

بررسی بیماری مرگ هلندی نارون در برخی از مناطق جنگلی استان گلستان

میرمعصوم عراقی^۱، *کامران رهنما^۲، سید اسماعیل رضوی^۳ و عبدالقیوم ابراهیمی^۴

^۱ دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه گیاهپزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ^۲ دانشیار گروه گیاهپزشکی دانشگاه

علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ^۳ مربی گروه گیاهپزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ^۴ استاد گروه

گیاهپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان

تاریخ دریافت: ۸۵/۱۱/۱۴؛ تاریخ پذیرش: ۸۶/۳/۲۳

چکیده

درختان نارون مناطق جنگلی استان گلستان همچون سایر مناطق جنگلی کشور نظیر مازندران، گیلان و ارسباران در دو دهه اخیر در اثر بیماری مرگ هلندی دچار زوال شدیدی شده‌اند. به طوری که خطر انقراض دو گونه مهم نارون ملج (*Ulmus glabra* Huds.) و اوجا (*U. carpinifolia* Borkh) در این مناطق در سال‌های اخیر به شدت مطرح بوده است. به منظور بررسی بیماری مرگ نارون در طی سال‌های ۱۳۸۳ تا ۱۳۸۵ بازدیدهای مکرر از برخی مناطق جنگلی استان گلستان انجام گرفت. در این بازدیدها علائم مختلف اعم از زردی، پژمردگی، ریزش برگ‌ها، سرخشکیدگی، خشک شدن تمام یا بخشی از درختان تنومند و از همه مهمتر علائم تغذیه سوسک‌های پوستخوار (که عامل اصلی انتشار عامل بیماری هستند) به شکل خطوط برجسته یا تونل‌هایی باریک و کشیده داخل پوست تنه به وفور دیده شد. پس از نمونه‌برداری از این درختان، نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل گردیدند. نتایج بررسی‌ها حاکی از وجود عامل بیماری در اغلب مناطق یاد شده بود. بررسی‌ها نشان داد که اغلب جدایه‌های قارچ عامل بیماری متعلق به گونه جدید *Ophiostoma novo-ulmi* هستند. همچنین بررسی برخی ویژگی‌های مورفولوژیک و فیزیولوژیک جدایه‌های دو گونه *O. ulmi* و *O. novo-ulmi* نشان داد که به طور کلی جدایه‌های گونه جدید عامل بیماری مرگ نارون (*O. novo-ulmi*) با داشتن پرگنه‌هایی نواری، فیبری تا گلبرگ مانند و رشد روزانه بیشتر (متوسط ۳/۶ میلی‌متر در روز)، بهینه دمای رشدی (متوسط ۲۲-۲۰ درجه سانتی‌گراد) و وزن خشک توده زنده کمتر، از جدایه‌های گونه *O. ulmi* با متوسط رشد روزانه ۲/۵ میلی‌متر قابل تفکیک هستند. نتایج تعیین میزان درصد پژمردگی نهال‌های نارون چینی (*U. parvifolia* Jacq.) که برای اولین بار در کشور انجام گرفت نیز نشان داد که علیرغم مقاومت این گونه نسبت به برخی از جدایه‌های عامل بیماری، جدایه‌های گونه جدید *Ophiostoma novo-ulmi* عامل بیماری نیز به دلیل اختلاف معنی‌دار درصد پژمردگی و ریزش برگ‌ها از قدرت بیماری‌زایی بیشتری در مقایسه با جدایه‌های گونه *O. ulmi* برخوردار هستند.

واژه‌های کلیدی: انقراض، عامل اخیر بیماری مرگ هلندی نارون، استان گلستان، نارون، *Ophiostoma novo-ulmi*.

مقدمه

بیماری مرگ هلندی نارون در یک قرن گذشته یکی از مهمترین، زیانبارترین و مخربترین بیماری‌های آوندی این درختان در نیمکره شمالی بوده است (استییز و کامپانا، ۱۹۸۱). این بیماری تاکنون با از بین بردن میلیون‌ها درخت نارون در اروپا و آمریکای شمالی موجب بیلین‌ها دلار خسارت اقتصادی شده است (بریزیر، ۱۹۷۹؛ استییز و کامپانا، ۱۹۸۱). امکان انتشار عامل بیماری به وسیله سوسک‌های پوستخوار خانواده *Scolytidae* این بیماری را از خیلی از بیماری‌های مشابه آوندی درختان متمایز کرده است. انتشار سریع عامل بیماری به مناطق دور دست از یک سو و حساسیت ارقام مختلف نارون از سوی دیگر، به ترتیب در دهه ۱۹۱۰ و ۱۹۴۰ باعث بروز دو اپیدمی با درجات شدت مختلف شده است (بریزیر، ۱۹۷۹، ۱۹۹۰، ۱۹۹۱ و ۲۰۰۱). اپیدمی اول مربوط به گونه غیرمهاجم *Ophiostoma ulmi* با شدت بیماری‌زایی کمتر و اپیدمی بعدی مربوط به گونه مهاجم با نام *O. novo-ulmi* با شدت بیماری‌زایی بیشتر می‌باشد (بریزیر، ۱۹۹۰).

بریزیر در سال ۱۹۹۱ با اشاره به چندین تفاوت مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و مولکولی بین این نژادها، آنها را دو گونه مجزا از هم توصیف کرد. گونه غیرمهاجم با نام *O. ulmi* (Buis.) Nannf. و گونه جدید و مهاجم با نام *O. novo-ulmi* Brasier sp. nov. عامل بیماری منشأ دو گانه‌ای دارد که باعث بروز دو نژاد جغرافیایی به نام‌های نژاد اروپایی - آسیایی (اوراسیایی) و آمریکای شمالی شده است (بریزیر، ۱۹۷۹ و ۲۰۰۱). مطالعات اپیدمیولوژیکی قارچ عامل بیماری مرگ نارون نشان می‌دهد که گونه مهاجم به تدریج در طبیعت جایگزین گونه غیرمهاجم می‌شود (بریزیر، ۲۰۰۱؛ داکازا و همکاران، ۲۰۰۳؛ کونراد و همکاران، ۲۰۰۳). بریزیر با ارائه شواهدی مبنی بر امکان جریان ژنی^۱ بین

گونه‌های *O. ulmi* و *O. novo-ulmi* وجود هیبریدهای بین گونه‌ای را در طبیعت و جایگزینی^۲ تدریجی گونه *O. novo-ulmi* بجای *O. ulmi* را نشان داد. از طرفی وجود هیبریدهای درون گونه‌ای بین زیرگونه‌های *O. novo-ulmi* ssp. *novo-ulmi* و *O. novo-ulmi* ssp. *americana* از مناطق مختلف اروپا نظیر ایرلند، هلند، اسکاتلند، آلمان و ایتالیا گزارش شده است (بریزیر، ۲۰۰۱).

این بیماری نخستین بار در سال ۱۹۱۸ از شمال غرب اروپا و از کشورهای فرانسه، بلژیک و هلند گزارش شد (استییز و کامپانا، ۱۹۸۱) ولی منشأ اولیه بیماری به‌طور دقیق مشخص نیست و این مسأله خود موضوع بحث و مطالعات و تحقیقات شماری از محققین می‌باشد. اعتقاد بر اینست که این بیماری از چین منشأ گرفته و سپس طی جنگ جهانی اول به اروپا و از طریق الوارهای آلوده صادراتی به آمریکای شمالی راه پیدا کرده است (بریزیر، ۱۹۹۰).

بیماری مرگ نارون در ایران برای اولین بار در سال ۱۳۳۸ در جنگل‌های گلستان و در ارتفاعات پایینی کرفکتر و کندسکوی بر روی درختان اوجا و ملج مشاهده شد. از اولین گزارش‌های رسمی در مورد عامل بیماری و جداسازی آن می‌توان به جداسازی آن در سال ۱۳۵۰ توسط ابراهیمی و مک‌تاب از روی درختان اوجا و ملج در جنگل‌های آستارا (ابراهیمی و مک‌تاب، ۱۹۷۲)، در سال ۱۳۵۳ توسط عادل و افشارپور و در سال ۱۳۵۸ توسط افشارپور و بریزیر (۱۹۷۹) از جنگل‌های اسالم گیلان و چاچکام مازندران اشاره کرد (بریزیر، ۱۹۹۰). که البته عامل بیماری در آن زمان به گونه غیرمهاجم *O. ulmi* نسبت داده شد. رهنما و همکاران (۲۰۰۰a) از مناطق جنگلی ارسباران در آذربایجان شرقی و اردبیل گستردگی بیماری را با عامل جدید *O. novo-ulmi* برای اولین بار گزارش نمودند. این گونه جدید عامل

بیماری نه تنها باعث زوال شدید درختان نارون شده است بلکه به گونه دیگری از درختان جنگلی تیره نارون در شمال کشور به نام آزاد با نام علمی *Zelkova carpinifolia* نیز حمله کرده است (رهنما و طاهری، ۲۰۰۴). با توجه به اهمیت و شدت بیماری به‌ویژه در سالیان اخیر و عدم وجود منابع علمی کافی در کشور در مورد ویژگی‌های جدایه‌های مختلف عامل بیماری مرگ نارون، در این تحقیق سعی شده است تا علاوه بر بررسی پراکندگی عامل بیماری در برخی از مناطق جنگلی استان گلستان، برخی از ویژگی‌ها و تفاوت‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی جدایه‌های مختلف این عامل بیماری نیز تعیین شود. بدیهی است که نتایج این تحقیق و آگاهی بیشتر از خصوصیات قارچ عامل بیماری، می‌تواند در مراحل مدیریتی بیماری در آینده مثمر ثمر واقع گردد.

