

## شناسایی گونه‌های قارچی روی گیاهان خودرو در استان همدان\*

دریافت: ۱۳۹۰/۱۱/۳۰ / پذیرش: ۱۳۹۱/۳/۲۱

پریسا رزاقی: دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان  
دوستمیراد ظفری✉: دانشیار دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان (zafari\_d@yahoo.com)

### چکیده

در این بررسی، از مناطق مختلف استان همدان از گیاهان خودرو مختلف مشکوک به آلودگی قارچی نمونه‌برداری صورت گرفت. از ۱۶۳ نمونه جمع‌آوری شده در مجموع ۴۹ جدایه قارچ ناقص براساس نتایج به دست آمده از بررسی‌های ریخت‌شناسی و مولکولی مورد شناسایی قرار گرفت. بر این اساس، ۱۳ گونه در شش جنس شناسایی شد. فراوان‌ترین قارچ‌ها به ترتیب متعلق به جنس‌های *Cladosporium*, *Ascochyta* و *Phoma* بودند. در بین آن‌ها چهار گونه به اسامی: *Embellisia astragali*, *E. tellustris*, *Phoma herbicoa* و *Septoria sonchi* به ترتیب روی *Scorzonera cana*, *Cirsium arvensis* sp., *Taraxacum* و *Sonchus oleraceus* برای نخستین بار از ایران گزارش می‌شوند. به منظور بررسی صحت شناسایی‌های انجام شده براساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی، توالی نواحی ITS (ITS1، ITS2 و ژن 5.8S) از DNA ریبوزومی در این چهار گونه تعیین شد. توالی نواحی ITS در گونه‌های مختلف جنس‌های *Phoma* و *Embellisia* بسیار متنوع است.

واژه‌های کلیدی: ایران، توالی نواحی ITS، رکورد جدید، فلور قارچی، گیاهان خودرو

## Mycobiota of volunteer plants in Hamedan province (W Iran)

Received: 19.02.2012 / Accepted: 10.06.2012

**P. Razaghi:** Former MSc Student, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

**D. Zafari**✉: Associate Prof., Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran (zafari\_d@yahoo.com)

### Summary

Out of 163 samples of suspected volunteer plants to fungal infection collected from different areas of Hamedan province (W Iran), 49 isolates of the anamorphic fungi were identified according to morphological and molecular features. Based on these, 13 species were identified and classified in six genera. Most of them belonged to *Cladosporium*, *Ascochyta* and *Phoma*, respectively. Among them, *Embellisia astragali*, *E. tellustris*, *Phoma herbicola* and *Septoria sonchi* on *Scorzonera cana*, *Cirsium arvensis*, *Taraxacum* sp. and *Sonchus oleraceus* are new records for the mycoflora of Iran. To confirm morphological identification, ITS regions (ITS1, ITS2 & 5.8 S gene) of ribosomal DNA from these species were sequenced. ITS sequences of different species of *Phoma* and *Embellisia* were very diverse.

**Keywords:** Iran, ITS sequences, mycoflora, new record, volunteer plants

\* بخشی از پایان‌نامه نگارنده اول به راهنمایی آقای دکتر ظفری ارائه شده به دانشگاه بوعلی سینا، همدان

## مقدمه

## روش بررسی

طی آمار حاصل از بررسی‌های بدری‌پور در سال ۲۰۰۴ (<http://www.fao.org/ag/AGP/AGPC/doc/Counprof/Iran/htm>) کشور ایران از جمله استان همدان از نظر وجود تنوع گونه‌های مختلف گیاهان از جمله گیاهان خودرو نسبتاً قابل توجه است. گیاهان خودرو دارای توانایی خاصی هستند که آن‌ها را از گیاهان اهلی متمایز می‌سازد. این توانایی‌ها شامل: تولید بذر فراوان، خواب بذر، تکثیر غیرجنسی، تثبیت سریع جمعیت، حفظ قوه نامیه به مدت طولانی و قدرت رقابت با گیاهان زراعی است (Rastegar 1996). به‌منظور کاهش رقابت گیاهان خودرو با محصولات زراعی، در بین روش‌های کنترل آن‌ها کنترل بیولوژیک بویژه توسط قارچ‌های پاتوژن اختصاصی آن‌ها توجه همگان را جلب نموده است. از این رو، شناسایی این قارچ‌ها از سالها پیش مورد توجه و بررسی محققان در ایران و سایر کشورهای جهان قرار گرفته است. به طور مثال: از روی قازیایی قارچ‌هایی به اسامی *Septoria rivini*, *Falcaria vulgaris* گزارش شده است (Khabiri 1958). *Septoria cirsii* از روی کنگر صحرایی *Cirsium arvensis*، از ورامین گزارش شده است (Esfandiari 1948a & Khabiri 1958). *Sonchus* روی شیرنم (*Sonchus oleraceus* sp. *Alternaria* از دزفول (Vaziri 1973) و *Septoria* sp. از رامین اهواز (Ebrahimi & Minasian 1973) گزارش شده است، روی گیاه پنج انگشت *Potentilla* sp. *Ramularia* sp. از آستارا گزارش شده است (Hedjaroude 1976) و *Alternaria arborescens* برای نخستین بار از روی پونه *Mentha pulegium* از رشت گزارش شده است (Ghosta 2004). برخی از قارچ‌های ناقص گزارش شده روی گیاهان خودرو از مناطق مختلف دنیا عبارتند از: *Septoria rhoeadis* روی شقایق وحشی (*Papaver rhoeas*) در ارمنستان (Simonyan 1981) و کره (Cho & Shin 2004)، *S. glacialis* و *S. vulcani* روی ترشک در آسیا (Gardner 1997). *Ascochyta chelidoniicola* در روسیه (Melnik & Pystina 1995) و *A. papaveris* در آفریقای جنوبی از روی گونه‌ای از شقایق (*Papaver nudicaule*) توسط گورتر (Gorter 1977) گزارش شده است. هم‌چنین، از روی گل قاصد، *Ascochyta taraxaci* در آلاسکا (Cash 1953)، *A. doronici* در لهستان (Salata et al. 1994) و از روی کاسنی، *A. doronici* در بلغارستان (Sameva 2004) گزارش شده است. با توجه به اهمیت فراوان قارچ‌های موجود روی گیاهان خودرو اعم از ساپروفیت، پارازیت، اندوفیت و اپیفیت، در این تحقیق، شناسایی قارچ‌های ناقص مورد بررسی قرار گرفت.

طی بهار، تابستان و پاییز ۱۳۸۸ مناطق مختلف استان همدان مورد بازدید قرار گرفت و از گیاهان خودرو مشکوک به آلودگی قارچی ۱۶۳ نمونه جمع‌آوری و در پاکت‌های کاغذی نو و سترون به آزمایشگاه منتقل و در دمای آزمایشگاه نگهداری شدند. قارچ‌ها از برگ‌ها و ساقه‌های نمونه‌های جمع‌آوری شده با روش قرار دادن روی محیط‌های آگاردار سیب زمینی- دکستروز-آگار و سیب زمینی- هویج-آگار جدا شدند. بدین ترتیب، ۴۹ قارچ ناقص از این نمونه‌ها به دست آمد. این جدایه‌ها به روش تک‌هاگ یا نوک ریسه خالص گردیدند. برای تحریک به هاگ‌زایی، گونه‌های فوما، به محیط آرد یولاف-آگار (OMA) و گونه‌های *Embellisia* به محیط هشت سبزی (V8) منتقل شدند. صفات پرگنه و هاگ‌های این قارچ‌ها مورد بررسی و اندازه‌گیری قرار گرفت و اطلاعات جمع‌آوری شده با کمک کلیدهای تشخیص و مقالات علمی مرتبط (Boerema et al. 2004, Lee & Nan 2007, Shin et al. 2001) مقایسه و شناسایی شد. تصاویر با استفاده از میکروسکوپ زمینه روشن Leica DMLB و LEITZ مجهز به دوربین عکس‌برداری متصل به کامپیوتر و با استفاده از نرم‌افزار "Digital Asus VCR" تهیه شد. برای انجام تحقیقات مولکولی و تعیین توالی نواحی ITS1، ITS2 و ژن 5.8S استخراج DNA ژنومی به روش اصلاح شده ماری و تامیسون (Murray & Thompson 1980) صورت گرفت. سپس قطعات DNA با استفاده از آغازگرهای ITS1 و ITS4 تکثیر شد. (Schneider et al. 1997 & Salazar et al. 2000). به منظور تعیین توالی DNA نمونه‌ها، قطعات DNA تکثیر شده به کره جنوبی فرستاده شد. توالی‌های DNA از طریق پست الکترونیک با فرمت FASTA از انستیتوی ملی بیوتکنولوژی کشاورزی کره جنوبی دریافت شد. در این بررسی، از نرم‌افزار TreeCon و Neighbor-Joining برای تجزیه و تحلیل نتایج استفاده گردید. به کمک جستجوی بلاست (Blast Search) و با توجه به مقالات متعدد در زمینه تاکسونومی قارچ‌های هیفومیست و سلومیست، outgroup مناسب انتخاب گردید. بعد از رج‌بندی توالی‌های به دست آمده با کمک نرم‌افزار GeneDoc، برای رسم درخت از نرم‌افزار TreeCon استفاده شد و درخت‌ها با روش NJ و مدل دو پارامتری کیمورا با هزار تکرار Bootstrap رسم گردیدند. لازم به ذکر است که کلیه نمونه‌ها در هرباریوم قارچ‌شناسی دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا (همدان) نگهداری می‌شوند.

