نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۷، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۲، ص. ۲۴۵-۲۳۸

Journal of Plant Protection
Vol. 27, No. 2, Summer 2013, P. 238-245

ارزیابی پرآزاری جدایه‌های قارچ *Cytospora chrysosperma* (Pers.) Fr. روی نهال‌ها و شاخه‌های بریده گردو

خدیجه عباسی[۱]- سعید عباسی[۲*]- خلیل بردی فتوحی فر[۳] - روح اله شریفی[۲]

تاریخ دریافت:۱۳۹۱/۶/۵
تاریخ پذیرش:۱۳۹۲/۲/۴

چکیده

بیماری سرخشکیدگی و شانکر سیتوسپورایی یکی از شایع‌ترین بیماری‌های درختان گردو در ایران است که توسط چندین گونه از جنس سیتوسپورا ایجاد می‌شود. در این مطالعه به منظور تعیین درجه پرآزاری جدایه‌های گونه غالب عامل بیماری، ۵۸ جدایه از گونه *Cytospora chrysosperma* منتخب از ۱۲ استان کشور شامل؛ همدان، کردستان، کرمانشاه، ایلام، آذربایجان غربی، زنجان، مرکزی، لرستان، چهارمحال و بختیاری، اصفهان، کهگیلویه و بویر احمد و فارس روی نهال‌های سه ساله‌ی درخت گردو مایه‌زنی شدند و مساحت زخم ایجاد شده ۳۰ روز پس از مایه‌زنی اندازه‌گیری گردید. همچنین به منظور تعیین صحت ارزیابی مقاومت و یا بیماریزایی از طریق مایه‌زنی روی شاخه‌ی بریده، آزمون بیماریزایی در شرایط آزمایشگاهی نیز به انجام رسید. به استناد نتایج حاصل، تنوع قابل ملاحظه‌ای از لحاظ پرآزاری در بین جدایه‌ها ملاحظه گردید و درصد قابل توجهی از جدایه‌ها فاقد قدرت بیماریزایی بودند. در واقع، در آزمون بیماریزایی روی نهال ۳۴ درصد از جدایه‌ها و در آزمون بیماریزایی روی شاخه بریده ۲۴درصد از جدایه‌ها اختلاف معنی‌داری با شاهد نشان ندادند. همچنین همبستگی ضعیف ولی معنی داری (۲۳درصد) بین این دو روش ارزیابی وجود داشت. به نظر می‌رسد که ارزیابی درجه بیماریزایی و یا مقاومت با استفاده از روش مایه‌زنی روی شاخه‌ی بریده به اندازه کافی قابل اعتماد نیست.

