Archive of SID

" نهال و بذر"
جلد ۲۰ ، شماره ۲ ، سال ۱۳۸۳

ارزیابی مقاومت نسبی ارقام و لاین‌های کلزا به بیماری پوسیدگی اسکلروتینیایی ساقه و جداسازی عامل بیماری

Evaluation of Relative Resistance of Rapeseed Cultivars and Lines to Sclerotinia Stem Rot and Isolation of the Causal Agent

سیدعلیرضا دلیلی، سیدوحید علوی و غلامحسین عرب

مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی مازندران

تاریخ دریافت: ۸۲/۷/۱۳

چکیده

دلیلی، س. ع.، علوی، س. و.، و عرب، غ. ۱۳۸۳. ارزیابی مقاومت نسبی ارقام و لاین‌های کلزا به بیماری پوسیدگی اسکلروتینیایی ساقه و جداسازی عامل بیماری. **نهال و بذر** ۲۰: ۲۳۴-۲۲۵.

پوسیدگی‌اسکلروتینیایی ساقه‌کلزا (Sclerotinia stem rot) باعامل *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) DeBary یکی از مهم‌ترین بیماری‌های محدودکننده زراعت کلزا در شمال ایران است. استفاده از ارقام مقاوم یا متحمل به دلیل سازگاری با سایر روش‌های پیشگیری و کنترل، جایگاه ویژه‌ای در مدیریت تلفیقی این بیماری به خود اختصاص داده است. در این بررسی عکس‌العمل چهار لاین و ۲۱ رقم کلزا در شرایط آلودگی مصنوعی در قالب طرح لاتیس ساده (۵ × ۵) در ایستگاه تحقیقاتی بابع‌کلا (شهرستان نکا) ارزیابی شد. ارقام کاشته شده با استفاده از دانه‌های گندم پوشیده شده با میسلیوم قارچ عامل بیماری در مرحله گلدهی مایه‌زنی شدند. محاسبه شاخص بیماری در زمان نزدیک به برداشت بر اساس رتبه‌دهی ۱ تا ۵ انجام شد. نتایج به دست آمده نشان داد که ارقام در سطوح یک درصد با یک دیگر اختلاف معنی داری دارند و از بین ارقام و لاین‌های مورد آزمایش، Foseto و Ebony به ترتیب با شاخص‌های بیماری ۴۸/۸۶ و ۶۷/۹۴ ، بیش‌ترین و کم‌ترین تحمل را در برابر بیماری پوسیدگی اسکلروتینیایی ساقه کلزا داشتند.

واژه‌های کلیدی: کلزا (*Brassica napus*) ، پوسیدگی ساقه، *Sclerotinia sclerotiorum* ، مقاومت.

مقدمه

بیماری پوسیدگی اسکلروتینیایی ساقه کلزا با عامل *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) DeBary یکی از مهم‌ترین بیماری‌های کلزا در اروپا، امریکا و کانادا است (Lamey, 1995). این بیماری در انگلستان، گرجستان و بسیاری از کشورهای جهان فراگیر شده است (Gladdress *et al.*, 1993 ؛ Bernneman *et al.*, 1991). بیماری پوسیدگی اسکلروتینیایی ساقه کمیّت و کیفیت دانه

این مقاله بر اساس نتایج به دست آمده از اجرای طرح تحقیقاتی شماره ۸۰۰۹۷-۱۱-۱۲۰ مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی مازندران تدوین گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

را با تأثیر بر وزن دانه و درصد کیفیت روغن تقلیل می‌دهد (Aggarwal *et al.*, 1997 ؛ Chaudhury, 1993 ؛ Morrall *et al.*, 1976).

در بین روش‌های مختلف کنترل این بیماری استفاده از ارقام مقاوم یا متحمل با توجه به قابلیت کاربرد آن در مدیریت تلفیقی، نقش مهمی ایفا نموده است. بررسی‌های نشان داده که تحمل و عکس‌العمل ارقام و لاین‌های مختلف کلزا، نتاج تلاقی‌های برگشتی و جمعیت‌های F_2 کلزا متفاوت بوده است (Vitasek, 1994; Jedreyczka *et al.*, 1996) و مقاومت نسبی خوبی در هیبریدهای F1، BC1 و BC2 والدینی که مقاومت بالایی داشته‌اند، مشاهده شده است (Liu *et al.*, 1991).

