بررسی نقش کلیستوتسیوم درزمستان گذرانی *Uncinula necator* (Schw.)Burr. عامل بیماری سفیدک سطحی انگور در استان خراسان

محمد حاجیان شهری[۱]، جواد زاد[۲]، عباس شریفی تهرانی[۲]، سید محمود اخوت[۲] و عباس صفرنژاد [۱]

چکیده

این پژوهش به منظور بررسی نقش کلیستوتسیوم‌ها درزمستان‌گذرانی و عامل مولد مایه تلقیح اولیه در ایجاد اپیدمی بیماری سفیدک سطحی انگور در استان خراسان انجام گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده زمستان گذرانی Uncinula necator (Schw.)Burr. به شکل میسلیوم در جوانه‌های درحال خواب انگور در طی یک بررسی دو ساله در استان خراسان دیده نشد. آسکوسپورهای U. necator توسط دستگاه اسپورگیر۵۵ روز بعد از بازشدن جوانه‌ها جمع آوری شد، نخستین کلنی‌های سفیدک سطحی انگور روی شاخه‌های جانبی به طول ۳۰-۷ سانتی‌متر ظاهر شدند. بیش از ۴۵-۳۵ درصد کلیستوتسیوم‌های تشکیل شده روی برگ‌ها، دمبرگ‌ها و شاخه‌ها درطی زمستان مردند. بیشترین میزان آسکوسپور در دورهٔ بازشدن جوانه‌ها و گل دهی، در زمانی که بارندگی بیش از یک میلی‌متر بود با دستگاه اسپورگیر به دام افتادند. آسکوسپورها به صورت دوره‌ای از مهرماه تا اردیبهشت ماه از کلیستوتسیوم‌های سطح برگ‌های نگه‌داری شده در باغ قادر به رهاسازی و از مهرماه تا دی ماه روی سطح لام‌های میکروسکوپی قادر به جوانه زنی بودند، ولی جوانه زنی آسکوسپورها به تدریج کاهش یافت و در طول دی ماه تا اوایل اسفندماه درحد صفر بود و از اوایل اسفند ماه به تدریج افزایش یافت و در طی ماه‌های فروردین و اردیبهشت به ۱۶درصد رسید. پتانسیل آب آسکوسپورها به طور دائم درطی این دوره کاهش یافت و وزن مورد نیاز برای شکستن آسکوکارپ‌ها در طی دورهٔ بلوغ آسکوسپورها از حدود ۵ گرم در پاییز به ۳ گرم در زمستان و ۲/۶ گرم در اوایل بهار رسید.

بیشترین میزان کاهش مقاومت دیوارهٔ آسکوکارپ‌ها در برابر شکستگی در زمستان اتفاق افتاد که به میزان ۱/۹ گرم بود. بیماری‌زایی آسکوسپورهای بالغ روی برگ‌های بریدهٔ سالم اثبات شد که نقش آنها را به عنوان مایه تلقیح اولیه نشان می‌دهد و مشخص می‌کند که کلیستوتسیوم‌ها شکل اصلی زمستان‌گذرانی U. necator در تاکستان‌های استان خراسان می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: *کلیستوتسیوم، آسکوسپور، زمستان گذرانی، سفیدک سطحی، انگور*

۱. استادیاران پژوهش مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان، مشهد

۲. استادان گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-09-18]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1384.9.1.18.6]

مقدمه

سفیدک سطحی انگور، که توسط *U. necator* ایجاد می‌شود از لحاظ اقتصادی مهم‌ترین بیماری درختان انگور در تمام دنیا می‌باشد (۲۷ و ۲۸). وجود کلیستوتسیوم‌های *U. necator* برای نخستین بار در ایران از استان فارس گزارش شده است درحالی که در اغلب نقاط انگورکاری ایران دیده شده بودند (۱). کلیستوتسیوم‌هایی که توسط این گونه تشکیل می‌شوند به عنوان مهم‌ترین منبع مایه تلقیح اولیه بیماری در ایتالیا، امریکا، آلمان و استرالیا گزارش شده است(۸، ۲۲، ۲۵ و ۳۲). چگونگی تشکیل کلیستوتسیوم‌ها و رهاسازی آسکوسپورها از برگ‌های جمع‌آوری شده از باغات انگور در آزمایشگاه توسط محققین مختلفی بررسی شده است (۱۱، ۱۳، ۱۵ ،۱۸ و۲۲). نتایج تحقیقات در کالیفرنیا (۳۰)، اروپای غربی (۶ و۲۶) و افریقای جنوبی (۳۳) اثبات کرده است که *U. necator* به شکل میسلیوم در جوانه‌های آلوده و درحال خواب انگور زمستان گذرانی می‌کند و زمستان گذرانی این گونه به شکل هیف در جوانه‌های در حال خواب انگور به عنوان شکل اصلی زمستان گذرانی این قارچ در اغلب نواحی انگورکاری دنیا پذیرفته شده بود، علی‌رغم این‌که وجود کلیستوتسیوم‌های آن روی شاخه و برگ‌های انگور در آلمان(۳۴ و ۳۶)، فرانسه (۳۸)، رومانی (۳)، کالیفرنیا (۵)، امریکا(۱۵) و استرالیا (۳۵) گزارش شده بود. ردیک و گلادوین (۲۹) معتقد بودند که روش زمستان گذرانی *U. necator* دقیقاً معلوم نیست ولی در عین حال آنها اعتقاد داشتند که این قارچ به شکل آسکوسپور در کلیستوتسیوم زمستان گذرانی می‌کند. جوانه زنی آسکوسپورهای بالغ این قارچ در اوایل سال ۱۸۹۵ (۱۶) دیده شده بود اما تلقیح مکرر انگور با آسکوسپور توسط گالوی در ۱۸۹۵ (۱۶) یوسفوویچ در ۱۹۲۳ (۳۸) و آئورل در ۱۹۷۴ (۳) نقش آسکوسپورها را در تولید بیماری رد کرد. ازآنجایی که قبلاً زمستان گذرانی *U . necator* درجوانه‌های درحال خواب انگور اثبات شده بود محققین زیادی معتقد بودند که نقش آسکوکارپ‌های این قارچ در زمستان گذرانی آن کم، یا ضروری نیست و نقش مهمی در سیکل بیماری سفیدک سطحی انگور ندارند (۷، ۱۲، ۳۱ و۳۷). در استان خراسان منبع مایه تلقیح اولیه برای شروع اپیدمی‌های سفیدک سطحی انگور مشخص نیست ولی در آخر فصل تعداد زیادی کلیستوتسیوم‌های این قارچ روی شاخه و برگ‌ها تشکیل می‌شوند، بنابراین این پژوهش به منظور بررسی نقش کلیستوتسیوم‌ها به عنوان شکل زمستانگذران و تولید کننده مایه تلقیح اولیه در ایجاد اپیدمی بیماری سفیدک سطحی انگور در استان خراسان انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

۱. بررسی موستان‌ها

تاکستان‌های شهرستان‌های مهم انگورخیز استان شامل قوچان، شیروان، فاروج، بجنورد، مشهد، کاشمر و شهرستان‌های جنوبی استان شامل گناباد، قاین و بیرجند که زمستان ملایم‌تری نسبت به شهرستان‌های شمالی استان دارند و بقای قارچ در جوانه‌های آلوده انگور محتمل بود برای مشاهده علائم Flag Shoot یا شواهد دیگری مبنی بر آلودگی انگور به *U. necator* از ابتدای فروردین ماه تا اواخرخردادماه که شاخه‌های جوان انگور تازه تشکیل می‌شوند در سال‌های ۱۳۸۱ و ۱۳۸۲ مورد بررسی قرار گرفتند. ارقام عمده انگور کاشته شده در این باغ‌ها ارقام عسگری، پیکامی، فخری، کشمشی و گونه *Vitis vinifera* L. هستند.

