**دوفصلنامه تحقیقات بیماری‌های گیاهی**
**سال ششم، شماره اول، بهار و تابستان ۱۳۹۹**
**صص ۳۳-۱۷**

# شناسایی گونه های *Leptosphaeria maculans* و *L.biglobosa* با استفاده از برخی خصوصیات ریخت‌شناسی در شرایط آزمایشگاهی

**علی زمان میرآبادی*[۱]، کامران رهنما[۲]، مهدی صدروی[۳]، منصور صلاتی[۴]**

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۲/۱ تاریخ پذیرش: ۹۷/۹/۲

## چکیده

این بررسی به منظور تفکیک گونه مهاجم *Leptosphaeria maculans* و غیر مهاجم *L.biglobosa* عوامل بیماری ساق سیاه کلزا، با تعیین ارتباط رشد پرگنه، تولید رنگدانه و پیکنیدیوم ۴۹ جدایه از این عوامل در چهار محیط غذایی و چهار دما (مجموع ۷۸۴ تیمار) در سه زمان بررسی و سه تکرار انجام گرفت. نتایج تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد بین جدایه‌ها از نظر رشد پرگنه در محیط‌های غذایی و تیمارهای دمایی و اثرات متقابل آنها اختلاف معنی داری وجود داشت. تنوع در تولید رنگدانه و پیکنیدیوم در محیط های کشت V8، MEA، PDA، CDB و CDA در هر دو گونه مشاهده شد. بیشترین رشد پرگنه بعد از ۱۲ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد در محیط (۴۸/۰۵ میلی متر) و کمترین آن در دمای ۱۵ درجه سانتی گراد (۱۷/۰۱ میلی متر) و در محیط زاپک مشاهده شد. بیشترین میزان تولید رنگدانه در PDA و دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و کمترین آن در محیط MEA و دمای ۱۵ درجه سانتی گراد مشاهده گردید. در محیط‌های و زاپک عمدتا رنگدانه قهوه ایی و در محیط های PDA و MEA رنگدانه زرد-نارنجی رویت شد. ۹۳/۷۸ درصد جدایه‌ها در محیط زاپک مایع تولید رنگدانه کردند. جدایه‌های *L.maculans* قطر پرگنه و سرعت رشد کم و در مقابل جدایه های *L.biglobosa* دارای رشد پرگنه و سرعت رشد بیشتری بودند. بر اساس نتایج داده‌های بدست آمده و اطلاعات قبلی بیماریزایی موجود، جدایه‌های مناطق دشت ناز، اسلام آباد، فاضل آباد، کوهی خیل و بیکار آیش مربوط به گونه مهاجم *L.maculans* و جدایه های تلوکلا، لالا و خالخیل و همچنین جدایه روی خردل در گونه غیر مهاجم *L.biglobosa* قرار گرفتند.

**واژه‌های کلیدی**: *Leptosphaeria maculans*، *L.biglobosa*، ساق سیاه، محیط کشت و کلزا.

۱- دانشجوی دکتری، مرکز تحقیقات کاربردی و تولید بذر شرکت توسعه کشت دانه های روغنی، ساری، ایران.
۲- دانشیار، گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
۳- دانشیار، گروه گیاهپزشکی، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران.
۴- استادیار پژوهش، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، مشهد، ایران.
* نویسنده مسئول مکاتبات: alizaman2006@gmail.com

**مقدمه**

*Leptospharia maculans* و *L. biglobosa* به عنوان عوامل بیماری ساق سیاه کلزا شناخته می‌شوند که به ترتیب مهاجم و غیر مهاجم هستند(Williams & Fitt, 1999) که بدلیل اهمیت گونه بیماری‌زا معمولا قارچ عامل بیماری ساق سیاه کلزا، تحت عنوان *Leptosphaeria maculans* (Desmaz.) Ces&De Not (anamorph *Plenodomus lingam* ( Tode: Fr.) Des.) شناخته می‌شود که یکی از عوامل مهم بیماری زا بر روی گیاهان خانواده چلیپائیان است و هر ساله منجر به خسارت‌های بسیاری در کشورهای تولید کننده کلزا می‌گردد. خسارت ناشی از این قارچ در جهان در حدود ۲۲ تا ۳۰۰ میلیون دلار در سال برآورد می‌شود (Fitt *et al.*, 2006). در ایران اولین بار شکل غیر جنسی قارچ عامل بیماری ساق سیاه کلزا (تیپ بیماری زای PG1) یا *L.biglobosa* که خسارت چندانی هم ندارد در سال ۲۰۰۷ از استان گلستان گزارش شد (Fernando *et al.*, 2007) و شکل جنسی آن در سال ۱۳۸۷ از استان های مازندران و گلستان گزارش گردید (Zaman Mirabadi *et al.*, 2008). تحقیقات بیشتر بر روی حضور نژادهای بیماری‌زای قارچ در ایران نشان داد که تیپ بیماری‌زای PG2 و PGT در استان مازندران وجود دارد. در تحقیق انجام شده توسط افشاری آزاد و همکاران (Afshari-Azad *et al.*, 2008) در ۱۵ منطقه از پنج استان خوزستان، اردبیل، قزوین، مازندران و گلستان شکل غیر جنسی عامل بیماری ساق سیاه کلزا جداسازی گردید. در نمونه برداری انجام شده توسط زمان میرآبادی و همکاران (Zaman Mirabadi *et al.*, 2010, 2017) از برگ، ساقه و بقایای کلزا (ارقام ریجنت در کبری، ساری گل، هایولا۴۰۱، اکاپی) در مناطق زیر کشت این محصول در ایران مشخص شد که از مجموع ۱۳ استان مورد تحقیق، نمونه های آلوده به قارچ عامل بیماری ساق سیاه در هفت استان و ۲۸ منطقه در استان های گلستان و مازندران وجود دارد. همچنین در تحقیقی دیگر توسط زمان آبادی و همکاران (Zaman Mirabadi et al., 2017) تفکیک این گروه های قارچی با استفاده از خصوصیات جوانه زنی هاگهای جنسی بررسی شده است (Zaman Mirabadi et al., 2017). در بررسی دیگر، شکل جنسی قارچ از بقایای کلزا در منطقه الشتر جداسازی گردید (اطلاعات منتشر نشده). در مطالعات وکیلی و همکاران (Vakili-Zarj *et al.*, 2017) دو نژاد PG3 و PG4 با آزمون بیماریزایی بر روی ارقام افتراقی نیز گزارش گردید. این دو گروه بیماری‌زا تحت عناوین گروه‌های مهاجم و غیر مهاجم بیماری‌زا و غیربیماری‌زا تیپ A و NA (Badawy *et al.*, 1991) و بسیار بیماری‌زا و کم بیماری‌زا نامگذاری شدند. یکی از روش‌های ارزان قیمت و آسان در تشخیص عوامل بیمارگر گیاهی و قابل انجام با امکانات اولیه آزمایشگاهی بررسی خصوصیات مربوط به پرگنه قارچی است و این در حالی است که گروه‌های بیماری‌زای قارچ عامل ساق سیاه کلزا نیز توسط بررسی خصوصیات ریخت شناسی بر اساس ویژگی‌های مربوط به هاگ‌های جنسی (Hammond *et al.*, 1985; Huang *et al.*, 2001; Zaman Mirabadi *et al.*, 2017) و غیر جنسی و رشد پرگنه قارچ نیز قابل تفکیک هستند. کانینگهام (Cunningham, 1927) جدایه‌های مختلفی از *L.maculans* از نیوزلند و کشورهای دیگر جداسازی نمود و از نظر خصوصیات رشد پرگنه و بیماری‌زایی مورد بررسی قرار داد و نشان داد که برخی جدایه‌های بیماری‌زا و غیر بیماری‌زا به ترتیب دارای رشد پرگنه کم و زیاد هستند. گزارشات زیادی مبنی بر تفکیک جدایه‌های بیماری زا از غیر بیماری زا بر اساس اندازه گیری میزان سرعت

رشد در دامنه زیادی از محیط های کشت حاوی آگار وجود دارد (Humpherson-Jones, 1983; Veldboom & Lee, 1996). ارزیابی تولید رنگدانه در محیط های کشت برای تشخیص تیپ های بیماری زا، از روش های دیگری است که در بسیاری موارد نیز کارایی مطلوبی داشته است (Somda *et al.*, 1996; Sock & Hoppe, 1999)

