

مقاله پژوهشی

شناسایی پلی‌فازی گونه *Cercospora cf. sigesbeckiae* همراه با بیماری لکه‌برگی سرکوسپورایی گیاهان دانه روغنی سویا، کلزا و کنجد در استان‌های گلستان و مازندران

مونس بخشی^{۱*} و رسول زارع^۱

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۲/۲۴؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱/۳۱)

چکیده

گیاهان زراعی سویا، کلزا و کنجد از گیاهان صنعتی مهم در ایران و جهان به شمار می‌روند. بیماری لکه‌برگی سرکوسپورایی یکی از تهدیدهای جدی تولید این گیاهان به‌ویژه گیاه سویا در دنیا به شمار می‌رود. طی بازدید از مزارع گیاهان زراعی مختلف در استان‌های گلستان و مازندران، شیوع گسترده‌ای از علائم لکه‌برگی سرکوسپورایی روی گیاهان سویا، کلزا و کنجد مشاهده شد. به منظور شناسایی عوامل دخیل در این بیماری، از برگ‌های دارای علائم لکه‌برگی، نمونه‌برداری به عمل آمد و کشت‌های تک اسپور به صورت مستقیم از لکه‌های برگ تهیه شدند. در مجموع تعداد ۵۰ جدایه قارچ به دست آمد که از بین آنها هشت جدایه از گیاه سویا، چهار جدایه از کنجد و چهار جدایه از کلزا انتخاب و با استفاده از ترکیب خصوصیات ریخت‌شناختی و توالی شش ناحیه ژنی ITS، *tef1*، *actA*، *cmdA*، *his3* و *gapdh* شناسایی شدند. نتایج تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی توالی‌ها نشان داد که گونه *Cercospora cf. sigesbeckiae* به عنوان عامل لکه‌برگی سرکوسپورایی در این دو استان روی سه گیاه زراعی سویا، کنجد و کلزا فعالیت می‌نماید. بر اساس منابع موجود، تحقیق حاضر اولین گزارش از وقوع گونه *C. cf. sigesbeckiae* از ایران و اولین گزارش این گونه روی کلزا و کنجد در دنیا می‌باشد.

کلیدواژه: آرایه‌بندی، دانه‌های روغنی، قارچ‌های سرکوسپورئید، گیاهان صنعتی، لکه‌برگی

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

۱. به ترتیب استادیار و استاد پژوهش بخش تحقیقات رستنی‌ها، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

Polyphasic identification of *Cercospora cf. sigesbeckiae* as causal agent of cercospora leaf spot of oilseed plants soybean, sesame and rapeseed in Golestan and Mazandaran provinces

M. Bakhshi^{1*} and R. Zare¹

(Received: 14.3.2020; Accepted: 19.4.2020)

Abstract

Soybean, sesame and rapeseed are important industrial crop plants in the world and Iran. *Cercospora* leaf spot is a significant threat to the production of these crops particularly in soybean, worldwide. In a field survey in Golestan and Mazandaran provinces, the widespread distribution of *Cercospora* leaf spot symptoms on soybean, sesame and rapeseed was observed. In order to identify the fungal agents associated with this disease, symptomatic leaves were collected from the field and taken to the laboratory. Single spore cultures derived directly from leaf spots. In total, 50 isolates were obtained of which eight isolates from soybean, four isolates from sesame and four isolates from rapeseed were identified based on sequences of six genomic loci (ITS, *act*, *tefl*, *cmdA*, *his3* and *gapdh*), host plant, and morphological data. The results of phylogenetic analysis have revealed that *Cercospora cf. sigesbeckiae* is a causal agent of cercospora leaf spot of soybean, sesame and rapeseed in Golestan and Mazandaran provinces. To our knowledge, this is the first report of *Cercospora cf. sigesbeckiae* for Iran mycobiota and its first report on sesame and rapeseed in the world.

Keywords: Cercosporoid fungi, industrial plants, leaf spot, oilseed crops, taxonomy.

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

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

مقدمه

2018). و باقالا (Kimber & Paull 2011) بیماری لکه‌برگی ایجاد می‌نمایند (Crous & Braun 2003). خسارت عمده این قارچ‌ها از طریق از بین بردن برگ‌ها یا کاهش سطح فتوسنتز گیاه به دلیل ایجاد نکروز می‌باشد که در نهایت منجر به کاهش راندمان و عملکرد محصول می‌شود (Groenewald et al. 2013, Bakhshi et al. 2015, 2018). فقدان صفات ریخت‌شناختی کافی برای تمایز گونه‌های جنس سرکوسپورا همواره آرایه‌بندی و شناسایی گونه‌ها در این جنس را با چالش مواجه ساخته است. به صورت سنتی، گونه‌های این جنس بر اساس ریخت‌شناسی کنیدیوم‌ها و کنیدیوم‌برها و اطلاعات گیاه میزبان طبقه‌بندی می‌شدند که بر این اساس، بیش از ۳۰۰ نام گونه برای این جنس توصیف شد (Crous & Braun 2003). کراوس و براون آرایه‌های این جنس را بازبینی نمودند و ۶۵۹ آرایه را به عنوان گونه حقیقی سرکوسپورا شناسایی کردند و ۲۸۱ گونه را نیز با توجه به ریخت‌شناسی مشابه با گونه *C. apii* Fresen. (گونه تیپ این جنس)، هم نام با این گونه در نظر گرفتند (Crous & Braun 2003). با پیشرفت روش‌های مولکولی در دو دهه اخیر، زمینه جدیدی در آرایه‌بندی جنس سرکوسپورا ظهور پیدا کرده است و روش پلی‌فازی که ترکیبی از اطلاعات توالی DNA، بیولوژی، اکولوژی، رابطه میزبانی و ویژگی‌های ریخت‌شناختی را به کار می‌گیرد یا به عبارتی مفهوم ترکیبی گونه (Consolidated Species Concept) (Quaedvlieg et al. 2014)، برای شناسایی گونه‌های این جنس مفید شناخته شده است (Groenewald et al. 2013, Bakhshi et al. 2015, 2018, 2019). با توجه به اهمیت گیاهان زراعی سویا، کنجد و کلزا به عنوان گیاهان دانه روغنی مهم در صنعت کشاورزی کشور، در پژوهش حاضر با توجه به مشاهده علائم بیماری لکه-

سویا (*Glycine max* (L.) Merr.) از تیره Fabaceae، کلزا (*Brassica napus* L.) از تیره Brassicaceae و کنجد (*Sesamum indicum* L.) از تیره Pedaliaceae، سه گیاه دانه روغنی و صنعتی مهم در دنیا به شمار می‌روند. سطح زیر کشت کلزا، سویا و کنجد در کشور در سال زراعی ۱۳۹۷ به ترتیب معادل ۱۹۱۰۰۰، ۴۰۰۰۰ و ۳۰۰۰۰ هکتار و میزان تولید آنها به ترتیب معادل ۳۲۹۰۰۰، ۸۳۰۰۰ و ۳۰۰۰۰ تن بوده است. استان‌های گلستان و مازندران از نقاط مهم کشت این محصولات در کشور به حساب می‌آیند، به طوری که استان گلستان رتبه نخست سطح زیر کشت (۵۵۳۱۵ هکتار) و تولید (۱۱۲۵۴۸ تن) کلزا در کشور را دارد. همچنین این استان از رتبه نخست سطح زیر کشت (۲۱۰۵۰ هکتار) و رتبه دوم تولید (۳۶۱۰۰ تن) سویا در کشور برخوردار می‌باشد (Ahmadi et al. 2018). عملکرد این گیاهان تحت تاثیر عوامل بیماری زای مختلفی قرار می‌گیرد. یکی از مهم ترین بیماری‌های مرتبط با این گیاهان بویژه در گیاه سویا در دنیا، بیماری لکه‌برگی سرکوسپورایی می‌باشد (Soares et al. 2015, Albu et al. 2016, Guillin et al. 2017).

جنس *Cercospora* Fresen. (Mycosphaerellaceae, Ascomycota) از بیمارگرهای گیاهی مهم روی محصولات کشاورزی به شمار می‌رود (Groenewald et al. 2013, Bakhshi et al. 2012, 2015, 2018). گونه‌های این جنس با پراکنش جغرافیایی وسیع، در دامنه گسترده‌ای از گیاهان زراعی از جمله چغندر قند (Weiland et al. 2011, Bakhshi et al. 2001)، کرفس (Groenewald et al. 2006)، ذرت (Crous et al. 2006)، سویا (Albu et al. 2016, Guillin et al. 2017)، لوبیا (Duangsong et al. 2017).

برگی سرکوسپورایی روی این گیاهان، طی بازدید از مزارع گیاهان زراعی در استان‌های گلستان و مازندران، شناسایی عامل بیماری لکه‌برگی سرکوسپورایی این محصولات با استفاده از روش پلی‌فازی (ترکیب خصوصیات ریخت-شناختی و مولکولی با استفاده از توالی شش ناحیه ژنی ITS، *tefl*، *cmdA*، *his3*، *actA* و *gapdh*) مدنظر قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه، جداسازی و خالص‌سازی قارچ‌ها

نمونه برداری از برگ‌های دارای علائم لکه‌برگی در گیاهان کلزا، کنجد و سویا طی ماه‌های اردیبهشت تا آبان سال‌های ۱۳۹۶ و ۱۳۹۷ در استان‌های گلستان و مازندران انجام شد. نمونه‌ها به صورت جداگانه درون پاکت‌های کاغذی به آزمایشگاه منتقل شدند. لکه‌های برگ‌ی زیر بینوکولر مورد بررسی قرار گرفته و پس از مشاهده دستجات کنیدیوم و کنیدیوم‌بر قارچ سرکوسپورا، کشت-های تک اسپور مطابق روش بخشی و همکاران (Bakhshi et al. 2020) تهیه شد.

استخراج DNA، تکثیر و توالی‌یابی

برای شناسایی مولکولی، جدایه‌های خالص شده، پس از کشت روی محیط کشت MEA، به مدت ۸-۱۰ روز در اتاقک رشد با دمای °C ۲۵ در تاریکی نگهداری شدند و DNA جدایه‌ها طبق روش مولر و همکاران (Möller et al. 1992) استخراج شد. بخش‌هایی از نواحی ژنی ITS، *tefl*، *cmdA*، *his3*، *actA* و *gapdh* تکثیر شد. آغازگرهای V9G (de Hoog & Gerrits van den Ende, 1998) و ITS4 (White et al. 1990) برای تکثیر بخشی از ناحیه

ITS استفاده شد. بخشی از ژن آکتین (*actA*) با استفاده از آغازگرهای ACT-512F و ACT-783R (Carbone & Kohn 1999)، بخشی از ژن هیستون (*his3*) با استفاده از آغازگرهای CylH3F و CylH3R (Crous et al. 2004)، بخشی از ژن کالمودولین (*cmdA*) با استفاده از آغازگرهای CAL-228F و CAL-2Rd (Carbone & Kohn 1999) و بخشی از ژن عامل تداوم ترجمه (*tefl*) با استفاده از آغازگرهای EF1-728F و EF1-986R (Carbone & Kohn 1999) و بخشی از ژن گلیسر آلدئید تری فسفات دهیدروژناز (*gapdh*) با استفاده از آغازگرهای Gpd1-LM و Gpd2-LM (Myllys et al. 2002) تکثیر شد (جدول ۱). واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) براساس بخشی و ارزنلو (Bakhshi & Arzanlou 2017) انجام شد. واکنش توالی‌یابی به صورت جداگانه در دو جهت مستقیم و معکوس با استفاده از آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن‌ها از طریق ارسال به شرکت توالی-یابی Microsynth سوییس انجام گرفت.

تجزیه و تحلیل داده‌های توالی

توالی‌های خام حاصل از هر دو آغازگر مستقیم و معکوس برای تمامی نواحی ژنی با استفاده از نرم‌افزار MEGA v. 6 (Tamura et al. 2013) بررسی و ویرایش شدند و توالی‌های برآیند به صورت دستی از دو آغازگر مستقیم و معکوس هر ناحیه ایجاد شد. توالی‌های نوکلئوتیدی حاصل از هر شش ناحیه ژنی ITS، *tefl*، *cmdA*، *his3*، *actA* و *gapdh* با توالی‌های موجود در بانک ژن با استفاده از ابزار جستجوی BLAST مقایسه شدند. سپس توالی‌های مربوط به این نواحی ژنی برای تمامی گونه‌های سرکوسپورای موجود در بانک ژن دریافت و برای رجبندی و برآورد فیلوژنتیک ذخیره شدند. به منظور

جدول ۱. لیست آغازگرهای مورد استفاده جهت شناسایی مولکولی جدایه‌های قارچی.

Table 1. Primer combinations used in this study for molecular identification of fungal isolates.

Primer name	Primer sequence (5' to 3')	Annealing temperature	Orientation	Locus
V9G	TTACGTCCCTGCCCTTTGTA	52°C	Forward	ITS
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	52°C	Reverse	ITS
EF1-728F	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG	52°C	Forward	<i>tefl</i>
EF1-986R	TACTTGAAGGAACCCTTACC	52°C	Reverse	<i>tefl</i>
ACT-512F	ATGTGCAAGGCCGTTTTCGC	55°C	Forward	<i>actA</i>
ACT-783R	TACGAG TCC TTCTGGCCCAT	55°C	Reverse	<i>actA</i>
CAL-228F	GAGTTCAAGGAGGCCTTCTCCC	58°C	Forward	<i>cmdA</i>
CAL-2Rd	TGRTCNGCCTCDCGGATCATCTC	58°C	Reverse	<i>cmdA</i>
CYLH3F	AGGTCCACTGGTGGCAAG	52°C	Forward	<i>his3</i>
CYLH3R	AGCTGGATGTCCTTGGACTG	52°C	Reverse	<i>his3</i>
Gpd1-LM	ATTGGCCGCATCGTCTTCCGCAA	60→58→53	Forward	<i>gapdh</i>
Gpd2-LM	CCCACTCGTTGTCGTACCA	60→58→53	Reverse	<i>gapdh</i>

منظور، لکه‌های برگی زیر بینوکولر مدل ZEISS Stemi 305 بررسی و نحوه و محل قرارگیری دستجات کنیدیوم و کنیدیوم‌بر در سطح رویی و زیرین برگ یادداشت شد. برای بررسی خصوصیات میکروسکوپی جدایه‌های قارچی، ساختارهای قارچی به صورت مستقیم از سطح لکه در زیر بینوکولر با استفاده از یک سوزن ظریف برداشته شد و روی لام حاوی اسید لاکتیک قرار داده شد و با استفاده از میکروسکوپ نوری مدل Olympus-BX51 بررسی شد. اندازه، رنگ و شکل ساختارهای قارچی همانند استروما، دستجات کنیدیوم‌بر، سلول‌های کنیدیوم‌زا، محل‌های کنیدیوم‌زایی، کنیدیوم‌ها و هیلوم آنها در بزرگنمایی $\times 1000$ ثبت شد. برای هر ساختار ۳۵ نمونه اندازه‌گیری شد و درجه اطمینان ۹۵٪ برای اندازه‌ها و نیز کمینه و بیشینه اندازه‌ها در داخل پرانتز ثبت شد. تصاویر میکروسکوپی با استفاده از دوربین دیجیتال Olympus مدل DP 25 متصل به میکروسکوپ Olympus-BX51 تهیه شد. تصاویر تهیه شده با استفاده از نرم‌افزار فتوشاپ نسخه CS5 ویرایش و فتوپلیت تهیه شد.

آماده‌سازی رجبندی چندژنی توالی‌ها، توالی‌های مربوط به ژن‌های انفرادی با استفاده از نرم‌افزار Mesquite v. 2.75 (Maddison & Maddison 2011) متصل شدند و رجبندی چندگانه توالی‌های متصل شده با استفاده از نرم‌افزار آنالین MAFFT v. 7 (Katoh & Standley 2013) صورت گرفت.

بهترین مدل جایگزینی نوکلئوتیدی در هر ژن، با استفاده از نرم‌افزار Mr Modeltest v. 2.2 (Nylander 2004) تعیین و تبارنمای چندژنی بر مبنای استنتاج بیزیان با استفاده از نرم‌افزار MrBayes v. 3.2.6 (Ronquist et al. 2012) با استفاده از ترکیب شش ناحیه ژنی ITS، *tefl*، *actA*، *his3*، *cmdA* و *gapdh* ترسیم شد. همچنین تبارنماهای تک ژنی نیز برای هر ژن ترسیم شد. توالی‌های جدید این پژوهش به بانک ژن NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) ارسال و راس شماره‌های بانک ژن برای آنها دریافت شد (جدول ۲).

بررسی ویژگی‌های ریخت‌شناختی

برای مطالعه صفات ریخت‌شناختی جدایه‌ها، ویژگی‌های ریخت‌شناختی روی برگ مطالعه شد. برای این

نتایج

علائم بیماری

در طی بازدید از مزارع گیاهان زراعی در شمال کشور، علائم بیماری لکه‌برگی سرکوسپورایی روی گیاهان دانه روغنی سویا، کنجد و کلزا مشاهده شد. علائم این بیماری به صورت لکه‌های ۳-۹ میلی‌متری قهوه‌ای کم‌رنگ تا پررنگ، گاهی با هاله زرد رنگ مشاهده می‌شود. در ادامه لکه‌های انفرادی بویژه در انتهای فصل زراعی با هم ترکیب شده و نواحی بیشتری از برگ‌ها قهوه‌ای و نکروز می‌شوند. در شکل ۱ علائم لکه‌برگی سرکوسپورایی روی سویا، شکل ۲ علائم لکه‌برگی سرکوسپورایی روی کنجد و شکل ۳ علائم لکه‌برگی سرکوسپورایی روی کلزا در انتهای فصل زراعی نشان داده شده است. در طی بررسی این لکه‌ها در زیر بینوکولر، کنیدیوم‌برها و کنیدیوم‌های قارچ سرکوسپورا در سطح رو و زیر لکه‌ها مشاهده شدند.

جداسازی جدایه‌ها

به منظور بررسی دقیق‌تر عامل یا عوامل دخیل در لکه‌برگی سرکوسپورایی در این گیاهان، تعداد ۵۰ جدایه قارچی از لکه‌های مختلف روی این گیاهان جداسازی شد. از بین قارچ‌های به دست آمده، تعداد هشت جدایه از برگ‌ها و لکه‌های مختلف سویا، چهار جدایه از کنجد و چهار جدایه از کلزا، برای شناسایی مبتنی بر صفات ریخت‌شناختی و مولکولی انتخاب شد. این جدایه‌ها در مجموعه کشت‌های زنده قارچی در موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور (تهران، ایران) (IRAN C) نگهداری می‌شوند. اطلاعات میزبان، تاریخ و محل جمع‌آوری جدایه‌های مطالعه شده در این تحقیق در جدول ۲ آمده است.

جدول ۲. اطلاعات و راس شمارهای توالی‌های جدایه‌های به دست آمده از گونه *Cercospora cf. sigesbeckiae* در این تحقیق.

Table 2. Collection details and GenBank accession numbers of *Cercospora cf. sigesbeckiae* strains included in this study.

Isolates	Host	Origin	Collector	Date	ITS	tefl	actA	cmdA	his3	gapdh
IRAN 3824C	<i>B. napus</i>	Golestan, Kordkuy, Balajadeh	M. Bakhshi	26 Aug. 2018	MT321103	MT186091	MT186107	—	—	MT186123
IRAN 3825C	<i>B. napus</i>	Golestan, Kordkuy, Chahardeh	M. Bakhshi	26 Aug. 2018	MT321497	MT186092	MT186108	—	—	MT186124
IRAN 3826C	<i>B. napus</i>	Mazandaran, Neka	M. Bakhshi	04 May 2018	MT338044	MT186093	MT186109	MT186083	MT186073	MT186125
IRAN 3827C	<i>B. napus</i>	Mazandaran, Behshahr	M. Bakhshi	04 May 2018	MT338029	MT186094	MT186110	—	—	MT186126
IRAN 3828C	<i>G. max</i>	Mazandaran, Amol	M. Bakhshi	11 Oct. 2017	MT338030	MT186095	MT186111	MT186084	MT186074	MT186127
IRAN 3829C	<i>G. max</i>	Golestan, Aliabad-e-katul	M. Bakhshi	13 Oct. 2017	MT338031	MT186096	MT186112	MT186085	MT186075	MT186128
IRAN 3830C	<i>G. max</i>	Mazandaran, Bahnamir	M. Bakhshi	11 Oct. 2017	MT338032	MT186097	MT186113	—	—	MT186129
IRAN 3831C	<i>G. max</i>	Golestan, Gorgan	M. Bakhshi	13 Oct. 2017	MT338033	MT186098	MT186114	—	—	MT186130
IRAN 3832C	<i>G. max</i>	Mazandaran, Jouybar	M. Bakhshi	11 Oct. 2017	MT338034	MT186099	MT186115	MT186086	MT186076	MT186131
IRAN 3833C	<i>G. max</i>	Mazandaran, Babol	M. Bakhshi	11 Oct. 2017	MT338035	MT186100	MT186116	—	—	MT186132
IRAN 3834C	<i>G. max</i>	Golestan, Kordkuy, Chahardeh	M. Bakhshi	26 Aug. 2018	MT338036	MT186101	MT186117	—	MT186077	MT186133
IRAN 3835C	<i>G. max</i>	Golestan, Kordkuy, Balajadeh	M. Bakhshi	26 Aug. 2018	MT338037	MT186102	MT186118	—	MT186078	MT186134
IRAN 3836C	<i>S. indicum</i>	Mazandaran, Jouybar	M. Bakhshi	11 Oct. 2017	MT338038	MT186103	MT186119	MT186087	MT186079	MT186135
IRAN 3837C	<i>S. indicum</i>	Mazandaran, Babol, Kiakola	M. Bakhshi	11 Oct. 2017	MT338039	MT186104	MT186120	MT186088	MT186080	MT186136
IRAN 3838C	<i>S. indicum</i>	Mazandaran, Babol, Tazeh abad	M. Bakhshi	11 Oct. 2017	MT338040	MT186105	MT186121	MT186089	MT186081	—
IRAN 3839C	<i>S. indicum</i>	Mazandaran, Jouybar	M. Bakhshi	11 Oct. 2017	MT338041	MT186106	MT186122	MT186090	MT186082	—



شکل ۱. علایم لکه‌برگی سرکوسپورایی در گیاه سویا.

Fig. 1. Cercospora leaf spot symptoms on soybean.



شکل ۲. علایم لکه‌برگی سرکوسپورایی در گیاه کنجد.

Fig. 2. Cercospora leaf spot symptoms on sesame.



شکل ۳. علائم لکه‌برگی سرکوسپورایی در گیاه کلزا.

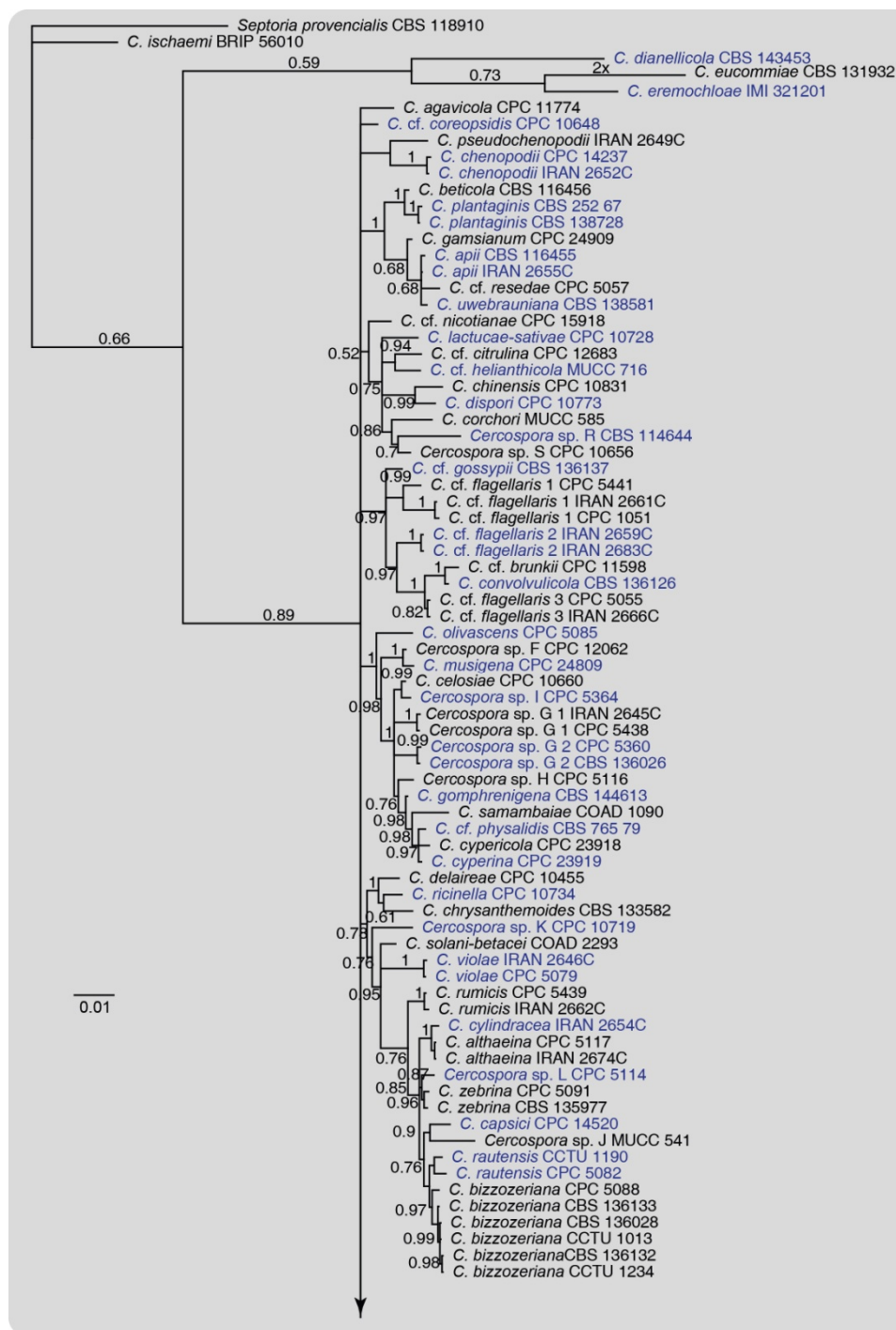
Fig. 3. *Cercospora* leaf spot symptoms on rapeseed.

شناسایی مولکولی

برای شناسایی مولکولی جدایه‌های سرکوسپورای به دست آمده، تبارنمای فیلوژنتیکی با استفاده از ترکیب نواحی ژنی ITS، *tefl*، *cmdA*، *his3*، *actA* و *gapdh* ترسیم شد. رجبندی چندگانه شامل ۱۴۵ آرایه داخلی مربوط به جنس سرکوسپورا (۱۲۹ آرایه از NCBI و ۱۶ آرایه از این تحقیق) بود و *Septoria provencialis* Crous (جدایه CBS 118910) به عنوان آرایه خارجی استفاده شد. رجبندی نهایی شامل ۲۶۱۸ کاراکتر شامل شکاف‌های رجبندی (Gap) بود و مرز ژن‌ها به ترتیب ۱-۴۸۲ کاراکتر برای ITS، ۴۸۳-۸۳۷ کاراکتر برای *tefl*، ۸۳۸-۱۰۵۷ کاراکتر برای *actA*، ۱۰۵۸-۱۳۵۹ کاراکتر برای *cmdA*، ۱۳۶۰-۱۷۳۲ کاراکتر برای *his3* و ۱۷۳۳-۲۶۱۸ کاراکتر برای *gapdh* بود. با توجه به نتایج نرم‌افزار تست مدل، مدل K2P برای ناحیه ژنی ITS، مدل HKY+G با نرخ

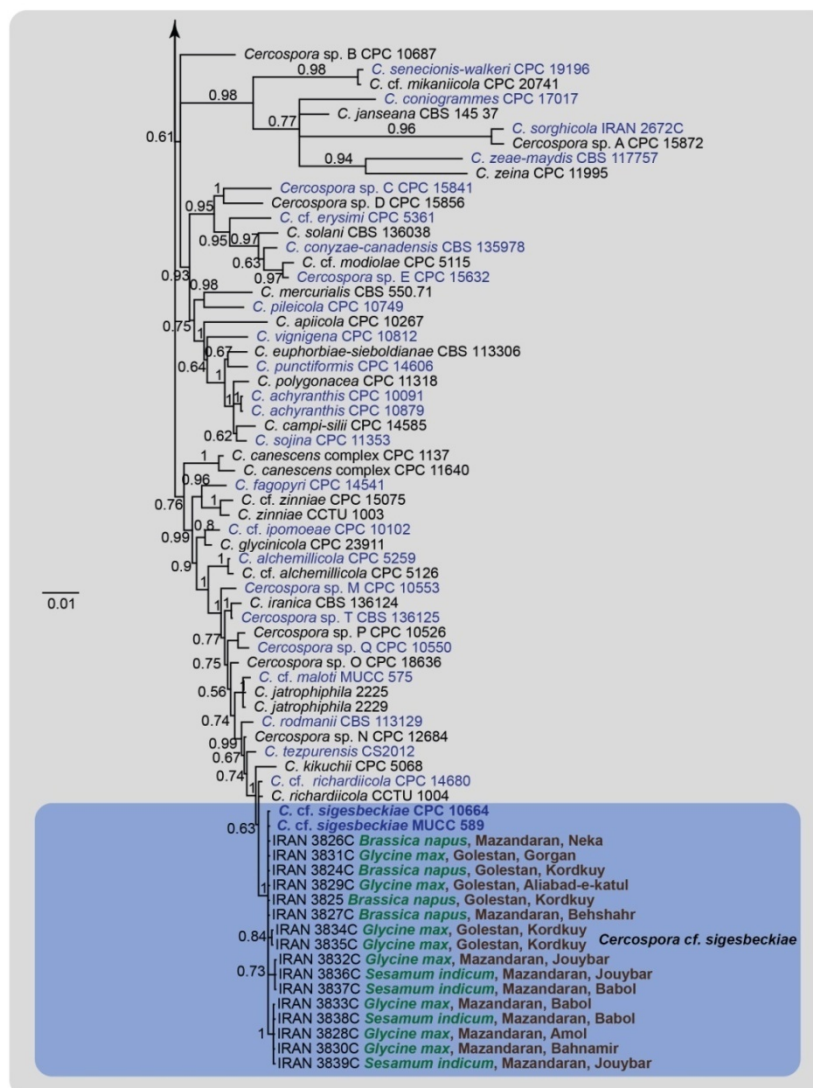
توزیع گاما برای نواحی ژنی *actA*، *tefl* و *cmdA* و مدل GTR+I+G با نرخ توزیع گامای معکوس برای نواحی ژنی *his3* و *gapdh* استفاده شدند. ناحیه ژنی ITS فراوانی equal و سایر ژن‌ها (*actA*، *his3*، *cmdA*، *tefl* و *gapdh*) فراوانی dirichlet base داشتند.

از بین ۲۶۱۸ کاراکتری که برای استنتاج بیزیان استفاده شد، ۱۰۱۶ الگوی مکانی منحصر به فرد وجود داشت که به ترتیب ۸۴، ۲۳۱، ۱۳۹، ۱۴۴، ۱۳۴ و ۲۸۴ نوکلئوتید مربوط به نواحی ژنی ITS، *tefl*، *actA*، *cmdA*، *his3* و *gapdh* بود. تجزیه و تحلیل بیزیان منتهی به ۳۴۱۵۰۰۰ نسل و ۶۸۳۲ تبارنما شد. بعد از حذف ۲۵٪ اولیه تبارنماهای جمع‌آوری شده برای مرحله burn-in، تبارنمای اجمالی و توزیع احتمال پسین خوشه‌ها از ۵۱۲۴ تبارنمای باقی‌مانده محاسبه شد (شکل ۴). بر اساس نتایج تبارنمای چندژنی مشخص شد که گونه



شکل ۴. تبارنمای فیلوژنتیکی حاصل از استنتاج بیزیان با استفاده از ترکیب توالی شش ناحیه ژنی ITS، *tef1*، *actA*، *cmdA*، *his3* و *gapdh* جدایه‌های سرکوسپورای به دست آمده از گیاهان سویا، کلزا و کنجد در استان‌های گلستان و مازندران. این تبارنما نسبت به گونه *Septoria provencialis* (جدایه CBS 118910) ریشه‌یابی شده است.

Fig. 4. Consensus phylogram of *Cercospora* isolates obtained from soybean, sesame and rapeseed in Golestan and Mazandaran provinces, resulting from a Bayesian analysis of the combined 6-gene (ITS, *actA*, *tef1*, *cmdA*, *his3* and *gapdh*) sequence alignment. The tree was rooted to *Septoria provencialis* (CBS 118910).



شکل ۴. ادامه

Fig. 4. Continued.

تراکم متوسط تا زیاد، از استرومای قهوه‌ای با توسعه کم تا زیاد، زیر اپیدرمی و زیر روزنه‌ای، برافراشته شده‌اند. کنیدیوم‌ها قهوه‌ای کمرنگ تا قهوه‌ای، مستقیم تا نسبتاً خمیده، ساده و بدون انشعاب، دارای ۱۵-۲ بند عرضی، با عرض نسبتاً منظم و در قسمت انتها کمی باریک و دارای کمی فرورفتگی در قسمت کنیدیوم‌زایی، به ابعاد ۵/۵-۳/۵ × (۱۶۰-۸۵-۶۵) میکرومتر. سلول‌های کنیدیوم‌زا ادغام شده، انتهایی، با گسترش سیمپودیال، با یک یا چند

Cercospora cf. sigesbeckiae با علایم بیماری لکه‌برگی سرکوسپورایی سه گیاه دانه روغنی سویا، کنجد و کلزا در استان‌های گلستان و مازندران مرتبط است.

توصیف ریخت‌شناختی گونه *Cercospora cf. sigesbeckiae*

توصیف روی بافت گیاهی: میسلیم داخلی است. کنیدیوم‌زایی در هر دو سطح برگ صورت می‌گیرد. کنیدیوم‌ها مستقیم تا سینوسی-زانووی، در دستجات با

محل کنیدیوم‌زایی؛ محل‌های کنیدیوم‌زایی ضخیم، رنگی، راسی، جانبی یا پیرامونی، ۱/۵-۲/۵ میکرومتر. کنیدیوم‌ها منفرد، بی‌رنگ، نیمه‌استوانه‌ای، نخ‌شکل تا واژگزی، مستقیم تا خمیده، دارای (۲۰-) ۱۵-۱۰ (۳) بند عرضی، با نوک نیمه‌تیز تا نیمه‌گرد و پایه تخت تا مخروطی تخت، ۲-۴ × (۲۲۰-) ۸۰-۱۰۵ (۴۰-) میکرومتر؛ هیلوم رنگی، ضخیم، منعکس‌کننده و ۱-۲ میکرومتر است (شکل ۵).

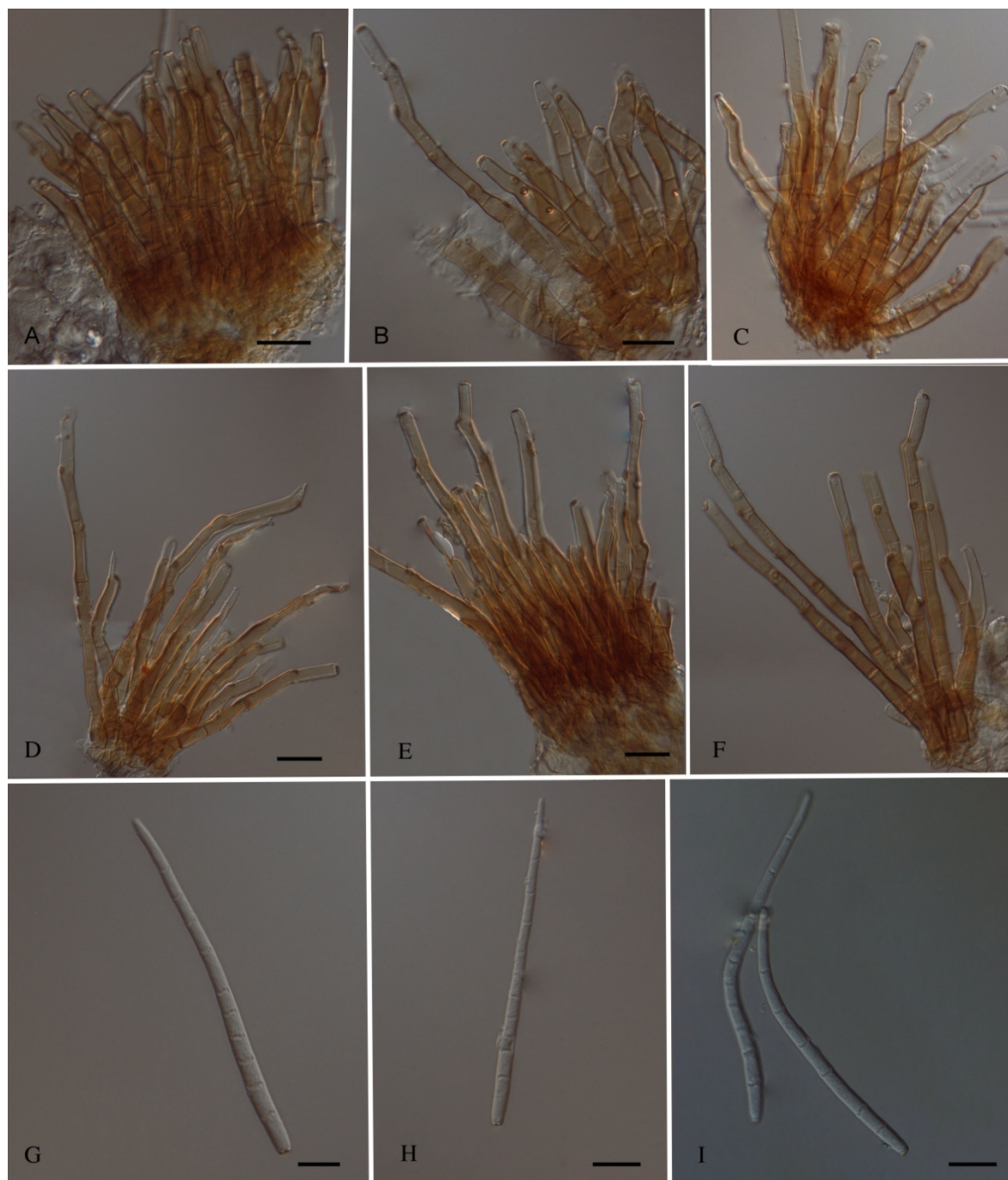
بحث

پژوهش حاضر در راستای شناسایی ریخت‌شناختی و مولکولی قارچ‌های مرتبط با لکه‌برگی سرکوسپورایی گیاهان زراعی مختلف در شمال کشور صورت گرفت. در بین گیاهان زراعی، گیاهان دانه روغنی سویا، کلزا و کنجد از گیاهان صنعتی مهم در دو استان گلستان و مازندران می‌باشند و طی بازدید از مزارع شهرستان‌های مختلف استان گلستان و مازندران، بیماری لکه‌برگی سرکوسپورایی روی گیاهان سویا، کلزا و کنجد مشاهده شد. به منظور بررسی و شناسایی دقیق عامل یا عوامل دخیل در بیماری لکه‌برگی سرکوسپورایی روی این گیاهان، مفهوم ترکیبی گونه (Quaedvlieg et al. 2014) با استفاده از ترکیب صفات ریخت‌شناختی و داده‌های توالی شش ناحیه ژنی ITS، *tefl*، *cmdA*، *his3*، *actA* و *gapdh* برای شناسایی جدایه‌های این پژوهش استفاده شد و مشخص شد که جدایه‌های به دست آمده، متعلق به گونه *C. cf. sigesbeckiae* می‌باشند.

گونه *C. cf. sigesbeckiae* شامل جدایه‌هایی است که از لحاظ ریخت‌شناختی شبیه به گونه *C. sigesbeckiae* Katsuki هستند، اما با توجه به اینکه توالی جدایه تیپ این گونه از روی میزبان اصلی آن *Sigesbeckia pubescens* (Makino) Makino از کشور ژاپن در

دسترس نیست، فعلاً توسط خرونوالد و همکاران (Groenewald et al. 2013)، با "cf." تحت نام *C. cf. sigesbeckiae* نامگذاری شده است. خرونوالد و همکاران در سال ۲۰۱۳ با استفاده از داده‌های توالی پنج ناحیه ژنی ITS، *tefl*، *cmdA*، *his3* و *actA* مشخص نمودند که این گونه روی میزبان‌های دیگر از قبیل سویا نیز فعالیت می‌نماید. جدایه‌های سرکوسپورای به دست آمده در این تحقیق از روی میزبان‌های سویا، کلزا و کنجد، با جدایه‌های گونه *C. cf. sigesbeckiae* در یک شاخه تکاملی قرار گرفتند. همچنین صفات ریخت‌شناختی این جدایه‌ها مشابه با گونه *C. sigesbeckiae* می‌باشد.

بر اساس تبارنامه‌های تک ژنی، در تبارنمای ژن *tefl* جدایه‌های گونه *C. cf. sigesbeckia* با جدایه‌های گونه‌های *C. iranica* M.، *Cercospora* spp. M,N,P,Q,T، Bakhshi, Arzanlou, Babai-ahari, Crous & U. Braun، *C. kikuchii* (T. Matsumoto & Tomoy.) M.W.، *C. cf. maloti*، *C. cf. richardiicola*، Gardner، *C. tezpurense* Meghvansi، و *C. rodmanii* Conway M.H. Khan & V. Veer در یک گروه قرار می‌گیرند و در تبارنمای ژن *actA*، این گونه از گونه *C. fagopyri* Nakata & S.Takim. قابل تفکیک نیست. در تبارنمای ژن *cmdA*، جدایه‌های گونه *C. cf. sigesbeckiae* با جدایه‌های گونه‌های *C. cf. sigesbeckiae*، *C. cf. richardiicola*، *C. kikuchii*، *C. cf. brunkii* و *C. cf. richardiicola* در یک گروه قرار می‌گیرند. در بیشتر تحقیقات مربوط به فیلوژنی جنس سرکوسپورا، توالی پنج ناحیه ژنی ITS، *tefl*، *cmdA*، *his3* و *actA* برای گونه‌های این جنس استفاده شده است و مشخص شده هیچ یک از این ژن‌ها



شکل ۵. گونه *Cercospora cf. sigesbeckiae*. A-F) دستجات کنیدیوم‌بر؛ G-I) کنیدیوم‌ها (مقیاس = ۱۰ میکرومتر).

Fig. 5. *Cercospora cf. sigesbeckiae*. A-F) Fasciculate conidiophores; G-I) conidia. — Scale bars = 10 μ m.

تفکیک گونه‌های جنس سرکوسپورا مطرح شده است (Bakhshi et al. 2018, Bakhshi 2019). بنابراین در تحقیق حاضر، تکثیر این ناحیه در گونه *C. cf. sigesbeckiae* برای اولین بار در دنیا صورت گرفت و

نمی‌تواند به عنوان بارکد مناسب عمل نماید و تمامی گونه‌ها را از هم تفکیک نماید (Groenewald et al. 2013, Bakhshi et al. 2015, Nganhom et al. 2016). اخیراً ناحیه ژنی *gapdh* نیز به عنوان ناحیه ژنی مهمی برای

اطلاعات توالی آن در بانک ژن قرار گرفت. در تبارنمای ژن *gapdh* نیز جدایه‌های این گونه با گونه *C. cf. richardiicola* در یک گروه قرار می‌گیرند. در تبارنمای تلفیقی شش ژن ITS, *tefl*, *cmdA*, *his3*, *actA* و *gapdh* جدایه‌های گونه *C. cf. sigesbeckiae* به صورت مجزا و به صورت گروه خاوه‌ری دو گونه *C. kikuchii* و *C. cf. richardiicola* گروه‌بندی می‌شوند. بنابراین ترکیبی از توالی‌های این چند ناحیه ژنی برای تفکیک گونه *C. cf. sigesbeckiae* از سایر گونه‌های جنس سرکوسپورا ضروری می‌باشد.

در بین آرایه‌های جنس سرکوسپورا تاکنون گونه‌های *C. flagellifera*, *C. canescens* Ellis & G. Martin, *C. glycinicola* R., *C. cf. flagellaris*, G.F. Atk., *C. Cheewangkoon*, P.W. Crous & U. Braun, *C. cf. sigesbeckiae*, *C. cf. nicotianae*, *kikuchii* Crous از روی سویا در دنیا گزارش شده‌اند (Crous & Barun 2003, Groenewald et al. 2013, Bakhshi et al. 2015, Nguanhom et al. 2016). در سال‌های اخیر با مطالعات گسترده روی لکه‌برگی سویا با استفاده از داده‌های توالی چند ژنی در نقاط مختلف دنیا، گونه *C. cf. sigesbeckiae* به عنوان یکی از عوامل مهم بیماری لکه-برگی سرکوسپورایی روی این گیاه شناخته شده است (Soares et al. 2015, Albu et al. 2016, Guillin et al. 2017). در ایران دو گونه *C. cf. flagellaris* و *C. kikuchii* از روی سویا گزارش شده‌اند (Ershad 2009, Bakhshi et al. 2015). در این تحقیق، گونه *C. cf. sigesbeckiae* روی سویا، برای اولین بار از ایران گزارش می‌شود.

در بین آرایه‌های جنس سرکوسپورا، تاکنون گونه‌های *C. sesamigena* J.M. Yen & C. *sesame* Zimm. Lim از روی کنجد در دنیا گزارش شده است (Crous &

Braun 2003, Groenewald et al. 2013). بخشی و همکاران (Bakhshi et al. 2015, 2018) با استفاده از ترکیب داده‌های ریخت‌شناختی و مولکولی از روی گیاه کنجد از دشت مغان استان اردبیل، گونه *C. gamsiana* M. Bakhshi & Crous را گزارش کرده‌اند. گزارش گونه *C. cf. sigesbeckiae* روی کنجد در این پژوهش، برای دنیا جدید می‌باشد. گونه *C. brassicicola* Henn. تنها گونه از جنس سرکوسپورا است که از روی کلزا در دنیا گزارش شده است (Crous & Braun 2003) و در ایران، گزارشی از جنس سرکوسپورا روی کلزا وجود ندارد (Ershad 2009, Ershad et al. 2018). بنابراین گزارش گونه *C. cf. sigesbeckiae* روی کلزا برای دنیا و ایران جدید می‌باشد.

در سال‌های اخیر مشخص شده است که در برخی گیاهان زراعی، چند گونه از جنس سرکوسپورا در بیماری لکه‌برگی سرکوسپورایی دخیل هستند (Bakhshi et al. 2015, 2018, Soares et al. 2015, Albu et al. 2016, Vaghefi et al. 2018). بخشی و همکاران تنوع گونه‌ای سرکوسپوراهای همراه با لکه‌برگی خربزه در استان گیلان را بررسی کردند و نتایج آنها نشان داد که دو گونه *Cercospora* sp. G و *Cercospora cf. flagellaris* همراه با لکه‌برگی سرکوسپورایی خربزه حضور دارند (Bakhshi et al. 2020). واقفی و همکاران (Vaghefi et al. 2018) تنوع گونه‌ای سرکوسپوراهای همراه با لکه‌برگی چغندرقد را بررسی کردند و علاوه بر گونه *C. beticola*، گونه‌های دیگری از قبیل *C. zebrina*، *C. apii*، *C. cf. flagellaris* و *Cercospora* sp. G نیز همراه با لکه‌برگی سرکوسپورایی چغندرقد شناسایی کردند. در گیاه سویا نیز داده‌های توالی DNA نشان دادند که چندین گونه از این جنس از جمله گونه *C. cf. sigesbeckiae* و *C. cf. flagellaris* همراه با لکه‌برگی سرکوسپورایی این گیاه

cf. sigesbeckiae روی گیاهان سویا، کنجد و کلزا انجام گیرد تا مشخص شود که آیا این گونه می‌تواند روی هر سه میزبان، به عنوان بیمارگر اولیه عمل نمایند. همچنین بررسی‌های تکمیلی در خصوص زیست‌شناسی و چرخه زندگی گونه *C. cf. sigesbeckiae* در آینده، می‌تواند اطلاعات ارزشمندی در زمینه ارائه راهکارهای مناسب مدیریت این بیماری فراهم آورد.

سپاسگزاری

نویسندگان از سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور و صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور به خاطر حمایت مالی این تحقیق تشکر می‌نمایند.

حضور دارند (Soares et al. 2015, Albu et al. 2016, Guillin et al. 2017, Bakhshi et al. 2018). در طی تحقیق حاضر، جدایه‌های به دست آمده از سه گیاه سویا، کنجد و کلزا از استان‌های گلستان و مازندران متعلق به گونه *C. cf. sigesbeckiae* بودند. با این حال ممکن است با مطالعه جدایه‌های بیشتر از نقاط دیگر روی این میزبان‌ها، گونه‌های دیگر نیز شناسایی شود. به عنوان مثال، بخشی و همکاران (Bakhshi et al. 2015, 2018) گونه *C. cf. flagellaris* را همراه با لکه‌برگی سرکوسپورایی گیاهان سویا از دشت مغان استان اردبیل با استفاده از داده‌های توالی چند ژنی شناسایی نمودند. در تحقیق حاضر، گونه *C. cf. sigesbeckiae* از روی گیاه کلزا و کنجد در مزارعی که در مجاورت گیاه سویا بودند، شناسایی شد. بنابراین در تحقیقات آتی نیاز است آزمون‌های بیماری‌زایی برای *C.*

منابع

- Ahmadi K., Ebadzadeh H., Abdeslah H., Kazemian A. and Rafae M. 2018. Statistics of agricultural products; crops. Ministry of Jihad-e-Agriculture, Tehran, Iran. (in Persian)
- Albu S., Schneider R., Price P. and Doyle V. 2016. *Cercospora cf. flagellaris* and *Cercospora cf. sigesbeckiae* are associated with *Cercospora* leaf blight and purple seed stain on soybean in North America. *Phytopathology* 106: 1376–85.
- Bakhshi M. 2018. Important criteria for identification of the *Cercospora* species. *Plant Pathology Science* 7 (1): 1–14.
- Bakhshi M. 2019. Epitypification of *Cercospora rautensis*, the causal agent of leaf spot disease on *Securigera varia*, and its first report from Iran. *Fungal Systematics and Evolution* 3: 157–163.
- Bakhshi M. and Arzanlou M. 2017. Multigene phylogeny reveals a new species and novel records and hosts in the genus *Ramularia* from Iran. *Mycological Progress* 16: 703–712.
- Bakhshi M., Arzanlou M. and Babai-Ahari A. 2011. Uneven distribution of mating type alleles in Iranian populations of *Cercospora beticola*, the causal agent of *Cercospora* leaf spot disease of sugar beet. *Phytopathologia Mediterranea* 50: 101–109.
- Bakhshi M., Arzanlou M. and Babai-Ahari A. 2012. Morphological and molecular characterization of *Cercospora zebrina* from black bindweed in Iran. *Plant Pathology and Quarantine* 2: 125–130.
- Bakhshi M., Arzanlou M., Babai-ahari A., Groenewald J.Z. and Crous P.W. 2018. Novel primers improve species delimitation in *Cercospora*. *IMA Fungus* 9(2): 299–332.
- Bakhshi M., Arzanlou M., Babai-ahari A., Groenewald J.Z., Braun U. and Crous P.W. 2015. Application of the consolidated species concept to *Cercospora* spp. from Iran. *Persoonia* 34: 65–86.
- Bakhshi M., Zare R., Arzanlou M. and Narmani A. 2020. Occurrence of *Cercospora* leaf spot disease on *Cucumis melo* in Guilan province and characterization of the casual agent(s) using molecular and morphological approaches. *Iranian Journal of Plant Pathology* 56(1): 17–31. (in Persian)
- Carbone I. and Kohn L.M. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous

- ascomycetes. *Mycologia* 91: 553–556.
- Crous P.W. and Braun U. 2003. *Mycosphaerella* and its anamorphs: 1. Names published in *Cercospora* and *Passalora*. CBS Biodiversity Series 1: 1–571.
- Crous P.W., Groenewald J.Z., Groenewald M., Caldwell P., Braun U. and Harrington T.C. 2006. Species of *Cercospora* associated with grey leaf spot of maize. *Studies in Mycology* 55: 189–197.
- Crous P.W., Groenewald J.Z., Mansilla J.P., Hunter G.C. and Wingfield M.J. 2004. Phylogenetic reassessment of *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs occurring on *Eucalyptus*. *Studies in Mycology* 50: 195–214.
- de Hoog G.S. and Gerrits van den Ende A.H.G. 1998. Molecular diagnostics of clinical strains of filamentous Basidiomycetes. *Mycoses* 41: 183–189.
- Duangsong U., Laosatit K., Somta P. and Srinives P. 2018. Genetics of resistance to *Cercospora* leaf spot disease caused by *Cercospora canescens* and *Pseudocercospora cruenta* in yardlong bean (*Vigna unguiculata* ssp. *sesquipedalis*) x grain cowpea (*V. unguiculata* ssp. *unguiculata*) populations. *Journal of Genetics* 97: 1451–1456.
- Ershad D. 2009. Fungi of Iran. Ministry of Jihad-e-Agriculture. Agricultural Research, Education and Extension Organization, Tehran, Iran.
- Ershad D., Asef M.R., Bakhshi M., Javadi A., Zangeneh S., Asgari B., Aliabadi F. and Mehrabi M. 2018. Genera of Fungi and Fungal Analogues of Iran. Ministry of Jihad-e-Agriculture. Agricultural Research, Education and Extension Organization, Tehran, Iran. (in Persian)
- Groenewald J.Z., Nakashima C., Nishikawa J., Shin H.-D., Park J.H., Jama A.N., Groenewald M., Braun U. and Crous P.W. 2013. Species concepts in *Cercospora*: spotting the weeds among the roses. *Studies in Mycology* 75: 115–170.
- Groenewald M., Groenewald J.Z., Braun U. and Crous P.W. 2006. Host range of *Cercospora apii* and *C. beticola* and description of *C. apiicola*, a novel species from celery. *Mycologia* 98: 275–285.
- Guillin E.A., de Oliveira L.O., Grijalba P.E., Gottlieb A.M. 2017. Genetic entanglement between *Cercospora* species associating soybean purple seed stain. *Mycological Progress* 16: 593–603.
- Katoh K. and Standley D.M. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* 30: 772–780.
- Kimber R.B.E. and Paull J.G. 2011. Identification and genetics of resistance to cercospora leaf spot (*Cercospora zonata*) in faba bean (*Vicia faba*). *Euphytica* 177: 419–429.
- Maddison W.P. and Maddison D.R. 2011. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.75. <http://mesquiteproject.org>.
- Möller E., Bahnweg G., Sandermann H. and Geiger H.H. 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acids Research* 20: 6115–6116.
- Myllys L., Stenroos S. and Thell A. 2002. New genes for phylogenetic studies of lichenized fungi: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-tubulin genes. *Lichenologist* 34: 237–246.
- Nguanhom J., Cheewangkoon R., Groenewald J.Z., Braun U., To-Anun C. and Crous P.W. 2016. Taxonomy and phylogeny of *Cercospora* spp. from Northern Thailand. *Phytotaxa* 233: 27–48.
- Nylander J.A.A. 2004. MrModeltest. Version 2.0. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, Uppsala, Sweden.
- Quaedvlieg W., Binder M., Groenewald J.Z., Summerell B.A., Carnegie A.J., Burgess T.I. and Crous P.W. 2014. Introducing the consolidated species concept to resolve species in the Teratosphaeriaceae. *Persoonia* 33: 1–40.
- Ronquist F., Teslenko M., Van der Mark P., Ayres D.L., Darling A., Höhna S., Larget B., Liu L., Suchard M.A. and Huelsenbeck J.P. 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61: 539–542.
- Soares A.P.G., Guillin E.A., Borges L.L., Da Silva A.C., De Almeida Á.M., Grijalba P.E., Gottlieb A.M., Bluhm B.H. and De Oliveira L.O. 2015. More *Cercospora* species infect soybeans across the Americas than meets the eye. *PloS One* 10: e0133495.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipowski A. and Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725–2729.
- Vaghefi N., Kikkert J.R., Hay F.S., Carver G.D., Koenick L.B., Bolton M.D., Hanson L.E., Secor G.A. and

- Pethybridge S.J. 2018. Cryptic diversity, pathogenicity, and evolutionary species boundaries in *Cercospora* populations associated with Cercospora leaf spot of *Beta vulgaris*. Fungal Biology 122(4): 264–282.
- Weiland J., Eide J., Rivera-Varas V. and Secor G. 2001. Genetic diversity of *Cercospora beticola* in the US and association of molecular markers with tolerance to the fungicide triphenyltin hydroxide. Phytopathology 91: 94.
- White T.J., Bruns T. and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., et al. (eds), A guide to molecular methods and applications: 315–322. Academic Press, New York.