

مطالعه جمعیت عوامل قارچی در نمونه های بذری ارقام کلزای زمستانه

جواد زاد^۱، سیامک رحمانپور^{۲*}، وحید رهجو^۲، سعیده جعفرپور^۳ و پریسا همتی^۴

- ۱- استاد دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، گروه زراعت و اصلاح نباتات، کرج
- ۲- استادیار پژوهش و عضو هیئت علمی، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج
- ۳- دانشجوی دکتری پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، گروه گیاه پزشکی، کرج
- ۴- کارشناس آزمایشگاه بیماری شناسی، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج

چکیده

آلودگی های بذری در روی کلزا همانند سایر محصولات از اهمیت ویژه ای برخوردار بوده و همه ساله امکان بروز تغییرات در آن ها وجود دارد. بیماری های ساق سیاه کلزا و پوسیدگی سفید اسکروتینیایی در حال حاضر مهمترین عوامل خسارت این محصول در ایران به شمار می آیند. احتمال انتقال مستقیم عوامل قارچی این دو بیماری از راه آلودگی های بذری و یا غیر مستقیم آن ها در بقایای آلوده موجود در محموله های بذری خطر استقرار و گسترش آن ها را به همراه دارد. در این راستا برای بررسی آلودگی بذرها به عوامل قارچی نمونه های بذری از محموله های بذر کلزای تولید شده در مناطق سرد شامل استان های البرز، کرمانشاه و مرکزی جمع آوری شدند. با هدف مشاهدات میکروسکوپی سطوح بذرهای برداشتی، بررسی نشانه های غیر طبیعی سطح بذرها شامل چروک، ترک، ریس یا شبیه آن، آواز مشکوک به بیماری های باکتریایی و لکه های سیاه صورت گرفت. همچنین احتمال حضور اسکروت های قارچ عامل بیماری پوسیدگی سفید ساقه و بقایای گیاهی دارای آلودگی به پیکنیدهای قارچ عامل بیماری ساق سیاه کلزا در نمونه های بذری بررسی شدند. شناسایی عوامل قارچی همراه بذرها نیز در آزمایشگاه با استفاده از کلید های معتبر قارچ شناسی صورت گرفت. در هیچکدام از نمونه ها اسکروت های قارچ عامل بیماری پوسیدگی سفید ساقه یافت نشدند. همچنین بقایای غلاف و قطعات ساقه موجود در نمونه های تهیه شده در مقطع پیش از عملیات بوجاری علائم مشکوک به آلودگی به پیکنیدهای قارچ عامل ساق سیاه نداشتند. نتایج حاصل از بررسی قارچ های همراه بذرهای کلزا حاکی از آن بود که این بذرها به قارچهای مختلفی از جنس های ریزوپوس (*Rhizopus sp.*)، اسپریلوس (*Aspergillus sp.*)، آلترناریا (*Alternaria sp.*) و پنی سیلیوم (*Penicillium sp.*) آلوده بودند.

کلمات کلیدی: کلزا، اسکروتینیا، ساق سیاه، ریزوپوس (*Rhizopus sp.*)، اسپریلوس (*Aspergillus sp.*)، آلترناریا (*Alternaria sp.*) و پنی سیلیوم (*Penicillium sp.*).

مقدمه

شده است. منشاء آن اروپای شرقی بوده و ارقام قدیمی آن بدلیل وجود اسیداروسیک بالا در روغن تنها بصورت صنعتی استفاده می شده است. پس از اصلاح کلزا از طریق کاهش میزان اسید اروسیک و گلوکوزینولات دانه، در سطح وسیع بصورت زراعی

کلزا با نام علمی (*Brassica napus*) از خانواده شب بوئیان (*Brassicaceae*) بوده که در طبیعت بطور طبیعی از تلاقی دو گونه خردل روغنی (*B. rapa*) و کلم (*B. oleracea*) و بصورت آمفی دیپلوئید حاصل

*نویسنده مسئول: سیامک رحمانپور، نشانی: کرج - بلوار شهید فهمیده - موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر

E-mail: sirahmanpour@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۷/۲۵

تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۱۱/۶

تر و پایدارتر می گردد (Rahmanpour and Amiri, 2008; Oghan; 2008).

یکی از نهاده های اساسی در تولید یک محصول زراعی بذر است. بذر یک محصول زراعی باید حاوی قدرت رویش مناسب و ایجاد یک بوته کاملاً سالم و دارای تمام خصوصیات زراعی و ژنتیکی رقم معرفی شده باشد. بنابراین توده بذری یک محصول زراعی علاوه بر دارا بودن استانداردهای خلوص فیزیکی و قوه نامیه باید از نظر ژنتیکی هموزن بوده (غیر از واریته های مولتی لاین و سنتتیک) و قادر باشد خصوصیات ژنتیکی والدین خود را به نتاج منتقل کند. منظور از تکثیر بذر یک رقم دستیابی به میزان بذر کافی آن رقم که دارای تمام مشخصات اولیه رقم مورد نظر باشد و از استانداردهای لازمه در زمینه خلوص فیزیکی و قوه نامیه برخوردار باشد، است. بذر باید در طی چند مرحله که با توجه به نوع محصول و میزان بذر مصرفی، این مراحل متفاوت است مطابق با استانداردهای لازمه تکثیر گردد. این مراحل یا طبقات از نظر علمی هر یک تعریف مشخصی دارد. طبقات تعیین شده شامل طبقه بذری به نژادگر، پرورشی، مادری و گواهی شده می باشند. طبقه بذری مادری از کشت بذور حاصله از طبقه پرورشی حاصل می شود. در این طبقه نیز همانند طبقه پرورشی پس از انجام مراقبتهای لازم و بازدیدهایی مکرر و رعایت استانداردهای لازم بذر کافی بدست خواهد آمد. چهار طبقه بذری که در بالا ذکر شد در مورد محصولات دانه های روغنی شامل کلزا، آفتابگردان، کنجد و گلرنگ صادق می باشد (Copeland and McDonald, 2014; Pasban Eslam, 2011). گسترش سریع سطح زیر کشت کلزا در استانهای مختلف کشور هماهنگی سایر زمینه های

درآمد و مصرف خوراکی پیدا نمود. دانه آن محتوی ۴۰-۴۵ درصد روغن و ۳۰-۳۵ درصد پروتئین می باشد. در حال حاضر کشورهای عمده تولید کننده آن، کانادا، چین، هندوستان، فرانسه و آلمان می باشد که بدلیل کیفیت خوب روغن آن در سایر کشورها نیز در حال توسعه است (Kimber and McGreogor, 2004; Pasban Eslam, 2011).

