

## بررسی برخی فاکتورهای موثر بر تولید و بیماری‌زایی زئوسپورهای *Phytophthora capsici* و *P. nicotianae* روی میوه‌ی گوجه فرنگی

علی اصغر داوری<sup>۱</sup>، کامران رهنما<sup>۲</sup> و حجت اله ربانی نسب<sup>۳\*</sup>

۱- دانش آموخته‌ی کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گلستان، گرگان، ایران.

۲- دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده تولیدات گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گلستان، گرگان، ایران.

۳- استادیار بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی گلستان، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان، ایران.

\*مسئول مکاتبه: h.rabbani@areeo.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۰/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۲/۴

### چکیده

گونه‌هایی از جنس فایتوفتورا باعث پوسیدگی ریشه، طوقه و مرگ گیاهچه‌ی گوجه‌فرنگی می‌شوند. در صورت تماس میوه با خاک و فعال بودن بیمارگر، میوه در معرض پوسیدگی به نام پوسیدگی چشم گوزنی قرار می‌گیرد. در این تحقیق عوامل بیمارگر از خاک، ریشه و طوقه‌ی گوجه‌فرنگی در استان خراسان شمالی جداسازی شده و به‌عنوان گونه‌های *capsici* *Phytophthora* و *P. nicotianae* شناسایی و بیماری‌زایی هر دو گونه روی نشاهای گوجه‌فرنگی به اثبات رسید. تولید زئوسپور در این گونه‌ها تحت تأثیر شرایط نوری و دمایی مختلف مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که از لحاظ واکنش به شرایط دمایی بین آنها اختلاف معنی‌داری وجود داشت. همچنین دما در آزادسازی زئوسپور هر دو گونه اثر معنی‌داری داشت. بیشترین تولید زئوسپور در یکی از جدایه‌های *P. capsici* در ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و در شرایط تاریکی اتفاق افتاد. در مورد *P. nicotianae* در ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و شرایط نوری بیشترین زئوسپور تولید شد. بیشترین طول زخم ایجاد شده توسط زئوسپورها در جدایه‌ی شماره‌ی دو مربوط به گونه‌ی *P. capsici* رخ داد که اندازه‌ی آن در ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و تاریکی پس از پنج روز به حدود ۵۰ میلی‌متر رسید. در مورد گونه‌ی *P. nicotianae* بیشترین بیماری‌زایی زئوسپورها در ۲۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و در شرایط نوری حادث شد.

واژه‌های کلیدی: فایتوفتورا، زئوسپور، گوجه‌فرنگی، خراسان شمالی.

### مقدمه

بیماری شده و پیش‌آگاهی بیماری به منظور مدیریت آن را امکان‌پذیر خواهد نمود. گونه‌های فایتوفتورا تولید اسپورهای تاژک‌دار متحرک به نام زئوسپور می‌کنند که درون کیسه‌های ویژه‌ی به نام اسپورانژیوم تولید می‌شوند. زئوسپورها در آب شنا کرده و به میزبان جدید حمله می‌کنند (بنی‌هاشمی و سرتیپی ۲۰۰۴).

زئوسپورها کموتاکسی<sup>۱</sup> داشته و به سمت مواد بیوشیمیایی مختلفی مانند ویتامین‌ها، ترکیبات فنولی، اسید نوکلئیک‌های نیتروژن‌دار، نوکلئوتیدها، تنظیم‌کننده‌های رشد، قندها، اسیدهای آلی و آمینواسیدها جذب می‌شوند (Khew and Zentmyer, 1973). گونه‌های *Phytophthora P. palmivora* (E.J. Butler) E.J. Butler و *capsici* Leonin

در میان شبه‌قارچ‌ها، گونه‌های مختلف فایتوفتورا به خصوص در شرایط رطوبت بالا و اشباع بودن دائمی خاک می‌توانند خسارات زیادی به گوجه‌فرنگی وارد سازند. این شبه‌قارچ‌ها به عنوان عوامل بیماری‌های مختلف در بسیاری از گیاهان زراعی، صیفی و جالیز شناخته شده‌اند. آنها در اثر حمله به گیاه علائمی مانند مرگ گیاهچه، سوختگی اندام‌های هوایی، پوسیدگی میوه، ساقه، طوقه و ریشه ایجاد کرده و در اکثر موارد هم منجر به مرگ میزبان می‌شوند (شکاری و همکاران ۲۰۰۵).

اطلاع از تأثیر دما بر اسپورزایی قارچ‌ها و شدت بیماری‌زایی آنها منجر به درک صحیح از شرایط انتشار

<sup>1</sup>Chemotaxis

در مورد *P. parasitica* بیشترین درصد زئوسپور در دمای ۲۰ درجه‌ی سانتیگراد و بیشترین درصد تولید لوله‌تندش در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتیگراد مشاهده گردید. در مورد *P. citrophthora* بیشترین درصد زئوسپور در دمای ۲۰ درجه‌ی سانتیگراد و بیشترین درصد لوله‌تندش در دمای ۳۰ درجه‌ی سانتیگراد انجام شد. در گونه *P. citricola* Sawada بالاترین درصد زئوسپور در دمای ۲۰ درجه‌ی سانتیگراد و بالاترین درصد لوله‌تندش در دمای ۱۵ درجه‌ی سانتیگراد اتفاق افتاد. در مجموع بهترین دما برای جوانه‌زنی کیست‌ها بهترین دماها جهت بیماری-زایی آن‌هاست (Daniel et al. 2005). هدف از این تحقیق شناسایی گونه‌های خاکزاد فایتوفتورا عامل پوسیدگی ریشه، طوقه و میوه‌ی گوجه‌فرنگی در استان خراسان-شمالی و مشخص شدن بهترین شرایط دمایی جهت تولید زئوسپور توسط این گونه‌ها و همچنین تعیین بهترین شرایط نوری و دمایی برای بیماری‌زایی زئوسپور بر روی میوه‌ی گوجه‌فرنگی است.

