Archive of SID

وقوع بیماری لکه برگی سرکوسپورایی خربزه در استان گیلان و شناسایی عوامل مرتبط براساس روش‌های مولکولی و ریخت‌شناختی

مونس بخشی[1*]، رسول زارع[1]، مهدی ارزنلو[2] و ابوالفضل نرمانی[2]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۶/۲۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۷/۱۵)

چکیده

طالبی و خربزه (با نام علمی *Cucumis melo*) از تیره کدوئیان (*Cucurbitaceae*) یکی از مهمترین گیاهان جالیزی می‌باشند که در اکثر مناطق ایران کشت می‌شود. طی بازدید از مزارع کشت کدوئیان در استان گیلان، شیوع گسترده‌ای از علایم لکه برگی روی گیاه خربزه مشاهده شد. به منظور شناسایی عوامل دخیل در این بیماری، از برگ‌های دارای علایم لکه برگی، نمونه‌برداری به عمل آمد. طی بررسی میکروسکوپی نمونه‌ها، مشخص شد، عامل بیماری متعلق به جنس *Cercospora* است و کشت‌های تک اسپور به صورت مستقیم از لکه‌های برگی تهیه شدند. در مجموع تعداد ٤٥ جدایه قارچی از گیاهان مختلف به دست آمد که از بین آنها ١٦ جدایه با استفاده از ترکیب خصوصیات ریخت‌شناختی و توالی پنج ناحیه ژنی ITS، *tef1*، *actA*، *cmdA* و *his3* شناسایی شدند. نتایج تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی توالی‌ها نشان داد، از ١٦ جدایه قارچی، ٤ جدایه به گونه *Cercospora* sp. G و ١٢ جدایه به گونه *Cercospora* cf. *flagellaris* تعلق داشتند. بر اساس منابع موجود، تحقیق حاضر اولین گزارش از وقوع گونه‌های *Cercospora* cf. *flagellaris* و *Cercospora* sp. G روی خربزه (*Cucumis melo*) در دنیا و اولین گزارش از وقوع بیماری لکه برگی سرکوسپورایی روی خربزه در ایران است.

کلیدواژه: آرایه بندی، فیلوژنی چندژنی، قارچ‌های سرکوسپوروئید، تیره کدوئیان، لکه برگی

---

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mounesbakhshi@gmail.com

۱. به ترتیب استادیار و استاد پژوهش بخش تحقیقات رستنی‌ها، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

۲. به ترتیب استاد و محقق پسادکتری گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

www.SID.ir

Archive of SID

Occurrence of Cercospora leaf spot disease on *Cucumis melo* in Guilan province and characterization of the casual agent(s) using molecular and morphological approaches

M. Bakhshi[1*], R. Zare[1], M. Arzanlou[2], and A. Narmani[2]

(Received: 18.9.2019; Accepted: 7.10.2019)

Abstract

Melon (*Cucumis melo*) which belongs to the family *Cucurbitaceae*, is one of most important plants, cultivated in different regions of Iran. In a field survey in Guilan province, the widespread distribution of leaf spot symptoms on melon was observed. In order to identify the fungal agents associated with this disease, symptomatic leaves were collected from the field and taken to the laboratory. Single spore cultures derived directly from leaf spots. In total, 45 isolates were obtained of which 16 were identified based on sequences of five genomic loci (ITS, ACT, *tef1*, *cmdA* and *his3*), host plants, and morphological data. The results of five-gene phylogenetic analysis have revealed that, of the 16 isolates, four isolates were identified as *Cercospora* sp. G and the remaining 12 isolates nested within *Cercospora* cf. *flagellaris*. To our knowledge, this is the first report of the *Cercospora* sp. G and *Cercospora* cf. *flagellaris* on *Cucumis melo* in the world. Moreover, it is the first report of *Cercospora* leaf spot (CLS) on *Cucumis melo* in Iran.

Keywords: Cercosporoid fungi, Cucurbitaceae, leaf spot, multi-gene phylogeny, taxonomy

*Corresponding author's E-mail: mounesbakhshi@gmail.com
1. Department of Botany, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.
2. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

تیره کدوئیان (*Cucurbitaceae*) شامل چندین گونه از گیاهان جالیزی بسیار مهم از قبیل کدو (*Cucurbita maxima* Duchesne)، خیار (*Cucumis sativus* L.)، هندوانه (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai) و خربزه و طالبی (*Cucumis melo* L.) می‌باشد (Ritschel *et al.* 2004). در این تیره، طالبی و خربزه از محصولاتی هستند که به علت طعم دلپذیر و ارزش غذایی، میوه آنها در دنیا جزء مطلوب‌ترین خوراکی‌ها می‌باشند (Ritschel *et al.* 2004). این گیاهان یکی از منابع غنی از پتاسیم و بتاکاروتن، ویتامین‌های A و E بوده و دارای درصد بالای فیبر، خواص آنتی اکسیدانی، کالری کم، و آب فراوان می‌باشند (Ismail *et al.* 2010). گیاهان تیره کدوئیان از محصولات جالیزی مهم در استان گیلان بوده و از خوراکی‌های محلی به شمار می‌روند و مصرف بالایی دارند.

جنس سرکوسپورا اولین بار در سال ۱۸۶۳ توسط فریزنوس (Fresenius 1863) توصیف شد و این جنس یکی از بزرگترین جنس‌های هیفومیست متعلق به تیره *Mycosphaerellaceae* می‌باشد (Groenewald *et al.* 2013, Bakhshi *et al.* 2015, 2018). گونه‌های این جنس با پراکنش جغرافیایی گسترده، اغلب باعث ایجاد لکه برگی در دامنه گسترده‌ای از گیاهان زراعی، باغی، جنگلی، صیفی، جالیزی، زینتی و... می‌شوند (Crous & Braun 2003). خسارت عمده این قارچ‌ها از طریق از بین بردن برگ‌ها یا کاهش سطح فروغ آمایی گیاه (فتوسنتز) به دلیل ایجاد نکروز می‌باشد که در نهایت منجر به کاهش راندمان محصول می‌شوند (Groenewald *et al.* 2013, Bakhshi *et al.* 2015). علاوه بر این، این قارچ‌ها از طریق ایجاد تغییر در فیزیولوژی گیاه میزبان منجر به رسیدن زودتر از موعد میوه و کاهش اندازه آن و ریزش زود هنگام برگ می‌شوند (Crous *et al.* 2004, Arzanlou *et al.* 2007). بیماری‌های لکه برگی سرکوسپورایی کرفس با عامل *Cercospora apii* Fresen. (Groenewald *et al.* 2006)، چغندرقند با عامل *C. beticola* Sacc. (Weiland *et al.* 2001)، باقلا با عامل *C. zonata* Winter (Kimber & Paull 2011)، ذرت با عوامل *C. zeae-maydis* Tehon & Daniels و *C. zeina* Crous & Braun (Crous *et al.* 2006)، و هویج با عامل *C. carotae* (Pass.) Kazn. & Siemaszko (Kushalappa *et al.* 1989) برخی از مهم‌ترین بیماری‌های این گروه محسوب می‌شوند که سالانه خسارت قابل توجهی به این محصولات در سرتاسر دنیا وارد می‌کنند. علاوه بر این، برخی از گونه‌های این جنس از زخم‌های نکروزه در گل‌ها، میوه‌ها و بذور یا پوسیدگی بعد از برداشت میوه‌ها (Silva & Pereira 2008) نیز در سرتاسر دنیا گزارش شده‌اند و برخی از گونه‌ها به عنوان عوامل کنترل زیستی علف‌های هرز شناخته شده‌اند (Tessmann *et al.* 2001, Praveena & Naseema 2004).

