



مقاله پژوهشی

شناسایی و آزمون بیماری‌زایی برخی قارچ‌های هیفومیست همراه با لکه برگ گیاه یونجه در استان آذربایجان غربی

محمد رضا خیری قلعه^۱، مونس بخشی^{۲*}، سید علی موسوی جرف^۱ و رسول زارع^۲

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۲۱؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۵/۲۷)

چکیده

یونجه یکی از محصولات مهم زراعی و مهم‌ترین محصول علوفه‌ای در کشور است و در تأمین علوفه جهت تغذیه دام نقش مهمی ایفا می‌نماید. قارچ‌های هیفومیست بخشی از عوامل همراه با بیماری لکه برگ گیاه یونجه محسوب می‌شوند. در این تحقیق با توجه به اهمیت کشت گیاه یونجه در استان آذربایجان غربی، در آبان ماه سال ۱۳۹۹ طی بررسی‌هایی از مزارع مختلف مناطق جنوبی استان آذربایجان غربی شامل شهرستان‌های میاندوآب، مهاباد و نقده، از گیاهان یونجه دارای علائم لکه برگ، نمونه‌هایی تهیه گردید. پس از بررسی نمونه‌ها و تهیه کشت‌های تک اسپور به صورت مستقیم از عوامل قارچی روی لکه‌های برگ، تعداد ۶۶ جدایه قارچی از جنس‌های مختلف به دست آمد. بعد از کشت تمامی قارچ‌های جداسازی شده روی محیط کشت‌های استاندارد و طبقه‌بندی آن‌ها بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی با استفاده از منابع معتبر، بررسی مولکولی جدایه‌های نماینده با توجه به جنس قارچی، بر اساس ناحیه ITS ریبوزومی و یا بخشی از ناحیه ژنومی *gapdh* انجام شد. بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی و مولکولی، هشت گونه متعلق به پنج جنس از قارچ‌های هیفومیست شامل *Alternaria sp.* (section *Alternaria*) *Alternaria kordkuyana* *Alternaria atra* *Albifimbria verrucaria* شناسایی شدند. بر اساس نتایج آزمون بیماری‌زایی در شرایط گلخانه، بیماری‌زایی گونه‌های *C. zebrina* *A. kordkuyana* *Alb. verrucaria* *S. vesicarium* و *S. botryosum* تأیید شد. بر اساس منابع موجود، از بین گونه‌های شناسایی شده، گونه‌های *A. atra* *A. kordkuyana* و *Cu. inaequalis* برای اولین بار از روی گیاه یونجه در جهان گزارش می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: هیفومیست، لکه برگ، یونجه، شناسایی مولکولی، آزمون بیماری‌زایی

* بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول ارائه شده به دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس

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

۱ گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

۲ موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.



DOI: 10.22034/ijpp.2023.2004424.412

Research Article

Identification and pathogenicity test of some hyphomycetous fungi associated with alfalfa leaf spot disease in West Azerbaijan province

Mohammadreza Kheiri Ghaleh¹, Mounes Bakhshi^{2**}, Seyed Ali Moosawi Jorf¹, Rasoul Zare²

(Received: 31.05.2023; Accepted: 25.09.2023)

Abstract

Alfalfa is an important agricultural crop and the most important forage crop in Iran, playing a crucial role in providing feed for livestock. hyphomycetous fungi are considered as part of the factors associated with the leaf spot disease of alfalfa. In this study, according to the importance of alfalfa cultivation in West Azerbaijan province, in November 2020, samples of alfalfa plants with leaf spot symptoms were collected from various farms in the southern regions of this province, including Miandoab, Mahabad and Naghadeh. After direct examination and single-spore isolations from the leaf spots, 66 fungal isolates from different fungal genera were obtained. After growing the isolated fungi on standard culture media and primary morphological identification, molecular analysis of representative isolates was performed using the ITS ribosomal region and or parts of the *gapdh* gene. Based on morphological and molecular characteristics, eight species belonging to five genera of hyphomycetes including *Albifimbria verrucaria*, *Alternaria atra*, *Alternaria kordkuyana*, *Alternaria* sp. (section *Alternaria*), *Cercospora zebrina*, *Curvularia inaequalis*, *Stemphylium botryosum* and *Stemphylium vesicarium* were identified. Following pathogenicity test under greenhouse condition, the pathogenicity of *Alb. verrucaria*, *A. kordkuyana*, *C. zebrina*, *S. botryosum* and *S. vesicarium* species was confirmed. Among the identified species, *A. atra*, *A. kordkuyana* and *Cu. inaequalis* are first world records on alfalfa.

Keywords: Alfalfa, Hyphomycetes, Leaf spot, Molecular identification, Pathogenicity test

*A part of MSc. thesis of the first author submitted to Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

** Corresponding author's E-mail: mounesbakhshi@gmail.com

1 Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2 Department of Botany, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

مقدمه

مرتبط با یونجه را در استان زنجان مورد بررسی قرار دادند. بر اساس نتایج بدست آمده قارچ‌هایی که باعث ایجاد لکه برگی در یونجه می‌شوند، شامل *Cercospora medicaginis* Ellis & Everh.، *Colletotrichum* spp.، *Peronospora Leptosphaerulina trifolii* Petr.، *Phoma medicaginis Malbr. & trifoliorum* de Bary، *Pseudopeziza medicaginis* Sacc.، Roum.، *Uromyces striatus* J. و *Stemphylium botryosum* Schröt. بودند. آن‌ها اثر هر یک از عوامل محیطی در گسترش بیماری‌های قارچی را نیز در منطقه زنجان مورد بررسی قرار دادند و نتایج آن‌ها نشان داد سه گونه *P. medicaginis trifoliorum*، *Ps. medicaginis trifoliorum* و *U. striatus* دارای بیشترین فراوانی بودند و دریافتند که دمای بالا همراه با رطوبت پایین باعث کاهش بیماری ناشی از این عوامل در یونجه می‌شود. همچنین طبق بررسی قارچ‌ها و شبه قارچ‌های بیماری‌زای اندام‌های هوایی یونجه در استان همدان توسط پرهیزی و همکاران (Parhizi et al. 2017)، گونه‌های *Bipolaris sorokiniana*، *Botrytis cinerea* Pers.، *Colletotrichum gloeosporioides* (Sacc.) Shoemaker، *Colletotrichum trifolii* Bain، Penz. & Sacc.، *Chaetopyrena penicillata*، *Epicoccum nigrum* Link، *Cladosporium cladosporioides* (Fuckel) Höhn. و *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc.، G.A. de Vries برای اولین بار از ایران و گونه‌های *Alternaria dumosa* E.G. Simmons، *Arthrinium*، *Alternaria infectoria* E.G. Simmons، *Bipolaris spicifera*، *phaeospermum* M.B. Ellis، *Ulocladium* و *Ulocladium atrum* Preuss، Subram. برای اولین بار در دنیا از روی این میزبان، گزارش شدند. اولین گزارش لکه برگی ناشی از *Chaetopyrena penicillata* (Fuckel) Höhn. روی یونجه در ایران توسط پرهیزی و همکاران (Parhizi et al. 2017)

گیاه یونجه (*Medicago sativa* L.) از تیره *Fabaceae* منبع غنی از پروتئین، کلسیم، انواع ویتامین‌ها (A و C) می‌باشد و همچنین به دلیل تولید برخی از متابولیت‌های ثانویه نظیر ساپونین با آگلیکن تری ترپنوئید، خوش‌خوراک بودن و درصد سلولز کم در زمره مهم‌ترین گیاهان علوفه‌ای قرار گرفته است (Mazahery-Laghab 2008). این گیاه در تغذیه دام‌ها نقش اصلی را دارد و همچنین سهم مهمی در تأمین نیاز علوفه کشور ایفا می‌نماید (Mobtaker et al. 2010). اصلاح زمین زراعی از راه تهویه زمین، تناوب، زهکشی و افزایش مواد آلی و ازت خاک از جمله دیگر ویژگی‌های بارز گیاه یونجه محسوب می‌شوند (Mazahery-Laghab 2008, Mobtaker et al. 2010).

عوامل قارچی زیادی هستند که باعث بیماری در گیاه یونجه می‌شوند، ولی با توجه به نوع بیمارگر که مکانیسم خاصی برای ایجاد بیماری دارد، می‌توان به مهم‌ترین عوامل شامل زنگ‌ها، سفیدک‌های پودری و دروغی، لکه‌های برگی، آنتراکنوز اشاره نمود (Samac et al. 2016). تاکنون گزارش‌های مختلفی در جهان از عوامل قارچی هیفومیست که باعث ایجاد لکه برگی در گیاه یونجه می‌شوند، صورت گرفته است که در جنس‌های مختلفی از جمله *Stemphylium*، *Bipolaris*، *Alternaria*، *Acremonium*، *Cladosporium*، *Cercospora* و ... قرار دارند (Mobtaker et al. 2010, Samac et al. 2016, de Ávila et al. 2015, Han et al. 2019, Díaz-Valderrama et al. 2020). براساس مطالعات صورت گرفته، هیفومیست‌های بیمارگر باعث کاهش پروتئین و کربوهیدرات در گیاه یونجه می‌شوند و بین پنج تا ۴۴ درصد خسارت ایجاد می‌کنند که از لحاظ اقتصادی دارای اهمیت می‌باشد (Mazahery-Laghab 2008). طبق مطالعات صورت گرفته در ایران، ناصری و معرفت (Naseri & Marefat 2008) فراوانی قارچ‌های

به چاپ رسید.

شوند. سپس تشتک پتری به حالت مورب به مدت یک شب نگهداری شد. پس از سپری شدن ۲۴ ساعت، آب اضافی تشتک‌های پتری خالی شده و در زیر بینوکولر بررسی شد و کنیدیوم‌های جوانه زده به تشتک‌های حاوی محیط کشت MEA جدید انتقال یافته و در دمای 25°C در تاریکی نگهداری شدند.

بررسی ویژگی‌های ریخت‌شناختی

برای این منظور جدایه‌های قارچی روی محیط‌های کشت MEA و سیب‌زمینی، هویج، آگار (PCA) در اتاقک رشد با دمای 25°C در شرایط نوری متفاوت بسته به جنس قارچی نگهداری و میزان رشد و خصوصیات ماکروسکوپی جدایه‌ها شامل رنگ، شکل و دیگر خصوصیات پرگنه پس از یک هفته تا یک ماه ثبت شدند. اسلایدها با استفاده از تکنیک اسلاید کالچر (Nugent *et al.* 2006) و نوارچسب (Bensch *et al.* 2012) تهیه و با استفاده از میکروسکوپ نوری مدل Olympus BX 51 بررسی شدند. اندازه ساختارهای قارچی شامل عرض ریشه و طول و عرض کنیدیوم‌بر، یاخته‌های کنیدیوم‌زا، کنیدیوم‌ها در بزرگنمایی $1000\times$ ثبت شد. برای هر ساختار ۳۰ نمونه اندازه‌گیری شد. تصاویر میکروسکوپی با استفاده از دوربین Olympus DP25 متصل به میکروسکوپ Olympus BX 51 در آزمایشگاه قارچ‌شناسی موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور تهیه شدند. تصاویر تهیه‌شده با استفاده از نرم‌افزار فتوشاپ نسخه CS20 ویرایش و فتوپلیت‌ها تهیه شدند.

