دوفصلنامه تحقیقات بیماری‌های گیاهی
سال چهارم، شماره دوم، پاییز و زمستان 1395
صص 44-27

تفکیک گونه‌های *Leptosphaeria maculans* و *Leptosphaeria biglobosa* عوامل بیماری ساق سیاه کلزا با برخی خصوصیات هاگ‌های جنسی در برخی جدایه‌ها از استان‌های مازندران و گلستان

علی زمان میرآبادی*[1]، کامران رهنما[2]، مهدی صدروی[3]، منصور صلاتی[4]

تاریخ دریافت: 94/4/9 تاریخ پذیرش: 94/9/28

چکیده

خصوصیات آسکوسپورهای هشت جمعیت قارچ‌های عوامل بیماری ساق سیاه کلزا *Leptosphaeria maculans* و *L. biglobosa* در استان‌های مازندران و گلستان جداسازی شده از بقایای کلزا و خردل وحشی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج تجزیه واریانس طول و عرض آسکوسپورها نشان داد که اختلاف معنی داری در سطح 1% در جمعیت‌های هر دو گونه وجود دارد. تغییرات طول و عرض آسکوسپورها به ترتیب 6/25 و 2/5 میکرومتر از بالاترین تغییرات دامنه طول و عرض آسکوسپورهای دیگر مطالعات انجام شده در جهان بیشتر بود. همچنین اختلاف معنی داری از نظر طول لوله تندش پس از 4، 16 و 24 ساعت از آزمایش مورد بررسی مشاهده گردید. هاگ‌های جنسی جمعیت مناطق دشت ناز ساری، کوهی خیل و فاضل آباد دارای تعداد لوله تندش بیشتر، کوتاهتر، پیچ خورده و با منشاء از سلول‌های میانی بودند در صورتیکه در جمعیت مناطق لالا، مازاروستاق و خالخیل لوله تندش بلندتر، صاف و از سلولهای طرفین منشاء گرفته بود که با در نظر گرفتن خصوصیات مربوط به ریخت شناسی لوله تندش، به ترتیب هاگ های جنسی بخشی از جمعیت های بررسی شده مکان‌های اول را تیپ‌های بیماری‌زا *L. maculans* و اکثر جمعیت های مناطق دوم را تیپ غیر بیماری‌زا *L. biglobosa* تشکیل می‌دهد. با توجه به بالا بودن درصد جوانه زنی اغلب جمعیت های قارچ عامل بیماری ساق سیاه کلزا در این بررسی، می‌توان نتیجه گرفت که بیشتر جمعیت ارزیابی شده از مناطق مختلف، متعلق به گروه غیر بیماری زا است. با توجه به خصوصیات لوله تندش جمعیت های قارچ بر روی خردل وحشی، این جمعیت‌ها غیربیماری‌زا تشخیص داده شد. رابطه‌ایی بین خصوصیات مربوطه به لوله تندش جمعیت های قارچ بر روی خردل و بیماریزا بودن آن مشاهده نشد.

واژه‌های کلیدی: کلزا، ساق سیاه، *Leptosphaeria maculans*، *Leptosphaeria biglobosa*، هاگ جنسی.

---

[1]- مربی پژوهش، مرکز تحقیقات کاربردی و تولید بذر شرکت توسعه کشت دانه های روغنی، ساری، ایران.
[2]- دانشیار، گروه گیاه پزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
[3]- دانشیار، گروه گیاه پزشکی، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران.
[4]- استادیار پژوهش، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، مشهد، ایران.
*- نویسنده مسئول مقاله: alizaman2006@gmail.com

مقدمه

ساق سیاه *Leptosphaeria maculans* (Desmaz.) Ces & De Not (anamorph *Phoma lingam* (Tode: Fr.) Des، یکی از بیماری های مهم تیره چلیپاییان، به ویژه کلزا بوده که در بسیاری از مناطق جهان منجر به آسیب های اقتصادی زیادی شده است (West *et al*., 2001؛Fitt *et al*.,2006). در مناطق جغرافیایی مختلف جهان جمعیت های بیماری زای قارچ عامل بیماری ساق سیاه کلزا متفاوت است (McGee and Petrie, 1978). دو گروه مختلف ژنتیکی برای این قارچ تحت عناوین مهاجم (بیماری‌زا یا تیپ A) و غیر مهاجم (غیر بیماری زا یا تیپ B) شرح داده شده است (Johnson and Lewis, 1994 ؛Koch *et al*., 1989). در گروه A نژادهای مختلفی نظیر PG1، PG2، PG3، PGT و PG4 بر اساس تیپ علایم ایجاد شده روی ارقام افتراقی وستار[1]، کوینتا[2] و گلاسیر[3] قابل تفکیک است (Mengistu *et al*.,1991). عدم امکان تلاقی آمیزشی بین این دو گروه و خصوصیات های متفاوت مولکولی، بیوشیمیایی، ریخت شناسی (Brun *et al*., 1997) و شکل علایم ایجاد شده روی برگ و ساقه ها (Johnson and Lewis, 1994) منجر به تفکیک آنها به ترتیب به دو گونه *L. maculans* و *L. biglobosa* گردید (West *et al*., 2001). *پتری و همکاران* (Petrie *et al*.,1988) بررسی هایی برای تفکیک گروه های مهاجم و غیر مهاجم بر اساس طول لوله تندش هاگ های غیر جنسی انجام دادند. در مطالعات انجام شده توسط *هوانگ و همکاران* (Huang *et al*., 2001) روی اثر دما بر جوانه زنی هاگ های جنسی و الگوی رشدی ریسه ها برای تعیین گروه های بیماری زا، آسکوسپورهای هر دو گروه بیماری زا و غیر بیماری زا، قادر به تولید لوله تندش در یک دامنه دمایی 5 تا 20 درجه سلسیوس بودند. شکل جنسی *L. maculans* در ایران توسط *زمان میرآبادی و همکاران* (Zaman Mirabadi *et al*., 2009b) گزارش شده است. همچنین نژاد بیماری زایی PG2 (Zaman Mirabadi *et al*., 2009a) و PGT نیز (Zaman Mirabadi *etal*., 2010b) از شمال ایران گزارش گردیده که این موضوع با توجه به خسارت زا بودن این جدایه ها و لزوم تعیین تیپ ها یا جمعیت بیماریزا در مزارع کلزا اهمیت بسیاری خواهد داشت. با توجه به تعداد کم تحقیقات انجام شده در سرتاسر جهان روی صفات مربوط به ریخت شناسی و جوانه زنی هاگهای جنسی قارچ عامل بیماری ساق سیاه کلزا و همچنین لزوم تعیین احتمالی روابط موجود بین این صفات ظاهری و بیماریزایی قارچ عامل ساق سیاه کلزا، این بررسی برای درک این موضوع روی هاگ های جنسی جداسازی شده از مناطق شمالی کشور انجام و سعی شد تا روابط احتمالی بین خصوصیات ریخت شناسی هاگ های جنسی در این تحقیق با بررسی‌های انجام شده روی بیماری زایی جدایه های مشابه با محل نمونه برداری واحد (Zaman Mirabadi *et al*., 2010b) مشخص گردد. با توجه به نقش دو گونه قارچی *L. maculans* و *L. biglobosa* در ایجاد بیماری ساق سیاه کلزا، در مواردی که لازم است نام هر دوگونه نوشته شود، به منظور جلوگیری از تکرار نام هر دو گونه و عدم اطلاع دقیق از جمعیت مورد مطالعه، تنها نام جنس *Leptosphaeria* بیان شده است.