در بین دانه های روغنی، کلزا (*Brassica napus L.*) به عنوان یکی از مهمترین گیاهان روغنی در جهان محسوب می شود. این گیاه در شرایط آب و هوایی مناطق مختلف ایران قابلیت کشت و گسترش دارد. کلزا به دلیل داشتن صفات زراعی بسیار مناسب مانند تحمل نسبی به شوری، ارزش تناوبی بالا، سهولت عملیات کاشت، داشت و برداشت، هزینه ی نسبتاً پائین تولید، دارا بودن پتانسیل عملکرد و درصد روغن بالا و داشتن روغنی با کیفیت مطلوب برای زراعت در کشور بسیار مناسب است و می تواند جهت کشت در اکثر نقاط کشاورزی ایران توصیه شود. در حال حاضر کلزا بهترین گونه ی گیاهی برای قرار گرفتن در نظام های زراعی مبتنی بر گندم و جو در ایران است که می تواند در صورت توسعه ی کشت و رفع مسایل مربوط به زراعت آن علاوه بر این که نقش زیادی در افزایش تولید روغن و کاهش وابستگی به روغن داشته باشد، نقش مهمی را ایفا نماید. از طرفی کشت کلزا می تواند بسیاری از مشکلات مربوط به کشت متداوم گندم و جو در یک قطعه زمین را کم کند. بنابراین در تناوب با زراعت گندم و جو قرار گرفته و از تراکم بیماری ها، آفات و علف های هرز بکاهد و باعث افزایش عملکرد دانه ی این محصولات شود. در واقع با کشت کلزا زراعت گندم و جوی بعدی به اصطلاح بیمه شده، اقتصادی

وسیع پراکنش آن را در تمامی مناطق کشاورزی بازگو می کند. با تولید اندام زمستانگذران به نام اسکروت که اندازه و شکل های متفاوتی دارد پایداری بروز بیماری در مناطق آلوده و جدید تضمین می شود. وجود اسکروت های قارچ در شکل و اندازه بذر کلزا و در نتیجه احتمال انتقال آن به مزارع سالم به نوبه خود از اهمیت بالایی برخوردار است (Rahmanpour, 2008).

آلودگی های بذری در کلزا از آن جهت که می تواند موجب بیماری در محصول و افت عملکرد شود حائز اهمیت می باشند (Afshari Azad, 2001). بصیر نیا (Basirnia, 2011)، طی تحقیقی بر روی مایکو فلور بذرهای کلزا در استان فارس قارچ های مختلف نظیر کلادوسپوریوم (*Cladosporium sp.*)، فوزاریوم (*Fusarium sp.*)، آلترناریا (*Alternaria sp.*)، پنی سیلیوم (*Penicillium sp.*)، بوتریتیس (*Botrytis sp.*)، فوما (*Phoma sp.*)، ریزوکتونیا (*Rhizoctonia sp.*) و ریزوپوس (*Rhizopus sp.*) را از روی محموله های بذری کلزا جداسازی و شناسائی نمودند که در این میان قارچ آسپرژیلوس (*Aspergillus sp.*) از فراوانی بیشتری برخوردار بودند.

قارچ های مختلفی بر روی بذرهای کلزا یافت می شوند که می توانند موجب بیماری در محصول شوند که از اهم آنها قارچ های عامل بیماری پوسیدگی سفید و ساق سیاه کلزا می باشند. بیماری های پوسیدگی سفید ساقه در اثر قارچ اسکروتینیا اسکروتیوروم (*Sclerotinia sclerotiorum*) و ساق سیاه ناشی از قارچ فوما لینگام (*Phoma lingam*) با شکل جنسی لپتوسفریا ماکیولنس (*Leptosphaeria maculans*) در شرایط ایران دو عارضه مهم تهدید کننده کشت کلزا به شمار می آیند که بیماری اول

علمی و کاربردی این توسعه را نیز نیاز دارد. در این رهگذر اطلاعات لازم در زمینه بیماریهای مهم این محصول امری لازم و ضروری می باشد. اکثر بیماری های گیاهی توسط قارچ ایجاد می شوند، و اغلب گزارش های مربوط به بیماری های کلزا نیز در ارتباط با قارچ های بیماریزاست. مهم ترین قارچ هایی که گیاهان کلزا را در مزارع آلوده می کنند توسط پژوهشگران ارایه شده است (Kharbanda *et al.*; 2001). برخی از این قارچ ها از طریق منافذ طبیعی مانند روزنه های هوایی، روزنه های آبی، نوشجای ها و عدسک ها وارد گیاه می شوند. در موارد دیگر، قارچ ها گیاهان را از طریق زخم های ایجاد شده توسط عوامل مختلف مانند تگرگ، ادوات خاک ورزی، حشرات، نماتودها و ... آلوده می سازند. برخی از قارچ ها علاوه بر رشد روی کلزا، علف های هرز و سایر میزبان ها را نیز آلوده می کنند و به این ترتیب پتانسیل بقای خود را افزایش می دهند.

نژادها یا جدایه های قارچ ها اگر چه از لحاظ ریخت شناسی قابل تشخیص نمی باشند، اما از نظر ویژگی های فیزیولوژیک قادرند با همکنش های مختلف با گونه ها و ارقام زراعی، درجات بیماری زایی مختلفی را تولید نمایند.

پوسیدگی اسکروتینایی ساقه از بیماری های رایج و مهم کلزا و سایر گیاهان پهن برگ در مناطق معتدل دنیا می باشد. این بیماری، مهمترین بیماری کلزا در اروپا، آمریکا و کانادا است (Lamey, 1998; Bradley *et al.* 2006a). پوسیدگی اسکروتینایی ساقه کمیت و کیفیت دانه را با تاثیر بر وزن دانه و درصد کیفیت روغن تقلیل می دهد (Morral, 1984). میزبان بودن بیش از ۴۰۰ گونه گیاهی شامل گیاهان زراعی و درختان میوه برای قارچ عامل این بیماری گستره

و ساق سیاه کلزا، و پتانسیل انتقال آن‌ها از طریق محموله‌های بذری، این تحقیق به منظور بررسی احتمال آلودگی بذرها، برخی ارقام کلزای پاییزه در مزارع تولید بذر کلزا (طبقه بذری گواهی شده) در استان‌های البرز، کرمانشاه و مرکزی انجام گردید.

