



وزارت جهاد کشاورزی

سازمان حفظ نباتات

Plant-protection.ir

به روزترین سایت گیاهپزشکی

علائم بیماریهای قارچی با تاکید بر قارچهای قرنطینه ای و روشهای جداسازی و شناسایی آنها



تهیه و تنظیم:

مهديه بنی هاشمی

سید جواد نوروزیان

مدیریت امور آزمایشگاهها

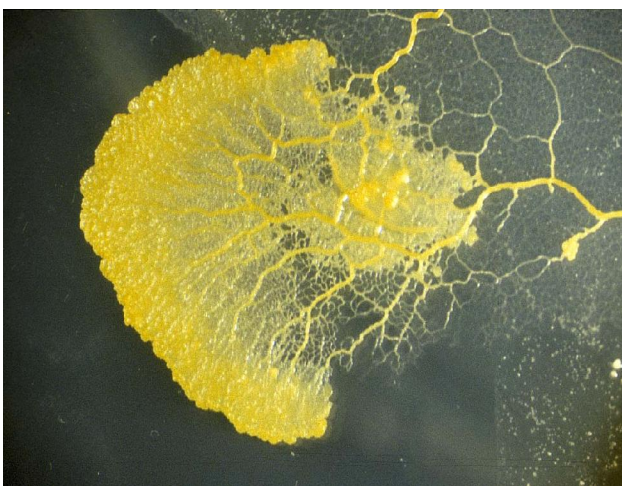
تابستان ۱۳۹۰

قارچ‌ها Fungi

قارچ‌ها موجوداتی فاقد کلروفیل و دارای دیواره سلولی می‌باشند که معمولا جنس دیواره سلولی از کیتین و گلوکان است. رشد قارچ‌ها به صورت ساپروفیت یا انگلی است. غالب قارچ‌های بیماریزای گیاهی ساپروفیت اختیاری بوده قادر به رشد و تکثیر روی انواع محیط‌های کشت و بافت‌های مرده گیاهی هستند. سایر آنها انگل اجباری بوده و فقط روی گیاه میزبان زنده خاصی قادر به رشد و تکثیر می‌باشند (نظیر زنگها، سیاهکها، سفیدک‌های سطحی و داخلی). بیشتر قارچ‌ها رشته‌هائی به ابعاد مختلف تولید می‌نمایند که به آنها هیف گفته میشود. در اثر رشد و منشعب شدن آنها نیز اندام رویشی یا میسلیم قارچ بوجود می‌آید. بیش از ۱۰۰۰۰۰ گونه قارچ وجود دارد که حدود ۸۰۰۰ گونه آن در گیاهان ایجاد بیماری می‌کنند.

تکثیر Reproduction

تقریباً همه قارچ‌ها به وسیله اسپورهای جنسی (حاصل تولید مثل جنسی) یا غیرجنسی (حاصل از اندامهای رویشی) تکثیر، انتشار و دوام می‌آورند. این اسپورها به سهولت در اثر جریان هوا، آبپاشی و برخی عوامل دیگر در سطح اندامهای گیاهی قرار می‌گیرند. اسپرهای مقاوم مانند کلامیدوسپور و اووسپور سبب دوام بعضی قارچها در شرایط نامساعد می‌شوند. عده‌ای از قارچها نیز اسپور تولید نمی‌کنند و با تشکیل توده متراکم قارچی (اسکلروتیوم) فصول نامساعد را سپری می‌کنند.



اندام رویشی (راست) و پلاسمودیوم (چپ) قارچ‌ها

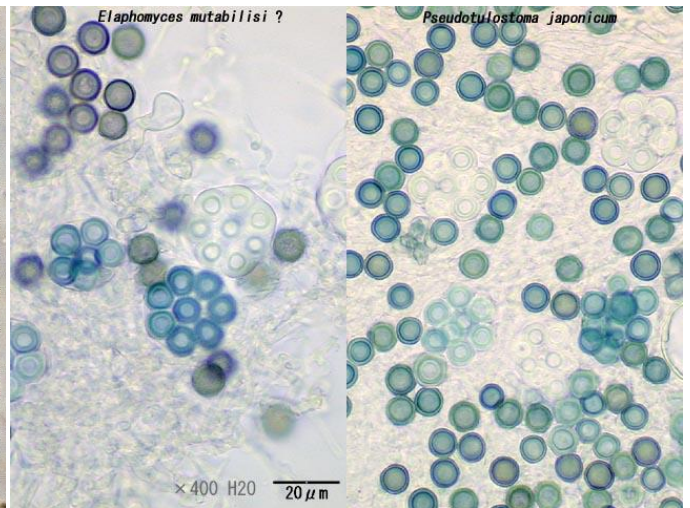
Dissemination

انتشار

انتشار قارچ‌ها از طرق مختلف نظیر میسلیموم، کنیدی، پیکنید، اسکروت، کلامیدوسپور و اندامهای جنسی مانند اووسپور، آسکوکارپ و تلیوسپور صورت می‌گیرد.



