رستنیها، جلد ۱۰(۲)، ۱۳۸۸

# مطالعه دو گونه *Ophiostoma* مرتبط با بیماری هلندی نارون در ایران*

Study on two species of *Ophiostoma* in relation with Dutch elm disease in Iran

**کامران رهنما و میرمعصوم عراقی****
دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

دریافت: ۱۳۸۷/۴/۹ پذیرش: ۱۳۸۸/۷/۱

**چکیده**

به منظور بررسی گونه‌های عامل بیماری هلندی نارون، مطالعه‌ای بین سالهای ۸۷-۱۳۸۶ در برخی از مناطق استان گلستان نظیر پارک جنگلی دلند، لوه، سوسرا، توسکستان، جنگل‌های گیلان شامل سیاهکل و اسالم، ارسباران و همچنین مناطق فضای سبز شهری انجام شد. در این بررسی، براساس برخی خصوصیات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و مولکولی و مقایسه با جدایه‌های تایید شده از سایر مناطق دنیا، دو گونه *Ophiostoma ulmi* و *O. novo-ulmi* به عنوان عامل بیماری هلندی نارون شناسایی شدند که بیشترین جدایه‌ها مربوط به گونه *O. novo-ulmi* بودند. در این نوشته، توصیف و تفاوت‌های جدایه‌های دو گونه تشریح شد و *O. novo-ulmi* برای اولین بار در ایران از درختان *Ulmus glabra* و *U. carpinifolia* از توسکستان و فضای سبز شهر تهران گزارش می‌شود. جدایه‌های *O. novo-ulmi* براساس روش فیلوژنی متعلق به جمعیت‌های اروپا- آسیایی بودند.

**واژه‌های کلیدی:** فیلوژنی، بیماری هلندی نارون، گیلان، گلستان، *Ophiostoma*

---

* بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده دوم به راهنمایی آقای دکتر کامران رهنما ارایه شده به دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان و بخشی از طرح ملی بیماری مرگ نارون در ایران، مجری: نگارنده اول

** مسئول مکاتبه (E-mail: iraqi602@yahoo.com)

**مقدمه**

قارچ‌های Ophiostomatoid از نظر قارچ‌شناسی و بیماری‌های درختان جنگلی حایز اهمیت زیادی هستند، به طوری که با ایجاد تغییر در کیفیت چوب باعث زیان اقتصادی می‌گردند (*رهنما* ۲۰۰۴a). برخی از گونه‌های این قارچ‌ها مانند *Ophiostoma clavigerum*، *O. piceae* و *O. ips* همانند برخی از گونه‌های *Ceratocystis* سبب تغییر رنگ در چوب درختان کاج و نراد شده و باعث کاهش کیفیت چوب می‌شوند. این گروه از قارچ‌ها به نام sapstain معروف شده‌اند که اغلب در ناحیه آوند آبکش فعالیت دارند و به واسطه وجود رنگدانه در میسلیوم این قارچ‌ها، سطح چوب در محل فعالیت آن‌ها به رنگ آبی تغییر می‌یابد (Harrington & Wingfield 1998, Wingfield *et al*. 1993, 2001). تاکنون در ژنوم هسته *Ophiostoma* بین ۱۰۰۰۰-۸۰۰۰ ژن شناسایی شده است (Hoffman & Breuill 2002) به طوری که این قبیل بررسی‌ها و آنالیز ژن باعث شده است تا در سالهای اخیر، گونه *O. novo-ulmi* به دو زیرگونه *O. novo-ulmi* ssp. *novo-ulmi* و *O. novo-ulmi* ssp. *americana* تمایز یابد (Rahnama 2004a, Brasier & Kirk 2001).

برخی گونه‌ها نیز می‌توانند درختان پهن برگ نظیر نارون و بلوط را مورد تهاجم قرار دهند. از این گونه‌ها می‌توان به دو گونه *O. ulmi* و *O. novo-ulmi* روی نارون و *O. quercus* روی بلوط اشاره کرد که از نظر میزان بیماریزایی و خسارت در سطح جنگل‌های آسیا، اروپا و آمریکا قابل توجه‌اند (Brasier 2001).

بیماری هلندی نارون یکی از مهمترین و مخربترین بیماری‌های آوندی گیاهی در دنیا است (Stipes & Campana 1981). منشأ اولیه بیماری به طور دقیق مشخص نیست اما *بریزر* (Brasier 1990) معتقد است که این بیماری از چین منشأ گرفته و سپس طی جنگ جهانی اول به اروپا و آمریکای شمالی راه پیدا کرده است. چنانچه اخیرا گونه دیگری از این عامل بیماری با نام *O. himal-ulmi* Brasier & Mehrotra از منطقه هیمالیا از درختان نارون جداسازی شده است (Brasier & Mehrotra 1995). اولین گزارش از مشاهده بیماری در سال ۱۹۱۸ از پیکاردی (Picardy) در فرانسه بود که به دنبال آن از کشورهای هلند و بلژیک نیز در همان سال گزارش شد (Stipes & Campana 1981)، اما بیماری برای نخستین بار توسط یک گیاه‌شناس هلندی به نام دینا اسپیرنبورگ (Dina Spirenburg) در سال ۱۹۱۹ شرح داده شد (Stipes & Campana 1981).

تاریخچه پیدایش بیماری در ایران به درستی معلوم نیست، اما براساس منابع معتبر قدیمی بیماری اولین بار در سال ۱۳۳۸ از جنگل‌های گلستان و در ارتفاعات پایین کرنکفتر و کندسکوی روی درختان اوجا و ملج مشاهده شد و در بقیه نواحی گسترش یافت (Afsharpour & Adeli 1974). این بیماری تاکنون باعث میلیون‌ها دلار خسارت اقتصادی در

اروپا و آمریکای شمالی شده است. در ایران میزان دقیقی از خسارت این بیماری برآورد نشده است ولی براساس مسیریابی‌های به عمل آمده در کشور تا به حال حدود یک میلیون اصله درخت نارون اوجا و ملج طی چهل سال گذشته بر اثر این بیماری از بین رفته‌اند. طبق آمار سالهای ۵۱-۱۳۵۰ و ارزش اقتصادی بسیار بالایی که چوب و الوار درختان مزبور دارند، حدود چهار درصد حجم تجارتی جنگل‌های شمال را درختانی از گونه‌های ملج و اوجا تشکیل می‌دادند که امروزه دو گونه فوق به دلیل گسترش بیماری و زوال، حدود کمتر از یک درصد از این حجم تجارتی را به خود اختصاص داده‌اند (Rahnama 2003, 2004b, Rahnama *et al.* 2002, Rahnama & Taheri 2004).

