

گزارش علمی کوتاه

وقوع بیماری پوسیدگی سیاه نیشکر ناشی از قارچ *Ceratocystis adiposa* در ایران

علیرضا پورصفر^۱، یوبرت قوستا^۲، امین علیدادی^۱، کوروش طاهرخانی^۳، حسین موذن رضا محله^۳ و محمد جوان نیکخواه^{۱*}

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۳/۱۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۴/۲)

با بررسی مزارع نیشکر کشت و صنعت امیر کبیر در استان خوزستان در سال ۱۳۹۴، نشانه‌های پوسیدگی سیاه رنگ در اندام‌های زیر زمینی گیاه نیشکر (رقم Sp 70-1143) مشاهده شد. گیاهان دارای نشانه‌های آلودگی جمع‌آوری و بعد از انتقال به آزمایشگاه و انجام عمل ضد عفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم یک درصد، روی محیط کشت سیب‌زمینی-دکستروز-آگار حاوی سولفات استرپتومایسین (۱۰۰ پی‌پی‌ام در لیتر) کشت شدند. از همه نمونه‌های کشت شده، قارچ *Ceratocystis* Ellis & Hals. جداسازی گردید. ناحیه ITS-rDNA هسته‌ای با استفاده از زوج آغازگرهای ITS1 و ITS4 (White *et al.* 1990) در جدایه منتخب AP2 تکثیر و توالی‌یابی گردید. جستجوی بلاست توالی ITS جدایه AP2 (KX008521) در بانک ژن NCBI، شباهت نوکلئوتیدی صد درصدی را با جدایه‌های مختلف از *Ceratocystis adiposa* نشان داد. براساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی جدایه AP2 و مقایسه‌ی آن‌ها با توصیف ارائه شده توسط رامش بات (Ramesh Bhat 1974) و نیز داده‌های توالی ناحیه ITS-rDNA هسته‌ای، گونه *Ceratocystis adiposa* شناسایی گردید.

آزمون اثبات بیماری‌زایی این گونه روی بوته‌های نیشکر، در شرایط گلخانه و بر اساس روش ساووجیا و همکاران (Savocchia *et al.* 2007) انجام گرفت. نشانه‌های پوسیدگی بعد از گذشت ۱۴ روز در بوته‌های مایه‌زنی شده مشاهده شد و قارچ مورد آزمایش، مجدداً از بافت‌های آلوده شده جداسازی گردید. در حالیکه در تیمارهای شاهد، هیچ نشانه‌ای از بیماری بروز نکرد (شکل ۱K-H). در سال‌های اخیر بیماری‌زایی این گونه به عنوان عامل ایجاد پوسیدگی سیاه در ریشه نیشکر نیز به اثبات رسیده است (Jie *et al.* 2014). این اولین گزارش از وقوع بیماری پوسیدگی سیاه نیشکر ناشی از قارچ *C. adiposa* در ایران می‌باشد. علاوه بر آن، گونه *C. adiposa* به عنوان آرایه جدیدی برای فلور قارچی ایران به شرح زیر گزارش و توصیف می‌شود:

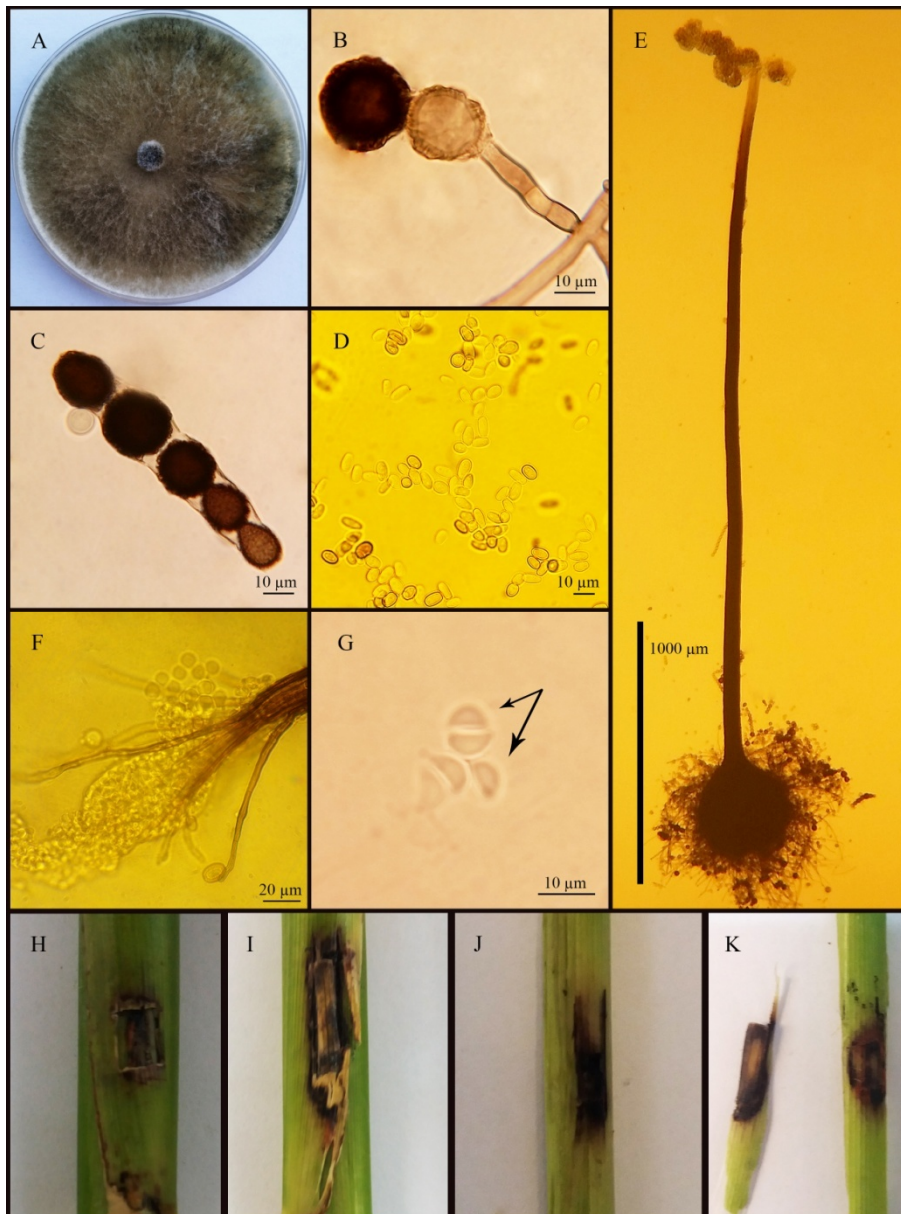
Ceratocystis adiposa (E.J. Butler) C. Moreau, Revue Mycol., Paris 17 (Suppl. Colon. no. 1): 22 (1952).

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

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

۲. گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه

۳. موسسه تحقیقات و آموزش توسعه نیشکر و صنایع جانبی خوزستان، اهواز



شکل ۱. گونه *Ceratocystis adiposa* (جدایه AP2)، A. پرگنه قارچ در محیط کشت عصاره مالت-آگار (MEA)، B. تشکیل زنجیره کنیدیوم روی فیالید، C. زنجیر پایدار کنیدیوم و غلاف ژلاتینی اطراف کنیدیوم‌ها، D. کنیدیوم‌های تشکیل شده در زنجیرهای ناپایدار، E. پریتیسیوم با گردن بسیار بلند، F. ریشه‌های اطراف روزنه پریتیسیوم، G. آسکوسپوره‌های کلاه‌شکل با غلاف ژلاتینی بی‌رنگ، H-K. آزمون بیماری‌زایی. H. تیمار شاهد، I-K. نشانه‌های پوسیدگی سیاه در تیمارهای مایه‌زنی شده در شرایط گلخانه.

Fig 1. *Ceratocystis adiposa* (isolate AP2); A. Colony on MEA, B. Conidial chain formation on phialide, C. Persistent conidial chain and gelatinous conidial sheath, D. Conidia formed in non-persistent chains, E. Perithecium with long neck, F. Ostiolar hyphae, G. hat shaped ascospores with hyaline gelatinous sheath. H-K. Pathogenicity tests. H. Control treatment, I-K. Symptoms of black rot on inoculated treatments under greenhouse condition.

پرگنه در جدایه‌های این گونه روی محیط کشت عصاره مالت-آگار (MEA)، در دمای ۲۵-۲۳ درجه سلسیوس و تحت شرایط تاریکی مداوم، سریع‌الرشد بوده و در مدت دو الی سه روز، تمام سطح تشک پتری نه سانتی‌متری را می‌پوشاند.

