مقاله کوتاه

شناسایی گونه‌های *Phytophthora* عامل پوسیدگی طوقه و ریشه درختان گیلاس در استان تهران*

IDENTIFICATION OF *Phytophthora* SPECIES THE CAUSING ROOT AND CROWN ROT OF CHERRY TREES IN TEHRAN PROVINCE

سید محمود سجادی نژاد[۱**]، جعفر ارشاد[۲]، منصوره میرابوالفتحی[۲] و حمیدرضا زمانی‌زاده [۱]

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۷/۱۱/۱۲؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۱۲/۵)

چکیده

طی بازدیدهایی از باغ‌های مختلف گیلاس استان تهران و با در نظر گرفتن علائم اندام‌های هوایی، از پوست طوقه و ریشه‌های اصلی و فرعی با علائم مشکوک به آلودگی نمونه‌برداری شد. پس از کشت نمونه‌ها در محیط نیمه اختصاصی CMA + PARPH جدایه‌هایی از جنس *Phytophthora* به دست آمد. که بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیک و پاره‌ای خصوصیات فیزیولوژیک آنها مورد شناسایی قرار گرفتند و مناطق عمدهٔ آلودگی نیز مشخص گردید. در این تحقیق دوازده جدایه و اکثرا از پایه‌های محلب به دست آمدکه متعلق به گونه‌های *P. cactorum* , *P. citrophthora* , *P. drechsleri* و *P. cryptogea* بودند. بیشترین و کمترین فراوانی به ترتیب مربوط به گونه‌های *P. cactorum* و *P. cryptogea* بود. بیماری‌زایی تمامی جدایه‌ها اثبات شد.

واژه‌های کلیدی: درختان گیلاس، استان تهران، خشکیدگی، *Phytophthora cactorum*, *P. citrophthora*, *P. drechsleri* ، *P. cryptogea*

---

*: بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول ارایه شده به دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران

**: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: sadjady72@yahoo.com

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران

۲. اعضای هیئت علمی مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور

مقدمه

از اوایل دهۀ هفتاد شمسی خشکیدگی‌های نسبتاً پراکنده و محدودی روی درختان گیلاس مناطق مختلف استان تهران مخصوصاً منطقۀ شمیرانات و کرج دیده شد که با توسعه و گسترش بیماری، سطح خسارت افزایش یافت. علائم این عارضه به طور عمده پژمردگی و سپس خشکیدگی ناگهانی در مدت زمان کوتاهی مخصوصاً مقارن با زمان رنگ انداختن و یا برداشت میوه بودند. عارضه مزبور به خسارت مجموعه‌ای از عوامل شامل اختلالات تغذیه‌ای، عدم اعمال مدیریت صحیح و اصولی باغبانی و دخالت برخی از آفات و بیماری‌ها شباهت دارد. علاوه بر این علائم این عارضه با نشانه‌های پوسیدگی‌های فیتوفتورایی ریشه و طوقه گیلاس معرفی شده توسط *میرستیچ و همکاران* (Mircetich *et al*. 1976) شباهت دارد. هم‌چنین *تسو* (Tsao 1990) نوشته است که علائم حاصل از بیماری‌های فیتوفتورایی می‌تواند اغلب با خسارات سایر بیمارگرها یا عوامل غیر زنده اشتباه گرفته شود. زوال درختان هلو در منطقه Great Lakes آمریکا از بارزترین مثال‌های خسارات ناشی از این قارچ‌ها می‌باشد این خشکیدگی‌ها را تا سال ۱۹۸۹ به سرمازدگی و یا خفگی ریشه‌ها نسبت می‌دادند که با جداسازی سه گونه *P. cactorum* , *P. megasperma* و *P. cryptogea* از بافت‌های خسارت دیده ریشه و طوقه، عامل اصلی آن مشخص گردید(Wilcox & Ellis 1989). در برخی از باغ‌های تجاری ایالت کالیفرنیا (آمریکا) نیز سه گونه *P. cambivora* , *P. megasperma* , *P. drechsleri* با ایجاد پوسیدگی طوقه و ریشه باعث خسارت به بیش از ۸۵٪ درختان گیلاس که عمری بین ۲ تا ۳۸ سال را داشته‌اند، شده بودند.(Mircetich *et al*. 1976).

