مدیریت تحصیلات تکمیلی
دانشکده کشاورزی
گروه گیاهپزشکی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته بیماری شناسی گیاهی

بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های *Paecilomyces variotii* دراستان کرمان

استاد راهنما
دکتر سید کاظم صباغ

استادان مشاور
مهندس محمد مهدی امینایی
دکتر ناصر پنجه که

نگارش
سمیه ابراهیمی

بهمن ماه ۱۳۹۰

تقدیم به او که هر چه هست همه از اوست.

و

تقدیم به او که جهان در انتظار اوست.

تقدیم به مادر و روح پدرم

آنان که امروز را مدیون دیروز آنانم

آنان که وجودم بر ایشان همه رنج بود و وجودشان همه مهر

و

تقدیم به همسرم

به پاس همه خوبی ها و محبت های بی دریغش

سپاسگزاری

من لم یشکر المخلوق، لم یشکر الخالق

سپاس و ستایش خداوند سبحان را که جز به الطاف و عنایات خاص او پیمودن این مسیر برایم میسر نبود. سپاس و ستایش خداوند یکتا را که قطره دانش و معرفت شناخت را به ما ارزانی داشت. با مدد ش به پایان رسید این راه و با یاریش به نیکی طی شد. اکنون که این مهم به پایان رسیده است به رسم ادب، وظیفه خویش می دانم تا مراتب امتنان و سپاسگزاری خود را از جناب آقای دکتر سید کاظم صباغ که در سمت استاد راهنمای این پایان نامه در تمام مراحل تحقیق، اجرا و نگارش مرا راهنمایی و مساعدت نمودند ابراز نمایم. از راهنمایی های ارزنده اساتید ارجمند آقایان محمد مهدی امینایی و دکتر ناصر پنجه که به عنوان مشاورین پایان نامه کمال تشکر و قدردانی را دارم. از جناب آقای دکتر محمد سالاری به عنوان داور و از آقای دکتر علی میرشکار به عنوان نماینده تحصیلات تکمیلی کمال تشکر و سپاسگزاری را دارم.

در پایان از همسر مهربانم که در طول مدت تحصیل صبورانه یاری ام نمود و سختی راه را بر من هموار ساخت بی نهایت قدردانی می نمایم.

چکیده

سرخشکیدگی یکی از بیماری‌های مخرب پسته در استان کرمان است که توسط قارچ *Paecilomyces variotii* ایجاد می‌شود. برای تعیین عامل بیماری، بررسی تنوع ژنتیکی و آزمون بیماریزایی این گونه، نمونه برداری به صورت تصادفی از پنج منطقه از استان به عمل آمد. نمونه‌ها بر روی محیط کشت PDA کشت داده شد. به دنبال آن با روش نوک هیف عمل خالص‌سازی انجام گردید و تعداد ۷۰ جدایه جداسازی و در نهایت تعداد ۲۰ جدایه برای مطالعات بعدی مورد استفاده قرار گرفت. جدایه‌ها بر روی محیط کشت PDA دارای رنگ پرگنه زرد متمایل به قهوه‌ای و کنیدیوفورها دارای انشعابات فراهم بودند. برای بررسی آزمون بیماریزایی، از رقم اوحدی استفاده شد. مطالعه تنوع ژنتیکی جدایه‌ها، با نشانگر ریزماهواره و چهار جفت آغازگر اختصاصی مربوط به *Paecilomyces* sp. انجام شد. نشانه‌های بیماری در ۱۴، ۲۱ و ۲۸ روز بعد از آلودگی ثبت گردید. تجزیه داده‌ها با نرم افزار SPSS نشان داد که جدایه‌ها مربوط به پنج گروه مجزا می‌باشند. جدایه‌های RE، SW و KS بیشترین پیشرفت را در بیماری نشان دادند.تجزیه داده‌های حاصل از نشانگر ریزماهواره و ترسیم درخت شجره نامه مشخص کرد که جدایه‌ها با ضریب تشابه ۴۱ درصد به ۱۳ گروه تقسیم گردیدند. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که با توجه گروه‌بندی‌های مربوط به مقایسه پیشرفت بیماریزایی، منطقه نمونه برداری و تنوع ژنتیکی،رابطه اختصاصی بین گروه‌های ژنتیکی و فاصله مکانی وجود ندارد بنابراین این گونه نمی‌تواند عامل اصلی و شروع کننده بیماری باشد.

