بررسی اتیولوژی و تعیین پراکنش عامل بیماری آنتراکنوز مرکبات در استان مازندران

Etiological study and dispersion appointment of anthracnose disease agent of citrus in Mazandaran province

ماریه ببری*، محمد جوان نیکخواه، حسین طاهری، یعقوب محمد علیان و جواد فتاحی مقدم
دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، موسسه تحقیقات مرکبات کشور

دریافت ۱۳۸۶/۵/۱۴ پذیرش ۱۳۸۷/۵/۲۳

چکیده

در سال‌های اخیر بیماری آنتراکنوز مرکبات، در استان مازندران در تعدادی از ارقام تجاری مرکبات خسارت قابل توجهی ایجاد کرده است. این بیماری به صورت گسترده‌ای در باغ‌های مرکبات این استان شیوع دارد. به منظور جداسازی و شناسایی عامل یا عوامل ایجاد کننده بیماری، تعیین میزان آلودگی منطقه و حساسیت ارقام مهم و معرفی شده مرکبات شمال کشور، طی سال‌های ۱۳۸۳ و ۱۳۸٤ از باغ‌های آلوده به صورت تصادفی نمونه‌برداری شد. با انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه و کشت قطعات بافت‌های شاخه، برگ، گل و میوه‌ی ۱۱۹ نمونه جمع‌آوری شده روی محیط کشت PDA، ۹٦ جدایه از شبه جنس *Colletotrichum* جداسازی شد. براساس خصوصیات مورفولوژیکی، بعضی ویژگی‌های فیزیولوژیکی و دمای مطلوب رشد، تمام جدایه‌ها به عنوان شبه گونه *C. gloeosporioides* شناسایی شدند. فرم جنسی قارچ مذکور، گونه *Glomerella cingulata* بود که از میان جدایه‌های بدست آمده، فقط یک جدایه در محیط کشت YPSS پریتسیوم تولید کرد. آزمون‌های بیماریزایی جدایه‌های *C. gloeosporioides* با استفاده از دو روش آزمایشگاهی و گلخانه‌ای انجام شد. در این آزمون‌ها از ۳۰جدایه

* مسئول مکاتبه

Archive of SID

www.SID.ir

مایه‌زنی شده روی شاخه‌ها، ایجاد زخم ایجاد نمودند و از نظر قدرت بیماریزایی بین جدایه‌ها تفاوت وجود داشت. این جدایه‌ها روی میوه‌های مایه‌زنی شده تولید پوسیدگی قهوه‌ای کردند. آلودگی درختان مرکبات استان مازندران به بیماری آنتراکنوز بین ۷۴-۲۳ درصد تعیین گردید که میانگین پراکنش بیماری در استان ٤۹ درصد بود. در زمینه رشد شعاعی جدایه‌ها در دماهای مختلف بین میانگین رشد شعاعی جدایه‌ها تفاوت وجود داشت که می‌تواند به عنوان یکی از ویژگی‌های اختصاصی جدایه مطرح شود. کمینه‌ی دما ۱۰°C-۵، بهینه ۲۷°C-۲۵ و بیشینه ۳۷°C-۳۵ روی محیط غذایی PDA در شرایط تاریکی اندازه‌گیری شد. بررسی زمستان‌گذرانی قارچ نشان داد که به صورت آسروول و ریسه در بقایای آلوده زمستان‌گذرانی نموده و میزان دوام آن در بقایای گیاهی بیش از یک سال بود.

کلمات کلیدی: مرکبات، آنتراکنوز، *Colletotrichum gloeopsporioides*، *Glomerella cingulata*

مقدمه

مرکبات در بیش از ۶۰ کشور جهان در فاصله عرض‌های جغرافیایی ۴۰ درجه شمالی و جنوبی کشت می‌شود. گزارش‌هایی وجود دارد که مرکبات از طریق مدیترانه به اروپا راه یافته است. استان مازندران از نظر وسعت کشت با دارا بودن ۹۵ هزار هکتار سطح زیر کشت، بعد از استان‌های کرمان و فارس قرار دارد. حدود ۳۹ درصد محصول مرکبات کشور در استان مازندران حاصل می‌شود. با روند افزایش سطح زیر کشت ارقام تجاری وجود یکسری عوامل بیماریزا در ۳-۲سال اخیر با افزایش بارندگی موجب خسارت سنگین می‌شود که نتیجه آن کاهش محصول است. یکی از عوامل بیماریزا قارچ *Colletotrichum* sp. است که بیماری آنتراکنوز را ایجاد می‌کند. این بیماری اولین بار در سال ۱۸۸۶ با عامل *C. gloeosporioides* (Penz.) Sacc. از فلوریدای امریکا گزارش شد (Rolfs 1904). سیموند در سال ۱۹۶۵ این بیماری را با عامل *C. acuttatum* از استرالیا گزارش کرد (Simmond 1965). اسموت و ملوین اعلام کردند که بیماری آنتراکنوز باعث خسارت در میوه نارنگی روبینسون (Robinson tangerine) می‌شود (Brown 1975 & 1977). دنهام و والر در سال ۱۹۸۱ گونه *C. gloeosporioides* را عامل این بیماری معرفی نمودند که با دوره‌های سرما و رطوبت همراه می‌شد. این دو محقق در همان سال بیماری مذکور را از کشورهای آرژانتین و برزیل نیز

