علوم و تحقیقات بذر ایران
سال یازدهم/ شماره دوم/ ۱۴۰۳ (۱۶ - ۱)
مقاله پژوهشی
DOI: 10.22124/JMS.2024.8660

ارزیابی میزان انتقال و تأثیر بیماری سیاهک آشکار روی برخی از شاخص‌های رشدی گیاهچه‌های جو در مزرعه

نیما خالدی*[۱]، لیلا زارع[۲]، سامان شیدائی[۳]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۲/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۵/۱۰

چکیده

تشخیص سریع و دقیق عوامل بیماریزای همراه با بذر جهت پیشگیری و کنترل بیماری‌های بذرزاد ضروری است. بیماری سیاهک آشکار یکی از مهمترین بیماری‌های قارچی بذرزاد جو در سراسر جهان است که موجب کاهش عملکرد محصول می‌شود. هدف از این پژوهش مقایسه روش‌های مختلف برای ردیابی و تشخیص عامل بیماری سیاهک آشکار در نمونه‌های بذری، میزان انتقال بیماری به نسل بعد و ارزیابی تأثیر آلودگی بذر روی برخی از شاخص‌های رشدی گیاهچه‌ها در مزرعه می‌باشد. به‌منظور ردیابی آلودگی در نمونه‌های بذری و شناسایی قارچ عامل بیماری سیاهک آشکار، از ارقام مختلف جو تولید شده در مزارع استان‌های اصفهان، خوزستان، خراسان شمالی، خراسان جنوبی، البرز و همدان بر اساس شیوه نامه‌ی انجمن بین المللی آزمون بذر نمونه‌برداری شد. نتایج مقایسه‌ی روش‌های تشخیصی نشان داد که آزمون اصلاح شده شمارش جنین در مقایسه با روش ایکاردا بر اساس حساسیت، مدت زمان مورد نیاز، سادگی و هزینه می‌تواند به عنوان روش قابل اعتمادتری برای ردیابی آلودگی سیاهک در نمونه‌های بذری در نظر گرفته شود. نتایج نشان داد که همبستگی مثبت قوی بین میزان آلودگی ردیابی شده در آزمون اصلاح شده شمارش جنین و میزان بروز بیماری در مزرعه وجود دارد. آلودگی بذر به‌طور قابل‌توجهی روی شاخص‌های رشدی گیاهچه در مزرعه تأثیر گذاشته و ضمن افزایش متوسط زمان لازم برای ظهور گیاهچه‌ها، موجب کاهش سرعت ظهور گیاهچه‌ها در مزرعه گردید. نتایج نشان داد که وجود آلودگی به سیاهک آشکار در نمونه‌های بذری در مقایسه با شاهد تأثیر قابل توجه روی درصد سبز نهایی در مزرعه داشته است. یافته‌های این پژوهش دیدگاه‌های جدیدی را درباره تأثیر میزان آلودگی بذرها روی شاخص‌های رشدی گیاهچه‌ها و میزان انتقال بیماری در مزرعه ارائه می‌دهد که می‌توانند در بازنگری استاندارد ملی سلامت بذر جو و مدیریت مؤثر این بیماری مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: آزمون شمارش جنین، انتقال بیماری، بذرزاد، جو، سیاهک، کیفیت بذر

۱- استادیار پژوهش، موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. n_khaledi@areeo.ac.ir
۲- محقق، موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. mycology.spcri@gmail.com
۳- استادیار پژوهش، موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. seedplant2024@gmail.com
*نویسنده مسئول: n_khaledi@areeo.ac.ir

مقدمه

جو زراعی با نام علمی *Hordeum vulgare* L. از مهمترین گیاهان زراعی است و نقش مهمی در تأمین امنیت غذایی ایفا می‌کند. بر اساس آخرین آمار سازمان خواروبار کشاورزی ملل متحد در سال ۲۰۲۲، سطح زیر کشت و میزان تولید جهانی جو به‌ترتیب حدود ۴۷ میلیون هکتار و ۱۵۴ میلیون تن بوده است (FAOSTAT, 2023). طبق آمارنامه کشاورزی در سال زراعی ۱۴۰۱-۱۴۰۰ در ایران، سطح زیر کشت این محصول حدود ۱/۷ میلیون هکتار و میزان تولید آن در حدود ۳/۲ میلیـون تـن برآورد شده است (Anonymous *et al*., 2023). استان‌های کرمانشاه، زنجان، تهران، البرز، کردستان و قم از جمله مهم‌ترین استان‌های تولیدکننده جو در کشور هستند (Anonymous *et al*., 2023). افزایش عملکرد در واحد سطح و دستیابی به پتانسیل واقعی عملکرد ژنوتیپ گیاهی با توجه به محدودیت سطح زیر کشت و نیاز روزافزون جمعیت جهان به محصولات کشاورزی حائز اهمیت می باشد. استفاده از بذر باکیفیت بویژه هنگامی که دیگر نهاده‌های مورد نیاز برای تولید و مدیریت مطلوب مزرعه رعایت شده باشند، حائز اهمیت است. بذر باکیفیت یکی از مهم‌ترین عوامل دستیابی به پتانسیل واقعی عملکرد و بهبود کیفیت محصول می‌باشد (Khaledi and Hassani, 2021). بیماری‌های بذرزاد از عوامل محدودکننده کشت گیاهان محسوب می‌شوند و می‌توانند رشد، کیفیت و کمیت عملکرد محصول تولیدی را کاهش دهند. بسیاری از عوامل بیماریزای قارچی به صورت بذرزاد و یا همراه بذر موجب کاهش یا از بین بردن توان جوانه زنی بذر، پوسیدگی بذر، سوختگی و پژمردگی گیاهچه، جلوگیری از استقرار گیاهچه، کاهش شاخص بنیه و در نهایت کاهش عملکرد محصولات گیاهی می‌شوند (Clear and Patrick, 1993).

بیماری سیاهک آشکار با عامل *Ustilago nuda* f. sp. *hordei*، یکی از مهمترین بیماری‌های قارچی جو به‌صورت بذرزاد می‌باشد که روی کیفیت بذر تولیدی تأثیری نداشته اما کمیت آن را کاهش می‌دهد (Quijano *et al*., 2016). میزان خسارت ناشی از سیاهک آشکار به‌طور مستقیم در ارتباط با درصد سنبله‌های آلوده در نظر گرفته می‌شود (Semeniuk and Ross, 1942; Green *et al*., 1968). میزان خسارت ناشی از سیاهک آشکار جو از سه تا پنج درصد گزارش شده است اما در صورت عدم استفاده از روش‌های مناسب مدیریت مزرعه، میزان خسارت می‌تواند در محدوده ۱۵ تا ۲۵ درصد افزایش یابد (Menzies *et al*., 2005; Menzies, 2008). در استان‌های کرمانشاه، تهران، زنجان، اصفهان، ایلام، لرستان و کردستان میزان آلودگی مزارع به سیاهک آشکار جو بین ۲۰ تا ۳۵ درصد برآورد شده است (Poormansuri *et al*., 2012). بذرهای آلوده تنها منبع آلودگی به این بیماری بوده که فاقد علایم قابل مشاهده‌اند و به‌طور کامل قابلیت جوانه‌زنی دارند (Doling, 1968; Woldemichael *et al*., 2019). بذر آلوده به سیاهک آشکار، کوچک‌تر از بذر سالم خواهد بود (Henning, 1913; Krull *et al*., 1966; Pedersen, 1967). بنابراین بی‌توجهی به ارزیابی سلامت بذرها موجب انتقال بیماری به نسل بعد و همچنین گسترش بیماری به مناطق دیگر می‌شود. پایش و کنترل بیماری در مزارع و همچنین ارزیابی سلامت بذرها نقش مهمی در کاهش اثرات مخرب بیماری در مزرعه و افزایش میزان عملکرد محصول دارد. در حال حاضر استفاده از ارقام مقاوم، بذر گواهی شده و ضدعفونی بذر با قارچ‌کش‌های شیمیایی از جمله کاربندازیم، کاربوکسین، کاربوکسین تیرام، تریادیمنول، تریتیکونازول، پروتیوکونازول + تبوکونازول، سایپروکونازول + دیفنوکونازول و ایپرودیون + کاربندازیم به‌عنوان مدیریت مؤثر در مهار این بیماری توصیه شده است (Murray *et al*., 2009; Nourbakhsh, 2024). ضدعفونی بذر جو با قارچکش کاربوکسین موجب بهبود شاخص‌های رشد گیاهچه و کاهش بروز بیماری سیاهک آشکار در مزرعه می شود (Murphy *et al*., 2017).

آلودگی بذرهای جو به قارچ‌های بذرزاد موجب کاهش شاخص‌های جوانه‌زنی و صفات رشدی گیاهچه‌ها می‌شود (Yari *et al*., 2018). تنش‌ها نیز موجب افزایش متوسط زمان لازم برای ظهور گیاهچه‌ها و کاهش سرعت ظهور گیاهچه‌های جو در مزرعه می‌شوند (Sharafizad, 2017). آزمون‌های سلامت بذر جهت شناسایی بیمارگرهای بذر گامی مهم در مدیریت بیماری‌های گیاهی است (Etebu *et al*., 2017). در دهه اخیر ارزیابی سلامت بذر به‌همراه رعایت قوانین بین‌المللی بهداشت گیاهی جایگاه بسیار مهمی در تجارت بین‌المللی بذر پیدا کرده است. البته این هدف تنها در صورتی به‌وقوع می‌پیوندد که با استفاده از روش‌های نوین آزمایشگاهی و تحقیقاتی در حوزه بذر امکان ردیابی دقیق میزان و نوع آلودگی وجود داشته باشد. در

حال حاضر چندین روش برای ردیابی و شناسایی یک بیمارگر خاص در یک نمونه‌ی بذری وجود دارد و روش‌های جدید ارزیابی سلامت بذر نیز در حال توسعه است. تحقیقات زیادی در زمینه توسعه روش‌های تشخیص بیمارگرهای بذرزاد صورت گرفته است (Mathur and Kongsdal, 2003; Albrechtsen, 2006).

