

## شناسایی گونه‌های قارچ آلترناریا در درختان پرتقال استان‌های گلستان و مازندران و بررسی بیماریزایی آن‌ها در رقم‌های پرتقال

محمود ریاحی<sup>۱</sup>، پریسا طاهری<sup>۲\*</sup> و مجتبی ممرآبادی<sup>۳</sup>

۱، ۲، ۳. دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشیار و استادیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۲/۲۷ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۶/۱۲)

### چکیده

لکه قهوه‌ای آلترناریایی و پوسیدگی سیاه پس از برداشت میوه جزو بیماری‌های مهم درختان مرکبات هستند. این بیماری‌ها ناشی از گونه‌های بیماریزای قارچ *Alternaria* بوده و می‌توانند آسیب و زیان اقتصادی به درختان حساس مرکبات و میوه‌های انبارشده وارد کنند. هدف از انجام این تحقیق شناخت گونه‌های بیماریزای این قارچ و معرفی رقم‌های مقاوم به این بیماری در درختان پرتقال است. به همین منظور نمونه‌های مشکوک به بیماری آلترناریایی از باغ‌های این دو استان گردآوری و در آزمایشگاه، در محیط‌های PDA و PCA کشت شدند. سپس این قارچ‌ها با توجه به ویژگی‌های ریخت‌شناختی (مورفولوژیکی)، طبق کلید گونه‌های آلترناریا شناسایی شدند. همچنین به منظور تأیید درستی شناسایی ریخت‌شناختی، شناسایی مولکولی با استفاده از آغازگر (پرایمر)های عمومی ITS1 و ITS4 و توالی‌یابی محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز انجام شد. از بین ۴۵ جدایه به دست آمده، ۲۸ جدایه متعلق به گونه *A. alternata*، ۱۲ جدایه مربوط به *A. dumosa* و ۵ جدایه از *A. atra* شناسایی شدند. برای ارزیابی بیماریزایی جدایه‌ها، از چهار رقم پرتقال شامل تامسون ناول، یافا شیرین، خونی سانگین و والنسیا استفاده شد. آزمون بیماریزایی با استفاده از سوسپانسیون اسپور با غلظت  $10^6$  اسپور در میلی‌لیتر روی برگ، میوه و نهال انجام گرفت. نتایج بررسی‌ها نشان داد، جدایه‌های این سه گونه توانستند در رقم‌های تامسون، یافا و والنسیا بیماری ایجاد کنند. اما رقم سانگین در آزمون بیماریزایی روی برگ، میوه و نهال به کلی مقاوم بوده و جدایه‌های آلترناریایی به دست آمده نتوانستند بیماری روی این رقم ایجاد کنند. بنابراین رقم سانگین به عنوان رقم مقاوم به گونه‌های آلترناریایی بیماریزا در پرتقال معرفی شد.

واژه‌های کلیدی: رقم‌های پرتقال، آزمون بیماریزایی، شناسایی مولکولی و ریخت‌شناختی، *Alternaria* spp.

## Identification of *Alternaria* spp. in orange trees of Golestan and Mazandaran provinces and investigating their virulence on orange cultivars

Mahmood Riyahi<sup>1</sup>, Parissa Taheri<sup>2\*</sup> and Mojtaba Mamarabadi<sup>3</sup>

1, 2, 3. M.Sc. Student, Associate Professor and Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran  
(Received: May 17, 2017 - Accepted: Sep. 3, 2017)

### ABSTRACT

*Alternaria* brown spot and postharvest black rot of fruit are serious diseases of citrus trees. These diseases are caused by *Alternaria* spp. and can be economically destructive on susceptible citrus trees. The aim of this study was to identify the pathogenic species of this fungus and to introduce orange cultivars resistant to this disease. For this purpose, samples suspected to *Alternaria* infection were collected from orchards of Golestan and Mazandaran provinces and were cultured on PDA and PCA media in the laboratory. Then, the fungi were identified according to the morphological key to *Alternaria* spp. In order to verify the morphological, molecular identification was done using universal primers ITS1, ITS4 and PCR product sequencing. From 45 isolates collected, the identified species were *A. alternata* (28 isolates), *A. dumosa* (12 isolates) and *A. atra* (5 isolates). For investigating pathogenicity of the isolates, 4 orange cultivars including Thomson Navel, Jaffa Sweet, Sanguinelli Blood, and Valencia were used. The pathogenicity test was done by using spore suspension with  $10^5$  spores per ml on the leaf, fruit and, seedling. The results revealed that the isolates of these three species showed serious symptoms on the Thomson, Jaffa, and Valencia cultivars. However, the Sanguinelli was relatively resistant in three pathogenicity tests on the leaf, fruit, and the seedling and the mentioned species were not able to create disease symptoms at this cultivar. Thus, Sanguinelli was introduced as a resistant cultivar against *Alternaria* spp. in orange.

**Keywords:** *Alternaria* spp., Morphological and molecular identification, Orange cultivars, Pathogenicity test.

\* Corresponding author E-mail: p-taheri@um.ac.ir

### مقدمه

میوه گونه‌ها و رقم‌های مختلف مرکبات از محصولات عمده و اصلی ایران به شمار می‌آیند که در صورت بالا بودن میزان تولید و کیفیت می‌تواند یکی از منابع مهم اشتغال‌زایی و کسب درآمد ارزی برای کشورمان باشند. گونه‌های مختلف قارچ آلترناریا عامل بروز بیماری‌هایی مانند سرخشکیدگی شاخه‌ها، لکه قهوه‌ای و پوسیدگی سیاه میوه مرکبات در ایران و جهان هستند. در این تحقیق به دو بیماری لکه قهوه‌ای و پوسیدگی سیاه که در ایران روی رقم‌های مختلف پرتقال و نارنگی دیده شده‌اند و آسیب‌زا هستند پرداخته شده است (Ershad, 2009). لکه قهوه‌ای آلترناریایی، نخستین بار در سال ۱۹۰۳ روی نارنگی امپرو در استرالیا توصیف شد (Timmer et al., 1998). این بیماری موجب برگ‌ریزی شدید، ریزش میوه و لکه‌دار شدن برگ و میوه‌های رقم‌های حساس می‌شود و تولید این رقم‌ها را در نواحی مرطوب محدود می‌سازد. قارچ عامل این بیماری (*Alternaria alternata* pv. *citri*) نوعی زهرابه اختصاصی به نام ACTG تولید می‌کند که عامل اصلی بافت‌مردگی لکه‌هاست. اسپوره‌های این قارچ دیواره ضخیم دارند و نسبت به خشکی و دیگر شرایط نامناسب مقاوم‌اند (Timmer et al., 1998).

پوسیدگی آلترناریایی بیشتر به شکل پوسیدگی دمگاه بروز می‌کند و در میوه‌هایی که زخمی شده‌اند و یا به مدت طولانی انبار می‌شوند دیده می‌شود. اما گاهی در باغ پوسیدگی در گلگاه میوه ایجاد و باعث ریزش میوه‌های جوان و نارس مرکبات می‌شود (Timmer et al., 2003). این نوع آسیب و زیان در باغ به‌ویژه روی رقم تامسون ناول شدید است که به علت وجود نقص در محل گلگاه آن‌ها آلودگی به آسانی ایجاد می‌شود. در این بیماری میوه بیمار در باغ و هنگامی که هنوز نارس است، رنگ می‌گیرد و گاهی بخش‌هایی از پوست در گلگاه یا نزدیک به گلگاه قهوه‌ای روشن تا متمایل به سیاه می‌شود (Brown & McCornack, 1972).

نتایج بسیاری از بررسی‌ها نشان داده‌اند، نارنگی دانسی و بیشتر دورگه (هیبرید)های این رقم یعنی

مینئولا تانجلو، اورلاندو تانجلو، لی، سان برست و نوا نسبت به لکه قهوه‌ای آلترناریایی بسیار حساس‌اند. افزون بر این، بعضی از رقم‌های نارنگی مانند امپرو نیز به این بیماری آلوده می‌شوند (Kohmoto et al., 1991). همچنین نتایج آزمایش‌ها نشان داده است که دورگه‌های نارنگی مانند انشو و کلمانتین و گریپ فروت مقاومت نسبی در برابر گونه‌های قارچ آلترناریا از خود نشان داده‌اند (Gardner et al., 1986). رقم‌هایی مانند کلمانتین ژن مقاومت نسبت به بیماری لکه قهوه‌ای دارند (Dalkilic et al., 2005). همچنین آزمون بیماری‌زایی چهار گونه مرکبات شامل پرتقال تامسون، نارنج، نارنگی فورتون و کلمانتین با استفاده از قارچ *A. alternata* انجام شد که به جز رقم کلمانتین، دیگر رقم‌ها حساسیت شدید به این بیمارگر داشتند (Mahmoudi, 2010). نتایج بررسی‌ها نشان داده است، رقم‌ها و دورگه‌های نارنگی مانند دانسی، به‌طورمعمول به *A. alternata* حساس هستند و رقم‌های پرتقال مانند تامسون مقاومت نسبی دارند. رقم‌های پرتقال سانگین و لیمو نیز به این بیمارگر (پاتوژن) مقاومت کامل نشان دادند (Vicent et al., 2004). در نتایج تحقیق دیگری پرتقال رقم تامسون و لیموشیرین به گونه *A. alternata* مقاومت نسبی و رقم نارنگی کلمانتین مقاومت کامل نشان دادند (Kakvan et al., 2012).

