نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۱، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۶، ص. ۳۱۱-۲۹۶

Journal of Plant Protection
Vol. 31, No. 2, Summer 2017, P. 296-311

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

زهرا وکیلی زارج[۱] - کامران رهنما [۲*]- سعید نصراله نژاد[۳] - احد یامچی[٤]

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 محیط‌کشت 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 پلیمراز در ناحیه‌ی فاصله‌ی ترانویسی 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 و PG-4در 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 می شود. نتایج پیشنهاد می‌کند که جدایه *L. maculans* (PG-4) به عنوان گروه پر آزار و با توجه به تغییرگروه بیماری‌زایی PG-2 به PG-3 و PG-4 نسبت به سال‌های قبل، تهدید مهمی برای صنعت کشت کلزا در شمال ایران می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آغازگر اختصاصی، ریخت‌شناسی، گروه‌های بیماری‌زایی

مقدمه

کلزا[۵] محصول روغنی بسیار مهم اقتصادی در بیشتر کشورها از جمله کانادا، چین، ایران، آلمان و آمریکا است. ساق سیاه[۶] یا شانکر ساقه (anamorph= *Plenodomus lingam*) (Desm.) Ces. & De Not *Leptosphaeria maculans* 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 ایجادکرده است (۲۹ و ۳۰). شیوع آن در استرالیا مربوط به ۸۵ سال، در اروپا ۶۵ سال، ۲۵ سال درکانادا و در 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 ۱۹۷۰در استرالیا و در سال ۱۹۹۳ درانگلستان 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 اسکلروتینیایی 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 شانکرساقه کلزا در طی۲۰ سال گذشته رو به افزایش بوده و انتشار گسترده آن توسط بذور، بقایا و پراکندگی مسافت کوتاه آن توسط هاگ های جنسی بنام آسکوسپورهای هوازاد صورت می‌گیرد (۴ و ۸). عامل بیماری می‌تواند در بذور کلزا به صورت میسلیوم و یا پیکنیدیوم یافت شود و علائم اولیه از آلودگی بذرزاد پس از کشت در

۱، ۲ و ۳- به‌ترتیب 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

مزرعه روی برگ‌های اولیه[1] 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 می شود که این دو تیپ بر اساس خصوصیات مولکولی، بیوشیمیایی، ریخت شناسی، سرعت رشد پرگنه و تولید رنگدانه در محیط کشت، علایم برگی، ساقه و آزمون برگ‌های اولیه روی ارقام افتراقی قابل تفکیک می‌شوند (۷ و ۲۹). جدایه های بیماری‌زا *L. maculans* دارای رشد کندتری نسبت به جدایه های 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 حالی‌که 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[2]، بدون توکسین و با توکسین[3]، بیماری‌زایی بالا و بیماری‌زایی ضعیف[4]، گروه A و B، مهاجم و غیر مهاجم[5] معرفی شده است (۱۱، ۱۵، ۲۸ و ۳۱). در بین روش‌های ریخت شناسی، فیزیولوژی، بیوشیمیایی، ژنتیک و مارکرهای مولکولی برای تفکیک این دو گروه، اختلاف دربیماری‌زایی بیشتر استفاده شده‌اند و جمعیت بیمارگر در گروه‌های بیماری‌زایی[6] مشخص می‌شوند (۳، ۱۳، ۱۴، ۱۸ و ۲۳).

آزمون‌های بیماری‌زایی بر اساس واکنش فنوتپی در تعیین گروه‌های بیماری‌زایی روی تعداد محدودی از ارقام افتراقی مفید است وگوناگونی در بیماری‌زایی جدایه‌ها بر روی ارقام افتراقی در تشخیص 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، کوینتا و گلاسیر[7] *B. napus* مورد بررسی قرار گرفته است و گروه *L. maculans* A درتشخیص گروه بیماری‌زایی در چهار گروه PG-2, PG-3, PG-4, PGT قرار گرفته‌اند (۱۸ و ۲۳) و جدایه‌های متعلق به گروه بیماری‌زایی PG-1 (گروه B) به عنوان گونه مستقل *Leptosphaeria biglobosa* R.A.Shoemaker & H.Brun معرفی شده است (۲۴). وجود این دو گونه با خصوصیات ریخت‌شناسی، رشد ریسه و تولید رنگدانه در محیط‌کشت، تعیین بیماری‌زایی و تفکیک پاتوتیپ‌ها (۱۴، ۱۵ و ۳۱) و واکنش زنجیره‌ایی پلیمراز[8] 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 وفیت (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 فصل های 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 اندام های گیاهی کلزای آلوده (برگ،