#### مواد و روش‌ها

##### نمونه‌برداری جدا سازی و شناسایی عامل بیماری

نمونه‌برداری، در دو مرحله انجام شد. مرحله‌ی اول یک هفته پس از نشاکاری گوجه‌فرنگی در اواسط اردیبهشت ماه و مرحله‌ی بعدی حدود اواخر مرداد که عوامل پوسیدگی طوقه و ریشه و حتی میوه فعال بودند. به این منظور در فصل رشد از میوه‌های آلوده و مقداری از خاک اطراف ریشه‌های آلوده تا عمق حدود ۱۵ سانتی‌متر، نمونه‌برداری شده و درون کیسه‌هایی به آزمایشگاه منتقل و تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شدند. به منظور جداسازی فایتوفتورا از خاک، از روش به دام انداختن با میوه خیار اقدام شد (ارشاد ۱۹۹۲). همچنین جداسازی قارچ از میوه و سایر اندام‌های گیاه روی محیط کشت آرد نرت-آگار همراه آنتی‌بیوتیک پیماریسین (۲۰ میلی‌گرم)، آمپی‌سیلین (۲۵۰ میلی‌گرم)، ریفامپیسین (۱۰۰ میلی‌گرم) و و قارچ‌کش پنتاکلرونیتروبنزن به میزان ۱۰ میلی‌گرم در یک لیتر از

Butler نسبت به زئوسپورهای *P. cinnamomi* Rands و *P. citrophthora* (R.E.Sm & E.H.Sm) Leonian به چهار نوع اسید آمینه آرژینین، اسید آسپارتیک، اسید گلوتامیک و متیونین بیشتر جذب می‌شوند. زئوسپورها سپس با از دست دادن تاژک‌هایشان انکیسته (encyste) شده و به پروتئین‌های سطحی ریشه متصل می‌شوند (Tyler et al. 1996).

در آزمایشی بر روی *P. megasperma* var. *sojae* A.A.Hildebr، مشخص شد که سه فاکتور دما، سن محیط کشت و نور در تعداد زئوسپورهای تولید شده تاثیر زیادی دارند. دمای بهینه برای رهاسازی زئوسپورهای *P. capsici*، ۲۰ درجه‌ی سانتیگراد تعیین شد و البته شوک سرمایی پنج درجه‌ای نیز مورد نیاز بود (Andres et al. 2005). سه عامل دما، نور و نوع محیط کشت مهم‌ترین عوامل تولید اسپورانژیوم و زئوسپور در فایتوفتورا گزارش شده اند (Alconero and Santiago 1972).

بیشترین توسعه‌ی بیماری ناشی از *Phytophthora pistaciae* در مناطق پسته کاری توسط زئوسپورها در دمای ۳۰ درجه‌ی سانتیگراد مشاهده گردید. بیشترین میزان پیشرفت بیماری در آزمون‌های بیماری‌زایی در محدوده‌ی دمایی ۲۵ تا ۳۰ درجه‌ی سانتیگراد صورت می‌گیرد (میرسلیمانی و همکاران ۲۰۱۲). در مطالعات جوانه‌زنی *P. parasitica* Dastur مشاهده شد که تشکیل فراوان زئوسپورها از پنج درجه شروع شده و در دماهای بالاتر، حتی ۳۵ درجه‌ی نیز ادامه می‌یابد. جوانه‌زنی مستقیم از دمای ۱۰ تا ۳۷ درجه‌ی سانتیگراد مشاهده شد. با این حال بیشترین جوانه‌زنی در دمای ۳۰ درجه وجود داشت (رآو ۱۹۷۰). در مورد *P. cryptogea* (FWD4) بیشترین تولید زئوسپور در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتیگراد به میزان ۵۲ درصد و بیشترین تولید لوله‌تندش در دمای ۱۵ درجه‌ی سانتیگراد به میزان حدود ۶/۶ درصد انجام گرفت. اما در مورد *P. cryptogea* (FDM51) بیشترین درصد تولید زئوسپور در دمای ۳۰ درجه‌ی سانتیگراد به میزان حدود ۳۹ درصد و بیشترین درصد تولید لوله‌تندش در دمای ۳۰ درجه‌ی سانتیگراد به میزان حدود ۱۲ درصد گزارش شد.

(Andres *et al.* 2005). شمارش زئوسپورها با استفاده از لام هموسیتومتر انجام شد (رهنا و ممرآبادی ۲۰۰۹). برای بررسی اثرات دما بر آزاد سازی زئوسپورها آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با هشت تیمار شامل چهار تیمار دمایی ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ درجهی سانتیگراد و دو تیمار نور و تاریکی بصورت ترکیبی، در سه تکرار برای هر گونه (سه جدایه) انجام شد.

### بررسی اثرات محیطی بر بیماری زایی

سوسپانسیون زئوسپور با غلظت ۱۰<sup>۵</sup> عدد در میلی لیتر تهیه شده و به وسیله‌ی پمپ یک میلی‌لیتر از آن روی میوه‌های زخمی تلقیح شد و میوه‌ها در تیمارهای دمایی ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۲۷ و ۳۰ درجهی سانتی‌گراد و همچنین دو حالت نور و تاریکی در اتاقک رشد قرار داده شده و توسعه‌ی زخم‌ها و میزان فساد میوه ارزیابی شد. به عبارت دیگر تاثیر دو فاکتور نسبتاً مهم شرایط مختلف دما و نور و تاریکی بر روی میزان بیماری‌زایی زئوسپورها اندازه‌گیری شد. آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار و ۱۰ تیمار برای هر گونه (سه جدایه) انجام شد. تیمارها شامل ترکیبات دما و نور بودند: ۱۰ درجهی سانتی‌گراد و نور، ۱۰ درجهی سانتی‌گراد و تاریکی، ۱۵ درجهی سانتی‌گراد و نور، ۱۵ درجهی سانتی‌گراد و تاریکی، ۲۰ درجهی سانتی‌گراد و نور، ۲۰ درجهی سانتی‌گراد و تاریکی، ۲۵ درجهی سانتی‌گراد و نور، ۲۵ درجهی سانتی‌گراد و تاریکی، ۲۷ درجهی سانتی‌گراد و نور، ۲۷ درجهی سانتی‌گراد و تاریکی، ۳۰ درجهی سانتی‌گراد و نور و ۳۰ درجهی سانتی‌گراد و تاریکی. تجزیه واریانس و آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم-افزار MSTAT-C انجام شد. مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون دانکن انجام شد.