---

[1] Westar
[2] Quinta
[3] Glacier

مواد و روش ها

نمونه برداری

نمونه برداری از بقایای کلزا برای بررسی اندازه آسکوسپورها در هشت جمعیت (30 آسکوسپور در هر زمان بررسی و مجموعا 90 آسکوسپور به طور تصادفی از ده‌ها هزار آسکوسپور آزاد شده در محیط کشت در مجموع زمان‌های بررسی از هر نمونه جمعیت) از روی کلزا و خردل انجام گرفت. جداسازی و خالص سازی هاگ‌های جنسی طبق روش منگیستو و همکاران (Mengistu *et al*., 1993) انجام گرفت. در این روش بقایای حدود 40 تا 50 میلی متری کلزا دارای پزدوتسیوم های قارچ پس از خیساندن به مدت حداقل 30 ثانیه در آب استریل توسط وازلین بر پشت لبه پلیت حاوی آگار 2 درصد برای آزاد سازی هاگهای جنسی قرار داده می شود. نمونه‌های مورد مطالعه از پنج منطقه، دشت ناز، خالخیل، مازاروستاق، کوهی خیل، لالا از استان مازندران، منطقه فاضل آباد از استان گلستان و دو جمعیت از ساقه خردل از مناطق بیکار آیش و دشت ناز استان مازندران بود.

اندازه گیری آسکوسپورها

برای بررسی اندازه طول و عرض آسکوسپورها، تشتک های پتری (حاوی آسکوسپورهای آزاد شده بر روی لام پوشش داده شده با آگار) برای مدت 20 ساعت در دمای 5 درجه سلسیوس در یخچال نگهداری شد. بعد از مدت زمان مذکور روی آسکوسپورها را با محلول لاکتوفنل آبی و یک لامل پوشش داده و پشت لام سه خط موازی (سه تکرار) در جهت طول آن رسم شد. سپس در زیر میکروسکوپ نوری (نیکون E200، ژاپن) با بزرگنمایی400 × (با عدسی چشمی مدرج)، طول و عرض آسکوسپورهای جوانه زده (طول لوله تندش حداقل 10 میکرومتر باشد) اندازه گیری گردید. روی هر خط طول و عرض30 آسکوسپور (مجموعا 90 آسکوسپور) برای هر منطقه محاسبه و داده ها در قالب طرح کاملاً تصادفی تجزیه و تحلیل گردید. میانگین، بیشترین، کمترین، دامنه، طول و عرض آسکوسپورها برای هر منطقه نیز ارزیابی شد.

بررسی خصوصیات لوله تندش

برای بررسی صفات لوله تندش نظیر درصد جوانه زنی (آسکوسپورهای با حداقل یک لوله تندش با اندازه بیش از 10میکرومتر)، تعداد لوله تندش (میانگین لوله های تندش سلول های انتهایی و میانگین لوله های تندش سلول های میانی)، منشاء لوله تندش (بر حسب موقعیت سلول جوانه زده به یکی از دو شکل انتهایی و میانی است)، طول لوله تندش (در آسکوسپورهای با بیش از یک لوله تندش، بزرگترین آنها محاسبه می‌شود) و حالت انشعابات لوله تندش (صاف یا پیچیده)، درب تشتک‌های مسدود شده از جمعیت‌های مناطق مختلف به دست آمده، در زمان های مشخص باز و 90 آسکوسپور (30 آسکوسپور در سه تکرار) مورد مطالعه قرار گرفت. به منظور توقف رشد هاگ‌ها از محلول آبی لاکتوفنل استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم افزار SAS 9.1 انجام گردید.

نتایج

اندازه آسکوسپورهای *Leptosphaeria*

نتایج حاصل از تجزیه واریانس اندازه آسکوسپورها نشان داد که اختلاف معنی داری در سطح 1% بین طول و عرض آسکوسپورها در جدایه های مناطق مختلف تحت بررسی وجود دارد (جدول 1). از نظر طول آسکوسپور منطقه کوهی خیل (64/4) بیشترین مقدار طول آسکوسپور و منطقه لالا (49/8) کمترین مقدار را داشته اند. از نظر عرض آسکوسپور منطقه فاضل آباد (9/19) بیشترین مقدار و منطقه لالا (5/09) کمترین مقدار عرض آسکوسپور را داشتند.

جدول 1- مقایسه میانگین طول و عرض آسکوسپورها در مناطق مورد بررسی.

جمعیت	طول آسکوسپور	عرض آسکوسپور
فاضل آباد	52/2 c	9/19 a
کوهی خیل	64/4 a	8/79 ab
دشت ناز خردل	58/7 bc	8/4 bc
خالخیل	61/2 b	8/15 c
بیکارآیش	60/8 b	8/7 ab
مازاروستاق	60/5 b	7/36 d
دشت ناز	58/1 bc	7/58 d
لالا	49/8 d	5/09 e

تغییرات دامنه طول و عرض آسکوسپور در تمام جمعیت های مورد مطالعه این بررسی به ترتیب در حدود 46/25 و 7/5 میکرومتر اندازه گیری شد. نتایج به دست آمده از بررسی دامنه طول و عرض آسکوسپورها تفاوت هایی را با نتایج مطالعات دیگر نشان می دهد (جدول 2). تغییرات دامنه طول و عرض آسکوسپورهای این تحقیق به ترتیب 6/25 و 2/5 میکرومتر از بیشترین تغیرات دامنه طول و عرض آسکوسپورها دیگر مطالعات انجام شده در جهان (جدول 2) بیشتر بود.

درصد جوانه زنی آسکوسپورهای *Leptosphaeria*

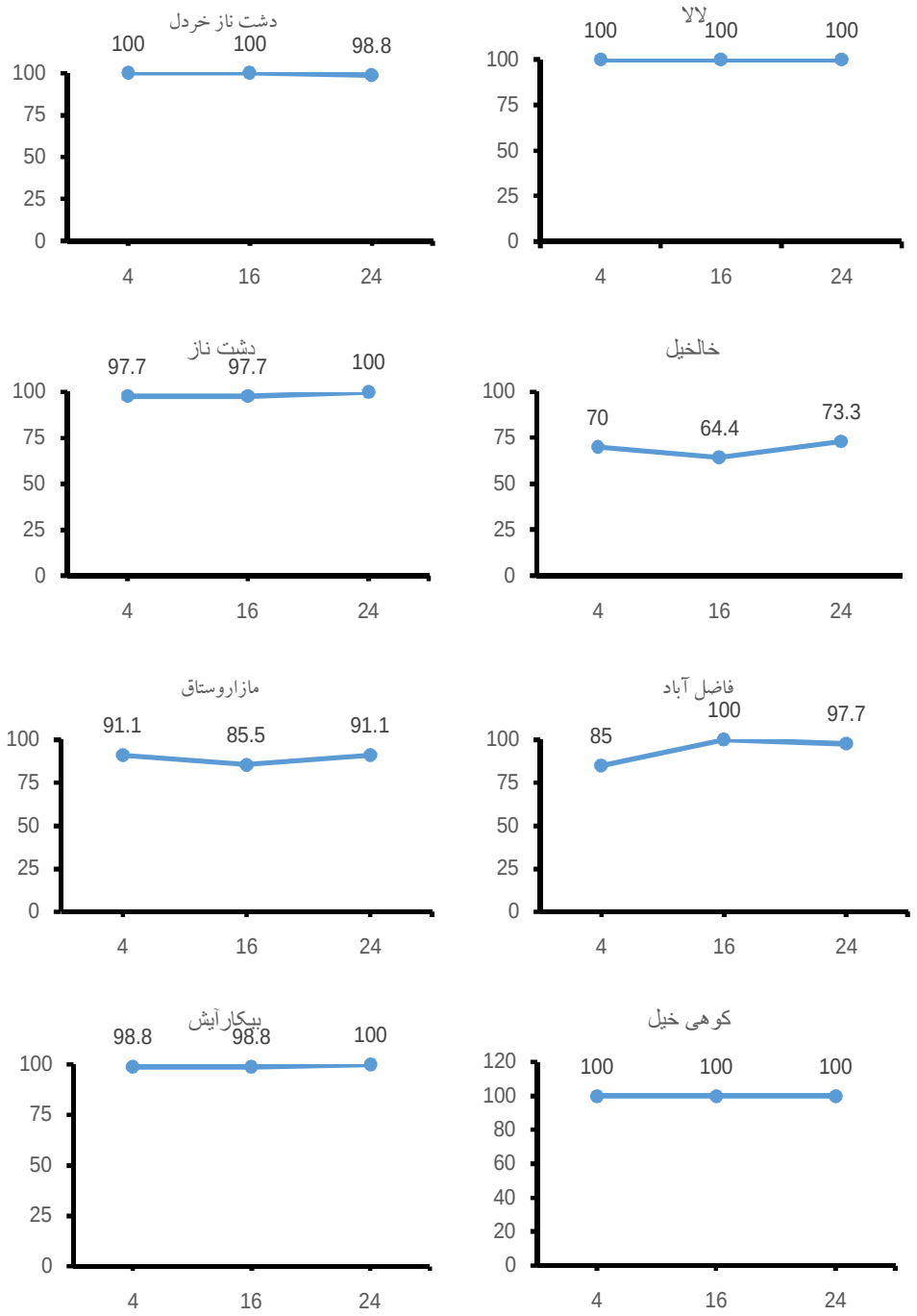
نتایج حاصل از درصد جوانی زنی جمعیت های مختلف مورد بررسی در شکل 1 آمده است. درصد جوانه زنی آسکوسپورها در همه زمان ها و برای همه مناطق به جز خالخیل بیش از 90% بوده است که این میزان برای منطقه خالخیل پس از 24 ساعت 73/33 بوده است (شکل 1).

