



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 حمله ی آفات و بیماری های زیادی قرار می گیرد. به همین منظور، مطالعاتی برای تشخیص عوامل بیماری زای قارچی گیاه کلزا در اصفهان انجام گرفت. در بازدیدهای به عمل آمده از مزارع کلزا در مناطق برآن، 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. بررسی های آزمایشگاهی با مطالعه ی مشخصات ماکروسکوپی و میکروسکوپی نشان داد که جدایه ها متعلق به دو جنس *Fusarium* و *Rhizoctonia* بودند. برای شناسایی گونه های فوزاریوم از محیط کشت های SA, WA, PDA, SNA, CLA, NASH & NYDER استفاده شد. بررسی جدایه ها بر اساس مشخصات مورفولوژیکی و کلیدهای موجود نشان داد که ۵ گونه متعلق به جنس *Fusarium* و شامل *F. solani*، *F. oxysporum*، *F. lateritium*، *F. heterosporum*، *F. culmorum* و یک گونه متعلق به جنس رایزوکتونیا، شامل *R. solani* بود. بررسی شدت بیماری زایی جدایه های مربوطه در شرایط گلخانه با کشت کلزا رقم الیت (Elite) در مقایسه با شاهد و با استفاده از شاخص بیماری زایی (۰-۲۴) مشخص کرد که گونه های *F. solani*، *F. oxysporum*، *F. culmorum* و *R. solani* دارای بالاترین میزان آلودگی در بین جدایه های مورد بررسی بوده، در حالی که دو گونه ی *F. lateritium* و *F. heterosporum* بیماری زایی قابل توجهی نداشتند. اثر جدایه ها بر روند رشدی و نشانه های بیماری

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mne2011@gmail.com

تاریخ دریافت: ۸۸/۸/۲۰، تاریخ پذیرش: ۸۸/۱۱/۲۸

گیاه کلزا در قالب یک طرح آماری کاملاً تصادفی و با ۳ تکرار در شرایط گلخانه مورد مطالعه قرار گرفت. تجزیه 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، *Brassica* ، *Rhizoctonia solani* ، *Fusarium spp.* ، *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 اند که در نقاط مختلف دنیا برای کنترل هر بیماری با در نظر گرفتن ملاحظات اقتصادی، روش‌های مناسبی برای کنترل آن‌ها در نظر گرفته می‌شود (Azizi et al., 1999; Church and Fitt, 1995).

از بیماری‌های مهم قارچی کلزا در جهان و در مناطق مورد کشت می‌توان پوسیدگی اسکروتینیایی ساقه *Sclerotinia sclerotiorum* ، ساق سیاه *Leptosphaeria maculans* ، لکه سیاه آلترناریایی کلزا *Alternaria brassicae*، *A. brassicola*، *A. rapeshani*، *japonica*، پژمردگی ورتیسیلیومی *Verticillium dahliae*، *V. longisporum*، پوسیدگی ساقه *Sclerotium rolfsii*، لکه برگ *Pseudocercospora capsellae*، سفیدک دروغی *Peronospora brassicae*، *P. parasitica*، سفیدک پودری *Erisiphe polygoni*، *E.*

Plasmodiophora cruciferarum، بیماری زنگ سفید *Albugo candida*، ریشه گریزی *brassicae*، لکه برگ *Phoma lingam*، پوسیدگی خاکستری *Botrytis cinerea*، پوسیدگی - های ریشه و مرگ گیاهچه ناشی از *Fusarium*، *F. oxysporum*، *Rhizotonia solani* و *Pythium spp.* را می توان 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.* از گلستان و مازندران، سفیدک پودری *Erysiphe cruciferarum* از گلستان، مازندران و تهران، ساق سیاه *Leptosphaeria maculans* از استان های شمالی کشور، پوسیدگی اسکروتینیایی 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* *Pythium spp.*، *Fusarium spp.* از استان های شمالی کشور می باشد (Roodi et al., 2003; Sadravie et al., 2003). معذالک، چون بررسی و مطالعات در این تحقیق بر روی بیماری های قارچی استوار است، لذا در این تحقیق سعی شده تا بیماری های قارچی این محصول در اصفهان مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش ها

نمونه گیری و جداسازی قارچ های عامل بیماری

برای نمونه گیری از مزارع مختلف کلزا در اصفهان در مناطق برآن، کوهپایه، مهاباد، مبارکه، دهقان، 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 بررسی های آزمایشگاهی در یخچال قرار داده شد.

