# پراکنش و اهمیت نسبی گونه‌های *Phytophthora* جدا شده از درختان گردو در حال زوال در استان‌های فارس، کرمان و کهگیلویه و بویراحمد و واکنش برخی از ژنوتیپ‌های گردو به آنها*

Distribution and relative importantce of *Phytophthora* species isolated from declining walnut trees in Fars, Kerman, Kohgilueh -&- Boyrahmad & Fars Provinces & reaction of walnut genetypes to them.

**فریبا قادری و ضیاءالدین بنی‌هاشمی****

بخش گیاهپزشکی،دانشکده کشاورزی،دانشگاه شیراز

دریافت ۸۵/۱۰/۳ پذیرش ۸۶/۹/۲۸

**چکیده**

پراکنش گونه‌های *Phytophthora* عامل انگومک (گموز) درختان گردو در استان‌های کرمان، فارس و کهگیلویه و بویراحمد مورد بررسی قرار گرفت. از سی و سه جدایه بدست آمده، هیجده جدایه به *P.citricola* تعلق داشت. گونه مذکور از طوقه و تنه و ریشه درختان گردوی منطقه اقلید، خانه‌زنیان، یاسوج و از طوقه درختان گردو در سپیدان جدا گردید. دوازده جدایه *P. citrophthora* از طوقه و تنه درختان گردوی استان کرمان (بافت کرمان، خبر، رابر و گوغر)، بوانات (جیان، سوریان، سیمکان و عاصمی) و از طوقه، تنه و ریشه درختان گردوی منطقه شیراز جداسازی گردیدند.سه جدایه *P. cactorum* از خاک‌های اطراف طوقه ،تنه و ریشه درختان در حال زوال منطقه مرودشت جداسازی گردیدند.

مقایسه بیماریزایی برخی جدایه‌ها با استفاده از شاخه های بریده گردو انجام گردید ریسه‌های گونه *P. citricola* با سرعت بیشتری نسبت به گونه‌های *P. citrophthora* و

* بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول ارائه شده به دانشگاه شیراز

** مسئول مکاتبه

Archive of SID

www.SID.ir

*P. cactorum* قادر به پیشروی در شاخه‌های بریده بودند.

در شرایط گلخانه عکس‌العمل طوقه و ریشه نهال‌های ۸ ماهه گردو ارقام سید حسینی، قلمی، سلطان ابراهیم، کلاغی، خوشه‌ای، ریز یاسوج، پوست کاغذی، B6SH10، $OR33/T_2$، حاج میرزا خان، G4، G7، G2 و همچنین درخت جنگلی لرگ (*Pterocarya fraxinifolia*) از خانواده Juglanaceae به جدایه‌ای از سه گونه *P.citricola*، *P.citrophthora* و *P.cactorum* که قدرت بیماریزائی بیشتری داشتند با استفاده از مایه بدست آمده از محیط ورمی کولیت- عصاره دانه شاهدانه مورد مطالعه قرار گرفت و درصد کلنیزاسیون طوقه، ریشه اصلی و فرعی، درصد مرگ ومیر، میزان پیشرفت بیماری، درجه آلودگی ریشه، ارتفاع دانهال، وزن تر و خشک ریشه ارزیابی گردید. مقایسه درصد کلنیزاسیون طوقه، ریشه اصلی و فرعی، درصد مرگ و میر و میزان پیشروی بیماری نشان داد که تمام ژنوتیپ‌های گردو به گونه‌های فیتوفتورا حساس بودند ولی بیشترین درصد پوسیدگی و پیشرفت بیماری مربوط به ژنوتیپ سید حسینی بود در صورتی که لرگ به هر سه گونه قارچ کاملاً مقاوم بود.

**واژهای کلیدی: انگومک، *P.citricola*، *P.citrophthora* و *P.cactorum* ، گردو، کرمان، فارس و کهگیلویه و بویراحمد**

**مقدمه**

گردو از درختان خزان‌دار و از جنس *Juglans* متعلق به خانوادهٔ Juglandaceae است. مهم‌ترین گردوی موجود در دنیا گردوی ایرانی (*Juglans regia* L.) است که تنها گونه‌ای است که مغز آن از نظر خوراکی مصرف اقتصادی دارد (Wilson & Ogawa 1979). پوسیدگی طوقه و ریشه گردو ناشی از *Phytophthora* spp. یکی از بیماری‌های مهم خاکزاد این گیاه می باشد. علائم بیماری به صورت کم برگ شدن و زردی خفیف برگ‌ها، تغییر رنگ بافت از طوقه تا ارتفاع یک متر از سطح خاک و ترشح شیرابه سیاهرنگی است که با برداشتن پوست در این منطقه ، به طور فراوانی خارج می‌شود (Banihashemi 1991). درختان جوانی که آلودگی شدید به این بیماری دارند، اغلب سبز خشک می‌گردند، در حالی که در درختان مسن‌تر علائمی نظیر ضعف و زوال تدریجی، خشکیدگی سرشاخه‌ها و نهایتاً مرگ درخت مشاهده می‌گردد

Archive of SID

www.SID.ir

(Ogawa & English 1991). گرین (Green 1980)، *P. citricola* را عامل اصلی پوسیدگی طوقه در *J. nigra* در کالیفرنیا دانست. سپس *مرستیچ و ماترون* (Mircetich & Matheron 1983) گونه‌های *P. cactorum*، *P.citrophthora*، *P.citricola*، *P.cinnamomi* و *P.cryptogea* را از بافت‌های بیمار گردو با علائم پوسیدگی و سیاه شدن طوقه و ریشه جدا کردند. در ایران بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه گردو اولین بار در سال ۱۳۷۰ در چند منطقه استان فارس دیده شد و عوامل آن *P. cactorum* تشخیص داده شد (Banihashemi 1991). متعاقب گزارش اولیه‌ی بیماری، در سال۱۳۷۷ زوال و مرگ درختان گردو در استان کرمان بیشتر مورد توجه قرار گرفت و عامل آن *P. cactorum* (Kiomarsi *et al*. 1998) و *P. citrophthora* (Abusaidi *et al*. 1998) تشخیص داده شد.

