"مجله علوم زراعی ایران"
جلد سیزدهم، شماره ۲ تابستان ۱۳۹۰

اثر جدایه‌ها و غلظت‌های اسپور بر شدت بیماری برق‌زدگی در دو ژنوتیپ نخود زراعی (*Cicer arietinum* L.)

Impact of pathotypes and spore concentrations on Ascochyta blight incidence in two chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes

همایون کانونی[۱]، علیرضا طالعی[۲]، سیّد علی پیغمبری[۳]، سیّد محمود اخوّت[۴] و ماتیو ابنگ[۵]

چکیده

کانونی،.ه. ع.ر. طالعی، س. ع. پیغمبری، س.م. اخوّت و م. ابنگ. ۱۳۹۰. اثر جدایه‌ها و غلظت‌های اسپور بر شدت بیماری برق‌زدگی در دو ژنوتیپ نخود زراعی (*Cicer arietinum* L.). **مجله علوم زراعی ایران. ۱۳(۲): ۳۷۹-۳۶۸.**

بیماری برق زدگی مخرب‌ترین بیماری گیاه نخود در مناطق غرب آسیا و شمال آفریقا است. به منظور مطالعهٔ واکنش نخود در برابر بیمارگر عامل برق زدگی، این تحقیق در سال ۱۳۸۶ در مرکز بین المللی تحقیقات کشاورزی در مناطق خشک (ایکاردا) انجام شد. در این بررسی اثر چهار پاتوتیپ بیماری در سه میزان غلظت (۲×۱۰^{۳}، ۲×۱۰^{۴} و ۲×۱۰^{۵} اسپور در میلی لیتر) از لحاظ درجه بیماری و درصد آلودگی برگ در دو ژنوتیپ نخود (رقم محلّی بیونیج و لاین ICC12004)، به دو روش سیستماتیک و گنبدک (mini-dome) مورد مطالعه قرار گرفت. این تحقیق به صورت دو آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار به اجرا درآمد. نتایج آزمایش‌ها حاکی از وجود اختلاف معنی‌دار بین ژنوتیپ‌ها، جدایه‌ها و غلظت‌های اسپور از لحاظ شدّت بیماری و درصد آلودگی برگ بود و واریانت مربوط به پاتوتیپ IV بیشترین میزان بیماریزایی را در هر دو ژنوتیپ ایجاد کرد. نظر به پائین بودن نسبی ضریب تغییرات در آزمایش دوم، بالاتر بودن دقّت در آزمایش گنبدک مورد تأیید قرار گرفت. بین درجه بیماری و درصد آلودگی برگ، همبستگی بالا و معنی داری وجود داشت. با توجه به نمره‌های بیماری ۴ و ۳/۵ که برای رقم بیونیج در فشار زادمایه ۲×۱۰^{۳} اسپور در میلی لیتر به دست آمدند، چنین می‌توان استنباط کرد که در این رقم، برخی ژن‌های کوچک اثر برای مقاومت به برق زدگی وجود دارند. تفکیک مجموع مربعات غلظت اسپور به اجزای خطّی و درجه دوّم نشان داد که با افزایش غلظت اسپور، شدت بیماری برق زدگی به صورت خطّی و معنی دار بالا می رود. هر دو ژنوتیپ نسبت به پاتوتیپ IV حساس و در برابر سایر جدایه‌ها، ICC12004 مقاوم و بیونیج حساس بود. از بین سه غلظت اسپور، غلظت ۲×۱۰^{۵} اسپور در میلی لیتر بیشترین تمایز را بین دو ژنوتیپ آزمایشی ایجاد کرد.

واژه‌های کلیدی: بیماری برق‌زدگی، پاتوتیپ، غلظت اسپور و نخود.

تاریخ دریافت: ۱۳۸۷/۳/۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۷/۲۱

۱- استادیار پژوهش مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی کردستان، سنندج (مکاتبه کننده) (پست الکترونیک:hkanouni@yahoo.com)
۲- استاد پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
۳- دانشیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
۴- استاد پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
۵- محقق بیماری شناسی، مرکز بین المللی تحقیقات کشاورزی در مناطق خشک (ایکاردا)، حلب، سوریه

مقدمه

عوامل بیماری زا موجب کاهش عملکرد و ناپایداری تولید در گیاهان زراعی می‌شوند. بیش از ۵۰ بیماری آلوده کننده در زراعت نخود گزارش شده‌اند، ولی از میان آنها، بیماری‌های برق‌زدگی، پژمردگی فوزاریومی و پوسیدگی‌های ریشه در سراسر جهان دارای اهمیت بیشتری هستند (Singh and Saxena, 1999). بیماری برق‌زدگی به وسیله قارچ *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labrousse (با تلومورف *Didymella rabiei* (Kovachevski) v. Arx) از رده آسکومیست‌ها ایجاد می‌گردد (Nene and Reddy, 1987). این بیمارگر می‌تواند همه اندام‌های هوایی گیاه را در کلیه دوره‌های رشدی آن آلوده کند. شرایط محیطی و زمینه ژنتیکی، هم برای جمعیت عامل بیماری‌زا و هم برای گیاه زراعی در یک منطقه خاص، دو عامل مهم در توسعه اپیدمی هستند (Chen *et al*., 2004, Peever *et al*.,2004). استفاده از قارچ کش از شدت بیماری می کاهد، ولی همیشه به اندازه هزینه انجام شده موثر نیست (Chongo *et al*., 2004)، بنابراین اقتصادی‌ترین روش برای مدیریت بیماری استفاده از ارقام مقاوم است (Singh *et al*., 1997). در منطقه مدیترانه، نخود به طور سنتی در بهار کاشته می‌شود و طبیعتاً در طول فصل رشد با باران کم و تابستان گرم مواجه است که نتیجه آن توسعه ماده خشک ضعیف گیاه خواهد بود. کشت زمستانه نخود باعث طولانی شدن رشد رویشی شده و عملکرد را تا حدود ۲ تن در هکتار افزایش می‌دهد (Singh *et al*., 1997)، ولی از آنجا که کشت زمستانه امکان بروز بیماری برق‌زدگی را افزایش می‌دهد، این روش کمتر با استقبال کشاورزان نخودکار مواجه شده است.

