

## فراوانی جداسازی برخی از میکروارگانیسم‌ها و بیمارگرهای گیاهی همراه با عارضه واکاری باغ‌های هلو در استان چهارمحال و بختیاری

ناصر امانی فر<sup>۱\*</sup>

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۴/۲۶؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۹/۲۵)

### چکیده

در حال حاضر، عارضه واکاری یا کوتاهی عمر درختان هلو، در باغ‌های واکاری شده، به‌عنوان مهم‌ترین عامل محدودکننده تولید این محصول در استان چهارمحال و بختیاری است. طی سال‌های ۹۶-۱۳۹۳ ضمن بازدید از باغ‌های هلو واکاری شده در این استان ۱۰۸ نمونه از اندام‌های گیاهی و خاک اطراف ریشه (فراریشه) جمع‌آوری شد و مورد بررسی آزمایشگاهی جهت جداسازی و شناسایی میکروارگانیسم‌ها و بیمارگرهای همراه با علائم عارضه واکاری هلو قرار گرفت. علائم عارضه به‌صورت زردی عمومی و کلروز، کم‌رشدی، خزان زودرس، تغییر رنگ برگ‌ها، پوسیدگی طوقه و ریشه، شانکر و مرگ درختان جوان بود. از نمونه‌های گیاهی و خاک به ترتیب فراوانی جدایه‌هایی از تاکسون‌های *Bacillus sp*، *Fusarium sp*، *Pseudomonas flourescens*، *Mesocriconema xenoplax*، *Aspergillus sp*، *Alternaria sp*، *Pantoea agglomerans*، *Arthrobacter sp*، *Phytophthora sp*، *Pseudomonas putidae*، *Pseudomonas syringae*، *Meloidogyne sp*، *Streptomyces sp*، *Trichoderma sp*، *Dematophora necatrix*، *Verticillium dahliae*، *Paratylenchus sp*، *Stenotrophomonas maltophilia*، *Pythium sp* و *Rhizoctonia sp* جداسازی و شناسایی شد. حدود ۱۱٪ جدایه‌ها نیز ناشناخته بودند. میزان عارضه واکاری و جداسازی این میکروارگانیسم‌ها در باغ‌هایی که بلافاصله پس از امحاء درختان کشت قبلی احداث شده و یا گونه مشابه قبلی کشت شده حدود ۳۰٪ بیشتر از باغ‌هایی است که حداقل یک سال به‌صورت نکاشت (آیش) بوده است. بر این اساس می‌توان گفت این عوامل مهم‌ترین عوامل زنده همراه با عارضه واکاری و کوتاهی عمر درختان هلو در استان چهارمحال و بختیاری هستند. آزمایش‌های اصول کخ برای تعیین نقش و سهم این میکروارگانیسم‌ها در ایجاد این عارضه ضروری است.

کلیدواژه: چهارمحال و بختیاری، عارضه واکاری، هلو

\* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: sahragardn@yahoo.com

۱. بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی چهارمحال و بختیاری، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شهرکرد.

## Frequency isolation some of microorganisms and pathogens associated with peach replant problem in orchards of Chahar Mahal va Bakhtiary province

N. Amanifar<sup>1\*</sup>

(Received: 17.7.2018; Accepted: 16.12.2018)

### Abstract

At present, replant disorder and peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) short life has become an important problem in peach production, and it has seriously restricted the development of the peach industry in Chahar Mahal va Bakhtiary province. During 2014-2017, 108 samples of plant tissues and rhizosphere were collected from the peach orchards of this province. Samples were investigated to isolation and identification microorganisms and pathogens associated with symptoms of peach replant problem. Symptoms including: yellowing, stunting, abscission of leaf, leaf discoloration and chlorosis, crown and root rot, canker and death of young trees. From plant and soil samples, the frequency respectively, isolates of *Bacillus* sp, *Fusarium* sp, *Pseudomonas flourescens*, *Mesocriconema xenoplax*, *Aspergillus* sp, *Alternaria* sp, *Pantoea agglomerans*, *Arthrobacter* sp, *Phytophthora* sp, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas putidae*, *Verticillium dahliae*, *Dematophora necatrix*, *Trichoderma* sp, *Streptomyces* sp, *Meloidogyne* sp, *Pratylenchus* sp, *Paratylenchus* sp, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pythium* sp and *Rhizoctonia* sp were isolated and identified. About 11% of isolates were unknown. The amount of replant disorder and isolation of these microorganisms in orchards that were planted immediately after the destruction of previous trees or planted the same previous species was about 30% more than the orchards that had not been cultivated (fallow) for at least one year. On this basis canbe say these microorganisms are the most important agents associated with replant problem and life short in peach orchards in Chahar Mahal va Bakhtiary province. Koch's postulates investigations are necessary to determine the role of these microorganisms in this replant disease.

**Keywords:** Chahar Mahal va Bakhtiary, *Prunus persica*, replant problem

\*Corresponding author's E-mail: sahragardn@yahoo.com

1. Assistant Professor, Department of Plant Protection Research; Chaharmahal va Bakhtiary Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Shahrekord, Iran.

## مقدمه

وجود ندارد، از طرفی عمر مفید اقتصادی درختان میوه محدود است، به‌عنوان مثال برای درختان هلو کمتر از ۱۰ سال است، لذا چاره‌ای جز جایگزینی و واکاری درختان قدیمی نیست. هنگامی که باغی جایگزین می‌شود، رشد و بهره‌وری درختان نسل جدید اغلب توسط "عارضه واکاری" سرکوب می‌شود (Gilmore 1959)، مگر اینکه اقدامات احتیاطی قبلاً صورت گرفته باشد. این پدیده بیش از ۲۰۰ سال است که به رسمیت شناخته شده است و در همه مناطق عمده کشاورزی دنیا در روی انواع درختان میوه دانه‌دار، هسته‌دار و زیتنی اتفاق می‌افتد (Bent et al. 2009). دو نوع عارضه واکاری توصیف شده است. عارضه واکاری غیراختصاصی که معمولاً گونه‌های گیاهی غیر مرتبط را تحت تأثیر قرار می‌دهد که پراکنش آن در باغ به‌صورت لکه‌ای است و اغلب با جمعیت بالای نماتدهای انگل گیاهی مرتبط است. در مقابل عارضه واکاری خاص است که پراکنش آن در باغ به‌صورت یکنواخت است و تنها یک یا چندگونه نزدیک را تحت تأثیر قرار می‌دهد و به‌ندرت به حضور نماتدهای انگل گیاهی مرتبط است. عوامل متعددی در بیماری واکاری نقش دارند. یک سری از میکروارگانیسم‌ها شامل باکتری‌ها، قارچ‌ها و اوومیسیت‌ها نیز در این عارضه نقش دارند (Browne et al., 2006).

از مهم‌ترین عوامل غیرزنده‌ای که در عارضه واکاری درختان میوه نقش دارند را می‌توان تغذیه نامتعادل، اسیدیته بالا یا پایین، بقایای گیاهی از محصولات قبلی، که متابولیت‌های سمی در طول تجزیه خود در اثر میکروارگانیسم‌ها آزاد می‌کنند، ساختار ضعیف، ترکیبات آرسنیک‌به‌ویژه در pH پایین که در خاک‌های شنی با ترکیبات آلی کم برای درختان جوان سمی هستند، زهکشی نامناسب خاک و تنش سرما و خشکی را نام برد (Traquair 1984, Browne et al., 2006). در بین عوامل

هلو (*Prunus persica* (L.) Batsch) یکی از درختان میوه مهم در مناطقی از ایران از جمله استان چهارمحال و بختیاری است، به‌طوری‌که حدود ۱۰٪ از سطح زیر کشت درختان میوه در این استان به هلو اختصاص داده شده است (آمارنامه وزارت جهاد کشاورزی ۱۳۹۴). کوتاهی عمر و عارضه واکاری هلو (Peach replant disorder) مهم‌ترین عامل محدودکننده تولید این محصول در استان چهارمحال و بختیاری است. درختان جوان هلو در باغ‌هایی که واکاری شده نسبت به باغ‌هایی که واکاری نشده (تازه احداث) رشد کمتر و محصول کمتری تولید می‌کنند.

مهم‌ترین اندام گیاهان که با عارضه واکاری درگیر است سیستم ریشه به‌ویژه فراریشه (رایزوسفر) است. فراریشه بخشی از اکوسیستم خاک است که در آن ریشه‌های گیاه، خاک و بخش زنده خاک (biota) در تعامل هستند. این برهمکنش‌ها اغلب برای گیاهان سودمند است، حاصلخیزی خاک را افزایش می‌دهند و باعث کاهش اثر تخریب مواد شیمیایی سمی می‌گردد. ترشحات ریشه گیاهان در ناحیه فراریشه انرژی موردنیاز بخش زنده فراریشه را تأمین می‌کنند. بخش زنده تعاملی فراریشه شامل میکروارگانیسم‌ها، پروتوزوا و فون خاک است. برخی از میکروارگانیسم‌ها مفیدند، درحالی‌که دیگران مضر هستند. برخی از موجودات زیان‌آور در انواع مختلف استراتژی‌های کنترل بیولوژیکی می‌توانند سرکوب شوند. عوامل فیزیکی کلیدی کنترل‌کننده فعالیت فراریشه گیاه عبارت‌اند از: درجه حرارت، آب قابل دسترس، اکسیژن، pH و ساختار خاک است (Lynch and Leij 2012).

با توجه به محدودیت‌های موجود به‌ویژه کمبود منابع آب امکان توسعه سطح زیر کشت درختان میوه در ایران

2010). نماتدهای *Mesocriconema xenoplax* و *Meloidogyne sp* از عوامل مؤثر در عارضه واکاری و کوتاهی عمر هلو محسوب می‌شوند. *M. xenoplax* به‌عنوان عامل پیش‌آمودگی آسیب‌سرم‌زادگی و شانکر باکتریایی ناشی از *Pseudomonas syringae pv. syringae* است که به‌طور غیرمستقیم در کوتاهی عمر هلو نقش دارد (Nyczepir et al., 1983). مهم‌ترین عوامل عارضه واکاری جمعیت بالای برخی نماتدهای انگل گیاهی، گونه‌های از قارچ‌های خاک برد و گونه‌هایی از فایتوفترا هستند (Browne et al., 2006).

بهترین روش مدیریت عارضه واکاری استفاده از پایه‌های رویشی و ارقام مقاوم به عوامل دخیل در این عارضه است. تاکنون هیچ پایه مقاوم از هسته‌داران به همه عوامل زنده دخیل در عارضه واکاری گزارش نشده است، اما برخی پایه‌های رویشی به بعضی از بیمارگرهای دخیل در این عارضه واکنش مقاوم یا متحمل نشان می‌دهند (Reighard 2000). در ایران بررسی‌هایی در خصوص ارزیابی مقاومت درختان میوه هسته‌دار به برخی بیمارگرهای مؤثر در عارضه واکاری و کوتاهی عمر درختان میوه هسته‌دار صورت گرفته است (Sahragard and Banhashemi, 2006)، در این بررسی‌ها از ژنوتیپ‌ها و پایه‌های بذری استفاده شده است و در هیچ‌کدام از آن‌ها پایه‌های رویشی بکار نرفته است. با توجه به اینکه اغلب درختان میوه هسته‌دار از نظر گرده‌افشانی خود ناسازگارند و بذرها حاصل از آن‌ها تفرق صفت دارند استفاده کاربردی از نتایج این گونه پژوهش‌ها خالی از ایراد نیست زیرا تنها فراوانی مقاومت را در ژنوتیپ‌ها نشان می‌دهد، بنابراین بررسی مقاومت برای دستیابی به پایه‌های رویشی مقاوم، به‌ویژه به بیمارگرهای خاک برد، لازم است. بر اساس منابع در دسترس هیچ پژوهشی در خصوص شناسایی عوامل

غیرزنده توکسین‌های گیاهی (phytotoxins)، از جنس ترکیبات فنلی، مانند فلوریزین (phlorizin) مترشح‌ه از ریشه و تجزیه بقایای گیاهی از مهم‌ترین ترکیبات شیمیایی در ایجاد مسمومیت (autotoxicity) در درختان جوان واکاری شده هستند. تخلیه عناصر غذایی خاک در کشت قبلی نیز از عوامل مؤثر در ایجاد عارضه واکاری است (Manici and Caputo 2010, Bent et al. 2009).