اگرچه اطلاعات اولیه نشان داد که پایه *J. regia* نسبت به پایه‌های دیگر گردو به *P. cactorum* مقاوم‌تر است ولی مرستیچ و همکاران ( Mircetich *et al*. 1976 ) نشان دادند که اختلاف ویژه‌ای بین گیاهچه‌های ٦ ماهه *J. regia* و *J. hindsii* و هیبرید Paradox در مقابل *P. cactorum* وجود ندارد. علاوه بر این *P. cinnamomi* باعث تولید شانکرهای بزرگتری نسبت به *P. cactorum* روی گیاهچه‌های سه ساله *J. regia* می شود .پس این نتایج نشان می دهد که مقاومت پایه‌های گردو به فیتوفتورا بستگی به سن یا حالات فیزیولوژیکی گیاه و یا هر دو درطول دوره رشد گیاه دارد.

*ماترون و میرستیچ* (Matheron and 1983 ) نشان دادند که *P.cinnamomi* روی گیاهچه‌های *J. hindsii* و Paradox بیماری‌زا بوده و سیستم ریشه را به طور کلی خراب می‌نماید به حدی که باعث کشتن آن‌ها می‌گردد. درحالی که *P. cactorum* باعث کشتن گیاهچه *J. hindsii* می‌گردد اما روی Paradox، باعث پوسیدگی طوقه و ریشه به صورت جزیی می‌شود و *P. megasperma* کمترین بیماری‌زایی را روی پایه‌های گردو از خود نشان می‌دهد . بعد از یکسری مطالعات دیگر، آنها بیان کردند که *J. regia*، *J. hindsii* و Paradox به *P. citricola* و *P. cinnamomi* حساس هستند اما پایه Paradox نسبت به *J. regia* و *J. hindsii* در مقابل *P. cactorum* از خود مقاومت بیشتری نشان می‌دهد. همچنین *P. citrophthora* را از لحاظ بیماری‌زایی روی پایه های گردو بسیار شبیه به *P.cactorum* دانستند و در نهایت *P.cinnamomi* و *P.citricola* را به عنوان

Archive of SID

www.SID.ir

عامل بسیار مخرب و تهدیدکننده گردو در کالیفرنیا دانستند (Mircetich & Matheron 1983). پوسیدگی طوقه و ریشه منجر به پژمردگی و مرگ بسیاری از درختان گردو در کالیفرنیا شد که بالاترین وقوع بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه درختان گردو معمولاً در اثر بارندگی، آبیاری بالا و اشباع طولانی خاک رخ خواهد داد. بنابراین مدیریت دقیق آبیاری و کاهش مدت زمان اشباع خاک در به حداقل رساندن پوسیدگی فیتوفتورایی می‌تواند مؤثر باشد ( Matheron & Mircetich, 1985).

یکی از روش های مدیریت صحیح بیماری استفاده از پایه های مقاوم می باشد.در سالهای اخیرتلاشهای زیادی در خصوص عکس‌العمل پایه‌های کوناگون*Juglans* به گونه‌های *Phytophthora* صورت گرفته است واختلافات زیادی مشاهده گردیده است (Browne *et al*. 2005, Matheron & Mircitech 1985). از بین پایه‌های موجود *J. regia* و هیبرید Paradox به عنوان پایه مورد استفاده قرار گرفته است(Browne *et al.* 2005). پایه Paradox ضمن مقاومت خوبی به گونه‌های *P. citricola* , *P. citrophthora* ,*P.cactorum* مقاومت چندانی به *P.cinnamomi* ندارد( تماس شخصی نویسنده دوم با دکتر Browne ).با توجه به اینکه پایه‌های *Juglans* به گونه‌های فیتوفتورا حساسیت دارد، تلاش‌های زیادی در راستای پیدا کردن پایه‌های مقاوم صورت گرفته است. در این خصوص از جنس *Ptercarya* که از خانواده Juglandiaceae میباشد استفاده شده است. عکس العمل گونه *P. stenoptera* به گونه‌های فیتوفتورا مورد ارزیابی قرار گرفته است(Browne *et al*. 1998, Burchell 2002 ). مطالعاتی نیز در خصوص تجانس بین *P stenoptera* با ارقام گردو صورت گرفته و نشان داده شده است که پایه مذکور با برخی از ارقام گردو سازگازی داشته و میزان سازگاری بین ۵۷ تا ۱۰۰ در صد گزارش شده است (Burchell 2002 ). در شمال ایران گونه *P. fraxinifolia* به طور خودرو وجود دارد و به نام محلی لرگ نامیده میشود (Sabeti 1966).

در سال‌های اخیر پوسیدگی طوقه و ریشه فیتوفتورایی، در مناطق گردو کاری استان‌های فارس، کرمان و کهگیلویه و بویراحمد دیده شده است. در نتیجه با توجه به گسترش وسیع زوال درختان گردو در استان‌های ذکر شده و احتمالاً سایر استان‌های گردو خیر کشور این بررسی انجام گرفت.

Archive of SID

www.SID.ir

**روش بررسی**

**نمونه برداری**

برای جداسازی گونه‌های *Phytophthora* از اواسط بهار تا اواخر پاییز ۱۳۸۲، در مناطق گردوکاری استان فارس (اقلید، جیان، خانه‌زنیان، سپیدان،سوریان، سیمکان، شیراز، عاصمی، مرودشت)، استان کرمان (بافت کرمان، خبر، رابر، گوغر) و استان کهگیلویه و بویر احمد (یاسوج و سی‌سخت) از درختان مختلف گردو و با علائم زوال نمونه‌برداری شد.

در باغ‌هایی که علایم بیماری در آنها مشاهده می‌شد، اطراف طوقه درختان بیمار گودالی به عمق ۵۰ تا ۷۰ سانتی‌متر حفر گردید، سپس از مرز بافت سالم و آلوده قسمت پایین تنه، طوقه و ریشه (پوست و قسمت سطحی چوب)، به صورت مجزا نمونه‌برداری صورت گرفت. همچنین از مجاور طوقه‌های این درختان نیز حدود یک کیلوگرم خاک برداشته شد و نمونه‌ها درون کیسه‌های نایلونی در صندوق حاوی یخ به آزمایشگاه منتقل شدند.