استخراج DNA، تکثیر و توالی‌یابی

برای شناسایی مولکولی، جدایه‌های نماینده خالص‌شده، پس از کشت روی محیط کشت MEA، به مدت ۱۰-۸ روز در اتاقک رشد با دمای 25°C در تاریکی نگهداری شدند و DNA جدایه‌ها طبق روش مولر و همکاران (Möller *et al.* 1992) استخراج شد. بسته به جنس قارچی،

با توجه به وجود عوامل بیماری‌زای ذکرشده و سطح زیر کشت بالای یونجه و وجود دام زیاد در کشور، شناسایی دقیق عوامل بیماری‌زای یونجه جهت کاهش خسارت و مدیریت بیماری، امری مهم می‌باشد. با توجه به اینکه استان آذربایجان غربی یکی از قطب‌های مهم یونجه‌کاری در کشور به حساب می‌آید، این تحقیق با هدف شناسایی ریخت‌شناسی و مولکولی قارچ‌های هیفومیست همراه با لکه برگ‌ی یونجه در این استان و همچنین بررسی بیماری‌زایی جدایه‌های نماینده بر روی گیاه یونجه در شرایط گلخانه انجام شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه، جداسازی و خالص‌سازی قارچ‌ها

نمونه‌برداری از مزارعی که دارای علائم لکه برگ‌ی در برگ‌های گیاهان یونجه بودند، در فصل پاییز ۱۳۹۹ در استان آذربایجان غربی شامل شهرستان‌های میاندوآب، مهاباد و نقده انجام شد. نمونه‌های گیاهی پس از قرار گرفتن درون پاکت‌های کاغذی همراه با مشخصات محل نمونه‌برداری و تاریخ آن‌ها، به آزمایشگاه قارچ‌شناسی موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، بخش تحقیقات رستنی‌ها انتقال داده شدند. لکه‌های برگ‌ی با استفاده از بینوکولر مورد بررسی قرار گرفتند و پس از مشاهده دستجات کنیدیوم و کنیدیوم‌بر قارچ‌ها، کشت‌های تک اسپور مطابق روش بخشی و همکاران (Bakhshi *et al.* 2021) تهیه شدند. تشتک پتری حاوی محیط کشت عصاره مالت آگار (MEA; Fluka, Hamburg, Germany) به صورت 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 اضافه‌شده به تشتک پتری قرار گرفت و کاملاً به هم زده شد تا کنیدیوم‌ها آزاد شده و پخش

ترسیم شد.

آزمون بیماری‌زایی

در این پژوهش آزمون بیماری‌زایی برای هشت جدایه منتخب از جدایه‌های توالی‌یابی شده از جنس‌های *Curvularia*, *Cercospora*, *Alternaria*, *Albifimbria* و *Stemphylium* انجام شد. برای این منظور سوسپانسیون اسپوری گونه‌های *Albifimbria verrucaria* (جدایه IRAN 4671C)، *Alternaria atra* (جدایه IRAN 4672C)، *Alternaria sp.* (section *Alternaria*) (جدایه IRAN 4664C)، *Alternaria kordkuyana* (جدایه IRAN 4665C)، *Curvularia inaequalis* (جدایه IRAN 4792C)، *S. botryosum* (جدایه IRAN 4668C) و *Stemphylium vesicarium* (جدایه IRAN 4667C) تهیه شد. برای گونه *Cercospora zebrina* (جدایه IRAN 4674C)، سوسپانسیون میسلیمی تهیه گردید. کاشت گیاه یونجه در گلخانه به این صورت بود که ابتدا ترکیبی از خاک مزرعه، پرلیت و ماسه (به ترتیب با نسبت ۱:۲:۱) تهیه و این مخلوط دو بار به فاصله یک روز در دمای 21°C به مدت ۶۰ دقیقه درون دستگاه اتوکلاو سترون شد. گلدان‌های پلاستیکی با مخلوط سترون شده پر شدند و در هر گلدان چندین بذر یونجه کشت شد و گلدان‌ها در گلخانه با دمای بین $28-25^{\circ}\text{C}$ به مدت یک ماه نگهداری شدند. به منظور تهیه مایه تلقیح، از کشت دو هفته‌ای قارچ روی محیط کشت MEA استفاده شد. برای این منظور میسلیوم همراه با اسپور قارچ از روی محیط کشت با استفاده از اسکالپل سترون خراش داده شد و سپس جهت تهیه سوسپانسیون، به آب مقطر سترون اضافه شد (Bakhshi et al. 2021). آزمون بیماری‌زایی با استفاده از سوسپانسیون اسپور جدایه‌ها با رقت 10^5 اسپور در میلی‌لیتر روی دو رقم یونجه شامل یونجه همدانی و قره یونجه انجام گرفت. سوسپانسیون اسپور حاوی 0.05 درصد توئین ۲۰ بود و غلظت آن توسط لام هموسایتمتر تعیین شد. آزمون بیماری‌زایی در شرایط گلخانه

برای هر جدایه مرتبط، بخش‌هایی از نواحی ژنومی ITS و یا ژن گلیسرآلدئید ۳-فسفات دهیدروژناز (*gapdh*) تکثیر شد. آغازگرهای V9G (de Hoog & Gerrits van den Ende 1998) و ITS4 (White et al. 1990) برای تکثیر ناحیه ژنی ITS و آغازگرهای *gpd1* و *gpd2* (Berbee et al. 1999) برای تکثیر ناحیه ژنی *gapdh* استفاده شدند. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) براساس بخشی و همکاران (Bakhshi et al. 2019) انجام شد. واکنش توالی‌یابی به صورت جداگانه در دو جهت مستقیم و معکوس با استفاده از آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن‌ها از طریق ارسال به شرکت توالی‌یابی Microsynth سوئیس 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 به صورت 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 و همچنین توالی‌های مورد استفاده در مقالات معتبر، با توالی‌های به دست آمده در این تحقیق، برای رج‌بندی و برآورد فیلوژنی دریافت و ذخیره شدند. به منظور آماده‌سازی رج‌بندی چندژنی توالی‌ها، توالی‌های مربوط به ژن‌های انفرادی با استفاده از نرم‌افزار Mesquite v. 2.75 (Maddison 2008) الحاق شدند، و رج‌بندی چندگانه توالی‌های الحاق شده با استفاده از نرم‌افزار آنالین 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 تبارشناختی چندژنی بر مبنای استنتاج بیزیان با استفاده از نرم‌افزار MrBayes v. 3.2.6 (Ronquist et al. 2012)

نتایج

در طی بازدید از مزارع یونجه در استان آذربایجان غربی شیوع گسترده‌ای از بیماری لکه برگ‌ی روی گیاه یونجه در شهرستان‌های میاندوآب، مهاباد، نقده مشاهده شد. علائم این بیماری در برگ‌ها به صورت لکه‌های کلروز و بافت مرده مشاهده شد و در ادامه گاه‌گاه لکه‌های انفرادی باهم ترکیب شده و نواحی بیشتری از برگ‌ها قهوه‌ای و بافت مرده شدند (شکل ۱). در طی بررسی این لکه‌ها در زیر بینوکولر، کنیدیوم‌برها و کنیدیوم‌های قارچ‌های هیفومیست مورد مطالعه در سطوح رو و زیر لکه‌ها مشاهده شدند.

انجام گرفت. برای هر تیمار، سطح برگ‌ها با مایه تلقیح جدایه‌های مختلف اسپری شد و برای تیمار شاهد، برگ‌ها با آب مقطر سترون اسپری شدند. سه تکرار برای هر تیمار انجام شد. پس از مایه‌زنی، هر گیاه به صورت جداگانه به منظور حفظ رطوبت ۱۰۰ درصدی به مدت ۴۸ ساعت با پلاستیک پوشیده شد. پس از ۴۸ ساعت، گیاهان در گلخانه با رطوبت ۸۰ درصد و دمای $26-30^{\circ}C$ نگهداری شدند. بازدید روزانه از گیاهان جهت بررسی بروز علائم انجام شد. برای تکمیل آزمون کخ، تمامی جدایه‌ها بر اساس ساختارهای قارچی تولید شده روی لکه‌ها بررسی و تأیید شدند.



شکل ۱. علائم لکه برگ‌ی در گیاه یونجه (*Medicago sativa*).

Fig 1. Leaf spot symptoms on alfalfa (*Medicago sativa*).

جداسازی جدایه‌ها

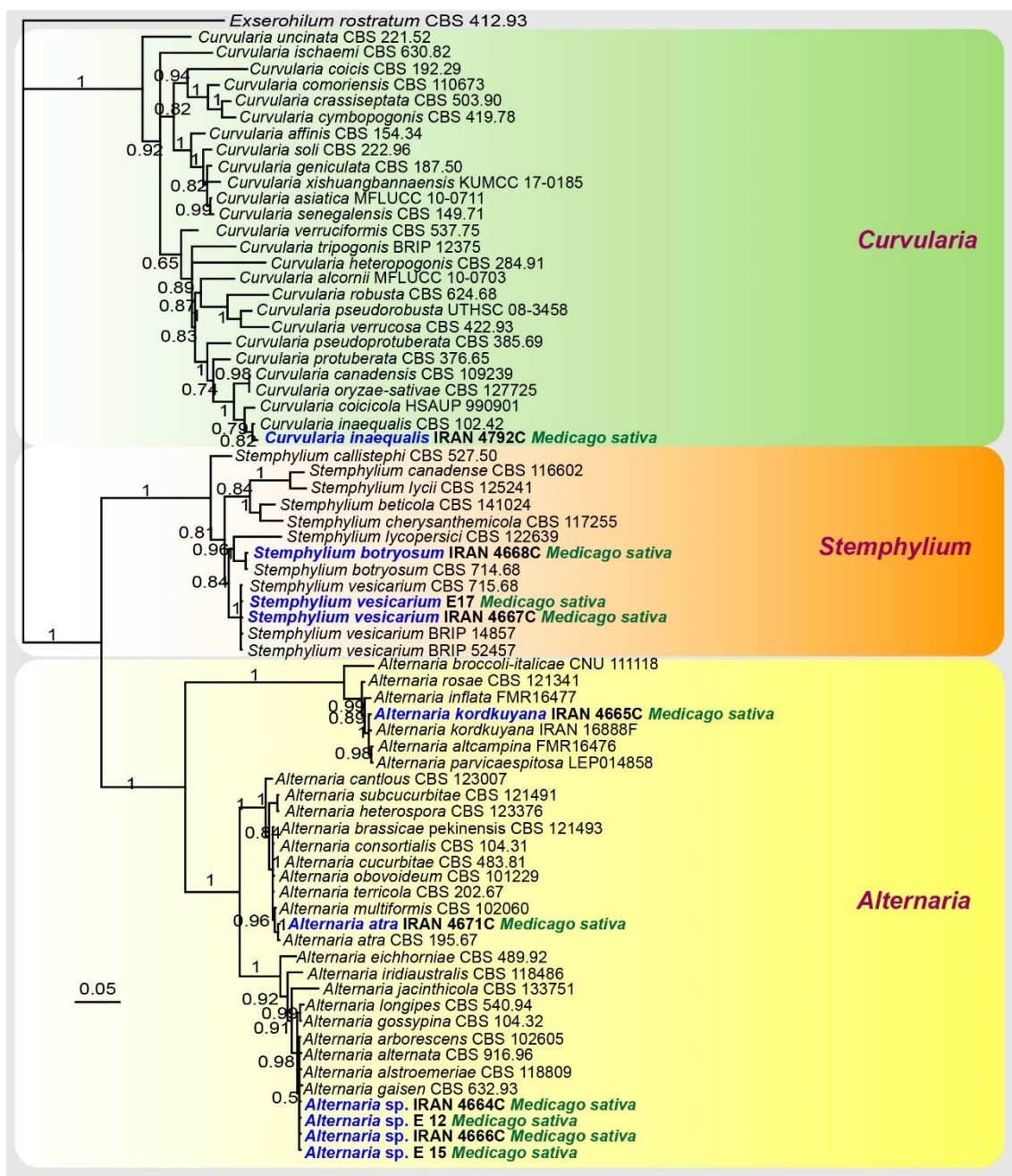
به منظور بررسی دقیق تر عامل یا عوامل دخیل در لکه‌برگی گیاه یونجه، تعداد ۶۶ جدایه قارچی از لکه‌های مختلف روی گیاه یونجه جداسازی شدند. بیشترین فراوانی به ترتیب مربوط به گونه‌های متعلق به جنس‌های *Alternaria* (۵۲ جدایه)، *Stemphylium* (نه جدایه)، *Cercospora* (دو جدایه)، *Albifimbria* (دو جدایه) و *Curvularia* (یک جدایه) بود. پس از گروه‌بندی اولیه جدایه‌ها بر اساس صفات ریخت‌شناختی، تعداد شش جدایه از جنس *Alternaria*، دو جدایه از جنس *Stemphylium*، دو جدایه از جنس *Cercospora* و یک جدایه از جنس *Curvularia* به عنوان جدایه نماینده برای شناسایی مبتنی بر ریخت‌شناسی و مولکولی انتخاب شدند. این جدایه‌ها در مجموعه کشت‌های زنده قارچی در موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، تهران، ایران (IRAN C) نگهداری می‌شوند.