اسکروت(راست) وکنیدی‌ها(چپ) قارچ



آسکوسپور(راست) و بازیدیوسپورها(راست) قارچ

Symptoms علائم

۱- لکه برگگی (Leaf blight) و لکه‌های روی میوه:

لکه‌های موضعی روی برگ‌ها و میوه میزبان که از سلول‌های مرده تشکیل شده است.



لکه‌های نکروزه ناشی از فعالیت قارچ قرنطینه‌ای *Alternaria mali* روی برگ‌های سیب



لکه‌های نکروزه ناشی از فعالیت قارچ قرنطینه‌ای *Mycosphaerella musicola* روی برگ موز



علائم بیماری لکه‌برگی گوجه فرنگی ناشی از قارچ قرنطینه‌ای *Septoria lycopersici* روی برگ گیاه گوجه فرنگی



علائم بیماری لکه سیاه مرکبات ناشی از قارچ قرنطینه‌ای *Guignardia citricarpa* روی برگ مرکبات



لکه‌های نکروزه ناشی از قارچ قرنطینه‌ای *Guignardia citricarpa* عامل لکه سیاه مرکبات روی میوه پرتقال



علائم بیماری قرنطینه‌ای بلاچ سیب ناشی از قارچ قرنطینه‌ای *Phyllostictina solitaria* روی میوه‌های ارقام مختلف سیب



لکه‌های ایجاد شده توسط قارچ قرنطینه‌ای *Alternaria mali* روی میوه سیب (راست) و پوسیدگی قهوه‌ای ناشی از قارچ

Monilinia fructicola روی میوه هلو



علائم بیماری پوسیدگی قهوه‌ای ناشی از قارچ *Monilinia fructicola* روی میوه هسته داران



علائم بیماری پوسیدگی قهوه‌ای ناشی از قارچ *Monilinia fructicola* روی میوه هلو

۲- بلایت یا سوختگی یا باد زدگی (Blight):

قهوه‌ای شدن سریع و عمومی برگ‌ها، شاخه‌ها و اندام‌های گل که منجر به مرگ آنها خواهد شد.



لکه‌های نکروز ناشی از فعالیت قارچ قرنطینه‌ای بلایت سیاه سیب زمینی *Phoma andigena* روی برگ‌های سیب زمینی



سرخشکیدگی و ریزش برگ‌های مرکبات در اثر فعالیت قارچ *Phoma tracheiphila*



ریزش برگ و دمبرگ‌های شاخه لیموی آلوده به قارچ *Phoma tracheiphila*

۳- بلاست (Blast):

قهوه‌ای شدن سریع و عمومی اندام‌های گل و برگ‌ها که منجر به مرگ آنها می‌گردد.



علائم بیماری بلاست برنج ناشی از قارچ *Pyricularia oryzae* روی برگ و خوشه برنج

۴- شانکر یا خوره (Canker):

یک زخم موضعی یا ناحیه مرده و اغلب فرورفته در زیر سطح ساقه است.



شانکر ناشی از قارچ قرنطینه‌ای *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *Platani* روی تنه درخت صنوبر



لکه‌های فرورفته روی غده سیب زمینی در اثر فعالیت قارچ قرنطینه ای عامل جرب کرکی

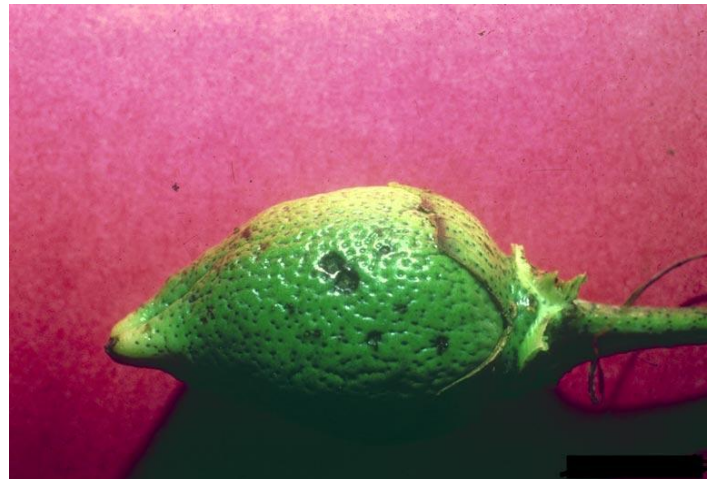
Spongospora subterranea f.sp. *subterranean*

Phomopsis prunorum on apple stem nursery stock



شانکر ناشی از قارچ *Phoma prunorum* روی ساقه نهال سیب

۵- آنتراکنوز (**Anthracnose**): لکه‌های زخم مانند مرده روی ساقه، برگ، میوه یا گل است.



