مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی
جلد پانزدهم، شماره چهارم، ۱۳۸۷
www.jasnr.info
www.sid.ir
www.magiran.com/jasnr

# بررسی هیستوپاتولوژی در دو گونه نارون اوجا و ملج مایه زنی شده با قارچ *Ophiostoma novo-ulmi*

***میرمعصوم عراقی[۱]، کامران رهنما[۲]، معصومه مصطفی[۳] و مرتضی مرندی[۴]**

[۱] دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد گروه گیاهپزشکی، [۲] دانشیار گروه گیاهپزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،
[۳] دانشجوی کارشناسی‌ارشد گروه گیاهپزشکی دانشگاه صنعتی اصفهان، [۴] دانشجوی کارشناسی‌ارشد گروه علوم و صنایع چوب و کاغذ
دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ دریافت: ۸۶/۳/۱۶ تاریخ پذیرش: ۸۷/۱/۲۸

## چکیده

بیماری هلندی نارون یکی از مهم‌ترین بیماری‌های آوندی نارون محسوب می‌شود. به‌همین دلیل بررسی جنبه‌های مختلف این بیماری نظیر پراکنش، بیولوژی، بیماری‌زایی، هیستوپاتولوژی، مدیریت بیماری و غیره همواره اهمیت فراوان داشته است. در این راستا بررسی رابطه پاتوژن- میزبان، این تحقیق با عنوان بررسی هیستوپاتولوژی در دو گونه نارون اوجا *Ulmus carpinifolia* و ملج *U. glabra* در اثر مایه‌زنی با قارچ *Ophiostoma novo-ulmi* انجام شد. به‌محض ظهور علائم پژمردگی و خشکیدگی شاخ و برگ نهال‌ها، ۸-٤ هفته پس از مایه‌کوبی، مقاطعی از قسمت‌های پایین شاخه‌های پژمرده و خشکیده تهیه گردید. پس از برش‌های عرضی بسیار نازک با دستگاه میکروتوم و انجام دادن مراحل مختلف رنگ‌آمیزی، اسلایدهای میکروسکوپی از آنها تهیه شد. نتایج بررسی‌های میکروسکوپی نشان داد که عامل بیماری با گسترش و ایجاد انسداد در آوندهای چوبی و تخریب عناصر آوندی در فیزیولوژی گیاه میزبان اختلال ایجاد می‌کند. همچنین عامل بیماری مانع انتقال جریان شیره آوندی شده و به پژمردگی اندام‌های هوایی منجر می‌شود. نتایج نشان داد که نهال‌ها نیز تولید تایلوز و مواد ژلاتینی باعث انسداد آوندها شده و از گستردگی پاتوژن جلوگیری به عمل می‌آورند. مکانیسم‌های بیماری‌زایی و دفاعی در تعامل بین پاتوژن- میزبان و نقش آنها در میزان حساسیت نهال‌های اوجا و ملج به بیماری مرگ هلندی نارون در این تحقیق بحث شده است.

***واژه‌های کلیدی:*** بیماری مرگ هلندی نارون، هیستوپاتولوژی، اوجا، ملج و *Ophiostoma novo-ulmi*

*- مسئول مکاتبه: iraqi602@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

## مقدمه

گیاهان خانواده نارون با بیش از ۱۵۰ گونه اعم از درخت و درختچه بیشتر در نواحی معتدلهٔ شمالی و مناطق گرمسیری پراکنده‌اند. در حدود ۱۳٦ میلیون اصله نارون با بیش از ۱۰ سانتی‌متر قطر تنه در مناطق شهری و حومه شهرها در شش قارّه برآورد شده است که به‌نظر می‌رسد بیش از ۹۵ درصد آنها در اروپا، آمریکای شمالی و آسیا پراکنده شده باشند. علاوه بر آن میلیون‌ها اصله درخت نیز در سرتاسر دنیا در جلگه‌ها و کنارهٔ رودخانه‌ها و جنگل‌ها وجود دارند که قابل شمارش نیست و نباید آنها را از نظر دور داشت (آرکیرو و موریس، ۱۹۸۲). ایران نیز یکی از مناطقی است که برخی گونه‌های نارون در آن گسترش دارد ولی نقشه دقیقی از تعداد و پراکندگی آن در دست نیست. در ایران بیشتر دو گونه نارون دیده می‌شود. اولی اوجا (*Ulmus carpinifolia* Gled.) که در جنگل‌های شمال و در جلگه‌های ساحلی خزر تا ارتفاعات میانبند و نیز از گرگان تا ارسباران انتشار دارد و در نقاط استپی و در جنگل‌های غرب نیز دیده می شود و دیگری به نام ملج (*U. glabra* Huds.) که در ارتفاعات متوسط و فوقانی جنگل‌های شمال از ارسباران و آستارا و طالش تا کجور و مازندران و گرگان امتداد دارد (ثابتی، ۱۹۹۹) که هر دو گونه مذکور حساسیت زیادی به عامل بیماری مرگ نارون دارند (استیپز و کامپانا،۱۹۸۱؛ عراقی و رهنما، ۲۰۰۷). البته درختان نارون در طبیعت به‌صورت هیبریدهای بین گونه‌ای نیز دیده می‌شوند. این گونه‌های هیبرید می‌توانند مقاوم یا حساس به عامل بیماری باشند. بنابراین برخی مواقع درختانی را به‌صورت اکوتیپ‌هایی می‌توان یافت که ظاهراً عاری از بیماری هستند و از دوره حساسیت و یا بحرانی در برابر بیماری عبور کرده‌اند ولی از نظر بافت‌شناسی دلایل مقاومت به بیماری در این دسته از درختان دقیقاً مشخص نیست. از طرفی منابع علمی اشاره کرده‌اند که شرایط مکانی، آب و هوایی و عرض جغرافیایی نیز تأثیر معنی‌داری در غلظت شیره گیاهی و وضعیت تشکیل شدن بافت‌های آوندی به‌خصوص در کلون‌های نارون دارد (سینکلر و کامپانا، ۱۹۷۸؛ استیپز و کامپانا، ۱۹۸۱).