برای ارزیابی تعداد زیادی ژرم پلاسم و مواد اصلاحی یک روش غربال ساده و قابل اعتماد در مرکز بین المللی تحقیقات کشاورزی در مناطق خشک (ICARDA) ارائه شده که شامل مراحل زیر است (Singh and Saxena, 1999): الف: کاشت ردیف‌های حساس پس از هر۲ تا ۱۰ ردیف از مواد گیاهی مورد ارزیابی، ب: مایه زنی مواد مورد نظر با سوسپانسیون بقایای گیاهی نخود آلوده به برق‌زدگی و اسپور قارچ عامل بیماری زا، ج: ایجاد رطوبت بالا (بیش از ۷۰ درصد)، به وسیلهٔ اجرای آبیاری بارانی، یا مه پاشی(mist)، و د: ارزیابی نمونه‌های ژرم پلاسم و مواد اصلاحی پس از از بین رفتن بوته‌های حساس. در حدود ۲۰۰۰۰ نمونه نخود با استفاده از این روش در ایکاردا غربال و تعداد زیادی لاین مقاوم مشخص شده‌اند که از آن جمله می‌توان به لاین‌های ILC 200، ILC6482، ICC 4457، ICC 6328 و ICC 12004 اشاره نمود. ارزیابی لاین‌های مقاوم در سطح بین المللی نشان داد که، هیچ کدام از آنها در تمامی مکان‌ها مقاوم نیستند و این موضوع مؤید وجود نژادهای متفاوت از عامل ایجاد بیماری است. این موضوع طی مطالعات بعدی به اثبات رسیده است (Kaiser, 1997؛ Haware *et al*.,1995). آسکوکارپ و آسکوسپورهای *A. rabiei* معمولاً بر روی بقایای گیاهی نخود در طول ماه‌های فصل زمستان تحت شرایط سرد و مرطوب توسعه یافته و نقش مهمی به عنوان زادمایه ثانویه در آغاز فصل زراعی ایفاء می‌کنند (Peever *et al*.,2004؛ Trapero-Casas and Kaiser,1992). از آنجا که آسکوسپورها از طریق نوترکیبی جنسی تولید شده و جمعیت عامل بیماری زا از لحاظ ژنتیکی متغیر است، اصلاح برای مقاومت به برق زدگی با مشکلات فراوانی همراه است. تا کنون تعداد زیادی از پاتوتیپ‌های قارچ عامل برق زدگی شناسایی شده‌اند (Shokouhifar *et al*., 1985; Udupa *et al*., 1998; Reddy and Kabbabeh, 2003) که قدرت بیماری زایی آن‌ها در داخل یک جدایه مشخص و بر اساس شرایط محیطی بسیار متنوع است (Gan *et al*., 2006). ردی و کبابه (Reddy and Kabbabeh, 1985) ۶ نژاد از *A. rabiei* را

در سوریه و لبنان با استفاده از ۶ رقم افتراقی نخود گزارش کردند. چن و مهلبائر (Chen and Muehlbauer, 2003) ۱۱ شکل بیماری زا را از بین ۳۹ جدایه از *A. rabiei*، در ناحیه پالوس ایالات متحده با استفاده از ۱۴ لاین افتراقی شناسایی کردند. ادوپا و همکاران (Udupa *et al*., 1998) یک سیستم سه پاتوتیپی را بر اساس توان بیماریزایی (پاتوتیپ I با قدرت بیماریزایی کم، پاتوتیپ II بیماریزا و پاتوتیپ III با قابلیت بیماری زایی زیاد) روی سه لاین افتراقی نخود به کار بردند. چونگو و همکارن (Chongo *et al*., 2004) ۴۰ جدایه کانادایی را بر اساس توان بیماری زایی آنها روی هشت ژنوتیپ افتراقی نخود به ۱۴ پاتوتیپ گروه بندی کردند.

بیماری برق زدگی از بیماری های مهم نخود در ایران نیز محسوب می شود. در سال ۱۳۵۲ بنی هاشمی از شیراز و همان سال کایزر از جنوب غربی ایران برق‌زدگی را گزارش کردند (Younesi, 1998). با توجه به سابقه و اهمیت این بیماری در ایران، تلاش های زیادی جهت شناسایی پاتوتیپ های موجود این بیماری در کشور انجام شده است (Nourolahi *et al*., 2000؛ Shahriari and Izadyar, 1998). در یک آزمایش بر اساس قدرت بیماری زایی، شش گروه پاتوتیپی برای این قارچ در ایران گزارش شده است (Shokouhifar *et al*.,2003). تا کنون تلاش‌های وسیعی نیز به منظور یافتن ارقام مقاوم نخود به پاتوتیپ های موجود در کشور صورت گرفته است (Sabaghpour *et al*., 2004 ; Boland-Andam *et al*., 1998 Younesi et al., 2000;).

روش‌های متعددی برای ارزیابی فنوتیپی میزان بیماری ارائه شده‌اند (Bayaa *et* Buchwaldt *et al*., 2007 Riahi *et al*., Chen & Muehlbauer, 2003; *al*., 2004; 1990;). از این میان، چن و مهلبائر (Chen & Muehlbauer, 2003) روشی قابل اعتماد برای سنجش توان بیماریزایی در مورد اثرات متقابل رقم زراعی با پاتوتیپ *A. rabiei*، در فرآیند غربال مواد اصلاحی ارائه نمودند. در این روش که تحت عنوان گنبدک (mini-dome) نامگذاری و منتشر شده (شکل ۱)، برای ایجاد شرایط یکنواخت از رطوبت نسبی بالا برای بروز آلودگی استفاده می‌شود.