تاکنون گونه‌هایی از قبیل *P. cambivora* , *P. drechsleri* , *P. cactorum* , *P. megasperma* *citrophthora* , *P. syringae* , *P. citricola* , *P. medicaginis* , *P. capsici*. *P. cryptogea* از روی پایه‌های حساس *Prunus mahaleb* و نسبتاً متحمل گیلاس شامل (mazzard cherry) *P. avium* و (sour cherry) *P. cerasus* از نقاط مختلف جهان گزارش شده است (Mc Intosh 1953 , Mircetich *et al*. 1974, Wilcox & Mircetich 1985 & 1987 , Alizadeh & Agharafee 1998). ازکشور ما نیز با مطالعات انجام شده روی درختان میوه سردسیری، تاکنون شش گونه: *P. cryptogea* از روی بادام و گلابی، *P. cactorum* از روی زردآلو، گیلاس، گردو و سیب، *P. citrophthora* از روی بادام، زردآلو، گیلاس، گردو و سیب، *P. citicola* از روی بادام و گیلاس، *P. drechsleri* از روی هلو و *P. capsici* از روی گیلاس و هلو و *P. iranica* از روی آلو و بادام گزارش شده‌اند (Ershad 1977 ,Banihashemi 1986 & 1991 & 1995, Zakii & Ershad 1994, Afzali & Khabbaz Jolfaii 2004, Behrouzin & Ershad 1989, Alizadeh & Agharafee 1998). *علی‌زاده و آقارفیعی*(۱۹۹۸) جهت بررسی علل مرگ و میر درختان میوه هسته دار در استان تهران همراه با بعضی از عوامل قارچی خاک برد سه گونه *P. citicola, P. capsici P. citrophthora* را به عنوان یکی از عوامل زوال درختان گیلاس از استان تهران (منطقه کرج) گزارش نمودند. از آنجا که ارتباط کامل علائم این عارضه و پراکنش آن، با بیماری فیتوفتورایی پوسیدگی‌های طوقه و ریشه مشخص نشده بود لذا این بررسی انجام گرفت.

روش بررسی

نمونه‌ها از درختان گیلاس با پایۀ محلب (*Prunus mahaleb*) با علائم ضعف، به همراه تغییر رنگ و پژمردگی برگ‌ها، زوال و در برخی موارد سبزخشکیدگی ناگهانی و گاهی با علائم صمغ زدگی در قسمت پایین تنه

و یا طوقه برداشت شد. به این منظور خاک اطراف طوقه این درختان تا سطح ریشه‌های اصلی کنارزده شد. درختانی که در ناحیه پوست داخلی طوقه یا ریشه‌های آنها تغییر رنگ قهوه‌ای متمایل به قرمز به همراه مرزی مشخص بین ناحیهٔ سالم و آلوده وجود داشت برای نمونه‌برداری انتخاب شده وسپس از نسوج بین بافت سالم و آلوده، قطعاتی جدا گردید. نمونه‌ها درون کیسه‌های فریز استفاده نشده، ریخته و با بهره‌گیری از محفظهٔ محتوی یخ به آزمایشگاه منتقل گردیدند. نمونه برداری‌ها از اواسط اردیبهشت ماه و هم‌زمان با ظهور شکوفه‌ها شروع اما بیشتر در فاصله زمانی نیمهٔ دوم خرداد تا اواسط مهر ماه و از مناطق مختلف کرج، لواسانات، کن، سولقان، شهریار و ساوجبلاق انجام شد.

پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه، بافت‌های مشکوک به آلودگی، زیر جریان ملایم شیر آب به طور کامل شسته شدند و از دو روش زیر برای جداسازی استفاده گردید.

(۱) پس از ضدعفونی سطحی به مدت سه الی پنج دقیقه با الکل۷۰٪ ، و یا آغشته نمودن سطح بافت با الکل۹۸٪ و سپس گرفتن روی شعله، از قسمت زیر سطح و از حدفاصل بافت آلوده و سالم قطعات ۵ میلی‌متری تهیه و روی محیط کشت نیمه انتخابی آرد ذرت آگار (CMA+ PARPH) انتقال داده شدند

(Erwin & Ribeiro 1996, Ershad 1992).

(۲) قطعاتی با همان ابعاد از بافت آلوده جدا و پس از قرار دادن داخل بطری شیشه ای دارای درب توری به مدت ۱ الی ۲ ساعت زیر جریان مستقیم شیر آب شستشو داده شده و پس از خشک نمودن با کاغذ صافی سترون به محیط کشت مورد نظر منتقل گردیدند. تشتک‌های پتری حامل نمونه‌ها در انکوباتور با دمای ۲۵±۱°C نگه‌داری گردیدند بررسی‌های لازم جهت مشاهده روئیده قارچ سه الی هفت روز به طور روزانه انجام شد (Kannwischer & Mitchell 1981).

در باغ (*In situ*) نیز پس از کنار زدن لایه‌های سطحی، با یک اسکالپل تمیز و ضدعفونی شده از حاشیهٔ منطقهٔ فعال آلوده قطعاتی به ابعاد حدود پنج میلی‌متر برداشته و مستقیماً روی محیط کشت نیمه انتخابی فوق الذکر منتقل شدند.

در باغی که درختان گیلاس آن به طور کامل سبز خشک شده بودند و جداسازی از اندام‌های مورد نظر میسر نبود، حدود سه نمونه از خاک اطراف هر درخت به همراه قطعاتی از ریشه‌ها جمع‌آوری و پس از مخلوط نمودن کامل آنها حدود ۰/۵ کیلوگرم از آن به ظرفی مناسب منتقل و سپس به گونه‌ای با آب مقطر غرقاب شد که حدود ۱cm آب سطح خاک را پوشانده بود در هر ظرف دو میوه (خیار، سیب یا گلابی) نارس اما سالم به عمق cm ۴-۳ و به صورت عمودی داخل این خاک قرار داده شد و در شرایط آزمایشگاه نگه‌داری گردید. پس از حدود پنج روز میوه‌ها از خاک خارج و پس از شستشوی سطحی، در دسیکاتور و در دمای حدود °C ۲±۲۲ قرار داده شدند. لکه‌های آبگز و یا قهوه‌ای در میوه‌هایی که مورد تهاجم گونه های فیتوفتورا قرار گرفته بودند، به سرعت توسعه یافته و در این زمان از قسمت میانی میوه و از مرز بافت سالم و آلوده قطعاتی جدا و روی محیط کشت PARPH+CMA منتقل گردیدند (Mircetich & Matheron 1976) .