بیماری هلندی نارون یکی از مهم‌ترین بیماری‌های آوندی نارون می‌باشد که به‌صورت اپیدمی در سرتاسر دنیا منتشر شده است (سولا و جیل، ۲۰۰۳). این بیماری برای اولین بار در برخی مناطق جنگلی استان گلستان بر روی درختان اوجا و ملج مشاهده شد و بعد در بقیّهٔ نواحی گسترش یافت (رهجو و همکاران،۲۰۰۰؛ عراقی و همکاران، ۲۰۰۷).

این بیماری تاکنون با از بین بُردن میلیون‌ها درخت نارون در اروپا و آمریکای شمالی موجب بیلیون‌ها دلار خسارت اقتصادی شده‌است (عراقی و همکاران، ۲۰۰۸). اگرچه عامل بیماری را برای اولین بار در سال ۱۳۳۸ شریف از استان گلستان گزارش داد (شربتخواری و همکاران، ۲۰۰۷)، ولی میزان دقیقی از خسارات این بیماری برآورد نشده است. براساس مسیریابی‌های به‌عمل آمده در کشور تا به‌حال حدود یک میلیون درخت نارون اوجا و ملج در طی چهل سال گذشته بر اثر این بیماری از بین رفته‌اند. بر طبق آمار سال‌های ۱۳۵۰ تا ۱۳۵۱ و ارزش اقتصادی بسیار بالایی که چوب و الوار درختان مزبور دارند، حدود چهار درصد حجم تجارتی جنگل‌های شمال را درختانی از گونه‌های ملج و اوجا تشکیل می‌دادند، اما امروزه به دلیل گسترش بیماری و زوال، حدود کمتر از یک درصد از این حجم تجاری به گونه‌های ملج و اوجا تعلق دارد (رهنما ، ۲۰۰۳). به‌دلیل اهمیت بسیار زیاد بیماری مزبور تاکنون جنبه‌های مختلف این بیماری نظیر پراکنش، بیولوژی، بیماری‌زایی، هیستوپاتولوژی و مدیریت آن بررسی شده است. در این میان بررسی تعامل پاتوژن _ میزبان و هیستوپاتولوژی درختان نارون در راستای شناخت بهتر از نحوه عملکرد پاتوژن و میزبان در برابر یکدیگر همواره از موضوعات مهم و جالب توجه بوده است. به‌طوری که نتایج حاصل می‌تواند در امر مدیریت بیماری کارآمد باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

از این رو در تحقیق حاضر رابطه عامل بیماریزا-میزبان و بررسی هیستوپاتولوژی دو گونه نارون اوجا و ملج در اثر مایه‌زنی با قارچ *Ophiostoma novo-ulmi* انجام شد.

## مواد و روش‌ها

مایه‌زنی نهال‌های ۲ ساله نارون اوجا *Ulmus carpinifolia* و ملج *U. glabra* در اواخر خرداد سال ۱۳۸۵ انجام شد. برای این منظور از روش عراقی و رهنما (۲۰۰۷) استفاده گردید. بدین‌ترتیب که پس از ایجاد یک شکاف کوچک روی ساقه نهال‌ها با چاقوی جراحی سترون، مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپور $10^6$ x ۱ میلی‌لیتر جدایه Onu1 گونه قارچی *Ophiostoma novo-ulmi* به‌وسیله یک سرنگ زیرپوستی ۵ میلی‌لیتر روی چاقو قرار داده شد. این سوسپانسیون بلافاصله به درون چوب کشیده شد. سپس محل مایه‌زنی شده به مدت ۲ روز با پارافیلم بسته شد.

۸-٤ هفته پس از مایه‌زنی نهال‌ها و ظهور علایم ظاهری از جمله پژمردگی برگ‌ها و خشکیدگی سرشاخه‌ها، نمونه‌هایی به‌طور تصادفی از قسمت‌های ۱۵-۱۰ سانتی‌متری بالاتر از محل مایه‌زنی شده تهیه و برای مطالعات میکروسکوپی به آزمایشگاه تشریح و تشخیص میکروسکوپی چوب و کاغذ واقع در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل گردید. با توجه به اینکه چوب‌های مذکور جزء چوب‌های سخت محسوب می‌شوند قطعات به‌دست آمده به‌منظور نرم شدن برای برش‌برداری، به‌مدت ۲-۱ ساعت در آب پخته و سپس به‌صورت قطعات کوچک ۵-۲ سانتی‌متری برش داده شدند. نهایتاً برش‌های میکروسکوپی با ضخامت ۱۵-۱۰ میکرومتر با استفاده از یک میکروتوم تنه لغزنده از نوع ریچرت[1] با تیغه از نوع AO به‌دست آمدند (پارسا پژوه و شواین گروبر، ۲۰۰۱). در این آزمایش از تعدادی نهال سالم مایه‌کوبی شده با آب مقطر سترون نیز به‌عنوان شاهد استفاده شد. پس از تهیه مقاطع، رنگ‌آمیزی نمونه‌ها بر اساس روش پارسا پژوه و شواین گروبر (۲۰۰۱) و به‌ترتیب زیر انجام گرفت:

**مراحل رنگ‌آمیزی مقاطع:** قرار دادن مقاطع به مدت ۳۰-۱۵ دقیقه در محلول آب ژاول ۵ درصد

شستشوی برش‌ها با آب‌مقطر به‌نحوی که بوی این محلول کاملاً از بین برود

قرار دادن برش‌ها در سافرانین ۱ درصد به مدت ۵-۳ دقیقه

شستشو با آب مقطر سترون

شستشوی برش‌های رنگ‌آمیزی شده در الکل ۵۰ درصد

شستشوی برش‌ها در الکل ۷۵ درصد

شستشوی برش‌ها در الکل ۹٦ درصد ۳-۲ مرتبه به‌منظور حذف ماده رنگی اضافی

قرار دادن مقاطع در داخل محلول زایلول به‌منظور شفاف‌سازی و خشک‌شدن مقاطع

قرار دادن مقاطع بر روی لام حاوی یک قطره چسب کانادا بالزام به‌منظور تهیه اسلاید دائم

## نتایج و بحث

پژمردگی نارون‌های آلوده به بیماری به‌طور مشخصی در نتیجه واکنش متقابل بین متابولیت‌های قارچی و درخت میزبان می‌باشد (شفر و استروبل، ۱۹۸۸). به‌طور کلی برای پژمردگی، زرد شدن و دیگر علائم بیماری مکانیسم‌های متعددی گزارش شده است. پژمردگی ممکن است یا به دلیل عدم توانایی سلول‌های ساقه و برگ در حفظ و نگهداری آب و یا در اثر عدم توانایی گیاه در تأمین آب از دست‌رفته سلول‌ها در اثر تبخیر باشد. اولین حالت ممکن است در اثر تخریب غشاءهای سلولی که منجر به تراوش آب به بیرون از سلول می‌شود ایجاد گردد. هر چند تغییر در متابولیسم نیتروژن نیز در نارون‌های بیمار مشاهده شده، ارتباط آن با علائم بیماری تاکنون درک نگردیده است (دوچسن و همکاران، ۱۹۹٤). مک‌هارد و بک‌من (۱۹۷۳) از انتقال در جریان تبخیر

1- Reichert

Archive of SID

www.SID.ir

به‌عنوان مکانیسمی برای پژمردگی در بیماری مرگ نارون یاد کرده است. چنین اختلالی ممکن است در اثر افزایش ویسکوزیتهٔ مایع آوندچوبی، انسداد منافذ آوندی با صمغ‌های تولید شده، انسداد مجاری آوندی با تایلوزها در اثر ترشح آنزیم‌های قارچی، تخریب و انهدام ستون آوندی، انسداد منافذ غشاءها توسّط ماکرومولکول‌های دارای منشأ پاتوژن یا میزبان و یا تلفیقی از این مکانیسم‌ها به‌وجود آید (کئولّت و ریوکس، ۱۹۹۲).

تغییر رنگ عناصرآوندی در برش عرضی نهال‌های مایه‌زنی شده با عامل بیماری مرگ نارون دیده شد (شکل ۱). علائم داخلی بیماری به‌صورت خطوط قهوه‌ای ناپیوسته در محل آوندهای چوبی بهاره (خارجی‌ترین حلقهٔ رشد سالانه)، دقیقاً در زیرپوست شاخه‌های بیمار پدیدار می‌شود و از مهم‌ترین علائم ماکروسکوپی بیماری است (سینکلر و کامپانا، ۱۹۷۸). در مواردی که بیماری پیشرفت کرده باشد، تغییر رنگ آوندی را با کنار زدن پوست درخت و مشاهدهٔ خطوط تیره یا قهوه‌ای منقطع می‌توان مشاهده نمود (استیپز و کامپانا، ۱۹۸۱). حمله قارچ عامل بیماری عمدتاً با افزایش ترکیبات فنولی در گیاه همراه است. این ترکیبات که عمدتاً از طریق سلول‌های پارانشیمی در اطراف آوندهای چوبی وارد این عناصر می‌شوند علاوه بر اینکه رنگ آوند را تغییرمی‌دهند، به‌دلیل سمی‌بودن از گسترش عامل بیماری جلوگیری می‌کنند (گاگنون، ۱۹٦۷؛ کلایدون و همکاران، ۱۹۷٤؛ کئولّت و ریوکس، ۱۹۹۲). ترکیبات فنولی در واقع ماکرومولکول‌هایی هستند که در اثر فعالیت آنزیم‌های پرواکسیداز در آوندها اکسیده می‌شوند (گاگنون، ۱۹٦۸) و سپس پلیمریزه شده و پیگمان‌های قهوه‌ای را تشکیل می‌دهند (گاگنون، ۱۹٦۷). به‌نظر می‌رسد که ترکیبات فنولیک با ایجاد تنش آبی در گیاه از طریق رطوبت‌پذیرکردن دیواره‌های آوندها، در خروج آب از آوندها و سیستم انتقال آن اختلال ایجاد می‌کند. اگرچه تولید ترکیبات فنولیک معمولاً بخشی از مکانیسم دفاعی میزبان است، قارچ عامل بیماری مرگ نارون نیز قادر است ترکیبات فنولی مشابهی را تولید کند ( سینکلر و کامپانا، ۱۹۷۸).

