فصلنامه گیاه‌پزشکی
دانشگاه آزاد اسلامی شیراز
۱۳۹۷ - ۹ (۲) : ۱۲۱-۱۳۲

شناسایی و بررسی مولکولی عامل پوسیدگی پایه سیترنج در باغات مرکبات شرق استان مازندران

سید وحید علوی[۱]، فائزه فلکی[۲*]

(۱) بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان مازندران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ساری، ایران

(۲) (*) بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، faezehfalaki@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۸/۱۱ **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۸/۰۱/۱۹

چکیده

در سال‌های اخیر عارضه‌ای شبیه به گموز مرکبات با علائم پوسیدگی، جداشدن پوست از تنه، قهوه‌ای شدن پوست و لایه سطحی چوب متصل به آن، زردی و زوال روی پایه سیترنج درختان مرکبات در شرق استان مازندران مشاهده گردید. نمونه‌های مشکوک به آلودگی در مراحل مختلف رشد جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل گردید. پس از شستشوی سطحی نمونه‌ها با آب جاری و ضدعفونی سطحی با الکل اتیلیک ۷۰٪ ، قطعاتی از هر نمونه با تیغ استریل جدا و در محیط‌های غذایی PARPH و PDA کشت داده شد. روی محیط PARPH پرگنه قارچی رشد نکرد ولی روی PDA جدایه‌های قارچی با پرگنه‌های همگن از نظر شکل ظاهری به دست آمد که پس از خالص سازی، بیماریزایی جدایه‌ها با قرار دادن یک قطعه از محیط کشت حاوی ریسه در محل برش داده پوست نهال‌های سیترنج در شرایط گلخانه‌ای، موجب نکروز در محل مایه کوبی و پیشرفت آلودگی و زردی نهال‌های سیترنج تلقیح شده گردید. شاهد نهال سیترنج مایه کوبی شده با قطعه‌ای از محیط کشت PDA سترون تلقیح شده با جدایه‌های قارچی علائم آلودگی را نشان ندادند. جدایه‌های قارچ مورد بررسی در محیط آگار حاوی Foeniculum vulgare تولید پریتس کروی نمود. آسک‌های آن تک جداره، چماقی و بی رنگ بود. فرم غیرجنسی آن تولید کنیدیوماهایی با استرومای حقیقی، کنیدیوفورهای سیلندری شکل و پیکنید نمود. بر اساس نتایج به دست آمده، پرگنه‌های مورد بررسی با گونه Diaporthe novem Santos مطابقت داشت. استخراج DNA ژنومی جدایه‌های قارچی انجام و تکثیر با آغازگرهای نواحی ITS1، ITS4 و Bt صورت گرفت و قطعات به دست آمده تعیین توالی گردید. نتایج حاصل از تعیین توالی نیز گونه قارچی فوق الذکر را تأیید نمود. این اولین گزارش از بیماری پوسیدگی پایه سیترنج و شناسایی عامل آن در شمال ایران می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: سیترنج، مرکبات، پوسیدگی، مازندران

۱. مقدمه

ایران یکی از کشورهای عمده تولید کننده مرکبات در دنیاست که سالانه بیش از ۳/۵ میلیون تن انواع پرتقال و نارنگی تولید می‌کند(Tajvar *et al*., 2011). ازدیاد بذری مرکبات در جهان تا اواسط دهه ۱۸۰۰ میلادی متداول بوده ولی با شیوع بیماری پوسیدگی طوقه در سال ۱۸۴۲ در منطقه Azores آمریکا، باغداران اقدام به پیوند درختان خود روی پایه نارنج که به این بیماری مقاومت نشان می‌داد کردند(Golein & Adoli, 2011).

سیترنج‌ها دورگ‌های بین جنسی پرتقال و پونسیروس (Poncirus *trifoliata* (L.) Rat. × *Citrus sinensis* (L.) Osbeck) هستند (Fotouhi ghazvini & fattahi moghadam, 2010; Golein & Adoli, 2011). چندین نوع سیترنج تا کنون به عنوان پایه مورد ارزیابی و آزمون قرار گرفته‌اند که مهم‌ترین آن‌ها عبارتند از راسک، مورتون، سویج، بنتون، کاریزو و ترویر که دو نوع اخیر در سال ۱۹۰۹ از تلاقی پرتقال رقم واشنگتن ناول و پونسیروس به دست آمده‌اند و بیشتر از سایرین مورد استفاده قرار می‌گیرند. سیترنج‌ها به پوسیدگی فیتوفترایی نیز متحمل است ولی به نماتد مرکبات متحمل نیستند (Gharibi, 2009; Golein & Adoli, 2011).