کلمات کلیدی: بیماریزایی، ریزماهواره، *Paecilomyces variotii*، تنوع ژنتیکی

عنوان ..... صفحه

۱- مقدمه ۲

۱-۱-جایگاه پسته در ایران ۲

۱-۲- خصوصیات گیاه شناسی و اقلیم پسته ۲

۱-۳- ارزش غذایی پسته ۳

۱-۴- سطح زیر کشت و میزان تولید پسته در ایران و جهان ۳

۱-۵- بیماری‌های پسته ۳

۱-۵-۱- عوامل سرخشکیدگی در پسته ۳

۱-۱-۵-۱- عوامل بیماریزا ۴

۱-۶- مدیریت بیماری ۵

۱-۷- اهداف تحقیق ۶

۲- بررسی منابع ۸

۲-۱- بیماری سرخشکیدگی درختان پسته در ایران با عامل *Paecilomyces variotii* ۸

۱-۱-۲- شیوه خسارت ۸

۲-۱-۲- علائم و نشانه‌های بیماری ۸

۳-۱-۲- چرخه عوامل بیماری ۹

۲-۲- تاریخچه جنس *Paecilomyces* و فرم جنسی آن ۱۰

۲-۳- جایگاه *Paecilomyces* در طبقه بندی قارچ‌ها ۱۲

۲-۴- نقش گونه‌های مختلف جنس ***Paecilomyces*** در طبیعت ۱۴

۲-۵- بررسی جنس *Paecilomyces* در ایران ۱۵

۲-۶- تعریف نشانگر ۱۵

۱-۶-۲- انواع نشانگر ۱۶

۲-۶-۲- ردیف تکراری ساده (SSRs) ۱۶

۳-۶-۲- ریزماهوارهها Microsatellit ۱۶

۴-۶-۲- مزایای ریزماهواره‌ها ۱۷

۵-۶-۲- معایب ریزماهواره‌ها ۱۷

۶-۶-۲- کاربرد ریزماهواره‌ها..... ۱۸
۲-۷- شناسائی مولکولی گونه‌های قارچ *Paecilomyces*..... ۱۸
۳- مواد و روش‌ها..... ۲۱
۳-۱- نمونه برداری..... ۲۱
۳-۲- جداسازی جدایه‌های *Paecilomyces* از چوب آلوده ۲۲
۳-۳- خالص سازی جدایه‌های قارچ *Paecilomyces*..... ۲۲
۳-۴- تهیه کلکسیون جدایه‌های قارچ..... ۲۲
۳-۵- شناسائی گونه *P.variottii* ۲۳
۳-۶- کشت در محیط مایع جهت تهیه میسلیوم برای استخراج DNA..... ۲۳
۳-۷- محلول‌ها و بافرهای مورد استفاده برای استخراج DNA..... ۲۴
۳-۸- روش استخراج DNA ژنومی..... ۲۴
۳-۹- ارزیابی کمیت و کیفیت DNA..... ۲۵
۳-۹-۱- روش اسپکتوفتومتری..... ۲۵
۳-۹-۲- کیفیت سنجی DNA روی ژل آگارز..... ۲۶
۳-۱۰- اجزاء واکنش PCR..... ۲۶
۳-۱۱- تهیه آغازگرها..... ۲۶
۳-۱۲- راه اندازی واکنش PCR ۲۷
۳-۱۳- تنظیم برنامه روی دستگاه ترموسایکلر ۲۸
۳-۱۴- طرز تهیه ژل آگارز ۲۸
۳-۱۵- تهیه بافر TAE..... ۲۹
۳-۱۶- الکتروفورز محصول تکثیر شده ۲۹
۳-۱۷- تهیه بافر Loadingdye 6x ۲۹
۳-۱۸- تجزیه و تحلیل داده ها ۳۰
۳-۱۹- بررسی ظاهری پرگنه جدایه‌های *P. variotii*..... ۳۰
۳-۲۰- بررسی پیشرفت بیماریزایی ۳۰
۴- نتایج ۳۴

۴-۱- جداسازی جدایه های *P. variotii* ۳۴
۴-۲- شناسائی گونه های *P. variotii* و مشخصات آن‌ها ۳۵
۴-۳- تکثیر ژن جدایه‌های *P. variotii* ۳۶
۴-۳-۱- بررسی‌های مولکولی ۳۸
۴-۳-۲- تجزیه و تحلیل خوشه ای داده‌ها ۳۹
۴-۳-۳- بررسی عملکرد آغازگرها برای جداسازی مولکولی جدایه‌ها ۴۱
۴-۴- بررسی و میزان رشد و خصوصیات ظاهری پرگنه جدایه‌های قارچ ۴۲
۴-۵- بررسی پیشرفت بیماریزایی ۴۲
۵- بحث ۴۸
۶- پیشنهادات ۵۰
۷- منابع ۵۲

عنوان ..... صفحه

جدول ۱-۳ توالی و دمای اتصال ۴ آغازگر استفاده شده در واکنش PCR ۲۷
جدول ۲-۳ حجم واکنش گرها در واکنش PCR ۲۸
جدول ۱-۴ کد جدایه‌های جداسازی شده از مناطق ۳۷
جدول ۲-۴ خلاصه محاسبات تنوع ژنتیکی برای تمام جایگاه‌های ژنی ۴۱
جدول ۳-۴ گروه بندی جدایه ها بر اساس شکل ظاهری پرگنه ۴۲
جدول ۴-۴ اختلاف میانگین بین زمان پیشرفت بیماری ۴۳
جدول ۵-۴ میانگین به دست آمده از تجزیه پیشرفت بیماریزایی قارچ در طول زمان ۴۴
جدول ۶-۴ میانگین به دست آمده از تجزیه پیشرفت بیماریزایی جدایه های قارچ ۴۵