۲. بررسی تغییرات فصلی رهاسازی آسکوسپورها

درطی مهرماه ۱۳۸۱ برگ‌های انگور آلوده رقم عسکری دارای کلیستوتسیوم از تاکستانی متعلق به ایستگاه تحقیقات کشاورزی گلمکان واقع در کیلومتر ۴۵ جاده مشهد- قوچان جمع‌آوری شدند. این برگ‌ها به قطعات ۵ سانتی‌متر مربع بریده شده و در کیسه‌های ململ در یک باغ انگور در مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی (مشهد) آویزان شدند. هر ۱۴ روز یک بار از مهرماه ۱۳۸۱ تا نیمه خردادماه ۱۳۸۲ میزان رهاسازی آسکوسپورها از این کلیستوتسیوم‌ها براساس روش پیرسون و

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-09-18]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1384.9.1.18.6]

گادوری (۲۵) اندازه‌گیری شد. برای جمع‌آوری کلیستوتسیوم‌های قارچ عامل بیماری هر بار ده قطعه برگی در یک شیشه ارلن ۱۰۰ سانتی‌متر مکعبی محتوی آب مقطر تکان داده شدند تا کلیستوتسیوم‌ها در آب آزاد شوند. سپس آب داخل شیشه‌ها از الک با قطر منافذ دو میلی‌متری و سپس از الک با قطر منافذ ۸۵ میکرومتر برای جمع‌آوری کلیستوتسیوم‌ها عبور داده شد، آسکوکارپ‌ها از سطح الک‌ها جمع‌آوری و روی سطح دیسک‌های کاغذی با قطر ۲/۵ سانتی‌متر به تعداد ۳۰ عدد آسکوکارپ توزیع شدند. در داخل درپوش هر تشتک پتری یک دیسک کاغذی تعبیه شد و در داخل پایه هرتشتک پتری نیز دو برگ کاغذ صافی سترون قرارداده شد که با ۵ میلی‌لیتر آب مقطر برای ایجاد رطوبت اشباع خیس شده بود و بر روی کاغذ صافی داخل هرتشتک پتری سه عدد خلال چوب کبریت سترون گذاشته شد و یک لام میکروسکوپی روی این خلال‌های چوب کبریت قرار داده شد تا آسکوسپورهای رهاسازی شده در سطح آنها جمع‌آوری شوند، سپس پایه و درپوش تشتک پتری‌ها بر روی هم قرارداده شدند و اطراف هر تشتک پتری با کمک پارافیلم مسدود گردید و میزان رهاسازی آسکوسپورها پس از ۲۴ ساعت در ۲۵ درجه سانتی‌گراد، بعد از رنگ آمیزی سطح لام‌ها با محلول لاکتوفنل- کاتن بلو اندازه‌گیری شد.

۳. بررسی تغییرات فصلی جوانه‌زنی آسکوسپورها

در فواصل زمانی دوهفته یک بار بر اساس روش گادوری و پیرسون (۱۳) از مهرماه ۱۳۸۱ تا اواسط خرداد۱۳۸۲، ۳۰ عدد کلیستوتسیوم روی دیسک های کاغذی با قطر۲ سانتی‌متر گذاشته شدند و سپس با آب مقطر خیس شدند. کلیستوتسیوم‌های مورد نیاز همانند روش پیرسون و گادوری(۲۵) تهیه شدند. برای تسهیل در رهاسازی آسکوسپورها دیواره آسکوکارپ‌ها با کمک یک اسکالپل تیز به آرامی شکسته شدند و این دیسک‌ها در درپوش ۵ عدد تشتک پتری به عنوان تکرار تعبیه شدند و همانند روش قبل یک لام میکروسکوپی در پایه تشتک پتری قرارداده شد. تشتک پتری‌ها در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند و پس از ۲۴ ساعت میزان جوانه زنی آسکوسپورها درسطح لام‌های میکروسکوپی پس از رنگ آمیزی با محلول لاکتوفنل- کاتن بلو اندازه‌گیری شدند.

۴. اندازه‌گیری مقاومت دیواره کلیستوتسیوم در برابر شکستگی

از مهرماه ۱۳۸۱ تا ابتدای اردیبهشت ماه ۱۳۸۲ هرماه یک بار میزان مقاومت دیواره آسکوکارپ‌ها دربرابر شکستگی براساس روش گادوری و پیرسون (۱۴) انجام گرفت. براساس این روش مقاومت دیواره ۳۰ عدد کلیستوتسیوم در برابر شکستگی به تفکیک اندازه‌گیری شد. نخست یک عدد کلیستوتسیوم در یک قطره آب مقطر حاوی ۰/۰۵ درصد توئین ۲۰ در سطح یک لام میکروسکوپی گذاشته شد و یک لامل روی آن قرار داده شد. این لام روی یک ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱گرم که در زیر یک بینوکولر قرارداشت گذاشته شد و یک مفتول سیمی در بدنه بینوکولر که می‌توانست با حرکت پیچ تنظیم وضوح آن بالا و پایین رفته و روی لامل فشار بیاورد تا در اثر این وزن دیواره آسکوکارپ شکسته شود نصب و میزان این فشار توسط ترازو برای هر ۳۰ کلیستوتسیوم در هربار اندازه‌گیری ثبت شد. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با یک تیمار (تاریخ اندازه‌گیری) و ۳۰ تکرار(کلیستوتسیوم) انجام شد.

۵. اندازه‌گیری پتانسیل آب سیتوپلاسم آسکوسپورها

اندازه‌گیری تورم سلولی آسکوسپورها در محلول‌های نمکی براساس روش بیدول (۴) انجام شد. براساس این روش تغییرات ابعاد آسکوسپورها برای یک آسکوسپور از هر آسکوکارپ و به تعداد ۳۰ آسکوکارپ اندازه‌گیری شد. نخست نقطه شروع پلاسمولیز آسکوسپورها در آب مقطر و سری محلول های ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ و یک مولار کلرید سدیم درزمان جمع‌آوری کلیستوتسیوم‌ها اندازه‌گیری و در فواصل زمانی هرماه یک بار نیز تغییرات ابعاد سلولی آسکوسپورها با اندازه‌گیری ابعاد ۳۰ آسکوسپور در محلول کلرید سدیم صفر،

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-09-18]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1384.9.1.18.6]

۰/۵ و یک مولار با اندازه‌گیری طول و عرض هر آسکوسپور با استفاده از میکروسکوپ نوری در بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰ برابر محاسبه شد.

