

Identification of *Alternaria* species from the section *Infectoriae* associated with wheat and barley black (sooty) head mold in Iran

Alireza Poursafar¹, Youbert Ghosta^{2*}, Mohammad Javan-Nikkhah³

¹M. S. Student of Plant Pathology, Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

²Associate Professor Department of Plant Protection, College of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

³Professor Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

Abstract

Black (sooty) head mold of wheat and barley which is commonly characterized by black discoloration of their heads, is caused by different fungi colonizing the mature and senescent heads. It seems that black head mold develop more on plants when humid conditions occurs as the crop matures, or when harvest is delayed due to wet conditions and/or when portions of plants specially heads are died prematurely. During an investigation on fungal species associated with black head mold of wheat and barley in Golestan, Alborz and Qazvin provinces in the spring and summer of 2014 and 2015, a total of 133 *Alternaria* isolates with the characteristics of the section *Infectoriae* were collected. Based on the results obtained from morphological studies and data from nucleotide sequences of the two genomic loci, ITS–nrDNA and part of *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (*gpdh*), four species *Viz.* *Alternaria arbusti*, *A. ethzedia*, *A. incomplexa* and *A. triticimaculans* were identified. All identified species in the case of this study are reported for the first time as *Alternaria* species associated with black head mold symptoms of wheat and barley in the world. Also, except for *A. arbusti*, which was previously reported from cabbage plants in Iran, the remaining three species are new records for mycobiota of Iran. The species are fully described here.

Key words: Disease, Cereal, *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, Nuclear rDNA, Phylogeny, Taxonomy

* y.ghoosta@urmia.ac.ir

شناسایی گونه‌های جنس *Alternaria* از بخش *Infectoriae* همراه با نشانه‌های کپک سیاه (دوده‌ای) خوشه‌های گندم و جو در ایران

علیرضا پورصفر^۱، یوبرت قوستا^{۲*}، محمد جوان نیکخواه^۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

۲- دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۳- استاد گروه گیاهپزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

چکیده

کپک سیاه (دوده‌ای) خوشه‌ها در گندم و جو معمولاً با تغییر رنگ خوشه‌های این گیاهان به سیاه مشخص می‌شود و قارچ‌های مختلف ایجادکننده آن خوشه‌های بالغ و در حال پیر شدن را کلنیزه می‌کنند. به نظر می‌رسد کپک سیاه خوشه‌ها روی گیاهانی که طی بلوغ آنها شرایط رطوبتی شایع می‌شود یا برداشت محصول به علت شرایط رطوبتی به تأخیر می‌افتد و یا در بخش‌هایی از گیاهان به‌ویژه خوشه‌هایی که پیش از بلوغ دچار خشکیدگی می‌شوند توسعه بیشتری دارد. در مطالعه حاضر و با هدف شناسایی قارچ‌های همراه با نشانه‌های کپک سیاه خوشه‌های گندم و جو در استان‌های گلستان، البرز و قزوین، طی بهار و تابستان سال‌های ۱۳۹۳ و ۱۳۹۴ تعداد ۱۳۳ جدایه متعلق به بخش *Infectoriae* از جنس *Alternaria* جمع‌آوری شد. بر اساس نتایج مطالعه‌های ریخت‌شناختی و داده‌های حاصل از توالی‌های نوکلئوتیدی دو جایگاه ژنومی شامل ITS از DNA ریبوزومی هسته‌ای و بخشی از ژن گلیسر آلدهید-۳-فسفات دهیدروژناز (*gpdh*) چهار گونه *A. ethzedia*، *A. arbusti*، *A. incomplexa*، و *A. triticimaculans* شناسایی شدند. هر چهار گونه شناسایی شده برای نخستین بار به‌عنوان گونه‌های همراه با نشانه‌های کپک سیاه خوشه‌های گندم و جو در دنیا گزارش می‌شوند. همچنین به‌غیر از گونه *A. arbusti* که قبلاً از گیاهان کلم در ایران گزارش شده است سه گونه دیگر آرایه‌های جدیدی برای بیوتای قارچی ایران گزارش می‌شوند. توصیف کامل گونه‌ها در مقاله حاضر ارائه شده است.

واژه‌های کلیدی: بیماری، غلات، گلیسر آلدهید-۳-فسفات دهیدروژناز، DNA هسته‌ای، تبارشناسی، آرایه‌بندی.

مقدمه

طیف وسیعی از بسترها است (Woudenberg *et al.*,

2013). تولید هاگ‌های رنگی چندیاخته‌ای با بندهای

عرضی و طولی به‌طور انفرادی یا زنجیری و وجود نوک

(beak) یا باریک‌شدگی در قسمت انتهایی هاگ از

جنس *Alternaria* (Nees, 1816) قارچی

همه‌جازی و شامل گروه بزرگی از گونه‌های قارچی با

چرخه‌های زندگی ساپروفیت، اندوفیت و بیمارگر روی

* y.ghoosta@urmia.ac.ir

2009; Lawrence *et al.*, 2012; 2013; 2014; Woudenberg *et al.*, 2013; 2014). در پژوهش Lawrence و همکاران (۲۰۱۳) ماهیت تک‌نیایی برخی از گروه‌های گونه‌ای ریخت‌شناختی بر اساس داده‌های حاصل از توالی‌های مبتنی بر چندین مکان ژنومی تأیید و به شناسایی ۸ گروه گونه‌ای تبارشناختی منجر شده است. در مطالعه یادشده، گروه‌های گونه‌ای تبارشناختی به رتبه تاکسونومیکی بخش (section) ارتقا داده شده‌اند. در مطالعه دیگری Woudenberg و همکاران (۲۰۱۳) ماهیت تک‌نیایی ۱۷ گروه گونه‌ای ریخت‌شناختی دیگر را نشان داده‌اند و آنها را بخش‌های جنس *Alternaria* در نظر گرفته‌اند. در آخرین بازنگری انجام‌شده روی جنس *Alternaria* بر اساس نشانگرهای مولکولی، اعضای این جنس در قالب ۲۷ بخش (section) تقسیم‌بندی شده‌اند (Lawrence *et al.*, 2016). یکی از بخش‌های مهم و بزرگی که در جنس *Alternaria* مشخص شده است بخش *Infectoriae* است که اعضای آن از نظر ویژگی‌های ریخت‌شناختی و تبارشناختی به‌خوبی از سایر بخش‌های جنس متمایز شده‌اند. تولید پرگنه‌های سفیدرنگ در محیط کشت‌های غنی از قند، هاگ‌زایی فراوان به‌شکل توده‌های جوش‌مانند در محیط کشت‌های ضعیف از نظر ماده قندی مانند PCA، V8 و WPDA (weak PDA)، تولید زنجیره‌های هاگ با انشعابات متعدد همراه با هاگ‌های ثانویه (نوک کاذب) بلند در انتهای درصد درخور توجهی از هاگ‌ها از جمله ویژگی‌های عمده ریخت‌شناختی ماکروسکوپی و میکروسکوپی مشترک بین اعضای این بخش هستند (Simmons, 1986; Pryor and Michailides, 2002; Dugan and Peever, 2002)؛ باین حال ممکن است اعضای این بخش از نظر برخی ویژگی‌های ریخت‌شناختی با اعضای

صفت‌های مهم ریخت‌شناختی این جنس محسوب می‌شوند (Simmons, 2007). شناسایی گونه‌ها در این جنس، بیشتر بر صفت‌های ریخت‌شناختی از جمله ویژگی‌های هاگ، الگوی انشعابات زنجیرها و به میزان کمتری بر تخصص‌یافتگی میزبانی متکی است؛ باوجوداین، تنوع ریخت‌شناختی زیاد، هم‌پوشانی صفت‌های ریخت‌شناختی و دامنه میزبانی وسیع (شامل بیش از ۴۰۰۰ گونه گیاهی) (Farr *et al.*, 1989) شناسایی گونه در این جنس را با پیچیدگی روبه‌رو کرده است. در گذشته، تلاش‌هایی برای ایجاد سهولت در تاکسونومی این جنس انجام شده است؛ بر اساس مطالعه‌های متعدد Simmons (۱۹۹۲) شرایط ویژه‌ای برای شناسایی افراد این جنس در سطح گونه ذکر شده که جامعه علمی آن را به‌طور گسترده‌ای به کار برده است. با توجه به شرایط یادشده اعضای این جنس بر مبنای برخی از صفت‌های مشترک ریخت‌شناختی از جمله ویژگی‌های هاگ، الگوی تشکیل زنجیره‌های هاگ و ماهیت نوک هاگ به چندین گروه گونه‌ای ریخت‌شناختی (morphological species-group) تفکیک شده‌اند و هر یک از گروه‌ها با یک گونه نماینده مشخص شده است. ماهیت این گروه‌بندی‌های ریخت‌شناختی بر اساس داده‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی، ژنتیکی و بیماری‌شناسی تأیید شده است (Andersen and Thrane, 1996; Roberts *et al.*, 2000; Andersen *et al.*, 2002; 2009). در سال‌های اخیر با ابداع و توسعه روش‌های مولکولی در سیستماتیک قارچ‌ها، مطالعه‌های متعددی بر مبنای توالی‌یابی ژن‌ها روی افراد جنس *Alternaria* انجام و نتایج آنها تغییرات زیادی را در تاکسونومی این جنس و سایر جنس‌های مشابه سبب شده است (Pryor and Bigelow, 2003; Hong *et al.*, 2005; Runa *et al.*,

