



مجله پژوهش‌های تولید گیاهی

جلد شانزدهم، شماره دوم، ۱۳۸۸
www.gau.ac.ir/journals

نقش توکسین سراتوآلمین در بیماری زایی و بقای دو گونه قارچ *Ophiostoma ulmi* و *Ophiostoma novo-ulmi* (عاملین بیماری مرگ هلندی نارون)

*میرمعصوم عراقی^۱، کامران رهنما^۲ و نسرین سلیمانی پور^۳

^۱دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه پاتولوژی گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، آدانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، آدانش آموخته کارشناسی گروه گیاهپزشکی، دانشگاه تبریز
تاریخ دریافت: ۸۶/۱۰/۱؛ تاریخ پذیرش: ۸۷/۷/۱۶

چکیده

سراتوآلمین مهم‌ترین توکسین عامل قارچی بیماری مرگ هلندی نارون است و مقدار آن یکی از مهم‌ترین عوامل تفکیک دو گونه *Ophiostoma ulmi* و *Ophiostoma novo-ulmi* می‌باشد. با توجه به این که گونه *O. novo-ulmi* در مقایسه با گونه *O. ulmi* از شدت بیماری زایی بیشتری برخوردار است، در این تحقیق سعی شده است تا با اندازه‌گیری مقادیر سراتوآلمین جدایه‌های عامل بیماری و مقایسه با میزان بیماری زایی و توان جوانه‌زنی اسپور آن‌ها تحت شرایط خشکی، نقش توکسین مزبور در بیماری زایی عامل بیماری مورد بحث قرار گیرد. برای این منظور میزان توکسین سراتوآلمین جدایه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۴۰۰ نانومتر و به صورت شاخص تولید سراتوآلمین محاسبه شد. همچنین میزان جوانه‌زنی اسپورها در شرایط تنش رطوبتی ۵، ۱۰ و ۱۵ روزه محاسبه گردید. نتایج نشان داد که جدایه‌های گونه مهاجم *O. novo-ulmi* مقادیر بسیار بیشتری از این توکسین در مقایسه با جدایه‌های *O. ulmi* تولید می‌کنند، ولی رابطه مشخصی بین میزان برگ‌ریزی و پژمردگی نهال‌های ملج (*Ulmus glabra* Huds.) و تولید توکسین در جدایه‌های گونه *O. novo-ulmi* مشاهده نشد و این در حالی است که بین میزان جوانه‌زنی اسپورها

* مسئول مکاتبه: iraqi602@yahoo.com

در شرایط تنش رطوبتی و تولید توکسین همبستگی کاملاً مثبت و معنی‌داری وجود داشت. نقش توکسین سراتوآلمین در بیماری‌زایی عاملین بیماری مرگ نارون پیچیده می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: مرگ نارون، سراتوآلمین، جوانه‌زنی اسپور، بیماری‌زایی، ملج، *Ophiostoma ulmi*
O. novo-ulmi

مقدمه

بیماری مرگ نارون مهم‌ترین بیماری درختان جنگلی در یک قرن گذشته بوده است. بر طبق آخرین رده‌بندی قارچ‌شناسی، عامل بیماری مرگ هلندی نارون قارچی است از شاخه Ascomycota و زیرشاخه Pezizomycotina که متعلق به رده Sordariomycetes، زیررده Sordariomycetidae، راسته Ophiostomatales و خانواده Ophiostomataceae می‌باشد (هیبت و همکاران، ۲۰۰۷؛ ژانگ و همکاران، ۲۰۰۷). بسیاری از محققان انتشار اسپورهای عامل بیماری به وسیله سوسک‌های پوست‌خوار خانواده Scolytidae و ترجیحاً گونه‌های مختلفی از دو جنس *Scolytus* و *Hylurgopinus* را به‌عنوان عامل اصلی شیوع همه‌گیری‌های وسیع جغرافیایی در نیم‌کره شمالی توسط گونه‌های مختلف عامل می‌دانند (ویر، ۲۰۰۴). بنابراین انتقال عامل بیماری توسط این سوسک‌ها و حفظ شدن قدرت جوانه‌زنی اسپورها در شرایط نامساعد محیطی نظیر خشکی، احتمالاً دو عامل اصلی در شدت همه‌گیری ایجاد شده در یک منطقه است. به‌عنوان مثال نتایج محققان نشان داده است که سوسک‌های کوچک‌تر مثل سوسک کوچک پوست‌خوار (*Scolytus multistriatus*) بیشتر و بهتر از سوسک‌های بزرگ‌تری چون سوسک بزرگ پوست‌خوار (*S. scolytus*) می‌توانند عامل بیماری را منتقل کنند (فاکولی و باتیستی، ۱۹۹۷). از سوی دیگر شدت همه‌گیری بیماری با قدرت تهاجم جدایه‌های عامل بیماری رابطه مستقیم دارد. دو گونه *O. ulmi* و *O. novo-ulmi* دارای قدرت تهاجم و توان بیماری‌زایی متفاوتی هستند، به‌طوری‌که گونه اول در دهه ۱۹۴۰-۱۹۲۰ باعث ایجاد همه‌گیری با شدت کم و گونه دوم در دهه ۱۹۷۰ باعث ایجاد همه‌گیری شدید در آمریکای شمالی، اروپا و برخی از مناطق آسیا شده است (تگلی و همکاران، ۱۹۹۴). تفاوت‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و مولکولی زیادی بین جدایه‌های دو گونه مهاجم و غیرمهاجم وجود دارد و از این‌رو نقش هر کدام این عوامل در توان تهاجمی عاملین بیماری همواره مورد توجه قرار گرفته و وجود همبستگی‌های مثبت و منفی بین توان بیماری‌زایی و برخی از این خصوصیات در تحقیقات مختلف به اثبات رسیده است.

