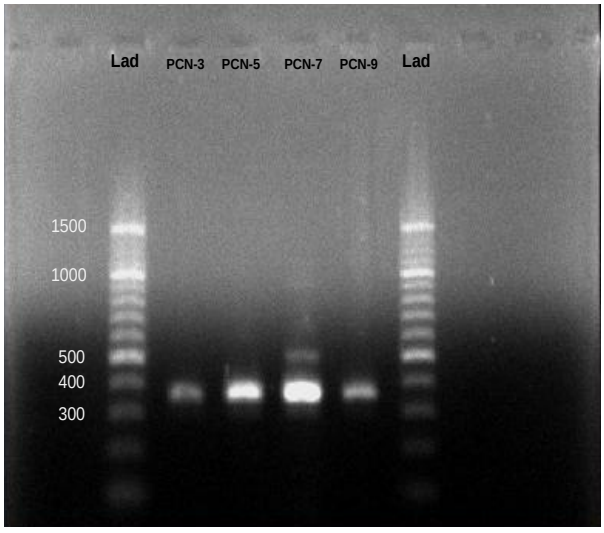


شکل ۲: مشخصات میکروسکوپی *G. rostochiensis* جمع آوری شده از مزارع سیب‌زمینی استان همدان؛ a: شبکه کوتیکولی انتهای بدن سیست بالغ؛ b: سر و استایلت لارو سن دوم نماتد؛ c: سیست بالغ طلایی رنگ d: تصویر میکروسکپی سیست پاره شده نماتد و تعداد زیادی تخم که از آن بیرون آمده است.

Fig 2: Microscopice characteristics of *G. rostochiensis* of Hamedan potato fields. a: vulval region of cyst; b: head and stylet of J2; c: dault golden cyst; d: eggs inside cyst.

