شناسایی مورفولوژیکی و مولکولی *Peyronellaea glomerata* عامل لکه برگی پیچک صحرایی در استان کردستان

Morphological and Molecular Identification of *Peyronellaea glomerata* as Causal Agent of Leaf Spot of Field Bindweed in Kurdistan Province

شیما باقرآبادی[۱]، دوستمراد ظفری[۲*]، محمدجواد سلیمانی[۲] و فاطمه قبادی‌انور[۳]

تاریخ دریافت: ۹۳/۰۹/۰۶ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۱۷

چکیده

طی پاییز سال ۱۳۹۲ از مزارع توت‌فرنگی در مناطق مختلف استان کردستان بازدید به‌عمل آمد. در اکثر مزارع، علف‌هرز پیچک صحرایی با علائم لکه برگی مشاهده و جمع‌آوری شد. بافت‌های دارای علائم پس از ضدعفونی سطحی با هیپوکلریت‌سدیم ۰/۵ درصد روی محیط‌کشت PDA (سیب‌زمینی، دکستروز، آگار) کشت داده شد. پس از هفت روز انکوباسیون در دمای ۲۵-۲۳ درجه سانتی‌گراد، پرگنه قارچ از قطعات کشت داده شده جدا و خالص‌سازی گردید. در مجموع ۲۱ جدایه قارچی واجد پیکنیدیوم به‌دست آمد که از نظر مورفولوژیکی کاملاً شبیه بودند. یکی از جدایه‌ها، به‌عنوان نماینده مورد بررسی مولکولی قرار گرفت و نواحی ITS1، ITS2 و ژن 5.8s آن تعیین توالی شد. در نهایت، براساس نتایج بررسی‌های مورفولوژیکی و مولکولی قارچ عامل لکه‌برگی پیچک صحرایی، *Peyronellaea glomerata* تشخیص داده شد. این اولین گزارش از *P. glomerata* به‌عنوان عامل لکه برگی روی پیچک صحرایی می‌باشد. بنابراین در صورتی‌که این قارچ روی گیاهان زراعی منطقه بیماری‌زایی نداشته باشد، میتواند به‌عنوان عامل بیوکنترل در مبارزه تلفیقی با پیچک صحرایی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: پیچک صحرایی، بیوکنترل علف‌هرز، توالی نواحی ITS، استان کردستان

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان

۲. دانشیاران گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان

۳. دانشجوی کارشناسی‌ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، پردیس دانشگاه لرستان، خرم‌آباد

