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

سیما خدایی[۱]، مهدی ارزنلو[۲]**، اسداله بابای اهری[۳]، عمر روتا استابلی[٤] و ایلاریا پرتوت[٥]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹٦/۸/۲۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹٦/۱۰/۲٦)

چکیده

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

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

---

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

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

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

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

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

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

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

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

S. Khodaei[1], M. Arzanlou[1*], A. Babai-Ahari[1], O. Rota-Stabelli[2], and I. Pertot[2]

(Received: 18.11.2017; Accepted: 16.1.2018)

Abstract

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

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

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

1. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, 51666-16471, Iran.
2. Sustainable Agro-Ecosystems and Bioresources Department, University of Trento/Fondazione Edmund Mach (FEM), San Michele all'Adige, Trento, Italy.

مقدمه

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

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

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

شکل ۱– نقشه مناطق نمونه‌برداری در شمال غرب ایران.

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

A. medicaginicola را بـه ترتیـب از *Paliurus spina-christi* L.، *Rumex crispus* L.، *Ailanthus altissima* Swingle، *Trigonella foenum-graecum* L.، *Solanum lycopersicum* L. و *Medicago sativa* L. از اسـتان‌هـای گیلان، مازندران، خوزستان و اصفهان گزارش نموده‌انـد. از آنجایی که تاکنون بررسی جامعی در خصـوص گونـه‌هـای متعلق بـه خـانواده Didymellaceae در اسـتان آذربایجـان شرقی صورت نگرفته است، مطالعه حاضر به منظور تعیـین تنوع گونه‌ای اعضای این خـانواده بـا تکیـه بـر روش‌هـای ریخت‌شناختی و مولکولی (با اسـتفاده از تجزیـه و تحلیـل توالی نوکلئوتیدی نواحی ITS، LSU و TUB) انجام شد.

مواد و روش‌های بررسی

نمونه‌برداری، جداسازی و خالص‌سازی قارچ‌ها

نمونه‌برداری به صورت تصادفی از خاک، گیاهان دارای علایم زنگ، سفیدک درونی و سفیدک سطحی، بافـت‌هـای زنده گیاهان سالم و یا دارای علایم مشکوک به آلودگی بـه این گروه قارچی و بقایای گیاهی موجود در خاک یا آب از مناطق مختلف استان آذربایجان شرقی و غربـی انجـام شـد (شکل ۱). نمونه‌ها متعاقب درج مشخصات (تاریخ و محل جمع‌آوری نمونه) در داخل پاکت‌های کاغذی جداگانـه بـه آزمایشگاه منتقل شده و بلافاصله مورد بررسی قرار گرفتند. برای جداسازی گروه‌های قـارچی مـورد نظـر از خـاک از روش *وارکاپ* (Warcup 1950) استفاده شـد و کشـت در محـیط غـذایی عصـاره گـیلاس آگـار (CA؛ Cherry-decoction agar؛ Boerema *et al*. 2004) انجـام شـد. در نمونه‌های فاقد اسپور و ریسه قارچی، قطعـات کـوچکی از قسمت‌های مختلف گیاهان سالم و بقایـای گیـاهی مـرده و نیز قطعاتی از حدفاصل بخش‌های سالم و دارای علایـم در گیاهان بیمار برش داده شدند. این قطعات توسط اتانول ۷۰ درصد به مدت ۹۰-۲۰ ثانیه (بسته به ضـخامت بافـت‌هـا) ضدعفونی سطحی و بلافاصله دو بار با آب مقطـر سـترون شستشو شدند. قطعات بر روی کاغـذ صـافی سـترون آب-گیری و به محیط غـذایی CA منتقـل شـدند. تشـتک‌هـای

پتری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس در تاریکی نگهداری شده و به مدت ۲-۱ هفته هر روز مورد بازبینی قرار گرفتند. در صورت رشد قارچ‌های متعلق به این خانواده خالص‌سازی به طریق تک اسپور صورت پذیرفت. بدین منظور، در زیر استریومیکروسکوپ، اسپورهای قارچ توسط سوزنی ظریف و سترون به طور کامل در داخل آب موجود در تشتک پتری پخش شدند. تشتک پتری به مدت ۲٤ ساعت به حالت مورب در دمای اتاق نگهداری شدند. سپس تشتک با بینوکولر بررسی شده و اسپورهای جوانه-زده همراه با قطعه کوچکی از محیط غذایی اطراف آن توسط سوزن سترون به محیط‌کشت جدید منتقل شدند. در نمونه‌های دارای اسپور یا ریسه قارچی خالص سازی به طور مستقیم به روش تک اسپور یا نوک ریسه انجام شد (Szentivanyi *et al.* 2005). جدایه‌های قارچی خالص-سازی شده در تیوب‌های دو میلی‌لیتری حاوی محیط کشت سیب زمینی هویج آگار (PCA؛ Potato carrot agar؛ Crous *et al*. 2009) در مجموعه کشت‌های زنده دانشگاه تبریز و مجموعه کشت‌های زنده موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور برای مطالعات بعدی نگهداری شدند. نمونه‌های گیاهی دارای علایم آلودگی در مجموعه هرباریوم موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور ذخیره و کد هرباریومی برای نمونه‌ها دریافت شد.

بررسی صفات ریخت‌شناختی

جهت شناسایی جدایه‌های قارچی بر پایه صفات ریخت‌شناختی از روش بورما و همکاران (Boerema *et al*. 2004) استفاده شد. برای این منظور، دیسک‌های پنج میلی‌متری از هر جدایه قارچی به مرکز تشتک‌های پتری حاوی آرد یولاف آگار (OA؛ Oatmeal agar؛ Crous *et al*. 2009) و عصاره‌ی مالت آگار (MEA؛ Malt extract agar؛ Crous *et al*. 2009) منتقل شدند. روی محیط غذایی OA به طور معمول تشکیل پیکنیدیوم‌ها به فراوانی صورت می‌پذیرد، در حالی که MEA باعث القای تولید رنگدانه و تشکیل کریستال می‌شود. تشتک‌ها به مدت یک هفته در دمای ۲۳ درجه سلسیوس در تاریکی نگهداری شدند و ویژگی‌های پرگنه ثبت شد. در هفته دوم به منظور القای تولید رنگدانه و تشکیل پیکنیدیوم‌ها تشتک‌ها زیر نور نزدیک به فرابنفش (NUV؛ Near-ultraviolet) با چرخه نوری ۱۳ ساعته و تاریکی ۱۱ ساعته نگهداری شدند. در محیط غذایی MEA تشکیل رنگدانه و کریستال و نیز آزمون لکه NaOH مورد بررسی قرار گرفت. در محیط غذایی OA صفات میکروسکوپی در ۳۰ تکرار اندازه‌گیری و بررسی شدند. برش‌های عرضی پیکنیدیوم‌ها با استفاده از دستگاه میکروتوم انجمادی Jung AG Heidelberg تهیه شدند. تصاویر میکروسکوپی با استفاده از دوربین دیجیتال تعبیه شده روی میکروسکوپ Olympus BX-41 تهیه شدند.

مطالعات مولکولی

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

استفاده شدند. واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR؛ Polymerase Chain Reaction) توسط دستگاه Biometra T Professional thermal cycler در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. مخلوط واکنش حاوی ۶۰-۵۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۱۲/۵ میکرولیتر DreamTaq Green PCR Master Mix و ۰/۲ µM از هر پرایمر بود. جهت تکثیر ناحیه LSU یک چرخه دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه؛ ۳۵ چرخه تکثیر شامل دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، دمای ۴۸ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه و دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۲۰ ثانیه و یک چرخه دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۷ دقیقه اعمال شد. واکنش PCR جهت تکثیر ناحیه ITS شامل یک چرخه دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه؛ ۳۵ چرخه تکثیر شامل دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، دمای ۴۸ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه و یک چرخه دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۷ دقیقه بود. جهت تکثیر ژن TUB یک چرخه دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه؛ ۳۵ چرخه تکثیر شامل دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، دمای ۵۲ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه و یک چرخه دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۷ دقیقه اعمال شد. محصولات PCR با استفاده از آنزیم Exo-Sap مطابق دستورالعمل شرکت سازنده خالص‌سازی و به وسیله کیت BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit در دو جهت مستقیم و معکوس توالی‌یابی شدند.

