

شناسایی چند گونه بیمارگر گیاهی متعلق به خانواده *Didymellaceae* براساس تجزیه و تحلیل چند ژنی و ریخت‌شناختی در استان‌های آذربایجان شرقی و غربی*

سیما خدایی^۱، مهدی ارزنلو^{۲*}، اسداله بابای اهری^۳، عمر روتا استابلی^۴ و ایلاریا پرتوت^۵

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۸/۲۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۲۶)

چکیده

خانواده *Didymellaceae* گونه‌های متنوع ساپروفیت، اندوفیت و بیمارگر را شامل می‌شود که با انواع مختلف بستره‌های غذایی مرتبط هستند. برخی گونه‌های این خانواده از قبیل افراد متعلق به جنس *Phoma sensu lato* در میان مهمترین و گسترده‌ترین بیمارگرهای گیاهی قرار دارند. با وجود اهمیت اقتصادی اعضای این خانواده در ایران، مطالعه جامعی بر روی تنوع گونه‌ای آن‌ها صورت نگرفته است. بسیاری از اعضای *Didymellaceae* در ایران بر اساس نمونه‌های هرباریومی شناسایی شده‌اند و در مورد اغلب آنها کشت‌های زنده برای مطالعات مولکولی در دسترس نمی‌باشد. هدف از مطالعه حاضر بررسی تنوع گونه‌ای خانواده *Didymellaceae* در استان‌های آذربایجان شرقی و غربی بود. پس از جداسازی و ایجاد کشت‌های تک اسپور از بستره‌های غذایی مختلف، جدایه‌ها بر اساس ترکیب داده‌های ریخت‌شناختی و داده‌های توالی چندژنی (*LSU-rDNA*, *ITS-rDNA* و ژن بتاتوبولین) شناسایی شدند. در مطالعه حاضر *Boeremia*, *Epicoccum nigrum*, *Phoma exigua*, *Phoma Ascochyta herbicola*, *Ascochyta medicaginicola*, *Didymella tanacetii*, *Didymella glomerata*, *Boeremia strasseri*, *eupyrena* و *Heterophoma novae-verbascicola* از میزبان‌های گیاهی مختلف، خاک و همچنین به عنوان میکوپارازیت شناسایی شدند. گونه‌های *H. novae-verbascicola* و *P. eupyrena* *D. tanacetii* *B. strasseri* گزارش‌های جدید برای میکوبیوتای ایران هستند. علاوه بر این، برای هر گونه میزبان‌ها/بستره‌های غذایی جدید گزارش شدند. نتایج این بررسی تایید کرد که تنها تکیه بر صفات ریخت‌شناختی جهت شناسایی این قارچ‌ها در سطح گونه و جنس ناکافی است.

کلیدواژه: بتاتوبولین، *Phoma*، *LSU*، *ITS*، آرایه

* بخشی رساله دکتری نویسنده اول، ارائه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.

** مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: arzanlou@tabrizu.ac.ir

۱. دانشجوی دکتری گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

۲. استاد گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

۳. استاد گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

۴. محقق پسا دکتری، مرکز کشاورزی، غذا، محیط زیست، دانشگاه ترنتو/فونداتزیونه ادموند ماخ، سان میکله الادیجه، ترنتو، ایتالیا.

۵. مرکز کشاورزی، غذا، محیط زیست، دانشگاه ترنتو/فونداتزیونه ادموند ماخ، سان میکله الادیجه، ترنتو، ایتالیا.

Characterisation of several plant pathogenic species belonging to the family Didymellaceae based on multigene and morphological analyses in East and West Azarbaijan provinces

S. Khodaei¹, M. Arzanlou^{1*}, A. Babai-Ahari¹, O. Rota-Stabelli², and I. Pertot²

(Received: 18.11.2017; Accepted: 16.1.2018)

Abstract

Didymellaceae is a species-rich family including saprophytic, endophytic, and pathogenic species that are associated with different types of substrates. Some species of this family, such as *Phoma sensu lato*, are among the most important and widespread plant pathogens. Despite the economic significance of species belonging to this family in Iran, no coherent study has been conducted on their biodiversity. Many of presently known Didymellaceae members in Iran have been identified based on herbarium materials and in most of the cases there is no living culture available for molecular studies. The aim of present study was to explore species diversity of the family Didymellaceae in East and West Azarbaijan provinces. After isolation and establishing single spore cultures from different substrates, the isolates were identified based on morphological and molecular data using sequence data of ITS-rDNA, LSU-rDNA, and beta-tubulin gene. In this study *Epicoccum nigrum*, *Boeremia exigua*, *Boeremia strasseri*, *Didymella glomerata*, *Didymella tanacetii*, *Ascochyta medicaginicola*, *Ascochyta herbicola*, *Phoma eupyrena* and *Heterophoma novae-verbascicola* were identified from different host plants, soil and also as mycoparasites. *Boeremia strasseri*, *D. tanacetii*, *P. eupyrena* and *H. novae-verbascicola* are new records for the mycobiota of Iran. Furthermore, for each species new hosts/substrates are reported. Our results confirm that the sole reliance on morphological features for the identification of these fungi, is insufficient both at species and genus level.

Keywords: β -tubulin, ITS, LSU, *Phoma*, taxon

*Corresponding author's E-mail: arzanlou@tabrizu.ac.ir

1. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, 51666-16471, Iran.

2. Sustainable Agro-Ecosystems and Bioresources Department, University of Trento/Fondazione Edmund Mach (FEM), San Michele all'Adige, Trento, Italy.

مقدمه

دهند (Aveskamp et al. 2010).

سیستم طبقه‌بندی کنونی به دلیل ناواضح بودن حدود و ثغور بین *Phoma* و چند جنس مرتبط و یا حتی جنس‌های همگرا مورد نقد قرار گرفته است (Aveskamp et al. 2008). روش‌های مدرن مبتنی بر DNA تا حد زیادی می‌تواند به شناسایی و طبقه‌بندی گونه‌های قارچی کمک کند. با این وجود، تعداد واقعی مطالعات با استفاده از روش‌های ماکرومولکولی برای توصیف گونه‌های جدید و حل وضعیت کمپلکس‌های گونه‌ای نسبتاً کم است (Aveskamp et al. 2008). جدیدترین مطالعه جامع بر روی گونه‌های *Phoma* و جنس‌های وابسته در سال ۲۰۱۵ توسط چن و همکاران (Chen et al. 2015) انجام شد. طی این مطالعه نه جنس جدید در خانواده *Didymellaceae* معرفی و توصیف شدند. پس از آن در سال ۲۰۱۷ وضعیت تبارشناختی خانواده *Didymellaceae* مورد مطالعه قرار گرفت و ۱۹ جنس در این خانواده شناسایی شد (Chen et al. 2017).

تاکنون، در ایران مطالعات انگشت شماری بر روی تنوع گونه‌ای اعضای این خانواده صورت پذیرفته است. اغلب گزارش‌هایی که از این گروه قارچی وجود دارد صرفاً بر اساس صفات ریخت‌شناختی و یا داده‌های حاصل از توالی نوکلئوتیدی نواحی محدود ژنی بوده است. به تازگی، امیردهی و همکاران (Amirdehi et al. 2017) مطابق با سیستم‌های آرایه‌بندی جدید بر اساس ترکیبی از داده‌های توالی نوکلئوتیدی ناحیه فاصله انداز داخلی (ITS)، ژن بتاتوبولین (TUB) و ژن اکتین (ACT) و نیز صفات ریخت‌شناختی شش گونه شامل *Boeremia exigua* Aveskamp et al.، *Didymella acetosellae* Chen & Cai، *Didymella bellidis* Chen & Cai و *Phoma destructive* Plowr. *pinodella* Chen & Cai

خانواده *Didymellaceae* در سال ۲۰۰۹ برای گروه-بندی گونه‌های تیپ پنج بخش *Phoma* Sacc. شامل *Phoma*، *Phyllostictoides*، *Sclerophomella*، *Macrospora* و *Peyronellaea* و نیز چند جنس دیگر ایجاد شد (De Gruyter et al. 2009). اعضای این خانواده به دلیل تسخیر طیف وسیعی از آشیان‌های اکولوژیک جالب توجه هستند (Aveskamp et al. 2009, 2010). اکثر آرایه‌های متعلق به این خانواده در ارتباط با گیاهان خشکی‌زی بوده و به طور عمده باعث بیماری‌های لکه برگی و پوسیدگی ساقه می‌گردند (Aveskamp et al. 2010). برخی از این آرایه‌ها دارای اهمیت قرنطینه‌ای نیز هستند و مشکلات جدی را برای سازمان‌های قرنطینه و سلامت گیاهان، به بار می‌آورند (Aveskamp et al. 2008). اگر چه بیشتر آرایه‌ها به طور مداوم در محیط زیست به عنوان موجودات ساپروفیت حضور دارند، بسیاری از گونه‌ها زمانی که با یک میزبان مناسب مواجه می‌شوند به حالت زندگی بیماری‌زا گذار می‌یابند (Aveskamp et al. 2010). از مهم‌ترین بیمارگرهای گیاهی می‌توان گونه همه‌جازی *Ascochyta medicaginicola* Chen & Cai را نام برد. اگر چه برآورد دقیق از خسارت ایجاد شده توسط این گونه موجود نمی‌باشد، اما تاثیر اعضای این گروه قارچی در کشاورزی بسیار قابل توجه می‌باشد (Aveskamp et al. 2008). علاوه بر این، برخی گونه‌ها به عنوان عوامل بیماری‌زای انسان و مهره‌داران دیگر شناخته شده‌اند (Aveskamp et al. 2010). در کنار چنین نقش فعالی در آسیب‌شناسی مهره‌داران، ممکن است به طور غیر مستقیم از طریق تولید متابولیت‌های ثانوی سمی سلامت انسان را تحت تاثیر قرار



شکل ۱- نقشه مناطق نمونه برداری در شمال غرب ایران.

Fig. 1. Map of sampling sites in northwestern Iran.

این گروه قارچی و بقایای گیاهی موجود در خاک یا آب از مناطق مختلف استان آذربایجان شرقی و غربی انجام شد (شکل ۱). نمونه‌ها متعاقب درج مشخصات (تاریخ و محل جمع‌آوری نمونه) در داخل پاکت‌های کاغذی جداگانه به آزمایشگاه منتقل شده و بلافاصله مورد بررسی قرار گرفتند. برای جداسازی گروه‌های قارچی مورد نظر از خاک از روش *Warcup* (1950) استفاده شد و کشت در محیط غذایی عصاره گیلاس آگار (CA; Cherry-decoction agar; Boerema *et al.* 2004) انجام شد. در نمونه‌های فاقد اسپور و ریشه قارچی، قطعات کوچکی از قسمت‌های مختلف گیاهان سالم و بقایای گیاهی مرده و نیز قطعاتی از حدفاصل بخش‌های سالم و دارای علائم در گیاهان بیمار برش داده شدند. این قطعات توسط اتانول ۷۰ درصد به مدت ۹۰-۲۰ ثانیه (بسته به ضخامت بافت‌ها) ضدعفونی سطحی و بلافاصله دو بار با آب مقطر سترون شستشو شدند. قطعات بر روی کاغذ صافی سترون آب-گیری و به محیط غذایی CA منتقل شدند. تست‌های

Paliurus spina- را به ترتیب از *A. medicaginicola*، *Ailanthus altissima*، *Rumex crispus* L.، *christi* L.، *Solanum*، *Trigonella foenum-graecum* L.، *Swingle lycopersicum* L. و *Medicago sativa* L. از استان‌های گیلان، مازندران، خوزستان و اصفهان گزارش نموده‌اند. از آنجایی که تاکنون بررسی جامعی در خصوص گونه‌های متعلق به خانواده *Didymellaceae* در استان آذربایجان شرقی صورت نگرفته است، مطالعه حاضر به منظور تعیین تنوع گونه‌ای اعضای این خانواده با تکیه بر روش‌های ریخت‌شناختی و مولکولی (با استفاده از تجزیه و تحلیل توالی نوکلئوتیدی نواحی ITS، LSU و TUB) انجام شد.