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

ساقه و بقایا) از شمال ایران درطی سال زراعی۹۳ -۱۳۹۲ از نظر ریخت‌شناسی و فیزیولوژی بررسی شدند. به منظور بررسی و شناسایی وجود مرحله جنسی نیز از بقایای مزارع مختلف استان گلستان نمونه‌برداری شدند. از آنجایی‌که از نظر ژنتیکی تعیین گونه همه جدایه‌ها در گذشته تاکنون در کشور از طریق توالی نوکلئوتیدی و مولکولی انجام نشده بود ضرورت دارد با استفاده از آغازگرها تعیین تیپ بیماری‌زایی و گونه آنها مشخص گردد. با توجه به اهمیت آزمون بیماری‌زایی برای ارزیابی گوناگونی جدایه‌ها در جمعیت *L. maculans*، تعیین گروه‌های بیماری‌زایی جدایه‌های انتخابی انجام و با بررسی‌های سال۲۰۰۷ و ۲۰۰۹ که در رابطه با گروه‌های بیماری-زایی غالب در آن سال‌ها می‌باشد مورد مقایسه قرارگرفت، تا تفاوت گروه بیماری‌زایی 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 درمورد بیمارگر ساق سیاه کلزا این بررسی ضروری است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری جدایه‌های قارچ: نمونه برداری از مزارع مختلف استان گلستان و نیز از مزارع شرق مازندران در طی سال ۹۳-۱۳۹۲ انجام گردید. نمونه‌برداری‌ها از مراحل مختلف رشد گیاه از مرحله برگ‌های اولیه تا مرحله رزت و در یک نوبت دیگر از مرحله ساقه‌دهی 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 می‌باشد، نیز نمونه برداری انجام شد. نمونه‌ها 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 قرارگرفتند.

جداسازی از برگ وساقه: ابتدا نمونه‌های آلوده با آب شیر شستشو داده شده و بخش‌های آلوده از برگ‌ها و ساقه‌های دارای علایم (لکه‌های خاکستری یا زرد قهوه‌ایی واغلب حاوی پیکنیدیوم) جدا شدند. ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به مدت دو دقیقه برای برگ‌های دارای علایم و با هیپو کلریت سدیم ۱۰ درصد به مدت سه تا پنج دقیقه برای ساقه‌ها انجام شده وپس از شستشو سه بار با آب مقطر استریل در محیط کشت ۱/۴ سیب زمینی دکستروز آگار[1]و محیط کشت آب آگار[2] دارای کلرامفنیکل[3] ۰/۰۳٪ کشت داده شدند و در دمای C° ۳ ±۱۸ در تاریکی قرار گرفتند. بعد از حدود ۱۰-۸ روز میسلیوم های رشد کرده اطراف برگ و ساقه آلوده به محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار منتقل و در دما C° ۲ ±۲۰ قرار گرفتند تا مورد بررسی قرار گیرند (۲۵ و ۳۲).

جداسازی قارچ از بقایای کلزا: از قطعات گیاهی ضدعفونی 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 C°۲۰ نگهداری شد و پس از این مدت حدود ۲ میلی‌لیتر 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 از۱۰ روز نگهداری در دمای C°۲۰، برای ارزیابی ریخت‌شناسی، مولکولی و بیماری‌زایی استفاده شدند (۱۶).

مشخصات ریخت‌شناسی: قطعات کوچکی به قطر پنج میلی متر از جدایه‌های قارچ به محیط کشت PDA حاوی کلرامفنیکل منتقل شدند و پس از نگهداری در دمای C° ۲۰ مدت ۷ روز از نظرمیزان رشد مورد بررسی و پس از حدود سه هفته از نظر نحوه رشد، تولید پیکنیدیوم و رنگدانه در آنها ارزیابی شدند. میانگین رشد میسلیومی جدایه‌ها از طریق آزمون LSD و با استفاده از نرم‌افزارهای Exel 2007 و R (R 3.3.3) مقایسه شدند (۲).