ابتدا نمونه ها با جریان ملایم شیر آب کاملاً شسته و به وسیله ی چاقویی تیز، پوست رویی قسمت آلوده برداشته شد و قطعاتی از بافت حد فاصل بخش های آلوده و سالم از قسمت ریشه و طوقه آلوده، با اسکالپل استریل بریده و هم چنین از ریشه ها 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 وسیله ی آب مقطر استریل شسته و در بین دو لایه ی 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 سانتی متری حاوی محیط PDA (Potato Dextrose Agar) کشت گردیدند. هر پتری در دمای ۲۴ درجه ی

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 ریشه‌ای 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 ۴-۵ 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 ریشه‌های 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 و شرایط 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 ریشه‌ای قطعات بریده شده نمونه ابتدا روی محیط کشت آب آگار (WA) کشت داده و سپس در انکوباتور در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شدند (Burgess et al., 1989). پس از گذشت ۲۴ ساعت، مشاهدات انجام و در صورتی که از هر یک از نمونه‌ها قارچ عامل بیماری شروع به رشد بر روی محیط نمود در اسرع وقت اقدام به انتقال آن به محیط کشت جدید می‌شد تا از احتمال آلودگی با برخی از قارچ‌های دیگر و یا احتمالاً قارچ‌های ساپروفیت پرهیز گردد. بدین صورت که از نوک ریشه قارچ‌های رشد کرده با چوب پنبه سوراخ کن قطعاتی که حاوی تک ریشه 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 گونه‌ها در موارد لازم از محیط برگ میخک (Cornation Leaf Agar) CLA استفاده شد (Carol, 1990 ; Nelson et al., 1983; Sneh et al., 1991).

بررسی‌های مورفولوژیکی و شناسایی گونه‌ها

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

وجود یا عدم وجود اسپورودوخیوم و رنگ آن یادداشت برداری شد. تکه‌هایی از ریشه و اسپورودوخیوم 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 زیر بوده است:

- نوع فیالید حامل ماکروکنیدی.
- وجود و یا عدم وجود ماکروکنیدی.
- اشکال مختلف میکروکنیدی و چگونگی تشکیل آن‌ها در صورت عدم تشکیل ماکروکنیدی، کشت‌ها تحت شوک سرما و دمای ۴ درجه سلسیوس و نور به مدت حداقل ۲ ساعت قرار داده 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 کلامیدوسپور کشت‌ها باید بیش از دو هفته در تاریکی نگهداری شوند) (Booth et al., 1971).

تولید اینوکولوم و اثبات بیماری زایی

برای اثبات بیماری زایی 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) گلدان‌ها در شرایط گلخانه تحت شرایط رطوبت نسبی ۸۰-۷۵ درصد و دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد نگه داری شدند و علائم پیشرفت بیماری بررسی و ثبت گردید. علائم، روزانه ثبت و به محض این‌که علائم برگ‌ها 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 بیماری زایی 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 شاخص‌های 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 برگ‌ها (۲)
- برگ‌های پایین ریخته شده، علائم شدید بیماری روی برگ‌های فوقانی، پژمردگی شدید (۳)

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

- مرگ کامل گیاه (۵)