عنوان ..... صفحه

شکل ۱-۳ علائم آلودگی بیماری سرخشکیدگی درختان پسته (عکس اصلی) ۲۱

شکل ۲-۳ میسلیوم تشکیل شده روی محیط کشت PDB (عکس اصلی) ۲۳

شکل ۳-۳ برداشتن پلاگ قارچ از محیط کشت (عکس اصلی) ۳۱

شکل ۴-۳ قرار دادن پلاگ قارچ در شکاف ایجاد شده در شاخه (عکس اصلی) ۳۱

شکل ۵-۳ پوشاندن شاخه با پارافیلم (عکس اصلی) ۳۲

شکل ۱-۴ جداسازی قارچ از چوب آلوده یک روز پس از کشت (عکس اصلی) ۳۴

شکل ۲-۴ جداسازی قارچ از چوب آلوده پنج روز پس از کشت (عکس اصلی) ۳۴

شکل ۳-۴ پرگنه قارچ *P. variotii* (عکس اصلی) ۳۵

شکل ۴-۴ a,b,c,d فیالیدهای فراهم بر روی کنیدیوفور؛ e رشد ابتدایی فیالید بر روی کنیدیوفور (عکس اصلی) ۳۵

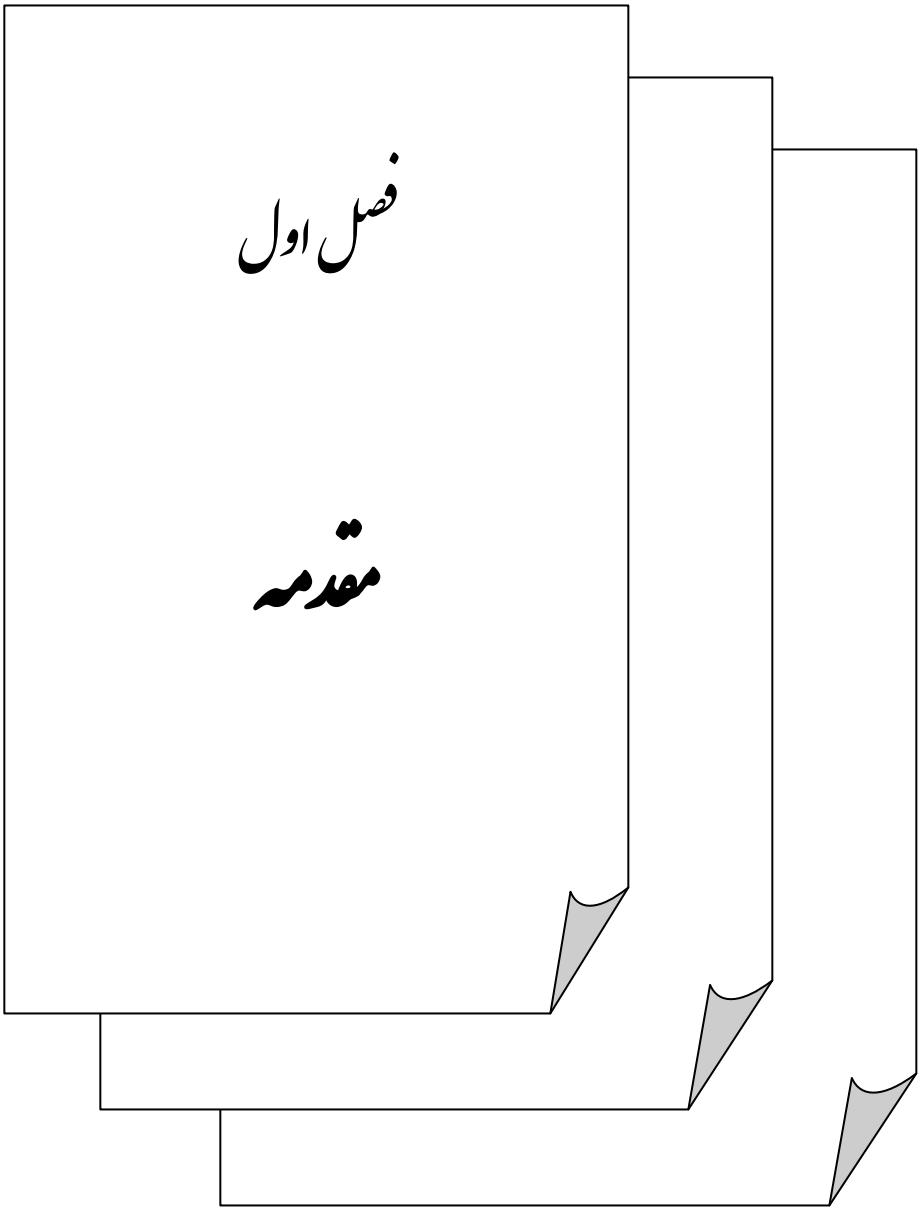
شکل ۵-۴ a رشد زنجیره ای اسپورها، b اسپور و کلامیدوسپور، c,d,e کلامیدوسپور (عکس اصلی) ۳۶