واژه‌های کلیدی: درجه بیماریزایی، شانکر سیتوسپورایی، مایه‌زنی، مقاومت

مقدمه

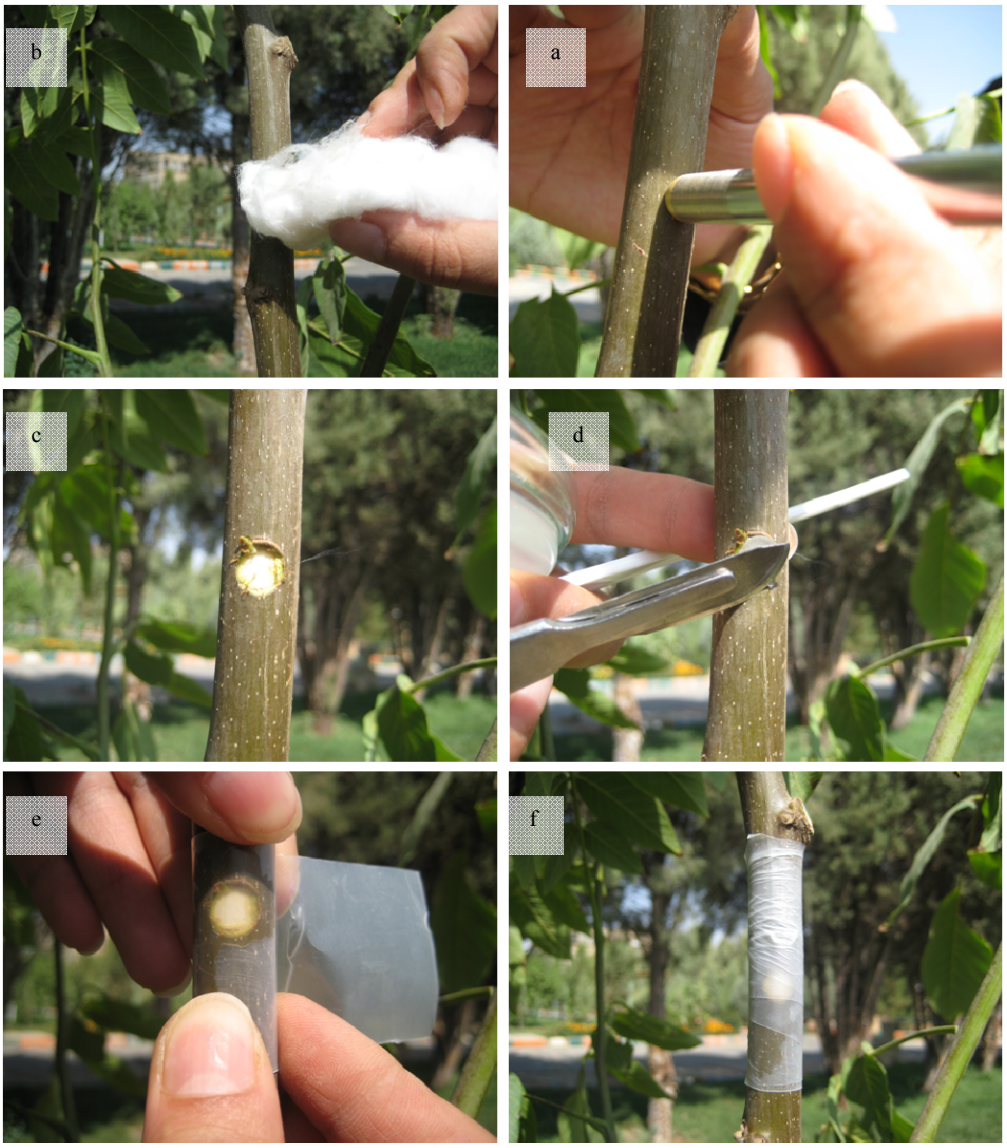
بیماری سرخشکیدگی و شانکر سیتوسپورایی (*Cytospora canker*) یکی از بیماری‌های شایع درختان گردو است که در بسیاری از نقاط دنیا موجب کاهش عمر مفید این درختان می‌شود (۸، ۱۱، ۱۲ و ۱۳). بیماری با گونه‌های مختلفی از جنس *Cytospora* ایجاد می‌گردد. کیومرثی و زکیئی (۷) عامل شانکر سیتوسپورایی درختان گردو در استان کرمان را مورد بررسی قرار داده و قارچ عامل بیماری را *Cytospora juglandicola* گزارش کردند. احمدی و بنی‌هاشمی (۱) عامل زوال درختان گردو در جنوب ایران را *C. juglandina* و *C. juglandicola* تشخیص داده و ضمن بررسی این گونه‌ها، گونه‌های دیگری از این جنس شامل *C. ambiens*، *C. ocellata*، *C. platani*، *C. atra* و *C. cincta* را به ترتیب از روی درختان سیب، فندق، چنار، توت و هلو جداسازی و بیماریزایی آن‌ها را روی شاخه‌های بریده گردو ارزیابی نمودند که این گونه‌ها روی شاخه‌های بریده گردو علائم بسیار ضعیفی ایجاد کردند. فتوحی‌فر (۶) گونه *C. chrysosperma* و شکل جنسی آن *Valsa sordida*، همچنین گونه‌های *C. cincta* و *C. leucosperma* را روی درختان گردو گزارش نموده است. ایشان همچنین *Juglans regia* را به عنوان میزبان جدیدی برای شکل جنسی و غیرجنسی قارچ *C. chrysosperma* در دنیا گزارش کرد. جوادی اصطهباناتی (۳) نیز گونه‌های *C. chrysosperma*، *C. leucostoma* و *C. rubescens* را از درختان گردو در ایران جداسازی نموده که در بررسی‌های ایشان گونه *C. chrysosperma* روی درختان گردو غالب بوده است. در مطالعه انجام گرفته توسط عباسی و همکاران (۴) نیز گونه *C. chrysosperma* به عنوان گونه غالب روی درختان گردو در ایران شناخته شد. همچنین درخت گردو به عنوان میزبان جدیدی برای گونه *C. schulzeri* گزارش گردید.

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه کردستان
۲ و۴ - استادیاران گروه گیاهپزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی
(*- نویسنده مسئول: (Email: abbasikhs@yahoo.com
۳- استادیار گروه گیاهپزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران

مواد و روش ها

جدایه‌های بیمارگر

در این مطالعه، طی سال ۱۳۸۷ بیش از ۲۰۰ نمونه شاخه آلوده دارای علائم شانکر سیتوسپورایی، از مناطق عمده پرورش گردو در ۱۲ استان کشور شامل؛ همدان، کردستان، کرمانشاه، ایلام، آذربایجان غربی، زنجان، مرکزی، لرستان، چهارمحال و بختیاری، فارس، کهگیلویه و بویر احمد و اصفهان جمع‌آوری شد. بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیکی اندام‌های باردهی غیرجنسی چهار گونه شامل؛ *Cytospora cincta*، *C. chrysosperma*، *C. leucostoma* و *C. schulzeri* شناسایی گردید. گونه‌ی *C. chrysosperma* که در بیش از ۸۰درصد نمونه‌ها شناسایی گردید، به عنوان گونه‌ی غالب روی درختان گردو شناخته شد (۴). از مجموع ۱۴۷ جدایه‌ی قارچ *C. chrysosperma*، تعداد ۵۸ جدایه بر اساس پراکنش جغرافیایی انتخاب شده و در آزمون تنوع بیماریزایی مورد استفاده قرار گرفتند.



