

## مطالعه دو گونه *Ophiostoma* مرتبط با بیماری هلندی نارون در ایران\*

Study on two species of *Ophiostoma* in relation with Dutch elm disease in Iran

کامران رهنما و میرمعصوم عراقی\*\*  
دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

پذیرش: ۱۳۸۸/۷/۱

دریافت: ۱۳۸۷/۴/۹

### چکیده

به منظور بررسی گونه‌های عامل بیماری هلندی نارون، مطالعه‌ای بین سالهای ۸۷-۱۳۸۶ در برخی از مناطق استان گلستان نظیر پارک جنگلی دلد، لوه، سوسرا، توسکستان، جنگل‌های گیلان شامل سیاهکل و اسالم، ارسباران و همچنین مناطق فضای سبز شهری انجام شد. در این بررسی، براساس برخی خصوصیات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و مولکولی و مقایسه با جدایه‌های تایید شده از سایر مناطق دنیا، دو گونه *Ophiostoma ulmi* و *O. novo-ulmi* به عنوان عامل بیماری هلندی نارون شناسایی شدند که بیشترین جدایه‌ها مربوط به گونه *O. novo-ulmi* بودند. در این نوشته، توصیف و تفاوت‌های جدایه‌های دو گونه تشریح شد و برای اولین بار در ایران از درختان *Ulmus glabra* و *U. carpinifolia* از توسکستان و فضای سبز شهر تهران گزارش می‌شود. جدایه‌های *O. novo-ulmi* براساس روش فیلوژنی متعلق به جمعیت‌های اروپا- آسیایی بودند.

واژه‌های کلیدی: فیلوژنی، بیماری هلندی نارون، گیلان، گلستان، *Ophiostoma*

\* بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده دوم به راهنمایی آقای دکتر کامران رهنما ارائه شده به دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان و بخشی از طرح ملی بیماری مرگ نارون در ایران، مجری: نگارنده اول  
\*\* مسئول مکاتبه (E-mail: iraqi602@yahoo.com)

## مقدمه

قارچ‌های Ophiostomatoid از نظر قارچ‌شناسی و بیماری‌های درختان جنگلی حایز اهمیت زیادی هستند، به طوری که با ایجاد تغییر در کیفیت چوب باعث زیان اقتصادی می‌گردند (رهنما ۲۰۰۴a). برخی از گونه‌های این قارچ‌ها مانند *Ophiostoma clavigerum*، *O. piceae* و *O. ips* همانند برخی از گونه‌های *Ceratocystis* سبب تغییر رنگ در چوب درختان کاج و نراد شده و باعث کاهش کیفیت چوب می‌شوند. این گروه از قارچ‌ها به نام sapstain معروف شده‌اند که اغلب در ناحیه آوند آبکش فعالیت دارند و به واسطه وجود رنگدانه در میسلیم این قارچ‌ها، سطح چوب در محل فعالیت آن‌ها به رنگ آبی تغییر می‌یابد (Harrington & Wingfield 1998, Wingfield et al. 1993, 2001). تاکنون در ژنوم هسته *Ophiostoma* بین ۸۰۰۰-۱۰۰۰۰ ژن شناسایی شده است (Hoffman & Breuill 2002) به طوری که این قبیل بررسی‌ها و آنالیز ژن باعث شده است تا در سالهای اخیر، گونه *O. novo-ulmi* به دو زیرگونه *O. novo-ulmi* ssp. *novo-ulmi* و *O. novo-ulmi* ssp. *americana* تمایز یابد (Rahnama 2004a, Brasier & Kirk 2001).

برخی گونه‌ها نیز می‌توانند درختان پهن برگ نظیر نارون و بلوط را مورد تهاجم قرار دهند. از این گونه‌ها می‌توان به دو گونه *O. ulmi* و *O. novo-ulmi* روی نارون و *O. quercus* روی بلوط اشاره کرد که از نظر میزان بیماری‌زایی و خسارت در سطح جنگل‌های آسیا، اروپا و آمریکا قابل توجه‌اند (Brasier 2001).

بیماری هلندی نارون یکی از مهمترین و مخربترین بیماری‌های آوندی گیاهی در دنیا است (Stipes & Campana 1981). منشأ اولیه بیماری به طور دقیق مشخص نیست اما بریزر (Brasier 1990) معتقد است که این بیماری از چین منشأ گرفته و سپس طی جنگ جهانی اول به اروپا و آمریکای شمالی راه پیدا کرده است. چنانچه اخیراً گونه دیگری از این عامل بیماری با نام *O. himal-ulmi* Brasier & Mehrotra از منطقه هیمالیا از درختان نارون جداسازی شده است (Brasier & Mehrotra 1995). اولین گزارش از مشاهده بیماری در سال ۱۹۱۸ از پیکاردی (Picardy) در فرانسه بود که به دنبال آن از کشورهای هلند و بلژیک نیز در همان سال گزارش شد (Stipes & Campana 1981)، اما بیماری برای نخستین بار توسط یک گیاه‌شناس هلندی به نام دینا اسپیرنبورگ (Dina Spirenborg) در سال ۱۹۱۹ شرح داده شد (Stipes & Campana 1981).

