مجله پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد شانزدهم، شماره دوم، ۱۳۸۸
www.gau.ac.ir/journals

نقش توکسین سراتواُلمین در بیماری‌زایی و بقای دو گونه قارچ *Ophiostoma ulmi* و *Ophiostoma novo-ulmi* (عاملین بیماری مرگ هلندی نارون)

***میرمعصوم عراقی[۱]، کامران رهنما[۲] و نسرین سلیمانی‌پور[۳]**

[۱]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد گروه پاتولوژی گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۲]دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۳]دانش‌آموخته کارشناسی گروه گیاهپزشکی، دانشگاه تبریز

تاریخ دریافت: ۸۶/۱۰/۱ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۷/۷/۱۶

چکیده

سراتواُلمین مهم‌ترین توکسین عامل قارچی بیماری مرگ هلندی نارون است و مقدار آن یکی از مهم‌ترین عوامل تفکیک دو گونه *Ophiostoma ulmi* و *Ophiostoma novo-ulmi* می‌باشد. با توجه به این‌که گونه *O. novo-ulmi* در مقایسه با گونه *O. ulmi* از شدت بیماری‌زایی بیشتری برخوردار است، در این تحقیق سعی شده است تا با اندازه‌گیری مقادیر سراتواُلمین جدایه‌های عامل بیماری و مقایسه با میزان بیماری‌زایی و توان جوانه‌زنی اسپور آن‌ها تحت شرایط خشکی، نقش توکسین مزبور در بیماری‌زایی عامل بیماری مورد بحث قرار گیرد. برای این منظور میزان توکسین سراتواُلمین جدایه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۴۰۰ نانومتر و به‌صورت شاخص تولید سراتواُلمین محاسبه شد. همچنین میزان جوانه‌زنی اسپورها در شرایط تنش رطوبتی ۵، ۱۰ و ۱۵ روزه محاسبه گردید. نتایج نشان داد که جدایه‌های گونه مهاجم *O. novo-ulmi* مقادیر بسیار بیشتری از این توکسین در مقایسه با جدایه‌های *O. ulmi* تولید می‌کنند، ولی رابطه مشخصی بین میزان برگ‌ریزی و پژمردگی نهال‌های ملج (*Ulmus glabra* Huds.) و تولید توکسین در جدایه‌های گونه *O. novo-ulmi* مشاهده نشد و این در حالی است که بین میزان جوانه‌زنی اسپورها

* مسئول مکاتبه: iraqi602@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

در شرایط تنش رطوبتی و تولید توکسین همبستگی کاملاً مثبت و معنی‌داری وجود داشت. نقش توکسین سراتواُلمین در بیماری‌زایی عاملین بیماری مرگ نارون پیچیده می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: مرگ نارون، سراتواُلمین، جوانه‌زنی اسپور، بیماری‌زایی، ملج، *Ophiostoma ulmi*، *O. novo-ulmi*

مقدمه

بیماری مرگ نارون مهم‌ترین بیماری درختان جنگلی در یک قرن گذشته بوده است. بر طبق آخرین رده‌بندی قارچ‌شناسی، عامل بیماری مرگ هلندی نارون قارچی است از شاخه Ascomycota و زیرشاخه Pezizomycotina که متعلق به رده Sordariomycetes، زیررده Sordariomycetidae، راسته Ophiostomatales و خانواده Ophiostomataceae می‌باشد (هیبت و همکاران، ٢٠٠٧؛ ژانگ و همکاران، ٢٠٠٧). بسیاری از محققان انتشار اسپورهای عامل بیماری به‌وسیله سوسک‌های پوست‌خوار خانواده Scolytidae و ترجیحاً گونه‌های مختلفی از دو جنس *Scolytus* و *Hylurgopinus* را به‌عنوان عامل اصلی شیوع همه‌گیری‌های وسیع جغرافیایی در نیم‌کره شمالی توسط گونه‌های مختلف عامل می‌دانند (وبر، ٢٠٠٤). بنابراین انتقال عامل بیماری توسط این سوسک‌ها و حفظ شدن قدرت جوانه‌زنی اسپورها در شرایط نامساعد محیطی نظیر خشکی، احتمالاً دو عامل اصلی در شدت همه‌گیری ایجاد شده در یک منطقه است. به‌عنوان مثال نتایج محققان نشان داده است که سوسک‌های کوچک‌تر مثل سوسک کوچک پوست‌خوار (*Scolytus multistriatus*) بیشتر و بهتر از سوسک‌های بزرگ‌تری چون سوسک بزرگ پوست‌خوار (*S. scolytus*) می‌توانند عامل بیماری را منتقل کنند (فاکولی و باتیستی، ١٩٩٧). از سوی دیگر شدت همه‌گیری بیماری با قدرت تهاجم جدایه‌های عامل بیماری رابطه مستقیم دارد. دو گونه *O. ulmi* و *O. novo-ulmi* دارای قدرت تهاجم و توان بیماری‌زایی متفاوتی هستند، به‌طوری‌که گونه اول در دهه ١٩٤٠-١٩٢٠ باعث ایجاد همه‌گیری با شدت کم و گونه دوم در دهه ١٩٧٠ باعث ایجاد همه‌گیری شدید در آمریکای شمالی، اروپا و برخی از مناطق آسیا شده است (تگلی و همکاران، ١٩٩٤). تفاوت‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و مولکولی زیادی بین جدایه‌های دو گونه مهاجم و غیرمهاجم وجود دارد و از این‌رو نقش هر کدام این عوامل در توان تهاجمی عاملین بیماری همواره مورد توجه قرار گرفته و وجود همبستگی‌های مثبت و منفی بین توان بیماری‌زایی و برخی از این خصوصیات در تحقیقات مختلف به اثبات رسیده است.

