بسمه تعالی

استاندارد نمونه برداری در باغ و نهالستان و دستورالعمل ردیابی بیمارگرهای قارچی *Verticillium dahliae, Rosellinia necatrix, Armillaria mellea, Fusarium* spp.) خاکزاد (*Pythium* spp. ، *Phytophthora* spp.) و شبه قارچی (*Rhizoctonia solani*

ذکر شده در استانداردهای سلامت

فهرست

نمونه برداری ۴

تعاریف ۴

نمونه ٤

نمونه مرکب خاک ٤

نمونه مرکب نهال یا درخت ٤

نمونه برداری تصادفی ۴

نمونه برداری تصادفی از خاک باغ مادری یا نهالستان ٤

رطوبت خاک در زمان نمونه برداری ٥

بررسی میدانی مواد گیاهی در باغ مادری و نهالستان ٥

زمان نمونه برداری ٦

دستورالعمل نمونه برداری تصادفی از مواد گیاهی در نهالستان ٨

دستورالعمل نمونه برداری تصادفی از مواد گیاهی در باغ ٩

نمونه برداری انتخابی از نهالستان و باغ ٩

ردیابی بیمارگرهای قارچی مورد نظر استاندارد سلامت نهال ١١

دستورالعمل ردیابی آلودگی به *Rosellinia necatrix* در خاک ١٠

بازرسی میدانی و جستجو برای علائم مهم آلودگی به پوسیدگی سفید ریشه ١١

دستورالعمل ردیابی آلودگی به *Rosellinia necatrix* در ریشه های آلوده ١٢

ردیابی آلودگی به *Verticillium dahliae* در خاک ١٢

دستورالعمل ردیابی آلودگی به *Verticillium dahliae* در خاک ١٤

بازرسی میدانی و جستجو برای علائم مهم پژمردگی ورتیسیلیومی ١٥

دستورالعمل ردیابی آلودگی به *Verticillium dahlia* در شاخه های آلوده ١٥

دستورالعمل ردیابی آلودگی به *Armillaria mellea* در خاک ١٦

بازرسی میدانی و جستجو برای علائم مهم آلودگی به پوسیدگی آرمیلاریایی ١٧

دستورالعمل ردیابی آلودگی به *Fusarium* spp. در خاک ١٧

محیط های کشت مناسب جهت شناسایی *Fusarium* spp. ١٨

دستورالعمل ردیابی آلودگی به *Fusarium* spp. از بافت میزبان ١٩

دستورالعمل ردیابی آلودگی به *Rhizoctonia solani* در خاک..... ۱۹
ردیابی بیمارگرهای شبه قارچی مورد نظر در استاندارد سلامت نهال..... ۲۰
دستورالعمل ردیابی آلودگی به *Phytophthora* spp. در خاک ۲۰
بازرسی میدانی و جستجو برای علائم مهم آلودگی به *Phytophthora* spp. ۲۱
دستورالعمل ردیابی آلودگی به *Phytophthora* spp. در ساقه ها و شاخه ها..... ۲۱
دستورالعمل ردیابی آلودگی به *Phytophthora* spp. در تنه و طوقه درختان ۲۲
دستورالعمل ردیابی آلودگی به *Pythium* spp. در خاک..... ۲۲
منابع ۲۵

نمونه برداری

تعاریف

نمونه اولیه : قسمتی از خاک، نهال(ریشه، ساقه،طوقه) و یا درخت (برگ، شاخه، طوقه، ریشه) که به شکل تصادفی گرفته می شود.

نمونه مرکب خاک: هر نمونه مرکب خاک از ۱۰ نمونه اولیه (زیر نمونه) تشکیل می شود.

نمونه مرکب نهال یا درخت: درمورد نهال به مجموع ۱۰ نمونه اولیه از ۱۰ نهال و در مورد درخت، به مجموع ۱۰ نمونه اولیه از ۵ درخت (۲ نمونه اولیه از هر درخت) یک نمونه مرکب گفته می شود.

نمونه برداری تصادفی

نمونه برداری تصادفی شامل انتخاب تعدادی نمونه از یک جمعیت است به گونه ای که هر نمونه شانس برابر برای انتخاب شدن داشته باشد. بنابراین چنانچه تنها از بخشی از نهالستان و یا باغ که دسترسی بیشتری به آن وجود دارد، نمونه برداری تصادفی انجام شود، نمونه به دست آمده نمی‌تواند نماینده کل جمعیت (جمعیت میکروارگانیزم های خاک ، نهال های موجود و یا درختان) باشد و به عبارت بهتر نمونه ای که به این ترتیب تهیه شده باشد، تصادفی نیست. جهت بررسی وضعیت سلامت خاک پیش از احداث نهالستان یا باغ مادری و یا ارزیابی سلامت باغ مادری یا نهالستان ، نمونه برداری تصادفی انجام می شود. (Celetti 2012 , بی نام ۱۳۹۰، Pedigo 1996).

نمونه برداری تصادفی از خاک پیش از احداث باغ مادری یا نهالستان

به منظور ارزیابی وضعیت سلامت خاک پیش از احداث نهالستان یا باغ مادری، از خاک به طور تصادفی نمونه برداری می شود. هر نمونه خاک به صورت مرکب بوده و از ۱۰ نمونه اولیه کوچکتر تشکیل می شود . نمونه برداری پس از حذف زوائد سطح خاک از عمق صفر تا ۳۰ سانتی متر انجام می شود. نمونه های اولیه به صورت جدا از هم برداشته می شوند و جهت تهیه نمونه مرکب در محل نمونه برداری ، مخلوط می شوند. نمونه ارسالی از این نمونه مرکب تهیه و به آزمایشگاه فرستاده می شود . (Celetti ,2012 , بی نام ۱۳۹۰). تعداد نمونه مورد نیاز به اندازه باغ یا نهالستان بستگی دارد و در جدول ۱ آورده شده است (Anonymous, 2010).

جدول ۱ – تعداد نمونه اولیه از خاک براساس سطح نهالستان(Anonymous, 2010)

اندازه نهالستان یا باغ مادری	تعداد نمونه اولیه
کمتر از ۱/ هکتار	۵۰ (۵ نمونه مرکب)
از ۱/ تا ۲/ هکتار	۱۰۰ (۱۰ نمونه مرکب)
از ۲/ تا ۴/ هکتار	۲۰۰ (۲۰ نمونه مرکب)
بیشتر از ۴/ هکتار	۳۰۰ (۳۰ نمونه مرکب)

توجه: ابزار نمونه برداری از خاک قبل از نمونه برداری ازخاک یک نهالستان - نهالستانی که برای آن یک برگ مجوز صادر خواهد شد - پس از شستشو با آب با هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد (وایتکس تجاری) ضدعفونی گردد. علاوه بر آن کفش یا چکمه فرد نمونه بردار برای جلوگیری از انتقال آلودگی به بلوک های دیگر نهالستان و یا نهالستان های دیگر باید تمیز و ضد عفونی شود .

