

## همه گیرشناسی بیماری پژمردگی ورتیسیلیومی پنبه: تنوع بیماری‌زایی

### جدایه‌های قارچ *Verticillium dahliae*

مرتضی عرب سلمانی\*

استادیار پژوهش مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی تهران

تاریخ دریافت: ۹۳/۶/۲ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۱/۸

#### چکیده

به منظور تعیین تنوع عامل بیماری پژمردگی ورتیسیلیومی پنبه، تعداد ۹۵ جدایه قارچ *Verticillium dahliae* Kleb. از خاک، پنبه، بادنجان، بامیه، خیار، پسته، کنجد، گوجه فرنگی و غوزک و ریزوسفر علف‌های هرز داتوره، توق و تاجرریزی سیاه جمع‌آوری شدند. خصوصیات بیماری‌زایی، مورفولوژیکی، بهترین دمای رشد و دامنه میزبانی و سازگاری رویشی جدایه‌ها بررسی گردید. نتایج نشان داد که جدایه‌ها از نظر ایجاد علائم در پنبه و بامیه به دو گروه برگ‌ریز و غیر برگ‌ریز تقسیم شدند. جدایه‌هایی که باعث برگ‌ریزی در پنبه شدند از نظر علائم در پنبه و بامیه، مورفولوژی میکرواسکلروت در آب آگار، دامنه میزبانی، دمای بهینه رشد در محیط کشت PDA و سازگاری رویشی با جدایه‌های غیر برگ‌ریز متفاوت بودند. تنوع بیماری‌زایی در جدایه‌های غیر برگ‌ریز بیشتر از جدایه‌های برگ‌ریز بود. بیماری‌زایی متقابل جدایه‌های جدا شده از میزبان‌های مختلف نشان داد که اختصاصیت میزبانی در بین جدایه‌های مورد مطالعه وجود نداشت ولی شدت بیماری‌زایی متفاوت بود. سویه برگ‌ریز *V. dahliae* از پنبه، بادنجان و خاک از مناطق پنبه‌کاری خیر استهبان، کردکوی و ورامین جداسازی و مورد شناسایی قرار گرفت. پنجاه و دو موتانت از ۹۵ جدایه قارچ بدست آمد. بر اساس توان استفاده از منبع نیتروژن موتانت‌ها به سه گروه نیت ۱ (۲۵٪)، نیت ۳ (۱۲٪) و نیت ام (۵۴٪) تقسیم شدند. نتایج نشان داد که بر اساس سیستم میزبان - پاتوژن و علائم ایجاد شده در پنبه دو سویه برگ‌ریز و غیر برگ‌ریز ولی بر اساس سازگاری رویشی هشت گروه در بین جدایه‌های مورد مطالعه وجود دارد. سویه برگ‌ریز در یک گروه و سویه غیر برگ‌ریز در هفت گروه دیگر سازگاری رویشی قرار گرفتند.

**واژه‌های کلیدی:** پژمردگی ورتیسیلیومی، سازگاری رویشی، تنوع بیماری‌زایی و پنبه.

\*نویسنده مسئول: mortezaarabsalmani@yahoo.com

## مقدمه

بیماری پژمردگی ناشی از *V. dahliae*، یکی از مهمترین عوامل محدود کننده کاشت ارقام پنبه پر محصول و حساس به این بیماری در مناطق مستعد توسعه آن می باشد (واتکینسون، ۱۹۸۱؛ الزیک، ۱۹۸۵؛ هیلوکس، ۱۹۹۲؛ سرینی واسان، ۱۹۹۴). سویه های مختلف عامل بیماری توسط محققین بر اساس خصوصیات مورفولوژی، بیماریزایی، تولید میکروکنیدیوم، شکل میکرواسکلروت، غیر سمی کردن سانگوینارین، پاسخ فیزیولوژیکی پنبه، گروه های سازگاری رویشی، مارک های مولکولی و صفات الکتروفورزی و نقوش پروتئینی شناخته شده اند. در ژاپن جدایه های که از گوجه فرنگی، کلم چینی، فلفل شیرین و ترب ژاپنی جمع آوری شده بودند. بر اساس بیماری زایی و اختصاصی بودن میزبان به چهار گروه زیر تقسیم شدند. این سویه ها عبارت بودند از سویه بادنجان، سویه گوجه فرنگی، سویه فلفل شیرین و سویه خاجیان (هوریوچی، ۱۹۹۰). اشناتورست (۱۹۶۶) با استفاده از دامنه میزبانی و شدت بیماری در پنبه، دو سویه برگریز (T-1) و غیر برگریز (SS-4) در قارچ *V. dahliae* را شناسایی نمود. در سال های بعد مشخص شد که این دو سویه از نظر مورفولوژی میکرواسکلروت در آب آگار، بهینه دمای رشد، دامنه میزبانی، حساسیت به الکاوئید سانگوینارینو سازگاری رویشی با هم تفاوت دارند (اشناتورس و مائره، ۱۹۶۶؛ پرسلی، ۱۹۶۹؛ پولمن، ۱۹۷۹؛ پولمن و هیومل، ۱۹۸۳؛ بلانکو لویز و همکاران؛ ۱۹۸۸؛ بجانانو الکازار و همکاران، ۱۹۹۵). پوهالا (۱۹۸۳) جدایه های ورتیسیلیوم را بر اساس توانایی تشکیل هتروکاریون پایدار به چهار گروه تقسیم کرد. سویه T-1 اشناتورست با گروه P-1 و سویه SS-4 با گروه P-2، پوهالا منطبق بود. گروه P-1 بیماریزایی خفیفی در سیب زمینی، گوجه فرنگی و هندوانه ایجاد می کنند و بندرت از این گیاهان در مزرعه جدا می شوند. گروه P-2 درجات مختلف بیماری را در پنبه ایجاد می کنند. گروه P-4 بیماری شدیدی در سیب زمینی ایجاد کرده و در پنبه کمترین شدت بیماری را دارند (هیلوکس، ۱۹۹۲). پوهالا و هیومل (۱۹۸۳) و ژاکیوم و روو (۱۹۹۰) و فوند و همکاران (۱۹۹۵) و بهات و سابارو (۲۰۰۳) مشخص کردند که سویه برگریز و غیر برگریز به دو زیر جمعیت ژنتیکی متفاوت تعلق دارند. روزبه و بنی هاشمی (۲۰۰۶) گیاهان را از نظر حساسیت به عامل بیماری به سه گروه طبقه بندی و از نظر سازگاری رویشی مشخص کردند که تمام گروه VCG یک به سویه برگریز تعلق دارند (روزبه و بنی هاشمی، ۲۰۰۶). در همه گیری بیماری پژمردگی ورتیسیلیومی پنبه پتانسیل زادمایه قارچ، تنوع عامل بیماری (بیماری زایی و قدرت مهاجمی)، رقم مورد کشت، زمان و تراکم کاشت پنبه، دما بویژه دمای خاک، شرایط خاک بویژه pH، رطوبت، مواد آلی، ECE و مواد غذایی آن، تراکم و تنوع موجودات آنتاگونیست با قارچ ورتیسیلیوم، تراکم و تنوع موجودات افزایش دهنده حساسیت پنبه به پاتوژن و عکس العمل متقابل بین عوامل مختلف زنده با محیط موثر می باشند. برآیند این عوامل مؤثر به صورت درجات مختلف بیماری در بوته ظاهر می شود