مواد و روش‌ها

بازدید از مناطق جنگلی استان گلستان: طی بازدیدهای مختلف از مناطق مختلف جنگلی استان گلستان نظیر پارک جنگلی دلد، توسکاستان، سوسرا و لوه‌گالیکش در بهار، تابستان و اوایل پاییز سال‌های ۱۳۸۳-۱۳۸۵ موارد بسیاری از درختان مشاهده شد که در بخشی از شاخ و برگ خود یا در تمام قسمت‌های آن نشانه‌های بیماری اعم از زردی و پژمردگی را نشان می‌دادند. پس از بررسی‌های دقیق‌تر و با مشاهده علائم داخلی که شامل خطوط قهوه‌ای حاصل از نکروز آوندی در زیر پوست بود (که معمولاً با آثار تونل تغذیه و فعالیت سوسک‌های پوستخوار ناقل بیماری همراه بود)، نمونه‌برداری از درختان انجام شد.

نمونه‌برداری از درختان مشکوک و بیمار: نمونه‌برداری از شاخه‌های بیمار در ناحیه مابین بخش خشک شده و بخش سالم که معمولاً علائم داخلی را به همراه داشت، صورت گرفت. شاخه‌ها به صورت قطعاتی به طول ۱۰-۱۵ سانتی‌متر برش داده شده و به داخل پاکت‌های نمونه‌برداری منتقل شدند. در درختان بزرگتری که نکروز

آوندی در تنه آنها ایجاد شده بود، پس از کنار زدن پوست درخت به کمک یک چاقوی جراحی، بخشی از قسمت‌های پوست که دارای علائم نکروزه بودند و نیز قسمت‌هایی از مجاور بخش‌های نکروزه شده جدا و به پاکت‌ها منتقل گردید. همچنین از درختان تنومند اعم از ملج و اوجا خشک شده‌ای که پوست آنها دارای دالان‌های سوسک‌های پوستخوار بوده نیز قطعاتی تهیه شد. 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 (یخچال) نگهداری شدند.

جداسازی عامل بیماری: برای جداسازی قارچ عامل بیماری از چوب شاخه‌های بیمار نارون ابتدا شاخه‌های جوان آلوده به بیماری به قطر حدود ۲/۵-۰/۵ سانتی‌متر و طول ۱۰-۱۵ سانتی‌متر که هنوز بافت آن خشک نشده و دارای علائم نکروز آوندی در زیر پوست هستند انتخاب شدند و پس از تقسیم به قطعات ۳-۴ سانتی‌متری به‌منظور ضدعفونی سطحی در محلول الکل اتیلیک ۷۰ درصد فرو برده شده و بلافاصله از روی شعله عبور داده شدند (بریزیر، ۱۹۸۱). سپس به کمک یک چاقوی استریل پوست آنها از چوب جدا شده و به صورت حلقه‌هایی به قطر ۳-۲ میلی‌متری برش داده شدند و سپس به کمک یک پنس سترون برش‌های چوب بر روی محیط آب - آگار ۱/۷ درصد منتقل و در انکوباتور در دمای ۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی نگهداری شدند. به محض مشاهده رشد ریشه‌ها، بخشی از ریشه‌ها به ظروف حاوی محیط کشت مالت اکسترکت آگار^۱ ۲ درصد منتقل گردیدند (بریزیر، ۱۹۹۱).

خالص سازی: از آنجا که برای بررسی‌های مختلف چه از نظر قارچ‌شناسی و چه از نظر بیماری‌زایی، خلوص جدایه‌ها مورد نیاز بود، از همه جدایه‌های به‌دست آمده تک اسپور تهیه گردید. برای این کار از روش مخطط

1- Malt Extract Agar (MEA)

شکل پرگنه جدایه‌ها: به‌منظور مقایسه شکل پرگنه جدایه‌های مختلف از محیط‌کشت مالت اکسترکت آگار استفاده شد. جدایه‌ها در ۴ تکرار و در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور نگهداری شدند. به محض ظهور پرگنه هر جدایه، شکل پرگنه آن به‌صورت کیفی توصیف گردید. پس از توصیف شکل پرگنه برای هر جدایه، جدایه‌ها از این لحاظ مورد مقایسه قرار گرفتند (بریزیر، ۱۹۸۱).

اندازه‌گیری سرعت رشد شعاعی: به‌منظور اندازه‌گیری سرعت رشد شعاعی، جدایه‌های مزبور در داخل ظروف پتری حاوی محیط‌کشت MEA کشت داده شدند و در ماه‌های ۲۰، ۲۸ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور نگهداری شدند. قطر پرگنه در هر سه تیمار دمایی، در هر روز با خط‌کش اندازه‌گیری شد و در نهایت سرعت رشد شعاعی روزانه پرگنه‌ها در هر تیمار دمایی برای همه جدایه‌ها به‌دست آمد. آزمایش از نوع فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و با ۶ تکرار انجام شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار آماری SAS و برای مقایسه میانگین بین داده‌ها نیز از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد (بریزیر و همکاران، ۱۹۸۱).

اندازه‌گیری وزن خشک توده قارچ در شرایط محیط مایع: برای انجام این آزمایش ابتدا دو حلقه ۵ میلی‌متری از هر جدایه در داخل ارلن‌های ۲۵۰ سی‌سی حاوی ۱۰۰ سی‌سی محیط مایع PDB کشت گردید (تینتر، ۱۹۹۰). سپس جدایه‌های کشت داده شده در داخل ارلن‌ها بر روی شیکر با سرعت ۷۰ دور در دقیقه و به مدت یک هفته قرار داده شد. پس از گذشت یک هفته و با استفاده از روش عصاره‌گیری با پمپ خلأ کل توده زنده تشکیل شده در داخل ارلن‌ها بر روی فیلتر چینی منتقل گردید. محصول به‌دست آمده جهت خشک کردن به‌ترتیب به مدت ۴ ساعت در داخل آون با دمای ۴۵-۴۰ درجه سانتی‌گراد و ۲۴ ساعت در داخل دسیکاتور قرار داده شد (بریزیر و همکاران، ۱۹۹۰). نهایتاً توده خشک به‌دست آمده از هر

کردن روی محیط کشت آب - آگار استفاده شد. ابتدا سوسپانسیون اسپور قارچ با استفاده از کشت جدایه‌ها در محیط مایع سیب‌زمینی دکستروز^۱ تهیه گردید. سپس یک حلقه کامل از سوسپانسیون رقیق اسپور توسط یک لوپ سیمی به‌صورت خطوط تقریباً موازی روی سطح محیط کشت آب - آگار کشیده شد. پس از ۲۴-۲۰ ساعت نگهداری ظروف پتری در دمای ۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد، به کمک یک سوزن سترون در زیر بینوکولر (استریومیکروسکوپ) اسپورهای جوانه‌زده منفرد به ظروف حاوی محیط کشت PDA منتقل شدند. سپس ظروف به‌منظور رشد قارچ در دمای ۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از آنکه از خلوص جدایه‌ها اطمینان حاصل شد، جدایه‌های خالص بر روی محیط کشت‌های MEA (ظروف پتری) و PDA (لوله آزمایشگاهی) منتقل شدند. بدین ترتیب از هر جدایه دو سری کلکسیون تهیه گردید که به‌ترتیب یکی در دمای آزمایشگاه و دیگری در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد در یخچال به‌منظور کشت پایه نگهداری شدند.

شناسایی: پس از خالص‌سازی جدایه‌ها، مشخصات ظاهری قارچ، حالت پرگنه و نیز مشخصات میکروسکوپی مراحل مختلف اسپورزایی اعم از مرحله اسپوروتریکس^۲ و پسونوم قارچ مورد بررسی قرار گرفته و با منابع قارچ‌شناسی موجود و نیز جدایه‌های استاندارد موجود (Ou3، Onu3 و Onu6) تطبیق داده شدند (بریزیر، ۱۹۸۱). برای اطمینان نهایی جدایه‌ها بر روی محیط کشت MEA ۲ درصد حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم آنتی‌بیوتیک سیکلوهگزامید کشت داده شدند. در مرحله بعدی با دست داشتن جدایه‌های تیپیک و بررسی یکسری مشخصات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی، گونه جدایه‌های مزبور تعیین گردید (بریزیر، ۱۹۹۱؛ بریزیر و کیرک، ۲۰۰۱).