به منظور خالص‌سازی جدایه‌ها از محیط آب آگار۲٪ (WA) و روش نوک ریسه استفاده شد و جهت نگه‌داری جدایه‌ها از توضیح داده شده توسط *ارشاد* (۱۹۹۲) بهره گرفته شد(Ershad 1992).

جهت تولید اسپورانژیوم از نوشته *شریف نبی و بنی‌هاشمی* (1997) استفاده گردید. برای بررسی میکروسکوپی اسپورانژیوم‌ها اسلایدهایی تهیه و سپس با استفاده از دستگاه آنالیز تصویری ابعاد ۵۰ اسپورانژیوم

اندازه‌گیری گردید. برای تولید اعضای جنسی از محیط کشت (۱) عصارهٔ ۵۰ گرم بذر شاهدانه در آگار و (۲) محیط کشت عصاره هویج و آگار استفاده گردید بدین صورت که از حاشیهٔ کلنی‌های فعال هر جدایه دیسک‌های میسلیومی برداشته و به تشتک‌های محتوی این محیط‌های کشت منتقل و سپس جهت تولید اُاُسپورهای جنسی به مدت یک الی دو هفته به مکان تاریک انتقال داده شدند. پس از این مدت با تهیهٔ اسلاید برای هر جدایه ابعاد ۵۰ اُاُگون، اُاُسپور و آنتریدی (در صورتی که تشکیل شده بودند) توسط دستگاه آنالیز تصویری اندازه‌گیری شد در صورت عدم تشکیل بار جنسی به روش ذکر شده، از روش کشت متقابل جدایه مورد بررسی با جدایه دیگری (از یک گونه شناخته شده یا ناشناخته) روی محیط کشت CMA نیز استفاده شد(Ershad 1992).

به منظور تعیین دماهای ویژه جدایه‌ها، ابتدا دیسک‌هایی از حاشیهٔ پرگنه‌های فعال به صورت وارونه در مرکز تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت CMA قرار داده شدند وپس از نگهداری به مدت ۱۲ الی ۲۴ ساعت در دمای آزمایشگاه و مشخص نمودن رشد حاصله به مدت سه روز درطیف دمایی ۲ تا ۳۶°C به فاصله۳°C و برای هر دما ۳ تکرار انجام ، و پس از این مدت متوسط رشد قطری یا شعاعی برای هر جدایه اندازه‌گیری گردید (Conn *et al*. 1991).

در آزمون بیماری‌زایی از سه روش مایه زنی طوقه نهال‌های یکساله، مایه زنی خاک اطراف منطقهٔ توسعهٔ ریشه و شاخه‌های بریده (Detached stem) استفاده شد.

در آزمون گلخانه‌ای برای مایه‌زنی از نهال‌های گیلاس با پایهٔ محلب *(Prunus mahaleb)* استفاده گردید. بدین منظور نهال‌های مورد نظر در گلدان‌هایی که خاک آنها دارای ترکیبی مساوی از خاک رس، ماسه و خاک برگ سترون بود، کشت گردیده و سپس نهال‌ها در گلخانه با دمای حدود ۲۵°C به مدت چندماه نگه‌داری شدند، هنگام مایه زنی مقدار کمی از خاک اطراف طوقه کنار زده شد و پس از ضدعفونی منطقهٔ طوقه با پنبهٔ آغشته به الکل، مقدار مناسبی از دیسک آگار محتوی مایهٔ آلوده کنندهٔ قارچ در زیر برش نازکی که در پوست این منطقه ایجاد شده بود قرار داده شده وسپس پوست را به حالت اولیه برگردانده و روی آن با پارافیلم پوشانده شد، در نهال‌های شاهد به جای مایه، تنها از دیسک آگار استفاده گردید (Erwin & Ribeiro 1996).

در مایه زنی خاک اطراف ریشه از روش *میرابوالفتحی*(۲۰۰۲) استفاده گردید. در مورد شاخه‌های بریده مطابق روش میرستیچ و ماسترون عمل گردید(Mircetich & Matheron 1983).