شکل ۱- مراحل انجام مایه‌زنی جدایه‌های قارچ *Cytospora chrysosperma* روی شاخه‌های یک ساله نهال‌های گردو a) ضدعفونی سطحی شاخه؛ b و c) برداشتن پوست شاخه تا سطح کامبیوم؛ d) مایه‌زنی سطح کامبیوم با استفاده از قرصی از حاشیه‌ی پرگنه‌ی در حال رشد قارچ؛ e و f) پوشانیدن محل زخم با استفاده از پارافیلم

آزمون بیماریزایی

آزمون بیماریزایی روی نهال

به منظور انجام آزمون بیماریزایی، حدود ۲۰۰ نهال گردوی سه ساله از رقم بومی ایرانی (*Juglans regia* L.) از نهالستان تهیه گردیده و در گلدان‌های پلاستیکی به قطر تقریبی ۴۰ و ارتفاع ۶۰ سانتی‌متر غرس گردیدند. خاک به کار رفته جهت کاشت، ترکیبی از دو قسمت خاک زراعی، یک قسمت ماسه و یک قسمت کود حیوانی بود. آبیاری نهال‌ها به طور منظم انجام گردیده و در اوایل مرداد ماه ۱۳۸۸ (حدود شش ماه بعد از کاشت نهال) آزمون بیماریزایی به انجام رسید.

جدایه‌های منتخب مطابق شکل ۱ روی شاخه‌های یک ساله به قطر تقریبی یک تا یک و نیم سانتی متر مایه‌زنی شدند (۱۴). بدین منظور، سطح شاخه‌ها با پنبه‌ی آغشته به اتانول ضدعفونی گردیده و با استفاده از چوب‌پنبه سوراخ‌کن (Corck borer) سترون یک برش عمیق دایره‌ای به قطر شش میلی‌متر در آن ایجاد و پوست شاخه در این محل برداشته شد. سپس یک قرص شش میلی‌متری از حاشیه‌ی پرگنه‌ی در حال رشد جدایه‌های قارچی برداشته شده و به دقت در محل چاهک ایجاد شده در سطح شاخه مایه‌زنی گردید. مایه‌زنی شاخه به گونه‌ای بود که میسلیوم قارچ با سطح کامبیوم در تماس قرار گیرد. سپس محل مایه‌زنی با استفاده از پارافیلم باندپیچی گردید. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی (CRD) با سه تکرار به اجرا درآمد و در تکرارهای شاهد از یک قرص شش میلی‌متری محیط کشت PDA جهت مایه‌زنی استفاده شد.

به منظور بررسی میزان پیشروی قارچ در بافت میزبان، شاخه‌های مایه‌زنی شده یک ماه بعد مایه‌زنی قطع گردیده و پس از جدا کردن پوست شاخه، مساحت زخم ایجاد شده در سطح کامبیوم اندازه‌گیری گردید. به منظور اثبات ارتباط بین زخم ایجاد شده با مایه‌زنی بیمارگر، در مورد هر یک از جدایه‌های مایه‌زنی شده، به تصادف از حاشیه زخم حاصل در یکی از تکرارهای آزمایش، بافت بیمار روی محیط کشت PDA کشت داده شد و قارچ عامل بیماری دوباره جداسازی و شناسایی گردید.

آزمون بیماریزایی روی شاخه بریده

به منظور تعیین صحت ارزیابی مقاومت و یا بیماریزایی از طریق مایه‌زنی روی شاخه‌ی بریده، آزمون بیماریزایی جدایه‌های منتخب در شرایط آزمایشگاهی روی شاخه‌های بریده نیز به انجام رسید. به این منظور، از درختان هشت ساله گردو، شاخه‌های یک‌ساله به قطر یک تا ۱/۵ سانتی‌متر تهیه شده و سریعاً به آزمایشگاه منتقل شدند. این شاخه‌ها سپس به قطعاتی به طول حدود ۲۰ سانتی‌متر تقسیم گردیدند. مراحل مایه‌زنی شاخه‌های بریده عیناً مطابق مایه زنی روی نهال به انجام رسید. شاخه‌های مایه‌زنی شده، سپس به منظور حفظ رطوبت، روی یک صفحه مشبک در ظرف‌های درب‌دار مخصوص نگهداری میوه قرار داده شدند و برای تأمین رطوبت، ته هر ظرف مقدار کمی آب مقطر استریل ریخته شد. ظروف حاوی شاخه‌های مایه‌زنی شده سپس به مدت ده روز، در ژرمیناتور با دمای $25^{\circ}C$ نگهداری شدند. بعد از گذشت ده روز مساحت زخم ایجاد شده در سطح کامبیوم اندازه‌گیری گردید. همچنین به منظور حصول اطمینان از ارتباط بین زخم ایجاد شده با مایه‌زنی بیمارگر، در مورد هر یک از جدایه‌های مایه‌زنی شده، اصول کخ به اجرا درآمد. آزمون بیماریزایی روی شاخه بریده نیز در قالب طرح کاملاً تصادفی (CRD) با سه تکرار به اجرا درآمد و در تکرارهای شاهد از یک قرص شش میلی‌متری محیط کشت سترون PDA جهت مایه‌زنی استفاده شد.

محاسبات آماری

تجزیه واریانس و مقایسه میانگین صفات به روش دانت (۰/۰۰۱، ۰/۰۱، $P \leq$ ۰/۰۵) و با استفاده از روش مدل خطی[1] SAS (SAS 9.1 SAS institute, Cary, NC) انجام گرفت. نرمال بودن پراکنش داده ها قبل از آنالیز آماری با نرم افزار SAS مورد آزمایش قرار گرفت. در صورت نرمال نبودن داده ها از تبدیل لگاریتمی استفاده شد ولی در نهایت میانگین های واقعی نمایش داده شده اند. برای مقایسه دو روش مورد استفاده از آزمون T-test در سطح آماری ۵٪ استفاده شد. میزان همبستگی دو آزمون نیز با محاسبه ضریب همبستگی پیرسون محاسبه گردید.

