Archive of SID

مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی
جلد چهاردهم، شماره اول، فروردین ـ اردیبهشت ۱۳۸٦
www.sid.ir
www.magiran.com/jasnr

اثر گلوکز و اسید آمینه ال– اسپارژین در محیط کشت بر تولید مثل غیرجنسی قارچ عامل بیماری پژمردگی هلندی نارون

*ماهرخ شربتخواری، سید اسماعیل رضوی، سید جواد صانعی و کامران رهنما
اعضای هیات علمی بخش گیاهپزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ دریافت: ۸٤/۹/۲۸ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۵/۱۰/۲۳

چکیده

تولید اندام‌های تکثیر غیرجنسی (کرمیوم) قارچ عامل بیماری مرگ نارون در سطح محیط کشت PDA تنها با افزودن قطعاتی از چوب نارون یا عصاره چوب و برخی اسیدهای چرب به محیط امکان‌پذیر است. با توجه به این که در شاخه‌های چوب نارون نسبت کربن به نیتروژن ۲٦:۱ می‌باشد و تولید کرمیوم‌های فراوان برروی چوب نارون مشاهده می‌گردد بنابراین نیتروژن کم و کربن بالا می‌تواند در تولید مثل غیرجنسی نقش مهمی داشته باشد. از این رو برای بهینه‌سازی شرایط تولید کرمیوم تأثیر نسبت‌های مختلف کربن/ نیتروژن براساس تغییر در غلظت‌های قند و اسید آمینه به‌ترتیب به‌عنوان منبع کربن و نیتروژن، روی میزان تولید کرمیوم مورد ارزیابی قرار گرفت. به این منظور هفت جدایه از *Ophiostoma novo-ulmi* از درختان نارون در استان گلستان انتخاب شدند. محیط پایه حاوی ۱۰ گرم گلوکز و دو گرم ال- آسپارژین بود که تأثیر نسبت‌های مختلف C:N با تغییر در غلظت‌های این دو ماده بررسی شد. نتایج آزمایش نشان داد که با کاهش مقدار کلی گلوکز و نیتروژن همزمان با افزایش میزان گلوکز نسبت به ال- آسپارژین تولید کرمیوم بدون استفاده از قطعات یا عصاره چوب و اسیدهای چرب اولئیک و لینولئیک در محیط کشت افزایش یافت. جدایه‌ها از نظر تولید کرمیوم در دو گروه قرار گرفتند. در گروه اول محیط بهینه به‌طور معنی‌داری باعث افزایش تولید کرمیوم شد در حالی که در گروه دوم تولید کرمیوم همچنان نادر بود. براساس طبقه‌بندی جدایه‌های مهاجم و غیرمهاجم در بررسی‌های قبلی میزان تولید کرمیوم می‌تواند با میزان بیماریزایی جدایه‌ها ارتباط مستقیم داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: مرگ نارون، کرمیوم، نسبت C:N

مقدمه

بیماری خشکیدگی درختان نارون یا بیماری هلندی نارون از مهمترین بیماری‌های نارون‌های جنگلی در کلیه مناطق دنیاست. این بیماری ابتدا در سال ۱۹۱۸ در شمال فرانسه، بلژیک و هلند توجه متخصصین را به خود جلب نمود و پس از آن به کشورهای منطقه بالکان، ایتالیا و پرتقال و همچنین غرب انگلستان سرایت نمود (ابراهیمی و مک ناب، ۱۹۷۰). بیماری هلندی نارون در ایران اولین بار توسط شریف در سال ۱۳۳۸ از ناحیه جنگل گلستان گزارش شد و به

*- مسدئول مکاتبه: mahish336@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

دنبال آن بررسی‌هایی در رابطه با جدا کردن عامل بیماری انجام گرفت (افشارپور و عادلی، ۱۳۵۳). میزبان اصلی گونه‌های مختلفی از نارون شامل *Ulmus americana* L. ,*Ulmus pumila* L. و *Ulmus glabra* L. بوده ولی طی بررسی‌های به عمل آمده مشخص شده که جنس دیگری از درختان خانواده نارون به نام درخت آزاد (*Zelkova spp.*) و گونه *Ulmus carpinifolia* نیز مورد حمله عامل بیماری قرار می‌گیرد. این بیماری برروی درختان آزاد از منطقه استان اردبیل گزارش شده است (افشارپور و عادلی، ۱۳۵۳). انتقال بیماری بین درختان میزبان از طریق سوسک کوچک پوست‌خوار *Scolytus spp* می‌باشد که آثار آن به شکل تونل‌هایی در زیر پوست دیده می‌شود.