۶. اندازه‌گیری میزان رهاسازی آسکوسپورها در موستان‌ها با استفاده از دستگاه اسپورگیر

درسال ۱۳۸۱ از نیمه اسفند ماه تا اواسط خردادماه ۱۳۸۲یک دستگاه اسپورگیر در موستان ایستگاه تحقیقات گلمکان واقع در کیلومتر ۴۵ جاده مشهد- قوچان دربین ردیف‌های درختان انگور رقم عسکری که به صورت پا چراغی کاشته شده بودند نصب گردید به طوری‌که شکاف روزنه آن در ارتفاع ۶۰ سانتی‌متری از سطح زمین قرارداشت. دستگاه طوری تنظیم گردید که ده لیتر هوا در هردقیقه وارد دستگاه می‌شد. هر هفته، یک نوار که سطح آن با وازلین همراه با پارافین (۱۰٪ حجمی) آغشته شده بود روی ساعت دستگاه تعبیه می‌گردید. نوار فوق هر هفته تعویض و به فواصل روزانه بریده شده و روی لام میکروسکوپی قرار داده می‌شد و با محلول کاتن بلو- لاکتوفنل رنگ‌آمیزی و تعداد آسکوسپورهای آزاد شده درطی روز در بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر شمارش می‌شد.

۷. اندازه‌گیری قابلیت بقای کلیستوتسیوم در طول فصل

آسکوکارپ‌های موجود در سطح برگ‌ها، شاخه‌های آلوده و سطح خاک از مهرماه ۱۳۸۱ تا فروردین ماه ۱۳۸۲ با استفاده از روش کورتسی و همکاران (۸) هرماه یک بار جمع آوری شدند. هربار ۵۰ عدد آسکوکارپ به صورت منفرد روی لام میکروسکوپ منتقل شده و قابلیت زنده ماندن آنها در محلول ۰/۰۱ درصد فلوئورسین دی استات در آب بعد از ۵ دقیقه تحت میکروسکوپ فلوئورسانس بر اساس روش گی و همکاران (۱۷) بررسی شد. آسکوکارپ‌هایی زنده محسوب می‌شدند که ۵۰٪ آسکوسپورهای آن رنگ سبز روشن فلوئورسانس را نشان دهند.

۸. بررسی بیماری زایی آسکوسپورها

برای اثبات بیماری‌زایی آسکوسپورهای قارچ عامل بیماری نخست برگ‌های انگور رقم عسکری که به ابعاد تشتک پتری با قطر ۹ سانتی‌متر بودند انتخاب و به مدت ۵ دقیقه با محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد ضدعفونی شدند. برگ‌های فوق از محل دم‌برگ در داخل یک تشتک پتری محتوی ۲۵ میلی‌لیتر محیط آب - آگار ۱/۵درصد همراه با۱۰۰ قسمت در میلیون بنزیمیدازول، که قبلاً درسطح آن چهار خلال چوب کبریت استریل به منظور ایجاد فاصله بین برگ و سطح محیط کشت تعبیه شده بود فروبرده شد. در درب هر تشتک پتری نیز دو برگ کاغذ صافی استریل تعبیه و با ۲ سانتی‌مترمکعب آب مقطر استریل خیس شد سپس چهار دیسک کاغذی که روی هر یک ۲۰ عدد کلیستوتسیوم قارچ عامل بیماری قرارداده شده بود روی کاغذ صافی موجوددر درب تشتک پتری‌ها گذاشته شد و پایه تشتک پتری به صورت وارونه روی درب آن گذاشته شد و اطراف لبه تشتک پتری با پارافیلم به منظورحفظ رطوبت مسدود شد. این آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با دو تیمار، شاهد (دیسک‌های کاغذی بدون کلیستوتسیوم) و تیمار بیماری زایی (دیسک‌های کاغذی با کلیستوتسیوم) هر یک با ۵ تکرار (تشتک‌های پتری) انجام گرفت(۱۱).

نتایج

علائم مربوط به حضور سفیدک سطحی در سرشاخه‌ها و جوانه‌های برگی انگور که در اول فصل بازشده بودند در موستان‌های شهرستان‌های تحت بررسی در استان خراسان دیده نشد. علائم این بیماری، در هنگام ظهور به صورت کلنی‌های مجزا روی سطح رویی برگ‌ها و اغلب در حاشیه برگ‌های شاخه‌های جانبی جوان که حدود ۳۰-۷ سانتی‌متر طول داشتند، در اواخر اردیبهشت ماه دیده شد. میزان رهاسازی آسکوسپورها در رطوبت اشباع و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در مهرماه ۱۳۸۱ حدود ۶ عدد در سانتی‌متر مربع لام میکروسکوپ اندازه‌گیری شد که به تدریج در طی ماه‌های آبان و آذر افزایش

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-09-18]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1384.9.1.18.6]

یافت و در اواخر دی ماه ۱۳۸۱ به ۸ عدد در سانتی‌متر مربع لام میکروسکوپ رسید، ولی در ماه‌های بهمن و اسفند ماه ۱۳۸۱ به تدریج کاهش یافت و به حدود ۲ عدد در سانتی‌متر مربع لام میکروسکوپ دراواخر اسفند ماه رسید و از اوایل فروردین ماه ۱۳۸۲ به تدریج افزایش یافت و در اواسط اردیبهشت ماه حدود ۷ عدد در سانتی‌متر مربع لام میکروسکوپی اندازه‌گیری شد(شکل۱).

میزان جوانه‌زنی آسکوسپورها در رطوبت اشباع و در دمای ۲۲درجه سانتی‌گراد بعد از ۲۴ساعت، در مهرماه ۱۳۸۱ حدود ۴۵ درصد اندازه‌گیری شد. این میزان به تدریج در طی ماه‌های آبان و آذر کاهش یافت و در دی ماه ۱۳۸۱ به صفر رسید و این روند تا اواسط اسفندماه ۱۳۸۱ ادامه یافت و از این زمان به بعد و در فروردین ماه۱۳۸۲ به تدریج افزایش یافت و در خاتمه آزمایش به حدود ۱۶درصد رسید(شکل۲).

نتایج به دست آمده از بررسی تغییرات میزان مقاومت دیواره کلیستوتسیوم‌ها در برابر شکستگی نشان داد که مقاومت دیواره آسکوکارپ با گذشت زمان به تدریج کاهش می‌یابد (جدول ۱ و شکل۳). بیشترین میزان کاهش مقاومت دیواره آسکوکارپ‌ها در برابر شکستگی در اوایل بهمن ماه اندازه‌گیری شد و در فاصله بین بهمن تا فروردین ماه تغییر کمی در مقاومت دیواره آسکوکارپ‌ها اندازه‌گیری شد(شکل۳).

در همین ارتباط نتایج به دست آمده نشان داد که پتانسیل آب سیتوپلاسم آسکوسپورها نیز با گذشت زمان کاهش می‌یابد. آسکوسپورهای مربوط به کلیستوتسیوم‌هایی که دو هفته از تشکیل آنها می‌گذشت در محلول ۰/۲ مولار کلرید سدیم پلاسمولیز شدند (شکل۴) و آسکوسپورهای مربوط به کلیستوتسیوم‌هایی که ۶ ماه از تشکیل آنها می‌گذشت در محلول یک مولار کلرید سدیم پلاسمولیز شدند. حداقل غلظت محلول کلرید سدیم که باعث پلاسمولیز۵۰ درصد آسکوسپورها شد در آبان ماه ۰/۲، آذرماه ۰/۴، در بهمن ماه ۰/۶ و در فروردین ماه یک مولار بود.