در این تحقیق افزون بر شناسایی گونه‌های بیماری‌زای آلترناریا در پرتقال، واکنش برخی رقم‌های پرتقال رایج در شمال ایران به گونه‌های شناسایی‌شده در سه آزمون برگ، میوه و نهال بررسی و مقاومت این رقم‌ها به این بیماری ارزیابی شد.

### مواد و روش‌ها

#### شناسایی ریخت‌شناختی جدایه‌های قارچی

نمونه‌های برگ و میوه با نشانه‌های مشکوک به بیماری آلترناریایی از باغ‌های مرکبات استان‌های گلستان و مازندران در ماه‌های شهریور و مهر سال ۱۳۹۴ گردآوری و به آزمایشگاه انتقال داده شدند. پس از شستشوی نمونه‌ها با آب، از مرز بین بافت سالم و بیمار برشی تهیه و با هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد

از محیط مایع جداسازی شد و تا زمان استفاده در فریزر با دمای  $20^{\circ}\text{C}$  - نگهداری شد (Issshiki *et al.*, 2001). به منظور استخراج DNA ژنومی از کیت استخراج DNA قارچ (ساخت شرکت دنازیست آسیا ایران) با دستورکار شرکت سازنده استفاده شد.

#### واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ( Polymerase chain

##### reaction; PCR) و توالی‌یابی محصولات PCR

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر و با استفاده از ۱۲/۵ میکرولیتر از ماسترمیکس انجام شد. به منظور انجام PCR از دو آغازگر پیش رو (ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') و پس رو (ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') که بر مبنای نواحی تکرارشونده rDNA در ژنوم قارچ‌ها طراحی شده‌اند، استفاده شد (White *et al.*, 1990). واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر مدل (Biometra Tpersonal; Germany) انجام شد. برنامه دمایی واکنش برای تکثیر این ناحیه به صورت زیر تنظیم شد؛ واسرشت سازی اولیه در دمای  $94^{\circ}\text{C}$  به مدت ۷ دقیقه و ۳۵ چرخه: واسرشت‌سازی در دمای  $94^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگرها در دمای  $55^{\circ}\text{C}$  به مدت ۳۰ ثانیه، بسط در  $72^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱ دقیقه و بسط نهایی در  $72^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱۰ دقیقه. به منظور مشاهده محصول PCR، از الکتروفورز در ژل آگارز ۱ درصد با ولتاژ ۸۰ ولت و شدت جریان ۱۰۰ میلی‌آمپر استفاده شد. همچنین برای تعیین اندازه قطعه‌های تکثیر شده، از نشانگر اندازه DNA با نام تجاری DNA ladder 100bp + 3k, SMOBiO استفاده شد. عکس‌برداری با استفاده از دستگاه Gel Documentation مدل (InGenius3; USA) انجام شد (Kang *et al.*, 2002). محصولات به دست آمده از PCR، برای توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کشور کره ارسال شدند. آنگاه توالی‌های جدایه‌ها با توالی‌های موجود در بانک ژن با استفاده از نرم‌افزار اینترنتی NCBI Blast Search مقایسه شدند. پس از آماده‌سازی توالی‌ها، هم‌ترازی آن‌ها به کمک نرم‌افزار Mega5 انجام گرفت (Tamura *et al.*, 2011). سپس به منظور بررسی ارتباط توالی‌های ناحیه ITS گونه‌های

ضد عفونی شدند. سپس به منظور رشد عامل بیماری، نمونه‌های ضد عفونی شده به روی محیط کشت XPDA (۲۰ گرم در ۱ لیتر) منتقل و درون دستگاه رشد (انکوباتور) با دمای  $28^{\circ}\text{C}$  قرار داده شدند. پس از رشد عامل‌های بیماری، از آن‌ها اسلاید تهیه شد. در نهایت بررسی ساختارهای قارچی، با استفاده از میکروسکوپ نوری (Olympus BH-2, Japan) انجام شد. سپس جدایه‌هایی که بر پایه بررسی‌های اولیه، قارچ آلترناریا تشخیص داده شدند، به منظور خالص‌سازی به محیط سیب‌زمینی- هویج- آگار (Potato carrot agar; PCA) منتقل شدند. از محیط PCA (۲۰ گرم عصاره هویج، ۲۰ گرم عصاره سیب‌زمینی و ۲۰ گرم آگار در ۱ لیتر آب) به منظور تهیه اسپور فراوان از این قارچ، استفاده شد. پس از انتقال تک اسپور به محیط PCA و خالص کردن قارچ مورد نظر، شناسایی ریخت‌شناختی (مورفولوژیکی) گونه‌ها با استفاده از کلید ریخت‌شناختی آلترناریا (Simmons, 2007) انجام شد. گونه‌های آلترناریا با توجه به ویژگی‌هایی مانند اندازه و شکل کنیدیوم، نوک کنیدیوم، وجود یا نبود زنجیره کنیدیوم، شمار کنیدیوم در زنجیره، وجود یا نبود انشعاب در زنجیره، فراوانی انشعاب در زنجیره، زگیل‌دار یا صاف بودن سطح کنیدیوم، کوتاه یا بلند بودن کنیدیوفور ثانویه و اولیه، دسته‌ای بودن یا نبودن کنیدیوم‌ها و قطر پرگنه قارچ در محیط PCA از هم جداسازی شدند (Simmons, 2007).

#### شناسایی مولکولی جدایه‌های قارچی

##### تهیه توده میسلیم و استخراج DNA ژنومی قارچ

به منظور تهیه توده میسلیم مورد نیاز برای استخراج DNA ژنومی (ژنگانی)، میزان ۵۰ میلی‌لیتر از محیط غذایی مایع سیب‌زمینی-دکستروز (Potato dextrose broth; PDB) در ظرف‌های شیشه‌ای ۱۰۰ میلی‌لیتری ریخته و استریل شد. آنگاه هر یک از ظرف‌ها توسط یک حلقه میسلیمی به قطر ۱۰ میلی‌متر مایه‌زنی شد. ظرف‌های مایه‌زنی شده به مدت هفت تا ده روز درون قسمت لرزای دستگاه رشد (شیکر انکوباتور) با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه و دمای  $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$  قرار داده شدند. پس از رشد و تشکیل میسلیم قارچی، توده میسلیم

آلترناریا با یکدیگر، تبارنما با استفاده از این نرم‌افزار ترسیم شد.

#### شرایط نگهداری رقم‌های پرتقال در گلخانه

برای ارزیابی بیماری‌زایی جدایه‌ها، از چهار رقم پرتقال شامل تامسون ناول، یافا، پرتقال خونی سانگین و پرتقال والنسیا تابستانه استفاده شد. این چهار رقم متعلق به گونه *Citrus sinensis* (L.) Osbeck هستند. رقم‌های پرتقال استفاده‌شده در این پژوهش دوساله بودند و پایه آن‌ها نارنج (Sour orange)<sup>۱</sup> بود. این نهال‌ها در گلدان ۸ کیلویی و در خاکی شامل ۱۵ درصد ماسه، ۱۵ درصد برگ جنگلی، ۲۵ درصد کود دامی و ۴۵ درصد خاک باغچه کاشته شدند. آبیاری نهال‌ها هر ۴ الی ۵ روز انجام گرفت. دما و رطوبت گلخانه که نهال‌ها در آن نگهداری شدند به ترتیب ۳۰°C و ۷۰ درصد و شرایط نوری نیز ۱۳ ساعت روشنایی و ۱۱ ساعت تاریکی بود.

#### آزمون بیماری‌زایی

آزمون بیماری‌زایی با استفاده از سوسپانسیون (دروایه) اسپور جدایه‌های *A. alternata*، *A. dumosa* و *A. atra* با غلظت ۱۰<sup>۵</sup> اسپور در میلی‌لیتر روی برگ، میوه و نهال انجام گرفت (Kohmoto et al., 1991). سوسپانسیون اسپور حاوی ۰/۰۵ درصد توئین ۲۰ بود و غلظت آن توسط لام هموسایتومتر تعیین شد (Waller et al., 1997). آزمون بیماری‌زایی روی برگ و میوه در شرایط آزمایشگاه و بررسی بیماری‌زایی جدایه‌ها روی نهال در شرایط گلخانه انجام شد. همچنین توان تهاجم جدایه‌ها، یعنی شمار روز پس از مایه‌زنی که در مورد هر جدایه قارچی نشانه‌های ظاهر می‌شود، روی رقم والنسیا ارزیابی شد. به طوری که هر چه زودتر نشانه‌های ظاهر شود، توان تهاجم آن جدایه قارچی بیشتر است. در آزمون بیماری‌زایی روی برگ، در آغاز در سطح برخی از برگ‌ها توسط سوزن استریل (سترون‌شده)، خراشی به طول ۱۰ میلی‌متر ایجاد شد تا شدت بیماری بافت‌های زخمی در مقایسه با

بافت‌های سالم بررسی شود و آنگاه مایه‌زنی با پاشش (اسپری) اسپورها روی برگ‌های سالم و خراش داده‌شده صورت گرفت. برگ‌های مایه‌زنی‌شده، درون ظرف شیشه‌ای شفاف با رطوبت ۸۵ درصد، دمای ۲۵°C و دوره ده ساعت روشنایی و ۱۴ ساعت تاریکی نگهداری شدند (Kohmoto et al., 1991). در آزمون بیماری‌زایی روی میوه‌ها، ۳ قسمت از پوست رویی<sup>۲</sup> در محل نزدیک به گلگاه، توسط کاردک (اسکالپل) به طول ۵ و عمق ۲ میلی‌متر برش داده شد. آنگاه دیگر مراحل، یعنی مایه‌زنی و شرایط نگهداری، همانند آزمون برگ انجام گرفت (Dalkilic et al., 2005). در آزمون بیماری‌زایی روی نهال، سوسپانسیون اسپور با همان غلظت پیشین روی برگ‌ها اسپری شد.