جدول 2- مقایسه طول و عرض (میکرومتر) آسکوسپورهای قارچ *Leptosphaeria*

مطالعه	اندازه (میکرومتر)		دامنه تغییرات	
	طول	عرض	طول	عرض
این بررسی (2015)	[A]38/75-85	5-12/5	46/25	7/5
هوانگ و همکاران(منتشر نشده)[B]	28-50	4-5	22	1
Jensen, 1994	49-64	7-9	15	2
Ndimande, 1976	31-64	3/9-6/6	37	2/7
Punithalingam and Holliday, 1972	35-70	5-8	35	3
Smith and Sutton, 1964	30-70	4-9	40	5

[A] خردل وحشی؛ [B] Young-Ju-Huang, Rothamsted, Research

بررسی تعداد لوله تندش هشت جمعیت (جدول3) نشان دادکه بیشتر آسکوسپورهای جمعیت های مناطق مختلف دارای دو لوله تندش در همه زمان های مورد مطالعه بوده است. تعداد لوله تندش از صفر (بدون لوله تندش) تا شش عدد در حداکثر 24 ساعت پس از تلقیح متغیر بود. بیشترین تعداد لوله تندش شش عدد در جمعیت فاضل آباد (Fa) مشاهده گردید.در منطقه دشت ناز (Da) روند نامشخصی در تعداد لوله تندش پس از 16 ساعت مشاهده شد. در منطقه خالخیل (Kh) نیز با افزایش زمان تعداد لوله های تندش افزایش یافته ولی حتی با گذشت 24 ساعت تنها حدود 60 درصد آسکوسپورها جوانه زنی کردند و لذا تعداد لوله های تندش کاهش یافت که این موضوع بیانگر عدم قدرت باروری آسکوسپورها در مناطق مختلف می باشد. جدایه مربوط به خردل در منطقه دشت ناز نیز بیشترین تعداد لوله تندش را تولید کرد. جمعیت منطقه بیکار آیش رتبه سوم را در تولید لوله تندش داشت.



شکل 1- تغییرات درصد جوانه زنی جمعیت آسکوسپورهای *Leptosphaeria* بقایای کلزا در مناطق لالا (La)، دشت ناز (Da)،خالخیل(Kh)، مازوق روستاق (Ma)، فاضل آباد (Fa) و کوهی خیل (Ko) و بقایای خردل در مناطق دشت ناز(Da-kh) و بیکارآیش (BKh)بر روی آب آگار، در شرایط تاریکی و دمای 20 درجه سانتی گراد، در زمان های 4، 16 و 24 ساعت پس از تلقیح

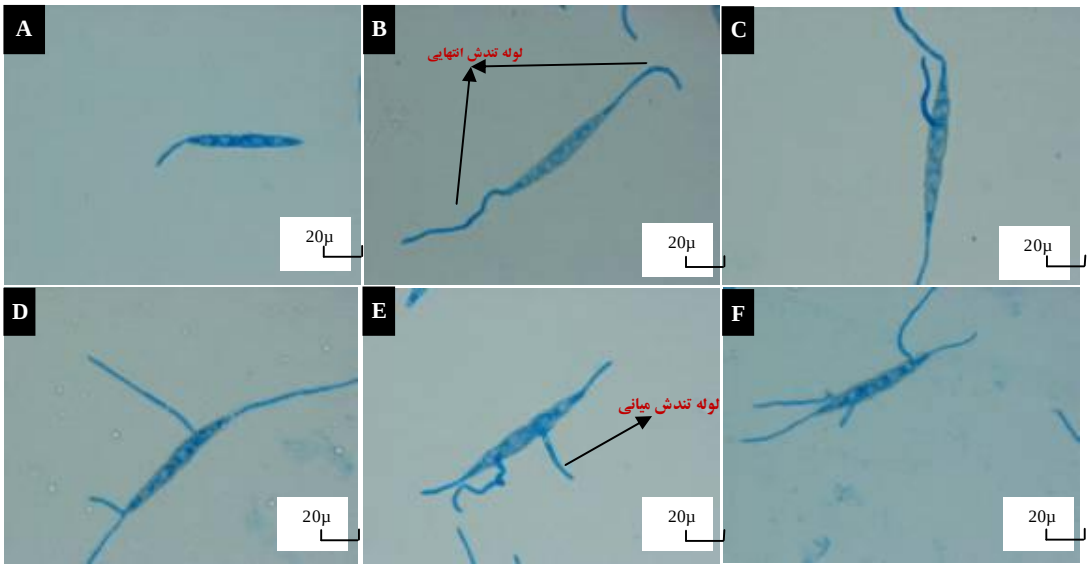
جدول 3- تعدا لوله تندش آسکوسپورهای *Leptosphaeria* بعد از 4، 16 و 24 ساعت از تلقیح در دمای 20 درجه سلسیوس

Region	Ko			Bkh			Fa			Ma			Kh			Da			La			Da-kh		
GM / T	24	16	4	24	16	4	24	16	4	24	16	4	24	16	4	24	16	4	24	16	4	24	16	4
0	-	-	-	-	1	1	2	-	5	8	4	8	24	32	27	-	2	2	-	-	-	1	-	-
1	-	-	2	-	-	5	2	4	7	4	3	-	9	8	4	-	-	-	5	10	11	-	2	5
2	71	83	88	67	77	84	52	61	71	64	82	82	43	45	59	60	81	82	75	61	73	48	81	82
3	16	7	-	20	10	-	25	20	6	12	1	-	12	5	-	23	7	4	8	8	5	29	6	3
4	3	-	-	3	1	-	6	5	-	1	-	-	2	-	-	5	-	2	2	1	1	10	1	-
5	-	-	-	-	1	-	2	-	1	1	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	2	-	-
6	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TGM	202			206			221			177			139			214			187			233		
AGA	2.24			2.27			2.45			1.96			1.54			2.37			2.07			2.6		

T:Time of after inoculation (houre) **GM**: Number of germ tube **TGM:**Total germ tube after 24 h **AGA**: Average of number of germ tube for an ascospore

منشاء لوله تندش *Leptosphaeria*

لوله های تندش از سلول های میانی و یا انتهایی منشاء می گیرد (شکل 2). در تمامی هشت جمعیت (جدول 4) مناطق تحت بررسی، میانگین تعداد لوله های تندش انتهایی با گذشت زمان تغییر چندانی نداشته ولی تعداد لوله‌های تندش میانی با گذشت زمان از چهار تا 24 ساعت افزایش یافت.