سلامت بذر به‌عنوان یکی از مهمترین اجزای کیفیت بذر از جمله مؤلفه‌های اثرگذار برکشاورزی پایدار می‌باشد. استفاده از روش‌های دقیق برای تشخیص بیمارگرهای بذرزاد برای تصمیم‌گیری صحیح در آزمایشگاه‌های سلامت بذر و مراکز قرنطینه برای به حداقل رساندن انتشار آلودگی سودمند است (Asaad *et al*., 2014). بر اساس دستورالعمل ارائه شده توسط اتحادیه بین المللی آزمون بذر، بر اساس نوع و محل استقرار قارچ‌ها در بذر، برای ردیابی آلودگی در بذر روش‌های مختلفی از جمله مشاهده چشمی، آزمون شستشو، بلاتر، بلاتر انجماد، کشت روی محیط، آزمون شمارش جنین و بررسی علایم روی گیاهچه پیشنهاد شده است (Anonymous, 2009). بر این اساس، برای ارزیابی سلامت بذر جو از نظر بیماری سیاهک آشکار و ردیابی قارچ *U. nuda* f. sp. *hordei* از آزمون شمارش جنین استفاده می‌شود (Morton, 1961; Rennie and Seaton, 1975; Rennie, 1982; Mathur and Kongsdal, 2003; Anonymous, 2011). روش‌های معمول که جهت ردیابی، تشخیص و شناسایی قارچ‌های بذرزاد و یا همراه بذر انجام می‌گیرد، وقت‌گیر، هزینه‌بر و از دقت کمتری برخوردار می‌باشد، بنابراین ارائه راهکارهای نوین و روش‌های جدیدی جهت کاهش هزینه‌های آزمایش و افزایش سرعت و دقت و در کنار آنها بررسی همزمان چندین عامل بیماریزا ضروری به‌نظر می‌رسد. به‌طور کلی انجام آزمایش‌های سلامت بذر و شناسایی بیمارگرهای بذرزاد می‌تواند در انتخاب راهکارهای مؤثر مدیریتی برای کاهش اثرات مخرب بیماری‌های ناشی از آنها در مزرعه و افزایش میزان تولید و کیفیت محصول مؤثر باشد.

با وجود اهمیت اقتصادی بیماری سیاهک آشکار جو، اطلاعات ما در مورد میزان بروز بیماری در نسل بعد و تأثیر آن روی سلامت گیاهچه‌های حاصل در مزرعه بسیار محدود است. بنابراین هدف از این پژوهش (الف) مقایسه روش‌های مختلف ردیابی عامل بیماری سیاهک آشکار در بذر، (ب) بررسی میزان انتقال بیماری به نسل بعد و (ج) ارزیابی تأثیر آلودگی بذر روی برخی از شاخص‌های رشدی گیاهچه‌ها در مزرعه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

نمونه‌برداری براساس شیوه نامه‌ی انجمن بین المللی آزمون بذر (Anonymous, 2017) در طی سال‌های زراعی ۱۴۰۲-۱۴۰۱ از مزارع جو در استان‌های اصفهان، خوزستان، خراسان شمالی، خراسان جنوبی، البرز و همدان انجام شد و نمونه‌ها به‌همراه ثبت مشخصات در پاکت‌های کاغذی به آزمایشگاه سلامت بذر موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال منتقل شدند (جدول ۱).

روش‌های ردیابی قارچ عامل بیماری سیاهک آشکار در نمونه‌های بذری

روش اول) ردیابی بذرهای آلوده به بیماری سیاهک آشکار جو براساس روش اسعد و همکاران (Asaad *et al*., 2014) معروف به‌روش ایکاردا انجام شد. از هر نمونه ۲۰۰۰ عدد بذر به‌طور تصادفی انتخاب و در فلاسک حاوی یک لیتر محلول ۱۰ درصد هیدروکسید سدیم (NaOH) و ۲۰۰ پی پی‌ام رنگ تریپان بلو و یا آنیلین بلو در حمام آب با دمای ۲ ± ۴۰ درجه سلسیوس به‌مدت ۲۱۰ دقیقه نگهداری شد. سپس میزان ۱ لیتر محلول پنج درصد کلرید سدیم (NaCl) جهت جداسازی جنین از پوسته بذر اضافه و به‌آرامی به‌مدت ۱۵ دقیقه مخلوط شد. سپس سه عدد الک به‌ترتیب شماره‌های ۳، ۲/۵ و ۱ میلی‌متری روی هم قرار و بذرها با جریان ملایم آب گرم (حدود ۵۰ درجه سلسیوس) شستشو داده شدند تا زمانی که اکثر جنین‌ها به الک زیرین (یک میلی‌متری) انتقال یافتند. جنین‌ها به قیف بیرمن حاوی ۲۰۰ میلی‌متر مخلوط گلیسرول و محلول ۵ درصد کلرید سدیم به نسبت ۱:۱ منتقل شده تا جنین‌ها شناور گردند. پس از صاف کردن نمونه‌ها، جنین‌ها را به‌مدت ۶۰ دقیقه در محلول گلیسرول ۸۷ درصد قرار گرفت. تعداد کل جنین‌ها و تعداد جنین‌های آلوده هم‌زمان و با استفاده از یک شمارش‌گر مکانیکی شمارش گردید و درصد آلودگی در نمونه بذر مشخص گردید (Asaad *et al*., 2014).

(روش دوم) آزمون اصلاح شده شمارش جنین به‌منظور بررسی میزان آلودگی بذرهای جو به سیاهک آشکار با استفاده از روش شرح داده شده توسط انجمن بین‌المللی آزمون بذر (۲۰۲۲) انجام شد (Anonymous, 2022). بر

اساس این شیوه‌نامه از هر نمونه ۲ تکرار و هر کدام شامل ۴۰۰۰-۲۰۰۰ عدد بذر (حدود ۱۲۰-۱۰۰ گرم) به‌طور تصادفی انتخاب و در فلاسک حاوی ۱ لیتر محلول ۵ درصد هیدروکسید سدیم در دمای ۲۰ درجه سلسیوس به‌مدت ۲۴ ساعت خیسانده شد. سپس بسته به‌وزن نمونه میزان ۶۰-۵۰ گرم کلرید سدیم جهت جداسازی جنین از پوسته بذر اضافه شد. سه عدد الک را به‌ترتیب با اندازه سوراخ‌هایی به قطر ۱، ۲ و ۳/۳۵ میلی‌متری روی هم قرار و بذرهای خیس‌خورده روی غربال‌ها با جریان ملایم آب گرم شستشو داده شدند تا زمانی که اکثر جنین‌ها روی الک یک میلی متری انتقال یافتند. جنین‌ها را به بشر حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محلول اسید لاکتیک به همراه ۰/۱۵ گرم متیل بلو منتقل نموده و به‌مدت پنج دقیقه جوشانده شدند. سپس نمونه‌ها را صاف شده و جنین‌های استخراج شده را به محلول گلیسرول منتقل شدند. سپس از محلول گلیسرول حاوی جنین در شیارهای خاص ورقه آزمون جنین که قبل از این در کف تشتک‌های پتری قرار داده شده بودند، ریخته شد و در زیر استریومیکروسکوپ میسلیوم‌های رنگ‌آمیزی شده جنین‌های آلوده مورد بررسی قرار گرفتند. تعداد کل جنین‌ها و تعداد جنین‌های آلوده هم‌زمان و با استفاده از یک شمارش‌گر مکانیکی شمارش و درصد آلودگی در نمونه بذر مشخص شد. میسلیوم سیاهک آشکار حدود ۳ میکرومتر ضخامت داشته و به رنگ قهوه‌ای طلایی قابل ردیابی بود. در موارد مشکوک یا آلودگی کم ریسه با تهیه اسلاید میکروسکوپی، مشاهده دقیق‌تر میسلیوم قارچ با میکروسکوپ انجام شد.

ارزیابی شاخص‌های رشد گیاهچه در مزرعه و میزان بروز بیماری

تمامی نمونه‌های بذری که دارای سطوح مختلف آلودگی بودند، همراه با نمونه‌های بذری از همان رقم که بر اساس نتایج آزمون سلامت فاقد هر گونه آلودگی به‌ویژه به قارچ عامل بیماری سیاهک آشکار بودند به عنوان شاهد، برای ارزیابی شاخص‌های رشد گیاهچه در مزرعه و همچنین بررسی میزان بروز بیماری بر اساس روش شرح داده شده توسط منزیس و همکاران (Menzies *et al*., 2014) مورد کشت قرار گرفتند. آزمایش در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار در مزرعه تحقیقاتی موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال اجرا شد. هر کرت شامل پنج خط کشت به طول شش متر با فاصله پشته ۲۰ سانتی متر بود. در هر کرت، تعداد ۱۰۰۰ عدد بذر از هر نمونه، به‌صورت دستی به فاصله ۳ سانتی متر از هم با رعایت عمق کاشت یکنواخت کشت شدند. عملیات زراعی تهیه زمین شامل شخم و کوددهی قبل از کاشت بر اساس آزمون خاک به‌میزان ۲۰ گرم کود شیمیایی اوره، ۱۰ گرم سولفات پتاسیم و ۱۵ گرم کود سوپر فسفات تریپل در هر کرت انجام شد. آبیاری با استفاده از تیپ و به‌صورت قطره‌ای صورت گرفت.

