

شناسایی قارچ‌هایی از تیره Didymellaceae همراه علائم مختلف بیماری در برخی گیاهان دارویی در استان خوزستان

فاطمه کشاورزی^۱، رضا فرخی‌نژاد^۲ و مهدی مهربانی کوشکی^{۳ و ۴*}

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۲- استاد بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۳- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی و علوم زیستی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۴- دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۲۹ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۲۲)

چکیده

اکالپتوس (*Eucalyptus sp.*)، بارهنگ (*Plantago sp.*)، خارشر (*Alhagi sp.*)، سه‌پستان (*Cordia myxa*)، شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza glabra*)، شوید (*Anethum graveolens*)، رزماری (*Rosmarinus officinalis*) و هندوانه ابوجهل (*Citrullus colocynthis*) از گیاهان دارویی در مناطق مختلف استان خوزستان هستند که می‌توانند میزان تعداد زیادی قارچ‌های بیماری‌زای و غیر بیماری‌زای گیاهی باشند. در این مطالعه در طول سال‌های ۹۸-۱۳۹۷، ۳۰ نمونه از گیاهان دارویی فوق با علائم لکه‌برگی، شانکر و نکروز ساقه جمع‌آوری و ۲۳ جدایه از شش گونه در تیره *Didymellaceae* شناسایی شدند. ویژگی‌های ریخت‌شناسی روی محیط کشت سیب زمینی - دکستروز- آگار (PDA) بررسی شد. برای شناسایی مولکولی، بخش‌هایی از ناحیه‌های ITS (بعضی جدایه‌ها)، *tub2* (تمام جدایه‌ها) و *rpb2* (بعضی جدایه‌ها) با استفاده از آغازگرهای مناسب تکثیر و توالیبندی شدند. بر اساس تبارزایی مولکولی و ریخت‌شناسی، گونه‌های *Allophoma labilis*، *Didymella glomerata*، *Epicoccum italicum*، *Neodidymelliopsis farokhinejad*، *Nothophoma raii* و *Xenodidymella glycyrrhizicola* شناسایی شدند. بر اساس دانش ما، این اولین گزارش گونه‌های فوق روی میزبان‌های ذکر شده و اولین ثبت از گونه‌های *Epicoccum italicum* و *N. raii* برای میکروبیوتای ایران است.

واژه‌های کلیدی: تبارزایی مولکولی، ریخت‌شناسی، پیکنیدیوم، کنیدیوم، میزبان گیاهی

Identification of Didymellaceae fungi associated with different disease symptoms in some medicinal plants of Khuzestan Province, Iran

Fatemeh Keshavarzi¹, Reza Farokhinejad² and Mehdi Mehrabi-Koushki^{3, 4*}

1. MSc Student of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran

2 Prof. of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran

3. Biotechnology and Bioscience Research Center, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran

4. Associate Prof. of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran

(Received: May, 19, 2022 - Accepted: Sep, 13, 2022)

ABSTRACT

Bitter apple (*Citrullus colocynthis*), camelthorn (*Alhagi sp.*), cordia (*Cordia myxa*), dill (*Anethum graveolens*), eucalyptus (*Eucalyptus sp.*), licorice (*Glycyrrhiza glabra*), plantain (*Plantago sp.*), and rosemary (*Rosmarinus officinalis*) are medicinal plants distributed in different parts of Khuzestan province. These plants could be host to many pathogenic and non-pathogenic fungi. In this study, 30 samples from medicinal plants showing leaf spot, stem canker and stem necrosis were collected during 2019-2020, and in which 23 isolates of six species in the family Didymellaceae were identified. Morphological characteristics were studied on potato - dextrose - agar (PDA). For molecular study, partial regions of *tub2* gene were amplified using appropriate primers and sequenced. Based on molecular phylogeny in combination with morphology, the isolates were identified as follow: *Allophoma labilis*, *Didymella glomerata*, *Epicoccum italicum*, *Neodidymelliopsis farokhinejad*, *Nothophoma raii* and *Xenodidymella glycyrrhizicola*. In our knowledge, this is the first report of above species on surveyed hosts and first record of both *E. italicum* and *N. raii* for mycobiota of Iran.

Key words: Molecular phylogeny, morphology, pycnidium, conidium, plant host.

* Corresponding author E-mail: mhdmhrb@gmail.com

مقدمه

از زمان‌های قدیم گیاهان جزء اولین و دردسترس‌ترین منابع قابل استفاده برای درمان بیماری‌ها بوده‌اند (Sharafzadeh and Alizadeh, 2012). گیاهان دارویی معمولاً به گیاهانی گفته می‌شوند که خواص درمانی یا اثرات دارویی مفید روی بدن انسان دارند. در ایران به دلیل دارا بودن اقلیم‌های متنوع، شرایط رشد گیاهان مختلف به ویژه گیاهان دارویی فراهم می‌باشد. استان خوزستان دارای بیش از ۹۵۰ گونه گیاهی می‌باشد که از این تعداد حدود ۲۲۵ گونه گیاهی در کتاب‌های موجود و عطاری‌های استان تحت عنوان گیاهان دارویی شناخته شده است (Howizeh et al., 2003). از جمله این گیاهان می‌توان به اکالیپتوس (*Eucalyptus sp.*)، بارهنگ (*Plantago sp.*)، خارشتر (*Alhagi sp.*)، سه‌پستان (*Cordia myxa*)، شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza glabra*)، شوید (*Anethum graveolens*)، رزماری (*Rosmarinus officinalis*) و هندوانه ابوجهل (*Citrullus colocynthis*) اشاره کرد (Howizeh et al., 2003). این گیاهان میزبان بسیاری از قارچ‌های بیماری‌زا و غیربیماری‌زا از جمله اعضای تیره Didymellaceae هستند. گونه‌های Didymellaceae در طیف گسترده‌ای از زیست‌بوم‌ها پراکنش دارند. اکثر اعضای این تیره بیمارگرهای گیاهی روی طیف وسیعی از میزبان‌ها هستند که عمدتاً سبب ایجاد آلودگی برگ و ساقه می‌شوند (Ahmadpour et al., 2017a, b, 2022a, b; ; (Babaahmadi et al., 2018; Larki et al., 2019). چندین گونه متعلق به جنس‌های *Ascochyta* و *Nothophoma* دارای میزبان‌های اختصاصی از یک تیره گیاهی هستند اما اختصاصیت میزبانی در جنس‌های Didymellaceae تایید نشده است (Farr and Rossman, 2022). در مطالعه چن و همکاران (Chen et al., 2017) مجموعه‌ای از ۱۰۸ جدایه‌ی از تیره Didymellaceae به دست آمده از ۴۰ گونه میزبان در ۲۷ تیره گیاهی بررسی شده است. بیشتر این میزبان‌ها برای گونه‌های Didymellaceae میزبان‌های عمومی محسوب می‌شوند. این میزبان‌های گیاهی متعلق به

تیره‌های Asteraceae, Fabaceae, Poaceae, Ranunculaceae, Rosaceae و Solanaceae هستند. بیشتر جنس‌های Didymellaceae دارای دامنه وسیعی از میزبان‌ها هستند، در حالی که بیشترین میزبان‌های سه جنس *Ascochyta*, *Neosascochyta* و *Neomicrosphaeropsis* در سه تیره Fabaceae, Poaceae و Tamaricaceae قرار دارند (Chen et al., 2015, 2017; Farr and Rossman, 2022). اکثر اعضای تیره Didymellaceae از گیاهان گزارش شده‌اند و تعداد کمی، از دیگر بسترها جدا شده‌اند، مانند گونه‌های *Phoma herbarum*, *Didymella glomerata* و *D. pomorum* که از مواد معدنی شامل آزبست، سیمان و رنگ جداسازی شده‌است (Aveskamp et al., 2008). گونه *D. eucalyptica* از آب، *D. gardeniae* از هوا و *Leptosphaerulina australis* از خاک جداسازی و گزارش شده است (Aveskamp et al., 2010).