لکه‌های گرد(چپ) و فرورفته(راست) ناشی از قارچ قرنطینه ای آنتراکنوز پنبه *Glomerella. gossypii* روی قوزه‌های پنبه



زخم‌های حاصل از قارچ قرنطینه‌ای آنتراکنوز بادام زمینی *Sphaceloma arachidis* روی ساقه و برگ بادام زمینی

۶- پوسیدگی‌ها (Rots):

پوسیدگی در اثر فساد و تجزیه اندام‌های گیاهی رخ می‌دهد.

الف- پوسیدگی ریشه (Root rot)



پوسیدگی ریشه ناشی از قارچ قرنطینه‌ای *Phymatotrichopsis omnivora* روی ریشه گیاه پنبه

ب- پوسیدگی ساقه و طوقه (Stem & Crown rot)



پوسیدگی طوقه ناشی از قارچ قرنطینه ای *Phytophthora cinnamomi* روی گیاه *Rhododendron* sp.



علائم بیماری پوسیدگی ریشه ناشی از قارچ قرنطینه ای *Phytophthora cinnamomi* روی درختان کاج

ج- پوسیدگی میوه



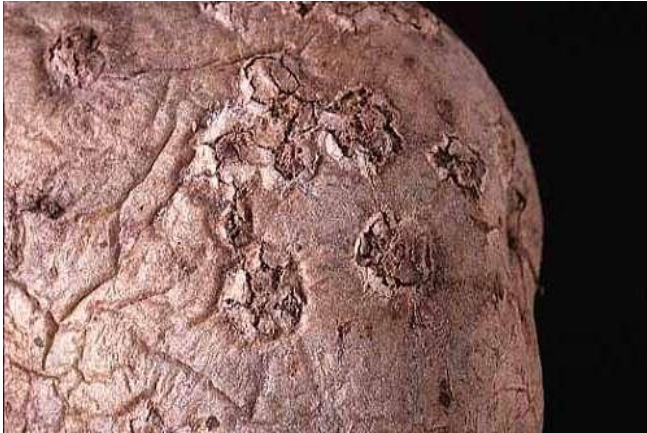
علائم قارچ قرنطینه ای پوسیدگی سیاه انگور ناشی از قارچ *Guignardia bidwellii* روی میوه انگور



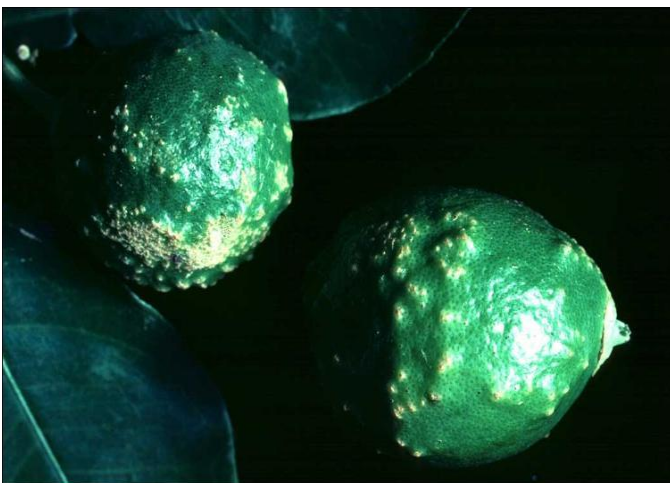
پوسیدگی خشک ایجاد شده توسط قارچ قرنطینه ای *Alternaria mali* روی میوه سیب

۷- جرب (Scab):

لکه‌های موضعی روی میوه، برگ، غده و سایر قسمت‌های میزبان که معمولا کمی برجسته یا فرورفته بوده و ترک‌خورده هستند.



زخم‌های ناشی از قارچ قرنطینه‌ای عامل جرب پودری *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea* روی غده سیب زمینی



علامه ناشی از قارچ قرنطینه‌ای عامل اسکب مرکبات *Elsinoe fawcettii* روی میوه پرتقال (راست) و گریپ فروت (چپ)

ج- پوسیدگی خوشه

در اثر فعالیت اندامهای قارچی بر روی خوشه، به تدریج خوشه ها تغییر رنگ داده و از بین می روند.



علامت پوسیدگی سفید بلال ذرت در اثر قارچ قرنطینه‌ای *Stenocarpella maydis* روی بلال ذرت



قهوه‌ای شدن بذور ذرت و ریشه های سفید قارچ قرنطینه‌ای *Stenocarpella maydis* روی بلال ذرت

۸- گال (Gall):

گال در واقع قسمت‌های بزرگ شده گیاه در اثر هیپر تروفی یا هیپر پلازی است.



