

مطالعه گونه‌های جنس *Phyllosticta* (*Ascomycota: Phyllostictaceae*) از گیلان*

دریافت: ۱۳۹۵/۰۳/۰۴ / پذیرش: ۱۳۹۵/۰۳/۱۹

حمیده دارسرایبی: دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت ۱۳۱۴-۴۱۶۳۵، ایران

سید اکبر خداپرست✉: دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت ۱۳۱۴-۴۱۶۳۵، ایران
(khodaparast@guilan.ac.ir)

رسول زارع: استاد پژوهش مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

چکیده

در این مطالعه که به منظور شناسایی و دامنه میزبانی گونه‌های جنس *Phyllosticta* در استان گیلان انجام شد، گیاهان جل *(Prunus laurocerasus)*، همیشک *(Danae racemosa)*، شاه‌بلوط هندی سرخ *(Aesculus carnea)*، کاملیا *(Camellia japonica)*، پرتقال *(Citrus sinensis)*، تمشک *(Rubus sp.)*، شفلرا *(Schefflera sp.)* و خرمالو *(Diospyros kaki)* و جینکو *(Ginkgo biloba)* به عنوان میزبان‌های جدید برای ایران معرفی می‌شوند. گیاهان مگنولیای بنفش *(Magnolia soulangeana)*، چای *(Camellia sinensis)*، لیموشیرین *(Citrus limetta)* و رز *(Rosa sp.)* نیز به عنوان میزبان‌های دیگری که در این بررسی یافت شدند، معرفی می‌شوند. تشخیص دقیق گونه‌های جنس *Phyllosticta* تنها با ادغام یافته‌های حاصل از مشاهدات ریخت‌شناسی و داده‌های مولکولی امکان‌پذیر است. در بررسی حاضر، تعداد ۱۴ آرایه از جنس *Phyllosticta* از گیاهان مختلف جداسازی شد. از میان آن‌ها، جدایه به دست آمده از چای به طور قطعی *(P. theacearum)* تشخیص داده شده و جدایه مرکبات *(Citrus sp.)* هم به گونه *P. citricarpa* شباهت دارد. بقیه جدایه‌ها (۱۲ جدایه) براساس کلیدهای ریخت‌شناسی آرایه شده برای گونه‌های جنس *Phyllosticta* قابل تشخیص نیستند که در نتیجه در این مقاله از آن‌ها به صورت *Phyllosticta sp.* نام برده شده است. علاوه بر این، ناحیه ITS روی rDNA برای هر ۱۴ جدایه توالی‌یابی شد، ولی این ناحیه برای تشخیص گونه‌های جنس مذکور مفید نبود.

واژه‌های کلیدی: آسکومیست، آنالیز فیلوژنتیک، تاکسونومی، تنوع زیستی، لکه‌برگی

Study on the genus *Phyllosticta* (*Ascomycota: Phyllostictaceae*) from Guilan province (N. Iran)

Received: 24.05.2016 / Accepted: 08.06.2016

Hamideh Darsaraei: Former Msc Student, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, P.O. Box 41735-1314, Rasht, Iran

Seyed Akbar Khodaparast✉: Associate Prof., Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, P.O. Box 41735-1314, Rasht, Iran (khodaparast@guilan.ac.ir)

Rasoul Zare: Research Prof., Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

Summary

Species of *Phyllosticta* are important group of pathogenic and endophytic fungi that are reported from various crop plants, ornamental and non-fruiting plants. These fungi cause several diseases such as leaf and fruit spots and fruit rot. In order to identify *Phyllosticta* species in Guilan province, several collections were examined around the region. Altogether 14 taxa were isolated from different plant species. Plant species viz. *Prunus laurocerasus*, *Danae racemosa*, *Aesculus carnea*, *Camellia japonica*, *Citrus sinensis*, *Rubus sp.*, *Schefflera sp.*, *Diospyros kaki* and *Ginkgo biloba* are recorded as new host for *Phyllosticta* spp. in Iran. *Magnolia soulangeana*, *Camellia sinensis*, *Citrus limetta* and *Rosa sp.* are also reported as host plants of *Phyllosticta* species in this province. Precise recognition of *Phyllosticta* sp. needs both morphological and molecular studies. Hence, in this study *P. theacearum* was distinctly identified; one collection on *Citrus sp.* was closely related to *P. citricarpa*. However, we could not retrieve appropriate name for 12 isolates using available literatures and morphological identification keys. Moreover, we generated ITS rDNA sequences for all 14 isolates but ITS regions are not informative for species identification.

Keywords: Ascomycete, biodiversity, leaf spot, phylogenetic analysis, taxonomy

* بخشی از پایان‌نامه نگارنده اول به راهنمایی دکتر سید اکبر خداپرست، آرایه شده به دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت

مقدمه

دقت و وسواس تفسیر شوند (Glienke et al. 2011). برای حل این معضل، ویکی و همکاران (۲۰۱۳) از فیلوژنی مبتنی بر پنج ژن (ITS, LSU, ACT, TEF, GPDH) و دو ژن (ACT و ITS) برای تفکیک گونه‌های *Phyllosticta* از یکدیگر استفاده کردند. حاصل کار این بود که داده‌های فیلوژنی مبتنی بر دو ژن، نتیجه یکسان با فیلوژنی پنج‌ژنی داشتند، به جز در مورد گونه‌هایی که دارای ارتباط نزدیک با گونه کمپلکس *P. capitalensis* بودند (Wikee et al. 2013b).