تاریخچه پیدایش بیماری در ایران به درستی معلوم نیست، اما براساس منابع معتبر قدیمی بیماری اولین بار در سال ۱۳۳۸ از جنگل‌های گلستان و در ارتفاعات پایین کرنگفتر و کندسکوی روی درختان اوجا و ملج مشاهده شد و در بقیه نواحی گسترش یافت (Afsharpour & Adeli 1974). این بیماری تاکنون باعث میلیون‌ها دلار خسارت اقتصادی در

اروپا و آمریکای شمالی شده است. در ایران میزان دقیقی از خسارت این بیماری برآورد نشده است ولی براساس مسیریابی‌های به عمل آمده در کشور تا به حال حدود یک میلیون اصله درخت نارون اوجا و ملج طی چهل سال گذشته بر اثر این بیماری از بین رفته‌اند. طبق آمار سالهای ۵۱-۱۳۵۰ و ارزش اقتصادی بسیار بالایی که چوب و الوار درختان مزبور دارند، حدود چهار درصد حجم تجارتي جنگل‌های شمال را درختانی از گونه‌های ملج و اوجا تشکیل می‌دادند که امروزه دو گونه فوق به دلیل گسترش بیماری و زوال، حدود کمتر از یک درصد از این حجم تجارتي را به خود اختصاص داده‌اند (Rahnama 2003, 2004b, Rahnama et al. 2002, Rahnama & Taheri 2004).

این قارچ برای اولین بار در سال ۱۹۱۹ توسط شوآرتز (Schwarz) جداسازی و شناسایی شد و به دلیل داشتن ساختمان رویشی سینما (synnema) یا کورمیوم (coremium) به نام *Graphium ulmi* Schwarz نامگذاری گردید (Stipes & Campana 1981) و نهایتاً در سال ۱۹۷۳ توسط کرین و شوکنخت (Crane & Schoknecht 1973) تحت نام *Pesotum ulmi* Crane & Schoknecht تغییر نام داده شد. مرحله کامل قارچ عامل بیماری برای اولین بار در سال ۱۹۳۲ توسط بویسمن (Buisman 1932) به نام *Ceratostomella ulmi* Buis. نامیده شد. در سال ۱۹۳۴ نانفلدت آن را به نام *Ophiostoma ulmi* (Buis.) Nannf. تغییر داد (Melin & Nannfeldt 1934)، ولی در سال ۱۹۵۲ توسط مورئو (Moreau 1952) به *Ceratocystis ulmi* (Buis.) Moreau تغییر یافت. عنوان مذکور توسط هانت (Hunt 1956) در رساله کامل خود که مربوط به ژن‌های جنس *Ceratocystis* Ellis & Halst بود مورد تایید قرار گرفت و از آن زمان به بعد به طور گسترده‌ای مورد استفاده محققان قرار گرفت. با این وجود دهوخ (De Hoog 1974) نشان داد که گونه‌هایی که قبلاً با عنوان *Ophiostoma* شناخته شده بودند، از برخی جنبه‌های مهم همچون تشکیل شکل غیرجنسی با گونه‌هایی که هانت (۱۹۵۶) در نظر گرفته بود تفاوت دارند و نهایتاً هرینگتون (Harrington 1981) توانست با اضافه نمودن آنتی‌بیوتیک سیکلوهگزیمید به محیط کشت قارچ، دو جنس *Ophiostoma* و *Ceratocystis* را از هم جدا کند. همچنین مطالعات مولکولی انجام شده روی گونه‌های *Ophiostoma* و *Ceratocystis* نشان داد که تفاوت مولکولی بارزی بین این گونه‌ها وجود دارد (Hoffman & Breuil 2002). امروزه جنس *Ophiostoma* با دارا بودن ویژگی‌هایی نظیر شکل غیرجنسی هلوبلاستیکی و غیرفیالیدی، غیرحساس به آنتی‌بیوتیک سیکلوهگزیمید، وجود سلولز و رامنوز در دیواره سلولی، آزاد شدن فعال آسکوسپور و برخی دیگر از خصوصیات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و مولکولی از جنس *Ceratocystis* متمایز شده است (2007 Alexopoulos et al. 1996, Wingfield et al. 1993, Iraqi & Rahnama 2007, Iraqi et al.).

به طور کلی، این قارچ دارای ریشه‌های هاپلوئید و هتروتال بوده و دارای دو نوع ریشه آمیزشی (mating type) به نام‌های A و B می‌باشد. نسبت فراوانی ریشه‌های آمیزشی در طبیعت نیز در بین گونه‌ها و زیرگونه‌ها متفاوت می‌باشد (Brasier 2001). همچنین قارچ عامل بیماری عمدتاً چهار نوع هاگ تولید می‌کند که عبارتند از:

۱- فرم اسپوروتریکس (*Sporothrix*) که به علت شباهت زیاد طرز قرار گرفتن این‌هاگ‌ها روی ریشه به جنس *Cephalosporium* تا مدت‌ها به این مرحله، سفالوسپوریوم گفته می‌شد و از روی نارون‌های منطقه کرج نیز با این نام گزارش شده است (ذاکری ۱۹۸۹)، اما دهوخ (۱۹۷۴) آن را به *Sporothrix* تغییر نام داد (Sinclair & Campana 1987). نهایتاً وجود ریشه‌های باریک و دنداندار برای آنامورف *Sporothrix* در نظر گرفته شد (Benade et al. 1997). هینتز (Hintz 1999) با تعیین توالی ژن سنتز کیتین ارتباط بسیار نزدیک قارچ *Ophiostoma novo-ulmi* با پاتوژن انسانی *Sporothrix schenckii* را بیش از پیش تایید کرد. در ایران اولین گزارش رسمی از فرم غیرجنسی *Sporothrix* در سال ۱۳۷۹ بوده است (Rahnama et al. 2000).

۲- فرم سینمادار قارچ به نام *Pesotum ulmi* نامیده می‌شود و عمدتاً در محیط غذایی با درصد کربن بالا نظیر چوب و پوست درختان نارون یا محیط کشت‌های حاوی عصاره چوب و پوست به وفور تولید می‌شود (Sharbatkhari et al. 2007).