رطوبت خاک در زمان نمونه برداری

رطوبت خاک در زمان نمونه برداری باید در حد ظرفیت مزرعه و یا کمی پایین تر باشد. تهیه نمونه از خاک های خشک و خیس توصیه نمی شود. برای حفظ رطوبت خاک و همچنین جلوگیری از رشد باکتری ها نمونه های ارسالی ابتدا باید در پاکت کاغذی و پس ازآن در کیسه های پلاستیکی سربسته قرار داده شوند و پس از ثبت مشخصات بر روی آن ها در کوتاهترین زمان به آزمایشگاه فرستاده شوند (Leslie & Summerell, 2006 ؛ بی نام ۱۳۹۰).

بررسی میدانی مواد گیاهی در نهالستان

جهت ارزیابی سلامت نهالستان از نمونه برداری تصادفی استفاده می شود. تعداد نهال مورد مشاهده در بررسی میدانی نهالستان بسته به وسعت نهالستان متفاوت می باشد و چنانچه تعداد نهال از ۱۰۰۰۰ بیشتر باشد ۱۰ درصد کل نهال موجود در نهالستان را شامل می شود (جدول ۲). ذکر مشخصات مربوط به نهالستان در فرم ویژه ضروری می باشد (جدول ۳).

توجه: ابزار نمونه برداری پس از هر بار نمونه برداری از یک ناحیه و یا ردیف نهال باید ابتدا با آب شستشوداده شده و سپس با هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد ضدعفونی شوند.

جدول۲ - تعداد نهال مورد مشاهده برحسب تعداد نهال در نهالستان(Anonymous, 2010)

تعداد نهال مورد مشاهده *	تعداد نهال در نهالستان
تمام نهال ها	کمتر از ۱۰۰۰
۲۵٪ نهال ها	از ۱۰۰۱ تا ۵۰۰۰
۱۱٪ نهال ها	از ۵۰۰۱ تا ۱۰۰۰۰
۱۰ ٪ نهال ها	بیشتر از ۱۰۰۰۰

*:کمترین تعداد مورد نیاز برای مشاهده علائم با اطمینان ۹۵ درصد.

زمان نمونه برداری

جهت ردیابی بیمارگر در باغ مادری یا نهالستان، بسته به بیمارگر باید سالیانه و در زمان توسعه بیمارگر نمونه برداری انجام شود. برای ردیابی آلودگی فیتوفترایی، پیتیومی، ریزوکتونیایی، فوزاریومی، رزلینیایی، ورتیسلیومی و آرمیلاریایی ۱ تا ۲ ماه پس از باز شدن شکوفه ها در بهار و حتی پس از توسعه کامل برگ‌ها نمونه برداری انجام می شود.

جدول ۳- فرم مربوط به مشخصات نهالستان

نام تولید کننده/ شرکت:				موقعیت جغرافیایی (GPS) :		
استان:	شهرستان:		محل/روستا:		نوع ملک:	
آدرس دقیق نهالستان:						

ردیف	مراحل مورد بررسی	شرح عملیات	نتایج بازدید کارشناسی			تاریخ بازدید:
			حالت	توضیحات لازم	روش نمونه برداری	
۱	انتخاب زمین	رعایت فاصله ایزولاسیون	مناسب			
			نامناسب			
		عنفهای هرز غالب و دائمی	دارد			
			ندارد			
		سابقه کاشت (آیش- تناوب)	آیش			
			کشت قبلی			
		آب و آبیاری	چاه عمیق			
			رودخانه/ نهر			
			قنات/ چشمه			
			روش آبیاری			
۲	کاشت و نگهداری	گرنه پایه	بذری			
			رویشی			
		تراکم نهال	فاصله روی خطوط			
			فاصله بین ردیف ها			
		علف های هرز میزبان	رقیب			
			ناقل			
		نوع آفات و بیماری	آفات			
			علائم بیماری			
		آبیاری و کوددهی	دور آبیاری			
			منظم/ نا منظم			
		رعایت بهداشت زراعی				

دستورالعمل نمونه برداری تصادفی از مواد گیاهی در باغ

برای ارزیابی وضعیت سلامت باغ مادری جهت صدور گواهی سلامت، از درختان باغ به شکل تصادفی نمونه برداری می شود. جهت نمونه برداری تصادفی در باغ از الگوی شکل۲ استفاده می شود. بر اساس این الگو، ردیف های کاشت همه و یا به صورت یک در میان ، برای نمونه برداری انتخاب می شوند. سپس از درختان موجود در هر ردیف به صورت یک یا دو در میان نمونه برداری انجام می شود . جهت نمونه برداری از تاج درخت حداقل از ۲ شاخه مختلف درخت نمونه برداری می شود (Anonymous, 2010).

شکل ۲- الگوی مورد استفاده در نمونه برداری تصادفی در باغ

توجه: ابزار نمونه برداری پس از هر بار نمونه برداری از یک ناحیه و یا ردیف درخت ابتدا باید با آب شستشوداده شده و سپس با هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد ضدعفونی شوند.

نمونه برداری انتخابی از نهالستان و باغ

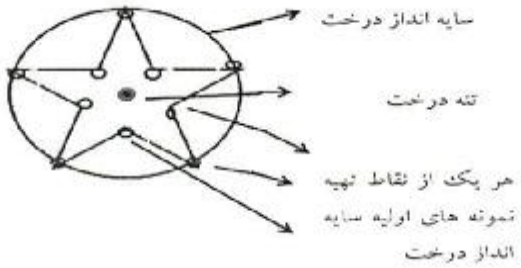
این نمونه برداری با هدف تعیین آلودگی باغ مادری یا نهالستان در مواردی که علائم بیماری وجود دارد، انجام می شود. نمونه برداری ازمواد گیاهی(ساقه، تنه و ریشه) درخت و نهال مشکوک به آلودگی و خاک و یا بستر کشت اطراف آن ها صورت می گیرد

(بی نام ۱۳۹۰). در نمونه برداری انتخابی مطابق الگو(شکل ۳) نمونه برداری با تهیه نمونه مرکب از ریشه ها ، شاخه ها و خاک انجام می شود(Celetti 2012 ، بی نام ۱۳۹۰). برای نمونه برداری از خاک از پروب استاندارد نمونه برداری استفاده می شود و از خاک ناحیه ریزوسفر نمونه برداری می شود. نمونه برداری پس از حذف ضایعات سطح خاک از عمق صفر تا ۳۰ سانتی متر انجام می شود. هر نمونه خاک به صورت مرکب

مقر حوزه استانی مازندران

است و از ۱۰ نمونه اولیه کوچکتر تشکیل می شود . نمونه های اولیه به صورت جدا از هم به آزمایشگاه منتقل می شوند. (Anonymous, 2010).