مواد و روش‌های بررسی

نمونه‌برداری، جداسازی و خالص‌سازی قارچ‌ها

نمونه‌برداری به صورت تصادفی از خاک، گیاهان دارای علائم زنگ، سفیدک درونی و سفیدک سطحی، بافت‌های زنده گیاهان سالم و یا دارای علائم مشکوک به آلودگی به

پتری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس در تاریکی نگهداری شده و به مدت ۲-۱ هفته هر روز مورد بازبینی قرار گرفتند. در صورت رشد قارچ‌های متعلق به این خانواده خالص‌سازی به طریق تک اسپور صورت پذیرفت. بدین منظور، در زیر استریومیکروسکوپ، اسپورهای قارچ توسط سوزنی ظریف و سترون به طور کامل در داخل آب موجود در تشتک پتری پخش شدند. تشتک پتری به مدت ۲۴ ساعت به حالت مورب در دمای اتاق نگهداری شدند. سپس تشتک با بینوکولر بررسی شده و اسپورهای جوانه-زده همراه با قطعه کوچکی از محیط غذایی اطراف آن توسط سوزن سترون به محیط کشت جدید منتقل شدند. در نمونه‌های دارای اسپور یا ریشه قارچی خالص‌سازی به طور مستقیم به روش تک اسپور یا نوک ریشه انجام شد (Szentivanyi et al. 2005). جدایه‌های قارچی خالص-سازی شده در تیوب‌های دو میلی‌لیتری حاوی محیط کشت سیب زمینی هویج آگار (PCA؛ Potato carrot agar؛ Crous et al. 2009) در مجموعه کشت‌های زنده دانشگاه تبریز و مجموعه کشت‌های زنده موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور برای مطالعات بعدی نگهداری شدند. نمونه‌های گیاهی دارای علایم آلودگی در مجموعه هرباریوم موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور ذخیره و کد هرباریومی برای نمونه‌ها دریافت شد.

مطالعات مولکولی

جدایه‌های قارچی در تشتک‌های حاوی محیط غذایی MEA کشت شده و در تاریکی در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت یک هفته نگهداری شدند. سپس استخراج DNA به روش مولر و همکاران (Moller et al. 1992) انجام شد. غلظت DNA استخراج شده به وسیله دستگاه NanoDrop 8000 spectrophotometer تخمین زده شد. جفت پرایمرهای ITS1/ITS4 (White et al. 1990)، LR0R/LR7 (Rehner & Samuels 1994)، و T1/Bt2b (Vilgalys & Hester 1990) و ITS (Donaldson 1995, O'Donnell & Cigelnik 1997) به ترتیب جهت تکثیر بخش‌هایی از ITS، LSU و TUB

پتری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس در تاریکی نگهداری شده و به مدت ۲-۱ هفته هر روز مورد بازبینی قرار گرفتند. در صورت رشد قارچ‌های متعلق به این خانواده خالص‌سازی به طریق تک اسپور صورت پذیرفت. بدین منظور، در زیر استریومیکروسکوپ، اسپورهای قارچ توسط سوزنی ظریف و سترون به طور کامل در داخل آب موجود در تشتک پتری پخش شدند. تشتک پتری به مدت ۲۴ ساعت به حالت مورب در دمای اتاق نگهداری شدند. سپس تشتک با بینوکولر بررسی شده و اسپورهای جوانه-زده همراه با قطعه کوچکی از محیط غذایی اطراف آن توسط سوزن سترون به محیط کشت جدید منتقل شدند. در نمونه‌های دارای اسپور یا ریشه قارچی خالص‌سازی به طور مستقیم به روش تک اسپور یا نوک ریشه انجام شد (Szentivanyi et al. 2005). جدایه‌های قارچی خالص-سازی شده در تیوب‌های دو میلی‌لیتری حاوی محیط کشت سیب زمینی هویج آگار (PCA؛ Potato carrot agar؛ Crous et al. 2009) در مجموعه کشت‌های زنده دانشگاه تبریز و مجموعه کشت‌های زنده موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور برای مطالعات بعدی نگهداری شدند. نمونه‌های گیاهی دارای علایم آلودگی در مجموعه هرباریوم موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور ذخیره و کد هرباریومی برای نمونه‌ها دریافت شد.

بررسی صفات ریخت‌شناختی

جهت شناسایی جدایه‌های قارچی بر پایه صفات ریخت‌شناختی از روش بورما و همکاران (Boerema et al. 2004) استفاده شد. برای این منظور، دیسک‌های پنج میلی‌متری از هر جدایه قارچی به مرکز تشتک‌های پتری حاوی آرد یولاف آگار (OA؛ Oatmeal agar؛ Crous et al. 2009) و عصاره‌ی مالت آگار (MEA؛ Malt extract

به جدایه‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است. داده‌های توالی به دست آمده از بانک ژن با داده‌های جدایه‌های جمع‌آوری شده در مطالعه حاضر مقایسه شدند. توالی‌های این سه ناحیه به طور جداگانه با استفاده از نرم‌افزار Muscle (Edgar 2004) موجود در نرم‌افزار Mega7 (Kumar *et al.* 2016) زیرهم‌چینی و در صورت نیاز به طور دستی ویرایش شدند. در ادامه، جهت تجزیه و تحلیل چندژنی روابط تبارشناختی، الحاق رج‌بندی‌های تک ژنی و تبدیل فایل فاستا به صورت فایل نکسوس با نرم‌افزار Mesquite v. 3.04 (Maddison & Maddison 2001) انجام شد. مناسب‌ترین مدل جایگزینی با استفاده از نرم‌افزار MrModelTest v. 2.2 (Nylander 2004) تعیین شد. تبارنما به روش بیژین (Bayesian) و با استفاده از نرم‌افزار MrBayes v. 3.2.1 (Ronquist & Huelsenbeck 2003) ترسیم شد. برای این منظور، دو استنتاج بیژین، با پارامتر گرمایی ۰/۱۵ و چهار زنجیره MCMC با استفاده از تبارنماهای تصادفی برای ۱۰۰۰۰۰۰ نسل راه‌اندازی شد و تبارنماها در هر ۱۰۰۰ نسل یک بار نمونه‌برداری شدند. ۲۵ درصد از تبارنماهای ذخیره شده حذف شده و تبارنمای برآیند و احتمال پسین (PP; Posterior probability) با استفاده از تبارنماهای باقیمانده محاسبه گردیدند. *Neocamarosporium betae* Ariyaw. & Hyde CBS 523.66 به عنوان برون گروه استفاده شد. تبارنمای برآیند با استفاده از نرم‌افزار FIG TREE v. 1.3.1 (Rambaut 2009) ویرایش و مستخرج شد.

نتایج و بحث

طی نمونه‌برداری از استان‌های آذربایجان شرقی و غربی تعداد ۴۹ جدایه متعلق به خانواده *Didymellaceae* از بسترهای غذایی مختلف به دست آمدند (جدول ۱).

استفاده شدند. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR; Polymerase Chain Reaction) توسط دستگاه Biometra T Professional thermal cycler در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. مخلوط واکنش حاوی ۶۰-۵۰ نانوگرم DNA DreamTaq Green PCR Master Mix و ۰/۲ μM از هر پرایمر بود. جهت تکثیر ناحیه LSU یک چرخه دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه؛ ۳۵ چرخه تکثیر شامل دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، دمای ۴۸ درجه سلسیوس به مدت ۱۲۰ ثانیه و یک چرخه دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۷ دقیقه اعمال شد. واکنش PCR جهت تکثیر ناحیه ITS شامل یک چرخه دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه؛ ۳۵ چرخه تکثیر شامل دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، دمای ۴۸ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه و یک چرخه دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۷ دقیقه بود. جهت تکثیر ژن TUB یک چرخه دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه؛ ۳۵ چرخه تکثیر شامل دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و دمای ۵۲ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه و یک چرخه دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۷ دقیقه اعمال شد. محصولات PCR با استفاده از آنزیم Exo-Sap مطابق دستورالعمل شرکت سازنده خالص‌سازی و به وسیله کیت BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit در دو جهت مستقیم و معکوس توالی‌یابی شدند.

توالی‌های برآیند از دو توالی معکوس و مستقیم با استفاده از نرم‌افزارهای DNA Dragon v. 1.6.0 (Hepperle 2017) و BioEdit v. 5.0.6 (Hall 1999) ایجاد شدند. کد دست‌یابی در بانک ژن و اطلاعات مربوط

جدول ۱- مشخصات جدایه‌های به دست آمده در تحقیق حاضر و اخذ شده از بانک ژن (NCBI).

Table 1. Isolates recovered in the present study and obtained from GenBank (NCBI).

Species	Isolate	Herbarium Code	Substrate/Host	Sampling site	Date of sampling	Reference	GeneBank Accession Numbers		
							TUB	LSU	ITS
<i>Ascochyta herbicola</i>	T261I	-	<i>Achillea</i> sp.	Bostan Abad, EA	Apr. 2015	Present study	MK140515	-	MK100133
	CC447	T470	<i>Rosa canina</i>	Afil, EA	Jul. 2014	Present study	MK140514	MK138715	MK100131
	B-2-13	-	<i>Populus alba</i>	Bostan Abad, EA	Sep. 2013	Present study	MK140513	MK138723	MK100140
	R2312	-	Rust on <i>Tragopogon graminifolius</i>	Firooragh, Khoj, WA	Aug. 2013	Present study	MK140522	MK138716	MK100132
	T271I; IRAN 3218 C	-	<i>Falcaria vulgaris</i>	Bostan Abad, EA	Apr. 2015	Present study	MK140516	MK138717	MK100134
	T301I	-	<i>Ranunculus repens</i>	Hashtrud, EA	Apr. 2015	Present study	MK140517	MK138722	MK100139
	T351I	-	Unknown plant debris on soil	Khorshid, Hashtrud, EA	Apr. 2015	Present study	MK140519	MK138720	MK100137
	T521I	-	<i>Verbascum thapsus</i>	Bozghoosh, EA	Apr. 2015	Present study	MK140520	MK138719	MK100136
	T5913	-	<i>Capsella bursa-pastoris</i>	Bozghoosh, EA	Apr. 2015	Present study	MK140521	MK138718	MK100135
	T641I	-	<i>Papaver somniferum</i>	Baftan, EA	Apr. 2015	Present study	MK140518	MK138721	MK100138
<i>Ascochyta medicaginicola</i>	CBS 629.97 (R) T3061I	- T306	Water	USA	-	Chen <i>et al.</i> 2017	GU237614	GU238083	GU237898
	T23212	T232	<i>Medicago sativa</i>	Kaleybar, EA	Oct. 2012	Present study	MK140523	-	MK100151
	CBS 112.53 (T) CBS 404.65 (R) CBS 316.90	- - -	<i>Medicago sativa</i> <i>Medicago sativa</i> <i>Medicago sativa</i>	USA Canada Czech Republic	- - -	Chen <i>et al.</i> 2017 Chen <i>et al.</i> 2017 Chen <i>et al.</i> 2017	GU237628 GU237629 GU237630	GU238101 GU238102 GU238103	GU237749 GU237859 GU237828

Table 1. Continued.

