Archive of SID

فصلنامه گیاه پزشکی
۱۳۸۸ -۱ (۲): ۲۱۲- ۲۲۷

شناسایی برخی عوامل بیماری زای قارچی ریشه و طوقه گیاه کلزا در اصفهان

مهدی نصر اصفهانی *
مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان
آزاده صنیعی راد
دانشگاه پیام نور تهران
نرگس نصرالهی
گروه گیاه پزشکی، دانشگاه بو علی سینا، همدان

چکیده

گیاه کلزا از مهم ترین نباتات روغنی جهان است که مورد حمله‌ی آفات و بیماری‌های زیادی قرار می‌گیرد. به همین منظور، مطالعاتی برای تشخیص عوامل بیماری‌زای قارچی گیاه کلزا در اصفهان انجام گرفت. در بازدیدهای به عمل آمده از مزارع کلزا در مناطق برآآن، کوهپایه، مهاباد، مبارکه، دهاقان، کبوترآباد و فریدن، گیاهان کلزای آلوده که آلودگی در اندام های هوایی آن ها قابل مشاهده بود جمع آوری و در شرایط آزمایشگاهی مورد کشت و بررسی قرار گرفتند. بررسی‌های آزمایشگاهی با مطالعه‌ی مشخصات ماکروسکوپی و میکروسکوپی نشان داد که جدایه‌ها متعلق به دو جنس *Fusarium* و *Rhizoctonia* بودند. برای شناسایی گونه‌های فوزاریوم از محیط کشت‌های SA, WA, PDA, SNA, CLA, NASH & NYDER استفاده شد. بررسی جدایه‌ها بر اساس مشخصات مورفولوژیکی و کلیدهای موجود نشان داد که ۵ گونه متعلق به جنس *Fusarium* و شامل *F. culmorum*، *F. heterosporum*، *F. lateritium*، *F. oxysporum* و *F. solani* و یک گونه متعلق به جنس رایزوکتونیا، شامل *R. solani* بود. بررسی شدت بیماری‌زایی جدایه‌های مربوطه در شرایط گلخانه با کشت کلزا رقم الیت (Elite) در مقایسه با شاهد و با استفاده از شاخص بیماری‌زایی (۰-۲۴) مشخص کرد که گونه‌های *F. solani*، *F. oxysporum*، *F. culmorum* و *R. solani* دارای بالاترین میزان آلودگی در بین جدایه‌های مورد بررسی بوده، در حالی‌که دو گونه‌ی *F. lateritium* و *F. heterosporum* بیماری‌زایی قابل توجهی نداشتند. اثر جدایه‌ها بر روند رشدی و نشانه های بیماری

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mne2011@gmail.com
تاریخ دریافت: ۸۸/۸/۲۰، تاریخ پذیرش: ۸۸/۱۱/۲۸

www.SID.ir

Archive of SID

گیاه کلزا در قالب یک طرح آماری کاملا" تصادفی و با ۳ تکرار در شرایط گلخانه مورد مطالعه قرار گرفت. تجزیه‌ی آماری نتایج به دست آمده نظیر طول، وزن تر و خشک اندام‌های هوایی، ریشه و کل گیاه بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن (DMRT) نشان داد که جدایه‌های مربوطه اثرات معنی داری در دو سطح ۵٪ و ۱٪ نسبت به شاهد و یکدیگر نشان می‌دهند.

واژه های کلیدی: کلزا، بیماری‌های قارچی، *Fusarium* spp. ، *Rhizoctonia solani* ، *Brassica napus* ، اصفهان

مقدمه

کلزا، بعد از سویا و نخل روغنی مقام سوم را در تامین روغن نباتی جهان دارد. به طوری که حدود ۱۴/۷ درصد کل تولید روغن نباتی را به خود اختصاص داده است(Azizi *et al*., 1999; Salati, 2003). میزان زیاد روغن در دانه‌ی کلزا در بعضی از ارقام به ۴۸ درصد وزن خشک دانه می‌رسد. ترکیب مناسب اسیدهای چرب روغن ارقام اصلاح شده موجب تسلط آن بر بازارهای روغن جهانی شده است. بر اساس گزارش آمار نامه کشاورزی استان اصفهان در سال زراعی ۸۲-۱۳۸۱، سطح زیر کشت کلزا ۷۰۰ هکتار با عملکرد ۱۶۰۰ کیلوگرم در هکتار بوده است. ویژگی‌های خاص گیاه کلزا و سازگاری آن با شرایط آب و هوایی اکثر نقاط کشور سبب شده است که توسعه‌ی کشت این گیاه به عنوان نقطه‌ی امید بخش جهت تأمین روغن خام مورد نیاز کشور و رهایی از وابستگی به شمار رود. به طوری که، در حال حاضر کلزا نقطه‌ی ثقل طرح‌های افزایش تولید دانه‌های روغنی محسوب می‌گردد. بر حسب گزارش خبرنامه‌ی طرح تولید دانه های روغنی کشور شماره ۱۲ آذرماه ۱۳۸۴، در سال زراعی ۸۵-۱۳۸۳ سطح زیر کشت کلزا در اصفهان به ۳۵۰۰ هکتار و در کشور به ۷۰۷۴۰ هکتار رسیده است.

کلزا نیز مثل سایر گیاهان زراعی بیماری‌های فراوانی دارد که در نقاط مختلف جهان کم و بیش باعث کاهش تولید آن می‌شوند. بیماری‌های گیاه کلزا شامل بیماری‌های قارچی، باکتریایی، ویروسی، ویرویدی، فیتوپلاسمایی و نماتدی گزارش گردیده اندکه در نقاط مختلف دنیا برای کنترل هر بیماری با در نظر گرفتن ملاحظات اقتصادی، روش‌های مناسبی برای کنترل آن ها در نظر گرفته می‌شود (Azizi *et al*., 1999; Church and Fitt, 1995).

