



Research Article

Smuts of poaceous plants in Markazi and Lorestan Provinces of Iran

BAHRAM SHARIFNABI¹, REZA RAGHEBI¹, FARIBA GHADERI²✉

1- Department of Plant Protection, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

2- Department of Plant Protection, Yasouj University, Yasouj, Iran

Received: 31.05.2021

Accepted: 04.07.2021

Sharifnabi B, Raghebi R, Ghaderi F (2021) Smuts of poaceous plants in Markazi and Lorestan Provinces of Iran. *Plant Pathology Science* 10(1):42-63. Doi: 10.2982/PPS.10.1.42.

Abstract

Introduction: Poaceous plants such as corn, wheat, barley, sorghum, oats and millet are an important part of agricultural ecosystems. Smuts are one of the most important fungal diseases of these plants, which often cause economic damage and the destruction of part or all of their yields. **Materials and Methods:** Poaceous smut infected plants in farms and pastures of Markazi and Lorestan provinces were sampled. Morphological characteristics of these fungi and their germination type of teliospores were studied with bright field and fluorescent microscopes and identified using valid keys. The phylogenetic relationship of these fungi with other smuts was also investigated based on ITS-rDNA region sequencing. **Results:** According to the type of host, morphological characteristics and mode of teliospores germination 12 species vs. *U. maydis*, *U. hordei*, *U. turcomanica*, *U. avenae*, *U. nuda*, *U. bromivora*, *U. cynodontis*, *U. tritici*, *Tilletia laevis*, *Tilletia controversa* *Sporisorium reilianum* and *S. cruentum* were diagnosed. The morphological characteristics and phylogenetic relationship of these fungi with other smuts are described. **Conclusion:** The smuts of poaceous plants in Markazi and Lorestan provinces include eight species of the genus *Ustilago*, two species of the genus *Sporisorium* and two species of the genus *Tilletia*.

Keywords: Corn, Wheat, *Ustilago*, *Tilletia*, *Sporisorium*.

✉ f.ghaderi@yu.ac.ir

مقاله پژوهشی

سیاهک‌های گیاهان تیره *Poaceae* در استان‌های مرکزی و لرستان ایران

بهرام شریف‌نبی^۱، رضا راغبی^۱، فریبا قادری^۲ ✉

۱- گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان

۲- گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه یاسوج، یاسوج

پذیرش: ۱۳/۰۴/۱۴۰۰

دریافت: ۱۰/۰۳/۱۴۰۰

شریف‌نبی ب، راغبی ر، قادری ف (۱۳۹۹) سیاهک‌های گیاهان تیره *Poaceae* در استان‌های مرکزی و لرستان ایران. دانش بیماری‌شناسی گیاهی ۱۰(۱): ۶۳-۴۲. Doi: 10.2982/PPS.10.1.42.

چکیده

مقدمه: گیاهان تیره *Poaceae* مانند ذرت، گندم، جو، سورگوم، انواع یولاف و ارزن بخش مهمی از زیست‌بومهای کشاورزی هستند. سیاهک‌ها از مهم‌ترین بیماری‌های قارچی این گیاهان هستند که اغلب باعث خسارت اقتصادی و از بین رفتن بخشی یا تمام محصول آنها میشوند. **مواد و روش‌ها:** نمونه‌برداری از گیاهان تیره *Poaceae* آلوده به سیاهک در مزرعه‌ها و مراتع استان‌های مرکزی و لرستان انجام شد. ویژگی‌های ریخت‌شناسی و نحوه جوانه‌زنی تلیوسپور این قارچ‌ها با میکروسکوپ‌های نوری زمینه‌روشن و فلورسنت مطالعه و با استفاده از کلیدهای معتبر شناسایی شدند. رابطه فیلوژنتیکی این قارچ‌ها با سایر سیاهک‌ها بر اساس توالی‌یابی ناحیه ITS-rDNA نیز مورد بررسی قرار گرفت. **یافته‌ها:** با توجه به نوع میزبان، خصوصیات ریخت‌شناسی و نحوه جوانه‌زنی تلیوسپور ۱۲ گونه *U. bromivora*، *U. nuda*، *U. avenae*، *U. turcomanica*، *U. hordei*، *U. maydis*، *Sporisorium reilianum*، *Tilletia controversa*، *Tilletia laevis*، *U. tritici*، *U. cynodontis* و *Sporisorium cruentum* تشخیص داده شدند. مشخصات ریخت‌شناسی و رابطه فیلوژنتیکی این قارچ‌ها با سایر سیاهک‌ها شرح داده شده است. **نتیجه‌گیری:** سیاهک‌های گیاهان تیره *Poaceae* در استان‌های مرکزی و لرستان شامل هشت گونه از جنس *Ustilago*، دو گونه از جنس *Sporisorium* و دو گونه از جنس *Tilletia* هستند.

واژگان کلیدی: ذرت، گندم، *Sporisorium*، *Tilletia*، *Ustilago*

Introduction

مقدمه

سیاهک‌ها از مهم‌ترین بیماری‌های قارچی گیاهان هستند که اغلب موجب خسارت اقتصادی به ویژه به گیاهان تیره *Poaceae* مانند ذرت، گندم، جو، سورگوم، انواع یولاف و ارزن می‌شوند. عوامل محیطی و شرایط جغرافیایی در پراکنش گونه‌های مختلف سیاهک نقش به‌سزایی دارند. آب و هوای

✉ f.ghaderi@yu.ac.ir

معتدل، رطوبت نسبی زیاد، هوای مرطوب و رطوبت آزاد بالا برای توسعه گونه‌ها مناسب است اگر چه بعضی در محدوده جغرافیایی نسبتاً کوچکی وجود دارند ولی بقیه هر جا که میزبان وجود داشته باشد آن‌ها نیز یافت می‌شوند (Vanky 2005, Sert 2009). تقریباً ۱۶۴۰ گونه سیاهک حقیقی در دو زیر شاخه، چهار رده، هشت راسته، ۲۴ تیره و ۹۰ جنس طبقه‌بندی و گزارش شده است (Vanky 2008). احتمالاً اولین سیاهک از ایران توسط رابینه‌ورست (۱۸۷۱) تحت عنوان *Tilletia sorghi-vulgaris* L. گزارش و معرفی شده است، ولی در حال حاضر ۱۱۸ گونه از سیاهک‌ها در ایران شناسایی شده‌اند که مربوط به ۱۶ جنس می‌باشند و میزبان‌های اصلی آن‌ها دو تیره *Poaceae* و *Cyperaceae* می‌باشند (Ershad 2009).

شناسایی ریختی هر سیاهک، براساس ویژگی‌هایی شامل نوع میزبان، نشانه‌های بیماری روی میزبان و خصوصیات ریختی هاگینه‌ها (Sours) شامل شکل، رنگ، اندازه، ساختار دیواره تلیوسپور، پیوستگی هاگها، تزیینات سطح خارجی دیواره، غلاف اطراف هاگها، هاگ‌های نارس، سلول‌های نازا و تندش هاگها انجام می‌شود (Ershad 2009).

هدف اصلی اجرای این تحقیق جمع‌آوری و شناسایی ریختی و مولکولی (بر اساس توالی‌یابی ناحیه ITS-rDNA) گونه‌های سیاهک روی گیاهان تیره *Poaceae* در دو استان مرکزی و لرستان بود.

Matherial and Methods

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری سیاهک‌ها

نمونه‌برداری از مزارع و مراتع مختلف در استان‌های مرکزی (خنداب- ده سد، فرمهین- ایبک آباد، خنداب، خنداب - بابائیس، شازند، آشتیان، ساروق، خنداب- مانیزان) و لرستان (ازنا- الیگودرز، الشتر، بدرآباد- خرم آباد، شورآب- خرم آباد، سراب چنگایی، ویسیان- پلدختر، کمالوند- خرم‌آباد، کوه‌دشت، دورود، بروجرد) انجام شد. نمونه‌های گیاهان آلوده به سیاهک همراه با نمونه گیاه سالم جمع‌آوری شده و به آزمایشگاه منتقل گردیدند.

