DOI: http://dx.doi.org/10.22092/jaep.2016.106536
آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ۸٤، شماره ۱، شهریور ۱۳۹۵

# پراکنش، شناسایی اختصاصی و تنوع بیماری زایی جدایه‌های *Calonectria pseudonaviculata* عامل بیماری بلایت شمشاد در جنگل‌های هیرکانی

**پریسا خزائلی[۱]، سعید رضائی[۱]✉، منصوره میرابوالفتحی[۲]، حمیدرضا زمانی زاده[۱] و هادی کیادلیری[۳]**

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه بیماری شناسی گیاهی، تهران، ایران؛

۲- مؤسسهٔ تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران؛

۳- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه جنگلداری، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۹۴؛ تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۹۵)

## چکیده

در سال‌های اخیر شیوع وسیع بیماری سوختگی و ریزش ناگهانی برگ‌های درختان شمشاد و متعاقب آن خشکیدگی کامل آنها، با عامل *Calonectria pseudonaviculata*، سطحی معادل ۴۰۰۰۰ هکتار از جنگل‌های شمال کشور را در معرض نابودی قرار داده است. به منظور بررسی پراکنش این بیماری طی سال ۱۳۹۳، از گیاهان دارای علائم بیماری از مناطق مختلف استان‌های گیلان، مازندران و گلستان نمونه برداری شد. ابتدا شناسایی جدایه‌های قارچی بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و پس از آن با استفاده از آغازگر اختصاصی ITS4 و ITS311F انجام شد. تنوع بیماریزایی در جمعیت جدایه‌های این قارچ در گلخانه با تعداد ۳۵ جدایه منتخب همراه شاهد روی نهال شمشاد جنگلی بررسی شد. ویژگی‌های ریخت‌شناسی تفکیک کننده این گونه بر اساس شکل، اندازه و تعداد جداره کنیدیوم ها، طول استیپ، شکل و اندازه وزیکول انتهای استیپ، تطبیق ریخت‌شناسی آن را با گونه *Cylindocladium pseudonoviculatum* به اثبات رسانید. تمامی جدایه‌ها با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی و انجام واکنش زنجیره‌ای پی‌سی‌آر باند ۲۵۰ جفت بازی تولید نمودند. مقایسه میزان شدت بیماری‌زایی ۳۵ جدایه این قارچ، آنها را در گروه‌های بیماری‌زایی متفاوت قرار داد. جدایه‌های گروه‌های مختلف بیماریزایی در هر سه استان وجود داشتند.

**واژه‌های کلیدی**: پراکنش، تنوع بیماریزایی، شمشاد، شناسایی اختصاصی، *Cylindrocladium pseudonaviculatum*.

# Distribution, specific detection and the pathogenesis variation of *Calonectria pseudonaviculata* isolates, causal agent of boxwood blight disease, in Hyrcanian forest of Iran

**P. KHAZAELI[1], S. REZAEE[1]✉, M. MIRABOLFATHY[2], H. ZAMANIZADEH[1] and H. KIADALIRI[3]**

1- Dept. of Plant Pathology, College of Agriculture and natural Resources, Science and Research branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. 2- Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran, 3- Dept. of Forestry, College of Agriculture and natural Resources, Science and Research branch, Islamic Azad University , Tehran, Iran

**Abstract**

During recent years outbreak of box blight trees causing sudden leaf abscission have declined about 40000 hectares boxwood trees in Northern forests of Iran. *Calonectria pseudonaviculata* is the causal agent of the disease. Distribution of boxwood blight disease was monitored in the northern forests from June to September of 2014. Sampling locations was included: Mazandaran, Gilan and Golestan provinces. The isolates were identified based on morphological characteristics at first, then molecular identification confirmed morphological identification using previously designed species-specific primer ITS113F and ITS4. The pathogenesis variation of Hyracanian isolates was tested in green houses using representative 35 isolates. Boxwood blight fungal agent was isolated from all surveyed areas. Based on morphological criteria including length shape and the number of septates of conidia, also length and vesicle characterization of stips, in addition to the mycellial growth cardinal temperatures, all Iranian isolates identified as *Calonectria pseudonaviculta*. ITS113F and ITS4 primers amplified the expected 250 bp region in all *Calonectria pseudonaviculata* isolates specifically. Comparing the pathogenicity of 35 isolates on *Buxus sempervirens* subsp. Hyrcana saplings revealed pathogenicity degree variation among Hyricanian *Cylindocladium pseudonoviculatum* divided in groups were scattered in three provinces.

**Key words:** Boxwood, *Cylindocladium pseudonoviculatum,* Distribution, Specific detection, Pathogenesis variation.

✉ **Corresponding author: srezaee@srbiau.ac.ir**

**مقدمه**

گونه شمشاد جنگلی با نام علمی *Buxus sempervirens* subsp. *hyrcana* از مهم‌ترین گونه‌های گیاهی همیشه سبز اختصاصی جنگل‌های حاشیه دریای خزر است. این گونه مختص ایران بوده و در بین ذخایر جنگلی جهان از اهمیت خاصی برخوردار است. بلایت شمشاد بیماری قارچی است که علائم آن به صورت لکه‌های قهوه‌ای تیره روی برگ، خطوط سیاه روی ساقه و ریزش شدید برگ‌ها ظاهر می‌شود (Henricot *et al*., 2008). علائم بیماری بلایت شمشاد برای اولین بار در سال ۱۹۹٤ در یک نهالستان در Hampshire در کشور انگلستان مشاهده شد و تا سال ۱۹۹۷ که شیوع ناگهانی بیماری در انگلستان اتفاق افتاد، موردی از این بیماری گزارش نگردید. عامل بیماری در این سال (R. Cook pers comm.) *Cylindrocladium scoparium* نامیده شد، گونه اخیر، قارچ بیماری‌زایی است که علائمی متفاوت از علائم بلایت شمشاد، روی دامنه میزبانی وسیعی از گیاهان در سراسر دنیا ایجاد می‌کند. در سال ۱۹۹۸ بیماری بلایت شمشاد از نیوزلند گزارش شد و عامل آن *Cylindrocladium spathulatum* و احتمالاً *Cylindrocladium ilicicola* معرفی شد که گونه *Cy. spathulatum* بیشتر به عنوان بیمارگر اکالیپتوس و گونه *Cy. ilicicola* دارای دامنه میزبانی وسیع‌تری است، گونه‌های فوق دارای تفاوت‌های اندک مورفولوژیک و فیزیولوژیک هستند. در سال ۲۰۰۲، پس از شیوع بیماری در اروپا و نیوزلند، با بررسی‌های مولکولی مشخص شد عامل بلایت شمشاد که اختصاصیت بیماریزایی برای میزبان شمشاد دارد، متفاوت از سه گونه فوق است. از این رو عامل بیماری شمشاد به نام *Cylindrocladium buxicola* معرفی شد (Henricot *et al*., 2002). سرانجام تحقیقات مولکولی عامل بیماری را تحت تلومورف (مرحله‌ی جنسی) *Calonectria pseudonaviculata* و آنامورف (مرحله‌ی غیرجنسی) *Cy. pseudonaviculatum* قرار داد (Lombard *et al*., 2010). در سال ۲۰۱۵ با بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های مختلف گونه جدید *Calonectria henricotiae* نیز از بین جدایه‌های عامل بلایت شمشاد معرفی کنند (Gehesquiere *et al*., 2015). در حال حاضر بیماری در سراسر اروپا، امریکا، کانادا، مناطقی از آسیا و نیوزلند به عنوان بیماری مخرب همه‌گیر شده است. از سال ۲۰۰٤ به بعد نیز بلایت شمشاد در فهرست بیماری‌های گیاهی تحت مراقبت سازمان حفظ نباتات اروپا (Eppo) قرار گرفته است (Vincent, 2008). این بیماری تاکنون از آلمان، ایتالیا، اتریش، اسپانیا، کرواسی، چک، فرانسه، ترکیه، ایالت متحده امریکا و کانادا گزارش شده است. بیماری بلایت شمشاد در سال ۱۳۹۱ در جنگل‌های جیسا و لیره‌سر مشاهده شد(کیادلیری، گزارش‌های منتشر نشده)و در همان سال از تنکابن در استان مازندران گزارش شد. (Rezaee *et al*., 2013; Mirabolfathy *et al*., 2013)، پس از آن علاوه بر مازندران از جنگل‌های استان گیلان نیز گزارش گردید (Mirabolfathy, 2013). این بیماری به سرعت همه‌گیر شد به طوریکه در سال بعد در سایر عرصه‌های شمشاد استان‌های مازندران و گیلان نیز گزارش شد، هم اکنون میزان خشکیدگی ناشی از این بیماری به بیش از ٤۰ هزار هکتار از رویشگاه‌های شمشاد رسیده است، مطالعاتی نیز برای کنترل بیماری صورت گرفته است (Fakhredin and Mirabolfathy, 1014). همچنین اقداماتی برای کنترل بیماری در سطح پایلوت در شمال ایران در دست بررسی است. بیماری بلایت شمشاد سبب خزان و خشکیدگی سرشاخه‌ها شده و نهایتاً سبب ازبین رفتن سریع توده‌های شمشاد جنگلی در جنگل‌های هیرکانی شده است. عامل بیماری (*Cy. pseudonaviculatum*) در شرایط طبیعی فقط روی برگ و ساقه گونه‌های مختلف شمشاد *Buxus* spp دیده شده است. دمای بهینه برای جوانه زدن کنیدیوم قارچ ۲۵ °C، بیشینه دمایی قارچ ۳۰°C و کمینه دمایی برای رشد میسلیوم ۵ °C است (Henricot *et al*., 2002). قارچ عامل بیماری می‌تواند به مدت پنج سال به صورت مسیلیوم در بقایای گیاهی دوام یابد (Henricot *et al*., 2008). بررسی‌های آزمایشگاهی برای تعیین دامنه میزبانی این قارچ در شرایط

