نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۱، شماره ۱، بهار ۱۳۹۶، ص. ۱۱۶-۱۰۵

Journal of Plant Protection
Vol. 31, No. 1, Spring 2017, P. 105-116

کاربرد اکسی‌تتراسایکلین، آمیکاسین و اریترومایسین در کنترل رشد میسیلیومی و جوانه‌زنی اسپور *Rhytima acerinum* عامل بیماری لکه قیری افرا پلت در شرایط آزمایشگاهی

شهرام مهدی کرمی[۱]- ضیاءالدین باده یان[۲*]- اکرم احمدی[۳]- فاطمه جعفری اصل[۴]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۱۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۰/۰۵

چکیده

قارچ *Rhytima acerinum* عامل بیماری لکه قیری در برگ درخت افرا می‌باشد. این تحقیق به منظور بررسی کاربرد اکسی‌تتراسایکلین، آمیکاسین و اریترومایسین در کنترل رشد میسیلیومی و جوانه‌زنی اسپور *Rhytima acerinum* عامل بیماری لکه قیری افرا پلت در شرایط آزمایشگاهی انجام گرفت. در این تحقیق برای کنترل رشد میسلیومی و جوانه‌زنی اسپور عامل بیماری لکه قیری افرا از آنتی‌بیوتیک‌های اکسی تتراسایکلین ۱۰ درصد، آمیکاسین ۵ درصد، اریترومایسین ۵ درصد استفاده شد. پس از تهیه و خالص‌سازی پرگنه و تهیه اسپور قارچ، محیط کشت‌هایی تحت شرایط نور و تاریکی با آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین۱۰درصد در ۴ غلظت ۵۰ ، ۱۰۰ ، ۲۰۰، ۵۰۰ میکرو لیتر و برای آمیکاسین ۵ درصد و اریترومایسین ۵ درصد در ۴ غلظت متفاوت ۱۰۰، ۲۰۰ ، ۴۰۰ ، ۱۰۰۰ میکرولیتر در ۱۰۰ سی‌سی آب مقطر، برای هر کدام تهیه گردید سپس این تحقیق با استفاده از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون دانکن انجام گرفت. نتایج نشان داد که آنتی‌بیوتیک‌ها در ضریب AUFGC و رشد میسیلیومی قارچ دارای تفاوت معناداری بودند و جوانه‌زنی اسپور قارچ در شرایط نور و تاریکی دارای تفاوت معنی‌دار بود. نتایج نشان داد که از بین آنتی بیوتیک‌های مورد استفاده، اکسی تتراسایکلین ۲۰۰ میکرولیتر در ۱۰۰ سی‌سی آب مقطر بیشترین تاثیر را بر کنترل رشد میسلیومی و جوانه‌زنی اسپور قارچ *Rhytisma acerinum* داشته است. براساس نتایج بدست آمده می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از آنتی بیوتیک‌ها در کنترل قارچها موثر است و نتایج این مطالعه می‌تواند در مدیریت جنگل و منابع طبیعی مفید واقع شود.

واژه‌های کلیدی: قارچ بیماری زا، Tar spot ، ضریب AUFGS، مدیریت جنگل

مقدمه

در کشور ایران بیش از ۱۷ گونه و زیر گونه درخت افرا وجود دارد که اغلب آن‌ها به صورت بومی و صنعتی در جنگل‌های کشور وجود دارند. تعداد محدودی از گونه‌های وارداتی نیز در پارک‌ها و سایر نقاط کشور کشت شده‌اند. در جنگل‌های شمال کشور حدود ۸ گونه و زیر گونه افرا بصورت بومی وجود دارند (۱۱). لازم به ذکر است که یکی از بیماری‌های مهم درختان افرا در بیشتر نقاط دنیا بیماری لکه قیری است. عامل این بیماری دو گونه قارچ از رده آسکومیست‌ها به‌نام *Rhytsima acerinum* و *R.puncatum* می‌باشند (۹). روی درختان مختلف افرا قارچ‌های عامل لکه قیری و گزارش‌های متعدی از شیوع اپیدمی این قارچ در سراسر دنیا وجود دارد. در کشور آلمان عامل بیماری لکه قیری روی افرا شبه چناری (*Acer pesudoplatanus*) در اثر قارچ *R. acerinum* می‌باشد (۲۴)، در هندوستان قارچ *Rhytisma spp.* روی درختان مختلفی دیده شده است (۱۶). هم‌چنین در آمریکا قارچ‌های عامل لکه قیری روی افرا نقره‌ای نیز گزارش شده است (۱۴). در استرالیا نیز قارچ *R. acerinum* و علایم بیماری لکه قیری روی درختان افرا مشاهده است (۲۳)، هم‌چنین در کشور ایتالیا قارچ *R. acerinum* روی افرای شبه چناری *A. Pseudoplatanus)* بیماری لکه قیری را به‌وجود می‌آورد (۲۲).

بیماری لکه قیری برگ درخت افرا به اسامی لکه سیاه برگ افرا و مرض سیاه پوست افرا و به انگلیسی *Maple tap spot* گفته می‌شود. در ایران اولین بار در سال ۱۳۱۸ توسط پتراک از مناطق شمال و اطراف تهران جمع‌آوری شده است. گونه‌های مختلف جنس افرا که در ایران مورد حمله این قارچ قرار می‌گیرند عبارتند از: کرب، شیردار، سفید کرکو، کرکو، کهوک، افرای سیاه، کرکف و شبه چناری پلت (۷ و ۱۷). این بیماری در سواحل دریای خزر، اطراف تهران و احتمالاً سایر نقاط کشور انتشار دارد ولی آمار درستی در خصوص میزان آن وجود ندارد. از علائم این بیماری میتوان به وجود لکه‌های گردی به

۱ و ۲- دانشجوی دکتری جنگل‌شناسی و اکولوژی جنگل و استادیار گروه جنگلداری، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه لرستان
(*- نویسنده مسئول: (Email: badehian.z@lu.ac.ir
۳- دکتری تخصصی، دانشکده علوم جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۴- دانش‌آموخته جنگلداری، گروه جنگلداری، دانشگاه ایلام
DOI: 10.22067/jpp.v31i1.52744

قطر ۸ – ۷ میلی‌متر روی برگ‌های افـرا و همچنـین خـزان زودرس اشاره نمود (شکل ۲). استرومای این قارچ در پهنک برگ در زیر لایه اپیدرمی گسترش می‌یابد و به تـدریج جانشـین بافـت‌هـای میزبـان می‌شود. در درون استروما، پیکنیـدهـا یـا اسـپرموگونیوم‌هـا (مرحلـه Melasmia) و بعد پریتسیوم (آسکوکارپ) که محتوی آسکوسپورهای نخی شکل، ساده و شفاف قارچ است تشکیل می‌گردد. پریتسیوم‌های مرحله تولیدمثل جنسی قـارچ (*Rhytisma*) در فصـل زمسـتان روی برگ‌های افتاده تشکیل می‌گردد که در اواخر زمستان یا اوایـل بهـار پریتسیوم تشکیل می‌گـردد. کـه در اواخـر زمسـتان یـا اوایـل بهـار پریتسیوم کامل می‌شوند. در داخل هر آسک تعداد ۸ آسکوسپور نخـی شکل وجود دارد که توسط باد و عوامل دیگر بر روی برگ افتاده و با تندش، ایجاد هیف می‌کند و زندگی قارچ روی میزبان آغاز می‌گردد. (۸، ۹ و ۱۰) تحقیقات انجام گرفته بر روی درختان افـرا پلـت نشـان می‌دهد که عامل بیماری لکه قیری افرا پلت در شصت کلاته گرگان قارچ *R. acerinum* می‌باشد (۱۷).

