گزارش علمی کوتاه

نخستین گزارش از *Alternaria alternata* به عنوان عامل لکه برگی *Sambucus ebulus* در ایران

امین علیدادی[۱]، اسماعیل شمس[۱]، سمیرا کریم‌زاده[۲] و محمد جوان نیکخواه[۳*]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۲/۲۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۷/۴)

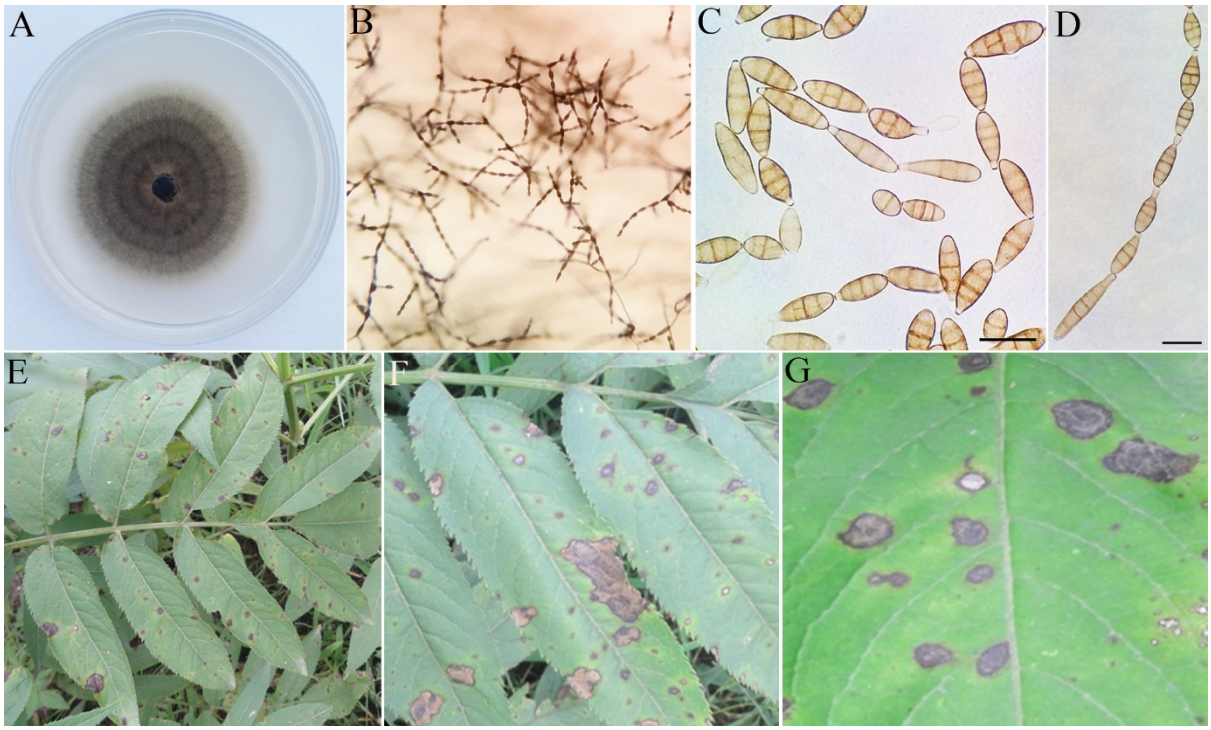
گیاهان دارویی از دیرباز ارتباط نزدیکی با زندگی انسانی داشته و برای درمان برخی بیماری‌های انسانی استفاده شده اند. گیاه آقطی با نام علمی *Sambucus ebulus* (*Caprifoliaceae*) از گونه های ارزشمند و دارویی از زمان قدیم است و بومی مناطق جنوبی و مرکزی اروپا، شمال غربی آفریقا و جنوب غربی آسیا (به ویژه شمال ایران) می‌باشد (Westwood 1985; Jabbari *et al.* 2017). این گونه نقش مهمی در طب سنتی بسیاری از کشورها در مناطق مختلف دنیا دارد (Jabbari *et al.* 2017). در تابستان سال ۱۳۹۳ بیماری لکه‌برگی روی گیاهان آقطی در استان‌های گیلان و مازندران مشاهده شد. علائم بیماری بر روی برگ‌های آلوده به صورت لکه‌های نکروزه، قهوه ای رنگ با هاله قهوه‌ای تیره و به شکل دایره‌ای تا نامنظم مشاهده گردید. در تابستان سال ۱۳۹۳ و ۱۳۹۴ از گیاهان دارای علائم بیماری در استان‌های گیلان و مازندران نمونه برداری صورت پذیرفت و جداسازی قارچ‌ها در محیط کشت‌های آب آگار ۲٪ (WA 2%) و سیب زمینی دکستروز آگار (PDA) انجام گرفت. خالص سازی جدایه‌های قارچی به روش برداشتن نوک ریسه در محیط کشت PDA انجام شد. به منظور بررسی ریخت شناختی، جدایه‌ها روی محیط سیب زمینی-هویج-آگار (PCA) کشت و در شرایط نور سفید فلورسنت با دوره روشنایی/ تاریکی ۱۶/۸ ساعته و دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۷ روز قرار گرفتند (Simmons 2007). پرگنه روی محیط PCA به رنگ سبز زیتونی تیره تا قهوه‌ای و قطر رشد آن پس از ۷ روز برابر با ۷۰-۶۵ میلی‌متر اندازه گیری شد. کنیدیوفورهای اولیه اغلب به صورت منفرد و به طول ۷۰ میکرومتر می‌باشند و زنجیره‌های کنیدیومی بلند و فاقد انشعاب از کنیدیوم‌های را تولید می‌کنند. کنیدیوم‌ها اغلب به صورت تخم مرغی یا گرزی شکل حاوی ۵-۳ دیواری عرضی و ۱-۲ دیواره طولی بوده و به ابعاد ۵۴-۲۰×۱۲-۸ میکرومتر می‌باشند (شکل ۱، A-D). بر اساس خصوصیات ریخت شناسی قارچ‌های جدا شده به عنوان گونه *A. tenuissima* شناسایی شدند (Simmons 2007). در مطالعات انجام شده توسط ودنبرگ و همکاران (۲۰۱۵) این گونه در حال حاضر تحت نام *A. alternata* نامگذاری شده است (Woudenberg *et al.* 2015).