Archive of SID

www.SID.ir

گزارش کردند (Denham & Waller 1981) . در سال ۱۹۸۵ کال و رانت دریافتند که بیماری آنتراکنوز در برگ‌ها و شاخه‌های جوان لکه‌های نکروتیک و در شاخه‌های بالغ و مسن باعث سرخشکیدگی می‌شود (Kale & Rant 1985). کاگیواتا در سال ۱۹۸۶ اعلام کرد که بیماری مذکور به میوه‌های جوان پیش از برداشت خسارت می‌زند. در این حالت زخم‌های فرورفته تیره‌ای در میوه به وجود می‌آید که باعث ریزش آن می‌شود (Kagiwata 1986). تیمر و همکاران در سال ۲۰۰۰ عامل آنتراکنوز مرکبات را دو گونه *C.gloeosporioides* و *C. acuttatum* معرفی کرد (Timmer *et al.* 2000) . عامل بیماری آنتراکنوز مرکبات در ایران ابتدا در سال ۱۳۲۰ از سواحل بحر خزر توسط پتراک و اسفندیاری و سپس در سال ۱۳۷۴ توسط ارشاد از فارس، خوزستان و میناب گزارش شد(Ershad 1995). میزبان‌های این قارچ در ایران شامل پرتقال خونی، دارابی، تامسون ناول، لیمو و ... هست و در ارقام مختلف مرکبات به سرشاخه، برگ، گل و میوه خسارت می‌زند (Elahinia 1996). هدف از اجرای این تحقیق، تعیین عامل بیماری، پراکنش و نحوه بقای آن در استان مازندران است.

روش بررسی

۱- نمونه برداری

طی سال‌های ۸۴- ۱۳۸۳ به طور تصادفی تعدادی از باغ‌های مرکبات استان مازندران انتخاب و از آنها نمونه‌برداری شد. ارقام مختلف مرکبات با علائم مشکوک به بیماری مانند خشکیدگی شاخه‌ها، وجود صمغ روی شاخه، وجود نقاط سیاهرنگ (آسروول) روی سطح برگ و شاخه، ریزش میوه بعد از گلدهی و میوه رسیده با علائم قطره اشکی مورد بازدید قرار گرفت و بافت‌های آلوده انتخاب و جمع‌آوری گردید. به منظور جداسازی بیمارگر، از درختان بیمار سر شاخه‌ها، برگ ها و میوه‌هایی که علائم بیماری را به وضوح نشان می‌دادند از باغ‌های مناطق مختلف جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها پس از جمع‌آوری، بلافاصله به آزمایشگاه منتقل گردیدند.

۲- جدا سازی و شناسایی عامل بیماری

در آزمایشگاه قطعاتی به طول ۰/۶ تا ۱/۵ سانتی‌متر در محل‌های بین نواحی سالم و آلوده انتخاب گردید. ضدعفونی قطعات با محلول هیپوکلریت سدیم تجارتی (۰/۵ درصد کلر فعال)

Archive of SID

www.SID.ir

به مدت ۱ تا ۲ دقیقه انجام و سپس سه بار با آب مقطر سترون شسته شدند. نمونه‌های ضدعفونی شده با کاغذ حوله‌ی سترون خشک گردید. چهار قطعه کوچک از هر نمونه ضدعفونی شده، روی محیط کشت PDA در تشتک پتری کشت شدند و به انکوباتور با دمای ۲۴ درجه‌سانتی گراد منتقل گردیدند. قارچ‌های بدست آمده تجدید کشت شده و پس از خالص‌سازی با استفاده از کلیدهای موجود (Sutton, 1980) مورد شناسایی قرار گرفتند.

۳- تشکیل مرحله جنسی قارچ عامل بیماری

در این مرحله از محیط کشت YPSS (Yeast Pepton Soluble Strach) استفاده شد. بعد از ٢٤ ساعت رشد، از حاشیه پرگنه های ۳ روزه جدایه ها قرص‌هایی به قطر ٦ میلی‌متر تهیه شد. در تعدادی از تشتک‌ها، جدایه‌ها به صورت منفرد و درتعدادی دیگر به صورت جفتی به گونه‌ای که فاصله دو جدایه از هم حدود ۲ سانتی‌متر باشد کشت داده شدند. تشتک‌ها در انکوباتور با دمای ۲۵±۱°c قرار داده شدند. تعدادی از تشتک‌ها در شرایط تاریکی، تعدادی در روشنایی و تعدادی هم در شرایط تناوب نور سفید (۱۲ ساعت روشنایی- ۱۲ ساعت تاریکی) با شدت ٦۰۰ لوکس نگهداری شدند.

٤- تعیین پراکنش و وقوع بیماری در باغ‌های مرکبات استان مازندران

به منظور تعیین پراکنش و درصد وقوع بیماری در طی سال های ٨٤-١٣٨٣ مناطق مرکبات‌کاری استان در نظر گرفته شد و در هر یک از مناطق ۱۰ باغ به طور تصادفی انتخاب شد. با قدم زدن در طول دو قطر باغ، تعداد درختان سالم و آلوده شمارش و یادداشت برداری شد. در هر باغ حداقل ۵۰ درخت مورد بررسی قرار گرفت. در بررسی تعیین پراکنش بیماری به علائم ظاهری مانند سرخشکیدگی، وجود آسروول روی برگ و شاخه و لکه برگی توجه شد.