علاوه بر این در جنس *Prunus spp.* عارضه واکاری با جمعیت بالای باکتری‌های گروه باسیل‌ها در فراریشه به‌عنوان میکروارگانیسم‌های سیانوژنیک ارتباط دارد (Bent et al. 2009). شناسایی عوامل ایجاد این عارضه آسان نیست، یکی از مشکلات اصلی این است که علائم عارضه واکاری مبهم و متناقض هستند و تحت شرایط محیطی مختلف متفاوت می‌باشند؛ بنابراین، حتی با انجام آزمایش‌های اصول کخ تعیین شواهد قطعی مشکل است. میکروارگانیسم‌های موجود در فراریشه گیاهان اثرات متفاوتی روی میزبان و سایر موجودات زنده در فراریشه دارند، به‌عنوان مثال برخی از گونه‌های *Pseudomonas spp.* به‌عنوان آنتاگونیست علیه سایر میکروارگانیسم‌ها عمل کرده و برخی با تولید ترکیباتی مانند سیانیدها اثر بازدارندگی رشد روی گیاه میزبان دارند. چندین گونه از اوومیسیت‌ها شناسایی شده که در عارضه واکاری درختان میوه نقش دارند. *Verticillium* و *Armillaria* از قارچ‌های شناخته‌شده مرتبط با مشکل واکاری بادام و هلو شناخته شده‌اند. گونه‌هایی دیگری از قارچ‌ها از جنس‌های *Rhizoctonia*, *Rosellinia*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Alternaria*, *Gliomastix*, *Papularia*, *Myceilia*, *Myrothecium* و *Curvularia* به‌طور عمومی و همراه با مشکل واکاری درختان میوه هسته‌دار جدا شده‌اند (Manici and Caputo, 2010).

پنج گرم خاک و فراریشه پس از توزین در داخل لوله حاوی ۲۰ میلی لیتر آب مقطر سترون ریخته شد، از آماده تهیه شده ۵۰۰ میکرو لیتر به لوله دیگر که حاوی ۲۰ میلی لیتر آب مقطر سترون بود اضافه گردید، این عمل شش بار در شش لوله جداگانه تکرار شد. از دو رقت آخری سوسپانسیون میزان ۱۰۰ میکرو لیتر در محیط کشت‌های آگار مغذی، King B، PDA و CMA برای جداسازی باکتری‌ها، اکتینومیسیت‌ها، قارچ‌ها و شبه قارچ‌ها پخش شد. ظروف پتری در دمای  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  پرگنه‌های باکتریایی روی محیط کشت‌های آگار مغذی و King B و قارچی روی PDA و CMA خالص‌سازی شدند (Singleton et al., 1992, Schaad et al., 2001).

۲-۲. **نماتدها:** از هر نمونه مقدار پنج گرم خاک و فراریشه توزین شد و از روش‌های ال‌ک و سانتریفیوژ (De Grisse, 1969) برای استخراج نماتد استفاده گردید. پس از استخراج نماتدها تراکم جمعیت جنس‌های مختلف با استفاده از اسلاید شمارش تعیین شد.

#### ۲- از ریشه

۱-۲. **جداسازی قارچ‌ها و شبه قارچ‌ها:** قطعات ۴ تا ۶ سانتی‌متری از ریشه از هر نمونه، بدون هیچ تیماری، جدا شد و به مدت ۲۴ ساعت در یک ظرف در شرایط دمایی آزمایشگاه نگهداری شد، سپس از هر نمونه ۱۵ قطعه ۱ تا ۲ سانتی‌متری جدا شد و به مدت ۳۰ ثانیه در آب مقطر سترون قرار داده شد سپس با کاغذ سترون خشک شد و در ظرف پتری حاوی آب-آگار ۱٪ قرار داده شد، برای هر نمونه سه ظرف پتری در نظر گرفته شد و

دخیل در عارضه واکاری درختان میوه هسته‌دار و یا مدیریت کنترل آن در ایران صورت نگرفته است. هدف از این پژوهش شناسایی و فراوانی میکروارگانیزم‌ها و بیمارگرهای مهم همراه با عارضه واکاری در باغ‌های واکاری شده هلو در استان چهارمحال و بختیاری است.

## مواد و روش

### بازدید باغ و نمونه برداری

طی سال‌های زراعی ۹۶-۱۳۹۳ ضمن بازدید از باغ‌های هلو واکاری شده در استان چهارمحال و بختیاری وضعیت عارضه واکاری مورد بررسی قرار گرفت. برای هر باغ فرم شناسنامه‌ای، حاوی اطلاعاتی شامل: سطح زیر کشت، پایه به‌کاررفته، رقم، زمان واکاری و سن درختان، مدت‌زمان بین واکاری و امحاء درختان کشت قبلی، گونه و رقم کشت قبلی، نوع آبیاری، وضعیت کود دهی، تیمارهای به‌کاررفته قبل از واکاری، نوع خاک، ارتفاع از سطح دریا و درصد عارضه واکاری بر اساس علائم قابل مشاهده تهیه و تکمیل گردید. از هر باغ به ازای هر پنج جریب سطح زیر کشت یک نمونه گیاهی شامل ساقه و ریشه و خاک اطراف ریشه (فراریشه) تهیه شد و برای بررسی آزمایشگاهی به آزمایشگاه منتقل گردید. تعداد ۱۰۸ نمونه طبق جدول یک برای این منظور تهیه شد. نمونه برداری از درختان دارای علائم عارضه واکاری صورت گرفت.

### جداسازی و خالص‌سازی

#### ۱- از فراریشه (رایزوسفر)

۱-۲. **باکتری‌ها، اکتینومیسیت‌ها، قارچ‌ها و شبه قارچ‌ها:** از روش سری رقت‌ها برای جداسازی میکروارگانیزم‌های فراریشه هلو استفاده شد. مقدار

در شرایط دمایی  $28 \pm 1$  °C به مدت ۳۶ ساعت نگهداری شدند. قارچ‌ها و اومیسست‌های ظاهر شده در سطح ریشه در ظرف پتری حاوی آب-آگار کشت مجدد شدند و پس از رشد به روش نوک ریشه روی محیط کشت‌های PDA و CMA خالص‌سازی شدند (Singleton et al., 1992). جدایه‌ها بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و برخی نیز به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شناسایی شدند.

### شناسایی

#### ۱- باکتری

۱-۱- **آزمون‌های بیوشیمیایی و مورفولوژیکی جدایه‌های باکتری:** جدایه‌های باکتری با استفاده از روش‌های استاندارد شناسایی باکتریایی گیاهی مورد شناسایی قرار گرفت (Schaad et al., 2001). آزمون‌های زیر جهت شناسایی جدایه‌های باکتری‌ها انجام گرفت: گرم (3% KOH)، اکسیداز، کاتالاز، لوان، لپانیدن غده سیب‌زمینی، آرژنین دی‌هیدرولاز، هیدرولیز توئین ۸۰، هیدرولیز نشاسته، هیدرولیز آسکولین، تحمل نمک ۰.۲، ۰.۳، ۰.۴٪، لسیتیناز، رشد در شرایط بی‌هوازی، فعالیت هسته یخ، زیست‌سنجی و تولید اسید از: مانیتول، اینوسیتول، سوربیتول، ساکارز، لاکتوز و سلوبیوز.

۲-۱- **واکنش زنجیره‌ای پلیمرز:** از کشت تازه جدایه‌های باکتری برای استخراج دی‌ان‌ای استفاده شد. برای استخراج دی‌ان‌ای باکتری از روش گای و همکاران استفاده شد (Gai et al., 2011). با استفاده از آغازگرهای R1378 (5' - CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG-3' ) و PO27F (5' - GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' ) که

در شرایط دمایی  $28 \pm 1$  °C به مدت ۳۶ ساعت نگهداری شدند. قارچ‌ها و اومیسست‌های ظاهر شده در سطح ریشه در ظرف پتری حاوی آب-آگار کشت مجدد شدند و پس از رشد به روش نوک ریشه روی محیط کشت‌های PDA و CMA خالص‌سازی شدند (Singleton et al., 1992). جدایه‌ها بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و برخی نیز به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شناسایی شدند.

۲-۲. **جداسازی باکتری‌ها و اکتینومیسست‌ها:** از هر نمونه ریشه ۱۰ قطعه نیم سانتی متر مربعی با اسکالپل جدا شد و در لوله حاوی ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر ریخته شد و به مدت نیم ساعت در دمای آزمایشگاه نگهداری شد. از آماده تهیه شده ۵۰۰ میکرو لیتر به لوله دیگر که حاوی ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون بود اضافه گردید و به روش جداسازی باکتری از فراریشه (بند ۱) به روش سری رقت‌ها عمل شد.

۲-۳. **جداسازی نماتدها:** مقدار پنج گرم از ریشه‌های هر نمونه به قطعات کوچک تقسیم شد و از روش بلندر و سانتریفیوژ (Coolen and D'herde, 1972) برای استخراج نماتدها استفاده شد.

#### ۳- از شاخه

#### جداسازی و خالص‌سازی قارچ و باکتری از شاخه

از شاخه‌های منتقل شده به آزمایشگاه قطعاتی به ابعاد ۰/۵ سانتی متری از بافت نواحی قهوه‌ای‌رنگ در آوند چوبی و یا شانکرهای سطح شاخه جدا شد و روی تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت سیب‌زمینی - دکستروز - آگار (PDA) کشت داده شدند، و در دمای

۲-۳- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز: از جفت آغازگر Ph2(F) و ITS4 به‌عنوان جفت آغازگر عمومی طراحی شده برای گونه‌های فایتوفترا در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده شد. برای استخراج دی ان ای از روش موری و تامپسون (Murray and Thompson 1980) استفاده شد. از آغازگر عمومی ناحیه ITS برای گونه‌های فوزاریوم (Kamel et al. 2013) استفاده شد.

۳- **نماتدها:** با استفاده از مشخصات مرفولوژی و مرفومتری با استفاده از روش دگریسه (DeGrise, 1969) پس از فیکس کردن و انتقال به گلسیرین لام‌های دائمی تهیه شده و بررسی‌های مرفولوژی و مرفومتری انجام و منابع معتبر علمی نسبت به شناسایی نماتدهای جدا شده اقدام شد.

### خالص‌سازی محصول پی سی آر برای تعیین ترادف

از روش استات سدیم برای خالص‌سازی محصول پی سی آر (Sambrook and Russell 2001) استفاده شد. پنج میکرولیتر از آماده در ژل آگاروز الکتروفورز شد و در صورت حذف باندهای ضعیف، نمونه برای تعیین ترادف ارسال گردید. مقدار ۵ میکرو لیتر از محصول خالص شده برای ارزیابی نتیجه خالص‌سازی در ژل الکتروفورز شد. از هر گونه قارچ یا باکتری یک نمونه برای تعیین ترادف به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شد.

### نتایج

#### علائم و میزان عارضه واکاری هلو

علائم عارضه واکاری در باغ‌های هلو در استان چهارمحال و بختیاری متنوع است. زردی عمومی درختان

برای شناسایی گروه باکتری‌های Proteobacteria استفاده می‌شود برای تکثیر 16S rDNA استفاده شد (Gai et al., 2011). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در یک بستر با حجم ۲۵ میکرو لیتری با استفاده از آنزیم TaKaRa Taq DNA polymerase با ترکیب HotStarTaq Master Mix ۱۰ میکرو لیتر، هرکدام از آغازگرها ۱/۵ میکرو لیتر، دی ان ای ۲ میکرو لیتر و آب مقطر ۱۰ میکرو لیتر انجام شد. واکنش پی سی آر در یک ترمال سایکلر (Thermal cycler) ساخت شرکت Biotech انگلستان با برنامه‌های متفاوت واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بسته به ژن و نوع آغازگر برای تکثیر در ۳۰ چرخه انجام شد. محصول پی سی آر در ژل آگاروز ۱٪ در شدت جریان پنج ولت بر سانتی متر به مدت یک ساعت الکتروفورز شد. ژل با اتیدیوم بروماید (10 mg/ml) برای ۱۵-۵ دقیقه رنگ آمیزی شد. پس از شستشو ژل در آب مقطر در دستگاه ژل داکيومنتيشن برای مشاهده قطعات تکثیر شده و تهیه عکس قرار گرفت.

#### ۲- قارچ‌ها و شبه قارچ‌ها

۱-۲- **شناسایی شبه قارچ‌ها:** پس از خالص‌سازی جدایه‌ها و ویژگی‌های مرفولوژیکی جدایه‌ها بر اساس روش‌های پیشنهادی ارشاد (Ershad 1992) مورد بررسی قرار گرفت.

۲-۲- **شناسایی قارچ‌ها:** برای تشخیص جدایه‌ها از کلیدهای توصیفی استفاده شد. تشخیص در حد جنس بر اساس مشخصات کنیدیوفور و فیالیدها و در حد گونه بر اساس اندام استراحتی صورت گرفت (Barnett and Pegg and Brady 2002, Hunter 1998).

