

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

حجت‌اله ربانی‌نسب<sup>۱\*</sup>، مهدی ارزنلو<sup>۲</sup>، علیرضا دلیلی<sup>۳</sup> و محمدعلی آقاجانی‌نسب<sup>۱</sup>

(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 اندام‌های گل و سطح میوه انار می‌گردد، در برخی مناطق کشت انار در ایران از جمله استان‌های 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 ۱۳۹۶ 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 ریشه جهت مطالعات ریخت‌شناختی و مولکولی ایجاد شدند. برگه قارچ روی محیط عصاره مالت آگار کند رشد (۳-۴ میلی‌متر در هفته)، برجسته، مطبق، مسلیوم متراکم در قسمت مرکزی، مسلیوم در قسمت مرکزی سفید رنگ و در حاشیه متمایل به صورتی بود. ساختارهای اسپورزایی در محیط کشت تشکیل نگردید. در محل لکه‌ها در سطح میوه‌های آلوده آسروول‌هایی مشاهده شدند. آسروول به قطر ۵۰ تا ۲۰۰ میکرومتر، کنیدیوفورها متراکم، منفرد و نسبتاً کوتاه، سلول‌های کنیدیوم زای بی‌رنگ یا قهوه‌ای روشن و فیالیدیک بودند. همچنین ناحیه ITS-rDNA توالی یابی شد. قارچ عامل بیماری براساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی و توالی نوکلئوتیدی ناحیه ITS-rDNA گونه *Elsinoë punicae* شناسایی گردید. مایه‌زنی میوه‌های سالم انار (رقم یزد) با سوسپانسیون مسلیوم قارچ منجر به ایجاد علائم اسکب روی میوه شد، در حالیکه در نمونه‌های شاهد علایمی مشاهده نگردید. عامل بیماری از بافت‌های مایه‌زنی 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 منابع طبیعی 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 منابع طبیعی مازندران، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، ساری، ایران.

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

H. Rabbaninasab<sup>1\*</sup>, M. Arzanlou<sup>2</sup>, A.R. Dalili<sup>3</sup>, and M.A. Aghajanasab<sup>1</sup>

(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 orchards 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 symptomatic 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 technique. Colonies on MEA grew very slowly (attained a diameter of 3-4 mm after 7 days at 25°C), raised, fluted, 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 subhyaline, phialidic. Conidia ellipsoidal, aseptate, hyaline, 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 search against sequence data in GenBank, showed 100 percent similarity with some sequences available 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, disease cycle and finally provide proper management strategies for this disease.

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

---

\*Corresponding author's E-mail: hrabbanisr@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, Mazandaran Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Sari, Iran.

## مقدمه

سیاه رنگ نامتقارن در سطح پوست آنها وجود داشت قارچ *A. alternata* جداسازی شد. با انجام آزمون بیماریزایی که با تزریق کنیدیوم 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 لکه‌های برگ 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 علائم 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 مجدداً توصیف نموده و آن را به جنس *Pseudocercospora* انتقال داد. در منابع مختلف قارچ *P. punicae* از انار جداسازی شده اما ارتباط این قارچ با علائم 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

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 آب و هوای مدیترانه‌ای است (Biale 1981). انار بومی ایران و مناطقی از آسیای میانه می‌باشد (Morton 1981).

آفات و بیماری‌های مختلفی درختان انار را تهدید می‌کنند 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 قابل توجهی 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 گزارش شده روی انار عمدتاً 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*, *Sphaeloma punicae* Bitanc. And Jenkins, Henn. *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Drechslera sp. و *Phomopsis* sp. به عنوان عوامل عارضه لکه برگ و میوه انار ذکر شده‌اند (Jamadar and Patil 2007). *Alternaria alternata* (Fr.) قارچ 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 علائم لکه‌های

