Journal of Iranian Plant Protection Research

https://jpp.um.ac.ir

Research Article
Vol. 36, No. 1, Spring 2022, p. 21-32

Molecular and Morphological Characteristics of Leaf Spot and Black Spike in Golestan Province, Iran

H. Malekiziarati[1], V, Babaeizad[2], M.A. Tajick Ghanbary[3]*, R. Hydari[4], M.A. Aghajani[5]

Received: 14-06-2021
Revised: 02-08-2021
Accepted: 19-09-2021
AvailableOnline: 20-06-2022

How to cite this article:
Malekiziarati, H., Babaeizad, V., TajickGhanbary, M.A., Hydari, R., & Aghajani, M.A. (2022). Molecular and Morphological Characteristics of Leaf Spot and Black Spike in Golestan Province, Iran. *Journal of Iranian Plant Protection Research 36*(1): 21-32. (In Persian with English abstract)
DOI: 10.22067.2021.70596.1024

Introduction

Black dot disease triggered by *Dilophospora alopecuri* causes considerable damage in some fields in Golestan province, North of Iran. *D. alopecuri* is its causal agent and carried in to wheat by wheat gall nematode. Extracellular appendages on the conidia adhere to the cuticule of the nematode juveniles. The disease was reported in united state of America, Canada, Germany, Ugoslavia, India and Pakistan.The fungi is classDothideomycetes and order Dothideales. The geographical distribution of disease was studied in South-Eastern Australia in the summer 1995.The disease in Iran has been reported by Bamdadian since 1973 from Baluchistan, Isfahan, Golestan, Khorasan, Kerman and Khuzestan. The disease agent causes considerable damage in some fields in Golestan province, North of Iran. Symptoms have been found during a survey of foliar disease of wheat in Golestan province. The disease incidence was very low but fungus interaction with seed gall nematode causes considerable damage. The symptoms start with yellow spindle-shaped flecks which develop and become tan brown with black border. This spots may occur on peduncle and heads. The pathogen survives as mycelium in host debris or as conidia on seeds. The purpose of this study was determining the geographical distribution, disease incidence (DI) and disease severity (DS). Then molecular identification of isolates with ITS rDNA in North of Iran, Golestan province.

Material and Methods

Wheat fields infected with the disease in the cities of Golestan province were visited and subjected to sampling during spring 2017-2018. 42 samples suspected to infection with the twist disease were gathered from seven cities of Golestan province. The rate of disease distribution from seven cities farms with disease symptoms, three farms were selected in each crop year and their geographical coordinates were recorded. In this research mapping the geographical distribution of disease was prepared by ArcGIS10.2 software. During 2018 and 2019, a survey was conducted to characterize the disease incidence (DI) and disease severity (DS). The *D. alpoecuri* leaf spot reading scales rate carried out in this study. No visible symptoms are observed and the leaf remain a health 0; A few chlorotic lesions are present and the infection site is a tan-spot colored 1: Necrosis and chlorosis both exist on the leaf 2: A few pycnidia are visible on the infected site and less than 30% of the leaf is occupied by pycnidia 3: The entire leaf is covered by pycnidial lesions scored 4. A significant difference was

1, 2 and 3- Ph.D. Student Mycology and Plant Pathology and Associate Professors, Plant Pathology Department of Plant Protection College of Agronomic Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: mycology2@gmail.com)
4- Associate Professor, Department of Plant Protection College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
5- Associate Professor Department of Plant Protection Research, Agricultural and Natural Resources Research Center of Golestan Province, Gorgan

observed between the disease rates in the two cropping years. Seven *D. alopecuri* isolates were identified on the based on morphological and molecular parameters. After purification of fungal isolates, 50 conidia and pycnidia were selected in each isolate and the length and width of pycnidia, conidia cell number, conidia size (length and width), colony shape on the culture medium were also measured in the laboratory. After that identifying of the fungus isolates pathogenicity test was performed in the greenhouse. The *D. alopecuri* spore suspension with 1.75×10^6 CFU concentration and for nematode population with 25000 larvae (L_2) were used for inoculation to plants. After three months symptoms of leaf spot (twist) disease was appeared in tillering stage. Fungal DNA extraction from mycelium mass of selected isolates was performed by Murray and Thompson (1980) method and part of ITS region was amplified using ITS4 and ITS5 primers by polymerase chain reaction (PCR). The amplified PCR products of fragments were purified and sequenced at sequencing Microsense Company in Switzerland.

Results and Discussion

Comparing of harvested fungal isolates which have been grown on PDA medium showed some variation in different characteristics such as the number of conidia walls, conidia appendages and pycnidia size. In both subsequent years, maximum disease incidence (DI) and disease severity (DS) was measured in Kalaleh by 3.6% to 3.9%, while for Bandar-Torkaman, the city with the lowest DS, were1.3% to 1.65%. The average size of conidia length was 4-8×1 µm in diameters.The pathogenicity test showed that the *D.alopecuri* is capable to produce twist disease symptoms only in the presence with seed gall nematode in the host. The nucleic acid sequences of Internal Spacer Transcribed (ITS) regions for Golestan isolates showed 100% similarity and had small genetic similarity with *D. alopecuri* MH859142.1 deposited in NCBI Genbank. The sequences belong to *D.alopecuri* from Gonbad, Aqala, Azadshahr, Maravehtapeh, Kalaleh, Minodasht cities were registered in NCBI Genbank with MW302360, MW291507, MW291561, MW303438, MW303517, MW303518 accession number, respectively.

Conclusion

This is the first study carried out on the morphological and molecular characteristics of twist disease agent isolates, disease severity and its distribution in Golestan province as a major wheat production area of Iran. Many of results especially molecular data and submitted sequences form Iranian isolates of *D.alopecuri* to databanks are new for Iran.

Keywords: *Anguina tritici*, Distribution, Disease severity, ITSrDNA

نشریه پژوهش‌های حفاظت گیاهان ایران
https://jpp.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۳۶، شماره ۱، بهار ۱۴۰۱، ص ۳۲-۲۱

مطالعه مورفولوژیکی و مولکولی عامل بیماری لکه برگی و خال سیاه گندم *Dilophospora alopecuri* در استان گلستان

حسن ملکی زیارتی[۱]- ولی الله بابایی زاد[۲]- محمد علی تاجیک قنبری[۳*]- رامین حیدری[۴]- محمد علی آقاجانی[۵]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۳/۲۴
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۲۸

