گزارش علمی کوتاه

اولین گزارش از گروه بیماری‌زایی ۳ و ٤ *Leptosphaeria maculans* عامل شانکر ساقه کلزا از شمال ایران

زهرا وکیلی زارج[۱]، کامران رهنما[۲*]، سعید نصراله‌نژاد[۲] و احد یامچی[۳]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۷/۶؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۸/۱۶)

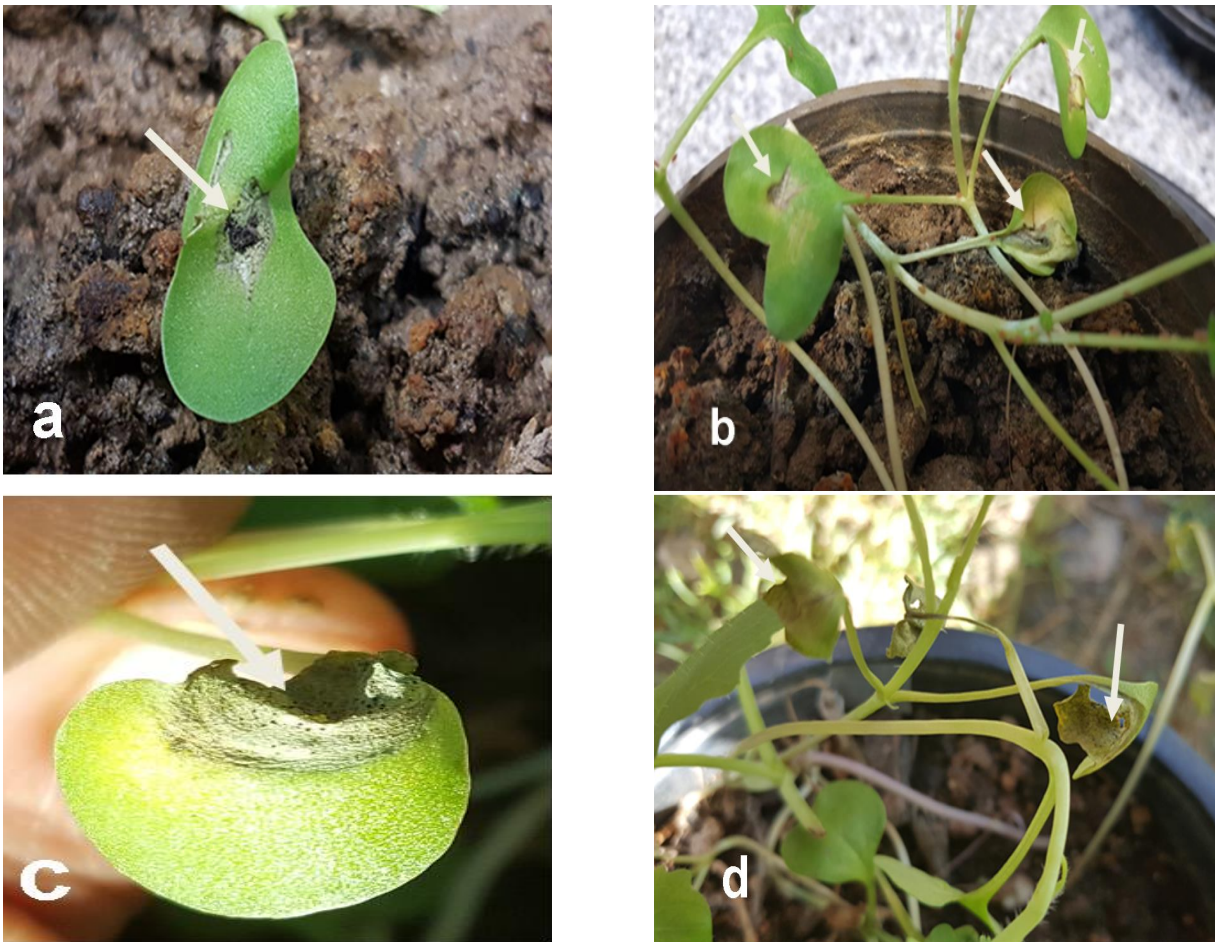
کلزا به عنوان یکی از مهمترین محصولات تولید روغن در سراسر دنیا بوده است و بیماری ساق سیاه با عامل بیمارگر *Leptosphaeria maculans* ازبیماری‌های مهم آن در ایران است. از بین گروه‌های بیماری‌زایی، گروه بیماری‌زایی ۱ PG- برای عامل بیمارگر L. biglobosa و PG-2و PG-T برای L. maculans از شمال ایران گزارش شده است (Fernando et al. 2007, Mirabadi et al. 2010). نمونه‌های آلوده کلزا از قسمت‌های گوناگون گیاه با علایم تغییر شکل، رنگ پریدگی و حضور پکنیدیوم در سال ۱۳۹۲-۹۵ از مزارع شمال ایران جمع‌آوری شدند. صد و دو جدایه بدست آمده از بافت‌های آلوده ابتدا بر اساس مورفولوژی جدایه‌هاو تشگیل رنگدانه (Boerema et al. 2004) و سپس بر اساس مولکولی با استفاده از واکنش زنجیره‌ایی پلیمراز با جفت آغازگراختصاصی به عنوانL. maculans شناسایی شدند (Liu et al. 2006). پیکنیدهای قارچ عامل بیماری سیاه رنگ، با سلول پایه متورم، قسمت هایی از پیکنیدیوم همراه با قطرات صورتی کم رنگ در انتهای منفذ برآمده دیده شدند. سلولهای آسک قلوه ای شکل و کشیده باریک دارای هشت اسپور بودند. علاوه بر آن همه جدایه‌ها در گروه عامل بیمارگر پر آزار با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی تعیین بیماری‌زایی، شدند. بیماریزایی جدایه‌های قارچ عامل بیماری با تعیین غلظت سوسپانسیون سلولی کنیدی (۲×۱۰۷)در هر میلی لیتر و سپس محلول پاشی اسپورها در مرحله برگچه های اولیه روی ارقام افتراقی وستار، کوینتا و گلاسیر انجام شد. همه گیاهان تلقیح شده در شرایط اتاقک رشد با دمای C°22 و رطوبت نسبی ۸۰٪ با فاصله زمانی ۱۶ ساعت روشنایی و تاریکی نگهداری شدند. گروه بیماری‌زایی ۳۲ جدایه بر روی سه رقم افتراقی گلاسیر، کوینتا و وستار از نظر حضور لکه‌های نکروزه یا هاله کلروتیک و تشکیل پیکنید مطابق روش کن و فرناندو (Chen and Fernando 2006) مشخص شدند (شکل ۱). شانزده جدایه در گروه بیماری‌زایی PG-4 قرارگرفتند و توسط توانایی آنها در تولید اسپور و واکنش حساسیت روی سه رقم افتراقی مشخص شدند. سه

