

تعیین و تشخیص بیماری زوال گوجه‌فرنگی و خیار ناشی از *Plectosphaerella cucumerina* در ایران

مریم میرطالبی* و ضیاءالدین بنی‌هاشمی^۱

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۳/۲۴؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۷/۳)

چکیده

در تابستان ۱۳۹۴، از مزارع گوجه‌فرنگی و خیار کفترک و باجگاه از استان فارس نمونه‌برداری انجام شد و گیاهانی با علائم زوال و مرگ به آزمایشگاه منتقل شدند. پس از جداسازی عامل بیماری، جدایه‌های به‌دست آمده به روش تک‌اسپور جهت مطالعات ریخت‌شناختی خالص شدند. پرگنه‌های قارچ روی محیط کشت PDA تخت، لزج، نارنجی یا صورتی، میسلیوم‌ها رویشی به هم فشرده و میسلیوم‌های هوایی اغلب غایب و یا پراکنده بودند و کنیدیوفورها روشن، منفرد، دارای دیواره نازک بدون انشعاب یا به ندرت دارای انشعابات نامنظم: سلول کنیدیوم‌زا فیالیدیک، منفرد و صاف، فیالیدها بدون دیواره عرضی، به ندرت دارای یک دیواره نزدیک پایه و گاهی در انتها منشعب. کنیدیوم‌ها در سرهای لزج به صورت مجتمع تشکیل می‌شدند شفاف، بیضوی شکل و بتدریج در دو انتها باریک‌تر می‌شوند و فاقد دیواره و یا دیواره‌دار بودند. براساس خصوصیات ریخت‌شناسی و مولکولی بر پایه‌ی توالی سنتی ناحیه‌ی فاصله‌ی ترانوسی شده‌ی داخلی (ای‌تی-اس) جدایه‌های به‌دست آمده *Plectosphaerella cucumerina* (Lindf.) W. Gams تشخیص داده شد. بر پایه‌ی واکاوی ناحیه‌ی ای‌تی‌اس جدایه‌ها دارای تنوع نوکلئوتیدی بودند به گونه‌ای که در جدایه‌های به‌دست آمده از نواحی باجگاه و کفترک دو زیرگروه مولکولی تعیین شد. آزمون بیماریزایی با استفاده از گیاهان گوجه‌فرنگی، فلفل، هندوانه و طالبی انجام شد. سه تا چهار هفته پس از مایه‌زنی گیاهان مایه‌زنی شده علائمی مانند پژمردگی، پوسیدگی ریشه و طوقه، کوتاه شدن طول ساقه و ریشه از خود نشان دادند. این اولین گزارش از زوال خیار و گوجه‌فرنگی ناشی از *P. cucumerina* از ایران همراه با بررسی خصوصیات ریخت‌شناختی، بیماریزایی و مولکولی این قارچ است.

کلیدواژه: ناحیه‌ی ITS، آزمون بیماریزایی، تنوع نوکلئوتیدی، فارس

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mmirtalebi@shirazu.ac.ir

۱. بخش گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

Identification and characterization of collapse on tomato and cucumber caused by *Plectosphaerella cucumerina* in Iran

M. Mirtalebi* and Z. Banihashemi¹

(Received: 13.6.2016; Accepted: 24.9.2016)

Abstract

In summer 2015, cucumber and tomato plants with collapse and decline symptoms were collected from fields in Bajgah and Kaftarak regions in Fars province and transported to the laboratory. After isolation of the causal agent, single spore colonies were derived prior to morphological identification. Colonies on PDA plates were buff or salmon pink; the mycelium was slimy with sparse or absent aerial hyphae. Conidiophores were solitary, unbranched or rarely irregularly branched and the conidiogenous cells could be described as phialidic, hyaline and smooth. Occasionally the conidiogenous cells showed one septa near the base. Conidia were aggregated in slimy heads, hyaline, ellipsoidal, tapering gradually to rounded apex and base, septate or aseptate. These characteristics are typical of *Plectosphaerella cucumerina* (Lindf.) W. Gams. (anamorph: *Plectosporium tabacinum*). The internal transcribed spacer (ITS) region of the isolates was amplified using primers ITS1 and ITS4 and sequenced. Blast analysis of the sequences showed identity of the isolates to *P. cucumerina*. Based on sequence analysis of ITS region, the fungal isolates showed nucleotide variation. Bajgah and Kaftarak isolates were identified as two molecular subgroups. Pathogenicity tests were also conducted on tomato, cucumber, pepper, watermelon and melon plants. 3-4 weeks after inoculation, 70% inoculated plants showed symptoms including wilting, root and collar rot, dwarfing of stem and root and death of seedling. This is the first report of *P. cucumerina* causing tomato and cucumber collapse in Iran with characterization of the fungus based on morphological, pathogenicity and molecular data.

Keywords: Pathogenicity test, ITS region, Nucleotide variation, Fars

* Corresponding author's E-mail: mmirtalebi@shirazu.ac.ir

1. Department of Plant Protection, College of Agriculture, Shiraz University.

مقدمه

نوع توسعه سنترم، این گروه از قارچ‌ها به Sordariaceae نزدیک‌تر هستند. پس از آن زارع (Zare et al. 2007) خانواده Plectosphaeraceae را به عنوان گروه خواهری Glomerellaceae برای تجمیع *Acrostalagmus*، *Plectosphaerella*، *Musicillium*، *Gilbellulopsis* (آنامورفی *Plectosporium*) و *Verticillium* پیشنهاد داد.

مرحله‌ی آنامورفی *P. cucumerina* ابتدا در جنس *Fusarium* بعنوان *F. tabacinum* قرار گرفت و پس از آن به جنس *Plectosporium* منتقل شد (Palm et al. 1995). به دلیل تغییر در نام‌گذاری قارچ‌ها، براساس تصویب کنگره‌ی بین‌المللی گیاه‌شناسی در ملبورن در سال ۲۰۱۱ (Hawksworth 2011) که هر قارچ باید یک نام داشته باشد، *Plectosphaerella* به عنوان جنس تلومرف *Plectosporium* در نظر گرفته می‌شود و در سال‌های اخیر، ترکیب جدیدی از گونه‌های *Plectosporium* در *Plectosphaerella* پیشنهاد شده است (Carlocci et al. 2012).

در ایران تاکنون *P. cucumerina* به صورت درون‌رست همراه با گیاه بامبو (Arzanlou et al. 2013) و همچنین عامل آنتراکنوز سویا، لوبیا چشم بلبلی و لوبیا چیتی (Atghia et al. 2014) گزارش شده است.

