رشد و اسپورزایی چند جدایه از قارچ *Gnomonia leptostyla* در محیط‌های کشت مختلف

سلیمان جمشیدی[1] و سیامک صلاحی[2]

چکیده

آنتراکنوز گردو شایع‌ترین بیماری قارچی بر روی گردوی معمولی در ایران می‌باشد که توسط قارچ *Gnomonia leptostyla* حادث می‌شود. در این تحقیق تأثیر محیط کشت‌های BAB، OMA، MA، NA، PDA، CMA، WLEA و WLEOMA بر رشد و اسپورزایی این قارچ مورد بررسی قرار گرفت. سه نمونه برگی از مناطق میانه (No_1)، مرند (DV) و کرج (Md_1) انتخاب و قارچ پس از جداسازی بر روی محیط‌های ذکر شده با سه تکرار انتقال داده شد. محیط‌های کشت‌ها در آزمایشگاه با دمای ۲۱ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۵۰ درصد و دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شده و پس از طی زمان‌های ۳،۲، ۶، ۹، ۱۴ و ۲۱ روز، ویژگی‌های کلنی‌های رشد یافته از قبیل حداکثر قطر کلنی، الگوی رشدی، تراکم میسلیومی، باروری جنسی و غیرجنسی بررسی شد. جهت باروری پریتسیوم‌ها، کشت‌های دارای پریتسیوم نابالغ به مدت سه ماه در شرایط دمایی ۴ درجه و تاریکی مطلق نگهداری شدند. تفاوت قابل توجهی از لحاظ مورفولوژی، رنگ و یا الگوی رشد کلنی ها در بین جدایه‌ها مشاهده نشد. اما تفاوت‌هایی در سرعت رشد و میزان و کیفیت اسپورزایی وجود داشت. جدایه Md_1 پرتیسیوم‌های نابالغی را بر روی محیط کشت‌های فاقد عصاره برگ گردو به وجود آورد، در حالی‌که سایرین قادر به تولید آن نبودند. No_1 به اندازه DV و Md_1 روی محیط کشت PDA، WA، CMA و OMA آسروول‌زایی نکرد. با این‌حال، تمامی جدایه‌ها توانستند به‌راحتی روی هر دو محیط WLEA و WLEOMA آسروول و پرینسیوم نابالغ تولید کنند. ضعیف‌ترین محیط کشت BAB بود. WA مناسب‌ترین محیط کشت برای جداسازی قارچ تشخیص داده شد. قارچ در محیط کشت OMA بیشترین سرعت رشد را داشت و بر روی محیط PDA متراکم‌ترین حالت از میسلیوم‌ها حاصل شد. اسپورزایی غیرجنسی و جنسی در محیط‌های کشت حاوی عصاره برگ گردو بهتر انجام شد. در هیچ یک از جدایه‌ها و محیط‌های کشت پس از ۳ ماه بلوغ پریتسیوم‌ها اتفاق نیافتاد.

واژه‌های کلیدی: آنتراکنوز گردو، محیط کشت، اسپورزایی، جدایه

تاریخ دریافت مقاله: ۸۷/۷/۱۳ تاریخ پذیرش: ۸۷/۷/۲٤

۱- عضو هیأت علمی و عضو باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد اسلامی واحد میانه s.jamshidi@m-iau.ac.ir

۲- عضو هیأت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد میانه salahi@m-iau.ac.ir

مقدمه و بررسی منابع

گردوی ایرانی[1] به عنوان یکی از کهن‌ترین درختان بومی کشور، علاوه بر ارزش غذایی بسیار بالا، دارای مصارف عمده صنعتی بوده و از اهمیت اقتصادی زیادی برخوردار است. ایران بعد از چین و ایالات متحده، سومین تولیدکننده گردو در دنیا به شمار می‌رود (۱۲). بیماری آنتراکنوز گردو از مهم‌ترین بیماری‌های باغات گردو در نواحی مختلف جهان از جمله آمریکای شمالی و جنوبی، نواحی گسترده‌ای از اروپا و نیز قسمت‌های وسیعی از آسیا می‌باشد (۱۳و۵). در ایران این بیماری در اغلب نواحی شمال و غرب و شمال‌غرب کشور و تا حدی در بخش‌های شرقی انتشار داشته و به ویژه در فصل‌های پرباران و خنک خسارت عمده‌ای را به این محصول وارد می‌کند (۱۰و٤،٥،٦،٧،٨،٢،٣). عامل این بیماری قارچ *Gnomonia leptostyla* (Fr.) Ces. & De Not. 1863 با فرم غیرجنسی *Marssonia juglandis* (Lib.) Sacc. 1884 می‌باشد (۱۳و۵).

