شناسایی و بررسی بیماری‌زایی قارچ‌های هیفومیستی مرتبط با ریشه و طوقه‌ی گندم در استان زنجان

لیلا عبدی‌پور اصل[۱]، رقیه همتی[۲*]، رسول زارع[۳]، محمد طاهر هرکی‌نژاد[۴] و علیرضا علیزاده[۵]

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاه پزشکی، دانشگاه زنجان.
۲- دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه زنجان.
۳- استاد پژوهش موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران.
۴- دانشیار بیوتکنولوژی، پژوهشکده ی فن آوری های نوین زیستی و گروه علوم دامی دانشگاه زنجان.
۵- استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران.
*مسئول مکاتبه rhemati@znu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۴/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۶/۴/۱۳

چکیده

گندم به عنوان استراتژیک‌ترین محصول کشاورزی، در امنیت غذایی بشر از اهمیت زیاد برخوردار بوده و بیش‌ترین سطح زیر کشت در کشور را به خود اختصاص داده است. قارچ‌های موجود روی ریشه و طوقه‌ی این گیاه در میزان تولید و عملکرد آن نقش بسزایی دارند. لذا به منظور شناسایی فلور قارچی ریشه و طوقه‌ی گندم در استان زنجان، در طی سال زارعی ۹۰-۱۳۸۹ از ۵۸ مزرعه‌ی گندم کشت دیم و آبی استان نمونه برداری به عمل آمد و در مجموع ۲۸۶ جدایه‌ی قارچ بدست آمد که از این میان، ۲۴۸ جدایه متعلق به هیفومیست‌ها بر اساس ویژگی‌های پرگنه، ویژگی‌های میکروسکوپی و استفاده از کلیدهای معتبر مورد بررسی قرار گرفتند. جهت کمک به شناسایی، جدایه‌ها تکثیر شده و توالی‌یابی نواحی ITS1-5.8S-ITS2 توسط جفت آغازگر ITS1/ITS4 انجام شد و این جدایه‌ها در ۱۰ جنس و ۲۳ گونه (*Alternaria alternata, A. atrum, A. chlamydospora, A. tenuissima, Aspergillus auricomus, A. niger, Bipolaris. sorokiniana, Botrytis cinerea, Curvularia australiensis, C. inaequalis, Fusarium acuminatum, F. avenaceum, F. chlamydosporum, F. equiseti, F. redolens, F. sambucinum, F. scirpi, F. solani, F. tricinctum, Microdochium nivale, Periconia circinata, Penicillium chrysogenum, Trichoderma atroviride,*) قرار گرفتند. آزمون بیماری‌زایی برخی از جدایه‌های قارچی بدست آمده در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار برای هر تیمار در شرایط گلخانه انجام شد. نتایج نشان داد که قارچ‌های *B. cinerea*، *B. sorokiniana*، *F. avenaceum*، *F. acuminatum*، *P. circinata*، *C. australiensis*، *F. equiseti*، *F. solani* و *A. chlamydospora* سبب ایجاد علائم بیماری در میزبان با شدت‌های مختلف شدند. در این بین قارچ‌های *B. cinerea*، *B. sorokiniana*، *F. avenaceum* و *F. acuminatum* به ترتیب بیش‌ترین علائم نکروز را در ریشه ایجاد کردند. در میان گونه‌های شناسایی شده قارچ *A. auricomus* برای نخستین بار از ریزوسفر گندم در ایران و قارچ‌های *A. tenuissima, B. cinerea, C. inaequalis, E. chlamydospora,.F. avenaceum, F. chlamydosporum,. F scirpi, F. tricinctum, M. nivale, P. circinata, P. chrysogenum* و *T. atroviride* برای نخستین بار از استان زنجان گزارش می‌شوند. بیماری‌زایی قارچ *B. cinerea* روی گندم نیز برای اولین بار از ایران گزارش می‌شود.

واژه‌های کلیدی: فلور قارچی، گندمیان، بیماریزایی، تاکسونومی، فوزاریوم.

مقدمه

گندم یکی از منابع اصلی تأمین جیره ی غذایی و قسمت اعظم پروتئین و کالری مورد نیاز بشر محسوب می‌شود با وجود تلاش‌های وسیع در جهت حفظ این محصول استراتژیک، هنوز شاهد حمله‌ی عوامل بیماری‌زای گیاهی و خسارت به این محصول در کشور می‌باشیم. تاکنون بررسی‌های زیادی در مورد جداسازی و مطالعه‌ی بیماری‌زایی گونه‌های قارچی مرتبط با ریشه و طوقه‌ی گندم در مناطق مختلف دنیا و همچنین در ایران صورت گرفته است. در مطالعات

صورت گرفته *Bipolaris sorokiniana* و *Fusarium* sp. به عنوان عوامل پوسیدگی ریشه و طوقه‌ی گندم در اکامیا گزارش شده‌اند (ریچارد و همکاران ۲۰۰۷). در استرالیای جنوبی علت این بیماری را به قارچ‌های *F. equiseti*، *B. sorokiniana* و *F. oxysporum* نسبت داده‌اند (فدل-مون و هریس ۲۰۱۰). بر اساس مطالعات صورت گرفته در داخل کشور و طی بررسی میکوبیوتای ریشه و طوقه‌ی گندم در استان تهران، گونه‌های *Acremonium strictum*، *Bgnodontis*، *Penicillium aurantiogriseum*، *P. purpurogenum*، *Phytophthora nicotiana* var. *parasitica*، *Cylindrocarpon* sp.، *Acremonium strictum*، *Aspergillus terreus*، *F. scirpi*، *F. redolens* و *Sporothrix* sp. از ریشه‌ی گندم جداسازی گردیده‌اند (امینی ۱۳۷۵). در چند بررسی دیگر بیماری‌زایی گونه‌های *Alternaria triticina*، *B. hawaiiensis*، *Curvularia senegalensis*، *F. reticulatum*، *F. lateritium*، *F. subglutinans* (درویش‌نیا و همکاران ۱۳۷۷)، *F. nivale*، *Bkusanoi*، *Drechslera tetrarrhenae* (دهقان و همکاران ۱۳۸۹)، *F. culmorum* و *F. graminearum* (کاظمی ۱۳۸۱) از ریشه و طوقه‌ی گندم گزارش گردید. در سال ۱۳۸۹ درویش‌نیا و همکاران پس از شناسایی ۳۵ گونه فوزاریوم بدست آمده از اندام‌های مختلف گیاهان تیره‌ی گندمیان، جدایه‌های *F. pseudonygamai*، *F. sacchari*، *F. pallidoroseum* و *F. heterosporum* را برای نخستین بار برای فلور قارچی ایران معرفی نمودند. در این بررسی گونه‌های *F. globosum*، *F. nygamai*، *F. reticulatum* و *F. subglutinans* از گیاه گندم و از استان زنجان گزارش شدند. در تحقیقات تکمیلی دیگر در مورد مطالعه‌ی بیماری‌زایی فوزاریوم‌های همراه ریشه و طوقه‌ی گندم در استان کرمانشاه، گونه‌های *F. culmorum*، *F. pseudograminearum* و *F. crookwellense*، به عنوان گونه‌های خسارت‌زا معرفی شدند (صفایی و همکاران ۱۳۹۱). در برخی از بررسی‌های دیگر گونه‌های *F. pseudograminearum* (صارمی ۱۳۸۳)، *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (ژولیده و همکاران ۱۳۸۹)، *B. specifera* و *B. australiensis* (محمدی‌پور و ارشاد ۱۳۸۱) به ترتیب از استان‌های زنجان، کرمانشاه و آذربایجان شرقی گزارش شدند. در طول سال‌های ۷۹-۱۳۷۸ جعفری و صارمی ضمن تحقیق روی پراکنش عوامل قارچی پوسیدگی طوقه و ریشه‌ی گندم در استان زنجان، قارچ‌های *Rhizoctonia solani*، *R. cerealis*، *F. culmorum*، *Drechslera* sp.، *Sclerotium rolfsii* و *B. sorokiniana* را شناسایی و معرفی کردند. در این بررسی بیماریزایی گونه‌های *Rhizoctonia* spp.، *Drechslera* sp. و *F. culmorum* به اثبات رسید. با توجه به اهمیت گندم به عنوان یکی از محصولات عمده‌ی کشاورزی در استان زنجان و نیز نظر به اینکه فلور قارچی این محصول در منطقه مورد مطالعه قرار نگرفته بود، در این بررسی قارچ‌های مرتبط با ریشه و طوقه‌ی این گیاه در مناطق عمده گندم کاری استان مورد مطالعه قرار می گیرد و همچنین نظر به تنوع بالای قارچ‌ها، شناسایی قارچ‌هایی با فرم آنامورف هیفومیستی در اولویت این تحقیق قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری

طی سال‌های زارعی ۹۰-۱۳۸۹ از ۵۸ مزرعه ی گندم دیم و آبی واقع در شهرستان زنجان (روستاهای آزاد سفلی، آزاد علیا، بناب، خیرآباد، قره‌تپه، نیماور)، ابهر (حومه ابهر)، خرمدره (روستاهای کموز، پیرزاقه)، ماهنشان (تازه‌کند، اندآباد علیا، لولک آباد)، خدابنده (ده-جلال، خمارک) و سلطانیه (حومه سلطانیه) نمونه برداری به عمل آمد. نمونه‌های دارای علائم مشکوک و نیز انواع سالم آن‌ها داخل پاکت‌های کاغذی نو و سترون قرار گرفته، به آزمایشگاه منتقل شده و در دمای اتاق خشک شدند.