Species	Isolate	Herbarium Code	Substrate/Host	Sampling site	Date of sampling	Reference	GeneBank Accession Numbers		
							TUB	LSU	ITS
<i>Ascochyta rabiei</i>	CBS 534.65	-	<i>Cicer arietinum</i>	India	-	Chen <i>et al.</i> 2017	GU237533	GU237970	GU237886
<i>Boeremia diversispora</i>	CBS 102.80	-	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Kenya	-	Chen <i>et al.</i> 2017	GU237492	GU237930	GU237725
<i>Boeremia exigua</i>	LS19; IRAN 3220 C T309I1	- T309	<i>Cirsium</i> sp. <i>Falcaria vulgaris</i>	Kaleybar, EA Kaleybar, EA	Oct. 2012 Nov. 2014	Present study Present study	MH760741	MK138769	MK100214
	R19I2	-	Rust on <i>Sorghum halepense</i>	Kaleybar, EA	Oct. 2012	Present study	MH760739	MK138770	MK100215
	CBS 431.74 (R)	-	<i>Solanum tuberosum</i>	Netherlands	-	Chen <i>et al.</i> 2017	FJ427112	EU754183	FJ427001
	CBS 101197	-	<i>Forsythia</i> sp.	Netherlands	-	Chen <i>et al.</i> 2017	GU237493	GU237931	GU237718
	CBS 101207 (T)	-	<i>Syringa vulgaris</i>	Netherlands	-	Chen <i>et al.</i> 2017	GU237503	GU237941	GU237721
<i>Boeremia foveata</i>	CBS 109176 (R)	-	<i>Solanum tuberosum</i>	Bulgaria	-	Chen <i>et al.</i> 2017	GU237508	GU237946	GU237742
<i>Boeremia sambucigræ</i>	CBS 629.68 (T)	-	<i>Sambucus nigra</i>	Netherlands	-	Chen <i>et al.</i> 2017	GU237517	GU237955	GU237897
<i>Boeremia strasserii</i>	LS27; IRAN 3214 C LS41	TL27	<i>Potentilla</i> sp. <i>Potentilla</i> sp.	Kaleybar, EA Kaleybar, EA	Oct. 2012 Oct. 2012	Present study Present study	MH760742	MK138763	MK100208
	P22I1	-	<i>Mentha pulegium</i>	Kaleybar, EA	Oct. 2012	Present study	MH760743	MK138764	MK100209
	R12I2	-	Rust on <i>Mentha pulegium</i>	Kaleybar, EA	Oct. 2012	Present study	MH760745	MK138765	MK100210
	R16I3	-	Rust on <i>Rumex</i> sp.	Kaleybar, EA	Oct. 2012	Present study	MH760744	MK138766	MK100211
	R16I4	-	Rust on <i>Rumex</i> sp.	Kaleybar, EA	Oct. 2012	Present study	MH760746	MK138767	MK100212
	CBS 126.93	-	<i>Mentha</i> sp.	Netherlands	-	Aveskamp <i>et al.</i> 2010	MH760747	MK138768	MK100213
	CBS 261.92	-	<i>Mentha piperita</i>	USA	-	Aveskamp <i>et al.</i> 2010	GU237518	GU237956	GU237773
<i>Didymella aurea</i>	CBS 269.93 (T)	-	<i>Medicago polymorpha</i>	New Zealand	-	Chen <i>et al.</i> 2017	GU237557	GU237999	GU237818

جدول ۱ - ادامه.

Table 1. Continued.

Species	Isolate	Herbarium Code	Substrate/Host	Sampling site	Date of sampling	Reference	GeneBank Accession Numbers		
							TUB	LSU	ITS
<i>Didymella glomerata</i>	T911	-	<i>Alyssum alyssoides</i>	Nematollah, Sofian, EA	Apr. 2015	Present study	MH760753	MK138754	MK100196
	KH-12-A	-	<i>Lolium</i> sp.	Khoy, WA	Sep. 2013	Present study	MH760760	MK138739	MK100180
	KH-19-A	-	<i>Alyssum</i> sp.	Khoy, WA	Sep. 2013	Present study	MH760761	-	-
	KH-1-A	-	<i>Hesperocyparis arizonica</i>	Khoy, WA	Sep. 2013	Present study	MH760762	MK138740	MK100181
	P3H1	T78	<i>Peganum harmala</i>	Khoy, WA	Jul. 2014	Present study	MH760764	MK138743	MK100184
	P4H1	TP4	<i>Peganum harmala</i>	Khoy, WA	Jul. 2011	Present study	MH760765	MK138744	MK100185
	T111	-	Unknown plant debris on soil	Shend Abad, EA	Apr. 2015	Present study	MH760754	MK138748	MK100190
	T29311	-	<i>Secale montanum</i>	Salkadeh, WA	Nov. 2014	Present study	MH760755	MK138749	MK100191
	T38811	-	<i>Aquilegia vulgaris</i>	Jolfa, EA	Oct. 2014	Present study	MH760756	MK138751	MK100193
	M1711	-	Powdery mildew on <i>Chrysanthemum</i> sp.	Kaleybar, EA	Nov. 2012	Present study	MH760763	MK138742	MK100183
	M140; IRAN 3216 C	-	<i>Vitis vinifera</i>	Miandoab, WA	Jun. 2011	Present study	MH760759	MK138738	MK100179
T411	-	<i>Ranunculus repens</i>	Nematollah, Sofian, EA	Apr. 2015	Present study	MH760758	MK138752	MK100194	
T32111	-	<i>Olea europaea</i>	Zanjan, Zanjan province	Nov. 2011	Present study	MH760757	MK138750	MK100192	
M1311	-	Powdery mildew on <i>Plantago major</i>	Khameneh, EA	Oct. 2012	Present study	MH760749	MK138746	MK100188	
M913	-	Rust on <i>Convolvulus arvensis</i>	Chercher, Zonooz, EA	Nov. 2012	Present study	MH760750	MK138747	MK100189	
SH-E	-	<i>Cucumis melo</i>	Maragheh, EA	Aug. 2013	Present study	MH760752	-	MK100187	
R1319	-	Rust on <i>Picnoman acarna</i>	Mianeh, EA	Oct. 2012	Present study	MH760751	MK138745	MK100186	
LS40	-	<i>Inula helenium</i>	Kaleybar, EA	Oct. 2012	Present study	MH760748	MK138741	MK100182	
CBS 528.66 (R)	-	<i>Chrysanthemum</i> sp.	Netherlands	-	Chen <i>et al.</i> 2017	FJ427124	EU754184	FJ427013	
CBS 464.97	-	Indoor environment	Netherlands	-	Aveskamp <i>et al.</i> 2010	FJ427123	GU238009	FJ427012	
LS13; IRAN 3217 C	TL13	<i>Buddleja</i> sp.	Kaleybar, EA	Oct. 2010	Present study	MH760767	MK138755	MK100200	
TAS 041-0071	-	<i>Tanacetum cinerariifolium</i>	Australia	-	Pearce <i>et al.</i> 2015	KT287000	KT287040	KT287039	

جدول ۱ - ادامه.

Table 1. Continued.

Species	Isolate	Herbarium Code	Substrate/Host	Sampling site	Date of sampling	Reference	GeneBank Accession Numbers		
							TUB	LSU	ITS
<i>Epicoccum nigrum</i>	R212	-	Rust on <i>Cynodon dactylon</i>	Zonooz, EA	Nov. 2013	Present study	MK140527	MK138737	MK100177
	T31212	T312	<i>Salix alba</i>	Kaleybar, EA	Jun. 2012	Present study	MK142301	MK138733	MK100173
<i>Epicoecum sorghinum</i>	T31213; IRAN 3213 C	T312	<i>Salix alba</i>	Kaleybar, EA	Jun. 2012	Present study	MK142300	MK138734	MK100174
	CBS 173.73 (T)	-	<i>Dactylis glomerata</i>	USA	-	Chen <i>et al.</i> 2017	FJ427107	GU237975	FJ426996
<i>Heterophoma novae-verbascicola</i>	CBS 179.80	-	<i>Sorghum vulgare</i>	Puerto Rico	-	Chen <i>et al.</i> 2017	FJ427173	GU237978	FJ427067
	LS30	TL30	<i>Sorghum halepense</i>	Kaleybar, EA	Oct. 2012	Present study	MH760772	MK138774	MK100219
<i>Heterophoma novae-verbascicola</i>	LS37; IRAN 3215 C	-	Unknown plant debris on soil	Kaleybar, EA	Oct. 2012	Present study	MH760773	MK138775	MK100220
	LS18	TL18	<i>Equisetum arvense</i>	Kaleybar, EA	Oct. 2012	Present study	MH760770	MK138772	MK100217
<i>Heterophoma novae-verbascicola</i>	LS22	TL22	<i>Urtica dioica</i>	Kaleybar, EA	Oct. 2012	Present study	MH760771	MK138773	MK100218
	P1911	-	Unknown plant branch on soil	Kaleybar, EA	Oct. 2012	Present study	MH760774	MK138776	MK100221
<i>Heterophoma poolensis</i>	CBS 114.93	-	<i>Verbascum</i> sp.	Netherlands	-	Aveskamp <i>et al.</i> 2010	GU237638	GU238119	GU237753
	CBS 127.93	-	<i>Verbascum densiflorum</i>	Netherlands	-	Aveskamp <i>et al.</i> 2010	GU237639	GU238120	GU237774
<i>Nothophoma quercina</i>	CBS 113.20	-	-	-	-	Chen <i>et al.</i> 2017	GU237638	GU238119	GU237751
	CBS 633.92	-	<i>Microsphaera alphitooides</i> from <i>Quercus</i> sp.	Ukraine	-	Chen <i>et al.</i> 2017	GU237609	EU754127	GU237900
<i>Nothophoma infossa</i>	CBS 123395	-	<i>Fraxinus pennsylvanica</i>	Argentina	-	Chen <i>et al.</i> 2017	FJ427135	GU238089	FJ427025
	K-26-1; IRAN 3223 C	-	soil	Maragheh, EA	Aug. 2014	Present study	MK140525	MK138728	MK100168
<i>Phoma eupyrena</i>	CBS 374.91	-	<i>Solanum tuberosum</i>	Netherlands	-	Aveskamp <i>et al.</i> 2010	FJ427110	GU238072	FJ426999
	CBS 527.66	-	Soil	Germany	-	Aveskamp <i>et al.</i> 2010	FJ427111	GU238073	FJ427000

(T): ex-type strain; (R): representative strain.

