شناسایی ریخت‌شناختی و مولکولی *Elsinoë punicae*، عامل بیماری اسکب انار در استان‌های گلستان و مازندران

حجت‌اله ربانی‌نسب[1*]، مهدی ارزنلو[2]، علیرضا دلیلی[3] و محمدعلی آقاجانی‌نسب[1]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۴/۱۲؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۷/۱۳)

چکیده

در سال‌های اخیر، یک بیماری کمتر شناخته شده که موجب ایجاد لکه‌های نکروتیک روی اندام های گل و سطح میوه انار می گردد، در برخی مناطق کشت انار در ایران از جمله استان های گلستان و مازندران شیوع پیدا کرده است. تحقیق حاضر با هدف شناسایی عامل بیماری در این دو استان اجرا گردید. به این منظور در بهار ۱۳۹٦ از باغات انار این دو استان بازدید و نمونه برداری از اندام‌های گل و میوه صورت پذیرفت. جداسازی عامل بیماری با استفاده از روش‌های رایج در بیماری شناسی گیاهی انجام و کشت‌های خالص با استفاده از روش نوک ریسه جهت مطالعات ریخت شناختی و مولکولی ایجاد شدند. پرگنه قارچ روی محیط عصاره مالت آگار کند رشد (۳-٤ میلیمتر در هفته)، برجسته، مطبق، میسلیوم متراکم در قسمت مرکزی، میسلیوم در قسمت مرکزی سفید رنگ و در حاشیه متمایل به صورتی بود. ساختارهای اسپورزایی در محیط کشت تشکیل نگردید. در محل لکه ها در سطح میوه های آلوده آسروول هایی مشاهده شدند. آسروول به قطر ۵۰ تا ۲۰۰ میکرومتر، کنیدیوفورها متراکم، منفرد و نسبتا کوتاه، سلول های کنیدیوم زا بی‌رنگ یا قهوه‌ای روشن و فیالیدیک بودند. همچنین ناحیه ITS-rDNA توالی یابی شد. قارچ عامل بیماری براساس ویژگی های ریخت شناختی و توالی نوکلئوتیدی ناحیه ITS-rDNA گونه *Elsinoë punicae* شناسایی گردید. مایه‌زنی‌میوه‌های سالم انار (رقم یزد) با سوسپانسیون مسیلیوم قارچ منجر به ایجاد علایم اسکب روی میوه شد، در حالیکه در نمونه های شاهد علایمی مشاهده نگردید. عامل بیماری از بافت های مایه زنی شده مجدد جداسازی شد.

کلیدواژه: انار، اسکب، *Elsinoë*، ITS

---

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: h.rabbani@areeo.ac.ir

۱. بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع‌طبیعی گلستان، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان، ایران.

۲. گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

۳. بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع‌طبیعی مازندران، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، ساری، ایران.

Morphological and molecular characterization of *Elsinoë punicae*, the causal agent of pomegranate scab disease in Golestan and Mazandaran provinces

H. Rabbaninasab[1*], M. Arzanlou[2], A.R. Dalili[3], and M.A. Aghajaninasab[1]

(Received: 7.3.2018; Accepted: 10.5.2018)

Abstract

In recent years a lesser known disease that causes necrotic spots on flower and fruit surface of pomegranate have been observed in orcahrds of Golestan and Mazandaran provinces, Iran. The present study was aimed to characterize and determine the causal agent of this disease. Towards this aim, during spring 2016 pomegranate orchards were inspected in Golestan and Mazandaran provinces and symptomtic flowers and fruits were collected and transported to the laboratory. Isolation was made using routine plant pathology methods on Potato dextrose Agar supplemented with sulphate streptomycin. Pure cultures were established using hyphal technqiue. Colonies on MEA grew very slowly (attained a diameter of 3-4 mm after 7 days at 25℃), raised, floded, dense aerial mycelium in centre, white in centre and pink in margin. Conidiomata did not develop in culture. Acervuli were observed on lesions in fruit surface, subcuticular, subepidermal, 50-200 µm diam; conidiophores dense, individual, short, and hyaline; conidiogenous cells hyaline to subhyalaine, phialidic.Conidia ellipsoidal, aseptate, hyalaine, 4-8 × 2-3.5 µm. The identity of the species was further investigated by PCR amplification and sequence of ITS-rDNA region. A BLAST serach against sequence data in GenBank, showed 100 percent similarity with some sequences avaibale in GenBank. Based on morphological and molecular data the fungus was identified as *Elsinoë punicea*. Inoculation of healthy pomegranate fruit (Yazd Cultivar) using mycelial suspension of the fungal isolates, resulted in the disease symptoms resembling those observed in field conditions; while, controls did not develop disease symptoms. The causal agent was re-isolated from inoculated tissues. With identification and determination of the causal agent, it is necessary to study the incidence of this disease in other pomegranate producing areas in country, biology of the causal agent, diseases cycle and finally provide proper management strategies for this disease.

Keywords: ITS, Plant disease, Punica, new plant disease

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

1. Plant Protection Research Department, Golestan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Gorgan, Iran.
2. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
3. Plant Protection Research Department, MazandaranAgricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Sari, Iran.

مقدمه

انار (*Punica granatum* L.) متعلق به خانواده‌ی Punicaceae (Harde *et al.* 1970) و یکی از میوه‌های مهم باغبانی تجاری است که به طور کلی مناسب آب‌و-هوای مدیترانه‌ای است (Biale 1981). انار بومی ایران و مناطقی از آسیای میانه می‌باشد (Morton 1981).

