

شناسایی، مطالعه بیماریزایی و تعیین پراکنش گونه های آلترناریای کلزا در ایران*

Identification, pathogenicity and distribution of *Alternaria* spp. of canola in Iran

سیده لائین نورانی، واهه میناسیان** و ناصر صفایی

گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

پذیرش ۱۳۸۷/۹/۶

دریافت ۱۳۸۷/۷/۱۷

چکیده

از مزارع کلزا در استانهای گلستان، خوزستان، آذربایجان غربی و شهرستان کرج، در دو فصل زراعی ۸۶-۸۵ و ۸۷-۸۶ اندامهای گیاهی مشکوک به آلودگی توسط جنس *Alternaria* جمع آوری شدند. با بررسی مشخصات ریخت شناسی از ۵۰ جدایه خالص سازی شده آلترناریا پنج گونه شناسایی شد. نتایج سنجش بیماریزایی گونه ها در شرایط گلخانه نشان داد که: بیشترین شدت بیماری بر حسب درصد سطح برگ آلوده مربوط به دو گونه *A. brassicicola* (۶۹ درصد) و *A. raphani* (۵۶ درصد) بود، گونه *A. brassicae* شدت بیماری متوسطی داشت (۴۳ درصد) و گونه *A. arborescense* علائم خفیفی روی برگ ها ایجاد نمود. اما گونه *A. infectoria* هیچگونه علائم بیماری ایجاد نکرد و تفاوتی با شاهد نداشت. بر اساس نتایج این پژوهش گونه های *A. brassicicola* و *A. raphani* سبب بروز علائم شدیدتری می شوند. این چهار گونه بیماریزا برای اولین بار از روی کلزا در ایران گزارش می شوند. همچنین جمع آوری اندام های آلوده از ۴۰ مزرعه کلزای این استان ها به طور تصادفی جهت تعیین گونه غالب بیماریزا انجام گرفت. نتایج نشان داد که گونه *A. raphani* در استانهای خوزستان و آذربایجان غربی گونه غالب منطقه بود در حالیکه

* قسمتی از پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول ارائه شده به دانشگاه تربیت مدرس

** مسئول مکاتبه

گونه های *A. brassicae* و *A. brassicicola* در نمونه های بررسی شده از این استان ها مشاهده نشدند. نتایج بررسی پراکنش گونه ها در استان گلستان نشان داد که گونه *A. brassicae* ۸۵/۴۴ درصد و گونه های *A. raphani* و *A. brassicicola* به ترتیب ۱۳/۲۴ درصد و ۷/۶۷ درصد گونه های بیماریزا را تشکیل دادند. برآورد کلی درصد گونه ها در هر سه استان نشان داد که گونه *A. raphani* ۶۶/۱۱ درصد و گونه های *A. brassicae* و *A. brassicicola* به ترتیب ۳۳/۳۶ و ۲/۹۹ درصد گونه ها را در این مناطق تشکیل دادند. با توجه به نتایج این پژوهش گونه *A. raphani* را می توان گونه غالب بیماریزا در مناطق عمده کشت کلزا معرفی کرد.

واژه های کلیدی: *Alternaria arborescense*، *A. brassicae*، *A. brassicicola*، *A. infectoria*، *A. raphani*، *A. alternata*، بیماریزایی، کلزا، ایران

مقدمه

کلزا (*Brassica napus* L.) یک هیبرید آمفی دیپلوئید طبیعی، روز بلند و با مسیر فتوسنتزی C3 می باشد (Hejazi 2000). سه گونه آلترناریا به نامهای *Alternaria brassicae* (Berk.) Sacc.، *A. brassicicola* (Schw.) Wilts. و *A. raphani* Groves and Skolko عموماً در تمام دنیا از روی کلزا گزارش شده است (Verma & Saharan 1994). دو گونه *A. brassicae* و *A. raphani* در کانادا به عنوان عوامل رایج بیماری هستند. آلودگی برگ باعث کاهش شدید فتوسنتز در گیاه آلوده می شود و غلافها را مستقیماً تحت تاثیر قرار می دهد و در این حالت محصول شدیداً کاهش می یابد. در گزارشی از دنیاهارت و همکاران (Degenhardt et al. 1982) اثر توام دو گونه *A. brassicae* و *A. raphani* تحت شرایط گلخانه باعث ۴۲ درصد خسارت روی محصول کلزا در کانادا شده است. علاوه بر کاهش کمی محصول این بیمارگرها روی کیفیت دانه، اندازه، رنگ و قابلیت جوانه زنی آن نیز تاثیر می گذارند (Chahal & Kang 1980). در کشورهایی با آب و هوای معتدل آلودگی گیاهچه به صورت لکه های سیاه در روی کوتیلدونها و هیپوکوتیل دیده می شود (Petric 1975). در گیاهچه های کلزای آلوده به *A. brassicicola* در فنلاند، مصر و هند مرگ گیاهچه گزارش شده است (Abdou et al. 1991). در مجموع این سه گونه بیشتر محصولات خانواده چلیپائیان را آلوده می کنند. در تحقیقی که توسط کومار (Kumar 1999)، مبنی بر برآورد میزان خسارت برای سطوح مختلف آلودگی به بلایت آلترناریایی خردل هندی