شناسایی ریخت‌شناختی و مولکولی آرایه‌ها

ترسیم تبارنما برای شناسایی تبارشناختی گونه‌های جنس‌های *Alternaria*، *Curvularia* و *Stemphylium* (تیره *Pleosporaceae*): تبارنمای تبارشناختی آرایه‌های تیره *Pleosporaceae* شامل جنس‌های *Alternaria*، *Curvularia* و *Stemphylium* با استفاده از داده‌های توالی نواحی ژنی ITS و *gapdh* ترسیم شد. رج‌بندی چندگانه شامل ۷۰ آرایه داخلی مربوط به جنس‌های *Alternaria* (از بخش‌های *Alternaria*، *Pseudoalternaria* و *Ulocladioides*)، *Curvularia* و *Stemphylium* (۶۰ آرایه از NCBI و ۱۰ آرایه از این تحقیق) بود (جدول ۱). گونه *Exserohilum rostratum* (Drechsler) K.J. Leonard & Suggs (جدایه CBS 412.93) به عنوان گروه خارجی مورد استفاده قرار گرفت. ماتریس رج‌بندی نهایی شامل ۱۱۷۰

کاراکتر شامل شکاف‌های رج‌بندی (*gap*) بود و مرز ژن‌ها به ترتیب ۱-۶۰۹ کاراکتر برای ITS و ۱۱۷۰-۶۱۰ کاراکتر برای *gapdh* بود. با توجه به نتایج نرم‌افزار تست مدل، مدل GTR+I+G با نرخ توزیع گامای معکوس برای هر دو ناحیه ژنی استفاده شدند. از بین ۱۱۷۰ کاراکتری که برای استنتاج بیزیان استفاده شد، ۵۳۶ الگوی مکانی منحصربه‌فرد وجود داشت که به ترتیب ۲۶۳ و ۲۷۳ نوکلئوتید مربوط به نواحی ژنی ITS و *gapdh* بود. تجزیه و تحلیل بیزیان منتهی به ۱۴۸۵۰۰۰ نسل و ۲۹۷۲ تبارنما شد. بعد از حذف ۲۵٪ اولیه تبارنماهای جمع‌آوری شده برای مرحله burn-in، تبارنمای برآیند و توزیع احتمال پسین خوشه‌ها از ۲۲۳۰ تبارنمای باقی‌مانده محاسبه شد (شکل ۲). بر اساس نتایج حاصل از تبارنمای رسم شده، سه گونه از جنس آلترناریا شامل گونه‌های *A. kordkuyana* از بخش *Pseudoalternaria*، گونه *A. atra* از بخش *Ulocladioides* و گونه نامعلوم *Alternaria* sp. از بخش *Alternaria*، دو گونه از جنس *S. vesicarium* و *S. botryosum* شامل گونه‌های استمفیلیوم و یک گونه از جنس کوروولاریا به نام گونه *Cu. inaequalis* شناسایی شدند (شکل ۲).

ترسیم تبارنما برای شناسایی تبارشناختی گونه‌های جنس *Albifimbria*: تبارنمای تبارشناختی گونه‌های جنس *Albifimbria* با استفاده از داده‌های توالی ناحیه ژنی ITS و مدل GTR+I+G، با نرخ توزیع گامای معکوس راه‌اندازی و ترسیم شد. رج‌بندی چندگانه شامل ۱۳ آرایه داخلی مربوط به جنس *Albifimbria* (۱۱ آرایه از NCBI و ۲ آرایه از این تحقیق) بود (جدول ۱). گونه *Dimorphiseta terrestris* L. Lombard & Crous (جدایه CBS 127345) به عنوان گروه خارجی مورد استفاده قرار گرفت. از بین ۵۴۵ کاراکتری که برای استنتاج بیزیان استفاده شد، ۲۰ الگوی مکانی منحصربه‌فرد وجود داشت. تجزیه و تحلیل بیزیان منتهی به ۸۵۰۰۰۰ نسل و ۱۷۰۲ تبارنما شد. بعد از حذف ۲۵٪ اولیه



شکل ۲. تبارنمای تبارشناختی رسم شده بر مبنای آنالیز بیزیان برای آرایه‌های تیره *Pleosporaceae* با استفاده از نواحی ژنی *gapdh* و ITS

Fig 2. Phylogenetic tree inferred by Bayesian analysis of the combined two-locus (ITS and *gapdh*) for *Pleosporaceae* taxa.

تبارنماهای جمع‌آوری شده برای مرحله burn-in، تبارنمای برآیند و توزیع احتمال پسین خوشه‌ها از ۱۲۷۸ تبارنمای باقی‌مانده محاسبه شد. بر اساس نتایج حاصل از ویژگی‌های ریخت‌شناسی و تبارنمای رسم شده برای جنس *Albifimbria*، دو جدایه منتخب این جنس تحت گونه *Alb. verrucaria* شناسایی شدند (شکل ۳).

تبارنمای جمع‌آوری شده برای مرحله burn-in، تبارنمای برآیند و توزیع احتمال پسین خوشه‌ها از ۱۲۷۸ تبارنمای باقی‌مانده محاسبه شد. بر اساس نتایج حاصل از ویژگی‌های



شکل ۳. تبارنمای تبارشناختی رسم شده بر مبنای آنالیز بیزیان برای جدایه‌های جنس آلیفیمبریا با استفاده از ناحیه ژنی ITS. **Fig 3. Phylogenetic tree inferred by Bayesian analysis of the *Albifimbria* isolates using ITS region.**

جدول ۱. آرایه‌های استفاده شده در ترسیم تبارنماها و راس شماره‌های بانک ژن آن‌ها (توالی‌های این تحقیق به صورت پررنگ نمایش داده شده‌اند).

Table 1. Taxa used in the phylogenetic analyses and Genbank accession numbers (the newly generated sequences are highlighted in black bold).

Taxa	Isolate	Genbank accession numbers		References
		ITS	<i>gapdh</i>	
<i>Albifimbria lateralis</i>	CBS 117712	KU845881	–	Lombard <i>et al.</i> 2016
<i>Alb. terrestris</i>	CBS 109378	KU845882	–	Lombard <i>et al.</i> 2016
	CBS 126186	KU845883	–	Lombard <i>et al.</i> 2016
	CBS 127838	KU845884	–	Lombard <i>et al.</i> 2016
	CBS 121142	KU845896	–	Lombard <i>et al.</i> 2016
<i>Alb. verrucaria</i>	IRAN 4672C	OR259225	–	This study
	IRAN 4673C	OR259226	–	This study
	CBS 176.27	KU845886	–	Lombard <i>et al.</i> 2016
	CBS 208.72	KU845891	–	Lombard <i>et al.</i> 2016
	CBS 231.56	KU845892	–	Lombard <i>et al.</i> 2016
	CBS 328.52	KU845893	–	Lombard <i>et al.</i> 2016
	CBS 390.39	KU845894	–	Lombard <i>et al.</i> 2016
	CBS 962.95	KU845895	–	Lombard <i>et al.</i> 2016
	<i>Alternaria alternata</i>	CBS 916.96	AF347031	AY278808
<i>A. altcampina</i>	FMR 16476	LR133895	LR133900	Marin-Felix <i>et al.</i> 2019
<i>A. alstroemeriae</i>	CBS 118809	KP124297	KP124154	Woudenberg <i>et al.</i> 2015
<i>A. arborescens</i>	CBS 102605	AF347033	AY278810	Woudenberg <i>et al.</i> 2013
<i>A. atra</i>	CBS 195.67	AF229486	KC584167	Woudenberg <i>et al.</i> 2013
	IRAN 4671C	–	OR269984	This study
<i>A. broccoli-italicae</i>	CNU 111118	KM821536	KM821537	Deng <i>et al.</i> 2018
<i>A. brassicaepekiniensis</i>	CBS 121493	KC584244	KC584170	Woudenberg <i>et al.</i> 2013
<i>A. cantlous</i>	CBS 123007	KC584245	KC584171	Woudenberg <i>et al.</i> 2013
<i>A. consortialis</i>	CBS 104.31	KC584247	KC584173	Woudenberg <i>et al.</i> 2013
<i>A. cucurbitae</i>	CBS 483.81	FJ266483	AY562418	Woudenberg <i>et al.</i> 2013
<i>A. eichhorniae</i>	CBS 489.92	KC146356	KP124276	Woudenberg <i>et al.</i> 2015
<i>A. gaisen</i>	CBS 632.93	KC584197	KC584116	Woudenberg <i>et al.</i> 2013

