ارزیابی برخی ویژگی‌های ریخت‌شناسی و تنوع بیماریزائی جدایه‌های *Ophiognomonia leptostyla* عامل آنتراکنوز گردو پس از نگهداری طولانی مدت

رعنا دستجردی* و سولماز نادی[1]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۷/۱۳؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۹/۲۳)

چکیده

در این مطالعه قابلیت بازیابی، برخی خصوصیات ریخت‌شناسی و نیز شدت بیماریزائی دوازده جدایه‌ی قارچ عامل بیماری آنتراکنوز گردو سیزده سال پس از نگهداری بر روی کاغذ صافی در محیط کشت آرد یولاف-آگار (OMA) و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس، مورد ارزیابی قرار گرفت. درصد رشد موفق جدایه‌ها در دامنه‌ای از ۸۹-۰ متغیر بوده و ۷۵ درصد نمونه‌های ذخیره‌شده، قدرت زنده‌مانی و بقای خود را در طی سال‌های نگهداری حفظ کرده بودند. در بررسی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی کشت‌های بازیابی‌شده، خصوصیات ظاهری پرگنه در همه جدایه‌ها تقریباً یکسان بود. کلیه جدایه‌ها توانائی تشکیل اندام‌های تولیدمثل غیرجنسی (آسروول حاوی کنیدیوم) را همچنان دارا بودند. در کشت‌های خالص قارچ، تشکیل آسکوکارپ بالغ سه ماه پس از نگهداری جدایه‌ها در دمای ۱۰-۸ درجه سلسیوس و تاریکی مشاهده نشد. براساس نتایج آزمون بیماریزائی، همه جدایه‌ها قادر به ایجاد بیماری روی دانهال‌های گردو بوده و اولین علائم بیماری را ۱۶-۱۲ روز پس از مایه‌زنی در گلخانه نشان دادند؛ اما بین جدایه‌های مورد مطالعه تنوع زیادی از نظر درصد آلودگی وجود نداشت. پایداری صفات ریخت‌شناسی، اسپورزائی و حفظ قدرت بیماریزائی جدایه‌ها پس از مدت طولانی نگهداری در محیط OMA نشان داد که انتقال اندام‌های غیرجنسی قارچ روی کاغذ صافی در محیط مذکور، می‌تواند روش مناسب، آسان و اقتصادی برای نگهداری طولانی مدت بیمارگر در یک کلکسیون کشت آزمایشگاهی باشد.

کلیدواژه: گردو، آنتراکنوز، صفات ریخت‌شناسی، تنوع بیماری‌زایی.

---

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: raana_dastjerdi@yahoo.com

۱. به ترتیب استادیار و کارشناس پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

Evaluation of some morphological features and diversity of pathogenicity of *Ophiognomonia leptostyla* isolates causal agent of walnut anthracnose after prolonged storage

R. Dastjerdi* and S. Nadi[1]

(Received: 5.10.2019; Accepted: 14.12.2019)

Abstract

In this study survivability, morphological characteristics and pathogenicity of 12 isolates of *Ophiognomonia leptostyla*, which is known as causal agent of walnut anthracnose, have been evaluated after 13-years of storage on filter paper in oat meal agar (OMA) and -20°C. The recovery rate varied from 0 to 89 percent and seventy-five percent of stored isolates were shown to be viable. In macroscopic and microscopic studies of revived cultures, the morphology of colonies was uniform for all isolates. Production of asexual bodies (acervular conidiomata) was preserved by all isolates. Fertile perithecia with asci and ascospores were not detected in pure fungal cultures after three months incubation at 8-10°C in darkness. In pathogenicity experiments, there was not a significant variability in infection severity for different isolates, and the first symptoms were observed on leaves 12-16 days after inoculation. Stability of morphological characteristics, ability to sporulation and retaining the pathogenicity of isolates confirmed that transferring of acervuli on filter paper in OMA medium could be a suitable, safe, simple and cost-effective tool to preserve *O. leptostyla* isolates in a viable state.