در بررسی مقایسه رشد پرگنه های برخی از جدایه های موتانت از محیط های V8، OA و CDY استفاده کردند. ویگت و همکاران (Voigt *et al.*, 2001) از محیط عصاره نخود فرنگی و محیط CDB برای تفکیک تیپ‌های بیماری زا و غیربیماری زا استفاده کرد. مکگی و پتری (McGee & Petrie, 1978) به موازات آزمون بیماری‌زای جدایه‌های قارچی بر روی کوتیلدونها، میزان رشد قارچ و تولید پیکنید را بعد از ۷ روز در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد ارزیابی کردند. آنها همچنین میزان تولید رنگدانه را در محیط زاپک در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد بعد از چهار هفته مطالعه نمودند. هیل و همکاران (Hill *et al.*, 1984) از محیط های V8، MEA و PDA برای بررسی رشد پرگنه و از محیط CDB برای تفکیک تیپ های بیماری زا برای تولید رنگدانه استفاده نمود. هونگ و همکاران (Hong *et al.*, 2009) از محیط های PDA، OA و MEA برای بررسی نوع گونه جدایه عامل بیماری ساق سیاه کلزا استفاده نمودند. تولید رنگدانه‌های قرمز متمایل به قهوه‌ایی در محیط کشت زاپک که توسط برخی تیپ های غیر بیماری زا تولید می‌شود در برخی تیپ های بیماری زا نیز مشاهده گردید. کاسک و همکاران از محیط CDB برای تولید رنگدانه و تفکیک تیپ های بیماری زا استفاده نمودند (Kuusk *et al.*, 2002). کوچ و همکاران از محیط زاپک مایع بعلاوه Yeast extract برای تفکیک تیپ های بیماریزا و غیر بیماری زا استفاده نمود (Koch *et al.*, 1989). نتایج حاصل از تحقیقات وست و همکاران (West *et al.*, 2002) نشان داد که ارتباط معنی داری بین آزمایشات مولکولی و مشخصات رشد پرگنه و تولید رنگدانه جدایه های بیماری زا و غیر بیماری زا وجود دارد.

در این تحقیق تلاش شده است رابطه رشد پرگنه، تولید رنگدانه و تولید پیکنیدیوم در جدایه های مختلف قارچ عامل بیماری ساق سیاه کلزا مربوط به استان های مازندران و گلستان (که پیش از این از نظر آزمون بیماری زایی روی کوتیلدونها و علائم شناسی به دو گونه *L. maculans* و *L. biglobosa* تقسیم شده بودند) در محیط‌های کشت و شرایط دمایی مختلف مورد ارزیابی قرار گیرد که بتوان با این بررسی، در آزمایشگاههای دارای امکانات محدود و بر اساس مواد و تجهیزات حداقل شناسایی اولیه، گروههای مهاجم و غیر مهاجم تشخیص داده شود.

## مواد و روش‌ها

### جدایه‌های مورد آزمایش

در این تحقیق از ۴۹ جدایه مورد آزمایش (Zaman Mirabadi *et al.*, 2010) به شرح جدول ۱ و ۲ استفاده گردید.

جدول ۱- مشخصات جغرافیایی, نوع نمونه، میزبان و تعداد جدایه های قارچ عامل بیماری ساق سیاه کلزا

| ردیف | استان | تعداد جدایه | میزبان | گروه بیماریزا | شرایط آب و هوایی | نام رقم | (نماد) | روستای محل نمونه برداری | نوع نمونه |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ۱ | مازندران | ۳ | کلزا | غیرمهاجم* | کوهستانی | پی اف و زرفام | L | لالا | بقایا |
| ۲ | مازندران | ۳ | کلزا | مهاجم* | کوهستانی | زرفام | M | مازاروستاق | بقایا |
| ۳ | مازندران | ۵ | کلزا | غیرمهاجم | کوهستانی | زرفام | T | تلوکلا | بقایا |
| ۴ | مازندران | ۲ | کلزا | غیرمهاجم | کوهستانی | زرفام | KH | خالخیل | بقایا |
| ۵ | مازندران | ۶ | کلزا | مهاجم | معتدل | هایولا۴۰۱ | DO1 | دشت ناز | برگ |
| ۶ | مازندران | ۳ | خردل وحشی | غیرمهاجم | معتدل | - | D02 | دشت ناز | بقایا |
| ۷ | مازندران | ۳ | کلزا | مهاجم | معتدل | هایولا۴۰۱ | BK | بیکارآیش | بقایا |
| ۸ | مازندران | ۳ | خردل وحشی | غیرمهاجم | معتدل | - | BK-H | بیکار آیش | بقایا |
| ۹ | مازندران | ۴ | کلزا | مهاجم | معتدل | هایولا۴۰۱ | K | کوهی خیل | بقایا |
| ۱۰ | مازندران | ۷ | کلزا | مهاجم | معتدل | هایولا۴۰۱ | D04 | اسلام آباد | بقایا |
| ۱۱ | مازندران | ۱ | کلزا | غیرمهاجم | معتدل | هایولا۴۰۱ | R | رستم کلا | برگ |
| ۱۲ | مازندران | ۴ | کلزا | غیرمهاجم | معتدل | هایولا۴۰۱ | S | سورک | بقایا |
| ۱۳ | گلستان | ۲ | کلزا | غیرمهاجم | نیمه خشک | هایولا۴۰۱ | B | بندرترکمن | بقایا |
| ۱۴ | گلستان | ۳ | کلزا | مهاجم | معتدل | هایولا۴۰۱ | F | فاضل آباد | بقایا |

**L.biglobosa* و ***L.maculans*

جدول ۲- کد و علائم اختصاری جدایه های مورد بررسی قارچ عامل بیماری ساق سیاه کلزا

| عنوان | جدایه | عنوان | جدایه | عنوان | جدایه | عنوان | جدایه |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| T-aa | ۱-B* | D04-6 | ۱۴-A | S-20 | ۲۷-B | Kh-g | ۴۰-B |
| T-cc | ۲-B | D04-4 | ۱۵-A | B-2 | ۲۸-B | K-19 | ۴۱-A |
| T-bb | ۳-B | D04-a | ۱۶-A | B-1 | ۲۹-B | K-3 | ۴۲-A |
| T-rr | ۴-B | D04-d | ۱۷-A | D02-b | ۳۰-B | K-1 | ۴۳-A |
| T-g | ۵-B | B-kh-aaa | ۱۸-B | D02-20 | ۳۱-B | K-18 | ۴۴-A |
| D01-k | ۶-A** | B-kh-dd | ۱۹-B | D02-3 | ۳۲-B | M-ad | ۴۵-A |
| D01-w | ۷-A | B-kh-bbb | ۲۰-B | L-b | ۳۳-B | M-a | ۴۶-A |
| D01-g | ۸-A | Bk-14 | ۲۱-A | L-aa | ۳۴-B | M-ab | ۴۷-A |
| D01-aa | ۹-A | Bk-b | ۲۲-A | L-a | ۳۵-B | D01-l | ۴۸-A |
| D01-ac | ۱۰-A | Bk-2 | ۲۳-A | F-1 | ۳۶-B | R | ۴۹-B |
| D04-12 | ۱۱-A | S-3 | ۲۴-B | F-gg | ۳۷-B | | |
| D04-11 | ۱۲-A | S-2 | ۲۵-B | F-nn | ۳۸-B | | |
| D04-5 | ۱۳-A | S-1 | ۲۶-B | Kh-m | ۳۹-B | | |

**L.biglobosa=B* ***L.maculans=A*

## محیط‌های غذایی مورد استفاده و طرز تهیه آنها

به منظور بررسی میزان رشد پرگنه در محیط های غذایی مختلف از بستر های کشت جدول ۳ استفاده گردید.

جدول ۳- محیط های غذای مورد استفاده ، مارک، کشور سازنده و کد مربوطه

| ردیف | محیط کشت | مخفف | شرکت و کشور سازنده | کد |
|---|---|---|---|---|
| ۱ | Agar | A | Merck (Germany) | ۱,۰۱۶۱۴ |
| ۲ | Vegetable 8 juice agar | V8 | Himedia (India) | ۶۳۸M |
| ۳ | Potato dextrose agar | PDA | Merck (Germany) | ۱,۱۰۱۳۰ |
| ۴ | Malt exteract agar | MEA | Liofilchem (Italy) | ۶۱۰۱۷۳ |
| ۵ | Czapeck dox agar | CDA | Liofilchem(Italy) | ۶۱۰۰۹۵ |
| ۶ | Czapek dox modified Broth | CDB | Conda (Spain) | ۱۲۵۰ |

برای جداسازی و نگهداری قارچ در یخچال از PDA و V8، به منظور تولید رنگدانه از V8،MEA، PDA، CDB و CDA، برای بررسی خصوصیات ریخت شناسی جدایه از PDA، V8،MEA و CDA و برای خالص سازی از Agar استفاده شد. تمام محیطهای کشت غذایی پس از ترکیب با آب مقطر استریل به نسبت لازم بر اساس مقدار توصیه شرکت سازنده به مدت حداقل ۳۰ دقیقه در روی شیکر هیتردار تا حصول محلول یکنواخت قرار داده شد و سپس در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد به مدت ۱۶ دقیقه در فشار یک اتمسفر در اتوکلاو استریل شد. پس از سرد شدن محیط کشت در دمای حدود ۴۵ تا ۵۵ درجه سانتی گراد، به آن ۱۰۰ پی پی ام آنتی بیوتیک سولفات استرپتومایسین و ۲۰۰ پی پی ام پنی سیلین برای ممانعت از فعالیت باکتری ها اضافه گردید.

