

## شناسایی مولکولی و تعیین پاتوتیپ‌های مهاجم جدید بیماری‌زا *Leptosphaeria maculans* عامل شانکر ساقه کلزا در شمال ایران

زهرا وکیلی زارج<sup>۱</sup> - کامران رهنما<sup>۲\*</sup> - سعید نصراله نژاد<sup>۳</sup> - احد یامچی<sup>۴</sup>

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۷/۱۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۰/۲۸

### چکیده

بیماری ساق سیاه کلزا (*Leptosphaeria maculans*) از بیماری‌های مهم اقتصادی در استان‌های شمال ایران می‌باشد. شاخص‌های ریخت‌شناسی و فیزیولوژیکی ۷۲ جدایه جمع آوری شده طی سال ۹۴-۱۳۹۳، به منظور شناسایی عامل بیمارگر پر آزار *L. maculans* در شمال ایران تعیین شده است. جدایه‌ها در اکثر موارد دارای رشد کند همراه با تشکیل پیکنیدیوم در محیط کشت و تولید رنگدانه به رنگ‌های متغیر زرد تا سیاه در محیط کشت مایع در دما ۱۸ درجه سلسیوس در تاریکی بودند. جدایه‌ها در سطح مولکولی نیز به کمک تکثیر با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در ناحیه‌ی فاصله‌ی ترانوسی شده‌ی داخلی ۱، ۲ و ۵/۸ اس آر‌ان‌ای ریبوزومی از ژنوم با جفت آغازگر اختصاصی LmF و LmR شناسایی شدند. تعدادی از جدایه‌ها نیز بر اساس تعیین توالی ناحیه ITS-5/8SrRNA و مقایسه با جدایه‌های موجود در ژن بانک به عنوان *L. maculans* برای اولین بار تایید و ثبت شدند. جدایه‌ها از نظر تیپ بیماری‌زایی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی تیپ بررسی شده و گروه بیماری‌زایی جدایه‌های انتخابی با تلقیح آنها بر روی سه رقم استاندارد مورد بررسی قرار گرفت. چهار گروه بیماری‌زا PG-2، PG-3، PGT، PG- و PG-4 در جدایه‌های مهاجم دیده شده است. بیشتر جدایه‌های مورد بررسی بر روی هر سه رقم افتراقی بیماری‌زا بوده و در گروه PG-4 قرار گرفتند، که برای اولین بار از ایران گزارش می‌شود. نتایج پیشنهاد می‌کند که جدایه (PG-4) *L. maculans* به عنوان گروه پر آزار و با توجه به تغییر گروه بیماری‌زایی PG-2 به PG-3 و PG- و 4 نسبت به سال‌های قبل، تهدید مهمی برای صنعت کشت کلزا در شمال ایران می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آغازگر اختصاصی، ریخت‌شناسی، گروه‌های بیماری‌زایی

### مقدمه

حدود ۲۰ سال نیز در آمریکاست (۷ و ۳۲). در بیشتر مناطق خسارت تا چند میلیون دلار هم گزارش شده است، به طوری که کاهش عملکرد در فرانسه، اپیدمی‌های شدید در سال ۱۹۷۰ در استرالیا و در سال ۱۹۹۳ در انگلستان گزارش شده است و به عنوان مثال خسارت عملکرد در داکوتای شمالی آمریکا تا بالای ۵۰-۴۵ درصد گزارش گردیده است (۵ و ۷). طی بررسی‌ها در ایران در ارتباط با بیماری‌های خسارت‌زا کلزا، بیماری پوسیدگی سفید اسکروتینیایی ساقه و ساق سیاه کلزا از جمله بیماری‌های مخرب در شمال ایران می‌باشد (۲۰، ۲۷). بیماری ساق سیاه کلزا در ایران ابتدا در سال ۲۰۰۷ در استان گلستان (۶) و مازندران (۱) مشاهده شده است. این عامل بیماری با خسارت جدی مزارع کلزا در شمال ایران را روبرو نموده است. اهمیت جهانی شانکر ساقه کلزا در طی ۲۰ سال گذشته رو به افزایش بوده و انتشار گسترده آن توسط بذور، بقایا و پراکنندگی مسافت کوتاه آن توسط هاگ‌های جنسی بنام آسکوسپوره‌های هوازد صورت می‌گیرد (۴ و ۸). عامل بیماری می‌تواند در بذور کلزا به صورت میسلیوم یا پیکنیدیوم یافت شود و علائم اولیه از آلودگی بذور پس از کشت در

کلزا<sup>۵</sup> محصول روغنی بسیار مهم اقتصادی در بیشتر کشورها از جمله کانادا، چین، ایران، آلمان و آمریکا است. ساق سیاه<sup>۶</sup> یا شانکر ساقه (anamorph = *Plenodomus lingam*) (Desm.) Ces. & Not *Leptosphaeria maculans* De Not بیماری بذرزاد و دارای اهمیت جهانی بر روی گیاهان زراعی جنس *Brassica* به خصوص کلزا است، که خسارت‌های جدی در این محصول در بخش‌هایی از اروپا، استرالیا و شمال آمریکا ایجاد کرده است (۲۹ و ۳۰). شیوع آن در استرالیا مربوط به ۸۵ سال، در اروپا ۶۵ سال، ۲۵ سال در کانادا و در

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانشجوی سابق دکتری بیماری شناسی گیاهی، و دانشیاران گروه گیاه پزشکی، دانشکده تولید گیاهی و دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

\* - نویسنده مسئول: (Email: Kamranrahnama1995@gmail.com)

۴- استادیار بخش اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشکده تولید گیاهی و دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

DOI: 10.22067/jpp.v0i0.58948

5- *Brassica napus* L. var *oleifera*, rapeseed, Colza

6- Blackleg

مقاومت یا حساسیت واکنش مشخص شده است (۱۳ و ۱۷). گوناگونی جدایه‌های *L. maculans* به عنوان گروه‌های بیماری‌زایی بر روی سه رقم استاندارد و افتراقی وستار، کویتا و گلاسیر<sup>۷</sup> *B. napus* مورد بررسی قرار گرفته است و گروه *L. maculans* A در تشخیص گروه بیماری‌زایی در چهار گروه PG-2, PG-3, PG-4, PGT گرفته‌اند (۱۸ و ۲۳) و جدایه‌های متعلق به گروه بیماری‌زایی PG-1 (گروه B) به عنوان گونه مستقل *Leptosphaeria biglobosa* (گروه B) معرفی شده است (۲۴). وجود این دو گونه با خصوصیات ریخت‌شناسی، رشد ریشه و تولید رنگدانه در محیط کشت، تعیین بیماری‌زایی و تفکیک پاتوتیپ‌ها (۱۴، ۱۵ و ۳۱) و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز<sup>۸</sup> بررسی شده است (۱۷ و ۳۲). گوناگونی جمعیت *Leptosphaeria* در شدت اپیدمی و پراکنش دو گونه در بخش‌های گوناگون دنیا متفاوت می‌باشد، برای مثال در چین تنها *L. biglobosa* یافت شده است و مطالعه بررسی پراکنش این دو گونه در اروپا نشان داده که گونه پرآزار *L. maculans* گسترش یافته و بتدریج جایگزین گونه کم آزار گردیده است (۴، ۷، ۳۱ و ۳۲). در استرالیا نیز قارچ *L. maculans* حایز اهمیت می‌باشد و گونه کم آزار به ندرت یافت می‌شود و در اروپا و شمال آمریکا هر دو گونه وجود داشته و به طور مشابه به شرایط اکولوژیکی و کشاورزی سازگار می‌شوند (۲۶ و ۳۲). ویلیامز و فیت (۳۱) گزارش کرده‌اند که از نظر بیماری‌زایی این دو گونه متفاوت بوده و گونه *L. maculans* به عنوان عامل ساق سیاه کلزا معرفی شده و بیشتر خسارت محصول از این گونه است و به علت بیماری‌زایی متنوع و تغییر جمعیت در دوره کوتاهی از زمان، این گونه به عنوان بیمارگر الگو برای مطالعه ارتباط ژنتیکی میزبان بیمارگر مطرح می‌باشد (۵). اپیدمی جمعیت *Leptosphaeria* و شدت بیماری در بین فصل‌های رشد، ارقام، عملیات کشاورزی مانند نوع رقم، قارچکش و شرایط محیطی (بخصوص دما و میزان بارندگی) گوناگون است (۲۶ و ۳۲). ارقام با مقاومت سطح متوسط تا بالا به عنوان روش اصلی در مدیریت بیماری بوده که در استرالیا، اروپا، و کانادا استفاده شده است و در نتیجه تغییر در جمعیت‌های *L. maculans* باعث شکست مقاومت گیاه در اروپا و استرالیا ایجاد شده است. برای مثال رقم Q2 به عنوان رقم مقاوم به PG-2 که در غرب کانادا کشت شده است به شدت بر اثر تغییر جمعیت آلوده شده و در نتیجه این شکست مقاومت که تحت اثر تغییر جمعیت بیمارگر در غرب کانادا، شمال داکوتا و آمریکا اتفاق افتاده وضعیت کشت کلزا تحت تاثیر قرار گرفته است (۳).

در این مطالعه به منظور بررسی از وضعیت دقیق مزارع آلوده ابتدا نمونه‌های جمع آوری شده از اندام‌های گیاهی کلزای آلوده (برگ،

مزرعه روی برگ‌های اولیه<sup>۱</sup> به صورت زخم‌هایی با تعداد زیاد پیکنیدیوم دیده شده است. قارچ توانایی رشد و آلودگی ساقه‌چه، برگ‌های اولیه و ساقه به صورت بیوتروف از زخم‌های برگ‌های حامل زخم اولیه و برگ همراه با پیکنیدیوم‌های سیاه رنگ را دارد (۹ و ۳۲). این قارچ توانایی بقا به دو شکل پیکنیدیوم و پسودوتسیم در بقایای آلوده را داشته است، هاگ‌های تولید شده در پیکنیدیوم با ضربات قطرات باران در فواصل کوتاهی از اطراف خود قابل انتقال هستند. از سوی دیگر آسکوسپورها به طور فعال از دهانه محفظه سلولی خارج و توسط باد پخش شده و در نتیجه خسارت اولیه و اصلی از آسکوسپورهاست (۱۶ و ۲۶).

اگر چه به طور عمومی بیماری توسط گونه *L. maculans* ایجاد می‌شود ولی بررسی‌ها نشان می‌دهد که بیماری، مربوط به دو گونه نزدیک به هم می‌باشند. قارچ عامل بیماری ساق سیاه توسط ترکیبی از دو گونه *L. maculans*، *L. biglobosa* ایجاد می‌شود که این دو تیپ بر اساس خصوصیات مولکولی، بیوشیمیایی، ریخت‌شناسی، سرعت رشد پرگنه و تولید رنگدانه در محیط کشت، علایم برگ، ساقه و آزمون برگ‌های اولیه روی ارقام افتراقی قابل تفکیک می‌شوند (۷ و ۲۹). جدایه‌های بیماری‌زا *L. maculans* دارای رشد کندتری نسبت به جدایه‌های غیر بیماری‌زا *L. biglobosa* داشته و در محیط کشت رنگدانه تولید نمی‌کنند و *L. maculans* در مقایسه با گونه دیگر پر آزارتر، با گسترش وسیع‌تر و اغلب در ارتباط با خسارت شانکر شدید پایه ساقه می‌باشد. در حالی که گروه کم آزار اغلب در ارتباط با زخم قسمت‌های بالاتر ساقه و به مغز ساقه آسیب می‌رساند (۱۱). به‌طور مداوم گوناگونی جمعیت *Leptosphaeria* از نواحی جغرافیایی مختلف بررسی شده و دو تیپ مشخص ژنتیکی در آنها وجود داشته و به عنوان دو گروه بیماری‌زا و غیر بیماری‌زا<sup>۲</sup>، بدون توکسین و با توکسین<sup>۳</sup>، بیماری‌زایی بالا و بیماری‌زایی ضعیف<sup>۴</sup>، گروه A و B، مهاجم و غیر مهاجم<sup>۵</sup> معرفی شده است (۱۱، ۱۵، ۲۸ و ۳۱). در بین روش‌های ریخت‌شناسی، فیزیولوژی، بیوشیمیایی، ژنتیک و مارکرهای مولکولی برای تفکیک این دو گروه، اختلاف در بیماری‌زایی بیشتر استفاده شده‌اند و جمعیت بیمارگر در گروه‌های بیماری‌زایی<sup>۶</sup> مشخص می‌شوند (۳، ۱۳، ۱۴، ۱۸ و ۲۳).

