پوسیدگی مغز سیب در استان های آذربایجان غربی و شرقی و شناسایی قارچ های همراه با این عارضه

مهدی ارزنلو[1*] و مونس بخشی[2]

تاریخ دریافت: ۸۸/۱۰/۲۳ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۰/۲۶

۱-استادیار گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

۲-دانشجوی دکترای بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

مسئول مکاتبه: E mail: arzanlou@hotmail.com

چکیده

در سالهای اخیر عارضه پوسیدگی مغز میوه سیب بصورت شایع بر روی این محصول باغی در استان های آذربایجان غربی و شرقی مشاهده است. با عنایت به اینکه محصول سیب سهم عمده ای در صنایع تبدیلی این منطقه را به خود اختصاص می دهند، در این تحقیق گونه های قارچی همراه با این عارضه با استفاده از رهیافت های مورفولوژیک و مولکولی مورد ارزیابی واقع شدند. برای این منظور میوه های سیب از بازار تبریز، خوی، صوفیان، تالش، جلفا و میاندوآب خریداری و قطعات کوچکی از بافت های پوسیده ناحیه مغز میوه پس از ضد عفونی سطحی، بر روی محیط کشت عصاره مالت آگار تحت شرایط استریل کشت داده شدند. کلنی های قارچی خالص سازی و گروههای قارچی براساس خصوصیات مورفولوژیک و داده های مولکولی مشخص شدند. جهت مطالعات مولکولی DNA تعدادی از جدایه ها استخراج گردید و ناحیه ITS DNA کد کننده RNA ریبوزومی با استفاده از واکنش زنجیره ای پلی مراز تکثیر و قطعات تکثیر یافته تعیین توالی شدند و توالی های حاصل با توالی های دیگر گونه های قارچی در بانک ژن مقایسه شدند. از مجموع ۳۰ جدایه خالص سازی شده، گونه های جنس *Alternaria* و *Penicillium* بیشترین فراوانی را به ترتیب با ۱۳ جدایه و ۹ جدایه به خود اختصاص دادند. علاوه بر گونه های این دو جنس، گونه های *Cladosporium* spp.، *Tricothecium sp.*، *Acremonium sp.* و *Stemphylium sp.* شناسایی شدند. اغلب گونه های جداسازی شده از پتانسیل توکسین زایی برخوردار می باشند. تاکنون اکثر مطالعات انجام شده بر روی توکسین های قارچی در فراورده‌های تبدیلی سیب بر روی پاتولین که توسط گونه های جنس *Penicillium* و *Aspergillus* تولید می شوند، متمرکز بوده است. نتایج تحقیق حاضر لزوم بررسی آلودگی های احتمالی فراورده های تبدیلی سیب با توکسین های تولید شده توسط گونه های جنس *Alternaria* را آشکار می سازد.

واژه های کلیدی: پوسیدگی مغز سیب، *Alternaria*، توکسین، قارچ

Apple Core Rot in East and West Azerbaijan Provinces of Iran and Fungal Groups Involved in this Disease

M. Arzanlou [1*] and M. Bakhshi [2]

Received: January 13, 2010 Accepted: January 16, 2011
[1]Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran
[2] PhD Student of plant pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran
*Corresponding author: E mail: arzanlou@hotmail.com

Abstract

In recent years, apple core rot have frequently been observed in East and West Azarbaijan provinces, Iran. As apple plays a major role in food industry, in present study fungal groups involved in apple core rot disease were elucidated by means of morphology and DNA sequence data. Apple fruits were purchased from local market in Tabriz, Khoy, Shabestar, Sofiyan, Talesh, Miyandoab and Jolfa cities. Small pieces from core tissues of apple fruits were surface-sterilized and plated on malt extract agar medium. Isolated fungi were purified and then identified using morphological and DNA sequence data. For molecular evaluation, DNA extraction carried out on pure cultures of selected fungal isolates and ITS region of ribosomal DNA (ITS-rDNA) was amplified and sequenced. In total, from the 30 isolates evaluated in this study, *Alternaria* and *Penicillium* species with 13 and 9 isolates were the most prevalent fungal groups. The other fungal groups were identified as *Cladosporium* spp., *Tricothecium sp., Acremonium sp.* and *Stemphylium sp.* Most of the fungal groups isolated in this study are toxicogenic; however, the main focus has been on the mycotoxin produced by *Penicillium* and *Aspergillus* in apple products, so far. The results of this study urge awareness on the possible contamination of apple fruit and its products by *Alternaria* toxins.

Key words: Apple core rot, *Alternaria*, toxin and fungi

مقدمه

قارچ ها به صورت مستقیم از طریق کاهش میزان تولید و کاهش ارزش غذایی محصولات کشاورزی و غیر مستقیم از طریق تولید متابولیت های ثانویه سمی یا مایکوتوکسین ها که اثرات سوء بر روی موجودات دریافت کننده این ترکیبات بر جای می گذارند، ایجاد خسارت می کنند (تینا واکی و همکاران ۲۰۰۱، والویک و همکاران ۲۰۰۳، فتحی آچاچلویی و همکاران۱۳۸۸، آگریوس ۲۰۰۵ و تراناسا و همکاران ۲۰۰۷). میزان خسارت ناشی از عوامل بیماری زا بر روی فراورده های کشاورزی حدود ۱۲ درصد میزان محصول تولیدی حدس زده می شود که در این بین قارچ ها سهم عمده ای را به خود اختصاص می دهند (آگریوس ۲۰۰۵). سیب و فراورده های تبدیلی آن نقش عمده ای در تغذیه انسان و اقتصاد ملی بازی می کنند. بیماری های بعد از برداشت سیب که عمدتا توسط قارچ ها ایجاد می شوند

