جداسازی، شناسایی و بررسی بیماری‌زایی عوامل قارچی همراه ریشه و طوقه درختان زیتون در استان خوزستان

مهناز فرزین[1] و سید علی موسوی جرف[2]*

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد رشته بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران

۲*- **نویسنده مسوول:** دانشیار گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

(MoosawiJorf@modares.ac.ir)

تاریخ دریافت: ۹۱/۹/۱۳ تاریخ پذیرش: ۹۲/۹/۲۳

چکیده

طی بازدیدهایی در سال‌های ۱۳۸٦-۱۳۸٤ از باغ‌های زیتون استان خوزستان، از درختان زیتون با علائم پژمردگی، سرخشکیدگی و در بعضی موارد زوال نمونه‌برداری شد. پس از شستشو و ضدعفونی سطحی، نمونه‌ها در محیط PDA کشت و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند.از ریشه و طوقه زیتون ۱۲٤ جدایه قارچ جداسازی گردیدکه شامل یک گونه از جنس ورتیسیلیوم (*V. dahliae* با ۳۵ جدایه)، سه گونه از جنس فوزاریوم (*F. solani* با ۲۳ جدایه،*F. equiseti* با۲۰ جدایه و *F. semitectum* با٤جدایه)، سه گونه از جنس سیلیندروکارپون (*C. destructans* با ۲۰ جدایه ،*C. obtosisporum* و *C. didymum* به ترتیب با ۹ و ۸ جدایه) و ۵ جدایه از جنس ریزوکتونیا بود که همه *R. solani* چند هسته‌ای و متعلق به گروه آناستوموزی AG-4 بودند. آزمون بیماری‌زایی برای جدایه‌های *V. dahliae*، *F. solani*، *F. equisetai* و *C. destructans* روی نهال‌های زیتون ۱۲ ماهه به وسیله فرو بردن ریشه نهال‌ها در سوسپانسیون اسپور انجام شد. برای جدایه‌های *R. solani* نیز آزمون بیماری‌زایی روی نهال‌های ۱۲ ماهه زیتون و با استفاده از مایه تلقیح گندم انجام گرفت. نتایج آزمون بیماری‌زایی نشان داد که از بین جدایه‌های به دست آمده سه گونه روی زیتون بیماری‌زای قوی (*F. solani*، *V. dahliae* و *C. destructans*)، گونه *F. equiseti* بیماری‌زای متوسط و گونه *R. solani* بیماری‌زای ضعیف بود. این اولین گزارش از گونه‌های *F. equiseti* و *C. destructans* از زیتون در ایران و گونه‌های *F. Semitectum* ، *C. didymium* و *C. obtosisporum* به عنوان عوامل بیماری روی زیتون می‌باشد.

کلید واژه ها: زیتون، Fusarium، Rhizoctonia، Cylindrocarpon، Verticilium، طوقه و ریشه

مقدمه

درخت زیتون به دلیل مقاومت به کم آبی و سازگاری با خاک های کم بازده و فقیر و تولید محصول با ارزش و کم هزینه، از نظر اقتصادی بسیار حائز اهمیت بوده که به محصول ثروتمند خاک‌های فقیر مشهور است (مسچی و همکاران، ۱۳۸۱). این گیاه با شرایط آب و هوایی خوزستان سازگار بوده و سطح زیرکشت آن نیز در استان در سال ۱۳۸۴ در حدود ۴۰۰۰ هکتار بوده که نسبت به سطح زیر کشت آن در همین سال در کل کشور که ۱۳۰۰۰ هکتار بوده، سطح زیر کشت بالایی است (بی نام، ۱۳۸۴ ؛ فائو[1]، ۲۰۰۵). از آنجایی که در چند سال اخیر درختان زیتون در مناطق مختلف استان علائم پژمردگی، سرخشکیدگی و در مواردی مرگ را نشان داده‌اند، و تاکنون علت این مسئله بررسی نشده، به همین علت با نمونه‌برداری از مناطق مختلف کشت زیتون به بررسی علت پرداخته شد.

1- FAO

تاکنون گونه‌های مختلفی از قارچ‌ها از زیتون جداسازی شده‌اند که با پژمردگی و سرخشکیدگی و مرگ درختان در زیتون در ارتباط بودند. از مهم‌ترین این عوامل می‌توان به قارچ‌های خاکزادی مانند: *Verticillium dahlia* Kelb، *Cylindrocarpon* sp.، *Fusarium* sp.، *Phytophtora* sp.، *Pythium* sp. و *Rhizoctonia* sp. اشاره کرد (سانچز هرناندز[1]، ۱۹۹۸).

پژمردگی ناشی از *V.dahliae* مسئله مهمی به شمار نمی‌رفت، تا اولین بار در سال ۱۹۴۶ از جزیره سیسیل در ایتالیا گزارش شد (لاچکوئر و سدرا[2]،۲۰۰۲). در ایران نیز اولین بار در بهار سال ۱۳۷۵-۱۳۷۶ از مناطق مختلف در استان گلستان مانند علی آباد، گنبد و گرگان، قارچ *V.dahliae* از درختان زیتون جداسازی شد (رهنما و همکاران، ۱۳۷۷).بعد از آن نیز از فارس(کامران و شیروانی، ۱۳۷۹)، کهکیلویه و بویراحمد (افشاری آزاد و علیزاده، ۱۳۸۳) و زنجان (ناظر کاخکی و ارشاد، ۱۳۸۳) نیز گزارش شد.

گونه *F.solani* اولین بار از هند در سال ۱۹۸۲ از ریشه و طوقه زیتون جداسازی شد و بیماری‌زایی آن نیز به اثبات رسید (بارتو و همکاران[3]، ۲۰۰۲). در ایران نیز در طی سال‌های ۱۳۷۶-۱۳۷۸ در تحقیقی که انجام گرفت، جدایه‌های *F.solani* و *F.oxysporum* روی زیتون بیماری‌زا تشخیص داده شدند (افشاری آزاد و خزینی، ۱۳۷۹)، پس از آن نیز این گونه از قزوین از روی زیتون گزارش شد (داودی و عصارزاده، ۱۳۸۱).

در جنوب اسپانیا در طی سال های ۱۹۸۹- ۱۹۹۵ تحقیقی انجام شد که نتایج نشان داد، گونه *Cylindrocarpon estructans* (Zins.) *Scholten* روی زیتون، بیماری‌زا است و مشاهده شد که این گونه می‌تواند علائمی مانند پژمردگی، سرخشکیدگی و مرگ در درختان زیتون ایجاد کند (سانچز هرناندز، ۱۹۹۸).در ایران فقط چند گزارش مبنی بر وجود این قارچ روی میزبان‌های دیگر وجود دارد، ولی این قارچ تاکنون از روی زیتون جداسازی نشده است.

گونه *R.solani* در تحقیقی که طی سال‌های ۱۹۸۹- ۱۹۹۵ در جنوب اسپانیا انجام شد از روی زیتون جداسازی شد که بیمار گر ضعیف روی زیتون تشخیص داده شد (سانچز هرناندز، ۱۹۹۸). در طی سال‌های ۱۳۷۶- ۱۳۷۸نیز جدایه‌های *R.solani* از روی زیتون در ایران جداسازی شد (افشاری آزاد و خزینی، ۱۳۷۹).