بررسی تشکیل رنگدانه: علاوه بربررسی‌های ریخت‌شناسی در محیط کشت جامد جهت آزمون تولید رنگدانه و به دنبال آن تشکیل پیکنیدیوم به منظور استفاده از آن جهت آزمون بیماری‌زایی از محیط کشت مایع سیب زمینی دکستروز[4] استفاده شده است. قرص‌های۶ میلی‌متری از جدایه‌های مختلف قارچ *L. maculans* به ارلن‌های ۱۰۰ میلی لیتری حاوی محیط کشت مایع منتقل و در شرایط تاریکی در دما C° ۱۸ 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. به‌طوری‌که گروه یک نشان‌دهنده عدم تشکیل رنگدانه، گروه دوم تشکیل رنگدانه کم زرد-خاکستری، گروه سوم وچهارم تشکیل رنگدانه بین زردنارنجی و قهوه‌ای، گروه پنج و شش مربوط به جدایه‌های با تشکیل رنگدانه زیاد بین قهوای تا سیاه بودند.

استخراج DNA: یک قطعه به قطر دو میلیمتری از حاشیه پرگنه‌های پنج روزه هر جدایه روی محیط سیب زمینی دکستروز آگار به ارلن‌های حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط مایع سیب زمینی دکستروز منتقل شد. ارلن‌ها در دما C° ۱۸ به مدت ۷۲ ساعت روی شیکر قرار

1- Quarter Potato dextrose agar (QPDA)
2- Distilled Water agar (DWA)
3- Chloramphenicol
4- Potato Dextrose Broth (PDB)

داده شدند. توده‌های میسلیومی تشکیل شده از پارچه ململ سترون عبور داده و با آب مقطر سترون شسته شدند. استخراج DNA طبق روش موری و تامپسون (۲۱) انجام شد. کیفیت DNAنمونه‌ها با استفاده از ژل آگارز یک درصد (Merck; Germany) درون دستگاه الکتروفورز افقی شرکت Bio Radبررسی و حضور تک باند شفاف با وزن مولکولی بالا، نشانه DNA مطلوب و مناسب‌تر تلقی شدند.

روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR): به‌منظور بررسی تعیین گونه قارچی موردنظر از آغازگر اختصاصی گونه استفاده گردید (۱۷) (جدول۱). تکثیر DNA در واکنش ۲۰ میکرولیتری با آنزیم Taq polymerase (Genet Bio; Corea) شامل: دو میکرولیتر PCR Buffer10X، MgCl2 با غلظت ۲/۵ میلی‌مولار، dNTP با غلظت۰/۲ میلی‌مولار،۱۰pmol آغازگر LmacF/LmacR، ۳۰ نانوگرم DNA ژنومی و۱۴/۷میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر استریل و یک واحد آنزیم تک‌پلی‌مراز (Bioscience Jena) در دستگاه ترموسایکلر شرکت اپندورف[1] و یا مدل LTD شرکت Coastec ژاپن طبق برنامه حرارتی مرحله اول واسرشته سازی اولیه C° ۹۵ به مدت ۲ دقیقه و در مرحله دوم ۳۵چرخه به صورت واسرشته سازی در دمای C° ۹۵ به مدت ۳۰ ثانیه و به دنبال آن مرحله اتصال آغازگر در دمایC° ۷۲ به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله بسط در دمایC° ۷۲ به مدت ۱ دقیقه و یک چرخه نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمایC° ۷۲ صورت گرفت. محصول PCR بر روی ژل آگارز ۲ درصد منتقل و الکتروفورز با ولتاژ ثابت ۱۰۰ ولت انجام شد. نهایتا ژل در دستگاه ژل خوان[2] برای عکسبرداری به کمک نورUV قرار داده شد.