در بررسی ۱۵ رقم بهاره کلزا مشخص گردید که ژنوتیپ کاملاً مقاومی بین ارقام وجود نداشته اما درجه تحمل آن‌ها نسبت به بیماری متفاوت بوده است (Sunchaocai and Sun, 1995). در ارزیابی گلخانه و مزرعه‌ای ۱۳ رقم کلزا نسبت به بیماری پوسیدگی اسکلروتینیایی ساقه، ارقام Bor، Boh، MAH 1391 و MAN 1592 مقاومت بیشتری داشتند (Jedreyczka *et al.*, 1996).

بیماری پوسیدگی اسکلروتینیایی ساقه کلزا در سال‌های اخیر در استان مازندران شایع و یکی از عوامل محدودکننده این زراعت بوده، به نحوی که در سال ۱۳۷۷ میزان آلودگی آن در برخی مناطق استان مازندران ۴۰ تا ۵۰ درصد برآورد شد (رعیت پناه، مذاکرات شخصی). در سال‌های بعدی میزان آلودگی بیماری به بیش از ۷۰ درصد رسید و کاهش وزن ۱۰۰۰ دانه حدود ۵۰ درصد بود (مشاهدات نگارنده). به همین دلیل بررسی حاضر به منظور دستیابی به منابع ژنتیکی مقاومت جهت استفاده در مدیریت تلفیقی با هدف کاهش خسارت ناشی از این بیماری انجام شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

در اردیبهشت و خرداد سال ۱۳۸۰ مزارع مختلف کلزا واقع در شهرستان‌های قائم‌شهر، بابل، ساری، نکا و بهشهر مورد بازدید قرار گرفت. تعداد ۱۸ نمونه آلوده جمع‌آوری جهت جداسازی و خالص نمودن قارچ عامل بیماری به آزمایشگاه منتقل گردیدند. نمونه‌ها تا زمان بررسی در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

جداسازی و خالص نمودن قارچ

قطعاتی به ابعاد ۱ × ۱ cm از حد فاصل بافت آلوده و سالم انتخاب شدند. نمونه‌ها به مدت دو تا سه دقیقه با هیپوکلریت سدیم یک درصد ضدعفونی سطحی شدند و پس از سه بار شستشو با آب مقطر سترون هر بار به مدت دو دقیقه و خشک کردن با کاغذ صافی سترون در تشتک‌های پتری حاوی P. D. A. کشت شدند. تشتک‌ها در دمای ۱ ± ۲۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری و پس از ۴۸ ساعت با مشاهده پرگنه

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- جدایه‌های *S. sclerotiorum* جمع‌آوری شده از استان مازندران

Table 1. *S. sclerotiorum* isolates collected from Mazandaran province

شماره جدایه Isolate No.	محل جمع‌آوری Location		شماره جدایه Isolate No.	محل جمع‌آوری Location	
S1	Hossein Abad	حسین‌آباد	S10	Bezminabad	بزمین آباد
S2	Ran	ران	S11	Sorbon 1	سوربن ۱
S3	Zaghemarz	زاغمرز	S12	Sorbon 2	سوربن ۲
S4	Ghartappeh	قرتپه	S13	Pahnagi	پهناجی
S5	Tooscola	توسکلا	S14	Gharakhil	قراخیل
S6	Khorshid	خورشید	S15	Asram	اسرام
S7	Baicola 1	بابع‌کلا ۱	S16	Dashtenaz	دشت ناز
S8	Baicola 2	بابع‌کلا ۲	S17	Mahdasht	مهدشت
S9	Panbehcholeh	پنبه چوله	S18	Joibar	جویبار

قارچی نسبت به جداسازی آن اقدام گردید. پس از جداسازی و کشت آن‌ها روی محیط آب آگار (W. A.) خالص‌سازی به روش نوک ریسه انجام شد. شناسایی قارچ عامل بیماری بر اساس روش کوهن (Kohn, 1979) صورت گرفت. و در نهایت هیجده جدایه به دست آمد.