Keywords: Walnut. Anthracnose, Morphological traits, Diversity of pathogenicity

**Corresponding author's E-mail: raana_dastjerdi@yahoo.com

1. Temperate Fruit Research Center, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran.

مقدمه

آنتراکنوز ناشی از *Ophiognomonia leptostyla* (Fr.) Sogonov (فرم غیرجنسی: *Marssoniella juglandis* (Lib.) Höhn)) یکی از مهم‌ترین بیماری‌های گردو در مناطق مختلف گردوکاری آمریکا، اروپا، ایران و سایر کشورهای آسیائی محسوب می‌شود (Belisario *et al.* 2008; Dastjerdi *et al.* 2009; Teviotdale *et al.* 2002). بیماری عمدتاً برگ، دمبرگ و میوه‌های جوان را مورد حمله قرار داده و سبب کندی رشد درختان، ریزش برگ و میوه قبل از بلوغ، و در نهایت کاهش کمیت و کیفیت محصول می‌شود. درصورت همه‌گیری بیماری خطر خشکیدگی و مرگ، درختان را تهدید می‌کند (Belisario *et al.* 2001; Teviotdale *et al.* 2002).

بیماری‌شناسان و به‌نژادگران درختان میوه بر این باورند که شناخت ویژگی‌های ریخت‌شناسی و تنوع موجود در جمعیت بیمارگر، نقش مهمی را در برنامه‌های همه‌گیرشناسی و مدیریت تلفیقی بیماری برعهده دارد. تحقیقات انجام‌شده در زمینه بررسی تنوع در جمعیت *O. leptostyla* اندک است. برخی محققین به دلیل عدم تفاوت در طول زیرواحدهای کوچک ریبوزومی (18s-rDNA)، احتمال وجود نژادهای مختلف قارچ را در مناطق گردوکاری ایتالیا رد می‌کنند (Belisario & Hubbes 1997; Belisario *et al.* 2008). مطالعات انجام‌گرفته در ایران نشان می‌دهد که توانائی جدایه‌های عامل آنتراکنوز در ایجاد آلودگی متفاوت است (Salahi *et al.* 2007; Dastjerdi *et al.* 2009). در بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های شمال‌غرب کشور نیز، این جدایه‌ها در کلاس‌های متفاوتی گروه‌بندی شدند (Mianaji *et al.* 2010).

نگهداری طولانی مدت بیمارگرهای گیاهی در وضعیت زنده با تاکید بر پایداری صفات، همواره مورد توجه محققین بوده است. این جدایه‌ها برای شناسائی آرایه‌ها در علم رده‌بندی، برنامه‌های اصلاح مقاومت در گیاهان، و نیز در مطالعات قرنطینه‌ای، تنوع زیستی، و مدیریت بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. آنچه اهمیت دارد تضمین پایداری خصوصیات ریخت‌شناسی، قابلیت اسپورزائی و بقای صفاتی نظیر بیماریزائی در طول دوره حفاظت و نگهداری است (Abd-Elsalam *et al.* 2010, Borman *et al.* 2006, Springer *et al.* 2013). این مقاله به بررسی صفات ریخت‌شناسی و تنوع بیماریزائی جدایه‌های *O. leptostyla* و نیز ارزیابی پایداری صفات، سیزده سال پس از نگهداری در شرایط آزمایشگاهی، می‌پردازد.

روش بررسی

در این مطالعه دوازده جدایه خالص قارچ *O. leptostyla* موجود در کلکسیون قارچی پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری-موسسه تحقیقات علوم باغبانی مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱). جدایه‌ها به صورت آسروول حاوی کنیدیوم روی کاغذ صافی سترون در محیط Oat Meal Agar (OMA) (شامل: عصاره ۳۰ گرم آرد یولاف، پنج گرم دکستروز و ۱۸ گرم آگار در یک لیتر آب) و در ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شده بودند (Dastjerdi *et al.* 2009). به منظور بازیابی و بررسی خصوصیات ریخت‌شناسی، نمونه‌های نگهداری‌شده روی کاغذ صافی در محیط‌های OMA، PDA و Corn Meal Agar (CMA) کشت شدند. تشتک‌ها به مدت سه الی چهار هفته در اطاقک رشد با دمای ۱ ± ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری و سپس برای تحریک قارچ به اسپورزایی غیرجنسی، در دمای ۱ ± ۲۱ درجه سلسیوس و

جدول ۱. موفقیت بازیابی جدایه‌های *Ophiognomonia leptostyla* نگهداری شده روی کاغذ صافی در محیط OMA و برخی ویژگی‌های ریخت‌شناسی آنها.

