

بررسی درون شیشه ای فرم جنسی قارچ عامل زوال درختان آزاد در ایران

میرمعصوم عراقی*، کامران رهنما

گروه گیاه پزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران

معصومه مصطفی

گروه گیاه پزشکی، دانشگاه صنعتی اصفهان، ایران

تاریخ پذیرش: ۸۸/۸/۲۸

تاریخ دریافت: ۸۷/۹/۱۴

چکیده

مقدمه: فرم جنسی قارچ عامل زوال درختان آزاد از نظر تاکسونومیکی حائز اهمیت زیادی است.

هدف: تحقیق حاضر با هدف بررسی مشخصات فرم جنسی جدایه های مختلف قارچ عامل زوال درختان آزاد جداسازی شده از منطقه جنگلی توسکستان در استان گلستان انجام گردید.

مواد و روش ها: در این راستا، طول گردن و عرض پایه پریتسیوم و نسبت این دو برای جدایه ها در

شرایط درون شیشه محاسبه گردید. هر کدام از جدایه ها به همراه دو جدایه استاندارد شامل تیپ های جنسی A و B روی محیط کشت MEA ۲ درصد حاوی پودر چوب آزاد کشت و در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری گردیدند.

نتایج: نتایج نشان داد که این جدایه ها با داشتن طول گردنی بلندتر (۵۴۰-۳۸۰ میکرون با میانگین حدود

۴۵۴ میکرون) و عرض پایه کوتاهتر (۱۱۰-۸۰ میکرون با میانگین حدود ۹۷ میکرومتر) از *Ophiostoma ulmi*

(گونه رایج و بیماری زا روی نارون) قابل تمییز هستند. همچنین متوسط نسبت طول گردن به عرض پایه پریتسیوم

برای جدایه ها ۴/۷ محاسبه شد. امکان استفاده از ابعاد پریتسیوم به عنوان یکی از فاکتورهای مهم تفکیک و شناسایی

قارچ مهاجم زوال درختان آزاد می تواند قابل ملاحظه و بحث باشد.

نتیجه گیری: این تحقیق نخستین گزارش از تشکیل و بررسی درون شیشه ای فرم جنسی قارچ

O. novo-ulmi جداسازی شده از درختان آزاد در ایران می باشد.

* عهده دار مکاتبات: Iraqi602@yahoo.com، تلفن: ۰۹۳۵۹۷۲۹۰۴۴

واژه های کلیدی: بیماری زوال درختان آزاد، فرم جنسی، استان گلستان، *Ophiostoma ulmi*، *Ophiostoma novo-ulmi*