خسارت قابل توجهی را به این محصول از نظر کمی و کیفی وارد می کنند. آلودگی میوه سیب از دو طریق صورت می گیرد:۱) از طریق زخم های مکانیکی ایجاد شده بر روی میوه موقع برداشت و ۲) از طریق آلودگی میوه بر روی درخت در طول دوره رشد و اواخر فصل که از طریق منافذ طبیعی موجود بر روی میوه اتفاق می افتد. تاکنون دامنه وسیعی از گروههای قارچی از میوه های سیب با علایم پوسیدگی گزارش شده اند (وندر والت و همکارن ۲۰۱۰، نیم و همکارن ۲۰۰۷). بیماری کپک آبی بر روی سیب توسط گونه های جنس پنی *سیلیوم* ایجاد می شود که گونه *پنی سیلیوم اکس پنسوم* از پراکنش بالاتری برخوردار می باشد (وندر والت و همکاران ۲۰۱۰). پوسیدگی خاکستری سیب توسط گونه بوتریتس سینرا ایجاد می شود. گونه موکور پیری فرمیس به عنوان عامل پوسیدگی میوه سیب مطرح می باشد (نیم و همکاران ۲۰۰۷). بیماری پوسیدگی مغز سیب یکی از مهمترین بیماری های بعد از برداشت سیب به حساب می آید، این بیماری در مراحل ابتدایی شیوع بیماری به خاطر غیر قابل مشاهده بودن علایم پوسیدگی و ظاهر سالم میوه غیر قابل تشخیص می باشد. بیماری پوسیدگی مغز سیب به دو فرم پوسیدگی نرم مغز سیب و پوسیدگی خشک مغز سیب دیده می شوند. بطور رایج گونه *پلئوسپورا هربارم* و گونه های *استمفیلیوم* ، کلادوسپوریوم، اولوکلادیوم، اپی کوکوم، *کونیوتریوم*، پزیکولا، *پنی سیلیوم*، *موکور*، *فوزاریوم* و *آلترناریا* از میوه های سیب با علایم پوسیدگی مغز میوه گزارش شده اند (الیس و بارات ۱۹۸۳، دکوک و همکاران ۱۹۹۱، کیم و شاو ۲۰۰۷، نیم و همکاران۲۰۰۷). علایم بیماری به صورت بافت های قهوه ای تیره خشک در محفظه تخمدان میوه دیده می شود که در مراحل پیشرفته به داخل بافت های مزوفیل میوه پیشروری می کند. اکثر گروههای قارچی جداسازی شده از پتانسیل تولید توکسین برخوردار می باشند. در این بین گونه های جنس پنی *سیلیوم* و توکسین زایی آنها بر روی فراورده های تبدیلی سیب بیشتر از بقیه گروههای قارچی مورد مطالعه واقع شده است. در تحقیقی که اخیرا بر روی قارچ های همراه با پوسیدگی نرم مغز سیب در آفریقای جنوبی انجام شده است گونه *پنی سیلیوم راموسوم* به عنوان گونه غالب شناسایی شده و گونه *پنی سیلیوم اکس پنسوم* به عنوان دومین گونه غالب معرفی شده است (وندر والت و همکاران۲۰۱۰). تحقیقات وسیعی در زمینه آلودگی فراورده های سیب با توکسین تولید شده توسط گونه های پنی *سیلیوم* انجام شده است (استوکنستروم و همکاران ۲۰۰۷). فتحی آچاچلویی و همکاران (۱۳۸۸) میزان پاتولین را در چندین نمونه آب سیب و آب انگور در استان آذربایجان شرقی بررسی کردند. کریمی و همکاران (۲۰۰۸) میزان آلودگی آب سیب موجود در بازار شهر مشهد را با مایکوتوسین پاتولین بررسی کردند. آلودگی میوه سیب با گونه های فوزاریوم چندان رایج نیست ولی در تحقیقی که در کشور اسلوونی بر روی قارچ های همراه با پوسیدگی مغز سیب انجام شده است گونه *فوزاریوم اوناسئوم* به عنوان گونه غالب عامل بیماری شناخته شده است که این گونه دامنه وسیعی از توکسین های قارچی را تولید می کند (سورنسن و همکاران۲۰۰۹). در تحقیق انجام شده ۱۳ متابولیت ثانویه تولید شده بر روی سیب های آلوده توسط گونه *فوزاریوم اوناسئوم* شاسایی شدند. گونه های جنس *آلترناریا* از رایج ترین گروه قارچی همراه با بیماری پوسیدگی مغز سیب می باشند (الیس و بارات ۱۹۸۳، کانگ و همکاران ۲۰۰۲، سردانی و همکاران ۲۰۰۲ و نیم و همکاران ۲۰۰۷). در بررسی های انجام شده در آفریقای جنوبی قارچ *آلترناریا* به عنوان گونه غالب همراه با بیماری پوسیدگی مغز سیب گزارش شده است (کانگ و همکاران ۲۰۰۲، سردانی و همکاران ۲۰۰۲ و واندر والت و همکاران ۲۰۱۰). نیم و همکاران (۲۰۰۷) پوسیدگی مغز سیب در ارقام حساس و مقاوم سیب را بررسی کرده اند. بیماری بعد از برداشت پوسیدگی سیاه میوه