*: نویسنده مسوول Email: zafari_d@yahoo.com

مقدمه

حدود سی هزار گونه گیاهی به‌عنوان علف‌هرز شناخته شده‌اند، که ۳۰۰ گونه از آنها بیشترین اختلال را در محصولات کشاورزی ایجاد می‌نمایند و گسترش جهانی دارند به‌نحوی‌که در کشورهای توسعه یافته حداقل ۱۰ تا ۱۵ درصد از کل خسارات سالانه ناشی از عوامل مختلف به محصولات کشاورزی، مربوط به علف‌های هرز است و این میزان در کشورهای در حال توسعه و مناطق استوایی بیشتر است در این بین، ۱۸ گونه از این علف‌های هرز متداول‌تر از سایر گونه‌ها هستند که گیاه پیچک نیز یکی از آنها می‌باشد. پیچک صحرایی با نام علمی *Convolvolus arvensis* متعلق به تیره پیچک *Covolvulaceae* می‌باشد. گیاهان این تیره، بالارونده و یا بوته‌ای بوده و دارای شیرابه‌ای شیری رنگ هستند. برگ‌های آنها متناوب، ساده و بدون گوشواره است. گیاهان این تیره در ایران انتشار وسیعی دارند و گونه‌های علف‌هرز آن بیشتر از جنس *Convolvolus* هستند. این علف‌هرز چند ساله مخرب دارای گسترش جهانی بوده که در بسیاری از گیاهان زراعی و باغی مشکلات فراوانی را ایجاد می‌نماید و به تنهایی می‌تواند عملکرد محصول را ۵۰ تا ۶۰ درصد کاهش دهد. (Anonymous) قارچ‌های سلومیست از نظر جغرافیایی دارای پراکندگی وسیعی هستند، به‌طوری‌که در نیچ‌های اکولوژیکی متنوع یافت می‌شوند *گرو* (Grov, 1935). تعداد زیادی از آنها ساپروفیت و برخی بیمارگر ثانویه بر روی گیاهان مختلف هستند *ساتون* (Sutton, 1980). *Phoma* یکی از متنوع‌ترین جنس‌های سلومیستی متنوع است که اغلب به‌صورت عوامل لکه برگی یا لکه روی ساقه گیاهان مختلف دیده می‌شود *ژانگ* و همکاران (Zhang *et al.*, 2009) تاکنون گونه‌های مختلفی از این جنس روی علف‌های هرز در دنیا گزارش شده است. *Peyronellaea* جنس جدیدی است که شامل گونه‌هایی است که در ابتدا در جنس *Phoma* *بورما* و همکاران (Boerema *et al.*, 2004) و گونه‌های مرتبط با آن که در جنس‌های *Pleosporalean* قرار داشتند. براساس مطالعات مورفولوژیکی، *Peyronellaea* به‌عنوان یکی از نه بخش (Section) جنس *Phoma* در نظر گرفته شده و ویژگی مشخص آن ساختار کلامیدوسپوری چندسلولی است (*بورما* و همکاران، 2004). با این حال طبقه‌بندی مورفولوژیکی مبهم، مصنوعی و وقت‌گیر بوده و شناسایی را برای محققین و بیماری شناسان گیاهی مشکل می‌سازد به همین دلیل نیاز به تجربه و مهارت بالا دارد *اوسکمپ* و همکاران (Aveskamp *et al.*, 2010). بنابراین طبقه‌بندی جنس *Phoma* و گونه‌های مشابه آن هنوز ادامه دارد. بررسی‌های مولکولی و فیلوژنتیکی کمک زیادی به شناسایی و فهم تنوع این گونه‌ها می‌کند *اوسکمپ* و همکاران، 2009؛ *گرویتر* و همکاران، 2009؛ *ایرینی* و همکاران (Irinyi 2009).

مواد و روش‌ها

در پاییز ۱۳۹۲، از مزارع توت‌فرنگی در مناطق مختلف استان کردستان بازدید به‌عمل آمد. در اکثر مزارع، علف‌هرز پیچک صحرایی با علائم لکه برگی مشاهده و جمع‌آوری شد. از بخش‌های دارای علائم، توسط اسکالپل از حدفاصل بافت آلوده و سالم قطعات نیم تا یک سانتی‌متری جدا شد و توسط محلول وایتکس ۱۰ درصد (معادل نیم درصد هیپوکلریت‌سدیم) به‌مدت یک تا دو دقیقه ضدعفونی سطحی شدند و بلافاصله دوبار با آب مقطر سترون شستشو داده شدند. این قطعات روی کاغذ صافی سترون آب‌گیری و به پتری‌دیش‌های حاوی محیط‌کشت PDA (سیب‌زمینی، دکستروز، آگار) انتقال داده شدند. پتری‌دیش‌ها در انکوباتور با دمای ۲۵-۲۳ درجه سانتی‌گراد به‌مدت پنج تا هفت روز نگهداری شدند. جدایه‌ها توسط روش‌های استاندارد نوک ریسه و تک اسپور خالص‌سازی شدند و سپس به لوله‌های حاوی محیط‌کشت PCA جهت نگهداری و شناسایی‌های بعدی انتقال داده شدند. جهت بررسی ویژگی‌های مورفولوژیکی حلقه‌هایی به قطر پنج میلی‌متر از حاشیه در حال رشد پرگنه‌های مربوط به هر جدایه برداشته شد و به پتری‌دیش‌های حاوی محیط‌کشت PCA (سیب‌زمینی، هویج، آگار) انتقال داده شد. این پتری‌دیش‌ها در دمای ۲۳ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد تحت نور فلورسنت با چرخه نوری ۸ ساعت روشنایی و ۱۶ ساعت تاریکی نگهداری و پس از پنج تا هفت روز مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین ویژگی‌های مورفولوژیکی جدایه‌ها روی محیط‌های OA و MEA مورد بررسی قرار گرفت. پس از گذشت ۷ روز، خصوصیات و اندازه پیکنیدیوم، کلامیدوسپور و کنیدیوم‌ها با استفاده از میکروسکوپ مدل لایکا مورد بررسی و اندازه‌گیری قرار گرفت. براساس ویژگی‌های پرگنه و شکل پیکنیدیوم‌ها، کلامیدوسپورها و کنیدیوم‌ها و با کمک منابع علمی معتبر (*اوسکمپ* و همکاران، 2010؛ *بورما* و همکاران، 2004) شناسایی صورت گرفت. از جدایه‌ای که مورد بررسی مولکولی قرار گرفت سوسپانسیون اسپور تهیه شد و آزمایش اثبات بیماریزایی با اسپورپاشی روی بوته‌های کاملاً توسعه‌یافته پیچک صحرایی انجام شد. برای بوته‌های شاهد از آب مقطر استریل استفاده شد.