تجزیه و تحلیل تبارشناختی

جهت تجزیه و تحلیل تبارشناختی از داده‌های توالی سه ناحیه ITS، LSU و TUB استفاده شد. مجموعه داده‌های نواحی الحاق شده شامل ۲۲۲۰ کاراکتر (حدود و ثغور نواحی ژنومی: TUB=۱-۳۴۳، ITS=۳۴۴-۸۹۹ و LSU=۹۰۰-۲۲۲۰) بود که دارای ۲۸۴ (TUB=۱۲۷، ITS=۹۵ و LSU=۶۲) الگوی مکانی منحصر به فرد بود. نرم افزار MrModelTest (مدل GTR+G (General Time Reversible+Gamma) را به عنوان مناسب‌ترین مدل برای هر سه مجموعه داده پیشنهاد داد. تجزیه و تحلیل بیشترین منتهی به ۴۰۰۰۰۰ نسل و ۵۸۸ تبارنما شد. بعد از حذف ۲۵ درصد اولیه تبارنماهای جمع‌آوری شده، تبارنمای اجمالی از تبارنماهای باقی مانده محاسبه گردید. تجزیه و تحلیل تبارشناختی با استفاده از استنتاج بیشترین جدایه‌های به دست آمده در مطالعه حاضر را به نه خوشه مجزا تفکیک نمود (شکل ۲). بر این اساس جدایه‌ها تحت عناوین *Boeremia B. exigua*, *Epicoccum nigrum* Link *Didymella glomerata strasseri* Aveskamp et al. *Didymella tanacetii* Pearce et al.، Chen & Cai *Ascochyta herbicola* Chen & Cai *medicaginicola* *Heterophoma novae*- و *Phoma eupyrena* Sacc. *verbascicola* Chen & Cai شناسایی شدند.

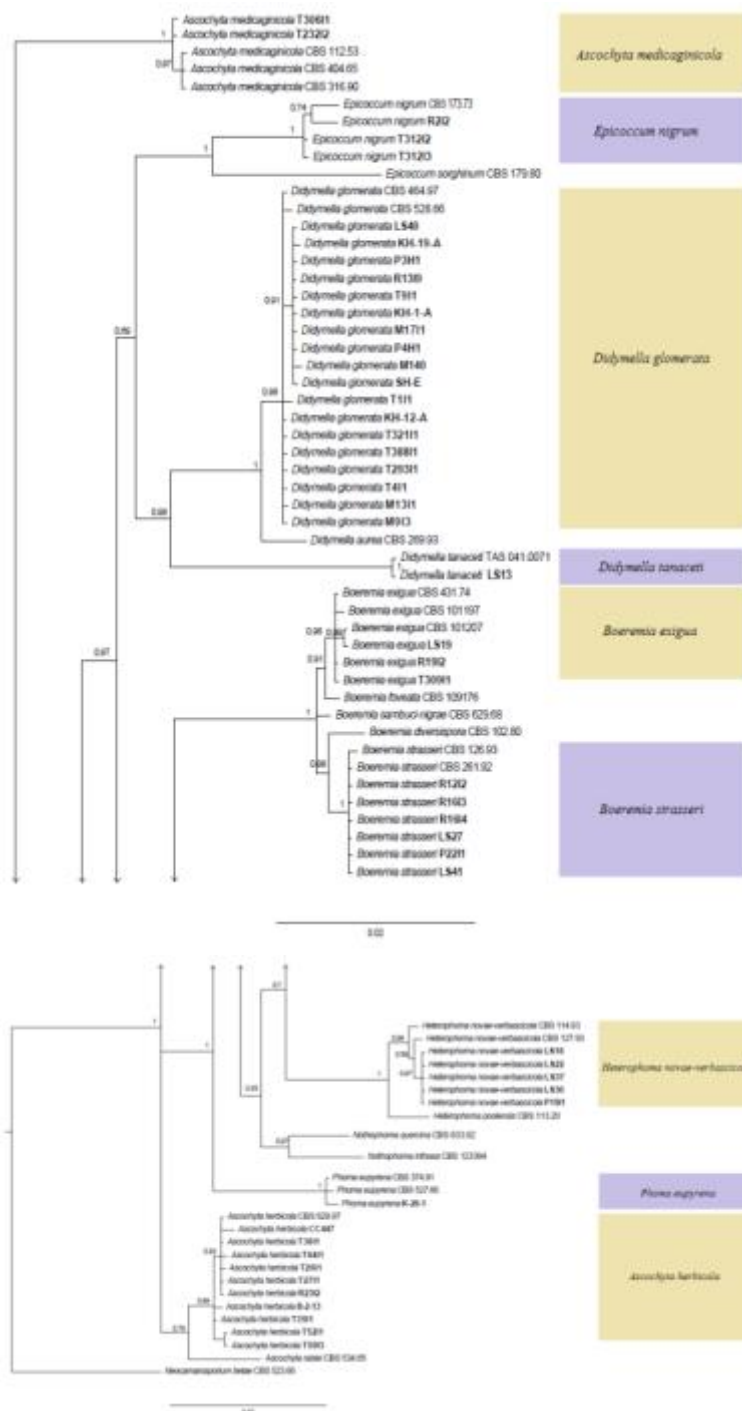
مطالعات ریخت‌شناختی

Ascochyta herbicola (Wehm.) Q. Chen & L. Cai, *Studies in Mycology* 82: 187 (2015)

پرگنه روی محیط کشت MEA پس از هفت روز در دمای ۲۳ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی سطح، گرد، دارای حاشیه صاف و منظم، به رنگ زرد طلایی (luteous) با مرکز قهوه‌ای تیره (به دلیل تولید متراکم پیکنیدیوم)،

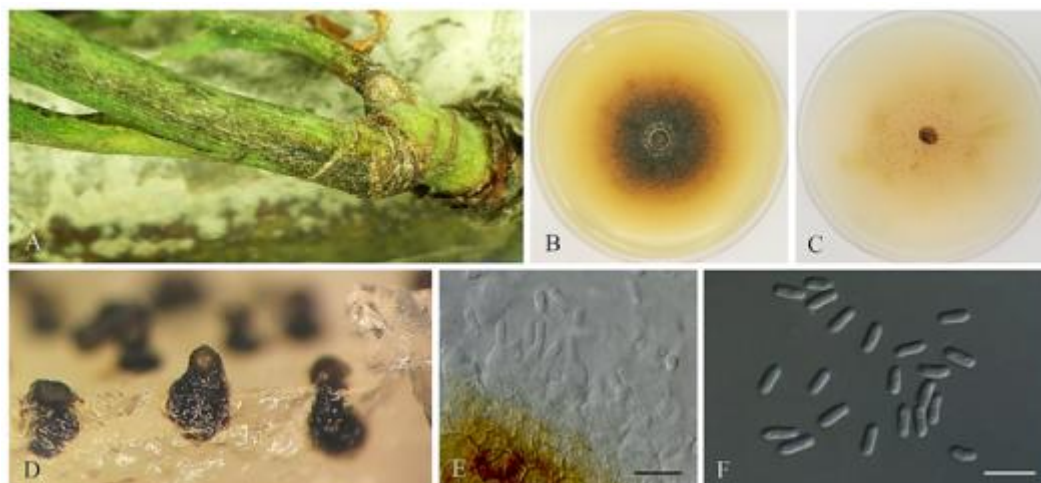
دارای ریشه‌های هوایی کرکی و سفید بود. قطر پرگنه‌های هفت روزه ۶۰ میلی‌متر بود. این گونه قادر به ایجاد تغییر در رنگ محیط کشت MEA و تولید کریستال نبود و آزمون NaOH منفی بود. پرگنه روی محیط کشت OA پس از هفت روز در دمای ۲۳ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی سطح، گرد، دارای حاشیه صاف و منظم، بی‌رنگ، با مرکز بژ مایل به زرد و دارای بخش‌هایی به رنگ سبز، دارای میسلیم هوایی اندک و سفید بود. قطر پرگنه هفت روزه ۵۵ میلی‌متر بود. در رنگ محیط کشت OA تغییر رنگی ایجاد نشد. ریشه‌ها در سطح و داخل آگار رشد کرده، نیمه‌شفاف تا قهوه‌ای کم‌رنگ، منشعب، دارای سطح صاف، دارای دیواره عرضی و به قطر ۴-۲ میکرومتر بودند. کلامیدوسپور رویت نشد. پیکنیدیوم‌ها نیمه کروی، دارای سطح صاف، به رنگ قهوه‌ای تیره تا سیاه، پراکنده در سطح پرگنه، منفرد یا مجتمع، اندکی یا به ندرت به طور کامل فرورفته در محیط غذایی، به قطر حداکثر ۴۴۶ میکرومتر، دارای ۱-۲ استیول روی گردن بلند به طول حداکثر ۲۰۰ میکرومتر بودند. دیواره پیکنیدیوم‌ها متشکل از هشت لایه *textura angularis* با دیواره ضخیم بود، که لایه‌های بیرونی به رنگ قهوه‌ای و لایه‌های داخلی شفاف بودند. سلول‌های کنیدیوم‌ها شفاف، دارای سطح صاف، آمپولی شکی و به ابعاد ۳-۵ × ۵-۷ میکرومتر بودند. کنیدیوم‌ها استوانه‌ای تا نیمه استوانه‌ای، دارای دو انتهای گرد، راست یا اندکی خمیده، شفاف، تک سلولی، دارای سطح صاف، فاقد گلوله چربی و به ابعاد (۷-) ۶ (۵-) × ۲/۵-۲ میکرومتر بودند (شکل ۳).

این گونه از گیاهان به ظاهر سالم مختلف شامل *Capsella bursa-pastoris*، *Papaver somniferum* L.، *Ranunculus repens*، *Verbascum thapsus* L.، Medik. و *Populus alba* L.، *Falcaria vulgaris* Bernh. J.L.



شکل ۲- تبارنمای حاصل از استنتاج بیژین اعضای *Didymellaceae* حاصل از الحاق سه ناحیه ITS, LSU و ژن TUB با سه کارگیری مدل GTR+G. تبارنما با استفاده از *Neocamarosporium betae* CBS 523.66 ریشه‌دار گردید. مقیاس خطی تعداد جایگزینی مورد انتظار را در هر مکان نشان می‌دهد. اعداد روی هر گره میزان احتمال پسین می‌باشد.

Fig 2. Bayesian inference phylogenetic tree of Didymellaceae members generated using concatenated sequences of ITS, LSU and TUB using a GTR+G model. The tree was rooted to *Neocamarosporium betae* CBS 523.66. The scale bar indicates the number of expected substitutions per site. The values above nodes show Bayesian posterior probability.



شکل ۳- گونه *Ascochyta herbicola* (جدایه CC447): A. علائم بیماری روی ساقه *Rosa canina* B. پرگنه قارچ روی محیط کشت MEA پس از هفت روز در شرایط تاریکی و دمای ۲۳ درجه سلسیوس، C. پرگنه قارچ روی محیط کشت OA پس از هفت روز در شرایط تاریکی و دمای ۲۳ درجه سلسیوس، D. پیکنیدیوم‌ها روی محیط کشت OA، E. سلول‌های کنیدیوم‌زا و F. کنیدیوم‌ها (مقیاس‌ها = ۱۰ میکرومتر).

Fig. 3. *Ascochyta herbicola* (isolate CC447): A. Symptoms on *Rosa canina* stem. B. seven days old colony on MEA at 23 °C in dark, C. seven days old colony on OA at 23 °C in dark, D. Pycnidia on OA, E. Conidiogenous cells (bar = 10 µm) and F. Conidia (bars = 10 µm).

گونه است.

Ascochyta medicaginicola Q. Chen & L. Cai, Studies in Mycology 82: 187 (2015)

توصیف کاملی از صفات ریخت‌شناختی این گونه توسط امیردهی و همکاران (Amirdehi et al. 2017) ارائه شده است. در پژوهش حاضر، این گونه از علائم لکه برگی *Vicia L. sp.* و *Medicago sativa L.* جداسازی شد. لکه‌های موجود روی *M. sativa* زاویه‌دار، قهوه‌ای و به قطر حداکثر دو میلی‌متر بودند. لکه‌برگی *Vicia sp.* بیضی شکل، قهوه‌ای مایل به خاکستری و به طول حداکثر هفت میلی‌متر بودند (شکل ۴). این گونه به طور عمده به عنوان عامل ساق سیاه اعضای خانواده *Fabaceae* شناخته می‌شود. با این حال از سایر خانواده‌های گیاهی نیز گزارش شده است. در ایران، *A. medicaginicola* پیش از این از یونجه و نخود ایرانی گزارش شده است (Amirdehi et al. 2017).