گال‌های ایجاد شده در اثر فعالیت قارچ قرنطینه‌ای جرب کرکی سیب زمینی *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea* روی

ریشه‌های سیب زمینی

۹- زگیل (Wart):

برجستگی‌های روی اندام‌هایی نظیر غده و ساقه است که در اثر فعالیت غیرطبیعی سلول‌ها بوجود می‌آید.



علائم بیماری قرنطینه‌ای گال سیب زمینی ناشی از قارچ *Synchytrium endobioticum* روی غده‌های سیب زمینی

۱۰- زنگ (Rust):

زنگ‌ها جوش‌هایی هستند که از اپیدرم اندام‌های گیاهی بیرون می‌زنند و نام بیماری نیز از ماهیت زنگ مانند اسپورهایی است که از این جوش‌ها تولید می‌شود.



علائم بیماری قرنطینه‌ای زنگ بادام زمینی ناشی از قارچ *Puccinia arachidis* روی برگ بادام زمینی



جوش های ناشی از بیماری قرنطینه ای زنگ معمولی سیب زمینی ناشی از قارچ *Puccinia pittieriana* در سطح زیرین برگ سیب زمینی

۱۱- سفیدکها (Mildew):

مناطق کلروزه (زرد) یا نکروزه (قهوه ای) روی برگ، ساقه و میوه که معمولا با ریشه یا اندام های باروری قارچ پوشیده شده است.

الف- سفیدک سطحی (Powdery mildew)



علامت سفیدک سطحی روی غنچه رز (چپ) و میوه سیب (راست)

ب- سفیدک دروغی (Downy mildew)



علامه بیماری قرنطینه‌ای سفیدک دروغی سورگوم ناشی از قارچ *Peronosclerospora sorghi* روی برگ های سورگوم



علامه بیماری قرنطینه‌ای سفیدک دروغی ذرت ناشی از قارچ *Peronosclerospora maydis* روی برگ های سورگوم

۱۲- پژمردگی یا بوته میری (Wilt)

معمولا یک نوع علامت ثانوی است که در اثر اختلال در سیستم آوندی رخ میدهد. در این حالت برگها و شاخهها شادابی خود را از دست داده و آویزان می شوند.



زردی، پژمردگی تاج و قهوه‌ای شدن دستجات آوندی درخت خرما ناشی از قارچ قرنطینه‌ای *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*



علایم بیماری پانامای موز ناشی از قارچ قرنطینه‌ای *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* روی موز



قهوه‌ای شدن مغز چوپ گیاه موز ناشی از قارچ قرنطینه‌ای *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*



علائم بیماری سندرم مرگ ناگهانی بلوط ناشی از قارچ *Phytophthora ramorum* روی درخت بلوط



علائم بیماری سندرم مرگ ناگهانی بلوط ناشی از قارچ *Phytophthora ramorum* روی تنه درخت بلوط و برگ گیاه آزالیا



شانکر و زوال درخت کاج ناشی از قارچ *Gremmeniella abietina*



زخم های ناشی از قارچ *Gremmenaiella abietin* روی تنه درخت کاج



زخم های ناشی از *Gremmenaiella abietin* روی ساقه کاج



علائم شانکر ناشی از *Lachnellula willkommii* روی تنه کاج اروپایی



شانکر ناشی از *Lachnellula flovovirens* روی تنه کاج اروپایی



شانکر ناشی از قارچ *Lachnellula willkommii* روی کاج



علائم بیماری زغالی *Biscogniauxia mediterranea* روی تنه بلوط

۱۳- مرگ گیاهچه (Damping off):

مرگ گیاهچه عبارت از مرگ سریع نهال‌های خیلی جوان در بستر بذر یا مزرعه است.



پوسیدگی ریشه و از بین رفتن گیاهچه ناشی از قارچ قرنطینه‌ای *Aphanomyces cochlioides* روی گیاهچه چغندر

۱۴- سیاهک‌ها:

توده ای از اسپورهای پودری و سیاه‌رنگ قارچ، که می‌تواند برگ، ساقه و بذر را تحت تاثیر قرار دهد اما بسیاری از آنها تنها بذر را آلوده می‌نمایند.



علامت ناشی از قارچ قرنطینه‌ای سیاهک برنج *Tilletia barclayana* روی دانه‌های برنج (چپ)



علايم ناشی از قارچ قرنطینه‌ای سیاهک هندی گندم *Tilletia indica* روی بذور گندم

۱۵- پیچیدگی برگ (Leaf curl):

شامل ضخیم شدن، پیچیدگی و بدشکل شدن برگ‌ها است.