در ایران تحقیقات متعددی برای شناسایی گونه‌های تیره Didymellaceae روی میزبان‌های مختلف علفی و چوبی انجام شده است که از آن جمله می‌توان به مطالعات امیردهی و همکاران (Amirdehi et al., 2017)، احمدپور و همکاران (Ahmadpour et al., 2017a, b, 2022a, b)، بابااحمدی و همکاران (Babaahmadi et al., 2018)، خدایی و همکاران (Khodaei et al., 2018)، و لرکی و همکاران (Larki et al., 2019) اشاره کرد. با توجه به اینکه گیاهان دارویی در استان خوزستان، از تنوع زیادی برخوردارند. در این مطالعه، قارچ‌هایی از تیره Didymellaceae که همراه علائم مختلف بیماری در برخی گیاهان دارویی جداسازی شدند، بر اساس روش‌های مبتنی بر ریخت‌شناسی و تبارزایی مولکولی شناسایی شدند.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی آلوده، جداسازی و

خالص‌سازی

در بازدیدهایی که از مناطق مختلف استان خوزستان، در سال ۱۳۹۸-۱۳۹۹ انجام گرفت. از گیاهان دارویی

جدایه‌های قارچی در محیط کشت سیب زمینی - دکستروز- برات (PDB) در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سلسیوس در شیکر انکوباتور برای ۱۰ روز رشد یافتند. زیست‌توده میسلیمی با استفاده از پمپ خلا، قیف و کاغذ صافی سترون از محیط کشت PDB جمع-آوری و با آب مقطر سترون شستشو و سپس آب‌گیری شدند. زیست‌توده میسلیمی در لوله‌های سانتریفیوژ ۵۰ میلی‌لیتری در فریزر ۸۰- به مدت حداقل دو ساعت نگهداری و سپس در دستگاه فریزدرایر (Freeze Dryer, Alpha 1-2 LDplus, Christ, Germany) خشک-انجمادی شدند. توده میسلیمی خشک شده در هاون چینی محتوی ازت مایع پودر و استخراج DNA به روش ریدر و برودا (Raeder and Broda, 1985) با اندکی تغییر (Ahmadpour *et al.*, 2017) انجام شد.

تکثیر ناحیه‌های ژنی

برای تکثیر ناحیه ITS بعضی جدایه‌ها، از جفت آغازگر عمومی ITS1 و NL4 استفاده شد (White *et al.*, 1993; O'Donnell, 1990). جهت تکثیر حدود ۴۵۰ bp از ژن بتاتوبولین از جفت آغازگر اختصاصی Btub2Fd و Btub4Rd استفاده شد (Woudenberg *et al.*, 2009).

همچنین برای تکثیر حدود ۹۰۰ bp از ناحیه RNA پلی‌مراز بعضی جدایه‌ها، از جفت آغازگر اختصاصی RPB2-5F2 و fRPB2-7cR استفاده گردید (Liu *et al.*, 2007; Sung *et al.*, 1999). مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از دو میکرولیتر بافر 10x Taq buffer، غلظت نهائی ۲-۳ میلی‌مولار از $MgCl_2$ ، ۰/۸ میکرولیتر از هر آغازگر روبه‌جلو و معکوس (10 μm)، ۰/۸ میکرولیتر از مخلوط 2.5 mm dNTP (each)، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase (5u/ μl)، کره جنوبی، ۲ میکرولیتر DNA الگو و آب مقطر دوبار تقطیر شده تا حجم ۲۰ میکرولیتر تهیه و در دستگاه ترموسیکلر (مدل MJ MiniTM Gradient Thermal Cycler) قرار گرفت. برنامه حرارتی برای تکثیر ناحیه‌های ژنی شامل یک

دارای علائم بیماری، شامل اکالیپتوس (نکروز، لکه‌برگی و شانکر ساقه)، بارهنگ (لکه‌برگی)، خارشتر (لکه‌برگی و شانکر شاخه)، رزماری (لکه‌برگی)، سه‌پستان (لکه‌برگی)، شوید (لکه‌برگی)، شیرین‌بیان (لکه‌برگی) و هندوانه‌ابوجهل (لکه‌برگی و شانکر ساقه)، ۳۰ نمونه جمع‌آوری شد. جهت جداسازی بیمارگرهای احتمالی، قطعاتی از مرز بافت آلوده و سالم هر نمونه تهیه و بعد از ضدعفونی سطحی با استفاده از هیپوکلریت سدیم ۰.۲٪ به مدت ۲-۱ دقیقه، سه بار با آب مقطر سترون شست و شو شدند. قطعات گیاهی روی کاغذ صافی سترون خشک و به محیط غذایی سیب زمینی- دکستروز - آگار (PDA) حاوی ۳۰ میلی‌گرم در لیتر سولفات استریتومایسین انتقال یافت. سه تا هفت روز پس از نگهداری تشک‌های پتری در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس، پرگنه‌های ظاهر شده قارچی به محیط جدید منتقل شدند. جدایه‌های قارچی با روش تک‌اسپور کردن خالص‌سازی شدند (Babaahmadi *et al.*, 2018).

بررسی ریخت‌شناختی

شکل ظاهری پرگنه، ویژگی‌های رشدی و شکل و اندازه پیکنیدیوم‌ها، کنیدیوم‌ها و کلامیدوسپورها روی محیط PDA بررسی شد. برای تهیه اسلایدهای میکروسکوپی از محلول‌های رنگ‌آمیزی لاکتوفنل، کاتن بلو، آبی‌لاکتیک و یا لاکتوفنل-کاتن‌بلو استفاده شد. به منظور مشاهده و اندازه‌گیری ساختارهای قارچی، از میکروسکوپ نوری Leitz Wetzlar استفاده شده و عکسبرداری با استفاده از میکروسکوپ نوری مدل OLYMPUS BX51 مجهز به دوربین عکسبرداری مدل OLYMPUS DP12 انجام شد. برای شناسایی و تطبیق خصوصیات ریخت‌شناختی جدایه‌های مورد بررسی با توصیف معتبر این گونه‌ها، ترجیحاً از توصیف آن‌ها در محل انتشار (Chen *et al.*, 2015, 2017; Ahmadpour *et al.*, 2017; Hou *et al.*, 2020) و در صورت عدم دسترسی از بانک قارچ‌ها (<http://www.mycobank.org>) استفاده شد.

تهیه زیست‌توده قارچی و استخراج DNA

نتیجه و بحث

در پژوهش حاضر، از ۴۰۰ جدایه قارچی بدست‌آمده همراه علائم بیماری در گیاهان دارویی، تنها ۲۳ جدایه مربوط به تیره Didymellaceae شناسایی شدند. درخت تبارزایی مبتنی بر سه ناحیه ژنی رسم و در آن ارتباط تبارزایی جدایه‌های تحت بررسی با جدایه‌های تیپ ارایه شد (شکل ۱). جزئیات بررسی ریخت‌شناسی و مولکولی هرگونه به تفکیک آورده شده است.