صارمی و همکاران (۱۳۸۱) جداسازی و رشد این قارچ را روی محیط‌های کشت سیب زمینی دکستروز آگار، آگار مغذی و آرد ذرت آگار در دمای ۲۰ و ۲۵ درجه سلسیوس با دوره نوری متناوب انجام داده و کلنی‌های سفید مایل به خاکستری به‌دست آورده و محیط آرد ذرت آگار را برای رشد سریع قارچ مناسب‌تر یافتند (۹). ایرانی و همکاران (۱۳۸۵) از محیط کشت آرد ذرت آگار برای کشت این قارچ استفاده نموده و کلنی‌های سفید رنگ، شعاعی و بعضاً به صورت دوایر متحدالمرکز به‌دست آوردند (۱). صلاحی (۱۳۸۵) با بررسی محیط‌های کشت آب آگار، سیب‌زمینی دکستروزآگار، عصاره مالت آگار، آرد یولاف آگار، آرد ذرت آگار و محیط آگاردار حاوی عصاره برگ گردو، بهترین محیط کشت را آرد یولاف آگار تشخیص داد (۱۱).

متیونی و نیلی (۱۹۷۹) به بررسی رشد و اسپورزایی و هتروتالیسم[1] در *G.leptostyla* پرداختند. این قارچ در دمای ۲۲ درجه سلسیوس و PH ٥/٤ بهترین رشد را داشت. روی محیط کشت آرد یولاف آگار در دمای ۲٦ درجه سلسیوس و PH ٦/٨ بیشترین اسپورزایی را انجام داد. نور سبب افزایش رشد رویشی شده و تولید کنیدیوم‌ها و آسروول‌ها را نیز افزایش داد. پریتسیوم‌های بارور در محیط آزمایشگاهی بعد از کشت تلاقی‌های دو تیپ آمیزشی[2] در تاریکی و دمای ۱۰ درجه سلسیوس و در عرض سه ماه به‌دست آمد (۱۹).

فایرت (۱۹۷٤) ضمن مطالعه رفتار قارچ در محیط کشت مصنوعی نشان داد که تشکیل پریتسیوم در صورتی که قارچ در زمان رشد فعال بخش رویشی در معرض نور باشد، متوقف می‌شود (۱٦). هم‌چنین فایرت و همکاران (۱۹۷٦) دریافتند که پریتسیوم‌ها در دمای ۲۰ درجه سلسیوس نابالغ باقی می‌مانند. وی عنوان نمود که سرما برای تکامل سلول‌های دیکاریوتیک اولیه لازم است (۱۷). فایرت (۱۹۷۷) اثر فاکتورهای غذایی بر رشد و القای ایجاد اندام‌های تولیدمثلی در آزمایشگاه بر قارچ *G. leptostyla* را آزمود. این قارچ بر روی محیط‌های غذایی معدنی با افزودن ۵ گرم در لیتر گلوکز ، ۰/٤۷۵ گرم آسپارتیک اسید ، ۱۰۰ میکروگرم تیامین و ۵ میکروگرم بیوتین، از رشد و تمایزیابی خوبی برخوردار بود. بالغ شدن پریتسیوم‌ها در دماهای پایین ۱۰ درجه سلسیوس

1. *Juglans regia*

1. Heterothalism
2. Mating type

صورت می‌گرفت. هم‌چنین هتروتروفی نسبت به تیامین مشاهده شد و نیز نشان داده شد که نور سبب تشکیل کنیدی‌ها شده و از تشکیل پریتسیوم‌ها جلوگیری می‌کند. برخی اسیدهای آلی مثل استات و سوکسینات دارای اثر مشابهی در تاریکی بودند (۱۶). فایرت (۱۹۷۷) بالغ شدن پریتسیوم‌ها را منوط به دماهای پایین ۱۰ درجه سلسیوس اعلام کرد. وی هم‌چنین نشان داده شد که نور سبب تشکیل کنیدی‌ها شده و از تشکیل پریتسیوم‌ها جلوگیری می‌کند. برخی اسیدهای آلی مثل استات و سوکسینات اثر مشابهی در تاریکی داشتند (۱۶). ایرانی و همکاران (۱۳۸۵) پریتسیوم‌های قارچ را در طبیعت در برگ‌های ریخته شده در شرایط سرمای شدید مشاهده کرده‌اند (۱). باب الحوائجی (۱۳۸۵) روند آزاد شدن آسک ها از آسکوکارپ را در شرایط طبیعی بررسی نمود (۳). صلاحی (۱۳۸۵) در هر دو محیط طبیعی و مصنوعی با پریتسیوم‌های نابالغ و بارور مواجه شد (۱۱). بلیساریو (۲۰۰۲) اعلام کرد که این قارچ اساساً هتروتال است ولی هموتالیسم نیز در آن دیده شده است (۱۴). بلیساریو (۲۰۰۷) ضمن اعلام هموتال بودن جدایه‌ها، مشاهده نمود که تنها ۶ جدایه از بین ۳۸ جدایه هموتال قادر به تولید پریتسوم بالغ در شرایط نگهداری در دمای ده درجه به مدت سه ماه در تاریکی می باشند (۱۳).

کشت بهینه قارچ در محیط‌های کشت مصنوعی اغلب در راستای جداسازی، شناسایی و تهیه مایه تلقیح برای آزمون‌های ارزیابی مقاومت و تحمل ارقام و نیز بررسی‌های ساختار ژنتیکی حایز اهمیت است (۱۸).

با توجه به عدم انجام تحقیقی جامع در زمینه تأثیر محیط‌های کشت، این آزمایش با هدف یافتن بهترین محیط کشت برای رشد و اسپورزایی جنسی و غیرجنسی این قارچ انجام گردید.