نتایج

نتایج حاصل از آزمون تی استیودنت حاکی از وجود تفاوت معنی‌دار بین بیماریزایی جدایه‌ها در دو روش مایه‌زنی روی شاخه‌ی بریده و نهال بود ($P \leq$ ۰/۰۰۱). به صورتی که میانگین مساحت زخم در روش شاخه بریده ۱۳۶ میلی متر مربع و در روش طبیعی ۱۱۴ میلی متر مربع برآورد شد (جدول ۱). بنابراین میانگین مساحت زخم در روش مایه‌زنی روی شاخه‌ی بریده در مجموع بیشتر بود. این در حالی است که مساحت زخم در روش مایه‌زنی روی شاخه بریده ده روز پس از مایه‌زنی و در روش طبیعی ۳۰ روز بعد از مایه‌زنی اندازه-گیری شده است. نتایج حاصل از تجزیه واریانس آزمون بیماریزایی به دو روش مایه‌زنی شاخه‌های بریده و نهال در ۵۸ جدایه *Cytospora chrysosperma* در جدول ۲ نشان داده شده است.

1- General Linear Model Procedure (GLM)

جدول۱- مقایسه میانگین شدت بیماریزایی در دو روش مورد استفاده با آزمون تی استودنت (T-test)

آزمون	میانگین	خطای معیار میانگین	حدود اطمینان میانگین در سطح ۹۵٪		Tمقدار	سطح معنی داری
			بالا	پایین		
شاخه بریده	۱۳۶/۹۳	۴/۵۷	۱۴۵/۹۶	۱۲۷/۹۱	۲۹/۹۶	۰/۰۰۰
نهال	۱۱۴/۹۷	۳/۳۰	۱۲۱/۴۸	۱۰۸/۴۶	۳۴/۸۷	۰/۰۰۰

جدول ۲- شدت بیماریزایی ۵۸ جدایه از قارچ جمع آوری شده از مناطق مختلف کشور در دو روش ارزیابی بیماریزایی روی شاخه های بریده و نهال‌های گردو در شرایط طبیعی

شماره جدایه	محل جمع‌آوری	میانگین مساحت زخم روی شاخه نهال (mm^2)	میانگین مساحت زخم روی شاخه‌ی بریده (mm^2)
۱	آذربایجان غربی- کهریز	۱۱۵/۴۱**	۱۸۰/۰۴***
۲	آذربایجان غربی- کهریز	۹۴/۲۶^{ns}	۹۸/۴۶*
۳	آذربایجان غربی- کهنه شهر	۱۵۹/۴۳***	۱۱۱/۲۸***
۴	آذربایجان غربی- سلماس	۱۳۷/۱۹***	۱۳۵/۵۷***
۵	آذربایجان غربی- سلماس	۱۲۰/۸۶***	۲۲۰/۶۰***
۶	چهارمحال و بختیاری- آورگان	۸۷/۵۳^{ns}	۶۵/۸۳^{ns}
۷	چهارمحال و بختیاری- فرخ شهر	۷۱/۹۶^{ns}	۱۶۸/۹۰***
۸	چهارمحال و بختیاری- فرخ شهر- روستای خیرآباد	۱۳۰/۶۵***	۱۷۷/۷۴***
۹	چهارمحال و بختیاری- سامان	۱۶۴/۲۶***	۱۱۷/۴۳**
۱۰	چهارمحال و بختیاری- سامان	۷۷^{ns}	۸۸/۶۰^{ns}
۱۱	چهارمحال و بختیاری- شهرکرد	۱۰۱/۵۳*	۱۳۱/۰۸**
۱۲	فارس- صفاشهر	۷۶/۶۱^{ns}	۹۹/۵۰^{ns}
۱۳	همدان- نهاوند	۱۸۸/۳۹***	۸۸/۷۵^{ns}
۱۴	همدان- نهاوند- روستای قاسم آباد	۷۷/۱۵^{ns}	۱۲۰/۷۷**
۱۵	همدان- ۱۵کیلومتربه نهاوند	۱۴۹/۱۸**	۱۳۵/۱۰***
۱۶	همدان- ۱۵کیلومتربه نهاوند	۸۵/۶۴^{ns}	۱۵۲/۶۳***
۱۷	همدان- کیلومتر۵جاده نهاوند	۱۰۰/۱۵*	۱۴۸/۸۰***
۱۸	همدان- سرکان- ورودی روستای باباپیر	۶۸/۷۱^{ns}	۱۷۸/۸۴***
۱۹	همدان- ابتدای سه راهی تویسرکان	۶۱/۷۶^{ns}	۷۵/۳۵^{ns}
۲۰	همدان- تویسرکان	۷۰/۴۵^{ns}	۷۱/۷۷^{ns}
۲۱	همدان- کیلومتر۱جاده تویسرکان	۸۶/۲۸^{ns}	۲۲۰/۶۹***
۲۲	همدان- تویسرکان۱۱جاده تویسرکان به کنگاور	۱۰۳/۳۶*	۱۲۹/۲۱***
۲۳	ایلام- بانقلان	۱۰۳/۸۰*	۸۶/۴۷^{ns}
۲۴	اصفهان- داران	۹۱/۳۴^{ns}	۱۴۲/۸۹***
۲۵	اصفهان- رضوان شهر- روستای تندران	۱۴۴/۶۲***	۱۱۸/۵۷***
۲۶	اصفهان- رضوان شهر- روستای الوار	۱۳۳/۲۹***	۲۸۱/۷۸***
۲۷	اصفهان- رضوان شهر- روستای مهدی آباد	۹۵/۵۳^{ns}	۱۴۷/۷۴^{ns}
۲۸	کرمانشاه- گهواره- روستای چفته سنجابی	۱۴۳/۸۵***	۱۱۷/۱۳**
۲۹	کرمانشاه- کنگاور	۱۱۳/۱۰**	۵۸/۴۷^{ns}
۳۰	کرمانشاه- صحنه	۲۶۸/۴۶***	۱۲۰/۷۴***
۳۱	کرمانشاه- صحنه	۹۷/۵۶*	۱۴۰/۵۷***
۳۲	کرمانشاه- سنقر	۱۶۳/۲۲***	۱۰۰/۷۷*
۳۳	کرمانشاه- صحنه	۷۸/۲۶^{ns}	۱۲۲/۴۵***