برای تمایز بهتر شاخص بیماری، نتایج به دست 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 ۰-۲۴ 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 مجدداً برای بار دوم قارچ‌های عامل بیماری از نهال‌های گلدانی مختلف انجام شد. هم چنین، جهت بررسی اثر قارچ‌های مربوطه بر روی رشد و نمو گیاه کلزا اقدام به بررسی‌های عملکردی آن‌ها بر روی گیاهان کلزای مورد آزمون در گلخانه گردید. بدین صورت که پس از انجام آزمایشات شاخص‌هایی 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 نمونه‌ها، کشت، جداسازی، خالص سازی و شناسایی، تعدادی جدایی‌ی 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 آن‌ها بر روی گیاه شامل طول، وزن تر و خشک ساقه و ریشه در جداول مربوطه ارائه 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 میکروکنیدیو فوراً کاملاً توسعه یافته و فیالیدهای بلند داشتند. گاهی رگه‌های رنگی در محیط کشت به وجود آمده بود. این گونه قارچ از برآن و کوه پایه جدا شد. علایم بیماری شامل خمیده شدن برگ‌ها، ریزش برگ‌ها از قسمت‌های زیرین، زردی برگ‌ها، پژمردگی و پوسیدگی ریشه به خصوص ریشه‌های فرعی بود.

گونه‌ی *F. oxysporum*

سرعت رشد در این نوع قارچ بیش از ۲ سانتی‌متر بود و تفاوت بین ماکرو و میکروکنیدی‌ها مشخص بود. ماکروها به تعداد فراوان و میکروکنیدی‌ها کم بودند. میکروکنیدی‌ها به طور زنجیروار نبوده و از فیالیدهای جانبی ایجاد شده بودند. قطر کلامیدوسپورها ۱۱-۷ میکرون اندازه‌گیری شد. کلونی این قارچ بر روی محیط کشت به رنگ سفید و دارای میسلیم‌های

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

گونه‌ی *F. lateritium*

این گونه دارای رشد بطی بود و تفاوت بین ماکروکنیدی و میکروکنیدی‌ها مشخص، ماکروکنیدی‌ها فراوان ولی میکروکنیدی‌ها به تعداد خیلی 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. علائم بیماری به شدت دو گونه‌ی فوق نبوده هر چند علائمی 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 لکه‌های 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 و کلامیدوسپور‌ها بسیار کمیاب بود. این گونه 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. میکروکنیدی‌ها 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. علائم بیماری به طور خفیف روی گیاه شامل زردی برگ‌ها و پوسیدگی ریشه مشاهده شد.

گونه‌ی *Rhizoctonia solani*

جدایه‌ها، دارای رشد سریع بود به طوری که تشتک‌های پتری قطر ۹ سانتیمتر را در ۲۵-۲۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۷۲-۴۸ ساعت پوشاند. سختینه و ریشه‌های هوایی کرک مانند تولید کرد و در محل انشعاب هیف‌ها که با زاویه ۹۰ درجه از هم جدا شده بودند فرورفتگی دیده می‌شد. این قارچ از شهرستان اصفهان جدا شد. علائم بیماری روی گیاه شامل پوسیدگی ریشه‌ها، زردی برگ‌ها، شانکر ساقه زیر زمینی، قهوه‌ای شدن بافت‌های آلوده، وجود ترک‌های طولی و نهایتاً کاهش رشد بود.

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 آن‌ها در قالب روش تجزیه‌ی آماری کاملاً تصادفی نتایج زیر حاصل گردید.

نتایج به دست آمده در این پژوهش (جدول ۲ و ۳) نشان داد که در مورد وزن تر ریشه‌ها 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 می‌شود. داده‌ها نشان می‌دهد 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 می‌دهد (جدول ۲ و ۳) ($P = 0.05$).

ارزیابی شدت بیماری‌زایی نسبی قارچ‌های جداسازی شده

در این مرحله، شدت بیماری‌زایی نسبی جنس‌ها و گونه‌های 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 می‌شود که جدایه‌های *F. solani* و *F. oxysporum* و *F. culmorum* از شدت بیماری‌زایی بالاتری در مقایسه با سایر جدایه‌ها برخوردار بودند (Thanassoulopoulos et al., 1985) (جدول ۴) ($P = 0.05$).