- 1- Potato Dextrose Broth (PDB)
- 2- Sporothrix
- 3- Pesotum

جدایه با ترازوی حساس وزن شده و داده‌های به‌دست آمده با آزمون دانکن مورد مقایسه آماری قرار گرفتند.

اثبات بیماریزایی و تعیین درصد پژمردگی: آزمون اثبات بیماریزایی و تعیین درصد پژمردگی قارچ مزبور نیز با استفاده از دو گونه قارچ *O. ulmi* و *O. novo-ulmi* بر روی نهال‌های دو ساله نارون چینی انجام شد. در این آزمایش برای هر گونه قارچ ۳ جدایه و برای هر جدایه و نمونه شاهد نیز ۴ تکرار در نظر گرفته شد. درصد پژمردگی نهال‌ها پس از ۱۰ هفته با شمارش برگ‌های پژمرده و ریزش کرده (اسمولی و گوریس، ۱۹۹۳؛ سانتینی و همکاران، ۲۰۰۲) در مقایسه با نهال‌های شاهد تعیین و داده‌های نهایی با آزمون دانکن مورد مقایسه آماری قرار گرفتند. آزمون مربوطه از نوع فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد.

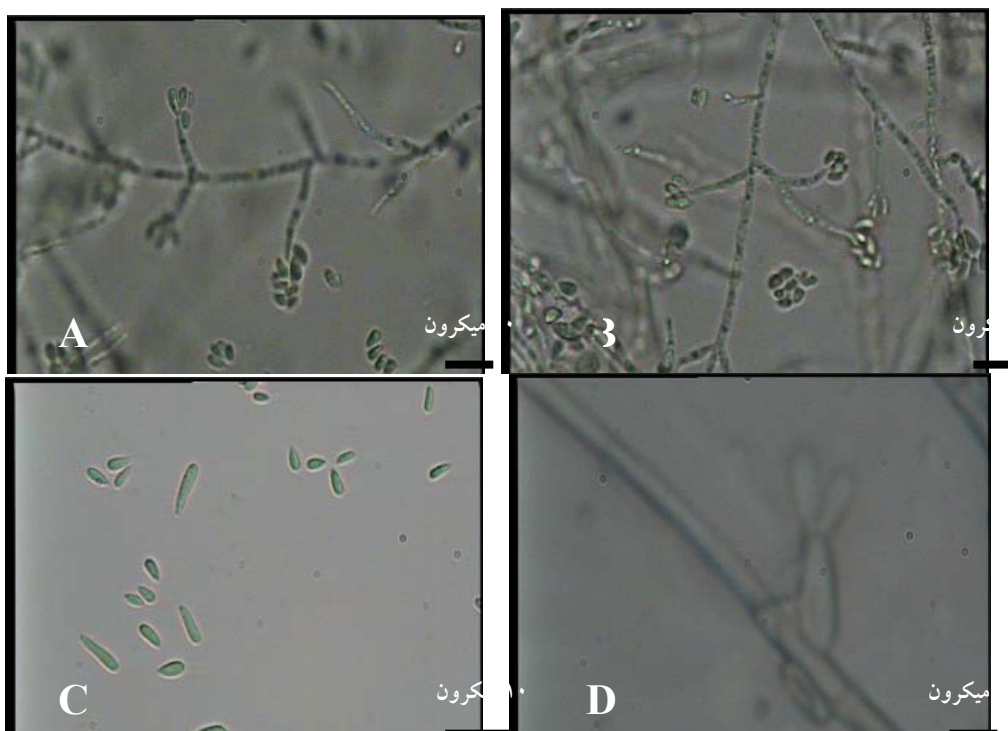
تهیه سوسپانسیون اسپور قارچ: برای تهیه سوسپانسیون اسپور قارچ از محیط‌کشت مایع PDB استفاده شد. پس از تهیه محیط کشت‌های سترون، دو حلقه ۵ میلی‌متری از میسلیم رشد یافته به همراه بلوک آگار، از حاشیه پرگنه‌های ۷ روزه هر جدایه از محیط‌کشت MEA در شرایط سترون به داخل آنها انتقال یافت و سپس محیط‌های مزبور بر روی یک دستگاه شیکری که با سرعت ۷۰ دور در دقیقه در حال چرخش بود قرار داده شدند تا کنیدی‌زایی صورت گیرد. پس از گذشت ۶ روز محیط‌کشت‌های واجد کنیدی‌های قارچ از درون کاغذ صافی سترون بر روی قیف خلأ عبور داده شدند تا کنیدی‌های قارچ از میسلیم‌های آن جدا گشته و در ظرف سترون زیر قیف جمع‌آوری شوند. سپس به‌منظور جداسازی نهایی کنیدی‌ها از سایر اجزاء محلول، ۳ مرتبه و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ صورت گرفت. سپس سوسپانسیون غلیظ حاصل جهت رسیدن به رقت نهایی حدوداً 10×10^6 کنیدی در هر میلی‌لیتر، توسط لام هموسیستمتر شمارش اسپور شد و بعد

به دفعات لازم عمل رقیق‌سازی انجام گردید. در نهایت سوسپانسیون اسپور حاصل جهت انتقال به گلخانه و عمل مایه‌کوبی بر روی نهال‌های نارون، داخل ارلن‌های سترون در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری شدند.

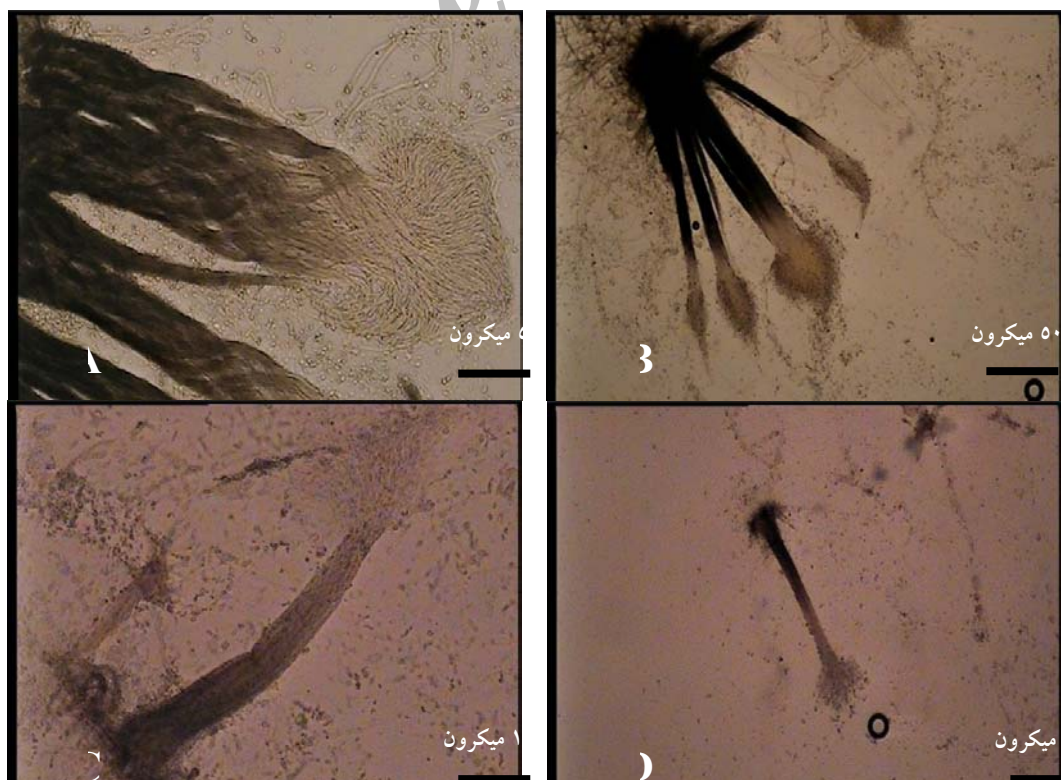
مایه‌زنی نهال‌های نارون چینی در گلخانه: پس از تهیه سوسپانسیون جدایه‌های قارچ عامل بیماری در آزمایشگاه، سوسپانسیون حامل اسپور جهت انجام مایه‌زنی به گلخانه منتقل شد. مایه‌کوبی نهال‌ها با استفاده از یک چاقوی جراحی استریل و با ایجاد یک شکاف کوچک عرضی مماس با مقطع آوندی در پوست نهال‌ها صورت گرفت و در هر بار مایه‌کوبی مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپور با استفاده از یک سرنگ ۵ سی‌سی روی لبه چاقو قرار داده شد تا جذب بافت آوندی شود (سوترلند و همکاران، ۱۹۹۵). مایه‌کوبی نهال‌ها از دو ناحیه صورت گرفت. مایه‌کوبی اول از ناحیه انشعاب اولین شاخه از پایین ساقه و مایه‌کوبی دوم به فاصله ۲۰ سانتی‌متری از آن انجام شد. محل زخمی شده پس از مایه‌کوبی با نوار پارافیلیم بسته شد. نهال‌ها در خاک کمپوست داخل گلدان‌های پلاستیک در شرایط گلخانه در دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. آبیاری گلدان‌ها نیز هر دو روز یکبار (با کاهش رطوبت خاک گلدان‌ها) تا پایان دوره آزمایش انجام گرفت.

