بیماری‌های گیاهی / جلد ۵۸ / شماره ۴/ سال ۱۴۰۱: ۲۴۰-۲۳۱ DOI: 10.22034/ijpp.2023.1996425.402

CC BY

مقاله پژوهشی

شناسایی عوامل پوسیدگی داخلی غوزه پنبه در استان‌های تهران، هرمزگان وگلستان*

مرتضی عرب سلمانی[1]**، زینب سادات طباطبایی[2] و حشمت‌الله امینیان[2]

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۱/۰۶؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۲۴)

چکیده

بیماری پوسیدگی داخلی غوزه یکی از بیماری‌های مهم پنبه است. همه ارقام تجاری پنبه به ویژه ارقام بومی، حساس به بیماری می‌باشند. بیماری در پسته، سویا و فلفل گزارش شده است. تغییر شکل و کاهش وزن غوزه، ریزش غنچه، گل و غوزه و ظهور لکه‌قهوه‌ای بر روی الیاف از علایم بیماری در پنبه می‌باشند. به منظور شناسایی عامل بیماری، ۱۷۸ نمونه غوزه آلوده از استان‌های تهران، گلستان و هرمزگان جمع آوری و از آنها ۱۷ جدایه مخمری جداسازی و بیماری‌زایی آنها بر روی غوزه پنبه و میوه فلفل دلمه‌ای ارزیابی شد. برای جداسازی عوامل از محیط PDA حاوی عصاره مخمر در دمای ۳۰درجه سلسیوس استفاده شد. شناسایی با روش تکثیر بخشی از DNA ریبوزومی به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و آغازگر ITS1- ITS4 صورت گرفت. تمام ۱۷ نمونه جداسازی شده در پنبه و میوه فلفل دلمه‌ای بیماری‌زا بودند. گونه *Filobasidium magnum* برای اولین بار از استان تهران و گونه *Meyerozyma guilliermondii* برای اولین بار از ایران به عنوان عوامل پوسیدگی داخلی غوزه پنبه گزارش می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: مخمر، فلفل دلمه‌ای، *Meyerozyma guilliermondii*، *Filobasidium magnum*.

*بخشی از نتایج طرح تحقیقاتی 92101-07-41-2 سازمان تحقیقات،آموزش و ترویج کشاورزی و پایان نامه نگارنده دوم ارایه شده به دانشکده فناوری کشاورزی (ابوریحان) دانشگاه تهران،تهران،ایران.

**مسئول مکاتبات،پست الکترونیکی Mortezaarabsalmani@yahoo.com .

۱. استادیار پژوهش بیماری‌شناسی گیاهی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی تهران،تهران،ایران.

۲. دانش آموخته کارشناسی‌ارشد بیماری‌شناسی و استاد دانشکده فناوری کشاورزی(ابوریحان)، دانشگاه تهران،تهران،ایران.

Iran. J. Plant Path., Vol. 58, No .4, 2022: 231-240

CC BY

DOI: 10.22034/ijpp.2023.1996425.402

Research Article

Identification of internal boll rot of cotton in Tehran, Golestan and Hormozgan provinces*

Morteza Arab- Salmani[**1] , **Zeynab sadat Tabatabae**[2] **and Heshmatollah Aminian**[2]

(Received: 26.03.2023; Accepted: 15.11.2023)

Abstract

Internal boll rot disease is one of the important diseases of cotton. All commercial cotton cultivars, especially the native varietes, are susceptible to the disease. The disease has been reported in pistachio, soybean, and pepper. Changes in the shape and weight of bolls, shedding of buds, flowers and bolls, and the appearance of brown spots on the fibers are symptoms of the disease in cotton. In order to identify the casual agent of the disease, 178 infected boll samples were collected from Tehran, Golestan and Hormozgan provinces, and 17 isolates were obtained from them, and their pathogenicity was evaluated in cotton and bell peppers. Agents were isolated in PDA medium containing yeast extract at a temperature of 30 degrees Celsius. Molecular identification was done by amplification of a part of ribosomal DNA by polymerase chain reaction and ITS1-ITS4 primers. All 17 samples isolated in cotton were pathogenic in Cotton and bell pepper. Two yeast species were identified, *Filobasidium magnum* was identified for the first time from Tehran province and *Meyerozyma guilliermondii*

Key words : Yeast**,** *Meyerozima guilliermondii, Fillobasidium magnum*, Bell pepper.

*. Part of the results of the research project No. 2-41-07-92101 of Agricultural Research, Education and Extension Organization and a part of M.Sc.thesis submitted by the second auther to College of Agricultural Technology (Abouraihan), University of Theran, Tehran, Iran.