**جداسازی عامل بیماری**

در آزمایشگاه بافت‌های آلوده به مدت ۲-۱ ساعت زیر آب لوله به ملایمت شسته شدند، تا قارچ‌های سطحی پوده زی و مواد اضافی در سطح بافت شسته شدند. سپس بافت به قطعات ۵-۲ میلی‌متری تقسیم شده و با حوله کاغذی خشک گردید و بدون ضدعفونی سطحی روی محیط کشت نیمه انتخابی CMA-PARP (Kannwischer & Mitchell 1981). (عصاره ٤٠ گرم دانه ذرت خرد شده، ۲۰ میلی‌گرم دلواسید (حاوی ۵۰ درصد پی‌مارسین)، ۲۵۰ میلی‌گرم آمپی‌سیلین، ۱۰ میلی‌گرم ریفامپیسین، ۱۰۰ میلی‌گرم PCNB، ۱۵ گرم آگار، یک لیترآب مقطر) کشت داده شدند. بعد از ظهور پرگنه‌ها و مشاهدات اولیه میکروسکوپی، ۲۰-۱۵ عدد بذر شاهدانه که به مدت ۲۰ دقیقه در آب جوشانیده و سپس خنک شده بودند روی پرگنه‌ها قرار داده شدند. بعد از ٢٤ ساعت در دمای ۲۵°C، این بذور به یک تشتک پتری حاوی ۱۵-۱۰ سانتی‌متر مکعب آب مقطر سترون انتقال یافته و در زیر نور دائم مهتابی (دو لامپ مهتابی ٤٠ واتی به فاصله ۳۰ سانتی‌متری) قرار داده شدند. بذور کلونیزه شده بعد از ٢٤ ساعت تا مدت ٥-٤ روز جهت تشکیل اسپورانجیوم و رهاسازی زئوسپور مورد بررسی قرار گرفتند (Ribeiro 1978).

Archive of SID

www.SID.ir

برای جداسازی عامل بیماری *P. cactorum* از خاک از بذور گلرنگ رقم Nebraska-10 استفاده گردید (Banihashem & Mitchell 1975) . بذور گلرنگ در محلول ۰/۵ درصد هیپوکلریت سدیم به مدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی سطحی گردید و آنگاه به مدت ۱۰-۵ دقیقه در زیر آب معمولی شسته شد، و سپس در ظروف یکبار مصرف حاوی ورمی کولیت سترون ( در دمای ۱۲۱°C و فشار یک اتمسفر به مدت یک ساعت) دراتاقک رشد در دمای ۲۸°C مدت ۷-۵ روز قرار داده شد. بعد از رشد، گیاهچه‌های گلرنگ به گلدان‌های پلاستیکی حاوی خاک سترون انتقال داده شدند. ٢٤ ساعت بعد، خاک‌هایی که از اطراف طوقه و ریشه درختان مرده و یا در حال زوال در مناطق ذکر شده، جمع‌آوری شده بودند، برروی خاک‌های سترون حاوی گیاهچه‌های گلرنگ ریخته شدند، بعد از ۷-۳ روزعلائم آلودگی به صورت قهوه‌ای شدن طوقه و سپس واژگون شدن نبات ظاهر گردید. جهت جداسازی*P. cactorum* ، طوقه گیاهچه‌های آلوده گلرنگ بعد از شستشو زیر شیرآب به قطعات چند میلی‌متری تقسیم و روی حوله‌های کاغذی خشک و سپس برروی محیط نیمه انتخابی CMA-PARP کشت داده شد. بعد از ظهور پرگنه‌های جدید نسبت به تشخیص آنها مانند روش بالا اقدام گردید.

**تشخیص گونه**

جدایه‌های فیتوفتورا پس از خالص سازی به روش نوک ریسه بر اساس مورفولوژی اسپور انجیوم، دمای کمینه، بیشینه و بهینه رشد، تولید اُاُسپور، شکل پرگنه و سرعت رشد آنها تشخیص داده شدند (Stamps *et al*., 1990). دماهای ۵، ۱۰، ۱۵،۲۰، ۲۸،۳۰،۳۵،۳۲، ۳۷°C، مورد استفاده قرار گرفت و سرعت رشد پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت اندازه گیری گردید. عرض و طول یکصد عدد اسپورانجیوم جدایه های بدست آمده در بزرگنمایی٤۰۰× اندازه گیری شد. جهت تولید اُاُسپورجدایه های مختلف با یکدیگر و با تیپ سازگاری جنسی موجود در بخش گیاه پزشکی دانشگاه شیراز روی محیط عصاره شاهدانه با روش ساندویچی (Mitchell & Kannwischer-Mitchell 1992) صورت گرفت.

**کاشت بذر گردو**

برای پرورش گیاهچه، بذور ژنوتیپ‌های مختلفی از دو منبع محلی و مؤسسه اصلاح بذر و نهال تهیه شد (جدول ۱). در اواخر اسفند ۱۳۸۱ این بذور در آب معمولی به مدت یک ساعت شسته شده و با مقدار کافی پودر وتابل بنومیل۵۰٪ مخلوط گردیدند. سپس بذرها به

Archive of SID

www.SID.ir

مدت ۲ ماه در سینی‌های حاوی ماسه سترون مرطوب در دمای ۵°C قرار داده شدند، تا نیاز سرمایی آنها برطرف شود. در طول این مدت سینی ها چند بار بازدید و از لحاظ میزان رطوبت مورد بررسی قرار گرفتند (در صورت خشک بودن ماسه ها آب اضافه می شد). دو ماه بعد (خرداد ماه۱۳۸۲) بذور در گلدانهای حاوی خاک بکر سترون شده در عمق حدود ۵ سانتی متری کشت شده و سپس گلدان ها آبیاری و در گلخانه نگهداری گردیدند. لازم به ذکر است که سرعت جوانه زنی و رشد گیاهچه های لرگ نسبت به بقیه ارقام بسیار کند بود. این نهال ها در طول مدت تحقیق چندین بار با کود مایع زربار یک در هزار آبیاری گردیدند. و دمای گلخانه در طول آزمایش بین ۱۵ و ۳۲ و دمای خاک بین ۲۲و ۲۸ °C متغیر بود. در آبان ماه سال ۱۳۸۲به طور ناگهانی برگ‌های نهال‌های گردو دچار نکروز شدید شده و شروع به ریزش نمودند. به طوری که با وجود مراقبت‌های ویژه به حالت سابق برنگشتند (بنابراین برای بار دوم بذور این رقم ها، به روش قبل در سرد خانه نگهداری شدند و سپس بهمن ماه ۱۳۸۲ کاشت گردیدند) و بعد از بررسی زیاد در اواسط خردادماه ۱۳۸۳، مشخص گردید نهال‌های گردو به علت یک تنش سرما در پاییز ۱۳۸۲، به خواب زمستانه فرو رفته بودند. در نتیجه نهال‌ها با دو ماده موثره Dormex با غلظت ۳ درصد و Volk با غلظت ۷ درصد محلول‌پاشی شدند و نهال ها بعد از یک هفته شروع به سبز شدن نمودند ( Rahemi & Asghari 2004).