نتایج

به‌طور کلی از مجموع بیش از ۳۰ مورد نمونه‌برداری شده ۶ جدایه از قارچ عامل بیماری مرگ نارون جداسازی گردید. تمامی جدایه‌ها توان تولید فرم اسپوروتریکس را بر روی محیط‌های کشت دارا بودند. همچنین برخی جدایه‌ها توان تولید سینما^۱ را در روی محیط‌کشت‌های بکار رفته نشان دادند (شکل‌های ۱ و ۲). همچنین تمامی جدایه بر روی محیط کشت حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم سیکلوهگزامید رشد کردند.



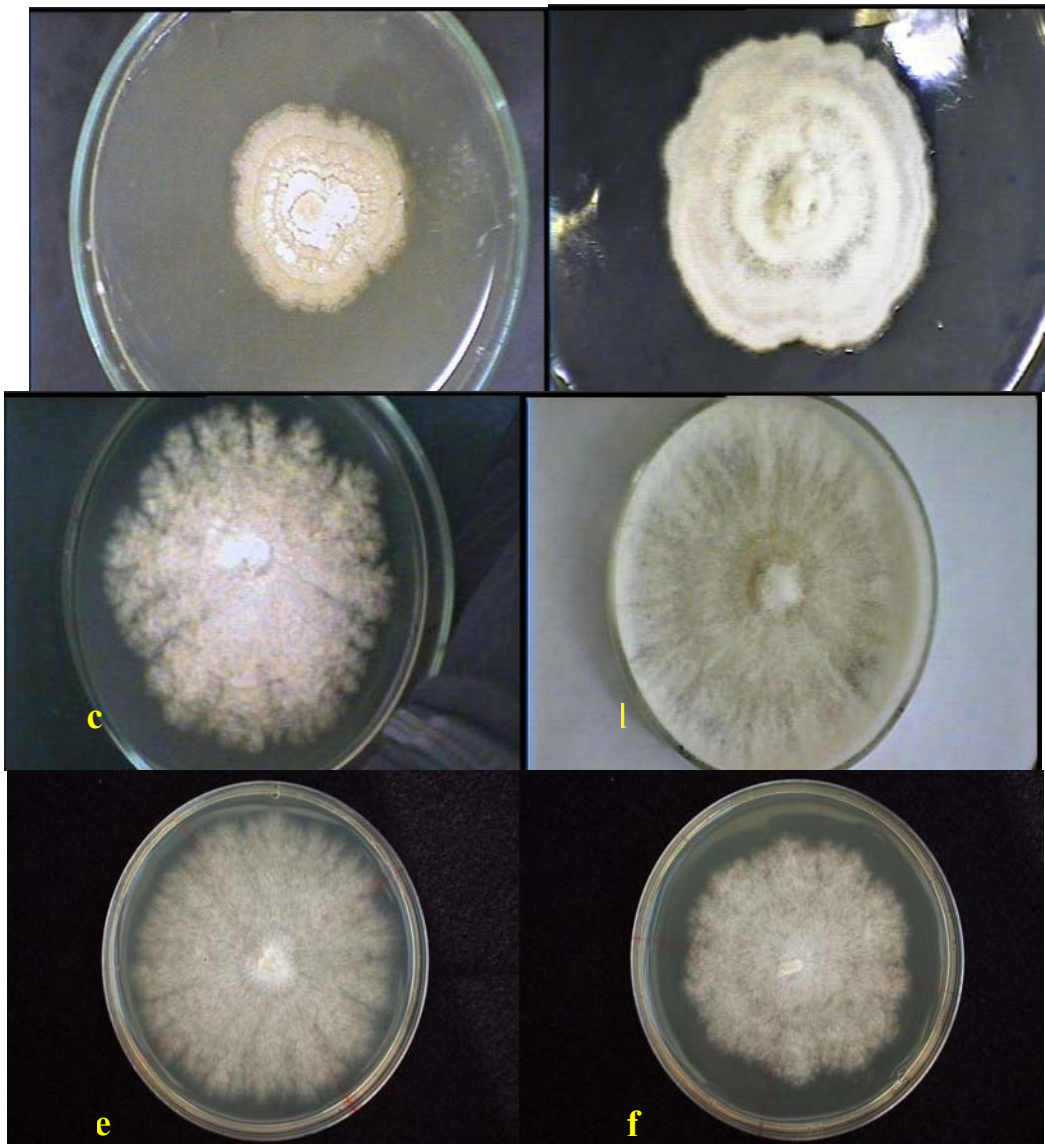
شکل ۱- فرم "Sporothrix" جدایه‌های مختلف عامل بیماری مرگ هلندی نارون بر روی محیط کشت PDA: A: میسلیم و انشعابات ساده و کوتاه (کنیدیوفور) حاوی اسپوره‌های فرم "Sporothrix" جدایه B. Onu1: میسلیم و انشعابات ساده و کوتاه (کنیدیوفور) حاوی اسپوره‌های فرم "Sporothrix" جدایه C. Onu4: ابعاد مختلف کنیدی‌های فرم "Sporothrix" جدایه D. Ou2: دو اسپور فرم "Sporothrix" بر روی کنیدیوفور کوتاه جدایه Ou2.



شکل ۲- اندام کورمیوم (سینما) جدایه‌های عامل بیماری مرگ هلندی نارون در محیط کشت PDA پس از ۲۵ روز. A - B مربوط به جدایه Onu3 و C-D مربوط به جدایه Onu2.

جدایه‌های مهاجم با داشتن رشد روزانه زیاد (متوسط ۳/۶ میلی‌متر در روز)، پرگنه‌های گلبرگ مانند، نواری و فیبری، از جدایه‌های غیرمهاجم قابل تفکیک می‌باشند. شکل ۳ تنوع فرم پرگنه را در جدایه‌های عامل بیماری نشان می‌دهد.

مطالعه شکل پرگنه جدایه‌های مهاجم و غیرمهاجم عامل بیماری بر روی محیط کشت MEA ۲ درصد در ۲۰ درجه سانتی‌گراد نشان داد که جدایه‌های گونه *O. ulmi* دارای پرگنه‌های نسبتاً صاف و نرم تا چمنی با میسلیم‌های نسبتاً یکنواخت و با رشد روزانه ضعیف (متوسط ۲/۵ میلی‌متر در روز) و کم می‌باشند در حالی که



شکل ۳- تنوع فرم پرگنه در جدایه‌های عامل بیماری مرگ نارون: a و b به ترتیب جدایه‌های *Ou1* و *Ou2* مربوط به گونه *Ophiostoma* c - f *ulmi* به ترتیب جدایه‌های *Onu1*، *Onu2*، *Onu4* و *Onu5* گونه *Ophiostoma novo-ulmi* بر روی محیط کشت مالت اکسترکت آگار ۲ درصد.

سرعت رشد شعاعی روزانه جدایه‌های عامل بیماری بر روی محیط کشت MEA در ۳ دمای ۲۰، ۲۸ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد، به‌منظور تفکیک جدایه‌های مهاجم و غیرمهاجم، در آزمایشگاه محاسبه شد. مقایسه آماری داده‌ها نشان داد که جدایه‌های مهاجم گونه *O. novo-ulmi* در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد و جدایه‌های غیرمهاجم گونه *O. ulmi* در دمای ۲۸ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد در مقایسه با همدیگر سرعت رشد روزانه بیشتری دارند. در ۲۰ درجه سانتی‌گراد جدایه‌های مهاجم با متوسط سرعت رشد روزانه ۳/۶ میلی‌متر در مقایسه با جدایه‌های غیرمهاجم با سرعت رشد روزانه ۲/۵ میلی‌متر، اختلاف معنی‌داری دارند. از طرفی جدایه‌های غیرمهاجم نیز در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به‌طور معنی‌داری سرعت رشد روزانه بیشتری را در مقایسه با جدایه‌های مهاجم از خود نشان دادند. در ۲۸ درجه سانتی‌گراد نیز علیرغم وجود سرعت رشد روزانه نسبتاً زیاد جدایه‌های غیرمهاجم در مقایسه با جدایه‌های مهاجم، اختلاف چندان معنی‌داری در بین اغلب جدایه‌ها مشاهده نشد (جدول ۱). اندازه‌گیری وزن خشک جدایه‌های دو گونه مهاجم و غیرمهاجم نشان داد که جدایه‌های غیرمهاجم نسبت به

جدایه‌های مهاجم میزان توده زنده کمتری تحت شرایط یکسان در محیط مایع تولید می‌کنند. به‌طورکلی نتایج آزمایش نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین وزن خشک جدایه‌های مهاجم و غیرمهاجم وجود دارد. در این میان جدایه *Ou1* مربوط به گونه غیرمهاجم *O. ulmi* با ۲۷۴/۲۵ و جدایه *Onu3* مربوط به گونه مهاجم *O. novo-ulmi* با ۲۴۴ میلی‌گرم به‌ترتیب بیشترین و کمترین میزان وزن خشک را در میان جدایه‌ها داشتند (جدول ۲).