از بیماری های مهم قارچی کلزا در جهان و در مناطق مورد کشت می‌توان پوسیدگی اسکلروتینیایی ساقه*Sclerotinia sclerotiorum* ، ساق سیاه *Leptosphearia maculans* ، لکه سیاه آلترناریایی کلزا *Alternaria brassicae, A. brassicola, A. rapehani* ، *A. japonica* ، پژمردگی ورتیسیلیومی *Verticillium dahliae, V. longisporum* ، پوسیدگی ساقه *Sclerotium rolfsii* ، لکه برگی *Pseudocercosporella capsellae* ، سفیدک دروغی *Peronospora brassicae, P. parasitica* ، سفیدک پودری *Erisiphe polygoni, E.*

www.SID.ir

Archive of SID

cruciferarum ، بیماری زنگ سفید *Albugo candida* ، ریشه گرزی *Plasmodiophora brassicae* ، لکه برگی *Phoma lingam* ، پوسیدگی خاکستری *Botrytis cinerea* ، پوسیدگی-های ریشه و مرگ گیاهچه ناشی از *Rhizotonia solani* ، *F. oxysporum* ، *Fusarium avenacium* و *Pythium* spp. را می‌توان نام برد (Olfert *et al*., 1999; Roodi *et al*., 2003; Sadravie *et al*., 2003).

مهم ترین بیماری های قارچی گزارش شده از کلزا در ایران: لکه سیاه آلترناریایی *Alternaria* spp. ازگلستان و مازندران، سفیدک پودری *Erysiphe cruciferarum* ازگلستان، مازندران و تهران، ساق سیاه *Leptospheria maculans* از استان های شمالی کشور، پوسیدگی اسکلروتینیایی ساقه *Sclerotinia sclerotiorum* از تهران، ساری، گیلان و کرج، سفیدک کرکی *Peronospora parasitica* از مازندران و گلستان، زنگ سفید *Albugo candida* از گیلان و بیماری مرگ گیاهچه *Rhizotocnia Fusarium* spp. *Pythium* spp., *solani* از استان های شمالی کشور می‌باشد (Roodi *et al*., 2003; Sadravie *et al*., 2003).

معذالک، چون بررسی و مطالعات در این تحقیق بر روی بیماری‌های قارچی استوار است، لذا در این تحقیق سعی شده تا بیماری‌های قارچی این محصول در اصفهان مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش ها

نمونه گیری و جداسازی قارچ‌های عامل بیماری

برای نمونه گیری از مزارع مختلف کلزا در اصفهان در مناطق براآن، کوهپایه، مهاباد، مبارکه، دهاقان، کبوترآباد و فریدن گیاهان کلزای آلوده با علایم پژمردگی و پوسیدگی ساقه، طوقه و ریشه جمع آوری و در کیسه های مخصوص نمونه گیری به آزمایشگاه انتقال و جهت بررسی‌های آزمایشگاهی در یخچال قرار داده شد.

ابتدا نمونه‌ها با جریان ملایم شیر آب کاملاً شسته و به وسیله‌ی چاقویی تیز، پوست رویی قسمت آلوده برداشته شد و قطعاتی از بافت حد فاصل بخش‌های آلوده و سالم از قسمت ریشه و طوقه آلوده، با اسکالپل استریل بریده و هم‌چنین از ریشه‌ها قطعاتی با قیچی جدا و در ظرفی مجزا قرار داده شدند. قطعات بریده شده به وسیله اسکالپل به قطعات کوچکتر ۳-۲ میلی متری تقسیم شدند و سپس در فیلترهای مخصوص به مدت بیست الی سی دقیقه در زیر آب معمول شیر قرار داده شد و سپس سه بار به وسیله‌ی آب مقطر استریل شسته و در بین دو لایه‌ی کاغذ خشک کن قرار داده شدند تا آب آن ها کاملاً گرفته و خشک شوند. سپس قطعات خشک شده را در زیر اتاقک کشت با استفاده از پنس استریل در داخل تشتک های پتری ۹ سانتی‌متری حاوی محیط PDA (Potato Dextrose Agar) کشت گردیدند. هر پتری در دمای۲۴ درجه‌ی

www.SID.ir

Archive of SID

سلسیوس و در شرایط نور و تاریکی متناوب ۱۲ ساعته به مدت یک هفته در داخل انکوباتور قرار داده شد (Sharifi, 1996).

خالص سازی

برای خالص سازی جدایه‌های قارچ‌های مربوطه هم از روش تک اسپور و نیز از روش نوک ریسه‌ای به شرح ذیل استفاده گردید. در روش تک اسپور تشتک‌های پتری حاوی قارچ که یک هفته عمر داشتند (حاوی تعداد زیادی کنیدی) را انتخاب کرده و سپس ۵-۴ میلی لیتر آب مقطر استریل را داخل هر تشتک پتری ریخته و پس از خراش دادن سطح تشتک پتری، سوسپانسیون به‌وجود آمده را از پارچه عبور داده تا ریسه‌های قارچ از کنیدی‌ها جدا شوند. سوسپانسیون بدست آمده را رقیق نموده و مقدار یک میلی لیتر از سوسپانسیون را روی سطح هر تشتک پتری ۹ سانتی‌متری حاوی محیط کشت آب آگار (Water Agar) پخش کرده و سپس تشتک‌ها درون انکوباتور در دمای ۲۴ درجه‌ی سانتی‌گراد وشرایط تاریکی قرار داده شدند. ۱۲ ساعت تا دو روز بعد از انکوباسیون، تشتک‌ها را زیر بینی کولر مشاهده کرده و تک اسپورهای جوانه زده را برداشته و به محیط کشت جدید حاوی PDA انتقال داده شد. سپس بسته به نوع قارچ در دماهای مختلف و شرایط نور یا تاریکی و مدت زمان مختلف در انکوباتور قرار گرفتند (Singleton *et al*.,1992).

