

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان حفظ نباتات
معاونت قرنطینه و بهداشت گیاهی



ضوابط شناسایی، ردیابی، استخراج و کنترل
بیماری پژمردگی ور تیسیلیومی زیتون
Verticillium dahliae

دفتر قرنطینه
معاونت قرنطینه داخلی

دامنه میزبانی و پراکندگی جغرافیایی :

قارچ ورتیسیلیوم عامل پژمردگی و خشکیدن نهال‌ها و درختان جوان و مسن زیتون بوده و تاکنون از کشورهای مهم زیتون‌خیز دنیا از جمله ایتالیا، اسپانیا، فرانسه، ترکیه، یونان، سوریه و اردن گزارش گردیده است. استرین‌های مختلف این قارچ می‌توانند بیش از ۱۶۰ گونه گیاهی را در ۴۰ خانواده مورد حمله قرار دهند. این قارچ در حال حاضر مهم‌ترین عامل محدودکننده توسعه زیتون در ایران محسوب گردیده و عدم توجه به آن می‌تواند موجب انتشار آلدگی در سطح وسیع و وارد آمدن خسارت هنگفت به زیتونکاری‌های کشور گردد.

با توجه به نتایج بررسی‌های انجام شده توسط کارشناسان ستاد گیاهپژوهی زیتون کشور از سال ۱۳۷۶-۱۳۸۵ فعالیت این پاتوژن در ۱۸ نهالستان زیتون در استان‌های گلستان، مازندران و گیلان با ظرفیت تولید بیش از دو میلیون نهال در سال و نیز در دهها هکتار از باغات جدیدالاحداث زیتون استان‌های سمنان، اردبیل، فارس، گلستان، سیستان و بلوچستان، ایلام، گیلان و زنجان به اثبات رسیده است.

علائم بیماری و خسارت:

علائم بیماری معمولاً بصورت پژمردگی، قهوه‌ای و خشک شدن ناگهانی برگ‌ها و شاخه‌ها در یکطرف درخت بروز می‌کند (شکل ۱). بیماری در نهال‌ها عموماً موجب خشک شدن کلیه شاخه‌ها و ریزش اکثر برگ‌ها می‌شود. برگ‌های شاخه‌های بیمار ابتدا رنگ سبز خود را از دست داده و برنگ سبز مایل به خاکستری در می‌آیند. در اکثر موارد حاشیه برگ‌ها به طرف پایین خمیده می‌شود، برگ‌ها در نهایت خشک شده و به رنگ قهوه‌ای در آمده و ریزش می‌نماید.



شکل ۱- علائم بروز پژمردگی، قهوه‌ای و خشک شدن ناگهانی و یکطرفه برگ‌ها و شاخه‌ها در درخت زیتون آلدۀ به قارچ *verticillium dahliae*

چنانچه پژمردگی در تابستان رخ دهد، معمولاً برگ‌ها و گل‌ها و میوه‌ها بصورت خشکیده بر روی شاخه‌ها باقی می‌مانند (شکل ۲). پیشرفت پژمردگی در اندام‌های رویشی و زایشی در نهایت به خشکیدگی کامل تاج و مرگ درخت منجر می‌شود (شکل ۳). تغییر رنگ قسمت بیرونی ساقه و تغییر رنگ آوندی از علائم مهم برای تشخیص

بیماری در درختان میوه و غیرمثمر آلوده بشمار می‌رود، اما برخلاف سایر درختان میزبان، تغییر رنگ آوندی در درختان زیتون بعنوان علامت مشخص بیماری مطرح نبوده و در اکثر موارد مشاهده نمی‌شود، اگر چه این تغییر رنگ در نهال‌های آلوده و درختان جوان حساس زیتون بویژه در محل انشعاب شاخه‌ها (شکل ۴) کاملاً نمایان می‌باشد.