**آزمون بیماری‌زایی**

برای اجرای بیماری‌زایی از شاخه‌هایی به طول ۳۰-۲۰ و قطر ۳ تا ٤ سانتی‌متر استفاده گردید. بعد از حذف شاخه‌های فرعی و برگ‌های اضافی و ضدعفونی سطحی با الکل اتیلیک۷۰ درصد، شکاف‌هایی به صورت T در پوست آنها ایجاد گردید. بعد بلوک های میسیلیومی به قطر ٦ میلی متر از پرگنه‌های جدایه‌های مورد نظر (جدول ۲)، که روی محیط عصاره دانه شاهدانه آگار (HSA) رشد کرده بودند، در داخل این زخم‌ها قرار داده شد. سپس پوست بریده شده در محل خود قرار داده شده و محل زخم با نوار پارافیلم مسدود گردید (Bielenin & Jones 1988b, Bostock & Doster 1985, Mircetich & Matheron 1983).

(جهت جلوگیری از تبخیر انتهای شاخه‌ها در پارافین مذاب فرو برده شد). در مورد شاهد از محیط کشت HSA بدون مایه استفاده گردید. شاخه‌ها بعد از مایه‌زنی در لایه‌های کاغذ کاهی مرطوب پیچیده شده و به مدت ١٤ روز در دمای°C ۲۵ قرار داده شدند. نتایج با برداشتن

Archive of SID

www.SID.ir

پوست از بالا و پایین قسمت مایه‌زنی شده و اندازه‌گیری مساحت کل قسمت‌های تغییر رنگ یافته با کمک دستگاه leaf area meter و کشت قطعات آلوده برروی محیط کشت نیمه انتخابی PARP ارزیابی گردید.

جدول ۱- بذور ژنوتیپ های مختلف گردو مورد استفاده در آزمون های مایه‌زنی با گونه‌های *Phytophthora*

Table 1. Sources of walnut seeds used for reaction to *Phytophthora* species

| نام رقم گردو<br>walnut genotype | منبع بذرها<br>seed sources |
|---|---|
| (a)پوست کاغذی | بوانات (B) |
| (b)حاج میرزا خان | بوانات (B) |
| (c )خوشه‌ای | بوانات (B) |
| (d)ریز یاسوج | یاسوج (Y) |
| (e)سلطان ابراهیم | یاسوج(Y) |
| (f)سید حسینی | یاسوج (Y) |
| (g)کلاغی | بوانات (B) |
| (h)قلمی | بوانات(B ) |
| (i)لرگ | ساری (S) |
| $G_2$ | مؤسسه اصلاح بذر و نهال* |
| $G_4$ | مؤسسه اصلاح بذر و نهال* |
| $G_7$ | مؤسسه اصلاح بذر و نهال* |
| B6SH10 | مؤسسه اصلاح بذر و نهال* |
| $OR33/T_2$ | مؤسسه اصلاح بذر و نهال* |

B=Bavanat, Y=Yasuj,S=Sari,*=Plant & Seed Improvement Organization,Karaj,Iran a=poost kaghazi, b= hajmirzakhan, c= khooshaee d= reez-e-yasuj, e= sultan ebraheem, f= sayed hosseini , g= kalaghi, h=ghalami, i=wingnut

**تعیین واکنش برخی از ژنوتیپ های گردو به برخی از گونه های *Phytophthora***

Archive of SID

www.SID.ir

**مایه‌زنی نهال‌ها**

از نهال‌های ۸ ماهه و ۱۵ ماهه گردو برای مایه‌زنی استفاده گردید. خاک اطراف هر نهال تا عمق سه سانتی‌متری کنار زده شد و ۱۰ سی‌سی از مایه تهیه شده در اطراف طوقه و ریشه اصلی هر نهال قرار داده شد. (برای تهیه مایه قارچ، از محیط عصاره شاهدانه ورمی کولیت استفاده شد (Banihashemi & Fatehi 1989). براساس این روش، ابتدا در کیسه‌های پلاستیکی مقاوم به دمای اتوکلاو، ۲۰۰ میلی‌لیتر ورمی کولیت ریخته شد و به آن ۱۲۰ میلی‌لیتر عصاره دانه شاهدانه (عصاره ٦۰ گرم دانه شاهدانه در لیتر) اضافه شد و به مدت یک ساعت در دمای ۱۲۱ $^{\circ}$C و فشار یک اتمسفر اتوکلاو سترون گردید. دو تا سه روز بعد از آن، ۸ بلوک میسیلیومی به قطر ٦ میلی متر از پرگنه‌های جدایه‌های موردنظر (جدول ۳)، که قبلاً روی محیط CMA رشد کرده بودند، به کیسه‌های پلاستیکی اضافه گردید. سپس کیسه‌های پلاستیکی به مدت چهار هفته در دمای$^{\circ}$C ۲۵ و در تاریکی قرار داده شدند.

برای تعیین حضور فعال قارچ در خاک بلافاصله سوراخ زه آب تمام گلدان‌ها با پارافین جامد بسته شده و خاک گلدان‌ها با آب لوله اشباع گردید. بعد از ۲٤ ساعت سوراخ زه آب باز گردید و آب گلدان‌ها در لیوان‌هایی پلاستیکی استفاده نشده جمع‌آوری شد و از برگ لیموشیرین دایره‌هایی به قطر پنج میلی‌متر جدا و ۵۰ عدد از آنها در هر نمونه قرار داده شد. بعد از ۲٤ ساعت نگهداری در محیط آزمایشگاه، قطعات برگ به مدت یک دقیقه با جریان آب معمولی شستشو داده شد و بعد از خشک شدن آنها روی دستمال کاغذی، به محیط کشت نیمه انتخابی CMA-PARP منتقل گردید. تشتک‌های پتری در دمای ۲۰$^{\circ}$C نگهداری شدند. جهت مشاهده رشد قارچ، تشتک‌های پتری روزانه مورد بررسی قرار گرفتند. بعد از ظهور پرگنه‌ها و مشاهدات اولیه میکروسکوپی از بذور شاهدانه استفاده گردید. این عمل هر دو هفته یکبار انجام شد (Banihashemi 2004). نهال‌ها در فواصل بین غرقابی و در موقع لزوم با آب لوله، آبیاری شدند. دمای گلخانه در طول آزمایش بین ۱۵ و ۳۲ و دمای خاک بین ۲۲$^{\circ}$C و ۲۸ متغیر بود (Afeck *et al*. 1990 ; Bielenin & Jones 1988a; 1988b; Browne & Mircetich 1988).