چکیده

عامل بیماری لکه برگی و سیاه شدن خوشه گندم (*Dilophospora alopecuri*) است که در استان‌های شمالی کشور به‌ویژه استان گلستان به‌همراه نماتد گال گندم (*Anguina tritici*) خسارت قابل‌توجهی وارد می‌کند و نماتد ناقل آن محسوب می‌شود. جهت تعیین میزان درصد وقوع و شدت بیماری در طی سال‌های زراعی ۹۷ و ۹۸، تعداد ۴۲ نمونه آلوده به بیماری از ۷ شهرستان استان گلستان نمونه‌برداری به عمل آمد. از کشت نمونه‌های دارای علائم بیماری خال سیاه روی محیط کشت PDA جدایه‌های قارچی جدا و خالص شدند. جدایه‌ها مورد مطالعه ریخت‌شناسی و مولکولی قرار گرفتند. در این تحقیق نقشه پراکنش بیماری با استفاده از نرم‌افزار ArcGIS10.2 تهیه شد. نتایج نشان داد که بیشترین میانگین شدت بیماری و درصد وقوع بیماری از ۷ شهرستان در دو سال به‌ترتیب، کلاله با ۲/۶۵ و ۲/۹ درصد بود و کمترین میزان بر اساس آنالیز آماری مربوط به شهرستان بندر ترکمن به ترتیب ۱/۳ و ۱/۶۵ درصد اندازه‌گیری شد. نتایج بررسی‌های ریخت‌شناسی نشان داد که جدایه‌ها در برخی ویژگی‌ها نظیر تعداد دیواره، تعداد زوائد اسپور و اندازه پیکنیدیوم و سرعت رشد جدایه‌ها متفاوت بودند. میانگین طول اسپور ۱× ۸-۴ میکرومتر اندازه‌گیری شد. در بررسی مولکولی، توالی ناحیه فاصله‌ساز ریبوزومی (ITS) مشخص شدکه جدایه‌های استان با هم شباهت ۱۰۰ درصدی داشتند ولی با قارچ *D. alopecuri* *MH859142.1* ثبت شده در پایگاه NCBI در این ناحیه تفاوت ژنتیکی مختصری نشان دادند. این مطالعه اولین بررسی از خصوصیات مورفولوژیکی و مولکولی، وضعیت پراکنش و شدت بیماری قارچ عامل بیماری خال سیاه گندم در استان گلستان، یکی از قطب‌های تولید گندم کشور است.

واژه‌های کلیدی: پراکنش، شدت بیماری، نماتد گال گندم، ITS rDNA

مقدمه

بیماری لکه برگی و سیاه شدن سنبله (خال سیاه) گندم یکی از بیماری‌های خسارت‌زای این محصول در کشورهای تولیدکننده آن است. (Anonymous, 2005; Bamdadian, 1973; Okhovat, 1999; Riley, 1994,). این بیماری در ایران نیز روی گندم مشاهده شده و بامدادیان از بلوچستان، دزفول، اصفهان، گناباد، گرگان، خراسان، سیستان و بلوچستان، کرمان و خوزستان آن را گزارش کرده است (Bamdadian, 1973). عامل بیماری قارچ *Dilophospora alopecuri* (Fr.) Fr.1849 است که به‌طور معمول با نماتد گال دانه، (*A. tritici*) همراه بوده و نماتد ناقل آن به شمار می‌رود (Anonymous, 2005). قارچ عامل بیماری از شاخه آسکومایکوتا رده Dothideomycetes و راسته Dothideales است و تولید استرومای مشخص و پیکنیدیوم‌های روزنه‌دار در بین لکه‌ها می‌کند. این بیماری در نیمه اول قرن اخیر در استرالیا، ایالات متحده آمریکا وکانادا به گندم خسارت زده و تا حدی در بخشی از اروپا سبب کاهش محصول شده است. بیشترین حد بروز بیماری در هندوستان در سال ۱۹۶۱ و حدود ۵۰ درصد گزارش‌شده است (Okhovat, 1999). اولین گزارش قارچ بیمارگر از نیوزلند در سال ۱۹۹۹ بود (McKenzie and

۱، ۲ و ۳- به‌ترتیب دانشجوی دکتری بیماری‌شناسی گیاهی و دانشیاران گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
(*- نویسنده مسئول: Email: mycology2@gmail.com)
۴- دانشیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی گروه گیاه‌پزشکی، تهران
۵- دانشیار بخش گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان

DOI: 10.22067/JPP.2021.70596.1024

Johnson, 1999). گزارش‌هایی از آلمان و یوگسلاوی در سال ۱۹۵۵ نشان داد که این بیماری تا ۵۰ درصد به گندم خسارت وارد نموده است و در سال ۱۹۳۹ خسارت آن در آلمان حدود ۳۰ درصد بود (Okhovat, 1999). بیماری اولین بار در کشور عراق در سال ۱۹۷۷ بر روی گندم نان، رقم Mexipak گزارش شد (Ldawi *et al.*, 1988). سپس در مناطق مختلف بر روی علف‌های هرز خصوصاً چچم (*Lolium rigidum*) و جو، بر روی برگ‌ها و سنبله گزارش شد (Lib and Nimer, 1989). بیماری اولین‌بار در ایران توسط بامدادیان در سال ۱۹۷۳ روی میزبان‌های مختلف به‌همراه نماتد گندم و باکتری خوشه صمغی گزارش شد (Bamdadian, 1973). این بیماری در ایران تاکنون از استان‌های گلستان، اصفهان، سیستان و بلوچستان، خراسان جنوبی و خوزستان گزارش شده است (Okhovat, 1999). خصوصیات بیماری‌زایی این قارچ تاکنون به‌طور مبسوط مطالعه نشده است. لارو سن دوم نماتد گال گندم ناقل برخی بیمارگرهای گیاهی ازجمله باکتری خوشه صمغی گندم *Rarhayibacter tritici* (R. *iranicus* و Zgurskaya1993) (Zgurskaya *et al.*, 1993) و قارچ عامل پیچیدگی و سیاه شدن سنبله و برگ گندم (*D. alopecuri*) (Sahebani *et al.*, 2005). بیماری‌زایی قارچ دیلوفوسپورا روی غلات، وابستگی زیادی به نماتد گال دانه گندم دارد و نماتد *A. tritici* ناقل کنیدیوم‌های قارچ بوده و آن‌ها را به برگ‌های بالایی و سنبله انتقال می‌دهد (Chen *et al.*, Asad *et al.* 2007, 2004; Okhovat, 1999). کنیدیوم‌های این قارچ به‌وسیله زوائد چنگال مانند به سطح کوتیکول نماتد می‌چسبند و به‌همراه نماتد به گیاه منتقل می‌شود و در سنبله و برگ‌ها ایجاد بیماری می‌کند. این قارچ یک بیمارگر بذرزاد (Asad *et al.*, 2007) است و قادر به ایجاد بیماری بر روی بسیاری از غلات به‌تنهایی و یا همراه با نماتد می‌باشد (Khan, 1995; Chen *et al.*, 2004;). علائم بیماری ابتدا به‌صورت تغییر شکل برگ‌های جوان و سپس ظهور لکه‌های ریز، زردرنگ و طویل یا دوکی شکل است (Asad Riley, 1994; Riley, 1996; *et al.*, 2007). پراکنش جغرافیایی قارچ در دنیا در بخش‌هایی از غرب و جنوب استرالیا (Riley, 1996) و اروپا درکشورهایی نظیر آلمان، یوگسلاوی (Okhovat, 1999)، نیوزلند (McKenzie and Johnson, 1999) و فنلاند (Jalli *et al.*, 2011) مشخص و مطالعه شده است. در اروپا قارچ *D. alopecuri* به‌طور معنی‌داری سبب خسارت اقتصادی به گندمیان می‌شود و ناقل آن نماتد گونه *A. tritici* است (Riley and McKay, 1990) ولی در استرالیا هیچ گزارشی از ارتباط گونه *A. tritici* با قارچ *D. alopecuri* وجود ندارد. شدت و میزان وقوع بیماری در مورد بسیاری از بیماری‌های غلات از جمله پیچیدگی سنبله گندم *D. alopecuri* در سال ۲۰۱۱ در کشور فنلاند بررسی شده است (Jalli *et al.*, 2011). در بسیاری از کشورها از جمله استرالیا این قارچ به‌دلیل وجود بیماری سمیت چاودار وحشی ناشی از باکتری *R. toxicus* دارای اهمیت است و ۶۸ درصد جدایه‌ها به‌همراه گونه‌های نماتد گندم نظیر *A. funesta* و *A. agrostis* گزارش شده‌اند، بعضی جدایه‌های این قارچ در استرالیا بدون حضور نماتد نیز قادر به ایجاد آلودگی بودند (Riley, 1996). رائیلی و مک‌کی در سال ۱۹۹۰ گزارش کردند که شدت بیماری و تعداد کنیدیوم‌های قارچ *D. alopecuri* در دو میزبان مختلف، تفاوت معنی‌داری را در ۷ جمعیت مختلف نماتد گال دانه گندم نشان دادند (Riley and Mckay, 1990). در تحقیقی درصد فراوانی قارچ بر روی گیاهان آلوده به نماتد یادداشت‌برداری شد و گال‌های نماتد در ۲۸هفته پس از مایه‌زنی شمارش شدند و نتایج نشان داد درصد گیاهان آلوده به قارچ در هفته‌های پانزدهم و هفدهم به ترتیب ۸۸ و ۶۸ درصد بود (Mc Kay *et al.*, 1981). حساسیت و مقاومت ارقام گندم و جو به قارچ عامل بیماری در شدت و میزان وقوع بیماری مؤثر است. مقاومت برخی از ارقام جو به بیماری پیچیدگی سنبله در عراق نیزگزارش شده است (Ldawi *et al.*, 1988). بیماری در دو منطقه Koprsko و Vicinity کشور یوگسلاوی روی گندم مشاهده شد و در بعضی مزارع گندم تا ۵۰ درصد خسارت گزارش شد (Mack and Konkan, 1988). ارقام ایتالیایی گندم نظیر san pastor حساسیت بالایی به بیماری دارند (Perisic, 1963). در آزمایشی از ۱۵ رقم گندم جهت بررسی مقاومت و حساسیت به بیماری پیچیدگی خوشه، رقم Mexipak بیشترین حساسیت را داشت، درحالی‌که ارقام Abu-Mexicali ،Aras ،Saberbeg ، Jerardo -574، Gharib1 و Storck بیشترین مقاومت را به بیماری نشان دادند (Al-Beldawy *et al.*, 1988). همچنین در بررسی میزان حساسیت ۸ رقم گندم در یوگسلاوی نشان داده شد ارقام jugoslavija و Macvanka دارای مقاومت و ارقام lonja و NS rana حساسیت شدید داشتند (Al-Beldawy *et al.*, 1988). استفاده از نشانگرهای مولکولی نظیر نواحی فاصله‌ساز ریبوزومی (ITS) برای مطالعه جمعیت‌های این قارچ بیمارگر گیاهی و ارتباط فیلوژنتیکی آن‌ها ابزار مهمی است که در ایران تاکنون مورد بررسی قرار نگرفته است. استفاده از بارکد DNA ابزاری کاربردی در تشخیص قارچهای بیمارگرگیاهی به شمار می‌رود از جمله نشانگرها در این خصوص ناحیه ITS می باشد که در شناسایی قارچ‌های فوزاریوم و آسپرژیلوس استفاده شده است (Choudhary *et al.*, 2021). ناحیه ITS با تعداد نسخه زیاد داخل ژنوم، با تنوع مناسب بین گروههای مختلف قارچی و موجودات زنده دیگر و نیز نواحی حفاظت شده برای طراحی آغازگرها و دارای ژن های متنوع با سرعت تکاملی مختلف به عنوان مرجع و پایه رمزینه گذاری تلقی می شود (Schoch *et al.*, 2012). جدایه‌های CBS 315.68 و CBS 302 قارچ *D. alopecuri* با استفاده از نشانگر ITS شناسایی و در پایگاه داده‌های NCBI ثبت شده‌اند (Vu *et al.*, 2019). در بررسی و آنالیز DNA ژنومی قارچها، نشانگر ITS سهم

عمده‌ای در شناسایی جنس و گونه‌ها دارد و درحدود ۹۹/۶درصد از قارچ‌های رشته‌ای مورد بررسی با این نشانگر شناسایی شدند (Vu *et al*., 2019). ایزوله جدید *Dilophospora sp*. isolate 47 با نشانگر ITSاز روی گیاه *Agrostis capillariis* از اسپانیا گزارش شد (San emitrio *et al*., 2021).

هدف از انجام این تحقیق، شناسایی ویژگی‌های ریخت‌شناسی و مولکولی جدایه‌های قارچ، اندازه‌گیری درصد وقوع، شدت بیماری و تعیین نقشه پراکنش جغرافیایی قارچ عامل بیماری در استان گلستان است که برای اولین‌بار در کشور صورت می‌گیرد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و بررسی میزان پراکنش بیماری

در طول ماه‌های فروردین و اردیبهشت سال‌های ۱۳۹۷ و ۱۳۹۸ از مزارع گندم آلوده به بیماری شهرستان‌های استان گلستان بازدید و نمونه‌برداری به عمل آمد. جهت بررسی میزان پراکنش بیماری از ۷ شهرستان با مزارع دارای علائم بیماری، در هر سال زراعی، ۳ مزرعه انتخاب و مختصات جغرافیایی آن‌ها یادداشت‌برداری شد. پس از مشاهده علائم بیماری پیچیدگی سنبله در هر مزرعه، ۳ نمونه تهیه و نمونه‌ها با درج تاریخ و مختصات محل نمونه‌برداری داخل پاکت‌های کاغذی به آزمایشگاه منتقل و جهت استفاده در بررسی‌ها در یخچال نگهداری شدند.

جداسازی، خالص‌سازی و نگهداری جدایه‌های قارچ

پس از بررسی نمونه‌ها با استریومیکروسکوپ و مشاهده پیکنیدیوم‌های قارچ عامل بیماری بر روی برگ و خوشه‌ها با استفاده از روش ایال و همکاران (Eyal *et al*., 1987; Ashrafi *et al*., 2018) جداسازی وخالص‌سازی قارچ عامل بیماری انجام شد. قسمت‌های دارای علائم بیماری و پیکنیدیوم‌ها در شرایط استریل با استفاده از هیپوکلریت سدیم نیم درصد به‌مدت یک دقیقه و ۳ بار شستشو به مدت ۱، ۳ و ۵ دقیقه ضدعفونی سطحی شدند. با استفاده از کاغذ صافی سترون خشک، سپس نمونه‌ها روی کاغذ فیلتر مرطوب استریل به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. جهت خالص‌سازی قارچ، با کشت هیف‌های رشد یافته در محل لکه‌ها حاشیه کلونی‌ها روی محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار غنی شده با ۱ گرم در لیتر عصاره مخمر استفاده شد. کلونی‌های رشد یافته در دمای یخچال نگهداری شدند.