(*Brassicae juncea*) وکلزا انجام گرفت، درصد کاهش محصول در درجات مختلف آلودگی (یک تا پنج) یک درصد تا بیش از ۷۵ درصد آلودگی برآورد شد که از ۷/۲ تا ۷۳/۷۱ درصد متغیر بود. بیماری بلایت آلترناریایی توسط *A. brassicae* سبب کاهش درصد روغن در بذر می شود، کاهش درصد روغن در ارقام متفاوت و حداکثر تا ۱۲/۵ درصد گزارش گردیده است (Shah & Ali 2002). در تحقیقی روی اثر لکه برگی آلترناریایی کلزا بر کیفیت دانه و عملکرد آن در سال ۱۹۹۵ توسط سیدل و همکاران (Seidle et al. 1995) در کانادا نشان داده شد که عموماً آلودگی آلترناریایی باعث چروکیدگی دانه و کاهش عملکرد آن می گردد. در آزمایشی که در خصوص برآورد خسارت لکه برگی آلترناریایی روی ارقام مختلف شلغم روغنی (*Brassicae campestris*) و خردل هندی توسط *A. brassicae* انجام گرفت، مشاهده شد که وزن دانه های غلاف های آلوده شده به شدت کاهش یافت. خسارت عملکرد از ۲۸/۶ تا ۷۱ درصد متفاوت بود (Ram & Chauhan 1998). با توجه به ارزش کلزا در ایران به ویژه در استان هایی مانند گلستان بررسی بیماری های آن به منظور برداشت محصول بهتر و بیشتر از اهمیت شایانی برخوردار است. در مورد اهمیت این بیماری در مزارع کلزای کشور و اینکه چه مقدار خسارت می زند کارهای گسترده ای انجام نشده است و شاید مختص به گزارشاتی از وجود این بیماری در مزارع باشد. علی رغم اهمیتی که این بیماری دارد تا کنون کار منسجمی در جهت بررسی بیماریزایی گونه های این قارچ روی کلزا (بررسی گونه های بیماریزا) در ایران صورت نگرفته است. از این رو هدف از این پژوهش مطالعه بیماریزایی گونه های آلترناریایی جدا شده از کلزا روی یک رقم متداول کشت شده در کشور می باشد. همچنین تعیین گونه غالب بیماریزای کلزا در سه استان گلستان، خوزستان و آذربایجان غربی از اهداف این تحقیق است.

روش بررسی

۱- نمونه برداری

جهت نمونه برداری بازدیدهایی از مزارع کلزای استانهای گلستان (هاشم آباد، کلاله و علی آباد)، خوزستان (دزفول و اندیمشک)، آذربایجان غربی (ارومیه و بوکان) و شهرستان کرج به عمل آمد، بررسی مزارع کلزا طی دو فصل زراعی ۸۶-۸۵ و ۸۷-۸۶ صورت گرفت.

اندامهای گیاهی که نشانه های مشکوک به آلودگی توسط جنس *Alternaria* را به صورت لکه‌های تیره رنگ داشتند جمع آوری و در داخل پاکتهای کاغذی جداگانه به آزمایشگاه منتقل شدند.

۲- جدا سازی از بافت های گیاهی

۲-۱) بدون ضدعفونی سطحی

بخشهای آلوده زیر بینوکولر مورد بررسی قرار گرفتند. در مواردی که علائم بیماری همراه با هاگ های *Alternaria* بود، هاگ ها توسط سوزنی سترون و ظریف برداشته شدند و به تشتکهای حاوی محیط غذایی PCA و PDA منتقل شدند این تشتکها در دمای $25-22^{\circ}\text{C}$ نگهداری شدند. مجدداً پرگنه های رشد یافته از آنها با بینوکولر بررسی و آنهایی که دارای مشخصات جنس *Alternaria* بودند به روش تک هاگ یا تک زنجیره هاگ خالص شدند.

۲-۲) با ضدعفونی سطحی

اندامهای گیاهی با نشانه های مشکوک به آلودگی و فاقد هاگ، ابتدا به مدت ۱۰ دقیقه با آب شیر شسته شدند و بخشهای نشانه دار توسط اسکالپل از بخشهای سالم جدا گردیدند. این قطعات توسط محلول وایتکس ۱۰ درصد (معادل نیم درصد هیپو کلریت سدیم) به مدت دو تا سه دقیقه ضدعفونی سطحی شدند و بلافاصله دو بار با آب مقطر سترون شستشو شدند. این قطعات روی کاغذ های صافی سترون آب گیری و بعد از بریدن آنها به قطعات کوچکتر، در تشتکهای پتری کشت شدند پرگنه های رشد کرده از آنها که مشخصات آلترناریا را داشت، به روش تک هاگ و یا برداشتن تک زنجیره هاگ خالص شدند.

۲-۳) جداسازی با استفاده از روش کاغذ صافی مرطوب

در این روش اندام های آلوده (برگ، غلاف و ساقه) در درون تشتک های حاوی کاغذ صافی مرطوب و در دمای $25-22^{\circ}\text{C}$ قرار داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت به کمک سوزن آزمایشگاهی ظریف سترون، از قارچ های رشد یافته روی اندام های آلوده آنهایی که مشخصات آلترناریا را داشتند، به روش تک هاگ یا تک زنجیره هاگ برداشته شده و به محیط غذایی PCA و WA منتقل گردیدند. تمامی روش های جداسازی با استفاده از روش (Ghosh *et al.* 2004) انجام گرفته است و با روش تک هاگ یا تک زنجیره هاگ خالص شدند.

۳- بررسی ریخت شناسی و شناسایی گونه ها

برای بررسی مشخصات ریخت شناسی، قرص‌هایی به قطر پنج میلی متر از حاشیه در حال رشد پرگنه های مربوط به هر جدایه خالص سازی شده برداشته شد و به تشتکهای حاوی محیط PCA منتقل شدند. این تشتکها در دمای $25-22^{\circ}\text{C}$ تحت نور فلورسنت با چرخه نوری ۸ ساعته و تاریکی ۱۶ ساعته نگهداری و بعد از یک هفته مورد بررسی قرار گرفتند. الگوهای کلی هاگ زایی شامل آرایش هاگ روی هاگ بر، تعداد هاگ در هر زنجیره و الگوی انشعاب یافتن با استفاده از بینوکولر مشخص گردید. همچنین با تهیه لام های میکروسکوپی جهت بررسی خصوصیات ریخت شناسی و به منظور شناسایی گونه از صفاتی همچون اندازه هاگ‌ها، رنگ، آرایش بند ها، وجود یا عدم وجود نوک و تزئینات سطح هاگ استفاده شد. برای تعیین ابعاد در هر مورد ۵۰ هاگ اندازه گیری شد. سپس با استفاده از کلید های شناسایی و با کمک و راهنمایی های دکتر قوستا از دانشگاه ارومیه گونه ها شناسایی شدند.