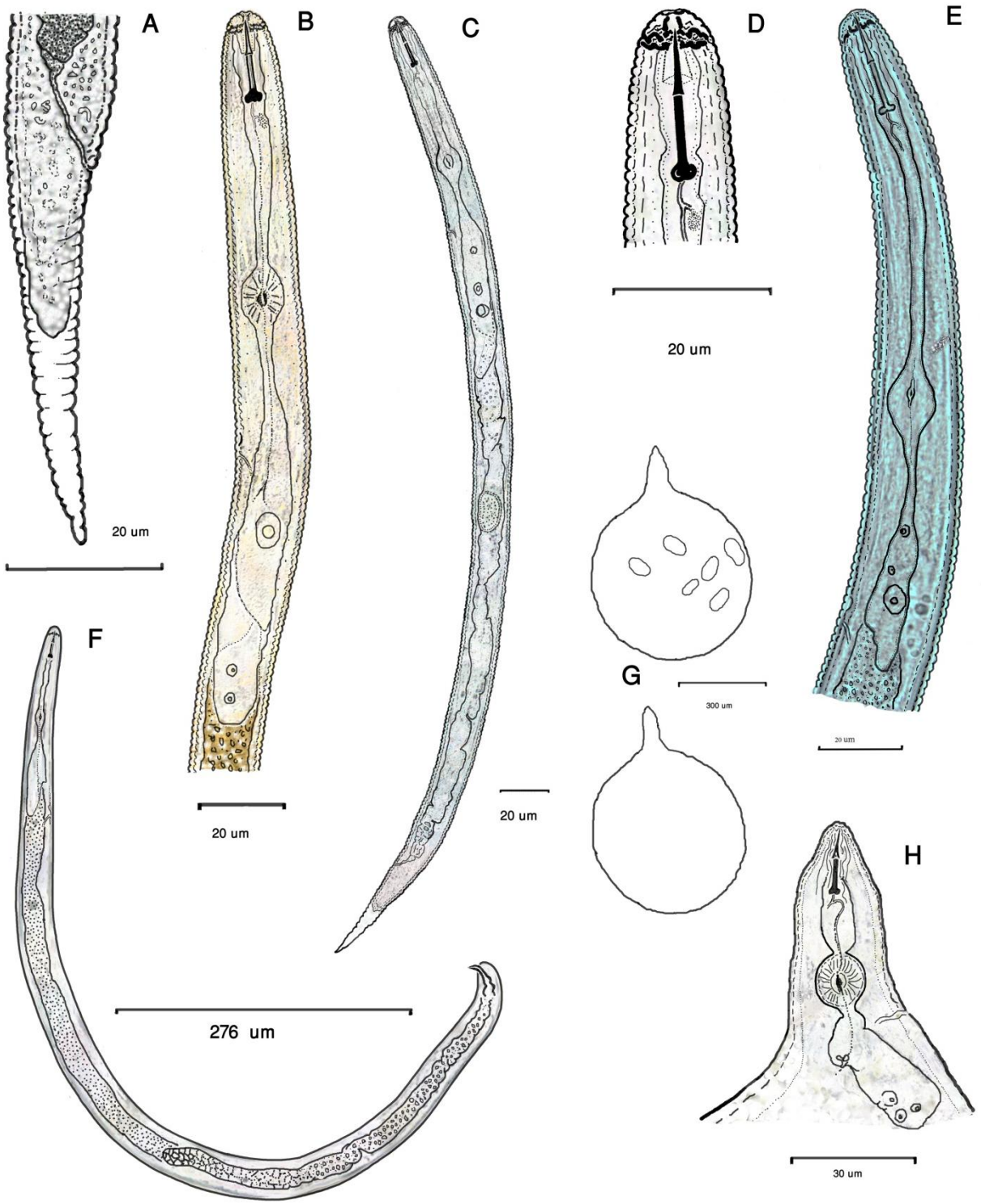
نتایج شناسایی عامل بیماری با روش ملکولی

نتایج شناسایی گونه *G. rostochiensis* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی مثبت بود و قطعه‌ای به طول حدود 320 kbp تکثیر شد (شکل ۳) در حالی‌که نتیجه انجام PCR با استفاده از پرایمر اختصاصی گونه *G. Pallida* منفی و هیچ باندی تشکیل نشد، در صورت مثبت بودن باند ایجاد شده حدود 800 kbp مشخص می‌شد.



شکل ۳: تصویر ژل آگارز نتیجه شناسایی گونه *G. rostochiensis* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی گونه، طول قطعه تکثیر شده در این روش برای این گونه حدود ۳۲۰ جفت باز است که دارای باندهای کاملا مشخص می‌باشد.

Fig 3: Agarose gel for identification of *G. rostochiensis* with RAPD-PCR by using species specific primers. length of amplified fragment is 320 bp with conspicuous bands.



شکل ۴: ترسیم میکروسکپی *G. rostochiensis*؛ A: انتهای بدن لارو سن دوم، B: ابتدای بدن لارو سن دوم، C: بدن کامل لارو سن دوم، D: سر و استایلت لارو سن دوم، E: ابتدای بدن نر بالغ، F: بدن کامل نر بالغ، G: سیست بالغ و تخم‌های بیضی شکل، H: سر، استایلت و مری ماده بالغ

Fig 4: *G. rostochiensis* from Hamedan; A, 2nd-stage juvenile end of body ; B, 2nd-stage juvenile anterior part of body; C, Entire juvenile; D, 2nd-stage juvenile head and stylet; E, Anterior part of mail body; F, Entire body of male; G, adult cyste with eggs; H, anterior part of adult female.