شناسایی ریخت‌شناسی قارچ عامل بیماری

پس از خالص‌سازی جدایه‌های قارچ، پیکنیدیوم‌ها و اسپورهای هر جدایه زیر میکروسکوپ نوری (مدل BN KE801 ساخت چین) بررسی و با استفاده از کلید قارچ‌شناسی واکر و ساتون (Walker and Sutton, 1974) شناسایی گردید. جهت بررسی صفات مرفولوژیک قارچ از هر جدایه تعداد ۵۰ عدد کنیدیوم و پیکنیدیوم انتخاب و طول و عرض پیکنیدیوم‌ها، تعداد زوائد کنیدیوم‌ها، اندازه کنیدیوم (طول و عرض)، شکل کلونی روی محیط کشت درآزمایشگاه با میکروسکوپ نوری بزرگنمایی ۴۰۰ اندازه‌گیری شد.

آزمون بیماری‌زایی

جهت آزمون بیماری‌زایی در گلخانه، ارقام گندم درآذرماه‌سال ۱۳۹۸در گلدان کشت شده و در دو حالت قارچ با غلظت $۱/۷۵\times۱۰^{۶}$ (Barbetti and Riley, 2006) و نماتد با جمعیت مؤثر ۲۵۰۰۰ لارو سن دوم (Fattah *et al*., 1988) به گیاه در دو حالت مایه‌کوبی شدند. مایه‌کوبی نماتد به‌تنهایی و مایه‌کوبی قارچ و نماتد همزمان به میزبان صورت گرفت. شاهد گیاهانی بودند که فقط با آب مقطر مایه‌زنی شدند. تقریباً پس از دو ماه در مرحله پنجه‌زنی تیمار مایه‌کوبی قارچ و نماتد همزمان و نماتد به تنهایی آلودگی‌ها را نشان داد. علائم قارچ و نماتد بر روی برگ‌های گندم شد و قارچ عامل بیماری از لکه‌ها جداسازی شد.

شناسایی مولکولی

استخراج DNA

جهت تائید مولکولی جدایه‌های شناسایی شده با مشخصات ریخت‌شناسی از ۶ جدایه قارچ *D. alopecuri* مورد استفاده در این تحقیق استخراج DNA به روش موری و تامپسون صورت گرفت (Murray and Thampson, 1980). پس از استخراج DNA از ناحیه ITSrDNA با استفاده از جفت پرایمر ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATGC)و ITS5 (ACCCGCTGAACTTAAGC) با برنامه[1] PCR شامل ۵ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد و به دنبال آن ۳۰ چرخه در مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۲۰ ثانیه در ۵۸ درجه سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد، ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و ۳۰ ثانیه در ۴ درجه سانتی‌گراد و با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (مدل Bio-Rad T100,USA) تکثیر گردید. واکنش زنجیره پلی‌مراز (PCR) انجام شد. محصول PCR به‌دست‌آمده جهت شناسایی به شرکت میکروسینس سوئیس ارسال شد. برای اطمینان از صحت توالی‌های به‌دست آمده، توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار بلاست با توالی‌های موجود در بانک ژن مقایسه شدند. سپس توالی‌های مربوط به جدایه‌های قارچ *D. alopecuri* شهرستان‌های گنبد، آق‌قلا، آزادشهر، مراوه‌تپه، کلاله

1- Polymerase Change Reaction

و مینودشت در بانک ژن (NCBI) ثبت شدند. درخت فیلوژنتیکی جدایه‌ها با ایزوله استاندارد با استفاده از نرم‌افزار مگا (Mega –X 10.0.5) به‌روش Upgama رسم شد.

تعیین درصد وقوع و شدت بیماری

جهت تعیین درصد وقوع و شدت بیماری از ۴۲ مزرعه آلوده در ۷ شهرستان که مختصات جغرافیایی آن تعیین و بصورت تصادفی نمونه‌برداری شد. تعداد بوته‌های بیمار در هر مزرعه با حرکت تصادفی در ۵ خط کاشت به فاصله ۱۰ متر شمارش شد و درصد وقوع بیماری، شدت بیماری براساس فرمولهای زیر محاسبه شد. شدت بیماری بااستفاده از مقیاس نرخ‌دهی عمومی بیماری‌های گیاهی با اندکی تغییر ثبت شد (Yan and Riley 2003 Zhang *et al*., 1999;). براساس علائم پیشرفت بیماری روی بوته‌های بیمار، از یک مقیاس پنج درجه‌ای به شرح زیر شامل بوته‌های سالم و فاقد آلودگی (نمره صفر)؛ بوته‌های دارای لکه‌های کلروزه (نمره ۱)؛ بوته‌های دارای لکه‌های نکروزه (نمره ۲)؛ شروع تشکیل پیکنیدیوم‌های قارچ روی لکه‌های نکروزه (نمره ۳) و پوشیده شدن تمام سطح لکه‌ها از پیکنیدیوم‌های قارچ به‌صورت پودر سیاه‌رنگ (نمره ۴) استفاده شد.

$$\text{درصد وقوع بیماری} = \frac{\text{تعداد بوته های بیمار}}{\text{تعداد کل بوته}} \times ۱۰۰$$

$$\text{متوسط شدت بیماری} = \frac{\text{تعداد بوته دارای آن نمره} \times \text{میانگین وزنی نمره شدت}}{\text{تعداد کل بوته های ارزیابی}} \times ۴$$

تهیه نقشه پراکنش بیماری

مختصات جغرافیایی محل جمع‌آوری نمونه‌هایی که عامل بیماری در آن مناطق جدا و خالص‌سازی شدند، با استفاده از نرم‌افزار ArcGIS10.2 برروی نقشه منتقل و نقشه پراکنش بیماری تهیه شد.

آنالیزهای آماری

تجزیه‌وتحلیل آماری صفات مورفولوژیکی و تعیین شدت و درصد وقوع بیماری با نرم‌افزارStategraphic centurion XVI (شرکت state point) انجام شد و مقایسه میانگین‌ها به روش LSD محاسبه شد.

نتایج و بحث

قارچ عامل خال سیاه یکی از عوامل بیماری‌زای گندم است که در بسیاری از نقاط دنیا سبب خسارت اقتصادی به گندم و سایر گرامینه‌ها می‌شود (Mcenzie *et al*., 1999). بیماری‌زایی قارچ در بیشتر مناطق وابستگی زیادی به گونه‌های نماتد گال دانه گندم دارد و نماتد ناقل کنیدیوم‌های قارچ است وکنیدیوم‌ها را به نقطه رشد گیاه انتقال می‌دهد (Chen *et al*., 2004; Riley *et al*., 1998 Riley, 1996 ; Riley, 1994).