شکل ۳- خشکیدگی کامل تاج و مرگ درخت زیتون
آلوده به قارچ ورتیسیلیوم داهلیا



شکل ۲- باقیماندن برگ‌ها، گل‌ها و میوه‌ها
 بصورت خشکیده بر روی شاخه‌ها

شدت بیماری با افزایش سن درخت افزایش می‌یابد. در درختان جوان زیتون ابتدا چند شاخه در یک طرف درخت خشک شده و بقیه قسمت‌های درخت سالم به‌نظر می‌رسد که با پیشرفت بیماری سایر شاخه‌ها و سرانجام تمام درخت خشک می‌شود. در بیشتر موارد، رشد پاچوش همزمان با خشک شدن یکطرفه شاخه‌ها از علائم مشخص این بیماری در درختان جوان ارقام حساس زیتون به حساب می‌آید (شکل ۵). در مجموع علایم حاصل از بیماری در سه بخش مهم درخت زیتون به شرح زیر می‌باشد:

برگ‌ها: تغییر رنگ غیرعادی، پژمردگی، خشکیدگی و ریزش غیرعادی.

ساقه‌ها: تغییر رنگ بیرونی، بینگ شدن داخلی، سرخ‌خشکیدگی.

کل گیاه: خشکیدگی یکطرفه و یا تمام شاخه‌ها، رشد غیرعادی و یکطرفه پاچوش‌ها، سرخ‌خشکیدگی و مرگ.



شکل ۵- تحریک رشد پاچوش همزمان با خشک شدن یکطرفه شاخه‌ها.



شکل ۶- علامت تغییر رنگ آوندی در درختان زیتون

شکل‌شناسی عامل بیماری:

کلونی‌های قارچ بطور متوسط تند رشد بوده و در ابتدا به رنگ سفید با میسلیوم هوایی شفاف کوچک تا متوسط، دارای حاشیه نامنظم که پس از گذشت یک هفته یا در نتیجه تولید میکرواسکلروت‌ها از قسمت مرکزی شروع به تیره شدن می‌کنند (شکل ۶).

کنیدی‌ها تخم‌مرغی شکل، شفاف و عمده‌ای یک سلولی بوده و در نوک سلول‌های کنیدی‌زای باریک و نوک‌تیز تولید می‌شوند. کنیدیوفورها دندانه‌دار شفاف و کمابیش صاف و اندازه کنیدی‌ها $2/5-6 \times 1/5-3$ میکرون می‌باشد. کنیدی‌ها بصورت ردیفی تولید شده و توب‌های اسپوری مرطوبی را در نوک سلول‌های کنیدی‌زا تشکیل و ظاهر مشخصی را به کنیدیوفور در محیط کشت می‌دهند (شکل ۷) توب‌های اسپوری درنهایت ادغام می‌شوند و در بخش‌های قدیمی تر محیط کشت اندازه آنها کوچکتر می‌شود. میکرواسکلروت‌ها (شکل ۸) شکل و اندازه نامنظمی دارند و برنگ قهوه‌ای تیره تا مشکی و تقریباً کروی می‌باشند.



شکل ۶- تولید میکرواسکلروت‌ها و تیره شدن کلته قارچ



شکل ۷- کنیدیوفورها و توبهای اسپوری قارچ *V.dahliae* در محیط کشت PDA



شکل ۸- شکل میکروسکلروت‌های قارچ *V.dahliae*

بیوakkولوزی قارچ عامل بیماری:

آلودگی گیاهان بصورت انفرادی یا گروهی، مستقیماً به تراکم اینکلوم میکروسکلروت‌ها در خاک بستگی دارد. بقای قارچ بصورت میکروسکلروت‌های آزاد و یا در داخل بافت میزبان می‌باشد و می‌تواند چندین سال بصورت میکروسکلروت، چه بصورت آزاد و چه در داخل بقایای میزبان درخاک دوام بیاورد. میکروسکلروت‌ها در شرایط مساعد دما و رطوبت و تحت تاثیر ترشحات ریشه میزبان، جوانه زده و ریسه‌ای تولید می‌کنند که ابتدا قسمت پشتی نوک ریشه را آلوده نموده سپس مستقیماً بدرون کورتکس ریشه جوان نفوذ نموده و به طرف بافت‌های آوندی در حال رشد پیشروی می‌کنند. زخمی شدن ریشه بوسیله ادوات کشاورزی و تغذیه نماتدهای پارازیت گیاهی، شرایط بسیار مساعدی را برای نفوذ و استقرار قارچ فراهم می‌نماید. قارچ پس از ورود می‌تواند درون آوند‌های چوبی رشد نموده و از طریق رشد میسلیومی و تولید کنیدی بصورت سیستمیک درآید. خسارت اساسی این پاتوژن، ایجاد انسداد آوندی و تولید توکسین است. میکروسکلروت‌ها در بافت‌های مسن آلوده تشکیل شده و پس از انهدام بقایای آلوده گیاهی در خاک آزاد می‌شوند. در شرایط نامناسب از نظر حرارت و رطوبت و میزبان، میکروسکلروت‌ها می‌توانند بمدت بیش از یک دهه زنده بمانند. توانایی زنده ماندن میکروسکلروت‌ها در خاک‌های مرطوب و گرم بسرعت کاهش می‌یابد و برخی از باکتری‌ها مانند سودوموناس فلورسانس، مهم‌ترین

