بهینه سازی روش سترون کردن سیست و لارو نماتد *Heterodera schachtii* و بررسی امکان کاربرد آنها در کشت آزمایشگاهی بذرهای چغندرقند

آتنا شادمهر[۱]، پیمان نوروزی[۲*]، قاسمعلی گروسی[۱] و نسرین یاوری[۲]

(تاریخ دریافت: ۸۵/۳/۱۳ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۵/۱۱/۲۴)

چکیده

در این پژوهش پس از بهینه سازی روش سترون کردن سطحی سیست و لارو نماتد مولد سیست چغندرقند (*Heterodera schachtii*)، امکان به کارگیری نماتد در گیاهچه‌های بذری چغندر قند جهت تبدیل لارو به سیست در کشت آزمایشگاهی بررسی گردید. بدین منظور ابتدا سیست‌ها از خاک آلوده استخراج و در محلول کلرید روی ۰/۵ گرم در لیتر قرار گرفته و تفریخ تخم‌ها صورت گرفت. سپس جهت تهیه لاروهای سترون نماتد از تیمارهای مختلف سترون کردن استفاده گردید. با مقایسه میانگین داده‌ها به روش دانکن برای تعداد لاروهای زنده و سترون، مشخص شد که تیمارهای اتانل ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه به اضافه هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به مدت ۵ دقیقه و نیز هیپوکلریت سدیم ۰/۱ درصد به مدت ۲۰ دقیقه به ترتیب به عنوان بهترین تیمارهای سترون کردن سیست‌های جدا سازی شده از خاک و لاروهای خارج شده از سیست‌های غیر سترون می‌باشند. در مرحله بعد، به منظور بررسی تبدیل لارو به سیست در شرایط درون شیشه از دو رقم چغندر قند حساس به نماتد به نام‌های ۱۹۱ و ۷۲۳۳ استفاده شد. جهت تهیه بستر مناسب ریشه زایی و مایه زنی ریشه‌ها با لاروهای سترون شده از محیط کشت PG_{oB} با غلظت‌های مختلف هورمونی استفاده گردید. مشاهده سیست‌های تشکیل شده روی ریشه، پس از رنگ‌آمیزی توسط استرئو میکروسکوپ انجام و شمارش نهایی سیست‌ها ۴۰ روز پس از مایه زنی گیاهچه‌ها صورت گرفت. روی هر گیاهچه از دو رقم مذکور ۵ تا ۱۲ سیست تشکیل گردید. در نتیجه به نظر می‌رسد این روش بتواند در ارزیابی ژرم پلاسم چغندر قند جهت غربال ژنوتیپ‌های مقاوم به نماتد در شرایط کنترل شده کشت آزمایشگاهی استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: نماتد مولد سیست، مایه زنی، چغندرقند، کشت آزمایشگاهی، ریشه‌های مویین

مقدمه

زراعت چغندرقند همه ساله در معرض آفات و بیماری‌های مختلف می‌باشد. از عوامل رایجی که در چغندرقند ایجاد بیماری می‌کنند، می‌توان به نماتد مولد سیست چغندرقند با نام علمی *Heterodera schachtii* Schmidt,1871 اشاره کرد. این نماتد جزو انگل‌های اجباری بوده و از ریشه چغندرقند تغذیه می‌کند (۷). حدود ۲۹ گونه نماتد، از ۱۶ جنس می‌توانند انگل چغندر قند باشند. کاهش عملکرد چغندر قند در اثر نماتدها

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیار بیوتکنولوژی، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، قزوین
۲. به ترتیب استادیار پژوهش و کارشناس خبره مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند، کرج
* : مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی : peymannorouzi @yahoo.com

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1386.11.42.20.4]

حدود ۱۰٪ برآورد شده که نماتد مولد سیست چغندر قند، مسئول کاهش بیش از ۹۰٪ این مقدار است (۲۴). لارو نماتد چغندرقند در صورت استقرار روی ریشه گیاه حساس، قابلیت تغذیه از ریشه و تبدیل شدن به سیست را دارا می‌باشد. این عمل در شرایط مزرعه و گلخانه امکان پذیر است. در شرایط کشت آزمایشگاهی هم گیاه و لارو باید هر دو سترون باشند. علاوه بر آن، فراهم سازی بستری مناسب جهت تغذیه لاروها و تبدیل آنها به سیست از نکات مهم و اساسی در مایه زنی لارو در کشت آزمایشگاهی می‌باشد. به‌منظور مایه زنی لارو سن دوم در محیط کشت آزمایشگاهی، وجود ریشه‌های فرعی و مویین با انشعابات زیاد مورد نیاز می‌باشد. تولید مثل نماتد مولد سیست چغندرقند و نماتد مولد غده در ریشه‌های مویین گزارش شده است (۱۷و۲۲). در یک بررسی مایه زنی بافت‌های چغندرقند با *Agrobacterium rhizogenes* منجر به تولید ریشه‌های مویین گردید. چنین ریشه‌هایی نیاز به هورمون نداشته و به سرعت تکثیر و منشعب شده و به مقادیر زیاد در کشت‌های متوالی قابل تهیه می‌باشند (۵ و ۱۹). کشت‌های ریشه مویین، می‌توانند به عنوان سنجش کشت آزمایشگاهی برای مقاومت به نماتد به کار روند (۱۷و۲۱). در بررسی دیگر در مایه زنی گیاهان ۱۴ روزه *Arabidopsis thaliana* در شرایط کشت آزمایشگاهی، با لارو سن دوم سترون نماتد مذکور پس از سه هفته ماده‌های شیری رنگ روی ریشه‌ها مشاهده شد (۹). درشرایط کشت آزمایشگاهی گیاه *Arabidopsis* و ریشه‌های مویین سویا با لاروهای سن دوم نماتد مولد سیست سویا مایه زنی شده‌اند و تولید مثل نماتد فوق روی ریشه‌های مویین بررسی شده است (۱۵). هم‌چنین مایه زنی ریشه‌های گیاه *Arabidopsis* با لاروهای سن دوم نماتد چغندرقند صورت گرفته است و روند تبدیل لارو به سیست بررسی شده است (۱۲). استفاده از شرایط کشت آزمایشگاهی برای ارزیابی مقاومت به عوامل محیط بافت گیاهچه چغندرقند پیش از این گزارش شده است (۳ و ۱۸).