یکی از مهم‌ترین عوامل تفکیک دو گونه *O. ulmi* و *O. novo-ulmi* تفاوت در میزان تولید توکسین سراتوآلمین می‌باشد (رهنما، ۲۰۰۴؛ عراقی و همکاران، ۲۰۰۷). مطالعات چند سال اخیر نشان داده است که توکسین مزبور علاوه بر این که در پژمردگی درختان میزبان نقش دارد، در انتشار سالم اسپورهای عامل بیماری توسط سوسک‌های پوست‌خوار نیز مؤثر است (تمپل و همکاران، ۱۹۹۷). در سال‌های اخیر با توجه به شیوع بیماری با نژاد و گونه جدید و مهاجم *O. novo-ulmi* در کشور و به‌ویژه نوار شمالی از ارسباران تا پارک جنگلی گلستان (رهنما، ۲۰۰۳) بررسی خصوصیات مختلف جدایه‌های عامل بیماری و مقایسه با جدایه‌های گونه *O. ulmi* بسیار ضروری به نظر می‌رسد. در این پژوهش نیز سعی شده است تا با اندازه‌گیری و مقایسه میزان توکسین سراتوآلمین در جدایه‌های *O. ulmi* و *O. novo-ulmi* جداسازی شده از مناطق جنگلی شمال کشور با شدت بیماری‌زایی جدایه‌های مزبور و نیز بررسی توان جوانه‌زنی اسپوره‌های این دو گونه در شرایط تنش رطوبتی، اقدام به بررسی نقش این توکسین مهم در چرخه بیماری مرگ هلندی نارون گردد.

مواد و روش‌ها

جدایه‌های مورد استفاده: برای انجام این آزمون از ۵ جدایه مربوط به گونه *O. novo-ulmi* و ۲ جدایه مربوط به گونه *O. ulmi* جداسازی شده از مناطق مختلف استان گلستان موجود در کلکسیون قارچ‌شناسی گروه گیاهپزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان استفاده شد. هم‌چنین دو جدایه CKT-11 گونه *O. novo-ulmi* (جداسازی شده از ایران) و W9 گونه *O. ulmi* (جداسازی شده از انگلستان) موجود در این کلکسیون نیز به‌عنوان دو گونه استاندارد، که قبلاً میزان توکسین سراتوآلمین آن‌ها با روش‌های مختلف مشخص شده بود (بریزر و همکاران، ۱۹۹۰)، مورد استفاده قرار گرفتند.

کشت جدایه‌ها بر روی محیط کشت مایع: برای انجام این کار ۲ قطعه ۵ میلی‌متر مربعی از کشت ۵-۷ روزه هر یک از جدایه‌ها در محیط کشت عصاره مالت آگار^۱ (۲ درصد) با استفاده از چوب‌پنبه سوراخ‌کن سترون برداشته شده و به داخل ارلن‌های حاوی ۲۰۰ میلی‌لیتر محیط مایع زنتمایر (بریزر، ۱۹۸۱) که با کمی تغییرات حاوی ۲۰ گرم گلوکز، ۲ گرم L-آسپاراژین، ۱ گرم KH_2PO_4 ، ۱ گرم

1- Malt Extract Agar

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ، ۵ میلی‌گرم $FeCl_3$ ، ۱ میلی‌گرم ویتامین B_1 و ۱ میلی‌گرم ویتامین B_6 بود، انتقال و به مدت ۶ روز روی شیکر با ۸۰ دور در دقیقه در دمای اتاق قرار داده شدند.

جداسازی اسپورها و مایع حاوی توکسین: پس از گذشت ۶ روز محیط کشت‌های واجد کنیدی‌های قارچ از درون کاغذ صافی سترون بر روی قیف خلاء عبور داده شدند تا کنیدی‌های قارچ از میسلیم‌های آن جدا گشته و در ظرف سترون زیر قیف جمع‌آوری شوند. سپس به منظور جداسازی نهایی کنیدی‌ها از سایر اجزای محلول، ۳ مرتبه و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ صورت گرفت. در نهایت، سوسپانسیون اسپور حاصل به سه قسمت تقسیم شد. بخشی از این سوسپانسیون برای انجام آزمون بیماری‌زایی جهت رسیدن به رقت نهایی حدود 10^6 کنیدی در هر میلی‌لیتر، توسط لام هموسیتمتر^۱ شمارش اسپور صورت گرفت. سپس به دفعات لازم عمل رقیق‌سازی انجام شد و داخل ارلن‌های سترون در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری شدند. قسمت دیگر برای تعیین درصد جوانه‌زنی به داخل پلیت‌های در بسته سترون منتقل و در یخچال نگهداری شدند و بخش سوم برای تعیین میزان توکسین سراتوآلمین تولید شده توسط جدایه‌های مختلف عامل بیماری مورد استفاده قرار گرفت. برای این منظور محلول حاضر (به‌منظور جداسازی اسپور از فاز مایع) با استفاده از کاغذ صافی میکروبیولوژیکی با قطر روزنه ۰/۲۲ میکرون به داخل ظروف سترون فیلتر شد. ظروف حاوی محلول فاقد اسپور برای انجام آزمون تعیین شاخص تولید سراتوآلمین (CPI^2) در یخچال نگهداری شدند. بدین ترتیب ۳ نوع محلول حاصل از کشت جدایه‌ها در هر ارلن حاوی محیط کشت مایع برای انجام ۳ آزمون ذیل مورد استفاده قرار گرفتند.