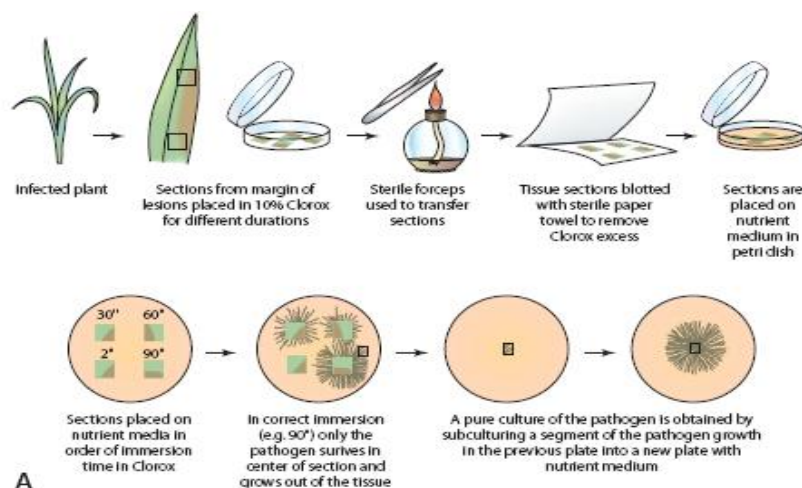


پیچیدگی و تغییر رنگ برگ‌های هلو در اثر آلودگی به قارچ *Taphrina deformans*

مراحل کشت و جداسازی نمونه‌های گیاهی مشکوک به آلودگی‌های قارچی

الف- اندام های هوایی

- ۱- نمونه‌ها پس از شستشو با آب مقطر، بر روی کاغذ صافی یا دستمال کاغذی قرار گرفته تا خشک شوند.
- ۲- به کمک اسکالپل استریل از حد فاصل بافت سالم و آلوده، قطعاتی را جدا و در محلول ضدعفونی (وایتکس ۱۰ درصد یا الکل اتیلیک ۷۰ درصد) قرار می‌گیرد.
- ۳- بسته به ضخامت نمونه، زمان ضدعفونی از ۳۰ ثانیه تا چند دقیقه است.
- نکته- در صورتی که از وایتکس استفاده شود لازم است پس از ضدعفونی، نمونه‌ها دو تا سه بار به فواصل یک دقیقه با آب مقطر استریل شسته شوند.
- ۴- پس از ضدعفونی، نمونه‌ها بر روی کاغذ صافی یا دستمال کاغذی قرار گرفته تا خشک شوند و سپس بر روی محیط کشت عمومی یا اختصاصی قرار داده می‌شوند.
- ۵- در شرایط استریل و زیر هود میکروبیولوژی، نمونه‌ها بر روی محیط کشت قرار داده می‌شوند. سپس پتری‌ها در انکوباتور و در دمای ۲۵-۳۰ درجه سانتی گراد نگهداری و به مدت یک هفته هر روز مورد ارزیابی قرار می‌گیرند.
- ۶- برای جداکردن بیمارگرهایی که عمیقاً در ساقه و میوه نفوذ کرده‌اند می‌توان آنها را در جهت طولی (از قسمت سالم نمونه) دو نیم کرده، سپس از مرز بافت سالم و آلوده بخش دورنی میوه یا ساقه که برای اولین بار در معرض محیط خارج قرار گرفته است، برش‌های کوچک ۵ تا ۱۰ میلی متری تهیه و آنها را بر روی محیط کشت مصنوعی کشت داد.



جداسازی پاتوژن قارچی از بافت آلوده گیاه

ب- اندام زیر زمینی

- ۱- در صورتی که اندام نمونه برداری شده (اعم از ریشه، غده یا پیاز) آغشته به خاک، پیت یا سایر مواد باشد، نمونه‌ها در زیر شیرآب با جریان ملایم آب شسته می‌شوند.
- ۲- نمونه‌ها پس از شستشو بر روی کاغذ صافی یا دستمال کاغذی قرار گرفته تا خشک شوند.
- ۳- به کمک اسکالپل استریل از حد فاصل بافت سالم و آلوده قطعاتی را جدا و در محلول ضدعفونی (وایتکس ۱۰ در صد یا الکل اتیلیک ۷۰ درصد) قرار می‌گیرد.
- ۴- بسته به ضخامت نمونه، زمان ضدعفونی از ۳۰ ثانیه تا چند دقیقه است.
- نکته- در صورتی که از وایتکس استفاده شود لازم است پس از ضدعفونی، نمونه‌ها دو تا سه بار به فواصل یک دقیقه با آب مقطر استریل شسته شوند.
- ۵- پس از ضدعفونی، نمونه‌ها بر روی کاغذ صافی یا دستمال کاغذی قرار گرفته تا خشک شوند و سپس بر روی محیط کشت عمومی یا اختصاصی قرار داده می‌شوند.
- ۶- در شرایط استریل و زیر هود میکروبیولوژی، نمونه‌ها بر روی محیط کشت قرار داده می‌شوند. سپس پتری‌ها در انکوباتور و در دمای ۲۵-۳۰ درجه سانتی گراد نگهداری و به مدت یک هفته هر روز مورد ارزیابی قرار می‌گیرند.

