اولین گزارش از وقوع سوختگی جوانه و سرشاخه درختان گلابی با عامل *Phoma glomerata* در ایران

First report of pear trees buds and twigs blight caused by *Phoma glomerata* in Iran

پرسا تیموری[1*] و سید وحید علوی[2]

دریافت: ۹۷/۱۰/۳۰ پذیرش: ۹۸/۳/۱۸

طی بازدیدهای انجام شده طی نیمه پایانی زمستان ۱۳۹۷ تا ابتدای بهار ۱۳۹۸ از باغات گلابی در استان مازندران، نشانه‌هایی مشابه سوختگی در سرشاخه‌ها و جوانه‌های جانبی مشاهده شد. به منظور بررسی و شناسایی عامل بیماری، نمونه‌های دارای علائم به آزمایشگاه منتقل گردید و پس از ضدعفونی سطحی توسط الکل اتانول ۷۰٪ و محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد در تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت آب آگار (WA) و سیب‌زمینی دکستروز آگار (PDA) همراه با ۱/۵ درصد آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین و استرپتومایسین کشت داده شد و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری گردید. پرگنه قارچ، ابتدا به رنگ کرم تا قهوه‌ای روشن و سپس به رنگ سبز تیره تغییر رنگ یافت و پس از پنج روز پیکنیدیوم‌های قارچ در محیط کشت ظاهر شدند. در نهایت خالص‌سازی جدایه‌های قارچی به روش نوک ریسه و تک اسپور انجام و جدایه‌های خالص درتشتک‌های حاوی محیط کشت PDA کشت داده شد. پیکنیدها تیره رنگ و تقریباً صاف با گردن نسبتاً بلند بوده و کنیدی‌های آن اغلب تک سلولی و تقریباً تخم‌مرغی شکل تا بیضوی و شفاف اما در توده اسپور تیره رنگ بودند. کلامیدوسپورهای آن نامنظم و در زنجیره‌های منشعب و غیرمنشعب به صورت میانی و انتهایی تشکیل شدند. بر اساس خصوصیات ماکروسکوپی و میکروسکوپی قارچ در محیط کشت و طبق توصیف ارائه شده توسط منابع معتبر علمی (Boerema *et al*., 2004)، گونه *Phoma glomerata* شناسایی شد. آزمون¬های بیماری¬زایی برروی ده نهال سالم یک ساله و شاخه‌های فاقد بیماری انجام شد. سوسپانسیون حاوی اسپورهای ثانوی با غلظت ($۱۰^{۶}$ × ۱ اسپور در میکرولیتر) روی آن‌ها پاشیده شد. گیاهان شاهد تنها با آب مقطر سترون آغشته شدند و پس از قرار دادن در محفظه پلاستیکی در دو دامنه دمایی ۲ ±۱۵ و ۲± ۲۳ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۹۰٪، در گلخانه نگهداری شدند. پس از ده روز علایم بیماری شامل لکه‌های زرد با حاشیه سوخته مشاهده شد که با علایم ارائه شده در منابع (Chuan and Chand, 1980) مطابقت داشت. گیاهان شاهد فاقد علائم مزبور بودند. به منظور تهیه توده میسلیومی جهت استخراج DNA ژنومی، از محیط غذایی PDB (Potato dextrose broth) استفاده شد. استخراج DNA به روش CTAB انجام گردید (Doyle and Doyle, 1987؛ امیردهی و همکاران، ۱۳۹۶). نواحی ژنومی ITS1-5.8S-ITS2 تکثیر و تعیین توالی شدند. جهت تکثیر این نواحی از ترکیب آغازگر ITS1 با توالی ('5-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') به عنوان آغازگر مستقیم و آغازگر ITS4 به عنوان آغازگر معکوس با توالی ('5-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') استفاده شد (White and Morgan, 1987؛ White *et al*., 1990). مخلوط واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۶/۵ میکرولیتر آب دیونیزه استریل، ۱۳/۵ میکرولیتر 2X PCR Master Mix، ۰/۵ میکرولیتر از هر آغازگر به غلظت نهایی ۱۰ پیکومول و ۴ میکرولیتر DNA طی واکنش زنجیره¬ای پلی‌مراز شامل واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت دو دقیقه و سپس ۳۸ چرخه تحت