کاهش رشد ریشه‌ها، کوتاه شدن ریشه و گاهی وجود گال در ریشه از دیگر علائم عارضه بود در این موارد جمعیت بالایی از *Meloidogyne* و *Pratylenchus* ردیابی شد. خزان زودرس درختان و بدشکلی میوه نیز در برخی باغ‌ها مشاهده شد. سبز خشکی و مرگ نهال‌ها از علائمی بود که در برخی باغ‌ها به صورت پراکنده در یک باغ مشاهده شد که در اوایل تابستان با گرم شدن هوا مشهود بود.

### شناسایی میکروارگانیسم‌های همراه با عارضه واکاری هلو

بر اساس ویژگی‌های مرفولوژیکی، بیوشیمیایی و در مواردی مولکولی از نمونه‌های گیاهی و خاک به ترتیب فراوانی جدایه‌هایی از تاکسون‌های *Bacillus sp*، *Pseudomonas sp*، *Fusarium sp*، *Aspergillus*، *Mesocriconema xenoplax*، *fluorescens*، *Pantoea agglomerans*، *Alternaria sp*، *sp*، *Pseudomonas*، *Phytophthora sp*، *Arthrobacter sp*، *Verticillium*، *Pseudomonas putidae*، *syringae*، *Trichoderma sp*، *Dematophora necatrix*، *dahliae*، *Pratylenchus sp*، *Meloidogyne sp*، *Streptomyces sp*، *Stenotrophomonas maltophilia*، *Paratylenchus sp*، *Pythium sp* و *Rhizoctonia sp* جداسازی و شناسایی شد. حدود ۱۱٪ جدایه‌ها ناشناخته بودند (جدول ۱).

### ویژگی‌های مرفولوژیکی جدایه‌های قارچ و شبه قارچ

جدایه‌های *Phytophthora*: حداقل دو گونه از جنس *Phytophthora* در نمونه‌ها جداسازی و شناسایی شد. الف- گونه *Phytophthora cactorum*: پرگنه قارچ صاف و گرد و شعاعی و یا گل‌سرخ نامنظم بود. انشعابات

جوان از مهم‌ترین علائم عارضه است. میزان بیماری و شدت علائم به عوامل مختلفی بستگی دارد. این عارضه از حدود ۱۵٪ تا بیش از ۸۰٪ درختان، بر اساس علائم، مشاهده شد (جدول ۱). در باغ‌هایی که بلافاصله پس از امحاء درختان کشت قبلی واکاری شده شدت علائم بیشتر است. در مواردی که کشت قبلی هلو بوده میزان بیماری بیشتر است. بیشترین میزان عارضه، به‌ویژه با علائم پوسیدگی طوقه و ریشه مربوط به باغ‌هایی است که از پایه رویشی GF677 استفاده شده است، در این باغ‌ها گاهی علائم پوسیدگی طوقه و ریشه تا ۸۰٪ مشاهده شد، از ریشه و طوقه این نهال‌ها در اغلب موارد جدایه‌هایی از *Phytophthora* و *Fusarium* جداسازی شد (جدول ۱).

پژمردگی، سبز خشکی، شانکر، پوسیدگی سفید ریشه، تغییر رنگ آوندها، تغییر رنگ و بدشکلی برگ‌ها و میوه از دیگر علائم عارضه بود. گاهی چندین علائم در درختان یک باغ مشاهده شد که احتمالاً حاکی از آلودگی مخلوط به انواع بیمارگرها است، نتایج جداسازی بیمارگرها شاهد این ادعاست. پوسیدگی سفید ریشه یکی از علائم عمومی در اغلب باغ‌ها بود در این حالت درختان جوان به‌راحتی از خاک جدا می‌شدند، روی ریشه این درختان اندام‌های قارچ مشاهده شد، در لام‌های میکروسکوپی تهیه‌شده از این نمونه‌ها ریشه‌های لوله لامپایی مربوط به *D. necatrix* و کنیدی‌های خنجری شکل مربوط به گونه‌های *Fusarium* مشاهده شد.

تغییر رنگ بافت چوبی شاخه از دیگر علائم عارضه بود که با سوختگی حاشیه برگ و تغییر رنگ برگ‌ها همراه بود از این نمونه‌ها در اغلب موارد *V. dahliae* جداسازی شد. شانکر و تغییر رنگ بافت شاخه، مرگ جوانه‌ها و ترشح صمغ از دیگر علائم بود در این موارد *P. syringae* جدا گردید.



جدول ۱- وضعیت جداسازی میکروارگانیسم‌ها و بیماری‌گرهای همراه با عارضه واکاری از نمونه‌های گیاهی و خاک از باغ‌های هلو واکاری شده در استان چهارمحال و بختیاری طی سال‌های ۹۳ الی ۹۶

**Table 1. Status isolation microorganisms and pathogens associated with peach replant problem of plant and soil samples of peach replanted orchard in Chahar Mahal va Bakhtiari province during 2014-2017.**

| Location      | Date | Rootstock/<br>cultivar | No. samples | Age of tree (year) | Disease Incidence (%) based on symptoms | Cultivation time after the destruction of previous trees | Previous species cultivated trees | Fungi isolated of                    |        |  | Bacteria isolated of       |              |   | Nematodes isolated of         |             |                               |
|---------------|------|------------------------|-------------|--------------------|---|--|-----------------------------------|--------------------------------------|--------|--|----------------------------|--------------|---|-------------------------------|-------------|-------------------------------|
|               |      |                        |             |                    |   |  |                                   | root                                 | Stem   | rhizosphere                                  | root                       | Stem         | rhizosphere                                     | root                          | rhizosphere | root                          |
| Abbas Abad    | 2014 | Seed/<br>Zaafarani     | 5           | 3                  | 40                                      | that year  | Peach                             | Phy <sup>(1**)</sup> , Fus(3), As(1) | Ver(1) | Phy(1), Fus(2), Al(3), As(3), Py(2)          | Pf(2), Ba(4)               | Ps(3)        | Pf(2), Pf(2), Pa(2), Ba(2), St(1)               | Mes(2)                        | Mes(2)      | Mes(2), Me(1), Pra(1), Par(1) |
|               |      |                        |             |                    |   |  |                                   | Phy(1), Fus(1), Al(2)                | -      | Ver(1) Fus(3), Al(3), As(3), Tri(2), Rhi(2)  | Pf(2), Pp(1), Ba(2)        | Ps(3), Sm(1) | Pf(1), Pp(2), Pa(2), Ba(1), Ar(2), St(1)        | Mes(2), Me(1), Par(1)         |             |                               |
| Shorab Saghir | 2016 | GN/<br>Zaafarani       | 3           | 2                  | 35                                      | that year  | Almond                            | Phy(1), Fus(1), Tri(1)               | Ver(1) | Phy(1), Fus(1), Dn(1), Al(3), As(3), Tri(2)  | Pf(1), Ba(2)               | Ps(1)        | Pp(2), Pa(2), Ba(1), Ar(2), St(1)               | Mes(1), Me(1), Pra(1), Par(1) |             |                               |
|               |      |                        |             |                    |   |  |                                   | Fus(1), Tri(2)                       | -      | Fus(3), Dn(1), Al(2), As(1), Tri(2)          | Ba(1), St(1)               | -            | Pf(1), Ba(4), Ar(2), St(1)                      | -                             |             |                               |
| Shorab Saghir | 2017 | Seed/<br>Zaafarani     | 5           | 3                  | 40                                      | that year  | Peach                             | Phy(3), Fus(4), Al(3)                | -      | Phy(2), Ver(1), Fus(3), Al(3), As(1), Tri(1) | Pa(2), Ba(4), Ar(2), St(1) | -            | Pf(2), Pp(2), Pa(2), Ba(3), Ar(2), Sm(1), St(2) | Mes(2), Pra(1), Par(1)        |             |                               |
|               |      |                        |             |                    |   |  |                                   | Phy(1), Fus(3), Dn(1), Tri(1)        | Ver(1) | Phy(1), Fus(4), Dn(1), Al(3), As(3), Tri(2)  | Ps(1), Pa(2), Ba(4)        | Ps(1)        | Pf(1), Pp(1), Ps(1), Pa(1), Ba(1), Ar(1), St(1) | Mes(1), Pra(1), Par(1)        |             |                               |
| Shorab Saghir | 2014 | GF677/<br>Zaafarani    | 5           | 3                  | 70                                      | that year  | Peach                             | Ver(1), Fus(3), Dn(1), Tri(1)        | Ver(2) | Ver(1), Fus(2), Dn(1), Al(3), As(1), Tri(2)  | Pf(2), Pa(2), Ba(2), St(1) | Ps(3)        | Pf(2), Pp(2), Ps(1), Pa(2), Ba(1), Ar(2), St(1) | Mes(2), Par(1)                |             |                               |
|               |      |                        |             |                    |   |  |                                   | Phy(1), Fus(1), Tri(2)               | Ver(1) | Phy(1), Fus(1), Dn(1), Al(3), As(3), Tri(2)  | Pf(1), Ba(2)               | Ps(1)        | Pp(2), Pa(2), Ba(1), Ar(2), St(1)               | Mes(2)                        |             |                               |
| Shorab Saghir | 2017 | Seed/<br>Zaafarani     | 3           | 4                  | 20                                      | two years later  | Peach                             | Fus(1), Dn(1)                        | -      | Fus(3), Dn(1), Al(2), As(1), Tri(2)          | Ba(1), St(1)               | -            | Pf(1), Ba(4), Ar(2), St(1)                      | -                             |             |                               |
|               |      |                        |             |                    |   |  |                                   | Fus(1), Dn(1)                        | Ver(1) | Fus(3), Dn(1), Al(2), As(1), Tri(2)          | Ba(1), St(1)               | -            | Pf(1), Ba(4), Ar(2), St(1)                      | -                             |             |                               |

Table 1. Continued

جدول ۱. ادامه.