## نتیجه

در بین نمونه‌های بررسی شده، ۴۹ جدایه قارچ متعلق به شش جنس و ۱۳ گونه تشخیص داده شد که نام میزبان گیاهی، نام جمع‌آوری کننده، محل جمع‌آوری، نام قارچ و تاریخ جمع‌آوری در جدول ۱ ارائه شده است. در بین این قارچ‌ها، چهار قارچ با صفات ریختی زیر برای میکوفلور ایران جدید هستند:

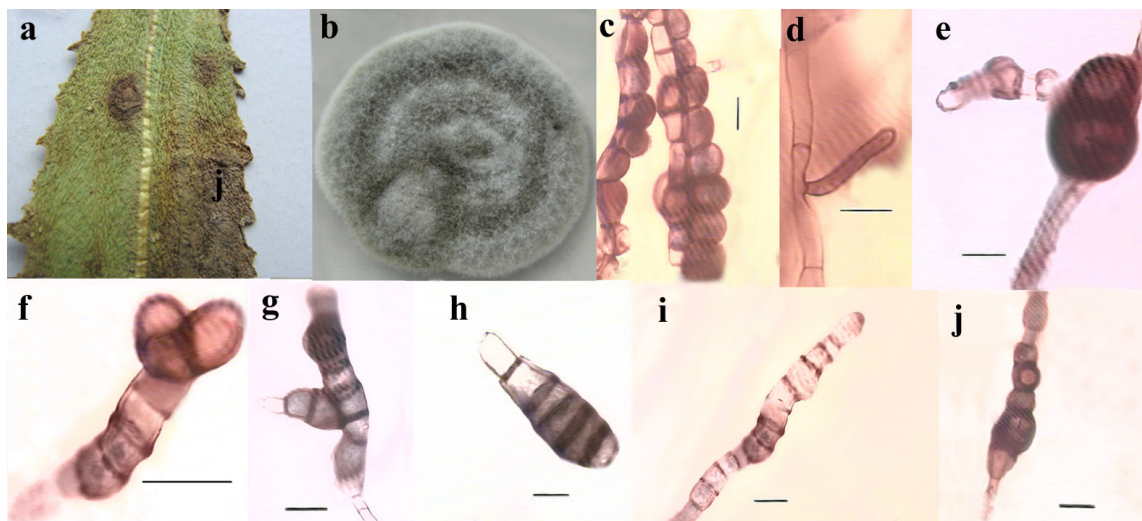
***Embellisia astragali* Li & Nan -۱**

نمونه‌های بررسی شده: روی *Scorzonera cana* روستای اورقین شهرستان کبودرآهنگ، فاوت، شهرستان ملایر، ۱۳۸۸  
این قارچ دارای علائم به صورت لکه‌های گرد در پهنک برگ‌ها و لکه‌های نامنظم به رنگ قهوه‌ای سوخته در حاشیه برگ‌ها می‌باشد. رنگ پرگنه روی محیط PCA سفید مایل به خاکستری تا زیتونی کم‌رنگ و رنگ سطح زیرین پرگنه تیره‌تر و میزان رشد آن پس از گذشت هفت روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به ۴۵ میلی‌متر می‌رسد. این گونه دارای کلامیدوسپورهای فراوان در زنجیره‌های قهوه‌ای مایل به قرمز با دیواره ضخیم می‌باشد. کنیدیوفورهای اولیه کوتاه، بدون دیواره تا یک دیواره‌ای بوده اما ممکن است طویل و چنددیواره‌ای شوند. کنیدیوفورهای ثانویه نیز در آن دیده شدند. اندازه کنیدیوفورها (۱۰)۳-۵ × ۹۴-۱۹۷ میکرومتر می‌باشد. این گونه دارای هاگ‌زایی اولیه و ثانویه نسبتاً کمتر است، به طوری که دارای انواع کنیدیوم‌های چماقی وارونه کشیده، راست یا Y شکل و به ندرت در دو سمت نامتقارن و خمیده هستند. دارای یاخته‌های پایه‌ای تقریباً کروی و دارای (۸-۶-۳) دیواره عرضی و بدون دیواره طولی یا مورب و به ندرت یکی می‌باشند. اندازه آن‌ها ۸-۱۵ × ۲۸-۶۶ میکرومتر است (شکل ۱). زنجیره کنیدیومی نیز کوتاه و کمتر از سه عدد در آن دیده شده است. مشخصات این گونه با شرح ارائه شده توسط لی و نان (Lee & Nan 2007) مطابقت داشت. در بررسی مولکولی، در درخت حاصل (شکل ۳)، جدایه (*E. astragali* (JQ308339) به دست آمده از *Scorzonera cana* در این تحقیق، با دو گونه *E. tellusterisis* (FJ357316)، *E. astragali* (FJ914716) *E. tellustris* (JN383494) و جدایه *E. tellustris* (JQ308340) مربوط به *Cirsium arvensis* در این تحقیق در یک گروه فرعی جدا از *E. allii* (AY278840) قرار دارند. تفاوت در ویژگی‌های مورفولوژیکی کنیدیوم مانند اندازه بزرگتر، شکل واژچماقی و طویل آن، وجود یاخته پایه‌ای متورم در

*E. astragali* باعث تمایز آن از *E. tellusterisis* می‌شود. درخت رسم شده این تفاوت را نشان نمی‌دهد، درحالی که اختلاف در یک تا دو نوکلئوتید در ناحیه ITS2 این دو گونه، این تفاوت‌ها را آشکار می‌کند. از ویژگی‌های برجسته *E. astragali* نسبت به سایر گونه‌های *Embellisia* هاگ‌زایی بسیار اندک آن است. این گونه نخستین بار توسط لی و نان (۲۰۰۷) از روی گون *Astragalus adsurgens* از چین به عنوان گونه جدید گزارش شد. براساس منابع در دسترس (Ershad 2009)، این گونه برای نخستین بار در ایران گزارش می‌شود (شکل ۱).