آفات و بیماری‌های مختلفی درختان انار را تهدید می-کنند که از مهمترین آفات می‌توان به کرم گلوگاه انار اشاره کرد. بیماری‌های قارچی و باکتریایی مثل سایر گیاهان در درختان انار نیز مشاهده می‌شود که در این بین بیماری‌های قارچی زیان‌های اقتصادی قابل‌توجهی در مراحل مختلف رشدی به درختان انار وارد می‌کنند (Munhuweyi *et al.* 2016). بلایت باکتریایی یکی از بیماری‌های مهم درختان انار است که باعث خسارت اقتصادی شده و از آفریقا و چین و چند کشور دیگر گزارش گردیده است (Petersen *et al.* 2010). بیماری‌های قارچی گزارش‌شده روی انار عمدتا شامل پوسیدگی‌های میوه، پوسیدگی ریشه، شانکر تنه و شاخه، سرخشکیدگی، زوال، آنتراکنوز و لکه‌برگی هستند (Munhuweyi *et al.* 2016). تاکنون عوامل قارچی متعددی به عنوان عامل لکه‌ها روی برگ، میوه و گل انار گزارش شده است. قارچ‌های *Cercospora punicae* Henn.، *Sphaceloma punicae Bitanc. And Jekins.*، *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc.، *Drechslera* sp. و *Phomopsis* sp. به عنوان عوامل عارضه لکه برگ و میوه انار ذکر شده‌اند (Jamadar and Patil 2007). قارچ *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. نیز بعنوان عامل این عارضه معرفی شده که علاوه بر لکه برگی موجب پوسیدگی میوه نیز می‌شود (Archana and Jamadar 2014, Tziros *et al.* 2008). در ایتالیا از قسمت‌های داخلی انارهایی که علایم لکه‌های سیاه رنگ نامتقارن در سطح پوست آنها وجود داشت قارچ *A. alternata* جداسازی شد. با انجام آزمون بیماریزایی که با تزریق کنیدیدیوم قارچ صورت گرفت فقط قسمت‌های داخلی انار دچار پوسیدگی شده و هیچ گونه لکه ای روی میوه انار ایجاد نگردید (Faedda *et al.* 2015). در آزمایش دیگری در سال ۲۰۱۶ در اسپانیا نتایج مشابهی به دست آمد. این بیماری به نام پوسیدگی قلبی انار شناخته شد (Vicent *et al.* 2016). در سال ۲۰۱۱ در بررسی بیماری‌های درختان میوه گرمسیری در تایلند قارچ *Pseudocercospora punicae* (Henn.) Deighton از لکه‌های برگی و میوه انار گزارش شد (Phengsintham *et al.* 2011). در ایران نیز در سالهای گذشته به نام گونه‌هایی از *Pseudocercospora* و *Cercospora* اشاره شده که از انار جداسازی شده است. گونه‌هایی دیگری از جنسهای *Ramularia* و *Cercospora* نیز مرتبط با انار شناسایی و معرفی شده است (Bakhshi *et al.* 2014). گونه *Pseudocercospora punicae* را از انارهای وحشی دارای علایم لکه‌برگی و لکه روی میوه از منطقه تالش استان گیلان جداسازی و شناسایی کردند (Bakhshi *et al.* 2014). این گونه ابتدا با نام *C. punicae* در سال ۱۹۰۶ توسط هنینگ از ژاپن گزارش شد (Chupp 1954). دیتون در ۱۹۷۶ این گونه را مجددا توصیف نموده و آن را به جنس *Pseudocercospora* انتقال داد. در منابع مختلف قارچ *P. punicae* از انارجداسازی شده اما ارتباط این قارچ با علایم لکه روی برگ، گل و میوه اثبات نشده و بیشتر از دیدگاه قارچ شناسی و تاکسونومی به آن پرداخته شده است (Deighton 1976).

چندین گونه قارچ نیز مرتبط با بیماری‌های پس از برداشت انار جداسازی شده است که ممکن است ارتباطی بین قارچهای عامل لکه میوه و گل و پس از برداشت

وجـود داشـته باشـد. در یـک تحقیـق گونـه‌هـای قـارچی *Aspergillus niger* Tiegh، *Penicillium expansum* (Link)، *P. glabrum*، *P. sclerotiorum* J.F.H. Beyma (Wehmer) Westling و *Pilidiella granati* (Sacc.) Aa روی انارهای مایه‌زنـی‌شـده، بیمـاری‌زا بودنـد در حالیکـه قارچهـای *P. minioluteum* Dierckx و *Cytospora annulata* Ellis & Everh. بیمـاری‌زا نبودنـد. هـیچ گونـه فساد و پوسیدگی توسط قارچهای *Alternaria* spp. و *Co. gloeosporioides* ایجـاد نشـده اسـت (Palou *et al.* 2013). شیوع یک بیماری کمتر شناخته‌شـده روی انـار در استان گلستان، این محصول را به شدت تهدیـد مـی‌نمایـد. این بیماری باعث ایجاد لکه در روی گل و نهایتا روی میوه شده و موجب نابودی کامل گلها یا بدشکلی میوه می‌شـود. تحقیق حاضر با هدف شناسـایی عامـل بیمـاری در اسـتان گلستان صورت پذیرفت.

روش بررسی

نمونه‌برداری

نمونه‌برداری از اوایل اردیبهشت ماه تا انتهای مرداد مـاه سال ۹۶ انجام شد. به باغات انار هـر دو اسـتان گلسـتان و مازنـدران مراجعـه و از گلهـای آلـوده در ابتـدای فصـل و میوه‌های نارس، بد شکل و لکه دار اواسط فصل در مـرداد ماه نمونه برداری گردیـد. در مجمـوع ۴۷ نمونـه از اسـتان گلستان و ۲۶ نمونه از استان مازندران جمع‌آوری گردید.