مطالعه خصوصیات ریختی سیاهک‌ها

ریخت‌شناسی تلیوسپورها، در محلول شی‌ار (Shear) (۳۰۰ میلی‌لیتر محلول دو درصد استات پتاسیم، ۱۲۰ میلی‌لیتر گلیسرین، ۱۸۰ میلی‌لیتر الکل اتیلیک ۹۵ درصد) پس از تهیه اسلایدهای میکروسکوپی، برای اندازه‌گیری خصوصیات مختلف مورفومتریک تلیوسپورهای گونه‌ها، ۵۰ تلیوسپور طبیعی و بالغ به‌طور تصادفی از هر گونه در این محلول توسط میکروسکوپ نوری معمولی با بزرگنمایی ۱۰۰ بررسی شد. سورها نیز در زیر استریومیکروسکوپ مشاهده شدند و اجزای آن‌ها مورد

بررسی قرار گرفت و از تلیوسپورها عکس‌برداری انجام شد. همچنین خصوصیات ریخت‌شناسی هر یک از نمونه‌ها توسط میکروسکوپ فلورسنت با بزرگنمایی ۱۰۰ بررسی و عکس‌برداری شد. بدین منظور، به نمونه مورد نظر روی اسلاید، یک قطره هیدروکسید پتاسیم ۱۵٪ (۱۵ گرم هیدروکسید پتاسیم KOH، ۲۰ میلی‌لیتر گلیسرول و ۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر) و یک قطره محلول کلکوفلور و ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) اضافه و کاملاً مخلوط گردید. نمونه‌های آماده شده در مدت زمان ۲۰ دقیقه تا شش ساعت بسته به نوع جنس و گونه در شرایط تاریکی در داخل فویل آلومینیومی قرار گرفته شدند. سپس تحت شرایط نور UV بررسی و عکس‌برداری شدند (Knaus et al. 2013). جهت بررسی جوانه‌زنی تلیوسپورها از محیط کشت آب اگر استفاده شد که بعد از خنک شدن محیط کشت، ۵۰ پی‌ام از آنتی بیوتیک کلرامفنیکل به آن اضافه شد. هاگ‌های قارچ در آب مقطر سترون رقیق گردید و سپس ۱-۵ میلی‌لیتر از آن روی محیط کشت آب اگر ریخته شد و پخش گردید و در مدت زمانی ۱۰ روزه در دمای ۲۰°C در شرایط تناوب نوری ۱۲ ساعت (۱۲ ساعت تاریکی، ۱۲ ساعت روشنایی) قرار گرفتند، الگوی جوانه‌زنی آنها بررسی شد. برای شناسایی جنس و گونه‌ها، از کلیدهای گونه و جنس سیاهک‌ها استفاده گردید (Vanky 2005, Vánky and Abbasi 2013).

بررسی رابطه فیلوژنتیکی سیاهک‌ها

برای تأیید شناسایی ریخت‌شناسی گونه‌های جنس *Tilletia*، *Sporisorium* و *Ustilago* ابتدا استخراج DNA به روش موری و تامپسون انجام گرفت (Murray and Thompson 1980). سپس از جفت آغازگر عمومی ITS4 /ITS5 برای شناسایی گونه‌های مختلف سیاهک‌ها استفاده گردید (White et al. 1990). مخلوط واکنش PCR با حجم ۲۰ میکرولیتر، ۸ میکرولیتر آب دیونیزه استریل، ۳ میکرولیتر 10X PCR Buffer، ۵ میلی‌مولار MgCl₂، ۲۰۰ میلی‌مولار از هر نوکلئوتید، ۲۰ پیکومول از هر آغازگر، یک واحد *Taq* DNA پلیمرز و سه میکرولیتر DNA با غلظت ۱۰ نانوگرم تهیه شد. برنامه حرارتی در PCR شامل یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۶ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه، ۳۵ چرخه شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال آغازگرها به ناحیه هدف در دمای ۵۶°C به مدت ۴۵ ثانیه و گسترش رشته در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و یک چرخه گسترش نهایی رشته در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت هشت دقیقه انجام گرفت. بعد از تکثیر ناحیه مورد نظر، محصول PCR در روی ژل آگاروز یک درصد ارزیابی شد. جهت تعیین توالی، محصول حاصل از تکثیر نواحی ژن ITS-rDNA به شرکت MacroGen Inc. کره جنوبی فرستاده شد. برای اطمینان از صحت توالی‌های به دست آمده از هر نمونه، هر یک از توالی‌ها با استفاده از ابزار جستجوی Blast (Altschul et al. 1997) با توالی‌های موجود در بانک ژن NCBI مقایسه شد. برای مقایسه فیلوژنتیکی جدایه‌های

توالی‌یابی شده، تعدادی توالی از گونه‌های مختلف جنس *Ustilago*، *Sporisorium* و *Tilletia* از بانک ژن انتخاب گردید و *Puccinia graminis* نیز به عنوان آرایه خارج از گروه (جدول ۱) انتخاب گردید. توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار MAFFT v.7.043b هم‌ردیف‌سازی گردید (Kato and Standley 2013). آنالیزهای فیلوژنتیکی با استفاده از روش فاصله (Distance method) انجام گردید. ماتریکس فاصله توالی‌های مرتب شده با روش پارامتر دو کیمورا (Kimura's two parameter) محاسبه جدول ۱. مشخصات جدایه‌های گونه‌های *Ustilago*، *Sporisorium* و *Tilletia* مورد استفاده در تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیکی در این مطالعه.

Table1. Characteristics of *Ustilago*, *Sporisorium* and *Tilletia* species isolates used in phylogenetic analyses in this study.

Species	NCBI Accession No.	Species	NCBI Accession No.
<i>Sporisorium cruentum</i>	MH114989*	<i>S. atharticum</i>	AY344971
<i>S. cruentum</i>	MH114990	<i>S. cenchri</i>	AY344972
<i>Tilletia controversa</i>	MH114991	<i>S. chrysopogonis</i>	AY344973
<i>T. controversa</i>	MH114992	<i>S. cruentum</i>	AY344974
<i>T. laevis</i>	MH114993	<i>S. destruens</i>	AF045871
<i>T. laevis</i>	MH114994	<i>S. sorghi</i>	AF038828
<i>Ustilago bromivora</i>	MH114995	<i>S. reilianum</i>	AF135432
<i>U. bromivora</i>	MH114996	<i>U. avenae</i>	AY344997
<i>U. cynodontis</i>	MH114997	<i>U. avenae</i>	AY344996
<i>U. cynodontis</i>	MH114998	<i>U. bullata</i>	AF135423
<i>U. turcomanica</i>	MH114999	<i>U. hordei</i>	AY345003
<i>U. maydis</i>	MH115000	<i>U. maydis</i>	AY345004
<i>U. maydis</i>	MH115001	<i>U. maydis</i>	AF135431
<i>U. tritici</i>	MH115002	<i>U. nuda</i>	AF135430
<i>U. tritici</i>	MH115003	<i>U. tritici</i>	AF135424
<i>U. nuda</i>	MH115004	<i>U. cynodontis</i>	AF038825
<i>U. nuda</i>	MH115005	<i>U. turcomanica</i>	AY345010
<i>U. hordei</i>	MH115006	<i>U. bromivora</i>	AY740064
<i>U. hordei</i>	MH115007	<i>T. vankyi</i>	EU257587
<i>U. avenae</i>	MH115008	<i>T. vankyi</i>	EU257585
<i>U. avenae</i>	MH115009*	<i>T. brevifaciens</i>	EU257565
<i>T. goloskokovii</i>	EU257569	<i>T. brevifaciens</i>	EU257566
<i>T. goloskokovii</i>	EU257568	<i>T. bromi</i>	EU257555
<i>T. trabutii</i>	EU257581	<i>T. bromi</i>	EU257557
<i>T. trabutii</i>	EU257582	<i>T. caries</i>	EU257559
<i>T. laevis</i>	EU257573	<i>T. caries</i>	EU257560
<i>T. laevis</i>	EU257571	<i>T. contraversa</i>	EU257561
<i>T. lolii</i>	EU257575	<i>T. contraversa</i>	EU257562
<i>T. lolii</i>	EU257576		

*MH114989 and MH115009 Cited from this study

(Kimura 1980) و درخت فیلوژنتیکی با استفاده از روش Bayesian inference با نرم‌افزار BEAUti and BEAST v 1.6.1 رسم گردید (Tamura et al. 2007) برای اطمینان از ثبات شاخه‌های موجود در درخت فیلوژنتیکی مقیاس اعتبار سنجی با ۱۰۰۰ تکرار با استفاده از این برنامه

محاسبه شد. توالی‌های مربوط به جدایه‌های مختلف گونه‌های *Ustilago*, *Sporisorium* و *Tilletia* در بانک ژن ثبت شد (جدول ۱).

