

جداسازی و شناسایی عامل بیماری لکه قیری درختان افراپلت در جنگل آموزشی و پژوهشی دکتر بهرام‌نیا

شهرام مهدی کرمی^۱، محمدرضا کاوسی^۲ و اکرم احمدی^۳

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، (نویسنده مسئول: shahramkarami67@yahoo.com)

۲ و ۳- دانشیار و دانشجوی دکتری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۲/۱۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۹/۲

چکیده

لکه قیری از جمله بیماری‌های قارچی است که درختان افرا را مبتلا نموده است. این بیماری باعث خزان زودرس، از بین رفتن برگ، سبب کاهش رشد، کاهش تولید چوب و بذر درختان افرا می‌گردد. به همین منظور جداسازی و شناسایی عامل بیماری روی برگ درختان افراپلت در جنگل آموزشی و پژوهشی دکتر بهرام‌نیا (شصت‌کلاته گرگان) انجام گرفت. پس از تهیه نمونه و کشت آن روی محیط PDA، پرگنه قارچ عامل بیماری که سفید رنگ و کرکی شکل بود، بدست آمد. عامل بیماری‌زایی پس از خالص‌سازی، جداسازی و بررسی خصوصیات رنگ و شکل اسپور، علایم بیماری شناسایی گردید. در محیط کشت مایع PDA، آسک‌های قارچ سفید رنگ و چماقی شکل بودند و آسکوسپوره‌های تک سلولی نخی شکل و کشیده در درون آنها مشاهده شد. با توجه به بررسی به‌عمل آمده، عامل بیماری لکه قیری در درختان افرا در منطقه مورد تحقیق، قارچ *Rhytisma acerinum* تشخیص داده شد.

واژه‌های کلیدی: افراپلت، لکه قیری، *Rhytisma acerinum*

مقدمه

می‌باشند (۱۳). یکی از مهم‌ترین بیماری‌های درخت افرا، بیماری لکه قیری^۱ می‌باشد که به اسامی لکه سیاه برگ افرا و مرض سیاه پوست افرا نامیده می‌شود. از عوامل بیماری لکه قیری برگ درختان افرا، قارچ‌های *Rhytisma acerinum* و *R. Punctatum* می‌باشند که در رده آسکومیسیت‌ها^۲ قرار دارند

درخت افراپلت (*Acer velutinum*) جزء تیره *Aceraceae*، راسته *Sapindales* و در شاخه *Magnoliophyta* قرار دارد. درختان افرا از مهم‌ترین گونه‌های صنعتی کشور به حساب می‌آیند که دارای حجمی تا حدود ۷/۵ درصد با متوسط موجودی ۲۱۰ مترمکعب در هکتار

1- *Rhytisma acerinum*

2- *Ascomycetes*

(۱۵،۸،۲،۱). این بیماری برای اولین بار در ایران در سال ۱۳۱۸ توسط پتراک در مناطق شمال و اطراف تهران مشاهده شد (۲).

نشانه‌های بیماری در تیرماه روی برگ درختان افرا به‌صورت لکه‌های گردی به قطر ۷-۸ میلی‌متر تشکیل می‌گردد. تعداد این لکه‌ها زیاد و گاهی تا ۵۰ عدد نیز در سطح برگ می‌رسد. رنگ لکه‌ها ابتدا زرد رنگ، سپس قهوه‌ای و در نهایت سیاه رنگ شده که خزان زودرس برگ‌ها را باعث می‌گردد. این بیماری علاوه بر درختان مسن، در خزانه‌ها روی نهال‌های جوان درختان افرا نیز گسترش دارد و میزان خسارت آن در نهالستان بیشتر است. نحوه‌ی انتشار این قارچ به این صورت می‌باشد که استرومای این قارچ در پهنک برگ در زیر لایه اپیدرمی گسترش می‌یابد و به تدریج جانشین بافت‌های میزبان می‌شود (۷،۴،۲). افراپلت، کرب، شیردار، سفیدکرکو، کرکو، افرای سیاه، کرکف و افرای شبه‌چناری از گونه‌های مهم جنس افرا (*Acer*) هستند که در ایران مورد حمله قارچ‌های عامل بیماری لکه قیری قرار گرفته‌اند. محل انتشار این بیماری در سواحل دریای خزر، اطراف تهران، کرج و احتمالاً سایر نقاط کشور می‌باشد (۱۰،۷،۲،۱). کانون و همکاران (۵) در تحقیقات خود پی بردند که *R. acerinum* روی بسیاری از گونه‌های افرا در اروپا و آمریکا پراکنش دارند هم‌چنین لاپوینت و بریسون (۱۲) در کشور آمریکا به بررسی قارچ *R. acerinum* پرداختند که سبب به‌وجود آمدن

لکه‌های سیاه رنگ روی برگ درختان افرا می‌شود.