تاکنون، ۳۴۰۵ اپیتت از جنس *Phyllosticta* در پایگاه اطلاعاتی MycoBank (<http://www.mycobank.org>) و ۱۸۵۴ اپیتت در ذیل این جنس در پایگاه اطلاع‌رسانی Fungal Database (<http://nt.ars-grin.gov/fungalatabases>) به ثبت رسیده است. این موضوع که آیا تمامی این اپیتت‌ها حقیقتاً بیانگر گونه‌های مجزا هستند یا بسیاری از آن‌ها به گونه‌های یکسان تعلق داشته و باید در هم ادغام شوند به مطالعه و بررسی بیشتری نیاز دارد و در مورد این جنس، استفاده از داده‌های حاصل از توالی ژن‌های مختلف و تلفیق نتایج آن‌ها با داده‌های شکل‌شناسی برای تفکیک گونه‌ها از ضروریات است.

در ایران، تاکنون ۱۹ گونه از جنس *Phyllosticta* از روی میزبان‌های گوناگون ثبت شده است که از این میان، سهم استان گیلان، چهار گونه *P. sphaerospoidea* از روی شاه‌بلوط هندی (*Aesculus hippocastanum* L.)، *P. theacearum* از روی چای (*Camellia sinensis* (L.) Kunze)، *P. concentrica* از روی ماگنولیای سفید (*Magnolia grandiflora* L.) و یک گونه *Phyllosticta* sp. (از روی لرگ (*Pterocarya fraxinifolia* (Poir.) Spach.) بوده است (Ershad 2009). با وجود این، گزارش‌های پراکنده تاکنون هیچ مطالعه جامعی در مورد تاکسونومی، دامنه میزبانی و پراکنش گونه‌های این قارچ در ایران انجام نشده است و این گزارش‌های پراکنده نمی‌تواند منعکس‌کننده وضعیت تاکسونومی این جنس در ایران باشد. از طرف دیگر، بازنگری تاکسونومی این جنس در سال‌های اخیر (van der Aa & Vanev 2002)، این امکان را فراهم می‌سازد که ساختار تاکسونومیک این جنس در ایران نیز مورد بازنگری قرار گیرد. بنابراین، نیاز به مطالعه دقیق و جامع در مورد تاکسونومی این جنس در ایران به خوبی احساس می‌شود. لذا، این مطالعه به منظور بررسی مقدماتی این جنس در استان گیلان انجام شده است.

گونه‌های *Phyllosticta* بیمارگرهای مهم گیاهی هستند و هر چند گونه‌های آن به طور معمول به عنوان اندوفیت شناخته می‌شوند، تعداد کمی از گونه‌ها نیز تحت عنوان ساپروفیت گزارش شده‌اند (Wulandari et al. 2013). به طور کلی، گونه‌های *Phyllosticta* منجر به بروز زخم‌های بافت مرده روی برگ‌ها می‌شوند. معمولاً یک یا تعداد بیشتری پیکنیدیوم در یک زخم یافت می‌شود. پس از آلودگی توسط *Phyllosticta* برگ ممکن است در مرکز زخم خشک شود که این منجر به حذف شدن بافت آلوده شده و ایجاد یک سوراخ می‌شود. لکه‌برگی‌ها معمولاً روی برگ‌های زنده در اواخر فصول خشک و مرطوب یا زمستان در کشورهای معتدل به وجود می‌آیند (Wikee et al. 2011). مونوگراف *Phyllosticta s. str.* نخستین بار در سال ۱۹۷۳ توسط ون‌در آا نوشته شد (van der Aa 1973). وی در این کتاب، ۴۶ گونه را به همراه شکل آن‌ها شرح داد و شکل جنسی ۱۲ گونه و شکل اسپرماتیومی ۱۷ گونه را که بیشتر براساس نمونه‌های جمع‌آوری شده از اروپا و آمریکای شمالی بود، فهرست نمود. اخیراً نیز ون‌در آا و وانف (van der Aa & Vanev 2002) نام تمام گونه‌هایی را که در *Phyllosticta* شرح داده شده بود، مورد بازبینی قرار دادند و فهرستی از ۱۹۰ اپیتت مورد قبول و فهرست دیگری از اسامی خارج شده و جایگاه فعلی آن‌ها، در صورت معلوم بودن، تهیه نمودند. در این بازبینی، ۵۰٪ از گونه‌ها به *Phoma*، ۲۰٪ به *Astromella*، ۵٪ به *Phomopsis* و حدود ۱۸٪ به سایر جنس‌های سیلومیست یا گروه‌های تاکسونومیک دیگر منتقل شدند (Su & Cai 2012).

جنس *Phyllosticta* از نظر ویژگی‌های کشتی و شکل‌شناسی با تیره *Botryosphaeriaceae* تفاوت دارد. این جنس همچنین، از نظر مولکولی نیز از *Botryosphaeriaceae* متمایز است (Slippers et al. 2013)، بنابراین توسط ویکی و همکاران (Wikee et al. 2013b) در تیره مجزای *Phyllostictaceae* که از ابتدا در آن پایه‌گذاری شده بود، قرار گرفت. اگرچه آنالیز فیلوژنتیک به یک روش استاندارد در شناسایی قارچ‌ها تبدیل شده است، اما مطالعات فیلوژنتیکی باید هر دو داده مولکولی و شکل‌شناسی را در هم ادغام نماید تا به مشخص شدن آرایه کمک کند (Wikee et al. 2013b). به دلیل فقدان جدایه‌های مرجع و این حقیقت که تاکنون ژنگاه‌های کمی به جز ITS برای آنالیز فیلوژنتیک استفاده شده‌اند، بیشتر نتیجه‌گیری‌هایی که تاکنون در مورد *Phyllosticta* انجام شده نادرست است، به این معنی که نوشته‌های منتشر شده باید با

روش بررسی

- جمع‌آوری نمونه‌ها

شد و در معرض نور near-UV و در دمای ۲۷ درجه سلسیوس قرار گرفتند. همچنین، برای استفاده از میسلیوم قارچی در صورت نیاز، همگی روی محیط کشت آرد یولاف-آگار (OA) کشت داده شدند و در شرایطی مانند آنچه برای محیط کشت PDA ذکر شده بود، نگهداری شدند (Wikee et al. 2013a).