با توجه به مشکلات روش‌های ارزیابی مقاومت به نماتد در شرایط مزرعه‌ای و گلخانه‌ای، در این تحقیق امکان بهره‌گیری از فنون کشت بافت، جهت مایه زنی گیاه چغندرقند با لارو سن دوم سترون نماتد در شرایط کشت آزمایشگاهی و ارزیابی روند تبدیل لارو به سیست در گیاهان حساس به نماتد بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

از دو رقم چغندر قند حساس به نماتد مولد سیست به اسامی مولتی ژرم ۷۲۳۳ و منوژرم ۱۹۱ برای تهیه گیاهچه‌های آزمایشگاهی استفاده گردید. برای این منظور بذرهای مورد نظر پس از سترون کردن سطحی با روش‌های مرسوم در آزمایشگاه (استفاده از هیپوکلریت سدیم ۲/۵٪ و اتانل ۷۰٪) روی محیط کشت PG_{oB}(۶) با ۳ درصد ساکارز و ۹ گرم در لیتر آگار کشت شدند. پس از ده روز بذور جوانه زده به محیط مشابه حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر هورمون NAA (Naphtalene acetic acid) و IBA (Indol botiric acid) روی ظروف پتری جهت تولید ریشه‌های افشان و منشعب منتقل گردیدند.

جداسازی و خالص سازی سیست از خاک آلوده

خاک آلوده به نماتد درون تشتکی ریخته شد و روی آنها آب اضافه گردید و به خوبی مخلوط شدند تا سیست‌ها از داخل ذرات خاک رها شده و به سطح آب بیایند. پس از ۳۰ ثانیه روشناور را روی الک‌هایی با قطر منافذ ۸۵۰ و ۲۵۰ میکرونی (به ترتیب روی هم قرار گرفته‌اند) خالی کرده و سپس سیست‌های حاصله از روی الک ۲۵۰ میکرونی با شستشو توسط پیست به درون بشر ریخته شدند. سیست‌هایی که بدین ترتیب جداسازی شدند با مقداری کاه وکلش همراه بودند که برای خالص سازی آنها از سانتریفوژ با شربت غلیظ قند ساکارز، استفاده گردید. بدین منظور حدود ۱ تا ۲ قاشق سیست همراه زوائد، به داخل لوله‌های سانتریفوژ ۸۰ میلی‌لیتری ریخته شده و ۲ تا ۳ قاشق پودر کائولین به آنها اضافه گردید. بعد از

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1386.11.42.20.4]

اضافه کردن پودر کائولین، درون لوله‌ها آب ریخته و مخلوط به خوبی به هم زده شد. سپس حجم همه لوله‌ها به یک اندازه تنظیم گردید. در اولین مرحله، نمونه‌ها با ۳۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردیده و سپس روشناور آنها حذف گردید. در مرحله دوم سانتریفوژ محلول ساکارز ۶۳٪ در همان حجم اضافه گردید و مخلوط به خوبی به هم زده شد و سپس با ۳۷۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ ثانیه سانتریفوژ گردیدند. در پایان، روشناور روی غربال ۲۵۰ میکرون، منتقل شده و پس از شستشو با آب مقطر، سیست‌های خالص به دست آمد.

سترون کردن سیست نماتد *H. schachtii*

بهترین تیمار برای ضد عفونی سیست، تیماری است که ضمن از بین بردن آلودگی‌های قارچی و باکتریایی سیست، قدرت تفریخ آن را حفظ کند. به عبارت دیگر تیمار ضد عفونی نباید روی میزان تفریخ تخم و لاروهای به دست آمده از آن، اثر سوء بگذارد. به منظور دست‌یابی به چنین تیماری از چندین آزمایش استفاده گردید. سیست‌های خالص به دست آمده، پس از شستشوی کامل سیست با آب مقطر سترون تحت تیمارهای ذیل (هر تیمار در سه تکرار) قرار گرفتند:

A: هیپو کلریت سدیم ۵ درصد (v/v) + تریتون (۰/۰۵٪) (v/v) به مدت ۵ دقیقه.

B: هیپو کلریت سدیم ۵ درصد (v/v) + اتانل ۷۰٪ (v/v) (۱ دقیقه) + تریتون (۰/۰۵٪) (v/v) به مدت ۵ دقیقه.

C: کلرید جیوه یک در هزار (w/v) + تریتون (۰/۰۵٪) (v/v) به مدت ۵ دقیقه.

D: اتانل ۷۰٪ (v/v) به مدت ۱ دقیقه + هیپو کلریت سدیم ۵ درصد (v/v) + تریتون (۰/۰۵٪) (v/v) به مدت ۵ دقیقه.

پس از اعمال هر تیمار، شستشو با آب مقطر سترون پنج تا شش مرتبه انجام شد.

به منظور تفریخ تخم از سیست‌های سترون، آنها را در محلول کلرید روی سترون (۰/۵ گرم در لیتر) قرار داده و در شرایط تاریکی و دمای ۲۵°C در اتاقک رشد به مدت ده روز نگه‌داری شدند.

تعیین بهترین زمان تفریخ تخم نماتد مولد سیست چغندرقند جهت جمع آوری لاروهای سن دوم

منظور از بهترین زمان تفریخ تخم، مدت زمان لازم برای خروج بیشترین تعداد لاروهای زنده و فعال از تخم می‌باشد. برای تعیین این زمان سیست‌های جدا شده از خاک در سه تکرار (هر تکرار شامل ۲۰۰ سیست) روی تنظیف (توری) قرار گرفته و محلول کلرید روی ۰/۵ گرم در لیتر(۲۰)، بر روی آنها ریخته شد. نمونه‌های حاصل، جهت تفریخ تخم‌ها، طبق روش گراندلر و همکاران (۱۰)، در تاریکی و در شرایط دمایی ۲۵°C، قرار گرفتند. شمارش لاروها در روز سوم، پنجم، ششم، هفتم، دهم، سیزدهم، هفدهم و بیستم از شروع تفریخ تخم‌ها صورت گرفت و براساس نتایج به دست آمده از شمارش، منحنی تفریخ تخم رسم گردید.