تهیه مایهٔ قارچ

مقدار ۲۰۰ گرم دانه گندم را به مدت ۲۴ ساعت در آب خیسانده تا بذرها کاملاً متورم گردند. بذرها در داخل ارلن ۵۰۰ میلی‌لیتری، به مدت ۲۰ دقیقه و در دمای ۱۲۱°C و فشار ۱/۲ اتمسفر سترون شدند. پنج بلوک به ابعاد ۱×۱ cm از کشت سه روزه جدایه قارچ خالص شده را به هر ارلن افزوده و در دمای ۱ ± ۲۲ درجه سانتی‌گراد به مدت دو هفته نگهداری شدند (Lewartovska *et al.*, 1994).

اثبات بیماریزایی جدایه‌ها

به ازاء هر جدایه قارچ، پنج گلدان از خاک سترون با ترکیب مناسب آماده گردید. تعداد ده عدد بذر کلزا رقم حساس PF 7045/91 پس از ضدعفونی سطحی در هر گلدان کاشته شد. پس از جوانه‌زنی و سبز شدن بذرها، چهار بوته در هر گلدان انتخاب و بقیه حذف شدند. بوته‌های مزبور با استفاده از روش لوارتوسکا و همکاران (Lewartovska *et al.*, 1994) مایه‌زنی و سپس در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۹۰-۸۵ درصد نگهداری شدند. پس از ظهور علائم، قارچ عامل بیماری جداسازی و شناسایی مجدد گردید.

ارزیابی مقاومت نسبی ارقام و لاین‌ها

در این پژوهش ۲۵ ژنوتیپ کلزا مورد ارزیابی قرار گرفت. بذر این ژنوتیپ‌ها از بخش تحقیقات دانه‌های روغنی مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر دریافت گردید.

در آذرماه سال ۱۳۸۰ آماده‌سازی قطعه زمینی در ایستگاه تحقیقات بابع‌کلا با انجام یک مرحله شخم، دو مرحله دیسک، ماله‌کشی، کوددهی بر اساس آزمون خاک و استفاده از

www.SID.ir

Archive of SID

علفکش اتال فلورالین (EC33.5) به میزان ۳ لیتر در هکتار به صورت مخلوط کردن با خاک (Soil incorporation) قبل از کاشت انجام شد. کاشت لاین‌ها و ارقام کلزا پس از پیاده نمودن نقشه طرح در قالب طرح لاتیس ساده (۵ × ۵) با چهار خط دو متری برای هر لاین و رقم، در دو تکرار زیر سیستم میست (مه‌پاشی) انجام شد. کلیه مراحل‌داشت طبق عرف منطقه رعایت شد. مایه‌زنی بیست بوته از هر لاین و رقم در مرحله گلدهی بر اساس روش لوارتوسکا و همکاران (Lewartovska *et al.*, 1994) با قرار دادن دانه گندم پوشیده از قارچ عامل بیماری در ارتفاع ۲۰ سانتی‌متری روی ساقه و بستن آن با پارافیلم انجام شد. رقم PF 7045/91 به عنوان شاهد حساس مایه‌زنی شد تا مقاومت سایر ژنوتیپ‌ها با شاهد مقایسه شود. سی دقیقه قبل از مایه‌زنی و دو ساعت پس از آن کلیه ارقام و لاین‌ها به مدت ۱۵ دقیقه جهت فراهم شدن رطوبت کافی برای تسهیل در ایجاد آلودگی، با استفاده از سیستم میست مه‌پاشی شدند. عمل مه‌پاشی تا ۳ هفته هر روز دو بار و هر بار به مدت ۳۰ دقیقه ادامه یافت.