Archive of SID

www.SID.ir

یکی از مهم‌ترین عوامل تفکیک دو گونه *O. ulmi* و *O. novo-ulmi* تفاوت در میزان تولید توکسین سراتوألمین می‌باشد (رهنما، ۲۰۰٤؛ عراقی و همکاران، ۲۰۰۷). مطالعات چند سال اخیر نشان داده است که توکسین مزبور علاوه‌بر این‌که در پژمردگی درختان میزبان نقش دارد، در انتشار سالم اسپورهای عامل بیماری توسط سوسک‌های پوست‌خوار نیز مؤثر است (تمپل و همکاران، ۱۹۹۷).

در سال‌های اخیر با توجه به شیوع بیماری با نژاد و گونه جدید و مهاجم *O. novo-ulmi* در کشور و به‌ویژه نوار شمالی از ارسباران تا پارک جنگلی گلستان (رهنما، ۲۰۰۳) بررسی خصوصیات مختلف جدایه‌های عامل بیماری و مقایسه با جدایه‌های گونه *O. ulmi* بسیار ضروری به‌نظر می‌رسد. در این پژوهش نیز سعی شده است تا با اندازه‌گیری و مقایسه میزان توکسین سراتوألمین در جدایه‌های *O. ulmi* و *O. novo-ulmi* جداسازی شده از مناطق جنگلی شمال کشور با شدت بیماری‌زایی جدایه‌های مزبور و نیز بررسی توان جوانه‌زنی اسپورهای این دو گونه در شرایط تنش رطوبتی، اقدام به بررسی نقش این توکسین مهم در چرخه بیماری مرگ هلندی نارون گردد.

مواد و روش‌ها

جدایه‌های مورد استفاده: برای انجام این آزمون از ۵ جدایه مربوط به گونه *O. novo-ulmi* و ۲ جدایه مربوط به گونه *O. ulmi* جداسازی شده از مناطق مختلف استان گلستان موجود در کلکسیون قارچ‌شناسی گروه گیاهپزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان استفاده شد. هم‌چنین دو جدایه CKT-11 گونه *O. novo-ulmi* (جداسازی شده از ایران) و W9 گونه *O. ulmi* (جداسازی شده از انگلستان) موجود در این کلکسیون نیز به‌عنوان دو گونه استاندارد، که قبلاً میزان توکسین سراتوألمین آن‌ها با روش‌های مختلف مشخص شده بود (بریزر و همکاران، ۱۹۹۰)، مورد استفاده قرار گرفتند.

کشت جدایه‌ها بر روی محیط کشت مایع: برای انجام این کار ۲ قطعه ۵ میلی‌متر مربعی از کشت ۷-۵ روزه هر یک از جدایه‌ها در محیط کشت عصاره مالت آگار[1] (۲ درصد) با استفاده از چوب‌پنبه سوراخ‌کن سترون برداشته شده و به داخل ارلن‌های حاوی ۲۰۰ میلی‌لیتر محیط مایع زنتمایر (بریزر، ۱۹۸۱) که با کمی تغییرات حاوی ۲۰ گرم گلوکز، ۲ گرم L- آسپاراژین، ۱ گرم $KH_{2}PO_{4}$، ۱ گرم

1- Malt Extract Agar

Archive of SID

www.SID.ir

$MgSo_{٤}.٧H_{٢}o$، ۵ میلی‌گرم $FeCl_{٣}$، ۱ میلی‌گرم ویتامین $B_{١}$ و ۱ میلی‌گرم ویتامین $B_{٦}$ بود، انتقال و به‌مدت ٦ روز روی شیکر با ۸۰ دور در دقیقه در دمای اتاق قرار داده شدند.

جداسازی اسپورها و مایع حاوی توکسین: پس از گذشت ٦ روز محیط کشت‌های واجد کنیدی‌های قارچ از درون کاغذ صافی سترون بر روی قیف خلاء عبور داده شدند تا کنیدی‌های قارچ از میسلیوم‌های آن جدا گشته و در ظرف سترون زیر قیف جمع‌آوری شوند. سپس به‌منظور جداسازی نهایی کنیدی‌ها از سایر اجزای محلول، ۳ مرتبه و هر بار به‌مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ صورت گرفت. در نهایت، سوسپانسیون اسپور حاصل به سه قسمت تقسیم شد. بخشی از این سوسپانسیون برای انجام آزمون بیماری‌زایی جهت رسیدن به رقت نهایی حدود $١٠^{٦}$ کنیدی در هر میلی‌لیتر، توسط لام هموسیتومتر[1] شمارش اسپور صورت گرفت. سپس به دفعات لازم عمل رقیق‌سازی انجام شد و داخل ارلن‌های سترون در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری شدند. قسمت دیگر برای تعیین درصد جوانه‌زنی به داخل پلیت‌های در بسته سترون منتقل و در یخچال نگهداری شدند و بخش سوم برای تعیین میزان توکسین سراتواُلمین تولید شده توسط جدایه‌های مختلف عامل بیماری مورد استفاده قرار گرفت. برای این منظور محلول حاضر (به‌منظور جداسازی اسپور از فاز مایع) با استفاده از کاغذ صافی میکروبیولوژیکی با قطر روزنه ۰/۲۲ میکرون به داخل ظروف سترون فیلتر شد. ظروف حاوی محلول فاقد اسپور برای انجام آزمون تعیین شاخص تولید سراتواُلمین (CPI[2]) در یخچال نگهداری شدند. بدین‌ترتیب ۳ نوع محلول حاصل از کشت جدایه‌ها در هر ارلن حاوی محیط کشت مایع برای انجام ۳ آزمون ذیل مورد استفاده قرار گرفتند.

