رستنیها، جلد ۱۰(۲)، ۱۳۸۸

مطالعه زادآوری جنسی و برخی ویژگی‌های مورفولوژیکی و بیماریزایی جدایه‌های ایرانی *Ophiognomonia leptostyla**

Study on sexual reproduction and some morphological and pathological traits of *Ophiognomonia leptostyla* in Iran

سلیمان جمشیدی**، حمیدرضا زمانی‌زاده، رسول زارع و سعید رضائی**

دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران و موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی ایران

دریافت: ۱۳۸۸/۶/۳۰ پذیرش: ۱۳۸۸/۷/۲۹

چکیده

بیماری آنتراکنوز گردو ناشی از *Ophiognomonia leptostyla* مهمترین و شایع‌ترین بیماری قارچی گردو در اغلب گردوکاری‌های ایران می‌باشد. به منظور مطالعه نحوه زادآوری جنسی در این قارچ، تعداد ۷۵ جدایه از مناطق مختلف کشور از گردوی ایرانی جمع‌آوری و پریتسیوم‌ها در ۱۱ منطقه از برگ و در هشت جدایه از محیط کشت آرد یولاف- آگار به دست آمدند. این جدایه‌ها به همراه پنج جدایه فاقد پریتسیوم، به صورت تک آسکوسپور یا تک ماکروکنیدیوم خالص شدند. پروتوپریتسیوم‌ها به راحتی از نمونه‌های برگی با قدمت بیش از یک سال به دست آمدند. تعداد گردن آسکوکارپ در برگ یک و در محیط کشت تا چهار عدد متغیر بود. در این مطالعه ۹/۳٪ جدایه‌ها هموتال بودند. همچنین از کشت متقابل هفت جدایه دارای

واژه‌های کلیدی: آنتراکنوز گردو، هموتالیسم، *Gnomonia leptostyla*، *Marssoniella juglandis*

---

* بخشی از رساله دکتری نگارنده اول به راهنمایی دکتر حمیدرضا زمانی‌زاده و دکتر رسول زارع ارایه شده به دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران

** مسئول مکاتبه (E-mail: s.jamshidi@m-iau.ac.ir)

پریتسیوم غیرهموتال همراه با پنج جدایه نابارور جنسی هیچ نوع پریتسیوم بالغی حاصل نشد. در جدایه‌های هموتال قطر پریتسیوم و طول گردن به طور معنی‌داری بیش از جدای‌های غیرهموتال بود. جدایه‌های هموتال و غیرهموتال، اختلاف معنی‌داری از لحاظ طول آسک و آسکوسپور، سرعت رشد پرگنه، زمان تشکیل آسروول در محیط و شاخص بیماریزایی نداشتند.

مقدمه

بیماری آنتراکنوز یا لکه سیاه گردو از مهمترین بیماری‌های گردو در نواحی مختلف جهان از جمله آمریکای شمالی و جنوبی، نواحی گسترده‌ای از اروپا و نیز قسمت‌های وسیعی از آسیا می‌باشد (Belisario 2002). این بیماری برای اولین بار در ایران توسط *خبیری* در سال ۱۳۳۱ گزارش شد (Behdad 1998) و در حال حاضر در اغلب نواحی شمال، غرب، شمال‌غرب، برخی نواحی مرکزی و شمال‌شرق کشور انتشار داشته و بویژه در فصول پرباران و خنک، همه‌گیر شده و زیان‌های عمده‌ای را به گردوکاران تحمیل می‌کند (Salahi *et al.* 2007, Irani *et al.* 2007). نام فرم جنسی قارچ عامل بیماری اخیرا توسط *سوگونوف* و همکاران (Sogonov *et al.* 2008) به *Ophiognomonia leptostyla* (Fr.) Sogonov تغییر داده شده و نام آناموف آن *Marssoniella juglandis* (Lib.) Höhn. می‌باشد (Roquebert & Fayret 1982). پیش از این نام تلومورف این قارچ *Gnomonia leptostyla* (Fr.) Ces. & De Not. (1863) و نام آناموف آن *Marssonina juglandis* (Lib.) Magnus (1906) بود (Belisario 2002).

بررسی‌ها نشان می‌دهد که نور سبب افزایش رشد رویشی در قارچ *O. leptostyla* شده و تولید کنیدیوم و آسروول را نیز افزایش می‌دهد (Fayret 1977). این قارچ در دمای ۲۲ درجه سلسیوس و اسیدیته ۵/۴ بهترین رشد را داشته و همچنین مناسب‌ترین دما برای هاگزایی غیرجنسی آن ۲۶ درجه سلسیوس و اسیدیته ۶/۸ در محیط کشت آرد یولاف- آگار است (Matteoni & Neely 1979).

رفتار جنسی از سازوکارهایی است که از طریق آن تنوع ژنتیکی و بقای یک گونه تضمین می‌شود. اساسا، هموتالیسم و هتروتالیسم دو روش عمده باروری جنسی در قارچ‌ها به شمار می‌روند (Souza *et al.* 2003). قارچ‌های هموتال، قارچ‌های خودباروری می‌باشند که در آن‌ها، ژن‌های دو تیپ آمیزشی (A و a) در یک ریسه قرار دارند. در مقابل، در قارچ‌های هتروتال هر ریسه منفرد، به تنهایی نابارور است و ژن‌های مذکور در ریسه‌های جداگانه‌ای قرار دارند (Mehrotra & Aneja 1990). بسیاری از گونه‌های رده آسکومیست هموتال می‌باشند ولی گونه‌های هتروتال نیز وجود دارد (El-Cholل *et al.* 1986). تشکیل پریتسیوم در صورتی که

بخش رویشی قارچ *O. leptostyla* در زمان رشد فعال در معرض نور باشد، بازداشته می‌شود (Fayret 1974, 1977). همچنین پریتسیوم‌ها در دمای ۲۰ درجه سلسیوس نابالغ باقی مانده و طی شدن یک دوره نسبتا طولانی سرما برای تکامل و بلوغ آن‌ها ضروری است (Fayret *et al.* 1976). بلوغ پریتسیوم در دمای ۱۰ درجه سلسیوس صورت می‌گیرد (Fayret 1977, Matteoni & Neely 1979). طبق گزارش *فایرت* (Fayret 1967) در فرانسه این قارچ هتروتال دوقطبی است. *متیونی* و *نیلی* (Matteoni & Neely 1979) نیز هتروتالیسم در این گونه را گزارش و مشاهده کردند که پریتسیوم‌های بالغ در جدایه‌های هتروتال بعد از تلاقی دو تیپ آمیزشی و سه ماه نگهداری آن‌ها در شرایط تاریکی و دمای ۱۰ درجه سلسیوس قابل حصول می‌باشد. از سوی دیگر، هیچ نوع پریتسیوم بالغی در کشت خالص جدایه‌های شمال آمریکا به دست نیامد، لذا این قارچ به عنوان هتروتال مطرح بود، تا این که *بلیساریو* (Belisario 2002) آن را دارای شکل‌های هموتال و هتروتال اعلام نمود. *بلیساریو* و همکاران (Belisario *et al.* 2008) با بررسی جدایه‌هایی از کشور ایتالیا گزارش کردند که پریتسیوم‌های اولیه در دمای ۲۰ درجه سلسیوس تولید می‌شود. همچنین ایشان هموتالیسم در این قارچ را با به دست آوردن پریتسیوم بالغ در کشت‌های خالص گزارش نمودند. نگهداری برخی جدایه‌های به دست آمده از گردوکاری‌های استان آذربایجان شرقی به مدت چهار ماه در شرایط چهار درجه سلسیوس سبب تولید و بلوغ پریتسیوم در محیط کشت آرد یولاف- آگار گردید (Salahi 2006). همچنین پریتسیوم‌های قارچ از برگ‌های ریخته شده در پای درختان در نواحی مختلف کشور از جمله مشهد (Jafarpour 2001)، زنجان (Saremi & Razzaz-Hashemi 2002)، آذربایجان شرقی (Salahi 2007) و همدان (Babalhavaeji & Minasian 2007) مشاهده و گزارش شده است.