سترون کردن لارو نماتد مولد سیست چغندرقند

جهت تعیین بهترین روش برای سترون کردن لاروها با حفظ قدرت بیماریزایی و زنده ماندن، لاروهای خارج شده از سیست‌های غیر استریل تحت تیمارهای هیپوکلریت سدیم با غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳ و ۰/۴ درصد + تریتون ۰/۰۵٪ به مدت ۲۰ دقیقه و آب اکسیژنه با غلظت‌های ۰/۵٪، ۰/۱٪، ۰/۰۵٪ و ۰/۰۱٪ به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند.

قبل از سترون کردن لاروها، شمارش لاروهای آزاد شده از سیست‌های غیرسترون، در سه تکرار و ۱۰۰ میکرولیتر محلول حاوی لارو در هر تکرار انجام شد. میانگین تعداد لاروهای زنده غیرسترون، ۳۰۰۰ لارو در ۱۰۰ میکرولیتر بود. پس از سترون کردن لاروها، شمارش لاروهای زنده سترون در زیر استرئومیکروسکوپ صورت گرفت.

آزمون عدم آلودگی سیست‌ها و لاروهای سترون شده

پس از اعمال تیمارهای سترون کردن سیست و یا لارو مقداری از آنها (۱۰۰ عدد) در محیط کشت مایع LB (Luria broth) (۱۴) و PDB (Potato Dextrose Broth) در لوله‌ای ۱۵

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1386.11.42.20.4]

میلی‌لیتری ریخته شد. لوله‌ها روی شیکر ۱۲۰ دور در دقیقه در دمای اتاق به مدت ۳ روز نگه‌داری شدند. هم‌چنین لاروهای سترون شده جهت آزمون عدم آلودگی روی محیط کشت PG_{oB} قرار داده شدند. پس از گذشت سه روز با مشاهده ظاهری و از روی تغییر رنگ محیط‌های کشت و مقایسه با کنترل مثبت (محیط‌های حاوی سیست و لارو ضد عفونی نشده) و منفی (محیط‌های LB و PDB سترون فاقد سیست و لارو)، تأثیر تیمارهای سترون کردن مشخص گردید.

تهیه بستری مناسب جهت مایه زنی لارو سن دوم و تأثیر محیط کشت گیاهی در تشکیل سیست

پس از انتخاب محیط کشت مناسب که در قسمت مواد گیاهی به آن اشاره شد، محیط مزبور را درون تشتک پتری سترون ریخته و ریشه‌های منشعب و فرعی که به طور سطحی رشد کرده، بر سطح آگار قرار گرفتند. جهت دست‌یابی به ریشه‌های سطحی، پتری‌ها به حالت نیمه عمودی قرار گرفتند، تا طبق خاصیت ژئو تروپیسم ریشه به سمت پایین و بصورت سطحی رشد کند و ریشه داخل آگار قرار نگیرد. سپس پتری‌ها تحت شرایط دمایی ۲۵°C با ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در اتاقک رشد قرار گرفتند.

به منظور بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف محیط‌های کشت گیاهی در فرآیند تبدیل لارو به سیست، آزمایشی مشاهده‌ای با پنج تیمار زیر (هرکدام در دو تکرار) طراحی شد.

الف) محیط آب و آگار

ب) محیط PG_{oB} یک چهارم غلظت + یک درصد ساکارز

ج) محیط PG_{oB} یک دوم غلظت + یک درصد ساکارز

د) محیط PG_{oB} یک دوم غلظت املاح و تمام غلظت ویتامین‌ها + سه درصد ساکارز

و) محیط PG_{oB} + یک درصد ساکارز

به تمام محیط‌ها ترکیب هورمونی IBA و NAA هر کدام به میزان ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر، افزوده شد. مقدار آگار محیط‌های کشت ۹ گرم در لیتر تعیین گردید. گیاهچه‌های ریشه دار شده در محیط اولیه، پس از گذشت ۷ روز به محیط‌های جدید (۵ تیمار مختلف) منتقل شدند.

مایه زنی نماتد در محیط کشت آزمایشگاهی و بررسی تبدیل لارو به سیست

پس از سترون لاروها، شمارش لاروهای سترون با بزرگنمایی ۲۰ برابر، زیر استرئومیکروسکوپ صورت گرفت. بدین ترتیب که سه قطره ۱۰۰ میکرولیتری روی لام قرار داده و تعداد لاروهای مرده و زنده درون هر قطره شمارش شدند. میانگین لاروهای زنده درسه تکرار محاسبه گردید و در نهایت تعداد لاروهای زنده موجود در فالکون حاوی لارو سترون محاسبه گردید. به طور متوسط در هر پتری بین ۸۰۰ تا ۱۰۰۰ لارو سن دوم در مجاورت ریشه‌های مویین مایه زنی گردید. هر پتری حاوی دو تا سه گیاهچه ریشه دار بود (۱۷).

پس از عمل مایه زنی، درب پتری‌ها توسط پارافیلم مسدود شده و در اتاقک رشد قرار گرفتند. پتری‌ها در شرایط دمایی ۲۵°C و در شرایط نوری ضعیف قرار داده شدند. برای بررسی موفقیت عمل مایه زنی گیاهچه‌ها، پتری‌ها به طور روزانه در زیر استرئومیکروسکوپ مورد مشاهده قرار گرفته و تعداد سیست‌های تشکیل شده شمارش شدند.

رنگ آمیزی ریشه و نماتد

جهت مشاهده نفوذ لاروهای سن دوم در ریشه ،از روش رنگ آمیزی آنها توسط محلول اسید فوشین استفاده گردید (۷). بدین منظور ۱۴ روز یا بیشتر بعد از زمان مایه زنی تعدادی از نمونه‌ها انتخاب و ریشه‌های آنها رنگ آمیزی شدند.

