

مطالعه ریخت‌شناختی و مولکولی برخی گونه‌های جنس *Phoma* و آرایه‌های وابسته در ایران

دریافت: ۱۳۹۶/۰۲/۱۱ / پذیرش: ۱۳۹۶/۰۵/۲۳

الهام امیردهی: دانشجوی دکتری گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

خلیل‌بردی فتوحی✉: دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج ۳۱۵۸۷-۷۷۸۷۱، ایران (fotowhi@ut.ac.ir)

محمد جوان نیکخواه: استاد گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

چکیده

جنس *Phoma* علاوه بر گونه‌های ساپروفیت، گونه‌های بیمارگر فراوانی نیز دارد که سبب خسارت در محصولات زراعی مهم اقتصادی می‌شوند. بنابراین، هدف از این تحقیق شناسایی ریخت‌شناختی و مولکولی ۳۵ جدایه از گونه‌های متعلق به جنس *Phoma* و آرایه‌های وابسته و جمع‌آوری شده از میزبان‌های مختلف بود. مطالعه فیلوژنتیکی چندژنی براساس توالی‌یابی نوکلئوتیدی سه ناحیه ژنومی ITS1-5.8S-ITS2، اکتین و بتا توبولین انجام شد. در نتیجه، هفت گونه به اسامی *Didymella acetosellae*, *Boeremia exigua*, *Phoma destructiva* var. *destructiva*, *Neocamarosporium betae*, *D. pinodella*, *D. bellidis* و *P. medicaginis* شناسایی و توصیف شدند که از این میان، سه گونه *D. acetosellae*, *D. bellidis* و *D. destructiva* var. *destructiva* برای نخستین بار برای میکوبیوتای ایران و دو گونه *B. exigua* و *D. pinodella* نیز به ترتیب از میزبان‌های گیاهی جدید *Paliurus spina-christi* و *Trigonella-foenum graecum* گزارش می‌شوند. ویژگی‌های ریخت‌شناختی و تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیکی به خوبی قادر بود حدود و ثغور جنس‌ها و گونه‌ها را تعیین نماید.

واژه‌های کلیدی: آرایه، اکتین و بتا توبولین، فیلوژنی، *Phoma*، ITS1-5.8S-ITS2

Morphological and molecular study on some species of *Phoma* and related taxa in Iran

Received: 01.05.2017 / Accepted: 14.08.2017

Elham Amirdehi: PhD Student of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Science and Engineering, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

Khalil-Berdi Fotouhifar✉: Associate Prof. of Mycology, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Science and Engineering, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj 31587-77871, Iran (fotowhi@ut.ac.ir)

Mohammad Javan-Nikkhah: Prof. of Mycology, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Science and Engineering, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

Summary

The genus *Phoma* Sacc. consists of important fungal plant pathogenic species occurring on economically important cultivated crops in spite of many other saprobic species. Thus, the aim of this study was to identify 35 isolates of *Phoma* species and related taxa collected from different hosts by means of morphological and molecular characters. Multi-locus phylogenetic analyses based on ITS1-5.8S-ITS2, actin and β -tubulin gene regions were conducted. Therefore, seven species including *Boeremia exigua*, *Didymella acetosellae*, *D. bellidis*, *D. pinodella*, *Neocamarosporium betae*, *Phoma destructiva* var. *destructiva*, and *P. medicaginis* were identified and described, and among them, three species including *D. bellidis*, *D. acetosellae*, and *P. destructiva* var. *destructiva* are new records for the mycobiota of Iran. Also, *B. exigua*, and *D. pinodella* are reported for the first time from new host plants including *Paliurus spina-christi*, and *Trigonella-foenum graecum*, respectively. The morphological features and phylogenetic analyses were able to clarify the generic and species delimitation very clearly.

Keywords: Actin and β -tubulin, ITS1-5.8S-ITS2, *Phoma*, phylogeny, taxon

* بخشی از رساله دکتری نگارنده اول به راهنمایی دکتر خلیل‌بردی فتوحی فرارایه شده به دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج

مقدمه

آن‌ها از بافت‌های سودوپاراننشیمی و یا اسکروپلکتاننشیمی است. پیکنیدیوم‌های این جنس معمولا واجد منفذ جهت خروج کنیدیوم‌ها هستند، اما در مواردی به صورت بسته بوده و یا پس از مدت طولانی باز می‌شوند. کنیدیوم‌زایی در این جنس روی فیالیدهای مجزا و به صورت انتروپلاستیک صورت می‌گیرد. کنیدیوم‌ها در جنس *Phoma* همواره در زمان آزاد شدن تک‌سلولی هستند، اما گاهی بر اثر تشکیل دیواره‌های عرضی ثانویه به صورت دو یا چندسلولی نیز دیده می‌شوند. شکل و اندازه کنیدیوم‌ها در این جنس بسیار متنوع است. کنیدیوم‌ها بی‌رنگ و گاهی به رنگ متمایل به قهوه‌ای و واجد دیواره صاف می‌باشند.

مطالعات تاکسونومیکی گونه‌های جنس *Phoma* براساس خصوصیات پیکنیدیوم، کنیدیوم و ویژگی‌های پرگنه منجر به گروه‌بندی *Phoma* به نُه بخش شامل *Phoma*، *Heterospora*، *Plenodomus*، *Phyllostictoides*، *Peyronellaea*، *Paraphoma*، *Sclerophomella*، *Macrospora* و *Pilosa* گردید. از سوی دیگر، فرم جنسی گونه‌های این نُه بخش به جنس‌های *Didymella*، *Mycosphaerella*، *Leptosphaeria* و *Pleospora* تعلق دارد. فرم‌های جنسی متفاوت و وجود صفات مشترک مبهم در این بخش‌ها نشان‌دهنده آن است که این بخش‌ها وضعیت تکاملی این جنس را نشان نمی‌دهند، بنابراین سیستم طبقه‌بندی *Phoma* می‌بایست با افزودن داده‌های حاصل از فیلوژنی مولکولی اصلاح گردد (de Gruyter et al. 2009).

اوسکمپ و همکاران (Aveskamp et al. 2009)، در مطالعه‌ای گونه‌های واقع در *Phoma* sect. *Peyronellaea* را مورد بررسی قرار دادند. گونه‌های این بخش از لحاظ ریخت‌شناختی با تولید دیکتیوکلامیدوسپور مشخص می‌شوند، لذا این ویژگی جهت تمایز گونه‌ها مورد استفاده قرار می‌گرفت. هر چند تولید کلامیدوسپور از گونه‌های متعلق به سایر بخش‌ها نیز گزارش شده است. از این رو جهت مطالعه فیلوژنی آرایه‌های این جنس از توالی‌های DNA حاصل از سه ناحیه ژنومی ITS، اکتین و بتا توبولین استفاده شد. فیلوژنی حاصل از توالی‌ها نشان داد که دو گونه از اعضای بخش *Peyronellaea* (*P. violicola* و *P. chrysanthemicola*) و گونه جدید توصیف شده *P. schachtii* به همراه سایر گونه‌های بخش *Peyronellaea*، در یک کلاد گروه‌بندی نمی‌شوند و همراه با بخش‌های *Heterospora*، *Paraphoma* و *Plenodomus* در بین دودمان‌های قاعده‌ای قرار می‌گیرند، هر چند ویژگی‌های

جنس *Phoma* Sacc. از تنوع اکولوژیکی بسیار زیادی برخوردار است و تعداد زیادی گونه اعم از بیماری‌زا و ساپروفیت با دامنه وسیعی از بسترها را در بر می‌گیرد (Aveskamp et al. 2008) و لذا تاکسونومی این جنس همواره محل بحث بوده است (Aveskamp et al. 2009). توصیف اولیه جنس *Phoma* به سال ۱۸۲۱ برمی‌گردد (Sutton 1980)، اما ساکاردو در سال ۱۸۸۰ رسماً این جنس را معرفی نمود (Saccardo 1880). در سیستم ساکاردو، نام جنس *Phoma* در مورد قارچ‌های رشته‌ای که قادر به تولید پیکنیدیوم واجد کنیدیوم بی‌رنگ و بدون دیواره که می‌توانند در ساقه‌ها مستقر شوند، استفاده شده و قارچ‌هایی با خصوصیات ریخت‌شناختی مشابه که سبب آلودگی‌های برگ می‌شدند در جنس *Phyllosticta* قرار گرفتند (Deshmukh & Rai 2005).

نخستین مطالعات مدرن و امروزی در مورد جنس *Phoma* توسط ولنوب و هوکافل در سال ۱۹۳۶ با معرفی ویژگی‌های قارچ در شرایط آزمایشگاهی انجام شد (Aveskamp et al. 2008). در اوایل دهه ۱۹۶۰، بوئرما (Boerema 1964) و پس از آن مورگان‌جونز و همکاران (Morgan-Jones 1988) این مفهوم را به تعداد زیادی از آرایه‌های مربوط به جنس *Phoma* با دامنه وسیع میزبانی تعمیم دادند. هیوز در سال ۱۹۵۳ نحوه کنیدی‌زایی را به عنوان یک معیار تاکسونومیکی مهم در قارچ‌های ناقص معرفی نمود که بعدها در مورد قارچ‌های واجد پیکنیدیوم از جمله گونه‌های جنس *Phoma* نیز به کار برده شد (Deshmukh & Rai 2005). بر این اساس، بوئرما و همکاران (Boerema et al. 2004) مجموعه‌ای از ویژگی‌ها اعم از خصوصیات ریخت‌شناختی پایدار در شرایط زنده (*in vivo*) و همچنین در شرایط آزمایشگاهی (*in vitro*)، به همراه یکسری خصوصیات پرگنه را جهت شناسایی گونه‌های این جنس پیشنهاد و کلید شناسایی گونه‌های جنس *Phoma* را معرفی نمودند. با گذشت زمان، ویژگی‌های بیشتری از قبیل داده‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی نیز به روش‌های تشخیص گونه‌های این جنس افزوده شد. در حال حاضر، جنس *Phoma* با مجموعه‌ای از ویژگی‌ها و مشخصه‌ها در پیکنیدیوم، کنیدیوم‌ها و نحوه کنیدیوم‌زایی از سایر جنس‌های قارچی متمایز می‌شوند. پیکنیدیوم‌ها در جنس *Phoma* از تنوع قابل ملاحظه‌ای در شکل و اندازه برخوردار می‌باشند. پیکنیدیوم‌ها کروی تا نیمه‌کروی بوده و واجد دیواره صاف و یا دارای زواید می‌باشند. جنس دیواره

آرایه *P. medicaginis* var. *medicaginis* براساس صفات ریخت‌شناختی و توالی‌یابی نواحی ITS از DNA ریبوزومی شناسایی و از علف‌های هرز *Taraxacum officinale* و *Chenopodium murale* در استان همدان معرفی شده است (Razaghi et al. 2012).

روش بررسی

- جمع‌آوری، جداسازی و شناسایی نمونه‌های قارچی
به منظور جمع‌آوری نمونه‌های آلوده، نمونه‌برداری از استان‌های گیلان، مازندران، اصفهان و خوزستان انجام گردید. نمونه‌برداری برحسب نوع علائم و میزان از بخش‌های متفاوت گیاهان انجام شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده در دمای محیط به خوبی خشک شده، سپس درون پاکت‌های کاغذی قرار داده و در دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شدند.

به منظور جداسازی قارچ از بافت‌های گیاهی آلوده دو روش مورد استفاده قرار گرفت. در روش اول، جهت جداسازی قارچ از بافت‌های برگ‌ریز و اجاد پیکنیدیوم قارچ، قطعات برگ به وسیله پنبه آغشته به الکل ۹۰٪ ضدعفونی و در تشتک‌های پتری حاوی کاغذ صافی استریل و مرطوب قرار داده شد. کینیدیوم‌ها پس از خروج از پیکنیدیوم‌ها با سوزن سترون به تشتک‌های حاوی محیط کشت PDA (Potato Dextrose Agar) و با MEA (Malt Extract Agar) منتقل شدند. در روش دوم، قطعات کوچکی از حد فاصل ناحیه سالم و آلوده گیاه بریده شده و پس از ضدعفونی سطحی به محیط کشت آب-آگار (WA) منتقل شدند. در نهایت خالص‌سازی جدایه‌های قارچی به روش نوک ریشه و یا تک‌اسپور انجام و جدایه‌های خالص در لوله‌های حاوی محیط کشت PCA (Potato Carrot Agar) و WA (Water Agar) نگهداری شدند.

