نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۲، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۷، ص. ۳۳۷-۳۲۳

Journal of Plant Protection
Vol. 32, No. 3, Fall 2018, P. 323-337

ارزیابی مقاومت ارقام آبی گندم نان به نماتد سیستی غلات *Heterodera filipjevi*

مرضیه معتمدی[۱]– مهدی نصراصفهانی[۲*]- عیدی بازگیر[۳]– مصطفی درویش‌نیا[۴]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۲۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۴/۲۰

چکیده

گندم *Triticum aestivum* L. یکی از محصولات زراعی مهم و استراتژیک در جهان می‌باشد. یکی از معضلات فعلی گندم نماتد سیستی، گونه *Heterodera filipjevi* بوده که دارای پراکنش گسترده‌تری نسبت به سایر گونه‌ها در مزارع غلات کشور است. در این تحقیق واکنش ۳۰ رقم گندم آبی در برابر نماتد سیستی *H. filipjevi* در قالب طرح‌های آماری در گلخانه و مزرعه بررسی شد. شناسایی گونه براساس مطالعات ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی و هم‌چنین، مشخصات مولکولی انجام گردید. شاخص تعداد سیست و تخم و لارو سن دوم، مبنای تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. هم‌چنین، فاکتور تولیدمثل و درصد کاهش و یا افزایش جمعیت نماتد سیستی غلات، در هر تیمار نسبت به جمعیت اولیه‌ی همان تیمار محاسبه شد. تجزیه و تحلیل آماری و خوشه‌ای داده‌ها، به ترتیب، با مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن (DMRT)، با استفاده از نرم افزارهای آماری SAS و SPSS انجام پذیرفت. نتایج نشان داد که در شرایط گلخانه، کمترین میزان سیست قهوه‌ای مربوط به رقم بهرنگ با میانگین ۱۵ عدد و بعد از آن رقم بم با میانگین ۱۵/۲۵ عدد در ۲۰۰ سی‌سی خاک بود. در صورتی که کمترین میزان تخم، لارو و فاکتور تولید مثل مربوط به رقم پیشتاز با میانگین ۰/۴۹ عدد در گرم خاک محاسبه شد. در شرایط مزرعه، کمترین میزان سیست مربوط به رقم بم با میانگین ۱۱۳/۳۳ عدد در ۲۰۰ سی‌سی خاک و کمترین میزان تخم، لارو و فاکتور تولید مثل مربوط به رقم پارسی با میانگین ۰/۶۹ عدد در گرم خاک بود. ارقام مربوطه بر اساس واکنش به نماتد سیستی در سه طیف، مقاوم، متحمل و حساس قرار گرفتند.

واژه‌های کلیدی: تخم ولارو، سیست، نماتد سیستی غلات، واکنش ارقام *Heterodera filipjevi*

مقدمه

گندم، *Triticum aestivum* L.، مهم‌ترین گیاه زراعی به شمار می‌آید و غذای اولیه و اصلی اغلب مردم جهان را تشکیل می‌دهد. تقریبا ۶ میلیون هکتار از زمین‌های زراعی کشور زیر کشت گندم است (۵).

نماتدهای انگل گیاهی یکی از عوامل مهم محدود کننده رشد غلات محسوب می‌شوند.

تاکنون نماتدهای انگل زیادی از گندم و جو گزارش شده که نماتدهای سیستی غلات[۵] CCN، *Heterodera* spp.، گونه *H. filipjevi* (Madzidov 1981) Stelter 1984 یکی از مهم‌ترین گونه‌های خسارت‌زا در کشورهای روسیه، سوئد، اوکراین، نروژ، آلمان، انگلستان، لهستان، اسپانیا، بلغارستان، آمریکا، هند، ترکیه، سوریه و ایران هستند (۸ و ۱۲). از گروه نماتدهای سیستی غلات در ایران، گونه *H. filipjevi*، از نظر پراکنش و اقتصادی، اهمیت بیشتری بر روی گندم دارد (۴۳). در استان اصفهان، نماتدهای گروه avenae برای اولین بار توسط طلاچیان و همکارانش در سال ۱۹۷۶ گزارش گردید. در مطالعه دیگری که توسط دامادزاده و انصاری‌پور در سال ۲۰۰۱ صورت پذیرفت، گونه نماتد سیستی *H. filipjevi* از مزارع گندم و جو در مناطق مختلف استان اصفهان تعیین شد. تنها معافی و همکاران، وقوع نماتد سیستی غلات را از مزارع استان‌های آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی، اصفهان، سیستان و بلوچستان، کردستان، کرمانشاه، کهکیلویه و بویراحمد، خوزستان، همدان، مازندران، گلستان، زنجان، لرستان، یزد و مرکزی گزارش کردند (۴۳ و ۴۴). در بررسی های مقدماتی صورت گرفته، پیرامون شناسایی و پراکنش نماتدهای سیستی غلات مزارع گندم و جو استان اصفهان، آلودگی به گونه *H. filipjevi* در ۵۱/۷ درصد نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده از مزارع مذکور با میانگین جمعیت ۱۶۵۸ تخم و لارو سن دوم در ۲۰۰ گرم خاک بود (۲۴). حداکثر کاهش محصول به میزان ۴۰ درصد با جمعیت اولیه ۲۰ تخم و لارو سن دوم در گرم خاک اندازه گیری گردیده است (۳۸ و ۳۹).

۱، ۳ و ۴- به ترتیب به ترتیب دانشجوی دکتری، استادیار و دانشیار دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه لرستان
۲- دانشیار بیماری شناسی گیاهی، بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اصفهان، ایران
(*- نویسنده مسئول: (Email: mne2011@gamil.com
DOI: 10.22067/jpp.v32i3.69796
5- Cereal Cyst Nematode

فاتح (۱۲) در سوریه، پراکنش نماتد سیستی غلات (CCN) را مورد ارزیابی قرار داد. این مطالعه نشان داد که ۶۲ درصد از مزارع با سه گونه *Heterodera* به ترتیب *H. latipons* (۷۶ درصد)، *H. avenae* (۳۱ درصد)، و *H. filipjevi* (۹ درصد) آلوده بودند. برای شناسایی دقیق، سریع و حساس از ژن اکتین-۱ برای تشخیص گونه *H. latipons*؛ و زیرواحد سیتوکروم اکسیداز از ژن میتوکندریایی (COI) برای شناسایی گونه‌های *H. avenae* و *H. filipjevi* استفاده شد. در پژوهشی که توسط مکرم حصار و همکاران (۲۸) صورت گرفت، جمعیت‌های مختلف ۹ گونه مربوط به گروه H. avenae در استان خراسان از نظر ریخت سنجی و ژنتیکی مورد بررسی قرار گرفت. از نظر ریخت شناسی دو گونه *H. filipjevi* و *H. mani* شناسایی شدند ولی PCR-RFLP و آنالیز فیلوژنتیکی فقط وجود گونه *H. filipjevi* را تأیید نمود.

جیانگ کوآن و همکاران (۲۲) واکنش تعدادی از لاین‌های گندم را در برابر نماتد سیستی غلات *H. avenae* مورد ارزیابی قرار دادند که ۶۸ درصد لاین‌ها فوق حساس و ۲۰ درصد نمونه‌ها مقاومت نشان دادند. دبابت و همکاران (۸)، ۱۲۶ لاین گندم بهاره پیشرفته سازگار با شرایط نیمه خشک برای شناسایی جایگاه مربوط به ژن مقاومت به نماتدهای *H. avenae*، *Pratylenchus neglectus* و *P. thornei* را با استفاده از نشانگرهای مرتبط با DART مورد ارزیابی قرار دادند. در نتایج ۱۱ نشانگر مرتبط با مقاومت به نماتد سیستی و ۲۵ نشانگر برای مقاومت به *P. neglectus* و ۹ نشانگر برای مقاومت به *P. thornei* معرفی شد.

نماتد سیستی غلات در ۲۲ استان کشور چین و یک ایالت آن وجود داشته و بیشترین خسارت در استان هنان چین بیش از ۱۵-۲۰ درصد گزارش شده است (۳۴). خسارت گندم در عربستان ۷۷ -۱۷ درصد، در استرالیا روی جو ۲۰ درصد و روی گندم ۲۳-۵۰ درصد گزارش شده است (۲۵ و ۲۶). در الجزایر نماتد سیستی غلات پراکنش گسترده‌ای داشته، به‌طوری که تراکم جمعیت آن در برخی نواحی بین ۲۶۷ تا ۲۸۱ عدد سیست در هر کیلوگرم از خاک بود (۱۴).

در یک بررسی مقایسه‌ای بین بیماری‌زایی *H. avenae* و *H. filipjevi*، روی شش رقم گندم بهاره نشان داد که رقم اویان (Ouyen) به نماتد H. avenae مقاوم، اما در برابر *H. filipjevi* حساس بود. هم‌چنین، رقم سانمز (Sönmez) برعکس قبلی در برابر *H. filipjevi* مقاوم و در برابر گونه دیگر حساس بود (۴۱). اسمیلی و مارشال (۴۰) تعداد ۳۹ رقم گندم بهاره را از نظر مقاومت و تحمل در برابر *H. avenae*، طی دو سال مورد ارزیابی قرار دادند. گیاهان در ردیف‌های تیمار شده با آلدیکارب در زمان کشت و تیمار نشده مقایسه شدند. تعداد سیست شیری تشکیل شده از ۷۰ – ۵ عدد در ریشه هر گیاه متغییر بود. در نوارهای تیمار شده با آلدیکارب، میانگین تعداد سیست شیری تا ۹۹ درصد روی رقم حساس جلی (Glee) کاهش یافت و میانگین تولید دانه در رقم کاتالدو (Cataldo) با حداقل تحمل تا ۷۷ درصد افزایش داشت. در این تحقیق، برای اولین بار ارقام گندم بهاره با ویژگی مضاعف مقاوم و متحمل به *H. avenae* گزارش شد. حاج حسنی و همکاران (۱۵)، مطالعه‌ای را پیرامون تاثیر و خسارت این گونه روی گندم رقم سرداری در شرایط میکروپلات در ایران طی سال‌های ۱۳۸۸-۱۳۸۷ انجام داده‌اند، مشخص شد که این گونه نماتد از لحاظ اقتصادی در گندم زمستانه مهم می‌باشد و میزان خسارت و کاهش محصول حتی در پایین‌ترین جمعیت به‌کار رفته (۲/۵ تخم و لارو سن دوم در گرم خاک) معنی‌دار است و باعث افت ۴۰ درصدی محصول می گردد.