Achillea L. sp. و نیز از بقایای گیاهی به عنوان ساپروفیت جداسازی شد. علاوه بر این، به عنوان هیپرپارازیت *Tragopogon graminifolius DC.* اسپوره‌های عامل زنگ شناسایی شد. یک جدایه از این گونه (CC447) نیز از شاخه‌های *Rosa canina L.* دارای علائم پوسیدگی آوندی جداسازی شد (جدول ۱). این گونه در سال ۱۳۹۱ با نام *Taraxacum Wigg.* از *Phoma herbicola* Wehmeyer sp. از ایران گزارش شده است (Razaghi & Zafari 2012). در تحقیق حاضر بر اساس شرایط استاندارد پیشنهاد شده توسط بورما و همکاران (Boerema et al. 2004) توصیف جامع‌تری برای ویژگی‌های ریخت‌شناختی این گونه ارائه شده است. پیش از این نیز شیوه زندگی ساپروفیتی در این قارچ مشاهده شده است (Boerema et al. 2004). تمامی گیاهان فوق به عنوان میزبان‌های جدید برای *A. herbicola* گزارش می‌شوند. همچنین، این نخستین گزارش از شیوه زندگی میکوپارازیتی برای این



شکل ۵- علائم بیماری گونه *Boeremia exigua* روی برگ

Falcaria vulgaris

Fig. 5. Symptoms of *Boeremia exigua* on *Falcaria vulgaris* leaf.

گرد، دارای حاشیه صاف و منظم، به رنگ سفید مایل به خاکستری و دارای ریشه‌های هوایی متراکم و پنبه‌ای بود. قطر پرگنه‌های هفت روزه ۷۳ میلی‌متر بود. این گونه قادر به ایجاد تغییر در رنگ محیط کشت MEA و تولید کریستال نبود و آزمون NaOH مثبت بود. پرگنه روی محیط کشت OA پس از هفت روز در دمای ۲۳ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی برآمده، گرد، دارای حاشیه صاف و منظم، به رنگ زرد مایل به قهوه‌ای کمرنگ با بخش‌های خاکستری مایل به سبز زیتونی، دارای میسلیم هوایی نمدی و فراوان بود. قطر پرگنه هفت روزه ۷۳ میلی‌متر بود. رنگ محیط کشت OA به رنگ متمایل به قهوه‌ای تغییر یافت. ریشه‌ها در سطح و داخل آگار رشد کرده، شفاف، نیمه‌شفاف تا قهوه‌ای کم‌رنگ، منشعب، صاف، دارای دیواره عرضی و به قطر ۷-۲ میکرومتر بودند. کلامیدوسپور رویت نشد. پیکنیدیوم‌ها کروی تا نیمه کروی، دارای سطح صاف، به رنگ قهوه‌ای تیره تا سیاه، پراکنده در سطح پرگنه، منفرد یا مجتمع، اندکی یا به طور کامل فرورفته در محیط غذایی، به قطر حداکثر ۳۵۰ میکرومتر و دارای ۱-۳ استیول بودند. دیواره پیکنیدیوم‌ها



شکل ۴- گونه *Ascochyta medicaginicola*: A علائم بیماری

روی برگ‌های *Medicago sativa*. B علائم بیماری روی برگ-

های *Vicia* sp.

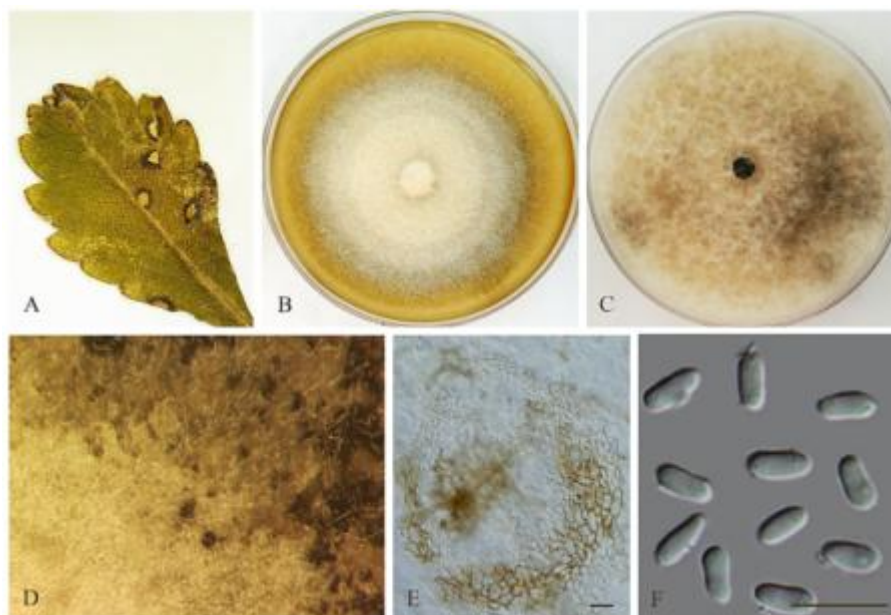
Fig. 4. *Ascochyta medicaginicola*: A. Symptoms on *Medicago sativa* leaves. B. Symptoms on *Vicia* sp. Leaves.

Boeremia exigua (Desm.) Aveskamp *et al.*, Studies in Mycology 65: 36 (2010)

توصیف کاملی از صفات ریخت‌شناختی این گونه توسط امیردهی و همکاران (Amirdehi *et al.* 2017) ارائه شده است. در پژوهش حاضر، این گونه از گیاه به ظاهر سالم *Cirsium* sp. و نیز به عنوان هیپرپارازیت عامل زنگ *Sorghum halepense* Pers. جداسازی و شناسایی شد. همچنین، از لکه برگی *F. vulgaris* نیز به دست آمد (شکل ۵). گونه *B. exigua* همه‌جازی و دارای بیش از ۲۰۰ میزبان گیاهی است. این گونه فارچی از جمله بیمارگرهای فرصت طلب است و ممکن است باعث بروز بیماری در اندام‌های هوایی، ریشه و غده گیاهان مختلف شود (Aveskamp *et al.* 2008, Boerema *et al.* 2004,) (Koening *et al.* 2000, Koike *et al.* 2006). به عنوان بیمارگر انسان نیز گزارش شده است (Aveskamp *et al.* 2008). این گونه پیش از این از ایران گزارش شده است (Amirdehi *et al.* 2017, Ershad 2009).

Boeremia strasseri (Moesz) Aveskamp *et al.*, Studies in Mycology 65: 40 (2010)

پرگنه روی محیط کشت MEA پس از هفت روز در دمای ۲۳ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی اندکی برآمده،



شکل ۶- گونه *Boeremia strasseri* (جدایه LS27): A. علائم بیماری روی برگ *Potentilla sp.* B. پرگنه قارچ روی محیط کشت MEA پس از هفت روز در شرایط تاریکی و دمای ۲۳ درجه سلسیوس، C. پرگنه قارچ روی محیط کشت OA پس از هفت روز در شرایط تاریکی و دمای ۲۳ درجه سلسیوس، D. پیکنیدیوم‌ها روی محیط کشت OA، E. برش عرضی پیکنیدیوم (مقیاس = ۲۰ میکرومتر) و F. کنیدیوم‌ها (مقیاس = ۱۰ میکرومتر).

Fig. 6. *Boeremia strasseri* (isolate LS27): A. Symptoms on *Potentilla sp.* leaf. B. seven days old colony on MEA at 23 °C in dark, C. seven days old colony on OA at 23 °C in dark, D. Pycnidia on OA, E. Cross section of pycnidium (bar = 20 µm) and F. Conidia (bar = 10 µm).

گونه‌های *Labiaceae* در نقاط مختلف دنیا شناخته می‌شود (Boerema *et al.* 2004). این نخستین گزارش از *B. strasseri* برای میکوبیوتای ایران است. در این گونه برای اولین بار شیوه زندگی میکوپارازیتی مشاهده شد. *Potentilla sp.* به عنوان میزبان جدید برای *B. strasseri* معرفی می‌گردد.

Didymella glomerata (Corda) Q. Chen & L. Cai, Studies in Mycology 82: 176 (2015)

پرگنه روی محیط کشت MEA پس از هفت روز در دمای ۲۳ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی اندکی برآمده، گرد، دارای حاشیه صاف و منظم، به رنگ سفید مایل به قرمز با مرکز شرابی رنگ و دارای ریشه‌های هوایی فراوان بود. قطر پرگنه‌های هفت روزه ۶۳ میلی‌متر بود. این گونه قادر به ایجاد تغییر در رنگ محیط کشت MEA و تولید

متشکل از ۵-۷ لایه پارانشیم کاذب بود، که لایه‌های بیرونی به رنگ قهوه‌ای و لایه‌های داخلی شفاف بودند. سلول‌های کنیدیوم‌زا رویت نشدند. کنیدیوم‌ها شفاف، تک سلولی، استوانی‌ای تا بیضی شکل، دو انتها گرد، راست، گاهی اندکی خمیده، دارای سطح صاف و به ابعاد ۷-۸ × ۲-۳ میکرومتر بودند (شکل ۶).

گونه حاضر از گیاهان به ظاهر سالم *Mentha pulegium* L. و به عنوان هیبرپارازیت عامل زنگ *M. pulegium* و زنگ *Rumex L. sp.* جداسازی شد. علاوه بر این، از لکه‌های نکروز، سفید مایل به زرد، با حاشیه ارغوانی مایل به سیاه، زاویه دار به قطر حداکثر پنج میلی-متر روی برگ‌های *Potentilla L. sp.* به دست آمد. *B. strasseri* به عنوان بیمارگر گونه‌های *Mentha L.* و سایر

ظاهر سالم *Alyssum L. sp. Alyssum alyssoides L.*
Lolium L. sp. Aquilegia vulgaris L.
Secale montanum Hesperocyparis arizonica Bartel
Cucumis melo و *R. repens, Vitis vinifera L. Guss.*
L. و نیز از روی اسپوره‌های عوامل زنگ *Convolvulus*
arvensis L. سفیدک سطحی *Chrysanthemum L. sp.* و
 سفیدک سطحی *Plantago major L.* جداسازی شد.
 علاوه بر این، برخی جدایه‌ها از گیاهان بیمار، شامل زیتون
Peganum (Olea europaea L.)؛ پوسیدگی میوه، اسپند (*Peganum*)
Inula helenium L.؛ لکه روی برگ و ساقه) و
L. (لکه برگ) نیز به دست آمدند. روی گیاه اسپند علایم
 به صورت لکه‌های بیضی شکل و کشیده، قهوه‌ای تیره تا
 سیاه، پراکنده در سطح برگ و به طول حداکثر هفت میلی-
 متر روی برگ و لکه‌هایی به اشکال متنوع، قهوه‌ای، با
 حاشیه قهوه‌ای تیره تا سیاه مشاهده شدند که به تدریج با
 پیشرفت بیماری لکه‌ها به هم پیوسته و کل سطح برگ و
 ساقه را فرا می‌گرفتند. علایم روی *I. helenium* به صورت
 لکه‌های نیمه گرد تا بی‌شکل، نکروز، سفید مایل به زرد،
 با حاشیه ارغوانی، متمرکز در اطراف رگبرگ میانی و به قطر
 حداکثر ۱۵ میلی‌متر بودند. *D. glomerata* گونه‌ای همه-
 جازی، دامنه میزبانی وسیع است. این گونه از مواد آلی و
 غیر آلی جداسازی شده است. به طور عمده به عنوان
 بیمارگر فرصت طلب گیاهان شناخته می‌شود و به نظر می-
 رسد میزبان‌های آن متعلق به بیش از ۱۰۰ جنس گیاهی
 هستند. علاوه بر این، در ردیف بیمارگرهای انسانی نیز
 قرار دارد (Boerema et al. 2004). این گونه پیش از این
 به عنوان هیپرپارازیت قارچ‌های انگل اجباری گیاهان
 گزارش شده است (Sullivan & White 2000). این گونه
 پیش از این از ایران با نام *Phoma glomerata* Wollenw.
 & Hochapfel گزارش شده است (Ershad 2009).