1986; Lawrence *et al.*, 2016; Thambugala *et al.*, 2017). تولید اندام‌های باردهی جنسی در برخی از استرین‌های این بخش به شکل کشت‌های خالص (axenic) پیشنهاد می‌کند اعضای این بخش از نظر جنسی هموتال هستند (Andersen *et al.*, 2009). همچنین اعضای این بخش به علت تولید برخی از متابولیت‌های ثانویه مانند اینفکتوپیرین‌ها و نوا - زلاندین‌ها از دیگر بخش‌های جنس *Alternaria* کاملاً متمایز می‌شوند (Anderson and Thrane, 1996; Andersen *et al.*, 2002; 2008; Andersen and Hollensted, 2008; Christensen *et al.*, 2005). گفته می‌شود هیچ‌یک از اعضای موجود در این بخش قادر به تولید زهرابه‌های قارچی رایج در سایر بخش‌های این جنس از جمله آلترناریول، تنوزوئیک اسید و آلترسولانول نیستند (Andersen *et al.*, 2002)؛ با وجود این، برخی مطالعه‌ها نشان می‌دهند تعدادی از گونه‌های موجود در این بخش زهرابه‌های قارچی از جمله آلترناریول و مونومتیل‌اتر را تولید می‌کنند (Oviedo *et al.*, 2013).

بامطالعه‌های انجام‌شده طی سال‌های اخیر در زمینه شناسایی گونه‌های *Alternaria* از بستره‌های مختلف در ایران (Ghоста *et al.*, 2003; 2004; Ardestani *et al.*, 2010; Hajipour Jarchelou *et al.*, 2012; Bagherabadi *et al.*, 2013; 2015) تنها سه گونه شامل *A. infectoria* (Ghosta *et al.*, 2003)، *A. arbusti* (Rahimlou and Ghosta, 2015) و *A. quercicola* (Crous *et al.*, 2016) از بخش *Infectoriae* در ایران گزارش شده‌اند. به‌غیر از مطالعه Poursafar و همکاران (۲۰۱۷) مطالعه جامعی برای شناسایی گونه‌های جنس *Alternaria* از بخش *Infectoriae* در ایران انجام نشده است؛ بنابراین، مطالعه

سایر بخش‌ها مانند بخش *Alternaria* هم‌پوشانی داشته باشند (Lawrence *et al.*, 2013). در حال حاضر، این بخش از جنس *Alternaria* با گونه *A. infectoria* (گونه نماینده) مشخص می‌شود. در سال‌های اخیر همواره درباره تعداد گونه‌های معتبری که به این بخش اختصاص داده شده‌اند تردید وجود داشته است. در بازبینی انجام‌شده روی جنس *Alternaria* تعداد ۲۵ گونه در این بخش قرار داده شده است (Lawrence *et al.*, 2016). در مطالعه‌های انجام‌شده روی افراد موجود در این بخش نیز تعداد گونه‌های موجود در این بخش به ۳۴ گونه افزایش یافته است (Gannibal and Lawrence, 2016). در حال حاضر، طبقه‌بندی این بخش از جنس *Alternaria* با اضافه‌شدن گونه‌های جدید (Crous *et al.*, 2016; Thambugala *et al.*, 2017) و نبود حمایت مناسب داده‌های حاصل از توالی‌های ژنومی برای تفکیک گونه‌های متفاوت از نظر ویژگی‌های ریخت‌شناختی دچار پیچیدگی بیشتری شده است (Poursafar *et al.*, 2017). در مجموع، اغلب گونه‌های شناخته‌شده در این بخش ارتباط وسیعی با گیاهان تیره چمنیان (Poaceae) دارند و از اندام‌های مختلف گیاهانی مانند گندم، جو و یولاف گزارش شده‌اند (Simmons, 1986; Andersen *et al.*, 2002; Dugan and Peever, 2002; Andersen *et al.*, 2008)؛ با وجود این، گونه‌های *A. ethzedia*، *A. triticina* و *A. viburni* گونه‌هایی با درجه‌های متفاوت بیماری‌زایی روی میزبان‌های مختلف شناخته شده‌اند (Perelló *et al.*, 1996; Andersen *et al.*, 2008; Andersen *et al.*, 2009). مرحله جنسی تنها در اعضای بخش *Infectoriae* شناسایی شده است و در جنس *Lewia* (Barr and Simmons, 2013) قرار داده شده‌اند (Simmons,

مطالعه‌های ریخت‌شناختی

ویژگی‌های ریخت‌شناختی جدایه‌های جنس *Alternaria* مطابق روش پیشنهادی Simmons (۲۰۰۷) بررسی شدند. به این منظور، قارچ‌های خالص شده روی محیط کشت سیب‌زمینی هویج آگار (PCA) کشت شدند و به مدت ۵ تا ۷ روز در شرایط دمایی ۲۳ تا ۲۵ درجه سلسیوس زیر نور سفید فلورسنت با دوره تاریکی/روشنایی ۸/۱۶ ساعت نگهداری شدند. ویژگی‌های کلی پرگنه‌ها و الگوی هاگ‌زایی و آرایش هاگ‌ها روی هاگبرها بدون تخریب حالت طبیعی و با بینوکولر (مدل Wild Heerbrugg) بررسی شدند. لام‌های میکروسکوپی به روش نوارچسپ شفاف (Schubert et al., 2007) در لاکتیک اسید ۲۵ درصد تهیه شدند؛ علاوه بر این، ویژگی‌های پرگنه‌ها در جدایه‌های مطالعه شده در محیط کشت Pentachloronitrobenzene-Rose bengal-Yeast (Frisvad, 1983) extract-Sucrose agar (PRYES) و محیط کشت PDA (ساخت شرکت مرک آلمان) و شرایط دمایی ۲۵ درجه سلسیوس و تاریکی مطلق پس از ۷ روز بررسی شدند؛ ویژگی‌های ثبت شده جدایه‌های مطالعه شده با توصیف‌ها و کلیدهای معتبر قارچ‌شناسی مقایسه شدند و شناسایی ریخت‌شناختی جدایه‌ها انجام شد. جدایه‌های گونه‌های شناسایی شده در مجموعه‌های قارچ‌شناسی دانشگاه تهران (UTFC) و پژوهشگاه زیست‌فناوری کشاورزی ایران - کرج (ABRII) نگهداری می‌شوند.

مطالعه‌های مولکولی و ارزیابی‌های تبارشناختی

به منظور تهیه توده میسلومی برای استخراج DNA ژنومی، جدایه‌های قارچی روی محیط کشت PDA در

حاضر با هدف جداسازی و شناسایی گونه‌های جنس *Alternaria* از بخش *Infectoriae* که با نشانه‌های بیماری کپک سیاه خوشه‌های گندم و جو در استان‌های گلستان، البرز و قزوین همراه بودند انجام شد.

روش بررسی

نمونه‌برداری، جداسازی و خالص‌سازی جدایه‌های قارچی

طی بهار و تابستان سال‌های ۱۳۹۳ و ۱۳۹۴ از خوشه‌های گندم و جوی دارای نشانه‌های کپک سیاه در مناطق مختلف زیرکشت این محصولات در استان‌های گلستان، البرز و قزوین به شکل کاملاً تصادفی نمونه‌برداری شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده درون پاکت‌های کاغذی جداگانه قرار داده شدند و پس از ثبت ویژگی‌های محل و نوع میزبان به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌ها پس از رطوبت‌گیری کامل تا زمان جداسازی قارچ‌ها در دمای اتاق نگهداری شدند. جداسازی قارچ‌ها از بافت‌های دارای نشانه به روش کاغذ صافی مرطوب (Blotter method) (Frisvad, 1983) و به دو شکل کشت پس از ضدعفونی سطحی بافت‌ها با محلول هیپوکلریت سدیم ۱ درصد به مدت ۱ دقیقه و ۳ بار شستشو با آب مقطر سترون و کشت بدون ضدعفونی سطحی انجام شد. خالص‌سازی جدایه‌های قارچی به روش کشت تک‌هاگ و یا کشت نوک ریشه روی محیط کشت‌های سیب‌زمینی دکستروز آگار (PDA) و آب آگار ۲ درصد (2% WA) انجام شد. جدایه‌های قارچی خالص‌سازی شده برای مطالعه‌های بعدی در لوله‌های آزمایش حاوی محیط کشت سیب‌زمینی هویج آگار (PCA) ذخیره شدند.