جهت شناسایی گونه‌های قارچی براساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی، طبق توصیف آرایه شده توسط بوئرما و همکاران (۲۰۰۴) عمل شد. به این منظور، قرص‌های میسلیومی به قطر پنج میلی‌متر از حاشیه پرگنه‌های هفت روزه در حال رشد قارچ برداشته و به تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت MEA و OMA (oat meal agar) انتقال داده شدند. تشتک‌های تلقیح شده در شرایط تاریکی مطلق و دمای ۲۲ درجه سلسیوس به مدت هفت روز نگهداری شدند. پس از هفت روز، میزان رشد پرگنه با اندازه‌گیری قطر پرگنه در دو محیط کشت MEA و OMA ارزیابی و ثبت گردید. سپس تشتک‌های پتری به مدت

ریخت‌شناختی این سه بخش به هیچ وجه در گونه‌های مذکور مشاهده نشد. نتیجه مطالعه بر این نکته تاکید دارد که یک صفت ریخت‌شناختی نمی‌تواند تمایز بین آرایه‌ها را نشان دهد (Aveskamp et al. 2009).

ایرینی و همکاران (Irinyi et al. 2009)، در مطالعه‌ای روابط تکاملی گونه‌های شبیه به جنس *Phoma* جداسازی شده از سویا، شامل گونه‌های *P. exigua* var. *exigua*، *P. sojicola* و *P. pinodella* را به دلیل این که این گونه‌ها تفاوت ریخت‌شناختی قابل توجهی جهت تمایز نشان نمی‌دادند را مورد بررسی قرار دادند. از این‌رو، تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیکی با استفاده از توالی نواحی ITS و اینترون بزرگ ژن فاکتور بسط ترجمه و بخشی از ژن بتا توبولین انجام شد. در نتیجه، *P. sojicola* در کلادی مشابه *P. pinodella* قرار گرفت و براساس GCPSR و مطالعات ریخت‌شناختی *P. sojicola* به عنوان مترادف *P. pinodella* معرفی گردید. در این بررسی، ژن‌های کد کننده پروتئین (*tef1* و بتا توبولین) جهت مطالعات فیلوژنتیکی در جنس *Phoma* مفید ارزیابی شدند.

در ایران، تاکنون مطالعه جامعی در مورد گونه‌های جنس *Phoma* صورت نگرفته است و تنها گزارش‌هایی که از این جنس وجود دارد، صرفاً براساس صفات ریخت‌شناختی و یا داده‌های حاصل از توالی نوکلئوتیدی نواحی محدود ژنی بوده که این مطالعات به صورت پراکنده و تنها در زمینه شناسایی گونه‌های جنس *Phoma* انجام گرفته است. تاکنون ۱۵ گونه شامل *P. betae* از *P. cucurbitacearum*، *Beta vulgaris* از *Cucumis*، *Solanum tuberosum* از *P. exigua tuberosum*، *P. glomerata* از *Triticum aestivum* و تعدادی دیگر از میزبان‌ها گزارش شده است. همچنین، چندین گونه از مرحله تلئومورفی قارچ شامل *Leptosphaeria biglobosa* و *Leptosphaeria maculans* از *Brassica napus*، *Leptosphaeria sacchari* از *Sacharum officinarum* و *Mycosphaerella rabiei* از *Cicer arietinum* از مناطق مختلف ایران گزارش شده است (Ershad 2009). حیدری و همکاران (Heydari et al. 2010)، گونه *P. betae* را با توجه به خصوصیات ریخت‌شناختی شناسایی و به عنوان یکی از عوامل قارچی مولد پوسیدگی ریشه و طوقه کلزا در شهرستان مرودشت استان فارس اعلام نمودند. آقاپور و همکاران (Aghapour et al. 2009) گونه *P. glomerata* را براساس خصوصیات ریخت‌شناختی شناسایی و به عنوان عامل لکه‌برگی گیاه *Ficus elastica* گزارش کردند.

هفت روز دیگر در شرایط ۱۳ ساعت نور نزدیک به فرابنفش (near UV) و ۱۱ ساعت تاریکی در دمای ۲۲ درجه سلسیوس نگهداری شدند. پس از ۱۴ روز، اندازه‌گیری ابعاد پیکنیدیوم‌ها، کنیدیوم‌ها و کلامیدوسپورها با استفاده از بررسی حداقل ۵۰ اندام قارچی صورت پذیرفت. جهت مطالعه اندام‌های قارچی از میکروسکوپ نیکون (Nikon) مدل E200 استفاده شد. نمونه‌های میکروسکوپی از اندام‌های قارچی با استفاده از محلول‌های لاکتوفل و کاتن‌بلو تهیه گردید.

- تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیکی

پس از شناسایی جدایه‌ها براساس خصوصیات ریخت‌شناسی، جدایه‌هایی از هر گونه جهت مطالعات فیلوژنتیکی انتخاب شدند (جدول ۱). 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 & Doyle 1987). به منظور ارزیابی فیلوژنتیکی، نواحی ژنومی ITS1-5.8S-ITS2، اکتین و بتا توبولین تکثیر و تعیین توالی شدند. جهت تکثیر ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 هسته‌ای از ترکیب آغازگرهای ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCG-3') به همراه ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') به ترتیب به عنوان آغازگرهای مستقیم و معکوس استفاده شد (White *et al.* 1990). مخلوط واکنش PCR با حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۸/۵ میکرولیتر آب دیونیزه استریل، ۱۲/۵ میکرولیتر 2 X PCR Master Mix، ۰/۵ میکرولیتر از هر آغازگر به غلظت ۱۰ پیکومول (با غلظت نهایی ۰/۲ پیکومول در حجم ۲۵ میکرولیتر مخلوط واکنش) و ۳ میکرولیتر DNA (غلظت ۱۰-۵ نانوگرم در حجم ۲۵ میکرولیتر مخلوط واکنش) تهیه گردید. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (thermal cycler) (MJ Research, USA) با واسرشت‌سازی اولیه در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه و ۳۵ چرخه تحت شرایط واسرشت‌سازی در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه، اتصال در ۵۶ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه، بسط در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه و بسط نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. برای تکثیر ناحیه ژنی اکتین، از ترکیب آغازگرهای ACT-512F (5'-ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC-3') و ACT-783R (5'-TACGAGTCCTTCTGCCCCAT-3') استفاده گردید (Carbone & Kohn 1999). مخلوط واکنش PCR با حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۹/۵ میکرولیتر آب دیونیزه استریل، ۱۱/۵ میکرولیتر 2 X PCR Master Mix، ۰/۵ میکرولیتر از هر آغازگر به غلظت ۱۰ پیکومول (با غلظت نهایی ۰/۲ پیکومول در حجم ۲۵ میکرولیتر مخلوط واکنش) و ۳ میکرولیتر DNA (غلظت ۱۰-۵ نانوگرم در حجم ۲۵ میکرولیتر مخلوط واکنش) تهیه شد. واکنش PCR در همان دستگاه ترموسایکلر تحت شرایط واسرشت‌سازی اولیه در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه و سپس ۴۰ چرخه با واسرشت‌سازی در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، بسط در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۸۰ ثانیه و بسط نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت هفت دقیقه انجام شد. برای تکثیر ناحیه ژنی بتا توبولین، از ترکیب آغازگرهای TUB2Fd (5'-GTBCACCTYCARACCGGYCARTG-3') و TUB4Rd (5'-CCRGAYTGRCRAARACRAAGTTGTC-3') استفاده گردید (Woudenberg *et al.* 2009). مخلوط واکنش PCR با حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۹/۵ میکرولیتر آب دیونیزه استریل، ۱۱/۵ میکرولیتر 2X PCR Master Mix، ۰/۵ میکرولیتر از هر آغازگر به غلظت ۱۰ پیکومول (با غلظت نهایی ۰/۲ پیکومول در حجم ۲۵ میکرولیتر) و ۳ میکرولیتر DNA در همان دستگاه ترموسایکلر با شرایطی مشابه شرایط تکثیر ناحیه ژنی اکتین انجام شد، با این تفاوت که دمای اتصال ۶۴ درجه سلسیوس تنظیم گردید. سپس، محصولات PCR از طریق الکتروفورز در ژل آگارز ۲٪ ارزیابی شدند. تعیین توالی نواحی تکثیر شده توسط شرکت بایونیر (Bioneer, South Korea) انجام شد. پس از اخذ توالی‌ها، جهت اطمینان از صحت داده‌ها، توالی‌ها با استفاده از ابزار جستجوی BLAST (basic local alignment search tool) با توالی‌های موجود در بانک ژن (NCBI) مقایسه شدند. مقایسه فیلوژنتیکی هفت جدایه به دست آمده به همراه ۲۴ جدایه که توالی آن‌ها از بانک ژن اخذ شده بود انجام گرفت و گونه *Pyrenochaeta lycopersici* به عنوان گروه خارجی (out-group) در نظر گرفته شد.

توالی‌ها با استفاده از ابزار ClustalW و نرم‌افزار MEGA v.6 مرتب‌سازی شدند و در ارزیابی توالی‌ها از روش مقایسه توالی‌ها و ترسیم درخت فیلوژنتیکی با روش‌های maximum likelihood (ML) و maximum parsimony (MP) با استفاده از نرم‌افزار MEGA v.6 انجام شد (Tamura *et al.* 2013). برای اطمینان از ثبات شاخه‌های موجود در شجره‌های حاصل، از

۶۲

۱۳ ساعت نور نزدیک به فرابنفش (near UV) و ۱۱ ساعت تاریکی در دمای ۲۲ درجه سلسیوس نگهداری شدند. پس از ۱۴ روز، اندازه‌گیری ابعاد پیکنیدیوم‌ها، کنیدیوم‌ها و کلامیدوسپورها با استفاده از بررسی حداقل ۵۰ اندام قارچی صورت پذیرفت. جهت مطالعه اندام‌های قارچی از میکروسکوپ نیکون (Nikon) مدل E200 استفاده شد. نمونه‌های میکروسکوپی از اندام‌های قارچی با استفاده از محلول‌های لاکتوفل و کاتن‌بلو تهیه گردید.

- تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیکی

پس از شناسایی جدایه‌ها براساس خصوصیات ریخت‌شناسی، جدایه‌هایی از هر گونه جهت مطالعات فیلوژنتیکی انتخاب شدند (جدول ۱). 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 & Doyle 1987). به منظور ارزیابی فیلوژنتیکی، نواحی ژنومی ITS1-5.8S-ITS2، اکتین و بتا توبولین تکثیر و تعیین توالی شدند. جهت تکثیر ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 هسته‌ای از ترکیب آغازگرهای ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCG-3') به همراه ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') به ترتیب به عنوان آغازگرهای مستقیم و معکوس استفاده شد (White *et al.* 1990). مخلوط واکنش PCR با حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۸/۵ میکرولیتر آب دیونیزه استریل، ۱۲/۵ میکرولیتر 2 X PCR Master Mix، ۰/۵ میکرولیتر از هر آغازگر به غلظت ۱۰ پیکومول (با غلظت نهایی ۰/۲ پیکومول در حجم ۲۵ میکرولیتر مخلوط واکنش) و ۳ میکرولیتر DNA (غلظت ۱۰-۵ نانوگرم در حجم ۲۵ میکرولیتر مخلوط واکنش) تهیه گردید. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (thermal cycler) (MJ Research, USA) با واسرشت‌سازی اولیه در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه و ۳۵ چرخه تحت شرایط واسرشت‌سازی در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه، اتصال در ۵۶ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه، بسط در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه و بسط نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. برای تکثیر ناحیه ژنی اکتین، از ترکیب آغازگرهای ACT-512F (5'-ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC-3') و ACT-783R (5'-TACGAGTCCTTCTGCCCCAT-3') استفاده گردید (Carbone & Kohn 1999). مخلوط واکنش PCR با حجم ۲۵

استان گیلان، شهرستان آستانه اشرفیه، منطقه صفرابسته،
۱۳۹۴/۴/۱۵

پیکنیدیوم‌ها کروی تا نامنظم، دارای یک روزنه پستانک‌دار (papillate) به صورت منفرد یا در هم ادغام شده، به قطر ۲۰۰ تا ۶۰۰ میکرومتر پراکنده در سطح محیط کشت، گاهی کوچک‌تر به قطر ۲۰۰-۱۲۰ میکرومتر دارای آرایش شعاعی متحدالمرکز. کنیدیوم‌ها بی‌رنگ، تک‌سلولی، بیضوی، به ابعاد $(۱/۹-۲/۵-۱/۵) \times (۴/۸-۸-۴)$ میکرومتر واجد یک تا دو قطره چربی (guttule) در قطبین، توده کنیدیوم به رنگ سفید متمایل به زرد و تولید سلول‌های متورم توسط ریشه‌ها در هر دو محیط کشت.