مصنوعی نشان داده است گونه‌ای از *Sarcococca* از خانواده Buxaceae نیز به این قارچ حساس بوده است. از بین گونه‌های شمشاد گونه *Buxus sempervirens* حساس‌ترین گونه به این قارچ است. موطن اصلی این بیماری نامشخص است. این بیمارگر در طی یک هفته تجدید نسل می‌کند و به سرعت باعث ایجاد بیماری می‌شود (Henricot *et al*., 2008). بر اساس تحقیقات Henricot آلودگی در دمای بهینه ۲۵°C–۱۸ و رطوبت بالا ایجاد می‌شود. در شرایط مساعد محیطی گونه *Cy. pseudonaviculatum* در برگ‌های ریخته به صورت میسیلیوم زمستان‌گذرانی کرده و تولید اسپور می‌کند (Henricot *et al*., 2008). کنیدیوم‌های قارچ در قطرات آب باران و شبنم صبحگاهی روی برگ‌های شمشاد پس از سه ساعت جوانه زده، لوله تندشی بدون ایجاد آپرسوریوم از طریق عدسک ویا بصورت مستقیم از کوتیکل وارد بافت برگ می‌شود، هفت روز بعد در شرایط مساعد (رطوبت بیش از ۸۰ درصد و دمای ۲۰–۲۵ درجه سلسیوس) مایه آلوده کننده ثانویه و اسپور فراوان در سطح برگ و سرشاخه‌ها تولید می‌شود (Henricot *et al*., 2008). بیماری بلایت شمشاد، از جمله بیماری‌های مخرب و بسیار خطرناک است که در سال‌های اخیر در ایران و بسیاری از کشورهای اروپایی، آمریکایی و آسیایی مشاهده شده و سبب خزان و یا از بین رفتن توده‌های شمشاد اعم از جنگلی و زینتی شده است. در ایران شمشاد یکی از گونه‌های همیشه سبز، منحصر بفرد، ممنوع‌القطع و از ذخایر جنگلی با ارزش ژنتیکی و بوتانیکی خاص است. در سال‌های اخیر بیماری بلایت شمشاد در جنگل‌های هیرکانی ایران با سرعت بسیار زیاد شیوع یافته و توده‌های جنگلی شمشاد را نابود نموده است. به این جهت بررسی جامع روی این بیماری و جدایه‌های عامل آن در مناطق انتشار، موضوع این تحقیق قرار گرفت.

## روش بررسی

**نمونه‌برداری و جداسازی جدایه‌ها:** نمونه‌برداری از مناطق جنگلی مختلف استان‌های گیلان، مازندران و گلستان از خرداد تا شهریور ۱۳۹۳ بسته به شرایط آب و هوایی منطقه، ارتفاع متفاوت از سطح دریا، شیب و موقعیت‌های اقلیمی متنوع انجام شد. در هر منطقه سری‌های مختلف جنگلداری به صورت تصادفی انتخاب و از گیاهان دارای علائم بیماری، نمونه‌برداری شد. برای تعیین پراکنش بیماری مختصات هر منطقه شامل طول و عرض جغرافیایی و ارتفاع از سطح دریا یادداشت شد. سرشاخه‌ها، برگ‌ها و بعضاً نهال‌های کوچک دارای علائم جمع‌آوری و در پاکت‌های کاغذی در یخچال نگهداری و بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شد. جهت جداسازی قارچ عامل بیماری، ابتدا نسوج آلوده برگ و سرشاخه‌ها تفکیک و سپس قطعات حدود ۰/۵ تا ۱ سانتی متری از حد فاصل بافت سالم و آلوده بریده شد و پس از ضدعفونی سطحی به مدت یک دقیقه با محلول هیپوکلریت سدیم (۱٪) و شستشوی مجدد با آب مقطر سترون روی کاغذ صافی سترون خشک شد، و در محیط سیب زمینی- دکستروز-آگار (PDA) کشت گردید، تشتک‌های پتری در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. پرگنه قارچ بعد از ۳ تا ۵ روز ظاهر و از سایر قارچ‌های غیر بیماریزا جدا و به محیط کشت جدید منتقل شد. خالص‌سازی جدایه‌ها به روش تک اسپور انجام شد. به منظور تولید اسپور جدایه‌ها در محیط کشت سیب زمینی هویج آگار(PCA) کشت و تحت تناوب نوری، ۱۲ ساعت تاریکی ۱۲ ساعت نور فرا بنفش قرار داده شد و سپس به محیط آب آگار دو درصد منتقل شد. تعداد ۸۰ جدایه به روش تک اسپور خالص گردید. این جدایه‌ها در لوله‌های فالکن ۲۰ میلی‌لیتری حاوی محیط کشت PDA در دریخچال (دمای ۴°C) نگهداری گردید.

**بررسی ریخت‌شناسی جدایه‌ها:** هر جدایه داخل تشتک پتری حاوی محیط غذایی PCA کشت و در دمای ۲۲ تا ۲۵ درجه سیلیسیوس تحت نور نزدیک فرابنفش با چرخه نوری ۱۲ ساعت نور ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری و بعد از ۱۰ روز بررسی شد. برای بررسی ویژگی‌های ریخت‌شناسی از

میکروسکوپ Leica DMLB با بزرگنمایی X ۴۰ و X ۱۰۰ استفاده شد. برای مشاهده و اندازه‌گیری شکل ماکروکنیدیوم، نحوه تشکیل میکروکنیدیوم، اندازه و شکل کنیدیوم، اندازه و شکل پایه (استیپ) از دستگاه آنالیز تصویری استفاده و ابعاد ۴۰ اندام اندازه‌گیری و میانگین اندازه‌ها محاسبه شد. برای مشاهده و ثبت الگو، رنگ و شکل پرگنه، از محیط کشت MEA (Malt Extract Agar) استفاده شد (Rayner, 1970; Crous *et al*., 1992; Henricot and Culham, 2002). برای اندازه‌گیری دماهای ویژه رشد جدایه‌های قارچی از هر جدایه قطعه‌ای به قطر ۵ میلیمتر در مرکز تشتک‌های پتری به قطر نه سانتی‌متر حاوی محیط کشت PDA قرار داده شد و در دمای ۵- ۳۱ درجه سلسیوس به فاصله ۳ درجه سلسیوس در سه تکرار در انکوباتور قرار داده شد و کمینه، بهینه و بیشینه دمایی جدایه‌ها برای رشد تعیین گردید.

**استخراج دی ان آ:** جدایه‌ها در محیط کشت Malt Extract Agar کشت شد و ۱۰ روز در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار داده شد. استخراج دی ان آ جدایه‌ها با استفاده از روش CTAB انجام گرفت. به منظور مشاهده حضور یا عدم حضور DNA، از الکتروفورز ژل آگارز یک درصد استفاده شد و میزان دی ان آ با دستگاه نانودراپ اندازه گیری شد. محلول DNA استوک در منفی ۲۰ درجه سلسیوس نگهداری شد.