نتایج و بحث

سترون کردن سیست

شمارش لاروهای آزاد شده از سیست‌های سترون در روز پنجم و ششم و یازدهم تفریخ صورت گرفت. با استفاده از نرم افزار SAS، تجزیه واریانس و مقایسه میانگین بین تیمارها در قالب طرح

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1386.11.42.20.4]

جدول ۱. شمارش لاروهای سترون شده با تیمارهای A ، B ، C وD به ترتیب ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳ و ۰/۴ درصد هیپوکلریت سدیم هر یک در دو تکرار

تکرار تیمار ها	زنده	مرده	مجموع	درصد زنده
A1	۲۰۰	۵۴	۲۵۴	۷۹
A2	۱۴۶	۱۱۲	۲۵۸	۵۷
B1	۹۴	۱۸۲	۲۷۶	۳۴
B2	۷۱	۲۳۳	۲۵۴	۲۸
C1	۳۲	۲۱۰	۲۴۲	۱۳
C2	۳۵	۳۰۴	۳۲۹	۱۱
D1	۱۰	۳۴۱	۳۵۱	۳
D2	۱۹	۲۹۰	۳۰۹	۶

کاملاً تصادفی صورت گرفت، براساس نتایج آزمون سترون کردن و با توجه به تعداد لاروهای زنده هر تیمار، بهترین تیمار جهت ضد عفونی سیست تیمار اتانل ۷۰٪ (v/v) به مدت یک دقیقه و به دنبال آن هیپوکلریت سدیم ۵ درصد (v/v) به همراه تریتون ۰/۰۵٪ (v/v) به مدت ۵ دقیقه تشخیص داده شد.

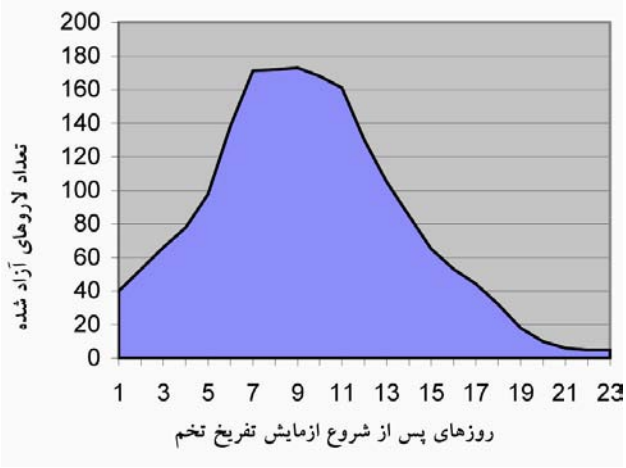
طبق گزارش‌های موجود در مورد مایه زنی لارو در شرایط کشت آزمایشگاهی، همواره از منبع اولیه سیست سترون استفاده شده است (۲ و ۹). به عنوان مثال، نوروزی و همکاران (۱ و ۲)، جهت مایه زنی ریشه‌های مویین با لارو نماتد، از سیست‌های اولیه سترون یعنی سیست‌های تکثیر شده خروی میزبان حساس در شرایط سترون، استفاده نمودند. آنها در آزمایش‌های خود از تیمار خاصی جهت ضد عفونی سیست‌ها استفاده نکردند. ولی در تحقیق حاضر، به دلیل عدم وجود منبع اولیه سیست سترون، سیست‌های مورد نیاز از خاک‌های آلوده خشک یا مرطوب و یا ریشه‌های آلوده چغندرقند تهیه گردید. کرامپ (۴) در بررسی خود ضد عفونی سطحی سیست‌ها را انجام داد. وی از هیپوکلریت سدیم۱۰٪ به همراه آنتی بیوتیک‌هایی از قبیل ۱۰ میلی‌گرم در لیترکلرامفنیکل و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر سولفات استرپتومایسین و پنی سیلین جی استفاده نمود. اختلاف آزمایش‌های کرامپ در سترون کردن سیست با آزمایش سترون لارو در تحقیق حاضر، این است که هدف کرامپ از سترون سطحی سیست انجام آزمایش‌های کنترل بیولوژیک بوده است. به این صورت که سیست‌ها را با روش فوق سترون نموده و در محیط کشت سترون اثر باکتری‌ها و قارچ‌های آنتاگونیست را روی سیست آزمایش نمود. در واقع هدف کرامپ دسترسی به لاروهای سترون از سیست‌های سترون شده نبوده است. نور و همکاران (۱۶)، در گزارشی در مورد بررسی باکتری‌های مرتبط با نماتد مولد سیست سویا، سترون کردن سطحی سیست‌ها را توسط محلول سفید کننده (هیپوکلریت سدیم) ۰/۳ درصد به مدت پنج دقیقه و سپس هفت مرتبه شستشو با آب مقطر سترون انجام داده است. هدف وی در این آزمایش صرفاً بررسی باکتری‌های موجود در سطح سیست بوده و از لاروهای آزاد شده، جهت مایه زنی کشت آزمایشگاهی استفاده ننموده است.

تعیین بهترین زمان تفریخ تخم

براساس نتایج به دست آمده از شمارش لاروها در دوره‌های متفاوت زمانی، در بین روزهای هفتم تا دهم تفریخ، ارتفاع منحنی به بالاترین حد خود رسیده، به عبارتی در هفته اول، میزان تفریخ کم بوده ولی پس از آن رو به افزایش می‌باشد و در بین روزهای هفتم تا دهم تفریخ به بیشترین مقدار خود می‌رسد. از روز یازدهم به بعد به تدریج میزان تفریخ کم شده و منحنی حالت نزولی پیدا کرده است (شکل ۱). به طور معمول حدود ۲۰ تا ۲۳ روز طول می‌کشد تا تمامی لاروهای داخل تخم‌ها از سیست‌ها آزاد شود و در نهایت تعداد لاروها به صفر

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1386.11.42.20.4]



شکل ۱. منحنی تفریخ تخم در دوره زمانی ۲۳ روزه

خواهد رسید. با توجه به نتایج به دست آمده به منظور استفاده از لاروهای فعال و پرتحرک برای مایه زنی، باید از لاروهای آزاد شده از سیست‌های تیمار شده با محلول کلرید روی پس از روز هفتم استفاده گردد. گاورز و همکاران (۹)، در آزمایش دیگری، جهت به دست آوردن لاروهای سن دوم *H. schachtii* (جهت مایه زنی گیاه *Arabidopsis*)، سیست‌های غیر سترون را در محلول کلرید روی ۳ میلی مولار در ۲۵°C قرار داده و با استفاده از روش گراندلر (۹)، پس از پنج تا هفت روز لاروهای آزاد شده را جمع آوری نموده‌اند. در این زمان تعداد لاروها بسیار زیاد بوده و همچنین وضعیت فعالیت و تحرک لاروها در این تاریخ بهتر از زمان‌های دیگر بود.