به‌منظور تعیین برخی از شاخص‌های رشد گیاهچه در مزرعه از هر کرت یک خط کاشت در نظر گرفته شده و به‌طور روزانه مورد بازدید قرار گرفت. تعداد گیاهچه های ظاهر شده تا ۱۴ روز پس از کاشت ثبت شد. سپس متوسط زمان ظهور گیاهچه‌ها، سرعت ظهور گیاهچه‌ها در مزرعه و درصد سبز نهایی مزرعه با استفاده از رابطه‌های زیر محاسبه گردید:

رابطه (۱) متوسط زمان ظهور گیاهچه‌ها (Mean emergence time)

$$MET=\frac{\sum fx_i}{F}$$

رابطه (۲) سرعت ظهور گیاهچه‌ها در مزرعه (Field emergence rate)

$$FER=\frac{FFE}{D}$$

رابطه (۳) درصد سبز نهایی مزرعه (Final emergence percentage in field)

$$FEP=\frac{SE}{N}\times 100$$

fx_i: تعداد گیاهچه ظاهر شده در میانه دوره ظهور گیاهچه‌ها

D: تعداد روز از کاشت تا پایان یادداشت‌برداری

FFE: درصد نهایی ظهور گیاهچه‌ها در مزرعه

F: حداکثر تعداد گیاهچه‌ی ظاهر شده

SE: تعداد بذر سبز شده

N: تعداد کل بذرهای کاشته شده

جهت ارزیابی بیماری سیاهک آشکار بازدید از مزرعه و یاداشت‌برداری از زمان ظهور سنبله‌ها تا رسیدگی فیزیولوژیکی انجام و درصد بوته‌های سالم و درصد بوته‌های بیمار ثبت و درصد بروز بیماری در مزرعه با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (Zegeye *et al*., 2015):

$$\text{درصد بروز بیماری} = \frac{\text{تعداد گیاهان بیمار}}{\text{تعداد کل گیاهان ارزیابی شده}} \times 100$$

سپس نتایج مربوط به میزان آلودگی بذر در آزمون جنین با درصد بروز بیماری در مزرعه با یکدیگر مقایسه گردید و روند انتقال بیماری از آزمایشگاه به مزرعه تعیین شد.

برای واکاوی آماری داده‌های حاصل از آزمایش‌های مختلف، ابتدا از نرمال بودن توزیع داده‌های خام اطمینان حاصل شد و سپس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار (version 9.4) SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی در سطح احتمال پنج درصد ($P \leq 0.05$) انجام شد. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Microsoft Office Excel 2013 استفاده شد.

نتایج

نتایج حاصل از ارزیابی میزان آلودگی جنین بذرها به بیماری سیاهک آشکار جو بر اساس روش ایکاردا و آزمون اصلاح شده جنین در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱- مشخصات نمونه‌های بذری جو جمع آوری شده بر اساس رقم و موقعیت جغرافیایی محل نمونه‌برداری

Table 1. Characteristics of barley seed samples collected based on cultivar and geographical location of the sampling site

کد نمونه Sample code	نام رقم Cultivar name	محل نمونه‌برداری Sample site	عرض جغرافیایی (شمالی) Latitude	طول جغرافیایی (شرقی) Longitude
BSK909	بهرخ Behrokh	اصفهان – اصفهان Isfahan - Isfahan	32° 36' 57.0"	51° 36' 47.3"
BSK918	انصار Ansar	اصفهان – اصفهان Isfahan - Isfahan	32° 36' 55.9"	51° 36' 47.6"
BSK936	آبیدر Abidar	خراسان شمالی – بجنورد North Khorasan - Bojnurd	37° 28' 35.1"	57° 16' 42.2"
BSK945	نصرت Nosrat	البرز – کرج Alborz - Karaj	35° 48' 06.3"	50° 58' 22.5"
BSK954	ریحان ۰۳ Reihan 03	البرز – کرج Alborz - Karaj	35° 48' 06.9"	50° 58' 21.8"
BSK963	ارمغان Armaghan	البرز – کرج Alborz - Karaj	35° 48' 05.8"	50° 58' 23.0"
BSK972	سهند Sahand	همدان – همدان Hamadan - Hamadan	34° 52' 46.3"	48° 32' 12.0"
BSK927	اکسین Oxin	خوزستان – دزفول Khuzestan - Dezful	32° 15' 43.5"	48° 25' 45.4"
BSK990	گلشن Golshan	خراسان جنوبی – بیرجند South Khorasan - Birjand	32° 52' 29.1"	59° 01' 04.5"

در روش ایکاردا از هر نمونه جو ۲۰۰۰ عدد بذر جو مورد ارزیابی قرار گرفتند. دامنه آلودگی به بیماری سیاهک آشکار در جو از صفر تا ۳/۹ درصد بود (جدول ۲). بر اساس ارزیابی بصری با استفاده از استریومیکروسکوپ مشاهده شد که نمونه‌هایی BSK909، BSK918 و BSK936 آلوده به قارچ عامل بیماری سیاهک آشکار جو بودند (جدول ۲).

همچنین نمونه‌های BSK927، BSK945، BSK954، BSK963، BSK972 و BSK990 فاقد هرگونه آلودگی به قارچ *U. nuda* f. sp. *hordei* بودند (جدول ۲).

جنین‌ها در زیر استریومیکروسکوپ با بزرگنمایی ۸۰-۲۵ برابر رویت گردیدند و در موارد مشکوک اسلاید میکروسکوپی تهیه شد. میسلیوم سیاهک آشکار گندم

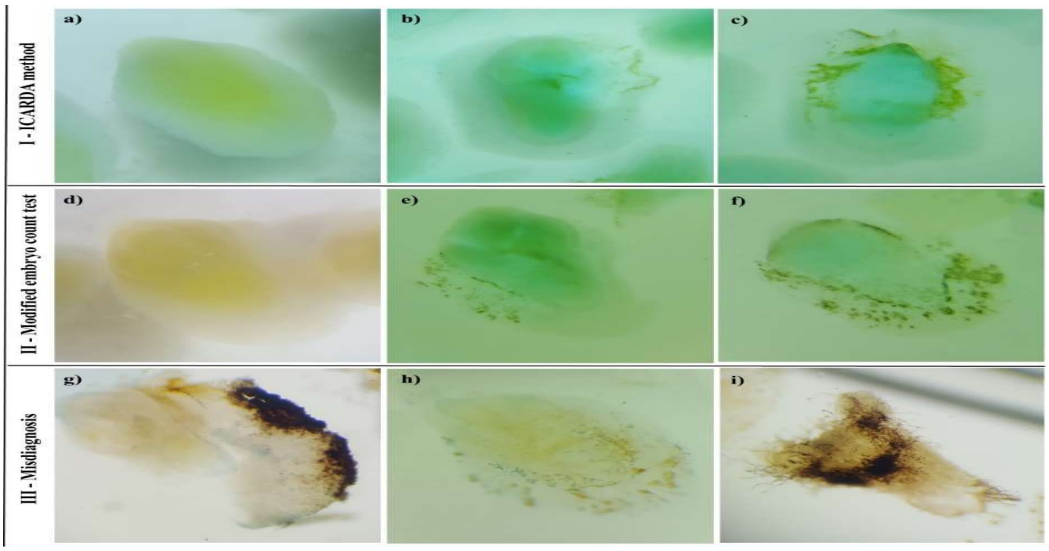
جدول ۲- مقایسه میزان آلودگی ردیابی شده در نمونه‌های بذری جو به قارچ عامل بیماری سیاهک آشکار بر اساس روش‌های مختلف (ایکاردا و آزمون اصلاح شده شمارش جنین) با میزان بروز بیماری در مزرعه

Table 2. Comparison of the levels of infestation detected in barley seed samples to the fungus causing loose smut disease based on different methods (ICARDA and Modified embryo count test) with the disease incidence in the field

کد نمونه Sample code	روش ایکاردا ICARDA method	آزمون اصلاح شده شمارش جنین Modified embryo count test			ارزیابی مزرعه ای Field assessment		
	جنین آلوده (درصد) Embryo infection (%)	تکرار ۱ Repeat 1	تکرار ۲ Repeat 2	میانگین جنین آلوده (درصد) Average embryo infection (%)	گیاهان سیاهک زده (تعداد) Smutted plants (number)	کل گیاهان (تعداد) Total plants (number)	بروز بیماری (درصد) Disease incidence (%)
BSK909	1.8	0.4	0.5	0.45	5	975	0.51
BSK918	3.9	1.1	1.1	1.1	13	986	1.32
BSK936	2	0.2	0.1	0.15	2	948	0.21
BSK945	0	0.1	0.1	0.1	1	971	0.10
BSK954	0	0.2	0.2	0.2	2	905	0.22
BSK963	0	0.1	0.1	0.1	1	943	0.11
BSK972	0	0.1	0.2	0.15	2	976	0.20
BSK927	0	ND	ND	ND	0	982	0
BSK990	0	ND	ND	ND	0	958	0

*ND: Not detected

و جو حدود سه میکرومتر ضخامت داشت، به رنگ قهوه‌ای طلایی یا بدون رنگ نیز دیده شد. اگرچه، آلودگی نیز از چند رشته از ریسه‌های کوتاه تا پوشاندن کامل اسکوتلوم متغیر بود (شکل ۱ - I).



شکل ۱- ارزیابی استریو میکروسکوپی جنین‌های جداسازی از نمونه‌های بذری بر اساس روش ایکاردا (I) جنین سالم (a) در مقایسه با جنین‌های آلوده (b و c)، بر اساس آزمون اصلاح شده شمارش جنین (II) جنین سالم (d) در مقایسه با جنین‌های آلوده (e و f)، تشخیص اشتباه (III) و جنین‌های آلوده به قارچ‌های مختلف (g، h و i) به غیر از *Ustilago nuda* f. sp. *hordei* عامل بیماری سیاهک آشکار. بزرگنمایی ۵۰ میکرومتر.