تشتک‌های پتری ۹ سانتی‌متری کشت شدند و روش Zhong و Steffenson (۲۰۰۱) با اندکی تغییر برای استخراج DNA ژنومی از جدایه‌های قارچی استفاده شد. به منظور بررسی روابط تبارشناختی جدایه‌های مطالعه‌شده، ناحیه ITS از DNA ریپوزومی با استفاده از آغازگرهای ITS4 و ITS5 (White *et al.*, 1990) و بخشی از ژن گلیسرآلدئید-۳-فسفات‌دهیدروژناز (*gpdh*) با استفاده از آغازگرهای *gpd 1* و *gpd 2* (Berbee, 1999) تکثیر شد. شرکت ماکروژن توالی‌یابی محصولات تکثیرشده را (Macrogen Inc., South Korea) انجام داد و ویرایش توالی‌های نوکلئوتیدی حاصل با نرم‌افزار BioEdit v. 7.2.5 انجام شد (Hall, 1999). عمل هم‌ردیف‌سازی چندگانه توالی‌های نوکلئوتیدی جدایه‌های مطالعه‌شده به همراه توالی‌های نوکلئوتیدی دریافت‌شده از بانک ژن NCBI (جدول ۱) در نرم‌افزار تحت وب MAFFT v. 7.304

(Kato and Standley, 2013) انجام شد. تبارنما با استفاده از ماتریکس داده‌ای مبتنی بر صفت‌های Maximum Parsimony (MP) به روش جستجوی تبارنمای ابتکاری (Heuristic search) شاخص random addition sequence با ۱۰۰۰ تکرار و الگوریتم TBR با نرم‌افزار PAUP v. 4.0b10 ترسیم شد (Swofford, 1999). تمام مکان‌های خالی (gaps) در این تجزیه و تحلیل اطلاعات از دست‌رفته (missing data) در نظر گرفته شدند. پایداری تبارنمای حاصل با شاخص bootstrap و ۱۰۰۰ تکرار ارزیابی شد (Felsenstein, 1985). در ارزیابی‌های تبارشناختی، گونه *Alternaria abundans* (CBS 534.83) گروه خارجی (out group) انتخاب شد. توالی‌های نوکلئوتیدی جدایه‌های مطالعه‌شده در مجموعه داده‌های بانک ژن NCBI ذخیره و شماره‌های دسترسی آنها دریافت شد (جدول ۱).

جدول ۱- گونه‌های استفاده‌شده در تجزیه و تحلیل‌های تبارشناختی به همراه توالی‌های نوکلئوتیدی دریافت‌شده از بانک ژن NCBI. ترادف‌های نوکلئوتیدی به دست آمده در پژوهش حاضر پررنگ تر نشان داده شده‌اند.

Species	Isolate/Strain	GenBank accession numbers	
		<i>gpdh</i>	ITS
<i>Alternaria. abundans</i>	CBS 534.83	FJ214852	JN383485
<i>A. alternariana</i>	EGS 10-193	JQ646289	JQ693648
<i>A. arbusti</i>	EGS 91-136	JQ646365	JQ693644
<i>A. arbusti</i>	FMD 578731-57FD	JQ693630	JQ693671
<i>A. arbusti</i>	UTFC 4-11/ ABR11 10246	KY290833	KY290828
<i>A. caespitosa</i>	CBS 177.80	KC584178	KC584250
<i>A. californica</i>	EGS 52-082	JQ646285	JQ693645
<i>A. conjuncta</i>	EGS 37-139	AY562401	FJ266475
<i>A. daucicaulis</i>	EGS 36-1947	JQ646294	JQ693653
<i>A. ethzedia</i>	EGS 37-143	AY278795	AY278833
<i>A. ethzedia</i>	UTFC 3-8/ ABR11 10247	KY290835	KY290830
<i>A. frumenti</i>	EGS 44-001	JQ646295	JQ693654
<i>A. graminicola</i>	EGS 41-139	JQ646291	JQ693650
<i>A. hordeiaustralica</i>	EGS 44-200	JQ646283	JQ693641
<i>A. hordeicola</i>	EGS 50-184	JQ646284	JQ693642
<i>A. humuli</i>	EGS 47-140	JQ646293	JQ693652
<i>A. incomplexa</i>	EGS 17-103	JQ646287	JQ693658
<i>A. incomplexa</i>	UTFC 4-14/ ABR11 10245	KY290831	KY290827
<i>A. incomplexa</i>	UTFC 4-16/ ABR11 10244	KY290832	KY290826
<i>A. infectoria</i>	EGS 27-193	AY278793	AF347034

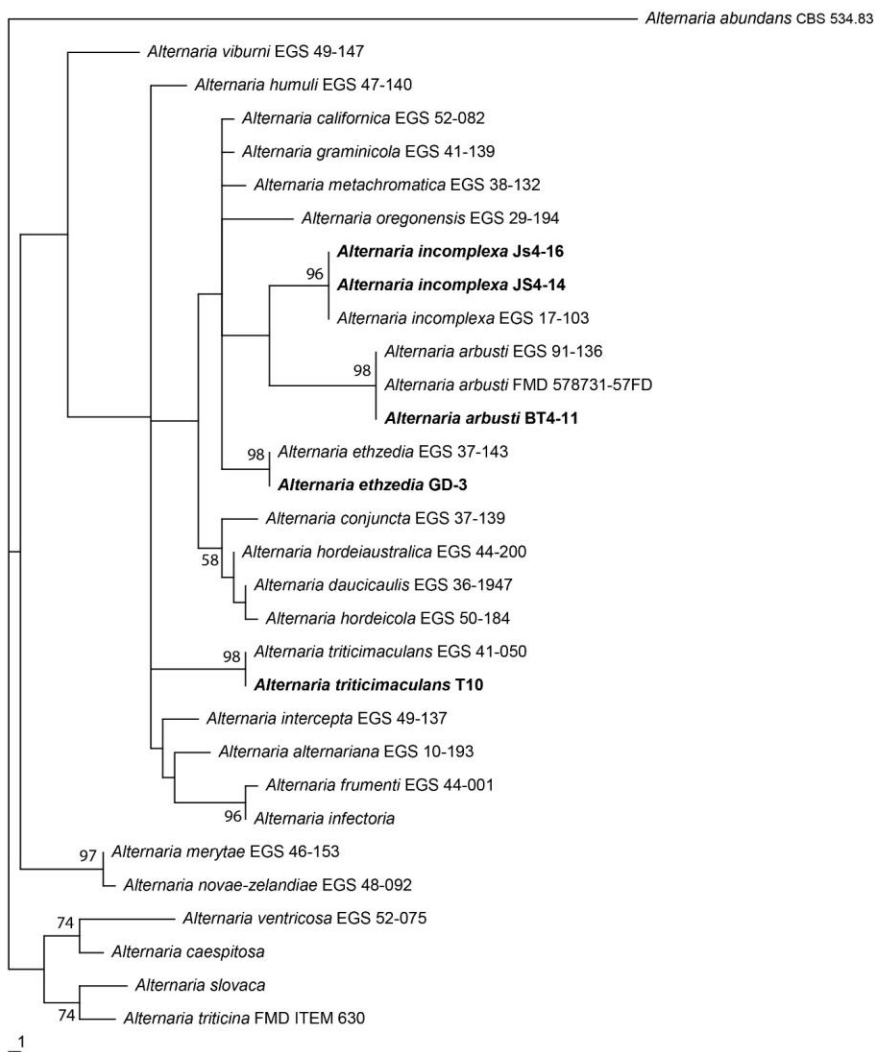
Species	Isolate/Strain	GenBank accession numbers	
		<i>gpdh</i>	ITS
<i>A. intercepta</i>	EGS 49-137	JQ646297	JQ693656
<i>A. merytae</i>	EGS 46-153	JQ646292	JQ693651
<i>A. metachromatica</i>	EGS 38-132	AY562404	JQ693660
<i>A. novae-zelandiae</i>	EGS 48-092	JQ646296	JQ693655
<i>A. oregonensis</i>	EGS 29-194	FJ266491	FJ266478
<i>A. slovacica</i>	CBS 567.66	KC584150	KC584226
<i>A. triticimaculans</i>	EGS 41-050	JQ646280	JQ693657
<i>A. triticimaculans</i>	UTFC 10-2/ ABR11 10248	KY290834	KY290829
<i>A. triticina</i>	FMD ITEM 630	JQ693623	JQ693665
<i>A. ventricosa</i>	EGS 52-075	JQ646290	JQ693649
<i>A. viburni</i>	EGS 49-147	JQ646288	JQ693647

نتیجه و بحث

در مطالعه حاضر، تعداد ۱۳۳ جدایه *Alternaria* با ویژگی‌های مربوط به بخش *Infectoriae* جمع‌آوری و بررسی‌های ریخت‌شناختی اولیه روی آنها انجام شدند. تعداد ۵ جدایه از این مجموعه بر اساس شناسایی‌های ریخت‌شناختی برای تأیید شناسایی‌های ریخت‌شناختی بر مبنای داده‌های توالی‌های ناحیه ITS-rDNA و بخشی از ژن *gpdh* انتخاب شدند. در مجموع، ۴ گونه شامل *A. incomplexa*, *A. ethzedia*, *A. arbusti* و *A. triticimaculans* متعلق به بخش *Infectoriae* بر اساس مجموعه ویژگی‌های ریخت‌شناختی و تبارشناختی شناسایی شدند. با مرور منابع علمی موجود، به‌غیر از گونه *A. arbusti* که قبلاً از گیاهان کلم در ایران جداسازی و گزارش شده بود (Rahimlou and Ghosta, 2015) سه گونه دیگر آرایه‌های جدیدی برای بیوتای قارچی ایران شناسایی شدند و در مقاله حاضر به ترتیب حروف الفبا گزارش و توصیف شدند. تکثیر ناحیه ITS از DNA ریبوزومی و بخشی از ژن گلیسرآلدئید-۳-فسفات‌دهیدروژناز (*gpdh*) در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جدایه‌های گونه‌های مطالعه‌شده به تولید قطعه‌های DNA به ترتیب ۵۷۰ تا ۶۰۰ و ۵۲۰ تا ۵۴۰ جفت بازی منجر شد. نتایج

