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

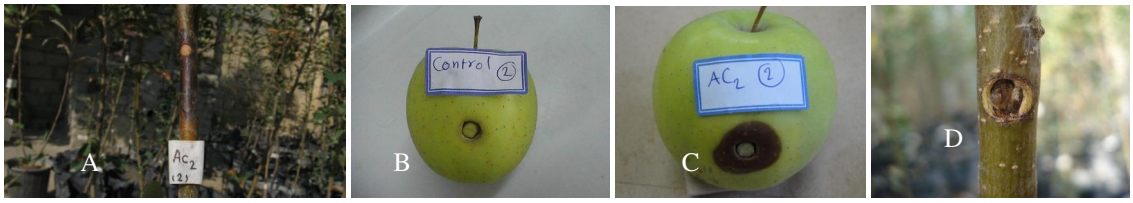
۴- گروه علوم زیستی، دانشکده علم و صنعت، دانشگاه جدید لیسبون

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 کاملا 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 ریسه انجام گرفت. برای القای تشکیل اندام‌های باردهی غیر جنسی، از روش سوزن کاج قرار گرفته روی محیط کشت آب آگار ۲ درصد استفاده گردید. تشتک‌های 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 ترادف یابی 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. کنیدیوماتاها 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 × ۵- ۲/۵ میکرومتر هستند. کنیدی‌زایی در یک سطح با قطور شدگی حاشیه‌ای (Priclinal) و یا به‌صورت 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 (ندرتا ۲ دیواره عرضی) و به ابعاد ۱۶-۱۱ × ۳۴-۱۹/۵ میکرومتر می‌باشند (شکل ۱). جستجوی بلاست توالی به‌دست 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 صورتی‌که 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 صورتی‌که در تیمار شاهد هیچ‌گونه علائم پوسیدگی یا تغییر رنگ ایجاد نگردید (شکل ۲). از بافت‌های تازه آلوده شده و دارای نشانه‌های سیاه شدگی پوست در نهال‌ها و میوه‌ها، بعد از عمل ضد عفونی سطحی، عمل جداسازی و شناسایی قارچ مجددا 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 علایم و با بافت کالوز در حاشیه محل تلقیح، C) روی میوه سیب رقم گلدن، D) تیمار شاهد بدون علایم 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.

Iran. J. Plant Path., Vol. 49, No. 2, 2013:83-84

Short Report

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

S. HANIFEH[1], Y. GHOOSTA[2], S. ABBASI[3] and A.J.L. PHILLIPS[4]

1.Dept. of Plant Protec., College of Agric., Kurdistan Unive., Sanandaj, Iran.
2. Dept. of Plant Protec.College of Agric., Urmia Univ., Urmia, Iran.
3. Dept. of Plant Protec., College of Agric., Razi Univ. of Kermanshah, Kermanshah, Iran.
4. Centro de Recursos Microbiológicos, Departamento de Ciências da Vida, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboan.

Abstract

In summer of 2009, a disease with symptoms such as stem and trunk cankers were seen in apple Golden Delicious cultivars trees in west Azerbaijan orchards. The disease was in progress due to environmental stresses such as drought and frostbite. Bark and vascular system of the tree was darkened at the site of infection and cankers were scaling on main trunk and branches. To isolation of the fungi, infected tissues were surface sterilized for 3 min in 70% ethanol and were washed 3 times with sterile distilled water. Pieces were taken from sterilized tissues and were transferred to PDA, and then were kept at 25 °C, in the dark. The growing fungi were purified by hyphal tip method. To induce the formation of asexual fruiting bodies, the method of using pine needles were used. Inoculated Petri plates were kept for 4 weeks at 25 °C under near-ultraviolet light (near-UV) with 12:12h photoperiod to produce the pycnidia (Pavlic *et al*. 2008). Different macroscopic and microscopic characters such as color and growth characteristics of colony, color, shape and dimensions of conidium, conidiogenous cell and pycnidium were studied. Also, the ITS region of one selected isolate was amplified and sequenced. Based on morphological and ITS sequence analysis, *Diplodia malorum* was identified. Descriptive characters of the species are as: Colony at first white, after two weeks turned to olive buff to olive greenish and finally after three weeks became dark. Conidiomata pycnidial, 600 × 500 mm in diameter, solitry or aggregated, spherical to oblong, dark brown to black, immersed, partially erumpent when mature. Conidiogenous cells hyaline, smooth, cylindrical, swollen at the base, 7 - 16 × 2.5 - 5 µm, proliferating at the same level to produce periclinal thickening, or proliferating percurrently, giving rise to 2-3 annelations. Conidia aseptate, thick-walled, smooth outer surface and verruculose inner surface, oblong to cylindrical with broadly rounded ends, hyaline, becoming dark brown and 1-septate after release from the pycnidium (rarely two septum), 17.5-34 × 11-16 µm. The results of Blast search showed high similarity (100 percent) of the studied isolate with the isolates belong to *Diplodia malorum* deposited in Gene bank(Phillips *et al*. 2012). The pathogenicity tests were carried out on potted 2 years old seedlings and fruits of apple Golden cultivar based on completely randomized design. After eight weeks post inoculation, symptoms of bark darkening and canker were seen in inoculated areas. In fruits, six days after inoculation the brown rot symptoms were seen in the inoculated area which was progressed into the fruit flesh. In the controls, no symptoms were developed. Reisolation and identification of the inoculated fungi were done from the newly infected tissues and fulfilled Koch's postulates. To our knowledge, this is the first report of isolation and pathogenicity confirmation of *Diplodia malorum* from apples in Iran.

References

PAVLIC, D., WINGFIELD, M.J., BARBER, P., SLIPPERS, B., HARDY, G.E.S.J. and BURGESS, T.I. 2008. Seven new species of the Botryosphaeriaceae from baobab and other native trees in Western Australia. **Mycologia** 100: 851-866.

PHILLIPS, A.J.L., LOPES, J., ABDOLLAHZADEH, J., BOBEV, S. and ALVES, A. 2012. Resolving the *Diplodia* complex on apple and other Rosaceae hosts. **Persoonia** 29: 29-38.