از آنجا که نحوه تولید مثل جنسی و توانایی و سهولت انجام آن از سوی قارچها با تنوع ژنتیکی و در نتیجه میزان انعطاف‌شان در برابر شرایط نامساعد محیطی و قدرت سازگاری آن‌ها با ژنوتیپ‌های مختلف میزبان در ارتباط است، لذا این مطالعه با هدف بررسی پدیده هموتالیسم و هتروتالیسم در بین جدایه‌های قارچ *O. leptostyla* جمع‌آوری شده از نقاط مختلف کشور و یافتن ارتباط آن با برخی ویژگی‌های مورفولوژیکی و بیماریزایی طراحی و اجرا شد.

روش بررسی

جمع‌آوری نمونه، جداسازی و شناسایی قارچ

طی بهار و تابستان سال‌های ۸۷-۱۳۸۵، تعداد ۱۳۰ نمونه برگی از گردوی ایرانی (*Juglans regia* L.) مشکوک به ابتلا به بیماری آنتراکنوز گردو از استان‌های مختلف شمال،

شمال‌غرب، غرب و نیز برخی استان‌های مرکزی و جنوب شرق کشور جمع‌آوری شد. از هر نمونه پنج دیسک برگی به قطر شش میلی‌متر تهیه و با اتانول ۷۵٪ (۳۰ ثانیه) و هیپوکلریت سدیم ۱٪ (۶۰ ثانیه) ضدعفونی سطحی گردید. دیسک‌های برگی به محیط کشت آرد یولاف- آگار ۳۸٪ (OA: Oatmeal Agar, Sigma-Aldrich, USA) انتقال یافته و به مدت دو هفته در دمای ۲۱ درجه سلسیوس و دوره نوری متناوب قرار داده شدند (Lappalaeinen & Yeli-Matilla 1999). شناسایی جدایه‌های واجد پریتسیوم با استفاده از کلید ارایه شده توسط *سوگونوف* و همکاران (Sogonov *et al.* 2008) انجام شد. در مورد سایر جدایه‌هایی که پریتسیوم آن‌ها در دسترس نبود شناسایی با استفاده از مقایسه آنامورف صورت گرفت (Roquebert & Fayret 1982) و در کل ۷۵ جدایه از قارچ *O. leptostyla* شناسایی گردید.

خالص‌سازی و نگهداری جدایه‌ها

جهت خالص‌سازی جدایه‌ها، قطعات کوچک برگی حاوی آسروول به اندازه تقریبی ۵ × ۵ میلی‌متر روی لام سترون و با استفاده از اسکالپل سترون له شده و به یک میلی‌لیتر آب مقطر سترون در لوله‌های اپندورف ۱/۵ میلی‌لیتری انتقال داده شد. لوله‌ها ۲۰ ثانیه ورتکس شده و ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون کنیدیوم روی آب- آگار ۲٪ (Agar-Agar, Merck, Germany) پخش و در دمای معمول آزمایشگاه به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند. تک‌کنیدی‌های جوانه زده در زیر میکروسکوپ نوری انتخاب و به محیط کشت جداگانه‌ای از آرد یولاف- آگار منتقل و در دمای ۲۱ درجه سلسیوس و دوره متناوب نوری نگهداری شدند.

برای نگهداری طولانی مدت جدایه‌ها روی محیط OA کاغذ صافی سترون مربعی شکل به ابعاد ۴ × ۴ سانتی‌متر قرار داده شده و یک دیسک میسلیومی به ابعاد هفت میلی‌متر از محیط کشت خالص هر یک از جدایه‌ها روی آن قرار داده شد. پس از نگهداری جدایه‌ها به مدت ۱۵ روز در دمای ۲۱ درجه سلسیوس، کاغذ صافی که میسلیوم قارچ در آن نفوذ کرده بود، از محیط‌های کشت برداشته شده و بین دو کاغذ صافی سترون دیگر با ابعاد ۶ × ۶ سانتی‌متر قرار داده شد. این مجموعه به پاکت‌های سترون منتقل و سپس جهت خشک شدن میسلیوم قارچ به مدت ۴۸ ساعت در شرایط آزمایشگاه نگهداری شد. کاغذ صافی آغشته به قارچ با قیچی سترون به قطعات کوچک با ابعاد ۰/۵ × ۰/۵ بریده شده و در داخل میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری قرار داده شده و در شرایط دمایی ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. همچنین از هر جدایه دو دیسک هفت میلی‌متری به محیط کشت مورب سیب زمینی-

دکستروز- آگار (PDA: Potato Dextrose Agar, Merck, Germany) منتقل و در دمای چهار درجه سلسیوس و شرایط تاریکی نگهداری شد.

مطالعه هموتالیسم

هشت جدایه که در محیط کشت پریتسیوم بالغ تولید نمودند، انتخاب و همراه با شش جدایه دیگر که پریتسیوم آن‌ها از برگ به دست آمد و نیز پنج جدایه نابارور که هیچ نوع پریتسیومی در طبیعت و محیط کشت تولید نکردند، در این آزمایش گنجانده شدند (جدول ۱). پریتسیوم‌های بالغ با استفاده از سوزن مخصوص اتاله حشرات زیر استریومیکروسکوپ از بافت گیاه یا از محیط کشت جدا و با له کردن پریتسیوم‌ها، محتوای آن‌ها آزاد شده و آسکوسپورها با استفاده از لوله مویین شیشه‌ای نوک تیز به آب مقطر سترون منتقل شدند. همچنین در پنج جدایه فاقد پریتسیوم نیز ماکروکنیدیوم‌های دویاخته‌ای به روش مذکور در بخش خالص‌سازی جدایه‌ها از آسروول به دست آمدند. آسکوکارپ‌ها و آسروول‌های خرد شده به ۵۰ میکرولیتر آب مقطر سترون در میکروتیوب ۰/۵ میلی‌لیتری انتقال داده شده و به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس شد. سپس با استفاده از لام هموسایتومتر غلظت سوسپانسیون ماکروکنیدیوم‌ها و آسکوسپورها به مقدار 10^4 هاگ در هر میلی‌لیتر تنظیم گردید. تعداد ۲۰ دایره کوچک با قطر تقریبی سه میلی‌متر با استفاده از ماژیک نوک تیز در پشت تشتک پتری پلاستیکی نه میلی‌متری ترسیم و سپس یک میکرولیتر از سوسپانسیون اسپوری در وسط دایره‌های ترسیم شده روی لایه نازکی از آب- آگار ۲٪ قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت، دایره‌ها زیر میکروسکوپ نوری بررسی گردید و تک‌اسپور رشد یافته در آن‌ها برداشته و سپس به محیط آرد یولاف- آگار ۳۸٪ منتقل شد. پس از گذشت پنج روز از رشد تک اسپورها، از هر جدایه چهار نوک ریسه مجددا به محیط کشت دیگری از آرد یولاف- آگار ۳۸٪ منتقل شد. جدایه‌ها پس از دو هفته نگهداری در دمای ۲۱ درجه سلسیوس، دوره متناوب نوری و رطوبت نسبی ۷۰٪، به شرایط دمایی ۱۰ درجه سلسیوس، تاریکی مطلق و رطوبت نسبی ۵۰٪ انتقال یافته و به مدت سه ماه نگهداری شدند. شرایط تاریکی با پیچیدن پوشش آلومینیومی دور تشتک‌های پتری حاصل شد.

