مطالعه میکوفلوربذر اسپرس در ایران

بهرام شریف نبی و اصغر نکوئی*

چکیده

به منظور بررسی میکوفلور بذر اسپرس، نمونه‌های بذری این محصول از استانهای مختلف اصفهان، اردبیل، زنجان و آذربایجان شرقی جمع آوری گردید. نیمی از بذور مورد بررسی پس از ضد عفونی سطحی و نیمی دیگر بدون ضد عفونی سطحی روی محیطهای PDA، SMA، MA، کاغذ و نیز ماسه استریل مرطوب کشت گردیده و در حرارت ۲۵ درجه سانتیگراد و تحت تابش ۱۲ ساعت نور فلورسنت نگهداری شدند. هفت روز بعد قارچهای رشد کرده برروی این بذرها به طریق تک اسپور و کشت نوک ریسه ای خالص سازی و برای شناسائی به محیطهای کشت اختصاصی منتقل شدند.

*از میان قارچهای به دست آمده از بذور اسپرس مناطق مختلف، چهار نوع قارچ **Alternaria**، **Aspergillus**، **Penicillium**، **Rhizopus** شیوع بیشتری داشتند، ولی قارچهای **Ulocladium**، **Cladosporium**، **Fusarium**، **Mucor**، **Nigrospora**، **Trichothecium**، **Stemphylium** و **Botrytis** به میزان کمتری از این بذر ها جداسازی شدند. با استفاده از روش شستشوی سطحی بذور، قارچهای **Uromyces** و **Oidiopsis** نیز در بذرهای اسپرس شناسائی گردیدند.*

واژه‌های کلیدی - *اسپرس، میکوفلوربذر*

مقدمه

بذر اسپرس (*Onobrychis viciifolia Scop*) به صورت غلافی ناشکوفا با سطحی برجسته و مشبک می‌باشد (۶)، از اینرو محل مناسبی برای استقرار بسیاری از عوامل بیماریزای گیاهی قارچی و باکتریائی است. حضور قارچها و سایر عوامل بیماریزای گیاهی روی سطح بذر، به مقدار زیاد باعث کاهش قوه نامیه و ایجاد پوسیدگی و فساد آن می‌گردد. به همین دلیل بررسی نقش قارچها و یا متابولیت های ناشی از آنها روی بذر، از دیر باز مورد توجه پژوهشگران بیماری شناسی بذر قرار گرفته است. گیاهچه‌های به دست آمده از بذور آلوده معمولاً دارای ریشه‌های غیر عادی بوده و لکه‌های نکروزه روی برگهای اولیه کوتیلدونی نیز ممکن است ظاهر شود. به علاوه، حساسیت به عوامل بیماریزای خاکزی را نیز می‌توان انتظار داشت.

وجود غلاف بذر اسپرس ممکن است برروی ریشه چه ایجاد زخم نماید که گاهی باعث آلودگی بذر به انواع عوامل بیماریزای مولد پوسیدگی ریشه و طوقه از طریق نفوذ در آنها می‌گردد (۸). از اینرو جدا کردن غلاف بذر اسپرس، به مقدار قابل توجهی از وزن و حجم آن می‌کاهد و باعث کاهش آلودگی گیاهچه‌های اولیه می‌شود (۶).

آلودگی غلاف به باکتری ها و قارچهائی مانند *Alternaria* بیش از بذور بدون غلاف می‌باشد و ضد عفونی بذر باعث بهتر

* به ترتیب مربی و کارشناس گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1376.1.2.1.5]

سبز شدن بذر و افزایش عملکرد اسپرس می‌گردد. (۷ و ۱۲).

میکروارگانیسم های مختلف بیشتری روی غلاف بذر اسپرس، نسبت به سایر گیاهان علوفه ای تیره لگومینوز وجود دارد (۱۶). گونه‌هائی از *Fusarium*، *Alternaria* و *Mucor* از غلاف بذر اسپرس جدا شده است (۱۶). *Septoria orobina* عامل لکه برگی سپتوریائی اسپرس، به غلاف بذر حمله می‌کند (۱) و *Botrytis cinerea* از بذر اسپرس جدا شده است و باعث از بین رفتن جوانه‌های گل آن می‌شود (۷).