۴- اثبات بیماریزایی

در آزمایش نخست سنجش بیماریزایی شش جدایه از گونه *A. arborescense* روی رقم (Okapi به طور انتخابی) بررسی شد. سی و شش گلدان در سه تکرار، از هر گلدان دو تا گیاهچه و از هر گیاهچه دو برگ انتخاب شد. برای مایه زنی قرص های میسلومی پنج میلیمتری از حاشیه در حال رشد پرگنه های هفت روزه گونه های مورد نظر تهیه و روی برگهای گیاهان ۴۰ روزه کلزا در محل هایی که با نوک سوزن ظریف و سترون چهار زخم کوچک ایجاد شده بود، قرار داده شدند (Hoffman et al., 2002). به همین ترتیب برای شاهد قرص های آگار خالی روی زخمها قرار داده شد. قبل از قرار دادن بلوک ها سطح برگهای زخمی با توئین ۲۰ مه پاشی شدند. بعد از قرار دادن قرص ها روی هر برگ زخمی، مجدداً سطح برگ مرطوب گردید و گیاهچه ها پس از مایه زنی زیر کیسه پلاستیک با رطوبت نسبی ۹۰ درصد یا بیشتر و دمای $24-23^{\circ}\text{C}$ به مدت سه روز نگهداری گردیدند. علائم بعد از سه روز مشاهده گردید.

در سری دوم آزمایشات توان بیماریزایی پنج گونه شناسایی شده شامل: گونه های *A. arborescense*، *A. brassicae*، *A. brassicicola*، *A. infectoria* و *A. raphani* روی رقم Hayola308 به عنوان یک رقم متداول کشت شده در کشور مورد سنجش قرار گرفت. در اینجا از گونه *A. arborescense* دو جدایه به کار رفت که یکی همان جدایه بیماریزای آزمایش قبلی

و دومی از جدایه هایی بود که روی رقم Okapi ایجاد علائم نکرده بود و به عنوان شاهد دوم استفاده گردید. آزمایش در قالب طرح بلوک کامل تصادفی و با سه تکرار در شرایط گلخانه انجام گرفت. به تعداد ۳۶ گلدان در سه تکرار، از هر گلدان دو تا گیاهچه و از هر گیاهچه دو برگ انتخاب شد. مایه زنی همانند روش ذکر شده انجام گرفت.

۵- برآورد شدت علائم

ارزیابی شدت علائم مشاهده شده توسط دستگاه تعیین شاخص سطح برگ و در دو مرحله، شامل اندازه گیری کل سطح برگ و اندازه گیری بخشهای آلوده (سبززد و بافت مرده) و سپس تفاضل این دو مقدار، صورت پذیرفت. به این ترتیب که با استفاده از اسکالپل نوک تیز قسمت بافت مرده را بریده، سپس برگ آلوده بدون این قسمت اندازه گرفته شد و به ترتیب برای تمام ارقام با سه تکرار انجام گرفت. بعدا بخش زرد شده هم پرش داده شده و این بار سطح برگ منهای بخش سبززد اندازه گیری شد. مساحت بخش های پیمایش شده بر حسب سانتی متر مربع محاسبه گردید. سپس مساحت بخش های آلوده از کل مساحت برگ (سالم، سبززد و بافت مرده) کم شد. در نهایت شدت علائم بر حسب درصد سطح سبززدی و بافت مردگی بر حسب سانتی متر مربع نسبت به کل سطح برگ محاسبه گردید.

۶- تعیین گونه غالب بیماریزا

در بازدید هایی که در سال های ۱۳۸۵ و ۱۳۸۶ از مزارع کلزای استان های گلستان، خوزستان و آذربایجان غربی به عمل آمد، آلودگی های شدید برگ (عمدتا در استان گلستان)، غلاف و ساقه به صورت لکه های تیره رنگ آلترناریایی مشاهده گردید. جمع آوری اندام های آلوده از ۴۰ مزرعه کلزای این استان ها به طور تصادفی جهت تعیین گونه غالب بیماریزا انجام گرفت. اندام های برگ، غلاف و ساقه آلوده به آلترناریا جمع آوری، در پاکت های مخصوص جداگانه قرار داده شده و به آزمایشگاه منتقل گردیدند. کارهای مربوط به جداسازی، شناسایی و خالص سازی همانند آنچه که ذکر شد انجام گرفت. به طور متوسط تعداد ۲۰ برگ به صورت تصادفی از هر مزرعه انتخاب و در درون تشتکهای حاوی کاغذ صافی مرطوب قرار داده شدند. این کار برای غلاف و ساقه هم انجام شد و بعد از ۲۴ ساعت زیر بینوکولر بررسی شدند. به این ترتیب که تعدادی لکه روی هر کدام از اندام های گیاهی شامل برگ، غلاف و ساقه در نظر گرفته شد و سپس گونه های آلترناریای موجود روی هر لکه شمارش شد.

داده‌های به دست آمده حاصل از شمارش گونه‌های موجود روی لکه‌ها از مزارع مختلف به صورت جدولی تنظیم گردیدند. هم زمان با شمارش گونه‌ها روی لکه‌ها، با استفاده از سوزن سترون باریک گونه‌های مورد نظر جداسازی وخالص سازی شده و بر روی محیط‌های کشت PCA و PDA جهت انجام آزمایشات مربوط به اثبات بیماریزایی کشت داده شدند.

نتیجه

با توجه به بازدید هایی که از مزارع کلزای استان های ذکر شده در این پژوهش صورت گرفته، علائم لکه آلترناریایی روی قسمت های مختلف کلزا از قبیل برگ، ساقه و غلاف مشاهده گردید. در بعضی از ایستگاه های تحقیقاتی استان گلستان از قبیل کلاله و هاشم آباد شدت علائم به مراتب بیشتر بود و در بعضی از قسمت های مزرعه تا روی دانه پیشروی کرده بود. از آنجایی که گونه هایی مانند *A. brassicae* و *A. brassicicola* بذرزاد هم می باشند، این بیماری می تواند به عنوان تهدیدی جدی برای مزارع کلزای این استان ها به حساب آید.