از زمان توصیف جنس سرکوسپورا، آرایه‌بندی گونه‌های آن دستخوش تغییرات بسیاری شده است. در طی سالیان بسیاری، ویژگی‌های گوناگونی از قبیل ریخت‌شناسی، تولید زهرابه‌های قارچی و تخصص‌یافتگی میزبانی برای تمایز گونه‌های این جنس به‌کار رفته‌اند، اما این مشخصات مفید واقع نشدند (Bakhshi 2018). در سال‌های اخیر با پیشرفت‌های چشمگیری که در ابداع روش‌های مولکولی برای تکثیر و توالی‌یابی نواحی ژنومی صورت گرفته و با توجه به محدودیت‌های موجود در آرایه‌بندی ریخت-شناختی و کاربرد مفاهیم بیولوژیک گونه، روش‌های مولکولی به دلیل اینکه در مقایسه با روش‌های سنتی از

www.SID.ir

Archive of SID

سرعت عمل و دقت بالاتری برخوردار می‌باشند، جایگاه خاصی در آرایه‌بندی قارچ‌ها پیدا کرده‌اند. بنابراین طی دهه اخیر، مفهوم تلفیقی گونه (Consolidated Species Concept) که ترکیبی از اطلاعات توالی DNA، بیولوژی، اکولوژی، رابطه میزبانی و ویژگی‌های ریخت‌شناختی را برای تعیین حدود گونه‌ها به‌کار می‌گیرد (Quaedvlieg *et al.* 2014)، برای شناسایی گونه‌های جنس سرکوسپورا مفید شناخته شده است (Groenewald *et al.* 2013, Bakhshi *et al.* 2015, 2018, Bakhshi 2019).

در پژوهش حاضر طی بازدید از مزارع کدوئیان در استان گیلان، شیوع گسترده‌ای از بیماری لکه برگی سرکوسپورایی روی گیاه خربزه مشاهده شد. بنابراین هدف تحقیق حاضر شناسایی عوامل مرتبط با بیماری لکه برگی سرکوسپورایی خربزه در استان گیلان، با استفاده از ترکیب خصوصیات ریخت‌شناختی و مولکولی (مفهوم تلفیقی گونه) با استفاده از ترکیب توالی پنج ناحیه ژنی ITS، *tef1*، *cmdA*، *his3* و *actA* می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه، جداسازی و خالص‌سازی قارچ‌ها

نمونه برداری از برگ‌های دارای علایم لکه برگی در گیاهان خربزه در تابستان ۱۳۹۱ در استان گیلان، انجام شد. نمونه‌ها به صورت جداگانه درون پاکت‌های کاغذی به آزمایشگاه منتقل شدند. لکه‌های برگی زیر بینوکولر مورد بررسی قرار گرفته و پس از مشاهده دستجات کنیدیوم و کنیدیوم‌بر قارچ سرکوسپورا، کشت‌های تک اسپور مطابق روش بخشی و همکاران (Bakhshi *et al.* 2011) تهیه شد. به این صورت که تشتک پتری حاوی محیط کشت عصاره مخمر آگار (اسیدی شده) (MEA; Fluka, Hamburg, Germany) به‌صورت مورب قرار داده شد و حدود ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون در یک گوشه محیط کشت اضافه شد. سپس با استفاده از سوزن ظریف و سترون توده کنیدیوم و کنیدیوم‌بر با دقت از سطح لکه برگ خراش داده شد و در داخل آب اضافه شده به تشتک پتری قرار گرفت و کاملاً به‌هم زده شد تا کنیدیوم‌ها آزاد شده و پخش شوند. سپس تشتک پتری به حالت مورب به مدت یک شب نگهداری شد. پس از سپری شدن ۲٤ ساعت، آب اضافی تشتک‌های پتری خالی شده و در زیر بینوکولر بررسی شد و کنیدیوم‌های جوانه زده به تشتک‌های حاوی محیط کشت MEA انتقال یافته و در دمای ۲۵° C در تاریکی نگهداری شدند.

استخراج DNA، تکثیر و توالی یابی

برای شناسایی مولکولی، جدایه‌های خالص شده، پس از کشت روی محیط کشت MEA، به مدت ۱۰-۸ روز در اتاقک رشد با دمای ۲۵ °C در تاریکی نگهداری شدند و DNA جدایه‌ها طبق روش مولر و همکاران (Möller *et al.* 1992) استخراج شد. برای هر جدایه بخش‌هایی از پنج ناحیه ژنومی ITS، *tef1*، *cmdA*، *his3* و *actA* تکثیر شد. آغازگرهای V9G (de Hoog & Gerrits van den Ende, 1998) و ITS4 (White *et al.* 1990) برای تکثیر بخشی از ناحیه ITS بکار رفت. بخشی از ژن آکتین (*actA*) با استفاده از آغازگرهای ACT-512F و ACT-783R (Carbone & Kohn 1999)، بخشی از ژن هیستون (*his3*) با استفاده از آغازگرهای CylH3F و CylH3R (Crous *et al.* 2004)، بخشی از ژن کالمودولین (*cmdA*) با استفاده از آغازگرهای CAL-228F (Carbone & Kohn 1999) و CAL-2Rd (Groenewald *et al.* 2013)، و بخشی از ژن عامل تداوم ترجمه (*tef1*) با استفاده از آغازگرهای EF1-728F و EF1-986R (Carbone & Kohn 1999) تکثیر

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱. لیست آغازگرهای مورد استفاده جهت شناسایی مولکولی جدایه‌های قارچی.

Table 1. Primer combinations used during this study for molecular identification of fungal isolates.

Primer name	Primer sequence (5' to 3')	Annealing temperature	Orientation	Locus
V9G	TTACGTCCCTGCCCTTTGTA	52°C	Forward	ITS
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	52°C	Reverse	ITS
EF1-728F	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG	52°C	Forward	*tef1*
EF1-986R	TACTTGAAGGAACCCTTACC	52°C	Reverse	*tef1*
ACT-512F	ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC	55°C	Forward	*actA*
ACT-783R	TACGAG TCC TTCTGGCCCAT	55°C	Reverse	*actA*
CAL-228F	GAGTTCAAGGAGGCCTTCTCCC	58°C	Forward	*cmdA*
CAL-2Rd	TGRTCNGCCTCDCGGATCATCTC	58°C	Reverse	*cmdA*
CYLH3F	AGGTCCACTGGTGGCAAG	52°C	Forward	*his3*
CYLH3R	AGCTGGATGTCCTTGGACTG	52°C	Reverse	*his3*

شد (جدول ۱). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) براساس بخشی و همکاران (Bakhshi *et al.* 2015) انجام شد. واکنش توالی‌یابی به‌صورت جداگانه در دو جهت مستقیم و معکوس با استفاده از آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن‌ها از طریق ارسال به شرکت توالی‌یابی Microsynth سوییس انجام گرفت.