مواد و روش‌ها

برای جداسازی قارچ عامل بیماری، سه نمونه برگی آلوده به بیماری آنتراکنوز گردو از مناطق میانه، کرج و مرند انتخاب و به مدت ۶۰ دقیقه به منظور پاکسازی سطحی با آب جاری معمولی شستشو گردید. برگ‌های خیس خورده به قطعاتی به اندازه تقریبی ۱۰ میلی‌متر مربع که در برگیرنده مرز بین بخش نکروزه و بخش به ظاهر سالم برگ بود، تقسیم شدند. این قطعات برگی جهت ضدعفونی سطحی در هیپوکلریت سدیم ۱٪ و الکل اتیلیک ۷۰٪ به ترتیب به مدت دو و یک دقیقه قرار گرفته و سه بار در آب مقطر استریل به مدت یک دقیقه در هر بار شستشو داده شدند. نمونه‌های برگی ضدعفونی شده روی کاغذ صافی استریل به مدت یک دقیقه رطوبت‌زایی شده و ۱۲ قطعه از هر نمونه انتخاب و به پتری دیش حاوی ۳۸ گرم محیط کشت آرد یولاف آگار، ۲۰ گرم آرد یولاف + ۱۸ گرم آگار در لیتر انتقال داده شدند. پس از ۴ روز نگهداری محیط های کشت در شرایط دمایی ۲۱ درجه سلسیوس، ۳۰ درصد رطوبت نسبی و دوره نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی، رشد قارچ به صورت کلنی‌های سفید رنگ در اطراف قطعات برگی مشاهده گردید.

محیط‌های کشت PDA[1]، NA[2]، MA[3]، CMA[4]، WA[5]، OMA[6]، WLEA[7] (۱۵۰ میلی‌لیتر عصاره

1. Potato Dextrose Agar
2. Nutrient Agar
3. Malt Agar
4. Cornmeal Agar
5. Water Agar
6. Oatmeal Agar
7. Walnut Leaf Extract Agar

۵ گرم برگ دم کرده گردو + ۲ گرم آگار)، WLEOMA[1] (۱۵۰ میلی‌لیتر عصاره ۵ گرم برگ دم کرده گردو + ۵/۵ گرم آرد یولاف آگار)، BAB[2] تهیه گردید. کلیه محیط‌های کشت تولید کمپانی مرک[3] آلمان بود. ۹ پتری دیش با قطر دهانه ٦ میلی‌متر انتخاب گردید و برای ریختن مقدار حدود ۱۰ میلی‌لیتر از هر یک از محیط‌های کشت استفاده شد.

از هر یک از جدایه‌های No_1، DV و Md_1 (به ترتیب جدایه‌های به‌دست آمده از مناطق میانه، کرج و مرند) دیسک‌های ۷ میلی‌متری برداشته شده و در شرایط استریل با سه تکرار بر روی محیط‌های کشت قرار داده شدند. تشتک‌های پتری در شرایط دمایی ۲۱ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۵۰ درصد و ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی در ژرمیناتور قرار گرفته و ٤٨، ٩٦ ساعت و ٦، ٩، ١٤ و ٢١ روز بعد ویژگی‌های آن‌ها از قبیل حداکثر قطر کلنی، الگوی رشدی، تراکم میسلیومی، باروری جنسی و غیرجنسی قارچ مورد بررسی قرار گرفت. جهت باروری پریتسیوم‌ها، محیط‌های کشت واجد پریتسیوم‌های نابالغ به مدت سه ماه در دمای ٤ درجه سلسیوس نگهداشته شده و هر ماه جهت رؤیت پریتسیوم بارور مورد بررسی قرار گرفتند. این آزمایش در قالب طرح آزمایشی کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. برای تجزیه واریانس داده‌ها از نرم‌افزار Mstatc استفاده شد و میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن گروه‌بندی شدند.

نتایج و بحث

تفاوت قابل توجهی از لحاظ مورفولوژی، رنگ و یا الگوی رشد کلنی‌ها در بین جدایه‌ها مشاهده نشد، ولی تفاوت‌هایی در سرعت رشد و میزان اسپورزایی وجود داشت. جدایه DV به طور معنی‌داری نسبت به دو جدایه دیگر، سرعت رشد کمتری داشت ($F=٦/٥٧$, $df=٢$, $P<٠/٠١$). جدایه Md_1 پرتیسیوم‌هایی را بر روی محیط کشت‌های فاقد عصاره برگ گردو به وجود آورد، در حالی‌که سایرین قادر به تولید آن نبودند. No_1 به اندازه DV و Md_1 روی محیط کشت PDA، WA، CMA و OMA آسروول‌زایی نکرد. با این‌حال، تمامی جدایه‌ها توانستند به‌راحتی روی هر دو محیط WLEA و WLEOMA آسروول و پریتسیوم تولید کنند. از این رو این دو به لحاظ دارا بودن عصاره برگ گردو، محیط‌های عمومی‌تری برای اسپورزایی قارچ بودند. رشد قارچ در محیط‌های کشت OMA، CMA، WLEA و WA بسیار سریع بود. بیشترین سرعت رشد کلنی روی OMA به‌دست آمد که بعد از ۲ هفته کلنی قارچی به اندازه ٦ میلی‌متر رشد نمود. کلنی‌ها روی محیط کشت OMA سفید بودند ولی بعداً به رنگ کرم مایل به خاکستری تمایل پیدا کردند.