برای کنترل بیماری‌های گیاهی معمولا از مواد شیمیایی اسـتفاده می‌کنند، علاوه بر کنترل شیمیایی، از روش کنتـرل بیولوژیـک و یـا ترکیبات بر گرفته از ترکیبات بیولوژیکی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها می‌توان برای کنترل بیماری‌های گیاهی به کار برد (۱، ۳، ۹ و ۱۹). به‌عنـوان مثال در کنترل بیولوژیک عامل مرگ نارون از گونه‌های بسیار زیادی از باکتری‌ها، اکتینومیست‌ها و قارچ خاصیت آنتاگونیستی نسـبت بـه عامل مرگ نشان داده‌اند، که مـی‌تـوان بـه مـوارد زیـر اشـاره کـرد: اسـترین‌هـایی از *Strepomyces griseus*, *S. Albovinaceus* و استرین‌هایی از *Pseudomonas Syringa* (۴، ۱۵، ۱۸). نتایج تحقیق انصاری و همکاران (۶) که برای کنترل قارچ لکـه قهـوه ای از آنتـی بیوتیک‌های پنی‌سیلین، جنتامایسـین، اریترومایسـین و تتراسـایکیلن استفاده نمودند، نشان داد ترکیبات آنتی‌بیوتیـک‌هـا در غلظـت‌هـای مختلف در کنترل رشد قارچ موثر واقع شده‌انـد. هـم‌چنـین از اکسـی تتراسایکلین و استرپتومایسین برای کنترل آتشـک گلابـی و شـانکر مرکبات استفاده مـی‌شـود (۵ و ۲۰). صـیاد و همکـاران (۱۲) بـرای کنترل عامل پوسیدگی گیاه زینتی گیاه سیگونیوم از آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین و استروپترومایسین استفاده نمودند که نتیجه تحقیقشان نشان داد اریترومایسین دارای اثر بیشتری نسبت به استروپترومایسـن در کنترل بیماری داشت.

در این تحقیق با توجه به اهمیت درخت افرا در جنگل‌های شمال کشـور از آنتـی‌بیوتیـک‌هـای اکسـی‌تتراسـایکلین، آمیکاسـین و اریترومایسین که از سنتز پروتیین عامل بیماری جلوگیری می‌کنند در کنترل قارچ *R. acerinum* روی برگ درختان افـرا پلـت[1] اسـتفاده گردید.

مواد و روش‌ها

جمـع‌آوری، جداسـازی و خـالص‌سـازی قـارچ *Rhytisma acerinum*

به‌منظور کشت و جداسازی قـارچ پرگنـه *R. acerinum*، نمونـه برگ آلوده به لکه قیری افرا را ابتدا از جنگل آموزشی و پژوهشی دکتر بهرام گرگان نیا با عرض جغرافیایی ۳۶ درجه و ۴۵ دقیقه تا ۳۶ درجه و ۴۱ دقیقه شمالی و طول جغرافیایی ۵۴ درجـه و ۲۴ دقیقـه تـا ۵۴ درجه و ۲۰ دقیقه شرقی جمع آوری شد (شکل ۱). سپس بـرگ‌هـای آلوده به بیماری را در آزمایشگاه در محیط سترون قرار داده بعد از این مرحله نمونه‌هایی از لکه‌ها به ابعادی ۵ × ۵ میلی‌متر از روی برگ‌های مبتلا به قارچ جدا کرده و ضد عفونی به مدت ۳ – ۲ دقیقه در سدیم هیپوکلرید ۱۰ درصد و شستشو با الکل ۹۶ درصد به مدت یک دقیقه و با آب مقطر سترون صورت گرفت، سپس تحت شرایط آزمایشگاهی سترون در محیط PDA کشت شدند و داخل دستگاه انکوباتور با درجه حرارت ۲۴±۱ به مـدت سـه هفتـه نگهـداری شـدند. سـپس، عمـل خالص‌سازی بر روی پرگنه قارچ عامل بیماری انجام شد.

کشت قارچ *R. acerinum* در محیط کشت‌هـای حـاوی آنتـی بیوتیک اکسی تتراسایکلین[2]، آمیکاسین[3] و اریترومایسین[4]

برای کنترل عامل بیماری لکه قیری افرا در شرایط نور و تاریکی از محیط کشت PDA حاوی تیمارهای اکسی تتراسایکلین ،آمیکاسین و اریترومایسین استفاده گردید. برای تیمـار اکسـی تتراسـایکلین ۱۰ درصد، در شـرایط نـور و تـاریکی ۴ غلظـت ۵۰ ، ۱۰۰ ، ۲۰۰ ، ۵۰۰ میکرولیتر در ۱۰۰ سی‌سی آب مقطر، همین‌طور برای تیمار آمیکاسین ۵ درصد و اریترومایسـین ۵ درصـد بـه طـور جداگانـه در ۴ غلظـت متفـاوت ۱۰۰، ۲۰۰ ، ۴۰۰ ، ۱۰۰۰ میکرولیتـر در ۱۰۰ سـی‌سـی آب مقطر محیط کشت تهیه شد (تیمار شاهد محیط PDA بدون اضـافه کردن مواد بود). در این مرحله برای بررسی تاثیر نور در میـزان رشـد پرگنه و میسیلیوم قارچ *Rhytisma acerinum*، بـرای هـر کـدام از تیمارها با غلظت‌های متفاوت نیمی از تکرارها را در شـرایط تـاریکی کامل (دستگاه انکوباتور) و نیمی دیگر در محیط با شرایط نـوری ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. سپس بعـد از مشـاهده رشد پرگنه قـارچ، در مـدت زمـان یـک هفتـه رشـد شـعاعی پرگنـه اندازه‌گیری شد.

1- Acer platinum

2- *Oxi vet*
3- *Amikacin*
4- *Erythromycin*

شکل ۱- محل جمع‌آوری برگ‌های آلوده در جنگل آموزشی و پژوهشی شصت کلاته

Fig. 1- Collection location of polluted leaves in educational and research forest of Shast kalateh

شکل ۲- برگ درخت افرا مبتلا به بیماری لکه قیری (*Rhytisma acerinum*)

Fig. 2- Infected leaf of maple by *Rhytisma acerinum*

شمارش اسپور

بعد از انجام مراحل خالص‌سازی مقداری از رشته‌های میسیلیومی قارچ را در محیط کشت که از ترکیب ۱۰۰ سی‌سی آب مقطر و عصاره سیب‌زمینی تهیه شده کشت گردید و روی دستگاه شیکر به مدت یک ماه قرار گرفت. بعد از این مرحله برای جداسازی اسپور، توده تشکیل شده میسیلیومی را از صافی پمپ خلأ هوا عبور داده و عصاره به دست آمده را روی دستگاه سانتریفیوژ با دور موتور ۳۰۰۰ دور در دقیقه و در سه بازه زمانی ۲۰، ۴۰ و ۶۰ دقیقه قرار دادیم سپس نمونه‌هایی از عصاره به دست آمده را در بازه‌های زمانی مختلف برای اندازه‌گیری تعداد اسپور تست کرده، که بهترین حالت برای شمارش اسپور مدت زمان ۴۰ دقیقه بود سپس برای شمارش بهتر اسپورها، عمل رقیق‌سازی را انجام داده و برای کنترل جوانه‌زنی، اسپورهای به‌دست آمده را تحت شرایط تاریکی کامل و نوری با شرایط نوری ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی در محیط‌های حاوی آنتی بیوتیک‌های اکسی تتراسایکلین ۱۰ درصد، در ۴ غلظت ۵۰ ، ۱۰۰ ، ۲۰۰ و ۵۰۰ میکرو لیتر در ۱۰۰ سی‌سی آب مقطر، آمیکاسین ۵ درصد و اریترومایسین ۵ درصد در ۴ غلظت ۱۰۰، ۲۰۰ ، ۴۰۰ ، ۱۰۰۰ میکرو لیتر در ۱۰۰ سی سی آب مقطر کشت داده شدند و بعد از مشاهده جوانه‌زنی اسپور، شمارش اسپورهای جوانه‌زده به روش دستی با استفاده از لام هموسیتومتر و میکروسکوپ نوری انجام گرفت.