وجود عامل بیماری در شکل ۲ نشان از استقرار و انتشار آن در آوندهای آلوده دارد. اسپورها به‌محض ورود به آوندها تکثیرشده و آزادانه و به‌سرعت به‌سمت بخش‌های فوقانی میزبان حرکت می‌کنند ولی حرکت به پائین آنها آهسته‌تر صورت می‌گیرد (سینکلر و کامپانا، ۱۹۷۸). در راستای جوانه‌زدن اسپورهای قارچی، لوله‌های تندشی به داخل سوراخ‌های غشایی آوندی رسوخ می‌کنند و قارچ مجدداً در عنصر بالایی اسپورزایی می‌کند. سپس جریان تعرّق این اسپورهای ثانویّه را به‌سمت بالا حمل می‌کند تا به مانع بعدی برسند و دوباره فرآیند مزبور تکرار گردد. علاوه بر حرکت اسپورها و رشد قارچ در آوندها به موازات درخت، قارچ با نفوذ انشعابات میسلیومی از طریق منافذی که بر سطوح غشایی آوندها وجود دارد، به آوندهای مجاور منتشر شده و به‌این ترتیب آلودگی بر روی حلقهٔ آوندی چوب بهاره پیشرفت می‌کند (استیپز و کامپانا، ۱۹۸۱). انتشار اسپورها و میسلیوم قارچ عامل بیماری که رابطه مستقیمی با میزان حساسیت گونه‌های مختلف نارون به این بیماری دارد، با یک‌سری از عوامل آناتومیکی و فیزیولوژیکی گیاه در ارتباط است. یکی از جنبه‌های آناتومیکی که می‌تواند بر پیشرفت بیماری خیلی موثّر باشد اندازه و ابعاد عناصر آوندی است. طول و ضخامت آوندها به‌طور مستقیم با توانایی آوندها در هدایت گاز و آب یا اسپورهای قارچی و نیز حساسیّت درختان در ارتباط می‌باشد. گونه‌هایی از نارون نظیر نارون آمریکایی که آوندهایی با قطر زیاد دارند، نسبت به گونه‌هایی همچون نارون سیبریایی که دارای آوندهایی با قطر و ضخامت کمترند، حساسیّت بیشتری در برابر بیماری نشان می‌دهند ( سینکلر و همکاران، ۱۹۷۵؛ سولا و جیل، ۲۰۰۲). علاوه بر ابعاد آوندها، دیگر جنبه‌های ساختمانی آنها نیز می‌تواند حرکت اسپورها را در آوندها تحت تأثیر قرار دهد. طبق مشاهداتی که با میکروسکوپ الکترونی انجام گرفته مشخّص شده که

Archive of SID

www.SID.ir

سطوح داخلی دیوارهٔ آوندها در برخی گونه‌ها دارای زوائد زگیل مانند هستند که این ناهمواری‌ها می‌تواند در تسریع حرکت اسپورها ممانعت ایجاد کنند. سوراخ‌های غشای آوندی نیز که با جلوگیری از عبور حباب‌های هوا برای سیستم انتقال آب، مانند سوپاپ‌های اطمینان عمل می‌کنند، به مانند یک میکروفیلتر از انتشار و عبور اسپورهای قارچی از آوندی به آوند دیگر جلوگیری می‌نمایند (استیپز و کامپانا، ۱۹۸۱) بنابراین انتشار سریع قارچ در سرتاسر گیاه به توانایی قارچ در رشد و عبور از این منافذ و تولید اسپورهایی که بتوانند آزادانه عبور کنند، بستگی دارد. از آنجایی که در نارون‌های مقاوم آوندها ابعاد کوچکتری دارند، بنابراین قارچ باید از تعداد منافذ بیشتری عبور نماید (سولا و جیل، ۲۰۰۲). همچنین نارون‌های مقاوم دارای گروه‌های کوچک‌تری از دستجات آوندی هستند که توسّط بافت پارانشیمی از یکدیگر جدا شده‌اند و از گسترش جانبی عامل بیماری‌زا جلوگیری می‌کنند (الجرسما، ۱۹۷۰؛ سولا و جیل، ۲۰۰۲).