- تشخیص گونه‌ها

تمامی نمونه‌های جمع‌آوری شده در ابتدا با استریو-میکروسکوپ بررسی شدند. در صورت مشاهده پیکنیدیوم، برش‌های عرضی از اندام مورد نظر تهیه شد تا شکل و ابعاد پیکنیدیوم و همچنین کنیدیوم‌ها با میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گیرند. همه برش‌های عرضی در یک قطره اسید لاکتیک ۰.۵٪ روی لام شیشه‌ای قرار داده شدند. نمونه‌هایی که دارای سایر اندام‌های قارچی نظیر آسروول بودند، کنار گذاشته شدند (van der Aa 1973).

برای تشخیص جنس *Phyllosticta* از جنس‌های مشابه و برای تشخیص گونه‌های آن، از مونوگراف ون‌در آ (van der Aa 1973) و بازبینی ون‌در آ و وانف (van der Aa & Vanev 2002)، همچنین تعدادی از مقالات که در آن‌ها شرح گونه وجود داشت (Wikee et al. 2012, Wikee et al. 2013a,b, Glienke et al. 2011) و نیز شرح‌های لاتین اولیه (Brunaud 1886, Saccardo 1878, 1884) استفاده شد. در این قسمت به شرح ریخت‌شناسی جدایه‌هایی پرداخته شده که دارای اندام قارچی قابل بررسی بودند و در هر مورد بحث مربوطه در ذیل شرح گونه آمده است. در مورد جدایه‌هایی که اندام باردهی قابل بررسی روی برگ و میوه نداشتند، مقایسه بین ابعاد و شکل کنیدیوم و طول زایده فوقانی از روی محیط کشت PNA به همراه مقایسه توالی ناحیه ژنی ITS آن‌ها با توالی‌های موجود در بانک ژن انجام شده است.

نکته قابل ذکر در مورد استفاده از کلید مندرج در مونوگراف ون‌در آ (۱۹۷۳) این است که این کلید تنها دربرگیرنده ۴۶ گونه از این جنس است و در بازبینی ون‌در آ و وانف (۲۰۰۲) نیز علی‌رغم ذکر نام حدود ۱۵۰ اپیتت، کلید جدیدی برای آن‌ها نوشته نشده است. استفاده از این کلید قدیمی در برخی موارد، نه تنها راهگشا نبوده، بلکه موجب بروز سردرگمی در تشخیص گونه نیز می‌شود. بنابراین، روش اصلی به کار گرفته شده در این مطالعه در کنار استفاده از کلید ریخت‌شناسی، مقایسه شرح گونه‌های گزارش شده از هر میزبان (در صورت وجود) با شرح جدایه مورد نظر است.

جمع‌آوری نمونه‌ها در استان گیلان از تابستان ۱۳۹۳ آغاز و تا زمستان ادامه یافت. نمونه‌برداری از برگ‌ها و میوه‌های دارای علائم صورت گرفت. شهرها به گونه‌ای انتخاب شدند تا تمام سطح استان را پوشش دهند. مناطقی از رشت، رودسر، رحیم آباد، لنگرود، لاهیجان، سیاهکل، دیلمان، شفت، فومن، صومعه‌سرا، رضوانشهر، پره‌سر، تالش، حویق، منجیل و توابع آن‌ها، همچنین، جنگل‌های سراوان و گیسوم و امامزاده ابراهیم شفت مورد بررسی قرار گرفت. بالغ بر ۳۰۰ نمونه در این مدت جمع‌آوری و برای بررسی به آزمایشگاه قارچ‌شناسی گروه گیاه‌پزشکی انتقال داده شد.

- کشت، جداسازی و خالص‌سازی قارچ‌ها

در صورت مشاهده پیکنیدیوم‌های *Phyllosticta* برگ یا میوه مورد نظر برای کشت آماده شد؛ به این ترتیب که برش‌های کوچکی به ابعاد 0.5×0.5 سانتی‌متر از مرز بین بافت آلوده و بافت سالم برگ تهیه شد. این برش‌ها به مدت پنج دقیقه (یا بیشتر برای بافت‌های ضخیم) در محلول هیپوکلریت سدیم ۰.۵ درصد قرار داده شدند. سپس این برش‌ها در آب مقطر استریل آبکشی شده و برای خشک شدن روی قطعات کاغذ صافی استریل قرار داده شدند. قطعات گیاهی سپس روی محیط کشت سیب‌زمینی-دکستروز-آگار (PDA) قرار داده شده و هر روز بررسی شدند. در مورد میوه‌هایی که در سطح پوست آن‌ها لکه وجود داشت، با سوزن استریل قطعه کوچکی از بافت میوه در مرز بین بخش سالم و آلوده برداشته و به محیط کشت انتقال داده شد. در صورت مشاهده پرگنه *Phyllosticta* قسمتی از حاشیه پرگنه که میسلیوم‌های آن در حال رشد بودند انتخاب و به تشتک پتری دیگری منتقل شد (van der Aa 1973).