۱- گونه *Allophoma labilis* (Saccardo) Q. Chen & L. Cai, *Studies in Mycology* 82: 162 (2015) سه جدایه از این‌گونه از هندوانه ابوجهل با نام‌های SCUA-Kesh-ABP (از نکرور میوه)، SCUA-Kesh-AB7 (شانکر ساقه) و SCUA-Kesh-AB6 (لکه‌برگی) و دو جدایه از خارشتر SCUA-Kesh-K2 (لکه‌برگی) و SCUA-Kesh-K3 (شانکر ساقه) بررسی شدند (شکل ۲).

در درخت تبارزایی (شکل ۱)، جدایه‌های مورد بررسی با جدایه تیپ *A. labilis* CBS 124.93 خوشه‌بندی شدند و یک شاخه تکاملی ایجاد کردند (MLBS 93%, MPBS 87%, BPP 0.79). ریخت‌شناسی جدایه مورد بررسی با جدایه تیپ گونه *Phoma labilis* Sacc. که از ساقه گوجه‌فرنگی (*Lycopersicon esculentum*) جداسازی شده است، تطابق دارد (de Gruyter et al., 1993). این گونه بعد از مطالعات تبارزایی مولکولی به جنس *Allophoma* انتقال یافت (Chen et al., 2015). علاوه‌براین، این گونه تاکنون از خاک و گیاهان مختلفی از جمله *Althaea armeniaca*, *Leonurus cardiaca*, *Lycopersicon esculentum*, *Rosa sp.*, *Salvia officinalis* و *Solanum lycopersicum* در کشورهای مختلف جداسازی شده است (Farr and Rossman, 2022). در ایران این گونه از گیاه زینتی پرپوش (*Catharanthus roseus*) گزارش شده است (Larki et al., 2019). براساس دانش ما، این اولین گزارش *A. labilis* روی هندوانه ابوجهل و خارشتر است.

مرحله ذوب اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت سه دقیقه، ۳۵ چرخه (شامل یک مرحله ۳۰ ثانیه‌ای در دمای ۹۴ درجه سلسیوس برای واسرشته‌سازی؛ ۳۰ ثانیه در دمای ۵۴ (ITS-LSU)، ۵۶ (*tub2*) و ۵۸ (*rpb2*) درجه سلسیوس برای اتصال آغازگرها و ۹۰ ثانیه‌ای در دمای ۷۲ درجه سلسیوس برای بسط آغازگرها) و یک مرحله بسط نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه بود. توالی‌یابی محصولات PCR بصورت مستقیم با استفاده از آغازگرهای رفت یا برگشت بوسیله شرکت کدون ژنتیک (تهران، ایران) انجام شد.

تجزیه و تحلیل تبارزایی

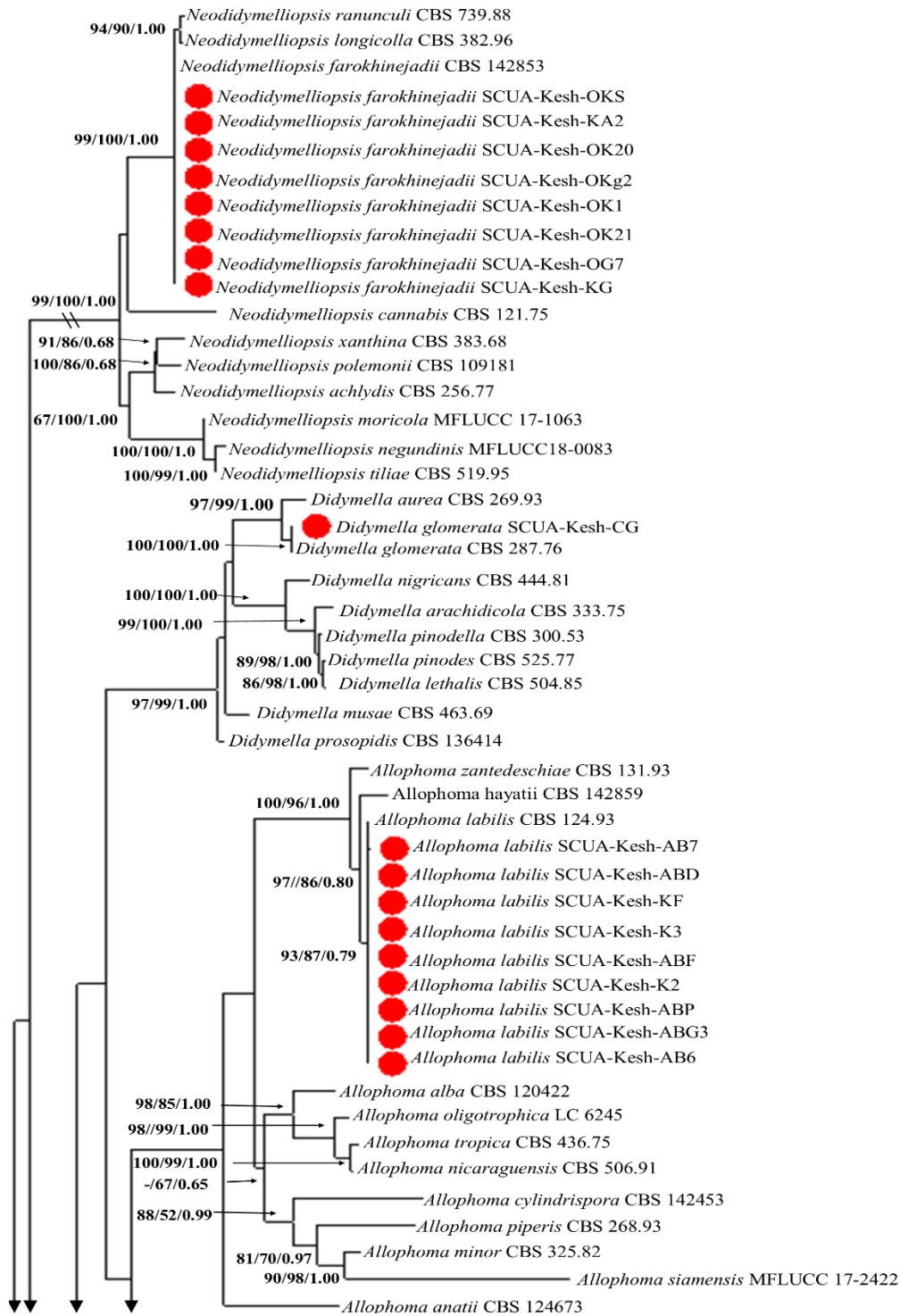
ارتباط تبارزایی گونه‌های شناسایی شده با استفاده از الگوریتم‌های درست‌نمایی بیشینه (Maximum Likelihood, ML) و استنباط بی‌ژین (parsimony, MP inference, BI) انجام شد. توالی‌های جدایه‌های معتبر گونه‌های نزدیک به آرایه‌های مورد بررسی از بانک ژن NCBI برداشت شد. برای تجزیه و تحلیل درست‌نمایی بیشینه از نرم‌افزار raxmlGUI 2.0 beta (Edler et al., 2021) و مدل تکاملی GTR+G+I، صرفه‌جویی بیشینه از نرم‌افزار MEGA v.7 (Kumar et al., 2016) و استنباط بی‌ژین (بصورت تجزیه و تحلیل خرد شده) از نرم‌افزار MrBayes v.3.2.6 (Ronquist et al., 2012) استفاده شد.

بهترین مدل تکاملی برای الگوریتم استنباط بی‌ژین با استفاده از نرم‌افزار jModelTest 2 (Darriba et al., 2012) تعیین شد. ارزش و اعتبار شاخه‌های تکاملی در الگوریتم درست‌نمایی بیشینه و صرفه‌جویی بیشینه با انجام آزمون بوت‌استرپ (Bootstrapping, BS) و در استنباط بی‌ژین با آزمون احتمال پسین (Posterior probability, BPP) محاسبه و در محل گره‌ها درج شد. در آزمون بوت‌استرپ ۱۰۰۰ بار نمونه‌گیری کاذب و در آزمون احتمال پسین پنج میلیون نمونه‌گیری کاذب (با حذف ۲۵٪ درختان اولیه) تنظیم شد.