محیط کشت BAB که ویژه قارچ‌های مخمری است، نتوانست رشد مناسبی از قارچ را سبب شود و ضعیف‌ترین محیط کشت برای رشد این قارچ بود. رشد کلنی‌ها تنها از روز ششم آغاز شد، در حالی‌که در سایر محیط‌های کشت رشد قارچ از روز دوم آغاز گردید. میانگین قطر کلنی‌ها ۲۱ روز بعد به ۱۲/٦٦ میلی‌متر رسید و رشد آن‌ها بعد از آن نیز متوقف شد (جدول۱). در سطح و نیز در اطراف محیط کشت اولیه از جنس OMA، هیف‌های ثانوی تیره و ضخیم‌تر و نیز آسروول‌هایی هر چند اندک و با اشکال نامنظم مشاهده گردید. کلنی‌ها سفید رنگ بوده و مرکز آن‌ها به‌دلیل حضور هیف‌های ثانوی ضخیم و

1. Walnut Leaf Extract Oat Meal Agar
2. Blood Agar base
3. Merk

رنگ‌دانه‌دار، تیره بود (شکلa –۱). در محیط کشت OMA قارچ از بیشترین سرعت رشد برخوردار بود. اضافه کردن عصاره برگی گردو سرعت رشد قارچ در همین محیط کشت را در ٤٨ ساعت اولیه تقریباً تا ۲ برابر کاهش داد (جدول۱). با این‌حال میزان اسپورزایی غیرجنسی در این محیط نسبت به محیط‌های کشت دارای عصاره برگی گردو و نیز PDA کمتر بود (جدول ۲ و شکل b–۱). در محیط کشت MA، قارچ ابتدا با هیف‌های بسیار کم تراکم رشد خود را آغاز نمود ولی رفته رفته کلنی‌ها متراکم‌تر شده و الگویی هر چند ضعیف از دوایر متحد المرکز در آن‌ها به‌وجود آمد. کلنی‌ها در حاشیه فاقد مرز مشخصی بوده و به صورت ابر مانند رشد نمودند. رنگ کلنی‌ها با افزایش سن به زرد تمایل یافت. اسپورزایی در این محیط به ندرت انجام شد و ساختارهایی شبیه به آسروول دیده شد، با این حال مشخصاً این محیط کشت جهت تحریک اسپورزایی قارچ مناسب نبود، با این‌حال تراکم مناسب میسلیومی از کلنی‌ها به دست آمد (جدول ۲ و شکل c–۱). در محیط کشت PDA کلنی‌ها از هیچ نوع مرزی در حاشیه برخوردار نبوده ولی دوایر متحدالمرکز مشخصی داشته و میسلیوم‌های بسیار متراکمی از قارچ بر روی محیط کشت تشکیل شد. رنگ کلنی‌ها در نواحی مربوط به مرز دوایر متحدالمرکز کاملاً زرد رنگ بود. اسپورزایی بر روی این محیط کشت با تراکمی زیاد صورت گرفت و آسروول‌های فراوان و تعدادی پریتسیوم نابالغ مشاهده گردید که آسک‌ها در آن‌ها تمایز لازم را پیدا نکرده بودند (شکل d–۱). از این محیط کشت می‌توان جهت موارد استخراج DNA از میسلیوم قارچی استفاده نمود، چرا که تراکم مناسب میسلیومی در این محیط حاصل شد.

در محیط کشت WA قارچ با هیف‌های بسیار غیرمتراکم رشد نمود به طوری که طرح و اندازه کلنی به‌راحتی قابل تشخیص نبود. اسپورزایی این قارچ تنها با تشکیل آسروول‌ها با تراکمی بسیار پایین انجام شد، با این‌حال این محیط برای رشد و اسپورزایی قارچ مناسب نبوده ولی به لحاظ ارزان بودن و آلودگی کمتر به قارچ‌های ساپروفیت می‌تواند محیطی مناسب برای جداسازی قارچ عامل بیماری از برگ‌های آلوده باشد. کلنی‌های قارچ در این محیط کشت با الگوی بادبزنی رشد نمودند (شکل e–۱). در محیط کشت CMA این قارچ از رشد نسبتاً سریعی برخوردار بود. به طوری‌که بعد از محیط‌های دارای OMA و نیز عصاره گردو سریع‌ترین رشد قارچ در این محیط به دست آمد. با این‌حال کلنی‌های به‌دست آمده دارای هیف‌های متراکمی نبودند و این محیط برای کشت‌هایی که در آن‌ها به‌دست آمدن میسلیوم مهم است مناسب می‌باشد. با این حال اسپورزایی بر روی این محیط نیز به خوبی صورت نگرفت و بلوغ آسروول‌ها با تأخیر انجام شد. الگوی رشدی در این محیط کشت نیز به شکل بادبزنی بود (شکل f–۱). قارچ در محیط کشت NA کلنی‌های زرد رنگی ایجاد کرد که رشد آن‌ها کند و محدود بود. در مرکز کلنی‌ها تراکم بیشتری از میسلیوم‌ها یافت شد و در حاشیه، هیف‌هایی با تراکم کم به‌دست آمد. اسپورزایی فقط اطراف محیط کشت اولیه در برخی کشت‌ها حاصل شد. در کل این محیط کشت برای رشد و اسپورزایی مناسب نبود. محیط کشت WLEA که تنها حاوی آگار و عصاره برگ خشک گردو بود رشد بسیار خوبی از قارچ را سبب گردید. این محیط کشت ارزان قیمت بعد از محیط‌های دارای OMA بهترین محیط کشت برای رشد و اسپورزایی قارچ بود. تنها