آزمون‌های بیماری‌زایی بر اساس واکنش فنوتیپ در تعیین گروه‌های بیماری‌زایی روی تعداد محدودی از ارقام افتراقی مفید است و گوناگونی در بیماری‌زایی جدایه‌ها بر روی ارقام افتراقی در تشخیص

- 1- Cotyledon
- 2- Virulent and avirulent
- 3- Tox0, Tox+
- 4- HV, WV
- 5- Aggressive, non aggressive
- 6- Pathogenicity groups=PGS

7- Westar, Quinta, Glacier

8- Polymerase Chain Reaction

شدند و در دمای  $3 \pm 18^\circ\text{C}$  در تاریکی قرار گرفتند. بعد از حدود ۱۰-۸ روز میسلیموم های رشد کرده اطراف برگ و ساقه آلوده به محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار منتقل و در دما  $2 \pm 20^\circ\text{C}$  قرار گرفتند تا مورد بررسی قرار گیرند (۲۵ و ۳۲).

#### جداسازی قارچ از بقایای کلزا: از قطعات گیاهی ضد عفونی

شده مورد بررسی که علاوه بر پیکنیدیوم دارای آسکوکارپ نیز بودند به منظور تهیه تک اسپور استفاده شد. به منظور تحریک آسکوکارپ جهت آزادسازی اسپور آنها را به مدت یک دقیقه در آب مقطر استریل قرار داده و بعد در تماس با وازلین زیر درپوش پلیت دارای محیط کشت آب آگار انتقال یافت. سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای  $20^\circ\text{C}$  نگهداری شد و پس از این مدت حدود ۲ میلی لیتر آب مقطر استریل به محیط کشت اضافه نموده و با سوزن استریل به آزادسازی اسپورها کمک نموده و سپس در زیر میکروسکوپ اقدام به تهیه تک اسپور نمودیم. تک اسپور به محیط کشت PDA منتقل شده و پس از ۱۰ روز نگهداری در دمای  $20^\circ\text{C}$ ، برای ارزیابی ریخت شناسی، مولکولی و بیماری زایی استفاده شدند (۱۶).

#### مشخصات ریخت شناسی: قطعات کوچکی به قطر پنج میلی

متر از جدایه های قارچ به محیط کشت PDA حاوی کلرامفنیکل منتقل شدند و پس از نگهداری در دمای  $20^\circ\text{C}$  مدت ۷ روز از نظر میزان رشد مورد بررسی و پس از حدود سه هفته از نظر نحوه رشد، تولید پیکنیدیوم و رنگدانه در آنها ارزیابی شدند. میانگین رشد میسلیمی جدایه ها از طریق آزمون LSD و با استفاده از نرم افزارهای Exel 2007 و R (R 3.3.3) مقایسه شدند (۲).

#### بررسی تشکیل رنگدانه: علاوه بر بررسی های ریخت شناسی در

محیط کشت جامد جهت آزمون تولید رنگدانه و به دنبال آن تشکیل پیکنیدیوم به منظور استفاده از آن جهت آزمون بیماری زایی از محیط کشت مایع سیب زمینی دکستروز<sup>۴</sup> استفاده شده است. قرص های ۶ میلی متری از جدایه های مختلف قارچ *L. maculans* به ارلن های ۱۰۰ میلی لیتری حاوی محیط کشت مایع منتقل و در شرایط تاریکی در دما  $18^\circ\text{C}$  به مدت سه هفته بر روی شیکر نگهداری شدند. تشکیل رنگدانه آنها مطابق روش وویگت و همکاران (۲۸) از ۱ تا ۶ درجه بندی شدند. به طوری که گروه یک نشان دهنده عدم تشکیل رنگدانه، گروه دوم تشکیل رنگدانه کم زرد-خاکستری، گروه سوم و چهارم تشکیل رنگدانه بین زرد نارنجی و قهوه ای، گروه پنج و شش مربوط به جدایه های با تشکیل رنگدانه زیاد بین قهوه ای تا سیاه بودند.

#### استخراج DNA: یک قطعه به قطر دو میلی متری از حاشیه

پرگنه های پنج روزه هر جدایه روی محیط سیب زمینی دکستروز آگار به ارلن های حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط مایع سیب زمینی دکستروز منتقل شد. ارلن ها در دما  $18^\circ\text{C}$  به مدت ۷۲ ساعت روی شیکر قرار

ساقه و بقایا) از شمال ایران در طی سال زراعی ۹۳-۱۳۹۲ از نظر ریخت شناسی و فیزیولوژی بررسی شدند. به منظور بررسی و شناسایی وجود مرحله جنسی نیز از بقایای مزارع مختلف استان گلستان نمونه برداری شدند. از آنجایی که از نظر ژنتیکی تعیین گونه همه جدایه ها در گذشته تاکنون در کشور از طریق توالی نوکلئوتیدی و مولکولی انجام نشده بود ضرورت دارد با استفاده از آغازگرها تعیین تیپ بیماری زایی و گونه آنها مشخص گردد. با توجه به اهمیت آزمون بیماری زایی برای ارزیابی گوناگونی جدایه ها در جمعیت *L. maculans* تعیین گروه های بیماری زایی جدایه های انتخابی انجام و با بررسی های سال ۲۰۰۷ و ۲۰۰۹ که در رابطه با گروه های بیماری - زایی غالب در آن سال ها می باشد مورد مقایسه قرار گرفت، تا تفاوت گروه بیماری زایی در گذشته و حال مشخص گردد (۶ و ۱۹). با توجه به شناسایی جمعیت بیمارگر و ساختار جمعیت از لحاظ استراتژی مدیریت موثر بیماری در مزرعه و چه بسا به علت تاثیر شرایط آب و هوایی بر توسعه بیماری در مورد بیمارگر ساق سیاه کلزا این بررسی ضروری است.

## مواد و روش ها

### نمونه برداری جدایه های قارچ: نمونه برداری از مزارع مختلف

استان گلستان و نیز از مزارع شرق مازندران در طی سال ۹۳-۱۳۹۲ انجام گردید. نمونه برداری ها از مراحل مختلف رشد گیاه از مرحله برگ های اولیه تا مرحله رزت و در یک نوبت دیگر از مرحله ساقه دهی و مرحله آخر بعد از برداشت محصول از بقایا انجام شد. به منظور بررسی فرم جنسی از بقایای محصول سال قبل مزارع مختلف که به عنوان منبع اصلی آلودگی اولیه بیماری در محصول سال جدید می باشد، نیز نمونه برداری انجام شد. نمونه ها به منظور جلوگیری از فساد آنها به خصوص در مرحله برگی بلافاصله به آزمایشگاه دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل و مورد جداسازی روی محیط کشت غذایی قرار گرفتند.

### جداسازی از برگ و ساقه: ابتدا نمونه های آلوده با آب شیر

شستشو داده شده و بخش های آلوده از برگ ها و ساقه های دارای علائم (لکه های خاکستری یا زرد قهوه ایی و اغلب حاوی پیکنیدیوم) جدا شدند. ضد عفونی با هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به مدت دو دقیقه برای برگ های دارای علائم و با هیپو کلریت سدیم ۱۰ درصد به مدت سه تا پنج دقیقه برای ساقه ها انجام شده و پس از شستشو سه بار با آب مقطر استریل در محیط کشت ۱/۴ سیب زمینی دکستروز آگار<sup>۱</sup> و محیط کشت آب آگار<sup>۲</sup> دارای کلرامفنیکل<sup>۳</sup> ۰.۳٪ کشت داده

1- Quarter Potato dextrose agar (QPDA)

2- Distilled Water agar (DWA)

3- Chloramphenicol

4- Potato Dextrose Broth (PDB)

گردید: واسرشت سازی اولیه در دما °C ۹۴ به مدت ۲ دقیقه و به دنبال آن ۳۰ سیکل شامل: واسرشت سازی در دما °C ۹۴ به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای °C ۵۵ جهت آغازگر گروه A و °C ۶۰ جهت آغازگر گروه B به مدت دو دقیقه، بسط رشته در دما °C ۷۲ به مدت سه دقیقه و در نهایت بسط پایانی رشته در دما °C ۷۲ به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. الکتروفورز بر روی ژل آغاز ۲ درصد و شرایط ذکر شده در موارد قبل به مدت یک ساعت انجام گردید (۱۵).

**آزمون بیماری‌زایی:** گروه بیماری‌زایی جدایه‌های انتخابی به روش آزمون کوتیلدونی بر روی سه رقم افتراقی به نام‌های رقم وستار (رقم بهاره) و ارقام کوینتا و گلاسیر (ارقام پاییزه) که از مرکز بین المللی تحقیقات بذور اصلاح شده اروپا در آلمان تهیه شدند، انجام شد. مایه تلقیح جهت آزمون بیماری‌زایی به روش کن و فرناندو (۳) تهیه شده و یا در روش دیگر از پیکنیدیوم‌های حاصل از محیط کشت مایع ساکاروز کازین<sup>۴</sup> (۱۲) و یا محیط مایع PDB استفاده شده است. غلظت اسپور ( $2 \times 10^7$ ) با لام هموسیتومتر برای هر جدایه تعیین و در صورت نیاز رقیق می‌شود (۱۶). پس از تهیه مایه تلقیح زخم سطحی با سوزن استریل بر روی برگ‌های اولیه ۲۰ روزه ایجاد و در حدود ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون با غلظت مورد نظر در محل زخم تلقیح می‌شود. بعد از ۲۴ ساعت نگهداری گیاهان در شرایط محیطی، گلدان‌ها به اتاقک رشد در یک دوره تناوبی ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای °C  $22 \pm 2$  و رطوبت ۸۰ درصد منتقل می‌شوند. ۱۲ روز بعد از مایه‌زنی، گیاهان از نظر حضور لکه‌های نکروزه یا هاله کلروتیک و تشکیل پیکنیدیوم مطابق روش کن و فرناندو (۳) از ۰ تا ۹ درجه بندی شده و گروه بیماری‌زایی آنها مشخص می‌شوند.