جداسازی، خالص‌سازی و نگه‌داری جدایه‌ها

جدایـه‌هـا از نمونـه‌هـای انـار آلـوده و دارای علایـم جداسازی و خالص شدند. ابتدا تکه‌های کوچک از پوست انار که دربرگیرنده لکه‌های نکروزه بـود بریـده شـده و در هیپوکلریت سدیم ۳ درصد به مدت ۲ دقیقه و در الکل ۷۰ درصد به مدت ۴۰ ثانیه ضدعفونی سطحی شـده سـپس در اتاقک مرطوب برای رشد قارچ بیمـارگر قـرار داده شـدند. بعد از گذشت ۱۰-۷ روز آسـروول‌هـای قـارچ در حاشـیه لکه‌ها ظاهر شدند. بـه منظـور خـالص‌سـازی جدایـه‌هـای قارچی، تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت PDA حاوی آنتی بیوتیک استرپتومایسین (به میزان یکصد میلـی‌گـرم در لیتر) به صورت مورب قرار داده شدند و حـدود ۱۰ میلـی لیتر آب مقطر استریل در یک گوشه محـیط کشـت ریختـه شد. سپس با استفاده از سوزن تلقیح استریل، تـوده کنیـدی از آسروول برداشته شد و در داخـل آب در تشـتک پتـری پخش گردید. سوسپانسیون اسپور به صورت یکنواخـت در سطح محیط کشت پخش گردید و سپس تشتک‌های پتـری به صورت مورب به مدت یک شب نگهـداری شـدند. آب اضـافی داخـل تشـتک پتـری خـالی و در زیـر استرئومیکروسکوپ کنیدی‌های جوانه زده به محیط کشـت جدید منتقل گردیدند. جدایـه‌هـا در تیـوب ۲ میلـی‌لیتـری حاوی محیط آگار تغذیه‌ای مصنوعی (SNA) و سیب‌زمینی هویج آگار (PCA) دریخچال ۴ درجه برای مطالعات بعدی نگهداری شدند.

شناسایی ریخت‌شناختی جدایه‌ها

شناسایی براساس صفات ماکروسکوپی و میکروسکوپی شامل نرخ رشد و رنگ و حاشیه کلنی، شکل، اندازه و نوع انـدام بـاردهی و سـلول کنیـدیوم‌زا و کنیـدیومها صـورت گرفت.

شناسایی مولکولی جدایه‌ها

به منظور کمک به شناسایی قارچ براساس ویژگـی‌هـای ریخـت‌شـناختی، ناحیـه ITS-rDNA تکثیـر و تـوالی‌یـابی گردید. برای این منظور DNA از کلنی‌های ۳۷ روزه قـارچ

با استفاده از روش مولر و همکاران (Moller *et al.* 1992) استخراج شد. ناحیه ITS-rDNA (شامل ITS1+5.s ITS2+) با استفاده از آغازگر رفت (= ITS1 5'TCCGTAGTTGGACCTGCGG3') و برگشت (ITS4 = 5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') در جدایه‌ها تکثیر شد. مخلوط واکنش حاوی ۱۵-۱۰ نانوگرم DNA ژنومی الگو، ۱۲/۵ میکرولیتر بافر واکنش ۱۰X، ۱/۵ میلی‌مول کلرید منیزیم، ۰/۲ میلی‌مولار هر یک از dNTPها، پنج پیکومول از هر یک از آغازگرها، ۰/۵ واحد آنزیم DNA پلی‌مراز و آب دوبار تقطیر استریل بود. حجم واکنش با استفاده از آب مقطر دوبار استریل به ۱۲/۵ میکرولیتر رسانده شد. تکثیر ناحیه ITS-rDNA با اعمال چرخه‌های حرارتی به قرار زیر انجام شد: یک چرخه دمایی ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت سه دقیقه جهت واسرشت‌سازی اولیه، ۳۶ چرخه تکثیر، شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، بسط در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و در نهایت یک چرخه بسط نهایی به مدت هفت دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد. فرآورده‌های واکنش روی ژل آگارز یک درصد حاوی ۰/۱ میکروگرم بر میلی‌گرم اتیدیوم‌بروماید در بافر1X TAE توسط دستگاه عکس برداری از ژل تحت نور ماوراءبنفش مشاهده و بررسی و محصول واکنش زنجیره ای پلی مراز جهت توالی یابی به موسسه پاستور ارسال شدند. داده‌های خام توالی بعد از ویرایش با نرم افزار سکمن (Lasergene package, DNAstar, Madison, USA)، با استفاده از نرم افزار برخط بلاست (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) با توالی-های موجود در بانک ژن مقایسه شد و هویت جدایه‌های قارچی مورد بررسی قرار گرفت.

