دانش گیاهپزشکی ایران
دورهٔ ۴۶، شمارهٔ ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۴ (ص ۶۷-۵۹)

جداسازی و بیماری‌زایی قارچ‌های مرتبط با پوسیدگی ریشه و طوقهٔ درختان گردو در شهرستان کرمانشاه

جهانشیر امینی[1*]، زینب عزیزی[2] و مهیار شیخ‌الاسلامی[3]
۱ و ۲. دانشیار و دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشگاه کردستان
۳. استادیار، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی کرمانشاه
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱/۲۵ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۴/۱۱)

چکیده

طی بازدیدهایی که از باغ‌های گردو در شهرستان کرمانشاه به عمل آمد، از ریشه و طوقه و خاک همراه ریشه و طوقهٔ درختان گردو که علائم زوال، پوسیدگی طوقه و ریشهٔ مشکوک به آلودگی *Pythium* و *Phytophthora* داشتند نمونه‌هایی جمع‌آوری شد. نمونه‌ها در آزمایشگاه روی محیط‌های کشت عمومی و نیمه‌انتخابی کشت شد. بر اساس خصوصیات مرفولوژیک، اندام‌های جنسی و غیرجنسی و میزان رشد کلنی قارچ در دماهای مختلف و تطابق با منابع معتبر، سیزده جدایه متعلق به سه گونهٔ *Phytophthora cactorum* و *P. citricola* و گونهٔ *Pythium sp.* شناسایی و تشخیص داده شد. خصوصیات جدایه پیتیوم با هیچ یک از گونه‌های شناخته‌شدهٔ *Pythium* در منابع معتبر مطابقت نداشت. دو جدایهٔ *Pythium* sp. (1) و *Pythium* sp. (2) به‌ترتیب از بافت ریشهٔ آلوده درخت گردو و خاک‌آلوده جداسازی گردید. آزمون بیماری‌زایی جدایهٔ پیتیوم به همراه دو گونهٔ *Phytophthora* بر روی شاخه‌های بریدهٔ گردو در شرایط آزمایشگاه و همچنین دانهال‌های گردو در گلخانه انجام گرفت. بر اساس نتایج آزمایشگاهی گونهٔ *Phytophthora cactorum* بیشترین میزان توسعهٔ بیماری را روی شاخه‌های بریدهٔ گردو به خود اختصاص داد و با گونهٔ *Pythium* sp.(1) در یک گروه آماری قرار گرفت. گونهٔ *Phytophthora citricola* و *Pythium* sp.(2) در گروه بعدی آماری قرار گرفتند. در آزمایش گلخانه‌ای گونهٔ *P. citricola* و *P. cactorum* به‌ترتیب بعد از هشت و دوازده روز منجر به مرگ کامل دانهال‌های گردو شدند. جدایه‌های *Pythium* sp. بعد از گذشت چهارده روز باعث خشکیدگی ساقه و برگ‌ها و مرگ دانهال‌ها شدند.

واژه‌های کلیدی: بیماری‌زایی، پوسیدگی طوقه و ریشه، گردو، *Phytophthora*، *Pythium*.

مقدمه

گردو (*Juglans regia* L.) از تیرهٔ *Juglandaceae* در پهنهٔ وسیعی از جهان گسترش دارد. گردو درختی یک‌پایه با گل‌های تک‌جنسی است که گرده‌افشانی آن با باد انجام می‌شود. رقم متداول گردو که در بیشتر کشورها کاشته می‌شود گردوی ایرانی است (Jalili, 2002). مرگ نهال‌ها و درختان بارور توسط قارچ‌های بیماری‌زای خاک‌زاد از مهم‌ترین مشکلات تولیدکنندگان این محصول است. از بین قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی، گونه‌های *Phytophthora* و *Pythium* که موجب پوسیدگی ریشه و طوقهٔ درختان

* تلفن: ۰۸۷۱۶۶۶۰۰۶۶
E-mail: jamini@uok.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