مرکبات نیز توسط گونه های *آلترناریا* ایجاد می شود (سردانی و همکاران ۲۰۰۲). گونه های جنس آلترناریا یکی از رایج ترین قارچ های همراه با فساد مواد غذایی می باشند و اغلب گونه های این جنس از توانایی تولید مایکوتوکسین برخوردار هستند (یکلر و همکاران ۲۰۰۱، کارلووا و همکاران ۲۰۰٦). شناسایی سریع میکروارگانیزم ها بر اساس روش های کلاسیک زمان بوده و در بیشتر موارد از دقت کافی برخودار نیستند (والویک و همکاران ۲۰۰۳ و ارزنلو و همکاران ۲۰۰۷). پیشرفت های اخیر در زیست شناسی مولکولی و تکنیک های مبتنی بر اطلاعات DNA امکان بررسی و شناسایی سریع قارچ ها را امکان پذیر ساخته است (لیونز و توما ۲۰۰۵). کانگ و همکاران (۲۰۰۲) با توالی یابی ژن های هیستون و ژنهای کد کننده RNA ریبوزمی گونه های *آلترناریا* همراه با بیماری پوسیدگی مغز سیب را شناسایی کردند. امروزه تکنیک های مولکولی به صورت رایج در شناسایی گونه های قارچی حاضر همراه با محصولات کشاورزی و آلودگی های مواد غذایی و شناسایی گونه های تو لید کننده توکسین مورد استفاده قرار می گیرند. والویک و همکاران با استفاده از آغازگرهای اختصاصی گونه های تولید کننده توکسین فوزاریوم بر روی غلات شناسایی کردند (والویک و همکاران ۲۰۰۳). در بررسی دیگر فلورز و همکاران (۲۰۰٦) با استفاده از تکنیک های مولکولی، گونه های قارچی همراه با نوعی پنیر را در اسپانیا شناسایی کردند. در بررسی حاضر با عنایت به جایگاه استانهای آذربایجان غربی و شرقی در تولید سیب کشور و سهم عمده محصول سیب در صنایع تبدیلی منطقه، گونه های قارچی همراه با عارضه پوسیدگی مغز سیب با استفاده از رهیافت های مورفولوژیک و مولکولی مورد ارزیابی واقع شدند.

مواد و روش ها

جداسازی و خالص سازی جدایه ها

در طول فصل های پاییز و زمستان سال ۱۳۸۸-۱۳۸۷میوه های دو رقم سیب درختی زرد لبنانی (گلدن دلیشس) و قرمز لبنانی (رد دلیسش) به صورت تصادفی از بازار شهرستان های خوی، میاندوآب و تبریز، جلفا، تالش، صوفیان تهیه شدند و به آزمایشگاه منتقل شدند. میوه ها پس از شست و شو تحت شرایط استریل با استفاده از اسکالپل استریل نصف شده و ناحیه تخمدان میوه مورد بررسی قرار گرفته و قطعاتی از بافت های ناحیه تخمدان پس از ضدعفونی سطحی در الکل ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه و سه بار شست و شو با آب مقطر استریل، بر روی کاغذ صافی استریل خشک گردیده و سپس بر روی محیط کشت عصاره مخمر آگار دو درصد (ساخت کارخانه مرک کشور آلمان) اسیدی شده (اسید لاکتیک ۲۰ درصد به میزان دو درصد) به منظور ممانعت از آلودگیهای باکتریایی، کشت شدند. کشت ها در درجه حرارت ۲۵ درجه سانتیگراد در شرایط تاریکی نگهداری شدند. پس از ظاهر شدن کلنی های قارچی، کشت ها با استفاده از تکنیک تک اسپور و یا نوک ریسه خالص سازی شدند. جهت تک اسپور کردن سری های رقت از سوسپانسیون اسپور هر جدایه تهیه و بر روی محیط کشت اسیدی پخش شدند. پس از ٢٤ ساعت اسپور های جوانه زده با استفاده از استرئومیکروسکوپ مشاهده و با استفاده از اسکالپل استریل همراه با بلوک کوچکی از محیط کشت برش داده شده و بر روی محیط کشت جدید منتقل شدند. در مورد جدایه هایی که اسپورزایی نکرده بودند از تکنیک نوک ریسه استفاده شد. برای این منظور قسمت انتهایی ریسه منفرد در زیر استرئو میکروسکوپ مشخص و با استفاده از اسکالپل استریل همراه با بلوک آگار جداسازی و به محیط کشت جدید منتقل شد.

!!

مطالعات مولکولی

استخراج DNA

برای این منظور جدایه های قارچی بر روی محیط کشت عصاره مالت آگار به صورت مخطط کشت داده شدند. پس از رشد کلنی قارچ به اندازه کافی، استخراج DNA با استفاده از کیت تجارتی موبیو (MoBio laboratories, USA) مطابق دستورالعمل کارخانه انجام گردید. DNA ی استخراج شده در دمای منفی ۲۰ درجه نگهداری شد. واکنش زنجیره ای پلی مراز : جهت تکثیر ناحیه ITS-rDNA آغاز گر های ITS1(TCCGTAGGTGAACCTGCGG) و ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) مورد استفاده واقع شدند که این آغازگر ها بخشی از ناحیه ۳َ زیر واحد کوچک DNA ی ریبوزومی (SSU-rDNA)، ناحیه ITS1 و 5.8S، ITS2 و بخشی ناحیه ۵َ از زیر واحد بزرگ DNA ی ریبوزومی (LSU-rDNA) را با استفاده از واکنش زنجیره ای پلی مزار تکثیر می کنند (وایت و همکاران ۱۹۹۰). مخلوط واکنش زنجیره ای پلی مراز شامل ۰,۵ واحد آنزیم پلی مراز (Taq DNA polymerase)، بافر واکنش (1X PCR buffer)، ۰,۵ میلی مول کلرید منیزیم (0.5 mM Mgcl2)، ۰,۲ میلی مول از هر یک از dNTP، ۵ پیکو مول از هر یک از اغازگر ها و ۱۰ الی ۱۵ نانو گرم از DNA بود که حجم نهایی مخلوط واکنش با استفاده از آب دیونیزه استریل به مقدار ۲۵ میکرولیتر تنظیم شد. تکثیر نواحی ژنومی مورد نظر با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (GenAmp PCR System 9700) و با اعمال حرارت ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه جهت واسرشت اولیه و به دنبال آن ۳۶ چرخه شامل ۹۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه و در نهایت یک چرخه ۷۲ درجه به مدت ۷ دقیقه جهت گسترش نهایی انجام شد. درجه حرارت دستگاه پس از انجام واکنش بر روی درجه حرارت ۱۰ درجه برای مدت نامعلوم، جهت جلوگیری از تجزیه و تخریب محصول PCR تنظیم گردید. محصولات واکنش PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد حاوی اتیدیوم بروماید زیر دستگاه ژل داک بررسی شدند.