**شناسایی مولکولی جدایه‌ها با استفاده از آغازگرهای اختصاصی گونه:** شناسایی مولکولی جدایه‌ها از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای پیشرو ITS 113F با توالی 5''-TGTTGGGGATCGGCAGA3' و پسرو ITS4 با توالی 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC3' که توسط هیلی (Healy, 2014) بر مبنای توالی ژن ITS طراحی شده بود، انجام شد. این جفت آغازگر قطعه‌ای به طول ۲۵۰ جفت باز را به صورت اختصاصی در جدایه‌های *Cy. pseudonaviculatum* تکثیر می‌نماید. مخلوط واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر (10X)، یک میکرولیتر MgCl2 (۵۰ میلی مولار)، نیم میکرولیتر dNTP (۱۰ میلی مولار)، یک میکرولیتر از هر آغازگر بالادست و پایین دست با غلظت ۱۰ پیکومول در میکرولیتر، (جدول ۱)، ۰/۲۵ میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase (Fermentas) (10 u/µl) و دو میکرولیتر DNA بود که حجم آن توسط آب دو بار تقطیر سترون به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. تکثیر نواحی ژنومی مورد نظر با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Biorad T100) و با اعمال حرارت ۹۴°C به مدت دو دقیقه جهت واسرشت‌سازی اولیه و به دنبال آن ۳۵ چرخه شامل ۹٤°C به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۵°C به مدت ۶۰ ثانیه و ۷۲°C به مدت ۶۰ ثانیه و در نهایت یک چرخه ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه جهت گسترش نهایی انجام شد. محصول PCR در ژل آگارز یک درصد در الکتروفورز با ولتاژ ۹۰ ولت ثابت به مدت ۴۰ دقیقه الکتروفورز شد. مشاهده و عکس‌برداری از قطعات دی ان آ تکثیر یافته طی واکنش پی‌سی‌آر با استفاده از دستگاه تصویربرداری از ژل (Gel Documentation) انجام شد.

**تنوع بیماریزایی:**

**جدایه‌ها:** برای بررسی تنوع بیماریزایی جدایه‌ها در گلخانه از بین جدایه‌های قارچی شناسایی شده، تعداد ۳۵ جدایه بر اساس وسعت منطقه نمونه‌برداری، ویژگی‌های جغرافیایی محل نمونه‌برداری، ارتفاع از سطح دریا، تنوع در شکل، الگوی رویشی و رنگ پرگنه، به نحوی انتخاب گردید که تفاوت‌های موجود در همه مولفه‌های فوق را پوشش دهد (جدول ۱).

**تهیه نهال:** به منظور تعیین میزان تنوع بیماریزایی جدایه‌ها *C. pseudonaviculata* تعداد ۱۵۰ نهال شش ساله شمشاد گونه *Buxus sempervirens* subsp. *hyrcana* از محلی عاری از آلودگی در جنگل سی‌سنگان واقع در استان مازندران با ارتفاع ۱۰ متر از سطح دریا و با وارسی دقیق از عدم وجود آلودگی در اندام‌های گیاهی در محل تهیه گردید. نهال‌ها پس از انتقال به گلخانه در گلدان‌های سترون حاوی سه کیلوگرم خاک جنگلی سترون واکشت شد، برای اطمینان از عدم احتمال

آلودگی اولیه، گلدانها به مدت دو هفته در شرایط بهینه دمایی- رطوبتی (رطوبت ۹۰٪ و دمای ۲۵°C-۲۲) برای رشد و توسعه عامل بیماری احتمالی در گلخانه نگهداری شد و روزانه وضعیت نهال‌ها ازنظر آلودگی‌های احتمالی به عامل بلایت شمشاد و سایر عوامل قارچی بررسی شد، در پایان این دوره با در نظر گرفتن اندازه و انبوهی برگ روی نهال و میزان رشد نهال، تعداد ۱۰۸ نهال که از نظر مولفه‌های مذکور تا حدودی همگن بودند انتخاب شد.

آزمایش مقایسه میزان بیماریزایی جدایه‌ها در گلخانه در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار برای هر جدایه در نظر گرفته شد. قبل از انجام آزمایش نهال‌ها به صورت تصادفی چیده شد و گلدان‌ها شماره زده شد، سپس شماره جدایه‌ها و شماره سه تکرار برای هر جدایه از طریق نرم افزار آماری SPSS مشخص شد و طبق نقشه برای هر جدایه آزمون بیماری‌زایی صورت گرفت.

**تهیه زادمایه:** تعداد ۳۵ جدایه منتخب قارچ عامل بیماری در محیط PCA کشت شد و در تناوب ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت نور نزدیک فرابنفش جهت اسپورزایی قرار داده شد.

**جدول ۱**- جدایه‌های منتخب *Calonectria pseudonaviculata* مورد استفاده در آزمایش بیماریزایی

**Table 1.** The representative *Calonectria pseudonaviculata* isolates used for pathogenicity test

| کد جدایه | تاریخ جمع آوری | محل جمع آوری | استان | ارتفاع از سطح دریا |
|---|---|---|---|---|
| **Isolate code** | **collection date** | **Location** | **Province** | **Height** |
| Cy-01 | Sep- 2014 | Afrachal | Mazandaran | 756 |
| Cy-02 | Sep- 2014 | Afrachal | Mazandaran | 756 |
| Cy-04 | Sep- 2014 | Savadkooh-chaeebagh | Mazandaran | 231 |
| Cy-05 | Sep- 2014 | Neka | Mazandaran | 63 |
| Cy-06 | Sep- 2014 | Neka | Mazandaran | 63 |
| Cy-08 | Sep- 2014 | Neka | Mazandaran | 74 |
| Cy-12 | Sep- 2014 | Savadkooh-sorkhkola | Mazandaran | 414 |
| Cy-13 | Sep- 2014 | Savadkooh-sorkhkola | Mazandaran | 456 |
| Cy-17 | Sep- 2014 | Savadkooh-vachat | Mazandaran | 430 |
| Cy-18 | Agu-2014 | Astara | Gilan | 193 |
| Cy-22 | Agu-2014 | Afrachal | Mazandaran | 742 |
| Cy-23 | Agu-2014 | Savadkooh-chaeebagh | Mazandaran | 231 |
| Cy-24 | Agu-2014 | Ghaemshahr | Mazandaran | 268 |
| Cy-26 | Jul-2014 | Bandargaz | Golestan | 213 |
| Cy-30 | Jul-2014 | Bandargaz | Golestan | 213 |
| Cy-34 | Agu-2014 | Astara | Gilan | 120 |
| Cy-36 | Agu-2014 | Astara | Gilan | 70 |
| Cy-39 | Agu-2014 | Kalat | Gilan | 150 |
| Cy-42 | Agu-2014 | Kalat | Gilan | 50 |
| Cy-44 | Jun-2014 | Sisangan | Mazandaran | 11 |
| Cy-48 | Jun-2014 | Chalandar | Mazandaran | 64 |
| Cy-49 | Jun-2014 | Chalandar | Mazandaran | 64 |
| Cy-50 | Jun-2014 | Kohnesara | Mazandaran | 21 |
| Cy-51 | Jun-2014 | Sisangan | Mazandaran | 11 |
| Cy-52 | Jun-2014 | Kohnesara | Mazandaran | 4 |
| Cy-53 | Jun-2014 | Liresar | Mazandaran | 376 |
| Cy-56 | Jul-2014 | Liresar | Mazandaran | 245 |
| Cy-58 | Jul-2014 | Liresar | Mazandaran | 300 |
| Cy-60 | Jul-2014 | Tooskatok | Mazandaran | 36 |
| Cy-62 | Sep-204 | Sari-Berengestanak | Mazandaran | 283 |
| Cy-64 | Jul-2014 | Mashelak | Mazandaran | 151 |
| Cy-71 | Jun-2014 | Roodsar | Gilan | 53 |
| Cy-72 | Jun-2014 | Siyahkal | Gilan | 171 |
| Cy-73 | Jun-2014 | Gisoom | Gilan | 4 |
| Cy-74 | Jun-2014 | Roodsar | Gilan | 142 |
| Cy-75 | Jun-2014 | Bijarkenar | Gilan | -1 |

بعد از دو هفته اسپورهای تولید شده در سطح ظروف پتری با استفاده از آب مقطر سترون شستشو شد و با توجه به میزان اسپور تولید شده، با افزودن حجم مناسبی از آب مقطر سترون، سوسپانسیونی با تراکم $۴\times۱۰^{۴}$ اسپور در میلی‌لیتر از هر جدایه تهیه شود. آزمون بیماریزایی و مایه زنی با روش فرو بردن برگ گیاه در سوسپانسیون اسپور (Henricot *et al.*, 2008) انجام شد. برای تامین رطوبت بهینه جوانه‌زنی اسپور و ایجاد بیماری (٪۹۰-۸۰)، هر یک از گلدان‌ها با کیسه نایلونی پوشانده شد و یک قطعه پنبه خیس جهت حفظ رطوبت در نایلون قرار داده شد. دمای گلخانه ۲۵±۲ و رطوبت آن ۸۵- ۹۰٪ و نور روز - شب در یک دوره ۲۸ روزه بود. آزمایش در دوره زمانی ۴ آبان ۱۳۹۴ تا اوایل آذر با ۳۵ جدایه انجام شد و گلدان‌ها دو روز در میان آبیاری گردیدند.