## نتایج و بحث

**مشخصات جدایه‌های *L. maculans*:** در حدود ۹۰ جدایه از بخش‌های گوناگون گیاهان آلوده (ساقه، برگ و بقایا) در طی نمونه برداری جمع آوری شد که شاخص‌های ریخت‌شناسی و مولکولی تقریباً ۷۲ جدایه در جدول ۲ آمده است. نتایج حاصل از تجزیه واریانس متوسط رشد میسلیمی جدایه‌ها بعد از گذشت ۷ روز در دما °C ۲۰ بیانگر اختلاف معنی‌دار با سطح احتمال ۱ درصد در جدایه‌های مورد آزمایش بوده است (جدول ۳). همچنین مقایسه میانگین‌ها نشان داد که جدایه Esf1 (۱/۲۶) دارای کمترین رشد میسلیمی پس از ۷ روز و جدایه‌های 1، 2، 3، 4، 5، 6، 7، 8، 9، 10، 11، 12، 13، 14، 15، 16، 17، 18، 19، 20، 21، 22، 23، 24، 25، 26، 27، 28، 29، 30، 31، 32، 33، 34، 35، 36، 37، 38، 39، 40، 41، 42، 43، 44، 45، 46، 47، 48، 49، 50، 51، 52، 53، 54، 55، 56، 57، 58، 59، 60، 61، 62، 63، 64، 65، 66، 67، 68، 69، 70، 71، 72، 73، 74، 75، 76، 77، 78، 79، 80، 81، 82، 83، 84، 85، 86، 87، 88، 89، 90، 91، 92، 93، 94، 95، 96، 97، 98، 99، 100، 101، 102، 103، 104، 105، 106، 107، 108، 109، 110، 111، 112، 113، 114، 115، 116، 117، 118، 119، 120، 121، 122، 123، 124، 125، 126، 127، 128، 129، 130، 131، 132، 133، 134، 135، 136، 137، 138، 139، 140، 141، 142، 143، 144، 145، 146، 147، 148، 149، 150، 151، 152، 153، 154، 155، 156، 157، 158، 159، 160، 161، 162، 163، 164، 165، 166، 167، 168، 169، 170، 171، 172، 173، 174، 175، 176، 177، 178، 179، 180، 181، 182، 183، 184، 185، 186، 187، 188، 189، 190، 191، 192، 193، 194، 195، 196، 197، 198، 199، 200، 201، 202، 203، 204، 205، 206، 207، 208، 209، 210، 211، 212، 213، 214، 215، 216، 217، 218، 219، 220، 221، 222، 223، 224، 225، 226، 227، 228، 229، 230، 231، 232، 233، 234، 235، 236، 237، 238، 239، 240، 241، 242، 243، 244، 245، 246، 247، 248، 249، 250، 251، 252، 253، 254، 255، 256، 257، 258، 259، 260، 261، 262، 263، 264، 265، 266، 267، 268، 269، 270، 271، 272، 273، 274، 275، 276، 277، 278، 279، 280، 281، 282، 283، 284، 285، 286، 287، 288، 289، 290، 291، 292، 293، 294، 295، 296، 297، 298، 299، 300، 301، 302، 303، 304، 305، 306، 307، 308، 309، 310، 311، 312، 313، 314، 315، 316، 317، 318، 319، 320، 321، 322، 323، 324، 325، 326، 327، 328، 329، 330، 331، 332، 333، 334، 335، 336، 337، 338، 339، 340، 341، 342، 343، 344، 345، 346، 347، 348، 349، 350، 351، 352، 353، 354، 355، 356، 357، 358، 359، 360، 361، 362، 363، 364، 365، 366، 367، 368، 369، 370، 371، 372، 373، 374، 375، 376، 377، 378، 379، 380، 381، 382، 383، 384، 385، 386، 387، 388، 389، 390، 391، 392، 393، 394، 395، 396، 397، 398، 399، 400، 401، 402، 403، 404، 405، 406، 407، 408، 409، 410، 411، 412، 413، 414، 415، 416، 417، 418، 419، 420، 421، 422، 423، 424، 425، 426، 427، 428، 429، 430، 431، 432، 433، 434، 435، 436، 437، 438، 439، 440، 441، 442، 443، 444، 445، 446، 447، 448، 449، 450، 451، 452، 453، 454، 455، 456، 457، 458، 459، 460، 461، 462، 463، 464، 465، 466، 467، 468، 469، 470، 471، 472، 473، 474، 475، 476، 477، 478، 479، 480، 481، 482، 483، 484، 485، 486، 487، 488، 489، 490، 491، 492، 493، 494، 495، 496، 497، 498، 499، 500، 501، 502، 503، 504، 505، 506، 507، 508، 509، 510، 511، 512، 513، 514، 515، 516، 517، 518، 519، 520، 521، 522، 523، 524، 525، 526، 527، 528، 529، 530، 531، 532، 533، 534، 535، 536، 537، 538، 539، 540، 541، 542، 543، 544، 545، 546، 547، 548، 549، 550، 551، 552، 553، 554، 555، 556، 557، 558، 559، 560، 561، 562، 563، 564، 565، 566، 567، 568، 569، 570، 571، 572، 573، 574، 575، 576، 577، 578، 579، 580، 581، 582، 583، 584، 585، 586، 587، 588، 589، 590، 591، 592، 593، 594، 595، 596، 597، 598، 599، 600، 601، 602، 603، 604، 605، 606، 607، 608، 609، 610، 611، 612، 613، 614، 615، 616، 617، 618، 619، 620، 621، 622، 623، 624، 625، 626، 627، 628، 629، 630، 631، 632، 633، 634، 635، 636، 637، 638، 639، 640، 641، 642، 643، 644، 645، 646، 647، 648، 649، 650، 651، 652، 653، 654، 655، 656، 657، 658، 659، 660، 661، 662، 663، 664، 665، 666، 667، 668، 669، 670، 671، 672، 673، 674، 675، 676، 677، 678، 679، 680، 681، 682، 683، 684، 685، 686، 687، 688، 689، 690، 691، 692، 693، 694، 695، 696، 697، 698، 699، 700، 701، 702، 703، 704، 705، 706، 707، 708، 709، 710، 711، 712، 713، 714، 715، 716، 717، 718، 719، 720، 721، 722، 723، 724، 725، 726، 727، 728، 729، 730، 731، 732، 733، 734، 735، 736، 737، 738، 739، 740، 741، 742، 743، 744، 745، 746، 747، 748، 749، 750، 751، 752، 753، 754، 755، 756، 757، 758، 759، 760، 761، 762، 763، 764، 765، 766، 767، 768، 769، 770، 771، 772، 773، 774، 775، 776، 777، 778، 779، 780، 781، 782، 783، 784، 785، 786، 787، 788، 789، 790، 791، 792، 793، 794، 795، 796، 797، 798، 799، 800، 801، 802، 803، 804، 805، 806، 807، 808، 809، 810، 811، 812، 813، 814، 815، 816، 817، 818، 819، 820، 821، 822، 823، 824، 825، 826، 827، 828، 829، 830، 831، 832، 833، 834، 835، 836، 837، 838، 839، 840، 841، 842، 843، 844، 845، 846، 847، 848، 849، 850، 851، 852، 853، 854، 855، 856، 857، 858، 859، 860، 861، 862، 863، 864، 865، 866، 867، 868، 869، 870، 871، 872، 873، 874، 875، 876، 877، 878، 879، 880، 881، 882، 883، 884، 885، 886، 887، 888، 889، 890، 891، 892، 893، 894، 895، 896، 897، 898، 899، 900، 901، 902، 903، 904، 905، 906، 907، 908، 909، 910، 911، 912، 913، 914، 915، 916، 917، 918، 919، 920، 921، 922، 923، 924، 925، 926، 927، 928، 929، 930، 931، 932، 933، 934، 935، 936، 937، 938، 939، 940، 941، 942، 943، 944، 945، 946، 947، 948، 949، 950، 951، 952، 953، 954، 955، 956، 957، 958، 959، 960، 961، 962، 963، 964، 965، 966، 967، 968، 969، 970، 971، 972، 973، 974، 975، 976، 977، 978، 979، 980، 981، 982، 983، 984، 985، 986، 987، 988، 989، 990، 991، 992، 993، 994، 995، 996، 997، 998، 999، 1000، 1001، 1002، 1003، 1004، 1005، 1006، 1007، 1008، 1009، 1010، 1011، 1012، 1013، 1014، 1015، 1016، 1017، 1018، 1019، 1020، 1021، 1022، 1023، 1024، 1025، 1026، 1027، 1028، 1029، 1030، 1031، 1032، 1033، 1034، 1035، 1036، 1037، 1038، 1039، 1040، 1041، 1042، 1043، 1044، 1045، 1046، 1047، 1048، 1049، 1050، 1051، 1052، 1053، 1054، 1055، 1056، 1057، 1058، 1059، 1060، 1061، 1062، 1063، 1064، 1065، 1066، 1067، 1068، 1069، 1070، 1071، 1072، 1073، 1074، 1075، 1076، 1077، 1078، 1079، 1080، 1081، 1082، 1083، 1084، 1085، 1086، 1087، 1088، 1089، 1090، 1091، 1092، 1093، 1094، 1095، 1096، 1097، 1098، 1099، 1100، 1101، 1102، 1103، 1104، 1105، 1106، 1107، 1108، 1109، 1110، 1111، 1112، 1113، 1114، 1115، 1116، 1117، 1118، 1119، 1120، 1121، 1122، 1123، 1124، 1125، 1126، 1127، 1128، 1129، 1130، 1131، 1132، 1133، 1134، 1135، 1136، 1137، 1138، 1139، 1140، 1141، 1142، 1143، 1144، 1145، 1146، 1147، 1148، 1149، 1150، 1151، 1152، 1153، 1154، 1155، 1156، 1157، 1158، 1159، 1160، 1161، 1162، 1163، 1164، 1165، 1166، 1167، 1168، 1169، 1170، 1171، 1172، 1173، 1174، 1175، 1176، 1177، 1178، 1179، 1180، 1181، 1182، 1183، 1184، 1185، 1186، 1187، 1188، 1189، 1190، 1191، 1192، 1193، 1194، 1195، 1196، 1197، 1198، 1199، 1200، 1201، 1202، 1203، 1204، 1205، 1206، 1207، 1208، 1209، 1210، 1211، 1212، 1213، 1214، 1215، 1216، 1217، 1218، 1219، 1220، 1221، 1222، 1223، 1224، 1225، 1226، 1227، 1228، 1229، 1230، 1231، 1232، 1233، 1234، 1235، 1236، 1237، 1238، 1239، 1240، 1241، 1242، 1243، 1244، 1245، 1246، 1247، 1248، 1249، 1250، 1251، 1252، 1253، 1254، 1255، 1256، 1257، 1258، 1259، 1260، 1261، 1262، 1263، 1264، 1265، 1266، 1267، 1268، 1269، 1270، 1271، 1272، 1273، 1274، 1275، 1276، 1277، 1278، 1279، 1280، 1281، 1282، 1283، 1284، 1285، 1286، 1287، 1288، 1289، 1290، 1291، 1292، 1293، 1294، 1295، 1296، 1297، 1298، 1299، 1300، 1301، 1302، 1303، 1304، 1305، 1306، 1307، 1308، 1309، 1310، 1311، 1312، 1313، 1314، 1315، 1316، 1317، 1318، 1319، 1320، 1321، 1322، 1323، 1324، 1325، 1326، 1327، 1328، 1329، 1330، 1331، 1332، 1333، 1334، 1335، 1336، 1337، 1338، 1339، 1340، 1341، 1342، 1343، 1344، 1345، 1346، 1347، 1348، 1349، 1350، 1351، 1352، 1353، 1354، 1355، 1356، 1357، 1358، 1359، 1360، 1361، 1362، 1363، 1364، 1365، 1366، 1367، 1368، 1369، 1370، 1371، 1372، 1373، 1374، 1375، 1376، 1377، 1378، 1379، 1380، 1381، 1382، 1383، 1384، 1385، 1386، 1387، 1388، 1389، 1390، 1391، 1392، 1393، 1394، 1395، 1396، 1397، 1398، 1399، 1400، 1401، 1402، 1403، 1404، 1405، 1406، 1407، 1408، 1409، 1410، 1411، 1412، 1413، 1414، 1415، 1416، 1417، 1418، 1419، 1420، 1421، 1422، 1423، 1424، 1425، 1426، 1427، 1428، 1429، 1430، 1431، 1432، 1433، 1434، 1435، 1436، 1437، 1438، 1439، 1440، 1441، 1442، 1443، 1444، 1445، 1446، 1447، 1448، 1449، 1450، 1451، 1452، 1453، 1454، 1455، 1456، 1457، 1458، 1459، 1460، 1461، 1462، 1463، 1464، 1465، 1466، 1467، 1468، 1469، 1470، 1471، 1472، 1473، 1474، 1475، 1476، 1477، 1478، 1479، 1480، 1481، 1482، 1483، 1484، 1485، 1486، 1487، 1488، 1489، 1490، 1491، 1492، 1493، 1494، 1495، 1496، 1497، 1498، 1499، 1500، 1501، 1502، 1503، 1504، 1505، 1506، 1507، 1508، 1509، 1510، 1511، 1512، 1513، 1514، 1515، 1516، 1517، 1518، 1519، 1520، 1521، 1522، 1523، 1524، 1525، 1526، 1527، 1528، 1529، 1530، 1531، 1532، 1533، 1534، 1535، 1536، 1537، 1538، 1539، 1540، 1541، 1542، 1543، 1544، 1545، 1546، 1547، 1548، 1549، 1550، 1551، 1552، 1553، 1554، 1555، 1556، 1557، 1558، 1559، 1560، 1561، 1562، 1563، 1564، 1565، 1566، 1567، 1568، 1569، 1570، 1571، 1572، 1573، 1574، 1575، 1576، 1577، 1578، 1579، 1580، 1581، 1582، 1583، 1584، 1585، 1586، 1587، 1588، 1589، 1590، 1591، 1592، 1593، 1594، 1595، 1596، 1597، 1598، 1599، 1600، 1601، 1602، 1603، 1604، 1605، 1606، 1607، 1608، 1609، 1610، 1611، 1612، 1613، 1614، 1615، 1616، 1617، 1618، 1619، 1620، 1621، 1622، 1623، 1624، 1625، 1626، 1627، 1628، 1629، 1630، 1631، 1632، 1633، 1634، 1635، 1636، 1637، 1638، 1639، 1640، 1641، 1642، 1643، 1644، 1645، 1646، 1647، 1648، 1649، 1650، 1651، 1652، 1653، 1654، 1655، 1656، 1657، 1658، 1659، 1660، 1661، 1662، 1663، 1664، 1665، 1666، 1667، 1668، 1669، 1670، 1671، 1672، 1673، 1674، 1675، 1676، 1677، 1678، 1679، 1680، 1681، 1682، 1683، 1684، 1685، 1686، 1687، 1688، 1689، 1690، 1691، 1692، 1693، 1694، 1695، 1696، 1697، 1698، 1699، 1700، 1701، 1702، 1703، 1704، 1705، 1706، 1707، 1708، 1709، 1710، 1711، 1712، 1713، 1714، 1715، 1716، 1717، 1718، 1719، 1720، 1721، 1722، 1723، 1724، 1725، 1726، 1727، 1728، 1729، 1730، 1731، 1732، 1733، 1734، 1735، 1736، 1737، 1738، 1739، 1740، 1741، 1742، 1743، 1744، 1745، 1746، 1747، 1748، 1749، 1750، 1751، 1752، 1753، 1754، 1755، 1756، 1757، 1758، 1759، 1760، 1761، 1762، 1763، 1764، 1765، 1766، 1767، 1768، 1769، 1770، 1771، 1772، 1773، 1774، 1775، 1776، 1777، 1778، 1779، 1780، 1781، 1782، 1783، 1784، 1785، 1786، 1787، 1788، 1789، 1790، 1791، 1792، 1793، 1794، 1795، 1796، 1797، 1798، 1799، 1800، 1801، 1802، 1803، 1804، 1805، 1806، 1807، 1808، 1809، 1810، 1811، 1812، 1813، 1814، 1815، 1816، 1817، 1818، 1819، 1820، 1821، 1822، 1823، 1824، 1825، 1826، 1827، 1828، 1829، 1830، 1831، 1832، 1833، 1834، 1835، 1836، 1837، 1838، 1839، 1840، 1841، 1842، 1843، 1844، 1845، 1846، 1847، 1848، 1849، 1850، 1851، 1852، 1853، 1854، 1855، 1856، 1857، 1858، 1859، 1860، 1861، 1862، 1863، 1864، 1865، 1866، 1867، 1868، 1869، 1870، 1871، 1872، 1873، 1874، 1875، 1876، 1877، 1878، 1879، 1880، 1881، 1882، 1883، 1884، 1885، 1886، 1887، 1888، 1889، 1890، 1891، 1892، 1893، 1894، 1895، 1896، 1897، 1898، 1899، 1900، 1901، 1902، 1903، 1904، 1905، 1906، 1907، 1908، 1909، 1910، 1911، 1912، 1913، 1914، 1915، 1916، 1917، 1918، 1919، 1920، 1921، 1922، 1923، 1924، 1925، 1926، 1927، 1928، 1929، 1930، 1931، 1932، 1933، 1934، 1935، 1936، 1937، 1938، 1939، 1940، 1941، 1942، 1943، 1944، 1945، 1946، 1947، 1948، 1949، 1950، 1951، 1952، 1953، 1954، 1955، 1956، 1957، 1958، 1959، 1960، 1961، 1962، 1963، 1964، 1965، 1966، 1967، 1968، 1969، 1970، 1971، 1972، 1973، 1974، 1975، 1976، 1977، 1978، 1979، 1980، 1981، 1982، 1983، 1984، 1985، 1986، 1987، 1988، 1989، 1990، 1991، 1992، 1993، 1994، 1995، 1996، 1997، 1998، 1999، 2000، 2001، 2002، 2003، 2004، 2005، 2006، 2007، 2008، 2009، 2010، 2011، 2012، 2013، 2014، 2015، 2016، 2017، 2018، 2019، 2020، 2021، 2022، 2023، 2024، 2025، 2026، 2027، 2028، 2029، 2030، 2031، 2032، 2033، 2034، 2035، 2036، 2037، 2038، 2039، 2040، 2041، 2042، 2043، 2044، 2045، 2046، 2047، 2048، 2049، 2050، 2051، 2052، 2053، 2054، 2055، 2056، 2057، 2058، 2059، 2060، 2061، 2062، 2063، 2064، 2065، 2066، 2067، 2068، 2069، 2070، 2071، 2072، 20