مطالعاتی در مورد بیماری‌زایی، چرخه زندگی و سیتولوژی این قارچ انجام شده است. رونالد و همکاران (۱۴) و پارتیدیک و وو (۱۶)، چرخه زندگی و سیتولوژی قارچ *R. punctaphylum* را بررسی نمودند (۱۶). هم‌چنین دوراوتز و مورگان (۶) مراحل رشد و نمو آسکوکارپ در قارچ‌های عامل لکه قیری افرا را مورد مطالعه قرار دادند. با توجه به نتایج، شکل اسپوره‌های قارچ *R. acerinum* به صورت نخی شکل و کشیده و به صورت بی‌رنگ می‌باشند (۹،۷،۴).

از جمله خسارات اولیه این بیماری خزان زودرس برگ درختان می‌باشد که بر روی نحوه رشد درخت تاثیر می‌گذارد (۱). این تحقیق به‌منظور شناسایی عامل این بیماری روی برگ درختان افرا پلت در جنگل آموزشی و پژوهشی دکتر بهرام‌نیا (شصت‌کلاته گرگان) برای مدیریت و حفاظت بهتر درختان افرا انجام گرفته است.

مواد و روش‌ها نمونه‌برداری

به‌منظور کشت و تشخیص عامل بیماری لکه‌قیری، نمونه برگ آلوده درختان افرا پلت به لکه قیری از جنگل آموزشی و پژوهشی دکتر بهرام‌نیا (شصت‌کلاته گرگان) واقع در جنوب غربی شهر گرگان به صورت تصادفی جمع‌آوری گردید.

جداسازی و شناسایی قارچ عامل بیماری لکه

قیری افراپلت

برای جداسازی قارچ عامل بیماری، نمونه‌هایی به ابعاد 5×5 میلی‌متر از روی برگ‌های مبتلا به قارچ جدا شدند (شکل ۱). برای ضدعفونی نمونه‌ها ۲-۳ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد قرار داده شدند و سپس با الکل ۹۶٪ برای مدت زمان ۱ دقیقه استریل شدند. پس از استریل نمونه‌ها، در شرایط آزمایشگاهی در زیر لامینار ایرفلو در محیط کشت PDA^۱ با اسیدیته ۴/۵ کشت شدند و در دستگاه انکوباتور در دمای 25 ± 1 درجه سانتی‌گراد و در شرایط تاریکی قرار داده شدند. در نهایت سه هفته بعد از کشت قارچ، مجدد عمل خالص‌سازی قارچ انجام گرفت.

همچنین، بعد از انجام مراحل خالص‌سازی و بدست آوردن پرگنه قارچ، مقداری از پرگنه قارچ در محیط کشت (مایع سیب‌زمینی و آب مقطر) روی دستگاه شیکر به مدت یک ماه قرار داده شد. جهت جداسازی اسپورها از توده میسلیومی تشکیل شده، استفاده گردید. سوسپانسیون تهیه شده، از داخل دستگاه خلاء عبور داده شده و سپس عصاره بدست آمده روی دستگاه سانتریفیوژ با ۳۰۰۰ دور در دقیقه برای سه مدت زمان ۲۰، ۴۰ و ۶۰ قرار داده شد. با توجه به نتایج بدست آمده اسپورهای بدست آمده با دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه برای مدت زمان ۴۰ دقیقه نتایج بهتری را برای شناسایی قارچ نشان داد. بعد از جوانه‌زنی اسپورها، مطالعات بعدی با استفاده از میکروسکوپ نوری صورت گرفت.

نتایج و بحث

علائمی که توسط این بیماری روی درختان افرا مشاهده گردید، ایجاد لکه‌های سبز مایل به زرد رنگ به صورت گروهی روی برگ‌ها، تبدیل شدن لکه‌ها به لکه‌های قیری شکل با حاشیه زرد رنگ بود استرومای قارچ به خوبی در سطح برگ قابل مشاهده بود (شکل ۲). روی هر ناحیه آسیب دیده دواپری بوجود می‌آید که کنیدی و در داخل هر کدام کنیدیوفورها تشکیل می‌شوند. همچنین، نتایج تحقیق حاصل از کشت حاشیه لکه‌های روی برگ نشان داد که شکل پرگنه‌ای که در اثر قارچ عامل بیماری روی لکه قیری افرا در محیط کشت بوجود آمد، سفید رنگ، کرکی شکل و دارای رشدی به صورت شعاعی بود (شکل ۳) که بعد از ۲ تا ۳ هفته رشد قارچ کامل و در مدت زمان یک هفته دارای میانگین رشدی $41/8$ میلی‌متر با انحراف معیار $6/78 \pm$ بود. توده میسلیومی تشکیل شده به شکل کروی و از هم جدا بود (شکل ۴). در اثر استقرار استرومای قارچ عامل لکه قیری افرا روی برگ درخت افرا، در درون استروما، پیکنیدها و بعد پریتسیوم که چماقی شکل، شفاف و بی‌رنگ بودند، مشاهده گردید (اشکال ۵ و ۶). در داخل پیکنید عدسی شکل، کنیدی‌های کوچک کشیده و بیضوی شکل مشاهده گردید. آسک‌های قارچ به رنگ سفید و چماقی شکل مشاهده شدند. در داخل هر آسک، دسته‌ای از آسکوسپورهای وجود داشت که نخی شکل، ساده، شفاف و بی‌رنگ بودند (۴). آسکوسپورها تک سلولی و سوزنی شکل بودند (۱۴). آسکوسپورها چسبناک هستند