تعیین توالی

واکنش تعیین توالی نوکلئوتیدی قطعات تکثیر شده با استفاده از کیت تجاری (BigDye terminator v. 3. 1) مطابق دستورالعمل سازنده کیت انجام گردید و تجزیه تحلیل نتایج با استفاده از دستگاه (ABI Persim 3700) انجام گردید.

فیلوژنی

توالی های خام با استفاده از نرم افزار SeqMan (Lasergene package, DNAstar) بررسی شده و ویرایش شدند. توالی های ایجاد شده در این بررسی با توالی های موجود در بانک ژن (NCBI Blast Search) مقایسه شده و زیر هم چینی جدایه ها با استفاده از نرم افزار Mega 4 انجام گردید و الگوی هم ترازی چند گانه بررسی و درختچه فیلوژنتیک بر اساس روش پیوست همسایه ها (Neighbor joining) ترسیم گردید و روابط خویشاوندی جدایه ها بررسی شد.

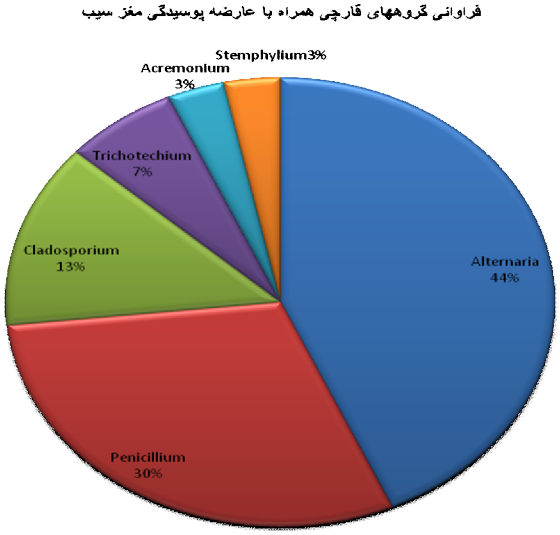
نتایج و بحث

هدف اصلی تحقیق حاضر شناسایی قارچ های همراه با پوسیدگی مغز سیب در استانهای آذربایجان شرقی و غربی بود. علایم بیماری به صورت نواحی قهوه ای متمایل به خاکستری در ناحیه مغز سیب مشاهده گردید که در سطح آن پوشش کرکی قارچی به رنگ قهو ه ای زیتونی مشخص بود. پوسیدگی مغز سیب از حالت جزئی محدود به ناحیه تخمدان تا پیشرفته که بیش از یک سوم حجم ناحیه داخلی سیب را شامل می شد مشاهده گردید (شکل ۱).

شکل ۱. علایم بیماری پوسیدگی مغز سیب با درجات مختلف پوسیدگی ناحیه مغزی سیب

میوه های آلوده ظاهر سالم داشته و تنها موقع ایجاد برش آلودگی مشاهده می شود. در مجموع ۳۰ جدایه قارچی از بافت های ناحیه تخمدان سیب جداسازی و خالص سازی گردید. بر اساس مشخصات ماکروسکوپی و میکروسکوپی جدایه ها و مقایسه مشخصات میکروسکوپی با منابع قارچ شناسی جدایه های خالص سازی شده در این بررسی شامل گونه های جنس آلترناریا، پنی سیلیوم، کلادوسپوریوم، تریکوتسیوم، اکرومونیوم، استمفی‌لیوم را شامل می شوند.

در بین قارچ های جداسازی شده گونه های جنس *آلترناریا* و پنی *سیلیوم* از فراوانی بالاتری برخوردار بودند و در مجموع ۱۳ جدایه از قارچ های جداسازی شده به گونه های جنس *آلترناریا* تعلق داشتند و ۹ جدایه پنی *سیلیوم* شناسایی شدند (جدول ۱، شکل ۲).

