آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ۸۷، شماره ۱، شهریور ۱۳۹۸ DOI: 10.22092/jaep.2018.121074.1213

ویژه‌گی‌های ریخت‌شناختی، مولکولی و بیماری‌زایی گونه‌های جنس *Colletotrichum* جدا شده از سیب‌زمینی و پیاز در استان اصفهان

بهرام شریف‌نبی[۱]، فریبا قادری[۲]✉، عاطفه کرباسی[۳]، علیرضا جوادی[٤]

۱ و ۳- به‌ترتیب استاد و دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران؛
۲- استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران؛ ٤- مربی پژوهش بخش رستنی‌ها، موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

(تاریخ دریافت:فروردین ۱۳۹۷؛ تاریخ پذیرش: مهر ۱۳۹۷)

چکیده

سیب‌زمینی و پیاز در منطقه فریدن استان اصفهان از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. بیماری خال سیاه یا آنتراکنوز از بیمارهای مهم این محصولات می‌باشد. در این پژوهش، از مزارع سیب‌ژمینی و پیاز مشکوک به بیماری خال سیاه مناطق : فریدن، داران، دامنه، چادگان، رزوه و آشجرد استان اصفهان نمونه‌برداری شد. نمونه‌ها شامل بافت‌های آلوده سیب‌زمینی (طوقه، ساقه، برگ و غده) و پیاز (برگ و فلس) بودند. ویژه‌گی‌های ریخت¬شناختی، مولکولی و بیماری‌زایی گونه‌های جنس *Colletotrichum* به‌دست آمده بررسی شد. براساس ویژه‌گی‌های ریخت‌شناختی ۱۷۰ جدایه مربوط به‌جنس *Colletotrichum* تشخیص داده شد. ۱۲۰جدایه گونه *C. coccodes* از سیب‌زمینی و ۵۰ جدایه *C. circinans* از پیاز جدا شد. تعداد ۳۵ جدایه از بین ۱۷۰ جدایه مذکور به‌طور تصادفی انتخاب و محصول حاصل از تکثیر نواحی ITS آنها تعیین توالی شد. علائم بیماری در پیاز سفید پس از گذشت یک ماه از مایه‌زنی با جدایه‌های گونه *C. circinans* مشاهده شد، اما مایه‌زنی جدایه‌های گونه *C. coccodes* جدا شده از سیب‌زمینی به بوته‌های پیاز موجب بروز هیچ علائمی در آنها نشد. از طرف دیگر، مایه‌زنی جدایه‌های گونه *C. coccodes* در سیب‌زمینی موجب ایجاد علائم بیماری شد و بیماری‌زایی آن اثبات شد، اما جدایه¬های گونه *C. circinans* جدا شده از پیاز هیچ علائمی روی گیاه سیب‌زمینی ایجاد نکرد. نتایج حاصل از مایه‌زنی تقاطعی این دو گونه روی سیب‌زمینی و پیاز می‌تواند در کنترل بیماری مؤثر باشد.

واژه‌های کلیدی: *Colletotrichum coccodes* ، *Colletotrichum circinans*، پیاز، سیب‌زمینی، ، مایه‌زنی تقاطعی

Morphological, molecular and pathogenicity characteristics of *Colletotrichum* species associated with potato and onion in Isfahan province

B. SHARIFNABI[1], F. GHADERI[2]✉, A. KARBASI[3], A. JAVADI [4]

1 and 3. Professor and M. Sc. graduate, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran; 2. Assistant professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Yasouj University, Iran
4. Research associate, Department of Botany, Iranian Research Instituteof Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

Abstract

Potato and onion are the most important commercial crops in Iran especially Isfahan province. Anthracnose caused by several species of *Colletotrichum* spp. In order to identify and determine the possibility of cross contamination among pathogenic species of each host to another host, sampling was carried out from potato and onion fields in Faraydan, Daran, Damaneh, Chadegan and Ashgerd regions from Isfahan province. Morphological characteristics led to 170 isolates of *Colletotrichum* that 120 isolates belonged to *C. coccodes* from potato and 50 isolates belonged to *C. circinans* from onion. 35 isolates of those 170 isolates were selected to amiliphy DNA using specific primers for the ITS-rDNA region and sequencing.Pathogenicity test was conducted in greenhouse conditions. The results indicated the pathogenicity of *C. circinans* on onion After 30 days, but no symptoms were found on potato inoculated by thes isolates, while pathogenicity of *C. coccodes* was confirmed on potato after 60 days and no any symptoms was found on onion plants. The results might have used to control anthracnose in potato and onion fields

Keywords: Onion, *Colletotrichum coccodes*, *Colletotrichum circinans*, Cross inoculation, , Potato

✉ **Corresponding author: fghaderi2003@yahoo.com**

مقدمه

بیماری آنتراکنوز یا خال سیاه یکی از بیماری‌های مهم سیب‌زمینی در اغلب کشورهای جهان از جمله ایران است. تحقیقات نشان می‌دهد این بیماری در سطح وسیعی از مناطق کشت سیب‌زمینی از جمله اردبیل، اصفهان، همدان و سایر نقاط ایران پراکنده است (ارشاد، ۲۰۰۹، فضلی و همکاران، ۲۰۱۲). تاکنون گونه‌های مختلفی از جنس *Colletotrichum* گزارش شده است. گونه‌ی *C. Dematium* از استرالیا و آمریکا (Damm *et al*., 2009 ; Yang *et al*., 2012)، گونه *C. nigrum* از نیوزلند و گونه‌ی *C. gloeosporioides* از کارولینای شمالی روی سیب‌زمینی گزارش شده‌اند (Grand, 1985). گونه غالب روی سیب‌زمینی در اکثر مطالعات انجام شده *C. coccodes* ذکر گردیده است (Hyde *et al*., 2009)، اما گونه‌های *C. atramentarium* و *C. dematium* نیز از مناطق سیب‌زمینی کاری دنیا و ایران نیز گزارش شده است (Binaeian *et al*., 2011).

بیماری آنتراکنوز پیاز در سال ۱۹۶۹ برای اولین‌بار در نیجریه گزارش شد و تصور می‌شد بر اثر گونه‌های *Fusarium* ایجاد شود ولی در سال ۱۹۸۰ عامل بیماری *Glomerella* تشخیص داده شد که در ابتدا بیماری کم اهمیت بوده ولی در سال ۱۹۷۹ تولید محصول پیاز را ۵۰ تا ۱۰۰ درصد در نیجریه و برزیل کاهش داد. این بیماری در سراسر جهان وجود دارد ولی در نواحی گرمسیری و نیمه گرمسیری مهم‌تر است (Ebenebe, 1980). گونه *C. coccodes* در بعضی مناطق دنیا عامل ایجاد آنتراکنوز در پیاز نیز معرفی شده است (Hyde *et al*., 2009 a,b). در سال ۲۰۱۰ در میشیگان بر روی برگ و گردن پیازهای در حال رشد زخم‌هایی خشک، بیضوی شکل با مرکزی به رنگ ماهی سالمون و ظاهر کلی سفید مشاهده شد و *C. coccodes* به‌عنوان عامل آلوده کننده پیاز گزارش شد. این مسئله در حالی گزارش شده که قبل از آن عامل آنتراکنوز پیاز در این منطقه گونه‌های *C. gloeosporioides* و *C. circinans* معرفی شده بود (Rodriguez-Salamanca and Enzenbacher, 2012). در سال ۲۰۱۶ در نیویورک نیز عامل بیماری آنتراکنوز پیاز *C. coccodes* گزارش شده است (Hay *et al*., 2016). عامل این بیماری برای اولین بار در ایران *C. circinans* توسط لیلایی و همکاران در سال ۲۰۱٤ از استان خوزستان گزارش شد (Leylaie *et al*., 2014).