در سال‌های اخیر در شمال کشور در گرگان و در درختان نارون چتری فضای سبز داخل شهر تهران عامل بیماری مرگ نارون *Ophiostoma novo-ulmi* (Brasier) معرفی شده بود (رهنما و همکاران، ۲۰۰۰). این قارچ برروی محیط کشت به اشکال مختلف جنسی، غیرجنسی و مخمری مشاهده می‌گردد (جنسن و همکاران، ۱۹۹۲). تاکنون حداقل چهار جنس مختلف برای شکل غیرجنسی این قارچ معرفی شده است (اکادا و همکاران، ۱۹۹۸). در حالت جنسی قارچ تولید پریتسیوم و آسکوسپور می‌کند ولی در فرم غیرجنسی آن یا *Pesotum ulmi* (گلدنهوئیز و همکاران، ۲۰۰٤) تولید اسپورها، برروی کنیدی برهای بلند و به هم چسبیده یاکرمیوم[1] صورت می‌گیرد (هیندال و همکاران، ۱۹۷۸). از نظر ریخت‌شناسی قارچ در شکل غیرجنسی با افزایش سن تیره رنگ شده ریسه‌ها به‌صورت دندانه‌ای و تشکیل کنیدی‌ها در انتهای آنها به‌صورت گرد یا بیضی می‌باشد. انشعاب کنیدی برها به‌صورت انفرادی بوده و دارای سه تا شش سلول کنیدی‌زا می‌باشد (رهنما و همکاران، ۲۰۰۰). تغییرات موجود در خصوصیات و ریخت‌شناسی قارچ با تغییر در توان بیماریزایی آن همراه است به‌طوری که این بیمارگر در فرم جنسی و غیرجنسی قادر به آلوده‌سازی گیاه می‌باشد اما تکثیر آن در داخل بافت میزبان به‌صورت مخمری است. علاوه‌بر این در سطح جدایه‌ها نیز تغییر در ریخت‌شناسی و شدت بیماریزایی دیده می‌شود (شریبر و تونسند، ۱۹۷٦؛ جنسن و همکاران، ۱۹۹۲). بنابر بررسی‌های انجام شده، جدایه‌های با تهاجم بیشتر معمولاً رشد سریع‌تری نسبت به جدایه‌های با تهاجم کمتر داشته‌اند. جدایه‌های مهاجم ریسه‌های هوایی بیشتری تولید کرده و در فرم غیرجنسی معمولاً کرمیوم بیشتری برروی قطعات چوب نارون *Ulmus pomila* تولید می‌کنند. از نظر ریخت‌شناسی اکثر نژادهای مهاجم یا غیرمهاجم این قارچ در محیط کشت‌های واجد آگار، کرمیوم تولید نکرده یا تولید کرمیوم آنها محدود است (هیندال و مک دونالد، ۱۹۷۸). در این شرایط اضافه نمودن قطعاتی از چوب نارون یا عصاره آن به محیط کشت تحریک تولید کرمیوم را به همراه دارد. براساس مطالعات انجام شده اسیدهای اولئیک و لینولئیک از دیگر فاکتورهایی هستند که در رابطه با تحریک تولید پریتسیوم و کرمیوم نقش دارند (هیندال و مک دونالد، ۱۹۷۸). از آنجا که در بررسی خصوصیات جدایه‌ها، ویژگی‌های کرمیوم اهمیت فراوانی داشته و مشکلاتی در اضافه نمودن چوب نارون و عصاره گیاه به محیط کشت وجود دارد و به‌علاوه استفاده از اسیدهای چرب اولئیک و لینولئیک نیز نسبتاً پر هزینه می‌باشد، بنابراین به‌منظور بهینه‌سازی شرایط تولید کرمیوم، با توجه به نسبت کربن به نیتروژن در شاخه‌های چوبی نارون که ۲٦:۱ است، اثر نسبت‌های متفاوتی از C:N در رابطه با تولید کرمیوم بدون استفاده از اسیدهای چرب مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

هفت جدایه *Ophiostoma novo-ulmi* که از درختان نارون آلوده در سطح استان گلستان جدا شده بودند، برای این بررسی انتخاب شدند. براساس مطالعات قبلی جدایه‌های مورد بررسی از نظر بیماریزایی در دو