این قارچ برای اولین بار در سال ۱۹۱۹ توسط *شوارتز* (Schwarz) جداسازی و شناسایی شد و به دلیل داشتن ساختمان رویشی سینما (synnema) یا کورمیوم (coremium) به نام *Graphium ulmi* Schwarz نامگذاری گردید (Stipes & Campana 1981) و نهایتا در سال ۱۹۷۳ توسط *کرین* و *شوکنخت* (Crane & Schoknecht 1973) تحت نام *Pesotum ulmi* Crane & Schoknecht تغییر نام داده شد. مرحله کامل قارچ عامل بیماری برای اولین بار در سال ۱۹۳۲ توسط *بویسمن* (Buisman 1932) به نام *Ceratostomella ulmi* Buis. نامیده شد. در سال ۱۹۳۴ *نانفلدت* آن را به نام *Ophiostoma ulmi* (Buis.) Nannf. تغییر داد (Melin & Nannfeldt 1934)، ولی در سال ۱۹۵۲ توسط *مورئو* (Moreau 1952) به *Ceratocystis ulmi* (Buis.) Moreau تغییر یافت. عنوان مذکور توسط *هانت* (Hunt 1956) در رساله کامل خود که مربوط به ژن‌های جنس *Ceratocystis* Ellis & Halst بود مورد تایید قرار گرفت و از آن زمان به بعد به طور گسترده‌ای مورد استفاده محققان قرار گرفت. با این وجود *دهوخ* (De Hoog 1974) نشان داد که گونه‌هایی که قبلا با عنوان *Ophiostoma* شناخته شده بودند، از برخی جنبه‌های مهم همچون تشکیل شکل غیرجنسی با گونه‌هایی که *هانت* (۱۹۵۶) در نظر گرفته بود تفاوت دارند و نهایتا *هرینگتون* (Harrington 1981) توانست با اضافه نمودن آنتی‌بیوتیک سیکلوهگزیمید به محیط کشت قارچ، دو جنس *Ophiostoma* و *Ceratocystis* را از هم جدا کند. همچنین مطالعات مولکولی انجام شده روی گونه‌های *Ceratocystis* و *Ophiostoma* نشان داد که تفاوت مولکولی بارزی بین این گونه‌ها وجود دارد (Hoffman & Breuil 2002). امروزه جنس *Ophiostoma* با دارا بودن ویژگی‌هایی نظیر شکل غیرجنسی هلوبلاستیکی و غیرفیالیدی، غیرحساس به آنتی بیوتیک سیکلوهگزیمید، وجود سلولز و رامنوز در دیواره سلولی، آزاد شدن فعال آسکوسپور و برخی دیگر از خصوصیات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و مولکولی از جنس *Ceratocystis* متمایز شده است (Alexopoulos *et al*. 1996, Wingfield *et al*. 1993, Iraqi & Rahnama 2007, Iraqi *et al*. 2007).

به طور کلی، این قارچ دارای ریسه‌های هاپلوییید و هتروتال بوده و دارای دو نوع ریسه آمیزشی (mating type) به نام‌های A و B می‌باشد. نسبت فراوانی ریسه‌های آمیزشی در طبیعت نیز در بین گونه‌ها و زیرگونه‌ها متفاوت می‌باشد (Brasier 2001). همچنین قارچ عامل بیماری عمدتا چهار نوع هاگ تولید می‌کند که عبارتند از:

۱- فرم اسپوروتریکس (*Sporothrix*) که به علت شباهت زیاد طرز قرار گرفتن این‌هاگ‌ها روی ریسه به جنس *Cephalosporium* تا مدت‌ها به این مرحله، سفالوسپوریوم گفته می‌شد و از روی نارون‌های منطقه کرج نیز با این نام گزارش شده است (*ذاکری* ۱۹۸۹)، اما دهوخ (۱۹۷۴) آن را به *Sporothrix* تغییر نام داد (Sinclair & Campana 1987). نهایتا وجود ریسه‌های باریک و دندانه‌دار برای آنامورف *Sporothrix* در نظر گرفته شد (Benade *et al.* 1997). *هینتز* (Hintz 1999) با تعیین توالی ژن سنتز کیتین ارتباط بسیار نزدیک قارچ *Ophiostoma novo-ulmi* با پاتوژن انسانی *Sporothrix schenckii* را بیش از پیش تایید کرد. در ایران اولین گزارش رسمی از فرم غیرجنسی *Sporothrix* در سال ۱۳۷۹ بوده است (Rahnama *et al*. 2000).

۲- فرم سینمادار قارچ به نام *Pesotum ulmi* نامیده می‌شود و عمدتا در محیط غذایی با درصد کربن بالا نظیر چوب و پوست درختان نارون یا محیط کشت‌های حاوی عصاره چوب و پوست به وفور تولید می شود (Sharbatkhari *et al*. 2007).

۳- فرم مخمر مانند (yeast-like): این فرم هاگی قارچ عامل بیماری در هر مرحله‌ای از زندگی رویشی و زایشی و در ابعاد مختلف دیده می‌شود و از ایران نیز گزارش شده است (Iraqi 2007, Rahnama *et al*. 2000).

۴- مرحله پریتسیوم که شکل جنسی قارچ را تشکیل می‌دهد و در واقع مهمترین فرم هاگی آن از نظر تاکسونومی به شمار می‌رود و یکی از شاخص‌های مهم در تفکیک گونه‌ها و زیرگونه‌های این عامل بیماری محسوب شده که در انگلستان مورد مطالعه قرار گرفته است (Brasier & Kirk 2001)، اما تاکنون مطالعه‌ای روی چگونگی تشکیل فرم جنسی و مقایسه اندازه‌های آن‌ها با یکدیگر در ایران در این دو گونه *O. ulmi* و *O. novo-ulmi* انجام نشده است.

اگرچه نخستین گزارش رسمی از عامل بیماری در ایران نیز در سال ۱۳۵۰ توسط *ابراهیمی* و *مک ناب* از روی درختان اوجا و از جنگل‌های آستارا صورت گرفت (Ershad 1995, Ebrahimi & Mc Nab 1972)، اما در این بررسی فقط اشاره به تولید کورمیوم روی ساقه‌های زنده گیاهان شده است. با این وجود قارچ عامل بیماری در اغلب منابع داخلی با عنوان *Ceratocystis ulmi* نام برده می‌شود و علیرغم شیوع اپیدمی‌های شدید از این عامل بیماری در سالهای اخیر در مناطق جنگلی و نیز فضای سبز شهری در سطح کشور اطلاعات دقیق و جامعی از عامل یا عوامل قارچی ایجاد کننده این بیماری و مشخصات

قارچ‌شناسی آن‌ها وجود ندارد. به طوری که در برخی از تحقیقات انجام شده در استان خراسان عامل بیماری با نام *Ceratocystis ulmi* جداسازی و شناسایی گردیده است (Hajian & Kashki 1999) و در بررسی‌های بعدی نیز از گونه *O. ulmi* یاد شده است اما خصوصیات کامل قارچ عامل بیماری توصیف نگردید (Rahjo *et al*. 1999).

بنابراین، تحقیق حاضر با هدف شناسایی دقیق گونه یا گونه‌های عامل بیماری در کشور انجام شده و در این راستا خصوصیات تاکسونومیکی، شامل مورفولوژی، فیزیولوژی و مولکولی جدایه‌های عامل بیماری در ایران مورد بررسی قرار گرفته است. امید است که نتایج این تحقیق در آینده در شناسایی و تفکیک و یا شناسایی گونه‌های دیگری از عامل بیماری در دیگر مناطق کشور نیز مثمر ثمر باشد.