تجزیه و تحلیل داده‌های توالی

توالی‌های خام حاصل از هر دو آغازگر مستقیم و معکوس با استفاده از نرم‌افزار MEGA v. 6 (Tamura *et al.* 2013) بررسی و ویرایش شدند و توالی‌های برآیند به‌صورت دستی از دو آغازگر مستقیم و معکوس هر ناحیه ایجاد شد. توالی‌های نوکلئوتیدی حاصل برای هر ژن با توالی‌های موجود در بانک ژن با استفاده از ابزار جستجوی BLAST مقایسه شده و توالی جدایه‌های با مشابهت بالا به توالی‌های بدست‌آمده در این تحقیق، برای رجبندی و برآورد فیلوژنتیک دریافت و ذخیره شدند. به منظور آماده‌سازی رجبندی چندژنی توالی‌ها، توالی‌های مربوط به ژن‌های انفرادی با استفاده از نرم‌افزار Mesquite v. 2.75 (Maddison & Maddison 2011) الحاق شدند، و رجبندی چندگانه توالی‌های الحاق شده با استفاده از نرم‌افزار آنلاین MAFFT v. 7 (Katoh & Standley 2013) صورت گرفت. بهترین مدل جایگزینی نوکلئوتیدی در هر ژن، با استفاده از نرم‌افزار Mr Modeltest v. 2.2 (Nylander 2004) تعیین و تبارنمای چندژنی برمبنای استنتاج بیژیان با استفاده از نرم‌افزار MrBayes v. 3.2.6. (Ronquist *et al.* 2012) ترسیم شد. توالی‌های جدید این پژوهش به بانک ژن NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) ارسال و راس شمارهای بانک ژن برای آنها دریافت گردید (جدول ۲).

بررسی ویژگی‌های ریخت‌شناختی

برای مطالعه صفات ریخت شناختی جدایه‌ها، ویژگی‌های ریخت‌شناختی روی برگ مطالعه شد. برای این منظور، لکه‌های برگی زیر بینوکولر مدل Nikon SMZ 445 بررسی و نحوه و محل قرارگیری دستجات کنیدیوم و کنیدیوم‌بر در سطح رویی و زیرین برگ یادداشت شد. برای بررسی خصوصیات میکروسکوپی جدایه‌های قارچی، ساختارهای قارچی به‌صورت مستقیم از سطح لکه در زیر بینوکولر با استفاده از یک سوزن ظریف برداشته شد و روی لام حاوی اسید لاکتیک قرار داده شد و با استفاده از میکروسکوپ نوری مدل Olympus-BX51 بررسی شد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲. محل نمونه برداری، میزبان و راس شمارهای توالی‌های جدایه‌های مطالعه شده در این تحقیق.

Table 2. Collection details and GenBank accession numbers of strains included in this study.

Isolate	Species	Host	Origion	Collector	ITS	*tef1*	*actA*	*his3*	*cmdA*
IRAN 2686C	*Cercospora* sp. G	*Cucumis melo*	Guilan, Masal	M. Bakhshi	MN422425	MN422375	MN422358	MN422392	MN422409
IRAN 2687C	*Cercospora* sp. G	*Cucumis melo*	Guilan, Masal	M. Bakhshi	MN422426	MN422376	MN422359	MN422393	MN422410
IRAN 2688C	*Cercospora* sp. G	*Cucumis melo*	Guilan, Masal	M. Bakhshi	MN422427	MN422377	MN422360	MN422394	MN422411
IRAN 2689C	*Cercospora* cf. *flagellaris*	*Cucumis melo*	Guilan, Masal	M. Bakhshi	MN422429	MN422379	MN422362	MN422396	MN422413
IRAN 2690C	*Cercospora* cf. *flagellaris*	*Cucumis melo*	Guilan, Masal	M. Bakhshi	MN422440	MN422390	MN422373	MN422407	MN422424
IRAN 2691C	*Cercospora* cf. *flagellaris*	*Cucumis melo*	Guilan, Masal	M. Bakhshi	MN422437	MN422387	MN422370	MN422404	MN422421
IRAN 2692C	*Cercospora* cf. *flagellaris*	*Cucumis melo*	Guilan, Masal	M. Bakhshi	MN422439	MN422389	MN422372	MN422406	MN422423
IRAN 2693C	*Cercospora* cf. *flagellaris*	*Cucumis melo*	Guilan, Masal	M. Bakhshi	MN422430	MN422380	MN422363	MN422397	MN422414
IRAN 2694C	*Cercospora* cf. *flagellaris*	*Cucumis melo*	Guilan, Masal	M. Bakhshi	MN422431	MN422381	MN422364	MN422398	MN422415
IRAN 2695C	*Cercospora* cf. *flagellaris*	*Cucumis melo*	Guilan, Masal	M. Bakhshi	MN422433	MN422383	MN422366	MN422400	MN422417
IRAN 2696C	*Cercospora* cf. *flagellaris*	*Cucumis melo*	Guilan, Masal	M. Bakhshi	MN422434	MN422384	MN422367	MN422401	MN422418
IRAN 2697C	*Cercospora* cf. *flagellaris*	*Cucumis melo*	Guilan, Masal	M. Bakhshi	MN422432	MN422382	MN422365	MN422399	MN422416
IRAN 2698C	*Cercospora* cf. *flagellaris*	*Cucumis melo*	Guilan, Masal	M. Bakhshi	MN422435	MN422385	MN422368	MN422402	MN422419
IRAN 2699C	*Cercospora* cf. *flagellaris*	*Cucumis melo*	Guilan, Masal	M. Bakhshi	MN422436	MN422386	MN422369	MN422403	MN422420
IRAN 2700C	*Cercospora* sp. G	*Cucumis melo*	Guilan, Masal	M. Bakhshi	MN422428	MN422378	MN422361	MN422395	MN422412
IRAN 2701C	*Cercospora* cf. *flagellaris*	*Cucumis melo*	Guilan, Masal	M. Bakhshi	MN422438	MN422388	MN422371	MN422405	MN422422

اندازه، رنگ و شکل ساختارهای قارچی همانند استروما، دستجات کنیدیوم‌بر، سلول‌های کنیدیوم‌زا، محل‌های کنیدیوم‌زایی، کنیدیوم‌ها و هیلوم آنها در بزرگنمایی ۱۰۰۰× ثبت شد. برای هر ساختار ۳۰ نمونه اندازه‌گیری شد و درجه اطمینان ۹۵٪ برای اندازه‌ها و نیز کمینه و بیشینه اندازه‌ها در داخل پرانتز ثبت گردید. تصاویر میکروسکوپی با استفاده از دوربین دیجیتال Olympus مدل DP 25 متصل به میکروسکوپ Olympus-BX51 تهیه شد. تصاویر تهیه شده با استفاده از نرم‌افزار فتوشاپ نسخه CS5 ویرایش و فتوپلیت تهیه شد.

تعیین گروه‌های آللی و هاپلوتیپ‌ها

توالی‌های مربوط به پنج ناحیه ژنی ITS، *tef1*، *actA*، *cmdA* و *his3* در جدایه‌های بدست آمده در این تحقیق با استفاده از نرم افزار MEGA v. 6 مقایسه شدند.گروه‌های آللی در هر ناحیه ژنی بر اساس توالی آن ناحیه، تعیین شدند، به این صورت که هر توالی یا یک یا بیش از یک نوکلئوتید متفاوت از توالی دیگر به عنوان آلل جدا در نظر گرفته شد (Bakhshi *et al.* 2018, Bakhshi 2019).