عامل از بین بردن میکروسکلروت‌ها در خاک‌های قلیایی بوده و نیز تعدادی از قارچ‌ها مانند گونه‌های مختلف قارچ تریکوودرما در خاک‌های اسیدی موجب از بین رفتن آنها می‌شوند.

این قارچ می‌تواند بوسیله اندام‌های تکثیری غیرجنسی (قلمه و پیوندک) و بذر (در برخی از میزبان‌ها بغیر از زیتون) و بقایای گیاهی انتشار یابد. در زیتونکاری‌های ایران، استفاده از قلمه و خاک آلوده به این پاتوژن مهم‌ترین عامل انتشار آن در نهالستان‌ها و باغات زیتون بوده و آلودگی برخی از باغهای منتخب برای قلمه گیری در استان‌های گلستان، گیلان و زنجان به اثبات رسیده است (گزارشات سازمان حفظ نباتات). در مناطق پنهانکاری آلوده به این پاتوژن در استان گلستان انتقال آن بوسیله ماشین‌آلات کشاورزی، آب آبیاری و باران از اراضی آلوده هم‌جوار به محوطه نهالستان‌ها و باغهای زیتون اجتناب‌ناپذیر می‌باشد.

درجه حرارت متوسط (۲۶-۱۸ درجه سانتی‌گراد) تا درجه حرارت نسبتاً زیاد (۲۶-۲۴ درجه سانتی‌گراد) برای فعالیت این قارچ مناسب بوده و درجه حرارت بیش از ۲۸-۳۰ درجه برای آن بازدارنده است. در مناطق گرم در صورت انجام آبیاری، درجه حرارت خاک کاهش یافته و با مساعد شدن شرایط برای رشد قارچ، خسارت ناشی از بیماری شدت می‌یابد. در مناطق معتدل بدلیل تسع زیاد شرایط اقلیمی در فصول مختلف، خسارت ناشی از ورتیسیلیوم نسبت به مناطق گرم و خشک خیلی بیشتر است. با کاشت نهال‌های آلوده در مناطق خشک بهمراه وارد آمدن تنش‌های زراعی و اکولوژیکی ناشی از نامناسب بودن دما و رطوبت و ناسازگاری رقم، شدت بیماری بمراتب افزایش می‌یابد. در این مناطق در صورتیکه دمای هوا در تابستان بالاتر از ۳۵ درجه سانتی‌گراد باشد، بطور موقت امکان بهبودی درختان آلوده وجود دارد، ولی در ماههای سرد سال هجوم قارچ بشدت افزایش می‌یابد. قارچ ورتیسیلیوم غلبه نماید. در ضمن، خسارت استرین‌های این پاتوژن در مناطق جدید شدیدتر می‌باشد. قارچ ورتیسیلیوم مونوسیکلیک است. یعنی در هر فصل فقط دارای یک سیکل آلودگی، کلونیزاسیون و تولید میکروسکلروت می‌باشد. نکته قابل توجه اینکه، تفاوت پژمردگی ایجاد شده در اثر قارچ گونه *V.dahliae* از پژمردگی ایجاد شده توسط گونه *V.albo-atrum* غیر قابل تشخیص می‌باشد. هر دو گونه، چندین میزبان مشترک داشته و در برخی مناطق معتدل نیز با هم دیده می‌شوند که ممکن است در این مناطق آنها از یک میزبان در یک مزرعه جداسازی شوند. عموماً *albo-atrum* بیشتر در نواحی شمالی وجود دارد که در آنجا دمای خاک عمدتاً از ۲۵ درجه سانتی‌گراد تجاوز نمی‌کند، در حالی که دمای خاک ممکن است به *V.dahliae* در مناطق معتدلی دیده می‌شود که دمای خاک ممکن است به ۳۰ درجه سانتی‌گراد برسد.

