تنوع مورفولوژی و قدرت بیماری‌زایی جدایه‌های مختلف *Cryphonectria parasitica* عامل بیماری سوختگی شاه‌بلوط در استان گیلان*

الهام قزی، سید اکبر خداپرست** و مصطفی نیک نژاد کاظم پور[۱]

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۷/۱/۲۳ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۴/۲۳)

چکیده

استان گیلان یکی از معدود رویشگاه‌های طبیعی درختان شاه‌بلوط در ایران است و حفظ این ذخیره ژنتیکی، دارای اهمیت بسزایی می‌باشد. روی درختان شاه‌بلوط مناطق جنگلی شفت، رضوان‌شهر و لاهیجان (استان گیلان)، خشکیدگی شاخه و زوال درختان شاه‌بلوط مشاهده شد. پس از نمونه‌برداری‌های متعدد و انجام بررسی‌های مورفولوژیک و بیماری‌زایی، گونه *Cryphonectria parasitica* به‌عنوان عامل بیماری سوختگی درختان شاه‌بلوط، شناسایی گردید. از میان ۱۲۰ جدایه به‌دست آمده، ۱۵ جدایه از قارچ *C. parasitica*، که نشانه‌هایی از احتمال آلودگی به ویروس‌های قارچی در برخی از آنها دیده می‌شد، از لحاظ خصوصیات پرگنه، تولید آنزیم لاکاز، توانایی پوساندن میوه سیب، بیماری‌زایی روی سرشاخه‌های بریده و پاجوش‌های طبیعی، مورد بررسی بیشتر قرار گرفتند. جدایه‌های مورد بررسی از نظر خصوصیات فوق تفاوت‌هایی را با هم نشان دادند. میزان رشد خطی پرگنه در جدایه‌های مختلف روی محیط PDA_{mt} در دمای ۲۵ °C و تاریکی پس از هفت روز ۳۰-۸۷ میلی‌متر بود. رنگ پرگنه روی محیط PDA_{mt} از زرد مایل به نارنجی، نارنجی مایل به قهوه‌ای تا سفید متفاوت بود. میزان تولید آنزیم لاکاز و واکنش جدایه‌های مختلف در دمای ۲۲ °C و تاریکی پس از هفت روز روی محیط TAM متفاوت بود. آزمون‌های قدرت بیماری‌زایی جدایه‌ها روی میوه سیب، سرشاخه‌های بریده و پاجوش‌های شاه‌بلوط در شرایط آزمایشگاه و طبیعت تفاوت‌های معنی‌داری برای برخی جدایه‌ها نشان دادند. بر اساس نتایج حاصل از بررسی‌های مورفولوژیکی و آزمون‌های بیماری‌زایی، سه جدایه در زمره جدایه‌های کم‌آزار (هیپوویرولانت) قرار گرفتند. این اولین گزارش از احتمال وجود جدایه‌های کم‌آزار این قارچ از ایران است که می‌توانند به‌منظور مهار بیولوژیک برای این بیماری در استان گیلان مورد توجه قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: سوختگی شاه بلوط، بیماری‌زایی، تنوع مورفولوژی، *Cryphonectria parasitica*

مقدمه

بیماری سوختگی درختان شاه بلوط از مهم‌ترین بیماری‌های این گیاه است که در اثر قارچ *Cryphonectria parasitica* (Murrill) M.E. Barr ایجاد می‌شود. این بیماری اثر مخربی در اکثر مناطق کشت شاه بلوط به‌ویژه در اروپا و امریکای شمالی روی این درخت با ارزش داشته است. پس از پیدایش آن در ابتدای قرن بیستم در امریکای شمالی، این بیماری بیشتر درختان شاه بلوط امریکایی

* : بخشی از پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد نگارنده اول، ارئه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان

** : مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: khodaparast@guilan.ac.ir

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشیاران بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان

www.SID.ir

Archive of SID

(*Castanea dentate* (Marsh) Borkh.) را از بین برد (Anagnostakis 1987). وقتی که بیماری به اروپا وارد شد، همه گیری‌های مشابهی روی شاه بلوط اروپایی (*C. sativa* Mill.) به‌وجود آمد، اما به‌تدریج در برخی نقاط اروپا به‌ویژه جنگل‌های شاه‌بلوط ایتالیای شمالی شانکرهایی مشاهده شد که متورم و سطحی بوده و موجب از بین رفتن درختان آلوده نگردیدند، به‌طوری‌که بعد از مدتی در بسیاری از مناطق آلوده به‌طور خود به خود ترمیم یافتند و این اولین امید برای بهبود جنگل‌های شاه‌بلوط آمریکا و اروپا بود (Bissegger *et al.* 1997, Chaloux 2000, MacDonald & Fulbright 1991). این برگشت سلامت و بهبودی درختان در این مناطق به‌وجود نژادهایی از قارچ نسبت داده شد که آلوده به ویروس‌هایی با آر ان ای دو رشته‌ای (dsRNA) بودند (Bissegger *et al.* 1997). اولین بار در سال ۱۹۶۵ اصطلاح هیپوویرولانت (کم‌آزار) برای این نژادها که از شانکرهای بهبود یافته به‌دست آمده بودند به‌کار برده شد (نقل از MacDonald and Fulbright 1991). این جدایه‌ها علاوه بر داشتن قدرت بیماری‌زایی کمتر، روی محیط کشت آگاردار دارای مورفولوژی غیر طبیعی و رنگ‌دانه بسیار اندکی بودند و پرگنه‌های سفید رنگ تولید می‌کردند. پنج سال بعد، محققین در آمریکای شمالی روی تعدادی از درختان شاه‌بلوط شانکرهای سطحی را مشاهده کردند که بسیار شبیه به شانکرهای کم‌آزار در اروپا بودند. اما جدایه‌های به‌دست آمده از این شانکرها، بر خلاف جدایه‌های کم‌آزار اروپایی، دارای مورفولوژی کشت طبیعی و میزان رنگ‌دانه همانند جدایه‌های بیماری‌زا بودند. مطالعات بعدی نشان داد، برای این‌که یک جدایه کم‌آزار نامیده شود، اولین و مهم‌ترین خصوصیت آن بیماری‌زایی کمتر است. جدایه‌هایی که شانکرهای کوچکی ایجاد می‌کنند یا در یک دوره زمانی معین اسپورزایی کمتری دارند، ممکن است کم‌آزار باشند (Enebak *et al.* 1994). تقریباً تمام این جدایه‌ها، دارای مولکول‌های آر ان ای دو رشته‌ای می‌باشند (Day *et al.* 1997, Gobbin *et al.* 2003).