و تشکیل رنگدانه در محیط مایع تنوع زیادی مشاهده شد. جدایه‌های بیماری‌زا دارای رشد کند و پرگنه‌ها دارای حاشیه نامنظم، میسلیم به صورت متراکم با تعداد زیاد پیکنیدیوم در محیط کشت PDA و بعد از نهایت ۲۱ روز رشد پرگنه‌ها متوقف شده و به ندرت پرگنه‌ها به حاشیه پتری‌دیش می‌رسند.

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده جهت تعیین گونه و تعیین تیپ بیماری‌زایی گونه‌های قارچ *Leptosphaeria* spp.

Table 1- Primers used for PCR assay to confirm the identity of *Leptosphaeria* species and their pathogenicity type

آغازگر Primer	توالی Sequence	منبع Source	اندازه باند مورد نظر (جفت باز) Expected fragment size (bp)
<i>Leptosphaeria maculans</i> (Lmac)			
LmacF	5'-CTTGCCACCAATTGGATCCCCTA-3'	لیو و همکاران (17)	334bp
LmacR	5'-GCAAAATGTGCTGCGCTCCAGG-3'		
LbigF	5'-ATCAGGGGATTGGTGCCTCCAGG-3'	کاسک و همکاران (15)	444bp
LbigR	5'-GCAAAATGTGCTGCGCTCCAGG-3'		
LMR1 (group A)	5'-GCGTAAGAAGCGTGCCTTAGAGTC-3' 5'-TCCTGCTCCTACTCCTTCTCTAGC-3'	Kussk et al	580bp
APH12 (group B)	5'-CCCAGTGCAGCTTCCAG-3' 5'-CATAGCAAGTGTGCATCG-3'		2000bp

F: پیشرو، R: پسرو، bp: base pair

آغازگرهای تعیین تیپ (جدول ۱)، همه جدایه‌های مورد بررسی با تشکیل باند ۵۸۰ جفت باز در گروه *L. maculans* A و با بیماری‌زایی بالا HV قرار گرفتند و به علت عدم تشکیل باند ۲۰۰۰ جفت باز با آغازگر گروه B هیچ‌یک مربوط به تیپ غیر مهاجم نبودند (جدول ۲) (شکل ۱). پس از دریافت نتیجه توالی نوکلئوتیدی بر اساس توالی ناحیه ITS-rDNA، با استفاده از آغازگر LmacF، LmacR (جدول ۱) توالی بدست‌آمده دو جدایه Haj1 از برگ و جدایه Maz1 از ساقه با توالی بدست‌آمده در پایگاه NCBI مقایسه شدند. با توجه به نتایج مقایسه با جدایه‌های موجود در ژن بانک نشان داد که این جدایه‌ها با احتمال ۹۹/۷ درصد متعلق به گونه *L. maculans* می‌باشد، سپس این دو جدایه با رس‌شمار KX792142، KX649997 به ترتیب در بانک ژن ثبت شدند.

#### مطالعات بیماری‌زایی: آزمون بیماری‌زایی جدایه‌های انتخابی

از نواحی مختلف استان گلستان و شرق مازندران انجام شدند و گروه‌های بیماری‌زایی آنها بر روی سه رقم افتراقی با استفاده از درجه بندی ۰ تا ۹ روش کن و فرناندو (۳) مشخص شد. به غیر از PG-1 که مربوط به بیماری‌زایی ضعیف WV همه چهار گروه PG-2، PG-3، PGT، و PG-4 (تیپ A) *L. maculans* (HV) با توجه به واکنش مقاومت (۲-۰)، حساسیت (۹-۷)، و حدواسط (۳-۶) جدایه‌ها بر روی ارقام کوبینتا، گلاسیرو و وستار مشخص شدند (جدول ۴ و ۵). اکثر

رنگ پرگنه بعد از حدود یک ماه از سفید، خاکستری تا قهوه‌ای تغییر رنگ می‌دهند و اغلب تشکیل بخش‌هایی با پیکنیدیوم در اندازه‌های مختلف می‌دهند (شکل ۱). فرم جنسی عامل بیمارگر نیز در سطح بقایا در میان ساقه‌های بجا مانده مزارع کلزا مورد بررسی از نواحی مختلف منطقه توشن گرگان (جدایه Ash1A) مشاهده گردید. در بررسی میکروسکوپی آسک‌ها خمیده، دو جداره و دارای ۸ اسپور بودند. آسکوسپورها دارای ۵ دیواره سلولی، بیضوی با طول ۴۳-۷۵ و با عرض ۵-۹ میکرومتر دیده شدند (شکل ۱) و جدایه حاصل از تک آسکوسپور نیز از نظر صفات ریخت‌شناسی و آزمون بیماری‌زایی بررسی شده است (جدول ۲). از نظر تشکیل رنگدانه جدایه‌ها در شش گروه درجه بندی شده‌اند، از بین جدایه‌ها تنها جدایه‌های Beh2، MA3، HA1A، Esf3، Haj1A، G1، Haj1B و رنگدانه تشکیل ندادند و تعداد ۹، ۴ و ۱۲ جدایه به ترتیب متعلق به گروه‌های دو، سه و چهار بودند و بقیه جدایه‌ها با بیشترین مقدار تشکیل رنگدانه در گروه پنج و شش قرار گرفتند (جدول ۲، شکل ۱). از نظر بررسی تعیین گونه با توجه به مشخصات ریخت‌شناسی جدایه‌های مورد بررسی پس از واکنش با جفت آغازگر اختصاصی LmacF، LmacR و با تشکیل باند ۳۳۴ جفت باز<sup>۱</sup> به عنوان گونه *L. maculans* تایید شدند. به علت عدم تشکیل باند ۴۴۴ جفت باز با جفت آغازگر اختصاصی LbigF، LbigR، هیچ‌کدام از جدایه‌ها مربوط به گونه *L. biglobosa* یافت نشدند. همچنین بر اساس واکنش تیپ بیماری‌زایی با استفاده از

جدایه‌ها متعلق به گروه بیماری‌زایی PG-4 بودند و با توانایی به اسپورزایی و واکنش حساسیت روی سه رقم افتراقی مشخص شدند.