جداسازی و خالص سازی

به منظور جداسازی جدایه‌های قارچی غیرسطحی، ریشه‌ها و طوقه‌های دارای علائم مشخص یا مشکوک انتخاب شده و از حد فاصل قسمت‌های سالم و بیمار ریشه و طوقه، قطعاتی به اندازه ۵-۳ میلی‌متر جدا شده و

به مدت یک دقیقه با هیپوکلریت سدیم ۱-۰/۵ درصد ضدعفونی سطحی شدند و پس از شستشو با آب مقطر سترون و خشک شدن روی کاغذ صافی سترون روی محیط کشت Potato Dextrose Agar (PDA) حاوی آنتی بیوتیک استرپتومایسین قرار گرفتند. جداسازی قارچ‌های سطحی پس از شستشوی قطعاتی از ریشه و طوقه با آب معمولی و بدون انجام عمل ضدعفونی سطحی و در نهایت کشت آن‌ها روی محیط کشت‌های آگاردار حاوی آنتی بیوتیک صورت پذیرفت. خالص سازی جدایه‌ها به روش تک اسپورسازی انجام شد.

استفاده از محیط کشت‌های تحریک کننده‌ی اسپورزایی

از آن جا که اغلب قارچ‌ها در محیط کشت‌های عمومی مانند PDA اسپورزایی نکرده و یا تولید اسپورهای معدودی می‌نمایند، به منظور تحریک اسپورزایی قارچ‌های مورد مطالعه در این بررسی، از محیط کشت‌های زیر بهره گرفته شد:

محیط کشت CLA در مورد جدایه‌های *Fusarium* (نلسون و همکاران ۱۹۸۳، لزلی و سامرل ۲۰۰۶)، محیط کشت PCA در مورد جدایه‌های *Alternaria* (سیمونز ۱۹۹۷)، محیط کشت‌های MEA[1]، CYA[2] و CYA 20% (Sucrose در مورد جدایه‌های *Aspergillus* (کلیچ ۲۰۰۲) و RA[3] جهت تحریک اسپورزایی قارچ‌های عقیم و یا افزایش اسپوردهی برخی از جدایه‌های جنس *Alternaria* (هال ۱۹۸۷).

شناسایی جدایه‌ها

به منظور شناسایی جدایه‌ها ابتدا از مشخصات مورفولوژیکی استفاده شد و با مقایسه ی خصوصیات ریخت شناسی پرگنه‌ها و نیز مشاهدات میکروسکوپی، شناسایی جنس‌ها و گونه‌ها با استفاده از کلیدها و منابع علمی معتبر صورت گرفت. مشخصات مورفولوژیکی و ماکروسکوپی مورد بررسی در این مطالعه، میزان رشد، رنگ و ویژگی‌های ظاهری پرگنه‌ها روی محیط‌های کشت بود. الگوی اسپورزایی قارچ‌ها با بررسی کشت‌ها در زیر بینوکولر مشخص گردید. صفات میکروسکوپی شامل مشخصات ریسه، کنیدیوفور، فیالید، سلول کنیدیوم‌زا و کنیدیوم‌ها با تهیه ی لام از محیط‌های کشت مورد بررسی قرار گرفت.

برای شناسایی گونه‌های مختلف جنس *Fusarium* از کلیدها و منابع علمی معتبر شامل گرلاخ و نیرنبرگ (۱۹۸۲)، نلسون و همکاران (۱۹۸۳)، برگیس و همکاران (۱۹۹۴)، سیفرت (۱۹۹۶)، گزو (۲۰۰۴) و لزلی و سامرل (۲۰۰۶) استفاده گردید. جهت تشخیص گونه‌های *Alternaria* از سیمونز(۲۰۰۷)، دمش و همکاران (۲۰۰۷) و ودنبرگ و همکاران (۲۰۱۳) استفاده شد. برای شناسایی گونه‌های *Penicillium* از منابع معتبر شامل رامیرز و مارتینز (۱۹۸۲)، پیت (۱۹۸۸) و فریسواد و سمسون (۲۰۰۴) استفاده گردید. گونه‌های مختلف جنس *Aspergillus* بر اساس توصیفات کلیچ (۲۰۰۲)، گونه‌های مربوط به جنس‌های *Botrytis* و *Periconia* به ترتیب بر اساس نوشته‌های چیلورز و دو تویت (۲۰۰۶) ، فریدریکسن و ادوودی (۱۹۸۶) ا لیس (۱۹۷۱) و کارماران و نواس (۲۰۰۳) و گونه‌های مربوط به جنس‌های *Curvularia* و *Bipolaris* بر اساس توصیفات سیوانسان (۱۹۸۷) و منامگودا و همکاران (۲۰۱۴) شناسایی شدند. شرح گونه مربوط به جنس *Trichoderma* با توصیف بیست (۱۹۹۲) انجام شد. همچنین منطقه ژنی ITS_1+5.8S+ITS_2 برخی جدایه‌ها توالی یابی شد که توالی این قسمت از ژن در برخی موارد به شناسایی کمک نمود.

استخراج DNA و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (Polymerase Chain Reac tion)

به منظور آماده سازی میسلیوم جهت استخراج DNA، ابتدا توده‌ی میسلیومی رشد کرده‌ی جدایه‌های قارچی (گونه‌های مختلف جنس فوزاریوم و جنس میکرودوکیوم) مورد نظر در محیط کشت PDA، با ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل شستشو داده شده و به ظروف شیشه‌ای استریل منتقل شدند، سپس به کمک

[1] Malt Extract Agar
[2] Czapek Yeast Agar
[3] Root Agar

دستگاه فریز-درایر در شرایط خلا و انجماد، لیوفیلیزه[1] شدند. سپس از ۲۰ میلی‌گرم از میسلیوم پودر شده‌ی جدایه‌ها (به کمک همزن شیشه‌ای استریل) به منظور استخراج DNA کل قارچ، مطابق با روش لیو و همکاران (۲۰۰۰) با اعمال تغییراتی استفاده گردید. به منظور انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) از جفت آغازگر ITS_1/ITS_4 (وایت و همکاران ۱۹۹۰) محصول (Bioneer, Germany) استفاده شد و ناحیه‌ی $ITS_1+5.8S+1TS_2$ جدایه‌های مورد نظر مطابق برنامه‌ی حرارتی به‌کاررفته توسط استوارت و همکاران (۲۰۰۶)، در حجم ۲۵ میکرولیتر حاوی ۵۰ نانوگرم DNA، ۱۰ پیکومول از هرکدام از آغازگرهای ITS_1 و ITS_2، ۰/۲ میلی مولار $dNTP_S$، ۴ میلی مولار از $MgCl_2$، یک واحد آنزیم Top DNA polymerase و 1X بافر PCR تکثیر شد.

تعیین توالی و آنالیز آنالیز فیلوژنتیک داده‌ها

پس از حصول اطمینان از تکثیر قطعات، محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز توسط شرکت ماکروژن[2] کره‌جنوبی تخلیص و توالی‌یابی شد. پس از ویرایش توالی‌ها به کمک نرم افزار BioEdit، توالی هر نمونه با سایر توالی‌های ثبت شده در پایگاه اطلاعاتی NCBI مورد مقایسه قرار گرفته و بدین ترتیب شناسایی قطعی گونه‌ها انجام گرفت. به منظور ترسیم شجره‌های فیلوژنتیکی، توالی‌های مرجع بر اساس توالی‌های معتبر موجود در NCBI و بر اساس بالاترین میزان شباهت انتخاب شدند (جدول ۱). جهت آماده‌سازی نهایی نمونه‌ها برای آنالیز فیلوژنتیک، با استفاده از نرم‌افزار ClustalX 2.1 رج‌بندی توالی‌ها[3] انجام شد و در نهایت درخت فیلوژنتیک به روش ماکسیمم پارسیمونی[4] با استفاده از نرم‌افزار PAUP 4.0b10 و بر اساس آزمون اعتبارسنجی با ۱۰۰۰ تکرار ساخته شد. لازم به ذکر است که درخت فیلوژنتیک تنها برای گونه‌های جنس فوزاریوم و میکرودوکیوم ترسیم شد گونه *Nectria cinnabarina* به عنوان گروه خارجی با شماره دسترسی KU516528.1 در بانک ژنی نظر گرفته شده است (جدول ۱).

