Archive of SID

Iranian Journal of Plant ProtectionScience
Vol 51, No 1, spring and summer 2020 (129-146)
DOI: 10.22059/ijpps.2019.273052.1006876

دانش گیاهپزشکی ایران
دورهٔ ۵۱، شمارهٔ ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۹ (ص۱۴۶-۱۲۹)

مطالعه گونه‌های جنس‌های *Bipolaris* و *Curvularia* همراه با گیاهان ذرت، سورگوم و نیشکر در ایران

سعدی کرمی[۱]، محمد جوان‌نیکخواه[*۲]، خلیل بردی فتوحی‌فر[۳]، وحید رهجو[۴]، عبداله احمدپور[۵]، امین علیدادی[۶]

۱ و ٦. دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه گیاه‌پزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

۲ و ۳. استاد و دانشیار، گروه گیاهپزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

٤. استادیار بخش تحقیقاتی ذرت و گیاهان علوفه‌ای، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج، ایران

۵. استادیار گروه ترویج و آموزش کشاورزی، مرکز آموزش عالی شهید باکری میاندوآب، دانشگاه ارومیه، میاندوآب، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۷/۱۱/۰۸ - تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۲/۱۳)

چکیده

به منظور مطالعه گونه‌های جنس‌های ***Bipolaris*** و ***Curvularia*** همراه گیاهان ذرت، سورگوم و نیشکر طی تابستان ۱۳۹۰ و ۱۳۹۱ نمونه‌برداری از اندام‌های هوایی گیاهان دارای علایم لکه‌برگی در مزارع مناطق مختلف کشور (استان‌های مازندران، گلستان، گیلان، اردبیل، زنجان، البرز، فارس و خوزستان) به عمل آمد. شناسایی گونه‌های قارچی بر اساس خصوصیات ریخت شناختی و اطلاعات توالی حاصل از نواحی **ITS** از **DNA** ریبوزومی صورت پذیرفت. بدین ترتیب تعداد ۱۰ گونه شامل ***Bipolaris cynodontis*** (٤٨ جدایه)، ***B. sorghicola*** (١٦ جدایه)، ***B. maydis*** (۱۷ جدایه)، ***B. sorokiniana*** (هفت جدایه)، ***B. bicolor*** (چهار جدایه)، ***B. oryzae*** (دو جدایه) ***Curvularia spicifera*** (۱۹ جدایه)، ***C. papendorfii*** (ده جدایه)، ***C. ellisii*** (دو جدایه) و ***C. hawaiiensis*** (یک جدایه) از گیاهان ذرت، سورگوم و نیشکر شناسایی شدند. آزمون بیماری‌زایی گونه‌ها روی گیاهچه‌های ذرت، سورگوم و نیشکر در مرحله چهار الی شش‌برگی صورت پذیرفت. در نهایت بیماری‌زایی گونه‌های ***B. sorokiniana*** و ***B. oryzae*** روی ذرت و گونه ***B. sorghicola*** روی سورگوم اثبات شد. گونه‌های ***B. sorokiniana*** و ***B. oryzae*** برای اولین بار به عنوان بیمارگر روی ذرت در ایران گزارش می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: تاکسونومی، فیلوژنی، ریخت‌شناسی، میزبان، ***Cochliobolus***.

Study on *Bipolaris* and *Curvularia* species associated with corn, sorghum and sugarcane in Iran

Saadi Karami[1], Mohammad Javan-Nikkhah[*2], Khalil Bardi-Fotuhifar[3], Vahid Rahjoo[4], Abdollah Ahmadpour[5], Amin Alidadi[6]

1 , 6. MSc Graduate, Department of Plant Protection, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

2 , 3. Professor and Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Science and Engineering, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

4. Assistant Prof., Maize and Forage Crops Research Department, Seed and Plant Improvement Institute, Karaj, Iran

5. Assistant Prof., Department of Agricultural Extension and Education, Higher Education Center Shahid Bakeri Miyandoab, Urumia University, Miyandoad, Iran

(Received: June 28, 2019 - Accepted: May 3, 2019)

ABSTRACT

In order to study the *Bipolaris* and *Curvularia* species associated with corn, sorghum and sugarcane, sampeling were performed from different regions of Iran (including Alborz, Ardabil, Fars, Gilan, Golestan, Khuzestan, Mazandaran and Zanjan provinces) during the summer of 2011 and 2012. Fungal species were identified based on morphological features and molecular data of ITS regions of ribosomal DNA. Eleven species including Viz. *Bipolaris cynodontis* (48 isolates), *B. sorghicola* (16 isolates), *B. maydis* (17 isolates), *B. sorokiniana* (seven isolates), *B. bicolor* (four isolates) and *B. oryzae* (two isolates), *Curvularia spicifera* (19 isolates), *C. papendorfii* (ten isolates), *C. ellisii* (two isolates), and *C. hawaiiensis* (one isolate) were identified. Pathogenicity test of the species were performed on four to six leaf stage of corn, sorghum and sugarcane seedlings. Finally, pathogenicity of *B. maydis*, *B. sorokiniana* and *B. oryzae* on corn and *B. sorghicola* on sorghum seedlings were confirmed. This is the first report of occurrence and pathogenicity of *B. sorokiniana* and *B. oryzae* on corn leaves in Iran.

Keywords: *Cochliobolus*, host, morphology, phylogeny, taxonomy.

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

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

گونه‌های جنس‌های *Bipolaris*، *Curvularia*، *Exserohilum* و *Drechslera* روی گندمیان به صورت جامع توسط سیوانسان مورد مطالعه قرارگرفته و به صورت مشروح گزارش شده‌اند (Sivanesan 1987). ویژگی‌هایی از جمله شکل کنیدیوم‌ها و نحوه جوانه‌زنی آن‌ها، مورفولوژی هیلوم، منشا لوله تندشی در سلول پایه و موقعیت آن نسبت به محور کنیدیوم، نحوه تشکیل دیواره عرضی کاذب و ویژگی‌های جایگاه یا گره کنیدیوم‌زایی (conidiogenous nodes) به عنوان صفات اصلی و مهم در تمایز سه جنس *Bipolaris*، *Exserohilum* و *Drechslera* مطرح شده‌اند (Alcorn 1982a, b, 1983, 1990,1991). مراحل جنسی این سه جنس نیز براساس شکل و وضعیت دیواره‌های آسکوسپورها به راحتی قابل تشخیص می‌باشند (Sivanesan, 1987). جنس‌های *Bipolaris* و *Curvularia* دارای مرحله جنسی مشترک *Cochliobolus* هستند.

برخی محققین معتقدند که جنس *Bipolaris* بایستی مترادف جنس *Curvularia* در نظر گرفته شود (Sivanesan, 1987; Alcorn, 1988). با این حال Sivanesan (1987) بیان می‌کند با اینکه این دو جنس در اغلب موارد دارای صفات ریخت‌شناختی یکسانی هستند، اما تا زمانی که اطلاعات بیشتر از طریق مطالعات بیوشیمیایی متابولیت‌های ثانویه و ژنتیکی تعداد زیادی از گونه‌های این دو جنس حاصل نشده است، بایستی به عنوان جنس‌های مجزا در نظر گرفته شوند. اخیراً، جهت تمایز چهار جنس ذکر شده و گونه‌های مربوط به آن‌ها از روش‌های مولکولی از جمله ترادف‌های نواحی ITS-rDNA، ژن گلیسرآلدهید-۳ فسفات دهیدروژناز (*gpd*) و ژن *Brn1* (ژن مسئول در سنتز ملانین) استفاده شده‌است (Berbee *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 2003; Kodsueb *et al.*, 2008; Manamgoda *et al.*, 2011, 2012; Ahmadpour *et al.*, 2011, 2012a, 2013) بر این اساس سه جنس *Bipolaris*، *Exserohilum* و *Drechslera* از نظر ژنتیکی از یکدیگر متمایز هستند. (Ahmadpour *et al.* (2011, 2012a, 2012b, 2013b در سال‌های اخیر مطالعات گسترده‌ای را روی تاکسونومی و فیلوژنی گونه‌های مختلف جنس‌های *Bipolaris* و *Curvularia* در ایران انجام داده‌اند و در سال ۲۰۱۲ گونه جدیدی از جنس *Bipolaris* را با نام *Bipolaris salkadehensis* برای دنیا معرفی کردند (Ahmadpour *et al.*, 2012b). گونه‌های جنس‌های *Bipolaris* و *Curvularia* به عنوان عوامل لکه‌برگی، پوسیدگی ریشه، طوقه و ساقه روی انواع گونه‌های گیاهان گندمیان شناخته می‌شوند. برخی گونه‌ها از جمله *B. maydis*، *B. oryzae* و *B. sorokiniana* خسارت شدیدی را به ترتیب روی گیاهان زراعی ذرت، برنج و گندم ایجاد می‌کنند (Sivanesan, 1987). تاکنون از ایران ۱۲ گونه از جنس *Bipolaris* و ۱۹ گونه از جنس *Curvularia* از روی میزبان‌های مختلف گزارش شده است (Ershad, 2009; Abbasi & Aliabadi, 2009; Ahmadpour *et al.*, 2011, 2012a, 2012b, 2013).

گونه‌های *B. maydis*، *B. zeicola*، *B. cynodontis*، و *Bipolaris* sp. و گونه‌های *C. lunata*، *C. ellisii*، *C. spicifera* از روی ذرت، گونه‌های *B. sorghicola* و *B. cynodontis* و گونه‌های *C. australiensis*، *C. tuberculata*، *C. spicifera* و *C. lunata* از روی سورگوم و گونه *C. papendorfii* از روی نیشکر در ایران گزارش شده اند (Ershad, 2009; Abbasi & Aliabadi, 2009).

با توجه به وسعت زمین‌های زراعی تحت کشت این سه محصول در ایران و همچنین تنوع آب وهوایی مناطق مختلف کشور انتظار می‌رود تعداد گونه‌های این دو جنس قارچی روی این میزبان‌ها بیشتر باشد. اهداف این تحقیق شامل شناسایی گونه‌های جنس‌های*Bipolaris* و *Curvularia* همراه گیاهان ذرت، سورگوم و نیشکر در اغلب مزارع کاشت این محصولات در ایران، شناسایی مولکولی و مطالعه روابط فیلوژنتیکی گونه‌ها براساس توالی ناحیه ITS-rDNA و انجام آزمون بیماری‌زایی گونه‌های شناسایی شده روی گیاهان میزبان جهت تعیین گونه‌های بیماری‌زا می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

نمونه‌برداری در تابستان سال‌های ۱۳۹۰ و ۱۳۹۱ از مزارع ذرت و سورگوم استان‌های گلستان، مازندران، گیلان، اردبیل (دشت مغان)، فارس، خوزستان، زنجان و البرز و مزارع نیشکر استان خوزستان به عمل آمد. نمونه‌برداری بصورت تصادفی و از بافت‌های دارای علایم لکه‌برگی انجام گرفت. اندام‌های گیاهی مشکوک به آلودگی درون پاکت‌های کاغذی جداگانه با ثبت مشخصات (مکان جمع‌آوری و تاریخ جمع‌آوری) به آزمایشگاه منتقل و بلافاصله به مدت دو الی سه روز در دمای ۲۸-۲۵ درجه سلسیوس در شرایط آزمایشگاه بین کاغذ خشک‌کن قرار گرفتند. پس از خشک شدن در یخچال با دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شدند.