عیب این محیط کشت، خشک شدن آن قبل از محیط‌های کشت دیگر و نامناسب بودن آن برای نگهداری طولانی مدت قارچ برای تولید پریتسیوم‌های بالغ و غیره بود. با این حال جهت تحریک قارچ برای تولید آسروول و نیز تولید سریع میسلیوم و جداسازی قارچ توصیه می‌شود (شکل i-۱). در این محیط، قارچ با الگوی کاملاً متحدالمرکز رشد نمود. در محیط کشت WLEOMA نیز قارچ با سرعت مناسب رشد کرده و ساختارهای اسپوری تولید نمود. این محیط مدت زمان بیشتری قابل نگهداری بوده ولی به نظر می‌رسد که برخی مواد بازدارنده موجود در برگ گردو در ابتدا روی رشد اولیه قارچ تأثیر داشت. با این‌حال میزان اسپورزایی قارچ در این محیط بیش از OMA و کمتر از PDA بوده ولی سرعت خشک شدن آن کمتر از WLEA و بیشتر از OMA بود (شکل h-۱). اسپورزایی روی WLEOMA بعد از ۱۰ روز اتفاق افتاد. پس از ۲۱ روز پریتسیوم‌های نابالغ[1] روی OMA، WLEA، WA، PDA و CMA در جدایه Md_1 تشکیل شد. روی سایر محیط‌های کشت هیچ نوع تولیدمثل جنسی در هیچ یک از جدایه‌ها اتفاق نیافتاد. آسروول‌ها گرد تا بیضی شکل و یا به شکل نامنظم بوده و در محیط کشت مدفون و حاوی ماکروکنیدی و بدون میکروکنیدی بود. پریتسیوم‌های نابالغ به صورت نیمه فرورفته در محیط تشکیل شدند. تشکیل پریتسیوم در همان دمای مطلوب برای رشد قارچ اتفاق افتاد (۲۱ درجه سلسیوس و ۱۲ساعت روشنایی و ۱۲ساعت تاریکی) نه در شرایط سرمادهی. با این وجود در طی یک ماه پریتسیوم‌ها بالغ نشده و آسک آسکوسپور در آن‌ها دیده نشد. به علاوه تشکیل پرتیسیوم بدون انجام آمیزش بین تیپ‌های آمیزشی دلیل هموتال بودن جدایه‌ها بود. پریتسیوم‌ها طی ۱۰ الی ١٤ روز روی OMA تشکیل شدند در حالی‌که بر اساس گزارش متیونی و نیلی[1] (۱۹۷۹) تولید پریتسیوم ۳ ماه در شرایط ۱۰ درجه سلسیوس به طول انجامید (۱۸). فایرت (۱۹۷۷) گزارش نمود که تاریکی تشکیل و توسعه پرتیسیوم‌ها و تمایز آن‌ها را در دمای پایین ۱۰ درجه سلسیوس افزایش می‌دهد (١٦). دایره‌های متحدالمرکز روی WLEOMA مشخص‌تر از سایرین بود. اما این الگو روی WLEA، OMA، MA و نیز PDA نیز دیده شد. پس از گذشت یک ماه، محیط کشت WLEA خشک شد در حالی‌که سایرین هنوز تازه بودند. هیچ نوع آلودگی باکتریایی و قارچی روی محیط‌های کشت غذایی دیده نشد.

جدول۱ – میانگین قطر کلنی‌های *G. leptostyla* روی محیط‌های کشت مختلف پس از گذشت دوره‌های زمانی مختلف