گیاهان شاهد نیز با همین روش، ولی ورمی کولیت حاوی عصاره شاهدانه مایه‌زنی شدند. در این آزمایش برای هر تیمار ۳ گلدان (هر گلدان حاوی ٤ نهال) در نظر گرفته شد. بعد از سه ماه، نهال ها به دقت از خاک خارج شده و بعد از شستشو در زیر شیرآب، درصد نهال‌های

Archive of SID

www.SID.ir

مرده، مقدار پیشروی قارچ روی طوقه، ارتفاع نهال، وزن خشک و تر شاخساره و ریشه و درصد کلنیزاسیون هر کدام از بافت‌ها در هر ژنوتیپ تعیین گردید. آزمایش در قالب فاکتوریل با پایه کاملاً تصادفی در ٤٢ تیمار ( ١٤ ژنوتیپ و سه گونه فیتوفتورا) و هر تیمار با ٤ تکرار انجام گرفت. سپس داده‌های حاصله مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد صورت پذیرفت.

## نتیجه

### تشخیص گونه

براساس نمونه‌برداری‌هایی که در اواخر بهار تا اواسط پاییز سال ۱۳۸۲ در استان‌های فارس، کرمان و کهگیلویه و بویراحمد، انجام گرفت، سی و سه جدایه فیتوفتورا از بافت‌های طوقه، ریشه و خاک به دست آمد (جدول ٤). جدایه‌ها در سه گروه مجزا قرار می‌گیرند.در گروه اول (جدایه‌های ۱ تا ۱۸) جدایه‌ها دارای اسپورانجیوم پایدار یک، دو و گاهی سه پاپیلایی بودند. اسپورانجیوم روی محیط کشت آگاردار به تعداد معدودی و در محیط کشت‌های مایع به تعداد زیاد تشکیل شدند. متوسط ابعاد آنها ۳۱/۵۹×۵۱/۶۹ میکرومتر بود. آنتریدیوم‌ها اغلب پاراجینوس بوده و به صورت دیکلین به نقاط مختلف اُگونیوم متصل می‌شدند. اُسپورتمام محفظه اُگونیوم را پر نمی‌کرد، متوسط قطر اُسپور۳۷/۹٤ میکرومتر بود. دمای کمینه، بهینه و بیشینه به ترتیب ۸، ۲۵ و ۳۰°C بود.درگروه دوم (جدایه‌های ۱۹ تا ۳۰) جدایه‌ها دارای اسپورانجیوم پایدار و یک یا دو پاپیلایی و فاقد اُسپور بودند. دمای کمینه، بهینه و بیشینه به ترتیب ۵، ۲۵ و°C ۳۲ بود. در گروه سوم (جدایه‌های ۳۱ تا ۳۳) اسپورانجیوم ها ۲۳/۶۶×۲۷/۴۳ میکرومتر و دارای یک پاپیل بزرگ نیمه کروی بودند. این اسپورانجیوم ها ریزان و طول دنباله آنها به چهار میکرومتر می‌رسید. آنتریدیوم‌ها اغلب پاراجینوس و اکثراً در نزدیکی پایه اُگونیوم با آن تماس حاصل می‌کردند. اُسپور کروی بود و تمام محفظه اُگونیوم را پر نمی‌کرد و متوسط آن۳۳/۳۸ میکرومتر بود. دمای کمینه، بهینه و بیشینه به ترتیب ۵، ۲۵ و ۳۲°C بود. با توجه به صفات اندازه‌گیری شده فوق و بر اساس برخی از کلیدهای موجود (Erwin & Ribeiro 1996, Stamps *et al.* 1990, Waterhouse 1963, 1970). جدایه‌های گروه اول، دوم

Archive of SID

www.SID.ir

و سوم به ترتیب *P. citricola*، *P. citrophthora* و *P. cactorum* تشخیص داده شدند. جدول شماره ۳ نشان دهنده مقایسه تعداد جدایه‌های *P.citricola*، *P. citrophthora* و *P. cactorum* در مناطق نمونه‌برداری شده می‌باشد. همان طور که مشاهده می‌گردد، تعداد جدایه‌ها به ترتیب فراوانی *P. citricola*، *P. citrophthora* و *P. cactorum* می‌باشد. فراوانی جدایه‌های *P. citricola* و *P. citrophthora* از منابع جداسازی به ترتیب مربوط به طوقه، تنه و ریشه می‌باشد. در حالی که جدایه‌های *P. cactorum* فقط از خاک (با کمک گیاهچه گلرنگ) جداسازی گردید

**اثبات بیماری‌زایی**

نتایج حاصل از مایه‌زنی شاخه‌های بریده نشان داد که ریسه‌های گونه *P.citricola* با سرعت بیشتری نسبت به گونه‌های دیگر قادر به پیشروی در شاخه‌های بریده بودندگونه *P. citricola* (جدایه‌های اقلید، یاسوج و سپیدان)، گونه *P. citrophthora* (جدایه‌های شیراز، کرمان و بوانات) و گونه *P. cactorum* (جدایه‌های مرودشت) به ترتیب از قدرت بیماریزایی بالایی برخوردار بودند. و گونه *P.citricola* به عنوان مهاجم‌ترین گونه روی شاخه‌های بریده گردو تشخیص داده شد.

**عکس‌العمل ارقام گردو به گونه‌های فیتوفتورا**

مقایسه درصد کلنیزاسیون طوقه، ریشه اصلی و فرعی، درصد مرگ ومیر و میزان پیشروی بیماری (جدول ۴) نشان داد که بیشترین درصد پوسیدگی و پیشرفت بیماری مربوط به ژنوتیپ سید حسینی و گونه *P.citricola* است. تمام ژنوتیپ های گردوکه مورد مطالعه قرار گرفتند به هر سه گونه قارچ حساس بودند و لرگ(*Pterocarya fraxinifolia*) به هر سه گونه قارچ مقاومت نشان داد .در واقع بر اساس درصد کلنیزاسیون طوقه، ریشه اصلی و فرعی، درصد مرگ ومیر و میزان پیشروی بیماری می توان *P.citricola* را به عنوان مهاجم ترین گونه در ایجاد بیماری در نظر گرفت. همان گونه که در جدول۳منعکس گردیده است، کمترین کاهش ارتفاع دانهال مربوط به لرگ با *P.cactorum* و بیشترین کاهش ارتفاع دانهال مربوط به ژنوتیپ سید حسینی با *P.citricola* در مقایسه با تیمار شاهد بود. مقایسه وزن تر و خشک ریشه و شاخسارها نشان داد که ژنوتیپ $G_2$ با *P.cactorum* کمترین کاهش و ژنوتیپ سید حسینی با *P.citricola* بیشترین کاهش را در مقایسه با تیمار شاهد داشتند.