به منظور خالص‌سازی پرگنه‌های در حال رشد، پس از شروع هاگ‌زایی، با سوزن استریل یک قطره اسپوری از دهانه یک پیکنیدیوم برداشته شد و به صورت خطی روی محیط کشت دیگری کشت داده شد. پرگنه حاصل پس از رشد به عنوان پرگنه خالص نگهداری و مطالعات بعدی روی آن صورت گرفت. دمای نگهداری جدایه‌ها ۲۰ درجه سلسیوس و شرایط نوری آن‌ها، ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی بود (van der Aa 1973).

علاوه‌براین، برای مقایسه ریخت‌شناسی گونه با برخی گونه‌هایی که شرح آن‌ها از روی محیط کشت برگ کاج-آگار (PNA) موجود بود، تمامی جدایه‌ها روی این محیط، کشت داده

رشد روی محیط PDA بررسی شدند. پس از حدود دو تا سه هفته، هاگ‌زایی آغاز شد. در این هنگام، به کمک سوزن سترون، یک قطره هاگ از دهانه یک پیکنیدیوم برداشته و به میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری سترون حاوی ۱۵۰ میکرولیتر محلول چلکس ۰.۵٪ منتقل شد. سپس میکروتیوب‌ها در دمای ۵۶ درجه سلسیوس به مدت حداقل یک ساعت نگهداری شدند. پس از آن، میکروتیوب‌ها در آب در حال جوش قرار گرفتند و به مدت ۱۲-۱۰ ثانیه با دستگاه شیکر به آرامی تکان داده شدند و این مرحله دو بار تکرار شد. میکروتیوب‌ها سپس به مدت پنج دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس و با ۱۵۰۰g سانتریفیوژ شدند تا DNA در فاز محلول رویی از ماده چلکس و سایر بقایای قارچی جدا شود. فاز رویی به آرامی به میکروتیوب سترون جدید منتقل شده و پس از کدگذاری، تا انجام مراحل بعدی مطالعات مولکولی در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد (Hirata & Takamatsu 1996, Walsh *et al.* 1991).

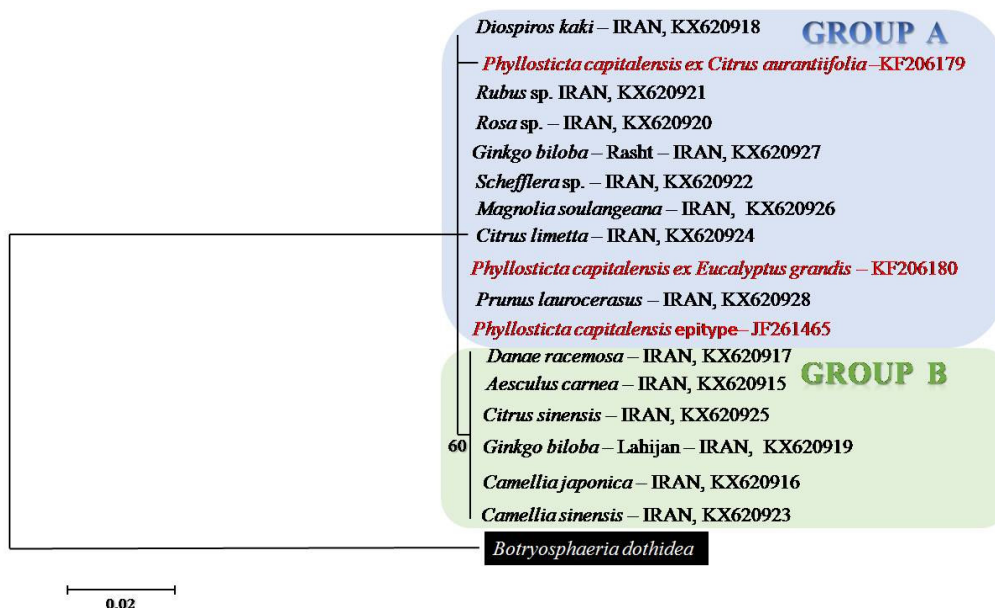
تکثیر ناحیه ITS شامل ITS1، ITS2 و 5.8S، قطعه 5'-TCC GTA GGT (با توالی 3'-GAA CCT GCG G-5' و 3'-TCC TCC GCT (با توالی 3'-TAT TGA TAT GC-3' مطابق روشی که قبلاً شرح داده شده است انجام شد (Khodaparast *et al.* 2012) و محصول PCR جدایه‌ها به منظور تعیین توالی به شرکت بیونیر (کره جنوبی) ارسال گردید. توالی به دست آمده به صورت چشمی و دستی بازبینی و ویرایش و با شماره‌های KX620915-KX620928 در بانک ژن ثبت شدند (شکل ۱). توالی‌های به دست آمده همراه با تعدادی از توالی‌های موجود در بانک ژن با کمک نرم‌افزار Genedoc رج‌بندی شدند (Nicholas & Nicholas 1997). تجزیه و تحلیل داده‌ها در نرم‌افزار MEGA5 (Tamura *et al.* 2011) با استفاده از Maximum Likelihood انجام شد. در روش Maximum Likelihood، فاصله تکاملی با استفاده از روش Kimura-2-parameter محاسبه گردید (Kimura 1980). تبارناما(ها)ی اولیه با اعمال الگوریتم Neighbor-Joining و روش Maximum Composite Likelihood (MCL) به دست آمد و توپولوژی دارای بیشترین ارزش درست‌نمایی انتخاب شد. تمام موقعیت‌های مبهم نیز از جفت توالی‌ها حذف شدند (گزینه Complete deletion). آزمون بوت‌استرپ با ۱۰۰۰ تکرار انجام شد (Felsenstein 1985). در این آنالیز فیلوژنتیک، قارچ *Botryosphaeria dothidea* به عنوان گروه خارجی در نظر گرفته شد.