Results

یافته‌ها

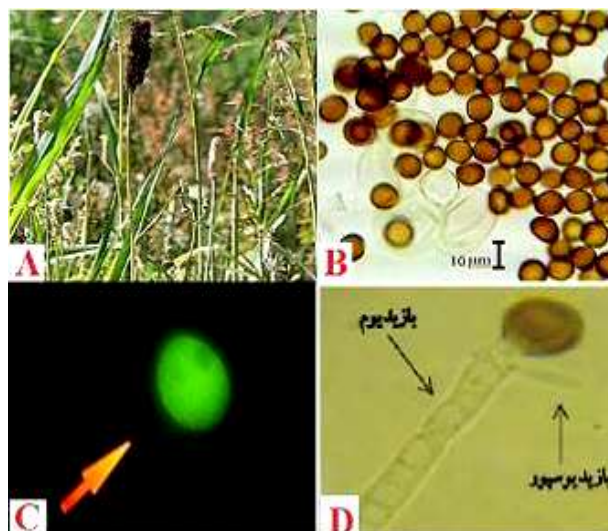
دوازده گونه سیاهک از سه جنس *Ustilago*, *Sporisorium* و *Tilletia* به شرح زیر شناسایی شدند:

1- *Sporisorium cruentum* (J.G. Kühn) Vánky

گیاهان آلوده معمولاً کوتاه‌تر به نظر می‌آیند. هاگینه‌ها غشائی ظریف در اطراف خود دارند. این غشاء استحکامی نداشته و زود پاره گشته و توده سیاه هاگ‌ها را رها می‌کند (شکل ۱، B). در این گونه، تلیوسپورها به اشکال کروی، بیضوی و تخم‌مرغی به رنگ قهوه‌ای مایل به زیتونی دیده شدند. سطح تلیوسپورها دارای زگیل‌هایی ظریف یا خاردار و دیواره تلیوسپورها خیلی ظریف و دیواره‌دار بودند. اندازه تلیوسپورها $(7/4 \pm 0/83)$ \times $(6/8-8/8)$ $(7/4 \pm 0/24)$ میکرومتر اندازه‌گیری شد. سلول‌های نازا درشت‌تر از تلیوسپورها (۲۰-۱۰ میکرومتر)، بی‌رنگ و دارای دیواره صاف که به صورت گروه‌های کوچک غیر منظم یا زنجیروار بودند مشاهده شد. از تندش هر هاگ بازیدیوم چهار سلولی به وجود می‌آید که روی محیط آب آگار ایجاد ریشه می‌کند (شکل ۱، B-D). در این تحقیق این گونه، از روی گیاه *Sorghum halepense* از خنداب و الشتر جداسازی و شناسایی گردید.

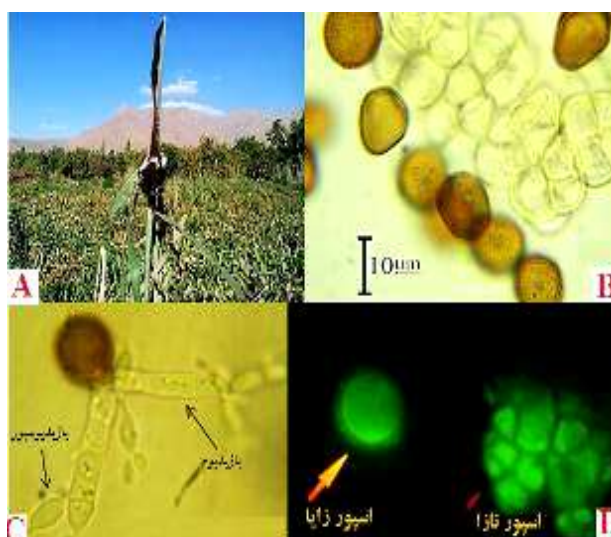
2- *Sporisorium reilianum* (J.G. Kühn) Langdon & Full.

هاگینه‌ها ابتدا به وسیله غشائی سفید تا قهوه‌ای روشن احاطه شده که از اجزای قارچ به وجود آمده است. این غشاء زود پاره می‌گردد (شکل ۲، A). تلیوسپورها کروی، نسبتاً کروی تا تخم‌مرغی شکل یا کمی غیر منظم و دیواره آنها زرد روشن تا قهوه‌ای مایل به قرمز که حدود یک میکرومتر ضخامت دارد و به صورت پر پشت خاردار هستند. اندازه آنها $(10/6 \pm 0/91)$ \times $(9/6-13/6)$ $(12/6 \pm 0/77)$ \times $(14/4-11/2)$ میکرومتر اندازه‌گیری شد. سلول‌های نازا کوچک‌تر از تلیوسپورها (۱۱-۸ میکرومتر) به صورت منفرد که به شکل گرد و یا گروهی به صورت تخت به نظر می‌رسیدند دیده شدند. سلول‌های نازا بیرنگ تا زرد روشن که درون هریک چند قطره چربی دیده شدند. از تندش هاگ بازیدیوم چهار یاخته‌ای به وجود می‌آید که بازیدیوسپورهای آن در جوانب و انتها تولید می‌شوند (شکل ۲، B-D).



شکل ۱. *Sporisorium cruentum* A) سور روی گیاه *Sorghum halepense* B) هاگ‌های زایا و نازا C) تصویر میکروسکوپی فلورسنت هاگ (D) جوانه زنی تلیوسپور و تشکیل بازیدیوم و بازیدیوسپورها. Figure 1. *Sporisorium cruentum* A) Sorus on *Sorghum halepense* B) Teliospores and sterile cells C) Teliosore in fluroscent microscopy D) Teliospore germination and formation of basidium and basiospores.

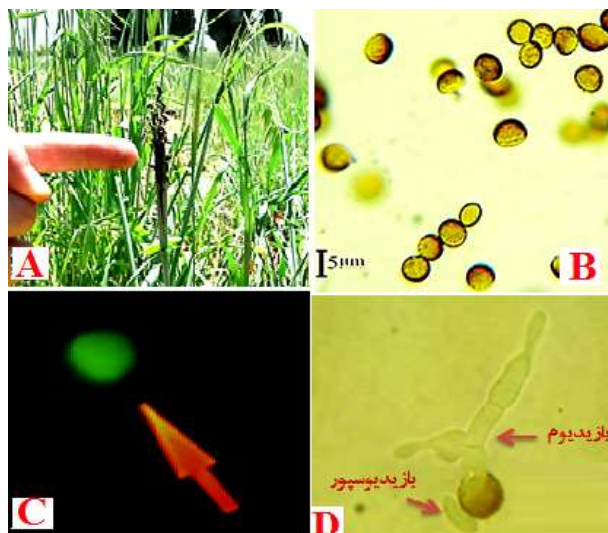
این گونه در این تحقیق از روی گیاه *Sorghum halepense* از خنداب (استان مرکزی)، جداسازی و شناسایی گردید.



شکل ۲. *Sporisorium reilianum* A) سور روی گیاه *Sorghum halepense* B) هاگ‌های زایا و نازا C) جوانه زنی تلیوسپور و تشکیل بازیدیوم و بازیدیوسپورها، D) تصویر میکروسکوپی فلورسنت هاگهای زایا و نازا. Figure 2. *Sporisorium reilianum* A) Sorus on *Sorghum halepense* B) Teliospores and sterile cells C) Teliospore germination and formation of basidium and basiospores D) Teliosore and sterile cell in fluroscent microscopy.

3- *Ustilago avenae* (Pers.) Roster.

این قارچ در مرحله گیاهچه به میزبان خود حمله می‌کند. هاگینه‌های قارچ در تمام سنبلچه‌ها به صورت جدا از هم تشکیل می‌شوند و تخمدان و سایر بخش‌های گل را تخریب می‌کنند و گاهی محور سنبلچه را نیز آلوده کرده و در نتیجه خوشه آلوده ظاهری شبیه سیاهک آشکار (جو) پیدا می‌کند. (شکل ۳، A). تلیوسپورها به رنگ قهوه‌ای مایل به زرد تا قهوه‌ای مایل به زیتونی و به اشکال کروی، تخم مرغی شکل دیده شدند. ابعاد آن‌ها $(4/7 \pm 0/44) \times (5/6 \pm 0/14) - 7/2 - 5$ میکرومتر اندازه‌گیری شد. دیواره تلیوسپورها نازک که در یک طرف کمی روشن‌تر و پوشیده از خارهای ظریف بود. از تندش هر هاگ بازیدیوم چهار یاخته‌ای به وجود می‌آید که هر یاخته تولید یک بازیدیوسپور می‌کند (شکل ۳، B-D). این گونه در این پژوهش از روی گیاه *Avena fatua* L. خرم‌آباد، کمالوند و ویسیان جداسازی و شناسایی گردید.