برای اندازه‌گیری تغییرات حجم آسکوسپورها، این اسپورها به شکل یک استوانه در نظر گرفته شدند و حجم آنها بر این اساس اندازه‌گیری شد که به طور معنی‌داری($P<۰/۰۱$) براثر غلظت ماده نگه‌دارنده آسکوسپور در روی لام میکروسکوپ تحت تأثیر قرار می‌گرفت. این اثر با گذشت زمان از مهرماه تا آذرماه بیشتر بود ولی پس از آن اختلاف کمی($P <۰/۰۵$) در تغییر حجم آسکوسپور در آب مقطر و محلول۰/۵ و یک مولار کلرید سدیم اندازه‌گیری شد (شکل۵). حجم آسکوسپورها در محلول یک مولار کلرید سدیم به طور معنی‌داری بین دی ماه و بهمن ماه کاهش یافت وکاهش معنی‌داری($P<۰/۰۵$) در حجم آسکوسپور در آب مقطر از مهر ماه تا اواخر دی ماه دیده شد(شکل۵).

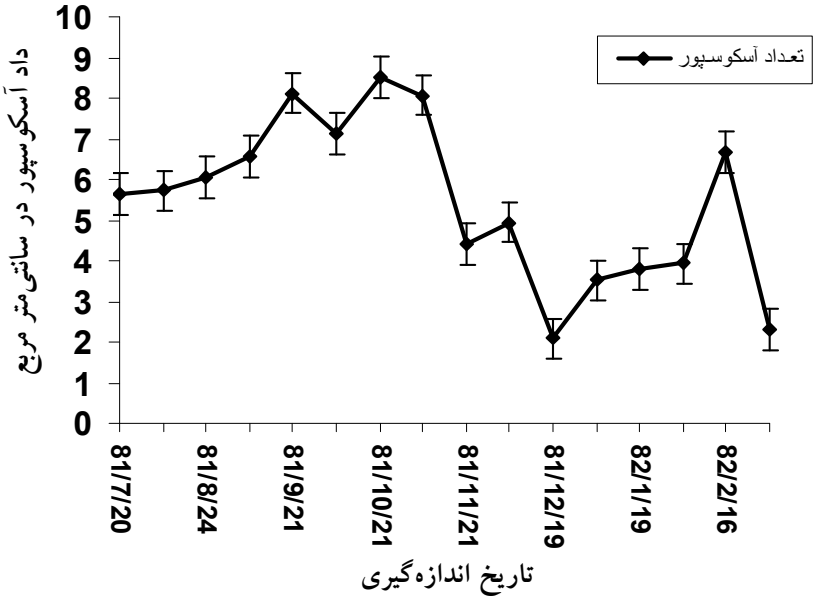
بر اساس نتایج به دست آمده از اندازه‌گیری تراکم آسکوسپورها در فضای باغ با استفاده ازدستگاه اسپورگیر اولین آسکوسپورها در تاریخ ۸۱/۱۲/۱۷ شکار شدند و از این تاریخ به بعد این عمل به طور مستمر ادامه داشت. تراکم آسکوسپورهای هوازاد *U . necator* به دام افتاده در طی هفت بارندگی عمده در سال ۱۳۸۲ از فروردین ماه تا خرداد ماه که منجر به افزایش معنی‌داری ($P <۰/۰۵$) در تعداد آسکوسپورهای رها شده گردید در شکل ۶ نشان داده شده است. حداقل میزان بارندگی که موجب رهاسازی و به دام افتادن آسکوسپورها گردید یک میلی‌متردر ۱۷ اسفند ۱۳۸۱ بود اما تعداد آسکوسپورهای به دام افتاده هر وقت که میزان بارندگی از یک میلی‌متر بیشتر بود به طورمعنی‌داری افزایش می‌یافت(شکل۶).

اکثر دوره‌های رهاسازی آسکوسپورها با جمعیت بالا، در دوره فنولوژی بین بازشدن جوانه‌های برگی و گل‌دهی انگور انجام گرفت. زنده ماندن کلیستوتسیوم‌ها روی برگ‌های افتاده در موستان گلمکان از آبان ماه ۱۳۸۱ لغایت فروردین ماه ۱۳۸۲ اندازه‌گیری شد. میزان زنده ماندن کلیستوتسیوم‌ها در شروع آزمایش ابتدای آبان ماه ۱۳۸۱، ۷۷/۵ درصد و در انتهای آزمایش در نیمه فروردین ماه ۱۳۸۲ حدود ۳۷ درصد اندازه‌گیری شد(شکل۷).

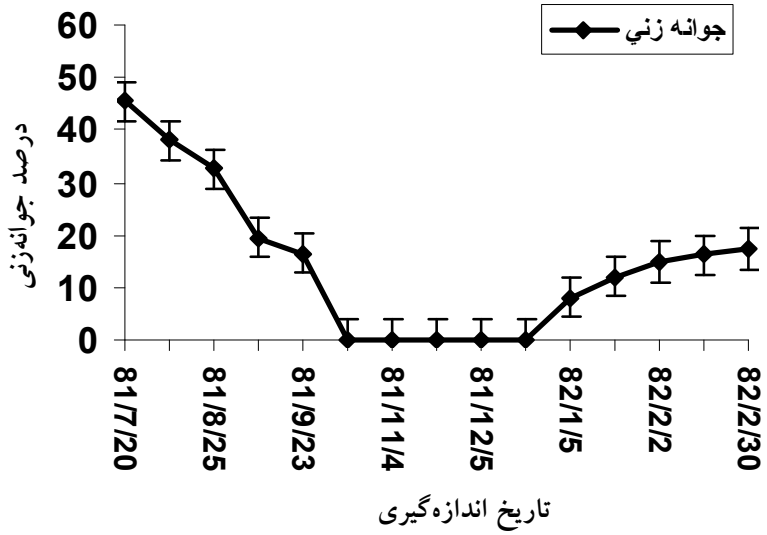
نتایج آزمون بیماری‌زایی آسکوسپورها نشان داد، ده روز بعد از نگه‌داری برگ‌های بریده در شرایط اشاره شده در قسمت

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-09-18]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1384.9.1.18.6]



شکل۱. تغییرات میزان رها سازی آسکوسپورهای *U. necator* از مهرماه ۱۳۸۱تا اردیبهشت ماه۱۳۸۲



شکل۲. تغییرات جوانه زنی آسکوسپورهای *U. necator* از مهرماه ۱۳۸۱تا اردیبهشت ماه۱۳۸۲

مواد و روش‌ها، عامل بیماری در روی سه برگ بریده، به ترتیب ۳، ۷ و۲ کلنی تشکیل داد که بیماری زایی آسکوسپورها و نقش آنها را در اپیدمیولوژی*U. necator* تأیید می‌کند.