۱- دانشجوی دکتری، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
۲- دانشیار، بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی مازندران، ساری، ایران
نویسنده مسئول مکاتبات: p_teymuri@yahoo.com

شرایط واسرشت‌سازی در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۰ درجه سلسیوس ۳۰ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سلسیوس ۳۰ ثانیه و گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفت و سپس محصول نهایی از طریق الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۲ درصد ارزیابی شد (White *et al*., 1990). پس از تعیین توالی و همردیف‌سازی با توالی‌های موجود در بانک ژن GenBank (NCBI) توسط نرم‌افزار BLAST مقایسه و شباهت جدایه‌های مورد نظر با قارچ *Phoma glomerata* (Corda) Wollenw & Hochapfel در سطح ۹۹ درصد مشخص گردید. قارچ *Phoma glomerata* اولین بار از کشور هند به عنوان عامل بیماری در فیکوس گزارش گردید (Mathur, 1979). همچنین این قارچ با علائم سرخشکیدگی و سوختگی جوانه‌های جانبی گلابی نیز برای اولین بار از هند گزارش شد (Chuan and Chand, 1980). در ایران نیز وجود این قارچ اولین بار بر روی گندم (صفایی و همکاران، ۱۳۷۹) گزارش گردید و پس از آن بر روی کدوئیان (حاتمی و همکاران، ۱۳۸۷)، فیکوس (آقاپور و همکاران، ۱۳۸۸)، نارنگی (رستمی و همکاران، ۱۳۹۲)، رزماری (Moshrefi Zarandi *et al.*, 2015) در مناطق مختلف ایران گزارش شد. بنابراین این قارچ تاکنون در ایران بر روی درختان گلابی گزارش نشده است و این اولین گزارش از وقوع سوختگی جوانه و سرشاخه با عامل قارچی *Phoma glomerata* روی درختان گلابی (*Pyrus communis*) در ایران است.

واژگان کلیدی: توالی نواحی ITS، سوختگی سرشاخه، *Pyrus communis*، *Phoma glomerata*

منابع References

آقاپور، ب. و فتوحی فر، خ .۱۳۸۷. اولین گزارش از وجود گونه *Phoma glomerata* روی گیاه فیکوس (*Ficus elastica*) در ایران. خلاصه مقالات هیجدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، دانشگاه بوعلی سینا همدان. صفحه 138.

امیردهی، ا.، فتوحی فر، خ. و جوان نیکخواه، م. ۱۳۹۶. مطالعه ریخت‌شناختی و مولکولی برخی گونه‌های جنس Phoma و آرایه‌های وابسته در ایران. رستنی‌ها ۱۸(۱): ۷۶-۵۹.

حاتمی، ن.، زمانی‌زاده، ح. و امینی، ن. ۱۳۸۷. جمع‌آوری و شناسایی قارچ‌های بیماری‌زای خیار گلخانه‌ای. خلاصه مقالات هیجدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، دانشگاه بوعلی سینا همدان. صفحه ۱۹۵.

رستمی، ا.، همتی، ر. و مسعودی، ن. ۱۳۹۲ . اولین گزارش از قارچ جدید *Phoma glomerat* (*Peyronellaea glomerata*) بر روی نارنگی در استان کرمانشاه. خلاصه مقالات ششمین همایش یافته‌های پژوهشی کشاورزی، دانشگاه کردستان. صفحه ۲۵۶.

صفائی، د.، اخوت، م. و حجارود، ق. ع. ۱۳۷۹. اولین گزارش از وجود *Phoma glomerata* در ایران. خلاصه مقالات چهاردهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، دانشگاه صنعتی اصفهان، صفحه ۲۲۰.

Boerema, G. H., De Gruyter, J., Noordeloos, M. E. and Hamers, M. E. C. 2004. *Phoma* identification manual differentiation of specific and infraspecific taxa in culture. CABI Publishing United Kingdom. 470 pp.

Chohan, J. S. and Chand, T. 1980. *Phoma glomerata*, a new pathogen on pears (*Pyrus communis*). Transactions of the British Mycological Society 75 (3): 509-511.

Doyle, J. J. and Doyle, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13–15.

Mathur, R. S. 1979. The coelomycetes of India. Bishen Singh Mahendra PalSingh, Delhi, India. 460pp.