تحقیقات زیادی براساس روش‌های مولکولی، برای روشن‌تر شدن وضعیت تاکسونومیک، شناسایی و تفکیک گونه‌های *Colletotrichum* صورت گرفته است (Fagan, 1984). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با آغازگر تصادفی (AP- PCR) و چندشکلی درDNA هسته، DNA ریبوزومی (rDNA)، DNA میتوکندری (mtDNA)، و DNA غنی از AT جهت افتراق جمعیت *C. acutatum*، *C. coccodes*، *C. fragariae*، *C. gloeosporioides*، *C. kahawae*، *C. magna* و *C. orbiculare* استفاده شده است (Photita *et al*., 2005). به‌منظور تفکیک گونه‌ها و شناسایی گونه‌ی *C. coccodes* از آغازگرهای ITS1 و ITS2 برای تکثیر نواحی ITS استفاده شده است (Photita *et al*., 2005). با استفاده از تکثیر ناحیه 18srDNA دو گونه *C. circinans* و *C. coccodes* از یکدیگر تفکیک شدند. از این روش برای تمایز بین دو گونه *C. gloeosporioides* و *C. acutatum* نیز استفاده شده است (Fagbola and Abang, 2004). لوب و همکاران (2004) از روش‌های ریخت¬شناختی به‌همراه تعیین توالی نواحی ITS و ژن بتا توبولین برای تفکیک و شناسایی گونه‌های مربوط به‌جنس *Colletotrichum* روی گیاهان تیره پروتیاسه (Proteaceae) استفاده نمودند (Lubbe *et al*. 2004).

با توجه به اهمیت بیماری آنتراکنوز در محصولات سیب‌زمینی و پیاز در کشور و نیز گزارش‌های متعدد از این بیماری در استان اصفهان و همچنین اهمیت اقتصادی بالای سیب‌زمینی و پیاز در این منطقه، شناسایی دقیق ریخت¬شناختی و مولکولی گونه‌های مرتبط با این بیماری حائز اهمیت است. به‌دلیل کشت محصولات سیب‌زمینی و پیاز در مزارع نزدیک به هم در اصفهان و نیز احتمال تناوب بین این دو محصول، بررسی اختصاصیت میزبانی مورد توجه قرار دارد و بدین‌منظور در تحقیق حاضر به بررسی مایه‌زنی

تقاطعی گونه‌های بیماری‌زای هر کدام از محصولات مورد نظر بر روی محصول دیگر پرداخته می‌شود.

روش بررسی

۱- جداسازی بیمارگر: نمونه‌برداری از مزارع سیب‌زمینی و پیاز مشکوک به آلودگی به بیماری خال سیاه در مناطق مختلف استان اصفهان از جمله فریدن، داران، دامنه، چادگان، رزوه و آشجرد صورت گرفت که در هر منطقه، از بافت‌های آلوده سیب‌زمینی (طوقه، ساقه، برگ و غده) و پیاز (برگ و فلس) در ۷-٦ مزرعه نمونه‌برداری به عمل آمد. برای جداسازی بیمارگر، ابتدا بافت‌های آلوده سیب‌زمینی (طوقه، ساقه، برگ و غده) و پیاز (برگ و فلس) زیر آب روان شستشو داده شدند تا بقایای گل و لای و آلودگی‌های سطحی حذف شود. سپس از مرز سالم و آلوده بافت، قطعاتی به ابعاد ۵×۵ میلیمتر تهیه شد. به منظور ضدعفونی نمونه‌ها از اتانول ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه و هیپوکلرید سدیم ۱۰ درصد به‌مدت دو دقیقه استفاده شد. پس از استفاده از هر محلول از آب مقطر سترون جهت شستشو استفاده شد. سپس به وسیله کاغذ جاذب رطوبت سترون، آب اضافی کاملاً گرفته شده و قطعات خشک‌شده به تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت PDA منتقل گردیدند. برای جلوگیری از رشد باکتری‌های ناخواسته از ppm ۵۰۰ محلول کلرامفنیکل در محیط کشت استفاده شد (Binaeian *et al*., 2011).

۲- خالص‌سازی و نگهداری جدایه‌ها: خالص‌سازی جدایه‌ها به روش تک‌اسپور انجام شد. برای نگهداری طولانی مدت، از روش نگهداری قارچ در کاغذ صافی استفاده شد. به این ترتیب که ابتدا کاغذهای صافی سترون در ابعاد ٤ × ۲ سانتی‌متر روی محیط کشتPDA قرار داده شدند و یک قطعه کوچک پرگنه از کشت خالص قارچ روی هر کاغذ صافی سترون قرار داده شد. تشتک‌ها به مدت هفت روز در دمای ۲۲-۲۰ درجه سلسیوس در انکوباتور قرار داده شدند. بعد از گذشت هفت روز، به کمک پنس سترون کاغذهای صافی از محیط سترون برداشته شد و در داخل میکروتیوپ‌های سترون حاوی سیلیکاژل قرار داده شدند. به منظور جلوگیری از آلودگی، سرپوش میکروتیوپ‌ها با پارافیلم مسدود گردید و سپس به دمای منفی ۸۰ درجه سلسیوس انتقال یافتند.

۳- ریخت¬شناختی جدایه‌ها: جهت بررسی خصوصیات ریخت¬شناختی و میکروسکوپی جدایه‌ها از محیط کشت سیب‌زمینی- هویج-آگار (PCA) استفاده شد. تشتک‌های حاوی این محیط‌های کشت تحت شرایط ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی و دمای ۲۵ درجه سیلسیوس و به‌مدت یک هفته نگهداری شدند. صفات مورد مطالعه شامل خصوصیات کنیدیوم، کنیدیوفور، سلول‌های کنیدیوم زا و موهای هر جدایه بود. برای مشاهده بهتر اندام‌های بدون رنگ مانند کنیدیوم از کاتن-بلو و سافرانین به‌طور مجزا استفاده شد. حداقل ۵۰ عدد از هر یک از اندام‌های قارچی بررسی و اندازه‌گیری شدند. شناسایی و تعیین گونه بر اساس منابع معتبر قارچ‌شناسی انجام شد (Sutton, 1992). به منظور مشاهده آپرسوریوم از روش کشت اسلاید استفاده شد به این صورت که محیط کشت آب آگار ۲ در صد ذوب شده روی لام سترون ریخته شد و یک برش از میسلیوم جدایه مورد نظر به ضخامت تقریبی دو میلی‌متر روی اسلاید حاوی آب آگار قرار داده شد و سپس در یک پتری حاوی کاغذ صافی سترون مرطوب در دمای ۲۷ درجه سلسیوس نگهداری شد. پس از ۱۰ تا ١٤ روز قطعه آگار قرار داده شده روی آب آگار به‌وسیله اسکالپل سترون کاملاً حذف و شکل و اندازه آپرسوریوم های تشکیل شده در طول لام بررسی و ثبت گردید. برای مشاهده میکروسکوپی از آب یا لاکتیک اسید و برای رنگ‌آمیزی از کاتن بلو استفاده شد (Sutton, 1968).

٤- آزمون بیماری‌زایی و مایه‌زنی تقاطعی: به‌منظور بررسی بیماری‌زایی گونه‌های به‌دست آمده و نیز بررسی امکان آلوده‌سازی یک میزبان به وسیله جدایه‌های میزبان دیگر از آزمون‌های بیماری‌زایی و مایه‌زنی تقاطعی در شرایط گلخانه استفاده شد.

٤-١- آزمون بیماری‌زایی و مایه‌زنی تقاطعی در گیاه سیب‌زمینی: برای انجام هر دو آزمون بیماری‌زایی و مایه‌زنی تقاطعی به‌طور جداگانه ۲۰ گیاهچه سیب‌زمینی کشت شد و سه بوته نیز به‌عنوان شاهد استفاده گردید. برای تهیه زادمایه هر جدایه به ازای هر گلدان ۱۵ گرم گندم در نظر گرفته شد. گندم‌ها پس از سه ساعت قرار گرفتن در آب، به شیشه‌های دربدار ۱۰۰ میلی‌لیتری منتقل و دو مرتبه اتوکلاو شدند. سپس به هر شیشه حاوی گندم چند قطعه از جدایه مورد نظر اضافه و به مدت سه هفته در دمای ۲۲ درجه سلسیوس در تاریکی نگهداری شدند. پس از گذشت دو هفته از زمان کشت، خاک پای بوته‌ها کنار زده شد و گندم‌های آلوده به قارچ به خاک اضافه گردید. لازم به ذکر است که در آزمون بیماریزایی از گندم‌های آلوده به جدایه‌های قارچی جداسازی شده از سیب‌زمینی برای مایه‌زنی استفاده گردید اما برای انجام آزمون مایه‌زنی تقاطعی از گندم‌های آلوده به جدایه‌های قارچی جداسازی شده از پیاز استفاده گردید. برای اندازه‌گیری میزان پیشرفت بیماری بعد از گذشت دو ماه از زمان تلقیح، آبیاری گیاهان قطع شده و بوته‌ها به آرامی از گلدان خارج گردیدند. علائم ایجاد شده روی اندام هوایی و زیرزمینی از نظر صفات ماکروسکوپی و میکروسکوپی مورد بررسی قرارگرفت (Fazli *et al.*, 2012) .