- تهیه عکس‌ها و رسم شکل‌ها
از تمام برگ‌های آلوده، نمای استریومیکروسکوپی اندام باردهی قارچ، همچنین ریخت‌شناسی پرگنه روی محیط کشت‌های مختلف با دوربین دیجیتال عکس‌برداری شد. کلیه عکس‌های میکروسکوپی پیکنیدیوم، آسکوکارپ و اسپرموگونیم با استفاده از دوربین دیجیتال متصل به میکروسکوپ نوری موجود در آزمایشگاه قارچ‌شناسی تهیه شد. شکل کنیدیوم‌ها، سلول‌های کنیدیوم‌زا، آسک و آسکوسپورها و همچنین اسپرماتی‌ها به کمک نرم‌افزار CorelDRAW®X7 در دمای ۲۴ ساعت برای تحریک جوانه‌زنی قارچ در تاریکی و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس، در داخل محیط مرطوب قرار گرفتند و پس از آن در دمای اتاق نگهداری شدند. میوه خرمالو در ابتدا با اتانول ۵۰٪ ضدعفونی سطحی شد. سپس قطعاتی از پرگنه قارچ روی سطح میوه و در داخل بافت میوه قرار داده شد و با پارافیلیم روی آن‌ها پوشانده شد. میوه‌ها نیز در داخل محیط مرطوب، به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سلسیوس و سپس در دمای اتاق نگهداری شدند. تعدادی از برگ‌های جوان و درحال رشد بوته گیاه همیشه با سوسپانسیون هاگ، هاگ‌پاشی شد و به منظور تامین رطوبت مورد نیاز برای رشد قارچ، با یک پلاستیک شفاف روی برگ‌های هاگ‌پاشی شده پوشانده شد. بوته مذکور در گلخانه شیشه‌ای با دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شد (Wikee *et al.* 2013a).

- آزمون بیماری‌زایی
برگ‌های سالم سه میزبان (پرتقال، لیمو شیرین و تمشک) به همراه بوته گیاه همیشه و میوه سالم خرمالو برای آزمون بیماری‌زایی انتخاب شد. برگ‌های پرتقال، لیمو شیرین و تمشک، پس از ضدعفونی سطحی با اتانول ۵۰٪ و هوا خشک شدن، با سوزن سترون خراش داده شدند. قطعاتی از پرگنه قارچ روی زخم‌ها و همچنین روی برگ‌های فاقد زخم قرار داده شد و برگ‌ها به مدت ۲۴ ساعت برای تحریک جوانه‌زنی قارچ در تاریکی و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس، در داخل محیط مرطوب قرار گرفتند و پس از آن در دمای اتاق نگهداری شدند. میوه خرمالو در ابتدا با اتانول ۵۰٪ ضدعفونی سطحی شد. سپس قطعاتی از پرگنه قارچ روی سطح میوه و در داخل بافت میوه قرار داده شد و با پارافیلیم روی آن‌ها پوشانده شد. میوه‌ها نیز در داخل محیط مرطوب، به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سلسیوس و سپس در دمای اتاق نگهداری شدند. تعدادی از برگ‌های جوان و درحال رشد بوته گیاه همیشه با سوسپانسیون هاگ، هاگ‌پاشی شد و به منظور تامین رطوبت مورد نیاز برای رشد قارچ، با یک پلاستیک شفاف روی برگ‌های هاگ‌پاشی شده پوشانده شد. بوته مذکور در گلخانه شیشه‌ای با دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شد (Wikee *et al.* 2013a).

در همه موارد، از آب مقطر سترون به عنوان تیمار شاهد استفاده شد و نمونه‌ها هر روز بررسی شدند. پس از گذشت دو هفته، جدایه‌های دارای علائم به عنوان بیماری‌زا و جدایه‌های فاقد علائم به عنوان غیربیماری‌زا در نظر گرفته شدند (Wikee *et al.* 2013a).

- توالی‌یابی ناحیه ITS و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک
برای استخراج DNA، ابتدا پرگنه‌های خالص در حال



شکل ۱- درخت فیلوژنتیکی رسم شده مبتنی بر ناحیه ژنی ITS به روش Maximum likelihood توسط نرم‌افزار MEGA 5.2. در این درخت، نام میزبان و شماره دسترسی بانک ژن به نمایندگی از هر جدایه نشان داده شده است. همچنین، قارچ *Botryosphaeria dothidea* به عنوان گروه خارجی در نظر گرفته شده است. عدد روی انشعاب‌ها نشان‌دهنده ارزش بوت‌استرپ با ۱۰۰۰ تکرار است. طول شاخه‌ها در این درخت نمایانگر تعداد جانشینی به ازای هر جایگاه است که در مقیاس نشان داده شده است. تفاوت بین دو گروه تنها ناشی از یک جانشینی بین دو باز T (گروه A) و G (گروه B) است.