<i>A. gossypina</i>	CBS 104.32	KP124430	JQ646312	Woudenberg <i>et al.</i> 2015
<i>A. heterospora</i>	CBS 123376	KC584248	KC584176	Woudenberg <i>et al.</i> 2013
<i>A. iridialustralis</i>	CBS 118486	KP124435	KP124284	Woudenberg <i>et al.</i> 2015
<i>A. inflata</i>	FMR 16477	LR133930	LR133938	Marin-Felix <i>et al.</i> 2019
<i>A. jacinthicola</i>	CBS 133751	KP124438	KP124287	Woudenberg <i>et al.</i> 2015
<i>A. kordkuyana</i>	IRAN 16888F	MF033843	MF033826	Poursafar <i>et al.</i> 2018
	IRAN 4665C	–	OR269985	This study
<i>A. longipes</i>	CBS 540.94	AY278835	AY278811	Woudenberg <i>et al.</i> 2013
<i>A. multiformis</i>	CBS 102060	FJ266486	KC584174	Woudenberg <i>et al.</i> 2013
<i>A. obovoidea</i>	CBS 101229	FJ266487	FJ266498	Woudenberg <i>et al.</i> 2013
<i>A. parvicaespitosa</i>	LEP 014858	MF033859	MF033842	Poursafar <i>et al.</i> 2018
<i>A. rosae</i>	CBS 121341	JQ646279	JQ646279	Poursafar <i>et al.</i> 2018
<i>A. subcucurbitae</i>	CBS 121491	KC584249	EU855803	Woudenberg <i>et al.</i> 2013
<i>A. terricola</i>	CBS 202.67	FJ266490	KC584177	Woudenberg <i>et al.</i> 2013
<i>Alternaria</i> sp. (section <i>Alternaria</i>)	IRAN 4664C	–	OR269986	This study
	IRAN 4666C	–	OR269987	This study
	E12	–	OR269988	This study
	E15	–	OR269989	This study
<i>Exserohilum rostratum</i>	CBS 412.93	KT265246	LT715894	Hernandez-Restrepo <i>et al.</i> 2018
<i>Curvularia heteropogonis</i>	CBS 284.91	JN192379	JN600969	Tan <i>et al.</i> 2014
<i>Cu. verruciformis</i>	CBS 537.75	HG779026	HG779133	Madrid <i>et al.</i> 2014
<i>Cu. tripogonis</i>	BRIP 12375	JN192388	JN600980	Manamgoda <i>et al.</i> 2011
<i>Cu. alcornii</i>	MFLUCC 10-0703	JX256420	JX276433	Manamgoda <i>et al.</i> 2012
<i>Cu. robusta</i>	CBS 624.68	KJ909783	KM083613	Manamgoda <i>et al.</i> 2014
<i>Cu. pseudorobusta</i>	UTHSC 08-3458	HE861838	HF565476	Da Cohan <i>et al.</i> 2013
<i>Cu. verrucosa</i>	CBS 422.93	MN688826	MN688853	Marin-Felix <i>et al.</i> 2020
<i>Cu. pseudoprotuberata</i>	CBS 385.69	MN688821	MN688848	Marin-Felix <i>et al.</i> 2020
<i>Cu. protuberata</i>	CBS 376.65	KJ922376	KM083605	Manamgoda <i>et al.</i> 2014
<i>Cu. canadensis</i>	CBS 109239	MN688804	MN688831	Marin-Felix <i>et al.</i> 2020
<i>Cu. oryzae-sativae</i>	CBS 127725	MN688808	MN688835	Marin-Felix <i>et al.</i> 2020
<i>Cu. coicicola</i>	HSAUP 990901	AB453880	–	Zhang & Zhang 2004
<i>Cu. inaequalis</i>	CBS 102.42	KJ922375	KM061787	Manamgoda <i>et al.</i> 2014
	IRAN 4792C	OR259227	OR269990	This study
<i>Cu. uncinata</i>	CBS 221.52	HG779024	HG779134	Madrid <i>et al.</i> 2014
<i>Cu. ischaemi</i>	CBS 630.82	HG778992	HG779131	Madrid <i>et al.</i> 2014
<i>Cu. coicis</i>	CBS 192.29	HF934917	HG779130	Madrid <i>et al.</i> 2014
<i>Cu. comoriensis</i>	CBS 110673	LT631357	LT715841	Hernandez-Restrepo <i>et al.</i> 2018
<i>Cu. crassiseptata</i>	CBS 503.90	LT631310	LT715882	Hernandez-Restrepo <i>et al.</i> 2018
<i>Cu. cymbopogonis</i>	CBS 419.78	HG778985	HG779129	Madrid <i>et al.</i> 2014
<i>Cu. affinis</i>	CBS 154.34	KJ909780	KM230401	Manamgoda <i>et al.</i> 2015
<i>Cu. soli</i>	CBS 222.96	KY905679	KY905691	Marin-Felix <i>et al.</i> 2017
<i>Cu. geniculata</i>	CBS 187.50	KJ909781	KM083609	Manamgoda <i>et al.</i> 2015
<i>Cu. xishuangbannaensis</i>	KUMCC 17-0185	MH275058	MH412750	Tibpromma <i>et al.</i> 2018
<i>Cu. asiatica</i>	MFLUCC 10-0711	JX256424	JX276436	Manamgoda <i>et al.</i> 2012
<i>Cu. senegalensis</i>	CBS 149.71	HG779001	HG779128	Madrid <i>et al.</i> 2014
<i>Dimorphiseta terrestris</i>	CBS 127345	KU846314	–	Lombard <i>et al.</i> 2016
<i>Stemphylium lycopersici</i>	CBS 122639	KU850611	KU850756	Woudenberg <i>et al.</i> 2017
<i>S. callistephi</i>	CBS 527.50	KU850539	KU850686	Woudenberg <i>et al.</i> 2017
<i>S. canadense</i>	CBS 116602	KU850641	KU850782	Woudenberg <i>et al.</i> 2017
<i>S. chrysanthemicola</i>	CBS 117255	KU850640	KU850781	Woudenberg <i>et al.</i> 2017
<i>S. beticola</i>	CBS 141024	KU850520	KU850667	Woudenberg <i>et al.</i> 2017
<i>S. botryosum</i>	CBS 714.68	KC584238	AF443881	Woudenberg <i>et al.</i> 2017
	IRAN 4668C	–	OR269991	This study
<i>S. lycii</i>	CBS 125241	KU850602	KU850748	Woudenberg <i>et al.</i> 2017
<i>S. lycopersici</i>	CBS 122639	KU850611	KU850756	Woudenberg <i>et al.</i> 2017
<i>S. vesicarium</i>	CBS 715.68	KU850565	KU850712	Woudenberg <i>et al.</i> 2017
	BRIP 14857	MK336816	MK336862	Woudenberg <i>et al.</i> 2017
	BRIP 52457	MK336824	MK336870	Woudenberg <i>et al.</i> 2017
	IRAN 4667C	–	OR269992	This study
	E17	–	OR269993	This study

آرایه‌های شناسایی شده

۱- گونه *Albifimbria verrucaria* (Alb. & Schwein.) L. Lombard & Crous

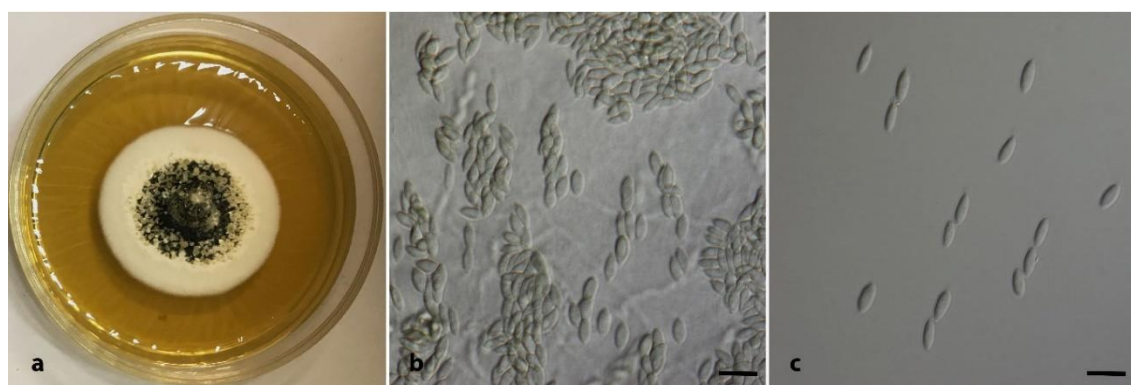
توصیف ویژگی‌های ریخت‌شناختی: میسلیم سطحی و حاوی ساختارهای اسپورودوکیوم لعابی به رنگ سبز و تیره که کنیدیوم‌ها در آن تشکیل می‌شوند. ریشه‌ها شفاف، صاف، دیواره دار و به عرض ۲-۳ میکرومتر هستند. کنیدیوم‌ها شفاف، دارای دیواره عرضی، فیالیدیک و به ابعاد $2-1/5 \times$ ۹-۱۴ میکرومتر می‌باشند. کنیدیوم‌ها به صورت دوکی شکل، زیتونی کمرنگ تا نیمه شفاف، در انتها نوک تیز و به ابعاد $3-4 \times 7-9$ میکرومتر می‌باشند (شکل ۴).

مشخصات پرگنه روی محیط کشت MEA: پرگنه پس از ۱۴ روز در دمای $25^{\circ}C$ به رنگ سبز زیتونی مایل به سیاه، حاشیه پرگنه منظم و به رنگ سفید، رشد سطحی، کنیدیوم‌زایی فراوان و درون توده‌های لزج سبز و تیره تشکیل

می‌شوند. قطر رشدی پرگنه در این مدت برابر با ۳۴ میلی‌متر است.

نمونه‌های بررسی شده: استان آذربایجان غربی، میاندوآب، روستای دوچی (مختصات جغرافیایی 37.096702, 46.050951)، روی گیاه یونجه (*Medicago sativa*)، ۹۹/۸/۲۲، جمع‌آوری محمدرضا خیری (IRAN 4672C) و استان آذربایجان غربی، مهاباد، (مختصات جغرافیایی 36.908176, 45.763412)، روی گیاه یونجه، ۹۹/۸/۲۳، جمع‌آوری محمدرضا خیری (IRAN 4673C).

توضیحات: این گونه قبلاً از روی گیاه یونجه در دنیا به عنوان بیمارگر ریشه گزارش شده است (Leath et al. 1983). در ایران این گونه تنها از میزبان نامتود شناسایی شده است و از گیاهان گزارش نشده است (Ershad 2022). تحقیق حاضر، اولین گزارش از این گونه به عنوان بیمارگر برگی روی گیاه یونجه برای ایران و جهان می‌باشد.



شکل ۴. *Albifimbria verrucaria* (IRAN 4672C): a. پرگنه در محیط کشت MEA، b-c. کنیدیوم، (مقیاس برابر با ۱۰ میکرومتر).

Fig 4. *Albifimbria verrucaria* (IRAN 4672C): a. Colony on MEA, b-c. Conidia, (Bars = 10 μ m).