از بیماری‌هایی که بر روی پایه‌های مرکبات گزارش شد می‌توان به پوسیدگی طوقه و پوسیدگی خشک اشاره کرد. بیماری انگومک که پوسیدگی طوقه نیز نامیده می‌شود مهمترین بیماری ناشی از تأثیر گونه‌های فیتوفتوراست که اولین بار در سال ۱۳۲۰ از ایران گزارش گردید و هم اکنون علاوه بر شمال در جنوب کشور نیز وجود دارد (Timmer *et al*., 2006; Elahinia, 2012). اخیراً یک زوال ویران کننده در بعضی باغات مرکبات که با پایه سیترنج احداث شدند، دیده شده است. *Fusarium solani* همواره از چوب تغییر رنگ داده درختان آلوده جداسازی می‌شود (Spina *et al*., 2008). فوزاریوم معمولاً به صورت زوال ریشه‌های بزرگتر وتنه در زیر ناحیه پیوند بدون ترشح هیچ صمغی، مانند پوسیدگی خشک ظاهر می‌شود. (Yaseen & D'Onghia, 2012).

گونه‌هایی از Diatrypaceae (Xylariales) به عنوان ساکنین چوب مرده و پوست گسترده‌ای از گیاهان در دنیا گسترش یافتند. یک تعدادی از این جنس‌ها در این خانواده به‌عنوان پاتوژن‌های بیمارگر شدید از چوب درختان باغی، جنگلی و زینتی گزارش شده است(Trouillas *et al*., 2011). جنس Diaporthe اولین بار توسط Nitschke (۱۸۷۰) انتشار یافت(Huang *et al*., 2013) *Diaporthe spp.* بر روی محدوده وسیعی از گیاهان میزبان مسئول بیماریزایی هستند. بعضی از نظر اقتصادی در سراسر دنیا مهم هستند مثل عوامل پوسیدگی ریشه و میوه، سرخشکیدگی، شانکرها، لکه برگی، سوختگی‌ها، زوال و پوسیدگی(Gomes *et al*., 2013). گونه‌های Phomopsis شکل غیر جنسی Diaporthe هستند، بنابراین بیشتر ادبیات قدیم و جدید که اطلاعات بیماریها با عامل Diaporthe گزارش شده می‌تواند تحت عنوان Phomopsis نیز بیان شود (Gomes *et al*., 2013؛ Huang *et al*., 2013). با استفاده از داده مولکولی، پیشرفت‌های زیادی به سمت شناسایی و توصیف پاتوژن‌های در حال ظهور صورت گرفت و اندوفیت‌ها و ساپروفیت‌های مرسوم در جنس Diaporthe قرار گرفتند(Udayanga *et al*., 2014). هدف از این بررسی شناسایی عامل عارضه پوسیدگی بر روی تنه سیترنج است.

۲. مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری در فصول مختلف سال از ناحیه پوسیده و تغییر رنگ یافته پایه درخت در زیر محل پیوند از باغات ساری، نکاء، قائم شهر صورت گرفت. این علائم شامل پوسته پوسته شدن تنه و تغییر رنگ در ناحیه پایه می‌باشد.

شکل ۱: علائم مشاهده شده در باغ

Fig. 1: Signs have been seen in the garden

در آزمایشگاه ابتدا نمونه‌ها زیر شیر آب شستشو شده و سپس به هود سترون منتقل و با اتانول ۷۰٪ ضد عفونی سطحی شد. از حد فاصل بافت سالم و تغییر رنگ یافته نمونه‌ها قطعات ۵-۳ میلی متری با تیغ سترون جدا شده و روی محیط کشت PDA و PARPH قرار داده شد و در دمای ۲۵ °C در انکوباتور به مدت سه روز نگهداری شد(Teymuri *et al*., 2013). خالص سازی جدایه‌های قارچی از طریق کشت مجدد نوک ریسه انجام شد(Peres *et al*., 2008). شناسایی جدایه‌ها براساس ویژگی‌های ریخت شناسی و رشدی آن بر روی محیط PDA صورت گرفت. اندازه‌های میکروسکوپی از ۲ تا ۳ سانتی متر میسیلیوم از حاشیه کلنی انجام شد. ویژگی‌های ریخت شناسی میکروبی از قبیل ساختار و اندازه کنیدیوفور، اندازه و تیپ‌های فیالید، وسعت تشکیل زگیل، و شکل و اندازه کنیدی از طریق مقدار آب اندازه گیری شد. اندازه‌گیری‌ها از هر نوع ساختار بوسیله میکروسکوپ نوری انجام شد(Arabnezhad & mohammadi, 2013).