شکل ۶-۴ a قطعات DNA تکثیر شده با استفاده از آغازگر D05 و b قطعات DNA تکثیر شده با استفاده از آغازگر D11a در جدایه های گونه قارچ *P. variotii* در ژل آگارز ۱ درصد (عکس اصلی) ۳۸

شکل ۷-۴ a قطعات DNA تکثیر شده با استفاده از آغازگر B04 و b قطعات DNA تکثیر شده با استفاده از آغازگر D11b در جدایه های گونه قارچ *P. variotii* در ژل آگارز ۱ درصد (عکس اصلی) ۳۹

شکل ۸-۴ دندروگرام رسم شده بر اساس روش UPGMA و ضریب تشابه نی در نرم افزار Statistica V5.5A برای ۲۰ جدایه از قارچ *P.variotii*، با استفاده از ادغام نتایج حاصل از چهار جفت آغازگر انتخابی ۴۰

شکل ۹-۴ علائم ایجاد شده در چوب سالم پس از مایع زنی با قارچ *P. variotii* (عکس اصلی) ۴۳


فصل اول
مقدمه

۱- مقدمه

۱-۱- جایگاه پسته در ایران

پسته گیاهی است که از دیرباز در مناطق مختلف ایران کشت می‌شده است (ابریشمی، ۱۳۷۳). این محصول به عنوان یک محصول استراتژیک جایگاه ویژه‌ای در بین تولیدهای کشاورزی دارد (پناهی و همکاران، ۱۳۸۰). در آمد ارزی پسته برای ۶۶ کشور جهان، در حدود یک میلیارد دلار است که جایگاه دوم را در صادرات غیر نفتی به خود اختصاص داده است (شرافتی، ۱۳۸۷). استان کرمان از نظر تولید پسته کشور در جایگاه نخست قرار گرفته است و استان‌های سمنان، خراسان رضوی، یزد، سیستان و بلوچستان و تهران در مقام‌های بعدی قرار دارند (دفتر آمار و فناوری اطلاعات وزارت جهاد کشاورزی، ۱۳۸۹).

۱-۲- خصوصیات گیاه‌شناسی و اقلیم پسته

کلمه لاتین *Pistacia* یا *Pistachio* از کلمه فارسی پسته گرفته شده است (ابریشمی، ۱۳۷۳). پسته متعلق به تیره آناکاردیاسه (*Anacardiaceae*) و جنس پسته است. گیاهان تیره پسته به صورت درخت و یا درختچه هستند. این جنس ۱۱ گونه دارد که همه آن‌ها، تربانتین و صمغ تولید می‌کنند. پسته‌های ایران مجموعاً به گونه پسته اهلی (*P.vera*) تعلق دارند (Esmil-pour, 1998). اگر چه پسته در طیف وسیعی از شرایط اقلیمی، آب و خاک رشد می‌کند اما تابستان‌های گرم، خشک و طولانی به همراه زمستان‌های سرد، موجب پدیدآمدن محیط مناسبی برای تولید محصول مناسب و با کیفیت می‌گردد. پسته قادر است سرما را تا ۲۰ درجه زیر صفر (برای مدت طولانی) و گرما را تا ۴۵ درجه بالای صفر تحمل نماید (پناهی و همکاران،۱۳۸۰). مهمترین عاملی که نقش مهمی در پراکندگی گونه‌های مختلف درختان میوه دارد، آب و هوا و اقلیم است (شرافتی، ۱۳۸۷).

۳-۱- ارزش غذایی پسته

پسته میزان زیادی آهن قابل جذب برای خون دارد. ترکیب مغز پسته بر اساس نوع رقم، مرحله رسیدن و زمان برداشت محصول پسته متفاوت است. میزان انرژی حاصل از ۱۰۰ گرم مغز پسته حدود ۶۲۶ کیلو کالری است (تاج آبادی، ۱۳۷۶).