**روش بررسی**

طی بازدیدهای مختلف از برخی مناطق جنگلی استان گلستان نظیر پارک جنگلی دلند، توسکستان، منطقه جنگلی اسالم و سیاهکل در استان گیلان موارد بسیاری از درختان نارون مشاهده شد که در بخشی از شاخ و برگ خود یا در تمام قسمت‌های آن نشانه‌های بیماری و پژمردگی را نشان می‌دادند. نمونه‌برداری با مشاهده علایم داخلی شامل خطوط قهوه‌ای حاصل از نکروز آوندی در زیر پوست انجام شد (که معمولا با آثار تغذیه و فعالیت سوسک‌های پوستخوار ناقل بیماری همراه بود). نمونه‌ها پس از ثبت مشخصات نمونه‌برداری از قبیل اطلاعات مربوط به محل نمونه‌برداری، گونه میزبان، تاریخ نمونه‌برداری و سایر مشخصات لازم جهت انجام آزمون‌های جداسازی و شناسایی به آزمایشگاه منتقل و در محل خنک نگهداری شدند. برای جداسازی عامل بیماری از محیط کشت Water Agar ۱/۷٪ و Malt Extract Agar ۲٪ استفاده شد (Brasier 1981). برای این منظور، قطعات ۲/۵- ۰/۵ سانتی‌متری از نمونه‌های آلوده پس از ضدعفونی سطحی با محلول الکل اتیلیک ۷۰٪ و عبور از روی شعله با استفاده از یک چاقوی استریل پوست آن‌ها از چوب جدا و به صورت حلقه‌هایی به قطر ۴-۲ میلی‌متری برش داده شد و پس از انتقال روی محیط کشت‌های مزبور در انکوباتور در دمای ۲۵-۲۰ درجه سلسیوس و در تاریکی نگهداری گردید. در صورت مشاهده ریسه‌های قارچی، پرگنه‌های آن به ظروف حاوی محیط کشت MEA ۲٪ منتقل گردید. برای خالص‌سازی نیز از روش تک اسپور کردن (هاگ اسپوروتریکس) استفاده شد. جدایه‌های تایید شده موجود در کلکسیون قارچ‌شناسی گروه گیاهپزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان که قبلا براساس روش‌های مولکولی (ژن $\beta$–tubulin) گونه آن‌ها تشخیص داده شده بود (Rahnama *et al.* 2005) نیز پس از کشت مجدد (subculture) روی محیط کشت Potato Dextrose Agar و MEA ۲٪ در شناسایی و تفکیک گونه‌های عامل بیماری مورد

بررسی قرار گرفتند. برای این منظور، اندازه‌گیری ابعاد ریسه‌ها وهاگ‌های مختلف مراحل غیرجنسی و جنسی جدایه‌های مزبور صورت گرفت. نهایتا برای شناسایی جدایه‌های فوق‌الذکر از برخی خصوصیات مورفولوژیکی نظیر نوع پرگنه روی محیط کشت MEA و بررسی مشخصات اندام جنسی و نوع تیپ آمیزشی روی محیط کشت MEA ۲٪ حاوی ۱۰۰ تا ۲۰۰ گرم پودر چوب نارون (Brasier 1981) و برخی خصوصیات فیزیولوژیکی نظیر اندازه‌گیری سرعت رشد شعاعی روزانه، تعیین دمای بهینه رشد روی محیط کشت MEA ۲٪، اندازه‌گیری وزن خشک توده قارچ در محیط مایع Potato Dextrose Broth و نیز تعیین میزان شدت بیماریزایی روی نهال‌های نارون چینی، استفاده شد. روش مایه‌زنی نهال‌ها در گلخانه به روش تزریق سوسپانسیون هاگ قارچ و با ایجاد برش عرضی کوچک به وسیله چاقوی جراحی تیز و استریل روی ساقه اصلی و قرار دادن مقدار ۰/۵میلی‌لیتر از سوسپانسیون هاگ (با غلظت $۱۰^{۶}$ × ۵ هاگ/ میلی‌لیتر) با استفاده از یک سرنگ روی لبه چاقو و هدایت آن به سمت بافت آوندی نهال صورت گرفت (Iraqi & Rahnama 2007). شدت بیماری با تعیین درصد برگ‌های پژمرده و ریزش کرده (Smalley & Guries 1993) پس از گذشت ۱۰ هفته محاسبه شد. تمامی آزمایش‌ها در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شدند.

برای تعیین تیپ جنسی و تولید مرحله جنسی قارچ عامل بیماری از ۵ جدایه مربوط به فضای سبز شهرهای ایران به نام‌های Ir-Out-1، Ir-Out-2، Ir-Out-3، Ir-Out-4 و Ir-Out-5 (جداسازی شده از مناطق فضای سبز شهری (Rahnama 2004a, Rahjo *et al.* 1999) و دو جدایه تایید شده مشخص از نظر تیپ جنسی به نام‌های $Ast_{20}$ (تیپ A گونه *O. novo-ulmi*) از جنگل اسالم ایران و W2 (تیپ B گونه *O. ulmi*) از گلوشایر (Gloshire) انگلیس، تهیه شده از کلکسیون آزمایشگاه بیوتکنولوژی و قارچ‌شناسی دانشگاه بریتیش کلمبیا، ونکوور کانادا، استفاده شد.

برای بررسی‌های میکروسکوپی اندام‌های مختلف جدایه‌های قارچ در PVLG، لاکتوفنول و یا اسید لاکتیک ۵۰٪ به صورت اسلایدهای میکروسکوپی آماده و جهت مطالعه دقیقتر عکسبرداری نیز شدند.

به منظور تعیین تنوع ژنتیکی جدایه‌های مزبور از روش توالی‌یابی ژن بتا توبولین استفاده شد (Rahnama 2004a). برای این منظور، پس از استخراج DNA اقدام به تکثیر توالی bp ۱۰۰۰ مزبور با استفاده از دو پرایمر بتا توبولین T10 (5'- ACGATAGGTTCACCTCCAGAC- 3') به عنوان Forward و T12 (5'- GTTGTCAATGCAGAAGGTCTCG- 3') به عنوان Reverse شد. طراحی این پرایمرها براساس کیم و همکاران (Kim *et al.* 2003) انجام گرفت. به منظور مقایسه توالی‌های جدایه‌ها و مشخص کردن ترتیب توالی نوکلئوتیدها از نرم‌افزار کلاستال (Clustal W, ver. 1.8)

(Thompson *et al.* 1994) تهیه شده توسط انستیتو پاستور استفاده شد (نشانی اینترنتی (http://bioweb.Pasteur.fr/seqanal/interfaces/clustalw-simple.html).