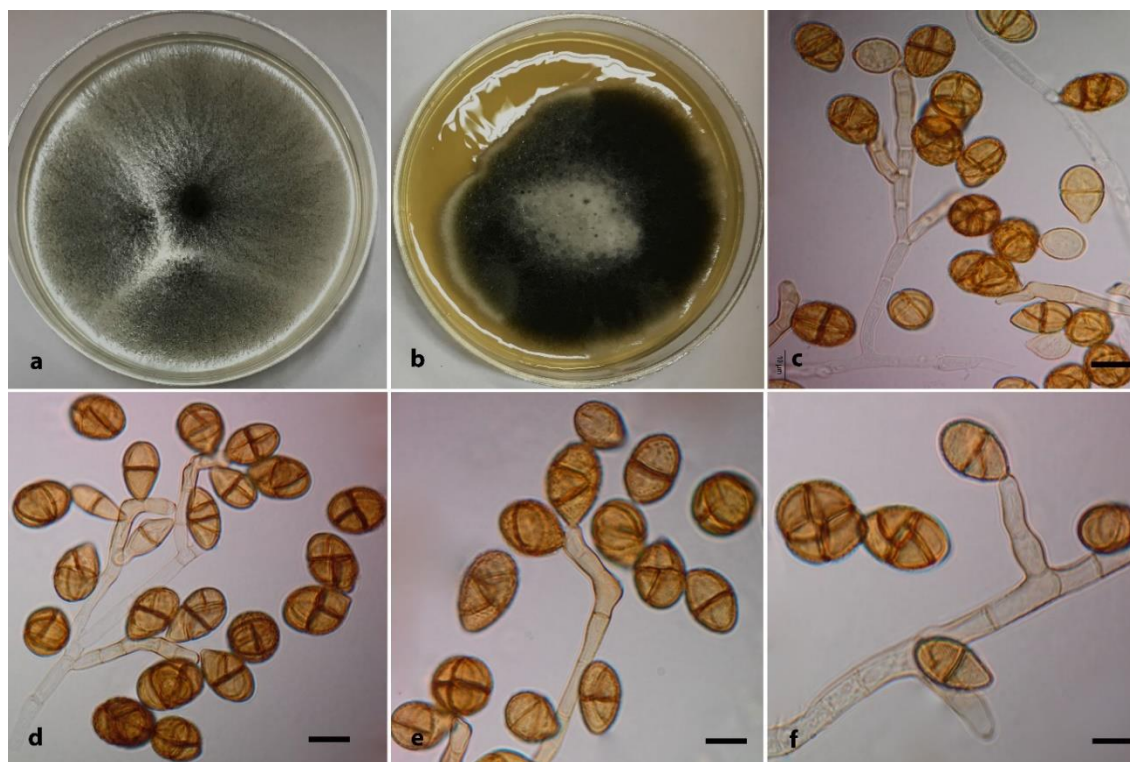
میکرومتر و به رنگ قهوه‌ای روشن هستند. کنیدیوم‌ها به طول ۱۳-۳۴ میکرومتر، منشعب و منشأ جانبی یا انتهایی دارند. کنیدیوم‌های این گونه بیضوی و یا کروی و قهوه‌ای تیره، به ابعاد ۹-۱۵ \times ۱۴-۲۴ میکرومتر هستند. کنیدیوم‌ها حداکثر دو دیواره طولی و دو دیواره عرضی دارند،

۲- گونه *Alternaria atra* (Preuss) Woudenb. & Crous, *Studies in Mycology* 75: 204 (2013)

توصیف ویژگی‌های ریخت‌شناختی: ریشه‌ها به عرض ۶

شناخته می‌شد. در سال ۲۰۱۳، نتایج مطالعات مولکولی وودنبرگ و همکاران بر مبنای استفاده از چندین ژن (*RPB2*، *ITS*، *gapdh*، *rDNA* 28S و *tefl*) نشان داد که جنس *Ulocladium* مترادف با جنس *Alternaria* است و لذا نام گونه به نام *A. atra* تغییر یافت و در بخش *Ulocladioides* قرار داده شد (Woudenberg et al. 2013). این گونه توان رقابتی پوده‌زیستی بسیار بالایی دارد و گاهی اوقات می‌تواند بیماری‌زا باشد. گونه *A. atra* قبلاً در ایران از گیاهان جو، پسته، مو، زردآلو، هلو، بلوط برودار، سرخدار و سیب‌زمینی گزارش شده است (Ershad 2022). تحقیق حاضر، اولین گزارش از این گونه روی گیاه یونجه برای ایران و جهان می‌باشد.

به‌طوری‌که در مرکز کنیدیوم همدیگر را قطع می‌نمایند و شبیه به یک ساختار سه‌بعدی به نظر می‌رسند (شکل ۵). مشخصات پرگنه روی محیط کشت MEA: پرگنه پس از ۱۴ روز در دمای 25°C به رنگ سیاه زیتونی مایل به خاکستری تیره، دارای میسلیم هوایی، حاشیه پرگنه نامنظم، سفید، وسط پرگنه به رنگ سفید، برآمده و محدب، دارای ترشحات قطره مانند، کنیدیوم‌زایی فراوان می‌باشد. قطر رشدی پرگنه در این مدت برابر با ۵۳ میلی‌متر است. نمونه بررسی شده: استان آذربایجان غربی، نقده (مختصات جغرافیایی 36.970508, 45.565122)، روی گیاه یونجه، ۹۹/۸/۲۳، جمع‌آوری محمدرضا خیری (IRAN 4671C). توضیحات: گونه *A. atra* قبلاً متعلق به جنس *Ulocladium* بود و به نام *Ulocladium atrum* Preuss



شکل ۵. *Alternaria atra* (IRAN 4671C): a پرگنه در محیط کشت PCA، b پرگنه در محیط کشت MEA، c-f ریشه، کنیدیوم بر و کنیدیوم، (مقیاس برابر با ۱۰ میکرومتر).

Fig 5. *Alternaria atra* (IRAN 4671C): a. Colony on PCA, b. Colony on MEA, c-f. Conidiophores and conidia, (Bars = 10 μm).

مشخصات پرگنه روی محیط کشت MEA: پرگنه پس از ۱۴ روز در دمای 25°C به رنگ سبز زیتونی مایل به سیاه، دارای میسلیم هوایی، حاشیه تا حدودی نامنظم، زیتونی کم‌رنگ، رشد سطحی، چروکیده، بدون ترشحات، کنیدیوم‌زایی فراوان می‌باشد. قطر رشدی پرگنه در این مدت برابر با ۵۵ میلی‌متر است.

نمونه‌های بررسی شده: استان آذربایجان غربی، مهاباد، (مختصات جغرافیایی 36.91249, 45.763206)، روی گیاه یونجه، ۹۹/۸/۲۳، جمع‌آوری کننده محمدرضا خیری (IRAN 4664C)، استان آذربایجان غربی، مهاباد، روستای لچ (مختصات جغرافیایی 36.892668, 45.778189)، روی گیاه یونجه، ۹۹/۸/۲۴، جمع‌آوری کننده محمدرضا خیری (E12)، استان آذربایجان غربی، میان‌دوآب، تاتانو (سیمینه رود) (مختصات جغرافیایی 36.957709, 46.053971)، روی گیاه یونجه، ۹۹/۸/۲۳، جمع‌آوری کننده محمدرضا خیری (E15) و استان آذربایجان غربی، میان‌دوآب، تاتانو (سیمینه رود) (مختصات جغرافیایی 36.957709, 46.053971)، روی گیاه یونجه، ۹۹/۸/۲۳، جمع‌آوری کننده محمدرضا خیری (IRAN 4666C).

توضیحات: برای تفکیک آرایه‌های بخش *Alternaria* نیاز به توالی یابی سایر نواحی ژنی شامل ITS, LSU, SSU, *Alt a 1*, *endoPG*, *tefl*, *RPB2* و *OPA10-2* می‌باشد (Woudenberg et al. 2015).

۵- گونه *Cercospora zebrina* Pass., Hedwigia 16: 124 (1877)

توصیف ویژگی‌های ریخت‌شناختی: توصیف این گونه به همراه تصاویر میکروسکوپی در منبع Khodaparast et al. (2022) آمده است.

نمونه‌های بررسی شده: استان آذربایجان غربی، میان‌دوآب، بکتاش (مختصات جغرافیایی 37.119576, 46.011875)، روی گیاه یونجه، ۹۹/۸/۲۲، جمع‌آوری کننده محمدرضا خیری (IRAN 4674C, IRAN 4675C).

۳- گونه *Alternaria kordkuyana* Poursafar, Gannibal, Ghosta, Javan-Nikkhah & D.P. Lawr., Mycological Progress 17 (3): 348 (2017)

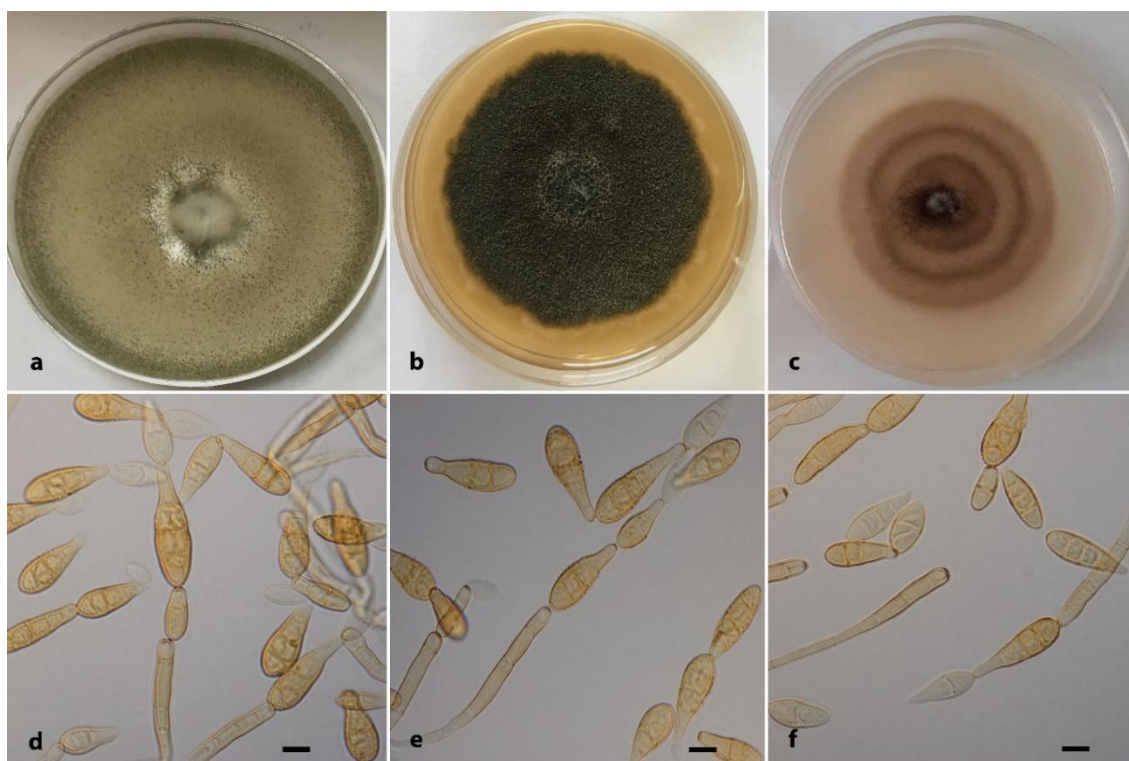
توصیف ویژگی‌های ریخت‌شناختی: توصیف این گونه به همراه تصاویر میکروسکوپی و تصاویر پرگنه قارچ در منبع Poursafar et al. (2018) آمده است.