Ascochyta onobrychidis عامل لکه برگی آسکوکیتائی اسپرس، از طریق بذر و بقایای گیاهی آلوده منتقل می‌شود و در چکسلواکی از روی بذر اسپرس جدا شده است (۱۰).

در ایـــران *Leveillula taurica*(۲)، *Uromyces onobrychidis*, (۳)، *Botrytis cenerea* (۴) و *Ascochyta fabae*(۵) از اسپرس جدا شده است و تمامی آنها قابلیت انتقال از طریق بذر را نیز دارند. تا قبل از این تحقیق روی میکوفلورکلی و اجزای بذر اسپرس در ایران کاری صورت نگرفته(۱) و در دنیا نیز فقط میکوفلورکلی اسپرس بررسی شده بود (۷ و ۱۶)، از اینرو با توجه به اهمیت اسپرس در استان اصفهان به عنوان یک گیاه علوفه ای و مرتعی مناطق سردسیر، بررسی میکوفلورکلی و اجزای بذر آن ضروری به نظر رسید.

مواد و روشها

بذور اسپرس از مناطق مختلف مانند استانهای اصفهان، اردبیل، زنجان و آذربایجان شرقی در تابستان ۱۳۷۴ جمع آوری گردید. نمونه‌ها به تفکیک داخل پاکت های کاغذی به آزمایشگاه منتقل و سپس میزان جوانه زنی و رطوبت آنها تعیین شد. جهت بررسی و تعیین قارچهای بذر زاد و یا قارچهای همراه بذر، از روشهای استاندارد بین المللی تعیین سلامتی بذور، که از سوی I.S.T.A پیشنهاد شده است (۱۳)، با اندک تغییراتی استفاده شد این روشها شامل کشت بذر روی محیطهای غذایی مختلف آگاردار، کشت بذر روی کاغذ صافی مرطوب، کشت بذر درون ماسه مرطوب و روش شستشوی سطحی بذر بودند که ذیلاً تشریح می‌گردند.

۱- روش کشت بذر روی محیطهای غذایی آگاردار

دویست عدد بذر از هر منطقه به طور تصادفی انتخاب و نیمی از آنها بدون ضد عفونی سطحی و نیمی دیگر با استفاده از محلول یک درصد هیپو کلرایت سدیم به مدت ۵ دقیقه ضد عفونی شدند و پس از آبکشی و خشک کردن، روی محیطهای غذایی آگاردار مختلف مانند سیب زمینی، دکستروز آگار (PDA)، مالت آگار (MA)، نمک مالت آگار (SMA) و محیط کشت اختصاصی اسپرس کشت شدند. برای تهیه محیط کشت اختصاصی اسپرس ۵۰ گرم بذر غلاف دارو ۵۰ گرم ساقه و برگ اسپرس در یک پارچه ململ، در ارلن حاوی یک لیتر آب مقطر به مدت یکساعت جوشانده شد و پس از صاف کردن به محلول به دست آمده ۱۰ گرم گلوکز و ۱۷ گرم آگار افزوده شد و استریل گردید.

۲- روش استفاده از کاغذ صافی مرطوب

دویست عدد بذر از هر منطقه به طور تصادفی انتخاب و نیمی از آنها با هیپوکلرایت سدیم یک درصد به مدت ۵ دقیقه ضد عفونی و سپس با آب مقطر استریل آبکشی و با کاغذ صافی استریل خشک شدند. نیم دیگر بدون ضد عفونی سطحی، در سطح کاغذ صافی مرطوب استریل درون تشتک پتری (۵ عدد در هر تشتک) گذاشته شده و تشتکهای پتری در دمای ۲±۲۵ درجه سانتیگراد و نور متناوب معمولی قرار داده شدند.

۳- روش کشت بذر درون ماسه مرطوب

در این روش دانه‌های ماسه به قطر ۳ تا ۴ میلیمتر انتخاب و پس از ضد عفونی، در جعبه‌های پلاستیکی ضد عفونی شده ریخته شد. سپس ۴۰۰ بذر از هر منطقه به فاصله یک سانتیمتر روی ردیف (فاصله هر ردیف از یکدیگر ۳ سانتیمتر) کشت شد و روی آنها با یک لایه ماسه مرطوب استریل به ضخامت حدود ۳ سانتیمتر پوشانده شد. سپس جعبه‌ها در شرایط ۲۶ تا ۲۸

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1376.1.2.1.5]

درجه سانتیگراد و رطوبت نسبی ۸۵ تا ۹۰ درصد و شرایط نوری معمولی (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) قرار داده شد. پس از ۱۲ تا ۱۴ روز گیاهچه‌ها مورد بررسی قرار گرفتند.