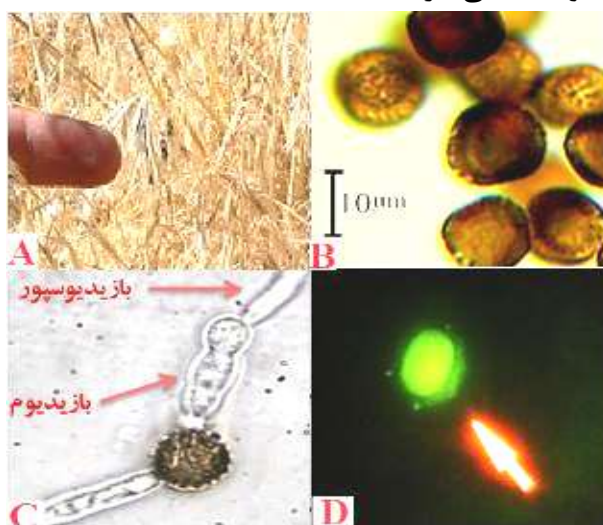
شکل ۳. *Ustilago avenae*: A) سور روی گیاه *Avena fatua* B) تلیوسپورها C) تصویر میکروسکوپی فلورسنت تلیوسپور D) جوانه زنی تلیوسپور و تشکیل بازیدیوم و بازیدیوسپورها.

Figure 3. *Ustilago avenae* A) Sorus on *Avena fatua* B) Teliospores C) Teliospore in fluorescent microscopy D) Teliospore germination and formation of basidium and basiospores.

4-*Ustilago bromivora* (Tul. & C. Tul.) A.A. Fisch. Wahdh.

این سیاهک در مرحله گیاهچه به میزبان خود حمله می‌کند. هاگینه‌های قارچ متورم و به طور جدا از هم درون سنبلچه‌ها تشکیل می‌شوند، به طوری که قسمت پایین گلوم‌ها و حتی تخمدان‌ها را تخریب می‌کنند. شکل آن‌ها تقریباً کروی و مجموعه هاگ‌های هر هاگینه در ابتدا به هم چسبیده بوده و توسط اپیدرم میزبان پوشیده‌اند ولی بعدها به صورت گرد سیاه یا قهوه‌ای مایل به سیاه در می‌آیند

(شکل ۴، A). تلیوسپورها کروی یا تقریباً کروی و گاهی تخم مرغی تا چند وجهی نامنظم و به رنگ قهوه‌ای مایل به زیتونی تا مایل به قرمز که در قسمت وسط (استوائی) دارای باند تیره‌تری بودند دیده شدند. ابعاد آنها $(7/2 \pm 0/77) \times (5/6-8/8)$ $(7/5 \pm 0/83) \times (4/8-9/6)$ اندازه‌گیری شد. همچنین سطح دیواره تلیوسپورها پوشیده از خارهای ظریف تا غده‌های نامنظم یا صاف دیده شدند. از تندش هاگ‌ها معمولاً دو بازیدیوم دو یاخته‌ای حاصل می‌شود که در انتها و جوانب آنها بازیدیوسپورهای تخم مرغی شکل به وجود می‌آید (شکل ۴، B-D). در این تحقیق از روی میزبان *Bromus tectorum* از الیگودرز، خنداب و شازند جداسازی و شناسایی گردید.



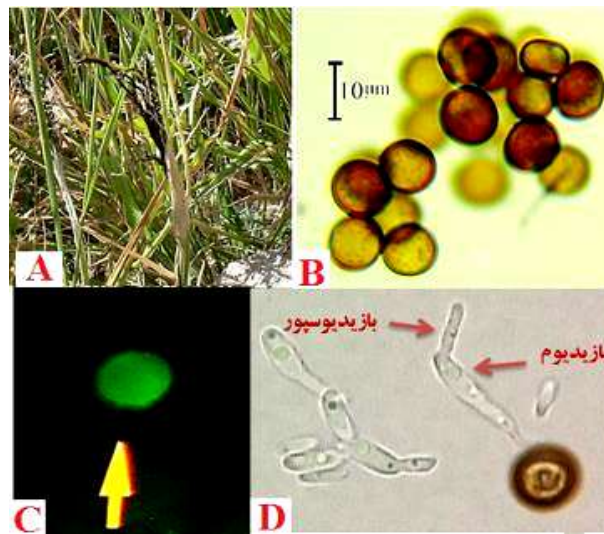
شکل ۴. *Ustilago bromovoria* (A) سور روی گیاه *Bromus tectorum* (B) تلیوسپورها (C) جوانه

زنی تلیوسپور و تشکیل بازیدیوم و بازیدیوسپورها (D) تصویر میکروسکوپی فلورسنت تلیوسپور.

Figure 4. *Ustilago bromovoria* A) Sorus on *Bromus tectorum* B) Teliospores C) Teliospore germination and formation of basidium and basiospores D) Teliosore in fluroscent microscopy.

5-*Ustilago cynodontis* (Henn.) Henn.

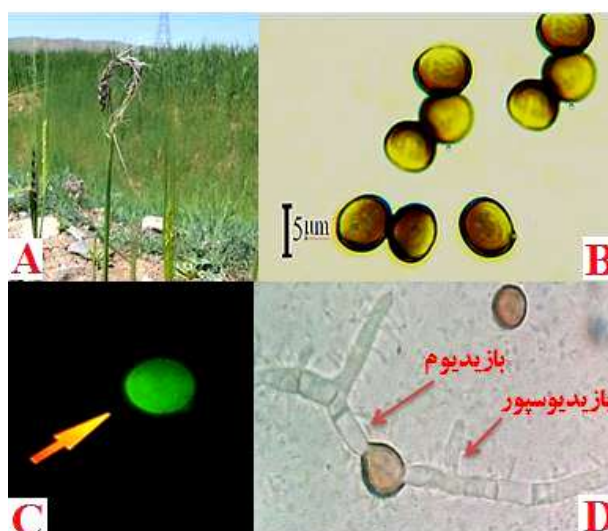
سورهای قارچ سنبلچه‌های شاخه‌های گل‌آذین را آلوده کرده و با توده‌های سیاه‌رنگی از هاگها آن را می‌پوشاند (شکل ۵، A). تلیوسپورها در این گونه به اشکال کروی تا تقریباً کروی و به رنگ قهوه‌ای دیده شدند. اندازه آنها $(7/1 \pm 0/44) \times (6/2-8)$ $(7/4 \pm 0/36) \times (6/4-8)$ میکرومتر اندازه‌گیری شد. دیواره تلیوسپورها نازک، صاف و به ضخامت تقریبی یک میکرومتر مشاهده شد. در این شرایط ضخامت دیواره تلیوسپورها نازک و دارای سطح صاف دیده شدند. از تندش هاگها، بازیدیوم‌های چهار سلولی به وجود می‌آید که بازیدیوسپورهای تخم‌مرغی تا بیضوی کشیده به طور جانبی و انتهایی روی آنها به وجود می‌آیند (شکل ۵، B-D). در این تحقیق از روی میزبان *Cynodon dactylon* (مرغ) از منطقه خرم‌آباد جداسازی و شناسایی گردید.



شکل ۵. *Ustilago cynodontis*: A) سور روی گیاه *Cynodon dactylon*. B) تلیوسپورها C) تصویر میکروسکوپی فلورسنت تلیوسپور D) جوانه زنی تلیوسپور و تشکیل بازیدیوم و بازیدیوسپورها.
Figure 5. *Ustilago cynodontis*. A) Sorus on *Cynodon dactylon* B) Teliospores C) Teliospore in fluorescent microscopy D) Teliospore germination and formation of basidium and basidiospores.

6- *Ustilago hordei* (Pers.: Pers.) Lagerh.

قارچ در مرحله گیاهچه میزبان خود را بیمار می‌کند، خوشه‌ها و ساقه‌های آلوده معمولاً کوتاه‌ترند و خوشه‌های آلوده کم و بیش درون غلاف باقی می‌مانند. سورها درون سنبلیچه‌ها تشکیل شده و رنگ قهوه‌ای مایل به سیاه یا مایل به بنفش دارند و قسمتی از آن درون گلوم قرار دارد (شکل ۶، A). تلیوسپورها به اشکال کروی، تقریباً کروی یا تخم مرغی و به رنگ قهوه‌ای دیده شدند. اندازه آن‌ها $(5/5 \pm 0/80) \times (4/8-6/8) \times (5/4 \pm 1/24) - 6/4$ میکرومتر اندازه گیری شد. دیواره تلیوسپورها صاف و قهوه‌ای، که در یک طرف روشن‌تر به نظر می‌رسید. از تندش هر هاگ، بازیدیوم چهار سلولی به وجود می‌آید که در محیط کشت‌های آگاردار تولید بازیدیوسپور به صورت جانبی و انتهایی می‌کند (شکل ۶، B-D). در این تحقیق از روی گونه *Hordeum vulgare* از شازند، آشتیان، خنداب، ساروق، بروجرد، اشترانکوه، خنداب (بابارئیس)، ویسیان، نورآباد، الشتر، خرم‌آباد جمع‌آوری شد.