مهم‌ترین میزبان‌های آن عبارتند از رازک، یونجه، پنبه، سیب‌زمینی، گوجه‌فرنگی، بادمجان، فلفل، توت‌فرنگی، زیتون، نعناع، کلم‌قمری، انگور، پسته، درختان میوه هسته‌دار، بادام‌زمینی و تعدادی از علف‌های هرز دولپه از قبیل گاوپنبه، تاج‌خرروس، تاج‌حریزی، خرفه و علف هفت‌بند که در تعدادی از علف‌های هرز دولپه از جمله تاج‌خرروس انتقال آن با بذر نیز امکان‌پذیر می‌باشد.

انتشار این پاتوژن در نهالستان‌ها و باغات زیتون از طریق جابجایی خاک، ابزارهای مورد استفاده، آب آبیاری و هرزآب، نهال، ریشه و اندام‌های هوایی آلوده صورت می‌گیرد.

ردیابی :

از آنجاییکه این بیماری، جزء بیماری‌های تحت کنترل رسمی می‌باشد لذا در نمونه برداری از باغها و نهالستانها ابتدا بطور انتخابی و بر اساس علائم ظاهری بیماری، نمونه برداری از قسمت‌های هوایی و ریشه

درختان آلوهه و درختان اطراف آن بعمل می آید ولیکن چنانچه هیچگونه علائمی از بیماری در باع مشاهده نشود در اینصورت نمونه برداری بصورت تصادفی و به ازاء هر ۵۰ درخت ، از یک درخت و چهار طرف تاج و ریشه و خاک آن انجام میشود.

روش های جداسازی عامل بیماری :

قبل از شرح روش های جداسازی ورتیسیلیوم از خاک و گیاه لازم است به فرمول و نحوه تهیه تعدادی از محیط کشت های نیمه اختصاصی قارچ اشاره گردد.

- محیط کشت I

Sucrose	7.5 gr
KCl	0.5 gr
K2HPO4	1.0 gr
NaNO3	2.0 gr
MgSO4. 7H2O	0.5 gr
FeSO4. 7H2O	0.01 gr
Agar	20 gr
Water	1 lit

بعد از اتوکلاو نمودن محیط کشت فوق و درست قبل از ریختن آن به تشک ها، لازم است مقدار ۰/۵ میلی لیتر اتانول، ۱۰۰ میلی گرم استرپтомایسین و ۲۵۰ میلی گرم کلرامفنیکل اضافه می گردد.

- محیط کشت II

Soil extract	25 ml
K2HPO4	4.0 gr
KH2PO4	1.5 gr
Agar	15 gr
Water	1 lit

برای تهیه عصاره خاک، یک کیلو گرم خاک باعچه را به یک لیتر آب اضافه کرده، بمدت ۳۰ دقیقه بهم می زنیم. مخلوط آب و خاک را از صافی می گذرانیم. اضافه کردن مقدار ۲ گرم در لیتر پلی گالاکترونیک اسید به محیط کشت باعث بهتر شدن محیط می گردد. بعد از اتوکلاو کردن محیط کشت و قبل از ریختن آن به تشک های پتری، مقدار ۵۰ میلی گرم از هر کدام از آنتی بیوتیکهای استرپтомایسین سولفات، کلرتراسیکلین و کلر آمفینیکل اضافه می گردد.

- محیط کشت III : (Nadakavukaren & Horner, 1959)

نخست آب آگار (۷/۵ گرم آگار در لیتر) را اتوکلاو نموده، سپس دمای آن را در بن ماری تا ۴۵ درجه سانتی گراد پائین آورده و مقدار ۰/۵ میلی لیتر الكل اتیلیک اضافه می نمائیم. برای جلوگیری از رشد باکتریها لازم است

استرپتوマイシン سولفات نیز اضافه گردد، طوریکه محیط کشت حاصله در نهایت حاوی 200 ppm استرپتوマイسين باشد.

