بررسی اثر بازدارندگی گونه‌های *Fusarium* همراه ریشه نهال‌های افراپلت بر نماتود مولد زخم ریشه در منطقه بهشهر مازندران[1]

علی برهانی[2] سید محمود اخوت[3] احمدخیری[4] حسن اشتیاقی[5]

چکیده

در بررسی نهال‌های افراپلت (*Acer velutinum* Boiss) در خزانه که علایم کم رشدی، زردی برگ‌ها و ضعف عمومی را نشان می‌دادند، قارچ‌های *Fusarium oxysporum* و *F. solani* از روی ریشه‌های آلوده جدا شد و بیماری‌زایی آنها مورد مطالعه قرار گرفت. شناسایی این گونه‌ها براساس ویژگی‌های کلنی آنها روی محیط کشت، شکل و اندازه ماکروکنیدی‌ها، میکروکنیدی‌ها، کلامیدوسپور و وجود یا عدم آنها میسر گردید. در تیمارهای مایه‌زنی شده این قارچ‌ها در طرح بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار (گلدان) پس از چهار ماه میانگین ارتفاع نهال‌ها به‌ترتیب ۲۸ ، ۲۷ و در تیمار شاهد ۲۸/۵ سانتیمتر بود و بعد از ۷ ماه به‌ترتیب به ۳۰، ۲۵/۷۵ و ۳۰/۵ سانتیمتر رسید، نهال‌های بدون مرگ و میر کاملا شاداب بودند. در پایان فصل رشد نهال‌ها از گلدان خارج شده و مورد بررسی قرار گرفتند. در بررسی‌های انجام شده روی ریشه‌های آلوده، نماتود مولد زخم ریشه (*Pratylenchus vulnus*) به‌تعداد زیاد جدا و عامل پوسیدگی ریشه‌ها تشخیص داده شد و باعث خشک شدن ۷۵درصد نهال‌ها گردید. میانگین ارتفاع نهال‌ها پس از ۷ ماه به‌ترتیب در تیمار نماتود با قارچ *F. oxysporum* ۱۲/۷۵ سانتیمتر، در تیمار با *F. solani* ۵/۵، در تیمار نماتود به تنهایی ۲/۲۵ و در تیمار شاهد ۳۰/۵ سانتیمتر بود که محاسبات آماری اختلاف معنی‌دار در سطح ۱درصد را نشان داد. بنابراین، نماتود به تنهایی بیشترین خسارت را به نهال‌های افرا ایجاد کرده، سپس تیمار نماتود همراه قارچ‌ها قرار گرفت. قارچ *F. oxysporum* زیان کمتری را نسبت به گونه دیگر باعث شد و نماتود را کاهش داد، هرچند بیماری‌زایی دو گونه قارچ روی نهال‌ها شدید نبود.

واژه‌های کلیدی: *افرا، Fusarium ، F. oxysporum ، F. solani ، نماتود مولد زخم ریشه Pratylenchus vulnus، ایران.*

---

[1] –تاریخ دریافت: ۸۰/۷/۲۳، تاریخ پذیرش: ۸۳/۱/۱۷

[2] - محقق ایستگاه تحقیقات جنگل و مرتع پاسند، بهشهر مازندران

[3] - استاد دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران (E-mail: mokhovat@ut.ac.ir)

[4] - استاد دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران

[5] - دانشیار دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران

مقدمه

کشور ما با دارا بودن ۱۲ میلیون هکتار اراضی جنگلی در گروه کشورهای فقیر دنیا از این نظر محسوب می‌شود و جنگل‌های کرانه‌های دریای خزر از مهم‌ترین و با ارزشترین جنگل‌های تجاری و صنعتی کشور است. با استناد به آمار ارایه شده سطح منابع جنگلی شمال کشور طی ۴-۳ دهه گذشته به مقدار قابل ملاحظه‌ای (۵۰-۴۵ درصد) کاهش یافته است (۶).

نظر به اینکه مقدار نیاز منطقه و کشور به انواع چوب به عنوان ماده اولیه صنایع در همین مقطع زمانی چند برابر شده است، سازمان‌های مسئول منابع‌طبیعی، روش‌های مختلفی را برای احیا و افزایش تولید جنگل در نظر گرفته‌اند. یکی از روش‌های موثر، تولید نهال در نهالستان‌های جنگلی و انتقال آن به عرصه‌های جنگلی و سپس پرورش و نگهداری آنها می‌باشد. به این منظور ۸۶ نهالستان در سطح کشور فعال شد که از این تعداد ۲۸ مرکز در شمال کشور با تولید سالیانه حدود ۴۵ میلیون نهال‌های جنگلی می‌باشد. در استان مازندران ۱۲ نهالستان جنگلی احداث گردیده است که سالیانه حدود ۱۵ میلیون اصله از انواع نهال‌های جنگلی سوزنی برگ، بلوط، افراپلت، شیردار، اقاقیا، زبان گنجشک، نمدار، توسکا و غیره تولید می‌کنند (۵). از بین گونه‌های فوق، افراپلت (*Acer velutinum Boiss*) و شیردار (*A. cappadocicum Gold*) به صورت تجاری با پراکنش وسیع در اغلب مناطق جنگلی شمال وجود دارد. افراپلت از گونه‌های پهن برگ مرغوب و سریع‌الرشد محسوب شده و از آستارا تا مینودشت یافت می‌شود و ۸ درصد حجم کل جنگل‌های شمال کشور را به خود اختصاص داده است. چوب افرا مصارف صنعتی متنوعی دارد و به علت شکل زیبا، رنگ‌های متنوع برگ و سایه مطبوع در ایجاد پارک و فضای سبز شهرها مورد استفاده فراوان قرار می‌گیرد. به علت شرایط نهالستان‌های جنگلی از حیث رطوبت خاک و کشت پی در پی، شرایط اکولوژیک برای آفات و عوامل بیماریزا مناسب بوده، افرا مورد حمله حشرات، نماتودها و همچنین عوامل قارچی، باکتریایی و ویروسی قرار می‌گیرد (۱). گونه‌های جنس فوزاریوم از مهم‌ترین عوامل خاکزی بوده و در سراسر دنیا پراکنده هستند. بسیاری از گیاهان زراعی، باغی، زینتی، جنگلی و مرتعی مورد حمله و خسارت این قارچ‌ها قرار می‌گیرند. بسیاری از گونه‌های فوزاریوم به صورت کلامیدوسپور یا ریسه در بقایای گیاهی و یا مواد آلی خاک به سر برده و باعث پوسیدگی ریشه یا قسمت‌های هوایی، انسداد آوندی، کلروز و بالاخره مرگ گیاه می‌شوند. چنانچه اطلاعات مناسبی در زمینه بیولوژی و اکولوژی آنها به دست آید، می‌تواند در شناخت و حتی کنترل عوامل بیماری‌زا موثر باشد (۴). گونه‌های مختلف فوزاریوم با تعداد زیادی از نماتودهای انگل گیاهی اثر متقابل داشته و ممکن است اثر تشدیدکننده یا افزایشی (synergistic)، کاهنده (antagonistic) و یا رقابتی (competitive) داشته باشد (۱۶). در بررسی درختان افرا قندی (*Acer saccharum*) در پنسیلوانیا که دارای علایم شانکر بودند چند گونه فوزاریوم جدا گردیده که فراوانی *Fusarium solani(Mart.)Sacc.* از همه بیشتر بود (۲۱).