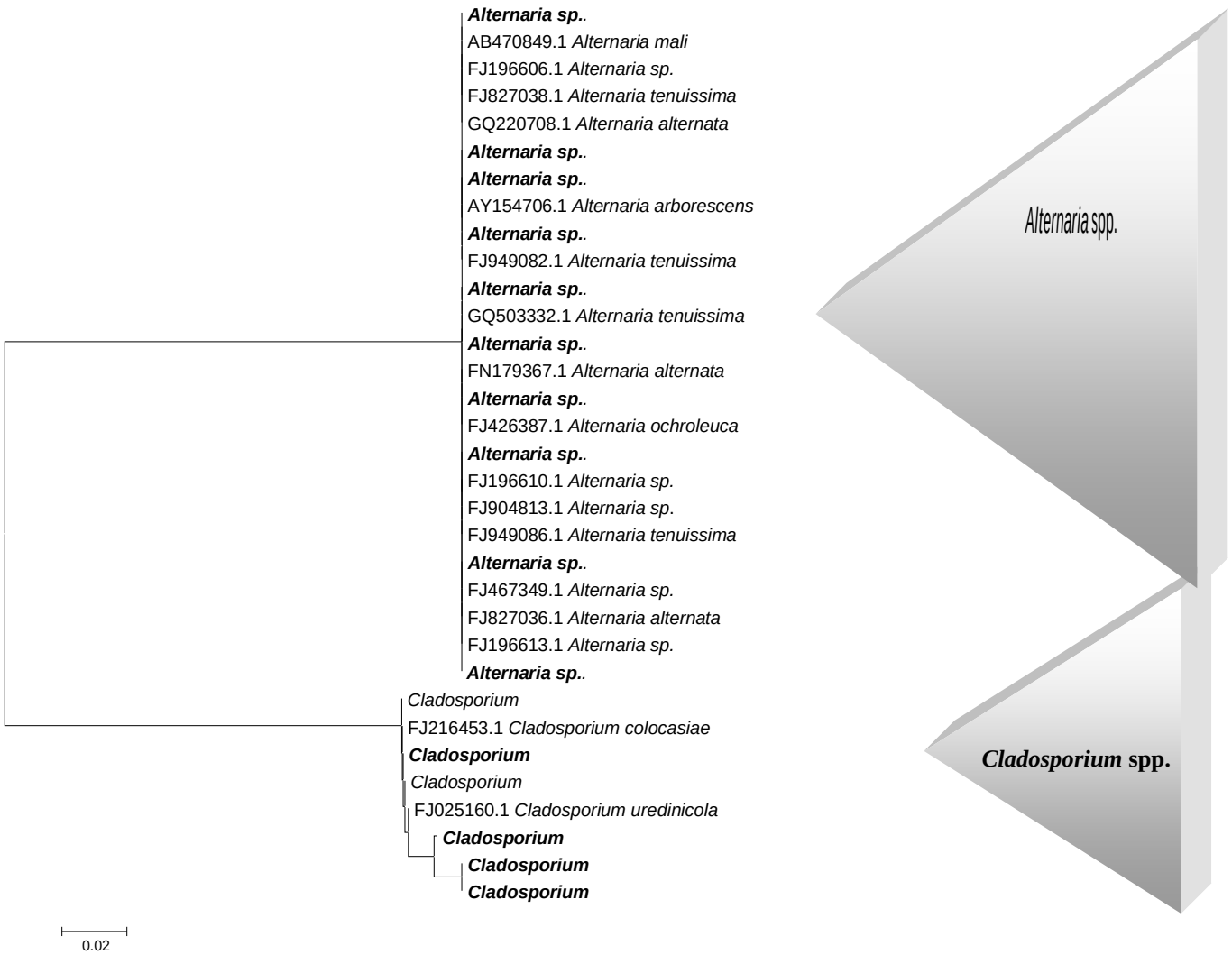


شکل ۲. فراوانی گروههای قارچی همراه با عارضه پوسیدگی مغز سیب

جدول ۱. نتایج شناسایی جدایه های قارچی خالص سازی شده از میوه های سیب با علایم پوسیدگی مغز

کد جدایه	گونه قارچی	میزبان	منطقه جغرافیایی
۱	*Alternaria*	سیب قرمز لبنانی	تالش
۲	*Alternaria*	سیب قرمز لبنانی	تالش
۲	*Alternaria*	سیب قرمز لبنانی	تالش
۴	*Alternaria*	سیب قرمز لبنانی	تالش
۵	*Alternaria*	سیب قرمز لبنانی	تالش
۶	*Alternaria*	سیب زرد لبنانی	خوی
۷	*Alternaria*	سیب قرمز لبنانی	میاندوآب
۸	*Alternaria*	سیب قرمز لبنانی	میاندوآب
۹	*Alternaria*	سیب قرمز لبنانی	میاندوآب
۱۰	*Alternaria*	سیب قرمز لبنانی	میاندوآب
۱۱	*Alternaria*	سیب رزد لبنانی	میاندوآب
۱۲	*Alternaria*	سیب قرمز لبنانی	میاندوآب
۱۳	*Alternaria*	سیب قرمز لبنانی	خوی
۱۴	*Penicillium*	سیب زرد لبنانی	تالش
۱۵	*Penicillium*	سیب زرد لبنانی	تالش
۱۶	*Penicillium*	سیب زرد لبنانی	خوی
۱۷	*Penicillium*	سیب زرد لبنانی	خوی
۱۸	*Penicillium*	سیب زرد لبنانی	تبریز
۱۹	*Penicillium*	سیب زرد لبنانی	تبریز
۲۰	*Penicillium*	سیب زرد لبنانی	تبریز
۲۱	*Penicillium*	سیب زرد لبنانی	جلفا
۲۲	*Penicillium*	سیب زرد لبنانی	تبریز
۲۳	*Cladosporium*	سیب قرمز لبنانی	تبریز
۲۴	*Cladosporium*	سیب زرد لبنانی	خوی
۲۵	*Cladosporium*	سیب زرد لبنانی	تبریز
۲۶	*Cladosporium*	سیب زرد لبنانی	خوی
۲۷	*Trichothecium*	سیب زرد لبنانی	تبریز
۲۸	*Acremonium*	سیب زرد لبنانی	تالش
۲۹	*Trichothecium*	سیب زرد لبنانی	تبریز
۳۰	*Stemphylium*	سیب زرد لبنانی	صوفیان