تعیین توالی: ناحیه ژنومی ITS-rRNA جدایه‌های بیمارگر در واکنش زنجیره‌ایی پلیمراز با استفاده از آغازگرهایLmacF و LmacR تکثیر گردید. پس از الکتروفورز قطعات حاصل از توالی 5.8S rRNA، ITS1و ITS2از ژنوم *L. maculans* به منظور تعیین توالی به شرکت Bioneerکره جنوبی ارسال گردید. و به منظور تایید *L. maculans* با جدایه‌های موجود در ژن بانک[3] مقایسه و سپس ثبت شدند.

شناسایی گروه بیماری‌زایی با استفاده از آغازگر اختصاصی تیپ: به منظور بررسی گروه بیماری‌زایی و تعیین تیپ جدایه‌های بیمارگر از آغازگر اختصاصی تیپ (جدول ۱ آغازگرهای گروه Aو B) استفاده شدند. همه جدایه‌های قارچ (ساقه، برگ و بقایا) با استفاده از پی‌سی‌آر در واکنش ۲۰ میکرو لیتری که در قسمت شناسایی گونه ذکر شد، تعیین تیپ شدند. برنامه زمانی پی‌سی‌آر به‌صورت زیر تنظیم گردید: واسرشت سازی اولیه در دما C°۹۴ به مدت ۲ دقیقه و به‌دنبال آن ۳۰ سیکل شامل: واسرشت سازی در دما C° ۹۴ به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای C° ۵۵ جهت آغازگر گروه Aو C° ۶۰ جهت آغازگر گروهB به مدت دو دقیقه، بسط رشته در دما C°۷۲ به مدت سه دقیقه و در نهایت بسط پایانی رشته در دماC°۷۲ به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. الکتروفورز بر روی ژل آگارز 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 فرنانـدو (۳) تهیه شده و یا در روش دیگر از پیکنیدیوم‌های حاصل از محیط کشت مایع ساکاروز کازین[4] (۱۲) ویا محیط مایع PDB استفاده شده است. غلظت اسپور (۲×۱۰^{۷}) با لام هموسیتومتر برای هر جدایه تعیین و در صورت نیاز رقیق می شود (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° ۲ ±۲۲ 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) از۰ 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 ریخت شناسی و مولکولی تقریبا ۷۲ جدایه در جدول ۲ آمده است. نتایج حاصل از تجزیه واریانس متوسط رشد میسلیومی جدایه‌ها بعد ازگذشت 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 جدایهEsf1 (۱/۲۶) دارای کمترین رشد میسلیومی پس از ۷ روز و جدایه‌های Nod1، Sh1، MAD1، M1، B1، Glo2Aو A3 (۳ سانتی‌متر) دارای بیشترین رشد بودند (F=4.351) (جدول ۲) .از نظر ریخت‌شناسی پرگنه و نحوه تشکیل پیکنیدیوم در محیط کشت PDA

1- Eppendorf; Germany
2- Gel Document
3- NCBI (National center for Biotechnology Information)

4- Sucrose casein salt

و تشکیل رنگدانه در محیط مایع تنوع زیادی مشاهده شد. جدایه‌های بیماری‌زا دارای رشد کند و پرگنه‌ها دارای حاشیه نامنظم، میسلیوم به صورت متراکم با تعداد زیاد پیکنیدیوم در محیط کشت PDA و بعد از نهایت ۲۱ روز رشد پرگنه‌ها متوقف شده وبه 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)
Leptosphaeria maculans (Lmac) *L. biglobosa* (Lbig)			
LmacF	5`-CTTGCCCACCAATTGGATCCCCTA-3`	لیو و همکاران (17)Liu et al	334bp
LmacR	5`-GCAAAATGTGCTGCGCTCCAGG-3`		
LbigF	5`-ATCAGGGGATTGGTGCGCTCCAGG-3`		444bp
LbigR	5`-GCAAAATGTGCTGCGCTCCAGG-3`		
LMR1 (group A)	5'-GCGTAAGAAGCGTGCCTTAGAGTC-3´ 5´-TCCTGCTCCTACTCCTTCTCTAGC-3´	کاسک و همکاران (15) Kussk et al	580bp
APH12 (group B)	5'-CCCAGTGCAGCTTCCAG-3´ 5´-CATAGCAAGTGTGCATCG-3´		2000bp