نتایج

علایم بیماری

در طی بازدید از مزارع تیره کدوئیان در استان گیلان شیوع گسترده‌ای از بیماری لکه برگی سرکوسپورایی روی گیاه خربزه در شهرستان ماسال مشاهده شد. علایم این بیماری در برگ بصورت لکه‌های ۸-۲ میلی متری به رنگ قهوه‌ای تا قهوه‌ای پررنگ با هاله زرد رنگ مشاهده می‌شود. گاهاً لکه‌های انفرادی با هم ترکیب شده و نواحی بیشتری از برگ‌ها قهوه‌ای و نکروز می‌شوند (شکل ۱). در

www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۱. علایم لکه برگی سرکوسپورایی در گیاه خربزه (*Cucumis melo*).

Fig. 1. *Cercospora* leaf spot symptoms on *Cucumis melo.*

طی بررسی این لکه‌ها در زیر بینوکولر، کنیدیوم‌برها و کنیدیوم‌های قارچ سرکوسپورا در سطح رو و زیر لکه‌ها مشاهده شدند.

جداسازی جدایه‌ها

به منظور بررسی دقیق‌تر عامل یا عوامل دخیل در لکه برگی سرکوسپورایی در این گیاه، تعداد ٤٥ جدایه قارچی از لکه‌های مختلف روی گیاهان مختلف خربزه در شهرستان ماسال جداسازی شد. در این مطالعه از بین قارچ‌های بدست آمده، ١٦ جدایه قارچی از برگ‌ها و لکه‌های مختلف برای شناسایی مبتنی بر ریخت‌شناسی و مولکولی انتخاب شد (جدول ٢). این جدایه‌ها در مجموعه کشت‌های زنده قارچی در موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور (تهران، ایران) (IRAN C) ذخیره می‌شوند (جدول٢).

شناسایی مولکولی

برای شناسایی مولکولی گونه‌های جنس سرکوسپورا، با توجه به دسترس بودن توالی‌های پنج ناحیه ژنی ITS، *tef1*، *actA*، *cmdA* و *his3* در بانک ژن، تبارنمای فیلوژنتیکی با استفاده از این پنج ناحیه ژنی ترسیم شد. رجبندی چندگانه شامل ٦٠ آرایه داخلی مربوط به جنس سرکوسپورا (٤٤ آرایه از NCBI و ١٦ آرایه در این تحقیق) بود و *Ramularia endophylla* Verkley & U. Braun (جدایه CPC 113265) به عنوان آرایه خارجی استفاده شد. رجبندی نهایی شامل ١٦٢٢ کاراکتر شامل شکاف‌های رجبندی (Gap) بود و مرز ژن‌ها به‌ترتیب ٤٧٣–١ کاراکتر برای ITS، ٧٩٢–٤٧٧ کاراکتر برای *tef1*، ٩٩٥–٧٩٦ کاراکتر برای *actA*، ١٢٥٦–٩٩٩ کاراکتر برای *cmdA* و ١٦٢٢–١٢٦٠ کاراکتر برای *his3* بود. با توجه به نتایج نرم‌افزار

www.SID.ir

Archive of SID

تست مدل، مدل GTR+G با نرخ توزیع گاما برای نواحی ژنی ITS و *cmdA*، مدل HKY+G با نرخ توزیع گاما برای نواحی ژنی *actA* و *tef1* و مدل HKY+I+G با نرخ توزیع گامای معکوس برای ژن *his3* استفاده شدند. تمامی ژن‌ها فراوانی dirichlet base داشتند.

از بین ۱۶۲۲ کاراکتری که برای استنتاج بیژیان استفاده شد، ٤۰۰ الگوی مکانی منحصر به‌فرد وجود داشت که به‌ترتیب ۳٦، ۱۱٦، ۷۵، ۹۵ و ۷۸ نوکلئوتید مربوط به نواحی ژنی ITS، *tef1*، *actA*، *cmdA* و *his3* بود. تجزیه و تحلیل بیژیان منتهی به ۲٦٤۰۰۰۰ نسل و ۵۲۸۲ تبارنما شد. بعد از حذف ۲۵٪ اولیه تبارنماهای جمع‌آوری شده برای مرحله burn-in، تبارنمای اجمالی و توزیع احتمال پسین خوشه‌ها از ۳۹٦۲ تبارنمای باقی‌مانده محاسبه شد (شکل ۲).

بر اساس نتایج تبارنمای پنج ژنی مشخص شد دو گونه *Cercospora* cf. *flagellaris* و *Cercospora* sp. G با علایم بیماری لکه برگی سرکوسپورایی خربزه در استان گیلان مرتبط هستند.

توصیف ریخت شناختی گونه‌ها

۱- گونه *Cercospora* cf. *flagellaris*

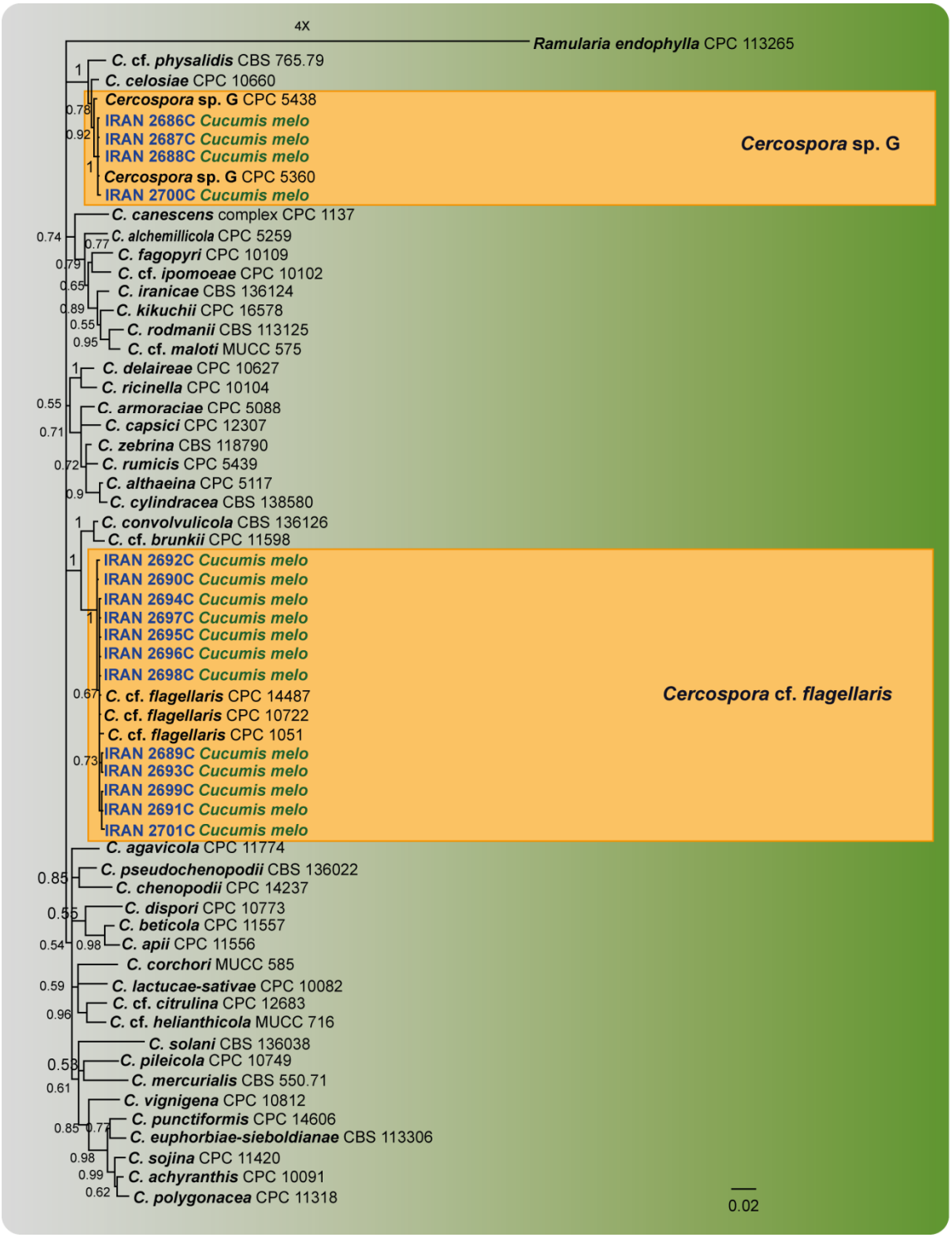
توصیف روی بافت گیاهی: میسلیوم داخلی است. کنیدیوم‌زایی در هر دو سطح برگ صورت می‌گیرد. کنیدیوم‌برها مستقیم تا سینوسی- زانویی، در دستجات با تراکم کم تا زیاد، از استرومای قهوه‌ای با توسعه کم تا زیاد، زیر اپیدرمی و زیر روزنه‌ای، برافراشته شده‌اند. کنیدیوم‌برها قهوه‌ای کمرنگ تا قهوه‌ای، گاهاً به سمت انتها کمرنگ‌تر می‌شوند، مستقیم تا نسبتاً خمیده، ساده و به ندرت منشعب، دارای ۱۵-۲ بند عرضی، با عرض منظم تا نامنظم و در قسمت انتها باریک و دارای فرورفتگی در قسمت کنیدیوم‌زایی، به ابعاد ۵/۵-۳/۵ × (۲۱۰-)۹۵-۷۰(-۳۰) میکرومتر. سلول‌های کنیدیوم‌زا ادغام شده، انتهایی، با گسترش سیمپودیال، با یک یا چند محل کنیدیوم‌زایی؛ محل‌های کنیدیوم‌زایی ضخیم، رنگی، راسی، جانبی یا پیرامونی، ۲/۵-۱/۵ میکرومتر. کنیدیوم‌ها منفرد، بی‌رنگ، نیمه‌استوانه‌ای، نخی شکل تا واژگرزی، مستقیم تا نسبتاً خمیده، دارای ۲۸-۲ بند عرضی، با نوک نیمه‌تیز تا نیمه‌گرد و پایه تخت تا مخروطی تخت، ۵-۲ × (۲۸۰-)۱٤۵-۱۱۰(-٤۰) میکرومتر؛ هیلوم رنگی، ضخیم، منعکس‌کننده و ۲-۱ میکرومتر است (شکل ۳).

