

## معرفی گونه‌های جدیدی از جنس‌های *Bipolaris* و *Curvularia* روی گندمیان در ایران

دریافت: ۱۳۹۰/۱۱/۱۵ / پذیرش: ۱۳۹۱/۴/۴

**عبداله احمدپور:** دانشجوی دکتری گروه گیاه‌پزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج  
**زینب حیدریان:** دانشجوی کارشناسی ارشد گروه گیاه‌پزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج  
**سعدی کرمی:** دانشجوی کارشناسی ارشد گروه گیاه‌پزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج  
**تاکائو تسوکیبوشی:** محقق موسسه بین‌المللی علوم دامی و گیاهان علفی، ژاپن  
**منک ژنگ:** محقق دانشکده بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه کشاورزی هنان، جمهوری خلق چین  
**محمد جوان نیکخواه:** دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج (jnikkhah@ut.ac.ir)

### چکیده

در این مطالعه، شش گونه از جنس *Bipolaris* شامل *B. heveae*, *B. neergaardii*, *B. papendrofii*, *B. zaeae*، *B. australiensis*، *B. oryzae* و دو گونه از جنس *Curvularia* شامل *Curvularia intermedia* و *Curvularia heteropogonicola* روی گیاهان گرامینه شناسایی شدند. گونه‌های *B. heveae* روی *Echinochloa* sp.، *Cynodon dactylon*، *Arundo* sp.، *B. neergaardii* روی *Oryza sativa*، *B. papendrofii* روی *Saccharum officinarum* و *C. intermedia* روی *Echinochloa* sp. نخستین بار از ایران گزارش می‌گردند. برخی از میزبان‌ها به عنوان میزبان جدید برای ایران و دنیا گزارش می‌شوند. همچنین، کلید شناسایی گونه‌های *Bipolaris* با ۳-۴ بند کاذب ارائه شده است و به مطالعه روابط فیلوژنتیکی تعدادی از گونه‌های *Bipolaris* براساس توالی‌یابی ناحیه rDNA-ITS پرداخته شده است.

**واژه‌های کلیدی:** تاکسونومی، فیلوژنی، مورفولوژی، میزبان، *Cochliobolus*، rDNA-ITS

## New species of *Bipolaris* and *Curvularia* on grass species in Iran

Received: 04.02.2012 / Accepted: 24.06.2012

- A. Ahmadpour:** PhD Student, Department of Plant Protection, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran  
**Z. Heidarian:** MSc Student, Department of Plant Protection, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran  
**S. Karami:** MSc Student, Department of Plant Protection, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran  
**T. Tsukiboshi:** Researcher, National Institute of Livestock and Grassland Science, Senbonmatsu 768, Nasushiobara, Tochigi 329-2793, Japan  
**M. Zhang:** Researcher, College of Plant Protection, Hennan Agriculture University, 95 Wenhua Road, Zhengzhou, Henan, The People's Republic of China  
**M. Javan-Nikkhah:** Associate Prof., Department of Plant Protection, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran (jnikkhah@ut.ac.ir)

### Summary

In the present study, six species of *Bipolaris* viz. *B. heveae*, *B. neergaardii*, *B. papendrofii*, *B. zaeae*, *B. oryzae*, and *B. australiensis* and two species of *Curvularia* viz. *C. intermedia* and *C. heteropogonicola* were identified on graminicolous species. *Bipolaris heveae* on *Echinochloa* sp., *Cynodon dactylon* and *Arundo* sp., *B. neergaardii* on *Oryza sativa*, *B. papendrofii* on *Saccharum officinarum* and *Curvularia intermedia* on *Echinochloa* sp. are newly reported from Iran. Some new host plants are reported for above-mentioned fungal species. Moreover, identification key has been prepared for *Bipolaris* species with 3-4 distoseptate and phylogenetic relationships of some *Bipolaris* species based on sequencing of rDNA-ITS region is provided.

**Keywords:** *Cochliobolus*, host, morphology, phylogeny, rDNA-ITS, taxonomy

## مقدمه

به همراه گونه‌هایی از جنس *Curvularia* قرار می‌گیرند (Berbee et al. 1999, Kodsueb et al. 2006).

گونه‌های مختلفی از چهار جنس مذکور به عنوان عوامل لکه برگی، پوسیدگی ریشه، طوقه و ساقه روی انواع گونه‌های گیاهان گرامینه شناخته می‌شوند. برخی گونه‌ها از جمله *B. sorokiniana*، *B. maydis* و *B. oryzae* خسارت شدیدی را به ترتیب روی گیاهان گندم، ذرت و برنج وارد می‌کنند (Sivanesan 1987). با توجه به اهمیت این قارچ‌ها، تعداد معدودی از گونه‌های این چهار جنس در ایران گزارش شده است. ارشاد (2009) ۱۳ گونه از جنس *Bipolaris* و ۱۰ گونه از جنس *Curvularia* را در کتاب قارچ‌های ایران گنجانده است. با این حال، در بسیاری موارد فقط نام گونه‌ها در نوشته‌های مربوط به ایران درج شده و هیچ توصیفی از آن‌ها ارائه نگردیده است. این پژوهش با هدف مطالعه و معرفی برخی گونه‌های جنس‌های *Bipolaris* و *Curvularia* از روی گونه‌های مختلف گیاهان گرامینه از مناطق مختلف کشور انجام شده است.

## روش بررسی

- جمع‌آوری، جداسازی و شناسایی نمونه‌های قارچی  
اندام‌های گیاهی گونه‌های مختلف گیاهان گرامینه که نشانه‌های مشکوک به آلودگی توسط گونه‌های مختلف جنس‌های *Bipolaris* و *Curvularia* را داشتند، جمع‌آوری گردید و هر کدام در پاکت‌های کاغذی جداگانه به آزمایشگاه منتقل شد. بخش‌هایی از بافت‌های آلوده ابتدا به مدت ۱۰ دقیقه زیر شیر آب شسته شد و سپس با استفاده از اسکالپل به قطعات کوچکتری تقسیم شد و به مدت یک دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد (نیم درصد کلر فعال) ضدعفونی سطحی گردید. پس از رطوبت‌گیری نمونه‌ها در کاغذ صافی، قطعات تقریبی به اندازه یک سانتی‌متر مربع از قسمت‌های آلوده به همراه نواحی سالم بافت گیاهی به تشتک‌های پتری حاوی محیط‌های کشت WA دو درصد (Water Agar 2%) و PDA (Potato Dextrose Agar) و دمای ۲۵ درجه سلسیوس منتقل گردید. قارچ‌های رشد کرده به روش تک کنیدیوم (single spore) روی محیط کشت WA دو درصد خالص‌سازی گردیدند. به علاوه، از روش کاغذ صافی مرطوب (Blotter method) نیز جهت جداسازی قارچ‌های مورد نظر استفاده شد. بدین منظور اندام‌های گیاهی با یا بدون ضدعفونی سطحی به تشتک‌های پتری حاوی کاغذ صافی مرطوب و استریل، تحت شرایط تاریکی یا NUV (near Ultra Violet) و دمای ۲۵ درجه سلسیوس منتقل گردید.