جدول ۲- ادامه

شماره جدایه	محل جمع‌آوری	میانگین مساحت زخم روی شاخه نهال (mm^2)	میانگین مساحت زخم روی شاخه‌ی بریده (mm^2)
۳۴	کرمانشاه- جاده سنقر به صحنه	۶۸/۸۴ ns	۱۱۶/۱۱ **
۳۵	کردستان- سقز	۱۵۶/۹۰ ***	۱۰۸/۵۲ **
۳۶	کردستان- کیلومتر۱۲جاده کامیاران به سنندج	۱۳۶/۶۴ ***	۶۲/۲۷ns
۳۷	کردستان- کیلومتر۹جاده کامیاران به سنندج	۸۹/۴۳ ns	۱۳۶/۵۵ ***
۳۸	کردستان- کیلومتر۱۳جاده کامیاران به سنندج	۱۰۶/۹۸ **	۱۲۱/۸۸ ***
۳۹	کردستان- کیلومتر۱۷جاده موچش	۱۰۰/۹۸ *	۱۲۷/۶۶ ***
۴۰	کردستان- موچش	۱۸۳/۶۹ ***	۱۴۵/۵۳ ***
۴۱	کردستان- کیلومتر۲۵جاده دهگلان به سنندج	۱۶۱/۸۱ ***	۱۱۴/۲۳ **
۴۲	لرستان- الیگودرز	۱۴۸/۹۱ ***	۸۳/۲۲ ns
۴۳	لرستان- ازنا	۷۶/۶۶ ns	۸۱/۰۹ ns
۴۴	لرستان- بروجرد	۱۳۵/۵۹ ***	۹۳/۴۶ ns
۴۵	لرستان- دورود	۱۶۵/۹۶ ***	۱۱۰/۵۲ **
۴۶	لرستان- دورود	۱۲۷/۱۵ ***	۲۵۸/۵۹ ***
۴۷	لرستان- اشترینان	۷۵/۱۲ ns	۹۳/۷۵ ns
۴۸	لرستان- اشترینان	۱۷۹/۹۲ ***	۱۲۰/۵۶ **
۴۹	مرکزی- اراک	۱۳۶/۷۰ ***	۸۶/۶۲ ns
۵۰	مرکزی- اراک	۲۳۵/۶۰ ***	۱۴۲/۶۴ ***
۵۱	مرکزی- اراک	۱۵۷/۰۳ ***	۱۵۵/۸۷ ***
۵۲	مرکزی- خمین	۲۰۶/۸۵ ***	۱۹۳/۰۵ ***
۵۳	مرکزی- خمین	۱۷۸/۴۰ ***	۱۳۸/۶۵ ***
۵۴	مرکزی- خمین	۸۸/۹۳ ns	۱۲۴/۳۵ ***
۵۵	زنجان- ابهر	۱۶۴/۱۸ ***	۱۴۸/۸۴ ***
۵۶	زنجان- زنجان	۲۴۴/۲۹ ***	۱۴۴/۰۵ ***
۵۷	زنجان- زنجان	۱۲۴/۹۲ ***	۱۳۱/۴۱ ***
۵۸	زنجان- زنجان	۱۴۲/۱۸ ***	۸۶/۹۹ ns
	شاهد	۵۰/۲۴	۶۳/۵۸

مقایسه میانگین ها با استفاده از روش دانت و در سطوح آماری ۵، ۱ و ۰/۱ درصد انجام شد.

ns -داده ها در سطح ۵٪ با شاهد اختلاف معنی داری ندارند

*- داده ها در سطح ۵٪ با شاهد اختلاف معنی داری دارند ولی اختلاف در سطح ۱٪ معنی دار نیست.