**. Corresponding author, e-mail:Mortezaarabsalmani@Yahoo.com.

1. Assistant Professor of Plant Pathology, Agriculture and Natural Resources Research Center of Tehran, Tehran, Iran
2. Graduate student and Profesor of College of Agricultural Technology (Abouraihan), University of Theran, Tehran, Iran.

مقدمه

پوسیدگی داخلی غوزه پنبه از اکثر مناطق پنبه‌کاری دنیا گزارش شده است. در ایران علائم بیماری در تمام مناطق پنبه کاری که سن‌های غوزه پنبه فعالیت دارند، مشاهده می‌شود (Arabsalmani, 2012). علائم بیماری بسته به سن

غوزه پنبه متغیر می‌باشد. اگر غوزه‌هایی که دو هفته از عمر آنها گذشته است، مورد حمله عوامل ایجادکننده پوسیدگی داخلی قرار بگیرند، سیاه شده و ریزش می‌کنند. اما اگر ۴-۳ هفته از سن آنها گذشته باشد، اندازه و وزن غوزه‌ها کاهش یافته و رنگ الیاف آنها از سفید به زرد تا قهوه‌ای خاکستری تغییر می یابد. اگر سن غوزه‌های پنبه بیش از پنج هفته باشد و مورد حمله قرار گیرند، اندازه غوزه کاهش نمی‌یابد، ولی لکه‌های سیاه روی پوست غوزه و الیاف داخل غوزه زرد تا قهوه‌ای می‌شوند(Blinka *et al.*, 2010). این لکه ها باعث کاهش درجه الیاف پنبه می شوند. شکل ظاهری غوزه‌ها از حالت طبیعی خارج شده و پوست غوزه از داخل تغییر رنگ داده و به نارنجی متمایل می‌گردد(Garibyan & Avashia, *2013*). با پیشرفت بیماری غوزه‌ها متورم شده و مایع لزج و شیری تا کرمی رنگ، چسبنده با بوی ترشیدگی که در نتیجه فعالیت مخمرها ایجاد شده است از محل اتصال برچه‌ها خارج می‌شود. این بیماری سبب کاهش کیفیت وچسبیده شدن الیاف شده و باعث عدم جداشدن الیاف از دانه در کارخانه های پنبه پاک‌کنی می‌شود. تراوش‌های خشک شده روی الیاف مانع باز شدن الیاف از هم و لکه‌دار شدن آنها می‌شوند. تغییر شکل ظاهری غوزه نیز یکی از علایم این بیماری است. عوامل بیماری توسط سنک‌هایی ناقل از راسته *Hemiptera* و خانواده *Miridae* به داخل غوزه تزریق می‌شوند. گاهی دراثر تخمیر قندهایی که الیاف در حال رشد را احاطه نموده‌اند، تمام‌محتویات داخل غوزه پنبه به یک توده قهوه‌ای رنگ تبدیل می‌شود (Kirkpatrik & Rotrock, 2001). غوزه‌هایی که بیش از هشت هفته از سن آنها گذشته باشد، به دلیل عدم تغذیه سن‌های ناقل عامل‌بیماری آلوده نمی شوند. عوامل‌بیماری پوسیدگی داخلی غوزه پنبه متعلق به جنس‌های *Ashbya*، *Nematospora*، *Eremothecium* و *Spermophthora* گزارش شده اند (Marsas, 1967). مخمر *N. coryli* از مزارع پنبه کالیفرنیای آمریکا و اروپا گزارش گردیده است. این قارچ بیمارگرگیاهان خانواده بقولات و پسته می‌باشد. مخمر *N. gossypii* از مناطق پنبه کاری اوگاندا گزارش شده است. گونه *N. gossypii* در گیاهان راسته پنیرکان (Malvales) بیماری‌زا می‌باشد. مخمر *N. nagpuri* از هند و مخمر *N. phaseoli* از آفریقا از روی پنبه و گیاهان خانواده بقولات گزارش شده اند. مخمرهای *Spermophthora gossypii*, *Eremothecium cymblariae* و *E. ashbyi* به عنوان عوامل ایجادکننده بیماری از سودان گزارش شده‌اند. مخمر *Eremothecium coryli* عامل‌بیماری بر روی سویا که توسط سن‌های خانواده *Pentatomidae* انتقال می یابند، از کیوتو در ژاپن، گزارش‌شده است (Kurtzman & Suzuki, 2010). مخمرهای *Spermophthora gossypii*، *Eremothecium cymblariae* و *E. ashbyi* از سودان گزارش گردیده‌اند (Kimura *et al.*, 2008). اطلاعاتی در مورد بیماری پوسیدگی داخلی غوزه پنبه درایران تا سال ۱۳۹۱ انتشار نیافته است. در سال ۱۳۹۱ علایم بیماری از مناطق پنبه کاری توسط نگارنده گزارش، ولی عامل بیماری در ایران نامشخص اعلام شده و فقط به عامل بیماری در سایر کشورها اشاره شده است. بیماری مشابهی در پسته کاری‌های ایران شایع است که به بیماری فساد مغز پسته یا ماسو معروف است. در سال ۱۳۴۳ ،عامل این بیماری قارچی بنام *Nematospora coryli* مشخص شد(Arabsalmani, 2012). این پژوهش به منظورشناسایی عوامل بیماری پوسیدگی داخلی غوزه پنبه انجام شده است.