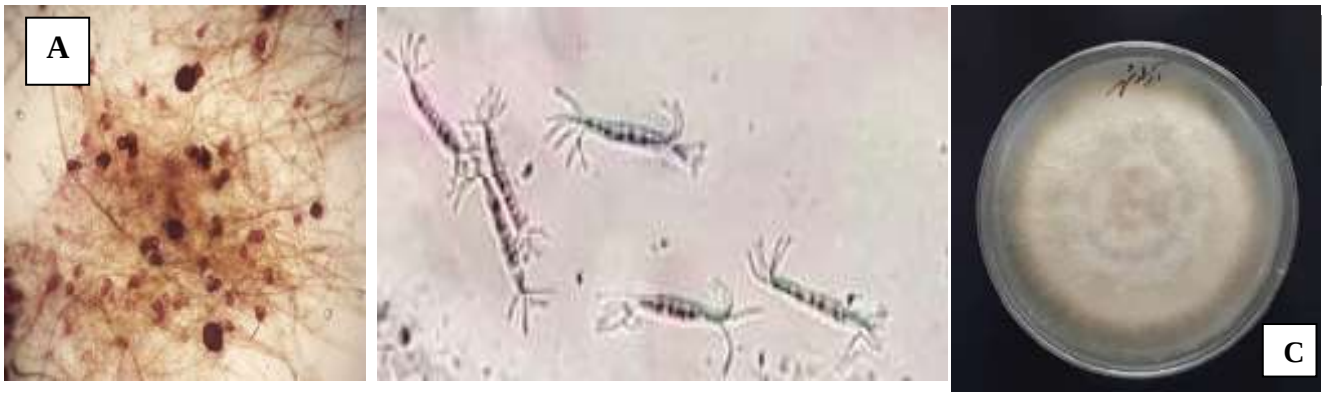
از ۷ شهرستان استان گلستان شامل آق‌قلا، بندر ترکمن، آزادشهر، گنبد، مینودشت، کلاله و مراوه‌تپه که علائم بیماری در آن‌ها مشاهده شد، تعداد ۴۲ نمونه در طی دو سال زراعی علائم بیماری لکه برگی و پیچیدگی سنبله جمع‌آوری شد (شکل ۱). نتایج مطالعه درخصوص قارچ عامل بیماری پیچیدگی سنبله گندم نشان داد که بین صفات ریخت‌شناسی جدایه‌های مناطق مختلف، اختلاف معنی‌داری ازلحاظ شکل پرگنه، صفات کنیدیوم و سرعت تشکیل پیکنیدیوم وجود داشت (شکل ۲). بین طول کنیدیوم قارچ و تعداد سلول آن در شهرستان‌های مختلف استان، اختلاف معنی‌داری وجود داشت (جدول ۱ و ۲). میانگین طول کنیدیوم قارچ *D. alopecuri* از ۴ تا ۸ میکرومتر متغیر بود. همچنین اختلاف معنی‌داری در تعداد زوائد کنیدیوم، طول و عرض پیکنیدیوم‌ها در تمام جدایه‌های استان وجود داشت (جدول ۱ و ۲). این تفاوت‌ها در کلید شناسایی قارچ *D. alopecuri* ارائه‌شده توسط واکر و ساتون نیز ذکر شده است (Schoch *et al*., 2012). نتایج این پژوهش نشان داد که روند ظهور بیماری از سمت غرب استان، قارچ بیشتر به‌صورت میسلیومی روی ساقه و خوشه گندم و بیماری نماتد گالی گندم کمتر و بالعکس باکتری عامل خوشه صمغی بیشتر مشاهده شد. در شهرستان آق‌قلا قارچ به‌صورت مسیلومی و تشکیل پیکنیدیوم ارزیابی شد و در شرق استان گلستان شهرستان‌های آزادشهر، گنبد، کلاله، مینودشت و مراوه‌تپه اندام بارده به‌صورت پیکنیدیوم بر روی برگ و سنبله در نمونه‌برداری‌ها مشاهده شد که علائم بیماری بیشتر به تعامل قارچ – نماتد و شرایط آب‌وهوایی استان گلستان بستگی دارد. بیشتر کلونی‌ها به رنگ سفید تا خاکستری و ازلحاظ رشد در دمای بهینه ۲۵ درجه سانتی‌گراد کند رشد بودند (جدول ۲). جدایه‌های آزادشهر و کلاله بیشترین سرعت رشد را دارا می‌باشند. همه جدایه‌های رشدیافته ویژگی‌های قارچ *D. alopecuri* را نشان دادند. نتایج آزمون اثبات بیماری‌زایی جدایه‌ها بر روی گندم در گلخانه نشان داد که قارچ فقط در حضور نماتد گال گندم قادر است در میزبان ایجاد آلودگی نماید و نماتد جهت تکثیر قارچ ضروری است که با نتایج صاحبانی و همکاران (Sahebani *et al*., 2005) مشابهت دارد. بررسی مولکولی و تکثیر و تعیین توالی بخشی از ناحیه ITS جدایه‌های استان گلستان نشان داد که این جدایه‌ها شباهت ۱۰۰ درصدی داشتند و به‌عنوان قارچ *D. alopecuri* شناسایی شدند. این نتایج نشان می‌دهد جدایه‌ها با وجود شباهت در سایر ویژگی‌های بیماری‌زایی و ریخت‌شناسی با مشخصات قارچ *D. alopecuri* CBS302 نمایه شده در NCBI دارای مقداری تفاوت ژنتیکی در توالی نوکلئوتیدی در ناحیه فاصله‌ساز ریبوزومی ITS

می‌باشند (شکل ۳).

بیماری بر روی ارقام گندم نظیر احسان، کوهدشت و مروارید و بیشترین علائم نیز روی ارقام احسان و مروارید رؤیت شد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که در میزان درصد وقوع و شدت بیماری اندازه‌گیری شده در دو سال زراعی ۹۷ و ۹۸ اختلاف معنی‌دار وجود نداشت (جدول ۳). بررسی مقایسه میانگین شدت و درصد وقوع بیماری نشان داد که در شهرستان کلاله در دو سال زراعی سال ۹۷ و ۹۸ به‌ترتیب ۲/۶۵ و ۲/۹ درصد بود. میانگین کمترین شدت و وقوع بیماری بر اساس آنالیز آماری مربوط به شهرستان بندر ترکمن به‌ترتیب ۱/۳ و ۱/۶۵ درصد اندازه‌گیری شد و نتایج نشان‌دهنده آن است که میزان وقوع و شدت بیماری در طی دو سال موردمطالعه روند یکنواختی در تمامی نقاط آلوده استان داشته است (شکل ۴). در بررسی رایلی و همکاران با مطالعه آلوزیم‌های جدایه‌های مختلف قارچ *D. alopecuri* نشان داده شد بین جدایه‌های مناطق مختلف استرالیا نیز اختلاف معنی‌دار وجود دارد (Riley *et al*., 1998). همچنین نتایج بررسی‌ها مشخص کرد که بین ۳۱ جدایه مناطق مختلف استرالیا ازنظر شدت بیماری‌زایی روی گیاه چچم *L. rigidum* اختلاف معنی‌دار وجود دارد (Yan and Riley, 2005). میزان وقوع و شدت بیماری از معیارهای مهم بررسی میزان خسارت بیماری است که به شرایط آب‌وهوایی، حساسیت و مقاومت ارقام و قدرت بیماری‌زایی جدایه‌های قارچ بستگی دارد (Perisic, 1963).