۴-۱- سطح زیر کشت و میزان تولید پسته در ایران و جهان

سطح زیر کشت پسته درکشور حدود ۲۵۱۴۶۷ هکتار می‌باشد (FAO, 2012) که ۸۸ درصد آن درختان بارور و ۱۲ درصد بقیه نهال بوده است (دفتر آمار و فناوری اطلاعات وزارت جهاد کشاورزی، ۱۳۸۹). میزان عملکرد این محصول در کشور ۱۷۷۶۲ کیلوگرم در هکتار و تولید آن ۴۴۶۶۴۷ تن است. در جهان مهم‌ترین کشور تولید کننده پسته بعد از ایران ایالات متحده آمریکا می‌باشد که سطح زیر کشت پسته این کشور۵۱۷۰۰ هکتار، میزان عملکرد ۴۱۱۹۹ کیلوگرم در هکتار وتولید آن ۲۱۳ هزار تن در سال است (FAO, 2012).

۵-۱- بیماری‌های پسته

از بیماری‌های پسته می‌توان به پوسیدگی طوقه و ریشه (انگومک)، ماسوی پسته، کپک زدگی ناشی از آسپرژیلوس، نماتود مولد ریشه گرهی، پژمردگی ورتیسلیومی پسته، زنگ پسته، عارضه ریزبرگی درختان پسته (قرمزو)، عارضه لکه پوست استخوانی و بیماری خشکیدگی سرشاخه های درختان پسته اشاره کرد (سمیع و همکاران، ۱۳۸۴).

۱-۵-۱- عوامل سرخشکیدگی در پسته

در پسته عوامل متعددی به خشکیدگی سرشاخه نسبت داده شده‌اند. این عوامل از بین آفات، بیماری‌ها، عناصر غذایی و سایر موارد می‌باشد. از بین آفات پسته پروانه چوبخوار، سپردار واوی و سوسک پوست و سرشاخه‌خوار باعث خشکیدگی شاخه‌ها می‌شوند (سمیع و همکاران، ۱۳۸۴). در

بعضی منابع خشکیدگی سرشاخه به کمبود مواد غذایی از جمله پتاسیم نسبت داده شده است (Ashworth *et al*, 1985). گاهی اوقات ممکن است در اواخر فصل با مصرف بیش از حد کودهای ازته رشد رویشی افزایش یابد و سر شاخه‌های رشد یافته، قادر به تکمیل دوره بلوغ نباشند، در نتیجه در سرمای شدید زمستان سر شاخه‌ها دچار خشکیدگی می‌شوند (سمیع و همکاران، ۱۳۸۴). علاوه بر اینها خشکیدگی به دلیل سمیت سدیم و کلرید در خاک گزارش شده است (Chitzanidis *et al*, 1995). البته همه این عوامل از نظر نشانه و شیوه خشکیدگی با بیمارگرها تفاوت دارند.

۱-۱-۵-۱- عوامل بیماریزا

گزارش‌های گوناگونی در مورد بیمارگر در سایر نقاط جهان منتشر شده است. میکائیلید و اوگاوا (Michailides and Ogawa, 1986) قارچ *Botryosphaeria dothidea* را عامل بلایت شاخه و خوشه-های پسته در کالیفرنیا گزارش دادند. رامبوس (Rumbos, 1986) از سرشاخه‌های خشکیده درختان پسته در یونان، قارچ *Eutypa lata* را جداسازی کرد و برای اولین بار پسته را به عنوان میزبان جدید این قارچ معرفی کرد. کورازا و همکاران (Corazza *et al*, 1990) از سرشاخه‌های انتهایی درختان پسته با نشانه مشخص مرگ سرشاخه از بالا (Die-back) مرحله کنیدیومی قارچ *Botryosphaeria ribis* را از ایتالیا گزارش کردند. اسوارت و بوتس (Swart *et al*, 1995) شانکر ساقه درختان پسته را در ناحیه پرسیکای آفریقای جنوبی بررسی کردند و قارچ عامل را *Botryosphaeria obtuse* نامگذاری و حساسیت نسبی سه گونه مهم پسته را نسبت به آن بررسی کردند. در استرالیا نیز از شاخه‌های آلوده با علائم سر خشکیدگی باکتری *X. translucens* جداسازی و گزارش شده است (Facelli *et al*, 2005).

تاکنون در کشورهای پسته خیز جهان روی درختان پسته بیش از ۵۳ گونه قارچ گزارش شده است (سمیع و همکاران، ۱۳۸۴). از بین قارچ‌های گزارش شده ۱۰ گونه می توانند در درختان پسته به نوعی خشکیدگی سرشاخه، سوختگی و یا شانکر ایجاد کنند. این گونه‌ها عبارتند از:

Cladosporium sp., *Alternaria* sp., *Fusarium* sp. and *Phoma* spp.(Edwards *et al*, 1998b). *Rhizoctonia solani*, *Oellicularia koleroga* (Farr *et al*,1989), *Botrytis cinerea* (Bolkan *et al*, 1984), *Schizophyllum commune*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phomopsis* sp. (Michailides *et al*, 1995).