در روش تک ریسه‌ای قطعات بریده شده نمونه ابتدا روی محیط کشت آب آگار(WA) کشت داده و سپس در انکوباتور در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد قرارداده شدند (Burgess *et al.,* 1989). پس ازگذشت ۲۴ ساعت، مشاهدات انجام و در صورتی که از هر یک از نمونه ها قارچ عامل بیماری شروع به رشد بر روی محیط نمود در اسرع وقت اقدام به انتقال آن به محیط کشت جدید می شد تا از احتمال آلودگی با برخی از قارچ‌های دیگر و یا احتمالاً قارچهای ساپروفیت پرهیز گردد. بدین صورت که از نوک ریسه قارچ‌های رشد کرده با چوب پنبه سوراخ کن قطعاتی که حاوی تک ریسه باشند جدا شده و بر روی محیط کشت PDA انتقال گردیدند. قارچ‌های رشد یافته با کشت‌های متناوب کاملاً خالص شدند. برای خالص سازی و شناسایی گونه ها در موارد لازم از محیط برگ میخک CLA (Cornation Leaf Agar) استفاده شد (Carol, 1990 ; Nelson *et al*., 1983; Sneh *et al.,* 1991).

بررسی‌های مورفولوژیکی و شناسایی گونه ها

نمونه‌ها از نظر ویژگی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفتند. برای شناسایی فوزاریوم از روش تک اسپور و نیز کشت نوک ریسه به شرح فوق بر روی محیط کشت‌های CLA (برگ میخک و اگار) و PDA استفاده شد (Booth *et al*., 1971; Nelson *et al*., 1983). بدین نحو که از پرگنه‌های رشد کرده بر روی محیط آب اگار (WA) نوک ریسه به‌وسیله کرک برر (چوب پنبه سوراخ کن) جدا شده و بر روی CLA یا PDA انتقال داده شد و در نهایت شناسایی گونه های فوزاریوم صورت گرفت. پس از سه روز میزان رشد، رنگ کلنی،

www.SID.ir

Archive of SID

وجود یا عدم وجود اسپورودوخیوم و رنگ آن یادداشت‌برداری شد. تکه‌هایی از ریسه و اسپوردوخیوم از مناطق در حال رشد و مناطق رشد یافته به طور جداگانه روی لام قرار داده شد. مشخصات عمده‌ای که در این محیط کشت برای شناسایی گونه‌های فوزاریوم مورد توجه قرار گرفت به شرح زیربوده است:

- نوع فیالید حامل ماکروکنیدی.
- وجود و یا عدم وجود ماکروکنیدی.
- اشکال مختلف میکروکنیدی و چگونگی تشکیل آن ها در صورت عدم تشکیل ماکروکنیدی، کشت‌ها تحت شوک سرما و دمای ۴ درجه سلسیوس و نور به مدت حداقل ۲ ساعت قرارداده شد. پس از تشکیل ماکروکنیدی، تعداد جداره عرضی، شکل سلول پایه و سلول رأسی ماکروکنیدی بررسی شد.
- وضعیت سلول مولد و حامل میکروکنیدی.
- وجود و یا عدم وجود کلامیدوسپور (برای تشکیل کلامیدسپور کشت‌ها باید بیش از دو هفته در تاریکی نگهداری شوند) (Booth *et al*., 1971).

تولید اینوکولوم و اثبات بیماری‌زایی

برای اثبات بیماری‌زایی با استفاده از روش ریختن سوسپانسیون اسپور جدایه های مورد نظر در پای هر گلدان مورد کشت با رقم اکاپی (Okapi) از ارقام فرانسوی و مورد کشت فعلی استفاده شد. (در هر گلدان حدود ۲۰۰ میلی لیتر با غلظت 10^5 تا 10^6 کنیدی در هر میلی لیتر) گلدان ها در شرایط گلخانه تحت شرایط رطوبت نسبی۸۰-۷۵ درصد و دمای ۲ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگه داری شدند و علایم پیشرفت بیماری بررسی و ثبت گردید. علایم، روزانه ثبت و به محض این‌که علائم برگی ظاهر شد، قطعاتی از ریشه های آلوده ضدعفونی و کشت داده شد و قارچ عامل بیماری مجدداً جداسازی گردید (Booth *et al*., 1971).

در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی برای شش جدایه در سه تکرار و هم‌چنین شاهد، ۲۱ گلدان استریل حاوی خاک، ماسه و کود حیوانی (۱:۱:۱) مورد کشت کلزا در نظر گرفته شد، سپس با استفاده از قارچ‌هایی که قبلاً تکثیر شده بودند، مایه زنی در کنار طوقه و ریشه‌ی گیاهان کلزا انجام شد. برای ارزیابی و تعیین شدت بیماری‌زایی جدایه‌های مربوطه روی گیاهان کلزای مورد آزمون، مشخصه‌های ظاهری مثل ریزش برگ، زردی، تغییر رنگ آوندها، نکروز و پژمردگی برگ‌ها بررسی شدند. برای تعیین شدت آلودگی از شاخص های توصیه شده توسط Thanassoulopoulos *et al.* (1995) به شرح زیر استفاده گردید:

- گیاه ظاهراً سالم با زردی ناچیز غیر قابل اندازه‌گیری (۰)
- گیاه با زردی کم قابل اندازه‌گیری و پژمردگی خفیف (۱)
- علائم مشخص روی برگ‌های بالایی و ریزش خفیف برگ ها (۲)
- برگ‌های پایین ریخته شده، علائم شدید بیماری روی برگ‌های فوقانی، پژمردگی شدید (۳)

www.SID.ir

Archive of SID

- برگ‌ها پژمرده و بقاء گیاه تنها با برگ انتهایی (۴)
- مرگ کامل گیاه (۵)

برای تمایز بهتر شاخص بیماری، نتایج به‌دست آمده به ترتیب با ضرایب ۰ ، ۱ ، ۳ ، ۶ ، ۱۲ و ۲۴ ضرب و سپس جمع و تقسیم بر تعداد کل بوته های مورد آزمون گردید، لذا شاخص بیماری در طیف ۲۴-۰ تعیین شد (Sharifi, 1996).