آزمون بیماری‌زایی

ابتدا برش‌هایی بصورت زخم بر روی تنه نهال سیترنج ترویر بوسیله یک چوب پنبه سوراخ کن به ابعاد ۵ میلی متر ایجاد شد و سپس یک قطعه ۵ میلی متری آگار حاوی میسیلیوم قارچ مورد نظر از یک کشت ۱۰ روزه بر روی محل زخم قرار می‌دهیم. محل زخم بوسیله پنبه مرطوب و پارافیلم پیچیده شد. همچنین قطعاتی از آگار PDA استریل (بدون قارچ) نیز بر روی محل زخم چند نهال به عنوان کنترل قرار داده شد. نهال‌های سبز تلقیح شده در گلخانه‌ای با دمای ۲۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد. پس از ۲۰ روز محل زخم باز شد و محل مایه کوبی بررسی شد. از بافت نکروتیک شده حاشیه محل زخم بریده و بر روی PDA قرار داده شد و قارچ رشد کرده را با قارچ مایه‌کوبی شده مطابقت داده شد تا فرضیه کخ بدرستی انجام گردد(Arabnezhad & Mohammadi, 2013).

* شناسایی مولکولی جدایه‌ها

استخراج DNA

پس از رشد پرگنه هر یک از جدایه‌های خالص سازی شده، قطعه‌ای از ریسه آن به ارلن حاوی محیط کشت PDB منتقل و روی دستگاه لرزاننده دورانی با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه به مدت ۳ تا ۴ روز قرار داده شد(Esfahani *et al*., 2013). استخراج DNA براساس روش Guo و همکارانش(۲۰۰۴) با تغییرات اندکی انجام شد(Guo *et al*., 2004). در شرایط سترون آزمایشگاهی توده میسیلیومی رشد کرده هر جدایه از محیط PDB خارج، با آب مقطر شستشو و سپس در هاون چینی و در مجاورت ازت مایع پودر گردید. پودر ریسه به لوله درب دار ۱/۵ میلی لیتری منتقل و ۸۰۰ میکرولیتر بافر استخراج CTAB به آن اضافه، مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۶۵°C قرار گرفت. سپس ۸۰۰ میکرولیتر مخلوط کلروفرم–ایزوآمیل الکل (۲۴:۱) به آن افزوده و با تکان دادن یکنواخت گردیده و به مدت ده دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتریفوژ گردید. لایه رویی به لوله دیگری منتقل و به میزان هم حجم آن، ایزوپروپانول سرد (°C ۲۰–) اضافه و در ۱۳۰۰۰g برای ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. رسوب حاصل با اتانول ۷۰٪ شستشو و پس از خشک شدن در مجاورت هوا، ۷۰ میکرولیتر بافر TE به آن اضافه و در دمای °C ۲۰– نگهداری گردید.

تکثیر با استفاده از آغازگرهای عمومی

تکثیر قطعات نوکلئیک اسید با استفاده از آغازگرهای طراحی شده برای تکثیر نواحی حفاظت شده داخلی DNA ریبوزومی (ITS rDNA) و بتا توبولین برای هر یک از جدایه‌های قارچی و در شرایط سترون به شرح زیر انجام شد(Al-Sadi *et al*., 2011).

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام گرفت. در این واکنش از تیوپ‌های آماده لیوفیلیزه AccuPower PCR PreMix (BioNEER Co.) استفاده شد. مقدار ۱/۵ میکرولیتر از آغازگرهای ITS1 (5- TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3)، ITS4 (5-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC -3)(Santos & phillips, 2009؛ Santos *et al*., 2011)، Bt2a (5-GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC-3) و Bt2b (5-ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC-3) (Glass & Donaldson, 1995؛ Gomes *et al*., 2013) به همراه ۸ میکرولیتر آب به هرکدام از تیوپ‌ها افزوده و در دستگاه ترموسایکلر (MJ Mini, BIO-RAD) با واسرشت سازی اولیه در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه حرارتی(۹۴ درجه سانتی گراد در ۱ دقیقه، ۵۸ درجه سانتی گراد در ۱ دقیقه و۷۲ درجه سانتی گراد در ۱/۵ دقیقه) و گسترش نهایی به مدت ۴ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد عمل تکثیر انجام شد(Trouillas *et al*., 2011).

ارزیابی محصول نهایی واکنش PCR

مقدار ۵ ماکرولیتر از محصول به دست آمده در مرحله قبلی روی ژل آگارز ۱/۵ ٪ در بافر TBE حاوی غلظت ۱/۱۰۰۰۰ سایبرگرین(SYBR GreenI) الکتروفورز شده و توسط دستگاه Prep OneTM Sapphire مشاهده و عکسبرداری شد.