توالی‌های برایند از دو توالی معکوس و مستقیم با استفاده از نرم‌افزارهای DNA Dragon v. 1.6.0 (Hepperle 2017) و BioEdit v. 5.0.6 (Hall 1999) ایجاد شدند. کد دست‌یابی در بانک ژن و اطلاعات مربوط به جدایه‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است. داده‌های توالی به دست آمده از بانک ژن با داده‌های جدایه‌های جمع‌آوری شده در مطالعه حاضر مقایسه شدند. توالی‌های این سه ناحیه به طور جداگانه با استفاده از نرم‌افزار Muscle (Edgar 2004) موجود در نرم‌افزار Mega7 (Kumar *et al*. 2016) زیرهم‌چینی و در صورت نیاز به طور دستی ویرایش شدند. در ادامه، جهت تجزیه و تحلیل چندژنی روابط تبارشناختی، الحاق رج‌بندی‌های تک ژنی و تبدیل فایل فاستا به صورت فایل نکسوس با نرم‌افزار Mesquite v. 3.04 (Maddison & Maddison 2001) انجام شد. مناسب‌ترین مدل جایگزینی با استفاده از نرم-افزار MrModelTest v. 2.2 (Nylander 2004) تعیین شد. تبارنما به روش بیژین (Bayesian) و با استفاده از نرم‌افزار MrBayes v. 3.2.1 (Ronquist & Huelsenbeck 2003) ترسیم شد. برای این منظور، دو استنتاج بیژین، با پارامتر گرمایی ۰/۱۵ و چهار زنجیره MCMC با استفاده از تبارنماهای تصادفی برای ۱۰۰۰۰۰۰ نسل راه‌اندازی شد و تبارنماها در هر ۱۰۰۰ نسل یک بار نمونه‌برداری شدند. ۲۵ درصد از تبارنماهای ذخیره شده حذف شده و تبارنمای برآیند و احتمال پسین (PP؛ Posterior probability) با استفاده از تبارنماهای باقیمانده محاسبه گردیدند. *Neocamarosporium betae* Ariyaw. & Hyde CBS 523.66 به عنوان برون گروه استفاده شد. تبارنمای برآیند با استفاده از نرم‌افزار FIG TREE v. 1.3.1 (Rambaut 2009) ویرایش و مستخرج شد.

نتایج و بحث

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

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

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

Species	Isolate	Herbarium Code	Substrate/Host	Sampling site	Date of sampling	Reference	GeneBank Accession Numbers		
							TUB	LSU	ITS
Ascochyta herbicola	T26I1	-	*Achillea* sp.	Bostan Abad, EA	Apr. 2015	Present study	MK140515	–	MK100133
	CC447	T470	*Rosa canina*	Afil, EA	Jul. 2014	Present study	MK140514	MK138715	MK100131
	B-2-13	-	*Populus alba*	Bostan Abad, EA	Sep. 2013	Present study	MK140513	MK138723	MK100140
	R23I2	-	Rust on *Tragopogon graminifolius*	Firooragh, Khoy, WA	Aug. 2013	Present study	MK140522	MK138716	MK100132
	T27I1; IRAN 3218 C	-	*Falcaria vulgaris*	Bostan Abad, EA	Apr. 2015	Present study	MK140516	MK138717	MK100134
	T30I1	-	*Ranunculus repens*	Hashtrood, EA	Apr. 2015	Present study	MK140517	MK138722	MK100139
	T35I1	-	Unknown plant debris on soil	Khorshid, Hashtrood, EA	Apr. 2015	Present study	MK140519	MK138720	MK100137
	T52I1	-	*Verbascum thapsus*	Bozghoosh, EA	Apr. 2015	Present study	MK140520	MK138719	MK100136
	T59I3	-	*Capsella bursa-pastoris*	Bozghoosh, EA	Apr. 2015	Present study	MK140521	MK138718	MK100135
	T64I1	-	*Papaver somniferum*	Baftan, EA	Apr. 2015	Present study	MK140518	MK138721	MK100138
	CBS 629.97 (R)	-	Water	USA	-	Chen *et al.* 2017	GU237614	GU238083	GU237898
Ascochyta medicaginicola	T306I1	T306	*Medicago sativa*	Kaleybar, EA	Oct. 2012	Present study	MK140523	-	MK100151
	T232I2	T232	*Vicia* sp.	Kaleybar, EA	Oct. 2012	Present study	MK140524	MK138724	MK100152
	CBS 112.53 (T)	-	*Medicago sativa*	USA	-	Chen *et al.* 2017	GU237628	GU238101	GU237749
	CBS 404.65 (R)	-	*Medicago sativa*	Canada	-	Chen *et al.* 2017	GU237629	GU238102	GU237859
	CBS 316.90	-	*Medicago sativa*	Czech Republic	-	Chen *et al.* 2017	GU237630	GU238103	GU237828

Table 1. Continued.

جدول ۱ ـ ادامه.

Species	Isolate	Herbarium Code	Substrate/Host	Sampling site	Date of sampling	Reference	GeneBank Accession Numbers		
							TUB	LSU	ITS
Ascochyta rabiei	CBS 534.65	-	*Cicer arietinum*	India	-	Chen *et al.* 2017	GU237533	GU237970	GU237886
Boeremia diversispora	CBS 102.80	-	*Phaseolus vulgaris*	Kenya	-	Chen *et al.* 2017	GU237492	GU237930	GU237725
Boeremia exigua	LS19; IRAN 3220 C	-	*Cirsium* sp.	Kaleybar, EA	Oct. 2012	Present study	MH760741	MK138769	MK100214
	T309I1	T309	*Falcaria vulgaris*	Kaleybar, EA	Nov. 2014	Present study	MH760740	MK138771	MK100216
	R19I2	-	Rust on *Sorghum halepense*	Kaleybar, EA	Oct. 2012	Present study	MH760739	MK138770	MK100215
	CBS 431.74 (R)	-	*Solanum tuberosum*	Netherlands	-	Chen *et al.* 2017	FJ427112	EU754183	FJ427001
	CBS 101197	-	*Forsythia* sp.	Netherlands	-	Chen *et al.* 2017	GU237493	GU237931	GU237718
	CBS 101207 (T)	-	*Syringa vulgaris*	Netherlands	-	Chen *et al.* 2017	GU237503	GU237941	GU237721
Boeremia foveata	CBS 109176 (R)	-	*Solanum tuberosum*	Bulgaria	-	Chen *et al.* 2017	GU237508	GU237946	GU237742
Boeremia sambuci-nigrae	CBS 629.68 (T)	-	*Sambucus nigra*	Netherlands	-	Chen *et al.* 2017	GU237517	GU237955	GU237897
Boeremia strasseri	LS27; IRAN 3214 C	TL27	*Potentilla* sp.	Kaleybar, EA	Oct. 2012	Present study	MH760742	MK138763	MK100208
	LS41	-	*Potentilla* sp.	Kaleybar, EA	Oct. 2012	Present study	MH760743	MK138764	MK100209
	P22I1	-	*Mentha pulegium*	Kaleybar, EA	Oct. 2012	Present study	MH760745	MK138765	MK100210
	R12I2	-	Rust on *Mentha pulegium*	Kaleybar, EA	Oct. 2012	Present study	MH760744	MK138766	MK100211
	R16I3	-	Rust on *Rumex* sp.	Kaleybar, EA	Oct. 2012	Present study	MH760746	MK138767	MK100212
	R16I4	-	Rust on *Rumex* sp.	Kaleybar, EA	Oct. 2012	Present study	MH760747	MK138768	MK100213
	CBS 126.93	-	*Mentha* sp.	Netherlands	-	Aveskamp *et al.* 2010	GU237518	GU237956	GU237773
	CBS 261.92	-	*Mentha piperita*	USA	-	Aveskamp *et al.* 2010	GU237519	GU237957	GU237812
Didymella aurea	CBS 269.93 (T)	-	*Medicago polymorpha*	New Zealand	-	Chen *et al.* 2017	GU237557	GU237999	GU237818

جدول ۱ ـ ادامه.

Table 1. Continued.