جداسازی عامل بیماری از خاک

به منظور جداسازی میکرواسکلروت های ورتیسیلیوم از خاک، نخست نمونه های خاک را به مدت ۱-۲ هفته در دمای 25°C درجه سانتی گراد در معرض هوا خشک نموده، از الک 2 میلی متری گذرانده و مخلوط می نمائیم. از هر نمونه الک شده مقدار 10 گرم زیر نمونه بر میداریم. سپس طبق روش مارتین و همکاران، زیر نمونه ها را در غربال های $125 \text{ و بعد } 37 \text{ میکرومتری}$ شستشو می دهیم. باقی مانده مواد روی الک 37 میکرومتری را به مدت 10 ثانیه در محلول هیپوکلریت سدیم $0.525 \text{ درصد فرو برده}$ ، به داخل بشر 50 میلی لیتری حاوی $15-20 \text{ میلی لیتر آب}$ منتقل می کنیم. سوسپانسیون اخیر را در 10 عدد تشتک پتری حاوی محیط کشت اتانول-استرپتوマイسين-آگار پخش می نمائیم. $7-10 \text{ روز بعد از انکوباسیون$ تشتک ها در دمای 22°C درجه سانتی گراد و تاریکی، خاک را توسط شستشو از سطح محیط کشت ها حذف نموده، تشتک ها را مجددا به مدت $2-3 \text{ روز در انکوباتور نگهداریم}$ تا کلنی های قارچ مشخص گردند. هر کلنی در واقع نماینده یک میکرواسکلروت است که کلنی از آن منشاء گرفته است. مجموع تعداد کلنی ها در 10 تشتک پتری ، تعداد میکرواسکلروت ها را در $10 \text{ گرم خاک نشان می کند}$. اخیرا یک روش جداسازی و شمارش میکرواسکلروت های *V. dahliae* از خاک بر اساس روش فوق با مختصر اصلاحات توسط هویپل و همکاران شرح داده شده است.

جداسازی عامل بیماری از گیاه

جداسازی ورتیسیلیوم از بخش های آلدود گیاه بیشتر در بهار موقعيت آمیز بوده و در ماه های پائیز و زمستان بدرت جدا می گردد (مگر در سال هایی که شرایط آب و هوایی معتدل باشد).

برای جداسازی ورتیسیلیوم از بافت های چوبی، حدود $8 \text{ سانتی متر از شاخه آلدود}$ (به قطر $6-8 \text{ میلی متر}$) را به مدت $2-3 \text{ دقیقه}$ در محلول $0.525 \text{ درصد هیپوکلریت سدیم فرو برده}$ ، سپس پوست ساقه و $3 \text{ میلی متر از دو انتهای شاخه حذف می کنیم$. شاخه بدون پوست را به قطعات $4-5 \text{ میلی متری}$ تقسیم کرده و از انتهای بریده شده در تشتک های پتری روی کاغذ صافی و اتمن شماره 1 استریل قرار داده و در دمای 22°C درجه سانتی گراد در تاریکی نگهداریم. بعد از $4-2 \text{ روز قطعات مزبور را از نظر ظاهر شدن میسلیوم پنهان مانند از آوندها مورد بررسی قرار می دهیم. در صورت رشد میسلیوم می توان آن را به محیط کشت PDA منتقل نموده و دقیق تر بررسی نمود$. لازم به یادآوری است که هیپوکلریت سدیم مورد استفاده برای ضد عفونی سطحی بافت آلدود توسط آوند های چوبی جذب شده و مانع رشد قارچ می گردد، بنابراین غلظت هیپوکلریت و مدت زمان اشاره شده بایستی دقیقا رعایت گردد..

کنترل:

در حال حاضر هیچ روش موثر و مطمئنی برای کنترل کامل این بیماری شناخته نشده است. از سوموم سیستمیک مانند کاربندازیم، تا حدودی می توان برای کاهش خسارت این پاتوژن آن هم فقط در نهال های آلدود کوتاه ($40-30 \text{ میلی متر}$)

سانتی متری) استفاده کرد که با توجه به کم دوام بودن اثر آن و لزوم تکرار محلول پاشی، از نظر اقتصادی مقررون به صرفه نمی باشد. با توجه به بررسی های انجام شده در مناطق زیتون خیز دنیا، تاکنون قارچکش های رایج در کنترل این بیماری موفق نبوده اند؛ ولی با استفاده توأم از روش های مبارزه زراعی و شیمیایی می توان ضمن کاهش خسارت این پاتوژن از بروز آلودگی های جدید جلوگیری نمود. این روش ها عبارتند از:

الف- استفاده از ارقام متحمل و مقاوم زیتون: مانند *Oblonga*, *Frantoio*, *Arbequina*

ب- کاهش میزان اینوکلوم (مايه تلقیح) از طریق:

- احداث نهالستان و باغ زیتون در اراضی عاری از آلودگی به ورتیسیلیوم.
- ایزوله کردن محیط نهالستان و باغ در مناطقی که احتمال انتقال آلودگی از اراضی همجوار وجود دارد.
- تهیه بستر ریشه زایی و خاک گلدان سالم از طریق ضد عفونی به روش فیزیکی و یا شیمیایی.
- تهیه قلمه های سالم و عاری از آلودگی از باغهای مادری سالم و کنترل شده.
- جلوگیری از انتشار اندام های مقاوم (میکرواسکلروت) در نهالستان از طریق انجام بازدیدهای مرتب روزانه و جمع آوری و امحاء قلمه ها و نهال های خشکیده و در حال خشک شدن.
- هرس بموقع درختان آلوده، حذف شاخه ها قبل از ریزش برگ های خشکیده و سوزانیدن بقایای آنها.
- حذف کامل درختان آلوده و امحاء دقیق بقایای ریشه و تنہ و اجتناب از سوزانیدن درختان آلوده در محل کاشت (شکل ۹).
- ضد عفونی محل کاشت و اطراف آن به روش آفتتابدهی و با استفاده از پوشش پلاستیکی در سطح ۱/۵ برابر سایه انداز درخت آلوده و درختان مجاور به مدت ۲-۳ ماه در تابستان و یا ضد عفونی صرفا سایه انداز درخت امحاء شده با استفاده از گاز متیل بروماید. (گاز متیل بروماید برای درختان در حال رشد سالم بوده و به آنها صدمه می زند)
- انجام واکاری، پس از بررسی های دقیق آزمایشگاهی و کسب اطمینان از سلامت محل کاشت.
- جلوگیری از انجام شخم و دیسک و زیر خاک بردن بقایای آلوده گیاهی.
- استفاده از ابزار و وسایل ضد عفونی شده.
- حذف علف های هرز (شکل ۱۰) و خودداری از کاشت گیاهان میزبان حساس و آلوده در محیط نهالستان و باغ زیتون.

ج- جلوگیری از انتشار پاتوژن از طریق:

- اجرای مقررات قرنطینه گیاهی و جلوگیری از تولید و انتقال نهال های آلوده به مناطق عاری از آلودگی.
- جلوگیری از ورود هرز آبهای و حیوانات و ادوات آلوده به محوطه نهالستان.
- استفاده از روش های مناسب آبیاری در باغهای زیتون مانند آبیاری قطره ای و خودداری از انجام آبیاری غرقابی.

د- ایجاد محدودیت برای رشد قارچ و بکار بردن روش هایی برای کاهش شدت بیماری و جلوگیری از افزایش حساسیت گیاه نسبت به پاتوژن از طریق برقراری رژیم مناسب تغذیه و فراهم نمودن شرایط مناسب محیطی برای رشد مانند:

- استفاده مناسب از کودهای پتاسه و عدم استفاده بی روش و زیاد کود از ته.
- خودداری از مصرف آب دارای EC نامناسب به منظور ممانعت از قلیابی شدن خاک.
- جلوگیری از افزایش درصد مواد آلی خاک در ترکیب خاک گلدان و باعهای آلوده.
- کاشت نهال در اراضی دارای تحتالارض نفوذپذیر و با ظرفیت آبگیری مناسب.
- ممانعت از خیس شدن مداوم و کاهش دمای خاک اطراف ریشه‌ها.
- قرار دادن نهال‌ها در محل‌های آفتابگیر.
- جلوگیری از زخمی شدن ریشه‌ها بر اثر انجام عملیات زراعی و کترل فعالیت نماتدهای پارازیت گیاهی.



شکل ۱۰- حذف علفهای هرز میزان قارچ و رتیسیلیوم



شکل ۹- اجتناب از سوزانیدن تنه آلوده در محل کاشت