پرگنه قارچ روی محیط کشت MEA به رنگ سفید با حاشیه منظم، قطر پرگنه در هفت روز اول ۵۲ و پس از ۱۴ روز ۷۵ میلی‌متر و روی محیط کشت OMA پرگنه قارچ به رنگ سبز متمایل به قهوه‌ای با حاشیه منظم و قطر پرگنه پس از هفت و ۱۴ روز به ترتیب ۵۰ و ۷۵ میلی‌متر (شکل ۱).

تجزیه و تحلیل اعتبارسنجی با انجام ۱۰۰۰ تکرار استفاده گردید (Felsenstein 1985). توالی‌های حاصل از سه ناحیه ژنی مربوط به هفت جدایه به NCBI فرستاده شد و شماره دستیابی برای آن‌ها اخذ گردید.

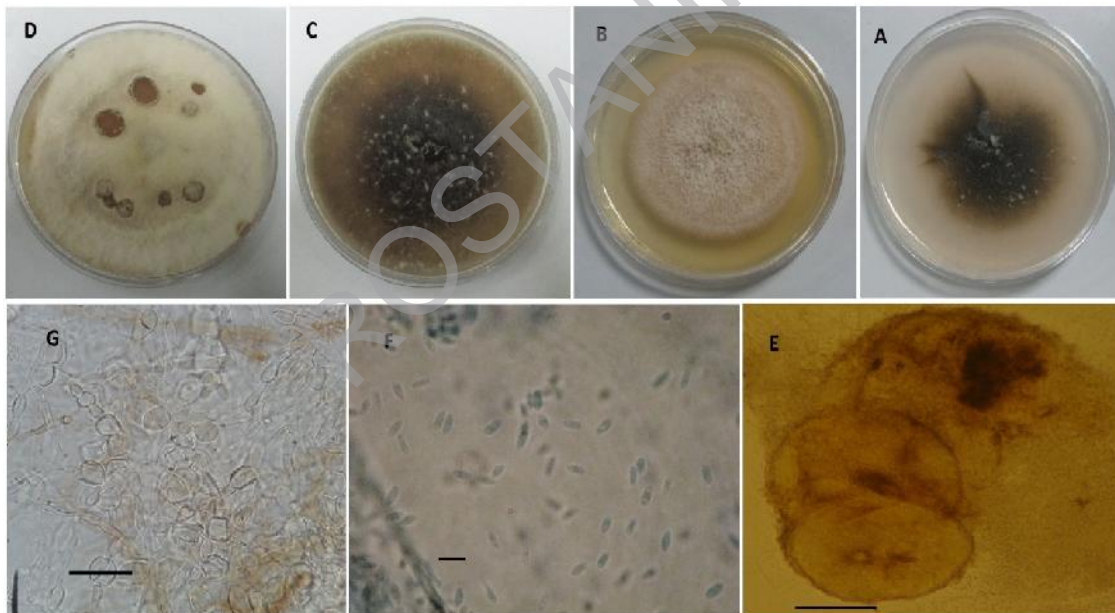
نتیجه

طی نمونه‌برداری از استان‌های مازندران، گیلان، اصفهان و خوزستان تعداد ۳۵ جدایه از گونه‌های مختلف جنس *Phoma* و آرایه‌های وابسته به دست آمدند که به هفت گونه تعلق داشتند. توصیف این گونه‌ها به شرح زیر آرایه می‌گردد:

Didymella bellidis (Neerg.) Q. Chen & L. Cai, in -1

Chen, Jiang, Zhang, Cai & Crous, Stud. Mycol. 82: 174 (2015)

نمونه‌های بررسی شده: شش جدایه از برگ *Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle جدایه‌های IR-P-Ai20، IR-P-Ai25 و IR-P-Ai24، IR-P-Ai22، IR-P-Ai23، IR-P-Ai21



شکل ۱- گونه *Didymella bellidis* (جدایه IR-P-Ai20): A. پرگنه هفت روزه قارچ روی محیط کشت OMA، B. پرگنه هفت روزه قارچ روی محیط کشت MEA، C. پرگنه ۱۴ روزه قارچ روی محیط کشت OMA، D. پرگنه ۱۴ روزه قارچ روی محیط کشت MEA، E. پیکنیدیوم‌ها (مقیاس = ۱۰۰ میکرومتر)، F. کنیدیوم‌ها (مقیاس = ۱۰ میکرومتر)، G. سلول‌های متورم (مقیاس = ۲۰ میکرومتر).

Fig. 1. *Didymella bellidis* (isolate IR-P-Ai20): A. Seven days old colony on OMA, B. Seven days old colony on MEA, C. 14 days old colony on OMA, D. 14 days old colony on MEA, E. Pycnidia (Bar = 100 μ m), F. Conidia (Bar = 10 μ m), G. Swollen cell (Bar = 20 μ m).

به ابعاد $(2/8-3-2) \times (5-7-4)$ میکرومتر و توده کنیدیوم به رنگ سفید متمایل به صورتی، دارای چند لکه چربی کوچک پراکنده. تولید سلول‌های متورم توسط ریشه‌ها.

پراکنه قارچ روی محیط کشت MEA به رنگ قهوه‌ای متمایل به خاکستری با حاشیه منظم و قطر ۴۲ و ۷۰ میلی‌متر پس از هفت و ۱۴ روز و روی محیط کشت OMA به رنگ سبز تیره با میسلیم هوایی سفید به قطر ۶۵ و ۷۵ میلی‌متر پس از هفت و ۱۴ روز (شکل ۲).

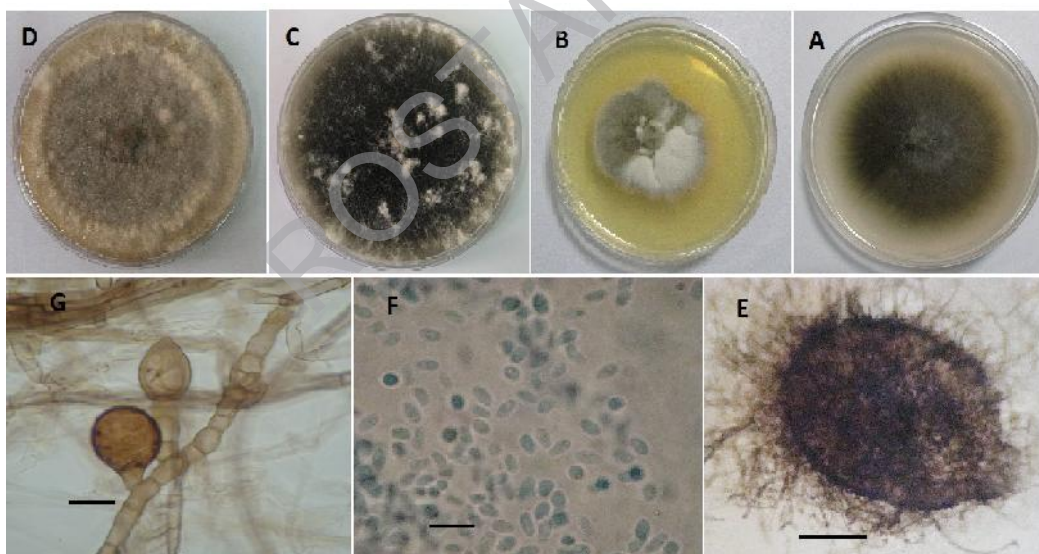
گونه *N. betae* دارای پراکنش جهانی بوده و از ارقام مختلف چغندر (*Beta vulgaris*)، اسفناج و گیاهان تیره *Chenopodiaceae* گزارش شده است. این گونه عامل ساق‌سیاه، مرگ گیاهچه، پوسیدگی ریشه، پوسیدگی انباری و لکه‌برگی می‌باشد (Boerema et al. 2004). در ایران، این گونه با نام *P. betae* نخستین بار توسط آلتمان و همکاران در سال ۱۹۷۲ از *Beta vulgaris* گزارش شد و پس از آن نیز بارها توسط افراد مختلف از این گیاه گزارش شده است (Ershad 2009).

گونه *D. bellidis* از بذور گیاه *Bellis perennis* و گیاهان تیره *Asteraceae* و همچنین به عنوان عامل لکه‌برگی و مرگ گیاهچه از نقاط مختلف اروپا گزارش شده است (Boerema et al. 2004). این گونه به عنوان عامل لکه‌برگی گیاه *Angelia dahurica* و عامل پوسیدگی ساقه گیاه *Eleocharis dulcis* از چین گزارش شده است (Lv. et al. 2011, Xu et al. 2016). گونه *D. bellidis* آرایه جدیدی برای فلور قارچی ایران است.

۲- *Neocamarosporium betae* (Berl.) Ariyawansa & K.D. Hyde, in Ariyawansa, Thambugala, Manamgoda, Jayawardena, Camporesi & Saranyaphat, Fungal Diversity 71: 119 (2015)

نمونه‌های بررسی شده: چهار جدایه از برگ *Beta vulgaris* L. جدایه‌های IR-P-be11، IR-P-be12، IR-P-be13 و IR-P-be14، استان خوزستان، شهرستان دزفول، ۱۳۹۳/۰۲/۰۲

پیکنیدیوم‌ها کروی، تقریباً کروی تا بیضوی، منفرد یا چند عدد درهم ادغام شده، پوشیده از موهای متراکم میسلیمی با یک یا دو روزنه نه چندان واضح بدون پستانک به قطر ۳۵۰-۱۵۰ میکرومتر. کنیدیوم‌ها بی‌رنگ، کروی تا بیضوی،



شکل ۲- گونه *Neocamarosporium betae* (جدایه IR-P-be13): A. پراکنه هفت روزه قارچ روی محیط کشت OMA، B. پراکنه هفت روزه قارچ روی محیط کشت MEA، C. پراکنه ۱۴ روزه قارچ روی محیط کشت OMA، D. پراکنه ۱۴ روزه قارچ روی محیط کشت MEA، E. پیکنیدیوم‌ها (مقیاس = ۱۰۰ میکرومتر)، F. کنیدیوم‌ها (مقیاس = ۱۰ میکرومتر)، G. سلول‌های متورم (مقیاس = ۲۰ میکرومتر).

Fig. 2. *Neocamarosporium betae* (isolate IR-P-be13): A. Seven days old colony on OMA, B. Seven days old colony on MEA, C. 14 days old colony on OMA, D. 14 days old colony on MEA, E. Pycnidia (Bar = 100 μ m), F. Conidia (Bar = 100 μ m), G. Swollen cells (Bar = 20 μ m).

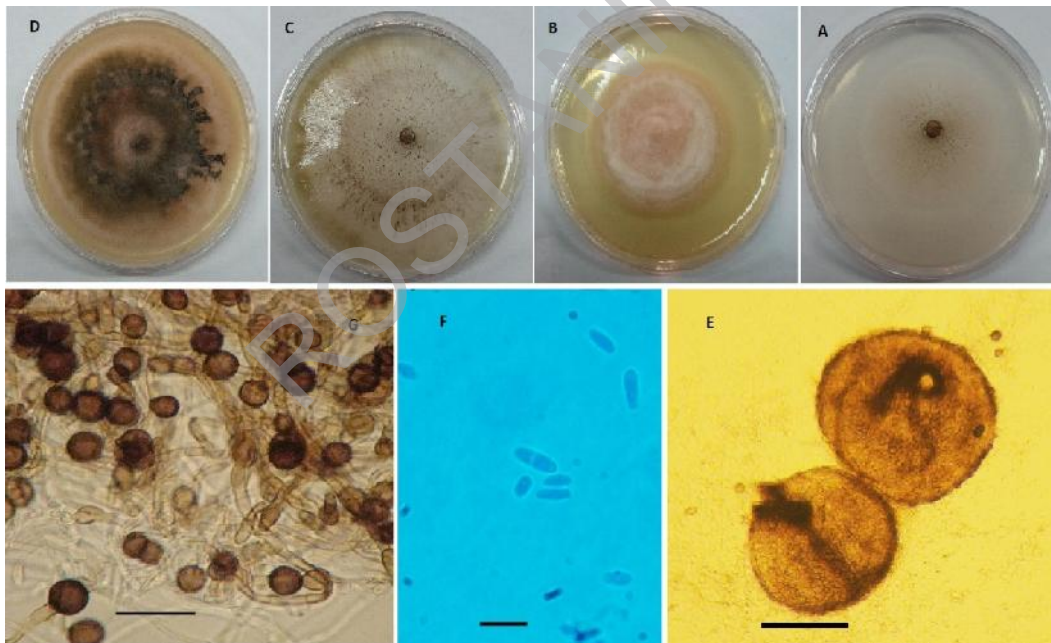
میلی‌متر پس از هفت و ۱۴ روز و روی محیط کشت OMA به رنگ سفید همراه با رگه‌های قهوه‌ای رنگ با حاشیه منظم به قطر ۵۵ و ۷۰ میلی‌متر پس از هفت و ۱۴ روز (شکل ۳).
 گونه *D. pinodella* بیمارگر معروف گیاهان تیره *Leguminosae* خصوصا *Pisum sativum* و عامل بیماری ساق‌سیاه و لکه‌برگی در طیف وسیعی از گیاهان در نقاط مختلف جهان می‌باشد. این گونه اغلب با *Peyronellaea pinodes* به دلیل شباهت در دامنه میزبانی، علائم بیماری و تولید کلامیدوسپور اشتباه گرفته می‌شود. هرچند تفاوت در ویژگی‌های پرگنه، کنیدی‌های بالغ واجد دیواره عرضی و تولید اندام جنسی در محیط‌های کشت تازه تمایز را تا حدودی امکان‌پذیر می‌سازد (Boerema et al. 2004). در ایران، گونه *P. pinodella* از سویا (*Glycine max*) گزارش شده است (Zad 1979). بنابراین، گونه مذکور برای نخستین بار از گیاه شنبليله (*-Trigonella foenum-graecum L.*) در ایران گزارش می‌شود.