**ارزیابی شدت بیماری روی نهال شمشاد:**

ارزیابی شدت بیماری به دو روش انجام شد:

**الف)** یادداشت برداری ۲۱ روز پس از مایه زنی و نمره دهی مطابق جدول (۲) انجام شد.

**جدول ۲**- درجه بندی شدت آلودگی نهال‌های شمشاد جنگلی (*Buxus sempervirens* subsp. *Hyrcana*) مایه زنی شده با جدایه‌های *Calonectria pseudonaviculata* در گلخانه

**Table 2.** Scoring the virulence of *Calonectria pseudonaviculata* isolates on *Buxus sempervirens* subsp. *Hyrcana* saplings in greenhouse

| درجه بیماری<br>Disease grade | اندازه لکه برگی<br>Leaf spot size |
|---|---|
| 0 | بدون علائم<br>No symptoms |
| 1 | ۱ تا ۲۵ درصد سطح برگ<br>1-25% of leaf surface |
| 2 | ۲۶-۵۰ درصد برگ<br>26-50% of leaf surface |
| 3 | ۵۱-۷۵ درصد برگ<br>51-75% of leaf surface |
| 4 | ۷۶-۱۰۰ درصد برگ و ریزش آن<br>76-100% of leaf surface |

شدت بیماری با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (Wheeler, 1969).

$$DSI=\frac{\text{جمع (درجه شدت بیماری} \times \text{تعداد برگ‌های آلوده به درجه آلودگی مربوطه)}}{\text{تعداد کل برگ‌ها} \times \text{بالاترین درجه بیماری}} \times ۱۰۰$$

(DSI) شاخص شدت بیماری)[۱]

**ب)**- با توجه به اینکه ریزش برگ‌ها مهم‌ترین فاکتور در ایجاد خسارت ناشی از بیماری بلایت شمشاد و عامل نابودی درختان شمشاد است، ارزیابی شدت بیماری با استفاده از این روش نیز انجام شد، در این روش ۲۸ روز بعد از مایه‌زنی ریزش برگ‌ها معیار ارزیابی شدت بیماری در نظر گرفته شد. به این منظور تعداد برگ‌های ریخته شده برای هر تیمار شمارش شد و سپس به کل برگ‌های نهال تقسیم گردید. در هر دو روش برای اثبات بروز علائم با قارچ *C. pseudonaviculata* از هر بوته تعدادی برگ دارای علائم انتخاب و عامل بیماری مجددا از آنها جداسازی شد.

**تجزیه و تحلیل داده‌ها:** تجزیه واریانس داده‌ها در قالب طرح کاملا تصادفی با ۳۵ تیمار، در سه تکرار و آزمون مقایسه میانگین ها بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در مورد شدت بیماری توسط نرم آفزار آماری SPSS انجام شد و گروهبندی جدایه‌های مختلف با استفاده از این نرم افزار صورت گرفت.

## نتیجه و بحث

**نتایج جداسازی عامل بیماری (تعیین پراکنش بیماری):** قارچ عامل بیماری از درختان شمشاد دارای علایم بیماری بلایت در کلیه مناطق شامل آستارا، گیسوم، کلات، بیجار کنار، رودسر و سیاهکل در استان گیلان، سی‌سنگان، چلندر، کهنه سرا، توسکاتوک، ماشلک، لیره سر، جیسا، برنجستانک، قائمشهر، نکا- شاهبند، افراچال، سوادکوه-وچات، سوادکوه-سرخکلا و سوادکوه-چای‌باغ در استان مازندران و لیوان شرقی- بندر گز دراستان گلستان جداسازی شد.

نتایج حاصل بیانگر وسعت پراکنش بیماری در سراسر

۱-Disease severity index

جنگل‌های شمشاد هیرکانی از آستارا در غربی‌ترین ناحیه تا گلستان در شرقی‌ترین نواحی جنگل‌های خزری با شدت متفاوت است. نتایج مطالعات سال‌های اخیر نشان می‌دهد که این بیماری از استان گیلان به سمت شرق کشور با سرعت زیادی رو به گسترش بوده است، این بیماری ابتدا به عنوان یک بیماری قارچی در لیره سر تنکابن در استان مازندران گزارش گردید (Mirabolfathy *et al*., 2013; Rezaee *et al*., 2013) و سپس از استان‌های گیلان و مازندران (Mirabolfathy, 2013) گزارش شد. انتشار بیماری تا استان گلستان منطقه بندرگز در سال ۱۳۹۴ گزارش شد (Khazaeli *et al*., 2015)، که این امر نشان دهنده گسترش سریع بیماری در مدت سه سال تا شرق جنگل‌های هیرکانی است.

نتایج نشان داد که جداسازی قارچ عامل بیماری از برگ‌های دارای علائم لکه برگی نسبت به سرشاخه‌ها کارایی بالاتری دارد. پایش بیماری در زمان نمونه‌برداری نشان داد شدت آلودگی بیماری درخانه آسیاب آستارا، پارک جنگلی دکتر رستگار گیسوم، باغ شمشاد سیاهکل و بیجار کنار در استان گیلان و منطقه لیره‌سر وجیسا در استان مازندران بیشتر بود به نحوی که در این مناطق درختان و نهال‌های شمشاد کاملاً خشک شده بودند.

**ریخت‌شناسی جدایه‌ها:** در خصوص مطالعات ریخت شناسی انجام شده در این تحقیق با در نظر گرفتن ویژگی‌هایی چون شکل و اندازه کنیدیوم و کنیدیوفور، شکل و اندازه پایه، رنگ و شکل پرگنه در محیط کشت و با استفاده از کلید شناسایی گونه‌های *Cylindrocladium* (Crous *et al*., 2004)، تعداد ۸۰ جدایه خالص‌سازی و شناسایی شد. محیط کشت MEA برای بررسی و تفکیک جدایه‌ها از نظر رنگ و شکل پرگنه مناسب‌تر و بهتر از محیط کشت PDA تشخیص داده شد. جدایه‌ها از نظر شکل پرگنه متفاوت بودند به طور کلی می توان این جدایه‌ها را به دو گروه تقسیم کرد: گروه اول جدایه‌هایی با پرگنه منظم، حاشیه کرم رنگ، در مرکز به رنگ قهوه‌ای روشن، گروه دوم جدایه‌هایی با پرگنه منظم با رنگ قهوه‌ای تیره، میزان رشد جدایه‌ها در دمای ۲۵°C بیانگر سرعت رشد متفاوت دو گروه اخیرالذکر بود. میانگین رشد جدایه‌ها در دمای ۲۵ °C در مدت چهار روز برای گروه اول ۷ تا ۱۰ میلی‌متر و برای گروه دوم ۵ تا ۶ میلی‌متر بود، که نشان دهنده تفاوت نرخ رشد در جدایه‌ها بود که در بررسی تنوع ریخت‌شناسی در تحقیقات بعدی می‌تواند مورد توجه قرارگیرد. دمای ۲۵ °C به عنوان بهینه دمایی در این تحقیق تأیید شد و در تمامی جدایه‌ها رشد قارچ در دمای بالای ۳۰°C متوقف شد، بهینه و بیشینه دمایی جدایه‌های *C. pseudonaviculata* جنگل‌های شمشاد ایران مؤید نتایج به دست آمده در تحقیقات قبلی بود (Crous *et al*., 2002)، که یکی از ویژگی‌های فیزیولوژیک جدا کننده این گونه از سایر گونه‌های این جنس است. کروس و همکاران (Crous *et al*., 2002)، حداقل دمای رشد برای قارچ عامل بیماری را ۵ و حداکثر دما را ۳۰°C و دمای بهینه رشد را نیز ۲۵°C گزارش نمودند ، همچنین هنریکوت و کالهام (Henricot and Calhum, 2002)، همین اعداد دمایی را تایید کردند.

ویژگی‌های مورفولوژی ماکروکنیدیوفر شامل شاخه‌های زایا فرچه مانند، که تولید کنیدیوم‌های فیالیدی، پایه (رشته عقیم فاقد اندام زایا) طویل و وزیکول در انتهای آن با طول ۱۵۵μ m تا ۹۵ و دارای بند، وزیکول بیضی شکل دارای پاپیل با قطر ۶/۵–۱۱μ m، فیالیدهای اولیه یک دیواره یا بدون دیواره با ابعاد ۳–۵μm × (۶۶–)(۴۱–۵) (–۵)، فیالیدهای ثانویه بدون دیواره عرضی ۳–۵μ m ×(۳۳–)(۲۵–۳)(–۱۱) و انشعبات فیالیدی سوم که دیده نشد. کنیدیوم‌ها سیلندری در دو انتها گرد کشیده، صاف و شفاف بوده و دارای یک دیواره عرضی بودند. اندازه کنیدیوم‌ها ۴–۶μ m ×۶۷–۴۱ بود که این نتایج با کلید شناسایی هنریکوت و کالهام (۲۰۰۲) و کروس و همکاران (۲۰۰۲) تطابق داشت (شکل ۱).

