شناسایی، پراکنش و علایم شناسی عوامل بیماری ساق سیاه کلزا (*Leptosphaeria maculans* و *Leptosphaeria biglobosa*) در استان‌های مازندران و گلستان و تعیین حساسیت سه رقم تجاری کلزا*

IDENTIFICATION, DISTRIBUTION AND SYMPTOMOLOGY OF THE CAUSAL AGENTS OF RAPESEED BLACKLEG (*Leptosphaeria maculans* AND *Leptosphaeria biglobosa*) IN MAZANDARAN AND GOLESTAN PROVINCES AND DETERMINATION OF THREE COMMON RAPESEED CULTIVARS SUSCEPTIBILITY REACTION

علی زمان میرآبادی[1]**، کامران رهنما[1]، مهدی صدروی[2] و منصور صلاتی[3]

(تاریخ دریافت:۸۸/۵/۱۱ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۸/۱۲/۵)

چکیده

در سال‌های ۸۷-۸۶، *Leptosphaeria maculans* و *Leptosphaeria biglobosa*عوامل بیماری ساق سیاه کلزا (*Brassica napus* L.) از بررسی علایم بیماری و خصوصیات ریخت‌شناسی قارچ (شکل جنسی و غیرجنسی) در استان‌های مازندران و گلستان شناسایی و مورد ارزیابی قرار گرفت. جمعاً ۴۹ جدایه در دو منطقه به‌دست آمد. علائم بیماری ساق سیاه کلزا بر روی کوتیلدون‌ها، برگ‌های حقیقی، ساقه و محل تماس طوقه با خاک مشاهده گردید. بر اساس میزان رشد پرگنه در محیط سیب‌زمینی دکستروز آگار و تولید رنگدانه از مجموع ۴۹ جدایه، تیپ بیماری‌زای شش جدایه کلزا و یک جدایه خردل با استفاده از سه رقم افتراقی وستار، کوینتا و گلاسیر تعیین شد. بر اساس واکنش فنوتیپی جدایه‌ها با ارقام افتراقی مشخص شد که چهار جدایه مربوط به گروه غیر بیماری‌زای PG1 (*L. biglobosa*)، یک جدایه متعلق به گروه بیماری‌زای PG2 (*L. maculans*) و دو جدایه متعلق به گروه بیماری‌زای PGT(*L. maculans*) بودند. جدایه خردل در گروه غیر بیماری‌زا PG1 قرار گرفت. هم‌چنین حساسیت ارقام اکاپی، زرفام و هیولا۴۰۱ نسبت به هفت جدایه مذکور بررسی گردید. مشاهده واکنش فنوتیپی جدایه‌ها بر ارقام مورد مطالعه نشان داد که هر سه نسبت به نژاد PGT (جدایه D04-12) کاملاً حساس بودند.

واژه‌های کلیدی: کلزا، *Leptosphaeria maculans*، *Leptosphaeria biglobosa*، *Phoma lingam* ، ساق سیاه

---

* : بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول، ارایه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

** : مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: alizaman2006@gmail.com

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشیار بیماری شناسی گیاهی ،دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۲. استادیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج

۳. مربی پژوهش مرکز تحقیقات کشاورزی گرگان

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

کلزا (*Brassica napus* L.) گیاهی است یک ساله متعلق به خانواده شب بوییان که پنج گونه آن شامل کلزای آرژانتینی، کلزای لهستانی یا شلغم روغنی، خردل هندی، خردل حبشی و خردل سفید یا خردل زرد در سطح جهان به‌عنوان دانه روغنی کشت می‌شوند (Bhowmil 2003). کلزای آرژانتینی در زبان انگلیسی تحت عنوان Rapeseed، به آلمانی رپس و در فرانسه کلزا (در فارسی نیز به همین عنوان فرانسوی یا گلزا است) نامیده می‌شود (Yilan 2004).

بر اساس آمار سازمان خوار و بار جهانی در سال ۲۰۰۷، چین، کانادا، هند، آلمان، فرانسه، انگلستان، لهستان، جمهوری چک و ایالات متحده امریکا جزو نه کشور اول جهان از نظر سطح زیر کشت کلزا بوده و در مجموع بیش از ۷۰ درصد تولید کلزا را با حدود ۴۴ میلیون تن در اختیار داشته اند که ۱۲۶۴۹۰۱۰ تن آن مربوط به چین می‌باشد (FAO 2007). در سال ۱۳۸۸-۱۳۸۷ میزان سطح زیر کشت کلزا در ایران حدود ۱۴۶۲۵۰ هکتار بوده که استان‌های مازندران، گلستان و فارس به ترتیب با ۲۹۲۷۰، ۲۴۸۰۳ و ۱۴۸۰۹ هکتار بیشترین سطح زیر کشت را داشته‌اند. بیماری‌های زیادی در جهان، بسته به شرایط اقلیمی، گیاه کلزا را مورد تهدید قرار می‌دهد و باعث وارد آمدن خسارت اقتصادی به آن می‌گردد، که از مهم‌ترین آنها پوسیدگی سفید ساقه کلزا (Stem white rot) در اثر *Sclerotinia sclerotiorum* و ساق سیاه (Blackleg) ناشی از (anamorph *Phoma*) (Desmaz.) Ces&De Not *Leptosphaeria maculans lingam* (Tode: Fr.) Des. است که در بسیاری از مناطق جهان شایع می‌باشد (Bhowmik2003).

قارچ عامل ساق سیاه یکی از بیماری‌های مهم کلزا بوده که منجر به خسارت‌های اقتصادی مهمی در اروپا، استرالیا و آمریکای شمالی شده است (Fitt *et al*. 2006, West *et al*. 2001).قارچ *L.maculans* در حال حاضر بیش از ۶۰ سال در اروپا و حداقل ۸۰ سال در استرالیا حضور داشته است (Chen & Fernando 2006). همه‌گیری‌های ناشی از قارچ مذکور همواره زراعت کلزا را تحت تأثیر خود قرار داده به‌طوری که کاهش ۴۰ درصدی محصول را در سال‌های ۱۹۶۷-۱۹۶۶ در فرانسه (Gugel *et al.* 1992)، خسارت ۷۰ درصدی را در سال‌های ۱۹۷۸-۱۹۷۷ در آلمان و انگلستان، کاهش ۹۶ درصدی سطح زیر کشت کلزای استرالیا در سال ۱۹۷۴ وخسارت بیش از ۳۰ میلیون دلاری را در انگلستان، سال‌های ۱۹۹۵-۱۹۹۳ شاهد بوده ایم (Williams & Fitt 1999). ولی در کشور کانادا با توجه به کشت ارقام مقاوم خسارت‌های جدی از این بیماری گزارش نشده است (Gugel *et al.* 1992). قارچ عامل بیماری ساق سیاه توسط ترکیبی از دو گونه *L.maculans* (گروه A) و *L. biglobosa* (گروهB) ایجاد می‌شود که این دو گونه (یا دو تیپ) بر اساس خصوصیات مولکولی (Goodwin & Annis 1991, Johnson & Lewis 1994)، بیوشیمیایی، ریخت‌شناسی، سرعت رشد پرگنه در محیط کشت، تولید رنگدانه (Koch *et al.* 1989, McGee *et al*. 1978)، علایم برگی و ساقه (Huang *et al*. 2005)، تلاقی بین تیپ‌های آمیزشی، متابولیت‌ها (Fitt *et al*. 2006) وآزمون کوتیلدونی روی ارقام افتراقی وستار، کوینتا و گلاسیر قابل تفکیک است. بر اساس واکنش فنوتیپی جدایه‌های *Leptosphaeria* روی سه رقم افتراقی وستار، کوینتا و گلاسیر، پنج تیپ قابل شناسایی می‌باشد (Koch *et al*. 1991, Mengistu *et al*. 1991). جدایه‌های گروه بیماری‌زایی۱ (PG1) یا تیپ B روی

Archive of SID

www.SID.ir

وستار، کوینتا و گلاسیر غیربیماری‌زا می‌باشد که تحت عنوان *Leptosphaeria biglobosa* نامیده می‌شود. تیپ A شامل گروه‌های بیماری‌زایی PG2، PG3، PG4 و PGT بوده، که بر اساس واکنش فنوتیپی یا Phenotipic interaction (PI) جدایه‌ها بر ارقام افتراقی، تقسیم‌بندی شده و تحت عنوان *Leptosphaeria maculans* نامیده می‌شود (Chen & Fernando 2005, Rimmer *et al*. 2006). این دو گونه تحت عناوین مهاجم یا غیرمهاجم (Johnson & Lewis 1994)، گروه A یا گروه B (Williams & Fitt 1999) و Tox^{+} (واجد توکسین) یا Tox^{0} (فاقد توکسین) نام‌گذاری می‌شوند (Balesdent *et al.* 1992).

