آفات و بیماریهای گیاهی
جلد ۶۵، شماره ۱، شهریور ۱۳۷۶

شیوع بیماری شانکر ساقه گوجه فرنگی در ورامین*

The prevalence of stem canker of tomato in Varamin

داریوش شهریاری و علیرضا کریمی روزبهانی
آزمایشگاه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی ورامین
موسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی

چکیده

در بررسیهای سالهای ۷۴-۱۳۷۳ در مناطق زیر کشت گوجه فرنگی در ورامین مشخص گردید که بیماری شانکر ساقه گوجه فرنگی در اکثر مزارع شیوع دارد. علائم به صورت زخم‌های بیضوی یا دوایر متحدالمرکز در محل طوقه و ساقه و یا لکه های مدور کوچک روی برگ‌ها و میوه مشاهده گردید. دسته دیگری از علائم که مربوط به ترشحات خارج سلولی قارچ عامل بیماری میباشد به صورت خطوط تیره روی ساقه و شاخه ها و نکروز بین رگ‌برگی روی برگها و یا تخریب آوندها دیده شد که منجر به خشکیدگی قسمتی یا تمام گیاه می‌گردید. بیماری زائی با زخم و بطور مستقیم با اسپور قارچ به میزان 10^6 spore/ml روی رقم پتوارلی (Peto early) ظرف مدت یک ماه به ثبوت رسید. اثر ترشحات خارج سلولی تولیدی با دو غلظت روی برگ‌های ارقام پتوارلی و پیرسون (Pearson) بعد از ۴۸ ساعت بصورت نکروز بین رگ‌برگی به رنگ قهوه‌ای تیره در زمینه برگ مشاهده شد. عدم ابتلاء گیاهان سیب‌زمینی، بادنجان، فلفل دلمه ای، فلفل قلمی، توتون، خیار، خربزه و کدو به بیماری پس از تلقیح با اسپور قارچ عامل بیماری، ظهور فرم اختصاصی آنرا روی گوجه فرنگی تحت نام *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* برای اولین بار در ایران اثبات میکند.

مقدمه

ابتدا لازم است اشاره گردد که بیماری مورد بحث با بیماری لکه موجی که عامل آن *A. solani* بوده و قدمت زیادی دارد متفاوت است. بیماری شانکر ساقه ناشی از *A. alternata* (Fr) Kliessler f. sp. *lycopersici* برای اولین بار به عنوان یک بیماری مهم و شایع در سال ۱۹۶۰ میلادی در San Diego county واقع در کالیفرنیای جنوبی دیده شد

* این مقاله مربوط به طرح بررسی علل خشکیدگی گوجه فرنگی به شماره ۷۳-۶۹ میباشد.

Jones و همکاران (1991) میزان خسارت تا زمان برداشت روی ارقام حساس Grand Pak، 428VF، 6339V، VFN sush، Early pak بیش از ۹۰ درصد برآورد نموده‌اند. قبلا این بیماری به دلیل تداخل با پژمردگی و پوسیدگی فوزاریومی ریشه تحت عنوان پوسیدگی فوزاریومی ریشه و تاج گوجه فرنگی شناخته شده بود ولی در بررسی‌های بعدی مشخص گردید که یک پاتوتیپ بیماری‌زا از *A. alternata* عامل شانکر ساقه بوده و روی ارقام خاصی از گوجه فرنگی بیماری زا است (Grogan & Missaghi, 1975). بخش دیگری از خسارت بیماری مربوط به تولید توکسین و انتشار سریع آن به قسمت هوایی گیاه است که سبب پژمردگی و مرگ سریع بوته میشود (Glichrist & Grogan, 1975). این بیماری در سال ۱۹۷۷ میلادی روی رقم Firt در ژاپن دیده شد. عامل بیماری به عنوان یک پاتوتیپ *A. alternata* با تولید توکسین اختصاصی مشخص شده است (Tachami *et al.*, 1984). طی سالهای ۸۶-۱۹۸۵ میلادی خسارت بیماری روی گوجه‌فرنگی ازکره گزارش گردیده است. همچنین رابطه ویرولانس آن با توکسین تولیدی، ثابت شده است (Chot *et al.*, 1989). معهذا این بیماری تاکنون در ایران گزارش نشده بود و این اولین گزارش از وجود بیماری و خسارت شدید آن روی رقم پتوارلی در منطقه ورامین میباشد. با توجه به اینکه تعداد زیادی نشاء گوجه فرنگی (طبق بررسی‌های این مقاله آلودگی آنها محرز گردیده است) از وارمین به سایر نقاط کشور برده میشود، احتمالا وجود بیماری و شیوع آن مطرح میباشد. لذا معرفی این عامل اختصاصی و نحوه ایجاد بیماری در کشور کاملا تازگی دارد. در حالیکه بیماری لکه موجی قبلا معرفی شده است (ارشاد، ۱۳۵۶).