**بررسی میزان رشد پرگنه**

به منظور بررسی خصوصیات ریخت شناسی (رشد پرگنه، تولید پیکنیدیوم و رنگدانه) قارچ عامل بیماری ساق سیاه کلزا، ۴۹ جدایه مربوط به تحقیق زمان میرآبادی و همکاران (Zaman Mirabadi *et al.*, 2010) جمع آوری شده از استانهای مازندران و گلستان در چهار محیط کشت (PDA، MEA، CDA و V8)، چهار دما (۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ درجه سانتی گراد) مجموعا ۷۸۴ تیمار و در سه مرحله (پنج، هشت و۱۲ روز بعد از تلقیح) و سه تکرار مورد ارزیابی قرار گرفت.

**بررسی تولید پیکنیدیوم و رنگدانه در محیط جامد**

علاوه بر تیمارهای فوق، تیمارهای تولید رنگدانه ۲۰ روز بعد از کشت و تولید پیکنیدیوم ۱۷ روز بعد از کشت مورد ارزیابی قرار گرفت. در این بررسی پلاگ‌های شش میلی متری *Leptosphaeria* از محیط کشت غذایی V۸ (V8) را با یک پیپت پاستور استریل برداشته و در مرکز پلیت‌های ۸۰ میلی متری حاوی قرار داده و پس از مهر و موم کردن پلیت‌ها با پارافیلم، نمونه‌ها در انکوباتور قرار گرفت و تیمارهای دمایی اعمال گردید. اندازه گیری قطر پرگنه با رسم دو خط عمود بر یکدیگر بر پشت پلیت و محاسبه میانگین عددی آنها برآورد گردید. تولید رنگدانه در جدایه‌های مختلف با تغییر رنگ اطراف محیط رشد پرگنه به زرد-نارنجی یا قهوه‌ای مشخص گردید. حضور پیکنیدیوم‌های قارچ عامل بیماری ساق سیاه کلزا با مشاهده تجمع ساختارهای سیاه کروی ثبت گردید. آزمایش به صورت کرتهای خردشده فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام گردید. تیمار دما به عنوان

فاکتور اصلی، جدایه فاکتور فرعی و محیط کشت به عنوان فاکتور فرعی-فرعی در نظر گرفته شد و تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم افزار SAS version 9.1 و رسم نمودارها در برنامه Microsoft Office Excel 2007 انجام شد.

**بررسی تولید رنگدانه در محیط مایع**

در مطالعه تولید رنگدانه در محیط مایع، پلاگ‌های شش میلی متری از جدایه‌های مختلف قارچ به شیشه‌های پنی سیلین حاوی محیط کشت CDB منتقل و در شرایط تاریکی در دمای تقریبی ۲۱ درجه سانتی گراد به مدت چهار هفته نگهداری شدند و پس از زمان مذکور نسبت به تعیین تولید یا عدم تولید رنگدانه زرد یا قهوه‌ای اقدام گردید.

## نتایج

**بررسی ریخت شناسی جدایه های قارچ عامل بیماری ساق سیاه کلزا**

نتایج تجزیه واریانس نشان داد بین تیمارهای آزمایش (دما و محیط غذایی) و اثرات متقابل آنها بر قطر پرگنه پس از زمان‌های مذکور در سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی دار وجود دارد (جدول ۴) و تیمار رشد پرگنه در تمامی دماها و محیط‌های کشت می‌تواند برای تفکیک گونه های مهاجم و غیر مهاجم استفاده گردید.

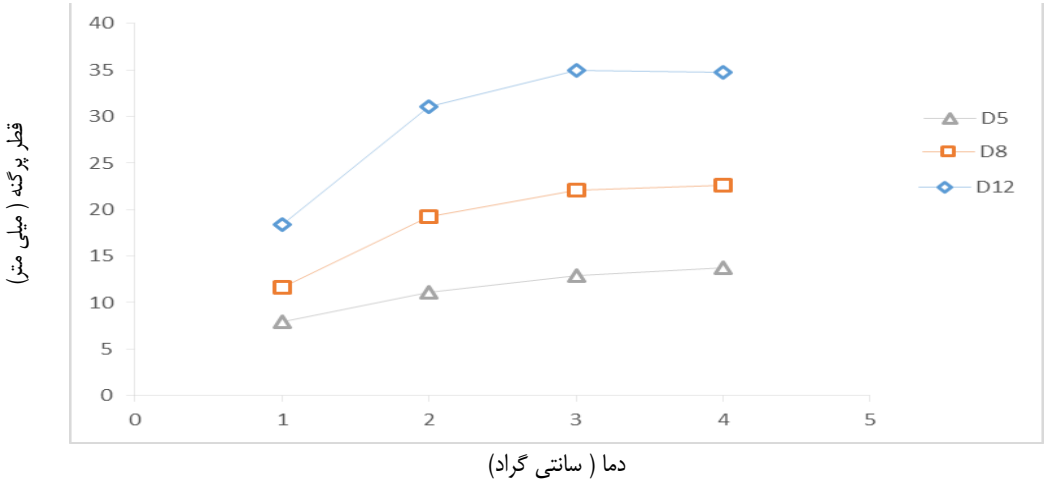
جدول ۴- جدول تجزیه واریانس قطر پرگنه ۴۹ جدایه ***Leptosphaeria*** در چهار محیط کشت و دما پس از ۵، ۸ و ۱۲ روز

| منابع تغییرات | درجه آزادی | مجموع مربعات | | |
|---|---|---|---|---|
| | | بعد از ۵ روز | بعد از ۸ روز | بعد از ۱۲ روز |
| دما (A) | ۳ | ۳۹۱۴/۵۱ | ۱۵۰۲۱/۸۷** | ۳۵۹۱۸/۳** |
| خطا (E) | ۸ | ۳/۶۸ | ۷/۳۱ | ۱۵۷/۴۴ |
| جدایه (B) | ۴۸ | ۱۰۷/۶۹** | ۳۳۷/۴۰** | ۷۱۵/۴۸** |
| اثر متقابل جدایه و دما (AB) | ۱۴۴ | ۹۱/۳۹** | ۲۳۵/۵۰** | ۴۶۷/۱۶** |
| محیط کشت (C) | ۳ | ۶۸۷۲/۵۴** | ۳۹۲۷۲/۱۱** | ۱۲۱۴۱۰** |
| اثر متقابل دما و محیط کشت(AC) | ۹ | ۴۸۴/۸۵** | ۱۸۱۶/۲۷** | ۴۰۰۶/۵۹** |
| اثر متقابل جدایه و محیط کشت (BC) | ۱۴۴ | ۳۳/۸۷** | ۱۳۲/۹۵** | ۳۶۵/۳۲** |
| اثر متقابل دما، جدایه و محیط کشت(ABC) | ۴۳۲ | ۳۰/۳۷** | ۱۰۱/۶۸** | ۳۵۱** |
| خطا (E) | ۱۵۶۰ | ۲/۴۱ | ۹/۲۷ | ۱۰۴/۹۸ |
| ضریب تغییرات٪ | | ۱۳/۶۱٪ | ۱۶/۱۱٪ | ۲۴/۴٪ |

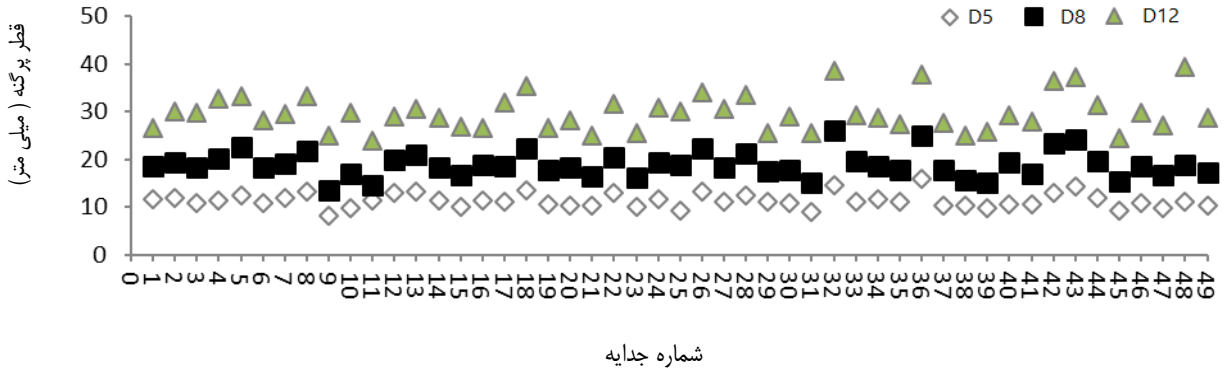
علامت ** نشانگر معنی دار بودن در سطح ۱ درصد می‌باشد.