(کمپل و مادن، ۱۹۹۰؛ آهومنش، ۲۰۰۷). سیکل شبه جنسی و سازگاری رویشی و تشکیل هتروکاریون‌ها روش‌های شناخته شده افزایش تنوع در جمعیت *Verticillium dahliae* می‌باشد (هاستی، ۱۹۶۷). بر اساس نظر پوهالا (۱۹۷۹)، پوهالا و هیومل (۱۹۸۳) و کورل و همکاران (۱۹۸۸)، بررسی سازگاری رویشی از طریق هتروکاریویزیس یک وسیله مفید برای مشخص نمودن استرین‌های *V. dahliae* می‌باشد. این تحقیق، با هدف شناسایی تنوع و سوبه عامل بیماری از روی علایم، جهت بررسی همه‌گیر شناسی و مدیریت بیماری از طریق معرفی ارقام متحمل با انتخاب تک بوته‌های بذری متحمل برای تهیه هسته اولیه بذر در ارقام تجاری پنبه ایران انجام شده است.

### روش بررسی

**الف: جدا سازی نمونه‌های قارچ *V. dahliae*:** از گیاهان پنبه، بادنجان، بامیه، کنجد و گوجه فرنگی که تابستانه بوده و هم زمان با پنبه کاشته می‌شوند و در مواردی جایگزین کاشت پنبه شده‌اند و علف‌های هرز که مشکوک به آلودگی به قارچ *V. dahliae* بودند، در اواسط دوره رشد، قطعاتی از بافت چوبی یا دمبرگ بطول ۰/۵ سانتی‌متر جدا و حدود ۰/۵ تا ۱ دقیقه با هیپوکلریت ۰/۵ درصد (محصول ۱۰٪ ماده سفید کننده تجاری) ضد عفونی شدند و پس از شستشو با آب مقطر استریل و خشک کردن با کاغذ صافی به محیط کشت عصاره سیب زمینی دکستروز آگار (PDA) منتقل و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در اتاقک رشد نگهداری شدند. سپس در صورت ظهور پرگنه‌های قارچ ورتیسیلیوم با استفاده از آب مقطر سترون سوسپانسیون حدود  $10^6$  اسپور در میلی‌لیتر تهیه و قطراتی از این سوسپانسیون به محیط کشت آب آگار (WA) منتقل شدند. سپس قطعه‌ای از یک پرگنه رشد کرده در WA به لوله حاوی محیط کشت PDA منتقل و در دمای  $10^0C$  نگهداری شدند.

**ب) جدا سازی از ریشه علف‌های هرز:** نباتات غیر زراعی از مزارع پنبه، گندم، جو و چغندر قند، بادنجان، بامیه، کنجد و گوجه فرنگی جمع‌آوری و پس از شستن سطح ریشه‌ها با آب لوله قطعاتی ۰/۵ تا ۱ سانتی‌متری از ریشه‌های فرعی و اصلی جدا و در درون فلاسک‌های ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری با ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه بر روی دستگاه تکان‌دهنده (شیکر) با حرکت ۱۴۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. سپس قطعات جدا شده به درون تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت آشر و همکاران (محیط کشت تغییر یافته الکل آگار) منتقل شدند (اوشر و همکاران، ۱۹۷۵). تشتک‌ها در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری و پس از ۱۰-۷ روز پرگنه‌های رشد کرده ورتیسیلیوم شمارش و مانند روش‌های ذکر شده تک کلنی تهیه و نگهداری شدند. جدا به‌هایی از خاک جدا و نیز از محققین دیگر دریافت شد.

ج) اندازه‌گیری ابعاد کنیدیوم: برای اندازه‌گیری ابعاد کنیدیوم از پرگنه‌های *V. dahliae* روی PDA، قطعه‌ای به قطر ۰/۵ سانتی‌متر به مرکز تشتک پتری حاوی محیط کشت (PSA) = Potato Sucrose Agar با pH = ۷/۲ انتقال و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در تاریکی نگهداری شد. پس از ۶-۷ روز طول و عرض ۳۰-۲۵ کنیدیوم از هر جدایه با بزرگنمایی ۱۰۰ اندازه‌گیری شد (هوریوچی و همکاران، ۱۹۹۰؛ سینگلتون و همکاران، ۱۹۹۲).

چ) اندازه‌گیری ابعاد میکرواسکلروت: برای این منظور از هر یک از جدایه‌های قارچ *V. dahliae* بر روی PDA، قطعاتی به قطر ۰/۵ سانتی‌متر به مرکز تشتک پتری حاوی محیط کشت آب آگار انتقال و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و پس از ۳-۴ هفته از قسمت ۲-۱/۵ سانتی‌متری مرکز تشتک پتری، نمونه‌هایی برداشته و طول و عرض ۲۵-۳۰ میکرواسکلروت با بزرگنمایی ۴۰ اندازه‌گیری شد (بلانکو لویز و همکاران، ۱۹۸۸).

ح) اکسید کردن اسید تانیک: برای این منظور از محیط کشت‌هاول (۱۹۷۰) در سال ۱۹۷۰ حاوی ۵ درصد اسید تانیک استفاده شد. قطعاتی به قطر ۰/۵ سانتی‌متر از قارچ هفت روزه رشد داده شده بر روی PDA به مرکز تشتک پتری حاوی محیط کشت‌هاول ساکارز،  $K_2H_2pO_4$  و  $K_2HPO_4$  و اسید تانیک منتقل و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در تاریکی نگهداری گردید. بعد از ۴-۵ روز مشاهده حلقه تیره رنگ در اطراف پرگنه مؤید تولید آنزیم پلی فنل اکسیداز توسط قارچ بود.