Table1. Overview of revival success of *Ophiognomonia leptostyla* isolates stored on filter paper in OMA and some morphological features.

Isolate	Site of collection	Date of collection	Revival (%)	Mean time after culture to vegetative growth (day)	Mean of colony diameter 10 days after culture on OMA (cm)	Mean of colony diameter 10 days after culture on CMA (cm)	Appearance of first acervuli (day)
LA	Tehran, Lavasan	84.04.20	77.8±13.5	12	3.25±0.15	4.70±0.15	11
Mr1	Maraghe	84.02.08	14.3±4.20	12	2.98±0.13	3.49±0.29	13
Z6	Takestan, Ziaabad	85.04.14	88.9±11.1	26	2.51±0.13	3.59±0.28	21
Lo1	Taleghan, Lohran	85.05.04	77.8±19.2	20	1.70±0.07	2.26±0.07	24
SH53	Shabestar, Sofian	86.03.07	-	-	-	-	-
QA41	Qazvin, Qadimabad	86.04.02	-	-	-	-	-
QA43	Qazvin, Qadimabad	86.04.02	11.1±2.30	18	1.39±0.07	2.65±0.30	23
K01	Karaj, Kamalshahr	86.05.03	-	-	-	-	-
Z60	Zanjan-Khoramdare	1386	22.2±5.60	17	2.44±0.01	3.65±0.30	13
Q57	Qazvin	1386	83.3±16.7	9	3.11±0.04	4.61±0.01	16
T50	Tabriz, Khosroshahr	1386	11.1±1.90	17	2.38±0.18	2.80±0.02	22
MA51	Marand, Ordaklo	1386	22.2±8.70	23	2.81±0.16	3.10±0.19	19

۱۸ ساعت نور و شش ساعت تاریکی قرار گرفتند. سرعت رشد پرگنه و نیز برخی خصوصیات ماکروسکوپی و میکروسکوپی نمونه‌های بازیابی‌شده ثبت شدند (جدول ۱). برای تهیه زادمایه قارچ، از کشت‌های ۳۰-۲۵ روزه استفاده شد. پس از تهیه سوسپانسیون اسپور، با کمک لام اسپورشمار (Hemocytometer) غلظت 10^5 اسپور در میلی‌لیتر از آن تهیه (Dastjerdi *et al.* 2009)، و آزمون بیماری‌زایی روی دانهال‌های یک ساله گردو مطابق روش بلک و نیلی (Black & Neely 1978) انجام شد. برای هر جدایه سه گلدان، و گلدان‌های شاهد با آب مقطر سترون مایه‌زنی شدند. سپس گلدان‌ها با کیسه‌های پلاستیکی شفاف پوشانده شدند. چهل ساعت پس از مایه‌زنی، پوشش‌های پلاستیکی حذف و گلدان‌ها به طور طبیعی آبیاری شدند. بیست و یک روز پس از مایه‌زنی، با تعیین مساحت برگ و مساحت آلودگی، درصد بافت آلوده در هر دانهال محاسبه شد (Dastjerdi *et al.* 2009). داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS 9.1 تجزیه و مقایسه میانگین‌ها به کمک آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج نشان داد که ۷۵ درصد از نمونه‌های مورد مطالعه، سیزده سال پس از نگهداری، با موفقیت قابل کشت بودند (جدول ۱). در بررسی میکروسکوپی و ماکروسکوپی کشت‌های بازیابی‌شده، ویژگی‌های ظاهری پرگنه در همه جدایه‌ها تقریباً یکسان بود و فقط تغییرات اندکی در رنگ میسیلیوم هوائی جدایه‌های مختلف مشاهده شد. جدایه‌ها در تاریکی و دمای ۱ ± ۲۵ درجه سلسیوس از رشد مناسبی برخوردار بودند، اما رشد رویشی قارچ در محیط OMA بسیار کند بود. فراوانی آسروول‌ها در محیط CMA کمتر از OMA، اما تشکیل آنها با سرعت بیشتری در مقایسه با OMA اتفاق افتاد. این یافته‌ها با نتایج تحقیقات گذشته مطابقت داشت (Dastjerdi *et al.* 2009). ماکروکنیدیوم‌ها شفاف، داسی‌شکل، دوسلولی به ابعاد تقریبی ۸/۵-۵ × ۷/۲-۸/۲۱ ۱۷- میکرومتر بودند. در برخی