۱- شناسایی عوامل بیماری

در خصوص مطالعات ریخت شناسی انجام یافته در این تحقیق با در نظر گرفتن خصوصیات همچون منفرد بودن یا زنجیره ای بودن هاگ ها، الگوی انشعاب زنجیره هاگ ، مورفولوژی هاگ ، وجود یا عدم وجود نوک در هاگ و رنگ پرگنه روی محیط کشت و با استفاده از کلید گونه های *Alternaria* (Simmons, 1994; 1995; 1999) از ۵۰ جدایه خالص سازی شده پنج گونه *Alternaria arborescense*، *A. brassicae*، *A. brassicicola*، *A. infectoria* و *A. raphani* به شرح زیر شناسایی شد.

۱-۱) *A. arborescense*: پرگنه های این گونه روی محیط کشت PCA به رنگ قهوه ای، زیتونی و قهوه ای تیره هستند. سطح هاگ منقوط یا زگیل دار می باشد. هاگ ها بیضوی تا تخم مرغی شکل و به رنگ قهوه ای تیره هستند. همچنین دارای ۱ تا ۵ بند عرضی و ۱ تا ۲ بند طولی در بخش عریض هاگ می باشند. ابعاد هاگ ۱۶-۶ × ۴۴-۱۲ میکرومتر است این گونه به دلیل تشکیل هاگ برهای دراز و تشکیل زنجیره های منشعب هاگ از بقیه گونه ها متمایز می شود (شکل ۱-۱).

۱-۲) *A. brassicae*: پرگنه ها روی محیط کشت PCA به رنگ طلایی، کرم و قهوه ای روشن

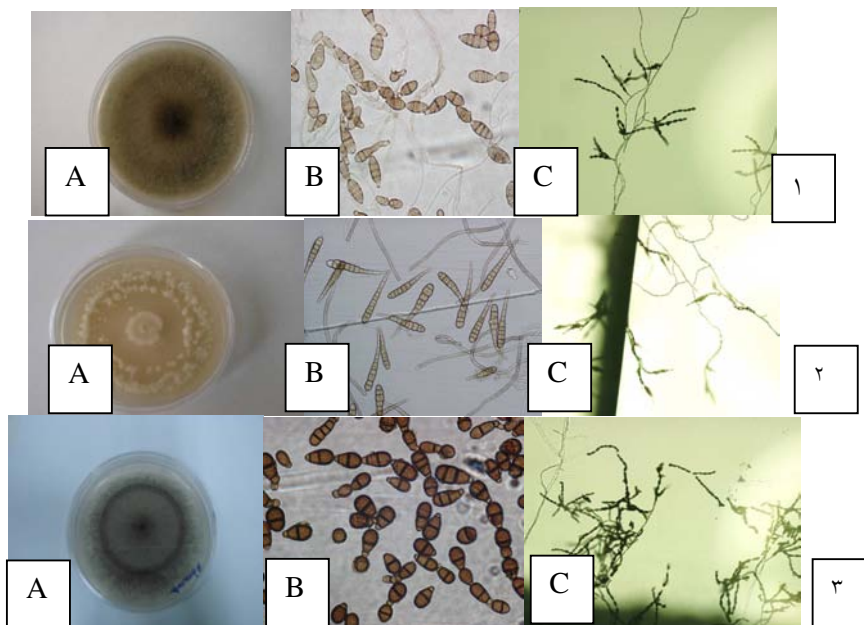
هستند. هاگ گریزی شکل وارونه یا تخم مرغی دراز، رنگ آنها قهوه‌ای روشن و دارای سطح صاف هستند. هاگ‌ها دارای نوک ستر می باشند که طول نوک متغیر و در مواردی به اندازه طول پیکره هاگ است. هاگ‌ها دارای ۴ تا ۱۲ بند عرضی و به ندرت ۱ تا ۳ بند طولی هستند. ابعاد هاگ ۴۰-۱۶ × ۱۸۴-۷۵ میکرومتر است (شکل ۱-۲).

۱-۳) *A. brassicicola*: پرگنه ها روی محیط کشت PCA به رنگ قهوه ای تیره مایل به سیاه می باشند. هاگ ها زنجیره ای دراز و منشعب و هاگ های اولیه بزرگتر از هاگ های انتهایی زنجیر است. هاگ ها فاقد نوک ولی دارای هاگ بر ثانویه تک یاخته ای به ابعاد ۵×۴ میکرومتر در انتهای هاگ هستند. هاگ های اولیه بزرگ تر، بیضوی و دارای ۵ تا ۷ بند عرضی و ندرتاً ۱ تا ۲ بند طولی در قسمت عریض هاگ هستند. ابعاد این هاگ ها ۱۶-۱۲ × ۴۰-۳۲ میکرومتر می باشد. هاگ های کوچکتر تخم مرغی شکل، دارای ۱ تا ۳ بند عرضی و فاقد بند طولی می باشند. ابعاد این هاگ ها ۶-۴ × ۲۸-۱۲ میکرومتر می باشد (شکل ۱-۳).

۱-۴) *A. infectoria*: پرگنه ها روی محیط کشت PCA به رنگ سفید تا سفید مایل به کرم هستند. ریشه های هوایی به فراوانی تشکیل می شوند. دارای هاگ بر اولیه ساده هستند، اما هاگ برهای ثانویه دراز نیز تشکیل می شود که ممکن است ۲ تا ۴ خمیدگی زانویی داشته باشند. هاگ ها به صورت زنجیره ای منشعب با ۴ تا ۸ هاگ می باشند. دارای ۳ تا ۷ بند عرضی و ۱ تا ۳ بند طولی در بخش عریض هاگ می باشند. جدایه هایی از *Alternaria* که دارای هاگ کوچک باشند و هاگ زایی در آنها به صورت زنجیره های منشعب می باشد و تولید هاگ بر ثانویه دراز می کنند، در گروه گونه ای *A. infectoria* قرار داده شده اند (Simmons & Roberts 1993). در حین تشکیل زنجیره هاگ، تشکیل هاگ بر ثانویه دراز در بین هاگ ها مهمترین صفت برای تمایز این گروه از دیگر گروه های دارای هاگ کوچک است (شکل ۱-۴).