۵- آزمون‌های بیماریزایی

۵-۱- بررسی‌های آزمایشگاهی

الف- مایه‌زنی روی شاخه‌های بریده شده

بعد از شناسایی عامل جدا شده، جهت آزمون بیماریزایی به روش *آفک* (Affek *et al.* 1990) با مایه‌زنی روی شاخه‌های جدا شده در آزمایشگاه مورد مطالعه قرار گرفت. بدین ترتیب که شش قطعه شاخه‌های مرکبات تقریباً هم‌سن به طول ۲۵ و قطر ۱-۲

Archive of SID

www.SID.ir

سانتی‌متر از درختان سالم باغ بریده و به آزمایشگاه منتقل شد. شاخه‌ها با فشار آب زیاد شسته، با حوله کاغذی خشک و سپس با الکل اتیلیک ۷۰ ٪ ضدعفونی سطحی گردیدند. دو سر شاخه‌ها با پارافین مایع پوشیده شدند. از هر ۱۵ منطقه نمونه برداری شده، دو جدایه انتخاب (مجموعا ۳۰ جدایه) و مورد انجام آزمون‌های بیماریزایی قرار گرفتند. برای هر جدایه ۴ شاخه در نظر گرفته شد. در هر تیمار سه شاخه با قارچ مایه‌زنی گردید و یک شاخه بدون مایه‌زنی با قارچ بعنوان شاهد نگهداری شد. مایه‌زنی به این ترتیب انجام شد که مربع مستطیلی به ابعاد تقریبی ۹×۵ میلیمتر در وسط شاخه در نظر گرفته و پوست شاخه در این قسمت در امتداد دو طول و یک عرض فوقانی آن با اسکالپل تیز برش داده شد. پوست این قسمت (حول عرض تحتانی مستطیل) از چوب شاخه جدا کرده و قطعه‌ای از محیط کشت محتوی میسلیوم ۳ روزه قارچ در آن محل قرار داده و پوست به محل اولیه (روی مایه) برگردانده و با پارافیلم بسته شد. در تیمار شاهد از محیط کشت بدون قارچ استفاده گردید. قطعات مایه‌زنی شده در کیسه‌های پلاستیکی قرار داده شدند. در یک کیسه پلاستیکی چهار شاخه که دو سر و محل قطع شاخه‌های فرعی آنها پارافیلم زده شده و پوست برداری نشده بود به عنوان شاهد عمومی در نظر گرفته شد. کیسه‌های حاوی شاخه‌های مایه‌زنی شده و شاهد عمومی در انکوباتور با دمای ۲۵ $^{\circ}C$ نگهداری و بعد از یک هفته شاخه‌ها بازدید شدند. بعد از ۱۰ روز رشد، جهت جداسازی قارچ، مجدداً بافت‌های آلوده روی محیط غذایی PDA کشت شدند.

ب- مایه زنی روی میوه

در این روش میوه های سالم، قیچی‌چین شده و یکدست ارقام پرتقال تامسون ناول (*Citrus sinensis* var. Tamson Navel)، والنسیا (C. *sinensis* var.Valencia)، هاملین (C. *sinensis* var.Hamlin)، رقم نارنگی انشو (*C. reticulata* var. Unshiu)، نارنج (*C. vulgaris*)، لیمو ترش (*C. aurantifolia*) و دارابی (*C. decumata*) تهیه شدند. ابتدا با آب معمولی و با فشار ملایم شستشو شده، پس از خشک نمودن و ضد عفونی سطحی با الکل ۷۰ درصد در شرایط سترون، به وسیله چوب پنبه سوراخ کن به قطر ٦ میلی‌متر در یک نقطه وسط سطح جانبی میوه سوراخ نموده طوریکه فقط پوست میوه (بخش پریکارپ) به اندازه یک سانتی‌متر تا قسمت

Archive of SID

www.SID.ir

گوشت میوه جدا شد. سپس توسط پنس و اسکالپل پوست قطع شده برداشته شد و در مرحله بعد برای مایه‌زنی میوه‌ها به روش زیر اقدام شد:

جدایه‌های قارچ به صورت جداگانه روی محیط کشت PDA کشت شد و به مدت ٤-٣ روز در دمای ٢٥ ^{O}C نگهداری شدند. به کمک چوب پنبه سوراخ کن و پنس، قرص‌هایی به قطر ٦ میلی‌متر تهیه شد و به صورت واژگون در محل برش قرار داده شد. پس از برگردانیدن پوست روی محل زخم با وازلین جامد پوشانده شد. در مورد تیمار شاهد از قرص‌های محیط کشت PDA بدون قارچ استفاده شد. سپس میوه‌های مایه‌زنی شده و شاهد برای حفظ رطوبت به صورت تصادفی در دسیکاتور با دمای ٢٥°c در تاریکی قرار داده شدند. بعد از ٤ روز میزان پیشروی قارچ با ظهور تغییر رنگ قهوه‌ای در پوست میوه مورد بازدید قرار گرفت. در پایان آزمایش جهت اطمینان از آلودگی و جداسازی عامل بیماری از میوه‌های آلوده شده، قطعاتی از حاشیه بافت آلوده و سالم به محیط کشت PDA منتقل شد.