ساختار جمعیتی تیپ‌های بیماری‌زای *L.maculans* در جهان متغیر است (Balesdent *et al.* 1992). تا سال ۲۰۰۴ بیماری ساق سیاه کلزا از اروپا (۲۵ کشور)، آفریقا (۸ کشور)، آسیا (۱۶ کشور)، آمریکای شمالی (کانادا، آمریکا و مکزیک) آمریکای مرکزی (۵ کشور)، آفریقای جنوبی، اقیانوسیه (۵ کشور) و آرژانتین و برزیل با گروه‌های بیماری‌زای مختلف گزارش شده است (Fitt *et al*. 2006). فرم غیرجنسی قارچ عامل بیماری ساق سیاه کلزا و تیپ بیماری‌زای یک قارچ (PG1) یا *L.biglobosa* که از نظر اقتصادی خسارت چندانی نداشته، از استان گلستان در سال ۲۰۰۷ توسط *فرناندو و همکاران* (Fernando *et al*. 2007) گزارش شد، اما مرحله جنسی آن در سال ۲۰۰۸ از استان‌های مازندران و گلستان گزارش گردید (Zaman Mirabadi *et al.* 2008). بررسی‌های بیشتر نشان داد که تیپ دو (PG2) بیماری‌زای *L.maculans* در استان مازندران وجود دارد (Zaman Mirabadi *et al.* 2009b). علایم برگی قارچ به‌صورت لکه‌های مدور با اندازه‌های مختلف در ابتدا زرد رنگ و سپس سفید متمایل به خاکستری است. در روی لکه‌ها پیکنیدیوم‌های قارچ بعضاً مشاهده می‌شود. در مراحل گلدهی روی ساقه‌ها و نزدیک به طوقه لکه‌های عمدتاً طولی با حاشیه قهوه‌ای تا سیاه و در مرکز خاکستری که ممکن است دور تا دور ساقه را در بر گیرد مشاهده می‌شود (Naseri 2006). بررسی‌های *بنائی و همکاران* (Banaie *et al.* 2009) نشان داد که هیبرید هیولا۴۰۱ و رقم ساری گل نسبت به یک جدایه پرآزار *P.lingam* حساسیت زیادی دارد. نظر به اهمیت کشت کلزا و توسعه آن و وجود این بیماری لازم گردید تا ضمن توصیف و معرفی مشخصات و زیست‌شناسی این قارچ عامل بیماری، وضعیت ارقام تجاری تحت کشت در برابر آن تعیین گردد. این مطالعه جهت روشن ساختن نژادهای قارچ عامل بیماری ساق سیاه کلزا جهت مدیریت بیماری در آینده ضروری می‌باشد. توضیح این‌که با توجه به نقش دو گونه *L.maculans* و *L.biglobosa* در ایجاد بیماری ساق سیاه کلزا، در مواردی که لازم است نام هر دو گونه نوشته شود، به‌منظور جلوگیری از تکرار، تنها نام جنس *Leptosphaeria* بیان شده است.

روش بررسی

۱- زمان و مکان نمونه‌برداری

در فصل زراعی ۸۷-۸۶، برای جداسازی قارچ عامل بیماری ساق سیاه کلزا، نمونه‌برداری به‌طور تصادفی در مزارع از برگ (کوتیلدون‌ها و برگ‌های حقیقی از ابتدا تا انتهای فصل)، ساقه (از مرحله ساقه‌دهی تا برداشت)و بقایای به‌جامانده کلزا (سه ماه پس از برداشت) انجام شد. مزارع هدف برای نمونه‌برداری بر اساس سابقه کشت کلزا در منطقه (حداقل چهار سال)، شرایط آب و هوایی (مناطق

Archive of SID

www.SID.ir

دشت با هوای گرم و مرطوب و مناطق کوهستانی با هوای سرد و مرطوب) و نوع فعالیت‌های زراعی (عدم رعایت تناوب کلزا برای حداقل سه سال و عدم دفن یا سوزاندن به‌موقع بقایا) انتخاب شد.

۲- روش نمونه‌برداری

در مرحله رویشی با توجه به علایم مشخص بیماری روی برگ (از نقاط مدور با حاشیه زرد و مرکز سفید تا خاکستری) و ساقه (لکه‌های عمدتا طولی با حاشیه تیره و مرکز خاکستری) نمونه‌برداری انجام گرفت. مرکز بافت آلوده ساقه و برگ ممکن است دارای پیکنیدیوم یا فاقد آن باشد. نمونه‌ها با ذکر محل، تاریخ نمونه‌برداری، نوع میزبان، رقم یا هیبرید کشت شده و موقعیت جغرافیای آن، در کیسه‌های پلاستیکی جمع‌آوری شد. برای کاهش رطوبت بقایای جمع‌آوری شده، آنها را در آون دمای ۳۰ °C به‌مدت ۴۸ ساعت قرار داده و سپس در ۶-۴ °C تا زمان استفاده در یخچال نگه‌داری شد. هم‌چنین با توجه به فساد سریع نمونه‌های برگی و ساقه‌ای، جداسازی قارچ عامل بیماری پس از انتقال به آزمایشگاه، سریعاً انجام شد.

۳- بررسی علایم

علایم بیماری ناشی از *Leptosphaeria* در مراحل کوتیلدونی، برگی (لکه برگی)، ساقه‌دهی (ساق سیاه) کلزا و در مکان‌های نمونه‌برداری شده بر اساس نوع علایم مورد ارزیابی قرار گرفت.

۴- جداسازی و خالص سازی

برای جداسازی و خالص سازی *Leptosphaeria* از محیط‌های غذایی هشت سبزی (V8)، آگار (WA) و عصاره سیب‌زمینی دکستروز آگار (PDA) استفاده گردید (Chen & Fernando 2006). محیط‌های کشت پس از ترکیب با آب مقطر سترون بر اساس مقدار توصیه شرکت سازنده، حداقل ۳۰ دقیقه روی شیکر هیتر دار تا حصول محلول یک‌نواخت قرار داده شد و سپس در دمای ۱۲۱°C و فشار یک اتمسفر، به‌مدت ۱۶ دقیقه در اتوکلاو سترون گردید. پس از سرد شدن محیط کشت تا دمای ۴۵°C درجه سانتی‌گراد، ۲۰۰ قسمت در میلیون آنتی‌بیوتیک سولفات استرپتومایسین به‌علاوه ۱۰۰ قسمت در میلیون پنی‌سیلین برای جلوگیری از فعالیت باکتری‌ها به آنها اضافه گردید.

۴-۱) جداسازی از نمونه‌های برگی و ساقه

در روش اول زمانی که اندام غیرجنسی قارچ (پیکنیدیوم) در روی علایم برگی و ساقه‌ای مشکوک به بیماری (لکه برگی فوما) مشاهده نگردید، از مرز بین بافت سالم و آلوده، قطعات ۴ تا ۵ میلی‌متری را برش داده و پس از ضدعفونی با محلول سفیدکننده هیپوکلریت سدیم (NaOCl ۱ درصد) به‌مدت ۳۰ ثانیه، آنها را با آب مقطر سترون شستشو داده و سپس در بین دو عدد کاغذ صافی اتوکلاو شده کاملاً خشک و به تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت V8 منتقل شد. تشتک‌های مایه‌زنی شده در دمای ۲۵ °C در ۳۰ سانتی‌متری مقابل لامپ نور سیاه (Black light) ۴۰ وات (مدل FL-T8) قرار گرفت. ده روز بعد از رشد پرگنه قارچ و تشکیل پیکنیدیوم‌ها در تشتک پتری، پنج میلی‌لیتر آب مقطر سترون روی محیط کشت اضافه نموده و سپس با یک میله شیشه‌ایی، سوسپانسیون رقیقی از پیکنیدیوسپورها تهیه شد. پانصد میکرولیتر از سوسپانسیون مذکور به تشتک پتری حاوی آگار مایه‌زنی و بعد از ۴۸ ساعت، جوانه‌زنی آنها با یک میکروسکوپ نوری در بزرگ‌نمایی ۴۰ × بررسی و اسپورهای جوانه زده

Archive of SID

www.SID.ir

به محیط کشت V8منتقل گردید. در صورتی که پیکنیدیوم‌های قارچ بر روی علایم برگی و ساقه مشاهده شدند، در روش دوم نمونه دارای پیکنیدیوم را در شرایط رطوبتی بالا (۹۰ تا ۹۵ درصد)، درون یک تشتک پتری در میان ۲ کاغذ صافی مرطوب (به منظور تحریک پیکنیدیوم‌ها برای تولید تراوشات ارغوانی) قرار می‌گیرد. سپس به‌وسیله یک سوزن سترون زیر میکروسکوپ نوری در بزرگ‌نمایی ۴۰×، تراوشات ارغوانی (حاوی پیکنیدیوسپورهای خارج شده از دهانه پیکنیدیوم) با آب مقطر سترون در یک لوله آزمایش رقیق گردید و برای بررسی جوانه‌زنی اسپورها شبیه حالت اول بقیه مراحل دنبال شد.

۴-۲) جداسازی از بقایای به‌جا مانده در مزرعه

برای جداسازی *Leptosphaeria*، از بقایای ساقه کلزا (دارای پزدوتسیوم‌های بالغ قارچ) از سال‌های قبل استفاده گردید. قطعات ۵۰-۴۰ میلی‌متری از بقایای مذکور را برای ۳۰ ثانیه در آب مقطر سترون خیسانده و سپس در تماس با وازلین زیر در پوش یک تشتک پتری ۸۰ میلی‌متری حاوی محیط کشت آگار ۱/۵ ٪ قرار داده شد. برای رهاسازی حداکثر آسکوسپورها به سطح محیط کشت، تشتک‌ها به‌مدت یک ساعت در دمای اتاق (۲۰°C) و سپس یک ساعت در دمای ۵°C نگه‌داری شد. سپس ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر سترون به تشتک حاوی آسکوسپورهای آزاد شده اضافه و با یک قلم مو نقاشی به شناورسازی آنها کمک شد. برای انتقال تک اسپورها به تشتک حاوی محیط V8 از میکروسکوپ نوری و عدسی شیی X10 استفاده شد. تشتک‌های پتری مایه‌زنی شده با پارافیلم مسدود و در اتاقک رشد با دمای ۲۲±۰/۵° C ، در فاصله ۳۰ سانتی‌متری مقابل یک لامپ نور سیاه (۴۰ وات) قرار گرفت. مشخصات مربوط به جدایه‌های به‌دست آمده از *Leptosphaeria* در جدول ۱ و ۲ آمده است.