Archive of SID

www.SID.ir

**بحث**

جداسازی گونه‌ها در خرداد ماه تا اواخر تابستان ۱۳۸۲ از طوقه، ریشه و خاک صورت گرفت، اما در نمونه‌برداری‌هایی که در اوایل تابستان و پاییز همان سال انجام گرفت، گونه‌های عامل بیماری جدا نگردید. به همین دلیل، انتخاب فصل و ماه جداسازی اهمیت زیادی دارد. همچنین، استفاده از محیط کشت نیمه انتخابی و روش مورد استفاده نیز در امر جداسازی حائز اهمیت می‌باشد (Haygood *et al*. 1986) .

نتایج این تحقیق نشان داد که گونه‌های *P. citricola*، *P. citrophthora* و *P. cactorum* که قبلاً توسط سایر محققین گزارش شده‌اند (*P. citricola* از ایران‌گزارش نشده است) (*ابوسعیدی* و همکاران،۱۳۷۷ ؛ *بنی‌هاشمی*، ۱۳۷۰؛ *کیومرثی* و همکاران، ۱۳۷۷) در پوسیدگی طوقه و ریشه درختان گردو در ایران نقش دارند. در حالی که گونه‌های عامل پوسیدگی طوقه و ریشه گردو در کالیفرنیا علاوه بر این سه گونه،گونه‌های *P. cinnamomi*، *P. megasperma* و *P. cryptogea* نیز می‌باشند. (Mircetich & Matheron 1983).

با توجه به نتایج این تحقیق، گونه *P. citricola* را می توان به عنوان یک بیمارگر مخرب و غالب در ناحیه طوقه و ریشه نسبت به دو گونه دیگر در نظر گرفت. در کالیفرنیا علاوه بر *P. citricola*، *P. cinnamomi* نیز به عنوان بیمارگر مخرب و مهم شناخته شده است (Mircetich & Matheron 1983). در ایران قبلا عامل اصلی پوسیدگی طوقه و ریشه گردو *P. cactorum* و *P. citrophthora* تشخیص داده شده بود (*ابوسعیدی* و همکاران،۱۳۷۷ ؛ *بنی‌هاشمی*، ۱۳۷۰: *کیومرثی* و همکاران، ۱۳۷۷).

گونه *P. citrophthora* از لحاظ فراوانی بعد از گونه *P. citricola* قرار دارد. درحالی که Mircetich و Matheron گونه‌ها را از لحاظ فراوانی در کالیفرنیا به ترتیب *P. citricola*، *P. cactorum*، *P.megasperma*، *P.cinnamomi*، *P. citrophthora* و *P. cryptogea* معرفی نمودند (Mircetich & Matheron 1983).

گونه *P. cactorum* فقط از خاک توسط گیاهچه گلرنگ (Nebraska-10) از منطقه مرودشت جداسازی گردید. این نتایج با نتایج *بنی‌هاشمی و میچل* (Banihashemi & Mitchell 1975) مطابقت دارد. آنها در تحقیقات خود به این نتیجه رسیدند که گیاهچه گلرنگ به عنوان یک

Archive of SID

www.SID.ir

میزبان حساس به *P. cactorum* و مقاوم به برخی از گونه‌های فیتوفتورا می‌باشد. گر چه در این تحقیق فقط گونه‌های *P. citricola*، *P. citrophthora* و *P. cactorum* از طوقه، ریشه و خاک جدا شدند ولی احتمال دارد به غیر از این گونه‌ها، گونه‌های دیگری نیز در باغهای گردو وجود داشته باشند که جدا نگردیده‌اند.

در این بررسی گونه *P. citricola* مخرب‌ترین گونه روی شاخه‌های بریده گردو بود. این نتایج تا حدودی با نتایج تحقیقات Mircetich و Matheron مطابقت دارد. آنها گونه‌های *P. citricola* و *P. cinnamomi* را بیمارگرهایی با قدرت بیماریزایی بالا روی شاخه‌های بریده گردو دانستند، اما گونه‌های *P. citrophthora* و *P. cactorum* را شبیه به هم از لحاظ بیماریزایی معرفی نمودند (Mircetich & Matheron 1983).

*براون* و همکاران (Browne *et al.* 1995) در آزمایش‌هایی که بر روی درخت سیب انجام دادند، متوجه شدند که متوسط طول شانکر در شاخه‌های بریده به طور معنی‌داری با متوسط ناحیه بافت مرده در طوقه این درختان در طبیعت مرتبط نمی‌باشد. آنها با انجام این آزمایشها به این نتیجه رسیدند که شاخه‌های بریده نمی‌توانند پیشگویی دقیقی از حساسیت طوقه بکنند.

نتایج نشان می‌دهد تمام ژنوتیپ‌های گردوی*J.regia* مورد استفاده در این تحقیق به گونه‌های فوق حساس بوده و لرگ به تمام گونه‌ها تقریباً مصونیت داشته است .در واقع ژنوتیپ سیدحسینی،حساس‌ترین ژنوتیپ و بیشترین خسارت را از خود نشان داد، و این نتایج با نتایج Mircetich و Matheron (1983) مطابقت دارد. آنها گونه ای از این جنس، *Pterocarya stenoptera* ( که به طور وسیع در چین کشت می شود و از آن به عنوان پایه در کالیفرنیا استفاده می گردد) را آزمایش نموده و مشاهده کردند که گیاهچه‌های *P. stenoptera* در خاک‌های آلوده به *P. cinnamomi* هیچ گونه آلودگی نشان نمی‌دهند و حتی در خاک‌های آلوده به *P. citricola* که هر دو هفته یک بار به مدت ۴۸ ساعت غرقاب می‌شدند، پوسیدگی ریشه بسیار ناچیزی ایجاد می نمایند. بنابراین، این پایه را به عنوان پایه‌ای مقاوم که می‌تواند روزی جایگزین پایه Paradox گردد، معرفی نمودند (Mircetich & Matheron 1983).