بعداً ویروس موجود در این جدایه‌ها با نام Cryphonectria hypovirus در خانواده Hypoviridae طبقه‌بندی شد (Bissegger *et al.* 1997, Chaloux 2000, Liu *et al.* 2002). جدایه‌های *C. parasitica* آلوده به هیپوویروس کمتر بیماری‌زا بوده به‌طوری‌که روی نهال‌های شاه‌بلوط از طریق کاهش اسپورزایی و کاهش سرعت رشد شانکر مشخص می‌شوند. این جدایه‌ها، اغلب دارای بیش از یک قطعه ژنوم dsRNA هستند و تعداد و اندازه این قطعات معمولاً متفاوت بوده و از یک جدایه به جدایه دیگر متغیر است (Chaloux 2000, Choi & Nuss 1992, Day *et al.* 1997, Locci 2003). اندازه این قطعات تقریباً بین ۱۲ هزار جفت باز تا کمتر از یک هزار جفت باز هستند. مولکول‌های ار ان ای موجود در جدایه‌های *C. parasitica* از آمریکای شمالی و اروپا با هیپوویرولانس در ارتباط هستند، اما از نظر ژنتیکی شباهت زیادی با یک‌دیگر ندارند (Basso *et al.* 2005, Enebak *et al.* 1997, Gobbin *et al.* 2003). هم‌چنین در جدایه‌های کم‌آزار ، فعالیت لاکازی معمولاً کاهش یافته و این کاهش فعالیت در استرین‌های هایپوویرلانت آلوده به ds-RNA نشان‌دهنده نقش آنزیم لاکاز در بیماری‌زایی قارچ *C. parasitica* می‌باشد (Rigling 1995, Rigling & Van Alen, 1993). مطالعات نشان داده‌اند که تغییر رنگ محیط جامد تانیک اسید به‌عنوان یک شاخص برای فعالیت فنل اکسیدازی آنزیم لاکاز می‌باشد به گونه‌ای که بین جدایه‌های بیماری‌زا و کم‌آزار دارای ژنوم ds-RNA در میزان تولید آنزیم لاکاز اختلاف معنی‌داری وجود دارد به‌طوری که جدایه‌های بیماری‌زا سبب تغییر رنگ محیط تانیک اسید به قهوه‌ای تیره می‌شوند در حالی که جدایه‌های کم‌آزار هیچ تغییر رنگی ایجاد نکرده و یا تغییر رنگ اندکی ایجاد می‌کنند(Chung *et al.* 1994, Rigling 1995).

استان گیلان یکی از معدود رویشگاه‌های طبیعی درختان شاه‌بلوط در ایران بوده و حفظ این ذخیره ژنتیکی دارای اهمیت به‌سزایی می‌باشد. بر اساس گزارش‌های به‌دست آمده از

Archive of SID

بازدیدهای کارشناسان منابع طبیعی استان از این رویشگاه‌ها در منطقه شفت، بیماری سوختگی شاه‌بلوط از چند سال پیش در جنگل‌های استان شیوع داشته است. با وجود این، اولین گزارش و تأیید رسمی بیماری توسط کاظم پور و همکاران (Kazempoore et al. 2006) در سال ۲۰۰۶ ارائه شد. در سال‌های اخیر، اپیدمی‌های شدید این بیماری در استان گیلان، یکی از مهم‌ترین معضلات این درختان محسوب می‌شود به‌طوری که به‌نظر می‌رسد در حال ریشه کنی این درخت با ارزش در این منطقه است. درخت شاه بلوط هم از نظر چوب با ارزشی که تولید می‌کند و هم از نظر میوه برای روستاییان مستقر در مناطق کوهپایه‌ای استان گیلان مثل شفت و رضوان‌شهر بسیار ارزشمند است. این در حالی است که اغلب روستاییان مستقر در این مناطق به‌دلیل نداشتن زمین‌های زراعی درامد بسیار پایین دارند و از اینرو در سال‌های اخیر درآمد آنها از این طریق به‌شدت کاهش یافته است. یکی از روش‌هایی که تاکنون در مبارزه با این بیماری سخت و خطرناک تا حدودی موثر بوده است، استفاده از نژادهای کم آزار قارچ می‌باشد. در این پژوهش، تنوع مورفولوژی و قدرت بیماری‌زایی جدایه‌های مختلف قارچ عامل بیماری سوختگی، که از مناطق مختلف زیستگاه شاه‌بلوط استان گیلان جمع‌آوری شده بودند، به‌منظور شناسایی جدایه‌های کم آزار در شرایط آزمایشگاه و طبیعت، مورد بررسی قرار گرفته است.

روش بررسی

نمونه‌برداری و تهیه جدایه‌ها

در تابستان ۱۳۸۵ و ۱۳۸۶، از مناطق شفت (ویسرود، بابا رکاب و طالقان)، رضوان‌شهر (دوران) و لاهیجان (شاه‌بلوط محله و غریب‌آباد) بازدید و از پوست درختان آلوده در محل شانکر و نیز از زخم‌های روی پاجوش‌های آلوده به بیماری سوختگی نمونه‌برداری به‌عمل آمد. نمونه‌ها داخل کیسه‌های پلاستیکی قرار داده شدند و به آزمایشگاه انتقال یافتند.

جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی جدایه‌های قارچ عامل بیماری

به‌منظور جداسازی عامل بیماری از پوست درختان شاه‌بلوط، نمونه‌های پوست به‌مدت یک دقیقه درون اتانول ۷۰% و دو دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۲% قرار داده شدند. قطعات ضدعفونی شده سه مرتبه با آب مقطر سترون شسته و پس از خشک کردن آن‌ها با کاغذ صافی روی محیط کشت‌های مختلف از جمله مالت-آگار (MA) و PDA حاوی یک قطره اسید لاکتیک کشت و به‌مدت ۵ تا ۷ روز درون انکوباتور در دمای ^{o}C ۱± ۲۵ در شرایط تاریکی قرار داده شدند. از نمونه‌های جمع‌آوری شده از مناطق مذکور، مجموعاً ۱۲۰ جدایه به‌روش تک اسپور روی محیط کشت آب آگار خالص‌سازی شدند (Anonymous 2005, Robin *et al.* 2000).

بررسی تنوع مورفولوژی جدایه‌ها

بررسی ویژگی‌های مربوط به پرگنه

ابتدا جدایه‌ها روی محیط کشت سیب زمینی-دکستروز آگار تازه حاوی ۰/۲ گرم در لیتر ال – متیونین (PDA_{mt}) کشت داده شدند و در انکوباتور در دمای $^{\circ}C$ ۱± ۲۵ در تاریکی به‌مدت یک هفته و سپس به‌دنبال آن هفت روز در شرایط دما و نور طبیعی در محیط آزمایشگاه نگه‌داری شدند. به‌طور روزانه تا روز هفتم و نیز در روزهای نهم، دوازدهم و چهاردهم از نظر رنگ پرگنه، میزان میسلیوم‌های هوایی، لوب دار بودن یا پیوسته بودن (صاف و غیر لوب دار) حاشیه پرگنه، حضور، رنگ، آرایش و تزئینات پیکنیدیوم‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند و خصوصیات مشاهده شده برای هر جدایه به‌طور جداگانه ثبت شد (Elliston 1985). از این مشخصات برای ارزیابی اولیه جدایه‌ها استفاده شد و بر آن اساس جدایه‌های بیماری‌زا و جدایه‌های کم‌آزار (احتمالی) غربال اولیه شدند و سپس نمایندگانی از آنها برای بررسی‌های بیشتر و دقیق‌تر بعدی انتخاب گردیدند.

Archive of SID

www.SID.ir

اندازه‌گیری میزان رشد پرگنه

به‌منظور اندازه‌گیری میزان رشد خطی، رشد پرگنه پس از هفت روز روی محیط PDA_{mt} با استفاده از خط کش و در دو جهت عمود بر هم اندازه‌گیری شد و در نهایت میانگین رشد پرگنه در دو قطر، به‌عنوان میزان رشد پرگنه ثبت گردید. برای هر جدایه چهار تکرار در نظر گرفته شد. از جدایه بیماری‌زای M1115 و جدایه هیپوویرولانت M1095 اهدایی دکتر ریگلینگ از مؤسسه تحقیقاتی فدرال کشور سوئیس نیز به‌منظور مقایسه استفاده شد(Chung 1994, Davis & Torsello 1999).

اندازه‌گیری میزان اسپورزایی

برای اندازه‌گیری میزان اسپورزایی، جدایه‌ها روی محیط PDA_{mt} حاوی ۰/۲ گرم در لیتر ال– متیونین، کشت شده و در انکوباتور در دمای ۱± ۲۵°C به‌مدت ۱۴ روز تحت شرایط تاریکی- روشنایی ۸:۱۶ نگه‌داری شدند. پس از این مدت، روی سطح محیط کشت میزان ۱۰ میلی‌لیتر توئین ۸۰ (۱۵%) اضافه و با سوزن سترون خراش داده و سوسپانسیون اسپور تهیه شده، از پارچه ململ سترون دو لایه عبور داده شد. میزان اسپورزایی با شمارش مستقیم اسپورها توسط هموسیتومتر انجام گرفت. برای هر جدایه چهار تکرار در نظر گرفته شد (Hillman *et al*. 1990).

اندازه‌گیری تعداد پیکنیدیوم

به‌منظور اندازه‌گیری تعداد پیکنیدیوم‌ها، جدایه‌های قارچی روی محیط عصاره مالت – آگار ۸ درصد (MEA) کشت داده شدند و در انکوباتور در دمای ۱± ۲۵°C به‌مدت ۱۴ روز تحت شرایط تاریکی – روشنایی ۸:۱۶ نگه‌داری شدند. پس از ۱۴ روز با استفاده از استریومیکروسکوپ تعداد پیکنیدیوم‌های تشکیل شده در مساحت ۳/۸۵ سانتیمتر مربع (ناحیه مرکزی تشتک پتری به قطر ۷cm) به‌طور جداگانه برای هر جدایه محاسبه شد. برای هر جدایه چهار تکرار در نظر گرفته شد(Zhang *et al*. 1993).

ارزیابی فعالیت فنل اکسیدازی آنزیم لاکاز

به‌منظور ارزیابی فعالیت لاکازی، جدایه‌ها روی محیط تانیک اسید– عصاره مالت (TAM) کشت داده شدند. محیط TAM به‌روش ریگلینگ (Rigling 1995) تهیه شد. در ادامه تشتک‌های پتری در انکوباتور در دمای ۱± ۲۲°C در تاریکی به‌مدت یک هفته نگه‌داری شدند. پس از این مدت، فعالیت لاکازی با تغییر رنگ محیط به قهوه‌ای توسط جدایه‌های بیماری‌زا و عدم تغییر رنگ یا تغییر رنگ اندک توسط جدایه‌های کم‌آزار مشخص و ثبت شد. برای هر جدایه پنج تکرار در نظر گرفته شد.