Figure 1. Stereomicroscope evaluation of embryos isolated from seed samples based on ICARDA (I); healthy embryo (a) compared to infected embryos (b and c), and based on the modified embryo count test (II) healthy embryo (d) compared to infected embryos (e and f), misdiagnosis (III) and infected embryos to various fungi (g, h and i) other than *Ustilago nuda* f. sp. *hordei* the causal agent of loose smut disease. 50 µm magnification.

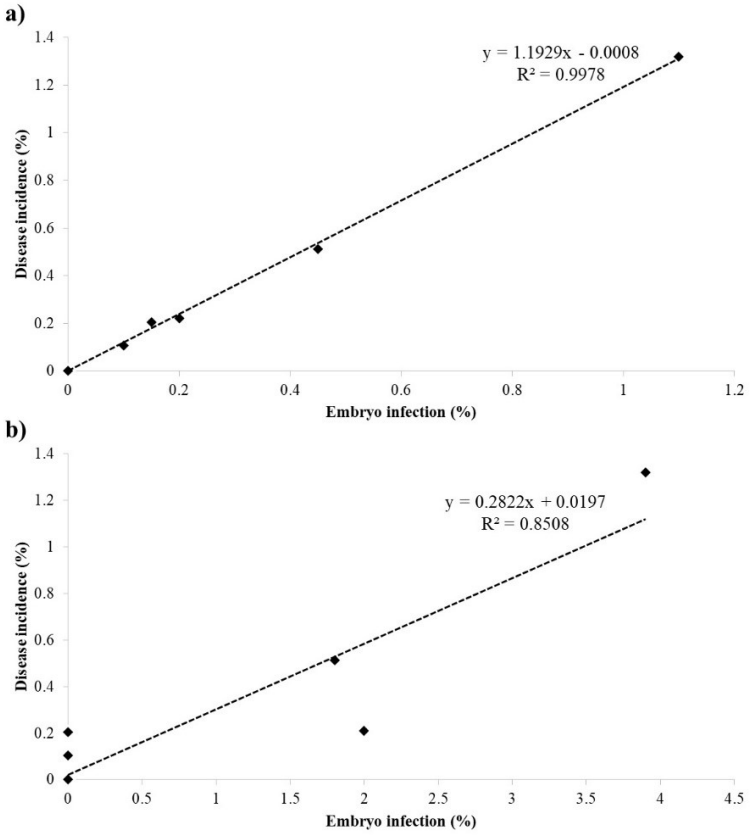
در روش آزمون اصلاح شده شمارش جنین از هر نمونه جو ۲ تکرار و هر کدام شامل حدود ۱۰۰۰ عدد جنین جو مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۱ - II). در این روش همانگونه که در شیوه نامه‌ی انجمن بین المللی آزمون بذر (Anonymous, 2022) اشاره شده است از هر نمونه ۲ تکرار مورد ارزیابی قرار گرفت و همچنین به جای ذکر عدد صفر برای نمونه‌های فاقد آلودگی از اصطلاح not detected (ردیابی نشده) استفاده شد (جدول ۲). دامنه آلودگی به بیماری سیاهک آشکار در جو از ردیابی‌نشده تا میانگین ۱/۱۰ درصد متغیر بود (جدول ۲). بر اساس ارزیابی بصری با استفاده از استریومیکروسکوپ مشاهده شد که نمونه‌هایی BSK909، BSK918، BSK936، BSK945، BSK954، BSK963 و BSK972 آلوده به قارچ عامل بیماری سیاهک آشکار جو بودند. همچنین نمونه‌های BSK927 و BSK990 فاقد هرگونه آلودگی به قارچ *U. nuda* f. sp. *hordei* بودند (جدول ۲). گاهی اوقات قارچ-های دیگری به غیر از عامل بیماری سیاهک آشکار جو در اسکوتلوم مشاهده می‌شوند، اما معمولاً رنگ آنها تیره‌تر و کاملاً قابل تفکیک هستند (شکل ۱ - III). هنگامی که دیواره‌های سلول تغییر رنگ می‌یابد ممکن است با میسلیوم قارچ *U. nuda* f. sp. *hordei* اشتباه گرفته شود، اما این مورد نیز در بررسی با بزرگنمایی ۵۰ برابر یا بیشتر و مقایسه با کنترل مثبت (شاهد) مشخص گردید (شکل ۱).

نتایج حاصل از ارزیابی میزان بروز بیماری در مزرعه نشان داد که میزان بروز بیماری ناشی از آلودگی جنین در نمونه‌های بذری به سیاهک آشکار از صفر تا ۱/۳۲ درصد متغیر بود (جدول ۲). در گیاهان حاصل از نمونه‌های بذری با کدهای BSK927 و BSK990 که فاقد آلودگی بذری بودند، در مزرعه هیچگونه علایم بیماری مشاهده نشد (جدول ۲). میزان ظهور بیماری سیاهک آشکار در گیاهان حاصل از نمونه‌های بذری با کدهای BSK909 (۰/۴۵ درصد آلودگی بذری)، BSK918 (۱/۱ درصد آلودگی بذری)، BSK936 (۰/۱۵ درصد آلودگی بذری)، BSK945 (۰/۱ درصد آلودگی بذری)، BSK954 (۰/۲ درصد آلودگی بذری)، BSK963 (۰/۱ درصد آلودگی بذری) و BSK972 (۰/۱۵ درصد آلودگی بذری) به ترتیب به میزان ۰/۵۱ درصد، ۱/۳۲ درصد، ۰/۲۱ درصد، ۰/۱۰ درصد، ۰/۲۲ درصد، ۰/۱۱ درصد و ۰/۲۰ درصد متغیر بود (جدول ۲ و شکل ۲).

شکل ۲- ظهور و بروز بیماری سیاهک آشکار در مزرعه و انتقال بیماری از بذر به گیاه حاصل از آن در نسل بعد

Figure 2. Appearance and incidence of Loose smut disease in the field and transmission of disease from seed to the resulting plant in the next generation

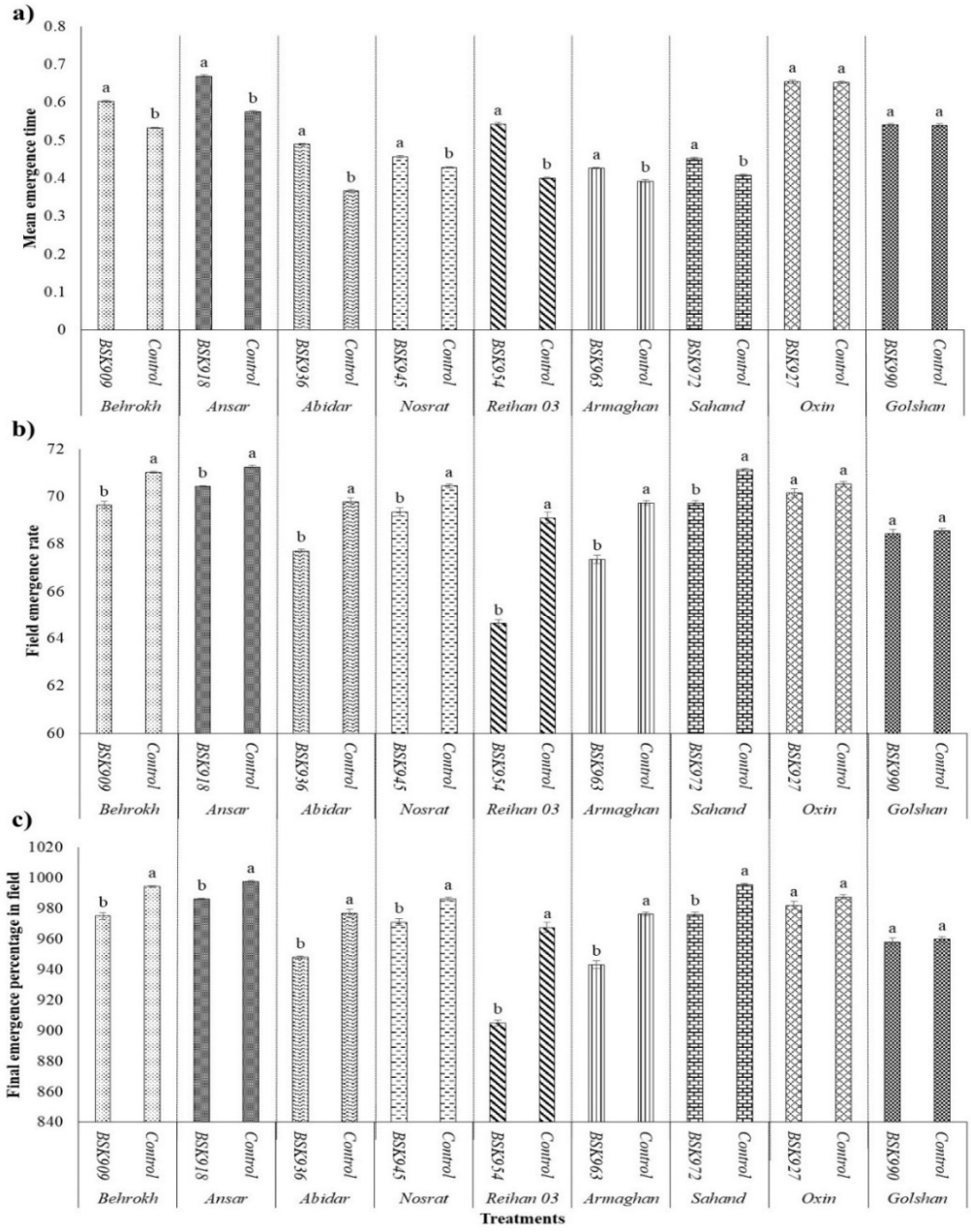
بر اساس تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از این پژوهش نشان داد که نتایج حاصل از میزان آلودگی جنین بذرها بدست آمده در روش آزمون اصلاح شده شمارش جنین در مقایسه با روش ایکاردا با میزان بروز بیماری در مزرعه ارتباط نزدیکتری داشت (شکل ۳). با توجه به معادله رگرسیون خطی بدست آمده و ضرایب همبستگی برای تجزیه و تحلیل دو متغیره مشاهده شد که رابطه‌ی مستقیمی بین میزان آلودگی ردیابی شده در آزمایشگاه با میزان بروز بیماری در مزرعه (در صورت فراهم بودن شرایط محیطی به‌نفع قارچ عامل بیماری و به‌ضرر میزبان) وجود داشته است (شکل ۳). ضرایب همبستگی برای آزمون اصلاح‌شده شمارش جنین و روش ایکاردا به‌ترتیب به‌میزان ۰/۹۹۸ و ۰/۹۰۲ محاسبه شد که نشان‌دهنده همبستگی مثبت بین میزان آلودگی ردیابی شده در آزمایشگاه و میزان بروز بیماری در مزرعه بود (شکل ۳).