مرحله تولیدمثل جنسی قارچ است که در فصل زمستان یا اوایل بهار روی برگ‌های افتاده تشکیل می‌گردد و با کمک باد باعث انتشار و انتقال بیماری می‌شوند (۸،۲).

و روی سطح برگ جوانه می‌زنند و از راه روزنه‌ها وارد برگ‌ها می‌شوند (۶) و موجب آلودگی سلول‌های اپیدرم و مزوفیل می‌شوند. با رشد قارچ، سلول‌ها پاره شده و استرومایی با پوشش سیاه رنگ تشکیل می‌دهند. مرحله پریتسیوم،



شکل ۲- استرومای قارچ *R. acerinum* روی برگ افراپلت



شکل ۱- بیماری لکه قیری روی برگ درخت افرا



شکل ۴- توده‌های میسلیومی حاصل از کشت قارچ *R. acerinum*



شکل ۳- پرگنه قارچ *R. acerinum* در محیط کشت PDA



شکل ۶- آسک قارچ *R. acerinum*



شکل ۵- الف: آسکوسپور، ب: آسک قارچ *R. acerinum*

تشخیص داده شد که با نتایج تحقیق کانون و همکاران (۵) و لاپوینت و بریسون (۱۲) در کشور آمریکا مطابقت دارد. قارچ‌های *Rhytisma* پارازیت هستند که روی برگ‌های نهاندانگان مشاهده می‌شوند (۱۱) و سبب بیماری در گونه‌های مختلف افرا می‌گردد (۱۲). معمولاً این

بر اساس مشخصات قارچ و علائم ظاهری لکه برگ، شکل و سایر مشخصات پرگنه، شکل و مشخصات آسکوسپور، قارچ عامل بیماری روی برگ درختان افراپلت از نوع *Rhytisma acerinum* از رده آسکومیست، راسته *Rhytismatales* و خانواده *Rhytismataceae*

بیماری در اواخر زمستان روی میزبان و برگ‌های افتاده، کیسه‌های آسک را تشکیل می‌دهند که سبب می‌شوند، اسپور قارچ روی برگ‌های درختان افرا در فصل رویش بعدی نفوذ کرده و لکه‌های سیاه استرومایی روی برگ درختان ایجاد کنند، این لکه‌ها در صورت توسعه باعث خزان زودرس، از بین رفتن برگ درخت افرا، سبب کاهش رشد، کاهش تولید چوب و بذر درختان می‌شود (۲، ۶).

روی برگ‌های افراپلت مورد مطالعه لکه‌های قیری شکل استرومایی با اندازه‌های مختلف مشاهده گردید که دارای حاشیه‌های کلروز و نکروز به عرض ۱-۳ میلی‌متر بودند (۱۰). درون استروما پیکنیدهایی تشکیل می‌شوند که کنیدی تولید می‌کنند. این کنیدی‌ها آزاد شده و پراکنده می‌شوند، نقش کنیدی‌ها هنوز شناخته نشده است. با رشد و توسعه بیشتر رشته‌های هیف، فرم جنسی، پریتسیوم قارچ تشکیل می‌شود که سطح آنرا استرومای سیاه رنگ و ضخیمی می‌پوشاند.

جنگل‌ها به‌عنوان واحد تولید ناخالص ملی در بسیاری از کشورهای دنیا مطرح هستند و از این نظر جایگاه خاصی را در عرصه اقتصاد به خود اختصاص داده‌اند. جنگل‌ها علاوه بر تولید چوب دارای نقش زیست محیطی بسیار مهمی هستند که ضامن بقای چرخه آلی، خاکی و آب و هوایی مناطق تحت پوشش خود می‌باشند. وجود انواع بیماری‌ها سبب نابودی و از بین رفتن جنگل‌ها و درختان موجود در آن می‌شود. بیماری لکه قیری افرا، به‌خصوص در نواحی شمال کشور روی گونه‌های افرا در مراحل مختلف رویشی، موجب خسارت فراوانی شده‌اند (۴). برای مبارزه و مدیریت این بیماری در جنگل استفاده از مواد شیمیایی توصیه نمی‌شود. راه عملی موثر در جهت کاهش و مبارزه با بیماری خارج کردن منابع آلودگی، جمع‌آوری و سوزاندن برگ‌های آلوده می‌باشد (۲، ۴). در صورت نیاز و برای از بین بردن بیماری، استفاده از سمومی مانند اکسی‌کلرمس، محلول بردو و زیرام در فصل تابستان توصیه می‌شود (۸).