۴- روش شستشوی سطحی بذر

در این روش ۱۰۰ بذر از هر منطقه بدون ضد عفونی سطحی، به طور جداگانه در ارلن های ۱۵۰ میلی لیتری، حاوی ۱۰ میلی لیتر آب مقطر استریل ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت در دستگاه تکان دهنده قرار داده شدند. محلولهای به دست آمده، به طور جداگانه به مدت ۵ دقیقه با دور ۶۰۰۰ سانتریفوژ گردید رسوب به دست آمده از آنها روی اسلایدهای میکروسکوپی ریخته شد و میکروسکوپی گردید.

۵- روش بررسی میکوفلور اجزاء بذر

جهت تعیین موقعیت قارچهای اجزاء مختلف بذر مانند جنین و آندوسپرم، تعداد ۱۰۰ بذر از هر منطقه به طور تصادفی انتخاب و پس از جداکردن غلاف بذر، بذور با محلول هیپوکلرایت سدیم یک درصد به مدت ۵ دقیقه ضد عفونی شدند. بذور ضد عفونی شده به طور جداگانه به مدت ۳ روز در ارلن های ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۷۵ میلی لیتر آب مقطر استریل خیسانده شدند. سپس در شرایط استریل، پوسته خارجی بذر از بخش داخلی (جنین و آندوسپرم) جدا گردید و هر کدام به طور جداگانه در تشتکهای پتری حاوی محیط کشت سیب زمینی، دکستروز آگار کشت داده شدند و تشتکهای پتری در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد قرار گرفتند.

نتیجه و بحث

هر چند که تنوع قارچهای جدا شده از غلاف و پوسته بذر اسپرس مناطق مختلف و با روشهای متفاوت، زیاد می‌باشد (جداول ۱ تا ۴) ولی تنها تعداد کمی از آنها مانند جنسهای *Aspergillus*، *Penicillium*، *Rhizopus* و *Alternaria* فراوانی و درصد آلودگی بالائی روی قسمتهای مختلف بذر داشته اند. با وجود فراوانی بالای قارچ *Aspergillus* روی قسمتهای مختلف بذر اسپرس، نشان داده شده است که ترشحات ریشه اسپرس برای قارچ *Aspergillus* حالت بازدارندگی دارد (۱۵).

بخش مهمی از میکوفلورکلی بذور هم در جنین و آندوسپرم (جدول ۵) به قارچ *Aspergillus* و *Penicillium* تعلق دارد و در غالب منابع از آنها به عنوان قارچهای غیر بیماریزا نام برده شده است.

قارچ *Ulocladium botrytis* تنها از جنین بذر اسپرس فریدن، روی محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار جدا شد و از آندوسپرم آن نیز *Penicillium* و *Aspergillus* و از آندوسپرم بذر اسپرس زنجان فقط *Aspergillus* جدا گردید (جدول ۵)، که نقش آنها در بیماریزائی دقیقاً مشخص نشده است.

قارچ *Alternaria* از غلاف بذر اسپرس زنجان، تبریز، اردبیل و فریدن و همچنین از پوسته بذر اسپرس تبریز و اردبیل جداسازی گردید و این قارچ به عنوان یکی از عوامل بیماریزای گیاهی آلوده کننده بذر شناخته شده است (۷ و ۱۲).

قارچ *Botrytis cinerea* از غلاف بذر اسپرس اردبیل و زنجان جدا گردید و این قارچ قبلاً نیز از روی اسپرس در سایر نقاط دنیا (۷) و در ایران از روی برگچه‌های اسپرس جداسازی شده است (۴). حال مشخص گردید که می تواند از طریق بذر هم منتقل شود.

در روش شستشوی سطحی بذر، فقط دو قارچ پارازیت اجباری *Oidiopsis* از روی غلاف بذر اسپرس تمامی مناطق مورد مطالعه و *Uromyces* از روی غلاف بذر اسپرس اردبیل و تبریز جدا گردید.