اختلاف معنی داری از نظر رشد پرگنه بعد از پنج روز در هر چهار تیمار دمایی وجود داشت ولی بعد از هشت و ۱۲ روز از آزمایش در دماهای ۲۵ و ۳۰ درجه سانتی گراد، اختلاف معنی داری مشاهده نگردید که این امر نشان دهنده عدم روند افزایش رشد پرگنه با افزایش دما بود. کمترین رشد پرگنه جدایه های *Leptosphaeria* در دمای ۱۵ درجه سانتی گراد و بیشترین آن برای پنج و هشت روز بعد از اندازه گیری در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد مشاهده

شد (شکل ۱) که در خصوص همه جدایه ها رویت نشد. رشد پرگنه ۴۹ جدایه در تمامی تیمارهای غذایی (V8، PDA، MEA و CDA) و دمایی (۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ درجه سانتی گراد) از پنج تا هشت و سپس ۱۲ روز بعد از اندازه گیری، افزایش یافت (شکل ۲).



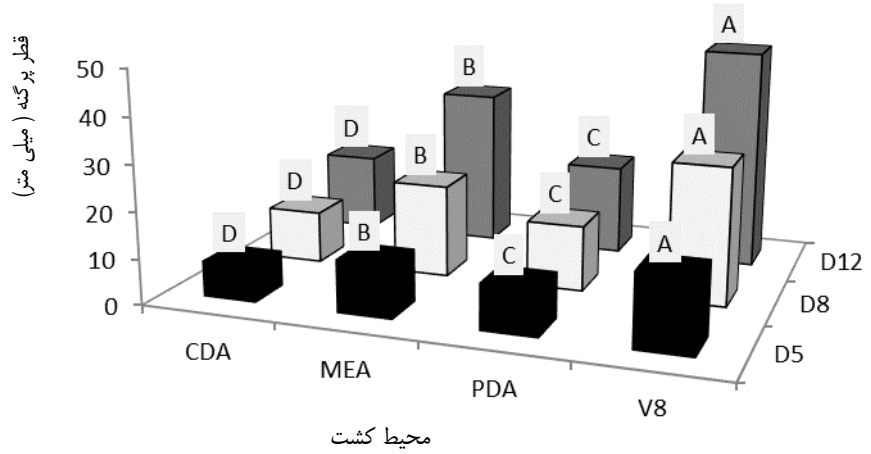

شکل ۱- نمودار میانگین قطر پرگنه جدایه های مختلف قارچ *Leptosphaeria* در چهار دما (۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰) پس از ۵، ۸ و ۱۲ روز. روی محور x عدد ۱، ۲، ۳ و ۴ به ترتیب بیانگر دماهای ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ درجه سانتی گراد هستند.




شکل۲- نمودار مقایسه میانگین قطر پرگنه ۴۹ جدایه *Leptosphaeria* پس از ۵، ۸ و ۱۲ روز

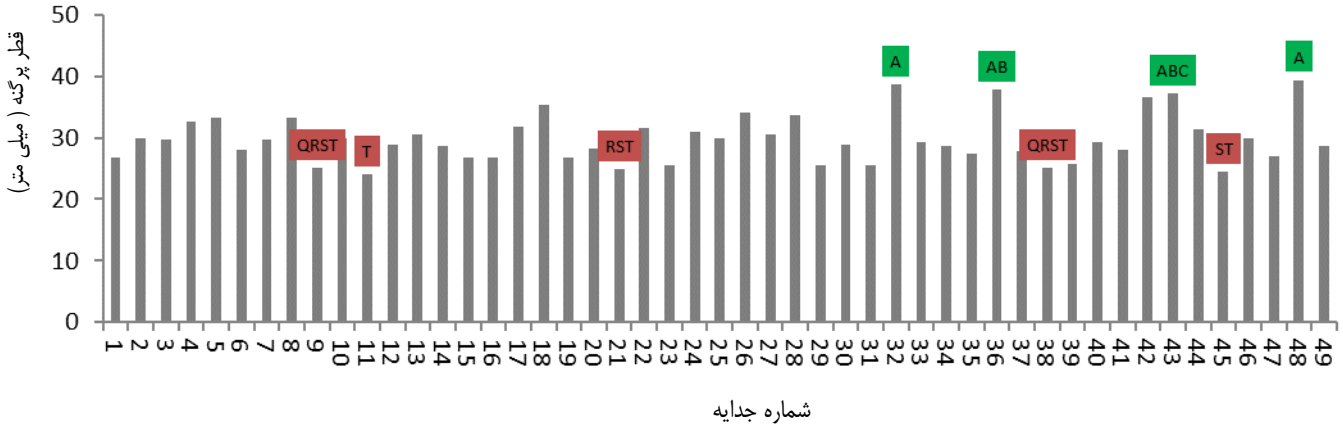
میانگین قطر پرگنه جدایه‌های مختلف قارچ عامل بیماری ساق سیاه کلزا بعد از ۱۲ روز در تمامی تیمارهای دمایی تفاوت معنی داری را در سطح احتمال یک درصد با یکدیگر نشان داد که پس از گذشت زمان یاد شده، کمترین رشد پرگنه مربوط به جدایه‌های۱۱(۲۳/۹۹ میلی متر)، ۴۵ (۲۴/۳۹میلی متر)، ۲۱(۲۴/۹۲میلی متر)، ۳۸ (۲۵/۰۵ میلی متر) و ۹ (۲۵/۱۳ میلی متر) بود و به ترتیب در جایگاههای اول تا چهارم (دو جدایه اخیر در یک رتبه قرار گرفتند) و بیشترین آنها مربوط به جدایه های ۴۸ (۳۹/۳۶ میلی متر)، ۳۲ (۳۸/۶۹)، ۳۶ (۳۷/۷۳) و ۴۳(۳۷/۲۳) به ترتیب در جایگاه‌های اول تا سوم (دو جدایه اول مشترکا در جایگاه اول) بود (شکل ۳) و این نشان داد که

جدایه‌های گونه مهاجم (*L. maculans*) سرعت رشد کمتری در تمامی محیط‌های کشت نسبت به گونه غیر مهاجم (*L. biglobosa*) دارند.

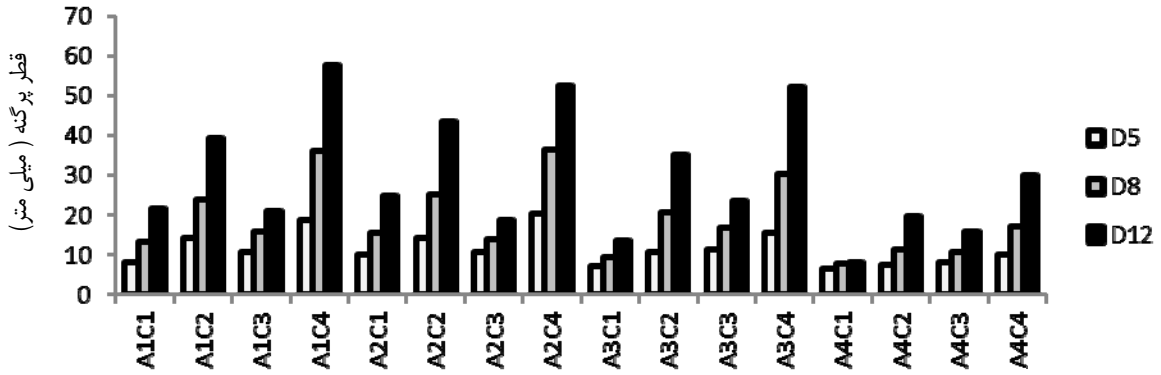



شکل ۳- نمودار مقایسه میانگین قطر پرگنه جدایه های مختلف قارچ *Leptosphaeria* پس از ۵، ۸ و ۱۲ روز در محیط کشت‌های مختلف (CDA، MEA، PDA و V8)

بیشترین قطر پرگنه در محیط‌های کشت غذایی در هر سه روز یادداشت برداری مربوط به محیط ۸V و کمترین آن در محیط زاپک دکس آگار بود (شکل ۴). محیط غذایی MEA و PDA نیز به ترتیب در جایگاههای دوم و سوم قرار داشتند. بعد از ۱۲روز، میانگین قطر پرگنه در هر چهار محیط غذایی (V8، MEA، PDA و CDA) به ترتیب از بیشترین تا کمترین در حدود ۴۸/۰۵، ۳۴/۳۷، ۱۹/۷۱ و ۱۷/۰۱ میلی متر بود. مقایسه میانگین‌های اثرات متقابل اثر دما و محیط کشت بر روی قطر پرگنه نشان داد که بیشترین میزان رشد پرگنه در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و محیط ۸V (A1C4) و کمترین آن در دمای ۱۵ درجه سانتی گراد و محیط کشت زاپک دکس آگار (A4C1) است (شکل ۵).