جستجوی بلاست توالی‌های ناحیه ITS از DNA ریبوزومی در بانک داده‌های ژن NCBI شباهت‌های زیادی (۹۹ تا ۱۰۰ درصد) را بین گونه‌های موجود در این بخش نشان داد که گویای ناتوانی این ناحیه ژنومی به‌تنهایی برای تفکیک گونه‌های موجود در این بخش است. از سوی دیگر، نتایج جستجوی بلاست توالی‌های به‌دست‌آمده از ژن گلیسرآلدئید-۳-فسفات‌دهیدروژناز (*gpdh*) در بانک داده‌های ژن NCBI نشان داد توالی‌های این ژن دارای تنوع کافی بین اغلب گونه‌های این بخش از جنس *Alternaria* هستند و نشانگر مناسبی برای شناسایی گونه‌های این بخش به شمار می‌آیند. ترکیب توالی‌های نوکلئوتیدی دو جایگاه ژنومی ITS از DNA ریبوزومی و *gpdh* برای گونه‌های شناسایی‌شده در مطالعه حاضر به همراه توالی‌های ۲۵ گونه مرجع از بخش *Infectoriae* تجزیه و تحلیل شدند؛ به این ترتیب، از تعداد کل ۱۰۵۶ کاراکتر استفاده‌شده در تجزیه و تحلیل حاضر، تعداد ۹۴۹ کاراکتر ثابت، ۵۷ کاراکتر متغیر و بدون اطلاعات پارسیمونی و ۵۰ کاراکتر دارای اطلاعات پارسیمونی بودند. در تبارنمای استنتاج‌شده (CI=0.758, TL=157, Maximum Parsimony) بر اساس روش (HI=242, RI=0.819, GD=3, BT4=11) جدایه‌های بررسی‌شده

JS4-14، JS4-16 و T10 به ترتیب با مقادیر *A. incomplexa*، *A. ethzedia*، *A. arbusti* و اعتبارسنجی زیاد در کلادهای مربوط به گونه‌های *A. triticimaculans* جای گرفتند (شکل ۱).



شکل ۱- تبارنمای استخراج شده از ترکیب توالی‌های نوکلئوتیدی ناحیه ITS و بخشی از ژن *gpdh* به روش Maximum Parsimony برای ۴ گونه شناسایی شده در مطالعه حاضر به همراه ۲۵ گونه نماینده از بخش *Infectoriae*. مقادیر Bootstrap بیشتر از ۵۰ درصد در محل گره‌ها نشان داده شده‌اند. گونه *A. abundans* CBS. 534.83 آرایه گروه خارجی انتخاب شده است.

محیط کشت PDA مسطح به رنگ قهوه‌ای تیره با حاشیه سفید و نامنظم و قطر ۴۵ میلی‌متر و روی محیط کشت PCA به رنگ سفید با توده‌های هاگ به رنگ زیتونی تا زیتونی تیره و قطر رشدی ۶۵ میلی‌متر است (شکل‌های C-۲A).

توصیف گونه‌ها

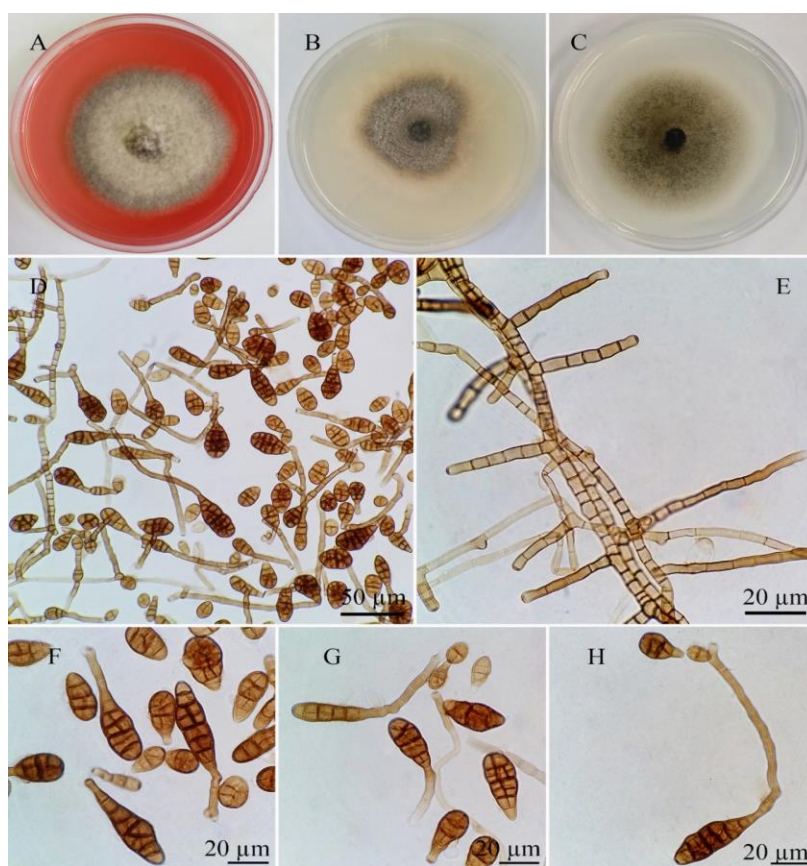
۱- *Alternaria arbusti* E.G. Simmons, Mycotaxon 48: 103 (1993)
ویژگی‌های پرگنه: پرگنه این گونه روی محیط کشت PRYES مسطح به رنگ زیتونی مایل به خاکستری با حاشیه منظم و قطر ۵۰ میلی‌متر، روی

موجود در این بخش است (شکل ۲). این گونه برای نخستین بار از گیاه گلابی *Pyrus pyrifolia* و میوه‌های گیلاس *Prunus avium* L. در ایالات متحده آمریکا جداسازی و شناسایی شده است (Simmons, 1993). این گونه به تازگی از گیاه سیب‌زمینی در شمال غرب ایالات متحده آمریکا جداسازی و بر مبنای تلفیق داده‌های ریخت‌شناختی و مولکولی شناسایی شده است (Tymon et al., 2016). Ghosta و Rahimlou (۲۰۱۵) این گونه را در ایران از برگ‌های گیاهان کلم دارای نشانه‌های لکه‌برگی جداسازی و گزارش کرده‌اند؛ علاوه بر این، نتایج آزمون‌های بیماری‌زایی این گونه روی برگ‌های کلم توان بیماری‌زایی کم آن را روی کلم نشان داده است (Rahimlou and Ghosta, 2015). گونه یادشده از نظر ویژگی‌های ریخت‌شناختی و تولید هاگ در زنجیرهای کوتاه مشابه گونه *A. gaisen* است؛ با وجود این، *A. arbusti* با برخی ویژگی‌های ریخت‌شناختی میکروسکوپی هاگ‌ها از جمله تولید هاگ‌های ثانویه دراز (Simmons, 2007) و از نظر تبارشناختی از گونه *A. gaisen* متمایز می‌شود (Lawrence et al., 2014).

نمونه‌های بررسی شده: جدایه‌های BT5-7 و BT4-11 (UTFC 4-11; ABR11 10246)، خوشه گندم، بندر ترکمن؛ جدایه‌های JS8-2، JS8-10 و JS8-12، خوشه گندم، جاده ساری- گرگان، استان گلستان؛ جدایه NAZ6-1، خوشه گندم، نظرآباد؛ جدایه H9-16، خوشه گندم، هشتگرد، استان البرز. جمع‌آوری کننده: علیرضا پورصفر، بهار ۱۳۹۳.

توصیف: ریشه‌ها به رنگ قهوه‌ای روشن با دیواره و بندهای عرضی تیره تر هستند. در برخی از موارد، ریشه‌ها در کنار یکدیگر قرار می‌گیرند و دستجاتی از ریشه‌ها تولید می‌کنند که باعث ایجاد توده‌های متراکم هاگ می‌شوند. هاگ‌های اولیه کوتاه، متوسط و بلند به رنگ قهوه‌ای روشن تا تیره، دارای بندهای عرضی تیره تر و به طول تا ۱۲۰ میکرومتر، اغلب راست و در برخی موارد دارای خمیدگی‌های زانویی شکل هستند و اغلب با یک محل هاگ‌زایی و در مواردی تا ۵ محل هاگ‌زایی دیده می‌شوند. هاگ‌ها به اشکال مختلف کروی تا تخم‌مرغی، گریزی تا گریزی شکل وارونه و مخروطی دیده می‌شوند. هاگ‌های ابتدای زنجیر دارای هاگ‌های ثانویه بلند، به اشکال کروی، بیضوی تا کشیده، به رنگ قهوه‌ای روشن تا تیره با سطح زگیل‌دار، با ۳ تا ۷ بند عرضی و ۳ تا ۵ بند طولی و مورب و به ابعاد ۲۳-۶۰×۱۶-۳۵ میکرومتر هستند. هاگ‌های میانی و انتهایی زنجیر به رنگ قهوه‌ای روشن تا تیره، به اشکال کروی، استوانه‌ای تا تخم‌مرغی و گریزی شکل و به ابعاد ۲۰-۵۰×۱۰-۲۰ میکرومتر هستند. هاگ‌های ثانویه راست تا دارای خمیدگی‌های زانویی شکل با ۱ تا ۵ محل هاگ‌زایی و در مواردی بیشتر هستند و تا ۱۲۰ میکرومتر طول دارند (شکل‌های ۲D-H).