مواد و روش ها

نمونه برداری

طی سال‌های ۱۳۸۴- ۱۳۸۶ باغات زیتون در مناطق مختلف استان خوزستان شامل ایذه، دهدز، رامهرمز، شوش، دزفول، اندیمشک و هفت تپه مورد بازدید قرار گرفتند. علائم مشاهده شده در درختان و نهال‌های جوان شامل زردی، پژمردگی، خشکیدگی یک طرفه درخت، برگشتن برگ ها به سمت داخل، شانکر شاخه و پوسیدگی ریشه و طوقه بود، از ریشه، طوقه و شاخه‌های این درختان و نهال‌های جوان نمونه‌برداری صورت گرفت. نمونه‌ها درون پاکت‌های پلاستیکی به آزمایشگاه انتقال داده شدند.

جداسازی

برای جداسازی قارچ ها، بافت‌های پوسیده ریشه و طوقه و شاخه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه و شستشو با آب مقطر به قطعات کوچک ۰/۵×۰/۵ سانتی‌متر بریده شدند و پس از ضد عفونی سطحی در اتانول ۷۵ درصد به مدت ۱۵-۱۰ ثانیه، با آب مقطر سترون شستشو داده در بین قطعات کاغذ صافی سترون خشک شدند، سپس درون تشتک‌های پتری حاوی ماده غذایی عمومی PDA (Merck) کشت شدند.

1- Sanchez Hernandez
2- Lachquer & Sedra
3- Barreto *et al.*

تشتک‌های پتری به مدت ۷-۵ روز در دمای 25 °C در شرایط نور- تاریکی ۱۲ ساعته قرار داده شد. برای جداسازی قارچ ورتیسیلیوم تشتک‌های پتری در تاریکی قرار داده شدند. قارچ‌های رشد یافته به تشتک-های محیط‌کشت تازه منتقل شدند و سپس نسبت به خالص‌سازی جدایه ها اقدام گردید.

خالص‌سازی جدایه‌ها

خالص‌سازی جدایه‌ها به روش تک اسپور (برای قارچ‌های ورتیسیلیوم، فوزاریوم و سیلیندروکارپون) و نوک ریسه کردن (برای قارچ ریزوکتونیا) روی محیط کشت آب- آگار ۲٪ انجام گرفت. سپس تک اسپورها و نوک‌ریسه‌ها به محیط کشت PDA انتقال یافتند (صارمی، ۱۳۷۷).

شناسایی جدایه‌ها

شناسایی جدایه‌ها با استفاده از کلیدهای شناسایی معتبر انجام شد. برای تشخیص جدایه‌های جنس ورتیسیلیوم از کلید توصیفی (اسمیت[1]، ۱۹۶۵) استفاده شد. برای جنس ورتیسیلیوم، تشخیص در حد جنس عمدتا بر اساس مشخصات کنیدیوفور و فیالیدها و در حد گونه بر اساس اندام استراحتی و اندازه کنیدیوم صورت گرفت. مشخصات عمده‌ای که برای شناسایی گونه‌های فوزاریوم مورد توجه قرار گرفت، عبارت بودند از: شکل ماکروکنیدیوم، وجود یا عدم وجود میکروکنیدیوم و شکل آن، وجود یا عدم وجود زنجیره میکروکنیدیومو سرهای دروغین، نوع فیالید (منوفیالید یا پلی‌فیالید)، اندازه رشد پرگنه در محیط کشت PDA، وجود یا عدم وجود کلامیدوسپور، شکل ظاهری پرگنه و رنگ آن (به خصوص از سطح زیر پتری). تشخیص گونه‌های فوزاریوم براساس ویژگی‌های اولیه و ثانویه و با استفاده از کلید شناسایی گونه های فوزاریوم (بورگس و همکاران[2]، ۱۹۹۴) صورت گرفت. مشخصات عمده‌ای که برای شناسایی گونه‌های سیلیندروکارپون مورد توجه قرار گرفت عبارت بودند از: وجود یا عدم وجود میکروکنیدیوم ها، وجود یا عدم وجود کلامیدوسپور و تعداد دیواره در ماکروکنیدیوم ها، تشخیص گونه‌های سیلیندروکارپون بر اساس ویژگی‌های اولیه و ثانویه، با استفاده از کلید شناسایی گونه‌های سیلیندروکارپون (بوث[3]، ۱۹۶۶) صورت گرفت. به منظور شناسایی جدایه‌های ریزوکتونیا، هر جدایه روی لام تمیز کشت داده شد. لام‌ها درون پتری سترون حاوی مقداری آب سترون روی میله شیشه‌ای قرار گرفتند، پس از رشد قارچ در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد، رنگ‌آمیزی هسته‌ها با افزودن یک قطره سافرانین ۰/۵ درصد و یک قطره هیدروکسید پتاسیم ۳ درصد انجام شد. سپس همه جدایه‌ها از لحاظ ویژگی ریسه مورد بررسی قرار گرفتند. تعیین گروه آناستوموزی جدایه‌های ریزوکتونیا به وسیله جفت شدن آن‌ها با سویه‌های آزمون کننده و مشاهده پیوند ریسه‌ها با روش اسلاید پوشیده از آگار مورد بررسی قرار گرفت.

اشکال ترسیمی و عکس‌های میکروسکوپی با استفاده از لوله ترسیم و میکروسکوپ مدل Olympus BX51 تهیه شد.

بررسی بیماری‌زایی

تعدادی از گونه‌های قارچی جداسازی شده برای بررسی بیماری‌زایی آزمایش شدند. کشت خالص جدایه‌ها روی محیط کشتPDA رشد داده شد. پتری‌ها به مدت ۱۵-۱۰ روز در شرایط استاندارد نگهداری شدند.سوسپانسیون اسپوری با غلظت ۴×۱۰^{۶} اسپور در میلی لیتر تهیه شد. نهال های جوان ۱۲ ماهه، از نهالستان تهیه شدند و به روش زیر مایه‌زنی شدند: ریشه نهال‌ها به دقت به وسیله آب شستشو داده شد و به مدت ۵ دقیقه در سوسپانسیون اسپور فرو برده شد، سپس در گلدان‌های پلاستیکی (هر گیاه در یک گلدان) که حاوی خاک اتوکلاو شده بود (ماسه، کود حیوانی و خاک زراعی ۱:۱:۱) کشت داده شد. به هر گلدان ۵۰ میلی لیتر از

1- Smith
2- Burgess *et al.*
3- Booth

سوسپانسیون اسپور اضافه شد. در تیمار شاهد به جای سوسپانسیون اسپور از آب مقطر سترون استفاده شد. برای جدایه‌های قارچ ریزوکتونیا که اسپور تولید نمی‌کنند به ازای هر نهال ۶ دانه گندم کلونیزه شده به وسیله ریزوکتونیادر کنار ریشه‌ها قرار داده شد. در تیمار شاهد نیز برای این جدایه ها از گندم سترون شده بدون قارچ استفاده گردید. گلدان‌ها به مدت ۴۵ روز (افشاری آزاد و علیزاده، ۱۳۸۳) در دمای ۳۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد (روز) و ۱۵-۱۰ درجه سانتی‌گراد (شب) و رطوبت نسبی ۹۵-۴۰ درصد نگهداری شدند. برای هر جدایه قارچی در یک طرح کاملاً تصادفی ۴ تکرار و ۴ شاهد در نظر گرفته شد. شدت علائم هوایی و ریشه‌ای به وسیله مقیاس ۵-۰ درجه ای که بر اساس درصدی از گیاه که بیمار شده است اندازه‌گیری شد (۰= ۰٪، ۱-۱۰ ٪=۱، ۱۱-۳۰ ٪ =۲، ۳۱-۵۰ ٪=۳، = ۵۱-۸۰ ٪=۴، ۸۱-۱۰۰٪=۵) (روبینسون و دیکون[1]، ۲۰۰۲). سپس قطعاتی از ریشه گیاهان مایه‌زنی شده روی محیط کشت PDA کشت داده شد تا از جداسازی دوباره جدایه‌های قارچی اطمینان حاصل شود. آنالیز واریانس برای شدت علائم روی اندام هوایی و ریشه در مقایسه با شاهد با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد و نرم افزار آماری SPSS انجام گرفت.