بررسی بیماری‌زایی جدایه‌ها

این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با ۱۶ تیمار شامل قارچ‌های *Fusarium acuminatum, F. avenaceum, F. chlamydosporum, F. equiseti, F. redolens, F. sambucium, F. scirpi, F. solani, F. tricinctum, Microdochium nivale, Bipolaris sorokiniana,Curvularia australiensis, Periconia circinata, Alternaria chlamydospora, Botrytis cinerea* و شاهد، در سه تکرار در گلخانه و در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد. جهت تهیه‌ی مایه تلقیح جدایه‌های قارچی هیفومیستی از روش بیلگی و همکاران (۲۰۰۸) با کمی تغییر استفاده شد. به این صورت که ابتدا مخلوطی با نسبت ماسه (۴۵ گرم)، آرد ذرت (۵ گرم) و آب مقطر (۱۰میلی‌لیتر) سه روز متوالی به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه‌ی سلسیوس اتوکلاو شد و سپس تعداد شش دیسک یک سانتیمتری از هر گونه‌ی قارچی که روی محیط کشت PDA کشت شده بودند، درون ارلن‌های حاوی مخلوط آرد ذرت و ماسه انداخته شد و به مدت ۲۱ روز در دمای اتاق قرار داده شد و هر روز ظرفها خوب تکان داده شدند تا اجازه‌ی رشد به قارچ در سراسر محتویات داده شود.

در این آزمون به یک جدایه از هر گونه اکتفا نشد، بلکه با توجه به تعداد جدایه‌های هر گونه، دیسک‌های میسلیومی از دو یا چند جدایه مختلف متعلق به هرگونه برداشته شد. سپس مایه تلقیح هر یک از گونه‌ها به نسبت ۱۰ درصد وزنی به خاک سه سانتی‌متری بالای گلدان‌هایی با قطر دهانه‌ی ۱۲ سانتی‌متر اضافه شد. در گلدان‌های شاهد به جای مایه‌ی تلقیح از خاک سترون استفاده گردید. سپس مقداری بذر رقم گندم سرداری (رقم غالب کشت شده در استان) با هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد به مدت ۵ دقیقه ضدعفونی سطحی شد و پس از سه بار شستشو با آب مقطر سترون درون پتری‌دیش-های که دو طرف آن با کاغذ صافی مرطوب سترون پوشانده شده بود، قرار گرفت و به مدت دو روز در

[1] Lyophilize
[2] Macrogen company
[3] Multiple alignment
[4] Maximum parsimony (MP)

دمای چهار درجه‌ی سلسیوس درون یخچال قرار گرفت. سپس به مدت یک روز در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس قرار گرفت تا جوانه بزند. آن‌گاه از گیاهچه‌های سالم که دارای سه ریشه‌چه به طول یک سانتی‌متر بودند، برای کاشت در هر گلدان استفاده شد. گلدان‌ها به مدت دو ماه در گلخانه با دمای ۴ ± ۲۵ درجه‌ی سلسیوس نگهداری و بر حسب نیاز گیاه آبیاری شدند. پس از دو ماه بوته‌ها از خاک خارج شده و ایجاد یا عدم ایجاد پوسیدگی و نکروز ریشه و نیز درصد خسارت اندام هوایی در آنها مورد بررسی قرار گرفت.

جهت تکمیل اصول کخ (Koch's postulates) در اثبات بیماری‌زایی گونه‌ها، قطعات ریشه‌ی گیاهان تیمار شده‌ای که علائم نکروز در ریشه‌ی خود داشتند، مجددا پس از ضد عفونی سطحی در محیط کشت PDA کشت شدند. فاکتورهای دیگر مورد ارزیابی در این بررسی تاثیر قارچها بر وزن خشک/تر ریشه و اندام هوایی و نیز طول ریشه و اندام هوایی گندم بود. شدت بیماری در ریشه با مقیاس ۰-۵ درجه‌ای طبق روش کیم و همکاران (۱۹۹۷) اندازه‌گیری شد (صفر=۰٪، ۱=۱-۲۰٪، ۲= حدود ۵۰٪، ۳= ۷۰-۶۰٪، ۴= مرگ گیاهچه پس از بیرون آمدن از خاک، ۵= مرگ گیاهچه قبل از بیرون آمدن از خاک یا پوسیدگی بذر). جهت اندازگیری علائم اندام‌های هوایی از روش هارتمن و همکاران (۱۹۹۷) استفاده شد: عدم وجود علائم در اندام‌های هوایی=صفر، روشن شدن برگ‌ها با حالت رنگ پریدگی =۱، علائم متوسط با کلروز و نکروز بین برگی (۲۱-۵۰٪ آلودگی برگی)=۲، علائم سنگین با کلروز و نکروز بین برگی(۵۱-۸۰٪ آلودگی برگی)=۳، علائم شدید با کلروز و نکروز بین برگی(۸۱-۱۰۰٪ آلودگی برگی)=۴، لازم به ذکر است که آزمون بیماری‌زایی در مورد جدایه‌های قارچی هیفومیستی که ساپروفیت بودن آن‌ها (بر اساس توصیفات ارایه شده در کلیدهای شناسایی مرتبط با خود) روی ریشه و طوقه‌ی گندم بارز بود، صورت نگرفت.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

نرمال سازی درصدهای شدت بیماری‌زایی ریشه و اندام‌های هوایی با استفاده از فرمول $Y=ArcSin\ \sqrt{Y}$ (درصد شدت بیماری‌زایی قارچ عامل بیماری) انجام گرفت (لیتل و هیلز ۱۹۷۸) . تجزیه و تحلیل آماری داده‌های هشت فاکتور اندازه‌گیری شده در این پژوهش، با استفاده از نرم افزار SAS ver. 9.1.3 انجام گرفت؛ این تجزیه و تحلیل‌ها شامل ANOVA و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح معنی داری پنج درصد بود.

نتایج و بحث

قارچ‌های شناسایی شده

در این بررسی در مجموع ۲۸۶ جدایه قارچی از ریشه و طوقه‌ی گندم به دست آمد که از این میان، ۲۴۸ جدایه در گروه هیفومیست‌ها مورد بررسی و شناسایی قرار گرفتند و در نهایت این جدایه‌ها در ۱۰ جنس و ۲۳ گونه به شرح زیر قرار گرفتند: *Alrernaria alternata, A. atrum, A. chlamydospora, A. tenuissima, Aspergillus auricomus, A. niger, Bipolaris sorokiniana, Botrytis cinerea, Curvulari australiensis, C. inaequalis, Fusarium acuminatum, F. avenaceum, F. chlamydosporum, F. equiseti, F. redolens, F. sambucinum, F. scirpi, F. solani, F. tricinctum, Microdochium nivale, Periconia circinata, Penicillium. chrysogenum, T. atroviride* فهرست پراکنش و فراوانی گونه‌های قارچی شناسایی شده در جدول ۲ ارایه شده است. لازم به ذکر است که قارچ‌های جداسازی شده طی مراحل پنجه‌دهی، به ساقه رفتن تا سفت شدن دانه‌ها مشابه هم بوده و لذا در جدول ذکر نگردیده است. ذیلا به شرح برخی از گونه‌های شناسایی شده در این تحقیق که به لحاظ شکل‌شناسی (سومین گونه‌ی توصیف شده) و یا بیماری‌زایی (دومین گونه‌ی توصیف شده) اهمیت دارند، پرداخته می‌شود. گونه *Aspergillus auricomus* برای نخستین بار از ریزوسفر گندم در ایران گزارش می‌شود و لذا در زیر توصیف شده است.

جدول ۱- جدایه‌های قارچی مورد استفاده در آنالیز فیلوژنتیک.

کد جدایه‌های مورد مطالعه	گونه‌های مقایسه شده از بانک ژنی	شماره دسترسی گونه‌ها در بانک ژنی ITS
	Microdochium nivale	**EF187912.1**
۸	*M. nivale*	**EF187912.1**
۱۴	*Monografella. Nivalis*	**FJ614641.1**
۳	*Fusarium tricinctum*	**JX179207.1**
۵	*F. tricinctum*	**JX179207.1**
۲۲	*F. tricinctum*	**JX179207.1**
۹	*Gibberella avenacea*	**EU255801.1**
۲۵	*G. avenacea*	**JX406576.1**
۱۹	*F. avenaceum*	**JN631748.1**
	F. redolens	**EF495234.1**
	F. equiseti	**JQ412109.1**
	F. chlamydosporum	**JX406535.1**
	G. acuminate	**EF531234.1**
	F. solani	**JX524020.1**
	Nectria cinnabarina	**KU516528.1**