نتایج تعیین درصد پژمردگی نشان داد که بین جدایه‌های مختلف از دو گونه قارچ عامل بیماری مرگ نارون مورد استفاده در این آزمایش اختلاف معنی‌دار وجود دارد، به‌طوری‌که جدایه *Ou1* مربوط به گونه غیرمهاجم *O. ulmi* با ۱ درصد و جدایه *Onu3* مربوط به گونه مهاجم *O. novo-ulmi* با ۲۵ درصد به‌ترتیب کمترین و بیشترین پژمردگی را بر روی نهال‌ها باعث شدند. نتایج نشان داد که جدایه‌های مربوط به گونه جدید *O. novo-ulmi* به مراتب شدت پژمردگی و برگ‌ریزی بیشتری را در مقایسه با جدایه‌های گونه *O. ulmi* ایجاد می‌کنند (جدول ۳).

جدول ۱- بررسی مقایسه سرعت رشد شعاعی پرگنه جدایه‌های قارچ عامل بیماری مرگ هلندی نارون در ۳ تیمار دمایی ۲۰، ۲۸ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد بر روی محیط کشت MEA ۲ درصد.

اندازه‌گیری (میلی‌متر بر روز) * دما (سانتی‌گراد)			جدایه***
۳۵	۲۸	۲۰	
۰/۶۲ ^a	۳/۰۹ ^b	۲/۴۹ ^c	<i>Ou1</i> ****
۰/۴۹ ^b	۳/۳ ^a	۲/۲۵ ^d	<i>Ou2</i>
۰/۴۹ ^b	۳/۰۵ ^b	۲/۶۲ ^c	<i>Ou3</i>
۰/۰۵ ^c	۲/۹۳ ^b	۳/۷ ^{ab}	<i>Onu1</i>
۰/۰ ^c	۲/۹ ^b	۳/۶ ^{ab}	<i>Onu2</i>
۰/۰ ^c	۲/۹ ^b	۳/۴۳ ^b	<i>Onu3</i>
۰/۰۷ ^c	۳/۰ ^b	۳/۶۳ ^{ab}	<i>Onu4</i>
۰/۰ ^c	۲/۶۷ ^c	۳/۷ ^a	<i>Onu5</i>
۰/۰ ^c	۲/۶۷ ^c	۳/۸ ^a	<i>Onu6</i>

دانکن (۵ درصد)

* هر عدد میانگین ۶ تکرار می‌باشد.

** حروف غیر مشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.

*** جدایه‌های *Ou1-3* مربوط به گونه غیرمهاجم *Ophiostoma ulmi* و جدایه‌های *Onu1-6* مربوط به گونه مهاجم *O. novo-ulmi* می‌باشند.

**** جدایه‌های *Ou3*، *Onu3* و *Onu6* جزء جدایه‌های استاندارد می‌باشند.

جدول ۲- بررسی میزان وزن خشک توده قارچی جدایه‌های عامل بیماری مرگ نارون یک هفته پس از کشت در محیط مایع PDB.

جدایه****	میانگین وزن خشک (میلی‌گرم) ± خطای استاندارد
Ou1	274/25 ± 19 ^{***}
Ou2	270/25 ± 26 ^{ab}
Ou3	266 ± 27 ^{abc}
میانگین کل	270/17A*
Onu1	252 ± 21 ^{abc}
Onu2	254/5 ± 23 ^{abc}
Onu3	244 ± 14 ^c
Onu4	247 ± 14 ^{bc}
Onu5	251 ± 12 ^{abc}
Onu6	253/5 ± 2 ^{abc}
میانگین کل	250/34B
دانکن (5 درصد)	

* هر عدد میانگین 4 تکرار می باشد، **حروف غیر مشابه بزرگ نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار دو گروه *Ophiostoma ulmi* و *O. novo-ulmi* در سطح احتمال 5 درصد می باشد، ***حروف غیر مشابه کوچک نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار همه جدایه‌ها در سطح احتمال 5 درصد می باشد. ****جدایه‌های Ou1-3 مربوط به گونه غیر مهاجم *Ophiostoma ulmi* و جدایه‌های Onu1-6 مربوط به گونه مهاجم *O. novo-ulmi* می باشند.

جدول ۳- بررسی میزان پژمردگی نهال‌های نارون چینی در برابر عامل بیماری مرگ نارون پس از گذشت 10 هفته از مایه‌زنی.

جدایه	پژمردگی (درصد)*
Ou1***	1 ^{***c}
Ou2	6 ^{cd}
Ou3	2 ^{de}
Onu1	11 ^b
Onu2	10 ^{bc}
Onu3	25 ^a
دانکن (5درصد)	

* هر عدد میانگین 4 تکرار می باشد، **حروف غیر مشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال 5 درصد می باشد. ***جدایه‌های Ou1-3 مربوط به گونه غیر مهاجم *Ophiostoma ulmi* و جدایه‌های Onu1-3 مربوط به گونه مهاجم *O. novo-ulmi* می باشند.

جدول ۴- مقایسه کلی برخی از ویژگی‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی مورد استفاده برای تفکیک جدایه‌های دو گونه *Ophiostoma ulmi* و *Ophiostoma novo-ulmi*.

<i>Ophiostoma novo-ulmi</i>	<i>Ophiostoma ulmi</i>	مشخصات
نواری و فیبری تا گلبرگ مانند و ناصاف و با رشد روزانه زیاد	صاف، نرم تا چمنی و با رشد روزانه ضعیف	مورفولوژیکی
		شکل پرگنه جدایه‌ها بر روی محیط MEA*
		فیزیولوژیکی
		نرخ رشد شعاعی بر روی محیط کشت MEA (میلی متر در روز) در:
3/4-3/8	2/4-2/6	20 درجه سانتی‌گراد
2/7-2/96	2/9-3/26	28 درجه سانتی‌گراد
0/0-0/07	0/49-0/7	35 درجه سانتی‌گراد
کمتر (244-254/5)	بیشتر (266-274/25)	وزن خشک توده قارچ در محیط مایع PDB** (میلی‌گرم)
با شدت بیشتر	با شدت کمتر	میزان بیماری‌زایی روی نارون چینی (درصد پژمردگی و ریزش برگ):
10-25 درصد	1-6 درصد	نهال‌های 2 ساله

* محیط کشت مالت اکسترکت آگار، ** محیط کشت مایع سیب‌زمینی دکستروز

بحث

و ظاهری اعلام کردند که از میان جدایه‌های به‌دست آمده، براساس آزمایش‌های دمایی و شکل پرگنه، تنها ۳۰ درصد مربوط به گونه غیرمهاجم می‌باشد و این نشان از جایگزینی تدریجی عامل بیماری با گونه و نژاد مهاجم‌تر در کشور دارد. این مسأله با توجه به نتایج این پژوهش و مقایسه با نتایج گذشته که همواره از این قارچ با عنوان *O. ulmi* یاد شده است (بریزیر و افشارپور، ۱۹۷۹) می‌تواند اثبات شود. جایگزینی گونه غیرمهاجم با گونه مهاجم تنها به ایران محدود نمی‌شود و در سایر نقاط دنیا نیز به اثبات رسیده است. در تحقیقی که اخیراً در اسپانیا انجام شد، مقایسه‌ای بین میزان پراکندگی و نوع عامل بیماری‌گر روی نارون در بین سال‌های ۱۹۸۶ و ۲۰۰۲ به عمل آمد. ۱۱۰ جدایه از ۱۵ ناحیه در سال ۲۰۰۲ جداسازی شد. براساس اندازه‌گیری سرعت رشد در دو دمای ۲۰ و ۳۳ درجه سانتی‌گراد و مورفولوژی پرگنه، ۴ جدایه مربوط به *O. ulmi*، ۱۰۴ جدایه مربوط به گونه *O. novo-ulmi* و دو جدایه ناشناخته تشخیص داده شدند. بدین ترتیب نتایج نشان داد که تنها ۳/۷ درصد از جدایه‌ها مربوط به گونه قدیمی یعنی *O. ulmi* است در حالی که در سال‌های ۱۹۸۷-۱۹۸۶ این گونه حدود ۴۳/۷ درصد از جدایه‌ها را تشکیل می‌داد و این نشان از جایگزینی تدریجی گونه مهاجم‌تر به جای گونه غیرمهاجم می‌باشد (داکازا و همکاران، ۲۰۰۳). در آزمایش مشابهی که جهت بررسی میزان پراکندگی و نوع عامل بیماری‌گر در اتریش (مرکز اروپا: منطقه‌ای که احتمال وقوع هیبریدهای طبیعی زیاد است) انجام شد، جمعاً ۱۵۱ جدایه از مناطق مختلف این کشور جداسازی شد. بررسی سرعت رشد جدایه‌ها در دو دمای ۲۰ و ۳۳ درجه سانتی‌گراد و نیز شکل پرگنه جدایه‌ها نشان داد که به استثناء یک جدایه بقیه جدایه‌ها مربوط به گونه *O. novo-ulmi* می‌باشند. از بین ۹۹ جدایه مزبور نیز ۶۶ جدایه مربوط به زیرگونه *O. novo-ulmi ssp. novo-ulmi* و ۳۳ جدایه مربوط به زیر گونه *O. novo-ulmi ssp. americana* هستند. مقایسه این جدایه‌ها با جدایه‌های قدیمی‌تر از