نتایج و بحث

در این پژوهش۱۲۴ جدایه قارچ از ریشه و طوقه درختان زیتون در استان خوزستان جداسازی و شناسایی شد که به ۴ جنس (ورتیسیلیوم، فوزاریوم، ریزوکتونیا و سیلیندروکارپون) تعلق داشتند. از این تعداد، ۳۵ جدایه متعلق به قارچ ورتیسیلیوم بود که همه از گونه *V.dahliae* بودند، این قارچ روی محیط کشت PDA تشکیل میسیلیوم‌های هوایی سفید رنگ و کرکی می‌دهد که پس از گذشت چند روز از وسط تولید اسکلروت-های سیاه رنگی می‌کند (شکل ۱)،کنیدیوفورهای فراهم در انتها نوک تیز،کنیدیوم‌ها بیضوی و تک سلولی متمرکز در انتهای فیالید (شکل ۱)، میکرواسکلروت ها تقریبا کروی دارای بافت متراکم و سیاه رنگ (شکل ۱).

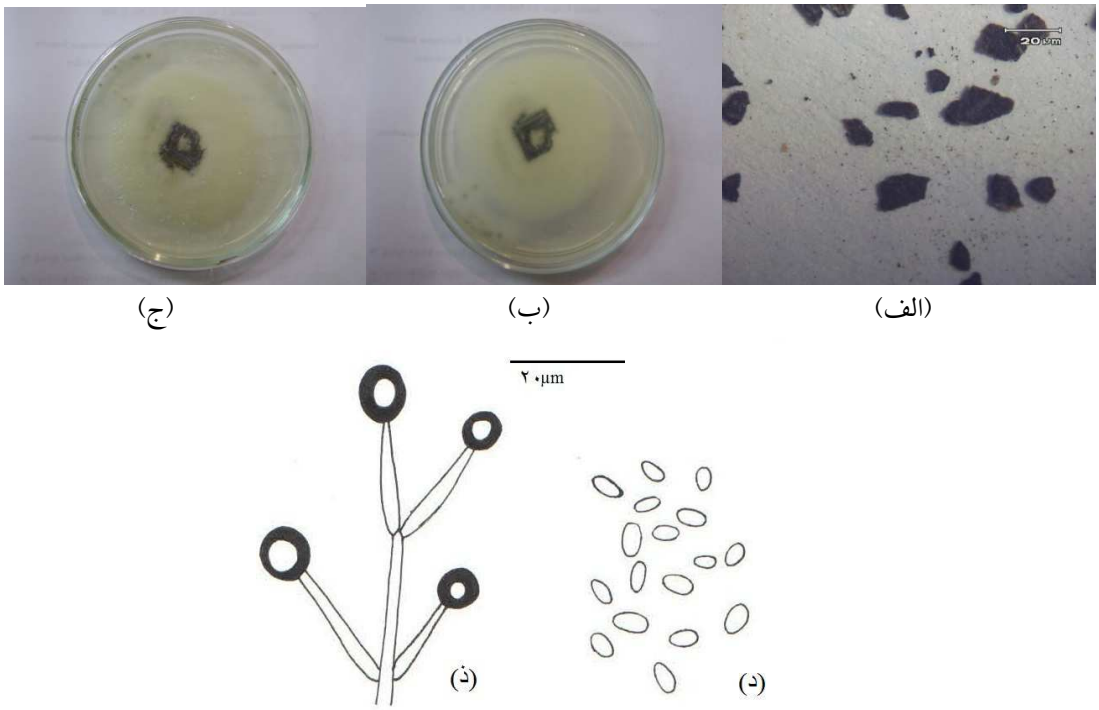
این قارچ در محدوده حرارتی ۲۱ تا ۲۹ درجه سانتی-گراد دارای بهترین رشد است و در دمای بالاتر از ۳۲ درجه سانتی‌گراد به صورت غیر فعال در آمده وتولید اندام استراحتی به نام میکرواسکلروت می‌کند و بعد با مناسب شدن دما دوباره فعال می‌شود. به همین علت در طیف وسیعی از مناطق می‌تواند برای درختان زیتون مشکل ساز باشد، همچنین بر طبق تحقیقات انجام شده در کشورهای مختلف و ایران مشخص شده که اکثر ارقام زیتون نیز به این بیماری حساس هستند. بر طبق تحقیقات صورت گرفته این قارچ از نقاط مختلف جهان مانند جزیره سیسیل در ایتالیا از روی کولتیوار بلادی اسپانگا (لاچکوئر و سدرا،۲۰۰۲) ،کالیفرنیا و یونان، سوریه، مراکش (پگ و برادی[2]، ۲۰۰۲) ، اسرائیل از رویکولتیوار مانزانیلا (لوین و همکاران[3]، ۲۰۰۳) ، ترکیه (درویس و همکاران[4]، ۲۰۰۷) ، اردن (موفق[5]، ۲۰۰۶) ، الجزایر (بلاحسن و همکاران[6]،۲۰۰۵) ، گزارش شده است. از ایران نیز از استان‌های گلستان (رهنما و همکاران؛ ۱۳۷۷)، فارس (کامران و شیروانی، ۱۳۷۹)، کهکیلویه و بویراحمد (افشاری آزاد و علیزاده، ۱۳۸۳) و زنجان (ناظر کاخکی و ارشاد، ۱۳۸۳) گزارش شده است. ارقام مختلف زیتون نیز نسبت به این بیماری حساس هستند که از آن جمله می توان به رقم دزفولی (که بومی منطقه خوزستان است و در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفته است)، همچنین در تحقیقی دیگر که در استان گلستان صورت گرفت ارقام مختلف زیتون از نظر شدت بیماری مورد مقایسه قرار گرفتند که مشخص شد ارقام کالامون و کروناکی کمترین حساسیت، ارقام میشن، کنسروالیا،