در زمینه اثرات متقابل نماتودها و قارچ‌های فوزاریوم بر روی افرا گزارشی در دست نیست ولی در زمینه اثر متقابل نماتودهای مولد گره ریشه (*Meloidogyne* spp.) و قارچ *Verticillium dahliae Kleb.* بررسی‌هائی انجام شده و اثر افزایشی آنها مشاهده گردیده است (۱۸).

هدف از این تحقیق با توجه به ضعف و مرگ و میر نهال‌های افرا در نهالستان‌های جنگلی شمال کشور به ویژه در منطقه نکا، شناسایی گونه‌های فوزاریوم و نماتود جدا شده و تعیین نقش آنها در ایجاد بیماری است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

نمونه‌برداری از خزانه‌های یک ساله و دو ساله نهال‌های افراپلت در نهالستان چلمردی انجام گرفت. هر نمونه شامل نهال‌های افرا که علایم بارز بیماری را نشان می‌دادند و خاک اطراف آن بوده، این نهال‌ها معمولا کوتاه و دارای ضعف عمومی بودند. نمونه‌برداری از سطح خاک تا عمق

نفوذ ریشه صورت گرفت. خاک اطراف نمونه‌ها در کیسه‌های پلاستیکی به آزمایشگاه حمل و تا زمان استخراج نماتودها و یا کشت برای جداسازی قارچ در یخچال (۴-۷ درجه سانتیگراد) نگهداری شد.

استخراج نماتودها

استخراج نماتودها از خاک: ۱- به روش عبور از الک و سانتریفوژ، ۲- با استفاده از قیف برمن و ۳- به روش وایت هد و ۴- همچنین استخراج نماتودها از ریشه گیاه صورت گرفت. جزییات استخراج از ریشه مختصرا به شرح زیر است:

ردیابی نماتودها به روش رنگ‌آمیزی بافت ریشه به وسیله اسید فوشین لاکتوفنل (۰/۳۵ گرم پودر اسید فوشین در ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید لاکتیک ۲۵درصد به مقدار ۵ میلی‌لیتر در یک لیتر لاکتوفنل) انجام شد. سپس از نماتودهای استخراج شده اسلاید دایمی تهیه گردید (۱۳ و ۱).

جداسازی قارچ از ریشه گیاه

از نهال‌های افرا که علایم بارز آلودگی را نشان می‌دادند جهت جداسازی قارچ‌های همراه استفاده شد. ریشه‌ها پس از شستشوی کامل با آب شیر به طوری‌که عاری از گل شدند، به مدت ۴-۳ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد یا حدود ۳۰ ثانیه در الکل اتیلیک ۹۶ درصد ضدعفونی سطحی شدند. سپس ۴-۳ قطعه ریشه به طول ۱۰-۵ میلیمتر از آن جدا و به محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار (PDA) در تشتک‌ها انتقال داده (در شرایط محیطی استریل)، سپس جهت رشد به انکوباتور (با دمای ۱ ± ۲۵ درجه سانتیگراد) منتقل شد. به منظور خالص‌سازی قارچ‌ها، سوسپانسیون رقیق شده اسپور با آب مقطر تهیه و روی آب آگار (WA) ریخته شد و اسپورهای جوانه زده روی PDA در تشتک‌های پتری یا لوله آزمایش کشت گردید.

محیط‌های کشت استفاده شده در تحقیق

محیط کشت (Potato Dextrose Agar (PDA، مقدار ۴۲ گرم از پودر PDA (شرکت Biolife ایتالیا) در شیشه‌های ارلن‌مایر محتوی ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل گردید و در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه استریل شد. پس از اینکه دمای محیط کشت به ۵۰-۴۵ درجه رسید، حدود یک میلی‌لیتر اسیدلاکتیک ۲۵درصد به آن اضافه شد و در تشتک‌های پتری استریل به قطر ۹ سانتیمتری تقسیم گردید.

محیط کشت آب آگار WA (Water Agar) ۱۵گرم پودر آگار (شرکت Himedia هند) در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل و در اتوکلاو استریل شد. از این محیط کشت برای جوانه‌زدن کنیدی‌های قارچ‌های فوزاریوم و تک اسپور کردن آنها استفاده شد.