| Location       | Date           | Rootstock/<br>cultivar | No. samples | Age of tree (year) | Disease Incidence (%) based on symptoms | Cultivation time after the destruction of previous trees | Previous species cultivated trees | Fungi isolated of                      |        |  | Bacteria isolated of      |                 |   | Nematodes isolated of                |                             |      |
|----------------|----------------|------------------------|-------------|--------------------|---|--|-----------------------------------|--|--------|--|---------------------------|-----------------|---|--------------------------------------|-----------------------------|------|
|                |                |                        |             |                    |   |  |                                   | root                                   | Stem   | rhizosphere  | root                      | Stem            | rhizosphere   | root                                 | rhizosphere                 | root |
| Saman          | 2015           | GF677/<br>Zaafarani    | 5           | 3                  | 50                                      | that year  | Peach                             | Phy(1),<br>Dn(2)                       | Ver(1) | Phy(2),<br>Tri(2),<br>Pyf(1)                               | Ba(2),<br>St(1)           | Pf(2)           | Pp(2),<br>Pa(2),<br>Sm(1),<br>St(1)                     | -                                    | Me(1),<br>Pra(1)            |      |
|                |                |                        |             |                    |   |  |                                   | Fus(1),<br>Dn(2),<br>As(2)             | -      | Phy(1),<br>Fus(1),<br>Dn(1),<br>Al(2),<br>As(1)            | Pf(1)                     | Ps(1)           | Pf(1),<br>Ps(1),<br>Pa(2),<br>Ba(1),<br>St(1)           | -                                    | Mes(1),<br>Me(1),<br>Pra(1) |      |
| Kahkesh        | 2014           | Seed/<br>Zaafarani     | 4           | 2                  | 25                                      | that year  | Almond                            | Phy(2),<br>Ver(1),<br>Fus(2),<br>Dn(2) | Ver(1) | Phy(1),<br>Ver(1),<br>Dn(1),<br>Al(1),<br>As(1),<br>Rhi(1) | Ba(2),<br>Pa(2),<br>Ba(3) | Ps(2)           | Pf(2),<br>Pp(2),<br>Pa(2),<br>Ba(2),<br>Ar(2),<br>Sm(1) | Mes(2),<br>Me(1),<br>Pra2,<br>Par(2) | Mes(2),<br>Me(1),<br>Pra(1) |      |
|                |                |                        |             |                    |   |  |                                   | Fus(1)                                 | Ver(1) | Phy(1),<br>Fus(1),<br>Al(1),<br>As(1)                      | Ba(1),<br>Ar(2)           | Ps(1)           | Pf(1),<br>Ba(1),<br>Ar(1)                               | -                                    | Mes(1)                      |      |
| Lordegan       | 2016           | Seed/<br>Zaafarani     | 4           | 3                  | 30                                      | that year  | Almond                            | Phy(1),<br>Fus(3),<br>As(2)            | Ver(1) | Phy(1),<br>Ver(1),<br>Dn(1),<br>Al(3),<br>As(3),<br>Tri(2) | Ba(2)                     | Sm(1),<br>Ps(2) | Pp(2),<br>Ba(2),<br>Ar(2),<br>St(1)                     | Me(1)                                | Mes(2),<br>Me(1)            |      |
|                |                |                        |             |                    |   |  |                                   | Fus(2),<br>Dn(2)                       | Ver(2) | Fus(2),<br>Al(3),<br>As(3),<br>Tri(1)                      | Ba(2),<br>Ar(1)           | Ps(3)           | Pf(2),<br>Pa(2),<br>Ba(1),<br>Ar(2),<br>St(1)           | -                                    | Mes(2)                      |      |
| Cham<br>Khoram | 2014           | GF677/<br>Zaafarani    | 3           | 2                  | 30                                      | One year later   | Peach                             | Phy(1),<br>Fus(2),<br>Al(3)            | -      | Phy(1),<br>Pyf(1),<br>Fus(3),<br>Al(3),<br>As(3)           | Pf(2),<br>Pp(2),<br>Ar(3) | Ps(1)           | Pf(2),<br>Pa(2),<br>Ba(4),<br>Ar(2),<br>St(1)           | Mes(2),<br>Me(1)                     | Mes(3),<br>Me(1),<br>Pra(1) |      |
|                |                |                        |             |                    |   |  |                                   | Phy(2),<br>Ver(1),<br>Fus(1)           | Ver(1) | Phy(1),<br>Ver(1),<br>Fus(1),<br>Dn(1),<br>Al(1),<br>As(3) | Ba(2)                     | -               | Pf(1),<br>Pa(1),<br>Ba(1),<br>Ar(1),<br>St(1)           | Mes(2),<br>Pra(1)                    |                             |      |
| Cham<br>Chang  | 2016           | GF677/<br>Zaafarani    | 4           | 3                  | 55                                      | that year  | Peach                             | Phy(1),<br>Fus(1),<br>Dn(1)            | -      | Phy(1),<br>Fus(1),<br>Al(3)                                | Ba(2)                     | -               | Pf(2),<br>Pa(2),<br>Ba(4),<br>Ar(2)                     | Mes(2)                               | Mes(2),<br>Pra(1)           |      |
|                |                |                        |             |                    |   |  |                                   | Fus(2),<br>Dn(1)                       | Ver(1) | Phy(1),<br>Fus(1),<br>Dn(1),<br>Al(1),<br>As(1)            | Pf(1),<br>Ba(1)           | -               | Ar(1)   | Mes(1)                               |                             |      |
| Horeh          | 2014           | GN/<br>Zaafarani       | 2           | 4                  | 40                                      | that year  | Peach                             | Phy(1),<br>Fus(2)                      | -      | Phy(1),<br>Fus(1),<br>Al(1),<br>As(2)                      | Ba(1),<br>St(1)           | -               | Pf(2),<br>Pp(2),<br>Ba(2),<br>Ar(1)                     | Me(1),<br>Pra(1)                     |                             |      |
|                |                |                        |             |                    |   |  |                                   | Phy(1),<br>Fus(3)                      | Ver(1) | Phy(2),<br>Pyf(1),<br>Fus(1),<br>Al(2)                     | Pf(2)                     | -               | Ar(2)   | Mes(2)                               |                             |      |
| Ilbagi         | 2016           | GF677/<br>Zaafarani    | 3           | 2                  | 80                                      | that year  | Peach                             | Phy(2),<br>Fus(3),<br>As(3)            | Ver(1) | Phy(1),<br>Fus(2),<br>Al(2),<br>As(2),<br>Tri(2)           | Ba(2),<br>Ar(2),<br>St(1) | Ps(3)           | Pf(2),<br>Pp(2),<br>Pa(2),<br>Ba(2),<br>Ar(2),<br>St(1) | Mes(2),<br>Pra(1)                    |                             |      |
|                |                |                        |             |                    |   |  |                                   | Fus(1),<br>Fus(3)                      | Ver(1) | Phy(1),<br>Fus(1),<br>Al(1),<br>As(1)                      | Pf(1),<br>Ba(1)           | -               | Ar(1)   | Mes(1)                               |                             |      |
| 2017           | Seed/<br>Kardi | 3                      | 3           | 30                 | that year                               | Almond   | Almond                            | Fus(1),<br>Tri(1)                      | -      | Phy(1),<br>Fus(1),<br>As(1)                                | Pf(1),<br>Ba(1)           | -               | Pf(1),<br>Pp(1),<br>Ba(1),<br>Ar(1)                     | Me(1)                                |                             |      |
|                |                |                        |             |                    |   |  |                                   | Fus(1),<br>Tri(1)                      | Ver(1) | Phy(1),<br>Fus(1),<br>Al(1),<br>As(1)                      | Pf(1),<br>Ba(1)           | -               | Ar(1)   | Mes(1)                               |                             |      |

جدول ۱. ادامه.

Table 1. Continued

| Location    | Date | Rootstock/<br>cultivar | No. samples | Age of tree (year) | Disease Incidence (%) based on symptoms | Cultivation time after the destruction of previous trees | Previous species cultivated trees | Fungi isolated of            |        |   | Bacteria isolated of      |       |   | Nematodes isolated of       |                             |             |
|-------------|------|------------------------|-------------|--------------------|---|--|-----------------------------------|------------------------------|--------|---|---------------------------|-------|---|-----------------------------|-----------------------------|-------------|
|             |      |                        |             |                    |   |  |                                   | root                         | Stem   | rhizosphere                                     | root                      | Stem  | rhizosphere                                 | root                        | Stem                        | rhizosphere |
| Sadegh Abad | 2015 | Seed/<br>Zaafarani     | 4           | 5                  | 45                                      | that year  | Peach                             | Phy(1),<br>Dni(2)            | Ver(1) | Phy(1), Al(2), As(1), Rhi(1)                    | Ba(2)                     | -     | Pf(2), Ba(4)                                | -                           | Mes(2),<br>Me(1)            |             |
|             |      |                        |             |                    |   |  |                                   | Fus(1),<br>Al(3)             | -      | Fus(1), Al(1), Pyt(1)                           | Pf(2),<br>Pa(2)           | Ps(2) | Pf(1), Pp(1),<br>Pa(1), St(1)               | Mes(2)                      | Me(1)                       |             |
| Markadeh    | 2015 | Seed/<br>Zaafarani     | 4           | 3                  | 40                                      | that year  | Peach                             | Phy(1),<br>Fus(1)            | Ver(1) | Phy(1), Ver(1), As(2), Tri(1)                   | Pa(2),<br>Ba(1)           | Ps(1) | Pf(1), Ba(1), Sim(1),<br>St(1)              | Pra(1),<br>Par(1)           | Mes(1),<br>Par(1)           |             |
|             |      |                        |             |                    |   |  |                                   | Al(1), As(2)                 | -      | Al(1), As(1), Tri(1), Rhi(1)                    | Ba(1)                     | -     | Pf(2)                                       | -                           | Par(1)                      |             |
| Ardal       | 2014 | Seed/<br>Zaafarani     | 5           | 3                  | 40                                      | that year  | Peach                             | Phy(1),<br>Ver(1),<br>Fus(2) | -      | Phy(1), Ver(1), Fus(1), Al(3),<br>As(3), Tri(3) | Pf(2),<br>Ar(2),<br>St(1) | Ps(3) | Pf(2), Pp(2),<br>Pa(2), Ba(1)               | Mes(2),<br>Pra(1)           | Mes(2),<br>Pra(1)           |             |
|             |      |                        |             |                    |   |  |                                   | Fus(2),<br>As(1)             | Ver(1) | Fus(2), As(3), Pyt(1)                           | Pa(2),<br>Ba(2)           | -     | Pf(2), Pa(2), Ba(2),<br>Ar(2)               | -                           | Pra(1),<br>Par(1)           |             |
| Rostam Abad | 2017 | Seed/<br>Zaafarani     | 2           | 5                  | 45                                      | that year  | Almond                            | Ver(1),<br>Fus(2)            | Ver(1) | Phy(1), Ver(1), Fus(1), Al(2)                   | Pf(2),<br>Ba(1)           | -     | Pf(2), Pp(2), Ps(1),<br>Ba(2)               | Mes(2),<br>Me(1)            | Mes(2),<br>Me(1)            |             |
|             |      |                        |             |                    |   |  |                                   | Fus(2),<br>As(2)             | -      | Phy(1), Fus(1), Al(2), As(1)                    | Pf(1),<br>Ar(2)           | Ps(2) | Ba(2), Ar(2), St(2),<br>Sim(1)              | Mes(2)                      | Par(1)                      |             |
| Joneghan    | 2015 | Seed/<br>Zaafarani     | 4           | 3                  | 20                                      | One year later   | Almond                            | Phy(2),<br>Fus(2)            | Ver(1) | Phy(1), Ver(1), Fus(1), Dni(1),<br>Al(3), As(3) | Pf(2),<br>Pa(2),<br>Ba(4) | Ps(3) | Pf(2), Pp(2), Ps(3),<br>Pa(2), Ba(4), Ar(2) | Mes(3),<br>Me(1),<br>Pra(1) | Mes(3),<br>Me(1),<br>Pra(1) |             |
|             |      |                        |             |                    |   |  |                                   | Ver(1),<br>Fus(4)            | Ver(1) | Phy(1), Ver(1), Fus(1), Dni(1),<br>Al(3), As(3) | Pf(2),<br>Pa(2),<br>Ba(4) | Ps(3) | Pf(2), Pp(2), Ps(3),<br>Pa(2), Ba(4), Ar(2) | Mes(3),<br>Me(1),<br>Pra(1) |                             |             |

\* Phy: *Phytophthora* sp, Pyt: *Pythium* sp, Ver: *Verticillium dahliae*, Rhi: *Rhizoctonia* sp, Fus: *Fusarium*, Dni: *Dematophora necatrix*, Al: *Alternaria* sp, As: *Aspergillus* sp, Tri: *Trichoderma*, Pf: *Pseudomonas fluorescens*, Pp: *Pseudomonas putida*, Pa: *Pantoea agglomerans*, Ba: *Bacillus* sp, Ar: *Arthrobacter* sp, Sm: *Stenotrophomonas maltophilia*, St: *Streptomyces* sp, Mes: *Mesocriconea xenoplax*, Me: *Meloidogyne* sp, Pra: *Praetylechus* sp, Par: *Paratylenchus* sp.

\*\* Number isolates

کنیدیوم‌ها بی‌رنگ، تک‌سلولی و تخم‌مرغی‌شکل هستند و به‌صورت توپ‌های اسپوری در دهانه فیالید قرار داده شده است.

**جدایه‌های *Verticillium dahliae*:** کنیدیوفورها باریک و راست بوده، ساده یا منشعب هستند. فیالیدها به‌صورت فراهم (*verticillate*) از یک نقطه و در فواصل منظم روی کنیدیوفور تولید می‌شوند. کلامیدوسپورها و میکرواسکلروت‌ها پس از دو هفته در محیط کشت PDA تشکیل می‌شوند و رنگ پرگنه‌ها سیاه‌رنگ می‌شود.

**جدایه‌های *Aspergillus*:** پرگنه‌ها در محیط کشت PDA به رنگ سیاه است. کنیدیوفور راست و در انتها به یک وزیکل ختم می‌شود و وزیکل‌ها توسط یک یا دو ردیف از فیالیدهای بطری‌شکل پوشیده شده‌اند. کنیدیوم‌ها ریز و کروی و به‌صورت زنجیرهای دراز تشکیل می‌شوند.

**جنس *Rhizoctonia*:** ریشه‌ها با زاویه حاده تا قائمه منشعب می‌شوند و در محل انشعاب دارای فرورفتگی هستند و بالاتر از محل انشعاب، هم در ریشه اصلی و هم در انشعاب دیواره عرضی دولپوری وجود دارد. همچنین در ریشه‌های مسن کلامیدوسپور تشکیل می‌شود. هیچ‌گونه کنیدی در محیط کشت تشکیل نمی‌شود.

**جنس *Alternaria*:** ریشه‌ها قهوه‌ای‌رنگ، کنیدیوفورها تیره‌تر و قطورتر از ریشه‌ها بوده، کنیدیوم‌ها به‌صورت منفرد یا زنجیری تشکیل شوند. زنجیرهای کنیدیومی به‌صورت اکروپتال تشکیل می‌شوند. کنیدیوم‌ها دارای دیواره عرضی و طولی هستند.