Species	Isolate	Herbarium Code	Substrate/Host	Sampling site	Date of sampling	Reference	GeneBank Accession Numbers		
							TUB	LSU	ITS
Didymella glomerata	T9I1	-	*Alyssum alyssoides*	Nematollah, Sofian, EA	Apr. 2015	Present study	MH760753	MK138754	MK100196
	KH-12-A	-	*Lolium* sp.	Khoy, WA	Sep. 2013	Present study	MH760760	MK138739	MK100180
	KH-19-A	-	*Alyssum* sp.	Khoy, WA	Sep. 2013	Present study	MH760761	-	-
	KH-1-A	-	*Hesperocyparis arizonica*	Khoy, WA	Sep. 2013	Present study	MH760762	MK138740	MK100181
	P3H1	T78	*Peganum harmala*	Khoy, WA	Jul. 2014	Present study	MH760764	MK138743	MK100184
	P4H1	TP4	*Peganum harmala*	Khoy, WA	Jul. 2011	Present study	MH760765	MK138744	MK100185
	T1I1	-	Unknown plant debris on soil	Shend Abad, EA	Apr. 2015	Present study	MH760754	MK138748	MK100190
	T293I1	-	*Secale montanum*	Salkadeh, WA	Nov. 2014	Present study	MH760755	MK138749	MK100191
	T388I1	-	*Aquilegia vulgaris*	Jolfa, EA	Oct. 2014	Present study	MH760756	MK138751	MK100193
	M17I1	-	Powdery mildew on *Chrysanthemum* sp.	Kaleybar, EA	Nov. 2012	Present study	MH760763	MK138742	MK100183
	M140; IRAN 3216 C	-	*Vitis vinifera*	Miandoab, WA	Jun. 2011	Present study	MH760759	MK138738	MK100179
	T4I1	-	*Ranunculus repens*	Nematollah, Sofian, EA	Apr. 2015	Present study	MH760758	MK138752	MK100194
	T321I1	-	*Olea europaea*	Zanjan, Zanjan province	Nov. 2011	Present study	MH760757	MK138750	MK100192
	M13I1	-	Powdery mildew on *Plantago major*	Khameneh, EA	Oct. 2012	Present study	MH760749	MK138746	MK100188
	M9I3	-	Rust on *Convolvulus arvensis*	Chercher, Zonooz, EA	Nov. 2012	Present study	MH760750	MK138747	MK100189
	SH-E	-	*Cucumis melo*	Maragheh, EA	Aug. 2013	Present study	MH760752	-	MK100187
	R13I9	-	Rust on *Picnomon acarna*	Mianeh, EA	Oct. 2012	Present study	MH760751	MK138745	MK100186
	LS40	-	*Inula helenium*	Kaleybar, EA	Oct. 2012	Present study	MH760748	MK138741	MK100182
	CBS 528.66 (R)	-	*Chrysanthemum* sp.	Netherlands	-	Chen *et al.* 2017	FJ427124	EU754184	FJ427013
	CBS 464.97	-	Indoor environment	Netherlands	-	Aveskamp *et al.* 2010	FJ427123	GU238009	FJ427012
Didymella tanaceti	LS13; IRAN 3217 C	TL13	*Buddleja* sp.	Kaleybar, EA	Oct. 2010	Present study	MH760767	MK138755	MK100200
	TAS 041-0071	-	*Tanacetum cinerariifolium*	Australia	-	Pearce *et al.* 2015	KT287000	KT287040	KT287039

Table 1. Continued.

جدول ۱ ــ ادامه.

Species	Isolate	Herbarium Code	Substrate/Host	Sampling site	Date of sampling	Reference	GeneBank Accession Numbers		
							TUB	LSU	ITS
Epicoccum nigrum	R2I2	-	Rust on *Cynodon dactylon*	Zonooz, EA	Nov. 2013	Present study	MK140527	MK138737	MK100177
	T312I2	T312	*Salix alba*	Kaleybar, EA	Jun. 2012	Present study	MK142301	MK138733	MK100173
	T312I3; IRAN 3213 C	T312	*Salix alba*	Kaleybar, EA	Jun. 2012	Present study	MK142300	MK138734	MK100174
	CBS 173.73 (T)	-	*Dactylis glomerata*	USA	-	Chen *et al.* 2017	FJ427107	GU237975	FJ426996
Epicoccum sorghinum	CBS 179.80	-	*Sorghum vulgare*	Puerto Rico	-	Chen *et al.* 2017	FJ427173	GU237978	FJ427067
Heterophoma novae-verbascicola	LS30	TL30	*Sorghum halepense*	Kaleybar, EA	Oct. 2012	Present study	MH760772	MK138774	MK100219
	LS37; IRAN 3215 C	-	Unknown plant debris on soil	Kaleybar, EA	Oct. 2012	Present study	MH760773	MK138775	MK100220
	LS18	TL18	*Equisetum arvense*	Kaleybar, EA	Oct. 2012	Present study	MH760770	MK138772	MK100217
	LS22	TL22	*Urtica dioica*	Kaleybar, EA	Oct. 2012	Present study	MH760771	MK138773	MK100218
	P19I1	-	Unknown plant branch on soil	Kaleybar, EA	Oct. 2012	Present study	MH760774	MK138776	MK100221
	CBS 114.93	-	*Verbascum* sp.	Netherlands	-	Aveskamp *et al.* 2010	GU237638	GU238119	GU237753
	CBS 127.93	-	*Verbascum densiflorum*	Netherlands	-	Aveskamp *et al.* 2010	GU237639	GU238120	GU237774
Heterophoma poolensis	CBS 113.20	-	-	-	-	Chen *et al.* 2017	GU237638	GU238119	GU237751
Nothophoma quercina	CBS 633.92	-	*Microsphaera alphitoides* from *Quercus* sp.	Ukraine	-	Chen *et al.* 2017	GU237609	EU754127	GU237900
Nothophoma infossa	CBS 123395	-	*Fraxinus pennsylvanica*	Argentina	-	Chen *et al.* 2017	FJ427135	GU238089	FJ427025
Phoma eupyrena	K-26-1; IRAN 3223 C	-	soil	Maragheh, EA	Aug. 2014	Present study	MK140525	MK138728	MK100168
	CBS 374.91	-	*Solanum tuberosum*	Netherlands	-	Aveskamp *et al.* 2010	FJ427110	GU238072	FJ426999
	CBS 527.66	-	Soil	Germany	-	Aveskamp *et al.* 2010	FJ427111	GU238073	FJ427000