1- Robinson & Deacon

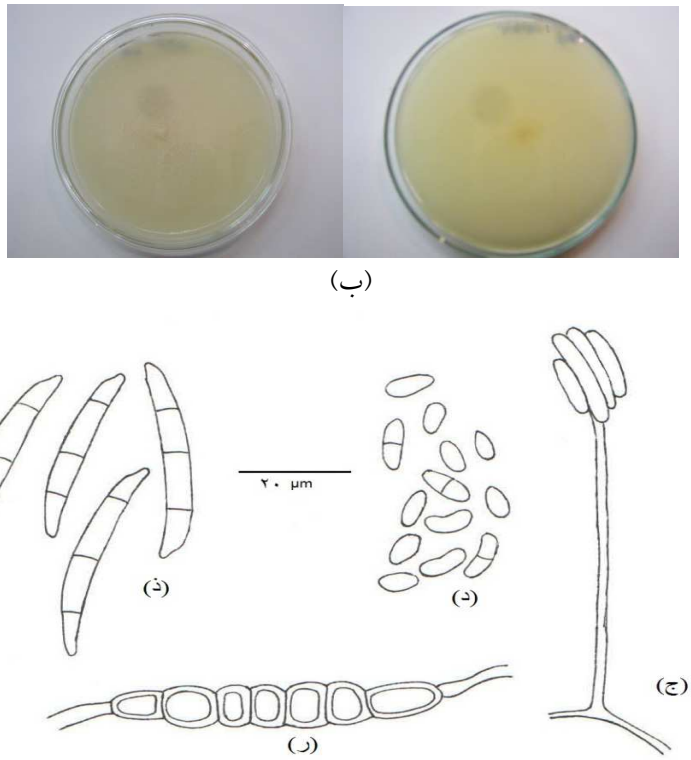
2- Pegg& Brady
3- Levin *et al.*
4- Dervis *et al.*
5- Muwaffaq
6- Bellahcene *et al.*

زرد و بلیدی بیشترین حساسیت و ارقام مانزانیلا و سویلانا در حد متوسطی به بیماری حساس بودند (عطار و همکاران، ۱۳۸۵).

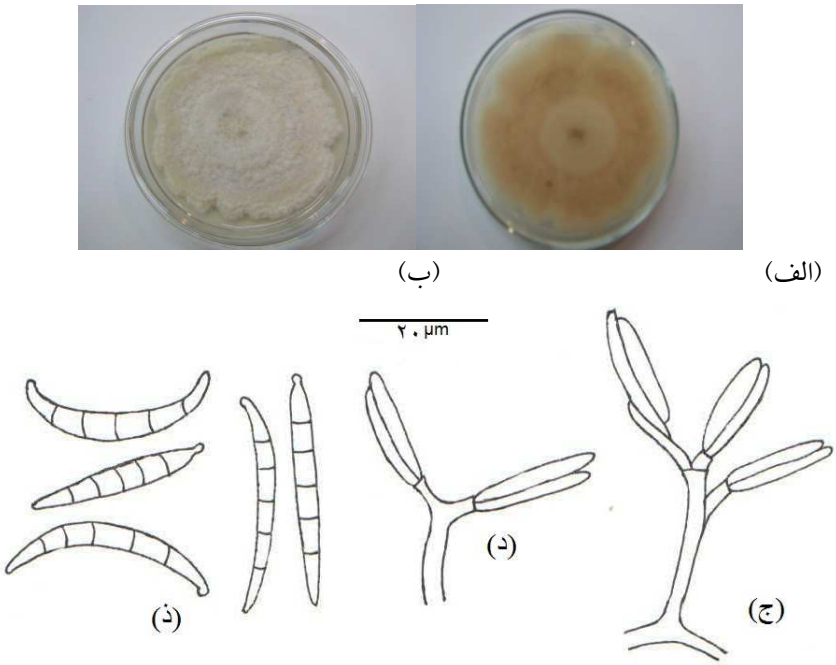
از جنس فوزاریم نیز ۴۷ جدایه به دست آمد که در ۳ گونه طبقه بندی شدند، گونه *F.solani* با ۲۳ جدایه، گونه *F.equiseti* با ۲۰ جدایه و *F.semitectum* با ۴ جدایه. گونه *F.solani* تولیدمیسیلیوم‌های کرم رنگ و به صورت پراکنده می‌کند. رنگ سطح زیرین پرگنه از بیرنگ تا کرم متغییر بود و در بعضی از جدایه‌ها رگه‌های قهوه‌ای کمرنگ نیز مشاهده می شود (شکل ۲)، اسپورها معمولا به صورت سرهای دروغین روی منوفیالیدهای بلندتشکیل می‌شوند (شکل ۲)، کنیدیوفورهای اولیه در ریسه های هوایی، کنیدیوفورهای ثانویه در اسپورودوشیوم (شکل ۲)، منوفیالید بلند، غیر منشعب، میکروکنیدیوم‌ها بدون دیواره عرضی یا با یک دیواره عرضی، بیضی، تخم مرغی تا قلوه‌ای شکل (شکل ۲)، ماکروکنیدیوم‌ها سیلندری شکل، کمی خمیده با ۴-۳ دیواره عرضی، سلول انتهایی کند و سلول پایه با کمی فرورفتگی (شکل۲)، کلامیدوسپورها فراوان به صورت منفرد، جفتی، زنجیری و یا توده‌ای (شکل ۲). گونه *F.semitectum* تولید میسیلیوم های هوایی متراکم وبه رنگ نخودی تا قهوه‌ای کمرنگ می کند، که از سطح زیرینبه رنگ کرم تا زرد مایل به قهوه‌ای دیده می شود (شکل ۳)، دارای منوفیالید و پلی‌فیالید، میکروکنیدیوم‌ها کمیاب، ماکروکنیدیوم‌ها به دو شکل کشیده و دوکی شکل و داسی شکل که سلول پایه در آن‌ها به شکل پاشنه پا است (شکل ۳).گونه *F.equiseti* تولید میسیلیوم‌های هوایی متراکم و به رنگ سفید مایل به کرم یا قهوه‌ای روشن می‌کند و رنگ سطح زیرین پرگنه زرد متمایل به قهوه‌ای روشن است که با افزایش سن محیط کشت، به خصوص در مرکز پرگنه به رنگ قهوه‌ای تیره تغییر می‌یابد (شکل ۴).



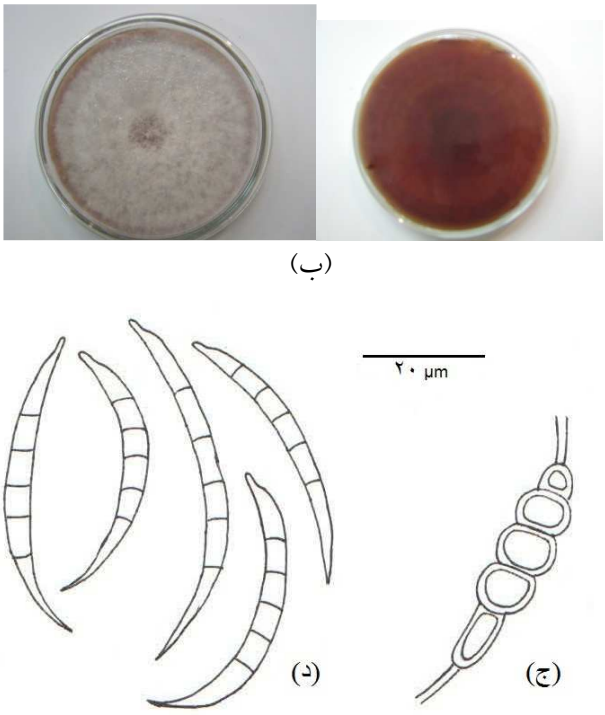
شکل ۱- قارچ *V. dahliae*: (الف):سطح زیرین پرگنه،(ب):سطح بالایی پرگنه، (ج):میکرواسکلروت، (د): میکروکنیدیوم‌ها. (ذ): فیالید



شکل۲- *F. solani* : (الف): سطح زیرین پرگنه، (ب): سطح بالایی پرگنه، (ج): منوفیالید، (د): میکروکنیدیوم‌ها، (ذ) ماکروکنیدیوم، (ر): کلامیدوسپور (عکس‌ها و ترسیم‌ها از نگارنده)



