مقاله کوتاه

اولین گزارش گونه *Pseudoidium neolycopersici* عامل سفیدک‌پودری گوجه‌فرنگی بر پایه شناسایی ریخت‌شناختی و مولکولی در ایران

مهدی داوری[1*]، کوثر شریفی[2]، سید اکبر خداپرست[2] و محمود باقری خیرآبادی[1]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۸/۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۷/۱)

چکیده

سفیدک پودری از بیماری‌های مهم گوجه‌فرنگی در مزارع و گلخانه‌های دنیا محسوب می‌شود و در ایران گونه *Leveillula taurica* به‌عنوان تنها عامل این بیماری گزارش شده است. طی مطالعه قارچ‌های تیره Erysiphaceae در استان اردبیل، برگ‌های گوجه‌فرنگی با علایم سفیدک پودری از گلخانه‌ای در شهر اردبیل جمع‌آوری و جدایه‌ها بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی مورد شناسایی اولیه قرار گرفتند. سپس DNA ژنومی قارچ به روش Chelex 5% استخراج گردید و ناحیه ITS از rDNA با آغازگرهای ITS1 و ITS4 تکثیر و توالی‌یابی شد. بر اساس مشخصات ریخت‌شناسی و توالی‌یابی ناحیه ITS-rDNA، این قارچ به عنوان گونه *Pseudoidium neolycopersici* (Syn: *Oidium neolycopersici*) شناسایی شد. بدین‌ترتیب، این گونه برای اولین‌بار به‌عنوان عامل سفیدک‌پودری گوجه‌فرنگی (*Lycopersicon esculentum*) در ایران معرفی می‌شود. گونه *P. neolycopersici* یکی از مهم‌ترین عوامل مولد سفیدک‌سطحی گوجه فرنگی در سراسر دنیا است و پیدایش آن در ایران تهدید جدیدی برای کشت گوجه فرنگی در کشور می‌باشد.

کلیدواژه: *Oidium*، *Erysiphe*، Erysiphales، ITS

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mdavari@uma.ac.ir

۱ - به‌ترتیب استادیار و مربی بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل

۲- به‌ترتیب فارغ‌التحصیل کارشناسی ارشد و دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت

First report of powdery mildew caused by *Pseudoidium neolycopersici* on *Lycopersicon esculentum* based on morphological and molecular identification in Iran

M. Davari[1*], K. Sharifi[2], S.A. Khodaparast[2] and M. Bagheri-Kheirabadi[1]

(Received: 30.10.2014; Accepted: 23.9.2015)

Abstract

Powdery mildew is an important disease in the fields and greenhouse-grown tomatoes in the world. *Leveillula taurica* has been reported as only tomato powdery mildew causal agent in Iran. During study on Erysiphaceae in Ardabil province, tomato leaves with powdery mildew symptoms in one greenhouse in Ardabil city were collected and isolates were identified based on morphological characteristics. Moreover, total DNA was extracted with Chelex 5% method and the ITS region of rDNA were amplified and sequenced using ITS1 and ITS4 primers. According to morphological and molecular characteristics, the fungus identified as *Pseudoidium neolycopersici*. Thus, this species reported for the first time as powdery mildew on *Lycopersicon esculentum* in Iran. *P. neolycopersici* is one of important causal agents of tomato powdery mildew in the world and its occurrence is a new treat on tomato culture in Iran.

Keywords: Erysiphales, *Oidium*, *Erysiphe*, ITS

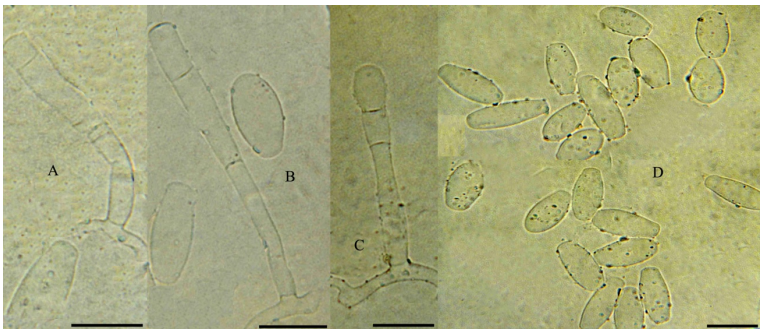
** Corresponding author's E-mail: mdavari@uma.ac.ir