### نتایج و بحث

#### شناسایی و تعیین هویت جدایه‌ها

بر اساس خصوصیات ریخت شناختی، جدایه‌های مورد بررسی، به‌عنوان دو گونه *P. nicotianae* Breda de Haan. و *P. capsici* شناسایی شدند. از میان ۵۰ جدایه که از ریشه،

محیط کشت پایه آرد ذرت- آگار انجام گردید. خالص- سازی ریشه‌ها به روش نوک ریشه انجام شد (درنس و ساندل ۲۰۱۱). جهت شناسایی از کلیدهای معتبر استفاده گردید (Gallegly, 2008 and Stamps, 1990). آزمون بیماری‌زایی گیاهچه‌ها به روش خرسندی و همکاران انجام گردید (خرسندی و همکاران ۲۰۰۹).

### تحریک به تولید اندام‌های تولیدمثل غیرجنسی و جنسی

از مهم‌ترین اندام‌های تولیدمثل غیرجنسی اسپورانژیوم است که زئوسپورها در آن تولید می‌شوند. به منظور تحریک تولید اسپورانژیوم، تعدادی بذر شاهدانه به مدت حدود ۲۰ دقیقه در آب مقطر جوشانده شده، بعد خشک شده و سپس در اطراف پرگنه‌ی جوان قارچ در محیط کشت آرد ذرت- آگار یا سیب زمینی- دکستروز- آگار قرار داده شد. پس از حدود ۲۴ ساعت و آلوده شدن بذور شاهدانه توسط قارچ، به منظور تولید اسپورانژیوم به آب مقطر سترون در زیر نور لامپ مهتابی در دمای اتاق منتقل شدند. به منظور تولید مثل جنسی از محیط کشت عصاره شاهدانه- آگار<sup>۳</sup> و عصاره لوبیا- آگار<sup>۴</sup> استفاده شد (بنی‌هاشمی و سرتیپی ۲۰۰۲). سپس از حاشیه‌ی ریشه‌های هر پرگنه قطعاتی توسط سوزن سترون برداشت شده و به این محیط کشت منتقل گردید و به منظور تولید اُسپور، آنتریدیوم و اُگونیوم (در صورت تشکیل) به مدت یک هفته به یک مکان تاریک منتقل شدند (سجادی‌نژاد و همکاران ۲۰۰۹). برای بررسی اثرات دما بر تولید اسپورانژیوم آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تیمار دمایی ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درجهی سانتی‌گراد در سه تکرار برای هر گونه قارچی (در مجموع سه جدایه) انجام شد.

### تحریک به تولید زئوسپور

برای تحریک و رهاسازی زئوسپورها از روش ارشاد استفاده شد (ارشاد ۱۹۹۲). همچنین از کشت یک هفته‌ای محیط کشت جامد مانند عصاره‌ی لوبیا- آگار به روش اندروس و همکاران به این منظور استفاده گردید

<sup>3</sup>Hempseed Agar ( HA)

<sup>4</sup>Lima Bean Agar (LBA)

<sup>1</sup>Corn Meal Agar (CMA)

<sup>2</sup>Potato Dextrose Agar (PDA)

(شکل ۱). اسپورانژیوم که محتوی زئوسپورهاست، هر چه تعدادش بیشتر باشد در شرایط ثابت، زئوسپور بیشتری نیز تولید خواهد نمود. در این آزمون هر سه جدایه مورد آزمایش، در ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد بیشترین اسپورانژیوم را تولید کردند.

#### تاثیر دما بر تعداد زئوسپور

نتایج تجزیه‌ی واریانس نشان داد که هم تیمار گونه‌ی قارچ و هم دما بر رها سازی زئوسپور اثر معنی‌داری داشته است (جدول ۲). تیمارهای ترکیبی گونه‌های قارچی و درجه‌ی حرارت نیز اختلاف معنی‌داری با یکدیگر داشتند. همچنین نتایج تجزیه واریانس نشان داد که نور به تنهایی اثر معنی‌داری بر رها سازی زئوسپورها ندارد اما اثر ترکیبی آنها بر گونه قارچی یا شرایط دمایی بر رها سازی زئوسپور در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). شکل مقایسه میانگین‌ها نشان می‌دهد که بیشترین رها سازی زئوسپور در مورد جدایه‌ی Pc2 و در دمای ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و در شرایط تاریکی بوده است. در این شرایط به میزان حدود  $10^6 \times 1/7$  زئوسپور در سانتی-متر مکعب آب مقطر استریل تولید گردید (شکل ۲). همچنین این شکل نشان می‌دهد که با افزایش دما جدایه‌های *P.capsici* بدون تاثیرپذیری از نور یا تاریکی، تا ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد رها سازی زئوسپور افزایش یافت.

طوقه و میوه به دست آمد، ۴۲ جدایه *P.capsici* و هشت جدایه *P.nicotianae* شناسایی شد. در شرایط مزرعه‌ای، گونه‌ی *P.capsici* بیماری‌زایی شدیدتری داشته و در رطوبت زیاد خاک، خسارات بیشتری به محصول وارد کرده بود. در هر دو گونه، علائم پوسیدگی ریشه، طوقه و بوته‌میری مشاهده شد اما علائم مرتبط با پوسیدگی چشم‌گوزنی میوه در مورد گونه‌ی *P.capsici* بیشتر مشاهده شد. جدایه‌های *P.capsici* بیشتر در خرداد ماه و گونه‌ی *P.nicotianae* بیشتر در اواخر مرداد جداسازی گردید. برای ادامه آزمایش‌ها دو جدایه از *P.capsici* به نامهای Pc1 و Pc2 استفاده شدند. Pc1 در خرداد ماه از خاک و Pc2 در انتهای فصل از میوه جداسازی شده بود. همچنین یک جدایه از *P.nicotianae* به نام Pn که در انتهای فصل از روی میوه جداسازی شده بود، انتخاب شدند.