Fig. 1. Maximum Likelihood phylogenetic tree obtained from the ITS sequence data. Bootstrap support values from 1000 replicates are shown at the nodes. The tree is rooted to *Botryosphaeria dothidea* (Bar indicates 0.02 substitutions per site). Difference between Group A and Group B is due to a substitution of T (Group A) for G (Group B).

نتیجه و بحث

ژن به آنالیز فیلوژنتیک، جایگاه گونه‌ها، بویژه گونه *P. capitalensis* دستخوش تغییر شد (Glienke *et al.* 2011). موقعیت گونه‌های پنهان درون این کمپلکس، تا قبل از ۲۰۱۳ بر همگان پوشیده بود، به طوری که گلینک و همکاران (۲۰۱۱) آنالیز فیلوژنتیکی مبتنی بر چهار ژن ITS، ACT، TEF و GPDH انجام دادند و اعلام کردند که علی‌رغم استفاده از چهار ژن، باز هم درون کلادی که به عنوان *P. capitalensis* معرفی کردند، تفاوت‌های ریخت‌شناسی وجود دارد (Glienke *et al.* 2011). در جدیدترین تحقیقی که به منظور بازبینی فیلوژنتیکی جنس *Phyllosticta* انجام شد (Wikee *et al.* 2013a)، دو آنالیز روی اعضای این جنس صورت گرفت: آنالیز اول مبتنی بر پنج ژن (ITS، LSU، ACT، TEF، GPDH) و آنالیز دوم مبتنی بر دو ژن (ITS و ACT) انجام شد. نتیجه کار، برابری ارزش آنالیز دو ژنی در برابر آنالیز پنج ژنی بود. البته استثنایی هم در این مورد وجود داشت و آن هم درباره گونه‌هایی بود که ارتباط نزدیکی با *P. capitalensis* داشتند و هنوز این ژن‌ها قادر به حل مشکلات تاکسونومیک پیچیده داخل این گونه نبوده‌اند (Wikee *et al.* 2013b). بنابراین، تنها راهی که امروزه برای تشخیص دقیق

- توالی‌یابی ناحیه ITS و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک همان‌گونه که در شکل ۱ مشخص شده است، جدایه‌های مورد مطالعه به دو گروه تقسیم می‌شوند. این گروه‌بندی به دلیل یک جانشینی بین دو باز T و G صورت گرفته است. در گروه A که جدایه تیپ و جدایه‌های معتبر به عنوان *Phyllosticta capitalensis* نیز در آن قرار دارند، ژنگاه مورد نظر دارای باز T و در گروه B دارای باز G است. جدایه‌های داخل هر دو گروه دارای تفاوت‌های ریخت‌شناسی هستند که در قسمت مربوط به نتایج به صورت مبسوط شرح داده شده است. *P. capitalensis* یک گونه کمپلکس با دامنه میزبانی وسیع و پراکندگی جغرافیایی گسترده است که علاوه بر بیماری‌زا بودن، به معروف‌ترین گونه اندوفیت جنس *Phyllosticta* نیز شهرت دارد. برای شناسایی این گونه به روش مولکولی، تاکنون تحقیقات بسیاری انجام شده است، از فیلوژنی مبتنی بر ITS تا فیلوژنی مبتنی بر سه تا پنج ژن (Wikee *et al.* 2013a,b, Glienke *et al.* 2011). همان‌گونه که در مقدمه اشاره شد، منابعی که تنها بر پایه ناحیه ژنی ITS به تفکیک گونه‌ها پرداختند باید با احتیاط تفسیر شوند، زیرا با گذشت زمان آشکار شد که با اضافه شدن هر

کلیدهای تشخیصی فعلی تقریباً غیرممکن بوده و به شدت وابسته به توالی‌یابی گاهی تا بیش از پنج ژن است. با پرهیز از انتخاب نام گونه از ایجاد آشفتگی بیشتر در مورد تاکسونومی این جنس در ایران جلوگیری کرده و امکان تشخیص دقیق گونه‌ها براساس توالی‌یابی ژن‌های بیشتر برای محققان در آینده فراهم خواهد آمد.

Phyllosticta sp. on *Aesculus carnea*

علایم به صورت لکه‌های قهوه‌ای با حاشیه زرد است که معمولاً از حاشیه شروع می‌شوند و ممکن است به هم بپیوندند و سطح وسیعی از برگ را بپوشانند. پیکنیدیوم‌ها روی سطح بالایی برگ تشکیل می‌شوند، کروی و کم و بیش در بالا تخت شده هستند، قطر آن‌ها ۷۵-۱۱۴ (۴۸) میکرومتر است و دارای دهانه‌ای به قطر ۲۳-۱۸ میکرومتر هستند که با روزنه‌ای به قطر ۵ میکرومتر باز می‌شود. دیواره دارای ۳-۲ لایه سلولی است که ۱۵-۱۰ میکرومتر ضخامت دارد و از سلول‌های قهوه‌ای با اشکال نامنظم تا گاهی تخت تشکیل شده است. سلول کنیدیوم‌ها استوانه‌ای و به ابعاد $3-1/5 \times 23-16$ (۱۳) میکرومتر می‌باشد. کنیدیوم‌ها واژتخم‌مرغی و استوانه‌ای و به ابعاد $7-5 \times 13-9$ میکرومتر هستند که توسط یک لایه ژلاتینی احاطه می‌شوند و معمولاً قطرات چربی مشخصی دارند، دارای زائده فوقانی به ابعاد ۹-۴ میکرومتر هستند که گاهی ممکن است ابعاد آن از طول کنیدیوم نیز بیشتر شود (شکل ۲).