شکل۴- نمودار مقایسه میانگین قطر پرگنه جدایه های مختلف قارچ *Leptosphaeria* در چهار محیط غذایی CDA، PDA، MEA و V8 پس از ۵، ۸ و ۱۲ روز




اثرات متقابل دما(A) و محیط کشت (C)

شکل ۵- مقایسه میانگین اثرات متقابل دما (A4:15 ˚C ، A3:20 ˚C ، A2:25 ˚C و A1: 30 ˚C و محیط کشت ( C1:CDA, C2: MEA, C3: PDA C4: V8) جدایه‌های مختلف قارچ *Leptosphaeria* بر قطر پرگنه پس از ۵، ۸ و ۱۲ روز

**تولید رنگدانه**

نتایج تولید رنگدانه در محیط‌های کشت غذایی و دماهای مختلف بسیار متغیر بود. بیشترین میزان تولید رنگدانه در تمامی دماهای مورد آزمایش پس از ۲۰ روز در PDA و سپس CZ مشاهده شد (جدول ۵). به جز دمای ۳۰ درجه سانتی گراد، کمترین میزان تولید رنگدانه در محیط MEA مشاهده شد (جدول ۵). با افزایش زمان بررسی (از ۵ تا ۱۲ روز)، تعداد جدایه‌هایی که پتانسیل تولید رنگدانه داشتند و رنگدانه تولید نکرده بودند بیشتر شد. برخی جدایه‌ها در برخی دماها تنها در یکی از محیط های غذایی تولید رنگدانه کردند که همواره محیط PDA در تمامی دماها از این نظر بیشتر تعداد را به خود اختصاص داد. تعداد جدایه‌هایی که هیچگونه رنگدانه‌ای تولید نکردند در محیط‌های مختلف متغیر بودند. برخی از جدایه‌ها در مراحل اولیه تولید رنگدانه می نمودند که با افزایش رشد پرگنه و بعضا تولید پیکنیدیوم در روز های بعد از یادداشت برداری، رنگدانه تولید شده در ابتدای رشد به سختی قابل تشخیص و تفکیک بود که در این خصوص بر اساس مشاهدات اولیه اقدام شد.

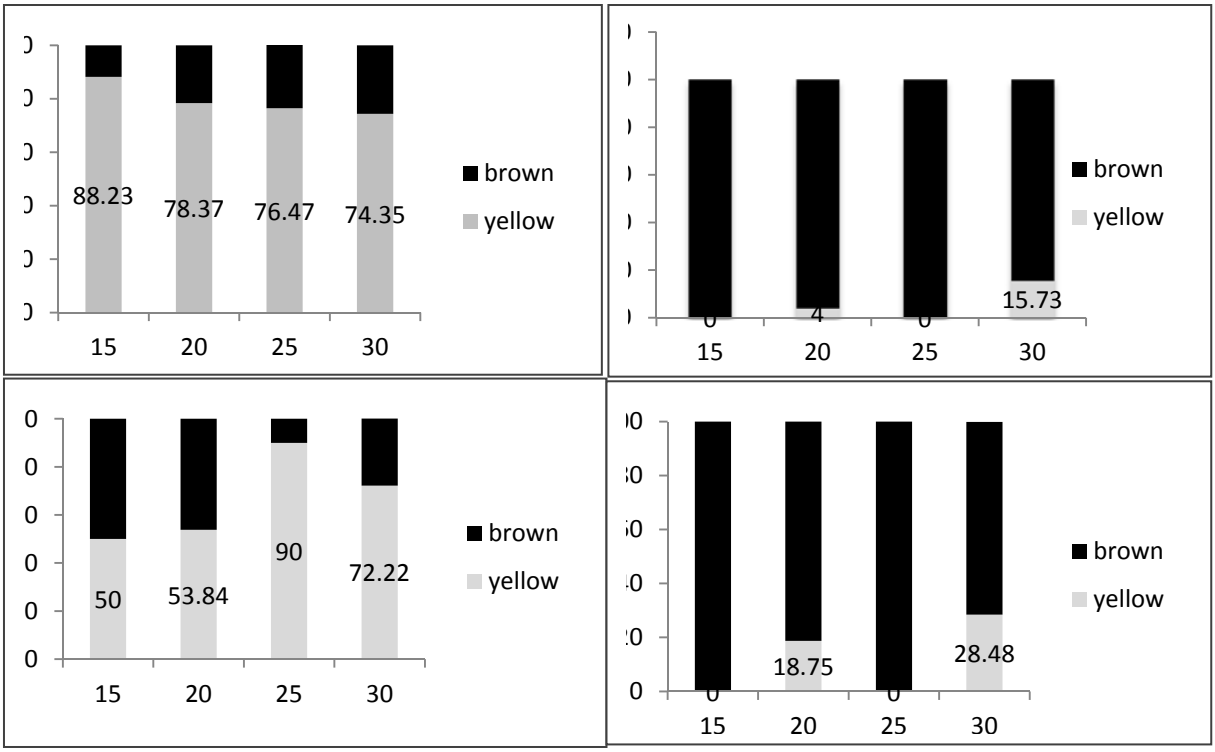
برخی جدایه ها مانند جدایه شماره یک در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد در هیچکدام از محیط های غذایی قادر به تولید رنگدانه نبودند در صورتیکه همین جدایه در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد در تمامی محیط های کشت مورد آزمایش تولید رنگدانه نمود که این مسئله نشان دهنده ارتباط مستقیم تولید رنگدانه با دما می‌باشد (جدول ۵). اغلب جدایه‌ها (۷۵/۵۱ درصد) پس از ۵ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد تولید رنگدانه نمودند در حالیکه تعداد آنها در دمای ۱۵ درجه سانتی گراد کمتر بود ( ۱۴/۲۸ درصد). بیشترین مقدار تولید رنگدانه در چهار محیط کشت آزمایش در ۴۹ جدایه مورد بررسی بعد از ۵ و ۸ روز مربوط به دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و در ۲۰ روز پس از آزمایش در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد بود و کمترین میزان آن در دمای ۱۵ درجه سانتی گراد مشاهده شد (جدول ۵).

جدول ۵- تولید یا عدم تولید رنگدانه‌های زرد- نارنجی یا قهوه‌ایی *Leptosphaeria* در محیط‌های غذایی و دماهای مختلف