F: پیشرو، R: پسرو. F: forward, R: reverse, bp: base pair

رنگ پرگنه بعد از حدود یک ماه از سفید، خاکستری تا قهوه‌ایی 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 ساقه های بجا مانده مزارع کلزا مورد بررسی از نواحی مختلف منطقه توشن گرگان (جدایه Ash1A) مشاهده گردید. دربررسی میکروسکوپی آسک‌ها خمیده، دو جداره و دارای ۸ اسپور بودند. آسکوسپورها دارای ۵ دیواره سلولی، بیضوی با طول ۷۵-۴۳ و با عرض ۹-۵ 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 نظرتشکیل رنگدانه جدایه‌ها در شش گروه درجه بندی شده‌اند، از بین جدایه‌ها تنها جدایه‌های Beh2 ، MA3، HA1A، Esf3، G1،Haj1A وHaj1B رنگدانه تشکیل ندادند وتعداد ۹، ۴ و ۱۲جدایه 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[1] 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 آغازگرهای تعیین تیپ (جدول ۱)، همه جدایه‌های مورد بررسی با تشکیل باند۵۸۰ جفت باز درگروه A *L. maculans* و با بیماری‌زایی بالا HV قرار گرفتند و به علت عدم تشکیل باند ۲۰۰۰جفت 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 LmacR، LmacF (جدول ۱) توالی بدست‌آمده دو جدایهHaj۱ 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 KX649997،KX792142 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 WVهمه چهار گروه PG-2، PG-3 ، PGT و PG-4 (تیپ *L. maculans* (HV = A با توجه به واکنش مقاومت (۲-۰)، حساسیت(۹-۷)، و حدواسط (۶-۳)[2] جدایه‌ها بر روی ارقام کوینتا، گلاسیر و وستار مشخص شدند (جدول ۴ و ۵). اکثر

1- Base pair

2- Susceptible, Resistant, Intermediate

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 دکستروزآگار [a] Growth rate on PDA	تشکیل رنگدانه در محیط مایع [c] Pigment formation in liquid culture	PCR[d] LmacR/LmacF	Group A
1	MA1	گرگان- محمود آباد Gorgan-Mahmodabad	برگ Leaf	93/12/8	۱.۷۶ ijkl[b]	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	2.56abcdefgh	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-Esfehankalateh	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– فاضل‌آباد 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 ببین 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	برگLeaf	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	ساقهStem	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	برگLeaf	94/2/25	2.5 abcdefghijk	3	+	+
67	Tan2	گالیکش- تنگه Galikesh-Tangeh	ساقه Stem	94/2/25	1.6k l	6	+	+
68	Dah1	کلاله_ دهنه Kalaleh-Dahaneh	برگLeaf	94/1/14	2.18 bcdefghijk	5	+	+
69	Dah2	کلاله- دهنه Kalaleh-dahaneh	ساقه Stem	94/3/10	2.9ab	۴	+	+
70	Pish3A	کلاله- پیشکمر Kalaleh-Pishkamar	برگ Leaf	94/1/14	2.1 cdefghijk	4	+	+
71	Pish3B	کلاله- پیشکمر Kalaleh-Pishkamar	ساقه Stem	94/3/10	2.26 abcdefghijk	nt	+	+
72	Fr	کلاله- فراغی Kalaleh- Feragi	برگ Leaf	94/1/14	2.2 bcdefghijk	nt	+	+

a) رشد میسلیومی بعد از۷ روزنگهداری در محیط کشت PDA در دما ۲۰ °C و 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 وچهارم تشکیل رنگدانه بین زردنارنجی و قهوه‌ایی، ۵ و ۶- گروه پنج و شش مربوط به جدایه‌های با تشکیل رنگدانه زیاد بین قهوایی تا سیاه می‌باشند، d)واکنش با جفت آغازگر اختصاصی (LmacF/ LmacR) و اندازه باند موردنظر ۳۳۴جفت باز، واکنش با جفت آغازگر تعیین تیپ (گروه A) و اندازه باند مورد نظر۵۸۰ جفت باز قابل مشاهده روی ژل آگارز+ ، آزمایش نشده :nt.