۵- شناسایی جدایه‌های *Leptosphaeria*

شناسایی شکل غیرجنسی قارچ عامل بیماری ساق سیاه کلزا (*Phoma lingam*) با استفاده از کلید *بوئرما و همکاران* (Boerema *et al.* 2004) بر اساس خصوصیات ماکروسکوپی مانند رنگ پرگنه، تراوشات ارغوانی پیکنیدیوم‌ها در محیط کشت V8 و خصوصیات میکروسکوپی مانند اندازه و شکل پیکنیدیوم‌ها و هم‌چنین رنگ و اندازه کنیدی‌ها انجام شد. برای شکل جنسی(*Leptosphaeria*) از کلید *سایوانسان* (Sivanesan 1984) استفاده گردید و شکل، اندازه و تعداد بندهای آسکوسپورها و خصوصیات مربوط به آسک و آسکوکارپ آنها ارزیابی شد.

۶- آزمون تعیین تیپ بیماری‌زایی

۶-۱) مشخصات طرح آزمایشی

برای تعیین تیپ بیماری‌زایی جدایه‌های قارچ *Leptosphaeria*، آزمایشی در قالب طرح کامل تصادفی با سه تیمار شامل ارقام افتراقی کوینتا (تیپ پائیزه)، گلاسیر (تیپ پائیزه) و وستار (تیپ بهاره) در سه تکرار و هر تکرار شامل شش گیاه کلزا، انجام شد. ارقام مذکور از مرکز بانک ژن گیاهی آلمان تهیه شد. تعیین حساسیت ارقام داخلی اکاپی، زرفام (ریجنت در کبری) و هیولا۴۰۱ به جدایه‌های *Leptosphaeria* به‌طور هم‌زمان با ارقام افتراقی مطالعه شد. مخلوط خاک زراعی الک شده، ماسه بادی و کود حیوانی(گوسفندی) پوسیده به نسبت ۱:۱:۱ برای بستر کشت استفاده شد. مخلوط به‌دست آمده دو مرتبه در یک دوره زمانی ۲۴ ساعته به‌مدت ۱۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ °C و فشار یک اتمسفر اتوکلاو شد. دو هزار

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱. مشخصات مربوط به جدایه‌های به‌دست آمده *Leptosphaeria* از استان‌های مازندران و گلستان

Table 1. Characteristics of *Leptosphaeria* isolates in Mazandaran and Golestan provinces

منطقه/روستا (Zone/Village)	تعداد جدایه (Isolate)	رقم (Cultivar)	شرایط آب و هوایی (Weather)	میزبان (Host)	زمان نمونه‌برداری (Sampling time)	فرم نمونه‌برداری (Sampling form)	استان (Province)
لالا (Lala)	3	Z و P	Mo	Ra	۸۶/۷/۱۴	R	M
مازاروستاق (Mazarostagh)	3	Z	Mo	Ra	۸۶/۷/۱۴	R	M
تلوکلا(Talokola)	5	Z	Mo	Ra	۸۶/۷/۱۴	R	M
خالخیل (Khalkhail)	2	Z	Mo	Ra	۸۶/۷/۱۴	R	M
دشت ناز (Dashte-naz)	6	H	Te	Ra	۸۶/۷/۲۴	LR	M
دشت نار (Dashte-naz)	3	-	Te	Mu	۸۶/۷/۲۴	R	M
بیکارآیش (Bikar-ayesh)	3	H	Te	Ra	۸۶/۹/۱۲	R	M
بیکارایش (Bikar-ayesh)	3	-	Te	Mu	۸۶/۹/۱۲	R	M
کوهی خیل (Kohikhail)	4	H	Te	Ra	۸۶/۹/۱۰و ۱۲/	SR	M
اسلام آباد (Eslamabad)	7	H	Te	Ra	۸۶/۷/۲۴	R	M
رستم کلا (Rostamkola)	1	H	Te	Ra	۸۶/۷/۲۴	L	M
سورک(Sorak)	4	H	Te	Ra	۸۶/۷/۲۴	R	M
بندر ترکمن (Bandar torkaman)	2	H	SD	Ra	۸۶/۷/۲۴	R	G
فاضل آباد (fazelabad)	3	H	Te	Ra	۸۶/۸/۳۰	R	G

G: Golestan; H : Hyola401; L:Leaf ; LR: Leaf & Residue; M: Mazandaran; Mo: Mountain; Mu: Mustard; P: PF (Sari gol); R: Residue;
Ra:Rapeseed; SD: Semi dry; SR: Stem& Residue; Z: Zarfam(Rigent&Cobra); Te: temperate;

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲. مکان جغرافیایی و علایم اختصاری جدایه های *Leptosphaeria*

Table 2. Geographical position and code of *Leptosphaeria* isolates

مکان نمونه‌برداری (Sampeling area)	علامت اختصاری (Code)	محل جمع‌آوری (Geographic location)
لالا (Lala)	L	۵ کیلومتری ساری- کیاسر (5km Sari-kiasar)
مازاروستاق(Mazarostagh)	M	۱۵ کیلومتری ساری- کیاسر (15km Sari-kiasar)
تلوکلا(Talokola)	T	۱۰ کیلومتری ساری- کیاسر(10 km Sari-kiasar)
خالخیل(Khalkhail)	KH	۳۵ کیلومتری ساری- کیاسر(35km Sari-kiasar)
دشت ناز(Dashte-naz)	D01	ساری- دشت ناز (Sari-Dashtenaz)
دشت نار(Dashte-naz)	D02	ساری- دشت ناز (Sari-Dashtenaz)
بیکارآیش(Bikar-ayesh)	D04	ساری- نکاء (Sari-Neka)
بیکارایش(Bikar-ayesh)	BK	۵ کیلومتری جویبار (5km Joybar)
کوهی خیل(Kohikhail)	BKH	۵ کیلومتری جویبار (5km Joybar)
اسلام آباد(Eslamabad)	K	۱ کیلومتری جویبار (1km Joybar)
رستم کلا(Rostamkola)	R	نکاء- بهشهر(Neka-Behshahr)
سورک(Sorak)	S	۱۰ کیلومتری ساری- نکاء(10km Sari-Neka)
بندر ترکمن(Bandar torkaman)	B	بندرگز- کردکوی (Bandargaz-Kordkoi)
فاضل آباد(fazelabad)	F	گرگان- تقی آباد (Gorgan-Taghiabad)

گرم مخلوط مذکور به ظروف پلاستیکی (گلدان) به ابعاد ۲۰×۱۳/۵×۸ سانتی‌مترمکعب (دارای شش قسمت ۶/۵×۶/۲۵ سانتی‌متر مربع) منتقل شد. سطح بستر برای کشت کلزا کاملاً یک‌نواخت و هموار گردید.

۶-۲) شرایط کشت و نگه‌داری گیاهان در گلخانه

در هر قسمت کشت (کرت آزمایشی) دو خط به موازات یکدیگر به عمق ۱/۵ سانتی‌متر در داخل گلدان‌ها حفر و بذرهای کلزا بیش از مقدار مورد نیاز (بیش از ۱۰ بذر جهت حصول اطمینان برای داشتن گیاهچه‌های کافی جهت تست بیماری‌زایی و با توجه به آزمایش تست قوه نامیه انجام شده) داخل ردیف‌های آماده شده قرار گرفت. سپس پوششی از بستر کشت را روی بذرهای پخش و تمام سطوح با یک آب فشان مرطوب شد. گلدان‌ها در گلخانه نگه‌داری شدند. در طول دوران جوانه‌زنی و سبز شدن گیاهان تا زمان انجام تست بیماری‌زایی روی کوتیلدون‌ها (از زمان کاشت تا مرحله کوتیلدونی شش تا هفت روز وقت می‌گیرد) هر روز بستر کشت از نظر میزان رطوبت کنترل شد، تا در صورت نیاز، رطوبت مورد نیاز تأمین گردد. هم‌چنین در هوای ابری، نور لازم برای گیاهان با ترکیبی از لامپ‌های سفید و زرد، فراهم گردید. پس از جوانه‌زنی بذور و بیرون آمدن آنها از خاک نسبت به تنک کردن کلزا تا حصول شش بوته در فواصل مناسب در بستر کشت اقدام شد. به‌منظور افزایش مدت زمان بقا و توسعه برگ‌های کوتیلدونی در صورت ظهور برگ‌های حقیقی (B1-B2) نسبت به سر برداری آنها اقدام گردید.