کریستال نبود و آزمون NaOH منفی بود. پرگنه روی
 محیط کشت OA پس از هفت روز در دمای ۲۳ درجه
 سلسیوس و شرایط تاریکی مسطح، گرد، دارای حاشیه
 صاف و منظم، به رنگ زیتونی و دارای میسلیم هوایی
 اندک بود. قطر پرگنه هفت روزه ۵۴ میلی‌متر بود. در رنگ
 محیط کشت OA تغییر رنگی ایجاد نشد. ریشه‌ها در سطح
 و داخل آگار رشد کرده، نیمه‌شفاف تا قهوه‌ای، منشعب،
 صاف، دارای دیواره عرضی و به قطر ۴-۱ میکرومتر بودند.
 کلامیدوسپورها توتی شکل، واجد دیواره‌های متعدد طولی
 یا مورب و عرضی (تداعی کننده کنیدیوم‌های اعضای
 جنس *Alternaria*)، قهوه‌ای تیره یا قهوه‌ای مایل به قرمز،
 انتهایی، منفرد یا زنجیری، به طول حداکثر ۷۵ میکرومتر و
 عرض حداکثر ۱۹ میکرومتر بودند. پیکنیدیوم‌ها کروی تا
 گلابی شکل، دارای سطح صاف، به رنگ قهوه‌ای تیره،
 پراکنده در سطح پرگنه، منفرد یا مجتمع، گاهی به هم
 پیوسته، اندکی فرورفته در محیط غذایی و به قطر حداکثر
 ۲۹۵ میکرومتر بودند. دیواره پیکنیدیوم‌ها متشکل از ۵-۴
 لایه *textura angularis* با دیواره ضخیم بود، که ۳-۲ لایه
 بیرونی به رنگ قهوه‌ای و لایه‌های داخلی شفاف بودند.
 روی میسلیم هوایی میکروپیکنیدیوم‌هایی به قطر حداکثر
 ۱۴۰ میکرومتر تشکیل می‌شدند. سلول‌های کنیدیوم‌زا
 شفاف، دارای سطح صاف، گلابی شکلی، دارای راس
 باریک و به ابعاد $6 \times 6 - 7/5 \times 4$ میکرومتر بودند. کنیدیوم-
 ها شفاف، تک سلولی، به اشکال متنوع، اغلب بیضی شکل،
 دو انتها گرد، راست یا اندکی خمیده، به ندرت سیگموئید،
 دارای سطح صاف، دارای دو گلوله چربی و به ابعاد
 $(10/5 - 6/5 - 5) \times (2 - 4)$ میکرومتر بودند (شکل
 ۷).

گونه حاضر به عنوان ساپروفیت از بقایای گیاهی در
 حال پوسیدن جداسازی شد. *D. glomerata* از گیاهان به



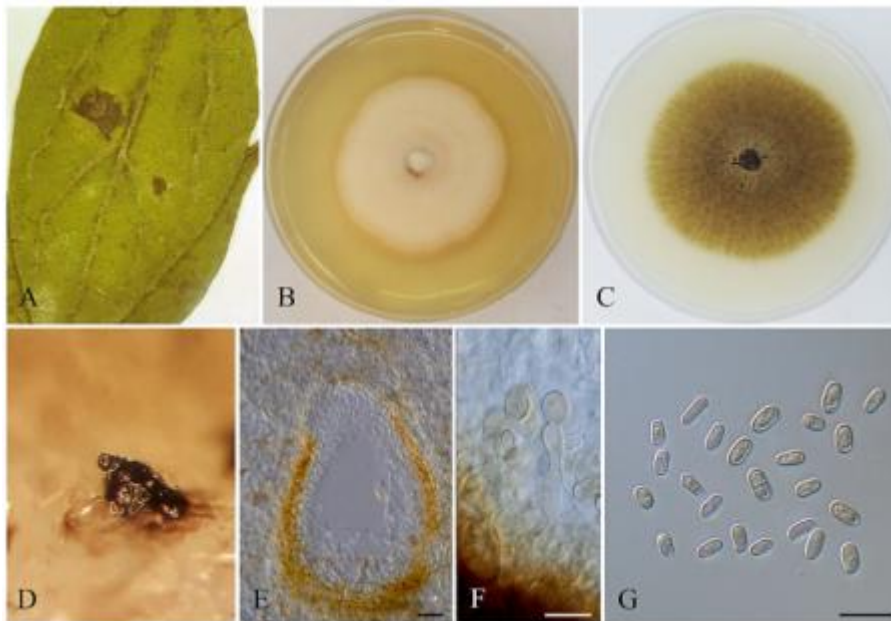
شکل ۷- گونه *Didymella glomerata* (جدایه SH-E): A-C. علائم بیماری روی برگ‌ها و ساقه‌های *Peganum harmala*. D. علائم بیماری روی برگ *Inula helenium*. E. علائم بیماری روی میوه *Olea europaea*. F. پرگنه قارچ روی محیط کشت MEA پس از هفت روز در شرایط تاریکی و دمای ۲۳ درجه سلسیوس، G. پرگنه قارچ روی محیط کشت OA پس از هفت روز در شرایط تاریکی و دمای ۲۳ درجه سلسیوس، H. پیکنیدیوم‌ها روی محیط کشت OA، I. میکروپیکنیدیوم، J. سلول‌های کنیدیوم‌زا، K. کنیدیوم‌ها و L. کلامیدوسپورها (مقیاس‌ها = ۱۰ میکرومتر).

Fig. 7. *Didymella glomerata* (isolate SH-E): A-C. Symptoms on leaves and stems of *Peganum harmala*. D. Symptoms on *Inula helenium* leaf. E. Symptoms on *Inula helenium* fruit. F. seven days old colony on MEA at 23 °C in dark, G. seven days old colony on OA at 23 °C in dark, H. Pycnidia on OA, I. Micropycnidium, J. Conidiogenous cells, K. Conidia and L. Clamydospores (bars = 10 μm).

دارای ریشه‌های هوایی فراوان بود. قطر پرگنه‌های هفت روزه ۴۹ میلی‌متر بود. این گونه قادر به ایجاد تغییر در رنگ محیط کشت MEA و تولید کریستال نبود و آزمون NaOH منفی بود. پرگنه روی محیط کشت OA پس از

Didymella tanacetii (Shivas *et al.*) Pearce *et al.*, Plant Pathology 65: 1177 (2016)

پرگنه روی محیط کشت MEA پس از هفت روز در دمای ۲۳ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی برآمده، گرد، دارای حاشیه صاف و منظم، به رنگ سفید، کرکی و



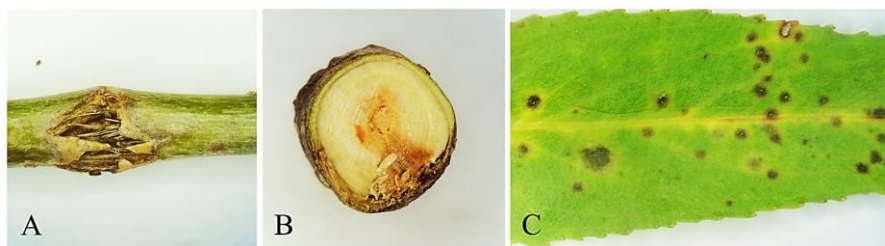
شکل ۸- گونه *Didymella tanacetii* (جدایه LS13): A. علائم بیماری روی برگ *Buddleja* sp. B. پرگنه فارچ روی محیط کشت MEA پس از هفت روز در شرایط تاریکی و دمای ۲۳ درجه سلسیوس، C. پرگنه فارچ روی محیط کشت OA پس از هفت روز در شرایط تاریکی و دمای ۲۳ درجه سلسیوس، D. پیکنیدیوم روی محیط کشت OA، E. سلول‌های کنیدیوم‌زا (مقیاس = ۱۰ میکرومتر) و F. کنیدیوم‌ها (مقیاس = ۱۰ میکرومتر).

Fig. 8. *Didymella tanacetii* (isolate LS13): A. Symptoms on *Buddleja* sp. leaf. B. seven days old colony on MEA at 23 °C in dark, C. seven days old colony on OA at 23 °C in dark, D. Pycnidium on OA, E. Cross section of pycnidium (bar = 20 μm), F. Conidiogenous cells (bar = 10 μm) and G. Conidia (bar = 10 μm).

عرض حداکثر ۷۱ میکرومتر بودند. دیواره پیکنیدیوم‌ها متشکل از ۴-۵ لایه *textura angularis* با دیواره ضخیم بود، که ۲-۳ لایه بیرونی به رنگ قهوه‌ای و لایه‌های داخلی شفاف بودند. سلول‌های کنیدیوم‌زا نیمه شفاف، دارای سطح صاف، نیمه استوانه‌ای تا بی‌شکل، به طول حداکثر ۲۰ میکرومتر و عرض ۳-۴ میکرومتر بودند. کنیدیوم‌ها قهوه‌ای روشن مایل به زیتونی، تک سلولی، به ندرت دو سلولی، بیضی شکل تا استوانه‌ای، دو انتها گرد، راست یا اندکی خمیده، دارای سطح صاف، فاقد گلوله چربی و به ابعاد ۵-۶ (-) × ۳-۵ میکرومتر بودند (شکل ۸).

گونه حاضر از لکه‌های قهوه‌ای مایل به خاکستری، زاویه‌دار و به قطر حداکثر پنج میلی‌متر بر روی برگ‌های

هفت روز در دمای ۲۳ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی مسطح، گرد، دارای حاشیه صاف و منظم، به رنگ زیتونی و دارای میسلیم هوایی اندک بود. قطر پرگنه هفت روزه ۵۴ میلی‌متر بود. در رنگ محیط کشت OA تغییر رنگی ایجاد نشد. ریشه‌ها در سطح و داخل آگار رشد کرده، شفاف، نیمه‌شفاف تا قهوه‌ای روشن، منشعب، صاف، دارای دیواره عرضی و به قطر ۲-۳ میکرومتر بودند. کلامیدوسپور رویت نشد. پیکنیدیوم‌ها کروی، نیمه کروی یا دارای اشکال نامنظم، دارای سطح صاف، به رنگ قهوه‌ای تیره تا سیاه، پراکنده در سطح پرگنه، منفرد یا مجتمع، گاهی به هم پیوسته، اندکی یا به طور کامل فرورفته در محیط غذایی، به قطر حداکثر ۲۴۳ میکرومتر، دارای ۱-۳ یا به ندرت ۴ استیول روی گردن بلند به طول حداکثر ۱۱۶ میکرومتر و



شکل ۹- گونه *Epicoccum nigrum*: A-B. علائم بیماری روی شاخه‌های *Salix alba*. C. علائم بیماری روی برگ *S. alba*.