جداسازی و خالص‌سازی نمونه‌های قارچی

جهت جداسازی ابتدا بخش‌هایی از بافت‌های آلوده به مدت ۱۰ دقیقه زیر جریان ملایم آب جاری شسته و سپس با استفاده از اسکالپل به قطعات کوچکتری تقسیم شده و به مدت یک دقیقه در هیپوکلریت سدیم رقیق شده ۱۰ درصد (نیم درصد کلر فعال) ضدعفونی سطحی شدند. پس از سه بار شستشوی نمونه‌ها در آب مقطر استریل و رطوبت‌گیری نمونه‌ها روی کاغذ صافی استریل، قطعات تقریبی به اندازه یک سانتی‌متر مربع از قسمت‌های آلوده به همراه نواحی سالم بافت گیاهی به تشتک‌های پتری حاوی محیط‌های کشت آب-آگار دو درصد (Water agar 2%) و سیب زمینی دکستروز آگار (Potato Dextrose Agar) منتقل و در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس منتقل گردیدند. خالص سازی قارچ‌های رشد کرده به روش تک کنیدیوم (single spore) روی محیط کشت WA دو درصد انجام شد.

بررسی صفات ریخت‌شناختی

پس از جداسازی و خالص‌سازی، جدایه‌ها روی محیط غذایی PDA و در شرایط ۲۴-۲۵ درجه سلسیوس و تاریکی کشت شدند. پنج روز پس از کشت، رنگ و شکل پرگنه جدایه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. جهت تعیین خصوصیات میکروسکوپی، هر جدایه درون تشتک‌های حاوی محیط کشت اختصاصی TWA به همراه قطعات دو سانتی‌متری کاه سه بار استریل گندم (tap water agar + wheat strew)، که برای کنیدیوم‌زایی گونه‌های جنس‌های *Bipolaris* و *Curvularia* استفاده می‌شود، منتقل شد (Sivanesan, 1987). تشتک‌ها به درون انکوباتور با دمای ۲۴-۲۰ درجه سلسیوس و تحت شرایط NUV متناوب (۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی) منتقل شدند. صفات ریخت‌شناختی مانند رنگ و شکل پرگنه، ابعاد و رنگ کنیدیوفورها و منفرد یا مجتمع بودن آن‌ها، طول و عرض کنیدیوم و تعداد دیواره‌های عرضی آن و نحوه جوانه‌زنی کنیدیوم‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند (Sivanesan, 1987). شناسایی گونه‌های قارچی با استفاده از کلیدهای شناسایی معتبر Ellis (1971, 1976) و Sivanesan (1987) انجام شد. جدایه‌هایی از گونه‌های شناسایی شده در کلکسیون میکروبی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII CC) نگهداری می‌شوند.

تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک

ده جدایه از گونه‌های جنس *Bipolaris* و شش جدایه از گونه‌های جنس *Curvularia* جهت مطالعات فیلوژنتیکی انتخاب شدند (جدول ۱). به منظور تهیه توده میسلیوم مورد نیاز جهت استخراج DNA ژنومی، از میسلیوم کشت هفت روزه جدایه‌های قارچی روی محیط غذایی PDA استفاده شد. استخراج DNA ژنومی از میسلیوم جدایه‌ها به روش Zhang & Steffenson (2002) صورت گرفت. برای تکثیر نواحی ITS1-5.8S-ITS2 از rDNA هسته‌ای نمونه‌های مورد بررسی، از جفت آغازگر ITS1/ITS4 (White *et al.*, 1990) استفاده شد. مخلوط واکنش PCR با حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۳ میکرولیتر آب مقطر استریل دیونیزه، ۲/۵ میکرولیتر 10X PCR Buffer، ۵ میلی‌مولار MgCl2، ۲۰۰ میلی‌مولار از هر نوکلئوتید،

www.SID.ir

Archive of SID

۱۰ پیکومول از هر اغازگر، یک واحد *Taq* DNA پلیمراز و سه میکرولیتر DNA با غلظت ۵۰-۳۰ نانوگرم تهیه شد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر Palm cycler CG1-96 (Thermal Cycler) Corbett) (Research, Australia انجام گرفت. محصولات خالص‌سازی شده با استفاده از توالی‌یاب ABI PRISM 3100 Applied Biosystems, Foster City, CA,) USA) توالی‌یابی شدند. پس از ویرایش توالی‌های نوکلئوتیدی بدست آمده با استفاده از نرم افزار BioEdit v. 7.2.5، به منظور مقایسه روابط فیلوژنتیکی جدایه‌های توالی‌یابی شده، شش گونه از جنس *Bipolaris*، هفت گونه از جنس *Curvularia*، چهار گونه از جنس *Exserohilum* و چهار گونه از جنس *Drechslera* از بانک ژن NCBI اخذ شدند و گونه *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler نیز به عنوان آرایه گروه خارجی (outgroup) انتخاب گردید. عمل همردیف سازی چندگانه توالی‌های نوکلئوتیدی جدایه‌های مورد مطالعه به همراه توالی‌های نوکلئوتیدی اخذ شده از بانک ژن NCBI در نرم افزار Clastal X v. 2.1 (Thompson *et al*., 1997) انجام گرفت. تبارنماهای فیلوژنتیکی با استفاده از دو روش Maximum Parsimony (MP) و Maximum Likelihood (ML) ترسیم شدند. ترسیم تبارنمای فیلوژنتیکی MP با استفاده از روش جستجوی تبارنمای ابتکاری (Heuristic search)، شاخص random addition sequence با ۱۰۰۰ تکرار و الگوریتم TBR بوسیله نرم افزار MEGA 6.0 انجام گرفت (Tamura *et al*., 2013). در این تجزیه و تحلیل تمامی مکان‌های خالی (gap) بصورت اطلاعات از دست رفته (missing data) در نظر گرفته شدند. تبارنمای فیلوژنتیکی ML، با مدل تامورا-نئی (Tamura-Nei) و توزیع گاما (TN93+G) و با استفاده از نرم‌افزار MEGA 6.0 تریسم شد. پایداری تبارنماهای حاصله بوسیله شاخص bootstrap و با ۱۰۰۰ تکرار مورد ارزیابی قرار گرفت (Felsentien, 1985). کلیه توالی‌های نوکلئوتیدی بدست آمده در این مطالعه در مجموعه داده‌های بانک ژن NCBI ذخیره و شماره‌های دسترسی برای آن‌ها فراهم گردید (جدول ۱).

بررسی بیماری‌زایی جدایه‌ها

جهت بررسی بیماری‌زایی گونه‌ها، قلمه‌های نیشکر رقم CP48 (تهیه شده از کشت و صنعت امام خمینی خوزستان) و بذور ذرت لاین B73 و سورگوم رقم پگاه (تهیه شده از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج، بخش تحقیقات ذرت و گیاهان علوفه‌ای) در گلدان‌هایی با قطر ۲۵ و ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر کاشته شدند. گلدان‌ها در گلخانه با محدوده دمایی ۳۵-۲۵ درجه سلسیوس نگهداری و هر چهار روز یکبار آبیاری شدند. مایه زنی به روش اسپور پاشی با استفاده از سوسپانسیون کنیدیوم با غلظت 10^4 کنیدیوم در میلی‌لیتر آب برای گونه‌های جنس *Bipolaris* و 10^5 کنیدیوم در میلی‌لیتر آب برای گونه‌های جنس *Curvularia* انجام شد. مایه زنی روی گیاهچه‌های ذرت، سورگوم و نیشکر در مرحله چهار الی شش برگی صورت پذیرفت و به ازای ۵۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون کنیدیوم، ۱۰ میکرولیتر توین ۲۰ جهت پخش بهتر کنیدیوم‌ها در سوسپانسیون کنیدیومی استفاده شد (Nanayakkara *et al.*, 2008). گلدان‌های شاهد نیز با آب مقطر استریل، مایه‌زنی شدند. بعد از مایه‌زنی، پوشش پلاستیکی روی گیاهچه‌ها به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. بعد از هفت روز، بیماری‌زا یا غیر بیماری‌زا بودن جدایه‌ها در مرحله چهار الی شش برگی گیاهان تحت آزمایش بررسی شد.

جدول ۱- مشخصات جدایه‌های استفاده شده در آنالیزهای فیلوژنتیکی

Table 1. Characterization of fungal isolates included in phylogenetic analyses

Species	Isolate/Strain	Refrence	GenBank accession No.
B. bicolor	CBS 960.96	Olivier *et al*., 2000	AF120260
B. bicolor	ZP24	This study	KP899100
B. cynodontis	BRIP16821	Goh & Hyde, 1998	AF163093

www.SID.ir

Archive of SID

ادامه جدول۱ -

B. cynodontis	ZG1	This study	KP899101
B. maydis	Leonard HM80	Berbee *et al*., 1999	AF158107
B. maydis	ZG10	This study	KP899103
B. maydis	BM	This study	KC315946
B. oryzae	BoM	Ahmadpour *et al*., 2014	KC315940
B. oryzae	ZGo1	This study	KC315944
B. oryzae	ZGo3	This study	KC315943
B. sorghicola	MAFF 511378	Berbee *et al*., 1999	AF071332
B. sorghicola	SB9	This study	KP899106
B. sorghicola	SS5	This study	KP899107
B. sorokiniana	DAOM 172489	Berbee *et al*., 1999	AF158105
B. sorokiniana	ZP5	This study	KP899108
Curvularia clavata	DAOM 148084	Berbee *et al*., 1999	AF071336
C. cymbopogonis	Alcorn 88109-1	Yun *et al*. 1999	AF071351
C. ellisii	81100c	Goh & Hyde, 1998	AF163091
C. ellisii	ZG9	This study	KC315947
C. hawaiiensis	BRIP15933	Goh & Hyde, 1998	AF163072
C. hawaiiensis	SP1	This study	KP899102
C. lunata	UAMH9 1349	Berbee *et al*., 1999	AF071339
C. papendorfii	9084c	Goh & Hyde, 1998	AF163075
C. papendorfii	NKh10	This study	KP899104
C. papendorfii	NKh18	This study	KP899105
C. spicifera	2199	Louis *et al*., 2014	HM195265
C. spicifera	SP2	This study	KP899109
C. spicifera	ZP1	This study	KP899110
Drechslera biseptata	CBS 108940	Zhang & Berbee, 2001	AY004788
D. erythrospila	CBS 10894	Zhang & Berbee, 2001	AY004782
D.tritici-repentis	DAOM 208990	Berbee *et al*., 1999	AF071348
D. tuberosa	DAOM 169286	Berbee *et al*., 1999	AF071347
Exserohilum minor	ATCCF 62323	Berbee *et al*., 1999	AF071341
E. monoceras	DAOM 208988	Berbee *et al*., 1999	AF071340
E. rostratum	Ex1	Ahmadpour *et al*., 2013a	KC198082
E. turcicum	94/1823	Goh & Hyde, 1998	AF163067
Alternaria alternata	Simmons 34-016	Berbee *et al*., 1999	AF071346

نتایج و بحث

در این تحقیق، شش گونه از جنس *Bipolaris* و چهار گونه از جنس *Curvularia* روی گیاهان ذرت، سورگوم و نیشکر بر اساس صفات ریخت شناسی و داده های مولکولی شناسایی و معرفی می‌شوند. توصیف ریخت شناسی گونه‌های شناسایی شده به شرح زیر است:

Bipolaris bicolor (Mitra) Shoemaker, *Can. J. Bot.* 37: 884 (1959)
Teleomorph: *Cochliobolus bicolor* Paul and Parbery, *Trans. Br. Mycol. Soc*. 49: 386 (1966). (Fig. 1A-D)

نمونه‌های بررسی شده: استان اردبیل، پارس‌آباد، *Zea mays*، شهریور ۱۳۹۱، جدایه ZP24 (ABRIICC 10180)؛ استان اردبیل، پارس‌آباد، *Sorghum bicolor*، مرداد۱۳۹۰، جدایه SG2؛ جمع‌آوری کننده سعدی کرمی. پرگنه قارچ روی محیط کشت PDA به رنگ قهوه‌ای می‌باشد. کنیدیوفورها منفرد و به رنگ قهوه‌ای تا قهوه‌ای تیره بوده و ابعاد آن‌ها ۷-۵ × ۷۰۰-۲۵۰ میکرومتر اندازه‌گیری شد (شکل ۱، A). کنیدیوم‌ها راست و یا گاهی اندکی خمیده، استوانه‌ای شکل و گاهی چماقی معکوس (obclavate) بوده و به رنگ قهوه‌ای تا قهوه‌ای تیره دیده شدند (شکل ۱، B و C). کنیدیوم‌ها دارای ۹-۴ دیواره عرضی کاذب بوده و با ابعاد ۱۸-۱۲ × ۸۰-۴۲ میکرومتر اندازه‌گیری شدند.