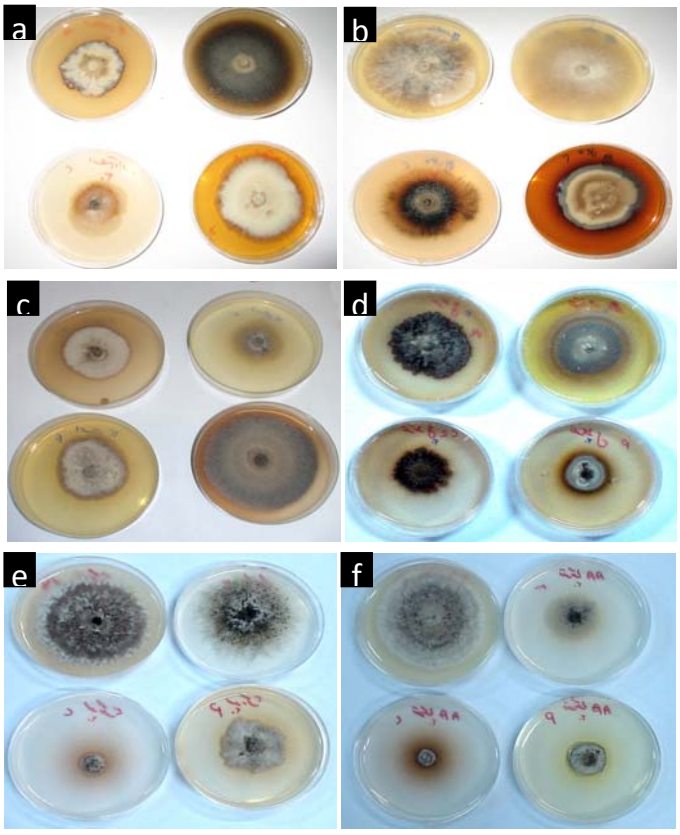
| دما (درجه سانتی گراد) | تعداد جدایه‌ها (روز) ۵ | ۸ | ۱۲ | درصد تولید رنگدانه در محیط‌های کشت مختلف بعد از ۲۰ روز | NIP[b] V8 | PDA | MEA | CZ | NIN[c] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ۱۵ | ۷ | ۱۵ | ۲۶ | PDA(۳۴/۶۹[a])=CDA(۳۴/۶۹)>V8(۲۶/۴۴)>MEA(۲۴/۴۸) | ۵ | ۹ | ۲ | ۴ | ۱۶ |
| ۲۰ | ۲۳ | ۳۶ | ۴۳ | PDA۷۷/۵۵)>CDA(۴۰/۸۱)>V8(۳۸/۷۷)>MEA(۳۲/۶۵) | ۰ | ۹ | ۰ | ۵ | ۵ |
| ۲۵ | ۳۳ | ۴۱ | ۴۳ | PDA(۷۵/۵۱)>CDA(۳۸/۷۷)=V8(۳۸/۷۷)>MEA(۲۶/۵۳) | ۱ | ۹ | ۰ | ۱ | ۵ |
| ۳۰ | ۳۷ | ۳۹ | ۴۲ | PDA(۸۹/۷۹)>CDA(۵۱/۰۲)>MEA(۴۶/۹۳)>V8(۴۰/۸۱) | ۰ | ۶ | ۰ | ۰ | ۶ |

a: درصد، b: تعداد جدایه‌هایی که فقط در یکی از محیط‌های غذایی تولید رنگدانه می‌کنند، c: تعداد جدایه‌هایی که در هیچکدام از محیط‌های غذایی تولید رنگدانه نمی‌نمایند.

دو رنگدانه زرد–نارنجی و قهوه‌ایی در محیط‌های کشت غذایی مشاهده گردید که درصد حضور آنها در محیط‌های غذایی و دماهای مختلف متفاوت بود ( شکل ۶). رنگدانه‌های تولید شده در محیط‌های V8 و CZ عمدتا قهوه‌ای رنگ و رنگدانه‌های تولید شده در محیط MEA و PDA زرد تا قهوه‌ای رنگ بود. در دماهای ۱۵ و ۲۵ درجه سانتی گراد در V8 و CZ هیچگونه رنگدانه زرد–نارنجی تولید نشد. بیشترین میانگین مجموع درصد تولید رنگدانه زرد–نارنجی در چهار دمای مورد تحقیق مربوط به محیط PDA (۷۹/۳۵ درصد) بود (شکل۶). تنوع رنگ و شکل پرگنه جدایه های *Leptosphaeria* در محیط های کشت و دماهای مختلف بسیار متفاوت و متنوع بودند (شکل ۷).




شکل ۶- درصد تولید رنگدانه های زرد و نارنجی یا قهواه ایی جدایه های *Leptosphaeria* در محیط های غذایی PDA، CDA، MEA و V8 در دماهای ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ درجه سانتی گراد بعد از ۱۲ روز.




شکل ۷- تفاوت رنگ و رشد پرگنه جدایه های مختلف قارچ *Leptosphaeria* در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد (تصاویر a، b و c) و دمای ۲۰ درجه سانتی گراد ( تصاویر d، e و f) در محیط های کشت مختلف (به ترتیب در هر تصویر از بالا سمت چپ به راست و پایین سمت چپ به راست V8،MEA، PDA وCDA )

**محیط CDB**

بیشترین درصد تولید رنگدانه زرد–نارنجی و قهوه‌ایی بعد از چهار هفته در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد از میان پنج محیط PDA، V8، MEA، CDA و CDB مربوط به محیط CDB بود (۹۳/۸۷درصد جدایه‌ها در این محیط تولید رنگدانه نمودند) (جدول ۶).

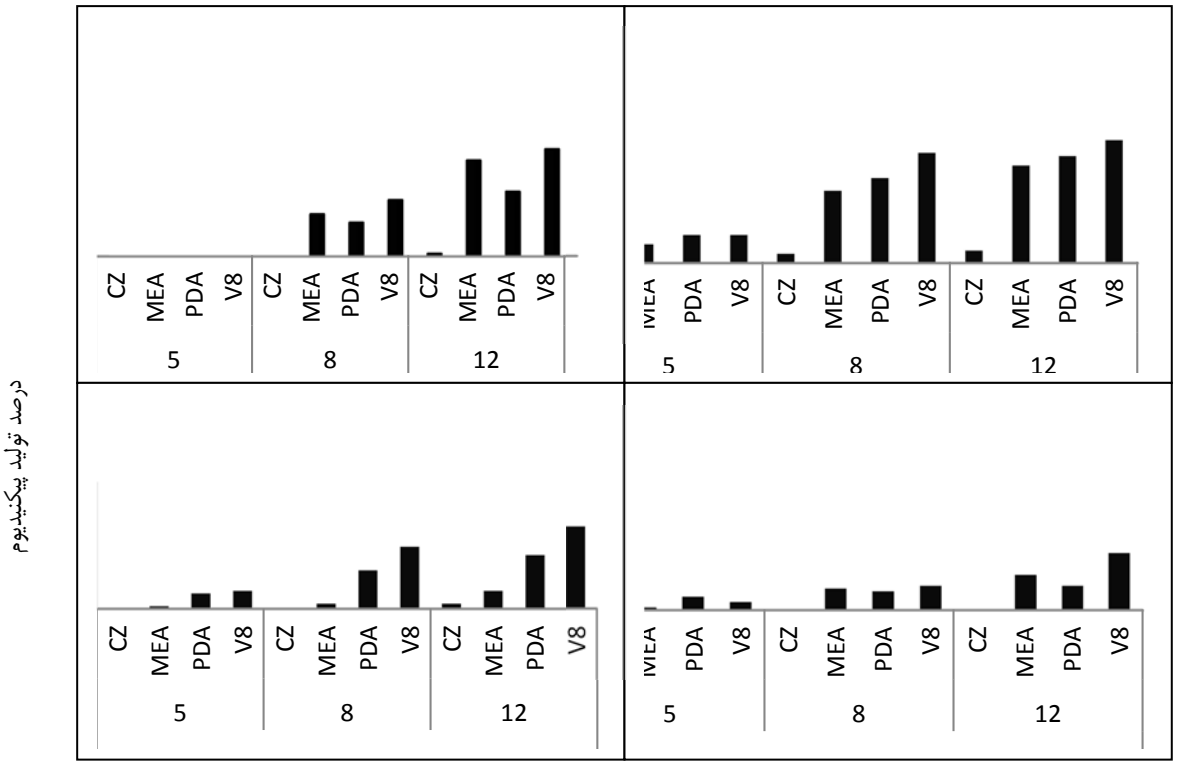
**بررسی تشکیل پیکنیدیوم**

نتایج تشکیل شکل غیر جنسی در محیط‌های غذایی و دماهای مختلف بعد از پنج روز نشان داد که دمای ۲۰ درجه سانتی گراد بهترین دما از نظر تشکیل شکل غیر جنسی می‌باشد. همچنین به ترتیب دماهای ۲۵، ۳۰ و ۱۵ درجه سانتی گراد بهترین دما برای تولید پیکنیدیوم در جدایه های مختلف این بررسی بودند. محیط V8 بیشترین و CZ کمترین مقدار تولید پیکنیدیوم را به خود اختصاص دادند ( شکل ۸).