تخریب و تغییرات دیواره‌های عناصر آوندی از دیگر نتایج بررسی مقاطع آلوده به قارچ عامل بیماری بود (شکل ۳). براساس مطالعات اخیر سلول‌های آوندی و پارانشیمی میزبان که با قارچ مورد حمله قرار گرفته‌اند، توسط آنزیم‌هایی که از سلول‌های قارچ ترشح می‌شوند بسیار صدمه می‌بینند. الجرسما (۱۹۷٦)، کلایدون و همکاران (۱۹۷٤) و شفر و الجرسما (۱۹۸۲)، اثبات کرده‌اند که شکسته‌شدن آوندهای چوب نمی‌تواند در اثر حمله قارچ عامل بیماری‌زا باشد بلکه در اثر تغییرات موجود در سیستم ترشحی آنزیمی است. چندین ترکیب با خاصیّت گیاه سوزی[1] از محیط کشت‌های مایع قارچ عامل بیماری جدا و خاص‌سازی شده‌اند که می‌توان آنها را به چهار گروه دسته‌بندی کرد: ترکیبات فنولیک، پلی‌ساکاریدها، پروتئینی به نام سراتواُلمین و یک گلیکوپپتید. که تصوّر می‌شود از میان این ترکیبات تنها گلیکوپپتید و سراتواُلمین نقش مهم‌تری در بیماری‌زایی داشته باشند ( استروبل و همکاران، ۱۹۷۸؛ شفر، ۱۹۸۲). همچنین تولید آنزیم‌های پکتیناز و سلولاز را در آزمایشگاه چندین محقق گزارش داده‌اند (الجرسما، ۱۹۷٦). وودز و هلمز (۱۹۷٤) مقادیر قابل توجّهی از این آنزیم ها را در آوندهای درختان بیمار در مقایسه با درختان سالم کشف کردند. همچنین مقایسه میزان آنزیم‌های تولید شده از نژادهای مهاجم و غیرمهاجم نشان داد که نژادهای مهاجم در تولید این آنزیم‌ها و پیشرفت و توسعهٔ بیماری به میزان خیلی موثرتری عمل می‌کنند. به‌عنوان مثال اسوالدی و الجرسما (۱۹۸۲) با مقایسهٔ فعالیت آنزیم‌های گلیکوزید از و اگزوگلیکاناز در دو نژاد مهاجم و غیرمهاجم دریافتند که مقادیر زیادی از آرابینوز، زایلوز و رامنوز از دیوارهٔ سلوّلی چوب نارون به واسطهٔ تحریک آنزیم‌های نژاد مهاجم ( *Ophiostoma novo-ulmi*) آزادشده که تصور می‌شود آنزیم‌های پکتیک، با نرم‌کردن دیواره و یا غشاهای سلولی نفوذ قارچ عامل بیماری را تسهیل می‌کنند، به‌طوری که قارچ می‌تواند از سلول‌های پارانشیمی مجاور به آوند توسعه یابد. با این حال وجود پلی‌گالاکتوروناز یا سلولاز در گیاه با مقاومت آن یا قدرت تهاجمی قارچ ارتباطی نداشته است. آنزیم فسفاتیداز نیز در بافت‌های آلوده به میزان زیادی یافت می‌شود. این آنزیم ممکن است قارچ را قادر سازد که با اختلال در نفوذپذیری غشاهای سلولی و تراوش محتویات پروتوپلاسمی به خارج باعث از بین رفتن پارانشیم آوندچوبی و در نتیجه پژمردگی درخت شود (استیپز و کامپانا، ۱۹۸۱). ترکیب مهم دیگری که ساختمان پروتئینی با وزن مولکولی ۷٦۲۷ کیلو دالتون داشته و نقش اساسی در پژمردگی گیاه دارد، در سال ۱۹٦۵ برای اولین بار پژوهش توسط سالمینک و همکاران گزارش گردید و در سال ۱۹۷٤ تاکای آن را سراتواُلمین نام نهاد (تاکای و همکاران، ۱۹۸۳). او بعدها شواهدی ارائه داد که بر اساس آن جدایه‌های مهاجم مقادیر بسیار زیادی سراتواُلمین در مقایسه با جدایه‌های غیرمهاجم تولید می‌کنند (بریزیر و همکاران، ۱۹۹۰). وان آلفان و تورنر (۱۹۷۵) نشان دادند

1-Phytotoxicity

Archive of SID

www.SID.ir

کـه توکـسین سـراتواُلمین بـا دخالـت در انتقـال آب در ساقه‌ها، تنش آبی ایجاد می‌کند.

در نهایت مکانیسم‌هایی که با آن قارچ عامـل بیمـاری مرگ نارون می‌تواند میزبان خـود را از بـین ببـرد، بـسیار پیچیده بوده و نیاز به تحقیقات وسـیع و همـه جانبـه دارد ولی مسلّم است که پاتوژن بیش از این‌که به میزبـان خـود صدمه بزند باید بتواند به راحتـی در آن رشـد کـرده و در سراسر گیاه منتشر شود (شفر و الگرسما، ۱۹۸۲).

تشکیل تایلوز در داخل آوندهای نهال‌هـای مایـه‌زنـی شده مشاهده شد (شکل ٤). هنگامی کـه سیـستم آونـدی درختان نارون مورد تهاجم عامل بیماری قـرار مـی‌گیـرد، میزبـان بـا ترشـح ترکیبـاتی نظیـر تایلوزهـا و ژلاتـین‌هـا آوندهای آلودهٔ خود را مسدود می‌کند و بـا ایـن روش بـه تهاجم پاتوژن پاسخ می‌دهد. به این ترتیب که سلول‌هـای پارانـشیم اطـراف عناصـر آونـدی، از طریـق حفـره‌هـای موجود، وارد عناصر آوندچوبی می‌شوند، آنگاه بـا جـذب آب متورم شده و سلول‌های بادکنکی شکلی به نام تـایلوز ایجاد می‌کنند. تشکیل تایلوزها مهم‌ترین عامل در انـسداد عناصر آوندی بوده و از انتشار عامـل بیمـاری جلـوگیری می‌کند به‌عبارت دیگـر انـسداد آونـدها توسـط تایلوزهـا، انتقال و جریـان شـیره‌خـام را متوقـف مـی‌کنـد و علائـم پژمردگی در گیاه ظاهر می‌شود. چنانچه تایلوز در آونـدها به‌سرعت تشکیل شود، گسترش عامل بیمـاری یـا انتـشار توکسین‌های حاصل متوقـف مـی‌گـردد. بـه ایـن ترتیـب تشکیل این سـاختارها را مـی‌تـوان یـک راهکـار دفـاعی به‌حـساب آورد (نیوبـانکز و همکـاران، ۱۹۸۳). در بیـشتر مـوارد بخـش کـوچکی از سیـستم فروریختـه و آنچـه باقی‌مانده از هجوم بیشتر پـاتوژن در امـان مـی‌مانـد. ایـن پاسخ زمانی موفقیت‌آمیز اسـت کـه فرآینـد مـسدودسازی آنقدر سریع باشد که در انتشار عامل بیماری اختلال ایجاد کند. این فرآیند در نارون‌هـای مقـاوم بـه‌خـوبی صـورت می‌گیرد ( وان آلفن و مک هاردی، ۱۹۷۸). اگرچـه وجـود میسلیوم‌ها و اسپورهای قارچ در آونـدها و نقـش آنهـا در ایجاد پژمردگـی در نـارون‌هـای بیمـار مُحـرز مـی‌باشـد، مشاهدات میکروسکوپی آوندهای چوبی بیمار دلالـت بـر این دارد که میزان هیـف‌هـا و اسـپورها در آونـدها بـرای دخالت مستقیم در افزایش غلظت و روند انتقال آب کافی نیست. نقش تایلوزها و صمغ‌ها در انسداد آوندی به‌خوبی شاخته شده است. تایلوز یک سلول پارانـشیمی بـادکنکی شکلی است که از طریق منافذ سطح غـشا بـه درون آونـد راه می‌یابد. ممکن است از یک سلول پارانـشیمی چنـدین تایلوز رشد کرده و کاملاً یک سـلول آونـدی را پـر کنـد. طبق مشاهدات الجرسـما تایلوزهـا در نـارون‌هـای مقـاوم زودتر از نارون‌های حساس ایجاد می‌شـوند. او همچنـین معتقد است که پاتوژن‌ها در درختان حساس ممکن اسـت به‌طریقـی از تـشکیل تـایلوز جلـوگیری کنـد (الجرسـما، ۱۹۷٦). صمغ‌ها نیز گـاهی اوقـات در آونـدهای درختـان بیمار تولید می‌شود و به‌نظر می‌رسد که در روند انتقال آب اختلال ایجاد می‌کند (سولا و جیـل، ۲۰۰۲) امّـا ویلـسون (۱۹٦۵) معتقد است که در مراحل اولیهٔ بیماری تنها بخش کوچکی از سیستم انتقال آب توسط صـمغ‌هـا و تایلوزهـا مسدود می‌شود. بنابراین به‌نظر مـی‌رسـد کـه ایـن عوامـل نمی‌توانند دلیل اصلی پژمردگی محسوب شوند.