درصد به مدت ۴۰ ثانیه ضدعفونی سطحی شده سپس در اتاقک مرطوب برای رشد قارچ بیمارگر قرار داده شدند. بعد از گذشت ۷-۱۰ روز آسروول‌های قارچ در حاشیه لکه‌ها ظاهر شدند. به منظور خالص‌سازی جدایه‌های قارچی، تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت PDA حاوی آنتی بیوتیک استرپتومایسین (به میزان یکصد میلی‌گرم در لیتر) به صورت مورب قرار داده شدند و حدود ۱۰ میلی لیتر آب مقطر استریل در یک گوشه محیط کشت ریخته شد. سپس با استفاده از سوزن تلقیح استریل، توده کنیدی از آسروول برداشته شد و در داخل آب در تشتک پتری پخش گردید. سوسپانسیون اسپور به صورت یکنواخت در سطح محیط کشت پخش گردید و سپس تشتک‌های پتری به صورت مورب به مدت یک شب نگهداری شدند. آب اضافی داخل تشتک پتری خالی و در زیر استرئومیکروسکوپ کنیدی‌های جوانه زده به محیط کشت جدید منتقل گردیدند. جدایه‌ها در تیوب ۲ میلی‌لیتری حاوی محیط آگار تغذیه‌ای مصنوعی (SNA) و سیب‌زمینی هویج آگار (PCA) درینچال 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 اندام باردهی و سلول کنیدیوم‌زا و کنیدیومها صورت گرفت.

#### شناسایی مولکولی جدایه‌ها

به منظور کمک به شناسایی قارچ براساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی، ناحیه ITS-rDNA تکثیر و توالی‌یابی گردید. برای این منظور DNA از کلنی‌های ۳۷ روزه قارچ

وجود داشته باشد. در یک تحقیق گونه‌های قارچی *Penicillium expansum*, *Aspergillus niger* Tiegh *P. glabrum*, *P. sclerotiorum* J.F.H. Beyma, (Link) *Pilidiella granati* (Sacc.) Aa و (Wehmer) Westling روی انارهای مایه‌زنی‌شده، بیماری‌زا بودند در حالیکه قارچهای *Cytospora* و *P. minioluteum* Dierckx و *annulata* Ellis & Everh. هیچ گونه فساد و پوسیدگی توسط قارچهای *Alternaria* spp. و *Co.* *Palou et al.* ایجاد نشده است (2013). شیوع یک بیماری کمتر شناخته‌شده روی انار در استان گلستان، این محصول را به شدت تهدید می‌نماید. این بیماری باعث ایجاد لکه در روی گل و نهایتاً روی میوه شده و موجب نابودی کامل گلها یا بدشکلی میوه می‌شود. تحقیق حاضر با هدف شناسایی عامل بیماری در استان گلستان صورت پذیرفت.

#### روش بررسی

##### نمونه‌برداری

نمونه‌برداری از اوایل اردیبهشت ماه تا انتهای مرداد ماه سال ۹۶ انجام شد. به باغات انار هر دو استان گلستان و مازندران مراجعه و از گلهای آلوده در ابتدای فصل و میوه‌های نارس، بد شکل و لکه دار اواسط فصل در مرداد ماه نمونه برداری گردید. در مجموع ۴۷ نمونه از استان گلستان و ۲۶ نمونه از استان مازندران جمع‌آوری گردید.

##### جداسازی، خالص‌سازی و نگهداری جدایه‌ها

جدایه‌ها از نمونه‌های انار آلوده و دارای علائم جداسازی و خالص شدند. ابتدا تکه‌های کوچک از پوست انار که دربرگیرنده لکه‌های نکروزه بود بریده شده و در هیپوکلیت سدیم ۳ درصد به مدت ۲ دقیقه و در الکل ۷۰