Archive of SID

www.SID.ir

۶-۳) تهیه مایه قارچ

جدایه‌های به‌دست آمده از *Leptosphaeria* در محیط V8 تلقیح و برای حداقل ۱۰ تا ۱۴ روز در دمای ۲۰°C در مقابل لامپ نور سیاه (۴۰) وات قرار گرفت. سپس یک تکه ۱۰ تا ۳۰ میلی‌متری از بخش فعال قارچ دارای پیکنیدیوم را از محیط کشت بریده و به یک لوله آزمایش حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون منتقل شد. لوله آزمایش به‌خوبی تکان داده شد، تا سوسپانسیون یک‌نواختی حاصل گردید. سوسپانسیون به‌دست آمده را از هشت لایه پارچه تنظیف سترون عبور داده و سپس با سمپلر به میکرو تیوپ‌های ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل گردید. میکروتیوپ‌ها در سانتریفیوژ به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۶۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد. محلول روی رسوب حاصله را خارج و پس از اضافه کردن آب مقطر سترون (تا حجم ۱ میلی‌لیتر) به آن، سوسپانسیون اسپور تکان داده شد. غلظت سوسپانسیون اسپور با هموسیتومتر (نئوبار آلمان) تخمین و در صورت نیاز، با آب مقطر سترون رقیق گردید. میکروتیوب‌های حاوی غلظت سوسپانسیون مورد نیاز مایه‌زنی (۲×۱۰^{۷} اسپور در میلی‌لیتر) در دمای ۲۰- °C در فریزر (تا یک سال با حفظ خاصیت بیماری‌زایی) نگه‌داری شد (Mengistu *et al.* 1991 and 1993).

(Moreno-Rico *et al.* 2001). در زمان استفاده، میکروتیوپ‌ها، از فریز خارج و برای ۱۵ دقیقه در دمای اتاق نگه‌داری شدند.

۶-۴) مایه‌زنی گیاهان

با دستکش‌های سترون و توسط یک سوزن انسولین ضدعفونی شده، زخم کوچکی بر کوتیلدون‌های هفت روزه در گلدان‌ها ایجاد و سپس در حدود ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون *Leptosphaeria* (به غلظت ۲×۱۰^{۷} اسپور در میلی‌لیتر) با یک سمپلر متغیر(۵۰-۵ میکرولیتر، کَپ دانمارک) در محل زخم تلقیح شد. سپس گلدان‌ها از گلخانه به اتاقک رشد (مدلKH-RH ، ساخت شرکت ایران خودساز) در شرایط رطوبتی اشباع ۱۰۰٪ در دمای ۲۰±۱ °C برای ۴۸ ساعت منتقل شدند. سپس تنظیمات دستگاه در شرایط رطوبتی ۹۵ درصد در یک دوره تناوبی ۱۶ ساعت روشنایی (با استفاده از دو لامپ نور زرد و دو لامپ نور سفید ۲۰ وات در فاصله ۱۵۰ تا ۲۰۰ میلی‌متری از کوتیلدون ها) و هشت ساعت تاریکی و دمای روزانه ۲۱°C و شبانه ۱۶°C تنظیم گردید.

۶-۵) تعیین شدت آلودگی کوتیلدون‌ها و گروه بیماری‌زای

ده روز بعد از زمان مایه‌زنی، علایم حاصله بر روی کوتیلدون‌های ارقام افتراقی (گلاسیر، کوینتا و وستار) مطابق روش *ویلیامز* (Williams 1985) از صفر تا نه درجه بندی شد (جدول ۳). میانگین قطر زخم روی کوتیلدون‌ها، حضور لکه‌های نکروز یا هاله کلروتیک، تشکیل پیکنیدیوم و هم‌چنین تغییر حالت بافت یادداشت برداری گردید. برای تفکیک گروه‌های بیماری‌زا از جدول ۴ استفاده شد (Chen & Fernando 2006).

۷- تعیین شاخص بیماری(Disease Index) روی ارقام داخلی

شاخص بیماری *Leptosphaeria* بر روی کوتیلدون‌های سه رقم کلزا (زرفام، اکاپی و هیولا۴۰۱) بر اساس فرمول $DI= \sum(N_{i\times} i)/N_t$ محاسبه شد. در این فرمول N_i تعداد محل‌های تلقیح آلوده با مقیاس i بین مقدار عددی صفر تا نه و N_t کل تعداد محل‌های آلوده می‌باشد. اگر میزان DI< ۴ باشد، حاکی از یک

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۳. واکنش فنوتیپی ارقام افتراقی کلزا نسبت به جدایه‌های قارچ *Leptosphaeria*

Table 3. Phenotypic interaction of rapeseed cultivars to the fungal isolates of *Leptosphaeria*

حساسیت رقم (Susceptibility of cultivar)	شرح علایم ایجاد شده جدایه‌های قارچ Leptosphaeria روی رقم افتراقی (Description of causes symptoms by isolates of *Leptosphaeria* on rapeseed differential cultivars)	مقیاس (Scale)
Resistant	No darking around wound, as in controls	0
	Limited blackening around wound, Lesion diameter 0.5-1.5 mm, faint chlorotic halo may be present. Sporulation absent	1
Intermediate	Dark necrotic lesions. 1.5-3 mm, chlorotic halo may be present, sporulation absent	3
	Non sporulating 3-6 mm lesions. Sharply delimited by dark necrotic margin, may show grey-green tissue collapse as in PI 7 and 9 or dark necrosis throughout	5
Susceptible	Grey-green tissue collapse 3-5mm diameter, sharply delimited, non darkened margin	7
	Rapid tissue collapse at about 10 days, accompanied by profuse sporulation in large, more than 5 mm, lesions with diffuse margins	9

جدول ۴. تعیین تیپ‌های بیماری‌زایی جدایه‌های *Leptosphaeria* براساس واکنش فنوتیپی آنها روی ارقام افتراقی گلاسیر، وستار و کوینتا

Table 4. Determination of pathogenicity group isolates of *Leptosphaeria* on the basis of phenotypic reaction on Glacier, Westar and Quinta cultivars.

گروه بیماری‌زایی (Pathogenicity group)	واکنش فنوتیپی رقم (PI)[#]		
	کوینتا (Quinta)	گلاسیر (Glacier)	وستار (Westar)
PG1[*]	0(R)	0(R)	0(R)
PG2	3-6(I)	0-2(R)	7-9(S)
PG3	3-6(I)	7-9(S)	7-9(S)
PGT	7-9(S)	3-6(I)	7-9(S)
PG4	7-9(S)	7-9(S)	7-9(S)

[*]: L.biglobosa Intermediate and S= [#]: Phenotypic interaction: R=Resistance, I= Susceptible

واکنش ناسازگاری یا غیر بیماری‌زای بودن جدایه دارد، در صورتی که ۶> DI ≥ ۴ باشد، نشان دهنده بیماری‌زا بودن جدایه با درجه متوسط تهاجمی (جدایه حدو واسط) است و نهایتاً اگر مقدار ۶≤ DI به‌دست آید، بیانگر قدرت تهاجمی بالای جدایه یا بیماری‌زا بودن آن است.

۸- محاسبات آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزارهای SAS® 9.1 و Excel 2007 انجام شد.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۵. تعیین تیپ‌های بیماری‌زایی جدایه‌های *Leptosphaeria* روی سه رقم افتراقی

Table 5. Determination pathogenicity group of *Leptosphaeria* isolates on three differential cultivars

جدایه (Isolate)	میانگین میزان آلودگی روی ارقام افتراقی Mean of infection on commercial cultivars: گلاسیر (Glacier)	کوینتا (Quinta)	وستار (Westar)	گروه بیماری‌زایی (Pathogenicity group)
D04-12	3.01(S*=3)	7.16(S=7)	7.46(S=7)	PGT
D04-3	2.5(S=3)	5.3(S=7)	3.14 (S=7)	PGT
D04-5	1.41(S=2)	3.72(S=7)	3.31(S=7)	PG2
F-aa	1.09(S=1)	2.2(S=3)	1.36(S=1)	PG1
B-2	0(S=0)	1.21(S=1)	2.53(S=3)	PG1
T-gg	0(S=0)	0(S=0)	0(S=0)	PG1
BKH-cc	0(S=0)	0(S=0)	0(S=0)	PG1
Control**	0(S=0)	0(S=0)	0(S=0)	PG1

*: Scale **: Sterile water

*: مقیاس **: آب مقطر سترون

نتایج و بحث

پراکنش *Leptosphaeria*

بررسی نمونه‌های مطالعه شده از بقایای کلزا در دو استان مازندران و گلستان نشان داد که با توجه به شرایط مناسب آب و هوایی، سطح زیر کشت بالای میزبان (کلزا) و هم‌چنین حضور تیپ‌های سازگار جنسی (در تمام نقاط نمونه‌برداری فرم جنسی قارچ روی بقایا مشاهده گردید)، قارچ عامل بیماری ساق سیاه کلزا در مناطق شمالی کشور گسترش زیادی داشته است. در این تحقیق از مجموع ۱۴ منطقه در دو استان مازندران و گلستان، ۴۹ جدایه از کلزا و خردل به‌صورت فرم جنسی و غیرجنسی جداسازی گردید (جدول ۱). با توجه به پراکنش قارچ مذکور در استان‌های مازندران، گلستان (بر اساس نتایج این تحقیق)، لرستان، شیراز، همدان و اندیمشک خوزستان (در مطالعات پراکنش قارچ عامل بیماری ساق سیاه کلزا در گزارش های بخش تحقیقات شرکت توسعه کشت دانه‌های روغنی) (Zaman Mirabadi *et al*. 2008)، اردبیل، قزوین و گیلان (Afshari-Azad *et al*. 2008) می‌توان نتیجه‌گیری نمود که در اکثر مناطق کلزا کاری کشور، *Leptosphaeria* حضور دارد.