جدول ۲- مشخصات ریخت شناسی و مولکولی جدایه‌های قارچ *L. maculans* از شمال ایران  
Table 2- Morphological and molecular characteristics of *L. maculans* isolates of North Iran

ردیف Row	جدایه ها Isolates	مکان جغرافیایی Geographic region	فرم نمونه برداری Sampling form	زمان نمونه برداری Sampling time	میزان رشد روی محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار <sup>a</sup> Growth rate on PDA	تشکیل رنگدانه در محیط مایع <sup>c</sup> Pigment formation in liquid culture	PCR <sup>d</sup> LmacR/LmacFGroup A	
1	MA1	گرگان - محمود آباد Gorgan- Mahmodabad	برگ Leaf	93/12/8	۱.۷۶ ijkl <sup>b</sup>	4	+	+
2	MA2	گرگان - محمود آباد Gorgan- Mahmodabad	ساقه stem	94/3/1	1.66 jkl	6	+	+
3	MA3	گرگان - محمود آباد Gorgan- Mahmodabad	برگ Leaf	93/12/8	1.83 hijkl	1	nt	nt
4	MA4	گرگان - محمود آباد Gorgan- Mahmodabad	ساقه stem	94/3/1	1.9 fghijkl	4	+	+
5	HA1A	گرگان - هاشم آباد Gorgan- Hashemabad	برگ Leaf	93/12/8	1.85ghijkl	1	+	+
6	HA1B	گرگان - هاشم آباد Gorgan- Hashemabad	بقایا Residue	94/3/1	2.5 abcdefghijk	nt	+	+
7	A3	کردکوی Kordkoy	برگ Leaf	93/12/3	3.00 a	2	+	+
8	A4	کردکوی Kordkoy	ساقه stem	94/2/26	2.73 abcd	4	+	+
9	Am	کردکوی Kordkoy	برگ Leaf	94/11/3	2.8 abc	6	+	+
10	Ak1A	کردکوی Kordkoy	برگ Leaf	94/1/10	2.5 abcdefghi	5	+	+
11	Ak1B	کردکوی Kordkoy	ساقه Stem	94/2/26	2.83 abc	5	+	+
12	MAD1	کردکوی Kordkoy	برگ Leaf	94/1/10	3.00 a	5	+	+
13	Ral	کردکوی Kordkoy	برگ Leaf	93/12/3	2.3 abcdefghijk	5	+	+
14	Kha	کردکوی - خطیرآباد Kordkoy- khatirabad	برگ Leaf	94/2/4	2.933 ab	5	+	+
15	Kha1	کردکوی - خطیرآباد Kordkoy- khatirabad	ساقه Stem	94/2/4	2.866 ab	3	+	+
16	Nod1	کردکوی - نودیجه Kordkoy- nodijeh	ساقه Stem	94/3/8	3.00 a	5	nt	nt

17	Glo1A	مازندران - گلوگاه Mazandaran- Galogah	برگ Leaf	94/1/12	2.1 cdefghijk	6	+	+
18	Glo2A	مازندران - گلوگاه Mazandaran- Galogah	ساقه Stem	94/2/3	3.00 a	5	+	+
19	Glo3	مازندران - گلوگاه Mazandaran- Galogah	ساقه Stem	94/2/26	2.63abcdef	2	+	+
20	Beh1	مازندران - بهشهر Mazandaran- Behshahr	برگ Leaf	94/1/12	2.73abcd	2	+	+
21	Beh2	مازندران - بهشهر Mazandaran- Behshahr	برگ Leaf	94/1/12	2.5 abcdefghi	1	+	+
22	G1	گرگان Gorgan	برگ Leaf	93/12/5	2.1 cdefghijk	1	+	+
23	G2B	گرگان Gorgan	برگ Leaf	93/12/5	2.1 cdefghijk	2	nt	nt
24	G2C	گرگان Gorgan	بقایا Residue	94/11/3	2.00 defghijkl	2	+	+
25	G3	گرگان Gorgan	ساقه Stem	94/3/1	2.66 abcde	2	+	+
26	Tosh1	گرگان - توشن Gorgan- Toshan	ساقه Stem	94/2/11	2.4 abcdefghijk	5	+	+
27	1J	گرگان - توشن Gorgan- Toshan	برگ Leaf	94/10/11	2.6 abcdefg	4	+	+
28	2j	گرگان - توشن Gorgan- Toshan	برگ Leaf	94/10/11	2.53 abcdefgh	4	+	+
29	3J	گرگان - توشن Gorgan- Toshan	برگ Leaf	94/10/11	2.56 abcdefgh	nt	+	+
30	5J	گرگان - توشن Gorgan- Toshan	برگ Leaf	94/10/11	2.83abc	nt	+	+
31	Ash1A	گرگان - توشن Gorgan- Toshan	بقایا Residue	94/10/11	2.56 abcdefgh	nt	+	+
32	Ash1B	گرگان - توشن Gorgan-Toshan	برگ Leaf	94/10/11	2.76 abc	nt	+	+
33	As	گرگان - توشن Gorgan-Toshan	برگ Leaf	94/10/11	2.8 abc	4	+	+
34	Tos1	گرگان - توسکستان Gorgan- Toskestan	برگ Leaf	94/2/11	2.83 abc	5	+	+
35	Tos2	گرگان - توسکستان Gorgan- Toskestan	ساقه Stem	94/2/11	2.83 abc	6	+	+
36	Tos3	گرگان - توسکستان Gorgan- Toskestan	ساقه Stem	94/2/11	2.76 abc	6	nt	nt
37	Esf1	گرگان - اصفهانکلاته Gorgan- Esfhankalateh	برگ Leaf	94/1/14	1.26 l	5	+	+

38	Esf2	گرگان-اصفهانکلاته Gorgan— Esfehankalate	ساقه Stem	94/3/8	2.83 abc	5	+	+
39	Esf3	گرگان-اصفهانکلاته Gorgan— Esfehankalate	بقایا Residue	94/10/20	2 defghijkl	1	+	+
40	Gor	قرق - فاضل آباد Gorog- Fazelabad	ساقه Stem	94/3/8	2.8 abc	5	+	+
41	Maz1	مازیاران - علی آباد Mazyaran- Aliabad	برگ Leaf	93/10/24	1.5 kl	5	+	+
42	Maz2	مازیاران - علی آباد Mazyaran- Aliabad	ساقه Stem	94/3/8	2.4 abcdefghijk	5	+	+
43	Haj1A	علی آباد Aliabad	برگ Leaf	93/11/17	1.77 ijkl	1	+	+
44	Haj1B	علی آباد Aliabad	ساقه Stem	94/1/14	2 defghijkl	1	+	+
45	Kor1A	علی آباد Aliabad	برگ Leaf	94/1/14	2.93 ab	6	+	+
46	Kor1B	علی آباد Aliabad	ساقه Stem	94/3/8	2.93 ab	5	+	+
47	Kor1D	علی آباد Aliabad	برگ Leaf	94/1/12	2.33 abcdefghijk	3	+	+
48	Khan	علی آباد- خان بیین Aliabad- Khanbebin	ساقه Stem	94/1/4	2.83 abc	5	+	+
49	Dal1	دلند- آزادشهر Daland- Azadshahr	ساقه Stem	94/1/4	2.5 abcdefghi	4	+	+
50	Dal2	دلند- آزادشهر Daland- Azadshahr	برگ Leaf	94/10/9	2.933 ab	5	+	+
51	Ram1	رامیان Ramian	ساقه Stem	94/1/4	2.83 abc	6	+	+
52	Bim1	آزادشهر Azadshahr	برگ Leaf	94/1/4	2.83 abc	6	+	+
53	GOL1	گنبد Gonbad	برگ Leaf	94/1/4	2.66 abcde	4	+	+
54	Go1	گنبد Gonbad	ساقه Stem	94/2/12	2.5 abcdefghijk	2	+	+
55	Go2	گنبد Gonbad	ساقه Stem	94/2/12	2.5 abcdefghij	5	+	+
56	X	مینودشت Minodasht	برگ Leaf	93/12/1	2.93 ab	5	+	+
57	M1	مینودشت Minodasht	برگ Leaf	93/12/1	3.00 a	2	+	+
58	Sh1	مینودشت Minodasht	برگ Leaf	93/11/17	3.00 a	2	+	+
59	Dale	مینودشت Minodasht	ساقه Stem	94/2/16	2.76 abc	5	+	+



60	B1	مینودشت Minodasht	ساقه Stem	94/2/3	3.00 a	5	+	+
61	EM1	گالیکش Galikesh	برگ Leaf	94/2/26	2.5 abcdefghi	4	+	+
62	EM2	گالیکش Galikesh	ساقه Stem	94/2/26	2.8 abc	3	+	+
63	Gal6	گالیکش Galikesh	بقایا Residue	93/3/12	1.91 efghijkl	nt	+	+
64	Gal8	گالیکش Galikesh	بقایا Residue	93/3/12	2.26 abcdefghijk	6	+	+
65	Gal9	گالیکش-تلوستان Galikesh- Talostan	بقایا Residue	93/3/12	2.66 abcde	5	+	+
66	Tan1	گالیکش-تنگه Galikesh- Tangeh	برگ Leaf	94/2/25	2.5 abcdefghijk	3	+	+
67	Tan2	گالیکش-تنگه Galikesh- Tangeh	ساقه Stem	94/2/25	1.6k l	6	+	+
68	Dah1	کالاله-دهنه Kalaleh- Dahaneh	برگ Leaf	94/1/14	2.18 bcdefghijk	5	+	+
69	Dah2	کالاله-دهنه Kalaleh- dahaneh	ساقه Stem	94/3/10	2.9ab	۴	+	+
70	Pish3A	کالاله-پیشکمر Kalaleh- Pishkamar	برگ Leaf	94/1/14	2.1 cdefghijk	4	+	+
71	Pish3B	کالاله-پیشکمر Kalaleh- Pishkamar	ساقه Stem	94/3/10	2.26 abcdefghijk	nt	+	+
72	Fr	کالاله-فراغی Kalaleh- Feragi	برگ Leaf	94/1/14	2.2 bcdefghijk	nt	+	+

(a) رشد میسلیمی بعد از ۷ روز نگهداری در محیط کشت PDA در دما ۲۰ °C در تاریکی، (b) اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ۹۹ درصد نمی‌باشند، (c) تولید رنگدانه و درجه بندی ۱ تا ۶: ۱- عدم تشکیل رنگدانه، ۲- تشکیل رنگدانه کم زرد-خاکستری، ۳ و ۴- گروه سوم و چهارم تشکیل رنگدانه بین زردنارنجی و قهوه‌ای، ۵ و ۶- گروه پنج و شش مربوط به جدایه‌های با تشکیل رنگدانه زیاد بین قهوه‌ای تا سیاه می‌باشند، (d) واکنش با جفت آغازگر اختصاصی (LmacF/ LmacR) و اندازه باند مورد نظر ۳۳۴ جفت باز، واکنش با جفت آغازگر تعیین تیپ (گروه A) و اندازه باند مورد نظر ۵۸۰ جفت باز قابل مشاهده روی ژل آگارز +، آزمایش نشده: nt.