خ) بیماری‌زایی جدایه‌های *V. dahliae* در پنبه و بررسی تیپ علائم بیماری: بذور پنبه رقم ساحل در طبقه هسته اولیه که از یکنواختی ژنتیکی بالایی برخوردار است و متحمل به بیماری است و در استان گلستان و مازندران کاشته می‌شود، در گلدان‌های حاوی خاک بکر کاشته شد. گلدان‌ها در گلخانه در دمای ۲۸-۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده و آبیاری شدند. بعد از سبز شدن، در هر گلدان سه گیاه نگهداری و بقیه حذف شدند. جهت تولید اسپور قارچ ورتیسیلیوم از محیط کشت PDA و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد استفاده شده و با کمک اسلاید گلبول شمار (Hemocytometer) سوسپانسیون حاوی  $10^6$  کنیدیوم در هر میلی‌لیتر تهیه و در مرحله ۸-۶ برگه به روش تزریق به ساقه (stem puncture) دو قطره از سوسپانسیون مذکور با سرنگ (شماره ۲۳ گیج) در محل اتصال برگ به ساقه انداخته و با سوزن به داخل آوند هدایت شد.

گیاهان شاهد با آب مقطر سترون مایه زنی شدند. بعد از ظهور علائم (سه ماه بعد از مایه زنی) نوع علائم از نظر برگ‌ریز و غیر برگ‌ریز بودن و بیماری‌زایی جدایه‌ها مشخص شد (اروین و همکاران، ۱۹۶۵؛ اشناتورس و ماتره، ۱۹۶۶). بعد از تزریق، گلدان‌ها در گلخانه با دمای ۲۸-۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. دو ماه بعد از تزریق شاخص بیماری با رابطه ۱ محاسبه شد (اشناتورس و ماتره، ۱۹۶۶؛

اشورث، ۱۹۸۳؛ چانگ و ایسبورن، ۱۹۹۴). به هر بوته در گلخانه درجات زیر داده شد (شدت بیماری = disease severity). بوته کاملاً سالم = ۰، تا ۳۳٪ برگ‌ها علائم بیماری را نشان می‌دهند = ۱، از ۳۴ تا ۶۶ درصد برگ‌ها علائم بیماری را نشان می‌دهند = ۲، از ۶۷ تا ۱۰۰ درصد برگ‌ها علائم بیماری را نشان می‌دهند = ۳ و بوته کاملاً لخت و بدون برگ و قوزه = ۴. سپس شاخص بیماری با استفاده از فرمول زیر محاسبه می‌گردد (چن و همکاران، ۲۰۰۸). در این فرمول  $\bar{X}$ ، درجه یا شدت بیماری بوته بیمار،  $f_i$ ، تعداد بوته با درجه معین و  $n$ ، حداکثر درجه داده شده به بوته بیمار.

$$DI = \frac{\sum (X_i f_i) \times 100}{n \sum f_i} \quad (1)$$

د) تعیین دمای بهینه رشد جدایه‌ها: جهت تعیین دمای بهینه رشد ۹ جدایه *V. dahliae* که از نظر علائم در روی رقم ساحل، مورفولوژی میکرواسکلروت و سازگاری رویشی در دو گروه جداگانه قرار گرفته بودند انتخاب و از کشت ۷ روزه قارچ روی PDA قطعه‌ای به قطر ۰/۵ سانتی‌متر به مرکز تشتک پتری حاوی PDA انتقال و در دماهای ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۲۷ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. بعد از ۸ روز میانگین رشد دو قطر عمود بر هم پرگنه قارچ اندازه‌گیری شد. برای هر جدایه در هر دما سه تکرار در نظر گرفته شد (بجارانو ال‌کازار و همکاران، ۱۹۹۵).

ذ) مطالعه دامنه میزبانی جدایه‌های برگ‌ریز و غیر برگ‌ریز: دو جدایه که از نظر دمای بهینه رشد، مورفولوژی میکرواسکلروت، علائم در پنبه و سازگاری رویشی در دو گروه جداگانه قرار گرفته بودند، انتخاب و مطالعه شدند. میکرواسکلروت قارچ طبق روش Hall و Ly در سال ۱۹۷۲ تهیه گردید. خاک بکر جمع‌آوری و با مقداری کود دامی پوسیده به نسبت ۱/۴ کود و ۳/۴ خاک مخلوط و زادمایه قارچ ورتیسیلیوم در هر گرم این خاک به ۷۰ رسانده شد. قبل از مخلوط کردن میکرواسکلروت با خاک خصوصیات خاک مخلوط با کود دامی اندازه‌گیری شد. این خاک دارای  $pH = 8/72$ ،  $EC_e = 1/446$  ds، درصد مواد آلی = ۲/۵ و بافت خاک سیلت لوم (Silt - loam) بود. خاک آلوده در گلدان‌های پلاستیکی ضد عفونی شده ریخته شد و سپس اقدام به کشت گیاهان زراعی شامل بادنجان، فلفل و گوجه فرنگی رقم پیرسون بصورت نشاء و گلرنگ رقم ژیلا، خیار، نخود فرنگی، لوبیا چشم بلبلی، بامیه، گل میمون و ارقام پنبه شامل T-۱۴ و دکتر عمومی (متعلق به گونه *Gossypium barbadense*)، اولتان، بختگان، تاشکند، ورامین، B-۴۳۳، ساحل، ۲ Acalasj<sub>2</sub>، B-۵۵۷ و Zeta-۲ (متعلق به گونه *Gossypium hirsutum*) به صورت بذر کشت گردید. برای جدایه و هر رقم سه گلدان در نظر گرفته شد. گیاهان شاهد در خاک بکر کشت گردیدند و برای هر رقم گیاه یک گلدان بود. گلدان‌ها را در گلخانه با دمای متغیر ۲۸-۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده و ۳/۵ ماه بعد از کشت عکس العمل گیاهان

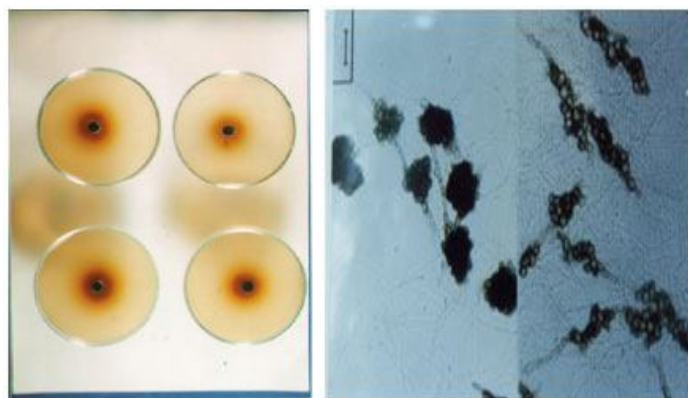
را بر اساس روش (بندخ) ارزیابی شد (اشناتورس و ماتره، ۱۹۶۶؛ اشورث، ۱۹۸۳؛ چانگ و ایسبورن، ۱۹۹۴).