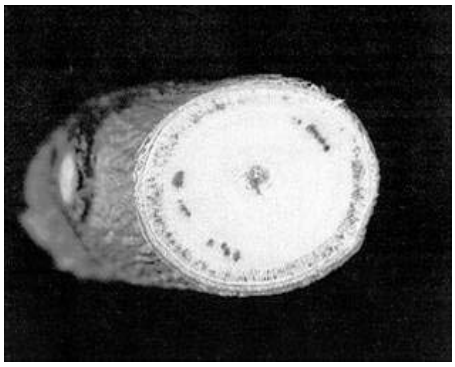
با در نظر گرفتن موارد فوق یعنـی عوامـل دخیـل در ایجـاد پژمردگـی و شـدت و ضـعف بیمـاری، بررسـی خصوصیات آناتومیکی و فیزیولوژیکی گونه‌های مختلـف نارون از یـک سـو و بررسـی ویژگـی‌هـای بیمـاری‌زایـی جدایـه‌هـای مختلـف عامـل بیمـاری از سـوی دیگـر در شـناخت و درک بهتـر از تعامـل بـین پـاتوژن _ میزبـان می‌تواند بسیار موثر بوده و در آینده می‌تواند در مطالعـات مربوط به پدیده مقاومت به بیماری بسیار سودمند باشد.

## سپاسگزاری

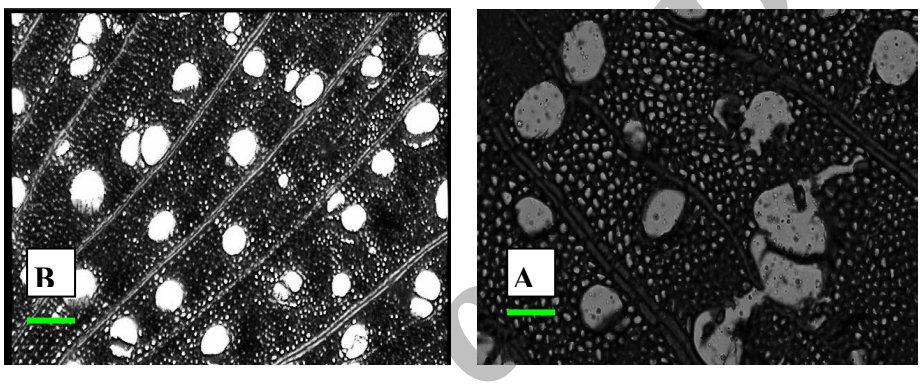
از همکاری گروه صنایع چوب و کاغذ دانشگاه علـوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان و به‌ویـژه آقـای مهنـدس جلال شاخص که در تهیه اسلایدهای میکروسکوپی مـا را یاری کردند، سپاسگزاری می‌نماییم.

Archive of SID

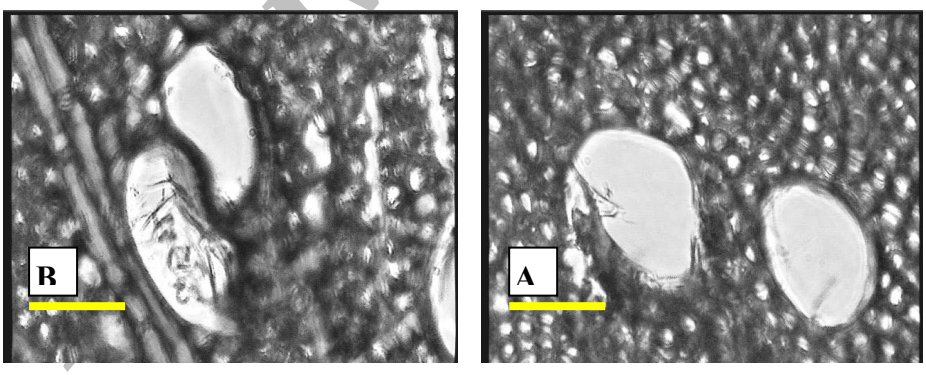
www.SID.ir



شکل ۱- خطوط تیره و ناپیوسته ایجاد شده در برش عرضی نارون اوجا مایه‌زنی شده با قارچ ***Ophiosotma novo-ulmi***.