در همه آزمایش‌های انجام شده، مهار منفی، برگ، میوه و نهالی بود که با آب مقطر استریل حاوی ۰/۰۵ درصد توئین ۲۰ محلول‌پاشی شد. در آخر برای دستیابی به اطمینان از ایجاد لکه‌ها توسط عامل بیماری، جداسازی عامل بیماری از برگ و میوه‌های آلوده روی محیط کشت PDA انجام شد. آزمایش‌ها در قالب طرح کامل تصادفی اجرا شدند، که بنابراین از هر رقم (تیمار) سه تکرار در نظر گرفته شد. در آزمون برگ و میوه، بی‌درنگ پس از مایه‌زنی، داده‌ها به صورت روزانه تا روز دهم و در آزمون نهال تا روز سی‌ام گردآوری شدند. به منظور بررسی شدت بیماری‌زایی جدایه‌ها، درصد آلودگی سطح برگ‌ها (به صورت بدون آلودگی = ۰، ۱ الی ۲۰٪ = ۱، ۲۱ الی ۴۰٪ = ۲، ۴۱ الی ۶۰٪ = ۳، ۶۱ الی ۸۰٪ = ۴ و آلودگی ۸۱ درصد و بیشتر از آن = ۵) (Kakvan et al., 2012) و درصد آلودگی میوه‌ها (به صورت بدون آلودگی = ۰، کمتر از ۵٪ = ۱، ۵ الی ۲۰٪ = ۲، ۲۱ الی ۵۰٪ = ۳ و آلودگی بیشتر از ۵۰٪ = ۴) اندازه‌گیری و نمره‌دهی شدند (Seif & Hillocks, 1999). همچنین برای ارزیابی مقاومت رقم‌های مختلف به بیماری، از شاخص‌های مقاومت که به صورت زیر تعریف شده‌اند، استفاده شد؛ (شاخص بیماری ۰ تا ۱۰ = مقاوم، ۱۱ تا ۳۰ = مقاومت نسبی، ۳۱ تا ۶۰ = حساسیت نسبی، شاخص بیماری بیش از ۶۱ = حساس) (Kakvan et al.,

به صورت دسته‌ای بود. مدل اسپورزایی این قارچ به صورت تولید یک کنیدیوفور عمودی و راست بود که در نوک آن یک خوشه از زنجیره‌های منشعب کنیدیوم قرار داشت (همانند درخت). کنیدیوم‌ها در زنجیره به صورت تارکسو (آکروپتال) تولید می‌شدند. به این صورت که کنیدیوم جدید از نوک کنیدیوم پیشین که به طور معمول یک یا دو سلولی بود، به دست می‌آید. همچنین کنیدیوم‌ها در شاخه‌های جانبی توسط کنیدیوفور ثانویه کوتاه که از پهلوی کنیدیوم منشعب شده بود، ایجاد می‌شدند (شکل ۱B). کنیدیوفورهای اولیه، به طور معمول به طول ۴۰-۷۰ μm و عرض ۳-۴ μm بودند. یک زنجیره کنیدیوم تنها در یکی از انشعاب‌ها ۱۵ الی ۲۰ کنیدیوم داشت. کنیدیوم‌های اولی و دومی در زنجیره به طور معمول بلند و به شکل بیضی کشیده (Elliptical) بودند (شکل ۱C) و کنیدیوم‌هایی که دیرتر تولید شدند در انتهای زنجیره قرار گرفتند تخم‌مرغی شکل (Ovoid) و بیضوی بودند. کنیدیوم‌های بیضوی کشیده به طول ۲۵-۳۰ (۴۰) μm و عرض ۵-۹ μm بود که تنها ۴ الی ۷ دیواره عرضی داشت و بدون دیواره طولی بود. کنیدیوم‌های تخم‌مرغی شکل نیز به طول ۷-۲۵ (۴۰) μm و عرض ۵-۱۲ μm بودند که ۱ الی ۷ دیواره عرضی داشتند و همانند کنیدیوم‌های بیضوی کشیده بدون دیواره طولی بودند و یا دیواره طولی در آن‌ها به ندرت دیده می‌شد.

(2012). به منظور ارزیابی و مقایسه شدت بیماری جدایه‌ها، میانگین درصد نشانه‌های بیماری ایجاد شده، اندازه‌گیری و با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۱،۰) و به روش دانکن تجزیه شدند. شاخص بیماری نیز با رابطه زیر به دست آمد:

= شاخص بیماری

$$\frac{\text{مجموع حاصلضرب ارزش هر نمره و تعداد نمونه برداری آن نمره}}{\text{بالاترین ارزش هر نمره} \times \text{تعداد کل نمونه‌ها}} \times 100$$

## نتایج

### شناسایی گونه‌ها

در بررسی نمونه‌های گردآوری شده از باغ‌های پرتقال استان‌های گلستان و مازندران، ۴۵ جدایه از قارچ آلترناریا به دست آمد (جدول ۱) که شامل سه گونه A. alternata (با ۲۸ جدایه)، A. dumosa (۱۲ جدایه) و A. atra (۵ جدایه) بودند (جدول ۲).

### ویژگی‌های ریخت‌شناختی گونه‌های شناسایی شده

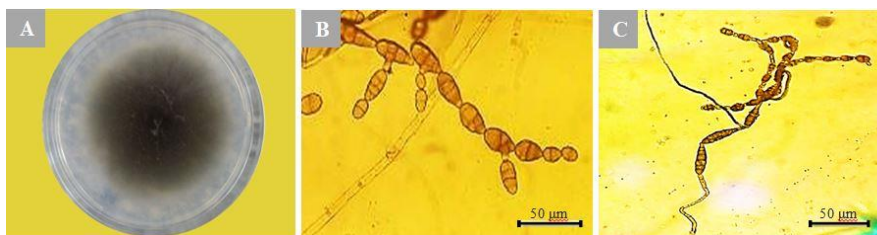
#### 1) *Alternaria alternata*

قطر پرگنه این قارچ در محیط PCA پس از گذشت شش روز، ۴ سانتی‌متر و رنگ آن سبز زیتونی مایل به خاکستری بود (شکل ۱A). اسپورزایی این قارچ در محیط PCA به دلیل فقر غذایی، فراوان و تیپ رشدی آن

جدول ۱. میزبان، موقعیت جغرافیایی و نام جدایه‌های قارچ آلترناریای به دست آمده از درختان پرتقال استان‌های گلستان و مازندران

Table 1. Host, geographic location and the name (code) of *Alternaria* isolates recovered from orange trees in Golestan and Mazandaran provinces

Location	Host	Tissue	Isolate code
Golestan- Gorgan	Thomson navel	Leaf	aGo1, aGo2, dGo4
	Thomson navel	Fruit	aGo3
	Jaffa sweet	Leaf	dGo5
Golestan- Kordkuy	Washington navel	Leaf	aK1
	Thomson navel	Leaf	aK2, atK3
Golestan- Bandar Gaz	Washington navel	Leaf	aBz1, atBz7
	Valencia late	Leaf	aBz2, dBz4
	Thomson navel	Leaf	aBz3, dBz5, atBz6
Mazandaran- Galugah	Thomson navel	Leaf	aGa1, dGa2
Mazandaran- Behshahr	Jaffa sweet	Leaf	aBe1
	Thomson navel	Fruit	aBe2, dBe3
	Washington navel	Leaf	dBe4, atBe5
Mazandaran- Neka	Thomson navel	Leaf	aNe1
Mazandaran- Sari	Thomson navel	Leaf	aS1, dS5, atS6
	Washington navel	Leaf	aS2, aS3, dS4
Mazandaran- Babol	Jaffa blood	Leaf	aBa1
	Thomson navel	Fruit	aBa2
Mazandaran- Amol	Thomson navel	Leaf	aA1, aA2
Mazandaran- Noor	Thomson navel	Leaf	aNo1, aNo2
Mazandaran- Chalus	Thomson navel	Leaf	aC1, dC4, dC5
	Washington navel	Leaf	aC2, aC3
Mazandaran- Tonekabon	Thomson navel	Leaf	aT1, aT2, dT3
Mazandaran- Ramsar	Thomson navel	Leaf	aR1, aR2