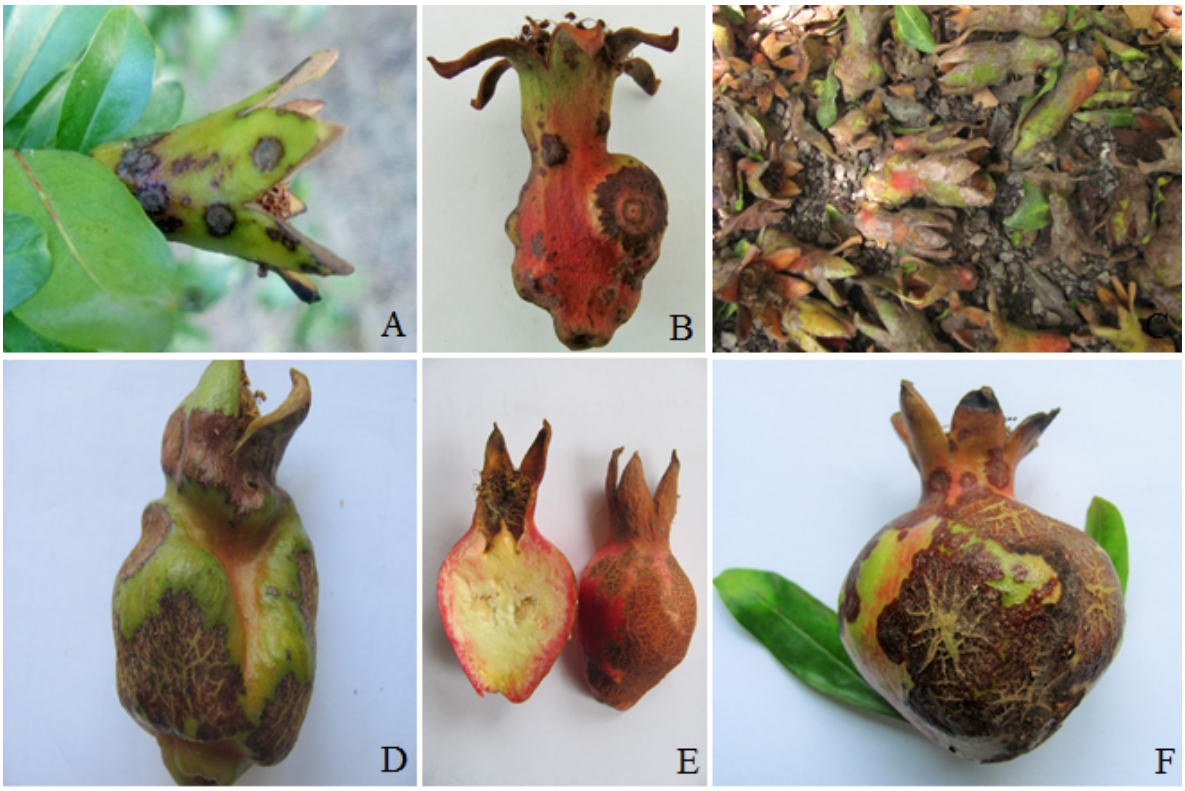
آزمون بیماری‌زایی

جهت تهیه مایه تلقیح عامل بیماری، جدایه‌های روی محیط کشت PDA به صورت مخطط مایه‌زنی شده و به مدت سه هفته در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. میوه‌های سالم انار (رقم یزد) تهیه شد. میوه‌ها ابتدا با آب شتشو داده شده، سپس با استفاده از الکل ۷۰ درصد سطح میوه‌ها ضدعفونی گردیدند. در سطح میوه‌ها با استفاده از لبه تیغ اسکالپل زخم‌های سطحی ایجاد و محل زخم با استفاده از توده هیف قارچ مایه‌زنی شد. میوه‌های خراش‌داده‌شده و تلقیح‌شده با محیط کشت PDA به عنوان شاهد استفاده شدند. میوه‌ها در داخل ظروف پلاستیکی درب دار حاوی کاغذ صافی مرطوب جهت تامین رطوبت نسبی و در دمای اتاق نگهداری و ظهور علایم بیماری در فواصل زمانی بررسی گردید.

نتایج

علایم بیماری

در شرایط طبیعی علایم بیماری به صورت لکه‌های قهوه‌ای تا قهوه‌ای تیره نسبتا فرورفته روی اندام‌های گل شامل (نهنج، کاسه گل و کاسبرگ‌ها) ظاهر می‌گردد. لکه‌ها گرد (به قطر یک تا ۱۲ میلیمتر) تا نامنظم بوده و ممکن است چندین لکه به هم پیوسته و بخش قابل توجهی از اندام‌های گل علایم نکروز نشان دهند (شکل ۱). آلودگی در مرحله گلدهی موجب بد شکلی گلها و منجر به ریزش بخش عمده ای از آنها در مراحل اولیه تشکیل میوه می‌شود (شکل ۱). میوه‌های آلوده به خوبی توسعه نمی‌یابند و بافت میوه در محل‌های آلوده به صورت چوپ پنبه ای و مشبک دیده شد و از رشد باز می‌ماند که منجر به بدشکلی میوه‌ها نیز می‌گردد (شکل۱). آلودگی میوه در مراحل بعدی



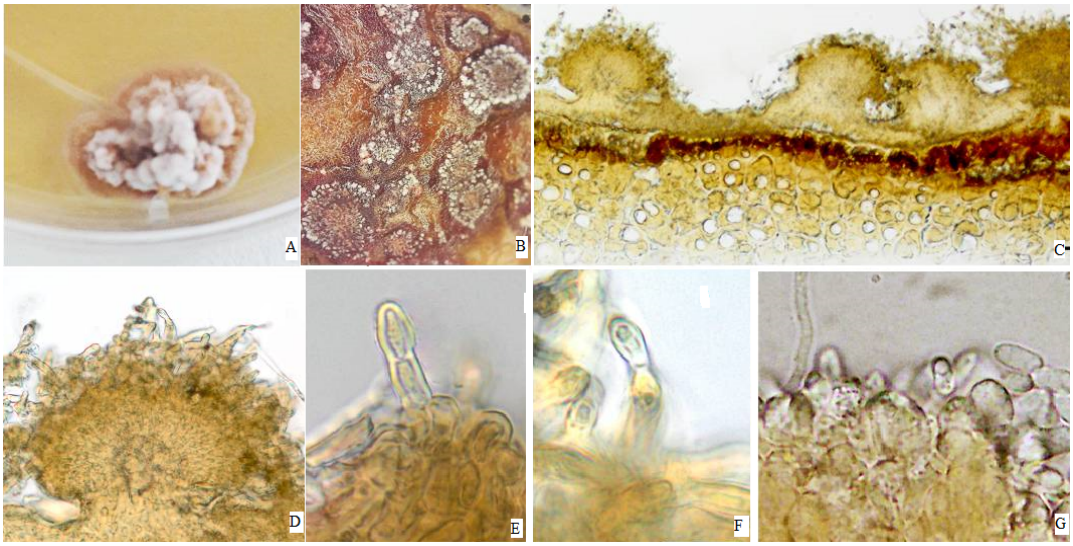
شکل ۱. علایم بیماری اسکب روی میوه انار در شرایط باغ. A. لکه های نکروتیک روی گل، B و C. گلهای دفورمه شده. D. میوه های جوان دفورمه شده، E. عدم تلقیح گلهای آلوده و تولید میوه های بدون دانه، F. لکه های شعاعی روی میوه های نارس