روش بررسی

۱- نمونه برداری

طی بازدیدهای مختلف در سالهای ۷۴-۱۳۷۳ از مزارع گوجه فرنگی ورامین شامل پیشوا، قلعه‌کرد، قلعه سین، عسگرآباد و جوادآباد نمونه های متعددی با علائم زخم‌های بیضوی فرورفته درناحیه طوقه، ساقه و شاخه‌ها و لکه‌های مدور یا نکروز بین رگ‌برگی روی برگ از رقم متداول کشت منطقه بنام پتوارلی جمع‌آوری و به خاطر جلوگیری از آلودگی ثانویه، سریعا در آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفتند.

۲- جداسازی قارچ

برای جداسازی قارچ بعد از شستشو، هر یک از اندام‌های تفکیک شده گیاه (ساقه، شاخه، برگ و میوه) به قطعات کوچک چند میلی متری تقسیم و سپس با محلول کلراکس موجود در بازار به نسبت ۱۰ درصد، ساقه و شاخه ها به مدت ۵ دقیقه و برگ و میوه به مدت ۲ تا ۳ دقیقه ضدعفونی سطحی گردید. قطعات مزبور روی محیط کشت عصاره سیب‌زمینی، دکستروز، آگار (P.D.A) با pH=۵/۶ و محیط آرد ذرت و آگار (C.M.A) در حرارت ۲۵ درجه سانتی گراد گذاشته شد. بعد ازظهور کلنی و تولید اسپور، قارچها به روش تک اسپور خالص شدند و با استفاده از

منابع، مورد شناسایی قرار گرفتند. سپس ظروف پتری به منظور اثبات بیماری‌زائی و تعیین فرم اختصاصی در حرارت ۱۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

۳- اثبات بیماری‌زائی

مایه زنی به سه روش به شرح زیر انجام شد.

الف- بررسی امکان آلودگی از طریق خاک

بدین منظور جدایه های ده روزه قارچ روی محیط P.D.A به میزان یک تشتک ۹ سانتی‌متری به ازای ۲۵۰ گرم مخلوط ماسه و آرد ذرت (۹۵:۵) استریل درون ارلن های یک لیتری تهیه و در حرارت اتاق به مدت یک ماه نگهداری شدند. مایه حاصله به نسبت ۱۰٪ وزنی با خاک گلدان (محتوی ماسه، کود، خاک به نسبت ۱:۱:۲) سترون شده مخلوط گردید. سپس ۴۰ گیاهچه یک ماهه رقم پتوارلی در ده گلدان پلاستیکی نشاء گردید. برای شاهد همین تعداد گیاهچه در خاک سترون بدون آلودگی کشت شدند.

ب- بررسی امکان آلودگی از طریق زخم

در این مرحله دیسک هایی بقطر ۷ میلی متر از کشت ده روز قارچ روی محیط P.D.A محتوی اسپور و میسلیوم به محل زخم حاصل از قطع دم‌برگ میانی روی بیست ساقه گوجه‌فرنگی یک ماهه رقم پتوارلی قرار داده شد و بوسیله پارافیلم در محل محکم شد. برای شاهد از محیط P.D.A بدون قارچ استفاده شد.

ج- بررسی امکان آلودگی مستقیم

برای اینکار ابتدا اسپورهای قارچ از روی محیط کشت ۱۲ روزه توسط اسکالپل جمع‌آوری و سپس درون آب مقطر استریل به نسبت 10^6 Spore/ml تهیه شد. سوسپانسیون مزبور توسط دستگاه آب‌فشان دستی (نیم لیتری) به سطح برگهای گیاهچه یکماهه رقم پتوارلی پاشیده شد. برای شاهد از آب مقطر استریل استفاده شد.