سایر قارچهای جدا شده، دارای درصد آلودگی ناچیزی روی بذور اسپرس هستند و احتمال این که این قارچها نقش بسزائی در بروز بیماریهای قارچی بذر زاد اسپرس داشته باشند، ضعیف می‌باشد. معمولاً این قارچها به عنوان قارچهای ساپروفیت شناخته شده‌اند. در عین حال، کاهش قدرت جوانه زنی بذور اسپرس، ارتباط مستقیم با فراوانی کلنی های قارچهای بذر

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1376.1.2.1.5]

جدول ۱- درصد فراوانی گونه‌های مختلف جدا شده از غلاف بذر اسپرس با استفاده از کاغذ صافی مرطوب

گونه قارچی	تبریز		زنجان		فریدن		اردبیل	
	استریل	غیراستریل	استریل	غیراستریل	استریل	غیراستریل	استریل	غیراستریل
Alternaria sp.	۶	۲۴	–	۱۲	۸	۱۲	۱۸	۵۶
Aspergillus niger	۱۸	۱۴	۱۴	۱۴	۲	۱۲	۱۸	۲۲
Aspergillus sp.	۲۶	۲۶	۴۸	۶۲	۳۰	۹۵	۴۲	۸۶
Cladosporium herbarum	–	۱۰	۲	۳۴	۴	۲	۴	۱۸
Penicillium sp.	۸	۲۴	۲	۱۰	۱۸	۸	۸	۱۸
Rhizopus sp.	۴	۱۰	–	۸	۱۲	۷۲	–	۱۲

جدول ۲- درصد آلودگی غلاف بذر اسپرس، با استفاده از محیطهای غذائی آگاردار

گونه قارچی	تبریز	زنجان	فریدن	اردبیل
Alternaria sp.	۱۴	–	۱	۷
Aspergillus niger	۲	۲	–	۴
Aspergillus sp.	۱۸	۲۱	۱۳	۱۱
Botrytis cinerea	۱	۱	–	–
Cladosporium herbarum	–	۳	۲	۱
Fusarium sp.	–	۲	–	۱
Nigrospora oryzae	۱	–	–	–
Penicillium frequentans	–	۱	–	–
Penicillium sp.	۳	۴	۱	۲
Rhizopus sp.	۷	۱۵	۶۰	۲۰
Trichothecium sp.	–	–	–	۱
Ulocladium chartharum	–	۱	–	۲

اسپرس داشته، که رابطه فراوانی قارچهای جدا شده از بذور مورد بررسی، با درصد قوه نامیه و نیز درصد گیاهچه‌های سالم در جدول ۵ آورده شده است. هر چند که اختلاف فلور قارچی بذور مناطق مختلف، عمدتاً تحت شرایط آب و هوائی و ندرتاً تحت تاثیر عوامل دیگر مانند نوع رقم است، ولی اختلاف زیادی میان فلور قارچی بذور مناطق مختلف مورد بررسی مشاهده نگردید. نقش شرایط آب و هوائی در شیوع و فراوانی قارچهای موجود روی بذر، قابل توجه است.

به طور کلی کشت بذور اسپرس بدون غلاف و همین طور ضد عفونی سطحی پوسته بذر با استفاده از قارچکشهای مناسب، به‌منظور افزایش عملکرد وجلوگیری از زیانهای ناشی از انواع قارچهای بذر زاد و یا قارچهای همراه بذر توصیه می‌شود.

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1376.1.2.1.5]

جدول ۳- درصد آلودگی غلاف بذر اسپرس، با استفاده از محیطهای غذائی آگاردار

گونه قارچی	تبریز	زنجان	فریدن	اردبیل
Alternaria sp.	۱	–	۱	۶
Aspergillus niger	۱۷	۳۲	۱	۲
Aspergillus sp.	۷	۱۵	۶	۱۱
Cladosporium herbarum	–	۱	۱	۱
Mucor sp.	–	۱	–	–
Penicillium sp.	۷	۸	۱	۱۰
Rhizopus sp.	۷	۱۶	۴۲	۲۹
Stemphylium botryosum	–	–	–	۱
Ulocladium chartarum	–	–	۱	۱