۵۲ روز پس از مایه زنی علایم بیماری روی گیاه کلزا ثبت ، هر کدام از تیمارها نمره دهی گردید. هم چنین، جداسازی مجددا برای بار دوم قارچ‌های عامل بیماری از نهال‌های گلدانی مختلف انجام شد. هم چنین، جهت بررسی اثر قارچ های مربوطه بر روی رشد و نمو گیاه کلزا اقدام به بررسی های عملکردی آن ها بر روی گیاهان کلزای مورد آزمون در گلخانه گردید. بدین صورت که پس از انجام آزمایشات شاخص هایی نظیر طول ساقه و ریشه، وزن تر و خشک ساقه و ریشه و در مجموع برای هر فاکتور به طور جداگانه محاسبه گردید. سپس با استفاده از نرم افزار SAS اقدام به تجزیه آماری و مقایسه میانگین داده‌ها گردید (NIAB, 1985).

نتایج

پس از انجام مراحل مختلف اعم از جمع آوری نمونه ها، کشت، جداسازی، خالص سازی و شناسایی، تعدادی جدایه‌ی قارچ از ریشه و طوقه‌ی گیاهان کلزای آلوده جدا گردیده که در بین آن‌ها ۵ جدایه مربوط به جنس فوزاریوم و ۱ جدایه مربوط به جنس رایزوکتونیا بود. لذا، موارد مربوطه به ترتیب و به شرح ذیل اعم از شناسایی، بیماری زایی و اثر آن ها بر روی گیاه شامل طول، وزن تر و خشک ساقه و ریشه در جداول مربوطه ارایه گردیده است.

گونه‌ی *F. solani*

سرعت رشد در این نوع قارچ بیش از ۲ سانتی‌متر و حدود ۸-۴ سانتی‌متر بود، اندازه‌ی کنیدی‌ها یکنواخت و تفاوت بین ماکروکنیدی و میکروکنیدی‌ها مشخص بود. ماکروها به تعداد زیاد و میکروکنیدی‌ها بعضاً موجود بود. میکروکنیدی‌ها زنجیری و از فیالیدهای ساده به وجود آمده بودند، کشت قارچ دارای رنگ سفید و میکروکنیدیوفورها کاملاً توسعه یافته و فیالیدهای بلند داشتند. گاهی رگه های رنگی در محیط کشت به وجود آمده بود. این گونه قارچ از براآن و کوه پایه جدا شد. علایم بیماری شامل خمیده شدن برگ‌ها، ریزش برگ‌ها از قسمت‌های زیرین، زردی برگ‌ها، پژمردگی و پوسیدگی ریشه به خصوص ریشه های فرعی بود.

گونه‌ی *F. oxysporum*

سرعت رشد در این نوع قارچ بیش از ۲ سانتی‌متر بود وتفاوت بین ماکروو میکروکنیدی ها مشخص بود. ماکروها به تعداد فراوان و میکروکنیدی ها کم بودند. میکروکنیدی ها به طور زنجیروار نبوده و از فیالیدهای جانبی ایجاد شده بودند. قطر کلامیدوسپورها ۱۱-۷ میکرون اندازه گیری شد. کلونی این قارچ بر روی محیط کشت به رنگ سفید و دارای میسلیوم‌های

www.SID.ir

Archive of SID

پنبه‌ای بوده، میکروکنیدیوفورها کند رشد و فیالیدهای کوتاه، آن را از *F. solani* متمایز کـرد. این قارچ از منطقه‌ی مبارکه جدا شد. علایم بیماری شامل ریزش برگ‌ها از قسمت‌های زیـرین، زردی برگ‌ها، پژمردگی و پوسیدگی ریشه، همراه با تغییر رنگ و پوسیدگی آوندی بود.

گونه‌ی *F. lateritium*

این گونه دارای رشد بطیی بود وتفاوت بین ماکروکنیدی و میکروکنیدی ها مشخص، ماکروکنیدی‌ها فراوان ولی میکروکنیدی ها به تعدادخیلی کم موجود و از فیالیدهای ساده ایجاد شده بود. رنگ کلونی قارچ ، سفید متمایل به کرم و سلول انتهایی ماکروکنیدی سرکج یا قلاب مانند بود. این قارچ از منطقه‌ی مبارکه جدا شد. علایم بیماری به شدت دو گونه‌ی فوق نبوده هر چند علایمی به طور خفیف شامل خمیده شدن برگ‌ها، ریزش برگ‌ها، کلروز و نکروز شدن برگ، زردی برگ‌ها، تغییر رنگ و پوسیدگی ریشه مشاهده گردید.

گونه‌ی *F. heterosporum*

میسلیوم‌ها متراکم و به صورت لکه های سفید و ناهموار در سطح کلنی مشاهده شد. تفاوت بین ماکروکنیدی و میکروکنیدی‌ها مشخص، میکروکنیدی‌ها به تعداد کم و از فیالیدهای ساده ایجاد شده بودند. سلول انتهایی ماکروکنیدی خمیده، منقار مانند یا بلند و کشیده بود. کشت قارچ به رنگ صورتی روشن و از پشت پتری سفید مات وکلامیدوسپور ها بسیار کمیاب بود. این‌گونه از منطقه‌ی کبوترآباد جدا شد و اثرات قابل توجهی روی گیاه کلزا نداشت و اساساً به عنوان یک قارچ غیر بیماری‌زا مشاهده شد.

گونه‌ی *F. culmorum*

سرعت رشد در این گونه زیاد و رنگ کلنی قارچ قرمزگلی بود. میکروکنیدی ها موجود نبود و سلول انتهایی ماکروکنیدی منقار مانند و شدیداً به طرف داخل خم شده بود. این قارچ از مناطق مهاباد و مبارکه جدا شد. علایم بیماری به طور خفیف روی گیاه شامل زردی برگ‌ها و پوسیدگی ریشه مشاهده شد.