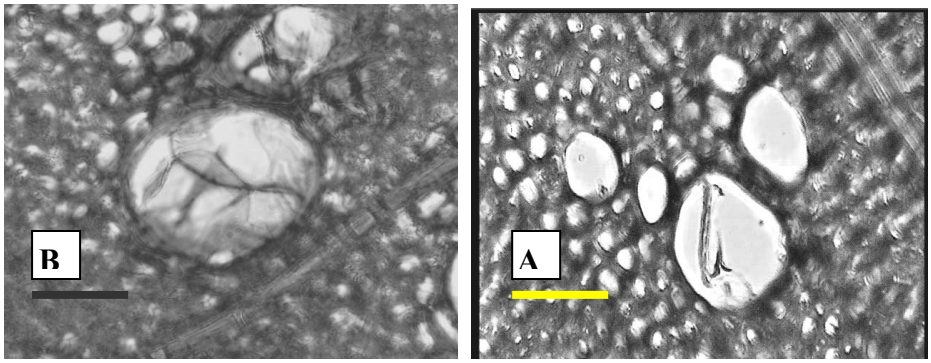



شکل ۲- حضور عامل بیماری (ریسه‌ها و اسپورها) در داخل آوندهای آلوده نهال نارون اوجا، (**A**) در مقایسه با آوندهای نهال سالم (**B**) (مقیاس ۵۰ میکرون).




شکل ۳- تخریب و ایجاد تغییرات در دیواره‌های آوندهای چوب بهاره آلوده نارون ملج، (**A** و **B**) (مقیاس۱۰۰میکرون).

www.SID.ir




شکل ٤- تشکیل تایلوز در آوند آلوده نارون اوجا، (**A** مراحل اولیه) (**B** تایلوز کامل و انسداد تقریباً کامل آوند) (مقیاس ۱۰۰ میکرون).

## منابع

1.Arciero, M., and Morris, T.V., 1982. Dutch elm disease Annual Report. The Resources Agancy California Department of Forestry. 30pp.

2.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. Pl. Pathol., 39: 231-236.

3.Clydon, N., Grove, J.F., and Hasken, M. 1974. Phenolic metabolites of Ceratocystis ulmi. Phytochemistry. 13: 2567-2571.

4.Duchesne, L.C., Jeng, R.S., Hubbes, M., and Sticklen, M.B. 1994. Accumulation of mansonones E and F in elm callus cultures inoculated with Ophiostoma ulmi. can. J. of Pl. Pathol., 16(2):118-121.

5.Elgersma, D.M. 1970. Length and diameter of xylem vessels as factors in resistance of elms to Ceratocystis ulmi. Neth. J. Pl. Pathol., 76: 179-182.

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

7.Gagnon, C. 1967. Polyphenols and discoloration in the elm disease investigated by histochemical techniques. Can. J. Bot. 45: 2119-2124.

8.Gagnon, C. 1968. Peroxidase in healthy and diseased elm trees investigated by the benzidine histochemical technique. Can. J. Bot. 46: 1491-1494.

9.Iraqi, M.M. 2007. Investigation on isolates of fungus the causal agent of Dutch elm disease in some areas of Golestan province and their pathogenesis effect on Ulmus species. M.Sc. thesis. Agricultural Sciences and Natural Resources University of Gorgan.108 pp. (Persian). Abstract in English.

10.Iraqi, M.M. and Rahnama, K. 2007. Investigation on severity of pathogencity of Ophiostoma ulmi and Ophiostoma novo-ulmi on Ulmus parvifolia Jacq. Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources. Gorgan University. 14:3 (in prees). (Persian).

11.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. Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources. Gorgan University. 14 (in press). (Persian).

12.Iraqi, M.M., Rahnama, K., Zafari, D. and Taghinasab, M. 2008. Investigating biological control of Ophiostoma novo-ulmi, causal agent of Dutch Elm Disease by Trichoderma harzianum and T. virens in vitro. Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources. Gorgan University. 14:5 (in prees). (Persian).

13.Mac Hardy, W.E., and Beckman, C.H. 1973. Water relations in American elm infected with Ceratocystis ulmi. Phytopathol., 63: 98-103.

14.Newbanks, D., Bosch, A., and Zimmermann, M.H., 1983. Evidence for xylem dysfunction to Dutch elm disease. Neth. J. Pl. Pathol. 76: 196-204.