Moshrefi Zarandi. D, Aminaee, M. M., Sharzei, A. and Rezaee, S. 2015. First report of Rosmemary leaf spot caused by *Phoma glomerata* in Iran. Journal of Plant Pathology 96 (4): 113- 131

White, J. F. and Morgan-Jones, G. 1987. Studies in the genus *Phoma* VI concerning *Phoma medicaginis var. pinodella.* Mycotaxon 28(1): 241–248.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. B. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315–322. In: Gelfand, M., Sninsky, D. and White, T. (eds). PCR Protocol: A Guide to Methods and Application. San Diego, California.

First report of pear trees buds and twigs blight caused by *Phoma glomerata* in Iran

P. Teymuri[1*] and S. V. Alavi[2]

Received: 20 Jan., 2019 Accepted: 8 Jun., 2019

Due to the observation of a disease symptoms resembling fire blight in pear orchards of Mazandaran province, sampling of the symptoms of blight of buds took place through winter 2018-spring 2019. Samples from infected bud and blighted twigs were cut into 2- to 3-mm pieces, surface of the leaves was sterilized by 75% ethanol for 10 s followed by drowning 3 min in 0.5% sodium hypochlorite, rinsed three times with sterile distilled water, and cultured on water agar (WA) and potato dextrose agar (PDA) with 1.5% streptomycin and tetracycline. Petri dishes were incubated at 25°C. The cultures were initially pale brown and turned dark green with age. Embedded pycnidia were generally formed after 5 days. The pycnidia were agglutinating, globose to subglobose. Hyphal tip from the growing edge of colonies cultured for 3 days at 25$^{\circ C}$ was transferred to PDA to obtain pure cultures. The colonies were whitish initially and then became olive green to dark brown. Conidia were long, ellipsoid, single-celled, and hyaline or slightly pigmented. The fungus was identified as *Phoma glomerata* morphologicaly (Boerema *et al*., 2004). Koch's postulates was done for pathogenicity test. Symptom-free one year old plants and branches were inoculated with spore suspension (1×10^6 spores/ml). Sterile water was sprayed on another set of plants as non-inoculated control. Each inoculated branch was wrapped in a plastic bag and maintained in a greenhouse at two temperature ranges of 15 ± 2$^{\circ C}$ and 23± 2$^{\circ C}$ with 90% rational humidity. After 10 days, symptoms similar to references (Chohan and Chand, 1980) were observed and the same fungus (*P. glomerata*) was re-isolated. The species of the fungus was confirmed by extraction of genomic DNA from a single spore isolate (Amirdehi *et al*., 2017 and Doyle and Doyle, 1987). Then, ITS1, 5.8S, ITS2 were amplified with universal primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') and maintained at 95$^{\circ C}$ for 3 min. Thirty eight cycles of PCR were performed by heating at 94$^{\circ C}$ for 1 min, 55$^{\circ C}$ for 1 min, and 72$^{\circ C}$ for 1 min, followed by a final period at 72$^{\circ C}$ for 10 min (White *et al*., 1990). The amplicon was sequenced and analyzed using BLAST software, and showed a homology of 99% with a corresponding sequence of *Phoma glomerata* (Corda) Wollenw & Hochapfel. The fungus was reported by Mathur (1979) on *Ficus elastica* for the first time from India. The fungus was also reported with symptoms of wilting and burning of the lateral buds of the pear (*Pyrus communis*) for the first time by Chohan and Chand (1980) from India. In Iran *Phoma glomerata* was reported from wheat *Triticum aestivum* L. and cucumber *Cucumis sativus* L. (Safaee *et al.*, 2000; Hatami *et al*., 2008), *Ficus elastica* (Aghapour *et al*., 2009), Mandarin (Rostami *et al*., 2011), Rosemary (Moshrefi *et al*., 2015). Nevertheless, this species has not been observed on *P. communis* from Iran. This is the first report of bud and twig blight disease of Pear (*P. communis*) in Iran caused by the fungus *Phoma glomerata*.

Keywords: *Phoma glomerata, Pyrus communis,* Sequences of ITS, twigs blight

1. Ph.D. Student, Department of Plant Pathology, Gorgan Agricultural and Natural Resources University, Gorgan, Iran.
2. Associated Professor, Department of Plant Protection Research, Mazandaran Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Sari, Iran.
Corresponding author: p_teymuri@yahoo.com