ج- مایه‌زنی روی برگ

در این روش چند برگ سالم از ارقام پرتقال والنسیا و تامسون‌ناول و هم‌چنین نارنگی پیج تهیه و به آزمایشگاه منتقل شد. برگ‌ها پس از شستشوی سطحی با الکل اتانول ٧٠ درصد ضدعفونی شدند. پس از اینکه الکل آنها به صورت کامل تبخیر و خشک شد با آب مقطر سترون شسته شدند. سپس برگ‌ها در تشتک‌های سترون که حاوی یک پنبه سترون مرطوب بود (هر برگ داخل یک تشتک پتری) قرار داده شدند. به منظور مایه‌زنی برگ‌ها قرص قارچ روی محیط کشت PDA به قطر ٦ میلی‌متر که از حاشیه فعال پرگنه ٣ روزه برداشته شده بود استفاده گردید. تعدادی از برگ‌ها قبل از مایه‌زنی با پودر کاربوراندوم خراش داده شدند تا زخم ایجاد شود. در مورد بقیه برگ‌ها از پودر کاربوراندوم استفاده نشد. به منظور مایه‌زنی برگ‌های شاهد از قرص‌های محیط غذایی PDA بدون قارچ استفاده شد. پس از پوشاندن درب تشتک‌ها با پارافیلم، آنها در دسیکاتور و در دمای آزمایشگاه قرار داده شدند.

٥-٢- بررسی‌های گلخانه‌ای

به منظور انجام این آزمایش از نهال‌های دو ساله مرکبات که در گلدان‌های پلاستیکی کشت شده بودند، استفاده شد. مراحل آلوده‌سازی به روش شرح داده شده در بند (٥-الف) انجام گرفت.

Archive of SID

www.SID.ir

٦- مطالعه اثر دما بر رشد شعاعی جدایه های بیمارگر در آزمایشگاه

هدف از این مطالعه، تعیین دماهای رشد کمینه، بهینه و بیشینه بود. برای این منظور رشد شعاعی قارچ مورد نظردر محیط غذایی PDA در دماهای ۳، ۵، ۸، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۲۷، ۳۰، ۳۵، ۳۷ و ٤٠°C مورد مطالعه قرار گرفت. زاد مایه، قرص‌هایی به قطر ٦ میلی‌متر بود که از حاشیه فعال پرگنه‌های در حال رشد که به مدت ۳-۲ روز با دمای ۱±۲۵°C نگهداری شده بودند برداشته شد. قرص‌ها در مرکز تشتک‌های حاوی مواد غذایی PDA که ٢٤ ساعت قبل ریخته شده بودند، به صورت واژگون قرار داده شدند. هر جدایه از هر تیمار در سه تکرار کشت گردید. سپس تشتک‌ها به انکوباتور با دمای مورد نظر منتقل شدند. بعد از گذشت ٢٤ ساعت، حاشیه پرگنه‌ها در پشت تشتک‌ها به وسیله ماژیک رنگی مشخص گردید. میزان رشد اندازه‌گیری شد و مجددا به انکوباتورهای مورد نظر منتقل گردید. این کار به مدت یک هفته و به صورت روزانه برای هر یک از دماها انجام شد و میزان متوسط رشد شعاعی پرگنه‌ها بر حسب میلی‌متر در روز برای هر تیمار محاسبه گردید.

۷- بررسی زمستان‌گذرانی بیمارگر

به منظور انجام این بخش از کار، روش های زیر به کار برده شد:

۱- تعدادی از برگ‌های آلوده که علائم آنتراکنوز را به وضوح نشان می دادند، علامت‌گذاری و در پای درخت ریخته شدند.

۲- تعدادی از شاخه‌های دارای علایم آلودگی علامت‌گذاری و در پای درخت ریخته شدند.

۳- تعدادی از برگ‌های آلوده روی درخت علامت‌گذاری شدند.

٤- تعدادی از شاخه‌های آلوده نیز روی درخت علامت‌گذاری شدند.

۵- در مورد میوه‌های آلوده، میوه‌هایی که علائم بیماری داشتند مدتی در یخچال نگهداری شدند.

هر یک از بافت‌های آلوده هر ماه در محیط کشت PDA کشت شدند تا فعالیت و زنده بودن قارچ در آنها بررسی شود.

نتیجه

۱- علائم بیماری

Archive of SID

www.SID.ir

در اثر بیماری آنتراکنوز، برگ‌ها ابتدا زرد و سپس خشک شده و می‌ریزند. گاهی نیز روی شاخه به حالت سبز خشک مشاهده می‌شود. لکه‌های روی برگ ابتدا به رنگ سبز روشن و سپس به رنگ قهوه‌ای در می‌آیند. اندام بارده قارچ (acervullus) بصورت نقاط سیاه‌رنگ و منظم روی این لکه‌ها تشکیل شد. این نقاط روی سر شاخه‌های آلوده نیز دیده شد.آلودگی شدید سر شاخه‌ها منجر به خشک شدن آنها گردید. روی میوه‌ها لکه‌های کوچک و بزرگ ابتدا به رنگ قرمز و سپس به رنگ قهوه‌ای تیره و در نهایت به رنگ سیاه تغییر می‌کنند(شکل ۱).