آزمون تعیین بیماری‌زایی: برای انجام این آزمون از نهال‌های ملج ۲ ساله استفاده شد. مایه‌زنی نهال‌ها با استفاده از یک چاقوی جراحی سترون و با ایجاد یک شکاف کوچک در پوست نهال‌ها صورت گرفت و در هر بار مایه‌کوبی مقدار ۰/۲ میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپور با استفاده از یک سرنگ ۵ میلی‌لیتری بر روی چاقوی جراحی قرار داده شد تا به آرامی جذب آوند شود (سانتینی و همکاران، ۲۰۰۵). مایه‌کوبی نهال‌ها از دو ناحیه صورت گرفت. مایه‌کوبی اول از ناحیه انشعاب اولین شاخه از پایین و مایه‌کوبی دوم به فاصله ۲۰ سانتی‌متری از آن (رو به بالا) انجام شد (عراقی و رهنما، ۲۰۰۷).

1- Homocytometer

2- Cerato-ulmin Production Index

درصد بیماری‌زایی نهال‌ها براساس تحقیق‌های اسمالی و گوریس (۱۹۹۳) در طول ۸ هفته و با شمارش برگ‌های پژمرده، خشکیده و نیز برگ‌های ریزش کرده محاسبه گردید.

آزمون تعیین درصد جوانه‌زنی: به‌منظور بررسی اثر طول مدت تنش خشکی بر کلونی‌زایی اسپورهای قارچ، پلیت‌های حاوی اسپور به‌منظور خشک شدن ابتدا در دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد در انکوباتور نگهداری شدند (تمپل و همکاران، ۱۹۹۷) و به فواصل زمانی ۵، ۱۰ و ۱۵ روز پس از خشک شدن با آب مقطر استریل دوباره به‌صورت سوسپانسیون درآمده و به‌منظور جوانه‌زنی بر روی محیط کشت آگار ۲ درصد منتقل گردیدند. سوسپانسیون اسپور مورد استفاده در مرحله آخر تقریباً حاوی ۲۵۰ اسپور بود. پس از گذشت ۷ روز، درصد جوانه‌زنی اسپورها با شمارش تعداد کلونی‌های ظاهر شده برای تیمارهای مختلف به‌دست آمده و به‌عنوان معیاری برای مقایسه آماری توانایی اسپورهای جدایه‌ها به تحمل شرایط تنش رطوبتی، مورد استفاده قرار گرفت.

آزمون تعیین میزان سراتوالمین: برای انجام این آزمون از روش اسکالا و همکاران (۱۹۹۴) و سوربو و همکاران (۲۰۰۰) و روش تعیین شاخص تولید سراتوالمین با استفاده از معادله $CPI = y_{\dots} \times 100 \times DF$ و به‌کارگیری دستگاه اسپکتروفوتومتر استفاده شد که در این رابطه y_{\dots} مقدار جذب نوری (OD) در رقت‌های به‌کار گرفته شده، در طول موج ۴۰۰ نانومتر و DF عامل یا فاکتور رقت^۲ است. با توجه به نوع دستگاه به‌کار گرفته شده رقت‌هایی استفاده گردید که مقادیر جذب نوری آنها بین ۰/۱-۲ بود. به‌منظور مقایسه دقیق‌تر جدایه‌ها از نظر شاخص CPI به‌ازای مقدار ثابت $y=1$ ، مقدار دقیق عامل رقت برای هر یک از جدایه‌ها با استفاده از رابطه خطی بین y و لگاریتم پایه ده عامل رقت (x) به‌صورت $y = a + bx$ محاسبه گردید. بدین ترتیب مقدار CPI در این آزمون از معادله (۱) (سوربو و همکاران، ۲۰۰۰) محاسبه گردید که در این معادله $10^{(1-a)/b}$ ، عامل رقت به‌دست آمده در جذب نوری ۱ برای هر یک از جدایه‌ها می‌باشد.

$$CPI = 100 \times 10^{(1-a)/b} \quad (1)$$

تجزیه و تحلیل آماری: تمامی آزمون‌های مربوطه در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار برای هر کدام از تیمارها انجام شد. برای تجزیه و تحلیل نتایج آزمون‌ها از نرم‌افزار آماری SAS (۲۰۰۱) و برای مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد.

1- Optical Density

2- Dilution Factor

نتایج

نتایج مقایسه میانگین مقدار شاخص *CPI*، درصد جوانه‌زنی و میزان بیماری‌زایی جدایه‌های دو گونه *O. ulmi* و *O. novo-ulmi* در جدول (۱) آورده شده است. به‌طور کلی نتایج نشان داد که جدایه‌های *O. novo-ulmi* مقدار شاخص *CPI*، درصد جوانه‌زنی در شرایط تنش رطوبتی و میزان بیماری‌زایی بسیار بیشتری نسبت به جدایه‌های *O. ulmi* دارند و از نظر آماری نیز در سطح احتمال ۱ درصد دارای تفاوت معنی‌دار هستند. در این میان جدایه *Onu3* بیشترین درصد بیماری‌زایی و جدایه *Onu2* بیشترین میزان تولید توکسین و جوانه‌زنی اسپور را دارا بودند. نتایج حاصل از همبستگی پیرسون بین سراتوآلمین، بیماری‌زایی و جوانه‌زنی نشان داد که همبستگی مثبت معنی‌داری بین میزان تولید سراتوآلمین و جوانه‌زنی اسپوره‌های جدایه‌های عامل بیماری وجود دارد، در حالی‌که رابطه معنی‌داری بین میزان تولید توکسین و بیماری‌زایی مشاهده نشد (جدول ۲).