ج- بذر

- ۱- بذور پس از ضدعفونی با محلول وایتکس ۱۰ در صد یا الکل اتیلیک ۷۰ درصد، بر روی کاغذ صافی یا دستمال کاغذی قرار گرفته تا خشک شوند.
- ۳- بسته به اندازه بذر، زمان ضدعفونی از ۳۰ ثانیه تا چند دقیقه است.
- نکته- در صورتیکه از وایتکس استفاده شود لازم است پس از ضدعفونی، بذور دو تا سه بار به فواصل یک دقیقه با آب مقطر استریل شسته شوند.
- ۴- در شرایط استریل و زیر هود میکروبیولوژی، نمونه‌ها بر روی محیط کشت قرار داده می‌شوند. سپس پتری‌ها در انکوباتور و در دمای ۲۵-۳۰ درجه سانتی گراد نگهداری و به مدت یک هفته هر روز مورد ارزیابی قرار می‌گیرند.

محیط کشت

عمومی ترین محیط کشتی که در جداسازی عوامل بیماریزای قارچی کاربرد دارد محیط کشت PDA است که به صورت تجارتي به فروش می رسد اما از محیط های دیگر مانند MA و PSA نیز در جداسازی استفاده می شود.

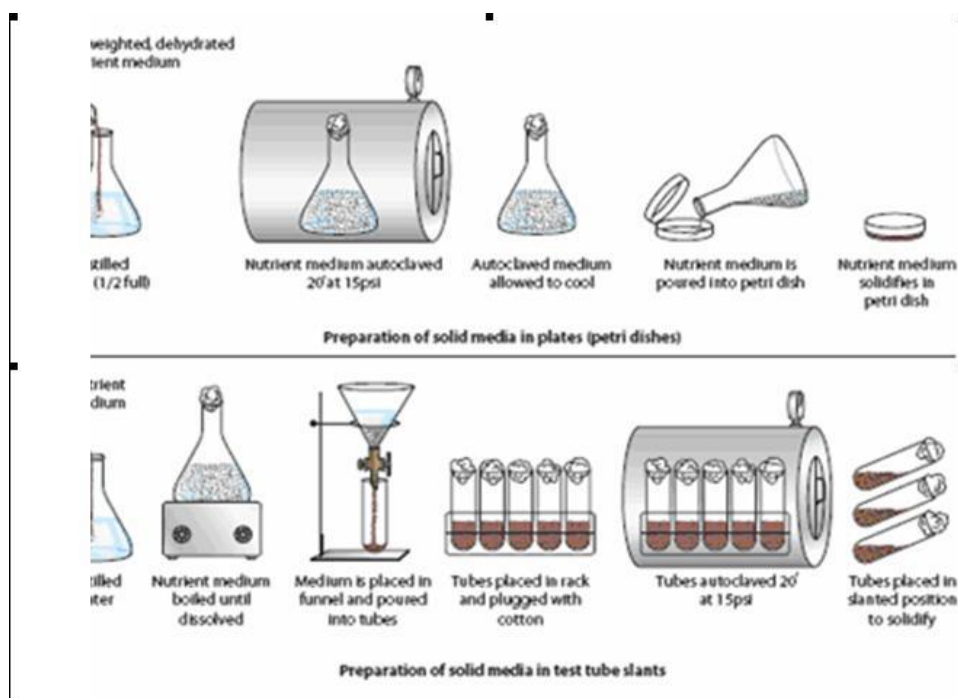
طرز تهیه محیط کشت

۱- با توجه به توصیه شرکت سازنده مقدار مشخصی از محیط کشت (مثلا برای محیط کشت PDA این مقدار معمولا ۳۹ گرم در لیتر است) درون ارلن حاوی آب مقطر ریخته شود.

۲- سپس به منظور حل شدن آگار موجود در محیط کشت، ارلن حرارت داده می شود تا آگار کاملا حل شده و محلول زلالی بدست آید.

۳- ارلن درون اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد و فشار یک اتمسفر به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده می شود تا استریل گردد.

۴- بعد از این مرحله و خنک شدن ارلن، محیط کشت به درون پتری دیش های استریل ریخته و پس از بسته شدن مورد استفاده قرار می گیرد.