این گونه از روی شمار زیادی از گیاهان تیره گندمیان قابل جداسازی است. این گونه در ایران روی برنج (Ershad, 2009)، *Setaria* spp.، *Echinochola* sp. و *Cynodon dactylon* (Ahmadpour *et al*., 2011) گزارش شده است. در این مطالعه این گونه برای اولین بار همراه با ذرت و سورگوم در ایران گزارش می‌شود.

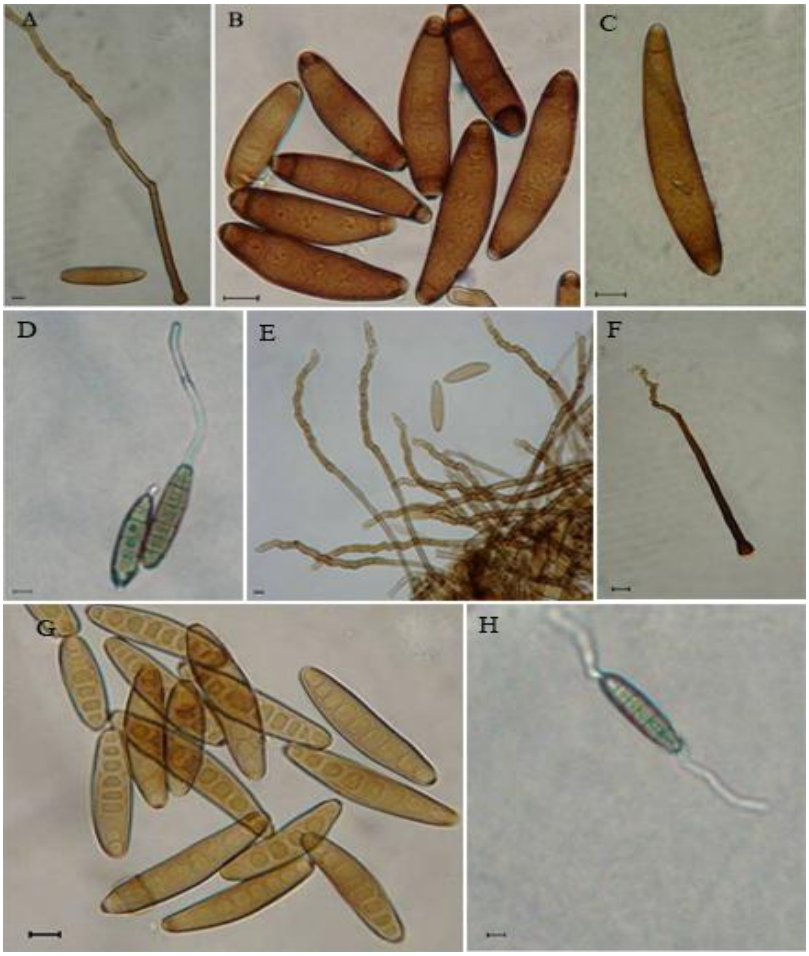
Bipolaris cynodontis (Marignoni) Shoemaker, Can. J. Bot. 37(5): 883 (1959) (Fig. 1)
Teleomorph: *Cochliobolus cynodontis* R.R. Nelson, Mycologia 56(1): 67 (1964). (Fig. 1E-H)

نمونه‌ی بررسی شده: استان گلستان، گرگان، *Zea mays*، مرداد ۱۳۹۰، جدایه ZG1 (ABRIICC

www.SID.ir

Archive of SID

10181)؛ استان گلستان، گرگان، *Sorghum bicolor*، مرداد ۱۳۹۰، جدایه SG1؛ استان خوزستان، هواز، کشت و صنعت دعبل خزاعی، *Sacharum officinarum*، مهر ۱۳۹۰، جدایه NKh2؛ جمع‌آوری کننده سعدی کرمی. پرگنه قارچ روی محیط کشت PDA به رنگ سبز زیتونی دیده شد. کنیدیوفورها منفرد و یا گاهی مجتمع و به رنگ قهوه‌ای دیده می‌شوند (شکل ۱، E و F). ابعاد کنیدیوفورها ۷-۵ × ۳۳۰-۱۵۰ میکرومتر اندازه‌گیری شد. کنیدیوم‌ها راست و یا اندکی خمیده و استوانه‌ای شکل بوده و به رنگ قهوه‌ای روشن تا قهوه‌ای دیده می‌شوند (شکل ۱، G). کنیدیوم‌ها دارای ۸-۴ (اغلب ۸-۶) دیواره عرضی کاذب بوده و ابعاد آن‌ها ۱۵-۱۰ × ۶۰-۳۵ میکرومتر اندازه‌گیری شد. گونه *B. cynodontis* گونه‌ای معمول روی گیاه مرغ (*Cynodon dactylon*) است و از روی بسیاری از گیاهان از جمله برگ سیب و کاج نیز جداسازی شده است و گونه‌ای همه جازی محسوب می‌شود (Ellis, 1971). این گونه نخستین بار در سال ۱۹۰۹ از روی برگ‌های خشک شده گیاه مرغ در ایتالیا جداسازی شد (Nelson, 1964). اینگونه توسط Ahmadpour *et al.*, (2012a) از میزبان‌های متعددی از جمله ذرت و سورگوم جداسازی شده است. گونه *Sacharum officinarum* میزبان جدیدی برای این گونه می‌باشد.



شکل ۱. A-D. گونه *Bipolaris bicolor*؛ A. کنیدیوفور، C&B. کنیدیوم‌ها، D. جوانه‌زنی دو قطبی و تک قطبی کنیدیوم‌ها. E-H. *Bipolaris cynodontis*؛ F&E. کنیدیوفورها، G. کنیدیوم‌ها، F. جوانه‌زنی دو قطبی کنیدیوم (مقیاس = ۱۰ میکرومتر).

Figure 1. A-D. *Bipolaris bicolor*; A. Conidiophores, B&C. Conidia, D. Bipolar and monopolar germination of conidia. E-F. *Bipolaris cynodontis*; E&F. Conidiophores, G. Conidia, F. Bipolar germination of conidia (Bar = 10 µm).

www.SID.ir

Archive of SID

Bipolaris maydis (Y. Nisik. & C. Miyake) Shoemaker, Can. J. Bot. 33: 882 (1959) Teleomorph: *Cochliobolus heterostrophus (*Drechsler) Drechsler, Phytopathology 24: 973 (1934). (Fig. 2A-F)

نمونه‌ی بررسی شده: استان گلستان، گرگان، *Zea mays*، تیر ۱۳۹۱، جدایه ZG10 (ABRIICC 10182)؛ استان مازندران، قائم‌شهر- قراخیل، *Zea mays*، تیر ۱۳۹۱، جدایه ZS13 (ABRIICC 10183)؛ جمع‌آوری کننده سعدی کرمی. پرگنه قارچ روی محیط کشت PDA به رنگ خاکستری می‌باشد. کنیدیوفورها غالبا به صورت مجتمع بوده و به رنگ قهوه‌ای تا قهوه‌ای تیره دیده شدند (شکل۲، A). کنیدیوفورها با ابعاد ۷-۵ × ۱۱۰۰-۵۵۰ (اغلب ۱۱۰۰-۸۰۰) میکرومتر اندازه‌گیری شدند. کنیدیوم‌ها به طور واضح خمیده و دوکی شکل بوده و به رنگ قهوه‌ای روشن تا قهوه‌ای دیده شد (شکل ۲، C و D). کنیدیوم‌ها دارای ۱۱-۶ (اغلب ۱۰-۸) دیواره عرضی کاذب بوده و ابعاد آن‌ها ۱۸-۱۲ × ۱۲۰-۶۵ (اغلب ۱۲۰-۱۰۰) میکرومتر اندازه‌گیری شدند. عرض هیلوم در این گونه ۵-۳ میکرومتر اندازه‌گیری شد (شکل ۲، E). گونه *B. maydis* از عوامل مهم لکه‌برگی ذرت در نواحی نیمه‌مرطوب و گرمسیری جهان می‌باشد (White, 1999). این گونه در ایران از استان‌های مازندران، گیلان و گلستان گزارش شده است (Ershad, 2009; Abbasi & Aliabadi, 2009; Mehrian *et al.*, 2000). دو نژاد از قارچ *B. maydis*، به نام نژاد T و نژاد O معرفی شده‌اند (Hooker, 1970). هر دو نژاد از نظر ریخت‌شناسی مشابه هستند اما از لحاظ آلل‌های لوکوس توکسین میزبان اختصاصی (Tox 1) متفاوت هستند (Klittich & Bronson, 1986). استرین‌هایی با آلل *TOX-1* (نژاد T) تولید T-توکسین کرده و سبب ایجاد لکه‌های دوکی شکل بزرگ روی برگ‌های ذرت هیبرید T-cms (Texas cytoplasmic male-sterile) می‌گردند، در حالی که استرین‌هایی با آلل *tox-1* (نژاد O)، T-توکسین تولید نکرده و سبب ایجاد لکه‌های کوچک موازی روی برگهای ذرت هیبرید T-cms می‌شوند (Klittich & Bronson, 1986). این گونه در ایران روی ذرت گزارش شده است (Ahmadpour *et al.*, 2013b).