(ر) بیماری‌زایی متقابل ورتیسیلیوم جدا شده از میزبان‌های مختلف: میکرواسکلروت جدایه‌های جمع‌آوری شده از پنبه (برگریز و غیر برگریز)، بامیه، کنجد، نخود فرنگی، بادنجان، خیار و پسته طبق روش (بند ذ) تکثیر و با خاک بکر به نسبت به ۷۰ زادمایه در هر گرم خاک مخلوط و در آن پنبه، بامیه، کنجد و خیار به صورت بذر و گوجه فرنگی و بادنجان به صورت نشاء کشت شدند. برای هر جدایه از هر میزبان دوگلدان در نظر گرفته شد. دو ماه بعد از کشت بیماری‌زایی جدایه‌ها بررسی شد.

(ز) تهیه موتانت‌های Nit و شناسایی آنها و بررسی سازگاری رویشی بین جدایه‌ها: موتانت‌های Nit طبق روش جوواکوئیم و روو (۱۹۹۰) تهیه و شناسایی آنها بر اساس توان استفاده از منبع ازت طبق روش کورل و همکاران، (۱۹۷۳) برای *Fusarium oxysporum* و کورل و همکاران (۱۹۸۸) و جوواکوئیم و روو (۱۹۹۰) برای *V. dahliae* صورت گرفت. برای این منظور قطعه‌ای به قطر ۰/۵ میلی‌متر از محیط کشت PDA حاوی قارچ ورتیسیلیوم به محیط کشت حداقل (minimal = MM) medium انتقال (پوهالا و هیومل، ۱۹۸۳) و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در تاریکی نگهداری شد. بعد از ۱۰ - ۷ روز از حاشیه پرگنه قطعه‌ای به قطر ۰/۵ میلی‌لیتر به تشتک پتری حاوی عصاره ذرت آگار (CMA) به اضافه کلرات پتاسیم ۱۵، ۲۰ و ۲۵ گرم در لیتر منتقل و در حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد در تاریکی نگهداری شد. بعد از ۱۵-۱۰ روز سکتورهای (sector) مقاوم به کلرات ظاهر شدند. از حاشیه سکتور قطعه کوچکی به محیط کشت MM منتقل و فنوتیپ آنها مورد بررسی قرار گرفت. جهت شناسایی نوع موتانت‌های Nit به محیط کشت پایه (basal medium = BM) یا محیط کشت MM بدون منبع ازت، منابع ازت شامل نیترات سدیم ۲ گرم در لیتر، نیتريت سدیم ۰/۴ گرم در لیتر، هیپوگواتین ۰/۵ گرم در لیتر، اسیداوریک ۰/۲ گرم در لیتر، تارتارات آمونیوم ۰/۸ گرم در لیتر اضافه شد. چون ممکن است بعضی از موتانت‌ها رشد خفیف داشته باشند به محیط حاوی تارتارات آمونیوم ۰/۵ گرم کربنات کلسیم اضافه شد. سپس قطعه‌ای به قطر ۰/۵ میلی‌لیتر از قارچ ۱۰-۸ روز رشد کرده در محیط BM به‌طور جداگانه به محیط‌های حاوی ازت منتقل و بعد از ۱۰-۷ روز بر اساس توان استفاده از موتانت از منابع ازت نوع موتانت مشخص شد. میزان رشد قارچ روی محیط BM به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. جهت تعیین گروه سازگاری رویشی، موتانت‌ها به صورت دو تائی روبروی هم گذاشته شدند. بین موتانت‌های سازگار، هتروکاریون تشکیل خواهد شد و بصورت وحشی رشد خواهند کرد ولی در صورت سازگار نبودن بین آن دو سد ایجاد شده و یا ریشه‌ها از کنار هم عبور می‌کنند.

## نتایج و بحث

مجموعاً ۹۵ جدایه از میزبان‌های پنبه، بادنجان، کنجد، غوزک، گوجه فرنگی، بامیه و سطح ریشه علف‌های هرز توق، داتوره و تاجریزی و از خاک مزارع پنبه آلوده بدست آمد و جدایه‌هایی از خیار، پسته و پنبه (SS-4 و T-1) از تهران، رفسنجان و آمریکا دریافت شد. جدایه‌ها از مناطق خیر استهبان، گلستان (کردکوی)، ورامین، کفترک شیراز، فسا، قزوین، رفسنجان و کالیفرنای آمریکا بودند. از ۹۵ جدایه ۲۷ جدایه که از خاک مزارع پنبه (فخرآباد و مبارک آبا د خیر استهبان)، بادنجان (خیر استهبان)، کنجد (خیراستهبان) T-1 (کالیفرنای آمریکا) و پنبه از مناطق خیر استهبان، کردکوی، شیراز (کفترک) و ورامین جدا شده بودند، در گلخانه در روی رقم پنبه ساحل باعث برگ‌ریزی کامل شدند و بقیه جدایه‌ها که از پنبه، بادنجان، غوزک، کنجد، گوجه فرنگی، پسته، خیار، بامیه و سطح ریشه علف‌های هرز توق و تاجریزی و خاک مناطق ورامین، کردکوی و خیر استهبان، قزوین، رفسنجان، فسا و کالیفرنای آمریکا جدا شده بودند، باعث برگ‌ریزی در روی رقم ساحل نشدند. شاخص بیماری جدایه‌های برگ‌ریز بیشتر از جدایه‌های غیر برگ‌ریز بود و در بین جدایه‌های غیر برگ‌ریز از نظر شاخص بیماری تنوع بیشتر از جدایه‌های برگ‌ریز مشاهده می‌شد. در اطراف کلیه جدایه‌ها حلقه تیره رنگ مشاهده می‌شد و همه توانایی اکسید کردن اسید تانیک را داشتند ولی رنگ و مقدار حلقه تیره رنگ اطراف پرگنه در جدایه‌های برگ‌ریز تیره رنگ تر مساحت بیشتری داشت (هاول، ۱۹۷۰) (شکل ۳).