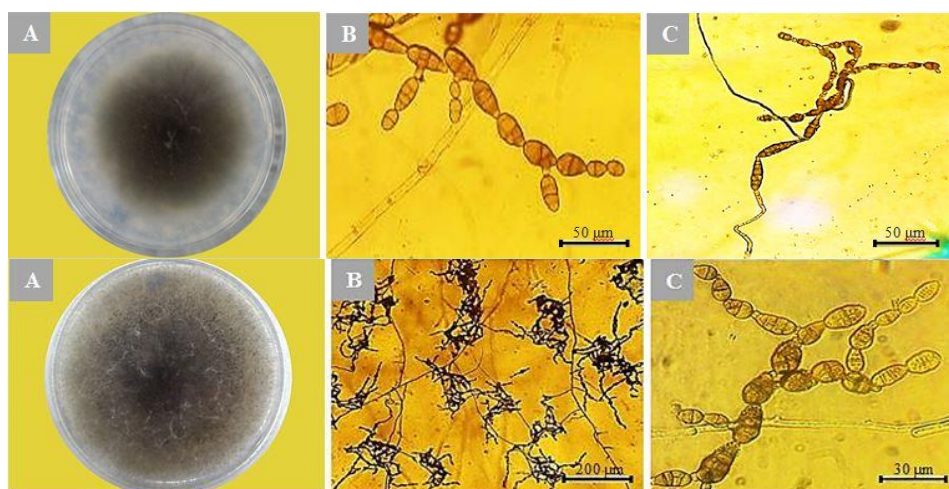
شکل ۱. عکس‌های مربوط به جدایهٔ aBz1 متعلق به گونهٔ *Alternaria alternata* هستند. A: پرگنهٔ شش روزه در محیط PCA به قطر ۴cm، B: زنجیره‌های جانبی که از پهلوی کنیدی‌ها و توسط کنیدیوفور ثانویه، ایجاد می‌شوند. C: کنیدیوفور اولیه به همراه کنیدی‌های بیضوی کشیده که در آغاز زنجیره قرار داشتند.

Figure 1. Images of the aBz1 isolate belonging to *Alternaria alternata*. A: Six days old colony on the PCA medium with 4cm diameter. B: Lateral chains produced on the lateral side of conidia by secondary conidiophore. C: Primary conidiophore and elliptical conidia at the beginning of the chain

۱۰-۶  $\mu\text{m}$  بودند. کنیدیوم‌های بالغ ۱ تا ۴ دیوارهٔ عرضی و ۱ یا ۲ دیوارهٔ طولی داشتند. همچنین دیوارهٔ برخی کنیدیوم‌ها تزئینات زگیل ماندی داشت. کنیدیوفورهای ثانویه نیز کوتاه، و به طول ۳-۶  $\mu\text{m}$  و عرض ۳  $\mu\text{m}$  بودند که خیلی به چشم نمی‌آمدند (شکل ۲C). رده‌بندی‌ها و ویژگی‌های ریخت‌شناختی نشان داد، دو گونهٔ *A. alternata* و *A. dumosa*، تنها در الگوی اسپورزایی و تیپ رشدی، همانند یکدیگر بوده و در ویژگی‌هایی مانند تراکم دسته‌های کنیدیوم، اندازهٔ کنیدیوم و سرعت رشد پرگنه‌ها، متفاوت بودند. به این صورت که اندازهٔ کنیدیوم‌ها در گونهٔ *A. dumosa* کوتاه‌تر بوده اما ساختارها و زنجیره‌های کنیدیوم در آن نسبت به گونهٔ *A. alternata* با تراکم و سرعت بیشتری تولید می‌شدند.

## ۲) *Alternaria dumosa*

قطر پرگنهٔ این قارچ در محیط PCA پس از گذشت شش روز، ۶cm و رنگ آن همانند گونهٔ *A. alternata* خاکستری مایل به سبز بود. با این تفاوت که سرتاسر پرگنهٔ *A. dumosa* به صورت نقطه‌نقطه دیده می‌شد (شکل ۲A). کنیدیوفورهای اولیه که به طور مستقیم از سطح PCA تولید شدند، بلند و به طول ۲۰-۶۰  $\mu\text{m}$  و عرض ۴-۵  $\mu\text{m}$  بودند. تیپ رشدی این گونه همانند گونهٔ *A. alternata* به صورت دسته‌ای و در هر دستهٔ آن شماری زنجیرهٔ کنیدیوم به هم پیوسته وجود داشت (شکل ۲B). به طوری که شمار کنیدیوم در هر زنجیره به ۵ الی ۱۲ واحد و در هر دسته به ۲۵ الی ۵۰ واحد می‌رسید. اغلب کنیدیوم‌ها در محیط PCA تخم‌مرغی شکل (ovoid) و به طول ۲۰-۱۰  $\mu\text{m}$  و عرض



شکل ۲. عکس‌های مربوط به جدایهٔ dGo4 متعلق به گونهٔ *Alternaria dumosa* هستند. A: پرگنهٔ شش روزه در محیط PCA به قطر ۶cm، B: تیپ رشدی متراکم کنیدی‌ها و به صورت دسته‌ای C: زنجیره‌های منشعب کنیدی‌ها

Figure 2. Images of the dGo4 isolate belonging to *Alternaria dumosa*. A: Six days old colony on the PCA medium with 6 cm diameter. B: Conidia in dense clumps of freely branching chains. C: Lateral branches of conidia

*A. dumosa*، جدایه aBz1 از گونه *A. alternata* و جدایه atS6 از گونه *A. atra* در این پژوهش توالی یابی شدند. تکثیر ناحیه ITS جدایه‌های مورد بررسی توسط PCR محصولاتی با اندازه ۵۵۰ جفت باز تولید کرد و چندشکلی در اندازه نوار (باند) مربوط به جدایه‌های مختلف مشاهده نشد.

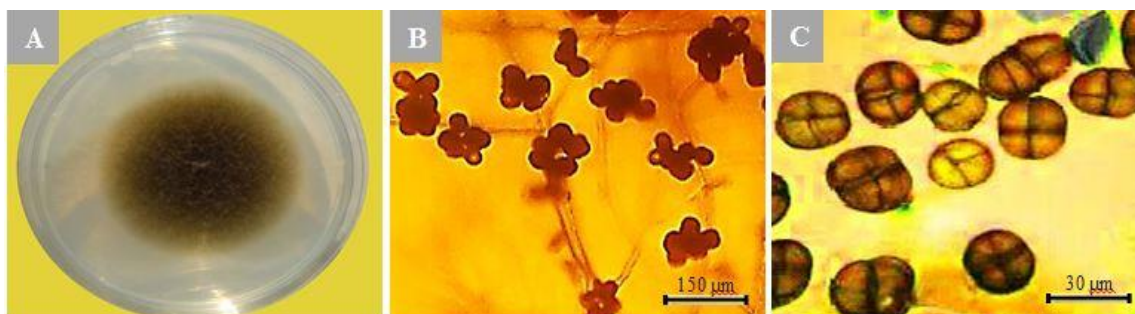
#### توالی‌یابی ناحیه ITS

مقایسه توالی ناحیه ITS جدایه‌های توالی‌یابی شده در این پژوهش با توالی گونه‌های آلترناریای موجود در سایت NCBI نشان داد که جدایه aBz1 با گونه *A. alternata* و جدایه atS6 با گونه *A. atra* همانندی ۹۹ درصد داشتند. جدایه‌های dGo4 و dBz5 که بنابر بررسی‌های ریخت‌شناختی متعلق به گونه *A. dumosa* شناسایی شدند، به دلیل نبود توالی ناحیه ITS این گونه در سایت NCBI، همانندی آن جدایه‌ها با گونه مورد نظر بررسی نشد. درخت تبارزایی (فیلوژنی) توالی جدایه‌ها و برخی از توالی‌های ناحیه ITS موجود در بانک ژن به روش اتصال همسایه‌ها با درجه اعتبارسنجی ۱۰۰۰ ترسیم شد. در این نمودار درختواره‌ای (دندروگرام) سه گونه *A. alternata*، *A. citri* و *A. dumosa* همانند کلید ریخت‌شناختی آلترناریا (Simmons, 2007)، در شاخه‌های نزدیک به هم قرار داشتند (شکل ۴) که این نشان می‌دهد ناحیه ITS ناحیه مناسبی برای تأیید بررسی‌های ریخت‌شناختی در رابطه با شناسایی گونه است.