بررسی‌های مولکولی

به‌منظور شناسایی دقیق جدایه‌ها در سطح گونه، یک جدایه برای انجام بررسی‌های مولکولی انتخاب گردید.

استخراج DNA

استخراج DNA با روش تغییر یافته *شارما* و همکاران، (Sharma *et al.*, 2002) انجام شد. مقداری میسیلیوم منجمد شده در یک هاون چینی که از قبل در فریزر سرد شده بود، ریخته شد و به‌کمک نیتروژن مایع پودر شد و میزان ۲۰۰ میلی‌گرم از آن به لوله ۱۵۰۰ میکرولیتری منتقل شد. مقدار ۷۵۰ میکرولیتر از بافر استخراج نگهداری شده در حمام آب‌گرم ۶۰˚c (2% PVP-40, pH=8.0 EDTA 20mM, CTAB 5% (W/V) Tris-HCl pH=8.0 100mM، NaCl 1/4M و ۰/۲٪ مرکاپتواتانول) به نمونه اضافه و مخلوط گردید و به‌مدت ۳۵ دقیقه در حمام آب‌گرم ۶۰˚c قرار گرفت و در این مدت محتویات لوله چندین مرتبه به آرامی مخلوط شد. معادل هم حجم از مخلوط کلروفرم-ایزوآمیل الکل (۱:۲۴) به لوله محتوی نمونه اضافه شد و به آرامی با برگرداندن به‌مدت یک دقیقه مخلوط گردید. پس از اختلاط کامل به‌مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۷۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع فوقانی برداشته و درون لوله سترون جدیدی ریخته شد. به اندازه یک سی‌ام حجم آن، استات‌سدیم ۳ مولار اسیدیته ۵/۲ و ۰/۶ حجم، محلول ایزوپروپانول سرد به آن اضافه گردید و چند مرتبه محلول داخل لوله به آرامی مخلوط گردید. در این مرحله کلاف DNA تشکیل شد که به آسانی قابل مشاهده بود. لوله محتوی به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۷۰۰۰ دور در دقیقه در دمای۴˚c سانتریفیوژ شد تا DNA در قسمت پایین لوله رسوب کند. مایع بالایی رسوب DNA به آرامی خالی شد به‌طوری‌که DNA داخل لوله دست‌نخورده باقی بماند. به لوله محتوی DNA، ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد افزوده شد و مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه در دمای۴˚c سانتریفیوژ گردید. سپس فاز رویی دور ریخته شد و لوله در مجاورت هوا به‌صورت وارونه روی کاغذ جاذب رطوبت قرار گرفت. پس از این مرحله به لوله ۵۰ میکرولیتر آب مقطر دو بار سترون افزوده شد. نمونه به‌مدت یک شب در یخچال نگهداری شد تا توده DNA در آب مقطر حل شود. برای مشاهده DNA استخراج شده از ژل آگارز ۱/۲ درصد در بافر TBE استفاده شد و مقدار ۵ میکرولیتر DNA با دو میکرولیتر بافر بارگذاری مخلوط و به‌مدت ۱/۵ ساعت با ولتاژ ثابت ۸۰ ولت الکتروفورز شد. تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با روش اسپکتروفتومتری و الکترفورز ژل آگارز تعیین شد.