۳- فرم مخمر مانند (yeast-like): این فرم هاگی قارچ عامل بیماری در هر مرحله‌ای از زندگی رویشی و زایشی و در ابعاد مختلف دیده می‌شود و از ایران نیز گزارش شده است (Iraqi 2007, Rahnama et al. 2000).

۴- مرحله پریتسیوم که شکل جنسی قارچ را تشکیل می‌دهد و در واقع مهم‌ترین فرم هاگی آن از نظر تاکسونومی به شمار می‌رود و یکی از شاخص‌های مهم در تفکیک گونه‌ها و زیرگونه‌های این عامل بیماری محسوب شده که در انگلستان مورد مطالعه قرار گرفته است (Brasier & Kirk 2001)، اما تاکنون مطالعه‌ای روی چگونگی تشکیل فرم جنسی و مقایسه اندازه‌های آن‌ها با یکدیگر در ایران در این دو گونه *O. novo-ulmi* و *O. ulmi* انجام نشده است.

اگرچه نخستین گزارش رسمی از عامل بیماری در ایران نیز در سال ۱۳۵۰ توسط ابراهیمی و مک ناب از روی درختان اوجا و از جنگل‌های آستارا صورت گرفت (Ershad 1995, Ebrahimi & Mc Nab 1972)، اما در این بررسی فقط اشاره به تولید کورمیوم روی ساقه‌های زنده گیاهان شده است. با این وجود قارچ عامل بیماری در اغلب منابع داخلی با عنوان *Ceratocystis ulmi* نام برده می‌شود و علیرغم شیوع اپیدمی‌های شدید از این عامل بیماری در سالهای اخیر در مناطق جنگلی و نیز فضای سبز شهری در سطح کشور اطلاعات دقیق و جامعی از عامل یا عوامل قارچی ایجاد کننده این بیماری و مشخصات

قارچ‌شناسی آن‌ها وجود ندارد. به طوری که در برخی از تحقیقات انجام شده در استان خراسان عامل بیماری با نام *Ceratocystis ulmi* جداسازی و شناسایی گردیده است (Hajian & Kashki 1999) و در بررسی‌های بعدی نیز از گونه *O. ulmi* یاد شده است اما خصوصیات کامل قارچ عامل بیماری توصیف نگردید (Rahjo et al. 1999).

بنابراین، تحقیق حاضر با هدف شناسایی دقیق گونه یا گونه‌های عامل بیماری در کشور انجام شده و در این راستا خصوصیات تاکسونومیک، شامل مورفولوژی، فیزیولوژی و مولکولی جدایه‌های عامل بیماری در ایران مورد بررسی قرار گرفته است. امید است که نتایج این تحقیق در آینده در شناسایی و تفکیک و یا شناسایی گونه‌های دیگری از عامل بیماری در دیگر مناطق کشور نیز مثمر ثمر باشد.

### روش بررسی

طی بازدیدهای مختلف از برخی مناطق جنگلی استان گلستان نظیر پارک جنگلی دلد، توسکستان، منطقه جنگلی اسالم و سیاهکل در استان گیلان موارد بسیاری از درختان نارون مشاهده شد که در بخشی از شاخ و برگ خود یا در تمام قسمت‌های آن نشانه‌های بیماری و پژمردگی را نشان می‌دادند. نمونه‌برداری با مشاهده علایم داخلی شامل خطوط قهوه‌ای حاصل از نکروز آوندی در زیر پوست انجام شد (که معمولاً با آثار تغذیه و فعالیت سوسک‌های پوستخوار ناقل بیماری همراه بود). نمونه‌ها پس از ثبت مشخصات نمونه‌برداری از قبیل اطلاعات مربوط به محل نمونه‌برداری، گونه میزبان، تاریخ نمونه‌برداری و سایر مشخصات لازم جهت انجام آزمون‌های جداسازی و شناسایی به آزمایشگاه منتقل و در محل خنک نگهداری شدند. برای جداسازی عامل بیماری از محیط کشت ۱/۷٪ Water Agar و ۲٪ Malt Extract Agar استفاده شد (Brasier 1981). برای این منظور، قطعات ۲/۵-۰/۵ سانتی‌متری از نمونه‌های آلوده پس از ضدعفونی سطحی با محلول الکل اتیلیک ۷۰٪ و عبور از روی شعله با استفاده از یک چاقوی استریل پوست آن‌ها از چوب جدا و به صورت حلقه‌هایی به قطر ۲-۴ میلی‌متری برش داده شد و پس از انتقال روی محیط کشت‌های مزبور در انکوباتور در دمای ۲۵-۲۰ درجه سلسیوس و در تاریکی نگهداری گردید. در صورت مشاهده ریشه‌های قارچی، پرگنه‌های آن به ظروف حاوی محیط کشت ۲٪ MEA منتقل گردید. برای خالص‌سازی نیز از روش تک اسپور کردن (هاگ اسپوروتریکس) استفاده شد. جدایه‌های تایید شده موجود در کلکسیون قارچ‌شناسی گروه گیاهپزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان که قبلاً براساس روش‌های مولکولی (ژن  $\beta$ -tubulin) گونه آن‌ها تشخیص داده شده بود (Rahnama et al. 2005) نیز پس از کشت مجدد (subculture) روی محیط کشت Potato Dextrose Agar و ۲٪ MEA در شناسایی و تفکیک گونه‌های عامل بیماری مورد