در تابستان ۱۳۹۴ طی بازدید از مزارع خیار و گوجه‌فرنگی باجگاه و کفترک در استان فارس از گیاهان گوجه‌فرنگی و خیار با علائم زوال و مرگ گیاهان بالغ دارای میوه، نمونه‌برداری انجام شد و پس از انتقال به آزمایشگاه و جداسازی، قارچ *P. cucumerina* جداسازی شد. هدف از انجام این مطالعه، شناسایی و بررسی خصوصیات مولکولی، بیماری‌زایی و ریخت‌شناختی جدایه‌های *P. cucumerina* به دست آمده از گیاهان آلوده گوجه‌فرنگی و خیار در مزارع استان فارس است.

بیماری پژمردگی و زوال ناگهانی کدوئیان از دهه‌ی ۱۹۸۰ از مناطق مختلف دنیا مانند ژاپن، اسرائیل، اسپانیا، آمریکا و ایتالیا گزارش شده است. (Watanabe 1979, Reuveni et al. 1983, Garcia-Jimenez et al. 1993, Hansen 2000, Stravato et al. 2002). عامل اصلی بیماری *Monosporascus cannonballus* و *Acremonium cucurbitaceanum* بوده است (Armengol et al. 1998, Bruton, 2000). بیماری‌گر دیگری که در ارتباط با این بیماری بصورت متناوب از کدوئیان جداسازی شده است *Plectosphaerella cucumerina* (Lindf.) W. Gams است (Bost & Mullins 1992, Palm et al. 1995, Carlucci et al. 2006).

P. cucumerina بعنوان یک قارچ چندخوار (Polyphagous)، دارای انتشار جهانی و دامنه‌ی میزبانی وسیع شناخته می‌شود (Pascoe et al. 1984, Palm et al. 1995). علاوه بر کدوئیان این بیماری‌گر از میزبان‌های دیگر مانند آفتابگردان، گوجه‌فرنگی و سویا جداسازی شده است. (Pascoe et al. 1984, Zizzerini & Tosi 1987, Chen et al. 1999, Xu et al. 2014, Zhang et al. 2015).

کلبان (Klebahn 1929) برای اولین بار *P. cucumerina* جدا شده از بوته‌های خیار جوان در آلمان را توصیف کرد. در سال ۱۹۷۰ قارچ توصیف شده توسط کلبان بعنوان هم‌گونه (Conspecific) با *Venturia cucumerina* معرفی شد (Elbakayan 1970). ترکیب *P. cucumerina* توسط گمس (Domsch & Gams, 1972) معرفی شد و به عنوان عضوی از Hypocreaceae مورد توجه قرار گرفت (Gams & Gerlach 1968, Barr 1990). در حالی که اوکر (Uecker 1993) پیشنهاد کرد که براساس

مواد و روش‌های بررسی

جداسازی

در تابستان ۱۳۹۴، از مزارع گوجه‌فرنگی و خیار کفترک و منطقه باجگاه استان فارس نمونه برداری انجام شد و گیاهانی با علائم زوال و مرگ به آزمایشگاه منتقل شدند. به منظور جداسازی عامل بیماری، ابتدا اندام‌های گیاهی به خوبی با آب شسته شدند. سپس ریشه و طوقه به قطعات ۲-۴ میلی‌متری تقسیم و به مدت دو دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد (مایع سفیدکننده ۱۰ درصد موجود در بازار) گندزدایی شدند. سپس این قطعات، ۶-۷ مرتبه با آب مقطر سترون شستشو و پس از خشک کردن آن‌ها روی کاغذ صافی سترون، در تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت سیب‌زمینی- دکستروز- آگار (PDA: عصاره‌ی ۳۶۰ گرم سیب‌زمینی، ۱۵ گرم آگار و آب مقطر تا حجم یک لیتر، حاوی ۰/۵ گرم در لیتر آمپی‌سیلین و ۰/۰۱ گرم در لیتر ریفامپین) منتقل شدند. تشتک‌های پتری به مدت یک هفته در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند.

شناسایی جدایه‌ها

جدایه‌های به دست آمده به روش تک‌اسپور روی محیط کشت آب آگار ۲ درصد (WA) خالص شدند (Hansen & Smith, 1932). جهت شناسایی جدایه‌های *Plectosphaerella*، از کلید شناسایی دمسچ و همکاران (Domsch et al. 2007) و هم‌چنین مقاله‌ی توصیفی کارلوسی و همکاران (Carlucci et al. 2007) استفاده شد. مشخصات پرگنه‌ها، شامل رنگ و شکل آن‌ها روی محیط کشت PDA در تاریکی پس از هفت روز مطالعه شد. جهت تعیین اثر دما روی رشد پرگنه‌ها، میانگین نرخ رشد

رویشی جدایه‌ها پس از هفت روز روی محیط کشت PDA در دماهی دمایی ۱۵ تا ۳۰ درجه‌ی سلسیوس (با فواصل ۵ درجه‌ی سلسیوس) و شرایط تاریکی بررسی شدند. بررسی خصوصیات ریخت‌شناسی با استفاده از کشت قارچ روی اسلاید انجام شد (Carlucci et al. 2012). برای این منظور یک بلوک دو میلی‌متری از حاشیه‌ی پرگنه‌های جوان قارچ در مرکز یک اسلاید میکروسکوپی شیشه‌ای سترون قرار گرفت و سپس این اسلاید در یک تشتک پتری سترون که حاوی کاغذهای صافی مرطوب بود گذاشته شد و به مدت یک هفته در تاریکی در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شد. سپس بلوک آگار حذف شد و اسید لاکتیک ۱۰۰ درصد روی ریشه‌های رشد یافته روی اسلاید که حاوی کنیدیوفور و کنیدیوم بودند ریخته شد. پس از گرفتن عکس با استفاده از میکروسکوپ نوری مدل ZEISS همراه با دوربین مدل Dino-Eye و با استفاده از نرم‌افزار Dinocapture 2.0 version 1.5.14.B، بررسی خصوصیات ریخت‌شناسی و اندازه‌گیری برای ساختارهای میکروسکوپی انجام شد.