1- corremium

www.SID.ir

Archive of SID

گروه مهاجم و با تهاجم کمتر قرار داشتند (ابراهیمی، ۱۳۷٤). کلیه جدایه‌ها برروی محیط سیب‌زمینی- دکستروز- آگار در لوله‌های آزمایش و دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده بودند. جهت فعال شدن جدایه‌ها نمونه‌های مورد بررسی به مدت پنج تا هفت روز برروی این محیط در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. آنگاه حلقه‌ای از حاشیه پرگنه‌ها برروی محیط کشت پایه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد تحت شرایط تاریکی قرار گرفتند. این محیط پایه واجد ۱۰ گرم گلوکز ۲ گرم ال- آسپاراژین ۱ گرم KH2PO4.7H2O، ۰/۵ گرم MgSO4 ۰/۲ میلی‌گرم، Fe ۰/۲ میلی‌گرم، Zn ۰/۱ میلی‌گرم Mn و ۱۵ گرم آگار در یک لیتر آب بوده است. تأثیر این محیط با تغییر غلظت گلوکز (۱، ۲، ۵ و ۱۰ گرم) در لیتر و نسبت گلوکز به ال- آسپاراژین (۱ به ۱، ۵ به ۱، ۲۳ به ۱ و ۳۰ به ۱) بررسی گردید. پس از ۱٤ روز میزان تولید کرمیوم توسط استریومیکروسکوپ با معیار یک تا چهار بررسی گردید[1]. در هر مورد پنج تکرار در نظر گرفته شد و آنالیز واریانس داده‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی و آزمون دانکن با نرم افزار MSTATC صورت گرفت.

نتیجه‌گیری و بحث

طی بررسی‌های انجام شده، قارچ برروی محیط سیب‌زمینی هیچ‌گونه کرمیومی تشکیل نداد. همچنین مشخص گردید که تولید کرمیوم در هر هفت جدایه برروی محیط پایه نادر است. البته با کاهش مقدار کلی گلوکز و نیتروژن در محیط پایه ولی افزایش نسبت گلوکز به ال- آسپاراژین شرایط مناسبی برای تولید کرمیوم در محیط کشت میسر شد (شکل ۱) به‌طوری که بیشترین تولید کرمیوم در محیطی با یک گرم گلوکز و ۰/۰٤٤ گرم ال- آسپاراژین یا نسبت ۲۳ به ۱ گلوکز به ال- آسپارژین صورت گرفت (شکل ۲). براساس نتایج به‌دست آمده در این آزمایش نیز نسبت C:N در بهترین شرایط تولید کرمیوم ۲۳:۱ بود.

در این تحقیق با استفاده از مقادیر مختلف و نسبت‌های خاصی از اجزای حاوی کربن و نیتروژن در محیط تولید کرمیوم بدون استفاده از قطعات یا عصاره چوب نارون یا اسیدهای چرب افزایش یافت.

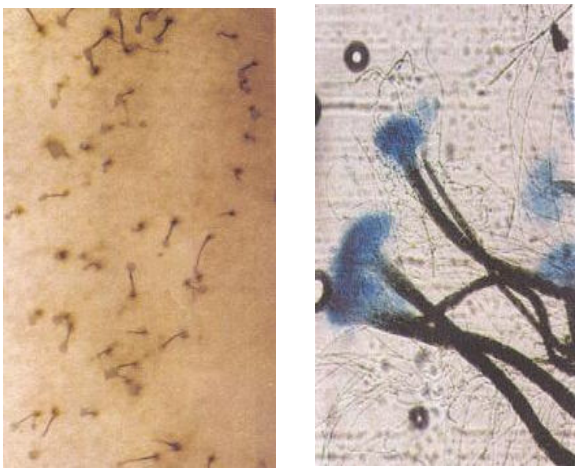
علاوه‌بر این، براساس نتایج مطالعات انجام شده میزان تولید کرمیوم بین جدایه‌های مختلف متفاوت بود به‌صورتی که جدایه‌ها از نظر تولید کرمیوم در دو گروه مجزا قرار گرفتند. در گروه اول محیط بهینه (واجد یک گرم گلوکز و نسبت ۲۳ به ۱گلوکز به ال- آسپاراژین) موجب افزایش تولید کرمیوم می‌شد. در حالی که در گروه دوم حتی در محیط بهینه تولید کرمیوم همچنان نادر بود. بررسی و مقایسه میزان تولید کرمیوم توسط جدایه‌ها با شدت بیماریزایی آنها رابطه مستقیم داشت که با آزمایش-های اخیر مورد تأیید قرار گرفت به‌طوری که جدایه‌های متهاجم در گروه یک کرمیوم فراوان تولید می‌کردند ولی جدایه‌هایی با تهاجم کمتر در گروه دو با تولید بسیار کم کرمیوم همراه بودند. میزان تجاوزگری جدایه‌ها با موقعیت جغرافیایی محل جمع‌آوری آنها ارتباطی نداشت.