گیاهچه های مایه زنی شده تماما در شرایط رطوبت اشباع زیر پلاستیک و حرارت ۲±۲۵ درجه سانتی گراد در گلخانه قرار داده شد و جمعا از پنج قارچ جدا شده از مناطق مختلف ورامین استفاده شد.

۴- بررسی امکان تولید ترشحات خارج سلولی

از جداشده های بیماری‌زا و غیربیماری‌زا (ساپروفیت) به میزان یک میلی لیتر محتوی $2/5\times10^5$ spore/ml به ۱۰۰ میلی لیتر عصاره سیب‌زمینی دکستروز (Potato Dextrose broth) ۲۰ گرم در لیتر در فلاسک‌های ۲۵۰ میلی لیتر ریخته شد. فلاسک‌ها روی شیکر با دور آهسته (۵۰ دور در دقیقه) و حرارت اتاق (۲۵ درجه سانتی گراد) به مدت یک هفته و دو هفته نگهداری شدند. محتویات فلاسک‌ها ابتدا از فیلتر واتمن شماره ۱ عبور داده شد. سپس عصاره قارچ از میلی پور به قطر ۰/۴۵ میکرون استخراج گردید (Glichrist & Grogan, 1975). از عصاره های

بیماری‌زا هر یک به میزان یک میلی لیتر بطور مجزا به تشتکهای ۹ سانتیمتری حاوی کاغذ فیلتر اضافه شد. برای شاهد یک میلی لیتر آب مقطر استریل افزوده شد. سپس از هریک از ارقام پتوارلی و پیرسون به تعداد سی برگ ازمحل اتصال دمبرگ به ساقه با تیغ استریل قطع گردید. برگها بصورت دو تایی ازناحیه بریدگی دمبرگ با کاغذ فیلتر در تشتک تماس داده شد. تشتک‌ها در انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد بمدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند.

۵- بررسی اثر اختصاصی عامل بیماری روی گوجه فرنگی

در این بررسی مطابق روش پیشنهادی گروگان و همکاران (Grogan *et al.*, 1975) از هشت جنس و گونه گیاه شامل سیب زمینی، فلفل دلمه‌ای و قلمی (*Capsicum annum*) بادنجان (*Solanum melongena*)، تنباکو (*Nicotiana tabacum*) خیار (*Cucumis sativus*)، خربزه (*Cucumis melo*)، کدو (*Cucurbita pepo*) و دو رقم گوجه‌فرنگی Peto early و Pearson در هشت تکرار (گلدان) استفاده شد. گیاهچه های مزبور با سوسپانسیون اسپور قارچ به نسبت 10^{+6} اسپور در میلی لیتر به صورت پاشش روی گیاه مایه زنی شدند. گلدانها در شرایط رطوبت اشباع و حرارت ۲±۲۵ درجه سانتی گراد در گلخانه قرار داده شدند.

نتیجه و بحث

۱- پراکندگی وشرح علائم

آلودگی در اکثر مزارع گوجه فرنگی ورامین بویژه روی رقم پتوارلی به شدت شیوع داشت. میزان آلودگی در مزارع پیشوا، قلعه کرد، عسگرآباد، قلعه سین و جوادآباد تا ۳۰٪ برآورد شد (شهریاری و کریمی، ۱۳۷۴).

نشانه های بیماری در خزانه روی گیاهچه های یک‌ماهه به صورت زخم فرو رفته روی طوقه و ساقه دیده شد. که معمولا سبب مرگ گیاهچه میگردد. از قسمتهای آلوده عمدتا قارچ *A. alternata* و در مرحله گیاهچه از ناحیه طوقه قارچ مذکور به همراه برخی از قارچهای مولد پوسیدگی طوقه و ریشه جدا وشناسائی شدند.

علائم پیشرفته بیماری بعد از انتقال نشاء به زمین اصلی در ماه‌های فروردین، اردیبهشت به صورت زخم‌های بیضوی (شانکر) قهوه ای تیره با دوایرمتحدالمرکز روی طوقه، ساقه و شاخه‌ها و خطوط قهوه ای تیره که از محل زخم تا جوانه انتهایی کشیده شده مشاهده گردید. در برش عرضی از ساقه، مشاهده شد که آوندهای چوبی تیره و مغز ساقه پوک و سیاه گردید (شکل ۱). در این مرحله ازناحیه آوند و شانکرها منحصرا قارچ *A. alternata* جدا گردید.