۱-۵) *A. raphani*: پرگنه ها روی محیط کشت PCA به رنگ قهوه ای مایل به خاکستری هستند. معمولاً هاگ ها در زنجیره های ۲ تا ۵ عددی تشکیل می شوند. ولی ممکن است به صورت منفرد هم باشند. هاگ ها تخم مرغی شکل بوده و دیواره هاگ در محل بند های عرضی فرورفته می باشد. کلامیدوسپورها هم در سطح و هم در داخل محیط کشت رشد می

کنند. کلامیدوسپورها ابتدا به صورت زنجیری می باشند و سپس به صورت توده ای و نامنظم در می آیند. رنگ کلامیدوسپورها قهوه ای روشن تا قهوه ای تیره است. ابعاد هاگ ۲۰-۱۶ × ۳۵-۶۵ میکرومتر است (شکل ۱-۵).



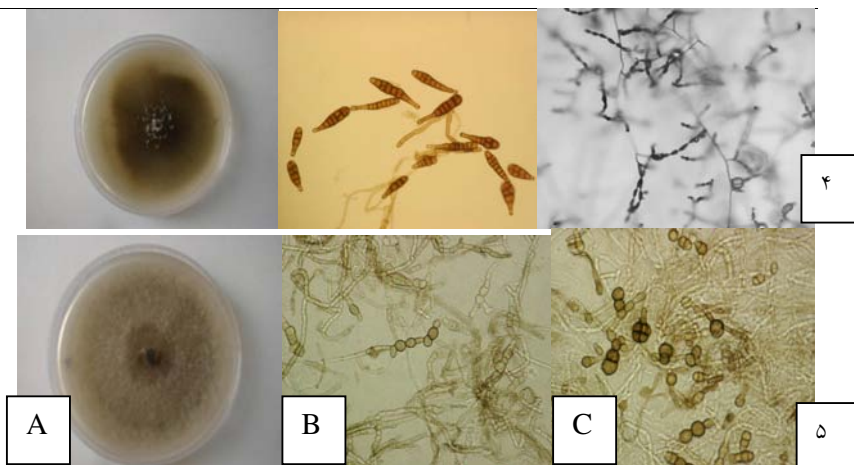
شکل ۱- (1): A: پرگنه، B: هاگ و C: هاگ بر، (2): A: پرگنه، B: هاگ و C: هاگ بر، (3): A: پرگنه، B: هاگ و C: هاگ بر، (4): A: پرگنه، B: هاگ و C: هاگ بر، (5): A: پرگنه، B: کلامیدوسپور و C: هاگ.

Fig. 1. (1): A: colony, B: conidia and C: conidiophores, (2): A: colony, B: conidia and C: conidiophores, (3): A: colony, B: conidia and C: conidiophores, (4): A: colony, B: conidia and C: conidiophores and (5): A: colony, B: clamidospore and C: conidia.

- بررسی بیماریزایی گونه ها

نتایج سنجش بیماریزایی شش جدایه انتخابی از گونه *A. arborescense* روی رقم Okapi نشان داد که یکی از جدایه های این گونه ایجاد علائم بافت مردگی (خفیف) و سبزدی (شدید) کرده بود و پنج جدایه دیگر علائمی ایجاد نکرده بودند.

ادامه شکل ۱-



آزمایش های مایه زنی برای سنجش بیماریزایی پنج گونه *A. brassicae*، *A. arborescense*، *A. brassicicola*، *A. infectoria* و *A. raphani* روی رقم Hayola308 به عنوان یک رقم متداول کشت شده در کشور به شرح زیر است:

A. arborescense

دو جدایه انتخاب شده از این گونه که یکی در آزمایش قبلی روی رقم Okapi بیماریزا بوده، ایجاد علائم لکه موجی نموده بود و دیگری غیر بیماریزا بود، بر روی رقم Hayola308 هر دو جدایه بیماریزا بودند.

A. brassicae

مایه زنی با این گونه سبب ایجاد هاله آبسوخته در اطراف قرص مایه قارچ شد و علائم بیشتر به صورت سبزدی بود که در نهایت به صورت خشکیدگی و چروکیدگی قسمت های آلوده سطح برگ نمایان شد.

A. brassicicola

علائم ناشی از گونه *A. brassicicola* به صورت لکه های آبسوخته موجی در هر دو سطح برگ بود همچنین لکه های بافت مرده وسیعی بر روی سطح برگ ایجاد گردید. برگ های مایه زنی شده توسط این گونه بعد از سه روز به صورت چروکیده درآمدند.

A. infectoria

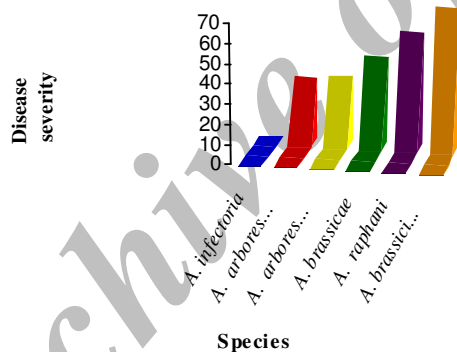
مایه زنی با گونه *A. infectoria* علائمی ایجاد نکرد و تفاوتی با شاهد نداشت.

A. raphani

در مایه زنی با گونه *A. raphani* هاله آبسوخته اطراف قرص آگار دیده شد و علائم به صورت سبزدی و بافت مردگی بود.

۲-۳ نتایج کلی توسعه علائم (سبزدی و بافت مردگی) گونه های مورد نظر روی رقم Hayola308

نتایج بررسی ها در شرایط گلخانه و تجزیه و تحلیل داده ها بر اساس ارزیابی شدت علائم مشاهده شده توسط دستگاه تعیین شاخص سطح برگ و اندازه گیری درصد سطح برگ آلوده و مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن نشان داد که بیشترین شدت بیماری بر حسب درصد سطح برگ آلوده مربوط به دو گونه *A. brassicicola* (۶۹ درصد) و *A. raphani* (۵۶ درصد) بود. گونه *A. brassicae* شدت بیماری متوسطی داشت (۴۳ درصد) و گونه *A. arborescense* باعث ایجاد علائم خفیفی روی برگ های آلوده شد که می توان این گونه را به عنوان یک گونه بیماریزا روی کلزا قلمداد کرد. گونه *A. infectoria* هیچ گونه علائمی ایجاد نکرد و تفاوتی با شاهد نداشت (شکل ۲).