نتیجه و بحث

نشانه‌های بیماری در درختانی که عامل فیتوفتورا از آنها جداسازی شد از تنوع زیادی برخوردار بود این درختان اغلب در رشد بهاره ویا تابستانه ناکام بودند به طوری که برخی از آنها در ابتدای فصل بهار به محض بازشدن گلبرگ‌ها و یا در اوج شکوفه دهی، سبز خشک می‌شدند و در برخی دیگر اگر چه شروع به رشد می‌نمودند اما برگ‌ها کوچک، پراکنده و سبزرد بودند. در برخی از درختان اگر چه ظاهرا دارای برگ‌های طبیعی و با تراکم بالا بودند اما با نزدیک شدن به ماه‌های گرم، برگ‌ها به تدریج پژمرده، سست و افتاده شده و درمدت حد اکثر یک ماه سبز خشک می‌شدند در ضمن چنانچه این عوارض مقارن با زمان رسیدن میوه اتفاق می‌افتاد، کوچک و پیش‌رس بودن میوه‌ها را نیز به همراه خواهد داشت. در برخی دیگر از درختان، نشانه‌های رنگ پریدگی، ریزبرگی، سرخشکیدگی

و یا پراکنده بودن شاخ و برگ‌ها، خشک شدن نوک و یا اطراف برگ‌ها مشاهده گردید که در تعداد معدودی با بروز لکه‌هایی سبزرد روی برگ همراه بود و در نهایت برخی از این درختان پس از مدت کوتاهی به طور کامل خشک می‌شدند. با کنار زدن خاک اطراف طوقه و ریشه‌های این درختان، در نواحی آسیب دیده یک تغییر رنگ متمایل به قهوه‌ای روی پوست مشاهده شد که پس از ایجاد برش در آنها مشخص شد که بافت زیر پوست به رنگ قهوه‌ای یا قهوه‌ای متمایل به قرمز تغییرنموده است. این پوسیدگی‌ها به طور عمده منحصر به ناحیهٔ ریشه‌ها و در برخی ریشه و طوقه و در معدودی نیز منحصر به ناحیهٔ طوقهٔ درخت بود. در ناحیهٔ آسیب دیده یک حاشیهٔ مشخص بین بافت‌های زنده و مردهٔ پوست وجود داشت که با تغییر رنگ روشن و تیره کاملاً مشخص بود (شکل ۱).

نهال‌های مایه زنی شده در ابتدا حالت پژمردگی نشان داده و سپس به تدریج برگ‌ها از محور رگبرگ اصلی به سمت داخل پیچیده و پس از چند روز روی شاخه‌ها سبزخشک شدند. در تمامی نهال‌هایی که طوقهٔ آنها با قارچ مزبور مایه‌زنی شده بود پس از ۱۵ الی ۲۵ روز تراوش صمغ مشاهده گردید و در نهال‌های مایه‌زنی شده با گونهٔ *P. citrophthora* علائم مذکور تا ۱۰ سانتی‌متری بالای طوقه پیشرفت کرده بود. ولی در نهال‌هایی که آلودگی مصنوعی با مایه‌زنی خاک اطراف ریشه انجام شده بود علائم ضعف و پژمردگی پس از ۱۰ الی ۱۵ روز ظاهر و نهال‌ها به سرعت دچار زوال شدند. در این آزمایش ریشه‌های فرعی و اصلی به طور کامل پوسیده شده ولی هیچ‌گونه علائم صمغ زدگی در ناحیهٔ طوقه دیده نشد.

دوازده جدایه از نقاط مختلف استان تهران جمع‌آوری گردید که بر اساس ویژگی‌های مشاهده شده به چهارگروه به شرح زیر تقسیم شدند:

۱- جدایه‌های گروه اول: پنج جدایه به این گروه تعلق داشت که از منطقه لواسانات، سولقان و کرج(چندار) و از قسمت ریشه یا طوقه درختان به دست آمده بودند. پرگنه در محیط کشت آگاردار دارای رشد سریع بوده و شکل آن روی محیط کشت PDA به صورت صاف یا کمی کرکدار بود. در محیط کشت جامد و مایع هیچ‌گونه آماس ریسه (Hyphal swelling) مشاهده نگردید اما در این دو محیط پس از مدت کوتاهی تولید اسپورانژیوم نمودند که در محیط مایع اسپورانژیوم‌های تولیدی فراوانتر و تشکیل آنها سریع‌تر (پس از ۲۴-۱۲ ساعت) بود. اسپورانژیوم‌ها دارای اشکال منظم بیضوی، تخم مرغی یا گلابی وارونه با پاپیل بزرگ و واضح (بیش از ۴ میکرومتر قطر) بوده که روی اسپورانژیوفورهای سیمپودیال استقرار یافته بودند. ابعاد اسپورانژ ۴۴-۱۹×۵۷/۵-۲۵ میکرومتر با نسبت طول به عرض ۱/۳، اسپورانژیوم‌ها ریزان، دارای دنباله (Pedicel) با طول متوسط ۴ میکرومتر. این جدایه‌ها هموتال بوده به طوری که در محیط کشت CMA با تأخیر، ولی در محیط کشت حاوی عصارهٔ شاهدانه در مدت زمان کوتاهی و پس از ۳ الی ۵ روز تولید اُاُسپورهایی plerotic با آنتریدیوم paragynous و به ندرت amphigynous نمودند.