گردو در دنیا و در ایران می‌شوند اهمیت ویژه‌ای دارند. علائم بیماری به‌صورت کاهش رشد و پیدایش علائم پژمردگی و ترشح یک شیرهٔ سیاه‌رنگ در قسمت طوقه تا حدود یک متر بالاتر از سطح خاک است. علائم بیماری در درختان جوان به‌صورت سبزخشکی ظاهر می‌شود، اما در درختان مسن‌تر علائمی نظیر ضعف و زوال تدریجی، خشکیدگی سرشاخه‌ها و نهایتاً مرگ درخت مشاهده می‌شود (Banihashemi, 1991). بیماری‌های ناشی از این عوامل در خاک‌هایی با بافت سنگین و فاقد زهکش، قسمت‌های گود مزرعه و در مزارعی که به‌صورت مکرر تحت آبیاری غرقابی قرار گرفته‌اند، یا سالیان متوالی زیر کشت آبی بوده‌اند عمومیت بیشتری دارد (Erwin, 1996). گونه‌های *P. Cactorum*، *P. citricola*، *P. cinnamomi*، *P. citrophthora* و یک گونهٔ ناشناس *Phytophthora* sp. در کالیفرنیا به عنوان عوامل پوسیدگی طوقه و ریشهٔ گردو در آمریکا معرفی شده‌اند (Green & Pratt, 1970; Mircetich & Matheron, 1983). در آزمایش دیگری در آمریکا گونهٔ *P. citricola* به عنوان عامل پوسیدگی ریشه و شانکر تنه روی گردو شناخته شد؛ به‌طوری که در آزمون بیماری‌زایی روی نهال، بعد از گذشت ۳۶ ساعت موجب مرگ کامل گیاه شد (Beckerman & Ruhi, 2007). در ایران *Phytophthora cactorum* به عنوان یکی از عوامل پوسیدگی طوقه و ریشهٔ گردو در مناطق مختلف کشور گزارش شده است (Abusaedi *et al*., 1998; Baktayari & Ershad, 2010; Banihashemi, 1995; Kumarciy *et al*., 1998). گونهٔ *P.citrophthora* در استان‌های فارس، کرمان و سمنان (Rafati *et al*., 2010; Ghaderi & Banihashemi, 2007) و *P.citricola* در فارس و کهگیلویه و بویراحمد (Ghaderi & Banihashemi, 2006) به عنوان عوامل پوسیدگی طوقه و ریشهٔ گردو معرفی شده‌اند. نتایج بیماری‌زایی پنج گونه از فیتوفتورا روی گردو نشان داد که گونهٔ *P.cinnamomi* باعث پوسیدگی شدید ریشه و مرگ گیاهچه شد، اما دربارهٔ گونه‌های *P. cactorum*، *P. citricola*، *P. cambivora* و *P. cryptogea* دو ماه پس از مایه‌زنی نیز علائم بیماری روی طوقهٔ درخت مشاهده نشد. این نتایج نشان داد که این گونه‌ها همچون عوامل مستعدکنندهٔ بیماری عمل می‌کنند و با تأثیر بر سیستم ریشه و افزایش آسیب‌پذیری میزبان به استرس‌های محیطی، سبب تضعیف درختان گردو می‌شوند (Vettraino & Belisario, 2003). تعدادی از گونه‌های *Pythium* از جمله مخرب‌ترین بیمارگرهای گیاهی‌اند (Agrios, 2005). ظرفیت بیماری‌زایی گونه‌های *Pythium* بستگی به تولید آنزیم‌های پکتولیتیک و سلولیتیک دارد و فیتوآلکسین و ایندولیک اسید فاکتورهای رشدی‌اند که در تعدادی از گونه‌های *Pythium* جدا شده‌اند (Blok, 1973). بیشتر گونه‌های *Pythium* قادر به پارازیته کردن بذر و نهال‌اند و در خانواده‌های گیاهی زیادی باعث بیماری بوته‌میری می‌شوند (Hendrix & Powell, 1968). نقش این گونه‌ها به عنوان بیمارگرهای گیاهی به پتانسیل اینوکولوم، دمای خاک، محتوای آب خاک، pH خاک، رقابت با دیگر میکروارگانیسم‌ها و محتوای کاتیونی بستگی دارد (Hendrix & Powell, 1968; Vettraino & Belisario, 2003). بررسی‌ها در استان فارس نشان داد که نهال‌های دو ماههٔ گردو نسبت به سه گونهٔ *P.aphanidermatum*، *P. deliense* و *P. vexans* حساسیت داشتند، اما ریسه‌های *P. aphanidermatum* قدرت تهاجمی بیشتری داشتند (Ghaderi & Banihashemi, 2010). تحقیقات نشان داد که گونه‌های *P. sylvaticum*، *P. ultimum*، *P. intermedium* بیمارگرهای قوی روی ریشهٔ اولیهٔ نهال سیب محسوب می‌شوند (Mulder, 2001). همچنین در آزمایشی که به بررسی سلامت آب‌های مراکش در آفریقای شمالی اختصاص داشت، برای اولین بار گونه‌هایی از پیتیوم شامل *P. catenulatum*، *P. torulosum* و *P.* group-F را که روی درختان میوه بیماری‌زا بودند، جداسازی و شناسایی کردند (El Androusse *et al*., 2007). اولین بار گونهٔ *P. vexans* از درختان گردو در آمریکا جداسازی شد (Hendrix & Powell, 1968). سپس گونه‌های *P. irregulare*، *P. oedochilum*، *P. vexans*، *P. torulosum* و *P. paroecandrum* از گردوهایی که دارای علائم پوسیدگی ریشه و طوقه بودند جدا و اثبات بیماری‌زایی شدند (Green & pratt, 1970).

هدف از این تحقیق بررسی پوسیدگی ریشه و طوقهٔ گیاهان گردو و تعیین عوامل ایجادکنندهٔ این بیماری و

Archive of SID

www.SID.ir

بیماری‌زایی عوامل جداشده روی گردو در شرایط آزمایشگاه و گلخانه است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

طی بازدیدهایی که برای بررسی پوسیدگی طوقه و ریشهٔ درختان گردو در سال‌های ۹۰-۱۳۸۹ از باغ‌های مناطق مختلف استان کرمانشاه به عمل آمد، از درختان در حال زوال و دچار پوسیدگی طوقه و ریشه در روستای ورمنجه در اطراف شهرستان کرمانشاه نمونه‌برداری شد. از قسمت‌های طوقه، ریشه و خاک همراه با ریشهٔ این درختان نمونه‌برداری شد. نمونه‌های جمع‌آوری‌شده ضمن ثبت مشخصات در داخل یخدان به آزمایشگاه انتقال داده شدند.