#### تعداد اسپورانژیوم‌ها در سه آزمون دمایی

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بین سه جدایه از دو گونه‌ی مورد بررسی به لحاظ تاثیر پذیری از دما در تولید اسپورانژیوم اختلاف معنی‌داری وجود دارد (جدول ۱). در مجموع گونه *P.nicotianae* اسپورانژیوم بیشتری نسبت به جدایه‌های گونه‌ی دیگر در تمام تیمارهای دمایی تولید نمود. با افزایش دما و بدون تاثیر نور، میزان تولید اسپورانژیوم افزایش یافت و بیشترین تعداد اسپورانژیوم در ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد مشاهده شد.

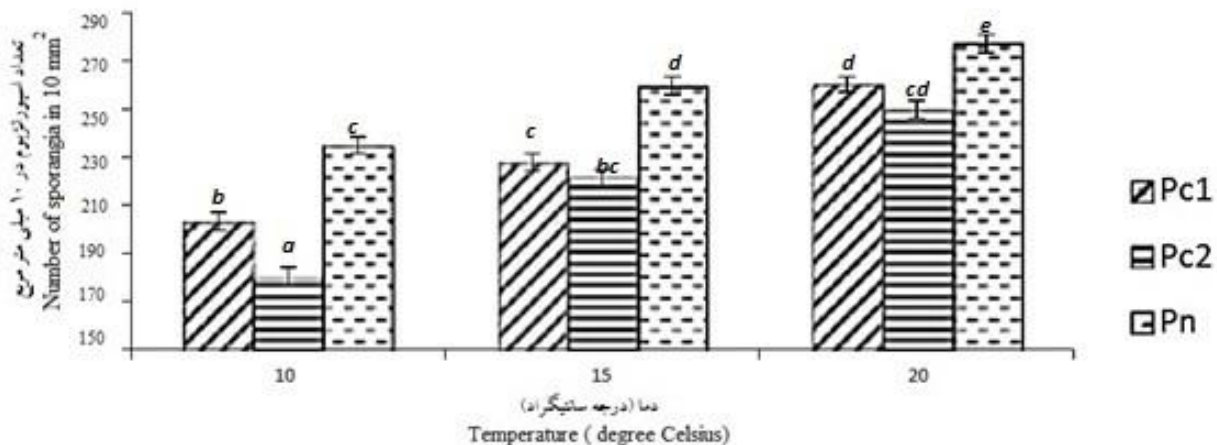
جدول ۱- تجزیه واریانس اثر گونه‌ی فایتوفتورا و درجه حرارت بر تعداد اسپورانژیوم.

Table 1. Analysis of variance of Phytophthora effect and temperature on number of sporangia.

Mean squares (میانگین مربعات)	(درجه آزادی) Degrees of freedom	(منابع تغییرات) Sources of variations
3773.44**	2	(گونه‌های فایتوفتورا) Phytophthora species
7124.11**	2	(دما) Temperature
164.55*	4	(گونه‌های فایتوفتورا × دما) Temperature × Phytophthora species
53.48	18	(خطای آزمایش) Experimentl error (%)
3.11	-	Coefficient of variabilities (ضریب تغییرات %)

\*: معنی‌دار در سطح 5% ، \*\*: معنی‌دار در سطح 1% و ns: غیر معنی‌دار

\*Significant level of 5%      \*\* Significant level of 1%      ns. Not significant



شکل ۱- مقایسه میانگین اثر دما بر تولید اسپورانژیوم در محیط کشت ۱۴ روزه ی دو جدایه *Phytophthora capsici* (Pc1 و Pc2) و یک جدایه *P. nicotianae* (Pn) روی عصاره لوبیا- آگار

Figure1- Temperature effect on sporangium production of *Phytophthora capsici*(Pc1&Pc2) and *P. nicotianae* (Pn) in bean agar medium

طریق گل‌گاه میوه که دارای زخم طبیعی است صورت خواهد گرفت. به طور کلی زخم بیمارگر، از نقاطی که دارای خراش یا زخم اولیه باشد، ظاهر می‌شود. شکل سه نشان می‌دهد که بیشترین بیماری‌زایی زئوسپورها در جدایه‌ی شماره دو گونه‌ی *P. capsici* (Pc2) بوده که در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتیگراد پس از پنج روز به حدود ۵۰ سانتی‌متر و تحت شرایط تاریکی بوده است.

جدول تجزیه واریانس نشان می‌دهد که تاثیر شرایط نور بر تولید زئوسپور معنی‌دار نبود. اما تاثیر دما و تاثیر دما به همراه نور در سطح یک درصد معنی‌دار بود. همچنین در مورد گونه *P. nicotianae* در دمای ۲۷ درجه‌ی سانتیگراد بیشترین بیماری‌زایی زئوسپورها اتفاق افتاده که نشانگر بهترین دما جهت جوانه‌زنی کیست‌های زئوسپورها نیز می‌باشند. به‌طور کلی در مورد جدایه *P. capsici* بیماری‌زایی زئوسپورها در شرایط تاریکی و در مورد جدایه *P. nicotiana* شرایط نور تاثیر نسبی بهتری در توسعه‌ی لکه‌های بیمارگر داشتند. بهترین جوانه‌زنی کیست‌های حاصل از زئوسپورهای *P. parasitica* در دمای ۳۰ درجه‌ی سانتیگراد گزارش شده است (رآ و ۱۹۷۰). نتایج تجزیه‌ی واریانس اثر گونه بیمارگر، دما و نور بر اندازه‌ی زخم چارچ روی میوه‌ی گوجه‌فرنگی نشان می‌دهد که اثر گونه‌ی بیمارگر و دما در سطح یک درصد و همین‌طور شرایط نوری بر توسعه‌ی زخم بیمارگر در سطح پنج

در دمای بالاتر از ۲۰ درجه‌ی سانتیگراد رها سازی زئوسپور توسط *P. nicotianae* بیشتر از گونه دیگر بود. در مورد جدایه‌ی *P. nicotianae* بیشترین زئوسپور در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و نور به غلظت حدود  $1/3 \times 10^6$  زئوسپور در سانتی‌متر مکعب آب تولید شد. نتایج تجزیه‌ی واریانس همچنین نشان داد که نور به تنهایی اثر معنی‌داری بر رها سازی زئوسپورها ندارد اما بصورت ترکیبی با سایر تیمارهای موجود در سطح یک درصد معنی‌دار است (جدول ۲). اما هر دو مورد با نتایج تحقیقات مطابقت دارد که دمای مورد نیاز جهت تولید بهینه‌ی زئوسپورها حدود ۸ تا ۱۰ درجه کمتر از دمای بهینه‌ی رشد پرگنه آن‌ها می‌باشد (ارشاد ۱۹۹۹).