٤-٢- آزمون بیماری‌زایی و مایه‌زنی تقاطعی در گیاه پیاز: برای انجام هر دو آزمون بیماریزایی و مایه‌زنی تقاطعی، ۲۰ بوته پیاز سفید برای تلقیح جدایه‌های *C. coccodes* (جداسازی شده از سیب‌زمینی)، ۲۰ بوته برای جدایه‌های *C. circinans* (جداسازی شده از پیاز) و پنج بوته نیز به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. کشت و مایه‌زنی پیاز به‌طور همزمان انجام گرفت، بدین ترتیب که هر گلدان تا یک سوم حجم از خاک پر شد سپس یک قرص شش سانتی‌متری از کشت یک هفته‌ای جدایه‌ی مورد نظر روی خاک قرار داده شد. در مرحله‌ی بعد پیاز سفید سترون شده با الکل ۹٦ درصد روی ظرف قارچ قرارگرفت. در نهایت باقی مانده گلدان‌ها با خاک سترون پر شدند. پس از گذشت یک ماه، پیازها از خاک خارج و علائم بیماری مورد بررسی قرار گرفت (Kiehr *et al.*, 2012).

٥- شناسایی مولکولی: در این تحقیق برای تأیید شناسایی ریخت¬شناختی جدایه‌ها، ابتدا استخراج DNA به روش موری و تامپسون انجام گرفت (Murray and Thompson, 1980). سپس از جفت آغازگر عمومی ITS1 (´5-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3´) و ITS2 (´5- GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC -3´) به‌عنوان آغازگرهای مستقیم و معکوس برای شناسایی گونه‌های مختلف مربوط به *Colletotrichum* استفاده گردید. مخلوط واکنش PCR شامل: ۸ میکرولیتر آب دیونیزه سترون، ۳ میکرولیتر 10X PCR Buffer، ۵ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۲۰۰ میلی‌مولار از هر نوکلئوتید، ۲۰ پیکومول از هر آغازگر، یک واحد DNA *Taq* پلیمراز و سه میکرولیتر DNA با غلظت ۱۰ نانوگرم تهیه شد. برنامه حرارتی شامل یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹٦ درجه سلسیوس به‌مدت پنج دقیقه، ۳۵ چرخه شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹٦ درجه سلسیوس به‌مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال آغازگرها به ناحیه هدف در دمای ٥٦ درجه سلسیوس به‌مدت ٤٥ ثانیه و گسترش رشته در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ٦۰ ثانیه و یک چرخه گسترش نهایی رشته در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت هشت دقیقه انجام گرفت (White *et al.*, 1990).

٦-تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی: در تحقیق حاضر جهت مطالعات فیلوژنتیکی،تعداد ۳۵ جدایه به‌طور تصادفی از بین ۱۷۰ جدایه کل انتخاب شدند و جهت تعیین توالی، محصول حاصل از تکثیر نواحی ITS به شرکت Macrogen Inc. کره جنوبی ارسال شد. برای اطمینان از صحت توالی‌های به دست آمده از هر نمونه، هر یک از توالی‌ها با استفاده از ابزار جستجوی Blast (Altschul *et al.*, 1997) با توالی‌های موجود در بانک ژن (NCBI) مقایسه شدند و از نرم‌افزار Bioedit نیز به‌منظور اصلاح نوکلئوتیدی توالی‌های استفاده شد (Hall, 1999). برای آنالیز مطالعات فیلوژنتیکی، تعداد ۹ جدایه از ۳۵ جدایه توالی‌یابی شده که تنوع را نشان می‌دادند،

به‌عنوان نماینده مولکولی در این پژوهش انتخاب شدند و همچنین تعداد ۳۰ جدایه از نتایج مطالعات مولکولی کنون و همکاران (Cannon *et al*., 2012) و لیو همکاران (Liu *et al*., 2011) انتخاب گریدند و گونه *Monilochaetes infuscans* نیز به‌عنوان آرایه خارج از گروه (Cannon *et al*., 2012) انتخاب گردید (جدول ۱).

توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار MAFFT v.7.043b هم‌ردیف‌سازی گردید (Katoh and Standley 2013). تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیکی با استفاده از روش فاصله (Distance method) انجام گردید. ماتریکس فاصله توالی‌های مرتب شده با روش پارامتر دو کیمورا (Kimura's two parameter) محاسبه (Kimura, 1980) و درخت فیلوژنتیکی با استفاده از روش maximum parsimony (MP) با الگوریتم close-Neghbor-Interchange algorithm (Nei, 1973) و با استفاده از الگوی از پیش تعیین شده با نرم‌افزار MEGA 6.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, ver. 4.0) رسم گردید (Tamura *et al*., 2007) برای اطمینان از ثبات شاخه‌های موجود در درخت فیلوژنتیکی مقدار اعتبارسنجی با ۱۰۰۰ تکرار با استفاده از این برنامه محاسبه شد. توالی‌های مربوط به جدایه‌های مختلف گونه‌های *Colletotrichum* در بانک ژن (NCBI) ثبت شد (جدول۱).

جدول۱- شماره دسترسی بانک ژن جدایه‌های *Colletotrichum* مورد استفاده در تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیکی در این مطالعه.

Table. GenBank accesion numbers of *Colletotrichum* isolates used in phylogenetic analyses in this study.

Species	accession numbers	Species	accession numbers
C. anthrisci	GU227845 [a]	*C. liriopes*	GU227804 [a]
C. anthrisci	GU227846 [a]	*C. liriopes*	GU227805 [a]
C. chlorophyti	GU227894 [a]	*C. truncatum*	GU227862 [a]
C. chlorophyti	GU227895 [a]	*C. truncatum*	GU227866 [a]
C. circinans	GU227855 [a]	*C. verruculosum*	GU227806 [a]
C. circinans	GU227854 [a]	*C. curcumae*	GU227893 [b]
C. simmondsii	FJ972610 [a]	*C. curcumae*	NR_111459 [b]
C. acutata	FJ972610 [a]	*C. circinans*	GU227855 [b]
C. spaethianum	GU227807 [a]	*C. spinaciae*	GU227847 [b]
C. spaethianum	GU227808 [a]	*C. lilii*	GU227810 [b]
C. coccodes	HM171678 [b]	*C. kinghornii*	JQ948454 [b]
C. coccodes	HM171679 [b]	*C. laticiphilum*	JQ948289 [b]
C. tofieldiae	GU227801 [a]	C. *limetticola*	JQ948193 [b]
C. dematium	GU227819 [a]	*Monilochaetes infuscans*	JQ005780 [b]
C. dematium	GU227820 [a]	*C. kinghornii*	JQ948454 [b]
C. johnstonii	JQ948444 [a]	*C. acerbum*	JQ948459 [b]
C. fruticola	FJ972611 [a]	*C. coccodes*	KY496701 [c]; IRAN2836C [d]
C. fruticola	FJ972603 [a]	*C. coccodes*	KY496702 [c]; IRAN2837C [d]
C. gloeosporioides	GQ485605 [a]	*C. coccodes*	MG881791 [c]
C. gloeosporioides	HM034809 [a]	*C. coccodes*	MG881792 [c]
C. horii	AY787483 [a]	*C. circinans*	MG881793 [c]
C. horii	AY791890 [a]	*C. circinans*	MG881794 [c]
C. kahawae	FJ972608 [a]	*C. circinans*	MG881795 [c]
C. kahawae	FJ972607 [a]	*C. circinans*	KY496703 [c]; IRAN2837C [d]
C. linicola	JQ005765 [a]	*C. circinans*	MG881796 [c]
C. lineola	GU227829 [a]		

a. Cited from Liu et al., 2011; **b**. Cannon et al., 2012; **c**. this study; **d**. Iran Collection accession numbers

نتیجه و بحث

۱- علائم بیماری و جداسازی بیمارگر : براساس نمونه‌برداری‌هایی که در مرداد ماه ۹۴ تا اواخر مهر ماه ۹۵ در مناطق مختلف استان اصفهان از جمله فریدن، داران، دامنه، چادگان، رزوه و آشجرد صورت گرفت، ۱۷۰ جدایه منسوب به‌جنس *Colletotrichum* از میزبان‌های سیب‌زمینی و پیاز از مزارع کشت این محصولات در این مناطق جداسازی شدند. براساس خصوصیات ریخت¬شناختی، جدایه‌های به‌دست آمده در ۲ گروه شناسایی شدند که ۵۰ جدایه متعلق به گونه‌ی *C. circinans* از پیاز و ۱۲۰ جدایه متعلق به گونه‌ی *C. coccodes* از سیب‌زمینی بود.