محیط‌های کشت / دوره‌های زمانی	WLOMA	WLEA	OMA	WA	CMA	PDA	NA	MA	BAB
پس از ۲ روز	۸/۰۰* ^{b}	۹/۳۳ ^{c}	۱۵/۱۱ ^{e}	۹/۲۲ ^{c}	۱۰/۸۸ ^{d}	۷/۶۶ ^{b}	۷/۶۶ ^{b}	۷/۱۱ ^{b}	۰/۰۰ ^{a}
پس از ۳ روز	۱۷/۰۰ ^{ab}	۱۴/۵۵ ^{d}	۲۷/۰۰ ^{e}	۱۴/۶۶ ^{bc}	۱۵/۳۳ ^{cd}	۱۲/۵۵ ^{ab}	۱۲/۰۰ ^{c}	۱۲/۲۲ ^{b}	۰/۰۰ ^{a}
پس از ۶ روز	۲۶/۳۳ ^{e}	۲۱/۸۸ ^{d}	۳۶/۵۵ ^{f}	۱۸/۱۱ ^{cd}	۱۹/۴۴ ^{d}	۱۶/۷۷ ^{bc}	۱۴/۸۸ ^{b}	۱۵/۱۱ ^{b}	۹/۰۰ ^{a}
پس از ۹ روز	۳۵/۳۳ ^{h}	۳۱/۳۱ ^{g}	۴۳/۲۲ ^{f}	۲۲/۲۲ ^{d}	۲۷/۰۰ ^{e}	۲۱/۵۵ ^{cd}	۱۹/۰۰ ^{b}	۱۹/۵۵ ^{bc}	۹/۶۶ ^{a}
پس از ۱۴ روز	۴۴/۴۴ ^{e}	۴۱/۱۳ ^{e}	۴۹/۰۰ ^{f}	۲۹/۵۵ ^{c}	۳۴/۵۵ ^{d}	۲۹/۸۸ ^{c}	۲۳/۲۳ ^{b}	۲۹/۵۵ ^{c}	۱۰/۸۸ ^{a}
پس از ۲۱ روز	۵۵/۰۰ ^{g}	۴۸/۰۰ ^{f}	۵۵/۰۰ ^{g}	۳۰/۷۷ ^{d}	۴۳/۷۷ ^{e}	۴۱/۷۷ ^{e}	۲۴/۵۵ ^{b}	۳۶/۸۸ ^{c}	۱۲/۶۶ ^{a}

در هر ستون میانگین‌های دارای حروف مشابه در سطح ۱٪ با همدیگر اختلاف معنی‌دار ندارند.

1. Primordial perithecium

1. Matteoni and Neely

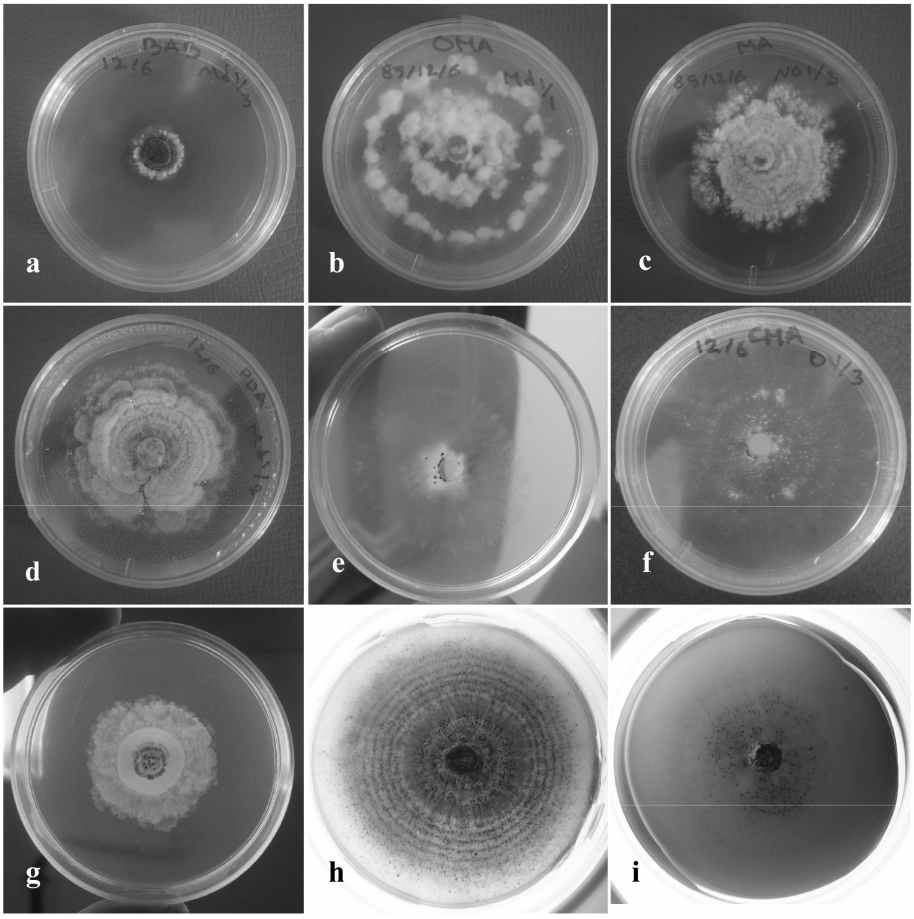
جدول۲- مشخصات جدایه‌های *G. leptostyla* روی محیط‌های کشت مختلف

ویژگی / محیط کشت	WLOMA	WLEA	OMA	WA	CMA	PDA	NA	MA	BAB
سرعت رشد	۲	۳	۱	۷	۴	۵	۸	۶	۹*
رشد اولیه	۵	۳	۱	۴	۲	۶	۶	۷	۸*
اسپورزایی	+++	+++	+++	+++	+++	+++	---	--+	---$
میزان اسپورزایی	۲	۳	۴	۶	۵	۱	۸	۷	۸*
تراکم میسلیومی	۳	۷	۲	۸	۹	۱	۵	۴	۶*
دوایر متحدالمرکز	+++	++	+	-	-	+	-	+	-#
مورفولوژی کلنی	مدور	مدور	مدور	بادبزنی	بادبزنی	مخملی	نیمرویی	مخملی	مخمری
رنگ کلنی	کرم	کرم	کرم	سفید	سفید	سفید	زرد	زرد کم‌رنگ	سیاه
خشک شدن محیط	-	+	-	-	-	-	-	-	-