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: jnikkhah@ut.ac.ir

۱. کارشناس‌ارشد، گروه گیاهپزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج

۲. دانشجوی کارشناس‌ارشد، گروه گیاهپزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج

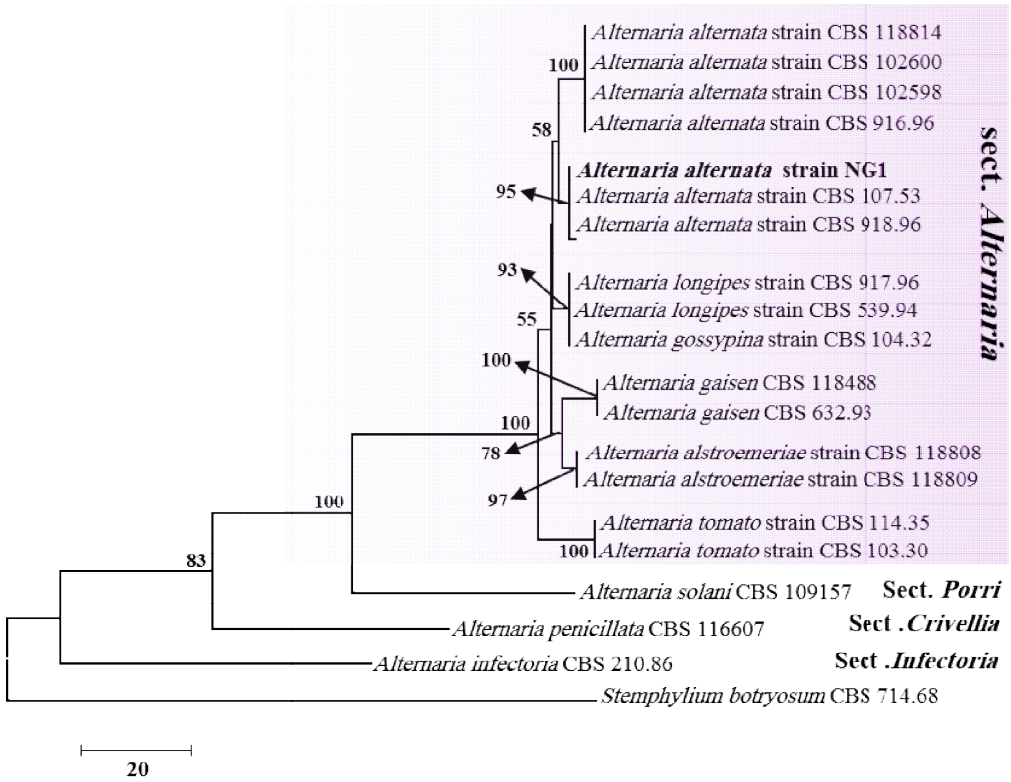
۳. استاد، گروه گیاهپزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج



شکل ۱. (*Alternaria alternata* (A-C جدایه NG1، A. پرگنه روی محیط PCA پس از ۷ روز، B. الگوی اسپورزایی، C-D. کنیدیوم‌ها و زنجیرهای کنیدیومی. (E-G) علائم بیماری لکه برگی روی گیاه *Sambucus ebulus*، E-F. علائم لکه برگی روی برگ‌های گیاه در استان گیلان، G. علائم ایجاد شده توسط تلقیح مصنوعی گیاه توسط جدایه‌های *A. alternata* پس از ۷ روز.

Fig 1. (A-C) Alternaria alternata isolate NG1, A. Colony on PCA medium after 7 days, B. Sporulation pattern, C-D. Conidia and conidial chain. (E-G) Symptoms of leaf spot disease of Sambucus ebulus, E-F. Leaf spot symptoms on leaves in Gilan province, G. Leaf spot symptoms on artificially inoculated leaf with A. alternate isolates 7 days after inoculation. (scale bar = 20 µm).

تکثیر نواحی ITS از دی ان ای ریبوزومی توسط جفت آغازگرهای ITS4/ITS1 (White *et al.* 1990) و تکثیر بخشی از ناحیه *rpb2* توسط آغازگرهای RPB2–5F2/ fRPB2–7cR (Sung *et al.* 2007; Liu *et al.* 1999) صورت پذیرفت. توالی‌های مربوط به ناحیه ITS و *rpb2* جدایه NG1 به ترتیب با کد دستیابی MK212914 و MK262741 در بانک ژن ثبت گردید. همچنین این جدایه در کلکسیون میکروبی پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی با شماره دستیابی ABRIICC 10119 نگهداری می‌گردد. ترسیم تبارنمای فیلوژنتیکی با استفاده از روش ماکسیموم پارسیمونی (Maximum Parsimony) و با استفاده از نرم افزار MEGA 6.0 انجام گرفت (Tamura *et al.* 2013). نتایج آنالیزهای فیلوژنتیکی نشان داد که جدایه مورد مطالعه با درجه اعتبار سنجی بالا (۱۰۰٪) در کنار جدایه‌های بخش *Alternaria* (sec. *Alternaria*) و همچنین در کنار گونه‌های دیگر *A. alternata* قرار می‌گیرد (شکل۲). اثبات بیماری‌زایی جدایه‌ها به روش پاشش اسپور روی برگ‌های سالم بریده شده گیاه انجام شد. تعداد ۱۰ برگ بریده شده گیاه به ازای هر جدایه توسط آب استریل شستشو و سوسپانسون اسپور به غلظت ۱×۱۰^{۶} در میلی‌لیتر روی آن‌ها پخش گردید. تعداد ۱۰ برگ بریده شده نیز به عنوان کنترل در نظر گرفته شد و فرآیند تلقیح با استفاده از آب مقطر استریل روی آن‌ها انجام شد. پس از 5 روز علائم بیماری درست شبیه به علائم اولیه



شکل ۲. تبارنمای فیلوژنتیکی استنباط شده از ناحیه‌هایITS-rDNA و rpb2 با روش Maximum Parsimony. درجهاعتبار سنجی از ۱۰۰۰ تکرار بزرگتر از ۵۰٪ بالای هر شاخه نوشته شده است. گونه Stemphylium botryosum CBS 714.68 به عنوان گروه خارجی انتخاب شده است.

Fig 2. Gene tree constructed using Maximum Parsimony method based on phylogenetic analysis of the nucleotide sequences of combined ITS-rDNA and rpb2 regions. Bootstrap support from 1000 replicates higher than 50% are given above each branch.

مشاهده شد و قارچ عامل بیماری مجددا از بافت آلوده جداسازی و شناسایی گردید (شکل ۱، E-G).