جدول ۱- نتایج مقایسه میانگین* درصد بیماری‌زایی (P)، میزان تولید سراتوآلمین براساس شاخص *CPI* و درصد جوانه‌زنی اسپورها در شرایط تنش رطوبتی ۵ روز (G/5)، ۱۰ روز (G/10) و ۱۵ روز (G/15) جدایه‌های دو گونه *O. novo-ulmi* و *Ophiostoma ulmi*

G/15	G/10	G/5	میزان سراتوآلمین بر حسب <i>CPI</i>	P بر حسب درصد	جدایه
۰/۰۰ ^c	۰/۰۱ ^c	۶/۲۱ ^f	۸/۴۸ ^f	۱۳/۱۵ ^g	Ou1**
۰/۰۰ ^c	۰/۰۰ ^c	۲/۳۱ ^f	۰/۰۰ ^f	۱۸/۴۵ ^f	Ou2
۰/۰۰ ^c	۰/۰۰ ^c	۳/۲۲ ^f	۴/۵۲ ^f	۱۰/۱۸ ^g	W9***
۱/۵۴ ^{bc}	۲/۵۲ ^{bc}	۳۹/۴۱ ^c	۴۴۰/۴۱ ^b	۷۹/۸۴ ^c	Onu1
۷/۲۵ ^a	۱۱/۵۹ ^a	۵۷/۶۶ ^a	۵۹۲/۲۷ ^a	۶۵/۸۵ ^c	Onu2
۱/۰۷ ^{bc}	۲/۲۳ ^{bc}	۳۱/۲۵ ^d	۳۲۳/۵۸ ^d	۹۴/۱۲ ^a	Onu3
۰/۰۰ ^c	۱/۲۳ ^{bc}	۳۰/۸۷ ^d	۲۸۶/۷۱ ^c	۸۴/۸۱ ^b	Onu4
۰/۰۰ ^c	۰/۸۴ ^{bc}	۲۵/۳۸ ^e	۳۶۹/۳۲ ^c	۷۶/۸۱ ^d	Onu5
۲/۰۹ ^b	۳/۵۷ ^b	۴۵/۲۴ ^b	۴۳۲/۷۱ ^b	۷۶/۶۴ ^d	CKT-11****

* اعداد دارای حروف غیرمشابه مربوط به هر کدام از آزمون‌های درصد بیماری‌زایی، میزان تولید سراتوآلمین و درصد جوانه‌زنی (جداگانه) با آزمون چنددامنه‌ای دارای اختلاف معنی‌دار دانکن در سطح احتمال ۱ درصد می‌باشند.

** جدایه‌های Ou1-2 متعلق به گونه *Ophiostoma ulmi* و جدایه‌های Onu1-5 متعلق به گونه *O. novo-ulmi* می‌باشند.

*** جدایه استاندارد *Ophiostoma ulmi* جداسازی شده از Oxford shire انگلستان در سال ۱۹۷۰ توسط J.N. Gibbs

(بریزر و همکاران، ۱۹۹۰).

**** جدایه استاندارد *Ophiostoma novo-ulmi* جداسازی شده از چاچکام استان مازندران ایران در سال ۱۹۷۷ توسط

C.M. Brasier (بریزر و همکاران، ۱۹۹۰).

جدول ۲- ضرایب همبستگی پیرسون بین شاخص تولید سراتوآلمین (CPI)، درصد جوانه‌زنی اسپور در شرایط تنش رطوبتی و میزان بیماری‌زایی جدایه‌های عامل بیماری مرگ نارون.

درصد بیماری‌زایی	جوانه‌زنی اسپور پس از تنش رطوبتی ۱۵ روزه	جوانه‌زنی اسپور پس از تنش رطوبتی ۱۰ روزه	جوانه‌زنی اسپور پس از تنش رطوبتی ۵ روزه	تولید سراتوآلمین
درصد بیماری‌زایی	۰/۰۶۷۷۹ ^{ns}	۰/۰۳۳۵ ^{ns}	۰/۰۳۲۴ ^{ns}	۰/۰۰۷۸ ^{ns}
تولید سراتوآلمین	۰/۳۲۵۰۵*	۰/۷۷۶۶۲**	۰/۸۱۸۳۵**	
جوانه‌زنی اسپور پس از تنش رطوبتی ۵ روزه	۰/۷۱۳۰۳**	۰/۹۶۷۹۹**		
جوانه‌زنی اسپور پس از تنش رطوبتی ۱۰ روزه	۰/۷۵۶۴۸**			
جوانه‌زنی اسپور پس از تنش رطوبتی ۱۵ روزه				

* معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد، ** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد و ns غیرمعنی‌دار.