بحث

در این پژوهش مشخص شد که کلیستوتسیوم‌های *U . necator* در استان خراسان در زمستان زنده می‌مانند و آسکوسپورهای آنها طی ماه‌های اسفند تا خرداد آزاد شده و می‌توانند درختان انگور را آلوده کنند و به عنوان مایه تلقیح اولیه عمل کنند. اگرچه زمستان گذرانی این قارچ به شکل میسیلیوم در جوانه‌های آلوده و در حال خواب انگور در نواحی مختلف دنیا اثبات شده است(۶، ۲۶، ۳۰ و ۳۱) ولی در زمینه این شکل

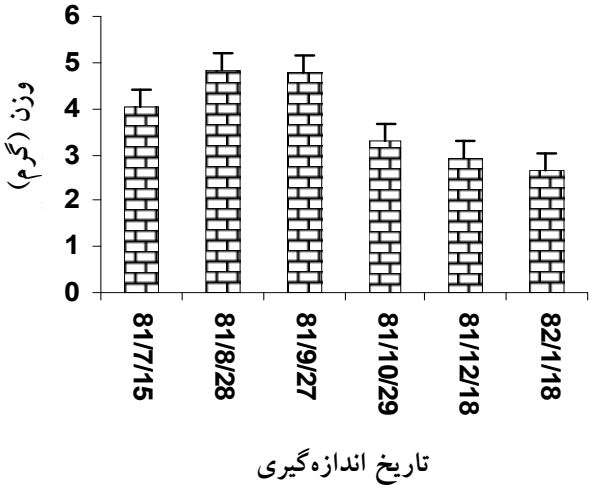
[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-09-18]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1384.9.1.18.6]

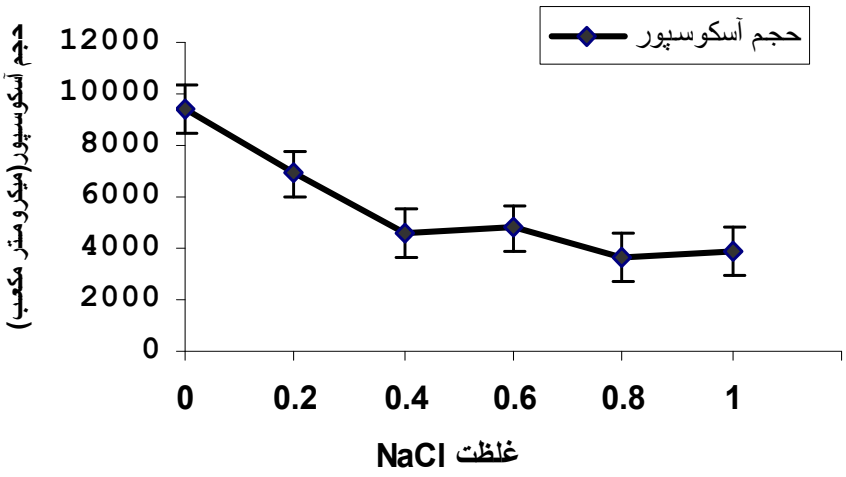
جدول ۱. وزن لازم برای شکستن دیوارهٔ کلیستوتسیوم‌های *U. necator*

وزن (گرم)	تاریخ
۴/۰۳۲	۸۱/۷/۱۵
۴/۸۲۷	۸۱/۸/۲۸
۴/۷۹۱	۸۱/۹/۲۷
۳/۲۸۹*	۸۱/۱۰/۲۹
۲/۹۱*	۸۱/۱۲/۱۸
۲/۶۶۲	۸۲/۱/۱۸

*: کاهش معنی‌دار در وزن مورد نیاز برای شکستن دیواره آسکوکارپ را نسبت به تاریخ جمع آوری قبلی نشان می دهد (P <۰/۰۵).



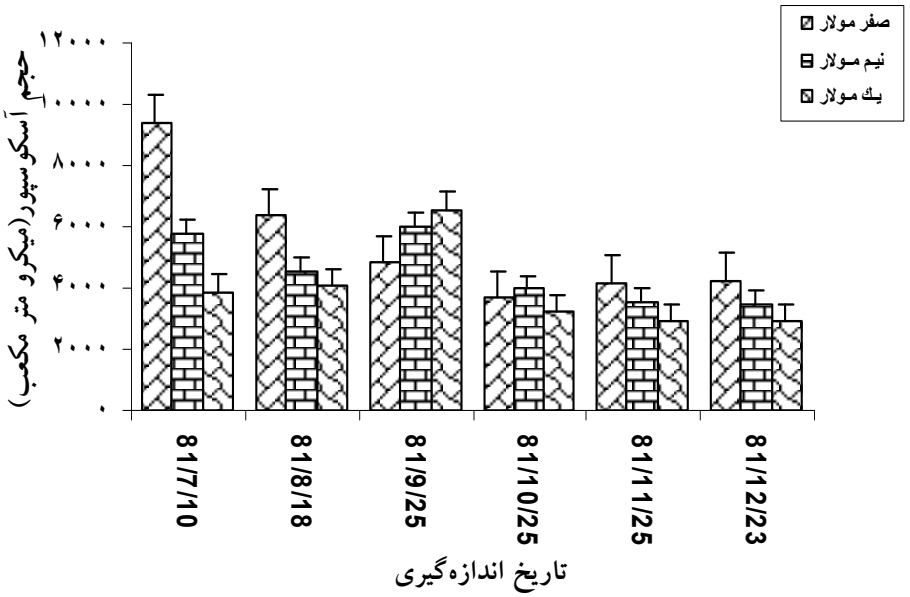
شکل۳. تغییرات میزان مقاومت دیواره کلیستوتسیوم‌های*U. necator* در برابر شکستگی از مهرماه ۱۳۸۱ تا فروردین ماه ۱۳۸۲



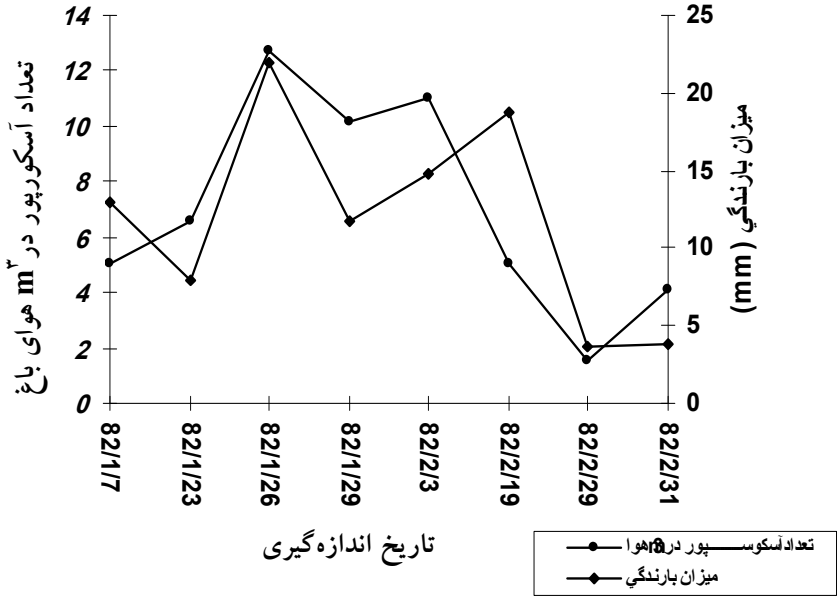
شکل۴. تغییرات حجم آسکوسپورهای *U. necator* در محلول‌های کلرید سدیم دو هفته پس از تشکیل