ابعاد اُاُگونیوم‌های تولیدی بین ۳۰/۳۴-۲۸/۷۱ میکرومتر، اُاُسپور ۲۶/۳۸-۲۴/۸۲ میکرومتر و آنتریدی ۱۳×۱۰/۴۲ میکرومتر محاسبه گردید. دمای بهینه برای این جدایه‌ها ۲۴°C بود و دماهای کمینه ۵ و بیشینه حدود ۳۳°C بودند ولی در دماهای ۲ و ۳۶°C رشدی نداشتند. اعضای این گروه با استفاده از کلیدهای شناسایی معتبر (Stamps *et al*.1990 , Ershad 1992) تحت نام *Phytophthora cactorum* (Lebert & Cohn) Schroeter تشخیص داده شدند. این

شکل ۱. علائم پوسیدگی طوقه روی پایه درخت گیلاس

Fig .1. Symptom of crown rot on a Cherry tree

جدایه‌ها با توجه به پاراژن بودن آنتریدیوم و پاپیل دار بودن اسپورانژیوم در گروه I جدول *استامپز و همکاران* (۱۹۹۰) قرار می‌گیرد. ریزان بودن اسپورانژیوم‌ها و دماهای ویژه آنها را از دیگر گونه‌های این گروه مجزا می سازد.

۲- جدایه‌های گروه دوم: سه جدایه از این گروه از نواحی کن، سولقان از ریشه و طوقه و خاک به دست آمدند. پرگنه آنها در محیط کشت PDA کرکدار با ریسه‌های هوایی به شکل گلسرخی یا گلبرگی ریسه‌ها به شکل رشته‌ای صاف تا کمی زبر و خشن که در محیط جامد و مایع آماس ریسه تولید نکردند. اسپورانژیوم‌ها دارای پاپیل مشخص با حداقل قطر ۳ میکرومتر، به اشکال متنوع تخم مرغی، گلابی وارونه، بیضوی و گاهی کروی و یا نامنظم که در تعداد معدودی از آنها اسپورانژیوم‌های با دو پاپیل نیز مشاهده گردید.

اسپورانژیوفورها به صورت نامنظم انشعاب پیدا نموده و نسبت به ریسه‌ها ظریف تر بودند، در برخی از آنها نیز در محل انشعاب و یا در زیراسپورانژیوم برآمدگی کوچکی دیده شد. اسپورانژیوم‌ها غیرریزان بوده و در محیط کشت جامد و مایع تشکیل گردیدند، ولی در محیط مایع (۱۰ درصد عصارهٔ سترون خاک) تعداد آنها فراوان‌تر و سریع‌تر تشکیل گردید. ابعاد اسپورانژیوم‌های تولیدی بین ۴۸-۲۱×۷۷-۲۸میکرومتر با نسبت طول به عرض L/B = ۱/۳ بودند. در محیط کشت تک ریسه این جدایه و هم‌چنین در تلاقی آنها با یکدیگر هیچ‌گونه اندام جنسی تولید نشد. این جدایه‌ها در دمای ۲۴ الی ۲۷°C بیشترین رشد را داشته، کمینه دمایی ۵ و بیشینهٔ آن برای رشد هیف ۳۳°C بود اما در دماهای ۲ و ۳۶ °C فاقد هرگونه رشد میسلیومی بودند. جدایه‌های مورد بررسی بر اساس منابع فوق *Phytophthora citrophthora* (Smith & Smith)Leonian شناسایی گردیدند. ویژگی‌های ذکر شده در بالا این سه جدایه را در گروه II جدول *استامپز و همکاران* (۱۹۹۰) قرار می‌دهد. به دلیل عدم رشد در دمای ۳۵°C عدم تولید آماس

ریسه و غیر ریزان بودن اسپورانژیوم از گونه‌های نزدیک به آن تفکیک می‌شود.

۳ – جدایهٔ گروه سوم: از این گروه فقط یک جدایه از منطقه کرج (چندار) و از طوقه جدا گردید. پرگنه آن روی محیط کشت PDA کمی کرک دار و یکنواخت و شکل آن شعاعی، گلسرخی یا شعله‌ای بدون ساختار مشخص بود. آماس ریسه در محیط جامد مشاهده نگردید اما به مقدار بسیار زیادی در محیط مایع به اشکال کروی، زاویه‌دار یا نامنظم و به صورت‌های زنجیری (Chains) یا خوشه‌ای (Clusters) تشکیل گردید.اسپورانژیوم‌ها به اشکال تخم مرغی تا گلابی وارونه یا نامتقارن با پایهٔ گرد و در تعداد بسیار معدودی با پایه‌ای نسبتاً کشیده، بدون پاپیل و بندرت در برخی دارای رأسی نسبتاً ضخیم و پاپیل مانند و غیرریزان که پس از ۳ روز به مقدار بسیار فراوانی در محیط کشت مایع(عصارهٔخاک ۳۰ الی ۵۰ درصد غیر سترون) تشکیل گردیدند. اسپورانژیوفورها دارای انشعابات سیمپودیال و در تعداد اندکی از آنها افژولی (پرلیفراسیون) داخلی مشاهده گردید. ابعاد اسپورانژیوم‌ها ۳۹-۲۴×۶۵-۳۳ میکرومتر با نسبت طول به عرض ۱/۵ بوده که در مرکز اغلب آنها یک واکوئل درشت قابل مشاهده بود. این جدایه در دمای ۲۷°C-۲۴ بیشترین رشد را داشته و در دمای حداقل ۵ و حداکثر ۳۳°C نیز دارای رشد مختصری بودند اما در دمای ۳۶ °C هیچ‌گونه رشدی دیده نشد. از تلاقی این جدایه با جدایه‌های متعددی از گونه‌های *P. citrophthora* و *P. drechsleri* هیچ‌گونه اندام جنسی در محیط کشت‌های حاوی عصارهٔ شاهدانه و هویج تشکیل نگردید. براساس خصوصیات مورفولوژی و فیزیولوژی فوق و کلیدهای شناسایی *استامپز و همکاران* (۱۹۹۰) و *ارشاد* (۱۹۹۲) این تک جدایه *Phytophthora cryptogea* Pethybridge & Lafferty شناسایی گردید.