مطالعه هتروتالیسم

جهت بررسی پدیده هتروتالیسم از روش کشت متقابل استفاده شد. در این آزمایش هفت جدایه شامل Ahr، Krp، Mdd، Mdo، Znk و Tof که سه ماه نگهداری کشت خالص آسکوسپور آن‌ها در دمای ۱۰ درجه سلسیوس به تولید پریتسیوم بالغ منجر نشد، به همراه پنج جدایه از منطقه میانه شامل Mi5، Mib، Mie، Mik و Mit که در همان شرایط، نگهداری کشت خالص حاصل از تک‌ماکروکنیدیوم آن‌ها به تولید پریتسیوم بالغ منجر نشد و همچنین در

جدول ۱- جدایه‌های *Ophiognomonia leptostyla* مورد استفاده در این مطالعه

Table 1. *Ophiognomonia leptostyla* isolates used in this study

Isolate No.	Sampling Site	Geographic Location	Altitude	Climate*	Perithecium Substrate**
Ahr	Ahar	E 38.28˚N˚48.03	1341	2	1
Arf	Ardebil	E 38.15˚N˚48.17	1530	3	1, 2
Hmd	Hamedan	E 34.11˚N˚48.21	2150	1	2
Khm	Khoy	E 38.32˚N˚44.57	1136	1	1
Krp	Paveh	E 34.02˚N˚46.21	2210	2	1
Mdd	Dizaj Olia	E 37.13˚N˚45.37	1442	3	1
Mdo	Marand	E 37.24˚N˚45.41	1353	3	1
Mi5	Miyaneh	E 37.26˚N˚47.37	1019	1	-
Mia	Aghkand	E 37.14˚N˚48.04	1747	1	1, 2
Mib	Balesin	E 37.38˚N˚47.35	1237	1	-
Mie	Ishlagh	E 37.37˚N˚47.29	1230	1	-
Mij	Balujeh	E 37.46˚N˚47.36	1503	1	1, 2
Mik	Tark	E 37.41˚N˚47.37	1276	1	-
Mir	Taleghan	E 36.09˚N˚50.31	1753	4	2
Mit	Tushmanlu	E 37.47˚N˚47.33	1315	1	-
Mrs	Marivan	E 35.41˚N˚46.16	1563	3	2
Shs	Shahrasar	E 36.14˚N˚50.39	2230	4	1, 2
Tof	Touyserkan	E 37.47˚N˚48.40	1873	1	1, 2
Znk	Zanjan	E 36.41˚N˚48.27	1706	2	1

* According to Embreger's Climatogram (SABETI 2009), 1 = cold semiarid, 2 = cold semihumid, 3 = arid cold, 4 = moderate humid

** 1 = leaf, 2 = culture medium.

طبیعت نیز پریتسیوم بالغی تولید نکردند گنجانده شد. مختصات جغرافیایی جدایه‌های مورد مطالعه در جدول ۱ ارایه شده است. این دو گروه از جدایه‌ها به طور جداگانه در دو گروه هفت و پنج‌تایی بررسی شدند. از کشت خالص جدایه‌ها، دیسک‌های میسلیومی از ناحیه فعال رشدی قارچ برداشته شده و به مرکز تشتک پتری ۹ میلی‌متری حاوی محیط کشت آرد یولاف- آگار ۳۸٪ منتقل و دیسک‌های مشابهی از جدایه‌های دیگر به فاصله سه سانتی‌متر از دیسک مرکزی در اطراف آن قرار داده شد. پس از هفت روز نگهداری در دمای ۲۱ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی، تشتک‌های پتری به دمای ۱۰ درجه سلسیوس منتقل و پس از سه ماه نگهداری جهت

بررسی تشکیل پریتسیوم بالغ با شکافتن آسکوکارپ و مشاهده محتویات آن با میکروسکوپ نوری مورد بازبینی قرار گرفتند.

مطالعه سایر ویژگی‌های مورفولوژیکی

قطر بزرگ و طول گردن ۳۰ پروتوپریتسیوم و پریتسیوم بالغ، تعداد گردن و نیز طول ۳۰ آسک و ۳۰ آسکوسپور روی برگ و محیط کشت آرد یولاف- آگار اندازه‌گیری شده و وجود یا عدم وجود میکروکنیدیوم نیز در آن‌ها ثبت گردید. همچنین، میانگین قطر کوچک و بزرگ پرگنه روی محیط کشت آرد یولاف- آگار پس از ۲۰ روز نگهداری در دمای ۲۱ درجه سلسیوس و دوره نوری متناوب در چهار تکرار اندازه‌گیری و نخستین روز تشکیل آسروول در این محیط ثبت شد.

تهیه برش‌های میکروتومی

برگ‌های دارای آسکوکارپ و آسروول، با استات سدیم ۷٪ آب‌دهی، با سدیم-کاکودیلیت ۲٪ و گلوتارآلدهید ۴٪ (Na-cacodylate 2% + Glutaraldehyde 4%) تثبیت و با سری الکل اتیلیک و الکل بوتیلیک آبگیری شده و در بستر پارافینی قرار داده شدند. برش‌هایی به ضخامت شش میکرومتر با استفاده از میکروتوم دستی انجام و پارافین‌زدایی با گزیلول و آبدهی مجدد با سری الکل اتیلیک و رنگ‌آمیزی با لاکتوفنل بلو و فوشین ۱٪ در الکل صورت گرفت.

آزمون بیماریزایی جدایه‌ها

نهال‌های گردوی یک‌ساله رقم محلی نجفیه تویسرکان به شرایط گلخانه با دمای ۲±۲۲ درجه سلسیوس منتقل و با سوسپانسیون هاگی به غلظت ۲×۱۰^{۵} ماکروکنیدیوم در میلی‌لیتر از هر کدام از ۱۹ جدایه مورد مطالعه به طور جداگانه و با سه تکرار مایه‌زنی شدند. سه نهال گردو با آب سترون مایه‌زنی شده و به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. نهال‌ها با کیسه‌های پلاستیکی شفاف پوشانده شده و پس از ۴۸ ساعت قرار گرفتن زیر این پوشش، در شرایط معمول گلخانه نگهداری شدند. برای مایه‌زنی نهال‌ها از دو مرکب برگ بالایی استفاده شده و دو هفته بعد از مایه‌زنی اولین علایم ماکروسکوپی مشاهده و یک ماه بعد شاخص بیماری به صورت نسبت تعداد لکه‌های ایجاد شده به تعداد برگچه‌های مایه‌زنی شده (Belisario *et al.* 2008)

محاسبه گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵٪ انجام شد. برای انجام محاسبات از نرم افزار آماری SPSS 16 استفاده گردید.

نتیجه

بیماری آنتراکنوز گردو به جز در نواحی مرکزی و جنوب شرق ایران، در اغلب نقاط کشور بویژه ناحیه شمال، غرب و شمال‌غرب مشاهده شد. پریتسیوم‌ها از جدایه‌هایی به دست آمدند که ارتفاع محل جمع‌آوری آن‌ها از سطح دریا بالاتر از ۱۰۰۰ متر بود. با این حال، همه جدایه‌های جمع‌آوری شده از مناطق مرتفع نیز لزوما پریتسیوم تولید نکردند. پریتسیوم‌ها تنها از جدایه‌های مربوط به چهار اقلیم از اقلیم‌های ۱۴ گانه کلیماتوگرام آمبرژه (Embreger's Climatogram, see Sabeti 2009) به دست آمدند. در حدود ۸۵٪ جدایه‌های تولید کننده پریتسیوم از اقلیم‌های سرد بودند، لذا به نظر می‌رسد که سرما نقش عمده‌ای در بلوغ جنسی قارچ در طبیعت عهده‌دار باشد. با این حال، ارتباطی بین هموتال بودن جدایه‌ها با طول و عرض جغرافیایی، ارتفاع از سطح دریا، نوع اقلیم و نیز سن نمونه‌ها مشاهده نشد. خشک یا مرطوب بودن اقلیم نیز در وجود پریتسیوم و هموتالیسم تاثیری نداشت (جدول ۱).

جدایه‌ها روی محیط کشت پرگنه‌هایی تولید نمودند که الگوی دوایر متحدالمرکز داشتند (شکل k-۱). تمامی جدایه‌های مورد مطالعه حداقل پس از هفت و حداکثر ۲۰ روز آسروول‌هایی را ایجاد نمودند که داخل آن‌ها در همه جدایه‌ها، ماکروکنیدیوم (شکل d-۱) و در برخی از جدایه‌ها میکروکنیدیوم (شکل h-۱) مشاهده شد (جدول‌های ۲ و ۳). اغلب جدایه‌ها نیز در محیط کشت، کم و بیش پیکنیدیوم‌های بسته‌ای ایجاد نمودند که میانگین قطر آن‌ها ۱۲۲ میکرومتر بود (شکل j-۱). تعداد ۶۳ جدایه از مجموع ۷۵ جدایه مورد مطالعه، پروتوپریتسیوم‌هایی تولید نمودند که هنوز بلوغ در آن‌ها اتفاق نیفتاده بود و داخل آن‌ها تنها یک توده پروتوپلاسمی قابل مشاهده بود (شکل j-۱). پروتوپریتسیوم‌ها در شرایط تاریکی به سرعت و طی یک هفته در نمونه‌های برگی که از نگهداری آن‌ها بیش از یک سال گذشته بود، تشکیل شدند (شکل a-۲). این امر به طور یکسان در نمونه‌های برگی دیده شد که در دمای چهار درجه سلسیوس و یا در دمای معمول آزمایشگاه به صورت خشک شده نگهداری شده بودند. در حالی که نمونه‌های تازه جمع‌آوری شده فرم غیرجنسی را با سرعت بیشتری تولید نمودند و غالبا پروتوپریتسیوم در آن‌ها حتی در طولانی مدت تولید نشد.