بحث

نتایج این آزمون نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین میزان تولید توکسین در جدایه‌های دو گونه مهاجم *O. novo-ulmi* و گونه غیرمهاجم *O. ulmi* وجود دارد. به‌طور کلی بیش از ۱۰ مورد تفاوت مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و مولکولی شاخص بین دو گونه مزبور شناخته شده است (بریزر، ۱۹۹۱). یکی از این موارد وجود تفاوت در میزان تولید سراتوآلمین در دو گونه *O. novo-ulmi* و *O. ulmi* می‌باشد (تاکائی و همکاران، ۱۹۸۳). توکسین مزبور که دارای ساختمان پروتئینی با وزن مولکولی ۷۶۲۷ کیلودالتون بوده (بریزر و همکاران، ۱۹۹۰) و نقش اساسی در بیماری‌زایی و پژمردگی گیاه دارد (تاکائی، ۱۹۷۸)، برای اولین بار توسط سالمینک و همکاران (۱۹۶۵) گزارش گردید و در سال ۱۹۷۴ توسط تاکائی سراتوآلمین نام گرفت. او بعدها شواهدی ارائه داد که براساس آن جدایه‌های مهاجم مقادیر بسیار زیادی سراتوآلمین در مقایسه با جدایه‌های غیرمهاجم تولید می‌کنند (بریزر و همکاران، ۱۹۹۰). تگلی و همکاران (۱۹۹۴) نیز در طی تحقیق‌های خود دریافتند که بهینه دمای تولید سراتوآلمین در شرایط آزمایشگاهی ۲۳ درجه سانتی‌گراد است که از این نظر به بهینه دمای رشدی جدایه‌های

مهاجم (۲۰-۲۲ درجه سانتی‌گراد) نزدیک‌تر است تا بهینه دمای رشدی جدایه‌های غیرمهاجم (۲۸-۳۰ درجه سانتی‌گراد). علاوه بر این بودن و همکاران (۱۹۹۴) و متعاقب آن جنگ و همکاران (۱۹۹۶) وجود تفاوت‌های مولکولی در تولید توکسین سراتوآلمین در بین جدایه‌های مهاجم و غیرمهاجم را با تعیین توالی نوکلئوتیدهای ژن CU (ژن تولیدکننده توکسین سراتوآلمین) به اثبات رساندند.

نتایج حاصل از این آزمون نشان داد که رابطه مشخصی بین میزان تولید سراتوآلمین و میزان بیماری‌زایی جدایه‌های عامل بیماری و ترجیحاً جدایه‌های گونه مهاجم *O. novo-ulmi* وجود ندارد، ولی همبستگی کاملاً مثبتی بین مقادیر توکسین تولید شده و درصد جوانه‌زنی جدایه‌ها در شرایط تنش رطوبتی وجود داشت. این نتایج در کار برخی از محققان نظیر بودن و همکاران (۱۹۹۶) و تمپل و همکاران (۱۹۹۷) نیز دیده می‌شود. با این وجود نتایج مختلفی در کار محققان مبنی بر میزان نقش سراتوآلمین در بیماری‌زایی دیده می‌شود. وان آلفان و ترنر (۱۹۷۵) نشان دادند که توکسین سراتوآلمین با دخالت در انتقال آب در آوندهای گیاه، تنش آبی ایجاد می‌کند. بریزر و همکاران (۱۹۹۴) ثابت کردند که برخی از جدایه‌های *O. novo-ulmi* فاقد توان تولید سراتوآلمین بوده ولی توان بیماری‌زایی بسیار بالایی دارند. به دنبال آن بودن و همکاران (۱۹۹۶) فقدان ارتباط بین شدت بیماری‌زایی و توان تولید، سراتوآلمین را به اثبات رساندند. با این حال اسکالا و همکاران (۱۹۹۷) نشان دادند که میزان سراتوآلمین در برگ‌های پژمرده و دارای علائم زردی و نکروز برگ‌ها بیش از برگ‌های فاقد علائم در نهال‌های مایه‌کوبی شده به‌وسیله جدایه‌های دو گونه *O. ulmi* و *O. novo-ulmi* است. تمپل و همکاران (۱۹۹۷) با انتقال ژن تولید سراتوآلمین از جدایه‌های مهاجم *O. novo-ulmi* به جدایه‌های غیرمهاجم *O. ulmi*، هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری در میزان بیماری‌زایی جدایه‌های *O. ulmi* طبیعی و تراریخته جدید مشاهده نکردند. اما سوربو و همکاران (۲۰۰۰) نشان دادند که انتقال این ژن به جدایه گونه *O. quercus* (که یک گونه غیربیماری‌زا بر روی نارون است) باعث افزایش توان بیماری‌زایی این گونه و بروز علائم مرگ نارون پس از مایه‌کوبی درختان نارون با جدایه تراریخته آن می‌شود.