تنظیم شرایط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(PCR):

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از دو آغازگر ITS1 و ITS4 جهت تکثیر نواحی ITS1، ITS2 و ژن 5.8S انجام گرفت. نام و توالی آغازگرهای اختصاصی استفاده شده در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱: نام و توالی آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده جهت تکثیر نواحی ITS1، ITS2 و ژن 5.8S

Table 1: Name and sequence of primers used to amplify ITS1, ITS2 and 5.8S regions

نام آغازگر Primer	توالی Sequence
ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

در زمان اجرای آزمایش‌ها، برای جلوگیری از بروز خطای زمان، برداشتن مقادیر بسیار کم مواد و نیز برای راحتی و سرعت عمل بیشتر، محلول پایه واکنش‌های PCR طبق جدول ۲ تهیه شد. محلول پایه شامل همه مواد موردنیاز برای انجام واکنش PCR به‌جز DNA نمونه و آغازگرها بود.

ابتدا دو میکرولیتر DNA مربوط به نمونه در داخل میکروتیوپ مخصوص PCR ریخته، سپس دو میکرولیتر از آغازگرها (با غلظت ۱۰ pmol/µl) به آن اضافه گردید و بلافاصله ۲۱ میکرولیتر از محلول پایه تهیه شده و به هریک از میکروتیوپ‌های حاوی DNA و آغازگر اضافه گردید. از دستگاه ترموسایکلر شرکت Techn مدل TC-512 جهت تکثیراستفاده گردید. مطابق برنامه داده شده به دستگاه، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرها براساس شرایط جدول ۳ انجام گردید.

الکتروفورز محصول PCR

برای الکتروفورز هریک از نمونه‌ها، پنج میکرولیتر از محصول PCR اولیه برداشته شد و پس از اختلاط با دو میکرولیتر بافر

بارگذاری، روی محیط ژل آگارز ۱/۲ درصد در بافر TBE با ولتاژ ثابت ۸۰ ولت الکتروفورز شد. پس از حدود ۲/۵ ساعت جریان برق قطع شده و ژل برای رنگ‌آمیزی ۳۰ تا ۴۵ دقیقه در محلول اتیدیوم بروماید (۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) قرار گرفت. پس از شستشوی ژل با آب مقطر، عکس‌برداری از ژل با دستگاه ژل داکیومنت مدلDIGI.DOC H101 انجام گرفت. نواحی ITS1، ITS2 و ژن 5.8S پس از تکثیر به‌منظور تعیین توالی، به کشور کره‌جنوبی فرستاده شد و نتایج تعیین توالی با فرمت فستا دریافت شد. شباهت توالی جدایه مورد بررسی در این تحقیق با توالی جدایه‌های موجود در بانک ژن از طریق بلاست مقایسه شد. پس از بررسی اولیه، توالی این جدایه با توالی تعدادی از جدایه‌های گرفته شده از بانک ژن و همچنین توالی گونه *Julella avicennae* به‌عنوان outgroup (جدول ۴) در نرم‌افزار Genedoc همردیف شدند و کلادوگرام آنها با نرم‌افزار Treecon به روش Neighbour– joining با هزار Bootstrap رسم و تجزیه و تحلیل شد.