گونه‌ی *Rhizoctonia solani*

جدایه‌ها، دارای رشد سریع بود به طوری‌که تشتک‌های پتری قطر ۹ سانتیمتر را در دمای۲۷-۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۷۲-۴۸ ساعت پوشاند. سختینه و ریسه های هوایی کرک مانند تولید کرد و در محل انشعاب هیف‌ها که با زاویه ۹۰ درجه از هم جدا شده بودند فرورفتگی دیده می شد. این قارچ از شهرستان اصفهان جدا شد. علایم بیماری روی گیاه شامل پوسیدگی ریشه‌ها، زردی برگ ها، شانکر ساقه زیر زمینی، قهوه‌ای شدن بافت‌های آلوده، وجود ترک‌های طولی و نهایتاً کاهش رشد بود.

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج حاصله از اثبات بیماریزایی

در آزمایش اثبات بیماریزایی پس از اندازه گیری شاخص‌های عملکرد نظیر طول، وزن تر و خشک قسمت‌های هوایی، ریشه‌ها و در نهایت کل گیاه و مقایسه‌ی میانگین آن ها در قالب روش تجزیه‌ی آماری کاملاً تصادفی نتایج زیرحاصل گردید.

نتایج به دست آمده در این پژوهش (جدول ۲ و ۳) نشان داد که در مورد وزن تر ریشه ها تفاوت معنی داری بین تیمارها مشاهده نشده است، اما در مورد طول ساقه و وزن خشک ساقه در سطح ۵ درصد و در مورد طول ریشه، طول کل گیاه، وزن تر ساقه، وزن تر کل گیاه، وزن خشک ساقه و وزن خشک کل گیاه در سطح ۱ درصد اختلاف معنی داری بین تیمارها مشاهده می شود. داده ها نشان می دهد که طول ساقه، ریشه و وزن تر و خشک گیاهان آلوده به قارچ *R. solani*، *F.oxysporum* و*F. culmorum* بیشترین درصد و طول ساقه، ریشه و وزن تر و خشک گیاه آلوده شده به قارچ *F. lateritium* و*F. heterosporum* کمترین درصد تفاوت را نشان می دهد (جدول ۲ و ۳) ($P = 0.05$).

ارزیابی شدت بیماری‌زایی نسبی قارچ‌های جداسازی شده

در این مرحله، شدت بیماری‌زایی نسبی جنس‌ها و گونه های جداسازی شده با استفاده از شاخص Thanassoulopoulos بر روی رقم الیت کلزا (با ۳ تکرار) مورد بررسی قرار گرفت. به استناد شاخص ارزیابی مورد استفاده، مشاهده می شود که جدایه های*F. solani* و *F.oxysporum* و *F. culmorum* و *R. solani* از شدت بیماری‌زایی بالاتری در مقایسه با سایر جدایه ها برخوردار بودند (Thanassoulopoulos *et al.*,1985) (جدول ۴) ($P = 0.05$) .

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- میانگین طول قسمت‌های مختلف شامل ساقه، ریشه و بوته ی کلزا (بر حسب سانتی‌متر)

ردیف	تیمار	میانگین طول ساقه	میانگین طول ریشه	میانگین طول کل گیاه
۱	شاهد	۱۸/۰۶^{a}	۱۲/۵۸^{a}	۳۰/۶۴^{a}
۲	*F. oxysporum*	۱۴/۵۷^{ab}	۹/۶۴^{ab}	۲۴/۲۱^{b}
۳	*F. lateritium*	۱۷/۷۲^{ab}	۹/۰۶^{ab}	۲۶/۷۸^{ab}
۴	*F. heterosporum*	۱۶/۵۸^{ab}	۹/۲۹^{ab}	۲۵/۸۷^{b}
۵	*F. culmorum*	۱۴/۴۴^{ab}	۹/۰۶^{b}	۲۳/۵۰^{b}
۶	*F. solani*	۱۲/۹۷^{ab}	۹/۰۷^{ab}	۲۲/۰۴^{b}
۷	*R. solani*	۱۳/۹۲^{b}	۹/۱۷^{ab}	۲۳/۰۹^{b}

- در هر ستون میانگین هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک می باشند طبق آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ متفاوت نیستند.

جدول ۲- تجزیه واریانس داده های مربوط به صفات طول بوته ، وزن تر و خشک ساقه ، وزن ریشه و بوته ی کلزا.

ردیف	تیمار	میانگین طول ساقه	میانگین طول ریشه	میانگین طول کل گیاه
۱	شاهد	۱۸/۰۶^{a}	۱۲/۵۸^{a}	۳۰/۶۴^{a}
۲	*F. oxysporum*	۱۴/۵۷^{ab}	۹/۶۴^{ab}	۲۴/۲۱^{b}
۳	*F. lateritium*	۱۷/۷۲^{ab}	۹/۰۶^{ab}	۲۶/۷۸^{ab}
۴	*F. heterosporum*	۱۶/۵۸^{ab}	۹/۲۹^{ab}	۲۵/۸۷^{b}
۵	*F. culmorum*	۱۴/۴۴^{ab}	۹/۰۶^{b}	۲۳/۵۰^{b}
۶	*F. solani*	۱۲/۹۷^{ab}	۹/۰۷^{ab}	۲۲/۰۴^{b}
۷	*R. solani*	۱۳/۹۲^{b}	۹/۱۷^{ab}	۲۳/۰۹^{b}

- ^{ns} بدون اختلاف معنی‌دار ($P= 0.05$). *، ** معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ و ۰/۰۱

www.SID.ir

جدول ۳- میانگین وزن تر و خشک قسمت‌های مختلف شامل ساقه، ریشه و بوته ی کلزا (بر حسب گرم)