#### بررسی اثرات محیطی بر بیماری‌زایی

هر دو گونه روی نشاهای دو هفته‌ای گوجه‌فرنگی بیماری‌زا بودند. اما میزان بیماری‌زایی آن‌ها در دو گونه تفاوت داشت. علائم بیماری شامل پوسیدگی ریشه و مرگ گیاهچه بود. با کشت مجدد قطعات ریشه بر روی محیط کشت، حضور بیمارگر شناسایی و تایید شد. در مورد جدایه‌های *P. capsici* آلودگی در تیمارهای تاریکی بهتر از نور بود ولی در مورد *P. nicotiana* آلودگی از جهتی که نور تابیده شده، آغاز می‌شود. همچنین وجود زخم یا خراش جهت آلودگی لازم بود که در غیر این صورت آلودگی از



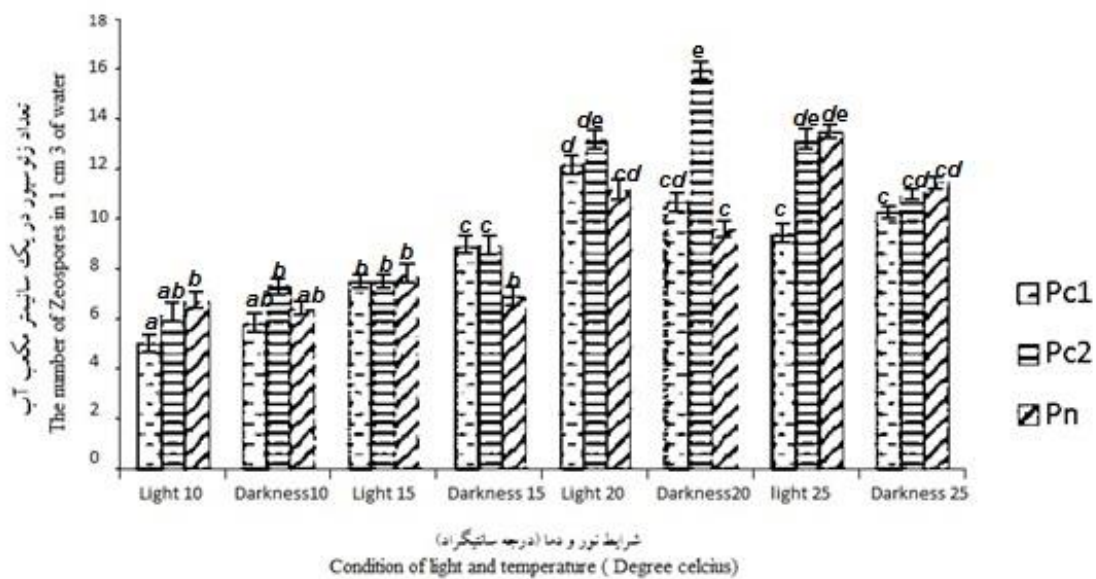
جدول ۲- تجزیه واریانس اثر گونه‌های *Phytophthora*، دما و نور بر تعداد زئوسپور.

Table 2- Analysis variance of *Phytophthora* species, temperature and light effect on zoospore number

Mean squares (میانگین مربعات) (تعداد زئوسپور)	Degrees of freedom (درجه آزادی)	Sources of variation (منابع تغییرات)
18.21 **	2	<i>Phytophthora</i> (فایتوفتورا) (A)
141/64**	3	Temperature (دما) (B)
8/96**	6	A×B
0.006 <sup>ns</sup>	1	Light condition (شرایط نوری) (C)
6.67**	2	A×C
3.04**	3	B×C
3.58**	6	A×B ×C
0.45	48	Experiment error (خطای آزمایش)
7.12	-	Coefficient of variabilities (ضریب تغییرات) (%)

\*: معنی دار در سطح ۵٪ ، \*\*: معنی دار در سطح ۱٪ و <sup>ns</sup>: غیرمعنی دار

\*Significant level of 5%    \*\* Significant level of 1%    <sup>ns</sup>. Not significant



شکل ۲- مقایسه میانگین اثر دما و نور بر تعداد زئوسپور در یک سانتی‌متر مکعب آب مقطر استریل در دو جدایه از *Phytophthora*

*capsici* (Pc1 و Pc2) و یک جدایه از *P.nicotianae* (Pn).

Figure 2- Comparison of mean of Temperature and light effect on zoospore number of *Phytophthora capsici*(Pc1&Pc2) and *P.nicotianae* (Pn) in a cm<sup>3</sup> of distilled water

نداشتند (جدول ۳).

با توجه به شکل چهار و تاثیر شرایط نور و تاریکی در توسعه‌ی زخم‌های حاصل از بیمارگر، به نظر می‌رسد جداسازی *P.nicotianae* در فصل تابستان از میوه در مزارع گوجه‌فرنگی شهرستان بجنورد، علاوه بر دمای

درصد معنی‌دار بود. تاثیر گونه بیمارگر به همراه دما بر توسعه‌ی زخم در سطح پنج درصد معنی‌دار بود. ترکیب هر سه تیمار نیز معنی‌دار بود اما اثر ترکیبی نور و درجه-ی حرارت اثر معنی‌داری بر اندازه‌ی زخم روی میوه

آن سمت از میوه که در مقابل نور قرار داشت، ظاهر شد. این نشان می‌دهد که نور حتی در جهت و میزان تحرک زئوسپورها اثر دارد. در مزرعه بیشتر آلودگی روی میوه-هایی که به تازگی از رنگ سبز به رنگ نارنجی تغییر یافته-اند ایجاد می‌شود اما در شرایط آزمایشگاه تفاوتی از این حیث وجود نداشت. از تفاوت‌های دیگر آلودگی میوه در مزرعه نسبت به شرایط آزمایشگاه این است که در مزرعه علائم آلودگی میوه‌ها توسط گونه‌های خاکزی فایتوفتورا به صورت پوسیدگی چشم آهویی یا Buckeye rot می‌باشد اما در آزمایشگاه به دلیل رطوبت بالا در بست پلاستیکی، علائم بیماری بلافاصله به صورت کپک سفید رنگ، میوه را احاطه می‌کند. البته در مزرعه نیز اگر شرایط رطوبت بالا فراهم باشد، به خصوص در میوه‌های رسیده، بیمارگر به سرعت سطح میوه را از جهت تماس با خاک در بر خواهد گرفت.