شکل ۳- ارتباط بین میزان بروز بیماری و میزان آلودگی جنین ردیابی شده بر اساس روش‌های آزمون اصلاح شده شمارش جنین (a) و روش ایکاردا (b)

Figure 3. The relationship between the levels of disease incidence with levels of embryo infection detected based on modified embryo count test (a) and ICARDA method (b)

نتایج حاصل از ارزیابی شاخص‌های رشدی گیاهچه در مزرعه نشان داد که اگرچه متوسط زمان لازم برای ظهور گیاهچه‌های حاصل از بذرهای آلوده در مقایسه با بذرهای سالم بیشتر است اما نرخ ظهور این گیاهچه‌ها در مزرعه کمتر است. (شکل ۴). همچنین نتایج نشان داد که وجود آلودگی به سیاهک آشکار در نمونه‌های بذری تأثیر قابل توجه روی درصد سبز نهایی در مزرعه داشته است (شکل ۴). همچنین بین ارقام مختلف بدون و یا با آلودگی از نظر برخی از شاخص‌های رشدی گیاهچه از جمله متوسط زمان ظهور گیاهچه، سرعت ظهور گیاهچه و درصد سبز نهایی در مزرعه تفاوت مشاهده شد (شکل ۴).



شکل ۴- مقایسه برخی صفات (میانگین ± خطای استاندارد) مرتبط با شاخص‌های رشدی گیاهچه حاصل از نمونه‌های بذری ارقام مختلف با نمونه‌های شاهد در مزرعه. متوسط زمان ظهور گیاهچه‌ها (a)، سرعت ظهور گیاهچه‌ها در مزرعه (b) و درصد سبز نهایی مزرعه (c). میانگین‌های درون نمودارهای میله ای مربوط به هر رقم که با حرف یکسان نشان داده شده‌اند بر اساس آزمون توکی در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌دار نداشتند. ارقام بهرخ، انصار، آبیدر، نصرت، ریحان ۰۳، ارمغان، سهند، اکسین و گلشن.

Figure 4. Comparison of some traits (mean ± standard error) related to the growth indicators of seedlings obtained from seed samples of different cultivars with control samples in the field. Mean emergence time (a), Field emergence rate (b) and Final emergence percentage in field (c). Means within bar graphs corresponding to each cultivar indicated by the same letter were not significantly different according to Tukey's test at the level $p \leq 0.05$. Cultivars of Behrokh, Ansar, Abidar, Nosrat, Reihan 03, Armaghan, Sahand, Oxin and Golshan

بحث

در استاندارد ملی بذر، بیماری‌های سیاهک آشکار، سیاهک سخت و لکه قهوه‌ای نواری در جو به‌عنوان مهمترین بیماری‌های بذرزاد عنوان شده‌اند که توجه کافی به ردیابی آنها در نمونه‌های بذری و مزرعه و همچنین ارائه راهکاریی جهت کاهش هزینه‌های ناشی از خسارت‌های آنها حائز اهمیت می‌باشد. شناسایی و محاسبه فراوانی قارچ‌های بذرزاد با توجه به اهمیت سلامت بذر در مراحل تولید و همچنین تأثیر آن در کمیت و کیفیت محصول به‌عنوان راه‌حلی برای پیشگیری از ایجاد خسارت در محصول ضروری و مهم به نظر می‌رسد. همچنین از نتایج حاصل از ارزیابی سلامت بذر در آزمایشگاه برای پیش‌بینی پتانسیل استقرار زادمایه بذرزاد در مزرعه و به‌عنوان ابزاری در صدور گواهی بهداشت بهره برداری می‌شود (Munkvold, 2009). در این پژوهش ضمن مقایسه روش‌های مختلف ردیابی عامل بیماری سیاهک آشکار، به ارزیابی ارتباط بین میزان آلودگی بذر با میزان بروز بیماری در مزرعه و همچنین تأثیر آلودگی بذر روی برخی از شاخص‌های رشدی گیاهچه‌ها در مزرعه نیز پرداخته شد. در حال حاضر چندین روش برای ردیابی و شناسایی عامل بیماری سیاهک آشکار در نمونه‌های بذری جو وجود دارد. اما استفاده از روش‌های نوین آزمایشگاهی که ضمن اختصاصی بودن و سادگی، دارای حساسیت و سرعت بالا، مقرون به صرفه و قابل اطمینان باشند، از ملزومات در انتخاب روش‌های آزمایش سلامت بذر است. قارچ عامل بیماری از طریق پوسته بذر به داخل اسکوتلوم و جنین وارد می‌شود (Menzies *et al*., 2014). میسلیوم قارچ عامل بیماری سیاهک آشکار جو در محل پریکارپ، لایه آلورون، آندوسپرم و جنین قرار دارد. از آنجا که تنها میسلیوم قرار گرفته در جنین مسئول ایجاد آلودگی در گیاه و تولید خوشه‌های سیاهک زده است لازم است که جنین‌ها از بذر استخراج گردیده و سپس وجود میسلیوم روی جنین مورد بررسی قرار گیرد (Menzies *et al*., 2014). آلودگی توسط قارچ عامل بیماری از چند رشته از میسلیوم‌های کوتاه تا پوشاندن کامل اسکوتلوم متغیر است (Mathur and Kongsdal, 2003). از آنجا که میزان آلودگی جنین در مقادیر بسیار کم می‌باشد، بنابراین لازم است که تعداد زیادی از جنین‌ها استخراج گردند و با دقت زیادی مورد بررسی قرار گیرند. روش‌های ایکاردا و آزمون اصلاح شده شمارش جنین به‌عنوان روش‌هایی سریع، ارزان قیمت و در دسترس در مقایسه با سایر روش‌ها برای ردیابی قارچ عامل سیاهک آشکار در بذر توصیه می‌شود. واندرل و همکاران (Wunderle *et al*., 2012) گزارش کردند که تفاوت قابل ملاحظه‌ای در روش‌های شمارش جنین، مولکولی و سرولوژیکی برای ردیابی و شناسایی قارچ‌های *U. nuda* f. sp. *hordei* و *U. tritici* عامل بیماری سیاهک سخت و آشکار وجود ندارد. وارد و همکاران (Ward *et al*., 2004) گزارش کردند که نتایج سرولوژیکی به‌خوبی با سطح آلودگی تعیین‌شده توسط رنگ‌آمیزی جنین بذر مطابقت دارد. اما در روش سرولوژیکی، تولید آنتی‌بادی‌های اختصاصی کافی برای میکروارگانیسم هدف دشوار بوده و از نظر اقتصادی توجیه ندارد (Ward *et al*., 2004). در روش مولکولی، حساسیت بالای استفاده از آغازگرهای اختصاصی در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در مقایسه با روش‌های سرولوژیکی و مشاهده‌ای این امکان را فراهم می‌سازد تا آلودگی را حتی در میزان اندک تشخیص دهیم (Andreson *et al*., 2006). با این حال، با توجه به وقت‌گیر بودن مرحله استخراج DNA و عدم دسترسی به مواد شیمیایی و امکانات آزمایشگاهی، باید قبل از استفاده گسترده از آن مشکلات مربوطه را برطرف نمود (Asaad *et al*., 2014). مبّصر و همکاران (Mobasser *et al*., 2012a) در نمونه‌های بذری جمع‌آوری شده از مزارع استان‌های آذربایجان شرقی و خراسان رضوی برای ردیابی قارچ عامل بیماری سیاهک آشکار از آزمون شمارش جنین استفاده نمودند. همچنین از آزمون شمارش جنین برای ردیابی میزان آلودگی بذرها به سیاهک آشکار در نمونه‌های بذری جمع آوری شده از مزارع شهرستان‌های کلاله، علی آباد، گنبد، گرگان، فاضل آباد و آق قـلا نیز استفاده نمودند (Mobasser et al., 2012b).