شکل۳- *F. semitectum*: (الف):سطح بالایی پرگنه، (ب): سطح زیرین پرگنه، (ج): کنیدیوم‌های گوش خرگوشی ومنوفیالید، (د): پلی‌فیالید، (ذ): ماکروکنیدیوم سوزنی و داسی شکل (عکس‌ها و ترسیم‌ها از نگارنده)



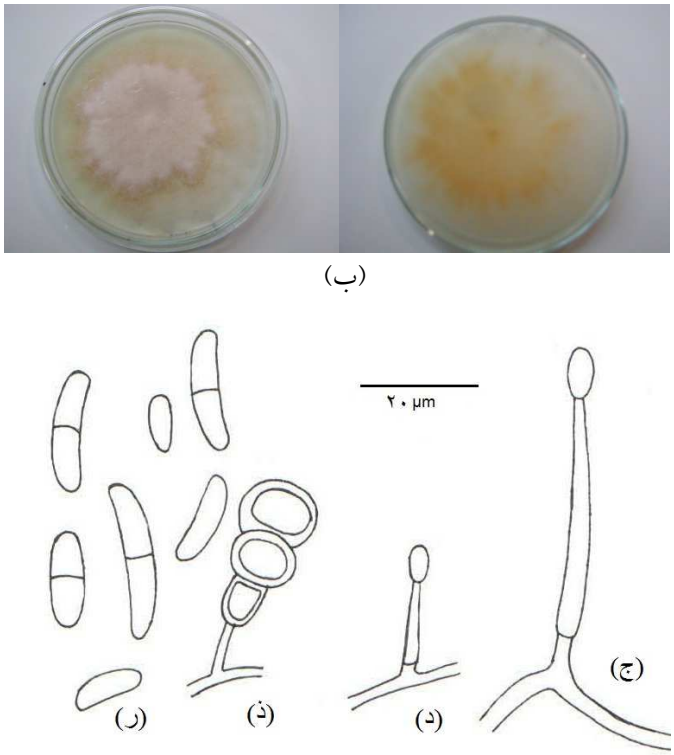
شکل ٤- *F. equiseti*: (الف):سطح بالایی پرگنه، (ب):سطح زیرین پرگنه، (ج): کلامیدوسپور، (د): ماکروکنیدیوم (عکس‌ها و ترسیم‌ها از نگارنده)

منوفیالید ساده و منشعب، ماکروکنیدیوم‌ها با دیواره ضخیم و انحنا در سطح پشتی، ۶-۵ دیواره، سلول انتهایی معمولا خیلی کشیده و شلاقی شکل و سلول پایه به طور مشخص پاشنه‌ای شکل (شکل ۴)، فاقد میکروکنیدیوم، کلامیدوسپور به تعداد زیاد و به اشکال زنجیری یا خوشه‌ای (شکل ۴).

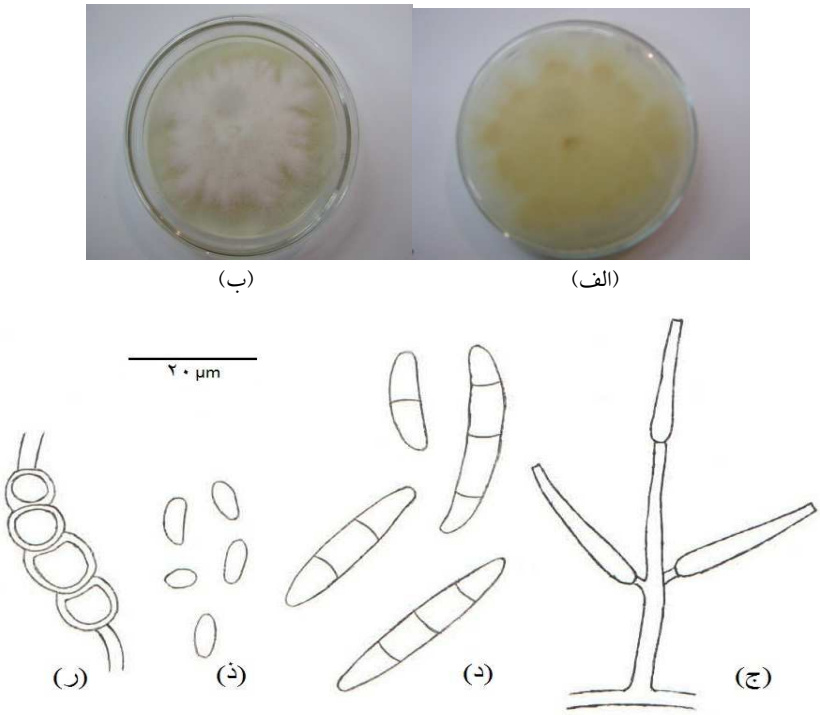
گونه های فوزاریوم از مهم‌ترین قارچ‌های خاکزی هستند که در شرایط مختلف اقلیمی گسترش دارند، این گسترش همه جانبه به علت توانایی آن‌ها در زندگی ساپروفیتی روی مواد مختلف، داشتن مکانیزم‌های مختلف برای پراکنش و قدرت دوام طولانی در شرایط نامناسب می باشد. این توانایی‌ها امکان سازگاری گونه-های فوزاریوم را در مناطق مختلف اکولوژیکی فراهم نموده است (صارمی، ۱۳۷۷). گونه‌های مختلف این قارچ تاکنون از مناطق مختلفی جداسازی شده‌اند که از آن جمله می‌توان به گونه *F. solani* از هند، گونه‌های *F.solani, F.equiseti* از آرژانتین (بارتو و همکاران، ۲۰۰۲)، گونه *F. solani* از جنوب اسپانیا (سانچز هرناندز، ۱۹۹۸) اشاره کرد. گونه *F.semitectum* تاکنون به عنوان عامل پوسیدگی ریشه و طوقه زیتون گزارش نشده است. گزارش این گونه از زیتون برای ایران و جهان جدید می باشد. در ایران نیز گونه *F.solani* از نهالستان‌ها و باغات جدید الاحداث کشور (افشاری آزاد و خزینی، ۱۳۷۹) و پس از آن از نهالستان‌های قزوین جداسازی شد (داودی و عصارزاده، ۱۳۸۱). گزارش گونه *F.equiseti* نیز از زیتون برای ایران جدید است.