در این تحقیق برای محاسبه سطح زیر منحنی رشد قارچ در طی روزهای مختلف که AUFGC۱ نامیده می‌شود از فرمول شماره ۱ و از فرمول شماره ۲ برای محاسبه میزان درصد بازدارندگی آنتی‌بیوتیک‌ها از رشد میسیلیوم قارچ استفاده گردید (۲۱).

$$AUFGC = \frac{(\sum_{i=1}^{n}(X_{i+1} \mid X_i)}{2}(t_{i+1} - t) \quad (1)$$

xi: اندازه کلونی در مشاهده i ام

1- Area under Fungi Growth Curve

t: زمان (تعداد روزهای اندازه گیری)

n: تعداد کل مشاهدات

(۲) $\text{درصد بازدارندگی} = \frac{A-b}{b} \times 100$

A= میزان رشد میسیلیومی در تیمار شاهد

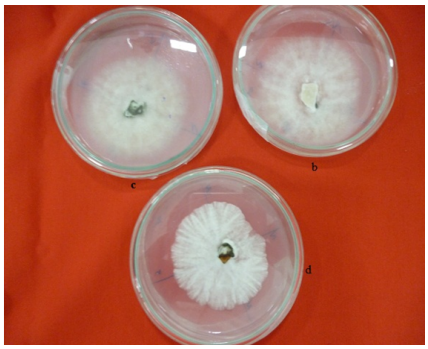
b= میزان رشد میسیلیومی در آنتی‌بیوتیک‌های مختلف (۲۹).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

این تحقیق بصورت آزمایش فاکتوریل دو عامله (نور و ماده) در قالب طرح کاملا تصادفی انجام گرفت. در این تحقیق برای تجزیه و تحلیل‌های آماری و رسم نمودارهای مختلف از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ استفاده شد و همچنین مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۹۵ درصد انجام گرفت.

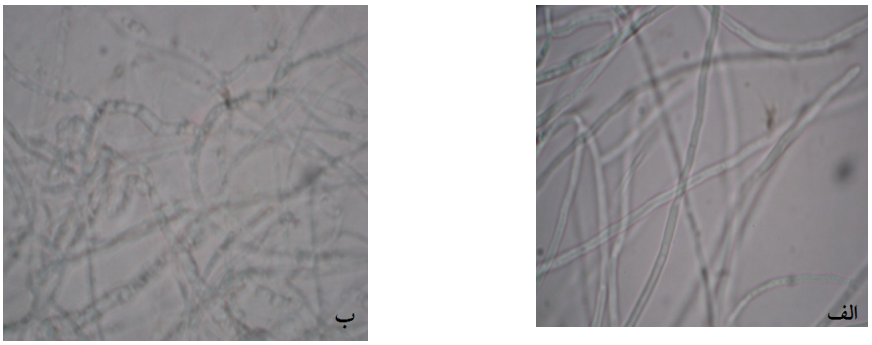
نتایج

نتایج نشان دادند که از بین آنتی‌بیوتیک‌های به‌کار گرفته شده آنتی‌بیوتیک اکسی تتراسایکلین با غلظت ۲۰۰ میکرو لیتر در ۱۰۰ سی‌سی آب مقطر مانع از رشد پر گنه قارچ عامل بیماری لکه قیری افرا (*R. acerinum*) (شکل ۳) و سبب ایجاد تخریب و از بین رفتن رشته‌های میسیلیومی قارچ *R. acerinum* شده است. رشته های میسیلیومی قارچ در شاهد و تیمار اکسی تتراسایکلین با غلظت ۲۰۰ میکرو لیتر در شکل۴ نشان داده شده است.



شکل ۳- پرگنه قارچ *Rhytisma acerinum* در تیمارهای مختلف

Fig. 3– Colony of Rhytisma acerinum in different treatments



شکل ٤- الف) رشته‌های میسیلیومی قارچ *Rhytisma acerinum* بدون آنتی‌بیوتیک (تیمار شاهد)، ب) تخریب رشته‌های میسیلیومی قارچ *Rhytisma acerinum* در اثر اکسی تتراسایکلین با غلظت ۲۰۰ میکرو لیتر

Fig. 4- a) Mycelium of Rhytisma acerinum without antibiotics(Control treatment); b) Demolition of mycelium of **Rhytisma acerinum by oxytetracycline with the dosage of 200 microliter**

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان می‌دهد که اثر متغیرهای نور و نور–ماده (نوع آنتی بیوتیک) بر ضریب AUFGC در تیمارهای مختلف در سطح احتمال ۹۹ و ۹۵ درصد اختلاف معنی‌داری نداشتند ولی در اثر نوع ماده به‌کار گرفته شده دارای اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۹۵ درصد بودند ($p< ۰/۰۱$) (جدول ۱). مقایسه میانگین آنتی‌بیوتیک‌های مختلف روی ضریب AUFGC نشان می‌دهد از بین آنتی‌بیوتیک‌های به‌کار گرفته شده، کمترین تاثیر را اکسی تتراسایکلین با غلظت ۲۰۰ میکرولیتر داشت (شکل ۵).

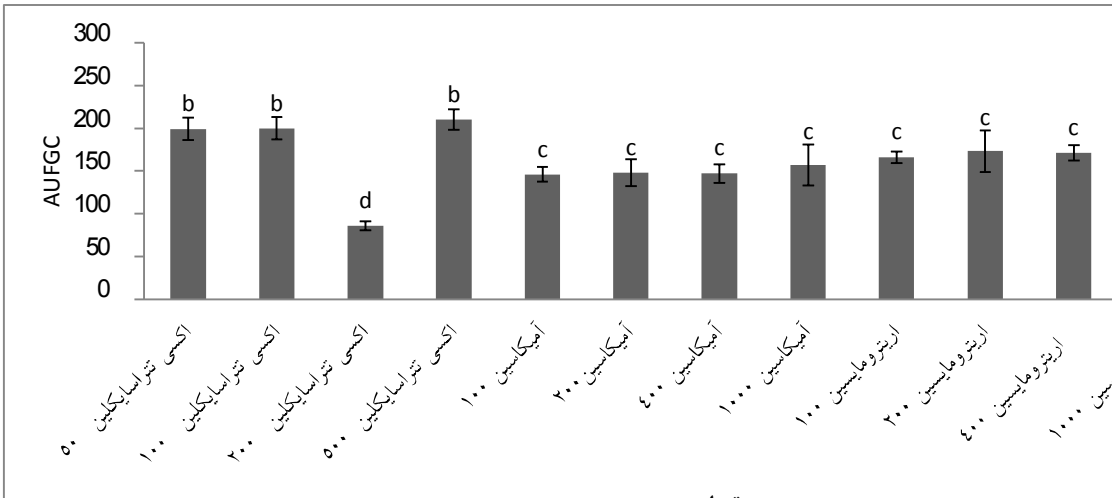
جدول۱- میانگین مربعات حاصل از تجزیه واریانس تاثیر نور، ماده، نور و ماده بر ضریب AUFGC