جدول ۲: مواد لازم و مقادیر موردنیاز برای تهیه محلول پایه PCR اختصاصی

Table 2: Materials and their amount for preparation of master mix in specific PCR

ماده Material	غلظت پایه Stock dilution	غلظت نهایی Working dilution	برای یک واکنش Amount for one reaction
آب دو بار تقطیر سترون Distilled Water	-	-	16.25µl
بافر PCR Buffer PCR	10 X	1 X	2.5µl
کلریدمنیزیم $MgCl_2$	50 mM	3.2 mM	1µl
دی. ان. تی. پی DNTPAS	10 mM	0.6 mM	0.75µl
آنزیم *Taq* DNA پلیمراز *Taq* DNA polymerase	5 Unit/µl	1 Unit	0.5µl
حجم نهایی Total volume	-	-	21µl

جدول ۳: زمان و دمای لازم جهت انجام مراحل مختلف PCR

Table 3: PCR protocol

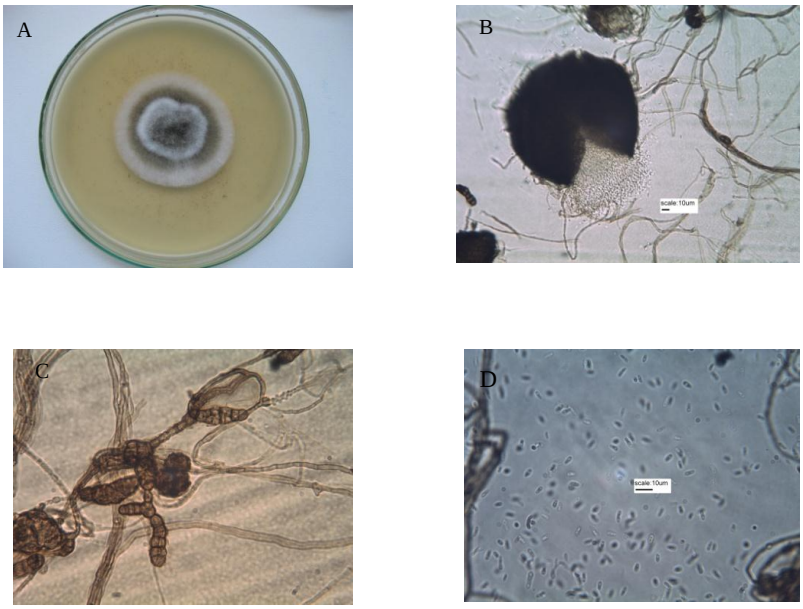
تعداد چرخه Number of cycle	مرحله انجام شده Step	زمان Time	درجه حرارت (^{0}C) Temperature
۱ چرخه 1 cycle	واسرشت اولیه Initial denaturation	5 min	94
۳۵ چرخه 35 cycle	واسرشت Denaturation	1 min	94
	اتصال Annealing	75 s	54
	گسترش Extension	2 min	72
۱ چرخه 1 cycle	گسترش نهایی Final extension	10 min	72

جدول ۴: مشخصات جدایه‌های گرفته شده از بانک ژن و جدایه مورد بررسی در این تحقیق جهت رسم کلادوگرام
Table 4: Accession number of fungal isolates used in this study

نام گونه Species	شماره دسترسی بانک ژن Accession number
Peyronellaea glomerata	208879729
Peyronellaea glomerata	208879730
Peyronellaea glomerata	208879737
Peyronellaea glomerata	208879631
Peyronellaea glomerata	289188405
Peyronellaea glomerata	262034988
Peyronellaea glomerata	307239064
Peyronellaea glomerata	KM014745(Iran)
Phoma glomerata	190402613
Julella avicenniae	284799283(Outgroup)