**- داده ها در سطح ۵٪ و ۱٪ با شاهد اختلاف معنی داری دارند ولی اختلاف در سطح ۰/۱٪ معنی دار نیست.

***- داده ها در سطحوح ۵٪، ۱٪ و ۰/۱٪ با شاهد اختلاف معنی‌داری دارند.

همان‌طور که مشاهده می‌شود بین جدایه‌های مورد مطالعه از نظر صفت اندازه‌گیری شده اختلاف بسیار معنی‌داری وجود دارد ($P\leq$ ۰/۰۱) (شکل ۲ و جدول ۲). بر اساس نتایج کلی حاصل از مقایسه میانگین مساحت زخم روی شاخه‌ی بریده، جدایه شماره ۲۶ و ۴۶ دارای بیشترین مقدار بودند و تعداد ۱۴ جدایه با شاهد اختلاف معنی‌داری نداشتند. همین‌طور در مورد اندازه زخم روی نهال، جدایه شماره ۳۰ و ۵۶ دارای بیشترین مقدار و جدایه شماره ۱۹ و ۱۸ دارای کمترین مقدار بودند. قابل توجه است که در این آزمون نیز ۲۰ عدد از جدایه‌ها اختلاف معنی‌داری با شاهد نداشتند. اما در مجموع الگوی خاصی بین محل جمع‌آوری جدایه ها و میزان بیماریزایی آنها وجود نداشت. به عبارتی در بین جدایه‌های جمع‌آوری شده از یک شهرستان خاص هم جدایه‌های با بیماریزایی شدید و هم جدایه های با بیماریزایی خفیف وجود داشت. البته جدایه‌های به دست آمده از برخی شهرستان‌ها مثل تویسرکان همدان، ازنا لرستان و صفاشهر فارس در مجموع قدرت بیماریزایی ضعیفی را در هر دو آزمون نشان دادند. میزان همبستگی بین آزمون بیماریزایی در شرایط آزمایشگاه و طبیعت (شاخه‌ی بریده و نهال) ۲۳/۴ درصد بود که از لحاظ آماری در سطح ۱٪ نیز معنی‌دار می‌باشد.

شکل ۲- تفاوت درجه‌ی پرآزاری جدایه‌های مختلف *Cytospora chrysosperma*؛ a- زخم ایجاد شده در سطح کامبیوم و b- زخم ایجاد شده در سطح پوست

همانطور که در جدول ۲ مشخص است، در بیشتر موارد میزان بیماریزایی جدایه‌ها در دو روش مورد استفاده شده متناسب است ولی در برخی موارد نتایج مشاهده شده نه تنها متناسب نیستند بلکه کاملاً متضاد هم هستند، به نحوی که یک جدایه با بیماریزایی زیاد روی شاخه‌های بریده، در آزمون بیماریزایی روی نهال تفاوت معنی‌داری با شاهد ندارد. مثل جدایه های ۷، ۱۶، ۱۸، ۴۴ و ۴۹ که میزان بیماریزایی آنها حتی کمتر از نصف شده بود. حالت عکس هم با فراوانی کمتر وجود داشت، حالتی که میزان بیماریزایی جدایه در آزمون شاخه‌های بریده کمتر از میزان آن در آزمون نهال بود. از جمله جدایه‌های ۱۳، ۳۶، ۵۸ که در آزمون شاخه‌های بریده تفاوت معنی داری با شاهد نشان ندادند.

بحث و نتیجه‌گیری

در گزارش پیشین نگارندگان (۴) گونه های مختلف جنس *Cytospora* از مناطق مختلف ایران جداسازی و شناسایی شدند. بر اساس آن گزارش گونه *C. chrysosperma* به عنوان گونه غالب مشخص گردید. در این مطالعه هدف این بود که نه تنها بیماریزایی جدایه های گونه *C. chrysosperma* مورد ارزیابی قرار گیرد بلکه روش مناسب برای ارزیابی بیماریزایی نیز معرفی گردد . بدین منظور، در این مطالعه از بین ۱۴۷ جدایه از قارچ *C. chrysosperma*، ۵۸ جدایه با توزیع جغرافیایی مناسب انتخاب گردیده و توان بیماریزایی آن‌ها به دو طریق؛ در شرایط طبیعت روی نهال‌های سه ساله گردو و در شرایط آزمایشگاه روی شاخه‌های بریده یک‌ساله گردو مورد ارزیابی قرار گرفت. به طور کلی چنان‌که از نتایج آزمون‌های بیماریزایی بر می‌آید، میزان بیماریزایی جدایه‌های مختلف به شدت متفاوت بوده و از لحاظ آماری بین جدایه‌های مورد مطالعه از نظر صفت اندازه‌گیری شده اختلاف بسیار معنی‌داری وجود داشت ($P\leq$ ۰/۰۱). مساحت زخم ایجاد شده در اثر مایه‌زنی در تعداد قابل توجهی از جدایه‌ها اختلاف معنی‌داری با شاهد نداشت. علت کم‌آزاری این جدایه‌های قارچی ممکن است یک صفت ذاتی یا در اثر آلودگی به مایکوویروس‌ها باشد. البته نباید اثر شرایط محیطی را نادیده گرفت. چراکه در مورد قارچ-های فرصت طلبی مثل سیتوسپورا، ضلع شرایط محیطی مثلث بیماریزایی از اهمیت ویژه ای برخوردار است. هامار و همکاران (۱۵) ارتباط dsRNA موجود در یک جدایه (۴A. ۱۴) از گونه *Leucostoma persoonii* با بیماریزایی پایین قارچ را مورد بررسی قرار دادند و توانستند به ارتباطی منطقی بین وجود نه بخش RNA دو رشته‌ای در این قارچ و بیماریزایی پایین آن دست یابند. در مطالعه حاضر نوعی فروپاشی خودبخودی در پرگنه برخی از جدایه‌های قارچ *C. chrysosperma* مشاهده می‌شد که ممکن است علت این پدیده نیز ناشی از حضور مایکوویروس در ریسه های این جدایه‌ها باشدکه در مطالعات بعدی انجام گرفته توسط عباسی و همکاران (۵) حضور مایکوویروس در جمعیت *C. chrysosperma* به اثبات رسید. به هر حال، صرف نظر از حضور جدایه‌های کم‌آزار در جمعیت *C. chrysosperma*، در آزمون بیماریزایی، میزان پیشرفت آلودگی حتی در مورد جدایه‌هایی که از قدرت تهاجمی بیشتری برخوردار بوده‌اند، چندان قابل توجه نبوده و به طور میانگین در مورد پرآزارترین جدایه میانگین اندازه زخم ایجاد شده در سطح کامبیوم پس از گذشت یک ماه، $۲۵۸mm^2$ اندازه‌گیری شده است. از این رو به نظر می‌رسد شیوع بیماری شانکر سیتوسپورایی در گردو احتمالاً بیشتر ناشی از وجود عوامل تنش‌زا و زمینه‌ساز محیطی و آسیب‌پذیری زیاد درختان گردو در برابر این عوامل محیطی از جمله آفتاب‌سوختگی، سرمازدگی، تنش رطوبت و تنش‌های تغذیه‌ای است که گیاه را در برابر عوامل