۴- جدایه‌های گروه چهارم: سه جدایه از این گروه از مناطق لواسانات و کرج (رزکان نو) از قسمت ریشه و طوقه به دست آمد. پرگنه آنها روی محیط کشت PDA دارای ریسه‌های فراوان و کرک مانند و به اشکال شعله‌ای یا گلسرخی یا بدون ساختار مشخص بودند. آماس ریسه در محیط کشت مایع به تعداد فراوان و به صورت زنجیری و گاهاً خوشه‌ای و به اشکال کروی یا منظم تشکیل گردیدند. اسپورانژیوم‌ها به اشکال تخم مرغی یا گلابی وارونه، بدون پاپیل و غیرریزان ، اسپورانژیوفورها طویل و غیرمنشعب و دارای افژولی (پرلیفراسیون) داخلی، و خارجی در محیط مایع بودند. اسپورانژیوم‌ها دارای ابعادی نسبتاً متغیر(۵۵µm-۱۸/۳۶×۷۶-۲۸) بوده، نسبت طول به عرض آنها ۱/۴ محاسبه گردید. دمای بهینهٔ جدایه‌های این گروه ۲۷°C بود و در دماهای حداقل ۵ وحداکثر۳۶°C نیزدارای رشد اندکی بودند اما در دماهای ۲ و ۳۹°C هیچ‌گونه رشد میسلیومی مشاهده نگردید. در کشت‌های تک ریسه این جدایه ها و هم‌چنین در تلاقی آنها با یکدیگر در دو محیط حاوی عصارهٔ شاهدانه و هویج و در شرایط تاریکی و دمای ۲۰°C-۱۵ و پس از ۳۰ روز هیچ‌گونه اندام جنسی مشاهده نگردید. براساس خصوصیات مورفولوژی و فیزیولوژی فوق و کلیدهای شناساسایی *استامپز و همکاران*(۱۹۹۰) و *ارشاد* (۱۹۹۲) این جدایه‌ها *Phytophthora drechsleri* Tucker تشخیص داده شدند. اگر چه *P. drechsleri* و *P. melonis* از نظر ریخت شناسی بسیار با هم شبیه بوده و ممکن است با یکدیگر اشتباه شوند اما برخی شاخص‌های ذکر شده در این دو گونه با یکدیگر تفاوت دارند *کاسورو* (Katsuro 1976) کمینه دمایی رشد میسلیوم‌های *P. melonis* را ۹°C ذکر نموده است در حالی که این شاخص در *P. drechsleri* بین ۲/۵ الی۵°C می‌باشد وی

هم‌چنین اسپورانژیوم‌های *P. melonis* را نیمه پاپیل (semipapillate) توصیف نموده و اظهار نموده که فاقد آماس ریسه می‌باشند در حالی که اسپورانژیوم‌های گونه‌های شناسایی شده به عنوان *P. drechsleri* بدون پاپیل بودند و در محیط مایع آماس ریسه فراوانی تشکیل داده بودند.

اگرچه درختان در سنین مختلف به بیماری پوسیدگی فیتوفتورایی طوقه و ریشه مبتلا شده بودند. ولی شدت و درصد خسارت بیماری در درختان ۳ الی ۱۰ سال بیشتر بود. میزان خسارت حاصل از حمله ۴ گونه فیتوفتورا متفاوت بود به طوری که بیشترین خسارت مربوط به درختان مبتلا به گونهٔ *P. cactorum* بوده هم‌چنین فراوانی این گونه در بین جدایه‌های مورد بررسی نیز از سایرگونه‌ها بیشتر بود به طوری که باعث سبز خشکی بسیاری از درختان با سنین بالای ۲۰ الی ۳۰ سال نیز شده بود. شایان ذکر است که در درختان مسن (حدود ۳۰ سال) خسارت این گونه فقط محدود به منطقه ریشه‌های اصلی و فرعی بود در حالی که در درختان جوان این آلودگی روی طوقه نیز وجود داشت. در آزمون بیماری‌زایی با استفاده از شاخه‌های بریده، پس از ۱۰ روز میانگین سطوح آلوده شده توسط گونه *P. cryptogea*، ۳/۸۷ cm^2 از همه گونه‌های مایه‌زنی شده بیشتر بود. اما در آزمون مایه‌زنی خاک اطراف منطقهٔ ریشه *P. citrophthora* سریع‌تر از سه گونهٔ دیگر علائم نشان داده و میزبان خود را از پای درآورد. در مورد بیماری‌زایی، علائم ایجاد شده روی درختان گیلاس آلوده به فیتوفتورا با علائمی که توسط *میرستیچ و همکاران* (Mircetich *et al.* 1974) برای درختان گیلاس گزارش نموده بودند کاملاً مطابقت داشت.