1. Assistant Professor and Instructor of Plant Pathology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.
2. Former MSc. Student and Associate Professor of Plant Pathology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

مقدمه

سفیدک پودری از بیماری‌های مهم گیاهان زراعی و زینتی و درختان مثمر و غیرمثمر می‌باشد. این بیماری روی گوجه‌فرنگی نیز به‌عنوان یکی از بیماری‌های مهم در مزارع و گلخانه‌ها محسوب می‌شود و تاکنون حداقل چهار گونه شامل *Euoidium lycopersici* (Cooke & Massee) Braun & Cook، *Leveillula taurica* (Lév.) G. Arnaud، *Golovinomyces orontii* (Castagne) V.P. Heluta و *Pseudoidium neolycopersici* (L. Kiss) L. Kiss در کشورهای مختلف به‌عنوان عوامل مولد این بیماری شناخته شده‌اند (Kiss *et al.*, 2001). گونه *Golovinomyces orontii* یک قارچ متداول عامل سفیدک پودری روی بسیاری از گیاهان در مناطق معتدل و گرم است و تنها قارچ برون‌زی در گوجه‌فرنگی است که کنیدیوم‌هایی را در زنجیره‌های بلند تولید می‌کند (Kiss *et al.*, 2005). در اواخر دهه ۱۹۷۰ یک بیماری جدید سفیدک‌پودری روی گوجه‌فرنگی در ژاپن، استرالیا و سپس از بخش‌های زیادی از اروپا و آمریکای شمالی گزارش شد و به سرعت در سراسر دنیا انتشار یافت (Kiss *et al.*, 2001). مطالعه گونه‌های *Oidium* در دنیا دو آرایه را مشخص ساخت، یکی از آنها در نقاط مختلف دنیا (به جز استرالیا) یافت شده و تحت عنوان *Oidium neolycopersici* L. Kiss شناخته شده است. این آرایه که برای اولین بار در سال ۱۹۸۶ از گلخانه‌ای در انگلستان به عنوان عامل سفیدک‌پودری گوجه‌فرنگی گزارش شد، هیف‌های سطحی روشن، کنیدیفورهای غیرمنشعب و کنیدیوم‌های بشکه‌ای‌شکل اغلب منفرد یا در رطوبت نسبی بالا زنجیره‌های دروغی ۶-۲ کنیدیومی تولید می‌کند (Jones *et al.*, 2000; 2001). این گونه در تک‌نگاشت براون و کوک (۲۰۱۲) تحت عنوان گونه *Pseudoidium neolycopersici* مطرح شده و تاکنون از اغلب کشورهای آسیایی، اروپایی، آمریکایی و آفریقایی به‌عنوان عامل سفیدک پودری گوجه‌فرنگی گزارش شده است (Braun & Cook, 2012). آرایه دیگر که در استرالیا وجود دارد، همیشه کنیدیوم‌های خود را به صورت زنجیری تشکیل می‌دهد و نام *O. lycopersici* را حفظ نموده است (Jones *et al.*, 2001; Kiss *et al.*, 2001).

بیماری سفیدک پودری گوجه‌فرنگی در ایران اولین بار توسط بنی‌هاشمی و ذاکری (۱۹۹۶) از شیراز و کرج گزارش شد که گونه *L. taurica* را به‌عنوان عامل بیماری معرفی کردند. اسکندری (۲۰۰۴) نیز همین گونه را به‌عنوان عامل این بیماری در استان خراسان گزارش کرده است. حسین‌خانی‌ها و همکاران (۲۰۱۲) با مطالعه جدایه‌های قارچی عامل سفیدک پودری گوجه‌فرنگی در برخی مناطق کشور از جمله مطالعات مولکولی مبتنی بر توالی‌یابی ITS-rDNA جدایه‌های استان قزوین، تنها گونه *L. taurica* را عامل این بیماری در استان قزوین معرفی نمودند و نشان دادند که جدایه‌های به دست آمده از گوجه‌فرنگی قادر به آلوده‌سازی سایر ارقام گوجه‌فرنگی و برخی گیاهان دیگر از جمله فلفل، خیار و بادنجان هستند ولی برخی گیاهان دیگر مثل سیب‌زمینی، آفتابگردان، یونجه، شبدر و اسپرس را آلوده نمی‌کنند. در حال حاضر، *L. taurica* با طیف میزبانی وسیع به‌عنوان گونه مرکب مطرح است (Khodaparast *et al.* 2011). در تحقیق حاضر، گونه قارچی عامل سفیدک پودری گوجه‌فرنگی گلخانه‌ای شهر اردبیل با روش‌های ریخت‌شناختی و مولکولی مورد بررسی قرار گرفته است.