۳۷ جدایه از جنس سیلیندروکارپون از روی زیتون به دست آمد که به سه گونه تعلق داشتند، *C.destructans* با ۲۰ جدایه، *C.didymum* با ۹ جدایه و *C.obtosisporum* با ۸ جدایه، گونه *C.didymum* تولید میسیلیوم هوایی سفید یا هلویی متراکم می کند که با گذشت زمان به رنگ بژ، قهوه‌ای روشن یا قهوه‌ای ارغوانی در می‌آید. رنگ پرگنه از سطح زیرین بژ به ندرت با لکه‌های خاکستری مایل به ارغوانی است (شکل ۵)، کنیدی‌های تخم مرغی، بیضی

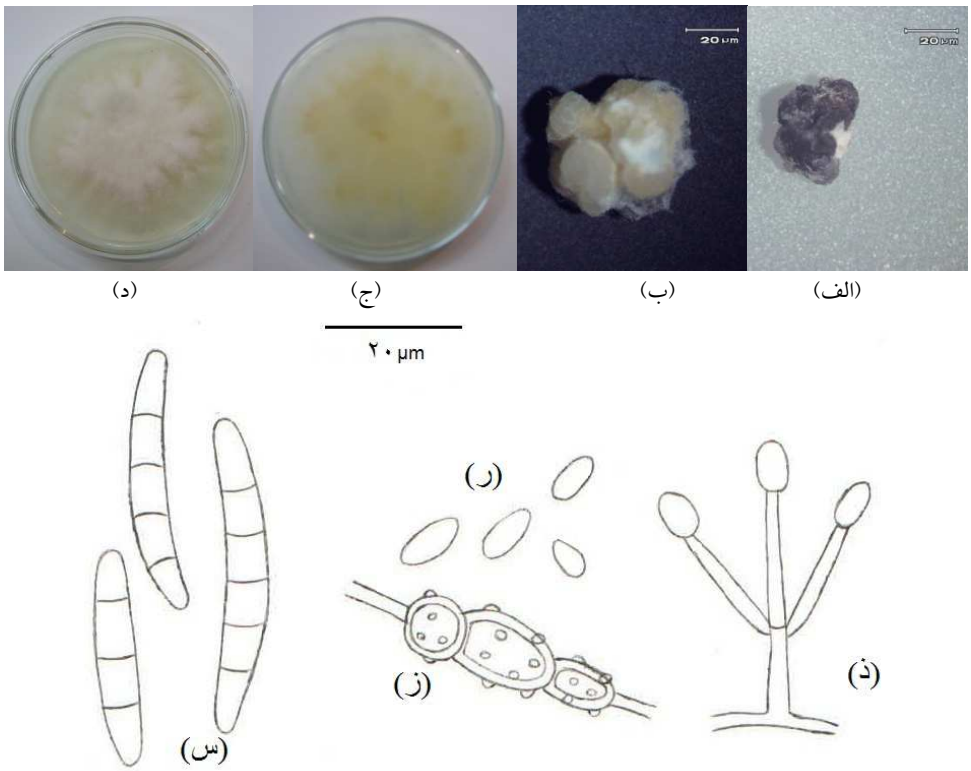
تا استوانه‌ای با دو انتهای گرد، باریک و مستقیم یا کمی خمیده، ۰ تا ۱ دیواره به ندرت ۲ دیواره (شکل ۵)، کلامیدوسپور به صورت انتهایی یا میانی، تکی در زنجیره یا خوشه‌ای، به اشکال کروی یا صاف به رنگ روشن تا قهوای (شکل ۵). گونه *C.obtosisporum* تولید مسیلیوم هوایی متراکم یا پراکنده به رنگ روشن می‌کند که بعد از مدتی به رنگ بژ کمرنگ خیلی به ندرت به رنگ قهوه‌ای شکلاتی در می‌آید (شکل ۶)، میکروکنیدی‌ها تخم مرغی، ماکروکنیدی‌ها به رنگ روشن، کمی خمیده، استوانه‌ای با انتهای گرد، گاهی با سلول پایه نوکدار، ۱-۳ دیواره (شکل ۶)، کلامیدوسپور صاف، کروی، به رنگ روشن یا قهوه‌ای روشن که به صورت تکی یا در زنجیره، در میسیلیوم یا در کنیدی تشکیل می‌شود (شکل ۶). گونه *C.destructans* میسیلیوم هوایی متراکم یا پراکنده، سفید مایل به خاکستری تولید می کند که بعدا به رنگ قهوه‌ای روشن تا قهوه‌ای قرمز تیره در می‌آید، رنگ پرگنه از سطح زیرین به رنگ بژ که عموما به رنگ قهوه‌ای قرمز تیره در می‌آید (شکل ۷)، میکروکنیدی‌ها تخم‌مرغی یا بیضی شکل، ماکروکنیدی ها استوانه‌ای با دو انتهای گرد، کشیده و مستقیم، ۳-۱ دیواره اما به ندرت بیشتر از ۵ دیواره (شکل ۷)، کلامیدوسپور کروی، صاف، اغلب دارای ناهمواری، زنجیره‌ای یا خوشه‌ای و یا در سلولی از ماکروکنیدی تشکیل می‌شوند (شکل ۷)، دارای اسکلروت‌های کرم، قهوه‌ای و یا سیاه (شکل ۷). این قارچ به صورت ساپروفیت، اندوفیت و پاتوژن در اغلب خاک‌ها وجود دارد و معمولا به همراه سایر قارچ‌های خاکزی باعث پوسیدگی ریشه و طوقه در گیاهان مختلف می شود، این قارچ خاکزی بوده و دوام بالایی در خاک دارد، بنابر این به محض اینکه گیاه تحت شرایط استرس قرار گیرد می‌تواند گیاه را بیمار کند. گزارش گونه‌های



شکل ۵- *C. didymium*: (الف): سطح بالایی پرگنه، (ب): سطح زیرین پرگنه، (ج): کنیدیوفور اولیه، (د): کنیدیوفور ثانویه، (ذ): کلامیدوسپور،(ر): کنیدیوم (عکس‌ها و ترسیم‌ها از نگارنده)



شکل٦- قارچ *C. obtosisporum*: (الف): سطح بالایی پرگنه، (ب): سطح زیرین پرگنه، (ج): ماکروکنیدیوفور، (د): ماکروکنیدیوم،(ذ): .میکروکنیدیوم،(ر): کلامیدوسپور.(عکس‌ها و ترسیم‌ها از نگارنده)



شکل ۷- قارچ *C. destructans*: (الف): سطح بالایی پرگنه، (ب): سطح زیرین پرگنه، (ج-د): اسکلروت (ذ): ماکروکنیدیوفور، (ر): میکروکنیدیوم، (ز): کلامیدوسپور، (س): ماکروکنیدیوم.(عکس‌ها و ترسیم‌ها از نگارنده)

C. didymum و *C.obtosisporum* از ایران و جهان از روی زیتون جدید است، ولی گونه *C.destructans* از روی زیتون ازجنوب اسپانیا و کالیفرنیا (سانچز هرناندز، ۱۹۹۸) گزارش شده است، ولی تاکنون از ایران از روی زیتون گزارش نشده است.

۵ جدایه نیز از جنس ریزوکتونیا به دست آمد که همه متعلق به گروه آناستوموزی AG-4 بودند، در این جدایه‌ها، ریسه‌ها دارای انشعابات ۹۰ درجه همراه با یک فرورفتگی در محل انشعاب بودند (شکل ۸)، همچنین در نزدیکی محل انشعاب یک دیواره عرضی وجود داشت، اسکلروت‌ها بی‌شکل و به رنگ‌های قهوه‌ای روشن و قهوه‌ای تیره (شکل ۸) و چند هسته‌ای (شکل ۸). بیماری-های ناشی از این قارچ در تمام دنیا وجود داشته و به اکثر گیاهان یکساله، چند ساله و درختان خسارت های زیادی وارد می کند. این گونه تاکنون از جنوب اسپانیا (سانچز هرناندز، ۱۹۹۸)، آرژانتین (باررا و همکاران[1]، ۲۰۰۳) گزارش شده است. از ایران نیز از فارس (کامران و شیروانی، ۱۳۷۹)، قزوین (داودی و عصارزاده، ۱۳۸۱) خوزستان با گروه آناستوموزی AG-A (صفایی و همکاران، ۱۳۷۸) و از کرمان با گروه آناستوموزی AG-4 جداسازی شد (ایلخان و همکاران، ۱۳۸۶).