جـدول ۲- مشخـصات مورفولـوژیکی پریتـسیوم جدایـه‌هـای *Ophiognmonia leptostyla* روی برگ

Table 2. Morphological characteristics of *Ophiognomonia leptostyla* isolates on leaf

Isolate No.	Perithecium Diameter	Beak Length	No. of Beaks	Ascus Length	Ascospore Length	Microconidium	Homothallism
Ahr	$33^{abc} \pm 336$	$23^{bc} \pm 389$	1	$1.5^{abc} \pm 48.8$	$1.2^{a} \pm 20.4$	+	-
Arf	$21^{ab} \pm 344$	$19^{ab} \pm 403$	1	$2.2^{abc} \pm 47.7$	$0.9^{a} \pm 18.8$	+	+
Khm	$27^{ab} \pm 345$	$10^{ab} \pm 410$	1	$1.8^{abc} \pm 50.1$	$1.9^{a} \pm 21$	+	+
Krp	$21^{c} \pm 308$	$12^{dc} \pm 372$	1	$1.7^{abc} \pm 50$	$0.9^{a} \pm 19.7$	+	-
Mdd	$22^{bc} \pm 321$	$13^{bc} \pm 389$	1	$2.6^{ab} \pm 51.6$	$1.4^{a} \pm 19.9$	+	-
Mdo	$25^{bc} \pm 327$	$25^{bc} \pm 398$	1	$3^{bc} \pm 48.4$	$0.9^{a} \pm 18.8$	+	-
Mia	$22^{bc} \pm 323$	$27^{e} \pm 346$	1	$3^{c} \pm 47.6$	$1.1^{a} \pm 20.5$	+	+
Mij	$14^{a} \pm 362$	$20^{a} \pm 420$	1	$3.9^{a} \pm 52.2$	$1.6^{a} \pm 20.7$	+	+
Shs	$29^{abc} \pm 336$	$22^{ab} \pm 409$	1	$2.9^{bc} \pm 48.6$	$1^{a} \pm 20.2$	+	+
Znk	$17^{bc} \pm 329$	$19^{ed} \pm 353$	1	$1.6^{ab} \pm 51.8$	$1.4^{a} \pm 20$	+	-

* All measurements are in micrometer as mean ± standard deviation.

Values in the same column followed by similar letters are significantly different at $p < 0.05$ (Duncan's test).

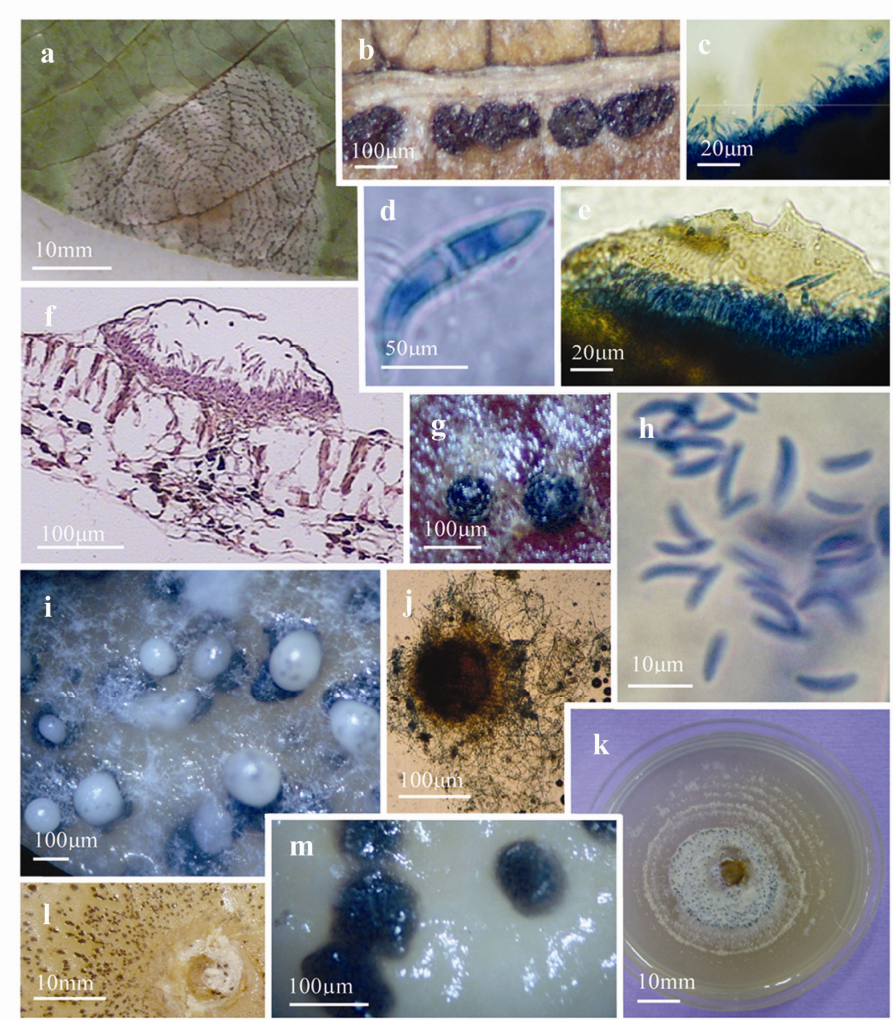
جـدول ۳- مشخـصات مورفولـوژیکی پریتـسیوم جدایـه‌هـای *Ophiognomonia leptostyla* روی محیط کشت آرد یولاف- آگار

Table 3. Morphological characteristics of *Ophiognomonia leptostyla* isolates on oatmeal agar (OA)

Isolate No.	Protoperithecium Diameter	Beak Length of Protoperithcium	Perithecium Diameter	Beak Length of Perithecium	No. of Beaks	Ascus Length	Ascospore Length	Micro-conidium
Ahr	$27^{abc} \pm 352$	$11^{a} \pm 195$	$28^{abc} \pm 379$	$12^{bc} \pm 216$	2.5^{b}	$1.1^{a} \pm 49.3$	$1.1^{a} \pm 20.7$	+
Hmd	$19^{ab} \pm 362$	$13^{a} \pm 196$	$18^{ab} \pm 386$	$14^{ab} \pm 220$	2^{bc}	$2.2^{a} \pm 48.9$	$1.8^{a} \pm 19.7$	+
Khm	$26^{ab} \pm 362$	$13^{a} \pm 203$	$26^{abc} \pm 382$	$14^{ab} \pm 228$	1.6^{c}	$1.5^{a} \pm 50.4$	$2.4^{a} \pm 20.6$	+
Mia	$16^{bc} \pm 333$	$11^{a} \pm 190$	$17^{c} \pm 353$	$12^{bc} \pm 215$	3.6^{a}	$1.8^{a} \pm 50.4$	$1.4^{a} \pm 20.5$	+
Mij	$36^{c} \pm 324$	$10^{a} \pm 198$	$18^{c} \pm 350$	$9^{ab} \pm 225$	2^{bc}	$1.5^{a} \pm 51.9$	$1.3^{a} \pm 19.8$	+
Mir	$25^{abc} \pm 344$	$11^{a} \pm 195$	$22^{bc} \pm 356$	$8^{ab} \pm 218$	2.5^{b}	$1.3^{a} \pm 50.3$	$2^{a} \pm 19.7$	+
Mrs	$31^{abc} \pm 352$	$11^{a} \pm 198$	$23^{abc} \pm 379$	$18^{ab} \pm 224$	2^{bc}	$3.5^{a} \pm 48.3$	$0.9^{a} \pm 21$	+
Shs	$14^{a} \pm 374$	$10^{a} \pm 205$	$20^{a} \pm 405$	$6^{a} \pm 234$	3.8^{a}	$1.8^{a} \pm 51.1$	$2.1^{a} \pm 21.3$	+
Tof	$17^{abc} \pm 343$	$13^{b} \pm 175$	$43^{a} \pm 392$	$14^{c} \pm 202$	2.5^{b}	$3.2^{a} \pm 49.5$	$1.2^{a} \pm 21$	+