بررسی قرار گرفتند. برای این منظور، اندازه‌گیری ابعاد ریشه‌ها و هاگ‌های مختلف مراحل غیرجنسی و جنسی جدایه‌های مزبور صورت گرفت. نهایتاً برای شناسایی جدایه‌های فوق‌الذکر از برخی خصوصیات مورفولوژیکی نظیر نوع پرگنه روی محیط کشت MEA و بررسی مشخصات اندام جنسی و نوع تیپ آمیزشی روی محیط کشت MEA ۲٪ حاوی ۱۰۰ تا ۲۰۰ گرم پودر چوب نارون (Brasier 1981) و برخی خصوصیات فیزیولوژیکی نظیر اندازه‌گیری سرعت رشد شعاعی روزانه، تعیین دمای بهینه رشد روی محیط کشت MEA ۲٪، اندازه‌گیری وزن خشک توده قارچ در محیط مایع Potato Dextrose Broth و نیز تعیین میزان شدت بیماری‌زایی روی نهال‌های نارون چینی، استفاده شد. روش مایه‌زنی نهال‌ها در گلخانه به روش تزریق سوسپانسیون هاگ قارچ و با ایجاد برش عرضی کوچک به وسیله چاقوی جراحی تیز و استریل روی ساقه اصلی و قرار دادن مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون هاگ (با غلظت  $10^6 \times 5$  هاگ/میلی‌لیتر) با استفاده از یک سرنگ روی لبه چاقو و هدایت آن به سمت بافت آوندی نهال صورت گرفت (Iraqi & Rahnema 2007). شدت بیماری با تعیین درصد برگ‌های پژمرده و ریزش کرده (Smalley & Guries 1993) پس از گذشت ۱۰ هفته محاسبه شد. تمامی آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شدند.

برای تعیین تیپ جنسی و تولید مرحله جنسی قارچ عامل بیماری از ۵ جدایه مربوط به فضای سبز شهرهای ایران به نام‌های Ir-Out-1، Ir-Out-2، Ir-Out-3، Ir-Out-4 و Ir-Out-5 (جداسازی شده از مناطق فضای سبز شهری (Rahnema 2004a, Rahjo et al. 1999) و دو جدایه تایید شده مشخص از نظر تیپ جنسی به نام‌های Ast<sub>20</sub> (تیپ A گونه *O. novo-ulmi*) از جنگل اسالم ایران و W2 (تیپ B گونه *O. ulmi*) از گلوشایر (Gloshire) انگلیس، تهیه شده از کلکسیون آزمایشگاه بیوتکنولوژی و قارچ‌شناسی دانشگاه بریتیش کلمبیا، ونکوور کانادا، استفاده شد.

برای بررسی‌های میکروسکوپی اندام‌های مختلف جدایه‌های قارچ در PVLG، لاکتوفنول و یا اسید لاکتیک ۵۰٪ به صورت اسلایدهای میکروسکوپی آماده و جهت مطالعه دقیقتر عکسبرداری نیز شدند.

به منظور تعیین تنوع ژنتیکی جدایه‌های مزبور از روش توالی‌یابی ژن بتا توبولین استفاده شد (Rahnema 2004a). برای این منظور، پس از استخراج DNA اقدام به تکثیر توالی ۱۰۰۰ bp مزبور با استفاده از دو پرایمر بتا توبولین T10 (5'- ACGATAGGTTACCTCCAGAC- 3') به عنوان Forward و T12 (5'- GTTGTCAATGCAGAAGGTCTCG- 3') به عنوان Reverse شد. طراحی این پرایمرها براساس کیم و همکاران (Kim et al. 2003) انجام گرفت. به منظور مقایسه توالی‌های جدایه‌ها و مشخص کردن ترتیب توالی نوکلئوتیدها از نرم‌افزار کلاستال (Clustal W, ver. 1.8)

(Thompson *et al.* 1994) تهیه شده توسط انستیتو پاستور استفاده شد (نشانی اینترنتی <http://bioweb.Pasteur.fr/seqanal/interfaces/clustalw-simple.html>).

جدول ۱- جدایه‌های *Ophiostoma* مورد استفاده در آزمون تعیین توالی ژن بتا توبولین  
Table 1. Isolates of *Ophiostoma* used in identification of sequence of  $\beta$ -tubulin Gene

کد جدایه Isolate Code	محل جداسازی Place of Isolation	تاریخ جداسازی Date	منبع Source	شماره بانک ژن Accession No.
*Ir-Out-1	Tehran & Karaj, Iran	1999	V. Rahjou <i>et al.</i>	EF638890
Ir-Out-2	Tehran & Karaj, Iran	1999	V. Rahjou <i>et al.</i>	EF638890
Ir-Out-3	Tehran & Karaj, Iran	1999	V. Rahjou <i>et al.</i>	EF638891
Ir-Out-4	Tehran & Karaj, Iran	1999	V. Rahjou <i>et al.</i>	EF638891
Ir-Out-5	Tehran & Karaj, Iran	1999	V. Rahjou <i>et al.</i>	EF638891
AST-20	Asalem Forest, Iran	1977	C.M. Brasier	X98835
CKT11-0	Chachkam, Sari, Iran	1977	C.M. Brasier	AB110977
W2WT	Gloucestershire, UK	1972	J.N. Gibbs	AF052061
CESS16K	Canada	1996	C.G. Bowden	EF5036A
FG245WT	Canada	1996	M. Hubbes	EU136398
MH75	Canada	1996	J.N. Gibbs	U23424
<i>O. ulmi</i> 695A	Canada	1996	M. Hubbes	CV827999
<i>O. ulmi</i> W9	Oxfordshire, UK	1970	J.N. Gibbs	AY887023
<i>O. ulmi</i> R21	Bozovici, Romania	1980	C.M. Brasier	EF467310
<i>O. quercus</i> H1039	UK	1989	P.T. Scard & CMB	AF081133
<i>O. quercus</i> H1040	UK	1987	P.T. Scard & CMB	AF234835
<i>O. ips</i> ATcc24285	Canada	1999	C. Breuil	AY194949

\* ۵ جدایه اول (جداسازی شده از ایران) در مرکز کلکسیون کشت قارچ‌ها در بخش گیاه‌شناسی دانشگاه آلبرتا (کانادا) نگهداری می‌شوند (مکاتبه با پروفیسور Lynne Sigler).