شکل ۱. برخی مشخصات گونه *Pseudoidium neolycopersici*، A، B و C: کنیدیوفورها، D: کنیدیوم‌ها (مقیاس‌ها: ۲۰ میکرومتر)

Fig. 1. *Pseudoidium neolycopersici*; A, B and C: Conidiophores; D: Conidia (Bars: 20 µm).

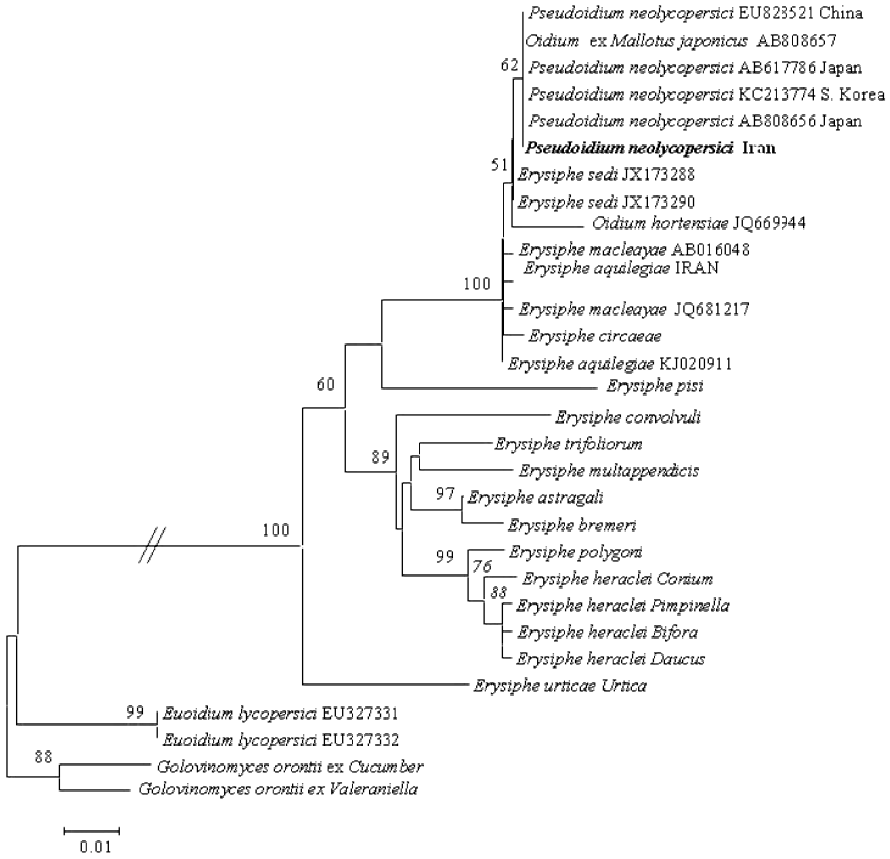
مواد و روش‌ها

برگ‌های گوجه‌فرنگی با علایم سفیدک پودری از گلخانه جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. بررسی میکروسکوپی عامل سفیدک پودری به وسیله میکروسکوپ نوری (Zeiss Axiolab) انجام و شکل و اندازه اندام‌های مختلف قارچی از جمله طول و عرض کنیدیوم، طول و عرض کنیدیوفور، طول و عرض سلول پایه کنیدیوفور، تعداد سلول بعد از سلول پایه کنیدیوفور، فاصله اولین دیواره از منشاء کنیدیوفور و ابعاد ریسه (در مراحل آنامورفی) تعیین شد. به منظور تعیین اندازه اندام‌های قارچی مورد نظر، در هر اسلاید ۳۰–۲۵ مورد از اندام‌ها مورد بررسی قرار گرفته و اندازه‌گیری شدند. نمونه شناسایی شده با کد FCUMA23 در کلکسیون قارچی دانشگاه محقق اردبیلی نگهداری می‌شود.

