مطالعه‌ی ریخت‌شناختی و مولکولی قارچهای جدا شده ازطوقه، غده و ریشه‌ی سیب زمینی در استان کردستان

ثریا سپهرنوش[۱]، جهانشیر امینی[۲*] و جعفر عبدالله زاده[۲]

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان.
۲- دانشیاران گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان.
* مسئول مکاتبه: jamini@uok.ac.ir
تاریخ دریافت: ۹۵/۱۱/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۷/۶/۱۳

چکیده

سیب‌زمینی یکی از محصولات مهم زراعی در استان کردستان است. عوامل قارچی زیادی موجب پوسیدگی غده، طوقه و ریشه درگیاه سیب‌زمینی می‌شوند. هدف از اجرای این تحقیق شناسایی عوامل قارچی مرتبط با پوسیدگی غده، طوقه و ریشه سیب‌زمینی در شهرستانهای قروه و دهگلان بود. به منظور انجام این کار در تابستان ۱۳۹۲ نمونه‌برداری از بخش‌های زیرزمینی گیاهان سیب زمینی مشکوک به آلودگی در مراحل مختلف رشدی گیاه از زمان کاشت غده‌ها تا برداشت محصول سیب‌زمینی از مزارع مختلف انجام گردید. نمونه‌ها پس از شستشو در زیر جریان ملایم آب به قطعات ۰/۵ تا ۱ سانتی‌متری تقسیم و پس از ضدعفونی سطحی بر روی محیط کشت عمومی و یا انتخابی کشت شدند. در مجموع، ۱۵۱ جدایه قارچی از غده، طوقه و ریشه گیاهان بیمار سیب‌زمینی جداسازی و با استفاده از روش تک اسپور یا نوک هیف خالص سازی گردید. شناسایی جدایه‌های قارچ بر اساس خصوصیات ریخت‌شناختی و آنالیز توالی نواحی ITS، RPB2 و TEF انجام گردید. جدایه‌های مورد بررسی متعلق به چهار جنس و ۱۰ گونه شامل *Alternaria arborescens*، *A. alternata*، *A. atra*، *A. embellisia*، *Colletotrichum coccodes*، *Fusarium equiseti*، *F. redolens*، *F. tricinctum*، *Neocosmospora haematococca* و *N. rubicola* بودند. بیشترین فراوانی جدایه‌ها مربوط به جنس فوزاریوم با ۹۳ جدایه بود.

واژه‌های کلیدی: آلترناریا، سیب زمینی، RPB2، ITS، TEF.

مقدمه

بیمارگرهای قارچی مختلفی در گیاه سیب‌زمینی خسارت ایجاد می‌کنند و باعث کاهش عملکرد و کیفیت محصول آن می‌شوند. این بیمارگرها می‌توانند کلیه‌ی اندام‌های سیب‌زمینی را در طول دوره رشد سیب‌زمینی مورد حمله قرار دهند و موجب بروز علائمی همچون شانکر و پوسیدگی شوند. تحقیقات متعددی در رابطه با شناسایی قارچ‌های مرتبط با غده و ریشه‌ی سیب‌زمینی در جهان و ایران انجام گرفته است. صارمی (۱۳۶۷) گونه‌هایی از جنس‌های *Alternaria*، *Rhizoctonia*، *Fusarium*، *Verticillium*، *Ulocladium*، *Penicillium*، *Aspergillus*، *Rhizopus*، *Cylindrocarpon*، *Phoma*، *Trichoderma*، *Pythium* و *Colletotrichum* را از غده سیب زمینی در کرج و دماوند جداسازی و شناسایی کرد. گونه‌های *Fusarium oxysporoum*، *F. solani*، *Alternaria alternata*، *Verticillium dahliae*، *Colletotrichum coccodes* و *Rhizoctonia solani* از غده های سیب زمینی در سمنان جداسازی وشناسایی گردیدند (امتی و کریمی ۱۳۸۱). در ایران گونه های مختلفی از جنس آلترناریا از قسمت‌های هوایی، ریشه و غده‌ی سیب زمینی جداسازی شده‌اند (طاهری اردستانی و همکاران ۲۰۰۸، حاجی پور جارچلو و همکاران ۱۳۹۱). گونه *Alternaria cantlous* برای اولین بار در جهان از غده

و ریشه‌ی سیب‌زمینی مزارع شهرستان قروه شناسایی گردید (امینی و همکاران ۲۰۱۶). قارچ *Colletotrichum coccodes* که اسکلرت‌های سیاه رنگ آن مشخص بود از ریشه‌ی زخمی سیب‌زمینی گردید (موهان و همکاران ۱۹۹۲، دیلارد ۱۹۹۲).

گونه‌های مختلفی از جنس *Fusarium* در ایران از ریشه، طوقه و غده سیب‌زمینی شامل *F. sulphurum*، *F. oxysporum*، *F. solani*، *F. avenaceum*، *F. sporotrichioides*، *F. sambucinum*، *F. culmorum*، *F. vertiicillioides*، *F. acuminatum*، *F. compactum*، *F. equiseti*، *F. graminearum*، *F. lateritium*، *F. reticulatum*، *F. monilliforme*، *F. chlamydosporium*، *F. semitectum* و *F. proliferatum* جداسازی شده‌اند (صارمی ۱۳۶۷، زارع و ارشاد ۱۳۷۶، مستوفی‌زاده قلمفرسا و بنی‌هاشم ۱۳۷۷، مرتضوی‌بک و شهسواری ۱۳۸۱، راه خدایی و فرخی‌نژاد ۱۳۸۳). همچنین در تحقیقی که جهت شناسایی و بیماریزایی گونه‌های فوزاریوم جدا شده از ریشه و طوقه سیب‌زمینی در استان گرگان انجام گرفته است، گونه‌های *F. croockwellnse*، *F. oxysporum*، *F. solani*، *F. monilliforme* و *F. equiseti* به عنوان گونه‌های بیماری‌زا شناسایی شدند (لتانی و همکاران ۱۳۸۵). این تحقیق به منظور شناسایی قارچ‌های مرتبط با شانکر و پوسیدگی غده، طوقه و ریشه سیب-زمینی در شهرستانهای قروه و دهگلان استان کردستان انجام شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

طی ماه‌های تابستان و پاییز ۱۳۹۲ از مزارع سیب‌زمینی مناطق مختلف شهرستان‌های قروه و دهگلان از اندام‌های زیرزمینی بوته‌های مشکوک به علائم قارچی نمونه‌برداری انجام شد. نمونه‌ها با ذکر محل و تاریخ جمع‌آوری در پاکت‌های جداگانه قرار گرفتند و به آزمایشگاه بیماری‌شناسی گیاهی دانشگاه کردستان منتقل شدند.

جداسازی و خالص سازی

نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه، زیر بینوکولر مورد بررسی قرار گرفتند. در صورت مشاهده اندام‌های قارچی، از این اندام‌ها، سوسپانسیون اسپور روی لام تمیز با آب مقطر سترون تهیه و با یک لوپ استریل اقدام به انتقال سوسپانسیون اسپور روی محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار[1](PDA) (۳۹ گرم در یک لیتر آب مقطر) حاوی آنتی‌بیوتیک آموکسی سیلین (۵۰۰ میلی گرم در یک لیتر)، محیط کشت سیب زمینی-هوی[2]ج- آگار (PCA) و محیط کشت آب- آگار[3](WA) شد. بعد از نگهداری نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس تک اسپورهای جوانه‌زده به تشتک‌های دیگر حاوی محیط کشت PDA منتقل و کشت‌های خالص تهیه گردید. در صورت عدم مشاهده اندام قارچی درمورد نمونه‌های دارای علائم شانکر و پوسیدگی، قطعات ۰/۵ تا یک سانتی-متری از بافت‌های آلوده به صورت مستقیم روی محیط کشت قرار داده شدند. قطعات مورد نظر به مدت سه تا چهار دقیقه در الکل ۷۰٪ ضدعفونی و بعد از سه بار شستشو با آب مقطر سترون و آبگیری توسط کاغذ صافی سترون به محیط کشت حاوی PDA منتقل و در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند. خالص سازی قارچ‌های بدست آمده از بافت، به روش نوک ریسه یا تک اسپور انجام شد. جهت حفظ و نگهداری جدایه‌های خالص بدست آمده، از هر کدام سه میکروتیوب تهیه و در دمای چهار درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند.

بررسی ویژگیهای ریخت‌شناختی

جهت بررسی خصوصیات ریخت‌شناختی جدایه‌های خالص شده، از پرگنه‌های جوان و در حال رشد دیسک-هایی به قطر پنج میلی‌متر برداشته و با توجه به نوع قارچ، به تشتک‌های حاوی محیط کشت PDA ، PCA و WA در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس منتقل شدند. به منظور تحریک

[1]Potato Dextrose Agar
[2]Potato Carrot Agar
[3]Water Agar

اسپورزایی برخی از جدایه‌ها به تشتک‌های حاوی محیط کشت آب- آگار دو درصد منتقل و در شرایط نور- تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت زیر ترکیبی از نور ماورا بنفش و فلورسنت در دمای ۲۰ تا ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای شناسایی ریخت‌شناختی جدایه‌های به دست آمده ویژگی‌های مختلفی مانند نحوه‌ی رشد و رنگ پرگنه، سرعت رشد پرگنه در دماهای مختلف، شکل، رنگ و تعداد سلول کنیدیوم‌ها، نحوه‌ی کنیدیزایی و ریخت شناسی کنیدیوفور و سلول کنیدیوم‌زا مورد مطالعه قرار گرفتند. جهت بررسی خصوصیات میکروسکوپی از حاشیه‌ی پرگنه‌های جوان و در حال رشد قارچ، اسلایدهای مناسب با استفاده از اسید لاکتیک تهیه و مورد بررسی قرار گرفتند. عکس برداری از ساختارهای قارچی به وسیله‌ی میکروسکوپ Olympus مدلBX51 صورت گرفت و اندازه گیری‌ها به وسیله نرم افزار Cell Sense Entry انجام شد. سرانجام با کمک منابع و متون مهم قارچ‌شناسی از جمله کلید شناسایی قارچ‌های مختلف مانند جنس *Alternaria* (سیمونز ۲۰۰۷)، *Fusarium* (نلسون و همکاران ۱۹۸۳، لزلی و سامرل ۲۰۰۶) و مقالات جدید شناسایی قارچ‌ها انجام شد. جهت تایید شناسایی ریخت‌شناسی، تشخیص مولکولی جدایه‌ها بر اساس روش‌های موجود در منابع انجام گردید.