در کلیه موارد جداسازی قارچ‌های روی ریشه‌های آلوده به سیست *Rhizoctonia solani* شناسایی شد. کلنی های جوان ایزوله‌های مختلف این قارچ به رنگ کرمی تا قهوه‌ای روشن بودند که با کامل شدن پوشش قارچ در سطح پتری به تدریج به رنگ قهوه‌ای تیره در می‌آمدند و اسکلروت-های قارچ به ابعاد ۲ تا ۵ میلی‌متر اغلب به‌صورت پراکنده در سطح پتری ظاهر گردیدند. همه جدایه‌ها چند هسته‌ای بوده و در گروه سه آناستوموزی (AG-3) قرار دارند. در بررسی ۱۰۰ بوته آلوده به نماتد سیستی طلایی سیب زمینی شیوع بیماری شانکر رایزوکتونیایی ساقه بیش از ۹۰ درصد و میانگین شدت توسعه شانکرها در ساقه‌های زیر زمینی این-گونه بوته‌ها براساس شاخص آلودگی صفر تا چهار، ۲/۹ تعیین گردید که احتمالاً ممکن است مبین بر هم‌کنش مثبت بین دو عامل بیماری‌زای فوق باشد.

نتایج بررسی پراکنش عامل بیماری در مزارع سیب‌زمینی استان

نتایج عملیات ردیابی که در کلیه مزارع سیب‌زمینی بذری و تجاری استان همدان انجام گرفت، نشان می‌دهد این نماتد فقط در منطقه کشت بهاره استان در شهرستان‌های بهار و همدان وجود دارد. در شهرستان بهار تعداد ۱۵۱ لکه آلوده با مجموع مساحت ۱۵ هکتار و با تراکم آلودگی ۲۱۳ تخم و لارو در گرم خاک در مرکز لکه آلوده که این لکه‌ها در ۸۱ مزرعه آلوده به وسعت تقریبی ۴۵۰ هکتار واقع شده است. در شهرستان همدان ۴۰ لکه آلوده با مساحت ۲۲/۵ هکتار با تراکم ۱۰۰ لارو و تخم در گرم خاک در مرکز لکه آلوده که این لکه‌ها در ۹ مزرعه آلوده به وسعت تقریبی ۷۳ هکتار می‌باشند. در هیچ‌یک از مزارع تجاری و بذری استان در شهرستان‌های اسدآباد، کبودرآهنگ، رزن ، فامنین و تویسرکان نماتد سیستی طلایی سیب‌زمینی دیده نشد.

بحث

نماتدهای سیستی سیب‌زمینی تاکنون از ۶۵ کشور دنیا در مناطق سیب‌زمینی کاری قاره‌های مختلف گزارش شده است (Marks and Brodie, 1998). این نماتد دارای قدرت تولید مثلی بالایی است به‌طوری‌که روی ریشه ارقام حساس سیب‌زمینی در یک فصل زراعی جمعیت تا ۷۰ برابر زیاد می‌شود و سیست‌های حاوی تخم درخاک‌های آلوده به مدت ۳۰-۲۰ سال قدرت زندگی را حفظ می‌نمایند. زندگی این انگل با تفریخ لاروهای سن دوم از داخل تخم‌های موجود در سیست در اثر ترشحات ریشه میزبان (سیب‌زمینی، گوجه‌فرنگی، بادمجان و تاجریزی) شروع می‌شود. با وجود شرایط مساعد و ترشحات ریشه میزبان ۸۰٪ از تخم‌ها تفریخ و در غیر این‌صورت ۳۰٪ تخم‌ها تفریخ می‌شوند. این انگل دارای ۴ مرحله لاروی است. لارو سن یک در داخل تخم پوست‌اندازی نموده و لارو سن دوم از تخم خارج می‌شود و به کمک استایلت خود و آنزیم‌های هضم‌کننده غدد مری پوست ریشه میزبان را از نزدیکی نوک ریشه سوراخ کرده و وارد بافت ریشه می‌گردد سپس در راستای طولی استوانه مرکزی در سلول‌های پری‌سیکل مستقر می‌شود. لاروهای ماده از سن سوم شروع به متورم شدن نموده و با پاره کردن پوست ریشه، بدن گرد و کروی خود را در سطح ریشه نمایان می‌کنند در حالی‌که سر و گردن آن‌ها برای تغذیه در داخل بافت ریشه است. ماده‌های جوان برای تولید تخم نیاز به جفت‌گیری دارند. و تخم‌ها از بدن ماده خارج نمی‌شوند و در انتهای دوره زندگی ماده بدن کروی آن پر از حدود ۲۰۰ تا ۵۰۰ تخم شده و با ضخیم شدن پوسته‌های سیست می‌تواند تخم‌ها را در مقابل شرایط نامساعد محیطی زنده نگهداری کند (Marks and Brodie, 1998). به همین دلیل امکان کنترل آلودگی در سطوح وسیع بسیار مشکل، گران، آلوده‌کننده محیط زیست و عملا غیر ممکن است.