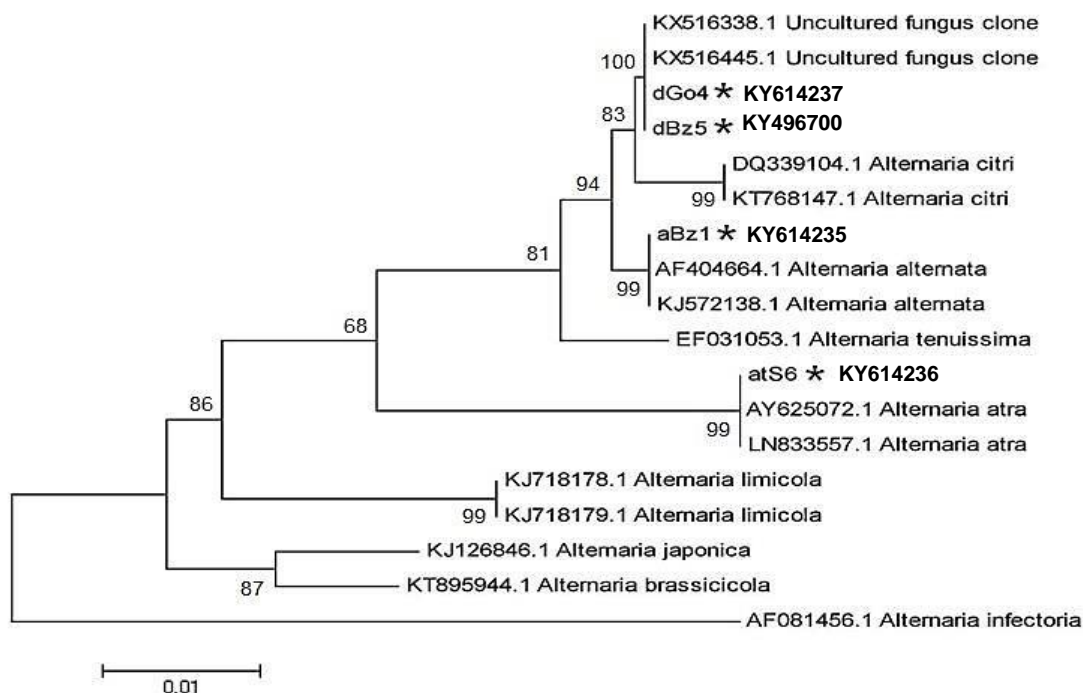
#### *Alternaria atra* (۳)

گونه *A. atra* پیشتر در جنس *Ulocladium* و به نام *Ulocladium atrum* شناخته می‌شد. بررسی‌های مولکولی بر مبنای استفاده از چندین ژن نشان داد، جنس *Ulocladium* مترادف با جنس *Alternaria* است و لذا نام گونه به نام *Alternaria atra* تغییر یافت و در بخش *Ulocladioides* قرار داده شد (Woudenberg et al., 2013). این گونه توان رقابتی پوده‌زیستی بسیار بالایی دارد و گاهی اوقات می‌تواند بیماریزا باشد (Eviner & Chapin, 2003). گونه *A. atra* پیشتر در ایران با نام *U. atrum* از گیاهان جو، پسته و سیب‌زمینی گزارش شده بود (Ershad, 2009). قطر پرگنه این قارچ همانند گونه *A. alternata* در محیط PCA پس از گذشت شش روز، ۴cm و رنگ آن برخلاف دو گونه پیش قهوه‌ای طلایی بود (شکل ۳A). کنیدیوم‌ها در این گونه بیضوی و یا کروی شکل بودند (شکل ۳B). اندازه کنیدیوم در مراحل اولیه به طول ۱۰ μm و عرض ۸ μm بود که به تدریج به طول ۲۵ μm و عرض ۲۰ μm می‌رسیدند. کنیدیوم‌ها اغلب یک دیواره طولی و یک دیواره عرضی داشتند به طوری که در مرکز کنیدیوم همدیگر را قطع می‌کردند (شکل ۳C). این گونه نیز همانند دو گونه پیش، تولید دسته‌هایی می‌کرد که شامل کنیدیوفور، زنجیره‌های کنیدیوم و انشعابات زنجیره می‌شد.

شناسایی مولکولی جدایه‌ها و تجزیه تبارزایی داده‌ها چهار جدایه شامل جدایه‌های dGo4 و dBz5 از گونه



شکل ۳. عکس‌های مربوط به جدایه atS6 متعلق به گونه *Alternaria atra* هستند. A: پرگنه شش روزه در محیط PCA به قطر ۴cm، تیپ رشدی کنیدی‌های کروی شکل با تراکم بالا به صورت دسته‌ای C: کنیدی‌های مجزا با یک دیواره عرضی و طولی Figure 3. Images of the atS6 isolate belonging to *Alternaria atra*. A: Six days old colony on the PCA medium with 4cm diameter. B: Globular conidia in dense clumps. C: Solitary conidia with transepta and longisepta.



شکل ۴. درخت تبارزایی ترسیم‌شده بر پایه توالی ناحیه ITS در نرم‌افزار Mega5 برای جدایه‌های قارچ *Alternaria* spp. به‌دست‌آمده از درختان پرتقال استان‌های گلستان و مازندران. دندروگرام بر پایه روش اتصال همسایه‌ها (Neighbor-joining) ترسیم شده است. اعداد در محل‌های انشعاب نشان‌دهنده ضریب اطمینان درستی شاخه‌بندی برحسب درصد و ناشی از هزار تکرار نمونه‌گیری (bootstrap) هستند. درخت ترسیم‌شده با روش بیشینه احتمال نیز به طرز همسانی گروه‌ها (شاخه‌ها) را تفکیک کرد. خط نشانه برابر ۰/۰۱ تغییر نوکلئوتید در هر محل است.

Figure 5. Phylogenetic tree depicting based on the sequence of ITS in the Mega5 software for the relationship of *Alternaria* spp. Isolates obtained from orange trees in Golestan and Mazandaran provinces. The dendrogram was constructed by the neighbor joining method. Numbers at the branch points reflect the robustness of branching (in percentage) obtained by 1000 resamplings (bootstrap). A similar tree was obtained when drawn by the maximum likelihood algorithm. The bar indicates number of nucleotide changes per sites

جایگاه‌های دوم و سوم از لحاظ شدت بیماریزایی قرار گرفتند. اما جدایه‌های aGo1 و aGo3 از گونه *A. alternata* ضعیف‌ترین عملکرد را در ایجاد بیماری داشتند (جدول ۲).

#### بررسی بیماریزایی جدایه‌ها روی برگ، میوه و نهال رقم‌های پرتقال

در سه آزمون برگ، میوه و نهال، بیماریزایی پانزده جدایه (از هرگونه پنج جدایه) به نام‌های aK2، aGo1، aBz1، aBe1، aS2، dGo4، dBz4، dBz3، dC4، dS4، atK3، atBz6، atBz7، atBe5 و atS6 روی چهار رقم پرتقال یادشده بررسی شد. تجزیه آماری داده‌های به‌دست‌آمده از این سه آزمون در سطح معنی‌داری  $P=0/05$  انجام شد. تجزیه آماری داده‌های به‌دست‌آمده

#### نتایج آزمون بیماریزایی

بررسی بیماریزایی جدایه‌ها روی برگ رقم والنسیا در این آزمون هیچ‌کدام از جدایه‌های قارچی قادر به ایجاد بیماری در برگ‌های سالم یا بدون خراش در طی ده روز نبودند. اما توانستند در برگ‌های خراش‌داده شده رقم والنسیا نشانه‌های بیماری را نشان دهند. در جدول ۲ میانگینی از درصد آلودگی سطح برگ، توان تهاجم جدایه‌ها و شاخص شدت بیماری آورده شده است. تجزیه آماری داده‌ها که با استفاده از نرم‌افزار SPSS و به روش دانکن در سطح معنی‌داری  $P=0/01$  انجام شد، نشان داد که جدایه atS6 متعلق به گونه *A. atra* بیشترین آلودگی را در برگ رقم والنسیا در مدت‌زمان ده روز کرد. جدایه‌های atBe5 و atBz6 نیز که به همین‌گونه تعلق داشتند به ترتیب در



رقم‌ها نسبت به جدایه‌های *A. dumosa* و *A. alternata* حساسیت نسبی داشت. رقم سانگین نیز اختلاف معنی‌داری با دیگر رقم‌ها داشت (جدول ۴). مقایسه میانگین داده‌های به‌دست‌آمده از ارزیابی شاخص بیماری روی نهال‌ها نشان داد، نهال‌ها برخلاف برگ‌ها و میوه‌ها پویایی و مقاومت بیشتری داشته و رقم‌های تامسون، یافا و والنسیا نیز همانند رقم سانگین توانستند مقاومت نسبی از خود نشان دهند. تجزیه واریانس داده‌ها در آزمون بیماری‌زایی نهال نشان داد که رقم والنسیا نسبت به جدایه‌ها، به‌ویژه جدایه‌های گونه *A. atra* مقاومت کمتری داشته است (جدول ۵).

از ارزیابی بیماری‌زایی جدایه‌ها روی برگ نشان داد، جدایه‌های متعلق به گونه *A. atra* توانستند بیشترین بیماری را در رقم‌های تامسون، یافا و والنسیا ایجاد کنند. در واقع می‌توان گفت این رقم‌ها به‌جز رقم سانگین که نسبت به همه جدایه‌ها مقاوم بوده، نسبت به جدایه‌های گونه *A. atra* حساس هستند (جدول ۳). مقایسه میانگین داده‌ها در آزمون میوه نشان داد که بیماری‌زایی روی میوه در مقایسه با بیماری‌زایی روی برگ کمتر است اما همچنان رقم‌های تامسون، یافا و والنسیا نسبت به جدایه‌های *A. atra* حساسیت نسبی از خود نشان داده‌اند. همچنین رقم والنسیا برخلاف دیگر

جدول ۲. بررسی شاخص بیماری، آلودگی سطح برگ و توان تهاجم جدایه‌های آلترناریا روی برگ پرتقال رقم والنسیا. آزمون بیماری‌زایی با استفاده از سوسپانسیون اسپور با غلظت  $10^5$  اسپور در میلی‌لیتر، و با سه تکرار انجام شد. ارزیابی بیماری ده روز پس از مایه‌زنی انجام شد.