آزمون بیماری‌زایی

الف- تهیه‌ی مایه‌ی قارچ

جهت آزمون بیماری‌زایی، از دو روش فرو بردن ریشه در سوسپانسیون کنیدیوم و از روش وسترلوند و همکاران (Westerlund et al. 1974) و آلوده کردن بذور گندم به قارچ، با اندکی تغییر استفاده شد. در روش اول محیط کشت عصاره‌ی سیب‌زمینی و دکستروز (PDB: عصاره‌ی ۳۰۰ گرم سیب‌زمینی، ۱۵ گرم دکستروز و آب مقطر تا حجم یک لیتر) با استفاده از شیکر برای تهیه‌ی

ب- آماده‌سازی گیاهان و مایه‌زنی

جهت تهیه گیاهان مورد نیاز برای مایه‌زنی در این مطالعه، از بذور خیار، گوجه‌فرنگی، طالبی، هندوانه و فلفل استفاده شد. برای مایه‌زنی با استفاده از روش فرو بردن ریشه در سوسپانسیون کنیدیوم، بذور پس از گندزدایی با محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد به مدت ۳-۵ دقیقه، با آب مقطر شستشو داده شدند. جهت جوانه‌زنی به مدت یک شب در دمای اطاق خیس شدند و پس از آن آب اضافی حذف و روی بذرها پنبه‌ی مرطوب گذاشته شد و تا شروع جوانه‌زنی در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند. بذرهاى جوانه‌زده سپس در ورمی‌کولایت قرار داده شدند و پس از ۷-۱۴ روز گیاهچه‌های جوان به آرامی از ورمی‌کولایت خارج و به مدت یک دقیقه در سوسپانسیون اسپور (۱۰^۶ کنیدیوم در میلی‌لیتر) فرو برده شدند و سپس در گلدان‌های حاوی خاک سترون نشاء گردیدند. به هر گلدان معمولاً پنج گیاهچه انتقال داده شد. ریشه‌ی گیاهان شاهد در آب غوطه‌ور شدند. در روش دوم مایه‌زنی با استفاده از دانه‌های ارزن آلوده به قارچ، بذرها پس از گندزدایی به روش ذکر شده مستقیماً در گلدان‌های حاوی خاک و ماسه‌ی سترون به نسبت دو به یک کاشته شدند. پس از ۲-۳ هفته و در مرحله‌ی ۳-۴ برگی مایه‌زنی انجام شد. برای این منظور خاک اطراف طوقه و ریشه‌ی هر گیاهچه کنار زده شد و در حفره‌ی کنار طوقه‌ی هر گیاهچه دو میلی‌لیتر بذر کلنیزه شده ارزن توسط قارچ ریخته شد. گلدان‌های شاهد نیز با بذور ارزن سترون مایه‌زنی شدند. پس از آن خاک‌های کنار زده‌شده‌ی کنار طوقه روی بذور ارزن ریخته شد. گلدان‌های مایه‌زنی شده به مدت ۲-۳ در گلخانه با دمای ۲۵ تا ۳۰ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند و هر روز جهت مشاهده و ثبت

سوسپانسیون کنیدیوم مورد استفاده قرار گرفت (Banihashemi & deZeeuw 1975, Banihashemi, 1982). برای این منظور پنجاه میلی‌لیتر PDB به فلاسک‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری اضافه و اتوکلاو شد. پس از خنک شدن، یک بلوک محیط کشت PDA حاوی قارچ به فلاسک‌ها اضافه شد و روی دستگاه شیکر با سرعت رفت و برگشت ۶۰ حرکت در دقیقه به مدت ۲-۳ روز در دمای اتاق قرار داده شد. پس از آن کنیدیوم‌های تولید شده در ۳ هزار دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند و دو بار دیگر رسوب حاوی کنیدیوم‌ها ضمن مخلوط کردن با آب مقطر سترون، مجدداً سانتریفوژ شدند. جهت تهیه مایه‌ی سوسپانسیون کنیدیوم‌ها، ابتدا با اسلاید گلبول شمار، تعداد آن‌ها در میلی‌لیتر تعیین و در نهایت غلظت آن به ۱۰^۶ کنیدیوم در میلی‌لیتر تنظیم شد.

در روش دوم تهیه مایه‌ی قارچ، به جای استفاده از بذور گندم از دانه‌های ارزن استفاده شد. برای این منظور در هر کیسه‌ی پلاستیکی قابل اتوکلاو شدن، ۱۵۰ گرم بذر ارزن ریخته شد. سپس مقداری آب مقطر به بذرها اضافه شد تا به مدت یک شب بذرها در آب بمانند و خیس بخورند. پس از آن آب اضافی خارج و سر کیسه‌ها بسته شد و کیسه‌ها سه مرتبه به صورت یک در میان در هر دفعه به مدت نیم ساعت در اتوکلاو (دمای ۱۲۱ درجه‌ی سلسیوس و فشار یک اتمسفر) گندزدایی شدند. سپس به هر یک از این کیسه‌ها تعداد هفت بلوک PDA حاوی قارچ اضافه شد و مخلوط داخل کیسه‌ها چندین مرتبه تکان داده شد تا بلوک‌ها کاملاً با بذور ارزن مخلوط شوند. کیسه‌ها به مدت سه هفته برای رشد قارچ در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند. در کیسه‌ی شاهد، از بذور ارزن گندزدایی شده و بلوک‌های PDA فاقد قارچ استفاده شد.

به مدت ۴۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه‌ی سلسیوس، هم-جوشی به مدت ۹۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه‌ی سلسیوس و گسترش به مدت ۲ دقیقه در دمای ۷۲ درجه‌ی سلسیوس انجام گرفت. گسترش نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه‌ی سلسیوس انجام شد. خالص‌سازی محصول حاصل از فزون‌سازی ناحیه‌ی آی‌تی‌اس با استفاده از GeneJet PCR Purification Kit (فرمتاز) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد و دی‌ان‌ای خالص شده جهت توالی‌سنجی به شرکت Bio Basic کانادا ارسال شد.

ویرایش توالی‌های دی‌ان‌ای و واکاوی فیلوژنتیکی

ویرایش و هم‌ردیف‌سازی توالی‌های به دست آمده به روش دستی و با استفاده از نرم‌افزار Bioedit (Hall 1999) انجام شد و با مقایسه‌ی نسخه‌ی مستقیم و معکوس شده، رشته‌ی برآیند به دست آمد و پس از ارائه به بانک ژن (GenBank, NCBI, USA; [Online]) رس‌شمار آن‌ها (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BankIt) اخذ شد (جدول ۱). مطالعات فیلوژنتیکی با توجه به توالی‌های جدایه‌های به دست آمده در این پژوهش و جدایه‌هایی که توالی آن‌ها از بانک ژن به دست آمده بود (جدول ۲)، انجام گرفت. ردیف‌سازی ابتدایی توالی‌های ویرایش شده، با نرم‌افزار Clustal X 2.0 (Larkin et al. 2007) انجام شد و تنظیمات دستی روی آن انجام گرفت. برای واکاوی فیلوژنتیکی و ترسیم درخت از نرم‌افزار Molecular evolutionary genetics (MEGA5.5) (Tamura et al. 2011) و از رهیافت بیشینه‌ی درست‌نمایی بر پایه‌ی مدل Kimura 2-parameter (Kimura 1980) استفاده شد. جدایه‌ی CBS 387.35 گونه‌ی *Gibellulopsis nigrescens* به‌عنوان گروه خارجی انتخاب شد. برای اطمینان قطعیت و قابل اعتماد بودن

علائم مورد بررسی قرار گرفتند. پس از مشاهده‌ی علائم در گیاهان، به منظور تکمیل اصول کخ، جداسازی مجدد عامل بیماری از ریشه و طوقه گیاهان انجام شد.