ردیف	تیمار	وزن‌تر قسمت های هوایی	وزن‌تر ریشه	وزن تر کل گیاه	وزن خشک قسمت های هوایی	وزن خشک ریشه	وزن خشک کل گیاه
۱	شاهد	۵/۰۷^{a}	۰/۶۳^{a}	۵/۷۰^{a}	۰/۷۰^{a}	۰/۱۲^{a}	۰/۸۲^{a}
۲	*F. solani*	۲/۱۹^{b}	۰/۳۱^{a}	۲/۵۰^{b}	۰/۳۳^{b}	۰/۰۶^{ab}	۰/۳۹^{c}
۳	*F. culmorum*	۲/۷۵^{b}	۰/۴۶^{a}	۴/۲۱^{b}	۰/۳۵^{b}	۰/۰۹^{ab}	۰/۴۴^{bc}
۴	*F. lateritium*	۵^{a}	۰/۶۰^{a}	۵/۶۰^{a}	۰/۶۷^{a}	۰/۱۱^{ab}	۰/۷۸^{ab}
۵	*F. oxysporum*	۲/۷۲^{b}	۰/۴۸^{a}	۳/۲۰^{b}	۰/۴۰^{ab}	۰/۰۹^{ab}	۰/۴۹^{abc}
۶	*R. solani*	۲/۴۲^{b}	۰/۳۶^{a}	۲/۷۸^{b}	۰/۳۵^{b}	۰/۰۷^{ab}	۰/۴۲^{c}
۷	*F. heterosporum*	۲/۹۱^{b}	۰/۵۰^{a}	۳/۴۱^{b}	۰/۴۸^{b}	۰/۱۰^{ab}	۰/۵۸^{c}

- در هر ستون میانگین هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک می باشند طبق آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ متفاوت نیستند.

جدول۴- میانگین شاخص پژمردگی در اثر گونه های مورد آزمون

شماره	تیمار	شاخص ارزیابی	شاخص
۱	شاهد	۰	۰
۲	*F. culmorum*	۲/۷۳	۷/۱۳
۳	*F. solani*	۳/۷۱	۹/۲۱
۴	*F. oxysporum*	۳/۲۶	۷/۶۰
۵	*F. heterosporum*	۱/۶۵	۲/۱۴
۶	*R. solani*	۳/۵۳	۹/۲۰
۷	*F. lateritium*	۱/۵۳	۲/۰۶

- طیف شاخص ۲۴-۰ می باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

نتایج این تحقیق نشان داد که جدایه‌های حاصله متعلق به شش گروه بوده که ۵ جدایه از جنس فوزاریوم و یک جدایه از جنس رایزوکتونیا از ریشه‌ی گیاه کلزا جدا سازی و شناسایی گردید. بررسی های بیماری‌زایی در شرایط گلخانه نیز نشان داد که قارچ‌های جداشده شامل *F. solani*، *F. oxysporum* ، *F. culmorum* و *R. solani* بودند که به شرح ذیل مورد بررسی قرار گرفتند:

گونه‌ی *F. solani*

مشخصات مورفولوژیکی و رشدی گونه‌ی *F. solani* در محیط‌های کشت شامل اندازه‌ی کنیدی های یکنواخت، تفاوت مشخص بین ماکروکنیدی و میکروکنیدی‌ها، تعداد زیاد ماکروکنیدی‌ها، میکروکنیدیوفورهای کاملاً توسعه یافته و فیالیدهای ساده و طویل با آنچه برای این گونه توسط Nelson *et al.* (1983) و Burgess *et al.,* (1989) بیان شده است مطابقت دارد. این گونه با تولید فیالیدهای طویل از *F. oxysporum* که فیالید کوتاه دارد، متمایز می-گردد. این قارچ از مناطق کشت کلزا در براآن و کوهپایه جدا شد.

علایم شامل خمیده شدن برگ‌ها، ریزش برگ‌ها از قسمت‌های زیرین، زردی برگ‌ها، پژمردگی و پوسیدگی ریشه ها به خصوص ریشه های فرعی گیاه بود. شاخص بیماری‌زایی این قارچ ۹/۲ بود که در بین سایر جدایه های مورد آزمون قابل توجه می باشد. شاخص‌های عملکردگیاه کلزا نسبت به شاهد و سایر تیمارها اثر معنی داری از خود نشان داده است. این مشاهدات با گزارشات سایر پژوهش گران در خصوص بیماری‌زایی این قارچ با طیف وسیع میزبانی بالاخص خانواده کروسیفر شامل بروکلی، کلم، گل کلم، ترب و غیره مطابقت دارد (Burgess *et al.,* 1989; Nelson *et al.,* 1983).

گونه‌ی *F. oxysporumd*

مشاهده سرعت رشد در این گونه و نیز تفاوت بین ماکروکنیدی و میکروکنیدی ها (ماکروها به تعداد زیاد و میکروکنیدی ها کم و غیر زنجیری و از فیالیدهای جانبی ایجاد شده) و هم‌چنین تعداد و فرم کلامیدوسپورها و نیز کلونی قارچ به رنگ سفید و میکروکنیدیوفورها خیلی کند رشد کرده بودند با شرح و توصیف این گونه در مرجع نلسون و همکاران و هم‌چنین بورگیز و همکاران مطابقت دارد. (Burgess *et al.,* 1989; Nelson *et al.,* 1983)

لازم به ذکر است که تشخیص این گونه از دو گونه‌ی *F. solani* و *F. subglutinans* کمی مشکل است. وجود فیالیدهای کوتاه، این گونه را از *F. solani* که فیالیدهای طویل تولید می کند متمایز می سازد و گونه‌ی *F. subglutinans* هم به علت تولید فیالیدهای منشعب و عدم تشکیل کلامیدوسپور با *F. oxysporum* متمایز می گردد.