**شناسایی مولکولی جدایه‌ها:** با توجه به اینکه ویژگی‌های ریخت‌شناسی در جنس *Cylindrocladium* دارای هم‌پوشانی با گونه‌های مختلف می‌باشد، جهت اطمینان از

تعیین گونه جدایه‌ها که براساس ویژگی‌های ریخت شناسی تعیین شده بود، جدایه‌های جنگل‌های هیرکانی ایران با استفاده از آغازگرهای اختصاصی گونه شناسایی شدند. آغازگرهای مورد استفاده قبلاً توسط Healy (2014) طراحی و بررسی شده بود، نتایج تحقیق حاضر نشان داد که در تمامی جدایه‌های *C. pseudonaviculata* باند اختصاصی ۲۵۰جفت بازی تولید و در الکترفورز پدیدار شد. هیلی Healy (2014) ده گونه نزدیک به *C. pseudonaviculata* را آزمایش نموده و نتایج او نشان داده است آغازگرهای طراحی شده او برای این گونه اختصاصی بوده و قادر به تکثیر این قطعه در هیچ یک از ۱۰ گونه مورد استفاده او نبوده است. نتایج بررسی حاضر نیز با نتایج ایشان مطابقت داشت و نتایج حاصل از محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای ITS4 و ITS311F در ژل آگارز نشان داد که این آغازگرها توانستند قطعه‌ای به طول ۲۵۰ جفت باز را در تمام جدایه‌های *C. pseudonaviculata* تکثیر نمایند و نتایج شناسایی برای ۸۰ جدایه مشابه بود، برای نشان دادن ویژگی این آغازگرها برای تکثیر اختصاصی باند ۲۵۰ جفت‌بازی در جدایه‌های *C. pseudonaviculata*، از جدایه‌های سایر آرایه‌های قارچی شامل *Fusarium solani*، *Mycogon perniciosa*، *Clonostachys buxi* و *Calonectria ilicicola* استفاده شد که با مواد و روش و شرایط کاملاً یکسان در آرایه‌های اخیرالذکر قطعه اختصاصی تولید نشد (شکل ۲). برای شناسایی سریع و تأیید دقیق هویت گونه‌های قارچی استفاده از روش‌های مولکولی از اهمیت ویژه برخوردار است. یکی از مهم‌ترین دلایل برای استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای تشخیص گونه *C. pseudonaviculata* این است که ویژگی‌های ریخت‌شناسی گونه‌های این قارچ باهم همپوشانی دارند و تفکیک گونه‌ها از هم با بررسی مورفولوژی بسیار زمان بر و در عین حال دقیق نیست و استفاده از روش‌های مولکولی در تشخیص گونه موثرتر است.

**آزمون بیماری‌زایی:** علائم اولیه بیماری بلایت شمشاد در طی مدت ۱۵ روز روی نهال‌ها ظاهر گردید. نتایج حاصل از بررسی در روش اول که ارزیابی بعد از ۲۱ روز و بر اساس علائم برگی انجام شده بود، نشان داد که همه جدایه‌ها طیفی از علائم مشخص بیماری شامل لکه‌های قهوه‌ای تیره در سطح فوقانی برگ‌ها، لکه‌های کشیده روی ساقه و همچنین ریزش برگها را نشان دادند (شکل ۳). نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که جدایه‌ها از نظر شدت بیماریزایی روی نهال شمشاد در سطح احتمال ۱٪ دارای اختلاف معنی‌داری هستند و جدایه‌ها در گروه‌های متفاوتی قرار گرفتند (جدول ۳). گروهبندی جدایه‌ها از نظر میانگین شدت بیماری در این روش با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن نشان داد که جدایه‌ها مطابق جدول ۴ درگروههای متفاوت قرار گرفتند (جدول ۴).

در بین جدایه‌ها جدایه Cy-08 که از منطقه نکا جداشده بود، بیشترین شدت بیماریزایی را نشان داد (شکل ۴). جدایه‌های Cy-12 ، Cy-13 و Cy-22 مربوط به منطقه سواد کوه–سرخکلا و افراچال کمترین بیماریزایی را بروز داد و هر سه جدایه در یک گروه بیماریزایی قرار گرفتند. بعد از جدایه Cy-8جدایه‌های Cy-04 ، Cy-34، Cy-74، Cy-44 مربوط به سوادکوه–چای باغ، آستارا، رودسر و سی‌سنگان و جدایه‌های Cy-53 و Cy-58 مربوط به لیره سر با اختلاف کم از یکدیگر بیشترین شدت بیماریزایی را به خود اختصاص دادند. از طرف دیگر جدایه‌های Cy-62، Cy-52 مربوط به برنجستانک، کهنه سرا و جدایه شماره Cy-26 و Cy-1 مربوط به بندرگز و افراچال در گروههای بعدی با بیماریزایی کمتر و با اختلاف کمی از شاهد قرار گرفتند. به طور کلی و با توجه به شدت بیماری به دست آمده از جدایه‌های مختلف در آزمون بیماریزایی می توان به این نتیجه رسید که در مناطقی که شیوع و خسارت بیماری در آنها بیشتر است، جدایه‌هایی با شدت بیماریزایی بیشتر دیده شده و بیماریزایی آن‌ها در گلخانه نیز بیشتر بود. به طور مثال در آستارا، رودسر، سی‌سنگان و لیره‌سر شدت و خسارت بیماری بسیار بالا برآورد شد و جدایه‌های حاصل از این مناطق نیز بیماریزاتر

بودند و برعکس در مناطقی مانند سوادکوه و افراچال که میزان آلودگی در منطقه مورد بازدید پایین است، جدایه‌های جمع‌آوری شده از آنها نیز بیماریزایی کمتری داشتند.

گروهبندی جدایه‌ها از نظر میانگین شدت بیماری با روش دوم یعنی ارزیابی شدت بیماری بر اساس میزان ریزش برگ نسبت به کل برگ‌های نهال ۲۸ روز پس از مایه زنی در گلخانه نیز انجام شد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها در این روش نشان داد که جدایه‌ها از نظر شدت بیماریزایی روی نهال شمشاد در سطح احتمال ۱٪ دارای اختلاف معنی‌داری هستند و جدایه‌ها در گروه‌های متفاوتی قرار گرفتند (جدول ۵) و گروهبندی داده ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن جدایه‌ها را مطابق جدول ۶ در گروههایی با بیماریزایی متفاوت قرار داد (جدول ۶).

بیشترین شدت بیماری مربوط به جدایه شماره Cy-8 از منطقه نکا و کمترین مربوط به Cy-22 و Cy-12 از منطقه افراچال و سواد کوه- سرخکلا می‌باشد که این نتایج با نتایج حاصل از روش اول همخوانی دارد (شکل ۵).

**جدول ۳**- تجزیه واریانس شدت بیماری حاصل از ۳۵ جدایه مختلف *Calonectria pseudonaviculata* روی نهال‌های شمشاد بر اساس شاخص لکه برگی

**Table 3-** Analysis of variation (ANOVA) of disease severity means of 35 different isolates of *Calonectria pseudonaviculata* on Boxwood saplings based on leaf spot index

| F test | میانگین مربعات<br>Mean Squares | مجموع مربعات<br>Sum of Squares | درجه آزادی<br>df | منابع تغییرات<br>Source of Variations |
|---|---|---|---|---|
| 31.14** | 0.045 | 1.604 | 35 | Treatment |
| | 0.01 | 0.106 | 72 | Error |
| | | 1.071 | 107 | Total |

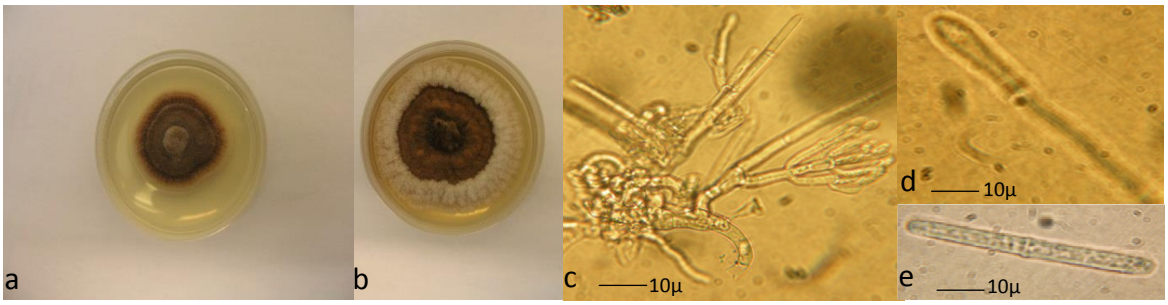
**- significant=P< 0.01 **معنی دار در سطح P<۰/۰۱