محیط کشت برگ میخک آگار CLA (Carnation leaf-piece agar)، برگ‌های تازه گیاه میخک (*Dianthus caryophyllus* L.) انتخاب و به قطعات ۸-۵ میلیمتری تقسیم گردید و در آون با درجه حرارت ۷۰ درجه سانتیگراد به مدت ۴-۳ ساعت قرار داده شد تا خشک شوند. سپس قطعات به مدت ۵ دقیقه با الکل اتیلیک ۶۰ درصد ضدعفونی سطحی شد. قطعات برگ در داخل تشتک‌های پتری استریل (یک تکه به ازای هر دو میلی‌لیتر آب آگار) قرار داده و آب آگار دو درصد به روشی که در بالا توضیح داده شد به آن اضافه گردید (۱۷). برگ‌های میخک در فواصل مختلف روی آب آگار قرار می‌گیرند. شکل و اندازه کنیدی‌ها در این محیط یکنواخت بوده و ماکروکنیدی‌ها نیز بر روی برگ میخک در روی اسپور دوکیوم (sporodochium) تشکیل شدند.

رنگ‌آمیزی قارچ و تهیه اسلایدهای دایمی از آن

به منظور رنگ‌آمیزی کنیدی‌ها و ریسه‌های قارچ‌های فوزاریوم، از محلول لاکتوفنل آبی پنبه (Lacto phenole cotton blue) با ترکیب زیر استفاده شد.

کریستال فنل ۲۰ گرم، اسید لاکتیک ۲۰ میلی‌لیتر، گلیسیرین ۴۰ میلی‌لیتر،محلول آبی پنبه یا کاتن بلو ۵ درصد ۲۰ میلی‌لیتر. قطعه کوچکی از قارچ روی محیط کشت به روی یک لام تمیز در یک قطره از محلول کاتن‌بلو لاکتوفنل انتقال داده و پس از قرار دادن لامل روی آن و حرارت ملایم، دور لامل با استفاده از کانادا بالزام (Canada balsam natural) گرفته شد تا لامل روی لام ثابت شود.

اندازه‌گیری اندام‌ها و اسپورهای قارچ‌های فوزاریوم و ترسیم آنها

به منظور شناسایی گونه‌های فوزاریوم، طول و عرض اسپورهای آنها اندازه‌گیری و نحوه رشد آن روی محیط کشت مطالعه شد. جهت اندازه‌گیری و ترسیم کنیدیوم‌ها، هیف‌ها، کنیدیوفر و کلمیدوسپورها از لوله ترسیم (drawing tube) که بر روی میکروسکپ Olympus BH۲ نصب و قبلا کالیبره شده بود استفاده گردید.

تهیه اینوکولوم یا زادمایه نماتود

برای تهیه نماتود به تعداد زیاد از محیط کشت دیسک هویج به روش ارایه شده توسط لون و نویل[1] ۱۹۸۴(۱۲) که برای تکثیر گونه‌های جنس *Pratylenchus* به‌کار برده بود استفاده شد. هویج‌های تازه از مزرعه و یا بازار تهیه شده ابتدا کلیه قسمت‌های هوایی و برگ‌های آنها قطع شده سپس در زیر شیر آب به خوبی شسته تا تمامی خاک و گل آنها تمیز شود. برای ضدعفونی سطحی ریشه‌ها به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه در الکل اتیلیک ۹۶ درصد غوطه‌ور گردیده سپس روی شعله چراغ‌الکلی عبور داده شد. در ادامه با تیغ اسکالپل استریل اقدام به پوست‌گیری و حذف قسمت چروکیده و سوخته روی آن شد.

پس از پوست‌گیری، هویج‌ها به صورت دیسک‌هایی به ضخامت ۵-۸ میلیمتر بریده و با استفاده از پنس استریل در داخل پتری‌های استریل قرار داده شد. سپس دور پتری‌ها با پارافیلم[2] پوشانده شده و در انکوباتور با دمای ۲۳-۲۱ درجه سانتیگراد نگهداری شد. حدود یک هفته بعد و با مشاهده رشد کالوس روی دیسک‌ها نمونه‌ها برای مایه‌زنی نماتود به‌کار برده شد و نمونه‌های اضافی برای مصرف بعدی در یخچال نگهداری شدند.

برای استریل نمودن نماتودهای مورد بررسی برحسب تجربه از محلول ۶۰۰۰PPM سولفات استرپتومایسین استفاده گردید. نماتودها در شیشه ساعتی حاوی محلول فوق به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق قرار داده شد. سپس نماتودها به وسیله سرنگ استریل از محلول فوق خارج و به مدت ۲۴ ساعت در آب مقطر استریل قرار داده شد تا محلول ضدعفونی کننده از نماتودها شسته شود. با استفاده از استریومیکروسکپ در شرایط استریل، به وسیله سوزن استریل ۱۵ تا ۲۰ نماتود از سنین مختلف در یک قطره آب به دیسک‌های هویج منتقل شد. دور پتری‌ها با پارافیلم کاملا بسته شد و در انکوباتور بدون نور در دمای ۲۲ درجه نگهداری گردیده و مورد بررسی هفتگی قرار گرفت.

استخراج نماتودها از بافت هویج

حدود دو ماه بعد از کشت، نماتود در بافت ریشه هویج به اندازه کافی تکثیر کرده بود. به منظور جداسازی نماتودها از بافت و استفاده از آن به عنوان زادمایه، اقدام به خردکردن محیط تا حد ممکن به‌وسیله تیغ اسکالپل استریل شد. سپس به روش برمن با مختصری تغییر نماتود استخراج گردید. نماتودهای جدا شده در هر روز در دمای ۷-۵ درجه سانتیگراد، تا جمع‌آوری جمعیت کافی آن، نگهداری شد.