بهینه رشد بالای این گونه، به علت طولانی بودن روزها و طول دوره‌ی روشنائی بیشتر نیز باشد و در نتیجه غالبیت بیشتری در فصل تابستان داشته باشد.

زئوسپورها فقط در صورت ایجاد زخم روی سطح میوه بیماری‌زایی دارند و در صورتی که زخم نباشد، بیماری‌زایی نداشته و یا بسیار دیرتر بروز خواهد نمود که این مورد به علت کموتاکسی<sup>۱</sup> زئوسپورها می‌تواند باشد که زئوسپورها به قندها، اسیدهای آلی یا آمینواسیدهایی که در سطح زخم وجود دارند، جذب شده و در آنجا تجمع می‌یابند. سپس در این نواحی کیست شده و پس از مدتی با جوانه زنی آن‌ها و تولید لوله تندش، آلودگی از سر گرفته خواهد شد. این مورد با تحقیقات خپو و زنتمایر (Khew and Zentmyer, 1973) مطابقت دارد. هم-چنین از موارد جالب توجه مشاهده شده این بود که کپک عامل بیمارگر در گونه *P. nicotianae* از سطح بالایی یعنی

جدول ۳- تجزیه واریانس اثر گونه‌ی بیمارگر، درجه حرارت و نور بر اندازه‌ی زخم روی میوه‌ی گوجه‌فرنگی.

Table 3- Analysis variance of pathogen species, temperature and light effect on lesion size on tomato fruit

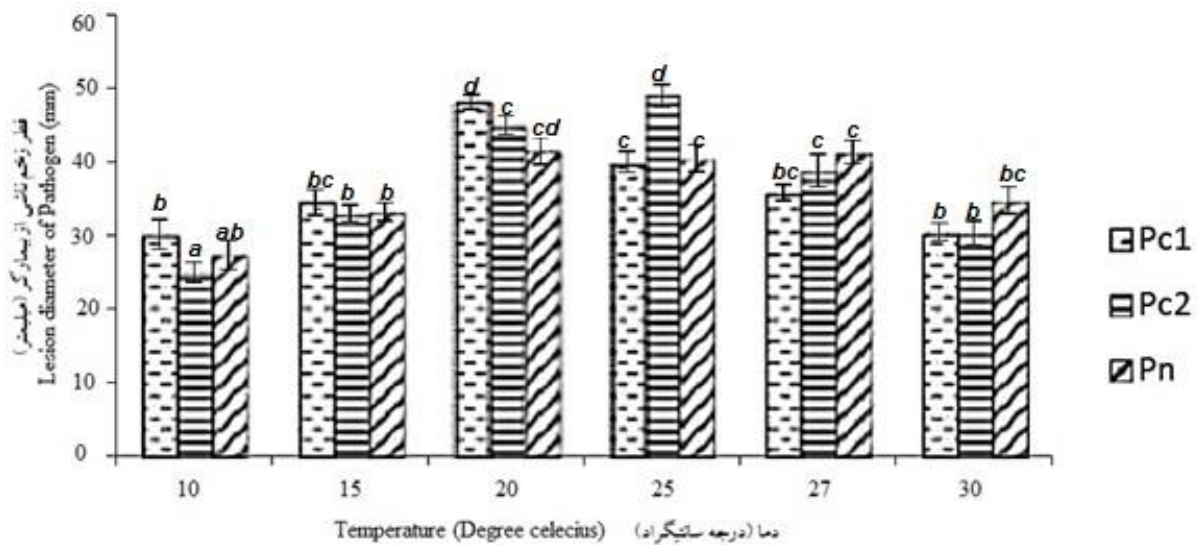
Mean squares (میانگین مربعات)	Degrees of freedom (درجه آزادی)	Sources of variation (منابع تغییرات)
Lesion diameter (اندازه زخم)		
1.75**	2	Phytophthora (فایتوفتورا) (A)
829.33 **	2	Temperature (دما) (B)
69.45*	10	A×B
56.33**	1	Light condition (شرایط نوری) (C)
308.66**	2	A×C
22.53 <sup>ns</sup>	5	B×C
33.82**	10	A×B ×C
10.61	72	Experiment error (خطای آزمایش)
8.90	-	Coefficient of variabilities (ضریب تغییرات) (%)

\*: معنی دار در سطح ۵٪، \*\*: معنی دار در سطح ۱٪ و <sup>ns</sup>: غیرمعنی دار

\*Significant level of 5%      \*\* Significant level of 1%      <sup>ns</sup>. Not significant