۲- گونه *Cercospora* sp. G sensu Groenewald *et al.* 2013

توصیف روی بافت گیاهی: میسلیوم داخلی است. کنیدیوم‌زایی در هر دو سطح برگ صورت می‌گیرد. کنیدیوم‌برها مستقیم تا سینوسی- زانویی، در دستجات با تراکم کم تا زیاد، از استرومای قهوه‌ای با توسعه کم تا زیاد، زیر اپیدرمی و زیر روزنه‌ای، برافراشته شده‌اند. کنیدیوم‌برها قهوه‌ای کمرنگ تا قهوه‌ای، مستقیم تا منعطف، ساده و بدون انشعاب، دارای ۱۱-۳ بند عرضی، با عرض نسبتاً منظم، به ابعاد ۵-۲/۵ × (۲۰۰-)۱۱۵-٦۵(-۳۵) میکرومتر. سلول‌های کنیدیوم‌زا ادغام شده یا انتهایی با گسترش سیمپودیال، با یک یا چند محل کنیدیوم‌زایی؛ محل‌های کنیدیوم‌زایی ضخیم، رنگی، راسی، جانبی و ۲/۵-۱/۵ میکرومتر. کنیدیوم‌ها منفرد، بی‌رنگ، نیمه‌استوانه‌ای، نخی شکل تا واژگرزی، مستقیم تا نسبتاً خمیده، دارای ۲۰-۳ بند عرضی، با نوک نیمه‌تیز تا نیمه‌گرد و پایه تخت تا مخروطی تخت کوتاه، ۵/۵-۳/۵ × (۲۲۰-)۱۳۰-۸۵(-٤۵) میکرومتر؛ هیلوم رنگی، ضخیم، منعکس‌کننده و ۲-۱ میکرومتر است (شکل ٤).

www.SID.ir

Archive of SID

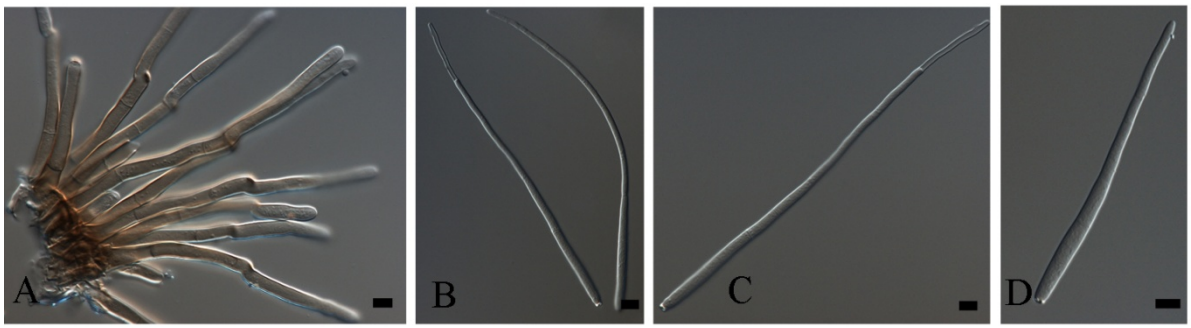


شکل ۲. تبارنمای فیلوژنتیکی حاصل از استنتاج بیزیان با استفاده از ترکیب توالی پنج ناحیه ژنی ITS، *tef1*، *actA*، *cmdA* و *his3* جدایه‌های سرکوسپورای بدست‌آمده از گیاه خربزه در استان گیلان. این تبارنما نسبت به گونه *Ramularia endophylla* (جدایه CPC 113265) ریشه‌یابی شده است.

Fig. 2. Consensus phylogram of *Cercospora* isolates obtained from *Cucumis melo* in Guilan province, resulting from a Bayesian analysis of the combined 5-gene (ITS, ACT, *tef1*, *cmdA* and *his3*) sequence alignment. The tree was rooted to *Ramularia endophylla* (isolate CBS 113265).

www.SID.ir

Archive of SID

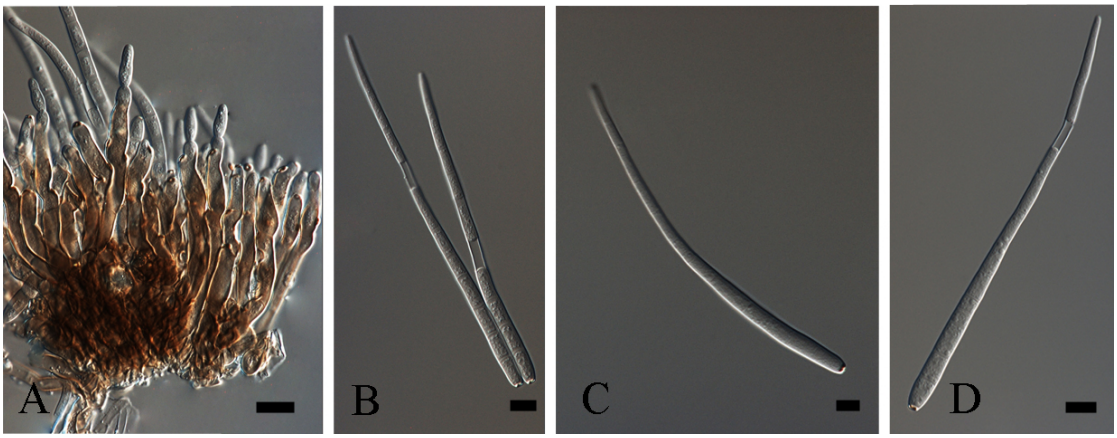


شکل ۳. گونه *Cercospora* cf. *flagellaris* روی گیاه *Cucumis melo*: A. دستجات کنیدیوم‌بر؛ B–D. کنیدیوم‌ها (مقیاس = ۱۰ میکرومتر).