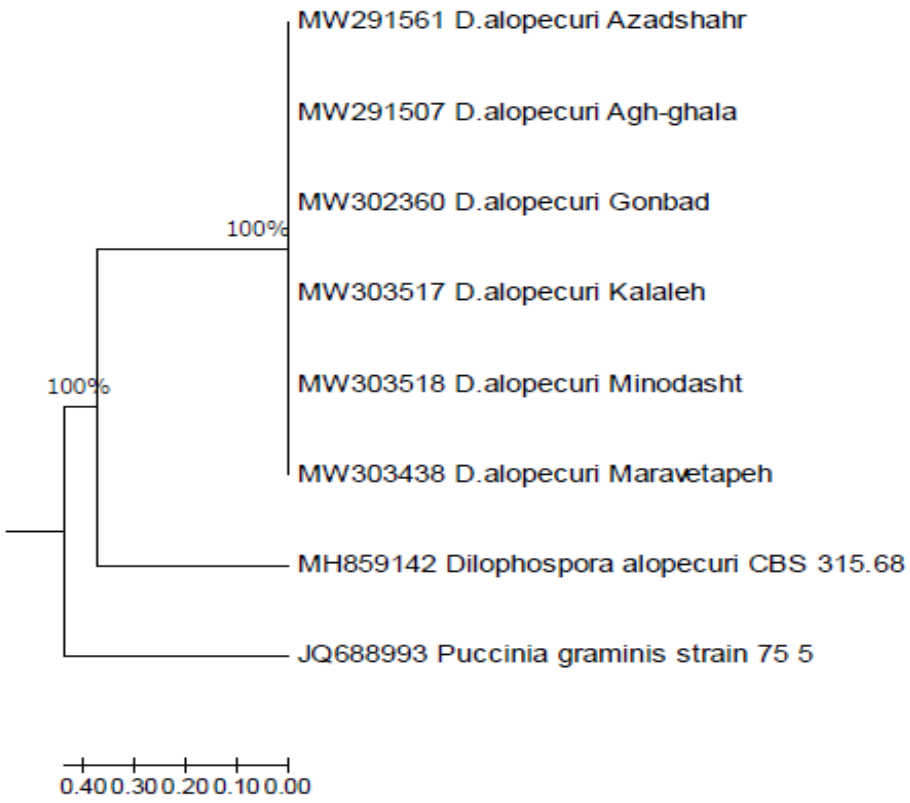
شکل ۱- علائم بیماری لکه برگی و خال سیاه گندم در بوته‌های آلوده‌ی گندم (A) و پیکنیدیوم‌های تشکیل شده روی ساقه و برگ آلوده (B)

Figure 1– Symptoms of wheat leaf spot and black spike disease (A) and pycnidia formation on infected stem and leaf (B)



شکل ۲- خصوصیات مورفولوژی پیکنیدیوم (مقیاس ۱۰۰ میکرومتر) (A)، کنیدیوم (مقیاس ۱۰ میکرومتر) (B) و کلونی ۲۵ روز بعد از تلقیح جدایه‌ی آزادشهر بر روی محیط کشت PDA(C)

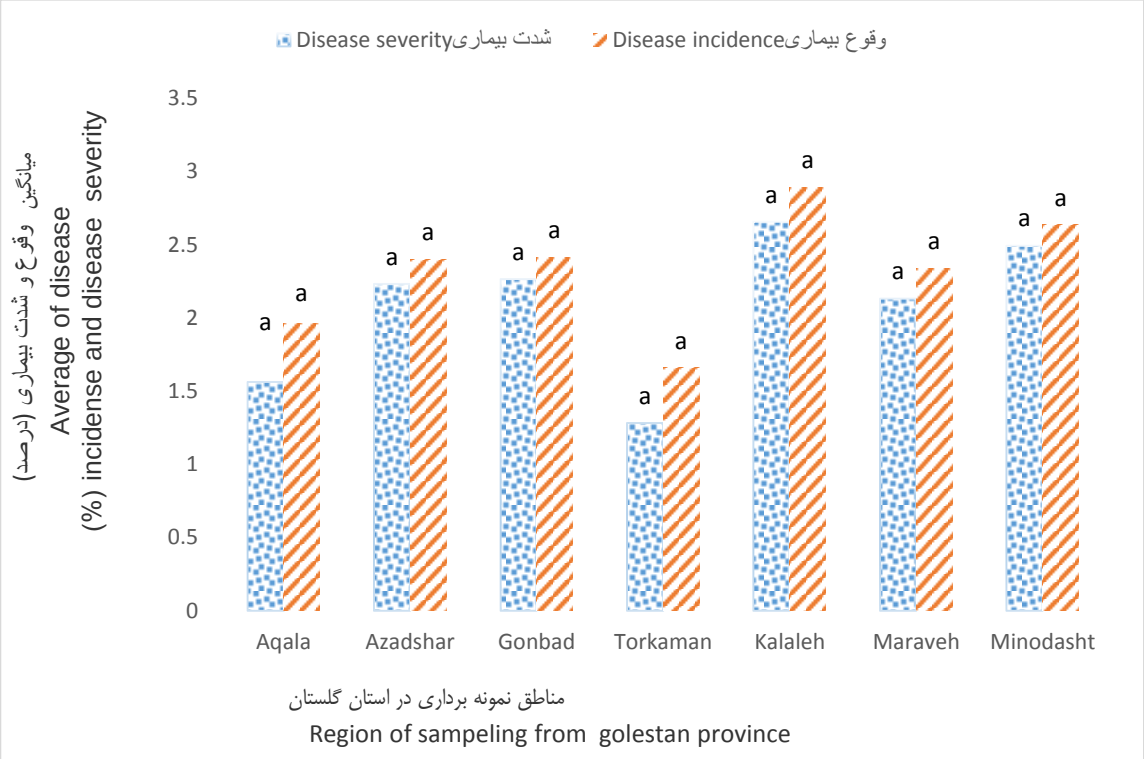
Figure 2– Morphological characters of Pycnidium (Bar = 100 µm), (A) conidium (Bar = 10 µm) (B) and colony 25 days after inoculation of Azadshahr isolate on PDA(c)



شکل ۳- درخت فیلوژنتیکی از ناحیه ITS جدایه‌های *Dilophospora alopecuri* استان گلستان براساس روش Upgama و اعتبارسنجی (بوت استرپ). *D. alopecuri* CBS 315.68 بعنوان ایزوله استاندارد و *Puccinia graminis* strain 755 بعنوان گروه خارجی انتخاب شده‌اند.

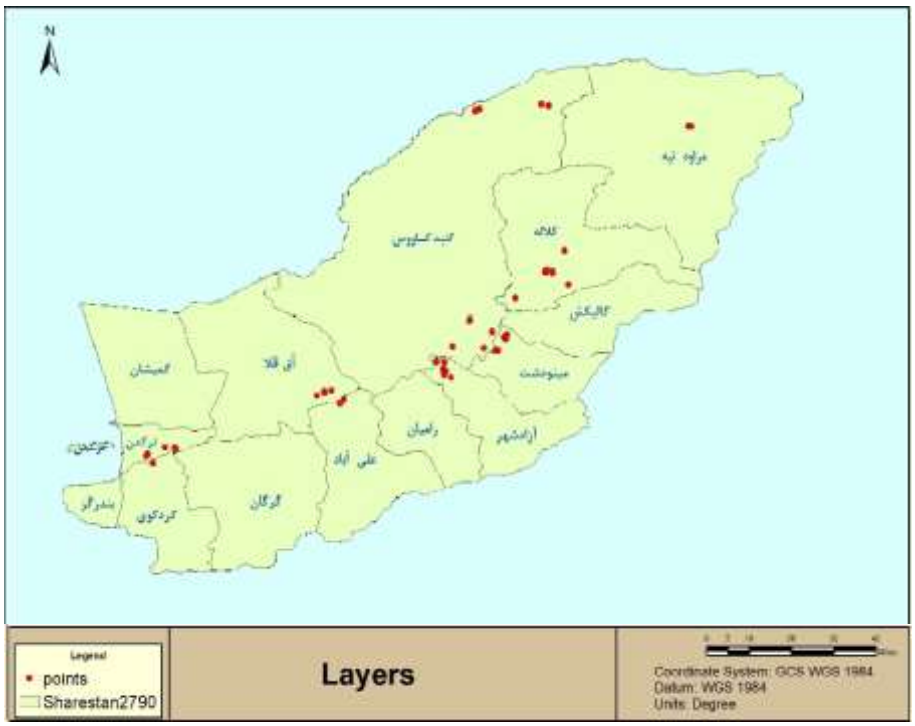
Figure 3- Phylogenetic tree producted from ITS region sequences showing the phylogenetic relationships among isolates obtained from Golestan province *D. alopecuri* CBS 315.68 and *Puccinia graminis* strain 755 as a outgroup fungus registered in the NCBI GenBank using Upgama method