## نتیجه و بحث

طی بررسی‌های انجام شده تعداد دو گونه قارچ به نام‌های *Ophiostoma. ulmi* و *O. novo-ulmi* روی گونه‌های اوجا و ملج شناسایی شد. از این بین گونه *O. ulmi* برای اولین بار از مناطق جنگلی لوه و سوسرا و گونه *O. novo-ulmi* برای اولین بار از روی اوجا از توسکستان درختان نارون فضای سبز شهر تهران به شرح زیر گزارش می‌شود:

۱- خصوصیات گونه *Ophiostoma ulmi* (Buis.) Nannfeldt, Sven Skogsvardsfoeren

Tidskr, 32: 397-616, 1934

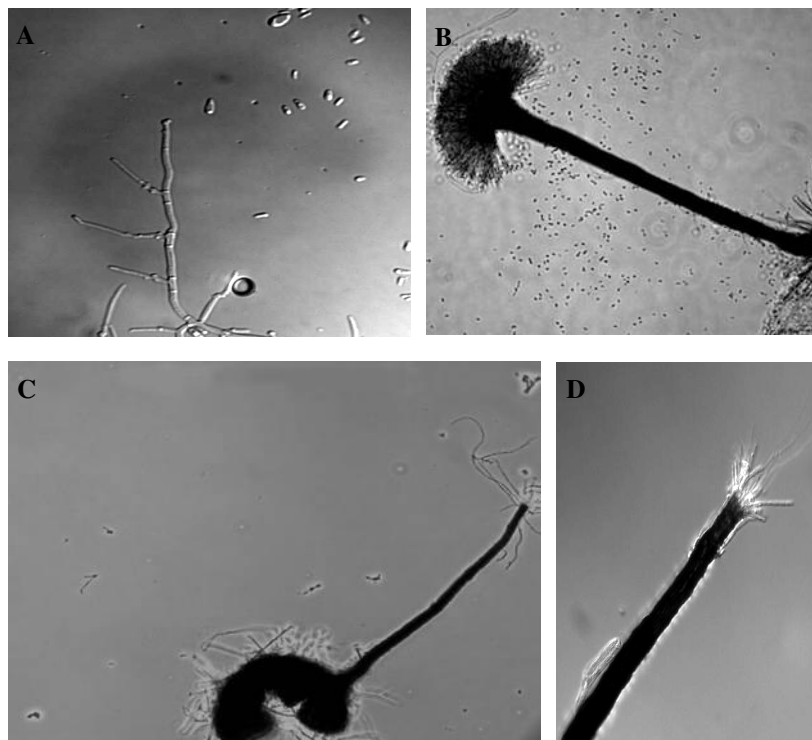
نمونه‌های بررسی شده از جنگل لوه (جمع‌آوری ۸۴/۶/۴) و سوسرا (۸۴/۷/۵) از روی اوجا (عراقی ۲۰۰۷).

پرگنه‌های قارچ روی محیط کشت MEA ۲٪ نسبتاً صاف و براق (waxy) تا چمنی (lawn) و سفید رنگ با ریشه‌های نسبتاً یکنواخت و با رشد روزانه متوسط ۲/۵ میلی‌متر بودند. همچنین دمای بهینه رشد برای این گونه ۲۸ درجه سلسیوس محاسبه شد. به طور کلی، شکل پرگنه برای جدایه‌های مختلف متفاوت بود. همچنین با تکرار کشت‌های مجدد (subculture)، یکنواختی رشد پرگنه‌ها از بین رفته و روی آگار به صورت رشد غیرطبیعی از یک سمت ریشه در برخی از کشت‌ها مشاهده شد و از میزان رشد روزانه جدایه‌ها نیز کاسته شد که دلیل این امر به وجود یکسری از عوامل سیتوپلاسمی مخرب تحت عنوان فاکتور بیماری (disease factor) در ریشه‌های قارچ نسبت داده می‌شود (Cole et al. 2000). وجود این عوامل باعث کاهش رشد و تکثیر قارچ می‌شود. این عوامل از طریق آناستاموزهای ریشه‌ای انتقال می‌یابند (Brasier 1983). تحقیقات اخیر نشان می‌دهد که این عوامل از چندین جزو ds RNA با وزن مولکولی متفاوت تشکیل یافته‌اند (Swinton & Gilligan 1999). از سوی دیگر، کاهش سرعت رشد و تهاجم جدایه‌های این گونه به وجود برخی مایکروویروس‌ها (Mycovirus) موسوم به مایتوویروس (Mitovirus) نسبت داده شده است (Cole et al. 2000). تاکنون وجود چند مایتوویروس در این قارچ به اثبات رسیده است (Tuomivirta 2004).