شکل2- اشکال مختلف جوانه زنی سلول های آسکوسپور *L. maculans* (400×). A)آسکوسپور دارای یک لوله تندش انتهایی ، B) آسکوسپور دارای دو لوله تندش انتهایی، C ،D) آسکوسپور دارای 2 لوله تندش انتهایی و یک لوله تندش میانی، E) آسکوسپور دارای دو لوله تندش انتهایی و دو لوله تنش میانی، F) آسکوسپور دارای دو لوله تندش انتهایی و 3 لوله تندش میانی

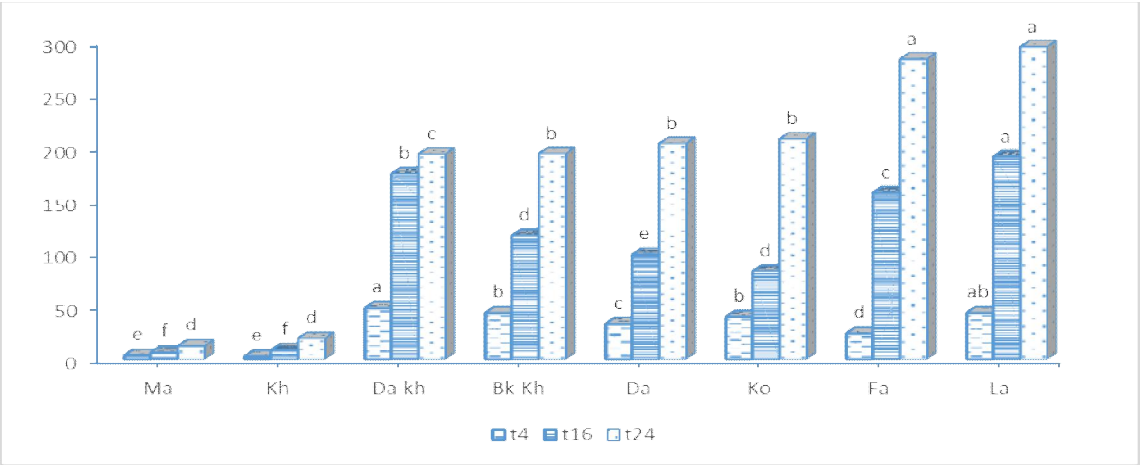
بررسی طول لوله تندش*Leptosphaeri*

نتایج تجزیه واریانس طول لوله تندش هاگ‌های جنسی *Leptosphaeria* هشت جمعیت نشان داد که اختلاف معنی داری در تمامی زمان های آزمایش در سطح 1% وجود دارد. بعد از چهار ساعت از زمان تلقیح (شکل 3) جمعیت دشت ناز (نمونه خردل) بیشترین و جمعیت مازاروستاق و خالخیل کمترین رشد طولی را داشته‌اند. بعد از 16 ساعت بیشترین طول لوله تندش مربوط به منطقه لالا و کمترین آن مربوط به مناطق خالخیل و مازاروستاق بود. پس از 24 ساعت از زمان تلقیح بیشینه میزان طول لوله تندش مربوط به مناطق لالا و فاضل آباد و کمینه آن مربوط به مناطق مازاروستاق و خالخیل بود. مقایسه میانگین طول لوله تندش در سه منطقه بیانگر تغییرات طول لوله تندش تا 24 ساعت بعد ازتلقیح بوده است. به عنوان مثال هاگهای جنسی جمعیت دشت ناز نمونه خردل که پس از چهار ساعت از زمان تلقیح در رتبه A قرار داشته نهایتا بعد از 24 ساعت در رتبه C قرار گرفته و یا منطقه فاضل آباد که حالت عکس منطقه مذکور را داشته است و این در حالی است که مناطق خالخیل و مازاروستاق در مدت زمان چهار

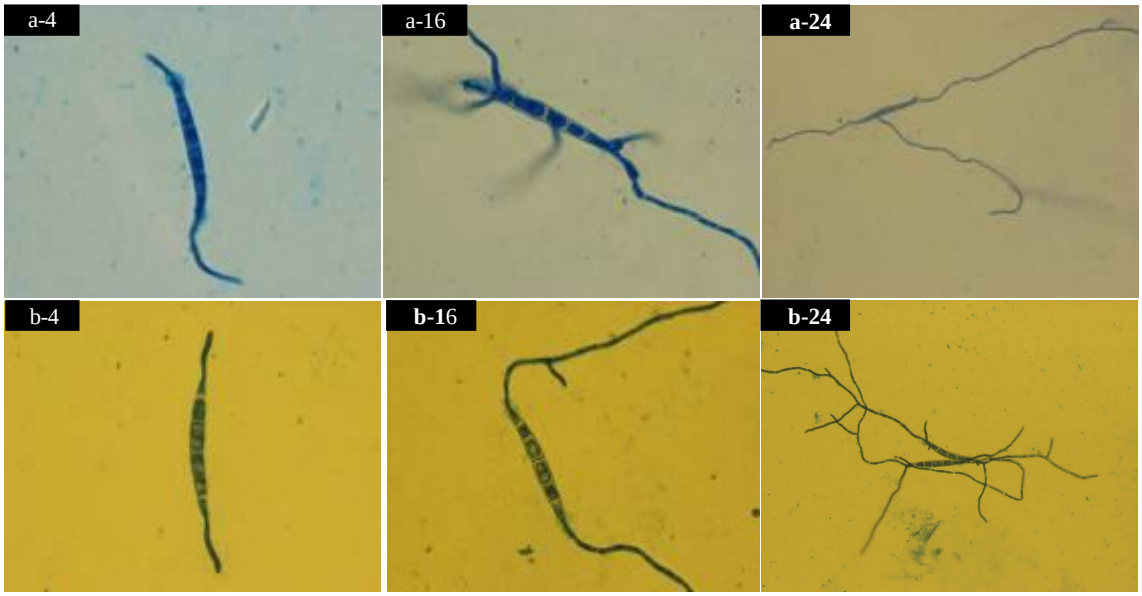
تا 24 ساعت روند ثابتی را داشته‌اند. نتایج تغییرات طول لوله تندش در زمان‌های چهار، 16 و 24 به ترتیب در شکل‌های 3 و 4 قید شده است.

جدول 4- تعداد لوله های تندش میانی و انتهایی در سه زمان 16،4 و 24 ساعت پس از تلقیح در هشت منطقه دشت ناز نمونه خردل(Da-Kh)، فاضل آباد(Fa)، دشت ناز(Da)، بیکارآیش نمونه خردل(B-Kh)، کوهی خیل (Ko)، مازاروستاق(Ma)، خالخیل (Kh) و لالا (La)

منطقه	سلول های انتهایی			سلولهای میانی		
/ ساعت	4	16	24	4	16	26
دشت ناز (خردل)	58/3	59/3	58	1/3	2/7	19/3
فاضل آباد	54/3	58/7	57/7	3	10	15/7
دشت ناز	58/7	58	60	1/3	2/3	13
بیکار آیش (خردل)	57/7	66	60	0	5	8/7
کوهی خیل	59/3	60	60	0	2/3	7/3
مازا روستاق	56/3	54	54	0/3	5/7	5/7
خالخیل	40/7	45/7	41/7	0	2/3	5/3
لالا	57	56	57/7	2/3	3/3	5



شکل 3- مقایسه میانگین طول لوله تندش حاصل از هاگ های جنسی ***Leptosphaeria*** پس از 4، 16 و 24ساعت