نمونه‌های بررسی شده: استان آذربایجان غربی، مهاباد (مختصات جغرافیایی 36.920362, 45.989183)، روی گیاه یونجه، ۹۹/۸/۲۳، جمع‌آوری کننده محمدرضا خیری (IRAN 4665C).

توضیحات: گونه *A. kordkuyana* قبلاً در ایران از گیاه گندم گزارش شده است (Ershad 2022) و تحقیق حاضر اولین گزارش از گونه *A. kordkuyana* روی گیاه یونجه برای ایران و جهان می‌باشد.

۴- گونه *Alternaria sp.1* در بخش *Alternaria*

توصیف ویژگی‌های ریخت‌شناختی: پرگنه این جدایه در محیط کشت PCA به رنگ قهوه‌ای مایل به زیتونی تا قهوه‌ای مایل به سیاه و دارای دوایر متحدالمرکز ناشی از تفاوت کنیدیوم‌زایی طی ۱۶/۸ ساعت چرخه نور/تاریکی است. میسلیم‌ها در روی و داخل محیط کشت رشد می‌کنند. ریشه‌ها به عرض ۳-۵ میکرومتر و به رنگ قهوه‌ای هستند. کنیدیوم‌برها و کنیدیوم‌ها معمولاً به رنگ قهوه‌ای طلایی متوسط هستند. کنیدیوم‌برها معمولاً ساده، برخی در انتها منشعب، مستقیم یا دارای انحنای ۱-۳ دیواره‌ای، به ابعاد ۴-۵ × ۶۷-۱۷ میکرومتر هستند. کنیدیوم‌ها به ابعاد ۱۰-۷ × ۳۴-۱۵ میکرومتر، در زنجیره‌های کوتاه تا متوسط، تخم‌مرغی شکل، گلابی شکل یا به ندرت بیضی شکل، دارای دم انتهایی کوتاه، قهوه‌ای متوسط، دارای دیواره صاف یا زگیل دار، دارای ۲-۴ دیواره عرضی و در قسمت پایین ۱-۲ دیواره طولی هستند (شکل ۶).



شکل ۶. *Alternaria* sp. (section *Alternaria*) (IRAN 4664C): a پرگنه در محیط کشت PDA، b پرگنه در محیط کشت MEA، c پرگنه در محیط کشت PCA، d-f ریشه، کنیدیوم بر و کنیدیوم، (مقیاس برابر با ۱۰ میکرومتر).
Fig 6. *Alternaria* sp. (section *Alternaria*) (IRAN 4664C): a. Colony on PDA, b. Colony on MEA, c. Colony on PCA, d-f. Conidiophores and conidia, (Bars = 10 μ m).

محیط کشت PCA در دمای 25°C بعد از گذشت هفت روز به رنگ قهوه‌ای تیره می‌باشد. ریشه‌ها دارای دیواره ضخیم و نسبتاً تیره، به فواصل منظم دارای دیواره عرضی، عرض آن‌ها ۵ میکرومتر می‌باشند. کنیدیوم‌برها در قسمت انتها متورم، ساده یا بدون انشعاب، اغلب در انتها زانویی، به رنگ قهوه‌ای و به صورت منفرد، به ابعاد $4-5 \times 4-8-65$ میکرومتر می‌باشند. کنیدیوم‌ها بیضوی یا تقریباً دوکی شکل، قهوه‌ای تا قهوه‌ای تیره، راست یا اندکی در سلول میانی خمیده، سلول ابتدایی و انتهایی روشن‌تر، اغلب دارای سه دیواره عرضی نسبتاً تیره (بندرت چهار دیواره عرضی) و به ابعاد $9-16 \times 24-45$ میکرومتر می‌باشند (شکل ۷).

مشخصات پرگنه روی محیط کشت MEA: پرگنه در محیط کشت MEA پس از ۱۴ روز در دمای 25°C به رنگ

توضیحات: بر اساس جستجوی بلاست ناحیه *gapdh* جدایه‌های (IRAN 4674C) Genebank accession (number = OR269982) (IRAN 4675C) Genebank (accession number = OR269983) دارای ۱۰۰ درصد تشابه نوکلئوتیدی با گونه *C. zebrina* هستند. این گونه قبلاً از ایران از گیاه یونجه در مناطق مختلف کشور و همچنین علف هرز *Fallopia convolvulus* (L.) Á. Löve گزارش شده است (Bakhshi et al. 2012, Ershad 2022).

گونه ۶- *Curvularia inaequalis* (Shear) Boedijn, Bulletin of the Torrey Botanical Club 34 (6) 305 (1907)

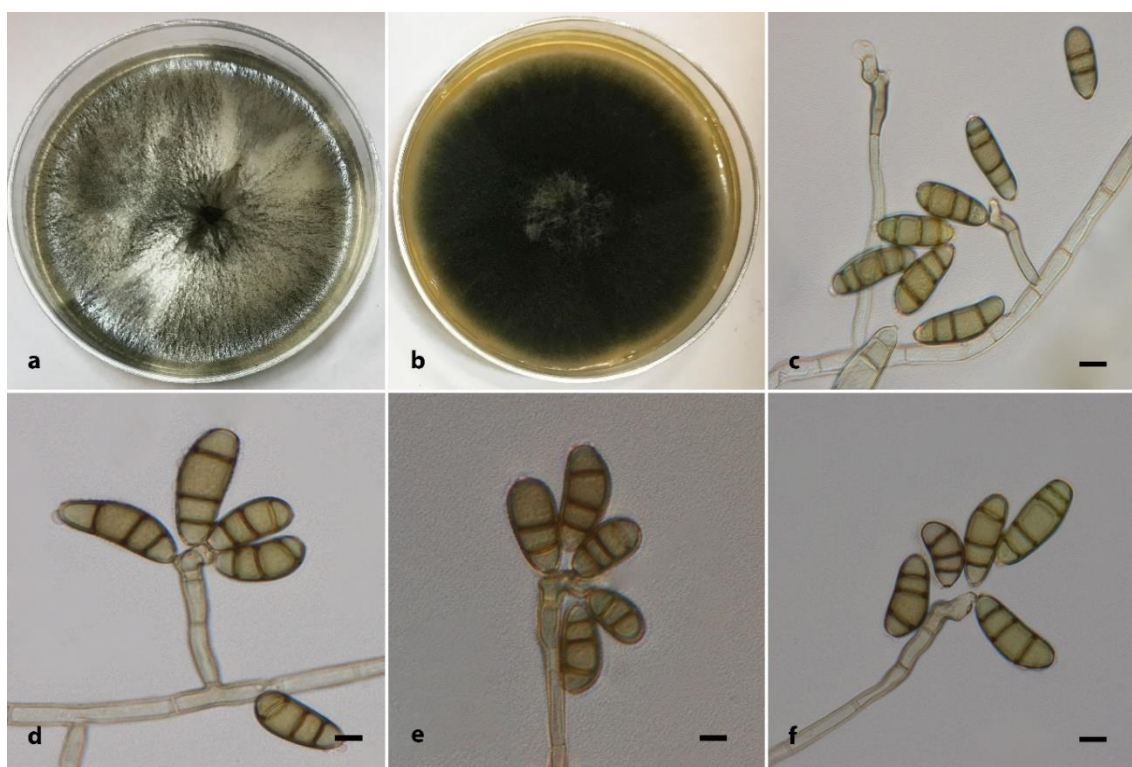
توصیف ویژگی‌های ریخت‌شناختی: پرگنه قارچ روی

(4792C).

توضیحات: گونه *Cu. inaequalis* قبلاً در ایران از توت فرنگی و گیاهان تیره گندمیان (*Poaceae*) شامل جو، برنج و سورگوم گزارش شده است (Ayoubi et al. 2017, Ershad 2022) و این تحقیق اولین گزارش از گونه *Cu. inaequalis* از روی گیاه یونجه برای ایران و جهان می‌باشد.

سبز زیتونی مایل به سیاه، حاشیه پرگنه منظم و روشن، رشد سطحی می‌باشد. قطر رشدی پرگنه در این مدت برابر با ۵۵ میلی‌متر است.

نمونه‌های بررسی شده: استان آذربایجان غربی، مهاباد (مختصات جغرافیایی 36.908176, 45.763412)، روی گیاه یونجه، ۹۹/۸/۲۳، جمع‌آوری محمدرضا خیری (IRAN)



شکل ۷. *Curvularia inaequalis* (IRAN 4792C): a پرگنه در محیط کشت PCA، b پرگنه در محیط کشت MEA، c-f ریشه، کنیدیوم بر و کنیدیوم، (مقیاس برابر با ۱۰ میکرومتر).

Fig 7. *Curvularia inaequalis* (IRAN 4792C): a. Colony on MEA, b. Colony on PCA, c-f. Conidiophores and conidia, (Bars = 10 µm).

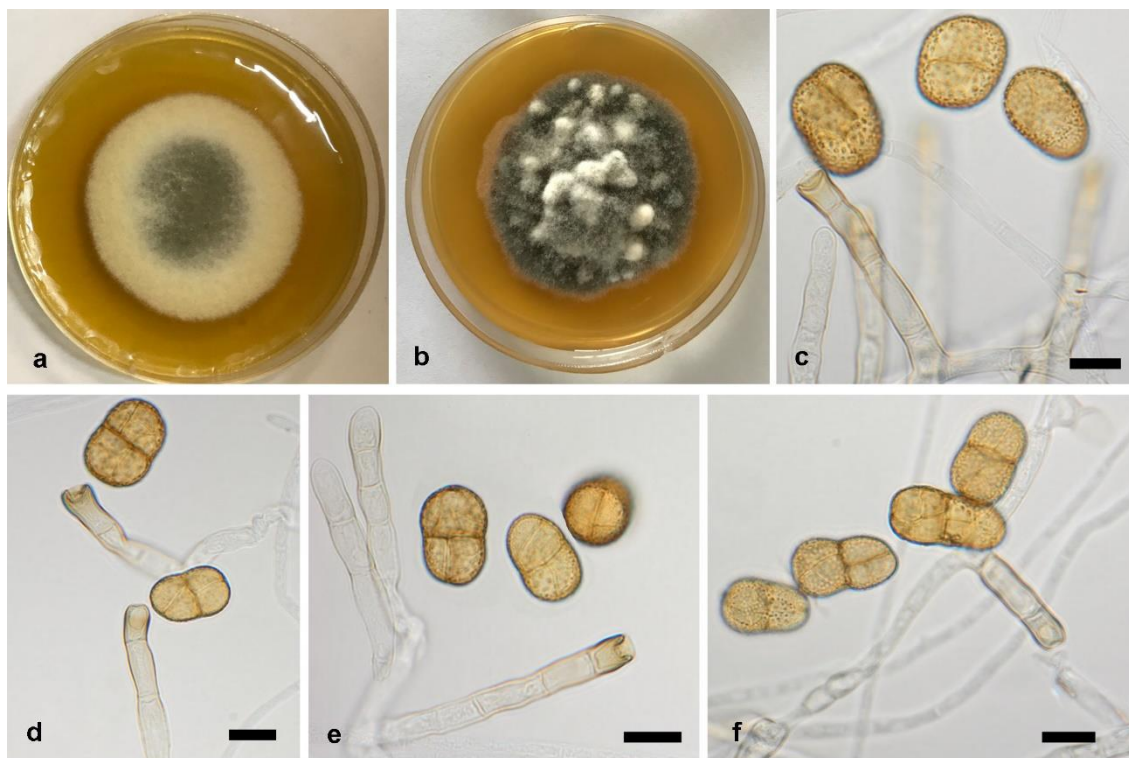
عرض ۴-۶ میکرومتر و شفاف هستند. کنیدیوم‌برها عمده‌تاً بدون انشعاب با سلول رأسی متورم تیره‌رنگ، به ابعاد ۷-۵ × ۸۰-۱۷ میکرومتر هستند. کنیدیوم‌ها به صورت منفرد، قهوه‌ای‌رنگ، دارای تزینات سطحی، بیضوی تا دایره‌ای، دارای فرورفتگی مشهود در دیواره عرضی مرکز کنیدیوم، دارای حداکثر ۲ دیواره طولی و عرضی و ابعاد ۷-۱۷ × (۴۵-