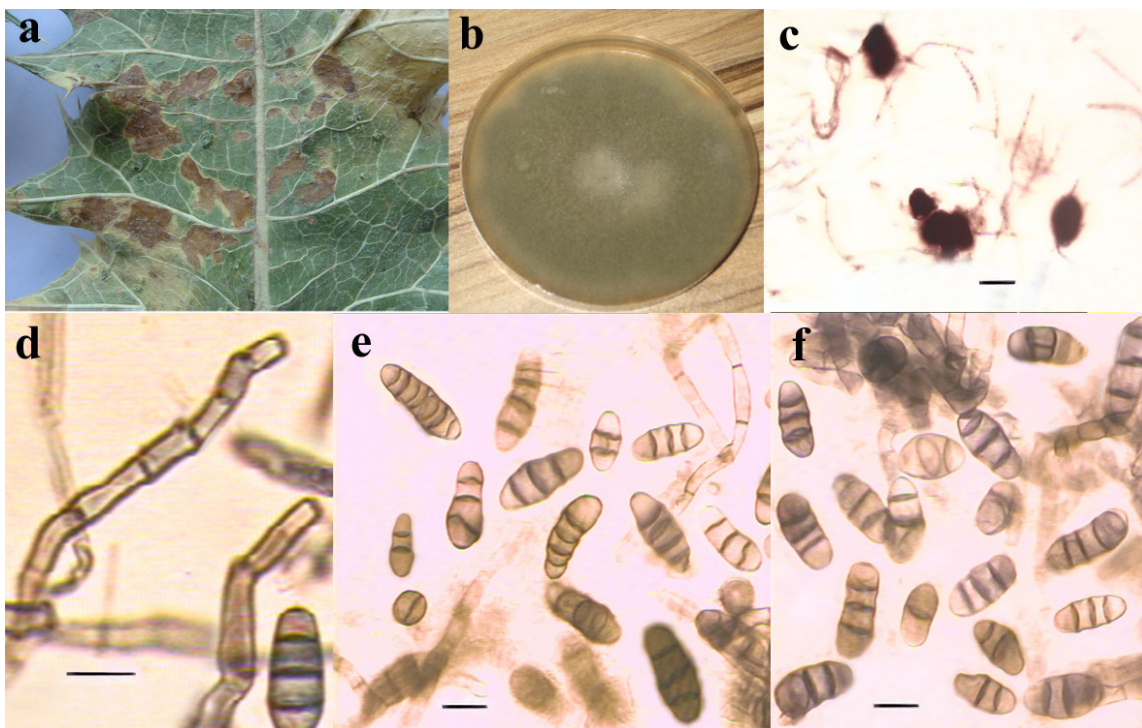
***Embellisia tellustris* Simmons -۲**

نمونه‌های بررسی شده: روی *Cirsium arvensis*، دشت خسروآباد شهرستان اسدآباد، سیاه‌کمر شهرستان ملایر، جاده ملایر-توره، پلیس‌راه همدان-تهران، ۱۳۸۸  
علائم مربوط به این قارچ به صورت لکه‌های قهوه‌ای مایل به مسی با شکل‌های نامنظم در سطح برگ‌ها و تیغه‌های گیاه دیده شد که اطراف لکه‌ها کلروز شده، به گونه‌ای که در محل لکه‌ها بافت میزبان کاملاً خشک شده و از بین رفته بود. رنگ پرگنه روی محیط V8 زیتونی مایل به خاکستری و سطح زیرین آن قهوه‌ای می‌باشد. میزان رشد آن پس از گذشت هفت روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به ۴۵ میلی‌متر می‌رسد. این گونه فاقد کلامیدوسپور روی محیط V8 است اما کلامیدوسپور و یا یاخته‌های ریشه‌ای متورم تنها روی محیط‌های PDA و PCA، آن هم پس از گذشت هشت ماه مشاهده شدند. کنیدیوفورها به صورت ساده یا منشعب و اغلب دارای ۴-۵ محل زایشی کنیدیوم روی خود هستند. هاگ‌زایی اولیه فراوان اما هاگ‌زایی ثانویه به ندرت دیده می‌شود. کنیدیوم‌ها تکی و گاهی منشعب و به شکل‌های تخم‌مرغی کشیده یا بیضی طویل، ایستاده و گاهی سیگموییدی و به ندرت در دو طرف نامتقارن دیده می‌شوند. دارای دیواره‌های عرضی (۷)۳-۵ و بدون دیواره طولی یا به ندرت یکی هستند. اندازه آن‌ها ۸-۱۰ × ۲۰-۳۵ میکرومتر می‌باشد (شکل ۲). مشخصات این گونه با شرح ارائه شده توسط سیمونز (Simmons 1983) مطابقت داشت. تاکنون تنها دو توالی از نواحی ITS در *E. tellusterisis* در دنیا توسط پریور و همکاران (Pryor et al. 2009) و لارنس و همکاران (Lawrence et al. 2011) گزارش شده است (شکل ۲).



شکل ۱- *Embellisia astragali*: a. علائم لکه برگی، b. سطح رویی پرگنه روی محیط PCA، c. کلامیدوسپورها، d. کنیدیوفور اولیه، e. کنیدیوفور ثانویه، f، g. کنیدیوم Y شکل، h. کنیدیوم چماقی، i. کنیدیوم راست، j. کنیدیوم دارای یاخته پایه‌ای متورم (مقیاس = ۱۰ میکرومتر).

Fig. 1. *Embellisia astragali*: a. Symptoms of leaf spot, b. Surface of colony on PCA, c. Chlamydospores, d. Primary conidiophore, e. Secondary conidiophore, f, g. Y-shaped conidia, h. Clavate conidium, i. Erect conidium, j. Conidium with protuberant basal cell (Bar = 10  $\mu$ m).



شکل ۲- *Embellisia tellustris*: a. علائم لکه برگی، b. سطح رویی پرگنه روی محیط V8، c. کلامیدوسپورها روی محیط PCA، d. کنیدیوفورها، e، f. کنیدیومها (مقیاس: d-f = ۱۰ میکرومتر و c = ۵۰ میکرومتر).

Fig. 2. *Embellisia tellustris*: a. Symptoms of leaf spot, b. Surface of colony on V8 medium, c. Chlamydospores on PCA, d. Conidiophores, e, f. Conidia (Bar: d-f = 10  $\mu$ m & c = 50  $\mu$ m).

## جدول ۱- قارچ‌های جدا شده از گیاهان خودرو در استان همدان

Table 2. Fungi associated with volunteer plants in Hamedan province (W Iran)