مقدمه

گونه های مختلف جنس *Ophiostoma* باعث ایجاد پژمردگی های آوندی در بسیاری از درختان غیرمثمر همچون انواع کاج، سرو، بلوط و نارون می شوند.^(۱) شاید بتوان گفت که دو گونه بسیار مهم *O. ulmi* و *O. novo-ulmi* مهمترین اپیدمی زوال درختان نارون جنگلی و فضای سبز شهری را در یک قرن گذشته در نیمکره شمالی باعث شده اند و این در حالی است که گونه *O. novo-ulmi* نقش بسیار مهمی در تشدید این اپیدمی ها داشته است، بطوریکه درختان آزاد نیز که نسبت به گونه غیرمهاجم *O. ulmi* مقاومت بسیار خوبی دارند از هجوم گونه اخیر در امان نمانده اند.^(۲،۳) قارچ عامل بیماری توان تولید چهار نوع اسپور جنسی و غیرجنسی را دارد.^(۴) شکل جنسی قارچ عامل بیماری از نظر تاکسونومی و طبقه بندی گونه های مختلف این جنس (*Ophiostoma*) حائز اهمیت زیادی است.^(۵،۶) این قارچ هتروتال بوده و برای تشکیل فرم جنسی نیاز به دو تیپ جنسی A و B دارد.^(۷) امروزه گونه *O. novo-ulmi* بر اساس برخی تفاوت های مورفولوژیکی نظیر نوع پرگنه و ابعاد اندام جنسی پریتسیوم بر روی محیط کشت های مختلف، تفاوت های فیزیولوژیکی همچون میزان رشد روزانه، بهینه دمای رشدی، تولید آنزیم ها و متابولیت های خارج سلولی، میزان تولید پروتئین سراتوالمین و شدت بیماری زایی روی نهال های با درجات مقاومت مختلف و برخی تفاوت های مولکولی نظیر پلی مورفیسم های پروتئین ها، ایزوزیم ها و DNA هسته، اندازه DNA هسته و میتوکندری و توالی ژن تولید سراتوالمین از گونه قدیمی *O. ulmi* به راحتی قابل تفکیک می باشد.^(۶، ۸، ۹-۱۲) مطالعات اپیدمیولوژیکی قارچ عامل بیماری نشان می دهد که گونه مهاجم به تدریج در طبیعت جایگزین گونه غیرمهاجم می شود.^(۱۳-۱۵) بریزیر (۲۰۰۱) با ارائه شواهدی مبنی بر امکان جریان ژنی بین گونه های *O. ulmi* و *O. novo-ulmi* وجود هیبریدهای بین گونه ای را در طبیعت و جایگزینی تدریجی گونه *O. novo-ulmi* بجای *O. ulmi* را ثابت کرد. اگرچه گزارشات متعدد و البته محدود از عامل بیماری در طی ۴۰ سال گذشته در کشور وجود دارد ولی مطالعات گسترده ای در امر شناسایی، اپیدمیولوژی و به ویژه مدیریت آن صورت نگرفته است. به عنوان مثال علیرغم وجود درختان آزاد کهنسال خشکیده در مناطق مختلف جنگلی شمال و شمال غرب کشور تنها در سالیان اخیر آنهم در حد گزارشی از جداسازی عامل بیماری اکتفا شده است و این درحالی است که سالانه در اروپا و آمریکا میلیون ها دلار صرف تحقیقات مختلف در راستای مبارزه با عامل بیماری مرگ درختان نارون و آزاد در مناطق شهری و جنگلی می شود. اگرچه جداسازی عامل بیماری در سال ۱۹۹۹ از درختان آزاد در رشت توسط رهجو و با نام گونه *O. ulmi* صورت گرفته بود^(۱۶) ولی رهنما (۲۰۰۰) از مناطق جنگلی ارسباران در آذربایجان شرقی و اردبیل گستردگی بیماری را با عامل جدید *O. novo-ulmi* برای اولین بار گزارش نمود.^(۱۷) رهنما (۲۰۰۳) و رهنما و طاهری (۲۰۰۴) شیوع عامل بیماری بر روی درختان آزاد را از مناطق جنگلی شمال کشور و به ویژه مناطق جنگلی استان گلستان همچون جنگل دلدن با عنوان گونه *O. novo-ulmi* گزارش نمودند.^(۱۸، ۱۹) این در حالی است که جمعیت های درون گونه ای عامل بیماری مدام در طبیعت

در حال دورگه گیری و تکامل می باشند و این امر مشکلات مدیریتی علیه بیماری را بیشتر و بیشتر می سازد. (۱۳، ۱۴)

بنابراین با توجه به اهمیت و شدت بیماری بویژه در سالیان اخیر و عدم وجود منابع علمی کافی در کشور در مورد ویژگی های جدایه های مختلف عامل بیماری زوال درختان آزاد، این تحقیق با هدف بررسی نوع و مشخصات فرم جنسی قارچ عامل زوال درختان آزاد و مقایسه با گونه های استاندارد موجود انجام گرفت. بدیهی است که آگاهی از این ویژگی در کنار تعیین سایر خصوصیات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و مولکولی قارچ عامل بیماری در راستای شناسایی بهتر عامل یا عاملین مرتبط با بیماری زوال آزاد در کشور و نهایتاً اقدامات مدیریتی علیه آن می تواند بسیار مفید واقع شود.