تعیین توالی قطعات DNA تکثیر شده، همردیف سازی و تطبیق با توالی‌های موجود در بانک ژن(NCBI)

محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز هر یک از جدایه‌ها پس از تعیین توالی(ABI 3730XL DNA Analyzer, BIONEER Co., Korea) و همردیف سازی توسط نرم افزار Sequin، با توالی‌های موجود در بانک ژن (NCBI, http://www.ncbi) مقایسه شد.

۳. نتایج

* مشخصات ظاهری جدایه‌های قارچی

پرگنه جدایه‌های قارچ عامل عارضه مورد بررسی روی محیط غذایی PDA در شرایط دمایی ۲۵ درجه سانتی گراد رشد نسبتاً کندی داشته است. پریتسیوم بر روی محیط حاوی ساقه *Foeniculum vulgare* Mill. کروی است و قطر آن ۳۲۰-۴۴۰ میکرومتر می‌باشد. پریتس‌ها بصورت پراکنده بر روی نواحی استروماتیک خارجی مشکی رنگ قرار دارند. گردن‌های مشکی و بلند ۱۶۰۰-۲۲۵۰ میکرومتری، مویی شکل، رشته‌ای و غالباً منشعب شده دارا می‌باشد. آسک‌ها تک جداره، چماقی شکل با حلقه‌ای انکساری در نوک که قابل مشاهده است و ۸ اسپوره می‌باشد. آسکوسپورها بصورت تصادفی مرتب شده، از تک ردیفه تا دو ردیفه آزاد، دارای هیالین، صاف، سیلندری شکل، به‌طور متوسط جداره دار، بعضی از اوقات در نواحی دیواره منقبض شده، بطور معمول ۴ قطره‌ای، بعضی از اوقات بدون قطره، زمانی که ۴ قطره دارد، ۲ قطره مرکزی و نزدیکتر به جداره و بزرگتر هستند، می‌باشند. کنیدیوماتای تشکیل شده بر روی ساقه‌های *Foeniculum vulgare* در محیط کشت پیکنیدی، مخروطی شکل و قطر ۳۱۰-۵۸۰ میکرومتر قطر دارد. گردن پیکنیدها مویی شکل، ۳۸۰-۷۱۰ میکرومتر طول و در خوشه‌هایی دسته بندی شده است. قطرات زرد نیمه شفاف کنیدی از دهانه خارج می‌شوند. کنیدیوفورها سیلندری شکل، شفاف، صاف، تک تا دو سلولی، ۱۰/۴-۵/۳ × ۳/۲-۱/۹ میکرومتر هستند. سلول‌های کنیدیوم زا فیالیدیک، چماقی تا نخ مانند، بطرف رأس مخروطی شکل، ضخیم شدگی پیرامونی موجود است. گریبانک دیده نمی‌شود. سلول‌های کنیدی زا انتهایی، چسبیده به رأس کنیدیوفورها، ۱۶/۰-۸/۹ × ۲/۷-۱/۷ میکرومتر و انتهایی، متعلق به محور اصلی کنیدیوفور اما یک طولانی شدن انتهایی نشان می‌دهد. کنیدی آلفا تک سلولی، بیضی تا سیلندری شکل، با انتهای منفرجه، شفاف و دو قطره‌ای است. کنیدی بتا شفاف، بدون دیواره، رشته‌ای شکل، انحنادار، بدون قطره با انتهای مدور می‌باشد. از نظر جنسی هتروتالیک است. میزبان‌های شناخته شده آن *Asclepias syriaca* L. ،*Aspalathus linearis* (Burm.f.) R.Dahlgren (van Rensburg *et al*., 2006)، *Glycine max* (L.) Merr. ، *Helianthus annuus* L. (Santos *et al*., 2011)، *Hydrangea macrophylla* (Thunb.) Ser. (Santos *et al*., 2011)، *Vitis vinifera L.* (van Niekerk *et al*., 2005) می‌باشد. گسترش آن در مناطق کرواسی، ایتالیا، پرتقال (Santos *et al*., 2011) و آفریقای جنوبی (van Niekerk *et al*., 2005، van Rensburg *et al*., 2006) گزارش شده است. نکته‌ی مهمی در اینجا وجود دارد که پریتس‌های بارور در محیط کشت فقط بعد از برخورد ایزوله‌ها با تیپ سازگار متفاوت تشکیل می‌شود، بطوریکه به‌وسیله PCR قابل تشخیص است. بنابراین، این گونه‌ها هتروتالیک هستند. این گونه‌ها شبیه به *D. chailletii* هستند اما گردن پریتس بسیار بلندتری دارد، آسک‌ها کوتاه‌تر و پهنتر هستند، و آسکوسپورها سیلندری شکل در مقابل با آسکوسپورهای *D. chailletii* که دوکی تا بیضوی‌شکل هستند (Santos *et al*., 2011). بر اساس

نتایج به دست آمده، پرگنه‌های مورد بررسی با گونه *Diaporthe novem J.M.* Santos مطابقت داشت (Santos *et al.*, 2011). هیچ قارچی بر روی محیط PARPH رشد نکرد.