بررسی قدرت بیماری‌زایی جدایه‌های مختلف قارچ *C. parasitica*

بررسی قدرت بیماری‌زایی جدایه‌ها روی میوه سیب

به‌منظور بررسی قدرت بیماری‌زایی جدایه‌های مختلف قارچ عامل بیماری، میوه‌های سیب رسیده و سفت رقم Golden Delicious تهیه شد و روی هر میوه با چوب پنبه سوراخ کن سه چاهک به فاصله مساوی درون گوشت میوه ایجاد شدند و درون هر چاهک دو دیسک حاوی پرگنه قارچ قرار داده و محل آلوده شده با نوار پارافیلم پوشانده شد. برای هر جدایه چهار تکرار و برای هر تکرار سه نمونه در نظر گرفته شد. میوه‌های آلوده شده در انکوباتور با دمای ۱± ۲۵°C و شرایط تاریکی قرار داده شدند. میزان گسترش پوسیدگی در هر جدایه پس از ۵، ۱۳، ۱۷، ۲۱ و ۲۴ روز اندازه‌گیری شد و مساحت ناحیه نکروزه با استفاده از فرمول مساحت بیضی محاسبه شد. از PDA سترون به‌عنوان تیمار شاهد استفاده گردید (Davis & Torsello 1999, Day *et al*. 1997, Hillman *et al*. 2004).

بررسی قدرت بیماری‌زایی جدایه‌ها با استفاده از قطعات بافت پوست و چوب

سر شاخه‌هایی به قطر ۳-۲ سانتی‌متر از درختان شاه‌بلوط جمع‌آوری گردید و سپس به قطعات ۲/۵ سانتی‌متری تقسیم و

Archive of SID

از طول دو نیم شدند. سپس هر یک از این قطعات درون تشتک‌های پتری حاوی کاغذ صافی سترون مرطوب قرار داده شدند. سپس از حاشیه پرگنه هفت روزه قارچ، دیسک‌های پنج میلی‌متری برداشته و روی قطعات بافت پوست و چوب قرار داده شد. پس از آلوده سازی، تشتک‌های پتری حاوی قطعات بافت پوست و چوب، درون انکوباتور با دمای ۱± ۲۵°C و رطوبت نسبی ۹۶% در شرایط تاریکی قرار داده شدند. پس از چهار روز، تشتک‌های پتری از انکوباتور خارج و هر یک از قطعات از نظر تشکیل ناحیه نکروتیک، میزان رشد میسلیوم و تولید پیکنیدیوم مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای هر جدایه چهار تکرار در نظر گرفته شد (Lee *et al.* 1992).

مقایسه قدرت بیماری‌زایی جدایه‌ها با استفاده از سرشاخه‌های بریده شده

سرشاخه‌هایی به قطر ۳-۲ سانتی‌متر از درختان شاه‌بلوط جمع‌آوری و سپس به قطعات ۳۰ سانتی‌متری تقسیم شدند. به‌منظور جلوگیری از خشک شدن این قطعات، هر یک از دو انتهای بریده شده با نوار پارافیلم پوشانده شد. در ادامه سه دیسک پنج میلی‌متری به فاصله ۱۲ سانتی‌متر از یک‌دیگر از پوست سرشاخه‌ها بر داشته شد و دیسک پرگنه قارچ به‌جای آن‌ها قرار داده شد. سطح سرشاخه‌ها در محل زخم پس از آلوده‌سازی با پارافیلم پوشانده شد. سرشاخه‌ها پس از آلوده‌سازی درون انکوباتور با دمای ۱± ۲۵°C و رطوبت نسبی ۹۶% در شرایط تاریکی قرار داده شدند. پس از پنج هفته سرشاخه‌ها از انکوباتور خارج، پوشش پارافیلم از روی آن‌ها برداشته شد. در ادامه طول و عرض شانکر هر یک از جدایه ها اندازه‌گیری شد و مساحت شانکر ایجاد شده با استفاده از فرمول مساحت بیضی محاسبه شد. برای هر جدایه چهار تکرار و برای هر تکرار سه نمونه در نظر گرفته شد (Lee *et al.* 1992, Elliston 1985, Griffin *et al.* 1983).

مقایسه قدرت بیماری‌زایی جدایه‌های *Cryphonectria* روی پاجوش‌های شاه‌بلوط در طبیعت

چهار پاجوش به قطر ۱۲-۷ سانتی‌متر از درختان شاه‌بلوط در منطقه رضوان‌شهر (دوران) انتخاب گردید. چهار دیسک شش میلی‌متری به فاصله حداقل ۳۰ سانتی‌متر از یک‌دیگر از پوست پاجوش‌ها برداشته شد و دیسک پرگنه چهار روزه قارچ به‌جای آن‌ها قرار داده شد و سطح پاجوش‌ها در محل زخم پس از آلوده‌سازی با پارافیلم پوشانده شد. پس از سه ماه پوشش پارافیلم از روی پاجوش‌ها، برداشته شد. در ادامه طول و عرض شانکر هر یک از جدایه‌ها اندازه‌گیری شد و مساحت شانکر ایجاد شده با استفاده از فرمول مساحت بیضی محاسبه شد. برای هر جدایه چهار تکرار در نظر گرفته شد (Elliston 1985, Hoegger *et al.* 2002).

نتیجه

در بررسی‌های اولیه مشخص شد که جدایه‌های مختلف *C. parasitica* از نظر ویژگی‌های مربوط به پرگنه روی محیط کشت PDA_{mt}، با یک‌دیگر تفاوت دارند. بر این اساس جدایه‌های Sh215 و Do3114 با پرگنه‌های سفید رنگ و جدایه Ba58 با پرگنه نارنجی از میان کلیه جدایه‌های مورد بررسی به‌عنوان جدایه‌های کم‌آزار احتمالی تشخیص داده شدند و پس از آزمایشات تکمیلی نتیجه به‌دست آمده مؤید این موضوع شد. در زیر نتایج بررسی‌های مربوط به این جدایه‌ها و نمایندگانی از جدایه‌های بیماری‌زا به‌طور مفصل شرح داده می‌شود.