شکل ۱- روش گنبدک: الف: محلول پاشی گیاهچه‌های ۱۴ روزه نخود با سوسپانسیون اسپور قارچ *A.rabiei*، ب: پوشاندن با درپوش‌های شفاف، ج: برداشتن گنبدک پس از ۲۴ ساعت و د: ارزیابی شدت بیماری دو هفته پس از مایه‌زنی

Fig. 1. Mini-dome technique. a) spraying 14 days old chickpea plants with sopre suspension of *A.rabiei*, b) covering with transparent caps for 24 hours, c) removing mini-dome and, d) assessment of disease severity two weeks after inoculation

اهداف اجرای این تحقیق عبارت بودند از ارزیابی واکنش دو ژنوتیپ نخود (ژنوتیپ‌های مورد نظر برای دورگ گیری در مطالعات بعدی) در برابر جدایه‌های مختلف بیماری برق‌زدگی، تشخیص بیماری‌زاترین جدایه و مناسب‌ترین میزان غلظت اسپور از لحاظ شدت ایجاد بیماری.

مواد و روش‌ها

برای این آزمایش دو ژنوتیپ نخود به نام‌های ICC 12004 و رقم محلّی بیونیج، انتخاب شدند. بیونیج رقمی با تیپ کابلی و متوسط رس است که علیرغم سازگاری گسترده و بازارپسندی مطلوب، فوق العاده به بیماری برق‌زدگی حساس است (Sabaghpour *et al.*, 2004). لاین ICC 12004 که از ژنوتیپ‌های اصلاحی مؤسسهٔ بین المللی ایکریسات است، دارای تیپ دسی بوده و در بررسی‌های مختلف به عنوان مقاوم به بیماری برق زدگی معرفی شده است (Flandez-Galvez *et al.*,2003; Chen *et al.*, 2004). در این آزمایش، برای ارزیابی بیماری از دو روش مقیاس ظاهری ۹-۱ (Reddy and Singh, 1984)؛ با تغییرات به عمل آمده توسط کولارد و همکاران (Collard *et al.*,2001) و درصد برگ های آلوده برای هر بوته (Chen *et al.*, 2004) استفاده شد.

در این آزمایش که در بهار سال ۱۳۷۶ در مرکز ایکاردا (حلب، سوریه) انجام شد، سه جدایه (هر کدام متعلّق به یکی از سه پاتوتیپ ثبت شده) و یک واریانت بیماریزای جدید از *A. rabiei*، که به نام پاتوتیپ IV معرفی شده است (Bayaa *et al.*, 2004) مورد استفاده قرار گرفتند. جدایه‌های موجود، به ترتیب عبارت بودند از: جدایه شماره ۵۱ از پاتوتیپ I؛ جدایه شماره ۴۷ از پاتوتیپ II و جدایه شماره ۱۳ از پاتوتیپ III (Udupa *et al.*, 1998)، که به عنوان کشت خالص از کلکسیون *A. rabiei* نگهداری شده در مرکز ایکاردا دریافت شدند. واریانت جدید از گیاهان آلوده به بیماری، جمع آوری شده از منطقه کلجبرین (Kaljebrine) واقع درشمال کشور سوریه، در خلال سال‌های ۲۰۰۴ تا ۲۰۰۶ به دست آمد. برای جداسازی قارچ از گیاهان بیمار، ساقه‌های واجد علائم شاخص برق‌زدگی به قطعات یک سانتیمتری برش داده شده و به مدت سه دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۶ درصد ضدعفونی سطحی شدند و سپس به مدّت سه دقیقه با آب مقطر استریل آبکشی شده و بر روی حوله کاغذی استریل خشک شدند. قطعات ساقه بر روی محیط کشت آگار دکستروز سیب زمینی (PDA) قرار داده شده و در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد به مدت ۷ تا ۱۰ روز نگهداری شدند. پس از این مدت جدایه‌ها به شکل کنیدی در داخل آب مقطر استریل در دمای ۴ درجه سانتیگراد در طول مدت آزمایش نگهداری شدند. تمامی جدایه‌های مورد استفاده در این آزمایش از کنیدی‌های منفرد (پیکنیدیوسپورهای واحد) منشاء گرفته بودند.

در آزمایش اوّل، چهار بذر از هر ژنوتیپ مورد آزمایش در گلدان‌هایی با ابعاد ۲۵×۱۵ سانتیمتر حاوی خاک، ماسه و تورب به نسبت‌های ۲-۱-۱، در عمق ۲ سانتی متر کشت شد. در آزمایش دوّم که برای اندازه‌گیری تنوع بیماری‌زایی از روش گنبدک (Chen and Muehlbauer, 2003) استفاده شد، بذور نخود در گلدان‌های عمیق مخصوص به ابعاد ۲۵×۶ سانتیمتر مشابه آزمایش اول کشت شدند. سوسپانسیون اسپور پس از اینکه از نظر طول عمر و رقّت اسپور استاندارد گردید، مورد استفاده قرار گرفت، به طوری که کنیدی‌های جدایه‌های منفرد از کشت‌های ۲ هفته‌ای در محیط آگار V-8 (۲۰۰ میلی لیتر آبمیوه V8، ۳ گرم کربنات کلسیم و ۲۰ گرم در لیتر آگار دیفکو) برداشت شدند. رقّت‌های اسپور از هر کدام از جدایه‌های مورد نظر با استفاده از دستگاه هماسایتومتر تعیین و به میزان‌های ۲×۱۰^{۳}، ۲×۱۰^{۴} و ۲×۱۰^{۵} اسپور در میلی لیتر تنظیم گردید. گیاهچه‌های با طول عمر ۲ هفته به طور جداگانه با این سوسپانسیون های اسپور به میزان ۲ میلی لیتر به ازای هر بوته (تا زمان چکیدن قطرات از برگ‌ها) محلول پاشی شدند. گلدان‌های آزمایش اول با کیسه پلاستیکی نیمه شفاف کاملاً پوشانده شده و در دمای ۲۵-۲۰ درجه سانتیگراد و طول روز ۱۲ ساعت نور طبیعی در گلخانه قرار داده شدند. گلدان‌های آزمایش دوم نیز بلافاصله با درپوش‌های شفاف مات (لیوان یک

بـار مصـرف) پوشـانده شـده و در اطاقـک رشـد (Convyron PGR15, USA) در ۱۲ساعت نـور بـا دمـای ۲۰ درجـه سـانتیگراد و ۱۲ سـاعت تـاریکی بـا دمای ۱۶ درجه سانتیگراد در رطوبت نسبی ۱۰۰درصد قرار داده شدند. پوشش‌های مزبور در آزمایش اول پس از ۴۸ سـاعت و در آزمـایش دوم پـس از ۲۴ سـاعت برداشته شدند. در هر دو آزمایش به گلدان‌هـای شـاهد فقط آب مقطر پاشیده شد و در ادامه، مشابه گلدان‌هـای آزمایشی با آنها رفتار گردید.