آزمون تعیین بیماری‌زایی: برای انجام این آزمون از نهال‌های ملج ۲ ساله استفاده شد. مایه‌زنی نهال‌ها با استفاده از یک چاقوی جراحی سترون و با ایجاد یک شکاف کوچک در پوست نهال‌ها صورت گرفت و در هر بار مایه‌کوبی مقدار ۰/۲ میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپور با استفاده از یک سرنگ ۵ میلی‌لیتری بر روی چاقوی جراحی قرار داده شد تا به آرامی جذب آوند شود (سانتینی و همکاران، ۲۰۰۵). مایه‌کوبی نهال‌ها از دو ناحیه صورت گرفت. مایه‌کوبی اول از ناحیه انشعاب اولین شاخه از پایین و مایه‌کوبی دوم به فاصله ۲۰ سانتی‌متری از آن (رو به بالا) انجام شد (عراقی و رهنما، ۲۰۰۷).

1- Homocytometer
2- Cerato-ulmin Production Index

Archive of SID

www.SID.ir

درصد بیماری‌زایی نهال‌ها براساس تحقیق‌های اسمالی و گوریس (۱۹۹۳) در طول ۸ هفته و با شمارش برگ‌های پژمرده، خشکیده و نیز برگ‌های ریزش کرده محاسبه گردید.

آزمون تعیین درصد جوانه‌زنی: به‌منظور بررسی اثر طول مدت تنش خشکی بر کلونی‌زایی اسپورهای قارچ، پلیت‌های حاوی اسپور به‌منظور خشک شدن ابتدا در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور نگهداری شدند (تمپل و همکاران، ۱۹۹۷) و به فواصل زمانی ۵، ۱۰ و ۱۵ روز پس از خشک شدن با آب مقطر استریل دوباره به‌صورت سوسپانسیون درآمده و به‌منظور جوانه‌زنی بر روی محیط کشت آگار ۲ درصد منتقل گردیدند. سوسپانسیون اسپور مورد استفاده در مرحله آخر تقریباً حاوی ۲۵۰ اسپور بود. پس از گذشت ۷ روز، درصد جوانه‌زنی اسپورها با شمارش تعداد کلونی‌های ظاهر شده برای تیمارهای مختلف به‌دست آمده و به‌عنوان معیاری برای مقایسه آماری توانایی اسپورهای جدایه‌ها به تحمل شرایط تنش رطوبتی، مورد استفاده قرار گرفت.

آزمون تعیین میزان سراتوألمین: برای انجام این آزمون از روش اسکالا و همکاران (۱۹۹٤) و سوربو و همکاران (۲۰۰۰) و روش تعیین شاخص تولید سراتوألمین با استفاده از معادله $CPI = y_{٤..} \times ١٠٠ \times DF$ و به‌کارگیری دستگاه اسپکترفوتومتر استفاده شد که در این رابطه $y_{٤..}$، مقدار جذب نوری (OD)[1] در رقت‌های به‌کار گرفته شده، در طول موج ٤٠٠ نانومتر و DF، عامل یا فاکتور رقت[2] است. با توجه به نوع دستگاه به‌کار گرفته شده رقت‌هایی استفاده گردید که مقادیر جذب نوری آنها بین ۲-۰/۱ بود. به‌منظور مقایسه دقیق‌تر جدایه‌ها از نظر شاخص CPI به‌ازای مقدار ثابت $y=١$، مقدار دقیق عامل رقت برای هر یک از جدایه‌ها با استفاده از رابطه خطی بین y و لگاریتم پایه ده عامل رقت (x) به‌صورت $y= a+bx$ محاسبه گردید. بدین‌ترتیب مقدار CPI در این آزمون از معادله (۱) (سوربو و همکاران، ۲۰۰۰) محاسبه گردید که در این معادله $١٠^{(١-a)/b}$، عامل رقت به‌دست آمده در جذب نوری ۱ برای هر یک از جدایه‌ها می‌باشد.

$$CPI = ١٠٠ \times ١٠^{(١-a)/b} \qquad (١)$$

تجزیه و تحلیل آماری: تمامی آزمون‌های مربوطه در قالب طرح کاملاً تصادفی با ٤ تکرار برای هر کدام از تیمارها انجام شد. برای تجزیه و تحلیل نتایج آزمون‌ها از نرم‌افزار آماری SAS (۲۰۰۱) و برای مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد.