روش‌های مختلفی به‌خصوص به‌صورت تلفیق چند روش با هم برای کنترل این نماتد استفاده می‌شود که شامل: ۱-تناوب زراعی با گیاهان غیر میزبان به‌مدت حداقل سه سال و مبارزه با علف های هرز خانواده بادمجانیان (Solanaceae) و شخم تابستانه در دوره تناوب؛ ۲- کاشت ارقام سیب‌زمینی مقاوم به نماتد، متاسفانه رقم مارفونا که در منطقه بهار کشت می‌شود یکی از حساس‌ترین ارقام نسبت به نماتد است و لازم است حتما از کشت این رقم در مزارع آلوده اجتناب گردد، از ارقام مقاوم نسبت به بیوتیپ شماره یک این نماتد ارقام اگریا، سانته، آتلانتیک، آئولا، کاردینال، کنکورد، دیامانت، فیانا، فرسکو، هرتا، لیدی روزتا، موندیال، مورن و پیکاسو میتوان نام برد؛ ۳- کاربرد نماتدکش‌ها برای کنترل نماتد طلایی با توجه به قیمت بالای آن‌ها، دوز بالای مورد نیاز جهت کنترل و آلودگی‌های شدید زیست محیطی که به‌دنبال دارند، فقط در موارد قرنطینه‌ای و لکه‌های آلوده امکان پذیر و قابل انجام است. از نماتدکش‌های موثر روی سیست، گاز متیل برماید به میزان ۴۸۰ تا ۱۵۶۰ کیلوگرم در هکتار در زیر پوشش پلاستیکی، دی کلروپروپن-دی کلروپروپان (D-D یا Telone II) به‌میزان ۱۵۶تا ۱۱۰۰ کیلوگرم در هکتار ، نماتدکش‌های فسفره از جمله: فنسولفوتیون،

تیونـازین، فنـامیفوس(Kg ai/h 11-13)، دی سـولفوتون، تربوفوس، اتوپروفوس، فوسـتوتان، نماتـدکش‌هـای کاربامـات شـامل آلـدیکارپ (Temik) ، اگزامیـل (Vydate) بـه میـزان 5.6 Kg ai/h می‌توان ذکر کرد.؛ ۴- اسـتفاده از گیاهـان تلـه؛ ۵- آفتاب‌دهی خاک؛ ۶- روش‌های قانونی و قرنطینه؛ هسـتند (Wing *et al*. 2008 ، USDA .2007).