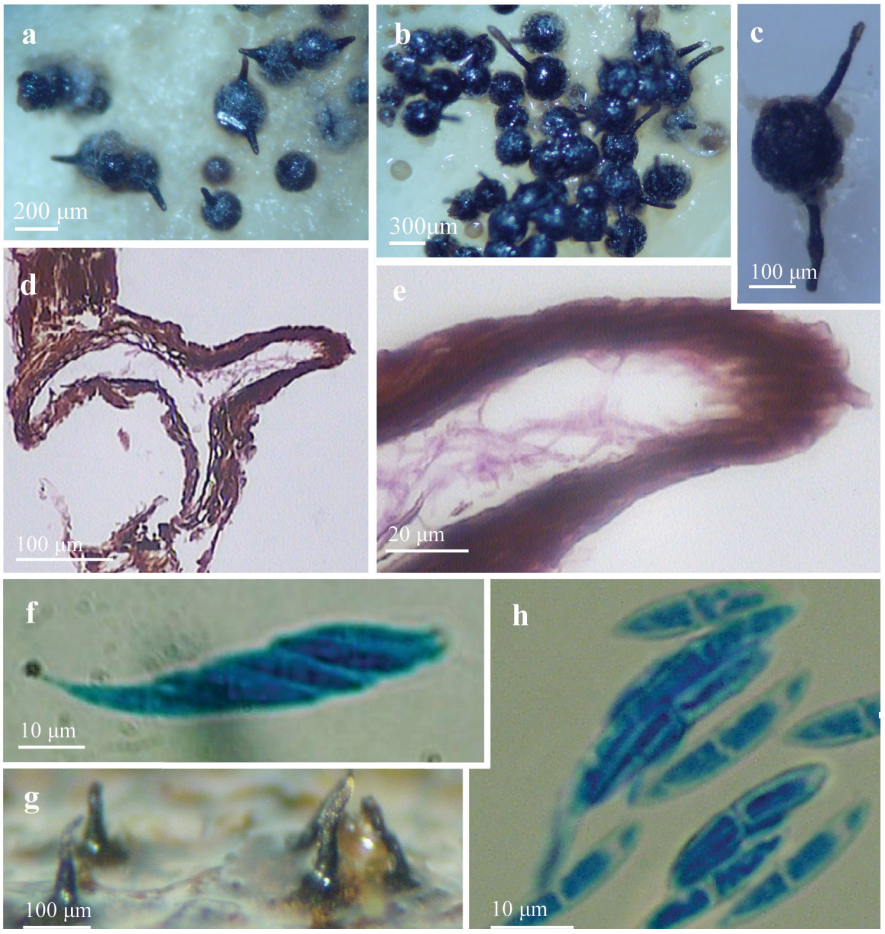
* All measurements are in micrometer as mean ± standard deviation.

Values in the same column followed by similar letters are significantly different at $p < 0.05$ (Duncan's test).



شکل ۱- کنیدیوماتای *Ophiognomonia leptostyla* و مشخصات آن روی برگ و در محیط کشت آرد یولاف-آگار. a و b. آسروول روی برگ، c و e. برش معمولی از آسروول روی برگ، d. ماکروکنیدیوم، f. برش میکروتومی آسروول، i. اندام‌های پیکنید مانند در محیط کشت، g و j. توده ماکروکنیدیومی خارج شده از دهانه آسروول، h. میکروکنیدیوم، k، l و m. تشکیل آسروول در محیط کشت.

Fig. 1. Conidiomata of *Ophiognomonia leptostyla* and their characteristics on leaf and oatmeal agar (OA). a, b. Acervuli on leaf, c, e. Cross section of acervulus on leaf, d. Macroconidium, f. Microtomic cross section of acervulus, g, j. Microconidial mass secreted from acervlus slit, i. Pycnidium-like bodies on OA, k, l, m. Acervuli formation on culture medium.



شکل ۲- آسکوماتای *Ophiognomonia leptostyla* و اجزای آن. a. پروتوپریتسیوم‌ها روی محیط کشت، b و c. پریتسیوم‌های بالغ، d. برش میکروتومی پریتسیوم، e. برش میکروتومی گردن پریتسیوم، f. آسک، g. پریتسیوم روی برگ، h. آسکوسپور.

Fig. 2. Ascomata in *Ophiognomonia leptostyla*. a. Protoperithecia on culture media, b, c. Fertile perithecia, d. Cross section of prithecium, e. Cross section of beak, f. Ascus, g. Perithecia on leaf, h. Ascospores.

در حدود ۱۰/۶٪ از جدایه‌ها پس از سه ماه نگهداری در دمای ۱۰ درجه سلسیوس توانستند پریتسیوم‌های بالغ حاوی آسک و آسکوسپور تولید نمایند. با این حال به دلیل خالص نبودن جدایه‌ها در مرحله جداسازی، هموتال بودن همه آن‌ها مسلم نبود. در کشت خالص، ۸۷/۵٪ از این جدایه‌ها، پریتسیوم بالغ تولید نمودند و تنها در کشت خالص جدایه Tof پریتسیوم بالغی مشاهده نشد (جدول ۳). به نظر می‌رسد که جدایه Tof در مرحله جداسازی

قارچ، خالص نبوده و با وقوع هتروتالیسم و یا هموتالیسم ثانوی موفق به تولید پریتسیوم بالغ شده است. پنج جدایه شامل Ahr، Khm، Krp، Mdd، Mdo و Znk با وجود تولید آسکوکارپ در طبیعت، در محیط کشت هیچ نوع پریتسیوم بالغی تولید نکردند. لذا احتمالا این جدایه‌ها هموتال نیستند. چهار جدایه شامل Arf، Mia، Mib و Shs هم در محیط کشت و هم در طبیعت پریتسیوم تولید نمودند. با توجه به تک آسکوسپور بودن پرگنه‌هایی که در آن‌ها پریتسیوم بالغ تولید شد می‌توان نتیجه گرفت که این نمونه‌ها به طور مشخص هموتال می‌باشند.

اندازه پروتوپریتسیوم‌ها در محیط کشت به طور معنی‌دار بزرگتر از پریتسیوم‌های بالغ روی برگ و کوچکتر از پریتسیوم‌های روی محیط کشت بود. طول گردن در پروتوپریتسیوم‌ها از طول گردن پریتسیوم‌های بالغ به طور معنی‌داری کمتر بود. در حالی که طول گردن در پریتسیوم‌های برگی از طول گردن پریتسیوم‌های بالغ روی محیط کشت به طور معنی‌داری بیشتر بود (جدول ۵). با این حال، پریتسیوم‌های روی محیط کشت مثل پریتسیوم‌های برگی به طور منفرد و پراکنده در محیط تشکیل شدند ولی تعداد گردن آسکوکارپ در محیط کشت یک تا چهار عدد بود، در حالی که تعداد گردن در پریتسیوم‌های روی برگ‌ها همواره یک عدد بود. تعداد گردن در پریستوم‌های بالغ در محیط و پروتوپریستوم‌های بالغ یکسان بود. اختلاف معنی‌داری بین طول آسک و آسکوسپور روی برگ و محیط کشت وجود نداشت، با این حال از لحاظ عددی اندازه هر دو در پریتسیوم‌های موجود در محیط کشت بیشتر بود (جدول ۵).

جدول ۵- مقایسه مورفولوژیکی اندام‌های جنسی جدایه‌های *Ophiognomonia leptostyla* روی برگ و محیط آرد یولاف- آگار

Table 5. Morphological comparison of sexual bodies of *Ophiognomonia leptostyla* on leaf and oatmeal agar (OA)

Type of Sexual Body	Perithecium Diameter	No. of Beaks	Beak Length	Ascus Length	Ascospore Length
Protoperithecia	353 ± 41^{a}	2.7^{a}	198 ± 11^{a}	-	-
Perithecia on leaf	333 ± 26^{b}	1^{b}	389 ± 30^{b}	49.7 ± 2.8^{a}	20 ± 1.4^{a}
Perithecia on culture	376 ± 30^{a}	2.7^{a}	220 ± 14^{ab}	50 ± 2.3^{a}	20.48 ± 1.6^{a}

* All measurements are in micrometer as mean ± standard deviation.