## آزمون بیماری‌زایی

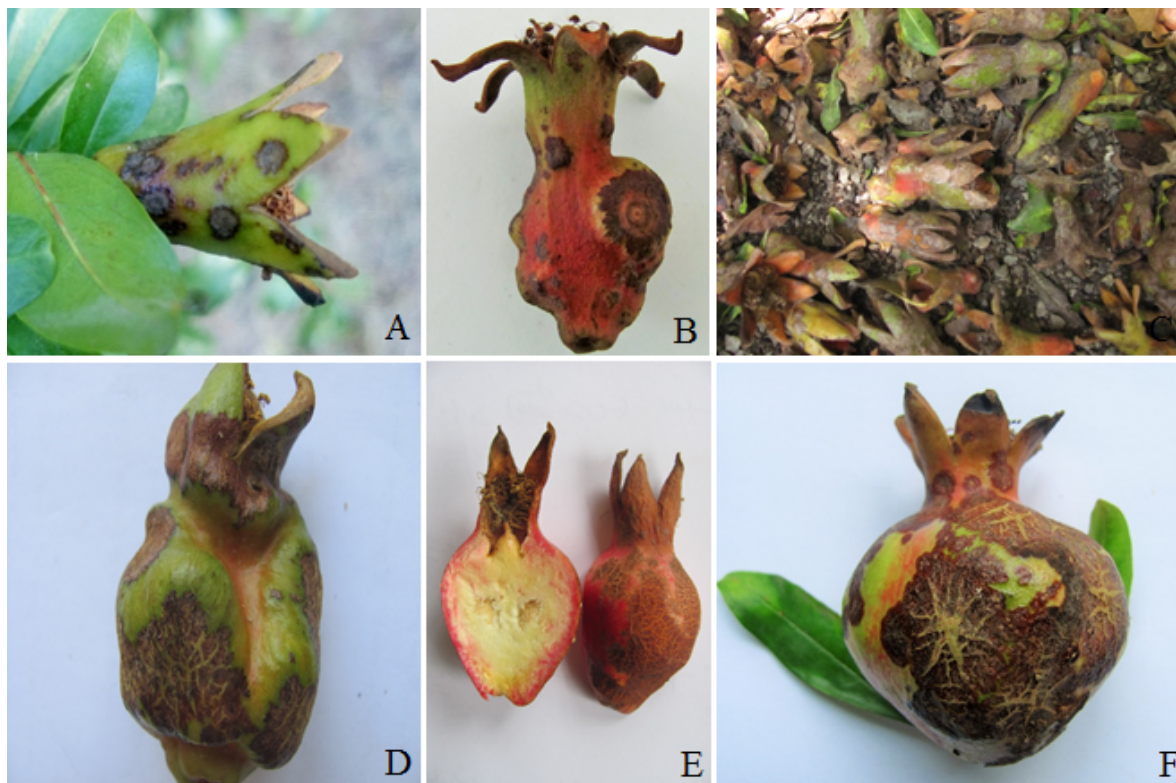
جهت تهیه مایه تلقیح عامل بیماری، جدایه‌های روی محیط کشت PDA به صورت مخطط مایه‌زنی شده و به مدت سه هفته در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. میوه‌های سالم انار (رقم یزد) تهیه شد. میوه‌ها ابتدا با آب شستشو داده شده، سپس با استفاده از الکل ۷۰ درصد سطح میوه‌ها ضدعفونی گردیدند. در سطح میوه‌ها با استفاده از لبه تیغ اسکالپل زخم‌های سطحی ایجاد و محل زخم با استفاده از توده هیف قارچ مایه‌زنی شد. میوه‌های خراش داده‌شده 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 علائم بیماری در فواصل زمانی بررسی گردید.

## نتایج

### علائم بیماری

در شرایط طبیعی علائم بیماری به صورت لکه‌های قهوه‌ای تا قهوه‌ای تیره نسبتاً 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 علائم 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 (شکل ۱). آلودگی میوه در مراحل بعدی

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، ۵/۵ 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 اتیدیوم بروماید در بافر 1X TAE توسط دستگاه عکس برداری از ژل تحت نور ماوراءبنفش مشاهده و بررسی و محصول واکنش زنجیره ای پلی‌مراز جهت توالی‌یابی 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 توالی‌های موجود در بانک ژن مقایسه شد و هویت جدایه‌های قارچی مورد بررسی قرار گرفت.