جهت استخراج DNA ژنومی از قطعات میسلیومی حاوی کنیدیوم و کنیدیوفور از روش Chelex 5% (Bio-Red) (Hirata & Takamatsu, 1996) استفاده شد. تکثیر ناحیه ITS شامل ITS1، قطعه 5.8S و ITS2 با استفاده از آغازگرهای ITS1 (با توالی 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') و ITS4 (با توالی 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') انجام شد (Khodaparast *et al.*, 2011) و محصول PCR جدایه به منظور تعیین توالی به شرکت سکوتک (Sequetech, USA) ارسال گردید. توالی به دست آمده همراه با تعدادی از توالی‌های موجود در GenBank به صورت چشمی و دستی بازبینی و ویرایش و با کمک نرم‌افزار Genedoc رج‌بندی شدند (Nicholas *et al.*, 1997). تجزیه و تحلیل داده‌ها در نرم‌افزار MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011) با استفاده از Minimum Evolution (با گزینه Close-Neighbor-Interchange (CNI) algorithm at a search level of 1) انجام شد (Nei and Kumar, 2000). در روش Minimum Evolution، فاصله تکاملی با استفاده از روش Kimura-2-parameter محاسبه گردید (Kimura, 1980). الگوریتم Neighbor-Joining برای ایجاد درختچه اولیه استفاده شد (Saitou and Nei, 1987) و تمام موقعیت‌های مبهم از جفت توالی‌ها حذف شدند (گزینه pairwise deletion). آزمون بوت‌استراپ با ۱۰۰۰ تکرار انجام شد (Felsenstein, 1985). گونه *Golovinomyces orontii* به عنوان گروه خارجی (outgroup) در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

علایم ظاهری بیماری شامل میسلیوم‌های متراکم سفید یا لکه‌های پراکنده روی ساقه و برگ (غالباً روی سطح بالایی برگ) است. ریسه‌ها به قطر ۷/۲–۴/۸ میکرومتر و



شکل ۲. درخت فیلوژنتیک ترسیم شده براساس توالی ناحیه ITS-rDNA با استفاده از نرم افزار MEGA5 به روش Minimum-Evolution به‌ازای ۱۰۰۰ تکرار اعتبارسنجی (Bootstrap). فواصل تکاملی با استفاده از Kimura 2-parameter محاسبه شده است. درصد بوت استراپ (برای ۱۰۰۰ تکرار و بالای ۵۰٪) در بالای شاخه‌ها نشان داده شده است. گونه *Golovinomyces orontii* به عنوان گروه خارجی (outgroup) در نظر گرفته شده است.

Fig. 2. A minimum-evolution (ME) tree based on ITS sequences. The evolutionary distances were computed using the Kimura 2-parameter. The numbers above the branches represent branch support using 1000 bootstrap replications (Bootstrap values below 50% are not shown). *Golovinomyces orontii* was used as outgroup taxon.