جدول ۱- جدایه‌های *Ophiostoma* مورد استفاده در آزمون تعیین توالی ژن بتا توبولین
Table 1. Isolates of *Ophiostoma* used in identification of sequence of $\beta$ -tubulin Gene

| کد جدایه **Isolate Code** | محل جداسازی **Place of Isolation** | تاریخ جداسازی **Date** | منبع **Source** | شماره بانک ژن **Accession No.** |
|---|---|---|---|---|
| *Ir-Out-1 | Tehran & Karaj, Iran | 1999 | V. Rahjou *et al*. | EF638890 |
| Ir-Out-2 | Tehran & Karaj, Iran | 1999 | V. Rahjou *et al*. | EF638890 |
| Ir-Out-3 | Tehran & Karaj, Iran | 1999 | V. Rahjou *et al*. | EF638891 |
| Ir-Out-4 | Tehran & Karaj, Iran | 1999 | V. Rahjou *et al*. | EF638891 |
| Ir-Out-5 | Tehran & Karaj, Iran | 1999 | V. Rahjou *et al*. | EF638891 |
| AST-20 | Asalem Forest, Iran | 1977 | C.M. Brasier | X98835 |
| CKT11-0 | Chachkam, Sari, Iran | 1977 | C.M. Brasier | AB110977 |
| W2WT | Gloucestershire, UK | 1972 | J.N. Gibbs | AF052061 |
| CESS16K | Canada | 1996 | C.G. Bowden | EF5036A |
| FG245WT | Canada | 1996 | M. Hubbes | EU136398 |
| MH75 | Canada | 1996 | J.N. Gibbs | U23424 |
| *O. ulmi* 695A | Canada | 1996 | M. Hubbes | CV827999 |
| *O. ulmi* W9 | Oxfordshire, UK | 1970 | J.N. Gibbs | AY887023 |
| *O. ulmi* R21 | Bozovici, Romania | 1980 | C.M. Brasier | EF467310 |
| *O. quercus* H1039 | UK | 1989 | P.T. Scard & CMB | AF081133 |
| *O. quercus* H1040 | UK | 1987 | P.T. Scard & CMB | AF234835 |
| *O. ips* ATcc24285 | Canada | 1999 | C. Breuil | AY194949 |

* ۵ جدایه اول (جداسازی شده از ایران) در مرکز کلکسیون کشت قارچ‌ها در بخش گیاه‌شناسی دانشگاه آلبرتا (کانادا) نگهداری می‌شوند (مکاتبه با پروفسور Lynne Sigler).

## نتیجه و بحث

طی بررسی‌های انجام شده تعداد دو گونه قارچ به نام‌های *Ophiostoma. ulmi* و *O. novo-ulmi* روی گونه‌های اوجا و ملج شناسایی شد. از این بین گونه *O. ulmi* برای اولین بار از مناطق جنگلی لوه و سوسرا و گونه *O. novo-ulmi* برای اولین بار از روی اوجا از توسکستان و درختان نارون فضای سبز شهر تهران به شرح زیر گزارش می‌شود:

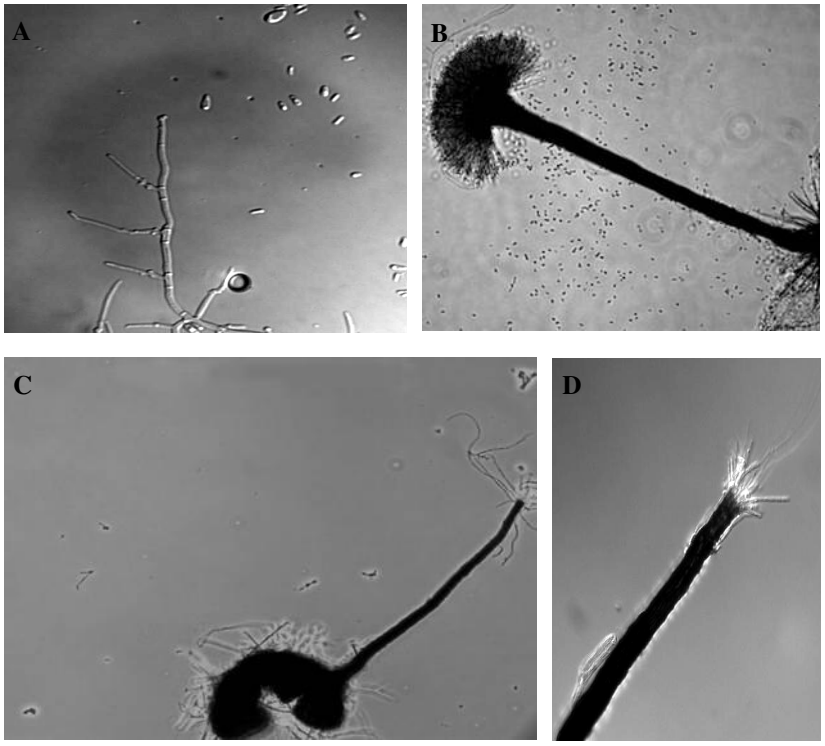
### ۱- خصوصیات گونه ***Ophiostoma ulmi*** **(Buis.) Nannfeldt, Sven Skogsvardsfoeren Tidskr, 32: 397-616, 1934**

نمونه‌های بررسی شده از جنگل لوه (جمع‌آوری ۸۴/۶/۴) و سوسرا (۸۴/۷/۵) از روی اوجا (عراقی ۲۰۰۷).

پرگنه‌های قارچ روی محیط کشت MEA ۲٪ نسبتا صاف و براق (waxy) تا چمنی (lawn) و سفید رنگ با ریسه‌های نسبتا یکنواخت و با رشد روزانه متوسط ۲/۵ میلی‌متر بودند. همچنین دمای بهینه رشد برای این گونه ۲۸ درجه سلسیوس محاسبه شد. به طور کلی، شکل پرگنه برای جدایه‌های مختلف متفاوت بود. همچنین با تکرار کشت‌های مجدد (subculture)، یکنواختی رشد پرگنه‌ها از بین رفته و روی آگار به صورت رشد غیرطبیعی از یک سمت ریسه در برخی از کشت‌ها مشاهده شد و از میزان رشد روزانه جدایه‌ها نیز کاسته شد که دلیل این امر به وجود یکسری از عوامل سیتوپلاسمی مخرب تحت عنوان فاکتور بیماری (disease factor) در ریسه‌های قارچ نسبت داده می‌شود (Cole *et al.* 2000). وجود این عوامل باعث کاهش رشد و تکثیر قارچ می‌شود. این عوامل از طریق آناستاموزهای ریسه‌ای انتقال می‌یابند (Brasier 1983). تحقیقات اخیر نشان می‌دهد که این عوامل از چندین جزو ds RNA با وزن مولکولی متفاوت تشکیل یافته‌اند (Swinton & Gilligan 1999). از سوی دیگر، کاهش سرعت رشد و تهاجم جدایه‌های این گونه به وجود برخی مایکوویروس‌ها (Mycovirus) موسوم به مایتوویروس (Mitovirus) نسبت داده شده است (Cole *et al.* 2000). تاکنون وجود چند مایتوویروس در این قارچ به اثبات رسیده است (Tuomivirta 2004).