شکل ۲. پرگنه قارچ *Diaporthe novem*

Fig. 2. *Diaporthe novem* fungus colon

شکل ۳. اسکلروت‌های *Diaporthe novem*

Fig. 3. *Diaporthe novem* sclerotia

آزمون بیماریزایی

بر اساس آزمون بیماریزایی، جدایه قارچی مورد نظر، بیماریزا بوده و زخم‌های نکروتیک بر روی نهال سبز ایجاد کرد که در جهت بالا و پایین محل مایه کوبی در حال گسترش بود که نسبت به کنترل اندازه بزرگتری داشت. از کشت نمونه‌های مایه کوبی شده روی محیط سیب زمینی دکستروز آگار(PDA) قارچ *Diaporthe novem* جداسازی شد. در نهال شاهد لکه نکروتیک مشاهده نشد.

شکل ۴. علائم آلودگی بر روی پایه سیترنج

Fig. 4. Infection symptoms on cittrange rootstocks

*** واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با آغازگر عمومی**

در تکثیر اسید نوکلئیک جدایه‌ها با استفاده از آغازگرهای ITS 1 و ITS 4 قطعاتی در حدود 600bp (شکل۶) و با آغازگرهای Bt2a و Bt2b، قطعاتی با اندازه حدود 500 bp تکثیر گردید(شکل ۷).

تعیین توالی قطعات DNA تکثیر شده، همردیف سازی و تطبیق با توالی‌های موجود در بانک ژن (NCBI)

محصول تکثیر شده با آغازگرهای ITS1 ، ITS4 ، Bt2a ، Bt2b پس از تعیین توالی در بانک ژن(NCBI) مورد

مقایسه قرار گرفت. میزان شباهت ژنتیکی با ناحیه ITS، ۹۹٪ و با ناحیه Bt2 به میزان ۹۹٪ مشابهت را با قارچ *Diaporthe novem* نشان داد. همچنین توالی‌های به دست آمده از تکثیر نواحی ITS و Bt2 به ترتیب با شماره دسترسی KR061990 و KR061991 در بانک ژن (NCBI) ثبت گردید.

۴. بحث

گونه‌های Diaporthe بصورت متداول به عنوان اندوفیت از چندین میزبان در مناطق معتدل و گرمسیری جدا شده‌اند(Gomes *et al*., 2013). اگرچه اعضای Diaporthe معمولاً به عنوان بیماریزای گیاهی توصیف می‌شود، یک افزایش تعدادی از گزارش‌های این جنس به مطالعات اندوفیتی مربوط است و بر روی پتانسیلشان به عنوان یک تولید کننده آنزیم و متابولیت‌های ثانویه جدید با فعالیت آنتی بیوتیکی، قارچ کشی و ضد سرطانی آن متمرکز می‌شود (Gomes *et al*., 2013). دقیقاً شناسایی گونه‌ها برای کنترل بیماریهایی که توسط Diaporthe ایجاد می‌شود و همچنین برای اجرای مقررات قرنطینه ضروری است. اخیراً گونه‌های Diaporthe براساس ریخت شناسی‌شان و ارتباط میزبانیشان شناخته می‌شوند. بهرحال، الگوهای ارتباط میزبانی و گونه زایی داخل گروه Diaporthe هنوز بطور کامل مشخص نیست(Udayanga *et al*., 2014). در جنس Diaporthe پریتسیوم‌ها در استروما فرو رفته‌اند و دارای گردن بلندند. آسک دارای یک منفذ و حلقه‌ی انتهایی انکساری است و آسکوسپورها بی رنگ و دو سلولی می‌باشند. آنامورف گونه های این جنس به Phomopsis تعلق دارند. در این جنس دو نوع کنیدیوم آلفا (بیضوی شکل) و بتا (نخی شکل) داخل یک پیکنیدیوم کاذب (استروما) تولید می‌شوند. برخی از گونه‌های مهم *Diaporthe citri* (عامل ملانوز مرکبات)، *D. phaseolorum* (عامل بیماری در گیاهانی نظیر لوبیا، سویا) ، *D. vexans* (پوسیدگی بادنجان) هستند. شبه گونه مهم وابسته به این جنس که در ایران روی انجیر به ویژه در منطقه‌ی استهبان فارس موجب شانکر می‌شود *Phomopsis cineracens* است. تا کنون فرم جنسی این قارچ در ایران مشاهده نشده است و بنابر گزارش‌های موجود کنیدیوم‌های نوع بتا نیز در نمونه‌های ایرانی تشکیل نمی‌شود و یا به ندرت تشکیل می‌شود(Khodaparast, 2010).