Didymella pinodella (L.K. Jones) Q. Chen & L. Cai, -۳
 Stud. Mycol. 82: 178 (2015)

نمونه‌های بررسی شده: چهار جدایه از برگ *Trigonella foenum-graecum L.* IR-IR-P-ve33, IR-P-ve32, IR-P-ve35, P-ve34 استان مازندران، شهرستان بابل، ۱۳۹۴/۰۱/۱۲

پیکنیدیوم‌ها کروی، تقریباً کروی تا نامنظم، دارای روزنه مشخص به قطر ۲۸۰-۱۰۰ میکرومتر. کنیدیوم‌ها بی‌رنگ، تخم‌مرغی تا بیضوی، فاقد یا دارای دیواره عرضی به ابعاد $(۲/۶۷-۳) \times (۷/۲-۱۰-۶)$ میکرومتر و توده کنیدیوم به رنگ سفید متمایل به زرد، برخی از کنیدیوم‌ها دارای یک یا دو قطره چربی کوچک. تولید کلامیدوسپورهای تک‌سلولی در قسمت‌های میانی یا انتهایی ریشه به صورت منفرد یا زنجیری به ابعاد ۲۰-۱۰ میکرومتر.

پرگنه قارچ روی محیط کشت MEA به رنگ زیتونی متمایل به قهوه‌ای با حاشیه نامنظم و قطر ۴۵-۵۵ و ۷۰



شکل ۳- گونه *Didymella pinodella* (جدایه IR-P-ve35): A. پرگنه هفت روزه قارچ روی محیط کشت OMA، B. پرگنه هفت روزه قارچ روی محیط کشت MEA، C. پرگنه ۱۴ روزه قارچ روی محیط کشت OMA، D. پرگنه ۱۴ روزه قارچ روی محیط کشت MEA، E. پیکنیدیوم‌ها (مقیاس = ۱۰۰ میکرومتر)، F. کنیدیوم‌ها (مقیاس = ۱۰ میکرومتر)، G. کلامیدوسپورها (مقیاس = ۲۰ میکرومتر).
 Fig. 3. *Didymella pinodella* (isolate IR-P-Ve35): A. Seven days old colony on OMA, B. Seven days old colony on MEA, C. 14 days old colony on OMA, D. 14 days old colony on MEA, E. Pycnidia (Bar = 100 μ m), F. Conidia (Bar = 10 μ m), G. Chlamydospores (Bar = 20 μ m).

***Phoma destructiva* var. *destructiva* Plowr., -۴**

Gard. Chron., N.S. 16: 621 (1881)

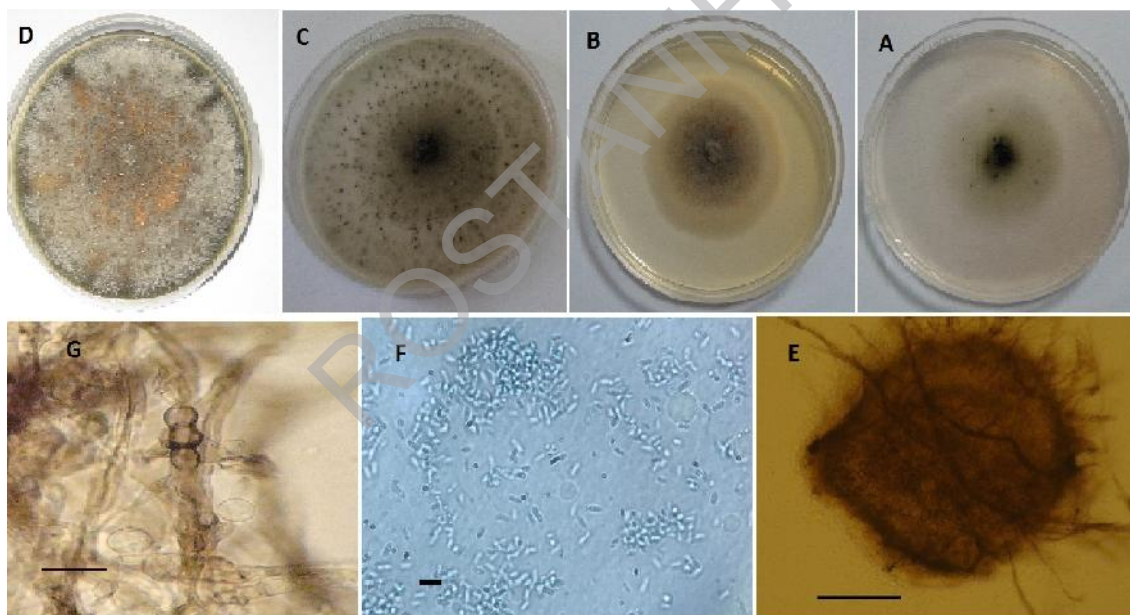
نمونه‌های بررسی شده: پنج جدایه از برگ *Solanum lycopersicum* L. جدایه‌های IR-P-To3، IR-P-To4، IR-P-To5، IR-P-To6 و IR-P-To7، استان مازندران، مزارع اطراف شهرستان بهنمیر، ۱۳۹۳/۰۴/۲۶

پیکنیدیوم‌ها کروی تا نامنظم، منفرد یا مجتمع و غالباً به صورت فرورفته در محیط کشت، دارای یک روزنه پستانک‌دار به قطر ۳۴۰-۱۲۰ میکرومتر. کنیدیوم‌ها بی‌رنگ، دوکی شکل تا بیضوی، فاقد دیواره عرضی به ابعاد $(-۲/۲۴) \times ۲-۳$ و $(-۵/۳۱) \times ۴-۷$ میکرومتر و توده کنیدیوم به رنگ صورتی متمایل به نارنجی. تولید کلامیدوسپوره‌های تک‌سلولی در قسمت‌های میانی یا انتهایی ریشه.

پرگنه قارچ روی محیط کشت MEA به رنگ قهوه‌ای متمایل به سبز تیره همراه با مسلیوم‌های سطحی سفیدرنگ با

حاشیه منظم و قطر ۵۰ و ۷۵ میلی‌متر پس از هفت و ۱۴ روز و روی محیط کشت OMA به رنگ سفید همراه با رگه‌های سبز تیره با حاشیه منظم به قطر ۴۴ و ۷۵ میلی‌متر پس از هفت و ۱۴ روز (شکل ۴).

این گونه از سال ۱۹۷۷ بارها از گوجه‌فرنگی در گلخانه‌های هلند گزارش شده است. گونه *P. destructiva* سبب نکروز قهوه‌ای در برگ‌ها و ساقه‌ها می‌گردد و پیکنیدیوم‌های سیاه‌رنگ قارچ به صورت دوایر متحدالمرکز در محل لکه‌ها ظاهر می‌شوند. همچنین، این گونه پوسیدگی میوه را موجب می‌گردد و به عنوان عامل سوختگی گوجه‌فرنگی از نقاط مختلف جهان گزارش شده است (Rashid et al. 2016, Boerema et al. 2004). تاکنون گزارشی از این گونه در ایران وجود نداشته و واریته *Phoma destructiva* var. *destructiva* آرایه جدیدی برای فلور قارچی ایران می‌باشد.



شکل ۴- گونه *Phoma destructiva* var. *destructiva* (جدایه (R-P-To4): A. پرگنه هفت روزه قارچ روی محیط کشت OMA، B. پرگنه هفت روزه قارچ روی محیط کشت MEA، C. پرگنه ۱۴ روزه قارچ روی محیط کشت OMA، D. پرگنه ۱۴ روزه قارچ روی محیط کشت MEA، E. پیکنیدیوم‌ها (مقیاس = ۱۰۰ میکرومتر)، F. کنیدیوم‌ها (مقیاس = ۱۰ میکرومتر)، G. کلامیدوسپورها (مقیاس = ۲۰ میکرومتر).
Fig. 4. *Phoma destructiva* var. *destructiva* (isolate IR-P-To4): A. Seven days old colony on OMA, B. Seven days old colony on MEA, C. 14 days old colony on OMA, D. 14 days old colony on MEA, E. Pycnidia (Bar = 100 μ m), F. Conidia (Bar = 10 μ m), G. Chlamydospores (Bar = 20 μ m).

۵- *Boeremia exigua* (Desm.) Aveskamp, Gruyter &Verkley, *Studies in Mycology* 65: 37 (2010)

نمونه‌های بررسی شده: هفت جدایه از برگ *Paliurus spina-christi* L. جدایه‌های IR-P-Pa12، IR-P-Pa13، IR-P-Pa14، IR-P-Pa15 و IR-P-Pa16، IR-P-Pa17 و IR-P-Pa18، استان مازندران، شهرستان پل سفید، منطقه شورمست، ۱۳۹۳/۰۷/۱۰

پیکنیدیوم‌ها کروی، تقریباً کروی تا نامنظم، منفرد یا مجتمع، گاهی به صورت فرورفته در محیط کشت، دارای یک روزنه پستانک‌دار به قطر ۲۸۰-۱۲۰ میکرومتر. کنیدیوم‌ها بی‌رنگ، دوکی شکل تا بیضوی فاقد یا دارای یک یا دو دیواره عرضی به ابعاد (۳-۴) × (۲/۵-۳) × (۳-۴) میکرومتر، برخی از کنیدیوم‌ها دارای یک یا دو قطره چربی در سطح یا قطبین و توده کنیدیوم به رنگ سفید متمایل به زرد. تولید سلول‌های متورم توسط ریشه‌ها.

پرگنه قارچ روی محیط کشت MEA به رنگ خاکستری متمایل به زیتونی با حاشیه نامنظم و قطر ۶۵ و ۷۵ میلی‌متر پس از هفت و ۱۴ روز و روی محیط کشت OMA بی‌رنگ همراه با رگه‌های خاکستری متمایل به سبز تیره با حاشیه نامنظم به قطر ۶۵ و ۷۵ میلی‌متر پس از هفت و ۱۴ روز (شکل ۵).

گونه *B. exigua* دارای دامنه میزبانی وسیع می‌باشد و تاکنون از بیش از ۲۰۰ میزبان گیاهی جداسازی شده‌اند. این گونه قارچی فرصت‌طلب است، به طوری که ممکن است علائمی همچون نکروز در برگ‌ها و ساقه‌ها، پوسیدگی ریشه‌های جوان و غده‌ها را در گیاهان تیره‌های *Apiaceae*، *Solanaceae*، *Asteraceae* ایجاد نماید

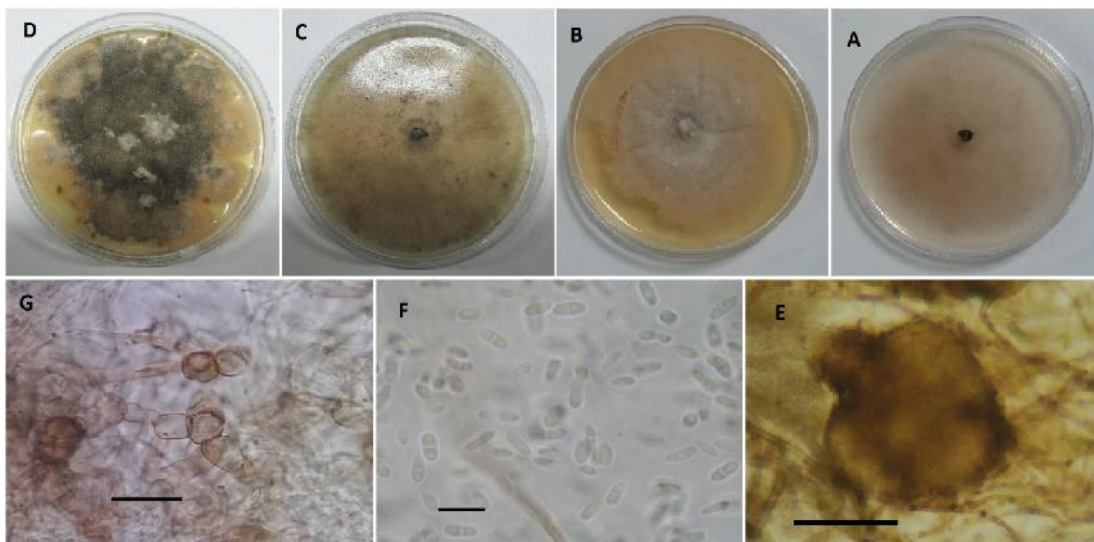
(Boerema *et al.* 2004). گزارش‌هایی از بیمارگری این گونه از پنبه، کاهو و ... از نقاط مختلف جهان وجود دارد و همچنین، در فهرست بیمارگرهای انسانی نیز قرار گرفته است (Koike *et al.* 2006, Koenig *et al.* 2000,) در ایران، این گونه توسط شریفی و همکاران در سال ۲۰۰۲ از سیب‌زمینی گزارش شده است (Ershad 2009).