جدول ۲. مقایسه میانگین تعداد و قطر لکه، مساحت آلودگی و درصد آلودگی در جدایه‌های مختلف قارچ *Ophiognomonia leptostyla*.

Table 2. Mean comparison of number and diameter of spots, infection area, infection percent in different isolates of *Ophiognomonia leptostyla*.

Isolate	Symptoms appearance after inoculation (day)	Number of spot	Spot diameter	Infection area	Infection percent
Z6	14	22.84ab	0.25b	1.27b	3.17b
LA	14	31.76ab	0.44a	4.98a	16.03a
Lo1	13	30.02ab	0.19bc	1.38b	5.30b
QA43	14	2.90c	0.14c	0.06b	1.09b
Q57	12	35.29a	0.41a	5.46a	16.44a
MA51	12	17.13bc	0.27b	1.22b	4.15b
T50	16	5.22c	0.25b	0.33b	1.09b
Mrl	12	3.87c	0.19bc	0.15b	0.43b
Z60	15	0.48c	0.10c	0.03b	0.35b

The means with different letters in each column are significantly different (P≤0.01).

موارد، آسروول حاوی میکروکنیدیوم‌های تک‌سلولی و شفاف نیز بود. این کنیدیوم‌ها در کشت‌های سال ۱۳۸۶-۱۳۸۴ نیز مشاهده و عدم توانائی آنها برای ایجاد بیماری به اثبات رسیده بود (Dastjerdi *et al*. 2009).

در بررسی خصوصیات بیماریزائی جدایه‌ها، دوازده روز پس از مایه‌زنی دانهال‌های گردو، اولین علایم به صورت نقاط ریز قهوه‌ای با حاشیه سفید-خاکستری در سطح زیرین برگ‌ها نمایان شد (جدول ۲). تشکیل هیف‌های زیرکوتیکولی که از نفوذ سریع بیمارگر به سلول‌های اپیدرمی ممانعت می‌کنند (Cline & Neely 1983)، می‌تواند یکی از دلایل عمده برای طولانی‌بودن دوره کمون و ظهور اولین علائم بیماری روی گیاه باشد. کلیه جدایه‌ها قادر به تولید اندام‌های تولیدمثل غیرجنسی روی برگ‌های گردو بودند. اولین آسروول‌ها ۱۹ روز پس از مایه‌زنی در سطح لکه‌ها ظاهر شدند. جدایه‌های قارچ از نظر توانائی در ایجاد آلودگی با یکدیگر تفاوت معنی‌دار داشتند. جدایه‌های Q57، LA و Lo1 بیشترین و جدایه Z60 کمترین تعداد لکه را ایجاد نمودند. جدایه Lo1 اگرچه تعداد لکه زیادی را به‌وجود آورد، اما رشد و توسعه لکه‌ها ناچیز بود. به نظر می‌رسد اندازه لکه‌ها معیار مناسب‌تری برای قدرت تهاجم آن‌ها باشد. ارتباط بیماریزائی قارچ با سرعت رشد پرگنه بیمارگر در محیط آزمایشگاه به اثبات رسیده است (Belisario *et al*. 2008). در این مطالعه نیز جدایه‌های LA و Q57 که دارای بیشترین سرعت رشد و اولین ظهور آسروول‌ها بودند، بالاترین درصد آلودگی دانهال‌ها را به خود اختصاص دادند. بررسی درصد آلودگی برگ‌ها ۲۱ روز پس از مایه‌زنی، تنوع زیادی را در بین جدایه‌ها نشان نداد (جدول ۲). براساس نتایج این تحقیق، کشت بیمارگر عامل آنتراکنوز گردو روی کاغذ صافی در محیط OMA، روشی مناسب برای نگهداری طولانی مدت قارچ با حفظ پایداری صفات ریخت‌شناسی، توانایی تولید اسپور و قدرت بیماریزایی آن، می‌باشد.