زوال برخی درختان گیلاس در منطقهٔ لواسانات بر اثر پوسیدگی ریشه و طوقه در زمان ظهور شکوفه‌های گل، توسط *P. drechsleri* که دارای دمای بهینهٔ رشد ۲۵ الی ۳۰°C می‌باشد، مؤید این است که برخی از گونه‌های این جنس (فیتوفتورا) در دمای حداقل نیز دارای فعالیت بوده و می‌توانند بسرعت بافت‌های موردنظر را اشغال نموده و میزبان را از پای درآورند. فعالیت و پیشرفت سریع این گونه با نظر *کلیزیویچ* (Klisiewicz 1977) که اظهار نموده بود: پوسیدگی‌های ریشه توسط گونه‌های هتروتالیک خیلی سریع‌تر از گونه‌های هموتالیک پیشرفت می‌کنند، تطابق دارد.

بامبیرز (Bumbieris 1974) مورفولوژی و فیزیولوژی این دو گونه را مطالعه نموده و اظهار می‌نماید که این دو گونه یکسان بوده و به دلیل مقدم بودن *P. cryptogea* در شناسایی، هر دو گونه باید به این نام، نامیده شوند. اما مقایسه نقوش پروتئینی آنها نشان داده است که این دو گونه از یکدیگر کاملاً متمایز می‌باشند (Cocciola & Magnani 1990). *میلز و همکاران* (Mills *et al.* 1991) نقوش آیزوزایمی و mtDNA RFLP مربوط به ۱۲۳ جدایه از این دو گونه را که از میزبان‌های مختلف جدا شده بود، بررسی نمودند و نتیجه گرفتند که نه تنها مجاز به یکی شمردن این دو گونه نمی‌باشند، بلکه داده‌های حاصل حاکی از آن است که حداقل ۷ گروه ژنتیکی مجزا در داخل این دو گونه وجود دارد و در تعدادی از این گروه‌های ژنتیکی، به قدری اختلاف در نقشه‌های mtDNA زیاد است که می‌توان آنها را به صورت گونه‌های جداگانه‌ای پذیرفته و مورد بررسی قرار داد.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (23-21) متن انگلیسی مراجعه شود.

Iran. J. Plant Path., Vol. 46, No. 1, 2010: 21-23

Short article

IDENTIFICATION OF *Phytophthora* SPECIES THE CAUSING ROOT AND CROWN ROT OF CHERRY TREES IN TEHRAN PROVINCE*

M. SADJADI NEZHAD[1], D. ERSHAD[2], M. MIRABOLFATHI[2] and H. ZAMANIZADEH[1]**

(Received : 31. 1. 2009 ; Accepted : 24. 2. 2010)

Abstract

Phytophthora species cause root and crown rot of wide host range of herbal and woody plants making heavy loss. The loss in woody trees are more important than other agricultural crops. In this study *Phytophthora* species,causing root and crown rot of stone fruit trees throughout Tehran province were identified and the distribution of the diseases was determined. Based on the decline and wilting symptoms of cherry trees,the discolored tissues of the collar region of infected trees were removed, and after surface disinfection the tissues were plated on semi selection medium (PARPH), and *Phytophthora* species were isolated. Features and cardinal temperatures ,the following species were identified. *P. cactorum* (from Karadj, Lavasan and Soulaghan), *P. citrophthora* (from Kan and Soulaghan), *P. drechsleri* (from Shemiran and Karadj), *P.cryptogea* (from Karadj). The most frequency and the least one were related to *P. cactorum* and *P. cryptogea* respectively. The pathogencity of isolates were proved on detached stem and collar region of Mahaleb cherry seedlings.This is the first report of *P. cactorum*, *P. drechsleri* and *P. cryptogea* on cherry trees.

Keywords: Cherry trees, Tehran province, Decline, *Phytophthora cactorum*, *P. cryptogea*, *P. citrophthora*, *P. drechsleri*

See persian text for figures and tables (Pages ۸۱-۸۸).

*: A Part of MSc. Thesis of the First Author, Submitted to Islamic Azad University, Branch of Science and Research, Tehran, Iran.

**: Corresponding Author, Email: sadjady72@yahoo.com

1. Former MSc. Student and Assis. Prof. of Plant Pathology, Respectively, Islamic Azad University, Branch of Science and Research, Tehran, Iran.

2. Scietific Members of Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, Iran.

References

AFZALI, H. and KHABBAZ JOFAII, H. 2004. *Phytophthora iranica* a new causal agent of almond trees death in Tehran province.**Proc. 16th Iran. Plant. Prot. Cong**., Tabriz, Iran, p. 397.

ALIZADEH, A. and AGHARAFEE, S. 1998. The causes of stone fruit trees decline in Tehran province. **Proc. 13th Iran. Plant Prot. Cong**., Karaj, Iran, p. 232.