آماده سازی محیط غذایی جامد در پتری دیش و لوله آزمایش بصورت مورب

آشنایی با پاره‌ای از روش‌های شناسایی عوامل بیماریزای بذر زاد

۱- مشاهده مستقیم Direct Inspection or Visual Inspection

نمونه‌های بذر مشکوک به آلودگی را می‌توان با استفاده از چشم، لنز یا بینوکولر از نظر وجود اسکروت، ارگوت، گال نماتد، بذر علف هرز، علائم پاتوژن، وجود تلئوسپور، خسارت حشرات یا علائم غیر معمول نظیر رنگ پریدگی، لکه‌های تیره و موارد مشابه مورد بررسی قرارداد. غوطه‌ور ساختن بذر در آب یا محلول دیگر و مشاهده آن در زیر بینوکولر از دیگر روشهای بررسی عوامل بیماریزای قارچی بذر زاد است. در این روش میتوان با غوطه‌ور نمودن بذر در محلولی نظیر آب و تکان دادن آن، اسپورها، ریشه و سایر اندامهای قارچی را که به بذر چسبیده‌اند، جدا کرده و در زیر میکروسکوپ بررسی نمود. هر چند با استفاده از روش مشاهده مستقیم وجود یا عدم وجود اندامهای قارچی در سطح بذر مورد ارزیابی قرار می‌گیرد اما نمی‌توان از زنده بودن آنها اطمینان حاصل نمود، ضمن اینکه برای آن گروه از قارچها که فاقد علائم ظاهری هستند نیز کارایی ندارد.

۲- آزمون بلاتر Blotter Test

آزمون بلاتر ارزان ترین و ساده ترین راه برای کنترل سلامت بذر در آزمایشگاه است. این آزمون بیانگر آلودگی بذر و در مواردی آلوده بودن گیاهچه ناشی از جوانه زنی بذر است. روش کار بدین صورت است که در پتری‌دیش آب مقطر استریل (یا آب مقطر معمولی) ریخته و سپس کاغذ صافی مدوری هم اندازه پتری درون آن گذاشته و بذر به فاصله مشخصی از یکدیگر درون پتری قرار داده و پس از پایان کار پتری دیش‌ها را در انکوباتور ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار می‌دهیم. اگر کاغذ صافی مورد استفاده آکاردئونی باشد، می‌توان تعداد ۴ عدد بذر را در هر شکاف قرار داد و با توجه به وجود ۵۰ شکاف در هر کاغذ آکاردئونی ۲۰۰ عدد بذر در هر کاغذ قرار می‌گیرد. اگر اندازه بذر بزرگ باشد (مانند بذر ذرت) بهتر است ۲ عدد بذر را در هر شکاف قرار داد تا در صورت آلودگی دو بذر مجاور هم، تداخلی در رشد ریشه‌های آنها اتفاق نیافتد (بذور در کاغذ آکاردئونی باید طوری قرار داده شوند که در تماس با یکدیگر نباشند). سپس کاغذ را درون ظرفی مناسب قرار داده و برای تامین رطوبت به آن ۴۰ سی سی آب اضافه کرده و ظرف به انکوباتور ۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل گردد. از روز دوم بذر هر روزه مورد بررسی قرار می‌گیرند تا در صورت رشد قارچ، از آنها لام تهیه شده و مورد ارزیابی قرار گیرند.

۳- آزمون Cold Blotter Test

در این روش بسته به نوع پاتوژن می‌توان دامنه‌ای از درجه حرارت‌ها را مورد استفاده قرار داد. به عنوان مثال عامل بیماری لکه نواری جو (*Pyrenophora graminea*) شرایط سرد را می‌پسندد، از این رو بذر را به مدت ۳-۵ روز در ۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده و سپس به دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد منتقل می‌کنیم. پس از گذشت چند روز از ریشه‌های رشد یافته اسلاید تهیه و در زیر میکروسکوپ بررسی گردد.

۴- آزمون Freezing Blotter Test

در مورد قارچ‌های نظیر *Septoria*، *Helminthosporium* (*Drechslera*)، *Alternaria* و *Penicillium*، *Fusarium*، *Cephalosporium*، *Diplodia* هم تحمل میکنند می‌توان آنها را یک شبانه روز در دمای ۲۵-۲۰ درجه قرار داده و سپس بذور را ۲۴ ساعت در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری نمود. پس از این مرحله مجدداً آنها را به دمای ۲۵ درجه انتقال داد. لازم به توضیح است که دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد علاوه بر کاهش یا توقف فعالیت ساپروفیت‌ها، سبب از بین رفتن جنین بذور نیز خواهد شد و در نتیجه دیگر گیاهچه تولید نمی‌شود تا در سهولت روند کار مشکلی پدید آید.