البته بیماری خشکیدگی سرشاخه‌های پسته از نوع پراکنده در ایران در هیچ یک از کشورهای دیگر دنیا گزارش نشده است. عوامل بیماریزایی که از ایران گزارش شده است عبارتنداز:

Coniotyrium sp.- *Alternaria* sp.- *Ulocladium* sp.- *Fusarium equiseti- Nattrassia mangiferae* (امینایی، ۱۳۶۴؛ اشکان و) ,*Paecilomyces variotii* (علیزاده و همکاران، ۱۳۷۸) اشکان و) .*Cytospora* sp ,(ابوسعیدی، ۱۳۷۳؛ علیزاده و همکاران، ۱۳۷۸؛ مظفری و همکاران، ۱۳۸۴ امینایی و ارشاد،) ,*Seimatosporium fusisporum* (ابوسعیدی، ۱۳۷۳؛ علیزاده و همکاران ۱۳۷۸ ۱۳۸۷), *Bacillus licheniformis* (Baradaran and Ghasemi, 2010).

از بین این عوامل بیشترین درصد از قارچ *Paecilomyces variotii* گزارش شده است.

۶-۱- مدیریت بیماری

۱- هرس و سوزاندن شاخه‌های بیمار ۱۵-۱۰ سانتی‌متر از زیر قسمتی که تغییر رنگ داده است. ریشه‌کنی و سوزاندن درختانی که آلودگی شدید دارند بسیار مؤثر است.

۲- حفظ بهداشت، یعنی ضدعفونی ادوات هرس، جمع‌آوری و سوزاندن شاخه‌های آلوده هرس شده مفید خواهد بود.

۳- تقویت درختان با روش‌های به زراعی مناسب، از جمله کوددهی مناسب، آبیاری منظم و استفاده از واریته‌های مقاوم از جمله موارد مؤثر در کنترل این بیماری است (سمیع و همکاران، ۱۳۸۴).

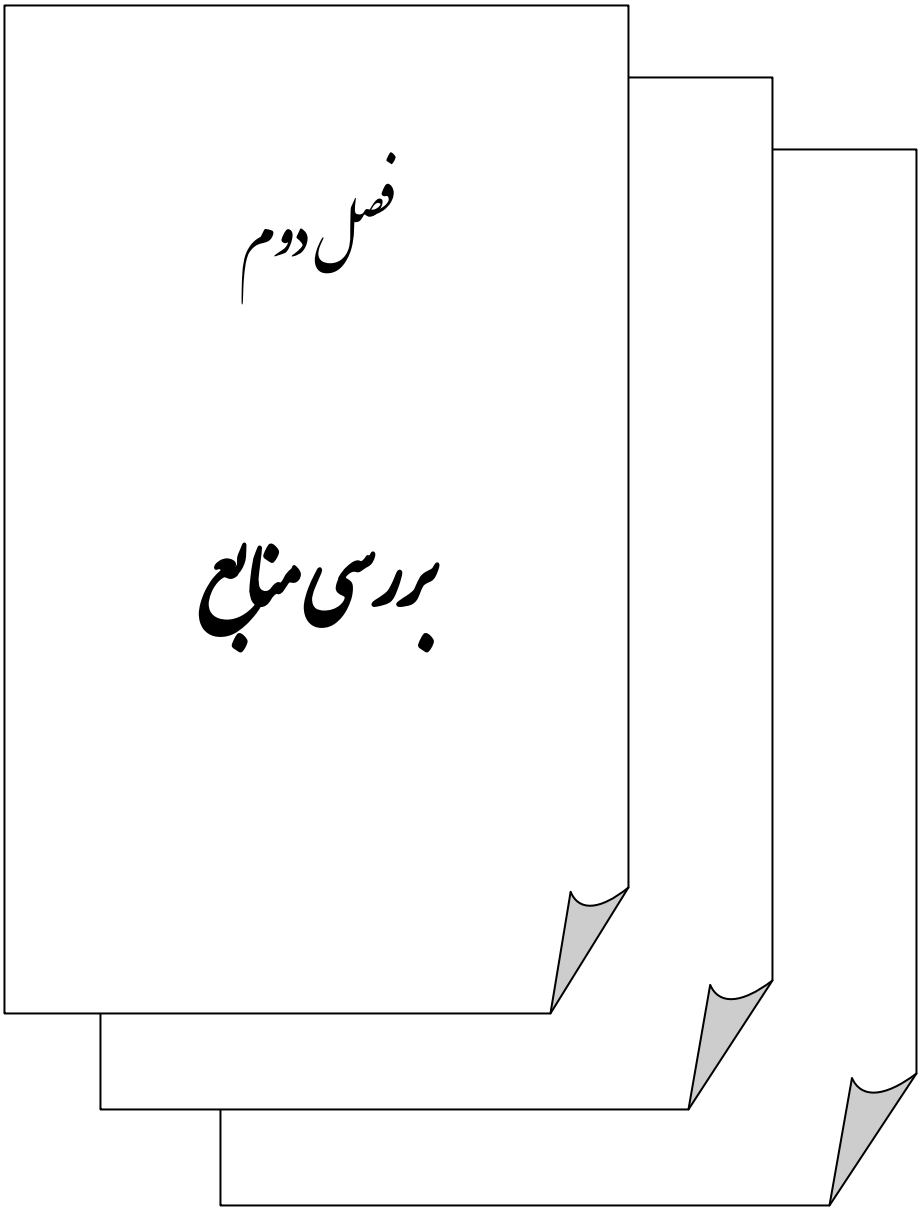
برای اعمال برنامه‌های مدیریتی، شناسائی وجود مقاومت در ارقام و همچنین مشاوره و قرنطینه، شناسائی جمعیت در سطح گونه و نژاد امری ضروری می‌باشد. لذا برای بدست آوردن نتایج دقیق‌تر و همچنین افزایش سرعت شناسائی عامل جهت تولید ارقام مقاوم و بررسی اپیدمیولوژیکی و روش‌های کنترل امروزه از روش‌های مولکولی استفاده می‌گردد. این روش‌ها عموماً برای بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت قارچ‌ها، چگونگی بیماری‌زایی، سازگاری‌های رویشی و تجزیه‌های بیوشیمیایی و مولکولی استفاده می‌گردد (Watson, 2004). از بررسی تنوع ژنتیکی به کمک نشانگرهای مولکولی می‌توان برای مطالعه تنوع حیاتی، شناسائی رقم، تجزیه فیلوژنتیکی، اکولوژی گیاهان و همچنین تجزیه جمعیت بیمارگر استفاده کرد (نقوی، ۱۳۸۴). در این تحقیق هدف از بررسی تنوع ژنتیکی، تجزیه جمعیت بیمارگر است که مشخص شود آیا ژن خاصی حامل صفت بیماریزایی است یا خیر؟