Table 1- Mean square acquired from ANOVA of light, material and light-material on the AUFGC coefficient

ردیف NO	متغییر variable	اختلاف معنی‌داری Significant	درجه آزادی df
1	نور Photo	0.19^{ns}	1
2	ماده Substance	0.02^{*}	12
3	نور و ماده Photo and substance	0.18^{ns}	12

* معنی‌دار در سطح 0.05، ns عدم معنی‌داری

*Significant at the level of 0.05, ns not significant



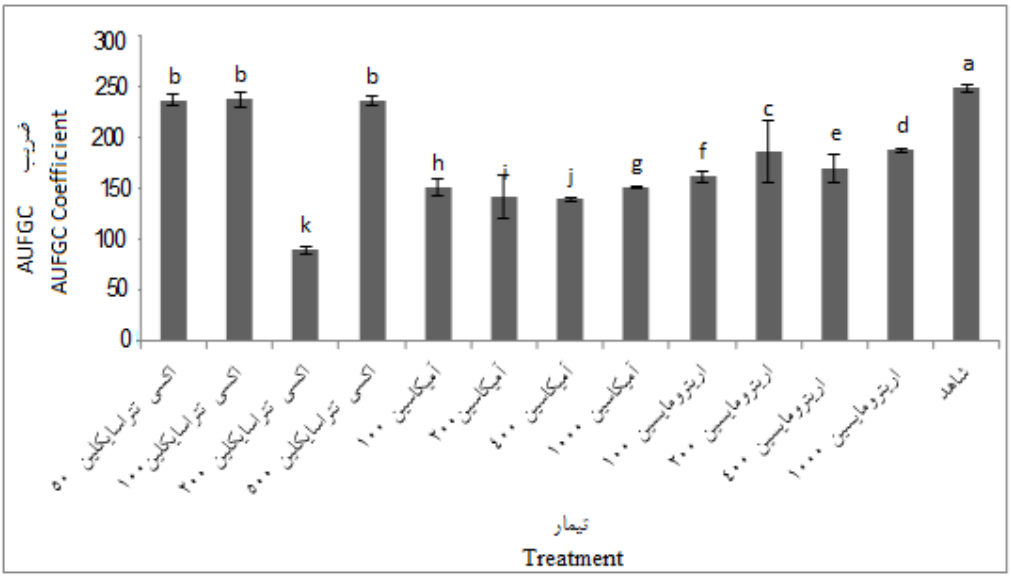
شکل ۵- مقایسه میانگین ضریب AUFGC در حضور آنتی‌بیوتیک‌ها

Fig. 5- Means comparison of AUFGC in the presence of antibiotics

نتایج نشان می‌دهند که اکسی‌تتراسایکلین با غلظت ۲۰۰ میکرولیتر کمترین تاثیر را روی ضریب AUFGC داشت و در تیمار شاهد بیشترین مقدار ضریب AUFGC مشاهده شد (شکل ۶). با توجه به شکل شماره ۷ بیشترین مقدار ضریب AUFGC در تیمار شاهد و کم‌ترین تاثیر روی ضریب AUFGC، درتیمار اکسی تتراسایکلین با غلظت ۲۰۰ میکرولیتر مشاهده شد.

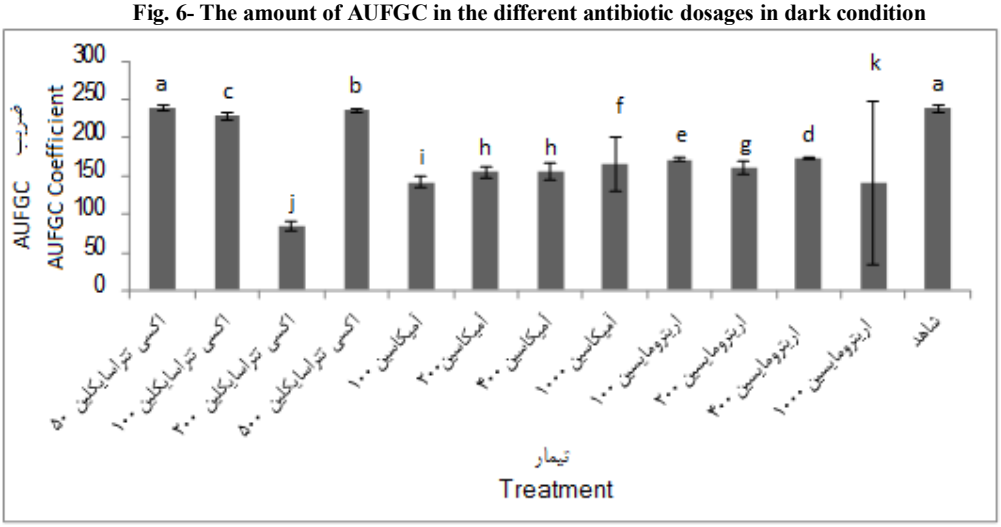
نتایج حاصل از تجزیه واریانس آنتی‌بیوتیک‌های مختلف بر رشد میسیلیوم قارچ نشان داد که تاثیر نور و هم‌چنین تاثیر نور و ماده روی رشد میسیلیومی قارچ دارای اختلاف معنی‌داری در سطح ۹۹ و ۹۵ درصد نبودند. ولی تاثیر ماده روی رشد میسیلیومی قارچ در سطح ۹۹ درصد دارای اختلاف معنی‌داری بود (جدول ۲). با توجه به شکل ۸ مقایسه میانگین‌های تیمارهای مختلف بر رشد میسیلیومی قارچ لکه قیری افرا نشان می‌دهد که اکسی تتراسایکلین با غلظت ۵۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ میکرولیتر و اریترومایسین با غلظت ۱۰۰۰ میکرولیتر دارای تاثیر کم‌تر و اکسی تتراسایکلین ۲۰۰ میکرولیتر بیشترین تاثیر را در جلوگیری از رشد میسیلیومی قارچ داشتند.

شکل ۹ نشان می‌دهد که اکسی تتراسایکلین ۲۰۰ سی‌سی بیشترین تاثیر را برای ممانعت از رشد میسیلیومی قارچ *Rhytisma acerinum* در شرایط تاریکی داشت و در بقیه بسترهای حاوی آنتی‌بیوتیک‌های مختلف، شاهد رشد میسیلیوم قارچ بودیم که از بین آنتی بیوتیک‌ها، اریترومایسین با غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ و اکسی‌تتراسایکلین ۲۰۰ و ۵۰۰ میکرولیتر کمترین تاثیر را در جلوگیری از رشد میسیلیومی تحت شرایط تاریکی داشتند و شکل ۱۰ بیانگر این است که اکسی‌تتراسایکلین ۲۰۰ میکرولیتر بیشترین تاثیر را در شرایط نور برای جلوگیری از رشد میسیلیومی قارچ داشت و در بقیه محیط‌های حاوی آنتی‌بیوتیک مختلف شاهد رشد میسیلیوم قارچ بودیم به‌طوری‌که آنتی بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین با غلظت ۵۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ میکرولیتر دارای کمترین اثر برای جلوگیری از رشد میسیلیومی قارچ داشتند.