**جدول ۴**- گروهبندی میانگین شدت بیماری حاصل از۳۵ جدایه مختلف *Calonectria pseudonaviculata* روی نهال‌های شمشاد، بر اساس شاخص لکه برگی

**Table 4-** Groups of disease severity means of 35 *Calonectria pseudonaviculata* isolates on Boxwood saplings based on leaf spot index

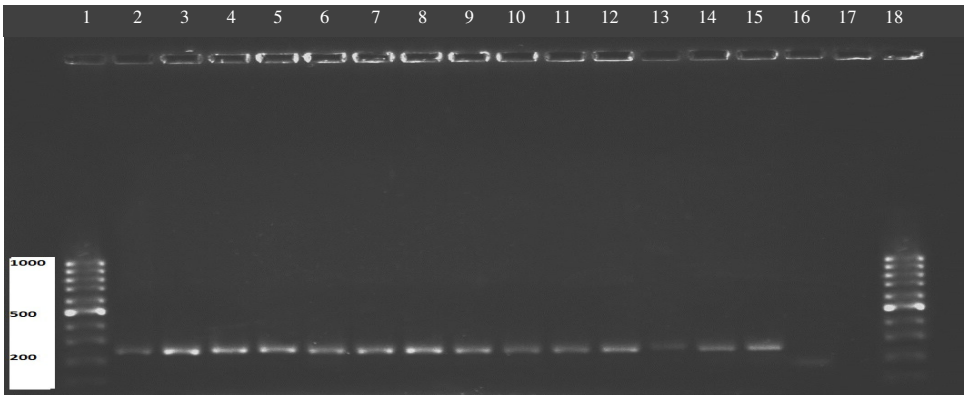
| کد جدایه<br>Isolate code | میانگین شدت بیماری<br>DSI Mean | کد جدایه<br>Isolate code | میانگین شدت بیماری<br>DSI Mean |
|---|---|---|---|
| Cy-08 | 39.2 a | 24- Cy | 22.1 hi |
| Cy-04 | 38.4 ab | 48- Cy | 21.3hi |
| Cy-34 | 37.2 abc | 56- Cy | 18 ij |
| 74-Cy | 36.4 abcd | 23- Cy | 14.6 jk |
| 44- Cy | 32.9 bcde | 17- Cy | 14.2 jk |
| 53- Cy | 32.7 bcde | 60- Cy | 13.6 jkl |
| 58- Cy | 32.1 cdef | 64- Cy | 13.4jklm |
| 73- Cy | 30.4 defg | 30- Cy | 11.3 klm |
| 5- Cy | 27.3 efgh | 50- Cy | 7.4 lmn |
| 2- Cy | 27.2 efgh | 49- Cy | 7.2 mn |
| 75- Cy | 26.7 efgh | 1- Cy | 4.3 no |
| 72- Cy | 26.3 fgh | 26- Cy | 4.2 no |
| 42- Cy | 26.2 fgh | 52- Cy | 4 no |
| 18- Cy | 25.9 fgh | 62- Cy | 3 no |
| 39- Cy | 25.2 gh | 22- Cy | 0.3 o |
| 51- Cy | 24.7 gh | 13- Cy | 0.2 o |
| 36- Cy | 24.2 ghi | 12- Cy | 0.2 o |
| Cy-08 | 39.2 a | Control | 0.0 o |

حروف غیر مشترک نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۹۹ درصد می‌باشد.



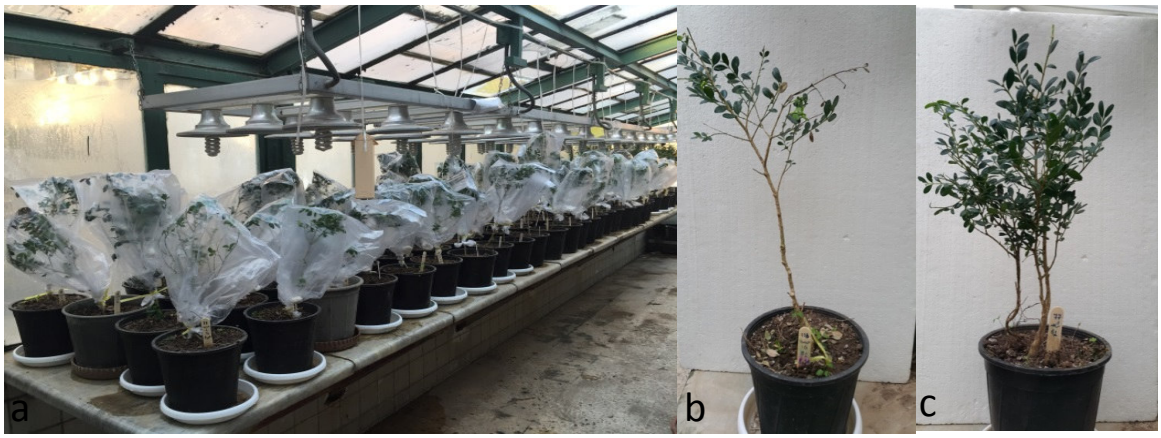

**شکل ۱**– a,b پرگنه *Calonectria pseudonaviculata* در محیط MEA بعد از ۷ روز، c– کنیدیوم و کنیدیوفر، d– استیپ e- کنیدیوم قارچ

**Fig.1.** a,b: *Colony pattern of Calonectria pseudonaviculata* after seven-days in 25°C on MEA. c: conidiophores and conidial cell, d: stip, e: conidia.



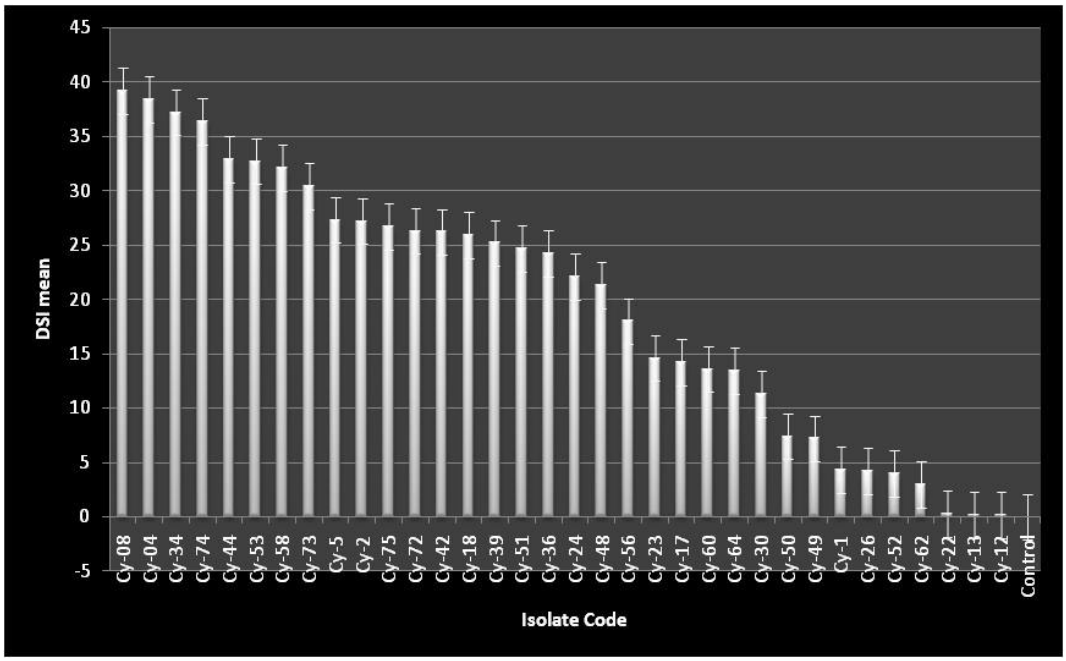

**شکل ۲**– شناسایی اختصاصی جدایه‌های *Calonectria pseudonaviculata* با استفاده از آغازگرهای ITS4/ITS311F، به ترتیب از چپ، راهک ۱ نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت باز، راهک ۲ شاهد مثبت (توالی یابی شده) *C. pseudonaviculata*، راهک‌های ۳ تا ۱۴ جدایه‌های مختلف *C. pseudonaviculata*، راهک ۱۵ *Calonectria ilicicola*، راهک ۱۶کنترل منفی فاقد د-ان-آ هدف (اندازه باندها ۲۵۰ جفت باز).

**Fig. 2.** Specific identification of *Calonectria pseudonaviculata* isolates using ITS4/ITS311F primers.Respectivelt from left lanes 1: Ladder 100 bp., 2: Positive control, 3-14: PCR products of different *Calonectria psudonaviculata* isolates using ITS4/ ITS311F primeres ,15 *Calonectria ilicicola* isolate, 16: Negative controls without DNA. (PCR products were 250bp).