مواد و روش ها

آماده سازی جدایه ها

برای انجام این آزمایش از ۵ جدایه قارچ عامل زوال درختان آزاد جداسازی شده از منطقه جنگلی توسکستان استفاده شد. برای آماده نمودن قارچ ها از کلکسیون موجود، قرص ۵ میلی متری از هر جدایه که در داخل لوله های آزمایش و در شرایط دمایی ۵ درجه سانتی گراد نگهداری می شدند به داخل ظروف حاوی محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار (PDA)^۱ منتقل و در دمای ۲۰-۲۲ درجه سانتی گراد به منظور رشد نگهداری شدند. پس از گذشت ۷ تا ۱۰ روز از حاشیه پرگنه های رشد کرده قرص هایی برداشته و به داخل ظروف حاوی محیط کشت عصاره مالت آگار ۲ درصد (MEA)^۲ انتقال داده شدند و در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد در انکوباتور نگهداری گردیدند. دو جدایه استاندارد AST به عنوان تیپ A و CKT₁₁ به عنوان تیپ B مورد استفاده در این آزمایش نیز از کلکسیون قارچ آزمایشگاه بیماری شناسی، گروه گیاهپزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان تهیه و برای انجام آزمایشات مربوطه به طریقه بالا آماده شدند.

بررسی مشخصات اندام جنسی (پریسیوم)

برای انجام این آزمایش از محیط کشت عصاره مالت آگار (MEA) به همراه ۱۰۰-۲۰۰ گرم پودر چوب آزاد (به ازای هر لیتر محیط کشت) استفاده شد. در این آزمایش مشخصات اندام جنسی از قبیل طول گردن و عرض پایه پریسیوم و نسبت این دو شاخص برای جدایه های عامل بیماری تعیین گردید. برای انجام این آزمایش در هر ظرف دو جدایه استاندارد (با تیپ آمیزشی مشخص) A و B و یک جدایه نامشخص به صورت یک قرص کوچک ۵ میلیمتری در مقابل هم کشت گردیدند و سپس در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد در داخل انکوباتور به مدت ۳-۴ هفته نگهداری شدند (شکل ۱).^(۲۰) در تیپ های سازگار، در محل تلاقی قارچ پریسیوم تشکیل شد. به منظور بررسی مشخصات ریختی از قبیل اندازه طول گردن و عرض پایه پریسیوم ها، از هر ظرف ده عدد پریسیوم بالغ به طور تصادفی انتخاب و پس از رنگ آمیزی با لاکتوفنول، طول گردن و عرض پایه پریسیوم هر جدایه در زیر میکروسکوپ نوری محاسبه شد.^(۶) اندازه های بدست آمده برای جدایه ها مورد مقایسه آماری قرار گرفتند.

1- Potato Dextrose Agar

2- Malt Extract Agar

تجزیه و تحلیل نتایج آزمون

آزمون مربوطه در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تکرار برای هر جدایه قارچ انجام شد. برای تجزیه و تحلیل نتایج آزمون از نرم افزار آماری SAS (۲۰۰۱) استفاده شد.^(۲۱) برای مقایسه میانگین داده ها از آزمون چند دامنه ای دانکن استفاده گردید.



شکل ۱- نحوه کشت جدایه ناشناخته (X) در مقابل دو جدایه تیپ استاندارد (A) و (B)

نتایج و بحث

اندازه گیری های مربوط به مشخصات اندام جنسی (پریتسیوم) از قبیل طول گردن، عرض پایه و نسبت این دو شاخص برای جدایه های عامل بیماری زوال درختان آزاد نشان داد که طول گردن جدایه ها به طور متوسط ۴۵۴ میکرومتر (۳۸۰-۵۴۰ میکرومتر)، عرض پایه به میزان ۸۰-۱۱۰ میکرومتر (متوسط ۹۷ میکرومتر) و متوسط نسبت این دو شاخص ۳/۵-۶/۸ (متوسط ۴/۷) می باشد. مقایسه داده ها برای تمامی جدایه ها نشان دهنده معنی دار بودن اختلاف در سطح احتمال ۵ درصد بود (جدول ۱).