۵- آزمون Centrifuge Washing Test

برای قارچ‌هایی نظیر سیاهک پنهان‌گندم (*Tilletia caries & T. foetida*)، سیاهک هندی (*Tilletia indica*)، سیاهک برگ‌پرچم (*Urocystis agropyri*) و سیاهک پاکوتاه (*Tilletia controversa*) می‌توان از این روش استفاده کرد. مثلاً در غلات ۵۰ گرم بذر، ۵۰ سی‌سی آب مقطر و یک قطره توپین (یا مایع ظرف‌شویی) را درون یک لوله آزمایش ریخته و در ۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ می‌کنیم و پس از حذف سوپرناتانت (مایع رویی)، رسوب حاصله را از نظر وجود اندام‌های قارچی مورد بررسی قرار می‌دهیم.

۶- استفاده از محیط کشت Agar Plate Test

به منظور مشاهده و تشخیص اسکروت، پیکنید، آسروول، اسپورودکیوم و شناسایی دقیق قارچ از این روش استفاده می‌شود، زیرا اندام‌های فوق‌الذکر به ندرت یا خیلی کم بر روی بلاتر تشکیل می‌شود. برای این منظور ابتدا در محیط کشت‌هایی نظیر سیب زمینی دکستروز آگار (PDA)، مالت دکستروز آگار یا یک محیط اختصاصی کشت می‌دهند. برای این منظور بذور را پس از ضدعفونی در محلول وایتکس تجارتي ۱۰ درصد، در شرایط استریل بر روی محیط کشت قرار داده و سپس تشتک‌ها را به مدت یک هفته یا کمتر در دمای ۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شوند. پس از این مدت با کمک میکروسکوپ و استفاده از بزرگنمایی پایین تشتک‌ها از نظر وجود ریشه یا اسپور قارچی مورد ارزیابی قرار می‌گیرند. در موارد لزوم به منظور تحریک اسپوردهی قارچ میتوان در ۲-۳ روز آخر نگهداری تشتک‌ها از نور NUV استفاده کرد. در برخی موارد نیز می‌توان بذور را بدون ضدعفونی بر روی محیط کشت داد. همچنین می‌توان با افزودن موادی نظیر آنتی‌بیوتیک‌ها، قارچ‌کش‌ها، اسید لاکتیک یا مواد دیگر محیط کشت را به محیط نیمه اختصاصی یا اختصاصی تبدیل نمود. از این روش برای ردیابی *Ascochyta pisi* در نخود، *Botrytis cinerea* در کتان، *Septoria nodorum* در گندم و *Botrytis allii* استفاده می‌گردد.

۷- آزمون Growing on Test

این روش برای جداسازی قارچ‌ها، باکتری‌ها و نماتدها کاربرد دارد. برای این کار ابتدا بذور را در گلدان کاشته و در شرایط مناسب جهت رشد پاتوژن قرار می‌دهیم تا پس از ظهور علائم در برگ، ریشه و یا ساقه میزبان، آنها را مورد ارزیابی قرار دهیم. روش مذکور به دلیل نیازمند بودن به مدت زمان طولانی جهت بررسی سلامت یا آلودگی میزبان‌ها، کارایی چندانی ندارد.

روش های شناسایی قارچ ها

۱- روش مورفولوژیکی

در این روش قارچ ها پس از رشد بر روی محیط کشت عمومی یا اختصاصی، با استفاده از کلیدهای معتبر (نظیر کلید قارچ های ناقص ترجمه واهه میناسیان و عزیزالله علیزاده، کلید شناسایی آسکومیست ها ترجمه ماهرخ فلاحتی رستگار) و به کمک اندام های تولید شده نظیر اسپور جنسی یا غیر جنسی، آسک، کنیدیوفور و ... شناسایی می شوند.

۲- روش سرولوژیکی

از این روش برای شناسایی قارچ هایی که بر روی محیط کشت رشد نمی کنند (پارازیت اجباری) و همچنین سایر قارچ ها استفاده می گردد. اساس کار در روش سرولوژیک بر پایه واکنش بین آنتی بادی و آنتی ژن استوار است. در این خصوص برخی از شرکتها برای تعدادی از قارچ ها نظیر قارچ قرنطینه ای جرب پودری سیب زمینی *Spongospora subterranea f.sp. subterranea* آنتی بادی به صورت تجاری تولید نموده اند که با مراجعه به کاتالوگ آن شرکت می توان اقدام به خرید آنها نمود.

روش ملکولی

در این روش از پرایمرهای عمومی یا اختصاصی که در منابع ذکر شده است، برای شناسایی قارچها استفاده می شود. واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR)، عمومی ترین روش ملکولی است که در شناسایی عوامل بیماریزای گیاهی نظیر قارچ ها مورد استفاده قرار می گیرد.