آستانه خسارت اقتصادی تحمل آلودگی خاک به نماتد سیستی طلایی بسته به منطقه و شرایط زارع و شرایط اقتصادی و نوع پاتوتیپ موجود در منطقه متفاوت بوده و برای مثال در کشور هلند تعداد یک و نیم، در ایتالیا دو، در انگلستان زیر ۲۰ عدد نوزاد و تخم در گرم خاک در نظر گرفته می شود. در آمریکا در صورت مشاهده حتی یک لارو و تخم در زمین، کشت فوراً معدوم و تدخین خاک تا شعاع ۸۰۰ متر با نماتدکش تیلون ۲ انجام می‌شود (USDA .2007). در همه کشورهای آلوده برنامه‌های مدون و منظمی جهت پایین نگه داشتن میزان آلودگی و جلوگیری از پراکنش آلودگی به نقاط غیر آلوده صورت می‌گیرد. از طرفی با توجه به مطالعات انجام شده، میزان آلودگی فعلی مزارع آلوده کشور، حدود ۲/۱۳ سیست و ۱۰۰ تخم یا نوزاد در یک گرم خاک است که با حداکثر میزان آلودگی قابل پذیرش در دنیا (۱۵ نوزاد یا تخم در گرم خاک) تفاوت چشم‌گیر دارد و در صورت کم توجهی به موضوع در سال‌های آینده خسارت جبران ناپذیری به زراعت سیب‌زمینی کشور وارد می‌گردد. لازم است در اسرع وقت در کلیه استان‌های سیب‌زمینی کاری کشور کمیته‌های فنی جهت ردیابی آلودگی احتمالی تشکیل گردد و با عزم راسخ جهت کنترل آلودگی‌های موجود اقدامات سریع و منسجم قرنطینه‌ای صورت گیرد. همچنین پیشنهاد می‌گردد تحقیقات لازم در مورد شناسایی پاتوتیپ (های) موجود در ایران، بررسی واکنش ارقام سیب‌زمینی تجاری کشور از نظر مقاومت به *G. rostochiensis* و پاتوتیپ مربوطه و مطالعه برهم‌کنش قارچ *R. solani* با این گونه تحقیقاتی انجام گردد.

منابع:

جهت ملاحظه منابع به صفحه‌های ۱۳-۱۴ متن انگلیسی مراجعه شود.

Occurrence of Potato Golden Cyst Nematode in Iran and its Distribution in Hamadan Province

Gitty[1]*, M., Tanha maafi[2], Z., Arjmandian[3], A. and Pishevar[4], S.

Abstract

The total area under cultivation of potato in Hamadan province is about 26000 hectares that has high economic importance role in the region. In a survey in June 2008 patches of about 200 m^2 poor growth were observed in three potato fields. Potato plants in these areas exhibited symptoms of severely nutrient deficiency along with chlorosis and wilting. Roots of infected plants showed white, golden mature females and brown cysts. Soil and root samples were transferred to the laboratory and processed by centrifugal floatation technique. The morphological and morphometrical characters of second stages juveniles and perineal area of cysts were determined by light microscope. On the basis of the characters *Globodera rostochiensis* was identified. Complementary diagnosis was done by species specific primers. Potato golden cyst Nematode is the most important pest on potato that can cause a major yield losses in potato crops up to 80 - 100%. Since introduction of PCN to other potato fields could cause remarkable yield losses therefore, implementation of quarantine regulations in infested fields in order to control and eradicate the infestation is necessary. *Rhizoctonia solani* the causal agent of the Rhizoctonia stem and stolon canker was isolated from 90% of infected potato plants with *G. rostochiensis*, the canker scale was determined 2.9. This preliminary study showed possible interactions between *Rhizoctonia solani* and potato cyst nematode. In Bahar city 81 fields with 450 hectars area and in Hamedan city 9 fields with 73 hectars area were infected**.**

Keywords: Potato Golden Cyst Nematode, *Globodera rostochiensis*, Quarantine, Hamadan

References

Agricultural Organization of Hamadan province. 2008 . Annual statistical report.

Baruti, Sh. and Alavi, A. 1995 . Plant Nematology, principles with parasitic and quarantine nematodes of Iran. Moallefin Press . 278 pages.

Brodie, B. B. 1984. Nematode parasites of potato. In: Nickle WR, *Plant and insect nematodes*, New York, Marcel Dekker, Inc., 167-212.

De Grisse, A. T. 1969. Redescription ou mudification de quelques techniques utilisees dans l'etude des nematodes phytoparasitaires. Mededlingen Rijksfaculteit der Landbouwwetenschappen Gent. 34:351-369.