روی برگ دو نوع علامت مشاهده شد. برخی از علائم روی برگ بصورت لکه‌های مدور با دوایر متحدالمرکز دیده شد که از آن قارچ مزبور مجددا جدا گردید. نوع دیگر علائم به صورت نکروز بین رگ‌برگی به رنگ قهوه‌ای در زمینه برگ دیده شد که به تدریج تمام برگ را فراگرفت. از برگهای اخیر هیچگونه قارچی جدا نشد (شکل ۲).

شکل ۱- شانکر قهوه ای تیره با دوایر متحدالمرکز روی طوقه و ساقه گوجه فرنگی (عکس اصلی، ورامین ۱۳۷۵).

Fig. 1. Drak brown canker with concentric zonation on the tomato collar and stem (Varamin 1996, Original).

شکل ۲- علائم حاصله از ترشحات خارج سلولی قارچ روی برگ گوجه فرنگی (عکس اصلی، ورامین ۱۳۷۵).

Fig. 2. The fangal extracellular extract symptoms on tomato leaves (Varamin 1996, Original).

۲- اثبات بیماری‌زائی و تعیین فرم اختصاصی عامل بیماری

مایه زنی با هر سه روش منجر به تولید علائم مشابه در مزرعه شد. در روش اول درناحیه طوقه ابتدا زخم فرو رفته (شانکر) بوجود آمد و ۱۲ روز بعد تمام طوقه را فراگرفت. در روش دوم و سوم در محل مایه‌زنی شده روی ساقه گیاهچه گوجه فرنگی زخم ایجاد شد. پس از ۴-۳ روز یک خط قهوه‌ای به سمت بالا پیشروی نمود و اولین برگی که در معرض آن قرار گرفت کاملا خشک گردید (شکل ۳).

شکل ۳- تشکیل خط قهوه ای روی ساقه و پژمردگی دمبرگ پائینی روی گیاهچه گوجه‌فرنگی رقم پتوارلی تقلیح شده با اسپور قارچ *A. alternata* f. sp *lycopersici*

Fig. 3. Forming of brown band on the stem and wilting of the lower leaflet in Peto early cultivar seedling inoculated with *Alternari alternata* f. sp *lycopersici* spores.

به تدریج برگ‌های بالائی علائم نکروز بین رگ‌برگی را نشان دادند و بعد از ۱۲ روز تمام بوته‌ها از بین رفتند. در برخی از برگ‌ها لکه های مدور با دوایر متحدالمرکز مشاهده شد. ازکشت بافت آلوده ازمحل زخم روی طوقه وساقه لکه‌های مدور روی برگ مجددا قارچ مایه زنی شده

جدا و شناسائی شد ولی از خطوط قهوه ای روی ساقه و برگ‌ها یا علائم نکروز بین رگ‌برگی هیچگونه قارچی جدا نگردید.

در بررسی دیگر اثر ترشحات خارج سلولی قارچ در پتری دیش روی برگ‌های جدا شده ارقام پیرسون و پتوارلی در شرایط آزمایشگاه با دوغلظت (یک‌هفته و دو هفته انکوباسیون فلاسک‌های حاوی قارچ که طبیعتا حاوی دوغلظت ترشحات است) بعد از ۴۸ ساعت علائم نکروز بین رگ‌برگی در ارقام مورد آزمایش باعصاره بیماری‌زا مشاهده شد ولی در تیمار عصاره غیر بیماریزا و شاهد هیچگونه تغییری دیده نشد.

به منظور شناسائی عامل بیماری، مشخصات تاکسونومیکی قارچ اولیه با قارچ جداشده ازگیاهان مایه زنی شده تطبیق داده شد. بر این اساس، کلنی قارچ روی محیط P.D.A بعد از ۴۸ ساعت، کرکی به رنگ خاکستری با حاشیه سفید مات بود که بعد از تولید اسپور بتدریج تیره رنگ گردید. کنیدیوفور با دیواره عرضی و به ابعاد (۳۶/۷-۴/۴×۳/۴-۲) میکرومتر، کنیدیهای بالغ با دیواره عرضی و طولی به ابعاد (۲۴/۶-۱۷/۶×۱۱/۲-۷) میکرومتر و سطح ناصاف و beak کوتاه بطول (۴-۱/۵) میکرومتر تعیین شد. با استناد به مشخصات مذکور و منابع، قارچ عامل بیماری تحت نام *A. alternata* مشخص گردید (Simmons, 1967; Ellis, 1971). که متعاقبا توسط دکتر جعفر ارشاد (بخش تحقیقات گیاه شناسی، موسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی) نیز تائید گردید.