در مرحله *Sporothrix* روی محیط کشت MEA ۲٪ کنیدیوم‌ها به طور انتهایی روی کنیدیوفورهای کوتاه تولید شده و به دندان‌های ریزی می‌چسبند (شکل ۳). تولید متوالی کنیدیوم‌ها در انتهای یک کنیدیوفور منجر به تشکیل خوشه‌ای از هاگ می‌شود که غالباً در یک قطره لعابی قرار گرفته‌اند. کنیدیوم‌ها بی‌رنگ (hyaline)، تک‌یاخته (single-celled)، کشیده و گلابی شکل (elongated pyriform) بوده و غالباً یک طرف آن‌ها خمیده و مورب است و اندازه آن‌ها ۴-۸ × ۲-۴ میکرومتر می‌باشد. مرحله *Pesotum* این گونه روی محیط کشت‌های آزمایشگاهی تشکیل نشد. در مرحله مخمری اندازه و شکل هاگ‌ها متفاوت بود. این مرحله از قارچ هم در محیط کشت مایع PDB و هم در محیط کشت جامد برای گونه مزبور به دست آمد. این مرحله از زندگی قارچ عامل اصلی انتشار قارچ در داخل آوندهای چوبی محسوب می‌شود. در مرحله جنسی تولید پریتسیوم‌هایی با پایه‌هایی (قسمت کروی پریتسیوم) به قطر متوسط ۲۰۰ میکرومتر تولید کرد. همچنین متوسط طول گردن پریتسیوم برای این گونه ۲۸۰ میکرومتر بود. پریتسیوم‌ها به کمک ریزوئیدهای تیره رنگ به محیط می‌چسبند. آسکوسپورها بی‌رنگ، تک‌یاخته، هلالی (crescent) تا قلوه‌ای (reniform) شکل بوده و اندازه آن‌ها ۴-۶ × ۱-۲ میکرومتر محاسبه شد. این آسکوسپورها به طریقه فعال از راه گردن به بیرون رانده می‌شوند و معمولاً در یک مایع لزج و چسبناک در نوک دهانه پریتسیوم تجمع می‌یابند (شکل ۳). میزان وزن خشک توده قارچی (کشت هفت روزه) در محیط مایع برای این گونه به طور متوسط ۲۷۰/۲۵ میلی‌گرم به دست آمد. میزان بیماری‌زایی این گونه روی گونه نارون



چینی دو ساله بسیار کم و در حدود دو درصد محاسبه گردید که نشان دهنده شدت بیماریزایی کم این گونه است.



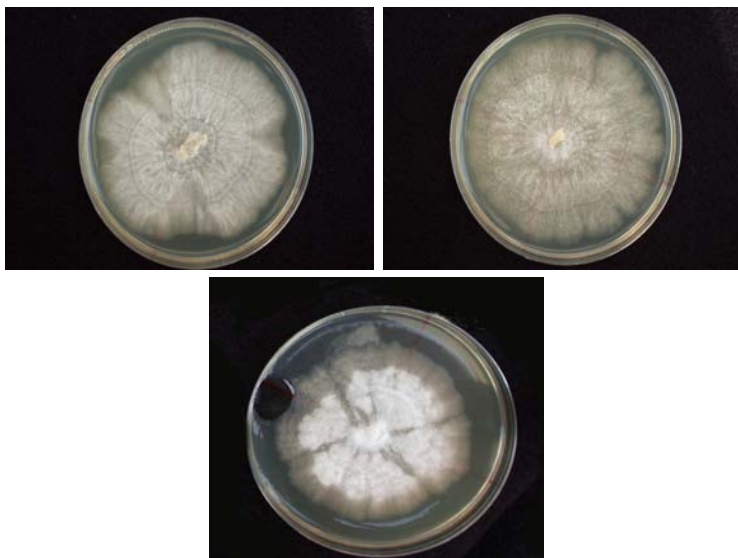
شکل ۳- مراحل مختلف تولید مثل جنسی و غیرجنسی قارچ *O. novo-ulmi* روی محیط کشت MEA: A: فرم *Sporothrix*; B: تشکیل مرحله غیرجنسی سینما (*Pesotum*). C: پریتسیوم با طول گردن بلند. D: دهانه استیولار به همراه ریشه.

Fig. 3. Characteristics of sexual and asexual stages of *Ophiostoma novo-ulmi* on MEA: A. *Sporothrix* form with conidiogenous cells on the dental mycelia. B. *Pesotum* form: Synnema. C-D. Perithecium with long neck and ostiolar hyphae.

۲- خصوصیات گونه -151 *Ophiostoma novo-ulmi* Brasier, *Mycopathologia*, 115: 151-161, 1991

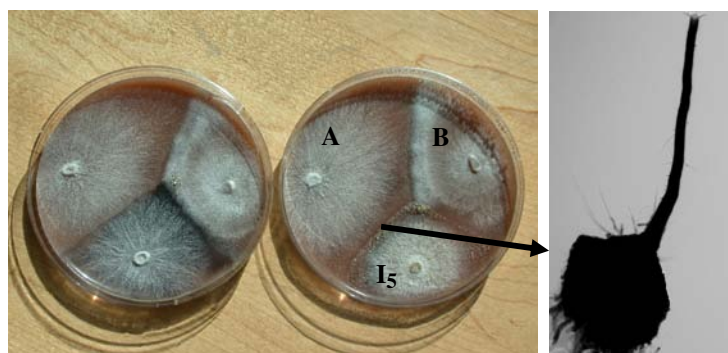
نمونه‌های بررسی شده از جنگل‌های توسکستان (۸۴/۴/۴) و دلد (۸۴/۷/۱۲) (عراقی ۲۰۰۷)، مشکین شهر اردبیل (رهنما ۱۳۷۹)، اسالم گیلان، سیاهکل (رهنما ۱۳۷۸)؛ فضای سبز تهران و کرج (رهنما ۱۳۷۸).

