

معرفی گونه های آنامورف مرتبط با جنس *Botryosphaeria* همراه با بیماری زوال سیب در استان آذربایجان غربیحسین ایرانی^۱، علیرضا جوادی اصطهباناتی^۲، رسول زارع^۲

۱- بخش تحقیقات آفات و بیماری های گیاهی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان غربی. ۲- بخش تحقیقات رستنی ها، موسسه

تحقیقات گیاه پزشکی کشور، تهران

چکیده

اخیراً "بیماری زوال درختان سیب در استان آذربایجان غربی شیوع و گسترش یافته است. گونه های مختلفی از جنس *Botryosphaeria* از عوامل بروز بیماری های مختلفی مانند پوسیدگی سیاه و سفید میوه، لکه چشم قورباغه ای برگ، شانکر شاخه، گموز، مرگ سرشاخه، زوال و در نهایت مرگ میزبان را موجب می گردند. به منظور بررسی بیماری زوال درختان سیب طی سالهای ۹۱-۱۳۹۰ از باغهای سیب مناطق مختلف استان بازدید به عمل آمد. نمونه هایی از درختان سیب دارای علائم شانکر و گموز روی شاخه و تنه، قهوه ای شدن بافت چوب و نکروزه بافت آوندی جمع آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. قارچ های جدا شده پس از خالص سازی جهت مطالعات تکمیلی به موسسه تحقیقات گیاهپزشکی ارسال شد. در این مطالعه دو گونه تحت عنوان *Diplodia bulgarica* و *Neofusicoccum parvum* شناسایی شدند. نتایج حاصل از آزمون بیماریزایی نشان داد که هر دو گونه قادر به ایجاد علائم تغییر رنگ بافت آوندی در سیب رقم گلدن دلشیز مایه زنی شده در شرایط آزمایشگاهی بودند.

کلمات کلیدی: سیب، شانکر بوتریوسفیریایی

مقدمه

سیب از محصولات محصولات مهم استان آذربایجان غربی است که با دارا بودن حدود ۴۴۰۰ هکتار باغ سیب و تولید حدود ۹۵۰۰۰۰ تن رتبه نخست را در کشور به خود اختصاص داده است. در بین سال های ۸۷-۱۳۸۶ نوعی بیماری با علائم شانکر بر روی تنه و شاخه های درختان سیب در استان آذربایجان غربی مشاهده شد. خسارت بیماری در بسیاری از باغ های سیب استان قابل توجه بود. در سال های توسعه بیماری، خسارت های سنگین و غیر قابل جبرانی به باغ های میوه وارد می آورد. قبلاً یک نوع بیماری شانکر بوتریوسفیریایی نیز در ایران اولین بار از روی درختان سیب باغ های سیب اطراف نوشهر و سپس از استان آذربایجان غربی توسط اشکان (۱۳۵۲) با عامل *Botryosphaeria ribis* تشخیص داده شده بود. اعضای خانواده بوتریوسفیریاسه *Theiss. & P. Syd. Botryosphaeriaceae* از میزبان های مختلف از جمله سیب جداسازی شده اند (Phillips, 2002; Brown and Britton, 1986). علائم بیماری در سیب و سایر درختان میوه شامل گموز، شانکر، نکروزه آوندی، عدم رشد جوانه، ساقه بلایت، چشم قورباغه برگ و پوسیدگی سفید و سیاه میوه سیب است (Brown and Britton 1986). اخیراً گونه جدید *Diplodia bulgarica* از درختان سیب با علائم پژمردگی، گموز، شانکر و پژمردگی شاخه از کشور بلغارستان فیلیس و همکاران (Phillips et al., 2012) و از ایران توسط عبدالله زاده (1388) گزارش شده است. همچنین گونه *Neofusicoccum parvum* نیز قبلاً از مو و سایر درختان گردو و بید گزارش شده است (ایرانی و همکاران، ۱۳۹۱؛ عبدالله زاده، ۱۳۸۸). این گونه از درختان سیب از کشور های امریکا و نیوزلند نیز گزارش شده است (Slippers et al., 2007).