سترون کردن سطحی لارو نماتد مولد سیست چغندرقند

در تیمار ۰/۱ درصد و ۰/۲ درصد هیپوکلریت سدیم، میانگین لاروهای زنده سترون به ترتیب ۱۰۰۰ و ۸۰۰ لارو در ۱۰۰ میکرو لیتر بود. پس از شمارش لاروهای سترون مشخص گردید که غلظت ۰/۳ و ۰/۴ درصد هیپوکلریت سدیم به طور وسیعی سبب از بین رفتن لاروها می‌گردد. در نتیجه از این دو تیمار در رابطه با سترون کردن سطحی لاروها نمی‌توان استفاده نمود (جدول ۱).

پس از شمارش لاروهای سترون توسط تیمارهای آب اکسیژنه، مشاهده شد که تقریباً تمامی لاروها مرده بودند که

جدول ۲. شمارش لاروهای ضدعفونی شده با چهار تیمار ۰/۵٪، ۰/۱٪، ۰/۰۵٪ و ۰/۰۱٪ (v/v) آب اکسیژنه. هر تکرار حاوی ۱۰۰ میکرولیتر می‌باشد.

درصد زنده	مجموع	مرده	زنده	تیمار آب اکسیژنه
۰	۱۱۰	۱۱۰	۰	٪۰/۵
۲/۵	۱۶۴	۱۶۰	۴	٪۰/۱
۶	۱۴۵	۱۴۱	۹	٪۰/۰۵
۱۰	۱۳۸	۱۲۴	۱۴	٪۰/۰۱

نشان دهنده سمی بودن شدید آب اکسیژنه با غلظت‌های ۰/۱ درصد و ۰/۵ درصد بر روی لاروها می‌باشد. همچنین غلظت‌های پایین تر آب اکسیژنه نیزسبب از بین رفتن تعداد زیادی از لاروها شدند (جدول ۲). با توجه به حساسیت بسیار بالای لاروهای نماتد مولد سیست، تیمار مورد نظر جهت سترون کردن لارو، بایستی به نوعی انتخاب گردد تا ضمن ضد عفونی کامل لارو بتواند قدرت بیماری زایی (Infectivity) لارو را حفظ نموده و اثر سوئی روی فعالیت و قدرت آلوده کنندگی لارو نداشته باشد.

ویراسینگ و همکاران (۲۳)، پس از انجام آزمایش‌های متعدد و پی بردن به این که سدیم آزید (Sodium Azid) ۰/۰۵ درصد به مدت ۳۰ دقیقه سبب کشته شدن لاروها می‌گردد، سر انجام توانستند لاروهای نماتد *Meloidogyne incognita* را با استفاده از محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد ضدعفونی سطحی نمایند. لوباخ و همکاران (۱۱)، طی آزمایشی تأثیر هیپوکلریت سدیم را بر باکتری‌های لاروهای آلوده *Nippostrongylus brasiliensis* و *Strongyloides ratti* بررسی کردند. طبق نتایج آنها بهترین غلظت جهت ضد عفونی لاروها تیمارهای ۰/۱ و ۰/۲ درصد میباشد که پس از اعمال این تیمارها روی لاروهای آلوده، لاروها سترون شده و همچنین زنده ماندند.

نتایج آزمون عدم آلودگی سیست‌ها و لاروهای سترون شده

پس از مشاهده و یادداشت برداری از نتایج حاصل از آزمون

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1386.11.42.20.4]

جدول ۳. مقایسه میانگین تعداد لاروهای زنده آزاد شده از هر تیمار سترون سازی سیست با روش lsd

گروه‌بندی میانگین‌ها در سطح احتمال یک درصد	مشخصات تیمارها
۸^{c}	A: هیپو کلریت سدیم ۵ درصد (v/v) + تریتون (۰/۰۵٪) (v/v) به مدت ۵ دقیقه.
۱۹^{b}	B: هیپو کلریت سدیم ۵ درصد (v/v) + اتانل ۷۰٪ (v/v) (۱ دقیقه) + تریتون (۰/۰۵٪) (v/v) به مدت ۵ دقیقه.
$۰/۲۵^{d}$	C: کلرید جیوه یک در هزار (w/v) + تریتون (۰/۰۵٪) (v/v) به مدت ۵ دقیقه.
۳۳^{a}	D: اتانل ۷۰٪ (v/v) به مدت ۱ دقیقه + هیپوکلریت سدیم ۵ درصد (v/v) + تریتون (۰/۰۵٪) (v/v) به مدت ۵ دقیقه.

CV=10.63 Lsd 0.01=3.46

عدم آلودگی در تیمارهای سترون کردن سیست، مشاهده شد که پس از سه روز از قرارگیری سیست‌های سترون در محیط‌های PDB و LB، در برخی تکرارهای تیمارهای A و B آلودگی قارچی و باکتریایی مشاهده شد. تیمارهای C و D فاقد آلودگی بودند. صفت مورد نظر برای تعیین بهترین تیمار سترون کردن، پس از تأیید قدرت سترون کنندگی هرتیمار، تعداد لاروهای زنده خارج شده از سیست سترون می‌باشد (جدول ۳).

آزمون سترون کردن لاروها نشان داد که شرایط سترون فوق‌الذکر بسیار مؤثر بوده و هیچ گونه آلودگی باکتریایی یا قارچی پس از گذشت یک هفته در نمونه‌های تیمار شده دیده نشده است. هم‌چنین نتیجه آزمون عدم آلودگی لاروهایی که پس از سترون کردن روی محیط تمام غلظت PG_{oB} قرار گرفتند، نشان داد که لاروهای مربوط به کلیه تیمارهای سترون سازی پس از شش روز سالم و سترون بودند و هیچ گونه آلودگی قارچی و یا باکتریایی روی محیط کشت مشاهده نگردید. بنابراین از تیمار ۰/۱ درصد هیپوکلریت سدیم که نسبت لاروهای زنده بیشتری نسبت به سایر تیمارها داشت، استفاده گردید. گاورز و همکاران (۹)، پس از سترون لاروهای نماتد مولد سیست سیب زمینی، جهت آزمون آلودگی از محیط کشت B5 (۸) استفاده نمودند. لوباخ و همکاران (۱۱)، پس از به کار بردن غلظت‌های مختلف هیپوکلریت سدیم، با به کار بردن محیط اختصاصی باکتری‌ها، سترون بودن لاروهای سترون شده را آزمایش نمودند.