علایم ایجاد شده روی گیاه کلزا در اثر تلقیح این قارچ، شامل ریزش و زردی برگ‌ها از قسمت‌های زیرین، زردی برگ‌ها، پژمردگی و پوسیدگی ریشه و تغییر رنگ و پوسیدگی آوندی

www.SID.ir

Archive of SID

بود که نشان می دهد این گونه یک عامل بیماریزا روی گیاه کلزا محسوب شده و با سایر گزارشات درباره‌ی این گونه که آن را یک گونه‌ی بیماریزا روی اکثر گیاهان زراعی می دانند، مطابقت دارد (Olfert *et al.,* 1999; Sharma *et al*., 2000; Singleton *et al*., 1972). البته این گونه دارای فرم‌های اختصاص یافته‌ی مربوط به خود است که به عنوان مثال روی کلزا با نام علمی *F. oxysporum* f.sp *conglutinans* معرفی گردیده است. البته این گونه‌ی قارچ طیف میزبانی وسیعی دارد و همان‌طور که قبلاً اشاره گردید فرم‌های اختصاص یافته بر حسب نوع میزبان را داراست که در اینجا نیز باگزارشات Burgess *et al.,* (1989) و Booth *et al*. (1971) و پس از آن سایر منابع نامبرده فوق مطابقت دارد.

گونه‌ی *F. lateritium*

گونه ای است کند رشد با ماکروکنیدی های فراوان و طویل و باریک با سلول انتهایی قلاب مانند، تعداد میکروکنیدی ها بسیار کم و فیالیدهای ساده. رنگ کلونی قارچ سفید متمایل به کرم بود. این مشخصات با تشریح و توصیف نلسون و همکاران (Nelson *et al.,* 1983) ، بورگیز و همکاران (Burgess *et al.,* 1989)، سینگلتون و همکاران (Singleton *et al.,* 1992) و نیز (Saremi, 1998) مطابقت داشت.

علایم بیماری در اثر تلقیح این قارچ بسیار خفیف بود. ریشه ها نیز تغییر رنگ ملایمی داده بودند و پوسیدگی قابل توجهی روی سطح ریشه ایجاد نشده بود، احتمالاً قارچ مذکور تولید توکسین نموده که بدین ترتیب موجب ایجاد علایم بیان شده می‌گردد. در بررسی های انجام شده از نظر شاخص بیماری روی قسمتهای هوایی گیاه این گونه در طیف ۲/۰۶ (۲۴-۰) قرار دارد. گزارشات نشان می دهد که این قارچ تولید توکسین می نماید و بعضاً هم بیماری‌زایی خفیفی نشان داده است (Nelson *et al.,* 1983). به طوری که نتایج گلخانه ای در بررسی اجزای عملکرد در خصوص طول ساقه گیاه آلوده و وزن خشک ریشه و کل گیاه آلوده نسبت به شاهد تفاوت قابل توجهی را نشان نمی دهد.

گونه‌ی *F. heterosporum*

بررسی های ماکروسکوپی و میکروسکوپی نشان داد که این گونه دارای میسلیوم‌های متراکم و به صورت لکه های سفید و ناهموار در سطح کلنی می باشد، سرعت رشد در این گونه قارچ، تفاوت بین ماکروکنیدی و میکروکنیدی ها مشخص، تعداد میکروکنیدی ها کم و از فیالیدهای ساده ایجاد می شوند، سلول انتهایی ماکروکنیدی خمیده، منقار مانند، بلند وکشیده است. بررسی های این گونه نشان داده است که این گونه در واقع همان گونه *F. graminum* است. در منابع قبلی، گرلاخ و نایربرگ این گونه را به علت داشتن ماکروکنیدی های طویل تر و تولید کلامیدوسپور از*F. graminum* جدا کرده اند، هر چند برخی از جدایه های *F. heterosporum* کلامیدوسپور تولید نمی کند (Saremi, 1998). هم چنین بوث *F. graminum* و *F. reticulatum* را هم نام با گونه *F. heterosporum* معرفی کرده است. (*et*

www.SID.ir

Archive of SID

Booth *et al.*, 1971) ولی نلسون آن را به عنوان یک گونه‌ی مشخص معرفی می نماید Nelson *et al.*, 1983).

علایم بیماری ایجاد شده روی گیاه در اثر این گونه چندان قابل توجه نبود به‌طوریکه در شاخص ۲/۱ قرار گرفت و کمترین میزان نسبت به سایر گونه های مورد مطالعه است. البته گزارش شده است که *F. heterosporum* یک قارچ توکسین زا است (Nelson *et al.*, 1983). نتایج بررسی های اجزای عملکرد در رشد و نمو گیاه کلزا نسبت به شاهد و سایر تیمارها نیز ان را اثبات می نماید. لذا گونه فوق در اینجا به عنوان یک گونه‌ی غیر بیماری‌زا معرفی می گردد.

گونه‌ی *F. culmorum*

سرعت رشد در این گونه قارچ بسیار سریع و رنگ کلنی قارچ صورتی تا قرمز گلی و فاقد میکروکنیدی است. کلامیدوسپورها به صورت منفرد بوده که بعضاً خوشه ای و البته در برخی جدایه ها تشکیل نمی شود. البته این گونه شباهت زیادی به دو گونه *F. sambucinum* و *F. crookwellense* دارد که رشد سریع *F. culmorum* در محیط آن را با گونه‌ی *F. sambucinum* متمایز می سازد و نیز شکل ماکروکنیدی این گونه را از *F. crookwellense* جدا می‌سازد، چون ماکروکنیدی در گونه‌ی اخیر طویل‌تر و دارای انحنای زیاد است و سلول پایه به شکل پاشنه پا می‌باشد. این بررسی با گزارشات نلسون و همکاران (Nelson *et al*.,1983) و سینگلتون و همکاران مطابقت دارد (Singleton *et al*.,1992).