استخراج دی‌ان‌ای

جدایه‌ها در ۲۵۰ میلی‌لیتر محیط عصاره‌ی سیب‌زمینی راکد، در ۲۵ درجه‌ی سلسیوس کشت شدند و پس از ۱۰ روز ریشه‌های به دست آمده با استفاده از کاغذهای صافی و پمپ خلاء از محیط کشت جدا و با آب مقطر سترون شستشو داده شدند. ریشه‌ها پس از قرار گرفتن در ازت مایع و یخ زدن به مدت ۲۴ ساعت، سرما خشک و برای استفاده‌های بعدی در ۲۰- درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند. استخراج دی‌ان‌ای براساس روش اندجیک و همکاران (Andjic et al. 2007) انجام شد. کیفیت و کمیت دی‌ان‌ای استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ مدل ام-دی ۱۰۰۰ (نانودراپ تکنولوژی، ایالات متحده آمریکا) در طول موج ۲۶۰ نانومتر بررسی شد.

فزون‌سازی و توالی‌سنجی دی‌ان‌ای

با استفاده از آغازگرهای عمومی ITS1 و ITS4 (White et al. 1990) ناحیه‌ی فاصله‌ی ترانویسی شده‌ی داخلی (آی‌تی‌اس) فزون‌سازی شد. برای این منظور مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ۲۰ میکرولیتری حاوی ۱۰-۵ نانوگرم از دی‌ان‌ای قالب، ۰/۸ میکرومول از هر آغازگر، ۰/۲ میکرومول dNTPs، ۲/۵ میکرومول $MgCl_2$ ، ۲ میکرولیتر بافر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و ۱ واحد Taq DNA polymerase تهیه شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با واسرشت‌سازی اولیه به مدت دو دقیقه در دمای ۹۵ درجه‌ی سلسیوس انجام شد. تکثیر در ۳۴ چرخه که هر چرخه شامل؛ واسرشت‌سازی

جدول ۱. مشخصات برخی از جدایه‌های *Plectosphaerella cucumerina* جداسازی شده از ریشه‌ی خیار و گوجه‌فرنگی در حال زوال در این مطالعه و رس‌شمار آن‌ها در بانک ژن.

Table 1. Isolates of *Plectosphaerella cucumerina* isolated from root of cucumber and tomato with decline symptoms in this study and their accession numbers in the GenBank database.

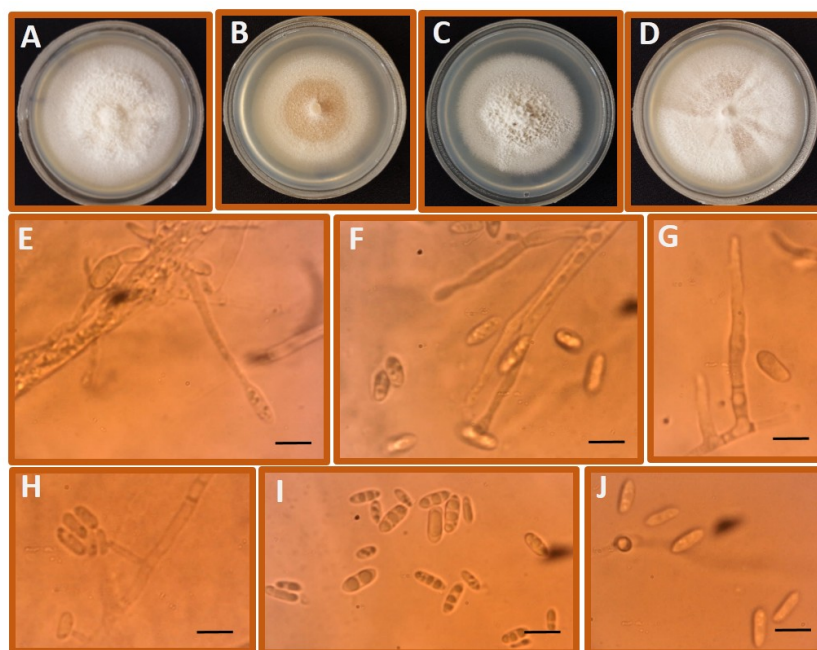
Isolate code	Host	Locality	Average radial growth rate (mmd-) on PDA at (°C)				Genbank accession number
			15	20	25	30	
جدایه	میزبان	محل جدا سازی	میانگین نرخ رشد رویشی (میلی متر در روز) روی محیط کشت PDA در (°C)				رس شمار
Pa1	Cucumber	Bajgah (Fars province)	2.4	3.8	5.1	0.2	KX371080
Pa2	Cucumber	Bajgah (Fars province)	2.3	3.7	4.8	0.1	KX371081
Pa3	Cucumber	Bajgah (Fars province)	2.6	4.1	5.2	0.1	KX371082
Pa4	Tomato	Kaftarak (Fars province)	3.2	4.2	5.2	0.1	KX371083
Pa5	Tomato	Kaftarak (Fars province)	3	4	5.1	0.1	KX371084
Pa6	Tomato	Kaftarak (Fars province)	3.1	4.1	5	0.1	KX371085

جدول ۲. رس‌شمار جدایه‌های به کار رفته در مطالعات فیلوژنتیکی. در صورت وجود اطلاعات، میزبان و محل جداسازی جدایه‌ها مشخص شده است.

Table 2. GenBank accession numbers of *Plectosphaerella cucumerina* isolates used for phylogenetic studies. Isolate's host and locality are indicated where known.

Species	code Isolate	Host	Locality	Accession number
گونه	جدایه	میزبان	محل جداسازی	رس شمار
<i>P. cucumerina</i>	CCTU	Bamboo	Iran	KC845226 ¹
	Plect4	Melon collar	Italy	HQ238977 ²
	Plect10	Melon collar	Italy	HQ238979 ²
	Plect22	Melon collar	Italy	HQ238981 ²
	Plect28	Melon collar	Italy	HQ238983 ²
	Plect143	Pepper collar	Italy	HQ238987 ²
	Plect216	Melon root	Italy	HQ238992 ²
	Plect275	Water melon collar	Italy	HQ238996 ²
	Plect368	Asparagus base turion	Italy	HQ239004 ²
	Plect373	Tomato collar	Italy	HQ239006 ²
ARC2	-	-	-	U66732 ³
-	-	-	-	L36640 ⁴
-	HLDT15	Tomato	China	KC894931 ⁵
<i>P. alismatis</i>	GAMS2	Water-plantain	Netherlands	AY572021 ⁶
<i>P. citrullae</i>	Plect189	Water melon root	Italy	HQ238964 ²
<i>P. delsorboi</i>	MAFF 238958	Siam tulip	Japan	AB264788 ⁷
<i>P. melonis</i>	Plect228	Melon root	Italy	HQ238967 ²
<i>P. pauciseptata</i>	Plect135	Tomato collar	Italy	JQ246958 ²
<i>P. plurivora</i>	Plect32	Tomato collar	Italy	HQ238969 ²
<i>P. ramiseptata</i>	Plect464	Tomato root	Italy	JQ246955 ²
<i>Acremonium cucurbitacearum</i>	CBS408.95	-	-	DQ825963 ⁸
<i>Gibellulopsis nigrescens</i>	CBS 387.35	-	-	EF543854 ⁸