مواد و روشها

نمونه برداری جدا سازی قارچ های بیمارگر

مونه برداری از باغات مناطق مختلف استان از درختان دارای علائم زوال و خشکیدگی صورت گرفت. در آزمایشگاه نمونه های چوب به ابعاد ۳×۳ سانتی متری بریده پس از ضد عفونی سطحی از قسمت سالم در مجاورت حاشیه آلوده بریده و در داخل محیط غذایی سبب زمینی، دکستروز آگار (PDA) ۲٪ حاوی آنتی بیوتیک سولفات استریتومایسین ۴۰ میلی گرم در لیتر قرار داده شد. پس از ظهور هیف از هر جدایه تک هیف تهیه و در محیط کشت محیط کشت PDA داده و در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد نگه دار شدند. جهت اسپورزایی بهتر، جدایه ها روی محیط کشت آب آگار ۲ درصد کشت و پس از قرار دادن چند تکه از برگ کاج استریل شده تحت تاثیر اشعه NUV قرار داده شدند (Slippers et al., 2007).

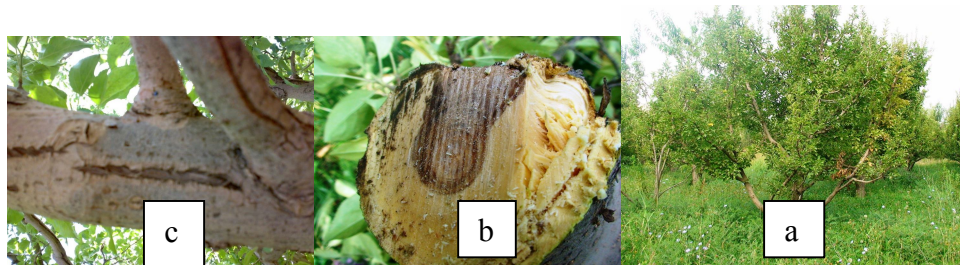
خالص سازی و شناسایی جدایه

پرگنه های جدایه ها براساس شکل و رنگ کلنی دسته بندی شده و سپس جدایه ها بوسیله تک اسپور به روش اسلیپر (Slippers et al., 2004b) خالص سازی شدند. اسپور ها بوسیله پروتوکل های (Slippers et al., 2004a; Phillips, 2002) مورد بررسی قرار گرفتند. جهت بررسی خصوصیات مورفولوژیکی و شناسایی گونه و یا گونه ها لوله های آزمایشی از لحاظ وجود پیکنید بررسی و پس از تشکیل پیکنید تعداد ۵۰ اسپور برای هر جدایه در محلول شفاف لاکتوفنل قرار داده و جهت بررسی خصوصیات مورفومتری اندازه طول و عرض، شکل، رنگ، وجود دیواره عرضی، خط بندی طولی ثبت شد (Slippers et al., 2004b). جهت آزمایشات مولکولی جدایه ها در محیط غذایی ۲٪ مالت، ۲٪ عصاره مخمر، ۲٪ آگار در داخل لوله های آزمایشی در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگه داری شدند (Slippers et al., 2007).

نتیجه

علائم بیماری

علائم بیماری شانکر بوتریوسفیریایی روی شاخه سیب در باغ های سیب استان آذربایجان غربی معمولاً به شکل لکه های کوچک کمی فرورفته به رنگ متمایل به قرمز و یا به شکل نواحی بی رنگ و کمی فرو رفته در حاشیه زخم ها بروز می کند. با گسترش آلودگی پریدرم از پوست جدا شده و سپس زخم هایی بصورت ترک در پوست شاخه ایجاد و از محل زخم مایعی به رنگ نارنجی تیره. تراوش می کند. در صورت ادامه آلودگی پوست خارجی به صورت لایه های نازک از جای خود کنده می شود. پیکنیدومها در متن شانکر ها تشکیل می شوند. علائم پیشرفته بیماری تشکیل شکاف روی شاخه و تنه آلوده است. این قارچ قادر است به شانکر های ایجاد شده بر اثر حمله بیماری آتشک و یا آسیب سرمازدگی نیز حمله نموده و ایجاد خسارت نماید (شکل ۱).