قارچ بیمارگر *A. alternata* یکی از گونه های مهم بیماری زای گیاهی با پراکنش وسیع جهانی می‌باشد و از طیف وسیعی از گیاهان جداسازی شده است (Domsch *et al.* 2007). این گونه یکی از پاتوژن‌های بسیار مهم گیاهی بوده و تاکنون از گونه‌های گیاهی متعددی ازجمله *Capsicum annuum*، *Solanum melongena* ، *Solanum lycopersicum*، *Solanum tuberosum* و *Medicago sativa* و میزبان مختلف دیگر به عنوان عامل بیماری لکه برگی در مناطق مختلف دنیا گزارش شده است (Li *et al.* 2011; Nasehi *et al.* 2012; Agamy *et al.* 2013Shahid *et al.* 2017; Abbasi *et al.* 2018;). در ایران نیز این گونه به عنوان عامل لکه برگی روی گونه‌های *Solanum tuberosum*، *Aloe vera* و *Populus euphratica* جداسازی و گزارش شده است (Ardestani *et al.* 2010; Abkhoo & Sabbagh 2014; Osdaghi *et al.* 2014). بر اساس بررسی منابع این اولین گزارش از بیماری‌زایی *A. alternata* روی گیاه *Sambucus ebulus* در ایران می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: لکه برگی، فیلوژنی، مورفولوژی، بیماری گیاهان دارویی.

First report of *Alternaria alternata* causing leaf spot on *Sambucus ebulus* in Iran

A. Alidadi, E. Shams, S. Karimzadeh, and M. Javan-Nikkhah[1*]

(Received: 18.5.2019; Accepted: 26.9.2019)

Medicinal plants have undoubtedly been considered by human beings since ancient times. *Sambucus ebulus* (*Caprifoliaceae*) is one of the best known medicinal herbs since ancient times and is native to Southern and Central Europe, Northwest Africa, and Southwest Asia (especially Northern Iran) (Westwood 1985; Jabbari *et al.* 2017). It plays an important role in traditional medicine in many countries from different regions of the world (Jabbari *et al.* 2017). During the summer of 2014, leaf spots have been observed on *S. ebulus* plants in Gilan and Mazandaran provinces, Iran. Symptoms on infected leaves appeared as brown necrotic spots that surrounded by distinct dark brown haloes and were circular to irregularly in shape. During the summer of 2014 and 2015, sampling was done in Gilan and Mazandaran provinces from symptomatic leaves of *S. ebulus* and the fungus was isolated on 2% water agar (WA 2%) and potato dextrose agar (PDA). Pure fungal cultures were obtained by picking up a single spore on PDA. For morphological identification, the isolates were cultured on Potato Carrot Agar medium (PCA) and incubated at 25 °C under cool-white fluorescent with 16 h dark, 8 h light photoperiod for 14 days (Simmons 2007). The seven-days-old colonies on PCA were dark olive to brown in color and 70 mm in diameter. Primary conidiophores were often simple, reached to 70 µm in length and produced numerous conidia in a simple long chain. The conidia were 8–12 × 20–45 µm in size, egg or club shaped and contained 3-5 transverse and 1-2 longitudinal septa (Fig. 1a-c). According to macro- and micro morphological characters, all recovered isolated were identified as *Alternaria tenuissima* which was later synonymized under the name of *A. alternata* by Woudenberg *et al.* (2015). PCR amplification of the nuclear ITS-rDNA and RNA polymerase II second largest subunit regions was performed using primers ITS1/ITS4 and RPB2–5F2/fRPB2–7cR respectively (White *et al.* 1990, Sung *et al.* 2007; Liu *et al.* 1999). The sequence of NG1 isolate was deposited into the GenBank with the accession numbers MK212914 for ITS-rDNA and MK262741 for *rpb2* region and living cultures of this strain were deposited in the Agriculture Biotechnology Research Institute of Iran culture collection (ABRII 10119). Phylogenetic estimates were evaluated using the Maximum Parsimony Analyses in MEGA 6.0 (Tamura *et al.* 2013). The results of phylogenetic study showed, NG1 isolate was clustered in a well-supported clade (100%) including sec. *Alternaria* and related to *Alternaria alternate* isolates (Fig. 2). Pathogenicity test was performed in greenhouse condition on the detached leaves taken from healthy *S. ebulus*. Ten healthy leaves per isolates were cleaned with sterile water and were inoculated with conidial suspension containing 1×10^6 conidia/mL using the spray method. The control leaves were inoculated with distilled water. Leaf spots similar to the original symptoms were observed on all inoculated leaves after 5 days since inoculation and the fungus re-isolated from leaf lesions (Fig. 1e-g). Also, no symptoms were seen in controls.