Table 2. Investigating disease index, leaf necrosis and aggressiveness of *Alternaria* isolates on the leaf of orange cultivar Valencia. The pathogenicity test was done by using spore suspension with the concentration of  $10^5$  spores per ml, with three replications. The disease was evaluated after 10 days of inoculation

Number	Species	Isolates code	Aggressiveness (day)	Leaf necrosis (%)	Disease index (%)
1	<i>A. alternata</i>	aGo1	5	15 i	20
2	<i>A. alternata</i>	aGo2	4.4	17.3 ghi	20
3	<i>A. alternata</i>	aGo3	4.4	15 i	20
4	<i>A. alternata</i>	aK1	5	17.6 ghi	20
5	<i>A. alternata</i>	aK2	4.4	17.3 ghi	20
6	<i>A. alternata</i>	aBz1	4.4	17.3 ghi	20
7	<i>A. alternata</i>	aBz2	4.4	17.6 ghi	20
8	<i>A. alternata</i>	aBz3	4	21.3 cdefghi	26.6
9	<i>A. alternata</i>	aGa1	4	21.6 cdefghi	26.6
10	<i>A. alternata</i>	aBe1	4	21 cdefghi	26.6
11	<i>A. alternata</i>	aBe2	4.3	17.3 ghi	20
12	<i>A. alternata</i>	aNe1	4.4	15.6 hi	20
13	<i>A. alternata</i>	aS1	4	20.3 cdefghi	26.6
14	<i>A. alternata</i>	aS2	3.6	23.6 cdefghi	33.3
15	<i>A. alternata</i>	aS3	4	21.3 cdefghi	26.6
16	<i>A. alternata</i>	aBa1	4	cdefghi 21	26.6
17	<i>A. alternata</i>	aBa2	4	cdefghi 21	26.6
18	<i>A. alternata</i>	aA1	3.6	cdefgh 24.3	33.3
19	<i>A. alternata</i>	aA2	4	20.3 cdefghi	26.6
20	<i>A. alternata</i>	aNo1	4	17.3 ghi	20
21	<i>A. alternata</i>	aNo2	4	22 cdefghi	26.6
22	<i>A. alternata</i>	aC1	4.4	18.6 efghi	20
23	<i>A. alternata</i>	aC2	4.4	18 fghi	20
24	<i>A. alternata</i>	aC3	4	22.6 cdefghi	26.6
25	<i>A. alternata</i>	aT1	4	22 cdefghi	26.6
26	<i>A. alternata</i>	aT2	4	cdefghi 21.3	26.6
27	<i>A. alternata</i>	aR1	4.3	16.3 ghi	20
28	<i>A. alternata</i>	aR2	4	19.6 defghi	26.6
29	<i>A. dumosa</i>	dGo4	3.6	27 cde	33.3
30	<i>A. dumosa</i>	dGo5	4	18 fghi	20
31	<i>A. dumosa</i>	dBz4	3.6	25 cdefg	33.3
32	<i>A. dumosa</i>	dBz5	4	21.6 cdefghi	26.6
33	<i>A. dumosa</i>	dGa2	4	21.3 cdefghi	26.6
34	<i>A. dumosa</i>	dBe3	3	25 cdefg	33.3
35	<i>A. dumosa</i>	dBe4	4	21.3 cdefghi	26.6
36	<i>A. dumosa</i>	dS4	3	28.3 bcd	40
37	<i>A. dumosa</i>	dS5	3.6	23.6 cdefghi	33.3
38	<i>A. dumosa</i>	dC4	3	27.3 cde	40
39	<i>A. dumosa</i>	dC5	3.3	24.6 cdefg	40
40	<i>A. dumosa</i>	dT3	3.3	26.6 cdef	40
41	<i>A. atra</i>	atK3	3.6	23.6 cdefghi	33.3
42	<i>A. atra</i>	atBz6	3	29 ab	40
43	<i>A. atra</i>	atBz7	3	28.3 bcd	40
44	<i>A. atra</i>	atBe5	2.6	36 b	46.6
45	<i>A. atra</i>	atS6	2.6	44.6 a	53.3

جدول ۳. بررسی شاخص بیماری و توان تهاجم جدایه‌های آلترناریا روی برگ رقم‌های پرتقال در آزمون بیماریزایی برگ. آزمون بیماریزایی با استفاده از سوسپانسیون اسپور با غلظت  $10^5$  اسپور در میلی‌لیتر و با سه تکرار انجام شد. ارزیابی بیماری ده روز پس از مایه‌زنی انجام شد.

Table 3. Investigating disease index and aggressiveness of *Alternaria* isolates on orange cultivars leaf. The pathogenicity test was done by using spore suspension with the concentration of  $10^5$  spores per ml, with three replications. The disease was evaluated after 10 days of inoculation

Species	Thomson navel			Jaffa sweet			Sanguine blood			Valencia late		
	A	DI	RC	A	DI	RC	A	DI	RC	A	DI	RC
<i>A. alternata</i>	4.4	21.3d	MR	4.2	23.9d	MR	-	0e	R	4.2	23.9d	MR
<i>A. dumosa</i>	4.2	25.2d	MR	3.2	34.6c	MS	-	0e	R	3.2	35.9c	MS
<i>A. atra</i>	2.1	63.9a	S	2.1	66.6a	S	-	0e	R	2.9	42.6b	MS

RC = کلاس مقاومت: شاخص بیماری ۰ تا ۱۰٪ مقاوم، ۱۱ تا ۳۰٪ مقاومت نسبی، ۳۱ تا ۶۰٪ حساسیت نسبی، شاخص بیماری بیش از ۶۱٪ حساس. DI = شاخص شدت بیماری (A). (A = قدرت تهاجم (برحسب روز))

RC = Resistance class: R: Resistance = 0-10% DI, MR: Moderately Resistance = 11-30% DI, MS: Moderately Susceptible = 31-60% DI, S: Susceptible = > 61% DI. DI = Disease index (%). A = Aggressiveness (day)

جدول ۴. بررسی شاخص بیماری و توان تهاجم جدایه‌های آلترناریا روی میوه رقم‌های پرتقال در آزمون بیماریزایی میوه. آزمون بیماریزایی با استفاده از سوسپانسیون اسپور با غلظت  $10^5$  اسپور در میلی‌لیتر و با سه تکرار انجام شد. ارزیابی بیماری ده روز پس از مایه‌زنی انجام شد.

Table 4. Investigating disease index and aggressiveness of *Alternaria* isolates on orange cultivars fruit. The pathogenicity test was done by using spore suspension with the concentration of  $10^5$  spores per ml, with three replications. The disease was evaluated after 10 days of inoculation

Species	Thomson navel			Jaffa sweet			Sanguine blood			Valencia late		
	A	DI	RC	A	DI	RC	A	DI	RC	A	DI	RC
<i>A. alternata</i>	4	25e	MR	4	25e	MR	-	0f	R	3	31.6d	MS
<i>A. dumosa</i>	4	25e	MR	3	26.6e	MR	-	0f	R	3	34.9c	MS
<i>A. atra</i>	2	48.3a	MS	2	48.3a	MS	-	0f	R	2	41.6b	MS

RC = کلاس مقاومت: شاخص بیماری ۰ تا ۱۰٪ مقاوم، ۱۱ تا ۳۰٪ مقاومت نسبی، ۳۱ تا ۶۰٪ حساسیت نسبی، شاخص بیماری بیش از ۶۱٪ حساس. DI = شاخص شدت بیماری (A). (A = قدرت تهاجم (برحسب روز))

RC = Resistance class: R: Resistance = 0-10% DI, MR: Moderately Resistance = 11-30% DI, MS: Moderately Susceptible = 31-60% DI, S: Susceptible = > 61% DI. DI = Disease index (%). A = Aggressiveness (day)

جدول ۵. بررسی شاخص بیماری و توان تهاجم جدایه‌های آلترناریا روی نهال رقم‌های پرتقال در آزمون بیماریزایی نهال. آزمون بیماریزایی با استفاده از سوسپانسیون اسپور با غلظت  $10^5$  اسپور در میلی‌لیتر و با سه تکرار انجام شد. ارزیابی بیماری سی روز پس از مایه‌زنی انجام شد.