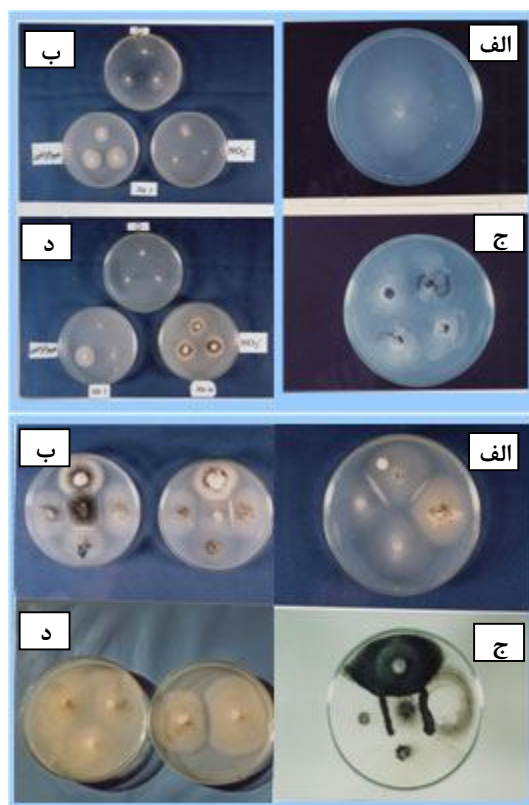
شکل ۱- اکسید شدن اسید تانیک توسط *V. dahlia* در محیط کشت،

میکرواسکلروت سویه برگ‌ریز و سویه غیر برگ‌ریز.

اندازه طول و عرض کنیدیوم در بین جدایه‌ها و حتی در داخل یک جدایه متغیر بود. این اندازه در بین جدایه‌ها همپوشانی داشت و بین  $6/7-6 \times 2/4-3/1$  میکرومتر متغیر بود. لذا نمی‌توان از این صفت در دسته بندی جدایه‌ها استفاده نمود. میکرواسکلروت‌های پاتوتیپ برگ‌ریز کشیده تر از پاتوتیپ غیر برگ‌ریز بود و بین  $8 \times 9-35$  میکرومتر برای جدایه‌های برگ‌ریز و بین  $10-19 \times 15-35$  میکرومتر برای جدایه‌های غیر برگ‌ریز متغیر بود (شکل ۱). از بین ۹ جدایه انتخابی مورد آزمایش بهترین دمای رشد برای ۴ جدایه ۲۷ درجه و برای ۵ جدایه دیگر ۲۳ درجه سانتی‌گراد بود. جدایه‌هایی که بهترین دمای رشد آنها ۲۷ درجه سانتی‌گراد بود از نظر برگ‌ریزی در روی رقم ساحل و مورفولوژی میکرواسکلروت در یک گروه قرار داشتند. جدایه‌های برگ‌ریز در ارقام مختلف پنبه که متعلق به گونه *G. hirsutum* بودند (اولتان، بختگان، تاشکند، ورامین، ۴۳۳-B، ساحل، AcalaSJ2، ۵۵۷-B و Zeta-۲) باعث برگ‌ریزی کامل شدند در حالی که دو رقم T-۱۴ و دکتر عمومی که متعلق به گونه *G. barbadense* هستند علائم متغیر ایجاد کردند. بیشترین شاخص بیماری مربوط به رقم ورامین و کمترین شاخص بیماری مربوط به رقم بختگان در ارقام تجاری ایران مشاهده شد. ولی در ارقام متعلق به *G. barbadense* بیماری خفیف ایجاد کردند. جدایه‌های برگ‌ریز باعث برگ‌ریزی در بامیه، علائم شدید بیماری ولی بدون برگ‌ریزی در بادنجان، گل میمون و گل‌رنگ، علائم خفیف درخیار و گوجه فرنگی رقم پیرسون و تغییر رنگ آوندی در فلفل و گوجه فرنگی رقم پیرسون شد ولی در نخود فرنگی و لوبیا چشم بلبلی بیماری‌زا نبود. جدایه برگ‌ریز در بامیه برگ‌ریزی شدید در گوجه فرنگی رقم پیرسون بیماری شدید ولی بدون برگ‌ریزی در خیار، گل‌رنگ و بادنجان علائم خفیف تولید کرد ولی در نخود فرنگی و لوبیا چشم بلبلی بیماری‌زا نبود. سکتورهای مقاوم به کلرات در محیط کشت کلرات دار با رشد سریع تر و در محیط کشت MM با رشد خفیف از غیر موتانت‌ها مشخص بودند. از ۹۵ جدایه، که جهت تولید موتانت مورد استفاده قرار گرفتند ۵۲ جدایه (۵۵٪) تولید موتانت کردند. از ۵۲ موتانت ۱۴ موتانت (۲۵٪) Nit 1 و شش موتانت (۱۲٪) Nit 3 و ۲۹ موتانت (۵۴٪) Nit m بودند. دو موتانت بین Nit 3 یا Nit m و یک موتانت بین Nit 3 یا Nit 1 مشکوک بودند. Nit‌های مختلف توانایی تشکیل هتروکاریون را با هم داشتند. هتروکاریون در محیط کشت MM بصورت رشد متراکم (وحشی) بین موتانت‌های آگزوتروف سازگار در محل تلاقی آنها تشکیل شد. گاهی بین دو موتانت که در یک گروه سازگار رویشی قرار نداشتند سدی تشکیل می‌شد و ناسازگاری بروز می‌کرد (پوهالا و هیومل، ۱۹۸۳). سازگاری رویشی ۵۲ موتانت بدست آمده مورد بررسی قرار گرفت که در نتیجه بیست جدایه در یک گروه قرار گرفتند. این بیست جدایه از نظر مورفولوژی میکرواسکلروت و نوع علائم در روی رقم ساحل با هم یکسان بودند و باعث برگ‌ریزی کامل در روی رقم ساحل شدند. این جدایه‌ها از خاک، پنبه، کنجد، بادنجان و از مناطق کردکوی، استهبان، ورامین، کفترک شیراز و کالیفرنیا بدست آمده بودند.



بقیه موتانت‌ها در گروه‌های دیگر قرار گرفتند که باعث برگ‌ریزی در پنبه نمی‌شدند و شاخص آلودگی متغیری را ایجاد می‌کردند. از این موتانت‌ها بیست و پنج موتانت در یک گروه و ۷ موتانت در ۶ گروه قرار گرفتند.



شکل ۲- الف: تولید سکتور، ب: موتانت‌های نیت، ج: تشکیل هتروکاریون و د: ایجاد سد بین دو موتانت ناسازگار.