شکل ۲- مقایسه میانگین شدت بیماری (%) پنج گونه آلترناریا بر روی کلزا رقم (Hayola308).

Fig. 2. Disease severity (%) of five *Alternaria* spp. on Hayola308 cultivar.

- تعیین گونه غالب بیماریزا

نتایج بررسی گونه غالب برای سه استان خوزستان، آذربایجان غربی و گلستان در (جدول

۱) ارائه شده است.

جدول ۱- تعیین پراکنش گونه های آلترناریا در استان های خوزستان، آذربایجان غربی و گلستان

Table 1. Survey on incidence and distribution of *Alternaria* species on canola in Golestan, Khuzestan and West Azarbeijan provinces.

Number	Provinces	Fields**	Total studied leaf spots	<i>A. brassicae</i> *	<i>A. brassicicola</i> *	<i>A. raphani</i> *
1	Khuzestan	BC/camp/L	136	0	0	136
2	Khuzestan	Fadak1/L	85	0	0	85
3	Khuzestan	MTS/1/L	120	0	0	120
4	Khuzestan	MTS/2/L	100	0	0	100
5	Khuzestan	MTS/3/L	122	0	0	122
6	Khuzestan	MTS/4/L	120	0	0	120
7	Khuzestan	MTS/5/L	120	0	0	120
8	Khuzestan	SHR1/L	100	0	0	100
9	Khuzestan	SHR2/L	135	0	0	135
10	Khuzestan	ZM/L	34	0	0	34
11	Khuzestan	Fadak2/L	64	0	0	64
12	West Azarbeijan	SA/1/L	10	0	0	10
13	West Azarbeijan	SA/4/L	14	0	0	14
14	West Azarbeijan	GRG/L	12	0	0	12
15	West Azarbeijan	KA/L	8	0	0	8
16	Golestan	H3/L	100	100	0	0
17	Golestan	K7/L	110	110	0	0
18	Golestan	K5/L	100	100	0	0
19	Golestan	K4/L	96	96	0	0
20	Golestan	H2/L	120	120	18	0
21	Golestan	H8/L	120	120	30	0
22	Golestan	K10/L	20	0	0	20
23	Golestan	H10/L	24	0	0	24
24	Golestan	K7/S	16	0	0	16
25	Golestan	K3/L	22	0	0	22
26	Golestan	H9/L	10	0	10	0
27	Golestan	K1/L	18	0	0	18

* Number of leaf spots infected with each of *Alternaria* species

L: leaf, S: Stem, BC/camp/: Research Station, MTS: Safiabab Research Station, ZM: Zaviye Moradi, **

SA: Seyedabad, GRG, Garegol, KA: Karimabad, K: Kalaleh, H: Hashemabad

نتایج داده های حاصل از شمارش گونه ها در استان های خوزستان و آذربایجان غربی نشان داد که ۱۰۰ درصد لکه ها حاوی گونه *A. raphani* بودند و دو گونه *A. brassicae* و *A. brassicicola* در نمونه های مورد بررسی از این استان ها مشاهده نشد. نتایج داده های حاصل از استان گلستان نشان داد که ۸۵/۴۴ درصد لکه ها مربوط به گونه *A. brassicae* بود.

همچنین گونه های *A. brassicicola* و *A. raphani* به ترتیب ۱۳/۲۴ و ۷/۶۷ درصد کل لکه ها را تشکیل دادند. نتایج کلی حاصل از برآورد درصد گونه های مورد نظر در هر سه استان نشان داد که گونه *A. raphani* ۶۶/۱۱ درصد کل لکه ها و گونه های *A. brassicicola* و *A. brassicae* به ترتیب ۳۳/۳۶ و ۲/۹۹ درصد کل لکه ها را تشکیل دادند.

بحث

شبه جنس *Alternaria* یکی از فراوانترین جنسهای قارچی است که در مکانهای متنوعی در دنیا یافت می شود و شامل گونه های بیماریزای گیاهی و پوده زی می باشد که موجب خسارت به بسیاری از گیاهان و فساد تولیدات گیاهی در انبارها می گردند. میزان خسارت در گونه های بیماریزای گیاهی متغیر است. این جنس از بیمارگرهای متداول بعد از برداشت محصولات کشاورزی بوده و موجب از بین رفتن ۲۰ تا ۴۰ درصد تولیدات گیاهی می شود (Bilgrami & Sinha, 1998, Rotem 1994). گونه های این جنس تولید متابولیت های متنوع و فراوانی می کنند که عده ای از آنها مواد سمی هستند و در بیماریزایی گیاهان نقش مهمی بازی می کنند و به عنوان مواد سمی اختصاصی میزبان شناخته شده اند. بیش از ۷۰ نوع ترکیب شیمیایی با سمیت های مختلف از این جنس گزارش شده است که بعضی از آنها از سموم خطرناک قارچی هستند و خصوصیتی از جمله تومورزایی و جهش زایی را دارا بوده و تعدادی نیز در ارتباط با بعضی سرطان ها می باشند (Bilgrami & Sinha 1998). در ایران اولین گزارش ها مربوط به گونه های *A. alternata* از گندم، *A. brassicae* از کلم و *A. solani* از گوجه فرنگی است که توسط اسفندیاری (Esfandiari 1948) ارائه شده است. اصولاً طبقه بندی گونه های آلترناریا بر اساس خصوصیات ریخت شناسی و ارتباط با میزبان می باشد. هر کدام از گونه های موثر بر روی کلزا (*A. brassicicola*، *A. brassicae*، *A. raphani*) دارای خصوصیات ریخت شناسی متمایز از یکدیگر می باشند. اخیراً پیشرفت های مهمی در زمینه طبقه بندی و شناسایی قارچ ها با استفاده از روش های مبتنی بر تجزیه و تحلیل DNA حاصل شده است. گونه های مختلف آلترناریا در مناطق مختلف جغرافیایی با استفاده از نشانگر RAPD تنوع نشان داده اند (Sharma & Tewari 1998, Cooke et al. 1998). در ایران بسیاری از گزارشهای مربوط به *A. alternata* وجود دارد که در این موارد شناسایی گونه بر اساس مفاهیم