مواد و روش های بررسی

نمونه‌برداری:جمع‌آوری غوزه‌های آلوده (شکل۱) از مزارع پنبه استان تهران، گلستان و هرمزگان انجام گرفت. در مجموع ۱۷۸ نمونه غوزه آلوده جمع‌آوری شد. که از این نمونه‌ها شش پرگنه مخمری از استان‌تهران، سه پرگنه مخمری از استان‌گلستان و ده پرگنه مخمری از

استان‌هرمزگان جداسازی و کدگذاری شدند.

جداسازی و کشت عوامل مخمری: در زمان نمونه‌برداری، غوزه‌های جمع آوری شده ازتهران دارای شیرابه ولی غوزه‌های جمع‌آوری شده ازهرمزگان و گلستان فاقد شیرابه بودند. به همین دلیل باتغییراتی جزیی در روش میرزایی و همکاران (Mirzaei *et al.*, 2007)، ازنمونه های تهران شیرابه‌های خشک شده و همچنین دانه‌های آغشته به شیرابه برای کشت جدا شده و در مورد نمونه‌های گلستان و هرمزگان، الیاف و دانه‌های دارای علایم، پس از شستشوی سطحی و ضدعفونی کردن آن‌ها، آماده کشت شدند. بافت‌های جدا شده به ترتیب داخل آب مقطر سترون به مدت یک دقیقه شستشوی سطحی شدند و بعد داخل محلول سفید کننده تجاری ۱۰درصد حاوی ۰/۵ درصد هیپوکلریت سدیم به مدت ۵-۱۰ثانیه (برای قطعات شیرابه‌ی خشک جدا شده ۵ ثانیه و سایر قطعات نامحلول ۱۰ ثانیه) و در نهایت مجدداً داخل آب مقطر سترون، ۱-۳ مرتبه (قطعات خشک شیرابه ۱-۲ مرتبه و سایر قطعات ۳ مرتبه) و در مجموع به مدت ۱ دقیقه شستشو داده شدند (Mirzaei *et al.*, 2007). سپس قطعات سترون شده همراه با مقدار کمی آب سترون به داخل میکرولوله‌های۲ میلی‌لیتری منتقل شده و پس از ده دقیقه، با دستگاه به هم زن، مخلوط شده و سوسپانسیونی از آب مقطر و عوامل موجود در قطعات حاصل شد. از سوسپانسیون حاصل در داخل هر تشتک پتری، بسته به غلظت سوسپانسیون ۰/۵ تا ۱ میلی‌لیتر روی محیط کشتYPDA (سیب زمینی، دکستروز-آگار حاوی عصاره مخمر) قرارداده شد.

خالص‌سازی به روش تک پرگنه کردن: در ۵ مرتبه و هر مرتبه از کشت یک روزه و از پرگنه‌های نوظهور و کوچک برای خالص‌سازی استفاده شد. نمونه‌ها روی محیط YPDA حاوی اسیدلاکتیک و کشت و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند.

خالص‌سازی به روش کشت انتهایی ریسه: یکی از نمونه‌های مخمری پس از انجام مراحل خالص سازی تولید ریسه کرد که خالص‌سازی برای این نمونه در محیط آب آگار صورت گرفت. یک قطعه‌ی میسلیومی از کشت یک هفته‌ای قارچ، از محیط کشت PDA به‌صورت وارونه در مرکز تشتک پتری حاوی محیط کشت آب آگار قرار داده شد. تشتک‌های پتری به مدت ۲۴-۴۸ ساعت در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس نگه‌داری شدند. پس از گذشت این زمان، در زیر استرئومیکروسکوپ از حاشیه‌ی پرگنه‌ی قارچ با سوزن سترون، قطعات کوچک محیط کشت حاوی نوک ریسه برداشته‌شده و به محیط کشت PDA منتقل گردیدند (Burgess *et al.*, 1994). تمام جدایه‌ها در لوله‌های آزمایش حاوی محیط کشت PDA و عصاره مخمر کشت و در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس در انکوباتور قرار گرفتند. پس از یک هفته لوله‌ها به دمای چهار درجه سلسیوس جهت نگه‌داری طولانی مدت منتقل شدند.