اختصاصیت میزبانی در بین جدایه‌های مورد آزمایش وجود نداشت و تمام میزبان‌های مورد آزمایش با جدایه‌های دیگر میزبان‌ها آلوده شدند ولی شدت بیماری متفاوت بود. در چند سال اخیر در مزارع پنبه‌کاری گرگان، وارمین و استهبان نوع خاصی از بیماری پژمردگی ورتیسیلیومی بدلیل گرمتر شدن هوا، فشار انتخاب زیاد در انتخاب ارقام متحمل مشاهده و گسترش یافته است که علائم آن با آنچه واتکینسون (۱۹۸۱) درباره سویه برگ‌ریز قارچ ورتیسیلیوم گزارش داده است مطابقت دارد و با علائم

سویه غیر برگ‌ریز کاملاً متفاوت می‌باشد. علائم این بیماری در کلیه ارقام تجارתי پنبه ایران شامل ورامین، ساحل، بختگان، مهر، اولتان B-۵۵۷، سای اکرا که متعلق به گونه *G. hirsutum* می‌باشند، مشاهده می‌شد. این علائم شامل پیچیدگی برگ‌ها به سمت بالا، روخمشی دم‌برگ (Epinasty)، مرگ از انتهای بوته (Die back) ریزش برگ و گل و قوزه ورشد شاخه‌های زایشی، جوانه زدن مجدد جوانه‌های پایین ساقه و پیدایش یک گیاه علفی با علائم کمبود مواد غذایی و تغییر رنگ بافت آوندی تا انتهای بوته می‌باشد. بوته‌هایی با درجات مختلف آلودگی به ورتیسیلیوم مشاهده می‌شود که علائم آنها با علائم نوع برگ‌ریز متفاوت و شامل کلروز و سپس نکروز بین رگبرگ‌ها و تغییر رنگ بافت آوندی تا نیمه بوته و گاهی ریزش برگ‌های آلوده می‌باشد. در این نوع ریزش برگ با ریزش نوع برگ‌ریز متفاوت بوده و برگ‌هایی ریزش می‌کنند که علائم آلودگی را نشان می‌دهند. بررسی جدایه‌های قارچ ورتیسیلیوم از نظر دامنه میزبانی، تیپ علائم در گلخانه و نوع علائم در مزرعه نشان داد که نوع خاص علائم برگ‌ریزی (به صورت سبز و سریع) مختص پنبه و بامیه می‌باشد. جدایه‌های پنبه، بادنجان و کنجد در گلخانه در پنبه رقم ساحل و بامیه علائم برگ‌ریزی ایجاد کردند، در حالیکه بادنجان و کنجد علائم برگ‌ریزی شبیه به پنبه نداشتند. جدایه‌های تیپ برگ‌ریز باعث ریزش کامل برگ در ارقام گونه *G. hirsutum* و گونه *G. barbadense* می‌شوند. این نوع علائم با آنچه که اشنا تورتست و ماتره (۱۹۶۶) در مورد بیماری سویه برگ‌ریز روی ارقام پنبه گزارش نمودند تا حدودی صدق می‌کنند. همچنین در تعیین دامنه میزبانی سویه برگ‌ریز و غیر برگ‌ریز و بیماری‌زایی آنها بر روی گوجه فرنگی رقم پیرسون، گل‌رنگ رقم ژیلا و گل میمون نتایج این تحقیق با آنچه که محققین بالا گزارش نموده اند مطابقت دارد. جدایه برگ‌ریز یا بیماری‌زایی شدید بر روی بادنجان و کلیه ارقام پنبه و بیماری‌زایی خفیف بر روی گوجه فرنگی رقم پیرسون و ارقام پنبه متعلق به گونه *G. barbadence* از جدایه‌های غیر برگ‌ریز قابل تشخیص هستند. جدایه‌های غیر برگ‌ریز در گوجه فرنگی رقم پیرسون بیماری شدید و در گل میمون بیماری خفیف ایجاد می‌کنند. بهینه دم‌ای رشد برای جدایه‌های برگ‌ریز ۲۷ و برای جدایه‌های غیر برگ‌ریز ۲۳ درجه سانتی‌گراد تعیین شد. این نتایج با آنچه که در مورد دم‌ای بهینه رشد برای جدایه‌های برگ‌ریز و غیر برگ‌ریز گزارش شده است مطابقت دارد. جدایه‌های غیر برگ‌ریز با تولید بیشتر آنزیم پلی فنل اکسیداز قدرت تهاجمی بیشتری نسبت به جدایه‌های غیر برگ‌ریز دارند. شکل میکرواسکلروت در جدایه‌های برگ‌ریز کشیده و در جدایه برگ‌ریز غیر کشیده است. این نتایج با آنچه در مورد مرفولوژی میکرواسکلروت سویه برگ‌ریز و غیر برگ‌ریز گزارش شده است صدق می‌کند. گرچه در این پژوهش امکان تهیه جدایه‌های استاندارد برای تعیین گروه‌های سازگاری رویشی وجود نداشت ولی از نظر سازگاری رویشی و تشکیل هتروکاریون جدایه‌های برگ‌ریز در یک گروه سازگاری رویشی و جدایه‌های غیر برگ‌ریز در ۷ گروه قرار گرفتند و

ارتباط مشخصی بین علائم و گروه سازگاری رویشی در جایه‌های غیر برگ‌ریز مشاهده نشد. گروه‌های ۱ و ۲ تعداد بیشتری از موتانت‌ها را به خود اختصاص داده‌اند. این جدایه‌ها توان سازگار بودن با هم و تشکیل هتروکاریون را داشتند و در نتیجه توان تکامل و رقابت و بقاء بیشتر را کسب کرده‌اند. به نظر می‌رسد که جدایه‌های یک منطقه بیشتر در یک یا دو گروه سازگاری رویشی قرار داشته باشند. شاید به دلیل خاکزاد بودن قارچ در سطح وسیع با منابع دیگر قارچ در مناطق مختلف و کاشت پنبه بصورت مداوم، تیپ‌های سازگار با هم تشکیل هتروکاریون را داده‌اند و قدرت بقاء بیشتر و تکامل را بدست آورده‌اند و جمعیت بیشتری از قارچ را به خود اختصاص داده‌اند تجامس و همکاران، (۲۰۰۰). سازگاری رویشی یا قابلیت یک تال در تبادل هسته‌ها با تال دیگر جهت تشکیل هتروکاریون روشی است که در بعضی از قارچ‌ها باعث تنوع می‌شود. اگر چه در قارچ *V. dahliae* تولید مثل جنسی گزارش نشده است ولی سازگاری رویشی بین ریشه‌های گروه‌های سازگار این قابلیت را به این قارچ می‌دهد که باعث تنوع در جمعیت طبیعی شوند (النا، ۱۹۹۹). این عمل درون گونه‌ای بوده و بین گونه‌ای نیست‌هاستی، (۱۹۶۷). بنابر این لازم است که میزان تحمل ارقام پنبه به صورت سالیانه برای جمعیت جدید بررسی گردد. در بین جدایه‌های ورتیسیلیوم از نظر بیماری‌زایی، مورفولوژی میکرو اسکروت و سازگاری رویشی تنوع وجود داشت. در سیستم میزبان پاتوژن، دو سویه از قارچ و در سیستم سازگاری رویشی بیش از دو گروه تشخیص داده شد. جدایه‌هایی که علائم برگ‌ریزی شدید در پنبه ایجاد می‌کنند، دارای میکرواسکلروت کشیده در آب آگار و در یک گروه سازگار رویشی قرار دارند ولی جدایه‌هایی که باعث علائم غیر برگ‌ریزی در پنبه می‌شوند در بیش از یک گروه سازگاری رویشی قرار دارند و دارای فرم میکرواسکلروت غیر کشیده هستند و علائم بیماری که با درجات مختلف آلودگی نشان داده می‌شود ایجاد می‌کنند. فراوانی علائم جدایه‌های برگ‌ریز در مزارع پنبه بین ۵ تا ۱۰ درصد مشاهده شد عرب سلمانی و همکاران، (۲۰۱۱). همبستگی مشخصی بین علائم غیر برگ‌ریزی با سازگاری رویشی وجود نداشت. در بین ارقام پنبه از نظر تحمل به بیماری تنوع وجود داشت. رقم‌های متعلق به گونه *G. barbadense* تحمل بالایی به سویه‌های قارچ *V. dahliae* دارند. ولی ارقام متعلق به گونه *G. hirsutum* تحمل نسبی به سویه برگ‌ریز قارچ مذکور دارند. بنابراین جهت مدیریت بیماری پژمردگی ورتیسیلیومی پنبه در کل مناطق تحت پوشش رقم زراعی، توصیه‌های زیر را بایستی مد نظر قرار داد:

- ۱- تولید ارقام مناسبی که از نظر خصوصیات زراعی یکسان ولی به سویه‌های غالب تحمل داشته باشند.
- ۲- استفاده از لاین‌های یک رقم (multiline) به سویه‌های غالب تحمل داشته باشند.
- ۳- اگر به دلیل ژنتیکی یا اقتصادی یا اجرایی استفاده از ارقام مخلوط یا مولتی لاین‌ها ممکن نباشد با استفاده از دو رگ‌گیری بین گونه‌ای ژن یا ژن‌های مقاومت را (تحمل زیاد به استرین برگ‌ریز و غیر

برگریز) از گونه *G. barbadense* به گونه *G. hirsutum* انتقال داد که نقش مهمی در کاهش خسارت بیماری در کشور خواهد داشت.

۴- به دلیل ایجاد تنوع در جمعیت میزبان (پنبه) بوسیله گرده افشانی و تفرق صفات و عامل بیماری (*V. dahliae*) بوسیله سازگاری رویشی هرساله باید تک بوته‌های مولد بذر در زمین آلوده دارای جمعیت غالب عامل بیماری در مناطق رقم مورد توصیه تهیه گردند، لذا ضرورت دارد اندام‌های آلوده پنبه از مناطق جمع‌آوری و پس از خرد نمودن با خاک مزرعه مخلوط و انتخاب تک بوته‌ها در این مزرعه صورت گیرد.

۵- در انتخاب تک بوته‌های بذری به سویه غیربرگریز به عنوان سویه غالب توجه شود و ابتدا بوته‌های باعلایم آلودگی به سویه برگریز از چرخه تولید خارج شوند.

#### منابع

- Ahoomanesh, A. 2007. Principles of Plant Disease Control. Isfahan University of Technology, 391pp.
- Arabsalman I., Okhovvat, S.M., Sharifitherani, A., Nikkha, M.J., and Safaie, N. 2011. Epidemiology of verticillium wilt of cotton in Golestan province: Effect of verticillium wilt on quantitative and qualitative characters of cotton. Iranian J. Plant Pathol. 7(1):1-18.
- Arabsalmani, M., and Banihashemi, Z. 2000. Vegetative compatibility groups within isolates of *Verticillium dahliae* from cotton and other sources in Iran. 14<sup>th</sup> Iranian Plant Protection Congress.
- Ausher, R., Katan, J., and Ovadia, S. 1975. An improved selective medium for the isolation of *Verticillium dahliae*. Phytoparasitica 3: 193-137.
- Bhat, R.G., and Subbarao, V. 2003. Characterization of *Verticillium dahliae* isolates and epidemics of pepper. Plant Disease, 87:789-797.
- Blanco-Lopea, M.A, Melero-Vara, J.M., and Jimenez- Diaz, R.M. 1988. Studies on *Verticillium dahliae* wilt of cotton in Andalucía Southern Spain. Agronomique Mediteranian de Montpellier. 3-4 Mars.
- Begarano-Alcazar, J., Melero-Vara, J.M., Blanco-Lopez, M.A., and Jimenez-Diaz, R.M. 1995. Influence of inoculums density of defoliating and non defoliating pathotypes of *Verticillium dahliae* on epidemiology of *Verticillium* of cotton in Southern Spain. Phytopathology 85: 1474-1481.
- Correll, J.C., Gordon, T.R. and McClain, A.H. 1988. Vegetative compatibility and pathogenicity of *Verticillium albo-atrum*. phytopathology, 78:1017-1021.
- Camppbell, C.L., and Madden, L.V. 1990. Introduction to Plant Disease Epidemiology. New York, WILEY Press, 531p.