1- Optical Density
2- Dilution Factor

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج

نتایج مقایسه میانگین مقدار شاخص CPI، درصد جوانه‌زنی و میزان بیماری‌زایی جدایه‌های دو گونه *O. ulmi* و *O. novo-ulmi* در جدول (۱) آورده شده است. به‌طورکلی نتایج نشان داد که جدایه‌های *O. novo-ulmi* مقدار شاخص CPI، درصد جوانه‌زنی در شرایط تنش رطوبتی و میزان بیماری‌زایی بسیار بیشتری نسبت به جدایه‌های *O. ulmi* دارند و از نظر آماری نیز در سطح احتمال ۱ درصد دارای تفاوت معنی‌دار هستند. در این میان جدایه Onu3 بیشترین درصد بیماری‌زایی و جدایه Onu2 بیشترین میزان تولید توکسین و جوانه‌زنی اسپور را دارا بودند. نتایج حاصل از همبستگی پیرسون بین سراتوألمین، بیماری‌زایی و جوانه‌زنی نشان داد که همبستگی مثبت معنی‌داری بین میزان تولید سراتوألمین و جوانه‌زنی اسپورهای جدایه‌های عامل بیماری وجود دارد، در حالی‌که رابطه معنی‌داری بین میزان تولید توکسین و بیماری‌زایی مشاهده نشد (جدول ۲).

جدول ۱- نتایج مقایسه میانگین* درصد بیماری‌زایی (P)، میزان تولید سراتوألمین براساس شاخص CPI و درصد جوانه‌زنی اسپورها در شرایط تنش رطوبتی ۵ روز (G/5)، ۱۰ روز (G/10) و ۱۵ روز (G/15) جدایه‌های دو گونه *Ophiostoma ulmi* و *O. novo-ulmi*.

جدایه	P برحسب درصد	میزان سراتوألمین برحسب CPI	G/5 برحسب درصد	G/10 برحسب درصد	G/15 برحسب درصد
Ou1**	۱۳/۱۵^{g}	۸/٤۸^{f}	٦/۲۱^{f}	۰/۰۱^{c}	۰/۰۰^{c}
Ou2	۱۸/٤٥^{f}	۰/۰۰^{f}	۲/۳۱^{f}	۰/۰۰^{c}	۰/۰۰^{c}
W9***	۱۰/۱۸^{g}	٤/٥۲^{f}	۳/۲۲^{f}	۰/۰۰^{c}	۰/۰۰^{c}
Onu1	۷۹/۸٤^{c}	٤٤۰/٤۱^{b}	۳۹/٤۱^{c}	۲/٥۲^{bc}	۱/٥٤^{bc}
Onu2	٦٥/۸٥^{e}	٥۹۲/۲۷^{a}	٥۷/٦٦^{a}	۱۱/٥۹^{a}	۷/۲٥^{a}
Onu3	۹٤/۱۲^{a}	۳۲۳/٥۸^{d}	۳۱/۲٥^{d}	۲/۲۳^{bc}	۱/۰۷^{bc}
Onu4	۸٤/۸۱^{b}	۲۸٦/۷۱^{e}	۳۰/۸۷^{d}	۱/۲۳^{bc}	۰/۰۰^{c}
Onu5	۷٦/۸۱^{d}	۳٦۹/۳۲^{c}	۲٥/۳۸^{e}	۰/۸٤^{bc}	۰/۰۰^{c}
CKT-11****	۷٦/٦٤^{d}	٤۳۲/۷۱^{b}	٤٥/۲٤^{b}	۳/٥۷^{b}	۲/۰۹^{b}

*اعداد دارای حروف غیرمشابه مربوط به هرکدام از آزمون‌های درصد بیماری‌زایی، میزان تولید سراتوألمین و درصد جوانه‌زنی (جداگانه) با آزمون چنددامنه‌ای دارای اختلاف معنی‌دار دانکن در سطح احتمال ۱ درصد می‌باشند.

**جدایه‌های Ou1-2 متعلق به گونه *Ophiostoma ulmi* و جدایه‌های Onu1-5 متعلق به گونه *O. novo-ulmi* می‌باشند.

***جدایه استاندارد *Ophiostoma ulmi* جداسازی شده از Oxford shire انگلستان در سال ۱۹۷۰ توسط J.N. Gibbs (بریزر و همکاران، ۱۹۹۰).

****جدایه استاندارد *Ophiostoma novo-ulmi* جداسازی شده از چاچکام استان مازندران ایران در سال ۱۹۷۷ توسط C.M. Brasier (بریزر و همکاران، ۱۹۹۰).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲- ضرایب همبستگی پیرسون بین شاخص تولید سراتوأُلمین (CPI)، درصد جوانه‌زنی اسپور در شرایط تنش رطوبتی و میزان بیماری‌زایی جدایه‌های عامل بیماری مرگ نارون.

	جوانه‌زنی اسپور پس از تنش رطوبتی ۱۵ روزه	جوانه‌زنی اسپور پس از تنش رطوبتی ۱۰ روزه	جوانه‌زنی اسپور پس از تنش رطوبتی ۵ روزه	تولید سراتوأُلمین	درصد بیماری‌زایی
درصد بیماری‌زایی	-۰/۰۶۷۷۹^{ns}	۰/۰۰۳۳۵^{ns}	۰/۰۰۳۲٤^{ns}	۰/۰۰۷۸^{ns}	
تولید سراتوأُلمین	۰/۳۲۵۰۵*	۰/۷۷٦٦۲**	۰/۸۱۸۳۵**		
جوانه‌زنی اسپور پس از تنش رطوبتی ۵ روزه	۰/۷۱۳۰۳**	۰/۹٦۷۹۹**			
جوانه‌زنی اسپور پس از تنش رطوبتی ۱۰ روزه	۰/۷۵٦٤۸**				
جوانه‌زنی اسپور پس از تنش رطوبتی ۱۵ روزه					

*معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد، **معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد و ns غیرمعنی‌دار.