توضیحات: در پژوهش حاضر، ۷ جدایه با ویژگی‌های گونه *A. arbusti* مطابقت داشتند. تولید هاگ‌های ستر (robust) با هاگ‌های ثانویه نسبتاً بلند و زنجیرهای کوتاه هاگ در توده‌های نسبتاً متراکم صفت ریخت‌شناختی متمایزکننده این گونه از سایر گونه‌های



شکل ۲- *Alternaria arbusti*، A تا C. پرگنه قارچ به ترتیب روی محیط کشت‌های PRYES، PDA و PCA پس از ۷ روز، D. تنوع شکل هاگ‌ها، E. هاگ‌های اولیه، F تا G. هاگ‌ها، H. هاگ‌ها ثانویه

هوایی تشکیل می‌شوند و هاگ‌زایی در زنجیرهای راست یا منشعب در توده‌های غیرمتراکم و حلقه‌های هم‌مرکز انجام می‌شود (شکل‌های C-3A).

توصیف: هاگ‌های اولیه دارای ابعاد کوتاه تا متوسط به طول تا ۱۰۰ میکرومتر و رنگ قهوه‌ای روشن، راست تا دارای خمیدگی‌های زانویی شکل و گاهی منشعب و اغلب با ۱ تا ۳ و به ندرت ۴ محل هاگ‌زایی هستند. هاگ‌ها به رنگ قهوه‌ای روشن با بندهای عرضی تیره، سطح صاف و به اشکال تخم‌مرغی تا تخم‌مرغی کشیده، کروی، گرزنی شکل وارونه دیده می‌شوند و در مواردی دارای باریک‌شدگی در قسمت انتهایی هاگ هستند. هاگ‌های ابتدای زنجیر اغلب

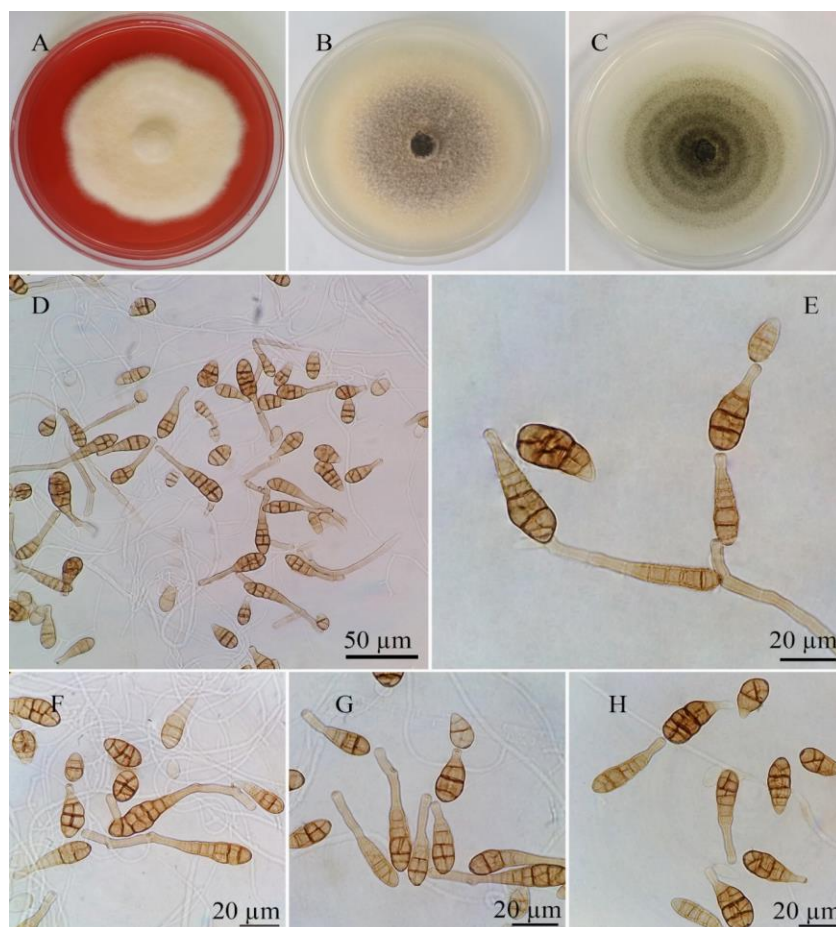
Alternaria ethzedia E.G. Simmons, -۲
Mycotaxon 25(1): 300 (1986)

ویژگی‌های پرگنه: پرگنه در جدایه‌های این گونه روی محیط کشت PRYES مسطح به رنگ سفید متمایل به زرد با حاشیه نامنظم و قطر ۵۵ میلی‌متر، روی محیط کشت PDA مسطح به رنگ سفید متمایل به خاکستری تیره با حاشیه سفید و منظم و قطر ۷۰ میلی‌متر و روی محیط کشت PCA به رنگ سفید مایل به خاکستری با توده‌های هاگ‌زایی سیاه‌رنگ و قطر رشدی ۶۰ میلی‌متر است. در محیط کشت PCA ریشه‌ها اغلب در سطح محیط رشد می‌کنند، بی‌رنگ تا قهوه‌ای روشن و با بندهای عرضی بی‌رنگ هستند. هاگ‌ها اغلب از ریشه‌های موجود در سطح آگار و از ریشه‌های

توضیحات: این گونه برای نخستین بار از گیاه کلزا (*Brassica napus* L.) در کشور سوئیس گزارش شده است و از معدود گونه‌های جنس *Alternaria* است که قادر به تولید مرحله جنسی است. در گذشته، مرحله جنسی این گونه با نام *Lewia ethzedia* شناخته می‌شد (Simmons, 1986).

نمونه‌های بررسی شده: جدایه FA6-4، فاضل‌آباد، خوشه گندم، استان گلستان، بهار ۱۳۹۳؛ جدایه B9-12، گنبد کاووس، خوشه جو، بهار ۱۳۹۳؛ جدایه GD-3 (UTFC 3-8; ABRII 10247)، خوشه گندم، درود محله، گرگان، استان گلستان، بهار ۱۳۹۴. جمع‌آوری کننده: علیرضا پورصفر

بزرگ و به ابعاد ۱۷-۱۰×۷۰-۴۰ میکرومتر، راست و در مواردی دارای انحنا و دارای ۳ تا ۸ بند عرضی تیره، صفر تا ۲ بند طولی و صفر تا ۱ بند مورب هستند. هاگبرهای ثانویه در این هاگ‌ها اغلب کوتاه و به طول تا ۸۰ میکرومتر، ساده یا منشعب و دارای ۱ تا ۳ محل هاگ‌زایی هستند. هاگ‌های میانی و انتهایی زنجیر اغلب تخم‌مرغی شکل با ۱ تا ۴ بند عرضی، صفر تا ۲ بند طولی و صفر تا ۲ بند مورب هستند و ابعاد آنها ۱۵-۹×۴۷-۱۹ میکرومتر است. این هاگ‌ها دارای هاگبر ثانویه کوتاه به طول تا ۵۰ میکرومتر هستند و یا هاگبر ندارند (شکل H-D۳).



شکل ۳- *Alternaria ethzedia*، A تا C. پرگنه قارچ به ترتیب روی محیط کشت‌های PRYES، PDA و PCA پس از گذشت ۷ روز، D. تنوع شکل در هاگ‌ها، C. هاگبر اولیه و هاگ، H تا F هاگ‌ها