۷-۱- اهداف تحقیق

بررسی تنوع مورفولوژیکی موجود بین جدایه‌های قارچ *Paecilomyces variottii* روی پسته در استان کرمان

بررسی تنوع ژنتیکی موجود بین جدایه‌های قارچ *Paecilomyces variottii* با استفاده از مارکر SSR

انجام آزمون بیماریزایی در شرایط آزمایشگاهی و بررسی شدت بیماریزایی


فصل دوم
بررسی منابع

۲- بررسی منابع

۲-۱- بیماری سرخشکیدگی درختان پسته در ایران با عامل *Paecilomyces variotii*

بیماری سرخشکیدگی درختان پسته که در اصطلاح انگلیسی به آن Die-back می‌گویند اولین بار در سال ۱۳۶۴ توسط امینایی در استان کرمان مشاهده شد، سپس امینایی و ارشاد (Aminaee and Ershad, 1987) با بررسی‌های بیشتر درمورد اثبات بیماریزایی قارچ جدا شده از شاخه‌های آلوده درختان پسته، عامل بیماری را *Paecilomyces variotii* گزارش کردند. اشکان و ابوسعیدی (۱۳۷۳) با انجام دادن مطالعات دیگر در باغ‌های پسته رفسنجان و سیرجان نیز، جنس *Paecilomyces sp.* را از درختان آلوده جداسازی و گزارش کردند. علیزاده و همکاران (۱۳۷۸) نیز با بررسی سبب شناسی خشکیدگی سرشاخه درختان پسته در رفسنجان این قارچ را گزارش کردند.

۲-۱-۱- شیوه خسارت

این بیماری سبب خشک شدن کامل شاخه‌ها، پژمردگی و خشکیدگی خوشه‌ها و از بین رفتن جوانه‌های سال آینده می‌شود (سمیع و همکاران، ۱۳۸۴).

۲-۱-۲- علائم و نشانه‌های بیماری

پژمردگی و مرگ خوشه‌ها، برگ‌ها و جوانه‌ها با سیاه شدن رنگ پوست شاخه‌های آلوده به آسانی شناخته می‌شود. بیماری در آغاز به صورت لکه‌های کوچک سیاه رنگ در سطح پوست شاخه‌های آلوده ظاهر می‌شود که با پیشرفت آن قسمت‌های آلوده، سیاه رنگ می‌شوند و به سبب اختلاف رنگ از قسمت‌های سالم شاخه به آسانی شناخته می‌شوند.