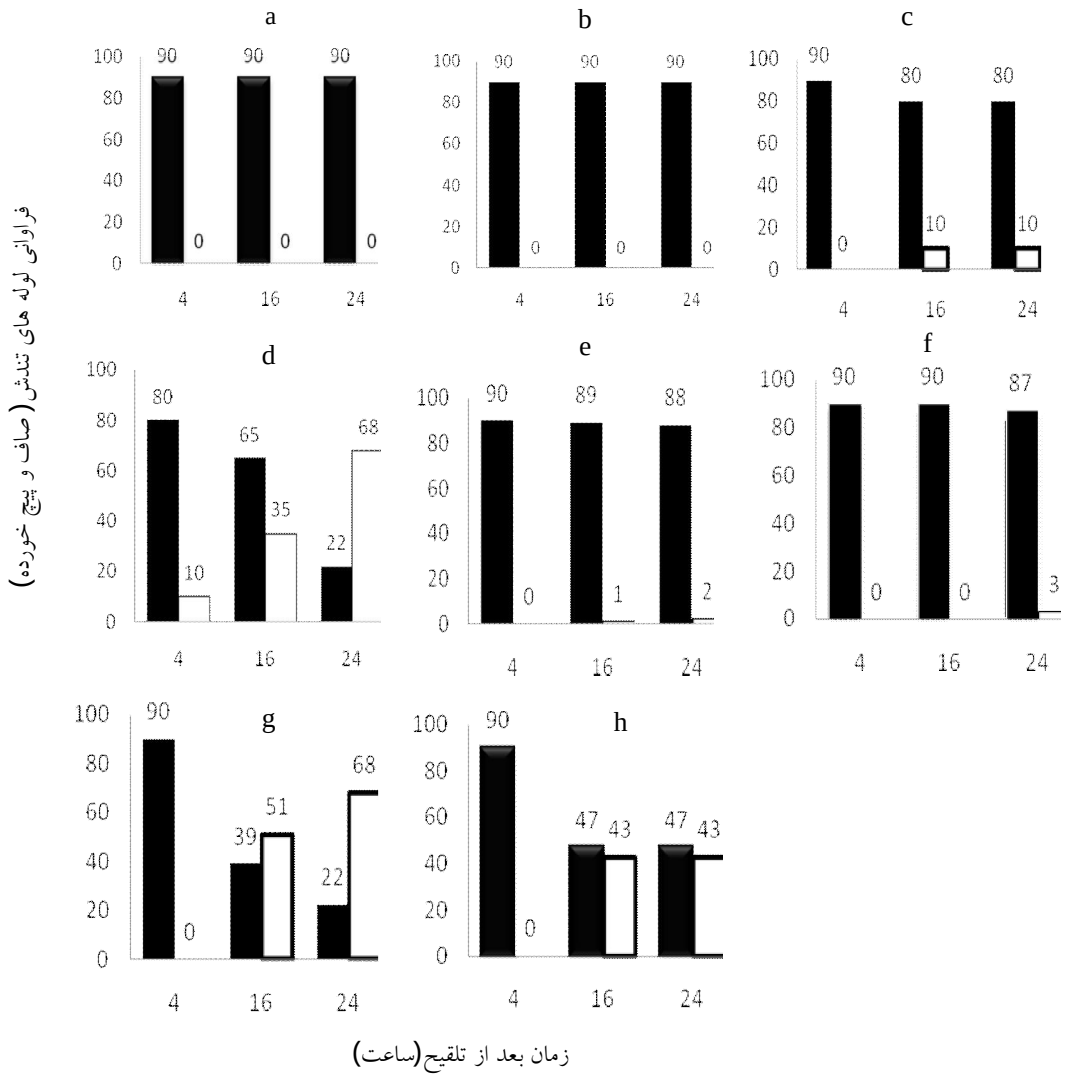


شکل 4- مقایسه طول لوله تندش حاصل از آسکوسپورهای ***L.maculans*** در2 منطقه فاضل آباد(**a**) و دشت ناز نمونه خردل(**b**) 4 ساعت(100×) ، 16 ساعت(100×) و 24 ساعت (40×) پس از تلقیح (اعداد موجود در شکل زمانهای پس از جوانه زنی آسکوسپور را نشان می دهد)

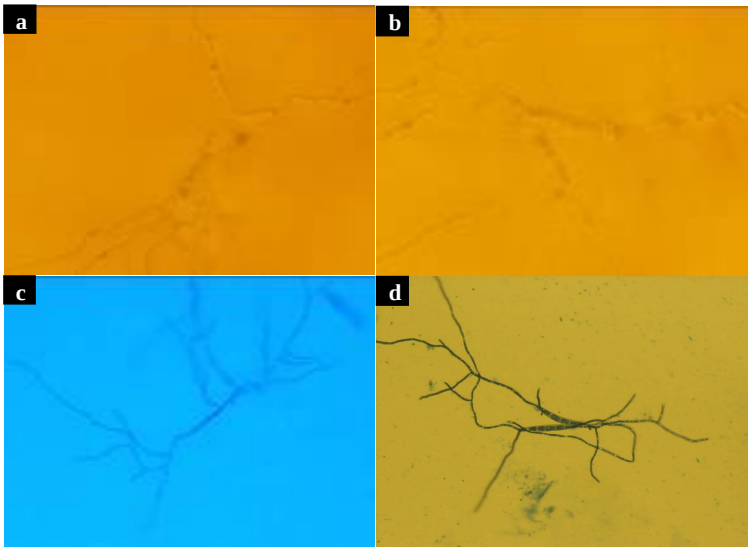
حالتهای مختلف لوله تندش *Leptosphaeria*

تجزیه واریانس مقایسه درصد حضور لوله های تندش بعد از 4، 16 و 24 ساعت از زمان تلقیح در هشت جمعیت نشان داد که اختلاف معنی داری (در سطح 1%) بین تیمارهای آزمایش وجود دارد. همچنین مقایسه میانگین تعداد لوله های تندش پیچ خورده و صاف در هشت جمعیت (شکل 5) نشان داد در جمعیت دشت ناز (نمونه خردل) و لالا هیچ گونه لوله تندش پیچ خورده ای مشاهده نشد. در مناطق مازاروستاق و خالخیل به ترتیب تنها یک و سه مورد لوله تندش پیچ خورده مشاهده گردید.

در تمامی مناطق در چهار ساعت بعد از تلقیح به جز در جمعیت دشت ناز نمونه کلزا (10 عدد) هیچ گونه لوله تندش پیچ خورده ای رویت نگردید (شکل 5). در شکل 6 حالتهای مختلف لوله های تندش پیچ خورده و صاف نشان داده شده است. دو جدایه خردل تفاوت زیادی با یکدیگر از نظر حالت های مختلف لوله تندش داشتند.



شکل5: مقایسه فراوانی حالتهای مختلف شکل لوله تندش صاف (نمودار توپر) و پیچ خورده (نمودار تو خالی) حاصل از آسکوسپورهای قارچ*Leptosphaeria* 8 منطقه در مدت 4، 16 و 24 ساعت بعد از تلقیح در شرایط آزمایشگاهی.**a** (دشت ناز خردل)، **b**(لالا)، **c**(فاضل آباد)، **d**(دشت ناز)، **e**(مازاروستاق)، **f**(خالخیل)، **g**(بیکار آیش خردل) و **h**(کوهی خیل)، **s**(صاف) و **c** (پیچ خورده)



شکل 6: حالت پیچ خورده لوله تندش آسکوسپورهای *Leptosphaeria* در مناطق فاضل آباد (a) و کوهی خیل(b) و حالت صاف آن در مناطق بیکار آیش خردل (C) و لالا (d) (400×)