Fig. 3. *Cercospora* cf. *flagellaris* on *Cucumis melo*. A) Fasciculate conidiophores; B–D) conidia. — Scale bars = 10 µm.

تعیین گروه‌های آللی در جدایه‌های دو گونه *Cercospora* sp. G و *C.* cf. *flagellaris* در این تحقیق

نتایج تعیین گروه‌های آللی مربوط به پنج ناحیه ژنی ITS، *tef1*، *actA*، *cmdA* و *his3* در جدایه‌های دو گونه *Cercospora* sp. G و *C.* cf. *flagellaris* در جدول ۳ آمده است. براساس این نتایج در ناحیه ITS دو گروه آللی دیده می‌شود، و جدایه‌های دو گونه *Cercospora* sp. G و *C.* cf. *flagellaris* دارای آلل‌های مشترک هستند. بنابراین ناحیه ITS برای تمایز این دو گونه مناسب نیست. در دو ناحیه *tef1* و *his3* دو گروه آللی دیده می‌شود و آلل یک تنها در جدایه‌های گونه *Cercospora* sp. G و آلل دو تنها در جدایه‌های گونه *C.* cf. *flagellaris* مشاهده می‌شود. در ناحیه ژنی *actA*، سه گروه آللی مشاهده می‌شود، همه جدایه‌های گونه *Cercospora* sp. G تنها دارای گروه آللی شماره یک هستند، در حالیکه در جدایه‌های گونه *C.* cf. *flagellaris* هر سه گروه آللی یک، دو و سه مشاهده می‌شود. در ناحیه ژنی *cmdA*، سه گروه آللی مشاهده می‌شود، آلل یک تنها در جدایه‌های گونه *Cercospora* sp.



شکل ٤. گونه *Cercospora* sp. G روی گیاه *Cucumis melo*: A. دستجات کنیدیوم‌بر؛ B–D. کنیدیوم‌ها (مقیاس = ۱۰ میکرومتر).

Fig. 4. *Cercospora* sp. G. on *Cucumis melo*. A) Fasciculate conidiophores; B–D) conidia. — Scale bars = 10 µm.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳. نتایج بررسی گروه های آللی هر ناحیه ژنی برای دو گونه *Cercospora* sp. G و *C.* cf. *flagellaris*.

Species	Culture accession number	Allele group per locus				
		ITS	*tef1*	*actA*	*cmdA*	*his3*
Cercospora sp. G	IRAN 2686C	I	I	I	I	I
	IRAN 2687C	I	I	I	I	I
	IRAN 2688C	I	I	I	I	I
	IRAN 2700C	II	I	I	I	I
Cercospora cf. *flagellaris*	IRAN 2689C	II	II	II	II	II
	IRAN 2690C	I	II	III	II	II
	IRAN 2691C	II	II	II	III	II
	IRAN 2692C	I	II	I	II	II
	IRAN 2693C	II	II	II	II	II
	IRAN 2694C	II	II	III	II	II
	IRAN 2695C	II	II	III	II	II
	IRAN 2696C	II	II	III	II	II
	IRAN 2697C	II	II	III	II	II
	IRAN 2698C	II	II	III	II	II
	IRAN 2699C	II	II	II	III	II
	IRAN 2701C	I	II	II	III	II

G، و آلل‌های دو و سه، در جدایه‌های گونه *C.* cf. *flagellaris* مشاهده می‌شوند.

بحث

پژوهش حاضر در راستای شناسایی ریخت‌شناختی و مولکولی قارچ‌های مرتبط با لکه برگی سرکوسپورایی خربزه از تیره کدوئیان در استان گیلان انجام گرفت. گیاهان تیره کدوئیان شامل کدو، هندوانه، خیار، طالبی و خربزه از محصولات جالیزی مهم هستند که در استان گیلان، از خوراکی‌های محلی به شمار می‌روند و به صورت گسترده در شهرستان‌های این استان کشت می‌شوند. در تحقیق حاضر، طی بازدید از مزارع تیره کدوئیان در شهرستان‌های مختلف استان گیلان، شیوع بسیار گسترده بیماری لکه برگی سرکوسپورایی روی گیاهان خربزه در شهرستان ماسال مشاهده شد. بر اساس اطلاعات موجود تا کنون گزارشی در رابطه با لکه سرکوسپورایی خربزه و طالبی (*Cucumis melo*) در کشور وجود نداشته است (Ershad 2009, Ershad *et al.* 2018). بنابراین تحقیق حاضر اولین گزارش از وقوع بیماری لکه سرکوسپورایی خربزه در کشور می‌باشد.

شناسایی دقیق عوامل بیماریزا، اولین گام در ارایه راهکارهای صحیح مدیریت بیماری‌ها است. در سال‌های اخیر برای شناسایی آرایه‌های جنس سرکوسپورا، مفهوم ترکیبی گونه (Quaedvlieg *et al.* 2014) که ترکیبی از اطلاعات میزبان، صفات ریخت‌شناختی و داده‌های توالی چندژنی را به کار می‌گیرد، مفید شناخته شده است (Bakhshi *et al.* 2012, 2015, 2018). بنابراین در این پژوهش، به منظور بررسی و شناسایی دقیق عوامل دخیل در بیماری لکه برگی سرکوسپورایی خربزه، تنوع گونه‌ای جنس سرکوسپورا در گیاه خربزه با استفاده از ترکیب صفات ریخت شناختی و داده‌های توالی پنج ناحیه ژنی ITS، *tef1*، *actA*، *cmdA* و *his3* مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که دو گونه *C.* cf. *flagellaris* و *Cercospora* sp. G عامل لکه برگی سرکوسپورایی در گیاه خربزه می‌باشند. در بین آرایه‌های جنس سرکوسپورا تاکنون گونه‌های *C. chidambarensis* Rangasw. & Chandras.،

www.SID.ir

Archive of SID

C. cucurbitacea Ellis & Galloway (Crous & Braun 2003)، *C. citrullina* Cooke و *C.* cf. *malloti* (Groenewald *et al.* 2013) از روی جنس *Cucumis* در دنیا گزارش شده اند. در این تحقیق دو گونه *Cercospora* cf. *flagellaris* و *Cercospora* sp. G برای اولین بار روی جنس *Cucumis* در دنیا گزارش می‌شوند. در بین این دو گونه، گونه *C.* cf. *flagellaris* در این تحقیق بیشترین فراوانی را به خود اختصاص داده است (۱۲ تا از ۱۶ جدایه). این گونه شامل جدایه‌هایی است که از لحاظ ریخت شناختی شبیه به گونه *C. flagellaris* Ellis & G. Martin هستند، اما با توجه به اینکه توالی جدایه تیپ این گونه از روی میزبان اصلی آن *Phytolacca decandra* L. (=*P. americana* var. *americana*) در دسترس نیست، فعلاً تحت نام *C.* cf. *flagellaris* نامگذاری شده است (Groenewald *et al.* 2013, Bakhshi *et al.* 2018).