***Aspergillus auricomus* (Guegen) Saito.**

قطر رشد پرگنه در محیط کشت CYA25، پس از هفت روز برابر با هفت سانتی‌متر بود. کنیدی‌زایی در این محیط کشت نسبت به محیط کشت MEA بیش‌تر بوده و مناطق کنیدی‌زایی زرد رنگ بود. اسکلرت‌های زرد تا زرد مایل به قهوه‌ای روشن به فراوانی تشکیل شده و رنگ پرگنه از زیر تشتک پتری قرمز مایل به خاکستری تا قهوه‌ای روشن بود. قطر رشد پرگنه در محیط کشت CYA20S، هفت و نیم تا هشت سانتی‌متر بود. سایر مشخصات مشابه ویژگی‌های ذکر شده روی محیط کشت CYA25 بود با این تفاوت که اسپورزایی بسیار فراوان بوده و رنگ پرگنه از زیر تشتک پتری زرد مایل به نارنجی بود. این جدایه روی محیط کشت CYA37 رشد چندانی نداشت. ابعاد پایه‌ها، ۱۰-۷/۵ × ۲۱۰۰-۹۰۰ میکرومتر، سطح آن‌ها معمولا زبر و رنگشان شفاف بود. وزیکل‌ها به دو شکل کروی و قاشقی شکل رویت شد که عرض آن‌ها در دو اندازه‌ی ۲۰-۱۷/۵ و ۴۷/۵-۳۷/۵ میکرومتر بود. فیالیدها به صورت دو ردیفه تشکیل شده و ابعاد آن‌ها ۴-۲/۵ × ۱۰-۷ میکرومتر بود. متولاها تقریبا کل سطح وزیکل را پوشانده و ابعاد آن‌ها ۵-۴ × ۱۵-۱۰ و ۳-۲ × ۳/۵-۷ میکرومتر بود، کنیدیوم‌ها کروی، زرد رنگ بوده و سطح آن‌ها صاف، به ابعاد ۳-۲/۵ میکرومتر بودند. ویژگی‌های این گونه با توصیف کلیچ (۲۰۰۲) انطباق کامل داشت. دو گونه *Aspergillus sclerotiorum* به لحاظ تولید اسکلرت‌های سفید رنگ تا زرد نخودی و *A. melleus* به دلیل ابعاد کوچک پایه و وزیکل از این گونه متمایز می‌گردد. این گونه معمولا از خاک جداسازی می‌شود (کلیچ ۲۰۰۲). ویژگی‌های این گونه با توصیف کلیچ (۲۰۰۲) انطباق کامل داشت. در ایران این گونه که توسط پورعبدالله (۱۳۷۴) از بذور بادام زمینی جداسازی شده است برای نخستین بار از ریزوسفر گندم در ایران گزارش می‌شود.

***Botrytis cinerea* Persoon**

رشد پرگنه به صورت پراکنده، خاکستری رنگ و منظره پودری داشت. اسکلرت‌های سیاه‌رنگ پس از حدود یک هفته در محیط کشت PDA رشد کردند. کنیدیوفورها صاف تا اندکی خمیده، قهوه‌ای رنگ، منشعب و انتهای هر کدام از انشعابات متورم شده (وزیکل) و روی آن تعدادی استریگما تشکیل شده بود. در سطح استریگما کنیدیوم‌ها به طور همزمان تشکیل شده و ظاهر خوشه مانندی داشتند. کنیدیوفورها جدار

صاف و ضخیم داشتند. قطر انشعابات کنیدیوفور ۴٫۵–۱۳٫۷۵ میکرومتر و ابعاد استریگما ۶٫۲۵–۵ × ۱۳٫۷۵–۶٫۲۵ میکرومتر بود. کنیدی‌ها بی‌رنگ و یا به رنگ قهوه‌ای روشن بوده و سطح صاف داشتند. کنیدی‌ها جدار عرضی نداشته ولی گاهی دارای ۲–۱ جدار عرضی و به اشکال مختلف بیضوی، تخم مرغی، کروی یا نیمه کروی دیده شد. ابعاد کنیدی‌ها ۸٫۷۵–۴٫۷۵ × ۲۰–۱۰ میکرومتر بود. این جنس در برگیرنده بسیاری از پاتوژن‌های مهم گیاهی است (الیس ۱۹۷۱). مشخصات این جدایه با توصیف چیلورز و دو تویت (۲۰۰۶) مطابقت داشت. این گونه از گیاه گندم و از کشورهای چین (تای ۱۹۷۹) و لهستان (مولنکو و همکاران ۲۰۰۸) گزارش شده است. در ایران این گونه توسط میرزایی و همکاران (۱۳۸۶) از گندم جداسازی شده است. شناسایی این گونه با استفاده از ویژگی های شکل‌شناسی انجام شد و نیز با مقایسه توالی ناحیه‌ی ITS+5.8S با توالی‌های ثبت شده در NCBI تایید گردید. نتایج آزمون بیماری‌زایی در این بررسی نشان داد که قارچ *B. cinerea* بیشترین تاثیر را در ایجاد علائم نکروز ریشه و کاهش ارتفاع بوته داشت.

***Microdochium nivale* (Fr.) Samuels & I.C. Hallett**

میزان رشد پرگنه روی محیط کشت PDA و در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتیگراد پس از گذشت هفت روز، ۷/۳–۶/۵ سانتی‌متر بود. پرگنه‌ها به رنگ کرم مایل به نارنجی کم رنگ بوده و تشکیل اسپوردوکیوم‌های نارنجی رنگ در وسط محیط کشت به چشم می‌خورد. رنگ کلنی از زیر تشتک پتری نیز به همان رنگ کرم مایل به نارنجی کمرنگ بود. در برخی از جدایه‌های به دست آمده از این گونه ظاهر پرگنه به گونه‌ای بود که گویی قارچ دفرمه شده است. اسپوردوکیوم‌های فراوان به رنگ نارنجی تیره در اطراف و روی برگ‌های میخک تشکیل شده در حالیکه ریسه‌های پنبه‌ای در این محیط کشت رویت نشد. ماکروکنیدی‌ها از فیالیدهای منفرد روی کنیدیوفورهای منشعب واقع در اسپوردوکیوم تشکیل شده و به لحاظ اندازه، کوچک بوده و ظاهری داسی شکل داشتند. ماکروکنیدی‌ها دارای ۱–۰ جدار عرضی (اغلب یک جدار عرضی) بوده، سلول انتهایی به شکل قلاب و سلول پایه دارای کمی فرورفتگی و ابعاد ماکروکنیدی‌ها ۲/۵–۱/۷۵ × ۱۲/۵–۷/۵ میکرومتر بود. در هیچ یک از جدایه‌های به دست آمده تشکیل کلامیدوسپور مشاهده نشد. با توجه به تشابه بالای توالی ناحیه‌ی ITS+5.8S جدایه‌ها با توالی ثبت شده برای گونه *M. nivale* در NCBI (درصد تشابه ۱۰۰ درصد)، شناسایی گونه *M. nivale* تایید شد. ویژگی‌های این گونه با توصیفات گرلاخ و نیرنبرگ (۱۹۸۲) و سیفرت (۱۹۹۶) مطابقت داشت. این گونه از گیاه گندم در استرالیا، بلغارستان، مجارستان، چین، واشنگتن و دیگر مناطق به ترتیب(شیواس ۱۹۸۹، بوب ۲۰۰۹، ریچاردسون ۱۹۹۰، تای ۱۹۷۹ و اسپراگو ۱۹۵۰) و در ایران از گرگان و خوزستان گزارش شده است (ارشاد ۱۳۸۸).

نتایج آنالیزهای فیلوژنتیکی

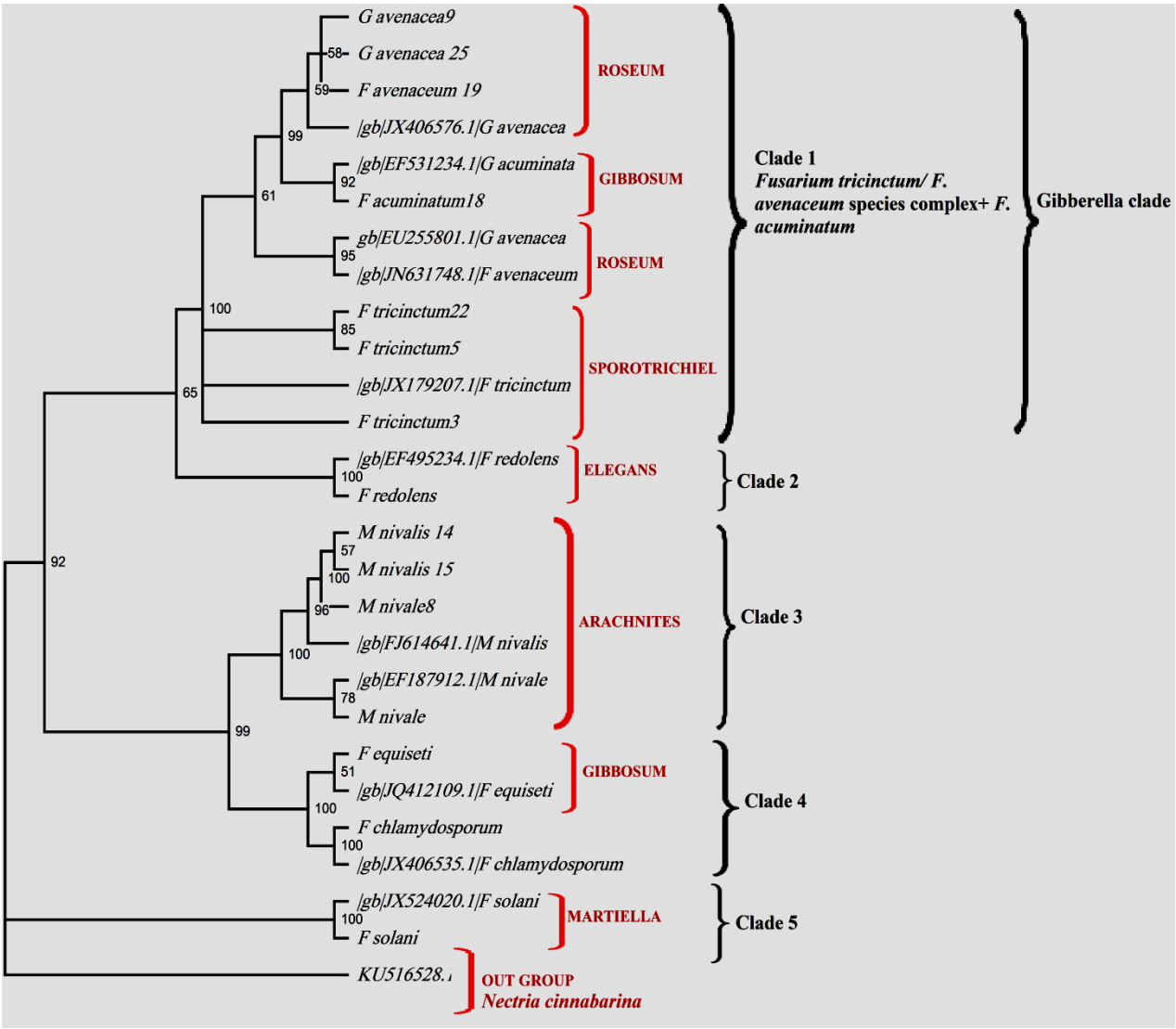
ترسیم درخت فیلوژنی به روش ماکسیمم پارسیمونی نشانگر تشکیل چهار کلاد مهم داخل جنس *Fusarium* و یک کلاد در جنس *Microdochium* بود (شکل ۱). مطالعات تاکسونومیکی گذشته بر مبنای ویژگی‌های شکل‌شناسی گونه‌های مختلف جنس فوزاریوم را در ۱۳ بخش قرار داده‌اند (نلسون و همکاران ۱۹۸۳). به گونه‌ای که افراد هر بخش بیش‌ترین شباهت را با هم دارند، به عنوان مثال تشابه زیادی بین گونه *F. equiseti* و دیگر گونه‌های بخش Gibbosum از جمله *F. scirpi* ،*F. compactum* و *F. longipes* وجود دارد.