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

تجزیه و تحلیل تبارشناختی

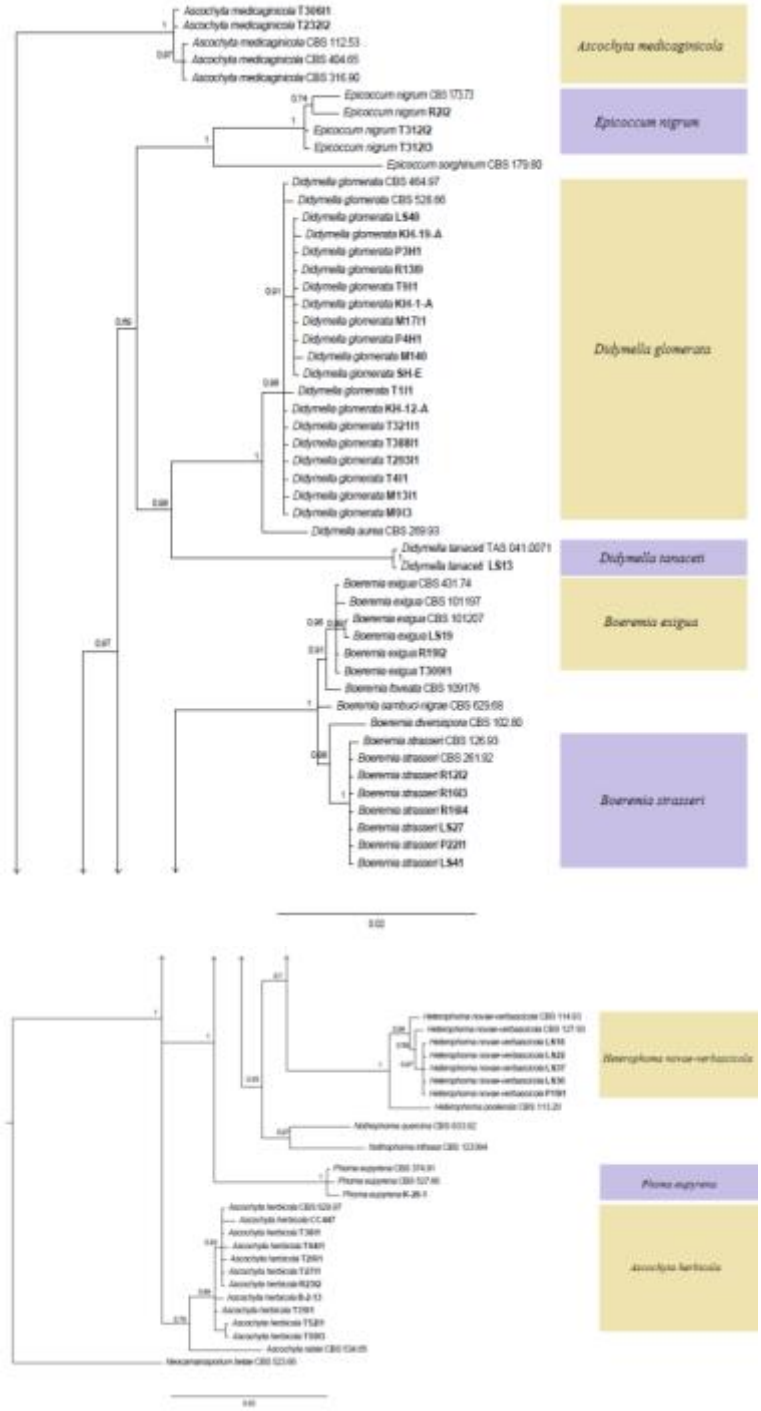
جهت تجزیه و تحلیل تبارشناختی از داده‌های توالی سه ناحیه ITS، LSU و TUB استفاده شد. مجموعه داده‌های نواحی الحاق شده شامل ۲۲۲۰ کاراکتر (حدود و ثغور نواحی ژنومی: TUB= ۱-۳٤۳، ITS= ۳٤٤-۸۹۹ و LSU= ۹۰۰-۲۲۲۰) بود که دارای ۲۸٤ (TUB= ۱۲۷، ITS= ۹۵ و LSU= ٦۲) الگوی مکانی منحصر به فرد بود. نرم افزار MrModelTest مدل GTR+G (General Time Reversible+Gamma) را به عنوان مناسب‌ترین مدل برای هر سه مجموعه داده پیشنهاد داد. تجزیه و تحلیل بیژین منتهی به ٤۰۰۰۰۰ نسل و ۵۸۸ تبارنما شد. بعد از حذف ۲۵ درصد اولیه تبارنماهای جمع‌آوری شده، تبارنمای اجمالی از تبارنماهای باقی مانده محاسبه گردید. تجزیه و تحلیل تبارشناختی با استفاده از استنتاج بیژین جدایه‌های به دست آمده در مطالعه حاضر را به نه خوشه مجزا تفکیک نمود (شکل ۲). بر این اساس جدایه‌ها تحت عناوین *Boeremia exigua*، *Epicoccum nigrum* Link، *strasseri* Aveskamp *et al.*، *Didymella glomerata* A. Chen & Cai، *Didymella tanaceti* Pearce *et al.*، *medicaginicola* Ascochyta herbicola Chen & Cai، *Phoma eupyrena* Sacc. و *Heterophoma novae-verbascicola* Chen & Cai شناسایی شدند.

مطالعات ریخت‌شناختی

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

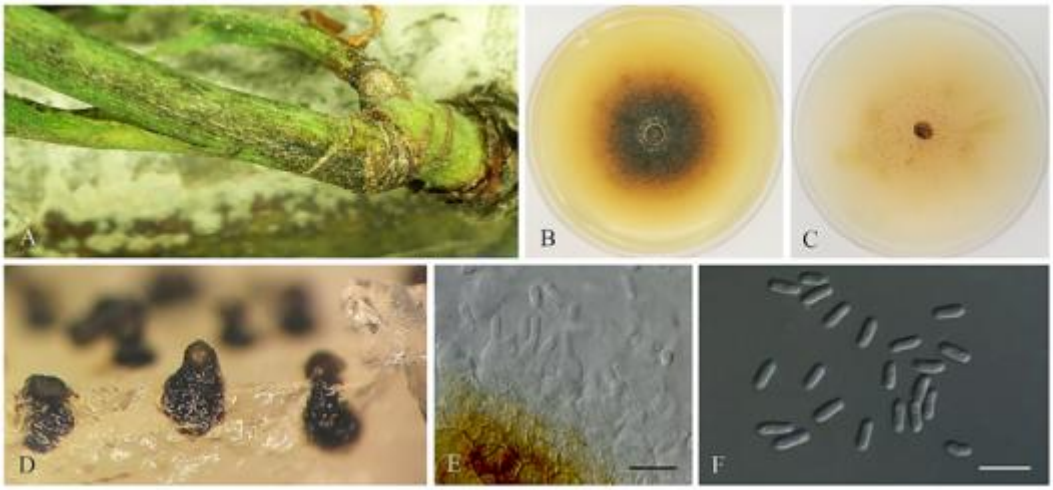
پرگنه روی محیط کشت MEA پس از هفت روز در دمای ۲۳ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی مسطح، گرد، دارای حاشیه صاف و منظم، به رنگ زرد طلایی (luteous) با مرکز قهوه‌ای تیره (به دلیل تولید متراکم پیکنیدیوم)، دارای ریسه‌های هوایی کرکی و سفید بود. قطر پرگنه‌های هفت روزه ٦۰ میلی‌متر بود. این گونه قادر به ایجاد تغییر در رنگ محیط کشت MEA و تولید کریستال نبود و آزمون NaOH منفی بود. پرگنه روی محیط کشت OA پس از هفت روز در دمای ۲۳ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی مسطح، گرد، دارای حاشیه صاف و منظم، بی‌رنگ، با مرکز بژ مایل به زرد و دارای بخش‌هایی به رنگ سبز، دارای میسلیوم هوایی اندک و سفید بود. قطر پرگنه هفت روزه ۵۵ میلی‌متر بود. در رنگ محیط کشت OA تغییر رنگی ایجاد نشد. ریسه‌ها در سطح و داخل آگار رشد کرده، نیمه‌شفاف تا قهوه‌ای کم‌رنگ، منشعب، دارای سطح صاف، دارای دیواره عرضی و به قطر ٤-۲ میکرومتر بودند. کلامیدوسپور رویت نشد. پیکنیدیوم‌ها نیمه کروی، دارای سطح صاف، به رنگ قهوه‌ای تیره تا سیاه، پراکنده در سطح پرگنه، منفرد یا مجتمع، اندکی یا به ندرت به طور کامل فرورفته در محیط غذایی، به قطر حداکثر ٤٤٦ میکرومتر، دارای ۲-۱ استیول روی گردن بلند به طول حداکثر ۲۰۰ میکرومتر بودند. دیواره پیکنیدیوم‌ها متشکل از هشت لایه textura angularis با دیواره ضخیم بود، که لایه‌های بیرونی به رنگ قهوه‌ای و لایه های داخلی شفاف بودند. سلول‌های کنیدیوم‌زا شفاف، دارای سطح صاف، آمپولی شکی و به ابعاد ۳-۵ × ۷/۵ -۵ میکرومتر بودند. کنیدیوم‌ها استوانه‌ای تا نیمه استوانه‌ای، دارای دو انتهای گرد، راست یا اندکی خمیده، شفاف، تک سلولی، دارای سطح صاف، فاقد گلوله چربی و به ابعاد (۷-) ٦ (-۵) × ۲/۵ -۲ میکرومتر بودند (شکل ۳).

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



شکل ۲- تبارنمای حاصل از استنتاج بیزین اعضای Didymellaceae حاصل از الحاق سه ناحیه ITS، LSU و ژن TUB با بـه کـارگیری مدل GTR+G. تبارنما با استفاده از *Neocamarosporium betae* CBS 523.66 ریشه‌دار گردید. مقیاس خطی تعـداد جـایگزینی مـورد انتظار را در هر مکان نشان می‌دهد. اعداد روی هر گره میزان احتمال پسین می‌باشد.

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



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

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

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

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

توصیف کاملی از صفات ریخت‌شناختی این گونه توسط *امیردهی و همکاران* (Amirdehi *et al.* 2017) ارایه شده است. در پژوهش حاضر، این گونه از علایم لکه برگی *Vicia* L. sp. و *Medicago sativa* L. جداسازی شد. لکه‌های موجود روی *M. sativa* زاویه‌دار، قهوه‌ای و به قطر حداکثر دو میلی‌متر بودند. لکه‌برگی *Vicia* sp. بیضی شکل، قهوه‌ای مایل به خاکستری و به طول حداکثر هفت میلی‌متر بودند (شکل ٤). این گونه به طور عمده به عنوان عامل ساق سیاه اعضای خانواده *Fabaceae* شناخته می‌شود. با این حال از سایر خانواده‌های گیاهی نیز گزارش شده است. در ایران، *A. medicaginicola* پیش از این از یونجه و نخود ایرانی گزارش شده است (Amirdehi *et al.* 2017).