بر اساس نتایج حاصل از ردیابی آلودگی سیاهک آشکار در نمونه‌های بذری با روش ایکاردا مشاهده شد که هنگامی که میزان آلودگی پایین باشد، امکان ردیابی آلودگی و مشخص کردن میزان دقیق آلودگی در نمونه‌ها امکان پذیر نمی‌باشد، هرچند امکان ردیابی آلودگی در مدت زمان کمتری امکان‌پذیر می‌باشد (Asaad *et al*., 2014). بنابراین در این روش در مقایسه با روش آزمون اصلاح شده شمارش جنین، دقت کمتری در ردیابی آلودگی در نمونه‌های بذری مشاهده شد. همچنین امکان ردیابی

آلودگی به سیاهک آشکار در بذرها تیمارشده با سموم شیمیایی در روش آزمون اصلاح‌شده شمارش جنین در مقایسه با روش ایکاردا وجود دارد (Anonymous, 2022). از ویژگی‌های آزمایشات سلامت بذر می‌توان به اختصاصی بودن، حساسیت و سرعت بالا، سادگی، مقرون به‌صرفه و قابلیت اطمینان بودن اشاره نمود (Mathur and Kongsdal, 2003). بنابراین روش آزمون اصلاح شده شمارش جنین در مقایسه با روش ایکاردا برای شناسایی آلودگی سیاهک آشکار بر اساس ارزشگذاری این مولفه‌ها در نمونه‌های بذری قابل اطمینان‌تر است. در نمونه‌های بذری جمع‌آوری شده از ارقام مختلف جو در استان‌های خوزستان، تهران، البرز، همدان، اصفهان، خراسان رضوی، خراسان شمالی و اردبیل با استفاده از آزمون اصلاح‌شده شمارش جنین قارچ *U. nuda* f. sp. *hordei* عامل بیماری سیاهک آشکار ردیابی و گزارش شد (Khaledi *et al*., 2024) که با مشاهدات این پژوهش مطابقت دارد.

بر اساس تجزیه و تحلیل ضرایب همبستگی برای میزان آلودگی ردیابی شده در آزمایشگاه و میزان بروز بیماری در مزرعه مشاهده شد که ضریب همبستگی محاسبه شده برای آزمون اصلاح‌شده شمارش جنین در مقایسه با روش ایکاردا به عدد یک بسیار نزدیک بوده که نشان‌دهنده همبستگی مثبت قوی بین میزان آلودگی ردیابی شده در آزمایشگاه در آزمون اصلاح شده شمارش جنین و میزان بروز بیماری در مزرعه است. در بعضی از ارقام رابطه تقریباً مستقیمی بین میزان آلودگی ردیابی شده در جنین با تعداد گیاهان آلوده مشاهده شده در مزرعه وجود دارد (Menzies *et al*., 2014; Woldemichael, 2019; Menzies *et al*., 1997; Marshall, 1959; Russel and Popp, 1951). مورتون و همکاران (Morton *et al*., 1960) گزارش کردند که ضریب همبستگی ۰/۹۴۶ را بین نتایج ۲۹۵ آزمون شمارش جنین و درصد خوشه‌های سیاهک زده که از نمونه‌ها رشد یافته بودند، بدست آوردند. در گیاه جو همبستگی مثبتی بین میزان آلودگی ردیابی شده در آزمایشگاه و بروز بیماری سیاهک در مزرعه مشاهده شده است (Rennie and Seaton, 1975). در گندم این رابطه چندان مستقیم نیست و به‌نظر می‌رسد تفاوت در حساسیت و مقاومت ارقام به نژادهای فیزیولوژیک قارچ سیاهک آشکار علت این تفاوت می‌باشد (Woldemichael, 2019; Doling and Hervey-murray, 1966; Ribeiro, 1963; Batts and Jeater, 1958; Batts, 1955; Hanna, 1937). خانزاده و همکاران (Khanzada *et al*., 1980) گزارش کردند که نسبت یک به یک بین درصد جنین‌های آلوده در آزمایشگاه و گیاهان آلوده در مزرعه وجود دارد. به‌طور کلی رابطه‌ی مستقیمی بین میزان آلودگی ردیابی‌شده در آزمایشگاه و میزان بروز بیماری در مزرعه مشاهده شده است که با نتایج مدیروست و نیلسن (Medeirost and Nielsen, 1977) مطابقت دارد. هرچند ممکن است سطح آلودگی در مزرعه نسبت به آزمایشگاه کمتر باشد که می‌تواند به علت میزان کمتر ظهور گیاهچه‌های از بذرهای آلوده و یا آلودگی کم جنین باشد که با نتایج رنی و سیتون (Rennie and Seaton, 1975) مطابقت دارد.

به‌طور کلی نتایج این پژوهش نشان داد که وجود آلودگی در بذر جو به سیاهک آشکار روی برخی از شاخص‌های رشدی گیاهچه‌ها در مزرعه تأثیر گذاشته و ضمن افزایش متوسط زمان ظهور گیاهچه‌ها در مزرعه، موجب کاهش نرخ ظهور گیاهچه‌ها در مزرعه می‌شود. زنگ و همکاران (Zang *et al*., 2023) گزارش کردند که آلودگی بذر به سیاهک آشکار جو موجب کاهش نرخ ظهور گیاهچه‌ها می‌شود که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد. همچنین وجود آلودگی در سطوح مختلف در بذر ارقام مختلف جو موجب کاهش درصد سبز نهایی مزرعه شد. منزیس و همکاران (Menzies *et al*., 1997) گزارش کردند که آلودگی بذرها به سیاهک هیچگونه تاثیری روی درصد جوانه‌زنی بذر نداشته، اما میزان سطح سبز نهایی مزرعه را کاهش می‌دهد که با مشاهدات پژوهش حاضر مطابقت دارد. خالدی و همکاران (Khaledi *et al*., 2023) گزارش کردند که با افزایش میزان آلودگی به سیاهک آشکار جو در بذر رقم ریحان، متوسط زمان ظهور گیاهچه‌ها و سرعت ظهور تجمعی آنها در مزرعه افزایش یافت اما نرخ ظهور گیاهچه‌ها و درصد سبز نهایی آنها در مزرعه کاهش داشته است که با مشاهدات این پژوهش مطابقت دارد.

پیش‌بینی میزان بروز و گسترش بیماری‌ها به علت عدم اطلاعات از حساسیت و مقاومت ارقام گیاهی به عوامل بیماریزا و تغییر مداوم شرایط آب و هوایی به‌آسانی امکان-پذیر نیست (Khaledi and Hassani, 2021). بر اساس نتایج واکاوی‌های آماری این پژوهش مشخص شد که میزان حساسیت و یا مقاومت رقم و شرایط آب و هوایی منطقه مورد کشت روی میزان بروز بیماری تأثیرگذار است که با

نتایج پژوهش‌های پیشین در تطابق بود (Wunderle *et al*., 2012; Khanzada and Mathur, 1988). نتایج حاصل از مقایسه میانگین شاخص‌های ارزیابی شده رشد گیاهچه در مزرعه نشان داد که نه تنها میزان آلودگی بذر بلکه واکنش ارقام نسبت به میزان آلودگی سیاهک آشکار متفاوت بود. نتایج این پژوهش با مشاهدات جوتیچ و همکاران (Jevtić *et al*., 2022) مطابقت دارد. آن‌ها گزارش کردند که شرایط آب و هوایی روی میزان بروز بیماری‌های سیاهک آشکار و لکه قهوه‌ای نواری جو تأثیر-گذار است. محققان گزارش کردند که واکنش ارقام مختلف جو به بیماری سیاهک آشکار متفاوت است (Li *et a*l., 2023; Abo-Elyousr *et al*., 2022; Ökmen *et al*., 2021; Menzies *et al*., 2010; Mueller, 2006) که با مشاهدات این پژوهش مطابقت دارد. بنابراین پیشنهاد می‌گردد که با توجه به تنوع بالای ارقام مورد کشت، نژادهای فیزیولوژیک قارچ سیاهک آشکار و شرایط آب و هوایی کشور، تحقیقات گسترده‌تری در زمینه رابطه آلودگی بین بذر و ظهور گیاهچه در مزرعه انجام گیرد.

نتیجه‌گیری کلی

به‌طور کلی نتایج این پژوهش نشان داد که آلودگی بذرها به قارچ عامل بیماری سیاهک آشکار موجب کاهش کیفیت نمونه‌های بذری و شاخص‌های رشد گیاهچه‌های حاصل از آن می‌شود. بررسی‌های انجام شده در این پژوهش نشان داد که همبستگی مثبت قوی بین میزان آلودگی ردیابی شده در آزمایشگاه و میزان بروز بیماری در مزرعه وجود دارد. در توسعه کشاورزی پایدار استفاده از بذر با کیفیت با هدف دستیابی به پتانسیل واقعی عملکرد و بهبود کیفیت محصول اهمیت ویژه‌ای دارد. اگرچه مزارع تولید بذر جو مورد بررسی در کشور از نظر میزان آلودگی به قارچ عامل بیماری سیاهک آشکار در سطح قابل قبولی قرار دارند، اما توجه به حفظ و حتی کاهش این میزان آلودگی برای بهبود سطح کیفیت و سلامت بذر تولیدی با مدیریت مناسب مزرعه امکان پذیر است. استفاده از بذر گواهی شده و ضدعفونی بذر با قارچکش‌های شیمیایی توصیه شده به عنوان مهمترین اقدامات مدیریتی پیش از کاشت و همچنین بازرسی مزارع از نظر اختلاط ژنتیکی و آلودگی به بیماری از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. به‌طور کلی نتایج حاصل از این پژوهش می‌تواند در بهبود و ارتقای روش ردیابی و شناسایی عامل بیماری سیاهک آشکار با رویکرد افزایش دقت کمک شایانی نماید. همچنین بررسی روند انتقال بیماری سیاهک آشکار به نسل بعد و میزان تأثیر آن روی سلامت گیاهچه‌های حاصل در مزرعه می‌تواند در انتخاب راهکارهای مؤثر مدیریتی برای کاهش اثرات مخرب این بیماری و بهبود کیفیت بذر تولیدی و در نتیجه افزایش عملکرد مؤثر باشد. پژوهش حاضر دیدگاه‌های جدیدی در مورد تأثیر میزان آلودگی بذرها روی برخی از شاخص‌های رشدی گیاهچه‌ها و میزان انتقال بیماری ارائه می‌دهد.