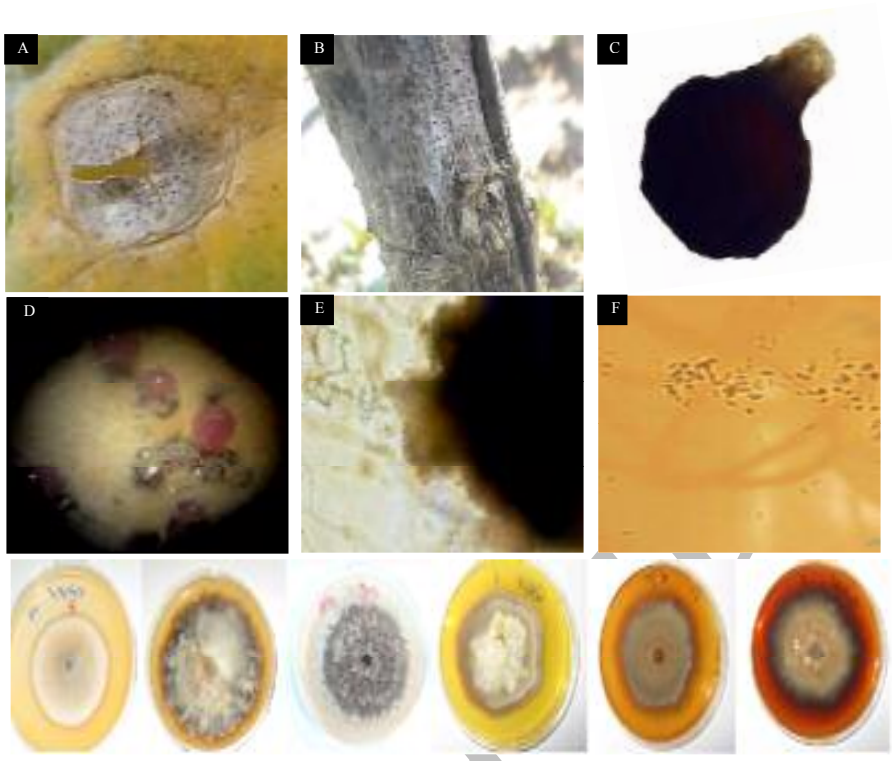
شناسایی قارچ عامل بیماری ساق سیاه کلزا

شکل آنامورف (*Phoma lingam*)

بر اساس کلید شناسایی *بوئرما و همکاران* (Boerema *et al*. 2004) پیکنیدیوم‌های *Phoma lingam*، با دو تیپ مختلف پزدوپارانشیماتوس (تیپ یک) و اسکلروپلکتنشیماتوس (تیپ دو) شناسایی شد. پیکنیدیوم نوع اول روی لکه‌های برگی و ساقه معمولاً به‌صورت منفرد و در یک ردیف منظم با اندازه‌های متغیر (۴۰۰)۳۵۰-۱۵۰ میکرومتر، گرد یا فلاسکی شکل با پایه

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱. فرم غیرجنسی : *Leptosphaeria* پیکنیدیوم نوع اول روی برگ(A)، پیکنیدیوم نوع دوم در طوقه(B)، پیکنیدیوم (×۴۰۰)(C)، تراوشات ارغوانی پیکنیدیوم (D)، الگوی خروج پیکنیدیوسپورهای (×۴۰۰)(E)، پیکنیدیوسپورها (×۱۰۰۰)(F) و به ترتیب از سمت چپ به راست پرگنه ۳ جدایه در محیط V8 و همان سه جدایه در PDA (G).

Fig. 1. Anamorph of *Leptosphaeria*: First type of pycnidium on leaf (A), Second type of pycnidium on stem (B), Pycnidium (×400) (C), Purpule exaduates of pycnidium (D), Pattern exite of pycnidiospores (×400) (E), Pycnidiospores (× 1000) (F) and From left to right colonies of three isolates on V8 and same isolates on PDA respectively (G).

عریض مشاهده شد (شکل ۱– A وC). پیکنیدیوم نوع دوم عموماً روی ساقه یا ریشه‌های سال قبل در بخش‌های چوبی، به شکل گرد برخی اوقات شبیه ریشه چغندر، در حدود (۱۰۰۰)۷۰۰–۳۰۰(۲۰۰) میکرومتر، با یک روزنه باریک دیده شد که بعضاً آنها عقیم بودند (شکل ۱– B). پیکنیدیوم‌ها قهوه‌ای تا سیاه و گاهی در گردن خود دارای پاپیل هستند (شکل ۱– C). پیکنیدیوم‌های رسیده یا فرم بالغ آنها دارای تراوشات ارغوانی رنگی بودند (شکل ۱– D). در محیط V8 تمامی جدایه‌ها، تولید رنگدانه ارغوانی نمودند و این در حالی است که برخی از جدایه‌های مذکور در محیط PDA تراوشات ارغوانی نداشتند. پیکنیدیوم‌ها در محیط کشت و روی برگ و ساقه‌ها به‌صورت نفرد یا مجتمع و یا در خطوط دایره‌ای متحدالمرکز یا پراکنده مشاهده شدند. خروج تراوشات (رها سازی پکنیدیوسپورها) از دهانه پیکنیدیوم به‌طور آهسته و با یک الگوی مشخص دیده شد (شکل ۱– E). پیکنیدیوسپورها شفاف، کوچک، بیضوی تا سیلندری،

Archive of SID
www.SID.ir

گاهی دارای دو بخش قطبی و تک سلولی بودند (شکل ۱- F). نود پیکنیدیوسپور از هر جدایه قارچ *Leptosphaeria* شمارش شد که میانگین ابعاد آنها در حدود (۵)۴/۵-۳,۵(۲) و (۲)۱/۵-۱ میکرومتر اندازه‌گیری شد. طول پیکنیدیوسپورهای تشکیل شده از جدایه‌های خردل گاها در حدود شش میکرومتر نیز تخمین زده شد. هم‌چنین به‌میزان کم پیکنیدیوسپورهای با کنیدی‌های کوچک‌تر (میکروکنیدی) به‌طول ۳-۱/۵ و عرض ۱/۵-۱ میکرومتر مشاهده شد. ریسه‌های قارچ دارای بند و در ابتدا شفاف بوده که با افزایش سن در محیط کشت تیره رنگ شدند. پرگنه جدایه‌های مختلف قارچ در محیط V8 و PDA به رنگ‌های سفید، شیری، نخودی، خاکستری و زیتونی مشاهده شد(شکل۳-G).

شکل جنسی (*Leptosphaeria*)

در استان‌های مازندران و گلستان پزدوتسیوم‌ها (آسکوکارپ ها) معمولاً به‌صورت زیر اپیدرمی روی ساقه‌ها و بعضا ریشه‌های باقیمانده از بقایای کلزا سال‌های قبل مشاهده شد که در شرایط مناسب آسکوسپورها از دهانه آنها خارج می‌شوند (شکل ۲- A و C). پزدوتسیوم‌ها به‌طور میانگین ۳۰۰ تا ۵۰۰ میکرومتر اندازه‌گیری شدند (شکل ۲- B) آسک‌ها به‌طور میانگین به‌طول (۱۵۰)۱۳۵-۱۲۰(۱۰۰) میکرومتر و عرض ۱۶-۱۲ میکرومتر و دارای هشت هاگ بودند (شکل ۲- D و E). آسکوسپورها به‌طور میانگین به‌طول (۸۷)۶۰-۵۰(۳۸) میکرومتر و عرض (۱۱)۹-۶(۵) میکرومتر، نسبتا دوکی شکل، دارای پنج بند، زرد تا قهوه‌ای بودند (شکل ۲- F).