۷- گونه *Stemphylium botryosum* Wallr., Flora Cryptogamica Germaniae 2: 300 (1833)

توصیف ویژگی‌های ریخت‌شناختی: پرگنه این گونه در محیط کشت PCA، قهوه‌ای مایل به سبز تیره است. ریشه‌ها به

نمونه بررسی شده: استان آذربایجان غربی، نقده (مختصات جغرافیایی 36.964386, 45.0557368)، روی گیاه یونجه، جمع‌آوری محمد رضا خیری (IRAN 4668C)، ۹۹/۸/۲۳، توضیحات: این گونه از بیمارگرهای مهم یونجه در دنیا می‌باشد. در دنیا دامنه‌ی میزبانی وسیع دارد و در ایران نیز از میزبان‌های مختلف از قبیل پیاز، چریش، مرکبات، کاهو، گوجه فرنگی، یونجه، کنجد، برنج و جو گزارش شده است (Ershad 2022).

(۲۵-۱۳ میکرومتر هستند (شکل ۸). مشخصات پرگنه روی محیط کشت MEA: پرگنه در محیط کشت MEA پس از ۱۴ روز در دمای 25°C به رنگ سفید مایل به خاکستری تیره، دارای میسلیم هوایی، حاشیه منظم، وسط پرگنه به برآمده و سفید رنگ، دارای ترشحات قطره مانند، کنیدیوم‌زایی فراوان می‌باشد. قطر رشدی پرگنه در این مدت برابر با ۴۰ میلی‌متر است.



شکل ۸. *Stemphylium botryosum* (IRAN 4668C): a, b. Colony on MEA, c-f. Conidiophores and conidia, برابر با ۱۰ میکرومتر).

Fig 8. *Stemphylium botryosum* (IRAN 4668C): a, b. Colony on MEA, c-f. Conidiophores and conidia, (Bars = 10 μm).

نمونه‌های بررسی شده: استان آذربایجان غربی، مهاباد (مختصات جغرافیایی 36.915843, 45.762996)، روی گیاه یونجه، جمع‌آوری محمد رضا خیری (IRAN 4667C) و استان آذربایجان غربی، میاندوآب، روستای حاجی برکنندی (مختصات جغرافیایی 37.124163, 46.047471)، روی گیاه یونجه، ۹۹/۸/۲۱، جمع‌آوری

۸- گونه *Stemphylium vesicarium* (Wallr.) E.G. Simmons, Mycologia 61: 1969.

توصیف ویژگی‌های ریخت‌شناختی: توصیف و تصاویر میکروسکوپی این گونه در منابع Woudenberg *et al.* (2017) و Poursafar *et al.* (2016) آمده است.

بحث

محمد رضا خیری (E17).

توضیحات: این گونه در دنیا دامنه میزبانی وسیع دارد. در ایران از پیاز، آفتابگردان، سانسوریا، بابونه، بومادران، جو و گندم گزارش شده است (Arzanlou et al. 2012, Ershad 2022).

آزمون بیماری زایی

نتایج آزمون بیماری زایی برای هشت جدایه قارچی نماینده در شرایط گلخانه نشان داد، گونه‌های (IRAN 4672C) *Alb. verrucaria* (شکل ۹، b-d)، (IRAN 4665C) *A. kordkuyana* (شکل ۹، e-h)، (IRAN 4674C) *C. zebrina* (شکل ۹، i-l)، (IRAN 4668C) *S. botryosum* (شکل ۹، m-p) و (IRAN 4667C) *S. vesicarium* (شکل ۹، q-t) سبب ایجاد بیماری لکه برگ روی هر دو رقم یونجه (همدانی و قره یونجه) شدند. در گیاهان شاهد که با آب مقطر سترون تیمار شده بودند، هیچ گونه علائمی از بیماری مشاهده نگردید. در گونه‌های (IRAN 4672C) *Alb. verrucaria* و (IRAN 4674C) *C. zebrina* علائم بیماری در ابتدا به صورت لکه‌های موضعی آبسوخته و همچنین کلروز بود، سپس با پیشرفت بیماری در کل سطح برگ حالت کلروز و نکروز مشاهده شد و در نهایت این علائم باعث ریزش برگ‌ها شدند. میزان بیماری زایی توسط این دو گونه بسیار بالا بود، به طوری که باعث از بین رفتن کل سطح برگ‌های گیاه یونجه شد. در مورد گونه‌های (IRAN 4665C) *A. kordkuyana*، (IRAN 4668C) *S. botryosum* و (IRAN 4667C) *S. vesicarium* علائم تقریباً مشابه و به صورت لکه‌های گرد نکروزه به صورت موضعی با حاشیه قهوه‌ای ظاهر شدند که در ابتدا کوچک بوده، سپس با گذر زمان این لکه‌ها بزرگ شدند. آزمون بیماری زایی گونه‌های *Alternaria* sp. (section *Alternaria*)، *A. atra* و *Cu. inaequalis* منفی شد.

پژوهش حاضر در راستای شناسایی ریخت‌شناختی و مولکولی قارچ‌های مرتبط با بیماری لکه‌برگی گیاه یونجه در استان آذربایجان غربی صورت گرفت. بر اساس نتایج حاصل از بررسی ویژگی‌های ریخت‌شناختی و ترسیم تبارنمای تبارشناختی بر اساس نواحی ژنومی ITS و *gapdh* برای آرایه‌های تیره *Pleosporaceae*، سه گونه از جنس آلترناریا در این پژوهش همراه با لکه‌برگی گیاه یونجه شناسایی شدند که شامل گونه‌های *A. kordkuyana* (IRAN 4665C) از بخش *Pseudoalternaria atra* و *A. atra* از بخش *Alternaria sp.* و *Ulocladioides Alternaria* می‌باشند. با بررسی منابع موجود از بین این‌ها، گونه‌های *A. kordkuyana* و *atra* برای اولین بار از روی گیاه یونجه در جهان گزارش می‌شوند. در بین آرایه‌های جنس آلترناریا تاکنون گونه‌های *A. alternata* (Fr.) Keissl.، *A. alternata* (Fr.) Keissl.، *Alternaria tenuis* Nees، *brassicae* (Berk.) Sacc. و *Alternaria tenuissima* (Kunze) Wiltshire در دنیا از میزبان یونجه گزارش شده‌اند (Farr & Rossman 2023). نتایج حاصل از آزمون بیماری زایی برای گونه‌های جنس *Alternaria* در این پژوهش نشان داد بیماری زایی گونه‌ی *A. kordkuyana* مثبت شد و بیماری زایی دو گونه‌ی *Alternaria* sp. (section *Alternaria*) و *A. atra* منفی شد و ممکن است دو گونه *Alternaria* sp. (section *Alternaria*) و *A. atra* به‌عنوان عوامل ثانویه در بیمارگری قارچ‌های همراه با لکه‌برگی گیاه یونجه دخیل باشند. همچنین بر اساس نتایج حاصل از بررسی ویژگی‌های ریخت‌شناختی و ترسیم تبارنمای تبارشناختی برای آرایه‌های تیره *Pleosporaceae*، دو گونه از جنس استمفیلیوم شامل گونه‌های *S. botryosum* و *S. vesicarium* شناسایی شدند. در این تحقیق آزمون بیماری زایی هر دو گونه در شرایط گلخانه اثبات شد. گونه‌های *S. botryosum* و *S. vesicarium* توسط ساماک و همکاران (Samac et al. 2016) به‌عنوان بیمارگرهای مهم یونجه معرفی شده‌اند. لذا



شکل ۹. نتایج آزمون بیماری‌زایی قارچ‌های هیفومیست جدا شده از گیاه یونجه a تصویر گلدان مربوط به شاهد، b-d آزمون بیماری‌زایی گونه *C. zebrina* (IRAN 4665C)، e-h آزمون بیماری‌زایی گونه *Alb. verrucaria* (IRAN 4672C)، i-l آزمون بیماری‌زایی گونه *A. kordkuyana* (IRAN 4665C)، m-p آزمون بیماری‌زایی گونه *S. botryosum* (IRAN 4668C)، q-t آزمون بیماری‌زایی گونه *S. vesicarium* (IRAN 4667C).

Fig 9. Pathogenicity tests results of some hyphomycetous fungi isolated from alfalfa a Pot is the control, b-d Pathogenicity test of the species *Alb. verrucaria* (IRAN 4672C), e-h Pathogenicity test of the species (IRAN 4665C) *A. kordkuyana*, i-l Pathogenicity test of the species *C. zebrina* (IRAN 4674C), m-p Pathogenicity test of the species *S. botryosum* (IRAN 4668C), q-t Pathogenicity test of the species *S. vesicarium* (IRAN 4667C).

بر اساس جستجوی بلاست ناحیه *gapdh* جدایه‌های *C. zebrina* IRAN 4674C و IRAN 4675C تحت گونه *C. zebrina* شناسایی شدند. نتایج آزمون بیماری‌زایی گونه‌ی *C. zebrina* نشان داد که جدایه (IRAN 4674C) بیمارگر گیاه یونجه بوده و با ایجاد لکه در سطح برگ باعث خسارت به یونجه می‌شود، لذا این گونه هم پتانسیل بیماری در منطقه را دارد. در بین آرایه‌های جنس سرکوسپورا تاکنون گونه‌های *C. davisii*، *C. canescens* Ellis & G. Martin، *C. medicaginicola*، *C. helvola* Sacc.، Ellis & Everh.، *C. medicaginis* Ellis & Everh.، *Pavgi & U.P. Singh*، *C. zebrina* Pass. و *C. traversiana* Sacc. از میزبان یونجه در دنیا گزارش شده‌اند (Simmonds 1966، Norse 1974، Alvarez 1976، Gray *et al.* 1980، Pollack 1987، Tai 1979، Bakhshi *et al.* 2015).

سپاسگزاری

نگارندگان از سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور و دانشگاه تربیت مدرس، به خاطر حمایت مالی این پژوهش تشکر می‌نمایند.