تأثیر محیط کشت گیاهی در تشکیل سیست

طبق نتایج به دست آمده، مشخص گردید که در محیط آب آگار ریشه‌ها به اندازه محیط‌های دیگر رشد نکرده و به صورت ریشه مویین نبودند. در این محیط در برخی تکرارها یک تا دو سیست تشکیل شده بود. در محیط PG_{oB} یک چهارم غلظت به همراه یک درصد ساکارز بیشترین تعداد سیست تشکیل شده بود. در این محیط غلظت مواد معدنی و ویتامین محیط کشت به میزان یک چهارم غلظت آنها در محیط کامل بوده است و درصد قند مصرفی ۱٪ بوده است. در این محیط ریشه به خوبی منشعب شده و ریشه‌های مویین و افشان تشکیل شده بود. در محیط PG_{oB} یک دوم غلظت به همراه یک درصد ساکارز ، دو تا سه سیست تشکیل گردید و تعداد سیست‌های تشکیل شده در این محیط نسبت به محیط PG_{oB} یک چهارم غلظت به همراه یک درصد ساکارز کمتر بود. در محیط سه درصد قند و نصف املاح و ویتامین کامل، سیست زیادی تشکیل نشده بود. در محیط PG_{oB} تمام غلظت نیز علی‌رغم رشد ریشه‌های مویین هیچ‌گونه سیستی تشکیل نشد. در تمامی محیط‌ها به استثنای محیط آب و آگار ریشه‌های فرعی به خوبی تشکیل شده وبستری از ریشه‌های مویین را به وجود آورده بودند (شکل ۲). در نتیجه با توجه به تعداد سیست‌های تشکیل شده که نشان دهنده جذب لاروهای مایه زنی شده به سمت ریشه می‌باشد، محیط PG_{oB} یک چهارم غلظت به همراه یک درصد ساکارز به

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1386.11.42.20.4]



شکل ۲. ریشه‌های رشد کرده بر سطح محیط کشت $PG0_B$ یک چهارم غلظت به همراه یک درصد ساکارز

عنوان بهترین محیط کشت جهت مایه زنی نماتد به گیاهچه‌های بذری چغندرقند شناخته شد.

نتایج بررسی تبدیل لارو به سیست (مایه زنی نماتد در محیط کشت آزمایشگاهی)

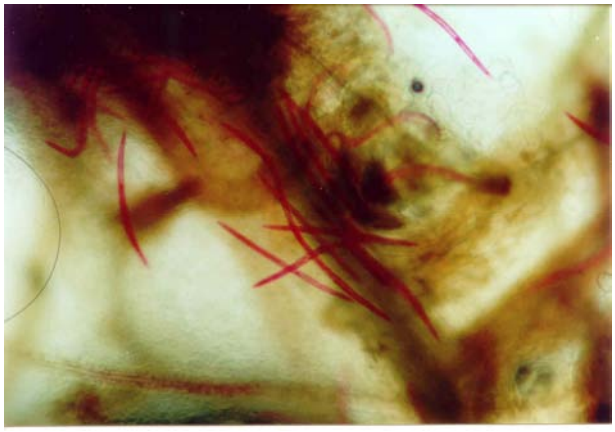
پس از رنگ آمیزی، ریشه‌ها به رنگ سفید و لاروها به رنگ قرمز مشاهده شدند. در برخی ریشه‌ها لاروها به خوبی به رنگ قرمز نمایان بوده و چندین لارو در اطراف ریشه و هم‌چنین تعدادی لارو در داخل بافت ریشه مشاهده گردیدند. به طور متوسط، ۱۴ روز بعد از مایه زنی، در ریشه‌های رنگ آمیزی شده، لارو در داخل بافت مشاهده گردید. در برخی نمونه‌ها، سیست‌های کوچک دوکی شکل به رنگ قرمز مشاهده شدند. بهترین زمان مشاهده سیست‌ها چهار تا شش هفته پس از تماس ریشه با لارو ذکر شده است (۳). نمونه‌ای از لاروها و سیست‌های رنگ آمیزی شده در شکل‌های ۳ و ۴ نشان داده شده اند. نمونه‌های مایه زنی شده با بزرگ نمایی ۱۰ برابر در زیر استرئو میکروسکوپ مشاهده و شمارش سیست‌ها مشخص نمود که اکثر سیست‌ها پس از ۲۷ تا ۴۰ روز تشکیل شده که معادل چهار تا شش هفته می‌باشد. عمدتاً از دو تا سه هفته پس از مایه زنی ماده‌های سفید توسط استرئومیکروسکوپ مشاهده می‌شوند (شکل ۵) و در هفته پنجم به سیست قهوه ای رنگ تبدیل می‌گردند (شکل ۶).

نتیجه‌گیری

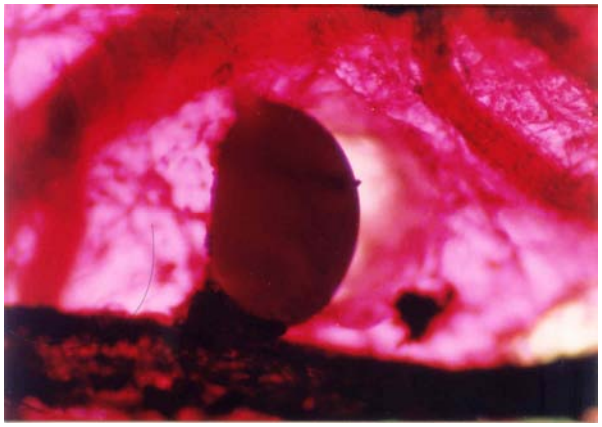
نتایج آزمایش‌های انجام شده در این تحقیق نشان می‌دهد که هیپوکلریت سدیم ۰/۱ درصد جهت سترون کردن لاروها با حفظ قدرت بیماری زایی آنها مناسب می‌باشد. نظر به این که ترکیبات ضد عفونی کننده، روی میزان تفریخ تخم‌ها و هم‌چنین تعداد لاروهای زنده تأثیر منفی داشته و موجب مرگ ومیر و از دست دادن تعداد زیادی از لاروها می‌شود، لذا توصیه می‌گردد ابتدا تفریخ تخم‌ها در شرایط غیر سترون صورت گرفته، سپس ضد عفونی لاروها انجام شود. بهترین زمان جهت جمع آوری لاروهای سن دوم، هفته دوم پس از شروع تفریخ می‌باشد که بیشترین تعداد لاروهای سن دوم در این تحقیق طی روزهای هفتم تا دهم جمع آوری گردید. نتایج مطالعات انجام شده در این تحقیق مشخص نمود که می‌توان با کشت بذرها در محیط کشت حاوی هورمون‌های IBA و NAA به غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر درون ظروف پتری و قرار دادن آنها به حالت مایل در اتاقک رشد، میزان بالایی ریشه‌های سطحی و مویین تولید نمود. بهترین شرایط جهت تبدیل لارو به سیست در