جدول ۱- اطلاعات جدایه‌های تحت مطالعه و شماره دسترسی توالی‌های نوکلئوتیدی آن‌ها در بانک ژن NCBI.

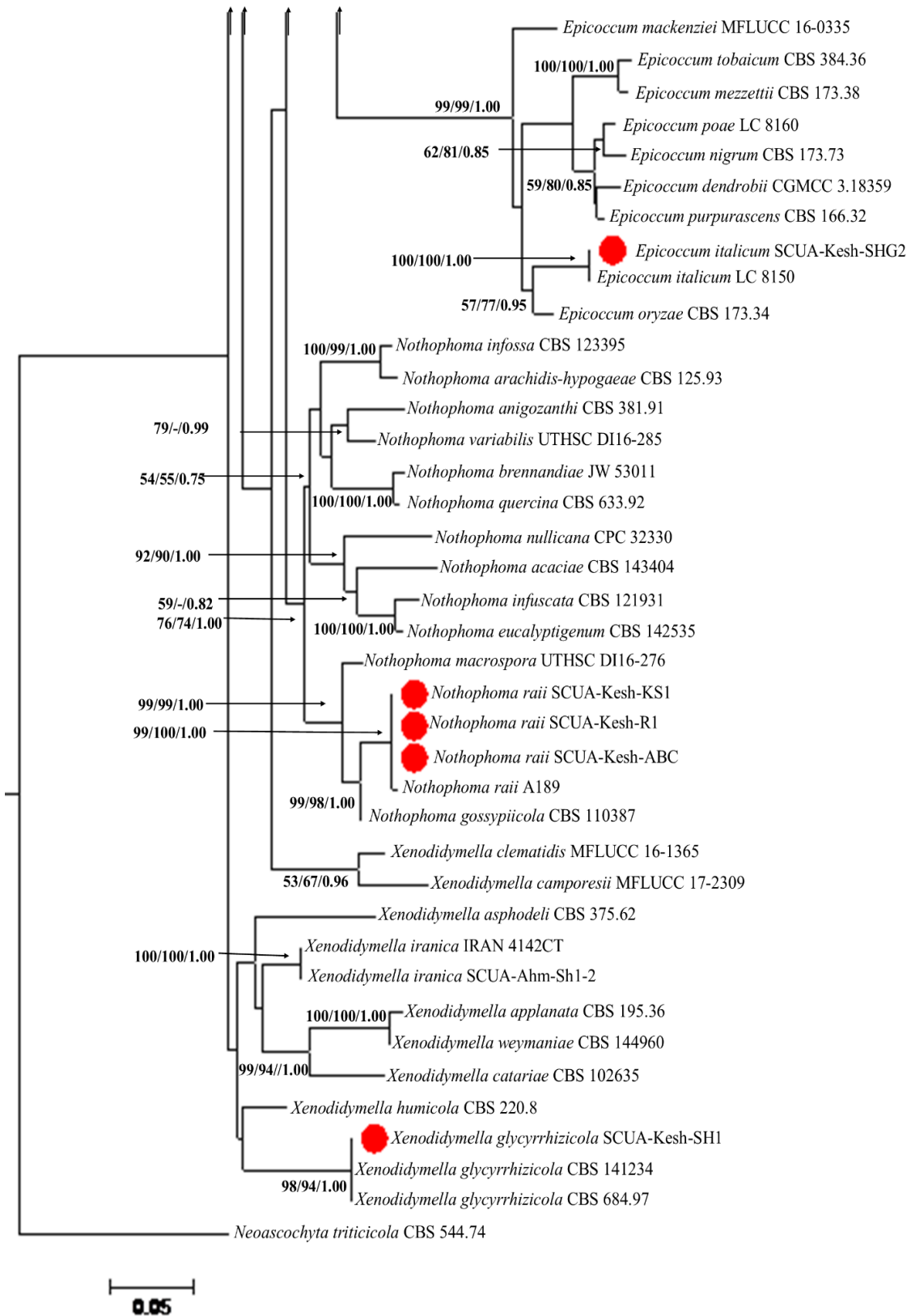
Table 1. Data of the isolates under study and their nucleotide sequence accession numbers in NCBI GenBank

Species name	Isolate numbers	Isolation source	Origin	accession numbers		
				ITS	tub2	rpb2
<i>Allophoma. Labilis</i>	SCUA-Kesh-AB7	<i>Citrullus colocynthis</i>	Khuzestan, Molasani	ON815021	OM638116	ON843643
<i>A. labilis</i>	SCUA-Kesh-AB6	<i>Citrullus colocynthis</i>	Khuzestan, Molasani	-	OM638115	-
<i>A. labilis</i>	SCUA-Kesh-ABP	<i>Citrullus colocynthis</i>	Khuzestan, Molasani	-	OM638121	-
<i>A. labilis</i>	SCUA-Kesh-ABF	<i>Citrullus colocynthis</i>	Khuzestan, Molasani	-	OM638152	-
<i>A. labilis</i>	SCUA-Kesh-ABD	<i>Citrullus colocynthis</i>	Khuzestan, Molasani	-	OM638118	-
<i>A. labilis</i>	SCUA-Kesh-K2	<i>Alhagi</i> sp.	Khuzestan, Ahvaz	-	OM638125	-
<i>A. labilis</i>	SCUA-Kesh-K3	<i>Alhagi</i> sp.	Khuzestan, Ahvaz	-	OM638126	-
<i>A. labilis</i>	SCUA-Kesh- KF	<i>Alhagi</i> sp.	Khuzestan, Ahvaz	-	OM638130	-
<i>A. labilis</i>	SCUA-Kesh- ABg3	<i>Citrullus colocynthis</i>	Khuzestan, Molasani	-	OM638120	-
<i>Didymella glomerata</i>	SCUA-Kesh-Cg	<i>Cordia myxa</i>	Safiabad	ON815022	OM638124	ON843644
<i>Epicocum italicum</i>	SCUA-Kesh-Shg2	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Khuzestan, Shavor	ON815023	OM638151	ON843645
<i>Neodidymelliopsis farokhinejadii</i>	SCUA-Kesh-Ok20	<i>Eucalyptus</i> sp.	Khuzestan, Shavor	-	OM638139	-
<i>N. farokhinejadii</i>	SCUA-Kesh-Ok21	<i>Eucalyptus</i> sp.	Khuzestan, Shavor	-	OM638140	-
<i>N. farokhinejadii</i>	SCUA-Kesh-Ok1	<i>Eucalyptus</i> sp.	Khuzestan, Shavor	-	OM638138	-
<i>N. farokhinejadii</i>	SCUA-Kesh-Og7	<i>Eucalyptus</i> sp.	Khuzestan, Shavor	-	OM638137	-
<i>N. farokhinejadii</i>	SCUA-Kesh-Ka2	<i>Plantago major</i>	Khuzestan, Dezful	-	OM638127	-
<i>N. farokhinejadii</i>	SCUA-Kesh-Kg	<i>Alhagi</i> sp.	Khuzestan, Dezful	-	OM638131	-
<i>N. farokhinejadii</i>	SCUA-Kesh- OKS7	<i>Eucalyptus</i> sp.	Khuzestan, Shavor	-	OM638142	-
<i>N. farokhinejadii</i>	SCUA-Kesh- OKg2	<i>Eucalyptus</i> sp.	Khuzestan, Shavor	-	OM638141	-
<i>Nothophoma raii</i>	SCUA-Kesh-R1	<i>Rosmarinus officinali</i>	Khuzestan, Ahvaz	-	OM638145	-
<i>N. raii</i>	SCUA-Kesh-ABC	<i>Citrullus colocynthis</i>	Khuzestan, Molasani	ON815024	OM638117	-
<i>N. raii</i>	SCUA-Kesh-KS1	<i>Alhagi</i> sp.	Khuzestan, Ahvaz	-	OM638135	-
<i>Xenodidymella glycyrrhizicola</i>	SCUA-Kesh-Sh1	<i>Anethum graveolens</i>	Khuzestan, Safiabad	ON815025	OM638150	ON843646