جداسازی و خالص‌سازی جدایه‌های قارچی

به منظور جداسازی بیمارگر از بافت‌های گیاهی، نسوج آلوده در زیر جریان آب شست‌وشو داده شده و به قطعات ۳-۲ میلی‌متری تقسیم شدند. قطعات بافت پس از ضدعفونی سطحی با استفاده از اتانول ۷۰ درصد، روی محیط کشت عمومی آرد ذرت- آگار (CMA) و همچنین CMA به همراه آمپی‌سیلین ۵۰۰ (۳۲۰mg/L)، ریفامپین ۳۰۰ (۳۰mg/L)، نیستاتین ۱۰۰ (۳۰mg/L) و بنومیل ۵۰ درصد (۱۰mg/L) کشت داده شدند و به‌مدت ۵-۴ روز در تاریکی در دمای ۲۵°C قرار گرفتند.

برای جداسازی قارچ از خاک پس از مخلوط کردن کامل نمونه‌های خاک حدود ۰/۵کیلوگرم از آن به ظرفی مناسب منتقل و سوسپانسونی از خاک و آب مقطر سترون تهیه گردید، به‌گونه‌ای که آب حدود یک سانتی‌متر سطح خاک درون ظرف را پوشاند. در هر ظرف سوسپانسیون خاک، قطعات کوچک برگ تازهٔ مرکبات پس از ضدعفونی سطحی با اتانل هفتاد درصد، به عنوان طعمه قرار داده شد و پس از حدود ۲۴ ساعت قطعات برگ از سوسپانسیون خاک خارج و پس از شست‌وشوی سطحی، روی محیط کشت نیمه‌انتخابی قرار داده شدند (Ershad, 1992). به منظور خالص‌سازی جدایه‌ها از محیط کشت آب آگار ۲٪ و روش نوک ریسه استفاده گردید و برای نگهداری جدایه‌ها از روش ارشاد بهره گرفته شد (Ershad, 1992).

شناسایی جدایه‌ها

شناسایی جدایه‌های فیتوفتورا بر اساس ویژگی‌های مرفولوژیک اندام‌های رویشی و زایشی و خصوصیات فیزیولوژیک نظیر رشد در دماهای مختلف صورت گرفت (Ershad, 1992). به منظور تولید اسپورانژیوم، جدایه‌های قارچی فیتوفتورا، ابتدا روی محیط کشت CMA کشت داده شدند و سپس تعدادی بذر سترون‌شدهٔ شاهدانه در حاشیهٔ پرگنه در حال رشد قرار داده شد. بذرهای مذکور پس از ۲۴ ساعت به آب مقطر سترون منتقل و زیر نور لامپ مهتابی در دمای اتاق قرار داده شدند. برای بررسی میکروسکوپی اسپورانژیوم‌ها، اسلایدهایی تهیه شد و ۵۰ اسپورانژیوم بررسی و اندازه‌گیری گردید (Stamps *et al.*, 1990; Waterhouse, 1963). برای تولید اعضای جنسی از محیط کشت آرد لوبیا آگار (Bean Agar) استفاده گردید (Ershad, 1992). بدین منظور، از حاشیهٔ پرگنهٔ فعال هر جدایه روی محیط کشت CMA، قرص‌های میسلیومی برداشته شد و به ظرف پتری حاوی محیط کشت آرد لوبیا آگار منتقل گردید. سپس برای تولید اسپور، ظروف پتری به‌مدت یک هفته به مکان تاریک انتقال داده شدند. به منظور تعیین دماهای ویژهٔ جدایه‌ها، ابتدا قرص‌هایی ۶ میلی‌متری از حاشیهٔ پرگنه‌های فعال به‌صورت وارونه در مرکز ظروف پتری حاوی محیط کشت CMA قرار داده شدند و پس از نگهداری به مدت ۱۲ تا ۲۴ ساعت در دمای آزمایشگاه و مشخص کردن رشد، به‌مدت سه روز در طیف دمایی ۴۰°C- ۵ به فاصلهٔ ۵°C و برای هر دما سه تکرار انجام شد و پس از این مدت متوسط رشد قطری قارچ برای هر جدایه اندازه‌گیری شد (Dick, 1990; Uzuhashi *et al.*, 2010; Van der Plaata-niterink, 1981).

برای شناسایی جدایه‌های قارچ پیتیوم جدایه‌های آن روی محیط غذایی CMA کشت و مشخصات پرگنهٔ آن بر اساس منابع معتبر بررسی گردید (Dick, 1990; Van der Plaata-niterink, 1981). برای تعیین دماهای ویژه برای رشد بهتر جدایه‌های پیتیوم به روش بالا از محیط کشت سیب‌زمینی- هویج - آگار (PCA) استفاده شد. برای این کار ۲۰ گرم سیب‌زمینی و ۲۰ گرم هویج به قطعات کوچک خرد شد و در یک لیتر آب به‌مدت

Archive of SID

www.SID.ir

یک ساعت پخته شد. عصاره‌گیری با عبور دادن آن از یک پارچه تمیز انجام گرفت. بعد از اضافه کردن آگار به آن، به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱°C استریل گردید. سپس جدایه‌های قارچ پیتیوم روی آن در دمای مختلف کشت گردید.