ارزیابی شش تا هفت هفته پس از مایه‌زنی بر اساس رتبه‌بندی داک و همکاران (Dueck *et al.*, 1983) به شرح ذیل انجام گرفت:

۱: ساقه سالم

۲: لکه کوچک بدون احاطه کردن دور ساقه

۳: احاطه شدن دور ساقه توسط لکه بدون زودرسی گیاه

٤: احاطه دور ساقه توسط لکه با زودرسی گیاه

۵: گیاه چروکیده و تولید بذر اندک

در این سیستم ارزش عددی ۰، ۱/۲۵، ۲/۵، ۳/۷۵ و ۵ به ترتیب برای رتبه‌های ۱ تا ۵ استفاده شد و شاخص بیماری (Disease Index) با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$D.I. = \frac{(1.25\times Y_2)+(2.5\times Y_3)+(3.75\times Y_4)+(5\times Y_5)}{\text{Total plants}} \times \frac{1}{0.05}$$

Y_2 = تعداد گیاهان با رتبه ۲

Y_3 = تعداد گیاهان با رتبه ۳

Y_4 = تعداد گیاهان با رتبه ٤

Y_5 = تعداد گیاهان با رتبه ۵

نتایج و بحث

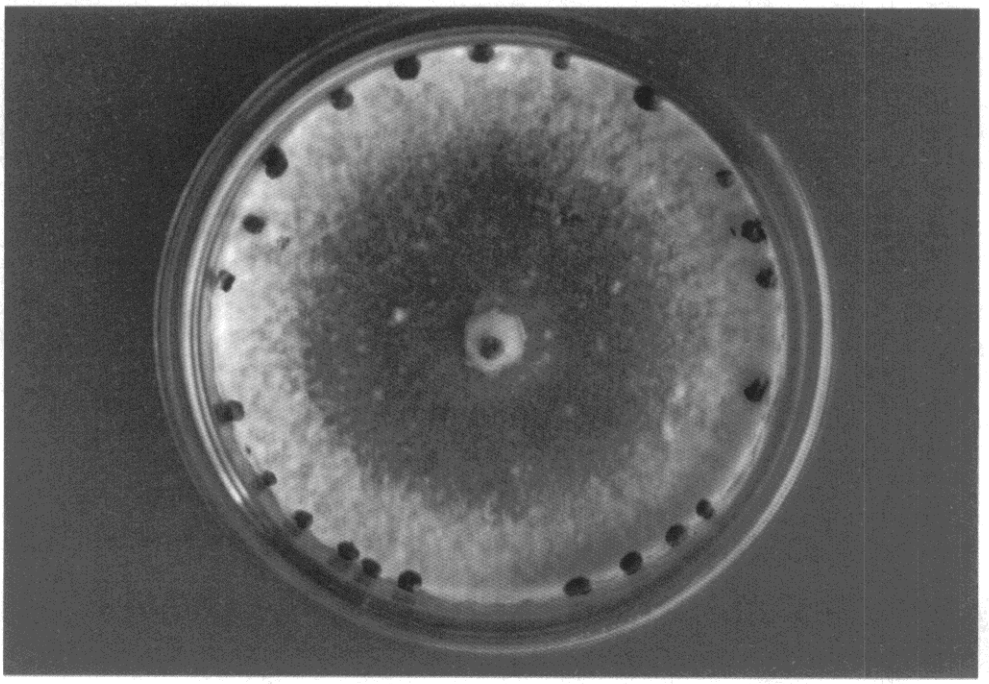
تشخیص جدایه‌ها

هر ۱۸ جدایه با توجه به میزان رشد میسلیوم، نحوه پراکندگی، اندازه و شکل اسکلروت، رنگ پرگنه قارچی در محیط کشت P. D. A. و سایر مشخصات میکروسکوپی و ماکروسکوپی، قارچ *Sclerotinia selerotiorum* (Lib.) De Bary شناسایی گردید. پرگنه قارچی در محیط P. D. A. به رنگ سفید و سفید خاکستری ظاهر شد (شکل ۱). اسکلروت‌ها گرد تا کشیده، با سطح صاف یا حاوی حفره‌های کم‌عمق با

www.SID.ir

Archive of SID

اندازه تقریبی ۲۰-۲ میلی‌متر بودند. اسکلروت از دو بخش پوسته و مغز تشکیل شده بود. پوسته از بافت منشوری ٦-۲ لایه‌ای از یاخته‌های گرد بدون حفره‌های مؤئین با دیواره تیره رنگ و مغز اسکلروت از ریسه‌های درهم پیچیده و شفاف تشکیل گردیده بود. آپوتسیم شامل چهاربخش Ectal excipulum ، Hymenium ، Subhymenium، Medulary excipulum که رشته‌های موازی Ectal excipulum عمود بر سطح آپوتسیم بودند (شکل ۲).