مواد و روش‌ها

الف- نمونه برداری از بذرها، ارقام کلزا: ارقام مورد استفاده در این پژوهش شامل اوپرا، اکاپی، لیکورد، احمدی و کرج ۱ برای مناطق سرد و معتدل سرد توصیه شده‌اند. منشاء رقم اکاپی از کشور فرانسه، دارای تیپ رشد بینابین مقاوم به سرما، متوسط رس با طول دوره رشد ۲۳۰ تا ۲۴۰ روز، درصد روغن آن ۴۳ تا ۴۵ درصد، وزن هزار دانه آن حدود ۴/۳ گرم، از ارقام دو صفر، عملکرد دانه بیش از ۳ تن در هکتار می‌باشد. رقم اوپرا با منشاء کشور آلمان، تیپ رشدی بینابین داشته و مقاوم به سرما می‌باشد. این رقم متوسط رس با طول دوره رشد ۲۲۰ تا ۲۳۰ روز، درصد روغن دانه ۴۳ تا ۴۵ درصد، وزن هزار دانه حدود ۴/۳ گرم بوده و از ارقام دو صفر و مقاوم به خوابیدگی می‌باشد. منشاء رقم لیکورد نیز از کشور فرانسه، دارای تیپ رشد زمستانه، دیررس با طول دوره رشد ۲۳۰ تا ۲۴۰ روز، درصد روغن آن ۴۳ تا ۴۵ درصد، وزن هزار دانه آن حدود ۴/۱ گرم، از ارقام دو صفر به شمار می‌آید.

ارقام ایرانی احمدی و کرج ۱ تیپ زمستانه بوده و هردو مقاوم به خوابیدگی هستند. همچنین درصد روغن و وزن هزار دانه آن‌ها به ترتیب در محدوده‌های ۴۴ تا ۴۵ درصد و ۳/۵ تا ۴ گرم قرار می‌گیرند. هر دو رقم از گروه متوسط رس بوده و رقم کرج در حدود یک هفته زودرس تر می‌باشد. عملکرد تمامی

سطح وسیعی از مزارع حاشیه دریای خزر شامل استان‌های گلستان، مازندران، اردبیل، و نیز استان خوزستان را فرا گرفته است. بیماری ساق سیاه نیز علاوه بر استان‌های یاد شده در استان‌های غربی، خراسان و قزوین مشاهده شده و در مقاطعی نیز خسارت‌های قابل ملاحظه‌ای به بار آورده است (Rahmanpour and Amiri Oghan, 2008; Rahmanpour, 2003).

اندام‌های تولیدکننده اسپورهای هوازا قارچ ساق سیاه بر روی بقایای ساقه و نیز بذرها، آلوده مشاهده شده‌اند. همچنین این بذرها، آلوده چروکیده و رنگ پریده دیده می‌شوند (Zhang et al., 2014).

بیماری لکه سیاه آلترناریایی که لکه برگ‌های خاکستری نیز نامیده می‌شود، توسط قارچ‌های آلترناریا براسیکه (*Alternaria brassicae*)، آلترناریا براسیسیکولا (*A. brassicicola*) و آلترناریا رافانی (*A. raphani*) به وجود می‌آید. این بیماری یکی از متداولترین بیماری‌های کلزا در غرب کانادا است (Afshari Azad, 2001). در حال حاضر، این بیماری از مزارع استان‌های گلستان، مازندران و به صورت پراکنده از استان تهران گزارش شده است (Rahmanpour and Amiri Oghan, 2008). همه قسمت‌های هوایی گیاه کلزا به آلودگی حساس هستند. به علاوه بذر آلوده کشت شده ممکن است در خاک پوسیده شود یا گیاهچه‌هایی با لکه‌های سیاه روی کوتیلدون‌ها تولید کند. قدرت جوانه زنی بذرها، ارقام کلزای برداشت شده از مزارع آلوده کاهش می‌یابد. همچنین این بیماری سبب کاهش کیفیت محصول می‌شود. برخی محققان کاهش کیفیت روغن کلزا را تا ۳۵ درصد گزارش کرده‌اند (Rahmanpour and Amiri Oghan, 2008). با توجه به اهمیت و خسارت دو بیماری پوسیدگی سفید ساقه

ج- جداسازی و شناسایی قارچهای همراه بذر
بذرهای ارسالی در دو گروه با ضدعفونی سطحی
و بدون ضدعفونی سطحی در روی محیط کشت پی
دی آ کشت شدند تا میزان آلودگی به عوامل مختلف
قارچی و باکتریایی مشخص شود. با هدف شناسایی و
بررسی قارچ های بذر زاد و همراه بذر کلزا، روش
های استاندارد تعیین سلامت بذرها که از سوی انجمن
بین المللی آزمون بذر^۱ (I.S.T.A.) پیشنهاد شده است
مورد استفاده قرار گرفتند (ISTA, 1996). در این
راستا ۵ شاخص به عنوان علایم مشکوک به آلودگی
بذری در نمونه های بذری جمع آوری شده شامل
چروک، ترک، ریسه یا شبیه آن، اووز مشکوک به
بیماری های باکتریایی و لکه های سیاه بررسی شدند
(شکل های ۱ و ۲) و در انتها این نمونه ها در دو گروه
با و بدون ضدعفونی سطحی روی محیط کشت پی
دی آ (برای هر کدام ۲۰ عدد بذر) کشت شدند تا
کلونی های رشد کرده ارزیابی شوند. کشت روی
محیط های مختلف غذائی آگاردار یکی از این
روشها می باشد. بدین ترتیب تعداد ۲۰ بذر کلزا از هر
رقم و منطقه به تفکیک مشخصات مذکور انتخاب و
در دو گروه بدون ضد عفونی سطحی و با ضد
عفونی سطحی تقسیم شدند. ضدعفونی نیز توسط
محلول هیپوکلریت سدیم رقیق شده ۱٪ به مدت دو
دقیقه انجام شد. گروه بذری ضدعفونی شده پس از
شستشو با آب مقطر سترون جهت خشک کردن
بذرها بر روی کاغذ صافی سترون قرار گرفتند. سپس
بذر ها روی محیط های غذائی آگاردار مختلف مانند
سیب زمینی دکستروز آگار (PDA) و آب آگار

ارقام یاد شده بیش از ۳ تن در هکتار می باشد
(Alizadeh et al., 2015).

نمونه های بذر گواهی شده از ارقام زمستانه کلزا
(تولیدی سال ۱۳۹۱) شامل اکاپی، کرج ۱ و احمدی
تولید استان البرز، لیکورد تولید استان مرکزی و اوپرا
تولید استان کرمانشاه که برای بوجاری به مجموعه
بوجاری بخش تحقیقات دانه های روغنی موسسه
تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر ارسال شده بودند،
تهیه گردیدند. لازم به ذکر است که تولیدات بذرهای
گواهی شده کلزا در مناطق سرد برای بوجاری به
کرج ارسال می شوند. لذا در این تحقیق ارقام ذکر
شده پیش از بوجاری در بخش تحقیقات دانه های
روغنی موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر در
دسترس بودند.