پرگنه قارچ روی محیط کشت PDA لوب‌دار سبز مایل به سیاه با حاشیه قهوه‌ای مایل به سیاه بوده، قطر پرگنه بعد از ۱۴ روز، به $5/5-5$ سانتی‌متر و قطر حاشیه میسلیمی آن، به ۲-۱ میلی‌متر می‌رسد.

نمونه بررسی شده: استان گیلان، لاهیجان، روی *Aesculus carnea* (شاه‌بلوط هندی سرخ)، ۹۳/۶/۳۰، حمیده دارسرای (GUMC211).

تاکنون تنها یک گونه، یعنی *P. sphaeropsoides* از روی این میزبان در ایران گزارش شده است. این گونه نسبت به جدایه مورد بررسی، دارای سلول‌های کنیدیوم‌زای کوچک‌تر ($5/3-2 \times 10-5$ میکرومتر) و کنیدیوم‌های بزرگ‌تر ($13-9 \times 20-10$ میکرومتر)، همچنین زائده فوقانی کوتاه‌تری ($5/7-6$ میکرومتر) است. همچنین، جدایه مورد بررسی دارای پیکنیدیوم کوچک‌تر، سلول کنیدیوم‌زای طولی‌تر و زائده فوقانی کوتاه‌تری نسبت به *P. capitalensis* می‌باشد.

این جدایه در ژنگاه مورد نظر دارای باز G بوده در گروه B قرار می‌گیرد. با توجه به این نتایج، گونه مورد بررسی با گونه

گونه‌های پنهان درون گونه کمپلکس *P. capitalensis* پیش روی ما است، استفاده از آنالیز فیلوژنتیک حداقل پنج ژن فوق می‌باشد.

- نتایج آزمون بیماری‌زایی

در هیچ موردی بعد از مایه‌زنی برگ‌ها یا میوه‌ها با جدایه‌های این قارچ در آزمایشگاه علایمی ظاهر نشد. این موضوع، احتمالاً ماهیت اندوفیتی حداقل بخشی از جدایه‌ها را تأیید می‌کند، زیرا برخی از آن‌ها از لکه برگ‌ها، برخی از آلودگی‌های مخلوط و بعضی دیگر از برگ‌های ریخته روی زمین جدا شده بودند. در این مورد، می‌توان گفت با توجه به تغییرات اقلیمی و روند افزایش دما که در سال‌های اخیر با آن مواجه هستیم، رشد روزافزون قارچ‌های اندوفیت به دلیل تنش خشکی دور از انتظار نخواهد بود. با مراجعه به مقالات مربوط به *P. capitalensis* آشکار می‌شود که در تمام آزمون‌هایی بیماری‌زایی که صورت گرفته، هیچ عفونتی در برگ‌های سالم دیده نشده و نتیجه‌ای که حاصل شد این بود که این اندوفیت موجب بروز بیماری روی میزبان‌های سالم و استرس ندیده نمی‌شود (Wikee et al. 2013a). چنین نتیجه‌ای، می‌تواند ارتباط نزدیک حداقل برخی از جدایه‌ها را با گونه *P. capitalensis* که مشهورترین اندوفیت در بین گونه‌های *Phyllosticta* است را تأیید کند. از طرف دیگر، وجود لکه برگ‌های متعدد همراه با این قارچ و عدم بیماری‌زایی آن در شرایط آزمایشگاهی ممکن است دلیل بر پیچیده بودن ماهیت بیماری‌زایی این قارچ باشد.

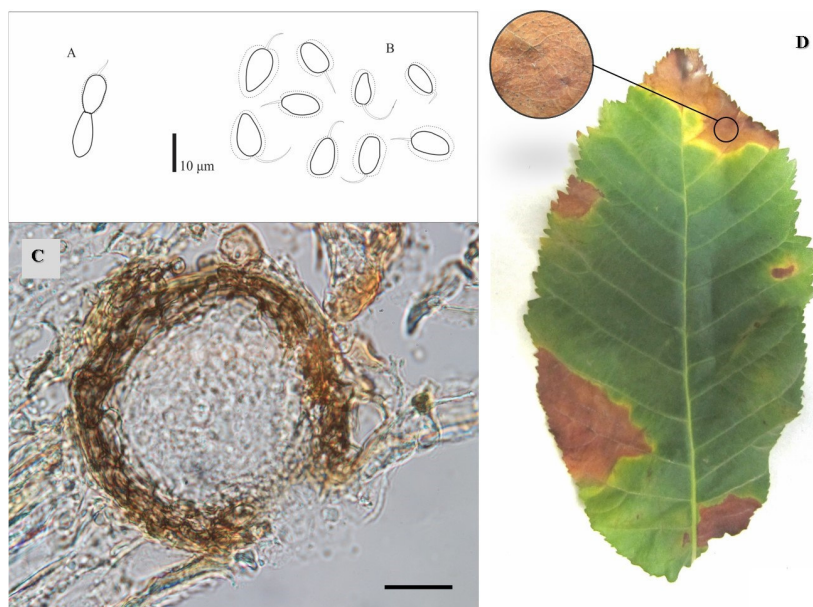
نکته قابل ذکر در مورد این قارچ این است که علایم مشروح روی برگ‌ها و میوه‌هایی که به عنوان نمونه جمع‌آوری شده‌اند را نمی‌توان با اطمینان به *Phyllosticta* نسبت داد، زیرا ممکن است قارچ‌های دیگری باعث ضعف شدن میزبان و بروز لکه شده باشد و *Phyllosticta* پس از آن، روی گیاه رشد کرده باشد و یا در اثر بروز تنش خشکی در گیاهان، ممکن است گونه‌های اندوفیت *Phyllosticta* که از قبل روی میزبان وجود داشتند ولی فاقد علایم بودند، ماهیت پاتوژنی پیدا کرده و خود باعث بروز لکه در میزبان شده باشند.