بر اساس نتایج این مطالعه مشخص شد، دو گونه *C.* cf. *flagellaris* و *Cercospora* sp. G می‌توانند به‌صورت همزمان روی یک گیاه و حتی یک لکه برگ نیز حضور داشته باشند. حضور همزمان دو یا چند گونه از جنس سرکوسپورا همراه با لکه برگی روی یک میزبان در گیاهان مختلف در سایر نقاط دنیا نیز گزارش شده است. واقفی و همکاران (Vaghefi *et al.* 2018) تنوع گونه‌ای سرکوسپوراهای همراه با لکه برگی چغندرقند را بررسی کردند، و نتایج آنها نشان داد علاوه بر *C. beticola*، عامل شناخته شده لکه برگی سرکوسپورایی چغندرقند، گونه‌های دیگر از قبیل *C. apii*، *C. zebrina*، *C.* cf. *flagellaris* و *Cercospora* sp. G نیز همراه با لکه برگی سرکوسپورایی چغندرقند حضور دارند. در گیاه سویا نیز داده‌های توالی DNA مشخص کردند، چندین گونه از این جنس همراه با لکه برگی سرکوسپورایی این گیاه حضور دارند (Soares *et al.* 2015, Albu *et al.* 2016, Guillin *et al.* 2017). نتایج آزمون بیماری زایی گونه‌های جدا شده از چغندرقند در تحقیق واقفی و همکاران (Vaghefi *et al.* 2018) نشان داد *C. apii* و *C.* cf. *flagellaris* روی این میزبان بیماری ایجاد کردند، در حالیکه دو گونه *C. zebrina* و *Cercospora* sp. G فاقد علایم بودند، بنابراین احتمالاً با وجود حضور چند گونه از جنس سرکوسپورا روی یک میزبان، برخی از این گونه‌ها به عنوان بیمارگر ثانویه عمل می‌کنند. در ضمن نتایج این آزمون‌های بیماریزایی (Vaghefi *et al.* 2018) شواهدی برای تایید فرضیه "pogo stick" که توسط کراوس و خرونوالد (Crous & Groenewald 2005) مطرح شد، ارائه می‌نماید. بر اساس این فرضیه عوامل بیماریزای با تخصص میزبانی قادر هستند، بافت‌های گیاهان غیر میزبان را کلونیزه نموده و به میزان کم علایم و پروپاگول قارچی تولید نموده تا زمانی که میزبان اصلی آنها که روی آن بیمارگر هستند، در دسترس قرار گیرد (Crous & Groenewald 2005). در تحقیقات آتی نیاز است آزمون‌های بیماری زایی برای دو گونه *C.* cf. *flagellaris* و *Cercospora* sp. G روی خربزه و سایر گیاهان تیره کدوئیان به منظور مقایسه میزان بیماریزایی این دو گونه انجام گیرد تا مشخص شود کدامیک به عنوان بیمارگر اولیه عمل می‌نمایند. در هر حال، این مسئله که گونه‌های مختلف جنس سرکوسپورا روی یک گیاه با همدیگر حضور دارند، تبادلات ژنتیکی بین گونه‌ای را بویژه بین گونه‌هایی که یک لکه را آلوده می‌کنند، تسهیل نموده و احتمالاً در نهایت منجر به گونه-زایی و تغییر الگوهای پرآزاری و تخصص‌یافتگی میزبانی می‌شود (Crous & Groenewald 2005). با بررسی گروه-های آللی در توالی نواحی ژنی مختلف (ITS، *tef1*، *actA*، *cmdA* و *his3*) در جدایه‌های دو گونه *C.* cf. *flagellaris*

www.SID.ir

Archive of SID

و *Cercospora* sp. G در این تحقیق مشخص شد، در برخی نواحی ژنی، آلل‌های مشترک بین این دو گونه مشاهده می‌شود. از طرفی تنوع گروه‌های آللی در نواحی ژنی مختلف، در بین جدایه‌های مورد مطالعه، نشان از تنوع بالای جمعیت این دو گونه دارد، که می‌تواند نشان دهنده وجود چرخه جنسی پنهان در جمعیت‌های این دو گونه باشد (Bakhshi *et al.* 2011)، که نیاز است این مسئله در تحقیقات آتی مورد ارزیابی قرار گیرد.

با توجه به عدم گزارش لکه برگی سرکوسپورایی خربزه و طالبی (*Cucumis melo*) در کشور، این بیماری می‌تواند در زمره بیماری‌های نوظهور در منطقه حائز اهمیت باشد و نیاز است نمونه برداری و ردیابی این بیماری از نواحی کشت و پرورش خربزه و طالبی در سایر استان‌های کشور نیز صورت گیرد. ظهور این بیماری‌های جدید بی تردید با فرصت‌هایی که برای ترکیب مخزن ژنی جمعیت‌ها بوسیله عملیات کشاورزی غیر اصولی و استفاده بی رویه از قارچکش‌ها در کنار قوانین قرنطینه و بهداشت زراعی ناقص، فراهم می‌آید، تقویت می‌شود.

دو گونه *C.* cf. *flagellaris* و *Cercospora* sp. G که در این تحقیق به عنوان عامل لکه برگی سرکوسپورایی خربزه (*Cucumis melo*) شناخته شدند، هر دو در تحقیقات قبلی (Bakhshi *et al.* 2015, 2018) مشخص شده است که دارای دامنه میزبانی وسیع از جمله سایر کدوئیان نظیر انواع کدو (*Cucurbita maxima* و *Cucurbita pepo* L.) هستند (Bakhshi *et al.* 2015)، بنابراین این نتایج نشان می‌دهد، تناوب زراعی احتمالاً راهکار مناسبی برای مدیریت لکه برگی سرکوسپورایی خربزه نیست. با اینحال جمع آوری و حذف علف‌های هرز که می‌توانند به عنوان میزبان جایگزین این دو گونه عمل نمایند، می‌تواند در مدیریت لکه سرکوسپورایی خربزه (تیره کدوئیان) نقش مهمی داشته باشد. با اینحال بررسی‌های تکمیلی در خصوص زیست‌شناسی و چرخه زندگی عامل بیماری و ... در آینده، می‌تواند اطلاعات ارزشمندی در زمینه ارائه راهکارهای مناسب مدیریت این بیماری، ازجمله تناوب زراعی و ... فراهم آورد.

سپاسگزاری

نویسندگان از سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور و صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور به خاطر حمایت مالی این تحقیق تشکر می‌نمایند.

منابع

Albu S., Schneider R., Price P. and Doyle V. 2016. *Cercospora* cf. *flagellaris* and *Cercospora* cf. *sigesbeckiae* are associated with Cercospora leaf blight and purple seed stain on soybean in North America. Phytopathology 106: 1376–85.