استخراج DNA ژنومی

به منظور تهیه‌ی میسلیوم جهت استخراج DNA جدایه‌ها درون ارلن‌های ۱۰۰ میلی لیتری حاوی ۵۰ سی‌سی محیط کشت مایع سیب زمینی- دکستروز (PDB)[1] کشت شدند و به مدت ۱۲-۷ روز در دمای اتاق و در صورت لزوم روی دستگاه شیکر با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه نگهداری شدند. جمع‌آوری میسلیوم با ریختن محتویات هر یک از ارلن‌ها روی یک قیف حاوی کاغذ صافی سترون و متصل به پمپ خلا انجام شد. توده‌های میسلیومی به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی لیتری سترون منتقل و تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. استخراج DNA ژنومی بر اساس روش ریدر و برودا (۱۹۸۵) با اندکی تغییر انجام گردید. جهت تعیین کیفیت و کمیت DNA استخراجی دو میکرولیتر DNA در ژل آگارز یک درصد بارگذاری و بررسی شد.

شناسایی مولکولی

برای شناسایی مولکولی جدایه‌های آلترناریا بخشی از ژن RPB2)[2]) انتخاب و توالی آن با استفاده از آغازگرهای 5F2 (GGGGWGAYCAGAAGAAGGC) و 7cR (CCCATRGCTTGYTTRCCCAT) تکثیر و قطعات DNA به طول ۹۵۰ جفت باز بدست آمد. واکنش PCR باحجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد (ودنبرگ و همکاران ۲۰۱۳). برای شناسایی جدایه‌های *Fusarium* و *Colletotrichum* از تکثیر ژن ناحیه ITS[3] با استفاده از آغازگرهای ITS1(TCCGTAGGTGAACCTGCGG) و ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) بر اساس روش وایت و همکاران (۱۹۹۰) و TEF[4] با استفاده از آغازگرهای EF1(ATGGGTAAGGAR(C/G)GACAAGAC) وEF2(GGARGTACCAGTS(T/A)ATCATG بر اساس روش اودونل و همکاران (۱۹۹۸) انجام گردید. بعد از پایان واکنش محصولات PCR در ژل آگارز یک درصد و بافر 1XTAE در الکتروفورز بارگذاری شدند. الکتروفورز به مدت ۴۵ دقیقه در جریان ثابت ۸۰ یا ۸۵ ولت انجام شد. پس از انجام الکتروفورز ، ژل‌ها توسط اتیدیوم بروماید به مدت پنج دقیقه رنگ‌آمیزی شدند و سپس توسط دستگاه Transilluminator White/ Ultraviolet مدل uvitek مشاهده و تصویربرداری شدند. برای تخمین اندازه‌ی قطعات DNA تکثیر شده از نشانگر وزنی GeneRuler™ استفاده شد.

سرانجام محصولات حاصل از PCR جهت توالی‌یابی به شرکت بایونیر کره جنوبی ارسال شدند. توالی‌های بدست آمده به همراه توالی‌های اخذ شده از بانک ژن (NCBI) با

[1] Potato Dextrose broth

[2] RNA Polymerase Second Largest Subunit
[3] Internal Transcribed Spacer
[4] Translation Elongation Factor

استفاده از نرم افزارهای ClustalX v. 1.83 هم‌ردیف شدند (تومپسون و همکاران ۱۹۹۷). آنالیزهای فیلوژنتیکی به روش NJ[1] و MP[2] به وسیله نرم افزار PAUP v. 4.0b10 انجام گردید (سوافورد ۲۰۰۳). درخت‌های حاصل از آنالیزهای فیلوژنتیکی به وسیله نرم‌افزار TreeView مشاهده شدند.

نتایج و بحث

در این تحقیق تعداد ۲۴ جدایه متعلق به جنس *Alternaria*، هشت جدایه متعلق به جنس *Colletotrichum*، ۹۳ جدایه متعلق به جنس *Fusarium* و۲۶ جدایه متعلق به جنس *Neocosmospora* جداسازی شده و بر اساس مشخصات ریخت شناسی و مولکولی بشرح زیر شناسایی گردیدند.

همچنین با توجه به اینکه گونه های شناسایی شده در این تحقیق قبلا توسط سایر پژوهشگران گزارش و توصیف شده از ذکر ویژگی‌های ریخت شناختی اجتناب و تنها تصاویر مربوط به مشخصات میکروسکوپی همراه با شناسایی مولکولی در این مقاله ارایه می‌شود. در جدول ۱ مشخصات جدایه های انتخاب شده جهت مطالعه مولکولی آورده شده است.

فیلوژنی

گونه های *Alternaria*

بر اساس نتایج حاصل از داده‌های ریخت شناختی، چهار جدایه از مجموع ۲۴ جدایه متعلق به جنس *Alternaria* برای مطالعات فیلوژنتیکی انتخاب شدند. جدایه‌های انتخاب شده بر اساس شکل پرگنه قارچ و شکل و اندازه کنیدی و کنیدیوفور برای مطالعات فیلوژنتیکی انتخاب شدند. توالی های مربوط به ژن RPB2 تعداد ۴۱ جدایه نماینده ۴۱ گونه از جنس *Alternaria* (*Pleosporaceae*) به توالی های چهار جدایه مطالعه شده در این تحقیق اضافه و هم‌ردیف شدند. بخش‌های ابتدایی و انتهایی که در بعضی توالی‌ها وجود نداشتند از آنالیزها حذف شدند. تعداد کل خصوصیت‌های استفاده شده در آنالیزهای فیلوژنتیکی به علاوه گپ‌ها ۱۱۵۳ عدد بود و گپ‌ها به عنوان missing در نظر گرفته شدند. آنالیزها با روش NJ انجام شد. دو جدایه متعلق به گونه‌های *Pleospora tarda* و *Pleospora herbarum* به عنوان outgroup و ۳۹ جدایه به عنوان ingroup و با وزن یکسان در نظر گرفته شدند. بر اساس نتایج حاصله جدایه S38 در کنار *Alternaria arborescens*، جدایه S18 در کنار *A. alternata*، جدایه S43 در کنار *A. atra* و جدایه S120 درکنار *A. embellisia* قرار گرفتند (شکل ۱).

مشخصات ریخت شناختی گونه‌های *Alternaria* بر اساس ویژگی‌هایی از قبیل رنگ و شکل پرگنه قارچ روی محیط‌های غذایی PDA و PCA، اندازه و سرعت رشد روی این محیط های غذایی، مشخصات میسلیوم، کنیدیوفور و کنیدی، ابعاد آنها بر حسب میکرومتر، دیواره عرضی و طول کنیدیوم‌ها مطالعه و بررسی گردید. مشخصات گونه های شناسایی شده زیر با منبع سیمونز (۲۰۰۷) مطابقت داشت.

Alternaria alternata (Fr.) Keissler., Beih. Bot. Centralbl., Abt. 2, 29:434. 1912

مشخصات این گونه به عنوان گونه تیپ در جنس آلترناریا در شکل ۲ نشان داده شده است. و مترادف آن *A. tenuis* است (نیس ۱۸۱۶). بر اساس مشخصات ریخت شناسی، جدایه مورد مطالعه (S18) و بر اساس منبع سیمونز (۲۰۰۷) به عنوان *A. alternate* در نظر گرفته شد. نتیجه اینکه مشخصات ریخت شناسی و مولکولی جدایه S18 براساس (هر دو با هم) با گونه *Alternaria alternata* مطابقت داشت.

جدایه‌های این گونه از مزارع حاجی آباد، ناظم آباد، دزج، وینسار، حسن آباد، قروچای و کامشگران استان کردستان جداسازی شدند. این گونه به عنوان عامل بیماری روی گیاهان مختلف از جمله پیاز، یولاف، فلفل، چغندرقند، آفتابگردان، گندم، بادام زمینی، سیب زمینی و بسیاری از