¹Arzanlou et al. 2013. ²Carlucci et al. 2012. ³Chen et al. 1996. ⁴O'Donnell & Gray 1995. ⁵Xu et al. 2014. ⁶Pitt et al. 2004 ⁷Unpubl. data (Nagao, H., Sato, T. & Kakishima, M.). ⁸Zare et al. 2007.



شکل ۱. A-D) پرگنه‌ی قارچ روی محیط کشت PDA پس از ۱۰ روز در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس، E و F) فیالیدها (G) سلول کنیدی-زا دارای یک دیواره در پایه، H) کنیدیوم‌ها در سرهای لزج، I) کنیدیوم‌های دیواره‌دار، J) کنیدیوم‌های فاقد دیواره. (خط مقیاس = ۱۰ میکرومتر).

Fig 1. *Plectosphaerella cucumerina*. A-D) Colonies on PDA after 10 days at 25°C, E & F) Phialides, G) Conidiogenous cell with one septate near the base, H) Slimy head of conidia, I) Septate conidia, J) Aseptate conidia. (Scale bars= 10 μm).

درخت‌های حاصل، از آزمون بوت استرپ با ۱۰۰۰ تکرار استفاده شد.

Carlucci *et al.* 2012). پرگنه‌های قارچ روی محیط کشت PDA دارای تنوع شکل عموماً تخت، لزج و صاف، نارنجی یا صورتی؛ میسیلیوم‌ها به هم فشرده و میسیلیوم‌های هوایی اغلب غایب و یا پراکنده؛ کنیدیوفورها روشن، منفرد، دارای دیواره نازک بدون انشعاب یا به ندرت دارای انشعابات نامنظم؛ سلول کنیدیوم‌زا فیالیدیک، منفرد و صاف؛ فیالیدها بدون دیواره عرضی، به ندرت دارای یک دیواره نزدیک پایه و گاهی در انتها منشعب؛ کنیدیوم‌ها در سرهای لزج به صورت مجتمع، شفاف، بیضوی شکل که به تدریج در دو انتها باریک‌تر می‌شوند و فاقد دیواره و یا دیواره‌دار بودند (شکل ۱). اندازه‌ی کنیدیوم‌ها ۴-۱۰/۷×۲/۵-۴ میکرومتر بود.

درخت‌های حاصل، از آزمون بوت استرپ با ۱۰۰۰ تکرار استفاده شد.

نتایج

جداسازی و مطالعه‌ی ریخت‌شناختی جدایه‌های قارچی

در این بررسی نه جدایه‌ی قارچ از ریشه و طوقه‌ی گیاهان آلوده‌ی گوجه‌فرنگی در منطقه‌ی کفترک استان فارس و هفت جدایه از گیاهان خیار دارای علائم زوال و مرگ مربوط به منطقه‌ی باجگاه جداسازی شد. این جدایه‌ها براساس خصوصیات ریخت‌شناختی *P. cucumerina* (Domsch *et al.* 2007,) تشخیص داده شدند.



شکل ۲. علایم ناشی از مایه‌زنی میزبان‌های مختلف با *Plectosphaerella cucumerina* شامل پژمردگی، پوسیدگی ریشه و طوقه، کوتاه شدن طول ساقه و ریشه و مرگ گیاهچه. (A) طالبی، (B) فلفل، (C) هندوانه و (D) خیار. (گیاه شاهد سمت چپ هر شکل قرار دارد).

Fig 2. Symptoms on several hosts caused by *Plectosphaerella cucumerina* including wilting, root and collar rot, dwarfing of stem and root and death of seedling. A) melon, B) pepper, C), watermelon and D) cucumber. (The control plant placed in the left of each figure).

جدایه‌ها دارای تنوع نوکلئوتیدی هستند و بر اساس واکاوی فیلوژنتیکی با استفاده از رهیافت پیشینه‌ی درست‌نمایی، جدایه‌های P1، P2 و P3 به‌دست آمده از خیار باجگاه و جدایه‌های P4، P5 و P6 به‌دست آمده از گوجه‌فرنگی کفترک در دو زیرگروه کاملاً جدا قرار گرفتند (شکل ۳).