طی بازدیدهایی که به‌منظور بررسی پراکندگی بیماری مرگ نارون در مناطق مختلف جنگلی استان گلستان نظیر جنگل لوه، توسکاستان، دلند و سوسرا، از درختان خشکیده، آلوده و مشکوک به آلودگی به‌عمل آمده و نمونه‌برداری گردید، ۶ جدایه مختلف قارچ عامل بیماری مرگ نارون مربوط به دو گونه قارچی *Ophiostoma ulmi* و *Ophiostoma novo-ulmi* جداسازی و خالص‌سازی گردید. با توجه به نتایج به‌دست آمده از جداسازی جدایه‌های عامل بیماری از این مناطق (علیرغم جداسازی کم عامل بیماری از تمام مناطق مورد بازدید به واسطه شرایط آب و هوایی گرم در زمان‌های نمونه‌برداری) و با توجه به بازدیدها از این مناطق و مشاهده نهال‌های بسیار تنومند که سال‌ها پیش خشکیده و به‌عنوان منبع اولیه و اصلی پراکندگی عامل بیماری در این مناطق به شمار می‌روند و مهمتر از همه وجود گونه جدید *O. novo-ulmi* نتیجه گرفته شد که بیماری در اغلب مناطق استان وجود دارد. اگرچه یکی از دلایل اپیدمی شدن، وجود سوسک پوستخوار کوچک نارون به نام *Scolytus multistriatus* می‌باشد که آثار آن در اکثر نمونه‌برداری‌ها مشهود بوده است که با توجه به دامنه قدرت پروازی آنها می‌توان وضعیت گسترده عامل بیماری و خشکیدگی درختان را به گونه جدید فوق نسبت داد. ضمن اینکه درختان جنگلی تنومند به این گونه جدید قارچ *O. novo-ulmi* حساسیت بیشتری دارند (بریزیر، ۱۹۹۱؛ بریزیر و کیرک، ۲۰۰۱). این نتایج اگرچه به‌علت عدم وجود اطلاعات کافی در منابع کشور مبنی بر چگونگی تغییرات جمعیتی این دو گونه در طول سالیان گذشته قابل ارجاع به اطلاعات و منابع گذشته نیست ولی نتایج محققین اخیر در این زمینه تا حدی این مسأله را تأیید می‌کند (رهنما و همکاران، ۲۰۰۰b؛ رهنما و ظاهری، ۲۰۰۴). مطالعات اپیدمیولوژیکی قارچ عامل بیماری مرگ نارون نشان می‌دهد که گونه مهاجم به تدریج در طبیعت جایگزین گونه غیرمهاجم می‌شود (بریزیر، ۲۰۰۱). رهنما

همان مناطق نشان از جایگزینی گونه مهاجم به جای گونه قدیمی و غیرمهاجم داشت (کونراد و همکاران، ۲۰۰۳). در این بررسی مطالعه شکل پرگنه جدایه‌های مهاجم و غیرمهاجم عامل بیماری برروی محیط‌کشت MEA ۲ درصد نشان داد که جدایه‌های گونه غیرمهاجم *O. ulmi* عمدتاً دارای پرگنه‌های نسبتاً صاف و نرم تا چمنی با میسلیم‌های نسبتاً یکنواخت و پر پشت با رشد روزانه ضعیف و کم می‌باشند در حالی که جدایه‌های مهاجم *O. novo-ulmi* با داشتن رشد روزانه زیاد، پرگنه‌های گلبرگ مانند، نواری و فیبری، از جدایه‌های غیرمهاجم قابل تفکیک هستند (شکل ۳). نتایج این تحقیق در کار بسیاری از محققین دیگر نیز به اثبات رسیده است (استییز و کامپانا، ۱۹۸۱؛ بریزیر، ۱۹۸۱؛ همکاران، ۱۹۸۱؛ رهنما و طاهری، ۲۰۰۴). مطالعه شکل پرگنه جدایه‌های مهاجم و غیرمهاجم عامل بیماری برروی محیط‌کشت MEA ۲ درصد نشان داد که گونه غیرمهاجم دارای پرگنه‌های نسبتاً صاف و نرم تا چمنی یکنواخت و با رشد روزانه ضعیف و کم می‌باشند در حالی که جدایه‌های مهاجم با داشتن رشد روزانه زیاد، پرگنه‌های گلبرگ مانند، نواری و فیبری (نژاد آمریکای شمالی) و یا کمتر نواری و گلبرگ مانند، اغلب چندجزئی (لخته لخته) و ناهموار (نژاد اوراسیایی) از جدایه‌های *O. ulmi* قابل تفکیک می‌باشند (بریزیر، ۱۹۸۱) در تحقیق دیگری جدایه‌های زیرگونه *O. novo-ulmi ssp. americana* دارای شکل پرگنه فیبری و نواری منظم و مشخص بوده در حالی که در جدایه‌های زیرگونه *O. novo-ulmi ssp. novo-ulmi* حالت نواری و فیبری به خوبی واضح و مشخص نبوده و پرگنه حالت ناصاف و غیرمنظمی داشت (بریزیر و همکاران، ۱۹۸۱). اما نتایج بررسی‌های پرگنه‌های جدایه‌های ایرانی در طول سالیان مختلف و از مناطق مختلف نشان‌دهنده تنوع بسیار زیادی است که در جدایه‌های ایرانی نمایان است (رهنما و طاهری، ۲۰۰۴) که مورد تأیید نتایج این تحقیق نیز می‌باشد.

نتایج به دست آمده از آزمایش‌های دمایی جدایه‌های مربوط به دو گونه *O. ulmi* و *O. novo-ulmi* در سه دمای ۲۰، ۲۸ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد نشان داد که جدایه‌های گونه *O. novo-ulmi* در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد بیشترین و در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد کمترین میزان سرعت رشدی را به ترتیب با ۳/۸-۳/۴ و ۰/۰-۰/۰۷ میلی‌متر در روز دارا بوده و از این نظر به‌طور معنی‌داری با جدایه‌های گونه غیرمهاجم *O. ulmi* که در دمای ۲۰ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد به ترتیب سرعت رشد روزانه معادل ۲/۷-۲/۲۵ و ۰/۶۲-۰/۴۸۳ میلی‌متر دارند، اختلاف دارند. به عبارت دیگر جدایه‌های مهاجم *O. novo-ulmi* خنک‌پسندتر از جدایه‌های *O. ulmi* بوده و در دماهای پایین‌تر سرعت رشد بیشتری دارند. این نتایج در کار بسیاری از محققین نیز به چشم می‌خورد (بریزیر، ۱۹۸۱؛ بریزیر و همکاران، ۱۹۹۰). اما در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد اگرچه سرعت رشد روزانه جدایه‌های *O. ulmi* نسبت به جدایه‌های *O. novo-ulmi* بیشتر است ولی به‌طور کلی از نظر آماری اختلاف معنی‌داری بین جدایه‌های این دو گونه وجود ندارد. بسیاری از محققین در تفکیک جدایه‌های مهاجم و غیرمهاجم نیز از دو دمای ۲۰ و ۳۳ درجه سانتی‌گراد استفاده کرده‌اند (استییز و کامپانا، ۱۹۸۱؛ بریزیر و همکاران، ۱۹۸۱ و تگلی، ۱۹۹۴). نتایج این تحقیق نیز نشان می‌دهد که دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد اگرچه به احتمال زیاد می‌تواند بهینه دما برای رشد جدایه‌های غیرمهاجم باشد ولی دمای مناسبی برای تفکیک جدایه‌های دو گونه *O. ulmi* و *O. novo-ulmi* نمی‌باشد، هر چند که در ترکیب با نتایج سایر گروه‌های دمایی می‌تواند مفید باشد. در تحقیقی توانایی رشد جدایه‌های مهاجم و غیرمهاجم در دو دمای ۲۰ و ۳۳ درجه سانتی‌گراد نشان داد که میانگین رشد شعاعی روزانه پرگنه جدایه‌های غیرمهاجم در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد در مقایسه با جدایه‌های مهاجم دو نژاد (زیرگونه) اوراسیایی و آمریکای شمالی کمتر است. میانگین رشد شعاعی روزانه برای