شکل ٤- گونه *Ascochyta medicaginicola*: A. علایم بیماری روی برگ‌های *Medicago sativa*، B. علایم بیماری روی برگ-های *Vicia* sp.

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

شکل ٥- علایم بیماری گونه Boeremia exigua روی برگ Falcaria vulgaris.

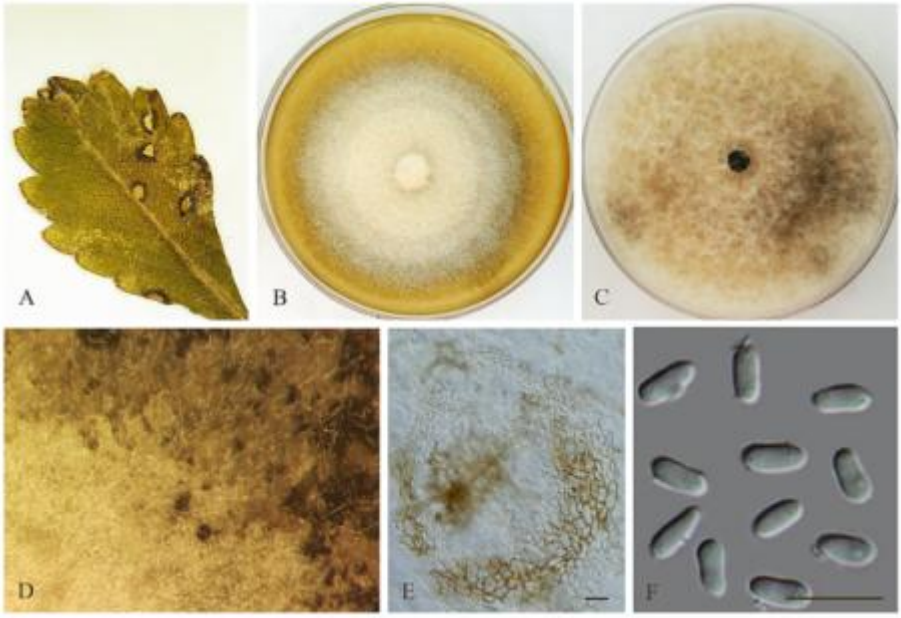
Fig. 5. Symptoms of Boeremia exigua on Falcaria vulgaris leaf.

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

توصیف کاملی از صفات ریخت‌شناختی این گونه توسط *امیردهی و همکاران* (Amirdehi *et al.* 2017) ارایه شده است. در پژوهش حاضر، این گونه از گیاه به ظاهر سالم *Cirsium* sp. و نیز به عنوان هیپرپارازیت عامل زنگ *Sorghum halepense* Pers. جداسازی و شناسایی شد. همچنین، از لکه برگی *F. vulgaris* نیز به دست آمد (شکل ٥). گونه *B. exigua* همه‌جازی و دارای بیش از ۲۰۰ میزبان گیاهی است. این گونه قارچی از جمله بیمارگرهای فرصت طلب است و ممکن است باعث بروز بیماری در اندام‌های هوایی، ریشه و غده گیاهان مختلف شود (Aveskamp *et al.* 2008, Boerema *et al.* 2004, Koenning *et al.* 2000, Koike *et al.* 2006). به عنوان بیمارگر انسان نیز گزارش شده است (Aveskamp *et al.* 2008). این گونه پیش از این از ایران گزارش شده است (Amirdehi *et al.* 2017, Ershad 2009).

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

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



شکل ٦- گونه *Boeremia strasseri* (جدایه LS27): A. علایم بیماری روی برگ *Potentilla* sp.، B. پرگنه قارچ روی محیط کشت MEA پس از هفت روز در شرایط تاریکی و دمای ۲۳ درجه سلسیوس، C. پرگنه قارچ روی محیط کشت OA پس از هفت روز در شرایط تاریکی و دمای ۲۳ درجه سلسیوس، D. پیکنیدیوم‌ها روی محیط کشت OA، E. برش عرضی پیکنیدیوم (مقیاس = ۲۰ میکرومتر) و F. کنیدیوم‌ها (مقیاس = ۱۰ میکرومتر).

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

متشکل از ۷-۵ لایه پارانشیم کاذب بود، که لایه‌های بیرونی به رنگ قهوه‌ای و لایه های داخلی شفاف بودند. سلول‌های کنیدیوم‌زا رویت نشدند. کنیدیوم‌ها شفاف، تک سلولی، استوانی‌ای تا بیضی شکل، دو انتها گرد، راست، گاهی اندکی خمیده، دارای سطح صاف و به ابعاد ۷-٤× ۳-۲ میکرومتر بودند (شکل ٦).

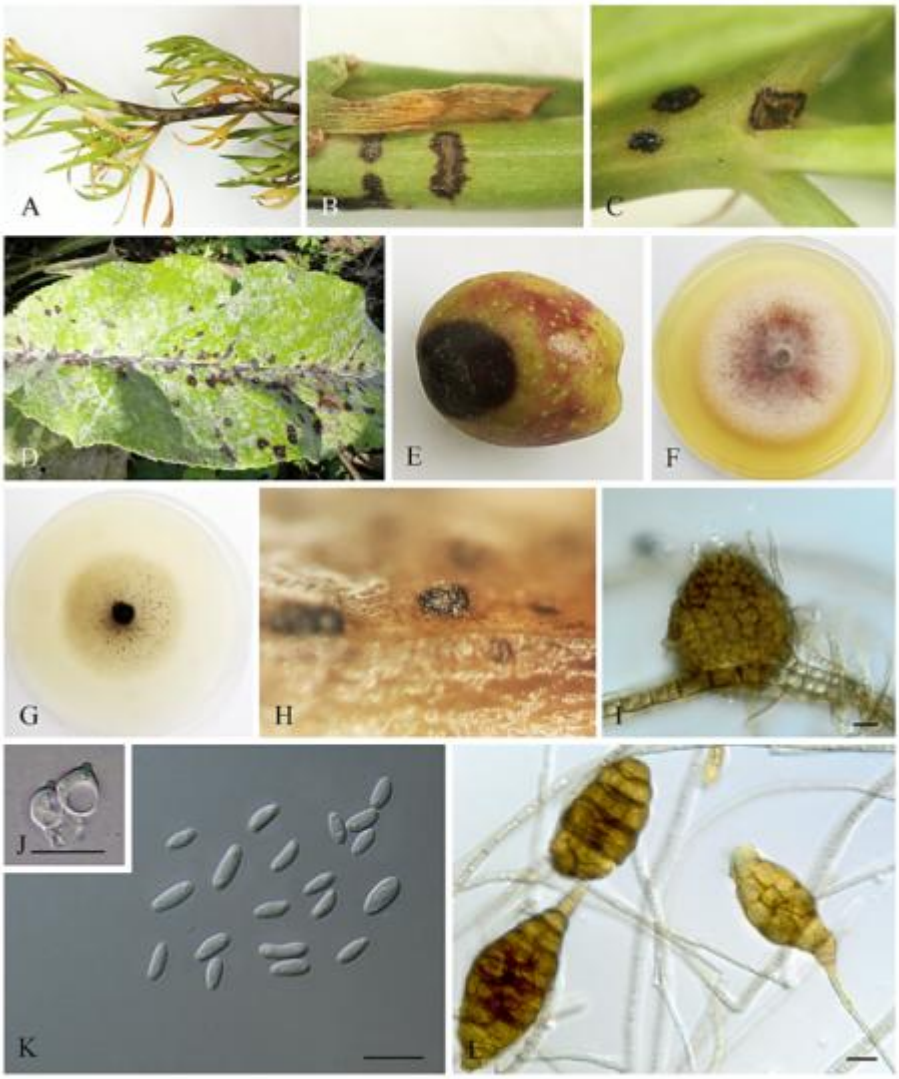
گونه حاضر از گیاهان به ظاهر سالم *Mentha pulegium* L. و به عنوان هیپرپارازیت عامل زنگ *M. pulegium* و زنگ *Rumex* L. sp. جداسازی شد. علاوه‌بر این، از لکه‌های نکروز، سفید مایل به زرد، با حاشیه ارغوانی مایل به سیاه، زاویه دار به قطر حداکثر پنج میلی-متر روی برگ‌های *Potentilla* L. sp. به دست آمد. *B. strasseri* به عنوان بیمارگر گونه‌های *Mentha* L. و سایر گونه‌های *Labiaceae* در نقاط مختلف دنیا شناخته می‌شود (Boerema *et al.* 2004). این نخستین گزارش از *B. strasseri* برای میکوبیوتای ایران است. در این گونه برای اولین بار شیوه زندگی میکوپارازیتی مشاهده شد. *B. strasseri* به عنوان میزبان جدید برای *Potentilla* sp. معرفی می‌گردد.