در صورت وجود علایم تیپیک یا مشکوک در تعدادی از نهال های نهالستان مورد بررسی، کل نهال های آلوده جهت بررسی نمونه برداری شوند و در صورت عدم وجود علایم مشخص یا مشکوک در نهال ها، چند نمونه به صورت تصادفی جهت بررسی آزمایشگاهی انتخاب می شود .



شکل ۳- روش نمونه برداری انتخابی از خاک و مواد گیاهی در باغ

ردیابی بیمارگرهای قارچی مورد نظر در استاندارد سلامت نهال

دستورالعمل ردیابی آلودگی به *Rosellinia necatrix* در خاک

الف - طعمه گذاری در خاک(Carlucci *etal.*, 2013)

۱- نمونه برداری

زیر نمونه: ۵۰۰گرم خاک (۱۰ عدد از نقاط مختلف سطح نهالستان) به هر یک از زیر نمونه ها ۳۰ میلی لیتر آب اضافه می شود.

نمونه مرکب : تهیه نمونه مرکب به میزان ۱ کیلوگرم پس از مخلوط کردن زیر نمونه ها

۲- تهیه قطعات چوب طعمه: قطعات چوب درخت سپیدار(Poplar) یا توت به طول ۶ سانتی متر و عرض ۱ سانتی متر. جهت آماده سازی طعمه پیش از استفاده باید ۲ بار و هر بار به مدت ۲۰ دقیقه و دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس اتوکلاو شوند.

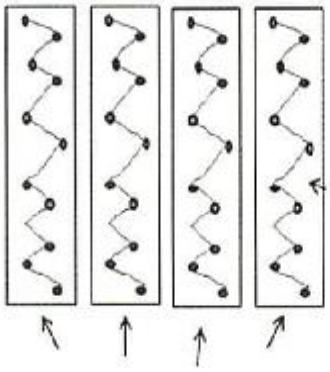
۳- هر نمونه مرکب خاک را در گلدان ریخته و در هر گلدان ۱۰ عدد طعمه به شکل عمودی قرار داده می شوند به طوری که سر قطعات خارج از خاک باشد.

۴- گلدان ها با نایلون پوشانده شده و به مدت ۱۰ روز در ۲۵ درجه سلسیوس انکوبه می شوند.

دستورالعمل نمونه برداری تصادفی از مواد گیاهی در نهالستان

جهت سهولت در نمونه برداری و رعایت اصل تصادف در نمونه برداری از نهالستان، از نمونه برداری تصادفی طبقه بندی شده(شکل ۱) استفاده می شود. به این ترتیب که ردیف های موجود در نهالستان به چند بلوک تقسیم می شود. پس از آن نمونه برداری تصادفی از هر بلوک به صورت مجزا صورت می گیرد. تعداد نهال در هر بلوک بسته به وسعت نهالستان متفاوت است (Pedigo 1996). نمونه برداری در نهالستان در طی فصل رشد انجام می شوددر صورتی که تعداد نهال در نهالستان ۱۰۰ الی ۱۰۰۰ اصله باشد، ۱ الی ۲ درصد نهال ها نمونه برداری شود. در صورتی که تعداد نهال در نهالستان بیش از ۱۰۰۰ اصله باشد، ۱الی۲ در هزار نهال ها- ۰/۱ تا ۲/. درصد- نمونه برداری گردد.

هریک از نمونه ها از نظر علائم ظاهری در ریشه و اندام های هوایی مورد بررسی قرار می گیرند. سپس به ازای هر ۱۰ نمونه اولیه (یک نمونه مرکب) یک نمونه انتخاب و برای جلوگیری از رشد قارچ های ساپروفیت نمونه ها در پاکت های کاغذی به آزمایشگاه فرستاده می شود(بی نام ۱۳۹۰).



الگوی تهیه نمونه های اولیه

هریک از بلوک های موجود در نهالستان که از ۱۰ ردیف نهال تشکیل شده است.

شکل ۱- الگوی مورد استفاده در نمونه برداری تصادفی از نهالستان

دفتر مرکزی امنای طرح‌های
تحقیقات کاربردی کشور

۵- قطعات طعمه از نظر رشد میسلیوم سفید رنگ خاک بر روی آن مورد بررسی قرار می گیرد.

۶- خاک گلدان هایی که چوب طعمه در آن ها فاقد میسلیوم رشد یافته بیمارگر باشد، عاری از بیمارگر ارزیابی می شود.

توجه ۱: انکوباسیون به مدت بیش تر از ۱۰ روز به دلیل پوشانده شدن میسلیوم سفید و تیپیک قارچ با ساپروفیت های خاک و دشوار شدن شناسایی توصیه نمی شود.

توجه ۲: زمان نمونه برداری برای ردیابی آلودگی *Rosellinia necatrix* در خاک اوایل بهار (اوایل فصل رشد) می باشد.

ب-کشت عصاره رقیق رقیق شده خاک بر روی محیط های کشت نیمه انتخابی (Freeman and Sztejnberg 1992,Dhingra & Sinclair, 1995)

۱-تهیه محیط های کشت

محیط کشت رزبنگال – PDA- استرپتومایسین:

محیط کشت پایه PDA	۱ لیتر
رزبنگال (Rose Bengal)	۳۰ - ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر
استرپتومایسین (Streptomycin)	۵۰-۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر

محیط کشت کلرامفنیکل – PDA:

محیط کشت پایه PDA	۱ لیتر
رزبنگال (Chloramphenicol)	۲۵۰ میلی گرم

۲- تهیه عصاره خاک : ۹۰ میلی لیتر آب به ۱۰ گرم خاک در ارلن افزوده می شود. سپس به مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه هم زده می شود. ۱ میلی لیتر از این سوسپانسیون به پتری دیش محتوی محیط کشت افزوده می شود. پتری دیش ها به مدت ۱ هفته در ۲۵ درجه سلسیوس انکوبه می شوند و سپس مورد بررسی قرار می گیرند.

بازرسی میدانی و جستجو برای علائم آلودگی به پوسیدگی سفید رزلینیایی

بیماری پوسیدگی سفید ریشه یکی از بیماری های مهم سیستم ریشه در بیش از ۱۷۰ گونه میزبان گیاهی از گیاهان زراعی و علف های هرز گرفته تا درختان برگ پهن سایه انداز و درختان میوه به شمار می رود. علائم

این پوسیدگی عبارتند از عدم وجود استحکام کافی در ریشه های آلوده و تیره ترشدن آن ها نسبت به ریشه های سالم، وجود میسلیوم های قارچ بر روی چوب و در زیر پوسته خارجی ریشه. میسلیوم ها در ابتدا سفید و روشن بوده ولی در مراحل بعدی خاکستری و قهوه ای می شوند. ریشه های فرعی با میسلیوم سفید و پنبه ای شکل پوشیده می شوند .پس از مدتی این ریشه ها کاملا از بین می روند و به همین دلیل نهال های مبتلا به بیماری را می توان به راحتی از خاک نهالستان بیرون کشید.علائم بیماری بر روی ریشه های فرعی تا زمانی قابل مشاهده است که این ریشه ها به وسیله بیمارگر از بین نرفته باشند.