OEPP/EPPO. 2004. *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida*. PM 7/40(1), *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 34, 309 –314.

Evans, K. and Trudgill, D. L. (1992). Pest aspects of potato production. Part 1. The nematode pest of potatoes In: Harris, P.(Ed). *The potato crop*, 2nd ed. London, UK, Chapman&Hall. pp.438-475.

FAO.(2005). Production Yearbook . Home page on internet .Availablr on the : www.http//.FAO**.**

Fleming, C. C. and Turner, S. 1998. Diagnosis of cyst nematodes: use of polymerase chain reaction to determine species and estimate population levels. *Aspects of Applied Biology*. 52: 375-382 .

Fullaondo, A., Barrena, E., Viribay, M., Barrena, I., Salazar, A. And Ritter, E. 1999. Identification of potato cyst nematode species *Globodera rostochiensis* and *G. pallida* by PCR using specific primer**.** *Nematology*. 1: 157-163.

Gitti, M. and Tanha-Moafi, Z. 2008. New report of occurrence of quarantine potato golden cyst nematode from Hamadan province. Proceedings of 18 th Iranian plant protection congress. Page 604 .

Karssen, G. 2004. Protocol for the diagnosis of quarantine organisms; *Globodera rostochiensis* and *Globodera palida* . EPPO A1 list No. 125.

Marks, R. J. and Brodie, B. B. 1998. *Potato Cyst Nematode , Biology, distribiution and control*. CAB International. London. 408 pp.

Parmeter, J. R, Sherwood, R. T. and Platt, W. D. 1969. Anastomosis grouping isolates of *Thanatephorus cucumeris* . Phytopathology . 59 : 1270-1278 .

Salavatian, M. 1996. Plant quarantine in Iran. Agricutural Education Press. Karaj.

Seinhorst, J. W. 1996. Effect of early planting on the tolerance of potato cv.Ehud to attack by *G. rostochiensis* pathotype RO 1 and *G. palida* pathotype PA 3 . *Nematol. Medit.* , 24 : 301-306 .

1. And 3. Academic Staff, Agricultural and Natural Resources Research Center of Hamadan, Hamadan

2. Associate Professor of Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran

4. Plant Protection division of Jehad-e-Agricultural organization of Hamadan Province

∗: Corresponding author

Sneh, B., Burppe, L. and Ogushi, A. 1991 . Identification of *Rhizoctonia* species. The American Phytopathological society . St. Paul, MN . 133pp .

Stone, A. R. 1973. *Heterodera rostochiensis*. CIH descriptions of plant parasitic nematodes set 2, No. 16. St. Albans, UK: Commonwealth Institute of Helminthology.

Tanha Maafi, Z., Subbotin, S. A. and Moens, M. 2003. Molecular identification of cyst-forming nematodes (Heteroderidae) from Iran and a phylogeny based on ITS-rDNA sequences. *Nematology* 5: 99-111.

USDA .2007. Potato Cyst Nematode National Survey and Diagnostic Cyst sample Forwarding Protocols. 27 pp.

Wing, S. and Knight, B. 2008. Guidelines on surveillance and Phytosanitary Actions for the Potato Cyst Nematodes: *Globodera rostochiensis* and *G. palida* .CFIA and APHIS .

Wouts WM and Baldwin JG 1998 Taxonomy and Identification. In: Sharma SB, ed. The Cyst Nematodes. Dordrecht, The Netherland: Kluwer Academic Publishers, 83-122.

Zabeer, K. 1998. potato cyct nematode (*Globodera* species) in Asia. pp. 333-347.In: Marks, R. J. and Brodie, B. B. (Ed.). *Potato Cyst Nematode , Biology, distribiution and control*. CAB International. London. 408 pp.

To look at the figures and tables, please refer to the Persian text (pages: 53-61= ۵۳-۶۱).