علیرغم وجود دامنه تغییرات در اندازه های مربوط به هر جدایه، نتایج مزبور در کار بسیاری از محققین دیگر نیز مشاهده شده است،^(۴، ۶، ۷) به طوری که حتی نوع محیط کشت مورد استفاده بر طول و عرض ابعاد پریتسیوم یک جدایه تأثیر می گذارد^(۴) به عنوان مثال بررسی ابعاد پریتسیوم تولید شده بر روی سرشاخه های نارون و محیط کشت "عصاره چوب نارون"^۱ برای دو گونه مهاجم و غیرمهاجم نشان داد که جدایه های مهاجم عمدتاً پریتسیوم هایی با گردن درازتر و عرض پایه کوتاهتری نسبت به گونه غیرمهاجم تولید می کنند. از سوی دیگر ابعاد پریتسیوم جدایه های هر دو گونه بر روی دو محیط کشت متفاوت بود. دامنه میانگین طول گردن و عرض پایه برای گونه مهاجم بر روی سرشاخه های نارون به ترتیب ۶۴۰-۲۳۰ و ۱۴۰-۷۵ میکرومتر و برای گونه غیرمهاجم ۴۲۰-۲۸۰ و ۱۵۰-۱۰۰ میکرومتر اندازه گیری شد.

جدول ۱- مقایسه مشخصات اندام جنسی جدایه های قارچ عامل زوال درختان آزاد از منطقه جنگلی توسکستان

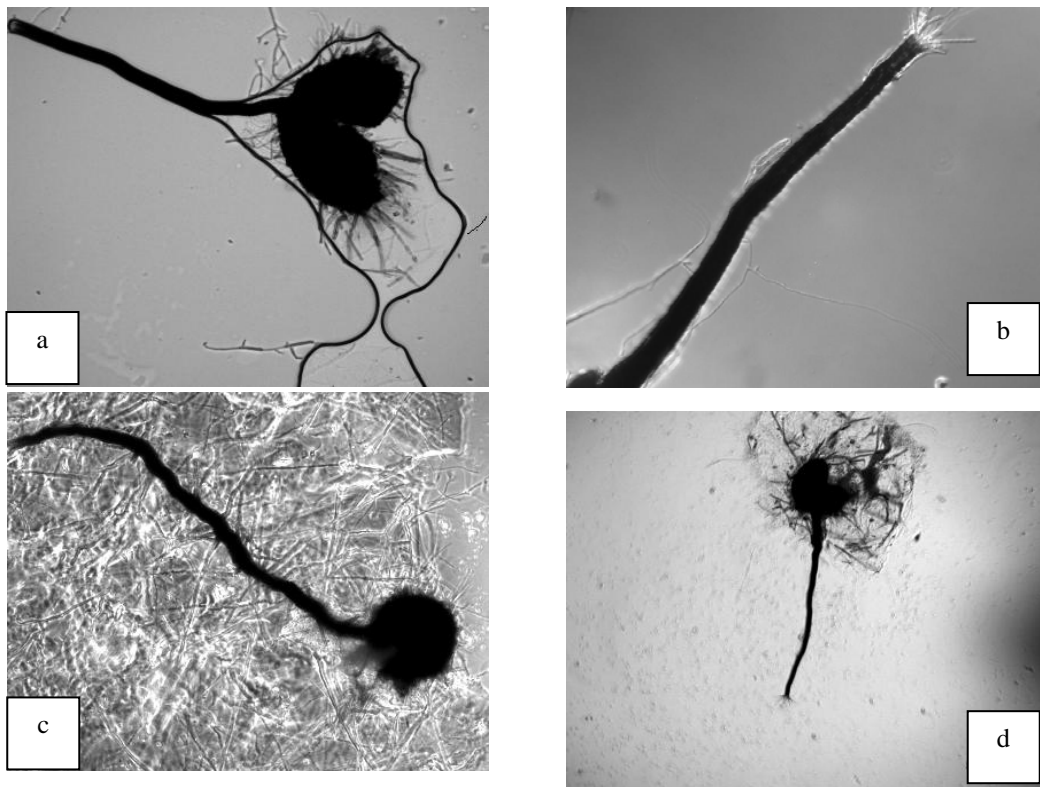
نسبت طول گردن به عرض پریس	مشخصات پریسیوم*		جدایه قارچ بیمارگر
	عرض پریس (میکرومتر)	طول گردن (میکرومتر)	
۲/۶ ± ۱/۹ ^c	۱۳۲ ± ۳۵ ^a	۳۵۲ ± ۶۲ ^{c**}	<i>O. ulmi</i> 3 ^{***}
۵/۹ ± ۲/۴ ^a	۸۵ ± ۱۰ ^c	۴۹۸ ± ۱۳۵ ^a	<i>O. novo-ulmi</i> 2 ^{****}
۴/۵ ± ۱/۴ ^b	۱۰۱ ± ۱۰ ^{bc}	۴۸۴ ± ۷۵ ^a	<i>Onuz</i> 1
۴/۶ ± ۰/۹ ^b	۹۳ ± ۱۲ ^c	۴۵۶ ± ۷۶ ^{ab}	<i>Onuz</i> 2
۴/۵ ± ۱/۵ ^b	۱۰۴ ± ۱۸ ^{bc}	۴۷۵ ± ۵۱ ^a	<i>Onuz</i> 3
۴/۸ ± ۱/۴ ^{ab}	۹۲ ± ۸ ^c	۴۲۶ ± ۴۷ ^b	<i>Onuz</i> 4
۵/۰ ± ۱/۵ ^{ab}	۹۵ ± ۱۶ ^c	۴۳۰ ± ۲۴ ^b	<i>Onuz</i> 5