۶- *Phoma medicaginis* Malbr. & Roum, Fungi Selecti Galliae Exs. 37: No. 3675 (1886)

نمونه‌های بررسی شده: روی برگ و ساقه *Medicago sativa* L. جدایه‌های IR-P-Me7، IR-P-Me8، IR-P-Me9، IR-P-Me10 و IR-P-Me11، استان اصفهان، شهرستان گلپایگان، ۱۳۹۳/۰۲/۲۴

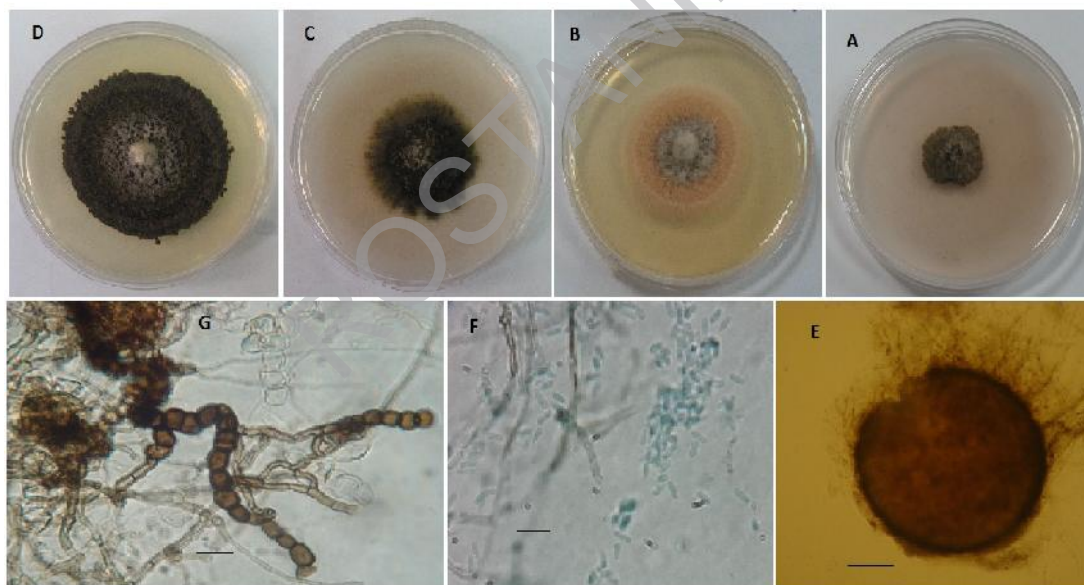
پیکنیدیوم‌ها کروی تا تقریباً کروی، منفرد و فاقد زواید میسلیومی، فاقد روزنه مشخص به قطر ۳۵۰-۱۵۰ میکرومتر. کنیدیوم‌ها بی‌رنگ، استوانه‌ای شکل و به ندرت واجد دیواره عرضی به ابعاد (۱/۹-۲) × (۱/۵-۱۲) میکرومتر، توده کنیدیوم‌ها به رنگ سفید متمایل به صورتی. تولید کلامیدوسپوره‌های تک‌سلولی به صورت زنجیره‌ای توسط ریشه‌ها.

پرگنه قارچ روی محیط کشت MEA به رنگ قهوه‌ای تیره همراه با مسلیوم‌های سطحی سفیدرنگ در مرکز پرگنه با حاشیه منظم و قطر ۴۵ و ۵۰ میلی‌متر پس از هفت و ۱۴ روز و روی محیط کشت OMA به رنگ زیتونی متمایل به سبز تیره با حاشیه نامنظم به قطر ۲۳ و ۴۰ میلی‌متر پس از هفت و ۱۴ روز (شکل ۶).



شکل ۵- گونه *Boeremia exigua* (جدایه IR-P-Pa15): A. پراگنه هفت روزه قارچ روی محیط کشت OMA، B. پراگنه هفت روزه قارچ روی محیط کشت MEA، C. پراگنه ۱۴ روزه قارچ روی محیط کشت OMA، D. پراگنه ۱۴ روزه قارچ روی محیط کشت MEA، E. پیکنیدیومها (مقیاس = ۱۰۰ میکرومتر) و F. کنیدیومها (مقیاس = ۱۰ میکرومتر)، G. سلول‌های متورم (مقیاس = ۲۰ میکرومتر).

Fig. 5. *Boeremia exigua* (isolate IR-P-Pa15): A. Seven days old colony on OMA, B. Seven days old colony on MEA, C. 14 days old colony on OMA, D. 14 days old colony on MEA, E. Pycnidia (Bar = 100 μ m), F. Conidia (Bar = 10 μ m), G. Swollen cell (Bar = 20 μ m).



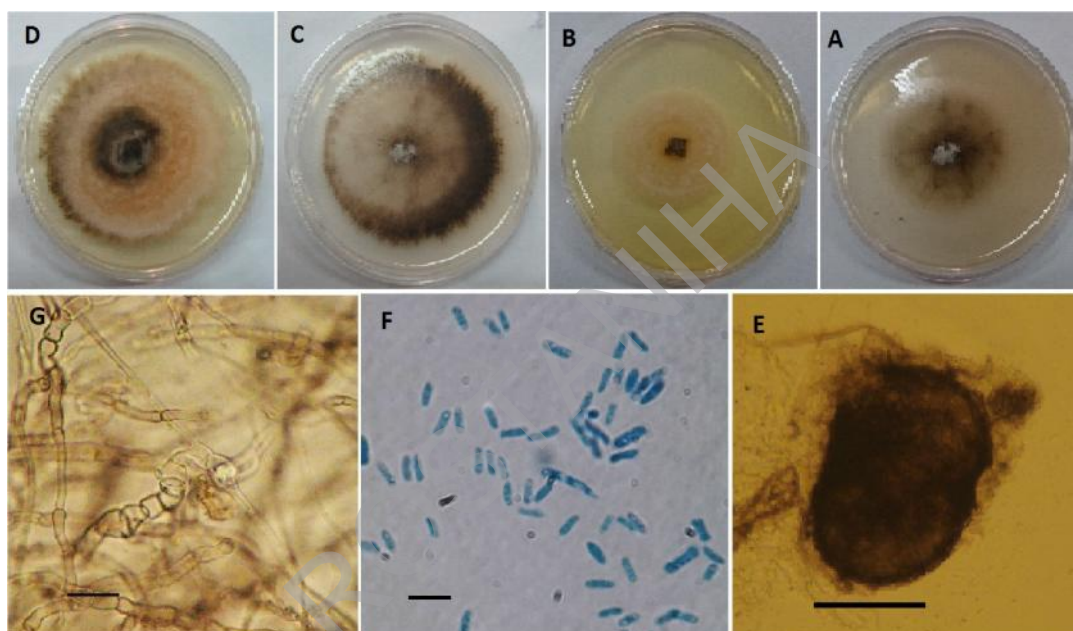
شکل ۶- گونه *Phoma medicaginis* (جدایه IR-P-Me8): A. پراگنه هفت روزه قارچ روی محیط کشت OMA، B. پراگنه هفت روزه قارچ روی محیط کشت MEA، C. پراگنه ۱۴ روزه قارچ روی محیط کشت OMA، D. پراگنه ۱۴ روزه قارچ روی محیط کشت MEA، E. پیکنیدیومها (مقیاس = ۱۰۰ میکرومتر)، F. کنیدیومها (مقیاس = ۱۰ میکرومتر)، G. کلامیدوسپورها (مقیاس = ۲۰ میکرومتر).

Fig. 6. *Phoma medicaginis* (isolate IR-P-Me8): A. Seven days old colony on OMA, B. Seven days old colony on MEA, C. 14 days old colony on OMA, D. 14 days old colony on MEA, E. Pycnidia (Bar = 100 μ m), F. Conidia (Bar = 10 μ m), G. Chlamydospores (Bar = 20 μ m).

گونه *P. medicaginis* عامل بیماری ساق‌سیاه یونجه (*Medicago sativa*) از تیره *Fabaceae* محسوب می‌شود و از گیاهان غیر از اعضای این تیره نیز جداسازی شده است. دو واریته *P. medicaginis* و *P. medicaginis* var. *medicaginis* از var. *macrospora* شبیه به هم هستند و تنها ویژگی متمایز کننده در آن‌ها تولید درصد زیادی از کنیدیوم‌های بزرگ واجد ۱ تا ۳ دیواره عرضی در فصل سرما (زمستان) روی میزبان در واریته *macrospora* می‌باشد (Boerema et al. 2004). آرایه *P. medicaginis* var. *pinodella* نیز تاکنون به عنوان عامل ساق‌سیاه شبدر قرمز و پوسیدگی و لکه‌برگی خودفرنگی گزارش شده است

Didymella acetosellae (A.L. Sm. & Ramsb.) Q. Chen -Y & L. Cai, in Chen, Jiang, Zhang, Cai & Crous, Stud. Mycol. 82: 173 (2015)

نمونه‌های بررسی شده: چهار جدایه از برگ *Rumex crispus* L. جدایه‌های IR-P-Ru44 و IR-P-Ru45، استان مازندران، شهرستان کلاردشت، جاده کلاردشت به عباس‌آباد، ۱۳۹۳/۰۷/۱۰، جدایه‌های IR-P-Ru46 و IR-P-Ru47 استان مازندران، بهشهر، منطقه عباس‌آباد، ۱۳۹۴/۰۳/۱۵



شکل ۷- گونه *Didymella acetosellae* (جدایه IR-P-Ru46): A. پرگنه هفت روزه قارچ روی محیط کشت OMA، B. پرگنه هفت روزه قارچ روی محیط کشت MEA، C. پرگنه ۱۴ روزه قارچ روی محیط کشت OMA، D. پرگنه ۱۴ روزه قارچ روی محیط کشت MEA، E. پیکنیدیوم‌ها (مقیاس = ۱۰۰ میکرومتر)، F. کنیدیوم‌ها (مقیاس = ۱۰ میکرومتر)، G. سلول‌های متورم (مقیاس = ۲۰ میکرومتر).

Fig. 7. *Didymella acetosellae* (isolate IR-P-Ru46): A. Seven days old colony on OMA, B. Seven days old colony on MEA, C. 14 days old colony on OMA, D. 14 days old colony on MEA, E. Pycnidia (Bar = 100 μm), F. Conidia (Bar = 10 μm), G. Swollen cell (Bar = 20 μm).

پرگنه قارچ روی محیط کشت MEA به رنگ زیتونی متمایل به قهوه‌ای با حاشیه منظم و قطر ۴۰ و ۶۰ میلی‌متر پس از هفت و ۱۴ روز و روی محیط کشت OMA سفید رنگ در حاشیه متمایل به قهوه‌ای و فاقد میسلیم‌های هوایی به قطر ۵۵ و ۷۵ میلی‌متر پس از هفت و ۱۴ روز (شکل ۷).

گونه *D. acetosellae* قارچی شایع در برگ‌های مسن *Rumex acetosella* از تیره *Polygonaceae* می‌باشد و سبب

پیکنیدیوم‌ها کروی تا تقریباً کروی، منفرد، واجد زواید سطحی میسلیمومی، یک یا دو روزه پستانک‌دار به قطر ۲۵۰-۱۰۰ میکرومتر. کنیدیوم‌ها بی‌رنگ، بیضوی تا سوسپسی شکل و به ندرت واجد دیواره عرضی به ابعاد $(2/2) - 3 \times (6/5) - 11$ میکرومتر، برخی از کنیدیوم‌ها دارای یک یا چند قطره چربی، توده کنیدیوم‌ها به رنگ سفید متمایل به زرد. تولید سلول‌های متورم توسط ریشه‌ها.