روش تهیه زادمایه یا اینوکولوم قارچ‌های فوزاریوم

برای تهیه زادمایه قارچ‌ها، از روش‌های بهروزین و اسدی۱۳۷۴(۲) که از روش ابوی و لوربیر۱۹۷۲[3] و ارشاد[4] ۱۹۷۱ اقتباس شده بود و با مختصری تغییر به شرح زیر استفاده شد:

در شیشه‌های سر سمباده‌ای یک لیتری ۱۲۵ گرم گندم با ۱۱۰ سانتیمتر مکعب آب مقطر مخلوط و در اتوکلاو در درجه حرارت ۱۲۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه استریل گردید. برای هر گونه قارچ ۵ شیشه در نظر گرفته شد و به هر شیشه قطعه‌ای از کشت ۷ روزه فوزاریوم اضافه گردید و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد با روشنایی و ۲۰ درجه تاریکی (تناوب ۱۲ ساعته) قرار داده شد، پس از ۲۵ روز (زمان مایه‌زنی) میسلیوم‌های قارچ تمامی دانه‌های گندم را فرا گرفته بود.

تهیه بذر و کاشت آن به‌منظور تهیه نهال

بذر گونه افراپلت از نهالستان چلمردی و از همان توده بذری که به منظور کاشت در نهالستان در نظر گرفته شده

---

۱. Lawn & Noel
۲. Parafilm
۳. Abawi & Lorbeer
۴. Ershad

بود، انتخاب شد. بذرها قبلا با استفاده از سم کربوکسین تیرام یا Plantvax به نسبت دو در هزار ضدعفونی شده بود. بذرها در آزمایشگاه پس از شستشو با آب با استفاده از ۱۰ درصد سدیم هیپوکلریت (وایتکس تجاری ۵ درصد) به مدت ۲۰ دقیقه ضدعفونی گردیدند.

بذرها سپس در یک جعبه چوبی محتوی مخلوط ماسه و کود حیوانی کاملا پوسیده به نسبت مساوی کاشته شد (مخلوط خاک قبلا در اتوکلاو به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد استریل شده بود). جعبه کشت شده در گلخانه قرار داده شد و آبیاری و سایر مراقبت‌های معمول صورت گرفت. بذرها بعد از حدود ۸۰ روز (از ۲۰ دی ۱۳۷۷ تا ۱۰ فروردین ۱۳۷۸) سبز شده و در مرحله دو برگی آماده انتقال به گلدان جهت مایه‌زنی با قارچ و نماتود شدند.

برای گلدان‌ها خاک در کیسه‌های ۲۰-۱۵ کیلویی در دمای ۷۰-۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه و در دو مرحله پاستوریزه شدند.

اختلاط زادمایه قارچ با خاک و کاشت نهال

خاک مورد استفاده شامل مخلوطی از ماسه، کود حیوانی کاملا پوسیده و خاک مزرعه به نسبت یک سوم انتخاب شد. خاک مزبور به نسبت (نه به یک) با زادمایه قارچ به طور مجزا مخلوط شدند و سپس در گلدان‌های پلاستیکی با حجم حدود ۱۳۰۰ سانتیمتر مکعب ریخته شد. نیمه پایینی آن شامل خاک بدون قارچ و نیمه بالایی آن شامل مخلوط خاک و زادمایه قارچ بود. بلافاصله نهال‌های دو برگی از جعبه خزانه نهال به گلدان‌ها انتقال داده و آبیاری شدند.

زادمایه نماتودها

چهار روز بعد از انتقال نهال‌ها به گلدان و مایه‌زنی با قارچ، مایه‌زنی با نماتود انجام شد. برای این کار به مقدار ۴۰ نماتود در هر ۱۰۰ سانتیمتر مکعب خاک انتخاب گردید و به هر گلدان ۱۳۰۰ سانتیمتر مکعبی حدود ۵۲۰ نماتود در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر به خاک اطراف هر نهال در گلدان به‌وسیله پیپت تزریق شد.

قالب آماری طرح و آماربرداری

طرح در قالب طرح بلوکهای کامل تصادفی با چهار تکرار و شش تیمار انجام شد. هر پلات شامل یک نهال گلدانی بود. تیمارها شامل:

۱)شاهد (Check)،

۲) نماتود به تنهایی (P)،

۳) قارچ *Fusarium solani* به تنهایی (FS) ،

۴) قارچ *F. oxysporum* به تنهایی (FO)،

۵) نماتود و قارچ *F. oxysporum* توام (PFO)،

۶) نماتود و قارچ و *F. solani* توام (PFS).

طرح در گلخانه شیشه‌ای اجرا و آبیاری بر حسب نیاز در فواصل نامنظم انجام شد، به شکلی که آب از زیر گلدان جاری نشود.

پس از گذشت حدود ۴۵ روز که اولین علایم در نهال‌های مایه‌زنی شده مشاهده شد یادداشت برداری انجام گرفت. علایم مختلف نظیر شادابی گیاه، علایم روی برگ و ارتفاع گیاه ثبت شد. در پایان فصل رشد (اوایل آبان‌ماه) گیاهان باقی مانده از خاک خارج شده و رشد ریشه و علایم آن ثبت و نیز تعداد نماتود در بافت ریشه و خاک تعیین گردید. با استفاده از آزمون دانکن، مقایسه میانگین‌های هر تیمار انجام و معنی‌دار بودن یا نبودن تیمارها بررسی شد.

نتایج

شناسایی و تشخیص گونه‌های فوزاریوم

۱- مشخصات *Fusarium solani* جدا شده از ریشه افرا

قطر کلنی در محیط کشت PDA پس از ۳ روز در ۱ ±۲۵ درجه سانتیگراد ۲/۴-۱/۶ سانتیمتر، شکل ظاهری کلنی در این محیط از روی ظروف پتری به رنگ سفید پنبه‌ای و در زیر پتری به‌رنگ زرد تا زرد روشن بود. در این محیط تولید میکروکنیدی و ماکروکنیدی فراوان نبود، در محیط CLA ماکروکنیدی بر روی اسپور دوخیوم کرم رنگ تولید شد. ماکروکنیدی‌ها دارای ۴-۳ دیواره عرضی و کمی خمیده و دارای سلول‌هایی با انتهای کمی گرد بوده و از فیالیدهای منفرد یا منشعب تولید شدند.