مناطق پراکنش بیماری با استفاده از نرم‌افزار ArcGIS10.2 بر روی نقشه منتقل و نقشه پراکنش بیماری تهیه گردید (شکل ۵). نتایج نشان داد که قارچ در اکثر شهرستان‌های استان گلستان به‌همراه نماتد ناقل آن *A. tritici* حضور دارد. این بیماری از نواحی غربی استان با آب‌وهوای معتدل و نسبتاً سرد تا نواحی شرقی استان نظیر گنبد، آزادشهر، کلاله، مینودشت با آب‌وهوای معتدل گرم مشاهده گردید (شکل ۵). بیماری به روش مقیاس نرخ دهی در استان اندازه‌گیری شد. علائم بیماری شامل لکه‌های کلروزه و نکروتیک روی پهنک برگ و غلاف بوده ودر شرایط مناسب آب‌وهوایی آلودگی بر روی ساقه، دم خوشه و سنبله با تشکیل پیکنیدیوم توسعه می‌یابد (McKenzie and Johnston, 1999). از این لحاظ مطالعات مورفولوژیکی و مولکولی می‌توانند ما را در شناخت بیماری و تعامل آن با نماتد و باکتری خوشه صمغی و بالطبع مدیریت آن‌ها کمک نمایند. در این پژوهش برای اولین‌بار شناسایی مولکولی، ریخت‌شناسی، پراکنش بیماری و شدت بیماری‌زایی قارچ *D. alopecuri* در استان گلستان که یکی از مناطق با آلودگی زیاد به بیماری خال سیاه گندم است در طی دو سال زراعی مورد مطالعه قرار گرفت.



شکل ۴- مقایسه میانگین درصد وقوع و شدت بیماری لکه برگی و خال سیاه گندم در دو سال زراعی ۹۷ و ۹۸ در استان گلستان

Figure 4- Comparing of the mean percentage of Disease incidence and Disease severity wheat leaf spot and black spike disease in two cropping years 2018 and 2019 in Golestan province



شکل ۵- نقشه پراکنش جغرافیایی بیماری لکه برگی و خال سیاه گندم در استان گلستان

Figure 5- Geographical Distribution map of wheat leaf spot and black spike disease in Golestan province

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس صفات ریخت‌شناسی جدایه‌های عامل بیماری لکه برگی و خال سیاه گندم در استان گلستان

Table 1- Results of variance Analysis of morphological characteristics of wheat leaf spot (Twist) and black spike disease causal agent isolates in Golestan province

		میانگین مربعات Means of Square					
منابع تغییر Source of variation	درجه آزادی Df	تعداد زوائدکنیدیوم Conidia appendage number	عرض پیکنیدیوم Pycnidium wide	طول پیکنیدیوم Pycnidium length	اندازه پیکنیدیوم pycnidium size	تعداد سلول کنیدیوم Conidia cell number	طول کنیدیوم Conidia length
جدایه Isolate	5	5.1946**	110.402**	167.642**	24481.1**	4.058**	39.5131**
بین جدایه Between isolate	144	0.3083**	1.9580**	2.7240**	435.23**	0.1542**	1.2093**
کل Total	149						
LSD		0.4099	1.033	1.2185	15.4033	0.2031	0.5687

**تفاوت در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار است.

**Significant difference at 1% probability level.

جدول ۲- مقایسه میانگین صفات ریخت‌شناسی جدایه‌های عامل بیماری جداسازی شده از مناطق مختلف بر روی محیط کشت PDA در استان گلستان

Table 2- Means comparison of morphological characteristics of different isolates wheat leaf spot (Twist) and black spike disease in different region from Golestan province on PDA

جدایه‌ها Isolates	اندازه پیکنیدیوم Pycnidium size	طول پیکنیدیوم Pycnidium length	عرض پیکنیدیوم Pycnidium wide (µm)	تعداد زوائد کنیدیوم Conidia appendage number	تعداد سلول کنیدیوم Conidia cell number	طول کنیدیوم Conidia length (µm)	رنگ کلونی Color of colony	شماره دسترسی توالی Sequence accession number
Aqala آق قلا	14.79c	3.96c	3.66b	2.84e	4.46b	4.6d	White to gray سفید تا خاکستری	MW291507
Azadshar آزادشهر	63.4b	8.12b	7.12a	3.32cd	4c	5.18bc	White to gray سفید تا خاکستری	MW291561
Gonbad گنبد	82.96a	9.88a	8a	3.48bc	4.7a	7.62a	White to gray سفید تا خاکستری	MW302360
Kalaleh کلاله	14.09c	3.76c	3.64b	3.84ab	4.58ab	4.72cd	White to gray سفید تا خاکستری	MW303517
Moraveh مراوه‌تپه	14.71c	4c	3.56b	4a	4c	5.06bcd	White to gray سفید تا خاکستری	MW303438
Minodasht مینودشت	14.2c	3.7c	3.6b	3.5bc	4.18c	5.48b	White to gray سفید تا خاکستری	MW303518

تیمارهای با حروف یکسان با توجه به آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

Treatments with the same letters not significantly different according to LSD test in level 5%.

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس درصد وقوع و شدت بیماری لکه برگی و خال سیاه گندم در دو سال زراعی ۹۷ و ۹۸

Table 3- Results of variance Analysis of Disease incidence (DI) and Disease severity (DS) of wheat leaf spot (Twist) disease in two cropping years 2018 and 2019

			میانگین مربعات Means of Square	
منابع تغییر Source of variation		درجه آزادی Df	شدت بیماری Disease Severity	وقوع بیماری Disease incidence
Year	سال	1	7.93463	11.1228
Region	منطقه	6	7.3394	5.0228
Field	مزرعه	2	2.4047	3.4280
Year* Region	سال*منطقه	6	1.6512	1.3787
Residual	خطا	194	7.0387	7.9070
Total	کل	209		

منابع

1- Al-Beldawy, A.S., Jawad, A., Shally, R., Darweash, A.K., Al-Talib, N.Y., Nimir, S.M., & Al-Shaffy, A.H. (1988). A preliminary study on the role of the fungus *Dilophosphora alopecuri* and the nematode *Anguina tritici* in the development of the twist of cereals disease in Iraq. *Arab Journal of Plant Protection*.