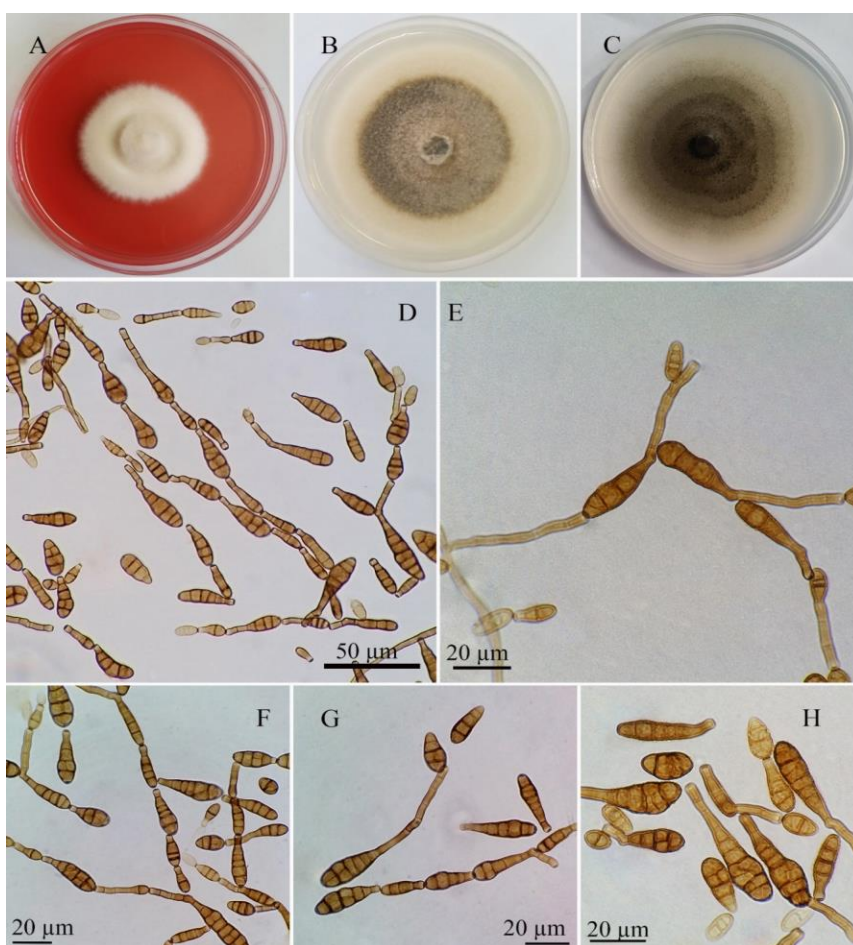
صفر تا ۲ بند مورب با قاعدهٔ کروی، باریک‌شده به سمت انتها و دارای فرورفتگی مشخص در محل بند عرضی میانی و یا یک‌سوم بالایی هاگ دیده می‌شوند. هاگبر ثانویه در این هاگ‌ها بلند و به طول تا ۱۰۰ میکرومتر و با ۱ تا ۳ محل هاگ‌زایی است. هاگ‌های میانی و انتهایی زنجیر به ابعاد ۱۵-۶×۴۰-۱۶ میکرومتر و اشکال تخم‌مرغی تا تخم‌مرغی کشیده و کروی تا گریزی‌شکل، به رنگ‌های قهوه‌ای تیره تا روشن، با ۱ تا ۴ بند عرضی و صفر تا ۱ بند طولی هستند. این هاگ‌ها دارای هاگبر ثانویه کوتاه به طول تا ۲۰ میکرومتر هستند و یا هاگبر ندارند. از ویژگی‌های مهم این گونه تشکیل هاگ‌هایی با اندازه‌های مختلف در طول زنجیرهٔ هاگ و انشعابات آن است و هاگ‌های کوچک و بزرگ به تناوب در طول زنجیر تشکیل می‌شوند (شکل‌های H-۴D).

توضیحات: این گونه برای نخستین بار از لجن‌های جوی آب در ایالات متحدهٔ آمریکا جداسازی و گزارش شده است (Simmons, 1996).

نمونه‌های بررسی‌شده: جدایه‌های JS4-14 (UTFC 4-14; ABR11 10245) و JS4-16 (UTFC 4-16; ABR11 10244)، خوشهٔ گندم، جادهٔ ساری-گرگان، استان گلستان، بهار ۱۳۹۳؛ جدایهٔ KQ3-7، خوشهٔ گندم، کردکوی، استان گلستان، بهار ۱۳۹۳؛ جدایهٔ ABY4-1، خوشهٔ گندم، آبیک، استان قزوین. جمع‌آوری‌کننده: علیرضا پورصفر

۳- *Alternaria incomplexa* E.G. Simmons, Mycotaxon 57: 394 (1996)
ویژگی‌های پرگنه: پرگنه در جدایه‌های این گونه روی محیط کشت PRYES برآمده و گنبدی‌شکل به رنگ سفید با حاشیهٔ منظم و قطر ۴۰ میلی‌متر، روی محیط کشت PDA مسطح به رنگ قهوه‌ای تیره با حاشیهٔ سفید و منظم و قطر ۷۵ میلی‌متر و روی محیط کشت PCA به رنگ خاکستری تیره با توده‌های هاگ‌زایی سیاه‌رنگ و قطر رشدی ۷۰ میلی‌متر است. در محیط کشت PCA ریشه‌ها اغلب در سطح محیط کشت توسعه می‌یابند و به رنگ قهوه‌ای با بندهای عرضی بی‌رنگ هستند (شکل‌های C-۴A).

توصیف: هاگبرها اغلب از ریشه‌های موجود در سطح محیط کشت و از ریشه‌های هوایی تشکیل می‌شوند و هاگ‌زایی در زنجیرهای راست تا منشعب به شکل توده‌های متراکم و حلقه‌های متحدالمرکز انجام می‌شود. در هر انشعاب از زنجیرها ممکن است ۵ تا ۷ هاگ و در مواردی تا ۱۲ هاگ تشکیل شود. هاگبرهای اولیه دارای ابعاد متوسط تا بلند به طول تا ۱۲۰ میکرومتر و رنگ قهوه‌ای روشن تا تیره، راست تا دارای خمیدگی‌های زانویی‌شکل، اغلب با ۱ و به ندرت ۲ محل هاگ‌زایی هستند. هاگ‌های تشکیل‌شده در ابتدای زنجیر بزرگ و به ابعاد ۱۵-۱۰×۷۰-۳۷ میکرومتر، به رنگ قهوه‌ای روشن تا تیره با بندهای عرضی تیره‌تر و سطح زگیل‌دار هستند و به اشکال تخم‌مرغی تا تخم‌مرغی کشیده و گریزی تا گریزی‌شکل وارونه، دارای ۳ تا ۸ بند عرضی، صفر تا ۱ بند طولی و



شکل ۴- *Alternaria incomplexa*، A تا C. پرگنه قارچ به ترتیب روی محیط کشت‌های PRYES، PDA و PCA پس از گذشت ۷ روز، D. تنوع شکل در هاگ‌ها، E. تشکیل هاگ روی هاگبر اولیه، F. هاگ‌هایی به اندازه‌های مختلف در طول زنجیر، G تا H. هاگ‌های ثانویه و هاگ‌ها

هاگبرهای اولیه اغلب از ریشه‌های موجود در سطح محیط کشت و از ریشه‌های هوایی تشکیل می‌شوند و هاگ‌زایی به فراوانی در زنجیرهای راست یا منشعب به شکل توده‌های متراکم و در حلقه‌های متحدالمرکز انجام می‌شود (شکل‌های A-C-۵).

توصیف: هاگبرهای اولیه کوتاه تا متوسط (تا ۱۰۰ میکرومتر)، اغلب راست، به رنگ قهوه‌ای روشن و با ۱ تا ۳ مکان هاگ‌زایی مشخص هستند. هاگ‌ها در این گونه دارای شکل و ابعاد نسبتاً یکنواختی هستند. هاگ‌های تشکیل شده در ابتدای زنجیر نسبتاً بزرگ‌تر،

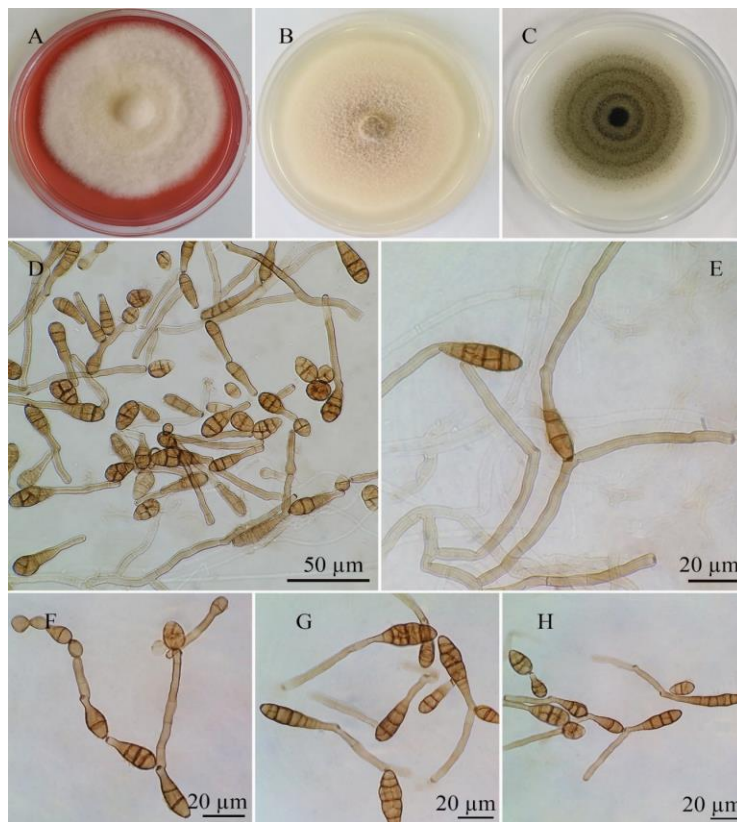
۴- *Alternaria triticimaculans* E.G. Simmons and Perelló, Mycotaxon 50: 413 (1994) ویژگی‌های پرگنه: پرگنه در جدایه‌های این گونه روی محیط کشت PRYES مسطح به رنگ سفید متمایل به خاکستری با حاشیه منظم و قطر ۶۵ میلی‌متر، روی محیط کشت PDA مسطح به رنگ سفید کرمی با حاشیه منظم و قطر ۷۰ میلی‌متر و روی محیط کشت PCA به رنگ زیتونی تا زیتونی روشن با توده‌های هاگ‌زایی سیاه‌رنگ و قطر رشدی ۶۵ میلی‌متر است. در محیط کشت PCA، ریشه‌ها اغلب در سطح محیط کشت توسعه می‌یابند و به رنگ قهوه‌ای روشن هستند.