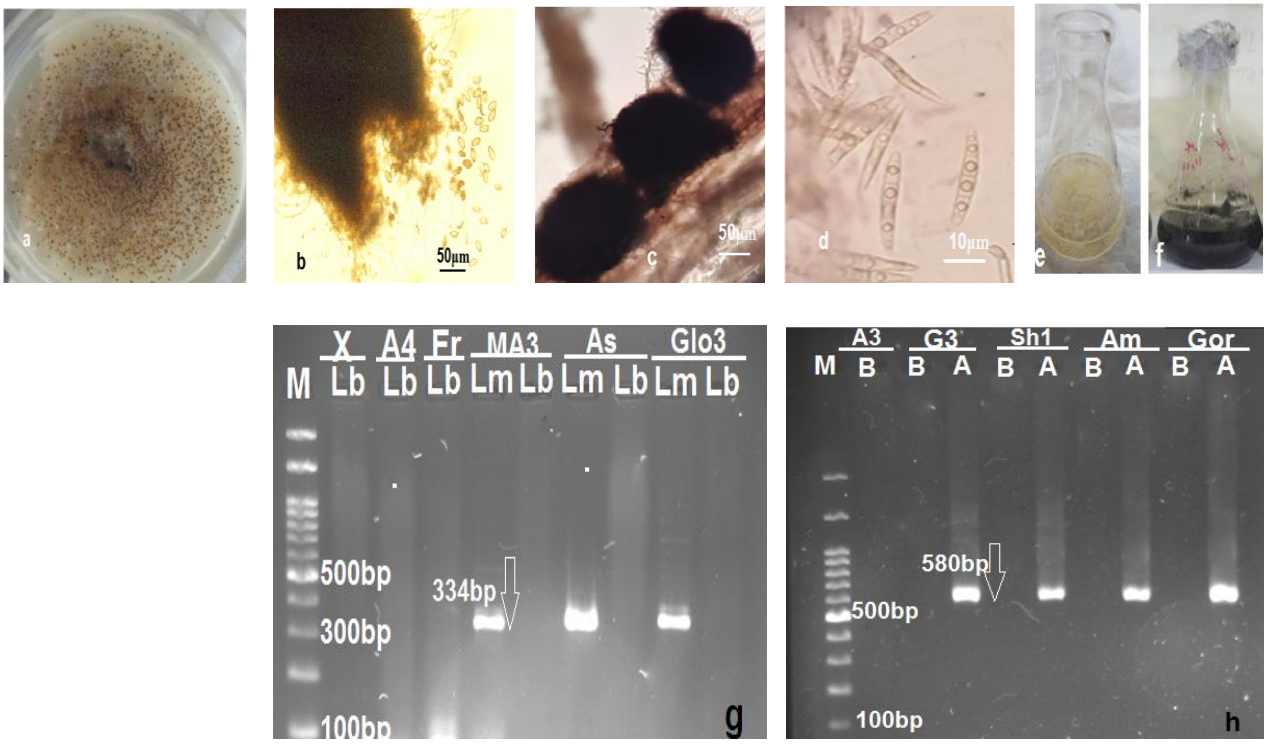
a) Mycelial growth rate was measured for 7 days at 22°C in dark, b) Means within the same column followed by the same letter are not significantly different according to Least Significant Difference, c) pigment formation and a score of 6 groups according to Voigt et al (26) 1. for no pigmentation, 2. 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 ریسه‌ای 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	Sum مجموع مربعات square	درجه آزادی Freedom degree	میانگین مربعات Average square	F. Value
جدایه Isolate	39/521	72	o/549	4/351**
خطا Erorr	18/041	143	0/126	
کل Total	57/561	215		

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



شکل ۱- مشخصات ریخت شناسی*Leptosphaeria maculans* . a,b) پرگنه، پیکنیدیوم و خروج اسپورهای تک سلولی به ترتیب. c,d) پریتسیوم و آسکوسپورهای هوازاد*Leptosphaeria maculans* به ترتیب. e,f) عدم تشکیل رنگدانه جدایه Haj1A(گروه۱)، تشکیل رنگدانه جدایه Bim1 (گروه ٦) در محیط کشت مایع PDB در دما ۱۸ °C به ترتیب. g) واکنش جدایه‌ها با جفت آغازگر اختصاصی Lm (LmacR, LmacF) و تشکیل باند ۳۳٤ جفت بازو عدم تشکیل باند ٤٤٤ جفت باز با جفت آغازگر اختصاصی Lb (LbigF, LbigR) . h) واکنش جدایه‌ها با جفت آغازگر اختصاصی گروه A و تشکیل باند ٦۰۰-۵۸۰ جفت باز و عدم تشکیل باند ۲۰۰۰-۱۹۰۰جفت باز با جفت آغازگر اختصاصی گروه B، M.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 formination 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.