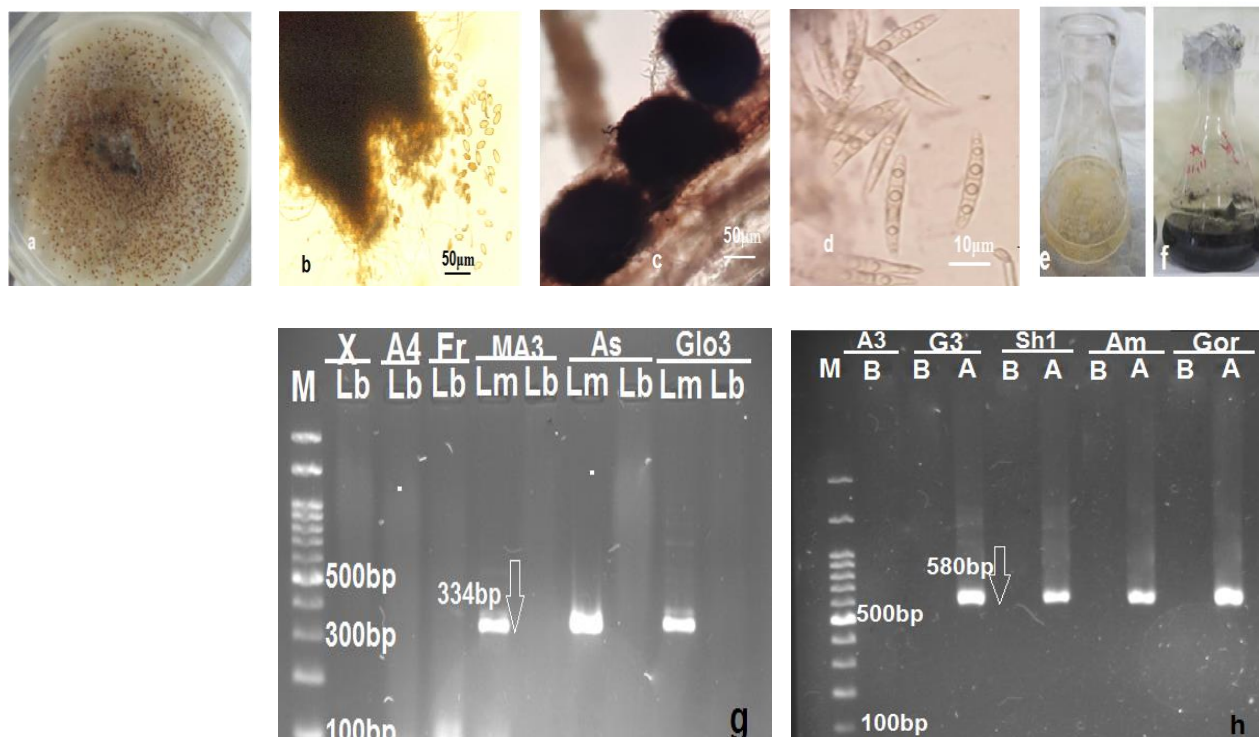
a) Mycelial growth rate was measured for 7 days at 22°C in dark, b) Means within the same column followed by the same letter are not significantly different according to Least Significant Difference, c) pigment formation and a score of 6 groups according to Voigt et al (26) 1. for no pigmentation, 2. for low pigment formation, 3, 4. for inter-mediate pigmentation, culture fluids between yellow and brown and 5, 6. for high pigmentation, culture fluids between brown and black (d) Fragment with the specific primer pair (LmacF/ LmacR) expected size (334 bp) visible on agarose gel (+), Fragment with group A specific primer pair expected size (580 bp) visible on agarose gel+, nt = not tested.

جدول ۳- تجزیه واریانس رشد ریشه‌ای جدایه‌های *L. maculans* جمع‌آوری شده از ساقه، برگ و بقایای آلوده کلزا

Table 3- Variance analysis of mycelial growth isolates of *L. maculans* (stem, leaves and residual)

منابع تغییرات Source of variation	مجموع مربعات Sum square	درجه آزادی Freedom degree	میانگین مربعات Average square	F. Value
جدایه Isolate	39/521	72	0/549	4/351**
خطا Error	18/041	143	0/126	
کل Total	57/561	215		

\*\*معنی‌دار بودن در سطح ۱ درصد (significantly differents)



شکل ۱- مشخصات ریخت شناسی *Leptosphaeria maculans* (a,b). پرگنه، پیکنیدیوم و خروج اسپوره‌های تک سلولی به ترتیب (c,d). پیرتسیوم و آسکوسپوره‌های هوازاد *Leptosphaeria maculans* به ترتیب (e,f). عدم تشکیل رنگدانه جدایه Haj1A (گروه ۱)، تشکیل رنگدانه جدایه Bim1 (گروه ۶) در محیط کشت مایع PDB در دما ۱۸ °C به ترتیب (g). واکنش جدایه‌ها با جفت آغازگر اختصاصی Lm (LmacR, LmacF) و تشکیل باند ۳۳۴ جفت باز و عدم تشکیل باند ۴۴۴ جفت باز با جفت آغازگر اختصاصی Lb (LbigF, LbigR) (h). واکنش جدایه‌ها با جفت آغازگر اختصاصی گروه A و تشکیل باند ۶۰۰-۵۸۰ جفت باز و عدم تشکیل باند ۲۰۰۰-۱۹۰۰ جفت باز با جفت آغازگر اختصاصی گروه B. نشانگر ۱۰۰ جفت باز M-100 bp DNA ladder

Figure 1- Morphological characteristics of *Leptosphaeria maculans* a,b) colony of fungus, Pycnidia and Single cell conidia out of pycnidia. c,d) Pseudothecia and ascospores of *Leptosphaeria maculans*. e, f) Group1 Haj1A isolates without pigmentation, Group 6 Bim isolate by high rate formation of pigments range in Potato Dextrose Broth at 18°C in the dark. g) using the specific primer pair Lm (LmacF/ LmacR) and Lb (LbigF/ LbigR) *L. maculans* (334bp) but no *L. biglobosa* appeared (444 bp).h) PCR amplified fragments of canola seed samples using the specific primer pair A (highly virulent) and B (WV), HV (580 bp) but no WV (1900 bp) (right); M-100 bp DNA ladder.

اساس تشکیل یا عدم تشکیل رنگدانه بوده به طوری که تیپ B قادر به تشکیل رنگدانه زرد تا قهوه‌ای ولی جدایه‌های (تیپ A) *L. maculans* این توانایی را ندارند (۲). اما بررسی‌ها نشان داد که با اینکه جدایه‌های مورد مطالعه در این آزمایش در گروه A قرار گرفتند اکثریت آنها توانایی تشکیل رنگدانه را داشتند که مشابه این اختلافات در بررسی‌های گذشته (۱۰) نیز نشان داده شده بود که در آن علاوه بر اینکه جدایه‌های گروه B قادر به تشکیل رنگدانه قهوه‌ای در محلول زاپک دکستروز بودند، جدایه‌های گروه A نیز رنگدانه زرد تا قهوه‌ای را تشکیل دادند. با توجه به اینکه حتی انتخاب محیط کشت تاثیر روی مشخصات ظاهری جدایه‌های مورد آزمایش داشته به طوری که تعدادی جدایه‌ها در محیط مایع PDB تشکیل رنگدانه نموده، ولی در محیط مایع کازئین سوکروز قادر به تشکیل رنگدانه

جدایه‌ها (A4, Glo2A) در گروه PG-3 روی ارقام وستار و گلاسیر اسپور می‌دهند و ایجاد زخم‌های قهوه‌ای و بدون اسپور روی رقم کوینتا می‌کنند. جدایه‌ها (G3, Pish3A, MAD1) در گروه بیماری‌زایی PG-2 روی رقم وستار دارای توانایی به اسپورزایی بوده و دارای واکنش متغیر بر روی رقم کوینتا و این جدایه‌ها روی رقم گلاسیر بدون ایجاد علائم می‌باشند و گروه PGT روی رقم گلاسیر دارای واکنش حدواسط می‌باشد (شکل ۲). به‌طور کلی رقم وستار حساس به جدایه‌های PG-2, PG-3, PG-4, PGT و رقم گلاسیر مقاوم به جدایه PG-2 ولی حساس به جدایه PG-3 و PG-4 و واکنش حدواسط به جدایه PGT دارند، رقم کوینتا حساس به جدایه PGT و PG-4 ولی واکنش حدواسط به جدایه PG-2 و PG-3 دارند (جدول ۶). با توجه به اینکه یکی از روش‌های تفکیک تیپ‌های A و B بر

هیچ کدام از جدایه‌ها به عنوان گروه بیماری‌زایی PG-1 که تنها زخم‌های کوچک و نکروتیک روی هر سه رقم افتراقی ایجاد کند نبودند، لیکن همه جدایه‌ها مهاجم بوده و توانایی ایجاد زخم همراه با تولید اسپور را روی رقم وستار داشتند. به طور کلی ارتباطی بین گروه بیماری‌زایی و موقعیت جغرافیایی جدایه‌ها وجود نداشت که تایید آن در نتایج تحقیق مهاک و همکاران (۱۸)، کن و فرناندو (۳) و رونگ و همکاران (۲۳) مشخص شده است.

با توجه به این که گروه بیماری‌زایی جدایه‌های حاصل از قسمت-های آلوده گیاه در طی بررسی در سال ۹۴-۱۳۹۳ متفاوت از گروه بیماری‌زایی گزارش شده در در سال‌های گذشته (۲۰۰۷ و ۲۰۰۹) است (۶ و ۱۹). به طوری که در مطالعه حاضر ۴۷/۳ و ۲۶/۳ درصد جدایه‌های انتخابی جهت آزمون گروه بیماری‌زایی به ترتیب در گروه بیماری‌زایی PG-4 و PGT قرار دارند و هیچ یک متعلق به گروه بیماری‌زایی PG-1 (*L. biglobosa*) نبودند.

نبودند، بررسی‌ها نیز نشان داد که در بررسی جدایه‌های *L. maculans* تعدادی جدایه‌ها در محیط آگار قادر به تشکیل رنگدانه ولی در محیط ۷۸ این توانایی را نداشتند و حتی اسیدیته این محیط در رشد شعاعی نیز تاثیرگذار بوده است (۳۱). بنابراین تشکیل رنگدانه را نمی‌توان معیار دقیق تعیین کننده برای تفکیک تیپ‌های بیماری‌زایی قرار داد و اکثر جدایه‌های مهاجم مورد آزمایش ایجاد رنگدانه در محیط مایع نموده و تعداد کمی فاقد این توانایی بودند، بنابراین تشخیص صحیح پاتوتیپ‌ها فقط بر اساس شاخص‌های ریخت شناسی معتبر نبوده و بدین جهت تعیین گروه بیماری‌زایی برای تشخیص صحیح و تعیین پاتوتیپ‌ها استفاده می‌شود (۱۴، ۱۸ و ۲۳). این مطالعه برای اولین بار حضور تیپ‌های بیماری‌زایی در اندام‌های مختلف گیاه از جمله برگ، ساقه و بقایا گیاهان کلزا آلوده در شمال ایران مورد بررسی قرار داده است و از روش تلقیح برگ‌های اولیه در مقایسه با روش‌های ساقه و برگ به علت سرعت، نیاز به فضای کمتر و اینکه تعداد بیشتر گیاه قابل ارزیابی در آزمون بیماری‌زایی می‌باشد، استفاده شده است (۱۳).

جدول ۴- واکنش فنوتیپی ارقام افتراقی کلزا نسبت به جدایه‌های قارچ *L. maculans*  
Table 4- Phenotype interaction of rapeseed cultivars on the fungal isolates of *L. maculans*.

مقیاس (Scale)	شرح علائم جدایه بر روی رقم افتراقی Description of causes symptoms by isolates on rapeseed differential cultivars	حساسیت رقم Susceptibility of cultivar
0	بدون علائم و تیرگی No darkening around the wounds	مقاوم Resistant
1	نکروز شدن اطراف محل زخم احتمال ظهور هاله کلروتیک ضعیف Limited blackening around the wound, a faint chlorotic halo may be present	
3	نکروز شدن همراه هاله کلروتیک (قطر در حدود ۱/۵ تا ۳ میلی‌متر) Dark necrotic lesions, a chlorotic halo 1/5-3 mm in diameter may be present	مقاومت نسبی Intermediate
5	زخم در حدود ۳ تا ۵ میلی‌متر دارای حاشیه زاویه‌دار Lesions 3-5 mm in diameter	
7	زخم ۳ تا ۵ میلی‌متر بافت خاکستری با حاشیه زاویه دار بدون تیرگی Lesions 3-5 mm in diameter, sharply delimited by a nondarkened margin	حساس Susceptible
9	زخم‌ها بیش از ۵ میلی‌متر با پیکنیدیوم‌ها مشخص روی آن Lesions more than 5 mm in diameter, accompanied by profuse sporulation	

جدول ۵- تعیین تیپ بیماری‌زایی جدایه‌های قارچ *L. maculans* بر اساس واکنش فنوتیپی آنها بر روی سه رقم افتراقی  
Table 5- Determination of pathogenicity group isolates of *Leptosphaeria* on the basis of phenotypic reaction on differential cultivars

گروه بیماری‌زایی Pathogenicity group	کوینتا Quinta	گلاسیر Glacier	وستار Westar
PG-2	3-6 (حدواسط) (I)	0-2 (مقاوم) (R)	7-9 (حساس) (S)
PG-3	3-6 (حدواسط) (I)	7-9 (حساس) (S)	7-9 (حساس) (S)
PGT	7-9 (حساس) (S)	3-6 (حدواسط) (I)	7-9 (حساس) (S)
PG-4	7-9 (حساس) (S)	7-9 (حساس) (S)	7-9 (حساس) (S)

R= Resistance, I= Intermediate, S= susceptible

جدول ۶- واکنش ارقام افتراقی با جدایه‌های انتخابی و تعیین گروه‌های بیماری‌زایی

Table ۶- Cotyledon reaction of differential cultivars with selected *Leptosphaeria maculans* isolates and detection of pathogenicity groups.