آزمون بیماری‌زایی

آزمون بیماری‌زایی به دو روش مایه‌زنی شاخه‌های بریده (Excised shoots) و ریشهٔ دانهال‌های دوماههٔ گردو انجام گرفت (Ren *et al*., 2011). در این آزمون از جدایه‌هایی از گونه‌های *P. cactorum* و *P. citricola* به همراه دو جدایه از قارچ *Pythium* که از خاک باغ درختان میوهٔ دچار بیماری و ریشهٔ پوسیدهٔ درختان گردو جداسازی شده بودند، استفاده گردید.

الف) آزمون بیماری‌زایی روی شاخه‌های بریده

در این روش از شاخه‌های یکسالهٔ درختان گردو به طول ۲۵ تا ۳۰ سانتی‌متر و قطر حدود دو سانتی‌متر استفاده گردید. بعد از حذف شاخه‌های فرعی و برگ‌ها، سطح شاخه‌ها با استفاده از اتانول ۹۶ درصد ضدعفونی شد. سپس شکاف‌هایی به‌صورت اریب، با طول تقریبی ۳ سانتی‌متر توسط چاقوی سترون در پوست شاخه‌ها ایجاد شد و قرصی از حاشیهٔ پرگنهٔ در حال رشد قارچ به قطر ۸ میلی‌متر در زیر پوست قرار داده شد. پس از برگرداندن پوست، روی آن توسط پارافیلم پوشانده شد. برای جلوگیری از تبخیر، انتهای شاخه‌ها با استفاده از پارافیلم پوشانده شد. برای شاهد از قطعات محیط کشت بدون قارچ استفاده شد. این آزمون در چهار تکرار انجام گرفت و شاخه‌های مایه‌زنی‌شده هر یک به‌صورت جداگانه در یک لولهٔ آزمایش حاوی آب مقطر سترون و در دمای ۲۵ ±۱°C در داخل انکوباتور قرار داده شدند (Ren *et al*., 2011; Boughalleb *et al*., 2006). پس از ۲۱ روز شاخه‌ها از نظر پیدایش علائم بیماری در مقایسه با شاهد بررسی شدند و میزان پیشروی قارچ روی ساقه و ریشه (طول بافت آلوده یا لکه‌های ایجادشده روی هر ساقه) در هر نمونه اندازه‌گیری شد. برای رعایت اصول کخ و جداسازی مجدد قارچ بیمارگر از بافت‌های گیاهی قطعاتی از بافت که دارای علائم بیماری بودند جداسازی و بعد از ضدعفونی سطحی روی محیط کشت نیمه‌انتخابی کشت داده شدند. اندازهٔ لکه‌های ایجادشده روی شاخه‌های آلوده برای هر تیمار اندازه‌گیری گردید و داده‌های به‌دست‌آمده در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 تجزیه و تحلیل شدند. مقایسهٔ میانگین‌ها هم با آزمون دانکن انجام گرفت.

ب) آزمون بیماری‌زایی روی دانهال‌های گردو در شرایط گلخانه

در آزمون گلخانه‌ای از دانهال‌های دوماههٔ گردو برای مایه‌زنی استفاده گردید. بذور گردو پس از شست‌وشو با آب معمولی ابتدا توسط محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی شدند و پس از شست‌وشو و خشک کردن به مدت دو هفته در داخل آب قرار داده شد. بعد از این مدت بذرها خشک شد و داخل کیسهٔ پلاستیکی گذاشته شد و به مدت ۳۰ روز داخل یخچال در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس قرار داده شد. پس از خارج کردن از یخچال، بذرها در دمای حدود ۲۵°C در داخل انکوباتور قرار داده شد تا آمادهٔ کاشت شدند. این بذور در داخل گلدان‌هایی به قطر ۱۰ و ارتفاع ۱۲ سانتی‌متر حاوی مخلوطی از خاک زراعی و ماسه به نسبت مساوی (۱:۱) کاشته شدند و دانهال‌های دوماهه با استفاده از مایهٔ قارچ تولیدشده بر روی قطعات برگ قیاق مایه‌زنی شدند. برای این کار، برگ قیاق به قطعات ۱ سانتی‌متری بریده شد و در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر در دمای ۱۲۱ °C به‌مدت ۲۰ دقیقه دو بار سترون شد. از هر کدام از جدایه‌های سه‌روزهٔ قارچ بیمارگر که روی محیط غذایی CMA کشت شده بودند، پنج قطعه با قطر نیم سانتی‌متر برداشته و در شرایط سترون زیر هود به داخل ارلن حاوی برگ قیاق سترون منتقل گردید و ارلن به‌مدت یک هفته در دمای ۲۷°C نگهداری شد. سپس خاک اطراف طوقهٔ نهال‌های جوان کنار زده شد و دو گرم از مایهٔ تلقیح قارچ بیمارگر (برای هر جدایه) اضافه شد و خاک دوباره به جای اول برگردانده شد. گلدان‌ها سپس به‌مدت ۴۸ ساعت غرقاب شدند (هر سه تکرار در یک سطل) و پس از این مرحله در شرایط معمولی نگهداری شدند. در تیمار شاهد از