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	<i>F. oxysporum</i>	۱۴/۵۷ ^{ab}	۹/۶۴ ^{ab}	۲۴/۲۱ ^b
۳	<i>F. lateritium</i>	۱۷/۷۲ ^{ab}	۹/۰۶ ^{ab}	۲۶/۷۸ ^{ab}
۴	<i>F. heterosporum</i>	۱۶/۵۸ ^{ab}	۹/۳۹ ^{ab}	۲۵/۸۷ ^b
۵	<i>F. culmorum</i>	۱۴/۴۴ ^{ab}	۹/۰۶ ^b	۲۳/۵۰ ^b
۶	<i>F. solani</i>	۱۲/۹۷ ^{ab}	۹/۰۷ ^{ab}	۲۲/۰۴ ^b
۷	<i>R. solani</i>	۱۳/۹۳ ^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	<i>F. oxysporum</i>	۱۴/۵۷ ^{ab}	۹/۶۴ ^{ab}	۲۴/۲۱ ^b
۳	<i>F. lateritium</i>	۱۷/۷۲ ^{ab}	۹/۰۶ ^{ab}	۲۶/۷۸ ^{ab}
۴	<i>F. heterosporum</i>	۱۶/۵۸ ^{ab}	۹/۲۹ ^{ab}	۲۵/۸۷ ^b
۵	<i>F. culmorum</i>	۱۴/۴۴ ^{ab}	۹/۰۶ ^b	۲۳/۵۰ ^b
۶	<i>F. solani</i>	۱۲/۹۷ ^{ab}	۹/۰۷ ^{ab}	۲۲/۰۴ ^b
۷	<i>R. solani</i>	۱۳/۹۳ ^b	۹/۱۷ ^{ab}	۲۳/۰۹ ^b

- بدون اختلاف معنی دار (P= 0.05) . * , ** معنی دار در سطح ۰/۰۵ و ۰/۰۱ ns

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

ردیف	تیمار	وزن تر قسمت های هوایی	وزن تر ریشه	وزن تر کل گیاه	وزن خشک قسمت های هوایی	وزن خشک ریشه	وزن خشک کل گیاه
۱	شاهد	۵۱۰۷ ^a	۵۱۷۰ ^a	۱۰۲۷۷ ^a	۰/۱۷ ^a	۰/۱۳ ^a	۰/۳۰ ^a
۲	<i>F. solani</i>	۲۱۱۹ ^b	۲۱۵۰ ^b	۴۲۶۹ ^b	۰/۳۳ ^b	۰/۰۶ ^{ab}	۰/۳۹ ^c
۳	<i>F. culmorum</i>	۲۷۷۵ ^b	۴۲۲۱ ^b	۷۰۰۶ ^b	۰/۳۵ ^b	۰/۰۹ ^{ab}	۰/۴۴ ^{bc}
۴	<i>F. lateritium</i>	۵ ^a	۵۱۶۰ ^a	۵۱۶۵ ^a	۰/۶۷ ^a	۰/۱۱ ^{ab}	۰/۷۸ ^{ab}
۵	<i>F. oxysporum</i>	۲۷۷۲ ^b	۲۱۲۰ ^b	۴۸۹۲ ^b	۰/۴۰ ^{ab}	۰/۰۹ ^{ab}	۰/۴۹ ^{abc}
۶	<i>R. solani</i>	۲/۴۲ ^b	۲/۷۸ ^b	۳/۲۰ ^b	۰/۳۵ ^b	۰/۰۷ ^{ab}	۰/۴۲ ^c
۷	<i>F. heterosporum</i>	۲/۹۱ ^b	۲/۴۱ ^b	۳/۳۲ ^b	۰/۴۸ ^b	۰/۱۰ ^{ab}	۰/۵۸ ^c

- در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشترک می‌باشند طبق آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ متفاوت نیستند.

جدول ۴- میانگین شاخص پژمردگی در اثر گونه‌های مورد آزمون

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

- طیف شاخص ۰-۲۴ می‌باشد.

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 جدا شده 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 می‌گردد. این قارچ از مناطق کشت کلزا در برآن و کوهپایه جدا شد.