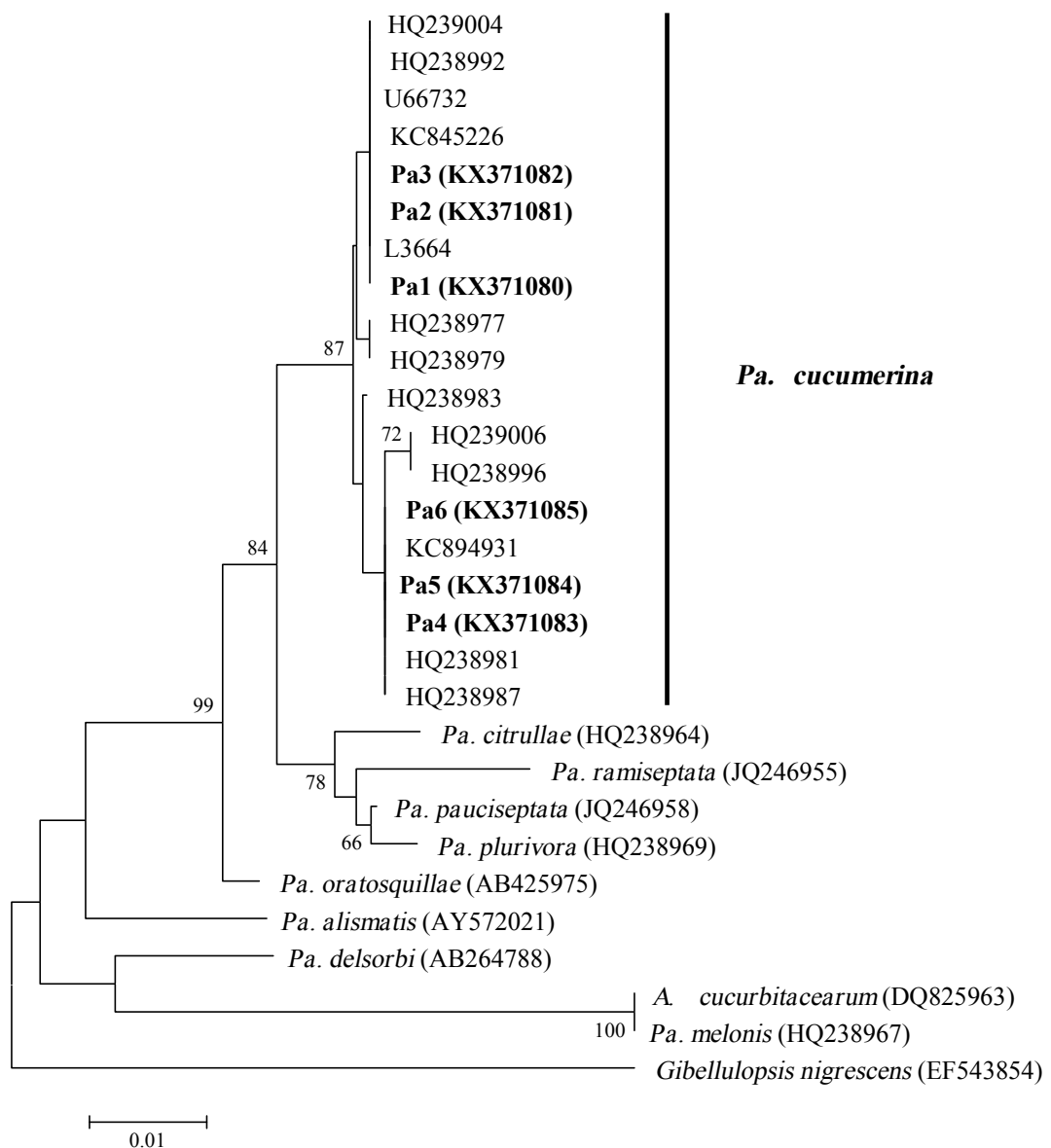
مطالعات بیماری‌زایی

گیاهان خیار، گوجه‌فرنگی، طالبی، هندوانه و فلفل پس از گذشت ۲-۳ هفته پس از مایه‌زنی با شش جدایه‌ی *P. cucumerina* علائمی مانند پژمردگی کامل گیاه، بافت مردگی، پوسیدگی ریشه و طوقه کوتاه شدن طول ساقه و ریشه و در نهایت مرگ گیاهچه را از خود نشان دادند (شکل ۲). درصد آلودگی گیاهان مایه‌زنی شده در روش فروبردن ریشه در سوسپانسیون نسبت به روش استفاده از بذور گندم آلوده بیشتر بود به گونه‌ای که در روش اول حدود ۷۰ درصد گیاهان آلوده شدند ولی در روش دوم تنها ۳۰ درصد گیاهان علائم آلودگی از خود نشان دادند. از

از بین این جدایه‌ها شش جدایه برای بررسی اثر دما بر میانگین نرخ رشد رویشی و همچنین مطالعات بیماری‌زایی و مولکولی انتخاب شدند. بیشترین و کمترین میانگین نرخ رشد رویشی جدایه‌ها به ترتیب در دمای ۲۵ و ۳۰ درجه‌ی سلسیوس بود و هیچ کدام از جدایه‌ها در دمای ۳۵ درجه‌ی سلسیوس رشد نکردند (جدول ۱).

واکاوی فیلوژنتیکی

فزون‌سازی ناحیه‌ی آی‌تی‌اس با استفاده از پرایمرهای ITS1 و ITS4 در شش جدایه‌ی به‌دست آمده از مزارع خیار و گوجه‌فرنگی مناطق باجگاه و کفترک استان فارس، باعث تکثیر قطعه‌ای به طول تقریبی ۵۵۰ جفت‌باز شد. نتایج Blast این جدایه‌ها در بانک‌ژن نشان داد که این جدایه‌ها به میزان ۹۸-۱۰۰ درصد به جدایه‌های معتبر دیگر دنیا که به نام *P. cucumerina* در بانک ژن ثبت شده بودند (جدول ۲) شباهت دارند. هم‌ردیف‌سازی توالی ناحیه‌ی آی‌تی‌اس این جدایه‌ها با توالی آی‌تی‌اس جدایه‌های معتبر *P. cucumerina*، اخذ شده از بانک‌ژن نشان داد که این



شکل ۳. موقعیت فیلوژنتیکی جدایه‌های *Plectosphaerella cucumerina* منطقه‌ی باجگاه و کفتراک استان فارس بر اساس توالی ناحیه‌ی فاصله‌ی ترانویسی شده‌ی داخلی (ای تی اس) به روش رهیافت پیشینه‌ی درست‌نمایی. اعداد نزدیک محل انشعاب هر شاخه مقدار آزمون اعتبارسنجی از ۱۰۰۰ تکرار را نشان می‌دهد. جدایه‌ی CBS 387.35 گونه‌ی *Gibellulopsis nigrescens* به‌عنوان گروه خارجی انتخاب شده است. جدایه‌های *Plectosphaerella cucumerina* جداسازی شده در این مطالعه به صورت سیاه مشخص شده‌اند.

Fig 3. Phylogeny of the *Plectosphaerella cucumerina* isolates of Bajgah and Kaftarak regions in Fars province inferred from the ITS regions of the rDNA in Maximum likelihood phylogenetic tree. Bootstrap values (> 60%) are shown as percentages of 1,000 replicates at the branch point. *Gibellulopsis nigrescens* isolate CBS 387.35 is included as outgroup. *Plectosphaerella cucumerina* isolates recovered in this study indicated in bold.

در مطالعه‌ی کارلوسی و همکاران (Carlucci et al. 2012) نشان داده شد که جدایه‌های مختلف *P. cucumerina* علاوه بر تنوع مورفولوژیکی دارای تنوع نوکلئوتیدی قابل ملاحظه‌ای نیز در ناحیه‌ی آی‌تی‌اس می‌باشند به گونه‌ای که این جدایه‌ها از لحاظ فیلوژنتیکی در پنج زیر گروه قرار گرفتند. در تحقیق حاضر نیز جدایه‌های به دست آمده از دو میزبان گوجه‌فرنگی و خیار هم از لحاظ ریخت‌شناختی مانند مشخصات پرگنه و میانگین نرخ رشد رویشی و هم‌چنین توالی ناحیه‌ی آی‌تی‌اس دارای تنوع بودند و شش جدایه‌ی مورد بررسی در توالی سنجی ناحیه‌ی آی‌تی‌اس در دو زیرگروه جدا همراه با زیرگروه‌های حاصل از مطالعه‌ی کارلوسی و همکاران (Carlucci et al. 2012) گروه‌بندی شدند. اگرچه در هر دوی این مطالعات تنها از ناحیه‌ی آی‌تی‌اس استفاده شده است و مطالعات فیلوژنتیکی برپایه توالی سنجی جایگاه‌های ژنی بیشتری نیاز است که نشان دهد که آیا این قارچ یک تاکسون تنهاست یا یک گونه‌ی کمپلکس است. مطالعه‌ی گروه‌های سازگاری رویشی در جدایه‌های مختلف *P. cucumerina* بدست آمده از مناطق جغرافیایی و میزبان‌های مختلف نیز نشان داد که تنها ۴ گروه سازگاری رویشی در آن‌ها تشکیل می‌شود که هر کدام از این گروه‌ها شامل دو جدایه از مناطق جغرافیایی نزدیک به هم بودند و همه از طالبی‌های دارای علائم جداسازی شده بودند. تقریباً بقیه‌ی جدایه‌ها ناسازگار رویشی بودند که بیانگر تنوع ژنتیکی گسترده‌ی آن‌ها در طبیعت است (Abad et al. 2000, Arzanlou et al. 2013).