* هر عدد میانگین ۵ تکرار و ده مشاهده برای هر تکرار می باشد.

**حروف غیرمشابه نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد با آزمون چند دامنه ای دانکن می باشد.

*** جدایه استاندارد گونه غیرمهاجم^(۱)

**** جدایه استاندارد گونه مهاجم جداسازی شده از نارون^(۲)



شکل ۲- ابعاد مختلف فرم جنسی قارچ عامل زوال درختان آزاد: a- پریسیوم با گردن دراز (بزرگنمایی ×۴۰۰) b- استیول های دهانه پریسیوم (بزرگنمایی ×۶۰۰) c- پریسیوم با گردن بسیار دراز (بزرگنمایی ×۲۰۰) d- پریسیوم با گردن دراز (بزرگنمایی ×۲۰۰)

همچنین دامنه میانگین طول گردن و عرض پایه بر روی محیط کشت ESA به ترتیب ۶۰۰-۲۵۰ و ۱۸۰-۱۳۰ میکرومتر (برای گونه مهاجم) و ۳۵۰-۱۹۰ و ۱۸۰-۱۲۰ میکرومتر (برای گونه غیرمهاجم) محاسبه گردید.^(۴) در

بسیاری از منابع برای مقایسه آماری از تعیین نسبت این دو شاخص استفاده شده است.^(۴، ۵، ۶، ۷) در این آزمون نسبت این دو شاخص ۳/۵-۶/۸ (متوسط ۴/۷) به دست آمد. نتایج آزمون مقایسه ای نشان داد که این شاخص در مقایسه با دو شاخص قبلی برای مقایسه و تشخیص جدایه های این گونه از گونه *O. ulmi* و زیرگونه *O. novo-ulmi ssp. americana* مناسب تر است. این نتایج در کار سایر محققین نیز به اثبات رسیده است.^(۶، ۷) در تحقیقی که در آن بیش از ۲۰۰ تلاقی بین جدایه های بدست آمده از بیش از ۴۰ کشور (اروپا، آمریکای شمالی و آسیا) صورت گرفت، متوسط نسبت طول گردن پرتسیوم به عرض پایه آن برای جدایه های *O. novo-ulmi* به میزان ۶/۲-۱/۵ و برای جدایه های *O. ulmi* ۲/۴-۳/۵ به دست آمد.^(۴) در تحقیقی دامنه میانگین طول گردن و عرض پایه پرتسیوم های دو زیرگونه *O. novo-ulmi ssp. americana* و *O. novo-ulmi ssp. novo-ulmi* به دست آمد. دامنه میانگین طول گردن و عرض پایه برای زیرگونه اولی به ترتیب ۱۶۸-۴۸۵ (با میانگین ۲۹۵/۵) میکرومتر و ۱۵۰-۸۴ (با میانگین ۱۱۶/۳) میکرومتر و برای زیرگونه دوم به ترتیب ۱۷۷-۷۱۸ (با میانگین ۴۵۰) میکرومتر و ۱۵۹-۷۹ (با میانگین ۱۰۳/۵) میکرومتر محاسبه گردید.^(۶) بدین ترتیب مشخص شد که طول گردن جدایه های مهاجم *O. novo-ulmi ssp. novo-ulmi* به طور معنی داری بلندتر از جدایه های مهاجم زیرگونه *O. novo-ulmi ssp. americana* و نیز جدایه های قارچ *O. ulmi* می باشد. از بین جدایه های *O. novo-ulmi ssp. novo-ulmi* نیز درازترین طول گردن مربوط به تلاقی جدایه CKT₁₁ (از ایران) با جدایه YU₁₆ (جداسازی شده از کرواسی) به میزان ۷۳۰ میکرومتر و کمترین طول گردن در تلاقی دو جدایه ایرانی H₅₈₁ و H₅₈₂ و به میزان ۱۹۰ میکرومتر بود. از طرفی کمترین میزان طول گردن در بین تلاقی های