شکل ۱- (a) علائم خشکیدگی شاخه (b) علائم پیشرفته بیماری قهوه ای شدن بافت آوندی (تشکیل شانکر روی روی شاخه اصلی درخت سیب رقم گلدن دلشز مبتلا به بیماری در باغ سیب شهرستان ارومیه

عوامل بیماری

در این مطالعه دو گونه تحت عنوان *Diplodia bulgarica* و *Neofusicoccum parvum* شناسایی گردید که گونه اول از عمده ترین عوامل مسبب شانکر و گموز درختان سیب در استان آذربایجان غربی بود (شکل ۱).

بحث

در بین سال های ۸۷-۱۳۸۶ نوعی بیماری با علائم شانکر بر روی تنه و شاخه های درختان سیب در استان آذربایجان غربی مشاهده شد. خسارت بیماری در بسیاری از باغ های سیب استان قابل توجه بود. در سال های توسعه بیماری، خسارت های سنگین و غیر قابل جبرانی بر باغ های میوه وارد آورده بود. علائم بیماری شامل زوال تدریجی، شانکر و گموز روی تنه و شاخه قطور بود. به هنگام برش عرضی شاخه بیمار بافت چوب قهوه ای شده و نکروزه بافت آوندی مشهود بود. در این پژوهش طی سالهای ۹۱-۱۳۹۰ نمونه هایی از درختان مشکوک به آلودگی شانکر بوتریوسفریایی با علائم زوال و خشکیدگی شاخه اصلی نمونه هایی تهیه و به آزمایشگاه منتقل شد. در این مطالعه دو گونه تحت عنوان *Diplodia bulgarica* و *Neofusicoccum parvum* شناسایی شدند. از ویژگی های بارز گونه *D. bulgarica* در محیط غذایی آب-آگار میسلیم های سطحی، منشعب دیواره دار ملانیزه و قهوه ای رنگ بود پرگنه قارچ عامل بیماری در دمای 22 ± 2 درجه سانتی گراد (اپتیمم) و تاریکی روی محیط غذایی MEA بعد از یک هفته تستک پتری را پر کرده بود. پرگنه قارچ روزت به رنگ سفید پنبه ای تا سبز تیره دارای میسلیم های هوایی و در سطح پستی زیتونی خاکستری بود. در نمونه های بررسی شده اثری از کنیدیوفور مشاهده نگردید. یاخته های کنیدی زا شفاف بی رنگ و دیواره نازک و صاف داشته که به شکل استوانه ای بودند. کنیدی های حوان دارای دیواره صاف، ضخیم، ابتدا و انتهای گرد به شکل بیضوی تا تخم مرغی و فاقد دیواره عرضی بودند ولی کنیدی های بالغ به رنگ قهوه ای کم رنگ تا تیره و دارای یک دیواره عرضی بودند. اندازه کنیدیها در فواصل اطمینان ۹۵٪ - 24/4-16/3×25/5 میکرومتر بود.

پرگنه قارچ در گونه *N. parvum* و در دمای 22 ± 2 درجه سانتی گراد (اپتیمم) و تاریکی در محیط غذایی MEA پرگنه قارچ عامل بیماری و تاریکی و در بعد از ده روز سطح پرگنه پوشیده از توده میسلیم سیاه دودی گاهی متمایل به زیتونی سیاه بود. روی محیط کشت PDA تولید میسلیم هوایی ابتدا سفید و سپس به سیاه زیتونی تغییر رنگ داده بود. پیکنیدها پس از ۱۵ تا ۲۰ روز تشکیل شدند. کنیدی ها در داخل پیکنیدیوم شفاف، فاقد دیواره عرضی و پس از خروج از پیکنیدیوم دارای یک دیواره عرضی، شکل کنیدیوم ها بیضوی تا دوکی، دیواره صاف و نازک بوده که داری قاعده گرد و یا تخت بودند. اندازه کنیدیها در فواصل اطمینان ۹۵٪ - 14/4-

15/5×6/9-7/3 میکرومتر بود. نتایج حاصل از آزمون بیماریزایی نشان داد که هر دو گونه قادر به ایجاد علائم تغییر رنگ بافت آوندی در روی شاخه های بریده سیب رقم گلدن دلپشز مایه زنی شده در شرایط آزمایشگاهی بودند.