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

پرگنه روی محیط کشت MEA پس از هفت روز در دمای ۲۳ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی اندکی برآمده، گرد، دارای حاشیه صاف و منظم، به رنگ سفید مایل به قرمز با مرکز شرابی رنگ و دارای ریسه‌های هوایی فراوان بود. قطر پرگنه‌های هفت روزه ٦۳ میلی‌متر بود. این گونه قادر به ایجاد تغییر در رنگ محیط کشت MEA و تولید

کریستال نبود و آزمون NaOH منفی بود. پرگنه روی محیط کشت OA پس از هفت روز در دمای ۲۳ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی مسطح، گرد، دارای حاشیه صاف و منظم، به رنگ زیتونی و دارای میسلیوم هوایی اندک بود. قطر پرگنه هفت روزه ٥٤ میلی‌متر بود. در رنگ محیط کشت OA تغییر رنگی ایجاد نشد. ریسه‌ها در سطح و داخل آگار رشد کرده، نیمه‌شفاف تا قهوه‌ای، منشعب، صاف، دارای دیواره عرضی و به قطر ٤-١ میکرومتر بودند. کلامیدوسپورها توتی شکل، واجد دیواره‌های متعدد طولی یا مورب و عرضی (تداعی کننده کنیدیوم‌های اعضای جنس *Alternaria*)، قهوه‌ای تیره یا قهوه‌ای مایل به قرمز، انتهایی، منفرد یا زنجیری، به طول حداکثر ۷۵ میکرومتر و عرض حداکثر ۱۹ میکرومتر بودند. پیکنیدیوم‌ها کروی تا گلابی شکل، دارای سطح صاف، به رنگ قهوه‌ای تیره، پراکنده در سطح پرگنه، منفرد یا مجتمع، گاهی به هم پیوسته، اندکی فرورفته در محیط غذایی و به قطر حداکثر ۲۹۵ میکرومتر بودند. دیواره پیکنیدیوم‌ها متشکل از ٥-٤ لایه textura angularis با دیواره ضخیم بود، که ٣-٢ لایه بیرونی به رنگ قهوه‌ای و لایه‌های داخلی شفاف بودند. روی میسلیوم هوایی میکروپیکنیدیوم‌هایی به قطر حداکثر ١٤٠ میکرومتر تشکیل می‌شدند. سلول‌های کنیدیوم‌زا شفاف، دارای سطح صاف، گلابی شکی، دارای راس باریک و به ابعاد ٧/٥ -٦ × ٦-٤ میکرومتر بودند. کنیدیوم-ها شفاف، تک سلولی، به اشکال متنوع، اغلب بیضی شکل، دو انتها گرد، راست یا اندکی خمیده، به ندرت سیگموئید، دارای سطح صاف، دارای دو گلوله چربی و به ابعاد (١٠/٥-) ٦/٥ -٥ × (٤-) ٢/٥ (-٢) میکرومتر بودند (شکل ٧).

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

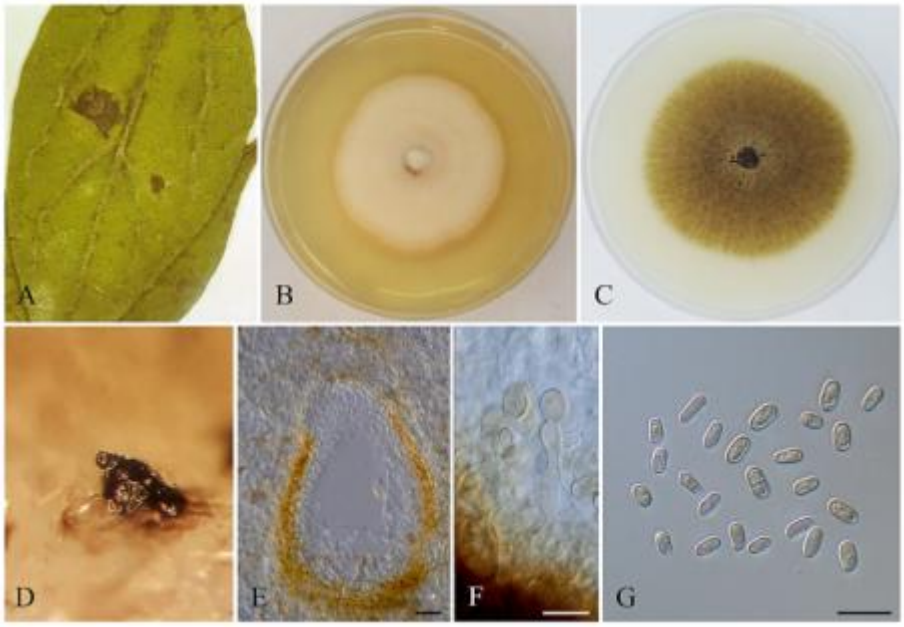


شکل ۷- گونه *Didymella glomerata* (جدایه SH-E): A-C. علایم بیماری روی برگ‌ها و ساقه‌های *Peganum harmala*، D. علایم بیماری روی برگ *Inula helenium*، E. علایم بیماری روی میوه *Olea europaea*، F. پرگنه قارچ روی محیط کشت MEA پس از هفت روز در شرایط تاریکی و دمای ۲۳ درجه سلسیوس، G. پرگنه قارچ روی محیط کشت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

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

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

پرگنه روی محیط کشت MEA پس از هفت روز در دمای ۲۳ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی اندکی برآمده، گرد، دارای حاشیه صاف و منظم، به رنگ سفید، کرکی و دارای ریسه‌های هوایی فراوان بود. قطر پرگنه‌های هفت روزه ۴۹ میلی‌متر بود. این گونه قادر به ایجاد تغییر در رنگ محیط کشت MEA و تولید کریستال نبود و آزمون NaOH منفی بود. پرگنه روی محیط کشت OA پس از



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

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

هفت روز در دمای ۲۳ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی مسطح، گرد، دارای حاشیه صاف و منظم، به رنگ زیتونی و دارای میسلیوم هوایی اندک بود. قطر پرگنه هفت روزه ٥٤ میلی‌متر بود. در رنگ محیط کشت OA تغییر رنگی ایجاد نشد. ریسه‌ها در سطح و داخل آگار رشد کرده، شفاف، نیمه‌شفاف تا قهوه‌ای روشن، منشعب، صاف، دارای دیواره عرضی و به قطر ۳-۲ میکرومتر بودند. کلامیدوسپور رویت نشد. پیکنیدیوم‌ها کروی، نیمه کروی یا دارای اشکال نامنظم، دارای سطح صاف، به رنگ قهوه‌ای تیره تا سیاه، پراکنده در سطح پرگنه، منفرد یا مجتمع، گاهی به هم پیوسته، اندکی یا به طور کامل فرورفته در محیط غذایی، به قطر حداکثر ۲٤۳ میکرومتر، دارای ۳-۱ یا به ندرت ٤ استیول روی گردن بلند به طول حداکثر ۱۱٦ میکرومتر و عرض حداکثر ۷۱ میکرومتر بودند. دیواره پیکنیدیوم‌ها متشکل از ٥-٤ لایه textura angularis با دیواره ضخیم بود، که ۳-۲ لایه بیرونی به رنگ قهوه‌ای و لایه های داخلی شفاف بودند. سلول‌های کنیدیوم‌زا نیمه شفاف، دارای سطح صاف، نیمه استوانه‌ای تا بی شکل، به طول حداکثر ۲۰ میکرومتر و عرض ٤-۳ میکرومتر بودند. کنیدیوم‌ها قهوه‌ای روشن مایل به زیتونی، تک سلولی، به ندرت دو سلولی، بیضی شکل تا استوانه‌ای، دو انتها گرد، راست یا اندکی خمیده، دارای سطح صاف، فاقد گلوله چربی و به ابعاد ٦-٥ (-٤) × ۳- ۲/٥ میکرومتر بودند (شکل ۸).