بحث

بررسی های متعددی در جهان برای تفکیک *L. maculans* و *L. biglobosa* انجام شده است (Koch*et al.*, 1989; Brun *et al.*, 1997; Johnson and Lewis, 1994). از روش‌هایی که می‌توان برای تخمین حضور جمعیت بیماری‌زا و غیر بیماری‌زا در یک منطقه استفاده نمود بررسی خصوصیات مربوط به هاگ‌های جنسی به خصوص لوله تندش می‌باشد و البته تحقیقات زیادی بر روی آن انجام نشده است و آنچنانکه در نتایج این بررسی آمد می‌توان از خصوصیات ظاهری لوله تندش برای شناسایی حضور جمعیت بیماریزا استفاده نمود. اندازه هاگ های جنسی برآورد شده در این مطالعه همانگونه که مشخص شد، نسبت به دیگر ارزیابی ها، دامنه بیشتری را به خود اختصاص داده است. از نظر عرض هاگ‌های جنسی، مقادیر کمتر از این مقدار نیز گزارش شده است ولی برای طول، بیشترین مقدار گزارش شده (در مطالعات بررسی شده در جدول 2) 15 میکرومتر کوچکتر می‌باشد و این در حالی است که جدایه‌های خردل در جمعیت مطالعه شده (بیکار آیش) 2/5 میکرومتر از بیشترین مقدار طول هاگ جنسی نیز بیشتر بوده است. در خصوص جمعیت خردل بررسی شده در منطقه دشت ناز مقدار طول برآورد شده (75) از بیشترین میزان طول جمعیت کلزا (85 میکرومتر) در حدود 10 میکرومتر کوچکتر بود. بیشترین دامنه مقادیر مشاهده شده برای طول و عرض هاگ‌های جنسی در این مطالعه به ترتیب شامل 40 و پنج میکرومتر بود که مجموعه این اطلاعات در واقع بیانگر تنوع اندازه هاگ‌های جنسی در مناطق مختلف و در روی میزبان‌های مختلف است که پیشنهاد می‌شود ارتباط این تنوع در اندازه با شرایط محیطی، میزبان و احتمالا نژاد بیماری‌زا و دامنه بیشتری از مناطق مختلف حضور این قارچ در مناطق دیگر مشخص شود. تفاوت درصد جوانه زنی در ساعت‌های مختلف در این بررسی می‌تواند به سه دلیل باشد. اول اینکه افزایش زمان در خصوص آسکوسپوهای با پتانسیل جوانه زنی از چهار

ساعت به 24 ساعت منجر به افزایش درصد جوانه زنی شده است. دوم، با توجه به اینکه برای بررسی درصد جوانه زنی آسکوسپورها در هر سه بازه زمانی یک جمعیت، 90 آسکوسپور برای هر زمان انتخاب می‌شود (نمونه‌های مورد بررسی در سه زمان یکی نبوده ولی از یک جمعیت انتخاب گردیده است)، لذا مقادیر درصدهای متفاوت مشاهده شده درجمعیت‌های دشت ناز خردل، مازاروستاق و فاضل آباد (24 ساعت بعد از تلقیح) می‌تواند دلیل آن باشد. سوم، با توجه به احتمال حضور تیپ‌های مهاجم و غیر مهاجم در مناطق مختلف و حتی بر روی یک ساقه از بقایای کلزا، مشاهده تفاوت‌ها دربسیاری از خصوصیات از جمله درصد جوانه زنی آسکوسپورها امری بدیهی است. نتایج داده های فوق نشان می‌دهد تفاوت شاخصی از نظر قدرت جوانه زنی بین جمعیت‌های کلزا و خردل وجود ندارد. بر طبق بررسی‌های انجام شده توسط *هوانگ و همکاران* (Huang *et al.*, 2001) بیشترین مقدار جوانه زنی در آسکوسپورهای گروه مهاجم یا A (*Leptosphaeria maculans*) و غیر مهاجم یا B (*Leptosphaeria biglobosa*) در دمای 20 درجه سانتی گراد پس از 24 ساعت (89% برای تیپ مهاجم و 95% برای تیپ غیر مهاجم مشاهده شد و مدت زمان لازم برای 50% جوانه زنی آسکوسپورها برای تیپ غیر مهاجم (3/3 ساعت) کمتر است از تیپ مهاجم (6/8 ساعت) است. قدرت جوانه زنی بیش از 50 درصد (90 درصد) آسکوسپورهای قارچ عامل ساق سیاه کلزا پس از چهار ساعت در این تحقیق حاکی از قدرت بالای جوانه زنی آنها بوده است. با توجه به اینکه درصد جوانه زنی آسکوسپورهای جمعیت‌های مختلف بعد از چهار ساعت از زمان تلقیح بیش از 50 درصد بوده است، احتمال اینکه بیشتر جمعیت ارزیابی شده از آسکوسپورها متعلق به گروه غیرمهاجم (*L.biglobosa*) باشد، منطقی است. در ارتباط با درصد جوانه زنی جمعیت‌های بررسی شده، جمعیت منطقه خالخیل درصد جوانی زنی کمی نسبت به بقیه جمعیت ها داشت. با توجه به اینکه مناطق لالا و مازاروستاق فاصله زیادی از منطقه مذکور نداشته و دارای شرایط آب و هوایی و میزبان (رقم کشت شده مشابه است) یکسان نیز هستند ولی شاهد یک تفاوت آشکار در اختلاف جمعیت هاگ‌های جنسی از نظر جوانه زنی و در نتیجه آن کاهش تعداد لوله تندش و همچنین طول آن حتی بعد از 24 ساعت از زمان تلقیح بودیم. لذا پیشنهاد می‌گردد تنوع ژنتیکی جدایه‌های مناطق اشاره شده مورد بررسی قرار گیرد. در مطالعات اخیری که توسط نویسنده اول این مقاله انجام شده (چاپ نشده است) علی رغم اینکه جمعیت‌های منطقه خالخیل قدرت جوانه زنی پائینی داشته ولی مدت زمان بقاء و آزاد سازی هاگ‌های جنسی در منطقه مذکور نسبت به مناطق اشاره شده بیشتر بوده (بیش از دو سال) که این مسئله خود نیز حائز اهمیت است. همچنین با توجه به اینکه اعداد ثبت شده برای درصد جوانه زنی این مطالعه پس از چهار ساعت، از درصد جوانه زنی هاگ‌های جنسی مطالعات *هوانگ و همکاران* (Huang *et al.*, 2001) که پس از 24 ساعت اندازه گیری شده، بیشتر بود، لذا برای ارزیابی رابطه بین جوانه زنی آنها با تیپ بیماریزا پیشنهاد می‌شود آزمون درصد جوانه زنی کمتر از چهار ساعت برای جمعیت‌های آسکوسپورهای مناطق مورد مطالعه شمال ایران، انجام شود. مطالعات *هوانگ و همکاران* (Huang *et al.*, 2001) نشان داد که هاگ‌های جنسی جدایه‌های بیماری‌زا نسبت به غیر بیماری‌زا، طول لوله تندش کوچکتری دارند. همچنین *پتری و همکاران* (Petrie *et al.*,1988) مشخص نمود که کنیدی‌های تیپ های بیماری‌زا نسبت به تیپ‌های غیر بیماری‌زا *Leptosphaeria* طول لوله تندش کوچکتری دارند. همچنین در دو مطالعه

