

گزارش کوتاه علمی

اولین گزارش از *Diplodia malorum* Fuckel عامل بیماری شانکر درختان سیب در ایران*

FIRST REPORT OF *Diplodia malorum* Fuckel THE CAUSAL AGENT OF CANKER DISEASE OF APPLE TREES IN IRAN

سیامک حنیفه^۱، یوبرت قوستا^۲، سعید عباسی^۳ و آلن فیلیپس^۴

۱- گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان

۲- گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

۳- گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی کرمانشاه

۴- گروه علوم زیستی، دانشکده علم و صنعت، دانشگاه جدید لیسبون

در تابستان سال ۱۳۸۸ بیماری خشکیدگی شاخه و شانکر تنه درختان سیب (*Malus domestica* Borkh.) رقم گلدن در باغات استان آذربایجان غربی دیده شد. بیماری در اثر تنش‌های محیطی مثل خشک‌سالی و سرمازدگی گسترش یافته، پوست و سیستم آوندی درخت در محل آلودگی کاملاً تیره می‌شود و محل شانکر در تنه اصلی و شاخه‌ها پوسته پوسته می‌گردد. جهت جداسازی، بافت‌های آلوده و مشکوک به بیماری به مدت ۳ دقیقه در اتانول ۷۰ درصد ضدعفونی سطحی گردیده و ۳ مرتبه با آب مقطر سترون شسته شدند. قطعات پس از خشک شدن بین کاغذ صافی سترون، روی محیط کشت PDA منتقل و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و تاریکی قرار داده شدند. از قارچ‌های رشد کرده در حاشیه بافت‌های گیاهی، قطعاتی برداشته شده و به محیط کشت آب آگار ۲ درصد منتقل و عمل خالص‌سازی به روش کشت نوک ریشه انجام گرفت. برای القای تشکیل اندام‌های باردهی غیر جنسی، از روش سوزن کاج قرار گرفته روی محیط کشت آب آگار ۲ درصد استفاده گردید. تشنگ‌های مایه‌زنی شده به مدت ۴ هفته در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و در زیر نور نزدیک ماورا بنفش (near-UV) و با دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی جهت تولید پیکنیدیوم‌ها نگهداری شدند (Pavlic et al. 2008). برای شناسایی قارچ‌های رشد یافته، معیارهای مختلف ماکروسکوپی از قبیل رنگ و خصوصیات ظاهری رشدی پرگنه و مشخصات میکروسکوپی از قبیل رنگ، شکل و ابعاد کنیدیوم، سلول‌های کنیدی‌زا و پیکنیدیوم مورد مطالعه قرار گرفتند. برای تأیید شناسایی مورفولوژیک، بخش ITS در یکی از جدایه‌های منتخب، با استفاده از آغازگرهای ITS1 و NL-4 تکثیر و ترادف‌یابی گردید. بر اساس مطالعات مورفولوژیک و ترادف‌یابی بخش ITS، گونه *Diplodia malorum* شناسایی شد. مشخصات توصیفی گونه به شرح زیر است: بافت پرگنه در ابتدا سفید رنگ، ولی بعد از گذشت دو هفته به رنگ زیتونی نخودی تا زیتونی متمایل به سبز تغییر یافته و در نهایت بعد از سه هفته کاملاً سیاه می‌شود. کنیدیوماتها به صورت پیکنیدیومی، به قطر تقریبی ۶۰۰ × ۵۰۰ میکرومتر، به طور