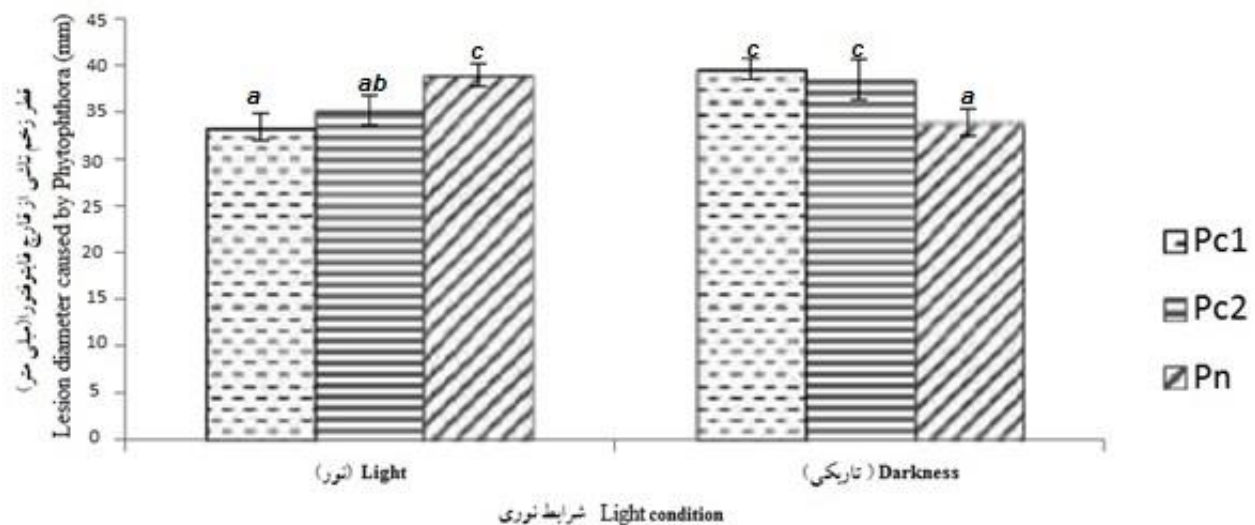
<sup>1</sup>Chemotaxis





شکل ۳- مقایسه میانگین تاثیر دما بر توسعه زخم حاصل از بیمارگر بعد از پنج روز از زمان تلقیح زئوسپورها در سطح میوه گیوجه- فرنگی دو جدایه Pc1 و Pc2 از *Phytophthora capsici* و جدایه Pn از *P. nicotianae*

Figure3- Temperature effect on Lesion development by pathogen, 5 days after Zoospore inoculation time on tomato fruit surface by *Phytophthora capsici*(Pc1&Pc2) and *P. nicotianae* (Pn)



شکل ۴- مقایسه میانگین تاثیر نور و تاریکی بر توسعه زخم بیمارگر دو جدایه Pc1 و Pc2 از *Phytophthora capsici* و جدایه Pn از *P. nicotianae* روی میوه گیوجه فرنگی

Table 4- Light and Darkness effect on Lesion development by *Phytophthora capsici*(Pc1&Pc2) and *P. nicotianae* (Pn) on tomato fruit surface

مجدا به رشد خود ادامه می دهد که آلودگی به صورت موجی در سطح میوه ظاهر می شود. به نظر می رسد که تغییرات دما تاثیرات معنی داری در تولید تعداد زئوسپور و بیماری زایی آن ها در هر دو گونه فایتوفتورا دارد. اما نور و تاریکی در مورد جدایه های

از طرفی در مزرعه به محض این که بخشی از میوه آلوده شد، سایر بیمارگرها شامل قارچ های ساپروفیت و باکتری ها نیز در سطح میوه مستقر شده و آن بخش را آلوده می نماید و فایتوفتورا بلافاصله پس از اسپورزایی

فراوان می‌شود و از این مواد در محیط کشت‌ها استفاده شده و اثر آن‌ها بر تولید اسپورانژیوم و رهاسازی زئوسپور بررسی شود. همچنین لازم است سایر عوامل مثل رطوبت نسبی هوا و میزان و توزیع بارش نیز به همراه دما و نور در شرایط مزرعه در بروز و انتشار بیماری بررسی شود. گونه‌هایی از جنس فایتوفتورا باعث پوسیدگی ریشه، طوقه و مرگ گیاهچه‌ی گوجه‌فرنگی می‌شوند. میوه‌هایی که با خاک در تماس هستند در صورت وجود بیمارگر، در معرض نوعی پوسیدگی به نام پوسیدگی چشم‌گوزنی قرار می‌گیرد. در این تحقیق عوامل بیمارگر از خاک، ریشه و طوقه گوجه‌فرنگی در استان خراسان شمالی جداسازی شده و به‌عنوان گونه‌های *Phytophthora capsici* و *P. nicotianae* شناسایی شدند. بیماری زایی هر دو گونه روی نشاهای گوجه‌فرنگی به اثبات رسید. تولید زئوسپور در این گونه‌ها تحت تأثیر شرایط نوری و دمایی مختلف مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که از لحاظ واکنش به شرایط دمایی بین آن‌ها اختلاف معنی‌داری وجود داشت. همچنین دما در آزاد سازی زئوسپور هر دو گونه اثر معنی‌داری داشت. بیشترین تولید زئوسپور در یکی از جدایه‌های *P. capsici* در ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و در شرایط تاریکی افتاد. در مورد *P. nicotianae* در ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و شرایط نوری بیشترین زئوسپور تولید شد. بیشترین طول زخم ایجاد شده توسط زئوسپورها در جدایه Pc2 مربوط به گونه *P. capsici* رخ داد. اندازه‌ی آن در ۲۵ درجه‌ی سانتی-گراد و شرایط تاریکی پس از پنج روز به حدود ۵۰ میلی‌متر رسید. در مورد گونه *P. nicotianae* بیشترین بیماری‌زایی زئوسپورها در ۲۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و در شرایط نوری حادث شد.

*P. capsici* تاثیر معنی‌داری ندارد. از این رو آگاهی از قدرت بیماری‌زایی زئوسپور به عنوان مهم‌ترین اندام عامل انتشار بیمارگر، می‌تواند به درک صحیح از همه‌گیر شناسی این بیماری در برخی مناطق به ویژه مناطق مرطوب منجر شود. به عنوان مثال در بهار و تابستان سال ۱۳۹۰ در استان خراسان شمالی بارش‌های قابل توجهی که برخی از آن‌ها با سیل همراه بود وجود داشت و در بسیاری از مزارع و باغات باعث انتشار نسبتاً بالای بیماری‌های با عامل شبه قارچ‌های رده Oomycetes گردید. پوسیدگی‌های طوقه و ریشه صیفی‌جات و جالیز با عوامل پی‌تیوم و فایتوفتورا از نمونه‌های تاثیر شرایط محیطی بر همه‌گیر شدن بیماری‌هاست. محدوده‌ی دمایی و نوری در مورد دو گونه از این عوامل جهت بیماری‌زایی و انتشار بیماری در استان خراسان شمالی در این مطالعه مشخص شد و از آن‌جا که دماهای ۲۰ درجه جهت تولید زئوسپورها در مورد همه‌ی جدایه‌ها و بیماری‌زایی زئوسپورها در دمای ۲۵ درجه در مورد ایزوله‌های *P. capsici* و دمای ۲۷ درجه در مورد *P. nicotianae* مناسب‌اند و این دماها در اوایل اردیبهشت تا اواسط خرداد در استان خراسان شمالی رخ می‌دهد و از طرفی نشاهای گوجه‌فرنگی که به تازگی در زمین اصلی مستقر شده‌اند، در شرایط رطوبت بالا، این بیماری می‌تواند به صورت همه‌گیر باعث مرگ گیاهچه‌ها شوند. لازم است کشاورزان در این ماه‌ها نسبت به بروز این بیماری حساسیت بیشتری نشان دهند و اقدامات پیش‌گیرانه را انجام دهند. از موارد مهم دیگر در این تحقیق، وجود اسپورانژیوم فراوان در سطح میوه‌ی گوجه‌فرنگی توسط هر دو گونه است. لازم است تحقیق شود که چه موادی در میوه گوجه-فرنگی وجود دارد که موجب تحریک به تولید اسپورانژیوم