گونه *Ophiostoma ulmi* نیز مربوط به تلاقی جدایه Gol4 (تیپ آمیزی A جداسازی شده در سال ۱۹۷۴ از جنگل های استان گلستان) با جدایه P98 (جداسازی شده از لهستان) و به میزان متوسط ۲۷۵ میکرومتر محاسبه شده است و این نشان دهنده دامنه وسیع تغییرات و به عبارتی تنوع مورفولوژیکی زیاد در بین جدایه های ایرانی در مقایسه با سایر نقاط جهان می باشد. این مسأله با توجه به تنوع فرم پرگنه (به عنوان یک صفت مهم مورفولوژیکی) و تفاوت میزان تولید توکسین و بیماری زایی (به عنوان صفات مهم فیزیولوژیکی) در جدایه های مهاجم ایرانی جداسازی شده از نارون نیز به اثبات رسیده است.^(۲، ۱۱، ۱۲) در تحقیق مشابهی که به منظور تعیین ویژگی های اندام تولید مثلی *O. himal-ulmi* (گونه جدید که بومی مناطق آسیای مرکزی و چین می باشد) انجام شد، نتایج ۱۶ تلاقی بین جدایه ها نشان داد که اندازه طول گردن پرتسیوم ها در این گونه از ۲۴۰ تا ۱۰۰۰ میکرومتر متغیر بوده و بطور میانگین ۸۵۰-۲۷۰ میکرومتر می باشد، که از این نظر اگرچه از دو گونه *O. ulmi* و *O. novo-ulmi* قابل تمییز می باشد،^(۵) ولی با توجه به ویژگی های جدایه های مهاجم ایران از نظر تولید پرتسیوم هایی با طول زیاد از یک طرف و فاصله کم جغرافیایی مناطق جنگلی استان گلستان با آسیای مرکزی و چین از سوی دیگر احتمال حضور نژادهایی از چنین گونه ای (یا گونه های نزدیک خواهری) در ایران یا ورود آن در سال های نه چندان دور بیش از پیش وجود دارد، چه بسا که با وجود از بین رفتن درختان بسیار تنومند در جنگل های شمال از سال ها قبل به دلیل شیوع اپیدمی و یا اپیدمی هایی توسط گونه *O. novo-ulmi*، حتی تا چند سال پیش شناسایی این گونه با مشکلات و ابهامات زیادی مواجه بوده است. چنانچه رهجو و همکاران (۱۹۹۹) پس از جداسازی قارچ عامل بیماری از درختان

آزاد در رشت و نارون در کرج و تهران آنرا *O. ulmi* نامیدند^(۱۶) ولی با انجام آزمایشات مورفولوژیک، فیزیولوژیک و مولکولی، غالب این جدایه ها جزء گونه مهاجم *O. novo-ulmi* شناخته شدند. از طرفی اگرچه تعیین ابعاد پریتسیوم به عنوان یک عامل مورفولوژیکی مناسب همیشه در راستای تفکیک جدایه های مهاجم و غیرمهاجم عامل بیماری مرگ نارون و زوال درختان آزاد مد نظر قرار گرفته است، اما با توجه به امکان دورگ گیری بین جدایه های عامل بیماری در طبیعت که منجر به تنوع ژنتیکی در بین جدایه ها می شود و چه بسا روی خواص مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی نیز تأثیرگذار باشد، لزوم انجام آزمایشات سایر عوامل تفکیکی مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و مولکولی الزامی به نظر می رسد.^(۱۵،۹)