آپرسوریوم ریسه‌ای لیمویی‌شکل و لبه‌دار می‌باشد. کنیدیوفورها راست و به صورت انتهایی از سلول مادر به وجود می‌آیند و به اندازه ۲/۷-۴/۸ × ۴۵/۶-۱۱۰/۴ میکرومتر هستند. سلول پایه کنیدیوفور استوانه‌ای‌شکل به‌ندرت در میانه متورم و در پایه منقبض و به‌اندازه ۲/۷-۴/۸ × ۲۶/۴-۵۷/۶ میکرومتر است که در روی آن ۳-۱ سلول کوتاه‌تر قرار دارد. کنیدیوم‌ها بیضوی - تخم‌مرغی یا نیمه-استوانه‌ای ـ بشکه‌ای شکل و با ابعاد ۱۶/۸-۴۰/۸ × ۱۲-۲۱/۶ میکرومتر هستند که به صورت منفرد تولید می‌شوند (شکل ۱). این ویژگی‌ها با مشخصات ذکر شده در تک-نگاشت براون و کوک (Braun & Cook, 2012) برای *Pseudoidium neolycopersici* (L. Kiss) L. Kiss (Syn: *Oidium neolycopersici* L. Kiss) مطابقت داشت. در تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک، قارچ به دست آمده از گوجه‌فرنگی در این تحقیق همراه با چهار نمونه توالی دیگر از ژاپن، کره و چین که با نام *P. neolycopersici* در بانک ژن ثبت شده‌اند، در یک گروه قرار گرفت (شکل ۲). در این تحقیق، گونه *P. neolycopersici* برای اولین‌بار به-

عنوان عامل سفیدک پودری گوجه‌فرنگی (*Lycopersicon esculentum* Mill.) در ایران معرفی می‌شود. قبلا از ایران تنها گونه *L. taurica* از روی گوجه‌فرنگی گزارش شده بود (Hoseinkhaniha *et al.*, 2012). این گونه یکی از مهمترین عوامل مولد سفیدک پودری گوجه‌فرنگی در سراسر دنیا است و پیدایش آن در ایران تهدیدی جدید برای کشت گوجه‌فرنگی در کشور به شمار می‌رود.

منابع

Banihashemi, Z. and Zakeri, A. 1996. The occurrence of *Leveillula taurica* on tomato and pepper in Iran. Iranian Journal of Plant Pathology 32: 27-28 (in Persian with English summary).

Braun, U and Cook, R.C.A. 2012. Taxonomic manual of the Erysiphales (Powdery Mildews). CBS Biodiversity Series 11. 707 Pp.

Eskandari M. 2004. Incidence of Tomato powdery mildew in Khorasan. 16th Iranian Plant Protection Congress, Tabriz, Iran. p: 248.

FelsensteinJ. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 39:783-791.

Hoseinkhaniha, S., Khodaparast, S.A., Zarabi, M.M. and Razaz Hashemi, S.R. 2012. Powdery mildew of tomato in Qazvin province of Iran: host range, morphological and molecular characterization. Journal of Crop Protection 1 (2): 143-152.

Jonse, H.E., Whipps, J.M., Thomas, B.J., Carver, T.L.W. and Gurr, S.J. 2000. Initial events in the colonization of tomatoes by *Oidium lycopersici*, a distinct powdery mildew fungus of *Lycopersicon* species. Canadian Journal of Botany 78: 1361–1366.

Jonse, H.J., Whipps, M. and Gurr, S.J. 2001. The tomato powdery mildew fungus *Oidium neolycopersici*. Molecular Plant Pathology 2: 303-309.

Khodaparast, S. A., Takamatsu, S., Harada, M., Abbasi M. and Samadi, S. 2011. Additional rDNA ITS sequences and its phylogenetic consequences for the genus *Leveillula* with emphasis on conidium morphology. Mycological Progress DOI 10.1007/s11557-011-0785-7.

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.

Kiss, L., Cook, R.T.A., Saenz, G.S., Cunnington, J.H., Takamatsu, S., Pascoe, I., Bardin, M., Nicot, P.C., Sato, Y. and Rossman, A.Y. 2001. Identification of two powdery mildew, *Oidium neolycopersici* sp. nov. and *Oidium lycopersici*, infecting tomato in different parts of the world. Mycological Research 105: 684–697.

Nei, M. and Kumar, S. 2000. Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, New York.

Nicholas, K.B., Nicholas H.B. Jr., and Deerfield, D.W. II. 1997 GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation, EMBNEW.NEWS 4: 14

Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution 4: 406-425.

Takamatsu, S., Hirata, T., Sato, Y. and Nomura, Y. 1999. Phylogenetic relationships of *Microsphaera* and *Erysiphe* section *Erysiphe* (powdery mildews) inferred from the rDNA ITS sequences. Mycoscience 40: 259-268.

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: 2731-2739.