Bipolaris oryzae (Breda de Haan) Shoemaker, Can. J. Bot. 37(5): 883 (1959) Teleomorph: *Cochliobolus miyabeanus* (S. Ito & Kurib.) Drechsler ex Dastur, Indian Journal of Agricultural Research 12: 733 (1942). (Fig. 2G-L)

نمونه‌ی بررسی شده: استان گلستان، گرگان، *Zea mays*، تیر ۱۳۹۱، جدایه ZGo1 (ABRIICC 10184) و ZGo3 (ABRIICC 10185)؛ جمع‌آوری کننده سعدی کرمی. پرگنه قارچ روی محیط کشت PDA به رنگ خاکستری می‌باشد. کنیدیوفورها منفرد یا مجتمع در دسته‌های کوچک بوده و به رنگ قهوه‌ای روشن تا قهوه‌ای دیده شدند (شکل ۲، G). کنیدیوفورها به طول ۱۱۵۰-۵۰۰ میکرومتر و عرض ۷-۵ میکرومتر بودند. کنیدیوم‌ها خمیده، دوکی شکل و به رنگ قهوه‌ای روشن تا طلایی دیده شدند (شکل ۲، J-H). کنیدیوم‌ها دارای ۱۲-۶ دیواره عرضی کاذب بوده و ابعاد آن‌ها ۲۰-۱۵ × ۱۴۵-۵۵ میکرومتر اندازه‌گیری شد. هیلوم اندکی متورم و دارای پاپیل است (شکل ۲، K).این گونه دارای دامنه میزبانی وسیعی است و به عنوان عامل لکه قهوه‌ای برنج که یکی از مهم‌ترین بیماری‌های برنج است، شناخته شده است (Scheffer, 1997).

علایم مهم ناشی از این بیمارگر لکه‌های قهوه‌ای روی برگ و پوشینه میزبان می‌باشد. علایم ممکن است روی کولیوپتیل و غلاف خوشه نیز ظاهر گردد، اما به ندرت روی ریشه، غلاف جوان و ساقه تشکیل می‌شود. لکه‌ها به صورت هم‌شکل در سطح برگ پراکنده‌اند. بیماری ممکن است سبب ضعف بوته‌های بالغ یا نشاها در خزانه شود اما زمانی که سبب آلودگی بذر گردد محصول از نظر کمی و کیفی دچار افت می‌شود (Ou 1985). گونه *B. oryzae* از نقاط مختلف ایران روی برنج گزارش شده است (Ershad, 2009; Abbasi & Aliabadi, 2009). این گونه برای اولین بار در ایران از میزبان ذرت گزارش می‌شود.

Bipolaris sorghicola (Lefebvre and Shervin) Alcorn, Mycotaxon 17: 69 (1983). (Fig. 3A-D)

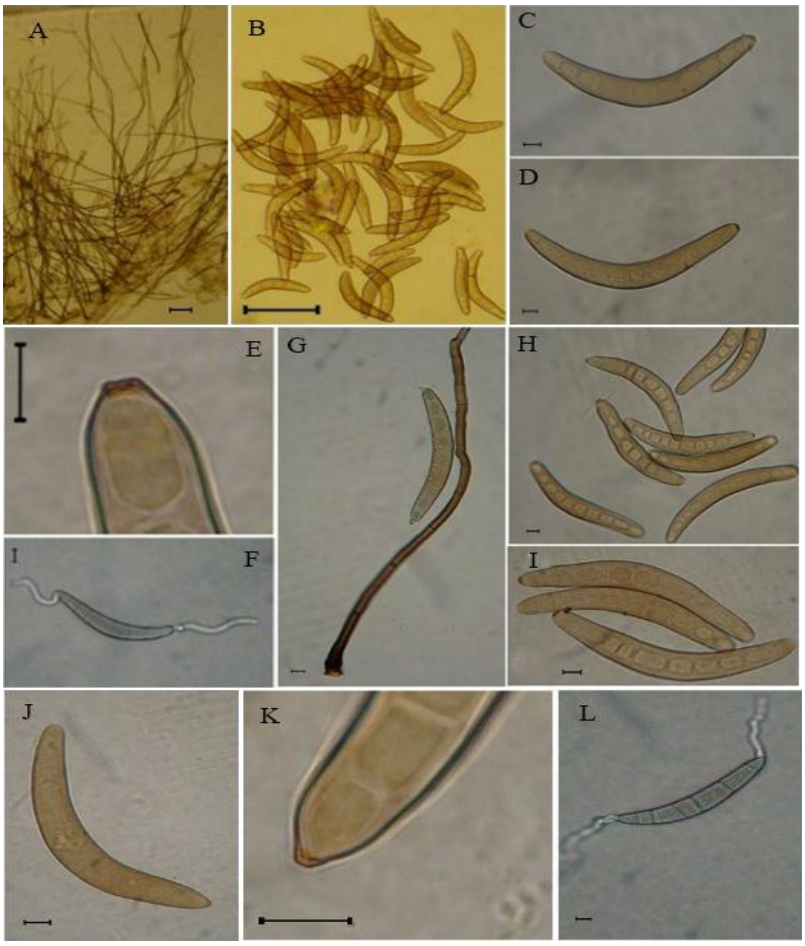
نمونه‌ی بررسی شده: استان اردبیل، پارس آباد، *Sorghum bicolor*، تیر ۱۳۹۱، جدایه SB9

www.SID.ir

Archive of SID

(ABRIICC 10186)؛ استان گلستان، گرگان، *Sorghum bicolor*، تیر ۱۳۹۱، جدایه SS5 (ABRIICC 10187)؛ جمع‌آوری کننده سعدی کرمی.

پرگنه قارچ روی محیط کشت PDA به رنگ زیتونی می‌باشد.



شکل ۲. A-F. گونه *Bipolaris maydis*، A. کنیدیوفور (مقیاس = ۱۰۰ میکرومتر)، B. کنیدیوم‌ها (مقیاس = ۱۰۰ میکرومتر)، D&C. کنیدیوم‌ها، E. هیلوم، F. جوانه‌زنی دوقطبی کنیدیوم (مقیاس = ۱۰ میکرومتر). G-L. گونه *Bipolaris oryzae*؛ G. کنیدیوفور (مقیاس = ۱۰۰ میکرومتر)، J-H. کنیدیوم‌ها، K. هیلوم، L. جوانه‌زنی دوقطبی کنیدیوم (مقیاس = ۱۰ میکرومتر).

Figure 2. *Bipolaris maydis*; A. Conidiophores and conidia (Bar = 100 µm), B. Conidia (Bar = 100 µm), C&D. Conidia,
E. Hilum, F. Bipolar germination of conidia (Bar = 10 µm). G-L. *Bipolaris oryzae*; G. Conidiophores (Bar = 100 µm), H-J. Conidia, K. Hilum, L. Bipolar germination of conidia (Bar = 10 µm).

کنیدیوفورها معمولاً منفرد و یا گاهی در دسته‌های کوچک بوده و به رنگ قهوه‌ای تا قهوه‌ای تیره دیده شدند (شکل ۳، A). کنیدیوفورها به طول ۷۸۰-۳۰۰ (اغلب ۷۰۰-۵۰۰) میکرومتر و عرض ۸-۵ میکرومتر می‌باشند. کنیدیوم‌ها اندکی خمیده، دوکی تا استوانه‌ای شکل بوده و به رنگ قهوه‌ای روشن تا طلایی دیده می‌شوند (شکل ۳، B). کنیدیوم‌ها دارای ۸-۵ دیواره عرضی کاذب بوده و ابعاد آن‌ها ۱۷-۱۲ × ۹۵-۵۵ میکرومتر اندازه‌گیری شد. در این گونه کنیدیوفورهای ثانویه به وضوح تشکیل می‌شوند (شکل ۳، C). گونه *B. sorghicola* به عنوان مهم‌ترین عامل بیماری لکه‌برگی ذرت خوشه‌ای یا سورگوم مطرح می‌باشد. علایم اولیه بیماری به صورت لکه‌های قرمز متمایل به قهوه‌ای بوده که بعداً این

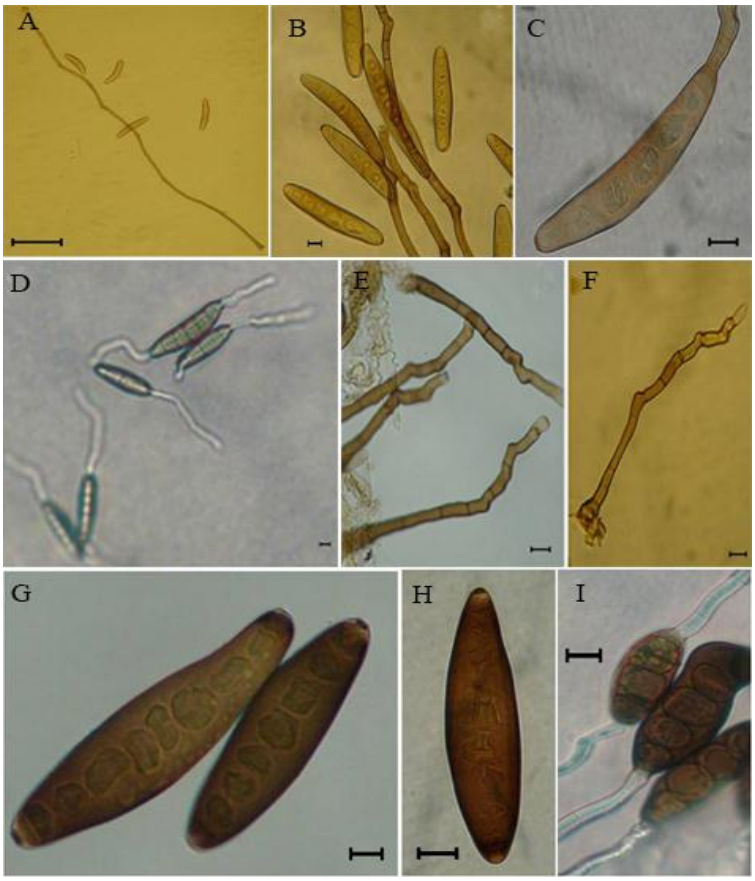
www.SID.ir

Archive of SID

لکه‌ها به صورت رگه‌ای در می‌آیند (Ellis, 1971). این گونه در ایران روی برنج، ذرت خوشه‌ای (*Sorghum bicolor*) و قیاق (*Sorghum haelpense*) گزارش شده است (Ershad, 2009; Abbasi & Aliabadi, 2009; Ahmadpour *et al.*, 2011).

Bipolaris sorokiniana (sacc) Shoemaker, Can. J. Bot. 37: 884 (1959)
Teleomorph: *Cochliobolus sativus* (Ito & Kurib.) Drechsler ex Dastur, Ind. J. Agric. Sci. 12: 733 (1942). (Fig. 3E-I)

نمونه‌های بررسی شده: استان اردبیل، پارس آباد، *Zea mays*، شهریور ۱۳۹۰، جدایه ZP5 (ABRIICC 10188)؛ استان گلستان، گرگان، *Sorghum bicolor*، مرداد ۱۳۹۰، جدایه SG4؛ جمع‌آوری کننده سعدی کرمی. پرگنه قارچ روی محیط کشت PDA به رنگ قهوه‌ای تیره می‌باشد. کنیدیوفورها منفرد و یا در دسته‌های کوچک و زانویی بوده و به رنگ قهوه‌ای روشن دیده می‌شوند (شکل 3، E و F). کنیدیوفورها با ابعاد ۸-۵ × ۱۵۰-۹۵ میکرومتر اندازه‌گیری شدند. کنیدیوم‌ها اغلب راست و یا گاهی اندکی خمیده بوده و دوکی شکل تا بیضوی و رنگ قهوه‌ای تیره دیده می‌شوند (شکل 3، G و H). کنیدیوم‌ها دارای ۹-۵ دیواره عرضی کاذب بوده و ابعاد آن‌ها ۲۸-۱۸ × ۱۱۰-۵۵ میکرومتر می‌باشند. گونه *B. sorokiniana* دارای دامنه میزبانی وسیعی بوده و گزارش‌هایی حاکی از جداسازی این گونه از گیاهان دو لپه‌ای نیز وجود دارد (Abbasi & Aliabadi, 2009).