**جنس *Fusarium*:** بیش از نیمی از جدایه‌ها دارای پرگنه کرم بودند، اما جدایه‌هایی با پرگنه سفید، بنفش و زرد نیز مشاهده شد. ماکروکنیدیوم‌ها عریض، کشیده و کمی خمیده با سه تا هفت دیواره عرضی با انتهای گرد بودند که

ریشه‌ها با زاویه قائمه و شاخه‌های فرعی در محل انشعاب باریک شده و سپس بلافاصله کمی آماس مشاهده شد. اسپورانژیوفورها با عرض ۲-۴ میکرومتر، ساده و یا به‌صورت سیمپودیال منشعب بودند و گاهی اوقات هم از رأس اسپورانژیوم منشعب می‌شدند. شکل اسپورانژیوم‌ها تخم‌مرغی، گلابی وارونه یا تقریباً کروی بودند. در قسمت پایه گرد بوده و در رأس، پاپیل بزرگ نیم کروی داشتند. آنتریدیوم‌ها پارازن و کروی و نامنظم بودند.

**ب- گونه *Phytophthora cryptogea*:** جدایه‌ها روی محیط کشت رشد CMA سریع داشتند. پرگنه‌ها یکنواخت و کرکدار بودند. ریشه‌ها عرضی غیریکنواخت داشتند. شاخه‌های فرعی با زاویه حاده و گاهی قائمه منشعب می‌شدند آماس ریشه‌ای در محیط مایع به‌صورت زنجیروار تشکیل می‌شد. اسپورانژیوم‌ها فاقد پاپیل و گلابی وارونه و گاهی استوانه‌ای شکل بودند. آنتریدیوم‌ها آمفیژن و به شکل بیضوی، تخم‌مرغی و یا استوانه‌ای بودند.

**جدایه‌های *Pythium*:** اسپورانژیوم‌ها متورم به ابعاد مختلف در ریشه‌ها تشکیل می‌شوند که گاهی غیرقابل تشخیص از ریشه‌اند. اگونیوم‌ها کروی شکل با دیواره صاف که در قسمت انتهایی ریشه تشکیل می‌شوند. آنتریدیوم به‌صورت پارازینوس و بین ریشه‌ای تشکیل می‌شود.

**جدایه‌های *Dematophora necatrix*:** وجود ریشه‌هایی که در قسمت‌هایی از آن متورم شده و حالت لوله لامپایی به خود گرفته بود از ویژگی‌های منحصربه‌فرد جدایه‌های این قارچ بود.

**جدایه‌های *Trichoderma*:** پرگنه‌ها سریع‌الرشد بوده و به رنگ سبز یا زرد بودند. کنیدیوفورها با انشعابات فراوان، فیالیدها به‌صورت منفرد یا گروهی تشکیل می‌شوند.

شیار طولی است. کوتیکول تا انتهای مری منقوط است. سر در امتداد بدن تقریباً گرد با شیارهای ظریف است. استایلت بلند و کمی خمیده با گره‌های گرد مشخص است.

**واکنش زنجیره‌ای پلیمرز:** در استفاده از جفت آغازگر ITS4 و Ph2(F) در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز باند ۷۰۰ bp تکثیر شد که تکثیر چنین باندی به جنس *Phytophthora* اختصاص دارد؛ بنابراین نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تشخیص بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی را تأیید کرد. همچنین نتایج ترادف قطعات تکثیری با استفاده از آغازگرهای عمومی برای تاکسون فوزاریوم تشخیص این تاکسون را برای فوزاریوم تأیید کرد. نتایج تعیین ترادف قطعات تکثیری مربوط به جدایه‌های باکتریایی در همه موارد تشخیص جدایه‌ها را بر اساس ویژگی‌های مرفولوژیکی تأیید کرد.

#### فراوانی میکروارگانسیم‌های همراه با عارضه واکاری هلو

فراوانی جداسازی میکروارگانسیم‌های همراه با عارضه واکاری هلو در استان چهارمحال و بختیاری حاکی از تفاوت قابل ملاحظه در تاکسون‌های جداسازی شده و جمعیت آن‌ها در نمونه‌ها است. برخی از تاکسون‌ها مانند *Bacillus sp* و *Fusarium sp* عمومیت داشته و از اغلب نمونه‌ها جداسازی شد (جدول ۲). فراوانی نسبی میکروارگانسیم‌ها نشان می‌دهد که تنوع، فراوانی و جمعیت تاکسون‌های جداسازی شده از فراریشه بیشتر از ریشه یا شاخه است (شکل‌های ۱، ۲ و ۳).

#### بحث

در این پژوهش حدود ۳۸٪ از میکروارگانسیم‌ها و واحدهای تاکسونومیکی شناسایی شده به باکتری‌ها تعلق داشتند که بیشترین فراوانی نسبی مربوط به جدایه‌های

سلول رأسی گرد و سلول پایه پاشنه‌ای بود. میکروکنیدیوم‌ها تخم‌مرغی یا قلوهای بدون دیواره تا یک دیواره عرضی که در سرهای دروغین گرد با مونوفالیدهای بلند تشکیل شدند. کلامیدوسپورها عموماً به اشکال کروی تا شبه کروی، با دیواره صاف یا زبر، به صورت منفرد (با اندازه ۷-۱۱ میکرومتر) یا جفت، زنجیره‌های کوتاه یا گاهی خوشه‌ای در هیفاها به صورت انتهایی یا میانی تشکیل شدند.

#### ویژگی‌های مرفولوژیکی نماتدها

**جنس *Mesocriconema*:** نماتدهای ماده دارای بدن عریض با کوتیکول ضخیم با تضاریس درشت و سوسیزی و قوسی شکل بودند. گره‌های استایلت به شکل لنگر و طویل است و گره‌های آن تا نزدیکی دریچه حباب میانی می‌رسد.

**جنس *Pratylenchus*:** نماتدهای ماده استوانه‌ای شکل بوده کوتیکول داری تضاریس ظریف است و در سطح جانبی بدن چهار عدد خطوط طولی وجود داشت. ناحیه سرکمی از بدن جدا شده و در قسمت انتهایی صاف با کناره‌های مدور با ۲-۴ شیار عرضی است. استایل کوتاه و قوی با گره‌های گرد می‌باشد. مری روی روده از دو طرف شکم همپوشانی دارد.

**جنس *Meloidogyne*:** نرها کرمی شکل و نماتدهای ماده گلابی‌شکل و دارای گردن بیرون زده از بدن بودند. شبکه کوتیکولی سر و استایلت ظریف است. نوجوانان سن دوم کرمی شکل و از سن سوم متورم می‌شوند. رنگ بدن نماتدهای ماده بالغ از شفاف تا قهوه‌ای روشن بود.

**جنس *Paratylenchus*:** نماتدهای ماده کرمی شکل بودند و بدنشان پس از تثبیت خمیده می‌شود. کوتیکول با حلقه‌های عرضی مشخص است. سطوح جانبی دارای سه

جدول ۲- فراوانی جداسازی میکروارگانیسم‌های همراه با عارضه واکاری از اندام‌های گیاه و خاک از باغ‌های هلو واکاری شده

**Table 2. The frequency of isolation of microorganisms and pathogens (percentages) from plant tissues and soil from peach orchards with replant problem**

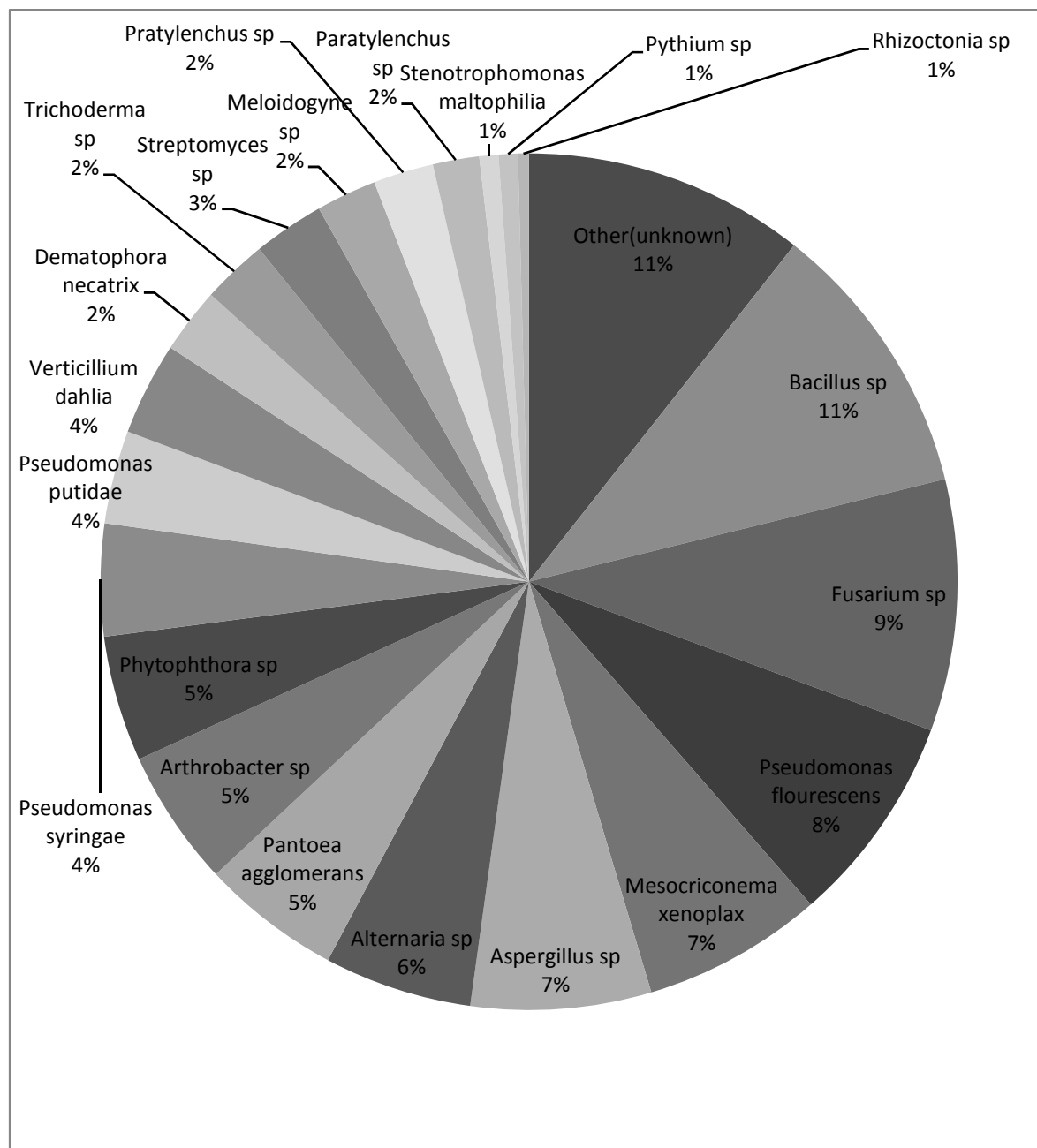
| Microorganism or pathogen           | Total frequency of isolation (percentages) | frequency of isolation (percentages) from |            |             |
|-------------------------------------|--|---|------------|-------------|
|                                     |  | Root                                      | Stem       | Rhizosphere |
| Other(unknown)                      | 95.3%                                      | 48(44.4%)                                 | 0          | 55(51%)     |
| <i>Bacillus</i> sp                  | 94.4%                                      | 48 (44.4%)                                | 0          | 54 (50%)    |
| <i>Fusarium</i> sp                  | 85.2%                                      | 52 (48.1%)                                | 0          | 40 (37%)    |
| <i>Pseudomonas flourescens</i>      | 71.3%                                      | 33 (30.5%)                                | 3 (2.7%)   | 41 (38%)    |
| <i>Mesocriconema xenoplax</i>       | 61.1%                                      | 25 (23.1%)                                | 0          | 41 (38%)    |
| <i>Aspergillus</i> sp               | 61.1%                                      | 15 (13.9%)                                | 0          | 51 (47.2%)  |
| <i>Alternaria</i> sp                | 50%  | 6 (5.5%)                                  | 0          | 48 (44.4%)  |
| <i>Pantoea agglomerans</i>          | 47.3%                                      | 16 (14.8%)                                | 0          | 35 (32.4%)  |
| <i>Arthrobacter</i> sp              | 46.3%                                      | 14 (13%)                                  | 0          | 36 (33.3%)  |
| <i>Phytophthora</i> sp              | 42.6%                                      | 22 (20.4%)                                | 0          | 24 (22.2%)  |
| <i>Pseudomonas syringae</i>         | 38%  | 1 (0.9%)                                  | 35 (32.4%) | 5 (4.6%)    |
| <i>Pseudomonas putidae</i>          | 31.5%                                      | 3 (2.7%)                                  | 2 (1.8%)   | 29 (26.8%)  |
| <i>Verticillium dahliae</i>         | 31.5%                                      | 7 (6.5%)                                  | 18 (16.7%) | 9 (8.3%)    |
| <i>Streptomyces</i> sp              | 24.1%                                      | 7 (6.5%)                                  | 0          | 19 (17.6%)  |
| <i>Dematophora necatrix</i>         | 22.2%                                      | 12 (11.1%)                                | 0          | 12 (11.1%)  |
| <i>Trichoderma</i> sp               | 22.2%                                      | 5 (4.6%)                                  | 0          | 19 (17.6%)  |
| <i>Meloidogyne</i> sp               | 20.4%                                      | 6 (5.5%)                                  | 0          | 16 (14.8%)  |
| <i>Pratylenchus</i> sp              | 20.4%                                      | 4 (2.4%)                                  | 0          | 18 (16.7%)  |
| <i>Paratylenchus</i> sp             | 15.7%                                      | 4 (3.7%)                                  | 0          | 13 (12%)    |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | 6.5%                                       | 0   | 2 (1.8%)   | 5 (4.6%)    |
| <i>Pythium</i> sp                   | 6.5%                                       | 0   | 0          | 7 (6.5%)    |
| <i>Rhizoctonia</i> sp               | 3.7%                                       | 0   | 0          | 4 (5.8%)    |