علایم بیماری در اثر تلقیح این قارچ نیز کماکان با زردی برگ‌ها و پوسیدگی ریشه همراه بود و نتایج آزمایشات گلخانه ای نسبت به شاهد تفاوت قابل توجهی در خصوص وزن تر ساقه و ریشه و وزن خشک ساقه و کل گیاه آلوده نسبت به شاهد و سایر تیمارها را نشان می دهد. لذا می‌توان گفت که این گونه برای کلزا عامل بیماری‌زا تلقی می شود. البته *F. culmorum* قبلاً به عنوان عامل پوسیدگی ریشه غلات، شبدر و غیره از سایر نقاط جهان معرفی شده است , (Singleton *et al.*, 1992 ; Nelson *et al*.1983)

گونه‌ی *Rhizoctonia solani*

بررسی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی این قارچ نشان داد که جدایه ها دارای رشد سریع بوده به طوری‌که تشتک‌های پتری قطر ۹ سانتی متر را در درجه حرارت ۲۷-۲۵ *سلسیوس* به مدت ۷۲-۴۸ ساعت می پوشانند. این قارچ تولید ریسه های هوایی کرک مانند کرده و فرورفتگی در محل انشعاب هیف‌هاکه با زاویه‌ی ۹۰ درجه از هم جدا شده بودند و تولید سختینه از دیگر خصوصیات این قارچ بود.

علایم ایجادشده توسط مایه زنی این قارچ روی گیاه کلزا در اینکه ریشه های پوسیده و قهوه ای رنگ شده، زردی برگ ها، شانکر ساقه زیر زمینی و ریشه ها همراه با کاهش رشد بود که با مشاهدات محمدی مطابقت دارد (Mohhamadi, 2003). شاخص بیماری‌زایی این قارچ در این بررسی ۹/۲۰ بود که نشان دهنده اهمیت این عامل بیماری‌زا می باشد. این مشخصات با

www.SID.ir

Archive of SID

شرح *Rhizoctonia solani* توسط Church & Fitt (1995) ، Singleton *et al.* (1992) و Sneh *et al.* (1991) مطابقت دارد.

این قارچ یک قارچ پلی فاژ است و به طیف وسیعی از محصولات زراعی و باغی خسارت وارد می سازد که با پوسیدگی ریشه و ساقه های زیرزمینی و ایجاد شانکر و حتی آلوده کردن قسمت‌های هوایی برخی از گیاهان ایجاد خسارت می‌نماید (Singleton *et al* 1992). البته ابن قارچ دارای گروه های متعدد آناستوموزی (ریسه پیوندی) است که مطالعات و بررسی‌های لازم خود را می طلبد. لازم به ذکر است که آناستوموز ۱-۲ (AG2-1) قبلاً از کلزا، گیاهچه گندم، ترب ژاپنی، ترب معمولی و کاهو گزارش شده است (Sneh *et al*., 1991). نتایج بررسی‌های گلخانه ای در اجرای عملکرد گیاه کلزا نشان داد که این قارچ اثر به سزایی در فاکتورهای رشد گیاه کلزا داشته است. لذا به عنوان یک قارچ بیماری‌زا برای کلزا معرفی می‌گردد. این مطالعات با گزارشات Sneh *et al.* (1991) ، Roodi *et al*., (2003) و نیز Church & Fitt (1995) مطابقت دارد.

منابع

Azizi, M. Soltani, A. & Khavari Khorasani, S. 1999. Rape Crops (Physiology, Agronomy, Breeding and Biotechnology). Mashhad Jahade Daneshgahi Publication, Mashhad, Iran (In Persain).

Booth, C. 1971. The genus *Fusarium*. Common wealth Mycological Institute, Kew, England.

Burgess, L. W. Nelson, P. E. & Summerell B. A. 1989. Variability and stability of morphological characters of *Fusarium oxysporum* isolated from soil in Australia. *Mycologia*, 81: 818-822.

Carol, E. W. 1990. *Fusarium* Soilborn Pathogen. P. 116- 128.

Church, V. J. & Fitt B. D. L. 1995. Incidence and effects of diseases on seven winter Oilseed rapee cultivars in 1991/2 and 1992/3. *International Organization for Biological Control Bulletin*, 18: 62-68.

Mohhamadi, S. 2003. *Stadies on biological control of Rhizoctonia by Trichoderma*. M.Sc Thesis, Islamic Azad University, Science and Research branch, Tehran, Iran.

National Institute of Agricultural Botany. 1985. NIAB Disease Assessment Manual for Crop Variety Trail. National Institute of Agricultural Botany. Cambridge, UK.

Nelson, P. E. Toussoun, T. A. & Marasas, W. F. O. 1983. *Fusarium species: an illustrated Manual for identification*. Pennsylvania State University Press, University Park, USA.

Olfert, O. Brandt, S. Eliott, R. H. Duczek, L. Thomas, A.G. & Soroka, J. 1999. Canola production in Saskatchewan-A synthesis of the issue of unexpected low yields. *10th International Rapeseed Congres, Canberra, Australia*.

www.SID.ir

Archive of SID

Roodi, D. Rahman poor, S. & Javidfar, F. 2003. *Rape Crops* (Eds.). Institution for Seed and Seedling Improvement, Tehran, Iran.

Sadravi, M. Taheri, A. & Rahnema, K. 2003. Rape *Sclerotinia* stem diseases in Golestan province. *The precedings of the first conference on research and development of rape, Golestan. p. 40.*

Salati, M. 2003. The important diseases of rapeseed crops. *The precedings of the first conference on research and development of rape, Golestan. p. 41*.

Saremi, H. 1998. Ecology and Taxonomy of the *Fusarium* spp. Mashhad Jahade Daneshgahi Publication, Mashad, Iran.

Sharifi, R. 1996. *Identification of wilting Fusarium spp. of potato and the reaction of varieties in glass house conditions in Fraydan*. M.Sc Thesis, Islamic Azad University, Science and Research branch, Tehran, Iran.

Sharma, P. D. 2000. *Plant Pathology*. Campus Books International.

Singleton, L. L. Mihail, J. D. & Rush, C. M. 1992. *Methods for Research on soil borne Phytopathogenic Fungi*. The American Phtopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA.

Sneh, B. Burpee, L. & Ogoshi, A. 1991. Identification of *Rhizoctonia* species. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA.

Thanassoulopoulos, C. C. & Kitsos, G. T. 1985. Studies on *Fusarium* wilt of Potatoes. 2-leafsprout and tuber infection in artificial inoculation. *Potato Research*, 28: 515-518.

www.SID.ir