ب- بررسی بذرهای محموله های بذری: نمونه
های بذری در زمان پیش از بوجاری با روش
استاندارد نمونه برداری فراهم شدند. از آنجا که در
نمونه های پیش از بوجاری مقادیر متنابهی از بقایای
گیاهی موجود است، در هر صد گرم از نمونه نهایی
جدا شده، بقایای کلزا از بذرها جدا شده و به تفکیک
با استفاده از بینوکولر از نظر احتمال آلودگی به اندام
های زمستانگذران قارچ های عامل بیماری ها شامل
پیکنید و پسودوتسیوم های ساق سیاه (Zhang et al.,
2014)، اسکروت های پوسیدگی سفید ساقه
(Rahmanpour, 2008) و لکه های سیاه مشابه لکه
برگی آلترناریایی (Rahmanpour and Amiri Oghan, 2008)
بررسی شدند. در نهایت بقایای گیاهی و
بذرهای کلزا در هر نمونه تفکیک شدند تا بذرهای
پاک شده در آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار
گیرند.

مرکز محیط کشت PDA منتقل شدند. تشتک‌های پتری محتوی تک اسپورهای منتقل شده در انکوباتور با دمای °C ۲۵ منتقل شده و پس از گذشت ۱۰-۷ روز کشت پرگنه خالص آنها تهیه گردید. شناسایی گونه های قارچی با توجه به علائم میکروسکوپی و استفاده از منابع مربوطه از جمله کلید شناسایی قارچ های ناقص (Barnett, H.L. and B.B. Hunter. 1972) صورت گرفت.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از بررسی قارچ های همراه بذرها کلزای نمونه گیری شده از محموله های بذری تولید شده در استان های البرز، مرکزی و کرمانشاه حاکی از آن بود که اندام های مشابه پیکنید و پسودوتسیوم مربوط به ساق سیاه کلزا، اسکلروت مربوط به قارچ اسکلروتینیا اسکلروتیوروم (S. sclerotiorum) عامل پوسیدگی سفید ساقه و نیز لکه های تیره مشکوک به آلودگی های آلترناریایی در بقایای گیاهی موجود در نمونه های محموله های بذری مشاهده نشدند. در مقابل بذرها آزمایشی در هر دو گروه به قارچهای پنی سیلیوم (*Penicillium* sp.)، آلترناریا (*Alternaria* sp.)، اسپرژیلوس (*Aspergillus* sp.) و ریزوپوس (*Rhizopus* sp.) آلوده بودند. جنس های شناخته شده قارچ های جدا شده از بذرها نیز به تفکیک در شرایط استریل و غیر استریل بودن بذرها در جدول های ۱ تا ۵ به همراه نسبت مربوطه آورده شده اند. با این وجود درصد آلودگی بذرها به قارچ های ذکر شده از نتایج متفاوتی برخوردار بود. از میان قارچ های جدا شده بیشترین درصد آلودگی مربوط به گونه هایی از جنس های اسپرژیلوس (*Aspergillus*) و ریزوپوس (*Rhizopus*)

(WA) منتقل شدند و تشتک های پتری درون انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی گراد با نور متناوب معمولی نگهداری شده و پس از ۱۰، ۱۵ و ۲۱ روز بعد از کشت مورد ارزیابی قرار گرفتند.

قارچ های رشد کرده در اطراف نمونه های بذر در ابتدا به محیط کشت های سیب زمینی دکستروز آگار جدید منتقل شده و پس از عمل خالص سازی برای شناسایی به محیط های سیب زمینی-دکستروز-آگار و آب-آگار انتقال داده شدند. پس از رشد کلنی خالص قارچ، مشخصات مرفولوژیکی شامل رنگ کلنی، خصوصیات ریشه، اندام باردهی یا اسپورانژیوم، شکل و رنگ اسپورها و با استفاده از کلیدهای شناسایی موجود جنس های این قارچ ها تشخیص داده شدند (Basimia, 2011).

د - خالص سازی و شناسایی گونه های جدایه های جنس آلترناریا (*Alternaria*):

با توجه به اینکه سه گونه آلترناریا براسیکه (*Alternaria brassicae* (Berk.) Sacc.)، آلترناریا براسیسیکولا (*A. brassicicola* (Schw.) Wilts) و آلترناریا رافانی (*A. raphani* Groves and Skolko) عموماً در تمام دنیا به کلزا و خردل (*B. juncea*) حمله می کنند (Afshari Azad, 2001)، کلنی های جنس آلترناریا در پروسه ای جداگانه خالص سازی و شناسایی شدند. روش تک اسپور یا تک کنیدی به منظور خالص سازی مورد استفاده قرار گرفت، در این راستا ابتدا سوسپانسیون رقیقی از کنیدی ها تهیه و به کمک سوزن لوپ استریل بر روی محیط کشت آب آگار ۲٪ با سه تکرار خط کشی صورت گرفت. پس از سپری شدن ۲۴-۱۲ ساعت تک کنیدی های جوانه زده روی محیط آب آگار و بعد از مشاهده با بزرگنمایی $10 \times$ میکروسکوپ نوری انتخاب و در

قارچی همراه بذر کلز به این نتیجه رسیده اند که بیشترین فراوانی در میان آن ها به سه جنس آسپرژیلوس (*Aspergillus*)، پنی سیلیوم (*Penicillium*) و آلترناریا (*Alternaria*) تعلق دارد (Vinas et al., 1994).

بنابراین ضدعفونی بذرهای کلزا با استفاده از قارچکش های متعارف برای عاری کردن یا کاهش کاربرد جمعیت این قارچ ها امری ضروری بوده و درصد جوانه زنی بذر در بستر مزرعه را افزایش می دهد. پیدایش و رشد و نمو کلنی های قارچ ساپروفیت ریزوپوس (*Rhizopus*) بر روی بذرهای ضدعفونی شده کلزا می تواند ناشی از آلودگی های مزرعه باشد. ولی نتایج حاصل از تحقیقات بصیرنیا (Basirnia, 2011) حاکی از آن است که برای برطرف کردن وجود این قارچ مدت زمان ضدعفونی باید پنج دقیقه در نظر گرفته شود. در هر صورت قدرت رقابت رشدی قارچ ریزوپوس (*Rhizopus*) نسبت به سایر کلنی ها پایین تر بوده و مانع از جوانه زنی بذر کلزا در آزمایشات اخیر نشده بود.