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-03-29]

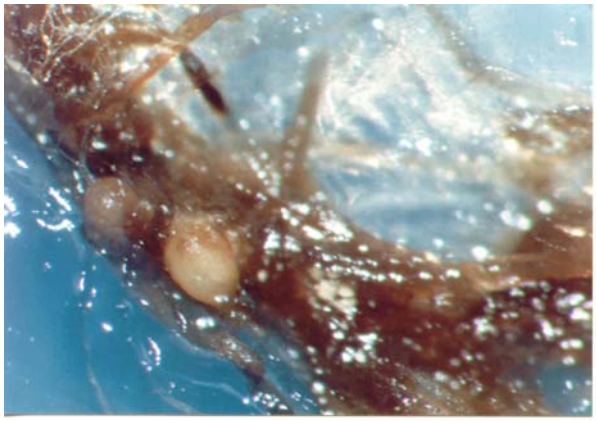
[DOR: 20.1001.1.24763594.1386.11.42.20.4]



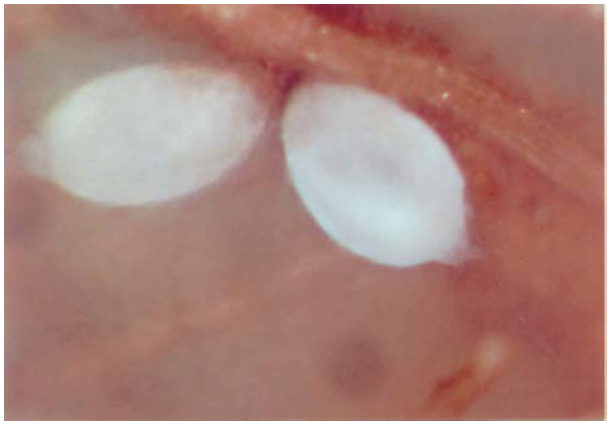
شکل ۳. مشاهده لاروهای رنگ آمیزی شده در بافت ریشه



شکل ۴. سیست رنگ آمیزی شده پس از تشکیل روی ریشه چغندرقند

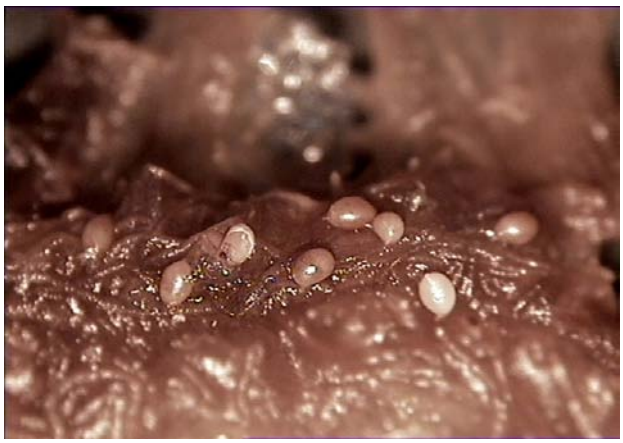


۵- الف

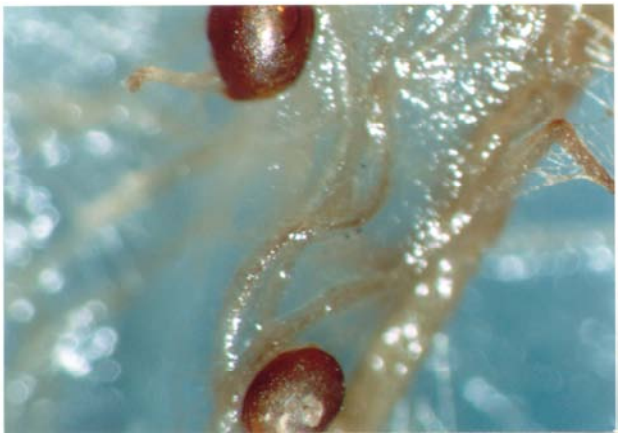


۵ - ب

شکل ۵ . الف و ب ماده‌های سفید تشکیل شده روی ریشه‌های مویین پس از سه هفته از شروع مایه زنی با لارو نماتد چغندرقند به ترتیب با بزرگ نمایی ۴۰ و ۸۰ برابر استرئومیکروسکوپ



۶-الف



۶- ب

شکل ۶. الف و ب، سیست‌های قهوه‌ای تشکیل شده روی ریشه‌های مویین پنج هفته پس از مایه زنی با لارو نماتد چغندر قند به ترتیب با بزگنمایی ۲۰ و ۴۰ برابر استرئومیکروسکوپ

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1386.11.42.20.4]

شرایط آزمایشگاهی، استفاده از محیط کشت PG_{oB} یک چهارم غلظت به همراه ۱۰ گرم در لیتر ساکارز، ۹ گرم در لیتر آگار با pH معادل ۶ می‌باشد، که در این شرایط تعداد بیشتری لارو به سیست تبدیل شده و قدرت فعالیت و بیماری زایی لاروها در این شرایط حفظ خواهد شد. بررسی نتایج تبدیل لارو به سیست در محیط کشت بهینه، نشان می‌دهد که ماده‌های جوان سفید رنگ نماتد چغندرقند پس از سه هفته تشکیل شده و تا شش هفته ادامه دارد. در رابطه با ارقام چغندرقند حساس به نماتد (۱۹۱ و۷۲۳۳)، تعداد سیست‌های تشکیل شده از ۵ تا ۱۲ سیست در هر گیاه شمارش گردید. بنابراین به نظر می‌رسد با استفاده از روش ارزیابی کشت آزمایشگاهی، بتوان تبدیل لارو نماتد به سیست را در گیاهان حساس بررسی و در ارزیابی‌های ژرم پلاسم چغندر، گیاهان مقاوم و حساس به نماتد را در شرایط کنترل شده درون شیشه غربال نمود.