Archive of SID

www.SID.ir

برگ‌های قیاق سترون بدون مایهٔ قارچ استفاده شد. گلدان‌ها در دمای ۳۵°C-۱۸، شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و رطوبت نسبی ۷۰ درصد در گلخانه نگهداری شدند. بعد از پیدایش علایم بیماری، نهال‌ها به‌دقت از خاک خارج شدند و بعد از شست‌وشو زیر شیر آب، میزان پیشروی قارچ روی طوقه و ریشه اندازه‌گیری شد. سرانجام پس از ضدعفونی ریشه و طوقهٔ نهال‌های آلوده با اتانول ۷۰ درصد، بافت‌های بیمار روی محیط کشت نیمه‌انتخابی برای جداسازی مجدد قارچ بیمارگر کشت داده شدند.

نتایج و بحث

مشخصات جدایه‌های تحت بررسی

با نمونه‌برداری‌هایی که از باغ‌های درختان گردو در شهرستان کرمانشاه صورت گرفت، هشت جدایهٔ Phytophthora به‌دست آمد که بر اساس ویژگی‌های مرفولوژیک و دمای رشد، هفت جدایه متعلق به *P. cactorum* و یک جدایه مربوط به *P. citricola* بود. مشخصات هر دو گونهٔ شناسایی‌شده با خصوصیات و مشخصاتی که Waterhouse (1963) و Stamps *et al.* (1990) برای این دو گونه ارائه داده بودند مطابقت داشت.

همچنین در این بررسی، پنج جدایهٔ قارچ *Pythium* sp. از طوقه و ریشه و همچنین خاک اطراف درختان بیمار از باغ گردو واقع در روستای ورمنجه، منطقهٔ میان‌دربند استان کرمانشاه به‌دست آمد. پرگنهٔ قارچ روی محیط کشت CMA کمی کرک‌دار و از پشت تشتک پتری منظره گل‌کلمی دارد (شکل a-۱). اما روی محیط کشت CMA تولید ریسه‌های تخت و بی‌شکل می‌کند. میزان متوسط رشد روزانهٔ قارچ روی محیط کشت PCA در دمای ۲۵±۱°C درجهٔ سانتی‌گراد ۱/۳-۱/۱ سانتی‌متر بود. عرض هیف‌های اصلی ۸-۶ میکرومتر بود. اسپورانژیوم‌ها کروی، لیمویی و تخم‌مرغی‌شکل اند و دارای لولهٔ تخلیهٔ طویل‌اند که اندازهٔ آنها حدود ۳۲-۲۵ میکرومتر است و پرولیفراسیون دارند (شکل b,c–۱). این گونه دارای تورم‌های هیفی زیادی است که اندازهٔ آنها ۳۶-۲۲ میکرومتر است. اعضای جنسی در این نمونه‌ها مشاهده نشد. حرارت‌های ویژه روی محیط کشت PCA، کمینه ۵°C، بیشینه ۳۰°C و بهینه ۲۵°C تعیین شد. مقایسهٔ ویژگی‌های جدایه‌های *Pythium* در این تحقیق با گونه‌های توصیف‌شده در کلیدهای شناسایی دیگر پژوهشگران و همچنین مشخصات گونه‌هایی که در مقالات به‌صورت پراکنده توصیف شده‌اند با مشخصات هیچ‌یک از گونه‌های توصیف‌شده توسط دیک و واندرپلات تطابق کامل نداشت (Dick, 1990; Van der Plaats-niterink, 1981).

نتایج اثبات بیماری‌زایی

در این بررسی دو جدایه از *Pythium* sp. از بافت و خاک آلودهٔ درختان گردو و دو جدایه از گونه‌های *P. cactorum* و *P. citricola* جداشده از خاک باغ درختان میوه از نظر میزان توسعهٔ بیماری روی شاخه‌های بریده آزمایش شد و علائم بیماری در مقایسه با شاهد کاملاً معنادار بود (شکل ۳). دربارهٔ میزان توسعهٔ بیماری بین تیمارهای مختلف در سطح آماری یک درصد اختلاف معنادار بود. همچنین آزمون مقایسه‌ای دانکن قارچ‌ها را از این نظر در گروه‌های مختلف قرار داد (شکل ۲). بر این اساس قارچ *P. cactorum* بیشترین میزان توسعهٔ بیماری را به خود اختصاص داد. تیمار *Pythium* sp. (1) جداشده از بافت بیمار در جایگاه دوم قرار گرفت، اما اختلاف آن با تیمار *P. cactorum* از نظر آماری معنادار نبود. تیمارهای دیگر شامل *Pythium* sp. (2) جداشده از خاک اطراف طوقه و ریشهٔ درختان بیمار و *P. citricola* در گروه بعدی آماری قرار گرفتند، اما اختلاف آنها از نظر میزان توسعهٔ بیماری با شاهد در سطح آماری یک درصد معنادار بود (شکل ۲). در این تحقیق گونهٔ *P. cactorum* بیشترین بیماری‌زایی را روی شاخه‌های بریدهٔ گردو ایجاد کرد. این نتایج با نتایج محققان دیگر در ایران و دیگر کشورها تا حدودی متفاوت است (Mircetich & Matheron, 1983; Banihashemi, 2007). بر اساس تحقیق قادری و بنی‌هاشمی ریسه‌های *P. citricola* با سرعت بیشتری نسبت به گونه‌های *P. citrophthora* و *P. cactorum* قادر به پیشروی در شاخه‌های بریده بودند (Ghaderi & Banihashemi, 2007). همچنین مرستیچ و ماترون گونه‌های *P. cinnamomi* و *P. citricola* را به عنوان