S. No.	Host	Fungus name	Locality	Date of collection	Collector
1	<i>Anchusa italica</i>	<i>Phoma</i> sp. 1	Alfavot (Malayer)	24.5.2009	P. Razaghi
2	<i>A. italica</i>	<i>Phoma</i> sp. 1	Tuyserekan	8.7.2009	"
3	<i>A. italica</i>	<i>Phoma</i> sp. 1	Razan	8.5.2009	"
4	<i>Cirsium arvensis</i>	<i>Embellisia tellustris</i>	Khosroabad (Asadabad)	8.5.2009	"
5	<i>C. arvensis</i>	<i>E. tellustris</i>	Siahkamar (Malayer)	24.5.2009	"
6	<i>C. arvensis</i>	<i>E. tellustris</i>	Malayer-Toure road	24.5.2009	"
7	<i>C. arvensis</i>	<i>E. tellustris</i>	Hamedan-Tehran road	29.9.2009	"
8	<i>Chenopodium murale</i>	<i>Phoma medicaginis</i> var. <i>medicaginis</i>	Kabudarahang	1.6.2009	"
9	<i>C. murale</i>	<i>P. medicaginis</i> var. <i>medicaginis</i>	Kabudarahang	17.7.2009	"
10	<i>C. murale</i>	<i>P. medicaginis</i> var. <i>medicaginis</i>	Razan	8.5.2009	"
11	<i>Falcaria vulgaris</i>	<i>Cladosporium variabile</i>	Kabudarahang	17.7.2009	"
12	<i>F. vulgaris</i>	<i>C. variabile</i>	Tuyserekan	8.7.2009	"
13	<i>Geranium tuberosum</i>	<i>Alternaria chlamyospora</i>	Malayer	24.5.2009	"
14	<i>G. tuberosum</i>	<i>A. chlamyospora</i>	Razan	8.5.2009	"
15	<i>Hulthemia persica</i>	<i>Cladosporium macrocarpum</i>	Hamedan-Tehran road	20.7.2009	"
16	<i>H. persica</i>	<i>C. macrocarpum</i>	Malayer	24.5.2009	"
17	<i>H. persica</i>	<i>C. macrocarpum</i>	Nahavand	24.5.2009	"
18	<i>Lactuca orientalis</i>	<i>C. cladosporioides</i>	Kabudarahang	1.6.2009	"
19	<i>L. orientalis</i>	<i>C. cladosporioides</i>	Ourghin (Kabudarahang)	8.5.2009	"
20	<i>L. orientalis</i>	<i>C. cladosporioides</i>	Malayer	8.6.2009	"
21	<i>L. orientalis</i>	<i>C. cladosporioides</i>	Razan	14.6.2009	"
22	<i>Mentha pulegium</i>	<i>C. herbarum</i>	Hamedan-Tehran road	1.6.2009	"
23	<i>M. pulegium</i>	<i>C. herbarum</i>	Nahavand	8.6.2009	"
24	<i>M. pulegium</i>	<i>C. herbarum</i>	Nahavand	8.7.2009	"
25	<i>Papaver dubium</i>	<i>Ascochyta</i> sp. 2	Asadabad	8.5.2009	"
26	<i>P. dubium</i>	<i>Ascochyta</i> sp. 2	Alfavot	24.5.2009	"
27	<i>P. dubium</i>	<i>Ascochyta</i> sp. 2	Kabudarahang	17.7.2009	"
28	<i>P. dubium</i>	<i>Ascochyta</i> sp. 2	Nahavand	8.6.2009	"
29	<i>P. dubium</i>	<i>Ascochyta</i> sp. 2	Tuyserekan	8.7.2009	"
30	<i>P. dubium</i>	<i>Ascochyta</i> sp. 2	Nahavand-Firuzan road	8.6.2009	"
31	<i>Potentilla</i> sp.	<i>Cladosporium variabile</i>	Malayer	8.7.2009	"
32	<i>Potentilla</i> sp.	<i>C. variabile</i>	Nahavand	8.7.2009	"
33	<i>Potentilla</i> sp.	<i>C. variabile</i>	Nahavand	11.7.2009	"
34	<i>Rumex obtusifolius</i>	<i>Ascochyta</i> sp. 1	Asadabad	8.5.2009	"
35	<i>R. obtusifolius</i>	<i>Ascochyta</i> sp. 1	Bahar	1.6.2009	"
36	<i>R. obtusifolius</i>	<i>Ascochyta</i> sp. 1	Ganjnameh	8.7.2009	"
37	<i>R. obtusifolius</i>	<i>Ascochyta</i> sp. 1	Kabudarahang	1.6.2009	"
38	<i>R. obtusifolius</i>	<i>Ascochyta</i> sp. 1	Kabudarahang	17.7.2009	"
39	<i>R. obtusifolius</i>	<i>Ascochyta</i> sp. 1	Nahavand	24.5.2009	"
40	<i>Scorzonera cana</i>	<i>Embellisia astragali</i>	Ourghin (Kabudarahang)	8.5.2009	"
41	<i>S. cana</i>	<i>E. astragali</i>	Alfavot (Malayer)	24.5.2009	"
42	<i>Sonchus oleraceus</i>	<i>Septoria sonchi</i>	Nahavand	8.7.2009	"
43	<i>S. oleraceus</i>	<i>S. sonchi</i>	Kurijan (Kabudarahang)	17.7.2009	"
44	<i>S. oleraceus</i>	<i>S. sonchi</i>	Ganjnameh	29.9.2009	"
45	<i>Taraxacum</i> sp.	<i>Phoma herbicola</i>	Jannatabad garden (Asadabad)	8.7.2009	"
46	<i>Taraxacum</i> sp.	<i>P. herbicola</i>	Asadabad	15.5.2009	"
47	<i>Taraxacum</i> sp.	<i>P. herbicola</i>	Kurijan (Kabudarahang)	8.5.2009	"
48	<i>Taraxacum</i> sp.	<i>P. herbicola</i>	Kian region (Nahavand)	24.5.2009	"
49	<i>Taraxacum</i> sp.	<i>P. herbicola</i>	Alfavot	8.7.2009	"

همان‌طور که در شکل ۳ ملاحظه می‌شود، جدایه *E. tellustris* (JQ308340) مربوط به *C. arvensis* در این تحقیق با دو گونه *E. astragali* (FJ914716)، *E. astragali* (FJ357316) و *E. tellusteris* (JN383494)، *E. tellusteris* همان‌طور که در این تحقیق در این

*S. cana* در این تحقیق در یک گروه فرعی جدا از *E. allii* AY278840 قرار دارند. این مشابه نتایج به دست آمده توسط پریور و همکاران (۲۰۰۹) است. جدایه *E. tellusteris* مورد بررسی در مطالعات آن‌ها،

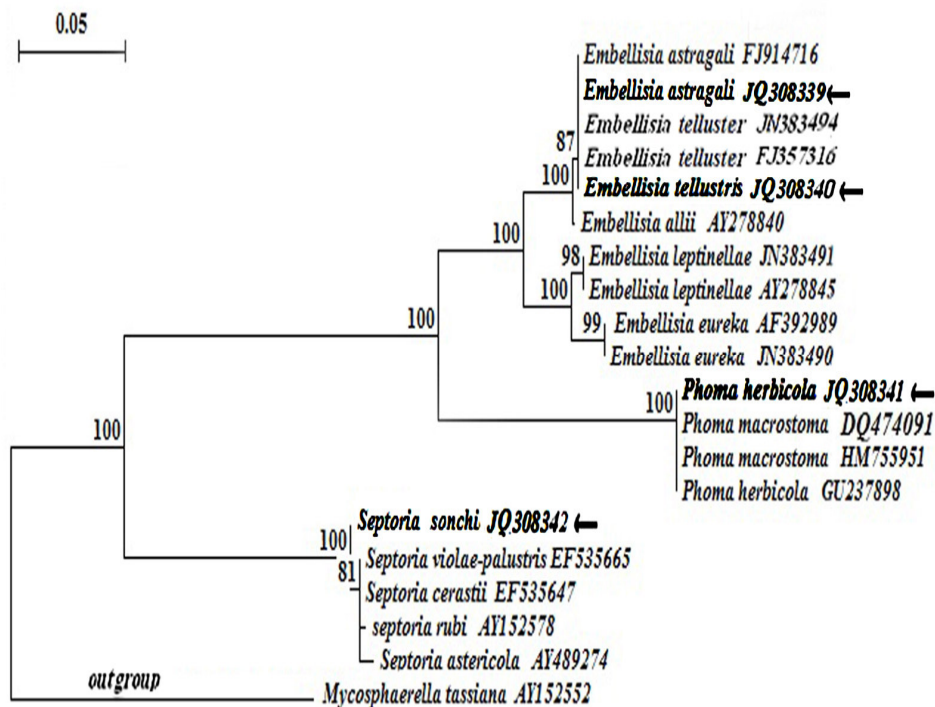
همان‌طور که در شکل ۳ ملاحظه می‌شود، جدایه *E. tellustris* (JQ308340) مربوط به *C. arvensis* در این تحقیق با دو گونه *E. astragali* (FJ914716)، *E. astragali* (FJ357316) و *E. tellusteris* (JN383494)، *E. tellusteris* همان‌طور که در این تحقیق در این