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: kamranrahnama1995@gmail.com

۱. دانشجوی دکتری بیماری شناسی گیاهی، دانشکده تولید گیاهی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۲. دانشیاران بخش گیاهپزشکی، دانشکده تولید گیاهی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۳. استادیار بخش اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولید گیاهی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان



شکل ۱. علایم روی کوتیلدون *Brassica napus*، ۱۲روز بعد از تلقیح با جدایه‌های *Leptosphaeria maculans* . a,b)جدایه PG-3به ترتیب روی رقم وستار (زخم بزرگ و اسپوردار) و روی رقم کوینتا (زخم با اندازه متوسط بدون اسپور)،c,d)جدایه PG-4به ترتیبروی رقم گلاسیرو کوینتا (زخم بزرگ و اسپوردار).

Fig 1-Symptoms on cotyledon of *Brassica napus* observed 12 days after inoculation with selected isolates of *Leptosphaeria maculans*a,b) PG-3 isolate on Westar (large, sporulating lesions) and Quinta cultivar (medium size lesions, nonsporulating) respectively, c,d) PG-4 isolate on Glacier and Quinta cultivars (large, sporulating lesions) respectively.

جدایه PG-3 روی ارقام وستار و گلاسیر اسپور می‌دهند و ایجاد زخم‌های قهوه‌ایی و بدون اسپور روی رقم کوینتا می‌کنند. نتایج نشان داده است، که از بررسی تغییرجمعیت قارچ بیمارگر در توسعه روش موفقیت آمیز در مدیریت بیماری می‌توان استفاده نمود.

کلیدواژه‌ها: Leptosphaeria maculans، کلزا، گروه‌های بیماری‌زایی

First report of pathogenicity group 3 and 4 *Leptosphaeria maculans*, the causal agent of blackleg disease of oilseed rape in Northern Iran

Z. Vakili[1], K. Rahnama[2], S. Nasrollahnejad[2], and A. Yamchi[3]

(Received: 27.9.2016; Accepted: 6.11.2016)