آزمون اثبات بیماری زایی: آزمون اثبات بیماری‌زایی برای نمونه‌های جدا شده از غوزه‌های استان تهران و گلستان (بجز *M. guiliermondii*) بر روی غوزه پنبه جمع آوری شده از استان هرمزگان و برای نمونه *M. guiliermondii* و نمونه‌های جدا شده از غوزه‌های استان هرمزگان از غوزه‌های جمع آوری شده از شهرستان قلعه گنج استان‌کرمان استفاده شد. بدین منظور سوسپانسیون‌هایی با غلظت 10^6 از نمونه‌های خالص شده ،تهیه شد که شامل آب مقطر دوبار سترون و نمونه کشت‌شده در محیط PDA بودند. برای هر نمونه ۳ غوزه کاملاً سالم و عاری از علائم با ۳ اندازه کوچک (۲سانتی-متر)، متوسط (۳.۵ سانتی‌متر) و بزرگ (۵سانتی‌متر) انتخاب شد که از نظر سنی نیز به ترتیب حدود ۲ هفته، ۴ هفته و ۶-۵هفته سن داشتند. غوزه‌ها کامل شسته و ضدعفونی شدند. برای غوزه‌های بزرگ۲۰ میلی‌لیتر، برای غوزه‌های متوسط ۱۰ میلی‌لیتر و برای غوزه‌های کوچک ۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون تهیه شده ،توسط سوزن انسولین با طول سر

سوزن mm ۶ و قطر mm ۰/۲۵، برداشته شد و در سه طرف به داخل غوزه تزریق شد. در نهایت غوزه‌ها داخل ظرف‌های ضدعفونی شده همراه با پنبه آغشته به آب جهت حفظ رطوبت محیط قرار گرفتند. ظروف داخل پلاستیک فریزر قرار داده و در انکوباتور با دمای ۳۰درجه منتقل شدند. نمونه‌های شاهد نیز مشابه نمونه‌های فوق انتخاب و با آب مقطر سترون مایه‌زنی شدند. علاوه بر این تزریق به میوه فلفل‌دلمه‌ای متصل به بوته هم انجام شد.

شناسایی نمونه ها

شناسایی براساس شکل ظاهری: ظاهر سلول‌های مخمری در زیر میکروسکوپ ارزیابی شد. اکثر نمونه‌ها دارای شکل کروی با دیواره سلولی نسبتا قطور، با تغییرجزئی در قطر دیواره مشاهده می‌شدند و غیر قابل تفکیک بودند. در چند مورد هم اشکال چند سلولی سوسیسی فرم و یا قایقی شکل مشاهده شد. با توجه به بسیار ریز بودن سلول‌ها برای دیده شدن جدایه‌ها، از میکروسکوپ دیجیتال دینولایت (Dino-Lite) ساخت کشور تایوان، مدل am-4113zt استفاده شد.