ویژگی‌های مربوط به پرگنه روی محیط PDA

اکثر جدایه‌ها روی محیط PDA_{mt}، حاشیه یک‌نواخت، میسلیوم‌های هوایی فراوان، متراکم و پرپشتی تولید کردند و این جدایه‌ها رنگ نارنجی جدایه‌های بیماری‌زای *C. parasitica* را روی محیط کشت ایجاد کردند. پیکنیدیوم‌ها به رنگ نارنجی با نوک تیره، نیمه‌کروی، صاف و لزج به فراوانی در سراسر پرگنه در دوایر و حلقه‌های متحدالمرکز به تعداد سه

www.SID.ir

تا پنج عدد به‌طور منظم، تشکیل شدند (شکل۱ و جدول۱). در جدایه Ba58 میزان تولید رنگ‌دانه نسبت به سایر جدایه‌ها، بسیار زیاد بود به‌طوری‌که پرگنه از ابتدای رشد، به رنگ نارنجی تیره مایل به قهوه‌ای مشاهده شد. در این جدایه، حاشیه پرگنه لوب‌دار، میسلیوم‌های هوایی کوتاه، کم پشت و به‌میزان بسیار اندک در سطح تشتک پتری تشکیل شدند. ساختارهای پیکنیدیومی بسیار کوچک در حلقه‌های متحد المرکز منظم روی پرگنه تولید شده بودند (جدول ۱). دو جدایه Sh215 و Do3114 از نظر خصوصیات مورفولوژیکی به آسانی از سایر جدایه‌ها قابل تمایز بودند. این جدایه‌ها تا روز دوازدهم به‌طور کامل سفید رنگ باقی ماندند و هیچ رنگ‌دانه‌ای در سطح محیط کشت مشاهده نشد و هیچ پیکنیدیومی در سطح محیط کشت تولید نکردند. با وجود این، در روز چهاردهم تعداد اندکی پیکنیدیوم به رنگ زرد روشن و محدود به مرکز پرگنه، سطح پرگنه را پوشانده بود. میسلیوم‌های هوایی بسیار اندک و کوتاه و حاشیه پرگنه یک‌نواخت تا تقریباً یک‌نواخت مشاهده شد (شکل۱ و جدول۲).

رشد خطی پرگنه روی محیط PDA

پس از ۷ روز، میانگین رشد خطی پرگنه به‌وسیله جدایه‌های *C. parasitica* روی محیط PDA_{mt} متفاوت بود. به‌طوری‌که بیشترین رشد خطی پرگنه مربوط به جدایه M1115 با میانگین ۸۷/۵ میلی‌متر و کمترین رشد خطی پرگنه مربوط به جدایه Ba58 با میانگین ۳۰ میلی‌متر بود. بین جدایه‌های سفید رنگ Sh215 و Do3114 با اکثر جدایه‌های نارنجی رنگ، از نظر رشد خطی پرگنه، اختلاف معنی داری مشاهده نشد. این در حالی بود که جدایه کم‌آزار M1095 از نظر رشد خطی پرگنه نیز، با اکثر جدایه‌های نارنجی رنگ و جدایه بیماری‌زای M1115، اختلاف معنی داری نداشت.

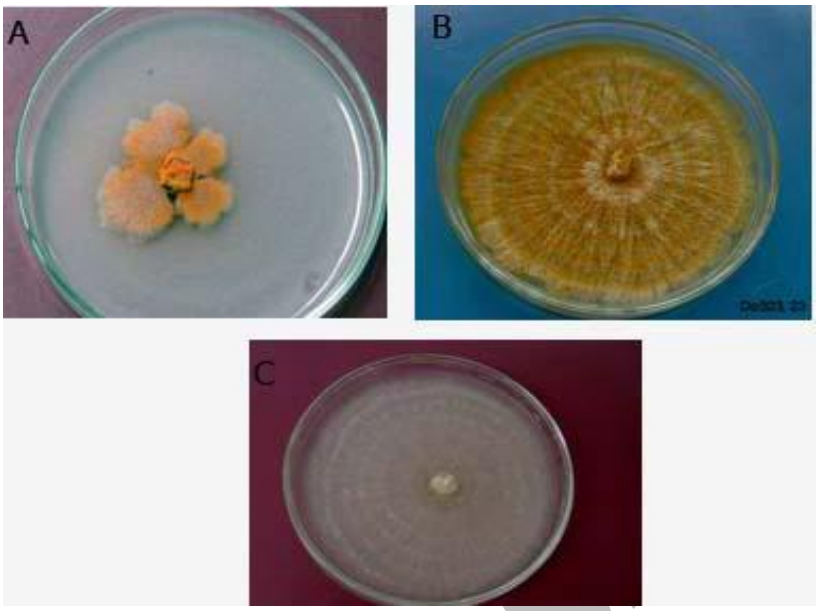
فعالیت فنل اکسیدازی آنزیم لاکاز

پس از گذشت یک هفته، واکنش جدایه‌های مختلف *C. parasitica* روی محیط TAM متفاوت بود (شکل۲). در این آزمایش، ۱۲ جدایه سبب تغییر رنگ شدید محیط کشت کرم رنگ TAM به قهوه‌ای تیره شدند، به گونه‌ای که بیشترین تغییر رنگ در حاشیه پرگنه مشاهده شد. در حالی که دو جدایه سفید رنگ Do3114 و Sh215 روی محیط TAM هیچ تغییر رنگی نشان ندادند و یا تغییر رنگ آن‌ها بسیار اندک بود. جدایه Ba58 پس از ۷ روز، نسبت به سایر جدایه‌ها رشد کمتری داشت و روی محیط TAM تولید رنگ‌دانه‌های نارنجی مایل به قهوه‌ای فراوان نمود. اما این جدایه با وجود تولید رنگ‌دانه‌های فراوان، سبب تغییر رنگ بسیار اندک محیط TAM شد و این خصوصیت به آسانی از روی رنگ حاشیه پرگنه قابل تشخیص بود.