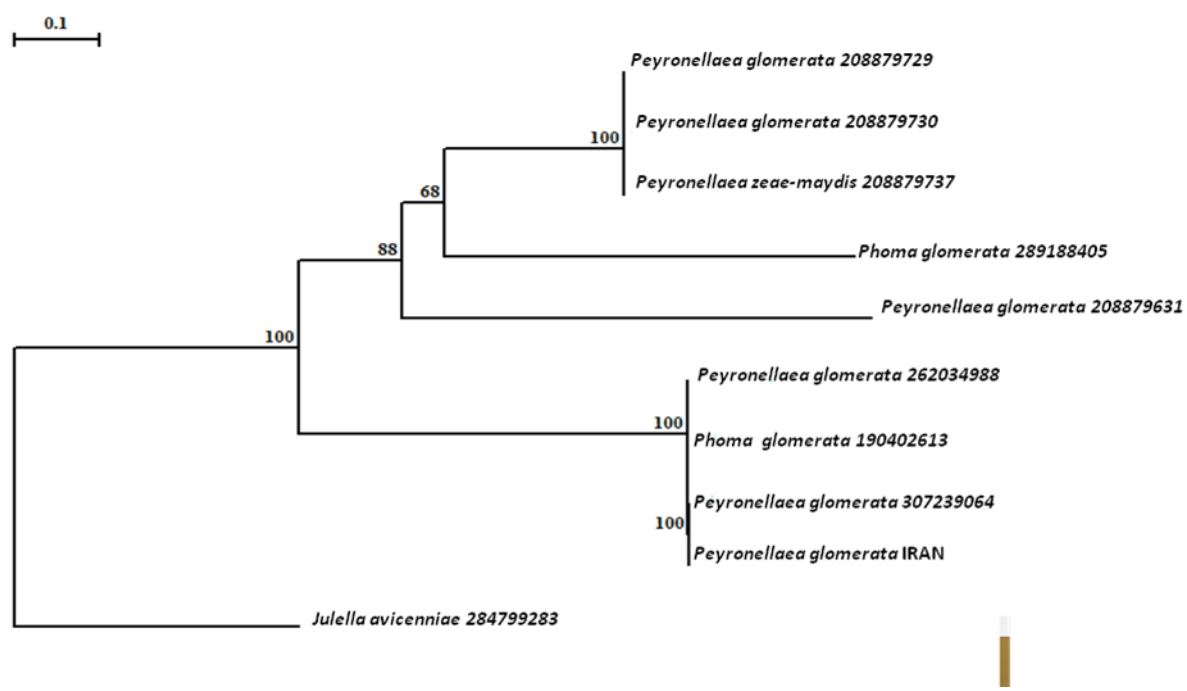
نتایج و بحث

از نمونه‌های پیچک صحرایی دارای لکه برگی، به‌عنوان یکی از علف‌های هرز مهم مزارع توت‌فرنگی در استان کردستان در مجموع ۲۱ جدایه قارچی جدا شد. سرعت رشد پرگنه جدایه‌های به‌دست آمده روی محیط OA، MEA و PCA سریع و تقریباً یکسان بود و در ظرف سه روز سطح پتری‌دیش‌های نه سانتی‌متری را می‌پوشانند. پرگنه قارچ روی محیط PCA متراکم به حالت پشمی، به رنگ سبز زیتونی مایل به قهوه‌ای و براق بودند (شکل ۱ الف). پیکنیدیوم‌ها بعد از یک هفته روی پرگنه تشکیل شدند که در مرکز پرگنه به‌صورت دانه‌های سیاه رنگ قابل مشاهده بودند. پیکنیدیوم‌ها نیمه‌کروی تا گلابی شکل با یک گردن باریک و قطر آنها ۵۰ تا ۲۵۰ میکرومتر اندازه‌گیری شد (شکل ۱ ب). کلامیدوسپورها به‌صورت تکی و دسته‌ای به فراوانی تشکیل شدند (شکل ۱ ج). کنیدیوم‌ها در اکثر موارد به‌صورت تکی و در برخی موارد مجتمع، ۳/۵-۲ × ۱۰-۵ میکرومتر و به اشکال متنوع، معمولاً مستطیلی، تخم‌مرغی و بیضوی و رنگ آنها شفاف بود (شکل ۱ د). براساس این ویژگی‌ها و با استفاده از کلیدهای شناسایی قارچ‌های ناقص *بارنت و هانتر*، ۱۹۹۸؛ *ساتون*، ۱۹۸۰ (Barnett and Hunter, 1998; Sutton, 1980) جدایه‌های به‌دست آمده به‌عنوان جنس *Phoma* شناسایی شدند. به‌منظور شناسایی دقیق‌تر و شناسایی در سطح گونه یکی از جدایه‌ها جهت بررسی مولکولی انتخاب شد. استخراج DNA انجام شد و نتیجه استخراج روی ژل‌آگاروز مشاهده شد. با استفاده از پرایمرهای ITS1 و ITS4 نواحی ITS1، ITS2 و ژن 5.8s تکثیر شد که تولید یک قطعه حدود ۶۰۰ جفت بازی نمود. قطعه تکثیرشده تعیین توالی شد و توالی آن در بانک ژن ذخیره شد (Accesion NO. KM014745). در بررسی‌های اولیه مولکولی توالی جدایه مورد بررسی در این تحقیق در سایت مرکز ملی بیوتکنولوژی بلاست شد. نتایج بلاست نشان داد که اکثر توالی‌های شبیه به توالی مورد بررسی در این تحقیق گونه‌های جنس *Phoma* و جنس بسیار نزدیک به آن *Peyronellaea* می‌باشد. بنابراین توالی تعدادی از جدایه-های بسیار نزدیک از بانک ژن دریافت شد (جدول ۴). براساس بررسی منابع و مقایسه بلاست گونه *Julella avicenniae* strain BCC به‌عنوان Outgroup انتخاب شد و با استفاده از نرم‌افزار Gendoc همردیف شدند و با استفاده از نرم‌افزار Treecon درخت فیلوژنیتکی رسم شد (شکل ۲). همان‌طورکه در درخت رسم شده مشاهده می‌شود جدایه مورد بررسی در این تحقیق با جدایه *Peyronellaea glomerata* با شماره دسترسی 307239064 با Bootstrap صد، در یک کلاد قرار گرفته‌اند. بنابراین براساس ویژگی‌های مورفولوژیکی و مولکولی جدایه‌های قارچی به‌دست آمده از لکه برگی پیچک صحرایی *glomerata P.