۲- جداسازی و شناسایی جدایه‌های بدست آمده

در این تحقیق از مجموع ۱۱۹ نمونه آلوده جمع‌آوری شده از مناطق مختلف استان مازندران، مجموعا ۹٦ جدایه قارچ متعلق به گونه قارچ بیمارگر بدست آمد که مورد شناسایی قرار گرفت. پرگنه قارچ در محیط غذایی PDA، در شرایط دمایی ۲۵±۱°C و نور متناوب (۱۲ ساعت نور سفید – ۱۲ ساعت تاریکی) رشد نسبتا سریعی داشتند. رنگ پرگنه بسیار متنوع به طوریکه در ابتدا سفید مایل به خاکستری و کپه‌ای شکل و سپس بتدریج خاکستری و تیره (به دلیل تولید رنگدانه) شد. توده کنیدیوم‌ها به رنگ نارنجی در قسمت‌های مختلف پرگنه مشاهده شد. اسپورهای غیر جنسی در اندامی بالشتکی شکل، برجسته و نعلبکی مانند به نام آسروول تشکیل شد. آسروول به صورت بافت‌های استروماتیک، فشرده، سخت و فرورفته در محیط کشت تشکیل می شد. کنیدیوم‌ها یک سلولی، (بجز در هنگام جوانه زنی که یک دیواره در قسمت مرکزی اسپور به وجود می آید) تک هسته ای، بی‌رنگ، استوانه‌ای شکل، گاهی اوقات بیضی شکل، با دو انتهای گرد که در بعضی موارد یک انتها باریک می‌شود، بودند. از نظر طول و عرض کنیدیوم، بین جدایه‌ها اختلاف وجود داشت بطوریکه ابعاد آنها ۵/۷۷– ۳/۳۲×۱۷/٦۷– ۱۰/٦۵ میکرومتر بود. کنیدیوم‌ها از نظر شکل و اندازه روی بافت آلوده میزبان یکنواخت‌تر بودند. در اثر تکرار کشت جدایه‌ها در محیط کشت PDA، میزان تولید اسپور کاهش یافت. خارهای (Setae) مشاهده شده بلند سیاه یا ریسه‌های مومانند سترون هستند که هیچ نوع اسپوری تولید ننمودند. حبابک‌ها (appressoria) بشکل کروی تا گرزی شکل، به رنگ قهوه‌ای، تک هسته‌ای و به اشکال نامنظم و گاهی منظم تشکیل شدند. بر اساس مشخصات و ویژگی‌های فوق و مطابقت آنها با کلیدهای شناسایی

Archive of SID

www.SID.ir

Colletotrichum gloeosporioides (Penz.) Sacc. قارچ مذکور (Sutton 1980, Mordue 1971a) تشخیص داده شد (شکل‌های ۲، ۳ و ۴).

۳- ویژگی پریتسیوم (Perithecia)

پریتسیوم‌های مشاهده شده دارای دیواره نرم، صاف، به شکل کروی با گردن دراز و به رنگ قهوه‌ای تیره بود. در ناحیه‌ی گردن رشته‌های مو مانندی (پریفیز) مشاهده شد. آسک‌ها بشکل استوانه‌ای، گرزی یا بیضوی با دیواره نازک و به ابعاد ۱۳/٥٤-۷/۹۲ × ۷۹-۳۳/٥۹ میکرومتر بودند. هر آسک حاوی هشت آسکوسپور تک خانه‌ای، شفاف، دوکی شکل که در دو ردیف درون هر آسک و به ابعاد ٥/۲٥-۳/۹۲ × ۱۹/۱٥-۹/۲۲ میکرومتر قرار داشتند. به استناد کلیدهای معتبر شناسایی و ویژگی‌های فوق، فرم جنسی تحت عنوان گونه *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld. et Schrenk. تشخیص داده شد (شکل ۵) (Mordue 1971).

۴- بررسی پراکنش و وقوع بیماری آنتراکنوز مرکبات در استان مازندران

نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که درصد آلودگی باغ های مرکبات بررسی شده در شهرهای استان مازندران به بیماری آنتراکنوز بین ۲۳ تا ٧٤ درصد متغیر است. متوسط آلودگی کل باغات مرکبات استان به بیماری آنتراکنوز ٤۹ درصد بود. جدول ۱ پراکنش وقوع بیماری را به ترتیب مناطق نشان می دهد.

٥- نتایج آزمون بیماریزایی

نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که جدایه‌ها روی شاخه‌های جدا شده ارقام مرکبات(پرتقال تامسون ناول، والنسیا و نارنگی پیج) زخم ایجاد می‌کنند. اما از نظر قدرت بیماریزایی بین جدایه‌ها تفاوت وجود داشت. علائم بیماری به صورت نکروزه شدن بافت ساقه ظاهر شد. در شاهد هیچ زخمی مشاهده نشد. تمامی جدایه‌ها از شاخه‌های آلوده مجددا جداسازی شدند. علائم بیماری در میوه‌های مایه‌زنی شده بعد از ٦- ٥ روز به صورت پوسیدگی قهوه‌ای روی پوست ظاهر گردید. روی قسمت پوسیده توده‌های اسپور به رنگ نارنجی مشاهده شد. علائم بیماری روی برگ‌های مایه‌زنی شده پس از ٦ روز به صورت قهوه‌ای شدن بافت برگ ظاهر شد. لازم به یادآوری است که برگ‌هایی که با پودر کاربوراندوم زخمی شده بودند علائم بیماری را به وضوح نشان دادند اما سایر برگ ها هیچ علائمی نشان

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- پراکنش بیماری آنتراکنوز مرکبات در استان مازندران

Table 1. Distribution of Citrus anthracnose disease in Mazandaran province

ردیف Row	محل نمونه‌برداری (۱) Sampling places (1)	درصد آلودگی (۲) Infection rate (2)
1	رامسر Ramsar	70
2	تنکابن Tonekabon	74
3	چالوس Chaloos	37
4	نوشهر Noshahr	35
5	نور Nor	31
6	محمودآباد Mahmoodabad	23
7	آمل Amol	65
8	بابل Babol	62
9	بابلسر Babolsar	49
10	جویبار Joibar	46
11	قائم‌شهر Ghaemshahr	59
12	سوادکوه Savadkouh	39
13	ساری Sari	69
14	نکاء Neka	26
15	بهشهر Behshahr	51

متوسط آلودگی کل باغات مرکبات به بیماری آنتراکنوز: ٤٩درصد

Avrage infection of total citrus garden to anthracnose disease:49%

(۱)- در هر شهر ۱۰ باغ و از هر باغ ۵۰ اصله درخت در نقاط مختلف آن باغ ارزیابی شدند.