Values in the same column followed by similar letters are significantly different at $p < 0.05$ (Duncan's test).

در آزمایش هتروتالیسم و کشت متقابل هیچ نوع پریتسیوم بالغی ایجاد نشد. لذا دقیقا نمی‌توان در مورد هتروتالیسم و جفت‌های سازگار قضاوت روشنی نمود. با این حال به احتمال زیاد این جدایه‌ها را نمی‌توان هموتال فرض نمود. قطر پریتسیوم بالغ در جدایه‌های هموتال در برگ به طور معنی‌داری بیشتر از جدایه‌های غیرهموتال بود ولی در محیط کشت این اختلاف معنی‌دار نبود. همچنین اختلاف معنی‌داری بین پروتوپریتسیوم‌ها از لحاظ طول آسک و آسکوسپور در پریتسیوم برگی و روی محیط کشت در جدایه‌های هموتال و غیرهموتال وجود نداشت. در حالی که طول گردن هم در پریتسیوم‌های برگی و هم در محیط کشت در جدایه‌های هموتال به طور معنی‌داری بیشتر از جدایه‌های غیرهموتال بود (جدول‌های ۶ و ۷). با این حال قطر پرگنه، اولین روز تشکیل آسروول در محیط کشت و شاخص بیماری در جدایه‌های هموتال و غیرهموتال معنی‌دار نبود (جدول ۸).

جدول ۶- مقایسه مورفولوژیکی اندام‌های جنسی جدایه‌های هموتال و غیرهموتال *Ophiognomonia leptostyla* روی برگ

Table 6. Morphological comparison of sexual bodies of *Ophiognomonia leptostyla* homothallic and non-homothallic isolates on leaf

Sexual Behaviour	Perithecium Diameter	No. of Beaks	Beak Length	Ascus Length	Ascospore Length
Homothallic	342 ± 25[a]	1[a]	397 ± 33[a]	49.41 ± 3.2[a]	20.24 ± 1.49[a]
Non-homothallic	324 ± 25[b]	1[a]	380 ± 24[b]	50.131 ± 2.5[a]	19.82 ± 1.25[a]

* All measurements are in micrometer as mean ± standard deviation.

Values in the same column followed by similar letters are significantly different at $p < 0.05$ (Duncan's test).

جدول ۷- مقایسه مورفولوژیکی اندام‌های جنسی جدایه‌های هموتال و غیرهموتال *Ophiognomonia leptostyla* در محیط کشت آرد یولاف- آگار

Table 7. Morphological comparison of sexual bodies in homothallic and non-homothallic *Ophiognomonia leptostyla* isolates on oatmeal agar (OA)

Sexual Behaviour	Protoperith-ecium Diameter	Beak Length	Perithecium Diameter	No. of Beaks	Beak Length	Ascus Length	Ascospor e Length
Homothallic	350 ± 28[a]	198 ± 11[a]	392 ± 27[a]	2.75[a]	233 ± 13[a]	50.06 ± 2.2[a]	20.42 ± 1.7[a]
Non-Homothallic	343 ± 17[a]	176 ± 13[a]	392 ± 43[a]	3[a]	202 ± 14[b]	49.5 ± 3[a]	21 ± 1.2[a]

* All measurements are in micrometer as mean ± standard deviation.

Values in the same column followed by similar letters are significantly different at $p < 0.05$ (Duncan's test).

جدول ۸- مقایسه مورفولوژیکی و بیماریزایی جدایه‌های هموتال و غیرهموتال *Ophiognomonia leptostyla*

Table 8. Morphological and pathogenicity comparison of homothallic and non-homothallic isolates of *Ophiognomonia leptostyla*

Sexual Behaviour	Colony Diameter*	The First Day of Acervuli Formation**	Disease Index
Homothallic	$1^{a} \pm 7.13$	$2^{a} \pm 12.22$	$0.97^{a} \pm 1.77$
Non-Homothallic	$0.95^{a} \pm 6.84$	$3^{a} \pm 12.42$	$0.85^{a} \pm 1.5$

* All measurements are in micrometer as mean ± standard deviation.

Values in the same column followed by similar letters are significantly different at $p < 0.05$ (Duncan's test).

بین تولید پریتسیوم‌های بالغ و تولید میکروکنیدیوم در محیط کشت همبستگی مثبت و معنی‌داری وجود داشت (جدول‌های ۲ و ۳). به این معنی که جدایه‌هایی که پریتسیوم در آن‌ها مشاهده شد، در آسروول آن‌ها میکروکنیدیوم قابل مشاهده بود. این یافته، چنین نظریه‌ای را تقویت می‌کند که میکروکنیدیوم‌ها در زادآوری جنسی نقش اسپرماتیوم را بازی می‌کنند (Fayret, 1977, Matteoni & Neely 1979)، لذا در بلوغ پریتسیوم‌ها ممکن است به عنوان یکی از اجزای اصلی مطرح باشند. به علاوه، از کشت مکرر میکروکنیدیوم‌ها هیچ نوع پرگنه مشخصی حاصل نشد و در آن‌ها جوانه‌زنی قابل مشاهده نبود. همچنین هیچ نوع ارتباط معنی‌داری بین محل جمع‌آوری نمونه، طول و عرض جغرافیایی و ارتفاع از سطح دریا با هموتالیسم و ویژگی‌های پرگنه دیده نشد.

در آزمون بیماریزایی، شاخص بیماری در همه جدایه‌ها با شاهد مایه‌زنی نشده اختلاف معنی‌داری داشت. وجود بیماری در گیاهان شاهد نشانه وجود مایه آزاد در هوای گلخانه و یا آلودگی اولیه برگ‌ها به مایه تلقیح قارچ در محل تولید و پرورش آن‌ها بود و این امر به دلیل آلودگی شدید درختان گردو در هر دو منطقه میانه و تویسرکان، طبیعی و غیرقابل اجتناب می‌باشد (جدول ۴). بین قطر پرگنه و اولین روز تشکیل آسروول همبستگی معنی‌دار و منفی وجود داشت. به این معنی که در پرگنه‌های سریع الرشد، آسروول‌ها زودتر و در زمان کوتاهتری تشکیل شدند. همچنین شاخص بیماری در جدایه‌هایی با سرعت رشد بالا نیز به طور معنی‌داری بالاتر بود و همبستگی مثبت و معنی‌داری بین سرعت رشد پرگنه و شاخص بیماری مشاهده گردید.

با این حال، بین سرعت رشد پرگنه و شاخص بیماریزایی و هموتال و غیرهموتال بودن جدایه همبستگی معنی‌داری وجود نداشت. هر چند از لحاظ این دو مشخصه، جدایه‌های هموتال نسبت به جدایه‌های غیرهموتال از برتری عددی برخوردار بودند (جدول ۸).

جدول ۴- قطر پرگنه و شاخص بیماری در جدایه‌های *Ophiognomonia leptostyla*

Table 4. Colony diameter and disease index of *Ophiognomonia leptostyla* isolates