سپاسگزاری

این مقاله نتایج بخشی از پروژه تحقیقاتی (به شماره مصوب ۹۶۰۱۰۲۳۱) است که در راستای تفاهم‌نامه شماره ۴۶۲۰۵/ص/۹۵ بین "سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی" و " صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران معاونت علمی فناوری ریاست جمهوری (INSF)" اجرا شده است.

منابع

Abd-Elsalam K. A., Yassin M. A., Moslem M. A., Bahkali A. H., de Wit P. J. G. M., McKenzie E. H. C., Stephenson S. L., Cai L. and Hyde K. D. 2010. Culture collections, the new herbaria for fungal pathogens. Fungal Diversity 45:21–32.

Belisario A. and Hubbes M. 1997. Genetic variability in *Gnomonia leptostyla*. Acta Hort. 442:385-387.

Belisario A., Forti E., Cichello A. M., Zoina A., Barbieri E. and Valier, A. 2001. Epidemiological surveys of *Gnomonia leptostyla* in *juglans regia* hedgerow trained orchard .Acta Hort. 544:405-409.

Belisario A., Scotton M., Santori A. and Onofri S. 2008. Variability in the Italian population of *Gnomonia leptostyla*, heterotallism and resistance of *juglans* species to anthracnose. Forest Pathology 38:129-145.

Black W. M. and Neely D. 1978. Relative resistance of *Juglans* species and hybrids to walnut anthracnose. Plant Dis. Rep. 62:497-499.

Borman A. M., Szekely A., Campbell C. K. and Johnson E. M. 2006. Evaluation of the viability of pathogenic filamentous fungi after prolonged storage in sterile water and review of recent published studies on storage methods. Mycopathologia 161:361-368.

Cline S. and Neely D. 1983. Penetration and infection of leaves of black walnut by *Marssonia juglandis* and resulting lesion development. Phytopath. 73:494-497.

Dastjerdi R., Hassani D. and Javan-nikkhah M. 2009. Study on some characteristics, assessment of pathogenicity and diversity in *Gnomonia leptpstyla* isolates, causal agent of walnut anthracnose in Iran. Plant Path. 45:61-73. (In Persian with English Summary).

Mianaji M., Abdollahi H. and Jamshidi S. 2010. Genetic diversity in walnut anthracnose causal agent fungi, *Ophiognomonia leptostyla* (FR.) Sogonov by ITS and IGS CAPS in northwest of Iran. Agroecology Journal 6:79-88. (In Persian with English Summary).

Salahi S., Javan-nikkhah M. and Zad J. 2007. Study of genetic diversity in *Gnomonia leptostyla* causal agent of walnut anthracnose by PCR and evaluation of ITS distribution and survival in east Azarbaijan province, Iran**.** M. SC. Thesis, University of Tehran, Iran. 92 Pages (In Persian with English Summary).

Springer J. C., Banies A. L. D. and Chansler M. T. 2013. Evaluating the long-term storage of *Cryphonectria parasitic*. Fungal Genetics Reports 60:11-15.

Teviotdale B. L., Michailides T. J. and Pscheidt J. W. 2002. Compendium of Nut Crop Diseases in Temperate Zones. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA. 126 Pages.