(1)- 10 garden in each city and 50 trees in each garden were estimated.

(۲)- میانگین آلودگی در هر شهر از بین ۱۰ باغ.

(2)- Infection rate for 10 garden in each city

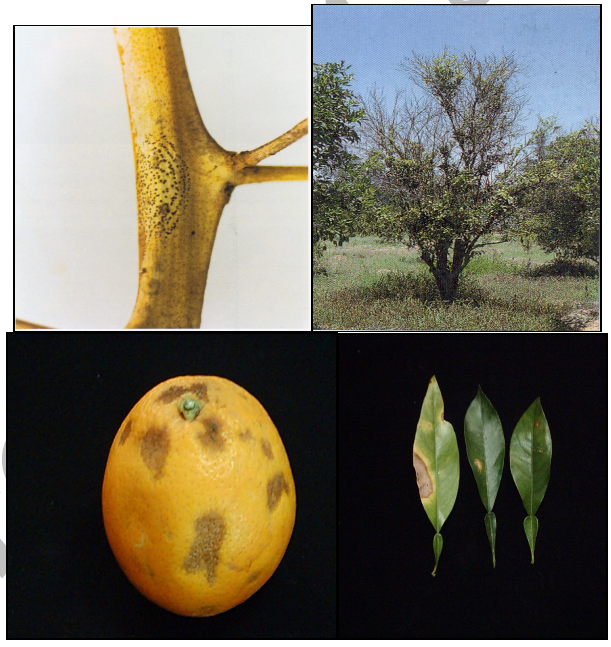
Archive of SID

www.SID.ir

ندادند. قارچ از برگ‌های آلوده مجدداً جداسازی شد. جدایه‌ها قادر به ایجاد بیماری روی نهال‌های دو ساله مرکبات بودند. در بررسی سطح پوست نهال های مایه‌کوبی شده در محل مایه‌زنی و اطراف آن علائم سیاه‌شدگی مشاهده شد و روی این قسمت سیاه در بعضی موارد توده اسپورهای نارنجی وجود داشت.

٦- اثر دما بر رشد شعاعی جدایه‌های قارچ *Colletotrichum gloeosporioides*

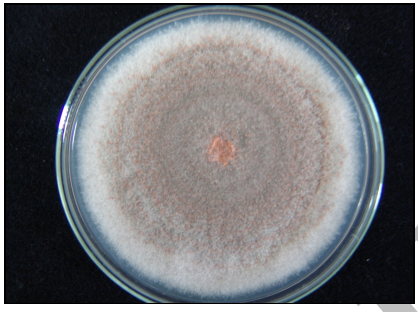
سه جدایه مورد مطالعه در دماهای ۳ و ٤٠^{O}C در طول ٢٤ ساعت اول رشد بسیار محدودی نشان دادند. بعد از آن رشد پرگنه بطور کامل متوقف شد به گونه‌ای که حتی پس از سه روز نیز رشدی مشاهده نشد. بیشترین میزان رشد برای تمامی جدایه‌ها در دمای ۳۰^{O}C- ۲۵ حاصل شد. در مجموع دمای ویژه رشد برای جدایه‌های بیماریزا، کمینه ۱۰-۵، بهینه ۳۰-۲۵ و بیشینه ۳۷-۳۵ درجه سانتی‌گراد بود (شکل ۶).



شکل ۱- نشانه های بیماری آنتراکنوز روی شاخه، سرشاخه(سرخشکیدگی)، میوه و برگ مرکبات (چپ به راست).

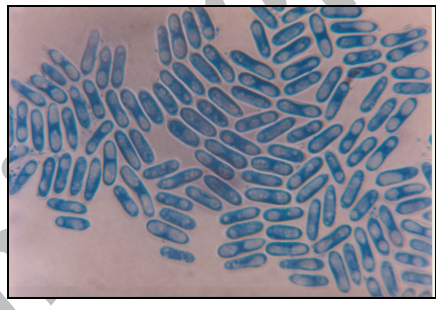
Fig. 1. Symptoms of anthracnose disease on citrus stem, twigs, fruit and leaf (left to right).

www.SID.ir



شکل ۲- شکل کلنی قارچ *Colletotrichum gloeosporioides* در محیط کشت PDA.

Fig. 2. Colony of *Colletotrichum gloeosporioides* On PDA medium.



شکل ۳– کنیدیوم های قارچ *Colletotrichum gloeosporioides* تولید شده روی محیط غذایی PDA.

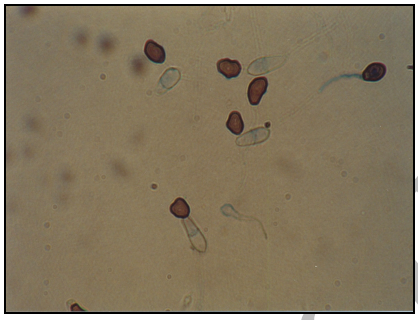
Fig. 3. Conidia of *Colletotrichum gloeosporioides* Product on PDA medium.

۷– بررسی زمستان‌گذرانی *Colletotrichum gloeosporioides* در استان مازندران

با هدف بررسی زمستانگذرانی، از نمونه‌های آلوده‌ای که از تاریخ ۸۳/۹/۱۱ الی ۸٤/۹/۱۱ جمع‌آوری شده بودند، قارچ عامل بیماری همچنان در محیط کشت رشد کرد که نشان دهنده دوام قارچ در بقایای آلوده به مدت بیش از یک سال و بصورت آسروول و ریسه بود.