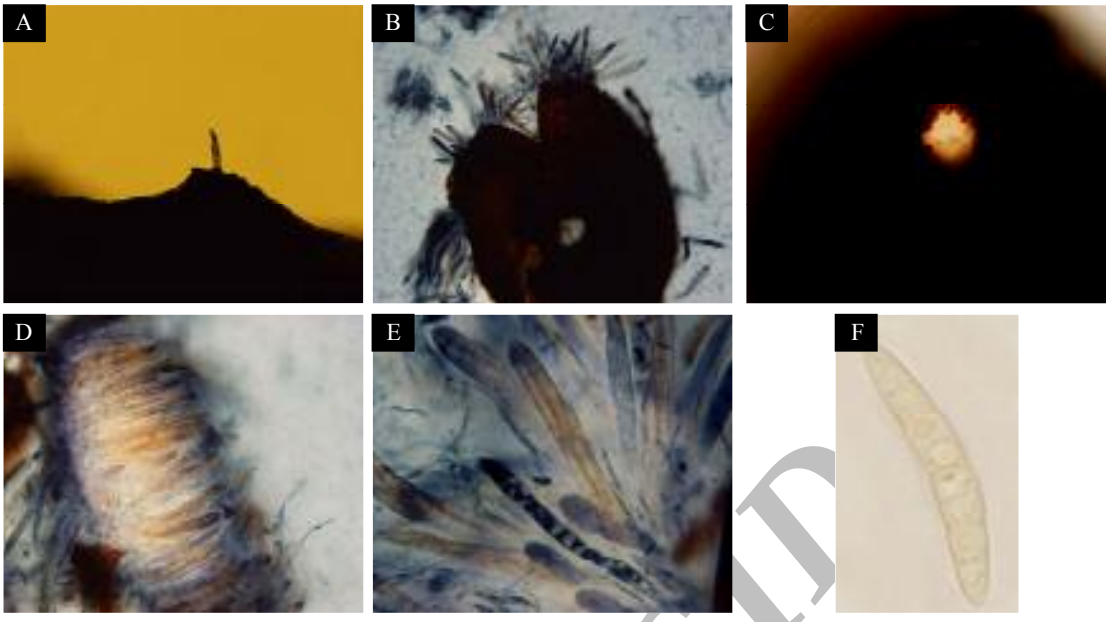
علایم بیماری

علایم کوتیلدونی

در نمونه‌برداری‌های انجام شده از مناطق مختلف تحت مطالعه، علایم برگی قارچ *Leptosphaeria* از مراحل اولیه رشد کلزا (مرحله کوتیلدونی،A) تا اواخر فصل رشد و زرد شدن غلاف‌ها (G4) مشاهده شد. علایم لکه برگی قارچ *Leptosphaeria* روی کلزا به مقاومت میزبان، بیماری‌زایی جدایه، مرحله آلودگی و شرایط آب و هوایی بستگی دارد. در صورت حضور مایه تلقیح اولیه علایم اولیه آلودگی کوتیلدون‌ها پس از ۴ تا ۶ روز مشاهده می‌شود (West *et al*. 2001). تیپ‌های غیر بیماری‌زا (*L.biglobosa*) معمولاً بدون علایم کوتیلدونی یا به شکل نقاط کوچک نکروزه، تیره و محدود و معمولاً با یک واکنش فوق حساسیت و غالباً بدون پیکنیدیوم مشاهده می‌شود (شکل ۳- C و A، B). علایم مذکور ممکن است با سایر علایم ناشی از خسارت عوامل قارچی (مانند *Peronospora parasitica* عامل بیماری سفیدک کرکی چلیپائیان) یا خسارت آفات (صدمات ناشی از کک‌ها .*Phyllotrea* spp) اشتباه گرفته شود ولی توجه به پوشش کرکی ناشی از بیماری سفیدک داخلی در پشت برگ‌ها و فرورفتگی ناشی از خوردگی کک‌ها روی برگ‌های اولیه در مقابل علایم ناشی از قارچ فوما (روی کوتیلدون‌ها و برگ‌های حقیقی) لکه برگی فوما تفکیک می‌شود. در صورت شرایط مناسب دمایی و رطوبتی بسته به نژادهای بیماری‌زای قارچ، گاها لب‌های کوتیلدون‌ها در اثر این قارچ از بین می‌رود و به رنگ خاکستری و به حالت چروکیده و آب سوخته مشاهده می‌شود که عمدتا این علایم توسط تیپ‌های بیماری‌زای قارچ (*L.maculans*) صورت می‌گیرد (West *et al*. 2001) (شکل ۳- E،D و F).

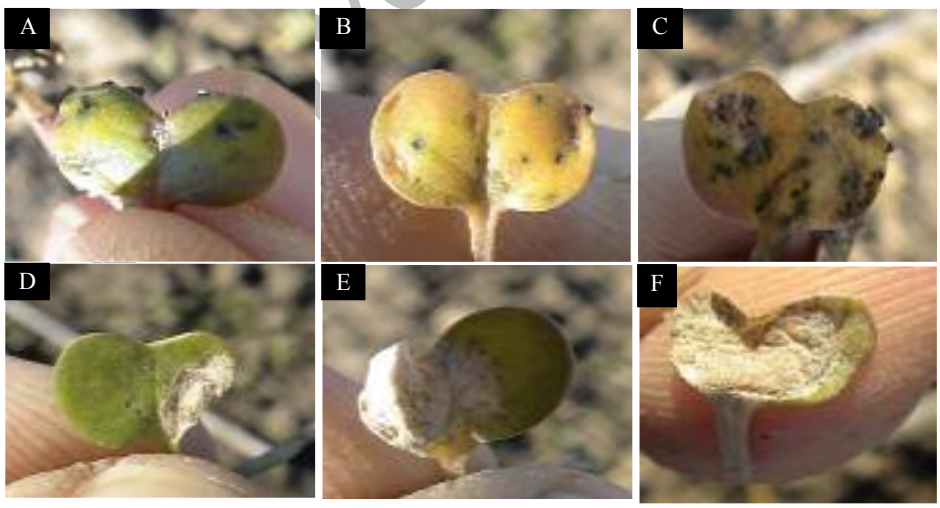
Archive of SID

www.SID.ir



شکل۲. *Leptosphaeria* : خروج آسک از دهانه آسکوکارپ (×۱۰۰)(A)، آسکوکارپ شکسته شده (×۲۰۰)(B)، دهانه آسکوکارپ (×۲۰۰)(C)، لایه هیمنیومی (×۴۰۰)(D)، آسک‌ها (×۱۰۰۰)(E) و آسکوسپور (×۱۰۰۰)(F).

Fig. 2. *Leptosphaeria*: Exit asci from ascocarp (×100)(A), Broken ascocarp (×200)(B), ascocarp (×200) (C), Hymenioum layer (×400)(D), Asci (×1000) (E) and Ascospors (×1000) (F)



شکل ۳. آلودگی کوتیلدون‌ها توسط قارچ *Leptosphaeria* در منطقه دشت ناز ساری: علایم لکه برگی تیپ‌های غیر بیماری‌زا (*Leptosphaeria biglobosa*) روی کوتیلدون‌ها (A، B و C) و علایم لکه برگی تیپ بیماری‌زا (*Leptosphaeria maculans*) روی کوتیلدون‌ها (D، EوF).

Fig. 3. Cotyledon infection by Leptosphaeria fungus in Dasht –e-Naz Sari: Caused by B group (*Leptospheria biglobosa*) (A, B and C) and by A group *(Leptosphaeria maculans*).

www.SID.ir

علائم برگی

در مراحل برگی کلزا از مرحله حضور یک برگ حقیقی (B1) تا شش یا هفت برگ حقیقی (B6- B7) و رزت (C) و در ادامه آن با شروع مرحله ساقه‌دهی (D) تا آخر فصل زراعی، بسته به شرایط منطقه و حضور قارچ در اغلب مناطق، مشاهده علایم برگی روی کلزا در مناطق آلوده امکان‌پذیر می‌باشد. بهترین زمان مشاهده علایم برگی قبل از مرحله رزت و یا شروع سرمای زمستان است. در مناطقی که فرم جنسی قارچ یا آسکوسپورها به‌عنوان مایه تلقیح اولیه بیماری وجود دارد (در بیشتر مناطق نمونه‌برداری در دو استان مازندران و گلستان)، با در نظر گرفتن زمان بلوغ و رهاسازی هاگ‌های جنسی از اواخر فصل تابستان به بعد (بر اساس نمونه‌برداری‌های انجام شده) و هم‌زمانی کشت کلزا با آن (از اواخر شهریور در مناطق کوهستانی تا نیمه دوم مهر ماه در مناطق دشت به‌عنوان بهترین زمان کاشت کلزا)، در صورت آلودگی بوته‌های کلزا بعد از گذشت تقریبا ۱۴ روز مشاهده علایم برگی و حضور فرم غیرجنسی قارچ (پیکنیدیوم) امکان‌پذیر می‌باشد (مناطق اسلام آباد و دشت ناز استان مازندران). علایم لکه برگی کلزا با توجه به تیپ‌های بیماری‌زای آن متفاوت است (West *et al*. 2001). در برخی نواحی یا درون یک مزرعه و گاها در روی یک برگ اندازه، تیرگی و روشنی علایم برگی با یکدیگر قابل تفکیک می‌باشد. در غالب نقاط نمونه‌برداری علایم توسعه یافته روی برگ‌ها که ناشی از آلودگی گیاه در مراحل اولیه بوده است، به شکل نقاط مدور خاکستری با حاشیه زرد و پیکنیدیوم‌های سیاه در مرکز به شکل دایره‌ای (متحدالمرکز) یا نامنظم (که عمدتاً مرکز علایم ترک خورده و در پایان از برگ به‌طور کامل جدا شده است) مشاهده می‌شود که این تیپ علائم عمدتا مربوط به *L.maculans* می‌باشد. در برخی نقاط (لالاو بندر ترکمن) علایم برگی مربوط به آلودگی‌های مراحل پایانی رشد رویشی گیاه به‌صورت نقاط کوچک تر و تیره مشاهد شد و پیکنیدیوم‌های قارچ در محل علایم برگی مذکور مشاهده نشد و یا مقدار کمی از آنها قابل رؤیت بود. معمولاً این نوع علایم مربوط به *L.biglobosa* نسبت داده می‌شود. اگر چه در برخی مناطق علائم ایجاد شده توسط *L.biglobosa* شبیه *L.maculans* می‌باشد (Toscano-Underwood *et al.* 2001).