علائم بیماری روی گیاه سیب‌زمینی به صورت شکاف‌هایی روی طوقه همراه با آسروول‌های کوچک سیاه رنگ مشاهده شد که در بیشتر موارد این شکاف‌ها همراه با پژمردگی و خشکیدگی کامل بوته‌ها بودند. بارزترین علامت در گیاه پیاز، بصورت لکه‌های تیره‌رنگ و پراکنده‌ای روی فلس‌های خارجی پیاز و گردن آن که شامل نقاط سیاه‌رنگ مربوط به آسروول‌های خاردار بود (شکل ۱).

شکل ۱- زردی و پژمردگی سیب‌زمینی در اثر بیماری خال سیاه(A-B)، شکاف‌های ایجاد شده روی طوقه گیاه سیب‌زمینی (C-D)، علائم بیماری خال سیاه سیب‌زمینی در مزرعه(E)، لکه‌های تیره‌رنگ و پراکنده‌ای روی فلس‌های خارجی و گردن پیاز در بیماری آنتراکنوز پیاز(F-G).

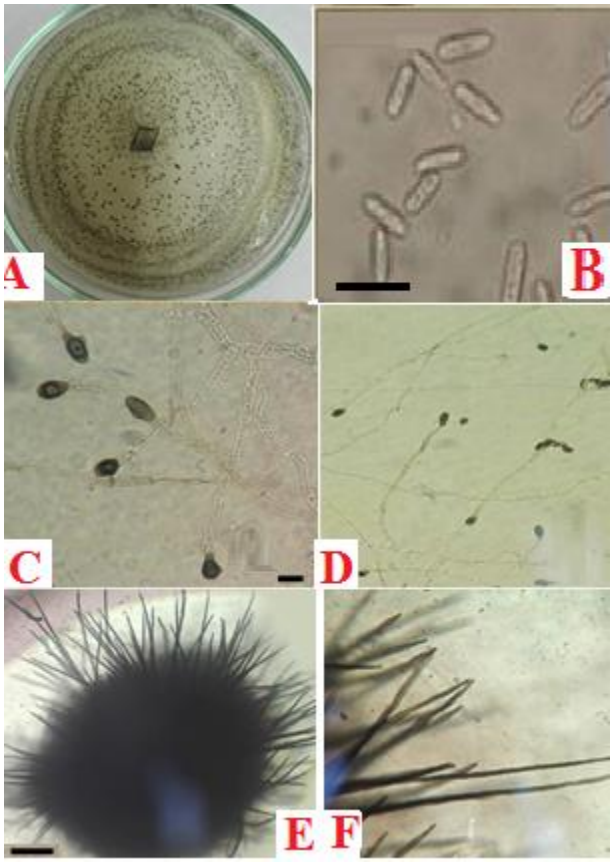
Fig 1. The symptoms of yellowing and wilting in potato due to Black dot disease (A-B); Crackes on potato crown (C-D); Black dot symptoms on potato in field (E); black lesions on onion scales and neck due to Anthracnose (F-G).

جدایه‌های مربوط به *C. coccodes* از قسمت طوقه و ریشه گیاه سیب‌زمینی و جدایه‌های منسوب به *C. circinans* از قسمت فلس و گردن پیاز جداسازی شدند. در رابطه با سیب‌زمینی با توجه به پراکنش بالای بیماری خال سیاه در منطقه فریدن و خسارت شدید به مزارع سیب‌زمینی این قارچ از اهمیت بالایی در منطقه برخوردار است اما در مورد آنتراکنوز پیاز خسارت شدید در مزرعه یا کاهش بازارپسندی قابل توجه مشاهده نشد.

۲- گونه‌های شناسایی شده: *Colletotrichum coccodes* (Wallr.) S. Hughes, Can. J. Bot. 36: 754 (1958)، جدایه‌های مربوط به این گونه روی محیط کشت PDA در ابتدا پرگنه‌ای سفیدرنگ ایجاد کردند که پس از مدتی خاکستری‌رنگ شده و روی آن اسکلروت‌ها به صورت نقاط سیاه‌رنگ تشکیل شدند. میسلیوم هوایی مشاهده نگردید و اسکلروت‌ها از مرکز شروع به رشد کرده و تمام تشتک پتری را در برگرفتند. ساتن (۱۹۹۲) گزارش نمود که پشت پرگنه در برخی جدایه‌ها ممکن است صورتی تا زرشکی باشد اما این حالت در جدایه‌های مورد بررسی در این تحقیق مشاهده نشد. کنیدیوم‌های تک‌سلولی، دوکی‌شکل و مستقیم بودند و توده‌ی لزج شفافی از کنیدیوم‌های تک‌سلولی در محیط کشت مغذی تولید شد که این ویژگی توسط استویانوا و همکاران (۲۰۱۳) نیز مشاهده گردید. اندازه کنیدیوم‌ها ۲۲-۱۶×۴-۳ میکرومتر بود و کنیدیوم‌ها روی کنیدیوفور یا مستقیماً روی ریسه تشکیل گردیدند. آپرسوریوم معمولی، قهوه‌ای تا قهوه‌ای متمایل به زرد، چماقی شکل و بیضوی بوده و حاشیه آن، صاف، گاهی اوقات نامنظم، دندانه‌دار و تقریباً به صورت کنگره‌دار مشاهده گردید. اندازه‌ی آپرسوریوم ها ۵/۱۶-۱۱ ×۵/۹-۶ میکرومتر می‌باشد و بندرت به صورت بهم چسبیده مشاهده شدند. این گونه روی محیط کشت PCA تولید آسروول‌های تیره‌رنگ، کروی و خاردار می‌کند که به صورت دوایر متحدالمرکز می‌باشد که این الگو ناشی از دوره‌های تاریکی و روشنایی طی رشد قارچ است. قطر آسروول در حدود ۱۵۰ تا ۳۰۰ میکرومتر می‌باشد (شکل ۲).

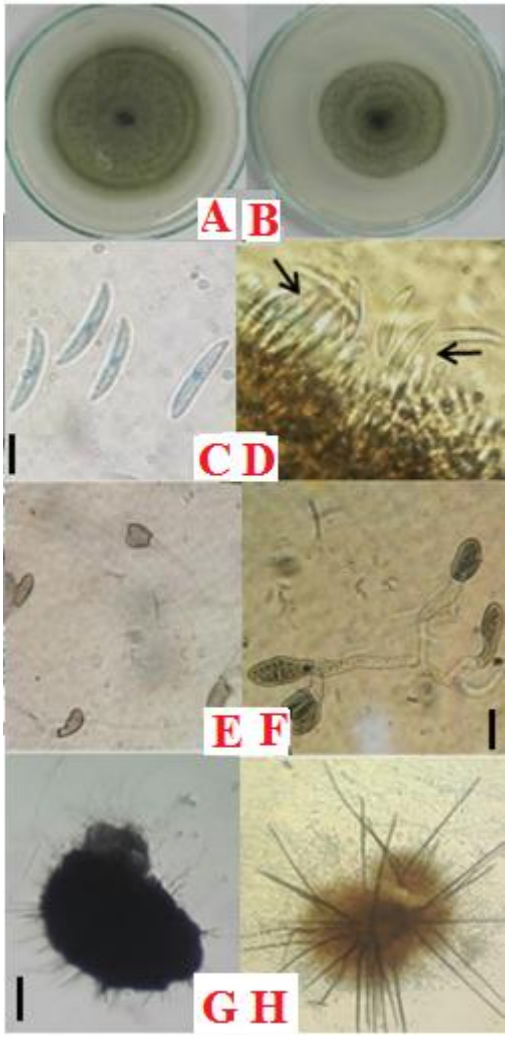
***Colletotrichum circinans* (Berk.) Voglino, *Annali R. Accad. Agric. Torino* 49: 175 (1907)**، جدایه‌های مربوط به این گونه روی محیط کشت PDA، پرگنه‌های سفید مایل به خاکستری و گاهی سبز تیره با رشد پنبه‌ای دارند. میسلیوم‌ها و آسروول‌ها در سطح و درون محیط کشت رشد کردند. ساتن (۱۹۹۲) گزارش کرده که در بعضی جدایه‌ها رنگ پرگنه حنایی تا جگری‌رنگ می‌باشد اما این حالت در جدایه‌های مورد بررسی در این تحقیق مشاهده نشد. کنیدیوم‌ها تک