فرصت‌طلب آسیب‌پذیر می‌سازد. بر اساس مشاهدات نگارندگان، بیماری شانکر سیتوسپورایی گردو در مناطق سردسیر نسبت به مناطق معتدل شیوع بیشتری دارد. همچنین در باغاتی که در نقاط کم ارتفاع احداث شده‌اند فراوانی بیماری نسبت به باغاتی که در ارتفاعات احداث شده‌اند بیشتر است. این مسئله اهمیت آسیب ناشی از سرمای زمستانه را که به عنوان یک عامل زمینه‌ساز برای ایجاد بیماری عمل می‌کند به وضوح نشان می‌دهد. تغذیه متعادل و آبیاری منظم نیز اهمیت بسیاری در مهار این بیماری دارند. اهمیت تنش‌های مختلف محیطی و تغذیه‌ای در وقوع بیماری شانکر سیتوسپورایی در میزبان‌های مختلف به کرات در منابع مختلف علمی مورد تأکید قرار گرفته است (۹، ۱۰، ۱۴ و ۱۶).

در این پژوهش سعی بر این بود تا علاوه بر ارزیابی پرآزاری جدایه ها، روش آزمایشگاهی مناسبی برای ارزیابی بیماریزایی معین گردد. لذا شاخه های بریده شده و یکدست گردو در شرایط کنترل شده آزمایشگاهی با جدایه های بیمارگر تلقیح شدند. همانگونه که از نتایج بر می آید، به طور کلی میزان پیشرفت آلودگی روی شاخه‌ی بریده بیشتر از نهال بود. در روش مایه‌زنی روی نهال، اندازه زخم ایجاد شده در سطح کامبیوم پس از گذشت یک ماه در مورد پرآزارترین جدایه به طور میانگین $258mm^2$ اندازه‌گیری شد؛ در حالی‌که در آزمون بیماریزایی روی شاخه‌های بریده مساحت زخم ایجاد شده در مدت ده روز پس از مایه‌زنی $281mm^2$ اندازه‌گیری گردید. به نظر می‌رسد در مورد آزمون بیماریزایی در نهال، سیستم فعال دفاعی گیاه پیشرفت بیمارگر را مهار می‌نماید. حال آن‌که در مورد شاخه‌های بریده سیستم دفاعی به تدریج تحلیل رفته و عامل بیماری با سرعت بیشتری پیشرفت می‌نماید. لذا چنان‌که از مقایسه نتایج آزمون‌های بیماریزایی روی نهال سالم و شاخه‌های بریده بر می‌آید، ارزیابی درجه مقاومت یا قدرت بیماریزایی روی شاخه‌ی بریده چندان معتبر نبوده یا حداقل برای استفاده از این روش، باید مدت زمان نگهداری شاخه‌های مایه‌زنی شده، به عنوان یک متغیر کلیدی به شدت مورد توجه قرار گیرد.