Fig. 9. *Epicoccum nigrum*: A-B. Symptoms on branches of *Salix alba*. C. Symptoms on *S. alba* leaf.

دمای ۲۳ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی اندکی برآمده، گرد، دارای حاشیه صاف و منظم، به رنگ گلبهی با مرکز مایل به سبز زیتونی و دارای ریشه‌های هوایی فراوان و پشمی شکل بود. قطر پرگنه‌های هفت روزه ۴۵ میلی‌متر بود. این گونه قادر به ایجاد تغییر در رنگ محیط کشت MEA و تولید کریستال نبود و آزمون NaOH مثبت بود. پرگنه روی محیط کشت OA پس از هفت روز در دمای ۲۳ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی مسطح، گرد، دارای حاشیه صاف و منظم، به رنگ گلبهی مایل به زیتونی و دارای میسلیم هوایی اندک بود. قطر پرگنه هفت روزه ۷۵ میلی‌متر بود. در رنگ محیط کشت OA تغییر رنگی ایجاد نشد. ریشه‌ها در سطح و داخل آگار رشد کرده، شفاف تا نیمه‌شفاف، منشعب، صاف، دارای دیواره عرضی و به قطر ۵-۱/۵ میکرومتر بودند. کلامیدوسپور رویت نشد. پیکنیدیوم‌ها بشکله‌ای شکل تا گلابی شکل، پاپیل دار، دارای سطح صاف، به رنگ قهوه‌ای، پراکنده در سطح پرگنه، منفرد یا مجتمع، اندکی یا به طور کامل فرورفته در محیط غذایی، به قطر حداکثر ۱۷۰ میکرومتر و دارای ۱-۲ استیول بودند. دیواره پیکنیدیوم‌ها متشکل از ۳-۴ لایه *textura angularis* بود، که ۲-۳ لایه بیرونی به رنگ قهوه‌ای و لایه های داخلی شفاف بودند. سلول‌های کنیدیوم‌ها شفاف، دارای سطح صاف، گلابی شکلی و به ابعاد $4 \times 3/5 - 3$ میکرومتر بودند. کنیدیوم‌ها شفاف، تک سلولی، نیمه

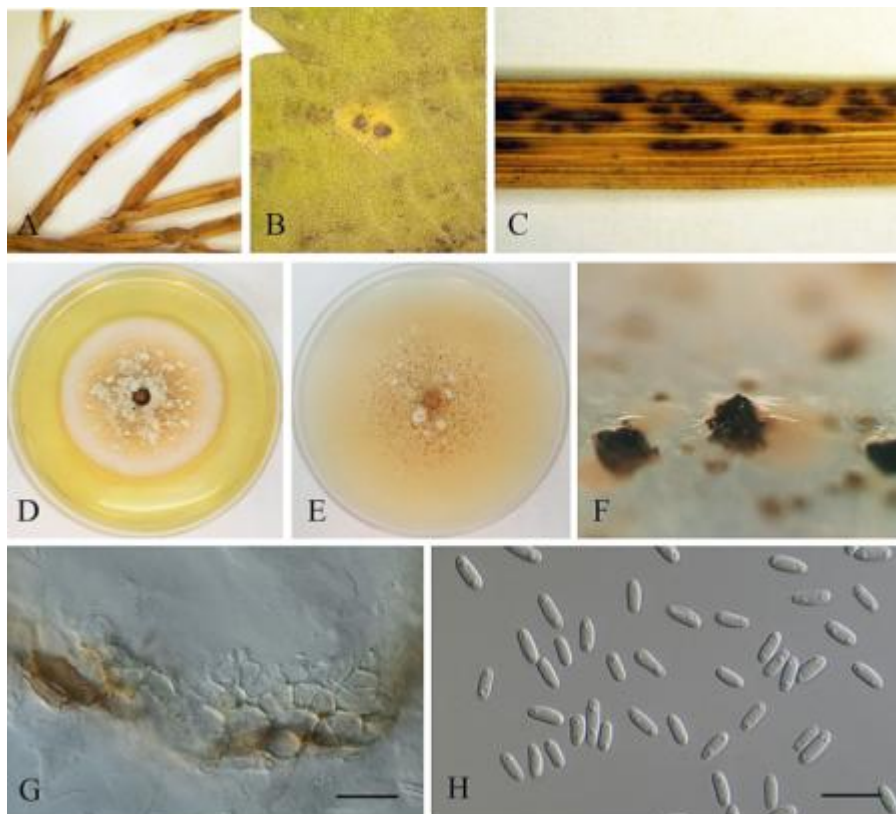
Buddleja L. sp. جداسازی شد. این نخستین گزارش از گونه *D. tanacetii* در ایران است. *Buddleja sp.* به عنوان میزبان جدید برای این قارچ معرفی می‌گردد.

Epicoccum nigrum Link., Neue Schriften, Gesellschaft Naturforschender Freunde zu Berlin 7: 32 (1815)

شرح کاملی از صفات ریخت‌شناختی این گونه توسط گل محمدی (Golmohammadi 2014) ارائه شده است. در پژوهش حاضر، این گونه به همراه قارچ عامل زنگ *Cynodon dactylon* Pers. و به عنوان هیپرپارازیت جداسازی شد. همچنین از برگ‌ها و شاخه‌های دارای علائم *Salix alba L.* به دست آمد. روی شاخه‌ها علائم به صورت شانکر و پوسیدگی آوندی بود. لکه‌های برگ‌ها به شکل گرد تا نیمه گرد، قهوه‌ای مایل به خاکستری، گاهی دارای هاله زرد رنگ، پراکنده در سطح برگ و به قطر حداکثر چهار میلی‌متر بودند (شکل ۹). این قارچ تاکنون از خاک، گیاهان مختلف و انسان گزارش شده است. با این حال، قابلیت بیماری‌زایی آن در اغلب موارد مشخص نیست (Boerema et al. 2004). این گونه از چند میزبان گیاهی در ایران گزارش شده است (Ershad 2009, Golmohammadi 2014).

Heterophoma novae-verbascicola (Aveskamp et al.) Q. Chen & L. Cai, Studies in Mycology 82: 165 (2015)

پرگنه روی محیط کشت MEA پس از هفت روز در



شکل ۱۰- گونه *Heterophoma novae-verbascicola* (جدایه LS37): A. علائم بیماری روی برگ‌های *Equisetum arvense*. B. علائم بیماری روی برگ *Urtica dioica*. C. علائم بیماری روی برگ *Sorghum halepense*. D. پرگنه فارچ روی محیط کشت MEA پس از هفت روز در شرایط تاریکی و دمای ۲۳ درجه سلسیوس. E. پرگنه فارچ روی محیط کشت OA پس از هفت روز در شرایط تاریکی و دمای ۲۳ درجه سلسیوس. F. پیکنیدیوم‌ها روی محیط کشت OA. G. سلول‌های کنیدیوم‌زا و H. کنیدیوم‌ها (مقیاس‌ها = ۱۰ میکرومتر).

Fig. 10. *Heterophoma novae-verbascicola* (isolate LS37): A. Symptoms on *Equisetum arvense* leaves. B. Symptoms on *Urtica dioica* leaf, C. Symptoms on *Sorghum halepense* leaf, D. seven days old colony on MEA at 23 °C in dark, E. seven days old colony on OA at 23 °C in dark, F. Pycnidium on OA, G. Conidiogenous cells and H. Conidia (bars = 10 μm).

حداکثر هشت میلی‌متر بودند. لکه برگی‌های *S. halepense* بیضی شکل و کشیده، قهوه‌ای تیره مایل به خاکستری و پراکنده در سطح برگ بودند که در نهایت به هم پیوسته و بخش بزرگی از سطح برگ را فرا می‌گرفت. لکه‌های موجود روی برگ‌های *U. dioica* زاویه‌دار، قهوه‌ای، دارای هاله‌ای زرد و به قطر حداکثر پنج میلی‌متر بودند. این گونه به طور عمده از روی *Verbascum L. sp.* در مناطق مختلف دنیا جداسازی و گزارش شده است (Boerema et

استوانه‌ای، بیضی شکل، یا گاهی تخم مرغی شکل، دو انتها گرد، راست یا اندکی خمیده، به ندرت سیگموئید، دارای سطح صاف، دارای (۳-) ۲ گلوله چربی و به ابعاد (۷-) ۵/۵- (۴-) ۲/۵ × ۲ میکرومتر بودند (شکل ۱۰). این گونه از بقایای گیاهی موجود در سطح خاک و همچنین لکه‌برگی *S. halepense* و *Equisetum arvense L.* و *Urtica dioica L.* جداسازی شد. لکه‌های موجود روی *E. arvense* قهوه‌ای تیره، زاویه دار، پراکنده و به طول

رویت نشدند. کنیدیوم‌ها شفاف، تک سلولی، بیضی شکل تا تخم مرغی شکل، دو انتها گرد یا قاعده مسطح، راست یا اندکی خمیده، دارای سطح صاف، دارای دو گلوله چربی و به ابعاد $5-4 \times 2/5-2$ میکرومتر بودند (شکل ۱۱).

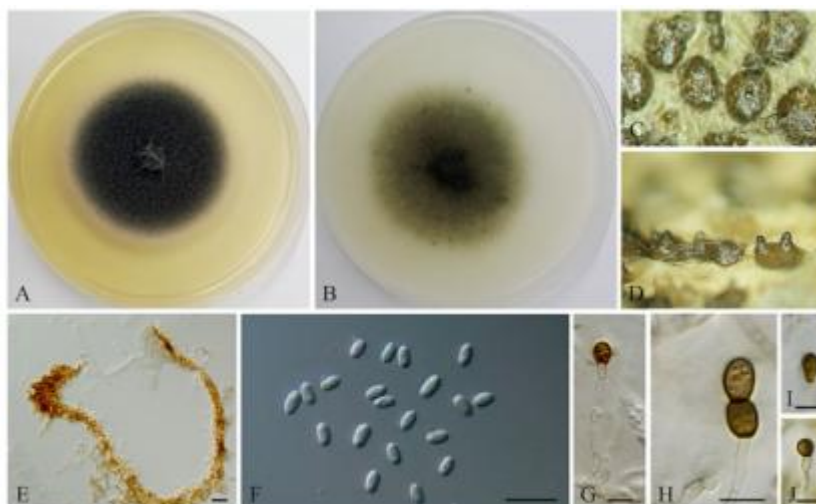
این گونه از خاک جداسازی شد. گونه حاضر یک قارچ خاک‌زی همه‌جازی است که ممکن است باعث بروز مرگ گیاهچه در گونه‌های متعلق به حدود ۳۰ جنس گیاهی شود (Boerema et al. 2004).