شکل ۶. *Ustilago hordei*: A) سوره روی گیاه B) *Hordeum vulgare* تلیوسپورها C) تصویر میکروسکوپی فلورسنت تلیوسپور D) جوانه زنی تلیوسپور و تشکیل بازیدیوم و بازیدیوسپورها.
Figure 6. *Ustilago hordei*. A) Sorus on *Hordeum vulgare* B) Teliospores C) Teliosore in fluorescent microscopy D) Teliospore germination and formation of basidium and basiospores.

7- *Ustilago maydis* (DC.) Corda

سوره‌های خود را به صورت جوش‌ها تا گال‌های بزرگ و نامنظم روی اندام‌های میزبان ایجاد می‌کنند (شکل ۷، A). در این گونه تلیوسپورها به اشکال کروی، تقریباً کروی، تخم مرغی کشیده تا کمی نامنظم و به رنگ قهوه‌ای دیده شدند. اندازه آن‌ها $(۸/۲ \pm ۰/۷) \times (۷/۲ - ۱۰/۴)$ تا $(۸/۳ \pm ۰/۷۳) \times ۱۱/۲ - ۷/۲$ میکرومتر اندازه‌گیری شد. دیواره تلیوسپورها به رنگ قهوه‌ای و خارهای ظریفی روی سطح آن مشاهده شد (شکل ۷، B-D). در این شرایط دیواره تلیوسپورها ضخیم و دارای خارهای ظریف دیده شدند. از تندش هاگها، بازیدیوم چهار سلولی تشکیل می‌شود که به‌طور جانبی و انتهایی بازیدیوسپور تولید می‌کند (شکل ۷، B-C). در این تحقیق از روی گونه *Zea mays*، از الیگودرز- ازنا جداسازی و جمع‌آوری شد.



شکل ۷. گونه *Ustilago maydis*: A) سور روی گیاه B) تلیوسپورها C) تصویر میکروسکوپی فلورسنت تلیوسپور D) جوانه‌زنی تلیوسپور و تشکیل بازیدیوم و بازیدیوسپورها.

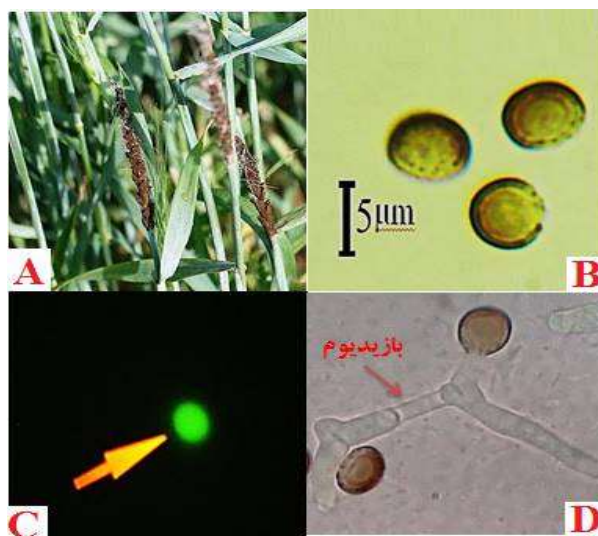
Figure 7. *Ustilago maydis*. A) Sorus on *Zea mays* B) Teliospores C) Teliosore in fluorescent microscopy D) Teliospore germination and formation of basidium and basiospores.

8- *Ustilago nuda* (C.N. Jensen) Kellerm. & Swingle

قارچ تمام سنبلچه‌ها را اشغال و به جای اجزای آن هاگینه قارچ تشکیل می‌شود (شکل ۸، A). تلیوسپورها به اشکال کروی، تقریباً کروی یا تخم‌مرغی که دیواره آن‌ها به رنگ قهوه‌ای مایل به زیتونی، دارای خارهای بسیار ریزی و در یک طرف کمی روشن‌تر مشاهده شدند. اندازه آن‌ها $(5/8 \pm 0/42) \times (4/8-6/4)$ $(5/8 \pm 0/48)$ میکرومتر بود. از تندش هاگها بازیدیوم چهار یاخته‌ای به وجود می‌آید (شکل ۸، B-D). در این تحقیق، از روی جو در خرم‌آباد و شورآب جداسازی و شناسایی شد.

9-*Ustilago tritici* (Pers.: Pers.) Rostr.

سورهای قارچ درون سنبلچه‌های میربان تشکیل یافته و با خروج و پیدایش خوشه‌های بوته‌های آلوده، دیده می‌شود که تمامی قسمت‌های آن به استثناء محور خوشه از بین رفته و تبدیل به گرد سیاه رنگی شده است (شکل ۹، A-B). در این گونه، تلیوسپورها به اشکال کروی تا تخم‌مرغی و به رنگ قهوه‌ای مایل به زیتونی که در یک طرف کمی روشن‌تر و روی دیواره آن‌ها خارهای ظریفی مشاهده شد. اندازه آن‌ها $(5/6 \pm 0/88) \times (4-8/8)$ $(5/7 \pm 0/73)$ میکرومتر اندازه‌گیری شد. از تندش هاگها، بازیدیوم چهار سلولی به وجود می‌آید ولی بازیدیوسپوری تولید نمی‌شود (شکل ۹، C-D). در این تحقیق از روی گونه‌های *Triticum aestivum* و *Aegilops triuncialis* از خرم‌آباد، زاغه، بروجرد و اراک جداسازی و شناسایی گردید.



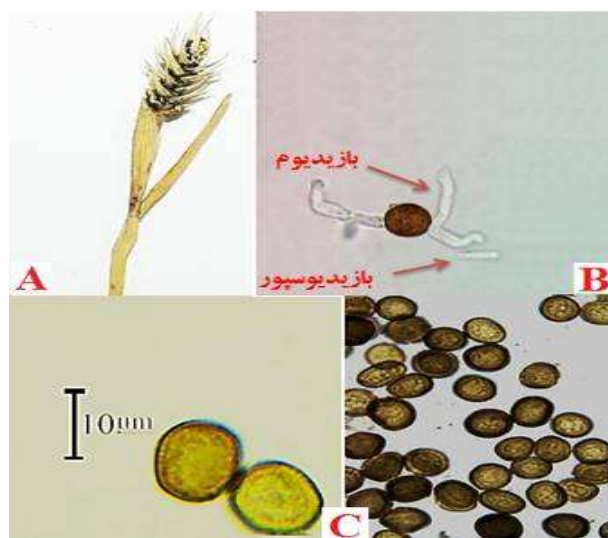
شکل ۸. *Ustilago nuda*: A) سور روی گیاه *Hordeum vulgare* B) تلیوسپورها C) تصویر میکروسکوپی فلورسنت تلیوسپور D) جوانه‌زنی تلیوسپور و تشکیل بازیدیم.
Figure 8. *Ustilago nuda*. A) Sorus on *Hordeum vulgare* B) Teliospores C) Teliosore in fluorescent microscopy D) Teliospore germination and formation of basidium.



شکل ۹. *Ustilago tritici*: A) سور روی گیاه *Aegilops triuncialis* B) سور روی گیاه *Triticum aestivum* C) تلیوسپورها D) جوانه‌زنی تلیوسپور و تشکیل بازیدیم.
Figure 9. *Ustilago tritici*. A) Sorus on *Aegilops triuncialis* B) Sorus on *Triticum aestivum* C) Teliospores D) Teliospore germination and formation of basidium.

10-*Ustilago turcomanica* Tranzschel ex Vánky

هاگینه‌های قارچ در پایه پوشش‌های گل به صورت آماس کرده تشکیل می‌شوند. هاگینه‌ها در ابتدا با غشائی نازک پوشیده می‌باشند. این غشاء بعداً پاره گشته و بدین طریق توده قهوه‌ای تیره و تقریباً گرد مانند هاگ‌ها آشکار می‌شود (شکل ۱۰، A). در این گونه، تلیوسپورها کروی، نیمه کروی، بیضوی تا



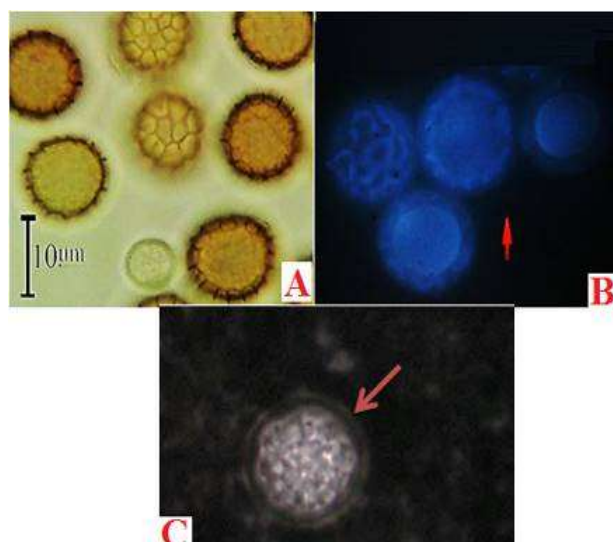
شکل ۱۰. *Ustilago turcomanica* (A) سور روی گیاه *Eremopyrum bonaepartis* (B) جوانه‌زنی تلیوسپور و تشکیل بازیدیوم (C) تلیوسپورها