رنگ پرگنه در ابتدا قهوه‌ای روشن بوده و با گذشت زمان به رنگ قهوه‌ای تیره تا سیاه تغییر می‌یابد (شکل ۱A). پریسیوم‌ها در سطح محیط کشت تشکیل می‌شوند و به رنگ قهوه‌ای تیره تا سیاه، به اشکال کروی تا نیم‌کروی، پوشیده از ریشه‌های بند بند مو مانند در قسمت قاعده و به ابعاد $۴۵۰-۶۰۰ \times ۳۵۰-۵۵۰$ میکرومتر می‌باشند. گردن پریسیوم بسیار بلند، به رنگ قهوه‌ای تیره تا سیاه، به طول تا ۳۷۵۰ میکرومتر، و در انتها دارای یک منفذ احاطه شده با ریشه‌های راست تا خمیده و به طول تا ۱۵۰ میکرومتر می‌باشد. آسک‌ها بی‌رنگ، با دیواره ناپایدار، آسکوسپورها تک یاخته‌ای، بی‌رنگ، کلاهکی شکل از دید جانبی، به ابعاد $۵-۹ \times ۳-۵$ میکرومتر و احاطه شده توسط یک غلاف بی‌رنگ ژلاتینی هستند (شکل ۱E-G). با مسن‌تر شدن پرگنه، آسکوسپورها به صورت قطره‌ی بی‌رنگی در بالای روزنه گردن پریسیوم تجمع می‌یابند. این گونه در مرحله غیر جنسی تولید دو نوع زنجیر کنیدیوم روی فیالیدهای استوانه‌ای تا نیمه استوانه‌ای، بی‌رنگ تا قهوه‌ای روشن، با $۱-۲$ بند عرضی و به ابعاد $۵-۷ \times ۶۰-۲۰$ میکرومتر می‌کند (شکل ۱B). نوع اول زنجیرهای کنیدیوم ناپایدار بوده و متشکل از فیالوکنیدیوم‌های بی‌رنگ و با سطح صاف، استوانه‌ای تا بشکته‌ای شکل و به ابعاد $۵-۷ \times (۲۴-۱۹-۱۰)$ میکرومتر هستند (شکل ۱E). نوع دوم از زنجیرهای کنیدیوم که به فراوانی تشکیل می‌شوند، پایدار بوده و متشکل از فیالوکنیدیوم‌های بی‌رنگ تا رنگی، با تزئینات سطحی، تخم‌مرغی، گلابی شکل، کروی تا کشیده با سطح زگیل‌دار و به ابعاد $۱۲-۲۷ \times ۱۵-۳۰$ میکرومتر هستند. پایدار بودن کنیدیوم‌های موجود در زنجیرهای کنیدیوم نوع دوم، به دلیل اتصال کنیدیوم‌ها به یکدیگر و به یاخته کنیدیوم‌ها و نیز به دلیل وجود یک غلاف ژلاتینی بی‌رنگ غشایی در اطراف کنیدیوم‌های موجود در زنجیر می‌باشد (Ramesh Bhat 1974، شکل ۱D). در گذشته، مرحله غیر جنسی این گونه با نام *Chalara adiposa* یا *Chalara state of Ceratocystis adiposa* شناخته می‌شد (Hawes & Beckett 1977).

نمونه بررسی شده: جدایه AP2، جداسازی شده از اندام‌های زیر زمینی نیشکر رقم Sp 70-1143، راتون اول نیشکر کشت و صنعت امیر کبیر، استان خوزستان، جمع‌آوری کننده: کوروش طاهرخانی، سال ۱۳۹۴.

Occurrence of black rot disease of sugarcane caused by *Ceratocystis adiposa* in Iran

A. Poursafar¹, Y. Ghosta², A. Alidadi¹, K. Taherkhani³, H. Moazzen-Reza Mahale³, and M. Javan Nikkhah^{1*}

(Received: 31.5.2017; Accepted: 23.6.2017)

During the surveys of sugarcane fields of Amir Kabir agro-industry in Khuzestan province in 2015, black rot symptoms were observed in underground parts of sugarcane plants (cultivar Sp 70-1143). Symptomatic plant samples were collected and transferred into the laboratory, surface sterilized with 1% sodium hypochlorite and were grown on potato-dextrose-agar amended with streptomycin sulfate (100 ppm/L). *Ceratocystis* Ellis & Hals. was isolated from all examined plant samples. The nuclear ITS-rDNA region of a representative isolate (AP2) was amplified and sequenced using ITS1/ITS4 primer pairs (White *et al.* 1990). A Blast search of the ITS-rDNA sequence (KX008521) in GenBank, revealed a 100% identity with different isolates of *Ceratocystis adiposa*.