Fig. 1.Symptoms of scab disease on naturally infected pomegranate fruits in orchards. A. Nectotic lesion on flowers. B, C. Deformed flowers. D. Deformed young friuts. E. Unpollinated flowers and development of seedless fruits. F. Radial necrotic spots on immature fruits.

منجر به بروز علایم اسکب روی پوست میوه می‌شود، با این وجود میوه‌ها شکل طبیعی خود را حفظ می‌کنند (شکل ۱). بدشکلی گل‌ها و ایجاد لکه‌هایی که بصورت شعاعی از مرکز لکه بصورت شکاف‌های ریزی توسعه پیدا کرده‌اند از بارزترین علایم این بیماری است (شکل ۱). گل‌هایی که در ابتدای فصل آلوده می‌شوند، پس از بد شکل شدن غالبا میوه کامل تشکیل نمی‌دهند (شکل ۱). اگر گل‌های مرحله دوم در اواخر بهار آلوده شوند معمولا تبدیل به میوه شده و میوه‌ها قابل مصرف هستند و ایجاد لکه روی پوست انار تاثیری چندانی بر دانه‌های انار ندارند هرچند نهایتا لکه‌های کاملا مشخصی روی پوست انار تشکیل می‌شود (شکل ۱).

شناسایی جدایه‌ها

کلنی بر روی محیط کشت PDA بسیار کند رشد بود. پس از یک ماه نگهداری در شرایط تاریکی، قطر کلنی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد حدود ۱/۵ الی ۲ سانتی متر می‌رسید. کلنی روی محیط کشت حالت برآمده (حدود ۴ میلی‌متر)، تا شده و دارای مسیلیوم‌های متراکم، فشرده بود. حاشیه کلنی حالت نامظنم و لبه‌دار (lobate) داشت. کلنی قارچ به رنگ گل‌بهی تا صورتی (سطح رویی) و به رنگ تیره (سطح زیرین) دیده می‌شد. ساختارهای تولید مثل جنسی و غیر جنسی در محیط کشت پس از دوماه نگهداری کشت‌های قارچی تشکیل نشد. روی میوه‌های آلوده انار در شرایط طبیعی، ساختارهای غیر جنسی قارچ



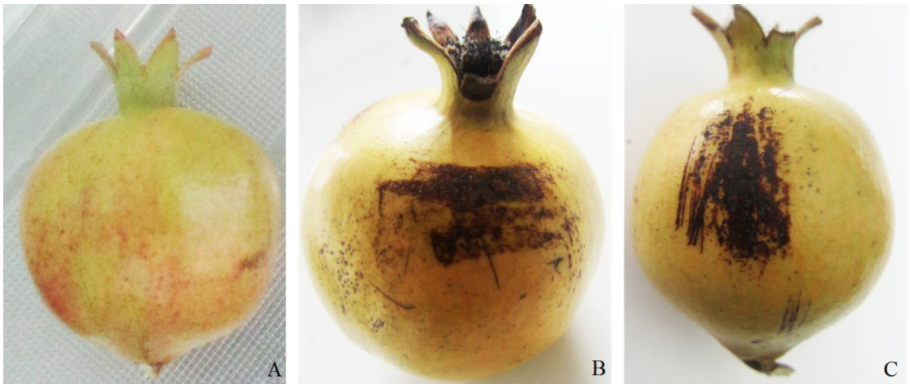
شکل ۲. قارچ *Elsinoë punicae*. A.پرگنه قارچ روی محیط کشت PDA B. کنیدیوماتا در سطح میوه های آلوده C و D. برش عمودی از محل آسرول E و F. کنیدیوفور و سلول کنیدیوم زا G. کنیدی های تک سلولی و شفاف.

Fig. 2. *Elsinoë punicae*. A. fungal colony on PDA. B. Conidiomata on naturally infected fruit. D, C. vertical section through acervuli. F. Conidiophore and conidiogenous cells. G. single-celled and hyaline conidia.