2- Al-Taae, A.K.M., Al-Talib, N.Y., & Nimer, S.M. (1989). New record of barley leaf and spike twist disease caused by Dilophosphora alopecuri (Fr.) Fr. *Arab Journal of Plant Protection*.

3- Anonaymous. (2005). *Anguina tritici.* CABI international, Wallinford. 21pp.

4- Asad, S., Sultan, A., Iftikhar, S., Munir, A., Ahmad, I., & Ayub, N. (2007). First report of Dilophospora leaf spot (twist) disease of wheat in Pakistan. *Pakistan Journal of Botany 39*(4): 1387.

5- Ashrafi, J., Rahnama, K., Babaeizad, V., Ramazanpour, S.S., & Keel, C. (2018). Investigation the mode distribution of *Septoria* blotch and evaluating the resistance of wheat cultivars in Golestan provinvce. *Iranian Journal of Pest and Plant Disease 2*(86): 185-202. (In Persian with English abstract)

6- Bamdadian, A. (1973).Twist disease of wheat in Iran caused by *Dilophospora alopecuri* (Fr.) Fr. *Iranian Journal of Plant Pathology 1*(9): 28-35. (In Persian with English abstract)

7- Barbetti, M.J., & Riley, I.T. (2006). Field application of *Dilophospora alopecuri* to manage annual ryegrass toxicity caused by Rathayibacter toxicus. *Plant Disease 90*(2): 229-232.

8- Chen, Z.X., & Chen, S.Y. (2004). *Vol. 1: Nematode morphology, physiology and ecology*. Wallingford [etc.]: CABI [etc.].

9- Choudhary, P., Singh, B.N., Chakdar, H., & Saxena, A.K. (2021). DNA barcoding of phytopathogens for disease diagnostics and bio-surveillance. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *37*(3): 1-20.

10- Durán, M., San Emeterio, L., & Canals, R.M. (2021). Comparison of Culturing and Metabarcoding Methods to Describe the Fungal Endophytic Assemblage of *Brachypodium rupestre* Growing in a Range of Anthropized Disturbance Regimes. *Biology 10*(12): 1246.

11- Eyal, Z., Schrren, A.L., Prescott, J.M., & Van Ginkel, M. (1987). The *septoria* disease of wheat: concepts and methods of disease management. Mexico, D.F: CYMMIT. 46pp.

12- Fattah, F.A. (1988). Effects of inoculation methods on the incidence of ear-cockle and 'tundu'on wheat under field conditions. *Plant and Soil 109*(2): 195-198.

13- Gibson, I.AS., & Sutton, B.C. (1976). *Dilophospora alopecuri*; CMI description of pathogenic fungi and bacteria. 490p.

14- Jalli, M., Laitinen, P., & Latvala, S. (2011). The emergence of cereal fungal diseases and the incidence of leaf spot diseases in Finland. *Agricultural and Food Science 20*(1): 62-73.

15- Khan, M.W. 1995. *Nematode Interaction (chapter 14)*.Chapman and Hall Publishing. 287-301.

16- Macek, J., & Koncan, D. (1988). Artificial inoculation of wheat *Triticum aestivum* with *Dilophospora alopecuri* and the sensitivity resistance of some Wheat cutivars. *Zastia Bilja* 2(39): 211-216.

17- McKay, A.C., Fisher, J.M., & Dubé, A.J. (1981). Ecological field studies on *Anguina funesta*, the vector in annual ryegrass toxicity. *Australian Journal of Agricultural Research 32*(6): 917-926.

18- McKenzie, E.H.C., & Johnston, P.R. (1999). New records of phytopathogenic fungi in the Chatham Islands, New Zealand. *Australasian Plant Pathology 28*(2): 131-138.

19- Okhovat, S.M. (1999). Cereal Disease (Wheat, barley, rice and maize). University of Tehran Published. 475pp.

20- Murray, M.G., & Thompson, W. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, *8*(19): 4321-4326.
21- Perisic, A.M. (1963). *Dilophospora alopercuri* parasitic on wheat. *Zastita Bilja 73*(14): 301-305.
22- Riley, I.T. (1996). Dilophospora alopecuri on *Lolium rigidum* and *Holcus lanatus* in south-eastern Australia. *Australasian Plant Pathology 25*(4): 255-259.
23- Riley, I.T. (1994). Dilophospora alopecuri and decline in annual ryegrass toxicity in Western Australia. *Australian Journal of Agricultural Research 45*(4): 841-850.
24- Riley, I.T., & McKay, A.C. (1990). Specificity of the adhesion of some plant pathogenic micro-organisms to the cuticle of nematodes in the genus Anguina (Nematoda: Anguinidae). *Nematologica 36*(1-4): 90-103.
25- Riley, I.T., Reardon, T.B., & Bertozzi, T. (1998). Allozyme analysis of Australian isolates of *Dilophospora alopecuri*. *Mycological Research 102*(3): 301-307.
26- Sahebani, N., Kkeiri, A., Rahimian, H., Sharifi Tehrani, A., & Zakeri, Z. (2005). Study of intraction between seed gall nematode *A. tritici* and *Rathayibacter tritici*. *Journal of Agricilture Sceince* (36)6: 1355-1360. (In Persian with English abstract)
27- Sampson, K., & Western, J.H. (1938). Note on the supposed connexion between *Mastigosporium album* Riess and *Dilophospora alopecuri* (Fr.) Fr. *Transactions of the British Mycological Society 22*(1-2): 168-173.
28- Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A., & White, M.M. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the national academy of Sciences*, *109*(16), 6241-6246.
29- Vu, D., Groenewald, M., De Vries, M., Gehrmann, T., Stielow, B., Eberhardt, U., & Verkley, G.J.M. (2018). Large-scale generation and analysis of filamentous fungal DNA barcodes boosts coverage for kingdom fungi and reveals thresholds for fungal species and higher taxon delimitation. *Studies in Mycology 91*(1): 23-36.
30- Walker, J., & Sutton, B.C. (1974). Dilophia sacc. and Dilophospora desm. *Transactions of the British Mycological Society 62*(2): 231-IN4.
31- Yan, G., & Riley, I.T. (2005). Variation in colonisation of Lolium rigidum by isolates of Dilophospora alopecuri, an antagonist of the causal organisms of annual ryegrass toxicity. *Australian Journal of Experimental Agriculture 45*(9): 1157-1162.
32- Yan, G., & Riley, I.T. (2003). Fermentation period, moisture content, and substrate effects on inoculum effectiveness of Dilophospora alopecuri: a biocontrol agent of annual ryegrass toxicity. *Biological Control 26*(2): 174-179.
33- Zhang, X., Haley, S.D., & Jin, Y. 1999. Diallel analysis of *Septoria tritici* blotch resistance winter wheat .Proceding of the fifth international *Septoria* workshop. CIMMYT, Mexico, 56-58.
34- Zgurskaya, H.I., Evtushenko, L.I., Akimov, V.N., & Kalakoutskii, L.V. (1993). Rathayibacter gen. nov., including the species Rathayibacter rathayi comb. nov., Rathayibacter tritici comb. nov., Rathayibacter iranicus comb. nov., and six strains from annual grasses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 43*(1): 143-149.