بحث

نتایج این آزمون نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین میزان تولید توکسین در جدایه‌های دو گونه مهاجم *O. novo-ulmi* و گونه غیرمهاجم *O. ulmi* وجود دارد. به‌طورکلی بیش از ۱۰ مورد تفاوت مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و مولکولی شاخص بین دو گونه مزبور شناخته شده است (بریزر، ۱۹۹۱). یکی از این موارد وجود تفاوت در میزان تولید سراتوأُلمین در دو گونه *O. ulmi* و *O. novo-ulmi* می‌باشد (تاکائی و همکاران، ۱۹۸۳). توکسین مزبور که دارای ساختمان پروتئینی با وزن مولکولی ۷٦۲۷ کیلودالتون بوده (بریزر و همکاران، ۱۹۹۰) و نقش اساسی در بیماری‌زایی و پژمردگی گیاه دارد (تاکائی، ۱۹۷۸)، برای اولین بار توسط سالمینک و همکاران (۱۹٦۵) گزارش گردید و در سال ۱۹۷٤ توسط تاکائی سراتوأُلمین نام گرفت. او بعدها شواهدی ارایه داد که براساس آن جدایه‌های مهاجم مقادیر بسیار زیادی سراتوأُلمین در مقایسه با جدایه‌های غیرمهاجم تولید می‌کنند (بریزر و همکاران، ۱۹۹۰). تگلی و همکاران (۱۹۹٤) نیز در طی تحقیق‌های خود دریافتند که بهینه دمای تولید سراتوأُلمین در شرایط آزمایشگاهی ۲۳ درجه سانتی‌گراد است که از این نظر به بهینه دمای رشدی جدایه‌های

Archive of SID

www.SID.ir

مهاجم (۲۰-۲۲ درجه سانتی‌گراد) نزدیک‌تر است تا بهینه دمای رشدی جدایه‌های غیرمهاجم (۲۸-۳۰ درجه سانتی‌گراد). علاوه‌بر این بودن و همکاران (۱۹۹٤) و متعاقب آن جنگ و همکاران (۱۹۹٦) وجود تفاوت‌های مولکولی در تولید توکسین سراتواُلمین در بین جدایه‌های مهاجم و غیرمهاجم را با تعیین توالی نوکلئوتیدهای ژن CU (ژن تولیدکننده توکسین سراتواُلمین) به اثبات رساندند.

نتایج حاصل از این آزمون نشان داد که رابطه مشخصی بین میزان تولید سراتواُلمین و میزان بیماری‌زایی جدایه‌های عامل بیماری و ترجیحاً جدایه‌های گونه مهاجم *O. novo-ulmi* وجود ندارد، ولی همبستگی کاملاً مثبتی بین مقادیر توکسین تولید شده و درصد جوانه‌زنی جدایه‌ها در شرایط تنش رطوبتی وجود داشت. این نتایج در کار برخی از محققان نظیر بودن و همکاران (۱۹۹٦) و تمپل و همکاران (۱۹۹۷) نیز دیده می‌شود. با این وجود نتایج مختلفی در کار محققان مبنی بر میزان نقش سراتواُلمین در بیماری‌زایی دیده می‌شود. وان آلفان و ترنر (۱۹۷۵) نشان دادند که توکسین سراتواُلمین با دخالت در انتقال آب در آوندهای گیاه، تنش آبی ایجاد می‌کند. بریزر و همکاران (۱۹۹٤) ثابت کردند که برخی از جدایه‌های *O. novo-ulmi* فاقد توان تولید سراتواُلمین بوده ولی توان بیماری‌زایی بسیار بالایی دارند. به دنبال آن بودن و همکاران (۱۹۹٦) فقدان ارتباط بین شدت بیماری‌زایی و توان تولید، سراتواُلمین را به اثبات رساندند. با این حال اسکالا و همکاران (۱۹۹۷) نشان دادند که میزان سراتواُلمین در برگ‌های پژمرده و دارای علائم زردی و نکروز برگی بیش از برگ‌های فاقد علائم در نهال‌های مایه‌کوبی شده به‌وسیله جدایه‌های دو گونه *O. ulmi* و *O. novo-ulmi* است. تمپل و همکاران (۱۹۹۷) با انتقال ژن تولید سراتواُلمین از جدایه‌های مهاجم *O. novo-ulmi* به جدایه‌های غیرمهاجم *O. ulmi*، هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری در میزان بیماری‌زایی جدایه‌های *O. ulmi* طبیعی و تراریخته جدید مشاهده نکردند. اما سوربو و همکاران (۲۰۰۰) نشان دادند که انتقال این ژن به جدایه گونه *O. quercus* (که یک گونه غیربیماری‌زا بر روی نارون است) باعث افزایش توان بیماری‌زایی این گونه و بروز علائم مرگ نارون پس از مایه‌کوبی درختان نارون با جدایه تراریخته آن می‌شود.