Table 5. Investigating disease index and aggressiveness of *Alternaria* isolates on orange cultivars seedling. The pathogenicity test was done by using spore suspension with the concentration of  $10^5$  spores per ml, with three replications. The disease was evaluated after 30 days of inoculation

Species	Thomson navel			Jaffa sweet			Sanguine blood			Valencia late		
	A	DI	RC	A	DI	RC	A	DI	RC	A	DI	RC
<i>A. alternata</i>	17.4	14.6c	MR	17.2	15.9c	MR	-	0d	R	13.8	23.9b	MR
<i>A. dumosa</i>	16.8	15.9c	MR	17.4	14.6c	MR	-	0d	R	14.2	25.2ab	MR
<i>A. atra</i>	15	21.3b	MR	14.6	22.6b	MR	-	0d	R	12.4	29.2a	MR

RC = کلاس مقاومت: شاخص بیماری ۰ تا ۱۰٪ مقاوم، ۱۱ تا ۳۰٪ مقاومت نسبی، ۳۱ تا ۶۰٪ حساسیت نسبی، شاخص بیماری بیش از ۶۱٪ حساس. DI = شاخص شدت بیماری (A). (A = توان تهاجم (برحسب روز))

RC = Resistance class: R: Resistance = 0-10% DI, MR: Moderately Resistance = 11-30% DI, MS: Moderately Susceptible = 31-60% DI, S: Susceptible = > 61% DI. DI = Disease index (%). A = Aggressiveness (day)

*A. dumosa* با توان تهاجمی ۳/۶ بیماریزایی بیشتری نسبت به aBz1 داشت (شکل ۵D, E, F). نشانه‌های بیماری شکل ۹G, H, I نیز متعلق به جدایه atS6 از گونه *A. atra* است که توان بیماریزایی آن روی برگ و میوه بیشتر از دو جدایه پیش بود.

مقایسه نشانه‌های بیماری ناشی از سه گونه آلترناریا روی برگ، میوه و نهال رقم والنسیا  
جدایه aBz1 متعلق به گونه *A. alternata* با توان تهاجمی ۴/۴، روی برگ، میوه و نهال رقم والنسیا بیماری ایجاد کرد (شکل ۵A, B, C). جدایه dGo4 متعلق به گونه



شکل ۵. نشانه‌های ناشی از جدایه‌های آلترناریا روی برگ، میوه و نهال پرتقال رقم والنسیا. A, B, C: نشانه‌های بیماری ناشی از جدایه aBz1 متعلق به گونه *Alternaria alternata* (D؛ برگ. E؛ میوه. F؛ نهال). D, E, F: نشانه‌های بیماری ناشی از جدایه dGo4 متعلق به گونه *A. dumosa* (G؛ برگ. H؛ میوه. I؛ نهال). G, H, I: نشانه‌های بیماری ناشی از جدایه atS6 متعلق به گونه *A. atra* (J؛ برگ. K؛ میوه. L؛ نهال).

Figure 9. Symptoms of *Alternaria* isolates on the leaf, fruit and seedling of orange cultivar Valencia. A, B, C: Disease symptoms of aBz1 isolate belonging to *Alternaria alternata* (D; leaf. E; fruit. F; seedling). D, E, F: Disease symptoms of dGo4 isolate belonging to *A. dumosa* (G; leaf. H; fruit. I; seedling). G, H, I: Disease symptoms of atS6 isolate belonging to the *A. atra* (J; leaf. K; fruit. L; seedling).

در این تحقیق پس از اینکه از استان‌های گلستان و مازندران نمونه‌برداری انجام شد، شناسایی گونه‌ها با استفاده از کلید ریخت‌شناختی گونه‌های آلترناریا (Simmons, 2007) و با بررسی ویژگی‌های ریخت‌شناسی جدایه‌ها صورت گرفت. بررسی میکروسکوپی جدایه‌های آلترناریا منجر به جداسازی سه گونه *A. alternata*، *A. dumosa*، *A. atra* بر پایه ویژگی‌های ریخت‌شناسی شد. به‌طوری‌که ویژگی‌های ریخت‌شناسی این سه گونه به ترتیب با گونه‌های *A. alternata*، *A. dumosa*، *A. atra* که سیمونز در کلید ریخت‌شناختی آلترناریا آورده بود همخوانی داشتند. همچنین این نتایج با نتایج دیگر محققان مانند Timmer *et al.* (2003) که گونه‌های آلترناریا را در درختان مرکبات فلوریدا شناسایی کرده بودند، همسان بود. بررسی‌های مولکولی جدایه‌های آلترناریا نیز درستی شناسایی بر مبنای ریخت‌شناسی را تأیید کرد، به این صورت که، توالی‌های ناحیه ITS1 جدایه‌ها با توالی‌های همسان موجود در NCBI

## بحث

قارچ *Alternaria* گونه‌های بیماری‌زای زیادی دارد که می‌توانند روی انواع گیاهان تک‌لپه و دولپه بیماری ایجاد کنند. این قارچ در حدود ۲۲ گونه بیماری‌زا در درختان مرکبات دارد (Simmons, 2007) که چهار گونه *A. alternata*، *A. dumosa*، *A. citri* و *A. turkisafria* از ایران گزارش شده‌اند (Ershad, 2009). لکه قهوه‌ای آلترناریایی و پوسیدگی سیاه پس از برداشت میوه از بیماری‌های ناشی از قارچ‌های فرصت‌طلب در درختان مرکبات هستند (Timmer *et al.*, 1998). این بیماری‌ها ناشی از گونه‌های قارچ *Alternaria* هستند که به دلیل شرایط آب و هوایی مساعد استان‌های گلستان و مازندران می‌توانند آسیب و زیان اقتصادی به درختان حساس و میوه‌های مرکبات انبارشده وارد کنند. بیماری لکه قهوه‌ای آلترناریایی نخستین بار در ایران از روی درختان نارنگی گزارش و پس از آن از روی گونه‌های دیگر مرکبات یافت شد (Golmohammadi & Rahimian, 2004).

خزر به سمت غرب می‌رویم توان بیماریزایی جدایه‌ها جز در مواردی، بیشتر شده است.

به‌منظور بررسی دقیق‌تر بیماریزایی جدایه‌ها از چهار رقم پرتقال تامسون، یافا، سانگین خونی و والنسیا استفاده شد. آزمایش‌ها در سه مرحله برگ، میوه و نهال انجام گرفت. نتایج بررسی‌ها نشان داد، رقم‌های پرتقال درجه‌های متفاوتی از مقاومت به جدایه‌های آلترناریا را از خود نشان دادند که با یافته‌های دیگر محققان همخوانی داشت. این پاسخ متفاوت رقم‌های پرتقال ممکن است ناشی از وجود یا نبود ژن‌های مقاومت در خود رقم‌ها، یا نوع زهرابه (توکسین) و متابولیت‌های ثانویه تولیدشده توسط جدایه‌های آلترناریا باشد (Kohmoto *et al.*, 1991).

داده‌های ناشی از ارزیابی بیماریزایی جدایه‌ها روی برگ نشان داد که از لحاظ شدت بیماریزایی روی برگ‌ها، رقم‌های تامسون، یافا و والنسیا نسبت به جدایه‌های *A. alternata* مقاومت نسبی، نسبت به جدایه‌های *A. dumosa* حساسیت نسبی و نسبت به جدایه‌های *A. atra* حساسیت شدید از خود نشان دادند. اما جدایه‌ها نتوانستند حتی در بافت آسیب‌دیده برگ سانگین، کوچک‌ترین نشانه‌هایی از بیماری را در بازه زمانی ده روز ایجاد کنند. تجزیه آماری داده‌ها که با نرم‌افزار SPSS و به روش دانکن در سطح معنی‌داری  $P=0/05$  انجام شده نشان داد که جدایه‌های متعلق به گونه *A. atra* توانستند بیشترین بیماری را در رقم‌های تامسون، یافا و والنسیا ایجاد کنند. در واقع این رقم‌ها به‌جز رقم سانگین، نسبت به جدایه‌های گونه *A. atra* حساس‌تر بودند. در این آزمایش که رقم تامسون نسبت به جدایه‌های *A. alternata* مقاومت نسبی از خود نشان داد، نتایج به‌دست‌آمده همسان یافته‌های Kakvan *et al.* (2012) بود. مقایسه میانگین داده‌ها در آزمون بیماریزایی میوه نشان داد که شدت بیماری در میوه در مقایسه با آزمون برگ کمتر بوده و رقم‌های تامسون و یافا نسبت به جدایه‌های *A. alternata* و *A. atra* حساسیت نسبی از خود نشان دادند. رقم والنسیا نیز در این آزمون نسبت به جدایه‌های این سه گونه حساسیت نسبی از خود نشان داد. نتایج آزمون

همانندی ۹۹ درصد داشتند. بنابراین نتایج به‌دست‌آمده از شناسایی بر مبنای ویژگی‌های ریخت‌شناختی و مولکولی ۴۵ جدایه آلترناریا نشان داد، سه گونه *A. atra*، *A. dumosa* و *A. alternata* در این پژوهش از دو استان مورد بررسی به دست آمدند و دو گونه *A. atra* و *A. dumosa* برای نخستین بار از این دو استان گزارش می‌شوند. همچنین گونه *A. atra* برای نخستین بار در ایران از درختان پرتقال جداسازی شده است.