تشکر و قدردانی

نگارندگان از موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال برای حمایت مالی از این پژوهش با شماره پروژه ۰۱۰۹۸۲-۰۲۱-۰۸-۰۸-۲ تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

Abo-Elyousr, K. A. M., Mourad, A. I., Baenziger, P. S., Shehata, A. H. A., Eckstein, P. E., Beattie, A. D. and Sallam, A. 2022. Identification of putative SNP markers associated with resistance to Egyptian loose smut race(s) in spring barley. Genes, 13: 1075. **(Journal)** DOI: 10.3390/genes13061075

Albrechtsen, S. E. 2006. Testing methods for seed-transmitted viruses: principles and protocols. Wallingford, UK: CABI Publishing. **(Book)** DOI: 10.1079/9780851990163.0000

Andreson, R., Reppo, E., Kaplinski, L. and Remm, M. 2006. Genomemasker package for designing unique genomic PCR primers. BMC Bioinformatics, 7(2): 172-172. **(Journal)** DOI: 10.1186/1471-2105-7-172

Anonymous, 2009. International Seed Testing Association (ISTA): International rules for seed testing. Annex to chapter 7 Seed health testing. Seed health testing methods. International seed health testing association. Bassersdorf, Swizerland. **(Handbook)**

Anonymous, 2011. International Seed Testing Association (ISTA): International rules for seed testing. Detection of *Ustilago nuda* on *Hordeum vulgare* (Barley) by a de-hulling method and floating

embryo extraction. Seed health testing method. Basserdorf (Switzerland): ISTA. Annex to Chapter, 7: 7-013b. **(Handbook)**

Anonymous, 2017. International Seed Testing Association (ISTA); International Rules for Seed Testing. Proceedings of the international seed testing association. In Bassersdorf. Switzerland: Seed Science and Technology, 333 pp. **(Book)**

Anonymous, 2022. International Seed Testing Association (ISTA); International Rules for Seed Testing. Chapter 7: Validated Seed Health Testing Methods. 7-013a: Detection of *Ustilago nuda* in *Hordeum vulgare* subsp. *vulgare* (barley) seed by embryo extraction. Bassersdorf, Switzerland: International Seed Testing Association; 2022. Available from: https://www.seedtest.org/api/rm/TT74P4C725A2QMV/7-013a-detection-of-ustilago-nuda-in-hordeum-vulga-1.pdf

Anonymous, 2023. Agricultural Statistics. Ministry of Agriculture-Jahad. First volume, 95 pp. (In Persian)**(Book)**

Asaad, S., Koudsieh, S. and Najjar, D. 2014. Improved method for detecting *Ustilago nuda* in barley seed. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 47: 149-156. **(Journal)** DOI: 10.1080/03235408.2013.805496

Batts, C. C. V. 1955. Loose smut (*Ustilago titici* (Pers.) Rostr.) of wheat: physiologic specialization and reaction of varieties in England. Annals of Applied Biology, 43: 533-537. **(Journal)** DOI: 10.1111/j.1744-7348.1955.tb02502.x

Batts, C. C. V. and Jeater, A. 1958. The development of loose smut (*Ustilago tritici*) in susceptible varieties of wheat and some observations on field infection. Transactions of the British Mycological Society, 41: 115-125. **(Journal)** DOI: 10.1016/S0007-1536(58)80015-7

Clear, R. M. and Patrick, S. K. 1993. Prevalence of some seedborne fungi on soft white winter wheat seed from Ontario, Canada. Canadian Plant Disease Survey, 73: 143-149. **(Journal)**

Doling, D. A. 1968. Effects of infection with *Ustilago nuda* and of seed size on the vigour of barley plants. Transactions of the British Mycological Society, 51: 179-183. **(Journal)** DOI: 10.1016/S0007-1536(68)80051-8

Doling, D. A. and Hervey-murray, C. G. 1966. *Ustilago nuda* in Cappelle-Desprez winter wheat. Transactions of the British Mycological Society, 49: 437-441. **(Journal)** DOI: 10.1016/S0007-1536(66)80088-8

Etebu, E. and Nwauzoma, A. Barth. 2017. A mini-review on the development and emerging perspectives of seed pathology. Microbiology Research International, 5(14): 1-7. **(Journal)** DOI: 10.30918/MRI.51.16.020

FAOSTAT, 2023. FAOSTAT Database. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Statistics Division. Retrieved April 20, 2024. From https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL

Green, G. J., Nielsen, J. J., Cherewick, W.J. and Samborski, D.J. (1968). The experimental approach in assessing disease losses in cereals: rusts and smuts. Canadian Plant Disease Survey, 48: 61-64. **(Journal)**

Hanna, W. F. 1937. Physiologic forms of loose smut ofwheat. Canadian Journal of Research, 15: l4l-153. **(Journal)** DOI: 10.1139/cjr37c-011

Henning, E. 1913. Några småforsök med kornets flygsot (*Ustilago nuda*) [Some small trials with seed barley loose smut (*Ustilago nuda*)]. Sveriges utsädesförenings Tidskrift [Journal of Swedish Seed Society], 23: 137-141. **(Journal)**

Jevtić, R., Župunski, V., Lalošević, M., Brbaklić, L. and Orbović, B. 2022. Co-occurrence patterns of *Ustilago nuda* and *Pyrenophora graminea* and fungicide contribution to yield gain in barley under fluctuating climatic conditions in Serbia. Journal of Fungi, 8: 542. **(Journal)** DOI: 10.3390/jof8050542

Khaledi, N. and Hassani, F. 2021. Effect of seed-borne *Fusarium* species on constituents of essential oils from seeds of black cumin populations. Journal of Plant Protection Research, 61(3): 229-242. **(Journal)** DOI: 10.24425/jppr.2021.137945

Khaledi, N., Zare, L., Hassani, F. and Moslemkhani, C. 2023. Effect of seed disinfection on the quality indicators of germination and the incidence of loose smut disease of barley. Plant Protection, 45(4): 53-76. (In Persian) **(Journal)** DOI: 10.22055/ppr.2023.17997

Khaledi, N., Zare, L., Hassani, F. and Osroosh, S. 2024. Comparison of diagnostic methods, virulence and aggressiveness analysis of *Pyrenophora* spp. in pre-basic seeds in the barley fields. Tropical Plant Pathology, 49: 304-316. **(Journal)** DOI: 10.1007/s40858-023-00631-3

Khanzada, A. K. and Mathur, S. B. 1988. Influence of extraction rate and concentration of stain on loose smut infection of wheat seed. Pakistan Journal of Agricultural Research, 9: 218-222. **(Journal)**

Khanzada, A. K., Rennie, W. J., Mathur, S.B. and Neergard, P. 1980. Evaluation of two routine embryo test procedures for assessing the incidence of loose smut infection in seed samples of wheat (*Triticum aestivum*). Seed Science and Technology, 8: 363-370. **(Journal)**

Krull, C. F., Robayo, G., Valbuena, L. A., Rico, G., Castiblanco, L. E. and Bravo, L. E. 1966. Influence of seed size on the incidence of loose smut in Funza barley. Plant Disease Reporter, 50: 101-103. **(Journal)**

Li, J., Zhang, J., Liu, P., Li, P., Yao, X., Liu, H. and Ciren, Y. 2023. Multi omics analysis revealed a resistance mechanism of Tibetan barley (*Hordeum vulgare* L., Qingke) infected by *Ustilago hordei*. Plants (Basel), 12: 157. **(Journal)** DOI: 10.3390/plants12010157

Marshall, M. G. 1959. The incidence of certain seed-borne diseases in commercial seed loose smut of barley, *Ustilago nuda*. Annals of Applied Biology, 47: 232-239. **(Journal)** DOI: 10.1111/j.1744-7348.1959.tb02540.x

Mathur, B. S., and Kongsdal, O. 2003. Common laboratory seed health testing methods for detecting fungi. Bassersdorf, Switzerland: International Seed Testing Association (ISTA), 425 pp. **(Book)**

Medeirost, M. C. and Nielsen, J. 1977. Physiologic races of loose smut of wheat (*Ustilago tritici*) in Brazil. Canadian Journal of Plant Science, 57: 1033-1039. **(Journal)** DOI: 10.4141/cjps77-154

Menzies, J. G. 2008. Carboxin tolerant strains of *Ustilago nuda* and *Ustilago tritici* in Canada. Canadian Journal of Plant Pathology, 30: 498-502. **(Journal)** DOI: 10.1080/07060660809507548

Menzies, J. G., McLeod, R., Tosi, L. and Cappelli, C. 2005. Occurrence of a carboxin-resistant strain of *Ustilago nuda* in Italy. Phytopathologia Mediterranea, 44: 216-219. **(Journal)** DOI: 10.14601/Phytopathol_Mediterr-1796

Menzies, J. G., Nielsen, J. and Thomas, P. L. 1997. Long-term storage of *Ustilago tritici*. Plant Disease, 81(11): 1328-1330. **(Journal)** DOI: 10.1094/PDIS.1997.81.11.1328

Menzies, J. G., Steffenson, B. J. and Kleinhofs, A.A. 2010. Resistance gene to *Ustilago nuda* in barley is located on chromosome 3H. Canadian Journal of Plant Pathology, 32: 247-251. **(Journal)** DOI: 10.1080/07060661003739977