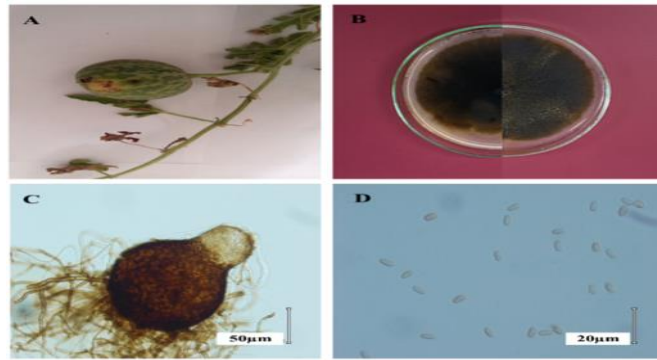


شکل ۱- درخت تبارزایی در تجزیه و تحلیل درست نمائی بیشینه بر اساس توالی ITS، *tub2* و *rpb2*. مقادیر مساوی و بالاتر از ۵۰٪ آزمون بوت استرپ در تجزیه و تحلیل درست‌نمایی بیشینه (MLBS) و صرفه‌جویی بیشینه (MPBS) و مقادیر مساوی و بالاتر از ۰/۵ آزمون احتمال پسین (BPP) در محل گره‌ها ذکر شده است. نمونه‌های بررسی شده با دایره توپر نشان داده شده- است. جدایه *Neoscochyta tritricicola* CBS 544.74 به‌عنوان آرایه گروه خارجی استفاده شد.

Figure 1. Phylogenetic tree inferred from the maximum likelihood analysis based on combined ITS, *tub2* and *rpb2* sequences. Bootstrap support values > 50% in Maximum likelihood (MLBS) and maximum parsimony (MPBS) analyses and Bayesian posterior probabilities ≥ 0.5 (BPP) are shown at the nodes. Taxa under survey are marked with red dots. The strain *Neoscochyta tritricicola* CBS 544.74 used as outgroup.



ادامه شکل ۱

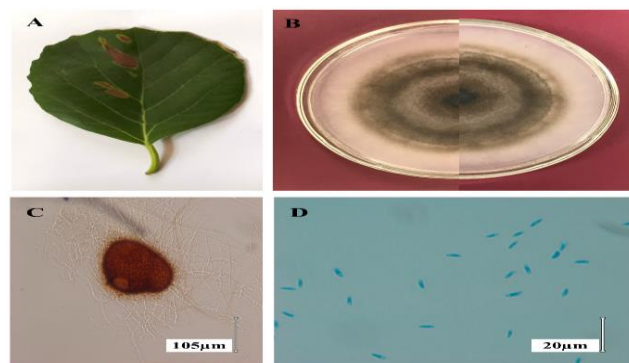


شکل ۲_ گونه *Allophoma labilis* (SCUA-kesh-ABP): A. علائم لکه‌برگی در میزبان (*Citrullus colocynthis*)، B. پرگنه چهارروزه روی PDA در سطح رویی و پشتی، C. پیکنیدیوم، D. کنیدیوم‌ها

بطور عمده به عنوان بیمارگر فرصت طلب گیاهان شناخته می‌شود و میزبان‌های آن متعلق به بیش از ۱۰۰ جنس گیاهی هستند از جمله *Actinidia*، *Leymus*، *Cornus*، *Citrus*، *Chrysanthemum*، *Boerema et* (*Vitis* و *Quercus*، *Prunus*، *Pistacia* *al.*، 2004; Alidadi *et al.*، 2019; Farr and Rossman، 2022). همچنین این گونه به عنوان هیپربازیت قارچ‌های انگل اجباری گیاهان و بیمارگر فرصت‌طلب انسانی گزارش شده است (Sullivan and White، 2000). این اولین گزارش آن روی گیاه سه-پستان است.

۲_ گونه *Didymella glomerata* (Corda) Q. Chen & L. Cai, Studies in Mycology 82: 176 (2015)

جدایه SCUA-Kesh-Cg *D. glomerata* از برگ سه‌پستان با علائم لکه‌برگی بررسی شد (شکل ۳). در درخت تبارزایی (شکل ۱)، جدایه‌های مورد بررسی با جدایه تیپ *D. glomerata* CBS 287.76 خوشه-بندی شدند و یک شاخه تکاملی ایجاد کردند (MLBS 100%، MPBS 100%، BPP 1.00). این گونه در ابتدا تحت نام *Coniothyrium glomeratum* توصیف شد (Corda، 1840) و بعداً بر اساس تبارزایی مولکولی به جنس *Didymella* انتقال یافت (Chen *et al.*، 2015). این گونه همه‌جازی، با دامنه میزبانی وسیع است و

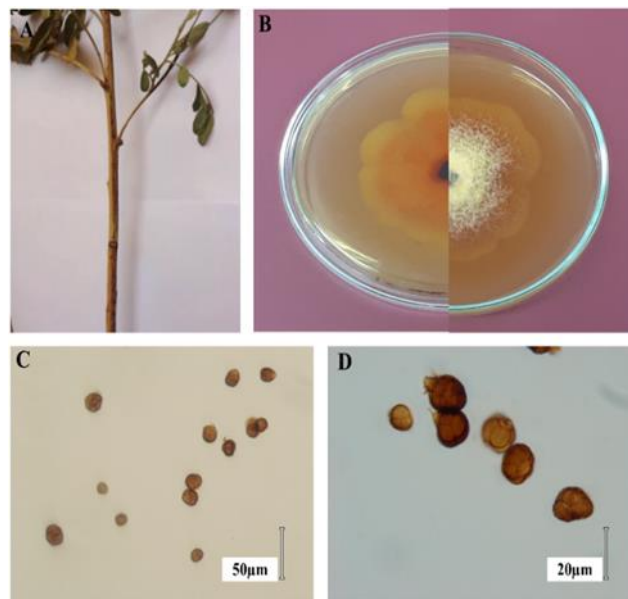


شکل ۳- گونه *Didymella glomerata* (SCUA-kesh-Cg): A. علائم لکه‌برگی در گیاه میزبان (*Cordia myxa*)، B. پرگنه هفت‌روزه روی PDA در سطح رویی و پشتی، C. پیکنیدیوم، D. کنیدیوم‌ها.

Figure 3. *Didymella glomerata* (SCUA-kesh-Cg): A. Leaf spot symptoms in host (*Cordia myxa*), B. 7- days colony on PDA in top and reverse sides, C. Pycnidium, D. Conidia.