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

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

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

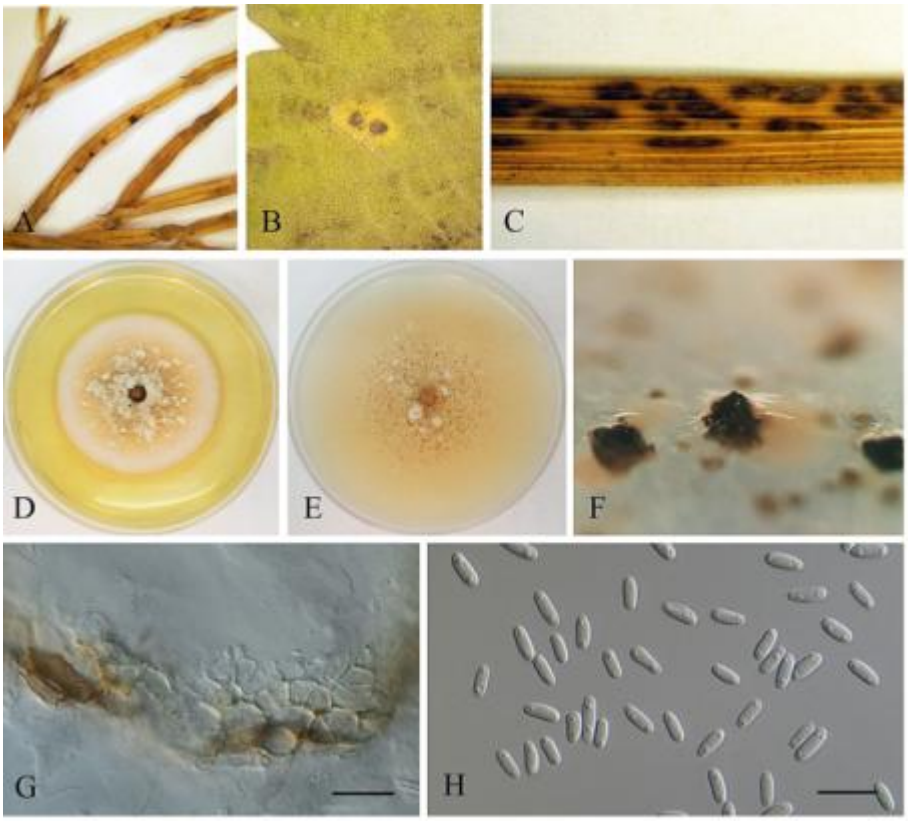
Buddleja L. sp. جداسازی شد. این نخستین گزارش از گونه *D. tanaceti* در ایران است. *Buddleja* sp. به عنوان میزبان جدید برای این قارچ معرفی می‌گردد.

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

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

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

پرگنه روی محیط کشت MEA پس از هفت روز در دمای ۲۳ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی اندکی برآمده، گرد، دارای حاشیه صاف و منظم، به رنگ گلبهی با مرکز مایل به سبز زیتونی و دارای ریسه‌های هوایی فراوان و پشمی شکل بود. قطر پرگنه‌های هفت روزه ٤٥ میلی‌متر بود. این گونه قادر به ایجاد تغییر در رنگ محیط کشت MEA و تولید کریستال نبود و آزمون NaOH مثبت بود. پرگنه روی محیط کشت OA پس از هفت روز در دمای ۲۳ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی مسطح، گرد، دارای حاشیه صاف و منظم، به رنگ گلبهی مایل به زیتونی و دارای میسلیوم هوایی اندک بود. قطر پرگنه هفت روزه ۷۵ میلی‌متر بود. در رنگ محیط کشت OA تغییر رنگی ایجاد نشد. ریسه‌ها در سطح و داخل آگار رشد کرده، شفاف تا نیمه‌شفاف، منشعب، صاف، دارای دیواره عرضی و به قطر ۵- ۱/۵ میکرومتر بودند. کلامیدوسپور رویت نشد. پیکنیدیوم‌ها بشکه‌ای شکل تا گلابی شکل، پاپیل‌دار، دارای سطح صاف، به رنگ قهوه‌ای، پراکنده در سطح پرگنه، منفرد یا مجتمع، اندکی یا به طور کامل فرورفته در محیط غذایی، به قطر حداکثر ۱۷۰ میکرومتر و دارای ۲-۱ استیول بودند. دیواره پیکنیدیوم‌ها متشکل از ٤-۳ لایه textura angularis بود، که ۳-۲ لایه بیرونی به رنگ قهوه‌ای و لایه های داخلی شفاف بودند. سلول‌های کنیدیوم‌زا شفاف، دارای سطح صاف، گلابی شکی و به ابعاد ٤ × ۳/۵ -۳ میکرومتر بودند. کنیدیوم‌ها شفاف، تک سلولی، نیمه



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

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

استوانه‌ای، بیضی شکل، یا گاهی تخم مرغی شکل، دو انتها گرد، راست یا اندکی خمیده، به ندرت سیگموئید، دارای سطح صاف، دارای (۳-) ۲ گلوله چربی و به ابعاد (۷-) ۵/۵ -۵ (-٤) × ۲/۵ -۲ میکرومتر بودند (شکل۱۰).

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

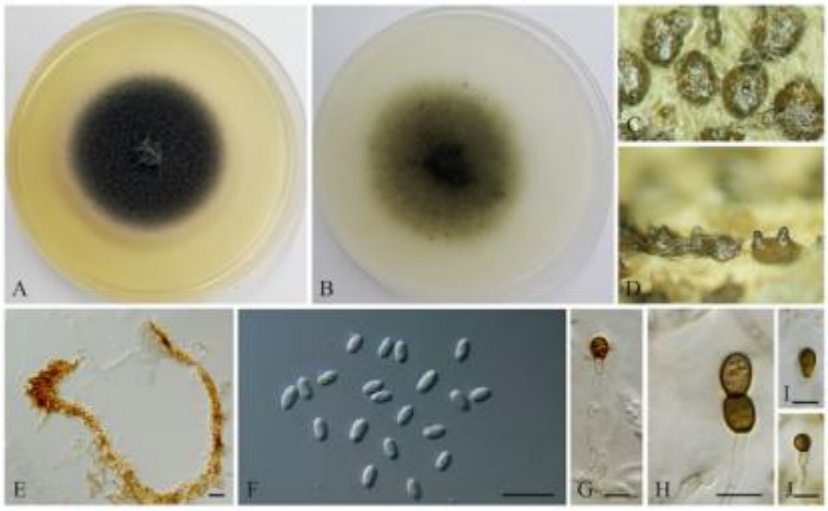
al. 2004). این نخستین گزارش از این گونه برای میکوبیوتای ایران است. هر سه گونه گیاهی فوق به عنوان میزبان‌های جدید برای این قارچ گزارش می‌شوند.

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

پرگنه روی محیط کشت MEA پس از هفت روز در دمای ۲۳ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی مسطح، گرد، دارای حاشیه صاف و منظم، به رنگ خاکستری مایل به سیاه و دارای ریسه‌های هوایی فراوان بود. قطر پرگنه‌های هفت روزه ٤٨ میلی‌متر بود. این گونه قادر به ایجاد تغییر در رنگ محیط کشت MEA و تولید کریستال نبود و آزمون NaOH منفی بود. پرگنه روی محیط کشت OA پس از هفت روز در دمای ۲۳ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی مسطح، گرد، دارای حاشیه صاف و منظم، به رنگ زیتونی مایل به خاکستری و دارای میسلیوم هوایی اندک بود. قطر پرگنه هفت روزه ۵۲ میلی‌متر بود. در رنگ محیط کشت OA تغییر رنگی ایجاد نشد. ریسه‌ها در سطح و داخل آگار رشد کرده، نیمه‌شفاف تا قهوه‌ای تیره، منشعب، صاف، دارای دیواره عرضی و به قطر ۷-۲ میکرومتر بودند. کلامیدوسپورها به اشکال متنوع، نیمه کروی، بشکه‌ای شکل، نیمه استوانه‌ای یا تخم مرغی، تک سلولی، منفرد یا زنجیری، انتهایی یا میانی، دارای چندین گلوله چربی، به ابعاد (۱۳-) ۸-۱۰ (-٦) × (۹-) ٦-۷ (-٤) میکرومتر بودند. پیکنیدیوم‌ها نیمه کروی تا مخروطی شکل، دارای سطح صاف، به رنگ قهوه‌ای مایل به زیتونی، پراکنده در سطح پرگنه، منفرد یا گاهی به هم پیوسته، اندکی فرورفته در محیط غذایی، به قطر حداکثر ۳۵۷ میکرومتر، دارای ۲-۱ یا به ندرت سه استیول روی گردنی به طول حداکثر ٨٤ میکرومتر بودند. دیواره پیکنیدیوم‌ها متشکل از ٤-۳ لایه textura angularis بود، که ۲-۱ لایه بیرونی به رنگ قهوه‌ای و لایه های داخلی شفاف بودند. سلول‌های کنیدیوم‌زا رویت نشدند. کنیدیوم‌ها شفاف، تک سلولی، بیضی شکل تا تخم مرغی شکل، دو انتها گرد یا قاعده مسطح، راست یا اندکی خمیده، دارای سطح صاف، دارای دو گلوله چربی و به ابعاد ٥-٤ × ۲/۵ -۲ میکرومتر بودند (شکل ۱۱).