تمایز *Phoma herbicola* از بقیه گونه‌های *Phoma* می‌شود، وجود گردن کشیده در پیکنیدیوم به اندازه  $50-65(100) \times$  ۳۰۰-۱۰۰ میکرومتر و کنیدیوم‌های استوانه‌ای تا نیمه‌استوانه‌ای، تک‌حجره‌ای به اندازه  $3-1/5 \times (7/5-6) \times$  ۴-۶ میکرومتر در محیط کشت است (شکل ۴). این ویژگی‌ها با توصیف ارائه شده توسط گرویتز و همکاران (Gruyter et al. 1998) مطابقت داشت. آن‌ها بیان کردند که این گونه فاقد ذرات چربی در کنیدیوم است. در درخت به دست آمده (شکل ۳)، (*JQ308341*) *Phoma herbicola* جدا شده از *Taraxacum* sp. در این تحقیق با جدایه *Phoma herbicola* (GU237898) و دو جدایه (*Q474091*) *P. macrostoma* (HM755951) در کنار هم قرار می‌گیرند. افراد زیادی نواحی مختلف ژنوم *P. macrostoma* را بررسی کردند. شکل ۳ به خوبی نشان می‌دهد که از بین جدایه‌های مختلف این گونه، تنها جدایه با شماره دسترسی DQ474091 از کانادا (Pitt et al. 2009) و همچنین، جدایه‌ای که برای نخستین بار روی ازمک (*Lepidium draba*) از آمریکا گزارش شده با شماره دسترسی HM755951 (Caesar & Lartey 2009)، با توالی جدایه مورد بررسی در این تحقیق، در یک گروه فرعی نسبت به سایر جدایه‌ها قرار می‌گیرند. اما نواحی مختلف ژنوم *Phoma herbicola* در دنیا بسیار کم بررسی شده است، به طوری که تنها یک توالی از نواحی ITS آن در بانک ژن وجود دارد (Aveskamp et al. 2010). بنابراین، توالی نواحی ITS در *Phoma herbicola* (*JQ308341*) به دو گونه *P. herbicola* و *P. macrostoma* بسیار شبیه است. اما از نظر ویژگی‌های مورفولوژیکی، *P. macrostoma* نمی‌تواند شناسایی شود، چون *P. macrostoma* دارای ذرات چربی کوچک و به تعداد زیاد در کنیدیوم است و همچنین، دارای دیواره عرضی در کنیدیوم‌های با شکل‌های متنوع می‌باشد. تاکنون گونه‌های مختلف *Phoma* شامل *P. herbarum* و *P. exigua* نیز از روی *Taraxacum* از کانادا توسط برابوم و بولاند گزارش شده است (Brebaum & Boland 1999). اما *P. herbarum* با داشتن ذرات چربی کوچک در کنیدیوم‌های خود و فقدان گردن در پیکنیدیوم و *P. exigua* با داشتن کنیدیوم‌های چندحجره‌ای و فقدان گردن در پیکنیدیوم نیز با جدایه مورد بررسی در این تحقیق تفاوت دارند. همچنین، کنیدیوم‌های این جدایه نسبت به *P. herbarum* اندکی باریک‌تر و استوانه‌ای‌تر است. در نهایت با توجه به بررسی‌های مولکولی و مورفولوژیکی جدایه مورد بررسی در این تحقیق به عنوان *P. herbicola* شناسایی می‌شود. این گونه نخستین بار توسط وهمیر (Wehmeyer 1946) از روی ساقه گیاهان علفی *Synthyris dissecta* و *Pedicularis bracteosa* از ایالت ویومینگ در آمریکای شمالی جداسازی و شناسایی شد. براساس منابع در دسترس (Ershad 2009)، این نخستین گزارش از گونه فوق در ایران است (جدول ۲).

همان جدایه‌ای است که توسط سیمونز (۱۹۸۳) شناسایی شد. براساس درخت رسم شده (شکل ۳) تفاوتی بین نواحی ITS گونه‌های *E. astragali* و *E. tellusteris* وجود ندارد. این دو گونه جز در ناحیه ITS2 با اختلاف در یک تا دو نوکلئوتید از هم جدا نمی‌شوند. توالی این ناحیه از ژنوم در جدایه (*E. tellustris*) (*JQ308340*) مربوط به *C. arvensis* در این تحقیق دقیقاً مشابه (*FJ357316*) *E. tellusteris* است. بنابراین، براساس نواحی ITS، جدایه مورد بررسی در این تحقیق به عنوان *E. tellusteris* شناسایی می‌شود. از آنجایی که سیمونز بیان می‌کند، نام *E. tellustris* به علت مونث بودن ماهیت این جنس، جایگزین *E. tellusteris* می‌شود (مکاتبه از طریق ایمیل). بنابراین، این جدایه تحت عنوان *E. tellustris* معرفی می‌شود. تاکنون دو جدایه از این گونه در دنیا دیده شده است که نخستین بار در سال ۱۹۶۵ از خاک‌های اطراف *Artemisia tridentate* در ایالت ویومینگ آمریکا جدا شده است. سپس مصطفی (Moustafa) در سال ۱۹۷۳ آن را از خاک‌های شور مردابی در کویت جدا کرده است (Simmons 1983). براساس منابع در دسترس (Ershad 2009)، این نخستین گزارش از گونه فوق در ایران است.

### ۳- *Phoma herbicola* Wehmeyer

نمونه‌های بررسی شده: روی *Taraxacum* sp.، کوریجان شهرستان کبودرآهنگ، گردنه اسدآباد، الفاوت، سراب کیان شهرستان نهاوند، باغ جنت آباد شهرستان اسدآباد، ۱۳۸۸  
 علایم این قارچ روی برگ‌ها به صورت لکه‌های کم و بیش گرد تا نامنظم و به رنگ خاکستری بودند که پیکنیدیوم‌های نیمه‌فرورفته به رنگ خاکستری تا قهوه‌ای نیز در آن‌ها دیده شد. پرگنه روی محیط PDA در ابتدا زرد کم‌رنگ و به تدریج پرنرنگ‌تر شد. سطح زیرین پرگنه نیز به همین رنگ بود. سپس پیکنیدیوم‌های خاکستری تا سیاه در سطح یا درون آگار به وجود آمدند که تولید آن‌ها از مرکز پرگنه به سمت حاشیه بود که به صورت تکی یا مجتمع تشکیل شدند. توده کنیدیومی PDA به رنگ زرد تا نارنجی روشن مایل به قهوه‌ای دیده می‌شود. پرگنه در محیط PCA سفید مایل به صورتی و دارای حاشیه صاف و تیره‌تر بود. مرکز پرگنه به سرعت با تشکیل پیکنیدیوم‌های خاکستری رنگ فراوان تیره شده و رنگ سطح زیرین پرگنه به طور غیریکنواخت در مرکز و حاشیه‌ها قهوه‌ای مایل به قرمز بود. میزان رشد پرگنه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس پس از هفت روز به ۵۰-۴۵ میلی‌متر می‌رسد. پیکنیدیوم‌ها کروی تا نامنظم دارای یک تا دو استیول و با قطر ۳۵۰-۱۰۰ میکرومتر هستند و دارای یاخته‌های کنیدیوم‌زا به صورت مجتمع، آمپولی‌شکل و به اندازه  $6-2/5 \times 7-3/5$  میکرومتر می‌باشند. خصوصیات اصلی که باعث