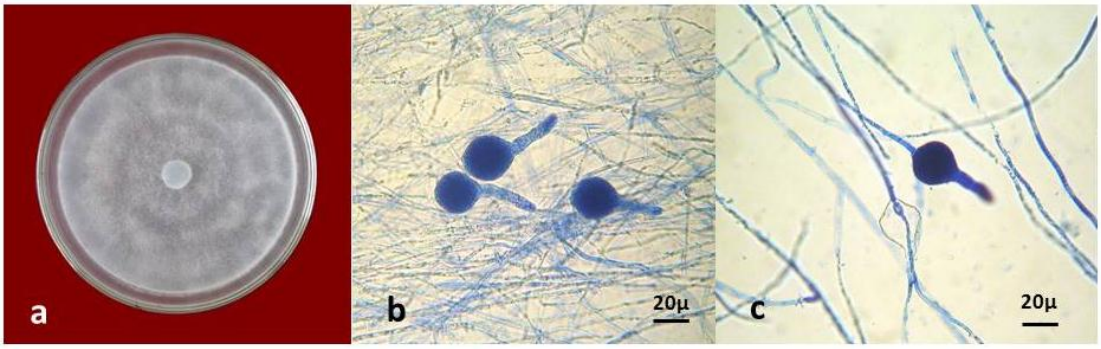
Archive of SID

www.SID.ir

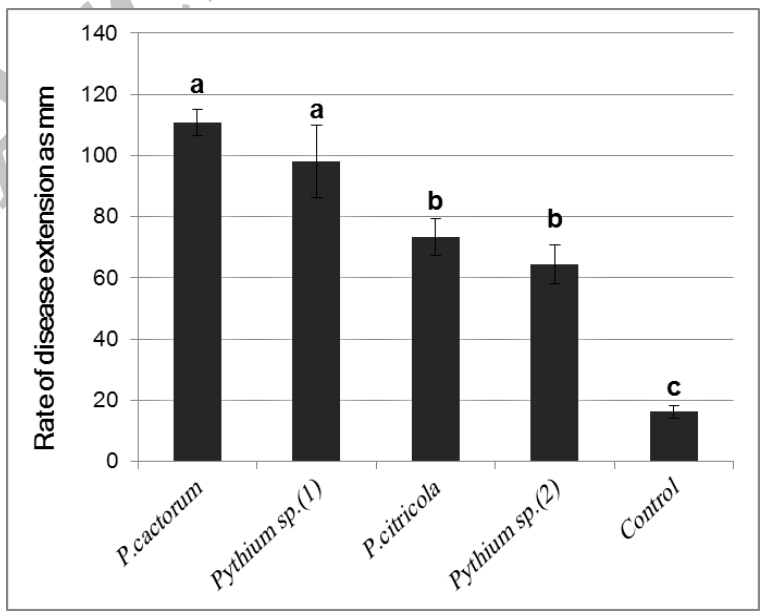
بیمارگرهای مخرب روی شاخه‌های بریدهٔ گردو معرفی کردند. بر اساس تحقیق آنان گونه‌های *P. cactorum* و *P. citrophthora* از لحاظ ایجاد بیماری‌زایی در یک سطح معرفی شدند (Mircetich & Matheron, 1983).

نتایج، بیماری‌زایی جدایه‌های سه گونهٔ قارچی روی دانهال‌های دو ماههٔ گردو در شرایط گلخانه نشان داد که جدایه‌های *P. citricola* بعد از گذشت هشت روز سبب سبزخشکی و مرگ کامل دانهال‌ها شدند. دربارهٔ گونه‌های *P. cactorum* بعد از گذشت دوازده روز و *Pythium* sp. بعد از گذشت چهارده روز علایم پژمردگی و مرگ روی دانهال‌ها ظاهر شد (شکل‌های ۴ و ۵). باغی که در این تحقیق تحت بررسی قرار گرفت و از آن نمونه‌ها جمع‌آوری شد، کاملاً از آب ساکن اشباع بود و جدایه‌های *Pythium* sp. از درختانی به‌دست آمدند که به‌طور دائم اشباع از آب بودند. همچنین سطح آب زیرزمینی در منطقهٔ تحت نظر بالا بود. لذا با توجه به طبیعت جنس *Pythium* وقوع بیماری در چنین شرایطی دور از انتظار نیست. قارچ‌های جنس *Pythium* در محصولات مختلف معمولاً عامل مرگ گیاهان جوان و بوته‌میری در گیاهان یک‌ساله می‌شوند (Al-Sadi *et al*., 2007; Drechsler, 1939; El Androusse *et al*., 2007). لذا ایجاد بیماری توسط این جنس روی درختان مسن گردو دستاورد جدیدی به شمار می‌رود.