Figure 10. *Ustilago turcomanica* A) Sorus on *Eremopyrum bonaepartis* B) Teliospore germination and formation of basidium C) Teliospores

گاهی نامنظم و به رنگ قهوه‌ای مایل به زیتونی که در دو قطب روشن‌ترند دیده شدند. اندازه آن‌ها $(۵/۶ \pm ۰/۸۲) \times (۸-۱۱/۲) \times (۹/۵ \pm ۱/۰۲)$ میکرومتر اندازه‌گیری شد. سطح تلیوسپورها تقریباً صاف و معمولاً به طور پرپشت پوشیده از خارهای ظریفی دیده شدند. از تندش هاگها، بازیدیوم‌های دو یا سه بندی تشکیل می‌شود که در قسمت انتهایی خود دو یا چهار شاخه به وجود می‌آورند (شکل ۱۰، B-C). این نکته قابل ذکر است که این قارچ با *U. bullata* شباهت دارد ولی هاگ‌های آن به علت داشتن ابعادی بزرگتر و فاقد قسمت وسط تیره رنگ از *U. bullata* متمایز می‌گردد (Ershad 2009). در این تحقیق از روی گونه *Eremopyrum bonaepartis* از فرم‌هین- ایبک آباد شناسایی و جداسازی گردید.

11- *Tilletia controversa* J.G. Kühn

بوته‌های آلوده کوتاه مانده و روی برگ‌های بوته‌های آلوده لکه‌ها یا خطوط رنگ پریده‌ای دیده می‌شود. قارچ تمام فضای درون تخمدان را پر می‌کند و فقط پریکارپ سالم باقی می‌ماند. تلیوسپورها به اشکال کروی تا تقریباً کروی و به رنگ قهوه‌ای مایل به زرد و دیواره آن‌ها به صورت مشبک که در هر قطر آن چهار تا هفت حفره به طور معمول مشاهده شد. دهانه حفره‌ها اغلب به صورت چند وجهی مشاهده شد. در اطراف هر تلیوسپور غلاف ژلاتینی بی‌رنگی مشاهده شد که $۱/۶-۰/۶$ میکرومتر ضخامت داشت. ابعاد تلیوسپورها $(۱۷/۲ \pm ۰/۸۷) \times (۱۶-۱۸/۴) \times (۱۷/۵ \pm ۰/۲۹)$ میکرومتر



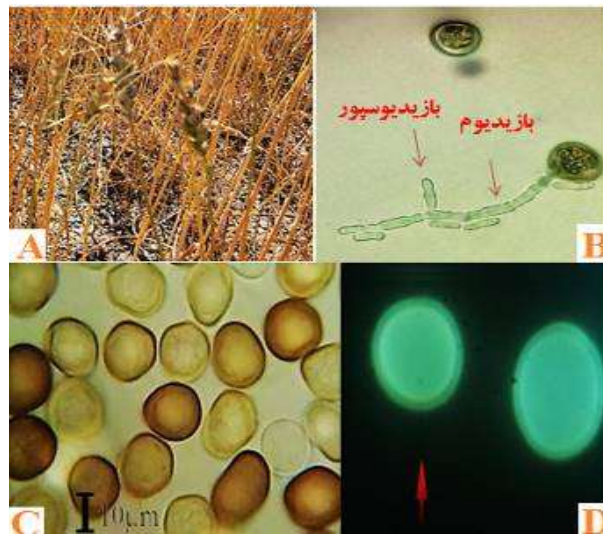
شکل ۱۱: *Tilletia controversa*: A) هاگ‌های زایا و نازا (B) تصویر میکروسکوپی فلورسنت هاگ‌های زایا و نازا (C) غلاف ژلاتینی با استفاده از سوسپانسیون مرکب چین ۳۰٪.

Figure 11. *Tilletia controversa* A) Teliospores and sterile cells B) Teliosores and sterile cells in fluroscent microscopy C) Teliospore gelatinous sheath using 30% indian ink suspension.

اندازه‌گیری شد. سلول‌های نازا به تعداد کم و مخلوط با هاگ‌های زایا و به اشکال کروی یا تقریباً کروی که دارای دیواره صاف و غلاف ژلاتینی و به ابعاد $(15/6 \pm 1/51) \times 11/2 - 16$ (۱۴/۶ ± ۱/۶۹) × ۱۸/۴ - ۱۲/۸ میکرومتر اندازه‌گیری شد (شکل ۱۱، A-C). این قارچ در این پژوهش از روی *Triticum aestivum* (گندم) از خرم‌آباد-کمالوند شناسایی و جداسازی گردید.

12- *Tilletia laevis* J.G. Kühn

سورها توسط پریکارپ احاطه شده‌اند و توسط گلوم‌ها پوشیده شده‌اند. (شکل ۱۲، A). تلیوسپورها به اشکال کروی، تقریباً کروی، تخم مرغی یا چند وجهی و به رنگ قهوه‌ای روشن تا زیتونی روشن مشاهده گردیدند. دیواره تلیوسپورها صاف و هریک اغلب دارای یک پاپیل کوتاه بودند. ابعاد آن‌ها $(12/07 \pm 1/10) \times 8/8 - 13/6$ (۱۲/۶۹ ± ۱/۸) × ۸/۸ - ۱۴/۴ میکرومتر اندازه‌گیری شد. همچنین محتوی تلیوسپورها دانه دانه‌ای یا به صورت قطرات ریز دیده شد. سلول‌های نازا همراه با تلیوسپورها به تعداد کم یا گاهی زیاد که معمولاً بیرنگ، کروی تا نامنظم و دارای دیواره صاف و نازک بودند مشاهده گردید. ابعاد سلول‌های نازا $(11 \pm 1/60) \times 7 - 14/5$ (۱۰/۵ ± ۱/۴۵) × ۸ - ۱۴/۵ اندازه‌گیری شدند (شکل ۱۲، B-D). در این تحقیق از روی گندم از خنداب-بابارئیس جداسازی و تشخیص داده شد.



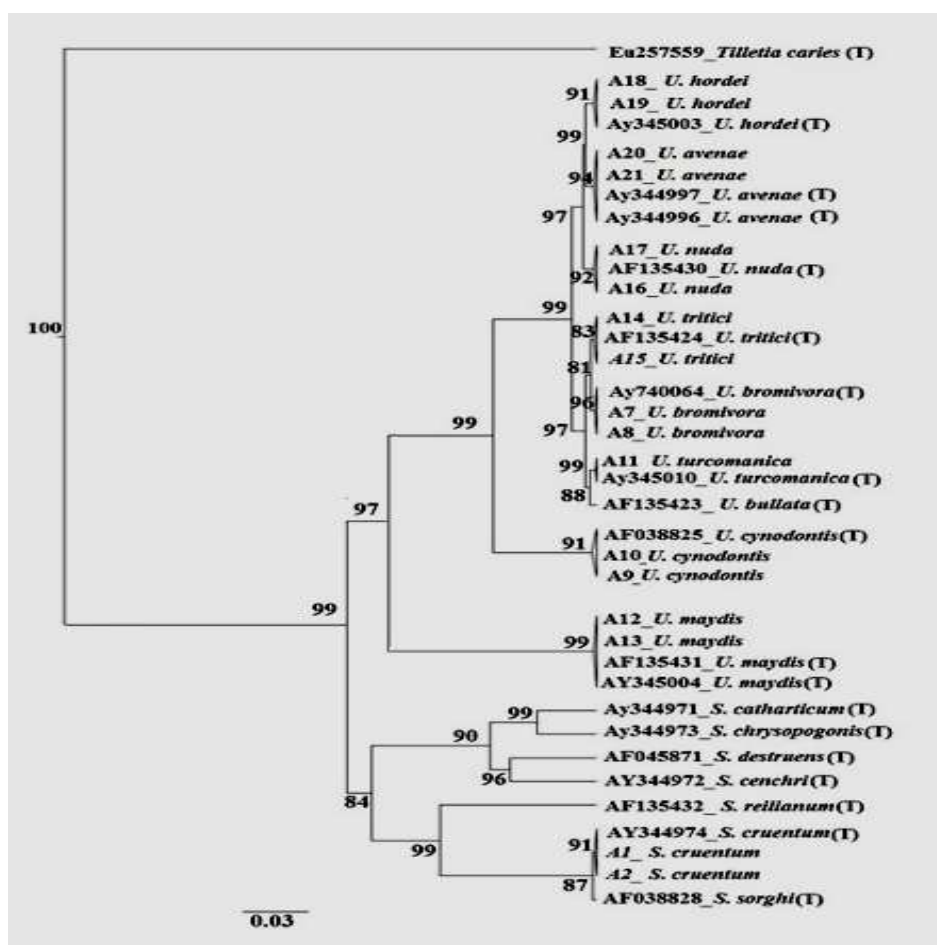
شکل ۱۲. *Tilletia laevis*: A) سوره روی گیاه *Triticum aestivum* B) جوانه‌زنی تلیوسپورها و تشکیل بازیدیوم و بازیدیوسپور C) هاگ‌های زایا و نازا D) تصویر میکروسکوپی فلورسنت هاگ‌های زایا. Figure 12. *Tilletia laevis*. A) Sorus on *Triticum aestivum* B) Teliospore germination and formation of basidium and basidiospores C) Teliospores and sterile cells D) Teliospores in fluorescent microscopy.