قبلی و تنها با تاکید بر ابعاد هاگ به عنوان صفت جدا کننده استوار بوده است. با در نظر گرفتن مفاهیم جدید در مورد *A. alternata* و دیگر گونه هایی که دارای هاگ کوچک هستند، باید باز نگری مجددی در بسیاری از این گزارشات صورت پذیرد. بر اساس مطالعه پژوهشگران (Roberts 2001, Simmons 1999, Serdani et al. 2002)، گونه *A. alternata* متداولی نیست و درصد بسیار کمی از کل جدایه های جمع آوری شده را شامل می شود و بر خلاف آن گونه هایی مانند *A. arborescense* به فراوانی جدا شده است. مطالعات نیرگارد (Neergaard, 1945) روی *A. alternata* بر مبنای گروهی از فرم های *Alternaria* استوار بوده که در منابع توسط محققین مختلف تحت نام *A. tenuis* ذکر شده است. نیرگارد این گروه پراکنده را تحت نام گونه مرکب می خواند و برای *A. tenuis* مفهوم گونه را قید نمی کند. سیمونز (Simmons, 1967) روی صفات ریخت شناسی هاگ و الگو های تشکیل زنجیره هاگ خیلی تاکید داشته و آنها را برای شناسایی و طبقه بندی گونه های *Alternaria* مهم می داند. در خصوص گونه *A. brassicicola* الگوی تولید هاگ مشابه با گروه *A. alternata* می باشد. با این تفاوت که در گونه *A. brassicicola* هاگ ها فاقد بند طولی هستند و رنگ دیواره هاگ و بند عرضی تیره تر از سطح هاگ می باشد. سیمونز (Simmons, 1967) در مطالعه ای که روی گونه های تولید کننده مواد سمی اختصاصی میزبان انجام داده است، بر اساس الگوی هاگ‌زایی هشت گونه را از هم جدا کرده است که در بعضی منابع به عنوان پاتوارهایی از *A. alternata* عنوان شده اند. اندرسن و همکاران (Andersen et al. 2001) برای تفکیک گونه‌هایی که دارای هاگ کوچک هستند از داده های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی استفاده کرده‌اند و نتایجی را که آنها به دست آوردند مطابق با نتایج حاصل از تفکیک ریخت شناسی گونه ها بود و پیشنهاد کردند که نباید به جای گونه های دیگر نام *A. alternata* را به کار برد. به کار بردن روش های ویژه و کنترل شده، شامل: استفاده از کشت های خالص قارچ و رشد روی محیط‌هایی مانند PCA که مواد قندی کمتری دارند، دمای ۲۵-۲۰ °C و تحت نور سفید فلورسنت با چرخه نوری ۸ ساعته و تاریکی ۱۶ ساعته باعث تحریک هاگ زایی و بروز تفاوت ها به طور مشخص و قابل توجه شده و گونه ها به راحتی از هم تشخیص داده می شوند (Ghosa et al. 2004). در این مطالعه از محیط کشت PCA به خاطر نشان دادن تفاوت ها

در میان گونه ها، و همچنین استفاده از آن در توصیف گونه های این جنس توسط محققین مختلف، استفاده شد. استفاده از کشت های خالص تک هاگ و یا تک زنجیره هاگ در شناسایی و توصیف گونه های این جنس بسیار با اهمیت می باشد. سه گونه آلترناریا به نامهای *A. brassicicola* (Schw.) Wilts. *A. brassicae* (Berk.) Sacc. و *A. raphani* Groves and Skolko در اکثر نقاط دنیا به کلزا حمله می کنند و باعث کاهش شدید فتوسنتز می شوند. بافت برگی مهمترین بخش جهت آلودگی توسط *Alternaria* می باشد. ویژگی های برگ از جمله ضخامت کوتیکول، تعداد روزنه ها و رطوبت پذیری سطح برگ عوامل موثری برای آلودگی توسط این قارچ محسوب می شوند. تعداد روزنه ها اثر مستقیمی بر روی شدت آلودگی دارد. در ارقامی که ضخامت کوتیکول کمتر است آلودگی نسبت به ارقام با کوتیکول ضخیم تر بیشتر می باشد. عامل رطوبت پذیری سطح برگ در خصوص گونه هایی مانند *A. brassicae* مهمترین نقش را در جوانه زنی هاگ های این گونه، روی سطح برگ بیشتر ارقام گیاهان خانواده چلیپاییان، ایفا می کند (Rotem 1994). رخنه به داخل کوتیکول اغلب به وسیله تخریب بافت میزبان از طریق فعالیت های آنزیمی و فشار مکانیکی میسر می شود (Kolattukudy 1985). آنزیم ها و توکسین های قارچی باعث اختلال در فعالیت های متابولیسمی سلول های میزبان می شوند. میزبان با نشان دادن علائم بیماری از جمله زخم ها، کاهش تنفس و اختلال در رشد واکنش نشان می دهد (Rotem 1994). در گیاهان آلوده غلاف ها هم تحت تاثیر قرار می گیرند که در این حالت باعث کاهش شدید محصول می شود. (Verma & Saharan 1994). وقتی قارچ به ساقه و غلاف ها حمله می کند باعث کاهش عملکرد دانه، شکستگی دانه و کاهش کیفیت آن می شود. در انگلیس در سال هایی که شرایط برای بروز *A. brassicae* مناسب باشد در ۲۵ درصد کل دانه ها آلودگی مشاهده شده است (Humpherson 1985). در بعضی مناطق استرالیا آلودگی دانه ۱۴ تا ۲۴ درصد مشاهده شده است (Stovold et al. 1987). با توجه به کشت روز افزون کلزا در ایران به ویژه در استان هایی که شرایط برای تولید محصولی با کیفیت بالا فراهم می باشد، توجه به بیماری های این محصول از اهمیت شایانی برخوردار است. از این رو در این تحقیق سعی بر این بود که با انجام دادن آزمایش های سنجش بیماریزایی در مورد گونه های شناسایی شده در