توجه: در آلودگی به پوسیدگی سفید ممکن است ریزومورف های سفید و غیر یکنواختی بر روی پوست تولید شود.

دستورالعمل ردیابی آلودگی به *Rosellinia necatrix* در ریشه‌های آلوده

(Freeman and Sztejnberg 1992,Ruano-Rosa *etal*,. 2007)

۱- شستشوی ریشه های آلوده با آب شیر تا حذف کامل خاک موجود بر روی آن ها.

۲- جداکردن پوست و قسمتی از چوب ناحیه آلوده وتهیه قطعاتی از آن به طول تقریبی ۲ سانتی متر.

۳- ضد عفونی سطحی به مدت ۵ دقیقه با هیپوکلریت سدیم ۵ درصد.

٤- شستشوی قطعات ضد عفونی شده با آب استریل به تعداد ۳ بار.

۵- خشک کردن قطعات بر روی کاغذ صافی استریل.

٦- قرار دادن بر روی محیط های کشت آزمایشگاهی دارای آنتی بیوتیک مانند MEAS ،PDAcl ،WAcl.

۷- انکوباسیون در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت یک هفته.

۸- بررسی پتری دیش ها و ردیابی قارچ بیماریزا با تولید تورم های هیفی گلابی شکل در محل دیواره عرضی بر روی ریسه ها.

ردیابی آلودگی به *Verticillium dahliae* در خاک

V. dahliae در مناطق معتدل به ویژه در کشت آبی مهم است. بیش از ۳۰۰ نوع میزبان چوبی و درختی به این بیمارگر حساس می باشند. پس از آلودگی میزبان به قارچ بیمارگر هیچ اقدام درمانی موجود نمی باشد. میکرواسکلرت های قارچ بیمارگر برای سال ها توانایی بیماریزایی خود را حفظ می کنند (Wilhelm, 1995) تاکنون جهت ردیابی و تعیین کمیت قارچ بیمارگر در خاک از روش های مختلفی استفاده شده است. مانند کشت و سنجش خاک بر روی محیط کشت، سنجش های بیولوژیکی، روش های مولکولی و مبتنی بر PCR.

دفتر مرکزی نهالستان

ردیابی و شمارش میکرواسکلرت قارچ بیمارگر به طور سنتی با قرار دادن خاک بر روی محیط نیمه انتخابی و شمارش کلنی ها پس از انکوباسیون صورت می گیرد. روش های کشت و سنجش خاک ممکن است تخمین درست و ثابتی از جمعیت قارچ بیمارگر به دست ندهد. میزان بازیافت قارچ بیمارگر در سنجش های مختلف و در آزمایش گاه های مختلف متفاوت بوده است(Termorshuizen, 2000). برای دست یابی به کلنی های قابل ردیابی *V. dahliae* بر روی پتری ، میکرواسکلرت ها باید جوانه زده و پس از رشد و تولید ریسه، دوباره میکرواسکلرت تولید کنند. جوانه زنی میکرواسکلرت ها در خاک تحت تاثیر فرایندی به نام میکرو بیوستازی(microbiostasis) بازداری می شود. این فرایند با افزوده شدن منابع کربن و نیتروژن موجود در ترشحات ریشه به ریزوسفر منتفی می‌شود . (Olsson and Nordbring-Hertz, 1985 Emmatty and Green1996) . با این وجود محیط های غذایی غنی برای کشت خاک مناسب نیستند چرا که در این صورت *V. dahliae* با رشد سریع قارچ های دیگر پوشانده می شود. مناسب ترین راهبرد در این زمینه بهینه سازی محیط های غذایی ضعیف یا مواد دیگر است. دسته ای از مواد مورد استفاده دارای ترکیب ناشناخته و نامعین بوده و بنابراین نتیجه آزمون آن ها تکرار پذیر نیست. برای نمونه عصاره خاک از این دسته اند (Harris *et al.*, 1993; Menzies and Griebel 1967) که البته وقتی ردیابی میکرواسکلرت بیمارگر در خاک برای صدور مجوز های قانونی صورت می گیرد، کاربرد آن ها توصیه نمی شود (Goud & Termoshuizen, 2003) . علاوه بر نیاز به تحریک کننده های رشد، کاربرد منابع کربن نیمه اختصاصی نیز مورد نیاز می باشد. برای نمونه پکتات(polygalucturonic acid) و اتانول که تنها به وسیله گروه کوچی از قارچ های دیگر مورد متابولیز قرار می گیرد، تاکنون مورد استفاده قرار گرفته اند (Zehsasian, 1966, Nadakavukaren and Horner, 1959). افزون برآن Tergitol NP-10,(NPX) نیز برای محدود کردن رشد کلنی قارچی و به دلیل اثرات آنتی بیوتیکی به محیط افزوده می شود. نتایج نشان داده است که شمارش میکرواسکلرت ها در روش های مبتنی بر محیط کشت حتی به طور معنی داری با برند آگار مورد استفاده تغییر می کند (Goud & Termoshuizen, 2003) . هم اکنون استفاده از پلی پکتات ها به بهینه سازی اسیدیته با NaOH نیاز دارد. زیرا به دلیل توقف تولید نوع مناسب آن یعنی P-1879 ماده P-3889 به طور جایگزین استفاده می شود (Kabir *et al.*, 2004). آزمون های سنجش خاک به سه نوع، کشت سوسپانسیون خاک (wet-plating)، کشت ذرات خشک خاک (dry-plating) و کشت رقت های متوالی خاک بر روی محیط کشت (dilution plating method) دسته بندی می شوند (Kabir *et al.*, 2004) . اگرچه مقایسه بین نتایج این روش ها پیش تر انجام گرفته است ولی در نتایج این مطالعات مقایسه ای گاهی اختلاف مشاهده می شود. در مواردی wet-plating و گاهی dry-plating بهتر و کارآمد تر شناخته شده اند(Smith & Rowe, 1984, Termorshuizen, 2000). عوامل مختلفی مانند اندازه ذرات خاک، نوع محیط کشت، میزان خاک مورد استفاده، مدت زمان انکوباسیون، بافت خاک (درصد شن و

سنگ موجود در آن) و میزان اسیدیته خاک در باز یافت قارچ بیمارگر از خاک دخالت دارند (Harris *et al.*, 1993, Kabir *et al.*, 2004, Wheeler & Rowe, 1995).