بسیاری از اعضای Didymellaceae قارچ‌های مرتبط با گیاهان را شامل می‌شوند. تا کنون تنها تعداد اندکی از گونه‌ها (همانند *P. herbarum*, *D. glomerata*, *Didymella eucalyptica* Chen & Cai، *Didymella pomorum* Chen، *gardeniae* Chen & Cai & Cai و *Leptosphaerulina australis* McAlpine) از سایر بسترهای غذایی همانند مواد شیمیایی، خاک، هوا و آب گزارش شده‌اند (Aveskamp et al. 2008, 2010). در مطالعه حاضر ۴۹ جدایه متعلق به نه گونه *B. E. nigrum*، *A. D. tanacetii*، *D. glomerata*، *B. strasseri*، *exigua*، *H. novae* و *P. eupyrena*، *A. herbicola*، *medicaginicola*، *novae-verbascicola* با تلفیقی از داده‌های توالی نوکلئوتیدی سه ناحیه (ITS، LSU و TUB) و صفات ریخت‌شناختی از ۳۰ میزبان گیاهی مختلف، خاک و همچنین به عنوان میکوپارازیت شناسایی شدند. چهار گونه *H. novae* و *P. eupyrena*، *D. tanacetii*، *B. strasseri*، *verbascicola* گزارش‌های جدید برای میکوبیوتای ایران هستند. به نظر می‌رسد اعضای برخی از جنس‌ها همانند *Ascochyta* (نسبت به Fabaceae)، *Neoascochyta* (نسبت به Poaceae)، *Neomicrosphaeropsis*، *Thambug* (نسبت به Tamaricaceae)، *Heterophoma* (نسبت به Scrophulariaceae) و *Phomatodes* (نسبت

al. 2004). این نخستین گزارش از این گونه برای میکوبیوتای ایران است. هر سه گونه گیاهی فوق به عنوان میزبان‌های جدید برای این قارچ گزارش می‌شوند.

Phoma eupyrena Saccardo, *Michelia* 1 (5): 525 (1879)

پرگنه روی محیط کشت MEA پس از هفت روز در دمای ۲۳ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی مسطح، گرد، دارای حاشیه صاف و منظم، به رنگ خاکستری مایل به سیاه و دارای ریشه‌های هوایی فراوان بود. قطر پرگنه‌های هفت روزه ۴۸ میلی‌متر بود. این گونه قادر به ایجاد تغییر در رنگ محیط کشت MEA و تولید کریستال نبود و آزمون NaOH منفی بود. پرگنه روی محیط کشت OA پس از هفت روز در دمای ۲۳ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی مسطح، گرد، دارای حاشیه صاف و منظم، به رنگ زیتونی مایل به خاکستری و دارای میسلیم هوایی اندک بود. قطر پرگنه هفت روزه ۵۲ میلی‌متر بود. در رنگ محیط کشت OA تغییر رنگی ایجاد نشد. ریشه‌ها در سطح و داخل آگار رشد کرده، نیمه‌شفاف تا قهوه‌ای تیره، منشعب، صاف، دارای دیواره عرضی و به قطر ۷-۲ میکرومتر بودند. کلأمیدوسپورها به اشکال متنوع، نیمه کروی، بشکه‌ای شکل، نیمه استوانه‌ای یا تخم مرغی، تک سلولی، منفرد یا زنجیری، انتهایی یا میانی، دارای چندین گلوله چربی، به ابعاد $(13-1) \times (8-10) \times (6-9) \times (7-6) \times (4-)$ میکرومتر بودند. پیکنیدیوم‌ها نیمه کروی تا مخروطی شکل، دارای سطح صاف، به رنگ قهوه‌ای مایل به زیتونی، پراکنده در سطح پرگنه، منفرد یا گاهی به هم پیوسته، اندکی فرورفته در محیط غذایی، به قطر حداکثر ۳۵۷ میکرومتر، دارای ۲-۱ یا به ندرت سه استیول روی گردنی به طول حداکثر ۸۴ میکرومتر بودند. دیواره پیکنیدیوم‌ها متشکل از ۳-۴ لایه *textura angularis* بود، که ۲-۱ لایه بیرونی به رنگ قهوه-ای و لایه های داخلی شفاف بودند. سلول‌های کنیدیوم‌زا



شکل ۱۱- گونه *Phoma eupyrena* (جدایه K-26-1): A. پرگنه قارچ روی محیط کشت MEA پس از هفت روز در شرایط تاریکی و دمای ۲۳ درجه سلسیوس، B. پرگنه قارچ روی محیط کشت OA پس از هفت روز در شرایط تاریکی و دمای ۲۳ درجه سلسیوس، C-D. پیکنیدیا روی OA، E. برش عرضی پیکنیدیوم (مقیاس = ۲۰ میکرومتر)، F. کنیدیومها (مقیاس = ۱۰ میکرومتر) و G-J. کلایدوسپورها (مقیاسها = ۱۰ میکرومتر).

Fig. 11. *Phoma eupyrena* (isolate K-26-1): A. seven days old colony on MEA at 23 °C in dark, B. seven days old colony on OA at 23 °C in dark, C-D. Pycnidia on OA, E. Cross section of pycnidium (bar = 20 μm), F. Conidia (bar = 10 μm) and G-J. Clamydospores (bars = 10 μm).

به این خانواده است.

مطالعه حاضر نخستین تحقیق در زمینه تنوع گونه‌ای اعضای خانواده *Didymellaceae* در استان‌های آذربایجان شرقی و غربی می‌باشد. این بررسی آشکار ساخت که تعداد زیادی از گونه‌های ناشناخته متعلق به این خانواده در طبیعت ایران، به خصوص در اکوسیستم‌هایی که تاکنون نادیده گرفته شده‌اند، وجود دارند.

سپاسگزاری

نگارندگان از همکاری جناب آقای دکتر خلیل بردی فتوحی فر برای استفاده از میکروتوم انجمادی و معاونت پژوهشی دانشگاه تبریز و *Studienstiftung für mykologische Systematik und Ökologie* به خاطر فراهم کردن اعتبارات پژوهشی این تحقیق سپاسگزاری می‌نمایند.

به *Brassicaceae*) دارای تخصص میزبانی بالایی هستند. اعضای سایر جنس‌ها دارای طیف وسیع‌تری از میزبان‌های گیاهی هستند (Chen *et al.* 2017).

در سال ۲۰۱۷ چن و همکاران (Chen *et al.* 2017) بر اساس داده‌های توالی چهار ناحیه ژنومی شامل ITS، LSU، TUB و rpb2 ۱۹ جنس را در این خانواده شناسایی کردند و اظهار داشتند که معرفی چند جنس دیگر ضروری به نظر می‌رسد. نتایج مطالعه حاضر و مطالعات پیشین (Aveskamp *et al.* 2010, Chen *et al.* 2015, 2017) به وضوح نشان داد که تنها اتکا به صفات ریخت‌شناختی جهت گروه‌بندی و شناسایی اعضای این خانواده کافی نیست. چرا که این گروه قارچی دارای ریخت‌شناسی ساده بوده و این صفات بین گروه‌های مختلف دارای هم‌پوشانی است. به نظر می‌رسد تلفیق تبارزایی مولکولی و ریخت‌شناسی روشی مطلوب در شناسایی گونه‌های متعلق

منابع

- Amirdehi E., Fotouhifar K.B. and Javan-Nikkhah M. 2017. Morphological and molecular study on some species of *Phoma* and related taxa in Iran. *Rostaniha* 18 (1): 59-76.
- Aveskamp M.M., De Gruyter J. and 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., De Gruyter J., Woudenberg J.H.C., Verkley G.J.M. and Crous P.W. 2010. Highlights of the Didymellaceae: A polyphasic approach to characterise *Phoma* and related pleosporalean genera. *Studies in Mycology* 65: 1-60.
- Aveskamp M. M., Verkley G. J. M., De Gruyter J., Murace M. A., Perello A., Woudenberg J. H. C., Groenewald J. Z. and Crous P. W. 2009. DNA phylogeny reveals polyphyly of *Phoma* section *Peyronellaea* and multiple taxonomic novelties. *Mycologia* 101: 363-382.
- 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.
- Chen Q., Jiang J. R., Zhang G. Z., Cai L. and Crous P. W. 2015. Resolving the *Phoma* enigma. *Studies in Mycology* 82: 137-217.
- Chen Q., Hou L. W., Duan W. J., Crous P. W. and Cai L. 2017. Didymellaceae revisited. *Studies in Mycology* 87: 105-159.
- Crous P. W., Verkley G. J. M., Groenewald J. Z. and Samson R. A. 2009. Fungal biodiversity - CBS Laboratory Manual Series 1. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Center, Utrecht, 269 pp.
- De Gruyter J., Aveskamp M. M., Woudenberg J. H. C., Verkley G. J. M., Groenewald J. Z. and Crous P. W. 2009. Molecular phylogeny of *Phoma* and allied anamorph genera: Towards a reclassification of the *Phoma* complex. *Mycological Research* 113: 508-519.
- Edgar R. C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32: 1792-1797.
- Ershad D. 2009. Fungi of Iran. 3rd ed. Agricultural Research, Education & Extension Organization Publication No. 10, Tehran, 531 pp.
- Glass N. L. and Donaldson, G. C. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 1323-1330.
- Golmohammadi R. 2014. Identification of fungal species associated with leaf spot disease on poplar trees (*Populus* spp.) in East Azerbaijan Province. MSc thesis, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
- Hall T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Hepperle D. 2017. DNA Dragon - DNA Assembly Software, Version 1.7, SequentiX - Digital DNA Processing, Klein Raden, Germany. Available from: <http://www.sequentix.de/> (accessed: 19 March 2017).
- Koenning S. R., Abdel Amin F. F. and Grand L. F. 2000. Stem canker on cotton caused by *Phoma exigua* in North Carolina and Virginia. *Plant Disease* 84 (11): 1251-1251.
- Koike S. T., Subbarao K. V., Verkley G. J. M., Fogle D. and 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.
- Kumar S., Stecher G. and Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33 (7): 1870-1874.
- Maddison W. P. and Maddison D. R. 2001. Mesquite. A modular system for evolutionary analysis. Available from: <http://mesquite.biosci.arizona.edu/mesquite/mesquite.html>.
- Moller E. M., Bahnweg G., Sandemann H. and Geiger H. H. 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies and infected plant tissues. *Nucleic Acid Research* 20: 6115-6116.
- Nylander J. A. A. 2004. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Center, Uppsala University, Uppsala.
- O'Donnell K. and Cigelnik E. 1997. Two divergent intra genomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are non orthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 7: 103-116.

- Pearce T. L., Scott J. B., Crous P. W., Pethybridge S. J. and Hay F. S. 2015. Tan spot of pyrethrum is caused by a *Didymella* species complex. *Plant Pathology* 65: 1170-1184.
- Rambaut A. 2009. FigTree v1.3.1. Available from: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software> (verified Dec 21, 2009).
- Razaghi P. and Zafari D. 2012. Mycobiota of volunteer plants in Hamedan province (W Iran). *Rostaniha* 13 (1): 57-68.
- Rehner S. A. and Samuels G. J. 1994. Taxonomy and phylogeny of *Gliocladium* analysed from nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycological Research* 98: 625-634.
- Ronquist F. and Huelsenbeck J. P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- Sullivan R. F. and White J. F. 2000. *Phoma glomerata* as a Mycoparasite of Powdery Mildew. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (1): 425-427.
- Szentivanyi O., Kiss L., Russell J. C., Kovacs G. M., Varga K., Jankovics T., Lesemann S., Xu X. M. and Jeffries P. 2005. *Ampelomyces* mycoparasites from apple powdery mildew identified as a distinct group based on single-stranded conformation polymorphism analysis of the rDNA ITS region. *Mycological research* 109: 429-438.
- Vilgalys R. and Hester M. 1990. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology* 172: 4238-4246.
- Warcup J. H. 1950. The soil-plate method for isolation of fungi from soil. *Nature* 166: 117-118.
- White T. J., Bruns T., Lee S. B. and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Gelfand M. Sninsky D. and White T. (eds). *PCR Protocol: A Guide to Methods and Application*, San Diego, California, pp. 315-322.