جدول ۶- بررسی مقایسه نتایج مربوط به تولید رنگدانه، پیکنیدیوم، رشد پرگنه با آزمون تست کوتیلدونی برخی جدایه‌های *Leptosphaeria*

| جدایه | آزمون کوتیلدونی[a] | گروه بیماری زایی[a] | تولید رنگدانه[b] | | | | | تولید پیکنیدیوم[c] | قطر پرگنه (میلی متر)[d] | سرعت رشد |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | CDB | PDA | CDA | MEA | V8 | | | |
| T-g | B/Tox$^0$ | PG1 | + | - | - | - | - | M | ۱/۶±۳۱ | سریع |
| F-1 | B/Tox$^0$ | PG1 | + | + | - | + | - | V | ۸/۸±۴۴ | سریع |
| B-kh-cc | B/Tox$^0$ | PG1 | + | + | + | - | - | M | ۳/۷۸±۳۸/۳۳ | سریع |
| B-2 | B/Tox$^0$ | PG1 | + | + | + | - | - | N | ۰/۲±۳۱ | سریع |
| D04-5 | A/Tox$^+$ | PG2 | [e]– | + | + | - | - | M | ۱/۴۴±۲۲/۶۶ | آهسته |
| D04-12 | A/Tox$^+$ | PGT | + | + | + | - | - | M | ۳/۲±۲۶/۳۳ | آهسته |

[a] (Zaman Mirabadi *et al.*, 2010) ، [b] بعد از چهار هفته در ۲۰ درجه سانتی گراد، [c] در محیط V8 بعد از ۸ روز در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد، M تعداد زیادی پیکنید، N، بدون پیکنید،V تعداد پیکنید متغیر و متوسط، [d] در محیط V8 بعد از هشت روز، [e] محاسبه نشده است




شکل ۸- بررسی مقایسه محیط‌های غذایی (V8، PDA،MEA وCZ) در دماهای مختلف ( ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ درجه سانتی گراد) از نظر تشکیل شکل غیر جنسی پس از ۵، ۸ و ۱۲ روز در *Leptosphaeria*

محیط غذایی PDA در دمای ۲۰ و ۲۵ درجه سانتی گراد و محیط غذایی MEA در دمای ۱۵ و ۳۰ درجه سانتی گراد بعد از V8 بیشترین پیکنیدیوم را تولید کردند. نتایج تاثیر دما بر تشکیل شکل غیر جنسی نشان داد که دمای ۲۰ درجه سانتی گراد مناسب ترین و دمای۳۰ درجه سانتی گراد در بین تیمارهای آزمایش نامناسب ترین دما برای تشکیل پیکنیدیوم بود. اگرچه در همین دمای ۳۰ درجه سانتی گراد تعداد جدایه‌هایی که فقط در V8 تولید پیکنیدیوم نمودند بیشتر از دماهای دیگر بود (جدول ۷).

جدول۷- تشکیل یا عدم تشکیل پیکنیدیوم *Leptosphaeria* در محیط های غذایی و دماهای مختلف

| دما (درجه سانتی گراد) | تشکیل پیکنید در محیط‌های کشت مختلف بعد از ۱۲ روز | عدم تشکیل پیکنید در جدایه‌های مختلف فقط در یک محیط کشت | | | | تعداد جدایه |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | V8 | PDA | MEA | CZ | |
| ۱۵ | V8(۷۷/۵۵)>MEA(۶۹/۳۸)>PDA(۴۶/۹۳)>CZ(۲/۰۴) | ۵ | ۲ | ۱ | ۰ | ۷ |
| ۲۰ | V8(۷۹/۵۹)>PDA(۶۹/۳۸)>MEA(۶۳/۲۶)>CZ(۸/۱۶) | ۶ | ۴ | ۱ | ۰ | ۳ |
| ۲۵ | V8(۶۵/۳۰)>PDA(۴۲/۸۵)>MEA(۱۴/۲۸)>CZ(۴/۰۸) | ۶ | ۱ | ۴ | ۰ | ۱۳ |
| ۳۰ | V8(۸۵/۴۲)>MEA(۲۶/۵۳)>PDA(۱۸/۳۶)>CZ(۰) | ۱۱ | ۳ | ۰ | ۰ | ۲۶ |

بهترین دما (۱۵،۲۰،۲۵ و۳۰ درجه سانتی گراد) از نظر تولید پیکنیدیوم برای جدایه های مختلف قارچ عامل بیماری ساق سیاه کلزا پس از ۱۷روز در چهار محیط کشت (CDA، PDA، V8وMEA) ارزیابی شد. دمای ۲۰ و ۱۵ درجه سانتی گراد بیشترین مقدار تولید پیکنیدیوم را به ترتیب به مقدار ۸۱/۶۳٪ و ۷۹/۵۹٪ داشتند و کمترین مقدار تولید پیکنیدیوم مربوط به دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مقدار ۳۸/۷۷٪ بود. درصد تولید پیکنیدیوم در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد ۵۹/۱۸ بود.

## بحث

در بسیاری از تحقیقات انجام شده در خصوص رشد پرگنه عامل بیماری ساق سیاه مشخص گردیده است که جدایه‌های بیماری‌زا معمولا رشد کندتری در محیط‌های غذایی نسبت به جدایه‌های غیربیماری‌زا دارند (Humpherson-Jones, 1983). از طرفی در بررسی‌های انجام شده توسط زمان میرآبادی و همکاران جدایه اسلام آباد ۱۲(جدایه ۱۱) جزو نژاد بیماری زا (PGT) و جدایه های مناطق بندر ترکمن (جدایه های ۲۸ و ۲۹)، تلوکلا (جدایه‌های ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵) و جدایه خردل (جدایه‌های ۱۸، ۱۹، ۲۰، ۳۰، ۳۱ و ۳۲) غیر بیماری زا بودند. در مطالعات تکمیلی تر توسط(Zaman Mirabadi *et al.*, 2017) بر روی هاگ های جنسی در تعیین جمعیت بیماری زا و غیر بیماری زا مشخص شد که بخشی از جمعیت قارچ عامل بیماری ساق سیاه کلزا در مناطق دشت ناز (جدایه‌های ۶،۷،۸،۹،۱۰ و۴۸) حومه، فاضل آباد (۳۶،۳۷و ۳۸)و کوهی خیل (۴۱،۴۲،۴۳و ۴۴) مربوط به تیپ‌های بیماری‌زا و اغلب جمعیت قارچ در مناطق جنوبی مازندران (تلوکلا، خالخیل و لالا) و جدایه خردل غیر بیماری‌زا می‌باشد. در مجموع، بررسی‌های این مقاله و دو تحقیق یاد شده و (Zaman Mirabadi *et al.*, 2010, 2017) نشان می دهد که بخشی از جمعیت‌های مناطق مربوط به دشت ناز، اسلام آباد و فاضل آباد و کوهی خیل و بیکار آیش را

جدایه‌های بیماری‌زا و مناطق جنوبی مازندران (تلوکلا، لالا و خالخیل) به جز منطقه مازاروستاق (اغلب غیر بیماری‌زا و بخشی هم بیماری‌زا) را اغلب تیپ‌های غیر بیماری‌زا و همچنین جدایه خردل مطلقا غیر بیماری‌زا تشکیل می‌دهد. در تحقیق اخیر جدایهزهای مربوطه به دشت ناز و فاضل آباد برخی دارای بیشترین رشد پرگنه و برخی دارای کمترین رشد پرگنه بودند. جدایه اسلام آباد ۱۲ جزو خطرناک ترین نژادهای بیماری زا (PGT) است که در این مقاله کمترین رشد پرگنه را به خود در مجموع تمامی تیمارهای غذایی و دمایی اختصاص داده است. بنابراین آزمون تعیین قطر پرگنه در چهار محیط کشت (V8، PDA، CDA و MEA) می‌تواند در تشخیص و تفکیک تیپ‌های بیماری‌زا کمک نماید ولی می‌بایست با بررسی جدایه‌های بیشتر یک میزان استاندارد برای آن مشخص نمود. تولید رنگدانه و سرعت بیشتر رشد پرگنه از دیگر موارد تفکیک جدایه‌های غیر بیماری‌زا از بیماری‌زا در نظر گرفته می‌شود. که در این تحقیق موارد متفاوت با این موضوع در جدایه غیر بیماری زا با جدایه بیماری‌زا به ترتیب در تصاویرc و d در شکل۷ مشاهده می‌شود که تفاوت رشدی زیادی بین این دو جدایه وجود ندارد یا جدایه بیماری زایی که برخلاف جدایه غیر بیماری زای در محیط PDA تولید رنگدانه می نماید (به ترتیب تصاویر a وb در شکل ۷)، لذا معیار تولید رنگدانه حداقل در خصوص جدایه های مورد بررسی نمی تواند به طور دقیق تفکیک کننده جدایه های بیماری زا (*L.maculans*) از غیر بیماری زا (*L.biglobosa*) باشد. در دمای ۱۵ درجه سانتی گراد تعداد کمی از جدایه ها تولید رنگدانه نمودند، لذا این دما نمی تواند فاکتور مناسبی برای نشان دادن قابلیت تولید رنگدانه توسط جدایه های مختلف برای تفکیک تیپ ها بیماری زا و غیر بیماری زا باشد. هونگ و همکاران (Hong *et al.*, 2009) نشان دادند که جدایه‌ای از *L. biglobosa* در چهار دمای مورد بررسی ۲۰، ۲۳، ۲۷ و ۳۱، تنها در دمای ۳۱ درجه سانتی گراد تولید رنگدانه نمود که این موضوع با نتایج این تحقیق که معمولا افزایش دما منجر به تولید رنگدانه در جدایه‌های که دارای پتانسیل تولید رنگدانه هستند، می‌شود یکسان است. با توجه به اینکه PDA بیشترین میزان تولید رنگدانه را به خود اختصاص داده بود لذا منابع غذایی دیگری که شاید پتانسیل بیشتری در تولید رنگدانه داشته باشد را برای بررسی میزان تولید رنگدانه با اعمال تیمارهای مختلف دمایی بالا پیشنهاد می گردد. اگر چه در آزمون تولید رنگدانه بیشتر جدایه های *Leptosphaeria* در محیط کشت CDB رنگدانه تولید نمود ولی در آزمون کوتیلدونی برخی از همین جدایه ها (۲۳) بیماری زا بودند. بنابراین نتایج آزمون تولید رنگدانه در محیط CDB نمی‌تواند به صورت مشخص و تعیین کننده برای تفکیک تیپ های بیماری زا استفاده گردد. لازم به ذکر است که قدرت تولید رنگدانه یک جدایه در محیط های کشت مختلف و دماهای متفاوت نیز با یکدیگر فرق دارد. اختلاف معنی دار بین تیمارهای آزمایشی در دماهای ۲۵ و ۳۰ درجه سانتی گراد بعد از ۱۲ روز از نظر رشد پرگنه وجود نداشت ولی رشد پرگنه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد حدود ۰/۱۷ میلی متر نسبت به دمای ۳۰ درجه سانتی گراد بیشتر بود و احتمالا با افزایش دما اختلاف بیشتری در جهت کاهش رشد پرگنه مشاهده خواهد شد که مطالعه در این خصوص پیشنهاد می‌گردد. همچنین مطالعه در خصوص کمینه دما و میزان رشد پرگنه در دمای کمتر از ۱۵ درجه سانتی گراد و بعد از ۱۲ روز نیز قابل بررسی است. نتایج این آزمایش نشان داد که تشکیل پیکنیدیوم یا عدم آن می تواند تحت تاثیر دما و محیط غذایی قرار گیرد. همچنین تعداد جدایه‌هایی که می توانند بطور اختصاصی در