کاربرد ارقام مقاوم در مدیریت نماتدهای مورد نظر، مقرون به صرفه و سازگار با محیط زیست است (۳۵). از این رو، ۲۱۷ لاین گندم زمستانه در سوریه برای بررسی مقاومت در برابر *H. filipjevi* در اتاقک رشد، مورد ارزیابی قرار گرفتند. لاین‌های مشابه با استفاده از نشانگر AFLP مشخص شدند. نتایج نشان داد که برخی از لاین‌ها به دلیل تعداد کم سیست، امید بخش بوده که این لاین‌ها مقاوم و نسبتاً مقاوم در نظر گرفته شدند (۲ و ۱۲). مقاومت به نماتد سیستی اولین بار در جو گزارش شد (۳۲) و چهار دهه بعد در گندم نان شناسایی گردید (۳۱). تاکنون ۱۱ ژن مقاوم مختلف به نماتد سیستی غلات با عنوان ژن‌های *Cre* معرفی شده است. اکثر ژن‌های مقاوم به این نماتد، از تلاقی گندم با خویشاوندان وحشی آن به گندم نان منتقل شده‌اند (۷ و۳۳). امروزه توسعه ارقام مقاوم به نماتد سیستی با استفاده از نشانگرهای مولکولی سرعت گرفته است. ویلیام (۴۶) با استفاده از نشانگر RFLP مشخص کرد که ژن‌های Cre در لاین‌های nulli-tetrasomic و ditelosomic روی بازوی بزرگ کروموزم شماره ۲ گندم قرار دارد. اِوان و همکاران (۱۱)، مجموعه ژنی در لوکوس Cre3 مورد بررسی قرار دادند که در بازوی بلند کروموزم D_2 گندم نقشه برداری شدند و به‌عنوان مقاومت به نماتد جدا شدند. بنابر این، Cre3، Cre1 و دیگر ژن‌های مقاومت Cre، در حال حاضر در برنامه انتخاب به کمک نشانگر (MAS) برای شناسایی گندم مقاوم در برابر نماتد سیستی استفاده می‌شود.

نتایج تحقیقات اولیه نشان دهنده خسارت‌زا بودن نماتد مذکور در محصول گندم است. انجام مطالعاتی جهت بررسی واکنش ارقام و لاین‌های مختلف گندم به این گونه از نماتد سیستی غلات و معرفی ارقام مقاوم، می‌تواند زمینه ساز به کارگیری ارقام مقاوم در مناطق آلوده و کاهش خسارت ناشی از این نماتد بوده و شرایط را جهت استفاده از این ارقام، در تحقیقات به‌نژادی و یا مهندسی ژنتیک جهت انتقال ژن‌های مقاوم به ارقام حساس و پرمحصول را فراهم آورد. با توجه به گستردگی زیاد گونه *H. filipjevi*، در مزارع گندم مناطق مختلف در اکثر استان‌ها، شامل: خوزستان، لرستان، گلستان، خراسان، کرمانشاه، فارس، اصفهان و... و هم‌چنین اهمیت نماتدهای سیستی

غلات در کشور، در همین راستا، واکنش ۳۰ رقم گندم آبی مورد کشت در کشور نسبت به گونه غالب نماتد سیستی *H. filipjevi* در شرایط مزرعه و گلخانه مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

بذور ارقام مورد مطالعه از مؤسسه بذر و نهال بخش غلات تهیه و در گلخانه و مزرعه بررسی گردید (جدول ۱).

شناسایی گونه نماتد

جهت شناسایی نماتد سیستی غلات، مزرعه‌ای با سابقه کشت گندم و آلودگی به این نماتد در منطقه کبوترآباد اصفهان انتخاب گردید. پس از جداسازی نماتدهای سیستی از خاک و ریشه گندم، مخروط انتهایی سه سیست از هر نمونه برش داده شد و پس از تهیه اسلاید مناسب، مطالعات ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی روی آن‌ها صورت پذیرفت. لاروهای سن دوم مربوط به هر سیست نیز جداگانه تثبیت و پس از انتقال به گلسیرین خالص، از آن‌ها اسلایدهای میکروسکوپی دایمی تهیه گردید و با استفاده از کلیدهای موجود شناسایی شدند (۱۶). برای شناسایی تکمیلی از روش مولکولی نیز استفاده شد (۴۰).

به منظور شناسایی گونه مورد مطالعه، هر سه گونه نماتد *H. latipons*، *H. avenae* و *H. filipjevi* استخراج DNA شد. جهت استخراج DNA، از کیت Iraizol Old Extraction DNA Kits (شرکت رنا زیست فناوران ایران) استفاده شد. سپس با استفاده از جفت پرایمرهای اختصاصی دو گونه *H. avenae* و *H. filipjevi*: HaITS6-F: (5′-ATGCCCCCGTCT GCTGA-3′) HaITS4-R: (5′-HfITS1-F: (5′- GAGCGTGCTCGTCCAAC-3′) CCCGTCTGCTGTTGAGA-3′)HfITS1-R: (5′-ACCTCAGGCTTTTATTATCAC-3′) واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام گردید (۴۱).

مطالعات گلخانه‌ای

بررسی‌ها، در گلخانه‌های بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی اصفهان انجام گرفت. در مطالعات گلخانه‌ای، از لیوان‌های سترون با حجم ۲۰۰ سی سی، حاوی خاک سترون با ترکیب خاک و ماسه به میزان ۱:۱ در پنج تکرار روی هر رقم و پنج تکرار به عنوان شاهد در قالب طرح کامل تصادفی استفاده شد. دمای گلخانه ۱۸– ۱۶ درجه سانتیگراد و روشنایی ۱۶ ساعت بود. در هر لیوان تنها یک بوته نگه‌داری شد. به منظور تهیه زادمایه نماتد، مزرعه‌ای با سابقه کشت گندم و آلودگی به نماتد سیستی در منطقه کبوترآباد اصفهان انتخاب گردید. سپس، ۱۰ زیرنمونه با حرکت به صورت زیگزاگ برداشت و نمونه‌ها با هم مخلوط و به عنوان یک نمونه کلی در نظر گرفته شد. مقداری از خاک هر نمونه بطور جداگانه در هوای معمولی خشک و با استفاده از روش فنویک (۱۳) و الک ۶۰ مش (۲۵۰ میکرون) شسته و سیست‌های موجود در آن با استفاده از نوارهای کاغذی مخصوص و الک جدا گردید.

جهت تهیه لارو نماتد، سیست‌ها با استفاده از سیست خردکن خرد گردید و به هر یک از گیاهچه‌های سه هفته‌ای گندم تعداد ۱۰۰۰ عدد لاور سن دوم فعال نماتد در دو نوبت مایه‌زنی شد. دو ماه پس از آخرین مایه زنی، تعداد سیست‌های تشکیل شده روی ریشه مورد شمارش قرار گرفتند. سپس، دو هفته بعد سیست‌های قهوه‌ای داخل خاک لیوان‌ها نیز شمارش شدند. از هر نمونه به صورت جداگانه به میزان ۲۰۰ سی‌سی خاک برداشته و سیست‌های آن به روش فنویک استخراج شد. سیست‌ها توسط سیست خردکن خرد شده و تخم و لارو آن‌ها آزاد گردید. پس از آن، حجم سوسپانسیون را به ۲۰۰ میلی‌لیتر رسانده و شمارش جمعیت نهایی لارو و تخم نماتد توسط اسلاید شمارش در گرم خاک هر لیوان در پنج تکرار محاسبه شد (۲۰ و ۳۰).

گروه‌بندی ارقام براساس تعداد سیست قهوه‌ای در ریشه هر گیاه انجام شد: بسیار مقاوم(≤ 3)، مقاوم(<5)، نسبتاً مقاوم (۱۰–۵)، نسبتاً حساس (۱۵–۱۱)، حساس (۲۰–۱۶)، بسیار حساس (<20) (۸، ۹و۱۲). هم‌چنین، به منظور ارتباط بین تعداد سیست، تخم و لارو با استفاده از ضریب همبستگی پیرسون (فرمول زیر) میزان همبستگی آن‌ها محاسبه گردید.

$$r = \frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^{n}(x_i-\bar{x})^2}\sqrt{\sum_{i=1}^{n}(y_i-\bar{y})^2}}$$

در این فرمول r ضریب همبستگی بین متغیرهای x و y است. xi تعداد سیست نماتد در هر نمونه، $\bar{x}$ میانگین جمعیت سیست نماتد، yi میزان جمعیت تخم و لارو نماتد و $\bar{y}$ میانگین جمعیت تخم و لارو نماتد می‌باشد.

مطالعات مزرعه ای

در این بخش از بررسی، از همان مزرعه آلوده استفاده گردید. به منظور تعیین جمعیت اولیه‌ی (Pi) نماتد سیستی گندم در خاک، ابتدا در زمین انتخابی و قبل از اعمال تیمارها، نمونه‌هایی از عمق صفر تا ۳۰ سانتی‌متری جمع آوری و پس از مخلوط کردن آن‌ها، یک نمونه‌ی مرکب دو کیلوگرمی تهیه و به آزمایشگاه منتقل شد. سپس، ۲۰۰ گرم از خاک هر نمونه در هوای معمولی خشک و سیست‌های موجود در آن، با روش فنویک استخراج گردید (۱۳).