بنابراین تاکنون نتایج مختلف و تا حدودی متناقض از تحقیق‌های سایر محققان در زمینه میزان و چگونگی نقش سراتوآلمین در بیماری‌زایی قارچ عامل بیماری وجود دارد و این با در نظر گرفتن تعامل پیچیده پاتوژن، میزبان، ناقل و شرایط محیطی در پدیده بیماری‌زایی تا حدی قابل توجیه است، چرا که عوامل بسیار زیادی در پدیده بیماری‌زایی نقش دارند. چه بسا ظهور و یا عدم ظهور یکی از

این عوامل، بیماری‌زایی و به ویژه ظهور علائم بیماری را با تغییراتی مواجه سازد. ولی آنچه که در پدیده بیماری‌زایی به جرأت می‌توان گفت این است که قارچ بیمارگر بیش از آنکه بتواند به میزبان خود با تولید انواع ترکیبات بیوشیمیایی آسیب برساند باید قادر باشد به راحتی در آن رشد کرده و در سراسر گیاه منتشر شود (شفر و الگرسما، ۱۹۸۱؛ عراقی و همکاران، ۲۰۰۸) و این در حالی است که میزان حساسیت درختان میزبان که رابطه مستقیم با سیستم دفاعی و خصوصیات آناتومیکی آنها دارد، نقش اساسی و عمده‌ای در بروز علائم و شدت بیماری‌زایی جدایه‌های عامل بیماری دارد. در اینجا این فرضیه را می‌توان مطرح کرد که اگرچه اغلب تحقیقات همواره به دنبال اثبات تأثیرپذیری توان بیماری‌زایی قارچ عامل بیماری از ظهور یا عدم ظهور ژن *CU* بوده‌اند، ولی شاید بتوان گفت که بیش از این که بیماری‌زایی از میزان سراتوآلمین تولید شده در گیاه تأثیر بپذیرد، این ژن *CU* و میزان تولید توکسین سراتوآلمین و حتی سایر خصوصیات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی قارچ عامل بیماری است که از عملکرد و بیان ژن *Vir* (ژن بیماری‌زایی) متأثر می‌شوند.

در راستای مطالعات در جهت یافتن سایر خصوصیات سراتوآلمین علاوه بر نقش آن در پژمردگی، تاکائی (۱۹۷۸) و تاکائی و همکاران (۱۹۸۰) وجود سراتوآلمین در سطح اندام‌های مختلف به ویژه اندام غیرجنسی قارچ به نام، سینما را به اثبات رساندند. استرینگر و تیمبرلاک (۱۹۹۳) نشان دادند که سراتوآلمین یک پروتئین از گروه هیدروفوبین هاست. در نهایت تمپل و همکاران (۱۹۹۷) در مقاله خود با عنوان "سراتوآلمین یک هیدروفوبین مناسب پارازیتی" اعلام کردند که پروتئین سراتوآلمین بیش از اینکه نقش اساسی در پژمردگی و رابطه تنگاتنگ با بیماری‌زایی داشته باشد با پوشش اسپورهای عامل بیماری و حفاظت آنها از شرایط محیطی به ویژه تنش رطوبتی باعث افزایش امکان انتقال و انتشار اسپورهای عامل بیماری در محیط می‌شود. طبیعی است که افزایش توان جوانه‌زنی اسپورها در چنین شرایطی بیشتر شود. بدین ترتیب سراتوآلمین علاوه بر اینکه در مکانیسم پیچیده پژمردگی در کنار سایر ترکیبات مهم نظیر گلیکوپپتیدها و پلی‌ساکاریدها (استروبل و همکاران، ۱۹۷۸؛ شفر، ۱۹۸۲؛ شفر و الگرسما، ۱۹۸۱)، آنزیم‌های مهمی نظیر لاکازها (بینز و کانواسینی، ۱۹۹۶)، آنزیم‌های سلولتیکی و پکتیکی (الگرسما، ۱۹۷۶؛ اُولت و ریوکس، ۱۹۹۲) (که نقش اساسی در پژمردگی ایفا می‌کنند) شرکت می‌کند، نقش اصلی خود را به عنوان یک فاکتور پارازیتی مناسب در چرخه زندگی عامل بیماری با پوشش اسپورهای عامل بیماری به خوبی ایفا می‌کند و از آنجایی که جدایه‌های *O. novo-ulmi* سراتوآلمین به مراتب بیشتری نسبت به *O. ulmi* تولید می‌کنند، از پتانسیل تهاجمی بیشتری برخوردار

هستند. ولی از طرفی عدم وجود همبستگی مشخص بین میزان بیماری‌زایی و تولید توکسین در آزمایش‌های متعدد نشان می‌دهد که سراتوآلمین نقش مستقیم و اساسی در ایجاد بیماری و درجات مختلف بیماری‌زایی و پژمردگی ندارد (تمپل و همکاران، ۱۹۹۷).