در درخت تبارزایی (شکل ۱)، جدایه تحت بررسی با جدایه تیپ *E. italicum* LC 8150 خوشه‌بندی شد و یک شاخه تکاملی ایجاد کردند (MLBS 100%)، ریخت‌شناسی جدایه مورد بررسی با توصیف جدایه تیپ انطباق داشت (Chen et al, 2017). گونه *E. italicum* با توصیف یک جدایه جداسازی شده از نهال *Acca sellowiana* (LC 8150) در ایتالیا معرفی شد (Chen et al, 2017). این گونه همچنین از خاک، گرد و غبار هوا و گیاهان *Quercus robur*، *Aquilaria agallochum* و *Ranunculus acris* گزارش شده است (Farr and Rossman, 2022; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). براساس دانش ما، این اولین ثبت گونه *E. italicum* برای میکوبیوتای ایران و گزارش آن روی شیرین بیان است.

۳- گونه *Epicoccum italicum* Q. Chen, Crous & L. Cai, Studies in Mycology 87: 144 (2017)
جدایه *E. italicum* SCUA-Kesh-Shg2 از برگ گیاه شیرین بیان با علائم لکه‌برگی بررسی شد (شکل ۴). قطر پرگنه روی PDA در شرایط تاریکی مطلق و در دمای 28 ± 0.5 درجه سلسیوس به مدت هشت روز، $30/5$ میلی‌متر بود. رنگ پرگنه در سطح رویی و زیرین نارنجی متمایل به قهوه‌ای بود. اسپورودوکیوم قابل تمییز مشاهده نشد. کنیدیوم‌ها قهوه‌ای روشن، دارای دیواره ضخیم، کروی، نیمه‌کروی، گاهی گلابی‌شکل، چندسلولی، به ابعاد $9-20 \times 10-20$ میکرومتر، میانگین ابعاد $13 \pm 1/4 \times 14/9 \pm 1/9$ میکرومتر (بر اساس ۵۰ عدد کنیدیوم) و ۹۵ درصد ابعاد در بازه اطمینان $13/5-12/7 \times 14/3-15/4$ قرار داشت (شکل ۴).



شکل ۴- گونه *Epicoccum italicum* (SCUA-kesh-Shg2): A. گیاه میزبان (*Glycyrrhiza glabra*), B. پرگنه هشت‌روزه روی PDA در سطح رویی و پشتی، C-D. کنیدیوم‌ها.

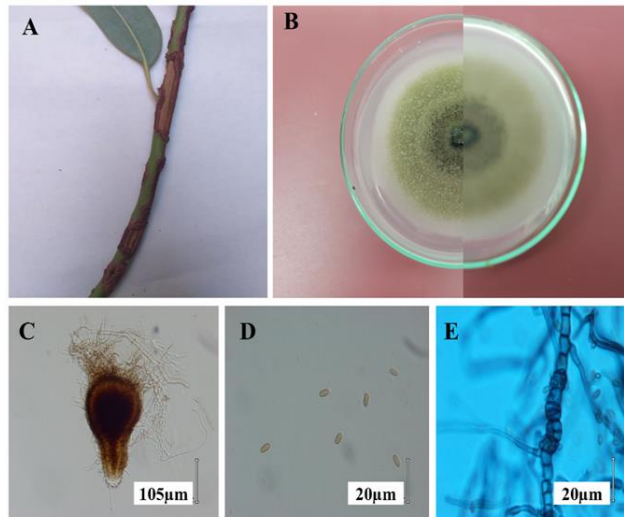
Figure 4. *Epicoccum italicum* (SCUA-kesh-Shg2): A. Host (*Glycyrrhiza glabra*), B. 8-days colony on PDA in top and reverse sides, C- D. Conidia.

Ok21, SCUA-Kesh-OK1, SCUA-Kesh-OK20, SCUA-Kesh-Og7, SCUA-Kesh-OKS7 و SCUA-Kesh-OKg2 همراه علائم شانکر قهوه‌ای شاخه

۴- گونه *Neodidymelliopsis farokhinejadii* Ahmadpour & Mehrabi-Koushki, Sydowia 69: 175 (2017)
هشت جدایه از این گونه شامل SCUA-Kesh-

شدند (MLBS 94%, MPBS 90%, BPP 1.00). در مقایسه ریخت‌شناختی، گونه *N. farokhinejadii* از دو گونه خویشاوند بالا متمایز شد. گونه *N. farokhinejadii* در سال ۲۰۱۷ از شاخه های مرده درختان نارنج، کنوکارپوس، اکالیپتوس، کنار، گردو و سرو در استان خوزستان جداسازی و توصیف شد (Ahmadpour et al., 2017). این گونه همچنین از گل کاغذی، لیموترش و تره از اهواز، شوش و رامهرمز گزارش شده است (Heidari, 2018; Safi, 2020). این اولین گزارش از این گونه روی بارهنگ و خارشتر است.

اکالیپتوس، SCUA-Kesh-Ka2 همراه علائم لکه برگه بارهنگ و SCUA-Kesh-Kg همراه علائم شانکر قهوه ای ساقه خارشتر بررسی شدند (شکل ۵). در درخت تبارزایی (شکل ۱)، جدایه مورد بررسی با جدایه های تیپ *N. farokhinejadii* CBS 142853 و *N. longicola* CBS 382.96 و CBS 739.88 *N. ranunculi* خوشه بندی شدند و یک شاخه تکاملی ایجاد کردند (MLBS 99%, MPBS 100%, BPP 1.00). در این شاخه تکاملی، دو گونه خویشاوند *N. longicola* و *N. ranunculi* یک زیرشاخه تکاملی کوچکتر ایجاد کردند و از گونه تحت بررسی متمایز



شکل ۵- گونه *Neodidymelliopsis farokhinejadii* (SCUA-kesh-OK21): A علائم شانکر در *Eucalyptus* sp.، B. پرگنه هشت‌روزه روی PDA در سطح رویی و پشتی، C. پیکنیدیوم، D. کنیدیوم ها و E. کلامیدسپورها.
Figure 5. *Neodidymelliopsis farokhinejadii* (SCUA-kesh-OK21): A. Canker symptoms in host (*Eucalyptus* sp.), B. 8-days colony on PDA in top and reverse sides, C. Pycnidium, D. Conidia, E. Chlamydospores.

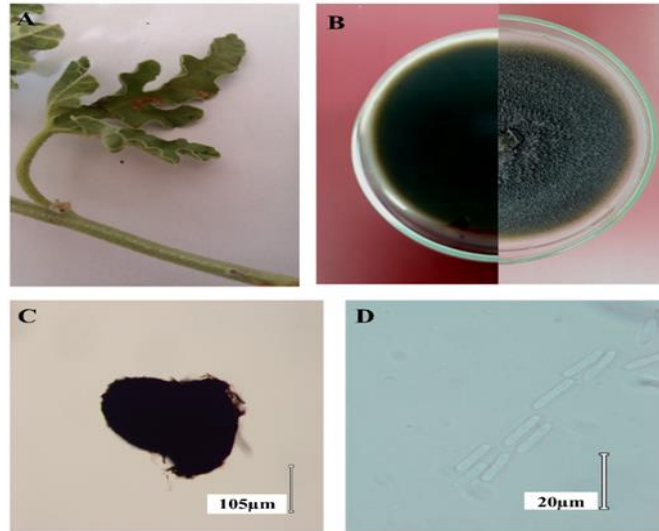
مشاهده شد. پیکنیدیوم‌ها سطحی یا نیمه فرورفته در محیط کشت، انفرادی، به ندرت دارای گردن، کروی، بیضوی، گلابی و سلیندری، قهوه‌ای تیره، به ابعاد $(۲۸۸/۷۵-۲۳۸) \times (۱۴۴/۵-۹۷/۸۷۵)$ $(۳۹۷/۵) \times$ $۳۷۰-۱۰۰$ (۲۰-) میکرومتر، میانگین ابعاد $۱۹۴/۵ \times ۷۴/۹ \pm ۲۳۱$ میکرومتر (بر اساس ۵۰ عدد پیکنیدیوم) و ۹۵ درصد ابعاد در بازه اطمینان $۲۰۵/۶-۲۰۵۲/۳ \times ۱۸۳/۴$ قرار داشت. دیواره‌ی پیکنیدیوم‌ها متشکل از چندین لایه سلول‌های تقریباً