در مرحله *Sporothrix* روی محیط کشت MEA ۲٪ کنیدیوم‌ها به طور انتهایی روی کنیدیوفورهای کوتاه تولید شده و به دندانه‌های ریزی می‌چسبند (شکل ۳). تولید متوالی کنیدیوم‌ها در انتهای یک کنیدیوفور منجر به تشکیل خوشه‌ای از هاگ می‌شود که غالبا در یک قطره لعابی قرار گرفته‌اند. کنیدیوم‌ها بی‌رنگ (hyaline)، تک‌یاخته (single-celled)، کشیده و گلابی شکل (elongated pyriform) بوده و غالبا یک طرف آن‌ها خمیده و مورب است و اندازه آن‌ها ۸-۴ × ۴-۲ میکرومتر می‌باشد. مرحله *Pesotum* این گونه روی محیط کشت‌های آزمایشگاهی تشکیل نشد. در مرحله مخمری اندازه و شکل هاگ‌ها متفاوت بود. این مرحله از قارچ هم در محیط کشت مایع PDB و هم در محیط کشت جامد برای گونه مزبور به دست آمد. این مرحله از زندگی قارچ عامل اصلی انتشار قارچ در داخل آوندهای چوبی محسوب می‌شود. در مرحله جنسی تولید پریتسیوم‌هایی با پایه‌هایی (قسمت کروی پریتسیوم) به قطر متوسط ۲۰۰ میکرومتر تولید کرد. همچنین متوسط طول گردن پریتسیوم برای این گونه ۲۸۰ میکرومتر بود. پریتسیوم‌ها به کمک ریزوییدهای تیره رنگ به محیط می‌چسبند. آسکوسپورها بی‌رنگ، تک‌یاخته، هلالی (crescent) تا قلوه‌ای (reniform) شکل بوده و اندازه آن‌ها ۶-۴ × ۲-۱ میکرومتر محاسبه شد. این آسکوسپورها به طریقه فعال از راه گردن به بیرون رانده می‌شوند و معمولا در یک مایع لزج و چسبناک در نوک دهانه پریتسیوم تجمع می‌یابند (شکل ۳). میزان وزن خشک توده قارچی (کشت هفت روزه) در محیط مایع برای این گونه به طور متوسط ۲۷۰/۲۵ میلی‌گرم به دست آمد. میزان بیماریزایی این گونه روی گونه نارون

چینی دو ساله بسیار کم و در حدود دو درصد محاسبه گردید که نشان دهنده شدت بیماریزایی کم این گونه است.



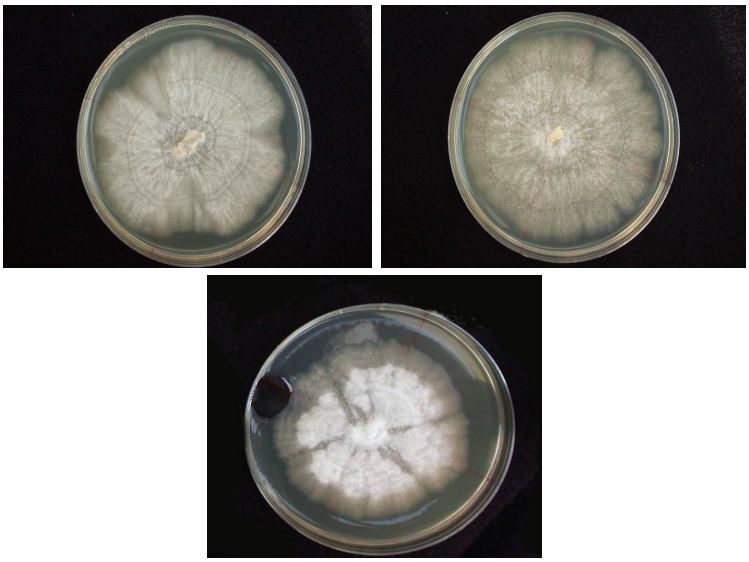

شکل ۳- مراحل مختلف تولید مثل جنسی و غیرجنسی قارچ *O. novo-ulmi* روی محیط کشت MEA: A: فرم *Sporothrix*. B: تشکیل مرحله غیرجنسی سینما (*Pesotum*). C: پریتسیوم با طول گردن بلند. D: دهانه استیولار به همراه ریسه.

Fig. 3. Characteristics of sexual and asexual stages of *Ophiostoma novo-ulmi* on MEA: A. *Sporothrix* form with conidiogenous cells on the dental mycelia. B. *Pesotum* form: Synnema. C-D. Perithecium with long neck and ostiolar hyphae.

**۲- خصوصیات گونه *Ophiostoma novo-ulmi* Brasier, Mycopathologia, 115: 151-161, 1991**

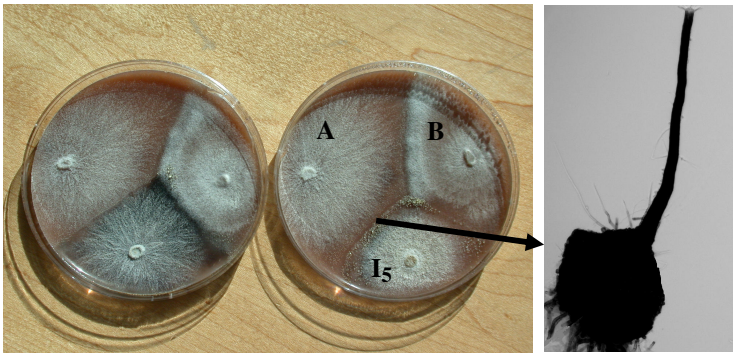
نمونه‌های بررسی شده از جنگل‌های توسکستان (۸۴/۴/۴) و دلند (۸۴/۷/۱۲) (عراقی ۲۰۰۷)، مشکین شهر اردبیل (رهنما ۱۳۷۹)، اسالم گیلان، سیاهکل (رهنما ۱۳۷۸)؛ فضای سبز تهران و کرج (رهجو ۱۳۷۸).

پرگنه‌های قارچ روی محیط کشت MEA ۲٪ نواری (striate) تا فیبری (fibrous)، ناصاف و با رشد روزانه متوسط ۳/۶ میلی‌متر بودند (شکل‌های ۱ و ۲). همچنین دمای بهینه رشد برای این گونه ۲۱ درجه سلسیوس تعیین شد.



شکل ۱- مقایسه دو شکل ظاهری پرگنه *Ophiostoma novo-ulmi* (عکس‌های بالا) و *O. ulmi* (عکس پایین) جدا شده از درختان نارون روی محیط کشت MEA ۲٪.

Fig. 1. Comparison between colony morphology of *Ophiostoma novo-ulmi* (top) and *O. ulmi* (bottom) isolated from elm trees on 2% MEA.




شکل ۲- کشت جدایه مجهول $I_5$ عامل بیماری با دو تیپ آمیزشی A و B قارچ بیمارگر *Ophiostoma novo-ulmi* (پیکان نشان دهنده تولید اندام جنسی در محل تلاقی تیپ‌های سازگار جنسی می‌باشد).

Fig. 2. Crossing the mycelia of two sexual types A and B with unknown isolates $I_5$. Production of perithecia at the crossing zone of mycelia between sexually compatible isolates (arrow).