شکل ۳. A-D. گونه *Bipolaris sorghicola*؛ A. کنیدیوفور و کنیدیوم‌ها (مقیاس = ۱۰۰ میکرومتر)، B. کنیدیوم‌ها، C. تشکیل کنیدیوفور ثانویه، D. جوانه‌زنی دوقطبی و تک قطبی کنیدیوم‌ها (مقیاس = ۱۰ میکرومتر). E-I. گونه *Bipolaris sorokiniana*؛ E&F. کنیدیوفورها، G&H. کنیدیوم‌ها، I. جوانه‌زنی دوقطبی و تک قطبی کنیدیوم‌ها (مقیاس = ۱۰ میکرومتر).

Figure 3. *Bipolaris sorghicola*: A. Conidiophores and conidia (Bar = 100 µm), B. Conidia, C. Secondary conidiophores formation, D. Bipolar and monopolar germination of conidia (Bar = 10 µm). E-I. *Bipolaris sorokiniana*; E&F. Conidiophores, G&H. Conidia, I. Bipolar and monopolar germination of conidia (Bar = 10 µm).

www.SID.ir

Archive of SID

این گونه عامل پوسیدگی ریشه و طوقه گندم می‌باشد که خسارت زیادی را به این محصول وارد می‌کند و اغلب گزارشات نیز در ایران از این محصول می‌باشد (Ershad, 2009; Abbasi & Aliabadi, 2009). گونه *B. sorokiniana* به عنوان عامل سوختگی برگ، پژمردگی گیاهچه، پوسیدگی طوقه، آلودگی میانگره‌ها، سوختگی سنبله و نقطه سیاه دانه گندم معرفی می‌شود (Duveiller & Gilchrist, 1994). این گونه برای اولین بار در ایران از میزبان ذرت گزارش می‌شود.

Curvularia ellisii (Danquah) Alcorn, Trans. Br. mycol. Soc. 81(1): 174 (1983)
Teleomorph: *Cochliobolus ellisii* Alcorn, Trans. Br. mycol. Soc. 81(1): 172 (1983). (Fig. 4A-C)

نمونه بررسی شده: استان گلستان، گرگان، اینچه‌برون، *Zea mays*، مرداد ۱۳۹۰، جدایه ZG9 (ABRIICC 10189)؛ جمع‌آوری کننده سعدی کرمی.

پرگنه قارچ روی محیط کشت PDA به رنگ قهوه‌ای تیره می‌باشد. کنیدیوفورها منفرد و یا مجتمع بوده و به رنگ قهوه‌ای تیره با قاعده متورم دیده می‌شوند (شکل۴، A). کنیدیوفورها با ابعاد ۸-۵ × ۴۵۰-۱۱۵ میکرومتر اندازه‌گیری شدند. کنیدیوم‌ها راست و یا خمیده، بیضوی تا گلابی شکل (pyriform)، قایقی شکل (navicular) و به ندرت چماقی بوده و به رنگ قهوه‌ای تا قهوه‌ای تیره دیده می‌شوند (شکل ۴، B). کنیدیوم‌ها دارای ۳ یا به ندرت ۲ دیواره عرضی کاذب بوده و ابعاد آن‌ها ۱۵-۱۰ × ۳۸-۱۲ میکرومتر اندازه‌گیری شد. گونه *C. ellisii* به عنوان ساپروفیت از روی *Crotalaria pseudospartium* در کنیا (Caretta *et al.*, 1999)، *Dactyloctenium aegyptium* در استرالیا (Sivanesan, 1987)، *Pinus khasya* از تایلند (Manamgoda *et al.*, 2011; Tokumasu *et al.*, 1990) و روی ذرت از ایران (Ahmadpour *et al.*, 2013) گزارش شده است.

Curvularia hawaiiensis (Bugnic. ex M.B. Ellis) Manamgoda, L. Cai & K. D. Hyde 2012, Fungal Diversity 56: 141(2012). (Fig. 4D-F)

نمونه‌های بررسی شده: استان اردبیل، پارس آباد، *Sorghum bicolor*، شهریور ۱۳۹۰، جدایه SP1 (ABRIICC 10190)؛ جمع‌آوری کننده سعدی کرمی.

پرگنه قارچ روی محیط کشت PDA به رنگ زیتونی می‌باشد. کنیدیوفورها منفرد به رنگ قهوه‌ای تا قهوه‌ای تیره دیده شدند (شکل ۴، D و E). ابعاد کنیدیوفورها ۷-۵ × ۱۷۰-۵۰ میکرومتر اندازه‌گیری شد. کنیدیوم‌ها راست و بیضوی تا استوانه‌ای شکل بوده و به رنگ قهوه‌ای تا قهوه‌ای تیره دیده می‌شوند (شکل ۴، F). کنیدیوم‌ها دارای ۶-۳ (اغلب ۵) دیواره عرضی کاذب بوده و ابعاد آن‌ها ۱۰-۶ × ۳۸-۱۹ میکرومتر بود. گونه *C. hawaiiensis* از گیاهان مختلف، خاک، منسوجات و غیره از اغلب کشورها جداسازی شده است و به عنوان عامل لکه برگی چمن و گندم معرفی شده است (Mirabolfathi & Ershad, 2006; Ellis 1971). این گونه قبلاً از روی چمن، گندم، قیاق، برنج، *Festuca rubra*، *Poa pratensis* و *Agrostis tenuis*از ایران گزارش شده است (Ershad, 2009; Nazari *et al.*, 2011; Ahmadpour *et al.*, 2011). این گونه به عنوان عامل سوختگی برگ و لکه‌برگی در برخی میزبان‌ها معرفی شده است (Subramanyam, 1990). اهمیت این گونه بیشتر به خاطر بیماری‌زایی در انسان است. این گونه به همراه دو گونه *C. australiensis* و *C. spicifera* به عنوان بیمارگر فرصت‌طلب انسانی شناسایی شده‌اند (Emami & Hack, 2002). این گونه در ایران از روی *Sorghum halepense* گزارش شده است (Ahmadpour *et al.*, 2011).

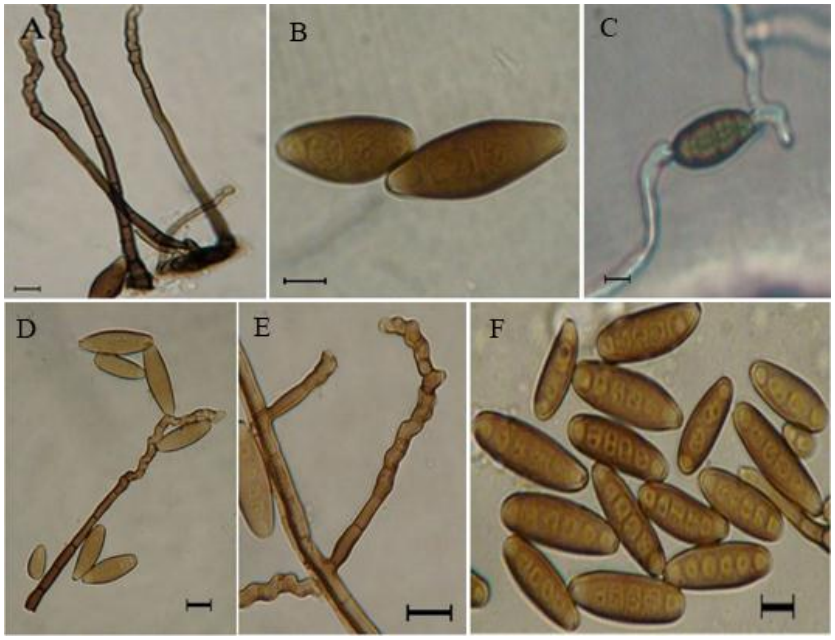
Curvularia papendorfii Alcorn, Mycotaxon 17: 68(1983). (Fig. 5A-D)

نمونه بررسی شده: استان خوزستان، اهواز، کشت و صنعت دعبل خزاعی، *Sacharum officinarum*، مهر ۱۳۹۰، جدایه‌های NKh10 (ABRIICC 10191) و NKh18 (ABRIICC 10192)؛ جمع‌آوری کننده سعدی کرمی. پرگنه قارچ در محیط کشت PDA به رنگ قهوه‌ای می‌باشد. کنیدیوفورها منفرد و زانویی بوده و به رنگ قهوه‌ای روشن دیده می‌شوند (شکل ۵،

www.SID.ir

Archive of SID

A و B). کنیدیوفورها با طول ۱۰۰-۷۵ میکرومتر و عرض ۸-۵ میکرومتر اندازه‌گیری شد. در جایگاه کنیدیومزایی زخم‌های تیره قابل مشاهده است. کنیدیوم‌ها به طور واضح خمیده و گلابی شکل معکوس بوده و به رنگ قهوه‌ای تیره دیده می‌شوند (شکل ۵، C). کنیدیوم‌ها دارای ۴-۳ دیواره عرضی کاذب بوده و ابعاد آن‌ها ۲۲-۱۲ × ۴۲-۲۵ میکرومتر اندازه‌گیری شد. گونه *C. papendorfii* روی گونه‌های مختلف .*Pennisetum* spp در هند (Sivanesan, 1987)، نیشکر از ایران (Ahmadpour *et al.*, 2012a) و چند میزبان گیاهی دیگرگزارش شده است.



شکل ۴. A-C. گونه *Curvularia ellisii*؛ A. کنیدیوفورها، B. کنیدیوم‌ها، C. جوانه‌زنی دوقطبی کنیدیوم (مقیاس = ۱۰ میکرومتر). D-F. گونه *Curvularia hawaiiensis*؛ D&E. کنیدیوفور، F. کنیدیوم‌ها (مقیاس = ۱۰ میکرومتر).

Fig. 4. *Curvularia ellisii*; A. Conidiophores, B. Conidia, C. Bipolar germination of conidia (Bar = 10 µm). D&F. *Curvularia hawaiiensis*; D&E. Conidiophore, F. Conidia (Bar = 10 µm).

Curvularia spicifera (Bainier) Subram., Hyphomycetes (New Delhi): 756 (1971)
Teleomorph: *Cochliobolus spicifer* R.R. Nelson, Mycologia 56: 198 (1964). (Fig. 5E-H)

نمونه‌های بررسی شده: استان اردبیل، پارس آباد، حاجی آباد، *Sorghum bicolor*، شهریور ۱۳۹۰، جدایه SP2 (ABRIICC 10193)؛ استان اردبیل، پارس آباد، تپراق کندی، *Zea mays*، شهریور ۱۳۹۰، جدایه ZP1 (ABRIICC 10194)؛ استان خوزستان، اهواز، کشت و صنعت دعبل خزاعی، *Sacharum officinarum*، مهر ۱۳۹۰، جدایه NKh3؛ جمع‌آوری کننده سعدی کرمی.