Arzanlou M., Abeln E.C., Kema G.H., Waalwijk C., Carlier J., Vries I.D., Guzmán M. and Crous P.W. 2007. Molecular diagnostics for the Sigatoka disease complex of banana. Phytopathology 97: 1112–1118.

Bakhshi M. 2018. Important criteria for identification of the *Cercospora* species. Plant Pathology Science 7 (1): 1–14.

Bakhshi M. 2019. Epitypification of *Cercospora rautensis*, the causal agent of leaf spot disease on *Securigera varia*, and its first report from Iran. Fungal Systematics and Evolution 3: 157–163.

Bakhshi M., Arzanlou M. and Babai-Ahari A. 2011. Uneven distribution of mating type alleles in Iranian populations of *Cercospora beticola*, the causal agent of Cercospora leaf spot disease of sugar beet. Phytopathologia Mediterranea 50: 101–109.

www.SID.ir

Archive of SID

Bakhshi M., Arzanlou M. and Babai-Ahari A. 2012. Comprehensive check list of Cercosporoid fungi from Iran. Plant Pathology and Quarantine 2: 44–55.

Bakhshi M., Arzanlou M., Babai-ahari A., Groenewald J.Z. and Crous P.W. 2018. Novel primers improve species delimitation in *Cercospora*. IMA Fungus 9(2): 299–332.

Bakhshi M., Arzanlou M., Babai-ahari A., Groenewald J.Z., Braun U. and Crous P.W. 2015. Application of the consolidated species concept to *Cercospora* spp. from Iran. Persoonia 34: 65–86.

Carbone I. and Kohn L.M. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. Mycologia 91: 553–556.

Crous P.W. and Braun U. 2003. *Mycosphaerella* and its anamorphs: 1. Names published in *Cercospora* and *Passalora*. CBS Biodiversity Series 1: 1–571.

Crous P.W. and Groenewald J.Z. 2005. Hosts, species and genotypes: opinions versus data. Australasian Plant Pathology 34: 463–470.

Crous P.W., Groenewald J.Z., Groenewald M., Caldwell P., Braun U. and Harrington T.C. 2006. Species of *Cercospora* associated with grey leaf spot of maize. Studies in Mycology 55: 189–197.

Crous P.W., Groenewald J.Z., Mansilla J.P., Hunter G.C. and Wingfield M.J. 2004. Phylogenetic reassessment of *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs occurring on *Eucalyptus*. Studies in Mycology 50: 195–214.

de Hoog G.S. and Gerrits van den Ende A.H.G. 1998. Molecular diagnostics of clinical strains of filamentous Basidiomycetes. Mycoses 41: 183–189.

Ershad D. 2009. Fungi of Iran. Ministry of Jihad-e-Agriculture. Agricultural Research, Education and Extension Organization, Tehran, Iran.(in Persian)

Ershad D., Asef M.R., Bakhshi M., Javadi A., Zangeneh S., Asgari B., Aliabadi F. and Mehrabi M. 2018. Genera of Fungi and Fungal Analogues of Iran. Ministry of Jihad-e-Agriculture. Agricultural Research, Education and Extension Organization, Tehran, Iran. (in Persian)

Fresenius G. 1863. Beiträge zur Mykologie. Vol. 3. Frankfurt: H.L. Brönner.

Groenewald J.Z., Nakashima C., Nishikawa J., Shin H.-D., Park J.H., Jama A.N., Groenewald M., Braun U. and Crous P.W. 2013. Species concepts in *Cercospora*: spotting the weeds among the roses. Studies in Mycology 75: 115–170.

Groenewald M., Groenewald J.Z., Braun U. and Crous P.W. 2006. Host range of *Cercospora apii* and *C. beticola* and description of *C. apiicola*, a novel species from celery. Mycologia 98: 275–285.

Guillin E.A., de Oliveira L.O., Grijalba P.E., Gottlieb A.M. 2017. Genetic entanglement between *Cercospora* species associating soybean purple seed stain. Mycological Progress 16: 593–603.

Ismail H.I., Chan K.W., Mariod A.A. and Ismail M. 2010. Phenolic content and antioxidant activity of cantaloupe (*Cucumis melo*) methanolic extracts. Food Chemistry 119: 643–647.

Katoh K. and Standley D.M. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. Molecular Biology and Evolution 30: 772–780.

Kimber R.B.E. and Paull J.G. 2011. Identification and genetics of resistance to cercospora leaf spot (*Cercospora zonata*) in faba bean (*Vicia faba*). Euphytica 177: 419–429.

Kushalappa A.C., Boivin G. and Brodeur L. 1989. Forecasting incidence thresholds of Cercospora blight in carrots to initiate fungicide application. Plant Disease 73: 979–983

Maddison W.P. and Maddison D.R. 2011. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.75. http://mesquiteproject.org.

Möller E., Bahnweg G., Sandermann 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 Acids Research 20: 6115–6116.

Nylander J.A.A. 2004. MrModeltest. Version 2.0. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, Uppsala, Sweden.

Praveena R. and Naseema A. 2004. Fungi occurring on water hyacinth (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) in Kerala. Journal of Tropical Agriculture 42: 21–23.

Quaedvlieg W., Binder M., Groenewald J.Z., Summerell B.A., Carnegie A.J., Burgess T.I. and Crous P.W. 2014. Introducing the consolidated species concept to resolve species in the Teratosphaeriaceae. Persoonia 33: 1–40.

Ritschel P.S., Lins T.C., Rodrigo Lourenço Tristan R.L., Buso G.S., Buso J.A. and Ferreira M.E. 2004.

www.SID.ir

Archive of SID

Development of microsatellite markers from an enriched genomic library for genetic analysis of melon (*Cucumis melo* L.). BMC Plant Biology 4: 9.

Ronquist F., Teslenko M., Van der Mark P., Ayres D.L., Darling A., Höhna S., Larget B., Liu L., Suchard M.A. and Huelsenbeck J.P. 2012. MrBayes 3.2: Effcient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. Systematic Biology 61: 539–542.

Silva M. and Pereira O.L. 2008. Postharvest *Cercospora apii* fruit rot disease on *Cucurbita maxima* (Cucurbitaceae). Australasian Plant Disease Notes 3: 21–23.

Soares A.P.G., Guillin E.A., Borges L.L., Da Silva A.C., De Almeida Á.M., Grijalba P.E., Gottlieb A.M., Bluhm B.H. and De Oliveira L.O. 2015. More *Cercospora* species infect soybeans across the Americas than meets the eye. PloS One 10: e0133495.

Tessmann D.J., Charudattan R., Kistler H.C. and Rosskopf E.N. 2001. A molecular characterization of *Cercospora* species pathogenic to water hyacinth and emendation of *C. piaropi*. Mycologia 93: 323–334.

Vaghefi N., Kikkert J.R., Hay F.S., Carver G.D., Koenick L.B., Bolton M.D., Hanson L.E., Secor G.A. and Pethybridge S.J. 2018. Cryptic diversity, pathogenicity, and evolutionary species boundaries in *Cercospora* populations associated with Cercospora leaf spot of *Beta vulgaris*. Fungal Biology 122(4): 264–282.

Weiland J., Eide J., Rivera-Varas V. and Secor G. 2001. Genetic diversity of *Cercospora beticola* in the US and association of molecular markers with tolerance to the fungicide triphenyltin hydroxide. Phytopathology 91: 94.

White T.J., Bruns T. and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., *et al.* (eds), A guide to molecular methods and applications: 315–322. Academic Press, New York.

www.SID.ir