در هـر دو آزمـایش، از دو روش بـرای ارزیـابی شـدت بیمـاری اسـتفاده شـد. روش اول بـر اسـاس مقیـاس درجـه یـا رتبـه بنـدی ۱ تـا ۹ ردی و سـینگ (Reddy and Singh, 1984) با تغییـرات صـورت گرفتـه توسط کولارد و همکاران (Collard *et al*.,2001) انجـام شد. در روش دوم، تعداد برگ‌های واجد علائم بیماری یا پژمردگی و همچنین تعداد کـل بـرگ‌هـای هـر بوتـه شمارش شده و درصد برگ‌های آلـوده بـرای هـر بوتـه محاسبه و ثبت گردید (Chen *et al*., 2004).

هر دو آزمـایش در قالـب طـرح کـاملاً تصـادفی بـه صورت فاکتوریل با سه تکرار اجـرا شـدند. دو ژنوتیـپ ICC 12004 و بیـونیج، چهـار جدایـه تـک اسـپور از *A.rabiei* در سه رقّـت مختلـف از سوسپانسـیون اسـپور قارچ، جمعاً ۲۴ تیمار آزمایشی را تشـکیل دادنـد. امتیـاز شدت بیماری برای تمامی بوته ها ثبت گردید و میانگین امتیـاز دو بوتـه در هـر گلـدان بـه عنـوان یـک واحـد آزمایشی در نظر گرفته شـد. آزمـون بارتلـت بـه منظـور بررسـی یکنـواختی واریـانس هـا انجـام شـد. تجزیـه واریـانس سـاده و مرکـب داده هـا و تجزیـه هـای رگرسیونی با استفاده از برنامه سیستم آنالیز آماری SAS انجام و از حـداقل تفـاوت معنـی دار (LSD)، در سـطح احتمال پنج درصد برای مقایسه میانگین تیمارها اسـتفاده شـد. بـرای محاسـبه همبسـتگی دو روش ارزیـابی (مقیاس ۱ تا ۹ و درصـد آلـودگی بـرگ)، از داده‌هـای واحدهای آزمایشی منفرد (گلدان‌ها) استفاده شد.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه واریانس سادهٔ دو آزمایش در جدول یک نشان داده شـده اسـت. نتـایج آزمـایش اوّل حـاکی از وجـود اخـتلاف معنـی‌دار بـین ژنوتیـپ‌هـا، جدایه‌ها و غلظت‌هـای مختلـف اسـپور از لحـاظ درجـه بـرق زدگـی و درصـد آلـودگی بـرگ بـود. مقایسـه میـانگین‌هـا نشـان داد کـه لایـن ICC 12004 مقاومت بیشـتری بـه همـه جدایـه‌هـای آزمایشـی داشـته (داده‌هـا درج نشـده‌انـد) و واریانـت IV بیشـترین میـزان بیمـاریزایی را در هـر دو ژنوتیـپ ایجـاد نمـود. غلظـت اسپور ۲×۱۰^{۵} در ایجاد بیماری بیشترین نقش را داشـت، ولی از این لحاظ با غلظـت ۲×۱۰^{۴} اسـپور در میلـی لیتـر تفاوتی نداشت. از بین اثرات متقابل فقط اثر غلظت‌هـای مختلف اسپور با ژنوتیپ ها از نظر درصد آلودگی برگ در سـطح احتمـال پـنج درصـد معنـی دار بـود. غلظـت ۲×۱۰^{۵} بر روی رقم بیونیج بیشترین و غلظـت ۲×۱۰^{۳} در رقـم ICC 12004 کمتـرین میـزان آلـودگی را ایجـاد کردند.

در آزمـایش دوم نیـز تفـاوت‌هـای معنـی‌داری بـین ژنوتیپ‌ها، بیمـاریزایی جدایـه‌هـا و غلظـت‌هـای اسـپور پاشی، مشاهده گردید. جدایه‌های دارای سطح بالایی از شـدت بیمـاری و درصـد بـالای آلـودگی بـرگ در آزمـایش اوّل، در آزمـایش دوّم نیـز سـطح بـالایی از بیمـاری را داشـتند. در ایـن آزمـایش اثـرات متقابل جدایه × ژنوتیپ، و اسپور × ژنوتیپ در مورد هر دو روش آلودگی معنی‌دار بودند. پـائین‌تـر بـودن نسـبی ضـریب تغییـرات آزمـایش دوم نسـبت بـه آزمـایش اول، تـا حـدودی بـالاتر بـودن میـزان دقّـت در آزمـایش گنبـدک را تأییـد کـرد. چـن و همکـاران (Chen *et al*., 2004) اظهـار داشـتند کـه روش گنبـدک دقیق‌تـر بـوده و اسـتفاده از آن بـا انـدازه گیـری درصـد آلودگی بـرگ، بـرآوردی کمّـی و عینـی را از بیمـاری فراهم می نماید. هرچند از بین دو روش انـدازه گیـری واکنش به بیمـاری بـرق‌زدگـی، روش درجـه آلـودگی

تنوع بیشتری را در هر دو آزمایش نشان داد، با این وصف، همبستگی بالایی بین دو روش یاد شده وجود داشت (r = 0.89). رابطه مزبور در شکل ۲ نشان داده شده است.