شناسایی مولکولی: استخراج DNAژنومی جدایه‌ها،با استفاده از تلفیق روش عمومی جداسازی DNA قارچ های ریسه ای توسط صدیقی و همکاران(Siddiquee *et al.*, 2007) و وایلند(Weiland, 2002) با کمی تغییر انجام شد. همچنین از کیت استخراج DNA پیشگامان (شرکت پیشگامان، ایران) مطابق با پروتکل شرکت برای استخراجDNA استفاده شد. DNA استخراج شده تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. ازجفت آغازگر ITS1 و ITS4 پیشنهاد داده شده توسط رومی و همکاران (Romi *et al.*, 2014) برای تکثیر DNA ژنومی مخمرها استفاده شد.آغازگرها از شرکت چینی سانشی بیوتکنولوژی (Shanghai Generay Biotechnology China)دریافت شدند(جدول۱). جهت بررسی کیفیت محصول PCR، کلیه نمونه‌ها توسط الکتروفورز افقی در ژل آگارز یک درصد بررسی شدند. هر نمونه شامل ۶ میکرولیتر از محصول PCRبود که با مقدار ۱/۵ میکرولیتر بافر بارگذاری مخلوط و درون چاهک مربوطه ریخته شد. جهت تخمین اندازه قطعات نوکلئیک اسید از نشانگرهای DNA حاوی قطعات مختلف با اختلاف اندازه ۱۰۰ و ۵۰ جفت باز ساخت شرکت سمبیوهلند (Smobio) استفاده شد. برای این منظور چهار میکرولیتر از این نشانگر در چاهک مربوطه ریخته شد. پس از ریختن تمام نمونه‌ها در چاهک‌ها الکتروفورز با ولتاژ ۱۰۰ و به مدت یک ساعت انجام شد. پس از این مدت، ژل به مدت ۳۰ دقیقه در محلول اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و سپس در آب مقطر شستشو داده شد. سپس مشاهده و عکس‌برداری از باندهای DNA موجود، در ژل با دستگاه Transilluminator UV ساخت شرکت BioDoc-It انجام شد. برنامه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در شرایط زیر انجام شد. واسرشت اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت پنج دقیقه، و سپس ۳۵ چرخه شامل: واسرشت سازی در دمای۹۴ به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمرها در دمای ۶۱ و مدت ۴۵ ثانیه، بسط در دمای ۷۲ به مدت دو دقیقه و بسط نهایی نیز در دمای ۷۲ به مدت دو دقیقه تنظیم گردید. محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مربوط به دو جدایه O_6 و G_1 توسط شرکت Bioneer در کره‌جنوبی خالص و با دو بار خوانش در دو جهت مستقیم و معکوس تعیین توالی شدند. توالی‌های حاصل از این دوجدایه با استفاده از نرم‌افزار آنلاین BLASTn در سایت NCBI با توالی‌های موجود در بانک جهانی ژن مقایسه شدند. درخت فیلوژنتیک با استفاده از روش کمترین فرگشت (Minimum Evolution) با کمک نرم‌افزار MEGA 11.0 (Tamura *et al.*, 2021) به دست آمد. فواصل فرگشتی با استفاده از روش دو پارامتری Kimura محاسبه شدند. نرخ تغییرات با توزیع گاما (پارامتر شکل = ۱) محاسبه شد. درخت MEبا استفاده از الگوریتم Close-Neighbor-Interchangeدر

سطح ۱ جستجو شد. الگوریتم نزدیکترین همسایه برای تولید درخت اولیه استفاده شد. همه موقعیت هایی که شامل گپ بودند نیزحذف شدند.

جدول ۱. فهرست آغازگرهای استفاده شده در این پژوهش.

Table 1. List of primers used in this stuty.

primer	Number of nucleotides	Sequence	GC	Melting point
ITS1	19	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′	63%	57
ITS4	20	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3	44%	50.77

نتایج و بحث

علایم آلودگی

غوزه‌هایی با علایم متفاوت از مزارع استان‌های تهران،گلستان و هرمزگان جمع‌آوری گردید (شکل۱). عامل‌بیماری از آنها جدا و بیماری‌زایی آنها در پنبه و میوه فلفل دلمه‌ای مشخص شد (شکل۱). بدشکلی غوزه‌ها، ملکوک و زردشدن الیاف و چسبیده شدن آنها به هم، کم رنگ شدن رنگ سبز غوزه ها از نشانه های آلودگی بودند. همچنین پوست غوزه از داخل تغییر رنگ داده و به نارنجی متمایل می‌گردید. در مراحل پیشرفته غوزه‌ها متورم شده و از محل اتصال لبه‌ها مایع لزج و شیری تا کرمی رنگ و چسبنده خارج می‌شود. بد شکلی میوه، زرد و سپس قرمز شدن پوست آن مهمترین علایم بیماری در فلفل دلمه‌ای می باشد (شکل ۲). در اکثر مزارعی که علایم بیماری مشاهده می شود،فعالیت سنک‌های غوزه پنبه قابل توجه بوده و به وفور مشاهده می شدند.

شکل ۱. علایم بیماری پوسیدگی داخلی غوزه پنبه.

Fig 1. Symptoms of internal boll rot disease of cotton.

شکل ۲. ظهور علایم بیماری در فلفل‌دلمه‌ای.

Fig 2. Symptoms of internal boll rot disease on bell Pepper.