دستورالعمل ردیابی آلودگی به *Verticillium dahliae* در خاک

برای ردیابی و شمارش میکرواسکلرت های قارچ بیمارگر از عصاره رقیق شده خاک (dilution plating) بر روی محیط های کشت نیمه انتخابی مانند محیط کشت الکل آگار Nadakavukaren and Horner) (1959 ، محیط نیمه اختصاصی سورنسن NPX (Sorenson's NPX) ، محیط کشت اختصاصی شماره ۳ (محیط کشت ۲۶۰) تغییر یافته (Dhingra and Sinclare 1995) و یا محیط کشت اختصاصی Christen, 1981کشت داده می شود. محیط کشت NPX برای محدود کردن رشد کلنی های قارچ دارای ماده Tergitol NP-10 می باشد (Anonymous, 2013).

محیط کشت الکل –آگار(Nadakavukaren and Horner 1959):

آگار	۲۰ گرم
الکل اتیلیک ۹۶ درجه	۱۰ درصد

محیط کشت اختصاصی ورتیسلیوم(محیط اختصاصی شماره ۳):

عصاره خاک	۲۵ میلی لیتر
K_2HPO_4	۴ گرم
آگار	۲۰ گرم
پلی گالاکتورونیک اسید (Polygalacturonic acid)	۲ گرم
استرپتومایسین	۵۰ میلی گرم

محیط کشت اختصاصی Cheristen 1981:

عصاره خاک	۲۵ میلی لیتر
K_2HPO_4	۱ گرم
KCl	۰/۵ گرم
FeNaEDTA	۰/۱ گرم
آگار	۲۰ گرم
ال آسپاراژین	۲ گرم

ال سوربوز	۲ گرم
استرپتومایسین سولفات	۳۰ میلی گرم
کلرونیتربنزین ۷۵٪	۱۰ گرم
اکسگال	۰/۵ گرم
فسفریک اسید ۱۰٪	۴/۵ میلی لیتر

توجه: پیش از تهیه عصاره خاک انجام ضد عفونی سطحی خاک به کمک یک پنبه آغشته به الکل شعله ور به کاهش جمعیت ساپروفیت ها و ردیابی راحتتر بیمارگر از خاک کمک می کند(توصیه خانم دکتر نراقی ، مکاتبات شخصی)

بازرسی میدانی و جستجو برای علائم مهم پژمردگی ورتیسلیومی

علائم این بیماری شامل پژمردگی، زردی، نکروز حاشیه برگ ها و مرگ برگ ها ممکن است از شاخه های کوچک شروع شود و در داخل گیاه توسعه یابد. بیماری در سالهای بعدی پس از آلودگی توسعه می یابد. به ندرت ممکن است در طول یک فصل تمام گیاه ، دچار مرگ شود. کوتولگی در نتیجه کند شدن رشد درخت آلوده معمول می باشد و ممکن است در بعضی از گونه های گیاهی متحمل تنها علامت بیماری باشد. آلودگی به این عامل بیماری زا به طور معمول سبب بروز تغییر رنگ در چوب می شود. این تغییر رنگ به صورت خطوط در پوست درخت و ایجاد حلقه های قهوه ای، سیاه در چوب مشاهده می شود.

دستورالعمل ردیابی آلودگی به *Verticillium dahliae* در شاخه‌های آلوده

(صانعی و همکاران، ۱۳۸۹ ,Kabir *etal*., 2004, Kuchta *etal*., 2008)

۱- ضدعفونی سطحی قطعه ای به طول ۴ سانتی متر از شاخه ۲ ساله دارای علائم با الکل اتیلیک وسوزاندن الکل باقیمانده روی پوست شاخه .

۲- جداکردن پوست شاخه با چاقو یا اسکالپل استریل.

۳- برش شاخه ضد عفونی شده به قطعاتی به طول تقریبی حدود ۲ سانتی متر.

٤- قرار دادن قطعات بریده شده بر روی محیط کشت چاپک-آگار(Czapec-Dox agar) .

۵- انکوباسیون در شرایط تاریکی و دمای ۲۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۲ روز .

بازرسی میدانی و جستجو برای علائم مهم آلودگی به پوسیدگی آرمیلاریایی

انجام بازرسی میدانی در اوایل پاییز همزمان با ظهور کلاهک قارچ .به دلیل کندی رشد قارچ بازیدیومیست بر روی محیط های آزمایشگاهی و رشد سریعتر ساپروفیت ها، استفاده از روش های پیشرفته مبتی بر DNA توصیه می شود.

دستورالعمل ردیابی آلودگی به *Fusarium* spp. از خاک

برای جداسازی گونه‌های فوزاریوم از خاک می توان از روش رقیق سازی و کشت عصاره خاک بر روی محیط کشت و یا از روش طعمه گذاری بافت گیاه میزبان استفاده شود (Leslie & Summerell, 2006).

الف) کشت عصاره رقیق شده خاک:

۱- تهیه عصاره خاک به نسبت ۱۰۰۰ : ۱ و پس از آن رقیق سازی دوباره آن به نسبت ۱۰۰۰۰ : ۱۰.

۲-کشت یک میلی لیتر از سوسپانسیون عصاره رقیق شده بر روی محیط کشت آب آگار (WA) و یا یک محیط کشت انتخابی (Warcup, 1955)

۳ -انکوباسیون ظروف پتری دیش کشت داده شده در روشنایی و دمای ۲۵ درجه سلسیوس.

۴ - مشاهده کلنی و اسپورهای ویژه قارچ در نتیجه ز جوانه زنی پروپاگول‌های قارچ موجود در سوسپانسیون خاک. استفاده از کلید شناسایی ویژه قارچ (Waksman, 1922; Nelson *et al.*, 1983)

ب) طعمه گذاری در خاک:

این روش برای جداسازی گونه‌های فوزاریوم از خاک روی تکه‌هایی از بافت گیاهی طعمه که در خاک قرار داده می شود، به کار گرفته می‌شود.

۱- شستشوی نمونه خاک محتوی با سه سری الک ۲/۸، ۰/۵۸ و ۰/۵ میلی‌متری.

۲- جداسازی و حذف ذرات درشت و بقایای ریشه گیاهان بر روی الک های درشت تر.

۳- کشت نمونه باقی مانده بر روی الک های ریز تر بر روی محیط کشت اختصاصی نش اشنایدر (Nash &Snyder) .

۴- مشاهده کلنی‌های قارچ فوزاریوم پس از ۷-۵ روز .

محیط کشت اختصاصی PPA (Nash&Snyder) :

PPA یک محیط کشت پایه است که آنتی بیوتیک و قارچ کش به آن افزوده شده و به صورت انتخابی برای جداسازی گونه‌های مختلف فوزاریوم از خاک و بافت‌های آلوده مورد استفاده قرار می گیرد. این محیط از رشد قارچ‌ها و باکتری‌ها به شدت جلوگیری می کند درحالی که گونه های فوزاریوم در این محیط رشد بطئی

مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی

دارند. این محیط کشت به علت سمی بودن و ایجاد تغییرات در مرفولوژی کنیدی‌ها، برای تشخیص گونه‌ها مناسب نمی‌باشد.