* تشخیص داده شدند. در آزمایش اثبات بیماریزایی بعد از آلوده‌کردن مصنوعی بوته‌های پیچک صحرایی با اسپورهای این قارچ، علایمی شبیه لکه برگی‌های جمع‌آوری شده از مزارع توت‌فرنگی ظاهر شد که از این لکه‌ها، مجدداً *P. glomerata* جداسازی شد. با بررسی منابع مختلف در دنیا گزارشی از وجود *P. glomerata* روی پیچک صحرایی مشاهده نشد. بنابراین برای اولین بار وجود و بیماریزا بودن *P. glomerata* بر روی پیچک صحرایی گزارش می‌شود. درصورتی‌که این قارچ در بین گیاهان زراعی منطقه، میزبانی نداشته باشد می‌تواند به‌عنوان عامل کنترل بیولوژیک در مبارزه تلفیقی با پیچک صحرایی که یکی از علف‌های هرز مهم می‌باشد به‌کار گرفته شود.



شکل ۱: *Peyronellaea glomerata* a) پرگنه روی PCA پس از گذشت هفت روز b) پیکنیدیوم c) کلامیدوسپورها d)کنیدیوم‌ها

Fig. 1: *Peyronellaea glomerata* a) colony on PCA after 7 days b) pycnidium c) chlamydospore d) conidia



شکل ۲: درخت فیلوژنی گونه‌های مربوط به جنس *Peyronllaea* رسم شده با نرم‌افزار Treecon با هزار Bootstrap

Fig. 2: Phylogenetic tree of isolates of *Peyronllaea* genus used in this study by Treecon software with 1000 Bootstrap

جهت مطالعه منابع به صفحه ۲۶ متن انگلیسی مراجعه شود.

Morphological and Molecular Identification of *Peyronellaea glomerata* as Causal Agent of Leaf Spot of Field Bindweed in Kurdistan Province

Bagherabadi[1], S., Zafari[2*], D., Soleimani[2], M. J. and Ghobadi Anvar[3], F.

Abstract

During the autumn of 1392 strawberry farms were inspected in the province of Kurdistan. In most fields, leaf spot symptoms of field bindweed were observed. Infected tissues surface sterilized with 5.0 percent sodium hypochlorite and were cultured on the medium PDA (potato, dextrose, agar). After seven days of incubation at 25-23°C, purifiction was done from edge of colonies in the maner of hyphal tip on water-agar medium. A total of 21 isolates posses pycnidium obtained that were morphologically similar. one of the isolates as representative was choosen and its ITS1, ITS2 and 5.8s gene was sequenced. Finally, based on the results of morphological and molecular studies the causal agent of leaf spot of field bindweed was diagnosed as *Peyronellaea glomerata*. This is the first report of *P. glomerata* leaf spot on field bindweed. This fungus can be used as biocontrol agents in the integrated control of field bindweed if does not able to disease other crop in Kurdistan area.