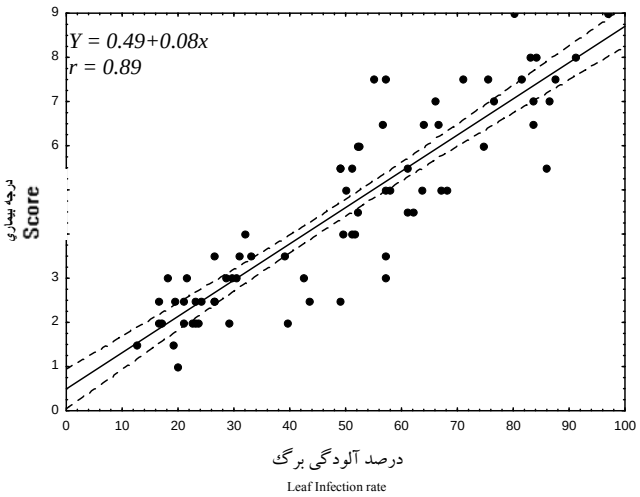
جدول ۱- تجزیه واریانس ساده دو آزمایش در بررسی اثر نوع جدایه و غلظت اسپور بر شدت آلودگی دو ژنوتیپ نخود به بیماری برق زدگی

Table 1. Analysis of variance for two experiments in study the effect of pathotype and spore concentrations on ascochyta blight incidence in two chickpea genotypes

			میانگین مربعات (MS)			
			آزمایش اول		آزمایش دوم	
S.O.V.	منابع تغییر	درجه آزادی d.f	درجه آلودگی Score	درصدآلودگی برگ Leaf infection (%)	درجه آلودگی Score	درصدآلودگی برگ Leaf infection (%)
Genotype (A)	ژنوتیپ	1	174.22**	2.18**	224.01**	2.17**
Pathotype (B)	جدایه	3	22.33**	0.12**	9.16**	0.49**
Spore Concentration (C)	غلظت اسپور	2	14.29**	0.15**	22.26**	0.18**
A × B		3	3.01	0.036	4.42**	0.102**
A ×C		2	0.43	0.086*	4.18**	0.024*
B × C		6	2.67	0.009	0.412	0.007
A × B × C		6	0.38	0.008	0.366	0.006
Error	خطا	48	1.26	0.017	0.819	0.007
C.V (%)	ضریب تغییرات		24.98	27.19	19.81	16.37

* and **: Significant at 5% and 1% probability levels respetively

* و **: به ترتیب معنی دار در سطوح احتمال پنج و یک درصد

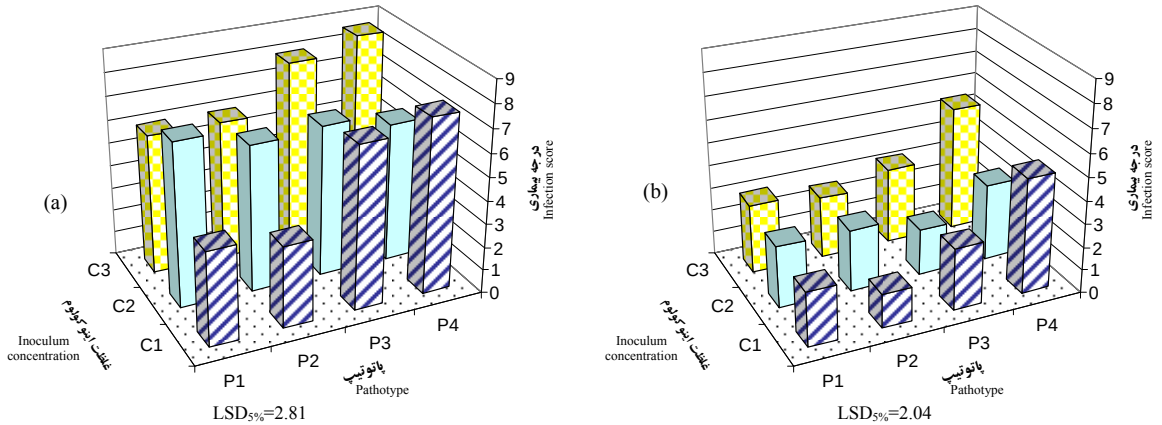


شکل ۲- رابطه بین درصد آلودگی برگ و درجه آلودگی به برق‌زدگی در ژنوتیپ‌های نخود

Fig. 2. Relationship between leaf infection rate and ascochyta blight scores in chickpea genotypes

در مجموع هر دو آزمایش، مقاومت لاین ICC12004 به بیماری برق‌زدگی مشهود بود، ولی به طوری که در شکل۳ ملاحظه می گردد، این ژنوتیپ در برابر پاتوتیپ جدید(IV) حساسیت نشان داد. مالهوترا و همکاران (Malhotra *et al.*, 2003) گزارش کردند که ژنوتیپ ICC12004 در برخی مناطق شمالی سوریه حساسیت به برق زدگی داشته است، ولی بایا و همکاران (Bayaa *et al.*, 2004) ضمن تأیید گزارش قبلی، تصریح نمودند که

لاین مذکور فقط در برابر واریانت جدید حساس است. رقم بیونیج کمترین درجه آلودگی را در پاسخ به پاتوتیپ II در غلظت ۲×۱۰^{۳} اسپور در میلی لیتر و بیشترین آن را در واکنش به پاتوتیپ IV در غلظت ۲×۱۰^{۵} اسپور در میلی لیتر نشان داد. با توجه به نتایج حاصل، رقم محلّی بیونیج در گروه ژنوتیپ‌های حساس به برق زدگی قرار می‌گیرد. ولی نکته قابل توجه، مقاومت این رقم به بعضی از جدایه‌های تحت بررسی، در چند غلظت از اسپور بود (شکل ۳). شدّت یا درجه بیماری رقم بیونیج، در مایه زنی با سه غلظت از پاتوتیپ I، به ترتیب برابر با ۴، ۷، ۶، و در مایه زنی با پاتوتیپ II، به ترتیب برابر با ۳/۵، ۶/۳، ۶ بود. درجات ۴ و ۳/۵ که در هر گروه با بقیه تفاوت معنی‌داری داشتند، هر دو در فشار زادمایه حاصل از ۲×۱۰^{۳} اسپور در میلی لیتر ایجاد شدند، بنابراین می‌توان چنین استنباط کرد که در رقم بیونیج، برخی ژن‌های کوچک اثر برای مقاومت به برق زدگی وجود دارند. چو و همکاران (Cho *et al.*, 2004) اعتقاد داشتند که وجود ژن‌های کوچک اثر در ارقام نخود حسّاس به بیماری، موجب بروز تفکیک متجاوز در نتاج حاصل از تلاقی آن‌ها با ارقام مقاوم می‌شود. همچنین، تعیین این ژن‌ها می‌تواند در تجمیع یا هرمی کردن ژن‌های مقاومت در برنامه های اصلاحی مورد استفاده قرار گیرد (Lichtenzveig *et al.*, 2002). در شکل ۳ نشان داده شده است که لاین ICC 12004، در واکنش به پاتوتیپ II در غلظت ۲×۱۰^{۳} اسپور در میلی لیتر کمترین و در واکنش به پاتوتیپ IV در غلظت ۲×۱۰^{۵} اسپور در میلی لیتر بیشترین درجه بیماری را داشته است.