محیط کشت پایه PPA:

تراکلر (حاوی ۰/۷۵ مادهٔ PCNB)	۱ گرم
پپتون	۱۵ گرم
KH2PO4	۱ گرم
MgSO4 و 7,H2O	۰/۵ گرم
آگار	۲۰ گرم
آب مقطر	۱ لیتر

پس از این‌که محیط کشت در اتوکلاو استریل شد و دمای آن به ۵۵ درجه رسید، ۱۰ میلی لیتر آب مقطر استریل به همراه یک گرم سولفات اسپرپتومایسین و ۰/۱۲ گرم سولفات نئومایسین به آن اضافه می شود.

محیط‌های کشت مناسب جهت شناسایی *Fusarium* spp.:

محیط کشت برگ میخک-آگار (CLA)

به منظور تهیه این محیط کشت برگ‌های میخک غیر آلوده به ز باقی‌ماندهٔ سموم پس از شستشو با آب به قطعات ۳-۲ سانتی متر تقسیم شده و در آون به مدت ۲ ساعت در دمای ۵۵-۴۵ درجه سانتی گراد خشک میشوند. سپس برگ‌ها را در فویل آلومینیوم پیچیده و در اتوکلاو استریل می شوند. برگ‌های خشک شده را در یک ظرف در دار ریخته و در یخچال (دمای ۴-۲ درجه سانتیگراد) نگهداری می شوند.

برای ساختن محیط کشت برگ میخک-آگار ، آب- آگار ۲ درصد را در پتری ریخته و پیش از جامد شدن محیط کشت، ۴-۳ قطعه برگ میخک بر روی آن قرار داده می شود.

توجه ۱: برگ‌های خشک شده میخک باید سبز و ترد باقی بمانند.

توجه ۲: محیط کشت برگ میخک-آگار از سویی موجب افزایش سرعت کنیدی زایی و از سویی دیگر تشکیل ماکروکنیدیوم‌های تیپیک (یکی از ویژگی‌های لازم برای تشخیص) می‌شود .

محیط کشت کلرید پتاسیم - آگار (KCLA):

برای مشاهدهٔ بهتر زنجیره‌های میکروکنیدی و شناسایی قارچ از محیط آب- آگار حاوی ۸-۴ گرم در لیتر KCl استفاده می شود. در روی این محیط جدایه‌های قارچ تولید زنجیرهٔ میکروکنیدی به میزان فراوان می‌نمایند و به علت وجود KCl در محیط کشت، زنجیره میکروکنیدی به صورت پایدار باقی می‌ماند و به راحتی می-

توان به وسیلهٔ میکروسکوپ وجود زنجیره را که یکی از معیارهای اصلی در شناسایی گونه های فوزاریوم ها می‌باشد، را مشاهده کرد.

دستورالعمل جداسازی و ردیابی *Fusarium* spp. از بافت میزبان:

قارچ عامل بیماری را از محل بافت‌های آلوده گیاهان میزبان می‌توان جداسازی کرد. برای این کار ابتدا محل‌های بافت آلوده با الکل اتیلیک ۷۵٪ ضد عفونی می‌شود و بعد به سرعت از روی شعله عبور داده می‌شود تا ضدعفونی سطحی صورت گیرد. پس از آن قطعات کوچکی از بافت‌های مرز بین ناحیهٔ سالم وآلوده با استفاده از اسکالپل جدا و روی محیط کشت انتخابی نش اشنایدر (Snyder & Nash) قرار داده می‌شود. نمونه‌های کشت شده در انکوباتور ۲۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌گردند. سپس گونه های فوزاریوم رشد کرده به محیط PDA انتقال داده می‌شوند و برای خالص سازی و شناسایی در یخچال نگهداری می شوند.

دستورالعمل ردیابی آلودگی به *Rhizoctonia solani* در خاک

(Carling and Sumner 1992)

۱- قرار دادن مواد گیاهی طعمه مانند دانه های جو، لوبیا، قطعات هویج یا سیب زمینی در خاک مرطوب برای مدت ۵ روز و دمای ۲۴-۲۸ درجه سلسیوس. رطوبت خاک باید به میزان ۵۰ درصد ظرفیت مزرعه باشد.

۲- شستشوی خاک بر روی الک ۶۰ مش (قطر ۲۵/ میلی متر) با آب شیر.

۳- خشک کردن قطعات طعمه بر روی کاغذ خشک کن استریل .

۴- کشت این قطعات بر روی محیط کشت آب-آگار دارای آنتی بیوتیک استرپتومایسین سولفات.

۵- مشاهده ریسه های ویژه *R. solani* و کشت نوک ریسه در محیط کشت PDA.

ردیابی بیمارگرهای شبه قارچی مورد نظر در استاندارد سلامت نهال

دستورالعمل ردیابی آلودگی به *Phytophthora* spp. در خاک

الف) طعمه گذاری در خاک اشباع ویا آب آبیاری (Mitchell and Kannwisecher-Mitchell 1992, Ershad, 1992)

۱- غوطه ور کردن ۵ تا ۱۰۰ گرم خاک از نمونه مرکب در آب مقطر استریل به طوری که ۳ سانتی متر آب روی خاک قرار گیرد.

۲- قرار دادن طعمه(برگ نارنج، **شاهدانه** ، برگ های سوزنی کاج) به صورت غوطه ور در آب.

۳- انکوباسیون در دوره های نور و تاریکی ۱۲ ساعته و دمای ۲۸ و ۲۰ درجه سلسیوس به مدت ۳ تا ۱۰ روز.

۴- بررسی بافت طعمه جهت ظهور علائم قهوه ای شدن بر اثر آلودگی به فیتوفتورا.

۵- انتقال بافت طعمه قهوه ای شده طعمه به محیط کشت انتخابی برای *Phytophthora* spp. مانند محیط کشت آرد ذرت-آگار(CMA).

توجه ۱: دانه های شاهدانه باید پیش از استفاده به مدت ۵ دقیقه جوشانده شوند.

توجه ۲: برای قرار دادن قطعات کوچک طعمه مانند شاهدانه از پارچه توری استفاده می شود.

استفاده از برگ های پسته در موارد مشکوک به آلودگی فیتوفتورایی در نهالستان پسته(میرابوالفتحی و همکاران ۱۳۶۹)

۱- اشباع ۱۰۰ گرم از نمونه مرکب خاک با آب مقطر در بشر به طوری که آب به ارتفاع ۱ سانتی متر بر روی خاک قرار گیرد.

۲- نگهداری بشر دارای خاک اشباع در تاریکی و دمای ۲۲ تا ۲۵ درجه به مدت ۲۴ ساعت.

۳- خرد کردن برگ های پسته به قطعات ۰/۵ × ۰/۵ سانتی متری و قرار دادن ۸ تا ۱۰ قطعه در هر بشر محتوی خاک اشباع.