P. cucumerina تاکنون به عنوان قارچ درون‌رست از بامبو و هم‌چنین عامل آنتراکتوز سویا، لوبیا چشم‌بلبلی و لوبیا چیتی (Atghia et al. 2014) از ایران گزارش شده است. این اولین گزارش از پژمردگی و زوال خیار و

تمام ریشه‌های آلوده‌ی گیاهان مایه‌زنی شده که روی محیط کشت PDA اسیدی کشت داده شده بودند مجدداً *P. cucumerina* جداسازی شد.

بحث

براساس خصوصیات ریخت‌شناسی و توالی سنجی ناحیه‌ی آی‌تی‌اس جدایه‌های بدست آمده از خیار و گوجه‌ی در حال مرگ و زوال مناطق کفترک و باجگاه در استان فارس *P. cucumerina* تشخیص داده شد.

P. cucumerina یک پوده‌رست عمومی در بقایای گیاهی پوسیده شده، بذرها و خاک‌ها است (Domsch et al. 2007). هم‌چنین این قارچ به عنوان یک پارازیت اختیاری از دامنه‌ی وسیعی از میزبان‌ها مانند سویا، گوجه‌فرنگی، آفتابگردان، ریحان شیرین، بادام زمینی و لوبیا سبز گزارش شده است (Odanfa 1979, Garibaldi et al. 1997, Chen et al. 1999, Pascoe et al. 1984, Zazzerini & Tosi 1987, Harington et al. 2000, Dillard et al. 2005, Zhang et al. 2015) و به نظر می‌رسد که دارای انتشار جهانی است (Seifert 1996). علائمی که توسط *P. cucumerina* ایجاد می‌شود در میزبان‌های مختلف متفاوت است. این علائم شامل لکه‌برگی‌ها و آنتراکتوز (Atghia et al. 2014, Carrieri et al. 2014)، پوسیدگی ریشه و طوقه (Carlucci et al. 2012)، پژمردگی (Zhang et al. 2015) و زنگار (Russet et al. 2005) است. در سال‌های اخیر *P. cucumerina* به عنوان یک بیمارگر نوظهور روی گیاهان جالیزی مانند کدو، خیار، طالبی و گوجه‌فرنگی مطرح بوده است که باعث پژمردگی، بافت‌مردگی، پوسیدگی ریشه، ریزش برگ‌ها و در نهایت مرگ گیاه می‌شود (Pascoe et al. 1984, Bost & Mullinus 1992, Mullen & Sikora 2003, Carlucci et al. 2006, Xu et al. 2014).

گوجه‌فرنگی ناشی از *P. cucumerina* از ایران است. انتشار گسترده‌ی *P. cucumerina* خصوصاً در سال‌های اخیر روی گیاهان جالیزی در دنیا (Hansen 2000, Mullen & Sikora 2003, Boucher & Wick 2004, Jimenes & Zitter 2005)، دامنه‌ی میزبانی وسیع آن و توانایی بقا به صورت پوده زیستی، تهدیدی برای تولید محصولات کشاورزی است که باید مورد توجه قرار گیرد.

منابع

- Abad, P., Pérez, A., Marqués, M. C., Vicente, M. J., Bruton, B. D. and García-Jiménez, J. 2000. Assessment of vegetative compatibility of *Acremonium cucurbitacearum* and *Plectosphaerella cucumerina* isolates from diseased melon plants. European and Mediterranean Plant Protection Organization Bulletin 30(2): 199-204.
- Andjic1, V., Hardy1, G. E. StJ., Cortinas, M. N., Wingfield, M. J. and Burgess, T. I. 2007. Multiple gene genealogies reveal important relationships between species of *Phaeophleospora* infecting Eucalyptus leaves. FEMS Microbiology Letters 268: 22-33.
- Armengol J., Sanz E., Martínez-Ferrer G., Sales R., Bruton B. D. and García-Jiménez J. 1998. Host range of *Acremonium cucurbitacearum*, cause of Acremonium collapse of muskmelon. Plant Pathology 47: 29-35.
- Arzanlou M., Torbati M. and Khodaei S. 2013. Phenotypic and molecular characterization of *Plectosphaerella cucumerina* on bamboo from Iran. Mycosphere 4(3): 647-651.
- Atghia O., Javan-Nikkhah M., Alizadeh A. and Stukenbrock E. H. 2014. First report of *Plectosphaerella cucumerina* on some host plants in Iran and the world. In: Proceeding of 21th Iranian Plant Protection Congress, Oromieh, Iran, p 907.
- Banihashemi Z. 1982. A new physiological race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* in Iran. Iranian Journal of Plant Pathology 18:1-6.
- Banihashemi Z. and de Zeeuw D. J. 1975. The behavior of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* in the presence and absence of host plants. Phytopathology 65: 1212-1217.
- Barr M. E. 1990. Prodromus to nonlichenized, pyrenomycetous members of class Hymenoascomycetes. Mycotaxon 39: 43-184.
- Bost S.C. and Mullins C.A. 1992. A blight of cucurbits caused by *Microdochium tabacinum*. Plant Disease 76: 861.
- Boucher, T.J. and Wick. R. 2004. Plectosporium blight: A new destructive disease of pumpkins and summer squash in New England. http://vegetablemdonline.ppath.cornell.edu/NewsArticles/Pump_PlectoNews04.htm.
- Bruton B.D. 2000. Assessment of virulence of *Acremonium cucurbitacearum* and *Monosporascus cannonballus* on *Cucumis melo*. Plant Disease 84: 907-913.
- Carlucci A., Raimondo M. L. and Frisullo S. 2006. Different morphotypes of *Plectosporium tabacinum* associated with collapse of cucurbit in Apulia. Journal of Plant Pathology 88: S36.
- Carlucci A., Raimondo M. L., Santos J. and Phillips A. J. L. 2012. *Plectosphaerella* species associated with root and collar rots of horticultural crops in southern Italy. Persoonia 28: 34-48.
- Carrieri R., Pizzolongo G., Carotenuto G., Tarantino, P. and Lahoz E. 2014. First report of necrotic leaf spot caused by *Plectosphaerella cucumerina* on lamb's lettuce in southern Italy. Plant Disease 98: 998.
- Chen, W. D., Gray, L. E., Kurlle, J. E. and Grau, C. R. 1999. Specific detection of *Phialophora gregata* and *Plectosporium tabacinum* in infected soybean plants using polymerase chain reaction. Molecular Ecology 8: 871-877.
- Chen, W., Gray, L. E. and Grau, C. R. 1996. Molecular differentiation of fungi associated with brown stem rot and detection of *Phialophora gregata* in resistant and susceptible soybean Cultivars. Phytopathology 86: 1140-1148.
- Dillard H. R., Cob A. C, Shah, D. A. and Straight, K. E. 2005. Identification and characterization of russet on snap beans caused by *Plectosporium tabacinum*. Plant Disease 89: 700-704.
- Domsch K.H, Gams W., Anderson T. H. 2007. Compendium of Soil Fungi. IHW-Verlag Eching. 627p.