قدرت بیماری‌زایی جدایه‌ها روی میوه سیب

پس از ۲۴ روز، میانگین مساحت ناحیه نکروزه ایجاد شده به‌وسیله جدایه‌های Sh188، Ba32، Ba62 و D03186 نسبت به جدایه‌های D03114، Sh215 و Ba58 روی میوه سیب بیشتر بود، به‌طوری‌که سه جدایه اخیر نسبت به سایر جدایه‌ها، بیماری‌زایی کمتری را روی میوه سیب ایجاد کردند. همانطور که در جدول ۳ نشان داده شده است، بیشترین مساحت ناحیه نکروزه ایجاد شده مربوط به جدایه Sh188 با میانگین cm^2 ۳۱/۷۱ و کمترین مساحت ناحیه نکروزه مربوط به جدایه Ba58 با میانگین cm^2 ۲/۳۵ بود. جدایه‌های D03114، Sh215 و Ba58 در انکوباتور در دمای ۱± ۲۵°C و شرایط تاریکی، روی میوه سیب رشد بسیار کمی داشتند، به‌طوری‌که رشد آنها پس از ۱۵ روز متوقف شد و حتی با گذشت ۳۰ روز از زمان مایه زنی، هیچ پیکنیدیوم روی آنها مشاهده نشد. در سایر جدایه‌ها، پس از گذشت ۳۰ روز لکه‌های نکروزه سراسر میوه را فرا گرفتند و سبب لهیدگی کامل بافت میوه شدند و پیکنیدیوم‌های نارنجی رنگ قارچ عامل بیماری به فراوانی روی سطح میوه تشکیل شدند (شکل۳).

Archive of SID



شکل۱. مشخصات پرگنه جدایه های *Cryphonectria parasitica* روی محیط PDA_{mt} بعد از ۱۲ روز: (A) تشکیل پرگنه با حاشیه لوب دار در جدایه کم‌آزار Ba58، (B) تشکیل پیکنیدیوم‌ها و رنگ‌دانه در جدایه بیماری‌زای Do323، (C) عدم تولید رنگ‌دانه و پیکنیدیوم در جدایه Sh215.

Fig. 1. Colony characteristics of *Cryphonectria parasitica* on PDA_{mt} after 12 days: (A) lobate colony in hypovirulent isolate Ba58, (B) Pigment and pycnidium production in virulent isolate Do323, (C) no pigment and pycnidium production in hypovirulent Sh215.

جدول۱. میزان اسپورزایی در جدایه‌های *Cryphonectria parasitica* روی محیط PDA_{mt} پس از ۱۴ روز

Table 2. Spore production in *Cryphonectria parasitica* isolates on PDA_{mt} after 14 days

جدایه‌ها Isolates	محل جداسازی Location	میانگین اسپورزایی± اشتباه معیار * $۱۰^{۷}$ SE *10 ^{7}±Mean spore production	Significance*
Ta164	Taleghan (Shaft)	4.73 ±7.70	bc
V284	Visrood (Shaft)	1.50 ±7.30	c
Sh188	Shahblutmahaleh (Lahijan)	3.19±10.73	a
Sh208	Shahblutmahaleh (Lahijan)	1.71±1o.72	a
Do3114	Doran (Rezvanshahr)	1.03±2.71	d
Ba58	Babarekab (Shaft)	1.84±6.32	c
Sh215	Shahblutmahaleh (Lahijan)	1.13±3.22	d
Ba62	Babarekab (Shaft)	3.39±3.44	d
Q153	Qaribabad (Lahijan)	1.69±7.82	bc
Q219	Qaribabad (Lahijan)	1.13±7.93	bc
Do3109	Doran (Rezvanshahr)	6.40±10.34	ab
Do3186	Doran (Rezvanshahr)	5.93±12.65	a
Do323	Doran (Rezvanshahr)	5.06±12.51	a
Ba32	Babarekab (Shaft)	1.70±7.95	bc
Do30725	Doran (Rezvanshahr)	3.64±12.54	a

Archive of SID

www.SID.ir

جدول۲. تولید پیکنیدیوم در جدایه‌های *Cryphonectria parasitica* روی محیط PDA_{mt} پس از ۱۴ روز*

Table 3. Pycnidium production in *Cryphonectria parasitica* on PDA_{mt} after 14 days

جدایه‌ها Isolates	میانگین تولید پیکنیدیوم± اشتباه معیار × ۱۰^۷ Mean pycnidium SE * 10^7 ±production	Significance*	جدایه‌ها Isolates	میانگین تولید پیکنیدیوم± اشتباه معیار * ۱۰^۷ Mean pycnidium SE * 10^7 ±production	Significance
Ta164	10.87±333.50	e	Q153	5.54±413.75	cd
V284	22.58±338.75	e	Q219	8.95±317.75	e
Sh188	3.37±413.75	cd	Do3109	23.09±367	de
Sh208	19.47±440.72	bc	Do3186	11.20±439.25	bc
Do3114	1.03±14.75	g	Do323	7.36±492.75	ab
Ba58	18.81±350	de	Ba32	17±356.25	de
Sh215	1.29±17	g	Do30725	3.94±519.25	a
Ba62	5.40±115	f			

شکل۲. ارزیابی فعالیت فنل اکسیدازی آنزیم لاکاز در جدایه‌های مختلف قارچ *Cryphonectria parasitica* روی محیط TAM پس از ۷ روز: (بالا) به‌ترتیب از چپ به راست جدایه‌های ویرولانت Ta164، Sh208 و Sh188. (پایین) به ترتیب از چپ به راست جدایه‌های کم آزار Ba58، Sh215 و Do3114.