علایم ساقه در مزرعه

در مزارع آلوده علایم ساقه‌ای از مراحل گلدهی به بعد (ماه‌های بهمن و اسفند در مازندران و گلستان با توجه تاریخ کاشت) مشاهده شد. این علایم در ابتدا به‌صورت زخم‌های کوچک و سیاه است (از مرحله گلدهی تا غلاف و رسیدگی بوته‌ها در تمام مناطق نمونه‌برداری رویت شد) که با پیشرفت بیماری به‌صورت عرضی و طولی گسترش یافته (غالباً دوکی شکل) که در نهایت می‌تواند دور ساقه را احاطه نماید. شروع محل آلودگی در محل میانگره‌ها (محل ریزش برگ ها) مشاهده شد. در برخی مناطق شروع محل علائم ایجاد شده روی ساقه بدون تماس با میان گره‌ها بوده که ممکن است در اثر خسارت مکانیکی ناشی از آفات در محل آلودگی باشد. مرکز زخم‌ها، سفید تا خاکستری با حاشیه بنفش یا سیاه بوده که گاها پیکنیدیوم‌ها روی آنها قابل رویت می‌باشند. معمولاً در ۱۰ سانتی‌متر ابتدای ساقه در نزدیکی طوقه تیپ بیماری‌زای قارچ (*L.maculans*) مشاهده می‌شود، در صورتی که بالاتر از منطقه مذکور هر دو تیپ بیماری‌زا و غیر بیماری‌زا (*L.biglobosa*) مشاهده می‌گردد (Toscano-Underwood *et al.* 2001). در مناطق دشت ناز ساری و اسلام آباد زخم هایی به شکل فرورفته

Archive of SID

www.SID.ir

(شانکر) که در نزدیک طوقه توسعه بیشتری داشته و آنها را به تیپ‌های بیماری‌زا (*L.maculans*) نسبت می‌دهند مشاهده گردید. درصورتی که در تیپ‌های غیر بیماری‌زا (*L.biglobosa*) عمدتاً در قسمت‌های بالاتر از طوقه و بدون شانکر مشاهده شد (در همه مناطق نمونه‌برداری مشاهده گردید). در آلودگی‌های حاد و در اواخر فصل با توسعه زخم‌های مذکور رسیدگی زودرس بوته‌ها (که در نتیجه مسدود شدن آوندها و محدودیت انتقال جریان آب و مواد غذایی شبیه علائم بیماری پوسیدگی سفید ساقه کلزا ناشی از قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* ایجاد می‌شود) در منطقه دشت ناز ساری به مقدار کم مشاهده گردید. شدت توسعه بیماری در یک مزرعه یا منطقه، با ارزیابی میزان پیشرفت آلودگی در ناحیه تماس طوقه با خاک (Taproot) نیز قابل بررسی می‌باشد.

شناسایی گروه بیماری‌زایی

از مجموع ۴۹ جدایه *Leptosphaeria* با توجه به‌میزان بذر ارقام افتراقی ارسال شده از مرکز بانک ژن گیاهی آلمان، چهار جدایه از روی کلزا در استان مازندران از مناطق اسلام آباد (سه جدایه D04-3، D04-5 و D04-12) و تلوکلا (T-gg)، دو جدایه در استان گلستان از مناطق فاضل آباد (F-aa) و بندر ترکمن (B-2) و یک جدایه از خردل (BKH-cc)در استان مازندران به‌علاوه تیمار شاهد (Control) روی سه رقم افتراقی وستار، کوینتا و گلاسیر مایه‌زنی و سپس واکنش فنوتیپی ارقام و گروه‌های بیماری‌زا تعیین گردید (جدول ۵). انتخاب این هفت جدایه بر اساس میزان رشد پرگنه و تولید رنگدانه در محیط کشت PDA انجام شد(Balesdent *et al.* 1992). جدایه‌های بیماری‌زا سرعت رشد کندتری نسبت به جدایه‌های غیر بیماری‌زا داشته و در محیط کشت رنگدانه تولید نمی کنند (Koch *et al.* 1989). در دو جدایه اسلام آباد (D04-3 و D04-12) مربوط به گروه بیماری‌زایی PGT و جدایه اسلام آباد D04-5 در گروه بیماری‌زایی PG2 جای گرفت. جدایه‌های فاضل آباد (F-aa)، بندر ترکمن (B-2)، تلوکلا (T-gg) و خردل (BKH-cc) غیر بیماری‌زا (*L.biglobosa*) بودند.

تعیین میزان آلودگی جدایه‌ها روی ارقام داخلی

نتایج تجزیه واریانس بیماری‌زایی جدایه‌های مختلف *Leptosphaeria* روی ارقام کلزا (زرفام، اکاپی و هیولا۴۰۱) نشان داد که در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی داری بین تیمارهای مختلف آزمایشی وجود دارد (جدول ۶).

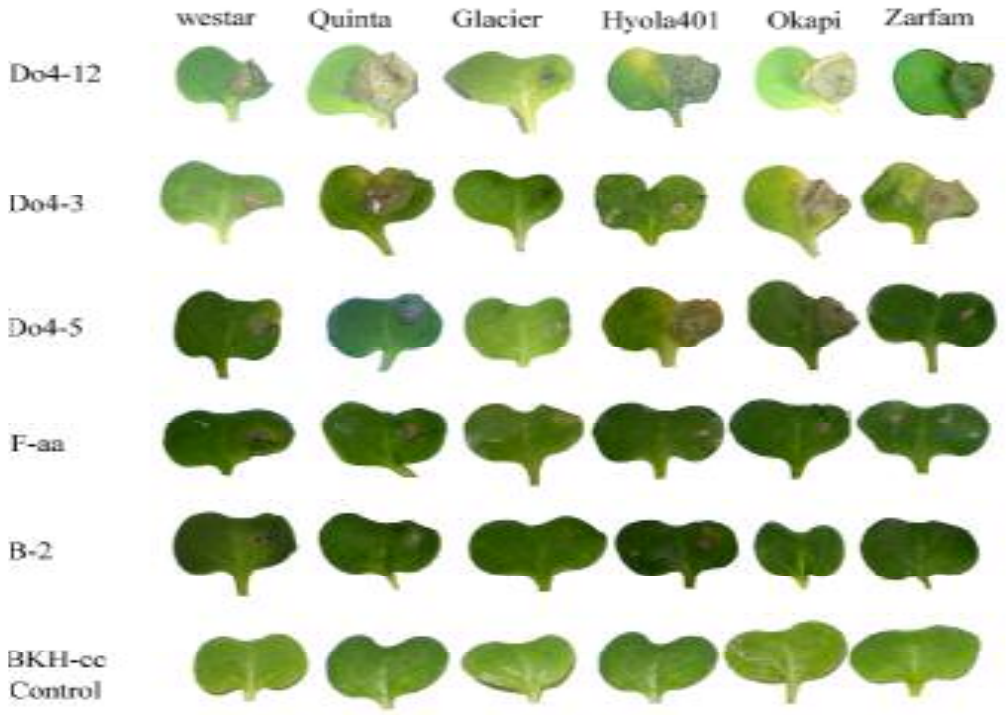
جدول مقایسه میانگین‌های هفت جدایه قارچ *Leptosphaeria* به‌علاوه تیمار شاهد (آب مقطر) بر روی ارقام کلزا (اکاپی، زرفام و هیبرید هیولا۴۰۱) نشان داد که جدایه D04-12 روی هر سه رقم داخلی قدرت بیماری‌زایی بالایی داشته است، در حالی‌که واکنش ارقام نسبت به جدایه های D04-3 و D04-5 متفاوت بوده است.

جدایه‌های F-aa، B-2، T-gg، BKH-cc و شاهد بر روی هر سه رقم غیر بیماری‌زا بودند. واکنش فنوتیپی رقم اکاپی به هر سه جدایه اسلام آباد بیانگر حساسیت بالای این رقم نسبت به زرفام و هیولا۴۰۱ است (شکل ۴).

در کانادا عموما تیپ دو (PG2)، در استرالیا، انگلستان و آمریکا غالبا تیپ سه (PG3) بیماری ساق سیاه کلزا شایع می‌باشد. در برزیل، سال ۲۰۰۳ تیپ یک، دو و سه بیماری گزارش شد (Fernando & Parks 2003). تیپ چهار (PG4) ساق سیاه برای اولین بار در سال ۲۰۰۵ از کانادا گزارش شد (Chen & Fernando 2005). بررسی‌های انجام شده در کشور مجارستان در سال ۲۰۰۶ بیانگر

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۴. بررسی واکنش فنوتیپی جدایه‌های فاضل آبادaa، تلوکلاgg، بندرترکمن۲، بیکارآیش خـردل cc، اسـلام آباد ۳،۵، ۱۲ و شاهد روی ارقام وستار، کوینتا، گلاسیر، زرفام، اکاپی و هیولا۴۰۱ در شرایط آزمایشگاهی

Fig. 4. Phenotipic interaction F-aa, T-gg, B-2, BKH-cc, Do4-3,5, 12 and control treatment on Westar, Quinta, Glacier, Zarfam, Okapi and Hyola401 cultivars in vitro

جدول ۶. تجزیه واریانس بیماری‌زایی جدایه‌های *Leptosphaeria* بر کوتیلدون‌های زرفام، اکاپی و هیولا۴۰۱

Table 6. Analysis of variances pathogenicity of *Leptosphaeria* isolates on Zarfam, Okapi and Hyola401 cotyledons.