شکل ۳- واکنش رقم بیونیج (*a*) و لاین ICC12004 (*b*) نخود در برابر چهار پاتوتیپ عامل بیماری برق زدگی در سه غلظت مختلف اسپور (میانگین دو آزمایش)

Fig. 3. Response of Bivanij (*a*) and ICC12004 (*b*) chickpea genotypes against four pathotypes and three spore concentrations of ascochyta blight (mean of two experiments)

نتایج آزمون بارتلت نشان داد که واریانس خطاهای دو آزمایش یکنواخت بودند و در نتیجه تجزیه واریانس مرکّب انجام شد (جدول ۲). برای هر دو متغیر درجه آلودگی و درصد آلودگی، بین ژنوتیپ‌ها، پاتوتیپ‌ها و غلظت‌های اسپور تفاوت معنی‌داری به دست آمد. اثر متقابل پاتوتیپ × آزمایش نیز از لحاظ درجه آلودگی و درصد آلودگی معنی‌دار بود ($P\leq0.01$)، به عبارت دیگر اثر پاتوتیپ‌های مورد بررسی در دو آزمایش متفاوت بوده است. این موضوع می‌تواند ناشی از شرایط مختلف حاکم بر دو آزمایش باشد. اثرمتقابل ژنوتیپ × غلظت اسپور برای آلودگی برگ معنی‌دار بود. طبیعتاً ژنوتیپ‌های مورد آزمایش پاسخ متفاوتی در

غلظت‌های مختلف اسپور داشتند. با توجه به این که فاصله سطوح در فاکتور C (غلظت اسپور) یکسان بود، مجموع مربّعات آن با استفاده از جدول ضرایب چند جمله‌ای متعامد به اجزای خطّی و درجه دوّم تفکیک شد. نتیجه تفکیک مجموع مربعات در جدول ۳ نشان داده شده است. همان طور که مشاهده می‌شود، رگرسیون خطّی غلظت اسپور با پاتوتیپ معنی‌دار ولی سهم غیر خطّی آن غیر معنی‌دار بود، بنابراین به نظر می‌رسد که با افزایش غلظت اسپور، شدّت بیماری برق‌زدگی به شکل معنی‌دار و به صورت خطّی افزایش یافته است. در ادامه، رگرسیون غلظت اسپور بر درجه آلودگی برای هر پاتوتیپ محاسبه شد (جدول ۴). بر اساس نتایج حاصل از این تجزیه، رگرسیون خطّی در مورد همه پاتوتیپ‌های مورد بررسی معنی‌دار بود، ولی در هیچ کدام از پاتوتیپ‌ها، حالت غیر خطّی مشاهده نشد.

جدول ۲- تجزیه واریانس مرکّب اثر نوع جدایه و غلظت اسپور بر شدت بیماری برق‌زدگی در ژنوتیپ‌های نخود

Table 2. Combined analysis of variance for the effects of isolates and spore concentrations on ascochyta blight incidence in chickpea genotypes

S.O.V.	منابع تغییر	درجه آزادی d.f	میانگین مربعات (MS) درجه بیماری Infection score	درصد آلودگی برگ Leaf infection (%)
Experiment (E)	آزمایش	1	0.17	0.021
Replication/E	تکرار در آزمایش	4	2.11	0.010
Genotype (A)	ژنوتیپ	1	396.67**	4.33**
A×E		1	1.56	34×10^{-6}
Isolate (B)	جدایه	3	25.36**	0.537**
B×E		3	6.14**	0.074**
A×B		3	6.75**	0.137**
A×B×E		3	0.67	0.011
Concentration (C)	غلظت اسپور	2	35.92**	0.309**
C×E		2	0.63	0.002
A×C		2	2.59	0.059**
A×C×E		2	2.02	32×10^{-5}
B×C		6	1.41	0.012
B×C×E		6	1.57	0.005
A×B×C		6	0.30	0.003
A×B×C×E		6	0.43	0.012
Error	خطا	92	0.998	0.109
Linear model	مدل خطی	R^2	0.85	0.83
C.V (%)	ضریب تغییرات		21.99	20.18

* and **: Significant at 5% and 1 % probability levels, respectively * و **: به ترتیب معنی‌دار در سطوح احتمال پنج و یک درصد

به طور کلی بر اساس نتایج این آزمایش و با توجه به نمره‌های ۴ و ۳/۵ که هر دو برای رقم بیونیج در فشار زادمایه ۲×۱۰^{۳} اسپور در میلی لیتر به دست آمدند، می‌توان استنباط کرد که در این رقم، برخی ژن‌های کوچک اثر برای مقاومت به برق زدگی وجود دارند. تفکیک مجموع مربّعات غلظت اسپور به اجزای خطّی و درجه دوم نشان داد که با افزایش غلظت اسپور، شدت بیماری برق زدگی به شکل معنی‌دار و به صورت خطّی افزایش می‌یابد. هر دو ژنوتیپ به پاتوتیپ IV حساس و در برابر سایر جدایه‌ها، ICC12004 مقاوم و بیونیج حساس بودند. ضمناً غلظت