پرگنه‌های قارچ روی محیط کشت MEA ۲٪ نواری (striate) تا فیبری (fibrous)، ناصاف و با رشد روزانه متوسط ۳/۶ میلی‌متر بودند (شکل‌های ۱ و ۲). همچنین دمای بهینه رشد برای این گونه ۲۱ درجه سلسیوس تعیین شد.



شکل ۱- مقایسه دو شکل ظاهری پرگنه *Ophiostoma novo-ulmi* (عکس‌های بالا) و *O. ulmi* (عکس پایین) جدا شده از درختان نارون روی محیط کشت MEA ۲٪.

Fig. 1. Comparison between colony morphology of *Ophiostoma novo-ulmi* (top) and *O. ulmi* (bottom) isolated from elm trees on 2% MEA.



شکل ۲- کشت جدایه مجهول I<sub>5</sub> عامل بیماری با دو تیپ آمیزشی A و B قارچ بیمارگر *Ophiostoma novo-ulmi* (پیکان نشان دهنده تولید اندام جنسی در محل تلاقی تیپ‌های سازگار جنسی می‌باشد).

Fig. 2. Crossing the mycelia of two sexual types A and B with unknown isolates I<sub>5</sub>. Production of perithecia at the crossing zone of mycelia between sexually compatible isolates (arrow).

در مرحله *Sporothrix* روی محیط کشت MEA ۲٪ کنیدیومها همانند گونه قبلی به طور انتهایی روی انشعابات نسبتاً کوتاه کنیدیوفورهای کوتاه تولید می‌شوند و به دندانه‌های ریزی می‌چسبند. تولید متوالی کنیدیومها در انتهای یک کنیدیوفور منجر به تشکیل خوشه‌ای از هاگ می‌شود که غالباً در یک قطره لعابی قرار گرفته‌اند. کنیدیومها بی‌رنگ، تک‌یاخته، کشیده و گلابی تا اشکی شکل بوده و غالباً یک طرف آن‌ها خمیده و مورب است و اندازه آن‌ها ۴-۷ × ۲-۳ میکرومتر می‌باشد.

مرحله *Pesotum* این گونه در برخی جدایه‌ها روی محیط کشت MEA ۲٪ پس از گذشت ۲۵-۳۰ روز تشکیل شد. در این مرحله قارچ روی ریزویدهای تیره رنگ تولید اندامی به نام سینما (synnema) کرد. هاگ‌ها در مایعی چسبناک و لزج در انتهای ساقه‌های تیره رنگ (به ارتفاع ۱-۲ میلی‌متر) تولید شدند. این هاگ‌ها نیز تک‌یاخته و شفاف و عمدتاً تخم‌مرغی شکل بوده و اندازه آن‌ها ۲-۴ × ۱-۲ میکرومتر محاسبه شد.

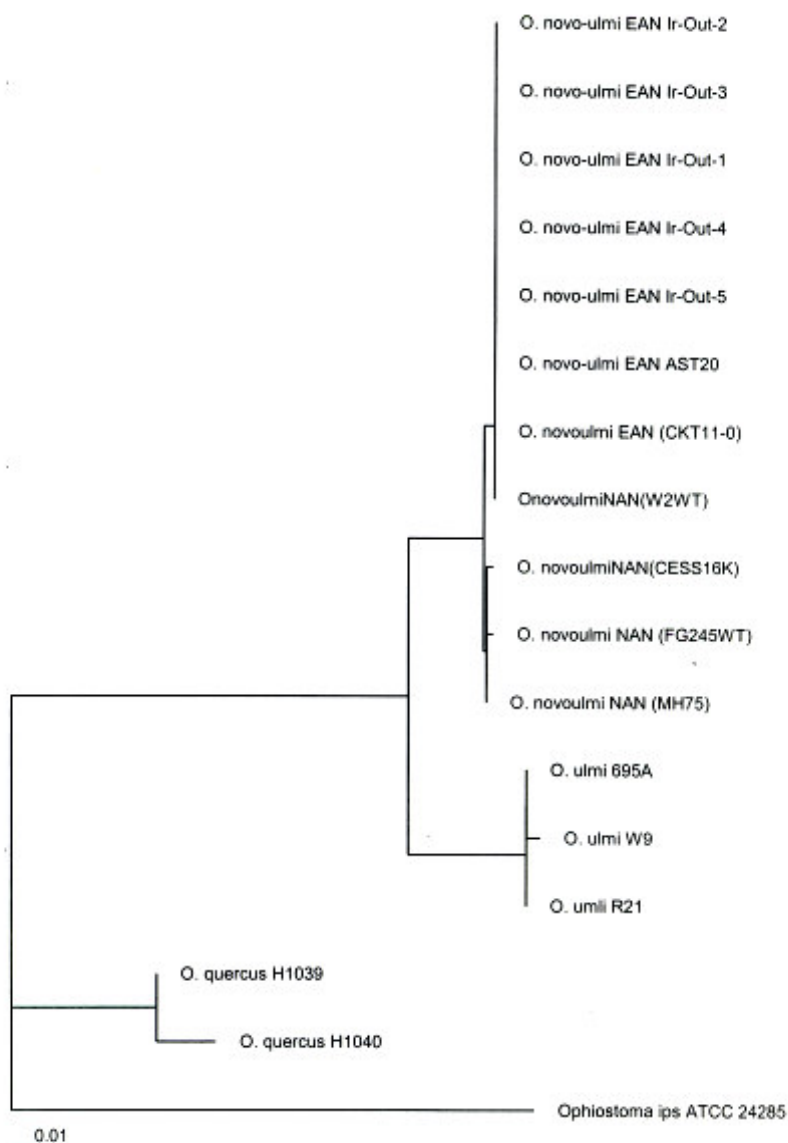
در مرحله مخمری، اندازه و شکل هاگ‌ها متفاوت بود. این مرحله از قارچ هم در محیط کشت مایع PDB و هم در محیط کشت جامد برای گونه مزبور به دست آمد. این مرحله از زندگی قارچ، عامل اصلی انتشار قارچ در داخل آوندهای چوبی محسوب می‌شود.