گونه *O. ulmi* (غیرمهاجم) در این دما ۳/۱-۲، حداقل ۱/۵ و حداکثر ۳/۵ میلی‌متر، برای زیرگونه *O. novo-ulmi* و حداکثر ۴/۸ میلی‌متر و برای زیرگونه *O. novo-ulmi* *ulmi* ssp. *novo-ulmi* (نژاد اوراسیایی) ۴/۴-۳/۱ و حداکثر ۴/۸ میلی‌متر و برای زیرگونه *O. novo-ulmi* *americana* ssp. *americana* ۳/۲-۴/۸ و حداکثر ۵/۵ میلی‌متر اندازه‌گیری شد، در حالی که میانگین رشد روزانه برای قارچ *O. ulmi* در دمای ۳۳ درجه سانتی‌گراد ۲/۸-۱/۱ میلی‌متر و برای دو نژاد اوراسیایی و آمریکای شمالی گونه *O. novo-ulmi* به ترتیب ۰/۱-۰/۵ و ۰/۱-۰/۵ میلی‌متر محاسبه گردید (بریزیر و همکاران، ۱۹۸۱) که به‌طورکلی نتایج حاصل از این آزمایش نیز با نتایج حاصل از این تحقیق همخوانی دارد. در آزمایشی مشابه بهینه دمای رشدی برای دو گونه *O. ulmi* و *O. novo-ulmi* به ترتیب ۲۲ و ۲۸ درجه سانتی‌گراد محاسبه شد. بریزیر و همکاران پیشنهاد کردند که احتمالاً گونه جدید *O. novo-ulmi* در مقایسه با گونه *O. ulmi* بیشتر به شرایط معتدل و نیمه سردسیری اروپا و آمریکای شمالی سازگاری داشته باشد (بریزیر، ۲۰۰۱). به‌طورکلی مقایسه نتایج این آزمایش با سایر محققین نشان می‌دهد که جدایه‌های مهاجم جداسازی شده نسبت به جدایه‌های مشابه اروپایی یا آمریکای شمالی گرما پسندتر می‌باشند و این مسأله با توجه به موقعیت جغرافیایی ایران در مقایسه با کشورهای اروپایی و آمریکای شمالی و اقلیم گرم و مرطوب تا خشک استان گلستان در مقایسه با اروپا و آمریکا می‌تواند مورد تأیید قرار بگیرد.

نتایج حاصل از تعیین میزان درصد پژمردگی و برگریزی نهال‌های نارون چینی مایه‌کوبی شده با جدایه‌های دو گونه قارچ مهاجم و غیرمهاجم عامل بیماری مرگ نارون در شرایط گلخانه‌ای نشان داد که جدایه‌های مهاجم شدت بیماری‌زایی بیشتری نسبت به جدایه‌های غیرمهاجم دارند و وجود اختلاف معنی‌دار در میزان بیماری‌زایی بین جدایه‌های گونه مهاجم *O. novo-ulmi* و *O. ulmi* بر روی نهال‌های ۲ ساله نارون چینی بیانگر این مسأله می‌باشد. نتایج حاصله در کار اغلب محققین به اثبات رسیده است. در تحقیقی میزان بیماری‌زایی جدایه‌های مهاجم و غیرمهاجم عامل بیماری مرگ نارون مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که جدایه‌های مهاجم زیرگونه *O. novo-ulmi* ssp. *americana* با ۱۰۰-۸۰ درصد برگریزی روی نهال‌های ۴ ساله نارون انگلیسی (*U. procera*) بیشترین و جدایه‌های غیرمهاجم گونه *O. ulmi* با ۳۵-۱۰ درصد کمترین میزان برگریزی را از خود نشان دادند (بریزیر و کیرک، ۲۰۰۱). اما نکته قابل توجه در این تحقیق امکان پژمردگی نهال‌های نارون چینی می‌باشد که در تمام منابع خارجی از این نهال در زمره نادر درختان با مقاومت بسیار بالا یاد شده است (اسمولی و گوریس، ۱۹۹۳). اگرچه نتایج حاصل با در نظر گرفتن مقدار و غلظت مایه تلقیح اولیه بکار رفته و سن نهال‌های استفاده شده، در مقایسه با تحقیقات و نتایج مشابه در دیگر گونه‌های مقاوم و

گونه *O. ulmi* (غیرمهاجم) در این دما ۳/۱-۲، حداقل ۱/۵ و حداکثر ۳/۵ میلی‌متر، برای زیرگونه *O. novo-ulmi* و حداکثر ۴/۸ میلی‌متر و برای زیرگونه *O. novo-ulmi* *ulmi* ssp. *novo-ulmi* (نژاد اوراسیایی) ۴/۴-۳/۱ و حداکثر ۴/۸ میلی‌متر و برای زیرگونه *O. novo-ulmi* *americana* ssp. *americana* ۳/۲-۴/۸ و حداکثر ۵/۵ میلی‌متر اندازه‌گیری شد، در حالی که میانگین رشد روزانه برای قارچ *O. ulmi* در دمای ۳۳ درجه سانتی‌گراد ۲/۸-۱/۱ میلی‌متر و برای دو نژاد اوراسیایی و آمریکای شمالی گونه *O. novo-ulmi* به ترتیب ۰/۱-۰/۵ و ۰/۱-۰/۵ میلی‌متر محاسبه گردید (بریزیر و همکاران، ۱۹۸۱) که به‌طورکلی نتایج حاصل از این آزمایش نیز با نتایج حاصل از این تحقیق همخوانی دارد. در آزمایشی مشابه بهینه دمای رشدی برای دو گونه *O. ulmi* و *O. novo-ulmi* به ترتیب ۲۲ و ۲۸ درجه سانتی‌گراد محاسبه شد. بریزیر و همکاران پیشنهاد کردند که احتمالاً گونه جدید *O. novo-ulmi* در مقایسه با گونه *O. ulmi* بیشتر به شرایط معتدل و نیمه سردسیری اروپا و آمریکای شمالی سازگاری داشته باشد (بریزیر، ۲۰۰۱). به‌طورکلی مقایسه نتایج این آزمایش با سایر محققین نشان می‌دهد که جدایه‌های مهاجم جداسازی شده نسبت به جدایه‌های مشابه اروپایی یا آمریکای شمالی گرما پسندتر می‌باشند و این مسأله با توجه به موقعیت جغرافیایی ایران در مقایسه با کشورهای اروپایی و آمریکای شمالی و اقلیم گرم و مرطوب تا خشک استان گلستان در مقایسه با اروپا و آمریکا می‌تواند مورد تأیید قرار بگیرد.

نتایج آزمایش اندازه‌گیری توده زنده جدایه‌های دو گونه *O. ulmi* و *O. novo-ulmi* نشان داد که به‌طورکلی جدایه‌های *O. novo-ulmi* نسبت به جدایه‌های *O. ulmi* مقادیر بیشتری توده زنده در داخل محیط مایع PDB تولید می‌کنند. این نتایج در کار بسیاری از محققین دیگر نظیر بریزیر و همکاران (۱۹۸۱)، جنگ و همکاران (۱۹۸۸) به اثبات رسیده است. مطالعات بریزیر و همکاران (۱۹۹۰) بر روی ۳۰ جدایه مهاجم و غیرمهاجم نشان داد که، متوسط میزان توده زنده برای جدایه‌های

بیماری مرگ نارون در سطح فضای سبز در کشور و جایگزینی به جای گونه‌های حساس مانند نارون چتری در شهرهایی همچون تهران و اصفهان و در حال انقراض نظیر اوجا و ملج و به‌ویژه بکارگیری آن در برنامه‌های اصلاح نارون، به‌منظور دستیابی به نهال‌های هیبرید با مقاومت بسیار مطلوب، می‌تواند مؤثر واقع شود.

سپاسگزاری

بدینوسیله از کلیه همکاران گروه گیاهپزشکی و تحصیلات تکمیلی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان که امکانات لازم جهت این تحقیق را فراهم نمودند، صمیمانه تشکر می‌شود. همچنین از اداره کل منابع طبیعی شهرستان گرگان، بخش حمایت و حفاظت جنگل داری و به‌ویژه جناب آقای مهندس خلیلی که در تهیه وسیله نقلیه و شناسایی عرصه درختان جنگلی جهت نمونه‌برداری کمک قابل توجه‌ای نمودند تشکر می‌شود. از آقای رحیمی کارشناس محترم دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان که در تهیه نهال‌های نارون چینی از گلخانه دانشگاه همکاری صمیمانه‌ای داشته‌اند نویسنندگان مقاله تشکر شایسته‌ای دارند.