با توجه به اینکه نتیجه آزمون بیماری‌زایی آن‌ها در این پژوهش نیز مثبت بود، لذا این گونه‌ها پتانسیل ایجاد بیماری در منطقه را دارند. علاوه بر این، بر اساس نتایج حاصل از استنتاج تبارزایی آرایه‌های تیره *Pleosporaceae*، یک گونه از جنس کوروولاریا به نام گونه *Cu. inaequalis* شناسایی شد. با توجه به بررسی منابع و مقالات معتبر گونه مذکور اولین بار در دنیا از روی گیاه یونجه جداسازی و گزارش می‌گردد. آزمون بیماری‌زایی این گونه در این پژوهش منفی شد و احتمالاً این گونه به‌عنوان عامل ثانویه در بیماری‌زایی آرایه‌های همراه با لکه برگی گیاه یونجه دخیل باشد.

بر اساس نتایج حاصل از بررسی ویژگی‌های ریخت‌شناختی و ترسیم تبارنمای تبارشناختی بر اساس ناحیه ژنی ITS برای آرایه‌های جنس آلیفیمبریا، دو جدایه IRAN 4672C و IRAN 4673C تحت گونه *Alb. verrucaria* شناسایی شدند. نتایج آزمون بیماری‌زایی گونه‌ی *Alb. verrucaria* نشان داد که این گونه بیمارگر گیاه یونجه بوده و با ایجاد لکه در سطح برگ باعث خسارت به یونجه می‌شود، لذا این گونه هم پتانسیل بیماری در منطقه را دارد. این گونه قبلاً با نام *Myrothecium verrucaria* (Alb. & Ditmar) Schwein. از روی گیاه یونجه در دنیا به عنوان بیمارگر ریشه گزارش شده است (Leath *et al.* 1983).

منابع

- Alvarez M. G. 1976. Primer catalogo de enfermedades plantas de Mexicanas. Fitofilo 71: 1-169.
- Arzanlou M., Khodaei S. and Babai-Ahari A. 2012. *Helianthus annuus* as a natural host for *Stemphylium vesicarium* in Iran. Australasian Plant Disease Notes 7: 167-170.
- Ayoubi N., Soleimani M. J., Zare R. and Zafari D. 2017. First report of *Curvularia inaequalis* and *C. spicifera* causing leaf blight and fruit rot of strawberry in Iran. Nova Hedwigia 105(1-2): 75-85.
- Bakhshi M., Arzanlou M. and Babai-Ahari A. 2012. Morphological and molecular characterization of *Cercospora zebrina* from black bindweed in Iran. Plant Pathology and Quarantine 2: 125-130.
- 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(1): 65-86.
- Bakhshi M., Arzanlou M., Zare R., Groenewald J. Z. and Crous P. W. 2019. New species of *Septoria* associated with leaf spot diseases in Iran. Mycologia 111(6): 1056-1071.
- Bakhshi M., Zare R., Jafary H., Arzanlou M. and Rabbani-nasab H. 2021. Phylogeny of three *Ramularia* species occurring on medicinal plants of the Lamiaceae. Mycological Progress 20(1): 27-38.
- Bensch K., Braun U., Groenewald J. Z. and Crous P. W. 2012. The genus *Cladosporium*. Studies in Mycology 72: 1-401.

- de Ávila M. R., Agnol M. D., Martinelli J. A., da Silva G. B. P., Schneider-Canny R., Souza J. A. R. and Fernandes A. A. 2015. First report in Southern Brazil of *Alternaria alternata* causing *Alternaria* leaf spot in alfalfa (*Medicago sativa*). African Journal of Agricultural Research 10(6): 491-493.
- Deng J. X., Li M. J., Paul N. C., Oo M. M., Lee H. B., Oh S. K. and Yu S. H. 2018. *Alternaria brassicifolii* sp. nov. isolated from *Brassica rapa* subsp. *pekinensis* in Korea. Mycobiology 46(2): 172-176.
- Díaz-Valderrama J. R., Casa-Coila V. H., Sencia-Torres V., Macedo-Valdivia D., Zanabria-Gálvez S. J., Baributsa D. and Woloshuk C. 2021. First report of Stemphylium leaf spot caused by *Stemphylium vesicarium* on alfalfa (*Medicago sativa*) in Peru. Plant Disease 105(4): 1196.
- Ershad D. 2022. Fungi and fungal analogues of Iran. Ministry of Agriculture, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Iranian Research Institute of Plant Protection, Iran.
- Farr D. F. and Rossman A. Y. 2023. Fungal Databases, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA. [Retrieved 2023 July 12]. Available online at <https://nt.ars-grin.gov/fungalDATABASES/>.
- Gray F. A., Haaland R. L., Clark E. M. and Ball D. M. 1980. Diseases of alfalfa in Alabama. Plant Disease 64(11): 1015-1017.
- Han Y. Z., Lu Y. X., Wu C. F., Fan Z. W., Yang Y. M., Shen Q. and Zeng B. 2019. First report of *Cladosporium tenuissimum* associated with leaf spot of alfalfa (*Medicago sativa*) in China. Plant Disease 103(7): 1778-1778.
- Hernandez-Restrepo M., Madrid H., Tan Y. P., Da Cunha K. C., Gene J., Guarro J. and Crous P. W. 2018. Multi-locus phylogeny and taxonomy of *Exserohilum*. Persoonia 41(1): 71-108.
- Katoh K. and Standley D. M. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. Molecular Biology and Evolution 30(4): 772-780.
- Khodaparast S. A., Asgari B. and Bakhshi M. 2022. Color atlas of Iranian fungi. University of Guilan, Guilan, Iran.
- Leath K. T. and Kendall W. A. 1983. *Myrothecium roridum* and *M. verrucaria* pathogenic to roots of red clover and alfalfa. Plant Disease 67(10): 1154-1155.
- Lombard L., Houbraken J., Decock C., Samson R. A., Meijer M., Réblová M. and Crous P. W. 2016. Generic hyper-diversity in Stachybotriaceae. Persoonia 36(1): 156-246.
- Maddison W. P. 2008. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Evolution 62: 1103-1118.
- Madrid H., Da Cunha K. C., Gené J., Dijksterhuis J., Cano J., Sutton D. A. and Crous P. W. 2014. Novel *Curvularia* species from clinical specimens. Persoonia 33(1): 48-60.
- Manamgoda D. S., Cai L., Bahkali A. H., Chukeatirote E. and Hyde K. D. 2011. *Cochliobolus*: an overview and current status of species. Fungal Diversity 51: 3-42.
- Manamgoda D. S., Cai L., McKenzie E. H. C., Chukeatirote E. and Hyde K. D. 2012. Two new *Curvularia* species from northern Thailand. Sydowia 64(2): 255-266.
- Manamgoda D. S., Rossman A. Y., Castlebury L. A., Crous P. W., Madrid H., Chukeatirote E. and Hyde K. D. 2014. The genus *Bipolaris*. Studies in Mycology 79(1): 221-288.
- Marin-Felix Y., Groenewald J. Z., Cai L., Chen Q., Marinowitz S., Barnes I. and Crous P. W. 2017. Genera of Phytopathogenic Fungi: GOPHY 1. Studies in Mycology 86: 99-216.
- Marin-Felix Y., Hernandez-Restrepo M. and Crous P. W. 2020. Multi-locus phylogeny of the genus *Curvularia* and description of ten new species. Mycological Progress 19: 559-588.
- Marin-Felix Y., Hernández-Restrepo M., Wingfield M. J., Akulov A., Carnegie A. J., Cheewangkoon R. and Crous P. W. 2019. Genera of Phytopathogenic Fungi: GOPHY 2. Studies in Mycology 92: 47-133.
- Mazahery-Laghab H. 2008. Introduction to Forage Crops. Bu-Ali Sina University Press. Hamedan, Iran (In Persian).
- Mobtaker H. G., Akram A. and Keyhani A. 2010. Economic modeling and sensitivity analysis of the costs of inputs for alfalfa production In Iran: A case study from Hamedan province. Ocean Journal of Applied Science 3(3): 313e9.
- Möller E. M., 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(22): 6115.

- Naseri B., Marefat A. R. 2008. Seasonal dynamics and prevalence of alfalfa fungal pathogens in Zanjan province, Iran. *International Journal of Plant Production* 2(4): 327-340
- Norse D. 1974. Plant diseases in Barbados (No. 18). Commonwealth Mycological Institute, Kew, UK.
- Nugent L. K., Sangvichen E. K., Sihanonth P., Ruchikachorn N. and Whalley A. J. 2006. A revised method for the observation of conidiogenous structures in fungi. *Mycologist* 20(3): 111-114.
- Nylander J. A. A. 2004. MrModeltest v25. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, Uppsala, Sweden.
- Parhizi N., Zafari D. and Soleymani M J. 2017. Peppers: Study of the pathogenic fungi and pseudo fungi on aerial parts of alfalfa in Hamadan province. Faculty of Agriculture, Iran.
- Pollack F. G. 1987. An annotated compilation of *Cercospora* names. *Mycological Memoirs* 12: 1-212.
- Poursafar A., Ghosta Y. and Javan-Nikkhah M. 2016. A taxonomic study on *Stemphylium* species associated with black (sooty) head mold of wheat and barley in Iran. *Mycologia Iranica* 3: 99-109.
- Poursafar A., Ghosta Y., Orina A. S., Gannibal P. B., Javan-Nikkhah M. and Lawrence D. P. 2018. Taxonomic study on *Alternaria* sections Infectoriae and *Pseudoalternaria* associated with black (sooty) head mold of wheat and barley in Iran. *Mycological Progress* 17: 343-356.
- Ronquist F., Teslenko M., Van Der Mark P., Ayres D. L., Darling A., Höhna S. and Huelsenbeck J. P. 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61(3): 539-542.
- Samac D. A., Rhodes L. H. and Lamp W. O. 2016. Compendium of alfalfa diseases and pests. Third edition. The American Phytopathological Society, Minnesota, USA.
- Simmonds J. H. 1966. Host index of plant diseases in Queensland. Queensland Department of Primary Industries, Brisbane.
- Tai F. L. 1979. *Sylloge Fungorum Sinicorum*. Science Press, China.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A. and Kumar S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30(12): 2725-2729.
- Tan Y. P., Madrid H., Crous P. W. and Shivas R. G. 2014. *Johnalcornia* gen. et. comb. nov., and nine new combinations in *Curvularia* based on molecular phylogenetic analysis. *Australasian Plant Pathology* 43: 589-603.
- Tibpromma S., Hyde K. D., McKenzie E. H., Bhat D. J., Phillips A. J., Wanasinghe D. N. and Karunarathna S. C. 2018. Fungal diversity notes 840–928: micro-fungi associated with Pandanaceae. *Fungal Diversity* 93: 1-160.
- White T. J., Bruns T., Lee S. J. W. 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.
- Woudenberg J. H. C., Groenewald J. Z., Binder M. and Crous P. W. 2013. *Alternaria* redefined. *Studies in Mycology* 75(1): 171-212.
- Woudenberg J. H. C., Hanse B., Van Leeuwen G. C. M., Groenewald J. Z. and Crous P. W. 2017. *Stemphylium* revisited. *Studies in Mycology* 87(1): 77-103.
- Woudenberg J. H. C., Seidl M. F., Groenewald J. Z., De Vries M., Stielow J. B., Thomma B. P. H. J. and Crous P. W. 2015. *Alternaria* section *Alternaria*: Species, formae speciales or pathotypes? *Studies in Mycology* 82(1): 1-21.