شده است (Simmons, 1994) و توانایی ایجاد آلودگی و نشانه‌های لکه‌برگی در گیاهان گندم را دارد (Perelló et al., 1996). این گونه شباهت ریخت‌شناختی زیادی از نظر الگوی انشعاب زنجیر و تولید هاگ با گونه *A. infectoria* دارد (Simmons, 2007) ولی بر اساس ویژگی‌های های هاگ و هاگبر ثانویه و داده‌های حاصل از توالی‌های ژنی از آن تشخیص داده می‌شود (Lawrence et al., 2014).

نمونه‌های بررسی‌شده: جدایه‌های T10 (UTFC)، T18-6، خوشه گندم، توسکستان، استان گلستان، بهار ۱۳۹۳. جمع‌آوری کننده: علیرضا پورصفر

به ابعاد $14 \times 8 \times 7-35$ میکرومتر و به شکل تخم‌مرغی تا تخم‌مرغی کشیده و رنگ قهوه‌ای روشن با ۳ تا ۶ یا ۷ بند عرضی، صفر تا ۲ بند طولی و صفر تا ۲ بند مورب تیره‌تر هستند. هاگبر ثانویه در این هاگ‌ها نسبتاً بلند و به طول تا ۹۰ میکرومتر و دارای ۱-۲ محل هاگ‌زایی است. هاگ‌های موجود در میانه و انتهای زنجیر به شکل کروی، تخم‌مرغی تا تخم‌مرغی کشیده، گریزی تا دوکی شکل، اغلب با ۳ تا ۴ بند عرضی، صفر تا ۱ بند طولی و صفر تا ۱ بند مورب تیره‌تر و به ابعاد $15-16 \times 8-52$ میکرومتر هستند. این هاگ‌ها ممکن است دارای هاگبر ثانویه کوتاه باشند و یا هاگبر نداشته باشند (شکل‌های H-۵D).

توضیحات: این گونه برای نخستین بار از گندم (*Triticum aestivum* L.) در کشور آرژانتین گزارش



شکل ۵- *Alternaria triticimaculans*، A تا C. پرگنه فارچ به ترتیب روی محیط کشت‌های PRYES، PDA و PCA پس از گذشت ۷ روز، D. تنوع شکل در هاگ‌ها، E. هاگبرهای اولیه، F. الگوی زنجیره هاگ، G تا H. هاگ‌ها و هاگبرهای ثانویه

Dreschlera, *Cladosporium*, *Curvularia* با نشانه‌های کپک سیاه خوشه‌های گندم و جو گزارش شده‌اند (Dexter and Matsuo, 1982; Perelló *et al.*, 2008; Srivastava *et al.*, 2014; Spurlock *et al.*, 2015). گونه‌های *A. infectoria*، *A. alternata* و *A. tenuissima* در مطالعه‌های انجام‌شده روی گونه‌های *Alternaria* همراه با کپک‌های سیاه و نیز بیماری نقطه سیاه گندم و جو جداسازی و گزارش شده‌اند (Mak *et al.*, 2006; Bensassi *et al.*, 2009). در مطالعه حاضر، گونه‌های متعلق به بخش *Infectoriae* فراوانی زیادی در میان قارچ‌های جداسازی شده داشتند و این نتایج نشان‌دهنده تنوع گونه‌ای جنس *Alternaria* مرتبط با این بیماری در مناطق بررسی شده در ایران هستند. به نظر می‌رسد مطالعه‌های بیشتری برای تعیین تنوع بیوتای قارچی مرتبط با کپک سیاه خوشه‌های غلات در مناطق مختلف لازم باشد تا شناخت دقیقی از عوامل قارچی مرتبط با کپک سیاه خوشه در این محصولات حاصل شود و بر اساس آن، راهکارهای مناسب برای مدیریت آن ارائه شود.

چندین جنس قارچی مختلف سیاه‌شدگی خوشه‌های گندم و جو را ایجاد می‌کنند که به نام کپک‌های سیاه خوانده می‌شوند و با رشد سبز تیره تا سیاه‌رنگ قارچ‌ها در سطح خوشه‌های بالغ گندم و جو مشخص می‌شوند. قارچ‌های عامل کپک‌های سیاه بخشی از مجموعه موجوداتی هستند که به تجزیه بقایای گیاهی کمک می‌کنند و زمانی که آب و هوا طی مراحل آخر تشکیل خوشه و یا بلوغ محصول مرطوب یا خیس باشد خوشه‌های گندم و جو را کلنیزه می‌کنند (Hershman, 2011). اغلب کپک‌زدگی زمانی بسیار شدید می‌شود که برداشت محصول به تأخیر بیفتد؛ علاوه بر این، در مواردی که سنبله‌ها کوچک، ضعیف و یا دچار رسیدگی پیش از بلوغ شوند و یا گیاهان دچار کمبودهای غذایی باشند و تحت تأثیر حشرات و دیگر بیماری‌ها قرار گرفته باشند معمولاً قارچ‌های کپک سیاه آنها را آلوده می‌کنند (Prescott *et al.*, 1985). با وجود این، آلودگی به کپک‌های سیاه اغلب سطحی است و دانه به‌طور مستقیم تحت تأثیر قرار نمی‌گیرد و وزن آن کاهش نمی‌یابد؛ هرچند ممکن است رنگ دانه‌ها تغییر کند که به بیماری نقطه سیاه معروف است (Sisterna and Sarandón, 2010). گونه‌های مختلف قارچ‌ها از جمله گونه‌های جنس‌های *Alternaria*

منابع

- Andersen, B. and Hollensted, M. (2008) Metabolite production by different *Ulocladium* species. *International Journal of Food Microbiology* 126(1): 172-179.
- Andersen, B. and Thrane, U. (1996) Differentiation of *Alternaria infectoria* and *Alternaria alternata* based on morphology, metabolite profiles, and cultural characteristics. *Canadian Journal of Microbiology* 42(7): 685-689.
- Andersen, B., Dongo, A. and Pryor, B. M. (2008) Secondary metabolite profiling of *Alternaria dauci*, *A. porri*, *A. solani* and *A. tomatophila*. *Mycological Research* 112(2): 241-250.

- Andersen, B., Krøger, E. and Roberts, R. G. (2002) Chemical and morphological segregation of *Alternaria arborescens*, *A. infectoria* and *A. tenuissima* species-groups. *Mycological Research* 106(2): 170-182.
- Andersen, B., Sørensen, J. L., Nielsen, K. F., van den Ende, B. G. and de Hoog, S. (2009) A polyphasic approach to the taxonomy of the *Alternaria infectoria* species-group. *Fungal Genetics and Biology* 46(9): 642-656.
- Ardestani, S. T., Sharifnabi, B., Zare, R. and Moghadam, A. A. (2010) New *Alternaria* species associated with potato leaf spot in various potato growing regions of Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology* 45: 83-86 (in Persian).
- Bagherabadi, S., Zafari, D. and Soleimani, M. J. (2015) A report on the *Alternaria* species and its similar genera in Hamedan province. *Taxonomy and Biosystematics* 7(24): 95-112 (in Persian).
- Bensassi, F., Zid, M., Rhouma, A., Bacha, H. and Hajlaoui, M. R. (2009) First report of *Alternaria* species associated with black point of wheat in Tunisia. *Annals of Microbiology* 59(3): 465-467.
- 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(6): 964-977.
- Christensen, K. B., Van Klink, J. W., Weavers, R. T., Larsen, T. O., Andersen, B. and Phipps, R. K. (2005) Novel chemotaxonomic markers of the *Alternaria infectoria* species-group. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(24): 9431-9435.
- Crous, P. W., Wingfield, M. J., Richardson, D. M., Le Roux, J. J., Strasberg, D., Edwards, J. and et al. (2016) Fungal planet description sheets: 400-468. *Persoonia* 36: 316-458.
- Dexter, J. E. and Matsuo, R. R. (1982) Effect of smudge and black point, mildewed kernels, and ergot on durum wheat quality. *Cereal Chemistry* 59(1): 63-69.
- Dugan, F. M. and Peever, T. L. (2002) Morphological and cultural differentiation of described species of *Alternaria* from *Poaceae*. *Mycotaxon* 83: 229-264.
- Farr, D. F., Bills, G. F., Chamuris, G. P. and Rossman, A. Y. (1989) *Fungi on plants and plant products in the United States*. APS press, St. Paul, MN, USA.
- Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39(4): 783-791.
- Frisvad, J. C. (1983) A selective and indicative medium for groups of *Penicillium viridicatum* producing different mycotoxins in cereals. *Journal of Applied Bacteriology* 54(3): 409-416.
- Gannibal, P. B. and Lawrence, D. P. (2016) Distribution of *Alternaria* species among sections. 3. Sections *Infectoriae* and *Pseudoalternaria*. *Mycotaxon* 131(4): 781-790.
- Ghosta, Y., Ershad, D., Zare, R. and Goltapeh, E. M. (2003) A taxonomic study on *Alternaria* species in Iran (2). *Rostaniha* 4(3/4): 31-56 (in Persian).
- Ghosta, Y., Ershad, D., Zare, R. and Mohammadi, G. E. (2004) A taxonomic study on *Alternaria* species in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology* 49(3): 101-104 (in Persian).
- Hajipour Jarchelou, Z., Ghosta, Y. and Rezaee, S. (2012) An identification and pathogenicity study of *Alternaria* spp. of tomato and potato in West Azerbaijan Province. *Iranian Journal of Plant Protection Science* 43(1): 155-163 (in Persian).
- Hajipour Jarchelou, Z., Ghosta, Y. and Rezaee, S. (2013) Identification and pathogenicity study of *Alternaria* spp. on potato in West Azerbaijan Province (1). *Iranian Journal of Plant Pathology* 49(3): 101-104.