گیاهی کمک می‌کنند. علاوه بر این، باکتری‌ها مقدار زیادی از پلیمرها تولید می‌کنند که منجر به دانه‌بندی خاک می‌شوند و بنابراین ساختار خاک را در فراریشه بهبود می‌بخشند که منجر به بهبود ظرفیت نگهداری آب و تبادل گازها در فراریشه می‌شود (Lynch 1990). در این بررسی نیز فراوانی جداسازی و جمعیت باکتری‌ها بیشتر از سایر میکروارگانیسم‌ها بود و بسیاری از گونه‌های جداسازی شده از ریشه و فراریشه به‌عنوان بیمارگر گیاهی تاکنون گزارش نشده‌اند.

همبستگی بین میکروارگانیسم‌های همراه ریشه و علائم بیماری واکاری هلو در کالیفرنیا نشان می‌دهد از کل واحدهای تاکسونومیکی باکتریایی شناسایی شده حدود ۶۰ واحد تاکسونومیکی غالب بودند که از این میزان ۲۷ واحد همبستگی منفی و ۱۰ واحد تاکسونومیکی همبستگی مثبت

*Bacillus* بود، فراوانی جداسازی برای قارچ‌ها حدود ۳۲٪، برای شبه قارچ‌ها ۶٪، برای اکتینومیسیت‌ها ۳٪ و برای نماتدها (به‌جز نماتدهای آزاد زی) حدود ۱۱٪ بود. بیش از ۱۱٪ میکروارگانیسم‌های جداسازی شده قابل‌شناسایی نبودند که اغلب آن‌ها از پروکاریوت‌ها بودند (شکل ۱). تنها فراوانی جداسازی *V. dahliae* و *P. syringae* از ساقه بیشتر از ریشه و فراریشه بود در مورد سایر میکروارگانیسم‌ها این وضعیت برعکس بود. به‌جز جدایه‌های *Fusarium* sp در سایر موارد فراوانی جداسازی از فراریشه بیشتر از ریشه بود (شکل ۲ و ۳).

اگرچه برخی از میکروارگانیسم‌ها ممکن است به‌عنوان بیمارگر گیاهی باعث آسیب به گیاه شوند، اما بسیاری از میکروب‌ها به گیاه میزبان خود از طریق تولید ترکیبات تنظیم‌کننده رشد و یا حفاظت از گیاه در برابر بیمارگرهای

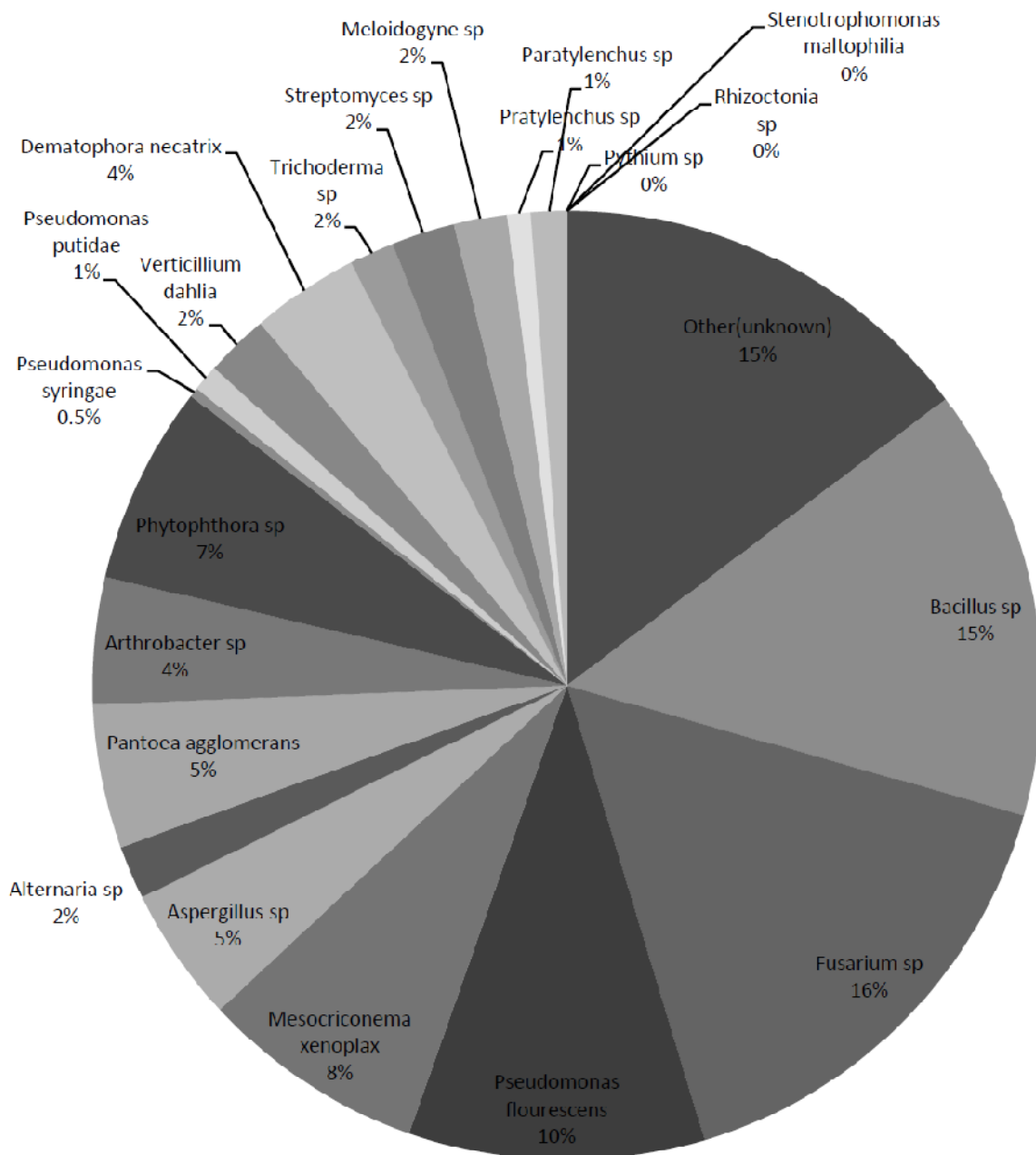


شکل ۱- فراوانی نسبی میکروارگانیسم‌های جداشده از نمونه‌های گیاه و خاک از باغ‌های هلو با عارضه واکاری

**Figure 1. Relative abundance of microorganisms isolated from plant and soil of peach orchards with replant disease symptoms**

با وزن ریشه هلو داشتند، ۹۶٪ این واحدهای تاکسونومیکی به شاخه Proteobacteria تعلق داشتند. در بین قارچ‌ها نیز گونه‌های *Fusarium solani* و *fimbriata* شایع‌ترین بودند. در بین گونه‌های *Trichoderma*، *Trichoderma asperellum*، *Ceratocystis*، *Fusarium oxysporum*، *virens* و *Pythium*، *Pythium vexans* نیز گونه‌های غالب بودند. به ترتیب ارتباط مثبت و منفی بین وزن ریشه هلو و

گونه‌های *Trichoderma*، *Trichoderma asperellum*، *Ceratocystis*، *Fusarium oxysporum*، *virens* و *Pythium*، *Pythium vexans* نیز گونه‌های غالب بودند. به ترتیب ارتباط مثبت و منفی بین وزن ریشه هلو و



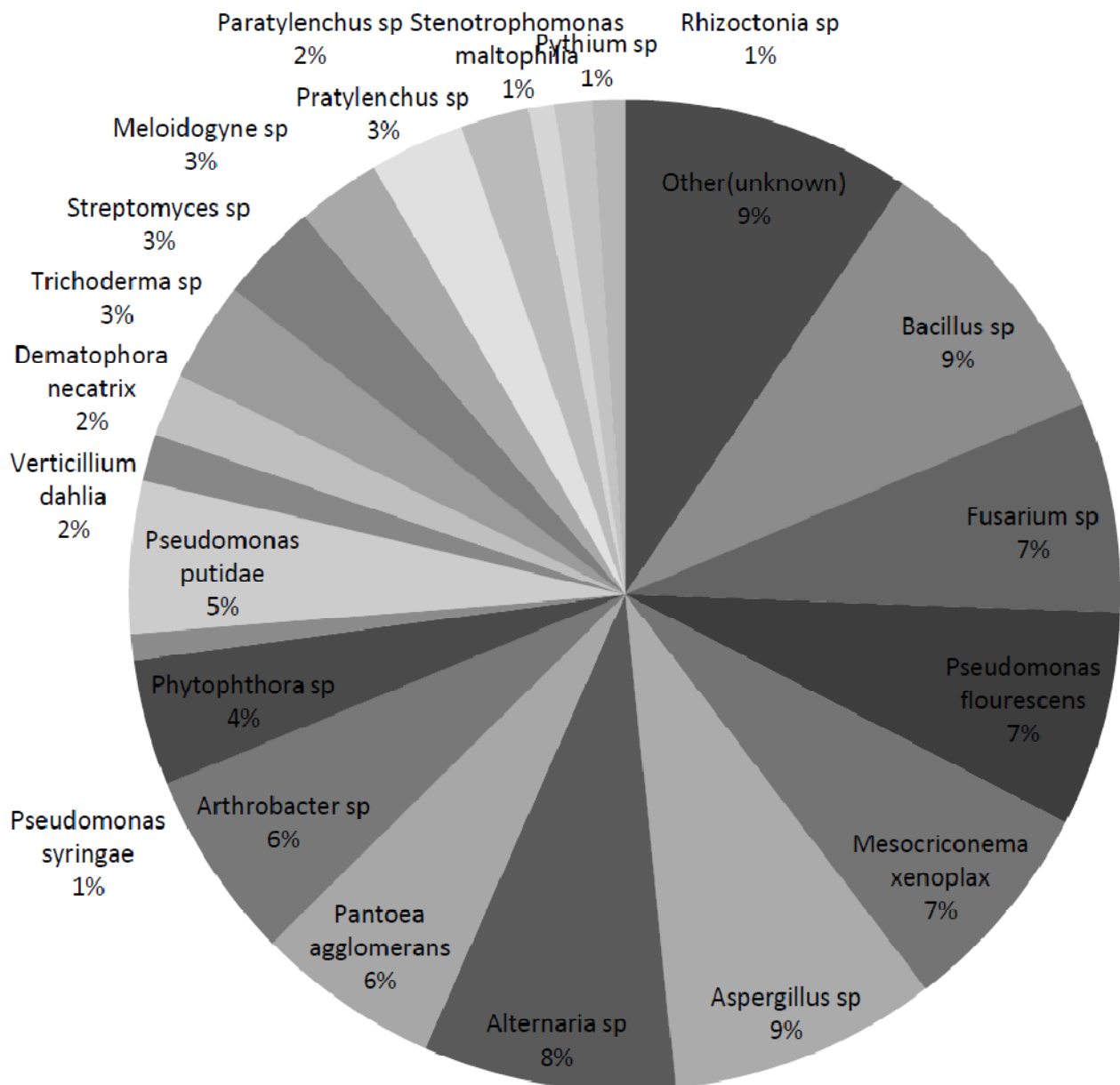
شکل ۲- فراوانی نسبی میکروارگانیسم‌های جداشده از ریشه نمونه‌های گیاهی از باغ‌های هلو با عارضه واکاری

**Figure 2. Relative abundance of microorganisms isolated from roots samples of peach orchards with replant disease symptoms**