۴- نگهداری در محلی با تناوب نور و تاریکی و دمای ۲۵ تا ۲۷ درجه به مدت ۴۸ ساعت.

۵- برداشتن تعدادی از قطعات برگی و انتقال آن ها به محیط کشت اختصاصی.

ب) کشت مستقیم خاک بر روی محیط انتخابی (Kannwisecher - Mitchell, 1978)

تهیه محیط کشت محیط تغییر یافته کنویشر-میشل (Modified Kannwisecher - Mitchell's medium):

۱- محیط پایه آرد ذرت-آگار(cornmeal agar) ۱ لیتر

۲- نمک سدیم آمپی سیلین (ampicillin) ۰/۲۵ گرم در لیتر

۳- ریفامپیسین (rifampicin) ۰/۰۱ گرم در لیتر

۴- کاربندازیم (carbendazim) ۰/۲۵ گرم در لیتر

۱- پاشیدن یک لایه بسیار نازک خاک به طور یکنواخت بر روی محیط با کمک سمپلر مناسب (Andersen's air sampler) و درصورت در اختیار نداشتن، به صورت دستی.

۲- انکوباسیون در دمای ۲۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ روز.

بازرسی میدانی و جستجو برای علائم مهم آلودگی به *Phytophthora* spp.

علائم این دسته از بیماری ها شامل پوسیدگی ریشه، زخم ساقه، بلایت برگ، لکه برگی، بلایت شاخه یا دای بک، زخم و تغییر رنگ داخلی و خارجی بر روی شاخه ها، برگ ریزی، تولید صمغ و ترشح غیر طبیعی بر روی تنه، زردی و تغییر رنگ غیر طبیعی در برگ ها و سر انجام مرگ گیاه است. علاوه بر آن بر روی بافت و تنه آلوده می توان میسلیوم های بیمارگر و یا اسپورانژیوم های میکروسکوپی آن را نیز مشاهده کرد. مشاهده علائم برای تایید آلودگی فیتوفتورایی کافی نبوده و نیازمند بررسی آزمایشگاهی است.

دستورالعمل ردیابی آلودگی به *Phytophthora* spp در ساقه ها و شاخه ها

(Ershad, 1992)

۱- شستشوی شاخه دارای علائم زخم فیتوفترایی به طول ۷ سانتی متر با آب شیر

۲- بریدن ۲-۳ سانتی متر بالا و پایین شاخه

۳- ضدعفونی سطحی شاخه با الکل اتیلیک وسوزاندن لایه الکل باقیمانده روی پوست شاخه

۴- جداکردن پوست شاخه با چاقو یا اسکالپل استریل

۵- برداشتن قطعه کوچک به ابعاد ۲ × ۵ /. سانتی متری از حد فاصل بافت سالم و بیمار

۶- قرار دادن قطعات در پتری دیش محتوی محیط کشت PDA

۷- انکوباسیون پتری دیش ها در دمای ۲۰ درجه سلسیوس و به مدت ۱ هفته

دستورالعمل ردیابی آلودگی به *Phytophthora* spp در تنه و طوقه درختان

(Ershad, 1992)

۱- برداشتن و کنارزدن قسمتی از خاک پای طوقه درخت

۲- برداشتن پوست محل زخم با چاقوی تیز باغبانی

۳- بریدن و جداکردن تکه هایی از چوب در حدفاصل بین زخم و بافت سالم

۴- قرار دادن دادن قطعات جداشده در کیسه های نایلونی مناسب

۵- قرار دادن قطعات کوچک ۲× ۵ /. سانتی متری از تکه چوب های بریده شده بر روی محیط کشت.

توجه ۱: تا حد امکان نمونه برداری از چوب در شرایط عاری از آلودگی، بدون تماس با خاک و با دستکش استریل انجام شود.

توجه ۲: باید توجه داشت که در بیشتر موارد ردیابی این بیمارگر از قسمت های زیر زمینی ویا نزدیک به زمین درخت به علت وجود قارچ ها و باکتریهای خاک زاد مشکل بوده وباید از روش های دیگر مانند طعمه گذاری و محیط های انتخابی بهره گرفت.

دستورالعمل ردیابی آلودگی به *Pythium* spp. در خاک

(Frank 1992)

الف) کشت عصاره رقیق شده خاک:

۱- تهیه عصاره خاک سوسپانسیون ۴ گرم خاک در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر

۲- بلافاصله کشت ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون خاک بر روی محیط کشت آب آگار (WA) و یا یک محیط کشت انتخابی.

۳ - انکوباسیون ظروف پتری دیش کشت داده شده در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سلسیوس.

۴- مشاهده کلنی ویژه شبه قارچ بر روی محیط کشت.

۵ - قرار دادن قرصی از کلنی رشد یافته به شکل غوطه ور درآب مقطراستریل دارای دانه های شاهدانه استریل و نگهداری در زیر نور و دمای ۲۵ درجه سلسیوس.

مشاهده اسپورانژیم های ویژه تشکیل شده شبه قارچ به کمک میکروسکوپ.

ب) روش طعمه گذاری در خاک :

۱- قرار دادن تکه‌هایی از بافت گیاهی طعمه مانند دانه های شاهدانه، قطعات هویج در خاک به مدت ۴ روز.

۲-خارج کردن قطعات طعمه از خاک و کشت آن ها بر روی محیط انتخابی.

توجه: جهت ردیابی و جداسازی *P. aphanidermatum.* قطعات سیب زمینی تازه پس از قرار دادن قطعه ای از محیط کشت آب –آگار بر روی آن به عنوان طعمه و نگهداری در دمای ۲۷ درجه سلسیوس به مدت ۲ روز درخاک مرطوب با موفقیت استفاده شده است(Stanghellini and Kronland 1985).

دستورالعمل ردیابی آلودگی به *Pythium* spp. از بافت گیاهی (Frank 1992)

۱- حذف قسمت های پوسیده و شستشوی قسمت های باقی مانده (حاشیه سالم بافت آلوده) با آب شیر

۲- ضد عفونی قطعات با هیپوکلریت سدیم ۵/. درصد به مدت ۳۰ ثانیه و شستشو با آب مقطر استریل

دانشگاه علوم کشاورزی

۳- خشک کردن قطعات شسته شده با کاغذ خشک کن استریل

۴- قرار دادن قطعات بر روی محیط کشت WA دارای آنتی بیوتیک پنی سیلین و یا آمپی سیلین

توجه۱: برخی از گونه های *Pythium* spp. ممکن است به ضد عفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم حساس باشند و بنابراین باید جداسازی بدون ضدعفونی سطحی و تنها با شستشو با آب استریل نیز مورد آزمون قرار گیرد.

توجه ۲: افزودن مقدار ۱/. درصد از ماده Tergitol NPX به محیط کشت با محدود کردن رشد خطی شبه قارچ می تواند به شناسایی گونه بر اساس مورفولوژی کلنی کمک کند.