تشکیل شدند. آسروول‌ها روی میوه‌های آلوده در زیر کوتیکول، داخل اپیدرمی و کمی فرورفته در پوست مشاهده شد. آسروول‌ها اغلب به هم پیوسته و گاها هم به صورت منفرد، قطری بین ۲۰۰-۵۰ میکرومتر داشتند (شکل۲). کنیدیوفورها از سطح بالایی بافت سودوپارانشیم منشاء گرفته، اغلب به صورت کاهش یافته به سلول‌های کنیدیوم زا و از نوع فیالیدیک، بی رنگ تا قهوه‌ای روشن مشاهده گردیدند (شکل۲). کنیدی‌ها تک سلولی، بیضوی و به رنگ روشن در اندازه ۳/۵-۲ × ۸-۴ میکرومتر بودند (شکل۲). ویژگی‌های ریخت‌شناختی جدایه‌های بدست آمده در این تحقیق با توصیف گونه *Elsinoë punicae* (Bitanc. & Jenkins) Rossman & W.C. Allen مطابقت داشت (Bitancourt and Jenkins 1940; Carstens *et al.* 2018). جهت کمک به شناسایی مولکولی گونه، قطعه‌ای به طول حدود ۶۳۰ جفت باز از ناحیه ITS-rDNA دو جدایه منتخب (CCTU358 و CCTU359) طی واکنش زنجیره ای پلی مراز تکثیر و توالی یابی گردید. داده‌های توالی به ترتیب با کدهای دسترسی MH845063 و MH845063 در بانک ژن ارسال شدند. مقایسه داده‌های توالی با توالی‌های موجود در بانک ژن مشابهت صدرصدی با توالی ناحیه ITS برای گونه‌های *Elsinoë punicae* جداسازی‌شده از انار (KX887276.1)، گونه *Elsinoe australis* Bitanc. & Jenkins جداسازی‌شده از نارنگی (FJ010318) و جوجوبا (*Simmondsia chinensis* (Link) C. K. Schneid.) (GU 126378) نشان دادند (Fan *et al.* 2017).

آزمون بیماری‌زایی

در آزمون بیماری‌زایی به دلیل عدم اسپوردهی قارچ در محیط کشت از قطعات میسیلیومی روی میوه انار استفاده شد. بعد از گذشت ۴۵ روز لکه‌های نکروزه در قسمت خراش‌ها بوجود آمد که در کشت دوباره، قارچ مورد نظر بازیابی شد (شکل ۳).



شکل ۳- آزمون بیماری‌زایی *Elsinoë punicae* روی میوه انار (رقم یزد) در شرایط آزمایشگاه. A. تیمار شاهد تلقیح شده با محیط کشت PDA (بدون علایم). B و C. میوه های تلقیح شده با سوسپانسیون اسپور و میسیلیوم و توسعه علایم بیماری بعد از ۴۵ روز نگهداری.

Fig 3. Pathogenicity assay of *Elsinoë punicae* on pomegranate fruit (Cultivar Yazd) under laboratory conditions. A. Control treatment inoculated with PDA culture medium (no disease symptoms). B, C. Fruits inoculated with spore and meylecial suspenstion and development of disease symptoms after 45 days of incubation.

بحث

هدف اصلی این تحقیق شناسایی عامل عارضه بد شکلی گل و میوه انار در استان‌های گلستان و مازندران بود که اکنون به نام اسکب انار شناخته می‌شود. تمام اعضای جنس *Elsinoë* انگل‌های گیاهی بوده و باعث ایجاد بیماری در بسیاری از گیاهان شامل محصولات اقتصادی مهمی مانند مرکبات، انگور و گیاهان زینتی، محصولات زراعی و سایر میزبان‌های درختی می‌شوند. بسیاری از گونه‌ها علایمی ایجاد می‌نمایند که به علت ایجاد بافت‌های نکروتیک چوپ پنبه‌ای به‌راحتی قابل تشخیص هستند. این علایم غالبا برجسته و همراه با ترک‌هایی هستند که اسکب نامیده می‌شوند. البته در میزبان‌های دیگر علایم ناشی از آلودگی متفاوت بوده و آنتراکنوز نامیده می‌شود Fan *et al.* (2017). با این وجود استفاده از نام آنتراکنوز برای بیماری‌های ناشی از *Elsinoë* گمراه کننده است چرا که آنتراکنوز بیشتر برای بیماری‌هایی استفاده می‌شود که عامل آنها قارچ *Colletotrichom* است.

هرچند شناسایی علایم اسکب ساده به نظر می‌رسد، با این‌حال بررسی جدایه‌های جمع‌آوری‌شده از باغ به علت عدم وجود ساختارهای بارور قارچ مشکل است. به‌علاوه جداسازی *Elsinoë* در شرایط آزمایشگاه به علت رشد بسیار کند سخت بوده و غالبا قارچ‌های ساپروفیت به خاطر سرعت رشد بیشتر مانع از رشد این قارچ می‌شوند. بنابراین موفقیت در جداسازی و خالص‌سازی این قارچ‌ها نقش بسیار مهمی در تایید اسکب مشکوک یا لکه‌های ناشی از آنتراکنوز که اتیولوژی آنها شبیه *Elsinoë* است، دارند (Fan *et al.* 2017).

در اواسط قرن بیستم علایم اسکب مهمترین ویژگی برای شناسایی و گزارش حضور قارچهای متعلق به *Elsinoë* و *Sphaceloma* در نظر گرفته شده است و اغلب گونه‌های جدید صرفا بر اساس علایم بیماری و میزبان گیاهی معرفی و توصیف شده‌اند. هرچند گونه‌های متعددی از جنس *Elsinoë* و یا فرم غیر جنسی آن *Sphaceloma* به عنوان عامل بیماری اسکب گزارش شده‌اند، فقط تعداد معدودی از آنها از نظر اقتصادی بیمارگرهای مهم به شمار می‌روند (Fan *et al.* 2017). بر اساس نظریه "یک قارچ یک نام" در مورد *Sphaceloma*/ *Elsinoë* اسم مرحله جنسی (*Elsinoë*) به عنوان اسم

معتبر برای این جنس انتخاب شده است (Rossman *et al.* 2015).