A. alternate is one of the important plant pathogen species with the worldwide distribution (Domesh *et al.* 2007) and has been reported as the causal agent of leaf spot disease on various hosts including *Capsicum annuum, Solanum melongena, Solanum lycopersicum, Solanum tuberosum* and *Medicago sativa* and various other hosts in the world (Li *et al.* 2011; Nasehi *et al.* 2012; Agamy *et al.* 2013; Zhao *et al.* 2016; Shahid *et al.* 2017; Abbasi *et al.* 2018). Additionally, there is a record of this fungus as the causal agent of leaf spot on *Solanum tuberosum*, *Alo vera* and *Populus euphratica* and *Eriobotrya japonica* in Iran (Ardestani *et al.*

* Corresponding author's email: jnikkhah@ut.ac.ir
1. Department of plant protection, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.

2010; Abkhoo & Sabbagh 2014; Osdaghi *et al*. 2014). To our knowledge, this is the first report of *A. alternata* as the cause of leaf spots on *Sambucus ebulus* plant in the world.

Keywords: Leaf spots, Phylogeny, Morphology, Medicinal plant disease.

منابع

Abbasi P. A., Ali, S., Renderos W., Naeem H. A. and Papadopoulos Y. 2018. First report of *Alternaria alternata* causing leaf spot and blight symptoms on alfalfa in Canada. Canadian Journal of Plant Pathology 40: 451-455.

Abkhoo J., and Sabbagh S. K. 2014. Evidence of *Alternaria alternata* causing leaf spot of Aloe vera in Iran. Journal of Phytopathology 162: 516-518.

Agamy R., Alamri S., Moustafa M. F. and Hashem M. 2013. Management of Tomato Leaf Spot Caused by *Alternaria tenuissima* Wiltshire using Salicylic Acid and Agrileen. International Journal of Agriculture and Biology 15: 266-272

Ardestani S. T., Sharifnabi B., Zare R. and Abbasi Moghadam A. 2010. New *Alternaria* species associated with potato leaf spot in various potato growing region of Iran. Iranian Journal of Plant Pathology 45: 83-86.

Domsch, K. H., Gams W. and Anderson, T. H. 2007. Compendium of soil fungi. 2nd ed. IHW –Verlag, Eching 672 Pp.

Jabbari M., Daneshfard B., Emtiazy M., Khiveh A. & Hashempur M. H. 2017. Biological effects and clinical applications of dwarf elder (*Sambucus ebulus* L): A review. Journal of evidence-based complementary & alternative medicine 22: 996-1001.

Li Y., Zhang D., Xu W., Wu Z., Guo M. and Cao A. 2011. *Alternaria tenuissima* causing leaf spot and fruit rot on pepper (*Capsicum annuum*): first report in China. New Dis Rep 24: 3.

Liu Y. J., Whelen S. and Hall B. D. 1999. Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerse II subunit. Molecular Biology and Evolution 16: 1799-1808.

Nasehi A., Kadir J. B., Abidin M. Z., Wong M. Y. and Mahmodi F. 2012. First report of *Alternaria tenuissima* causing leaf spot on eggplant in Malaysia. Plant Disease 96: 1226-1226.

Osdaghi E., Kakavandi N. R. and Nejati M. 2014. First report of *Alternaria alternata* causing leaf spot on *Populus euphratica* in Iran. Iranian Journal of Plant Pathology 50: 309-310.

Shahid A. A., Iftikhar S., Nawaz K., Anwar W. and Ali M. 2017. First report of *Alternaria alternata* causing brown leaf spot of potato in Pakistan. Journal of Plant Pathology 99: 287-304.

Simmons E.G. 2007. *Alternaria*: An Identification Manual. CBS Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands. 757 Pp.

Sung G. H., Sung J. M., Hywel-Jones N. L. and Spatafora J. W. 2007. A multi-gene phylogeny of *Clavicipitaceae* (*Ascomycota*, Fungi): Identification of localized incongruence using a combinational bootstrap approach. Molecular phylogenetics and evolution 44: 1204-1223.

Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A. and Kumar S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 Molecular biology and evolution 30: 2725-2729.

Westwood J. 1985. Albion: a guide to legendary Britain. London, England, Grafton books, 103 Pp.

White T. J., Bruns T., Lee S. J. W. T. and Taylor J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetic. PCR protocols: a guide to methods and applications 18: 315-322.

Woudenberg J. H. C., Seidl M. F., Groenewald J. Z., de Vries M., Stielow J. B., Thomma B. P. H. J. and Crous P.W. 2015. *Alternaria* section *Alternaria*: species, formae speciales or pathotypes? Studies in Mycology 82: 1-21.