به طوری که در ۴۸/۳٪ نمونه‌ها هر دو تاکسون جداسازی شدند. برهمکنش این دو عامل به عنوان مهم‌ترین عامل کوتاهی عمر هلو (Nyczepir *et al.* 1983)، مؤثر در عارضه واکاری و توسعه شانکر باکتریایی هلو است

گونه‌های *Trichoderma spp.* و *P. vexans* وجود داشت در این پژوهش بیشترین همبستگی جداسازی میکروارگانیسم‌ها مربوط به جداسازی *M. xenoplax* از فراریشه و *P. syringae* از ساقه بود





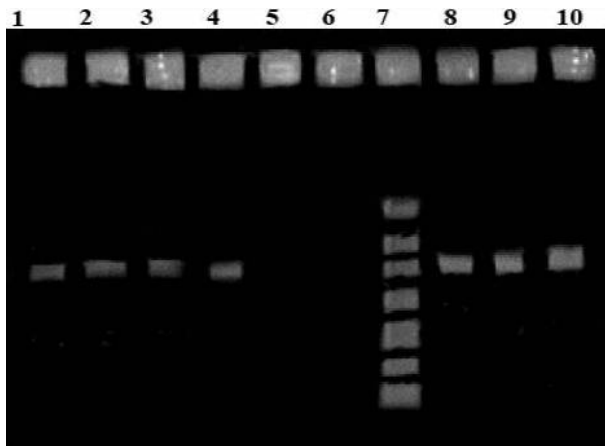
شکل ۳- فراوانی نسبی میکروارگانیسم‌های جدا شده از فراریشه هلو با عارضه واکاری

Figure 3. Relative abundance of microorganisms isolated from soils of peach orchards with replant disease symptoms

جداسازی *Pratylenchus sp* از فراریشه و *V. dahliae* از ساقه حدود ۹/۳٪ همبستگی وجود داشت (جدول ۱). تغذیه نماتدها به‌ویژه گونه *Criconebella xenoplax* باعث بدشکلی ریشه، تغییر رنگ برگ‌ها و کاهش رشد ریشه هلو می‌شود. قارچ‌های *Fusarium*، *Phytophthora*

(Vigouroux and Bussi 1998).

از حدود ۱۴٪ نمونه‌های فراریشه که تاکسون *Pratylenchus sp* جداسازی شد جدایه‌های *Fusarium sp* از ریشه جدا گردید. همین فراوانی در جداسازی *M. xenoplax* از فراریشه و *V. dahliae* از ساقه بود. بین

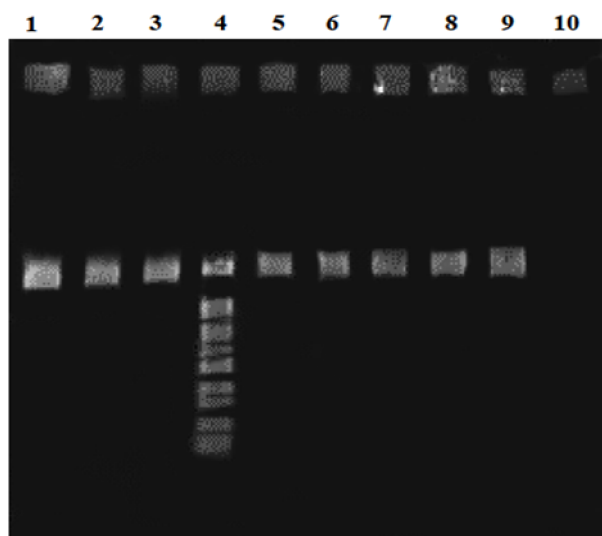


شکل ۵- نقوش الکتروفورز ژل محصول پی سی آر، قطعه حدود ۷۰۰ جفت بازی، با استفاده از جفت آغازگر ITS4 / Ph2(F) جدایه های *Phytophthora sp* (راهک های ۱ تا ۴ و ۸ تا ۱۰)، جدایه های *Pythium sp* (راهک های ۵ و ۶) و راهک ۷ مارکر 100bp.

**Figure 5.** Gel electrophoresis pattern of PCR amplification products, fragments about 700 bp, using *Phytophthora sp* universal primers (Ph2(F)/ITS4). Isolates of *Phytophthora sp* (lanes 1, 2, 3, 4, 8, 9, 10), isolates of *Pythium sp* (lanes 5, 6) and 100 bp DNA ladder (lane 7).

پوسیدگی ریشه و زوال تدریجی گزارش شده است. چندین گونه از فوزاریوم و رایزوکتونیا همراه با بیماری واکاری هلو و گیلان گزارش شده است (Weaver 1971). نقش گونه‌هایی از فوزاریوم در ایجاد عارضه واکاری هلو به اثبات رسیده است (Nyczeper and Lewis 1984). در این بررسی نیز در بین قارچ‌ها و شبه قارچ‌ها بیشترین فراوانی نسبی (حدود ۹٪) جداسازی مربوط به جدایه‌های فوزاریوم بود.

تکنیک‌های سنتی، جداسازی روی محیط کشت، میکروارگانیسم‌ها ناحیه فراریشه در ۹۹٪ موارد قادر به ردیابی میکروارگانیسم‌های فراریشه نیست (Lynch and Leij 2012). علاوه بر این، وجود یک میکروارگانیسم خاص در فراریشه لزوماً به این معنی نیست که



شکل ۴- نقوش الکتروفورز ژل محصول پی سی آر، قطعه حدود ۱۱۰۰ جفت بازی، با استفاده از جفت آغازگر عمومی برای *Proteobacteria* (R1378/PO27F)، به ترتیب برای جدایه های *Pseudomonas syringae* (راهک های ۱ و ۲)، *Pseudomonas fluorescens* (راهک ۳ و ۵)، *Pseudomonas putidae* (راهک ۶)، *Pantoea agglomerans* (راهک های ۷ و ۸)، *Stenotrophomonas maltipholia* (راهک ۹)، *Bacillus sp* (راهک ۱۰) و راهک ۴ مارکر 100bp.

**Figure 4.** Gel electrophoresis pattern of PCR amplification products, fragments about 1100 bp, using *Proteobacteria* universal primers for isolates of *Pseudomonas syringae* (lanes 1, 2), *Pseudomonas fluorescens* (lane 3, 5), *Pseudomonas putidae* (lane 6), *Pantoea agglomerans* (lane 7, 8), *Stenotrophomonas maltipholia* (lane 9), *Bacillus sp* (lane 10) and 100 bp DNA ladder (lane 4).

*Pythium* و نیز ممکن است باعث ایجاد چنین علائمی شوند (Nyczeper and Lewis 1984). پژوهش‌ها نشان می‌دهد گونه‌هایی از *Fusarium* و *Trichoderma* و نماتد مولد زخم ریشه *Pratylenchus penetrans* نسبت به سایر میکروارگانیسم‌ها به عنوان عوامل همراه عارضه واکاری هلو از فراوانی بیشتری برخوردارند (Yang et al. 2012, Atucha 2017). چندین گونه از قارچ‌ها به عنوان عامل دخیل در مشکل واکاری درختان میوه به صورت ایجاد

*Rosellinia necatrix* با عارضه واکاری درختان میوه مرتبط است (Pepin et al., 1975). در این پژوهش از حدود ۲۲/۲٪ نمونه‌ها این قارچ جداسازی شد و فراوانی نسبی آن به کل میکروارگانیسم‌ها و نماتدهای جدا شده حدود ۲٪ بود. با توجه به قدرت بیماری‌زایی قوی این بیمارگر احتمال نقش آن در ایجاد عارضه واکاری هلو دور از انتظار نیست. در مواردی که مرگ نهال یا درختان جوان مشاهده شد از این نمونه‌ها یکی از دو تاکسون *Phytophthora* و یا *D. necatrix* و یا هر دو جداسازی شد.

دامنه میزبانی *D. necatrix* وسیع است. از ۱۹۷ گونه گیاهی گزارش شده است. اگرچه این قارچ به‌عنوان بیمارگر درختان جنگلی در مناطق گرمسیر و نیمه گرمسیر می‌دانند، اما از مناطق معتدل و سردسیر و از انواع درختان میوه و گیاهان زراعی نیز گزارش شده است. از میزبان‌های مهم و اقتصادی آن می‌توان گونه‌هایی از *Prunus*، *Malus spp*، *Vitis vinifera* spp و *Coffea spp* را نام برد. این قارچ فعالیت آنزیمی سلولولیتیکی (cellulolytic) قوی دارد، به همین دلیل ظرفیت بالایی در آلوده کردن بافت‌های چوبی ریشه گیاهان را دارد، همچنین متابولیت‌های مختلف با اثرات فیتوتوکسیکی (phytotoxic) تولید می‌کند. به دلیل داشتن این ابزارهای بیوشیمیایی قدرت تخریبی بالایی در ریشه گیاهان دارد و گاهی باعث مرگ ناگهانی میزبان می‌شود (Pérez-Jiménez 2006). در این بررسی نیز در برخی باغ‌های واکاری شده سبز خشکی نهال‌ها و درختان جوان مشاهده شد که در مواردی *D. necatrix* جداسازی و شناسایی شد.

برخی گونه‌های *Penicillium* و *Aspergillus* در عارضه واکاری درختان میوه دخیل هستند (Utkhede and Li 1988, Catska et al. 1989). فراوانی جداسازی

میکروارگانیسم جدا شده با فراریشه یک گیاه خاص ارتباط دارد. بنابراین دانشمندانی که در تعاملات میکروبی در فراریشه مطالعه می‌کنند نیاز به تکنیک‌های جدید دارند که با این تکنیک‌ها بتوان مشخص کرد که آیا میکروب مورد مطالعه با گیاه تعامل دارد و یا می‌تواند به‌عنوان یک ارگانیسم واقعی فراریشه محسوب و طبقه‌بندی شود؛ علاوه بر این قادر به تشخیص و ردیابی میکروارگانیسم‌های غیرقابل کشت و همچنین قادر به تشخیص عملکرد ارگانیسم‌های مختلف در فراریشه باشد (Lynch 1990, Lynch and Leij 2012). در این پژوهش حدود ۱۱٪ از میکروارگانیسم‌های جداسازی شده با روش‌های سنتی غیرقابل تشخیص بودند، همچنین احتمالاً میکروارگانیسم‌هایی وجود داشت که در محیط کشت‌های مورد استفاده در این بررسی قادر به رشد نبودند. با این حال، ابزارهای مولکولی جدیدی به شکل ژنومیکس، پروتئومیکس و متابولومیکس به دست آمده است که می‌تواند بدون نیاز به کشت میکروارگانیسم تا حدودی این نقیصه را رفع کند. این رویکرد جدید مطالعه فراریشه به‌عنوان "متازنومیکس" نامیده شده است (Lynch and Leij 2012).

میزان عارضه واکاری بر اساس علائم ظاهری از حدود ۱۵٪ تا بیش از ۸۰٪ بسته به مدت‌زمان پس از امحای درختان قبلی و واکاری، گونه قبلی کشت‌شده، پایه مورد استفاده در واکاری و نوع سیستم آبیاری متفاوت بود. میزان عارضه در باغ‌هایی که بلافاصله پس از حذف درختان قبلی کشت‌شده بودند بیشتر بود. در باغ‌های واکاری شده که پایه GF677 به‌کاررفته میزان پوسیدگی طوقه و ریشه بیشتر از باغ‌هایی بود که از پایه بذری یا پایه رویشی GN رفته و فراوانی جداسازی تاکسون‌های *Phytophthora* و *Fusarium* بیشتر بود (جدول ۱).

حدود ۲۰٪ بود. گونه‌های *Pratylenchus* spp انتشار جهانی دارند. این نماتدها به‌تنهایی نقش بیشتری در مقایسه با قارچ‌ها و باکتری‌ها در ایجاد عارضه واکاری سبب نقش دارند. ارتفاع گیاه، وزن ریشه و رشد ریشه در زمانی که آلودگی مخلوط *P. penetrans* با *Bacillus subtilis* یا با قارچ‌ها یا سایر باکتری‌ها باشد به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد این بدین معنی است که وقتی آلودگی مخلوط نماتدها بیمارگر با سایر میکروارگانیسم‌ها صورت می‌گیرد اثر تشدیدکنندگی (synergist) در ایجاد عارضه واکاری دارد (Mazzola 1998, Utkhede et al. 1991). از حدود ۱۸٪ نمونه‌ها در این پژوهش هر دو تاکسون *Bacillus* و *Pratylenchus* جدا شد.