گزارش‌های جدید سیستمیکی Diaporthe با استفاده از داده‌های تعیین توالی DNA بسیار دقیق است که به عنوان ابزاری برای قرار دادن گونه‌ها در داخل این جنس بکار می‌رود. نشانگرهای مورد استفاده در گزارش‌های فیلوژنتیکی حال حاضر شامل مناطق فاصله ترانویسی شده‌ی داخلی ریبوزوم کامل هسته‌ای (ITS) و بیشتر اخیراً قسمتی از توالی‌های اکتین (ACT)، بتا توبولین (TUB)، کالمودولین (CAL)، هیستون H3 (HIS)، ژن‌های تیپ آمیزشی (MAT 1-1-1 و MAT 1-2-1) و فاکتور طویل شدن ترجمه (EF1-α) می‌باشد. توصیف گونه‌های چند ژنی فیلوژنتیکی ابزار بسیار موثری برای مطالعات رده بندی قارچ‌های مقایسه شده با آزمایشات تیپ‌های متداول و ریخت شناسی آن می‌باشد. اگرچه منطقه ITS اغلب برای شناسایی گونه‌های Diaporthe مفید است اما آنالیز فیلوژنتیکی چند ژنی برای بازسازی دقیق گونه‌های مرزی و ارتباط آنها نیاز است. تنوع درون گونه‌ای در تعیین توالی‌های ITS در چندین گونه از Diaporthe مشاهده شده که می‌تواند علت گیج شدن در تشخیص گونه‌ها زمانی که تنها استفاده می‌شوند باشد(Udayanga *et al*., 2014).

Diaporthe novem از میزبان‌هایی همچون *Hydrangea macrophylla*، *Helianthus annuus* و *Vitis vinifera* (Gomes *et al*., 2013؛ Huang *et al*., 2013)، رویبوس و سویا نیز گزارش شده است (Huang *et al*., 2013).

Diaporthe novem (فرم غیر جنسی Phomopsis) به عنوان عامل پوسیدگی پس از برداشت در کیوی معرفی شد. در تحقیقات DÍaz مشخص شد که این جنس عامل مهمی در پوسیدگی پس از برداشت است و مقدار خسارت آن قابل توجه است. علائم آن پوسیدگی نرم با پوست قهوه‌ای که از انتهای ساقه شروع می‌شود و در شدت‌های بیشتر وارد میوه می‌شود. اثر آن بر روی میوه شامل قهوه‌ای شدن و آبکی شدن بافت می‌باشد(DÍaz *et al*., 2014).

طبق آنالیزهای فیلوژنتیک بر روی EF1-α و اطلاعات تعیین توالی ITS، ۴ گونه از *Diaporthe* را بر روی سویا در کرواسی آشکار شد. ۳ تا از اینها (*D. phaseolorum*، *D. caulivora* و *D. longicolla*) از سویا شناسایی شدند در حالیکه *D. novem* تا کنون از این میزبان به ثبت نرسیده است. نه تنها گونه‌ها از نظر فیلوژنتیکی متمایز بودند، اما آن‌ها می‌تواند همچنین بر اساس شکل شناسیشان، رفتار جفت یابی و براساس بیماری که ایجاد می‌کنند، تشخیص داده شوند. این گونه بر روی سویا در کرواسی در هر دو درخت فیلوژنتیکی با ایزوله‌های شناسایی شده به عنوان *Phomopsis sp.* طبقه بندی می‌شوند. این یکی از گونه‌های شناسایی نشده است که اخیراً بر روی رویبوس (*Aspalathus linearis*) (van Rensburg *et al*., 2006) و هورتانسیا (*Hydrangea macrophylla*) (Santos *et al*., 2011) گزارش شده است. مقایسه توالی ITS روشن کرد که این گونه بر روی آفتابگردان (*Helianthus annuus*) (Rekab *et al*., 2004) و انگور (*Vitis vinifera*) (van Niekerk *et al*., 2005) نیز تحت نام یافت شده بود. van Rensburg و همکاران در سال ۲۰۰۶ اشاره کرد به بکاربردن یک اسم برای این گونه‌ها زیرا آنها فقط یک جدایه دارند که قادر به تولید اسپور نمی‌باشد (Santos *et al*., 2011). در مطالعه انجام شده، نه فقط جدایه‌های ما پیکنید بارور تولید می‌کنند اما آنها همچنین پریتس تشکیل می‌دهند در زمانی که جدایه‌ها مقابل تیپ‌های جنسی در محیط کشت قرار می‌گیرند. در مطالعات انجام شده تلومورف این گونه‌ها مشاهده شد و *D. novemis* نامگذاری گردید. مطالعات بیماریزایی به روشن شدن کمک کرد اگر این گونه‌ها یک تهدید نشان دادند یا اگر آن هست یک پاتوژن ضعیف روی این میزبان. این هست مهم نکته‌ای که این قارچ همیشه از بذرهای بدون علائم و هرگز از ساقه‌های بیمار جدا نشده بود. جدایه‌های آینده از Diaporthe و Phomopsis از سویا، بخصوص در کرواسی، تأیید خواهد کرد که این یک پاتوژن ضروری روی این میزبان هست(Santos *et al*., 2011).