پرگنه قارچ روی محیط کشت PDA به رنگ زیتونی می‌باشد. کنیدیوفورها منفرد و یا گاهی در دسته‌های کوچک بوده و به رنگ قهوه‌ای تا قهوه‌ای تیره دیده می‌شوند (شکل ۵، E و F). ابعاد کنیدیوفورها ۶-۴ × ۳۱۰-۱۵۰ میکرومتر اندازه‌گیری شد. کنیدیوم‌ها راست و استوانه‌ای شکل بوده و به رنگ قهوه‌ای تیره دیده می‌شوند (شکل ۵، G). کنیدیوم‌ها دارای ۳ دیواره عرضی کاذب و بسیار به ندرت دارای ۲ دیواره عرضی کاذب بوده و ابعاد آن‌ها ۱۵-۱۰ × ۳۶-۲۱ میکرومتر اندازه‌گیری شد. گونه *C. spicifera* دامنه میزبانی وسیعی دارد که از ۷۷ جنس گیاهی مختلف، هوا و خاک جداسازی شده است. گونه‌ای همه جازی بوده و اغلب در کشورهای گرمسیری و نیمه‌گرمسیری از فراوانی بالایی برخوردار است (Ellis, 1971). این گونه در ایران از روی میزبان‌های زیادی از جمله *Arundo* sp.، *Typha*

www.SID.ir

Archive of SID

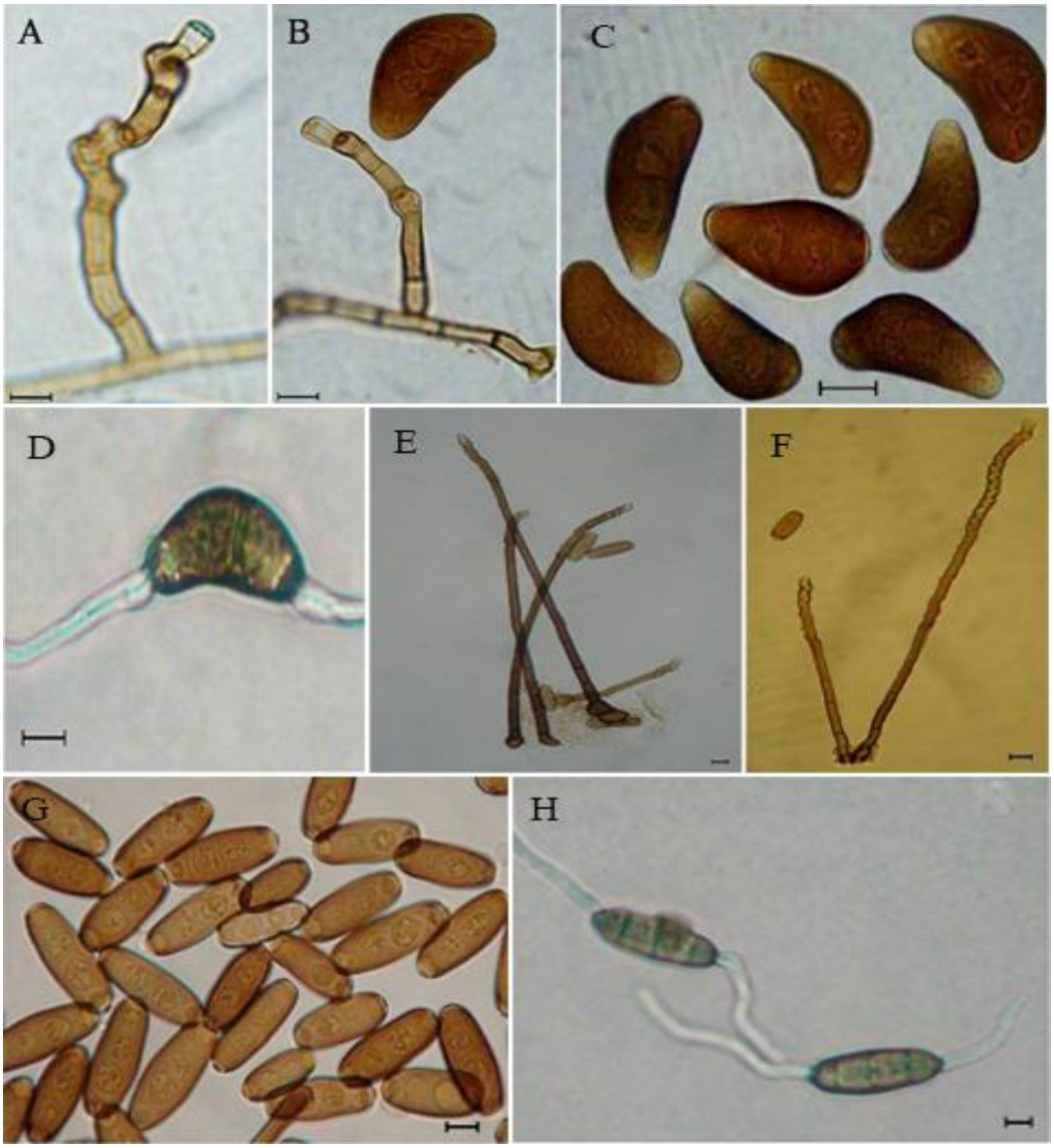
Sorghum ،*Oryza sativa* ،*Setaria* sp. ،*latifoliat* ،*bicolor* ،*S. halepense* ،*Zea mays* گزارش شده است (Ershad, 2009; Ahmadpour *et al.*, 2011, 2012b). در این مطالعه این گونه از روی میزبان *Sacharum officinarum* جداسازی و شناسایی شد.

تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی

تکثیر ناحیه ITS با استفاده از جفت آغازگرهای ITS1 و ITS4، قطعاتی بطول ۵۲۱ تا ۵۶۳ جفت باز تولید کرد. انجام همردیف سازی چندگانه ترادف‌های نوکلئوتیدی ناحیه ITS مربوط به ۱۵ گونه مورد مطالعه به همراه ترادف‌های نوکلئوتیدی ۲۲ گونه از بانک ژن NCBI (جدول ۱) منجر به ایجاد ۵۱۱ کاراکتر (نوکلئوتید + گپ‌ها) شد. از مجموع کل کاراکترهای مورد بررسی تعداد ۳۳۹ کاراکتر ثابت، ۱۶۷ کاراکتر متغیر و ۱۲۲ کاراکتر دارای اطلاعات پارسیمونی هستند. درخت‌های فیلوژنتیکی ترسیم شده با روش ML و MP دارای توپولوژی یکسانی بودند. درخت ترسیم شده به روش ML در شکل ۶ نشان داده شده است. با توجه به درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده با روش ML و MP براساس توالی ناحیه ITS-rDNA سه شاخه تکاملی اصلی *Drechslera-Pyrenophora*، *Exserohilum-Setosphaeria* و *Bipolaris/Curvularia-Cochliobolus* به ترتیب با مقدار اعتبارسنجی ۱۰۰/۱۰۰، ۹۸/۱۰۰ و ۹۹/۹۹ درصد (MP/ML) قابل تشخیص است (شکل ۶). همچنین شاخه تکاملی *Bipolaris/Curvularia-Cochliobolus* به دو زیر شاخه گروه یک و گروه دو *Cochliobolus* تقسیم می‌شود. در گروه یک *Cochliobolus* گونه‌های جنس *Bipolaris* که دارای کنیدیوم‌های خمیده، دوکی شکل و با تعداد دیواره عرضی کاذب بیش از هفت عدد قرار می‌گیرند. بیمارگرهای مهم گیاهان زراعی مانند *B. maydis*، *B. oryzae* و *B. sorokiniana* در این گروه قرار می‌گیرند. در گروه دو *Cochliobolus* گونه‌های جنس *Curvularia* با کنیدیوم‌های راست یا خمیده، کوتاه و با تعداد دیواره عرضی کاذب کمتر از هفت عدد قرار گرفتند. در سال‌های اخیر تعدادی از گونه‌های جنس *Bipolaris* با کنیدیوم اغلب راست، کوتاه و با دیواره عرضی کاذب کمتر از هفت عدد در گروه دو *Cochliobolus* کنار گونه‌های جنس *Curvularia* قرار می‌گرفتند.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۵. A-D. گونه *Curvularia papendorfii*؛ A و B. کنیدیوفور، C. کنیدیوم‌ها، D. جوانه‌زنی دوقطبی کنیدیوم (مقیاس = ۱۰ میکرومتر). E-H. گونه *Curvularia spicifera*؛ E و F. کنیدیوفور، G. کنیدیوم‌ها، H. جوانه‌زنی دو قطبی کنیدیوم‌ها (مقیاس = ۱۰ میکرومتر).

Figure 5. A-D. *Curvularia papendorfii*; A&B. Conidiophore, C. Conidia, D. Bipolar germination of conidia (Bar = 10 µm). E-H. *Curvularia spicifera*; E&F. Conidiophore, G. Conidia, H. Bipolar germination of conidia (Bar = 10 µm).

Manamgoda *et al.* (2012) طی تحقیق جامعی براساس تجزیه و تحلیل توالی چهار ناحیه ژنومی rDNA-ITS، *GPDH*، rDNA-LSU (large subunit) و *EF1-α* (translation elongation factor 1-α) روی گونه‌های مختلف کمپلکس *Bipolaris*/*Curvularia*-*Cochliobolus*، گونه‌هایی از جنس *Bipolaris* که در کنار گونه‌های جنس *Curvularia* در گروه دو *Cochliobolus* قرار می‌گرفتند را به جنس *Curvularia* با فرم جنسی *Cochliobolus* منتقل کردند و گونه‌های موجود در گروه دو *Cochliobolus* به شکل قبلی خود باقی ماندند. جدایه‌های توالی‌یابی شده از گونه‌های *B. oryzae* (با درجه اعتبارسنجی ۱۰۰/۹۹ درصد (MP/ML) و ۹۹ درصد تشابه نوکلیوتیدی با جدایه استاندارد)، *B. sorghicola* (با

www.SID.ir

Archive of SID

درجه اعتبارسنجی ۱۰۰/۱۰۰ درصد (MP/ML) و ۹۸ درصد تشابه نوکلیوتیدی با جدایه استاندارد)، *B. cynodontis* (با درجه اعتبارسنجی ۸۴/۹۵ درصد (MP/ML) و ۹۹ درصد تشابه نوکلیوتیدی با جدایه تیپ)، *B. sorokiniana* (با درجه اعتبارسنجی ۹۳/۸۹ درصد (MP/ML) و ۹۸ درصد تشابه نوکلیوتیدی با جدایه تیپ)، *B. maydis* (با درجه اعتبارسنجی ۱۰۰/۱۰۰ درصد (MP/ML) و ۹۹ درصد تشابه نوکلیوتیدی با جدایه تیپ)، *B. bicolor* (با درجه اعتبارسنجی ۹۳/۸۹ درصد (MP/ML) و ۹۸ درصد تشابه نوکلیوتیدی با جدایه تیپ) در گروه یک *Cochliobolus* قرار می‌گیرند (شکل ۶). همه گونه‌های ذکر شده دارای کنیدیوم‌های خمیده، دوکی شکل و با تعداد بیش از هفت دیواره عرضی کاذب می‌باشند.