شکل ۱- پرگنه سفید مایل به خاکستری رنگ قارچ *S. sclerotiorum* بر روی محیط کشت P.D.A.

Fig. 1. White grey colony of *S. sclerotiorum* on P.D.A.

اثبات بیماریزایی جدایه‌ها

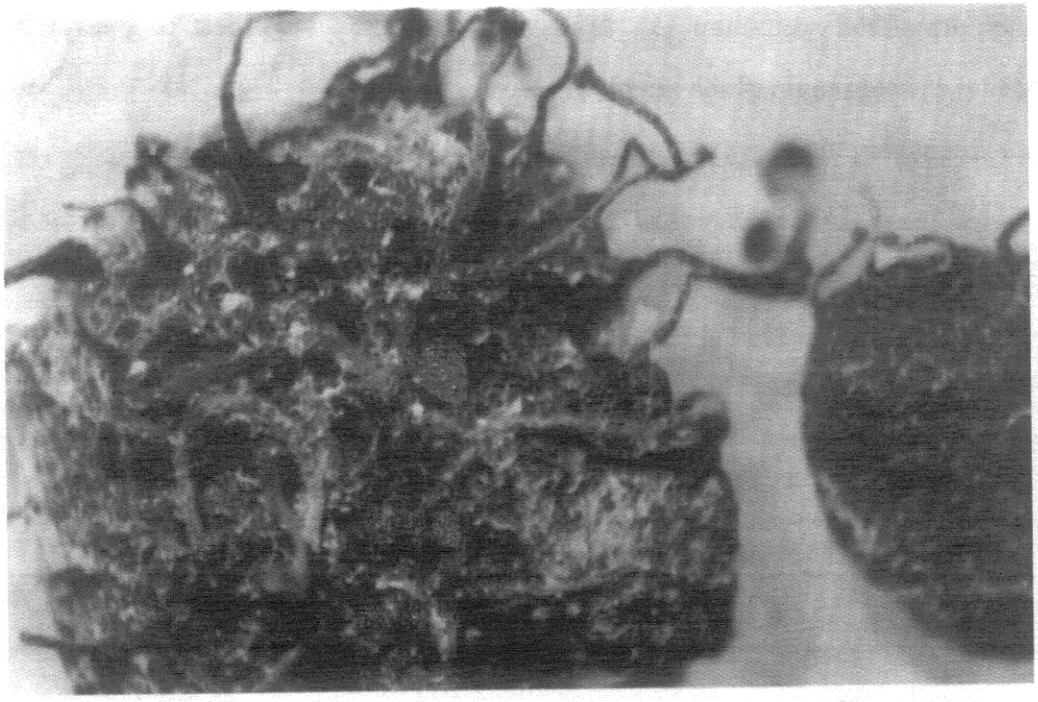
کلیه جدایه‌ها در رقم PF 7045/91 ایجاد آلودگی نمودند. نشانه‌های بیماری شش تا هفت روز پس از مایه‌زنی به صورت لکه‌های کوچک آب سوخته ظاهر گردید و پس از مدتی پوسیدگی سفید رنگ دور ساقه را احاطه و به صورت لکه‌های موجی گسترش یافت (شکل ۳). با جداسازی و شناسایی مجدد، قارچ عامل بیماری گونه *S. sclerotiorum* تعیین گردید.