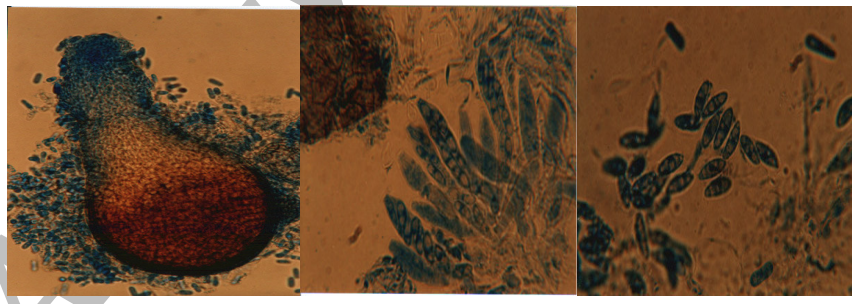
Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۴- اپرسوریوم قارچ *Colletotrichum gloeosporioides* روی اسلاید شیشه‌ای در محیط مرطوب.

Fig. 4. Appressorium production of *Colletotrichum gloeosporioides* on glass slide in wet condition.



شکل ۵- تشکیل فرم جنسی در قارچ *Colletotrichum gloeosporioides* در شرایط آزمایشگاه A) پریتسیوم B) آسک‌های واجد آسکوسپور C) آسکوسپورهای آزاد شده.

Fig 5. Formation of *Colletotrichum gloeosporioides* teleomorph in lab condition. A) Perithicium B) Asci and ascospores. C) Ascospores out of ascus.

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

سطح زیر کشت مرکبات در نواحی ساحلی شمال ایران بیش از ۹۵۰۰۰ هکتار است. با روند افزایش سطح زیر کشت در ارقام تجاری وجود یکسری عوامل بیماریزا در ۳-۲ سال اخیر همراه با افزایش بارندگی موجب خسارت سنگین و در نتیجه کاهش محصول می‌شود. در این میان یکی از بیماری‌های قابل توجه آنتراکنوز است. در آنتراکنوز مرکبات بویژه در پرتقال، نارنگی و لیمو شیرین بیماری به تمامی اعضای بالغ ضعیف شده یا آسیب‌دیده قسمت‌های بالای درخت شامل گل، میوه، برگ و شاخه حمله می‌کند. آنتراکنوز در درختان در هر اندازه‌ای که باشند در خزانه‌ها و یا در باغ روی می‌دهد، اما بندرت روی درختانی که توان رشدی خوبی دارند اتفاق می افتد. این بیماری در درختانی که در اثر کمبود مواد غذایی، خشکی، سرما، آسیب‌های سم‌پاشی، حشرات یا بیماری‌ها و غیره ضعیف شده یا آسیب دیده اند، امری عادی است. بیماری آنتراکنوز کم و بیش در تمامی مناطق استان مازندران وجود دارد. در بررسی پراکنش بیماری، شهرستان تنکابن با ۷٤ درصد آلودگی بیشترین و شهرستان نور با ۲۳ درصد آلودگی کمترین میزان وقوع بیماری را داشتند. شهرستان تنکابن یکی از مهمترین مناطق تولید محصول مرکبات در غرب استان مازندران، با سطح زیر کشت بیش از ۲۰ هزار هکتار و همچنین یکی از مراکز اصلی تهیه و تولید نهال پیوندی برای مناطق شرق مازندران و استان‌های گلستان و گیلان از گذشته‌های دور تا حال است. قارچ عامل بیماری از طریق نهال‌های پیوندی آلوده به سایر مناطق انتقال داده می‌شود و در صورت وجود شرایط محیطی مناسب برای فعالیت قارچ ایجاد خسارت می‌کند. میانگین پراکنش بیماری در کل استان مازندران ٤۹ درصد است. در برخی مطالعات بیماریزایی انجام شد، از روش مایه‌زنی شاخه‌های بریده استفاده شد که در تفکیک افتراقی جدایه‌ها بر اساس شدت بیماریزایی نسبی آنها تحت شرایط کنترل شده، روشی مطمئن و قابل تکرار است. این اطمینان مشروط به اولا فراهم نمودن شرایط رطوبت نسبی بالای ۹۰ درصد برای تیمارها و ثانیا مدت زمان بررسی نمونه ها کوتاه باشد (کمتر از دو هفته) است. در غیر این صورت شاخه‌های مورد استفاده شادابی خود را از دست داده و به بافت مرده‌ای تبدیل شده و منبع غذایی سایر ساپروفیت ها خواهند شد. این روش به صورت گسترده توسط دیگر محققین نیز به کار گرفته شد و نتایج حاصل مورد تایید قرار گرفته است