میانگین اندازه ماکروکنیدی‌ها در یکصد عدد ۴/۲×۳۰-۱۴ میکرومتر بود. میکروکنیدی‌ها تخم‌مرغی تا قلوه‌ای یک تا دو سلولی، اندازه آنها ۱۶/۶ – ۷/۲×۴ - ۲/۴ میکرومتر، میکروکنیدی‌های اولیه روی کنیدیوفورهای جانبی که احتمالا فیالیدهای طویل شده که به طرف نوک کمی باریک شده‌اند تشکیل گردید. میکروکنیدیوفورهای بعدی به مقدار زیادی منشعب شده و بسیار طویل (۱۲۰ میکرومتر) بود. میکروکنیدی‌ها عمدتا به صورت مجتمع (false-head) یافت می‌شد. کلامیدوسپورها در محیط CLA به فراوانی تشکیل شدند. کلامیدوسپور به صورت انتهایی یا بین سلولی بوده که انواع بین سلولی تقریبا گرد اما کلامیدوسپورهای انتهایی تخم‌مرغی بودند و شکل این اسپورها هم به صورت انفرادی و هم جفت در هر دو شکل انتهایی یا بین سلولی یافت می‌شد.

۲- مشخصات قارچ *Fusarium oxysporum* جدا شده از ریشه افرا

متوسط قطر کلنی در محیط کشت PDA پس از ۳ روز در دمای ۱ ± ۲۵ درجه سانتیگراد ۲/۷ سانتیمتر بود. شکل ظاهری کلنی در سطح پتری با میسلیوم‌های هوایی فراوان به رنگ سفید با رنگ دانه‌های بنفش تا ارغوانی، در زیر پتری نیز رنگ محیط به صورت قهوه‌ای تیره تا خرمایی متمایل به بنفش دیده می‌شد. ماکروکنیدی‌ها فراوان و داسی شکل دارای ۵-۳ دیواره عرضی و اندازه آنها ۴-۳/۲×۳۳/۶-۱۹/۲ میکرومتر بود.

میکروکنیدی‌ها به فراوانی در محیط کشت تولید شده آنها عموما به صورت مجتمع یا flase-head و روی منوفیالیدهای کوتاه (در مقایسه با *F. solani*) با اندازه ۱۲-۴/۸×۳/۲-۲/۴ میکرومتر بود. میکروکنیدی‌ها یک سلولی و گاهی دو سلولی به شکل تخم‌مرغی تا قلوه‌ای بودند. کلامیدوسپورها به فراوانی در محیط CLA تولید شده و معمولا به صورت چهارتایی و یا منفرد انتهایی یا بین سلولی بود.

۳- مشخصات نماتود جدا شده

باتوجه به تغییرات احتمالی، اندازه‌گیری و بررسی مشخصات نر و ماده از جمعیت نماتود جدا شده از ریشه افراپلت و خاک خزانه آن، به‌طور مجزا انجام و با هم مقایسه شد.

۱-۳-مشخصات نماتود ماده

نماتود ماده کشیده به طول نیم میلیمتر (۵۰۱ تا ۶۰۴ میکرومتر نمونه‌های جدا شده از ریشه و ۴۱۳ تا ۵۹۲ میکرومتر نمونه‌های جدا شده از خاک)، کرمی شکل و پس از تثبیت تا حدودی از ناحیه شکم خمیده و سر نسبتا بلند و همطراز با بدن، معمولا دارای سه (دوشیار) و گاهی چهار حلقه (سه شیار) بود.

شبکه کوتیکولی سرقوی و سفالیدها نامشخص، استایلت قوی طول آن ۱۶/۶-۱۵ میکرومتر و گره‌های استایلت گرد بود. مری توسعه یافته طول آن ۶۶/۴ تا ۱۱۸/۵ میکرومتر مربوط به نمونه‌های بافت ریشه و ۵۶/۹ تا ۹۰/۶ میکرومتر مربوط به نمونه‌های خاک بود و لوله اولیه مری (مری قدامی) در ابتدا پهن و در نزدیکی حباب باریک و حباب میانی قوی مشخص و کاملا بیضوی و با دریچه مشخص بود. لوله ثانویه مری (مری خلفی) بلند باریک، غده‌های مری به طول ۳۳/۶ تا ۴۹ میکرومتر در نمونه‌های جدا شده از بافت ریشه و ۳۴ تا ۵۵/۳ میکرومتر از خاک و بخش شکمی یا شکمی-جانبی روده را می‌پوشاند. حلقه عصبی در نیمه اول لوله ثانویه مری (مری میانی) (نزدیک به حباب میانی مری)، منفذ دفعی ترشحی بالاتر از محل تلاقی روده با مری، با فاصله ۸۱ تا ۸۸ میکرومتر از سر در نمونه‌های جدا شده از بافت ریشه و ۷۲/۷ تا ۸۱/۳ میکرومتر در نمونه‌های جدا شده از خاک بود. همیزویید بلافاصله قبل از منفذ دفعی-ترشحی و با طول ۲ تا ۳ حلقه به طرف سر، همیزونیون نامشخص، سطوح جانبی دارای چهار شیار ساده، دو شیار جانبی تا انتهای دم ادامه داشت. تخمدان به طرف جلوی بدن کشیده شده، کیسه ذخیره اسپرم بیضوی در حالت حاوی اسپرماتوزویید و تقریبا گرد در حالت خالی بود. کیسه عقبی رحم بلند و ۱/۱ تا ۲/۵ برابر عرض بدن در ناحیه فرج، دم در ماده‌ها مخروطی به طول ۲۳/۷ تا ۲۸/۴ میکرومتر در نمونه‌های جدا شده از ریشه و ۲۰/۵ تا ۲۶/۱ میکرومتر در نمونه‌های جدا شده از خاک بود. دم مخروطی و انتهای دم صاف و فاسمید تقریبا در وسط دم قرار داشت.