جدول ۴- درصد فراوانی گونه‌های مختلف جدا شده از جنین و آندوسپرم بذر اسپرس

گونه قارچ	تبریز		زنجان		فریدن		اردبیل	
	جنین	آندوسپرم	جنین	آندوسپرم	جنین	آندوسپرم	جنین	آندوسپرم
Aspergillus sp.	–	–	–	۶	–	–	–	۶
Penicillium sp.	–	–	–	–	–	–	–	۲
Ulocladium botrytis	–	–	–	–	۲	–	–	–

جدول ۵- درصد قوه نامیه بذور اسپرس مناطق مختلف و ارتباط آن با درصد قارچهای جدا شده از بذر

نمونه‌های مورد استفاده	تبریز	زنجان	فریدن	اردبیل
قوه نامیه (٪)	۷۵	۶۵	۵۸	۷۰
کلنی قارچهای جدا شده	۱۰۸	۱۳۰	۲۸۷	۲۰۲
گیاهچه‌های سالم (٪)	۷۷	۶۹	۶۰	۸۷
Rhizopus	۱۰	۸	۷۲	۱۲
Penicillium	۲۴	۱۰	۸	۱۸
Aspergillus	۳۸	۶۵	۹۵	۸۶
Alternaria	۲۴	۱۰	۸	۵۶

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1376.1.2.1.5]

منابع مورد استفاده

۱- ارشاد، ج. ۱۳۷۴. قارچهای ایران. نشریه شماره ۱۰ سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، وزارت کشاورزی، ۸۷۴ صفحه.

۲- شریف نبی، ب و ض. بنی هاشمی ۱۳۶۹. مطالعه قارچ *Leveillula taurica* عامل سفیدک پودری اسپرس در استان اصفهان. مجله بیماریهای گیاهی، جلد ۲۶، ص ۱۹ تا ۲۸.

۳- شریف نبی، ب و ض. بنی هاشمی. ۱۳۷۴. زنگ اسپرس *(Uromyces onobrychidis)* در ایران. مجله بیماریهای گیاهی، جلد ۳۱، ص ۱۰۶ تا ۱۰۷.

۴- شریف نبی، ب و ا. نکوئی. ۱۳۷۵. بیماری لکه شکلاتی برگ اسپرس در ایران. مجله بیماریهای گیاهی. جلد ۳۲، ص ۴۳.

۵- شریف نبی، ب و ج. فاتحی. ۱۳۷۵. بیماری بلایت آسکوکیتائی اسپرس در ایران. مجله بیماریهای گیاهی، جلد ۳۲، ص ۴۳ تا ۴۴.

۶- گرامی، ب. ۱۳۶۳. اسپرس. نشریه دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، ۸۷ صفحه.

7- Czaplinska, S. 1966. Mycoflora of *Onobrychis viciaefolia* seeds. Biol. Abstr.

8- Ditterline, R.L. and C.S. Cooper. 1975. Fifteen Years with Sainfoin Mont. Agric. Exp. Sta. & Mont. State Univ. Bull. 614.

9- Kilch, M.A. and J.I. pitt. 1988. A Laboratory Guide to Common *Aspergillus* Species and Their Teleomorph. Commonwealth Scientific and Industrial Organization, Division of Food Processing, Australia, 116 pp.

10- Kvicala, B.A. 1964. New disease of sainfoin in Czechoslovokia. Biol. Abstr. 46:77451.

11- Mathre, D. 1968. Disease in sainfoin. p. 65-66 in C.S., Cooper and A. E. Carleton (eds.). Sainfoin Symposium, Montana State University.

12- Mishustin, E.N. and I.M. Karashchuk. 1955. The epiphytic microflora of the seeds of sainfoin and increasing the yield of the latter. Biol. Abstr. 32:38758.

13- Neergaard, p. 1971. Seed Pathology. The McMillan Press Ltd. 1197 pp.

14- Pitt, J.L. 1988. A Laboratory Guide to *Penicillium* Species. 2nd ed. CommonWealth Scientific and Industrial Organization. Division of Food Processing, Australia, 187 pp.

15- Vidal, G. 1965. Studies on the Rhizosphere mycoflora of three legumes. Herb. Abstr. 46:86037.

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1376.1.2.1.5]