منابع مورد استفاده

اشکان، م. ۱۳۵۲. شانکر درخت سیب. نشریه بیماری های گیاهی، شماره های ۳ و ۴، جلد نهم. صفحات ۹۴-۸۵.
ایرانی، ح.، جوادی اصطهباناتی، ع و ر، زارع. ۱۳۹۱. معرفی گونه های آنامورف مرتبط با جنس *Botryosphaeria* همراه با بیماری زوال مو در استان آذربایجان غربی. خلاصه مقالات بیستمین کنگره گیاهپزشکی ایران، دانشگاه شیراز. شیراز. ص ۳۶۶.
عبدالله زاده، جعفر. ۱۳۸۸. تاکسونومی و فیلوژنی تیره *Botryosphaeriaceae*، دانشگاه تربیت مدرس. دانشکده کشاورزی. پایان نامه دکتری، ۱۴۵ ص.

Brown, E., and K. Britton. 1986. *Botryosphaeria* diseases of apple and peach in the southeastern United States. *Plant Disease* 70: 480-484.
Phillips, A. 2002. *Botryosphaeria* species associated with diseases of grapevine in Portugal. *Phytopathologia Mediterranea* 41: 3-18.
Phillips, A.J.L., J. Lopes, J. Abdollahzadeh, S. Bobev, A. Alves. 2012. Resolving the *Diplodia* complex on apple and other Rosaceae hosts. *Persoonia* 29: 29-38.
Slippers, B., P. Crous, and S. Denman. 2004a. Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria* dothidea. *Mycologia* 96: 83-101.
Slippers, B., Fourie, G., Crous, P., Coutinho, T., Wingfield, B., and Wingfield, M. 2004b. Multiple gene sequences delimit *Botryosphaeria australis* sp. nov. from *B. lutea*. *Mycologia* 96: 1030-1041.
Slippers, B., W. Smit, P. Crous, T. Coutinho, B. Wingfield, and M. Wingfield. 2007. Taxonomy, phylogeny and identification of *Botryosphaeriaceae* associated with pome and stone fruit trees in South Africa and other regions of the world. *Plant Pathology* 56: 128-139.

New records of *Botryosphaeria* anamorph species on apple trees in West Azarbaijan province

H. Irani¹, A. Javadi- Estahbanati², R. Zare²

1-Plant Pest and Diseases Research Department, Agricultural and Natural Resources Center of W. Azarbaijan. 2- Department of Botany, Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, Iran

Abstract

Recently, apple trees decline has been a very serious problem on apple trees in west Azerbaijan province. Species of *Botryosphaeria* Ces. and De Not. are important pathogens of apple trees, causing fruit rots (e.g. black and white rot of apple), frog-eye leaf spot, stem and branch cankers, gummosis, die-back and in some cases tree death. A field survey was conducted in 2011-۲۰۱۲ from different apple tree orchards. In order to identify fungal pathogens associated with fruit trees decline disease samples were taken from trunk and stem of apple such as showing canker on the stem and trunk and also twig blight, black spots and dark brown of the xylem tissues and can be seen when cross section cuts made in the trunk and stems, slow decline, trunk canker and dieback, twig blight. Fungi isolated after purification, identification and their pathogenicity on the host, for further studies, they were sent to the Plant Protection Research Institute. In this study *Neofusicoccum parvum* and *Diplodia bulgarica* on apple orchards was identified for the first time in West Azarbaijan province. The pathogenesis test was conducted for *Neofusicoccum parvum* and *Diplodia bulgarica* in the laboratory conduction on stem of the apple trees (Golden delicious) and results showed that these isolates produce black discoloration in vascular tissues.