سلولی، بی‌رنگ، داسی‌شکل، در انتها مخروطی و نوک تیز می‌باشند و اندازه‌ی آن‌ها ۲۳-۱۶×۵/۳ میکرومتر می‌باشد. آپرسوریوم‌ها فراوان، چماقی یا گرد، گاهی اوقات نامنظم بوده و اندازه‌ی آن‌ها ۵/۱٤-۱۰×۵/٦-٦ میکرومتر می‌باشد. اغلب آپرسوریوم‌ها به هم متصل می‌شوند و کمپلکس تشکیل می‌دهند. آسروول‌ها تیره‌رنگ و دارای مو یا خار می‌باشند که یک تا سه موی سوزنی‌شکل دیواره‌دار و یک انتهای پیازی شکل دارند که توسط لیلایی (۲۰۱٤) نیز مشاهده شده است. خارها دارای ۸۰ تا ۳۰۰ میکرومتر طول هستند (شکل ۳).



شکل ۲- پرگنه قارچ *Colletotrichum coccodes* روی محیط کشت PCA (A) .کنیدیوم و کنیدیوفور(B) (مقیاس =۲۰ میکرومتر). آپرسوریوم(C-D) (مقیاس = ۱۰ میکرومتر) .آسروول و خارها (E-F) (مقیاس = ۵۰ میکرومتر).

Fig 2. Colony of *Colletotrichum coccodes* on PCA (A); Conidia and conidiophore (B) (Bar = 10 µm); Appressoria (C-D) (Bar = 10 µm); Acervulus and setae (E-F) (Bar = 50 µm).



شکل ۳- پرگنه قارچ *Colletotrichum circinans* روی محیط کشت PCA (A-B). کنیدیوم و کنیدیوفور (C-D) (مقیاس = ۱۰ میکرومتر). آپرسوریوم (E-F) (مقیاس = ۱۰ میکرومتر). آسروول و خارها (G-H) (مقیاس = ۵۰ میکرومتر)

Fig 3. Colony of *Colletotrichum circinans* on PCA (A-B); Conidia and conidiophore(C-D) (Bar = 10 µm) ; Appressoria (E-F) (Bar = 10 µm); Acervulus and setae (G-H) (Bar = 50 µm).

به‌طور کلی ویژگی‌های ریخت¬شناختی مانند اندازه و شکل آسروول، کنیدیوم، کنیدیوفور، خار و آپرسوریوم می‌تواند بسیار تحت تاثیر شرایط محیطی مثل محیط کشت و دما قرار گیرد. ساتن (۱۹۹۲) بیان کرد که محیط کشت‌های آگاردار از جمله PDA و PCA در دماهای مختلف برای شناسایی گونه‌های *Colletotrichum* کاربرد دارد. بنابراین، در این پژوهش برای شناسایی گونه‌های منسوب به *Colletotrichum* از محیط

کشت PDA و PCA استفاده گردید. به نظر ساتن(۱۹۹۲) مورفولوژی کنیدیوم *C. gloeosporioides* و *C. lindemuthianum* به هم شبیه است، اما ویژگی‌های کشت آن‌ها با هم به‌طور واضحی متفاوت است. گونه *C. lindemuthianum* رنگدانه‌های تیره در محیط تولید می‌کند و رشد آن آهسته‌تر از *C. gloeosporioides* است. بنابراین دامنه‌ای از صفات ریخت‌شناسی را برای شناسایی گونه‌های متفاوت جنس *Colletotrichum* مورد استفاده قرار دادند (Sutton, 1992). یافته‌های کنو و همکاران (Cano *et al*., 2004) نشان می‌دهد که یاخته‌های کنیدیوم‌زا و خارها هیچ‌کدام صفات مناسبی برای تفکیک و تمایز گونه‌ها نبودند و معیارهای مهم جهت تفکیک گونه‌ها، تولید یا عدم تولید سختینه، شکل‌شناسی کنیدیوم و آپروسوریوم می‌باشد. ناپایداری و تغییرپذیری وسیع در این صفات به همراه وجود جدایه‌های دارای صفات حد واسط یا مخلوط، تغییرپذیری زیاد تحت شرایط کشت و انعطاف‌پذیری در ترجیح میزبانی نیز معیارهای فوق را برای شناسایی گونه‌ها غیر قابل اطمینان کرده است (Cano *et al*., 2004). در این پژوهش گونه *C. coccodes* بسیار مشابه با گونه *C. gloeosporioides* بود که برای اطمینان از ناحیه ITS-rDNA استفاده گردید که با نتایج دمم و همکاران (Damm *et al*., 2009) که تشخیص این دو گونه را منوط بر مطالعات مولکولی دانست مطابقت داشت. بطور کلی استفاده از ویژگی‌های دیگر از قبیل داده‌های توالی‌یابی مولکولی، شیمیایی، خصوصیات فیزیولوژیکی و دامنه میزبانی در کنار ویژگی‌های مورفولویک می‌تواند تا حد زیادی از تشخیص اشتباه جلوگیری نماید. با توجه به کاستی و انعطاف‌پذیری صفات ظاهری، تجزیه و تحلیل توالی اسید نوکلئیک برای ریخت¬شناختی طبقه‌بندی *Colletotrichum* قابل اعتمادتر می‌باشد و به‌عنوان روش‌های مکمل مناسب برای طبقه‌بندی و ابزار مهمی برای حل مشکلات مربوط به تعیین حدود گونه‌ها می‌باشد (Arzanlou, *et al*., 2015).

۳- شناسایی مولکولی: تعداد ۳۵ جدایه از میان ۱۷۰ جدایه جهت تایید شناسایی گونه‌های بیماری‌زای آنتراکنوز سیب‌زمینی و پیاز که بر اساس خصوصیات ریخت¬شناختی *C. circinans* و *C. coccodes* تشخیص داده شده بودند، انتخاب گردیدند. سپس از جفت آغازگر ITS2 و ITS1 استفاده گردید، با استفاده از این جفت آغازگر قطعه ۵۸۰ جفت بازی در جدایه‌های مربوط به آنتراکنوز سیب‌زمینی تکثیر شد که تکثیر چنین قطعه‌ای با این جفت آغازگر در رابطه با گونه *C. circinans* با یافته‌های پژوهشگرانی از جمله فضلی و همکاران (Fazli *et al*., 2012)، نصر اصفهانی و مرتضوی (2004) و کنو و همکاران (۲۰۰٤) .مطابقت داشت. همچنین تکثیر قطعه ۵۳۰ جفت بازی در جدایه‌های مربوط به آنتراکنوز پیاز در رابطه با گونه *C. circinans* با یافته‌های لیلایی و همکاران (Leylaie *et al*., 2012) و کی‌هر و همکاران (Kiehr *et al*., 2012) مطابقت داشت. به‌طور کلی نتایج حاصل از بررسی‌های مولکولی با نتایج آبانگ و همکاران (۲۰۰۲) که تکثیر یک قطعه ۵۰۰ تا ٦۰۰ جفت بازی را در گونه‌های *Colletotrichum* گزارش نموده است (Abang *et al*., 2002) مطابقت دارد.

٤- تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک: برای مطالعات فیلوژنی در مجموع ۳۹ جدایه به‌عنوان نماینده مولکولی انتخاب شدند که تعداد ۳۰ جدایه بر گرفته از مطالعات کن‌نون و همکاران (Cannon et al., 2012) و لیو و همکاران (Liu et al., 2011) بود و تعداد ۹ جدایه نیز به این پژوهش اختصاص داشت (جدول ۱). درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده با روش آنالیز Maximum Parsimony براساس توالی ناحیه rDNA-ITS نشان داد که جنس *Colletotrichum* مونوفیلتیک می‌باشند. در این تحقیق، طول توالی نوکلئوتیدی ناحیه ITS-rDNA توالی‌یابی شده در جدایه‌های مختلف گونه‌های *Colletotrichum*، ۵۳۰ جفت باز بود.