## منابع

- Alconero R, and Santiago A, 1972. Characteristics of asexual sporulation in *Phytophthora palmivora* and *Phytophthora parasitica nicotianae*. *Phytopathology* 62:993-997.
- Andrés Ares JL, Rivera Martínez A, and Fernández Paz J, 2005. Resistance of pepper germplasm to *Phytophthora capsici* isolates collected in northwest Spain. *Spanish Journal of Agriculture Research* 3(4): 429-436.
- Banihashemi Z and Sartipi A, 2004. Identification of *Phytophthora* species associated with stone fruits crown rot in Fars Province and reaction of certain rootstock to *P. cactorum*. *Journal of Sciences and Technology of Agriculture and Natural Resources* 8(3): 241-249.

- Daniel OO, 2005. Repeated emergence, motility and autonomus dispersal by sporangial and cyst derived zoospores of *Phytophthora*. Document type. OSU Dissertations [8892].
- Ershad Dj, 1992. *Phytophthora* Species in Iran, 217pp. (in farsi)
- Gallegly ME, ChuanXue H. and Hong C. 2008. *Phytophthora*: identifying species by morphology and DNA fingerprints. APS Press, 158 pp. USA.
- Khew K and Zentmyer L, 1973. Chemotactic response of zoospores of five species of *Phytophthora*. *Phytopathology* 63:1511-1517.
- Khorsandi S, Baba ahari A, Rezaei S, and Mohammadi pour M, 2009. Identification of fungal disease agents of root and crown rot of tomato in East Azarbayjan. *Scientific Journal of Agricultural Sciences, Islamic Azad University, Tabriz Branch*, 12:79-93.
- Mirsoleimani Z, Mostowfizadeh-Ghalamfarsa R, Mohammadi AH, Djavaheri M and Banihashemi Z, 2013. Reaction of pistachio cultivars to *Phytophthora pistaciae* and the influence of temperature on its pathogenicity. *Iranian Journal of Plant Pathology* 49(3): 279-296.
- Rahnama K and Mamar abadi M, 2009. *Herbal Clinic Guide*, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources Press 138pp.
- Rao VG, 1970. Influence of temperature upon growth and sporulation in two species of *Phytophthora*. *Mycopathologia et Mycologia Applicata* 42(1-2): 39-48.
- Tyler BM, Wu M, Wang J, Cheung W and Morris PF, 1996. Chemotactic preferences and strain variation in the response of *Phytophthora sojae* zoospores to host isoflavones. *Applied and Environmental Microbiology* 62(8): 2811-2817.
- Sajadi nejad M, Ershad D, Mirabolfathy M and Zamanizadeh H, 2010. Identification of *Phytophthora* species the causing root and crown rot of cherry trees in Trhran Province. *Iranian Journal of Plant Pathology* 45: 70-74
- Shekari A, Mirabolfathy M, Mohammadi-pour M, Zad J and Okhovvat M, 2006. *Phytophthora* root and crown rot of several field, summer and patch crops in East Azarbaijan province. *Iranian Journal of Plant Pathology* 42(2): 293- 308
- Stamps DJ, Waterhouse GM, Newhook FJ, and Hall GS, 1990. Revised tabular key to the species of *Phytophthora*, *Mycological Paper*. No 62. C.A.B. International Mycological Institute 28p.

## Investigation of Some Effective Factors on Production and Pathogenicity of Zoospores of *Phytophthora capsici* and *P.nicotianae* on Tomato Fruit

A A Davari<sup>1</sup>, K Rahnama<sup>2</sup> and H Rabbani nasab<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Graduated Student, Department, of Plant Protection Plant Production College, University of Agriculture and Natural Resource of Gorgan, Gorgan, Golestan, Iran.

<sup>2</sup>Associate Professor, Department, of Plant Protection Plant Production College, University of Agriculture and Natural resource of Gorgan, Gorgan, Golestan, Iran.

<sup>3</sup>Assistant Professor, Plant Protection Research Division, Golestan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Gorgan, Iran.

\*Corresponding author: [h.rabbani@areeo.ac.ir](mailto:h.rabbani@areeo.ac.ir)

Received: 13 January 2019

Accepted: 22 February 2020

### Abstract

Some species of *Phytophthora* genus cause crown and root rot, and damping off of tomato seedlings. Fruits that contact with soil containing pathogen are affected by a type of decay called buckeye rot of tomato. In this research Pathogens were isolated from soil, tomato root and crown in North Khorasan province and identified as *Phytophthora capsici* and *P.nicotianae*. Pathogenicity of both species were demonstrated on tomato seedlings. The production Zoospores was investigated under different light and temperature conditions. The results showed that there was a significant differences between species in reaction to temperature condition. Temperature also had significant effect on the release of zoospore in both species. The highest release of zoospores occurred in one of the *P.capsici* isolates at 20°C under dark conditions. In the case of *P.nicotianae* at 25°C and light conditions the highest zoospore were released. The largest wound length occurred in isolate Pc2 of *P.capsici*. It reached to 50 mm at 25°C and dark condition after 5 days. In the case of *P.nicotianae* the highest pathogenicity of zoospores occurred at 27°C under light condition.

**Keywords:** Phytophthora, Zoospores, Tomato, North Khorassan.