مناطق مورد بررسی، میزان شدت علائم بر حسب درصد سطوح آلوده به دست آید. چنانچه ذکر شد گونه *A. brassicicola* باعث ایجاد بیشترین علائم (۶۹٪) بر روی رقم Hayola308 شد که به عنوان یکی از ارقام متداول در مناطق کشت کلزا می باشد. در گیاهچه های کلزای آلوده به *A. brassicicola* در فنلاند، مصر و هند هم مرگ گیاهچه گزارش شده است (Abdou et al. 1991). بر این اساس می توان گفت این گونه می تواند به عنوان خطر جدی برای محصول کلزا باشد. همچنین گونه *A. raphani* با داشتن (۵۶٪) علائم در درجه دوم اهمیت قرار داشت. گونه *A. brassicae* شدت علائم متوسطی نشان داد. جدایه های *A. brassicae* که به کلزا حمله می کنند از لحاظ قدرت بیماریزایی متفاوت هستند (Mukadan & Deshmukh 1977). تنوع مورفولوژیکی در جدایه های *A. brassicae* از میزبانهای خردل و کلزا می تواند روی بیماریزایی موثر باشد به طوریکه تفاوت در اندازه هاگ ها، همچنین داشتن بند طولی در هاگ و نیز وجود بند در نوک، که از خصوصیات بارز مورفولوژیکی این گونه به حساب می آید باعث تنوع در بیماریزایی و دوره ظهور بیماری می گردد (Mehta et al. 2003). در مورد مایه زنی با گونه *A. arborescense* بر روی رقم Hayola308 علائم مشاهده گردید و این نشانگر این است که می توان این گونه را به عنوان یک گونه بیماریزا بر روی کلزا قلمداد کرد. در زمینه تعیین پراکنش گونه های آلترناریای کلزا در مناطق مختلف دنیا که این بیماری به عنوان یکی از عوامل کاهش این محصول محسوب می شود، مطالعات کمی صورت گرفته و محدود به تعدادی گزارش می شود. در مطالعاتی که در این زمینه در کشورهایی مانند استرالیا (Sivapalan & Browning 1992)، کانادا (Petric 1974)، جنوب آفریقا (Holtzhausen & Knox-Davies 1974)، تایوان (Wu 1979) و آمریکا (Babadoost & Gabrielson 1979). انجام یافته گونه اصلی عامل بیماری برای سوختگی آلترناریایی *A. brassicicola* گزارش شده است، اگر چه در بعضی مناطق *A. brassicae* و *A. raphani* هم مهم هستند. در گزارشی از دزفارس و همکاران (Degenhardt et al. 1982)، بیان شده است که دو گونه *A. brassicae* و *A. raphani* در کانادا به عنوان عوامل رایج بیماری هستند. چنانچه ذکر شد در مورد تعیین پراکنش سه گونه *A. brassicae*، *A. brassicicola* و *A. raphani* در سه استان خوزستان، گلستان و آذربایجان غربی، مطالعاتی به عمل آمد.

اطلاعات بیان شده در این پژوهش مبنی بر تعیین پراکنش گونه‌ها بر اساس مشاهدات ما از گونه‌های مورد نظر بر روی لکه‌های موجود روی سطح برگ و شمارش گونه‌ها استوار می‌باشد. در نمونه‌های آلوده آورده شده از بعضی ایستگاه‌های تحقیقاتی استان گلستان از قبیل کلاله و هاشم آباد شدت علائم به مراتب بیشتر بود و در بعضی از قسمت‌های مزرعه تا روی دانه پیشروی کرده بود. از آنجایی که گونه‌هایی مانند *A. brassicae* و *A. brassicicola* بذرزاد هم می‌باشند و طبق نتایج حاصل از مشاهدات ما گونه *A. brassicae* گونه غالب مزارع گلستان بود لذا این گونه می‌تواند به عنوان تهدید جدی برای مزارع این استان به حساب آید. در این پژوهش مشاهده شد که گونه *A. brassicicola* با داشتن بیشترین علائم دارای کمترین پراکندگی در استان گلستان بود. در نمونه‌های بررسی شده دو استان خوزستان و آذربایجان غربی فقط گونه *A. raphani* مشاهده گردید. در صورتی که در استان گلستان با مطالعه اندام‌های آلوده هر سه گونه مشاهده شد. در مطالعات انجام شده در این تحقیق مشاهده شد که بین جدایه‌های *A. raphani* استان خوزستان و آذربایجان غربی از لحاظ ریخت‌شناسی تفاوت‌هایی وجود دارد، به این ترتیب که جدایه‌های خوزستان دارای ریشه‌های هوایی زیاد و کلأمیدوسپور کمتر و جدایه‌های آذربایجان غربی دارای ریشه‌های هوایی کمتر و کلأمیدوسپور زیاد می‌باشند. این مشاهدات می‌تواند منعکس‌کننده تفاوت‌هایی در بیماریزایی این جدایه‌ها باشد. تایید این مطلب نیازمند مطالعات مولکولی و سنجش بیماریزایی جدایه‌های به دست آمده از این دو استان می‌باشد. مطالعات گسترده‌تر و بررسی نمونه‌های آلوده بیشتر در زمینه تعیین پراکنش گونه‌های آلترناریای کلزا در کشور می‌تواند ما را در رسیدن به یافته‌های جدید یاری دهد.

سپاسگزاری

از جناب آقای دکتر یوبرت قوستا از گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه به خاطر راهنمایی‌های بی‌دریغ و بی‌منت ایشان در زمینه شناسایی گونه‌ها قدردانی می‌شود.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (33-37) متن انگلیسی مراجعه شود.

آدرس نگارندگان: سیده لائین نورانی، واهه میناسیان و ناصر صفایی، گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

Archive of SID