پژوهشگران دریافته اند که تعدادی از قارچ های همراه بذر دانه های روغنی تولید توکسین های قارچی می کنند که برای سلامت بذر و انسان خطرناک هستند. به عنوان مثال ۷ نوع توکسین توسط قارچ های بیماریزای آلترناریا (*Alternaria*) تولید می شوند که بر روی جوانه زنی بذر نیز تاثیر دارند (Montemuro and Visconti, 1992). پژوهش های مشابهی نیز در خصوص آلودگی بذرهای کلزا به قارچ های بیماریزا و ساپروفیت در دنیا وجود دارند (Szopinska et al., 2007). به طور کلی آلوده شدن کلزا به قارچ های مختلف میزان روغن بذر را تا ۳۵ درصد کاهش می دهد (Bansal et al., 1990).

بود که در تیمارهای بدون ضدعفونی سطحی افزایش داشتند (جدول ۶). تعدادی از نمونه ها نیز آلودگی به پنی سیلیوم (*Penicillium*) داشتند که با ضدعفونی نیز به میزان قابل توجهی دچار کاهش جمعیت شدند. نتایج به دست آمده در پژوهش اخیر حاکی از آن است که بذرهای کلزای تیپ زمستانه تولیدی در مناطق سرد کشور به عوامل قارچی ساپروفیت آغشته و آلوده هستند که برخی آلودگی سطحی و برخی نیز درون بذری تولید می کنند. با خالص سازی پرگنه های آلترناریا (*Alternaria*) و تک اسپور کردن و مطالعه آن دو گونه آلترناریا آلترناتا (*Alternaria alternate*) و آلترناریا تنویزا (*A. tenuissima*) شناسایی شدند. لازم به ذکر است که گونه های بیماریزای آلترناریا (*Alternaria*) بر روی کلزا با این دو گونه شناسایی شده اخیر متفاوت می باشند (Afshari Azad, 2001).

آلودگی بذرهای آزمایشی به قارچ های شناسایی شده در هر دو حالت ضدعفونی سطحی و بدون ضدعفونی سطحی کاهش قدرت جوانه زنی بذرها را نیز به دنبال داشته است به طوری که به کلونیزه شدن کامل بذرها قبل از جوانه زنی انجامیده است. بصیرنیا (Basirnia, 2011) نیز در بررسی های صورت گرفته بر روی میکوفلور بذر کلزا در استان فارس به چنین نتیجه ای رسیده است. وی بیشتر موارد جوانه زدن بذرها را به دو قارچ آسپرژیلوس (*Aspergillus*) و پنی سیلیوم (*Penicillium*) نسبت داد. در تحقیق حاضر نیز جنس آسپرژیلوس (*Aspergillus*) در اکثر تیمارها وجود داشت. تولید توکسین های حاصل از رشد و فعالیت این قارچ میتواند در خاصیت بازدارندگی از جوانه زدن بذرهای کلزا نقش داشته باشد (Basirnia, 2011). پژوهشگران در جمع بندی شناسایی عوامل

کشور گزارش شده است. به عنوان مثال استان های خراسان شمالی، قزوین، کرمانشاه و مرکزی دارای آلودگی های پراکنده هستند (Afshari Azad et al., 2008; Personal communications). گفتنی است که بیماری ساق سیاه به هر دو تیپ بهاره و زمستانه کلزا حمله می کند و میزبان های دیگری نیز غیر از کلزای زراعی دارد (Kaczmarek and Jedryczka, 2011). با توجه به توسعه سریع بیماری بر روی ارقام تیپ زمستانه کلزا (Zhang et al., 2014) و فقدان منبع مقاومت به آن در ژرم پلاسما داخلی کلزا ضد عفونی کارآمد محموله های بذری و همچنین رصد کردن دائم بیماری در مزارع تکثیری از اهمیت خاصی برخوردار است. انتقال عامل بیماری ساق سیاه در این محموله ها می تواند به ظهور بیماری در مناطق عاری از آن منتهی شود. نپال و همکاران (Nepal et al., 2014) بر این عقیده هستند که با وجود ضد عفونی اکثر بذرها گواهی شده با ترکیبی از قارچکش ها و حشره کش ها برای کاهش ریسک گسترش بیماری، این ضد عفونی بذری به طور کامل خطر موجود را برطرف نمی کند.

گزارشات اخیر (Personal Communications) مبنی بر بروز بیماری پوسیدگی سفید ساقه در نقاط مرطوب نواحی سرد و معتدل سرد زنگ خطر برای مزارع تکثیری کلزا به شمار می آید. چرا که انتقال اسکروت قارچ عامل بیماری به همراه بذری پیدایش نقاط جدید آلودگی و در پی آن توسعه و خسارت به محصول را به همراه خواهد داشت.

شناسایی آلودگی های بذری کلزا به عوامل قارچی بیماریزا از این جهت حائز اهمیت می باشد که عدم اجرای تمهیدات پیشگیرانه می تواند در توزیع و استقرار گاهها خطرناک آن ها در مناطق عاری

تولید توکسین نیز از جمله خسارات کیفی است که بر روی سلامتی انسان ها تاثیر گذار است و قارچ آلترناریا (*Alternaria*) با تولید دامنه ی وسیعی از این ترکیبات حائز اهمیت می باشد (Boland and , 2013; Hall, 1994; Aneja and Agnihotri, 2013).

به طور کلی میزان جوانه زنی بذرها در اثر آلودگی به عوامل مختلف قارچی به طور قابل ملاحظه ای تحت تاثیر قرار می گیرد به طوری که مایه زنی مصنوعی بذری کلزا با قارچ آلترناریای بیماریزا روی میزبان کاهش جوانه زنی و مرگ گیاهچه تاثیر داشته است (Silvana and Skares, 2000).

قارچ عامل بیماری ساق سیاه کلزا بذری زاد بوده و به سرعت در مزارع تولید بذری از طریق پیکنیدیوسپورهای درون قطرات ریز باران گسترش می یابد. بیماری فوما یا همان ساق سیاه به فراوانی در محموله های بذری تولید شده در نواحی معتدل (خنک) و مرطوب یافت شده و ایجاد لکه برگی های گسترده و شانکر ساقه می نماید (Williams, 1980; Nepal et al., 2014). اگرچه بروز و خسارت این بیماری بیشتر از استان های شمالی و مرطوب کشور گزارش گردیده است (Afshari Azad et al., 2008)، ولی در کشور چین بروز آن بر روی کلزای تیپ زمستانه بیشتر از تیپ بهاره بوده و سرعت پیشرفت بیماری نیز بر روی کلزاهای تیپ زمستانه و بهاره به ترتیب ۷۰ و ۴۷ کیلومتر در سال برآورد شده است. گفتنی است که هر دو گونه قارچ عامل بیماری ساق سیاه در بقایای گیاهی و محموله های بذری بین سالهای ۲۰۰۹ تا ۲۰۱۱ وارد کشور چین شده اند (Zhang et al., 2014). در حال حاضر آلودگی برخی مزارع کلزا به ساق سیاه در نواحی سرد و معتدل سرد

همراه بذرها در هر دو نمونه با ضدعفونی سطحی و بدون ضدعفونی سطحی و با فراوانی های متفاوتی مشاهده شدند. این قارچ ها عمدتاً به جنس های پنی سیلیوم (*Penicillium*)، آلترناریا (*Alternaria*)، آسپرژیلوس (*Aspergillus*) و ریزوپوس (*Rhizopus*) تعلق داشتند.