- Chen, B., Li, S.K., Wang, K.R., Wang, J., Wang, F.Y., Xia, C.H., Lai, J.C., and Wang, N. 2008. Spectrum characteristics of cotton canopy infected with *Verticillium* wilt and applications. *Agri. Sci. in China*, 7(5):561-569.
- Chang, R.J., and Eastburn, D.M. 1994. Host range of *Verticillium dahliae* from hoseradish and pathogeniety of strains. *Plant Dis.* 78: 503 - 506.
- Carder, J.H., and Barbara, D.J. 1994. Molecular variation within some Japanese isolates of *Verticillium dahliae*. *Plant Pathol.* 43: 947-950.
- El-zik, K.M. 1985. Integrated control of *Verticillium* wilt of cotton. *plant Dis.* 69:1025 -1032.
- Elena, K. 1999. Genetic relationship among *Verticillium dahliae* from cotton in Greece based on Vegetative compatibility. *Europe. J. Plant Pathol.* 105: 609-616.
- Found, D., Michel, N., and Jeam, P.G. 1995. Differentiation of *Verticillium dahliae* population on the basis of Vegetative compatibility and pathogenicity on cotton. *Europe. J. Platholo.* 101: 69-79.
- Joaquim, T.F., and Row, R.C. 1990. Reassessment of vegetative compatibility relationship among strains of *Verticillium dahliae* using nitrate non-utilizing mutants. *Phytopathol.* 80: 1160 -1166.
- Hamidi, H., Naderi-Aarefi, A., Forghani, S.H., Arabsalmani, M., Vafai-Tabar, M., and Hakimi, M. 2012. Cotton seed production and technology. SPCRI press, 648p.
- Howel, C.R. 1970. Differential enzyme synthesis by haploid and diploid forms of *Verticillium albo-atrum*. *Phytophthol.* 60: 488- 490.
- Hastie, A.C. 1967. Mitotic recombination of *Verticillium albo-atrum*. *Nature*, 214:24- 252.
- Hillocks, R.J. 1992. Cotton Diseases. CAB International, Wallingford, UK. 415p.
- Horiuchi, S.H., and Takeuchi, S. 1990. Host specificity of isolates of *Verticillium dahliae* towards Cruciferous and Solanaceous plants. pp. 235-295. *In:* Hornby, D. (ed.), Biological control of Soil born plant pathogens. CAB International UK.
- Heale, J. and Isaac, I. 1963. Wilt of Lucerne caused dy species of verticillium IV. Pathogenicity of *Verticillium albo-atrum* to Lucerne and other crops: spread and survival of *Verticillium albo-atrum* in soil and in weed. Effect upon Lucerne production. *Ann. Appl. Biol.* 52: 439- 451.
- Isaac, I. 1967. Speciation in verticillium. *Annu. Rev. Phytopathol.* 5:201-222.
- Kirkpatrick, T.L., and Rotrock, C.S. 2001. Compendium of cotton disease. APS Press, 77 p.
- Mace, M.E., Bell, A.A., ad Beckman, C.H. 1981. Fungal wilt disease of Plant. Academic Press. New York, 640 pp.
- Mathere, D.E., Erwin, D.C., Paulus, A.O., and Ravencroft, A.V. 1966. Comparison of the virulence of isolates of *Verticillium albo-atrum* from several of the cotton growing regions in the United States. *Plant Dis. Reporter*, 50: (12) 930 - 933.

- Nelson, R. 1950. Verticillium wilt of Peppermint. Mich. Agr. Eept. Sta. Tech. Bull. 221.
- Otero, L., Ducasse, D., and Miller, G. 2004. Variability in ribosomal DNA genetic and spacer regions in *Verticillium dahliae* isolates from different hosts. Fitopatologia Brasileria, 29: 441–446.
- Okoli, C.A.N., Carder, J.H. and Barbara, D.J. 1994. Restriction fragment Ineght polymorphism (RFLPS) and the relationships of some host - adapted isolates of *Verticillium dahliae*. Plant pathol. 43: 33-40.
- Puhalla, J.E. 1979. Classification of isolates of *Verticillium dahliae* based on heterocaryon incompatibility. Phytopathol. 69: 1186–1189.
- Puhalla, J.E. and Hummel, M. 1983. Vegetative compatibility groups within *Verticillium dahliae*. Phytopathol. 73: 1305 - 1308.
- Presely, J.T. 1969. Growth response of Verticillium albo-atrum to sanguinarine in nutrient agar. Phytopatholo. 59: 1968-1969.
- Radisk, S., Jakes, J., Simoni, A., and Javornik, B. 2003. Charactrization of verticillium albo-atrum field isolates using pathogenicity data and AFLP analysis. Plant Dis. 87: 633- 638.
- Roozbeh, M., and Banihashemi, Z. 2006. Host range of *Verticillium dahliae* from Iran. 17<sup>th</sup> Iranian Protection Congress, 2-5 Sep. p. 428.
- Roozbeh, M., and Banihashemi, Z. 2006. Genetic diversity and host specificity of *Verticillium dahliae* in Iran. Iranian J. Plant pathol. 42(1):323-325.
- Saneii, S.J., RAazavi, S.E., Okhovvat, S.M., and Pahlevani, M. 2010. Verticillium Wilts. Paek Raihan press. 651pp.
- Srinivasan, K.V. 1994. Cotton diseases. Indian Society for Cotton Improvement C/O CIRCOT. 187 p.
- Schnathorst, W.C., and Mather, D.E. 1966. Host range and differentiation of a severe form of *Verticillium albo-atrum* in cotton. Phytopathol. 56: 1155 – 1165.
- Singlton, L.L., Miral, J.D., and Rush, C.M. 1992. Methods for Research on Soil-born phytopathogenic Fungi. Am. Phytopathol. Soc. St. Minnesota, 265p.
- Tjamos, E.C., Rowe, R.C., Heale, J.B., and Fravel, D.R. 2000. Advances in verticillium research and disease management. Am. Phytopathol. Soc. St. Minnesota, 357pp.
- Watkinson, G.M. 1981. Compendium of cotton disease. APS Press, 87 p .
- Zare, R. 2001. An integrated approach to the taxonomy of plant-associated *Verticillium* species. Rostaniha, 2: 65-66.
- Zare, R., and Gams, W. 2000. A revision of *Verticillium* sect. Prostratal. Phylogenetic using its sequences. Nova Hedwigia, 71: 465-480.

## **Epidemiology of verticillium wilt of cotton: Pathogenicity variation among isolates *Verticillium dahlia***

**M. Arabsalmani\***

Assistant Prof. Agricultural and Natural Resources Research Center of Tehran Province

Received: 2014/8/24 Accepted: 2015/1/28

### **Abstract**

In order to determination of variability of pathogenicity of *Verticillium dahliae* kleb., Ninety five isolates form soil, cotton, eggplant, okra, cucumber, pistachio, sesame, tomato, and wild hemp, and rhizosphere of *Datura stramonium*, *Xanthium* sp. and *Solanum nigrum* were compared in respect to microsclerotial morphology, pathogenicity, host range, optimum temperature for growth and vegetative compatibility groups (VCGs). The result showed that based on symptom in cotton and okra plants the isolates were divided in two defoliating and no defoliating strains which also differed in microsclerotial morphology on water agar, optimal temperature for growth on potato dexteros agar. The variability among no defoliating isolates were more than defoliating isolates. Although, there was not host specificity among isolates but observed various disease severity in cotton. The defoliating strains were collected from cotton, eggplant, sesame and soil in Estahban, Kord kuy and Varamin regions. From 52 nit mutants (54%) were obtained 95 isolates. Based on the ability to use different nitrogen sources the mutant were grouped into three phenotypic classes nit 1(25%), nit 3(12%) and nit M( 54%). The isolates were separated into different groups. Eight VCGs were recognized among nit mutants. All defoliating isolates were belonged to one VCG and rest of the isolated grouped in 7 VCGs.

**Keywords:** *Verticillium* Wilt, Cotton, Vegetative Compatibility Groups

---

\*Corresponding author; mortezaarabsalmani@yahoo.com