اشکان و حجارود (۲) نیز توان بیماریزایی گونه‌های مختلف جنس *Cytospora* را به دو روش مایه‌زنی روی شاخه‌ی بریده در آزمایشگاه و مایه‌زنی روی نهال در طبیعت مورد بررسی قرار دادند و بیان داشتند که روش مایه‌زنی روی شاخه‌های بریده طریقه ساده و مطمئنی برای آزمون بیماریزایی در این جنس است که در مدت کمی به نتیجه می‌رسد. از آن‌جایی که ایجاد آلودگی و شدت آن به عواملی از جمله سن میزبان، سن شاخه‌ی مایه‌زنی شده روی میزبان، شرایط جوی محل کاشت نهال، دمای محیط در زمان مایه‌زنی و فصل مایه‌زنی دارد (۱۷)، از این رو نتایج به دست آمده در یک تحقیق در زمان‌های متفاوت نیز ممکن است با هم یکسان نباشند. به هر حال تعیین درجه اعتبار روش مایه‌زنی روی شاخه‌ی بریده مستلزم استفاده از ارقامی با درجه حساسیت یکسان است که با توجه به روش تکثیر بذری گردو قطعاً درجه مقاومت نهال‌های مختلف یکنواخت نخواهد بود. لذا توصیه می‌شود این آزمون‌ها با تعداد کمتری از جدایه‌ها از طریق مایه‌زنی روی شاخه‌های یک درخت مورد مقایسه قرار گیرند. از طرف دیگر در آزمون شاخه‌های بریده اثر شرایط محیطی مؤثر در توسعه بیماری به عنوان یکی از اجزای مثلث بیماریزایی به حداقل می رسد. لذا با توجه به وابستگی زیاد این بیمارگر به تنش‌های محیطی به نظر می رسد روش شاخه‌های بریده برای بیمارگرهای فرصت طلب نظیر *Cytospora* برآوردی صحیح از میزان پرآزاری واقعی آنها نباشد.

منابع

۱- احمدی ف. و بنی‌هاشمی ض. ۱۳۸۵. نقش گونه‌های سیتوسپورا در زوال درختان گردو در جنوب ایران. خلاصه مقالات هفدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. کرج، ایران. صفحه ۳۱۳.

۲- اشکان م. و حجارود ق.ع. ۱۳۶۱. بررسی تاکسونومیک و پاتولوژیک درباره‌ی قارچ‌های شبه‌جنس *Cytospora* Ehrenb و اشکال جنسی آن‌ها روی درختان میوه در ایران. قسمت دوم- بیماری‌زایی. بیماری‌های گیاهی. ۱۸: ۲۰-۴۲.

۳- جوادی اصطهباناتی ع. ۱۳۸۷. معرفی گونه‌های سیتوسپورا روی گردو در ایران. خلاصه مقالات هجدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. همدان، ایران. صفحه ۶۳۹.

۴- عباسی خ.، عباسی س. و فتوحی‌فر خ.ب. ۱۳۹۱. شناسایی گونه های جنس *Cytospora* جدا شده از درختان گردو در ایران. مجله گیاهپزشکی، جلد ۳۵، شماره ۳، صفحات ۵۹ تا ۶۹.

۵- عباسی س.، عباسی خ. و هاشمی م. ۱۳۹۱. پراکنش طبیعی dsRNA در جدایه های قارچ سیتوسپورا در ایران. خلاصه مقالات بیستمین کنگره گیاهپزشکی ایران. شیراز، ایران. صفحه ۴۵۳.

۶- فتوحی‌فر خ.ب. ۱۳۸۶. تحقیق تاکسونومیک روی شبه‌گونه‌های ایرانی شبه‌جنس *Cytospora* Ehrenb. رساله دکتری، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج.۱۸۳ صفحه.

۷- کیومرثی ش. و زکیئی ز. ۱۳۷۷. شانکر سیتوسپورائی درختان گردو در استان کرمان. سیزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. کرج، ایران. صفحه ۲۳۶.

8- Adams G.C., Survelyer R.S., and lezzoni A. 2002. Ribosomal DNA sequence divergence and group l introns within *Leucostoma* species, *L. cinctum*, *L. persoonii* and *L. parapersoonii* sp. nov., ascomycetes that cause cytospora canker of fruit trees. Mycologia, 94: 947-967.

9- Adams G.C., Wingfield M.J., Common R., and Roux J. 2005. Phylogenetic relationships and morphology of *Cytospora* species and related teleomorphs (Ascomycota, Diaporthales, Valsaceae) form Eucalyptus. Studies in Mycology, 52: 11-44.

10- Agrios G.M. 2005. Plant Pathology. 5th ed. Academic Press, New York, USA. 948p.

11- Belisario A. 1992. Phytopathological problems of walnut. InformatoreAgrio, 48: 51-53.

12- Biggs A. R. 1989. Integrated control of Leucostoma canker of peach in Ontario. Plant Disease, 73: 869-874.

13- Biggs A.R. 1989. Temporal changes in the infection court following wounding of peach bark are associated with cultivar variation in infection by *Leucostoma persoonii*. Phytopathology, 79: 627-630.

14- Brown-Rytlewski D.E., and McManus P.S. 2000. Virulence of *Botryosphaeria dothidea* and *Botryosphaeria obtusa* on apple and management of stem cankers with fungicides. Plant Disease, 84:1031-1037.

15- Hammar S., Fulbrigh D.W., and Adams G.C. 1989. Association of double stranded RNA with low virulence in an isolate of *Leucostoma persoonii*. Phytopathology, 79: 568–572.

16- Kepley J.B., and Jacobi W.R. 2000. Pathogenicity of *Cytospora* fungi on six hardwood species. Journal of Arboriculture, 26: 326–332.

17- Surve-Iyer R.S., Adams G.C., Iezzoni A.F., and Jones A.L. 1995. Isozyme detection and variation in *Leucostoma* species from *Prunus* and *Malus*. Mycologia, 87(4): 471-482.