- Hall, T. A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Hershman, D. E. (2011) Black “sooty” head mold of wheat. *Plant Pathology Fact Sheet, PPFS-AG-SG-07*, 2 pp.
- Hong, S. G., Cramer, R. A., Lawrence, C. B. and Pryor, B. M. (2005) Alt a 1 allergen homologs from *Alternaria* and related taxa: analysis of phylogenetic content and secondary structure. *Fungal Genetics and Biology* 42(2): 119-129.
- Katoh, K. and Standley, D. M. (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* 30(4): 772-780.
- Lawrence, D. P., Gannibal, P. B., Dugan, F. M. and Pryor, B. M. (2014) Characterization of *Alternaria* isolates from the *infectoria* species-group and a new taxon from *Arrhenatherum*, *Pseudoalternaria arrhenatheria* sp. nov. *Mycological Progress* 13(2): 257-276.
- Lawrence, D. P., Gannibal, P. B., Peever, T. L. and Pryor, B. M. (2013) The sections of *Alternaria*: formalizing species-group concepts. *Mycologia* 105(3): 530-546.
- Lawrence, D. P., Park, M. S. and Pryor, B. M. (2012) *Nimbya* and *Embellisia* revisited, with nov. comb. for *Alternaria celosiae* and *A. perpunctulata*. *Mycological Progress* 11(3): 799-815.
- Lawrence, D. P., Rotondo, F. and Gannibal, P. B. (2016) Biodiversity and taxonomy of the pleomorphic genus *Alternaria*. *Mycological Progress* 15(1): 1-22.
- Mak, Y., Willows, R. D., Roberts, T. H., Wrigley, C. W., Sharp, P. J. and Copeland, L. E. S. (2006) Black point is associated with reduced levels of stress, disease-and defense-related proteins in wheat grain. *Molecular Plant Pathology* 7(3): 177-189.
- Nees von Esenbeck, C. G. (1816) *Das System der Pilze und Schwämme*. Stahelsche Buchhandlung, Würzburg.
- Oviedo, M. S., Sturm, M. E., Reynoso, M. M., Chulze, S. N. and Ramirez, M. L. (2013) Toxigenic profile and AFLP variability of *Alternaria alternata* and *Alternaria infectoria* occurring on wheat. *Brazilian Journal of Microbiology* 44(2): 447-455.
- Perelló, A., Cordo, C. and Simón, M. R. (1996) A new disease of wheat caused by *Alternaria triticimaculans* in Argentina. *Agronomie-Sciences des Productions Vegetales et de l'Environnement* 16(2): 107-112.
- Perelló, A., Moreno, M. and Sisterna, M. (2008) *Alternaria infectoria* species-group associated with black point of wheat in Argentina. *Plant Pathology* 57(2): 379-379.
- Poursafar, A., Ghosta, Y., Orina, A. S., Gannibal, P. B., Javan-Nikkhah, M. and Lawrence, D. P. (2017) Taxonomic study on *Alternaria* sections *Infectoriae* and *Pseudoalternaria* associated with black (sooty) head mold of wheat and barley in Iran. *Mycological Progress* 17(3): 343-356.
- Prescott, J. M., Burnett, P. A., Saari, E. E., Ransom, J., Bowman, J., de Milliano, W., Singh, R. P. and Bekele, G. (1985) *Wheat diseases and pests: a guide for field identification*. CIMMYT, Mexico.
- Pryor, B. M. and Bigelow, D. M. (2003) Molecular characterization of *Embellisia* and *Nimbya* species and their relationship to *Alternaria*, *Ulocladium* and *Stemphylium*. *Mycologia* 95(6): 1141-1154.
- Pryor, B. M. and Michailides, T. J. (2002) Morphological, pathogenic, and molecular characterization of *Alternaria* isolates associated with *Alternaria* late blight of pistachio. *Phytopathology* 92(4): 406-416.
- Rahimlou, T. and Ghosta, Y. (2015) The occurrence of *Alternaria* species on cabbage in Iran. *Zemdirbyste-Agriculture* 102(3): 343-350.

- Roberts, R. G., Reymond, S. T. and Andersen, B. (2000) RAPD fragment pattern analysis and morphological segregation of small-spored *Alternaria* species and species groups. *Mycological Research* 104(02): 151-160.
- Runa, F., Park, M. S. and Pryor, B. M. (2009) *Ulocladium* systematics revisited: phylogeny and taxonomic status. *Mycological Progress* 8(1): 35-47.
- Schubert, K., Groenewald, J. Z., Braun, U., Dijksterhuis, J., Starink, M., Hill, C. F., Zalar, P., de Hoog, G. S. and Crous, P. W. (2007) Biodiversity in the *Cladosporium herbarum* complex (*Davidiellaceae*, *Capnodiales*), with standardisation of methods for *Cladosporium* taxonomy and diagnostics. *Studies in Mycology* 58: 105-156.
- Simmons, E. G. (1986) *Alternaria* themes and variations (17-21). *Mycotaxon* 25(1): 203-216.
- Simmons, E. G. (1992) *Alternaria* taxonomy: current status, viewpoint, challenge. In: *Alternaria: biology, plant diseases, and metabolites* (Eds. Chelkowski, J. and Visconti, A.) 1-35. Elsevier, Amsterdam.
- Simmons, E. G. (1993) *Alternaria* themes and variations (63-72). *Mycotaxon* 68: 91-107.
- Simmons, E. G. (1994) *Alternaria* themes and variations (106-111). *Mycotaxon* 50: 409-427.
- Simmons, E. G. (1996) *Alternaria* themes and variations (145-149). *Mycotaxon* 57: 391-409.
- Simmons, E. G. (2007) *Alternaria*. An identification manual. CBS Biodiversity Series 6. CBS Fungal Biodiversity Centre, Utrecht.
- Sisterna, M. and Sarandón, S. (2010) Wheat grain discoloration in Argentina: current status. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 3(Special Issue 1): 54-64.
- Spurlock, T., Faske, T., Kirkpatrick, T., Mills, G. and Kelley, J. (2015) Important wheat diseases in Arkansas and their management. *Arkansas Plant Disease Control Products Guide* 7: 1-14.
- Srivastava, J., Kushwaha, G. and Shukla, D. (2014) Black point disease of wheat and its implications on seed quality. *Crop Research* 47: 21-23.
- Swofford, D. L. (1999) PAUP, Phylogenetic analysis using parsimony, version 4.0b2. Sinauer Associates, Inc, Sunderland.
- Thambugala, K. M., Wanasinghe, D. N., Phillips, A. J. L., Camporesi, E., Bulgakov, T. S., Phukhamsakda, C., Ariyawansa, H. A., Goonasekara, I. D., Phookamsak, R., Dissanayake, A., Tennakoon, D. S., Tibpromma, S., Chen, Y. Y., Liu, Z. Y. and Hyde, K. D. (2017) Mycosphere notes 1-50: grass (Poaceae) inhabiting Dothideomycetes. *Mycosphere* 8(4): 697-796.
- Tymon, L. S., Peever, T. L. and Johnson, D. A. (2016) Identification and enumeration of small-spored *Alternaria* species associated with potato in the US Northwest. *Plant Disease* 100(2): 465-472.
- White, T. J., Bruns, T. D., Lee, S. B. and Taylor, J. W. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR protocols: a guide to methods and applications* (Eds. Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. and White, T. J.) 315-322. Academic Press, London.
- Woudenberg, J. H. C., Groenewald, J. Z., Binder, M. and Crous, P. W. (2013) *Alternaria* redefined. *Studies in Mycology* 75: 171-212.
- Woudenberg, J. H. C., Truter, M., Groenewald, J. Z. and Crous, P. W. (2014) Large-spored *Alternaria* pathogens in section *Porri* disentangled. *Studies in Mycology* 79: 1-47.
- Zhong, S. and Steffenson, B. J. (2001) Genetic and molecular characterization of mating type genes in *Cochliobolus sativus*. *Mycologia* 93(5): 852-863.