ویژگی عمومی جدایه‌های موجود در بخش‌های Gibbosum ،Sporotrichiella ،Roseum ،Arthrosporiella و Discolor رشد میسلیومی سریع و فراوان بوده و سطح زیرین پرگنه‌های آنها به رنگ قرمز جگری است. ترسیم درخت فیلوژنی بر مبنای توالی‌یابی ناحیه‌ی ITS نشان داد که گونه‌های هر کلاد ارتباط نزدیکی با یکدیگر دارند. گونه *F. acuminatum* و *F. avenaceum* از بخش Roseum مقداری شبیه به هم بوده و مورد اختلاف آن‌ها کلامیدوسپورها هستند که در *F. avenaceum* وجود ندارند. همچنین کلاد ۲ با دارا بودن فیالیدهای کوتاه‌تر و کلفت‌تر، ماکروکنیدوم‌های باریکتر با یاخته انتهایی تیزتر و نیز میکروکنیدیوم‌های کوچکتر از کلاد ۵ متمایز می-

شود. همچنین بر اساس تجزیه و تحلیل مولکولی جنس *Microdochium* نزدیک به سایر گروه های جنس *Fusarium* قرار می‌گیرد.

جدول ۲- پراکنش و تعداد جدایه‌های مربوط به گونه‌های قارچی شناسایی شده از ریشه و طوقه‌ی گندم در استان زنجان.

گونه‌های قارچی جداسازی شده طی مراحل مختلف رشدی گیاه	نام شهرستان و فراوانی جدایه‌ها				تعداد کل جدایه
	زنجان	خدابنده	خرمدره	ماهنشان	ابهر	
Fusarium acuminatum	۲۲	۰	۳	۴	۱۱	۴۱
F. equiseti	۴	۰	۷	۲	۵	۱۸
F. sambucinum	۰	۰	۰	۱	۰	۱
F. scirpi	۰	۰	۰	۰	۱	۱
F. redolens	۲	۰	۰	۰	۰	۲
F. solani	۰	۰	۲	۰	۰	۲
Microdochium nivale	۱۱	۳	۵	۷	۰	۲۶
F. chlamydosporum	۱	۰	۰	۰	۰	۱
F. tricinctum	۵	۱	۱	۲	۳	۱۲
F. avenaceum	۳	۲	۲	۲	۴	۱۳
Alternaria	۳۶	۸	۱۴	۸	۰	۶۶
A. alternata	۱	۰	۱	۰	۰	۲
A. tenuissima	۵	۰	۰	۱	۰	۶
A. atrum	۳	۰	۳	۲	۱	۹
Aspergillus niger	۰	۰	۱	۰	۰	۱
A. auricomus	۰	۰	۰	۰	۱	۱
Trichoderma atroviride	۳	۰	۱	۰	۰	۴
Botrytis cinerea	۰	۰	۲	۰	۱	۳
Bipolaris sorokiniana	۶	۰	۸	۰	۹	۲۳
Curvularia australiensis	۱	۰	۴	۲	۳	۱۰
C. inaequalis	۱	۰	۰	۰	۰	۱
Periconia circinata	۰	۰	۱	۰	۲	۳
Penicillium chrysogeum	۲	۰	۰	۰	۱	۳



شکل ۱- فیلوژنی برخی جدایه‌های متعلق به جنس‌های ***Fusarium*** و ***Microdochium*** با استنتاج از توالی **ITS** ترسیم درخت فیلوژنی به روش ماکسیمم پارسیمونی با استفاده از نرم‌افزار **PAUP 4.0b10**، بر اساس آزمون اعتبارسنجی با ۱۰۰۰ تکرار. نام‌های موجود در نمودار از چپ به راست: نام جدایه‌ها و شماره توالی آن‌ها در بانک ژنی ، نام بخش مربوط به جنس فوزاریوم، کلاد تشکیل شده در دندروگرام.

نتایج آزمون بیماری‌زایی

نتایج آزمون بیماریزایی ۱۵ جدایه قارچی در شرایط گلخانه نشان داد که قارچ‌های *Botrytis cinerea*، *Bipolaris sorokiniana*، *Fusarium avenaceum*، *F. acuminatum*، *Periconia circinata*، *B. australiensis*، *F. equiseti*، *F. solani* و *Alternaria chlamydospora* سبب ایجاد علائم بیماری روی رقم گندم سرداری می‌شوند با این تفاوت که شدت بروز علائم در میزبان توسط گونه‌های مختلف قارچی متفاوت بود. در گیاهان شاهد هیچ علائمی از بیماری مشاهده نشد. لازم به ذکر است که از گیاهان بیمار گونه‌های مورد بررسی مجددا جداسازی شدند (جدول ۳).

جدول ۳- نتایج آزمون بیماری‌زایی گونه‌های قارچی مختلف روی گندم رقم سرداری در شرایط گلخانه‌ای.*

تیمار	طول ریشه (cm)	طول اندام هوایی (cm)	وزن تر ریشه (mg)	وزن تر اندام هوایی (mg)	درصد خسارت ریشه	درصد خسارت اندام هوایی
گیاه سالم	۲۲/۸ a	۰/۴۰ a	۴۱/۰ a	۲۴۰/۰ a	۰ g	۰ e
F. tricinctum	۰/۱۷ bc	۰/۳۷ ba	۱۳/۰ dc	۱۰۶/۰ dc	۰ g	۰ e
F. scirpi	۲/۱۵ bcd	۰/۳۲ ebdcf	۲۹/۳ ba	۲۱۶/۰ a	۰ g	۰/۱۱۴ e
F. solani	۱۴/۸ bcd	۶/۳۵ bdac	۸/۳ d	۱۴۰/۰ bc	۰/۵۶۰ d	۰/۳۲۱ c
F. chlamydosporum	۵/۱۴ bcd	۰/۳۳ ebdacf	۱۲/۶ dc	۷۰/۰ de	۰/۳۳۶ e	۰/۱۸۳ d
F. sambucinum	۶/۱۳ becd	۱/۳۱ ebdcf	۲۳/۳ bc	۵۳/۰ de	۰ g	۰ e
A. chlamydospora	۶/۱۳ becd	۶/۳۳ ebdac	۱۲/۶ dc	۹۶/۰ dce	۰/۲۲۹ f	۰/۱۶۹ d
F. redolens	۸/۱۲ fbecd	۸/۳۰ ebdcf	۱۳/۳ dc	۵۳/۰ de	۰ g	۰ e
M. nivale	۸/۱۲ fbecd	۱/۳۶ bac	۱۲/۳ dc	۹۶/۰ dce	۰ g	۰ e
C. australiensis	۳/۱۲ fecd	۰/۳۲ ebdcf	۸/۳ d	۶۰/۰ de	۰/۶۸۳ c	۰/۷۸۰ ba
P. circinata	۱/۱۱ fed	۵/۲۹ ebdcf	۱۵/۳ dc	۹۳/۰ dce	۰/۷۰۱ bc	۰/۷۶۷ ba
B. cinerea	۰/۱۱ fed	۰/۲۵ f	۱۳/۳ dc	۶۰/۰ de	۰/۸۱۸ a	۰/۸۶۹ a
F. equiseti	۸/۱۰ fed	۸/۲۸ edcf	۹/۶ dc	۳۶/۰ e	۰/۵۶۰ d	۰/۳۴۷ c
F. acuminatum	۵/۸ fe	۸/۳۱ ebdcf	۱۱/۰ dc	۹۰/۰ dce	۰/۷۳۵ bac	۰/۷۰۰ b
F. avenaceum	۸/۷ f	۸/۲۷ edf	۸/۰ d	۷۰/۰ de	۰/۷۳۵ bac	۰/۷۱۸ b
B. sorokiniana	۷/۳ f	۳/۲۷ ef	۱۲/۰dc	۱۲۰/۰ dc	۰/۷۸۰ ba	۰/۷۱۸ b

*اعداد جدول میانگین سه تکرار می‌باشند؛ در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حروف غیرمشابه هستند دارای تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد می‌باشند؛ داده های مربوط به وزن خشک ریشه و اندام هوایی تفاو ت معنی داری با هم و گیاه سالم نداشتند و از جدول حذف شده اند.