طبق مطالعات انجام شده مواد تشکیل‌دهنده چوب به دلیل داشتن مقادیر بالایی از ترکیبات کربن‌دار بویژه گلوکز معمولاً نسبت بالایی از C:N دارند (فرایز، ۱۹۷۵). نسبت کربن به نیتروژن در مورد شاخه‌های چوب نارون حدود ۲٦ به ۱ می‌باشد و از آنجایی که تولید کرمیوم‌های فراوان برروی قطعات چوب نارون مشاهده می‌شود بنابراین کربن بالا و نیتروژن کم می‌تواند نقش مهمی در تولید کرمیوم جدایه‌های مختلف داشته باشد که به این نسبت در چوب نارون نزدیک‌تر می‌باشد (هیندال و مک دونالد، ۱۹۷۸). براساس مطالعات محققین دیگر، نزدیک بودن نسبت C:N محیط کشت با این نسبت در چوب نارون که محیط طبیعی رشد بیمارگر می‌باشد از عوامل مهم تحریک تولید کرمیوم توسط قارچ بوده است ولی علاوه‌بر این حضور اسیدهای چرب لینولئیک، اولئیک و آلدهیدهای آلیفاتیک نظیر هگزانال در محیط کشت نیز برای تحریک تولید کرمیوم ضروری شناخته شده بود (فرایز، ۱۹۷۵) در حالی که در این بررسی بدون نیاز به افزودن اسیدهای چرب میزان تولید کرمیوم افزایش یافت.

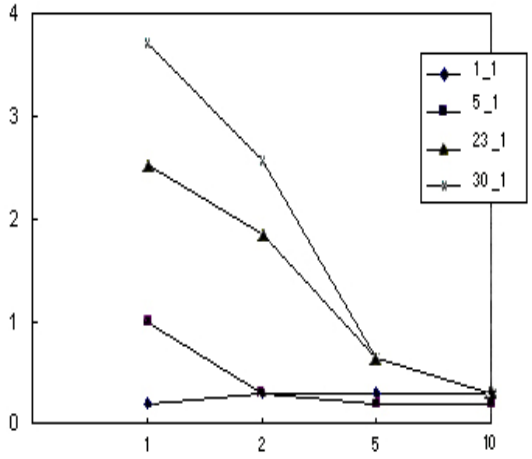
۱- بدون کرمیوم ۲- خیلی کم ۳-کم ۴- زیاد

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱- تصاویر میکروسکوپی و ماکروسکوپی از کرمیوم‌های قارچ *Pesotum ulmi* برروی محیط کشت اختصاصی.



شکل ۲- تأثیر گلوکز و نسبت گلوکز به آسپارژین پس از یک هفته در تولید کرمیوم *Pesotum ulmi*، بالاترین میزان تولید کرمیوم مربوط به نسبت ۲۳ به ۱ می‌باشد که معادله رگرسیون مربوط به آن در شکل آورده شده است

نتایج محققین در دیگر نقاط دنیا نشان می‌دهد که توانایی تولید کرمیوم در رابطه با جدایه‌های مختلف متفاوت است و جدایه‌های با قدرت بیماریزای پایین‌تر کرمیوم کمتر و جدایه‌های متهاجم کرمیوم بیشتری را برروی *Ulmus americana* L. و *Ulmus pumila* L. تولید می‌کنند (هیندال و مک دونالد، ۱۹۷۸؛ شریبر و تونسند، ۱۹۷۶). این وضعیت می‌تواند دلیلی بر گسترش محدودتر جدایه‌های با تهاجم کمتر نیز باشد زیرا توانایی بالاتر یک جدایه در تولید کرمیوم در کانال‌های سوسک پوست‌خوار *Scolytus multistriatus* که ناقل بیماری مرگ هلندی نارون است احتمال پراکنش مؤثرتر پاتوژن توسط ناقل را افزایش می‌دهد.