سپاسگذاری: بدین وسیله از اتحادیه باغداران استان مازندران و همکاران در آزمایشگاه تشخیص آفات و بیماری‌های گیاهی آن اتحادیه که امکانات و همکاری لازم جهت اجرای این پژوهش را فراهم نمودند، قدردانی می‌گردد.

۵. منابع

Al-Sadi, A. M., Al-Sadi, F. A., Al-Kiyumi, K. S., Al-Mahrouqi, R. S., Al-Mahmooli, I. H., Deadman, M. L. 2011. Etiology and charachterization of cucumber vine decline in Oman. Crop Prot, 30,192-197.

Arabnezhad, M. & Mohammadi, H. 2013. Detection of *Phaeoacremonium tuscanum and Botryosphaeriaceae* species associated with grapevine decline in Iran and the potential role of pruning debris on the survival of the pathogens. Iran. J. Plant Path. 49(4): 139-148.

Díaz, G. A., Latorre, B. A., Jara, S., Ferrada, E., Naranjo, P., Rodríguez, J., Zoffoli, J. P. 2014. First report of *Diaporthe novem* causing postharvest rot of kiwifruit during controlled atmosphere storage in Chile. Plant disease. 98(9): 1274.

Elahinia, S. A. 2012. Fruit tree diseases. GUILAN University Press, Rasht, Iran.

Esfahani, M. N., Shafagh, N., Falahati rastegar, M., Malekiyan. R. 2013. Genetical diversity analysis of Iranian *Fusarium oxysporum f.sp. melonis* by PCR-RAPD marker. International Journal of Farming and Allied Sciences, 2:23. 1054-1059.

Fotouhi Ghazvini, R. & Fattahi Moghadam, J. 2010. Citrus Growing in Iran. GUILAN University Press, Rasht, Iran.

Gharibi, H. A. 2009. Citrus Root stocks. Monthly Journal of the Jihad-e-Agriculture Organization of Golestan Province. 7(100): 5.

Glass N. L. & Donaldson G. C. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 61. No. 4. Pp. 1323-1330.

Golein, B & Adoli, B. 2011. Citrus (Planting). Novinpouya, Chaboksar, Iran.

Gomes, R. R., Glienke, C., Videira, S. I.R., Lombard, L., Groenewald, J. Z. 2013. Diaporthe: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. Persoonia. 31: 1-41.

Guo L. D., Xu L., Zheng W. H., Hyde K. D. 2004. Genetic variation of *Alternaria alternata*, an endophytic fungus isolated from *Pinus tabulaeformisas* determined amplified microsatellites (RAMS). Fungal Diversity 16: 53-65.

Huang, F., Hou, X., Dewdney, M. M., Fu, Y., Chen, G., Hyde, K. D., Li, H. 2013. Diaporthe species occurring on citrus in China. Fungal Diversity. 61: 237-250.

Khodaparast, S. A. 2010. Fungi Kingdom. GUILAN University Press, Rasht, Iran.

van Niekerk, J. M., Groenewald, J. Z., Farr, D. F., Fourie, P. H., Halleen, F., Crous, P. W . 2005. Reassessment of Phomopsis species on grapevine. Australasia Plant Pathology. 34: 27– 39.

Peres, N. A., MacKenzie, S. J., Peever, T. L., and Timmer, L. W. 2008. Postbloom fruit drop of citrus and Key lime anthracnose are caused by distinct phylogenetic lineages of *Colletotrichum acutatum*. Phytopathology, 98:345-352.