بررسی بیماری‌زایی

نتایج آزمون بیماری‌زایی برای گونه‌های *V.dahliae*، *F. solani*، *F.equiseti*، *C.destructans* و *R. solani* انجام شد. گونه *V.dahliae* نشان داد که این قارچ در مقایسه با شاهد روی زیتون بیماری‌زایی بالایی دارد، و روی نهال‌های تلقیح شده علائمی مانند پژمردگی، سبز خشکی، ریزش برگ‌ها و پوسیدگی ریشه را نشان داد (شکل ۹ و۱۰). قارچ دوباره از قطعات ریشه کشت داده شده جداسازی شد.

بیماری‌زایی دو گونه از گونه‌های فوزاریوم شناسایی شده که بیشترین فراوانی را داشتند (*F.solani* و*F.equiseti*) مورد بررسی قرار گرفت. اگر چه نتایج آزمون بیماری‌زا بودن دو گونه را در مقایسه با شاهد تائید می‌کرد ولی شدت بیماری‌زایی در دو گونه با یکدیگر تفاوت داشت و از نظر شدت بیماری‌زایی در دو گروه قرار گرفتند، قارچ‌های تلقیح شده دوباره از ریشه نهال‌های مایه‌زنی شده به دست آمدند. در بررسی بیماری‌زایی جدایه‌های قارچ *F. solani* علائم بیماری به صورت پوسیدگی ریشه و طوقه، پژمردگی عمومی، برگشتن برگ‌ها به سمت داخل و زردی برگ‌ها مشاهده شد (شکل ۱۱). در بررسی بیماری‌زایی جدایه‌های *F. equiseti* همه جدایه‌ها روی زیتون بیماری‌زا بودند و علائم پوسیدگی ریشه، برگشتن برگ‌ها به سمت داخل و پژمردگی عمومی مشاهده شد.

بیماری‌زا بودن گونه *C.destructans* که بیشترین فراوانی را دارا بود مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که این گونه در مقایسه با شاهد بیماری-زای قوی روی زیتون است و علائمی مانند پژمردگی و پوسیدگی شدید ریشه روی نهال های تلقیح شده ایجاد می کند(شکل۱۳). این قارچ از نهال‌های مایه‌زنی شده دوباره جداسازی شد.

نتایج حاصل از آزمون بیماری‌زایی جدایه‌های ریزوکتونیا در مقایسه با شاهد نشان داد که این قارچ روی زیتون بیماری‌زا است ولی بیمارگر ضعیفی است، که علائمی مانند پژمردگی جزئی و پوسیدگی خفیف ریشه روی زیتون ایجاد کرد (شکل۱۴). این قارچ دوباره از نهال‌های مایه‌زنی شده جداسازی شد.

به طور کلی نتایج حاصل از آزمون بیماری‌زایی بدین صورت است:

۱- همه جدایه‌های قارچی که آزمون بیماری‌زایی روی آن‌ها انجام شد، بیماری‌زا تشخیص داده شدند.

۲- با توجه به اینکه علائم ناشی از آلودگی زیتون به گونه‌های مختلف در این مطالعه مشابه بود و از ایندکس

1 -Barrera

(ب) (الف)

شکل ۸- *R.solani*: (الف وب): اشکال مختلف اسکلروت، (ج):ریخت شناسی ریسه (عکس‌ها و ترسیم‌ها از نگارنده)

(ج) (ب) (الف)

شکل۹- علائم مختلف ایجاد شده توسط جدایه‌های *V. dahliae* روی اندام هوایی زیتون،(الف): برگ‌ریزی، (ب): پژمردگی، (ج): پژمردگی برگ‌های نیمی از شاخه. (عکس‌ها از نگارنده).

(ب) (الف)

شکل۱۰- (الف): علائم پوسیدگی ریشه ناشی از قارچ *V. dahliae*، (ب): شاهد. (عکس‌ها از نگارنده).

(ب) (الف)

شکل۱۱- (الف): علائم پژمردگی برگ‌ها در نهال زیتون ناشی از تلقیح قارچ *F. solani*، (ب) علائم پوسیدگی ریشه (عکس‌ها از نگارنده)

(ب) (الف)

شکل۱۲- (الف)-: علائم پژمردگی برگ‌ها در نهال زیتون ناشی از تلقیح قارچ *F. equiseti*، سمت راست شاهد، سمت چپ گیاه بیمار (ب) علائم پوسیدگی ریشه (عکس‌ها از نگارنده)

(ب) (الف)

شکل۱۳- *C.destructans*:(الف): علائم پژمردگی: سمت راست شاهد، سمت چپ گیاه بیمار، (ب): پوسیدگی ریشه (عکس‌ها از نگارنده)

(ب) (الف)

شکل ١٤ - *R.solani*: (الف): علائم پژمردگی جزئی، سمت راست شاهد، سمت چپ گیاه بیمار (ب): علائم پوسیدگی ریشه (عکس ها از نگارنده)

ثابتی در این خصوص استفاده شد، شدت بیماری-زایی گونه‌های مختلف در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱ و ۲). شدت بیماری‌زایی در گونه‌های مختلف قارچی متفاوت بود به طوری که در سه گروه قرار گرفتند (نمودار ۱):

گروه اول با بیشترین شدت بیماری‌زایی شامل گونه-های (*F.solani, C.destructans, V.dahliae*)

گروه دوم با بیماری‌زایی متوسط شامل گونه (*F.equiseti*)

گروه سوم با بیماری‌زایی ضعیف شامل گونه (*R.solani*)

جدول ۱ - تجزیه واریانس مقایسه شدت بیماری زایی گونه های مختلف قارچ های جداسازی شده با شاهد روی اندام هوایی زیتون

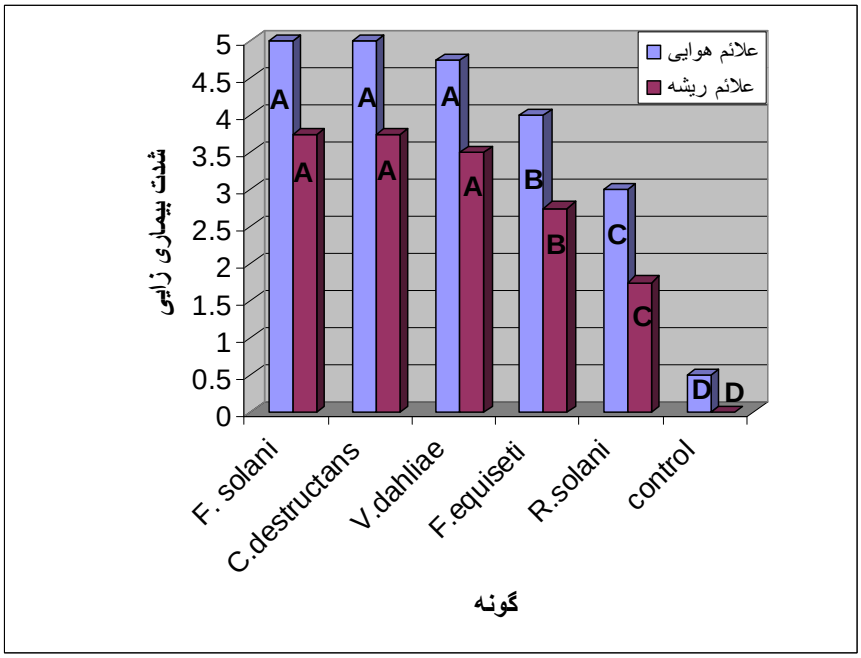
منابع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	ارزش F	سطح احتمال
تیمار	۵	۶۱/۲۰۸	۱۲/۲۴۲	۱۲۵/۹۱۴	*۰/۰۰
اشتباه آزمایشی	۱۸	۱/۷۵۰	۰/۰۹۷		
جمع	۲۳	۶۲/۹۵۸			