شکل ٦- میزان AUFGC در آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در شرایط تاریکی

Fig. 6- The amount of AUFGC in the different antibiotic dosages in dark condition



شکل ۷- میزان AUFGC در آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در شرایط نور

Fig. 7- The amount of AUFGC in the different antibiotics in light condition

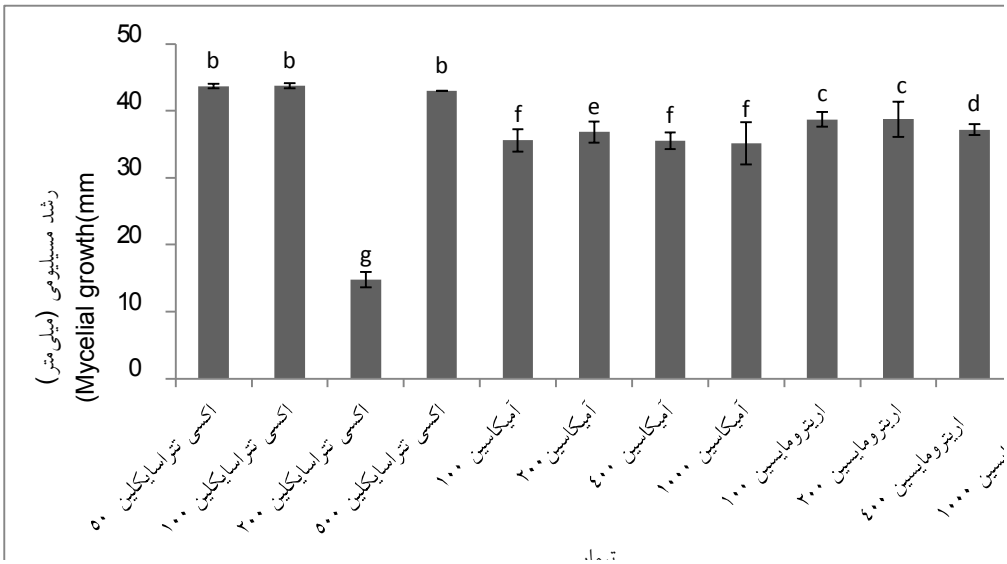
جدول۲- میانگین مربعات حاصل از تجزیه واریانس تاثیر نور، ماده، نور و ماده روی رشد میسیلیومی قارچ

Table 2- Mean square acquired from ANOVA of light, material and light-material on the mycelial growth of the fungi

ردیف NO	متغییر variable	اختلاف معنی‌داری Significant	درجه آزادی df
1	نور Photo	0.90^{ns}	1
2	ماده Substance	0.003**	12
3	نور و ماده Photo and Substance	0.88^{ns}	12

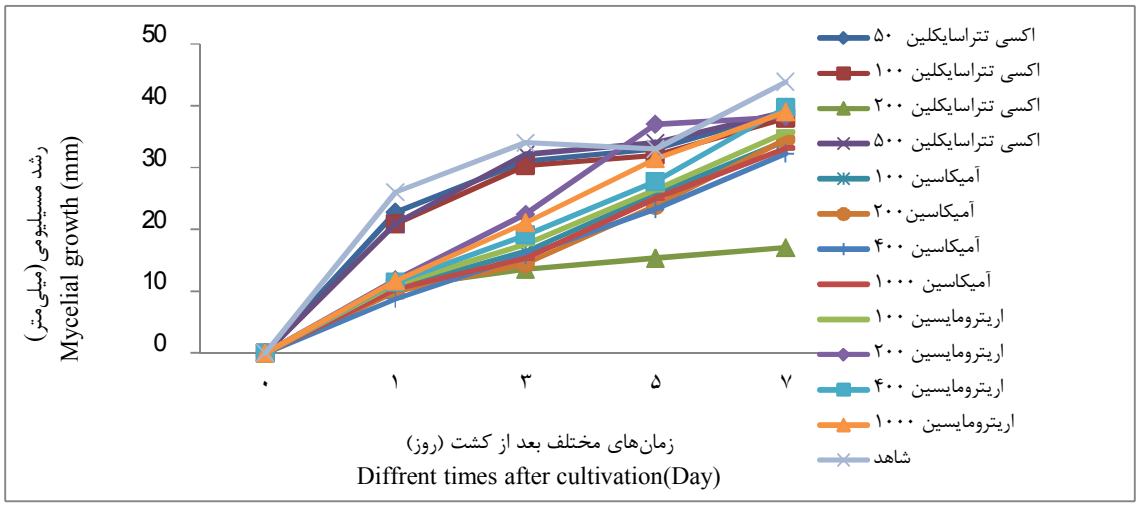
* معنی‌دار در سطح ۰/۰۱، ns عدم معنی‌داری

**Significant at the level of 0.01, ^{ns} not significant



شکل ۸- مقایسه میانگین آنتی‌بیوتیک‌ها روی رشد میسیلیومی قارچ

Fig. 8- Means comparison of antibiotics on the mycelial growth of the fungi

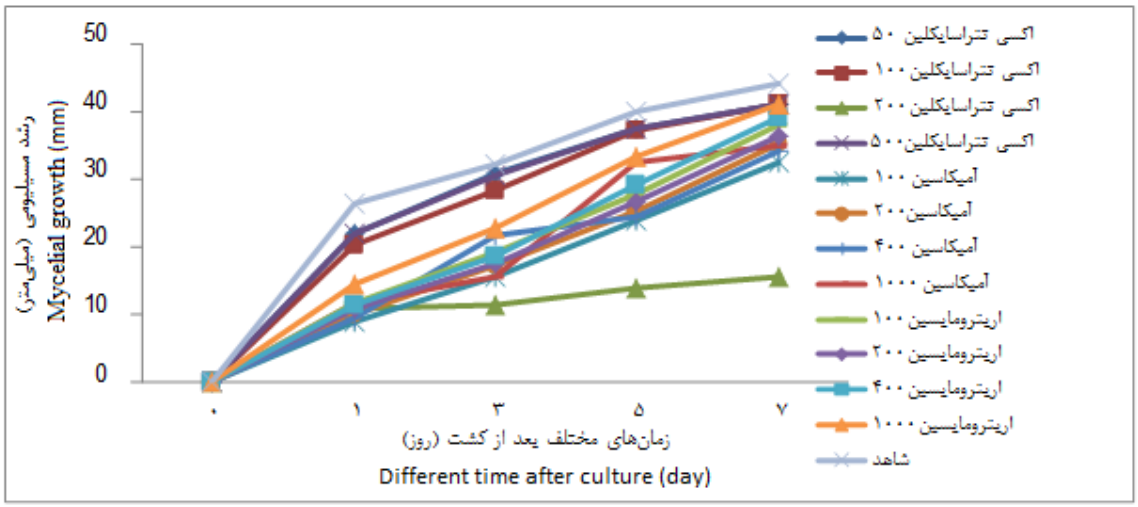


شکل ۹- منحنی میزان رشد میسیلیومی قارچ *Rhytisma acerinum* تحت تاثیر آنتی‌بیوتیک‌ها در شرایط تاریکی

Fig. 9- Mycelial growth of R*hytisma acerinum under the effect of antibiotics in dark condition*

با توجه به جدول تجزیه واریانس اثر نور، ماده و اثرات متقابل نور و ماده بر روی جوانه‌زنی اسپور دهی قارچ نشان می‌دهد که تاثیر نور، ماده و نور و ماده بر جوانه‌زنی قارچ در سطح احتمال ۹۹ درصد معنی‌دار بودند ($p< ۰/۰۵$). نتایج مقایسه میانگین جوانه‌زنی نشان می‌دهد که بیشترین درصد جوانه‌زنی در تیمار شاهد بوده است و در بقیه تیمارها جوانه‌زنی اسپورها در یک سطح بوده و آنتی‌بیوتیک‌های به‌کار گرفته شده توانسته‌اند جوانه‌زنی اسپور را کنترل نمایند (شکل ۱۱).