جدایه‌ها (Glo2A، A4) در گروه PG-3 روی ارقام وستار و گلاسیر اسپور می‌دهند وایجاد زخم‌های قهوه‌ای و بدون اسپور روی رقم کوینتا می‌کنند. جدایه‌ها (MAD1، Pish3A، G3) در گروه بیماری‌زایی PG-2 روی رقم وستار دارای توانایی به اسپورزایی بوده ودارای واکنش متغیر بر روی رقم کوینتا و این جدایه‌ها روی رقم گلاسیربدون ایجاد علائم می‌باشند و گروهPGT روی رقم گلاسیر دارای واکنش حدواسط می‌باشد (شکل۲). به‌طور کلی رقم وستار حساس به جدایه‌های PG-2، PG-3،PG-4 و PGT، رقم گلاسیر مقاوم به جدایه PG-2 ولی حساس به جدایه PG-3 و PG-4و واکنش حدواسط به جدایهPGT دارند، رقم کوینتا حساس به جدایه PGT و PG-4ولی واکنش حدواسط به جدایه PG-2وPG-3 دارند (جدول ۶).

با توجه به اینکه یکی از روش‌های تفکیک تیپ‌های Aو B بر اساس تشکیل یا عدم تشکیل رنگدانه بوده به طوری‌که تیپB قادر به تشکیل رنگدانه زرد تا قهوه‌ایی 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 Aقرار گرفتند اکثریت آنها توانایی تشکیل رنگدانه را داشتندکه 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 قرمز قهوه‌ای در محلول زاپک دکستروز بودند، جدایه‌های گروه A نیز رنگدانه زرد تا قهوه‌ای راتشکیل دادند. با توجه به اینکه حتی انتخاب محیط کشت تاثیر روی مشخصات ظاهری جدایه‌های مورد آزمایش داشته به طوری‌که تعدادی جدایه‌ها در محیط مایع PDB تشکیل رنگدانه نموده، ولی در محیط مایع کازئین سوکروز قادر به تشکیل رنگدانه

نبودند، بررسی‌ها نیز نشان دادکه در بررسی جدایه‌های *L. maculans* تعدادی جدایه‌ها در محیط آگار قادر به تشکیل رنگدانه ولی در محیط V8این توانایی را نداشتند و حتی اسیدیته این محیط در رشد شعاعی نیز تاثیرگذار بوده است (۳۱).بنابرین 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 بدین‌جهت 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).

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 طورکلی ارتباطی بین گروه بیماری‌زایی و موقعیت جغرافیایی جدایه‌ها وجود نداشت که تایید آن در نتایج تحقیق مهاکا و همکاران (۱۸)، کن و فرناندو (۳) و رونگ و همکاران (۲۳) مشخص شده است.

با توجه به این‌که گروه بیماری‌زایی جدایه‌های حاصل از قسمت-های آلوده گیاه در طی بررسی در سال ۹۴-۱۳۹۳متفاوت از گروه بیماری‌زایی گزارش شده در در سال‌های گذشته (۲۰۰۷و ۲۰۰۹) است (۶ و ۱۹). به طوری‌که 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(*L. biglobosa*)PG-1 نبودند.

جدول ٤- 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 ۳میلی‌متر) 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 ٥- 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 ٦- واکنش ارقام افتراقی با جدایه‌های انتخابی‌وتعیین گروه‌های بیماری‌زایی

Table ٦- Cotyledon reaction of differential cultivars with selected *Leptosphaeria maculans* isolates and detection of pathogenicity groups.

ردیف Row	مکان جغرافیایی Geographic location	نام جدایه ها Isolates	گلاسیر 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- هاشم آباد 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	علی آباد 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	کلاله- 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).