در آزمایش دیگر چون قارچ عامل بیماری روی گیاهان سیب‌زمینی، فلفل دلمه‌ای، فلفل قلمی، بادنجان، خیار، توتون، کدو و خربزه ایجاد بیماری ننمود لذا قارچ عامل بیماری با نام *A. alternata* f. sp. *lycopersici* برای اولین بار از ایران معرفی میگردد.

در سالهای اخیر بیماری شانکر ساقه گوجه فرنگی روی رقم پتوارلی Peto early در اکثر مزارع زارعین ورامین پراکنده گردیده و شیوع یافته است. عامل بیماری ارقام حساس را بطور مستقیم آلوده می‌سازد و بیشترین آلودگی بعد از انتقال نشاء به زمین اصلی از طریق زخمهای حاصله روی گیاهچه ایجاد میشود. رقم پتوارلی که کشت آن در منطقه متداول است شدیدا به بیماری حساس است. رطوبت بالا و دمای بهینه شرایط مساعد محیطی برای فعالیت قارچ را در ماه‌های فروردین و اردیبهشت فراهم میسازد.

در تحقیقات دیگری توسط نگارندگان، اهمیت عوامل بیماریزائی مثل *Rhizoctonia solani* و *Phytophthora nicotiana* var. *parasitica* و *Pythium* spp. در مراحل اولیه رویش گیاه روشن شده است (شهریاری و کریمی، ۱۳۷۴). با توجه به مکانیزم بیماری‌زائی و شرایط مطلوب محیطی اینگونه پاتوژن‌ها احتمالا فعالیت هم‌آهنگی را برای نفوذ و آلوده سازی گیاه مهیا مینمایند و از این‌رو میتوانند در توسعه بیماری شانکر ساقه گوجه فرنگی نقش موثر و تشدید کننده‌ای داشته باشند. که این نیازبه بررسی بیشتری دارد. مکانیزم عمده بیماری‌زائی *A. altetnata* f.sp. *lycopersici* از طریق تولید توکسین و انتقال وانتشار سریع آن به قسمتهای هوایی گیاه

میباشد، که در مطالعات اثبات بیماری‌زائی وجود یک خط قهوه‌ای باریک روی ساقه از محل شانکر و همچنین تشکیل نکروز بین رگ‌برگی نشانه‌هایی احتمالی از وجود یک نوع توکسین میباشد که در بررسی‌های آینده نوع ونقش آن روشن‌تر ارائه خواهد شد. بهرحال این موضوع مشخص میکند این قارچ یک پاتوژن قوی است زیرا از یک طرف از طریق زخم و یا نفوذ مستقیم سبب تخریب بافت کورتکس طوقه و شاخه ها شده واز طرف دیگر با تولید و انتقال احتمالی توکسین به قسمتهای حساس گیاه سبب پژمردگی و مرگ سریع گیاه میشود.

از آنجا که میوه گوجه فرنگی هم مورد حمله قارچ قرار میگیرد. لذا بررسی‌هائی را در زمینه جداسازی و شناسائی توکسین ترشحی و اثرات زیان بار آن در شرایط انبار و تغذیه انسان در قالب طرح جداگانه ای الزامی بنظر میرسد.

سپاسگزاری

نویسندگان لازم میدانند از آقای دکتر جعفر ارشاد (بخش تحقیقات گیاه شناسی، موسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی) به خاطر تشخیص نمونه‌ها و همچنین از همکاری‌های مستمر آقای محمدعلی قاسمی کاردان آزمایشگاه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی ورامین تشکر و قدردانی نمایند.

نشانی نگارندگان: مهندس داریوش شهریاری، آزمایشگاه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی ورامین، صندوق پستی ۱۴۴-۳۳۷۱۵ ورامین. مهندس علیرضا کریمی‌روزبهانی، موسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی، صندوق پستی ۱۴۵۴ تهران ۱۹۳۹۵.