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-09-18]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1384.9.1.18.6]



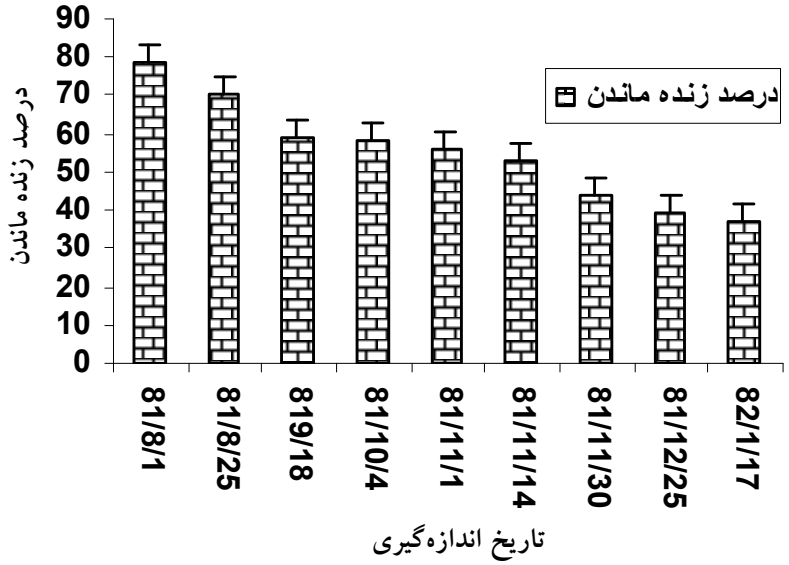
شکل۵. تغییرات حجم آسکوسپورهای *U. necator* در محلول‌های کلرید سدیم در طی زمستان گذرانی سال۱۳۸۲ -۱۳۸۱



شکل۶. تغییرات تعداد آسکوسپورهای *U. necator* شکار شده با دستگاه اسپورگیر وبارندگی از فروردین ماه ۱۳۸۲ تا خرداد ماه ۱۳۸۲

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-09-18]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1384.9.1.18.6]



شکل۷. تغییرات زنده ماندن کلیستوتسیوم‌های *U. necator* ازمهرماه ۱۳۸۱تا فروردین ماه ۱۳۸۲

زمستان گذرانی قارچ مزبور در ایران بررسی صورت نگرفته است. علائم این بیماری به شکل آلودگی‌های سر شاخه‌های جوان بعد از تشکیل (Flag Shoot) در بررسی موستان‌های سطح استان دیده نشد و هیچ کنیدی قارچ عامل بیماری تا قبل از مرحله گل‌دهی در هوای باغ شکار نشد و اولین کنیدی‌ها در تاریخ ۱۳۸۲/۳/۲ شکار شدند. تغییر شکل و زوال کلیستوتسیوم‌های روی برگ‌ها، خوشه‌ها و ساقه‌ها ممکن است دلیلی برای عدم اثبات نقش آنها در بیماری زایی روی درختان انگور باشد(۳، ۱۶ و۳۸) مگر این‌که در هنگام آزمون بیماری‌زایی از تعداد زیادی کلیستوتسیوم استفاده شود. سایر محققین نشان داده‌اند که کلیستوتسیوم‌ها به سادگی از روی بافت‌های انگور براثر بارندگی حذف می‌شوند (۲ و۳۸) و امکان دارد که آسکوکارپ‌های بالغ بیشتر در اثر بارندگی از روی برگ‌ها و ساقه‌ها جدا و در محیط پخش شوند (۱۵). پراکنده شدن آسکوکارپ‌های*U. necator* در اثر باران برای نخستین بار توسط یوسفوویچ (۳۸) گزارش شد و بعداً برای آسکوکارپ‌های *Pleochaeta polychaeta* نیز گزارش شد (۲۰) رابطه بین پراکنده شدن آسکوکارپ‌های *U. necator* و بقای آنها توسط گادوری و پیرسون(۱۵) بررسی شده است. اکثریت آسکوکارپ‌هایی که در روی برگ‌ها باقی می‌مانند از نظر فیزیولوژیکی ظاهراً بالغ نیستند و قادر به بقا در زمستان نمی‌باشند. اما تعداد کمی از آسکوکارپ‌ها می‌توانند روی برگ‌هایی که در زمستان در باغ باقی مانده‌اند زنده بمانند. در این تحقیق به طور موفقیت آمیزی بیماری‌زایی آسکوسپورهای *U. necator* روی برگ‌های بریده انگور که با کلیستوتسیوم‌های داخل کیسه‌های ململ و نگه‌داری شده در باغ تلقیح شده بودند اثبات شد. دیهل وهینتز(۱۰) و جیلوکس همکاران (۱۸) نیز نتایج مشابهی با تلقیح برگ‌های انگور با استفاده از دیسک‌های برگ انگور که حامل کلیستوتسیوم‌های *U. necator* بودند و در آزمایشگاه نگه‌داری می‌شدند به دست آوردند.

در تحقیقات قبلی نیز از کلیستوتسیوم‌های موجود در سطح برگ‌های آلوده که در باغ زمستان را سپری کرده بودند برای اثبات بیماری زایی آنها استفاده شده است (۳، ۱۶، ۲۵ و۳۸) ولی عدم موفقیت برخی از این تحقیقات در ایجاد بیماری توسط آسکوسپورها (۳، ۱۶ و ۳۸) احتمالاً به علت فساد تدریجی آسکوکارپ‌های موجود در سطح برگ‌ها در طی

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-09-18]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1384.9.1.18.6]