در مرحله *Sporothrix* روی محیط کشت MEA ۲٪ کنیدیوم‌ها همانند گونه قبلی به طور انتهایی روی انشعابات نسبتا کوتاه کنیدیوفورهای کوتاه تولید می‌شوند و به دندانه‌های ریزی می‌چسبند. تولید متوالی کنیدیوم‌ها در انتهای یک کنیدیوفور منجر به تشکیل خوشه‌ای از هاگ می‌شود که غالبا در یک قطره لعابی قرار گرفته‌اند. کنیدیوم‌ها بی‌رنگ، تک‌یاخته، کشیده و گلابی تا اشکی شکل بوده و غالبا یک طرف آن‌ها خمیده و مورب است و اندازه آن‌ها ۷-۴ × ۳-۲ میکرومتر می‌باشد.

مرحله *Pesotum* این گونه در برخی جدایه‌ها روی محیط کشت MEA ۲٪ پس از گذشت ۳۰-۲۵ روز تشکیل شد. در این مرحله قارچ روی ریزوییدهای تیره رنگ تولید اندامی به نام سینما (synnema) کرد. هاگ‌ها در مایعی چسبناک و لزج در انتهای ساقه‌های تیره رنگ (به ارتفاع ۲-۱ میلی‌متر) تولید شدند. این هاگ‌ها نیز تک‌یاخته و شفاف و عمدتا تخم‌مرغی شکل بوده و اندازه آن‌ها ۴-۲ × ۲-۱ میکرومتر محاسبه شد.

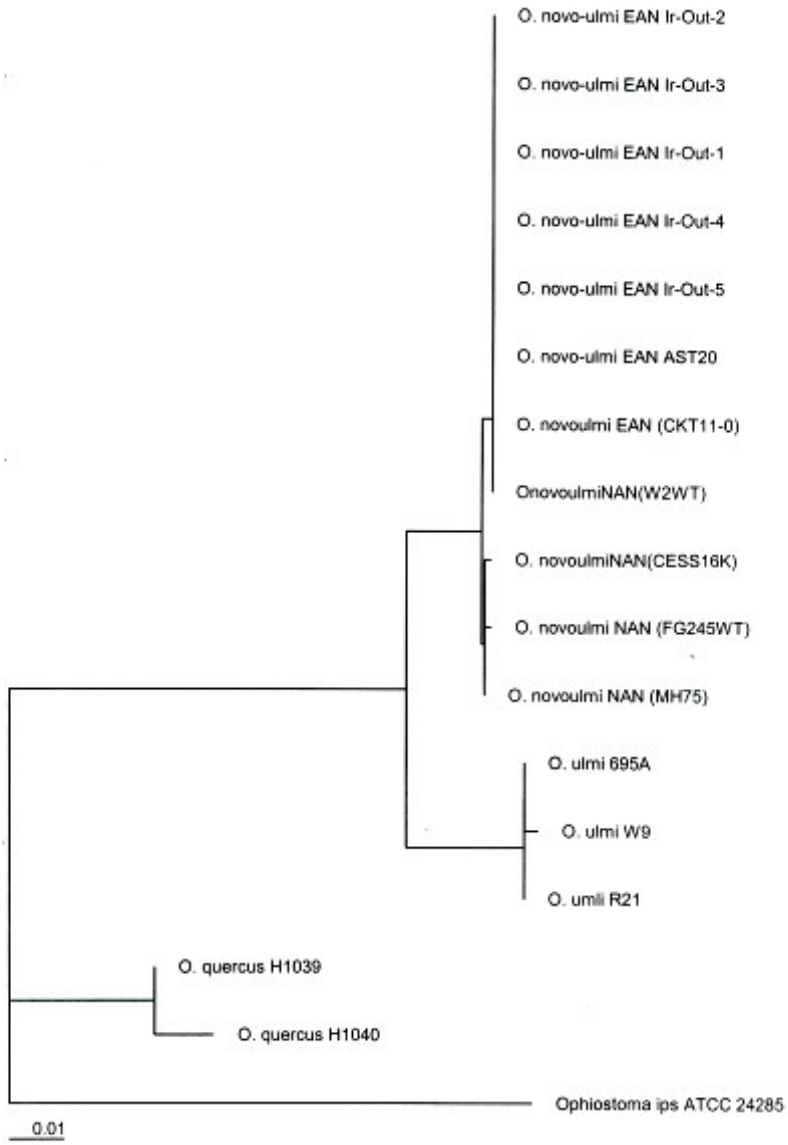
در مرحله مخمری، اندازه و شکل هاگ‌ها متفاوت بود. این مرحله از قارچ هم در محیط کشت مایع PDB و هم در محیط کشت جامد برای گونه مزبور به دست آمد. این مرحله از زندگی قارچ، عامل اصلی انتشار قارچ در داخل آوندهای چوبی محسوب می‌شود.

در مرحله جنسی، قارچ تولید پریتسیوم‌هایی خاردار با پایه‌هایی (قسمت کروی پریتسیوم) به قطر ۲۰۳ میکرومتر کرد. همچنین طول گردن پریتسیوم برای این گونه به طور متوسط ۳۵۰ میکرومتر محاسبه شد. پریتسیوم‌ها به کمک ریزوییدهای تیره رنگ به محیط می‌چسبند. آسکوسپورها بی‌رنگ، تک‌یاخته، هلالی تا قلوه‌ای شکل بوده و اندازه آن‌ها ۶-۴ × ۲-۱ میکرومتر محاسبه شد. این آسکوسپورها به طریقه فعال از راه گردن به بیرون رانده می‌شوند و معمولا در یک مایع لزج و چسبناک در نوک دهانه پریتسیوم تجمع می‌یابند. ابعاد پریتسیوم این گونه با گونه قبلی به طور معنی‌داری اختلاف داشت (جدول ۲). میزان وزن خشک توده قارچی (کشت هفت روزه) در محیط مایع برای این گونه به طور متوسط ۲۵۰ میلی‌گرم به دست آمد. میزان بیماریزایی این گونه روی گونه نارون چینی دو ساله نیز در مقایسه با گونه قبلی بیشتر و به طور متوسط ۱۳٪ محاسبه گردید که نشان دهنده شدت بیماریزایی زیاد این گونه در مقایسه با گونه *O. ulmi* است.

جدول ۲- مقایسه برخی از ویژگی‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی جدایه‌های دو گونه *Ophiostoma ulmi* و *O. novo-ulmi*

| مشخصات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی | *Ophiostoma ulmi* | *Ophiostoma novo-ulmi* |
|---|---|---|
| شکل پرگنه جدایه‌ها روی محیط کشت MEA | صاف، نرم تا چمنی و سفید با رشد روزانه ضعیف (متوسط ۲/۵ میلی‌متر/ روز) | نواری و فیبری و ناصاف و با رشد روزانه زیاد (متوسط ۳/۶ میلی‌متر/ روز) |
| طول گردن پریتسیوم روی محیط کشت MEA | اغلب کوتاهتر (۲۹۰-۲۷۳ میکرومتر) | اغلب طویلتر (۶۴۰-۲۹۰ میکرومتر) |
| عرض پایه پریتسیوم | ۲۰۰ میکرومتر | ۲۰۳ میکرومتر |
| **نرخ رشد شعاعی روی محیط کشت MEA (میلی‌متر در روز) در:** | | |
| ۲۰ درجه سلسیوس | ۲/۴-۲/۶ | ۳/۴-۳/۸ |
| ۲۸ درجه سلسیوس | ۲/۹-۳/۳ | ۲/۷-۳ |
| ۳۵ درجه سلسیوس | ۰/۵-۰/۶ | ۰ |
| بهینه دمای رشد (درجه سلسیوس) | ۲۸ | ۲۱ |
| وزن خشک توده قارچ در محیط مایع PDB (میلی‌گرم) | بیشتر (۲۷۴/۲۵-۲۶۶) | کمتر (۲۵۴/۵-۲۴۴) |
| میزان بیماریزایی روی نارون چینی دو ساله (درصد پژمردگی و ریزش برگ) | کمتر (۲٪) | بیشتر (۱۳٪) |