شکل شناسی حجدایه ها

پرگنه‌های مخمری بدست آمده از غوزه‌ها، خالص شده و اطلاعات مربوط به خصوصیات ظاهری ثبت شدند (جدول۲). برخی از پرگنه‌ها از نظر طیف رنگی با یکدیگر متفاوت بودند (شکل ۳). پرگنه‌ها غالبا سفید، کرم و برخی با هاله‌ای صورتی رنگ همراه بودند. در برخی از کشت‌ها پرگنه‌ها تغییر رنگ‌های مختصری داشتند که می‌توان تغییر شرایط را از عوامل این تغییرات دانست. تصاویر میکروسکوپی نمونه‌ها در دمای ۳۰ درجه سلسیوس غالبا سلول‌های کروی و نسبتا بی‌رنگی را نشان می‌داد. یکی از جدایه‌ها با کد O_5 در مرحله ای به شکل ریسه‌ای نیز ظاهر شد. این جدایه (کد O_5) که در تاریکی نگه‌داری شده بود پس از ۱۰ روز تولید پرگنه‌هایی به رنگ ارغوانی با ریسه‌هایی سفید نمود که رنگ محیط را نیز به ارغوانی تغییر داد. پس از تکرار این عمل این نتیجه بدست آمد که عامل تاریکی طولانی مدت علت این تغییر فاز می‌تواند باشد. لذا پیشنهاد می شود از تغییرات مدت زمان نگه‌داری پرگنه‌ها در تاریکی و نور جهت ظهور مرحله ریسه ای مخمرها استفاده شود. تصویر میکروسکوپی تهیه شده از *M. guilliermondii* نیز سلول‌های دوقلوی کروی و کوچکی را نشان داد که در کنار هم قرار گرفته و در ابتدا ظاهری استوانه‌ی دارد که با اندکی دقت متوجه دوسلولی بودن آنها می‌توان شد.

بررسی‌های ملکولی

با توجه به ظهور باند نسبتا مناسب بر روی ژل آگارز، به نظر می رسد پروتوکل فنول کلروفرم کارایی مناسبی برای استخراج DNA ژنومی مخمرها دارد. امینی و همکاران نیزبا استفاده از پروتوکل فنول و کلروفورم توانستند ژنوم مخمرهایی از شالیزارهای ایران متعلق به جنس *Pseudozyma* را جداسازی و مورد استفاده قرار دهند (Amini *et al.*, 2015_). باندهای حاصل از این دو آغازگر برای برخی از جدایه‌ها در برخی از دماهای اتصال مناسب و با کیفیت به نظر می‌رسیدند. امینی و همکاران (Amini *et al.*, 2015) و مختارنژاد و همکاران (Mokhtarnejad *et al.*, 2015) با استفاده از جفت آغازگر NL1-NL4 توانستند ژنوم مخمرهایی از شاخه‌آسکومایکوتا و بازیدیومایکوتا را تکثیر نمایند. واکاوی فیلوژنتیکی دو گونه *F. magnum* و *M. guilliermondi* به صورت همزمان انجام شد

شکل ۳. پرگنه پرگنه جدایه‌های مخمر عامل بیماری پوسیدگی داخلی غوزه پنبه در روی YPDA .

Fig 3. Colony of yeast isolates of the causal agent of cotton internal boll rot disease onYPDA.

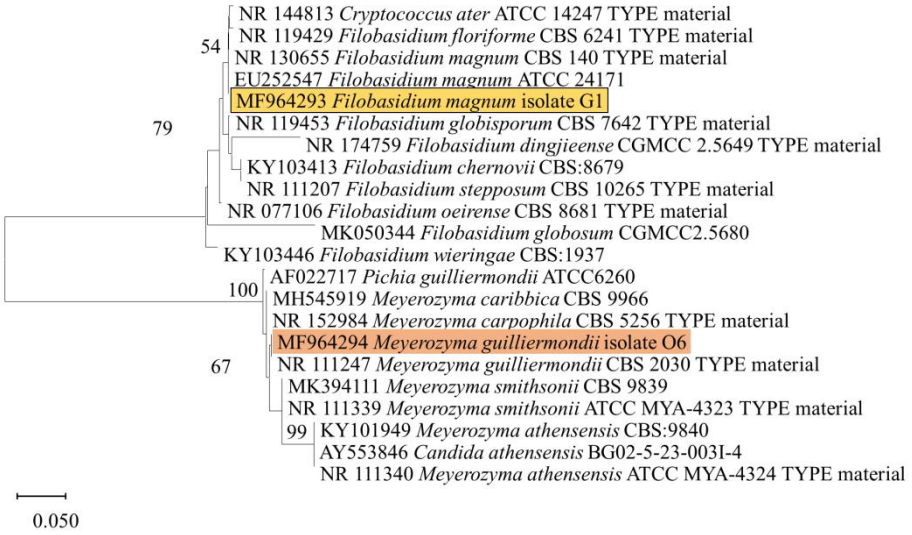
جدول ۲. مشخصات جدایه های مخمری بدست آمده در این پژوهش

Table 2.Charactristies of the yeast isolates used in this stuty.