در این بررسی بیشترین جدایه‌های به دست آمده مربوط به جنس و گونه‌های فوزاریوم بود و در این بین قارچ‌های *Fusarium acuminatum*، *F. avenaceum* و *F. equiseti* به ترتیب بیشترین فراوانی را داشتند. در این بررسی در مجموع ۱۰ آرایه فوزاریوم از ریشه و طوقه‌ی گندم از استان زنجان جداسازی شد. با بررسی جدایه-های بیشتر از این استان، تنوع گونه‌ای این قارچ همه جازی نیز افزایش خواهد یافت. توانایی بالای زندگی ساپروتروفی روی مواد مختلف، داشتن مکانیزم‌های مختلف برای پراکنش و نیز قدرت دوام و بقای طولانی در شرایط نامناسب، امکان سازگاری گونه‌های مختلف این جنس را در نواحی متفاوت اکولوژیکی فراهم آورده است.

چگونگی فعالیت و الگوی پراکنش قارچ‌های *F. acuminatum* و *F. avenaceum* در اغلب مناطق معتدل و نسبتا سرد گندمکاری استان زنجان موید این مطلب می‌باشد که عوامل اقلیمی خصوصا دما و رطوبت نقش عمده‌ای در حضور و یا عدم حضور یک گونه در آن منطقه دارد. اگرچه هر دو گونه مذکور عمدتا ساپروفیت هستند ولی قارچ *F. acuminatum* به عنوان یکی از عوامل پوسیدگی ریشه‌ی گندم دیم در کلرادو مطرح بوده و قارچ *F. avenaceum* سبب آلودگی خفیف تا متوسط بذور گندم در آلبرتای کانادا شده است (مرگام و همکاران ۱۹۹۸، تورکینگتون و همکاران ۲۰۰۲، لزلی و سامرل ۲۰۰۶). گونه‌های *F. equiseti* و *F. tricinctum* به عنوان گونه‌های همه‌جازی از اغلب

شهرستان‌های استان جداسازی شدند. صفات مورفولوژیک جدایه‌هایی از دو گونه اخیر در محیط کشت با تغییرات شدیدی همراه بود. احتمالا به دلیل چنین خصوصیتی، این گونه‌ها قادر هستند نواحی اکولوژیکی وسیعی را در بسیاری از مناطق جغرافیایی اشغال کنند. گونه‌ی *F. equiseti* به عنوان عامل بیماریزای ثانویه شناخته شده، از این رو بیماریزایی آن باید مورد بررسی قرار بگیرد (سامرل و همکاران ۲۰۰۳). این قارچ در کشور کانادا به عنوان عامل بیماری بلایت خوشه گندم معرفی شده است (گزو و همکاران ۲۰۰۴). گونه *Fusarium tricinctum* عمدتا ساپروفیت بوده (چلکوسکی و همکاران ۱۹۸۹) و در برخی مناطق از آن به عنوان پارازیت ضعیف یاد می‌شود (لمپریچت ۱۹۸۸). شیوع زیاد جدایه‌های گونه ی *Microdochium nivale* در مناطق مرتفع و سردتر روستاهای شهرستان زنجان و ماهنشان نسبت به سایر مناطق استان، گویای همبستگی ژنتیکی این گونه با دمای سرد بود. این گونه به عنوان عامل کپک برفی گندم در جهان مطرح است و آلودگی ریشه‌ها و کولئوپتیل‌های گیاهچه‌های غلات با قارچ عامل بیماری در شرایط خاک سرد (۵-۰ درجه‌ی سلسیوس) و خشک رخ می‌دهد. تا کنون گزارشی از وقوع این بیماری در استان زنجان وجود ندارد. در این تحقیق، آزمون بیماری‌زایی این گونه روی گندم رقم سرداری حاکی از عدم ایجاد بیماری بود. اما توجه به این نکته حائز اهمیت است که شرایط گلخانه‌ای مورد استفاده در این تحقیق گرچه برای بیماری‌زایی اغلب گونه‌ها مناسب بود ولی با توجه به وقوع بیماری کپک برفی در آب و هوای سرد، لازم است آزمون بیماری‌زایی *M. nivale* در شرایط سرد تکرار شود. این بیمارگر یکی از شایع‌ترین علل سوختگی برگ گندم در انگلستان به حساب می‌آید (پاولی و همکاران ۱۹۹۶). در مورد جدایه‌های غیر فوزاریومی، قارچ *Bipolaris sorokiniana* به ترتیب پس از جدایه‌های قارچی *Alternaria chlamydospora* و *M. nivale* بیشترین فراوانی را داشت. این قارچ عامل پوسیدگی معمولی ریشه‌ی گندم بوده و به عنوان یکی از عوامل محدود کننده‌ی کشت گندم زمستانه در شمال غربی اقیانوس آرام گزارش گردیده است و میزان کاهش محصول در این مناطق ۳۹-۱۰ درصد برآورد شده است (اسمایلی و پترسون ۱۹۹۶).

در مورد آزمون گلخانه‌ای نتایج مقایسه میانگین علائم نکروز ریشه نشان داد که قارچ *Botrytis cinerea* بیشترین تاثیر را در ایجاد علائم نکروز ریشه و در نهایت کاهش ارتفاع بوته داشت. قارچ‌های *B. sorokiniana*، *F. avenaceum* و *F. acuminatum* به لحاظ شدت بیماری‌زایی در دو گروه آماری قرار گرفته و به ترتیب در رتبه‌های دوم و سوم جای گرفتند. گونه‌های *Periconia circinata*، *C. australiensis*، *F. solani*، *F. equiseti* و *F. chlamydosporum* در رتبه های بعدی جای گرفته و علائم به صورت زخم‌های قهوه‌ای پراکنده در طول ریشه مشاهده شد و در نهایت آلودگی ایجاد شده توسط قارچ *A. chlamydospora* محدود به نوک ریشه‌ها بود. مقایسه میانگین طول اندام‌های هوایی و طول ریشه نشان داد که جدایه‌های *B. sorokiniana* و *F. avenaceum* به ترتیب بعد از قارچ *B. cinerea* بیشترین اثر را در کاهش ارتفاع بوته داشتند. همچنین نتایج مشابهی در مورد طول ریشه به دست آمد با این تفاوت که *B. cinerea* نسبت به دو گونه *B. sorokiniana*، *F. avenaceum* تاثیر کمتری در کاهش طول ریشه نشان داد در حالیکه دو گونه اخیر بیشترین اثر را در کاهش طول ریشه داشته و ضمن قرار گرفتن در یک گروه آماری، تفاوت معنی‌داری با شاهد نشان دادند. از نظر تاثیر وزن ریشه، قارچ *F. avenaceum* بیشترین اثر را در کاهش وزن ریشه داشته و جدایه‌های *Botrytis cinerea*، *Bipolaris sorokiniana*، *F. acuminatum* و *Fusarium equiseti* در یک گروه آماری و در رتبه بعد جای گرفتند. تجزیه واریانس اثر قارچ‌های مورد بررسی بر ایجاد علائم برگی نشان داد که این اثر نیز در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار می‌باشد. بدین صورت که قارچ *Botrytis cinerea* در ایجاد نکروز برگی بیشترین تاثیر را گذاشته و بدین سبب اختلاف معنی‌دار با گیاهان شاهد دارد. قارچ‌های *C. australiensis* و *Periconia circinata* علی رغم ایجاد پوسیدگی کمتر ریشه و طوقه نسبت به جدایه‌های قارچی *B. sorokiniana*، *F. avenaceum* و *F.*

acuminatum، به لحاظ ایجاد نکروز برگی در رتبه دوم و در یک گروه آماری قرار گرفتند و سه جدایه‌ی اخیر با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشته و همگی در یک گروه آماری و در رتبه سوم قرار گرفتند. سایر جدایه‌ها اهمیت کمتری در ایجاد علائم برگی داشته و لذا ذکر نشده‌اند. در مورد وزن اندام‌های هوایی گیاه تلقیح شده با قارچ *F. equiseti* (علیرغم شدت بیماریزایی کم) وزن کمتری داشت؛ دلیل این امر رشد علفی گیاه و عدم وجود انشعابات جانبی بود. قارچ‌های *C. australiensis*، *B. cinerea* و *F. avenaceum* در یک گروه آماری و در رتبه دوم قرار گرفته و قارچ‌های *P. circinata*، *F. acuminatum* و *B. sorokiniana* به ترتیب در رتبه‌های سوم و چهارم جای گرفتند.