بنابراین احتمال تغییر گروه بیماری‌زایی طی سال‌های متوالی قابل پیش بینی است، به‌طوری‌که در مقایسه با بررسی‌های سال های 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 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 احتمالا به علت عدم رعایت مسائل قرنطینه‌ای واردات بذرهای کلزا، احتمال

ورود تیپ پر آزارتر (PG3 و PG-4) و در نتیجه تغییر درگروه بیماری- زایی ایجاد شده است.

شکل ۲- واکنش فنوتیپی روی کوتیلدون*Brassica napus* ۱۲ روز بعد از تلقیح با جدایه‌های گوناگون. a) جدایه PG-2روی رقم گلاسیر (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 گلاسیر (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.

در این راستا با پراکنش گونه *L. maculans* در مناطقی که قبلا 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). به‌طوری‌که 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 ازاستان 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 نیزاین شرایط وجود دارد (۲۹).

از سوی دیگر در بررسی‌های کن و همکاران (۴) نیز خطر پراکنش *L. maculans* به چین و سایر کشورهای آسیایی که قبلا تنها *L. biglobosa*وجود داشته است، از طریق بذور صادراتی از کانادا به اثبات رسیده است (۲۳ و ۳۲). بنابرین 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 نپال 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 انها بر روی سه رقم افتراقی جدایه‌های مورد بررسی متعلق به چهار گروه بیماری‌زایی PG-2، PG-3، PG-4 و PGT بودند، به طوری‌که ۵۹ درصد آنها در گروه بیماری‌زایی PG-4 و ۳۷ و ۴ درصد به ترتیب در

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

با توجه به این‌که این جدایه‌ها قبلا 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 ودر نتیجه این بیماری با شدت بیشتر به‌خصوص در ارقام حساسی چون رقم وستار آسیب‌پذیر شده است. علاوه بر آن توانایی زیاد بیمارگر در تشکیل آسکوسپور نیز در پراکنش بیماری و اپیدمیولوژی آن، نوترکیبی جنسی و در نتیجه در تغییرات ژنتیکی و گوناگونی جمعیت قارچ می‌تواند تاثیر گذار باشد، به طوری‌که تاثیر تولید مثل جنسی در گوناگونی جدایه‌ها و در نتیجه گروه‌های بیماری‌زایی آنها در مزارع کانادا توسط مهیوکیو و همکاران (۱۸) و کن و فرناندو (۳) نیز مشخص شده است (۱۶ و ۲۶).

به‌طورکلی اختلاف بیولوژیکی و اپیدمیولوژی بین جمعیت *Leptosphaeria* مربوط به برهم‌کنش جدایه‌ها به عوامل زنده (برگ، ساقه، غلاف و بقایا) و عوامل غیر زنده (عملیات کشت و آب و هوا) در طول فصل رشد می‌باشد، به‌طوری‌که 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 این‌که 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 آسکوسپورهای قارچ و توسعه بیماری تاثیر گذارست، ایجاد می‌شود. به‌طوری‌که بلوغ پسودوتسیم روی بقایا بستگی به دما و رطوبت داشته، شرایط خشک بلوغ آن را به تاخیر می‌اندازد و دما اپتیمم °C ۲۰–۱۸ 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 محیط‌کشت، ایجاد رنگدانه در محیط مایع و ایجاد بیماری بر روی گیاهان تلقیح شده مورد آزمایش °C ۲۰ بوده است (۲۵).

در این بررسی همه جدایه ها از نظر مشخصات ظاهری (تشکیل پیکنیدیوم در محیط‌کشت 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 PG3در شمال آنجا که قبلا 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 درنتیجه 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 درآینده نیز می‌باشد.

سپاسگزاری

نگارندگان از همکاری صمیمانه مسئولین محترم مرکز بین المللی تحقیقات بذور اصلاح شده اروپا در آلمان برای ارسال بذور ارقام افتراقی برای آزمایش ها تشکرمی‌نمایند.

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 18th 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 repot on the presence of phoma blackleg pathogenicity group1 (*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* GroupA 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. Identificatiom, 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 sclera-tiorum* 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., Lamge 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.