COLOR AND FORM OF COLONY	PROVIENCE	CODE OF ISOLATES
Colony white to cream,with irregular border and flat surface,texture of colony doughy and without elasticity.	Tehran	O_1
Colony white ,with irregular border and flat surface,texture of colony doughy and without elasticity.	Tehran	O_2
Colony white ,with perfectly round and flat surface,texture of colony doughy and elasticity.	Tehran	O_3
Colony white to cream, with perfectly rounded border and raised surface.	Tehran	O_4
A: Hyphae stage: First, purple-colored raised and gradually grow and uniformly purple. B: Yeast stage: very low density growth and small number of colony, Colony white to pinkish with completely rounded border and raised surface.	Tehran	O_5
Colony white to cream, with perfectly round and raised surface.	Tehran	O_6
Colony first light brown and later white to pink, with completely rounded border and perfectly raised surface.	Golestan	G_1
Colony first light brown and flat , later white,with irregular border .	Golestan	G_2
Colony milky to white, watery and elastic,with a flat surface and a relatively round border.	Golestan	G_3
Colony watery,transparent, elastic and completely flat with a relatively round border .	Hormozgan	B_3
Colony transparent, watery, elastic and very low growth .	Hormozgan	B_4
Colony transparent, watery and elastic membrane, completely flat and with a relatively round border .	Hormozgan	B_5
Colony transparent, watery and elasic membrane, completely flat and with a relatively round border .	Hormozgan	B_6
Colony transparent, watery and elastic membrane, completely flat and with a relatively round border .	Hormozgan	B_7
Colony transparent, watery and elastic membrane, completely flat and with a relatively round border .	Hormozgan	B_8
Colony transparent, watery and elastic membrane, completely flat and with a relatively round border .	Hormozgan	B_9
Colony transparent, watery and elastic membrane, completely flat and with a relatively round border .	Hormozgan	B_{10}

(شکل های ۴). نتایج حاصل از تجزیه توالی‌ها منجر به تفکیک جدایه‌های مورد بررسی و موید ماهیت گونه‌ای متفاوت آنها است. ارزیابی شباهت توالی ناحیه ITS جدایه‌های ایرانی با گونه‌های تیپ موجود در بانک ژن نشان داد که جدایه O6 ایرانی به میزان ۴۷. ۹۹ درصد شباهت به گونه تیپ *Meyerozima guilliermondii* دارد. بنابراین جدایه O6 به عنوان گونه *M. guilliremondii* تشخیص داده شد و با کد MF964294 در بانک جهانی ژن

NCBI ثبت شد. سایر محققین نیزجدایه‌هایی که آنالیز فیلوژنتیکی بین ۷۹ تا ۱۰۰ درصد شباهت به گونه *Meyerozima guilliermondii* داشتند، به عنوان این گونه در نظر گرفته اند (Valsalan & Mathew, 2020). شباهت توالی جدایه G1 ایرانی با گونه تیپ *Filobasidium magnum*، (توالی KY103433) ۱۰۰ درصد بود. بنابراین جدایه G1 به عنوان گونه *F. magnum* تشخیص داده و با کد MF964293 در بانک جهانی ژن NCBI ثبت شد. سایر محققین نیز جدایه‌هایی که آنالیز فیلوژنتیکی بطور میانگین ۹۰ درصد (با دامنه ۸۸/۷ تا ۱۰۰ درصد) شباهت به گونه *F. magnum* داشتند، به عنوان این گونه در نظر گرفته اند (Haelewaters *et al*., 2021).



شکل ۴. واکاوی فیلوژنتیک بر اساس ناحیه ITS برای ۲۲ توالی با استفاده از نرم افزار MEGA 11 درخت فیلوژنتیک با استفاده از روش کمترین فرگشت (Minimum Evolution) به دست آمده است. نتایج آزمون بوت استراپ (>50%)روی شاخه‌ها نوشته شده است.

Fig 4. Phylogenetic analysis of ITS region for 22 sequences using MEGA 11.0 software. The evolutionary history was inferred using the Minimum Evolution method. Bootstrap values (>50%) are shown above the branches.

در نتیجه این تحقیق دو گونه مخمر جدید به عنوان عامل پوسیدگی داخلی غوزه پنبه در ایران شناسایی شدند. یک گونه از استان‌تهران و با نام *Meyerozyma guilliermondii* و دیگری از استان‌گلستان با نام *Filobasidium magnum* شناسایی شدند. گونه *M. guilliermondii* برای اولین بار از روی میزبان پنبه از استان تهران و *F. magnum* نیز برای اولین بار از ایران و از روی میزبان پنبه گزارش می‌شود. نمونه هایی که از هرمزگان جمع آوری،و مشخصات آنها در جدول ۲ ذکر شده است اگرچه در روی پنبه بیماری‌زا بودند ولی شناسایی قطعی نشدند.