جدول۳- آزمون رگرسیون‌های خطّی و درجه دوّم برای غلظت اسپور عامل بیماری برق‌زدگی نخود

Table 3. Linear and quadratic regressions for sopre concentration of Ascochyta blight in chickpea

S.O.V	منابع تغییر	درجه آزادی d.f	میانگین مربعات (MS)	F value
Concentration	غلظت اسپور	2	0.309	25.81**
Linear	خطی	1	0.607	51.03**
Quadratic	درجه دوم	1	0.001	< 1

** : Significant at 1% probability level

** : معنی دار در سطح احتمال یک درصد

جدول ۴- سهم مجموع مربعات غلظت اسپور برق‌زدگی نخود برای هر کدام از چهار پاتوتیپ مورد بررسی

Table 4. Proportion of SS for ascochyta blight spore concentration of four pathotypes in chickpea

PathotypeI	†MS	PathotypeII	MS	PathotypeIII	MS	PathotypeIV	MS
خطی Linear	0.211**	خطی Linear	0.230**	خطی Linear	0.043*	خطی Linear	0.0182**
درجه دوم Quadratic	0.003	درجه دوم Quadratic	0.020	درجه دوم Quadratic	0.001	درجه دوم Quadratic	7×10^{-4}

†: MS = SS

* and **: Significant at 5% and 1 % probability levels, respectively

* و ** به ترتیب معنی دار در سطوح احتمال پنج و یک درصد

۲×۱۰^{۵} اسپور در میلی لیتر بیشترین تمایز را بین دو ژنوتیپ مورد آزمایش ایجاد کرد.

استفاده از مقاومت میزبان مفهوم مهمّی در مدیریت برق زدگی نخود است، ولی منابع مقاومت در نخود محدود است (Gan *et al.*, 2006). در این تحقیق، شناسایی ژن‌های کوچک اثر در ژنوتیپ حساس (رقم محلّی بیونیج)، منابع مقاومت بیشتری را برای تجمیع یا هرمی کردن ژن‌های مقاومت در برنامه های اصلاحی آینده فراهم نمود. علاوه بر این، پاسخ افتراقی دو ژنوتیپ آزمایشی به پاتوتیپ های بررسی شده، شواهد بیشتری را برای تمایز پاتوتیپ‌های بیماری برق‌زدگی در اختیار قرار داد.

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی مؤسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور انجام شده است. از مسئولین محترم مؤسسه و بخش تحقیقات حبوبات دیم تشکر و قدردانی می گردد.

منابع مورد استفاده

References

Bayaa, B., S. M. Udupa, M. Baum, R. S. Malhotra and S. Kabbabeh. 2004. Pathogenic variability in Syrian isolates of *Ascochyta rabiei*. Conference Handbook, 5th European Conference of Grain Legumes and 2nd International Conference on Legume Genomics and Genetics. 7-11 Jun. 2004, Dijon, France.

Boland-Andam, J., H. Rouhani and A. Alizadeh. 1998. Study of resistance of chickpea cultivars to Ascochyta blight. Seed and Plant J. 15: 184-191. (In Persian with English abstract).

Buchwaldt, L., H. Booker and K. Gali. 2007. A detached leaf assay for phenotyping of chickpea-ascochyta interaction. Agriculture and Agri-Food Canada, Saskatoon, Saskatchewan, S7N0X2.

Chen, W., C. J. Coyne, T. L. Peever and F. J. Muehlbauer. 2004. Characterization of chickpea differentials for pathogenicity assay of ascochyta blight and identification of chickpea accessions resistant to *Didymella*

rabiei. Plant Pathol. 53: 759-769.

Chen, W. and F. J. Muehlbauer. 2003. An improved technique for virulence assay of *Ascochyta rabiei* on chickpea. Inter. Chickpea and Pigeonpea Newsl. 10: 31-33.

Cho S., W. Chen and F. J. Muehlbauer. 2004. Pathotype-specific genetic factors in chickpea (*Cicer arietinum* L.) for quantitative resistance to ascochyta blight. Theor. Appl. Genet. 109: 733–739.

Chongo, G., B. D. Gossen, L. Buchwaldt, T. Adhikari and S. R. Rimmer. 2004. Genetic diversity of *Ascochyta rabiei* in Canada. Plant Dis. 88: 4–10.

Collard, B. C. Y., P. K. Ades, E. C. K. Pang, J. B. Brouwer and P. W. J. Taylor. 2001. Prospecting for sources of resistance to ascochyta blight in wild *Cicer* species. Austr. Plant Pathol. 30: 271-276.

Flandez-Galvez, H., P. K. Ades, R. Ford, E. C. K. Pang and P. W. J. Tayler. 2003. QTL analysis for ascochyta blight resistance in an intraspecific population of chickpea (*Cicer arietinum* L.). Theor. Appl. Genet. 107: 1257–1265.

Gan, Y. T., K. H. M. Siddique, W. J. MacLeod and P. Jayakumar. 2006. Management options of minimizing the damage by ascochyta blight (*Ascochyta rabiei*) in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Field Crops Res. 97: 121-134.

Haware M. P., H. A. van Rheenen and N. S. S. Prasad. 1995. Screening for ascochyta blight resistance in chickpea under controlled environment and field conditions. Plant Dis. 79: 132-135.

Kaiser, W. J. 1997. Inter-and intra national spread of ascochyta pathogens of chickpea, faba bean, and lentil. Can. J. Plant Pathol. 19: 215–224.

Lichtenzveig, J., D. Shtienberg, H. B. Zhang, D. J. Bonfil and S. Abbo. 2002. Biometric analysis of the inheritance of resistance to *Didymella rabiei* in chickpea. Phytopathology, 92: 417–23.

Malhotra, R. S., M. Baum, S. M. Udupa, B. Bayaa, S. Kabbabe and G. Khalaf. 2003. Ascochyta blight resistance in chickpea: Present status and future prospects. Proceeding of International Chickpea Congress: Chickpea Research for Millenium, 20-22 Jan. 2003, Raipur, India.