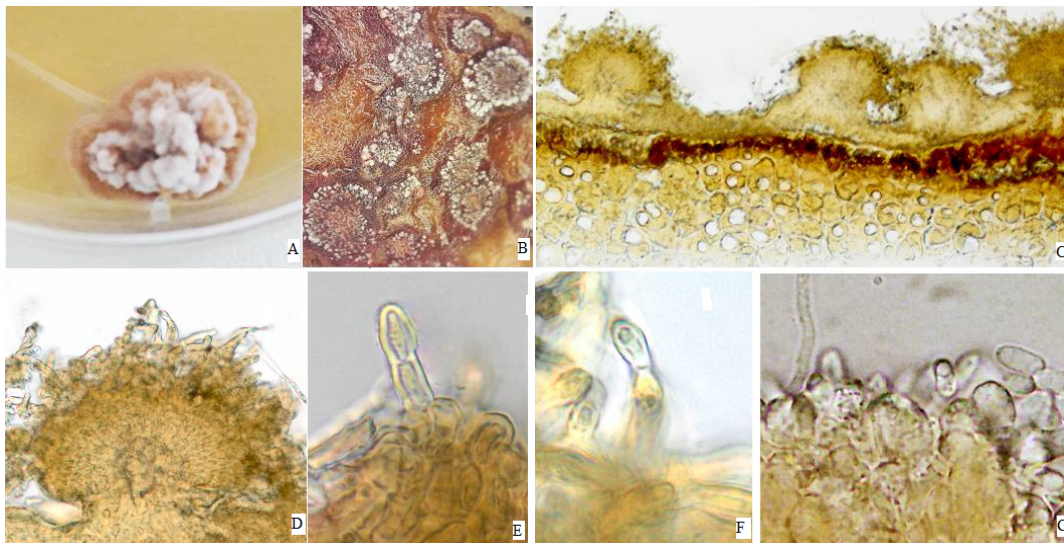
شکل ۱. علائم بیماری اسکب روی میوه انار در شرایط باغ. A. لکه های نکروتیک روی گل، B و C. گل‌های دفورمه شده. D. میوه های جوان دفورمه شده، E. عدم تلقیح گل‌های آلوده و تولید میوه های بدون دانه، F. لکه های شعاعی روی میوه های نارس

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

### 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 سانتی‌متر می‌رسید. کلنی روی محیط کشت حالت برآمده (حدود ۴ میلی‌متر)، تا شده و دارای مسیلیوم‌های متراکم، فشرده بود. حاشیه کلنی حالت نامنظم 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 دو ماه نگهداری کشت‌های قارچی تشکیل نشد. روی میوه‌های آلوده انار در شرایط طبیعی، ساختارهای غیر جنسی قارچ

منجر به بروز علائم 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 علائم این بیماری است (شکل ۱). گل‌هایی که در ابتدای فصل آلوده می‌شوند، پس از بد شکل شدن غالباً میوه کامل تشکیل نمی‌دهند (شکل ۱). اگر گل‌های مرحله دوم در اواخر بهار آلوده شوند معمولاً تبدیل به میوه شده و میوه‌ها قابل مصرف هستند و ایجاد لکه روی پوست انار تاثیری چندانی بر دانه‌های انار ندارند هرچند نهایتاً لکه‌های کاملاً مشخصی روی پوست انار تشکیل می‌شود (شکل ۱).



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 آسروول E و F. کنیدیوفور و سلول کنیدیوم زا G. کنیدی های تک سلولی و شفاف.

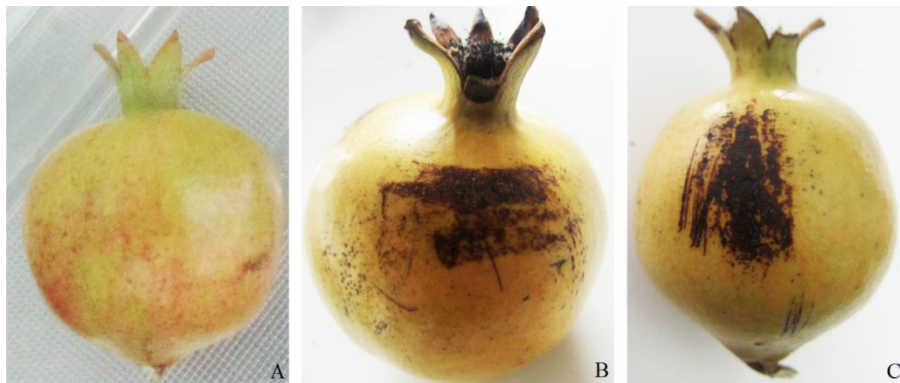
**Fig. 2. *Elsinoë punicae*. A. fungal colony on PDA. B. Conidiomata on naturally infected fruit. D, C. vertical section through acervuli. F. Conidiophore and conidiogenous cells. G. single-celled and hyaline conidia.**