گونه *P. citricola* یک گونه بسیار مهاجم در ایجاد بیماری روی ژنوتیپ‌های مختلف گردوی‌ایرانی (*J. regia*) می‌باشد. و رقم‌ها به ترتیب به *P. citricola*، *P. citrophthora* و

Archive of SID

www.SID.ir

*P. cactorum* حساسیت نشان می‌دهند. این نتایج با نتایج Mircetich و Matheron (1983) مطابقت دارد. آنها بیان کردند که پایه *J. regia* یک پایه بسیار حساس به گونه‌های مختلف *Phytophthora* می‌باشد (Mircetich and Matheron 1983).

شدت بالای پوسیدگی فیتوفتورایی در مناطق نمونه‌برداری شده معمولاً در اواخر بهار و از اواسط تابستان به بعد مشاهده شد، که احتمالاً به علت آبیاری بالا و اشباع طولانی خاک می‌باشد. ماترون و مرستیچ تغییرات فصلی را در حساسیت پایه‌های گردو به گونه‌های *Phytophthora* یک امر مهم پنداشتند. آنها بیان کردند غرقاب کردن زمین از اواسط پاییز تا اوایل بهار حساسیت پایه‌های *J. hindsii* و Paradox را به *P. citricola* زیاد نمی‌کند. در حالی که غرقاب شدن زمین در اواخر بهار و تابستان باعث افزایش حساسیت پایه‌ها می‌گردد. آنها بیشترین شدت پوسیدگی طوقه وریشه پایه‌های *J. hindsii* و Paradox را در خرداد ماه و کمترین شدت پوسیدگی پایه *J. hindsii* را در دی ماه و پایه Paradoxرا در مهر- آبان، کل زمستان و اوایل بهار بیان نمودند و با توجه به این نتایج آنها پایه Paradox را به عنوان یک پایه مقاوم‌تر از *J. hindsii* در طول فصل سال معرفی نمودند (Matheron & Mircetich 1985b). در واقع، مسئله غرقاب کردن درختان گردو و ایستادن آب به مدت نسبتاً زیاد در پای آنها می‌تواند یک عامل مخرب و مهم در پیشرفت پوسیدگی فیتوفتورا گردد. Matheron وMircetich در تحقیقات خود نشان دادند که گیاهچه‌های *J. hindsii* در خاک‌های آلوده به *P. cryptogea* و *P. citrophthora* که هر دو هفته یک بار به مدت صفر، ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت غرقاب شده بودند، کمترین و بیشترین پوسیدگی را در مدت زمان های صفر و ۴۸ ساعت و در خاک‌های آلوده به *P. cinnamomi* و *P. citricola* این پایه( *J. hindsii*) پوسیدگی بسیار بالایی را در همه شرایط (بدون غرقاب و غرقاب کردن در مدت زمان‌های متفاوت) از خود نشان می‌دهد. پایه Paradox در خاک‌های آلوده به *P. cinnamomi* مانند پایه *J. hindsii* واکنش نشان داد. در حالی که در خاک‌های آلوده به*P. citricola* در تیمارهای ۲۴ تا ۴۸ ساعت میزان پوسیدگی بالایی داشت و در تیمارهای صفر تا ۱۲ ساعت پوسیدگی نسبتاً کم و اختلاف قابل ملاحظه ای بین این تیمارها (صفر تا ۱۲ ساعت) مشاهده نمی‌شود (Matheron & Mircetich 1985a).

Archive of SID

www.SID.ir

به‌عقیده Mircetich و Matheron (1983) گاهی مدیریت صحیح آب مشکل پوسیدگی فیتوفتورایی گردو را حل نخواهد کرد. در واقع، جلوگیری از اشباع شدن طولانی خاک باعث کاهش آلودگی *P. cryptogea* و *P. citrophthora* روی پایه‌های *J. hindsii* و Paradox خواهد شد، اما مدیریت صحیح آب در باغ‌های آلوده به *P. cinnamomi* و *P. citricola* تاثیری در کاهش آلودگی بیماری روی پایه *J. hindsii* ندارد، هر چند تا حدود نسبتاً کمی باعث کاهش خسارت *P. citricola* روی پایه Paradox می‌گردد. اما باغ‌های آلوده به *P. cinnamomi* حتی با مدیریت صحیح آب کنترل نمی‌گردند.

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که لرگ (*Pterocarya fraxinifolia*) کاملاً مقاوم به *P. citricola*، *P. citrophthora* و *P. cactorum* می‌باشد و این نتایج با نتایج Mircetich و Matheron (1983) مطابقت دارد. آنها گیاهچه‌های *Pterocarya stenopetra* مقاوم به *P. cinnamomi* و *P. citricola* معرفی نمودند بنابراین، این پایه را به عنوان پایه‌ای مقاوم که می‌تواند روزی جایگزین پایه Paradox گردد، پیشنهاد دادند (Mircetich & Matheron 1983). بنابراین تحقیق بیشتر در مورد این پایه در حال حاضر یک امر ضروری می باشد چرا که استفاده از یک پایه مقاوم به بیماری همراه بامدیریت صحیح آب می تواند به طور قابل توجه مثمر ثمر واقع گردد.

یکی از مشکلات مهم استفاده از جنس *Pterocarya* به عنوان پایه عدم سازگاری آن با برخی از ژنوتیپ های گردو است. طبق تحقیقاتی که در امریکا صورت گرفته است سازگاری پایه *P.stenoptera* با کلیه ژنوتیپ های گردو موفقیت امیز بوده و میزان موفقیت در ژنوتیپ‌های گردو بین ۵۷ تا ۱۰۰٪ گزارش شده است (Burchell 2002) و استفاده از پیوند زبانه‌ای روی *Pterocarya* نسبت به سا یر روشها از موفقیت بیشتری بر خوردار بوده است (Burchell 2002) . تا کنون تحقیقی در مورد تجا نس *P. fraxinifolia* که زیستگاه طبیعی ان جنگل‌های استان مازندران است صورت نگرفته است. با توجه به رشد سریع این درخت و ریشه‌دهی فراوان ان تحقیقات بیشتری در مورد این پایه لازم است. نظر به اینکه در این تحقیق مشخص گردید که این پایه کاملا مصون به گونه های موجود فیتو فتورا در گردو بخصوص گونه بسیار مهاجم *P. citricola* است میتواند در اینده پایه بسیار مناسبی برای ارقام گردو در

Archive of SID

www.SID.ir

ایران باشد.