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که عوامل قارچی مختلفی در پوسیدگی ریشه و طوقه‌ی گندم در استان زنجان دخالت دارند. این موضوع توسط محققین دیگر نیز گزارش شده است (جعفری و صارمی ۱۳۸۳، ژولیده و همکاران، ۱۳۸۹). در این بررسی از هیچ یک از نمونه‌های گندم جدایه *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* که به عنوان یکی از عوامل اصلی پوسیدگی ریشه و طوقه‌ی گندم در ایران شناخته می‌شود، جداسازی نشد درحالیکه این جدایه توسط ژولیده و همکاران (۱۳۸۹) از مزارع گندم استان زنجان جداسازی شد. بنابراین تغییراتی که در ترکیب قارچ‌ها در مناطق و یا مزارع مختلف مشاهده می‌شود را می‌توان در ارتباط با اثر عملیات زراعی اعمال شده مثل تناوب، آیش، نوع و میزان کوددهی، به جای گذاشتن و یا جمع‌آوری بقایای محصول در مزرعه، رقم مورد استفاده و احتمالا برخی شرایط میکروکلیمایی مثل شیب مزرعه و پستی و بلندی‌های آن دانست. به طور کلی بیماری‌زاترین قارچ‌های این تحقیق به ترتیب گونه‌های قارچی *B. cinerea*، *B. sorokiniana*، *F. avenaceum* و *F. acuminatum* بودند. قارچ *B. cinerea* تاکنون روی گیاه گندم و از استان آذربایجان غربی گزارش شده است (میرزایی و همکاران، ۱۳۸۶) و بیماری‌زایی آن روی ریشه‌ی گندم برای اولین بار در ایران گزارش می‌شود. این گونه به لحاظ شدت بیماری‌زایی روی ریشه‌ی گندم اهمیت داشته ولی به لحاظ پراکندگی اهمیت چندانی در این تحقیق نداشت به طوریکه که در هر یک از شهرستان‌های ابهر و خرمدره، تنها از یک مزرعه جداسازی گردید. گونه‌های *B. sorokiniana*، *F. avenaceum* و *F. acuminatum* به عنوان فراوان‌ترین گونه‌های جداسازی شده در اغلب مزارع استان، در آزمون اثبات بیماری‌زایی نکروز قابل توجهی را در ریشه‌ی گیاهان مایه زنی شده ایجاد کردند، لذا این گونه‌ها پتانسیل ایجاد خسارت در منطقه را دارا بوده و لازم است طی مطالعات تکمیلی بیماری‌زایی سایر جدایه‌های آن‌ها و تنوع بیماریزایی جدایه‌های آن‌ها مورد بررسی بیشتری قرار گیرد. نتیجه این بررسی با مطالعات انجام شده توسط منصوری و همکاران (۱۳۷۸ و ۱۳۸۰) مطابقت دارد. در این بررسی *Bipolaris sorokiniana* و گونه‌های مختلف فوزاریوم (*Fusarium* spp.) به عنوان عامل اصلی بیماری پوسیدگی معمولی ریشه و طوقه‌ی گندم معرفی شدند. در مطالعه مشابه دیگر *B. sorokiniana* به عنوان عامل اصلی پوسیدگی ریشه و طوقه‌ی گندم معرفی شده با این تفاوت که گونه‌های فوزاریوم مورد بررسی در ایجاد علائم بیماری نقشی نداشتند (عمارلو و همکاران ۱۳۸۹). در ریشه‌ی گیاه تلقیح شده با *Microdochium nivale* علائمی مشاهده نشد که با توجه به اینکه این گونه به عنوان عامل کپک برفی برخی گیاهان در جهان مطرح است لازم است بیماری‌زایی سایر جدایه-های این قارچ نیز بر روی رقم‌های مختلف گندم تحت شرایط دمایی مختلف انجام گیرد تا میزان ریسک آن در مناطق سردسیری تعیین گردد. لازم به ذکر است که بسیاری از جدایه‌های این گونه توانایی ساپروفیتی بالایی داشته و لذا عدم ایجاد بیماری توسط جدایه مورد آزمایش این گونه را می‌توان به این ویژگی نیز نسبت داد. با این حال ضرورت بررسی‌های بیشتر در آینده جهت بررسی بیماری‌زایی جدایه‌های دیگری از این گونه و تعیین دامنه میزبانی این گونه در منطقه احساس می‌شود.

منابع مورد استفاده

ارشاد ج، ۱۳۸۸. قارچ‌های ایران. سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی.

امینی ج، ۱۳۷۵. بررسی میکوفلور ریشه گندم در استان تهران. پایان‌نامه کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه تربیت مدرس.

پورعبدالله ش، ۱۳۷۴. بررسی میکوفلور بذر بادام‌زمینی. پایان‌نامه کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه تربیت مدرس.

جعفری ح و صارمی ح، ۱۳۸۳. بررسی قارچ‌های خاکزاد عوامل پوسیدگی ریشه و طوقه‌ی گندم و تعیین میزان خسارت آن‌ها. مجله دانش کشاورزی جلد چهاردهم، شماره ۱. صفحه‌های ۱۳ تا ۲۳.

درویش‌نیا م، علیزاده ع و محمدی گل تپه ا، ۱۳۷۷ گونه‌های فوزاریوم و قارچ‌های مرتبط با پوسیدگی طوقه و ریشه‌ی گندم در استان لرستان. صفحه ۲۰ خلاصه مقالات سیزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، کرج.

درویش‌نیا م، علیزاده ع و زارع ر، ۱۳۸۹. معرفی چهار آرایه جدید فوزاریوم جدا شده از گیاهان تیره‌ی گندمیان در ایران. رستنیها جلد یازدهم، شماره ۱. صفحه‌های ۵۵ تا ۶۷.

دهقان س، هاشمی م و برادران غ، ۱۳۸۹. معرفی گونه‌های بیماریزای قارچی پوسیدگی طوقه و ریشه‌ی گندم در استان کرمان. صفحه-۸۹ خلاصه مقالات نوزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، تهران.

ژولیده ف، ناصری ب و معرفت ع، ۱۳۸۹. گزارش بیماری پاخوره گندم ناشی از قارچ *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* در استان زنجان. صفحه ۲۶۷ خلاصه مقالات نوزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، تهران.

صارمی ح، ۱۳۸۳. معرفی گونه جدید *Fusarium pseudograminearum* عامل بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه‌ی گندم در استان‌های زنجان، آذربایجان شرقی و اردبیل. صفحه ۴۴ خلاصه مقالات شانزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران.

صفائی د، یونسی ح و شیخ الاسلامی م، ۱۳۹۱. گونه‌های فوزاریوم عامل پوسیدگی ریشه و طوقه‌ی گندم در استان کرمانشاه. فصلنامه بیماری‌های گیاهی جلد چهل و هشتم، شماره ۴. صفحه‌های ۶۹ تا ۲۶۵.

عمارلو ا، روحانی ح و مهدیخانی مقدم ع، ۱۳۸۹ . شناسایی و بررسی بیماری‌زایی قارچ‌های عامل پوسیدگی ریشه و طوقه‌ی گندم در استان خراسان شمالی. نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی). جلد بیست و چهارم، شماره ۳. صفحه‌های ۲۸۴ تا ۲۶۹.

کاظمی ه، ۱۳۸۱. فوزاریوم‌های همراه ریشه و طوقه‌ی گندم در استان تهران. صفحه ۳۵ خلاصه مقالات پانزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، کرمانشاه.

محمدی پور م و ارشاد ج، ۱۳۸۱. شناسایی گونه‌های *Bipolaris* عامل پوسیدگی ریشه و طوقه‌ی گندم آبی در استان آذربایجان شرقی. صفحه‌های۳۶ و ۳۷ خلاصه مقالات پانزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. کرمانشاه.

منصوری ب، روانلو ع، نوراللهی خ، آزادبخت ن، جعفری ح و قلندر م، ۱۳۸۱. بیماری پوسیدگی معمولی ریشه و طوقه-ی گندم در استان‌های آذربایجان غربی، ایلام، لرستان، زنجان و مرکزی. صفحه ۴۱ خلاصه مقالات پانزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، کرمانشاه.

میرزائی س، محمدی گل تپه ا و شمس بخش م، ۱۳۸۶. مطالعات تاکسونومیکی روی جنس بوتریتیس در ایران. مجله علوم و فن‌آوری کشاورزی. جلد سوم، شماره ۱. صفحه‌های ۶۵ تا ۷۶.

Bilgi VN, Bradley CA, Khot SD, Grafton KF and Rasmussen JB, 2008. Response of dry bean genotypes to *Fusarium* root rot caused by *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli*, under field and controlled conditions. Plant Disease 92: 1197-1200.

Bissett J, 1992. *Trichoderma atroviride*. Canadian Journal of Botany 70: 639–641.

Bobev S, 2009. Reference guide for the diseases of cultivated plants. Unknown journal or publisher. 466 pp.

Burgess LW, Summerell BA, Bullock S, Gott KP and Backhouse D, 1994. Laboratory manual for *Fusarium* research. *Fusarium* research laboratory. Department of Crop Science University of Sydney and Royal Botanic Gardens. 133 pp.