نتایج آنالیز توالی‌یابی و مقایسه فیلوژنی نشان داد که هر پنج جدایه مورد استفاده در این آزمون متعلق به گونه مهاجم *Ophiostoma novo-ulmi* و ترجیحا جمعیت‌های اروپا-آسیایی یا به عبارت بهتر زیرگونه *O. novo-ulmi* ssp. *novo-ulmi* می‌باشند (شکل ۴). نتایج مقایسه ۷۹۰ نوکلئوتید در این آزمون نشان داد که اختلاف اصلی جدایه‌های گونه *O. ulmi* و *O. novo-ulmi* در کد شدن اسیدآمینه سرین می‌باشد.




شکل ۴- مقایسه فیلوژنی جدایه‌های عامل بیماری نارون از ایران (پنج جدایه اول از بالا) با جدایه‌های تایید شده از سایر نقاط جهان براساس توالی‌یابی ژن بتا توبولین: تمامی جدایه‌های ایرانی *O. novo-ulmi* متعلق به زیر گونه *O. novo-ulmi* ssp. *novo-ulmi* (جمعیت‌های اروپا- آسیایی).

Fig. 4. Comparison of phylogeny of five Iranian isolates of Dutch elm disease with isolates of others areas based on sequence of $\beta$ –tubulin gene. All Iranian isolates of *Ophiostoma novo-ulmi* belong to *O. novo-ulmi* ssp. *novo-ulmi* (EAN populations).

**منابع**

جهت ملاحظه منابع به متن انگلیسی مراجعه شود.

**نشانی نگارندگان:** دکتر کامران رهنما و مهندس میرمعصوم عراقی، بخش گیاه‌پزشکی دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

# STUDY ON TWO SPECIES OF *OPHIOSTOMA* IN RELATION WITH DUTCH ELM DISEASE IN IRAN

**K. RAHNAMA and M.M. IRAQI***
Agricultural Sciences & Natural Resources, University of Gorgan

Received: 29.06.2008 Accepted: 23.09.2009

An investigation was carried out in some areas of Golestan Province including: Loveh forest, Soosara, Daland forest park, Tooskestan; Gilan Province including Siahkal and Asalem forests; Arasbaran and landscape of urban trees during 1999–2007. In this investigation, based on some morphological, physiological and molecular characteristics and also comparison with standard isolates two species *Ophiostoma ulmi* and *O. novo-ulmi* were identified as casual agents of Dutch elm disease where majority of isolates belonged to *O. novo-ulmi*. This is the first report of *O. novo-ulmi* on *Ulmus glabra* and *U. carpinifolia*, from Tooskestan forest and urban elm trees and here it is compared with *O. ulmi*. The *O. novo-ulmi* isolates of Iran belonged to the EAN (Euro-Asian) populations based on sequence comparison.

**Key words:** Phylogeny, Dutch elm disease, Guilan, Golestan, *Ophiostoma*

---

* Corresponding author (E-mail: iraqi602@yahoo.com)

Figures and table are given in the Persian text.

**References**

AFSHARPOUR, F. and ADELI, E. 1974. Dutch elm disease *Ceratocystis ulmi* (Buisman) C. Moreau in Iran. Research Institute of Forests & Rangelands (Tehran). Tech. Pub. 16: 27pp.

ALEXOPOULOS, C.J., MIMS, C.W. and BLACKWELL, M. 1996. Introductory Mycology. Wiley & Sons. New York. 868pp.

BENADE, E., WINGFIELD, M.J. and VAN WYK, P.S. 1997. Conidium development in *Sporothrix* anamorphs of *Ophiostoma*. Mycol. Res. 101: 1108–1112.

BRASIER, C.M. 1981. Laboratory investigation of *Ceratocystis ulmi*. Pp. 76–79. *In*: R.J. Stipes & R.J. Campana (eds). Compendium of Elm Diseases. APS Press.

BRASIER, C.M. 1983. A cytoplasmically transmitted disease of *Ceratocystis ulmi*. Nature 305: 220–223.

BRASIER, C.M. 1990. China and the origin of Dutch elm disease: an appraisal. Pl. Pathol. 39: 5–16.

BRASIER, C.M. 1991. *Ophiostoma novo-ulmi* sp. nov., causative agent of current Dutch elm disease pandemics. Mycopathologia 115: 151–161.

BRASIER, C.M. 2001. Rapid evolution of introduced plant pathogens via interspecific hybridization. Bioscience 51(2): 123–133.

BRASIER, C.M. and KIRK, S.A. 2001. Designation of the EAN and NAN races of *Ophiostoma novo-ulmi* as subspecies. Mycol. Res. 105(5): 547–554.

BRASIER, C.M. and MEHROTRA, M.D. 1995. *Ophiostoma himal-ulmi* sp. nov., a new species of Dutch elm disease fungus endemic to the Himalayas. Mycol. Res. 99: 205–215.

BUISMAN, C.J. 1932. *Ceratostomella ulmi*, de geschlachteliuke vorm van *Graphium ulmi* Schwarz Tijdschr. Plantenziekten 38: 1–8.

COLE, T.E., HONG, Y., BRASIER, C.M. and BUCK, K.W. 2000. Detection of an RNA-dependent-RNA polymerase in mitochondria from a mitovirus infected isolate of the Dutch elm disease fungus, *Ophiostoma novo-ulmi*. Virology 268: 239–243.

CRANE, J.L. and SCHOKNECHT, J.D. 1973. Conidiogenesis in *Ceratocystis ulmi*, *Ceratocystis piceae* and *Graphium penicillioides*. Amer. J. Bot. 60: 396–354.

DE HOOG, G.S. 1974. The genera *Blastobotrys*, *Sporothrix*, *Calcarisporium* and *Calcarisporiella* gen. nov. Stud. Mycol. 7: 84pp.

EBRAHIMI, A.G. and MC NAB, H. 1971. Growth of fungus *Ceratocystis ulmi* causal agent of decline Dutch elm disease, in forest areas of Astara on stem of various fresh plants. Appl. Ent. Phytopath. 32: 26–30.

ERSHAD, D. 1995. Fungi of Iran. Agricultural Organization, Ministry of Jihad-e-Agriculture, Tehran, Iran. 870pp.

HAJIAN, M. and KASHKI, M. 1999. Incidence of Dutch elm disease in Mashhad. Pajouhesh-va-Sazandegi 40: 60–61 (in Persian).