ارزیابی مقاومت نسبی ارقام و لاین‌ها

بیماری پوسیدگی اسکلروتینیایی ساقه در کلیه ارقام و لاین‌ها ظاهر گردید و اولین نشانه‌های بیماری یک هفته پس از مایه‌زنی به صورت لکه‌های آب سوخته نمایان شد که با گذشت زمان گسترش یافت. آزمون نرمال برای داده‌های مربوط به شاخص بیماری انجام شد که تبدیل داده‌ها ضروری نبوده، لذا داده‌ها پس از محاسبه شاخص بیماری بر اساس طرح لاتیس ساده تجزیه و تحلیل شدند. با توجه به کارآیی

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲- تشکیل آپوتسیم بر روی اسکلروت قارچ *S. sclerotiorum*

Fig. 2. Apothecium formation on sclerotia of *S. sclerotiorum*

شکل ۳- علائم بیماری بر روی بوته کلزا، ۲۵ روز بعد از مایه‌زنی با قارچ *S. sclerotiorum*

Fig. 3. Symptoms of the disease on rapeseed plant, 25 days after inoculation

www.SID.ir

Archive of SID

۱۰۰/۲۹ طرح لاتیس نسبت به طرح بلوک کامل تصادفی (جدول ۲)، طرح در قالب بلوک‌های کامل تصادفی تجزیه و تحلیل گردید (جدول ۳). بین ارقام و لاین‌های مختلف از نظر تحمل به بیماری پوسیدگی اسکلروتینیایی ساقه اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ وجود داشت. گروه‌بندی ارقام و لاین‌ها بر اساس روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک درصد انجام شد (جدول ٤).

جدول ۲- تجزیه واریانس شاخص بیماری (Disease Index) ۲۵ لاین و رقم کلزا در طرح لاتیس ساده

Table 2. Analysis of variance for disease index of 25 cultivars and lines of rapeseed in simple lattice design

S. O. V.	منبع تغییرات	df.	SS	MS	F
Replication	تکرار	1	0.903	0.903	—
Treatment	تیمار	24	1248.971	52.040	3.11**
Block (adj)	بلوک داخل تیمار	8	142.299	17.787	
Effective error	اشتباه مؤثر	16	266.584	16.662	
Treatment error	اشتباه بلوک	24	401.050	16.710	
Inter block error	اشتباه داخل بلوک	16	258.751	16.172	
Total	کل	89	2298.558		

**: Significant at 1% probability level.

**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

Efficiency of lattice: Compared with Randomized complete block 100.26
Coefficient of variation: 6.841 percent

جدول ۳- تجزیه واریانس شاخص بیماری (Disease Index) ۲۵ لاین و رقم نسبت به بیماری پوسیدگی اسکلروتینیایی ساقه کلزا در طرح بلوک کامل تصادفی

Table 3. Analysis of variance for disease index of 25 cultivars and lines of rapeseed in randomized complete block design

S. O. V.	منبع تغییرات	df.	SS	MS	F
Replication	تکرار	1	0.72	0.724	
Treatment	تیمار	24	1233.64	51.402	3.08**
Error	خطا	24	400.83	16.701	

**: Significant at 1% probability level.

**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ٤- مقایسه میانگین شاخص بیماری ارقام و لاین‌های مختلف کلزا نسبت به بیماری پوسیدگی اسکلروتینیایی ساقه کلزا

Table 4. Mean Comparison of the disease index in different lines and cultivars of rapeseed to sclerotinia stem rot

Genotype	Disease Index
Jewel	53.40 hi
Quantum	51.92 hij
OAC-SP-field	50.63 ij
Kristina	60.97 bcde
Hyola 308	62.11 bcd
Hyola 401	61.23 bcde
W-W 1432	62.49 bcd
Delta	58.89 def
Excel	63.84 b
Profit	63.71 b
Foseto	48.86 j
Fusia	62.90 bc
45 A71	58.17 ef
Option 500	52.20 hij
OAC-Summit	64.10 b
Legacy	63.84 b
Ebony	67.94 a
LG3310	59.19 cdef
Garrison	62.11 bcd
Magnum	54.44 gh
PF 7045/91	57.21 ef
Sponsor	59.37 cdef
Kabel	63.71 b
Dakini	63.55 b
Goliath	64.40 b

میانگین‌ها با حروف مشابه، از نظر آماری فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح ۱٪ هستند (آزمون چند دامنه دانکن).

Means followed by similar letters are not significantly different at 1% level (DMRT).