منابع تغییرات (Sources of variation)	درجه آزادی (Freedom degree)	میانگین مربعات (Sum square)		
		هیولا۴۰۱ (Hyola401)	اکاپی (Okapi)	زرفام (Zarfam)
مایه تلقیح(Inoculum)	7	25.1**	33**	24**
خطا(Erorr)	16	0.05	0.08	0.1
ضریب تغییرات(Coefficient variation)		9.58	10.66	16.6

** نشانگر معنی دار بودن در سطح ۱درصد می‌باشد. ** Significant at 1% level.

حضور تیپ سه قارچ *L.maculans* روی ارقام مختلف کلزای زمستانه (جک هلگا و الادین) بوده است (Szl-vik *et al.* 2006). در کشور لهستان در مناطق با تابستان گرم غالباً تیپ غیربیماری‌زا (*L.biglobosa*) حضور دارد که به‌طور کلی خسارت چندانی ندارد و عمدتا منجر به زخم‌های سطحی روی ساقه کلزا می‌شوند

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۷. شاخص بیماری‌زایی جدایه‌های *Leptosphaeria* بر رقم زرفام، اکاپی و هیولا۴۰۱

Table 7. Disease index of *Leptosphaeria* isolates on Zarfam, Okapi and Hyola40 cultivars.

جدایه (Isolate)	میانگین شاخص بیماری‌زایی (Mean of disease index)		
	هیولا۴۰۱ (Hyola401)	اکاپی (Okapi)	زرفام (Zarfam)
D04-12	6.95 a[z]	7a	6.66a
D04-3	2.76 b	6.65a	6.13 a
D04-5	6.65 a	6.52a	2.2 b
F-aa	2.22 c	0.95b	0.8 c
B-2	0.85 d	0.83b	0.09 d
T-gg	0e	0c	0 d
B-kH-cc	0e	0c	0 d
Control*	0e	0c	0 d
LSD(α=0.05)	0.4%	0.5%	0.57%

z : میانگین‌های با حروف مشابه در سطح آماری ۱٪ معنی دار نیستند.

z :Within columns, numbers fallowed by a common letter are not significantly different (P=0.01) according to Duncan's multiple range test.

*: Sterile water

* : آب مقطر سترون

(Fitt *et al*. 2006). با توجه به خسارت کم و پراکنده قارچ عامل بیماری ساق سیاه کلزا تا کنون در مناطق شمالی کشور و سطح زیر کشت بالای کلزا در استان‌های مازندران و گلستان و از طرفی حضور تیپ‌های بیماری‌زای PG2 (Zaman Mirabadi *et al*. 2009c) و PGT با شدت بیماری‌زایی بالا بر ارقام رایج داخلی (زرفام، اکاپی و هیبرید هیولا۴۰۱)، این امکان وجود دارد که در شرایط مناسب آب و هوایی، همه گیری این بیماری در شرایط مطلوب رخ دهد.

هر دو گونه *L.maculans* و *L.biglobosa* قادر به تولید آسکوسپور روی بقایای غیر مدفون شده کلزا هستند. (Fitt *et al*. 2006). آسکوسپورها یا مایه تلقیح اولیه از پزدوتسیوم‌های قرار گرفته روی بقایای گیاهی آزاد می‌شوند (Gugel & Petrie 1992). نتایج آزمایش‌های انجام شده روی بیماری‌زایی هر دو گونه قارچ در شرایط مصنوعی حاکی از قدرت آلودگی آسکوسپورهای هر دو آنها در دامنه دمایی ۲۰-۵ درجه سانتی‌گراد می‌باشد (West *et al*. 2001). بیشترین میزان تشکیل فرم جنسی و هم‌چنین درصد فراوانی علائم ساق سیاه کلزا در روستاهای لالا، خالخیل و بی کار آیش (خردل) در استان مازندران مشاهده شد. با توجه به تشکیل و حضور فرم جنسی قارچ *Leptosphaeria*در مناطق تحت پژوهش در دو استان مازندران و گلستان (Zaman Mirabadi *et al*. 2009a)، نظر به این است که در بسیاری از مناطق شمالی آسکوسپورها به‌عنوان مایه تلقیح اولیه محسوب می‌شوند که این مسأله (با توجه به شرایط مطلوب برای تشکیل شکل جنسی و حضور تیپ‌های آمیزش جنسی) در بقا، توسعه و پراکنش بیماری نقش مهمی دارد. علی‌رغم عدم

Archive of SID

www.SID.ir

سابقه طولانی و سطح زیر کشت کلزا (کمتر از ۱۰ هکتار) در مناطق لالا، تلوکلا و خالخیل (از مناطق کوهستانی استان مازندران) جمعیت غیر بیماری‌زای قارچ *L.biglobosa* در نواحی مذکور بسیار زیاد بوده است (آلودگی بیش از ۸۰ درصد بوته ها) که این مساله شاید به‌دلیل حضور قارچ مذکور از گذشته دور در منطقه و استقرار آن روی علف‌های هرز و دیگر میزبان‌های احتمالی دارد (Johnson & Lewis 1994). در این خصوص انجام مطالعات ژنتیکی برای تعیین و تفکیک این جدایه‌ها از جدایه‌های به‌دست آمده از مناطق دیگر در استان‌های مازندران و گلستان می‌بایست انجام گیرد.

در روی بقایای باقی‌مانده کلزا همراه قارچ عامل بیماری ساق سیاه کلزا عوامل قارچی دیگری وجود داشته که مطالعه آنها و روابط برهم کنشی آنها با *Leptosphaeria* نیز باید مورد مطالعه قرار گیرد.

با توجه به این‌که در بخش‌های زیادی از مناطق شمالی کشور احتمال آلودگی اولیه از طریق آسکوسپورها زیاد بوده و معمولاً انجام تست‌های بیماری‌زایی با هاگ‌های جنسی نسبت به غیرجنسی حائز اهمیت بیشتری در شناخت همه گیری بیماری است ولی با در نظر گرفتن عدم شناخت کافی از تنوع جمعیتی مایه تلقیح آسکوسپورها و احتمال حضور تیپ‌های مختلف بیماری‌زا در یک منطقه (که ممکن است بدلیل عدم تیپ سازگار جنسی، شکل جنسی آن تشکیل نشده باشد) پیشنهاد می‌شود تا مشخص شدن تنوع جمعیتی تیپ‌های قارچ عامل بیماری ساق سیاه کلزا، آزمون‌های بیماری‌زایی با فرم غیرجنسی ردیابی و پیگیری گردد.

تحقیق در خصوص بیماری‌زایی برخی جدایه قارچ *Leptosphaeria* در این مطالعه نشانه حضور تیپ‌های بیماری‌زای PGT، PG2 و PG1 می‌باشد که در صورت انجام بررسی‌های دقیق تر با توجه به، عدم رعایت مسائل نظارتی و قرنطینه‌ای برای واردات بذرها کلزا از نظر آلودگی به قارچ مذکور، احتمال حضور یا ورود تیپ‌های مهاجم تر وجود دارد. با توجه به این‌که جدایه B-KH-cc (جداسازی شده از ساقه خردل) روی هیچ کدام از ارقام افتراقی و داخلی بیماری‌زایی ایجاد نکرده می‌بایست تأ ثیر بیماری‌زایی جدایه‌های خردل روی کلزا و بالعکس و نقش احتمالی گیاه خردل را در بقای جدایه‌های قارچ بررسی نمود. قارچ عامل بیماری ساق سیاه کلزا یک قارچ هتروتال بوده که در مرحله تولید مثل جنسی و شرایط محیطی خاص می‌تواند تغییرات ژنتیکی مطلوبی جهت شکستن مقاومت گیاهان و ایجاد نژادهای جدید داشته باشد (Naseri 2006, Gugel & Petrie 1992). با درک این موضع هرچند ارقام افتراقی ذکر شده (وستار، کوینتا و گلاسیر) می‌توانند برای تفکیک تیپ‌های بیماری‌زا استفاده شود ولی جدایه هایی وجود داشته (F-aa و B-2) که با این مقیاس تعیین شده (جدول ۴) برای تفکیک نژادهای بیماری‌زایی کاملاً منطبق نیست، بنابراین تجدید نظر در انتخاب این ارقام و یا استفاده بیشتر از ۳ رقم می‌تواند نتایج مطلوب تری حاصل نماید.

در حال حاضر بهترین روش کنترل قارچ عامل بیماری ساق سیاه کلزا استفاده از ارقام مقاوم یا متحمل می‌باشد. با در نظر گرفتن حساسیت ارقام موجود در داخل کشور برای پیشگیری از خسارت قارچ *Leptosphaeria* بهتر است ارقام و هیبریدهای مقاوم به بیماری پس از انجام آزمون‌های سازگاری و بررسی عملکرد، مورد استفاده قرار گیرد.

Archive of SID

www.SID.ir

سپاسگزاری

نگارندگان از شرکت توسعه کشت دانه‌های روغنی به خاطر حمایت مالی طرح و از مدیر مرکز بانک ژن گیاهی آلمان آقای گرانر (Prof. Andreas Graner) برای ارسال بذرهای ارقام افتراقی تشکر می‌نمایند.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (78-75) متن انگلیسی مراجعه شود.

Archive of SID

www.SID.ir