BANIHASHEMI, Z. 1986. Photobiology of oospores of *Phytophthora iranica* and its comparison with *P.citricola* and *P. cactorum.* **Proc. 8th Iran. Plant Prot. Cong**., Esfahan, Iran, p. 83.

BANIHASHEMI, Z. 1991. Root and crown rot of walnut in Fars province. **Proc. 10th Iran. Plant Prot. Cong**., Kerman, Iranm p. 114.

BANIHASHEMI, Z. 1995. Role of *Phytophthora cactorum* on decline of fruit and nut trees in Fars province. **Proc. 12th Iran. Plant Prot. Cong.,** Karaj, Iran, p. 224.

BEHROUZIN. M. and ERSHAD. D. 1989. Isolation of *Phytophthora citricola* from almond trees in East azarbaijan. **Proc. 9th Iran. Plant Prot. Cong**., Mashhad, Iran, p. 96.

BUMBIERIS, M. 1974. Characteristics of two *Phytophthora* species. **Aust. J. Bot.** 22:655-660.

CACCIALO, S. and Magnano, P. 1990. Electrophoredic study of three relatd *Phytophthora* species. **Eurp. Medit. Plant Prot. Org. Bull** 20: 47-58.

CONN, K., GULBER, W. and MIRCETICH, S. 1991. Pathogencity and relative virulence of nine *Phytophthora* Spp. from Kiwifruit. **Phytopathology** 81:974-979.

ERSHAD, D. 1992. ***Phytophthora* species in Iran (Isolation, Purification, Identification).** Agriculture Research Organization. 215pp.

ERSHAD, D. 1997. **Fungi of Iran**. Plant pest and diseases research institute. publication no 10.

ERWIN, D, C. and RIBEIRO, K. 1996. ***Phytophthora* diseases world wide.** University of California. 562 p.

KANNIWISCHER, M. and MITCHELL, D. 1981. Relationships of numbers of spores of *P. parasitica* to infection and mortality of tobacco. **Phytophathology** 71: 69-73.

KATSURA, K. 1976. Two new species of *Phytophthora* causing damping off of cucamber and trunk rot of chestnut. **Trans. Mycol. Soc. Japan(English Summary).** 17:238-242.

KLISIEWICS, J. 1977. Identity and relative virulence of some heterothallic *Phytophthora* species associated with root and stem rot of safflower. **Phtopathyology** 67: 1174-1177.

MC INTOSH, D. 1953. A trunk and crown rot of sweet cherry in British columbia. **Phytopathology** 43: 402-403.

MILLS, S., FORESTER, H. and COFFEY, M. 1991. Taxonomic structure of *P. cryptogea* and *P. drechsleri* based on isozyme and mitochondria DNA analysis. **Mycol. Res.** 95.

MIRABOLFATHI. M. 2002. Root, stem, bulb and rhizome like tuber rot of seweral ornamental plants caused by *Phytophthora nicotiana* in Iran. **Iran. J. Plant Pathol.** 38. (In Farsi With English Summary).

MIRCETICH, S., and MATHERON, M., SCHREADER, W. 1974. Sweat cherry root rot and trunk canker caused by *Phytiphthora* Spp. (Abstr). Proc. **Amer. Phytopathol. Soc.** 1:58.

MIRCETICH, S. and MATHERON, M. 1976. *Phytophthora* root and crown rot of cherry trees**. Phytopathology** 66: 549-558.

MIRCETICH, S. and MATHERON, M. 1983. *Phytophthora* root and crown rot of walnut trees. **Phytopathology** 73:1481-1488.

SHARIF NABI, B. and BANIHASHEMI, Z. 1997. Study of *Phytophthora* root and crown rot of sainfoin in Iran. **Iran. J. Plant Pathol.** 33:58-63. (In Farsi With English Summary).

STAMPS, J., WATERHOUSE, G., NEWHOOK, F. and HALL, G. 1990. **Revised tabular key to the species of *Phytophthora***. (Cited by Erwin & Ribeiro .1996).

TSAO, P. 1990. Why many *Phtophthora* root rots and crown rots of tree and Horticultures crops remin undetected. **EPPO. BULL** 20: 11-17

WILCOX, W. and ELLIS, M. 1989. *Phytophthora* root and crown rots of peach trees in the eastern great lakes region. **Plant Dis.** 73: 797-798.

WILCOX, W. and MIRCETICH, S. 1985. Pathogenicity and relative virulence of seven *Phtophthora* spp. on Mahaleb and Mazzard cherry. **Phytopathology** 75: 221-226.

WILCOX, W. and MIRCETICH. S. 1985. Influence of soil water matric potential on the development of *Phytophthora* root and crown rots of Mahaleb cherry. **Phytophthology** 75: 648-653.

WILCOX. W. and MIRCETICH, S. 1987. Lack of host specificity among isolation of *Phtophthora megasperma*. **Phytopathology** 77: 1132-1137.

ZAKII, Z. and ERSHAD, D. 1994. Isolation of *Phytophthora cactorum* from cherry trees in Karaj. **Iran. J. Plant Pathol.** 30: 78 (In Farsi With English Summary).