از بیماری نقش غیر قابل چشم پوشی داشته باشد. با توجه به این مهم در پژوهش اخیر با بررسی وضعیت ظاهری نمونه های بذری، نشانه های بقایای آلوده به عوامل قارچی بیماریزا روی کلزا دیده نشدند. کشت نمونه های بذری در محیط کشت پیش و پس از ضد عفونی سطحی حاکی از عدم رشد کلنی های قارچی این عوامل نیز بود. در مقابل قارچ های ساپروفیت

جدول ۱- جمعیت قارچ های مشاهده شده بر روی نمونه های بذری کلزا رقم احمدی تولید شده در استان البرز

Table .1: Fungal population on canola seed samples (cultivar Ahmadi) produced in the Alborz province

نشانه مشکوک Symptoms	با ضدعفونی سطحی Surface disinfection	بدون ضدعفونی سطحی Without surface treatment
چروکیده Wrinkle	*-	**1:20 <i>Alternaria</i> , 1:20 <i>Rhizopus</i>
ترک سطح بذری Crack	-	18:20 <i>Rhizopus</i>
اندام ریشه مانند Hyphal shape particle	-	17:20 <i>Rhizopus</i>
اووز Ooze	12:20 <i>Aspergillus</i>	3:20 <i>Aspergillus</i> 10:20 <i>Rhizopus</i>
لکه های تیره Black spots	-	-

* سالم یا کلنی غیر قارچی ** اعداد نسبت بوده و فاقد واحد هستند.

Healthy or non fungal colony *

جدول ۲- جمعیت قارچ های مشاهده شده بر روی نمونه های بذری کلزا رقم لیکورد تولید شده در استان مرکزی

Table .2: Fungal population on canola seed samples (cultivar Likord) produced in the Markazi province

نشانه مشکوک Symptoms	با ضدعفونی سطحی Surface disinfection	بدون ضدعفونی سطحی Without surface treatment
چروکیده Wrinkle	12:20 <i>Aspergillus</i> 1:20 <i>Penicillium</i>	**4:20 <i>Alternaria</i> , 11:20 <i>Aspergillus</i> 3:20 <i>Penicillium</i>
ترک سطح بذری Crack	15:20 <i>Aspergillus</i> 4:20 <i>Penicillium</i>	4:20 <i>Alternaria</i> , 15:20 <i>Aspergillus</i> 1:20 <i>Penicillium</i>
اندام ریشه مانند Hyphal shape particle	10:20 <i>Aspergillus</i>	14:20 <i>Rhizopus</i> 6:20 <i>Aspergillus</i>
اووز Ooze	1:20 <i>Alternaria</i> , 17:20 <i>Aspergillus</i> 2:20 <i>Penicillium</i>	20:20 <i>Aspergillus</i>
لکه های تیره Black spots	15:20 <i>Aspergillus</i> 5:20 <i>Rhizopus</i>	2:20 <i>Alternaria</i> , 15:20 <i>Aspergillus</i> 2:20 <i>Penicillium</i>

Numbers are rates.

** اعداد نسبت بوده و فاقد واحد هستند.

جدول ۳- جمعیت قارچ های مشاهده شده بر روی نمونه های بذری کلزا رقم اوپرا تولید شده در استان کرمانشاه

Table .3: Fungal population on canola seed samples (cultivar Opera) produced in the Kermanshah province

نشانه مشکوک Symptoms	با ضد عفونی سطحی Surface disinfection	بدون ضد عفونی سطحی Without surface treatment
چروکیده Wrinkle	-*	**5:20 <i>Aspergillus</i>
ترک سطح بذر Crack	16:20 <i>Aspergillus</i>	6:20 <i>Rhizopus</i> 11:20 <i>Aspergillus</i> 3:20 <i>Penicillium</i>
اندام ریشه مانند Hyphal shape particle	20:20 <i>Rhizopus</i>	9:20 <i>Rhizopus</i> 11:20 <i>Aspergillus</i>
اووز Ooze	20:20 <i>Rhizopus</i>	2:20 <i>Alternaria</i> , 1:20 <i>Aspergillus</i> 1:20 <i>Penicillium</i>
لکه های تیره Black spots	-	16:20 <i>Rhizopus</i> 10:20 <i>Rhizopus</i> 10:20 <i>Aspergillus</i>

* سالم یا کلنی غیر قارچی ** اعداد نسبت بوده و فاقد واحد هستند. Numbers are rates.

* Healthy or non fungal colony

جدول ۴- جمعیت قارچ های مشاهده شده بر روی نمونه های بذری کلزا رقم کرج ۱ تولید شده در استان البرز

Table .4: Fungal population on canola seed samples (cultivar Karaj2) produced in the Alborz province

نشانه مشکوک Syptoms	با ضد عفونی سطحی Surface disinfection	بدون ضد عفونی سطحی Without surface treatment
چروکیده Wrinkle	*6:20 <i>Aspergillus</i> 10:20 <i>Rhizopus</i>	11:20 <i>Aspergillus</i> 3:20 <i>Penicillium</i>
ترک سطح بذر Crack	6:20 <i>Rhizopus</i> 7:20 <i>Aspergillus</i>	6:20 <i>Aspergillus</i> 14:20 <i>Rhizopus</i>
اندام ریشه مانند Hyphal shape particle	16:20 <i>Aspergillus</i> 4:20 <i>Rhizopus</i>	4:20 <i>Penicillium</i> 16:20 <i>Rhizopus</i>
اووز Ooze	20:20 <i>Rhizopus</i>	13:20 <i>Aspergillus</i> 7:20 <i>Rhizopus</i>
لکه های تیره Black spots	10/20 <i>Aspergillus</i> 8/20 <i>Rhizopus</i>	20/20 <i>Aspergillus</i>

* اعداد نسبت بوده و فاقد واحد هستند. Numbers are rates.