تایید مولکولی گروههای قارچی شناسایی شده در این تحقیق، بر اساس توالی یابی ناحیه ITS دی ان ای ریبوزومی (ITS-rDNA) ۱٤جدایه که اغلب گونه های جنس *آلترناریا* را شامل می شدند، مورد بررسی واقع گردید. نتایج حاصل از تکثیر ناحیه ITS دی ان ای ریبوزومی (ITS-rDNA) در حضور آغازگر های ITS1 و ITS4 و با استفاده از واکنش زنجیره ای پلی مراز نشان داد که در هریک از جدایه ها قطعه ای به طول تقریبی ٦۰۰ جفت باز تکثیر یافته است (نتایج نشان داده نشده است). بررسی داده های خام توالی های حاصل از واکنش زنجیره ای پای مراز نشان داد که حدود ۵۵۰-۵۰۰ جفت باز از کیفیت خوب برخوردار بودند. مقایسه توالی های بد ست آمده در این بررسی با توالی های موجود در بانک ژن نشان داد که همولوژی بالایی بین این توالی ها با توالی های گونه های *آلترناریا* موجود در بانک ژن وجود دارد که با نتایج بدست آمده بر اساس خصوصیات مورفولوژیک مطابقت داشت و تحت عنوان *آلترناریا* تایید شدند (شکل ۳). توالی چهار جدایه دیگر همولوژی بالایی با توالی های گونه های کلادوسپوریوم نشان دادند. با در نظر گرفتن داده های توالی DNA و خصوصیات مورفولوژیک قارچ *آلترناریا* به عنوان گونه غالب دخیل در بیماری پوسیدگی مغز سیب شناسایی شد (شکل ۳).



شکل ۳. درختچه فیلوژنتیک ترسیم شده بر اساس توالی های نوکلئوتیدی ناحیه ITS جدایه های بررسی شده در این تحقیق. مقیاس نشان دهنده ۰،۰۲ تغییر در اسید های نوکلئو ئیک در ناحیه ITS بین جدایه های مختلف می باشد. توالی های بررسی شده در این تحقیق به صورت بولد مشخص شده اند.

گونه های جنس *آلترناریا* به عنوان گونه قارچی غالب همراه عارضه پوسیدگی مغز سیب در بررسی های انجام شده توسط محققین دیگر معرفی شده اند (کانگ و همکاران ۲۰۰۲، کیم و شاو ۲۰۰۷، نیم و همکاران ۲۰۰۷). در کشور آفریقای جنوبی میزان خسارت بیماری پوسیدگی مغز سیب حدود ۷ الی ۱۰ درصد تخمین زده شده و گونه های *آلترناریا* همراه با گونه های جنس *پنی سیلیوم* از فراوانی بالاتری برخودار بوده اند (وندر والت و همکاران ۲۰۱۰). هدف اصلی بررسی حاضر شناسایی قارچ های همراه با بیماری پوسیدگی مغز سیب بود و نتایج بررسی ما نشان می دهد که گونه های جنس *آلترناریا* همراه با گونه های جنس *پنی سیلیوم* از فراوانی بالاتری برخوردار هستند. تا به حال بیشترین تاکید در مورد بیماری پوسیدگی مغز سیب مربوط به خسارت ناشی از این عارضه در ریزش زودتر از موعد میوه قبل از برداشت، کاهش قابلیت انبارداری میوه های آلوده و کاهش ارزش غذایی و بازار پسندی میوه های آلوده بوده است و امکان آلودگی فراورده های تبدیلی سیب با مایکوتوکسین های *آلترناریا* مورد توجه واقع نشده است. نقطه ثقل مطالعات در ارتباط با آلودگی

فراورده های تبدیلی سیب با مایکوتوکسین ها مربوط به آلودگی فراورده های سیب با مایکوتوکسین پاتولین بوده است که توسط گونه های جنس *پنی سیلیوم* و *آسپرژیلوس* ایجاد می شوند (چراغعلی و همکاران ۲۰۰۵، کریمی و همکاران ۲۰۰۸، فتحی آچاچلویی و همکاران ۲۰۰۷). گونه های این دو جنس به عنوان ساپروفیت های رایج در طبیعت حضور داشته و موقع برداشت محصول سیب میوه های صدمه دیده و زیر درختی را که عموما در صنایع تبدیلی مورد استفاده قرار می گیرند را آلوده می کنند. شرایط نگهداری میوه های صدمه دیده در باغ و محوطه انبار کارخانه ها شرایط مساعد برای رشد این قارچ ها را فراهم می آورد. قارچ *آلترناریا* در دیگر بررسیهای انجام شده نیز به عنوان گونه غالب همراه بیماری پوسیدگی مغز سیب شناسایی شده است. نتایج مطالعات نشان داده است که میوه های سیب رقم قرمز لبنان در برابر آلودگی با قارچ *آلترناریا* حساستر می باشند. در این بررسی نیز قارچ *آلترناریا* اغلب از میوه های سیب رقم قرمز لبنان با علایم پوسیدگی مغز جداسازی شد (جدول ۱). گونه های جنس *آلترناریا* در بیماری بعد از برداشت پوسیدگی سیاه میوه مرکبات دخیل می باشند. در یک بررسی انجام شده بر روی قارچ های آلوده کننده دانه های غلات در کشورهای مدیترانه ای و ترکیه ۳۰ گونه *آلترناریا* از دانه های غلات مختلف جداسازی شده اند (یکلر و همکاران ۲۰۰۱). اغلب گونه های جنس *آلترناریا* از توانایی تولید توکسین های قارچی برخوردار هستند. از بین توکسین های تولید شده توسط *آلترناریا* می توان به آلترناریول (AOH)، آلترناریول متیل اتر (AME) ، آلتنوئن (ALT) و تنوازونیک اسید (TeA) اشاره کرد. این ترکیبات بر روی کشت سلولهای انسانی، باکتریایی و حیوانی اثرات سوء بر جای گذاشته اند. در یک بررسی تاثیر آلترناریول متیل اتر و تنوارونیک اسید بر روی موش مورد آزمایش واقع شده و اثرات سوء این ترکیبات به اثبات رسیده است (یکلر و همکاران ۲۰۰۱).