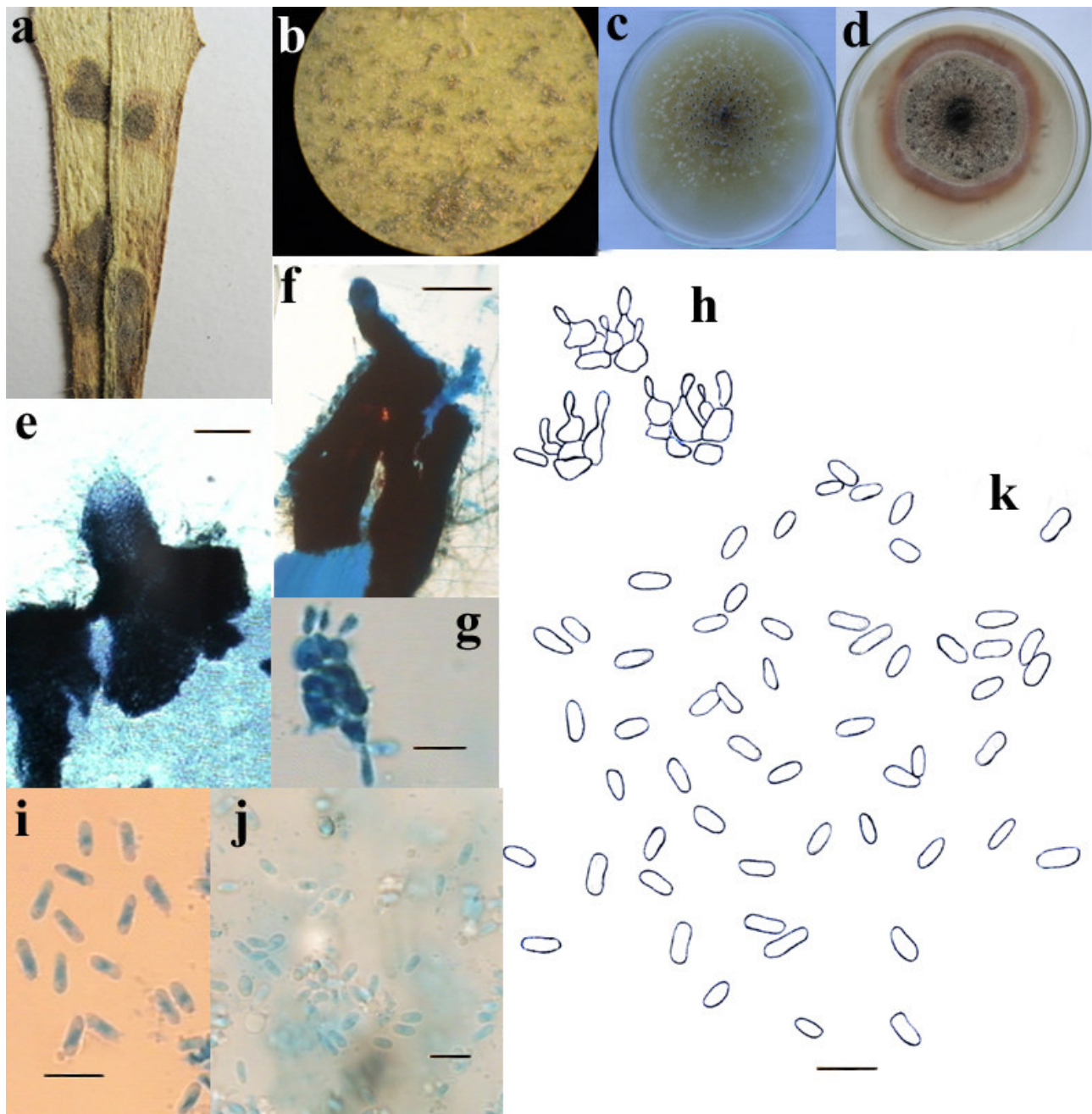
شکل ۳- کلادوگرام به دست آمده از مقایسه توالی نواحی ITS جدایه‌های به دست آمده در این تحقیق با سایر داده‌های موجود در بانک ژن با استفاده از نرم‌افزار TreeCon به روش Neighbor-Joining با هزار تکرار Bootstrap. منابع و محل جدایه‌ها در جدول ۲ نشان داده شده است (جدایه *Mycosphaerella tassiana* AY152552 به عنوان ریشه درخت در نظر گرفته شده است).

Fig. 3. Cladogram constructed from ITS1-5.8S-ITS2 sequence data using Neighbor-Joining method. Percentages of 1000 bootstrap replications are shown above the branches (original and source of the isolates are given in Table 2). The tree is rooted with *Mycosphaerella tassiana* (AY152552).

جدول ۲- جدایه‌های به کار گرفته شده برای مقایسه توالی نواحی ITS

Table 2. Isolates used for ITS region analysis

Molecular identification	GenBank No.	Locality	Reference
<i>Embellisia eureka</i>	AF392989	Canada	Berbee & Zhang 2002
<i>E. eureka</i>	JN383490	USA	Lawrence <i>et al.</i> 2011
<i>E. leptinellae</i>	AY278845	USA	Pryor & Bigelow 2004
<i>E. leptinellae</i>	JN383491	USA	Lawrence <i>et al.</i> 2011
<i>E. allii</i>	AY278840	USA	Pryor & Bigelow 2004
<i>E. astragali</i>	FJ914716	China	Zhang & Pan 2009
<i>E. tellusteris</i>	FJ357316	USA	Pryor <i>et al.</i> 2009
<i>E. tellusteris</i>	JN383494	USA	Lawrence <i>et al.</i> 2011
<i>E. astragali</i>	JQ308339	Iran	Razaghi & Zafari 2011
<i>E. tellustris</i>	JQ308340	Iran	Razaghi & Zafari 2011
<i>Phoma herbicola</i>	GU237898	Netherlands	Aveskamp <i>et al.</i> 2010
<i>P. macrostoma</i>	DQ474091	Canada	Pitt <i>et al.</i> 2009
<i>P. macrostoma</i>	HM755951	USA	Caesar & Lartey 2010
<i>P. herbicola</i>	JQ308341	Iran	Razaghi & Zafari 2011
<i>Septoria sonchi</i>	JQ308342	Iran	Razaghi & Zafari 2011
<i>S. rubi</i>	AY152578	Netherlands	Verkley <i>et al.</i> 2011
<i>S. cerastii</i>	EF535647	Republic of Korea	Jeon <i>et al.</i> 2007
<i>S. astericola</i>	AY489274	Netherlands	Verkley & Starink-willemse 2011
<i>S. violae-palustris</i>	EF535665	Republic of Korea	Jeon <i>et al.</i> 2008
<i>Mycosphaerella tassiana</i>	AY152552	Netherlands	Verkley <i>et al.</i> 2011



شکل ۴- *Phoma herbicola*: a. علائم لکه برگی، b. پیکنیدیوم‌ها در سطح برگ، c. پرگنه روی محیط PDA، d. پرگنه روی محیط PCA، e، f. پیکنیدیوم گردن‌دار، g، h. یاخته‌های کنیدیوم‌زا، i-k. کنیدیوم‌ها (مقیاس: g-k = ۱۰ میکرومتر، e = ۵۰ میکرومتر، f = ۱۰۰ میکرومتر).

Fig. 4. *Phoma herbicola*: a. Symptoms of leaf spot, b. Pycnidia on leaf, c. Colony on PDA medium, d. Colony on PCA medium, e, f. Necked pycnidia, g, h. Conidiogenesis cells, i-k. Conidia (Bar: g-k = 10  $\mu$ m, e = 50  $\mu$ m, f = 100  $\mu$ m).