انجام شده قبلی هیچ نسبتی برای تفاوت طول لوله تندش بیان نشده بود (Petrie et al., 1988؛ Huang et al., 2001). در این بررسی با توجه به عدم قدرت بالای جوانه زنی جمعیت‌های مناطق خالخیل و مازاروستاق مجموع میانگین طول لوله تندش ایجاد شده برای مناطق مذکور بسیار کم ارزیابی گردید. همچنین منبع مطالعاتی برای بررسی جمعیت‌های خردل بدست نیامد که بتوان آن را با جمعیت‌های دیگر مقایسه نمود. در بررسی تفاوت های بین چهار منطقه دیگر (شکل 2) به ترتیب جمعیت‌های لالا، فاضل آباد، کوهی خیل و دشت ناز با مقادیر 295/03، 283/4، 208/08 و 203/76 بیشترین طول لوله تندش را داشته‌اند. طول لوله تندش در دو منطقه کوهی خیل و دشت ناز به طور میانگین 83/29 میکرومتر پائین‌تر از دو منطقه فاضل آباد و لالا بود. بنابراین در این مطالعه بر اساس منابع دیگر بررسی شده می‌توان نتیجه گرفت که احتمال حضور تیپ‌های بیماری‌زا در مناطق کوهی خیل و دشت ناز بیشتر می‌باشد. بررسی‌های *هوانگ و همکاران* (2001) نشان داد که میانگین کل تعداد لوله‌های تندش پس از 24 ساعت از زمان تلقیح برای گروه مهاجم *L. maculans* نسبت به گروه غیر مهاجم *L. biglobosa* بیشتر است. همچنین نتایج *هوانگ و همکاران* (2001)، نشان داد میانگین تعداد لوله تندش در یک دوره تلقیح 24 ساعته در دمای 20 درجه سانتی گراد برای تیپ مهاجم (3/8) بیشتر از تیپ غیر مهاجم (3/2) به نسبت 1/18 بود. بیشترین و کمترین تعداد لوله تندش به ترتیب مربوطه به جمعیت دشت ناز روی خردل (233) و جمعیت خالخیل (139) بود. میانگین تعداد لوله‌های تندش این بررسی بیشترین مقدارش برای جدایه کلزا 2/51 برای منطقه فاضل آباد بوده که به حداقل میانگین تعداد لوله تندش مطالعات *هوانگ و همکاران* (جدایه های اروپایی) نیز نمی‌رسد و بنظر می‌آید پتانسیل تولید جدایه‌های بررسی‌های *هوانگ و همکاران* برای تولید لوله تندش بسیار بیشتر بوده هرچند در نتایج درصد جوانه زنی مقادیر کمتری بیان شده است. در جمعیت های مختلف صرف نظر از دو جدایه خردل، طبق جدول شماره 4، اگر نسبت 1/18 (همان نسبت فرض شده در مطالعات *هوانگ و همکاران*) تعداد لوله تندش تیپ های مهاجم به غیر مهاجم را فرض نماییم احتمال حضور تیپ های بیماری‌زا در جمعیت‌های فاضل آباد، دشت ناز، کوهی خیل بیشتر و به مقدار بسیار کم در مازاروستاق موجود است. جدایه‌های اروپایی نسبت به جدایه‌های مورد بررسی در این مطالعه (جدایه‌های ایرانی) درصد جوانه زنی کمی داشته‌اند ولی تعداد لوله تندش بیشتری تولید نموده که در بحث بیماری‌زایی، پتانسیل احتمال ایجاد بیماری را با تعداد بیشتر لوله تندش قوی‌تر می‌نماید. در جمعیت منطقه خالخیل هاگ‌های جنسی درصد جوانه زنی کمتری داشتند و لذا در جمعیت آن تعداد لوله‌های تندش نیز کمتر مشاهده شد. با توجه به خسارت کم ناشی از تیپ‌های بیماری‌زا در مزارع که یکی از دلایل آن ناشی از حضور کم جمعیت آنها است، پیشنهاد می‌گردد تعداد نمونه برداری‌های بیشتری از مناطق مختلف به خصوص سه منطقه اخیر برای تخمین دقیق‌تر حضور تیپ‌های بیماری‌زا انجام شود. *هوانگ و همکاران* (Huang *et al.*, 2001) نشان دادند که تعداد لوله های تندش میانی با افزایش زمان از دو تا 24 ساعت برای گروه مهاجم *L. maculans* نسبت به گروه غیر مهاجم *L. biglobosa* بیشتر است. همچنین پس از زمان مذکور مجموع کل تعداد لوله‌های تندش در گروه مهاجم نسبت به غیر مهاجم بیشتر می‌باشد. در مطالعات *هوانگ و همکاران* (2001) نسبتی برای تعیین تعداد لوله تندش میانی نسبت به انتهایی برای تخمین تیپ های بیماریزا نسبت به غیر بیماریزا قید نشده است. تعداد لوله تندش میانی

در مناطق مورد مطالعه پس از 24 ساعت علی رغم افزایش (در یک جمعیت با 90 هاگ جنسی) متغیر بود. روند افزایشی و تعداد لوله های تندش در سه منطقه مازاروستاق، خالخیل و لالا شبیه هم بوده و با توجه به نتایج آزمایشات کوتیلدونی، تولید رنگدانه در محیط کشت و علائم مزرعه‌ای و تفاوت نسبت زیاد تعداد لوله‌های تندش انتهایی به میانی به ترتیب 9/4، 7/8 و 11/54 می‌توان نتیجه گرفت که اکثر جمعیت این سه منطقه را تیپ غیر بیماری‌زا تشکیل می‌دهد (Zaman Mirabadi *et al.*, 2010b). تعداد لوله تندش میانی در مناطق دشت ناز و فاضل آباد به ترتیب به مقدار 3/6 و 4/6 نسبت به دیگر مناطق، بیش از دو برابر (نسبت به زمان مشابه) بوده که می‌توان دلیل آن را احتمال حضور تیپ‌های بیماری‌زا با درجات مختلف دانست که نتایج آزمایشات *زمان میرآبادی و همکاران* (Zaman Mirabadi *et al.*, 2010b) نیز این مسئله را تائید کرد. با توجه به اینکه عموماً تیپ‌های بیماری‌زا لوله‌های تندش پیچ خورده تولید می‌نمایند (Huang *et al.*, 2001) لذا به نظر می رسد با توجه به نمونه‌های ارزیابی شده از جمعیت های لالا، خالخیل و مازاروستاق، تیپهای موجود در منطقه از نوع غیر بیماری‌زا باشد. در بقیه جمعیت‌های فاضل آباد، کوهی خیلو دشت ناز نمونه کلزا لوله‌های تندش پیچ خورده پس از 24 ساعت به نسبتی متفاوت از بقیه جمعیت‌های بررسی شده مشاهده شد (شکل 5) که این مسئله می‌تواند بیانگر حضور تیپ‌های بیماری‌زا در مناطق مذکور باشد. در خصوص منشاء لوله تندش، در مجموع با توجه به درصد کم تعداد لوله‌های تندش میانی در مدت زمان 24 ساعت بنظر می‌رسد بررسی تعداد لوله‌های تندش میانی مناطق مختلف در زمان‌های بیشتر از 24 ساعت در تقسیم بندی برای حضور تیپ بیماری‌زا برای جدایه‌های ایرانی نتیجه بهتری داشته باشد. همچنین می‌توان با انجام آزمایشات تکرار دار و مکمل (ریخت شناسی هاگ‌های جنسی از نظر منشاء لوله تندش و آزمون کوتیلدونی) از مناطق مختلف این نسبت تغییر لوله تندش میانی به انتهایی را تخمین و مشخص نمود. در بررسی انجام شده توسط *زمان میرآبادی و همکاران* (2010b) بیماری زایی جدایه های مناطق مختلف از طریق تست کوتیلدونی، و آزمون رنگدانه و خصوصیات رشدی در محیط V8 انجام گردید و مشخص شد جدایه های بررسی شده از مناطق دشت ناز و اطراف آن بیماری زا و جدایه های نزدیکی مناطق تلوکلا که مازاروستاق، لالا و خالخیل را شامل می شود غیر بیماری زا هستند. همچنین در بررسی‌های میدانی انجام شده و مشاهده‌ای علائم زخم ساقه کلزا که منجر به خوابیدگی محصول شده باشد تنها در منطقه دشت ناز و جویبار (نزدیک منطقه کوهی خیل) مشاهده شد (Zaman Mirabadi *et al.*, 2010b). مجموع نتایج حاصل از این تحقیق از نظر تعداد، منشاء، طول و حالت‌های مختلف لوله تندش هاگ‌های جنسی *Leptosphaeria* بیانگر حضور تیپ های بیماری‌زا با جمعیت‌های مختلف *L. maculans* در مناطق دشت ناز، فاضل آباد و کوهی خیل و عدم حضور تیپ های بیماری‌زا *L. biglobosa* در مناطق لالا، خالخیل و مازاروستاق می‌باشد و این نتایج با بررسی های آزمون بیماری زایی جدایه ها از طریق تست کوتیلدونی و تولید رنگدانه مطالعات *زمان میرآبادی و همکاران* (Zaman Mirabadi *etal.*, 2010b) مطابقت دارد. همچنین مشخص شد جدایه‌های کلزا و خردل از منطقه دشت ناز از نظر حالت لوله تندش کاملا با یکدیگر متفاوت هستند بطوریکه جمعیت قارچ مربوط به دشت ناز و میزبان خردل تا 24 ساعت پس از آزمایش هیچ گونه لوله تندش به حالت پیچ خورده نداشت و این در حالی است که جمعیت قارچ از منطقه مذکور بر روی میزبان کلزا 68

لوله تندش پیچ خورده تولید کرده بود. در صورتیکه پیشنهادات این تحقیق ملاک قرار گیرد و رابطه دقیق آن با آزمون های کوتیلدونی و علائم مزرعه ای منطبق گردد می توان با در نظر گرفتن خصوصیات ظاهری هاگ های جنسی *Leptosphaeria* تخمین دقیقی از جمعیت تیپ های بیماری زا یا تغییرات آنها در سال های مختلف به عمل آورد. البته این موضوع را نبایستی فراموش کرد تولید شکل جنسی و هوازاد بودن هاگ‌های جنسی و قدرت انتخاب این قارچ در فشار طبیعی جمعیت می تواند منجر به ایجاد نژادهای بیماری‌زا جدیدتر نماید که این نژادها ممکن است ساختار متمایزی همچنین از نظر ظاهری با شکل‌های قبلی خود داشته باشند لذا ردیابی این تغییرات به صورت سالیانه برای تعیین ارتباط ظاهری و بیماری‌زایی می بایست صورت گیرد.