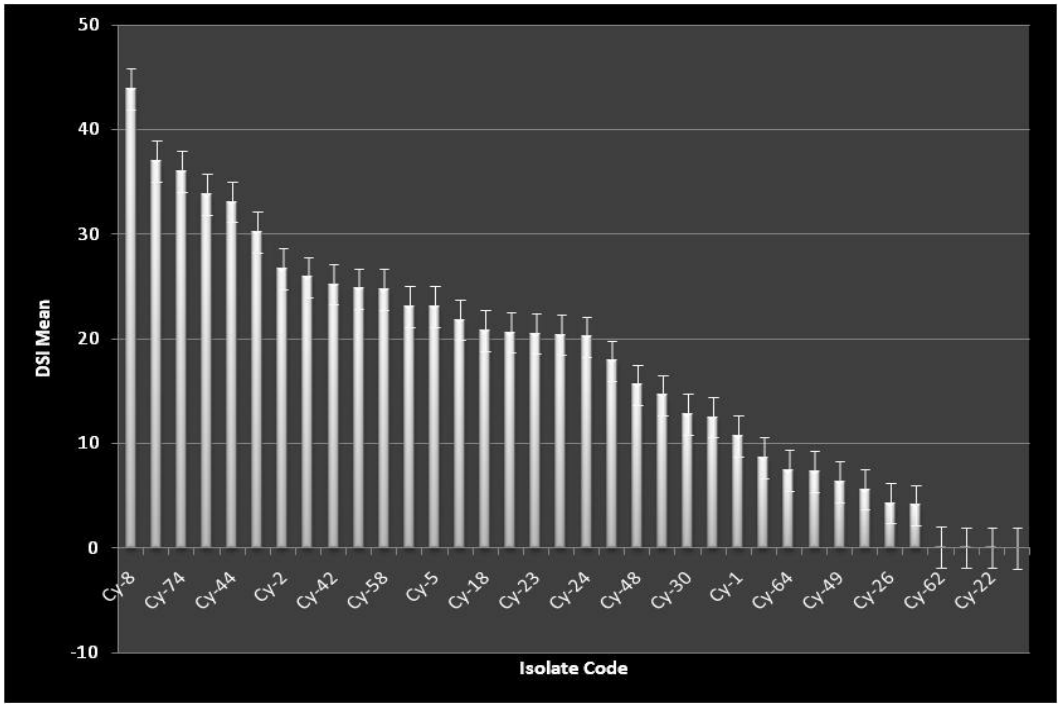

**شکل ۳**– مایه‌زنی نهال‌های شمشاد با جدایه‌های *Calonectria pseudonaviculata*. a: نهال‌های مایه زنی شده. b: علائم آلودگی بعد از ۲۸ روز c: نمونه شاهد

**Fig. 3.** a: Inoculation of buxus saplings at greenhouse b: Symptom after 28 days c: Negative control




**شکل ۴**- هیستوگرام مقایسه میانگین شدت بیماری حاصل از ۳۵ جدایه *Calonectria pseudonaviculata* بر اساس شاخص لکه برگی

**Fig. 4.** Histogram of 35 isolates of *Calonectria pseudonaviculata* DSI mean based on leaf spot index




**شکل ۵**- هیستوگرام مقایسه میانگین شدت بیماری حاصل از ۳۵ جدایه *Calonectria pseudonaviculata* بر اساس درصد ریزش برگ

**Fig. 5.** Histogram of 35 isolates of *Calonectria pseudonaviculata* DSI mean based on leaf abscission percent

**جدول ۵**- تجزیه واریانس شدت بیماری حاصل از ۳۵ جدایه *Calonectria pseudonaviculata* بر اساس درصد ریزش برگ نهالهای شمشاد

**Table 5-** Analysis of variation (ANOVA) of disease severity means of 35 different isolates of *Calonectria pseudonaviculata* on Boxwood saplings based on leaf abscission percent

| F test | میانگین مربعات<br>Mean Squares | مجموع مربعات<br>Sum of Squares | درجه آزادی<br>df | منابع تغییرات<br>Source of Variations |
|---|---|---|---|---|
| 4.73** | 0.33 | 1.156 | 35 | تیمار |
| | 0.007 | 0.502 | 72 | خطا |
| | | 1.658 | 107 | کل |

**- significant=P< 0.01 **معنی دار در سطح P<۰/۰۱

**جدول ۶**- گروهبندی میانگین شدت بیماری حاصل از ۳۵ جدایه مختلف *Calonectria pseudonaviculata* روی نهال‌های شمشاد، بر اساس درصد ریزش برگ

**Table 6-** Groups of disease severity means of 35 *Calonectria pseudonaviculata* isolates on Boxwood saplings based on leaf abscission percent

| کد جدایه<br>Isolate code | میانگین شدت بیماری<br>DSI Mean | کد جدایه<br>Isolate code | میانگین شدت بیماری<br>DSI Mean |
|---|---|---|---|
| Cy-8 | 43.9 a | Cy-24 | 20.2fghijk |
| Cy-6 | 37 ab | Cy-56 | 17.9 ghijkl |
| Cy-۷۴ | 36 ab | Cy-48 | 15.6 hijklm |
| Cy-34 | 33.8 bc | Cy-36 | 14.6 ijklmn |
| Cy-44 | 33.1 bcd | Cy-30 | 12.8 jklmno |
| Cy-53 | 30.2 bcde | Cy-60 | 12.5klmnop |
| Cy-2 | 26.7 cdef | Cy-1 | 10.7lmnop |
| Cy-72 | 25.9 cdefg | Cy-17 | 8.6 mnopq |
| Cy-42 | 25.2 defg | Cy-64 | 7.4 mnopqr |
| Cy-75 | 24.8 defg | Cy-50 | 7.3 nopqr |
| Cy-58 | 24.7 efg | Cy-49 | 6.3 nopqr |
| Cy-73 | 23.1 efgh | Cy-52 | 5.6 opqr |
| Cy-5 | 23.1 efgh | Cy-26 | 4.3 pqr |
| Cy-39 | 21.8 fgh | Cy-13 | 4.1pqr |
| Cy-18 | 20.8 fghij | Cy-62 | 0.06 qr |
| Cy-51 | 20.6 fghijk | Cy-12 | 0.02 r |
| Cy-23 | 20.5 fghijk | Cy-22 | 0.02 r |
| Cy-4 | 0.204 fghjk | Control | 0.0 r |

حروف غیر مشترک نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۹۹ درصد می‌باشد.

نظر به این که از دو روش برای ارزیابی شدت بیماری استفاده شده بود، برای یافتن همبستگی بین نتایج حاصل از این دو روش ارزیابی در برآورد و مقایسه شدت بیماری جدایه‌ها، ضریب همبستگی پیرسون محاسبه شد که این ضریب معادل ۰/۹۳۴ بود و نتیجه حاصل نشان داد که از هر دو روش می‌توان برای ارزیابی شدت بیماری استفاده کرد. با توجه به اینکه خزان برگ‌ها از علائم اصلی این بیماری است و بیشتر خسارت بیماری بواسطه ریزش برگ‌ها می‌باشد، به نظر می‌رسد برای آزمون ارزیابی و مقایسه میزان بیماریزایی و یا قدرت تهاجمی جدایه‌ها در گلخانه می‌توان از شاخص درصد برگ‌های ریزش یافته که روشی صریح‌تر و آسان‌تر است و نتایج آن همبستگی بالایی با روش شاخص لکه برگی دارد، می‌توان استفاده نمود و آنرا توصیه نمود. در هر دو روش از برگ‌های دارای علائم، جدایه عامل بیماری مجددا

جداسازی و شناسایی شد. برای یافتن رابطه بین ارتفاع منطقه آلوده از سطح دریا و میزان شدت بیماریزایی جدایه‌های حاصل از آن منطقه ارتفاع محل هر نمونه‌برداری از سطح دریا ثبت شده بود، نتایج تجزیه واریانس همبستگی داده‌های حاصل از شدت بیماری و ارتفاع‌های مختلف نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین ارتفاع منطقه و شدت بیماریزایی جدایه‌های هر منطقه وجود ندارد (جدول ۷) و اثر بیماری‌زا بودن جدایه‌ها خود به تنهایی مهم‌تر از تاثیر فاکتورهای محیطی مانند ارتفاع از سطح دریا بر شدت بیماری است.