دماهای مختلف فقط در V8 تولید پیکنیدیوم نمایند بیشتر از دیگر محیط های غذایی است (جدول ۷). جدایه‌هایی که در تمامی تیمارهای دمایی فاقد قدرت تشکیل پیکنیدیوم باشد مشاهده نگردید لذا می توان با اعمال تیمارهای مختلف دمایی و غذایی جدایه های مختلف را وادار به تشکیل آن نمود که از این نظر انجام آزمون بر روی دیگر محیط های غذایی، تیمارهای مختلف دما و یا دیگر محرک های محیطی مانند منابع و شدت های متغیر نوری می بایست انجام گیرد. برای تولید پیکنیدیوم توصیه می شود به منظور حداکثر تولید آن از دمای ۲۰ درجه سانتی گراد استفاده گردد. تنوع فنوتیپی حاصل از تنوع ژنتیکی در جمعیت های *Leptosphaeria*، تولید مثل جنسی این قارچ و هتروتال بودن آن از جمله عواملی است که تفکیک جدایه های مختلف بیماریزا و غیر بیماریزا را با اتخاذ یک روش ثابت برای جمعیت های در حال تغییر کمی مشکل می کند لذا لازم است حسب این تغییرات در جمعیت ها، پروتکل های جدید تری در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از تیمارهای غذایی و دمایی اتخاذ نمود. لذا پیشنهاد می شود در بررسی های اولیه قبل از ورود به آزمایشات سخت و زمانبر آزمونهای بیماریزایی، در مطالعات محدود به یک منطقه، در شرایط ضرورت تصمیم گیری، با استفاده از خصوصیات رشدی میزان حجم مطالعات مکمل یا تکمیلی را برای تعیین نژادهای بیماریزا با استفاده از بررسی خصوصیات رشد پرگنه جدایه های*Leptosphaeria* محدود کرد.

**References**


1. Afshari-Azad H, Dalili SAR, Salati M, Amini-Khalaf MA. 2008. Distribution of rapeseed blackleg disease in Iran. Paper presented at: 18th Iranian Plant Protection Congress; 24 August; Hamedan, Iran.
2. Badawy HMAA, Hoppe H-H -H, Koch E. 1991. Differential reactions between the genus brassica and aggressive single spore isolates of *Leptosphaeria maculans*. Journal of Phytopathology 131: 109–119.
3. Cunningham GH. 1927. Dry-rot of swedes and turnips: its cause and control. New Zealand Department of Agriculture Bulletin 133.
4. Fernando WGD, Ghanbarnia K, Salati M. 2007. First report on the presence of *Phoma* blackleg pathogenicity group 1 (*Leptosphaeria biglobosa*) on *Brassica napus* (Canola/Rapeseed) in Iran. Plant Disease 91: 465–465.
5. Fitt BDLL, Brun H, Barbetti MJ, Rimmer SR. 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.
6. Hammond KE, Lewis BG, Musa TM, 1985. A systemic pathway in the infection of oilseed rape plants by *Leptosphaeria maculans*. Plant Pathology 34: 557–565.
7. Hill CB, Xu XH, Williams PH. 1984. Correlation of virulence, growth rate, pigment production and allozyme banding patterns which differentiate virulent and avirulent isolates of *Leptosphaeria maculans*. Cruciferae Newsletter 9: 79.
8. Hong SK, Kim WG, Shin DB, Choi HW, Lee YK, Lee SY. 2009. Occurrence of stem canker on rape caused by *Leptosphaeria biglobosa* in Korea. Plant Pathology Journal 25: 294–298.
9. Huang YJ, Toscano-Underwood C, Fitt BDL, Todd AD, West JS, Koopmann B, 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.
10. Humpherson-Jones FM. 1983. The occurrence of *Alternaria brassicicola, Alternaria brassicae* and *Leptosphaeria maculans* in brassica seed crops in south-east England between 1976 and 1980. Plant Pathology 32: 33–39.
11. Koch E, badawy HMAA, Hoppe HH, Koch E, Badawy HMA, 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.
12. Kuusk AK, Happstadius I, Zhou L, Steventon LA, Giese H, Dixelius C. 2002. Presence of *Leptosphaeria maculans* group A and group B isolates in Sweden. Journal of Phytopathology 150: 349–356.
13. McGee DC, Petrie GA. 1978. Variability of *Leptosphaeria maculans* in relation to blackleg of oilseed rape. Phytopathology 68: 625–630.
14. Sock J, Hoppe H-H. 1999. Pathogenicity of Sirodesmin-deficient Mutants of *Phoma lingam*. Journal of Phytopathology 147: 169–173.
15. Somda I, Renard M, Brun H. 1996. Morphology, pathogenicity and isozyme variation amongst French isolates of *Leptosphaeria maculans* recovered from *Brassica juncea* cv. *Picra*. Plant Pathology, 45: 1090–1098.
16. Vakili-Zarj Z, Rahnama K, Narollah-Nejad S, Yamchi A. 2017. Molecular identification of *Leptosphaeria maculans* and determination of aggressive new pathotypes canola *Phoma* stem canker in north Iran. Journal of Plant Protection 3: 296–311.

17. Veldboom LR, Lee M. 1996. Genetic mapping of quantitative trait loci in maize in stress and non-stress environments: I. grain yield and yield components. Crop Science 36: 1310–1319.
18. Voigt K, Jedryczka M, Wöstemeyer J. 2001. Strain typing of Polish *Leptosphaeria maculans* isolates supports at the genomic level the multi-species concept of aggressive and non-aggressive strains. Microbiological Research 156: 169–177.
19. West JS, Fitt BDLL, Leech PK, Biddulph JE, Huang Y-JJ, Balesdent M-HH. 2002. Effects of timing of *Leptosphaeria maculans* ascospore release and fungicide regime on phoma leaf spot and phoma stem canker development on winter oilseed rape (*Brassica napus*) in southern England. Plant Pathology 51: 454–463.
20. Williams RH, Fitt BDL. 1999. Differentiating A and B groups of *Leptosphaeria maculans*, causal agent of stem canker (blackleg) of oilseed rape. Plant Pathology 48: 161–175.
21. Zaman Mirabadi A, Rahnama K, Sadravi M, Rezapour Alamdarlou R, 2008. First report of *Leptosphaeria maculans* teleomorph on canola stem in the north of Iran. Rostaniha 9: 128-130.
22. Zaman Mirabadi A, Rahnema 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: 267–285.
23. Zaman Mirabadi A, Rahnema K, Sadravi M, Salati M. 2017. 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. Research in Plant Pathology 4: 27–44.