منفرد یا در دسته‌های چندتایی به شکل گرد تا تقریباً مخروطی، به رنگ قهوه‌ای تیره تا سیاه و فرورفته در بافت و در هنگام بلوغ کمی شکوفا می‌باشند. سلول‌های کنیدی‌زا بی‌رنگ، صاف، استوانه‌ای شکل، در قسمت پایه متورم و به ابعاد $۱۶-۷ \times ۵-۲/۵$ میکرومتر هستند. کنیدی‌زایی در یک سطح با قطور شدگی حاشیه‌ای (Prickling) و یا به صورت percurrent و دارای ۲ یا ۳ حلقه می‌باشد. کنیدی‌ها با دیواره ضخیم، با سطح بیرونی صاف و سطح درونی زگیل‌دار، تقریباً بیضی کشیده تا استوانه‌ای، در هر دو انتها گرد، ابتدا بی‌رنگ و یک سلولی بوده و به مدت طولانی در داخل پیکنیدیوم بی‌رنگ باقی می‌مانند ولی بعد از خروج از پیکنیدیوم، به رنگ قهوه‌ای تیره تغییر می‌یابند و دارای یک دیواره عرضی (ندرتاً ۲ دیواره عرضی) و به ابعاد $۱۱-۱۶ \times ۳۴-۱۹/۵$ میکرومتر می‌باشند (شکل ۱). جستجوی بلاست توالی به دست آمده با توالی‌های موجود در بانک ژن شباهت ۱۰۰ درصدی آن را با جدایه‌های گونه *Diplodia malorum* تأیید نمود (Phillips et al. 2012). آزمون اثبات بیماری-زایی، با تلقیح جدایه‌ها روی نهال‌های دو ساله و هم‌چنین میوه سیب رقم گلدن در قالب طرح کاملاً تصادفی به همراه تیمار شاهد انجام گرفت. بعد از گذشت ۸ هفته، تمام نهال‌های تلقیح شده توسط جدایه‌های قارچی علائم شانکر، سیاه و خشک شدن پوست در اطراف محل تلقیح شده را نشان دادند، در صورتی که در تیمار شاهد، هیچ‌گونه سیاه‌شدگی و یا خشک‌شدن پوست مشاهده نگردید و بافت کالوز در اطراف زخم ناشی از برداشتن حلقه تشکیل و رشد عادی نهال‌ها ادامه یافت. در مورد میوه‌ها، مطالعات بیماری‌زایی نشان داد که بعد از گذشت ۶ روز، در اطراف محل تلقیح، علایم پوسیدگی قهوه‌ای تیره با حاشیه کاملاً مشخص و متمایز از بافت سالم ایجاد شد و در برش عمودی از محل تلقیح، پیشرفت پوسیدگی به داخل میوه به‌طور مشخصی مشاهده گردید، در صورتی که در تیمار شاهد هیچ‌گونه علائم پوسیدگی یا تغییر رنگ ایجاد نگردید (شکل ۲). از بافت‌های تازه آلوده شده و دارای نشانه‌های سیاه‌شدگی پوست در نهال‌ها و میوه‌ها، بعد از عمل ضد عفونی سطحی، عمل جداسازی و شناسایی قارچ مجدداً انجام گرفت و به این ترتیب اصول کخ اثبات شد. نتایج تجزیه واریانس آزمون اثبات بیماری‌زایی نشان داد که تمام جدایه‌های مورد مطالعه، روی نهال‌ها و میوه‌های سیب بیماری‌زا بوده و نسبت به تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری نشان دادند. بر اساس بررسی منابع، این اولین گزارش از وجود و تعیین بیماری‌زایی گونه *Diplodia malorum* مرتبط با شانکر درختان سیب در ایران می‌باشد.



شکل ۱. مشخصات ریخت‌شناختی گونه *Diplodia malorum* (A) برش طولی پیکنیدیوم‌ها، (B) توسعه و رشد کنیدیوم روی سلول کنیدی‌زا، (C-E) کنیدیوم‌های بی‌رنگ و رنگی، (F) دیواره داخلی زگیل‌دار کنیدیوم

Fig. 1. Morphological characters of *Diplodia malorum*, A) Longitudinal section of pycnidia, B) Conidium developing on conidiogenous cell, C-E) Hyaline and colored aseptate and septate (one and two septum) conidia, F) conidia with verruculose inner surface.



شکل ۲. آزمون اثبات بیماری‌زایی گونه *Diplodia malorum* (A) روی نهال سیب رقم گلدن، (B) تیمار شاهد بدون علائم و با بافت کالوز در حاشیه محل تلقیح، (C) روی میوه سیب رقم گلدن، (D) تیمار شاهد بدون علائم پوسیدگی میوه

Fig. 2. Pathogenicity tests of *Diplodia malorum*, A) Symptoms on apple seedling, B) control with no symptoms on seedling and callose tissues forming in margin of inoculation site, C) Symptoms on fruit, D) Control with no symptoms on fruit.