در مرحله جنسی، قارچ تولید پریتسیوم‌هایی خاردار با پایه‌هایی (قسمت کروی پریتسیوم) به قطر ۲۰۳ میکرومتر کرد. همچنین طول گردن پریتسیوم برای این گونه به طور متوسط ۳۵۰ میکرومتر محاسبه شد. پریتسیومها به کمک ریزویدهای تیره رنگ به محیط می‌چسبند. آسکوسپورها بی‌رنگ، تک‌یاخته، هلالی تا قلوهای شکل بوده و اندازه آن‌ها ۴-۶ × ۱-۲ میکرومتر محاسبه شد. این آسکوسپورها به طریقه فعال از راه گردن به بیرون رانده می‌شوند و معمولاً در یک مایع لزج و چسبناک در نوک دهانه پریتسیوم تجمع می‌یابند. ابعاد پریتسیوم این گونه با گونه قبلی به طور معنی‌داری اختلاف داشت (جدول ۲). میزان وزن خشک توده قارچی (کشت هفت روزه) در محیط مایع برای این گونه به طور متوسط ۲۵۰ میلی‌گرم به دست آمد. میزان بیماری‌زایی این گونه روی گونه نارون چینی دو ساله نیز در مقایسه با گونه قبلی بیشتر و به طور متوسط ۱۳٪ محاسبه گردید که نشان دهنده شدت بیماری‌زایی زیاد این گونه در مقایسه با گونه *O. ulmi* است.

جدول ۲- مقایسه برخی از ویژگی‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی جدایه‌های دو گونه *O. novo-ulmi* و *Ophiostoma ulmi*

<i>Ophiostoma novo-ulmi</i>	<i>Ophiostoma ulmi</i>	مشخصات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی
نواری و فیبری و ناصاف و با رشد روزانه زیاد (متوسط ۳/۶ میلی‌متر/ روز)	صاف، نرم تا چمنی و سفید با رشد روزانه ضعیف (متوسط ۲/۵ میلی‌متر/ روز)	شکل پرگنه جدایه‌ها روی محیط کشت MEA
اغلب طولیتر (۶۴۰-۲۹۰ میکرومتر)	اغلب کوتاهتر (۲۹۰-۲۷۳ میکرومتر)	طول گردن پربتسیوم روی محیط کشت MEA
۲۰۳ میکرومتر	۲۰۰ میکرومتر	عرض پایه پربتسیوم
		نرخ رشد شعاعی روی محیط کشت MEA (میلی‌متر در روز) در:
۳/۴-۳/۸	۲/۴-۲/۶	۲۰ درجه سلسیوس
۲/۷-۳	۲/۹-۳/۳	۲۸ درجه سلسیوس
۰	۰/۵-۰/۶	۳۵ درجه سلسیوس
۲۱	۲۸	بهینه دمای رشد (درجه سلسیوس)
کمتر (۲۴۴-۲۵۴/۵)	بیشتر (۲۶۶-۲۷۴/۲۵)	وزن خشک توده قارچ در محیط مایع PDB (میلی‌گرم)
بیشتر (۰/۱۳)	کمتر (۰/۲)	میزان بیماری‌زایی روی نارون چینی دو ساله (درصد پژمردگی و ریزش برگ)

نتایج آنالیز توالی‌یابی و مقایسه فیلوژنی نشان داد که هر پنج جدایه مورد استفاده در این آزمون متعلق به گونه مهاجم *Ophiostoma novo-ulmi* و ترجیحا جمعیت‌های اروپا-آسیایی یا به عبارت بهتر زیرگونه *O. novo-ulmi ssp. novo-ulmi* می‌باشند (شکل ۴). نتایج مقایسه ۷۹۰ نوکلئوتید در این آزمون نشان داد که اختلاف اصلی جدایه‌های گونه *O. novo-ulmi* و *O. ulmi* در کد شدن اسیدآمیننه سرین می‌باشد.



شکل ۴- مقایسه فیلوژنی جدایه‌های عامل بیماری نارون از ایران (پنج جدایه اول از بالا) با جدایه‌های تایید شده از سایر نقاط جهان براساس توالی یابی ژن بتا توبولین: تمامی جدایه‌های ایرانی *O. novo-ulmi* متعلق به زیر گونه *O. novo-ulmi* ssp. *novo-ulmi* (جمعیت‌های اروپا- آسیایی).

Fig. 4. Comparison of phylogeny of five Iranian isolates of Dutch elm disease with isolates of others areas based on sequence of  $\beta$ -tubulin gene. All Iranian isolates of *Ophiostoma novo-ulmi* belong to *O. novo-ulmi* ssp. *novo-ulmi* (EAN populations).

---

منابع

جهت ملاحظه منابع به متن انگلیسی مراجعه شود.

---

نشانی نگارندگان: دکتر کامران رهنما و مهندس میرمعصوم عراقی، بخش گیاه پزشکی دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.