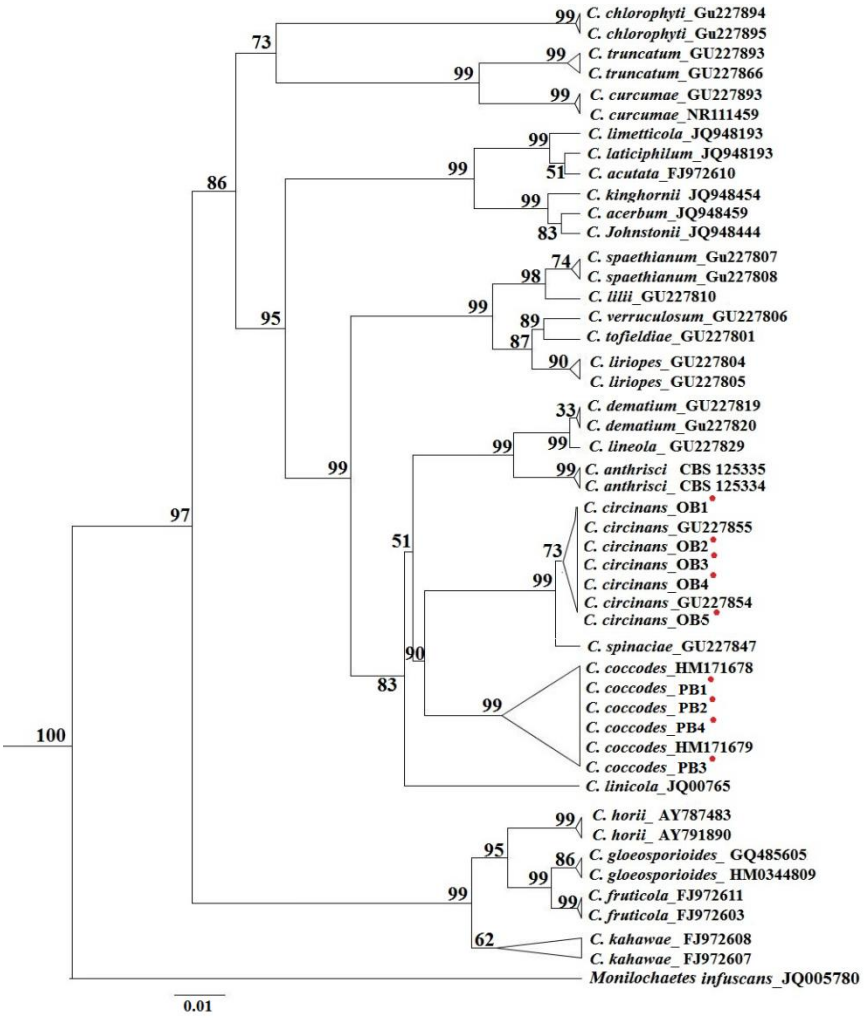
جدایه‌های مورد بررسی در این مطالعه، براساس نتایج آنالیزهای فیلوژنتیکی، به دو شاخه تکاملی *C. circinans* و *C. coccodes* تعلق داشتند. براساس ویژه‌گی‌های ریخت‌شناختی، جدایه‌های به‌دست آمده در ۲ گروه شناسایی شدند که ۵۰ جدایه متعلق به گونه‌ی *C. circinans* از پیاز و۱۲۰ جدایه

متعلق به گونه‌ی *C. coccodes* از سیب‌زمینی می‌باشد. با توجه به درخت Maximum Parsimony رسم شده، همه جدایه‌های توالی‌یابی شده کلاد *C. coccodes* براساس ناحیه rDNA-ITS با مقدار اعتبار سنجی ۹۹درصد با گونه *C. coccodes* که حاصل مطالعات کن‌نون و همکاران (Cannon *et al.*, 2012) بوده، گروه‌بندی گردید و تشکیل یک گروه مونوفیلتیک را داد (شکل ٤) و میزان شباهت توالی نوکلئوتیدی بین جدایه‌های مورد مطالعه در این تحقیق بیش از ۹۹ درصد بود. در واقع، بزرگ‌ترین گروه در این مطالعه به *C. circinans* تعلق داشت. جدایه‌های توالی‌یابی شده شاخه تکاملی *C. circinans* با مقدار اعتبار سنجی ۷۳ درصد با گونه *C. circinans* که حاصل مطالعات لیو و همکاران (Liu *et al.*, 2011) بوده، گروه‌بندی گردید، این کلاد دومین گروه در این مطالعه را به خود اختصاص داد (شکل ٤).

در این مطالعه نواحی ITS- rDNA در تفکیک گونه‌های جنس *Colletotrichum* و تأیید شناسایی ریخت¬شناختی گونه‌ها مؤثر بود که با تحقیقات دیگران از جمله شریف و همکاران (1995) مطابقت نشان داد آنها با استفاده از توالی نواحی ITS -rDNA توانستند جدایه‌های *C. graminicola* به دست آمده از ذرت را از جدایه‌های *C. sublineolum* سورگوم تفکیک و جدا نمایند (Sherriff *et al.*, 1995). بیلی و همکاران (۱۹۹٦) گونه‌های *Colletotrichum* عامل آنتراکنوز تیره‌ی *Malvaceae* را بر اساس توالی‌های ITS2 و D2 از ژن 28S بررسی کردند و آن‌ها را در دو گونه شامل *C. gloeosporioides* روی پنبه و *C. orbiculare* روی برگ نمدی، گل ختمی و پنیرک تقسیم‌بندی کردند (Bailey *et al.*, 1996). جانسون و همکاران (۱۹۹۷) از ناحیه ITS-rDNA همراه با ویژگی‌های مورفولوژیک برای شناسایی گونه‌ی جدید *C. nuphariola* که به نیلوفر آبی حمله می‌کند، استفاده کردند (Johnson, *et al.*, 1997). لوب و همکاران (۲۰۰٤) گونه‌های مربوط به‌جنس *Colletotrichum* بیماری‌زا روی اعضای تیره پروتیاسه که گل برخی از آن‌ها به فروش می‌رسد و ارزش اقتصادی دارند را با استفاده از روش‌های ریخت¬شناختی و مولکولی بررسی کردند. آن‌ها در این تحقیق بر اساس خصوصیات ظاهری و توالی ITS- rDNA گونه‌های *C. crassipes*،*C. gloeosporioides* و *C. acutatum* را از گونه‌های مختلف تیره پروتیاسه شناسایی نمودند (Lubbe *et al.*, 2004). همچنین مطالعات فانگ و همکاران (Fang *et al.*, 2011) براساس آنالیزهای فیلوژنتیکی با استفاده از تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از توالی ژن‌های بتاتوبولین، گلوتامین سنتاز، کالمودولین، گلیسرآلدهید تری فسفات دهیدروژناز و نواحی ژنی rDNA-ITS نشان داد که گونه *C. coccodes* از گونه *C. gloeosporioides* complex مجزا بوده اما ارتباط نزدیکی با گونه‌های *C.liriopes*، *C. verruculosum* و *C. spaethianum* دارد، در حالی که در این پژوهش، فقط از ناحیه ITS استفاده گردید که نشان دهنده ارتباط نزدیک دو گونه *C. coccodes* و *C. circinans* می‌باشد که با مطالعات انجام شده توسط فاگ‌بولا و ابانگ (Fagbola and Abang, 2004) مطابقت ندارد زیرا آن‌ها بیان کردند که ناحیه ITS-rDNA به‌تنهایی نمی‌تواند باعث تفکیک دقیق دو گونه *C. circinans* و *C. coccodes* از یکدیگر گردد. همچنین مطالعات مولکولی کنون و همکاران (۲۰۱۲) و لیو همکاران (۲۰۱۱) نشان داد که ناحیه ITS به تنهایی قادر به تمایز گونه‌های *Colletotrichum* نمی‌باشد و بنابراین آنها استفاده از ژن‌های توبولین، اکتین، کیتین سنتاز و نواحی ITS را برای تفکیک گونه‌های این جنس معرفی نمودند. بنابراین پیشنهاد می‌شود که جدایه‌های این تحقیق توسط چندین ژن مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفته تا نتایج مطلوب‌تری حاصل گردد.