علائم شامل خمیده شدن برگ‌ها، ریزش برگ‌ها از قسمت‌های زیرین، زردی برگ‌ها، پژمردگی و پوسیدگی ریشه‌ها به خصوص ریشه‌های فرعی گیاه بود. شاخص بیماری‌زایی این قارچ ۹/۲ بود که در بین سایر جدایه‌های مورد آزمون قابل توجه می‌باشد. شاخص‌های عملکرد گیاه کلزا نسبت به شاهد و سایر تیمارها اثر معنی داری از خود نشان داده است. این مشاهدات با گزارشات سایر پژوهش‌گران 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. oxysporum*

مشاهده سرعت رشد در این گونه و نیز تفاوت بین ماکروکنیدی و میکروکنیدی‌ها (ماکروها به تعداد زیاد و میکروکنیدی‌ها 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 می‌کند متمایز می‌سازد و گونه‌ی *F. subglutinans* هم به علت تولید فیالیدهای منشعب و عدم تشکیل کلامیدوسپور با *F. oxysporum* متمایز می‌گردد.

علائم 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

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 با گزارشات (Burgess *et al.*, 1989) و Booth *et al.* (1971) و پس از آن سایر منابع نامبرده فوق مطابقت دارد.

گونه‌ی *F. lateritium*

گونه‌ی ای است که رشد با ماکروکنیدی‌های فراوان و طویل و باریک با سلول انتهایی قلاب مانند، تعداد میکروکنیدی‌ها 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.

علائم بیماری در اثر تلقیح این قارچ بسیار خفیف بود. ریشه‌ها 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 علائم بیان شده می‌گردد. در بررسی‌های 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 گلخانه‌ای 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*

بررسی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی نشان داد که این گونه دارای میسلیم‌های متراکم و به صورت لکه‌های سفید و ناهموار در سطح کلنی می باشد، سرعت رشد در این گونه قارچ، تفاوت بین ماکروکنیدی و میکروکنیدی‌ها مشخص، تعداد میکروکنیدی‌ها کم و از فیالیدهای ساده ایجاد می شوند، سلول انتهایی ماکروکنیدی خمیده، منقار مانند، بلند و کشیده است. بررسی‌های این گونه نشان داده است که این گونه در واقع همان گونه *F. graminum* است. در منابع قبلی، گزلاخ و نایبرگ این گونه را به علت داشتن ماکروکنیدی‌های طویل تر و تولید کلامیدوسپور از *F. graminum* جدا کرده اند، هر چند برخی از جدایه‌های *F. heterosporum* کلامیدوسپور تولید نمی کند (Saremi, 1998). هم چنین بوث (*F. heterosporum* و *F. reticulatum* را هم نام با گونه *F. heterosporum* معرفی کرده است. (Booth *et al.*, 1971)

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

علائم بیماری ایجاد شده روی گیاه در اثر این گونه چندان قابل توجه نبود به طوری که 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 می سازد، چون ماکروکنیدی در گونه‌ی اخیر طولی تر و دارای انحنای زیاد است و سلول پایه به شکل پاشنه پا می باشد. این بررسی با گزارشات نلسون و همکاران (Nelson *et al.*, 1983) و ال و سینگلتون و همکاران مطابقت دارد (Singleton *et al.*, 1992).

علائم 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 می توان 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*

بررسی های ماکروسکوپی و میکروسکوپی این قارچ نشان داد که جدایه ها دارای رشد سریع بوده به طوری که تشتک‌های پتری قطر ۹ سانتی متر را در درجه حرارت ۲۷-۲۵ سلسیوس به مدت ۴۸-۷۲ ساعت می پوشانند. این قارچ تولید ریشه 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.

علائم ایجاد شده 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

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 قسمت های هوایی برخی از گیاهان ایجاد خسارت می نماید (Singleton *et al.* 1992). البته این قارچ دارای گروه های متعدد آناستوموزی (ریسه پیوندی) است که مطالعات و بررسی های 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 بررسی های 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 بیماری زا برای کلزا معرفی می گردد. 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 rape 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. Elliott, 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 Congress, Canberra, Australia*.

- 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.
- Thanassouloupoulos, 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.