*Septoria sonchi* Sacc. -۴

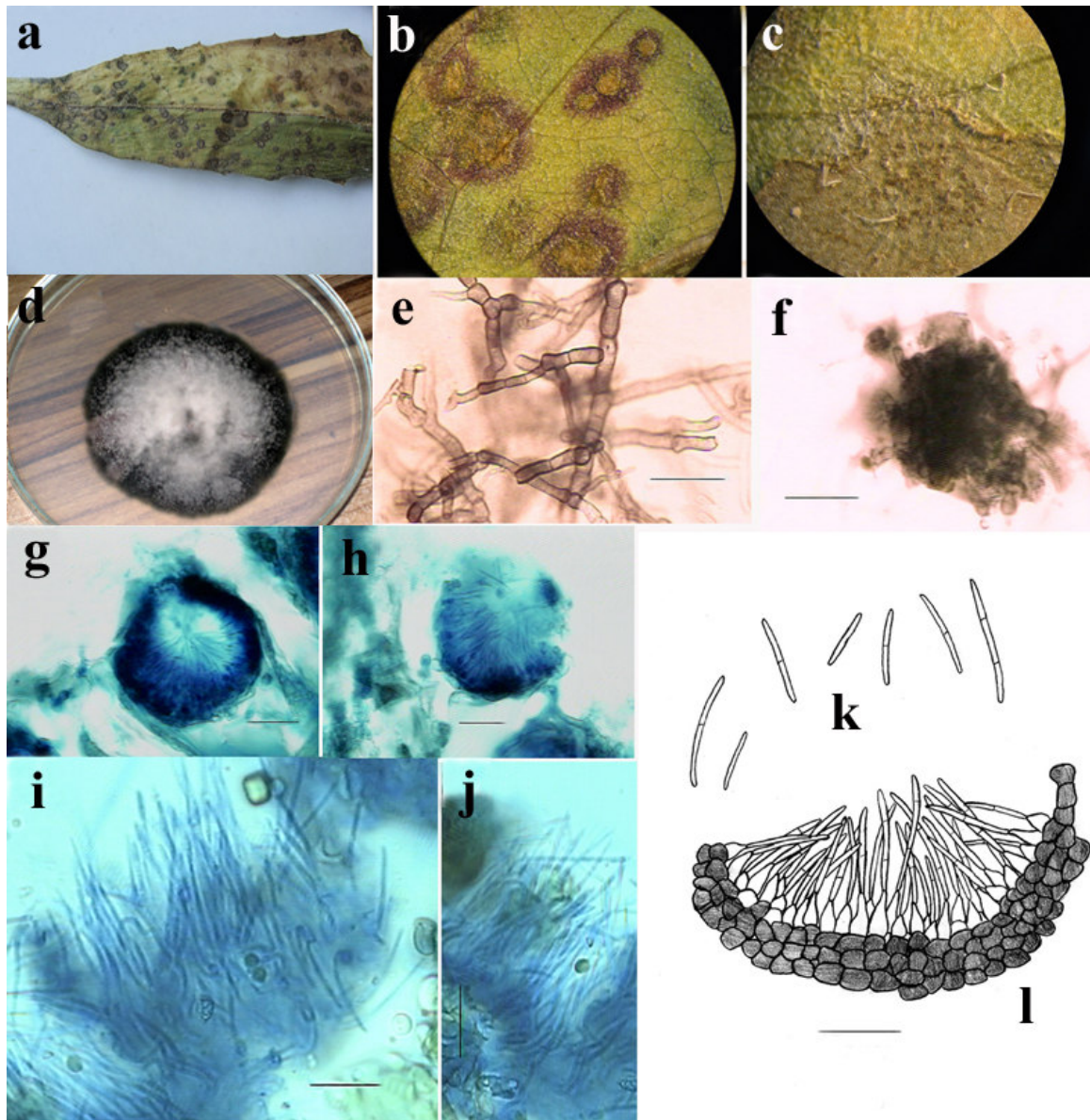
نمونه‌های بررسی شده: روی *Sonchus oleraceus*، کوریجان شهرستان کبودرآهنگ، نهاوند، گنج‌نامه شهرستان همدان، ۱۳۸۸

این قارچ دارای علائم به صورت لکه‌های قهوه‌ای روشن مایل به زیتونی، با شکل‌های گرد تا نامنظم می‌باشد که بیشتر در بین رگبرگ برگ‌های بالایی گیاه تشکیل می‌شوند. قطر این لکه‌ها ۵-۱ میلی‌متر است که حاشیه‌ای بنفش رنگ اطراف آن‌ها را احاطه کرده است که این ویژگی توسط براون و همکاران (Braun et al. 2006) نیز دیده شده است. پرگنه‌های این قارچ روی محیط PCA سبز رنگ است. میسلیوم‌های هوایی به رنگ سفید تا خاکستری و به حالت پنبه‌ای دیده می‌شود. میزان رشد پرگنه پس از گذشت ۱۰ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به ۲۵ میلی‌متر می‌رسد. جدایه‌های این گونه روی محیط کشت، تنها میسلیوم‌هایی با قطر ۵-۲ میکرومتر تولید می‌کنند که از یاخته‌های با شکل‌های نامنظم تشکیل شده است. سپس از به هم پیوستن آن‌ها اندام‌هایی شبیه پیکنیدیوم نارس تشکیل می‌شود. پیکنیدیوم‌ها تنها روی بافت گیاهی میزبان دیده می‌شوند. رنگ آن‌ها قهوه‌ای، به صورت تکی و در کنار هم، فرورفته تا نیمه‌سطحی، کروی، تک‌حفره‌ای، با قطر ۱۰۰-۶۰ میکرومتر، دارای یک استیول دایره‌ای شکل با قطر ۱۰-۵) میکرومتر می‌باشند. از دیواره داخلی پیکنیدیوم، یاخته‌های کنیدیوم‌زا به صورت هولوبلاستیک، پراکنده، lageniform و تا حدی آمپولی شکل، صاف و روشن، با اندازه ۴/۵-۳ × ۱۰-۲ میکرومتر ایجاد می‌شوند. هر یک از این یاخته‌ها تولید یک کنیدیوم در انتهای خود می‌کنند. کنیدیوم‌ها نخ‌شکل، راست تا اندکی خمیده، در پایه subobtuse تا obtuse و در انتها subacute تا subobtuse، بدون ذرات چربی و دارای ۲-۱) (۰ دیواره عرضی می‌باشند. رنگ آن‌ها نیمه‌روشن تا روشن و به اندازه ۲-۱/۵ × ۲۲-۱۵) میکرومتر می‌باشند (شکل ۵). مشخصات این گونه با شرح ارائه شده توسط شین و همکاران

(Shin et al. 2001) مطابقت داشت. این گونه نخستین بار توسط ساکاردو (Saccardo 1878) از روی برگ‌های *Sonchus oleraceus* جداسازی و شناسایی شد. براون و همکاران (۲۰۰۶) گزارش کرده‌اند که این گونه بیشتر روی برگ‌های زنده *Sonchus asper* و *Sonchus oleraceus* در کشورهای شمال اروپا، بلغارستان، ایتالیا، رومانی، روسیه، اوکراین، هند، قزاقستان و کره پراکنش دارد. *S. sonchi* از نظر اندازه و شکل کنیدیوم و تعداد دیواره‌های عرضی آن با سایر گونه‌های *Septoria* روی *S. oleraceus* تفاوت دارد. همان‌طور که در درخت به دست آمده (شکل ۳) ملاحظه می‌شود، *S. sonchi* (JQ308342) جدا شده از *S. oleraceus* در این تحقیق به عنوان یک گونه مجزا و در یک گروه فرعی از سایر گونه‌های *Septoria* قرار گرفته است. *S. sonchi* با داشتن کنیدیوم کوچک‌تر و تعداد کمتر دیواره عرضی در کنیدیوم از سایر گونه‌های *Septoria* جدا می‌شود. هم‌چنین، گونه‌های مختلف *Septoria* شامل: *S. sonchifolia* S.، *S. sonchina*، *S. sonchicola* و *S. modonia* var. *brevispora* از روی *Sonchus* در دنیا گزارش شده‌اند. اما *S. sonchi* از لحاظ اندازه کنیدیوم، اندازه پیکنیدیوم و تعداد دیواره عرضی با تمام این گونه‌ها تفاوت دارد (جدول ۳). لازم به ذکر است که توالی نواحی ITS هیچ‌یک از گونه‌های *Septoria* گزارش شده روی *Sonchus* spp. در بانک ژن وجود ندارد. بنابراین، در صورت مطالعه مولکولی سایر جدایه‌های به دست آمده در این تحقیق و هم‌چنین، سایر جدایه‌های *Septoria* گزارش شده از روی *Sonchus* spp.، وضعیت تاکسونومیکی این گونه‌ها روشن‌تر خواهد شد. با توجه به بررسی‌های مورفولوژیکی، جدایه مورد بررسی در این تحقیق به عنوان *S. sonchi* شناسایی می‌شود. براساس منابع در دسترس (Ershad 2009)، این گونه برای نخستین بار در ایران گزارش می‌شود. هم‌چنین، توالی نواحی ITS این گونه برای نخستین بار در دنیا نیز گزارش می‌شود (شکل ۵).