بنابراین تاکنون نتایج مختلف و تا حدودی متناقض از تحقیق‌های سایر محققان در زمینه میزان و چگونگی نقش سراتواُلمین در بیماری‌زایی قارچ عامل بیماری وجود دارد و این با در نظر گرفتن تعامل پیچیده پاتوژن، میزبان، ناقل و شرایط محیطی در پدیده بیماری‌زایی تا حدی قابل توجیه است، چرا که عوامل بسیار زیادی در پدیده بیماری‌زایی نقش دارند. چه بسا ظهور و یا عدم ظهور یکی از

Archive of SID

www.SID.ir

این عوامل، بیماری‌زایی و به ویژه ظهور علائم بیماری را با تغییراتی مواجه سازد. ولی آنچه که در پدیده بیماری‌زایی به جرأت می‌توان گفت این است که قارچ بیمارگر بیش از آنکه بتواند به میزبان خود با تولید انواع ترکیبات بیوشیمیایی آسیب برساند باید قادر باشد به‌راحتی در آن رشد کرده و در سراسر گیاه منتشر شود (شفر و الگرسما، ۱۹۸۱؛ عراقی و همکاران، ۲۰۰۸) و این در حالی است که میزان حساسیت درختان میزبان که رابطه مستقیم با سیستم دفاعی و خصوصیات آناتومیکی آنها دارد، نقش اساسی و عمده‌ای در بروز علائم و شدت بیماری‌زایی جدایه‌های عامل بیماری دارد. در اینجا این فرضیه را می‌توان مطرح کرد که اگرچه اغلب تحقیقات همواره به دنبال اثبات تأثیرپذیری توان بیماری‌زایی قارچ عامل بیماری از ظهور یا عدم ظهور ژن *CU* بوده‌اند، ولی شاید بتوان گفت که بیش از این‌که بیماری‌زایی از میزان سراتوأُلمین تولید شده در گیاه تأثیر بپذیرد، این ژن *CU* و میزان تولید توکسین سراتوأُلمین و حتی سایر خصوصیات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی قارچ عامل بیماری است که از عملکرد و بیان ژن *Vir* (ژن بیماری‌زایی) متأثر می‌شوند.

در راستای مطالعات در جهت یافتن سایر خصوصیات سراتوأُلمین علاوه‌بر نقش آن در پژمردگی، تاکائی (۱۹۷۸) و تاکائی و همکاران (۱۹۸۰) وجود سراتوأُلمین در سطح اندام‌های مختلف به ویژه اندام غیرجنسی قارچ به نام، سینما را به اثبات رساندند. استرینگر و تیمبرلاک (۱۹۹۳) نشان دادند که سراتوأُلمین یک پروتئین از گروه هیدروفوبین‌هاست. در نهایت تمپل و همکاران (۱۹۹۷) در مقاله خود با عنوان "سراتوأُلمین یک هیدروفوبین مناسب پارازیتی" اعلام کردند که پروتئین سراتوأُلمین بیش از اینکه نقش اساسی در پژمردگی و رابطه تنگاتنگ با بیماری‌زایی داشته باشد با پوشش اسپورهای عامل بیماری و حفاظت آنها از شرایط محیطی به‌ویژه تنش رطوبتی باعث افزایش امکان انتقال و انتشار اسپورهای عامل بیماری در محیط می‌شود. طبیعی است که افزایش توان جوانه‌زنی اسپورها در چنین شرایطی بیشتر شود. بدین‌ترتیب سراتوأُلمین علاوه‌بر اینکه در مکانیسم پیچیده پژمردگی در کنار سایر ترکیبات مهم نظیر گلیکوپپتیدها و پلی‌ساکاریدها (استروبل و همکاران، ۱۹۷۸؛ شفر، ۱۹۸۲؛ شفر و الگرسما، ۱۹۸۱)، آنزیم‌های مهمی نظیر لاکازها (بینز و کانواسسینی، ۱۹۹٦)، آنزیم‌های سلولتیکی و پکتیکی (الگرسما، ۱۹۷٦؛ أئولت و ریوکس، ۱۹۹۲) (که نقش اساسی در پژمردگی ایفا می‌کنند) شرکت می‌کند، نقش اصلی خود را به‌عنوان یک فاکتور پارازیتی مناسب در چرخه زندگی عامل بیماری با پوشش اسپورهای عامل بیماری به‌خوبی ایفا می‌کند و از آنجایی که جدایه‌های *O. novo-ulmi* سراتوأُلمین به مراتب بیشتری نسبت به *O. ulmi* تولید می‌کنند، از پتانسیل تهاجمی بیشتری برخوردار

Archive of SID

www.SID.ir

هستند. ولی از طرفی عدم وجود همبستگی مشخص بین میزان بیماری‌زایی و تولید توکسین در آزمایش‌های متعدد نشان می‌دهد که سراتوألمین نقش مستقیم و اساسی در ایجاد بیماری و درجات مختلف بیماری‌زایی و پژمردگی ندارد (تمپل و همکاران، ۱۹۹۷).

منابع

1.Binz, T., and Canevascini, G. 1996. Differential production of extracellular laccase in Dutch elm disease pathogens *Ophiostoma ulmi* and *O. novo-ulmi*. Mycol. Res. 100: 1060-1064.

2.Bowden, C.G., Hintz, W.E., Jeng, R., Hubbes, M., and Horgen, P.A. 1994. Isolation and characterization of the cerato-ulmin toxin gene of Dutch elm disease pathogen, *O. ulmi*. Curr. Genet. 25: 323-329.

3.Bowden, C.G., Smalley, E., Guries, R.P., Hubbes, M., Temple, B., and Horgen, P.A. 1996. Lack of association between cerato-ulmin production and virulence in *Ophiostoma novo-ulmi*. Moleculare Plant-Microbe Interactions, 9: 556-564.

4. Brasier, C.M. 1981. Laboratory investigation of *Ceratocystis ulmi*. In: Stipes, R.J., and Campana, R.J. (eds.). Comp. of Elm Dis. APS Press. Pp: 76-79.

5.Brasier, C.M. 1991. *Ophiostoma novo-ulmi* sp. nov., causative agent of current Dutch elm disease pandemics. Mycopathol. 115: 151-161.