شکل‌های ۱۲ و ۱۳ نشان می‌دهد که جوانه‌زنی اسپور تحت شرایط تاریکی در اثر تیمارهای مختلف نسبت به جوانه‌زنی اسپور در تیمارهای مختلف در شرایط نور کمتر رخ داده است و در تیمار شاهد و اریترومایسین اسپورها قدرت جوانه‌زنی بالایی داشتند و آنتی‌بیوتیک‌های آمیکاسین و اکسی تتراسایکلین بیشترین تاثیر را در کنترل جوانه‌زنی اسپور قارچ *Rhytisma acerinum* داشتند.



شکل ۱۰- منحنی رشد میسلیومی قارچ *Rhytisma acerinum* تحت تاثیر آنتی‌بیوتیک‌ها در شرایط نور

Fig. 10- ycelial growth of *Rhytisma acerinum* under the effect of antibiotics in light condition

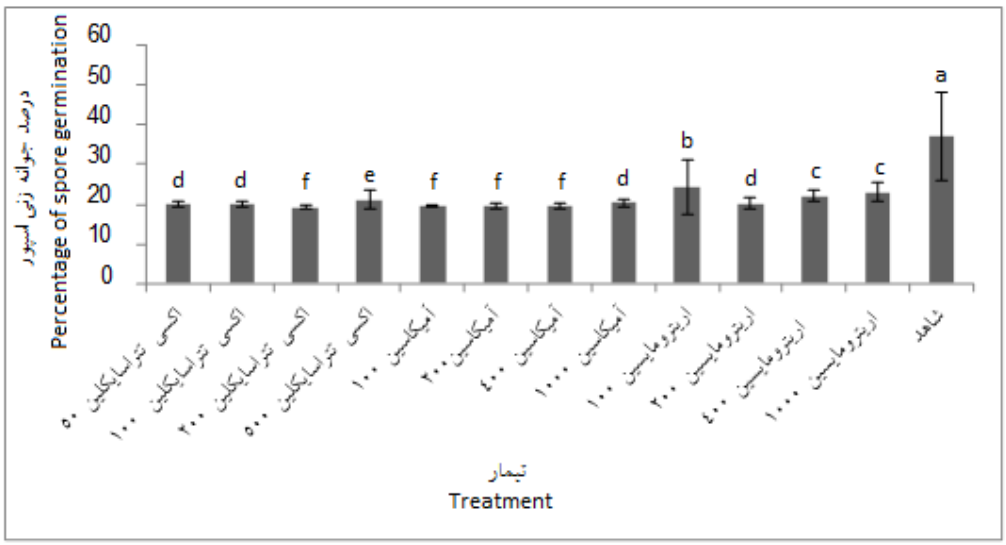
جدول۳- میانگین مربعات حاصل از تجزیه واریانس تاثیر نور، ماده، نور و ماده روی جوانه‌زنی اسپور قارچ

Table 3- Mean square acquired from ANOVA of light, material and light-material on the spore germination of the fungi

ردیف NO	متغییر variable	اختلاف معنی‌داری Significant	درجه آزادی df
1	نور Photo	0.001**	1
2	ماده Substance	0.001**	12
3	نور و ماده Photo and Substance	0.003**	12

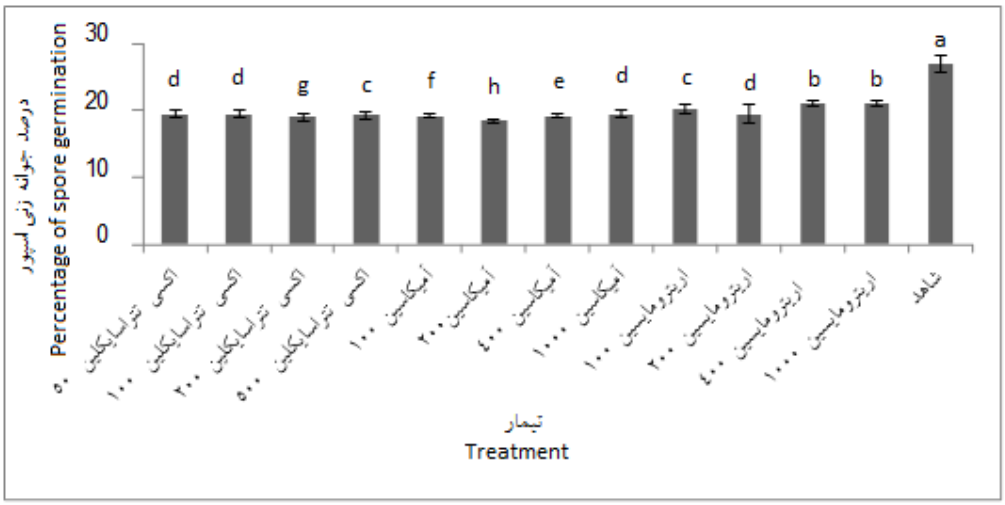
** معنی‌دار در سطح ۰/۰۱

**Significant at the level of 0.01



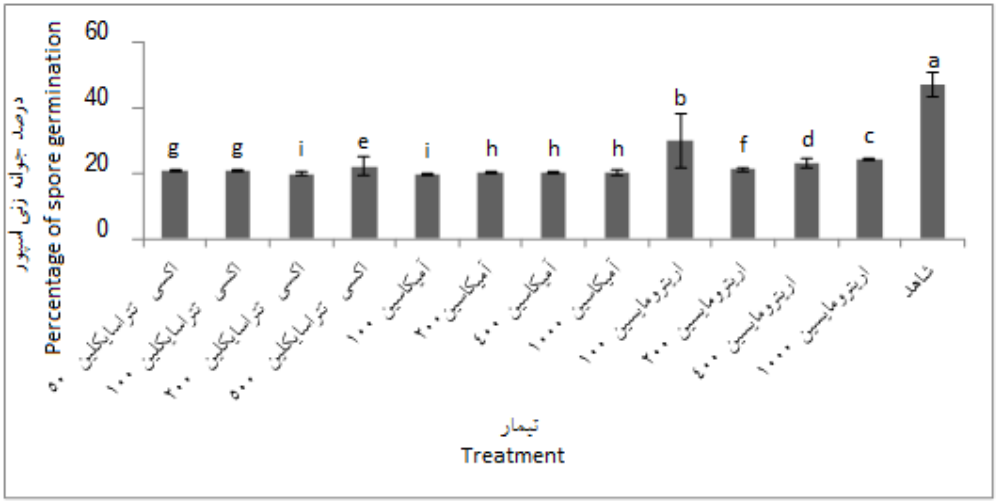
شکل۱۱- مقایسه میانگین تاثیر آنتی‌بیوتیک‌ها برجوانه‌زنی اسپور قارچ *Rhytisma acerinum* در تیمارهای مختلف

Fig. 11- Mean comparison of the antibiotics effect on spore germination of *Rhytisma* acerinum in different treatments



شکل ۱۲- جوانه‌زنی اسپور در تیمارهای مختلف در شرایط تاریکی

Fig. 12- Spore germination in different treatments in dark condition



شکل ۱۳- جوانه‌زنی اسپور در تیمارهای مختلف در شرایط نور

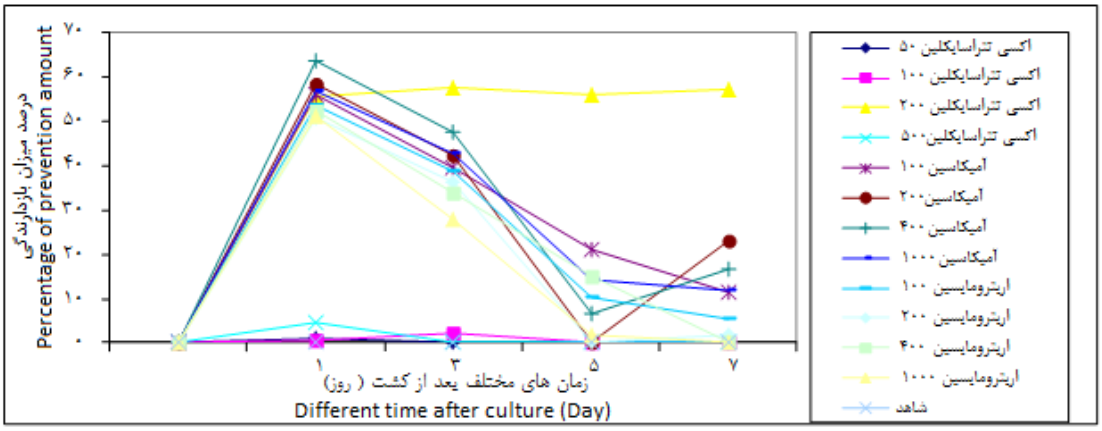
Fig. 13- Spore germination in different treatments in light condition