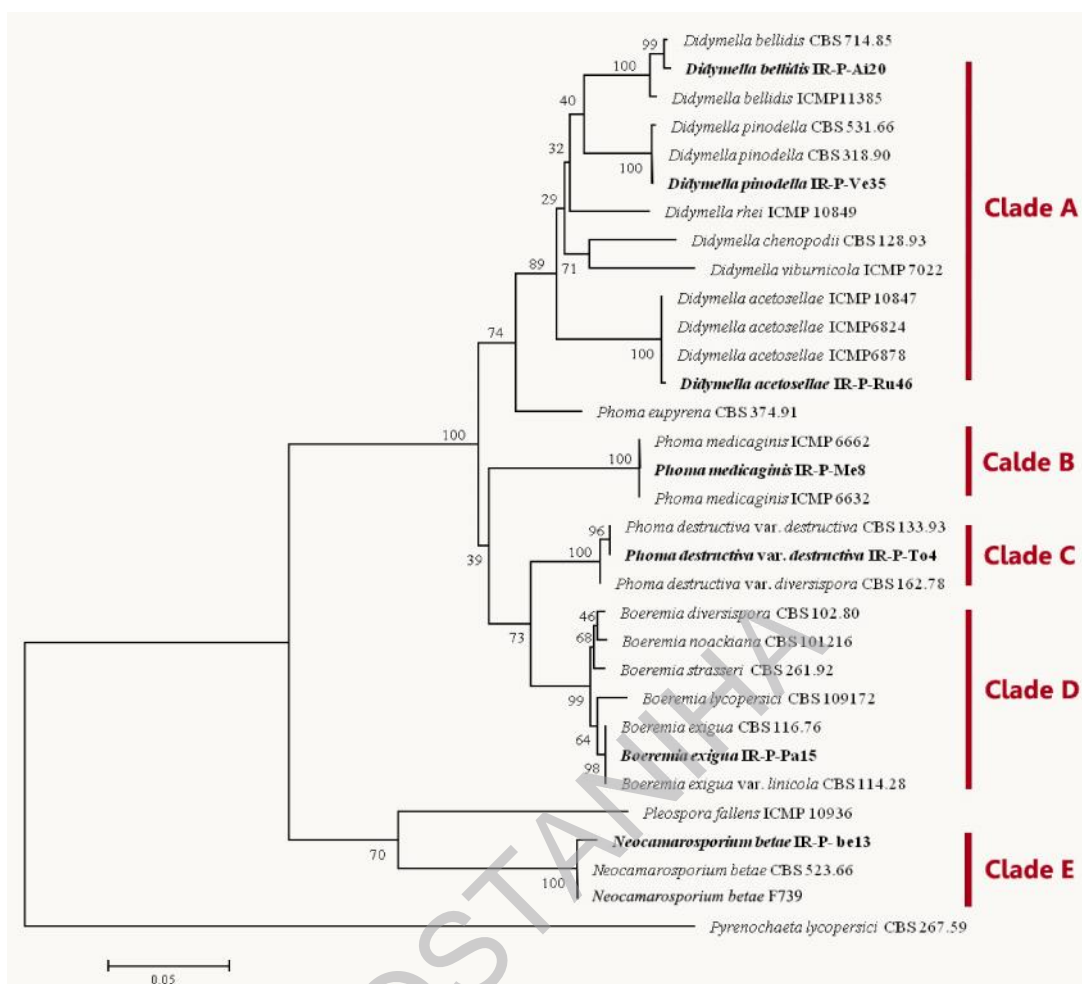
لکه‌برگی و نکروز ساقه در این گیاهان می‌شود. این گونه تاکنون از نقاط مختلف دنیا و در هر مکانی که میزبان وجود داشته باشد گزارش شده است (Boerema et al. 2004). تاکنون گزارشی از این قارچ در ایران وجود نداشته و لذا گونه *D. acetosellae* آرایه جدیدی برای فلور قارچی ایران به حساب می‌آید.

به این گروه از قارچ‌ها نیز از بانک ژن (NCBI) اخذ و به توالی‌های هفت جدایه مورد مطالعه در این تحقیق اضافه گردید و هم‌ردیف‌سازی آن‌ها نیز انجام شد. گونه *Pyrenochaeta lycopersici* R.W. Schneid. & Gerlach به عنوان گروه خارجی (out-group) انتخاب شد (جدول ۱). تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیکی تک‌ژنی مبتنی بر نواحی ژنومی ITS، اکتین و بتا توبولین و در نهایت چندژنی (ITS-ACT-TUB) با روش‌های ML و MP با استفاده از نرم‌افزار MEGA6 انجام شد.

- ارزیابی فیلوژنتیکی گونه‌های جنس *Phoma* و آرایه‌های وابسته پس از بررسی‌های ریخت‌شناختی ۳۵ جدایه، در مجموع هفت جدایه به عنوان نماینده گونه‌های ریخت‌شناختی جهت مطالعات مولکولی انتخاب شدند. توالی ۲۴ جدایه مربوط

جدول ۱- مشخصات جدایه‌های گونه‌های جنس *Phoma* و آرایه‌های وابسته توالی‌یابی شده در این تحقیق و اخذ شده از بانک ژن (NCBI)
Table 1. Isolates of species belonging to *Phoma* and related taxa sequenced in this study and obtained from GenBank (NCBI)

شماره دستیابی در بانک ژن (NCBI) (GenBank Accession No.)			منبع (Reference)	جدایه (Isolate)	گونه (Taxon)
TUB	ACT	ITS			
GU237492	EU880861	GU237725	Aveskamp et al. (2008)	CBS 102.80	<i>Boeremia diversispora</i>
GU237500	EU880880	GU237754	Aveskamp et al. (2008)	CBS 116.76	<i>B. exigua</i>
GU237499	EU880879	GU237752	Aveskamp et al. (2010)	CBS 114.28	<i>B. exigua</i> var. <i>linicola</i>
KY486380	KY486367	KY486370	Amirdehi et al. (2017)	IR-P-Pa15	<i>B. exigua</i>
GU237513	KY484569	GU237739	Berner et al. (2010)	CBS 109172	<i>B. lycopersici</i>
KY484766	EU880883	KY484671	Berner et al. (2017)	CBS 101215	<i>B. noackiana</i>
GU237519	EU880905	GU237813	Aveskamp et al. (2009)	CBS 261.92	<i>B. strasserii</i>
GU237586	KT287041	GU237904	Crous et al. (2010)	CBS 714.85	<i>Didymella bellidis</i>
KT309414	KT309164	KT309826	Johnston & Park (2015)	ICMP 11385	<i>D. bellidis</i>
KY486378	KY486362	KY486368	Amirdehi et al. (2017)	IR-P-Ai20	<i>D. bellidis</i>
KT309590	KT309347	KT310013	Johnston & Park (2015)	ICMP 6878	<i>D. acetosellae</i>
KT309574	KT309328	KT309994	Johnston & Park (2015)	ICMP 6824	<i>D. acetosellae</i>
KT309395	KT309145	KT309806	Johnston & Park (2015)	ICMP 10847	<i>D. acetosellae</i>
KY486377	KY486361	KY486373	Amirdehi et al. (2017)	IR-P-RU46	<i>D. acetosellae</i>
GU237591	JN251985	GU237775	Aveskamp et al. (2010)	CBS 128.93	<i>D. chenopodii</i>
FJ427161	FJ426941	FJ427052	Aveskamp et al. (2008)	CBS 318.90	<i>D. pinodella</i>
FJ427162	FJ426942	FJ427052	Aveskamp et al. (2008)	CBS 531.66	<i>D. pinodella</i>
KY486381	KY486364	KY486372	Amirdehi et al. (2017)	IR-P-Ve35	<i>D. pinodella</i>
KT309396	KT309146	KT309807	Johnston & Park (2015)	ICMP 10849	<i>D. rhei</i>
KT309594	KT309352	KT310018	Johnston & Park (2015)	ICMP 7022	<i>D. viburnicola</i>
FJ427110	FJ426892	FJ426999	Aveskamp et al. (2009)	CBS 374.91	<i>Phoma eupyrena</i>
GU237602	JN251987	GU237779	de Gruyter et al. (2011)	CBS 133.93	<i>P. destructiva</i> var. <i>destructiva</i>
GU237600	JN251988	GU237788	Aveskamp et al. (2008)	CBS 162.78	<i>P. destructiva</i> var. <i>diversispora</i>
KY486379	KY486366	KY486369	Amirdehi et al. (2017)	IR-P-TO4	<i>P. destructiva</i>
KT309554	KT309306	KT309972	Johnston & Park (2015)	ICMP:6632	<i>P. medicaginis</i>
KT309557	KT309311	KT309977	Johnston & Park (2015)	ICMP:6662	<i>P. medicaginis</i>
KY486376	KY486363	KY486371	Amirdehi et al. (2017)	IR-P-Me8	<i>P. medicaginis</i>
KT389842	JF740118	FJ426981	de Gruyter et al. (2011)	CBS 523.66	<i>Neocamarosporium betae</i>
KM249111	KM249131	KM249075	Strausbaugh et al. (2015)	F739	<i>N. betae</i>
KY486375	KY486365	KY486374	Amirdehi et al. (2017)	IR-P-be13	<i>N. betae</i>
KT309398	KT309148	KT309809	Johnston & Park (2015)	ICMP 10936	<i>Pleospora fallens</i>
AB500009	AB499664	JF740261	Shimono et al. (2009)	CBS 267.59	<i>Pyrenochaeta lycopersici</i>



شکل ۸- شجره فیلوژنتیکی رسم شده با استفاده از توالی نوکلئوتیدی نواحی ژنومی ITS، اکتین و بتا توبولین برای ۳۱ جدایه از گونه‌های جنس *Phoma* و آرایه‌های وابسته به روش maximum likelihood در نرم‌افزار MEGA6. اعداد بالای هر شاخه مقدار اعتبارسنجی (bootstrap) از ۱۰۰۰ تکرار را نشان می‌دهند. گونه *Pyrenochaeta lycopersici* CBS 267.59 به عنوان گروه خارجی در نظر گرفته شد. توالی ۲۴ جدایه از بانک ژن اخذ شده است (جدایه‌های مورد مطالعه در این تحقیق بولد شده‌اند).

Fig. 8. The phylogenetic tree constructed with maximum likelihood method based on the ITS-ACT-TUB sequence data in MEGA6 for 21 isolates of *Phoma* and related taxa. Numbers above the branches show the bootstrap values with 1000 replicates. The tree is rooted using *Pyrenochaeta lycopersici* (CBS 267.59). Twenty four related sequences were obtained from GenBank (isolates studied in this survey are marked with bold letters).

کلادهایی مجزا قرار گرفتند، اما توالی نوکلئوتیدی ناحیه ITS قادر به تفکیک گونه‌های جنس‌های *Boeremia* و *Didymella* نبود و گونه‌های *B. exigua* در کنار گونه‌های جنس *Didymella* و گونه *D. rhei* همراه با گونه‌های جنس *Boeremia* در یک کلاذ جای گرفتند. در شجره فیلوژنتیکی حاصل از روش MP، طول شاخه ۳۴۱ به دست آمد. همچنین، شاخص پایداری (۰/۹۱)، شاخص بازداري (۰/۹۷) و شاخص ثبات واحدها برای کلیه مکان‌ها (۰/۸) به دست آمد.