جدول ۵- جمعیت قارچ های مشاهده شده بر روی نمونه های بذری کلزا رقم اکاپی تولید شده در استان البرز

Table .5: Fungal population on canola seed samples (cultivar Okapi) produced in the Alborz province

نشانه مشکوک Syptoms	با ضد عفونی سطحی Surface disinfection	بدون ضد عفونی سطحی Without surface treatment
چروکیده Wrinkle	20/20 <i>Aspergillus</i>	8/20 <i>Aspergillus</i> 12/20 <i>Rhizopus</i>
ترک سطح بذر Crack	20/20 <i>Aspergillus</i>	6/20 <i>Aspergillus</i> 14/20 <i>Rhizopus</i>
اندام ریشه مانند Hyphal shape particle	20/20 <i>Aspergillus</i>	9/20 <i>Aspergillus</i> 11/20 <i>Rhizopus</i>
اووز Ooze	10/20 <i>Aspergillus</i> 10/20 <i>Rhizopus</i>	5/20 <i>Aspergillus</i> 15/20 <i>Rhizopus</i>
لکه های تیره Black spots	20/20 <i>Aspergillus</i>	10/20 <i>Aspergillus</i> 10/20 <i>Rhizopus</i>

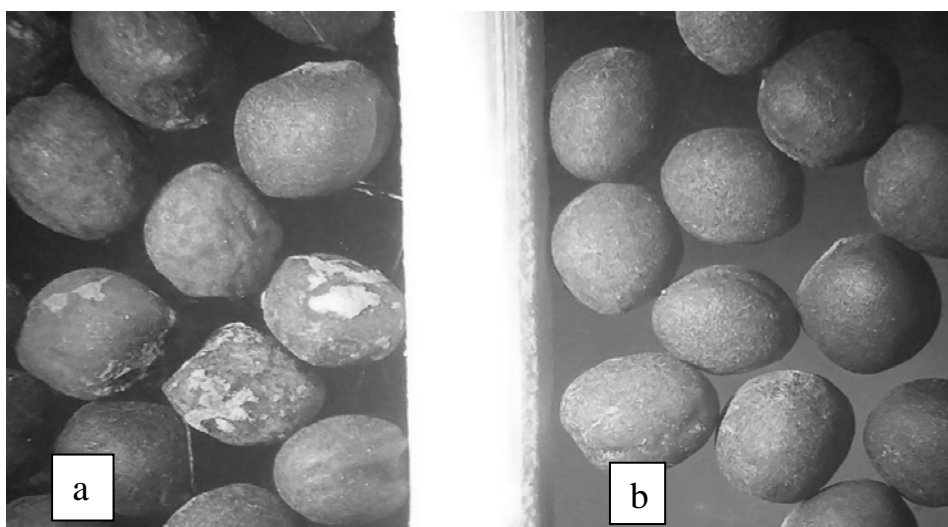
* اعداد نسبت بوده و فاقد واحد هستند. Numbers are rates.

جدول ۶- فراوانی (درصد) قارچ های مشاهده شده بر روی نمونه های بذری کلزا تولید شده در مناطق سرد کشور (۱۳۹۱)

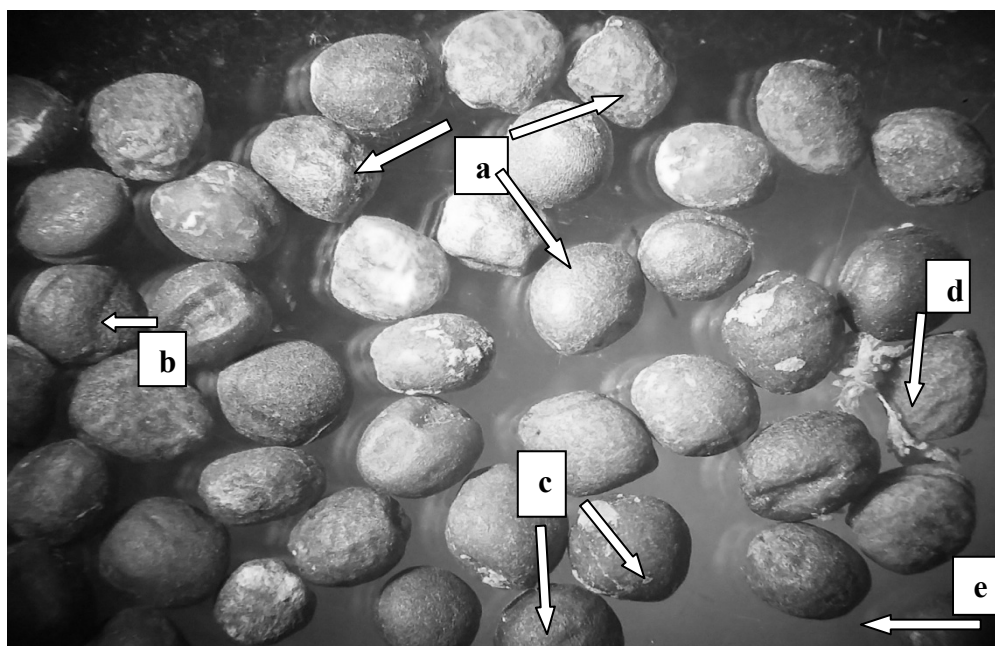
Table .6: Percentage of observed fungi on canola seed samples in cold regions (2012)

قارچ Fungus	درصد آلودگی قارچی Percent of fungal contamination									
	با ضد عفونی سطحی/ارقام Surface disinfection/Cultivars					بدون ضد عفونی سطحی/ارقام Without surface treatment/Cultivars				
	لیکورد Likord	کرج ۱ Karaj1	اوپرا Opera	اکاپی Okapi	احمدی Ahmadi	لیکورد Likord	کرج ۱ Karaj1	اوپرا Opera	اکاپی Okapi	احمدی Ahmadi
<i>Alternaria</i>	1	-*	-	-	-	10	-	2	-	1
<i>Rhizopus</i>	5	48	40	10	-	14	37	41	62	46
<i>Penicillium</i>	7	-	-	-	-	6	7	4	-	-
<i>Aspergillus</i>	69	39	16	90	12	67	50	38	38	3

* سالم یا کلنی غیر قارچی Healthy or non fungal colony



شکل ۱- بذر های کلزا به شکل های غیر طبیعی (a) و طبیعی (b) جداسازی شده از نمونه های بذری مناطق سرد
Figure 1- Canola seeds with abnormal (a) and normal (b) appearances separated from cold area seeds



شکل ۲- نشانه های چروکیدگی (a)، ترک سطح بذر (b)، اندام های ریشه مانند (c)، اووز (d) و لکه های فرورفته تیره (e) در بذرهای غیر طبیعی کلزا.