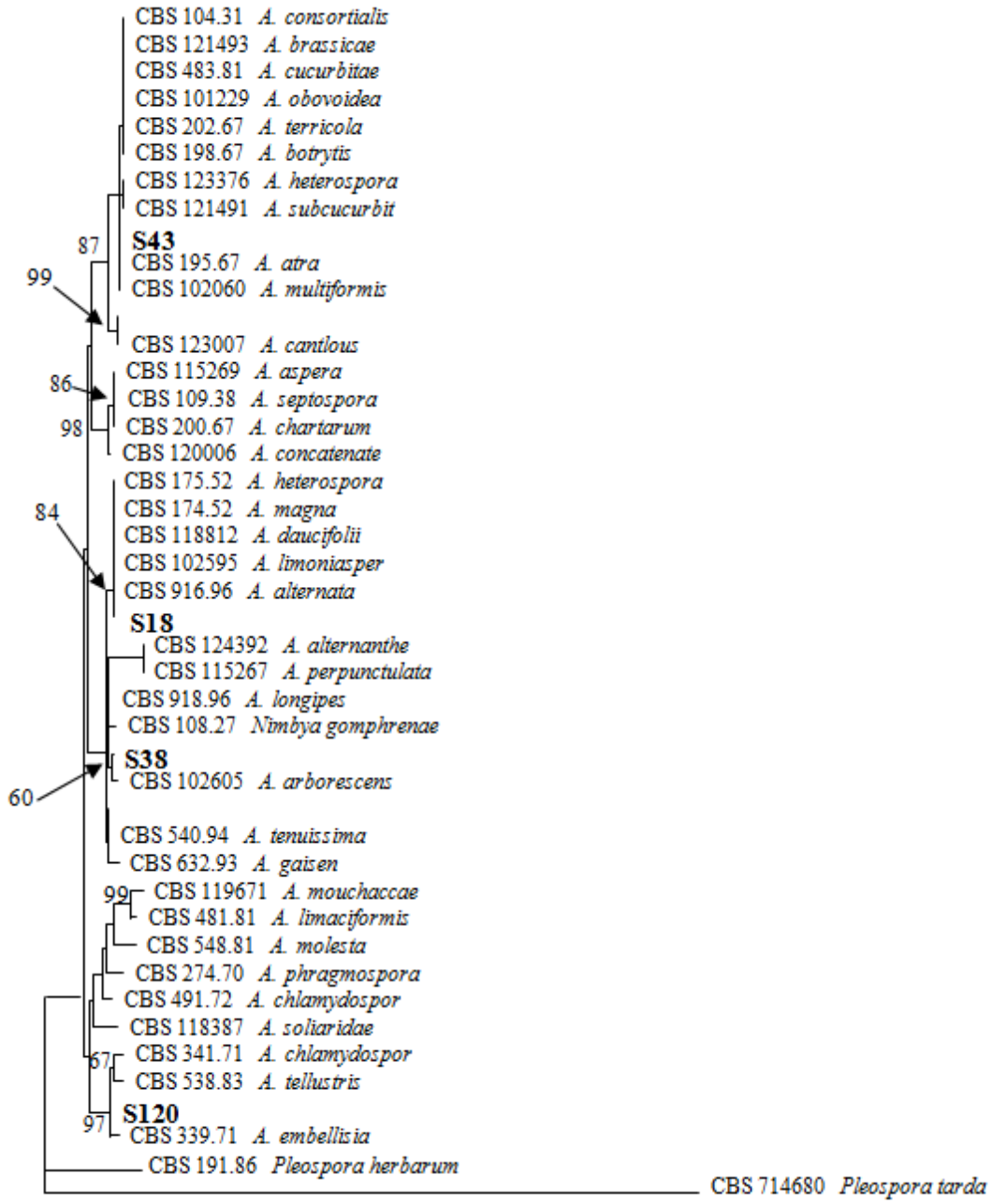
[1] Neighbour-joining
[2] Maximum Parsimony

گیاهان گزارش شده است (ارشاد ۱۳۸۸، حاجی‌پور جارچلو و همکاران ۱۳۹۱، باقرآبادی ۱۳۹۲، طاهری اردستانی ۲۰۰۸). این قارچ به عنوان یک بیمارگر ضعیف در گیاه سیب‌زمینی محسوب می‌شود و لکه‌های سیاه روی آن ایجاد می‌نماید (هوکر ۲۰۰۰). این گونه توسط قوستا در سال ۲۰۰۴ از گیاهان فلفل، سیب زمینی، نعناع، کدو جداسازی گردیده است. علاوه بر این، این قارچ روی گیاهان بید، هلو، خیار، رز، ترشک، کاهو، تاج خروس، تلخه، آلو، ازمک، ختمی، گندم جمع آوری و شناسایی شده است (شیما باقرآبادی و همکاران ۱۳۹۴).

شکل ۲- گونه *Alternaria alternata*: الف) پرگنه روی PDA، ب) کنیدیوفور، ج و د) چگونگی قرارگیری کنیدیوم‌ها روی کنیدیوفور، ه و و) کنیدیوم‌ها. مقیاس‌ها =۲۰ میکرومتر.

جدول ۱- مشخصات جدایه های انتخاب شده جهت مطالعات مولکولی با استفاده از آنالیز توالی نواحی ITS، RPB2 و TEF

جدایه ها	نتیجه تحقیق بلاست	درصد مشابهت	طول باند	کد جدایه‌ها در بانک ژن
Isolates	**Blast research results**	**Identity %**	**Length (bp)**	**GenBank accession number**
S43	***Alternaria atra***	**99**	**619**	**MH345694**
S18	***Alternaria alternata***	**84**	**887**	**MH345692**
S38	***Alternaria arborescens***	**60**	**890**	**MH345693**
S120	***Alternaria embellisia***	**97**	**551**	**MH345695**
S161	***Neocosmospora rubicola***	**93**	**473**	**MH281953**
S10	***Fusarium equiseti***	**95**	**472**	**MH282461**
S24	***Fusarium equiseti***	**95**	**474**	**MH281955**
S135	***Fusarium redolens***	**98**	**442**	**MH282576**
S149	***Fusarium tricinctum***	**82**	**479**	**MH281946**
S67	***Neocosmospora haematococca***	**85**	**472**	**MH281941**
S108	***Colletotricum coccodes***	**100**	**542**	**MH281956**

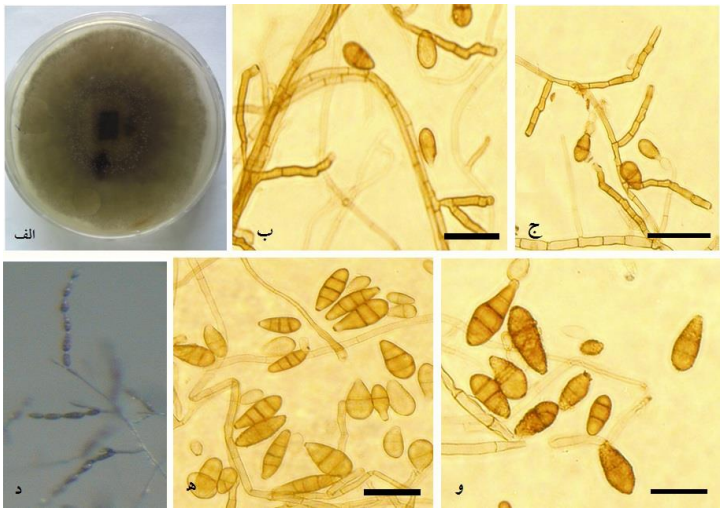


شکل ۱- درخت حاصل از آنالیز داده‌های توالی بخشی از ژن **RPB2** متعلق به جنس ***Alternaria*** مقادیر **bootstrap support** مربوط به آنالیز **NJ** روی شاخه‌ها نشان داده شده است. از دو گونه ***Pleospora herbarum*** و ***Pleospora tarda*** به عنوان **outgroup** استفاده شده است.

***Alternaria arborescens* E.G. Simmons, Mycotaxon 70:356. 1999**

مشخصات این گونه در شکل ۳ نشان داده شده است. این جدایه‌ها از مزارع قروچای، تازه آباد، دیوزند، حاجی آباد و حسن آباد جداسازی شدند. گونه *A. arborescens* از میزبان‌هایی مانند گل گندم خاردار، انگور، افرا، بلوط، نارون به عنوان قارچ اندوفیت در دنیا گزارش شده است (سان و همکاران ۲۰۱۳، قادری و همکاران ۲۰۱۳). در ایران

نیز این گونه از روی سیب‌زمینی، گردو، یونجه، پنبه، بادمجان، خربزه، بادام‌زمینی، گوجه‌فرنگی، مرکبات، زردآلو و فندق جداسازی و شناسایی شده است (ارشاد ۱۳۸۸، طاهری اردستانی و همکاران ۲۰۰۸، حاجی‌پور جارچلو و همکاران ۱۳۹۱ و هاشم لو و همکاران ۱۳۹۴).

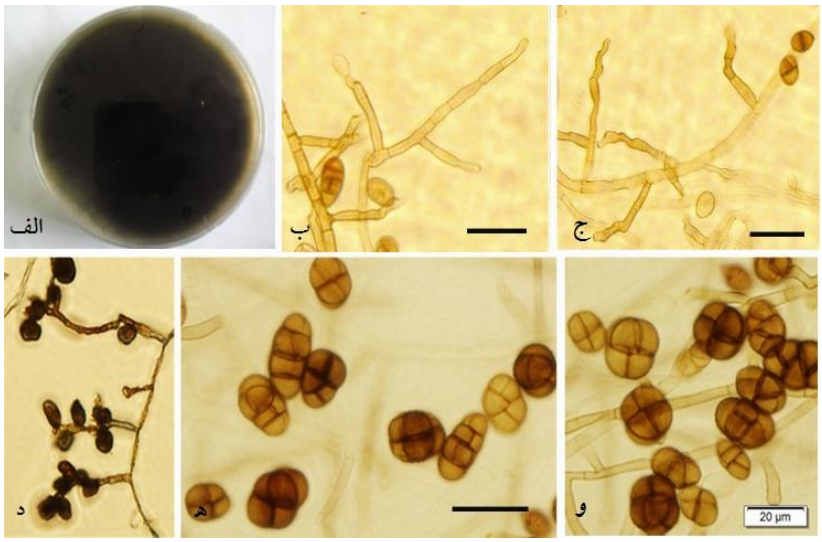


شکل ۳- گونه ***Alternaria arborescens***: الف) پرگنه روی **PDA**، ب و ج) کنیدیوفور، د) چگونگی قرارگیری کنیدیوم‌ها بر روی کنیدیوفور، ه و و) کنیدیوم‌ها. مقیاس‌ها = ۲۰ میکرومتر.

***Alternaria atra* (Preuss) Woudenberg. & Crous, Stud. Mycol. 75(1): 204. 2013**

مشخصات این گونه در شکل ۴ نشان داده شده است. جدایه‌های این گونه از مزارع قروچای، کامشگران، کروندان و حاجی آباد جداسازی شدند. بر اساس مشخصات ریخت شناسی جدایه مورد مطالعه (S43) بر اساس منبع Simmons 2007 به عنوان *A. atra* در نظر گرفته شد. نتیجه اینکه مشخصات ریخت شناسی و مولکولی جدایه S43 (هر دو با هم) با گونه *A. atra* مطابقت داشت.

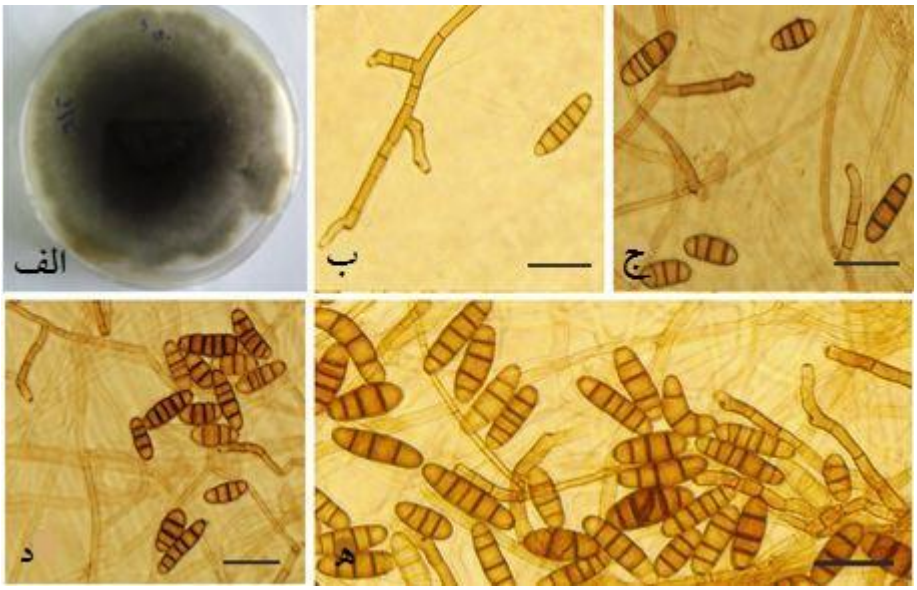
در سطح جهانی این گونه از گیاهانی مانند سیر، نخود، عدس، خیار و گندم گزارش شده است (ودنبرگ و همکاران ۲۰۱۳). این قارچ در کنترل زیستی قارچ *Botrytis cinerea* در گیاهان انگور، کیوی، پیاز و توت فرنگی و قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* در گیاهان لوبیا، کلزا و یونجه و بیماری ناشی از *Melampsora* در صنوبر موثر است (بوف و همکاران ۲۰۰۲، هانگ و ارکون ۲۰۰۷، راگاوندرا و نیوکامب ۲۰۱۳). در ایران نیز از سیب‌زمینی (صارمی ۱۳۶۷)، جو و پسته (ارشاد ۱۳۸۸)، زردآلو ودرختان میوه هسته‌دار (هاشم‌لو و همکاران ۱۳۹۴) گزارش شده است. گونه *A. atra* قبلا در جنس *Ulocladium* و به‌نام *atrum Ulocladium* شناخته می‌شد که مطالعات مولکولی بر مبنای استفاده از چندین ژن نشان داد که جنس *Ulocladium* مترادف با جنس *Alternaria* است و لذا نام گونه به نام *Alternaria atra* تغییر یافت (ودنبرگ و همکاران ۲۰۱۳).



شکل ۴- گونه *Alternaria atra*: الف) پرگنه روی PDA، ب و ج) کنیدیوفور، د) چگونگی قرارگیری کنیدیوم‌ها بر روی کنیدیوفور، ه و و) کنیدیوم‌ها. مقیاس‌ها = ۲۰ میکرومتر.

***Alternaria embellisia* Woudenberg & Crous, Stud. Mycol. 75(1):191. 2013**

مشخصات این گونه در شکل ۵ نشان داده شده است. جدایه های این گونه از مزارع دلبران، حاجی آباد، حسن آباد و کاظم آباد جداسازی شدند. در ایران این گونه از گیاه سیر جداسازی شده است (باقرآبادی و همکاران ۱۳۹۴، ظفری و مهدی زاده نراقی ۲۰۰۸).

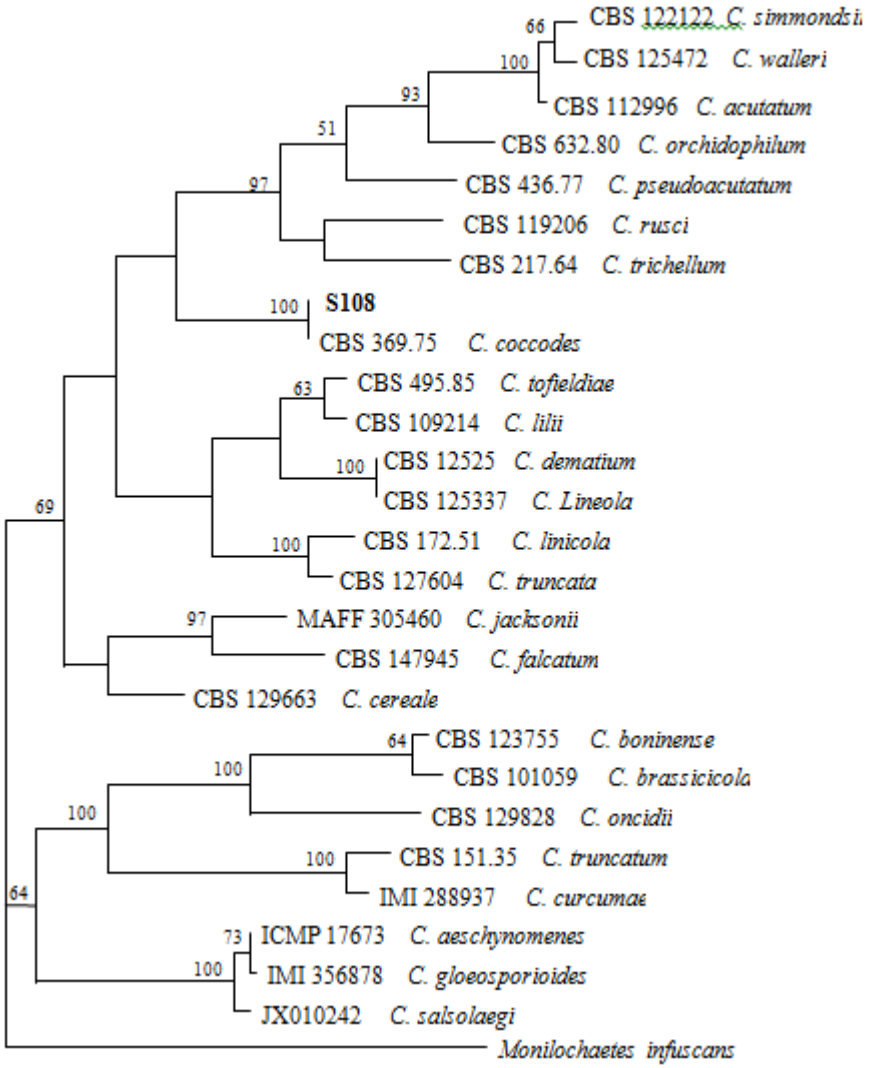


شکل ۵- گونه ***Alternaria embellisia***: الف) پرگنه قارچ روی محیط کشت **PDA**، ب و ج) کنیدیوفور، د و ه) کنیدیوم‌ها. مقیاس‌ها = ۲۰ میکرومتر.

فیلوژنی *Colletotrichum coccodes*

بر اساس نتایج حاصل از داده‌های ریخت‌شناسی یک جدایه از مجموع هشت جدایه متعلق به جنس *Colletotrichum* برای مطالعات فیلوژنتیکی انتخاب شد. توالی‌های مربوط به ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 تعداد ۲۵ جدایه نماینده ۲۵ گونه از این جنس و تیره *Glomerellaceae* به

توالی جدایه مورد مطالعه شده در این تحقیق اضافه و هم‌ردیف شدند. بخش‌های ابتدایی و انتهایی که در برخی از توالی‌ها وجود نداشتند از آنالیزها حذف شدند. تعداد کل کاراکترهای استفاده شده در آنالیزهای فیلوژنتیکی به علاوه گپ ها ۶۳۶ عدد بود و گپ‌ها به عنوان کاراکتر پنجم در نظر گرفته شدند. آنالیزها با روش Maximum Parsimony (MP) انجام شد. گونه *Monilochaetes infuscans* به عنوان outgroup و ۲۶ جدایه به عنوان ingroup استفاده شدند و جدایه S۱۰۸ کنار گونه *C. coccodes* قرار گرفت (شکل ۶).



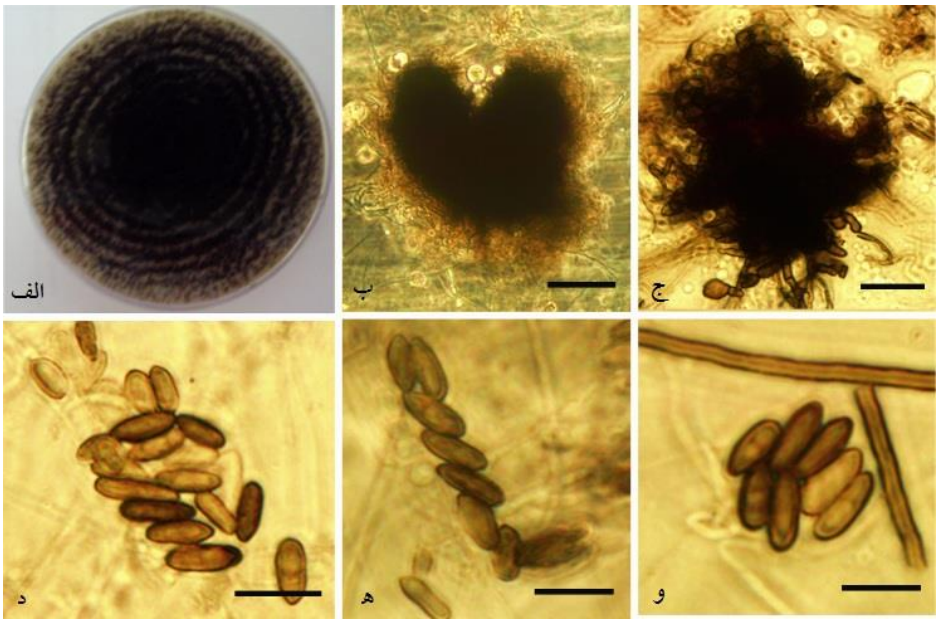
شکل ۶ – درخت حاصل از آنالیز داده‌های توالی ناحیه **ITS** متعلق به جنس ***Colletotrichum***. مقادیر **bootstrap support** مربوط به آنالیز **MP** روی شاخه‌ها نشان داده شده است.گونه ***Monilochaetes infuscans*** به عنوان **outgroup** استفاده شده است.

***Colletotrichum coccodes* (Wallr.) S. Hughes, Canadian Journal of Botany 36 (6): 754. 1958**

مشخصات این گونه در شکل ۷ نشان داده شده است.

جدایه‌های این گونه از مزارع کایوشه، میرکی، کانی گنجی، وینسار و حاجی‌آباد جداسازی شدند. این جنس متعلق به خانواده *Glomerellaceae* از راسته *Glomerellales* است. گزارش‌های اولیه راجع به این بیماری در سیب‌زمینی به اوایل قرن ۱۹ توسط دیکسون (۱۹۲۶) شرح داده شده است. این بیماری در سال‌های اخیر به یک بیماری مهم از

نظر اقتصادی تبدیل شده است و قادر به آلوده کردن ۳۵ میزبان از ۱۳ تیره گیاهی است (لیز و هیلتن ۲۰۰۳). ولی بیشترین خسارت آن بر روی سیب‌زمینی و گوجه‌فرنگی گزارش شده است (دیلارد ۱۹۹۲). این گونه پراکنش وسیعی در ایران دارد و علاوه بر سیب‌زمینی به دیگر جنس‌های خانواده سولاناسه نظیر گوجه‌فرنگی، فلفل و بادنجان هم خسارت وارد میکند (ارشاد ۱۳۸۸، شریفی و همکاران ۱۳۹۲).



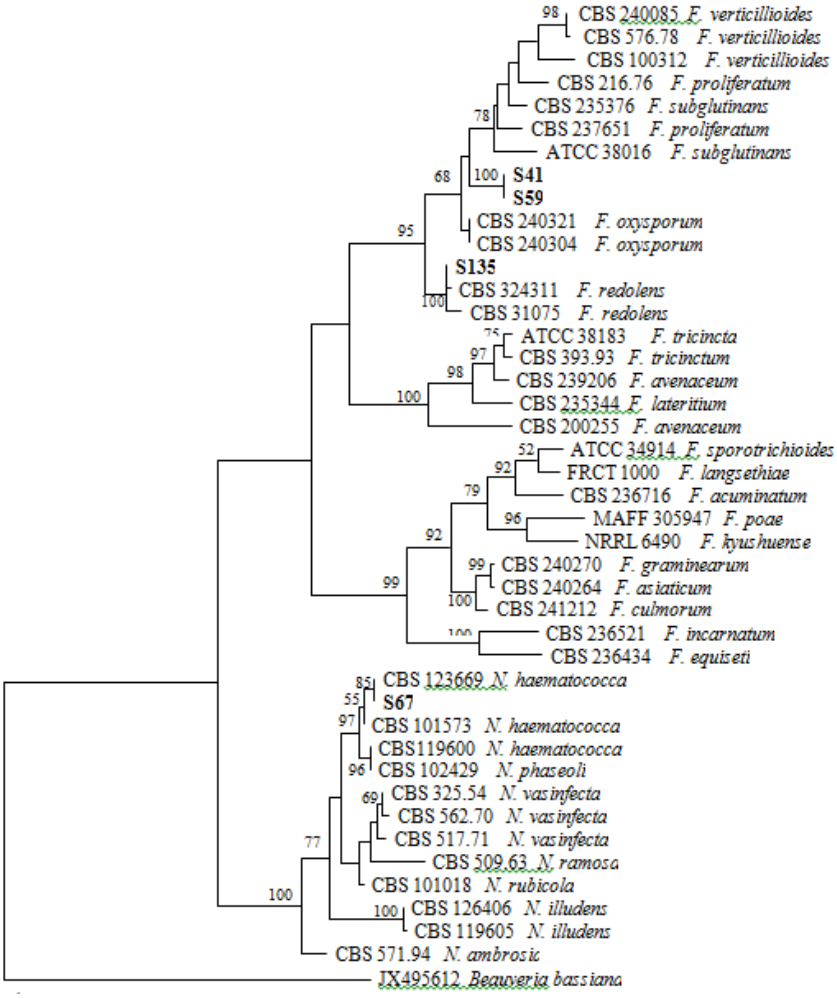
شکل ۷- گونه ***Colletotrichum coccodes***: الف) پرگنه روی **PDA**، ب و ج) اسکلروت، د، ه و و) کنیدیوم‌ها. مقیاس‌ها = ۱۰ میکرومتر.

فیلوژنی گونه های جنس *Fusarium*

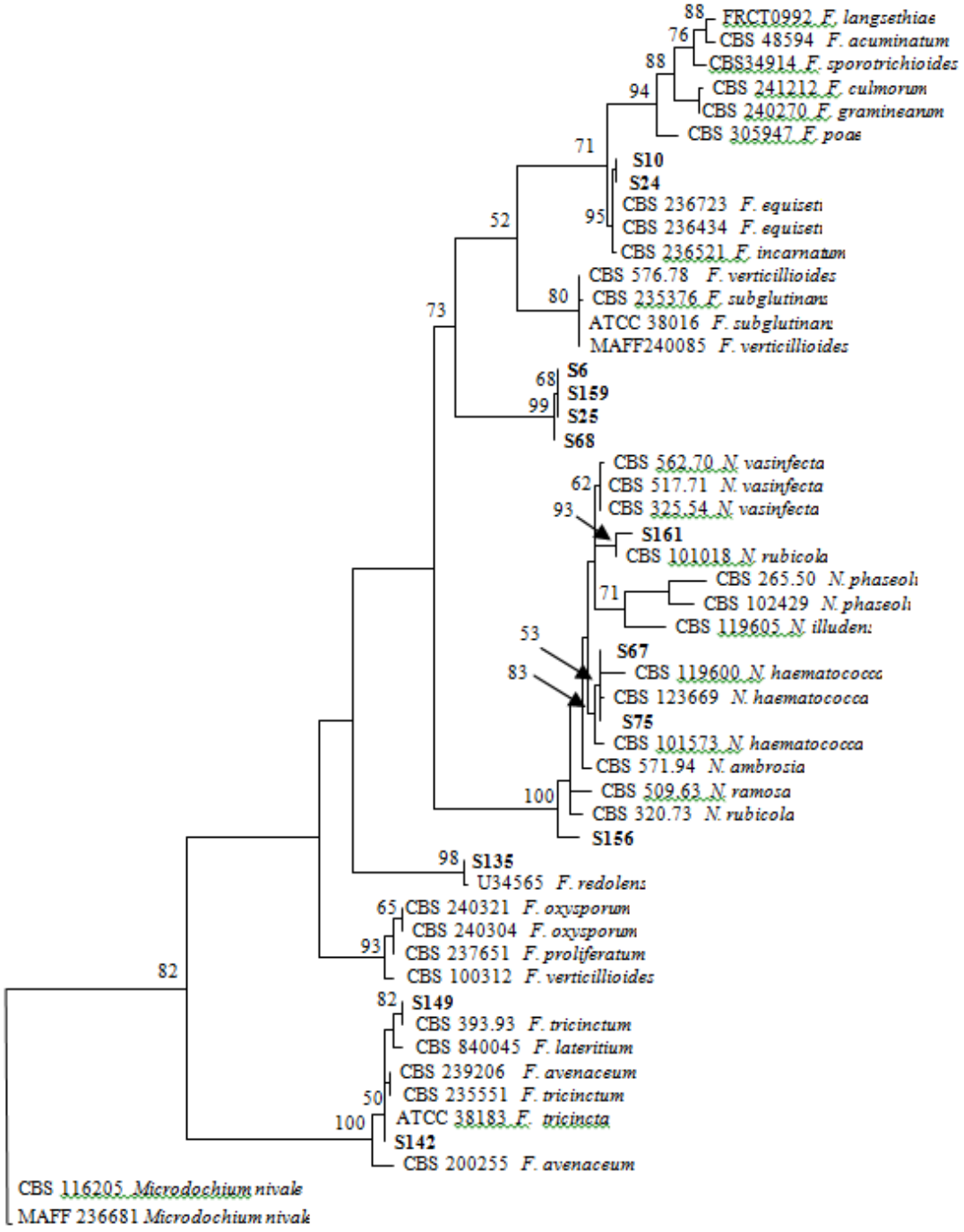
برای شناسایی مولکولی گونه‌های فوزاریوم از توالی ناحیه ITS و بخشی از ژن TEF استفاده گردید که بر اساس نتایج حاصل از داده‌های ریخت‌شناسی ۱۳ جدایه از مجموع ۹۳ جدایه متعلق به جنس *Fusarium* برای مطالعات فیلوژنتیکی براساس ناحیه ITS و چهار جدایه نیز برای مطالعات فیلوژنتیکی براساس بخشی از ژن TEF انتخاب شدند. جهت رسم درخت حاصل از آنالیز داده‌های توالی بخشی از ژن TEF توالی‌های تعداد ۴۰ جدایه نماینده ۲۹ گونه از جنس *Fusarium* و تیره *Nectriaceae* به توالی جدایه‌های مورد مطالعه در این تحقیق اضافه و هم‌ردیف شدند. بخش‌های ابتدایی و انتهایی که در برخی از توالی‌ها وجود نداشتند، از آنالیزها حذف شدند. تعداد کل صفات استفاده شده در آنالیزهای فیلوژنتیکی به علاوه گپ ها ۱۲۳۹عدد بود و جدایه *Beauveria bassiana* به عنوان outgroup و ۴۴ جدایه به عنوان ingroup استفاده شدند. در رسم درخت حاصل از آنالیز داده‌های ناحیه ITS نیز توالی‌های مربوط به ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 تعداد ۳۹ جدایه نماینده ۲۷ گونه از این جنس اضافه و هم‌ردیف شدند. تعداد کل کاراکترهای استفاده شده در آنالیزهای فیلوژنتیکی به علاوه گپ ها ۱۱۶۵عدد بود. دو جدایه *Microdochium nivale* (CBS116205) و *Microdochium nivale* (MAFF236681) به عنوان outgroup و ۵۲ جدایه به عنوان ingroup استفاده شدند. در هر دو درخت گپ‌ها به عنوان missing در نظر گرفته شدند وآنالیزها با روش MP انجام شد (شکل‌های ۸ و ۹).

بر اساس نتایج حاصل از هر دو درخت جدایه‌های S67، S75، S161 وS156 در کنار جدایه‌های معتبر گونه‌های *Neocosmospora* قرار گرفتند (لومبارد و همکاران ۲۰۱۵). جدایه S135 در کنار جدایه معتبر گونه *F. redolens* و جدایه

هـای S10 و S24 در کنـار گونـه‌هـای *F. equiseti* و *F. incarnatum* قرار گرفتند که در تطبیق با ویژگیهای ریخت-شناسی این دو گونـه، جدایـه‌هـای S10 و S24 بـه گونـه *F. equiseti* شباهت بیشتری داشتند. جدایه S149 نیـز در کنـار *F. tricinctum* و S142 در کنـار *F. avenaceum* قـرار گرفتنـد (واتانابه و همکاران ۲۰۱۱). جدایه‌های S41، S59، S6، S159، S25و S68 بـر اسـاس داده‌هـای موجـود بـا تاکسـون‌هـای توصیف شده تفاوت داشته کـه نیـاز بـه مطالعـات تکمیلـی دارند.



شکل ۸- درخت حاصل از آنالیز داده‌های توالی بخشی از ژن **TEF** متعلق به جنس **Fusarium**. مقادیر **bootstrap support** مربوط به آنالیز **MP** روی شاخه‌ها نشان داده شده است.گونه ***Beauveria bassiana*** به عنوان **outgroup** استفاده شده است.

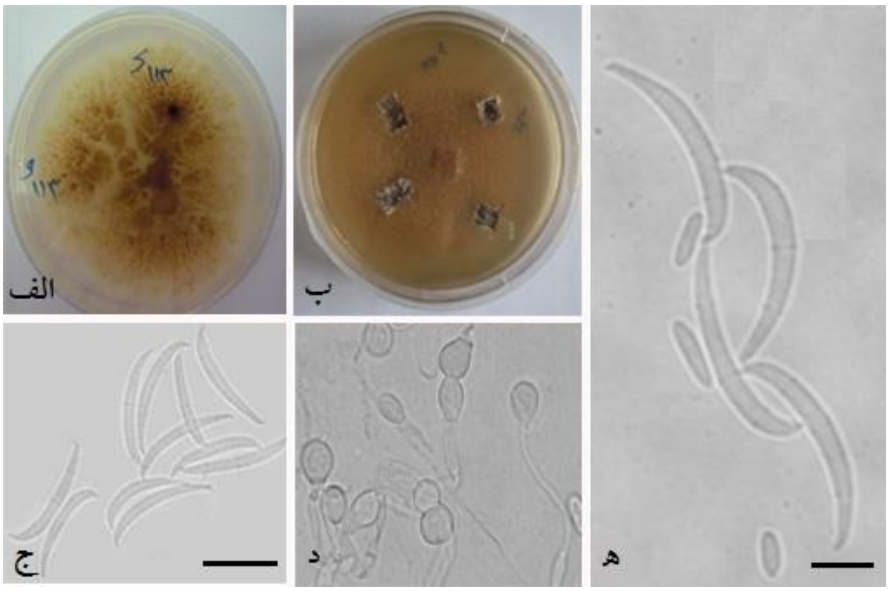


شکل ۹- درخت حاصل از آنالیز داده‌های توالی ناحیه **ITS** متعلق به جنس ***Fusarium***. مقادیر **bootstrap support** مربوط به آنالیز **MP** روی شاخه‌ها نشان داده شـده است. دوگـونه ***Microdochium nivale* (CBS116205)** و ***Microdochium nivale* (MAFF236681)** به عنوان **outgroup** استفاده شده است.

***Fusarium equiseti* (Corda) Sacc., Sylloge Fungorum 4: 707. 1886**

مشخصات این گونه در شکل ۱۰ نشان داده شده است. جدایه‌های S10 و S24 بر اساس توالی ژن ITS در این گروه قرار گرفتند. جدایه‌های این گونه از مزارع دیوزند، دلبران، حاجی آباد و کانی گنجی جداسازی شدند این گونه پراکنش جهانی داشته و از ریشه، طوقه، برگ، ساقه و دیگر بخش‌های تعداد زیادی از گیاهان جدا شده است (گرلاخ و نیرنبرگ ۱۹۸۲، ترون و هولز ۱۹۹۱). همچنین در ایران از گیاهان متعدد از جمله سیب‌زمینی (صارمی ۱۳۶۷، لتانی و همکاران ۱۳۸۵، شریفی و همکاران ۱۳۸۷) و گوجه‌فرنگی (امینی و همکاران ۱۳۹۲) گزارش شده است.

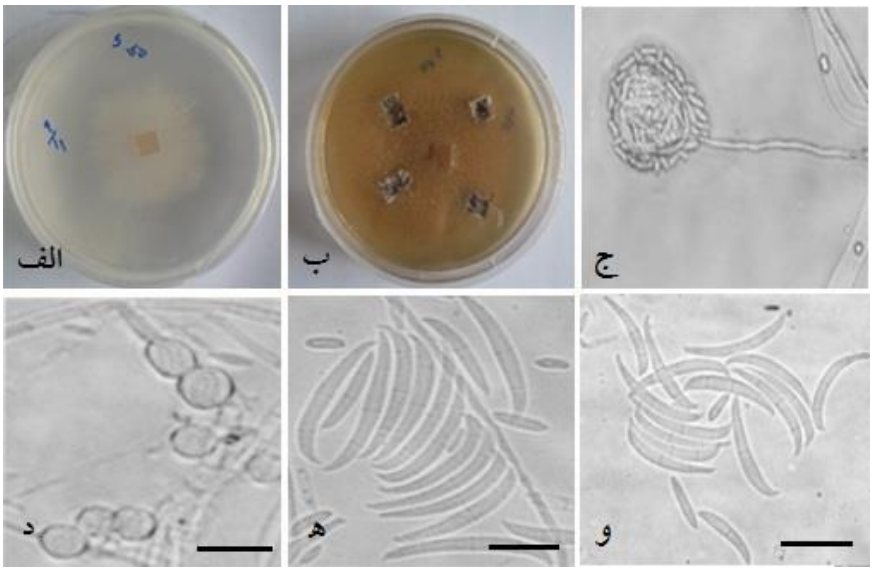
مشخصات ریخت شناختی گونه های فوزاریوم بر اساس ویژگی‌های از قبیل رنگ و شکل پرگنه قارچ روی محیط های غذایی PDA، CLA و SNA، اندازه و سرعت رشد قارچ روی این محیط های غذایی، مشخصات میسلیوم، میکروکنیدیوم‌ها، ماکروکنیدیوم‌ها، اسپوردوخیوم وکلامیدوسپور، ابعاد آنها بر حسب میکرومتر، دیواره عرضی و طولی ماکروکنیدیوم‌ها و غیره مطالعه و بررسی گردید. مشخصات گونه های شناسایی شده زیر با منبع نلسون و همکاران (۱۹۸۳) و لزلی و سامرل (۲۰۰۶) مطابقت داشت.



شکل ۱۰- گونه ***Fusarium equiseti***: الف و ب) پرگنه قارچ روی محیط کشت **PDA** و **CLA**، ج) ماکروکنیدیوم، د) کلامیدوسپور، هـ) ماکرو و میکروکنیدیوم، مقیاس‌ها = ۲۰ میکرومتر و هـ = ۱۰ میکرومتر.

***Fusarium redolens* Wollenw, Phytopathology 3(1): 29. 1913**

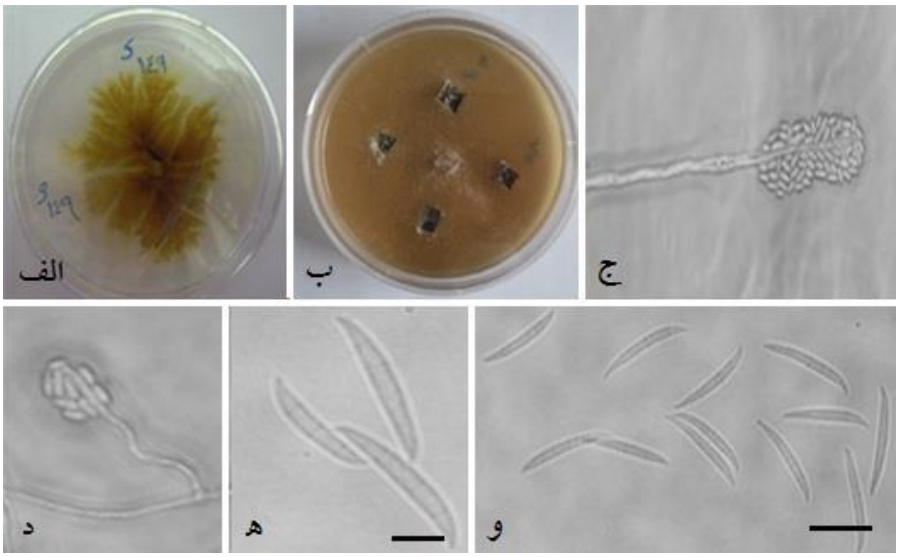
مشخصات این گونه در شکل ۱۱ نشان داده شده است. جدایه S135 بر اساس توالی ژن TEF و ITS در این گروه قرار گرفت. این جدایه‌ها از مزارع دزج، دلبران و حسن آباد جداسازی شدند. این گونه از روی نخود توسط جیمنز و همکاران (۲۰۱۱) گزارش شده است. این قارچ در ایران نیز از روی غلات و گوجه فرنگی گزارش شده است (امینی و همکاران ۱۹۹۸، ارشاد ۱۳۸۸).



شکل ۱۱- گونه ***Fusarium redolens***: الف و ب) پرگنه قارچ روی محیط کشت **PDA** و **CLA**، ج) میکروکنیدیوم‌ها در سر دروغین، د) کلامیدوسپور، ه و و) ماکروکنیدیوم. تمامی مقیاس ها = ۲۰ میکرومتر

***Fusarium tricinctum* (Corda) Sacc., Sylloge Fungorum 4: 700. 1886**

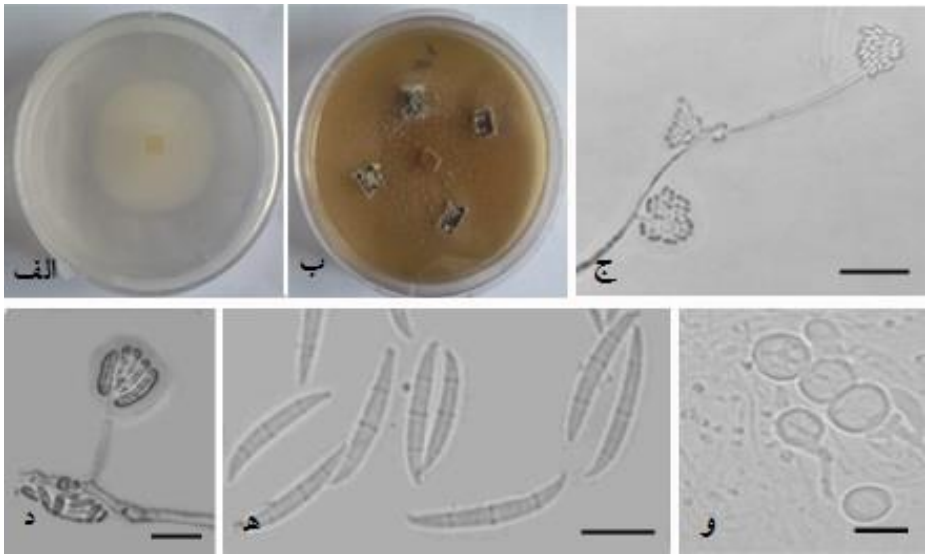
مشخصات این گونه در شکل ۱۲ نشان داده شده است. جدایه S149 بر اساس توالی ژن ITS در این گروه قرار گرفت. جدایه‌های این گونه از مزارع کاظم آباد، کانی گنجی و کایوشه جداسازی و شناسایی شدند. در سطح جهانی این گونه از روی سیب‌زمینی (گاچانگو و همکاران ۲۰۱۲)، دانه غلات (کولیک ۲۰۰۸) وگندم (کاستانارز و همکاران ۲۰۱۱) گزارش شده است. در ایران نیز از ریشه گندم توسط مستوفی‌زاده قلمفرسا (۱۳۸۵) جداسازی و مورد شناسایی قرار گرفته است.



شکل ۱۲- گونه ***Fusarium tricinctum***: الف و ب) پرگنه قارچ روی محیط کشت **PDA** و **CLA**، ج و د) میکروکنیدیوم‌ها در سر دروغین ، ه و و) ماکروکنیدیوم. مقیاس‌ها) د و و= ۲۰ میکرومتر، ه = ۱۰ میکرومتر.

***Neocosmospora haematococca* (Berk. & Broome) Nalim, Samuels & Geiser Mycologia 103 (6): 1322. 2011**

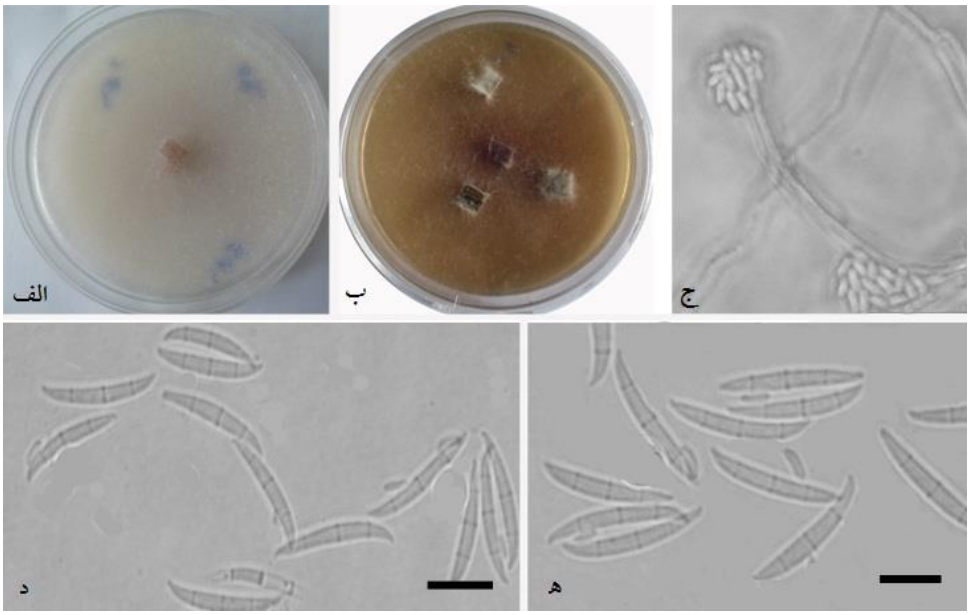
مشخصات این گونه در شکل ۱۳ نشان داده شده است. جدایه S67 بر اساس توالی ژن TEF و ITS در این گروه قرار گرفت. جدایه‌های این گونه از مزارع کاظم آباد، کانی گنجی، کروندان،میرکی، کایوشه، حسن آباد، آبباریک، دزج، دیوزند، تازه آباد، وینسار و حاجی آباد جداسازی شدند. این گونه به عنوان عامل بیماری‌زا در بسیاری از گیاهان از جمله لگوم‌ها، مرکبات، نخودفرنگی، فلفل، سیب‌زمینی، گوجه‌فرنگی و بادمجان گزارش شده است (زارع و ارشاد ۱۳۷۶، ارشاد ۱۳۸۸، امینی و همکاران ۱۳۹۲ و بهروزین و اسدی ۱۹۹۴). یکی از میزبان‌های مهم این قارچ غده‌های سیب‌زمینی است که در آنها بیماری پوسیدگی ایجاد می‌کند (بوث ۱۹۷۱). در ایران نیز در بسیاری از مناطق سیب‌زمینی کاری گزارش شده است (صارمی۱۳۶۷، شریفی و همکاران ۱۳۸۷و نصراصفهانی ۱۹۹۸).



شکل ۱۳- گونه *N. haematococca*: الف و ب) پرگنه قارچ روی محیط کشت PDA و CLA، ج و د) میکروکنیدیوم‌ها در سر دروغین، ه) ماکروکنیدیوم، و) کلامیدوسپور. تمامی مقیاس‌ها = ۲۰ میکرومتر.

***Neocosmospora rubicola* L.Lombard & Crous, Studies in mycology 80: 227. 2015**

مشخصات این گونه در شکل ۱۴ نشان داده شده است. جدایه S161 بر اساس توالی ژن ITS در این گروه قرار گرفت. جدایه‌های این گونه از مزارع وینسار، کروندان، حسن آباد، دزج، دیوزند و تازه آباد جداسازی شدند.



شکل ۱۴- گونه ***N. rubicola***: الف و ب) پرگنه قارچ روی محیط کشت **PDA** و **CLA**، ج) میکروکنیدیوم‌ها در سر دروغین، د و ه) ماکروکنیدیوم. تمامی مقیاس‌ها = ۲۰ میکرومتر.

منابع

ارشاد ج، ۱۳۸۸. قارچ‌های ایران. انتشارات مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور. ۵۳۱ صفحه.

امتی ف و کریمی ع، ۱۳۸۱. بررسی بیماری های قارچی سیب زمینی در استان سمنان. صفحه ۳۴، خلاصه مقالات پانزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، کرج.

امینی ج، کاظمی م، عبداله زاده ج و درویش‌نیا م، ۱۳۹۲. شناسایی و بیماریزایی گونه‌های فوزاریوم مرتبط با ریشه و طوقه گوجه‌فرنگی در منطقه‌ی مرودشت. دانش گیاه‌پزشکی ایران. جلد ۴۴ شماره ۱، صفحه های ۷۱ تا ۸۰.

باقرآبادی ش، ۱۳۹۲. شناسایی گونه‌های آلترناریا و جنس‌های دماتیاسه مشابه در استان همدان. پایان نامه کارشناسی ارشد رشته بیماری‌شناسی گیاهی. دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا.

باقرآبادی ش، ظفری د و سلیمانی م، ۱۳۹۴. گزارشی از گونه های *Alternaria* و جنس های مشابه آن در استان همدان. تاکسونومی و بیوسیستماتیک. شماره ۲۴، صفحه های ۹۵ تا ۱۱۲.

حاجی پور جارچلور ز، قوستا ی و رضایی س، ۱۳۹۱. شناسایی و مطالعه بیماریزایی گونه های آلنرناریای گوجه فرنگی و سیب زمینی در استان آذربایجان غربی. دانش گیاه پزشکی ایران. شماره ۱، صفحه های ۱۵۵ تا ۱۶۳.

راه خدایی الف و فرخی نژاد ر، ۱۳۸۳. فوزاریوم های همراه با پژمردگی آوندی سیب زمینی در استان های فارس و خوزستان و بررسی بیماریزایی گونه های غالب آنها. صفحه ۲۱۴، شانزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، دانشگاه تبریز، تبریز.

زارع ر و ارشاد ج، ۱۳۷۶. گونه های فوزاریوم جداشده از غلات در منطقه گرگان. بیماری های گیاهی. جلد ۳۳، صفحه های ۱ تا ۱۴.

شریفی ک، زارع ر، زمانی زاده ح و ارجمندیان الف، ۱۳۸۷. بررسی گونه‌های فوزاریوم عامل پوسیدگی خشک سیب‌زمینی در استان‌های اردبیل، تهران و همدان. آفات و بیماری‌های گیاهی. جلد ۷۶، شماره ۲، صفحه های ۲۰ تا ۳۸.

شریفی ک، بینائیان م و زمانی‌زاده ح، ۱۳۹۲. بررسی پراکنش و بیماری‌زایی قارچ *Colletotrichum coccodes* عامل بیماری خال سیاه سیب‌زمینی در کشور. اولین همایش سراسری محیط زیست، انرژی و پدافند زیستی. تهران، ایران.

صارمی ح، ۱۳۶۷. اکولوژی و تاکسونومی گونه های فوزاریوم. انتشارات جهاد دانشگاهی. مشهد،۱۳ صفحه.

لتانی س، طاهری ع و رهنما ک، ۱۳۸۵. شناسایی و بیماریزایی گونه های فوزاریوم جدا شده ار ریشه و طوقه سیب زمینی منطقه گرگان. علوم کشاورزی و منابع طبیعی. جلد ۱۳، صفحه‌های ۱۳ تا ۲۵.

مرتضوی بک ا و شهسواری م، ۱۳۸۱. بررسی ارقام سیب‌زمینی به سه گونه قارچ فوزاریوم عامل پوسیدگی خشک سیب زمینی در اصفهان. آفات و بیماری های گیاهی. جلد ۷۰، صفحه‌های ۱۷ تا ۲۵.

مستوفی زاده قلمفرسا ر و بنی هاشمی ض، ۱۳۷۷. تشخیص و بیماریزایی فوزاریوم های سیب زمینی در جنوب شرقی استان فارس. صفحه ۳۰۴، چهاردهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، جلد ۲.

مستوفی زاده قلمفرسا ر، بنی هاشمی ض و تقوی م، ۱۳۸۵. بررسی شیوه فعالیت آنتاگونیستی سودوموناس فلورسنت فراریشه گندم و بازدارندگی آن ها در برابر فورازیوم های بیماریزای ریشه در استان فارس. بیماری‌های گیاهی. جلد ۴۲، صفحه های ۳۳ تا ۵۴.

هاشم‌لو ا، جمالی زواره ع و قوستا ی، ۱۳۹۴. شناسایی گونه‌های اندوفیت جنس *Alternaria* از درختان میوه هسته دار در ارومیه و میاندوآب(استان آذربایجان غربی). رستنیها. جلد ۱۶، شماره ۱، صفحه‌های ۸۸ تا ۱۰۰.

Amini J, Ershad D and Torabi M, 1998. A survey on mycoflora of wheat root in Tehran Province. P 45, Proceedings of 13th Iranian Plant Protection Congress, Karaj, Iran.

Amini J, Sepehrnoosh S and Abdollahzadeh J, 2016. First report of *Alternaria cantlous* causing leaf spot on potato in Iran. Plant Disease 100 (3): 653.

Behroozin M and Assadi P, 1994. Report on tree *Fusarium* species as the casual agents of the based and root rot of onion and their distribution in East Azarbaijan. Plant Pathology 30:41- 49.

Boff P, Jürgen Köhl J, Gerlagh M and Kraker J, 2002. Biocontrol of grey mould by *Ulocladium atrum* applied at different flower and fruit stages of strawberry. BioControl. 47: 193-206.

Booth C, 1971. The genus *Fusarium*. CMI, Kew, surrey,UK. 273 p.

Castañares E, Stenglein SA, Dinolfo MI and Moreno MV, 2011. *Fusarium tricinctum* associated with head blight on wheat in Argentina. Plant Disease 95(4): 496- 496.

Dickson BT, 1926. The" black dot" disease of potato. Phytopathology 16: 23- 40.

Dillard HR, 1992. *Colletotrichum coccodes*: the pathogen and its hosts. Pp.225- 236. CAB International.

Gachango E, Hanson LE, Rojas A, Hao JJ and Kirk WW, 2012. *Fusarium* spp. causing dry rot of seed potato tubers in Michigan and their sensitivity to fungicides. Plant Disease 96(12):1767- 1774.

Gerlach W and Nirenberg H, 1982. The Genus *Fusarium*- A Pictorial Atlas, Mitt. Boil. Bondesanst., land-Forstwitsch, Berlin, Dahlem,406 p.

Hooker DG, 2000. Potato Diseases. Tehran University Press, Tehran. Iran. 463 Pp.

Huang H.C and Erickcon R.S, 2007. Biological control of *Sclerotinia stem* rot of canola using *Ulocladium atrum*. Plant Pathology Bulletin. 16: 55-59.

Jiménez-Fernández D, Navas-Cortés JA, Montes-Borrego M, Jiménez-Díaz RM and Landa BB, 2011. Molecular and pathogenic characterization of *Fusarium redolens*, a new causal agent of *Fusarium* yellows in chickpea. Plant Disease 95(7): 860- 870.

Kulik T, 2008. Detection of *Fusarium tricinctum* from cereal grain using PCR assay. Journal of Applied Genetics 49(3):305- 311.

Lees AK and Hilton AJ, 2003. Black dot (*Colletotrichum coccodes*): an increasingly important disease of potato. Plant Pathology 52(1): 3- 12.

Leslie JF and Summerell BA, 2006. The Fusarium Laboratory Manual. Blackwell Professional publishing, Ames, Iowa, 385 P.

Lombars L, van der Merwe NA, Groenewald JZ Crous PW, 2015. Generic concepts in *Nectriaceae*. Studies in Mycology. 80: 189-245.

Mohan SK, Davis JR, Sorensen LH and Schneider AT, 1992. Infection of aerial parts of potato plants by *Colletotrichum coccodes* and its effects on premature vine death and yield. American Potato Journal 69(9): 547- 559.

Nasr Esfahani M, 1998. *Fusarium* species associated with dry rot of potato tubers in Esfahan. Iranian Journal of Plant Pathology 34: 225- 232.

Nees Von Esenbeck CG, 1816-1817. Das system der pilz and schwame. Stahelschlen Buchhandlum Wurzburg. XXVIII + 329 pp. PI. I-XXVII (1816); PI. XXVII-XLIV.

Nelson PE, Toussoun TA and Marasas WFO, 1983. *Fusarium* Species: An Illustrated Manual for Identification. The Pennsylvania Press, 193P.

O'Donnell K, Kistler HC, Cigelnik E and Ploetz RC, 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. Proceedings of the National Academy of Sciences of America 95(5): 2044- 2049.

Raeder U and Broda PR, 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous Fungi. Letters in Applied Microbiology 1: 17- 20.

Raghavendra A.K.H and Newcombe G, 2013. The contribution of foliar endophytes to quantitative resistance to *Melampsora* rust. New Phytologist. 197: 909-918.

Simmons EG, 2007. *Alternaria* an identification manual. CBS Fungal Biodiversity Centrel Utrecht the Netherlands. 775 P.

Sun H, Gao LX and Wang B, 2013. Chemical constituents of marine mangrove-derived endophytic fungus *Alternaria tenuissima* EN-192. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 31: 464-470.

Swofford DL, 2003. Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods). Sunderland, Massachusetts Sinauer Associates.

Taheri-Ardestani S, Sharifnabi B, Zare R and Abbasi Moghadam A, 2008. Two new *Alternaria* species on potato from Iran. 674pp. Proceeding of the 18th Iranian Plant Protection Congress, Hamadan, Iran.

Theron DJ and Holz G, 1991. Prediction of potato dry rot based on the presence of *Fusarium* in soil adhering to tubers at harvest. Plant Disease 75(2): 126- 130.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F and Higgins DG. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: Flexible Strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acid Research 25: 4876– 4882.

Watanabe M, Yonezawa T, Lee KI, Kumagai S, Sugita-Konishi Y, Goto K and Hara-Kudo Y, 2011. Molecular phylogeny of the higher and lower taxonomy of the *Fusarium* genus and differences in the evolutionary histories of multiple genes. BMC Evolutionary Biology 11: 322.

White TJ, Bruns T, Lee SJWT and Taylor JW, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego 18: 315-322.

Woudenberg JHC, Groenewald JZ, Binder M and Crous PW, 2013 *Alternaria* redefined. Studies in Mycology 75: 171– 212.

Zafari D, Mahdizadeh Naraghi R, 2008. *Embellisia allii*, a new record for mycoflora of Iran. Rostaniha. 32: 114-115 (in Persian).

Morphological and Molecular Study of Fungi Isolated from Potato Crown, Root and Tuber in Kurdistan Province

S Sepehrnoosh[1], J Amini[2]* and J Abdollahzadeh[2]

[1]Former MSc Student, Dept. of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran.
[2]Associate Professors, Dept. of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran.
*Corresponding author: jamini@uok.ac.ir

Received: 29 January 2017 Accepted: 4 September 2018

Abstract

Potato is one of the major Agronomic crops in Kurdistan province. Many fungi have been reported as the causal agents of tuber, crown and root rot and canker on potato plants. The objective of this study was to identify fungal agents associated with tuber, crown and root rot and canker of potato. Samples were collected from diseased plants in East of Kurdistan (Ghorveh and Dehgolan) during cropping season in 2014. Samples were first washed under tap water and then sliced to 0.5-1 cm pieces, surface sterilized and plated on general or selective culture media. In total 151 isolates were obtained from tuber, crown and roots of infected potatoes and purified using single spore or hyphal tip. Fungal isolates were identified based on morphological and sequence data of ITS, RPB2 and TEF loci. Finally, based on morphologic characters and DNA sequence data 10 species belonging to four genera were identified including *Alternaria arborescens*, *A. alternata*, *A. atra*, *A. embellisia*, *Colletotrichum coccodes*, *Fusarium equiseti*, *F. redolens*, *F. tricinctum*, *Neocosmospora rubicola* and *N. haematococca*. Among the identified genera, *Fusarium* with 93 isolates was the most frequent genus.

Keywords: *Alternaria*, Potato, RPB2, ITS, TEF.