Rekab, D., del Sorbo, G., Reggio, C., Zoina, A., Firrao, G. 2004. Polymorphisms in nuclear rDNA and mtDNA reveal the polyphyletic nature of isolates of Phomopsis pathogenic to sunflower and a tight monophyletic clade of defined geographic origin. Mycol. Res. 108(4): 393–402

van Rensburg, J. C. J.., Lamprecht, S. C., Groenewald, J. Z, Castlebury, L. A., Crous, P. W. 2006. Characterisation of *Phomopsis spp.* associated with die-back of rooibos (*Aspalathus linearis*) in South Africa. Studies in Mycology 55: 65 –74.

Santos, J. M. & Phillips, A. J. L. 2009. Resolving the complex of Diaporthe (Phomopsis) species occurring on Foeniculum vulgare in Portugal. Fungal Diversity. 34: 111-125.

Santos, J. M., Vrandečić, K., Ćosić, J., Duvnjac, T., Phillips, A. J. L. 2011. Resolving the Diaporthe species occurring on soybean in Croatia. Persoonia. 27: 9-19.

Spina, S., Coco, V., Gentile, A., Catara, A., Cirvilleri, G. 2008. Association of *Fusarium solani* with Rolabc and wild type Troyer Citrange. Journal of Plant Pathology. 90(3): 479-486.

Tajvar, Y., Fotouhi Ghazvini, R., Hamidoghli, Y., Sajedi, R. H. 2011. Physiological and biochemical responses of Page mandarin on citrange rootstock to low temperature stress. Journal of Plant Biology, 3(9): 1-12.

Teymuri, S., Rahnama, K., Hajian Shahri, M., Afzali, H. 2013. Identification, Distribution and Pathogenicity of Fusarium Species Isolated from Root and Crown of Cantaloupe and Melon in Khorasan Razavi Province. Research in Plant Pathology, 1(4): 33-44.

Timmer, L. W., Garnsey, S. M., Graham, J. H. Translated by Ashkan, S. M. & Zakeii, Z. 2006. Compendium of Citrus diseases. IUP, Tehran, Iran.

Trouillas F. P., Pitt W. M. Sosnowski, M. R. Huang R., Peduto F., Loschiavo A., Savocchia S., Scott E. S., Gubler W. D. 2011. Taxonomy and DNA phylogeny of Diatrypaceae associated with *Vitis vinifera* and other woody plants in Australia. Fungal Diversity. 49:203-223.

Udayanga, D., Castlebury, L. A., Rossman, A. Y., Hyde, K, D. 2014. Species limits in Diaporthe: molecular re-assessment of *D. citri*, *D. cytosporella*, *D. foeniculinaand* and *D. rudis*. Persoonia. 32: 83-101.

Yaseen, T. & D'Onghia, A.M., 2012. *Fusarium spp.* Associated to Citrus Dry Root Rot: an Emerging Issue for Mediterranean Citriculture. ActaHortic. 940.89.

Plant Protection Journal
(Islamic Azad University, Shiraz Branch)
2018 – 9 (2) : 121-132

Pathological and Molecular Identification the causal agent of Cittrange rootstock rot in Citrus Orchards the East of Mazandaran

Seyed vahid Alavi[1], Faeze Falaki[2*]

(1) Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences and Food Industry, Islamic Azad University, Tehran Science and Research Branch, Tehran, Iran.
(2) (*) Plant Protection Research Department, Mazandaran Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Sari, Iran., faezehfalaki@yahoo.com

Abstaract

Recently, a devastating decline has been observed in some citrus groves established with cittrange rootsock. The most conspicuous symptom is a frustose rootstock and decline. The suspicious infected samples were collected at different stages of growth and transported to the laboratory. The samples were rinsed under top water and disinfested with 70% ethyl alcohol. Pieces of each sample was separated with a sterile blade and cultured on potato dextrose agar (PDA) medium. Obtained fungal isolates were purified and pathogenicity of the isolates was tested by A mycelial plug (5 mm diam.) obtained from the margin of a fungal colony was placed in the wound with the mycelium facing towards the stem, and the wound was wrapped with Parafilm. Based on the morphological characteristics including colony form, conidia specific feature, and growing on agar cum Foeniculum vulgare stipes, studied fungal isolates were identified as Diaporthe novem Santos. Genomic DNA extraction was done from fungal isolates and amplification was done with ITS1, ITS4 and Bt regions primers and the amplicons were sequenced. Also the sequencing results confirmed fungal species mentioned above. This is the first report of fruit drop and dieback disease and the causal agent identification on local tangerine in north of Iran.

Keywords: Cittrange, Citrus sp., rootstock rot, Mazandaran