با توجه به شکل‌های ۱۴ و ۱۵ در شرایط تاریکی و نور بیشترین تاثیر روی بازدارندگی رشد میسیلیومی را آنتی‌بیوتیک اکسی تتراسایکلین با غلظت ۲۰۰ میکرولیتر داشت سایر آنتی‌بیوتیک‌ها در ابتدا مانع رشد میسیلیومی قارچ شدند ولی با گذشت زمان توانایی بازدارندگی آن‌ها کاهش یافت. از بین آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده اکسی تتراسایکلین ۲۰۰ میکرولیتر روند صعودی و یکنواختی را در بازدارندگی رشد میسیلیومی قارچ از خود نشان داد.

بحث

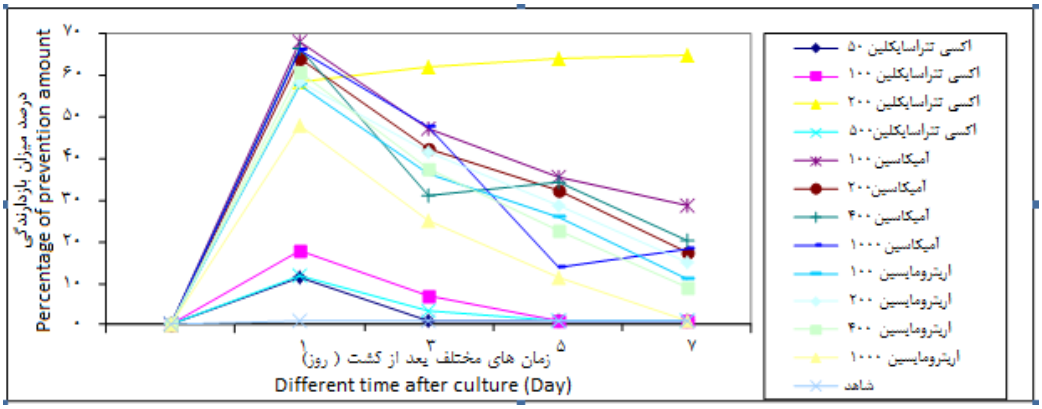
بیماری و آفات درختی سالانه خسارت زیادی به میزبان‌های خود وارد می‌نمایند (۲) بیماری لکه قیری افرا با توجه به اینکه باعث خزان زود رس و از بین رفتن برگ درخت افرا می‌شود سبب کاهش رشد و تولید چوب و تولید بذر درختان می‌شود در دهه اخیر جنگل‌کاری با گونه پلت در نقاط مختلف ازجنگل های شمال کشور انجام شده است که توده‌های یکدست و خالص از آن به چشم می‌خورد. در این گونه موارد و یا در پارکها در صورت آلودگی شدید، نیاز به مبارزه و کنترل این بیماری، وجود خواهد داشت (۹). یک راه عملی موثر در جهت کاهش و مبارزه با بیماری خارج کردن منابع آلودگی، جمع‌آوری و سوزاندن برگ‌های آلوده می‌باشد در صورت نیاز و برای از بین بردن بیماری، استفاده از سمومی مانند اکسی‌کلرمس، محلول بردو و زیرام

در فصل تابستان توصیه شده است (۲۱) اما امروزه در جنگلداری استفاده از آنتی بیوتیکها و مواد بیولوژیک در جنگلهای طبیعی در جهت کنترل بیماریها بیشتر مورد توجه قرار می‌گیرد که چنین روشی در دراز مدت در مقایسه با مواد شیمیایی مقرون به صرفه است.



شکل ۱۴- منحنی بازدارندگی قارچ *Rhytisma acerinum* در شرایط تاریکی

Fig. 14- The prevention curve of *Rhytisma acerinum* in dark condition



شکل ۱۵- منحنی میزان بازدارندگی *Rhytisma acerinum* در شرایط نور

Fig. 15- The prevention curve of *Rhytisma acerinum* in light condition

کاشت نهال‌های مقاوم به بیماری در کانون‌های آلوده نیز توصیه می‌شود و از کاشت نهال‌های آلوده به بیماری لکه قیری و سایر بیماری‌ها در مناطق جنگلکاری شده بایستی خودداری گردد. لذا یافتن روشی مناسب برای کنترل این بیماری بسیار مهم می‌باشد که زیان کمتری به محیط وارد کند (۹). بدین منظور تحقیقی که روی برگ درخت افرا در شرایط آزمایشگاهی انجام گرفت نشان داد از بین آنتی‌بیوتیک‌های اکسی تتراسایکلین، آمیکاسین و اریترومایسین با غلظت‌های متفاوت، اکسی تتراسایکلین با غلظت ۲۰۰ میکرولیتر در ۱۰۰ سی‌سی آب مقطر نسبت به بقیه تیمارها در غلظت‌های متفاوت موثرتر واقع شده است به‌طوری‌که اکسی تتراسایکلین با غلظت ۲۰۰ میکرولیتر کمترین تاثیر و اریترومایسسین با غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰۰ و اکسی تتراسایکلین با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ میکرولیتر بیشترین تاثیر را بر روی ضریب AUFGC داشت نتایج نشان می‌دهند که تاثیر نور و نور–ماده بر روی ضریب AUFGC و رشد میسیلیومی معنی‌دار نمی‌باشد ولی تاثیر ماده روی ضریب AUFGC و رشد دارای تفاوت معنی‌داری می‌باشد. در اثر اضافه کردن آنتی‌بیوتیک اکسی تتراسایکلین با غلظت ۲۰۰ میکرولیتر به محیط کشت، پرگنه و رشته‌های میسیلیومی قارچ دچار تخریب شده‌اند براساس نتایج به‌دست آمده اکسی تتراسایکلین ۲۰۰ در شرایط نور و تاریکی بیشترین تاثیر را بر میزان بازدارندگی و جلوگیری از رشد میسیلیومی قارچ دارا می‌باشد و آنتی‌بیوتیک اکسی تتراسایکلین با غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰۰ میکرولیتر و اریترومایسین با غلظت ۱۰۰ میکرولیتر در شرایط نور و تاریکی کمترین تاثیر را بر بازدارندگی و ممانعت از رشد میسیلیومی داشتند شرایط وجود یا عدم وجود نور تاثیر چندانی بر رشد