Keywords: Field bindweed, Weed biocontrol, Sequences of ITS regeans, Kurdistan province

References

Anonymous. Weedy Wildflowers of Illinois. http://www.illinoiswildflowers.info/weeds/plants/field_ bindweed.htm

Aveskamp, MM., De Gruyter, J., Woudenberg, JH., Verkley, GJ. and Crous, PW. 2010. Highlights of the *Didymellaceae*: a polyphasic approach to characterise *Phoma* and related pleosporalean genera. Studies in Mycology, 65: 1-60.

Aveskamp, MM., de Verkley, GJ., Gruyter, J., Murace, MA., Perelló, A., Woudenberg, JH., Groenewald, JZ. and Crous, PW. 2009. DNA phylogeny reveals polyphyly of *Phoma* section *Peyronellaea* and multiple taxonomic novelties. Mycologia, 101: 363-82.

Barnett, HL. and Hunter, BB. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. 4th ed. USA: St Paul.

Boerema, G. H., de Gruyter, J., Noordeloos, M. E. and Hamers, M. E. C. 2004. *Phoma* Identification Manual. Differentiation of Specific and Infra-specific Taxa in Culture. CABI publishing, Wallingford, UK, 479 pp.

De Gruyter, J., Aveskamp, MM., Woudenberg, JH., Verkley, GJ., Groenewald, JZ. and Crous, PW. 2009. Molecular phylogeny of *Phoma* and allied anamorph genera: towards a reclassification of the *Phoma* complex. Mycological Research, 113(Pt 4): 508-19.

De Gruyter, J., Noordeloos, M. E. and Boerema, G. H. 1998. Contributions towards a monograph of *Phoma* (Coelomycetes) I-3. section *Phoma*: Taxa with conidia longer than 7 m. Persoonia, 16(4): 471-490.

Grov, W. B. 1935. British Stem and Leaf Fungi (Coelomycetes) Vol. 1 Sphaeropsidales. Cambridge University Press, Cambridge.

Irinyi, L., Kövics, GJ. and Sándor, E. 2009. Taxonomical re-evaluation of *Phoma*-like soybean pathogenic fungi. Mycological Research, 113(Pt 2): 249-60.

Sharma, AD., Prabhjot, KG. and Prabhjot, S. 2002. DNA isolation from dry and fresh samples of polysaccharide–rich plants. Plant Molecular Biology Reporter, 20 (4): 415a-415f.

Sutton, B. C. 1980. The Coelomycetes. Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acervuli and Stromata. CMI, Kew.

Zhang, T. Y., Hou, T. J. and Zhao, G. Z. 2009. Taxonomic studies on 20 dictyosporic hyphomycete genera from China and molecular systematics of represented species of 5 allied genera. Flora Fungorum Sinicorum, 31: 62.

1. M.Sc. Graduate Student Plant Pathology, Department of plant protection, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamadan

2. Associate professors, Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan

3. M.Sc. Student Plant Protection, Department of plant protection, Faculty of Agriculture, Campus of Lorestan University, Khoramabad

*: Corresponding author Email: zafari_d@yahoo.com

Zou, Z., Eibl, C. and Koop, H. U. 2003. The stem-loop region of the tobacco psbA 5′ UTR is an important determinant of mRNA stability and translation efficiency. Molecular Genetics and Genomics, 269: 340-349.

Zoubenko, O. V., Allison, L. A., Svab, Z. and Maliga, P. 1994. Efficient targeting of foreign genes into the tobacco plastid genome. Nucleic Acids Research, 22: 3819-3824.

Zubko, M. K., Zubko, E. I., van Zuilen, K., Meyer, P. and Day, A. 2004. Stable transformation of petunia plastids. Transgenic Research, 13: 523-530.