- ارزیابی روابط فیلوژنتیکی گونه‌ها با استفاده از توالی نوکلئوتیدی ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 طول توالی نوکلئوتیدی ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 از DNA ریبوزومی توالی‌یابی شده در بین ۳۱ جدایه مورد بررسی از ۴۱۵ الی ۵۲۸ جفت باز متغیر بود. در شجره فیلوژنتیکی ترسیم شده براساس روش ML، گونه‌های *B. exigua*، *P. destructiva* var. *destructiva*، *P. medicaginis*، *D. pinodella*، *D. bellidis*، *D. acetosellae* و *N. betae* در

- ارزیابی روابط فیلوژنتیکی گونه‌ها با استفاده از توالی نوکلئوتیدی چندژنی (ITS-اکتین-بتا توبولین) طول توالی نوکلئوتیدی سه ناحیه ژنی (ITS-اکتین-بتا توبولین) در بین ۳۱ جدایه مورد بررسی از ۸۳۰ الی ۸۷۱ جفت باز متغیر بود. در شجره فیلوژنتیکی ترسیم شده براساس روش ML پنج کلاد مشاهده شد. کلاد A شامل گونه‌های *D. pinodella*، *D. chenopodii*، *D. bellidis*، *D. acetosellae*، *D. rhei* و *D. viburnicola* با مقدار اعتبارسنجی ۸۹٪ در یک کلاد قرار گرفتند و گونه *P. eupyrena* به صورت خواهری با این کلاد قرار گرفت. کلاد B گونه *P. medicaginis* و کلاد C گونه *P. destructiva* را شامل می‌شد که هر کدام با میزان حمایت ۱۰۰٪ تفکیک می‌شدند. کلاد D شامل گونه‌های جنس *Boeremia* می‌شد که گونه‌های *B. exigua* را با مقدار اعتبارسنجی ۹۸٪ در بر می‌گرفت. کلاد E گونه‌های *N. betae* با مقدار اعتبارسنجی ۱۰۰٪ را شامل می‌شد و گونه *P. fallens* با درجه اعتبارسنجی ۶۹٪ در یک کلاد با این گونه قرار گرفت. در شجره فیلوژنتیکی حاصل از تجزیه و تحلیل MP، طول شاخه‌ها ۷۴۴ به دست آمد. همچنین، شاخص پایداری، شاخص بازداری و شاخص ثبات واحدها به ترتیب ۰/۸۲، ۰/۵۶ و ۰/۵۶ حاصل شد. مجموعاً ۷۴۰ کارکتر در تجزیه و تحلیل نهایی مورد استفاده قرار گرفت. براساس این درخت، گونه‌های متعلق به جنس‌های *Boeremia*، *Didymella*، *Phoma* و *Neocamarosporium* هر کدام در کلادهای مستقل قرار گرفتند.

بحث

جنس *Phoma* به دلیل دارا بودن ویژگی‌های ریخت-شناختی مبهم و گروه‌بندی مصنوعی، جنسی قابل بحث به شمار می‌رود (Aveskamp et al. 2009). طبقه‌بندی که در حال حاضر از این جنس وجود دارد به دلیل تمایز غیرواضح بین این جنس و چندین جنس وابسته و یا حتی همگرا همواره مورد انتقاد بوده است. یکی از راه‌حل‌ها جهت حل مشکلات تاکسونومیک گونه‌های جنس *Phoma*، گروه‌بندی آن‌ها به نُه بخش بوده است. این روش هر چند در شناسایی گونه‌ها بسیار مفید به نظر می‌رسید، اما گاهی ویژگی‌های مربوط به گونه‌های یک بخش در سایر گروه‌های تاکسونومیک نیز مشاهده شده است و هنوز اطمینان از این نوع تقسیم‌بندی از منظر تکاملی طبیعی است، وجود ندارد. علاوه بر این، به نظر می‌رسد که بخش‌های

- ارزیابی روابط فیلوژنتیکی گونه‌ها با استفاده از توالی نوکلئوتیدی ناحیه ژنی اکتین (ACT) طول توالی نوکلئوتیدی ناحیه ژنی اکتین در بین ۳۱ جدایه مورد بررسی از ۱۴۸ الی ۱۶۴ جفت باز متغیر بود. در شجره فیلوژنتیکی ترسیم شده براساس روش ML، گونه‌های *D. acetosellae*، *D. bellidis*، *D. pinodella* به ترتیب با مقدار اعتبارسنجی ۹۹٪، ۹۶٪ و ۹۹٪ از یکدیگر تفکیک شدند و همراه با گونه‌های *D. chenopodii*، *D. rhei* و *P. eupyrena* در کلادی مجزا قرار گرفتند. گونه‌های *B. exigua*، *B. lycopersici* و *B. strasseri* با درجه اعتبارسنجی ۹۳٪ به صورت کلاد خواهری با *P. destructiva* var. *destructiva* قرار گرفتند. گونه‌های *N. betae* و *P. medicaginis* با حمایت ۸۵٪ و ۱۰۰٪ تفکیک شدند. در شجره فیلوژنتیکی حاصل از روش MP، طول شاخه ۲۸۲ به دست آمد. همچنین، شاخص پایداری (۰/۶۵)، شاخص بازداری (۰/۸۲) و شاخص ثبات واحدها برای کلیه مکان‌ها (۰/۵۴) به دست آمد. شجره فیلوژنتیکی حاصل از ناحیه ژنی اکتین در هر دو روش ML و MP نیز قادر به تفکیک گونه‌های جنس *Boeremia*، *Didymella* و *Phoma* نبود. گونه‌های *D. bellidis* با مقدار اعتبارسنجی ۹۸٪ و گونه‌های *P. destructiva* var. *destructiva* و *B. exigua* با حمایت ۱۰۰٪ تفکیک و تشکیل کلاد خواهری با حمایت ۸۰٪ دادند و سایر گونه‌ها با حمایت ۱۰۰٪ در کلادهای مستقل قرار گرفتند.

- ارزیابی روابط فیلوژنتیکی گونه‌ها با استفاده از توالی نوکلئوتیدی ژن بتا توبولین (TUB)

طول توالی نوکلئوتیدی ناحیه ژنی بتا توبولین در بین ۳۱ جدایه مورد بررسی از ۲۳۰ الی ۲۷۱ جفت باز متغیر بود. در شجره فیلوژنتیکی براساس روش ML، گونه‌های *B. diversispora*، *B. exigua*، *B. lycopersici*، *B. noackiana* و *B. strasseri* با مقدار اعتبارسنجی ۷۰٪ در یک کلاد قرار گرفتند و گونه‌های *D. acetosellae*، *D. bellidis*، *D. pinodella* و *P. medicaginis* و *N. betae* با حمایت ۱۰۰٪، ۸۹٪، ۹۹٪ و ۹۹٪ در کلادی مجزا قرار گرفتند. در شجره فیلوژنتیکی حاصل از تجزیه و تحلیل MP، طول شاخه ۲۸۵ به دست آمد. همچنین، شاخص پایداری (۰/۵۵)، شاخص بازداری (۰/۸۱) و شاخص ثبات واحدها برای کلیه مکان‌ها (۰/۵۷) به دست آمد. هرچند درخت‌های ترسیم شده حاصل از روش‌های ML و MP از ناحیه ژنی بتا توبولین، گونه‌های جنس *Boeremia* را در کلادی مجزا تفکیک نمود، اما قادر به تمایز گونه‌های جنس‌های *Didymella* و *Phoma* نبود.

می‌شد قرار گرفتند. نتایج به دست آمده با تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیکی چندژنی توسط چن و همکاران (Chen et al. 2015) مبتنی بر چهار ناحیه ژنی ITS، LSU، rpb2 و tub2 تطابق داشت و براساس نتایج گونه‌های مذکور از جنس *Phoma* خارج و به جنس *Didymella* انتقال یافتند. جنس *Didymella* نخستین بار در سطح جنس توسط ساکارو در سال ۱۸۸۰ با توصیف گونه *D. exigua* که بعدها به عنوان گونه تیپ پذیرفته شد استفاده گردید. در مطالعه‌ای که توسط د گریتر و همکاران (de Gruyter et al. 2009) انجام شد، تیره جدید *Didymellaceae* برای کلاد *Didymella* معرفی گردید که اغلب اعضای جنس *Phoma* و جنس‌های وابسته را شامل می‌شد. از این‌رو به نظر می‌رسید جنس *Didymella* پلی‌فلیتیک بوده و نیاز به تجدید نظر تاکسونومیک داشته است (Aveskamp et al. 2010). از سوی دیگر، در سال‌های اخیر مشخص گردید که جنس *Didymella* تنها جنسی است که به طور صحیح با جنس *Phoma sensu stricto* مرتبط است و انتقال بسیاری از گونه‌ها به این جنس تایید کننده این تئوری می‌باشد (Chen et al. 2015). در قرار گرفتن گونه *D. pinodella* در جنس *Phoma* همواره بحث‌هایی وجود داشته، به طوری که این گونه در ابتدا در جنس *Ascochyta* با نام *A. pinodella* قرار گرفته بود (Jones 1927). به دلیل این که روابط بین گونه‌های *Phoma* و *Ascochyta* که کنیدی‌های واجد دیواره عرضی تولید می‌کنند، همواره قابل تامل بوده و وجود تعداد زیادی اسامی مترادف مشترک، پیچیدگی بین این دو جنس را نشان می‌دهد (Aveskamp et al. 2008). در سال ۱۹۷۵، بوئرما و بولن (Boerema & Bollen 1975) وجه‌تمایز *Phoma* از *Ascochyta* را تفاوت در کنیدی‌زایی و کنیدی‌های واجد دیواره بیان نمودند. آن‌ها معتقد بودند که کنیدی‌ها در گونه‌های متعلق به جنس *Ascochyta* اساساً دوسلولی است، در حالی که در جنس *Phoma*، کنیدی‌های واجد دیواره عرضی در محیط کشت به ندرت مشاهده می‌شوند. بعدها فاریس-موکاییش و همکاران (Faris-Mokaiesh et al. 1996)، دو گونه *D. pinodella* و *A. pinodes* را با استفاده از نشانگر PCR-RFLP و هضم آنزیمی نواحی ژنومی ITS و IGS از DNA ریبوزومی مورد بررسی قرار دادند و وابستگی بین دو گونه براساس شباهت در باندها مورد تایید قرار گرفت. در این تحقیق، اطلاعات ریخت‌شناختی گونه *D. pinodella* با توصیف ارائه شده توسط بوئرما و همکاران (۲۰۰۴) تطابق داشت و در بررسی فیلوژنتیکی و تجزیه و تحلیل چندژنی، گونه *D. pinodella* با

Phoma و *Phyllostictoides* گروه‌هایی مصنوعی باشند، زیرا به جای آن که یک ویژگی مناسب این بخش‌ها را تفکیک نماید، در واقع گروه‌هایی هستند که گونه‌های فاقد ویژگی مناسب جهت تمایز در آن‌ها قرار داده شده‌اند (Aveskamp et al. 2008). از این‌رو در سال‌های اخیر جنس *Phoma* دستخوش تغییرات فراوانی شده و تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیکی زیادی جهت تعیین جایگاه اصلی گونه‌ها در کمپلکس *Phoma* صورت پذیرفته است (de Gruyter et al. 2009, Aveskamp et al. 2010, Chen et al. 2015).

در تحقیق حاضر، مطالعات تاکسونومیک و فیلوژنتیکی هفت گونه *D. bellidis*، *D. acetosellae*، *B. exigua*، *D. pinodella*، *P. medicaginis* و *P. destructiva*، *N. betae* به همراه ۲۴ جدایه که توالی نوکلئوتیدی آن‌ها از بانک ژن اخذ گردید صورت پذیرفت. سه گونه *D. bellidis*، *D. acetosellae* و *D. pinodella* به جنس *Didymella*، گونه *B. exigua* به جنس *Boeremia*، گونه‌های *P. medicaginis* و *P. destructiva* به جنس *Phoma* و گونه *N. betae* به جنس *Neocamarosporium* تعلق داشتند. نتایج به دست آمده با مطالعات چن و همکاران (Chen et al. 2015) تطابق داشت و تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیکی به خوبی توانست گونه‌های متعلق به چهار جنس *Phoma*، *Boeremia*، *Didymella* و *Neocamarosporium* را از یکدیگر تفکیک نماید.

گونه *P. medicaginis* براساس شجره فیلوژنتیکی رسم شده با استفاده از توالی نوکلئوتیدی چندژنی (ITS-اکتین-بتا توبولین)، یک رابطه خواهری را با گونه‌های جنس *Boeremia* و *P. destructiva* var. *destructiva* نشان داد. این گونه همچنان در کمپلکس *Phoma* قرار دارد و به جنس‌های دیگر منتقل نشده است. این نتایج با مطالعات ایرینی و همکاران (Irinnyi et al. 2009) تطابق داشت. اطلاعات ریخت‌شناختی گونه *P. medicaginis* نیز با توصیف ارائه شده توسط بوئرما و همکاران (۲۰۰۴) مطابقت داشت. همچنین، این گونه از مزارع یونجه در زنجان به عنوان عامل بیمارگر جداسازی و گزارش شده است (Naseri & Marefat 2008).