۲-۳-مشخصات نماتود نر

نماتود نر از نظر شکل ظاهری (به جز از نظر اندام‌های تولیدمثلی) تفاوت محسوس با نماتود ماده نداشت و طول آن در نمونه‌های ریشه و خاک کمی از نماتود ماده کوچکتر بود. حلقه عصبی تقریبا در وسط لوله ثانویه مری، دم اندازه ۲۰/۵ تا ۲۶ میکرومتر در نمونه‌های جدا شده از بافت ریشه و ۱۸ تا ۲۳ میکرومتر در نمونه‌های جدا شده از خاک داشت. بورسا تا انتهای دم، بیضه تقریبا کشیده، اسپیکول ۱۴ تا ۱۷/۵ میکرومتر گاهی به مقدار جزیی از منفذ دفعی – تناسلی بیرون آمده وگوبر ناکولوم ساده به طول ۵-۳ میکرومتر بود.

علایم خسارت نماتود *Pratylenchus vulnus* در افرا

۱- علایم خسارت در مزرعه با آلودگی طبیعی

در نهالستان اولین علایم خسارت نماتود روی افرا پس از سر برآوردن از خاک در مرحله ۴-۲ برگی ظاهر می‌شوند. گیاهچه‌هایی که در نقاط آلوده سبز شدند کاهش رشد که اغلب با مرگ آنها همراه بود نشان داد که در نگاه نخست ممکن است با مرگ گیاهچه (damping off) در اثر سایر بیمارگرها اشتباه شود. گیاهچه‌های آلوده در نهالستان علایم به صورت تقلیل در سیستم ریشه (به طوری‌که فقط به یک یا چند ریشه فرعی در پایه ساقه محدود می‌شود) مشاهده می‌گردد. گیاهچه‌هایی که از این مرحله جان بدر برند، در مراحل بعدی با کاهش رشد و کوتولگی همراه خواهند بود، به طوری که نقاط آلوده در مزرعه کاملا از دور مشخص می‌شود. نقاط آلوده به صورت قطعات تقریبا دایره‌ای شکل، به قطرهای متفاوت در داخل مزرعه که ارتفاع نهال‌ها در این قسمت نسبت به سایر نقاط بسیار کمتر می‌باشد و یا در اثر مرگ و میر نهال‌ها، نهالستان کچل، لخت و یا تراکم نهال آن نسبت به سایر نقاط کمتر است، مشاهده می‌شود.

در مزرعه، در اواسط تا اواخر فصل رشد، یعنی از اواسط تابستان تا اواسط پاییز، درحالی‌که نهال‌های مناطق کمتر آلوده و یا غیر آلوده به ارتفاع حدود یک متر رسیدند، در نقاط آلوده به نماتود ارتفاع نهال‌ها به ۲۵-۱۵ سانتیمتر تقلیل یافته بود. در این مرحله تعدادی از نهال‌های سبز خشک می‌شدند، به طوری‌که برگ‌ها به نهال‌ها آویزان است و نهال با مرگ روبه‌رو می‌گردید (این حالت مخصوصا در افرا شیردار حتی در نهال‌هایی با ارتفاع ۵۰ سانتیمتر دیده شده است). این نهال‌ها به راحتی از خاک خارج می‌شدند. ریشه نهال‌ها فرم طبیعی خود را کاملا از دست داده در مقابل نهال‌های سالم دارای سیستم ریشه‌ای وسیع با ریشه‌های فرعی گسترده بود، ریشه‌ها تا عمق نیم متری خاک نفوذ کرده و به سختی از زمین کنده می‌شدند. نهال‌های آلوده دارای گسترش ریشه‌ای بسیار محدود بوده فقط به ۱۰-۵ سانتیمتر سطح خاک نفوذ کرده‌اند. ریشه اصلی کاملا از بین رفته و فقط به یک یا دو دسته ریشه فرعی در نزدیکی سطح خاک از حدود یقه نهال‌ها به‌طور افقی رشد نموده بود. در بررسی ریشه با بینوکلر نقاط قهوه‌ای رنگ مدور ناشی از زخم نماتود مشاهده شد. این زخم‌ها با چشم غیر مسلح نیز قابل رؤیت بود.

۲-علایم حاصل از آلودگی مصنوعی در گلخانه

در گلخانه گیاهچه‌ها که در مرحله دو برگی با نماتود، نماتود به علاوه قارچ و قارچ به تنهایی آلوده شده بودند حدود ۵۰ روز بعداز آلودگی (اولین مرحله ثبت نتایج) در تیمارهای آلوده شده با نماتود به تنهایی ۲۵ درصد نهال‌های مایه‌زنی شده علایم پژمردگی نشان دادند که بعدا کاملا خشک شدند. در نهال‌های مایه‌زنی شده با نماتود و قارچ‌های فوزاریوم اولین علایم به صورت ریزش برگ‌های پایینی گیاه به طوری‌که فقط دو برگ انتهایی روی گیاه باقی مانده بودند ظاهر شد. در صورتی‌که سایر تیمارها شامل شاهد و هر یک از قارچ‌های *F. solani* و *Fusarium oxysporum* شاداب و سالم بودند. حدود چهار ماه پس از مایه‌زنی تمامی نهال‌های مایه‌زنی شده با نماتود به تنهایی علایم مشخصی داشتند. در این موقع ۷۵ درصد نهال‌ها درحالی‌که دارای ارتفاعی بین ۵-۱۴ سانتیمتر بودند کاملا خشک شدند و ۲۵ درصد نهال باقی مانده بسیار کوتاه، با کاهش رشد شدید بودند. اما در تیمارهای با آلودگی توام نماتود و هریک از قارچ‌های فوزاریوم، ۲۵ درصد از نهال‌ها در این مرحله دچار سرگ شده و نهال‌های باقی مانده نیز کاهش شدید رشد و ریزش

برگ‌های پایینی را نشان داد و تنها دو تا چهار برگ انتهایی روی نهال‌ها باقی ماند، در تیمارهای شاهد و قارچ‌ها به تنهایی، نهال‌ها کاملا حالت شاداب داشتند (جدول ۱).