The rapeseed (*Brassica napus*) is an important oilseed crop throughout the world for oil production. Blackleg disease which caused by *Leptosphaeria maculans* is one of the most important disease of rapeseed in Iran. Among pathogenicity groups PG-1 (*Leptosphaeria biglobosa*) and PG-2, PGT (*L. maculans*) has been reported on rapeseed from Mazandaran and Golestan provinces of northern Iran (Fernando *et al.* 2007, Mirabadi *et al.* 2010). The samples (leaves, stem, flowers and seed) with symptoms of diseases such as discoloration, deformation, wrinkled and presence of pycnidia were collected during 2013-2016 from canola crops in North Iran. In addition, some of the stem debris with stem canker symptoms was examined for the presence and absence of pathogen sexual (perfect) state. Diseased tissues (leaves, stems, flowers and seed) were surface sterilized to obtain pathogen isolates following the procedure described by West *et al.* (2002) and Chen *et al.* (2010). Single ascosporic cultures of the fungus were isolated from psedothecia using the method developed by Li *et al.* (2004). In all 102 isolates when the causal pathogen was isolated from infected tissues, it was identified as *L. maculans*, by colony morphology/ pigment production on potato dextrose agar (PDA) and potato dextrose broth (PDB) respectively (Boerema *et al.* 2004), and species specific polymerase chain reaction (PCR) (Liu *et al.* 2006). The pycnidia of the fungus were black, globose to subglobose in shape, parts of pycnidia have pale pink droplet overflowed from the ostiole and Asci are clavate to cylindrical, bitunicate and 8 spores. Moreover, all isolates were classified as highly virulent using PCR with virulence type specific primers (Kuusk *et al.* 2002). Thirty-two isolates of *L. maculans* were used for determining the pathogenicity test using a cotyledon inoculation method. Pathogenicity of the isolates was confirmed by spraying a conidial suspension of the fungus (2×10^7 conidia mL^{-1}) on cotyledons of Westar, Quinta and Glacier cultivars. All plants were maintained in a growth chamber at 22°C with 16 h light period and relative humidity of 80%. The first review of the plants was performed after 5 days and changes during experimenting plants have been observed after 12 days using the scale of 0–9 developed by Chen & Fernando (2006) which 0 to 3 reaction was considered as resistant (R), 4 to 6 as intermediate (I) and 7 to 9 as susceptible (S) (Fig. 1). Sixteen of isolates were classified as belonging to pathogenicity group PG-4. They were characterized by their ability to sporulate on the three differential hosts (S=7-9). Three isolates were PG-3, they sporulated on Westar and Glacier, and caused brown, non sporulating lesion on Quinta (I=4-6). The remaining isolates belonged to PG-2 and PGT. Moreover, our findings provided evidence that *L. maculans* (PG-4) is present on oilseed rape seeds in the North Iran. Our results showed that an understanding of possible shift in fungus populations will be of value in developing strategies for successful management of blackleg disease such as longer rotation between canola crops, new resistant cultivars against all PG isolates and strict regulations concerning crop seed trade. In addition, the current study is the first report on the identification of *L. maculans* (PG-3, PG-4) from oilseed in Northern Iran.

Keywords: *Leptosphaeria maculans*, Canola, pathogenicity group.

* Corresponding author's E-mail: Kamranrahnama1995@gmail.com

1. Ph.D. student of plant pathology, faculty of plant production, Gorgan university of Agricultural sciences & Natural Resources, Gorgan-Iran.
2. Associate Professor's of department of plant protection, faculty of plant production, Gorgan university of Agricultural sciences & Natural Resources, Gorgan-Iran.
3. Assistant Professor department of plant breeding & Biotechnology, faculty of plant production, Gorgan university of Agricultural sciences & Natural Resources, Gorgan-Iran.

Acknowledgement

We thank to the Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK) for providing the seeds (Quinta, Glacier and Westar cultivars).

منابع

BoeremaG. 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.347 p.

ChenY. 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.

ChenJ. Y. Wu C. P. Li B. Su H. Zhen S. Z. and AnY. L. 2010. Detection of *Leptosphaeria maculans* from imported Canola seeds. Journal of Plant Diseases and Protection 117: 173–176.

Fernando W. G. D. Ghanbarnia K. and Salati M. 2007.First report on the presence of phoma blackleg pathogenicity group1 (*Leptosphaeria biglobosa*) on *Brassica napus*(canola/rapeseed) in Iran. Plant Disease 91: 465.

Kuusk A. k. Happstadius I. Zhou L. Steventon L. A. Giese H. and DixeliusC. 2002. Presence of *Leptosphaeria maculans* Group A and Group B isolates in Sweden. Phytopathology 150:349- 356.

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 of General Plant Pathology 70: 261-269.

Liu S. Y. Liu Z. FittB. 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 defense activators in field and controlled environments. Plant Pathology55: 401–412.

MirabadiA. Rahnama K. Sadravi M. and 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.

West J. S.Balesdent M. H. Rouxel T. Narcy J. P. HuangY. J.Roux J. Steed J. M. Fitt B. D. L. SchmitJ. 2002. Colonization of winteroilseed rape tissues by A/Tox(+) and B/Tox(0) *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) in France and England. Plant Pathology 51: 311–321.