Nene Y. L. and M. V. Reddy. 1987. Chickpea diseases and their control. In: M.C. Sexena and K.B. Singh (Eds.). The Chickpea.Wallingford, UK: CAB International, 233–370.

Nourolahi, Kh., M. Falahati-Rastgar and B. Jafarpour. 2000. Identification of physiological races of *Ascochyta rabiei* in chickpea across some locations of Iran. J. Agric. Tech. Sci. 4(1): 127-136. (In Persian with English abstract).

Peever T. L., S. S. Salimath, G. Su, W. J. Kaiser and F. J. Muehlbauer. 2004. Historical and contemporary multilocus population structure of *Ascochyta rabiei* (teleomorph: *Didymella rabiei*) in the Pacific Northwest of the United States. Mol. Ecol. 13: 291–309.

Reddy, M. V. and K. B. Singh, 1984. Evaluation of a world collection of chickpea germplasm accessions for resistance to ascochyta blight. Plant Dis. 68: 900–901.

Reddy M. V. and S. Kabbabeh. 1985. Pathogenic variability in *Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab. in Syria and Lebanon. Phytopathol. Mediterranea, 24: 265–6.

Riahi H., M. M. Harrabi, M. H. Halila, and R. E. Strange. 1990. A quantitative scale for assessing chickpea reaction to *Ascochyta rabiei*. Can. J. Bot. 68: 2736–2738.

Sabaghpour, S. H., D. Shahriari, F. Mahmoudi, K. Keshavarz, and M. Salavati. 2004. Seed yield of new chickpea cv. Arman and its resistance to ascochyta blight. Dryland Agric. Res. Institute, Publication No. 217. (In Persian).

Shahriari, D. and M. Izadyar. 1998. Study of differences in pathogenicity of *Ascochyta rabiei* on some of chickpea cultivars. Proc. 13th Iranian Plant Protection Congress, 23-27 Aug. 1998, University of Kermanshah, Iran. (In Persian).

Shokouhifar, F., A. Bagheri and M. Rastegar. 2003. Identification of virulence group of *Ascochyta rabiei* isolates in Iran. J. of Agric. Natur. Resour. Sci. 10(1): 217-232. (In Persian with English abstract).

Singh, K. B., R. S. Malhotra, M. C. Saxena and G. Bejiga, 1997. Superiority of winter sowing over traditional spring sowing of chickpea in the Mediterranean region. Agron. J. 89: 112–118.

Singh, K. B. and M. C. Saxena. 1999. Chickpeas. The tropical Agriculturalists. ICARDA. Aleppo, Syria.

Trapero-Casas, A. and W. J. Kaiser. 1992. Influence of temperature, wetness period, plant age and inoculum concentration on infection and development of ascochyta blight of chickpea. Phytopathol. 82: 589–596.

Udupa S. M., F. Weigand, M. C. Saxena and G. Kahl. 1998. Genotyping with RAPD and microsatellite markers resolves pathotype diversity in the Ascochyta blight pathogen of chickpea. Theor. Appl. Genet. 97: 299–307.

Younesi, H. 1998. Identification of reces of *Ascochyta rabiei* in Kermanshah province and resistance of some chickpea genotypes to these races M.Sc. Thesis. University of Tehran, Iran. (In Persian).

Younesi, H.,M. Okhovat, Gh. Hajaroud, J. Zad and A. Taleei. 2000. Evaluation of some chickpea cultivars to three local races of *Ascochyta rabiei* at greenhouse and field conditions. Proc. 14th Iranian Plant Protection Congress, 5-8 Sep. 2000, Industrial University of Isfahan, Iran. (In Persian).

Impact of pathotypes and spore concentrations on Ascochyta blight incidence in two chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes

Kanouni H.[1], A. Talei[2], S. A. Peyghambari[3], S. M. Okhovat[4] and M. Abang[5]

ABSTRACT

Kanouni, H., A. Talei, S. A. Peyghambari, S. M. Okhovat and M. Abang. 2011. Impact of pathotypes and spore concentrations on Ascochyta blight incidence in two chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes**. Iranian Journal of Crop Sciences. 13(2): 368-379. (In Persian).**

Ascochyta blight (AB) is the major constraint and the most destructive disease for chickpea production in Central and West Asia and North Africa (CWANA) region. To study response of chickpea genotypes against this disease, a research was conducted in the International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA) in 2007. Effects of four pathotypes of *A. rabiei* in three spore concentrations were investigated on disease score (DS) and leaf infection percentage (LI) of two genotypes of chickpea (Iranian local "Bivanij" and ICC12004), using systematic and mini-dome methods. The layout of this study was factorial experiment based on completely randomized design with three replications. Results revealed significant differences between genotypes, isolates and concentrations for DS and LI. New variant of pathotype IV developed highest pathogenicity on both genotypes. Lower coefficient of variation in the second method confirmed higher precision of mini-dome trial. There was significant correlation between LI and DS. Disease score for Bivanij (susceptible to AB) were 3.5 and 4.0 under 2×10^3 spores.ml^{-1} concentration which suggested presence of some minor Ascochyta blight resistance genes in this genotype. Effect of spore concentration was divided into linear and quadratic components. Disease severity increased significantly with the increase in spore concentration and this trend was linear. Both genotypes were susceptible to pathotype IV, whereas only ICC12004 was resistant to other pathotypes. The highest spore concentration (2×10^5 spores.ml^{-1}) developed the most discrimination between two chickpea genotypes.

Key words: Ascochyta blight, Chickpea, Pathotype and Spore concentration.

Received: May, 2008 Accepted: October, 2010

1-Assistant Prof., Kurdistan Agriculture and Natural Resources Research Center, Sanandaj, Iran (Corresponding author) (Email: hkanouni@yahoo.com)
2-Prof., Agricultural and Natural Resources Campus, University of Tehran, Karaj, Iran
3-Associate Prof., Agricultural and Natural Resources Campus, University of Tehran, Karaj, Iran
4-Prof., Agricultural and Natural Rseources Campus, University of Tehran, Karaj, Iran
5- Pathologist, International Center for Agricultural Reseach in the Dry Area (ICARDA), Aleppo, Syria