میسیلیومی قارچ یا بازدارندگی رشد قارچ نداشت ولی در جوانه‌زنی نتایج بیانگر این هستند که تاثیر نور، ماده و نور–ماده بر جوانه‌زنی اسپور دارای اختلاف معنی‌داری بودند. در کنترل جوانه‌زنی اسپور برخلاف کنترل رشد میسیلیوم قارچ و پرگنه قارچ که فقط تیمار اکسی تتراسایکلین با غلظت ۲۰۰ میکرولیتر رشد میسیلیوم را کنترل کرد، بقیه آنتی‌بیوتیک‌ها با توجه به مقایسه میانگین‌ها تقریبا در یک سطح سبب کنترل بیماری شده‌اند که مطابق نتایج تحقیق انصاری و همکاران (۶) بود. این محقیقن پی بردند که آنتی‌بیوتیک‌ها به‌کار گرفته شده در غلظت‌های متفاوت در کنترل لکه قهوه‌ای قارچ خوراکی می‌باشد موثر واقع شده‌اند. شرایط وجود یا عدم وجود نور در جوانه‌زنی اسپور قارچ بسیار موثر بوده است به‌نحوی‌که در شرایط نوری اسپورهای قارچ لکه قیری قادر به جوانه‌زنی بیشتری نسبت به شرایط عدم نور می‌باشند. براساس نتایج بدست آمده می‌توان نتیجه گرفت استفاده از آنتی‌بیوتیک روش موثری در کنترل بیماری لکه قیری افرا می‌باشد. لازم به ذکر است که آنتی‌بیوتیک اکسی تتراسایکلین بیشترین تاثیر را بر روی کنترل قارچ لکه قیری داشته است و با نتایج رانگسازوامی و همکاران (۲۰) که از اکسی تتراسایکلین در کنترل بیماری آتشک و شانکر مرکبات استفاده کرده اند مطابقت داشت.

همچنین میتوان عنوان کرد که روش کنترل بیولوژیکی با دیگر روش‌های کنترل میتواند استراتژی مفیدی در کنترل بیماریهای جنگلی باشد که نیاز به مطالعات بیشتر در این زمینه است (۲۵). معرفی عوامل کنترل بیولوژیکی در استراتژی کنترل بیماریها از نقطه نظر کاهش استفاده از سموم شیمیایی بسیار مطلوب است (۲۶). اهمیت درختان افرا با توجه به پراکنش محدود و کمبود تعداد پایه‌های این درختان در جنگل‌های شمال کشور ما را به حفظ این گونه با ارزش در برابر عوامل بیماری‌زا ایجاب می‌نماید بنابراین نتایج این تحقیق نشان داد که آنتی‌بیوتیک‌ها نقش موثری در کنترل بیماری لکه قیری (سبب خزان زود و کاهش توان مقاومتی درختان افرا پلت) دارند.

منابع

1- Akhavan sapahi A., Zakeri Sh., and Rezapnah D. 2011. Plant pathogenic fungi assessment antifungal activity against *Phytophtora infestans* and Verticillium Dahliar and Bacillum CerealL, Journal of Islamic Azad University (JSIAU) 12 p.

2- Arjmand P. 2001.The Effect of the Amount of establishing Wood and Paper Factory in Development of Northern forests of Iran, 31-41, Proceedings of the Second International Conference of the Forest Industry. Publication of Tehran.

3- Akbari L., and Nik-nezhad D. 2003 Management of plant diseases. Publication of Agricultural Sciences. 280 p.

4- Aska O., and Shoda M. 1996. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping off of tomato with Bacillus subtilis RB14. Applied and Environmental Microbiology, 62:4081-4085.

5-Ark P.A. 1953. Use of Streptomycin dust to control fire blight. Plant Disease Report, 37: 404-406.

6. Ansarifard N., Hasanzadeh N., and Rezaii M.B. 2011. Comparison of antibacterial extracts and essential oils of walnut with four antibiotics for the control of brown spot fungus sprout *in vitro*. Seventh Conference of Biotechnology, Islamic Republic of Iran. 6 p.

7- Borhani A., and Moosazadeh S.E. 2009. Investigating the different species of Maple tar Spot disease in Mazandaran province. Journal of Research Support and Protection of forests and Rangelands, 6(2):88-97.

8-Behdad O.R. 1998. Diseases of Forest Trees and Ornamentl Plants. Shrubs of Iran.824p.

9- Behdad OR. 2007. Phytopathology of important plant and plant diseases of Iran. Miran Publications. (1)785 p.

10- Blanchard T. 1993. Translated by Jafarpour, B., Pathology of trees: field and Laboratory guide. University Of Mashhad Publications. 335p.

11- Sabati H. 1994. Trees and shrubs of Iran. Publication of Agriculture and Natural Resources Research Organization, 810 p.

12- Sayad S., Hasanzageh N., Ghassemi A., Nazerian E. 2012. Control of soft rot ornamental plant syngonium (*Pectobacterium carotovorum*) Using essential oils and antibiotics in both laboratory and greenhouse, journal Medicinal and Aromatic Plants Research of Iran, 28:730 -740.

13- French W.J. 1969. Eutypella cankey on Acerin newyork. Syracase, Newyork, USA. State University of Newyork, College of forestry, Technical publication, 56p.

14- Hulder W.D., Benik M.T., and Miller S.G. 1987. unusual Epidemic of tar Spot on Norway Maple in Newyork. Journal of Plant Diseases, 71:65- 68.

15- Araqi M., Rahnama K. 2009. Evaluation of Biological Biological Control Possibility of *Ophiostoma- novo- ulmi* (Dutch elm disease risk factor) by *Bacillus subtilis in vitro*. Journal of Agricultural Sciences and Natural resources, Gorgan, Golestan. No. 1, 10 p.

16- Khan S.N., Mishara B.M., and Tivari R.K. 1995. New host of Pathogenic fungi from India. Journal of forestry, 18(1):89-92.

17- Karami M.Sh., Kavoosi M.R., Ahmadi A. 2014. Isolation and Identification of Maple Tar Spot Pathogen in Acer velutinumTrees in Dr. Bahramnia Educational and Research Forest. Iranian Forests Ecology, 2(3):26-332.
18- Mirzaei M., Aminian H. 2012. The Study of Biological Control of Pear Fire Blight Caused by Erwinia amylovora by some Antagonistic Bacteria, Biological Control of Pests and plant diseases, 39-47.).
19-Maleki Ziarati, H. 2009. Investigating the importance of the fungus *Trichoderma harzianum* in the biological control of plant pathogens. Journal of botany and food, 2:21-25.
20-Rangaswami G.R., and. Laskshmanan A. 1959. Studies on the control of citrus canker with streptomycin. Phytopatology, 49:221
21-Soltanloo H., Alimohammadi M., Ramezanpour S., Bagherieh Najar M.B .2010. Nanosilver Colloid: a Novel Antimicrobial Candidate Applicable in plant Tissue Culture Medium. Australian journal of Basic and Applied Sciences, 4 (10):5338-5345.
22-Talogo M.T., and Leodery R.N. 1973. Observation on *Rhytisma Acerinum* (Pers.) Fr. on Moment Terminillo. Annali Istituto Sperimentale per la Patalogia Vegetale, 4:111-121
23-Wittman W. 1990. *Rhytisma spp* Ascomycota. Banko Ianakary. 2414 p.
24-Wulf A. 1989. Leaf Diseases on Maple. Journal of Gesunde Pflanzen, 41(6):218- 22.
25- Lecomtea C.C, Alabouvetteb C., Edel-Hermannc V., Roberta F., Steinberg C. 2016. Biological control of ornamental plant diseases caused by Fusarium oxysporum: A review. Biological Control. 101:17-30.
26- Mbargaa J.B., Begoudea B.A.D., Ambangb Z., Mebomaa M., Kuatea J., Schiffersc B., Ewbankd W., Dedieue L., ten Hoopen G.M. 2014. A new oil-based formulation of *Trichoderma asperellum* for the biological control of cacao black pod disease caused by Phytophthora megakarya. Biological Control, 77:15-22.