به‌ویژه هیبرید بکار گرفته شده در برنامه‌های اصلاح نارون در سایر نقاط دنیا مغایرتی نمی‌تواند داشته باشد، اما این تحقیق برای اولین بار در کشور نشان داد که گونه نارون چینی نیز همانند بسیاری از نارون‌های دیگر امکان آلودگی و حتی پژمردگی را در اثر هجوم نژادهای با توان بیماری‌زایی بیشتر عامل بیماری مرگ نارون دارد، چنانچه این موضوع در مورد نارون‌های سیبریایی (*U. pumila* L.) که در دهه ۱۹۳۰ و با شیوع فرم مهاجم‌تر بیماری در اروپا به جای گونه‌های حساس موجود آن زمان کاشته و در سال‌های بعد نسبت به نژادهای جدید بیماری حساسیت نشان دادند، نیز مشاهده شد (استیپز و کامپانا، ۱۹۸۱). بنابراین با در نظر گرفتن وجود نژادهای مختلفی از این عامل بیماری در کشور و احتمال وجود نژادهای دیگر با توجه به شرایط اپیدمیولوژیکی و جغرافیایی ایران و با توجه به شناسایی شدت بالای بیماری‌زایی جدایه‌های مهاجم عامل بیماری مرگ نارون که در موارد بسیاری از مناطق شهری و جنگلی ایران و به‌ویژه در این تحقیق به اثبات رسیده است، بنابراین لزوم انجام اقدامات اساسی در جهت مبارزه با عاملین و ناقلین بیماری مرگ نارون در کشور بیش از گذشته توصیه می‌شود. در این میان استفاده از این گونه نارون چینی، به‌عنوان گونه‌ای مقاوم نسبت به

منابع

1. Brasier, C.M. 1979. Dual origin of recent Dutch elm disease outbreaks in Europe. *Nature*. 281: 78-79.
2. Brasier, C.M. 1981. Laboratory investigation of *Ceratocystis ulmi*. In: R. J. Stipes and R.J. Compana (eds.). *Compendium of Elm Disease*. APS. Press., 76-79.
3. Brasier, C.M. 1990. China and the origin of Dutch elm disease an appraisal. *Plant Pathology*. 39:5-16.
4. Brasier, C.M. 1991. *Ophiostoma novo-ulmi* sp. Nov., Causative agent of current Dutch elm disease pandemics. *Mycopathologia*. 115:151-161.
5. Brasier, C.M. 2001. Rapid evolution of introduced plant pathogens via interspecific hybridization. *Bioscience*., 51(2): 123-133.
6. Brasier, C.A., and Afsharpour, F. 1979. The aggressive and non-aggressive strains of *Ceratocystis ulmi* (Buisman) C. Moreau in Iran. *Res. Eur. J. of For. Pathol.* 99, 113-122.
7. Brasier, C.M., and Kirk, S.A. 2001. Designation of the EAN and NAN races of *Ophiostoma novo-ulmi* as subspecies. *Mycol. Res.* 105(5): 547-554.
8. Brasier, C.M., Lea, J., and Rawlings, M.K. 1981. The aggressive and non-aggressive strains of *Ceratocystis ulmi* have different temperature optima for growth. *Transactions of British Mycological Society*., 76 : 213-18.
9. Brasier, C.M., Takai, S., Nordin, J.H., and Richards, W.C. 1990. Differences in Cerato-ulmin production between the EAN and NAN and nonaggressive subgroups of *Ophiostom ulm*. *Pl. Pathol.*, 39: 231-236.

10. Dacasa, M.C., Solla, A., Lopez, D., Buron, M., Sanchez, G., and Gill, L. 2003. Identification of *Ophiostoma* sp. isolates sampled in Spain between 1986 and 2002. In Proceeding: The Second International Elm Conference. Valsain, Segovia, Spain. p.44.
11. Ebrahimi, A., and McNab, H. 1972. Growth of fungus *Ceratocystis ulmi* causal agent of decline "Dutch Elm Disease" in forest areas of Austria on stem of various plants. Iranian J. of Pests and Plant Disease, 32; 26-30.
12. Jeng, R.S., Brenier, L., and Brasier, C.M. 1988. A comparative study of cultural and electrophoretic characteristics of the Eurasian and North American races of *Ophiostoma ulmi*. Can. J. Bot., 66:1325-1333.
13. Konrad, H., Halmschlager, E., Stauffer, CH., and Kiristts, T. 2003. Studies on the Dutch disease pathogens in Austria. In Proceedings: The Second International Elm Conference. Valsain, Segovia, Spain. p 42.
14. Rahnama, K. 2003. Incidence of Dutch elm disease in new area of natural forest and urban trees of Iran. In: Proceeding of the Second International Elm Conference. Valsain, Segovia, Spain. 34pp.
15. Rahnama, K., and Taheri, A.H. 2004. Distribution of Dutch elm disease pathogens, aggressive and non-aggressive isolates in Iran. Canadian Journal of Plant Pathology, Symposium supplement. 26:121-126.
16. Rahnama, K., Asadeh, Gh., and Salahshour, M. 2000. Study in occurrence of "Dutch Elm Disease" current status and the future of disease in IRAN. In Proceeding: The first Asian Conference on Plant Pathology. China Agricultural Sciencetech Press. 49p.
17. Rahnama, K., Asadeh, Gh., Salahshour, M., Arab Nejjad, A., and Ebrahimi, A. 2000. Importance and distribution of Dutch elm disease, strategies for protecting and prevention of elm trees decline in Golestan Forest National Park. In: Proceeding of the Second Conference on the Potentials of Golestan Province progress, Gorgan University. of Agricultural Sciences and Natural Resources, (In Persian Language). 5: 2-12.
18. Santini, A., Fagnani, A., Ferrini, F., and Mittempergher, L. 2002. "San Zanobi" and "Plinio" Elm Trees. Hortscience. 37(7): 1139-1141.
19. Smalley, E.B., and Guries, R.P. 1993. Breeding elms for resistance to Dutch elm disease. Ann. Rev. Phytopathol., 31; 325- 352.
20. Stipes, R.J., and Compana, R.J. 1981. Compendium of elm disease. APS. Press. Pp 96.
21. Sutherland, M.L., Mittempergher, L., and Brasier, C.M. 1995. Control Dutch Elm disease by induced host resistance. Eur. J. For. Path. 25, 307-318.
22. Tainter, F.H. 1990. *Ceratocystis*. In: L.L. Singleton, J., Mihail and C.M. Rush (eds.),. Methods for research on soilborn phytopathogenic fungi. APS Press. Minnesota., 55-59.
23. Tegli, S., Comparini, C., Giannetti, C., and Scala, A. 1994. Effect of temperature on growth and cerato-ulmin production of *Ophiostoma novo-ulmi* and *O. ulmi*. Mycol. Res. 98(4): 408-412.

Investigation on "Dutch Elm Disease" in some forest areas of Golestan province.

M.M. Iraqi¹, *K. Rahnama², S.I. Razavi³ and A. Ebrahimi⁴

¹Former M.Sc. student, Dept. of Plant Protection, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran, ²Associate Prof, Dept. of Plant Protection, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran, ³Instructor, Dept. of Plant Protection, Gorgan University, of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran, ⁴Prof., Dept. of Plant Protection, Islamic Azad University of Gorgan, Iran

Abstract

Forest elm trees of Golestan province such as; Mazandaran, Guilan and Arasbaran forests, have been declined by causal agent "Dutch Elm Disease" during the last two decade. Since the decline damage of *Ulmus glabra* Huds. and *U. carpinifolia* Borkh., the two important elms, had been reported during the recent years, in order to investigate "Dutch Elm Disease", some of Golestan forest areas were continuously inspected during the years 2004-2006. In this inspections, different symptoms such as; yellows, wilt, defoliation, dieback, complete or partial decline and, more important than all, feeding symptoms of bark beetles, the only source of pathogen transmission, on trees' bark were observed, frequently. Samples were transferred to laboratory. The results indicated, that the causal fungus exists in predominance of areas. In this study, *Ophiostoma novo-ulmi* isolates showed the highest frequency. Investigating some of morphological and physiological characteristics, between *O. ulmi* and *O. novo-ulmi* also proved, that most isolates of *O. novo-ulmi* have; striate, fibrous to petaloid colony with more daily growth rate (3.6 mm/day), fewer optimal growth temperature (20-22° C) and dry weight of biomass distinguished from *O. ulmi* with mean daily growth rate (2.5 mm/day). The results of estimating seedlings wilt percent of Chinese elm, *U. parvifolia* Jasq., first times carried out in Iran, indicated, *O. novo-ulmi* isolates are more pathogenic than *O. ulmi* in spite of fact that this tree showed significantly higher relative resistance against the fungal pathogenic isolates.

Keywords: Decline; Current Dutch Elm Disease; Golestan province; Elm; *Ophiostoma novo-ulmi*.

* - Corresponding Author; Email: Kamran_ra@yahoo.com