۵- آزمون بیماری‌زایی و مایه‌زنی تقاطعی: علائم ایجاد شده روی اندام هوایی و زیرزمینی سیب‌زمینی به دقت مورد بررسی قرار گرفت. در اندام‌های هوایی، علائم بیماری در هیچ یک از نمونه‌ها مشاهده نشد. در اندام‌های سیب‌زمینی مایه زنی شده با *C. coccodes* علائم بیماری به صورت زخم روی ساقه زیرزمینی و تشکیل آسروول روی ریشه‌ها و ساقه زیرزمینی مشاهده گردید. در نمونه‌های شاهد و نمونه‌های

مایه‌زنی شده با جدایه‌های *C. circinans* جدا شده از پیاز هیچ علائمی مشاهده نشد (شکل ۵). نمونه‌های دارای علائم را به آزمایشگاه منتقل شده و برای جداسازی و شناسایی مجدد عامل بیمارگر مورد بررسی قرار گرفتند. در نمونه‌های مایه‌زنی شده با جدایه‌های *C. circinans* پیاز علائم روی سطح فلس‌ها به صورت لکه‌های مدور تیره رنگ با اندازه‌های متفاوت مشاهده شد که روی هر لکه آسروول‌های عامل بیماری به صورت دوایر متحدالمرکز تشکیل شده بود. روی ریشه، طبق و گردن بعضی از نمونه‌ها نیز آسروول قابل مشاهده بود. اما در نمونه‌های مایه زنی شده با جدایه‌های *C. coccodes* سیب‌زمینی، نمونه‌های شاهد و نیز برگ‌های تمام نمونه‌ها هیچ علائمی مشاهده نشد (شکل ٦). نمونه‌های دارای علائم پس از



شکل ٤– درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده براساس نواحی rDNA-ITS، 39 آرایه *Colletotrichum* با آنالیز maximum parsimony: اعداد بالای هر شاخه نشان‌دهنده مقدار اعتبار سنجی از ۱۰۰۰ تکرار می‌باشد (طول شاخه‌ها تعداد جایگزینی نوکلئوتیدی، توسط خط مقیاس پایین شجره نشان داده شده است). گونه *Monilochaetes infuscans* به‌عنوان خارج گروه انتخاب شده است

Fig. 4. A phylogenic tree of *Colletotrichum* inferred from rDNA- ITS from 39 taxa: Bootstrap values > 50% (1000 replicates) of maximum parsimony analysis is shown above the branches (bar indicates the nucleotide substitution in maximum parsimony analysis) *Monilochaetes infuscans* is out group.

شستشو و سترون شدن در الکل و هیپوکلرید سدیم با دو روش کشت بافت آلوده و کشت آسرووِل روی محیط PDA قرار داده شدند و قارچ *C. circinans* از پیاز مایه زنی شده با آن جداسازی و خصوصیات ماکروسکوپی و میکروسکوپی آن مورد بررسی قرار گرفت. در نتیجه می‌توان گفت در صورت آلودگی بستر کشت با گونه *C. coccodes* و کشت پیاز در آن بیماری آنتراکنوز ناشی از این قارچ در این گیاهان بروز نخواهد کرد. به همین ترتیب در صورت آلودگی بستر کشت سیب‌زمینی به *C. circinans* بیماری ناشی از این قارچ ایجاد نمی‌شود. این نتایج نشان داد که در صورت تناوب سیب‌زمینی با پیاز امکان بروز بیماری آنتراکنوز وجود نخواهد داشت.

شکل ۵- سیب‌زمینی‌های مایه‌زنی شده با جدایه‌های *Colletotrichum coccodes* (آسرووِل روی طوقه و ریشه)(A-B). سیب‌زمینی‌های مایه‌زنی شده با جدایه‌های *C. circinans* (بدون هیچ علائمی)(C).

Fig 5. Inoculation of potato with *Colletotrichum coccode* (acervulus on crown and root) (A-B); Potatoe inoculated with *Colletotrichum circinans* (no symptoms) (C).

شکل ٦- پیازهای مایه‌زنی شده با جدایه‌های *Colletotrichum circinans* (آسرووِل روی فلس‌های پیاز) (A-B). پیازهای مایه‌زنی شده با جدایه‌های *C. coccodes* (بدون هیچ علائمی) (C).

Fig 6. Inoculation of onion with *Colletotrichum circinans* (acervulus on onion scales) (A-B); **o**nions inoculated with *Colletotrichum coccode* (no symptoms) (C).

نیتزان و همکاران (Nitzan *et al.,* 2008) در رابطه با منبع بیماری خال سیاه سیب‌زمینی دو عقیده را مورد بررسی قرار دادند؛ اول اینکه زاد مایه خاک‌زاد نسبت به زاد مایه غده‌زاد موجب ایجاد بیماری شدیدتر می‌شود، دوم؛ شدت بیماری خال سیاه به میزان زاد مایه خاکزاد بستگی دارد. پس از انجام آزمایشات متعدد با زادمایه استاندارد، مشخص شد که نظر اول در رابطه با بیشتر بودن شدت بیماری در حالت خاک‌زاد نسبت به‌حالت غده‌زاد صحیح بوده و این مسئله بر عملکرد گیاهان مورد آزمایش اثر گذار بوده است. گیاهان رشد یافته در خاک آلوده نسبت به گیاهان رشد یافته از غده‌های آلوده، اسکلروت بیشتری روی ریشه‌ها داشتند و نیز تعداد غده‌های دختری ایجاد شده در گیاهان رشد یافته در خاک آلوده کمتر از گیاهان سالم بوده است، در حالی که گیاهان حاصل از غده‌های آلوده تعداد مشابهی غده نسبت به گیاهان سالم تولید کردند. اما در رابطه عقیده دوم وقتی میزان زاد مایه خاک‌زاد افزایش یافت، علائم هوایی، حجم اسکلروت روی ریشه‌ها و پیشرفت اسکلروت روی ساقه‌ها بدون تغییر ماند و در نتیجه می‌توان گفت با بالا بردن میزان زاد مایه خاک‌زاد شدت بیماری ثابت می‌ماند.

نتیجه گیری کلی

در این پژوهش ۱۷۰ جدایه قارچی با علائم لکه برگی، پوسیدگی طوقه و ریشه یا گردن از میزبان‌های سیب‌زمینی و پیاز در مناطق مختلف استان اصفهان از جمله فریدن، داران، دامنه، چادگان، رزوه و آشجرد جداسازی گردید. با مطالعه خصوصیات ریخت¬شناختی جدایه‌ها، دو گونه *C. circinans* و *C. coccodes* شناسایی شدند. گونه *C. coccodes* از سیب‌زمینی با ۱۲۰ جدایه گونه غالب در نظر گرفته شد و گونه *C. circinans* از پیاز با ۵۰ جدایه دومین گونه را بخود اختصاص داد. شناسایی مولکولی به منظور تائید گونه‌های ریخت¬شناختی شناسایی شده، با استفاده از جفت آغازگرهای ITS1 و ITS4 صورت پذیرفت.

یافته‌های حاصل از اثبات بیماری‌زایی و تلقیح تقاطعی گونه‌های به‌دست آمده بیانگر آن است که در پیاز سفید پس از گذشت یک ماه از زمان تلقیح با جدایه‌های گونه *C. circinans* علائم بیماری شامل ایجاد زخم و پوسیدگی و تشکیل آسروول‌های عامل بیماری روی گردن، فلس‌ها و طبق مشاهده شد، اما در برگ‌ها هیچ گونه علائمی ایجاد نگردید. تلقیح جدایه‌های *C. coccodes* به بوته‌های پیاز نیز موجب بروز هیچ علائمی در آن نشد. در رابطه با سیب‌زمینی، تلقیح جدایه‌های *C. coccodes* موجب ایجاد علائم بیماری شامل تشکیل آسروول روی طوقه، ریشه و ساقه زیرزمینی و ایجاد زخم روی ساقه زیرزمینی گردید و بیماری‌زایی آن را اثبات کرد، اما جدایه‌های *C. circinans* هیچ گونه علائمی روی میزبان سیب-زمینی ایجاد نکردند. این نتایج می‌تواند در پیشگیری از بیماری آنتراکنوز در مزارع سیب‌زمینی و پیاز که ناشی از عدم رعایت تناوب زراعی صحیح با گیاهان غیرمیزبان است، نقش داشته باشد. همچنین جدایه‌های مورد بررسی در این مطالعه، براساس نتایج آنالیزهای فیلوژنتیکی، به دو کلاد *C. circinans* و *C. coccodes* تعلق داشتند.