Carmarán, C.C. and Novas, M.V. 2003. A review of Spegazzini taxa of *Periconia* and *Sporocybe* after over 115 years. Fungal Diversity 14: 67-76.

Chelkowski J, Manka M, Kwasna H, Visconti A and Golinski P, 1989. *Fusarium sporotrichioides* (Sherb.), *Fusarium tricinctum* (Corda) Sacc. and *Fusarium poae* Wollenw. Cultural characteristics, toxigenicity and pathogenicity towards cereals. Journal of Phytopathology 124: 155-161.

Chilvers MI and du Toit LJ, 2006. Detection and identification of *Botrytis* species associated with neck rot, scape blight, and umbel blight of onion. Online. Plant Health Progress doi:10.1094/PHP-2006-1127-01-DG.

Domsch KH, Gams W and Anderson T, 2007. Compendium of Soil Fungi. 2nd ed. Germany. 672 pp.

Ellis MB, 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, England. 608 pp.

Fedel-Moen R and Harris JR, 2010. Stratified distribution of *Fusatium* and *Bipolaris* on wheat and barley with dryland root rot in South Australia. Plant Pathology 36: 447-454.

Frederiksen RA and Odvody GN, 1986. Compendium of Sorghum Disease. 2nd ed. USA: 33-34.

Frisvad JC and Samson RA, 2004. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium* a guide to identification of food and air-borne terverticillate Penicillia and their mycotoxins. Studies in Mycology 49: 1-174.

Gerlach W and Nirenberg H, 1982. The Genus *Fusarium* A Pictorial Atlas of Mitt Biology. Bundesanst, Land-Forswirtsch, Berlin, Dahlem 209: 1-406.

Hall G, 1987. Sterile fungi from roots of winter wheat. Transactions of the British Mycological Society 89: 447-456.

Hartman GL, Huang YH, Nelson RL and Noel GR, 1997.Germplasm evaluation of *Glycine max* for resistance to *Fusarium solani*, the causal organism of sudden death syndrome. Plant Disease81: 515-518.

Kim DS, Cook RJ and Weller DM, 1997. *Bacillus* sp. L324-92 for biological control of three root diseases of wheat grown with reduced tillage. Phytopathology 87: 551-558.

Klich MA, 2002. Identification of common *Aspergillus* species. CBS Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, the Netherlands. 116 pp.

Lamprecht SC, Marasas WFO, Wyk PS and Davies PS, 1988. *Fusarium tricinctum* (Fungi, Hyphomycetes) in South Africa: Morphology and pathogenicity. Bothalia 18: 189-194.

Leslie JF, Summerell BA, 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing Ames, IA. USA. 388 pp.

Little TM and Hills FJ, 1978. Agricultural experimentation design and analysis.John Wiley and Sons. New York. USA. 368pp.

Liu D, Coloe S, Baird R. and Pedersen J, 2000. Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR. American Society for Microbiology 38: 471.

Manamgoda DS, Rossman AY, Castlebury LA, Crous PW, Madrid H, Chukeatirote E and Hyde KD, 2014. The genus *Bipolaris*. Studies in Mycology 79: 221-228.

Mergoum M, Hill JP and Quick JS, 1998. Evaluation of resistance of winter wheat to *Fusarium acuminatum* by inoculation of seedling roots with single, germinated macroconidia. Plant Disease 82: 300-302.

Mulenko W, Majewski T and Ruszkiewicz-Michalska M, 2008. A preliminary checklist of micromycetes in Poland. Polish Academy of Sciences 9: 752.

Nelson PE, Toussoun TA and Marassas WFO, 1983. *Fusarium* species an illustrated manual for identification. Pennsylvania State University Press, University Park. 193 pp.

Paveley ND; Rennie WJ; Reeves JC; Wray MW; Slawson DD; Clark WS; Cockerell V and Mitchell AG, 1996. Cereal seed health strategies in the UK. Home-Grown Cereals Authority, London.

Pitt JA, 1988. A Laboratory Guide to Common *penicillium* species. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization Division of Food Processing. 187 pp.

Ramirez C and Martinez AT, 1982. Manual and atlas of Penicillia . Elsevier biochemical, New York, Oxford. 874 pp.

Richard S and Cynthia MO, 2007. Wheat common root rot. Plant Disease Control. http://www.agric.gov.ab.ca/$ department/deptdocs.nsf/all/prm2394.

Richardson MJ, 1990. An annotated list of seed-born diseases. 4th ed. International Seed Testing Association, Zurich. 387pp.

Seifert k, 1996. Fus key. *Fusarium* interactive key. Agriculture and Agri-Food Canada. 65 pp.

Shivas RG, 1989. Fungal and bacterial diseases of plants in Western Australia. Journal of the Royal Society of Western Australia 72: 1-62.

Simmons EG, 2007. *Alternaria* an identification manual. CBS Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands. 775 pp.

Sivanesan A, 1987. Graminicolous species of *Bipolaris. Curvularia, Drechslera, Exerohilum* and their teleomorphs. Mycological Papers 158: 1-261.

Smiley R and Patterson LM, 1996. Pathogenic fungi associated with foot rot of winter wheat in the semi-arid Pacific Northwest. Plant Diseases 80: 944-949.

Sprague R, 1950. Diseases of cereals and grasses in North America. Ronald Press Company, New York. 538 pp.

Stewart JE, Kim MS, James RL, Dumroese RK and Klopfenstein NB, 2006. Molecular characterization of *Fusarium oxysporum* and *Fusarium commune* isolates from a conifer nursery. Phytopathology 96: 1124-1133.

Summerell BA, Salleh B and Leslie JF, 2003. A Utilitarian approach to *Fusarium* identification. Plant Disease 87: 117-128.

Tai FL, 1979. Sylloge fungorum sinicorum. Science Press, Academia Sinica, Peking. 1527 pp.

Turkington TK, Clear RM, Burnett PA, Patrick SK, Orr DD and Xi K, 2002. Fungal plant pathogens infecting barley and wheat seed from Alberta, 1995-1997. Canadian Journal of Plant Pathology 24: 302-308.

Woudenberg JHC, Groenewald JZ, Binder M and Crous PW, 2013. *Alternaria* redefined. Studies in mycology 75:171-212.

Xue AG, Armstrang KC, Voldeng HD, Fedak G and Babcock C, 2004. Comparative aggressiveness of isolates of *Fusarium* spp. causing headblight on wheat in Canada. Canadian Journal of Plant Pathology 26: 81-88.

Identification and Pathogenicity Assay of Hyphomycetous Fungi Associated with Wheat Root and Crown Rot in Zanjan Province

L Abdipoure Asl [1], R Hemmati [2*], R Zare [3], M T Harkinezhad [4] and AR Alizadeh [5]

[1]Former MSc Student of Plant Pathology, Department of Plant Protection, University of Zanjan, Zanjan, Iran.
[2]Associate Professor of Plant Pathology, Department of Plant Protection, University of Zanjan, Zanjan, Iran.
[3]Research Professor, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.
[4]Associate Professor, Research Institute of Modern Biological Techniques and Department of Animal Science, University of Zanjan, Zanjan, Iran.
[5]Assistant Professor, Department of Plant Protection, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran.
*Corresponding author: rhemati@znu.ac.ir

Received: 18 June 2016 Accepted: 3 June 2017

Abstract

Wheat as the most strategic agricultural crop has an important role in food security, and so the most cultivation area among the agronomic crops, belongs to wheat. Fungi associated with root and crown of wheat, are effective on crop production and yield. Therefore, in order to identify mycobiota of wheat root and crown in Zanjan province, sampling was carried out from 58 rainfed and irrigated wheat fields during cultivation season of 2011. Out of 286 fungal isolates obtained, 248 isolates belonged to hyphomycetes as identified morphologically. Sequence data of ITSrDNA region was used to confirm the identify of the isolates. Accoreding 10 genera and 23 species *of Alternaria alternata, A. atrum, A. chlamydospora A. tenuissima, Aspergillus auricomus, A. niger, Bipolaris sorokiniana, Botrytis cinerea., Curvularia australiensis, C. inaequalis, Fusarium acuminatum, F. avenaceum, F. chlamydosporum, F. equiseti, F. redolens, F. sambucium, F. scirpi, F. solani, F. tricinctum, Microdochium nivale, Periconia circinata, Penicillium chrysogenum, Trichoderma atroviride* were identified. Pathogenicity test of some fungal isolates were conducted based on completely randomized design with three replications under greenhouse condition. According to the results *B. cinerea, B. sorokiniana, F. avenaceum, F. acuminatum, P. circinata, C. australiensis, F. equiseti, F. solani* and *A. chlamydospora* caused disease with different severity on their host. Among the species, *B. cinerea, B. sorokiniana, F. avenaceum* and *F. acuminatum* caused visible root necrosis. *A. auricomus* was isolated for the first time from wheat rhizosphere in Iran. This study is the first report of *A. tenuissima, B. cinerea, C. inaequalis, E. chlamydospora, F. avenaceum, F. chlamydosporum, F. scirpi, F. tricinctum, M. nivale* (= *F. nivale*), *P. circinata, P. chrysogenum* and *T. atroviride* from Zanjan province. Also this is the first report of the pathogenicity of *B. cinerea* on wheat in Iran.

Keywords: *Fusarium.* Mycoflora, Poaceae, root and crown rot.