Menzies, J. G., Thomas, P. L. and Woods, S. 2014. Incidence and severity of loose smut and surface-borne smuts of barley on the Canadian prairies from 1972 to 2009. Canadian Journal of Plant Pathology, 36 (3): 300-310. **(Journal)** DOI: 10.1080/07060661.2014.927791

Mobasser, S., Jazayeri, M., Khazaei, F. and Sadeghi, L. 2012a. Wheat seed contamination with seed-borne diseases in cold climatic zone of Iran. International Journal of Plant Production, 6: 337-352. **(Journal)** DOI: 10.22069/ijpp.2012.769

Mobasser, S., Zare, L., Mehravar, M. 2012b. Status and contamination rate of informal wheat seeds to seed-born diseases in Golestan province. Iranian Journal of Seed Science and Technology, 1(2): 161-171. (In Persian)**(Journal)**

Morton, D. J. 1961. Trypan blue and boiling lactophenol for staining and clearing barley tissues infected with *Ustilago nuda*. Phytopathology, 51: 27-29. **(Journal)** DOI: 10.1007/s10658-004-1421-z

Morton, D. J., Tool, E. and Hagen, I. K. 1960. Procedure and effectiveness of the barley embryo test for loose smut in Dakota. Plant Disease Report, 44(10): 802-803. **(Journal)**

Mueller, K. J. 2006. Susceptibility of German spring barley cultivars to loose smut populations from different European origins. European Journal of Plant Pathology, 116: 145-153. **(Journal)** DOI: 10.1007/s10658-006-9049-9

Munkvold G. P. 2009. Seed pathology progress in academia and industry. Annual Review of Phytopathology, 47: 285-311. **(Journal)** DOI: 10.1007/s10658-006-9049-9

Murphy, B. R., Doohan, F. M. and Hodkinson, T. R. 2017. A seed dressing combining fungal endophyte spores and fungicides improves seedling survival and early growth in barley and oat. Symbiosis, 71: 69-76. **(Journal)** DOI: 10.1007/s13199-016-0418-7

Murray, T. D., Parry, D. W. and Cattlin, N. D. 2009. Diseases of small grain cereal crops: a colour handbook. London: Manson Publishing, 142 pp. **(Book)**

Nourbakhsh, S. 2024. List of important pests, diseases and weeds of major agricultural products, chemicals and recommended ways for their control. Plant Protection organization, Ministry of Jihad-e Agriculture, 217 pp. (In Persian)**(Book)**

Ökmen, B., Schwammbach, D., Bakkeren, G., Neumann, U. and Doehlemann, G. 2021. The *Ustilago hordei*-barley interaction is a versatile system for characterization of fungal effectors. Journal of Fungi, 7: 86. **(Journal)** DOI: 10.3390/jof7020086

Pedersen, P.N. 1967. On the relation between the placement of the flower in ears of barley and its susceptibility to attacks of loose smut (*Ustilago nuda*). Acta Agriculturae Scandinavica, 17: 39-42. **(Journal)** DOI: 10.1080/00015126709433138

Poormansuri, T., Jalali, S., Nasrollahi, M. and Golkar, K. 2012. The effect of Rovral TS, Carboxinthiram and their mixtures for simultaneous control of barley loose smut and leaf stripe by seed treatment. Proceedings of the 20th Iranian Plant Protection Congress. 25-28 August, University of Shiraz, Shiraz, Iran. pp: 215. (In Persian)**(Conference)**

Quijano, C. D., Wichmann, F., Schlaich, T., Fammartino, A., Huckauf, J., Schmidt, K., Unger, C., Broer, I. and Sautter, C. 2016. KP4 to control *Ustilago tritici* in wheat: Enhanced greenhouse resistance to loose smut and changes in transcript abundance of pathogen related genes in infected KP4 plants. Biotechnology Reports, 11: 90-98. **(Journal)** DOI: 10.1016/j.btre.2016.08.002

Rennie, W. J. 1982. Barley. Loose smut. In: ISTA Handbook on Seed Health Testing. Working Sheet No. 25. Zürich (Switzerland): ISTA. **(Handbook)**

Rennie, W. J. and Seaton, R. D. 1975. Loose smut of barley: the embryo test as a means of assessing loose smut infection in seed stocks. Seed Science and Technology, 3: 697-709. **(Journal)**

Ribeiro, M. A. 1963. Investigates sobre a hereditariedade da resistancia do trigo an *Ustilago nuda* (Jens.) Rostr. Agronomia Lusitana, 25: 367-381. **(Journal)**

Russell, R. C. and Popp, W. 1951. The embryo test as a method of forecasting loose smut infection in barley. Scientia Agricola, 31: 559-565. **(Journal)**

Semeniuk, W. and Ross, J.G. 1942. Relation of loose smut to yield of barley. Canadian Journal of Research Section C, 20: 491-500. **(Journal)**

Sharafizad, M. 2017. Effect of salicylic acid and drought stress on germination and activity of antioxidant enzymes of barely. Iranian Journal of Seed Science and Technology, 6: 161-169. (In Persian)**(Journal)** DOI: 10.22034/ijsst.2018.116567

Ward, E., Foster, J. S., Fraaije, A. B. and McCartney, H. A. 2004. Plant pathogen diagnostics, immunological and nucleic acid-based approaches. Annals of Applied Biology, 145:1-16. **(Journal)** DOI: 10.1111/j.1744-7348.2004.tb00354.x

Woldemichael, M.D. 2019. Importance, biology, epidemiology, and management of loose smut (*Ustilago nuda*) of barley (*Hordeum vulgare*): a review. East African Journal of Sciences, 13(1): 89-108. **(Journal)** DOI: 10.20372/eajs.v13i1.764

Wunderle J., Leclerque A., Schaffrath U., Slusarenko A. and Koch E. 2012. Assessment of the loose smut fungi (*Ustilago nuda* and *U. tritici*) in tissues of barley and wheat by fluorescence microscopy and real-time PCR. European Journal of Plant Pathology, 133 (4): 865-875. **(Journal)** DOI: 10.1007/s10658-012-0010-9

Yari, L., Hashemi Fesharaki, S. and Zareian, A. (2018). Effect of storage temperature on seed-borne fungi infestation and seeds vigor on barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars. Iranian Journal of Seed Science and Technology, 7: 13-24. (In Persian) **(Journal)** DOI: 10.22034/ijsst.2017.108013.1012

Zang, W., Zhang, X. M., Eckstein, P. E., Yang, F., Colin, M. and Beattie, A.D. 2023. Optimization of *Ustilago nuda* inoculum concentration for screening Un8-mediated loose smut resistance in barley reveals a resistance reaction that disrupts seed germination and suggests a role for abscisic acid in disease development. Phytopathology, 113(6): 1077-1083. **(Journal)** DOI: 10.1094/PHYTO-06-22-0219-R

Zegeye, W., Dejene, M. and Ayalew, D. (2015). Importance of Loose Smut [*Ustilago nuda* (Jensen) Rostrup] of Barley (*Hordeum vulgare* L.) in Western Amhara region, Ethiopia. East African Journal of Sciences, 9(1): 31-40. **(Journal)** DOI: 10.20372/eajs.v9i1.256

Evaluation of the transmission rate and effect of loose smut disease on the some growth indicators of barley seedlings in the field

Nima Khaledi[1*], Leila Zare[2], Saman Sheidaei[3]

Received: May 6, 2024 Accepted: July 31, 2024

Abstract

Quick and accurate diagnosis of pathogenic agents associated with seeds is necessary for the prevention and control of seed-borne diseases. Loose smut disease is one of the most important seed-borne fungal diseases of barley throughout world, which causes a decrease in crop yield. The aim of this study was to compare different methods of the detection and diagnosis of the loose smut disease agents in seed samples, transmission rate to the next generation and to evaluate the effect of seeds infection on the growth indicators of seedlings in the field. In order to detect infection in seed samples and identify the fungus that causes loose smut disease, from different cultivars of barley produced in the some fields of Isfahan, Khuzestan, North Khorasan, South Khorasan, Alborz and Hamedan provinces were sampled according to the International Seed Testing Association rules (ISTA). The results of comparison of diagnosis methods showed that the modified embryo test compared to ICARDA method can be considered as a more reliable method for detect smut infection in seed samples based on sensitivity, time required, simplicity and cost. The results revealed that there is a strong positive correlation between level of seed infection detected in the modified embryo test and the disease incidence in the field. Infected seeds has significantly affected the growth indicators of seedlings in the field while increasing the mean emergence time, the causes decreasing the field emergence rate and final emergence percentage in field. The findings of this research provide new insights into the effect of seed infection on the growth indicators of seedlings and transmission rate of disease in the field, which can be used for the revision of the national standard for barley seed and the effective management of this disease.

Keywords: Barley; Disease transmission; Embryo count test; Seed-borne; Seed quality; Smut

How to cite this article
Khaledi, N., Zare, L. and Sheidaei. S. 2024. Evaluation of the transmission rate and effect of loose smut disease on the some growth indicators of barley seedlings in the field. Iranian Journal of Seed Science and Research, 11(2): 1-16. (In Persian)**(Journal)**
DOI: 10.22124/JMS.2024.8660

COPYRIGHTS
Copyrights for this article are retained by the author(s) with publishing rights granted to the Iranian Journal of Seed Science and Research
The content of this article is distributed under Iranian Journal of Seed Science and Research open access policy and the terms and conditions of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY4.0) License. For more information, please visit http://jms.guilan.ac.ir/

1. Research Assistant Professor, Seed and Plant Certification and Registration Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. n_khaledi@areeo.ac.ir
2. Researcher, Seed and Plant Certification and Registration Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. mycology.spcri@gmail.com
3. Research Assistant Professor, Seed and Plant Certification and Registration Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. seedplant2024@gmail.com
*Corresponding author: n_khaledi@areeo.ac.ir