* شماره‌ها نشان‌دهنده رتبه محیط کشت از لحاظ سرعت رشد کلنی و سرعت اولیه و میزان و تراکم میسلیومی است

$ (-) به معنی عدم اسپورزایی و (+) به معنی وجود اسپورزایی است. هر علامت + یا - به یک جدایه و به ترتیب به $\mathbf{No_1}$، **DV** و $\mathbf{Md_1}$ تعلق دارد.

(-) به معنی وجود دوایر متحد المرکز در کلنی‌ها و (+، ++ و +++) به معنی افزایش تعداد دوایر متحدالمرکز است

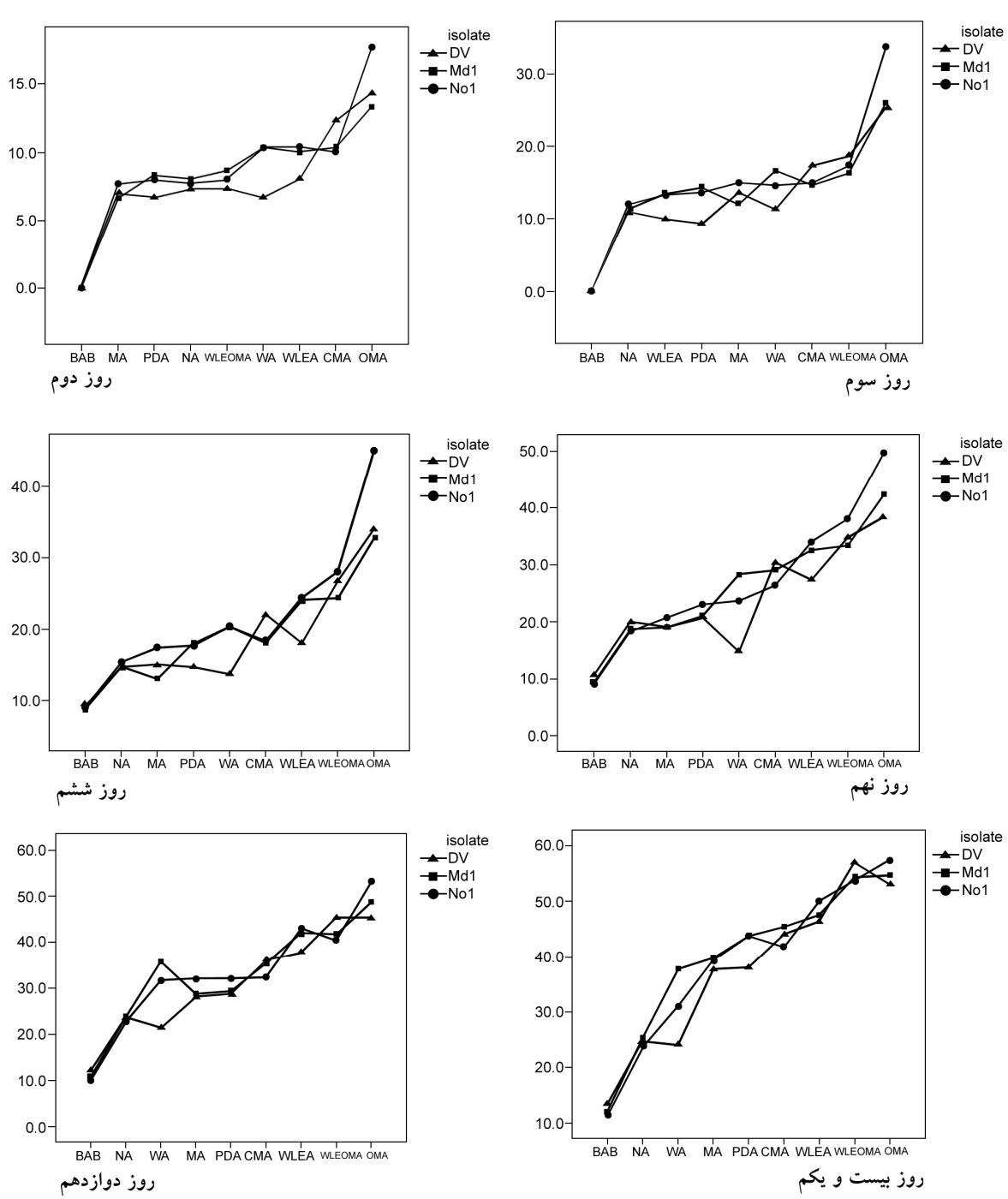


شکل۱- الگوی رشدی *G. leptostyla* بر روی محیط‌های مختلف رشد

a: BAB, b: OMA, c: MA, d: PDA, e: MA, f: CMA, g: NA, h: WLEA, i: WLEOMA

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به‌نتایج به‌دست آمده، محیط کشت BAB برای رشد قارچ مناسب نبوده و قابل توصیه نمی‌باشد. درحالی‌که بیشترین سرعت رشد قارچ روی محیط کشت OMA و متراکم‌ترین میسلیوم‌ها روی محیط کشت PDA مشاهده گردید. هم‌چنین محیط‌های کشت حاوی عصاره برگ گردو برای اسپورزایی غیرجنسی و جنسی قارچ مناسب‌تر بودند.