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

بسیاری از اعضای Didymellaceae قارچ‌های مرتبط با گیاهان را شامل می‌شوند. تا کنون تنها تعداد اندکی از گونه‌ها (همانند *P. herbarum*، *D. glomerata*، *Didymella eucalyptica* Chen & Cai، *Didymella gardeniae* Chen & Cai، *Didymella pomorum* Chen & Cai و *Leptosphaerulina australis* McAlpine) از سایر بسترهای غذایی همانند مواد شیمیایی، خاک، هوا و آب گزارش شده‌اند (Aveskamp *et al.* 2008, 2010). در مطالعه حاضر ٤٩ جدایه متعلق به نه گونه *B. exigua*، *E. nigrum*، *B. strasseri*، *D. glomerata*، *D. tanaceti*، *A. medicaginicola*، *A. herbicola*، *P. eupyrena* و *H. novae-verbascicola* با تلفیقی از داده‌های توالی نوکلئوتیدی سه ناحیه (ITS، LSU و TUB) و صفات ریخت‌شناختی از ۳۰ میزبان گیاهی مختلف، خاک و همچنین به عنوان میکوپارازیت شناسایی شدند. چهار گونه *B. strasseri*، *D. tanaceti*، *P. eupyrena* و *H. novae-verbascicola* گزارش‌های جدید برای میکوبیوتای ایران هستند. به نظر می‌رسد اعضای برخی از جنس‌ها همانند *Ascochyta* (نسبت به Fabaceae)، *Neoascochyta* (نسبت به *Poaceae*)، *Neomicrosphaeropsis* Thambug. (نسبت به *Tamaricaceae*)، *Heterophoma* (نسبت به *Scrophulariaceae*) و *Phomatodes* (نسبت



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

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

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

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

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

سپاسگزاری

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

منابع

Amirdehi E., Fotouhifar K.B. and Javan-Nikkhah M. 2017. Morphological and molecular study on some species of *Phoma* and related taxa in Iran. Rostaniha 18 (1): 59-76.

Aveskamp M.M., De Gruyter J. and Crous P.W. 2008. Biology and recent developments in the systematic of *Phoma*, a complex genus of major quarantine significance. Fungal Diversity 31: 1–18.

Aveskamp M.M., De Gruyter J., Woudenberg J.H.C., Verkley G.J.M. and Crous P.W. 2010. Highlights of the Didymellaceae: A polyphasic approach to characterise *Phoma* and related pleosporalean genera. Studies in Mycology 65: 1-60.

Aveskamp M. M., Verkley G. J. M., De Gruyter J., Murace M. A., Perello A., Woudenberg J. H. C., Groenewald J. Z. and Crous P. W. 2009. DNA phylogeny reveals polyphyly of *Phoma* section *Peyronellaea* and multiple taxonomic novelties. Mycologia 101: 363–382.

Boerema G. H., De Gruyter J., Noordeloos M. E. and Hamers M. E. C. 2004. *Phoma* identification manual differentiation of specific and infraspecific taxa in culture. CABI Publishing, United Kingdom, 470 pp.

Chen Q., Jiang J. R., . Zhang G. Z., Cai L. and Crous P. W. 2015. Resolving the Phoma enigma. Studies in Mycology 82: 137-217.

Chen Q., Hou L. W., Duan W. J., Crous P. W. and Cai L. 2017. Didymellaceae revisited. Studies in Mycology 87: 105-159.

Crous P. W., Verkley G. J. M., Groenewald J. Z. and Samson R. A. 2009. Fungal biodiversity - CBS Laboratory Manual Series 1. CBS-KNAW Fungul Biodiversity Center, Utrecht, 269 pp.

De Gruyter J., Aveskamp M. M., Woudenberg J. H. C., Verkley G. J. M., Groenewald J. Z. and Crous P. W. 2009. Molecular phylogeny of *Phoma* and allied anamorph genera: Towards a reclassification of the *Phoma* complex. Mycological Research 113: 508–519.

Edgar R. C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Research 32: 1792–1797.

Ershad D. 2009. Fungi of Iran. 3nd ed. Agricultural Research, Education & Extension Organization Publication No. 10, Tehran, 531 pp.

Glass N. L. and Donaldson, G. C. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. Applied and Environmental Microbiology 61: 1323–1330.

Golmohammadi R. 2014. Identification of fungal species associated with leaf spot disease on popular trees (*Populus* spp.) in East Azerbaijan Province. MSc thesis, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

Hall T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows. Nucleic Acids Symposium Series 41: 95-98.

Hepperle D. 2017. DNA Dragon - DNA Assembly Software, Version 1.7, SequentiX - Digital DNA Processing, Klein Raden, Germany. Available from: http://www.sequentix.de/ (accessed: 19 March 2017).

Koenning S. R., Abdel Amin F. F. and Grand L. F. 2000. Stem canker on cotton caused by *Phoma exigua* in North Carolina and Virginia. Plant Disease 84 (11): 1251–1251.

Koike S. T., Subbarao K. V., Verkley G. J. M., Fogle D. and O'Neill T. M. 2006. *Phoma* basal rot of romaine lettuce in California caused by *Phoma exigua*: Occurrence, characterization, and control. Plant Disease 90: 1268–1275.

Kumar S., Stecher G. and Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. Molecular Biology and Evolution 33 (7): 1870–1874.

Maddison W. P. and Maddison D. R. 2001. Mesquite. A modular system for evolutionary analysis. Available from: http://mesquite.biosci.arizona.edu/mesquite/mesquite.html.

Moller E. M., Bahnweg G., Sandemann H. and Geiger H. H. 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies and infected plan tissues. Nucleic Acid Research 20: 6115-6116.

Nylander J. A. A. 2004. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Center, Uppsala University, Uppsala.

O'Donnell K. and Cigelnik E. 1997. Two divergent intra genomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are non orthologous. Molecular Phylogenetics and Evolution 7: 103–116.

Pearce T. L., Scott J. B., Crous P. W., Pethybridge S. J. and Hay F. S. 2015. Tan spot of pyrethrum is caused by a *Didymella* species complex. Plant Pathology 65: 1170-1184.

Rambaut A. 2009. FigTree v1.3.1. Available from: http://tree. bio. ed. ac. uk/software (verified Dec 21, 2009).

Razaghi P. and Zafari D. 2012. Mycobiota of volunteer plants in Hamedan province (W Iran). Rostaniha 13 (1): 57-68.

Rehner S. A. and Samuels G. J. 1994. Taxonomy and phylogeny of *Gliocladium* analysed from nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. Mycological Research 98: 625-634.

Ronquist F. and Huelsenbeck J. P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics 19: 1572–1574.

Sullivan R. F. and White J. F. 2000. *Phoma glomerata* as a Mycoparasite of Powdery Mildew. Applied and Environmental Microbiology 66 (1): 425-427.

Szentivanyi O., Kiss L., Russell J. C., Kovacs G. M., Varga K., Jankovics T., Lesemann S., Xu X. M. and Jeffries P. 2005. *Ampelomyces* mycoparasites from apple powdery mildew identified as a distinct group based on single-stranded conformation polymorphism analysis of the rDNA ITS region. Mycological research 109: 429-438.

Vilgalys R. and Hester M. 1990. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. Journal of Bacteriology 172: 4238-4246.

Warcup J. H. 1950. The soil-plate method for isolation of fungi from soil. Nature 166: 117–118.

White T. J., Bruns T., Lee S. B. and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In*: Gelfand M. Sninsky D. and White T. (eds). PCR Protocol: A Guide to Methods and Application, San Diego, California, pp. 315–322.