- Domsch K.H. and Gams W. 1972. Fungi from agricultural soils. Longman, United Kingdom. 290p.
- Elbakyan M. A. 1970. Maloizvestnoe zaboлевanie ogurtsov. Trudy. Vsesoyuznyi Nauchno Issledovalel'skii Inslituta Zashchita Rastanii 29: 116-120.
- Gams W. and Gerlach M. 1968. Beiträge zur Systematik und Biologie von *Plectosphaerella cucumeris* und der zugehörigen Konidienform. Persoonia 5: 177-188.
- García-Jiménez J., Martínez-Ferrer G., Armengol J., Velázquez M. T., Orts M., Juárez M., Ortega A., Jordá M. C. and Alfaro A. 1993. Agentes asociados al colapso del melon en distintas zonas españolas. Boletinde Sanidad Vegetaly Plagas 19: 401-423.
- Garibaldi, A., Gullino, M. L. and Minuto, G. 1997. Diseases of basil and their management. Plant Disease. 81: 124-132.
- Hall T. A. 1999. Bio Edit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium 41: 95-98.
- Hansen M. A. 2000. Plectosporium Blight of cucurbits. http://vegetablemdonline.ppath.cornell.edu/NewsArticles/Cuc_Plecto2.htm.
- Hansen, H. N. and Smith, R. E. 1932. The mechanisms of variation in imperfect fungi: *Botrytis cinerea*. Phytopathology 37: 369- 371.
- Harrington, T. C., Steimel, J., Workneh, F. and Yang, X. B. 2000. Molecular identification of fungi associated with vascular discoloration of soybean in the north central United States. Plant Disease 84: 83-89.
- Hawksworth, D. L. 2011. A new dawn for the naming of fungi: impacts of decisions made in Melbourne in July 2011 on the future publication and regulation of fungal names. MycoKeys 1: 7-20.
- Jimenez, P. and Zitter, T. A. 2005. First report of plectosporium Blight on pumpkin and squash caused by *Plectosporium tabacinum* in New York. Plant Disease 89: 432.
- Kimura M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution 16: 111-120.
- Klebahn H. 1929. Vergilbende junge Treibgurken, ein darauf gefundes *Cephalosporium* und dessen Schlauchfrüchte. Phytopathologische Zeitschrift 1: 31-44.
- Larkin M. A., Blackshields G., Brown N. P., Chenna R., Mc Gettigan P. A., McWilliam H., et al. 2007. ClustalWand X version 2.0. Bioinformatics 23: 2947-2948.
- Mullen, J. M. and Sikora, E. J. 2003. First report of plectosporium blight on pumpkin caused by *Plectosporium tabacinum* in Alahama. Plant Disease 87: 749.
- Odufa, S. A. 1979. *Fusarium* species associated with groundnut fruit and soil in Nigeria. Transactions of the British Mycological Society 72: 342-344.
- Palm M. E., Gams W. and Nirenberg H. I. 1995. *Plectosporium*, a new genus for *Fusarium tabacinum*, the anamorph of *Plectosphaerella cucumerina*. Mycologia 87: 397-406.
- Pascoe I. G., Nancarrow R. J. and Copes C. J. 1984. *Fusarium tabacinum* on tomato and other hosts in Australia. Transactions of the British Mycological Society 82: 343-345.
- Pitt, W. M., Goodwin, S. B., Ash, G. J., Cother, N. J. and Cother, E. J. 2004. *Plectosporium alismatis* comb. nov. a new placement for the Alismataceae pathogen *Rhynchosporium alismatis*. Mycological Research 108: 775-780.
- Reuveni R., Krikun J. and Shani U. 1983. The role of *Monosporascus eutypoides* in collapse of melon plants in an arid area of Israel. Phytopathology 73: 1123-1126.
- Seifert, K. A. 1996. *Plectosporium tabacinum*. Canadian Journal of Plant Pathology 18: 309-311.
- Stravato V. M., Farano F. and Cappelli C. 2002. Malattie emergenti in provincia di Latina. Informatore Agrario 49: 55-57.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution 28(10): 2731-2739.
- Uecker F. A. 1993. Development and cytology of *Plectosporium cucumerina*. Mycologia 85: 470-479.
- Watanabe T. 1979. *Monosporascus cannonballus*, an ascomycete from wilted melon roots undescribed in Japan. Annual Phytopathology Society of Japan 51: 272-275.
- Westerlund, F. V., Jr., Campbell, R. N. and Kimble, K. A. 1974. Fungal root rots and wilt of chickpea in

- California. *Phytopathology* 64: 432-436.
- White T. J., Bruns T., Lee S. and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, pp. 315–322. In: M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T.J. White (Eds). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, California.
- Xu J., Xu X. D., Cao, Y. Y. and Zhang W. M. 2014. First report of greenhouse tomato wilt caused by *Plectosphaerella cucumerina* in China. *Plant Disease* 98(1): 158.
- Zare R., Gams W., Starink-Willemse M. and Summerbell R. C. 2007. *Gibellulopsis*, a suitable genus for *Verticillium nigrescens*, and *Musciellium*, a new genus for *V. theobromae*. *Nova Hedwigia* 85: 463–489.
- Zizzerini A. and Tosi L. 1987. New sunflower disease caused by *Fusarium tabacinum*. *Plant Disease* 71: 1043–1044.
- Zhang, Y. Y., Li, M. Liang, Y., Zhou, H. Y. and Zhao, J. 2015. First report of sunflower wilt caused by *Plectosphaerella cucumerina* in China. *Plant Disease* 99: 1646.