Isolate No.	Colony Diameter*	First Day of Acervuli Formation**	Disease Index
Ahr	5.43 ± 0.4^{g}	12.83 ± 0.75^{b}	1.15 ± 0.59^{de}
Arf	6.31 ± 0.53^{def}	13.33 ± 1.21^{b}	2.64 ± 0.5^{ab}
Hmd	7.8 ± 0.55^{a}	10 ± 1.41^{bc}	3.11 ± 0.9^{a}
Khm	6.5 ± 0.26^{defg}	14.5 ± 1.52^{d}	2.4 ± 0.76^{abc}
Krp	5.45 ± 0.37^{g}	17.33 ± 2.16^{a}	1.46 ± 0.66^{bde}
Mdd	7.55 ± 0.26^{ab}	9.17 ± 1.47^{bc}	3.23 ± 0.55^{a}
Mdo	7.33 ± 0.66^{abc}	8.33 ± 1.61^{d}	1.17 ± 0.68^{de}
Mi5	7.82 ± 0.49^{a}	10.17 ± 1.17^{bc}	2.42 ± 0.56^{abc}
Mia	6.05 ± 1.12^{fg}	12.83 ± 0.75^{b}	1.22 ± 0.76^{de}
Mib	6.9 ± 0.54^{bcde}	13.5 ± 1.05^{b}	1.09 ± 0.46^{de}
Mie	6.83 ± 0.65^{bcdef}	13.33 ± 1.03^{b}	0.64 ± 0.7^{e}
Mij	$7.58 \pm 0.2b^{ab}$	13.66 ± 1.63^{b}	0.95 ± 0.66^{de}
Mik	6.63 ± 0.5^{defg}	14.16 ± 1.33^{b}	1.61 ± 0.53^{de}
Mir	7.13 ± 1.6^{abcd}	11 ± 1.79^{c}	1.18 ± 0.64^{de}
Mit	7.52 ± 0.45^{ab}	13.83 ± 0.41^{b}	0.96 ± 0.19^{de}
Mrs	7.78 ± 0.42^{a}	10.66 ± 0.82^{bde}	1.51 ± 0.83^{bde}
Shs	7.83 ± 0.37^{a}	11 ± 0.89^{c}	0.83 ± 0.22^{de}
Tof	7.65 ± 0.59^{ab}	9.67 ± 0.82^{bc}	1.17 ± 0.4^{de}
Znk	6.11 ± 0.64^{efg}	14.33 ± 0.82^{b}	1.93 ± 0.25^{cde}
Control	-	-	0.09 ± 0.08^{f}

* Mean of colony diameter ± standard deviation.

** Mean of four replications of the first day of acervuli formation in colony.

Values in the same column followed by similar letters are significantly different at $p < 0.05$ (Duncan's test).

بحث

آسکوکارپ ساختار پریاخته‌ای است که در ابتدای چرخه جنسی قارچ‌های آسکومیست تولید می‌شود. در حالی که آسکوسپورها در طول چرخه میوزی از ریسه‌ها منشأ می‌گیرند (Moore 1998). مراحل اولیه توسعه آسکوکارپ ممکن است به صورت مستقل از وقایع چرخه جنسی اتفاق افتد و این پدیده در پیوند با ریسه‌های آسکزایی است که وجود و وارد عمل شدن آن‌ها منجر به تشکیل پریتسیوم‌های بالغ خواهد شد (Dyer *et al.* 1992). بنابراین، تولید پریتسیوم‌های اولیه در این مطالعه به منزله هموتالیسم و تولید پریتسیوم نیست، بلکه تبدیل پروتوپریتسیوم‌ها به پریتسیوم بالغ و تولید آسک و آسکوسپورهاست که وقوع پدیده هموتالیسم و یا هتروتالیسم را به اثبات می‌رساند. با این حال، ۸۴٪ از جدایه‌ها توان تولید پریتسیوم‌های اولیه را در محیط کشت دارا بودند. نکته قابل توجه این که، سپری شدن زمان لازم برای فرا رسیدن زمان ورود به فرآیند جنسی در چرخه زندگی قارچ در تولید این پریتسیوم‌های اولیه و نابالغ ضروری است. به این دلیل در نمونه‌های برگی تازه، این اندام‌ها

با شرایط ذکر شده قابل تولید و مشاهده نبودند. تولید این اندام‌ها ارتباطی با سرما نداشت ولی تاریکی جهت تولید فراوان آن‌ها در محیط کشت از ضروریات بود. تولید آسکوکارپ بالغ با شماری از عوامل متعدد غذایی و محیطی در ارتباط است و عمدتا در این قارچ، دمای ۱۰ درجه سلسیوس و تاریکی این پدیده را به حد مطلوب خود می‌رساند (Fayret & Parguey-Leduc 1976, Fayret 1977, Matteoni & Neely 1979)، لذا نگهداری جدایه‌های خالص در این شرایط در صورت هموتال بودن جدایه‌ها لزوما به بلوغ پروتوپریتسیوم‌ها خواهد انجامید. نمونه‌های برگی جمع‌آوری شده از هشت اقلیم از ۱۴ اقلیم کلیماتوگرام آمبرژه به دست آمدند و پیدایش پریتسیوم در چهار اقلیم سرد نشان می‌دهد که طی روند تکاملی احتمالا سرما نقش اساسی در تمایل قارچ به تشکیل فرم جنسی و باروری آن ایفا نموده است. چنین نقشی در مورد رطوبت قابل تصور نبود. در این مطالعه با توجه به خالص بودن جدایه‌های مورد بررسی می‌توان اذعان نمود که تنها ۱۰/۷٪ از کل جدایه‌ها به طور مشخص هموتال بودند. قبلا تصور می‌شد که این قارچ صرفا هتروتال است. *فایرت* و *پارگو- لدوس* (Fayret & Parguey-Leduce 1976) اعلام کردند که این قارچ یک هتروتال دوقطبی است. همچنین در سالهای آتی نیز ثابت شد که این قارچ به کلی هتروتال می‌باشد، چرا که در بین جدایه‌های مورد مطالعه از آمریکا از کشت‌های تک اسپور شده هیچ نوع پریتسیوم بالغی مشاهده نشد (Matteoni & Neely 1979). اغلب آسکومیست‌ها هموتال می‌باشند. با این حال، در چندین گونه از آسکومیست‌ها مثل *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld. et H. Schrenck اشکال هموتال و هتروتال شناخته شده است. برای چنین گونه‌هایی هموتال بودن احتمالا از نوعی برتری نسبت به هتروتالیسم برخوردار است، چرا که موجودات هموتال می‌توانند به تنهایی و به راحتی تولید مثل جنسی نموده و تحت شرایط نامساعد نیز به سهولت به این عمل مبادرت ورزند (Wheeler 1954). همچنین برخی آسکومیست‌ها مثل *Nectria galligena* کاملا هموتال گزارش شده‌اند (El-Choll 1986).

جدایه‌هایی که در کشت‌های خالص پریتسیوم بالغی تولید نکردند، احتمالا هتروتال می‌باشند. اگرچه به دلیل عدم موفقیت در تولید پریتسیوم بالغ در کشت متقابل نمی‌توان به روشنی در این زمینه قضاوت نمود. با توجه به این که برخی از نمونه‌های برگی تازه جمع‌آوری شده وارد مرحله جنسی نشدند، لذا نمی‌توان در مورد هموتال نبودن آن‌ها دقیقا اظهار نظر کرد. در صورتی که در مورد نمونه‌هایی که پریتسیوم آن‌ها در طبیعت یافت شده است به طور مشخص مرحله جنسی را تشکیل داده و با توجه به عدم تشکیل پریتسیوم بالغ در محیط کشت می‌توان در مورد هتروتال بودن آن‌ها با اطمینان بیشتری اظهار نظر نمود. با این حال، تلاش برای یافتن جفت سازگار جنسی با انتخاب جدایه‌هایی با فاصله جغرافیایی کمتر نیز کمکی در یافتن پدیده هتروتالیسم نکرد. به نظر می‌رسد تعداد بیشتری از جدایه‌ها

بایستی گنجانده شده و به طور فراگیر در این زمینه مطالعه صورت گیرد. احتمالا آزمودن جدایه‌های روی یک درخت و یک برگ و یا تلاقی دادن میسلیوم‌های حاصل از آسکوسپورهای مختلف یک آسک نیز مفید خواهد بود. *متیونی و نیلی* (Matteoni & Neely 1979) جفت‌های سازگار رویشی را در شمال آمریکا یافته و هیچ نوع تفاوت مورفولوژیکی در آن‌ها را مشاهده ننمودند. در نهایت این که، تشکیل سریع پروتوپریتسیوم‌ها در این جدایه‌ها، تمایل زیاد قارچ برای ورود به مرحله جنسی، جدا از موفقیت آن در تولید پریتسیوم بالغ را تداعی می‌کند. احتمالا علاوه بر عوامل ژنتیکی و محیطی، فاکتورهای شیمیایی قارچی نیز در بلوغ پریتسیوم‌های اولیه نقش دارند. در این زمینه نقش تعیین کننده تنش‌های محیطی در کنترل اندام‌زایی جنسی و ارتباط آن‌ها با بیان ژن‌های مرتبط با جفت‌های سازگار جنسی در جدایه‌های غیرهموتال قابل بررسی خواهد بود.