References

ABANG, M. M., S. WINTER, K. R. GREEN, P. HOFFMANN, H. D. MIGNOUNA and G. A. WOLF. 2002. Molecular identification of *Colletotrichum gloeosporioides* causing yam anthracnose in Nigeria. Plant Pathology, 51: 63-71.

ARZANLOU, M., M. BAKHSHI, K. KARAMI and M. TORBATI. 2015. Multigene phylogeny reveals three new records of *Colletotrichum* spp. and several new host records for the mycobiota of Iran. Journal of Plant Protection Research, 55:198-211.

BAILEY, J. A., C. NASH, L.W. MORGAN, R. J. O'CONNELL and D. O. TEBEET, 1996. Molecular taxonomy of *Colletotrichum* species causing anthracnose on the Malvaceae. Phytopathology, 86: 1076-1083.

BINAEIAN, M., K. SHARIFI and H.R. ZAMANIZADEH. 2011. Investigation on vegetative compatibility

groups and pathogenicity of *Colletotrichum coccodes*, the causal agent of potato black dot in Iran. Iranian Journal of *PLANT* Pathology, 47: 31-46.

CANO, J., J. GUARRO and J. GENE. 2004. Molecular and morphological identification of *Colletotrichum* species of clinical interes. Journal of Clinical Microbiology, 6: 2450–2454.

CANNON, P. F., U. DAMM, P.R. JOHNSTON and B.S. WEIR. 2012. Colletotrichum – current status and future directions. Studies in Mycology 73: 181-123.

DAMM, U., J. H. C., WOUDENBERG, P. F. CANNON and P.W. CROUS. 2009. *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts. Fungal Diversity, 39: 45-87.

EBENEBE, A. C. 1980. Onion twister disease caused by *Glomerella cingulata* in northern Nigeria. Plant Disease, 64:1030-1032.

ERSHAD, D. 2009. Fungi of Iran. Iranian Research Institute of Plant Protection, 539Pp.

FAGAN, H. J. 1984. Postbloom fruit drop of citrus in Belize: I. Disease epidemiology. Turrialba. 34: 173-177.

FAGBOLA, O. and M. M. ABANG. 2004. *Colletotrichum circinans* and *Colletotrichum coccodes* can be distinguished by DGGE analysis of PCR amplified 18S rDNA fragments. African Journal of Biotechnology, 3: 195-198.

FAOSTAT database. 2013. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Available at: http://faostat.fao.org

FAZLI, M., G. KHODAKARAMIAN, D. ZAFARI and A. BAGHERI. 2012. Interactions between *Colletotrichum coccodes* and *Ralstonia solanacearum* on three potato cultivars. Iranian Journal of Plant Pathology, 48: 85-102.

GRAND, L. F. 1985. North Carolina plant disease index. Technical Bulletin, North Carolina Agricultural Research, 240: 1-157.

HAY, F. S., D. STRICKLAND, E. MALONEY, C. HOEPTING and S. J. PETHYBRIDGE. 2016. Anthracnose of onion caused by *Colletotrichum coccodes* in New York. Plant Disease, 100: 2171.

HOOKER, W. J. 1986. *Compendium of potato diseases*. American phytopathological Society. 125 pp.

HYDE, K. D., L. CAI, E. H. C. MCKENZIE, Y. L. YANG, J. Z. ZHANG and H. PRIHASTUTI. 2009a. *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. Fungal Diversity, 39: 1-17.

HYDE, K. D., L. CAI, P. F. CANNON, J.A. CROUCH, P. W. CROUS, U. DAMM, P. H. GOODWIN, H. CHEN, P. R. JOHNSTON, E. B. G. JONES, Z. Y. LIU, E. H. C. MCKENZIE, J. MORIWAKI, P. NOIREUNG, S. R. PENNYCOOK, L. H. PFENNING, H. PRIHASTUTI, T. SATO, R. G. SHIVAS, Y. P. TAN, P. W. J. TAYLOR, B. S. WEIR, Y. L. YANG and J. Z. ZHANG. 2009b. *Colletotrichum* – names in current use. Fungal Diversity, 39: 147-182.

JOHNSTON, D. A., L. M. CARRIS and J. D. ROGERS. 1997. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum nymphaeae* and *Colletotrichum nupharicola sp.nov.* on water-lilis (*Nymphaea* and *Nuphar*). Mycological *RESEARCH*, 101: 641-649.

KATOH, K. and D. M. STANDLEY. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software. Version 7: improvements in performance and usability. Molecular Biology and Evolution, 30: 772–780.

KIMURA, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Molecular Biology and Evolution, 16: 111–120.

KIEHR, M., R. DELHEY and A. AZPILICUETA. 2012. Smudge and other diseases of onion caused by *Colletotrichum circinans*, in southern Argentina. Journal of Experimental Botany, 81: 161-164.

LEYLAIE, S., D. ZAFARI and S. BAGHER ABADI. 2014. First report of *Colletotrichum circinans* causing smudge on onion in Iran. New Disease Report, 30: 2.

LIU, F., K. D. HYDE and L. CAI. 2011. Neotypification of *Colletotrichum coccodes*, the causal agent of potato black dot disease and tomato anthracnose. Mycology 2: 248– 254.

LUBBE, C. M., S. DENMAN, P. F. CANNON, J. Z. GROENEWALD, S. C. LAMPRECHT, and P. W.

CROUS, 2004. Characterization of *Colletotrichum* species associated with diseases of Proteaceae. Mycologia, 96: 1268-1279.

NASR ESFAHANI, A. and A. MORTEZAVI BAK. 2004. Biological and cultural control of black dot disease of potato. Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources, 8: 193-206.

NITZAN, N., CUMMINGS, T.F. and JOHNSON, D.A. 2008. Disease potential of soil- and tuberborne inocula of *Colletotrichum coccodes* and black dot severity on potato. Plant Disease 92: 1497-1502.

OKHVAT, M. 2006. *Diseases of Sugarbeet and Potato*. Noon publication, 196 Pp.

PHOTITA, W., P. W. J. TAYLOR, R. FORD, K. D. HYDE and S. LUMYONG. 2005. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* species from herbaceous plants in Thailand. Fungal Diversity, 18: 117-133.

RODRIGUEZ-SALAMANCA, L.M. and T. B. ENZENBACHER. 2012. First Report of *Colletotrichum coccodes* Causing Leaf and Neck Anthracnose on Onions (*Allium cepa*) in Michigan and the United State. Plant Disease, 96: 769.

SAOTOU, N. and M. NEI. 1987. The Neighbor-Joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution, 4: 406–425.

SHERRIFF, C., M. J. WHELAN, G. M. ARNOLD and J. A. BAILEY. 1995. rDNA sequence analysis confirms the distinction between *Colletotrichum graminicola* and *C. sublineolum*. Mycological Research, 99: 475-478.

SUTTON, B. C. 1992. The Genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. pp. 1-23. In: Bailey J. A. and JEGER M. J. (eds.)."*Colletotrichum*: *Biology, Pathology and Control*. CAB International. p 1–26.

SUTTON, B. C.1968. The appressoria of *Colletotrichum graminicola* and *C. falcatum.* Canadian Journal of Botany, 46: 873-876.

STOYANOA, Z. B., R. M. RODEVA, I. KAROV, B. KOVACEVIK, V. I. MANOVA and R. G. GEORGIEVA. 2013. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum coccodes* isolated from pepper cultivated in Bulgaria and Macedonia. Journal of Natural Sciences124: 249-261.

TAMURA, K., DUDLEY, J., NEI, M. and S. KUMAR. 2007. Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. Molecular Biology and Evolution, 24: 1596–1599.

WHITE T.J., T. BRUNS, S. LEE, and J. TAYLOR. 1990 Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds). Academic Press, New York, USA: 315–322.

YANG, Y., Z. LIU, L. CAI and K.D. HYDE. 2012. New species and notes of *Colletotrichum* on daylilies (*Hemerocallis* spp.). Tropical Plant Pathology, 37: 165-174.