سپاسگزاری

بدین وسیله از ریاست محترم مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند کرج به خاطر تقبل هزینه‌ها و تجهیزات مورد نیاز این پروژه، صمیمانه تشکر و سپاسگزاری می‌گردد. از جناب آقای دکتر محمودی و دکتر امیری از مؤسسه مذکور به خاطر راهنمایی‌ها و تجارب ارزنده ایشان و جناب آقای دکتر احمدی از دانشگاه الزهرا به دلیل ارائه اطلاعات ارزشمند و راهنمایی‌های ایشان قدردانی می‌گردد.

منابع مورد استفاده

۱. نوروزی، پ.، د. کای، م.ع. ملبوبی و ب. یزدی صمدی. ۱۳۸۲. انتقال ژن‌های *VAP*و *OF2* به چغندرقند با کمک آگروباکتریوم ریزوژنز برای بررسی مقاومت به نماتد. علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی ۳: ۲۱۱-۲۲۳.

۲. نوروزی، پ.، ت. تورا، د. کای، ب. یزدی صمدی و م.ع. ملبوبی. ۱۳۸۳. تراریختی چغندرقند (*Beta vulgaris* L.) با آگروباکتریوم ریزوژنز، برای مطالعه بیان ژن در ریشه‌های مویین. مجله علوم کشاورزی ایران ۳۵: ۸۵-۹۲.

۳. یاوری، ن. و پ. هاشمی.۱۳۷۳. *گزارش دوره بیوتکنولوژی و تولید بذر چغندرقند در دانمارک*. انتشارات موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند، کرج.

4. Crump, D. H. 1987. A method for assessing the natural control of cyst nematode population. Nematologica 33:232-243.
5. Damgard O. and O. Rasmussen. 1991. Direct regeneration of transformed shoots in *Brassica napus* from hypocotyls infections with *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Mole. Biol. 17:1-8.
6. De Greef, W. and M. Jacobs 1979. *In vitro* culture of sugarbeet: description of a cell line with high regeneration capacity. Plant Sci. Letters17 : 55-61.
7. Dropkin, V. H. 1989. Introduction to Plant Nematology. John Wiley and Sons. Inc. Pub., New York.
8. Gamborg, O. L., R. A. Miller and K. Ojima 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Res. 50: 151-158.
9. Goverse, A., H. Overmars, J. Engelbertink, A. Schots, J. Baker and J. Helder. 2000. Both Induction and morphogenesis of cyst nematode feeding cells are mediated by Auxin. Molecular Plant-Microbe Interactions. 13: 1121-1129.
10. Grunlder, F. M. W., M. Sobczak and S. Iange. 1997. Defense responses of *Arabidopsis thaliana* during invasion and feeding site induction by the plant- parasitic nematode *Heterodera glycines*. Physiol. Mol. Plant Pathol. 50:419-429.
11. Laubach H. E., E. Jordan and A. A. Kocan . 2000. Effect of Sodium Hypochlorite on the Bacterial flora of infective larvae of *Nippostrongylus brasiliensis* and *Strongyloides ratti*. Microbiol. and Public Health 59:74074.
12. Hermsmeier, D., J. K. Hart., M. Byzova, S.R. Rodermel and T.J. Baum. 2000. Changes in mRNA abundance within *Heterodera schachtii*- infected roots of *Arabidopsis thaliana* . Plant Microbe Mol. Interaction 13:309-315.
13. Krens, F. A., E. M. J. Salentijn, H. Paul, W. Lange and H. J. Huizing. 1989. Engineering nematode resistance in sugar beet. J. Cell Biochem. Suppl. 13:337-345.
14. Maniatis, T., E. F. Fritsch and J. Sambrook. 1982. Molecular cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY.

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.24763594.1386.11.42.20.4]

15. Nazarei M., A. K. Lennon, D. P. Puthoff, S. R. Rodermel and T. J. Baum. 2004. Homologous Soybean and Arabidopsis genes share responsiveness to cyst nematode infection. Mol. Plant Pathol. 5:409-423.
16. Nour, S. M., J. R. Lawrence, H. Zhu, G. D. W Swerhone, M. Welsh, T. W. Welacky and E. Topp. 2003. Bacteria Associated with Cyst of the Soybean Cyst Nematode (*Heterodera glycines*). Applied Environ. Microbiol. 69:607-615.
17. Paul. H., J. E. M. Deelen, B. Henken, S. M. Bock, W. Lang and F. A Krens. 1990. Expression in vitro of resistance to Heterodea schachtii in hairy roots of an alien monotelosomic addition plant of Beta vulgaris, transformed by Agrobacterium rhizogenes. Euphytica 48:153-157.
18. Sadeghian, S. Y. and N. Yavari. 2004. Effect of water-deficit stress on germination and early seeding growth in sugar beet. J. Agron. and Crop Sci. 190: 138-144.
19. Shahin, E, K. Sukhapinda, R. Simpson, R. Spivey. 1986. Transformation of cultivated tomato by a binary vector in *Agrobacterium rhizogenes*: transgenic plants with normal phenotypes harbor binary vector. T-DNA, but no Ri Plasmid T-DNA. Theor. and Appl. Genet. 72: 770-777.
20. Southey, J. F. 1970. Laboratory Methods for Work with Plant and Soil Nematodes. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food London.
21. Thurau, T., S. Kifle, C. Juna and D. Cai. 2003. The promotor of the $Hs1^{pro-1}$ nematode resistance gene activates a nematode – responsive and feeding site-Specific gene expression in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) and *Arabidopsis thaliana*. Plant Mol. Biol. 52:643-660.
22. Verdejo, S., B. A. Jaffee and R. Mankau. 1988. Reproduction of *Meloidogyne javanica* on plant roots genetically transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. J. Nematol. 20:599-604.
23. Weerasinghe R., D. M. Bird and N.S. Allen. 2005. Root-Knot nematodes and bacterial Nod factors elicit common signal transduction events in *Lotus japonicus*. Department of Botany and Center for the Biology of Nematode parasitism, North Carolina State University, Raleigh, NC-27695.102: 3147-3152.
24. Whitney E. D. and E. Duffus. 1991. Compendium of Beet Diseases and Insects. The American Phytopathological Society Press, USA.

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1386.11.42.20.4]