با توجه به نتایج آزمایش‌های گلخانه‌ای، گونهٔ *P. citricola* بیشترین تأثیر را در مرگ دانهال‌ها داشت که این نتایج با نتایج محققان دیگر در ایران و جهان هماهنگی دارد (Ghaderi & Banihashemi, 2007 ; Mircetich & Matheron, 1983).

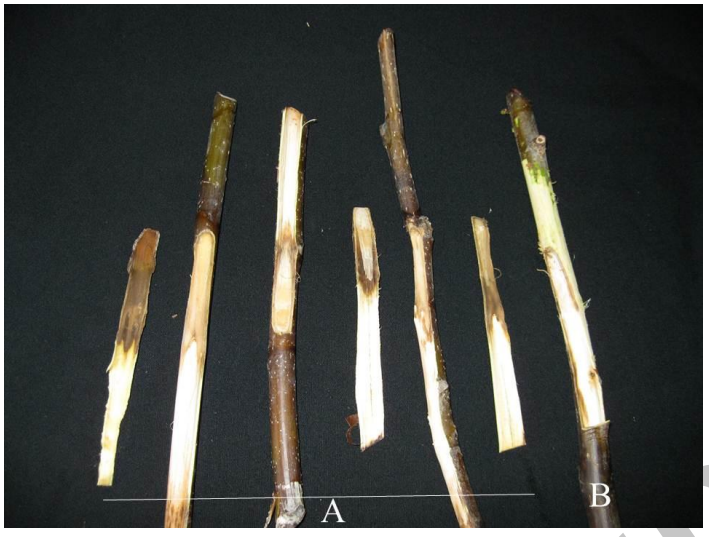


شکل ۱. کلنی .Pythium sp روی محیط CMA (a). اسپورانژیوم‌ها با لولهٔ تخلیه طویل (b). پرولیفراسیون(c).



شکل ۲. نتیجهٔ تأثیر بیماری‌زایی قارچ‌های مختلف روی شاخه‌های بریدهٔ گردو

www.SID.ir



شکل ۳. علائم بیماری حاصل از مایه‌زنی .Pythium sp روی شاخه‌های بریدهٔ گردو (A) در مقایسه با شاهد (B)

شکل ۴. علائم بیماری توسط قارچ Phytophthora citricola روی دانهال‌های گردو (A) در مقایسه با شاهد (B) بعد از گذشت هشت روز

شکل ۵. علائم بیماری توسط .Pythium sp روی دانهال‌های گردو (A) در مقایسه با شاهد (B) بعد از گذشت دو هفته

نتیجه‌گیری کلی

نتایج کلی نشان داد که دو گونهٔ *P. cactorum* و *P. citricola* و گونهٔ .*Pythium* sp عامل پوسیدگی ریشه و طوقهٔ درختان گردو در شهرستان کرمانشاه محسوب می‌شوند. مشخصات جدایه‌های پیتیوم با مشخصات منابع معتبر مطابقت نداشت و احتمالاً یک گونهٔ جدید از این قارچ باشد و لازم است مطالعات بیشتر و دقیق‌تری روی آن انجام گیرد. اگرچه برخی خصوصیات این جدایه‌ها نظیر

www.SID.ir

لولهٔ تخلیهٔ طویل در اسپورانژیوم و وجود پرولیفراسیون با گونهٔ *Pythium oedochilum* مشابهت دارد، اما خصوصیات دیگر نظیر تولید اووسپور در کشت خالص که در گونهٔ *P. oedochilum* به سهولت تشکیل می‌شود و نحوهٔ اتصال آنتریدیوم و اووگونیوم با گونهٔ ذکرشده متفاوت است. در طبقه‌بندی جدید گونه‌هایی از (*Pythium senso lato*) که دارای اسپورانژیوم از نوع تخم‌مرغی و گلابی‌شکل اند در جنس *Ovatisporangium* قرار می‌گیرند و به این ترتیب جدایه‌های فوق نیز در این جنس جای می‌گیرند (Uzuhashi & Kakishima, 2010). با توجه به ابهامات و دشواری‌هایی که برای تشخیص این گونه و گونه‌های دیگر *Pythium* وجود دارد، لذا انجام آزمایش‌های مولکولی و تکمیلی برای شناسایی دقیق این گونه ضرورت دارد.

سپاسگزاری

هزینه و امکانات مورد استفاده در این طرح از اعتبارات پژوهشی دانشکدهٔ کشاورزی و معاونت پژوهشی دانشگاه کردستان تأمین شده است. بدین وسیله نگارندگان مراتب قدردانی خود را ابراز می‌دارند.