منابع

1. Behdad, A. 1987. forest pests and diseases of trees and shrubs and ornamental plants in Iran. of printing Esfahan University. 824 pp.
2. Behdad, A. 2007. Important Plant Diseases and Plant phytopatology Iran. Miran publication printing. 785 pp.
3. Blanchard, R. 1982. Translated by Jafapour.B. Diseases of trees, a field and laboratory manual. Ferdowsi University of Mashhad Press. 335 pp.
4. Borhani, A. and A. Mosazadeh. 2008. Maple tar spot disease on different types of In the Mazandaran, Research Journal of protection and conservation of forests and grasslands Iran. 6: 88-97. (In Persian)
5. Cannon, P.F. and D.W. Minter. 1984. Rhytisma acerinum. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. 791 pp.

6. Duravetz, J.Y. and J.F. Morgan-Jones.1971. Ascocarp development in *Rhytisma Acerinum* and *R. punctatum* Canadian Journal of Botany, 49: 1242-1267.
7. Elahinia, S.A. 1988. Mycology and Plant Disease, Third Edition, published by the University of Guilan. 503 pp.
8. Khamenei Tabrizi, S. 2003. Fungal and bacterial pests and diseases of Urban and Forest trees. 186 pp.
9. Khodaparast, S. 2008. Fungi Hierarchy, Guilan University Press. 811 pp.
10. Kosiba, P. 2007. Impact of air pollution on the occurrence of *Rhytisma acerinum* "Tap-Spot" on maple leaves. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 76: 333-343.
11. Kosiba, P. 2009. Self-organizing feature maps and selected conventional numerical methods for assessment of environmental quality. *Journal of Acta society Botanicorum Poloniae*, 78: 335-343
12. Lapointe, M. and J. Brisson. 2011. Tar spot disease on Norway Maple North American. Quantifying the impact of a reunion between an invasive tree species and its adventive natural enemy in an urban. *Journal, Ecoscience*, 18: 63-69.
13. Marvi Mohadjer, M.R. 2007. Forests and Silviculture, Tehran University Press, second edition, 32-50.
14. Ronald, W., S. Weber and J. Webster. 2002. Teaching techniques for mycology: 18. *Rhytisma acerinum*, cause of tar-spot disease of sycamore leaves *Mycologist*, Volume 16, Part 3. Cambridge University Press Printed in the United Kingdom.
15. Seyyed Khorasani, Y. 1999. Principles of fungi (Mycology), Ameri Press, 295 pp.
16. Woo, J.Y. and A.D. Partridge. 1969. The life history and cytology of *Rhytisma acerinum* on big leaf maple. *Mycologia*, 61: 1085-1095.

Isolation and Identification of Maple Tar Spot Pathogen in *Acer velutinum* Trees in Dr. Bahramnia Educational and Research Forest

Shahram Mehdi Karami¹, Mohammad Reza Kavousi² and Akram Ahmadi³

1- Graduated M.Sc., Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources (GUASNR)
(Corresponding author: shahramkarami67@yahoo.com)

2- Associate Professor, Department of Forest sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences
and Natural Resources (GUASNR)

3- PhD, Department of Forestry, Faculty of Agriculture and Natural Resource, Gonbad Kavous
University, Gonbad, Iran

Received: November 23, 2013 Accepted: December 23, 2014

Abstract

Maple tap spot is one of the fungal diseases which has been infected maple trees. Early deciduous, the disappearance of leaf, reduction of growth, seed and wood production of maple trees are resulted due to this disease. The objective of this research was isolation and identification of the pathogen on leaves of *Acer velutinum* in Dr. Bahramnia educational and research forest (Shast-Kalateh of Gorgan). After sampling and culture of explants in PDA medium, growing of fungal pathogen was white delete and fluffy shape. Pathogenic fungi were identified after purification and isolation and characterization of spore, color, shape and disease symptoms. In PDA liquid medium, ascus of fungi was white and a clubbing shape with the fiber shape and linear ascospores was observed inside them. Upon the results, the identified fungal pathogen was *Rhytisma acerinum* on maple trees in this area.

Keywords: *Acer velutinum*, Maple tar spot, *Rhytisma acerinum*