*Verticillium dahliae* یکی از بیمارگرهای مهم دخیل در عارضه واکاری در توت‌فرنگی محسوب می‌شود (Wang et al., 2007). فراوان‌ترین قارچ جداشده از اندام‌های هوایی در این بررسی به *V. dahliae* مربوط بود که همراه با علائم تغییر رنگ بافت چوبی شاخه و تغییر رنگ برگ‌ها و گاهی پژمردگی شاخه بود.

نماتدهای حلقوی (*Criconebella* sp) با عارضه کوتاهی عمر هلو در جنوب ایالات متحده آمریکا مرتبط هستند (Mai and Abawi 1981). در این مطالعه از حدود ۷٪ نمونه‌ها *M. xenoplax* جدا شد که در اغلب موارد همراه با علائم شانکر باکتریایی و جداسازی *P. syringae* بود.

نماتدهای مولد گره ریشه (*Meloidogyne* spp) با عارضه واکاری درختان میوه هسته‌دار در مناطق گرم آمریکا مرتبط است (Mai and Abawi 1981).

فعالیت نماتدها در محیط ریشه به‌عنوان عامل پیش‌آمودگی (predisposing) در آلوده شدن ریشه هلو به سایر میکروارگانیسم‌های بیمارگر تشخیص داده‌شده است

جدایه‌های *Aspergillus* در این تحقیق حدود ۷٪ بود. گونه‌های *Pythium* به‌عنوان عامل عارضه واکاری هلو در آمریکا گزارش شده‌اند (Micetich 1971). از حدود ۶/۵٪ نمونه‌ها در این بررسی جدایه‌های *Pythium* جداسازی شد.

گزارش‌هایی از نقش اکتینومیست‌ها در عارضه واکاری درختان میوه در دنیا وجود دارد (Westcott et al. 1987, Sewell and Roberts 1985). در این پژوهش از ۶/۵٪ نمونه‌های ریشه و ۱۷/۶٪ نمونه‌های فراریشه *Streptomyces* sp جدا شد.

دو سویه از *Bacillus subtilis* گزارش شده که باعث کاهش رشد در نهال‌های جوان سیب در باغ‌های واکاری شده می‌شود (Utkhede and Li 1988). بیشترین فراوانی در بین میکروارگانیسم‌های جداسازی و شناسایی شده در این بررسی مربوط به جدایه‌های *Bacillus* sp بود (جدول ۲)، با توجه به این فراوانی احتمال نقش برخی از جدایه‌های این تاکسون در عارضه واکاری هلو دور از انتظار نیست.

در جمهوری چک جدایه‌هایی از *Pseudomonas putida* و *Pseudomonas fluorescens* را در عارضه واکاری سیب مؤثر می‌دانند (Catska 1988). در این پژوهش مجموع فراوانی نسبی جداسازی هر دو گونه حدود ۱۲٪ بود.

شواهد متعددی از نقش نماتدها در ایجاد عارضه واکاری هلو، سیب و گیلاس وجود دارد (Mai and Abawi 1981). نماتد مولد زخم *Pratylenchus penetrans* عامل مهمی در ایجاد عارضه واکاری است (Utkhede et al. 1992). در ایتالیا *Pratylenchus vulnus* با عارضه واکاری هلو ارتباط دارد (Simeone 1990). فراوانی جداسازی تاکسون *Pratylenchus* در این بررسی

### نتیجه‌گیری

به‌طور خلاصه، این پژوهش نشان داد تعداد زیادی از میکروارگانیسم‌ها با علائم عارضه واکاری هلو در استان چهارمحال و بختیاری همراه هستند. نقطه ارتباط بین این میکروارگانیسم‌ها و برهمکنش آن‌ها باهم یا باریشه گیاه تعیین‌کننده این خواهد بود که آیا اثر تشدیدکنندگی در این عارضه دارند یا اثر بازدارندگی دارند. پژوهش‌های آینده این پرسش‌ها را پاسخ می‌دهد، برای تعریف نقش این میکروارگانیسم‌ها در عارضه واکاری هلو آزمایش‌هایی همانند اجرای اصول کخ در پاسخ به این سؤال‌ها کمک می‌کند.

### سپاسگزاری

این پژوهش قسمتی از نتایج پروژه تحقیقاتی شماره ۷۳۸۰۹۵-۰۸۳-۱۶-۴۲-۴ مصوب سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی است که بخشی از اعتبارات آن توسط سازمان جهاد کشاورزی استان چهارمحال و بختیاری تأمین شده است، از سازمان فوق تشکر و قدردانی می‌شود. از آقای مهندس رحیم اسحاقی، کارشناس ارشد نماتد شناسی بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی چهارمحال و بختیاری، به خاطر همکاری در تشخیص نماتدها سپاسگزارم.

(Utkhede and Smith 1994). در این پژوهش از حدود ۲٪ نمونه‌های ریشه و ۳٪ نمونه‌های فراریشه گونه‌های *Meloidogyne* جدا شد.

بین نماتدها و میکروارگانیسم‌های فراریشه در ایجاد عارضه واکاری درختان میوه برهمکنش به‌صورت هم‌افزایی در ایجاد این عارضه وجود دارد (Mai and Jaffee 1982). مطالعه هیستولوژیکی ریشه درختان با عارضه واکاری حاکی از وجود هم‌زمان نماتدها و ریشه *Pythium*، *Phytophthora*، *Rhizoctonia* است (Utkhede et al. 1992b). برهمکنش‌های بین گونه‌های *Phytophthora penetrans* و *Pratylenchus* نشان داده است که با عارضه واکاری مرتبط است (Utkhede et al. 1992b). برهمکنش‌های مشابهی بین نماتدها و سایر بیمارگرهای باکتریایی و قارچی در ارتباط با عارضه واکاری در خاک‌های دارای این بیماری گزارش شده است (Utkhede et al. 1992a).

یکی از مشکلات اساسی در پژوهش در خصوص مشکل واکاری درختان میوه تناقض و ابهامات در علائم متنوع ایجادشده توسط عوامل زنده در شرایط محیطی گوناگون است. بدین ترتیب حتی وقتی اصول کخ (Koch's postulates) انجام گیرد به دست آوردن شواهد قطعی بسیار مشکل است (Bent et al. 2009). در این پژوهش ترکیب و مجموعه‌ای از میکروارگانیسم‌ها جداسازی شد که اثر آنتاگونیستی و یا تشدیدکنندگی آن‌ها در ایجاد عارضه واکاری هلو و یا کنترل آن مشخص نیست.

### منابع

- Atucha, A. 2017. Root Dynamics of Peach Replant Tolerant and Susceptible Rootstocks in Soils with Different Cropping History. *J Hort* 4: 214-220.
- Barnett, H.L. and B.B. Hunter. 1998. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi* 4th (fourth) Edition. Amer Phytopathological Society. 240p.
- Bent, E., Loffredo, A., Yang, J., McKenry, M. V., Becker, J. O. and Borneman, J. 2009. Investigations into peach

- seedling stunting caused by a replant soil. *FEMS Microbiology Ecology* 68 (2):192-200.
- Browne, G. T., Connell, J. H., and Schneider, S. M. 2006. Almond replant disease and its management with alternative pre-plant soil fumigation treatments and rootstocks. *Plant Dis.* 90:869-876.
- Browne, G.T.; Lampinen, B.D., *et al.* (2013). "Managing the almond and stone fruit replant disease complex with less soil fumigant." *California Agriculture* 37(3): 128-138.
- Coolen, W.A., and C.J. D'herde. 1972. A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. *nematology and Entomology Research.* Ghent, Belgium.
- De Grisse, A. T. 1969. Redescription ou modification de quelques techniques dans L'étude des nematodes phytoparasitaires. *Mede. Rijks. fac. Landbwet. Gent*, 34: 351-369.
- Domsch, K. H. , Gams, W. and Anderson, T. H. 1980. *Compendium of Soil Fungi.* Academic Press. 859p.
- Ershad, D. 1992. *Phytophthora species in Iran (isolation, purification, identification)* Agriculture Research Organization. 92 p.
- Gai, C. S., F. Dini-Andreote, F. D. Andreote, J. R. S. Lopes, W. L. Araújo, T. A. Miller, J. L. Azevedo and P. T. Lacava. 2011. Endophytic Bacteria Associated to Sharpshooters (Hemiptera: Cicadellidae), Insect Vectors of *Xylella fastidiosa* subsp. *pauc*a. *J. Plant Pathol. Microbiol.* 2:2-8.
- Gilmore, A. E. 1959. Growth of replanted peach trees. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.* 73:99-111.
- Kamel A. A., Ibrahim N.A., Mohamed A.A., Mohamed S.K. and Joseph A.V. 2013. PCR identification of *Fusarium* genus based on nuclear ribosomal-DNA sequence data. *African Journal of Agriculture* Vol. 1: 014-016.
- Lynch J.M. 1990. *The Rhizosphere.* Chichester,UK:Wiley. 458 p.
- Lynch J.M. and de Leij F. 2012. *Rhizosphere.* In: eLS. John Wiley and Sons, Ltd: Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0000403.pub2
- Mai, W.F. and Abawi, G.S. 1981. Controlling replant diseases of pome and stone fruits in Northeastern United States by preplant fumigation. *Plant Disease* 65: 859–864.
- Manici, L. M. and Caputo, F. 2010. Soil fungal communities as indicators for replanting new peach orchards in intensively cultivated areas. *European Journal of Agronomy* 33 (3):188-196.
- Mazzola, M. 1998. Elucidation of the microbial complex having a causal role in the development of apple replant disease in Washington. *Phytopathology* 88:930-938.
- Murray M.G. and W.F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8: 4321-4326.
- Nyczepir, A. P., and Lewis, S. A. 1984. Incidence of *Fusarium* and *Pythium* spp. in peach feeder roots as related to dibromochloropropane application for control of *Criconebella xenoplax*. *Plant Disease* 68:497-499.
- Nyczepir, A.P., E.I. Zehr, S.A. Lewis, and D.C.Harshman. 1983. Short life of peach trees induced by *Criconebella xenoplax*. *Plant Disease* 67:507-508.
- Pegg, G. F. and Brady, B. L. 2002; *Verticillium wilts.* CABI Publishing. 552p.
- Pérez-Jiménez RM. 2006. A review of the biology and pathogenicity of *Rosellinia necatrix* -the cause of white root rot disease of fruit trees and other plants. *J Phytopathology* 154:257-66.
- Reighard, G. L. 2000. Peach rootstocks for the United States: Are foreign rootstocks the answer? *HortTechnology* 10(4): 7-11.
- Sahragard, N. 2008. Evaluation of resistance of some genotypes and cultivars of almond to *Verticillium dahliae*. *Pajouhesh and Sazandegi* 78: 125-131 (in Persian).
- Sahragard, N. and Banihashemi, Z. 2006. Evaluation of resistance of some almond genotypes and cultivars to *Phytophthora cactorum*. *Iran. J. Plant Pathol.* 42: 309-322 (in Persian).
- Sambrook, J. and D. Russell. 2001. *Molecular cloning: A laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Schaad, N.W., Jones, J.B., and Chun, W. 2001. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria.* 3rd ed. St. Paul (MN): American Phytopathological Society Press; p. 373.
- Singleton, L. L. , Mihail. J. D. and Rush. CM. 1992. *Methods for research on soil borne phytopathogenic fungi.* APS press. 265p.
- Smith, H. C. 1965. The morphology of *Verticillium albo-atrum*, *V. dahliae*, and *V. tricorpus*. *N. Z. J. Agric. Res.*

8: 450-478.

- Traquair J A 1984 Etiology and control of orchard replant problems: A review. *Can. J. Plant Pathol.* 6, 54-62.
- Utkhede, S., Vrain, T.C. and Yorston, J.M. 1992. Effects of nematodes, fungi and bacteria on the growth of young apple trees grown in apple replant disease soil. *Plant and Soil* 139: 1-6.
- Vigouroux, A., and Bussi, C.1998. A predisposing influence of pruning on the development of bacterial canker in the peach tree its probable relation to stem water content in winter. *Acta Horticulturae* 465.
- Wang, L., Hu, T., Ji, L. and Cao, K. 2007. Inhibitory efficacy of calcium cyanamide on the pathogens of replant diseases in strawberry. *Front. Agric. China* 1: 183-187.
- Weaver, D. J. 1971. Association of two *Cylindrocladium* species with "Short Life" of peach trees in Georgia. *Phytopathology* 61:1095-1096.
- Westcott S.W.III., Beer S.V. and Israel H.W. 1987 Interactions between actinomycete-like organisms and young apple roots grown in soil conducive to apple replant disease. *Phytopathology* 77: 1071-1077.
- Yang J-i, Ruegger PM, McKenry MV, Becker JO, Borneman J (2012) Correlations between Root-Associated Microorganisms and Peach Replant Disease Symptoms in a California Soil. *PLoS ONE* 7(10): e46420.