در این آزمایش گروه‌بندی میانگین شاخص بیماری ارقام و لاین‌ها حاکی از وجود تفاوت قابل ملاحظه بین آن‌ها بود که با نظر ویتاسک (Vitasek, 1994) مطابقت داشت. ارقام و لاین‌ها در دامنه شاخص بیماری ٤٨/٨٦ تا ٦٧/٩٤ قرار داشتند. رقم Ebony با شاخص ٦٧/٩٤ (با میانگین اعضاء گروه Y_4) کم‌ترین تحمل را نسبت به این بیماری داشت

www.SID.ir

Archive of SID

در حالی که ارقام Foseto ، با شاخص ٤٨/٨٦ (با میانگین اعضاء گروه Y_3) بیشترین تحمل را از خود نشان دادند و ارقام OAC-Sp-Field ، Quantum و 500 Option به ترتیب با شاخص‌های ٥٠/٦٣ ، ٥١/٩٢ و ٥٢/٢٠ در مقام بعدی قرار گرفتند که نسبت به شاهد تحمل بیشتری از خود نشان دادند.

References

Aggarwal, P. A. K., Kumar, A., and Thakur, H. L. 1997. Effect of sclerotinia rot on oil quality in low erucic acid cultivars of rapeseed. Crucifera Newsletter No. 19: 103-104.

Bernneman, T. B., Sumner, O. R., and Phillips, D. V. 1991. *Sclerotinia sclerotiorum* on canola in Georgia and its potential as a pathogen on peanut. Plant Disease 75: 30-31.

Chaudhury, B. N. 1993. Yield loss estimation by *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary. Journal of the Institute of Agriculture and Animal Science 14: 113.

Dueck, J., Morrall, R. A. A., and McKenzie, D. L. 1993. Control of *Sclerotinia sclerotiorum* in rapeseed with fungicides. Canadian Journal of Plant Pathology 5: 289-293.

Gladdress, P., Davies, J. M. L., and Hardwick, N. V. 1993. Review of sclerotinia epidemic in winter oilseed rape in England and Wales in 1991. Bulletin OILB. SROP. 16: 1-8.

Jedryczka, U., Lewarlowska, M., Francel, E., and Drobmik, M. 1996. Evaluation of resistantce of Polish oilseed winter rape cultivars to stem canker and sclerotonia stem rot. Plant Breeding and Seed Science 40 (1-2): 17-22.

Kohn, L. M. 1979. Determination of the economically important plant pathogenic sclerotinia species. Phytopathology. 69: 881-886.

Lamey, H. A. 1995. Survey of black leg and sclerotinia stem rot of canola in North Dakoth in 1991 and 1993. Plant Disease 79: 322-324.

Lewartovska, E., Jedryczka, U., and Frencel, I. 1994. The methods of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) resistance evaluation against *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary. IV. Symposium on Plant Immunity to Diseases and Pests. Dobrich Bulgaria Plant Science (Sofia), pp. 252-254.

www.SID.ir

Archive of SID

Liu, C. Q., Dud, Z., Huangy, J., and Wong, C. H. 1991. Study on the tolerance to *Sclerotinia sclerotiorum* in *Brassica napus* and its genetic effects. Scientia Agriculture Sinica 24 (3): 43-49.

Morrall, R. A. A., Dueck, J., McKenzie, D. L., and McGee, D. C. 1976. Some aspects of *Sclerotinia sclerotiorum* in Saskatchewan in 1970-75. Canadian Plant Disease Survey 56: 56-62.

Sunchaocai, L., and Sun, C. C. 1995. Comparison of methods for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in *Brassice napus* L. Acta-Agriculture Shanghai 11(3): 17-22.

Vitasek, V. 1994. Resistance of winter sweden rape to *Phoma lingam* and *Sclerotinia sclerotiorum*. Oil Seed Crops, XVLth Polish Research Conference, 19-20, April, Rosliny-Oleiste, 15 (2): 87-92.

آدرس نگارندگان:

سیدعلیرضا دلیلی، سیدوحید علوی- بخش تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی مازندران، ساری.

غلامحسین عرب- بخش تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی مازندران، ساری.

www.SID.ir