منابع

1. Binz, T., and Canevascini, G. 1996. Differential production of extracellular laccase in Dutch elm disease pathogens *Ophiostoma ulmi* and *O. novo-ulmi*. Mycol. Res. 100: 1060-1064.
2. Bowden, C.G., Hintz, W.E., Jeng, R., Hubbes, M., and Horgen, P.A. 1994. Isolation and characterization of the cerato-ulmin toxin gene of Dutch elm disease pathogen, *O. ulmi*. Curr. Genet. 25: 323-329.
3. Bowden, C.G., Smalley, E., Guries, R.P., Hubbes, M., Temple, B., and Horgen, P.A. 1996. Lack of association between cerato-ulmin production and virulence in *Ophiostoma novo-ulmi*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 9: 556-564.
4. Brasier, C.M. 1981. Laboratory investigation of *Ceratocystis ulmi*. In: Stipes, R.J., and Campana, R.J. (eds.). Comp. of Elm Dis. APS Press. Pp: 76-79.
5. Brasier, C.M. 1991. *Ophiostoma novo-ulmi* sp. nov., causative agent of current Dutch elm disease pandemics. Mycopathol. 115: 151-161.
6. Brasier, C.M., Takai, S., Nordin, J.H., and Richards, W.C. 1990. Differences in Cerato-ulmin production between the EAN and NAN and non-aggressive subgroups of *Ophiostoma ulmi*. Plant Pathol. 39: 231-236.
7. Brasier, C.M., Kirk, S., and Tegli, S. 1994. Naturally occurring non cerato-ulmin producing mutants of *Ophiostoma novo-ulmi* are pathogenic but lack aerial mycelium. Mycol. Res. 99: 436-440.
8. Elgersma, D.M. 1976. Production of pectic and cellulolytic enzymes by aggressive and non-aggressive strains of *Ophiostoma ulmi*. Neth. J. Plant Pathol. 82: 161-172.
9. Faccoli, M., and Battisti, A. 1997. Observations on the transmission of *Ophiostoma ulmi* by the smaller elm bark beetles (*scolytus* spp.). Pp: 172-176. In Grégoire, J.C., Liebhold, A.M., Stephen, F.M., Day, K.R., and Salom, S.M. (eds.). In Proceedings: Integrating cultural tactics into the management of bark beetle and reforestation pests. USDA Forest Service General Technical Report NE-236.
10. Hibbett, D.S., and *et al.* (Plus 66 other editors). 2007. A higher-level phylogenetic classification of the fungi. Mycol. Res. 111: 509-547.

11. Iraqi, M.M., and Rahnama, K. 2007. Investigating the disease severity of *Ophiostoma ulmi* and *O. novo-ulmi* isolates of the causal disease of Dutch elm disease on *Ulmus parvifolia* Jacq. J. Agri. Sci. and Natur. Res. 14: 3. 164-173.
12. Iraqi, M.M., Rahnama, K., Razavi, S.I., and Ebrahimi, A. 2007. Investigation on isolates of fungus the causal agent of Dutch elm disease in some areas of Golestan province. J. Agric. Sci. Natur. Resour. 14: 6. 124-138.
13. Iraqi, M.M., Rahnama, K., Mostafa, M., and Marandi, M. 2008. A survey on histopathology of *Ulmus glabra* and *U. carpinifolia* inoculated by *Ophiostoma novo-ulmi* fungus. J. Agric. Sci. Natur. Resour. 15: 4.
14. Jeng, R.S., Hintz, W.E., Bowden, C.G., Horgen, P.A., and Hubbes, M. 1996. A comparison of the nucleotide sequence of the cerato-ulmin gene and the rDNA ITS between aggressive and non-aggressive isolates of *Ophiostoma ulmi* sensu lato, the causal agent of Dutch elm disease. Curr. Genet. 29: 168-173.
15. Ouellette, G.B., and Rioux, D. 1992. Anatomical and Physiological Aspects of Resistance to Dutch Elm Disease. Pp: 256-305. In: Blanchette, A., and Biggs, R. (eds.). Defense Mechanisms of Woody Plant against Fungi. Berlin, Germany. Springer-Verlag.
16. Rahnama, K. 2003. Incidence of Dutch elm disease in new area of natural forest and urban trees of Iran. In Proceeding: The Second International Elm Conference. Valsain, Segovia, Spain. 34p.
17. Rahnama, K. 2004. Molecular identification of *Ophiostoma* and *Ceratocystis* genera and their relationship together: emphasis on identification and occurrence population of new casual agent of Dutch elm disease in Iran. Five months report of studies opportunity in British Columbia University, Vancouver, Canada. 20p.
18. Salemink, C.A., Robel, H., Kerling, L., and Tchernoff, V. 1965. Phytotoxin isolated from liquid cultures of *Ceratocystis ulmi*. Sci. 149: 202-203.
19. Santini, A., Montaghi, A., Vendramin, G. G., and Capretti, P. 2005. Analysis of the Italian Dutch elm disease fungal population. Phytopathol. 153: 73-79.
20. SAS Institute. 2001. SAS system. Inc, Cary, NC, USA.
21. Scala, A., Pattuelli, M., Coppola, L., Guastini, M., Tegli, S., Del Sero, G., Mitterpergher, L., and Scala, F. 1997. Dutch elm disease progression and quantitative determination of cerato-ulmin in leaves, stems and branches of elms inoculated with *Ophiostoma novo-ulmi* and *O. ulmi*. Phisiol. and Mol. Pl. Pathol. 50: 349-360.