روی شاخه‌های به قطر ۳ تا ۴ سانتی متر و گاهی قطورتر، نوارهای طولی به رنگ قهوه ای تیره ظاهر می‌شود و قسمت‌های مبتلا کمی فرورفته و نشست پیدا می‌کنند. روی پوست و چوب شاخه‌های آلوده در محل شانکرهای خشکیده، ترک‌های ریز عرضی به وجود می‌آید. بافت‌های سالم و نکروزه، مرز

کاملاً مشخصی دارند و خشکیدگی شاخه‌ها معمولاً از بالا به پایین پیشروی می‌کند و گاهی تا پایین-ترین قسمت شاخه‌های کلفت و گهگاهی به طوقه می‌رسد. گاهی در سطح شاخه‌های به کلفتی ۱ تا ۲ سانتی‌متر رگه‌های تیره رنگ و کشیده به اندازه‌های متفاوت (تا ۳۰ سانتی‌متر) بروز می‌کند. تیرگی و نکروز بافت در این حالت بیشتر سطحی بوده و معمولاً به ژرفای چوب نمی‌رسد. وقتی آلودگی دور تا دور شاخه را فرا بگیرد، قسمت‌های انتهایی شاخه، برگ‌ها، جوانه‌ها و خوشه‌ها کاملاً پژمرده و چروکیده می‌شوند و سرانجام می‌میرند. این حالت با گرمتر شدن هوا شدت بیشتری می‌گیرد. برگ‌ها ابتدا به حالت سبز خشک در می‌آیند و سپس قهوه ای می‌شوند و غالباً از شاخه جدا نمی‌شوند. شروع آلودگی روی شاخه‌ها معمولاً همراه با ایجاد شانکر و ترشح صمغ می‌باشد. با پیشرفت بیماری، شانکرها به سمت پایین حرکت می‌کنند و هر جا که دور تا دور شاخه را بگیرند قسمت‌های بالاتر از آن خشک می‌شوند (سمیع و همکاران، ۱۳۸۴).

۳-۱-۲- چرخه عوامل بیماری

قارچ‌های عامل بیماری برای ایجاد آلودگی احتیاج به راه نفوذ دارند و به عنوان بیمارگرهایی که از طریق زخم وارد می‌شوند، اهمیت ویژه‌ای دارند. کوچکترین زخم یا آسیب روی قسمت‌های مختلف شاخه کافی است که آلودگی توسط قارچ شروع شود. آلودگی از طریق زخم‌های مکانیکی ناشی از هرس، محل تغذیه حشرات چوبخوار، محل جدایی خوشه از شاخه، ترک‌های ناشی از سرما و یخبندان و آفتاب سوختگی امکان‌پذیر خواهد بود. بنابراین اگر چه وقوع بیماری در تمام فصول امکان‌پذیر است، ولی بیشترین آلودگی‌ها در زمان هرس و برداشت محصول اتفاق می‌افتد. پیشرفت آلودگی و خسارت بیماری در بهار تا اوایل تابستان، به دلیل مساعد بودن دما برای رشد عوامل بیماریزا بیشتر است. در طول زمستان قارچ‌های عامل بیماری در کانون‌های آلوده و به حالت غیرفعال باقی می‌مانند (سمیع و همکاران، ۱۳۸۴).

۲-۲- تاریخچه جنس *Paecilomyces* و فرم جنسی آن

جنس *Paecilomyces* ابتدا توسط بینر (Bainier) در سال ۱۹۰۷ که از جگن‌های تجزیه شده جدا شده بود، با گونه تیپیک *P.variotii* معرفی و توصیف شد. مقاله بینر در زمان خود توجه کمی به خود جلب کرد. شکل آن در فهرست شکل‌های ساکاردو (۱۹۱۱) لیست شد و در سال ۱۹۱۳ گونه *P.variotii* به *Penicillium* انتقال یافت.

اشاره بعدی از کپک توسط تام (Thom)(کسی که از مقاله بینر اطلاعی نداشت) در سال ۱۹۱۰ بود که آن را بطور مستقل *Pen. divaricatum* شرح داد. مقاله تام بطور وسیعی مطالعه شد، از این رو آن اولین زمانی بود که بعضی گونه‌های راسته به جنس *Penicillium* آورده شد. توصیف او از کپک به تفصیل گفته و اشکال با دقت کشیده شده بود. در طی دو دهه بعد اغلب منابع برای *P. variotii* تحت نام *Penicillium* یافت شده است.

وستلینگ (Westling, 1911) درتک‌نگاره‌اش روی جنس *Penicillium*، سؤالی از گونه‌های غیر سبز مطرح کرد. او به گونه‌های *Pen. divaricatum* و *Pen. liliacinum* اشاره کرد و گفت که آن‌ها متعلق به جنس *Penicillium* نیستند و باید به جنس‌های دیگری انتقال یابند. به نظر می رسد که او از جنس *Paecilomyces* که در همان مجله و در همان سال چاپ شده بود، اطلاع نداشت.

ساپ (Sopp, 1912)، جنس جدید *Corollium* را شرح داد که کپک گندم گونی روی پوتین‌های ارتشی در انبار ایجاد می‌کرد. از شرح مقاله و اشکالش این شک وجود داشت که گونه *C dermatophagum*. هم نام دیگری از *P. variotii* است. ساپ مانند تام و وستلینگ از توصیف *Paecilomyces* توسط بینر، اطلاعی نداشت.