جدول ۳- مقایسه گونه‌های *Septoria* گزارش شده از روی *Sonchus oleraceus*Table 3. Comparison of *Septoria* species recorded on *Sonchus oleraceus*

Fungus	Conidial size ( $\mu\text{m}$ )	Pycnidial diameter ( $\mu\text{m}$ )	No. of septa	Reference
<i>Septoria sonchi</i>	15–22(30) $\times$ 1.5–2	60–100	(0)2–1	Samples in this survey
<i>S. sonchi</i>	15–35 $\times$ 1.5–2	70–130	(0)2–1	Shin <i>et al.</i> 2001
<i>S. sonchi</i>	15–30(35) $\times$ 1.5–2(2.5)	60–140	(0)1–2	Saccardo 1878
<i>S. sonchina</i>	28–34 $\times$ 1.5–2	not recorded	3–4	Saccardo 1884
<i>S. sonchifolia</i>	20–30 $\times$ 1–1.5	100–120 $\times$ 150–200	3	Saccardo 1884
<i>S. sonchicola</i>	40–54 $\times$ 2	80–100	Not recorded	Saccardo 1913
<i>S. modonia</i> var. <i>brevispora</i>	33–45 $\times$ 1.5–2	90–125	1–4	Saccardo 1909



شکل ۵- *Septoria sonchi*: a, b. علائم لکه برگ، c. تصویر بینوکولار پیکنیدیوم‌های کوچک در سطح لکه‌ها، d. سطح پرگنه روی محیط PCA، e. میسلیم‌ها در محیط کشت، f. درهم رفتگی میسلیم‌ها برای تشکیل پیکنیدیوم در محیط کشت، g. پیکنیدیوم استیول‌دار، h. برش عرضی پیکنیدیوم، i، j. کنیدیوم‌های نخ‌شکل در برش عرضی پیکنیدیوم، k. کنیدیوم‌ها، l. یاخته‌های کنیدیوم‌زا (مقیاس = ۲۰ میکرومتر).

Fig. 5. *Septoria sonchi*: a, b. Symptoms of leaf spot, c. Binocular picture of small pycnidia on lesion, d. Surface of colony on PCA medium, e. Mycelia in medium, f. Mycelia coiled to make pycnidium on medium, g. Ostiolated pycnidium, h. Sector of pycnidium, i, j. Filiform conidia in sector of pycnidium, k. Conidia, l. Conidiogenous cells (Bar = 20  $\mu\text{m}$ ).

## References

- Aveskamp, M.M., Gruyter, J. de, Woudenberg, G.H.C., Verkley, G.J.M. & Crous, P.W. 2010. Highlights of the *Didymellaceae*: A polyphasic approach to characterize *Phoma* and related pleosporalean genera. *Studies in Mycology* 65: 1–60.
- Boerema, G.H., Gruyter, J. de, Noordeloos, M.E. & Hamers, M.E.C. 2004. *Phoma* identification manual. Differentiation of Specific and Intra-specific Taxa in Culture. CABI Publishing, Wallingford, 479 pp., U.K.
- Braun, U., Delhey, R., Dianese, J.C. & Hosagoudar, V.B. 2006. Miscellaneous notes on biotrophic micromycetes. *Schlechtendalia* 14: 85–97.
- Brebaum, S.N. & Boland, G.J. 1999. First report of *Phoma herbarum* and *Phoma exigua* as pathogens of dandelion in southern Ontario. *Plant Disease* 83: 200.
- Caesar, A.J. & Lartey, R.T. 2009. First report of a leaf spot caused by *Alternaria brassicae* on the invasive weed *Lepidium draba* in North America. *Plant Disease* 93(8): 844–846.
- Cash, E.K. 1953. A checklist of Alaskan fungi. *Plant Disease Reporter* 219: 1–70.
- Cho, W.D. & Shin, H.D. 2004. List of Plant Diseases in Korea. Fourth edition. Korean Society of Plant Pathology, 779 pp.
- Ebrahimi, A.Gh. & Minassian, V. 1973. An index of cultivated and wild plant diseases in Khuzestan. College of Agriculture, Jundi Shapur University, Ahvaz, Iran.
- Ershad, D. 2009. Fungi of Iran. 3<sup>rd</sup> ed. Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, 531 pp.
- Esfandiari, E. 1948a. Troisieme liste des fungi ramasses en Iran. *Entomologie Phytopathologie Application* 8: 1–15.
- Gardner, D.E. 1997. *Septoria vulcani* sp. nov. on endemic *Rumex* in Hawaii. *Mycotaxon* 62: 461–464.
- Ghosta, Y. 2004. A taxonomic study on the genus *Alternaria* from Iran. PhD Thesis submitted to Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran (In Persian).
- Gorter, G.J.M.A. 1977. Index of plant pathogens and the diseases they cause in cultivated plants in South Africa. Republic of South Africa, Department of Agricultural and Technical Services, Plant Protection Research Institute, Science Bulletin 392: 1–177.
- Gruyter, J.de, Noordeloos, M.E. & Boerema, G.H. 1998. Contributions towards a monograph of *Phoma* (*Coelomycetes*) I-3. Section *Phoma*: Taxa with conidia longer than 7 m. *Persoonia* 16(4): 471–490.
- Hedjaroude, Gh.A. 1976. Report on some form-species of imperfect fungi of Caspian sea area. *Iranian Journal of Plant Pathology* 12: 89–94 (In Persian with English summary).
- Khabiri, E. 1958. Contribution a' la mycoflora de l' Iran. Troisieme liste. *Revue Mycologia* 23: 408–412.
- Lawrence, D.P., Park, M.S. & Pryor, B.M. 2011. *Nimbya* and *Embellisia* revisited, with nov. comb. for *Alternaria celosiae* and *A. perpunctulata*. *Mycological Progress* (2012) (In Press).
- Li, Y.Z. & Nan, Z.B. 2007. A New Species, *Embellisia astragali* sp. nov., causing standing milk-vetch disease in China. *Mycologia* 99(3): 406–411.
- Melnik, V.A. & Pystina, K.A. 1995. Novitates de micromycetibus reservati svirensis inferioris. *Novosti Sistematiki Nizshikh Rastenii* 30: 29–36.
- Murray, M.G. & Thompson, W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8: 4321–4325.
- Pitt, W.M., Bailey, K.L., Fu, Y.B. & Peterson, G.W. 2009. Characterization of *Phoma macrostoma* using AFLP fingerprinting and ribosomal DNA ITS sequence analysis. Unpublished.
- Pryor, B.M., Creamer, R., Shoemaker, R.A., McLalin-Romero, J. & Hamblen, S. 2009. *Undifilum* a new genus for endophytic *Embellisia oxytropis* and parasitic *Helminthosporium bornmuelleri* on legums. *Botany* 87: 178–194.

- Rastegar, M.A. 1996. Weeds and their control methods. Press Center of Academic Publishing, 413 pp, Iran.
- Saccardo, P.A. 1878. Fungi Veneti novi vel critici vel mycologiae Venetae addendi. Series VII. Michelia 1(2): 133–221.
- Salata, B., Mulenko, W. & Wolczanska, A. 1994. New and rare species of *Sphaeropsidales* in the Polish flora. Acta Mycologica 29: 81–93.
- Salazar, O., Julian, M.C. & Rubio, V. 2000. Primers based on specific rDNA-ITS sequence for PCR detection of *Rhizoctonia solani*, *R. solani* AG-2 subgroups and ecological types, and binucleate *Rhizoctonia*. Mycological Research 104: 281–285.
- Sameva, E.F. 2004. New Records of Anamorphic Fungi from Bulgaria. Mycological Balcanica 1: 55–57.
- Schneider, J.H.M., Salazar, O., Rubio, V. & Keijer, J. 1997. Identification of *Rhizoctonia solani* associated with field grown tulips using ITS rDNA polymorphism and pectic zymograms. European Journal of Plant Pathology 103: 607–622.
- Shin, H.D., Sameva, E.F. & Kim, J.D. 2001. Morphometric studies on the genus *Septoria* in Korea (I). Mycobiology 29: 145–153.
- Simmons, E.G. 1983. An aggregation of *Embellisia* species. Mycotaxon 17: 216–241.
- Simonyan, S.A. 1981. Mycoflora of Botanical Gardens and Arboreta of the Armenian SSR. Hayka, 232 PP, Armenia.
- Vaziri, A. 1973. List of plant diseases in Dezful, Safiabad, Irrigation Department, Agricultural Research Centre. 25 pp.
- Wehmeyer, L.E. 1946. Studies on some fungi from north-western Wyoming. II. Fungi Imperfecti. Mycologia 38: 306–330.