در این تحقیق هویت جدایه‌های قارچی مرتبط با علایم اسکب میوه انار، بر اساس داده‌های ریخت‌شناختی گونه *Elsinoë punicae* تشخیص داده شد. این گونه قبلا از روی انار از آرژانتین، ایتالیا و اخیراً از آفریقای جنوبی گزارش شده است (Fan *et al.* 2017). در این بررسی علایم بیماری فقط روی ساختارهای گل‌دهی و نهایتا روی میوه‌ها مشاهده گردید و علایمی روی برگ در درختان آلوده مشاهده نشد. با این وجود این گونه ابتدا از کشور آرژانتین و سپس از برزیل و ایتالیا به عنوان عامل لکه برگی جداسازی شده است (Bitancourt and Jenkins 1940). قارچ *Sphaceloma punicae* از روی زخم‌های شبیه اسکب میوه از کشور چین گزارش شد (Xiao-Hui *et al.* 2004). در هندوستان بصورت لکه‌های زنگ مانند روی میوه‌ها و برگ‌ها (Jamadar *et al.* 2011) قارچ *E. punicae* شناسایی و گزارش شد. اخیرا از آفریقای جنوبی (Fan *et al.* 2017 و Carstens *et al.* 2018) به عنوان عامل زخم و اسکب میوه انار گزارش شده است.

مقایسه داده توالی ناحیه ITS ایجادشده در این تحقیق با داده‌های توالی موجود در بانک ژن، گونه *E. punicae* را از گونه‌های *E. australis* و *E.genipae-americanae* Fan & Crous تفکیک نکرد. نتایج این بررسی با نتایج فان و همکاران (Fan *et al.* 2017) مطابقت داشت. با این وجود اخیرا کارستنس و همکاران (Carstens *et al.* 2018) براساس داده‌های توالی چند ژنی، نشانگرهای مولکولی، آزمون بیماری زایی و دامنه میزبانی *E. punicae* را از دیگر گونه‌ها تفکیک کرده‌اند.

گونه *E. australis* به همراه گونه *E. fawcettii* Bitanc. & Jenkins در مرکبات عامل بیماری اسکب هستند. بیماری اسکب یکی از مهمترین بیماری‌های مرکبات در بسیاری از کشورهای تولید کننده مرکبات با شرایط آب و هوایی مرطوب به شمار می‌رود. این دو گونه تاکنون از ایران گزارش نشده‌اند و در لیست بیمارگرهای قرنطینه واقع شده‌اند. علیرغم کشت توام مرکبات و انار در دو استان گرگان و مازندران، علایم بیماری اسکب فقط در باغات انار مشاهده گردید. با وجود تشابه توالی ناحیه ITS گونه *E. punicae* با گونه *E. australis*، این دو گونه بر اساس دامنه میزبانی از همدیگر قابل تفکیک هستند (Carstens et al. 2018). گونه *E. australis* عامل بیماری اسکب در Sweet ornage می‌باشد و با نام اختصاری اسکب نارنگی شیرین (SOS) شناخته می‌شود. این گونه اخیرا از (*Citrus australasica* (F. Muell.) (Australian finger lime) و (جوجوبا) گزارش شده است و براساس آزمون بیماری زایی و دامنه میزبانی به عنوان دو پاتوتیپ جدید از این گونه معرفی شده‌اند (Miles *et al.* 2015). گونه *E. fawcettii* در *Citrus* ایجاد بیماری اسکب می‌کند و دامنه میزبانی وسیعتر و تعداد پاتوتیپ‌های بیشتری دارد (Hyun *et al.* 2001, 2009; Wang *et al.* 2009; Hou *et al.* 2014). به کمک مارکرهای مولکولی RAPD و RFLP سطوح مختلف تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌های میزبانی برخی از گونه‌های *Elsinoë* نشان داده شد (Alvarez *et al.* 2003).

در بسیاری از موارد اسکب روی محصولات در مرحله برداشت نیز دیده می‌شود و موجب کاهش بازارپسندی محصولات نهایی می‌گردد (Swart *et al.* 2001). البته اسکب انار در شرایط استان گلستان و مازندران هم در باغ و هم در زمان برداشت صدمه ایجاد می‌نماید. چون درخت انار دو تا سه بار در فصل بهار گل‌دهی می‌کند چنانچه گل-های ابتدایی آلوده شوند دچار بدشکلی شده و گل تلقیح

نشده و هیچ میوه ای تشکیل نمی‌شود. در باغاتی که تغذیه خوبی داشته باشند گل‌های بارور دوم یا سوم نیز تشکیل می‌شوند که آلودگی این گل‌ها در دماهای بالاتر منجر به بدشکلی نشده و بر روی میوه‌ها نیز توسعه می‌یابد. میوه-های لکه دار دانه‌های سالمی داشته و فقط در زیر لکه‌ها دانه‌ها کمی سفید می‌گردند. با این‌حال وجود این لکه‌ها موجب کاهش ارزش بازاری محصول می‌شوند. توسعه کشت انار در استان‌های مازندران و گلستان که دارای شرایط آب و هوایی گرم و مرطوب هستند به گسترش بیماری کمک نموده است در حالیکه عوارض این بیماری قبلا از مناطق اصلی انارکاری ایران مثل خراسان رضوی و استان مرکزی گزارش نشده است. با شناسایی عامل بیماری در پژوهش حاضر، تحقیقات تکمیلی درخصوص چرخه بیماری، پراکنش عامل بیماری، تنوع ژنتیکی داخل جمعیت‌های بیمارگر و مدیریت این بیماری امکان‌پذیر خواهد بود.

منابع

Alvarez E., Mejia J. F., and Valle, T. L. 2003. Molecular and pathogenicity characterization of *Sphaceloma manihoticola* isolates from south-central Brazil. Plant Disease 87:1322-1328.

Archana B.C. and Jamadar M.M. 2014. Management of leaf spot and fruit spot/rot of pomegranate (*Punica granatum* L.) caused by *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler. Karnataka Journal of Agricultural Science 27 (2): 247-249.