منابع

جهت ملاحظه منابع به متن انگلیسی مراجعه شود.

نشانی نگارندگان: سلیمان جمشیدی، دکتر حمیدرضا زمانی‌زاده و دکتر سعید رضائی، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، صندوق پستی ۷۷۵-۱۴۱۵۵ و دکتر رسول زارع، بخش تحقیقات رستنی‌ها، موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، صندوق پستی ۱۴۵۴، تهران ۱۹۳۹۵.

STUDY ON SEXUAL REPRODUCTION AND SOME MORPHOLOGICAL AND PATHOLOGICAL TRAITS OF *OPHIOGNOMONIA LEPTOSTYLA* IN IRAN

S. JAMSHIDI*, H.R. ZAMANIZADEH, R. ZARE and S. REZAEE

Islamic Azad University, Science & Research Branch
and Iranian Research Institute of Plant Protection

Received: 21.09.2009 Accepted: 21.10.2009

Walnut anthracnose caused by *Ophiognomonia leptostyla* is the most important and prevalent fungal disease in most walnut growing areas in Iran. Seventy-five isolates of *Ophiognomonia leptostyla*, causing walnut anthracnose, were obtained from *Juglans regia* from various regions of Iran. In order to study the sexual reproduction of the fungus, the isolates collected from various parts of Iran were examined and perithecia were obtained from 11 regions from leaves and in eight isolates from oatmeal agar (OA). These isolates along with five sexually non-fertile isolates were purified as single-ascospore or single-macroconidium cultures. Protoperithecia were readily obtained from leaves collected more than one year back. Perithecia had one beak on leaves and up to four beaks on culture media. As the result 9.3% of isolates were found to be homothallic. In dual cultures of seven non-homothallic, but sexually fertile *in vivo*, and five sexually non-fertile isolates, no fertile perithecium was produced. Perithecium in homothallic isolates had significantly higher diameter and longer beaks than non-homothallic isolates.

* Corresponding author (E-mail: s.jamshidi@m-iau.ac.ir)

There was no significant difference between homothallic and non-homothallic isolates in ascus and ascospore size, colony growth rate and disease index.

Keywords: Walnut anthracnose, Homothallic, *Gnomonia leptostyla*, *Marssoniella juglandis*

Figures and tables are given in the Persian text.

References

BABALHAVAEJI, E. and MINASIAN, V. 2007. Study on biology of *Gnomonia leptostyla*, the causal agent of walnut anthracnose in Hamedan. Bu-Ali Sina University, Hamedan, 25–28 Aug. 2007. Proceedings of 17th Iranian Plant Protection Congress, p. 314 (Abstract).

BEHDAD, E. 1998. Plant Protection Encyclopedia of Iran; Pests, Diseases and Weeds, Yadboud Publisher, Isfahan pp. 1604-1605 (in Persian).

BELISARIO, A. 2002. Anthracnose. pp. 77−78. *In*: TEVIORDALE, B.L., MICHALIIDES, T.J. & PSCHEIDT, J.W. (eds). Compendium of Nut Crop Diseases in Temperate Zones. APS Press, USA.

BELISARIO, A., SCOTTON, M., SANTORI, A. and ONOFRI, S. 2008. Variability in the Italian populations of *Gnomonia leptostyla*, homothallism and resistance of *Juglans* species to anthracnose. Forest Pathology 38: 129–145.

DYER, S.P., INGRAM, D.S. and JOHNSTONE, K. 1992. The control of sexual morphogenesis in the Ascomycotina. Biol. Rev. 67(4): 421–458.

El-CHOLL, N.E., BARNARD, E.L. and SCHROEDER, R.A. 1986. Homothallism in *Nectria galligena*. Canad. J. Bot. 64: 902−903.

FAYRET, J. 1967. Cycle biologique naturel et in vitro, *Gnomonia leotostyla* (Fr.) Ces. et De Not. Compte Rende Hebd. Seances Acad. Sci. Ser. D Sci. Nat. 265: 908–911.

FAYRET, J. 1974. Photoinhibition of perithecial formation during sexual morphogenesis in *Gnomonia leptostyla* (Fr.) Ces. & De Not. Compte Rende Hebdomadaries des Seances de l'Academie des Science. Serries D. Science Naturelles 278(23): 2909–2912 (in French with English summary).

FAYRET, J. 1977. Effect of nutritional factors on the growth and induction of reproductive morphogeneses in vitro of *Gnomonia leptostyla* (Fr.) Ces. & De Not. Revue de Mycologie 41(1): 49–72 (in French with English summary).

FAYRET, J. and PARGUEY-LEDUCE, A. 1976. Heat inhibition of saprophyte development during ripening of perithecia of *Gnomonia leptostyla* (Fr.) Ces. De Not. Revue de Mycologie 40(3): 245–253 (in French with English summary).

IRANI, H., ASADI, P., KARIMI, M., BOLANDANDAM, J., KHOSROW, F., RABIEIFAR, A.R. and KHABBAZ, H. 2007. Study of walnut anthracnose disease in Iran. Bu-Ali Sina University, Hamedan, 25–28 Aug. 2007. Proceedings of 17th Iranian Plant Protection Congress, p. 362 (Abstract).

JAFARPOUR, B. 2001. Study of walnut anthracnose in Mashhad. Agri. Sci. and Technol. J. 4(2): 31–40 (in Persian with English summary).

LAPPALAEINEN, J.H. and YELI-MTILLA, T. 1999. Genetic diversity in Finland of the birch endophyte *Gnomonia setacea* as determined by RAPD-PCR markers. Mycol. Res. 103: 328–332.

MATTEONI, J.A. and NEELY, D. 1979. *Gnomonia leptostyla*: growth, sporulation and heterothallism. Mycologia 71(5): 1034–1042.

MEHROTRA, R.S. and ANEJA, K.R. 1990. An Introduction to Mycology. South Asia Books Publisher, pp. 638–642.

MOORE, D. 1998. Fungal morphogenesis. Cambridge, UK, Cambridge University Press.

ROQUEBERT, M.F. and FAYRET, J. 1982. *Marssoniella juglandis*: anamorph of *Gnomonia leptostyla*. Canad. J. Bot. 60(8): 1320–1329.

SABETI, H.A. 2009. Forests, trees and shrubs of Iran. 3rd Edition. Iran University of Science and Technology Press, Tehran 886pp (in Persian).

SALAHI, S. 2006. Genetic diversity of *Gnomonia leptostyla*, causal agent of walnut anthracnose using by RFLP-PCR and its distribution and overwintering in East Azarbaijan, Iran. M.Sc. Thesis, University of Tehran, Faculty of Agriculture, 71pp.

SALAHI, S., JAVAN-NIKKHAH, M., ZAD, J., HASANI, J. DASTJERDI, R. and JAMSHIDI, S. 2007. Distribution and some characteristics of *Gnomonia*

laptostyla isolates on Persian walnut in East Azarbaijan Province. Bu-Ali Sina University, Hamedan, 25–28 Aug. 2007. Proceedings of 17th Iranian Plant Protection Congress, p. 361 (Abstract).

SAREMI, H. and RAZAZ-HASHEMI, R. 2002. Study on walnut anthracnose in Northwest of Iran. Agri. and Nat. Res. J. 9(4): 141–152 (in Persian with English summary).

SOGONOV, M.V., CASTLEBURY, L.A., ROSSMAN, A.Y., MEJIA, L.C. and WHITE, J.F. 2008. Leaf-inhabiting genera of the *Gnomoniaceae*, *Diaporthales*. Studies in Mycology 62: 1−79.

SOUZA, A.J., SILVIA, C.C. and FERREIRA, V.B. 2003. Sex in fungi: lessons of gene regulation. Gen. and Mol. Res. 2(1): 136−147.

WHEELER, H.E. 1954. Genetics and evolution of heterothallism in *Glomerella*. Phytopathology 44: 342–345.

Addresses of the authors: S. JAMSHIDI, Dr. H.R. ZAMANIZADEH and Dr. S. REZAEE, Department of Plant Pathology, Agriculture & Natural Resources College, Science & Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran, P.O. Box 14155-775 and Dr. R. ZARE, Department of Botany, Iranian Research Institute of Plant Protection, P.O. Box 1454, Tehran 19395, Iran.