Archive of SID

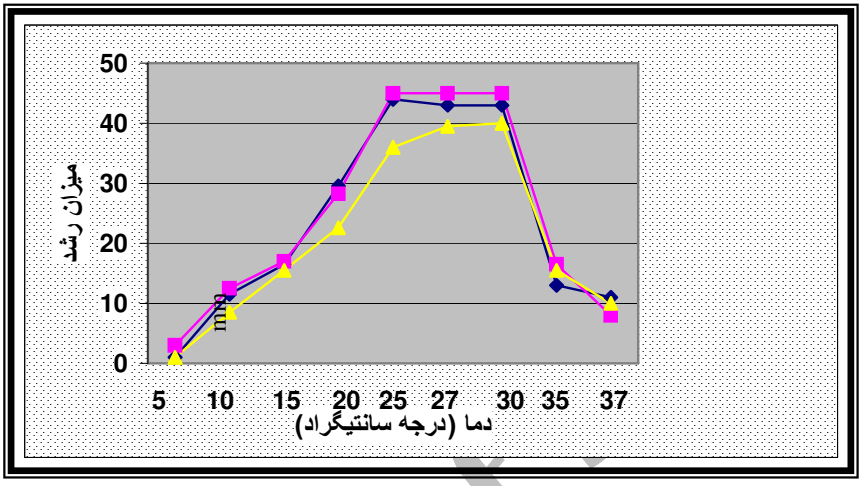
www.SID.ir

Affek 1990, Aldwinkle *et al*. 1975, Borekhi & Melikan 1969, Jeffers *et al.* 1981 & Micheal) 1994). انجام اصول کخ در آزمون بیماریزایی به روش‌های آزمایشگاهی و گلخانه‌ای نشان داد که گونه *Colletotrichum gloeosporioides* قادر به ایجاد آلودگی روی شاخه، برگ و میوه مرکبات است. روی شاخه‌های مایه‌زنی شده زخم‌های تیپیک و سیاهرنگی ایجاد می‌شود که در ابتدا به صورت نقاط قهوه‌ای کوچک بوده، بتدریج توسعه یافته و به رنگ قهوه‌ای روشن مایل به خاکستری تبدیل می‌شود. حاشیه لکه‌ها پر رنگتر بوده و از بافت سالم قابل تشخیص بود. در آزمون بیماریزایی روی نهال‌ها در گلخانه در اثر مایه زنی جدایه قارچ روی شاخه نارنگی پیچ، تراوش صمغ نیز مشاهده شد. روی میوه در محل مایه زنی و اطراف آن پوسیدگی قهوه‌ای ایجاد گردید و روی آن توده‌های اسپور به رنگ نارنجی مشاهده شد. شدت علائم ایجاد شده روی رقم نارنگی بیشتر از پرتقال بود که به وسیله محققین دیگر در مناطق مختلف مورد تایید قرار گرفته است (Agostini &Timmer 1992, Bailey & Jeger 1992, Fagan 1979, Timmer *et al.* 1998).

در خصوص برگ‌های مایه‌زنی شده، آنهایی که به وسیله پودر کاربوراندم خراش داده شده بودند، علائم را به خوبی نشان دادند ولی در مورد برگ‌های بدون زخم هیچ نوع علائمی مشاهده نشد. این نشان می‌دهد که وجود زخم برای شروع آلودگی ضروری است. علائم ایجاد شده روی برگ‌های نارنگی پیچ نسبت به سایر ارقام شدیدتر بود. در این تحقیق بین جدایه‌های مختلف قارچ از نظر میزان رشد شعاعی میسلیوم روی محیط غذایی PDA در دماهای مختلف بین ۳ تا ۴۰ درجه سانتی‌گراد تفاوت‌هایی وجود داشت. دمای بهینه رشد شعاعی میسلیوم جدایه‌های بیماریزا در محدوده $30^{o}C$ –۲۵ درجه سانتی‌گراد بود (شکل ۶). این دامنه دمایی رشد با آنچه که در منابع مربوط به جدایه‌های بیماریزا ذکر شده بود با اندکی اختلاف مطابقت دارد (Adaskaveg & Hartin 1997, Agostini *et al.* 1992, Brown 1975, 1977, Fagan 1979). اختلاف دما احتمالا ناشی از تفاوت جدایه‌های مورد استفاده و یا شرایط متفاوتی بود که تحت آنهاآزمایش ها انجام گرفته است. بین میانگین رشد شعاعی جدایه‌ها در دماهای مختلف نیز تفاوت‌هایی وجود دارد که می‌تواند به عنوان یکی از ویژگی‌های اختصاصی جدایه‌ها مطرح شود. نتایج حاصل از بررسی زمستان گذرانی قارچ نشان داد که قارچ به صورت آسروول و

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۶- میانگین سرعت رشد سه جدایه *Colletotrichum gloeosporioides* در دماهای مختلف روی محیط کشت PDA.

Fig. 6. Growth rate means of three isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* under the different temperatures on the PDA medium.

ریسه در بقایای آلوده زمستان‌گذرانی می‌کند و میزان دوام قارچ در بقایا بیش از یک سال است. تنها یک مورد پریتسیوم در اسلاید تهیه شده از برگ‌های مرده مشاهده شد. این نشان می‌دهد که فرم جنسی نیز می‌تواند در شروع آلودگی و بیماریزایی نقش داشته باشد. این نتیجه‌گیری با یافته‌های سایرمحققین مطابقت داشت (Bailey and Jeger 1992, Bronx 1994, Fagan 1980).

سپاسگزاری

مراحل انجام این تحقیق در آزمایشگاه بیماریهای گیاهی موسسه تحقیقات مرکبات کشور در رامسر انجام شده است. بدینوسیله از همکاریهای صمیمانه مسئولین محترم آن موسسه قدردانی بعمل می‌آید.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (12-9) متن انگلیسی مراجعه شود.

آدرس نگارندگان: ماریه ببری، محمد جوان نیکخواه، حسین طاهری، یعقوب محمد علیان، جواد فتاحی مقدم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، موسسه تحقیقات مرکبات کشور

Archive of SID

www.SID.ir