**جدول ۷**- جدول تجزیه واریانس رابطه بین داده‌های حاصل از شدت بیماری ۳۵ جدایه مختلف *Calonectria pseudonaviculata* روی نهالهای شمشاد در گلخانه و ارتفاع مناطق مورد جمع آوری جدایه ها

**Table 7-** Analysis of variation of correlation between pathogenicity degrees of *Calonectria pseudonaviculata* iolates and altitude of sampling locations

| | Sum of Squares | Df | Mean Square | F |
|---|---|---|---|---|
| **Regression** | 0.017 | 1 | 0.017 | 0.826 ns |
| **Residual** | 1.473 | 73 | 0.020 | |
| **Total** | 1.489 | 74 | | |

non significant=ns اختلاف معنی دار نیست

به طور کلی نتایج این بررسی نشان داد که این بیماری با توجه به سیکل زندگی کوتاه خود در شرایط مساعد آب و هوایی به سرعت پیشرفت می‌کند. سطح گستردگی در مناطق گیلان به عنوان اولین محل آلودگی بسیار زیاد و اکثر درختان خشکیده بودند، که در طی نمونه‌برداری دیده شد و از طرفی تمام جدایه‌های جدا شده از این منطقه شدت بیماریزایی زیادی را نشان دادند. بعد از گیلان در منطقه لیره سر و سی‌سنگان در مازندران بیماری به شدت پیشرفت کرده و در سایر مناطق بیماری رو به افزایش بود.

ارتباطی بین ارتفاع و میزان بیماریزایی در یافته‌های این تحقیق مشاهده نشد، البته در بررسی‌های انجام شد در مرحله نمونه‌برداری در مناطق با رطوبت بالا (۸۰ تا ۹۰ درصد) و هوای حدود ۲۵°C در تابستان آلودگی بیشتر قابل رویت بود. از آنجایی که تشخیص سریع بیماری می‌تواند در اقدامات مدیریتی موثر باشد، کاربرد آغازگرهای اختصاصی بررسی شده در این تحقیق می‌تواند روش مناسبی برای این منظور و تشخیص سریع‌تر عامل بیماری باشد.

بررسی‌های انجام شده در آزمون بیماریزایی نشان داد، که ایجاد شرایط مناسب آب و هوایی یعنی دمای بین ۲۲ تا ۲۵°C و رطوبت بالا حدود ۸۰ تا ۹۰ درصد از عوامل مهم در بروز بیماری است، در این بررسی دیده شد که رطوبت عامل بسیار موثری در ایجاد بیماری است به طوری که با تأمین نشدن رطوبت مناسب در گلخانه بروز بیماری کند می‌شد، این امر نتیجه مشاهدات میدانی را تأیید نمود، چنانکه در مناطق با رطوبت بالاتر و مناطق حاشیه رودخانه، هم بواسطه رطوبت بالاتر و هم آب به عنوان حامل سهل‌تر جابجا کننده اسپور به طور مستقیم و هم محل رفت و آمد وحوش و انسان به عنوان حاملین اسپور پیشرفت بیماری سریع‌تر اتفاق می‌افتاد، که در نتیجه این مسئله در الگوی زمینی نیز قابل تأیید است. همچنین دمای مناسب ۲۵°C که در آزمایشگاه به عنوان دمای بهینه تأیید شده بود در گلخانه نیز مورد تأیید قرار گرفت و پیشرفت بیماری در گلخانه در دمای زیر ۱۵°C و بالای ۲۷°C به طور محسوس کاهش یافت. ریزش برگ‌ها از حدود ۱۵ روز بعد از مایه‌زنی دیده شد و بعد از حدود یک ماه ریزش برگ‌ها بسیار شدید بود که روش مناسبی برای ارزیابی شدت بیماری می‌باشد. بررسی شدت بیماریزایی نشان می‌دهد که حدود ۷۰ درصد از جدایه‌هایی که سرعت رشد بیشتری را در محیط کشت نشان دادند، شدت بیماریزایی بیشتری داشتند،

البته جدایه‌های سریع الرشد و کند رشد به طور کامل در دو گروه متمایز بیماریزایی، به ترتیب با شدت بالاتر و شدت کمتر قرار نگرفتند و در بین جدایه‌های سریع الرشد جدایه‌هایی با شدت بیماریزایی کم نیز قابل مشاهده بود. به طور کلی در نتایج حاصل از بررسی بیماری‌زایی جدایه‌ها، تنوع بیماریزایی به وضوح قابل مشاهده بود و مقایسه میزان شدت بیماری‌زایی ۳۵ جدایه این قارچ، آنها را در گروه‌های بیماریزایی متفاوت قرار داد. جدایه‌های گروههای مختلف بیماریزایی در هر سه استان وجود داشتند. نظر به اهمیت این بیماری در کشور و همچنین جدید بودن آن و نتایج حاصل از این تحقیق ضروری است تحقیقات تکمیلی در راستای چگونگی مدیریت این بیماری انجام شود.

## سپاسگزاری

نگارندگان از آقای مهندس یزدانفر آهنگران کارشناس مسئول محترم جنگل دفتر حفاظت و حمایت ستاد چالوس که در هنگام نمونه‌برداری همکاری بی‌دریغ نمودند و همچنین از جناب آقای مهندس شهاب حاج منصور رئیس محترم اداره آزمایشگاه‌های کشاورزی دانشگاه علوم وتحقیقات که در مطالعات آزمایشگاهی یاری فراوان نمودند، قدردانی می‌نمایند.

## References

CROUS, P. W. and M. J. WINDFIELD, 1994. A monograph of *Cylindrocladium*, including anamorphs of *Calonectria*. Mycotaxon, 51: 341-435.

CROUS, P. W., J. Z.GROENEWALD and CF. HILL, 2002. C*ylindrocladium pseudonaviculatum* sp. nov. from New Zealand, and new Cylindrocladium records from Vietnam. Sydowia, 54(1): 23-34.

CROUS, P. W., J. Z. GROENEWALD, J. M. R. P SIMONEAU and N. L. HYWEL-JONES, 2004. *Calonectria* species and their *Cylindrocladium* anamorphs: species with sphaeropedunculate vesicles. Studies in mycology, 50: 415–430

FAKHREDIN, F. and M. MIRABOLFATHY, 2014. Comparative effects of some fungicides to control boxwood blight, proceeding of 21st Iranian Plant Protection Congress, P.23

GEHESQUIERE, B., J. A. CROUCH, R. E. MARRA, K. VAN POUCKE, F. RYS, M. MAES, B. GOBIN, M. HEOFTE and K. HEUNGENS, 2015. Characterization and taxonomic reassessment of the box blight pathogen *Calonectria pseudonaviculata*, introducing *Calonectria henricotiae* sp. nov. Plant Pathology, 12401.

GORGILADZE, L., G. MEPARISHVILI, Z. SIKHARULIDZE, K. NATSARISHVILI and R. DAVITADZE, 2011. First report of box blight caused by *Cylindrocladium buxicola* in Georgia. New Disease Reports.23, 24

HEALY, S. E. 2014. Biology and management of box blight caused by *Cylindrocladium buxicola.* Thesis Presented to The University of Guelph, Ontario, Canada.

HENRICOT, B. and A. CULHAM, 2002. *Cylindrocladium buxicola*, a new species affecting *Buxus* spp, and its phylogenetic status. Mycologia, 94(6): 980-997.

HENRICOT, B., C. GORTON, G. DENTON and J. DENTON, 2008. Studies on the control of *Cylindrocladium buxicola* using fungicides and host resistance. Plant Disease, 92, 1273–9.

KHAZAELI1, P., S. REZAEE, M. MIRABOLFATHY, H. ZAMANIZADEH and H. KIA-DALIRI1, 2015. Report of boxwood blight extension to Golestan province forests. Applied Entomology and Phytopathology, Vol. 83, 85-86

LOMBARD, L., P. W. CROUS, B. D. WINGFIELD and M. J. WINGFIELD, 2010. Phylogeny and systematics of the genus *Calonectria*. Studies in Mycology, 66, 31–69.

MIRABOLFATHI, M. 2013. Outbreak of Boxwood tree leaf drop in Guilan and Mazndaran forests. 1st Iranian Mycological Congress, 3-5 September 2013, University of Guilan, Rasht, Iran, P. 8.

MIRABOLFATHY, M., Y. AHANGARAN, L. LOMBARD, and P. W. CROUS, 2013. Leaf blight of *Buxus sempervirens* in northern forests of Iran caused by *Calonectria pseudonaviculata*, Plant Disease. 97(8): 1121.

RAYNER, R. W. 1970. A mycological colour chart. Kew, Surrey, UK: CMI and British Mycological Society.

REZAEE, S., H. KIA-DALIRI, K. SHARIFI, Y. AHANGARAN and S. HAJMANSOOR, 2013. Boxwood blight caused by *Cylindrocladium buxicola* in Tonekabon forest (short report), Applied Entomology and Phytopathology. 80(2): 197-198.

VINCENT, M. 2008. *Cylindrocladium buxicola*. une nouvelle maladie du buis. ACL 2008/4. [http://acl-lullier.ch/pdf_conf/07_CYLINDRO CLADIUM_B_ 23_01_08.pdf]. Accessed 26 August 2014.

WHEELER, BEJ. 1969. An Introduction to Plant Diseases, John Wiley and Sons Limited, London, P. 301.