22. Scala, A., Tegli, S., Comparini, C., Mittempergher, L., Scala, F., and Sorbo, G. 1994. Influence of fungal inoculum on cerato-ulmin production: Purification of cerato-ulmin and detection in elm sucker cuttings. *Petria*. 4: 53-63.
23. Scheffer, R.J. 1982. A phytotoxic glycopeptide produced by *Ophiostoma ulmi* in several elm species and clones. Pp: 215-223. In: Kondo, E.S., Hiratsuka, Y., and Denyer, W.G. (eds.). Proc. Dutch elm disease. Symposium and workshop, Winnipeg, Manitoba.
24. Scheffer, R.J., and Elgersma, D.M. 1981. Detection of a phytotoxin glycopeptide produced by *Ophiostoma ulmi* in elm by enzyme-linked immunospecific assay (ELISA). *Physiol. Plant Pathol.* 18: 27-32.
25. Smalley, E.B., and Guries, R.P. 1993. Breeding elms for resistance to Dutch elm disease. *Ann. Rev. Phytopathol.* 31: 325-352.
26. Sorbo, G., Scala, F., Parrella, G., Lorito, M., Comparini, C., Ruocco, M., and Scala, A. 2000. Functional expression of the gen *cu*, encoding the phytotoxic hydrophobin cerato-ulmin, enables *Ophiostoma quercus*, a nonpathogen on elm, to cause symptoms of Dutch elm disease. *Molecular Plant-Microb Interactions*. APS Press, 13: 1. 43-53.
27. Stringer, M.A., and Timberlake, W.T. 1993. Cerato-ulmin, a toxin involved in Dutch elm disease, is a fungal hydrophobin? *The Plant Cell*, 5: 145-146.
28. Strobel, G.A., Van Alfen, N., Hapner, K.D., Mc Neil, M., and Albersheim, P. 1978. Some glycopeptides from *Ceratocystis ulmi*, Dutch elm disease pathogen. *Biochim Biophys Acta*. 538: 60-75.
29. Takai, S. 1974. Pathogenicity and cerato-ulmin production in *Ceratocystis ulmi*. *Nature*. 252: 124-126.
30. Takai, S. 1978. Cerato-ulmin, a wilting toxin of *Ceratocystis ulmi*: cultural factors affecting cerato-ulmin production by the fungus. *J. Phytopathol.* 91: 147-158.
31. Takai, S. 1980. Relationship of the production of the toxin, cerato-ulmin, to synnemata formation, pathogenicity, mycelial habit and growth of *Ceratocystis ulmi* isolates. *Can. J. Bot.* 58: 658-662.
32. Takai, S., Hiratsuka, Y., Krywienczyk, J., Richards, W.C., and Davies, Y.P. 1980. Evidence for the presence of the toxin cerato-ulmin in the synnemata head fluid of *Ceratocystis ulmi*. *Can. J. Bot.* 58: 669-675.
33. Takai, S., Richards, W., and Stevenson, K. 1983. Evidence for the involvement of Cerato-ulmin, the *Ceratocystis ulmi* toxin, in the development of Dutch elm disease. *Physiol. Plant Pathol.* 23: 275-280.

34. Tegli, S., Comparini, C., Giannetti, C., and Scala, A. 1994. Effect of temperature on growth and cerato-ulmin production of *O. novo-ulmi* and *O. ulmi*. Mycol. Res. 98: 4. 408-412.
35. Temple, B., Horgen, P.A., Bernier, L., and Hintz, W.E. 1997. Cerato-ulmin, a hydrophobin secreted by the causal agents of Dutch elm disease, is a parasitic fitness factor. Fungal Gen. and Biol. 22: 39-53.
36. Van Alfan, N.K., and Turner, N.C. 1975. Influence of a *Ceratocystis ulmi* toxin on water relations of elm (*Ulmus americana*). Pl. Physiol. 55: 312-316.
37. Webber, J.F. 2004. Experimental studies on factors influencing the transmission of Dutch elm disease. Investigación Agraria: Sistemasy Recursos Forestales. 13: 197-205.
38. Zhang, N., Castlebury, L.A., Miller, A.N., Huhndorf, S., Schoch, C.L., Seifert, K., Rossman, A.Y., Rogers, G.D., Kohlmeyer, J., Volkmann-Kohlmeyer, B., and Sung, G.H. 2007. Sordariomycetes systematics: an overview of the systematics of the Sordariomycetes based on a four gene phylogeny. Mycologia. 98: 1077-1088.



Gorgan University of Agricultural
Sciences and Natural Resources

J. of Plant Production, Vol. 16(2), 2009
www.gau.ac.ir/journals

The involvement of Cerato-ulmin toxin on pathogenicity and survive of *Ophiostoma ulmi* and *O. novo-ulmi* fungi, Causal agents of Dutch elm disease

***M.M. Iraqi¹, K. Rahnama² and N. Soleimanipoor³**

¹M.Sc. student, Dept. of Plant Pathology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, ²Associate Prof., Dept. of Plant Protection, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, ³B.Sc. student, Dept. of Plant Protection, Tabriz University

Abstract

Cerato-ulmin is the most important toxin of fungal causal agents of Dutch elm disease and its content is one of the most important factors to distinguish two species *Ophiostoma ulmi* and *O. novo-ulmi*. With attention to the *Ophiostoma novo-ulmi* is more pathogenicity than *O. ulmi*, this research was carried out to discuss the role of Cerato-ulmin on pathogenicity of causal agent using measurement of Cerato-ulmin content of isolates of casual agent and their comparison with pathogenicity and spore germination ability in moisture stress conditions. For these aim, content of Cerato-ulmin toxin was calculated as Cerato-ulmin Production Index (CPI) using spectrophotometer at 400 nm. The spore germination was also calculated in moisture stress conditions (5, 10 and 15 days-old). The results showed that *O. novo-ulmi* isolates able to produce the higher Cerato-ulmin toxin than *O. ulmi*, however was not observed clear relationship between rate of defoliation and wilting of *Ulmus glabra* Huds. seedlings and toxin production but there was completely significant positive correlation between rate of spore germination in moisture stress conditions and toxin production by fungal isolates of Dutch elm disease. The involvement of Cerato-ulmin on pathogenicity of causal agents of Dutch elm disease is intricate.

Keywords: Dutch elm disease, Cerato-ulmin, Spore germination, Pathogenicity, *Ulmus glabra* Huds., *Ophiostoma ulmi*, *O. novo-ulmi*

* Corresponding Author; Email: iraqi602@yahoo.com