به علاوه، جدایه‌های توالی‌یابی شده از گونه‌های *C. spicifera* (با درجه اعتبارسنجی ۹۹/۸۷ درصد (MP/ML) و ۹۹ درصد تشابه نوکلیوتیدی با جدایه استاندارد)، *C. ellisii* (با درجه اعتبارسنجی ۹۹/۱۰۰ (MP/ML) درصد و ۹۸ درصد تشابه نوکلیوتیدی با جدایه تیپ)، *C. papendorfii* (با درجه اعتبارسنجی ۱۰۰/۹۸ (MP/ML) درصد و ۹۸ درصد تشابه نوکلیوتیدی با جدایه تیپ) و *C. hawaiiensis* (با درجه اعتبارسنجی ۱۰۰/۱۰۰ (MP/ML) درصد و ۹۸ درصد تشابه نوکلیوتیدی با جدایه تیپ) در گروه دو *Cochliobolus* قرار می‌گیرند (شکل ۶). گونه‌هایی که در گروه مذکور قرار می‌گیرند دارای کنیدیوم‌های راست (به ندرت خمیده)، کوتاه و با تعداد دیواره عرضی کاذب کمتر از هفت می‌باشند. نتایج فیلوژنتیکی بدست آمده در این تحقیق با تحقیقات قبلی از نظر تعداد شاخه‌های تکاملی حاصل و نحوه توزیع گونه‌ها در شاخه‌های تکاملی کاملا هم‌سو می‌باشد. (Berbee *et al.*, 1999; Kodsued *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2003; Manamgoda *et al.*, 2011, 2012; Ahmadpour *et al.*, 2012 , 2013b).

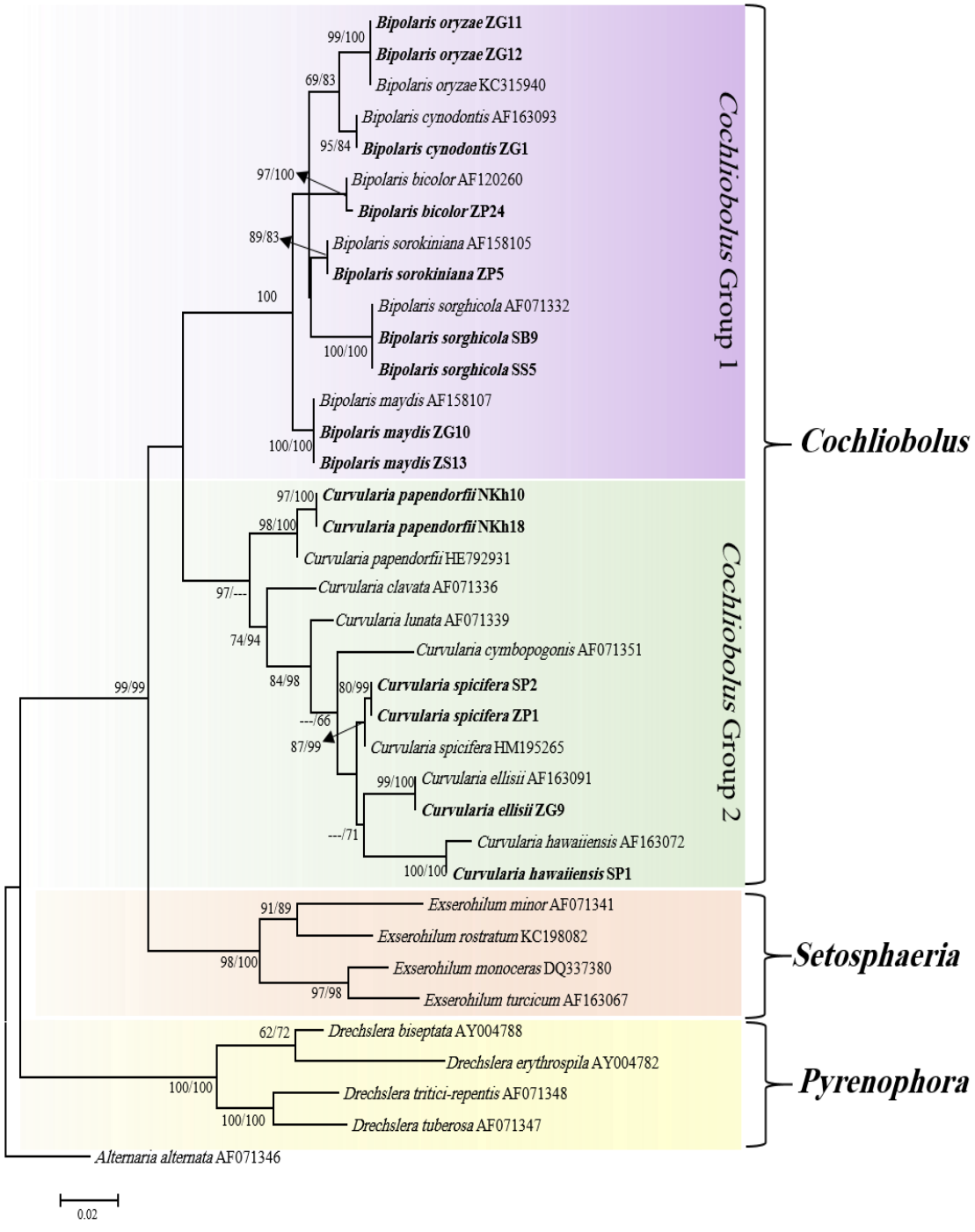
آزمون بیماری‌زایی جدایه‌ها

از میان گونه‌های *Bipolaris* و *Curvularia* که جهت انجام آزمون بیماری‌زایی روی بوته‌های نیشکر استفاده شدند، بیماری‌زایی هیچ یک روی نیشکر در مرحله چهار تا شش‌برگی اثبات نشد. از میان تمامی جدایه‌های گونه‌های شناخته شده‌ای که جهت انجام آزمون بیماری‌زایی روی بوته‌های چهار تا شش برگی ذرت استفاده شدند، سه جدایه ZGo1 (*B. oryzae*)، ZP9 (*B. sorokiniana*) و ZS13 (*B. maydis*)، روی بوته‌های تیمار شده ایجاد علایم لکه‌برگی کردند. علایم ایجاد شده روی بوته‌های ذرت به وسیله گونه *B. oryzae* چهار روز پس از مایه‌زنی ظاهر شدند. علایم به صورت لکه‌های گرد، کوچک و سفید رنگ با حاشیه تیره در سطح برگ بوته‌های تحت تیمار بودند (شکل ۷، A-C). گونه *B. oryzae* تاکنون به عنوان بیمارگر روی ذرت گزارش نشده است و این اولین گزارش از بیماریزایی این گونه روی میزبان ذرت می‌باشد. گونه *B. sorokiniana* پنج روز پس از مایه‌زنی، روی سطح برگ بوته‌های ذرت تحت تیمار سبب ایجاد لکه‌های بیضوی خاکستری با حاشیه قهوه‌ای شد (شکل ۷، D). ۱۰-۱۴ روز پس از مایه‌زنی تعدادی از لکه‌ها در امتداد رگبرگ‌ها به هم پیوسته و لکه بزرگ‌تری را ایجاد کردند (شکل ۷، E). این نخستین گزارش از بیماری‌زایی *B. sorokiniana* روی گیاه ذرت از ایران است. نخستین علایم در مورد گونه *B. maydis*، یک روز پس از مایه‌زنی ظاهر گردید. علایم اولیه به صورت لکه‌های کوچک و خاکستری رنگ در سطح برگ ظاهر شدند. پس از گذشت سه الی چهار روز لکه‌ها به صورت بیضوی و مستطیلی شکل به آسانی قابل رویت بودند. در نهایت ۱۰-۱۴ روز بعد از مایه‌زنی، برخی از لکه‌ها به هم پیوسته و ایجاد لکه‌های کشیده و باریک در امتداد رگبرگ‌های بوته‌های آلوده کردند. برخی از برگ‌ها در اثر شدت آلودگی کاملا پژمرده و خشک شدند. این گونه قبلا به عنوان عامل لکه‌برگی ذرت در استان‌های گیلان، مازندران و گلستان معرفی شده است (Mehraban *et al.*, 2000). در سال‌های اخیر در مناطق مختلف کشت ذرت کشور از ارقام ذرت مقاوم به بیماری‌ها مانند بیماری لکه‌برگی ناشی از قارچ *B. maydis* استفاده می‌شود، در نتیجه توسعه این قارچ در سال‌های اخیر بسیار محدود بوده است و در اغلب

www.SID.ir

Archive of SID

مناطق کشت ذرت در کشور معمولا این بیمارگر یافت نمی‌شود و اهمیت چندانی ندارد.

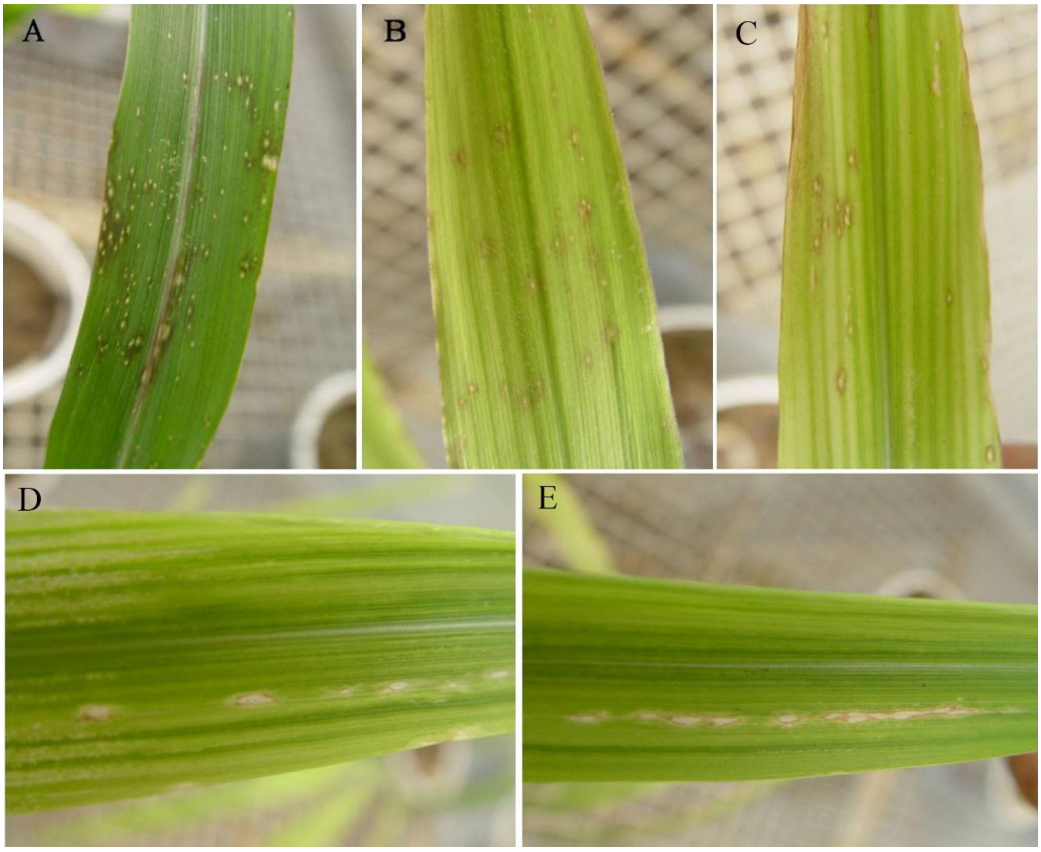


شکل ۶- درخت فیلوژنتیکی استنباط شده براساس توالی ناحیه ITS1- 5.8S- ITS2 از rDNA هسته‌ای برای ۳۷ آرایه قارچی با روش Maximum likelihood. اعداد بالای هر شاخه درجه اعتبارسنجی از ۱۰۰۰ تکرار را نشان می‌دهد (ML/MP). گونه *Alternaria alternata* به عنوان آرایه گروه خارجی انتخاب شده است.