Fig. 2. Laccase activity in *Cryphonectria parasitica* isolates on TAM after 7 days: (upper, left to right) virulent isolates Ta164, Sh208, Sh188, (lower, left to right) hypovirulent isolates Ba58, Sh215 and Do3114.

قدرت بیماری‌زایی جدایه‌ها روی قطعات بافت پوست و چوب

تمام جدایه‌ها به استثناء Do3114، Sh215 و Ba58، پس از چهار روز روی نمونه‌های پوست و چوب به‌ویژه روی پوست، به فراوانی رشد کرده و سطح بافت پوست و چوب را به‌طور کامل احاطه کردند، به‌طوری‌که میسلیوم‌های انبوه و فراوان سرتاسر بافت پوست و چوب را در مدت چهار روز به‌طور کامل پوشاندند و با گذشت ۱۰ روز از نگه‌داری نمونه‌ها درون انکوباتور، پیکنیدیوم‌های زرد مایل به نارنجی ظاهر شدند و هم‌زمان با تشکیل پیکنیدیوم‌ها، رنگ‌دانه‌ها نیز تولید و سراسر پرگنه را پوشاندند. جدایه Ba58 از نظر میزان تولید رنگ‌دانه روی قطعات بافت پوست و چوب، با سایر جدایه‌ها متفاوت

www.SID.ir

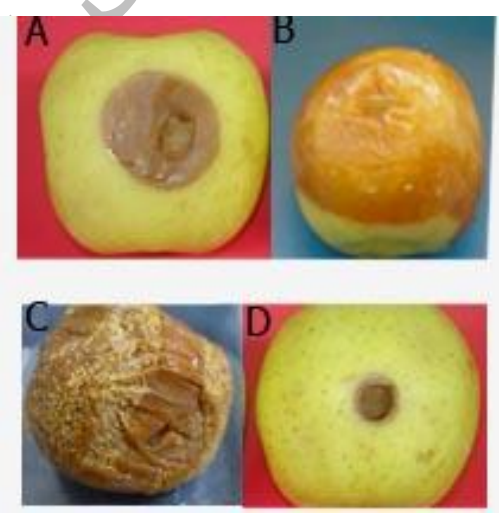
جدول۳. توانایی پوساندن میوه سیب توسط جدایه‌های *Cryphonectria parasitica* ۲۴ روز پس از مایه‌زنی

Table 4. Apple fruit rot capability by *Cryphonectria parasitica* isolates after 24 days

جدایه‌ها iaolates	میانگین مساحت ناحیه پوسیده SE*(cm^2)±Mean rotted area	
Ba62	1.43±28	a
Ba32	2.16±29.03	a
Do3186	1.05±25.60	a
Sh188	1.94±31.71	a
Ba58	0.08±2.35	b
Do3114	0.18±7.96	b
Sh215	0.36±7.51	b
شاهد control	0	b

*میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون، از نظر آماری در سطح ۱% بر اساس آزمون توکی اختلاف معنی داری ندارند.

* Isolates with the same letters are not significantly different at 1 % level according to Tuky test.



شکل۳. مقایسه قدرت پوسانندگی جدایه‌های مختلف قارچ *Cryphonectria parasitica* روی میوه سیب پس از ۲۴ روز:(A) جدایه کم‌آزار Sh215، (B) جدایه بیماری‌زای V284، (C)تولید پیکنیدیوم در جدایه V284 روی میوه سیب پس از ۳۰ روز نگه‌داری در انکوباتور در شرایط تاریکی و دمای ۲۵°C، (D) تیمار شاهد.

Fig. 3. Apple fruit rot capability in *Cryphonectria parasitica* isolates after 24 days: (A) hypovirulent isolate Sh215 (B) virulent isolate V284 (C) pycnidium production in V284 after 30 days incubation at 25 and darkness (D) control.

شکل۴. مقایسه قدرت بیماری‌زایی جدایه‌های مختلف قارچ *Cryphonectria parasitica* روی قطعات بافت پوست و چوب: عدم تشکیل میسلیوم‌های هوایی و رنگ‌دانه و پیکنیدیوم در جدایه Sh215 پس از ده روز (بالا). تشکیل رنگ‌دانه‌های نارنجی و پیکنیدیوم‌های تیره به میزان فراوان در جدایه بیماری‌زای Sh188 پس از ده روز (پایین).

Fig. 4. Comparision of virulence of *Cryphonectria parasitica* on bark/wood tissue: lack of aerial mycelia and pigment in hypovirulent isolate Sh215 after 10 days (upper), orange pigmentation and pycnidium production in virulent isolate Sh188 after 10 days (lower).

www.SID.ir

جدول۴. شانکر ایجاد شده روی شاخه‌های بریده توسط جدایه‌های مختلف *Cryphonectria parasitica* در ۵ هفته پس از مایه‌زنی

Table 5. Cankers on cut stems caused by *Cryphonectria parasitica* after 5 weeks

جدایه‌ها	میانگین اندازه شانکر ایجاد شده SE±mean canker size (cm^2)	Significance*	جدایه‌ها	میانگین اندازه شانکر ایجاد شده SE±mean canker size (cm^2)	Significance
V284	0.02±35.19	a	Ba62	1.73±24.73	ab
Sh215	0.80±12.75	c	Sh208	1.18±35.32	a
Do3114	1.18±15.69	bc	Sh188	1.27±34.67	a
Ba32	1.90±34	a	Do3186	1.02±30.26	a
Ta164	1.73±31.72	a	Do3109	0.68±32.40	a
Do30725	1.59±34.41	a	Ba58	0.81±15.72	bc
Q219	1.78±30	a	Q153	0.79±35.57	a
Do323	1.42±34.69	a	شاهد control	0	d

*میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون، از نظر آماری در سطح ۱% بر اساس آزمون توکی اختلاف معنی داری ندارند.