نمودار۱– روند رشدی سه جدایه از *G. leptostyla* بر روی محیط‌های کشت در طی روزهای مختلف

منابع

۱- ایرانی، ح.، پ. اسدی، م. ر. کریمی، ج. بلنداندام، ف. خسرو، ع. ر. ربیعی فر و ح. خباز. ۱۳۸۵. مطالعه بیماری آنتراکنوز گردو در ایران. هفدهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، صفحه ۳٦۲.

۲- ایرانی، ح. و ع. ر. ربیعی فر. ۱۳۷۹. مطالعه بیماری آنتراکنوز گردو در آذربایجان‌غربی، چهاردهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران. دانشگاه صنعتی اصفهان، صفحه ۳۳۱.

۳- باب الحوائجی، ف. و و. میناسیان. ۱۳۸۵. بررسی بیولوژی *Gnomonia leptostyla* عامل آنتراکنوز گردو در همدان. خلاصه مقالات هفدهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، صفحه ۳۱٤.

٤- بختیاری، م. ح. و ا. ارجمندیان. ۱۳۸۵. وقوع گسترده و مطالعه بیماری آنتراکنوز (لکه سیاه) گردو در استان همدان. هفدهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، صفحه ۳۱۵.

۵- بهداد، ا. ۱۳۷٦. دایره‌المعارف گیاه‌پزشکی ایران. انتشارات نشاط اصفهان، ۱٦۰۵-۱٦۰٤.

٦- جعفرپور، ب. ۱۳٦۹. بررسی آنتراکنوز گردو در مشهد. مجله علوم و صنایع کشاورزی، جلد٤. شماره۲، ٤۰-۳۱.

۷- ربیعی‌فر، ب. ۱۳۷۷. بررسی مقدماتی بیماری آنتراکنوز گردو در ایران. سیزدهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران، آموزشکده کشاورزی کرج، صفحه ۲۲۳.

۸- رزاز هاشمی، ر.، ع. علیزاده و ز. ذاکری. ۱۳۸۰. بررسی بیولوژی قارچ عامل بیماری آنتراکنوز. وزارت جهاد سازندگی، مرکز تحقیقات منابع طبیعی و امور دام استان قزوین، ۵۰ صفحه.

۹- صارمی، ح. و ر. رزاز هاشمی. ۱۳۸۱. بررسی بیماری آنتراکنوز گردو در مناطق شمال‌غرب کشور. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی، سال نهم، شماره ٤، ۱٤۱-۱۵۲.

۱۰- صارمی، ح. و ر. رزاز هاشمی. ۱۳۷۹. پراکنش و اپیدمی لکه سیاه گردو در غرب کشور. چهاردهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران. دانشگاه صنعتی اصفهان، صفحه۳۳۲.

۱۱- صلاحی، س.، م. جوان نیکخواه، ج. زاد، د. حسنی، ر. دستجردی و س. جمشیدی. ۱۳۸۵. پراکندگی و تعیین برخی خصوصیات جدایه‌های *Gnomonia leptostyla* در درختان گردوی استان آذربایجان‌شرقی. هفدهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، صفحه ۳٦۱.

۱۲- طباطبایی، م. و ع. احمدی. ۱۳۷۷. گردو، چاپ دوم. مؤسسه انتشارات جهاد دانشگاهی، ٤۰٦ صفحه.

13. Belisario, A., M. Scotton, A. Santori and S. Onofri. 2007. Variability in the Italian population of *Gnomonia leptostyla*, homothallism and resistance of *Juglans* species to anthracnose. Forest Pathology 38: 129–145.
14. Belisario, A. 2002. Anthracnose. In: Teviotdale, B.L., Michailides, T.J. and Pscheidt, J.W. (eds.): Compendium of nut crop diseases in temperate zones. USA, APS Press, pp. 77–78.
15. Fayret, J. 1974. Photoinhibition of perithecial formation during sexual morphogenesis in *Gnomonia leptostyla* (Fr.) Ces. & De Not. Compte rende hebdomadaires des seances de l'academie des sciences. Series D. Sciences Naturelles 278(23): 2909–2912.
16. Fayret, J. 1977. Effect of nutritional factors on the growth and induction of reproductive morphogeneses in vitro of *Gnomonia leptostyla*. Review of Mycology 41(1): 49–72.

17. Fayret, J., and A. Parguey Leduc. 1976. Heat inhibition of saprophyte development during ripening of perithecia of *Gnomonia leptostyla*. Review of Mycology 40(3): 245–253.
18. Matteoni, J. A., and D. Neely. 1979. *Gnomonia leptostyla*: growth, sporulation, and heterothallism. Mycologia 71(5): 1034–1042.