نتیجه گیری

این تحقیق نخستین گزارش از تشکیل و بررسی درون شیشه ای فرم جنسی قارچ *O. novo-ulmi* جداسازی شده از درختان آزاد در ایران می باشد. همچنین نتایج این آزمون نشان داد که تعیین ابعاد پریتسیوم به منظور تفکیک و شناسایی گونه ها و نژادهای مهم قارچ عامل زوال درختان آزاد (در کنار بررسی سایر خصوصیات مورفولوژیک، فیزیولوژیک و مولکولی) می تواند به عنوان یکی از فاکتورهای مهم و قابل ملاحظه در شناسایی جدایه های مهاجم تلقی شود.

References:

1. Wingfield, M.J., Seifert, K.A., and Webber, J.F., *Ceratocystis and Ophiostoma Taxonomy, Ecology and Pathogenicity*, A.M. Phytopathol. Soc., Minnesota (1993).
2. Iraqi, M.M., and Rahnema, K., *Iran. J. Agric. Sci. Natur. Resour*, **16** (2009).
3. Rahnema, K., Asadeh, G., and Taheri, A., *In proceeding: The Second Seminar of Research Designs of Golestan Province*, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Gorgan, Iran (2002).
4. Brasier, C.M., *Mycopathologia.*, **115**, 151 (1991).
5. Brasier, C.M., and Mehrotra, M.D., *Mycol. Res.*, **99**, 205 (1995).
6. Brasier, C.M., and Kirk, S.A., *Mycol. Res.*, **105**, 547 (2001).
7. Iraqi, M.M., Rahnema, K., Razavi, S.I., and Ebrahimi, A., *Iran. J. Agric. Sci. Natur. Resour*, **14**, 124 (2007).
8. Binz, T., and Canevascini, G., *Mycol. Res.*, **100**, 1060 (1996).
9. Dacasa, M.C., Solla, A., Lopez, D., Buron, M., Sanchez, G., and Gill, L., *In Proceedings: The Second International Elm Conference.*, Valsain Segovia, Spain (2003).
10. Hoegger, P.J., Binz, T., and Heininger, U., *Eur. J. Forest Pathol.*, **26**, 57 (1996).
11. Iraqi, M.M., Rahnema, K., and Taheri, A.H., *Iran. J. Forest Range Protect. Res.*, **6**, 10 (2008).
12. Iraqi, M.M., Rahnema, K., and Soleimanipoor, N., *Iran. J. Agric. Sci. Natur. Resour.*, **16** (2009).
13. Brasier, C.M., *The Elms- Breeding and Conservation*. Dordrecht, the Netherlands, Kluwer (2000).
14. Brasier, C.M., *Bioscience.*, **51**, 123 (2001).

15. Konrad H., Halmschlager, E., Stauffer, C.H., and Kiristts, T., *In Proceedings: The Second International Elm Conference Valsain*, Segovia, Spain (2003).
16. Rahjo, V., Mojdehi, H., Zamanizadeh, H., and Mosahebi, GH., *Scientific Res. J. Agric. Sci.*, **5**, 15 (1999).
17. Rahnama, K., Asadeh, G., and Salahshour, M., *The first Asian Conference on Plant Pathology.*, China Agric. Sciencetech Press, China (2000).
18. Rahnama, K., *In Proceedings: The Second International Elm Conference. Valsain*, Segovia, Spain (2003).
19. Rahnama, K., and Taheri, A. H., *Can. J. Plant Pathol.*, **26**, 121 (2004).
20. Stipes, R.J., and Campana, R.J., *Compendium of Elm Diseases.*, A.M. Phytopathol. Soc., Minnesota (1981).
21. SAS Institute, *SAS system.* Inc, Cary- NC, USA (2001).