منوگراف جنس‌های *Bipolaris*، *Curvularia*، *Drechslera* و *Exserohilum* روی گیاهان تیره گرامینه توسط سیوانسان نوشته شد (Sivanesan 1987) و از آن سال به بعد، چندین گونه جدید از جنس‌های مذکور گزارش گردید. ویژگی‌هایی از جمله شکل کنیدیوم‌ها و نحوه جوانه‌زنی آن‌ها، مورفولوژی هیلوم، منشا لوله تندشی در یاخته پایه و موقعیت آن نسبت به محور کنیدیوم، نحوه تشکیل بند کاذب و ویژگی‌های جایگاه یا گره کنیدی‌زایی (conidiogenous nodes) را به عنوان صفات اصلی و مهم در تمایز جنس‌های *Bipolaris*، *Exserohilum* و *Drechslera* می‌توان مطرح کرد (Alcorn 1982a, 1982b, 1983, 1990, 1991). مراحل جنسی این سه جنس نیز براساس شکل و وضعیت دیواره‌های آسکوسپورها به راحتی قابل تشخیص می‌باشند (Sivanesan 1987). جنس *Curvularia* براساس متورم بودن یاخته‌های میانی و پررنگ بودن آن‌ها نسبت به یاخته‌های انتهایی و با مرحله جنسی *Cochliobolus* از سه جنس قبلی متمایز می‌گردد (Ellis 1971, 1976, Sivanesan 1987). جنس‌های *Bipolaris* و *Curvularia* دارای مرحله جنسی مشترکی هستند. برخی محققان بیان می‌کنند که جنس *Bipolaris* بایستی مترادف جنس *Curvularia* در نظر گرفته شود (Sivanesan 1987, Alcorn 1988). این ظاهراً هتروژنی یا ناهمگونی در روابط بین آنامورف و تلئومورف را ایجاد خواهد کرد. با این حال، سیوانسان (1987) بیان می‌کند با این که این دو جنس در اغلب موارد دارای صفات مورفولوژیکی یکسانی هستند، اما تا زمانی که اطلاعات بیشتر از طریق مطالعات بیوشیمیایی متابولیت‌های ثانویه و ژنتیکی تعداد زیادی از گونه‌های این دو جنس حاصل نشده است، بایستی به عنوان جنس‌های مجزا در نظر گرفته شوند. اخیراً جهت تمایز چهار جنس ذکر شده و گونه‌های مربوط به آن‌ها، از روش‌های مولکولی از جمله توالی‌یابی بخش‌هایی از rDNA (ITS1, 5.8S, ITS2)، ژن گلیسرآلدئید-۳ فسفات دهیدروژناز (*gpd*) و ژن *Bm1* (ژن مسئول در فرآیند سنتز ملاتین) استفاده گردیده است (Berbee et al. 1999, Kodsueb et al. 2006, Sun et al. 2003). بر این اساس، سه جنس *Bipolaris*، *Exserohilum* و *Drechslera* از نظر ژنتیکی از یکدیگر متمایزند. با این حال، گونه‌های مختلف جنس *Bipolaris* در دو گروه مختلف قرار می‌گیرند. در گروه اول گونه‌هایی با تعداد بند کاذب بیشتر (بیش از هفت بند کاذب) و بیمارگرهای مهم گیاهان زراعی (از جمله *B. victoriae*، *B. sorokiniana*، *B. oryzae*، *B. maydis* و *B. sorghicola*) قرار می‌گیرند و در گروه دوم گونه‌هایی با تعداد بند کاذب کمتر (کمتر از هفت بند کاذب) از جمله *B. spicifera*، *B. australiensis*، *B. hawaiiensis*، *B. ravenelli*، *B. australis* و غیره)

برای تکثیر نواحی ITS1-5.8S-ITS2 rDNA از ترکیب آغازگرهای ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') و ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al. 1990) به ترتیب به عنوان آغازگرهای مستقیم (forward) و معکوس (reverse) استفاده گردید. مخلوط واکنش PCR با حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۸/۳ میکرولیتر آب دیونیزه استریل، ۲/۵ میکرولیتر 10X PCR Buffer، پنج میلی مولار  $MgCl_2$ ، ۲۰۰ میلی مولار از هر نوکلئوتید، ۱۰ پیکومول از هر آغازگر، یک واحد *Taq* DNA پلیمرز و سه میکرولیتر DNA با غلظت ۱۰-۵۰ نانوگرم تهیه شد و واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر Corbett Research, ) Palm cycler CG1-96 (Thermal Cycler) (Australia) با ۳۵ چرخه تحت شرایط واسرشت‌سازی اولیه (primary denaturation) در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت دو دقیقه، واسرشت‌سازی در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه، دورگه‌سازی (hybridization) در ۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۷۰ ثانیه، بسط (extension) در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۹۰ ثانیه و بسط نهایی ۷۲ درجه سلسیوس به مدت هفت دقیقه انجام گردید. محصولات خالص‌سازی شده با استفاده از توالی‌یاب ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) توالی‌یابی شدند.

برای مقایسه روابط فیلوژنتیکی جدایه‌های توالی‌یابی شده، ۱۶ گونه از *Bipolaris*، چهار گونه از *Curvularia*، چهار گونه از *Exserohilum* و چهار گونه از *Drechslera* از بانک ژن NCBI اخذ شد و گونه *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler نیز به عنوان آرایه outgroup انتخاب گردید (جدول ۱) (Berbee et al. 1999, Tsukiboshi et al. 2005). توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار Clustal X ver 2.0.12 (هم‌ردیف) شدند (Thompson et al. 1997). آنالیزهای فیلوژنتیکی با استفاده از روش فاصله (Distance method) انجام گردید. ماتریکس فاصله توالی‌های مرتب شده با روش دوپارامتری کیمورا (Kimura's two parameters) محاسبه شد (Kimura 1980) و با استفاده از روش NJ (Neighbor-Joining) (Saitou & Nei 1987) و با نرم‌افزار MEGA 4.0 درخت فیلوژنتیکی رسم گردید (Tamura et al. 2007). برای اطمینان از ثبات شاخه‌های موجود در درخت فیلوژنتیکی، مقدار Bootstrap با ۱۰۰۰ تکرار با استفاده از این برنامه محاسبه شد. توالی‌های مربوط به جدایه‌های مختلف گونه‌های *Bipolaris* در بانک ژن NCBI ثبت شدند و شماره دستیابی اخذ شد که به ترتیب از JQ517477 تا JQ517489 می‌باشد (جدول ۱).

جهت بررسی خصوصیات مورفولوژیکی و میکروسکوپی جدایه‌ها، حلقه‌هایی به قطر ۵ میلی‌متر از حاشیه در حال رشد پرگنه‌های مربوط به هر جدایه برداشته شد و به تشتک‌های حاوی محیط‌های کشت PDA و TWA (tap water agar + wheat straw) منتقل گردید. تشتک‌های حاوی محیط‌های کشت PDA تحت شرایط تاریکی (جهت بررسی مورفولوژی پرگنه جدایه‌ها) و تشتک‌های حاوی محیط کشت TWA تحت شرایط NUV متناوب (۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی) و دمای ۲۵ درجه سلسیوس منتقل شد و به مدت ۱۴-۱۰ روز نگهداری گردید (Sivanesan 1987). صفات مورد مطالعه شامل رنگ پرگنه، مشخصات کنیدیوفورها و کنیدیوم‌ها بود. حداقل ۵۰ عدد از هر کدام از اندام‌های قارچی (کنیدیوفور و کنیدیوم) در چند نمونه میکروسکوپی بررسی و اندازه‌گیری شدند. از صفات مذکور با استفاده از میکروسکوپ نوری الیمپوس (Olympus) مدل BH2 عکس تهیه گردید. نمونه‌های میکروسکوپی با بهره‌گیری از منابع معتبر (Ellis 1971, 1976, Sivanesan 1987) شناسایی و تعیین نام گردید.

#### - تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیک

تعدادی از جدایه‌های گونه‌های جنس *Bipolaris* در تحقیق حاضر و قبلی (Ahmadpour et al. 2011) جهت مطالعات فیلوژنتیکی انتخاب شدند (جدول ۱). پنج جدایه مشکوک به گونه *B. heveae* (جدا شده از *Arundo sp.*, *Cynodon dactylon*, *Echinochloa spp.* و گیاه گرامینه ناشناخته)، یک جدایه از گونه *B. oryzae* (جدا شده از برنج)، دو جدایه از گونه *B. sorghicola* (جدا شده از *Sorghum halepense* و گیاه گرامینه ناشناخته)، یک جدایه از گونه *B. australiensis* (جدا شده از گیاه گرامینه ناشناخته)، دو جدایه از گونه *B. cynodontis* (جدا شده از *Zea mays* و *Typha sp.*)، یک جدایه از گونه *B. hawaiiensis* (جدا شده از *Sorghum halepense*) و یک جدایه از گونه *B. prieskaensis* (جدا شده از خاک) برای مطالعات فیلوژنتیکی استفاده گردید (جدول ۱). به منظور تهیه توده میسلیم مورد نیاز جهت استخراج DNA ژنومی از محیط غذایی مایع سیب‌زمینی- دکستروز (PDB: potato dextrose broth) که حاوی عصاره ۲۰۰ گرم سیب زمینی خرد شده و ۱۷ گرم دکستروز در یک لیتر آب مقطر بود، استفاده شد. بعد از رشد و تشکیل میسلیم قارچی، توده میسلیم به کمک قیف بوختر، کاغذ صافی سترون و با استفاده از پمپ خلا از محیط مایع جداسازی گردید و توسط دستگاه انجماد خشک (freeze dryer) خشک شدند. جهت استخراج DNA ژنومی کل از میسلیم‌های هر جدایه از روش تسوکیبوشی و همکاران (Tsukiboshi et al. 2005) استفاده شد.

## جدول ۱- مشخصات جدایه‌های قارچی استفاده شده در آنالیزهای فیلوژنتیکی

Table 1. Characterization of fungal isolates included in phylogenetic analyses

Species	Isolate/Strain	Source	GenBank accession No.
<i>Bipolaris australiensis</i> (M.B. Ellis) Tsuda & Ueyama	Alcorn 8320b	Berbee <sup>a</sup>	AF081450
<i>Bipolaris australiensis</i>	Bi-22	This study	JQ517489
<i>B. australis</i> Alcorn	Turgeon 77139	Berbee <sup>a</sup>	AF081448
<i>B. cynodontis</i> (Marignoni) Shoemaker	BRIP16821	Goh & Hyde <sup>b</sup>	AF163093
<i>B. cynodontis</i>	Bi-11	This study	JQ517485
<i>B. cynodontis</i>	Bi-12	This study	JQ517486
<i>B. eleusines</i> Alcorn & R.G. Shivas	Alcorn 8749c	Berbee <sup>a</sup>	AF081451
<i>B. hawaiiensis</i> (M.B. Ellis) J.Y. Uchida & Aragaki	Alcorn 7612(b)-6	Berbee <i>et al.</i> <sup>a</sup>	AF071324
<i>B. hawaiiensis</i>	Bi-5	This study	JQ517484
<i>B. heveae</i> (Petch) Arx	Zoy-7	Tsukiboshi <i>et al.</i> <sup>c</sup>	AB179832
<i>B. heveae</i>	Bi-6	This study	JQ517477
<i>B. heveae</i>	Bi-7	This study	JQ517478
<i>B. heveae</i>	Bi-9A	This study	JQ517479
<i>B. heveae</i>	Bi-10	This study	JQ517480
<i>B. heveae</i>	Bi-13	This study	JQ517481
<i>B. maydis</i> (Y. Nisik. & C. Miyake) Shoemaker	Yoder HAW288	Berbee <i>et al.</i> <sup>a</sup>	AF158108
<i>B. oryzae</i> (Breda de Haan) Shoemaker	24/89	Berbee <i>et al.</i> <sup>a</sup>	X78122
<i>B. oryzae</i>	Bi-4	This study	JQ517483
<i>B. perotidis</i> Alcorn	Alcorn 7846-2	Berbee <i>et al.</i> <sup>a</sup>	AF071320
<i>B. prieskaensis</i>	Bi-2	This study	JQ517482
<i>B. sacchari</i> (E.J. Butler) Shoemaker	Macko HS4	Berbee <i>et al.</i> <sup>a</sup>	AF071318
<i>B. sorghicola</i> (Lefebvre & Sherwin) Alcorn	MAFF 511378	Berbee <i>et al.</i> <sup>a</sup>	AF071332
<i>B. sorghicola</i>	Bi-15	This study	JQ517487
<i>B. sorghicola</i>	Bi-17	This study	JQ517488
<i>B. sorokiniana</i> (Sacc.) Shoemaker	Tinline A20	Berbee <i>et al.</i> <sup>a</sup>	AF071329
<i>B. spicifera</i> (Bainier) Subram.	BRIP12529	Goh & Hyde <sup>b</sup>	AF163076
<i>B. stenospila</i> (Drechsler) Shoemaker	CBS 156.36	Tsukiboshi <i>et al.</i> <sup>c</sup>	AB179837
<i>B. urochloae</i> (V.A. Putterill) Shoemaker	DAOMC 171970	Berbee <i>et al.</i> <sup>a</sup>	AF071334
<i>B. victoriae</i> (F. Meehan & H.C. Murphy) Shoemaker	Macko HVW	Berbee <i>et al.</i> <sup>a</sup>	AF158109
<i>C. clavata</i> B.L. Jain	DAOM 148084	Berbee <i>et al.</i> <sup>a</sup>	AF071336
<i>C. cymbopogonis</i> (C.W. Dodge) J.W. Groves & Skolko	Alcorn 88109-1	Yun <i>et al.</i> <sup>a</sup>	AF071351
<i>C. gudauskasii</i> Morgan-Jones & Karr	DAOM 165085	Berbee <i>et al.</i> <sup>a</sup>	AF071338
<i>C. lunata</i> (Wakker) Boedijn	UAMH9 1349	Berbee <i>et al.</i> <sup>a</sup>	AF071339
<i>Exserohilum minor</i> Alcorn	ATCCf 62323	Berbee <i>et al.</i> <sup>a</sup>	AF071341
<i>E. monoceras</i> (Drechsler) K.J. Leonard & Suggs	DAOM 208988	Berbee <i>et al.</i> <sup>a</sup>	AF071340
<i>E. rostratum</i> (Drechsler) K.J. Leonard & Suggs	ATCCf 32197	Berbee <i>et al.</i> <sup>a</sup>	AF071342
<i>E. turcicum</i> (Pass.) K.J. Leonard & Suggs	94/1823	Goh & Hyde <sup>c</sup>	AF163067
<i>Drechslera biseptata</i> (Sacc. & Roum.) M.J. Richardson & E.M. Fraser	CBS 108940	Zhang & Berbee <sup>a</sup>	AY004788
<i>D. erythrospila</i> (Drechsler) Shoemaker	CBS 10894	Zhang & Berbee <sup>a</sup>	AY004782
<i>D. tritici-repentis</i> (Died.) Shoemaker	DAOM 208990	Berbee <i>et al.</i> <sup>a</sup>	AF071348
<i>D. tuberosa</i> (G.F. Atk.) Shoemaker	DAOM 169286	Berbee <i>et al.</i> <sup>a</sup>	AF071347
<i>Alternaria alternata</i> (Fr:Fr) Keissler	Simmons 34-016	Berbee <i>et al.</i> <sup>a</sup>	AF071346

<sup>a</sup> Dept. of Botany, University of British Columbia, 6270 University Blvd, Vancouver, BC V6T 1Z4, Canada.<sup>b</sup> Dept. of Ecology & Biodiversity, The University of Hong Kong, Pokfulam Road, Hong Kong SAR, China.<sup>c</sup> National Institute of Floricultural Science, Laboratory of Plant Pathology; Fujimoto 2-1, Tsukuba, Ibaraki 305-8519, Japan.

## نتیجه و بحث

(استان آذربایجان غربی)؛ *Cynodon dactylon* sp. *Arundo* و گیاه گرامینه ناشناخته، روستای سعلکده شهرستان خوی (استان آذربایجان غربی)، ۱۳۸۹

پراکنده‌های قارچ روی محیط کشت PDA به رنگ قهوه‌ای تا قهوه‌ای زیتونی دیده شد. کنیدیوفورها زانویی، در بخش پایه متورم، قهوه‌ای روشن تا قهوه‌ای که به سمت انتها کمرنگ‌تر می‌شوند و به ابعاد ۲۹۰-۱۰۵ میکرومتر اندازه‌گیری شدند (شکل ۱A). کنیدیوم‌ها راست یا خمیده، دوکی‌شکل، قهوه‌ای روشن تا قهوه‌ای تیره می‌باشند (شکل‌های ۱B-۱I). تعداد بند کاذب در

در این تحقیق شش گونه از جنس *Bipolaris* و دو گونه از جنس *Curvularia* شناسایی شدند. توصیف کامل گونه‌های جدید برای میکوبیوتای ایران به شرح زیر ارائه می‌گردد:

***Bipolaris heveae* (Petch) Arx, Beih. Nova Hedwigia. -1**  
87: 288 (1987) (Fig. 1)  
Teleomorph: *Cochliobolus heveicola* Tsukib. & W.H. Chung, Mycoscience 46(1): 20 (2005)  
نمونه‌های بررسی شده روی *Echinochloa* sp. شهرستان رستم آباد (استان گیلان) و روستای سعلکده شهرستان خوی

از هم متمایز کرد (مکاتبات شخصی با دکتر تاکائو تسوکیبوشی). به همین دلیل، اقدام به توالی‌یابی ناحیه rDNA-ITS گردید (به بخش آنالیزهای فیلوژنتیک مراجعه گردد). در نهایت براساس داده‌های مورفولوژیکی و مولکولی، گونه *B. heveae* تشخیص داده شد. برای نخستین بار به عنوان بیمارگر *Hevea brasiliensis* گزارش شده است که روی برگ‌های این میزبان لکه‌های گرد ارغوانی با حاشیه قهوه‌ای ایجاد می‌کند (Ellis 1971). نخستین گزارش از گونه فوق از روی گیاهان تیره گرامینه در سال ۲۰۰۵ توسط تسوکیبوشی و همکاران (Tsukiboshi et al. 2005) بوده است و از *Cynodon dactylon* و *Zoysia japonica* گزارش کرده‌اند. براساس منابع در دسترس (Abbasi & Aliabadi 2009, Ershad 2009) این نخستین گزارش از گونه فوق در ایران است.

هر کنیدیوم ۱۳-۶ (غالباً ۱۱-۹) عدد بوده و به ابعاد ۲۱-۱۳ × ۵۶-۱۳۰ میکرومتر می‌باشند. معمولاً یاخته‌های انتهایی کنیدیوم‌ها کمرنگ‌تر از یاخته‌های میانی بوده (شکل‌های D، ۱ و H، ۱) و در برخی موارد ممکن است دارای دیواره مشخص و تیره‌تر باشند (شکل‌های D، ۱ و H، ۱).

این گونه از لحاظ مورفولوژیکی بسیار شبیه به گونه *B. stenospila* می‌باشد. در گونه *B. heveae* کنیدیوم‌ها اغلب قهوه‌ای تا قهوه‌ای تیره می‌باشند اما در گونه *B. stenospila* اغلب به رنگ قهوه‌ای طلایی روشن هستند که بر این اساس، این دو گونه از هم متمایز می‌گردند (Sivanesan 1987). با این حال، شرح گفته شده (شکل و ابعاد کنیدیوم‌ها) برای گونه *B. stenospila* بسیار شبیه به گونه *B. heveae* می‌باشد. به نظر نمی‌رسد که بتوان این دو گونه را تنها براساس رنگ کنیدیوم‌ها



شکل ۱- *Bipolaris heveae*: A. کنیدیوفور، B-I. کنیدیوم‌ها (مقیاس = ۱۰ میکرومتر).

Fig. 1. *Bipolaris heveae*: A. Conidiophores, B-I. Conidia (Bar = 10 µm).



می‌باشند که براساس شکل سیلندری و عرض کوچکتر (۱۱-۱۳) × ۲۰-۴۰ میکرومتر) کنیدیوم‌ها در *B. spicifera* (شکل‌های C، A-5، ۵) و اندازه بزرگتر کنیدیوم‌ها (۱۷-۲۳) × ۳۰-۴۶ میکرومتر)، هیلوم مشخص و تعداد بیشتر بند کاذب (۳-۴) بند کاذب) در *B. prieskaensis* (شکل‌های I، G-5، ۵) از گونه *B. neergaardii* تفکیک می‌گردند (Sivanesan 1987). این گونه تاکنون از چین، استرالیا، عربستان سعودی، غنا و هند از روی گیاهان میزبان (*Callistephus chinensis* (Deng et al. 2002)، *Oryza sativa* (Sivanesan 1987)، *Hibiscus esculentus* (Sivanesan 1987) و *Sesamum indicum* (Alcorn 1990) (Richardson 1990) گزارش شده است. براساس منابع در دسترس (Abbasi & Aliabadi 2009, Ershad 2009) این نخستین گزارش از گونه فوق در ایران است و برنج به عنوان میزبان جدیدی برای گونه فوق در ایران معرفی می‌گردد.

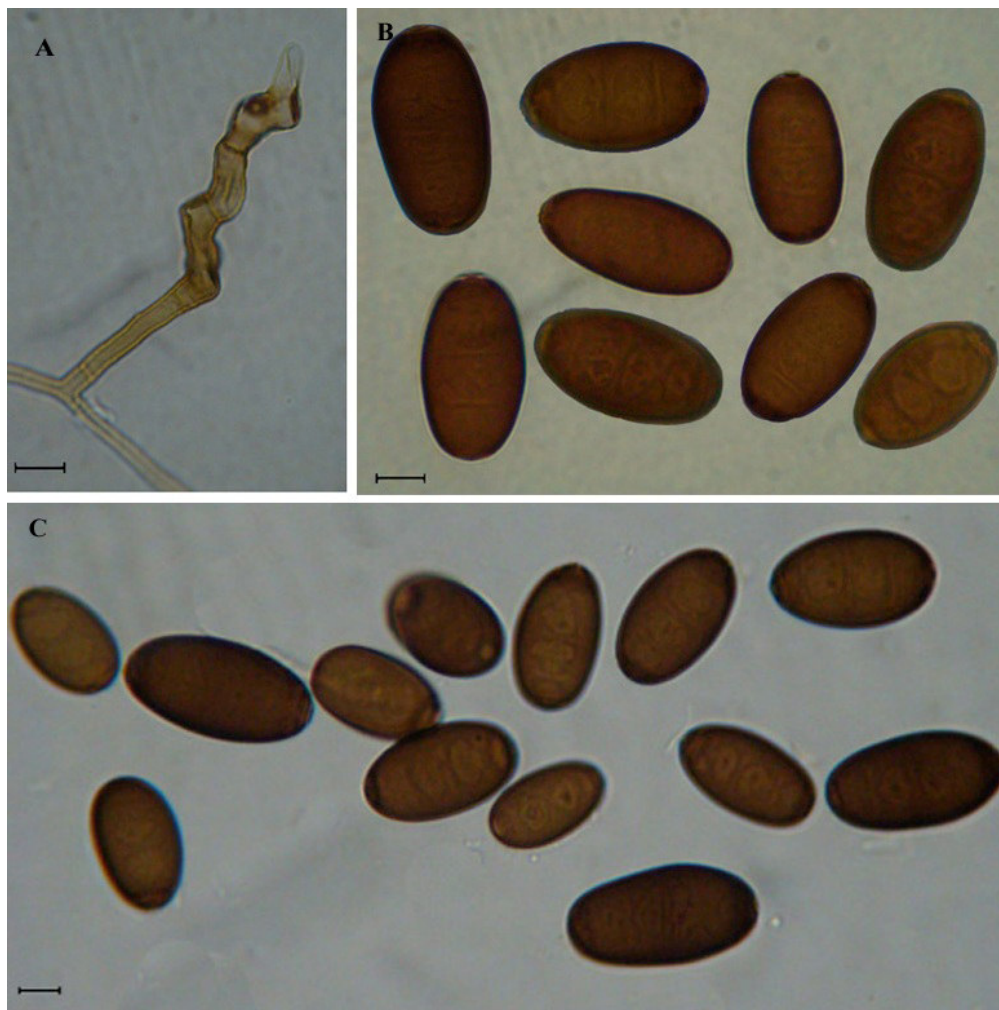
## ۲- *Bipolaris neergaardii* (Danquah) Alcorn, Mycotaxon – 2

17: 68 (1983) (Fig. 2)

Teleomorph: *Cochliobolus neergaardii* Alcorn, Mycotaxon 39: 385 (1990)

نمونه بررسی شده روی *Oryza sativa*، درودزن (استان فارس)، ۱۳۹۰

پرگنه‌های قارچ روی محیط کشت PDA به رنگ قهوه‌ای تیره تا قهوه‌ای زیتونی دیده شد. کنیدیوفورها منفرد و به ندرت در دسته‌های کوچک، به رنگ قهوه‌ای که به طرف انتها کمرنگ‌تر می‌شوند (شکل A، ۲). طول کنیدیوفورها تا ۲۲۰ میکرومتر می‌رسد. پایه کنیدیوفورها در این گونه متورم نیست (شکل A، ۲). کنیدیوم‌ها راست، بیضوی، به رنگ قهوه‌ای تا قهوه‌ای تیره، با ۳ بند کاذب و هیلوم نامشخص می‌باشند (شکل‌های C، ۲-B، ۲). ابعاد کنیدیوم‌ها ۱۵-۲۰ × ۱۹-۴۰ میکرومتر اندازه‌گیری گردید. نزدیک‌ترین گونه‌ها به *B. neergaardii*، دو گونه *B. prieskaensis* و *B. spicifera*



شکل ۲- *Bipolaris neergaardii*: A. کنیدیوفور، B-C. کنیدیوم‌ها (مقیاس = ۱۰ میکرومتر).

Fig. 2. *Bipolaris neergaardii*: A. Conidiophore, B-C. Conidia (Bar = 10 µm).

*Bipolaris papendrofii* Alcorn, Mycotaxon 17: 68 – ۳  
(Fig. 3) (1983)

نمونه بررسی شده روی *Saccharum officinarum* آبادان (استان خوزستان)، ۱۳۹۰

پرگنه قارچ در محیط کشت PDA به رنگ قهوه‌ای تا قهوه‌ای تیره می‌باشد. کنیدیوفورها منفرد، زانویی، به ندرت منشعب، به رنگ قهوه‌ای که به طرف انتها کمرنگ‌تر می‌شوند (شکل‌های A.۳ و C.۳). طول کنیدیوفورها تا ۱۰۰ میکرومتر می‌رسد. پایه کنیدیوفورها در این گونه متورم نیست (شکل‌های A.۳ و C.۳). کنیدیوم‌ها خمیده، دوکی تا گلابی‌شکل معکوس،

به رنگ قهوه‌ای تا قهوه‌ای تیره با ۳ بند کاذب و به ابعاد ۲۰-۱۲ × ۴۲-۲۲ میکرومتر مشاهده شدند (شکل‌های B.۳-D.۳). گونه *B. papendrofii* شباهت زیادی به گونه *B. ellisii* دارد. گونه اخیر براساس کنیدیوم‌های دوکی و گلابی‌شکل و با ۳-۵ بند کاذب از گونه *B. papendrofii* جدا می‌گردد (Sivanesan 1987). این قارچ روی گونه‌های مختلف *Sorghum* sp.، *Setaria geniculata*، *Pennisetum* spp.، *Triticum* sp. و خاک گزارش شده است (Sivanesan 1987). براساس منابع در دسترس (Abbasi & Aliabadi 2009, Ershad 2009) این نخستین گزارش از گونه فوق در ایران است.



شکل ۳- *Bipolaris papendrofii*: A و C. کنیدیوفور، B-D. کنیدیوم‌ها (مقیاس = ۱۰ میکرومتر).  
Fig. 3. *Bipolaris papendrofii*: A and C. Conidiophore, B-D. Conidia (Bar = 10 µm).



**Curvularia intermedia** Boedijn, Bull. Jard. Bot. -۴

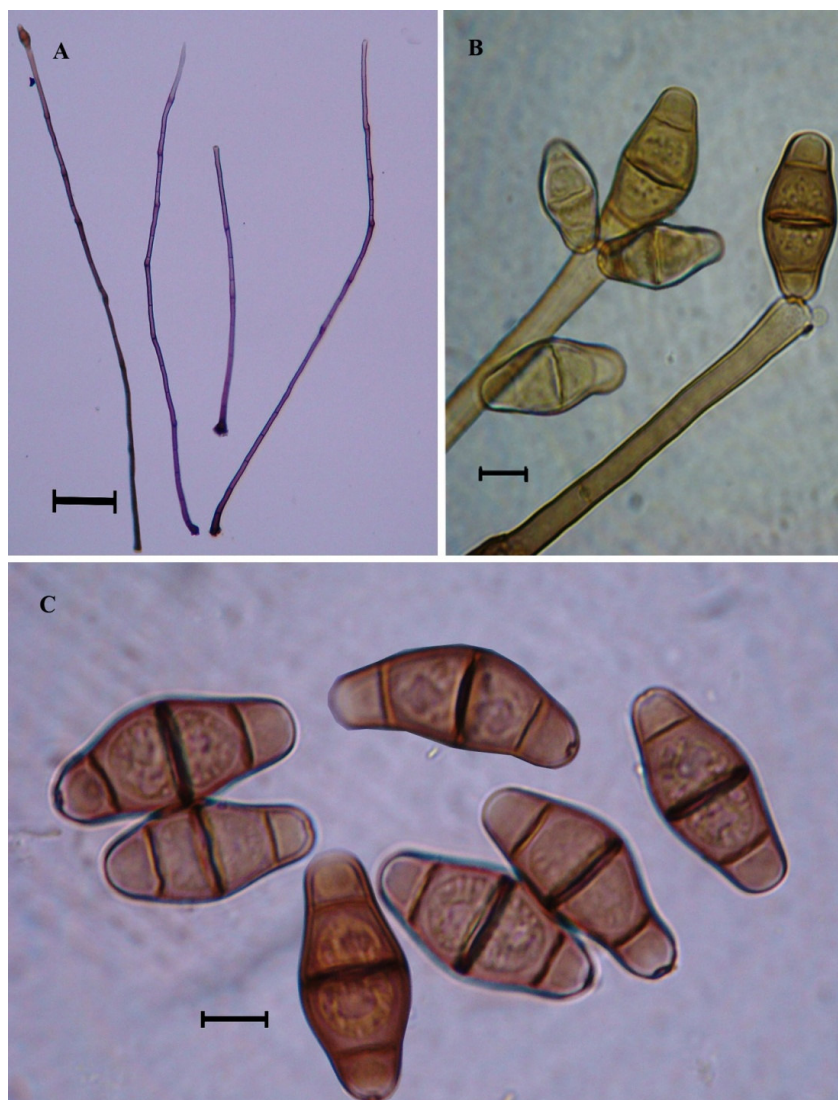
Buitenz. III. 13: 126 (1933) (Fig. 4)

Teleomorph: *Cochliobolus intermedius* R.R. Nelson, Mycologia 52(5): 776 (1960)نمونه بررسی شده روی *Echinochloa* sp. لوشان (استان گیلان)، ۱۳۹۰

پرگنه‌های قارچ روی محیط کشت PDA به رنگ قهوه‌ای تا قهوه‌ای زیتونی دیده شد. کنیدیوفورها به رنگ قهوه‌ای کم‌رنگ تا قهوه‌ای، در بخش پایه متورم بوده و به صورت منفرد تشکیل می‌شوند. طول آن‌ها تا ۸۰۰ میکرومتر می‌رسد (شکل A، ۴). کنیدیوم‌ها راست، بیضوی یا دوکی‌شکل و اغلب نامتقارن (asymmetrical) در طرفین هستند (شکل‌های B، ۴-C). تعداد بند کاذب در هر کنیدیوم سه عدد می‌باشد که بند میانی در مرکز آن قرار دارد. دو یاخته انتهایی کنیدیوم قهوه‌ای روشن

و یاخته‌های میانی قهوه‌ای تا قهوه‌ای تیره بوده و کنیدیوم‌ها به ابعاد ۱۱-۱۵ × ۲۵-۳۴ میکرومتر اندازه‌گیری شدند (شکل‌های C، ۴-B، ۴).

نزدیک‌ترین گونه به گونه فوق *C. eragrostidis* می‌باشد. گونه *C. eragrostidis* با داشتن کنیدیوم‌های متقارن (symmetrical) و با بند میانی ضخیم و تیره‌تر از گونه *C. intermedia* متمایز می‌شود (Sivanesan 1987). *C. intermedia* از کشورهای استرالیا، هنگ کنگ، هند، تانزانیا، ونزوئلا و چند کشور دیگر و از روی گیاهان ذرت، گندم، سورگوم، برنج، نیشکر، چمن، پنجه انگشتی و مرغ گزارش شده است (Sivanesan 1987). براساس منابع در دسترس (Abbasi & Aliabadi 2009, Ershad 2009) این نخستین گزارش از گونه فوق در ایران است.



شکل ۴- *Curvularia intermedia*: A. کنیدیوفور (مقیاس = ۱۰۰ میکرومتر)، B-C. کنیدیوم‌ها (مقیاس = ۱۰ میکرومتر).

Fig. 4. *Curvularia intermedia*: A. Conidiophore (Bar = 100 μm), B-C. Conidia (Bar = 10 μm).



***Bipolaris australiensis* (M.B. Ellis) Tsuda & Ueyama, -۵**

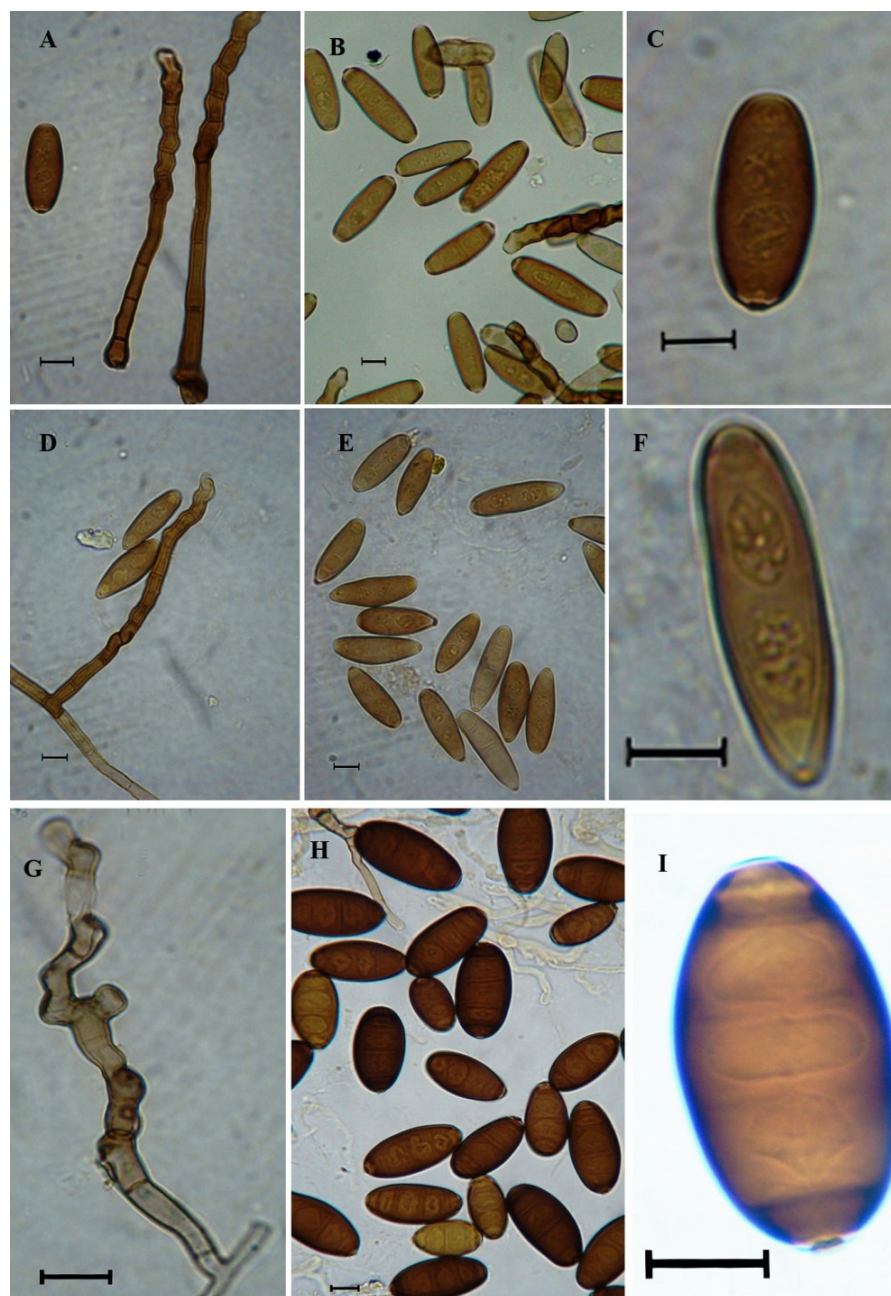
Mycologia 73(1): 90 (1981) (Fig. 5D-F)

Teleomorph: *Cochliobolus australiensis* (Tsuda & Ueyama) Alcorn, Mycotaxon 16(2): 373 (1983)

نمونه بررسی شده روی گیاه گرامینه ناشناخته، جاده تالش

به خلخال (استان گیلان)، ۱۳۹۰.

گونه *B. australiensis* عامل ایجاد لکه‌برگی روی *Cymbopogon* و سوختگی برگ *Pennisetum typhoides* *winterianus* در هندوستان می‌باشد (Sivanesan 1987). این گونه در ایران قبلا از روی چمن، گندم، خیار، ذرت خوشه‌ای، خرما، سیب، جو و برنج گزارش شده است (Abbasi & Aliabadi 2009, Ershad 2009). (شکل ۵).



شکل ۵- کنیدیوفور و کنیدیوم‌ها در گونه‌های مختلف *Bipolaris*: A-C. *Bipolaris spicifera*, D-F. *Bipolaris australiensis*, G-I. *Bipolaris prieskaensis* (مقیاس = ۱۰ میکرومتر).

Fig. 5. Conidiophore and conidia in *Bipolaris* spp.: A-C. *Bipolaris spicifera*, D-F. *Bipolaris australiensis*, G-I. *Bipolaris prieskaensis* (Bar = 10  $\mu$ m).

***Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker, Can. J. -۶**

Bot. 37(5): 883 (1959)

Teleomorph: *Cochliobolus miyabeanus* (S. Ito & Kurib.) Drechsler ex Dastur, Indian Journal of Agricultural Research 12: 733 (1942)نمونه بررسی شده روی *Oryza sativa*. باغ‌ملک (استان خوزستان)، آمل (استان مازندران)، رشت و لوشان (استان گیلان)، گرگان (استان گلستان)، ۱۳۹۰گونه *B. oryzae* عامل ایجاد لکه قهوه‌ای برنج در دنیا و ایران می‌باشد و از مناطق مختلف کشت برنج در ایران گزارش شده است (Abbasi & Aliabadi 2009, Ershad 2009).***Bipolaris zae* Sivan., Trans. Br. Mycol. Soc. 84: 418 -۷**

(1985)

Teleomorph: *Cochliobolus zae* H.S. Chang, Bot. Bull. Acad. sin., Taipei 33(2): 175 (1992)نمونه‌های بررسی شده روی *Cynodon dactylon*، *Sorghum halepense* (استان آذربایجان غربی)؛ *Paspalum sp.*، *Dactylis sp.*، رشت (استان گیلان)؛ گیاه گرامینه ناشناخته، روستای سعلکده شهرستان خوی (استان آذربایجان غربی)، ۱۳۹۰این گونه نخستین بار در سال ۱۹۷۳ از روی ذرت و از کشور استرالیا جداسازی شد (Sivanesan 1987). هم‌چنین، از ایران از روی *Setaria sp.* گزارش شده است (Ahmadpour et al. 2011). گیاهان *Sorghum halepense*، *Cynodon dactylon*، *Paspalum sp.* و *Dactylis sp.* میزبان‌های جدید *B. zae* از ایران گزارش می‌گردند.***Curvularia heteropogonicola* (Sivan.) Alcorn, -۸**

Mycotaxon 41: 332 (1991)

نمونه‌های بررسی شده روی *Cynodon dactylon* و *Digitaria sp.* روستای سعلکده شهرستان خوی (استان آذربایجان غربی)، ۱۳۹۰گونه *C. heteropogonicola* قبلاً در جنس *Exserohilum* با نام *E. heteropogonicola* قرار داده شده بود (Alcorn 1991). این گونه قبلاً از روی *Sorghum halepense* از ایران گزارش شده است (Ahmadpour et al. 2011). بنابراین، گیاهان *C. dactylon* و *Digitaria sp.* به عنوان میزبان‌های جدید از ایران گزارش می‌گردند.**کلید شناسایی گونه‌های جنس *Bipolaris* با ۳-۴ بند کاذب در ایران**همه گونه‌های گزارش شده با ۳-۴ بند کاذب در دنیا به استثنای *B. hadotrichoides* در مطالعه حاضر و قبلی (Ahmadpour et al. 2011) از ایران جداسازی و شناسایی گردیدند و کلید شناسایی این گونه‌ها به شرح زیر می‌باشد:

- ۱a) کنیدیوم‌ها با ۳ بند کاذب..... ۲
- ۱b) کنیدیوم‌ها با ۳-۴ بند کاذب..... ۵
- ۲a) کنیدیوم‌ها راست..... ۳
- ۲b) کنیدیوم‌ها خمیده و  $20-12 \times 42-22$  میکرومتر..... *B. papendrofii* (Fig. 3)
- ۳a) کنیدیوم‌ها معمولاً با عرض کمتر از ۱۱ میکرومتر ( $11-6 \times 40-14$  میکرومتر)..... *B. australiensis* (Fig. 5D-F)
- ۳b) کنیدیوم‌ها با عرض بیش از ۱۱ میکرومتر..... ۴
- ۴a) کنیدیوم‌ها سیلندری و  $14-9 \times 40-20$  میکرومتر..... *B. spicifera* (Fig. 5A-C)
- ۴b) کنیدیوم‌ها بیضوی و  $20-15 \times 40-19$  میکرومتر..... *B. neergaardii* (Fig. 2)
- ۵) کنیدیوم‌ها بیضوی و  $23-17 \times 46-30$  میکرومتر..... *B. prieskaensis* (Fig. 5G-I)

**- تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیک**

درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده با روش NJ براساس توالی ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 rDNA نشان می‌دهد که جنس‌های *Pyrenophora*، *Cochliobolus* و *Setosphaeria* مونوفیلتیک می‌باشند و کلادهای *Bipolaris/Curvularia/Cochliobolus*، *Drechslera/Pyrenophora* و *Exserohilum/Setosphaeria* به ترتیب با مقدار Bootstrap ۹۹ و ۵۳ و ۱۰۰ درصد حمایت می‌شوند (شکل ۶).

می‌شود و تنها گونه‌های *Bipolaris* در گروه یک *Cochliobolus* قرار می‌گیرند. در گروه دو *Cochliobolus* گونه‌های *Curvularia* و تعدادی از گونه‌های *Bipolaris* قرار می‌گیرند. تسودا و همکاران (Tsuda et al. 1977) گونه‌های *Bipolaris* گروه دو *Cochliobolus* را به جنس *Pseudocochliobolus* منتقل کرده بودند. این محققان بیان می‌کردند که جنس مذکور با پس‌دوتسیوم‌های منشا یافته از استرومای سیلندری و آسک‌های نسبتاً کم عرض با آسکوسپورهای پیچ‌خوردگی

تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیک درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده با روش NJ براساس توالی ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 rDNA نشان می‌دهد که جنس‌های *Pyrenophora*، *Cochliobolus* و *Setosphaeria* مونوفیلتیک می‌باشند و کلادهای *Bipolaris/Curvularia/Cochliobolus*، *Drechslera/Pyrenophora* و *Exserohilum/Setosphaeria* به ترتیب با مقدار Bootstrap ۹۹ و ۵۳ و ۱۰۰ درصد حمایت می‌شوند (شکل ۶).

با این حال همه جدایه‌های توالی‌یابی شده در این مطالعه با گونه *B. heveae* هم‌گروه شدند و دورتر از گونه *B. stenospila* قرار گرفتند (شکل ۶). در مجموع، براساس داده‌های مورفولوژیکی و مولکولی پنج جدایه مورد مطالعه در این تحقیق به عنوان گونه *B. heveae* تشخیص داده شدند. با این حال به نظر می‌رسد که مطالعات مورفولوژیکی بیشتری جهت تمایز گونه‌های *B. heveae* و *B. stenospila* بایستی انجام گیرد.

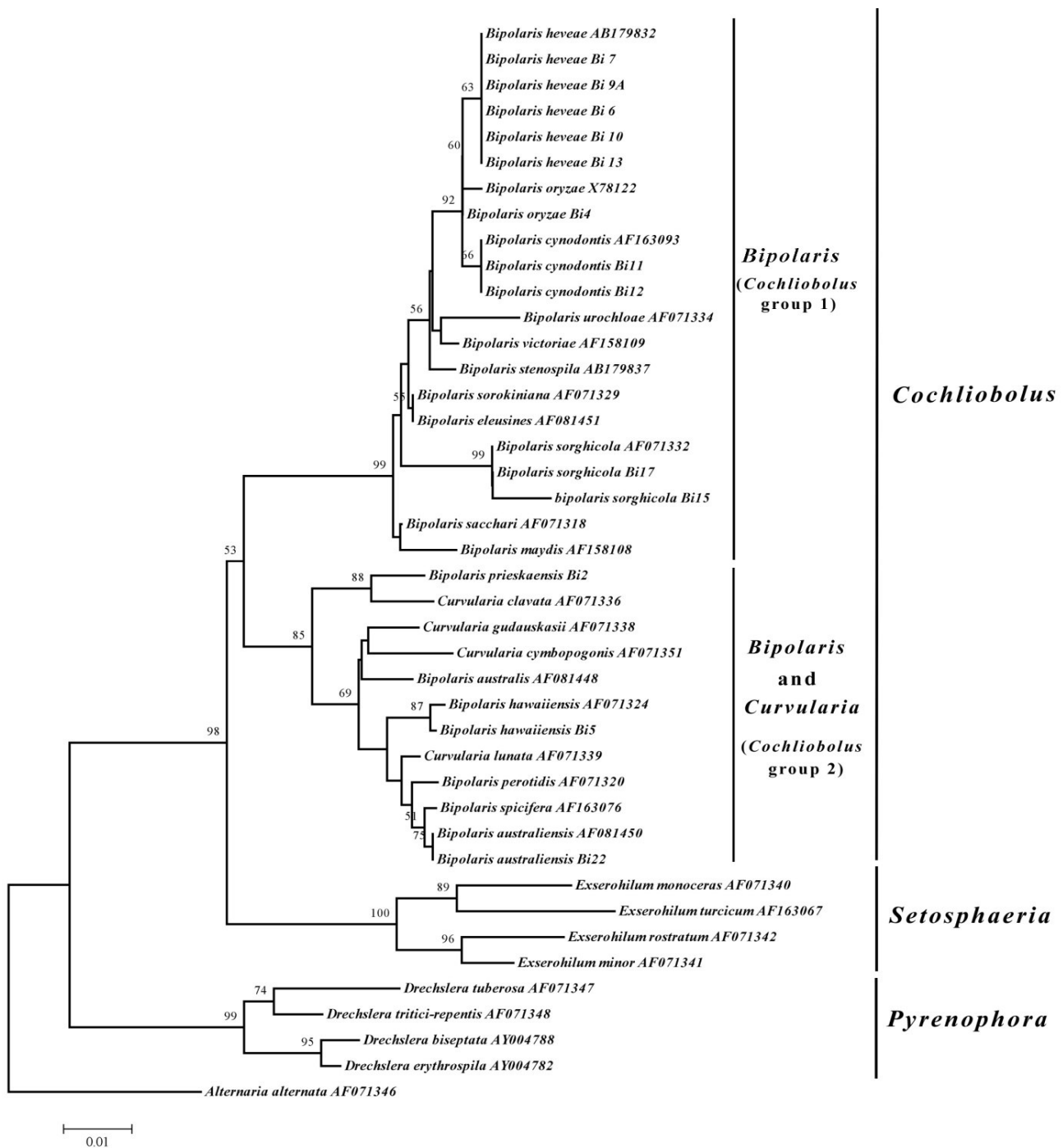
جدایه‌های توالی‌یابی شده از گونه‌های *B. oryzae* (با ۹۹ درصد تشابه نوکلئوتیدی با جدایه استاندارد و بدون Bootstrap)، *B. sorghicola* (با مقدار Bootstrap ۹۹ درصد و ۹۸-۹۹ درصد تشابه نوکلئوتیدی با جدایه استاندارد) و *B. cynodontis* (با مقدار Bootstrap ۶۶ درصد و ۹۹ درصد تشابه نوکلئوتیدی با جدایه استاندارد) در گروه یک *Cochliobolus* قرار گرفتند (شکل ۶). همه گونه‌های مذکور دارای کنیدیوم‌های خمیده، دوکی‌شکل و با تعداد بیش از هفت بند کاذب می‌باشند. به علاوه، جدایه‌های توالی‌یابی شده از گونه‌های *B. australiensis* (با مقدار Bootstrap ۷۵ درصد و ۱۰۰ درصد تشابه نوکلئوتیدی با جدایه استاندارد)، *B. hawaiiensis* (با مقدار Bootstrap ۸۷ درصد و ۹۹ درصد تشابه نوکلئوتیدی با جدایه استاندارد) و *B. prieskaensis* در گروه دو *Cochliobolus* قرار گرفتند (شکل ۶) و گونه‌هایی که در گروه مذکور قرار می‌گیرند دارای کنیدیوم‌های راست (به ندرت خمیده)، کوتاه و با تعداد بند کاذب کمتر از هفت می‌باشند. تا به حال توالی‌یابی ناحیه rDNA-ITS در گونه *B. prieskaensis* انجام نشده است. این نخستین گزارش از توالی‌یابی ناحیه مورد نظر در گونه مذکور می‌باشد. هم‌چنین، در این گروه گونه‌های *Curvularia* نیز قرار گرفتند (شکل ۶). نتایج این مطالعه با نتایج محققان دیگر نیز هم‌سو بود (Berbee et al. 1999, Kodsueb et al. 2006, Manamgoda et al. 2011). گونه‌های *Bipolaris* که در گروه اول *Cochliobolus* قرار می‌گیرند بیمارگرهای مهم گیاهان زراعی محسوب می‌شوند و در گروه دوم *Cochliobolus* هم تعدادی از گونه‌های *Bipolaris* و گونه‌های *Curvularia* با بیمارگرهای متوسط می‌باشند. این گروه‌بندی براساس توالی نواحی ITS، JTS، TEF، GPD، Brn1 و MAT نیز دیده می‌شود (Berbee et al. 1999, Kodsueb et al. 2006, Sun et al. 2003, Turgeon 1998, Manamgoda et al. 2011).

### سپاسگزاری

نگارندگان از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تهران به خاطر فراهم کردن اعتبارات مالی این تحقیق کمال تشکر را دارند.

کم و یا موازی و با مراحل غیرجنسی *Curvularia* و *Bipolaris* با کنیدیوم‌های راست و تعداد بند کاذب کمتر (کمتر از هفت بند کاذب) از جنس *Cochliobolus* متمایز می‌شود. بعداً آلکورن (1983) جنس *Pseudocochliobolus* را مترادف جنس *Cochliobolus* دانست و بیان داشت که وجود استروما و میزان پیچ‌خوردگی آسکوسپورها حتی در بین جدایه‌های یک گونه متغیر می‌باشد و سیوانسان (1987) نیز همین عقیده را داشت و از آن به بعد جنس *Pseudocochliobolus* در نوشته‌های تاکسونومیکی مورد استفاده قرار نگرفت. بدین ترتیب، جنس‌های *Bipolaris* و *Curvularia* دارای مرحله جنسی مشترکی شدند. به علاوه، ویژگی‌هایی از جمله نحوه جوانه‌زنی کنیدیوم‌ها، مورفولوژی هیلوم، منشا لوله تندشی در یاخته پایه و موقعیت آن نسبت به محور کنیدیوم، نحوه تشکیل بند کاذب و ویژگی‌های جایگاه کنیدی‌زایی در دو جنس مذکور مشترک می‌باشد. به همین دلیل، برخی محققان بیان می‌کنند که جنس *Bipolaris* بایستی مترادف جنس *Curvularia* در نظر گرفته شود (Sivanesan 1987, Alcorn 1988). این ظاهراً هتروژنی یا ناهمگونی در روابط بین آنامورف و تلئومورف را ایجاد می‌کند. با این حال، سیوانسان (1987) بیان می‌کند که این دو جنس در اغلب موارد دارای صفات مورفولوژیکی یکسانی هستند، اما تا زمانی که اطلاعات بیشتر از طریق مطالعات بیوشیمیایی متابولیت‌های ثانویه و ژنتیکی تعداد زیادی از گونه‌های این دو جنس حاصل نشده است، بایستی به عنوان جنس‌های مجزا در نظر گرفته شوند. مطالعات فیلوژنتیکی بری و همکاران (Berbee et al. 1999) نیز نشان می‌دهد که جنس‌های *Bipolaris* و *Curvularia* مونوفیلیتیک نمی‌باشند.

در این تحقیق، طول توالی نوکلئوتیدی ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 rDNA توالی‌یابی شده در جدایه‌های مختلف گونه‌های *Bipolaris* بین ۵۳۱-۵۶۴ جفت باز متغیر بود. با توجه به درخت NJ رسم شده براساس ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 rDNA همه جدایه‌های مشکوک به گونه *B. heveae* جدا شده از میزبان‌های مختلف (طول توالی نوکلئوتیدی ناحیه توالی‌یابی شده بین این جدایه‌ها ۵۵۰-۵۶۲ جفت باز متغیر بود) با Bootstrap ۶۳ درصد تشکیل گروه مونوفیلیتیک با جدایه استاندارد گونه *B. heveae* (AB179832) دادند و با هم گروه‌بندی شدند (شکل ۶) و میزان شباهت توالی نوکلئوتیدی جدایه‌های مورد مطالعه در این تحقیق با جدایه استاندارد گونه *B. heveae* ۹۹ درصد بود. جدایه‌های مختلف گونه *B. heveae* در گروه یک *Cochliobolus* قرار گرفتند. گونه‌هایی که در این گروه قرار می‌گیرند معمولاً دارای کنیدیوم‌های بزرگ، خمیده و قایقی تا دوکی‌شکل می‌باشند. همان‌طوری که قبلاً گفته شد، گونه *B. heveae* از نظر خصوصیات مورفولوژیکی (تعداد بند کاذب کنیدیوم‌ها و ابعاد آن‌ها) بسیار شبیه به گونه *B. stenospila* می‌باشد.



شکل ۶- درخت فیلوژنتیکی استنباط شده از ناحیه ITS و 5.8S rDNA از ۴۲ تاکسون با روش NJ (Neighbor-Joining). اعداد بالای هر شاخه مقدار bootstrap از ۱۰۰۰ تکرار را نشان می‌دهد. طول شاخه‌ها با تعداد تغییرات باز که به صورت مقیاس بار نشان داده شده است، متناسب می‌باشد. گونه *Alternaria alternata* (AF071346) به عنوان outgroup انتخاب شده است.

Fig. 6. A Neighbor-Joining tree inferred from the ITS regions and 5.8S rDNA sequences from 42 taxa. The number in front of represented isolates shows the bootstrap values in 1000 bootstrap replicates. The length of branches is proportional to the number of base changes, indicated by the scale bar. *Alternaria alternata* (AF071346) is an outgroup.



## References

- Abbasi, M. & Aliabadi, F. 2009. The list of fungi reported in proceedings of 12<sup>th</sup> to 18<sup>th</sup> Iranian plant protection congress. Elm & Honar Publication, 272 pp., Tehran.
- Ahmadpour, A., Donyadoost-Chelan, M., Heidarian, Z. & Javan-Nikkhah, M. 2011. New species of *Bipolaris* and *Curvularia* on grass species in Iran. *Rostaniha* 12: 39–49.
- Alcorn, J.L. 1982a. New *Cochliobolus* and *Bipolaris* species. *Mycotaxon* 15: 1–19.
- Alcorn, J.L. 1982b. Ovaricolous *Bipolaris* species on *Sporobolus* and other grasses. *Mycotaxon* 15: 20–48.
- Alcorn, J.L. 1983. Generic concepts in *Drechslera*, *Bipolaris* and *Exserohilum*. *Mycotaxon* 17: 1–86.
- Alcorn, J.L. 1988. The taxonomy of *Helminthosporium* species. *Annual Review of Phytopathology* 26: 37–56.
- Alcorn, J.L. 1990. Additions to *Bipolaris*, *Cochliobolus* and *Curvularia*. *Mycotaxon* 39: 361–392.
- Alcorn, J.L. 1991. New combinations and synonymy in *Bipolaris* and *Curvularia*, and a new species of *Exserohilum*. *Mycotaxon* 41: 329–343.
- Berbee, M.L., Pirseyedi, M. & Hubbard, S. 1999. *Cochliobolus* phylogenetics and the origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. *Mycologia* 91: 964–977.
- Deng, H., Zhang, T.Y. & Zhao, G.Z. 2002. Two new records of *Bipolaris* in China. *Mycosystema* 21: 133–134.
- Ellis, M.B. 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, 608 pp., Kew, England.
- Ellis, M.B. 1976. More Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, 507 pp., Kew, England.
- Ershad, D. 2009. Fungi of Iran. 3<sup>rd</sup> ed. Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, 531 pp.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111–120.
- Koduseb, R., Dhanasekaran, V., Aptroot, A., Lumyong, S., Mckenzie, E.H.C., Hyde, K.D. & Jeewon, R. 2006. The family *Pleosporeaceae*: intergeneric relationships and phylogenetic perspectives based on sequence analyses of partial 28S rDNA. *Mycologia* 98: 571–583.
- Manamgoda, D.S., Cai, L., Bahkali, A.H., Chukeatirote, E. & Hyde, K.D. 2011. *Cochliobolus*: an overview and current status of species. *Fungal Diversity* 51: 3–42.
- Richardson, M.J. 1990. An annotated list of seed-borne diseases. 4<sup>th</sup> ed. International Seed Testing Association, Zurich, 387 pp.
- Saitou, N. & Nei, M. 1987. The Neighbor-Joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406–425.
- Sivanesan, A. 1987. Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs. *Mycological Papers* 158, 261 pp.
- Sun, G.Y., Oide, S., Tanaka, E., Shimizu, K., Tanaka, C. & Tsuda, M. 2003. Species separation in *Curvularia* “*geniculata*” group inferred from *Brn1* gene sequences. *Mycoscience* 44: 239–244.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596–1599.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D.G. 1997. The Clustal X Windows Interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25: 4876–4882.

- Tsuda, M., Uyama, A. & Nishihara, N. 1977. *Pseudocochliobolus nisikadoi* the perfect stage of *Helminthosporium coicis*. Mycologia 69: 1109–1120.
- Tsukiboshi, T., Chung, W.H. & Yoshid, S. 2005. *Cochliobolus heveicola* sp. nov. (*Bipolaris heveae*) causes brown stripe of bermudagrass and Zoysia grass. Mycoscience 46: 17–21.
- Turgeon, B.G. 1998. Application of mating type gene technology to problems in fungal biology. Annual Review of Phytopathology 36: 115–137.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S.B. & Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Gelfand, M., Sninsky, D. & White, T. (eds). PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic, San Diego, California, pp. 315–322.