براساس بررسی‌های انجام شده در رابطه با شدت بیماریزایی جدایه‌های مختلف و معرفی دو گونه مجزا *Ophiostoma novo-ulmi* (گونه مهاجم) و *Ophiostama ulmi* (گونه با تهاجم کمتر) که در شرایط دمایی متفاوتی از یکدیگر تفکیک می‌شوند (کنزاد و همکاران، ۲۰۰۳) این احتمال وجود دارد که ارتباط

www.SID.ir

Archive of SID

مستقیمی بین گروه‌بندی ایجاد شده در بین ایزوله‌های مورد بررسی در این تحقیق با گونه‌های معرفی شده وجود داشته باشد و احتمالاً بتوان تشخیص دو گونه مهاجم و غیرمهاجم را براساس میزان تولید کرمیوم در محیط بهینه نیز انجام داد.

منابع

1.Afsharpour, F., and Adeli, E. 1975. Dutch elm disease in Iran and method of control. Research Institute of Forests and Steps of Iran. Tehran. p. 18.

2.Brasier, C.M. 1987. Recent genetic changes in the *Ophiostoma ulmi* populations of plant pathogens. Blackwell Scientific Publication: Oxford.PP.213-226.

3.Ebrahimi, A.Gh., and Mcnabb, H.S. 1970. Coremia production by *Ceratocystis ulmi* growing on fresh plant material. Proc. Acad. Sci. 77:19-22.

4.Fries, N. 1975. The formation of coremia in *Ceratocystis piceae* included by hexanal. Physiol. Plant. 33:138-141.

5.Geldenhuis, M., Roux, J., Montenegro, F., De Beer, Z.W., Michael, J., Wingfield, M.J., and Wingfield, B.D. 2004. Identification and pathogenicity of *Graphium* and *Pesotum* species from machete wounds on *Schizolobium parahybum* in Ecuador. Fungal diversity 15:137-151.

6.Hindal, D.F., and McDonald, W.L. 1978. Production of synnemata on defined agar media and its relation to pathogenecity of *Ceratocystis ulmi*. Phytopathol. 68:571-575.

7.Jensen, E.C., Ogg, C., and Nickerson, K.W. 1992. Lipoxygenase inhibitors shift the yeast\mycelium dimorphism in *Ceratocystis ulmi*. Applied and environmental microbial. 58: 2505-2508.

8.Konrad, H., Halmschlager, E., Stauffer, CH., and Kirisitis, T. 2003. Studies on the Dutch elm disease pathogens in Austria. Second international elm conference, Spain. p. 42.

9.Okada, G., Seifert, K.A, Takematsu, A., Yamaoka, Y., Miyazaki, S., Tubaki, K. 1998. A molecular phylogenetic reappraisal of the Graphium complex based on 18S rDNA sequences. Can J Bot 74:1495–1506.

10.Rahnama, K., Asadeh, Gh., and Salahshour. 2000. Study in occurrence of Dutch elm disease status and the future of disease in Iran. The first Asian conference on plant pathology, China. p. 49.

11.Schreiber, L.R., Townsend, A.M. 1976. Viability in aggressiveness recovery and culthral characteristics of isolates of *Ceratocystis ulmi*. Phytopathol. 66: 239-244.

www.SID.ir

Archive of SID

J. Agric. Sci. Natur. Resour., Vol. 14(1), Apr -May 2007
www.sid.ir
www.magiran.com/jasnr

The effect of glucose and amino acid L. Aspargin on asexual reproduction of the casual agent of Dutch elm disease

M. Sharbatkhari, S.E. Razavi, S.J. Saneii, K. Rahnama
Dept., of Plant protection Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources University of Gorgan

Abstract

Production of asexual bodies (coremia) by isolates of casual agent of Dutch elm disease on PDA media only is possible by adding pieces of elm twigs or twig extract with some fatty acids. Considering to the ratio of C: N in elm wood (26:1) and abundant production of coremia on it, low amount of nitrogen and high carbon have an important role on asexual reproduction. To optimize the coremia production different ratio of C: N was evaluated on media by changing the concentration of glucose and L.aspargin as a sourse of carbon and nitrogen, respectively. For this purpose seven isolates of *Ophiostoma novo-ulmi* were selected from ulmus trees in Golestan area .The basal media contained 10 gr glucose and 2 gr L.aspargin. Various proportion of C: N was provided by changing the concentration of these two substances. Results showed that decreasing of glucose and nitrogen and increasing the C: N ratio coremia productions were increased without using elm twigs or extract in presence of oleic and linoleic fatty acids in the media. Based on the quantity of coremia production the isolates were seperated into two groups. In the first group, optimization of the media caused an increase in coremia production but in the second group coremia production was scare. On the basis of two classified virulent and avirulent isolates in previous study there is a positive relation between coremia production and pathogenicity of isolates.

Keywords: Dutch elm disease; Coremia; C: N ratio

www.SID.ir