HARRINGTON, T.C. 1981. Cycloheximide sensitivity as a taxonomic character in *Ceratocystis*. Mycologia 73: 1123–1129.

HARRINGTON, T.C. and WINGFIELD, M.J. 1998. The *Ceratocystis* species on Coniferous. Can. J. Bot. 76: 1446–1457.

HINTZ, W.E. 1999. Sequence analysis of the chitin synthesis A gene of the Dutch elm disease pathogen *Ophiostoma novo-ulmi* indicates a close association with the human pathogen *Sporothrix schenckii*. Gene 137(1): 215–221.

HOFFMAN, B. and BREUILL, C. 2002. Cloning and genetic analysis of subtilases in sap staining fungi. Curr. Gen. 41: 168–175.

HUNT, J. 1956. Taxonomy of genus *Ceratocystis*. Lloydia 19: 1–58.

IRAQI, M.M. 2007. Investigation on isolates of fungus causal agent Dutch elm disease in some areas of Golestan Province and their pathogenesis effect on *Ulmus* species. M.Sc. thesis. Agric. Sci. Nat. Resour. University of Gorgan. 108pp. (in Persian with English summary).

IRAQI, M.M. and RAHNAMA, K. 2007. Investigation on severity of pathogenicity of *Ophiostoma ulmi* and *Ophiostoma novo-ulmi* on *Ulmus parvifolia* Jacq. J. Agric. Sci. Natur. Resour. 14(3): 164–173 (in Persian with English summary).

IRAQI, M.M., RAHNAMA, K., RAZAVI, S.I. and EBRAHIMI, A. 2007. Investigation on isolates of fungus causal agent Dutch elm disease in some areas of Golestan Province. J. Agric. Sci. Natur. Resour. 14(6): 124–138 (in Persian with English summary).

KIM, J.J., KIM, S.H., LEE, S. and BREUIL, C. 2003. Distinguishing *Ophiostoma* ips. and *Ophiostoma montium*, two bark beetlr-assiciated fungi. FEMS. Microbiology Letters 222: 187–192.

MELIN, E. and NANNFELDT, J.A. 1934. Researches into the bluing of ground pulpwood. Sven Skogsvardsfoeren Tidskr. 32: 397–616.

MOREAU, C. 1952. Coexistence de formes *Thielaviopsis* et *Graphium* chez une souche de *Ceratocystis* major (Van Beyma) nov. comb. Remarques sur les variations de *Ceratocystis*. Rev. Mycol. 17, Suppl. 1(12): 17–25.

RAHJO, V., MOJDEHI, H., ZAMANIZADEH, H. and MOSAHEBI, GH. 1999. Investigation of distribution of Dutch elm disease in Tehran and Karaj cities, and initial evaluation effect of some fungicides against *Ophiostoma ulmi*. Iran. J. Agric. Sci. 5(20): 15–36 (in Persian with English summary).

RAHNAMA, K. 2003. Incidence of Dutch elm disease in new area of natural forest and urban trees of Iran. Proceedings of the 2nd International Elm Conference. Valsain, Segovia, Spain. P. 34. (Abst.).

RAHNAMA, K. 2004a. Molecular identification of *Ophiostoma* and *Ceratocystis* genera and their relationship together: with emphasis on identification and occurrence population of new casual agent of Dutch elm disease in Iran. Research report of study opportunity in University of British Columbia, Vancouver, Canada. 20pp.

RAHNAMA, K. 2004b. Dutch elm disease survival of elm (*Ulmus*) and *Zelkova* species by integrated pest management and the conservation of forest genetic resources. University of British Columbia, Forest Sciences, Vancouver Canada. 18pp.

RAHNAMA, K. and TAHERI, A.H. 2004. Distribution of Dutch elm disease pathogens, aggressive and non-aggressive isolates in Iran. Can. J. Pl. Pathol. 26: 121–126.

RAHNAMA, K., ASADEH, G. and SALAHSHOUR, M. 2000. Study in occurrence of Dutch elm disease, status and the future of disease in Iran. The first Asian Conference on Plant Pathology. China Agricultural Scientech Press. P. 49. (Abst.).

RAHNAMA, K., ASADEH, G. and TAHERI, A. 2002. Incidence of Dutch elm disease in some new areas of Golestan Province and conservation from

decline of species. Proceedings of the 2nd Seminar of Research Projects of Golestan Province. J. Agric. Sci. Natur. Resour. Pp. 52–53 (in Persian).

RAHNAMA, K., TAHERI, A., BREUILL, C. and SADRAVI, M. 2005. Molecular analysis and nucleotide sequences of Iranian isolates of Dutch elm disease by β-tubulin gene sequences distinguishes two distinct forms of the Euro-Asian and North American isolates. Proceedings of the 2nd International Asian Conference of Plant Pathology. Faculty of Science, National University of Singapore. P. 65 (Abst.).

SHARBATKHARI, M., RAZAVI, S.I., SANEI, S.J. and RAHNAMA, K. 2007. Effect of glucose and amino acid L-asparagin on asexual reproduction of the causal agent of Dutch elm disease. J. Agric. Sci. Natur. Resour. 14(1): 93–98 (in Persian with English summary).

SINCLIAR, A. and CAMPANA, R.J. 1978. Dutch Elm Disease: Perspectives after 60 years. Agric. Pl. Pathol. 8(5): 55pp.

SMALLEY, E.B. and GURIES, R.P. 1993. Breeding elms for resistance to Dutch elm disease. Ann. Rev. Phytopathol. 31: 325–352.

STIPES, R.J. and CAMPANA, R.J. 1981. Compendium of Elm Diseases. APS Press. 96pp.

SWINTON, J. and GILLIGAN, C.A. 1999. Selecting hyperparasites for biocontrol of Dutch elm disease. Proceedings of the Royal Society. London. 266: 437–445.

THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.C. and GIBSON, T.J. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22: 4673–4680.

TUOMIVIRTA, T. 2004. Polyphylectic viruses of *Grammeniella abietina* type A, a major pathogenic fungus of coniferous trees. Ph.D. Thesis, University of Helsinki.

WINGFIELD, M.J., SEIFERT, K.A. and WEBBER, J.F. 1993. *Ceratocystis* and *Ophiostoma* Taxonomy, Ecology and Pathogenicity. St. Paul, Minnesota: APS Press. 293pp.

WINGFIELD, M.J., SLIPPERS, B., ROUX, J. and WINGFIELD, B. 2001. Worldwide movement of exotic forest fungi, especially in the tropics and the Southern Hemisphere. Bioscience 51(2): 134–140.

ZAKERI, Z. 1989. Occurrence of Dutch elm disease in Karaj area. Proceedings of 9th Iranian Congress of Plant Protection. College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad (Abst.) (in Persian with English summary).

**Acknowledgment**

This paper is partly supported by National Project of Dutch elm disease in Iran and partly of M.Sc. thesis of the second author submitted to the Agricultural Sciences & Natural Resources, University of Gorgan, Gorgan, Iran.

**Address of the authors:** Dr. K. RAHNAMA and M.M. IRAQI, Department of Plant Protection, Faculty of Crop Sciences, Agricultural Sciences & Natural Resources, University of Gorgan, Gorgan, Iran.