ردیف Row	مکان جغرافیایی Geographic location	نام جدایه‌ها Isolates	گلاسیبر Glacier	کوینتا Quinta	وستار Westar	گروه بیماری‌زایی PG
1	گرگان Gorgan	G2B	I	S	S	PGT
2	گرگان Gorgan	G3	R	I	S	PG-2
3	گرگان - توشن Gorgan- Toshan	Ash1A	S	S	S	PG-4
4	گرگان - هاشم‌آباد Gorgan- Hashemabad	HA1A	I	S	S	PGT
5	کردکوی Kordkuy	A4	S	I	S	PG-3
6	کردکوی Kordkuy	Ak1A	S	S	S	PG-4
7	کردکوی Kordkuy	Ak1B	S	S	S	PG-4
8	کردکوی Kordkuy	MAD1	R	I	S	PG-2
9	بندرگز Bandargaz	K1	S	S	S	PG-4
10	علی‌آباد Aliabad	Haj1A	S	S	S	PG-4
11	دلند - آزادشهر Daland- Azadshahr	Dal2	I	S	S	PGT
12	آزادشهر Azadshahr	Bim1	S	S	S	PG-4
13	گنبد Gonbad	Gol1	I	S	S	PGT
14	گالیکش Galikesh	Gal8	S	S	S	PG-4
15	گالیکش Galikesh	Gal9	I	S	S	PGT
16	گالیکش - تنگه Galikesh- Tangeh	Tan2	S	S	S	PG-4
17	کالاه - پیشکمر Kalaleh- Pishkamar	Pish3A	R	I	S	PG-2
18	مازندران - گلوگاه Mazandaran- Galogah	Glo1A	S	S	S	PG-4
19	مازندران - گلوگاه Mazandaran- Galogah	Glo2A	S	I	S	PG-3

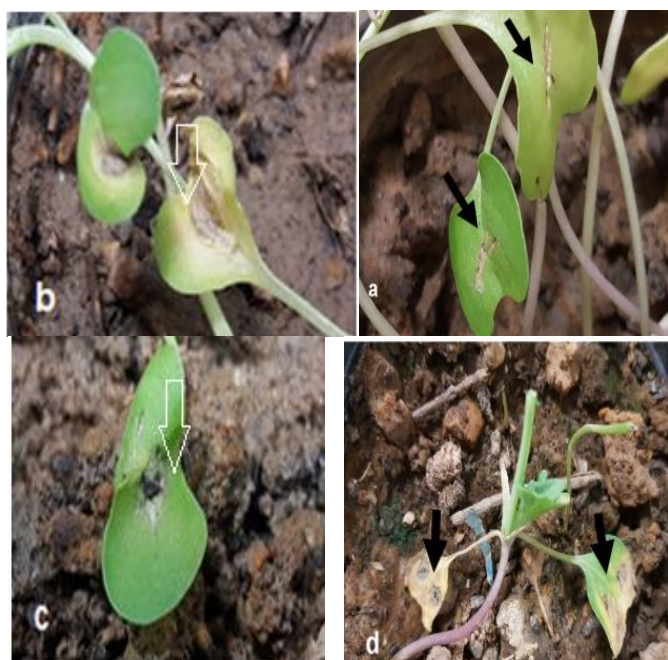
واکنش‌ها به عنوان مقاوم (R: 0-3)، حدواسط (I: 4-6) و حساس (S: 7-9) بر اساس درجه بندی ۰ تا ۹ روش کن و فرناندو (۳) مشخص شده‌اند.

Reactions are classified as Resistant (R:0-3), Intermediate (I:4-6) and Susceptible (S:7-9) according to phenotype scale of 0-9 (Chen and Fernando 2006).

متعلق به گروه بیماری‌زایی PG-2 (*L. maculans*) و دو جدایه متعلق به گروه بیماری‌زایی PGT بوده است. اختلاف در شیوع و پراکنش گروه‌های بیماری‌زایی ممکن مربوط به شرایط آب و هوایی، نوع رقم کشت، سیستم کشتی و مدیریت بیماری باشد و احتمالاً به علت عدم رعایت مسائل قرنطینه‌ای واردات بذرها کلزا، احتمال

بنابراین احتمال تغییر گروه بیماری‌زایی طی سال‌های متوالی قابل پیش بینی است، به طوری که در مقایسه با بررسی‌های سال‌های قبل توسط میرآبادی و همکاران (۲۰) بر اساس واکنش فنوتیپی شش جدایه کلزا از استان مازندران و گلستان با ارقام افتراقی، چهار جدایه مربوط به گروه غیر بیماری‌زای PG-1 (*L. biglobosa*) یک جدایه

ورود تیپ پر آزارتر (PG3 و PG4) و در نتیجه تغییر در گروه بیماری- زایی ایجاد شده است.



شکل ۲- واکنش فنوتیپی روی کوتیلدون *Brassica napus* ۱۲ روز بعد از تلقیح با جدایه‌های گوناگون. (a) جدایه PG-2 روی رقم گلاسیبر (زخم نکروتیک و بدون اسپور)، (b) جدایه PG-3 روی رقم کوینتا (زخم با اندازه متوسط بدون اسپور)، (c) جدایه PG-4 روی رقم وستار (زخم بزرگ و اسپوردار)، (d) جدایه PGT روی رقم گلاسیبر (زخم با اندازه متوسط بدون اسپور).

**Figure 2- Interaction phenotypes on cotyledons of *Brassica napus* observed 12 days after inoculation with different isolates of *Leptosphaeria maculans*. a) PG-2 isolate on Glacie cultivar (necrotic, nonsporulating lesion), b) PG-3 isolate on Quinta cultivar (medium size lesions, nonsporulating), c) PG-4 isolate on Westar cultivar (large, sporulating lesions), d) PGT isolate on Glacier cultivar (medium size lesions, nonsporulating) shown by arrows.**

پراکنش *L. maculans* به چین و سایر کشورهای آسیایی که قبلاً تنها *L. biglobosa* وجود داشته است، از طریق بذور صادراتی از کانادا به اثبات رسیده است (۲۳ و ۳۲). بنابراین با توجه به امکان گسترش و امکان افزایش شدت اپیدمی با تغییرات آب و هوایی و در نتیجه کمبود روغن برای مصرف بشر، استراتژی‌هایی از جمله استفاده از ارقام مقاوم با عملکرد بالا، آزمون بذور و دانش کافی به کشاورزان در رابطه با بیماری برای کاهش خطر *L. maculans* در چین نیز در نظر گرفته شده است (۸ و ۳۲).

در بررسی نیپال و همکاران (۲۲) نیز بیماری از ۲۸ درصد در سال ۲۰۰۴ به ۶۳ و ۷۴ درصد در سال‌های ۲۰۰۷ و ۲۰۰۹ شیوع یافته و در اکثر سال‌ها گروه بیماری‌زایی PG-4 شیوع بیشتری داشته و PG-2 در کمتر از دو درصد جدایه‌ها بوده است. در این راستا در مطالعات رونگ و همکاران (۲۳) هم در تعیین ساختار بیماری‌زایی ۱۱۵ جدایه از مزارع کانادا و آلبرتا در سال ۲۰۱۵ (۲۳) با توجه به واکنش آنها بر روی سه رقم افتراقی جدایه‌های مورد بررسی متعلق به چهار گروه بیماری‌زایی PG-2، PG-3، PG-4 و PGT بودند، به طوری که ۵۹ درصد آنها در گروه بیماری‌زایی PG-4 و ۳۷ و ۴ درصد به ترتیب در

در این راستا با پراکنش گونه *L. maculans* در مناطقی که قبلاً تنها قارچ *L. biglobosa* وجود داشته برای مثال در کانادا (۱۹۹۸-۱۹۷۵) و لهستان (۲۰۰۷-۱۹۹۴) شدت اپیدمی شانکر ساقه کلزا افزایش یافته است (۸،۳۲). به طوری که در کانادا قبل از ۱۹۷۰ تنها جدایه کم‌آزار *L. biglobosa* وجود داشته ولی در سال ۱۹۷۵ برای اولین بار گونه پرآزار *L. maculans* نیز از استان ساسکاچوان و در سال ۱۹۸۰ از استان آلبرتا و استان مانیتوبا پراکنش یافته است و بعد از آن در تمام مناطق کشت کلزا در کانادا به عنوان اپیدمی شدید، خسارات جدی ایجاد کرده است. در بررسی شیوع گروه‌های بیماری-زایی در غرب کانادا و شمال داکوتا (۶) نیز مشخص شده است که در بین ۴۸۹ جدایه مورد بررسی تنها گروه بیماری‌زایی PG-1 و PG-2 در سال ۱۹۸۴ و ۲۰۰۱ وجود داشته ولی در جدایه‌های سال‌های ۲۰۰۲ و ۲۰۰۴، همه پنج گروه بیماری‌زایی وجود داشته‌اند. از جمله عوامل پراکنش عامل بیمارگر در کانادا شامل: دانش ناکافی زارعین نسبت به بیماری، تراکم بالا کشت کلزا در نواحی جغرافیایی مختلف بوده است که در ژاپن نیز این شرایط وجود دارد (۲۹). از سوی دیگر در بررسی‌های کن و همکاران (۴) نیز خطر

مورد آزمایش  $20^{\circ}\text{C}$  بوده است (۲۵).

در این بررسی همه جدایه‌ها از نظر مشخصات ظاهری (تشکیل پیکنیدیوم در محیط کشت و تشکیل رنگدانه) و واکنش با آغازگرهای تشخیص گونه و آغازگرهای تشخیص تیپ در گروه *L. maculans* قرار گرفتند و به طور کلی *L. maculans* به عنوان گونه حمله کننده جهانی مطرح می‌باشد. علاوه بر تعیین گروه‌های بیماری‌زایی در *L. maculans* با استفاده از روش تلقیح برگ‌های اولیه بر روی ارقام افتراقی، با استفاده از آزمون بیماری‌زایی زیر گروه‌های جدایه‌های انتخابی از هر منطقه نیز مشخص گردید و موفق به تشخیص تغییر گروه بیماری‌زایی نسبت به سال‌های گذشته هم شده‌ایم. به علت نواحی کشت زیاد محصول در منطقه، تراکم کشت بالا محصول، احتمال آلودگی بذور، شرایط آب و هوایی متفاوت و دانش ناکافی در مورد بیماری در بین کشاورزان احتمال گسترش گروه بیماری‌زایی PG-4 و PG-3 در شمال آنجا که قبلاً تنها جدایه‌های کم آزارتر (PG-1، PG-2) وجود داشته، ایجاد شده است که این می‌تواند تهدیدی برای توسعه این دانه روغنی در کشور باشد (۱۹). با توجه به تنوع ارقام کشت در شمال ایران و از آنجا که کنترل به روش کشت و شیمیایی برای مبارزه با این بیمارگر به علت تنوع گروه‌های بیماری‌زایی آن ناکافی است، احتیاج ضروری است که از این اطلاعات فنی برای کاهش خطر، جلوگیری از توسعه گروه بیماری‌زایی پر آزار و در نتیجه استراتژی پرورش ارقام مقاوم در برابر همه گروه‌های بیماری‌زایی استفاده نمود. اگرچه توجه به این نکته نیز ضروری است که برای ایجاد مقاومت پایدار در برابر این بیمارگر نیاز به بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت قارچ در آینده نیز می‌باشد.