زمستان بوده است (۳۷). نقش مبهم کلیستوتسیوم‌ها دراپیدمیولوژی سفیدک سطحی انگور (۸، ۱۲، ۳۰ و ۳۱) ممکن است مربوط به پراکنده شدن آسکوکارپ‌ها توسط باران در مدت زمانی باشد که برای تکامل و بلوغ نیاز دارند و یا تأخیر در بلوغ مرفولوژیکی و عدم بلوغ فیزیولوژیکی آنها باشد. وقتی که برگ‌های حامل آسکوکارپ‌های بالغ در زیر خاک مدفون شدند تمامی آسکوکارپ‌ها قدرت زنده ماندن خود را از دست دادند (۱۵) در این بررسی نیز هیچ آسکوکارپ زنده‌ای در بهار از خاک به دست نیامد. گادوری و پیرسون (۱۵) گزارش کرده‌اند که بقای آسکوکارپ‌ها روی پوست شاخه‌ها بیشتر از بقای آنها روی برگ‌ها، میوه، ساقه یا خاک می‌باشد. جیلوکس و همکاران(۱۸) در یک بررسی ۵ ساله گزارش کرده‌اند که رهاسازی آسکوسپورها در باغ همیشه بعد از بازشدن جوانه‌های برگی شروع می‌شود و تا زمان گل‌دهی درختان انگور ادامه پیدا می‌کند، نتایج این تحقیق نیز مؤید همین نکته می‌باشد. هم‌آهنگی دوره‌ای رهاسازی آسکوسپورها با شیوع سفیدک سطحی انگور در تاکستان‌ها در امریکا (۲۵) استرالیا (۲۳) ایتالیا (۸) گزارش شده است. در این بررسی رهاسازی آسکوسپورها با دوره‌های بارندگی همراه بود که میزان بارندگی تجمعی بین ۲ تا ۲۳ میلی‌متر متغیر بود. بنابراین به نظر می‌رسد بارندگی یک عامل ضروری برای رهاسازی آسکوسپورها می‌باشد. گادوری و پیرسون (۱۴) گزارش کردند که رها سازی آسکوسپورها بلافاصله یا حداقل بعداز ۲/۵ میلی متر بارندگی در نیویورک اتفاق می‌افتد. جیلوکس و همکاران (۱۸) درتحقیقات خود هیچ ارتباطی بین میزان بارندگی و تعداد آسکوسپورهای به دام افتاده پیدا نکردند ولی به نظرمی‌رسد که بارندگی نقش اساسی در مرطوب شدن آسکوکارپ‌ها دارد که برای پاره شدن دیواره آسکوکارپ‌ها و رهاسازی آسکوسپورها ضروری می‌باشد(۱۹). تغییر در میزان جوانه‌زنی آسکوسپورها در طول فصل به نظر می‌رسد با بلوغ آسکوسپورها درطی زمستان گذرانی، کاهش پتانسیل آب سیتوپلاسم آسکوسپورها و تغییر در مقاومت دیواره آسکوسپورها در برابر شکستگی مرتبط باشد. آسکوسپورهای رهاسازی شده از کلیستوتسیوم‌ها در اوایل پاییز قادر به جوانه زنی در رطوبت اشباع بودند با کاهش پتانسیل آب سیتوپلاسم آسکوسپورها در طی زمستان گذرانی به تدریج جوانه‌زنی آسکوسپورها درطی ماه‌های زمستان کاهش یافت و هم زمان با افزایش درجه حرارت و جذب رطوبت توسط آسکوسپورها مجدداً جوانه‌زنی آسکوسپورها طی ماه‌های فروردین و اردیبهشت افزایش یافت.

در بررسی انجام شده متوسط طیف درجه حرارت روزانه درطی دوره رهاسازی آسکوسپورها بین ۶/۵ تا ۲۴درجه سانتی‌گراد بود که درطیف درجه حرارت مناسب برای رهاسازی آسکوسپورهای *U. necator* قرار می‌گیرد(۱۸ و۱۹). درجه حرارت بهینه برای رهاسازی آسکوسپورها ۲۵ درجه سانتی‌گراد (۱۵ و۲۳) و طیف ۲۵- ۱۵ درجه سانتی‌گراد (۱۸) گزارش شده است. در درجه حرارت‌های کمتراز ۸ درجه سانتی‌گراد رهاسازی آسکوسپورها کاهش می‌یابد (۱۳ و۱۸). همین درجه حرارت‌های آستانه‌ای برای رهاسازی آسکوسپورها در مورد *Sphaerotheca humuli* ،*Erysiphe cichoracearum* و *E. graminis f.sp.hordei* (۹، ۲۱ و۲۴) گزارش شده است. رهاسازی آسکوسپورها از آسکوکارپ‌های *U. necator* تحت تأثیر دو فاکتور کاهش مقاومت دیواره آسکوکارپ‌ها درطی زمستان در برابر پاره شدن و افزایش هم‌زمان پتانسیل آب احتمالاً به علت افزایش پتانسیل آب در آسکوکارپ‌های کامل بعد از مرطوب شدن می‌باشد. در این پژوهش مقاومت دیواره آسکوکارپ‌ها از مهر تا بهمن ماه کاهش پیدا کرد که با نتایج به دست آمده توسط گادوری و پیرسون (۱۴) مطابقت دارد حجم آسکوسپورها درمحلول نیم مولار کلرید سدیم بین دی ماه تا اسفندماه کاهش می‌یابد (شکل۵) که نشان دهنده افزایش پتانسیل آب سیتوپلاسم آسکوسپورها در این دوره می‌باشد. کاهش در حجم آسکوسپورها در محلول نیم مولار کلرید سدیم بین دی ماه و اسفند ماه هم چنین نشان دهنده تغییرات در دیواره سلولی آسکوسپورها می‌باشد که انبساط دیواره آسکوکارپ را توسط افزایش فشار پتانسیل آب محدود می‌کند.

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-09-18]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1384.9.1.18.6]

کاهش مقاومت دیواره آسکوکارپ بین پاییز و اوایل بهار ممکن است درپاسخ به هردو عامل یعنی کاهش پتانسیل آب و تغییرات مرفولوژیکی در دیواره آسکوکارپ باشد. پتانسیل آب انرژی مورد نیاز برای باز شدن دیواره آسکوکارپ‌ها و رهاسازی آسکوسپورها را تأمین می‌کند. میانگین فشار پتانسیل سیتوپلاسم آسکوسپورها در آب معادل پتانسیل شیمیایی محلولی است که موجب پلاسمولیز ۵۰٪ آسکوسپورها می‌شود (۴). بنابراین فشار پتانسیل در آسکوکارپ‌های مرطوب شده از ۶۷۰- کیلو پاسکال در مهرماه به ۲۹۹۰ - کیلو پاسکال در اردیبهشت ماه افزایش می یابد(۴). اگرچه دراین پژوهش تنها پتانسیل آب سیتوپلاسم آسکوسپورها اندازه‌گیری شد اما احتمال دارد که پتانسیل آب سیتوپلاسم سلول‌های پارانشیم دروغی دیواره آسکوکارپ و اپی پلاسم آسکها تغییرات مشابهی را تحمل کنند و بنابراین در پاره شدن دیواره آسکوکارپ و رهاسازی آسکوسپورها دخالت داشته باشند.

در نتیجه‌گیری کلی از این پژوهش می‌توان بیان داشت که *U. necator* می‌تواند در ایران به صورت کلیستوتسیوم زمستان‌گذرانی کند و آسکوسپورهای این گونه قارچی در ابتدای فصل نقش مایه تلقیح اولیه در شروع بیماری را دارند. هم چنین با توجه به دوره‌های رهاسازی متناوب آسکوسپورها در طول فصل بهار، به ویژه پس از بارندگی و مرحله فنولوژی انگور و نقش آسکوسپورها در شروع اپیدمی‌های بیماری، ساخت یک مدل پیش آگاهی برای کاهش خطر بیماری و برنامه‌ریزی دقیق‌تر در استفاده از قارچکش‌های مناسب ضروری است که می‌بایست در تحقیقات آینده مورد توجه قرار گیرد.

منابع مورد استفاده

۱. بنی هاشمی، ض. و ش. پروین. ۱۳۷۴. مشاهده فرم جنسی *Uncinula necator* عامل سفیدک پودری مو در استان فارس. بیماری‌های گیاهی ۴-۱ (۳۱) : ۱۰۲.