در یک بررسی دیگر میزان توکسین های تولید شده توسط *آلترناریا* در حبوبات و دانه های روغنی اندازه گیری شده است (کارلووا و همکاران ۲۰۰۶). با وجود اینکه قارچ *آلترناریا* یکی از گروههای قارچی رایج همراه با بیماری پوسیدگی مغز سیب می باشد، تاکنون امکان آلودگی میوه های سیب و فراورد ه های تبدیلی سیب با توکسین های این قارچ بررسی نشده است. نتایج شناسایی مولکولی جدایه های قارچی با استفاده از تعیین توالی نوکلئوتیدی ناحیه ITS نتایج بررسیهای مورفولوژیک را تایید کرد. امروزه توالی نوکلئوتیدی ناحیه ITS و دیگر نواحی ژنومی به طور رایج در شناسایی گروههای مختلف میکروارگانیزم ها مورد استفاده قرار می دهند. روشهای مبتنی بر اطلاعات DNA در شناسایی میکروارگانیزم ها با توجه به دقت و سرعت عمل بالا در مقایسه با روش های سنتی و کلاسیک، از اقبال عمومی در بین محققین شاخه های مختلف کاربردی علوم زیستی برخوردار هستند (پینا و همکاران ۲۰۰۵، لیونز و توما ۲۰۰۵، ارزنلو و همکاران ۲۰۰۷، فلورز و همکاران ۲۰۰۷). شناسایی مولکولی بر مبنای داده های DNA به طرق مختلف انجام می گیرد و تکنیک های مختلفی در این راستا ابداع شده اند. به طور کلی می توان این روشها را به دو گروه رو شهای مبتنی بر واکنش زنجیره پلی مراز و رو شهای غیر مبتنی بر واکنش زنجیره ای پلی مزار تقسیم بندی کرد. تکنیک های شناسایی مبتنی بر واکنش زنجیره ای پلی مراز به صورت رایج در کلینیک های تشخیص عوامل بیماری زای انسانی، گیاهی و آزمایشگا ههای تشخیص سلامت غذایی مورد استفاده واقع می شوند (لیونز و توما ۲۰۰۵، ارزنلو و همکاران ۲۰۰۷، والویک و همکارن ۲۰۰۳). اساس این روشها بر تکثیر اختصاصی بخشی از ژنوم میکرو ارگانیزم مورد نظر با استفاده از واکنش زنجیره ای پلی مراز می باشد. با استفاده از تکنیک های مولکولی امکان تشخیص سریع آلودگی های مواد غذایی با میکروارگانیزم مضر بدون نیاز به کشت و خالص سازی

این عوامل وجود دارد (لیونز و همکاران ۲۰۰۵، ارزنلو و همکاران ۲۰۰۷). توالی ایجاد شده در این تحقیق امکان طراحی آغازگرهای اختصاصی برای قارچ *آلترناریا* را فراهم می آورد که امکان تشخیص سریع این قارچ را در مراحل اولیه آلودگی میوه سیب که معمولا علایم آلودگی پنهان می باشند را فراهم خواهد کرد. تحقیق حاضر اولین بررسی بر روی عارضه پوسیدگی مغز سیب در ایران می باشد که نشان داد گروههای مختلف قارچی در این عارضه دخیل بوده و در بین این قارچ ها *آلترناریا* و *پنی سیلیوم* از فراوانی بالاتری برخوردار بودند. در این تحقیق برای اولین بار از داده های مولکولی جهت شناسایی قارچ های همراه با عارضه پوسیدگی مغز سیب در ایران استفاده شد. بررسی حاضر به عنوان نقطه شروعی برای بررسی جنبه های مختلف این عارضه شامل تعیین منابع مایه تلقیح، زمان آلودگی میوه ها، اکولوژی عوامل قارچی دخیل در این عارضه و بررسی امکان آلودگی میوه سیب و فروراده های تبدیلی سیب با توکسین های قارچ های فوق به شمار می رود.

نتیجه گیری

نتایج این بررسی نشان داد که گروههای قارچی مختلفی در عارضه پوسیدگی مغز سیب در استانهای آذربایجان شرقی و غربی دخیل هستند. از مجموع ۳۰ جدایه خالص سازی شده، گونه های جنس *Alternaria* و *Penicillium* بیشترین فراوانی را به ترتیب با ۱۳ جدایه و ۹ جدایه به خود اختصاص دادند. علاوه بر گونه های این دو جنس، گونه های .*Cladosporium* spp، *Tricothecium sp.*، *Acremonium sp.* و *Stemphylium sp.* شناسایی شدند. اغلب گونه های جداسازی شده از پتانسیل توکسین زایی برخوردار می باشند.

شناسایی گروههای قارچی دخیل در عارضه پوسیدگی به عنوان اولین قدم در ارایه راهکار مناسب جهت ارتقاء کیفیت فراورده‌های تبدیلی سیب و به حداقل رساندن میزان آلودگی این فراورده‌ها با متابولیت سمی تولید شده توسط قارچ ها به شمار می رود.

داده های مولکولی مورد استفاده در این بررسی امکان شناسایی سریع و دقیق گروههای عمده قارچی دخیل در این عارضه را امکان پذیر ساخت. امروزه روشهای مبتنی بر اطلاعات DNA در شناسایی میکروارگانیزم ها با توجه به دقت و سرعت عمل بالا در مقایسه با روش های سنتی و کلاسیک، در آزمایشگاههای کنترل کیفی و مراکز بهداشتی، نظارتی مورد استفاده واقع می شوند. توالی های ایجاد شده در این بررسی امکان توسعه ابزار مولکولی و در نهایت بارکد DNA جهت شناسایی این گروه از قارچ ها را فراهم خواهد کرد.