Based on the morphological characteristics of isolate AP2 as compared to Ramesh Bhat (1974) and nuclear ITS-rDNA sequence data, *Ceratocystis adiposa* (E.J. Butler) C. Moreau was identified.

Pathogenicity tests were conducted in greenhouse conditions according to Savocchia *et al.* (2007). After 14 days, typical symptoms of black rot disease were developed on inoculated sugarcane tissues and the fungus re-isolated. No disease symptoms were observed on the controls (Fig. 1. H-K). In recent years, pathogenicity of this species, as the causal agent of sugarcane black root rot, has also been reported (Jie *et al.* 2014). This is the first report of *C. adiposa* causing black rot disease of sugarcane in Iran. Also, *C. adiposa* is reported as a new species for mycobiota of Iran.

Ceratocystis adiposa (E.J. Butler) C. Moreau, Revue Mycol., Paris 17 (Suppl. Colon. no. 1): 22 (1952).

Colonies on Malt Extract Agar (MEA), at 23-25 °C and under continuous darkness, fast growing and covering a 9 cm petri plate in 2-3 days, cottony, at first dark brown then blackened with the age (fig. 1A). Perithecia superficial on agar medium, dark brown to black, globose to subglobose, covered with septate and hair like hyphae, 350-550 × 400-450 μm. Perithecial neck very long, dark brown to black, up to 3750 μm long, apical ostiole surrounded by straight or curved ostiolar hyphae up to 150 μm long. Asci hyaline and evanescent. Ascospores unicellular, hyaline, hat shaped in side view, surrounded by hyaline gelatinous sheath, 5-9 × 3-5 μm in side view (Fig. 1E-G). Ascospores collect at the tip of the perithecial neck, forming a hyaline droplet at later stages of the growth.

The fungus produces two different kinds of basipetal conidial chains: persistent and non-persistent. Phialides subcylindrical to cylindrical, hyaline to pale brown, 1-2 septate and 20-60 × 5-7 μm (Fig. 1B). In non-persistent, conidia chains are easily separated and the resulted conidia are hyaline, smooth, cylindrical to barrel shape and 10-19(-24) × 5-7 μm (Fig. 1E). The persistent conidial chains are composed of hyaline to pigmented, ornamented, ovoid, pyriform, spherical to oblong, margin verrucous and 15-30 × 12-27 μm. The persistency of these conidial chains are due to their attachment to each other and to conidiogenous cells which are surrounded by a hyaline membranous sheath (Ramesh Bhat 1974; Fig. 1D). These asexual forms of the fungus have previously known as *Chalara adiposa* or *Chalara* state of *Ceratocystis adiposa* (Hawes & Beckett 1977).

Specimen examined: isolate AP2, underground parts of sugarcane plants cultivar Sp 70-1143, first ratoon of sugarcane fields of Amir Kabir agro-industry, Khuzestan province, K. Taherkhani, 2015.

* Corresponding author's E-mail: jnikkhah@ut.ac.ir

1. Department of plant protection, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.

2. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Urmia, Urmia, Iran.

3. Sugarcane Research and Training Institute for the Development of Industries in Khuzestan, Ahvaz, Iran.

منابع

- Hawes C. R. and Beckett A. 1977. Conidium ontogeny in the *chalara* state of *Ceratocystis adiposa*. Transactions of the British Mycological Society 68:259-265.
- Jie L., YongChuan L., Hong Y. Lei Y., and Qiong H. 2014. Identification of the pathogen causing black rot in sugarcane (*Saccharum sinensis*). Journal of Yunnan University-Natural Sciences Edition 36:139-143.
- Ramesh Bhat V. 1974. Observations on *Ceratocystis adiposa* and the conidial ontogeny of its imperfect state. Sydowia Annales Mycologici 26:26-28.
- Savocchia S., Steel C. C., and Stodart B. J. 2015. Pathogenicity of *Botryosphaeria* species isolated from declining grapevines in sub-tropical regions of Eastern Australia. VITIS-Journal of Grapevine Research 46:p. 27.
- 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 phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods and applications, 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.