2. Abid, K. H., A. H. El-behadli and I. Al-Sohaili. 1980. Overwintering of grape powdery mildew in Iraq. PP. 62-63. *In*: Mediterr (Ed.), Phytopathology. Patras Pub., Greece.
3. Aurel, T. N. 1974. Cercetari privind biologia ciupercic *Uncinula necator* (Schw.) Burr. Care prova ca Fainarea Vitei de vie si mijloaacele de combatere in conditiil epodogoriei Dealul Mare. Ph.D. Thesis. Institutal Agronomic. Bucuresti. Romania. 212 pp.
4. Bidwell, R. G. S. 1974. Plant Physiology. MacMillan Publishing Co., New York.
5. Bioleti, R. F. 1907. Oidium or powdery mildew of the vine. Bull. No. 186. Agricultural Exprimental Station, California.
6. Boubales, D. 1961. Etude des causes de la resistance des vitacees a l oidium de la vigine (*Uncinula necator*) et de leur mode de transmision hereditaire. Ann. Ameliore Plantes. 11: 401 - 500.
7. Built, J. and R. Lfon. 1978. Powdery mildew of the vine. PP. 525-548 *In*: D. M. Spencer (Ed.), The Powdery Mildwes.Academic Press, New York.
8. Cortesi, P., M. Bisiach., M. Ricciolini and D. M.Gadoury. 1997. Cleistothecia of *Uncinula necator* - An additional source of inocolum in Italian Vineyards. Plant Dis. 81: 922-926
9. Cutter, E. C. and B. E. J. Wheeler. 1968. Effect of temperature on ascsorpore discharge from cleistocarps of *Erysiphe cichoracearum* on *Arctium lappa*. Trans. Br. Mycol. Soc. 51(5): 791-812.
10. Diehl, H. J. and C. Heintz. 1987. Studies on the generative reproduction of grapevine powdery mildew *Uncinula necator.* Vitis 26: 114-122.
11. Evans, K. J. L. Whisson and E. S. Scott. 1996. An experimental system for characterizing isolates of *Uncinula necator*. Mycol. Res. 100(b): 675-680.
12. Flaherty, D. L., F. L. Jensen., A. N. Kasimatis., H. Kido and W. J. Moller. 1981. Grape pest management. Univ. Calif. Pub, California.
13. Gadoury, D. M. and R. C. Pearson. 1990. Germination of ascospores and infection of Vitis by *Uncinula necator*. Phytopathol. 80: 1198-1203.
14. Gadoury, D. M. and R. C. Pearson. 1990. Ascocarp dehiscence and ascospore discharge in *Uncinula necator*. Phytopathol. 80: 393-401.

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-09-18]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1384.9.1.18.6]

15. Gadoury, D. M. and R. C. Pearson. 1988. Initiation, development, dispersal and suruival of cleistothecia of *Uncinula necator* in NewYork vineyards. Phytopathol.78: 1413- 1421.
16. Galloway, B. T. 1895. Observation on the development of *Uncinula spiralis*. Bot. Gaz. 20: 486-493.
17. Gee, L. M., B. E. Stummer, D. M. Gadoury, L. T. Biggins and E. S. Scott. 2000. Maturation of cleistothecia of *Uncinula necator* (powdery mildew) and release of ascospores in southern Australia. Aust. J. Grape and Wine Res. 1(6): 13-20.
18. Jailloux, F., T. Thind and M. Clerjeau. 1998. Releases, germination and pathogenicity of ascospores of *Uncinula necator* under controlled conditions. Can. J. Bot. 76: 777-781.
19. Jailloux, F. L., L. Willocquet, L. Chapuis and G. Froidefond. 1999. Effect of weather factors on the release of ascospores *Uncinula necator*, the cause of grape powdery mildew, in the Bordeaux region. Can. J. Bot. 77: 1044-1051.
20. Kimbrough, J. W. 1963. The development of *Pleochaeta polychaeta* (Erysiphaceae). Mycologia 55: 608-618.
21. Lianage, A. S. and D. G. Royle. 1976. Overwintering of *Sphearotheca hummuli*, the cause of hop powdery mildew. Ann. Appl. Biol. 83: 381-394.
22. Magarey, P. A., D. M. Gaoury, R. W. Emmmet, L. T. Biggins, K. Clarke, M. F. Watchel, T. J. Wicks and R. C. Seem. 1997. Cleistothecia of *Uncinula necator* in Austeralia. Viticultural and Enolog. Sci. 52: 210-218.
23. Moritz, C., V. Zinkernagel and H. H. Kassemeyer. 1994. Investigation on release and germination of ascospores *Uncinula necator* in South -West Germany. *In*: Proceeding of the 2th international workshop on Grapevine Downey and Powdery Mildew Modelling, Freiburg, Germany, 29 August – 1 September, Freiburg, Germany.
24. Moseman, J. G. and H. R. Powers. 1957. Function and longevity of cleistothecia of *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei.* Phytopathol. 47: 53-56.
25. Pearson, R. C. and D. M. Gadoury. 1987. Cleistothecia, the source of primary inoculum for Grape powdery mildew in NewYork. Phytopathol. 77: 1509-1514.
26. Pearson, R. C. and E. Gartel. 1985. Occurrence of hyphae of *Uncinula necator* in buds of grapevine. Plant Dis. Rep. 69: 149-151.
27. Pearson, R. C. and A. C. Goheen. 1990. Compendium of Grape Disease. APS Press, Minnesota, USA.
28. Pool, R. M., R. C. Pearson., M. J. Welser, A. N. lakso and R. C. Seem. 1984. Influence of powdery midew on yield and growth of rossette grapevines. Plant Dis. 68: 540- 543.
29. Reddick, D. and F. E. Gladwin. 1915. Powdery mildew of grapevine and its control in the United States. pp. 117-125. *In*: Report of the International Congress of Viticulture. Dattner Printing Co., San Francisco, Calif.
30. Sall, M. A. and J. Wrysinski. 1982. Perenation of powdery mildew in buds of grape vines. Plant Dis. 66: 678-679.
31. Schnathorst, W. C. 1965. Enviromental relationships in the powdery mildews. Ann. Rev. Phythopathol. 3:343-366.
32. Schneider, S., D. M. Gadoury and H. Kassemeyer. 1998. The role of cleistothecia in the epidemiology of grape powdery mildew in Germany. *In*: P. A. Magarey, K. L. Tschirpig and B. F. Scrafe(Eds.), Third International workshop on Grapewine Downy and Powdery Mildew: Book of Abstract. APS Press, USA.
33. Van der Spuy, J. E. and F. N. Mtthee. 1977. Overwintering of the oidium stage of *Uncinula necator* in the buds of the grapevine. Plant Dis. Rep. 61: 612-615.
34. Weltzien, H. C. and M. Weltzien. 1962. Cleistothecia Von *Uncinula necator* in Wurtemberg 1961. Z. Pflanzen Krankh. 69: 664 - 667
35. Wicks, T., P. A. Magarey and R. W. Emmet. 1985. First report of *Uncinula necator* cliestothecia on grapevine in Australia. Plant Dis. 69: 727.
36. Wilhelm, A. F. 1964. Zum Auftreten der Perithecien von *Uncinula necator* im Freiland. Z. Pflanzenkr. 71: 445-449.
37. Yarwood, C. E. 1957. Powdery mildews. Bot. Rev. 23: 235-301.
38. Yossifovitch, M. 1923. Contribution a l etude de l oidium de la vigne et de son traitment. PH.D. Thesie, Universite de Tolouse. France.

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-09-18]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1384.9.1.18.6]