Figure. 6. A Maximum likelihood tree inferred from the ITS1- 5.8S- ITS2 of rDNA regions sequences from 37 taxa. The number in front of represented isolates shows the bootstrap values in 1000 bootstrap replicates (ML/MP). The ITS sequence of *Alternaria alternata* was used as out group.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۷- A-C. علایم لکه‌برگی در بوته‌های ذرت آلوده به قارچ *Bipolaris oryzae* و D-E. قارچ *Bipolaris sorokiniana* در گلخانه.

Figure. 7. A-C. Leaf spot symptoms on infected corn by *Bipolaris oryzae* and D-E. *Bipolaris sorokiniana* under greenhouse conditions

از میان تمامی جدایه‌هایی که جهت انجام آزمون بیماری‌زایی روی بوته‌های چهار تا شش برگی سورگوم استفاده شدند، تنها جدایه SS5 که گونه *B. sorghicola* بود، ایجاد علایم لکه‌برگی کرده و به عنوان گونه بیماری‌زا در این مرحله از رشد گیاه معرفی می‌شود.

یک روز بعد از مایه‌زنی گونه *B. sorghicola* روی بوته‌های سورگوم، لکه‌های کوچک به صورت نقاط سرسنجاقی قرمز رنگ روی سطح برگ ظاهر شد. لکه‌ها با گذشت یک هفته بزرگ شده و به صورت لکه‌های بزرگ بیضوی و مستطیلی شکل ارغوانی تا قرمز در آمدند. برگ‌های شدیداً آلوده بعد از گذشت دو هفته پژمرده و یا خشک شدند. گونه *B. sorghicola* یکی از عوامل اصلی بیماری لکه‌برگی در گیاه سورگوم است. لکه‌های ایجاد شده توسط این گونه به اشکال مختلف نقطه‌ای تا کشیده با ابعاد ۶-۲ × ۲۰ میلی‌متر و به رنگ قرمز تا ارغوانی و گاهی قهوه‌ای دیده می‌شوند. این لکه‌ها می‌توانند گسترش یافته و موجب مرگ بافت‌های آلوده شوند. لکه‌ها اغلب بین رگبرگ‌ها محدود می‌شوند و در امتداد آن‌ها گسترش می‌یابند (Saivanesan, 1987). این گونه پراکنش وسیعی در سطح کشور دارد و معمولاً در اغلب مناطق مرطوب کشور که گیاه سورگوم کشت می‌شود، این بیمارگر نیز وجود دارد. با این حال، مطالعات کمی روی این گونه تاکنون انجام گرفته است.

REFERENCES

1. Abbasi, M. & Aliabadi, F. (2009). *The list of fungi reported in proceedings of* 12th to 18th *Iranian plant protection congress*. Elm & Honar Publication, 272 pp., Tehran.
2. Ahmadpour, A., Donyadoost-Chelan, M., Heidarian, Z. & Javan-Nikkhah, M. (2011). New species of *Bipolaris* and *Curvularia* on grass species in Iran. *Rostaniha* 12, 39–49.

www.SID.ir

Archive of SID

3. Ahmadpour, A., Heidarian, Z., Karami, S., Tsukiboshi, T., Zhang, M. & Javan-Nikkhah, M. (2012a). New species of *Bipolaris* and *Curvularia* on grass species in Iran. *Rostaniha*, 13(1), 69-82.
4. Ahmadpour, A., Javan-Nikkhah, M., Naghavi, M. R., & Dehkaei, F. P. (2014). Morphological and phylogenetic investigation of *Bipolaris oryzae* and some species of *Bipolaris* obtained from rice and grass weeds. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 50(2).
5. Ahmadpour, A., Heidarian, Z., Donyadoost-Chelan, M., Javan-Nikkhah, M., & Tsukiboshi, T. (2012b). A new species of *Bipolaris* from Iran. *Mycotaxon*, 120(1), 301-307.
6. Ahmadpour, A., Karami, S., Heidarian, Z., & Javan-Nikkhah, M. (2013a). *Exserohilum rostratum* causing sugarcane leaf spot in Iran. *Australasian Plant Disease* Notes, 8(1), 97-99.
7. Ahmadpour, A., Heidarian, Z., Karami, S., Pordel, A., Jabbarifar, S. M., Tsukiboshi, T., , T., Zhang, M. & Javan-Nikkhah, M. (2013b). New species of Bipolaris and Curvularia on poaceous plants in Iran (3). Rostaniha, 14(2), 216-228.
8. Alcorn, J. L. (1990). Additions to Bipolaris, *Cochliobolus* and *Curvularia*. *Mycotaxon*, 39, 361-392.
9. Alcorn, J. L. (1983). Generic concepts in Drechslera, *Bipolaris* and *Exserohilum*. *Mycotaxon*, 17, 1-86.
10. Alcorn, J. L. (1982). New *Cochliobolus* and *Bipolaris* species [Fungi]. *Mycotaxon*, 15, 1-19.
11. Alcorn, J. L. (1991). New combinations and synonymy in *Bipolaris* and *Curvularia*, and a new species of *Exserohilum*. *Mycotaxon*, *41*(2), 329-343.
12. Alcorn, J. L. (1988). The taxonomy of ‘‘*Helminthosporium*’’ species. *Annual Review of Phytopathology*, 26, 37–56.
13. Berbee, M. L., Pirseyedi, M. & Hubbard, S. (1999). *Cochliobolus* phylogenetics and the origin of known highly virulent pathogens Inferred from ITS and glyceraldehydes-3-dehydrogenase gene sequence. *Mycologia*, 91, 964-977.
14. Caretta, G., Piontelli, E., Picco, A.M. & Del Frate, G. (1999). Some filamentous fungi on grassland vegetation from Kenya. *Mycopathologia*, 145(3), 155–169.
15. Duveiller, E. & Gilchrist, L. I. (1994). Production constraints due to *Bipolaris sorokiniana* in wheat: current situation and future prospects. In: Saunders D & Hettel G (ed) Wheat in heat-stressed environments: irrigated, dry areas and rice-wheat farming systems. Proceedings of the CIMMYT/UNDP workshop, Nashipur (Dinajpur), Bangladesh, February, 52–343.
16. Ellis, M. B. (1971). *Dematiaceous hyphomycetes*. *CMI*, Kew, England, pp. 608.
17. Emami, K., & Hack, E. (2002). Conservation of XYN11A and XYN11B xylanase genes in *Bipolaris sorghicola*, *Cochliobolus sativus*, *Cochliobolus heterostrophus*, and *Cochliobolus spicifer*. *Current microbiology*, 45(4), 303-306.
18. Ershad, D. (2009). *Fungi of Iran*. 3nd ed. *Agricultural Research. Education & Extention Organization*, Publication. No. 10, Tehran, 531 pp.
19. Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39, 783-791.
20. Goh, T. K., Hyde, K. D. & Lee, D. K. (1998). Generic distinction in the *Helminthosporium*-complex based on restriction analysis of the nuclear ribosomal RNA gene. *Fungal Diversity*, 1, 85–107.
21. Hooker, A. L., Smith, D. R., Lim, S. M., & Beckett, J. B. (1970). Reaction of corn seedlings with male-sterile cytoplasm to *Helminthosporium maydis*. *Plant Disease Reporter*, 54, 708-12.
22. Klittich, C. J. R. & Bronson, C. R. (1986). Reduced fitness associated with TOX1 of *Cochliobolus heterostrophus*. *Phytopathology*, 76(12), 1294-1298.
23. Kodsueb, R., McKenzie, E. H. C., Lumyong, S. & Hyde, K. D. (2008). Diversity of saprobic fungi on *Magnoliaceae*. *Fungal Diversity*, 30(1), 37-53.
24. Louis, B., Waikhom, S. D., Roy, P., Bhardwaj, P. K., Sharma, C. K., Singh, M. W., & Talukdar, N. C. (2014). Host-range dynamics of *Cochliobolus lunatus*: from a biocontrol agent to a severe environmental threat. *BioMed research international*, 2014.
25. Manamgoda, D. S., Cai, L., Bahkali, A. H., Chukeatirote, E. & Hyde, K. D. (2011). *Cochliobolus*: an overview and current status of species. *Fungal Diversity*, 51(1), 3-42.
26. Manamgoda, D. S., Cai, L., McKenzie, E. H., Crous, P. W., Madrid, H., Chukeatirote, E., ... & Hyde, K. D. (2012). A phylogenetic and taxonomic re-evaluation of the *Bipolaris-Cochliobolus-Curvularia* complex. Fungal Diversity, 56(1), 131-144.
27. Mehraban, F., Zad, S. J., Hedjaroude, G. H. A. & Sharifi-Tehrani, A. (2000). Investigation on corn leaf blights in Golestan, Mazandaran and Guilan. Iranian. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 36, 99–111.
28. Mirabolfathi, M. & Ershad, D. (2006). *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera* and *Exserohilum* diseases of turfgrass in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 42(2).

www.SID.ir

Archive of SID

29. Nanayakkara, U. N., Uddin, W. & Datnoff, L. E. (2008). Effects of soil type, source of silicon, and rate of silicon source on development of gray leaf spot of perennial ryegrass turf. *Plant disease*, 92(6), 870-877.
30. Nazari S., Javan-Nikkhah M., Fotouhifar K.H. & Khosravi V. (2011). Occurrence of *Bipolaris hawaiiensis* associated with rice grain in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 47(4), 159.
31. Nelson, R. R. (1964). The perfect stage of *Helminthosporium cynodontis*. *Mycologia*, 56(1), 64-69.
32. Olivier, C., Berbee, M. L., Shoemaker, R. A., & Loria, R. (2000). Molecular phylogenetic support from ribosomal DNA sequences for origin of *Helminthosporium* from *Leptosphaeria*-like *loculoascomycete* ancestors. *Mycologia*, 736-746.
33. Scheffer, R. P. (1977). *The nature of disease in plants*. *Cambridge University Press*, New York.
34. Sivanesan, A. (1987). Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs. *Mycological Papers*, 158, 1–261.
35. Subramanyam, K., Hegde, R. K., Srikant, K. & Nargund, V. B. (1990). Effect of leaf blight infection caused by *Drechslera hawaiiensis* Subram. and Jain ex. MB Ellis on biochemical constituents of wheat varieties. *Current Research-University of Agricultural Sciences* (Bangalore), 19(11), 188-189.
36. Sun, G., Oide, S., Tanaka, E., Shimizu, K., Tanaka, C. & Tsuda, M. (2003). Species separation in *Curvularia* "geniculata" group inferred from Brn1 gene sequences. *Mycoscience*, 44(3), 239-244.
37. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, 30(12), 2725-2729.
38. Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D. G. (1997). The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25, 4876–4882.
39. Tokumasu, S., Tubaki, K. & Manoch, L. (1990). A preliminary list of hyphomycetes isolated from pine leaf litter of Thailand. *Report of the Tottori Mycological Institute*, 28, 185–190.
40. White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T. & Taylor, J. L. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods and applications, 18(1), 315-322.
41. Yun, S. H., Berbee, M. L., Yoder, O. C., & Turgeon, B. G. (1999). Evolution of the fungal self-fertile reproductive life style from self-sterile ancestors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(10), 5592-5597.
42. Zhang, G. & Berbee, M. L. (2001). *Pyrenophora* phylogenetics inferred from ITS and glyceradehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences, 93(6), 1048–1063.
43. Zhang, S. & Steffenson, B. J. (2002). Virulence and molecular diversity in *Cochliobolus sativus*. *Phytopathology*, 91(5), 469–476.

www.SID.ir