Figure 2- symptoms of seed wrinkle (a), seed cracks (b), hyphal shape particles (c), ooze (d), and black spots on abnormal canola seeds.

کلیه همکارانی که به نحوی در انجام این تحقیق ما را یاری دادند تشکر و قدردانی می گردد.

سپاسگزاری

این تحقیق با پشتیبانی مالی معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج انجام گردیده که بدینوسیله از مسئولین محترم آن دانشگاه و

References

- Afshari Azad, H. 2001. The major diseases of canola. AREO Publ.99 p. (In Persian).
Afshari Azad, H., S.R. Dalili, M. Salati and M.A. Amini Khalaf. 2008. Distribution of canola blackleg disease in Iran. Proc. 18th Iranian. Plant Protec. Congr., Hamedan, Iran. 199(Abst.).

منابع

- Aghajani, M.A. 2008.** Sclerotinia stem rot of Canola. Agricultural and Natural Resources Research Center of Golestan. Tech. J. 44, 36 p. (In Persian).
- Alizadeh, B., H. Amiri Oghan, A.H. Shirani Rad and S. Rahmanpour. 2015.** Canola Ann. Hand. SPII, Karaj, Iran. 43p. (In Persian).
- Aneja J.K. and A. Agnihotri. 2013.** Alternaria blight of oilseed brassicas: epidemiology and disease control strategies with special reference to use of biotechnological approaches for attaining host resistance. J. Oil. Brass. 2013 4(1): 1-10.
- Bansal V K, S.G. Seguin, G.F.W. Rakow and G.A. Petric. 1990.** Reaction of *Brassica* species to infection by *Alternaria brassicae*. Can. J. Plant Sci. 70: 1159-1162.
- Barnett, H.L. and B.B. Hunter. 1972.** Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Burgess Pub. Co., Minneapolis, Minnesota. 241pp.
- Basirnia, T. 2011.** Study on canola seed mycoflora in Fars province. Plant Dis. Res.1: 47-56. (In Persian with English abstract)
- Boland, G.J. and R. Hall. 1994.** Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. Can. J. Plant Pathol. 16:93-108.
- Bradley, C.A., R.A. Henson, P.M. Porter, D.G. LeGare, L.E. del Río, and S.D. Khot. 2006.** Response of canola cultivars to *Sclerotinia sclerotiorum* in controlled and field environments. Plant Dis. 90:215-219.
- Copeland, L.O. and M.B. McDonald. 2014.** Principles of Seed Science and Technology. (Trans. F. Akram Ghaderi, B. Kamkar and A. Soltani). JDN Press. Mashad Univ., Mashad, Iran. (In Persian).
- ISTA. 1996.** Seed Sci. and Technol. 21(Suppl.): 1B288.
- Kaczmarek, J. and M. Jędrzycka. 2011.** Characterization of two coexisting pathogen populations of *Leptosphaeria* spp., the cause of stem canker of brassicas. Acta Agrobot. 64(2): 3-14.
- Kharbanda P.D, B.D.L. Fitt, R.M. Lange, J.S. West, A.H. Lamey and D.V. Phillips. 2001.** Common names of plant diseases: Diseases of rapeseed = Canola (*B. napus* L. and *Brassica rapa* L. (= *B. campestris* L.)) [Online] Available at <http://www.apsnet.org/online/common/names/rapeseed.asp>.
- Kimber, D.S. and D.I. McGreogor. 2004.** Oilseed rape: Physiology, Agronomy, Breeding, Biotechnology. (Trans. M. Azizi, A. Soltani and S. Khavari Khorasani). JDN Press. Mashad Univ., Mashad, Iran. (In Persian).
- Lamey, H. A. 1995.** Survey of blackleg and sclerotinia stem rot of canola in North Dakota in 1991 and 1993. Plant Dis. 79(3): 322-324.
- Montemuro, N., and A. Visconti. 1992.** *Alternaria* metabolites chemical and biological data. P. 449-557. In Y. Chelkowski and A. Visconti (eds). *Alternaria: Biology, Plant Disease and Metabolites*. Amsterdam: Elsevier.
- Morrall, R.A.A., J. Dueck and P.R. Verma. 1984.** Yield losses due to *Sclerotinia* stem rot in western Canadian rapeseed. (Abstr.) Can. J. Plant Pathol. 6:265.
- Nepal, A., S. Markell, J. Knodel, C.A. Bradley and L.E. del Río Mendoza. 2014.** Prevalence of blackleg and pathogenicity groups of *Leptosphaeria maculans* in North Dakota. Plant Dis. 98:328-335.
- Pasban Eslam, B. 2011.** Seed Science and Technology. Parivar Press. Tabriz, Iran (In Persian).
- Rahmanpour, S. 2003.** Evaluation of resistance of canola lines and cultivars to stem rot caused by *Sclerotinia sclerotiorum* under controlled condition. Final report of research project. SPII. (In Persian).
- Rahmanpour, S. 2008.** Studies on the role of the glucosinolate-myrosinase system in resistance of oilseed rape to *Sclerotinia sclerotiorum*. Ph.D. Thesis. Univ. of New England, Armidale, NSW, Australia.
- Rahmanpour, S. and H. Amiri-Oghan. 2008.** Identification and management of Canola diseases. Agric. Educ. Publ. 182 p. Karaj, Iran (In Persian).
- Silvana D.M. and L.M.V. Skares, 2000.** A method for the determination of two *Alternaria* toxin, Alternariol and Alternariol monomethyl ether, in tomato products. Braz. J. Microbiol. 31: 315-320.
- Szopinska, D., K. Tylkowska and A. Stach, 2007.** Relationship between seed development stage, germination, occurrence and location of fungi Oilseed Rap (*Brassica napus*spp. Oleiferal.) seeds and the presence of *Alternaria* and *Cladosporium* spp. Spores in the air. Elec. J. Polish Agric. Univ. 10: 4-19.
- Vinas, I., J. Palma, S. Garza and A. Visconti. 1994.** Natural occurrence of aflatoxin and *Alternaria* mycotoxin in oilseed rape from Catalonia (Spain)- incidence of toxigenic strain. Mycopathol. 128:175-179.
- Williams, P.H., 1980.** Blackleg, a fellow traveler. Plant Dis 64(8): 736-742.
- Zhang, X., R.P. White, E. Demir, M. Jedryczka, R.M. Lange, M. Islam, Z.Q. Li, Y.J. Huang, A. M. Hall, G. Zhou, Z. Wang, X. Cai, P. Skelsey and B.D.L. Fitt. 2014.** *Leptosphaeria* spp., phoma stem canker and potential spread of *L. maculans* on oilseed rape crops in China. Plant Pathol. 63:598-612.