معنی داری در سطح ۵ ٪= *

جدول۲- تجزیه واریانس مقایسه شدت بیماری زایی گونه های مختلف قارچ های جداسازی شده با شاهد روی ریشه زیتون

منابع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	ارزش F	سطح احتمال
تیمار	۵	۴۳/۸۳۳	۸/۷۶۷	۳۹/۴۵۰	*۰/۰۰
اشتباه آزمایشی	۱۸	۴/۰۰۰	۰/۲۲۲		
جمع	۲۳	۴۷/۸۳۳			

معنی داری در سطح ۵ ٪= *



نمودار ۱- مقایسه شدت بیماری زایی گونه های مختلف قارچ های جداسازی شده از زیتون با شاهد

منابع

۱. افشاری آزاد، ه. و خزینی، ف. ۱۳۷۹. قارچ های همراه جدا شده از قلمه ها و نهال های زیتون کشور. خلاصه مقالات چهاردهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، اصفهان، ص ۳۳۳.

۲. افشاری آزاد، ه. و علیزاده، پ. ۱۳۸۳. جداسازی قارچ *Verticillium dahliae* از درختان زیتون در استان کهکیلویه و بویر احمد. خلاصه مقالات شانزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. تبریز، ص ۳۴۸.

۳. ایلخان، ل. ۱۳۸۶.پوسیدگی رایزوکتونیایی ریشه و طوقه پسته در استان کرمان. پایان نامه کارشناسی ارشد بخش بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاهپژشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، ۱۱۵ ص.

۴. بی نام. ۱۳۸۴. آمار نامه کشاورزی استان خوزستان سال زراعی ۸۲-۸۳ . سازمان جهاد کشاورزی خوزستان، مدیریت طرح و برنامه ریزی، اداره آمار و برنامه ریزی، ۲۲۱ص.

۵. داودی، ع. و عصار زاده، خ. ۱۳۸۱. عوامل قارچی جداسازی شده از قلمه ها و نهالستان های زیتون در استان قزوین. خلاصه مقالات پانزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران،کرمانشاه، ص۲۲۷.

۶. رهنما، ک. رضوی، س. ا. لطیفی، ن. و زراعی، ح. ۱۳۷۷. وقوع خشکیدگی سر شاخه ها و زوال درختان زیتون در گرگان و گنبد. خلاصه مقالات سیزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، کرج، ص۲۲۲.

۷. صارمی، ح. ۱۳۷۷. اکولوژی و تاکسونومی گونه های فوزاریوم. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد، ۱۳۲ ص.

۸. صفایی، ن.، میناسیان، و. و رحیمیان، ح. ۱۳۷۸. جداسازی، تشخیص و بررسی بیماری زایی گونه های ریزوکتونیا از گیاهان مختلف در استان خوزستان. مجله بیماری های گیاهی، ۳۵ (۴-۱): ۱-۸.

۹. عطار، ل.، رهنما، ک.، صدوری، م. و صلاتی، م. ۱۳۸۵. بررسی واکنش ارقام زیتون به جدایه های برگریز و غیر برگریز قارچ *Verticillium dahlia*Kleb. در استان گلستان. خلاصه مقالات هفدهین کنگره گیاهپزشکی ایران، ص ۳۰۳.

۱۰. کامران، ر. و شیروانی، ع. ب. ۱۳۷۹. بررسی قارچ های عامل پژمردگی نهال ها و خشکیدگی سرشاخه و زوال درختان زیتون در استان فارس. خلاصه مقالات چهاردهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، اصفهان، ص ۱۲۳.

۱۱. مسچی، م.، خزینی، ف.، عصمتی، ع.، شیرزاد، ح.، و ضرابی م. م. ۱۳۸۱. راهنمای زیتون (کاشت، داشت، برداشت، فرآوری). نشر آموزش کشاورزی، ۱۹۳ص.

۱۲. ناظر کاخکی، س.ح. و ارشاد، ج. ۱۳۸۳. شناسایی *Verticillium dahliae*عامل بیماری سرخشکیدگی درختان زیتون در استان زنجان. خلاصه مقالات شانزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. تبریز، ص۲۷۳.

13. Barrera, V.A., Barreto, D., Perez, B., Roca, M., Naito, S., and Kobayashi, K. 2003. *Rhizoctonia* root rot of olive trees in Argentina. International Congress of Plant Pathology, 86.

14. Barreto, D. Babbitt, S., Gally, M., and Perez, B. 2002. First report of *Nectria haematococca* causing wilt of olive plants in Argentina. Plant Disease, 86(3): 326.

15. Bellahcene, M., Fortas, Z., Fernandez, D., and Nicole, M. 2005. Vegetative compatibility of *Verticillium dahlia* isolated from olive trees (*Olea europea* L.) in Algeria. African Journal of Biotechnology, 4: 963-967.

16. Booth, C. 1966. The Genus *Cylindrocarpon*. CMI, Kew, 56 p.

17. Burgess, L.W., Summerell, B.A., Bullock, S., Gott, K.P., and Backhous, D. 1994. Laboratory Manual for *Fusarium* Research.3rd. ed. University of Sydney, 133 p.

18. Dervis, S., Erten, L., Soylu, S., Tok, F.M., Kurt, S., Yıldız, M., and Soylu, E.M. 2007. Vegetative compatibility groups in *Verticillium dahliae* isolates from olive in western Turkey. European Journal of Plant Pathology, 119: 437–447.

19. FAO. 2005. Quantity produced Islamic Rep of Iran. [online] Available: http:// www. Agrisis.Org/ statistic/ FAO/ stat 2005.htm.

20. Lachquer, K.H., and Sedra, H. 2002. Characterisation of *verticillium dahliae*kleb.isolates from *Olea europea* using RAPD markers. Phytopathology Mediterranea, 41: 170-178.

21. Levin, A.G., Lavee, S., and Tsror, L. 2003. Epidemiology of *Verticillium dahliae* on olive (cv. Picual) and its effect on yield under saline conditions. Plant Pathology, 52: 212-218.

22. Muwaffaq, R. 2006. Seed transmission of *Verticillium dahliae* in olive as detected by a highly sensitive nested PCR-based assay. Phytopathology Mediterranea, 45: 15–23.

23. Pegg, G.F., and Brady, B.L. 2002. *Verticillium* Wilt. CABI Publishing. 552 p.

24. Robinson, H., Deacon, J.W. 2002. Double- stranded RNA element in *Rhizoctoniasolani* AG-3. Mycological Research, 106: 12-22.

25. Sanchez Hernandez, M.E., Ruiz Davila, A., Perez de Algaba, A., Blanco lopez, M.A., and Trapero Casas, A. 1998. Occurrence and etiology of death of young olive trees in southern Spain. European Journal of Plant Pathology, 104: 347-357.

26. Smith, H.C. 1965. The morphology of *Verticillium albo-atrum*, *V. dahliae* and *V. tricorpus*. New Zealand Journal of Agricultural Research, 8: 450-478.