۵- گونه *Nothophoma raii* Rohit Sharma, *Persoonia* 39: 319(2017)

جدایه SCUA-Kesh-ABC از لکه‌برگی هندوانه ابوجهل و جدایه‌های SCUA-Kesh-R1 و SCUA-Kesh-KS1 به ترتیب از لکه‌برگی رزماری و شانکر ساقه خارشتر بررسی شدند (شکل ۶). قطر پرگنه روی PDA در شرایط تاریکی مطلق و در دمای $۲۸ \pm ۰/۵$ درجه سلسیوس به مدت هشت روز، ۶۶ میلی‌متر بود. رنگ پرگنه در سطح رویی سبز یشمی تا سبز تیره و در سطح زیرین سورمه‌ای تیره با حاشیه قهوه‌ای روشن

میکرومتر (بر اساس ۵۰ عدد کنیدیوم) و ۹۵ درصد ابعاد در بازه اطمینان $۲/۹۶-۲/۶۵ \times ۱۱/۷۵-۱۲/۷$ قرار داشت (شکل ۶).

هم‌اندازه، قهوه‌ای تا قهوه‌ای تیره بود. کنیدیوم‌ها بی‌رنگ، دیواره نازک و صاف، بیضوی کشیده، تک سلولی، به ابعاد $۲/۹۶-۲/۶۴ \times ۱۱/۷۵-۱۲/۶۵$ میکرومتر، میانگین ابعاد $۰/۵۵ \pm ۲/۸ \times ۱/۵۷ \pm ۱۲/۲$



شکل ۶- گونه A: *Nothophoma raii* (SCUA-kesh-ABC). علائم لکه‌برگی در گیاه میزبان (*Citrullus*

colocynthis). B. پرگنه هشت‌روزه روی PDA در سطح رویی و پشتی، C. پیکنیدیوم، D. کنیدیوم‌ها.

Figure 6. *Nothophoma raii* (SCUA-kesh-ABC): A. Leaf spot symptoms in host (*Citrullus colocynthis*), B. 8-days colony on PDA in top and reverse sides, C. Pycnidium, D. Conidia.

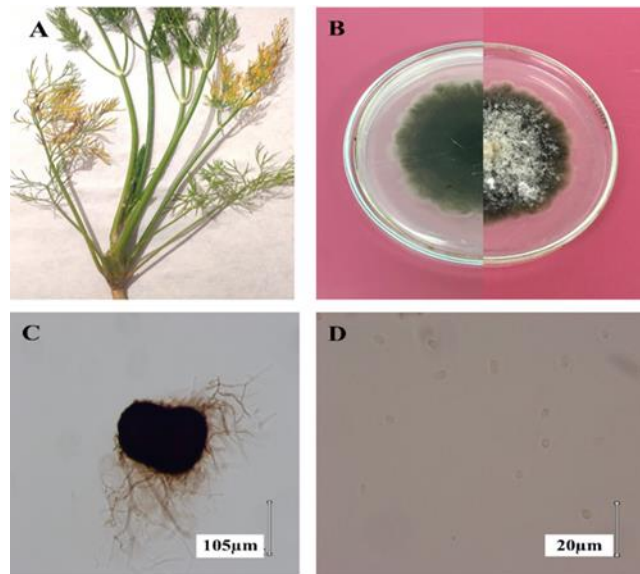
(Chen *et al.*, 2015). این اولین ثبت *N. raii* برای میکوبیوتای ایران و گزارش آن روی گیاهان هندوانه ابوجهل، رزماری و خارشتر است.

گونه ۶- *Xenodidymella glycyrrhizicola* L.W. Hou, L. Cai & Crous, *Studies in Mycology* 96: 388 (2020)
جدایه *X. glycyrrhizicola* SCUA-Kesh-Sh1 از برگ گیاه شوید با علائم لکه‌برگی بررسی شد (شکل ۷). در درخت تبارزایی (شکل ۱)، جدایه مورد بررسی با جدایه‌های معتبر *X. glycyrrhizicola* خوشه‌بندی شدند و یک شاخه تکاملی ایجاد کردند (MLBS 98%, MPBS 94%). این‌گونه اولین بار توسط Hou *et al.* 2020 با توصیف یک جدایه جداشده از گیاه شیرین بیان با علائم لکه‌برگی در نیوزیلند

در درخت تبارزایی (شکل ۱)، جدایه مورد بررسی با سویه تیپ *N. raii* MCC A189 خوشه‌بندی شد و یک شاخه تکاملی ایجاد کردند (MLBS 99%, MPBS 100%, BPP 1.00). ریخت‌شناسی جدایه مورد بررسی با جدایه تیپ *N. raii* A189 تطابق دارد اما اندازه پیکنیدیوم‌ها کمی کوچکتر از جدایه تیپ (۴۱۱-۱۹۵ × ۳۱۵-۱۹۴) است (Crous *et al.*, 2017). جدایه مورد بررسی با گونه *N. gossypicola* از نظر شکل کلنی، شکل اندام بارده و اندازه کنیدیوم‌ها تطابق نداشت (Crous *et al.*, 2017). این‌گونه از خاک یک منطقه صنعتی در هند جداسازی و توصیف شده است (Crous *et al.*, 2017). جنس *Nothophoma* در مطالعات تبارزایی مولکولی قارچ‌های شبه‌فوما با انتقال پنج گونه *Phoma*، که یک دودمان متفاوت از سایر اعضای تیره Didymellaceae ایجاد کردند، معرفی شد

شدند. در مطالعات گذشته تعداد اندکی از این تیره قارچی روی این جنس‌های گیاهی گزارش شده است از جمله گونه‌هایی از جنس‌های *Allophoma*, *Juxtiphoma*, *Epicoccum*, *Didymella*, *Boeremia* و *Pseudopeyronellaea*, *Phoma*, *Paraphoma* و *Stagonosporopsis* (Farr and Rossman, 2022). بهر حال، میزبان‌های فوق برای گونه‌های قارچی شناسایی شده در این مطالعه جدید هستند و به محققین در بررسی دامنه میزبانی اعضای تیره Didymellaceae بویژه روی گیاهان دارویی کمک خواهد کرد (Ershad, 2009; Farr and Rossman, 2022).

معرفی شد. از نظر ریخت‌شناسی، این گونه با تولید کنیدی‌های قهوه‌ای کم رنگ مشخص می‌شود در حالی که کنیدیوم‌های گونه‌های دیگر *Xenodidymella* بی‌رنگ است. براساس دانش ما این اولین گزارش این گونه روی شوید است. در مطالعه حاضر گونه‌هایی از تیره Didymellaceae شامل *Didymella glomerata*, *Allophoma labilis*, *Neodidymelliopsis*, *Epicoccum italicum* و *Nothophoma raii farokhinejad* از گیاهان دارویی اکالیپتوس، بارهنگ، خارشتر، رزماری، سه‌پستان، شوید، شیرین‌بیان و هندوانه ابوجهل جداسازی و شناسایی



شکل ۷- گونه *Xenodidymella glycyrrhizicola* (SCUA-kesh-Sh1): علائم لکه برگ گیاه میزبان (*Anethum graveolens*)، B. پرگنه هشت‌روزه روی PDA در سطح رویی و پشتی، C. پیکنیدیوم، D. کنیدیوم‌ها.