منابع مورد استفاده

فتحی آچاچلوئی ب، آزادمرد دمیرچی ص، حصاری ج و نعمتی م، ۱۳۸۸. مقدار مایکوتوکسین پاتولین در آب میوه‌های تولیدی چند کارخانه آب میوه سازی شمال غرب کشور، مجله پژوهش های صنایع غذایی. شماره ۱، جلد ۱۹. صفحه: ۱-۱۲.

Agrios, GN, 2005. Plant Pathology (5th edition). Elsevier-Academic Press, San Diego, CA. 922 pp.

Arzanlou M, Abeln ECA, Kema GHJ, Waalwijk C, Carlier J, Vries I de, Guzmán M, Crous PW, 2007. Molecular diagnostics for the Sigatoka disease complex of banana. Phytopathology, 97: 1112-1118.

Cheraghali AM, Mohammadi, HR, Amirahmadi M, Yazdanpanah H, Abouhossain G, Zamanian F, Ghazi Khansari M, Afshar M, 2005. Incidence of patulin contamination in apple juice produced in Iran. Food Control, 16: 165-167.

De Kock SL, Visagie TR, Combrink JC, 1991. Control of core rot in Starking apples. Deciduous Fruit Grower, 41: 20-22.

Ellis MA, Barrat JG, 1983. Colonization of delicious apple fruits by *Alternaria* spp. and effect of fungicide sprays on moldy-core. Plant Disease, 67: 150-152.

Fathi Achachlouei B, Ahmadi-zenouz A, Assadi Y, Hesari J, 2007. Reduction of patulin content in apple juice concentrate using activated Carbon and its effects on several chemical constituents. Journal of Food, Agriculture & Environment, 5: 84-88.

Floreza B, Alvarez-Martına P, Lopez-Dıazb TM, Mayo B, 2007. Morphotypic and molecular identification of filamentous fungi from Spanish blue-veined Cabrales cheese, and typing of *Penicillium roqueforti* and *Geotrichum candidum* isolates. International Dairy Journal, 17: 350-357.

Kang JC, Crous, PW, Godwin, RAM, Serdani M, Song SM, 2002. Phylogenetic analysis of *Alternaria* spp. associated with apple core rot and citrus black rot in South Africa. Mycological Research, 106: 1151-1162.

Karimi GR, Hassanzadeh M, Yazdanpanah H, Nazari F, Iranshahi M, Nili A, 2008. Contamination of patulin in clear apple juice in Mashhad, Iran. Journal of Food Safety, 28: 413-421.

Kralova J, Hajslova J, Poustka J, Hochman M, Bjelkova M, Odstrcilova L, 2006. Occurrence of *Alternaria* toxins in fibre flax, linseed, and peas grown in organic and conventional farms: monitoring pilot study. Czech Journal of Food Science, 24: 288-296.

Kim YK, Xiao CL, 2007. Distribution and incidence of Sphaeropsis rot in apple in Washington State. Plant Disease, 92:940-946.

Lievens B, Thomma BPHJ, 2005. Recent developments in pathogen detection arrays: implications for fungal plant pathogens and use in practice. Phytopathology, 95: 1374-1380.

Niem J, Miyara, I, Ettedgui Y, Reuveni M, Flaishman M, Prusky D, 2007. Core rot development in red delicious apples is affected by susceptibility of the seed locule to *Alternaria alternata* colonization. Phytopathology, 97:1415-1421.

Pina C, Teixeiro P, Leite P, Villa M, Belloch C, Brito L, 2005. PCR-fingerprinting and RAPD approaches for tracing the source of yeast contamination in a carbonated orange juice production chain. Journal of Applied Microbiology, 98: 1107-1114.

Serdani M, Kang JC, Peever TL, Andersen B, Crous PW, 2002. Characterization of *Alternaria* species groups associated with core rot of apples in South Africa. Mycological Research 106: 562-570.

Sorensen JL, Phipps RK, Nielsen KF, Schroes H-J, Frank J, Thrane U, 2009. Analysis of *Fusarium avenaceum* metabolites produced during wet apple core rot. Journal of Agricultural Food Chemistry, 57: 1632-1639.

Stockenstrom DR, Thembo S, Balducci KM, Shephard GS, 2007. Investigation of patulin contamination in apple juice sold in retail outlets in Italy and South Africa. Food Additives & Contaminants, 24: 630-634.

Taniwaki MH, Hocking AD, Pitt JI, Fleet GH, 2001. Growth of fungi and mycotoxin production on cheese under modified atmospheres. International Journal of Food Microbiology, 68: 25-133.

Tournasa VH, Heeresb J, Burgess L, 2007. Moulds and yeasts in fruit salads and fruit juices. Food Microbiology, 23: 684-688.

Yekeler H, Bitmis K, Ozçelik N, Doymaz MZ, Calta M, 2001. Analysis of toxic effects of Alternaria toxins on Eesophagus of mice by light and electron microscopy. Toxicologic Pathology, 29: 492-497.

van der Walt L, Spotts RA, Visagie CM, Jacobs K, Smit FJ, McLeod A, 2010. *Penicillium* species associated with preharvest wet core rot in South Africa and their pathogenicity on apple. Plant Disease, 94: 666-675.

Waalwijk C, Kastelein P, de Vries I, Kerényi Z, van der Lee T, Hesselink T, Köhl J, Kema G, 2003. Major changes in *Fusarium* spp. in wheat in the Netherlands. European Journal of Plant Pathology, 109: 743-754.

White TJ, Bruns TD, Lee SB, Taylor JW, Amplification and sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis N. Gelfand D. Sninsky J. White TC. eds. PCR-Protocols and Applications – A Laboratory Manual. New York: Academic Press, 1990; pp. 315–322.