6.Brasier, C.M., Takai, S., Nordin, J.H., and Richards, W.C. 1990. Differences in Cerato-ulmin production between the EAN and NAN and non-aggressive subgroups of *Ophiostoma ulmi*. Plant Pathol. 39: 231-236.

7.Brasier, C.M., Kirk, S., and Tegli, S. 1994. Naturally occurring non cerato-ulmin producing mutants of *Ophiostoma novo-ulmi* are pathogenic but lack aerial mycelium. Mycol. Res. 99: 436-440.

8.Elgersma, D.M. 1976. Production of pectic and cellulolytic enzymes by aggressive and non-aggressive strains of *Ophiostoma ulmi*. Neth. J. Plant Pathol. 82: 161-172.

9.Faccoli, M., and Battisti, A 1997. Observations on the transmission of *Ophiostoma ulmi* by the smaller elm bark beetles (*scolytus* spp.). Pp: 172-176. In Grégoire, J.C., Liebhold, A.M., Stephen, F.M., Day, K.R., and Salom, S.M. (eds.). In Proceedings: Integrating cultural tactics into the management of bark beetle and reforestation pests. USDA Forest Service General Technical Report NE-236.

10.Hibbett, D.S., and *et al*. (Plus 66 other editors). 2007. A higher-level phylogenetic classification of the fungi. Mycol. Res. 111: 509-547.

Archive of SID

www.SID.ir

11.Iraqi, M.M., and Rahnama, K. 2007. Investigating the disease severity of *Ophiostoma ulmi* and *O. novo-ulmi* isolates of the causal disease of Dutch elm disease on *Ulmus parvifolia* Jacq. J. Agri. Sci. and Natur. Res. 14: 3. 164-173.
12.Iraqi, M.M., Rahnama, K., Razavi, S.I., and Ebrahimi, A. 2007. Investigation on isolates of fungus the causal agent of Dutch elm disease in some areas of Golestan province. J. Agric. Sci. Natur. Resour. 14: 6. 124-138.
13.Iraqi, M.M., Rahnama, K., Mostafa, M., and Marandi, M. 2008. A survey on histopathology of *Ulmus glabra* and *U. carpinifolia* inoculated by *Ophiostoma novo-ulmi* fungus. J. Agric. Sci. Natur. Resour. 15: 4.
14.Jeng, R.S., Hintz, W.E., Bowden, C.G., Horgen, P.A., and Hubbes, M. 1996. A comparison of the nucleotide sequence of the cerato-ulmin gene and the rDNA ITS between aggressive and non-aggressive isolates of *Ophiostoma ulmi* sensu lato, the causal agent of Dutch elm disease. Curr. Genet. 29: 168-173.
15.Ouellette, G.B., and Rioux, D. 1992. Anatomical and Physiological Aspects of Resistance to Dutch Elm Disease. Pp: 256-305. In: Blanchette, A., and Biggs, R. (eds.). Defense Mechanisms of Woody Plant against Fungi. Berlin, Germany. Springer-Verlag.
16.Rahnama, K. 2003. Incidence of Dutch elm disease in new area of natural forest and urban trees of Iran. In Proceeding: The Second International Elm Conference. Valsain, Segovia, Spain. 34p.
17.Rahnama, K. 2004. Molecular identification of *Ophiostoma* and *Ceratocystis* genera and their relationship together: emphasis on identification and occurrence population of new casual agent of Dutch elm disease in Iran. Five months report of studies opportunity in British Colombia University, Vancouver, Canada. 20p.
18.Salemink, C.A., Robel, H., Kerling, L., and Tchernoff, V. 1965. Phytotoxin isolated from liquid cultures of *Ceratocystis ulmi*. Sci. 149: 202-203.
19.Santini, A., Montaghi, A., Vendramin, G. G., and Capretti, P. 2005. Analysis of the Italian Dutch elm disease fungal population. Phytopathol. 153: 73-79.
20.SAS Institute. 2001. SAS system. Inc, Cary, NC, USA.
21.Scala, A., Pattuelli, M., Coppola, L., Guastini, M., Tegli, S., Del Sero, G., Mittempergher, L., and Scala, F. 1997. Dutch elm disease progression and quantitive determination of cerato-ulmin in leaves, stems and branches of elms inoculated with *Ophiostoma novo-ulmi* and *O. ulmi*. Phisiol. and Mol. Pl. Pathol. 50: 349-360.