جدول ۱- شجره، منشأ، عادت رشدی و واکنش میزبانی ارقام مورد مطالعه به نماتد سیستی *Heterodera filipjevi*

Table 1- Pedigree, origin, growth type and host response of the selected wheat accessions and their response to *Heterodera filipjevi.*

S/N	Name Englis – Persian	Pedigree	Origin	Growth type	Host response
1	Aflak–افلاک	LR/ Son64/4/ Tit/ Son64//Nai60 /3/ 23854 /Tob/ Cno/5/HD160	CIMMYT	Spring	Ms
2	Alvand–الوند	0771FC/5726-72-1	Iran	Facultative	MR
3	Arg–ارگ	Inia/22-66-1	Iran	Spring	HS
4	B.C. Roshan-بک کراس روشن	Hys//Drc*2/7c/3/2*Rsh	Iran	Facultative/Spring	S
5	Bahar–بهار	ICW84-0008-013AP-300L-3AP-300L-OAP	ICARDA	Spring	MR
6	Baharan–بهاران	7-89-WS	CIMMYT	Spring	MS
7	Bam–بم	Vee "s"/Nac //1-66-22	Iran	Facultative	R
8	Berang–بهرنگ	3-NEERG*2/OUZ GNOHZ	CIMMYT	Spring	R
9	Chamran–چمران	YO -M3-YO-MO-Y05-63858MC),alittA	CIMMYT	Spring	MS
10	Chamran –۲چمران 2	Attila 50y//Attila/Bacanora	Iran	Spring	S
11	Dena–دنا	3 Tarro	CIMMYT	Spring	MS
12	Gonbad–گنبد	ATRAK/WANG-SHUI-BAI	Iran	Spring	S
13	Hiedari–حیدری	C-85-3	Iran	Facultative	S
14	Karkhe–کرخه	Shwa/Mald/Aza	ICARDA	Spring	MS
15	Mehregan–مهرگان	ROTSAP*2/3/NCB*4//ZUAKS/SISAO	CIMMYT	Spring	MS
16	Mihan–میهن	Bkt 90-Zhong87	Iran	Winter	S
17	Narin–نارین	85saI/ nadlA//dnavlA/3/22-66-1	Iran	Spring	MS
18	Neishabor–نیشابور	Tob//Cno/Sx /12300/3/31-63-1	Iran	Spring	MS
19	Ofogh–افق	Attila/GF-gy54	Iran	Spring	MS
20	Orom–اروم	Alvand /NS732/Her	Iran	Facultative	MR
21	Parsi–پارسی	Darab*2/"Dove"s"/Buc"s	Iran	Spring	MR
22	Pishgam–پیشگام	BKT/90-Zhong 87	Iran	Facultative	MS
23	Pishtaz–پیشتاز	Alvand//Aldan/Ias58	Iran	Spring	MR
24	Roshan–روشن	BLOUNDANL/3/Bb/7C*2// Y50E/KAL*3	Iran	Facultative/Spring	MS
25	Shabrang–شبرنگ	81-18-WD	CIMMYT	Spring	S
26	Shosh–شوش	XDICOCCOIDE SSTORK/3-CBRD	ICARDA	Spring	MR
27	Sirvan–سیروان	PASTOR*2/PRL	CIMMYT	Spring	MS
28	Sistan–سیستان	"Bank"s"/Vee"s	CIMMYT	Spring	S
29	Sivand–سیوند	Kauz"S"/Azd	Iran	Spring	MS
30	Zare–زارع	Lira/3/Ymh/Tob//Mcd/4/Mo73/F35,70//130L1,11	CIMMYT	Winter	S

کلیه‌ی سیست‌های پر (حاوی تخم و لارو سن دوم) با بررسی زیر استریومیکروسکوپ جدا و پس از خرد کردن آن‌ها با سیست خردکن، جمعیت اولیه‌ی تخم و لارو سن دوم موجود در هر نمونه ۲۰۰ گرم خاک و در نهایت در یک گرم خاک، به طور میانگین ۵/۵ عدد محاسبه شد. جهت بررسی میزان حساسیت و مقاومت ژنوتیپ‌های مختلف گندم به نماتد سیستی، ژنوتیپ‌های مورد نظر در خاک آلوده مزرعه به صورت خطی در نیمه دوم آبان ماه ۱۳۹۴ در قالب طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی در سه تکرار و هر تکرار با چهار خط کشت شدند. زمین مورد آزمون به ۱۲۰ خط تقسیم شد که طول هر خط دو و نیم متر و فاصله هر رقم با رقم بعدی نیم متر بود. رقم بک کراس، به‌عنوان شاهد حساس و رقم سیروان شاهد نسبتاً مقاوم، در مقایسه با سایر ارقام در نظر گرفته شد (۲۱). عملیات برداشت در اردیبهشت ماه ۱۳۹۵ صورت پذیرفت. برای تعیین تعداد سیست شیری، از هر تکرار چندین نمونه ریشه گندم برداشت شد و جهت مشاهده ماده‌های بالغ با

استفاده از استریومیکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفتند (۱ و ۳).

برای ارزیابی ریشه‌های گیاه از هر رقم گندم مورد آزمون، از روش ذیل استفاده گردید:

در شاهد حساس اگر متوسط تعداد سیست کمتر از۴۰ باشد آزمایش حذف می‌شود.

اگر بین ۸۰-۴۰ باشد، کیفیت اجرای آزمایش متوسط و آزمایش ادامه می یابد. گیاهان با تعداد سیست کمتر از ۸-۴ مقاوم.

اگر بیش از ۸۰ تا ۱۰۰ سیست باشد کیفیت اجرای آزمایش خوب وآزمایش ادامه می یابد. گیاهان با تعداد سیست کمتر از ۱۰تا ۱۵ مقاوم.

اگر بیش از ۱۲۰ سیست باشد کیفیت اجرای آزمایش عالی وآزمایش ادامه می یابد. گیاهان با تعداد سیست کمتر از ۲۵ تا ۳۰ مقاوم.

به‌علت ریزش سیست‌های شیری در هنگام جداسازی ریشه از خاک موفق به شمارش آنها نشدیم.

جهت تعیین جمعیت نهایی در اواخر خرداد ماه، مقدار ۲۰۰ گرم از خاک اطراف بوته‌ها برداشته شده و پس از مخلوط کردن به صورت یک نمونه واحد برای هر تکرار به آزمایشگاه منتقل شد. از هر نمونه به صورت جداگانه مقدار ۲۰۰ گرم خاک برداشته و سیست‌های پر آن به روش فنویک استخراج و شمارش شد. سیست‌ها توسط سیست خرد کن خرد شد و تخم و لاروها آن‌ها آزاد گردید. سپس، حجم سوسپانسیون به ۲۰۰ میلی‌لیتر رسید و شمارش تخم و لارو در سه تکرار صورت گرفت. در نهایت جمعیت نهایی لارو و تخم موجود در هر گرم خاک هر نمونه مزرعه محاسبه شد (۱ و ۴).

جهت سهولت و نتیجه قاطع‌تر تغییراتی به شرح ذکر شده در جدول ۲ در آن ایجاد و ارقام ارزیابی گردید. طبق فرمول ارائه شده توسط استنبرینک (۱۹۶۶)؛ یعنی، R= Pf//Pi، محاسبه فاکتور تولیدمثل برای هر یک از تیمارها صورت گرفت. که در آن Pi جمعیت اولیه تخم و لارو سن دوم (Initial population) و Pf جمعیت نهایی (Final population) آن‌ها می‌باشد. درصد کاهش و یا ازدیاد جمعیت نیز، با محاسبه میانگین جمعیت نهایی و اولیه هر تیمار طبق فرمول ذیل محاسبه و بر اساس آن، درصد کاهش و یا افزایش جمعیت نماتد سیستی غلات، در هر تیمار نسبت به جمعیت اولیه‌ی همان تیمار مشخص شد (۶،۱۷ و ۱۹).

$$\text{Corrected (\%)} = 1 - \left[\frac{Ta - Cb}{Tb - Ca}\right] \times 100$$

Ta = تعداد تخم و لارو قبل از اجرای آزمایش; Tb= تعداد تخم و لارو پس از اجرای آزمایش; Ca = تعداد تخم و لارو در شاهد (فاقد تیمار) قبل از اجرای آزمایش; Cb = تعداد تخم و لارو در شاهد (فاقد تیمار) پس از اجرای آزمایش.

جدول ۲- ارزیابی مقاومت بر اساس شاخص تعداد تخم و لارو

Table 2 - Assessment of resistance based on the number of eggs and larvae

number of eggs and larvae per gram soil	Degree of resistant
Resistant مقاوم -	0-5
Moderately resistant- نسبتاً مقاوم	5-10
Tolerance- متحمل	10-25
Moderately susceptible- نسبتاً حساس	25-50
Susceptible- حساس	> 50

تجزیه و تحلیل آماری

برای تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از بررسی‌های گلخانه و مزرعه، ابتدا جهت یکنواخت سازی داده‌ها، با رابطه Asin $\sqrt{x}$ + ۰/۵ تبدیل داده صورت گرفت. سپس، تجزیه واریانس با استفاده از نرم افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه شدند. برای دسته بندی ارقام بر اساس تعداد سیست و تخم و لارو به روش تجزیه خوشه‌ای از نرم افزار SPSS استفاده شد (۳۷).

نتایج

سیست‌های جدا شده براساس شاخص‌های ریخت شناسی و مولکولی، فقط سیست‌های *H. filipjevi* بودند. مشخصات گونه *H. filipjevi* پاتوتیپ اصفهان به شرح ذیل اندازه‌گیری و مشخصات ریخت‌سنجی تعیین شد (شکل ۱).

مشخصات سیست:

طول سیست: (۶۸۰-۴۹۰) ۶۶۰ میکرومتر

عرض سیست: (۴۸۰-۳۳۰) ۴۱۰ میکرومتر

مشخصات مخروط انتهایی (Vulval cone region) :

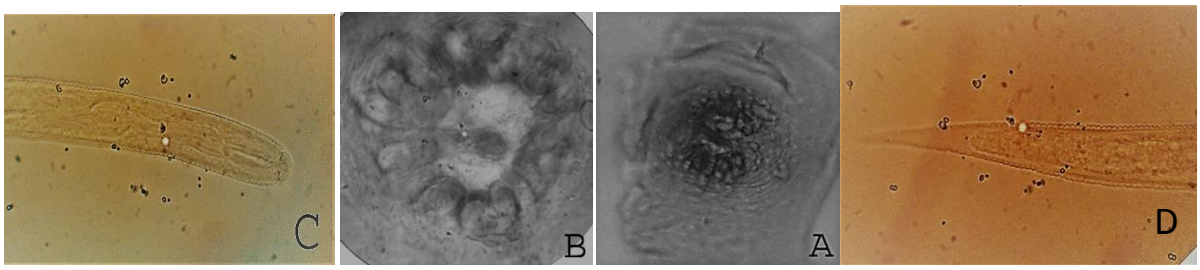
- طول شکاف فرج: (۱۲-۹) ۱۰/۸ میکرومتر
- طول پنجره خروجی لارو: (۵۰-۴۳) ۴۶ میکرومتر
- عرض پنجره خروجی لارو: (۲۶-۲۱) ۲۴ میکرومتر
- ماهیچه‌های نگهدارنده واژن (Under bridge): (۷۸-۷۴)

۷۹/۱ میکرومتر

مشخصات لاروسن دوم (J2):

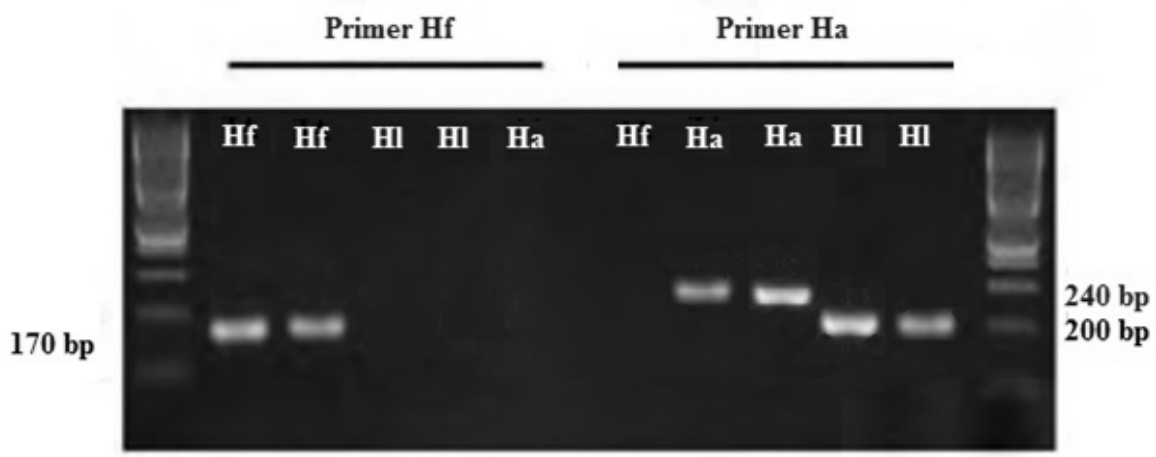
- طول بدن: (۶۰۰-۵۲۰) ۵۶۰ میکرومتر
- طول به عرض(a): (۲۶/۲-۲۳/۵) ۲۴ میکرومتر
- طول بدن به طول مری تا محل اتصال به روده(b): (۵/۸-۳/۲) ۴/۴ میکرومتر
- طول بدن به طول کل مری (Overlap) (b´): (۴/۷-۳/۵) ۳/۶ میکرومتر
- طول اتصالات: (۲۵-۲۳) ۲۳/۹ میکرومتر
- طول دم: (۵۸-۴۹) ۵۱ میکرومتر
- طول بخش شفاف انتهای دم: (۳۶-۳۰) ۳۴/۲ میکرومتر

نتایج حاصل از PCR با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی، قطعه ۱۷۰ جفت بازی برای نماتد *H. filipjevi* و قطعه ۲۴۰ جفت بازی برای نماتد *H. avenae* تولید نمود. گونه *H. latipons* با پرایمر اختصاصی *H. filipjevi* هیچ باندی نداد اما با پرایمر اختصاصی *H. avenae* باندی در حدود ۲۰۰ جفت باز تولید کرد (شکل ۲).



شکل ۱- A . پنجره خروجی لارو B. ماهیچه‌های نگهدارنده واژن مخروط انتهایی *Heterodera filipjevi*، C . سر و ناحیه مری لارو سن دوم D. ناحیه دم لارو سن دوم

Fig 1- A. Vulval cone region, B. underbridge Vulval cone region of *Heterodera filipjevi,* C. Tail in second juveniles, D. head and Esophagus in second juveniles



شکل ۲ - باند حاصل از الکتروفورز واکنش زنجیره‌ای با استفاده از پرایمرهای اختصاصی دو گونه *Heterodera filipjevi* و *H.avenae*

Ha: *H.avenae*, Hf: *H. filipjevi*, Hl: *H. latipons*

Fig 2- specific-specific PCR in *Heterodera filipjevi* & *H.avenae*

واکنش ارقام

نتایج حاصله، نشان داد که در بین ارقام مورد آزمون در دو شرایط مزرعه و گلخانه اختلاف معنی‌دار وجود دارد ($P < 0.01$). تجزیه خوشه‌ای، ارقام مورد آزمون را نسبت به نماتد سیستی غلات، در رابطه با صفت مورد بررسی، به سه دسته متفاوت گروه بندی نمود که با نتایج آزمون دانکن نیز تشابه نزدیکی داشت.

نتایج گلخانه

نتایج گلخانه روی تعداد سیست رقم‌های مختلف، نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین آن‌ها وجود دارد (جدول ۳) ($P < 0.01$). در این

خصوص ارقام ارگ و شبرنگ با بیشترین تعداد سیست قهوه‌ای یعنی ۲۹/۲۵ عدد در ۲۰۰ سی‌سی خاک در راس قرار گرفته‌اند و نسبت به سایر رقم‌ها اثر معنی‌داری نشان دادند (جدول ۵) ($P < 0.01$). سپس، رقم بک کراس روشن با میانگین ۲۸/۵ عدد سیست در ۲۰۰ سی‌سی خاک در گروه آماری دیگر قرار گرفت. هم‌چنین، رقم بهرنگ با میانگین ۱۵ عدد سیست در ۲۰۰ سی‌سی خاک، کمترین تعداد سیست را داشت.

نتایج حاصل از گلخانه نشان داد که بیشترین تعداد تخم، لارو و فاکتور تولیدمثل مربوط به رقم سیوند با ۱۴/۶۸ و ۲/۹۴ در گرم خاک بود. سپس، رقم کرخه با ۷/۹۴ و ۱/۵۹ تخم و لارو در گرم خاک در گروه آماری بعدی قرار گرفت.

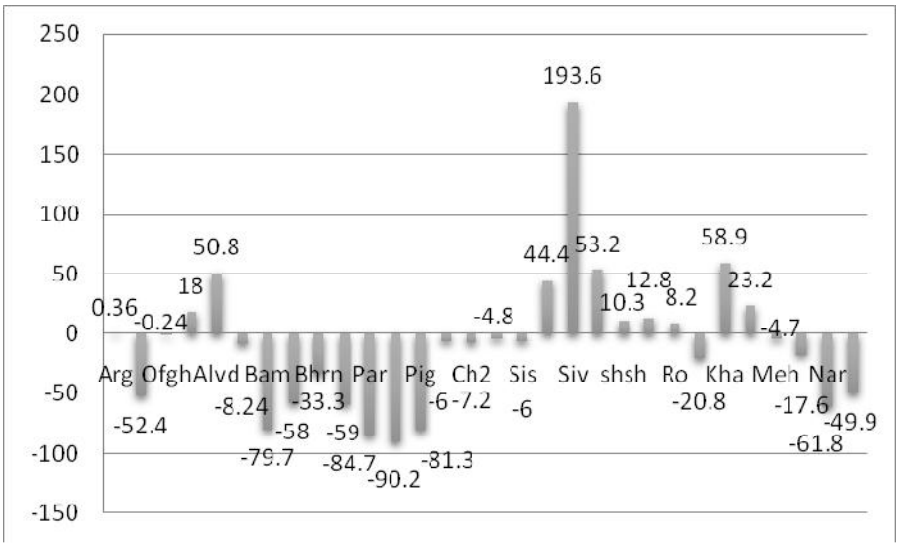
جدول ۳- تجزیه واریانس تعداد سیست، تخم و لارو و فاکتور تولیدمثل نماتد *H. filipjevi* روی ارقام گندم در شرایط گلخانه

Table 3 - Variance analysis of number of cyst, egg and larvae and reproduction factor in *H. filipjevi* nematode on wheat cultivars in greenhouse conditions

Source of cultivars	DF	Cyst	Egg and larvae	Reproduction factor
Repeat	4	1.33	0.06	0.002
Treat	29	3910**	1170.97**	46.84**
Error	116	122.67	3.09	0.12
Total	149	4034	1174.12	46.96
CV		7.04	3.57	3.57

ns و * *: به ترتیب غیر معنی دار و معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

ns and * *; non – significant and significant at 1% probability level, respectively

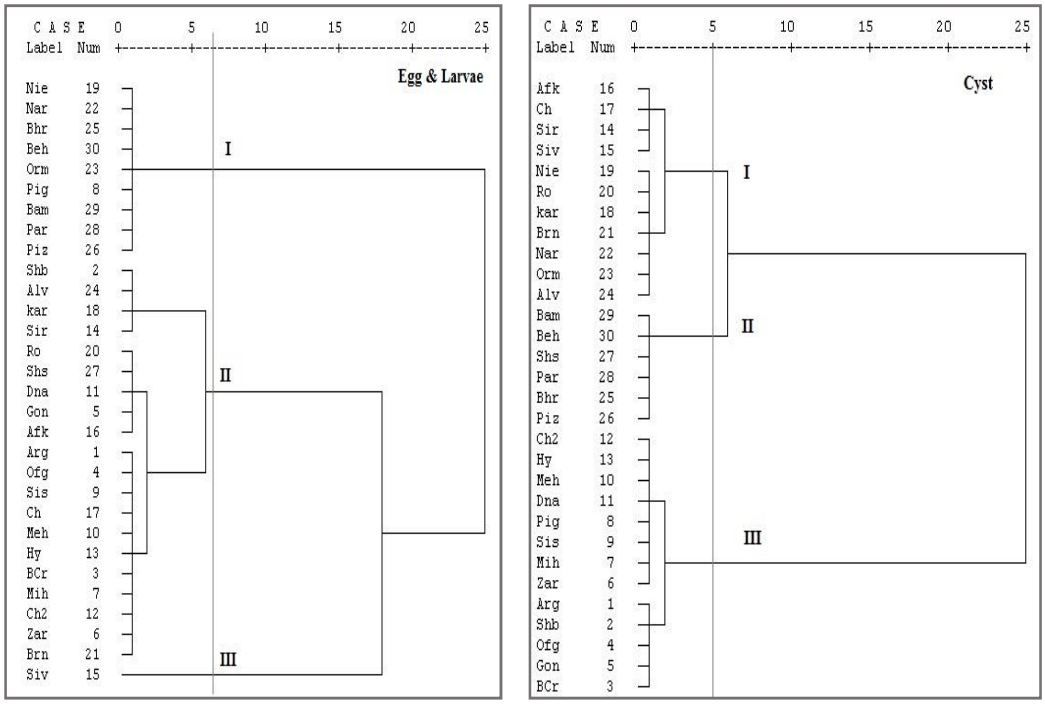


شکل ۳- درصد کاهش یا افزایش جمعیت نماتد روی ارقام در شرایط گلخانه.

(۱. ارگ، ۲. اروم، ۳. افق، ۴. افلاک، ۵. الوند، ۶. بک کراس روشن، ۷. بم، ۸. بهار، ۹. بهاران، ۱۰. بهرنگ، ۱۱. پارسی، ۱۲. پیشتاز، ۱۳. پیشگام، ۱۴. چمران، ۱۵. چمران۲، ۱۶. حیدری، ۱۷. سیستان، ۱۸. سیروان، ۱۹. سیوند، ۲۰. شبرنگ، ۲۱. شوش، ۲۲. دنا، ۲۳. روشن، ۲۴. زارع، ۲۵. کرخه، ۲۶. گنبد، ۲۷. مهرگان، ۲۸. میهن، ۲۹. نارین، ۳۰. نیشابور)

Fig 3- Percentage increase or decrease of nematode population in green house conditions.

(Arg, 2. Orom, 3. Ofogh, 4. Aflak, 5. Alvand, 6. Back Cross Roshan, 7. Bam, 8. Bahar, 9. Baharan, 10. Behrang, 11. Parsi, 12. Pishtaz, 13. Pishgam, 14. Chamran, 15. Chamran II, 16. Hiedari, 17. Sistan, 18. Sirvan, 19. Sivand, 20. Shabrang, 21. Shosh, 22. Dena, 23. Roshan, 24. Zare, 25. Karkhe, 26. Gonbad, 27. Mehregan, 28. Mihan, 29. Narin, 30. Neishabor)



شکل ٤ - خوشه بندی ارقام مقاوم و حساس گندم به نماتد *H.filipjevi* براساس میانگین سیست و تخم ولارو در شرایط گلخانه (نام ارقام در زیر نویس شکل ۳ ارائه شده است)

Fig 4 - Clustering of resistant and susceptible varieties of wheat to *H.filipjevi* based on average of cyst and eggs and larvae in the greenhouse (Cultivars name are presented in Subtitles fig 3)

جدول ٦- همبستگی صفات مورد بررسی واکنش ژنوتیپ‌های گندم به نماتد سیستی در شرایط گلخانه

Table 6 - Correlation between traits of wheat cultivars to cyst nematode in greenhouse conditions

Traits	Cultivars	Cyst	Egg & larvae	Reproductive factor
Cultivars	1.00			
Cyst	1.00	1.00		
Egg & larvae	1.00	0.37*	1.00	
Reproductive factor	1.00	0.37*	0.99	1.00

ns و *: به ترتیب غیر معنی دار و معنی‌دار در سطح احتمال پنج در صد

ns and *; non – significant and significant at 5% probability level, respectively

همچنین، کمترین میزان تخم، لارو و فاکتور تولید مثل مربوط به رقم پیشتاز با ۰/۴۹ و ۰/۱ در گرم خاک بود. سپس، به ترتیب ارقام پارسی با ۰/۷۶ و ۰/۱۵ و رقم پیشگام با ۰/۹۳ و ۰/۱۹ در گرم خاک در گروه آماری بعد قرار گرفتند (جداول ۳ و ۵) ($P < 0.01$). بیشترین درصد افزایش جمعیت نماتد مربوط به رقم سیوند و بیشترین درصد کاهش نیز مربوط به رقم پیشتاز بود (شکل ۳).

تجزیه‌ی خوشه‌ای نتایج گلخانه، ارقام گندم مربوطه را به سه گروه متمایز بر حسب شدت آلودگی به نماتد سیستی غلات تقسیم نمود (شکل ۴). ضریب همبستگی بین تعداد سیست، تخم و لارو در گلخانه معادل ۰/۳۷ بود که نشان دهنده رابطه مستقیم و ضعیف بین این دو فاکتور می‌باشد (جدول ۶).

نتایج مزرعه

جمعیت اولیه نماتد در مزرعه قبل از اجرای آزمایش با میانگین ۱۰۰ عدد سیست در ۲۰۰ سی‌سی خاک و ۵/۵ عدد تخم و لارو سن دوم در گرم خاک برآورد گردید. داده‌های مزرعه در خصوص میانگین تعداد سیست روی ارقام نشان داد که تفاوت معنی‌داری در بین ارقام وجود دارد (جدول ۴) ($P < 0.01$). در این خصوص، رقم ارگ با بیشترین تعداد سیست در ۲۰۰ گرم خاک یعنی ۳۷۸ عدد در راس قرار گرفت که در یک گروه مجزا و با اثر معنی‌دار واقع شد. سپس، رقم میهن با ۳۱۶ عدد درگروه بعدی قرار گرفت. همچنین، رقم بم با ۱۱۳/۳۳ کمترین تعداد سیست را داشت و پس از آن رقم بهرنگ با میانگین ۱۲۰/۳۳ عدد بود.

در این ارزیابی از لحاظ تعداد تخم، لارو و فاکتور تولیدمثل، رقم

سیوند با بیشترین مقدار تخم، لارو و فاکتور تولیدمثل؛ یعنی ۱۴/۶۸ و ۲/۸۶ در گرم خاک، در راس قرار گرفت. سپس، رقم سیروان با ۷/۲۲ و ۱/۴۱ تخم، لارو و فاکتور تولیدمثل در ردیف بعدی قرار گرفت. رقم پارسی با ۰/۶۹ و ۰/۱۳ کمترین تعداد تخم، لارو و فاکتور تولیدمثل را در این بررسی‌ها داشت (جداول ۴ و ۵)($P < 0.01$). بیشترین درصد افزایش جمعیت نماتد در مزرعه هم مربوط به رقم سیوند و کمترین درصد مربوط به رقم پارسی بود (شکل ۵). در تجزیه خوشه‌ای، ارقام در سه گروه مقاوم، متحمل و حساس قرار گرفتند (شکل ۶). میزان همبستگی بین تعداد سیست، تخم و لارو در مزرعه معادل ۰/۲۲ بود که حاکی از رابطه ضعیف این دو فاکتور با یکدیگر می‌باشد (جدول ۷).

بحث

نتایج بدست آمده در خصوص شناسایی گونه نماتد سیست مربوطه از طریق روش‌های ریخت‌شناسی و مطالعات مولکولی با نتایج توالی‌یابی سیست دو گونه *H. avenae* و *H. filipjevi* با استفاده از واکنش اختصاصی- اختصاصی PCR، RFLP، توسط اسمیلی و یان (۴۱) مطابقت داشت. براساس نتایج به دست آمده این پژوهش، نماتد سیستی در استان اصفهان *H. filipjevi* تشخیص داده شد. در مطالعات قبلی *H. filipjevi* به عنوان تنها گونه نماتد سیستی غلات در استان گزارش شده است (۱۰، ۲۱، ۲۳ و ۴۳).

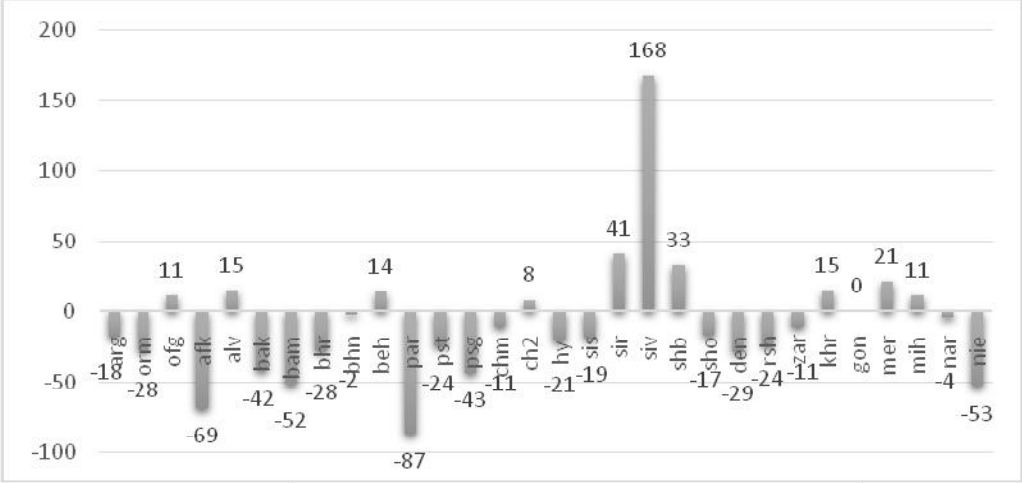
جدول٤- تجزیه واریانس تعداد سیست، تخم و لارو و فاکتور تولیدمثل نماتد *H.filipjevi* روی ارقام گندم در شرایط مزرعه

Table 4 - Variance analysis of number of cyst, egg and larvae and reproduction factor in *H. filipjevi* nematode on wheat cultivars in field

Source of cultivars	DF	Cyst	Egg and larvae	Reproduction factor
Repeat	2	444.68	0.04	0.001
Treat	29	379313.79**	516.9**	17.09**
Error	58	16880.64	3.7	0.12
Total	89	396639.12	520.64	17.21
CV		7.39	4.99	4.99

ns و ** *: به ترتیب غیر معنی دار و معنی‌دار در سطح احتمال یک در صد.

ns and * *; non – significant and significant at 1% probability level, respectively



شکل ۵ - درصد کاهش یا افزایش جمعیت نماتد روی ارقام در شرایط مزرعه
(نام ارقام در زیر نویس شکل ۳ ارائه شده است).

Fig 5- Percentage increase or decrease of nematode population in field conditions.
(Cultivars name are presented in Subtitles fig 3)

جدول ۵- میانگین تعداد سیست، تخم و لارو و فاکتور تولید مثل نماتد *H. filipjevi* روی ارقام در شرایط مزرعه و گلخانه

Table 5 - Mean number of cysts, eggs and larvae and reproductive factor *H. filipjevi* on wheat cultivar under greenhouse and field conditions

S/N	Cultivars name	Number of brown cyst (in 200 cc soil)		Number of egg and larvae (per gram of soil)		Reproductive factor	
	English – Persian	greenhouse	field	greenhouse	field	greenhouse	field
1	Arg–ارگ	29.25 ±0.38 a	378 ±8.08 a	5.02 ±0.07 h	4.54±0.23 hi	1±0.01 h	0.82± 0 hi
2	Shabrang–شبرنگ	29.25± 0.97 a	289.33± 5.9 e	7.66± 0.07c	7.31± 0.26 c	1.53±0.01 c	1.33± 0.05 c
3	Bak crass roshan– بک کراس روشن	28.5±0.52 b	275± 7.55 ef	4.59 ±0.12 j	3.21± 0.13 k	0.92±0.02 j	0.58± 0.02 k
4	Ofogh–افق	27.75 ± 0.71 c	262± 15.56 fgh	4.99 ± 0.06 hi	6.12±0.02 e	0.1±0.01 j	1.11± 0 e
5	Gonbad–گنبد	27.75± 0.4 c	312.33± 7.22 c	6.16± 0.02 e	5.53± 0.14 f	1.23±0 e	1± 0.02 f
6	Zare–زارع	27 ± 0.37 c	300.67± 6.64 d	3.96± 0.08 k	4.91± 0.05 gh	0.79±0.01 k	0.89± 0.01 gh
7	Mihan–میهن	26.5± 0.51 d	316± 6.11 b	4.12± 0.05 k	6.09± 0.12 e	0.82±0.01 k	1.11± 0.02 e
8	Pishgam–پیشگام	26.25± 0.37d	255.67± 3.76 gh	0.93±0.08 o	3.15±0.07 k	0.19±0.01 o	0.57± 0.01 k
9	Sistan–سیستان	26.25± 0.33d	281± 11.06 ef	4.7±0.05 ij	4.49± 0.06 hi	0.94±0.01 ij	0.81± 0.01 hi
10	Mehregan–مهرگان	26± 0.28 d	266.67± 15.49 fg	4.76± 0.04 hij	6.69± 0.23 d	0.95±0 k	1.21± 0.04 d
11	Dena–دنا	25.75± 0.51e	266.67± 14.44 fg	5.64± 0.07 fg	3.93± 0.09 j	1.13±0.01 fg	0.71± 0.02 j
12	Chamran 2– چمران ۲	25.5± 0.50 e	303.33± 5.54 d	4.12± 0.05 k	6.09± 0.12 e	0.82±0.01 k	1.11± 0.02 e
13	Hiedari–حیدری	25.25± 0.49 e	290.33± 4.91 e	4.76± 0.05 hij	4.33± 0.16 ij	0.95±0.01 hij	0.79± 0.03 ij
14	Sirvan–سیروان	23.75± 0.6 f	210± 2.89 l	7.22± 0.11 d	7.74± 0.06 b	1.44±0.02 d	1.41± 0.01 d
15	Sivand–سیوند	23.5± 0.55 f	242± 7.02 hi	14.68± 0.1 a	14.72± 0.18 a	2.94±0.02 a	2.68± 0.03 a
16	Aflak–افلاک	22.5 ± 0.51 g	220.33± 12.98 kl	5.9 ± 0.05 ef	1.69± 0.12 m	1.18±0 ef	0.31± 0.02 m
17	Chamran–چمران	22.25± 0.24 g	197.33±8.68 m	4.7± 0.04 ij	4.87± 0.14 gh	0.94±0 ij	0.89± 0.02 gh
18	Karkhe–کرخه	21± 0.29 h	234± 15.01 ij	7.94± 0.05 b	6.34± 0.2 de	1.59±0.01 b	1.15± 0.04 de
19	Neishabor–نیشابور	20.75± 0.50 i	227.67± 4.65 jk	1.91± 0.03 n	5.28± 0.19 fg	0.38±0 n	0.96± 0.03 fg
20	Roshan–روشن	20.5 ± 0.4 i	221.67± 2.73 kl	5.41± 0.1 g	4.17± 0.11 ij	1.08±0.02 i	0.76± 0.02 ij
21	Baharan–بهاران	20.25± 0.24 i	199± 7.77 m	3.34± 0.1 l	5.39± 0.18 f	0.67±0.02 l	0.98± 0.03 f
22	Narin–نارین	20± 0.37 i	227.67± 4.65 jk	1.91± 0.03 n	5.28± 0.19 fg	0.38±0 n	0.96± 0.03 fg
23	Orom–اروم	19.75 ±0.31 j	169.33± 14.14 n	2.38 ±0.04 m	3.96± 0.14 j	0.48±0 m	0.72± 0.02 j
24	Alvand–الوند	19.25± 0.27 j	165.33±5.49 no	7.54±0.13 c	6.32±0.12 de	1.51±0.02 c	1.15± 0.02 de
25	Bahar–بهار	17 ± 0.52 k	136.67± 5.96 op	2.1± 0.03 n	3.96± 0.16 j	0.42±0 n	0.72± 0.02 j
26	Pishtaz–پیشتاز	16.75 ± 0.4 l	146.67± 3.44 o	0.49± 0.03 p	4.21± 0.06 ij	0.1±0 p	0.76± 0.01 ij
27	Shosh–شوش	16.5±0.24 l	174± 6 n	5.51± 0.09 g	4.57± 0.14 hi	1.1±0.02 g	0.83± 0.03 hi
28	Parsi–پارسی	16.25± 0.85 l	137.67± 6.23 op	0.76± 0.04 o	0.69± 0.11 n	0.15±0 o	0.13± 0.02 n
29	Bam–بم	15.25± 0.46 m	113.33± 5.24 q	1.01± 0.03 o	2.63± 0.17 l	0.2±0 o	0.48± 0.03 l
30	Berang–بهرنگ	15± 0.44 m	120.33± 10.17 pq	2.05±0.02 n	6.26± 0.07 de	0.41±0 n	1.14± 0.01 de
	Means± SE	22.71± 0.45	231.33± 7.84	4.58±0.23	5.32± 0.13	0.92± 0.04	0.93± 0.02

میانگین‌هایی که دارای یک حرف مشترک هستند تفاوتی با یکدیگر ندارند. Means fallowed by similar letters are not significantly different at 1% probability.

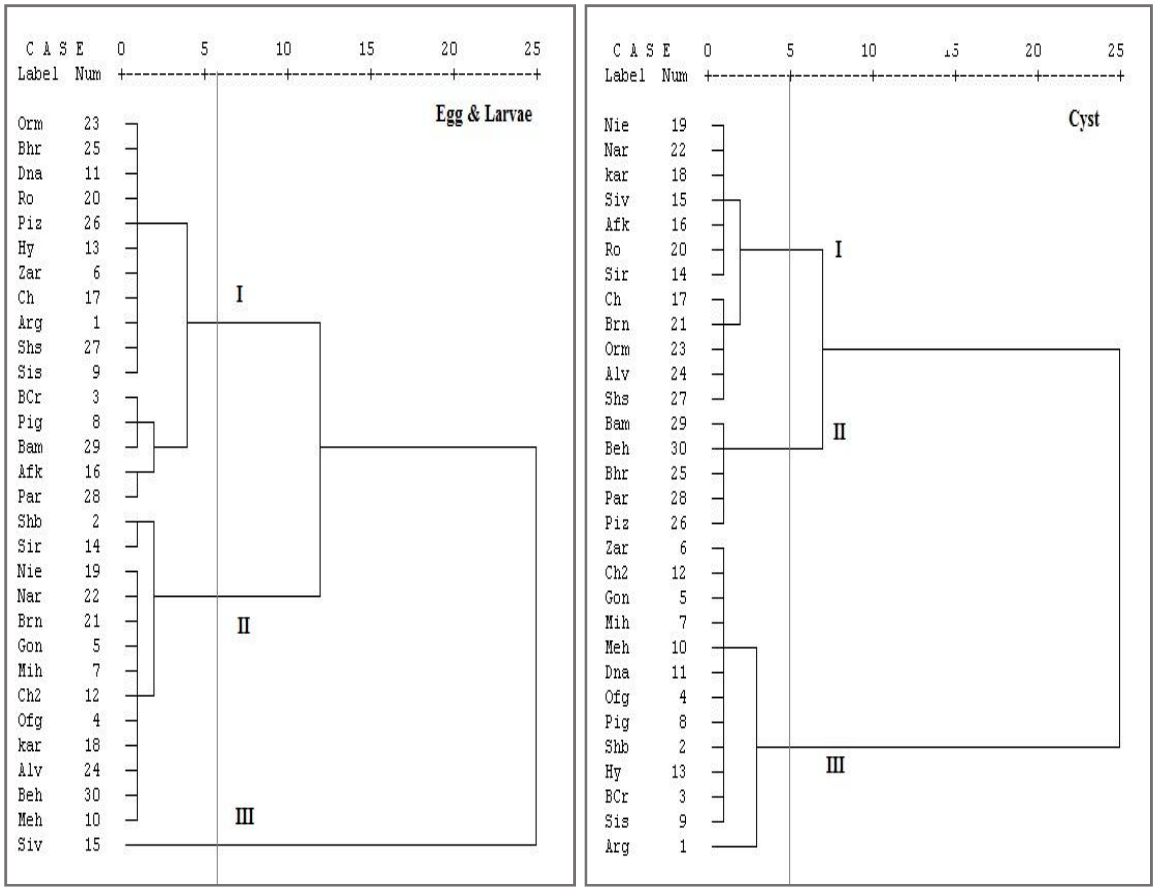
جدول ۷- همبستگی صفات مورد بررسی واکنش ژنوتیپ‌های گندم به نماتد سیستی در مزرعه

Table 7- Correlation between traits of wheat cultivars to nematode in field

Traits	Cultivars	Cyst	Egg & larvae	Reproductive factor
Cultivars	1.00			
Cyst	1.00	1.00		
Egg & larvae	1.00	0.22*	1.00	
Reproductive factor	1.00	0.22*	1.00	1.00

ns و *: به ترتیب غیر معنی دار و معنی‌دار در سطح احتمال پنج در صد

ns and *; non – significant and significant at 5% probability level, respectively



شکل ٦ - خوشه بندی ژنوتیپ‌های مقاوم و حساس گندم به نماتد *H.filipjevi* براساس میانگین سیست و تخم ولارو در شرایط مزرعه (نام ارقام در زیر نویس شکل ۳ ارائه شده است).

Fig 6- Clustering of resistant and susceptible varieties of wheat to *H.filipjevi* based on average of cyst and eggs and larvae in the field (Cultivars name are presented in Subtitles fig 3)

بررسی‌های انجام شده در خصوص مقاومت ارقام گندم مورد آزمون در این آزمایشات، نشان داد که ارقام مربوطه از واکنش قابل توجه و متفاوتی نسبت به یکدیگر برخوردار بوده‌اند. همانطور که مشاهده گردید این تفاوت‌ها در جداول مربوط به بررسی تعداد سیست، تخم، لارو و فاکتور تولید مثل به وضوح مشهود است. بررسی تعداد سیست در این آزمایش‌ها روی ارقام گندم مورد آزمون نتایج متفاوتی نشان داد و آن‌ها را برحسب تعداد سیست تفکیک و متمایز نمود.

در خصوص تعداد سیست نماتد سیستی غلات (CCN) در مزرعه مشخص گردید که تفاوت بین کمترین و بیشترین تعداد سیست روی ارقام موجود حدود سه برابر بوده که در این‌جا به ترتیب رقم ارگ و بم می‌باشد. سایر ارقام نیز با اختلاف قابل توجه و متمایز از یکدیگر در خصوص تعداد سیست تولیدی، متفاوت بوده‌اند که این واکنش نشان دهنده‌ی تفاوت ژنتیکی ارقام مورد بررسی در این تحقیق نسبت به نماتد سیستی غلات (CCN) است. در این رابطه، دبابت و همکاران (۹) جهت بررسی و دست‌یابی به ارقام مقاوم، بررسی‌هایی روی ۴۲ لاین گندم بهاره انجام داده‌اند که مشخص گردید ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از واکنش‌های متفاوتی برخوردار بوده‌اند. به طوری که در این بین، پنج لاین از آن‌ها، مقاوم به نماتد *H. filipjevi* بوده و تعداد ۹ لاین نیز مقاومت نسبی نشان داده اند.

در بررسی دیگری توسط توکتای و همکاران (۴۵) نیز کماکان به این نتایج دست یافته‌اند. آن‌ها مشخص نمودند که در بین لاین‌ها، بعضاً تعداد محدودی با میانگین ۴۳ عدد سیست، آن ژنوتیپ مقاوم‌ترین لاین به نماتد سیستی غلات (CCN) می‌باشد. در این بررسی‌ها، مبنای تعیین مقاومت ژنوتیپ‌ها به نماتد سیستی غلات *H. filipjevi* در شرایط مزرعه، با استفاده از روش توکتای و همکاران و هم چنین، با اصلاحاتی توسط دبابت استفاده شده است که مبنای ارزیابی تعداد سیست بوده است که در اینجا هم‌خوانی و هماهنگی داشته است.

ولی، آیا، شمارش تعداد سیست می تواند ملاک قطعی در تفکیک ژنوتیپ ها باشد؟ نتایج این تحقیق نشان داد که رابطه‌ی چندان

مستقیمی در این راستا وجود ندارد. چرا که، نتایج تفکیکی گلخانه و مزرعه به طور جداگانه نشان داد که رقم ارگ به ترتیب با ۲۹/۲۵ و ۳۷۸ عدد در این آزمایش بیشترین تعداد سیست را در ۲۰۰ گرم خاک داشته در صورتی که از نظر تعداد تخم و لارو رقم سیوند با میانگین ۱۴/۷ عدد در گرم خاک بیشترین بوده است. هم‌چنین، ضریب همبستگی تعداد سیست و تخم و لارو در مزرعه ۰/۲۲ و در گلخانه ۰/۳۷ بود که رابطه ضعیفی را نشان می‌دهد. لذا، با توجه به اهمیت این موضوع که ممکن است تعداد تخم و لارو بر حسب تراکنش بین ژنوتیپ‌های مورد آزمون گندم و نماتد سیستی غلات (CCN)، تولید نسل را تحت تأثیر قرار دهد، بررسی تعداد تخم و لارو نیز در این تحقیق صورت پذیرفت تا به عنوان یک فاکتور تکمیلی، برای مشخص نمودن وجه تمایز ارقام مد نظر قرار داده شود. در این‌جا، همان گونه که مشخص گردید، تعداد تخم و لارو در گرم خاک در رقم بم (با کمترین میزان سیست) با ۱/۰۱ عدد و پس از آن رقم بهرنگ با ۲/۰۵ عدد و هم‌چنین، رقم پارسی و بهار به ترتیب با ۰/۷۶ و ۲/۱ عدد حدود سه برابر و یا بیشتر تفاوت در تخم و لارو مشاهده می‌گردد. یعنی این‌که بین تعداد سیست با تعداد تخم و لارو هم خوانی و رابطه ی مستقیمی مشاهده نمی‌گردد. در واقع، رقم بم با ۱۱۳/۳۳ سیست، دارای میانگین ۲/۶۳ عدد تخم و لارو در گرم خاک بوده، در صورتی که رقم سیوند با ۲۴۲ عدد سیست دارای ۱۴/۷۲ عدد تخم و لارو در گرم خاک بوده است که بیشترین تخم و لارو را دارا می‌باشد. کمترین میزان تخم و لارو در گرم خاک نیز متعلق به رقم پارسی با تعداد ۰/۶۹ عدد بوده است و یا در رقم بهرنگ تعداد سیست ۱۱۲۰/۳۳ عدد و تعداد تخم و لارو ۶/۲۶ عدد در گرم خاک می‌باشد.

لذا، این‌طور به نظر می‌رسد که در خصوص بررسی مقاومت به نماتد سیستی گندم، شمارش تعداد تخم و لارو سن دوم را نیز باید در نظر داشت. چرا که مکانیزم‌های بیماری‌زایی و توسعه‌ی نماتد و تکثیر آن، نقش اساسی و مهمی در روند رشدی گیاه در بر خواهد داشت. هم‌چنین، به نظر می‌رسد که فاکتور تولیدمثل که در واقع همان تعداد تخم و لارو تولیدی در سیست‌های ایجاد شده روی ارقام بوده‌اند، نیز مهم می‌باشند. بنابراین، به نظر می‌رسد که علاوه بر تعداد سیست تولیدی روی ریشه و محور آن که حائز اهمیت است، بایستی تعداد تخم و لارو را نیز در نظر گرفت. چرا که واکنش‌های گیاه و نماتد می‌تواند در ایجاد سیست و باروری آن نقش اساسی ایفا نماید و اثر به سزایی در کاهش و یا ازدیاد جمعیت نماتد در نسل‌های بعدی داشته باشد. این نتایج با نتایج عباسی و همکاران (۱) در این‌که تعداد سیست و تخم و لارو نماتد را در ارزیابی ارقام مقاوم ملاک قرار دادند مطابقت دارد. آن‌ها براین اساس ژنوتیپ‌های گندم مورد بررسی را در چهار گروه: مقاوم، نسبتاً مقاوم، نسبتاً حساس و حساس گروه‌بندی، جمع‌بندی و نتیجه‌گیری کرده‌اند و ژنوتیپ‌های M-90-7 را با کمترین تعداد سیست و رقم پارسی با کمترین تعداد تخم و لارو معرفی نمودند. در بررسی‌های انجام شده توسط دبابت و همکاران، اسمیلی و همکاران و فاتح، روی ژنوتیپ‌های گندم، ملاک اصلی ارزیابی برای تعیین مقاومت، تعداد سیست شیری در هر گیاه بوده است (۹، ۱۲ و ۳۹).

در بررسی‌هایی که در اصفهان روی سه رقم پارسی، الوند و بک کراس روشن انجام شد، مشخص گردید که به طور میانگین ۲۲ درصد کاهش محصول گندم می‌باشد که در مزارع تحقیقاتی ایستگاه کبوترآباد اصفهان مطالعات آن در سال ۱۳۹۲ انجام گردید (۲۴). هم‌چنین، مشخص گردید که در بین ارقام اختلاف قابل توجهی در واکنش به این نماتد مهلک وجود دارد که یک موضوع امیدوار کننده‌ای برای دست‌یابی به ارقام و یا لاین‌ها و ژنوتیپ‌های مقاوم می‌باشد (۱). ۳۸ درصد از مزارع گندم و جو بررسی شده در استان خوزستان با متوسط جمعیت ۲۸۰ تخم و لارو در ۱۰۰ گرم خاک به نماتد سیستی غلات آلوده می‌باشند. میزان خسارت نماتد سیستی غلات گونه *H. filipjevi* با جمعیت ۹ تخم و لارو در گرم خاک بر روی گندم رقم چمران در رامشیر ۵۲ درصد و گونه *H. avenae* با جمعیت ۶۲ تخم و لارو در گرم خاک بر روی گندم رقم چمران در بهبهان ۱۱ درصد تعیین گردیده است. سیست‌های نماتد موجود در خاک مورد حمله عوامل مختلفی قرار می‌گیرند که در بین آن‌ها قارچ‌ها از جایگاه ویژه‌ای برخوردار هستند (۳ و ۴۲). در یک جمع‌بندی از نتایج این مطالعات مشخص گردید که هم اکنون نماتد سیستی غلات، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است چرا که وضعیت تعداد سیست و تعداد تخم و لارو نشان داد که نماتد مربوطه وجود داشته و از جمعیت بالایی نیز برخوردار می‌باشد (۱، ۳ و ۲۴).

با توجه به اینکه انتقال ژن یا ژن های مقاوم در ارقام و ژنوتیپ‌های مختلف گندم باعث افزایش وسعت ژنتیکی و مقاومت به این نماتد می‌گردد، لذا به نظر می‌رسد ارزیابی اولیه به منظور دستیابی به ژنوتیپ‌های جدید اصلاحی الزامی است که از لحاظ مقاومت به نماتد و صفات زراعی دارای برتری باشند (۱۸ و ۲۷). در حال حاضر استفاده از ارقام مقاوم و متحمل گندم نسبت به نماتد سیستی غلات مهم‌ترین روش مقابله با آن در دنیا می‌باشد که در بسیاری از کشورهای اروپایی؛ مانند انگلستان، دانمارک، فرانسه، سوئد و استرالیا، در سطح وسیع به کار می‌رود (۲۹ و۳۶). بنابراین، شناسایی و تشخیص ژن مقاوم در ارقام مورد مطالعه، راه را برای تولید گیاهان تراریخته فراهم می‌سازد که بتوان آن‌ها را به ارقام تجاری، ولی حساس منتقل نمود و ژنوتیپ‌های مقاوم به نماتد و مناسب شرایط آب و هوایی کشور را فراهم ساخت.

نهایتاً آنچه در این تحقیق می‌توان جمع‌بندی و به آن اشاره کرد دستیابی به ارقامی است که به نماتد سیستی *H. filipjevi* مقاومت نشان دادند. از این ارقام مقاوم می‌توان در برنامه مدیریت نماتد سیستی غلات و ردیابی و انتقال ژن‌های مقاومت به ارقام زراعی

مطلوب استفاده نمود.

بدین وسیله از بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی اصفهان به خاطر همکاری در این تحقیق تقدیر و تشکر می‌گردد.

تشکر و قدرانی

منابع

1- Abbassi N., Nasr Esfahani M., and Mossavi M. R. 2015. Genetical diversity for resistant in promising wheat lines to *Heteroder filipjevi*. 11th International Nematologists Symposium RSN. Russia, Cheboksary, pp: 6-10.
2- Abidou H., El-Ahmad A., Nicol J. M., Bolat N., Rivoal R., and Yahyaoui A. 2005. Occurrence and distribution of species of the *Heterodera avenae* group in Syria and Turkey. Nematologia Mediterranea, 33: 195-201.
3- Ahmadi A. R., and Tanha Maafi Z. 2014. Incidence of cereal cyst nematodes (*Heterodera avenae* type B and *H. filipjevi*) in southwestern Iran. Journal of Crop Protection 3(1): 75-88.
4- Ahmadi A. R., Tanha Maafi Z., and Abeyat T. 2013. Reaction of some wheat, barley and triticale cultivars to cereal cyst nematode, *Heterodera filipjevi* under field conditions in Khuzestan province. Plant Protection Journal (Islamic Azad University, Shiraz Branch), 6(2): 123-132.
5- Amini M. 2015. The importance of wheat, bread and pasta in nutrition. Iran. 158p.
6- Boopathi T., Karuppuchamy P., Singh S. B., Kalyanasundaram M., Mohankumar S., and Ravi M. 2015. Microbial control of the invasive spiraling whitefly on cassava with entomopathogenic fungi. Brazilian Journal of Microbiology 46 (4): 1077-1085.
7- Cui J. K., Peng D. L., Huang W. K., Peng H., Dababat A. A., Erginbas-Orakci G., He W. T., Kong L. A., Ting L., and Wu Q.S. 2015. Resistance identification of different wheat varieties from CIMMYT to Daxing population of *Heterodera avenae*. . Nematodes of Small Grain Cereals. Current status and research. (AA Dababat, H Muminjanov and RW Smiley), pp: 71-78.
8- Dababat A., Hugo Ferney G. B., Erginbas-Orakci G., Dreisigacker S., Imren M, Toktay H., Elekcioglu H., Mekete T., Nicol J., Ansari O., and Ogbonnaya F. 2016. Association analysis of resistance to cereal cyst nematodes (*Heterodera avenae*) and root lesion nematodes (*Pratylenchus neglectus* and *P. thornei*) in CIMMYT advanced spring wheat lines for semi-arid conditions. Breeding Science. 66(5): 692-702.
9- Dababat A., Imren M., Erginbas-Orakci G., Ashrafi S., Yavuzaslanoglu E., Toktay H., Pariyar S., Elekcioglu H., Morgounov A., and Mekete T. 2014. The importance and management strategies of cereal cyst nematodes, *Heterodera* spp., in Turkey Euphytica, 202: 173–188.
10- Damadzadeh M., and Ansaripour B. 2001. Identification and distribution of *Heterodera filipjevi* in the Esfahan province of Iran. Russian Journal of Nematology 9: 57-58.
11- Evans S. L, Odile M., and Rudi A. 2009. Map-based cloning of a gene sequence encoding a nucleotide-binding domain and a leucine-rich region at the *Cre*3 nematode resistance locus of wheat, Genome, 40: 659-665.
12- Fateh T. 2017. Cereal cyst nematodes: molecular identification and quantification, and screening for resistance in wheat. Biology and Life Sciences. 230 pages.
13- Fenwick D. W. 1940. Methods for recovery and counting of *H. schachtii* from soil. Helminth Journal. 18: 155-177.
14- Haddadi F., and Mokabli A. 2015. Current occurrence of cereal cyst nematodes in some fields of northern Algeria. In 'Nematodes of Small Grain Cereals: current status and research.' (AA Dababat, H Muminjanov and RW Smiley) pp. 59-66.
15- Hajihassani A., Tanha Maafi Z., Nicol J. M., and Rezaee S. 2010. Effect of the cereal cyst nematode, *Heterodera filipjevi*, on wheat in microplot trials. Nematology 12(3): 357-363.
16- Handoo Z. A. 2002. A key and compendium to species of the *Heterodera avenae* group (Nematoda: Heteroderidae). Journal of Nematology. 34: 250-262.
17- Henderson C. F. and Tilton E. W. 1955. Tests with acaricides against the brow wheat mite. J. Econ. Entomol, 48: 157-161.
18- Holgado R., Andersson S., Rowe J. A., and Magnusson C. 2004. First record of *Heterodera filipjevi* in Norway. Nematol Mediterr, 32: 205–211.
19- Hu C.and Qi Y. C. 2010. Abundance and diversity of soil nematodes as influenced by different types of organic manure. Helminthologia. 47:58–66.
20- Jaabari A. M., Abded A. A., Dababat A., and Al-Banna L. 2015. Response of barley, oat and wheat to the mediterranean cereal cyst nematode *Heterodera latipons*. Nematodes of Small Grain Cereals. Current status and

research. (AA Dababat, H Muminjanov and RW Smiley), pp 185-192.

21- Jamali S., Pourjam E., Kheiri A., and Damadzadeh M. 2005. Tylenchs (Nematoda: Tylenchida) from wheat fields in Isfahan province. Journal of Agricultural Science and Natural Resources 12(1): 115-125, (In Persian with English Summary).
22- Jiang-Kuan C., Wen-Kun H., Peng H., Yan L., Kong L. A., Li H., Luo S., Wang Y., and Peng D. L. 2015. Efficacy Evaluation of Seed-Coating Compounds Against Cereal Cyst Nematodes and Root Lesion Nematodes on Wheat.Plant Disease, 101(3): 428-433.
23- Karimipour Fard H., Pourjam E., Tanha Maafi Z., and Safaie N. 2016. Distribution of cereal cyst nematode, *Heterodera filipjevi*, in wheat fields of Isfahan province based on interpolation and relationship of climatic factors with its population densities. Iranian Journal of Plant Pathology, 52(3): 399-413.
24- Karimipour Fard H., Pourjam E., and Tanha Maafi Z. 2015. Assessment of grain yield reduction caused by *Heterodera filipjevi* in wheat cultivars under normal irrigation and drought stress in natural field conditions. In 'Nematodes of Small Grain Cereals: current status and research.' (AA Dababat, H Muminjanov and RW Smiley), pp. 115-120.
25- Khaled A. M., Abdullah A. A., Mohamed I. M., Solaiman A., Ahmed A. M., Ahmed L. M., Suloiman M. R., and Ahmad S. H. 2015. Selection of spring bread wheat genotypes for resistance to cereal cyst nematode (*Heterodera avenae* Woll.) based on field performance and molecular markers.Plant Omics Journal, 8(5): 392-397.
26- Maqbool M. A. 1988. Present status of research on plant parasitic nematodes in Pakistan. In Saxena, M.C., Sikora R.A. & Srivastava, J.P.(eds.). Nematodes parasitic to cereals and legumes in temperate semi-arid regions. Aleppo, Syria, ICARDA, pp: 173-180.
27- Marshall J. M., and Smiley R. W. 2016. Resistance and tolerance of spring barley to Heterodera avenae. Plant Disease, 100: 396–407.
28- Mokrem Hesar A., MahdiKhani Moghadam E., Tanha Maafi Z., and Karimi J. 2012. Comparative morphological and molecular study of Iranian populations of *Heterodera filipjevi* (Madzhidov, 1981) Stelter, 1984 and other members of '*H. avenae* group'. J. Nematode Morphol. Syst, 15 (1): 1-11.
29- Nicol J. M., and Rivoal R. 2010. An update: Current global status of cereal cyst nematode (*Heterodera* spp.) research on wheat- opportunities and future needs. Cereal cyst nematode biology and management workshop, Austria (A day post workshop congress from the 30th international European society of nematologist meeting), pp: 223.
30- Nicol J. M., and Dababat A. A. 2009. Cereal Cyst Nematodes: Status, Research and outlook, pp: 79-81.
31- Nielsen C. H. 1966. Studies on the inheritance of resistance to cereal cyst nematode (*Heterodera avenae*) in wheat. Nematologica, 12: 575-578.
32- Nilsson-Ehle N. H. 1920. Ueber Resistenz gegen *Heterodera schactii* bei gewissen Gerstensorten, ihre Verebungsweise und Bedeutungfur die Praxis. Hereditas, 1: 1-34.
33- Ogbonnaya F. C., Eastwood R. F., and Lagudah E. 2009. Identification and utilisation of genes for cereal cyst nematode resistance (*Heterodera avenae*) resistance in wheat: the Australian experience. Cereal cyst nematodes: status, research and outlook. pp: 166-171.
34- Peng D., Peng H. and Huang W. 2015. Occurrence, Distribution and integreated management of the Cereal cyst nematodes (*Heterodera avenae* & *H. filipjevi*) in China. Nematodes of small grain cereals current status and reseach. pp: 17-24.
35- Rivoal R. and Cook R. 1993. Nematode pests of cereals. In: Evans K, Trudgill DL, Webster JM, editors. Plant Parasitic Nematodes in Temperate Agriculture. Wallington, UK: CAB International, pp. 259–303.
36- Rivoal R., and Nicol J. M. 2009. Past research on the cereal cyst nematode complex and future needs. In Riley, I.T. Nicol, J.M. and Dababat, A.A. (eds.). Cereal Cyst Nematodes: Status, Research and outlook, pp: 3-9.
37- SAS Institute. 2004. The SAS system for Windows. Release 8.2. SAS Inst., Cary, NC.
38- Smiley R. W., and Nicol J. M. 2009. Nematodes which challenge global wheat production. In: Carver BF, ditor. Wheat Science and Trade. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, pp. 171–187.
39- Smiley R. W., Yan G. P., and Handoo Z. A. 2016. First record of the cyst nematode *Heterodera filipjevi* on wheat in Oregon. Plant Disease, 92: 11-36.
40- Smiley R. W., and Marshall J. M. 2016. Detection of dual *Heterodera avenae* resistance plus tolerance traits in spring wheat. Plant Disease, 100: 1-23.
41- Smiley R. W., and Yan, G. P. 2015. Discovery of *Heterodera filipjevi* in Washington and comparative virulence with *H. avenae* on wheat. Plant Disease, 99: 376-386.
42- Subbotin S. A., Rumpenhorst H. J., Sturhan D., and Mones M. 2003. Molecular and morphological characterization of *Heterodera avenae* species complex (Tylenchida: Heteroderidae). Nematology, 5: 515-538.

43- Tanha Maafi Z., Sturhan D., Kheiri A., and Geraert E. 2007. Species of the *Heterodera avanae* group (Nematoda: *Heteroderidae*) from Iran. Russian journal of nematology, 15: 49-58.
44- Tanha Maafi Z., Subbotin S. A., and Moens M. 2003. Molecular identification of cyst forming nematodes (*Heteroderidae*) from Iran and a phylogeny based on ITS-rDNA sequences. Nematology, 5: 99– 111.
45- Toktay H., Yavuzaslanoğlu E., İmren M., Nicol J. M., Elekcioğlu I. H., and Dababat A. A. 2012. Screening for resistance to *Heterodera filipjevi* (Madzhidov) Stelter (Tylenchina: Heteroderidae) and Pratylenchus thornei (Sher & Allen) (Tylenchida: Pratylenchidae) sister lines of spring wheat. Turk J Entomol, 36: 455–461.
46- Williams K. J., Fisher J. M., and Longridge P. 1994. Identification of RFLP markers linked to the cereal cyste nematod resistance gene (Cre) in wheat. Thror Appl Genet, 89: 927-930.