جدول ۲- مناطق جداسازی گونه‌های فیتوفتورای مورد استفاده در آزمون بیماریزایی

Table 2. Locations of *Phytophthora* species isolated & used for pathogenicity test

| گونه فیتوفتورا<br>*Phytophthora* species | محل<br>location |
|---|---|
| *Phytophthora citricola** | اقلید Eghleed |
| *P. citricola* | یاسوج Yasuj |
| *P. citricola* | سپیدان Sepidan |
| *P. citrophthora** | شیراز Shiraz |
| *P. citrophthora* | کرمان Kerman |
| *P. citrophthora* | بوانات Bavanat |
| *P.. cactorum** | مرودشت Marvdasht |
| *P. cactorum* | مرودشت Marvdasht |
| *P. cactorum* | مرودشت Marvdasht |

*گونه‌های فیتوفتورا مورد استفاده در آزمون واکنش ژنوتیپ‌های مختلف گردو

* Isolates of *Phytophthora* species used to evaluate reaction of walnut genotypes

جدول ۳- منابع ومناطق جداسازی گونه‌های مختلف فیتوفتورا از باغ‌های گردو

Table3.Sources & location of *Phytophthora* spp.from walnut orchards

| نام گونه<br>*Phytophthora* species | تعداد جدایه<br>No .of isolates | محل<br>Location | منبع جدایه<br>Sources of isolates |
|---|---|---|---|
| 5–4–3–2–1–*P .citricola* | 5 | اقلید Eghleed | طوقه و تنه C,T |
| 7–6–*P. citricola* | 2 | اقلیدEghleed | ریشه R |
| 10–9–8–*P. citricola* | 3 | خانه زنیان,Khaneh Zenyan | طوقه و تنه C,T |

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۳- (ادامه) Table 3. (continued)

| | | | |
|---|---|---|---|
| 11–*P. citricola* | 1 | خانه زنیان, Khaneh Zenyan | ریشه R |
| 14–13–12–*P. citricola* | 3 | سپیدان Sepidan | طوقه C |
| 17–16–15–*P. citricola* | 3 | یاسوج Yasuj | طوقه و تنه C,T |
| 18–*P. citricola* | 1 | یاسوج Yasuj | ریشه R |
| 19–*P. citrophthora* | 1 | بافت کرمان Bafte Kerman | طوقه C |
| 20–*P. citrophthora* | 1 | خبر Khabr | تنه T |
| 21–*P. citrophthora* | 1 | رابر Rabor | طوقه C |
| 22–*P. citrophthora* | 1 | گوغر Goohar | طوقه C |
| 23–*P. citrophthora* | 1 | جیان Gian | تنه T |
| 24–*P. citrophthora* | 1 | سوریان Sorian | طوقه C |
| 25–*P. citrophthora* | 1 | سیمکان Seamakan | طوقه C |
| 26–*P. citrophthora* | 1 | عاصمی Asemi | تنه T |
| 28–27–*P. citrophthora* | 2 | شیراز Shiraz | طوقه و تنه C,T |
| 30–29–*P. citrophthora* | 2 | شیراز Shiraz | ریشه R |
| 31-32-33- *P. cactorum* | 3 | مرودشت Marvdasht | خاک S |

Archive of SID

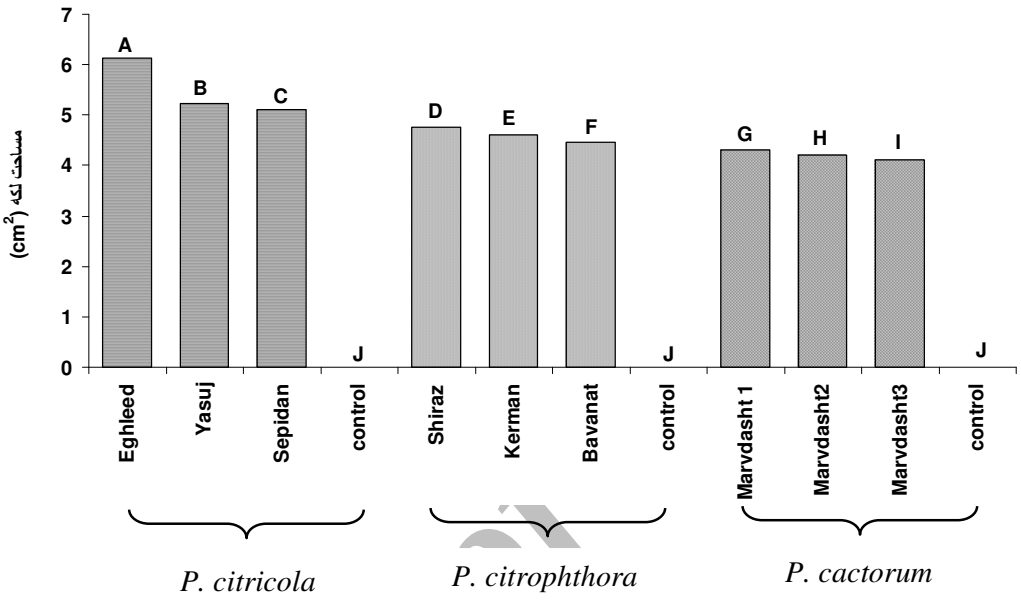
www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir




*Phytothora* spp.

شکل ۱- میزان پیشروی (مساحت لکه) جدایه‌های مختلف .*Phytophthora* spp روی شاخه‌های بریده گردو (طبق جدول ۲).

Fig. 1. Lesion extension ($cm^2$) on detached walnut branches of by isolates *Phytophthora* spp. (see Table 2).

**سپاسگزاری**

نویسندگان ازکمیته پژوهشی دانشکده کشاورزی و شورای پژوهشهای علمی دانشگاه شیراز به خا طر حمایت علمی و مالی ا ین پژوهش و از موسسه اصلاح بذر و وزارت جهاد کشا ورزی و سازمان تحقیقا ت یا سوج و اداره کشا ورزی بوانات به خا طر بذر های گردو و از آقا ی دکتر رحیمیا ن به خا طر جمع آوری و ارسال بذر لرگ صمیما نه قدردا نی می‌نمایند.

Archive of SID

www.SID.ir

**منابع**

جهت ملاحظه به صفحات (61-58) متن انگلیسی مراجعه شود.

---

آذرس نگارندگان: فریبا قادری و دکتر ضیاءالدین بنی‌هاشمی، بخش گیاهپزشکی،دانشکده کشاورزی،دانشگاه شیراز

Archive of SID

www.SID.ir