براساس شجره فیلوژنتیکی رسم شده با استفاده از توالی نوکلئوتیدی چندژنی (ITS-اکتین-بتا توبولین)، گونه‌های *D. bellidis*، *D. pinodella*، *D. acetosellae* به همراه توالی نوکلئوتیدی گونه‌های *D. chenopodii*، *D. rhei* و *D. viburnicola* در یک کلاد که متعلق به جنس *Didymella*

در سال‌های اخیر نیز این پیچیدگی تاکسونومیک توسط محققان مختلف به اثبات رسید (Aveskamp et al. 2010). آریاوانزا و همکاران (Ariyawansa et al. 2015) در راستای بررسی روابط تکاملی و تعیین حدود و ثغور گونه‌های *Pleospora* و جنس‌های وابسته از فیلوژنی چندژنی برپایه نواحی ژنومی LSU، SSU، ITS، RPB2 و TEF1 استفاده نمودند و در نتیجه برخی از گونه‌های این جنس به جنس‌های *Comoclathris*، *Neocamarosporium*، *Curvularia* و *Dactuliophora* منتقل شدند. ویژگی ریخت‌شناختی جدایه‌های متعلق به گونه *N. betae* با توصیف ارائه شده توسط بوئرما و همکاران (۲۰۰۴) نیز مطابقت داشت. وجود زواید میسلیومی در سطح پیکنیدیوم که از ویژگی‌های گونه‌های بخش *Pilosa* محسوب می‌گردد که در بررسی ریخت‌شناسی جدایه‌های متعلق به این بخش در این تحقیق نیز مشاهده شد. گونه *N. betae* طی سال‌های ۲۰۰۹ الی ۲۰۱۰ در نواحی مرودشت استان فارس از ناحیه ریشه و طوقه گوجه‌فرنگی‌های آلوده جداسازی شد و براساس اطلاعات ریخت‌شناختی شناسایی و گزارش گردید (Sharzehei et al. 2011).

ویژگی‌های ریخت‌شناسی جدایه‌های متعلق به گونه *P. destructiva* var. *destructiva* با توصیف ارائه شده توسط بوئرما و همکاران (۲۰۰۴) مطابقت داشت. این گونه نیز آرایه جدیدی برای میکروفلور ایران محسوب می‌شوند. در پایان، می‌توان نتیجه گرفت که تلفیق فیلوژنی مولکولی چندژنی و ریخت‌شناسی، می‌تواند روشی مطلوب در شناسایی حدود و ثغور گونه‌های متعلق به جنس *Phoma* و آرایه‌های وابسته باشد.

سپاسگزاری

نگارندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه تهران به خاطر فراهم کردن اعتبارات پژوهشی این تحقیق سپاسگزاری می‌نمایند.

References

Aghapour, B., Fotouhifar, K.B., Ahmadpour, A. & Ghazanfari, K. 2009. First report of leaf spot disease on *Ficus elastica* caused by *Phoma glomerata* in Iran. Australasian Plant Disease Notes 4: 82–83.

مقدار اعتبارسنجی ۱۰۰٪ در کنار سایر گونه‌های متعلق به جنس *Didymella* قرار گرفت. نخستین بار گونه *D. pinodella* در سال ۱۹۷۹ از بذور سویا در ایران گزارش گردید (Zad 1979). همچنین، این گونه از ریشه و طوقه گیاهان نخود که علایم زردی و پوسیدگی نشان می‌دادند در فصل برداشت جداسازی و گزارش گردید (Nazari & Fatehi 1995). خصوصیات ریخت‌شناختی جدایه‌های متعلق به گونه *D. bellidis* و *D. acetosellae* نیز با توصیف ارائه شده توسط بوئرما و همکاران (۲۰۰۴) مطابقت داشت. این گونه‌ها آرایه‌های جدیدی برای فلور قارچی ایران محسوب می‌شوند.

اطلاعات ریخت‌شناختی گونه *B. exigua* با توصیف ارائه شده توسط بوئرما و همکاران (۲۰۰۴) تطابق داشت. این گونه با مقدار اعتبارسنجی ۹۷٪ در کنار سایر گونه‌های متعلق به جنس *Boeremia* قرار گرفت. در شجره فیلوژنتیکی ترسیم شده کلاد متعلق به جنس *Boeremia* شامل گونه‌های *B. exigua*، *B. diversispora*، *B. lycopersici*، *B. noackiana* و *B. strasseri* می‌باشد و نتایج به دست آمده با مطالعات آوسکمپ و همکاران (Aveskamp et al. 2010) تطابق داشت. گونه *B. exigua* از جمله گونه‌های مورد بحث است. وان‌درا (Vander A 2000) در سال ۲۰۰۰ تئوری وجود ۱۱ واریته در گونه *P. exigua* را مطرح نمود و آبلن و همکاران (Ablein et al. 2000) در حمایت از این تئوری، از تکنیک AFLP استفاده نمودند و تنوع گسترده‌ای را در *B. exigua* مشاهده کردند (Aveskamp et al. 2008). پیش از این، گونه *B. exigua* در سال ۲۰۱۳ از گوجه‌فرنگی در استان زنجان جداسازی و براساس اطلاعات ریخت‌شناختی و تعیین توالی نوکلئوتیدی، دو ناحیه ژنی ITS و EF-11 شناسایی و گزارش گردید (Hemmati 2014).

در تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیکی گونه‌های *N. betae* با درجه اعتبارسنجی ۱۰۰٪ در کلادی مجزا و متمایز در پایه درخت قرار گرفت. هولم (Holm 1962) و بربی (Berbee 1996) تئوری پلی‌فلیتیک بودن جنس *Pleospora* را مطرح نمودند و

Ariyawansa, H.A., Thambugala, K.M., Manamgoda, D.S., Jayawardena, R., Camporesi, E., Boonmee, S., Wasnasinghe, D.N., Phookamasak, W.R., Hongsanant, S., Singtripop, C., Chukeatirote, E., Kang, J., Gareth Jones, E.B. & Hyde, K.D. 2015.

- Towards a natural classification and backbone tree for *Pleosporaceae*. Fungal diversity 71: 85–139.
- Aveskamp, M.M., De Gruyter, J. & Crous, P.W. 2008. Biology and recent developments in the systematic of *Phoma*, a complex genus of major quarantine significance. Fungal Diversity 31: 1–18.
- Aveskamp, M.M., Verkley, G.J.M., De Gruyter, J., Murace, M.A., Perello, A., Woudenberg, J.H.C., Groenewald, J.Z. & Crous, P.W. 2009. DNA phylogeny reveals polyphyly of *Phoma* section *Peyronellaea* and multiple taxonomic novelties. Mycologia 101: 363–382.
- Aveskamp, M.M., De Gruyter, J., Woudenberg, J.H.C., Verkley, G.J.M. & Crous, P.W. 2010. Highlights of the *Didymellaceae*: A polyphasic approach to characterise *Phoma* & related pleosporalean genera. Studies in Mycology 65: 1–60.
- Boerema, G.H. 1964. *Phoma herbarum* Westend., the type species of the form-genus *Phoma* Sacc. Persoonia 3(1): 9–16.
- Boerema, G.H. & Bollen, G.J. 1975. Conidiogenesis and conidial septation as differentiating criteria between *Phoma* and *Ascochyta*. Persoonia 8: 111–144.
- Boerema, G.H., De Gruyter, J., Noordeloos, M.E. & Hamers, M.E.C. 2004. *Phoma* identification manual differentiation of specific and infraspecific taxa in culture. CABI Publishing United Kingdom, 470 pp.
- Carbone, I. & Kohn, L.M. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. Mycologia 91: 553–556.
- Chen, Q., Jiang, J.R., Zhang, G.Z., Cai, L. & Crous, P.W. 2015. Resolving the *Phoma* enigma. Studies in Mycology 82: 137–217.
- de Gruyter, J., Aveskamp, M.M., Woudenberg, J.H.C., Verkley, G.J.M., Groenewald, J.Z. & Crous, P.W. 2009. Molecular phylogeny of *Phoma* and allied anamorph genera: Towards a reclassification of the *Phoma* complex. Mycological Research 113: 508–519.
- Deshmukh, S.K. & Rai, M.K. 2005. Biodiversity of fungi: Biodiversity of fungi their role in human life. Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd. 460 pp.
- Doyle, J.J. & Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13–15.
- Ershad, D. 2009. Fungi of Iran. 3rd ed. Agricultural Research, Education & Extension Organization. Publication No. 10, 531 pp., Tehran.
- Faris-Mokaiesh, S., Boccara, M., Denis, J.B., Derrien, A. & Spire, D. 1996. Differentiation of the "*Ascochyta* complex" fungi of pea by biochemical and molecular markers. Current Genetics 29: 182–190.
- Fesentein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies an approach using the bootstrap. Evolution 39: 783–791.
- Hemmati, R. 2014. First report of *Boeremia exigua* on tomato in Iran. Iranian Journal of Plant Pathology 50(3): 141.
- Heydari, S., Raoufi, F. & Najafipour, G. 2010. Identification the etiology of root and foot rots casual agents of *Brassica napus* in Marvdasht (Fars province). Journal of Microbial World 2(4): 261–269.
- Irinyi, L., Kovics, G.J. & Sandor, E. 2009. Taxonomical re-evaluation of *Phoma*-like Soybean pathogenic fungi. Mycological Research 113: 249–260.
- Jones, L.K. 1927. Studies of the nature and control of blight, leaf and pod spot, and foot rot of peas by species of *Ascochyta*. Bulletin of the New York State Agricultural Experimental Station 547: 46.
- Koenning, S.R., Abdel Amin, F.F. & Grand, L.F. 2000. Stem canker on cotton caused by *Boeremia exigua* in North Carolina and Virginia. Plant Disease 84(11): 1251.
- Koike, S.T., Subbarao, K.V., Verkley, G.J.M., Fogle, D. & O'Neill, T.M. 2006. *Phoma* basal rot of

- romaine lettuce in California caused by *Phoma exigua*: Occurrence, characterization, and control. *Plant Disease* 90: 1268–1275.
- Lee, S.B., Milgroom, M.G. & Taylor, J.W. 1988. A rapid, high yield mini-prep method for isolation of total genomic DNA from fungi. *Fungal Genetics Newsletter* 35: 23–24.
- Lv, R., Zheng, L., Zhu, Z., Pan, L. & Huang, J. 2011. First report of stem blight of *Eleocharis dulcis* caused by *Phoma bellidis* in China. *Plant Disease* 95(9): 1190.
- Morgan-Jones, G. 1988. Studies in the genus *Phoma*. XV. Concerning *Phoma multirostrata*, a leaf spot-inducing and soil-borne species in warm climates. *Mycotaxon* 33: 339–351.
- Naseri, B. & Marefat, A.R. 2008. Seasonal dynamics and prevalence of alfalfa fungal pathogens in Zanjan province, Iran. *International Journal of Plant Production* 2: 327–340.
- Nazari, K. & Fatehi, J. 1995. Isolation of *Phoma medicaginis* var. *pinodella* from chickpea root and crown in Lorestan province. *Iranian Journal of Plant Pathology* 31(1): 39–40.
- Rashid, T.S., Sijam, K., Nasehi, A., Kodir, J., Saud & Awla, H.K. 2016. Occurrence of *Phoma* blight caused by *Phoma destructiva* on tomato (*Solanum lycopersicum*) in Malaysia. *Plant Disease* 100(6): 1241–1242.
- Razaghi, P., Zafari, D. & Bahador, M. 2012. Molecular and morphological characteristics of two *Phoma* species isolated from *Taraxacum officinale* and *Chenopodium murale*. *Agricultural Biotechnology* 10(2): 43–48.
- Saccardo, P.A. 1880. *Conspectus generum fungorum Italiae inferiorum nempe ad Sphaeropsideas, Melanconieas et Hyphomyceteas pertinentium systemate sporologico dispositorum*. *Michelia*. 2(6):1–38.
- Sharzehei, A., Heidary, S. & Raufi, F. 2011. Identification of tomato root and crown pathogenic fungi in Marvdasht region, Iran. *Quarterly Journal of Research in Plant Pathology* 1(1): 57–65.
- Sutton, B.C. 1980. *The Coelomycetes. Fungi imperfecti with pycnidia, Acervuli and Stromata*. 1st ed. Commonwealth Mycological Institute, United Kingdom.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725–2729.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S.B. & Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Gelfand, M., Sninsky, D. & White, T. (eds). *PCR Protocol: A Guide to Methods and Application*. San Diego, California, pp. 315–322.
- White, J.F., Morgan-Jones, G. 1987. Studies in the genus *Phoma* VI concerning *Phoma medicaginis* var. *pinodella*. *Mycotaxon* 28(1): 241–248.
- Woudenberg, J.H.C., Aveskamp, M.M., Gruyter, J.de, Spiers, A.G. & Crous, P.W. 2009. Multiple *Didymella* teleomorphs are linked to the *Phoma clematidina* morphotype. *Persoonia* 22: 56–62.
- Xu, H., Cui, J., Zhu, R. & Hao, N. 2016. First report of leaf spot disease in *Angelica dahurica* caused by *Phoma bellidis* in China. *Journal of Phytopathology* 164: 448–454.
- Zad, J. 1979. Mycoflora of soybean seeds Iranian Journal of Plant Pathology 15(1): 42–47.