References

1. Brun H, Levivier S, Eber F, Renard M and Chevre AM. 1997. Electrophoretic analysis of natural populations of *Leptosphaeria maculans* directly from leaf lesions. Plant Pathology 46: 147–154.
2. Fitt BDL, Hu BC, Barbetti MJ and Rimmer SR. 2006. World-breadth importance of phoma stem canker (*Leptosphaeria maculans* and *L.biglobosa)* on oilseed rape *(Brassica napus*). European journal plant pathology 114: 3–15.
3. Huang YJ, Toscano-Underwood C, Fitt BDL, Todd AD, West JS, Koopmann B and Balesdent MH. 2001. Effects of temperature on germination and hyphal growth from ascospores of A-group and B-group *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker of oilseed rape). Annals of Applied Biology 139: 193–207.
4. Jensen LB.1994. First record of ascomata of *Leptosphaeria maculans* on winter-grown oilseed rape in Denmark. Plant Pathology 43 (4): 759–761.
5. Johnson RD and Lewis BG. 1994. Variation in host range, systemic infection and epidemiology of *Leptosphaeria maculans*. Plant Pathology 43(2): 269–277.
6. Koch E, Badawy HMA and Hoppe HH. 1989. Differences between aggressive and non-aggressive single spore lines of *Leptosphaeria maculans* in cultural characteristics and phytotoxin production. Journal of phytopathology 124: 52–62.
7. McGee DC and Petrie GA. 1978.Variability of *Leptosphaeria maculans* in relation to blackleg of oilseed rape. Phytopathology 68: 625–630.
8. Mengistu A, Rimmer SR, Koch E and Williams PH. 1991. Pathogenicity grouping of isolates of *Leptosphaeria maculans* on *brassica napus* cultivars and their disease reaction profiles on rapid-cycling brassicas. Plant disease 75: 1279–1282.
9. Mengistu A, Rimmer RS and Williams PH. 1993. Protocols for in vitro sporulation, ascospore release, sexual mating, and fertility in crosses of *Leptosphaeria maculans*. Plant Disease 77: 538–540.
10. Ndimande B. 1976. Studies on *Phoma lingam* (Tode ex. Fr.j Desm. and the Dry Rot on Oilseed Rape. *Brassica napus* (L.) var. oleifera Metzger [PhD]. [Uppsala]: Agricultural College of Sweden.
11. Petrie GA. 1988. The rapid differentiation of virulent and weakly virulent strains of *Leptosphaeria maculans* (blackleg or stem canker) and related pycnidial fungi *Brassica* seeds and stems. Canadian Journal of Plant Pathology 10: 188–190.
12. Punithalingam E and Holliday P. 1972. *Leptosphaeria maculans*. CMI descriptions of pathogenic Fungi and Bacteria. No. 331.
13. Salisbury PA, Ballinger DJ, Wratten N, Plummer KM and Howlett BJ. 1995. Blackleg disease on oilseed *Brassica* species in Australia: A review. Australian Journal of Experimental Agriculture 35: 665–672.
14. Smith HC and Sutton BC. 1964. *Leptosphaeria maculans* the ascogenous state of *Phoma lingam*. Transactions of the British Mycological Society 47: 159–165.
15. Toscano-Underwood, Westa, CJS, Fitta BDL, Todda AD and edryczka, MJ. 2001. Development of phoma lesions on oilseed rape leaves inoculated with ascospores of A-group or B-group *Leptosphaeria maculans* (stem canker) at different temperatures and wetness durations. Plant Pathology 50: 28–41.
16. West JS, Kharbanda PD, Barbetti MJ and Fitt BDL. 2001. Epidemiology and management of *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) on oilseed rape in Australia, Canada and Europe. Plant Pathology 50: 10–27.

17. Zaman Mirabadi A, Mehdi Alamdarlou R, Esmailifar A and Fathi H. 2010a. Distribution of *Leptosphaeria maculans* in Iran. Paper presented at: 19th Iranian Plant Protection Congress; 31 July – 3 August; Tehran, Iran.
18. Zaman Mirabadi A, Rahnama Kand Esmaailifar A. 2009a. First report of pathogenicity group 2 of *Leptosphaeria maculans* causing blackleg of oilseed rape in Iran. Plant Pathology 58: 1175.
19. Zaman Mirabadi A, Rahnama K, Sadravi M and Mehdi Alamdarlou R. 2009b. First report of *Leptosphaeria maculans* teleomorph on canola stem in the north of Iran. Rostaniha 9(1): 128–130.
20. Zaman Mirabadi A, Rahnama K, Sadravi M and Salati M. 2010b. Identification, distribution, symptomology and population structure of the causal agents of rapeseed blackleg (*Leptosphaeria maculans* and *Leptosphaeria biglobosa*) in Mazandaran and Golestan provinces and determination of three common cultivars susceptibility reaction of rapeseed. Iranian Plant Disease 45(4): 285–267.

Survey of some of ascospore characteristics of rapeseed blackleg disease for differentiating *Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa* in some areas of Mazandaran and Golestan provinces

A. Zaman Mirabadi*[1], K. Rahnema[2], M. Sadravi[3], M. Salati[4]

Abstract

Ascospore dimensions of eight populations of *Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa*, causal agents of rapeseed blackleg disease, isolated from debris of rapeseed (*Brassica napus*) and wild mustard (*Sinapis arvensis*) were evaluated in Mazandaran and Golestan provinces. Results of ANOVA indicated significant differences in the dimensions of ascospores of the different populations. The greatest length and width of sexual spores were 87.5 and 12.5 micrometer, respectively. Variations in the range of Length and width of ascospores in the studied populations was measured, 46.25 and 7.5 micrometer, respectively also these variations were 6.25 and 2.5 micrometers greater than the dimensions of ascospores reported by other studies in the world. The length of sexual spores isolated from stem debris of mustard was much bigger than those of canola. Germination percentage of most studied populations was more than reported in other studies, so likely the most of studied populations of different regions belong to non aggressive group. Sexual spores of aggressive types have greater number of germ tubes, shorter in length, twisted and originate from the middle cells. While in the nonaggressive type the germ tubes grow out of end cells and are not twisted. With regard to morphological characteristics of sexual spore germ tube and also cotyledon test characteristics, field symptoms, pigment production and colony growth rate it was determined that ascospores of the studied populations from Dasht-e-Naz of Sari, Kohikheil and Fazel Abad were of the aggressive type (*L. maculans*) and most of population in Lala, Mazarustaq and Talookola areas belonged to nonaggressive type (*L. biglobosa*). There was no correlation between germ tube characteristics of fungus populations on mustard and their pathogenicity.

Keywords: Rapeseed, Blackleg, *Leptosphaeria maculans* ،*Leptosphaeria biglobosa*, Ascospore.

[1]- Research Instructor, Applied Research Center, Oilseeds Research and Development Company, Sari, Iran.
[2]- Associate Professor, Department of Plant Protection, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Gorgan, Iran.
[3]- Associate Professor, Department of Plant Protection, Yasouj University, Yasouj, Iran.
[4]- Research Assistant Professor, Agricultural and Natural Resources, Research Center of Khorasan Razavi, Mashad, Iran.
*Corresponding author: alizaman2006@gmail.com