نتایج به‌دست‌آمده از ترسیم درخت تکاملی مربوط به توالی‌های ناحیه ITS جدایه‌ها نشان داد که تفاوت‌های ژنتیکی در این ناحیه، در سطح بین گونه‌ای وجود دارد و تنها می‌شود گونه‌های مختلف قارچ را از هم جداسازی کرد. لذا اگر بخواهیم جدایه‌های قارچی را در سطح درون گونه‌ای از هم جداسازی کنیم، نیازمند تکثیر نواحی دیگری از ژنوم قارچ (مانند IGS) و بررسی الگوهای برشی ناشی از آنزیم‌های مختلف در این ناحیه ژنتیکی هستیم. همچنین این نتایج نشان داد، ناحیه ITS ناحیه مناسبی برای تأیید بررسی‌های ریخت‌شناختی در رابطه با شناسایی گونه است. این مطلب پیشتر هم توسط دیگر محققان گزارش شده است (Pryor & Michailides, 2002).

پس از شناسایی گونه‌های این قارچ، مقایسه بیماریزایی جدایه‌ها، روی برگ رقم والنسیا انجام شد. در این آزمون هیچ‌کدام از جدایه‌های قارچی قادر به ایجاد بیماری در برگ‌های سالم یا بدون خراش در طی ده روز نبودند. اما توانستند در برگ‌های خراش داده‌شده رقم والنسیا بیماری ایجاد کنند. این نتایج نشان می‌دهد جدایه‌های قارچ *Alternaria* برای ایجاد بیماری در برگ سالم نیاز به زمان بیشتری دارند یا اینکه غلظت سوسپانسیون در بازه زمانی ده روز افزایش یابد. جدایه‌های متعلق به گونه *A. atra* نسبت به جدایه‌های دیگر توان بیماریزایی بیشتری داشتند. این نخستین گزارش از بررسی بیماریزایی این قارچ روی رقم والنسیا است. بیماریزایی قارچ *A. atra* که پیشتر با نام *Ulocladium atrum* شناخته می‌شد توسط Eviner & Chapin (2003) اثبات شده بود. همچنین می‌توان گفت هرچه از سمت شرق دریای

توانسته مقاومت کامل از خود نشان دهد. البته این نتیجه با یافته‌های Vicent *et al.* (2004) که بیماریزایی قارچ *A. alternata* را روی رقم سانگین و دیگر رقم‌ها بررسی کرده بودند، همسان بود.

به این ترتیب پیشنهاد می‌شود در رقم سانگین که به بیماری‌های آلترناریایی بسیار مقاوم است می‌توان ژن‌های مسئول بروز مقاومت به این بیماری‌ها را شناسایی کرد و به منظور اصلاح نژاد رقم‌های حساس، از آن‌ها استفاده کرد. لذا اجرای برنامه‌های اصلاحی برای تولید رقم‌های دارای سطوح بالای مقاومت به این بیماریگر باید مدنظر قرار گیرد تا در مهار این بیماری به صورت درازمدت به کار رود.

### سپاسگزاری

از دانشگاه فردوسی مشهد بر ای حمایت مالی از این پژوهش با کد طرح ۳۸۹۱۸/۳ مصوب ۲۸/۰۷/۱۳۹۴، تشکر و قدرانی می‌گردد.

بیماریزایی میوه با نتایج Karvalho (2008) که بیماریزایی *A. alternata* را روی نارنگی فورتون، لیمو و پرتقال بررسی کرد، همخوانی داشت. در واقع مقاومت نسبی رقم پرتقال در برابر این بیماریزا از نتایج کاروالو بود. در آزمون بیماریزایی نهال که در گلخانه انجام شد، رقم‌های تامسون، یافا و والنسیا نسبت به همه جدایه‌ها مقاومت نسبی از خود نشان دادند. رقم سانگین نیز همانند دو آزمون برگ و میوه نسبت به همه جدایه‌ها بسیار مقاوم بود. در مورد مقاومت نسبی نهال‌های رقم‌های تامسون، یافا و والنسیا در گلخانه می‌توان این فرضیه را مطرح کرد که نهال‌ها نسبت به برگ و میوه پویایی بیشتری داشته و ترکیب‌های دخیل در پاسخ‌های دفاعی مانند آنزیم‌ها، فیتوآلکسین‌ها و رادیکال‌های فعال اکسیژن در نهال‌ها بهتر و فعال‌تر عمل می‌کنند (Kohmoto *et al.*, 1991). در مورد مقاومت رقم سانگین باید گفت که این رقم برای نخستین بار در ایران در برابر بیماریزایی جدایه‌های آلترناریا بررسی شده است و

### REFERENCES

- Brown, G. E. & McCornack, A. A. (1972). Decay caused by *Alternaria citri* in Florida citrus fruit. *Plant Disease Reporter*, 56, 909-912.
- Dalkilic, Z., Timmer, L.W. & Gmitter, F. G. (2005). Linkage of an *Alternaria* disease resistance gene in mandarin hybrids with RAPD fragments. *Journal of American Society of Horticulture Science*, 130, 191-195.
- Ershad, J. (2009). *Fungi of Iran*. Iranian Research Institute of Plant Protection press, Tehran, Iran.
- Eviner, V. T. & Chapin, F. S. (2003). Gopher-plant-fungal interactions affect establishment of an invasive grass. *Ecology Journal*, 84, 120-128.
- Gardner, J. M., Kono, Y. & Chandler, J. L. (1986). Bioassay and hostselectivity of *Alternaria citri* toxins affecting rough lemon and mandarins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 29, 293-304.
- Golmohammadi, M. & Rahimian, H. (2004). First report of brown spot caused by *Alternaria alternata* on tangrine in Iran. In: Proceedings of 16<sup>th</sup> Iranian plant protection congress, 28 Aug.-1 Sept, Tabriz University, Tabriz, Iran, pp. 461. (in Farsi)
- Isshiki, A., Akimitsu, K., Yamamoto, M. & Yamamoto, H. (2001). Endopolygalacturonase is essential for citrus black rot caused by *Alternaria citri* but not for brown spot caused by *Alternaria alternata*. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*, 14, 749-757.
- Kakvan, N., Zamanizadeh, H., Morid, B., Taheri, H. & Hajmansor, SH. (2012). Study on pathogenic and genetic diversity of *Alternaria alternata* isolated from citrus hybrids of Iran, based on RAPD-PCR technique. *European Journal of Experimental Biology*, 2(3), 570-576.
- Kang, J., Crous, P., Godwin R., Mchau, A., Serdani, M. & Song, SH. (2002). Phylogenetic analysis of *Alternaria* spp. associated with apple core rot and citrus black rot in South Africa. *Jornal of the British Mycological Society*, 106(10), 1151-1162.
- Karvalho, D. C. (2008). Conidial production and reaction of *Alternaria alternata* f.sp. *citri* to plant extracts. (Annual Report 1940:91). Agricultural Experiment Station Bulletin. 487.
- Kohmoto, K., Akimitsu, K. & Otani, H. (1991). Correlation of resistance and susceptibility of citrus to *Alternaria alternata* with sensitivity to host-specific toxin. *Phytopathology*, 81, 719-722.
- Mahmoudi, E. (2010). Evaluation of citrus cultivars susceptibility to leaf spot disease caused by *Alternaria alternata* under in vitro conditions. *Journal of Research in Agricultural Science*, 2, 75- 81.
- Peever, T. L., Ibanez, A., Akimitsu, K. & Timmer, L.W. (2002). Worldwide phylogeography of the citrus brown spot pathogen, *Alternaria alternata*. *Phytopathology*, 92, 794-802.

14. Pryor, B. M. & Michailides, T. J. (2002). Morphological, pathogenic, and molecular characterization of *Alternaria* isolates associated with *Alternaria* late blight of pistachio. *Phytopathology*, 92(4), 406-416.
15. Seif, A. A. & Hillocks, R. J. (1999). Reaction of some citrus cultivars to *Phaeoramularia* fruit and leaf spot in Kenya. *Fruits*, 54, 323-329.
16. Simmons, E. G. (2007). *Alternaria An Identification Manual*. CBS Biodiversity Series 6. CBS Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands.
17. Tamura, K., Peterson, D. , Peterson, N., Stecher, G. , Nei, M. & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28, 2731-2739.
18. Timmer, L. W., Roberts, P. D. & Chung, K. R. (2003). *Alternaria* brown spot (L.W. Timmer). In: *Florida Citrus Pest Management Guide*, University of Florida, USA, IFAS, 146 pp, Publication No. 43E, 81-83.
19. Timmer, L. W., Solel, Z., Gottwald, T. R., Ibanez, A. M. & Zitko, S. E. (1998). Environmental factors affecting production, release, and field populations of conidia of *Alternaria alternata*, the cause of brown spot of citrus. *Phytopathology*, 88, 1218-1223.
20. Vicent, A., Badal, J., Asensi, M. J., Sanz, N., Armengol, J. & García-Jiménez, J. (2004). Laboratory evaluation of citrus cultivars susceptibility and influence of fruit size on fortune mandarin to infection by *Alternaria alternata* pv. Citri. *European Journal of Plant Pathology*, 110(3), 245-251.
21. Waller, J. M., Ritchie, B. J. & Holderness, M. (1997). *Plant Clinic Handbook*. Oxon, New York, pp. 144.
22. White, T. J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Edited by Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. & White, T. J. (Academic Press, Inc. New York, N.Y), pp. 315-322.
23. Woudenberg, J. H. C., Groenewald, J. Z., Binder, M. & Crous, P. W. (2013). *Alternaria* redefined. *Studies in Mycology*, 75, 171-212.