REFERENCES

1. Abusaedi, D., Banihashemi, Z. & Alavi, H. (1998). Foot and root rot of Walnut in Kerman Province. *13th Iranian Plant Protection Congress*, Karaj, P, 214.
2. Agrios, G.N. (2005). *Plant Pathology*. New York, San Francisco, London: Academic Press. 922 pp.
3. Al-Sa'di, A. M., Drenth, A., Deadman, M. L., Decock, A.W.A.M. & Aitken, E.A.B. (2007). Molecular characterization and pathogenicity of Pythium species associated with damping-off in greenhouse cucumber (*Cucumis sativus*) in Oman. *Plant Pathology*, 56(1), 140-149.
4. Baktayari, Ershad, J. (2010). Survey of pathogenicity of Fungi the causal of crown and root rot of walnut in Hamadan. *19th Iranian Plant Protection Congress*, Hamadan, Iran, p, 47.
5. Banihashemi, Z. (1991). Root and crown rot of walnut in Fars province. *10th Iranian Plant Protection Congress*, Kerman, Iran, p, 114.
6. Banihasemi, Z. (1995). Relative of *P. cactorum* on declining walnut trees in Fars province. *12th Iranian Plant Protection Congress*, Karaj, Iran, p, 67.
7. Beckerman, J. & Ruhi, G. (2007). *Phytophthora citricola* caused stem canker in black walnut. *Plant Patholology*, 10, 420-428.
8. Blok, I. (1973). A growth regulating substance produced by *Pythium sylvaticum*. *The Netherlands J. of Plant Pathology*. 79, 266-267.
9. Boughalleb, N., Moulahi, A. & Mahjoub, E. (2006). Variability in pathogenicity among Tunisian isolates of *Phytophthora cactorum* as measured by ability to cause crown rot on four apple trees. *Journal of Agronomy*, 41, 321-325.
10. Dick, M. W. (1990). *Key to Pythium. College of estate management*. White knights, Reading, 64pp.
11. Drechsler, C. (1939). Several species of *Pythium* causing blossom-end rot of watermelon. *Phytopathology*, 29, 391-422.
12. El Androusse, A., El Aissami, A., Rahouti, M., Lahlou, H., Ben Abdellah, S. & Seigle Murandi, F. (2007). First record of three species of *Pythium* from Moroccan Waters. *Acta Botanica Malacitana*. 32, 35-40.
13. Ershad, J. (1992). *Phytophthora species in Iran*. Agricultural research organization, Tehran, Iran, 217p.
14. Erwin, D. C. & Ribeiro, O. K. (1996). *Phytophthora Diseases Worldwide*, University of California, 562 pp.
15. Ghaderi, F. & Banihashemi, Z. (2006). Isolation of Phytophthora citricola from walnut tree in southern Iran and its prevalence and pathogenicity on walnut as compared to *P. citrophthora* and *P. cactorum*. *17th Iranian Plant Protection Congress*, Karaj, Iran, p, 317.
16. Ghaderi, F. & Banihashemi, Z. (2007). Distribution and relative importance of Phytophthora species isolated from declining walnut trees in Fars, Kerman, Kohgilue and Boyrahmad and Fars province and reaction of walnut genetypes to them. *Iranian journal of Plant Pathology*, 43(2), 163-183.
17. Ghaderi, F. & Banihashemi. (2010). Identification and pathogenicity species of pythium causal of root and crown rot in walnut in Fars province. *Applied Entomology and Phytopathology*, 6(2), 237-256.
18. Green, R. J. & Pratt, R. G. (1970). Root rot of black walnut seedlings caused by *Phytophthora citricola*. *Plant Disease*, 54, 583-585.
19. Hendrix, F. F. J. & Powell, W. M. (1968). Nematode and *Pythium* species associated with feeder root necrosis of pecan tree in Georgia. *Plant Disease*, 52, 334-335.

Archive of SID

www.SID.ir

20. Jalili marandi, R. (2002). *Agronomy*. Jahad Daneshgahi of west Azarbyajan. 289P.
21. Kumarciy, S., Zakie, Z. & Aminae, M. (1998). Root and crown rot of walnut tree Kerman province. *13th Plant Protection Congress*, Karaj, Iran, P, 236.
22. Mircetich, S.M. & Matheron, M.E. (1983). Phytophthora root and crown rot of walnut trees. *Phytopathology*, 73, 1481-1488.
23. Mulder, D. (2001). The Pathogenicity of several *Pythium* species to rootlets of apple seedlings. *Plant Pathology*, 178-181.
24. Rafati, N., Alaei, H., Mohammadi, H. & Massomi, H. (2010). Isolation and Identification of Phytophthora species from walnut trees in Sirjan. *19th Iranian Plant Protection Congress*, Tehran, Iran, p, 101.
25. Ren, J.H., Ye, J.R., Liu, H., Xu, X.L. & Wu, X.Q. (2011). Isolation and characterization of a new *Burkholderia Pyrrocinia* strain JK-SH007 as a potential biocontrol agent. *World J. Microbial. Biotecnol*, 27, 2203-2215.
26. Stamps D. J., Waterhouse, G.M., Newhook, F.J. & Hall, G.S. (1990). *Revised tabular key to the species of Phytiphthora*. Mycol. Pap. No. 62. C. A. B. International, Mycological Institute, 28 p.
27. Waterhouse, G.M. (1963). *Key to the Genus Phytophthora de Bary*. Commonw. Mycol. Inst., Mycol. Pap. 92., England.
28. Uzuhashi, S., Tojo, M. & Kakishima, M. (2010). Phylogeny of the genus *Pythium* and description of new genera. *Mycoscience*, 51, 337-365.
29. Van der Plaats-niterink, A. J. (1981). *Monograph of the Genus Pythium*. Centraalbureau voor chimmelcultures, Baarn, 241p.
30. Vettraino, A. & Belisario, A. (2003). Evaluation of root damage to English walnut caused by five phytophthora species. *Plant Pathology*, 491-495.

Archive of SID

www.SID.ir