رابطه فیلوژنتیکی سیاهک‌ها

تعداد ۵۸ جدایه به عنوان نماینده برای مطالعات مولکولی گونه‌های جنس *Sporisorium*, *Ustilago* و *Tilletia* انتخاب شدند (جدول ۱). دو درخت فیلوژنتیکی، یکی برای گونه‌های دو جنس *Ustilago* و *Sporisorium* و دیگری برای گونه‌های جنس *Tilletia* با روش Bayesian inference براساس توالی ناحیه rDNA-ITS ترسیم گردید در این تحقیق، طول توالی نوکلئوتیدی ناحیه ITS-rDNA توالی‌یابی شده در جدایه‌های مختلف گونه‌های *Sporisorium*, *Ustilago* و *Tilletia*، ۶۳۰ جفت باز بود.

نتایج آنالیزهای فیلوژنتیکی اولین درخت (شکل ۱۳) مربوط به جدایه‌های *Sporisorium* و *Ustilago* در این مطالعه، به ۹ کلاد *S. cruentum*, *U. maydis*, *U. hordei*, *U. turcomanica*, *U. avenae*، *U. nuda*, *U. bromivora*, *U. cynodontis* و *U. tritici* و تعلق داشتند و گونه *T. caries* نیز به عنوان آرایه خارج از گروه انتخاب گردید. جدایه‌های جنس *Ustilago* به ۸ کلاد تحت عناوین: *U. maydis*, *U. tritici*, *U. cynodontis*, *U. bromivora*, *U. nuda*, *U. avenae*, *U. turcomanica*, *U. hordei* تعلق داشتند و جدایه‌های مربوط به جنس *Sporisorium* در کلاد *S. cruentum* قرار گرفتند (شکل ۱۳).

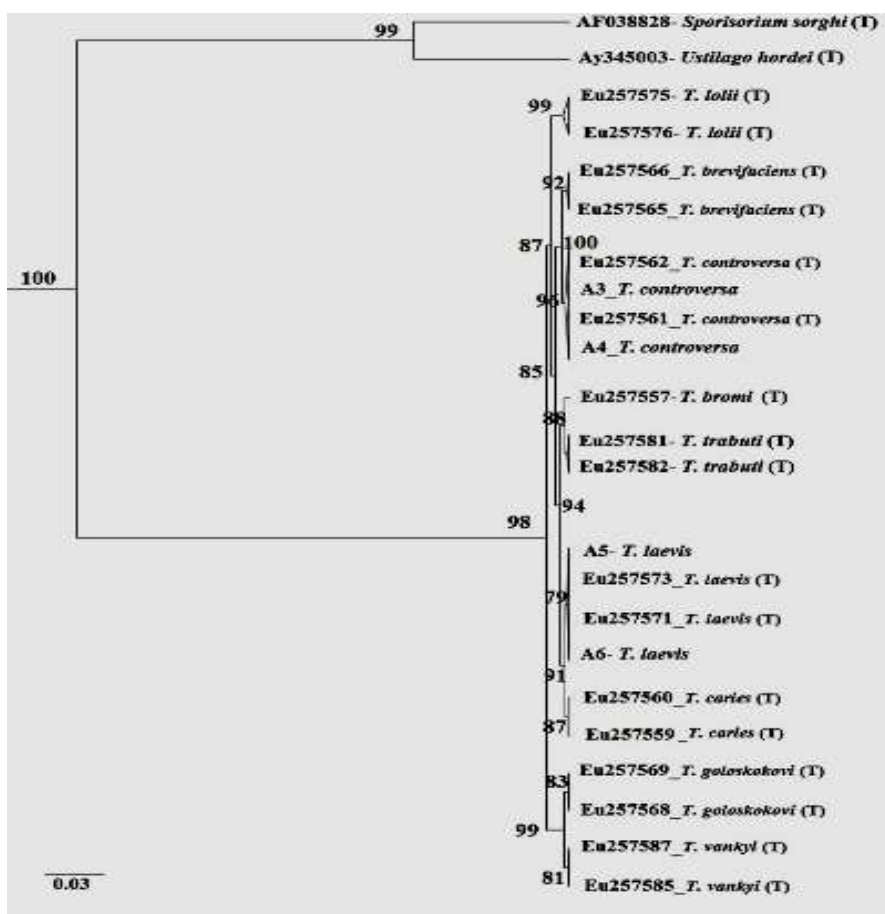
دومین درخت فیلوژنتیکی (شکل ۱۴) مربوط به جنس *Tilletia* بود، آنالیزهای فیلوژنتیکی مربوط به جدایه‌های مورد مطالعه در این پژوهش به دو کلاد *T. laevis* و *T. contraversa* تعلق داشتند و دو



شکل ۱۳. درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده براساس نواحی rDNA-ITS، ۳۵ آرایه از گونه‌های جنس *Ustilago* spp. و *Sporisorium* spp. با روش Bayesian inference: اعداد بالای هر شاخه نشان‌دهنده مقدار Bayesian posterior probabilities (PP) می‌باشد (طول شاخه‌ها تعداد جایگزینی نوکلئوتیدی، توسط خط مقیاس پایین شجره نشان داده شده است). گونه *Tilletia caries* به عنوان خارج گروه انتخاب شده است.

Figure 13. A phylogenetic tree of *Ustilago* and *Sporisorium* species inferred from rDNA-ITS from 35 taxa: Bayesian posterior probabilities (PP) value is indicated above on branches (Bar indicates the nucleotide substitution in Bayesian inference analysis). An isolate of *Tilletia caries* was used as outgroup.

گونه *Ustilago hordei*، *Sporisorium sorghi* نیز به عنوان آرایه خارج از گروه انتخاب گردیدند (شکل ۱۴).



شکل ۱۴. درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده براساس نواحی rDNA-ITS، 23 آرایه از گونه‌های *Tilletia* با روش Bayesian inference: اعداد بالای هر شاخه نشان‌دهنده مقدار Bayesian posterior probabilities (PP) می‌باشد (طول شاخه‌ها تعداد جایگزینی نوکلئوتیدی، توسط خط مقیاس پایین شجره نشان داده شده است). گونه‌های *Sporisorium sorghi*، *Ustilago hordei* به عنوان خارج گروه انتخاب شده است.

Figure 14. A phylogenetic tree of *Tilletia* spp. species inferred from rDNA-ITS from 23 taxa: Bayesian posterior probabilities (PP) value of Bayesian inference analysis is indicated above on branches (Bar indicates the nucleotide substitution in Bayesian inference analysis). Two species *Ustilago hordei* and *Sporisorium sorghi* were used as outgroup.

Discussion

بحث

در گذشته مفهوم گونه در جنس‌های سیاهک بر پایه ویژگی میزبان و ریخت‌شناسی هاگ استوار بوده است اما امروزه ثابت شده که ناحیه ITS-rDNA برای تشخیص جنس، گونه و حتی جدایه‌ها در جنس *Ustilago* قابل استفاده است (Bakkeren et al. 2000, Stoll et al. 2005). بکرن و همکاران (۲۰۰۰) جهت تعیین ارتباط فیلوژنتیکی قارچ‌های سیاهک راسته *Ustilaginales* از ناحیه ITS-

rDNA استفاده کردند و نشان دادند که این ناحیه، قابلیت جدا کردن گونه‌ها را از هم دارد (Bakkeren et al. 2000).