Figure 7. *Xenodidymella glycyrrhizicola* (SCUA-kesh-Sh1): A. Leaf spot symptoms in host (*Anethum graveolens*), B. 8-days colony on PDA in top and reverse sides, C. Pycnidium, D. Conidia.

چمران اهواز به جهت پوشش مالی این تحقیق قدردانی می‌شود.

سپاسگزاری

به این وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید

REFERENCES

1. Ahmadpour, S.A., Mehrabi-Koushki, M. & Farokhinejad, R. (2017a). *Neodidymelliopsis farokhinejadii*, a new fungal species from dead branches of trees in Iran. *Sydowia*, 69, 171–182.
2. Ahmadpour, S.A., Farokhinejad, R. & Mehrabi-Koushki, M. (2017b). Further characterization and pathogenicity of *Didymella microchlamydospora* causing stem necrosis of *Morus nigra* in Iran. *Mycosphere*, 8(7), 835–852.

3. Ahmadpour, S.A., Mehrabi-Koushki, M., Farokhinejad, R. & Asgari B. (2022a). New species of the family *Didymellaceae* in Iran. *Mycological Progress*, 21, 28. DOI: 10.1007/s11557-022-01800-5
4. Ahmadpour, S.A., Mehrabi-Koushki, M., Farokhinejad, R. & Asgari B. (2022b). *Xenodidymella iranica* sp. nov. and new hosts of *X. glycyrrhizicola* in Iran. *Tropical Plant Pathology*, 47, 430–441.
5. Alidadi, A., Kowsari, M., Javan-Nikkhah, M., Salehi-Jouzani, G.R., & Ebrahimi Rastaghi, M. (2019). New pathogenic and endophytic fungal species associated with Persian oak in Iran. *European Journal of Plant Pathology*, 155(3), 1017-1032.
6. Amirdehi, E., Fotouhifar, K.B. & Javan-Nikkhah, M. (2017). Morphological and molecular study on some species of *Phoma* and related taxa in Iran. *Rostaniha*, 18 (1), 59–76. (In Farsi)
7. Aveskamp, M.M., de Gruyter, J. & Crous, P.W. (2008). Biology and recent developments in the systematics of *Phoma*, a complex genus of major quarantine significance. *Fungal Diversity*, 31, 1–18.
8. Aveskamp, M.M. (2010). Highlights of the Didymellaceae: a polyphasic approach to characterize *Phoma* and related pleosporalean genera. *Studies in Mycology*, 65, 1–60.
9. Babaahmadi, G., Mehrabi-Koushki, M. & Hayati, J. (2018). *Allophoma hayatii* sp. nov., an undescribed pathogenic fungus causing dieback of *Lantana camara* in Iran. *Mycological Progress*, 17(3), 365–379.
10. Boerema, G.H., de Gruyter, J., Noordeloos, M.E. & Humers, M.E.C. (2004). *Phoma identification manual. Differentiation of specific and infra-specific taxa in culture*. CABI Publishing, Wallingford, UK.
11. Chen, Q., Jiang, J. R. & Zhang G. Z. (2015). Resolving the *Phoma* enigma. *Studies in Mycology*, 82, 137–217.
12. Chen, Q., Hou, L. W., Duan, W. J., Crous, P. W. & Cai, L. (2017). Didymellaceae revisited. *Studies in Mycology*, 87, 105–159.
13. Corda, A. C. J. 1840. *Icones Fungorum Hucusque Cognitorum*. Vol 4, Prague.
14. Crous, P.W., Wingfield, M.J., Burgess, T.I., Carnegie, A.J., Hardy, G.E.St.J. *et al.* (2017). Fungal planet description sheets: 625–715. *Persoonia*, 39, 270–467.
15. Darriba D., Taboada, G.L., Doallo, R. & Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9(8), 772.
16. de Gruyter, J., Noordeloos, M.E. & Boerema, G.H. (1993). Contributions towards a monograph of *Phoma* (Coelomycetes) – I. 2. Section *Phoma*: additional taxa with very small conidia and taxa with conidia up to 7 µm long. *Persoonia*, 15, 369–400.
17. Edler, D., Klein, J., Antonelli A. & Silvestro, D. (2021). raxmlGUI 2.0 beta: a graphical interface and toolkit for phylogenetic analyses using RAxML. *Methods in Ecology and Evolution*, 12, 373–377.
18. Ershad, D. (2009). *Fungi of Iran* (3rd ed.). Agricultural Research, Education & Extension Organization Publication, Tehran, 531 pp.
19. Farr, D.F. & Rossman, A.Y. (2022). *Fungal Databases*. U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA. Retrieved February 7, 2022 from <https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>.
20. Heidari, K. (2018). *Detection and identification of fungal pathogens causing anthracnose of some plants in Khuzestan province*. M.Sc. dissertation, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz.
21. Hou, L.W., Groenewald, J.Z., Pfenning, L.H., Yarden, O., Crous, P.W. & Cai, L. (2020). The phoma-like dilemma. *Studies in Mycology*, 96, 309–396.
22. Howizeh, H., Dinarvand, M. & Salehi, H. (2003). Medicinal plants of Khuzestan. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 14(1), 55–72. (In Farsi)
23. Khodaei, S., Arzanlou, M., Babai-Ahari, A., Rota-Stabelli, O. & Pertot, I. (2018). Characterisation of several plant pathogenic species belonging to the family Didymellaceae based on multigene and morphological analyses in East and West Azarbaijan provinces. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 54(2), 87–110. (In Farsi)
24. Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33, 1870–1874.
25. Larki, R., Mehrabi-Koushki, M. & Farokhinejad, R. (2019). *Ectophoma iranica* sp. nov. and new hosts and records of *Allophoma* spp. in Iran. *Journal of Phytopathology*, 167, 538–545.
26. Liu, Y.J., Whelen, S. & Hall, B.D. (1999). Phylogenetic relationships among *Ascomycetes*: evidence from an RNA polymerase II subunit. *Molecular Biology and Evolution*, 16, 1799–1808.
27. O'Donnell, K. (1993). *Fusarium* and ITS near relatives. In: Reynolds, D. R. & Taylor, J. W. (eds), *The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics*. UK: CAB International, pp. 225–233.
28. Raeder, U. & Broda, P. (1985). Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*, 1 (1), 17–20.

29. Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A. *et al.* (2012). MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61, 539–542.
30. Safi, A. (2020). *A survey on pathogenic and non-pathogenic cultivable mycoflora of some wooden ornamentals in Ahvaz landscapes*. M.Sc. dissertation, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz.
31. Sharafzadeh, S. & Alizadeh, O. (2012). Some medicinal plants cultivated in Iran. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2, 134–137.
32. Sullivan, R.F. & White, J.F. (2000). *Phoma glomerata* as a mycoparasite of powdery mildew. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(1), 425–427.
33. Sung, G. H., Sung, J. M., Hywel-Jones, N. L., & Spatafora, J. W. (2007). A multi-gene phylogeny of Clavicipitaceae (Ascomycota, Fungi): Identification of localized incongruence using a combinational bootstrap approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44, 1204–1223.
34. White, T. J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. & White, T. J. (eds), *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, New York, USA, pp. 315–322.
35. Woudenberg, J., Aveskamp, M., de Gruyter, J., Spiers, A., & Crous, P. (2009). Multiple *Didymella* teleomorphs are linked to the *Phoma clematidina* morphotype. *Persoonia*, 22, 56–62.

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.