* Isolates with the same letters are not significantly different at 1 % level according to Tuky test.

بود، به‌طوری‌که رنگ‌دانه‌های نارنجی تیره مایل به قهوه‌ای سرتاسر پرگنه را پوشاندند. با این وجود پس از چهار روز، هیچ پوسیدگی و نکروزی روی سطح نمونه‌ها مشاهده نشد و با گذشت ۱۰ روز از آلوده سازی نمونه‌ها، هیچ پیکنیدیومی روی پرگنه تشکیل نشد. در مقابل، دو جدایه سفید رنگ Sh215 و Do3114 پس از چهار روز روی قطعات بافت پوست و چوب، میسلیوم‌های بسیار اندکی تولید کردند به گونه‌ای که رشد میسلیوم‌ها پس از چهار روز متوقف شد و پس از ۱۰ روز نگه‌داری نمونه‌ها درون انکوباتور، هیچ پیکنیدیومی مشاهده نشد (شکل ۴).

مقایسه قدرت بیماری‌زایی جدایه‌ها با استفاده از سرشاخه-های بریده شده

مساحت شانکرهای ایجاد شده توسط جدایه‌های مختلف، روی قطعات بریده ساقه، پس از پنج هفته نگه‌داری در انکوباتور در دمای ۲۵°C و شرایط تاریکی، متفاوت بود. همان‌طور که در جدول ۴ نشان داده شده است، بیشترین مساحت شانکر ایجاد شده مربوط به جدایه V284 با میانگین cm^2 ۳۹/۱۹ و کمترین مساحت شانکر ایجاد شده، مربوط به جدایه Sh215 با میانگین cm^2 ۱۲/۷۵ بود. به‌طورکلی شانکرهای ایجاد شده توسط جدایه‌های بیماری‌زا نسبت به سه جدایه Ba58، D03114 و Sh215 بزرگ‌تر بوده و تعداد زیادی پیکنیدیوم نارنجی رنگ با نوک تیره همراه با فتیله‌های اسپوری تولید کردند. شانکرهای ایجاد شده توسط این جدایه‌ها، پس از پنج هفته به‌طور واضح و مشخص، فرو رفته بودند و سراسر ساقه را فرا گرفتند. سه جدایه Ba58، D03114 و Sh215 به‌طور معنی داری نسبت به سایر جدایه‌ها، بیماری‌زایی کمتری داشته و شانکرهای کوچک‌تری ایجاد کردند. این جدایه‌ها پس از مایه‌زنی، بخش کوچکی از پوست ساقه را کلنیزه و موجب نکروزه شدن آن گردیدند، اما رشد آنها پس از سه هفته متوقف شد، به‌طوری‌که پس از پنج هفته هیچ پیکنیدیومی مشاهده نشد و یا میزان آن‌ها بسیار اندک بود.

مقایسه قدرت بیماری‌زایی جدایه‌های *Cryphonectria* روی پاجوش‌های شاه‌بلوط در طبیعت

پس از سه ماه، میانگین مساحت شانکرهای ایجاد شده به‌وسیله جدایه‌های *C. parasitica* روی پاجوش‌های شاه‌بلوط متفاوت بود. همان‌طور که در جدول ۵ نشان داده شده است، بیشترین مساحت شانکر ایجاد شده مربوط به جدایه Sh188 با میانگین cm^2 ۸۴/۱۶ و کمترین مساحت شانکر، مربوط به جدایه

Archive of SID

جدول۵. شانکر ایجاد شده روی پاجوش‌ها در طبیعت توسط جدایه‌های مختلف *Cryphonectria parasitica* سه ماه پس از مایه‌زنی

Table 5. Cankers on natural sprout caused by *cyphonecteria. parasitica* after 3 months

جدایه‌ها	میانگین شانکر SE±Mean canker size (cm^2)	Significance*
Sh188	5.55±84.16	a
V284	6.90±80.36	a
Ba62r	2.94±32.18	b
Do323	2.30±26.09	b
Sh215	2.17±7.94	c
Ba58	1.04±8.32	c
شاهد control		c

* میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون، از نظر آماری در سطح ۱% بر اساس آزمون توکی اختلاف معنی داری ندارند.

*Isolates with the same letters are not significantly different at 1 % level according to Tuky test.

Sh215 با میانگین cm^2 ۷/۹۴ بود. دو جدایه Sh215 و Ba58 نیز شانکرهای بسیار کوچک بیضوی شکل در نقطه مایه‌زنی شده تولید نمودند. پیکنیدیوم‌ها به رنگ زرد مایل به نارنجی به‌میزان اندک تا متوسط در نقطه مایه‌زنی شده و اطراف آن به‌صورت پراکنده تشکیل شده بودند. پوست درخت در محل شانکر ایجاد شده به‌میزان اندکی شکاف برداشته بود (شکل ۵). در حالی‌که جدایه‌های بیماری‌زا سبب ایجاد شانکرهای طولی گسترده‌ای شدند که دور تا دور ساقه را فرا گرفته بود. در این جدایه‌ها، پوست درخت در نقطه مایه‌زنی شده به‌شدت نکروزه و فرو رفته بود و شکاف‌هایی به رنگ قرمز مایل به قهوه‌ای در ناحیه شانکر ایجاد شدند. پیکنیدیوم‌ها به رنگ زرد مایل به نارنجی به میزان فراوان در سرتاسر شانکر ایجاد شده و پوست درخت در زیر نقطه مایه‌زنی شده به‌طور کامل از بین رفته بود.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (10-9) متن انگلیسی مراجع شود.

Archive of SID

www.SID.ir