در این پژوهش، دو جدایه (*U. nuda* (A16 و A17) و *U. tritici* (A14 و A15) از نظر ریخت‌شناسی، نحوه جوانه‌زنی هاگ و نشانه‌ای که روی میزبان ایجاد می‌کنند کاملاً مشابه بودند این در حالی است که از نظر دامنه میزبانی و نوع میزبان متفاوت بودند که احتمالاً نوع میزبان در تفکیک این دو گونه می‌تواند نقش داشته باشد. گونه *U. tritici* از لحاظ دامنه میزبانی بیشتر محدود به گندم و *Ustilago nuda* محدود به *Hordeum sp.* و *Agropyron sp.* می‌باشد که نوع میزبان می‌تواند در تفکیک این دو گونه نقش داشته باشد (Stoll et al. 2005). همچنین جدایه (*U. hordei* (A18 و A19) و *U. hordei* (A17) و *U. nuda* (A16) از نظر نوع میزبان مشابه ولی از لحاظ خصوصیات ریخت‌شناسی، نشانه و نحوه جوانه‌زنی کاملاً متفاوت بودند که می‌تواند یکی از دلایل جدا قرار گرفتن این گونه نسبت به گونه *U. nuda* می‌باشد. از نظر خصوصیات ریخت‌شناسی، نوع نشانه، نحوه جوانه‌زنی و نوع میزبان جدایه‌های *U. tritici* و *U. hordei* کاملاً متفاوت هستند. نتایج حاصل از مقایسه توالی ناحیه ITS مربوط به گونه جنس *Ustilago* در این تحقیق نشان داد که این سه گونه از لحاظ رابطه فیلوژنتیکی از هم جدا می‌شوند و با نتایج بکرن و همکاران (۲۰۰۰) که برای بررسی رابطه فیلوژنتیکی سیاهک‌های راسته *Ustilaginales* از ناحیه ITS-rDNA استفاده کردند مطابقت داشت (Bakkeren et al. 2000).

در این پژوهش گونه‌های جنس *Ustilago* با استفاده از ناحیه ITS-rDNA از هم تفکیک شدند که نتایج این تحقیق با نتایج استول و همکاران مطابقت دارد (Stoll et al. 2005). وانگ و همکاران (۲۰۱۴) از شش ژن و ناحیه ITS-rDNA برای تعیین رابطه فیلوژنتیکی بسیاری از قارچ‌ها اعم از گونه *U. tritici* و *U. hordei* که از نظر خصوصیات ریخت‌شناسی، جوانه‌زنی، نشانه و نوع میزبان متفاوت بودند استفاده کردند که نتایج این تحقیق با نتایج آنها مطابقت داشت (Wang et al. 2014). همچنین کاستل‌بری و همکاران (۲۰۰۵) در آنالیز فیلوژنتیکی راسته *Tilletiales* بر پایه توالی rDNA (nLSU) نشان داد *Tilletia spp.* آلوده کننده اعضای زیرتیره *pooideae*، گروهی شامل گونه‌های دارای هاگهای مشبک تشکیل دادند که از جوانه زدن آنها بازیدیوسپورهای تلفیقی ایجاد می‌شود. این گروه شامل دو گونه *T. caries*، *T. controversa* بود و nLSU تنوع کافی در بین تاکسون‌های دارای هاگ مشبک و ارتباط آنها در این گروه نشان نداد (Castlebury et al. 2005).

در این مطالعه آنالیز توالی‌ها براساس ناحیه rDNA- ITS گونه‌های مربوط به جنس *Tilletia* که از نظر مورفولوژیکی مشابه هستند، تفکیک نمود که این نتایج با نتایج لوی و همکاران (2001) متناقض می‌باشد، آن‌ها نشان دادند که آنالیز توالی‌ها تفاوت کمی را در ناحیه ITS در بین جدایه‌های آلوده کننده گندم مربوط به جنس *Tilletia* که از نظر مورفولوژیکی مشابه هستند، دارند. مطالعات بیانگر بالا بودن میزان تغییر این ناحیه از rDNA در جنس مذکور بوده است و با توجه به کمبود مطالعات فیلوژنتیکی مولکولی در این جنس و نیز تنوع پایین ناحیه ITS بین گونه‌های نزدیک، توالی‌هایی از ژن‌های دیگر برای تعیین روابط فیلوژنتیکی ضروری است (Levy et al. 2001). مک‌دونالد و همکاران (۱۹۹۹) (1999) در شناسایی تلیوسپوره‌های منفرد گونه‌های *Tilletia* با آغازگرهای طراحی شده از قسمتهای حفاظت شده در نواحی ITS موفق نبودند (McDonald et al. 1999).

کریس و همکاران (۲۰۰۷) نیز طی مطالعه‌ای نشان دادند ژن *RPB2* برای مطالعات فیلوژنتیکی راسته *Tilletiales* مفید و کارا بوده و نسبت به نواحی ITS1 متنوع‌تر می‌باشد. آنها از چند ژن برای مقایسه گونه‌های نزدیک آلوده کننده گندمیان در جنس *Tilletia* استفاده کردند. آنالیز این گروه با استفاده از ITS, EF1 α , RPB2 نشان داد که جدایه‌های *T.controversa* آلوده کننده میزبانان غیر از گندم از لحاظ ژنتیکی از *T.caries*, *T.controversa*, *T.laevis* آلوده کننده گندم متمایز هستند. یک سیاهک آلوده کننده چاودار که براساس مورفولوژی تلیوسپور و کوتاه شدن میزبان *T.controversa* در نظر گرفته شده، از نظر ژنتیکی از سه گونه آلوده کننده گندم جدا شد (Carris et al. 2007).

Conclusion

نتیجه‌گیری

سیاهک‌های گیاهان تیره *Poaceae* در استان‌های مرکزی و لرستان شامل هشت گونه از جنس *Ustilago*، دو گونه از جنس *Sporisorium* و دو گونه از جنس *Tilletia* هستند.

References

منابع

- Altschul SF Madden TL Schaffer AA Zhang J, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25:3389-3402.
- Bakkeren G Kronstad JW, Lévesque CA (2000) Comparison of AFLP fingerprints and ITS sequences as phylogenetic markers in Ustilaginomycetes. *Mycologia* 92:510-521.
- Begerow D Stoll M, Bauer R (2006) A Phylogenetic hypothesis of Ustilaginomycotina based on multiple gene analyses and morphological data. *Mycologia* 98:906-916.

- Carris LM Castlebury LA Huang G Alderman SC Luo J, Bao X (2007) *Tilletia vankyi*, a new species of reticulate- spored bunt fungus with non- conjugating basidiospores infecting species of *Festuca* and *Lolium*. Mycological Research 111:1386-1398.
- Castlebury LA Carris LM, Vanky K (2005) Phylogenetic analysis of *Tilletia* and allied genera in order Tilletiales (*Ustilaginomycetes*; *Exobasidiomycetidae*) based on large subunit nuclear rDNA sequences. Mycologia 97:888-900.
- Ershad D (2009) Fungi of Iran. Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran. 531p.
- Katoh K, Standley DM (2013) MAFFT multiple sequence alignment software. Version 7: improvements in performance and usability. Molecular Biology and Evolution 30:772-780.
- 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.
- Knaus H Blab GA van Veluw GJ Gerritsen HC, Wösten HAB (2013) Label free fluorescence microscopy in fungi. Fungal biology Reviews 27:60-66.
- Levy L Castlebury LA Carris LM Meyer RJ, Pimentel G (2001) Internal transcribed spacer sequence-based phylogeny and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism differentiation of *Tilletia walkeri* and *T. indica*. Phytopathology 91:935-940.
- McDonald JG Wong E Kristiansson GT, White GP (1999) Direct amplification by PCR of DNA from ungerminated teliospores of *Tilletia* species. Canadian Journal of Plant Pathology 21:78-80.
- Murray MG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research 8:4321-4326.
- Scholz H, Scholz I (1988) Die prandpilze deutschlands (Ustilaginales). Englera 8:1-691.
- Sert H (2009) Additional to rust and smut fungi of turkey. Phytoparasitica 37:189-192.
- Stoll M, Begerow D, Oberwinkler F (2005) Molecular Phylogeny of *Ustilago*, *Sporisorium*, and related taxa based on combined analyses of rDNA sequene. Mycological Research 109:342-356.
- Tamura K Dudley J Nei M, Kumar S (2007) Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. Molecular Biology and Evolution 24:1596-1599.
- Vanky K (2005) Taxonomic studies on Ustilagomycetes. Mycotaxon 91:217-272.
- Vanky K (2008) Smut fungi (Bsidiomycota P. P., Ascomycota P. P.) of the world.

Novelties, Selected examples, Tenda. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 55:91-109.

Vánky K, Abbasi M (2013) Smut fungi of Iran. *Mycosphere* 4:363-454.

Wang Q, Theelen B, Groenewald M, Bai FY, Boekhout T (2014) Moniliellomycetes and Malasseziomycetes, two new classes in Ustilaginomycotina. *Persoonia* 33:41-47.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal Rna Genes for Phylogenetics. Pp:315-322. In: M A Innis, D H Gelfand, J J Sninsky, T J White (eds.). *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*. Academic, San Diego, USA.