www.SID.ir

15. Parsa Pajouh, D., and Schweingruber, F.H. 2001. Atlas des bios du nord de I'Iran: Description anatomique et identification microscopique des essences principales (3rd.ed.). Tehran University Publications. 136pp.
16. Quellette,G.B., and Rioux, D. 1992. Anatomical and Physiological Aspects of Resistance to Dutch Elm Disease. In: A. blanchette, R. Biggs (eds.), Defense Mechanisms of lant against Fungi. Berlin, Germany. Springer-Verlag., 256-305.
17. Rahjo, V., Mojdehi, H., Zamanizadeh, H., and Mosahebi, GH. 2000. Investigation of distribution of Dutch Elm Disease, in Tehran and Karaj cities, and initial evaluation effect of some fungicides against Ophiostoma ulmi. Scientific Reaserch Journal of Agri. Sci. Islamic Azade Univ. Press.15-36.
18. Rahnama, K., 2003. Incidence of Dutch elm disease in new area of natural forest and urban trees of Iran. In Proceeding: Second International Elm Conference. Valsain, Segovia, Spain. 34p.
19. Sabeti, H., 1999. Iranian Forests, Trees and Shrubs. University of Science and Industry. 753-775. (Persian).
20. Salemink, C.A., Robel, H., Kerling, L., and Tchernoff, V. 1965. Phytotoxin isolated from liquid cultures of Ceratocystis ulmi. Science, 149: 202-203.
21. Scheffer, R.J. 1982. A phytotoxic glycopeptide produced by Ophiostoma ulmi in several elm species and clones. In: E. S. Kondo, Y. Hiratsuka and W. G., Denyer (eds.), Proc. Dutch elm disease. Symp. and worksh. , Winnipeg , Manitoba , Oct 5-9. 1981. 215-223.
22. 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. Pl. Pathol., 18 :27-32.
23. Scheffer, R.J., and Elgersma, D.M. 1982. A scanning electron microscope study of cell wall degradation in elm wood by aggressive isolates of Ophiostoma ulmi. Eur. J. For. Pathol. 12:25-28.
24. Scheffer, R.J., and Strobel, G.A. 1988. Dutch Elm Disease, a model tree disease for biological control, In; K. G. Mukeri, and K. l. Garg (eds.). Biocontrol of Plant Disease. CRC. Press. Inc., B. ca. Raton, FL., 103-119.
25. Sharbatkhari, M., Razavi, S.I., Sanei, S.J., and Rahnama, K. 2007. Effect of Glucose and amino acid L- asparagin on asexual reproduction of the causal agent of Dutch elm disease. Gorgan Univ. of Agricultural Sciences and Natural Resources. 14(1): 93-98.
26. Sincliar, A., and Campana, R.J. 1978. Dutch Elm Disease; Perspectives after 60 years. Agr. Pl. Pathol., 8(5): pp.55
27. Sinclair, W.A., Zahand, J.P., and Melching, J.B. 1975. Anatomical markers for resistance of Ulmus americana to Ceratocystis ulmi. Phytopathol., 65: 349-359.
28. Stipes, R.J., and Campana, R.J. 1981. Compendium of elm disease. APS Press. 96pp.
29. Strobel, G.A., Van Alfen, N., Hapner, K.D., McNeil, M., and Albersheim, P. 1978. Some glycopeptides from Ceratocystis ulmi, Dutch elm disease pathogen. Biochim Biophis Acta. 538: 60-75.
30. Solla, A. and Gil, L. 2002. Xylem vessel diameter as a factor in resistance of Ulmus minor to Ophiostoma novo-ulmi. For. Path., 32: 123-134.
31. Solla, A. and Gil, L. 2003. Evaluting Verticilium dahliae for biological control of Ophiostoma novo-ulmi in Ulmus minor. Plant Pathology, 52: 579-585.
32. Svaldi, R., and Elgersma, D.M. 1982. Further studies on the activity of cell wall degrading enzymes of aggressive and non-aggressive isolates of Ophiostoma ulmi. Eur. J. of For. Path., 12: 29-36.
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. Pl. Pathol., 23: 275-280.
34. 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.
35. Van Alfen, N., and Mac Hardy, W. 1978. Symptoms and host-pathogen interaction. Pages 20-25 In: W. A. Sinclair and R. J. Campana (eds.) Dutch elm disease: Perspectives after 60 years. Cornell Univ., Agri., Exp., Stn., Search (Agriculture). 8(5): 1-52.
36. Wilson, C.L. 1965. Ceratocystis ulmi in elm wood. Phytopathol., 55: 477.
37. Woods, A.C., and Holmes, F.W. 1974. Extraction of fluid from healthy and Dutch elm diseased elm branches using hydraulic compression. Phytopathol., 64: 1265-1266.

Archive of SID

www.SID.ir

*J. Agric. Sci. Natur. Resour., Vol. 15(4), 2008*
*www.jasnr.info*
*www.sid.ir*
*www.magiran.com/jasnr*

# A survey on histopathology of *Ulmus glabra* and *U. carpinifolia* inoculated by *Ophiostoma novo-ulmi* fungus

**[*]M. M. Iraqi[1], K. Rahnama[2], M. Mostafa[3] and M. Marandi[4]**

[1] M.Sc. Student graduated, Dept. of Plant Pathology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resource [2] Associate Prof. Dept. of Plant Pathology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resource, [3] M.Sc. Student, Dep. of Plant Pathology, Technology University of Isfahan. and [4]M.Sc. Student, Dept. of Wood and paper Sciences and Industries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resource

**Abstract**

Dutch elm disease is one of the most important vascular diseases of elm. However, it has always being considered to survey its different perspectives such as; distribution, biology, pathogencity, histopathology, disease management and etc. In order to investigate host-pathogen interaction, this research was carried out with title survey on histopathology of two elm species, *Ulmus glabra* and *U. carpinifolia* inoculated by *Ophiostoma novo-ulmi* the causal agent of Dutch elm disease. When withered and dieback symptoms were occurred 4-8 weeks after inoculation by *Ophiostoman novo-ulmi* against seedlings, transversal sections were prepared from lower parts of withered and dried foliage. Then, very thin transversal sections were prepared and after different stages of staining, microscopic slides were prepared. The results of microscopic investigations showed that the causal agent of Dutch elm disease has caused disordered in physiology and flowing of vascular sap through spreading into vessels, obstruction of xylem vessels and their destruction. The results also showed that seedlings with tylose production caused obstruction of vessels and prevented spreading of pathogen. Pathogencity and defensive mechanisms associated with host-pathogen interaction and their roles at susceptibility rate of *Ulmus carpinifolia* and *U. glabra* to Dutch elm disease was discussed in this paper.

***Keywords:*** Dutch elm disease; histopathology; *Ulmus carpinifolia*; *U. glabra*, *Ophiostoma novo-ulmi*

Archive of SID

*- Corresponding Author; E-mail: Iraqi602@yahoo.com

www.SID.ir