Bakhshi M., Arzanlou M., Babai-Ahari A., Groenewald J.Z and Crous P.W. 2014. Multi-gene analysis of *Pseudocercospora* spp. from Iran. Phytotaxa 184 (5): 245–264.

Biale J.B. 1981. Respiration and ripening in fruits- retrospect and prospect. In J. Friend and M.J. Rhodes (Eds.), Recent advances in the biochemistry of fruits and vegetables. London: Academic Press, pp: 1-39.

Bitancourt A.A. and Jenkins A.E.1940. New discoveries of Myriangiales in the Americas.

Carstens E., Shaun D. L, Romain P., Wilhelm L., Jakobus J. S., Carolien M. B., Elrita V., Paul H. F., Vaughan H. and Lizel M. 2018. *Elsinoë punicae* causing scab of pomegranates in South Africa does not cause disease on citrus. Australian Plant Pathology 47: 405-411

Chupp C. 1954. A monograph of the fungus genus *Cercospora*. Ithaca, New York, 667 pp.

Deighton F.C.1976. Studies on *Cercospora* and allied genera. VI. *Pseudocercospora* Speg., *Pantospora* Cif. And *Cercoseptoria* Petr. Mycological Papers 140: 1–168.

Faedda R., Granata G., Massimino Cocuzza G. E., Lo Giudice V., Audoly G., Pane A., and Cacciola S.O. 2015. First Report of Heart Rot of Pomegranate (*Punica granatum*) Caused by *Alternaria alternata* in Italy. Plant Disease 99(10): 1446.

Fan X.L., Barreto R.W., Groenewald J.Z., Bezerra J.D.P., Pereira O.L., Cheewangkoon R., Mostert L., Tian C.M. and Crous P.W. 2017. Phylogeny and taxonomy of the scab and spot anthracnose fungus *Elsinoë* (*Myriangiales*, *Dothideomycetes*). Studies in Mycology 87:1-41.

Harde H., Schumacher W., Firbas F. and Deffer D. 1970. Strasburg's Textbook of Botany. Chaucer, London.

Hou X., Huang F., Zhang T., Xu J., Hyde D.K. and Hong-ye L. 2014. Pathotypes and genetic diversity of Chinese collections of *Elsinoë fawcettii* causing citrus scab. Journal of Integrated Agriculture 13:1293–1302.

Hyun J.W., Timmer L.W., Lee S.C., Yun S.H., Ko S.W. and Kim K.S. 2001. Pathological characterization and molecular analysis of *Elsinoë* isolates causing scab diseases ofcitrus in Jeju Island in Korea. Plant Disease 85:1013–1017.

Hyun J.W., Yi S.H., Mackenzie S.J.,Timmer L.W., Kim K.S., Kang S.K., Kwon H.M. and Lim H.C. 2009. Pathotypes and genetic relationship of worldwide collections of *Elsinoë spp.* causing scab diseases of citrus. Phytopathology 99:721–728

Jamadar M.M., Sataraddi A.R. and Patil P.V. 2011. Status of pomegranate diseases of Northern Karnataka in India. Acta Horticulturae 890: 501–507.

Moller E.M., Bahnweg G., Sandermann H. and Geiger H.H. 1992. A simple and efficient protocol for isolation of

high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. Nucleic Acids Research 20(22):6115-6116.

Morton J.F. 1981. Atlas of Medicinal Plants of Middle America. Library of Congress cataloging in Publication Data. Thomas books. 1420 p.

Munhuweyi K., Lennox C.L., Meitz-Hopkins J.C., Caleb O. J. and Opara U.L. 2016. Major diseases of pomegranate (*Punica granatum* L.), their causes and management, review. Scientia Horticulturae 211: 126-139

Palou L., Taberner V., Guardado A., Del Río M. Á. and Montesinosherrero C. 2013. Incidence and etiology of postharvest fungal diseases of pomegranate (*Punica granatum* cv. Mollar de Elche) in Spain. Phytopathologia Mediterranea 52(3): 478−489.

Petersen Y., Mansvelt E.L., Venter E. and Langenhoven W.E. 2010. Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv.*punicae* causing bacterial blight on pomegranate in South Africa. Australasian Plant Pathology 39(6): 544-546.

Phengsintham P., Chukeatirote E., McKenzie E.H.C., Hyde K.D. and Braun U. 2011. Tropical phythopathogens 1: *Pseudocercospora punicae*. Plant Pathology and Quarantine 1(1): 1–6.

Rossman A.Y., Crous P.W. and Hyde K.D. 2015. Recommended names for pleomorphic genera in Dothideomycetes. IMA Fungus 6: 507–523.

Swart L., Crous P.W. and Kang J.C. 2001. Differentiation of species of *Elsinoë* associated with scab disease of *Proteaceae* based on morphology symptomatology and ITS sequence phylogeny. Mycologia 93:366–379.

Tziros G. T., Lagopodi A. L. and Tzavella-Klonari K. 2008 .*Alternaria alternata* fruit rot of pomegranate (*Punica granatum*) in Greece. Plant Pathology 57(2): 379.

Vicent A., Mira J. L., Bartual J., Beltrán V., Taberner V. and Palou L. 2016. First Report of Black Heart of Pomegranate Caused by *Alternaria alternata* in Spain. Plant disease 100(9):1952.

Wang L., Liao H., Bau H. and Chung K. 2009 Characterization of pathogenic variants of *Elsinoë fawcettii* of citrus implies the presence of new pathotypes and cryptic species in Florida. Canadian Jornal of Plant Pathology 31:28–37.

Xiao-Hui Z., Yan-Yu Y. and Biao X. 2004. Pathogen of pomegranate Sphaceloma scab. Journal of Yunnan Agricultural University. 19: 498–499 (translated from Manderin).