تشکر و قدردانی

از سازمان تحقیقات،آموزش و ترویج کشاورزی به دلیل تخصیص اعتبار پژوهشی، پردیس ابوریحان ومرکز تحقیقات وآموزش کشاورزی و منابع طبیعی تهران به خاطر همکاری در این پژوهش تشکر و قدردانی می‌شود.

References **منابع**

Amini L., Soudi M.R. and Nasr Sh. 2015. Isolation of yeasts from rice farms and study of secretory enzyme profile in two species of the genus Pseudozyma. Journal of Molecular and Cellular Research 28: 23 - 34. 20.1001.1.23832738.1394.28.1.3.8

Arabsalmani M. 2012. Cotton diseases,diagnosis and their Management. Agricultural Education Press. Tehran., Iran. 240pp

Blinka E. L., Herbert A., Malone S., VanDuyn J. W., Roberts P., Bradley J. R. and Bacheler J. S. 2010. Relationship between external stink bug (Hemiptera: Pentatomidae) boll-feeding symptoms and internal boll damage with respect to cotton lint gin-out and fiber quality. Journal of Economic Entomology 103(6): 2236-2241.10.1603/ec10122

Burgess L.W., Summerell B.A., Bullock S., Gott K.P. and Backhouse D. 1994. Laboratory anual for Fusarium research. Third edition. Department of Crop Sciences, and Royal Botanic Garden, University of Sydney, Australia., University of Sydney Press

Garibyan L. and Avashia N. 2013. Polymerase Chain Reaction. Journal of Investigative Dermatology 133: 1-4. 10.1038/jid.2013.1

Haelewaters D., Urbina H., Brown S., Newerth-Henson S. and Aime M.C. 2021. Isolation and molecular characterization of the romaine lettuce phylloplane mycobiome. Journal of Fungi 7(49):1-27.2309-608X/7/4/277

Kimura SH., Tokumaru S. and Kuge K. 2008. Eremothecium ashbyi causes soybean yeast-spot and is associated with stink bug, Riptortus clavatus. Journal of General Plant Pathology 74: 275-280. 10.1007/s10327-008-0097-1

Kirkpatrik T.L. and Rotrock C.S. 2001. Compendium of Cotton Diseases. APS Press,77p

Kurtzman C. K. and Suzuki M. 2010. Phylogenetic analysis of ascomycete yeasts that form coenzyme q-9 and the proposal of the new genera Babjeviella, Meyerozyma, Millerozyma, Priceomyces, and Scheffersomyces. Mycoscience 51(1):2-14. 10.1007/s10267-009-0011-5

Marsas W. F. O. 1967. Cotton staining caused by Crebrothecium ashbyi (= eremothecium ashbyi) In South Africa. Bothalia-African Biodiversity and Conservation 10(3) 407-410. 10.4102/abc.v10i3.1543

Mirzaei S., Mohammadi Goltapeh E. and Shams-Bakhsh M. 2007. Taxonomica studies on the genus Botrytis in Iran. Jornal of Agricultural Technology. 3(1): 65-76.

Mokhtarnejad L., Arzanlo M., Baba Ahari A. and Turchetti B. 2015. Molecular identification of basidiomycetous yeasts from soils in iran. Rostaniha 16(1): 61-80.10.22092/botany.2015.101997

Romi W., Keisam S., Ahmed G. and Jeyaram K. 2014. Reliable differentiation of meyerozyma guilliermondii from meyerozyma caribbica by internal transcribed spacer restriction fingerprinting. BMC Microbiology 14(1):52-56. 10.1186/1471-2180-14-52

Siddiquee S., Abdullah F., Tan S.G. and Aziz E.R. 2007. Phylogenetic relationships of Trichoderma harzianum based on the sequence analysis of the internal transcribed spacer region-1 of the rDNA. Journal of Applied Sciences Research 3: 896-903. 10.4236/ajps.2012.33045

Tamura K., Stecher G. and Kumar S. 2021. MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. Molecular Biology and Evolution 38: 3022-3027. 10.1093/molbev/msab120

Valsalan R. and Mathew D. 2020. Draft genome of Meyerozyma guilliermondii strain vka1: a yeast strain with composting potential. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology18(1): 1-6. 10.1186/s43141-020-00074-2

Weiland J. 2002. Rapid procedure for the extraction of DNA from fungal spores and mycelia. Fungal Genetics Newsletter 44:60-63. 10.4148/1941-4765.1290