### سیاسگزار

نگارندگان از همکاری صمیمانه مسئولین محترم مرکز بین المللی تحقیقات بذور اصلاح شده اروپا در آلمان برای ارسال بذور ارقام افتراقی برای آزمایش‌ها تشکر می‌نمایند.

گروه بیماری‌زایی PGT و PG-2 قرار گرفتند. در حالی که در مقایسه با مطالعات پیشین (۱۴) ۵۵ درصد جدایه‌ها در گروه بیماری‌زایی PG-2 قرار داشته‌اند.

با توجه به این که این جدایه‌ها قبلاً در این مناطق کمیاب بوده است یکی از علل شیوع آن می‌تواند کشت ارقام تکراری در مزارعی که کلزا برای چندین سال متوالی در تناوب کوتاه کشت می‌شود باشد و در نتیجه این بیماری با شدت بیشتر به خصوص در ارقام حساسی چون رقم وستار آسیب پذیر شده است. علاوه بر آن توانایی زیاد بیمارگر در تشکیل آسکوسپور نیز در پراکنش بیماری و اپیدمیولوژی آن، نو ترکیبی جنسی و در نتیجه در تغییرات ژنتیکی و گوناگونی جمعیت قارچ می‌تواند تاثیر گذار باشد، به طوری که تاثیر تولید مثل جنسی در گوناگونی جدایه‌ها و در نتیجه گروه‌های بیماری‌زایی آنها در مزارع کانادا توسط مهبیوکیو و همکاران (۱۸) و کن و فرناندو (۳) نیز مشخص شده است (۱۶ و ۲۶).

به طور کلی اختلاف بیولوژیکی و اپیدمیولوژی بین جمعیت *Leptosphaeria* مربوط به برهم کنش جدایه‌ها به عوامل زنده (برگ، ساقه، غلاف و بقایا) و عوامل غیر زنده (عملیات کشت و آب و هوا) در طول فصل رشد می‌باشد، به طوری که سیستم تک کشت با مقاومت مشابه می‌تواند سبب فشار انتخابی روی جمعیت بیمارگر و در نتیجه گوناگونی در ساختار جمعیت گردد (۷ و ۲۳). ضمن این که اختلاف در شدت بیماری و ظهور گروه‌های بیماری‌زایی در بین مناطق و فصول سال، تحت تاثیر شرایط آب و هوایی از جمله میزان بارندگی و دما که در زمان ظهور مرحله جنسی و در نتیجه آلودگی برگ‌ها توسط آسکوسپوره‌های قارچ و توسعه بیماری تاثیر گذار است، ایجاد می‌شود. به طوری که بلوغ پسودوتسیم روی بقایا بستگی به دما و رطوبت داشته، شرایط خشک بلوغ آن را به تاخیر می‌اندازد و دما اپتیمم  $20-18^{\circ}\text{C}$  و بارندگی، سبب اطمینان در بلوغ آسکوکارپ در مرحله ظهور گیاهچه در پاییز، ایجاد علائم زخم برگ، تولید پیکنیدیوم و اسپور روی برگ و گسترش بیماری در مزارع می‌گردد. در بررسی‌های انجام شده نیز بهترین دما برای تشکیل پیکنیدیوم در محیط کشت، ایجاد رنگدانه در محیط مایع و ایجاد بیماری بر روی گیاهان تلقیح شده

### منابع

- 1- Afshari-Azad H., Dalili S.A.R., Salati M., and Amini-Khalaf M.A. 2008. Distribution of rapeseed blackleg disease in Iran. p. 199. Proceedings of the 18<sup>th</sup> Iranian Plant protection congress, 24-27 Aug. 2008. In Faculty of Agriculture university of BU-Ali Sina Hame-dan. (in Persian with English abstract)
- 2- Boerema G.H., De Gryter J., Noordeloos M. E., and Hamers M.E.C. 2004. *Phoma* identification manual, Differentiation of specific and intraspecific taxa in culture. CABI Publishing, United Kingdom. 470p.
- 3- Chen Y., and Fernando W.G.D. 2006. Prevalence of pathogenicity groups of *Leptosphaeria maculans* in western Canada and North Dakota, USA. Canadian Journal Plant Pathology, 1:533-539.
- 4- Chen J.Y., Wu C.P., Li B., Su H., Zhen S.Z., and An Y.L. 2010. Detection of *Leptosphaeria maculans* from imported Canola seeds. Journal of Plant Diseases and Protection, 117:173-176.

- 5- Del Rio Mendoza L.E., Nepal A., and Markell S. 2012. Outbreak of blackleg in canola in North Dakota is caused by new pathogenicity groups. Online. Plant Health Progress.
- 6- Fernando W.G.D., Ghanbarnia K., and Salati M. 2007. First report on the presence of phoma blackleg pathogenicity group 1 (*Leptosphaeria biglobosa*) on *Brassica napus* (Canola/ Rapeseed) in Iran. Plant Diseases, 1:465. (Abstract)
- 7- Fitt B.D.L., Brun H., Barbetti M.J., and Rimmer S.R. 2006. World-wide importance of phoma stem canker (*Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa*) on oilseed rape (*Brassica napus*). European Journal of Plant Pathology, 114:3–15.
- 8- Fitt B.D.L., Hu B.C., Li Z.Q., Liu S.Y., Lange R.M., Kharbanda P.D., Butterworth M.H., and White R.P. 2008. Strategies to prevent spread of *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) onto oilseed rape crops in China; costs and benefits. Plant Pathology, 57:652–664.
- 9- Hammond K.E., Lewis B.G., and Musa T.M. 1985. A systemic pathway in the infection of oilseed rape plants by *Leptosphaeria maculans*. Plant Pathology, 34:557–65.
- 10- Hanacziwskyj P., and Drysdal R.B. 1984. Cultural and biochemical characterisation of isolates of *Leptosphaeria maculans* varying in pathogenicity. Aspects of Applied Biology, 6:387-397.
- 11- Johnson R.D., and Lewis B.G. 1994. Variation in host range, systemic infection and epidemiology of *Leptosphaeria maculans*. Plant Pathology, 43:269-277.
- 12- Keinath A.P., Farnham M.W., and Zitter T.A. 1995. Morphological, pathological, and genetic of differentiation *Didymella bryoniae* and *Phoma* spp isolated from cucurbits. Phytopathology, 85:364-369.
- 13- Kutcher H.R., van den Berg C.G.J., and Rimmer S.R. 1993. Variation in pathogenicity of *Leptosphaeria maculans* on *Brassica* spp. based on cotyledon and stem reactions. Canadian Journal of Plant Pathology, 15:253–8.
- 14- Kutcher H.R., Keri M., McLaren D.L., and Rimmer S.R. 2007. Pathogenic variability of *Leptosphaeria maculans* in western Canada. Canadian Journal Plant Pathology, 29: 388-393.
- 15- Kuusk A.k., Happstadius I., Zhou L., Steventon L. A., Giese H., and Dixelius C. 2002. Presence of *Leptosphaeria maculans* Group A and Group B isolates in Sweden. Phytopathology, 150:349- 356.
- 16- Li H, Sivasithamparam K., Barbetti M.J., and Kuo J. 2004. Germination and invasion by ascospores and pycnidiospores of *Leptosphaeria maculans* on spring-type *Brassica napus* canola varieties with varying susceptibility to blackleg. Journal General Plant Pathology, 70:261-269.
- 17- Liu S.Y., Liu Z., Fitt B.D.L., Evans N., Foster S.J., Huang Y.J., Latunde-Dada A.O., and Lucas J.A. 2006. Resistance to *Leptosphaeria maculans* (Phoma stem canker) in *Brassica napus* (oilseed rape) induced by *L. biglobosa* and chemical defence activators in field and controlled environments. Plant Pathology, 55:401–412.
- 18- Mahuku G.S., Goodwin P.H., Hall R., and Hsiang T. 1997. Variability in the high virulent type of *Leptosphaeria maculans* within and between oilseed rape fields. Canadian Journal of Botany, 75:1485-1492.
- 19- Mirabadi A, Rahnama K., and Esmaailifar A. 2009. First report of pathogenicity group 2 of *Leptosphaeria maculans* causing blackleg of oilseed rape in Iran. Plant Pathology 58: 1175.
- 20- Mirabadi A., Rahnama K., Sadravi M., Salati M. 2010. Identification, distribution and symptomology of the causal agents of rapeseed blackleg (*Leptosphaeria maculans* and *Leptosphaeria biglobosa*) in Mazandaran and Golestan provinces and determination of three common rapeseed cultivars susceptibility reaction. Iranian Journal of Plant Pathology, 45:285- 267. (in Persian with English abstract)
- 21- Murray M.G., and Thompson, W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research, 8:4321- 4325.
- 22- Nepal, A., Markell, S., Knodel, J., Bradley, C. A. and Del Río Mendoza, L. E. 2014. Prevalence of blackleg and pathogenicity groups of *Leptosphaeria maculans* in North 2 Dakota. Plant Disease. 98 (3), 328-335.
- 23- Rong S., Feng J., Li Q., Fei W., Ahmed H.U., Liang Y., Hwang S.F., and Strelkov S.E. 2015. Pathogenic variability and prevalence of Avr genes in *Leptosphaeria maculans* populations from Alberta, Canada. Journal of Plant Diseases and Protection, 4:161–168.
- 24- Shoemaker R.A., and Brun, H. 2001. The teleomorph of the weakly aggressive segregate of *Leptosphaeria maculans*. Canadian Journal of Botany, 79:412-419.
- 25- Sosnowski M, Scott E.S, and Ramsey M.D. 2004. Infection of Australian canola cultivars (*Brassica napus*) by *Leptosphaeria maculans* is influenced by cultivar and environmental conditions. Australasian Plant Pathology, 33:401–411.
- 26- Toscano-Underwood C., West J.S., Fitt B. D. L., Todd A.D., and Jedryczka, M. 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.
- 27- Vakili zarj Z., and Rahnama K. 2009. Study on mycelial compatibility of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates from canola field of Golestan. Journal of Plant Protection, 22(2):147-159. (in Persian with English abstract).

- 28- Voigt K., Malgorzata J., and Wostemeyer J. 2001. Strain typing of Polish *Leptosphaeria maculans* isolates supports at the genomia level the multispecies concept of aggressive and non-aggressive strains. *Microbiological Research*, 156:169-177.
- 29- West J.S., Kharbanda P.D., Barbetti M.J., and Fitt, B.D.L. 2001. Epidemiology and Management of *Leptosphaeria maculans* (Phoma stem canker) on oilseed rape in Australia, Canada and Europe. *Plant Pathology*, 50(1):10-27.
- 30- Williams P.H. 1992. Biology of *Leptosphaeria maculans*. *Canadian Journal Plant Pathology*, 14:30-35.
- 31- Williams, R.H., and Fitt, B.D.L. 1999. Differentiating A and B groups of *Leptosphaeria maculans*, causal agent of stem canker (blackleg) of oilseed rape. *Plant Pathology*, 48: 161-175.
- 32- Zhang X., White R.P., Demir E., Jedryczka M., Lange R.M., and Islam M., Li Z.Q., Hang Y.J., Hall A.M., Zhou G., et al. 2014. *Leptosphaeria* spp., Phoma stem canker and potential spread of *L. maculans* on oilseed rape crops in China. *Plant Pathology*, 63:598-612.