توجه ۳: برای گونه های کند رشد، استفاده از محیط کشت اختصاصی مانند P10VP و P5ARP توصیه می شود.

محیط کشت P10VP (Tsao & Ocana, 1969):

۱- محیط پایه آرد ذرت-آگار(cornmeal agar) ۱ لیتر

۲- پیماریسین (Pimaricin) ۰/۰۱ گرم در لیتر

۳- ونکومایسین اسیدی(Vancomycin HCl) ۰/۲ گرم در لیتر

۴- پی سی ان بی (PCNB) ۰/۱ گرم در لیتر

محیط کشت P5ARP (Jeffers &Martin 1986):

۱- محیط پایه آرد ذرت-آگار(cornmeal agar) ۱ لیتر

۲- نمک سدیم آمپی سیلین (ampicillin) ۰/۲۵ گرم در لیتر

۳- ریفامپیسین (rifampicin) ۰/۰۱ گرم در لیتر

منابع

ارشاد، ج.۱۳۷۱.گونه های فیتوفتورا در ایران(جداسازی-خالص سازی-شناسایی).۲۱۷ صفحه.

بی نام ۱۳۹۰.ضوابط ردیابی و نمونه برداری نماتد های پارازیت گیاهی در مزارع، باغ ها و نهالستان ها.مدیریت تدوین برنامه های کنترل. سازمان حفظ نباتات. وزارت جهاد کشاورزی.

میرابوالفتحی، م.، ارشاد، ج. و حجارود، ق.۱۳۶۹. بررسی بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه (گموز) درختان پسته در منطقه رفسنجان. بیماری های گیاهی گیاهی. ۲۶: ۱-۱۲.

یوسفی همدانی، ا ، شریف نبی، ب. و بهار، م. ردیابی سریع *Armillaria mellea* عامل پوسیدگی ریشه و طوقه درختان از نمونه های خاک و چوب با استفاده از تکنیک PCR آشیانه ای. مجله علمی کشاورزی. ۳۵: ۸۲-۷۱

Anonymous.2010. Phytophthora species in the Environment and Nursery Settings New Pest Response Guidelines, USDA–APHIS–PPQ–Emergency and Domestic Programs–Emergency Management, Riverdale, Maryland. U.S. Department of Agriculture, Animal and Plant HealthInspection Services (APHIS).

Anonymous, 2013. *Verticillium dahliae* Soil Testing. Pest Pros. Division of Allied Coop http://www.pestprosinc.com/Verticillium-Dahliae-Testing.html

Celetti, M. 2012.Sampling soil and roots for parasitic nemathodes. Factsheet. Ministry of Agriculture and Food. Ontario.http.//.www.omafra.gov.on.ca/English/crops/facts/06-099.html.

Carling, D.E.. and Sumner, D.R. 1992. *Rhizoctonia* spp. 157-165. In: L. L Singleton, J.D. Mihail and C. M. Rush (Eds), Method for research on soil borne phytopathogenic fungi. APS press, USA.

Carlucci,A.,. Manici , L. M.,Colatruglio , L., Caputo, A. and Frisullo, S. 2013. *Rosellinia necatrix* attack according to soil features in the Mediterranean environment. For. Path. 43 :12–18. doi: 10.1111/j.1439-0329.2012.00787.x

Dhingra, O.D. and Sinclare, J.B. 1995. Basic Plant Pathology Methods. Second edition.LEWIS Publishers. 434 pp.

Ershad, D.J.1992. PHYTOPHTHORA SPECIES IN IRAN(Isolation-Purification-Identification).Agricultural Research Organisation, Tehran.217pp.

دفتر مرکزی انجمن حمایت
کتابخانه و آموزش

Frank, N.M., A. 1992. *Pythium* spp. 39-49. In: L. L Singleton, J.D. Mihail and C. M. Rush (Eds), Method for research on soil borne phytopathogenic fungi. APS press, USA.

Freeman, S. and Sztejnberg, A. 1992. *Rosellinia* spp. 71-73. In: L. L Singleton, J.D. Mihail and C. M. Rush (Eds), Method for research on soil borne phytopathogenic fungi. APS press, USA.

Goud, J.C. and Termorshuizen, A. J. 2003.Quality of methods to quantify microsclerotia of *Verticillium dahliae* in soil. European Journal of Plant Pathology. 109: 523–534.

Harrington, T.C., Worrall, J.J. and Baker, F.A. 1992. *Armillaria* spp. 81-85. In: L. L Singleton, J.D. Mihail and C. M. Rush (Eds).Method for research on soil borne phytopathogenic fungi. APS press, USA.

Jeffers, S.N. and Martin, S.B. 1986.Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* spp. Plant Disease. 70:1038-1043.

Kabir, Z., Bhat, R. G., and Subbarao, K. V. 2004. Comparison of media for recovery of *Verticillium dahliae* from soil. Plant Disease. 88:49-55.Leslie JF, Summerell BA. 2006. The Fusarium laboratory manual. 1st ed. Ames, Iowa: Blackwell Publishing.

Leslie, J.F. and Summerell, B.A. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. 1st ed. Ames, Iowa: Blackwell Publishing

Mitchell, D.J. and Knnwischer-Mitchell,M.E.1992.*Phytophthora spp.*31-38. In: L. L Singleton, J.D. Mihail and C. M. Rush (Eds), Method for research on soil borne phytopathogenic fungi. APS press, USA.

Nadakavukaren, M.J., and Horner, C.E. 1959. An alcohol agar medium selective for determining *Verticillium* microsclerotia in soil. PHytopathology, 49: 527-528.

Nelson PE, Toussoun TA & Marasas WFO (1983). Fusarium Species- An Illustrated Manual for Identification. Park and London, USA: The Penssylvania State University Press. 199p.Pedigo, L.P. 1996 Entomology and Pest Management, 2nd edn. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ, USA.

Stanghellini, M.E. and Kronland, W.C. 1985. Bioassay for quantification of *Pythium aphanidermatum* in soil. Phytopathology.75:1242-1245.

Termorshuizen, A.J. 2000. Interlaboratory comparison of methods to quantify microsclerotia of *Verticillium dahliae* in soil. Pages 122-124 in Advances in Verticillium research and disease management. E.C. Tjamos, R.C. Rowe, J.B. Heale, and D.R. Fravel, (eds). APS Press, St. Paul, MN.

Tsao, P.H. and Ocana, G. 1969. Selective isolation of species of *Phtophthora* from natural soils on an improved antibiotics medium. Nature(London).223:636-638.

Waksman S.A. 1922. A method of counting the number of fungi in the soil. J Bacteriol 7: 339-341.

Warcup J.H.1955. On the origin of colonies of fungi developing on soil dilution plates. Trans Brit Mycol Soc. 38: 298-301.