Archive of SID

www.SID.ir

22.Scala, A., Tegli, S., Comparini, C., Mittempergher, L., Scala, F., and Sorbo, G. 1994. Influence of fungal inoculum on cerato-ulmin production: Purification of cerato-ulmin and detection in elm sucker cuttings. Petria. 4: 53-63.
23.Scheffer, R.J. 1982. A phytotoxic glycopeptide produced by *Ophiostoma ulmi* in several elm species and clones. Pp: 215-223. In: Kondo, E.S., Hiratsuka, Y., and Denyer, W.G. (eds.). Proc. Dutch elm disease. Symposium and workshop, Winnipeg, Manitoba.
24.Scheffer, R.J., and Elgersma, D.M. 1981. Detection of a phytotoxin glycopeptide produced by *Ophiostoma ulmi* in elm by enzyme–linked immunospecific assay (ELISA). Physiol. Plant Pathol. 18: 27-32.
25.Smalley, E.B., and Guries, R.P. 1993. Breeding elms for resistance to Dutch elm disease. Ann. Rev. Phytopathol. 31: 325-352.
26.Sorbo, G., Scala, F., Parrella, G., Lorito, M., Comparini, C., Ruocco, M., and Scala, A. 2000. Functional expression of the gen *cu*, encoding the phytotoxic hydrophobin cerato-ulmin, enables *Ophiostoma quercus*, a nonpathogen on elm, to cause symptoms of Dutch elm disease. Molecular Plant-Microb Interactions. APS Press, 13: 1. 43-53.
27.Stringer, M.A., and Timberlake, W.T. 1993. Cerato-ulmin, a toxin involved in Dutch elm disease, is a fungal hydrophobin? The Plant Cell, 5: 145-146.
28.Strobel, G.A., Van Alfen, N., Hapner, K.D., Mc Neil, M., and Albersheim, P. 1978. Some glycopeptides from *Ceratocystis ulmi*, Dutch elm disease pathogen. Biochim Biophis Acta. 538: 60-75.
29.Takai, S. 1974. Pathogenicity and cerato-ulmin production in *Ceratocystis ulmi*. Nature. 252: 124-126.
30.Takai, S. 1978. Cerato-ulmin, a wilting toxin of *Ceratocystis ulmi*: cultural factors affecting cerato-ulmin production by the fungus. J. Phytopathol. 91: 147-158.
31.Takai, S. 1980. Relationship of the production of the toxin, cerato-ulmin, to synnemata formation, pathogenicity, mycelial habit and growth of *Ceratocystis ulmi* isolates. Can. J. Bot. 58: 658-662.
32.Takai, S., Hiratsuka, Y., Krywienczyk, J., Richards, W.C., and Davies, Y.P. 1980. Evidence for the presence of the toxin cerato-ulmin in the synnemata head fluid of *Ceratocystis ulmi*. Can. J. Bot. 58: 669-675.
33.Takai, S., Richards, W., and Stevenson, K. 1983. Evidence for the involvement of Cerato-ulmin, the *Ceratocystis ulmi* toxin, in the development of Dutch elm disease. Phisiol. Plant Pathol. 23: 275-280.

Archive of SID

www.SID.ir

34.Tegli, S., Comparini, C., Giannetti, C., and Scala, A. 1994. Effect of temperature on growth and cerato-ulmin production of *O. novo-ulmi* and *O. ulmi*. Mycol. Res. 98: 4. 408-412.
35.Temple, B., Horgen, P.A., Bernier, L., and Hintz, W.E. 1997. Cerato-ulmin, a hydrophobin secreted by the causal agents of Dutch elm disease, is a parasitic fitness factor. Fungal Gen. and Biol. 22: 39-53.
36.Van Alfan, N.K., and Turner, N.C. 1975. Influence of a *Ceratocystis ulmi* toxin on water relations of elm (*Ulmus americana*). Pl. Physiol. 55: 312-316.
37.Webber, J.F. 2004. Experimental studies on factors influencing the transmission of Dutch elm disease. Investigación Agraria: Sistemasy Recursos Forestales. 13: 197-205.
38.Zhang, N., Castlebury, L.A., Miller, A.N., Huhndorf, S., Schoch, C.L., Seifert, K., Rossman, A.Y., Rogers, G.D., Kohlmeyer, J., Volkmann-Kohlmeyer, B., and Sung, G.H. 2007. Sordariomycetes systematics: an overview of the systematics of the Sordariomycetes based on a four gene phylogeny. Mycologia. 98: 1077-1088.

Archive of SID

www.SID.ir

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

J. of Plant Production, Vol. 16(2), 2009
www.gau.ac.ir/journals

The involvement of Cerato-ulmin toxin on pathogenicity and survive of *Ophiostoma ulmi* and *O. novo-ulmi* fungi, Causal agents of Dutch elm disease

***M.M. Iraqi[1], K. Rahnama[2] and N. Soleimanipoor[3]**

[1]M.Sc. student, Dept. of Plant Pathology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [2]Associate Prof., Dept. of Plant Protection, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [3]B.Sc. student, Dept. of Plant Protection, Tabriz University

Abstract

Cerato-ulmin is the most important toxin of fungal causal agents of Dutch elm disease and its content is one of the most important factors to distinguish two species *Ophiostoma ulmi* and *O. novo-ulmi*. With attention to the *Ophiostoma novo-ulmi* is more pathogenicity than *O. ulmi*, this research was carried out to discuss the role of Cerato-ulmin on pathogenicity of causal agent using measurement of Cerato-ulmin content of isolates of casual agent and their comparison with pathogenicity and spore germination ability in moisture stress conditions. For these aim, content of Cerato-ulmin toxin was calculated as Cerato-ulmin Production Index (CPI) using spectrophotometer at 400 nm. The spore germination was also calculated in moisture stress conditions (5, 10 and 15 days-old). The results showed that *O. novo-ulmi* isolates able to produce the higher Cerato-ulmin toxin than *O. ulmi*, however was not observed clear relationship between rate of defoliation and wilting of *Ulmus glabra* Huds. seedlings and toxin production but there was completely significant positive correlation between rate of spore germination in moisture stress conditions and toxin production by fungal isolates of Dutch elm disease. The involvement of Cerato-ulmin on pathogenicity of causal agents of Dutch elm disease is intricate.

Keywords: Dutch elm disease, Cerato-ulmin, Spore germination, Pathogenicity, *Ulmus glabra* Huds., *Ophiostoma ulmi*, *O. novo-ulmi*

* Corresponding Author; Email: iraqi602@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir