

شناسایی مولکولی *Cochliobolus sativus* عامل بیماری لکه سوختگی گندم با استفاده از توالی‌یابی ITS
ریبوزومی و بررسی روابط فیلوژنتیکی گونه‌های موجود در جنس *Cochliobolus*

Molecular Identification of *Cochliobolus sativus*, the Causal Agent of Wheat
Spot Blotch Disease, Using ITS Sequencing and its Phylogenetic
Relationships with other *Cochliobolus* Species

رحیم مهربانی^۱، محمد ترابی^۲، مهناز رجب‌پور^۳، نسیم کرمی^۳، اقدس‌الله حسنی^۴
و امین ابراهیمی^۴

۱ و ۴- به ترتیب استادیار و محقق، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج
۲ و ۳- به ترتیب استاد و دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین- پیشوا، دانشکده کشاورزی،
گروه بیماری‌شناسی گیاهی، ورامین

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۹/۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۲/۱۱

چکیده

مهربانی، ر.، ترابی، م.، رجب‌پور، م.، کرمی، ن.، حسنی، ا. و ابراهیمی، ا. ۱۳۹۳. شناسایی مولکولی *Cochliobolus sativus* عامل بیماری لکه سوختگی گندم با استفاده از توالی‌یابی ITS ریبوزومی و بررسی روابط فیلوژنتیکی گونه‌های موجود در جنس *Cochliobolus*. مجله به‌نژادی نهال و بذر ۳۰-۱: ۴۱۷-۳۹۹.

عامل بیماری لکه سوختگی گندم قارچ *Cochliobolus sativus* است که در بسیاری از مناطق جهان به عنوان یکی از مهم‌ترین بیماری‌های گندم مطرح است. از مناطق آلوده شمال کشور نمونه‌های مشکوک به این بیماری جمع‌آوری و از میان آن‌ها هشت جدایه عامل بیماری به عنوان نماینده انتخاب و مورد بررسی مورفولوژیکی، اثبات بیماری‌زایی و مولکولی قرار گرفتند. مشخصات مورفولوژیکی جدایه‌ها با استفاده از کلیدهای معتبر نشان داد که علائم بیماری مشاهده شده ناشی از آلودگی به بیمارگر *C. sativus* بود. آزمون بیماری‌زایی نشان داد که جدایه‌های عامل بیماری قادر به ایجاد علائم تیپیک لکه سوختگی روی رقم حساس بولانی بودند. نتایج توالی‌یابی نشان داد که توالی منطقه ITS همه جدایه‌های *C. sativus* شمال ایران با جدایه مرجع *C. sativus* کاملاً یکسان بود. قرابت و روابط فیلوژنی جدایه‌های ایرانی قارچ *C. sativus* با گونه‌های دیگر موجود در جنس *Cochliobolus* با استفاده از چندین روش تجزیه فیلوژنی از جمله فاصله ژنتیکی (GD)، پارسیمونی (MP) و تخمین بیشینه (ML) محاسبه و با یکدیگر مقایسه شد. تجزیه فیلوژنی با هر سه روش نشان داد که جدایه‌های ایرانی قارچ *C. sativus* با جدایه مرجع در یک گروه قرار گرفته و درخت‌های فیلوژنی حاصل بسیار به هم شبیه بودند. گونه‌های مختلف *Cochliobolus* در دو گروه اصلی و چند زیر گروه طبقه‌بندی شدند. بررسی فاصله ژنتیکی محاسبه شده برای گونه‌های مختلف *Cochliobolus* نشان داد که گونه *C. eleusines* با فاصله ژنتیکی بسیار کم بیشترین قرابت را با گونه *C. sativus* دارد، در حالی که گونه *C. sativus* بیشترین فاصله را با دو گونه *C. kusanoi* و *C. australiensis* داشت. یافته‌های حاصل از این تحقیق حاکی از پراکنش سراسری این بیماری در اقلیم گرم و مرطوب شمال کشور بود و بنابراین برای پیشگیری از گسترش روزافزون این بیماری لازم است در برنامه‌های به‌نژادی گندم در این اقلیم، مقاومت به این بیماری مورد توجه قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: لکه سوختگی گندم، توالی‌یابی، روابط فیلوژنی، *Bipolaris sorokiniana*

مقدمه

با افزایش روز افزون جمعیت نیاز غذایی بشر روز به روز در حال افزایش بوده، به طوری که تغذیه این جمعیت روز افزون یکی از نگرانی‌های مهم بشر امروزی است. گندم مهم‌ترین گیاه زراعی دنیاست که غذای اصلی بیش از یک سوم مردم جهان را تشکیل می‌دهد. نتایج مطالعات نشان می‌دهد که این محصول حدود ۶-۵ هزار سال قبل از میلاد مسیح در خاورمیانه به وجود آمده است. در ایران گندم مهم‌ترین محصول استرترژیک بوده که بیشترین سطح زیر کشت و میزان مصرف را به خود اختصاص داده است. گندم نان (*Triticum aestivum*) در بین گونه‌های تیره گندمیان دارای سازگاری بالایی است به طوری که بیشترین سطح زیر کشت را در سراسر دنیا به عنوان یک محصول تجاری به خود اختصاص داده است (یزدی صمدی و عبد میثانی، ۱۳۷۵). امکان افزایش تولید گندم از طریق افزایش سطح زیر کشت به دلیل محدودیتی که در آب و خاک زراعی وجود دارد، کم است. بنابراین بیشترین برنامه‌های تحقیقاتی روی افزایش عملکرد در واحد سطح و اصلاح کیفیت آن متمرکز شده است.

آفات و بیماری‌ها عوامل زیستی هستند که نقش بزرگی در کاهش محصول دارند. در میان عوامل بیماری‌زای گندم، قارچ‌ها از اهمیت فراوانی برخوردارند، به طوری که غالب بیماری‌های مهم از دسته عوامل بیماری‌زای

قارچی هستند. در بین این عوامل لکه برگی‌های گندم از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند. طی بازدیدهایی که در دو سال گذشته به مناطق شمالی کشور انجام شده بیماری لکه سوختگی (Spot blotch) با شدت بالا و به صورت اپیدمیک در اکثر مزارع گندم مشاهده شده است (مشاهدات نگارنده و همکاران).

عامل این بیماری قارچ نکروتروف *Cochliobolus sativus* (Ito & Kurib.) Drechs. ex Dastur. (anamorph: *Bipolaris sorokiniana* (Sacc in Sorok.) بوده که در بسیاری از مناطق جهان به عنوان یکی از مهم‌ترین بیماری‌های گندم مطرح است. این قارچ اولین بار در سال ۱۸۹۰ از روسیه با نام *Helminthosporium sorokiniana* Sacc. گزارش شد (Sivansean, 1987). فرم جنسی آن در سال ۱۹۴۲ با نام *Cochliobolus sativus* (Ito & Kurib.) Drechs. ex Dastur. ارایه و تاکنون مورد استفاده قرار گرفته است اما در سال ۱۹۵۹ فرم غیرجنسی آن به *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shome. تغییر نام یافت (Sivansean, 1987). عامل بیماری لکه سوختگی از سلسله قارچ‌ها، شاخه *Ascomycota* رده *Dothideomycetes*، راسته *Pleosporales*، تیره *Pleosporaceae* و جنس *Cochliobolus* و آنامورف آن جنس *Bipolaris* است.

در طول ۲۰ سال گذشته تقریباً همه ساله این

۲۲-۱۸ درصد است (Singh et al., 1997). در نپال شدت این بیماری به ترتیب در سال‌های ۲۰۰۴ و ۲۰۰۵ تا ۱۰۰ درصد و ۷۰ درصد گزارش شده است (Sharma and Duveiller, 2007). این بیماری در سال باعث کاهش ۱۵ درصدی محصول در بنگلادش و چین می‌شود (Alam et al., 1998). عامل این بیماری همچنین به ترتیب باعث ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد خسارت در کشورهایی مانند اسکاتلند، کانادا و برزیل می‌شود (Murray et al., 1998).

تحقیق حاضر با توجه به اهمیت روزافزون این بیماری، شیوع همه‌گیری‌های اخیر، تشابه علائم این بیماری با برخی دیگر لکه‌برگی‌ها نظیر لکه خرمایی و نیاز به شناسایی دقیق عامل این بیماری با استفاده از روش‌های مرسوم مورفولوژیکی و مولکولی انجام شد. ضمن بررسی‌های مزرعه‌ای، جداسازی و خالص‌سازی قارچ عامل بیماری انجام و پس از شناسایی مورفولوژیکی و آزمون بیماری‌زایی، توالی یابی منطقه Internal Transcribed Spacers (ITS) انجام شد. قرابت جدایه‌های ایرانی قارچ عامل بیماری با جدایه‌های سایر نقاط دنیا و همچنین روابط فیلوژنی گونه *C. sativus* با گونه‌های دیگر موجود در جنس *Cochliobolus* با استفاده از چندین روش تجزیه فیلوژنی نیز از اهداف این تحقیق بود. این مطالعه اولین تحقیق در نوع خود برای شناسایی عامل بیماری لکه‌سوختگی با استفاده همزمان از روش‌های

بیماری در مزارع استان‌های گلستان و مازندران وجود داشته و هر سه تا چهار سال یکبار به حالت همه‌گیری و با شدت بالا ظاهر شده است. لکه سوختگی در بسیاری از مناطق مورد کاشت گندم در جهان نیز وجود داشته که موجب کاهش شدید محصول می‌شود. کشت بی‌رویه ارقام حساس به این بیماری و عوامل دیگری نظیر فراوانی بیشتر گندم در برنامه‌های تناوب، کم‌توجهی به مدیریت بقایای گیاهی، افزایش مصرف کودهای نیتروژن و مقاومت به قارچکش‌های سیستمیک نیز در گسترش روز افزون بیماری و بروز اپیدمی‌ها بی‌تاثیر نبوده است.

ظرفیت تخریبی این بیمارگر و مقدار محصول کاهش یافته ناشی از این بیماری براساس گزارش‌های اعلام شده از مناطق مختلف دنیا متغیر است. در نواحی گرم جنوب آسیا میزان کاهش محصول بیشتر است و به طور متوسط در این مناطق ۲۰ درصد محصول در اثر بیماری‌های لکه‌برگی از بین می‌رود. میزان خسارت ناشی از لکه سوختگی در جنوب آسیا از ۴ تا ۳۸ درصد و ۲۵ تا ۴۳ درصد به ترتیب در سال‌های ۲۰۰۴ و ۲۰۰۵ گزارش شده است (Sharma and Duveiller, 2006). تعداد دانه‌های هر سنبله و وزن هزار دانه به ترتیب در سال‌های ۲۰۰۴، ۱۰ درصد و ۱۵ درصد و در سال ۲۰۰۵ حدود ۱۱ درصد و ۱۸ درصد کاهش یافت (Sharma and Duveiller, 2006). در هندوستان میزان خسارت وارد بر محصول

سنتی سیستماتیک و همچنین روش‌های مولکولی توالی‌یابی در ایران بود.

میسلیوم قارچی جمع‌آوری به لوله‌های ایتدورف انتقال و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

مواد و روش‌ها

جداسازی و خالص‌سازی عامل بیماری

در بهار سال ۱۳۹۱ از مناطق زیر کشت گندم در مناطق آلوده شمالی کشور، نمونه‌های برگ‌ی آلوده گندم مشکوک به بیماری لکه‌سوختگی، جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل و قارچ عامل بیماری از آن‌ها جدا شد. برای جدا سازی قارچ ابتدا قطعه‌ای از برگ دارای علائم لکه‌سوختگی به وسیله هیپوکلریت سدیم ۱٪ به مدت ۲-۳ دقیقه ضد عفونی سطحی شد. سپس قطعات برگ سه بار با آب مقطر استریل شستشوی سطحی شده و در نهایت در تشتک‌های پتری دارای کاغذ صافی مرطوب قرار گرفته و در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. خالص‌سازی نمونه‌ها با استفاده از روش تک اسپور (Single spore) انجام شد. بدین منظور پس از ظاهر شدن کنیدیوفور و کنیدی قارچ عامل بیماری، کنیدی‌ها از روی برگ به وسیله لوپ آزمایشگاهی جمع‌آوری و روی محیط کشت آب-آگار پراکنده شدند. بعد از ۵-۸ ساعت یکی از کنیدی‌های جوانه زده به وسیله اسکالپل استریل از روی محیط کشت آب-آگار جدا و به محیط کشت PDA منتقل شد و تشتک‌های پتری در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد و تاریکی به مدت ده روز قرار گرفتند. برای نگهداری جدایه‌های خالص،

تهیه زادمایه قارچ و آزمون بیماری‌زایی

زادمایه قارچی با استفاده از محیط کشت PDA (Potato Dextrose Agar) تهیه شد. محیط کشت‌های دارای کلنی‌های قارچ به مدت هشت روز در دمای ۲۲°C در شرایط تاریکی قرار گرفتند، سپس آب مقطر استریل روی کلنی‌های قارچ اضافه شد تا میسلیوم‌ها کاملاً پوشانده شوند و کنیدی‌ها به وسیله یک بورس شستشو و آزاد شدند. سوسپانسیون کنیدی حاصل، به غلظت $10^3 \times 5$ کنیدی در میلی‌لیتر تنظیم و ۱۰-۵ قطره روغن تووین ۲۰ (Tween 20) به هر لیتر سوسپانسیون قارچ اضافه شد تا برای مایه‌زنی استفاده شود. مایه‌زنی با استفاده از مه‌پاشی گیاهچه‌های ۱۵-۱۰ روزه با سوسپانسیون اسپور قارچ انجام شد. گیاهچه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در شرایط رطوبتی اشباع در تاریکی قرار داده شدند و در نهایت در زیر سرپوش‌های پلی‌اتیلنی شفاف در دمای 20 ± 2 درجه سانتی‌گراد با ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی نگهداری شدند. در این بررسی تعداد زیادی جدایه قارچ عامل بیماری با خصوصیات مشابه تهیه شد و از بین آن‌ها هشت جدایه به عنوان نماینده انتخاب و بر اساس مشخصات کلنی، میسلیوم، کنیدیوفور و کنیدی آن‌ها و با استفاده از کلید معتبر سیوانسان

(Sivanesan, 1987)، شناسایی دقیق گونه آن‌ها انجام شد. آزمون بیماریزائی جدایه‌ها با مایه‌زنی سوسپانسیون $10^3 \times 5$ اسپور در میلی‌لیتر هر جدایه روی گیاهچه‌های رقم حساس بولانی در گلخانه انجام شد.

جداسازی DNA

جدایه‌های مورد نظر بر روی محیط کشت PDA رشد داده شد و محیط کشت‌ها به مدت هشت روز در دمای 22°C در شرایط تاریکی قرار گرفتند. استخراج DNA از میسلیم جدایه‌ها با استفاده از روش SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) انجام شد. بدین منظور ابتدا بافر استخراج [Tris-HCl pH=8 (100mM), EDTA (50mM), NaCl (500mM), 2 β -mercaptoethanol (2%), SDS (1%)] تهیه و میسلیم جدایه‌ها در نیتروژن مایع پودر شده و بلافاصله به تیوب‌های 1/5ml منتقل و 600 μl بافر استخراج اضافه شد. نمونه‌ها در دمای 65°C به مدت 20 دقیقه قرار گرفته و سپس 700 μl کلروفرم:ایزوامیل‌الکل (به نسبت 1:24) به تیوب‌ها اضافه شد و پنج دقیقه به آرامی در دمای اتاق به هم زده و در نهایت به مدت 10 دقیقه با دور 12000 rpm سانتریفوژ انجام شد. پس از اتمام سانتریفوژ، فاز روشن‌ترین به تیوب جدید منتقل شده و استات سدیم 5 مولار (pH = 5.2) به نسبت یک دهم حجم بافر استخراج به نمونه‌ها اضافه و در ادامه ایزوپروپانول سرد (به مقدار هم حجم) به هر

تیوب اضافه شد و به مدت 2 دقیقه به آرامی تکان داده شد تا کلایف DNA مشاهده شود. برای جداسازی کلایف DNA عمل سانتریفوژ با دور 12000 rpm به مدت 5 دقیقه انجام شد که در این مرحله DNA به صورت رسوب نازکی در ته تیوب قرار گرفته و فاز مایع دور ریخته شد. شستشوی رسوب DNA با اتانول 70٪ انجام شد و تیوب‌ها به مدت 20 دقیقه در دمای اتاق به صورت درب باز و وارونه گذاشته شدند تا خشک شوند. رسوب حاصل در 100 μl [Tris-HCl pH=7 (10mM), EDTA TE بافر (1mM) یا آب مقطر استریل حل شد.

تکثیر ITS از منطقه rDNA نمونه‌ها

واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراس (PCR) با استفاده از آغازگرهای ITS1 (3'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-5') و ITS5 (3'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-5') انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراس در حجم 50 میکرولیتر برای هر واکنش با استفاده از بافر PCR (1X)، آغازگرهای اختصاصی به میزان 200 nM برای هر کدام، آنزیم تک پلیمراس (1 unit)، dNTPs (0.2 mM)، کلرید منیزیم (2.5 mM) و DNA (10 ng) انجام شد. برنامه حرارتی PCR به صورت یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه در دمای 94°C به مدت 2 دقیقه و 35 چرخه شامل مراحل واسرشت‌سازی در دمای 94°C به مدت 45 ثانیه، اتصال در دمای 50°C به مدت 45

تجزیه و تحلیل داده‌های DNA

توالی‌های DNA ابتدا به وسیله نرم‌افزار SeqMan (Madison, WI, USA) مورد تجزیه قرار گرفت. بدین منظور ابتدا توالی‌های مربوط به هر جدایه که از طرف چپ و راست با استفاده از آغازگرهای ITS1 و ITS5 توالی‌یابی شده بودند، هم‌گذاری (Assemble) و بررسی و در صورت نیاز به صورت دستی اصلاح (Manual annotation) شدند و در نهایت توالی‌های حاصل به صورت فایل جداگانه‌ای ذخیره شدند. با استفاده از نرم‌افزار EditSeq (Madison, WI, USA) مناطق بالا دست و پایین دست منطقه ITS1 و ITS2 مشخص و در نهایت توالی به اندازه ۵۱۶bp ذخیره شد. توالی‌های مشابه مربوط به گونه‌های مختلف *Cochliobolus* از بانک ژن جهانی (NCBI genebank) استخراج و در پایان تمامی توالی‌ها از جمله توالی‌های مربوط به جدایه‌های توالی‌یابی شده و توالی‌های مستخرج شده از بانک ژن جهانی در یک فایل با فرمت fasta ذخیره شد.

تمام توالی‌های حاصل به وسیله نرم‌افزار SeaView.v4 (Gouy *et al.*, 2010) مورد تجزیه قرار گرفت. بدین منظور پس از انتقال فایل توالی‌ها در نرم‌افزار مذکور، الگوریتم (Thompson *et al.*, 1994) CLUSTAL w استفاده و توالی‌ها مرتب (Align) شدند. برای انتخاب بهترین مدل برای ترسیم درخت فیلوژنی از میان ۲۵ مدل از روش آماری احتمال بیشینه

و بسط در دمای 72°C به مدت ۲ دقیقه و در خاتمه یک چرخه بسط نهایی در دمای 72°C به مدت ۷ دقیقه تنظیم شد. برای انجام الکتروفورز فرآورده‌های تکثیر شده PCR از ژل آگارز با غلظت ۱/۵ درصد استفاده شد.

قطعات DNA حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از کیت خالص‌سازی (GE Healthcare PCR Purification Kit, Life Sciences) خالص شد، سپس محصولات PCR خالص شده با استفاده از دستگاه نانودراپ (Nanodrop ND-1000, Thermo Scientific) تعیین غلظت شد و غلظت DNA نمونه‌ها در حدود $12\text{ ng}/\mu\text{l}$ تنظیم شد. واکنش PCR برای توالی‌یابی با استفاده از هر کدام از آغازگرها به طور جداگانه و با استفاده از DNA خالص شده به میزان ۲ میکرولیتر از DNA، ۱ میکرولیتر مخلوط (AmerDye (Amersham)، ۱ میکرولیتر از آغازگر ($5\mu\text{M}$)، ۴ میکرولیتر از بافر توالی‌یابی ($200\text{ mM Tris/HCl pH }9.0, 10\text{ mM MgCl}_2$) و افزودن آب دیونیزه شده تا حجم $13\mu\text{l}$ انجام شد. برنامه واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز به صورت یک مرحله واسرشت‌سازی در دمای 94°C به مدت ۲۰ ثانیه، یک مرحله اتصال در دمای 50°C به مدت ۱۵ ثانیه و یک مرحله بسط در دمای 60°C به مدت یک دقیقه در 30 سیکل انجام شد. محصولات PCR سپس با استفاده از ABI sequencer 3100 (BioRad, USA) مورد توالی‌یابی قرار گرفت.

برای بررسی فاصله ژنتیکی موجود بین گونه‌های مختلف *Cochliobolus* از نرم‌افزار MEGA5 استفاده شد. ابتدا توالی‌های مذکور در نرم‌افزار MEGA5، با استفاده از روش ClustalW مرتب (Align) شد. پارامترهای استفاده شده برای مرتب‌سازی با این روش به شرح زیر بود. $\text{Gap opening penalty} = 15$ ، $\text{Gap Extension penalty} = 6.66$ و $\text{DNA Weight Matrix} = \text{IUB}$ و $\text{Transition Weight} = 0.5$. در نهایت داده‌ها تجزیه و فواصل ژنتیکی بین گونه‌های مختلف *Cochliobolus* محاسبه شد.

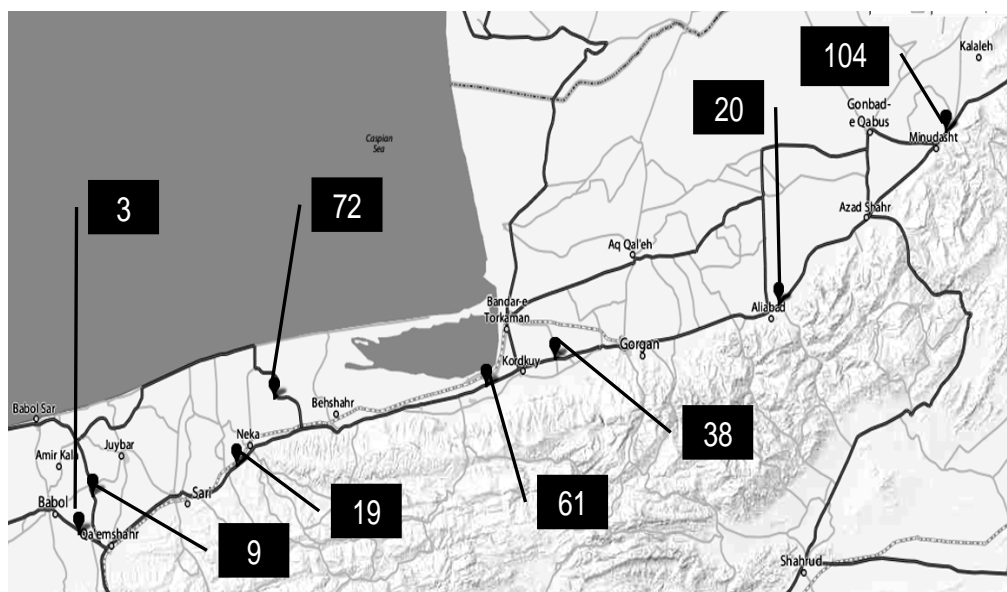
نتایج و بحث

از نمونه‌های مشکوک به بیماری لکه‌سوختگی جمع‌آوری شده از مناطق مختلف استان‌های مازندران و گلستان (شکل ۱)، تعداد زیادی جدایه قارچ عامل بیماری تهیه و از بین آن‌ها هشت جدایه با مشخصات مورفولوژیکی یکسان و شبیه به عامل بیماری لکه‌سوختگی به عنوان نماینده انتخاب شد (جدول ۱). جدایه‌های مذکور با استفاده از کلید معتبر (Sivanesan, 1987) شناسایی شدند. به طور خلاصه پرگنه قارچ تولید یک لایه میسلیم خاکستری تا قهوه‌ای تیره کرد. میزان تولید کنیدی روی محیط کشت PDA بسیار زیاد بود. کنیدیوفورها به صورت منفرد و یا در دستجات با تعداد کم به طور عمودی غیرمنشعب، صاف، دیواره‌دار به رنگ قهوه‌ای، نیمه تیره به طول

(Maximum Likelihood: ML) موجود در نرم افزار MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011) استفاده شد. پس از انتخاب بهترین مدل، ساخت درخت فیلوژنی با استفاده از سه روش فاصله ژنتیکی (Genetic Distance)، پارسیمونی حداکثری (Maximum Parsimony) و تخمین حداکثری (Maximum Likelihood) انجام شد. در روش فاصله ژنتیکی الگوریتم NJ (Neighbor Joining) با استفاده از مدل K2P (Kimura., 1980)، (بهترین مدل محاسبه شده در نرم افزار MEGA5)، و تخمین Bootstrap (Felsenstein, 1985) با ۱۰۰۰ بار تکرار مورد تجزیه و در نهایت فایل درخت فیلوژنی با فرمت php ذخیره شد. در روش پارسیمونی بهترین درخت فیلوژنی از میان ۱۰۰۰۰ درخت انتخاب شد. ترتیب استفاده از توالی‌ها در برنامه به میزان پنج بار تصادفی و Bootstrap با ۱۰۰۰ بار تکرار مورد محاسبه و در نهایت فایل درخت فیلوژنی با فرمت php ذخیره شد. در روش تخمین حداکثری (ML) از برنامه PhyML به عنوان یک برنامه خارجی موجود در نرم‌افزار SeaView.v4 استفاده شد. مدل K2P با محاسبه Bootstrap با هزار بار تکرار و عملیات جستجوی درخت فیلوژنی با کمک الگوریتم (Nearest Neighbor Interchange) NNI انجام شد. برای مشاهده تمامی درخت‌های فیلوژنی از نرم‌افزار FigTree V1.3.1 استفاده شد.

جدول ۱- مشخصات جدایه های *Cochliobolus sativus* جمع‌آوری شده از مناطق شمال ایران
Table 1. Specifications of *Cochliobolus sativus* isolates collected from northern areas of Iran

جدایه Isolate	کد محل Location code	کد جدایه Isolate code	عرض جغرافیایی Latitude	طول جغرافیایی Longitude
<i>C. sativus</i> -3	loc2-a	90M2AB5S1	36.48911	52.77124
<i>C. sativus</i> -9	loc-4	90M4B1S1	36.56344	52.81258
<i>C. sativus</i> -19	loc-8	90M8B7S4	36.61933	53.24681
<i>C. sativus</i> -20	loc-27	90M27B4S3	36.92252	54.89301
<i>C. sativus</i> -38	loc -19	90M19B1S3	36.81921	54.21454
<i>C. sativus</i> -61	loc-16	90M16B5S1	36.76922	54.00687
<i>C. sativus</i> -72	loc-11	90M11B4S1	36.74614	53.36384
<i>C. sativus</i> -104	Loc-32	90M32B3S1	37.24875	55.40349



شکل ۱- مکان‌های نمونه‌برداری از مزارع گندم با علائم برگ‌گی مشکوک به بیماری لکه‌سوخستگی در استان‌های مازندران و گلستان

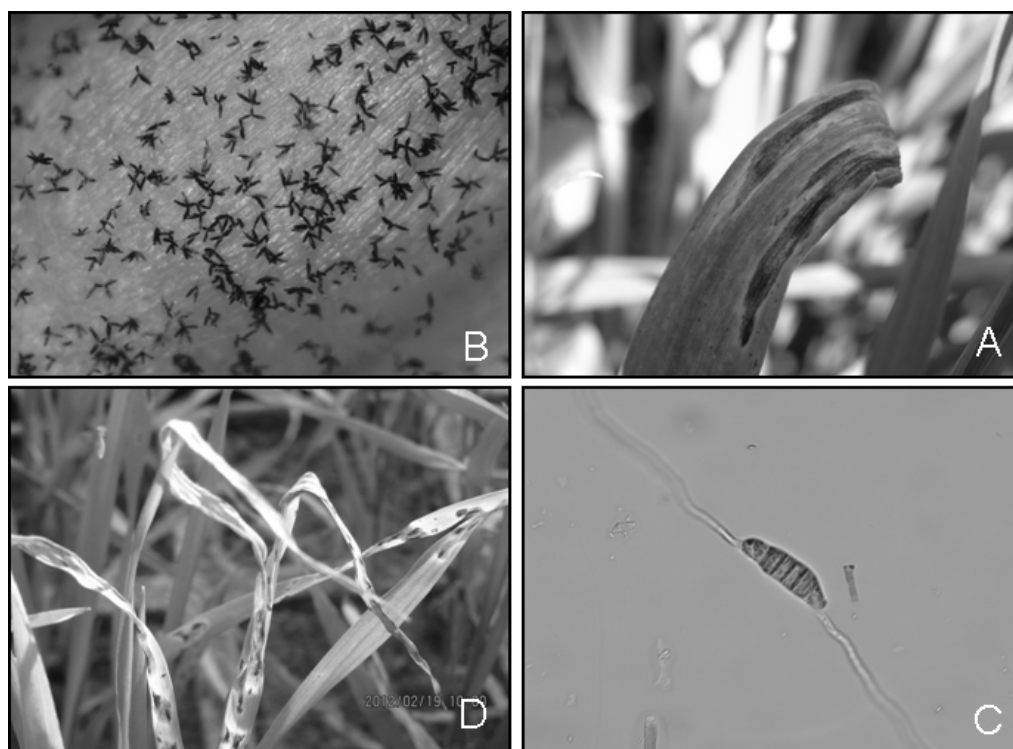
اعداد داخل مستطیل‌های سیاه، شماره جدایه‌های شناسایی شده به عنوان *Cochliobolus sativus* هستند.

Fig. 1. Sampling locations of wheat fields showing suspected spot blotch symptoms in Mazandaran and Golestan provinces

Figures in black rectangles are the numbers of isolates determined as *Cochliobolus sativus*

کنیدی‌ها از دو سوی سلول‌های انتهایی انجام می‌شد. مشخصات مشاهده شده با گونه *Cochliobolus sativus* و کلید توصیف شده توسط سیوانسان (Sivanesan, 1987) مطابقت داشت (شکل ۲).

حدود $200\mu\text{m}$ بودند. کنیدی‌ها به صورت جانبی از سوراخ‌های زیر دیواره‌های عرضی کنیدیفورها تولید می‌شدند. کنیدی‌ها غالباً راست گاهی کمی خمیده، قهوه‌ای تیره با سطح صاف، 6 تا 10 سلولی و به اندازه $28-17 \times 4-12\mu\text{m}$ بودند. جوانه‌زنی



شکل ۲- A: علائم برگ‌گی مشکوک به بیماری لکه‌سوختگی مشاهده شده در مزارع گندم؛ B: مشاهده لکه‌ها در زیر بینوکولر در آزمایشگاه؛ C: جوانه‌زنی کنیدی‌های *Cochliobolus sativus* از دو سلول انتهایی؛ D: علائم بیماری هفت روز پس از مایه‌زنی در شرایط گلخانه‌ای

Fig. 2. A: Leaf symptoms suspected to spot blotch disease observed in wheat fields; B: Observation of lesions under binocular in laboratory; C: Conidial germination of *Cochliobolus sativus* from two apical cells; D: The disease symptom as observed seven days post inoculation under greenhouse conditions

سوختگی قادر به ایجاد علائم اولیه بیماری بعد از گذشت ۴۸ ساعت شدند. علائم اولیه شامل رنگ پریدگی موضعی بود که با گذشت زمان

بر اساس آزمون بیماری‌زایی جدایه‌ها پس از مایه‌زنی آن‌ها در مرحله گیاهچه‌ای روی رقم حساس بولانی، جدایه‌های عامل بیماری لکه

تبدیل به لکه‌های کلروزه با مرکز تیره‌تر شده که به جزایر سبز (Green Islands) معروف هستند. مناطق کلروزه سپس تبدیل به لکه‌های نکروزه که با گذشت زمان وسیع‌تر شدند و در نهایت با پیوستن لکه‌های نکروز و کلروز سراسری تمام سطح برگ دچار سوختگی سراسری شد که از علائم تپیک بیماری است (شکل ۲).

در ایران تحقیقات کمی در مورد بیماری لکه سوختگی گندم انجام شده است که اغلب آن‌ها مربوط به مقاومت ارقام و لاین‌های گندم نسبت به این بیماری بوده است. بین سال‌های ۱۳۷۸ تا ۱۳۸۰ بررسی‌هایی توسط منصور و همکاران (Mansouri et al., 2002) انجام شد که گونه‌های مختلف قارچ فوزاریوم و *B. sorokiniana* به عنوان عامل اصلی بیماری پوسیدگی معمولی ریشه و طوقه معرفی شدند. خسارت ناشی از این بیماری به طور متوسط سالانه ۱۲/۵-۳ درصد برآورد شد. همچنین در منطقه میناب بندرعباس اپیدمی لکه برگی گندم ایجاد شده توسط این قارچ باعث خسارت سنگین شد (Mansouri and Pajumand, 2005). در بررسی دیگری واکنش ارقام و لاین‌های گندم نسبت به عامل بیماری در شرایط گلخانه با ایجاد آلودگی روی ریشه گیاهان مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور دو جدایه Sh و Kh با بیماریزایی بالا انتخاب و اثر آن‌ها روی پانزده رقم و لاین گندم مورد بررسی قرار گرفت (Samii et al., 2008). در نتیجه ارقام سبلان،

زرین و نیک‌نژاد نسبت به پوسیدگی ریشه در مقایسه با سایر ارقام مقاوم‌تر بودند. واکنش ۱۱۴ رقم و لاین گندم نان نسبت به عامل لکه سوختگی در شرایط مزرعه‌ای نشان داد که ارقام مرودشت و چمران و لاین M-75-20 حساسیت کمتری نسبت به بیماری دارند (منصوری و پژوهشگر، ۲۰۰۵).

در سال‌های گذشته در زمینه تنوع ژنتیکی گونه‌های موجود در جنس *Cochliobolus* چندین تحقیق انجام شده است. ژونگ و استفانسون (Zhong and Steffenson, 2001) تعداد ۷۰ جدایه موجود در این جنس را با روش AFLP مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که روش تجزیه کلاستر می‌تواند جدایه‌های مربوط به گونه‌های *C. heterostrophus*، *C. carbonum*، *C. sativus* و *C. victoriae* را از هم متمایز کند. ناسیمتو و وندراسند (Nascimento and van der Sand 2008) با استفاده از تکثیر منطقه ITS و انجام ITS-RFLP نشان دادند که جدایه‌های برزیلی قارچ *C. sativus* نسبت به جدایه‌های دیگر کشورها در یک گروه جدا قرار گرفته اما این روش قادر به تمایز جدایه‌ها بر اساس منطقه جغرافیایی و یا میزبان آن‌ها نبود. بربی و همکاران (Berbee et al., 1999) روابط فیلوژنی ۴۱ گونه موجود در خانواده Pleosporaceae مربوط به جنس‌های *Bipolaris* و *Curvularia* را با استفاده از بررسی توالی‌های ITS و ژن

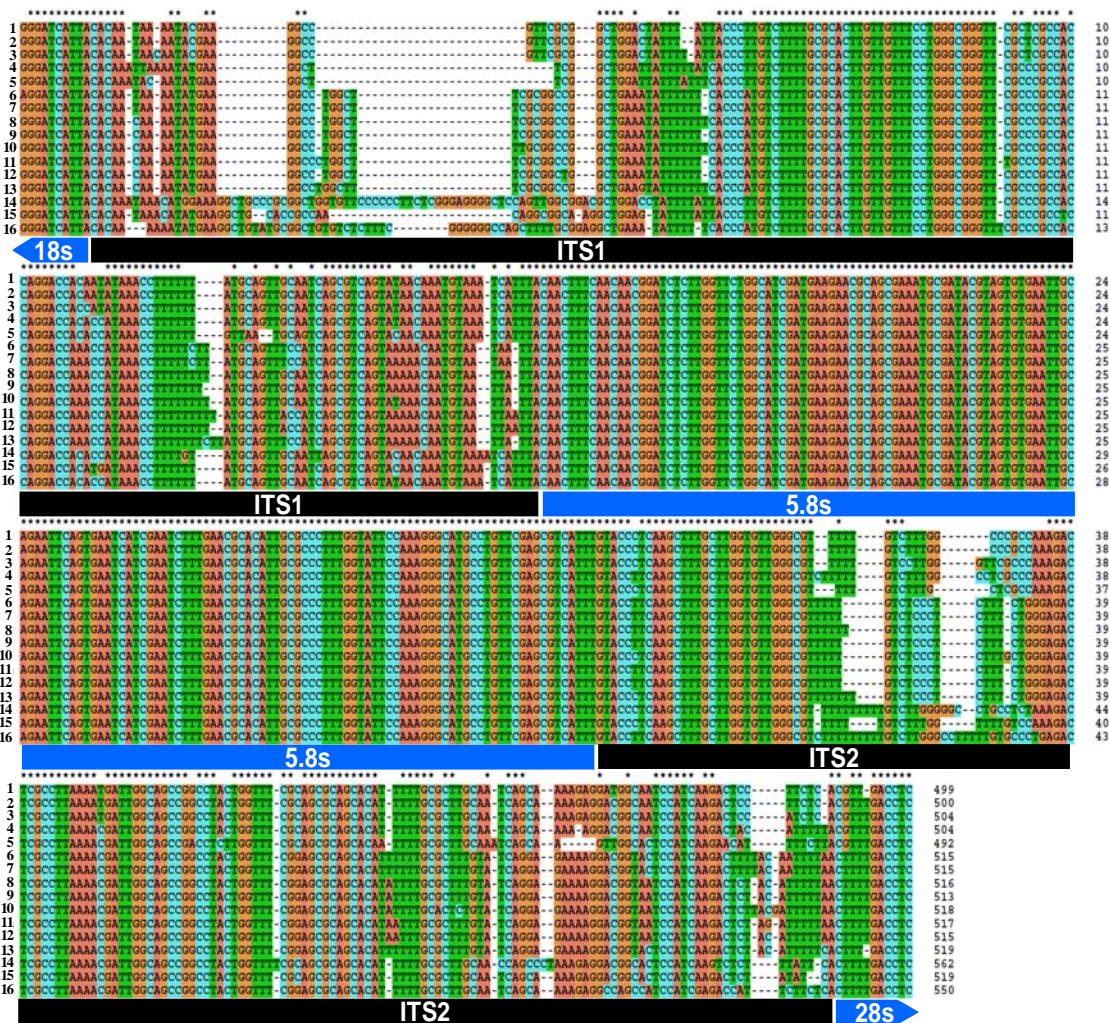
بعضی مواقع در میان نژادهای یک گونه است (Peay et al., 2008). از این رو در این تحقیق جدایه‌های مشکوک به عامل بیماری لکه‌سوختگی مورد توالی‌یابی قرار گرفت. نتایج توالی‌یابی نشان داد که تمامی قطعات تکثیر شده DNA ناشی از تکثیر منطقه ITS بود. بر این اساس توالی همه جدایه‌های *C. sativus* شمال ایران با جدایه آمریکایی مرجع *C. sativus* موجود در NCBI (JX145649) کاملاً یکسان بود. انجام آزمون BLAST با توالی‌های موجود در بانک ژن جهانی نشان داد که توالی جدایه‌های ایران با جدایه‌های *C. sativus* ۱۰۰٪ شباهت (Identity) داشت (Evalue = 0).

مقایسه توالی‌های ITS نشان داد که منطقه ITS1 نسبت به منطقه ITS2 دارای تنوع بیشتری به ویژه در ناحیه ۷۰bp ابتدایی بود. شکل ۳ نشان‌دهنده توالی‌های مرتب شده گونه‌های مختلف *Cochliobolus* است. اندازه توالی‌های منطقه ITS1-5.8S-ITS2 در گونه‌های مختلف از ۴۹۲bp متعلق به گونه *C. kusanoi* تا ۵۶۲bp متعلق به گونه *C. nisikadoi* متفاوت بود. اندازه این منطقه برای گونه *C. sativus*، ۵۱۶bp، اندازه قطعه 5.8S rDNA، ۶۹bp و بزرگ‌ترین توالی ایندل اضافه شده (Inserted indle) مربوط به گونه *C. lunatus* به اندازه ۳۴bp در منطقه ITS1 بود. از مجموع ۵۷۹ نوکلئوتید مرتب شده، ۱۵۲ نوکلئوتید متنوع و بقیه به صورت حفاظت شده (Conserved) بودند.

همان‌گونه که انتظار می‌رفت تجزیه‌های

گلیسرآلدئید-۳- فسفات دهیدروژناز مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که از میان ۳۲ گونه مورد بررسی در جنس *Cochliobolus*، ۱۳ گونه در یک گروه و ۱۸ گونه در یک گروه دیگر قرار گرفتند اما گونه *C. homomorphus* در هیچ کدام از این گروه‌ها قرار نگرفت.

سالیان سال شناسایی قارچ‌ها عمدتاً با استفاده از مشخصات مورفولوژیکی انجام می‌شد. در دو دهه گذشته روش‌های مولکولی سریع و دقیق، به کمک روش‌های سنتی سیستماتیک آمده‌اند. توالی‌یابی DNA از جمله روش‌های بسیار مهم در این زمینه است. مهم‌ترین مناطق مورد استفاده در فیلوژنی قارچ‌ها منطقه DNA ریبوزومی (rDNA) است که بیشترین استفاده و کاربرد را تاکنون در این زمینه داشته است. در میان یوکاریوت‌ها منطقه rDNA شامل سه منطقه کاملاً حفاظت شده به نام‌های 28S rDNA، 5.8S rDNA، 18S rDNA و دو منطقه ITS1 و ITS2 که در طول تکامل به سرعت تغییر می‌کنند، است (Hillis and Dixon, 1991). این دو منطقه در سال‌های گذشته برای مطالعه روابط فیلوژنی گونه‌های نزدیک موجودات به وفور استفاده شده است (Noge et al., 2005) در حال حاضر در میان قارچ‌ها بیشترین اطلاعات توالی از منطقه ITS موجود است و بنابراین عموماً بهترین و مفیدترین منطقه برای استفاده در سیستماتیک و فیلوژنی مولکولی در سطح گونه و حتی در



شکل ۳- مرتب‌سازی (Alignment) توالی‌های گونه‌های مختلف جنس *Cochlibolus* با استفاده از الگوریتم ClustalW موجود در نرم‌افزار ClustalX

انتهای منطقه 18s rDNA، منطقه ITS1، منطقه 5.8s rDNA، منطقه ITS2، و ابتدای منطقه 28s rDNA مشخص شده است. توالی‌های هر گونه با شماره‌های زیر مشخص شده است.

1. *C. australiensis*, 2. *C. spicifera*, 3. *C. hawaiiensis*, 4. *C. lunatus*, 5. *C. kusanoi*, 6. *C. homomorphus*, 7. *C. cynodontis*, 8. *C. sativus*, 9. *C. eleusines*, 10. *C. heterostrophus*, 11. *C. carbonum*, 12. *C. victoriae*, 13. *C. miyabeanus*, 14. *C. nisikadoi*, 15. *C. geniculatus*, 16. *C. intermedius*.

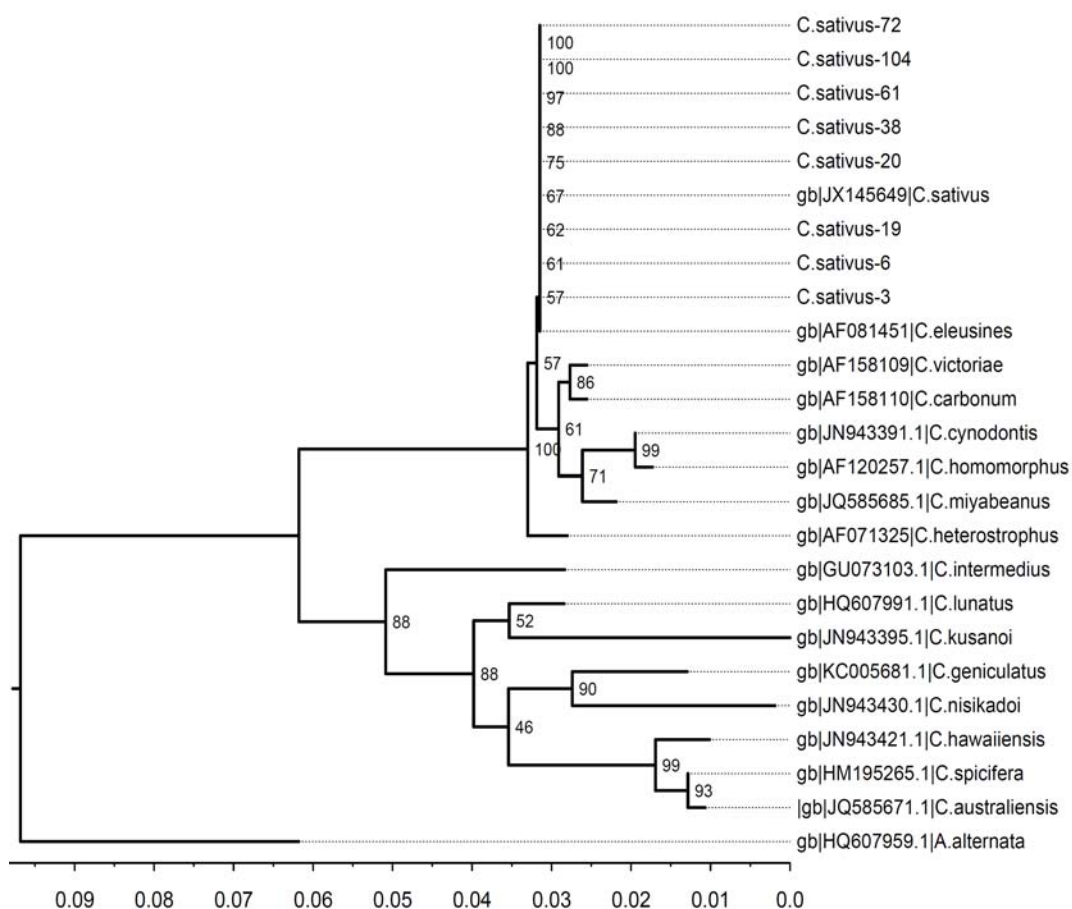
Fig. 3. Sequence alignment of species belonging to *Cochlibolus* using ClustalW algorithms presented in ClustalX software

The last part of 18S rDNA, ITS1, 5.8S rDNA and the first part of 28S rDNA regions are illustrated. The sequences of each species are shown with the following numbers:

1. *C. australiensis*, 2. *C. spicifera*, 3. *C. hawaiiensis*, 4. *C. lunatus*, 5. *C. kusanoi*, 6. *C. homomorphus*, 7. *C. cynodontis*, 8. *C. sativus*, 9. *C. eleusines*, 10. *C. heterostrophus*, 11. *C. carbonum*, 12. *C. victoriae*, 13. *C. miyabeanus*, 14. *C. nisikadoi*, 15. *C. geniculatus*, 16. *C. intermedius*.

C. sativus با جدایه مرجع در یک گروه قرار گرفتند (شکل‌های ۴، ۵ و ۶). تجزیه

فیلوژنتیکی با روش‌های مختلف مانند MP، ML و GD نشان داد که جدایه‌های ایرانی قارچ

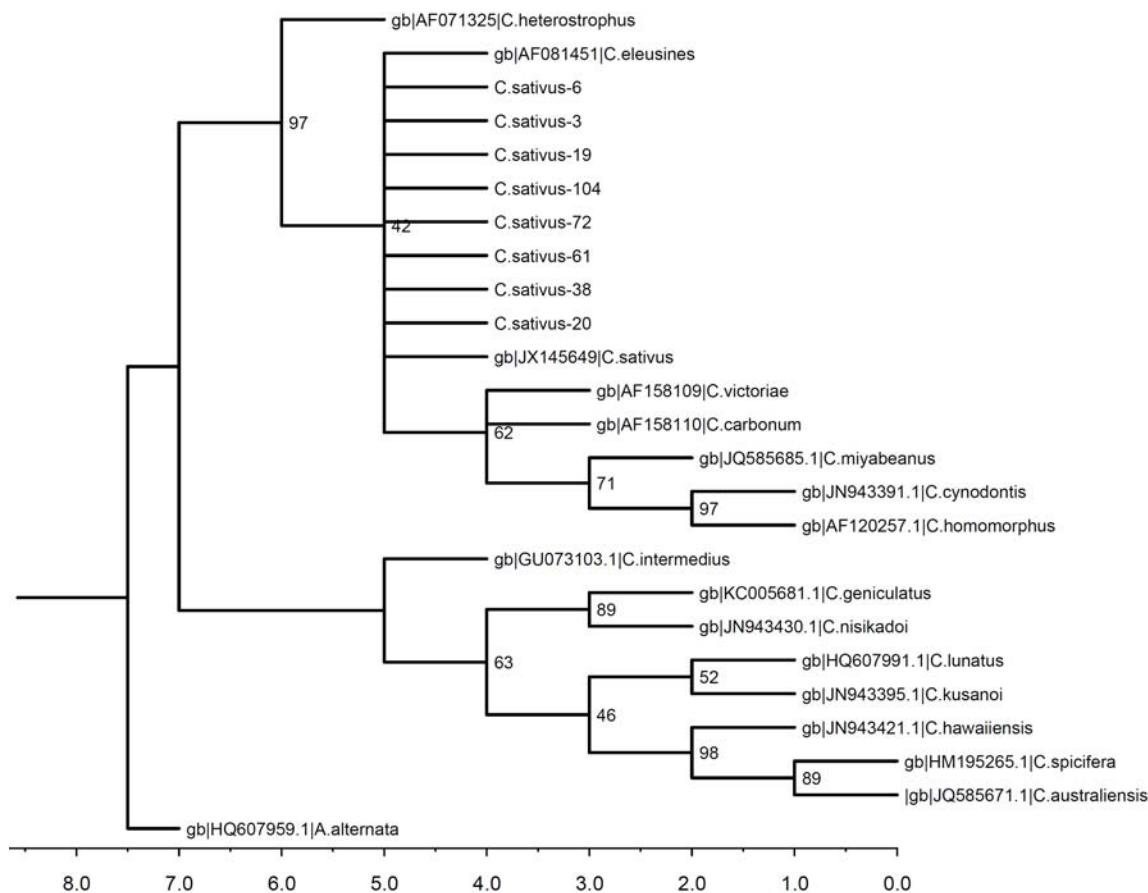


شکل ۴- فیلوگرام گونه‌های مختلف *Cochliobolus* با استفاده از روش فاصله ژنتیکی (Genetic Distance) و الگوریتم NJ

Fig. 4. Phylogram of different species of *Cochliobolus* drawn using Genetic Distance method and NJ algorithm

نتایج درخت فیلوژنی حاصل از روش GD نشان داد که دو گروه اصلی در میان گونه‌های *Cochliobolus* وجود دارد. گروه اول با Bootstrap ۱۰۰ به دو زیر گروه شامل گونه *C. sativus* که با فاصله بسیار کمی با گونه *C. eleusines* یک زیر گروه را تشکیل دادند. زیر گروه دوم شامل گونه‌های *C. cynodontis*، *C. miyabeanus*، *C. homomorphus* و *C. carbonum* و *C. victoriae* به

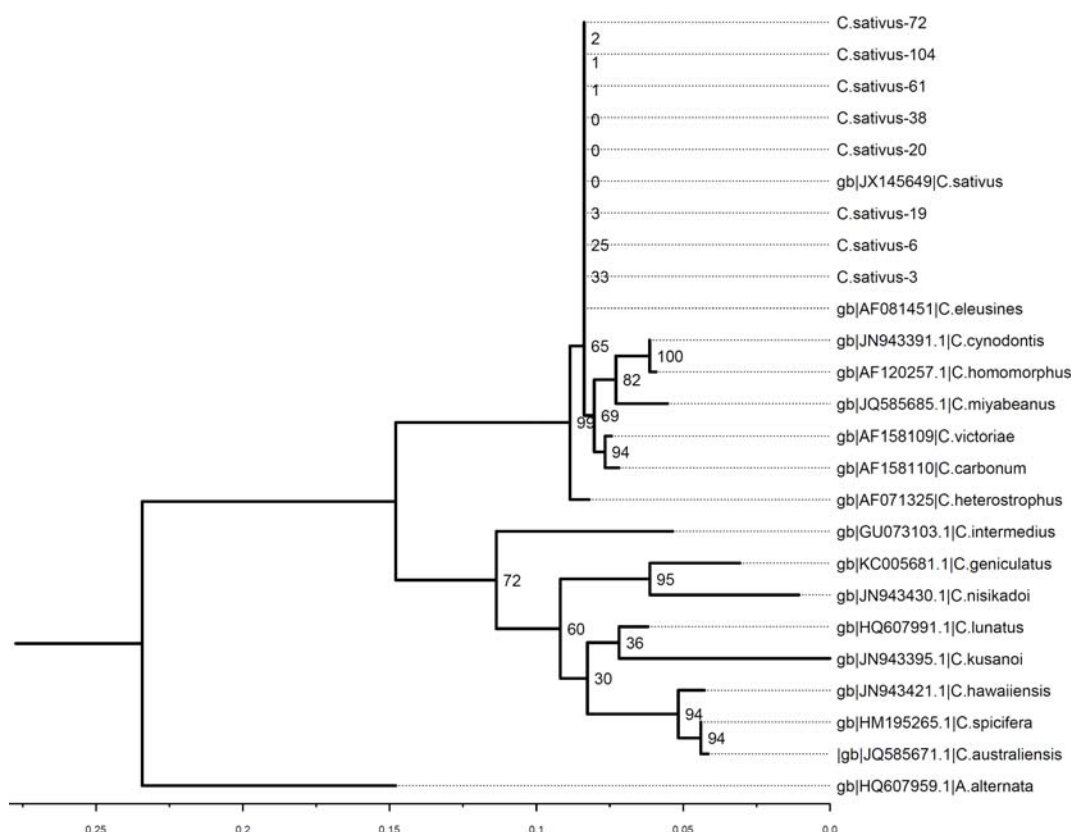
فیلوژنی بر اساس ماتریکس فاصله ژنتیکی با استفاده از روش Neighbor-Joining انجام شد. علاوه بر این روش پارسیمونی بیشینه (Maximum Parsimony) و تخمین بیشینه (Maximum Likelihood) به عنوان دو روش معتبر دیگر نیز مورد استفاده قرار گرفت و درخت فیلوژنی حاصل با درخت فیلوژنی NJ مقایسه شد نتایج نشان داد که هر سه روش قادر به ترسیم درخت فیلوژنی بسیار مشابه بودند.



شکل ۵- فیلوگرام گونه‌های مختلف *Cochliobolus* با استفاده از روش پارسیمونی بیشینه (Maximum Parsimony)
 Fig. 5. Phylogram of different species of *Cochliobolus* drawn using Maximum Parsimony method

داده شده است. درخت فیلوژنی حاصل از روش ML نیز در شکل ۶ نمایش داده شده است. همان گونه که از درخت حاصل از این دو روش پیداست، دو گروه اصلی در میان گونه‌های *Cochliobolus* همانند آنچه که در روش GD حاصل شده بود، مشخص شدند. تنها تفاوت در Bootstrap بود که اختلاف جزئی با روش GD داشت. بررسی فاصله ژنتیکی محاسبه شده برای گونه‌های مختلف *Cochliobolus* نشان داد که گونه *C. eleusines* با فاصله ژنتیکی بسیار کم

انضمام گونه *C. heterostrophes* همگی در گروه اول قرار گرفتند. گروه دوم شامل مجموعه‌ای از گونه‌های *C. geniculatus*، *C. nisikadoi*، *C. intermedius*، *C. hawaiiensis*، *C. lunatus*، *C. kusanoi* و *C. spicifera* و *C. australiensis* بود که به طور واضحی (BootStrap = 88) از گروه اول متمایز شدند. به همین منوال تجزیه MP با تولید ۱۰۰۰۰ درخت فیلوژنی انجام شد که مناسب‌ترین درخت فیلوژنی در شکل ۵ نشان



شکل ۶- فیلوگرام گونه‌های مختلف *Cochliobolus* با استفاده از روش تخمین بیشینه (Maximum Likelihood)
 Fig. 6. Phylogram of different species of *Cochliobolus* drawn using Maximum Likelihood method

از مناطق مختلف شمال کشور به عنوان نماینده انتخاب و قارچ عامل بیماری جداسازی و مورد بررسی مورفولوژیکی، اثبات بیماریزایی و مولکولی قرار گرفت که تمامی روش‌های مذکور ضمن تایید یک‌دیگر نشان دادند که علائم بیماری مشاهده شده مربوط به گونه *C. sativus* است. این یافته‌ها حاکی از گسترش و پراکنش سراسری این بیماری در شمال کشور است. با توجه به مشاهدات مزرعه‌ای و آزمایش‌های انجام شده به نظر می‌رسد که بیماری لکه سوختگی یکی از بیماری‌های شایع

از گونه *C. sativus* قرار گرفت که نشان‌دهنده بیشترین قرابت دو گونه مذکور است، در حالی که گونه *C. sativus* بیشترین فاصله را با دو گونه *C. kusanoi* ($GD = 0.0888$) و *C. australiensis* ($GD = 0.0791$) داشت. بیشترین فاصله ژنتیکی ($GD = 0.0937$) بین دو گونه *C. kusanoi* و *C. carbonum* بود (جدول ۲).

از میان نمونه‌های برگی متعدد گندم با علائم شبیه به بیماری لکه سوختگی، تعداد هشت نمونه

جدول ۲- فاصله ژنتیکی محاسبه شده بر اساس مدل K2P بین گونه‌های مختلف *Cochliobolus spp.* با استفاده از نرم افزار MEGA5.

Table 2. Calculated genetic distances based on the K2P model among different *Cochliobolus spp.* species using MEGA5 software

گونه قارچی Fungal species	گونه قارچی Fungal species															
	<i>C. homomorphus</i>	<i>C. miyabeanus</i>	<i>C. australiensis</i>	<i>C. kusanoi</i>	<i>C. spicifera</i>	<i>C. hawaiiensis</i>	<i>C. intermedius</i>	<i>C. lunatus</i>	<i>C. nisikadoi</i>	<i>C. geniculatus</i>	<i>C. eleusines</i>	<i>C. cynodontis</i>	<i>C. carbonum</i>	<i>C. heterostrophus</i>	<i>C. victoriae</i>	<i>C. sativus</i>
<i>C. homomorphus</i>																
<i>C. miyabeanus</i>	0.01517															
<i>C. australiensis</i>	0.08625	0.07668														
<i>C. kusanoi</i>	0.08636	0.08405	0.07437													
<i>C. spicifera</i>	0.08383	0.07428	0.00215	0.07677												
<i>C. hawaiiensis</i>	0.08383	0.07428	0.01079	0.07677	0.00862											
<i>C. intermedius</i>	0.06716	0.06720	0.06027	0.07904	0.05792	0.05792										
<i>C. lunatus</i>	0.06249	0.06487	0.03971	0.05330	0.03742	0.03742	0.04641									
<i>C. nisikadoi</i>	0.08138	0.07188	0.04871	0.07913	0.04641	0.05334	0.05563	0.05334								
<i>C. geniculatus</i>	0.07668	0.06487	0.03958	0.07190	0.03732	0.03958	0.05334	0.04414	0.03283							
<i>C. eleusines</i>	0.01079	0.00862	0.07908	0.08881	0.07668	0.07668	0.06250	0.06018	0.07898	0.07428						
<i>C. cynodontis</i>	0.00215	0.01297	0.08383	0.08392	0.08141	0.08141	0.06482	0.06017	0.07898	0.07428	0.00862					
<i>C. carbonum</i>	0.01515	0.01296	0.08387	0.09368	0.08145	0.08145	0.06718	0.06484	0.08376	0.07904	0.00430	0.01296				
<i>C. heterostrophus</i>	0.01956	0.01296	0.07913	0.09136	0.07672	0.07672	0.06722	0.06490	0.08141	0.07672	0.00862	0.01735	0.01297			
<i>C. victoriae</i>	0.01296	0.01078	0.08145	0.09121	0.07904	0.07904	0.06483	0.06250	0.08136	0.07664	0.00214	0.01078	0.00215	0.01079		
<i>C. sativus</i>	0.01079	0.00862	0.07908	0.08881	0.07668	0.07668	0.06250	0.06018	0.07898	0.07428	0.00000	0.00862	0.00430	0.00862	0.00214	

گندم در شمال کشور بوده که قابلیت خسارت‌زایی بالایی را دارد، بنابراین برای کنترل این بیماری و پیشگیری از ایجاد اپیدمی‌های گسترده‌تر، در برنامه‌های به‌نژادی گندم و معرفی رقم برای اقلیم گرم و مرطوب شمال کشور لازم است مقاومت نسبت به این بیماری نیز مورد توجه قرار گیرد تا از خسارت‌های شدیدتر و گسترش روزافزون این بیماری جلوگیری شود.

References

- Alam, K. B., Banu, S.P., and Shaheed, M. A. 1998.** The occurrence and significance of spot blotch disease in Bangladesh. pp. 63-66. In: Duveiller, E., Dubin, H. J., Reeves, J., and McNab, A. (eds.) *Helminthosporium Blight of Wheat: Spot Blotch and Tan Spot*, CIMMYT, Mexico, D. F. Mexico.
- Berbee, M. L., Pirseyedi, M., and 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.
- Felsenstein, J. 1985.** Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Gouy, M., Guindon, S., and Gascuel, O. 2010.** SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution* 27: 221-224.
- Hillis, D. M., and Dixon, M. T. 1991.** Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Quarterly Review of Biology* 66: 411-453.
- 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.
- Mansouri, B., and Pajumand, M. 2005.** Response of wheat advanced lines and cultivars to common root and crown rot pathogens under field conditions in Fars province. *Seed and Plant*. 21: 81-91 (in Persian).
- Mansouri, B., Ravanlou, A., Noorollahi, K., Azadbakht, N., Jafari, H., and Ghalandar, M. 2002.** Common root and crown rot disease of wheat in the provinces of West Azarbaijan, Ilam, Lorestan, Markazi and Zanjan. *Proceedings of the 15th Iranian Plant Protection Congress*. Kermanshah, Iran. Page 41 (in Persian).

- Murray, T. D., Parry, D.W., and Cattlin, N. D. 1998.** A Color Handbook of Diseases of Small Grain Cereal Crops. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA.
- Nascimento E. J. D., and van der Sand, S. T. 2008.** Restriction analysis of the amplified ribosomal DNA spacers ITS1 and ITS2 of *Bipolaris sorokiniana* isolates. World Journal of Microbiology & Biotechnology 24: 647-652.
- Noge, K., Mori, N., Tanaka, C., Ritsuo, N., Tsuda, M., and Kuwahara, Y. 2005.** Identification of astigmatid mites using the second internal transcribed spacer . ITS2. region and its application for phylogenetic study. Experimental and Applied Acarology 35: 29–46.
- Peay, K. G., Kennedy P. G., and Bruns, T. D. 2008.** Fungal community ecology: a hybrid beast with a molecular master. BioScience 58: 799–810.
- Samii, F., Nikkhah, M., Zamanizade, H., and Rafie Karherudy, Z. 2008.** Reaction of some wheat cultivars to common root rot fungus *Bipolaris sorokiniana*. Journal of Plant Protection 22: 211-219.
- Sharma, R. C., and Duveiller, E. 2006.** Spot blotch continues to cause substantial grain yield reductions under resource limited farming conditions. Journal of Phytopathology 154: 482-488.
- Sharma, R. C., and Duveiller, E. 2007.** Advancement toward new spot blotch resistant wheats in South Asia. Crop Science 47: 961-968.
- Singh, R. V., Singh, A. K., and Singh, S. P. 1997.** Distribution of pathogens causing foliar blight of wheat in India and neighbouring countries. pp. 59-62. In: Duveiller, E., Dubin, H. J., Reeves, J., and McNab, A. (eds.) Helminthosporium Blight of Wheat: Spot Blotch and Tan Spot, CIMMYT, Mexico, D. F. Mexico.
- Sivanesan, A. 1987.** Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs. CAB International Mycological Institute, Mycological Paper 158, Wellingford, UK. 261 pp.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. 2011.** MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony method. Molecular Biology and Evolution 28: 2731-2739.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. 1994.** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence

weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.

Yazdi Samadi, B., and Abdemishani, C. 1996. Crop Breeding. Center for Academic Publication, Tehran, Iran. 283 pp. (in Persian).

Zhong, S. B., and Steffenson, B. J. 2001. Virulence and molecular diversity in *Cochliobolus sativus*. *Phytopathology* 91: 469-476.