جدول ۱- ارتفاع نهال‌های افراپلت (*Acer velutinum*) مایه‌زنی شده با گونه‌های فوزاریوم و نماتود زخم ریشه پس از ۴ ماه

تیمار	میانگین ارتفاع نهال‌ها بعداز ۴ ماه/ سانتیمتر*
۱- شاهد	۲۸/۵
۲- نماتود به تنهایی	۲/۵
۳- قارچ *F. solani*	۲۷
۴- قارچ *F. oxysporum*	۲۸
۵- نماتود + *F. oxysporum*	۱۲/۵
۶- نماتود + *F. solani*	۱۲

*میانگین ارتفاع در ۴ تکرار با احتساب صفر برای نهال‌های خشک شده

در پایان فصل رشد یعنی حدود ۷ ماه بعد از مایه‌زنی، آخرین آمار برداری از زنده ماندن نهال‌ها و ارتفاع نهال‌ها انجام شد. در این مرحله ۷۵ درصد نهال‌های مایه‌زنی شده با نماتود به تنهایی دچار مرگ شده بودند که با بیشترین مرگ و میر همراه بودند. مقدار مرگ و میر نهال‌ها در تیمار نماتود به علاوه قارچ *F. solani*، ۵۰ درصد و در تیمار نماتود به علاوه *F. oxysporum*، ۲۵ درصد بود. تیمارهای بدون نماتود یعنی شاهد و هریک از قارچ‌ها نیز در این مرحله یعنی پایان فصل رشد بدون مرگ و میر و کاملا شاداب بودند. در محاسبات آماری به دلیل وجود صفر در بین اعداد (نهال‌های خشک شده) از تبدیل آنها به $\sqrt{x+1/2}$ برای تعدیل نرمال بهره‌گیری شد که بین تیمارها اختلاف معنی‌داری را نشان داد (جدول ۲). تعداد نماتود شمارش شده در هر گرم ریشه و خاک به‌ترتیب در تیمارهای انجام شده ۰-۰ ، ۱۲۶۶-۱۱/۲ ، ۰-۰ ، ۰-۰ ، ۲۰-۶/۲ و ۷۳۶-۶/۴ بود.

جدول ۲- تجزیه واریانس تیمارهای مختلف در بررسی تاثیر گونه‌های فوزاریوم و نماتود مولد زخم ریشه روی رشد نهال‌های افرا (براساس $\sqrt{x+1/2}$ جهت تعدیل نرمال)

	منبع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F	Prob
۱	تکرار	۳	۰/۵۱۴	۰/۱۷۱	۰/۱۱۲۴	
۲	تیمار	۵	۶۸/۷۵۸	۱۳/۷۵۲	۹/۰۱۹۱	۰،۰۰۰۴
۳	خطای آزمایش	۱۵	۲۲/۸۷۱	۱/۵۲۵		
	Total	۲۳	۹۲/۱۴۳			

آزمون چند دامنه‌ای دانکن At alfa = ۰/۰۱۰ LSD value = ۲/۵۷۳

در گروه‌بندی تیمارها، نماتود به تنهایی بیشترین خسارت را به نهال‌های افرا ایجاد کرده و سپس نماتود همراه با قارچ‌ها قرار دارد، قارچ *F. oxysporum* زیان کمتری را نسبت به گونه دیگر روی نهال‌ها سبب شد زیرا تعداد نماتود را کاهش داد هر چند دو گونه قارچ به تنهایی چندان خسارتی به نهال‌ها وارد نکردند (جدول ۳).

جدول ۳- میانگین ارتفاع نهال‌ها در پایان فصل رشد با احتساب ارتفاع صفر برای نهال‌های خشک شده.

تیمار	گروه و میانگین ارتفاع نهال‌ها با تبدیل $\sqrt{x+\frac{1}{2}}$	گروهها و میانگین ارتفاع نهال‌ها /سانتیمتر در ۴ تکرار بعد از ۷ ماه
۱- شاهد	۵/۵۶۶a	۳۰/۵a
۲- نماتود به تنهایی	۱/۳۰۱b	۲/۲۵c
۳- قارچ *F. solani*	۵/۱۲۲a	۲۵/۷۵ab
۴- قارچ *F. oxysporum*	۵/۵۲۲a	۳۰a
۵- نماتود + *F. oxysporum*	۳/۵۶۳ab	۱۲/۷۵abc
۶- نماتود + *F. solani*	۲/۰۴۷b	۵/۵bc

* گروههایی که با حروف یکسان هستند در سطح ۵درصداختلاف معنی‌دار ندارند.

بحث و نتیجه‌گیری

گونه‌های جنس فوزاریوم جدا شده از ریشه‌های افرای آلوده به نماتود مولد زخم در نهالستان چلمردی دو گونه

1-Fusarium solani (Mart) Apple & Wollenw. Emend. Synder & Hansen.

2-Fusarium oxysporum Schlecht: emend Snyd & Hans.

تشخیص داده شد(۸ و ۱۷).

نماتودهای جنس *Pratylenchus* در نمونه‌های استخراج شده از بافت ریشه از نظر جثه قویتر و طول و عرض آن بیشتر و بزرگ‌تر از نمونه‌های مشابهی است که از خاک جدا شده‌اند. در اغلب مقالات منبع استخراج نماتود ذکر نگردیده است، این موضوع می‌تواند منشاء بروز اشتباه در تشخیص گونه‌ها شود. در مجموع طول بدن نماتود بسته به جمعیت نماتود ممکن است از تغییرات نسبی زیادی برخوردار باشد، زیرا عوامل زیادی چون تغذیه، نوع گیاه میزبان و شرایط محیطی می‌توانند اندازه نماتود را تحت تاثیر قرار دهند.

این نمونه با توجه به اندازه، شکل دم، شکل کیسه ذخیره اسپرم و مقایسه آن با منابع موجود (Fredorick & Capefilho & Huang, ،Tarjan 1989 , Loof, 1991 1989 و پورجم ۱۳۷۷) بیشترین تشابه را با *Pratylenchus vulnus* (Allen & Jensen, 1951) داشت.

مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن نشان می‌دهد که تیمارهای ۱ و ۴ و ۳ شامل شاهد، قارچ‌های *F. solani* , *F.oxysporum* به ترتیب دارای بیشترین ارتفاع نهال و تیمارهای ۲ و ۶ و ۵ شامل نماتود به تنهایی، نماتود + *F.solani* و نماتود + قارچ *F. oxysporum* به ترتیب دارای کمترین ارتفاع نهال و مقدار مرگ و میر نهال بیشتری بودند (جدول ۳). تعداد نماتود نیز در تیمارهای همراه با قارچ‌ها در هر گرم خاک و ریشه کاهش یافت.

به عقیده موزا و وبستر۱۹۹۲ (۱۶) کاهش نماتود در حضور قارچ *F . solani* ممکن است ناشی از اثر مستقیم قارچ روی نماتود مولد زخم ریشه یونجه *(P. penetrans)* باشد که شباهت به نتایج بررسی حاضر دارد و یا به طور غیرمستقیم با تولید بعضی مواد در داخل ریشه، بر تکثیر نماتود اثر بگذارد. در همین راستا ویل و ویل ۱۹۸۸(۲۰) ثابت نمودند که در ذرت آلوده به قارچ *F. moniliforme* تفریخ تخم‌های نماتود *P. zeae* در مرحله جنینی متوقف می‌شود. همچنین داوه و همکاران (۱۰) نشان دادند که حضور مقدار زیاد زادمایه قارچ *F. solani* f. sp. *phaseoli* باعث کاهش جمعیت *P. penetrans* در لوبیا می‌شود.

ضمنا سین هورست و کونی یازو ۱۹۷۱(۱۹) کاهش تکثیر نماتود *P. penetrans* درحضور *F.oxysporum* f. sp. *Pisi* در نخود سبز را گزارش نمودند که مشابه نتایج

محققین حاضر بود و در این بررسی هم گونه *F. oxysporum* بیشتر از *F. solani* نماتود *P. vulnus* را روی ریشه افرا کاهش داده و مقدار خسارت آن نیز کمتر شد.

درباره دلایل تظاهر چنین اثراتی بین نماتود و قارچ فرضیه‌های مختلفی وجود دارد. از جمله این عقیده است که اثر بین قارچ‌های خاکزی و نماتود مولد زخم ریشه در طبیعت بر روی گیاه میزبان بیشتر از نوع بیولوژیکی و فیزیولوژیکی می‌باشد تا فیزیکی یعنی نماتود تنها به عنوان ایجاد کننده مدخلی برای ورود قارچ عمل نمی‌کند و تغییر در وقوع و شدت اثرات به ترکیب نماتود و قارچ و شرایط محیطی بستگی دارد (۱۴ و ۱۵).

تشکر و قدردانی

هزینه انجام این تحقیق از محل اعتبارات پژوهشی دانشگاه تهران تامین گردیده و طرح در ایستگاه تحقیقات جنگل و مرتع پاسند بهشهر مازندران به اجرا درآمده است. به این وسیله از مقامات مسئول کمال تشکر را می‌نماید. از همکاری‌های آقای دکتر ابراهیم پورجم استادیار دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس و آقای دکتر حمید روحانی استاد دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا، همدان نیز سپاسگزاری می‌شود.

منابع

۱- برهانی، علی، ۱۳۷۹. بررسی اثر متقابل نماتود مولد زخم ریشه *(Pratylenchus vulnus)* و دو گونه قارچ فوزاریوم بر رشد نهال‌های افراپلت در منطقه بهشهر مازندران. پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته بیماری‌شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، ص ۱۱۴.

۲- بهروزین، مهوش و پرویز اسدی، ۱۳۷۳. معرفی سه گونه فوزاریوم عامل پوسیدگی ریشه و طبق پیاز خوراکی و تعیین فراوانی آنها در آذربایجانشرقی. مجله بیماریهای گیاهی، جلد ۳۰ : ص ص۴۹-۴۱.

۳- پورجم، ابراهیم، ۱۳۷۷. بررسی شکل‌شناسی و طبقه‌بندی گونه‌های جنس *Pratylenchus* در شمال ایران. رساله دوره دکترا. دانشگاه تربیت مدرس. ص۶۱.

۴- صارمی، حسین، ۱۳۷۷. اکولوژی و تاکسونومی گونه‌های فوزاریوم. انتشارات جهاد دانشگاهی زنجان. ص۱۳۲.

۵- محمدی، محمود و پرویز طاهریان، ۱۳۷۲. شناسایی و مطالعه جامعه علف‌های هرز نهالستان‌های جنگل شمال کشور. انتشارات موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع ایران. ص۵۰.

۶- موسوی، علیرضا و غضنفر اخلاصی، ۱۳۷۴. گزارش بررسی سوزنی برگان جنگل‌کاری شده در حوزه مدیریت اداره کل منابع طبیعی ساری. منتشر نشده.

7-Allen, M. W. & H. J. Jensen, 1951. *Pratylenchus vulnus* new species (Nematoda: Pratylenchidae) a parasite of trees and vines in California. *Proc. Heleminth. Soc. Wash.* 18: 47-50.

8-Booth, C. 1971. The genus *Fusarium.* Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 237 pp.

9-Cafe Filho, A. & C. S. Huang, 1989. Description of *Pratylenchus pseudofallax* n. sp. with a key to species of the genus *Pratylenchus* Filipjev, 1936 (Nematoda: Pratylenchidae). *Revue de nematol.* 12:7-15.

10-Dave, G. H., R. E. Wilkinsen & W. F. Mai, 1972. Effect of Two Plant Parasitic Nematode on Fusarium Dry Root Rot of BEAn. Phytopathology 63:749-751.

11-Frederik, J. J. & A. C. Tarjan, 1989. A Compendium of the Genus *Pratylenchus* Filipjev, 1936 (Nematoda: Pratylenchidae). *Revue de Nematolo.* 12:243-256.