ترتیب با کدهای دسترسی MH845063 و MH845063 در بانک ژن ارسال شدند. مقایسه داده‌های توالی با توالی‌های موجود در بانک ژن مشابهت صددرصدی با توالی ناحیه ITS برای گونه‌های *Elsinoë punicae* جداسازی شده از انار (KX887276.1)، گونه *Elsinoë australis* Bitanc. & Jenkins جداسازی شده از نارنگی (FJ010318) و جوجوبا (*Simmondsia chinensis* (Link) C. K. (GU 126378) (Schneid. 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).

تشکیل شدند. آسروول‌ها روی میوه‌های آلوده در زیر کوتیکول، داخل اپیدرمی و کمی فرورفته در پوست مشاهده شد. آسروول‌ها اغلب به هم پیوسته و گاهی هم به صورت منفرد، قطری بین ۲۰۰-۵۰ میکرومتر داشتند (شکل ۲). 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 (شکل ۲). کنیدی‌ها تک سلولی، بیضوی و به رنگ روشن در اندازه  $2-3/5 \times 4-8$  میکرومتر بودند (شکل ۲). ویژگی‌های ریخت‌شناختی جدایه‌های بدست آمده در این تحقیق با توصیف گونه *Elsinoë punicae* Rossman & W.C. Allen (Bitanc. & Jenkins) (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 (CCTU359 و CCTU358) طی واکنش زنجیره ای پلی مرز تکثیر و توالی‌یابی گردید. داده‌های توالی به



شکل ۳- آزمون بیماری‌زایی *Elsinoë punicae* روی میوه انار (رقم یزد) در شرایط آزمایشگاه. A. تیمار شاهد تلقیح شده با محیط کشت PDA (بدون علائم). B و C. میوه های تلقیح شده با سوسپانسیون اسپور و میسلیوم و توسعه علائم 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 mycelial suspension and development of disease symptoms after 45 days of incubation.**

## بحث

عدم وجود ساختارهای بارور قارچ مشکل است. به‌علاوه جداسازی *Elsinoë* در شرایط آزمایشگاه به علت رشد بسیار کند سخت بوده و غالباً 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 صرفاً 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

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 به راحتی قابل تشخیص هستند. این علایم غالباً 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 این حال بررسی جدایه‌های جمع‌آوری شده از باغ به علت



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 اخیراً از *Citrus australasica* (F. Muell.) (Australian finger lime) و (جوجوبا) گزارش شده است و براساس آزمون بیماری زایی و دامنه میزبانی به عنوان دو پاتوتیب 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 پاتوتیب‌های 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 گل‌های ابتدایی آلوده شوند دچار بدشکلی شده و گل تلقیح

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 قبلاً 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 نهایتاً 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. اخیراً 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 اخیراً 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.

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.

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. میوه‌های لکه دار دانه‌های سالمی داشته و فقط در زیر لکه‌ها دانه‌ها کمی سفید می‌گردند. با این حال وجود این لکه‌ها موجب کاهش ارزش بازاری محصول می‌شوند. توسعه کشت انار در استان‌های مازندران و گلستان که دارای

## 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.
- Faemma 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., Firtas 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 of citrus 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 phytopathogens 1: *Pseudocercospora punicae*. *Plant Pathology and Quarantine* 1(1): 1-6.
- Rossmann 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 Journal 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 Mandarin).