- نتایج مطالعات ریخت‌شناسی

در این بخش، هر جدایه با گونه‌های گزارش شده از روی آن میزبان، همچنین با گونه *P. capitalensis* مقایسه شده است. از انتخاب نام گونه برای نمونه‌های ایرانی در بسیاری از موارد فعلاً اجتناب شده است، زیرا امکان تشخیص گونه‌ها براساس

ژن‌های بیشتری ضروری به نظر می‌رسد. از طرف دیگر، به دلیل عدم دسترسی به نمونه‌ای که قبلاً از ایران با نام *P. sphaerospoidea* گزارش شده است، قضاوت در مورد یکسان بودن گزارش قدیمی با نمونه بررسی شده در این مطالعه غیرممکن است.

رایج روی این میزبان، یعنی *P. sphaerospoidea* (تنها گونه‌ای که تاکنون از این میزبان گزارش شده است) متفاوت بوده و احتمالاً گونه جدید یا نزدیک به یکی از گونه‌های موجود است. با توجه به نقش توالی‌یابی ژن‌های مختلف در تعیین تکلیف گونه‌های جنس *Phyllosticta* برای تشخیص نهایی، توالی‌یابی



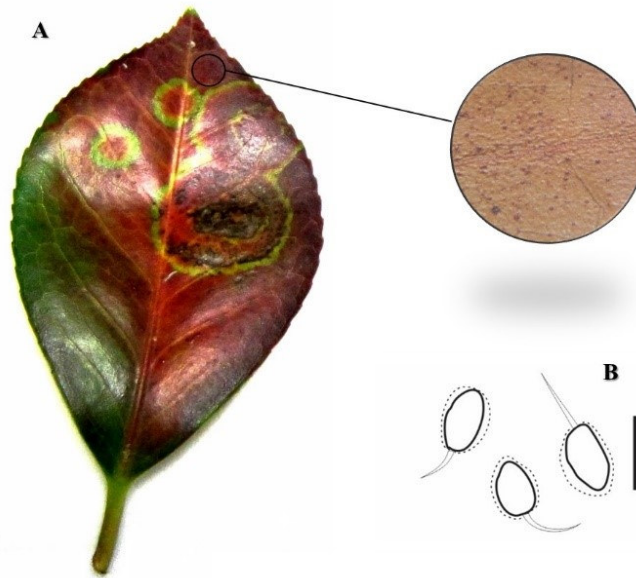
شکل ۲- *Phyllosticta* sp. on *Aesculus carnea*: A. سلول کنیدیوم‌زا، B. کنیدیوم‌ها، C. برش عرضی پیکنیدیوم، D. تصویر استریومیکروسکوپی پیکنیدیوم‌های قارچ به همراه علائم احتمالی قارچ روی برگ شاه‌بلوط هندی (مقیاس برای A و B = ۱۰ میکرومتر و برای C = ۲۰ میکرومتر).

Fig. 2. *Phyllosticta* sp. on *Aesculus carnea*: A. Conidiogenous cell, B. Conidia, C. Cross section through pycnidium, D. A symptomatic leaf of host (Bars for A and B = 10 µm and for C = 20 µm).

Phyllosticta sp. on *Camellia japonica*

به دلیل نارس بودن اندام‌های باردهی روی برگ، به برخی ویژگی‌های این جدایه روی محیط کشت‌های مختلف اشاره می‌شود. پرگنه روی محیط کشت PDA لوب‌دار، سبز تیره با حاشیه سبز زیتونی بوده، پس از ۱۴ روز قطر پرگنه ۴-۶/۵ سانتی‌متر و قطر حاشیه میسلیمی، ۱ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. روی محیط کشت PNA قطر پیکنیدیوم‌ها حدود ۷۵-۱۰۰ میکرومتر است. ابعاد کنیدیوم‌ها ۹/۵-۱۲ × ۵-۷ میکرومتر و طول زائده فوقانی ۷-۱۲ میکرومتر است. در کشت‌های کهنه و قدیمی، کلامیدوسپور تشکیل می‌شود (شکل ۳). نمونه بررسی شده: استان گیلان، لاهیجان، روی *Camellia japonica* (کاملیا)، ۹۳/۷/۱۰، حمیده دارسرای (GUMC207). این جدایه در ژنگاه مورد نظر دارای باز G بوده و در گروه B قرار می‌گیرد.

به دلیل نارس بودن اندام‌های باردهی روی برگ، به برخی ویژگی‌های این جدایه روی محیط کشت‌های مختلف اشاره می‌شود. پرگنه روی محیط کشت PDA لوب‌دار، سبز تیره با حاشیه سبز زیتونی بوده، پس از ۱۴ روز قطر پرگنه ۴-۶/۵ سانتی‌متر و قطر حاشیه میسلیمی، ۱ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. روی محیط کشت PNA قطر پیکنیدیوم‌ها حدود ۷۵-۱۰۰ میکرومتر است.



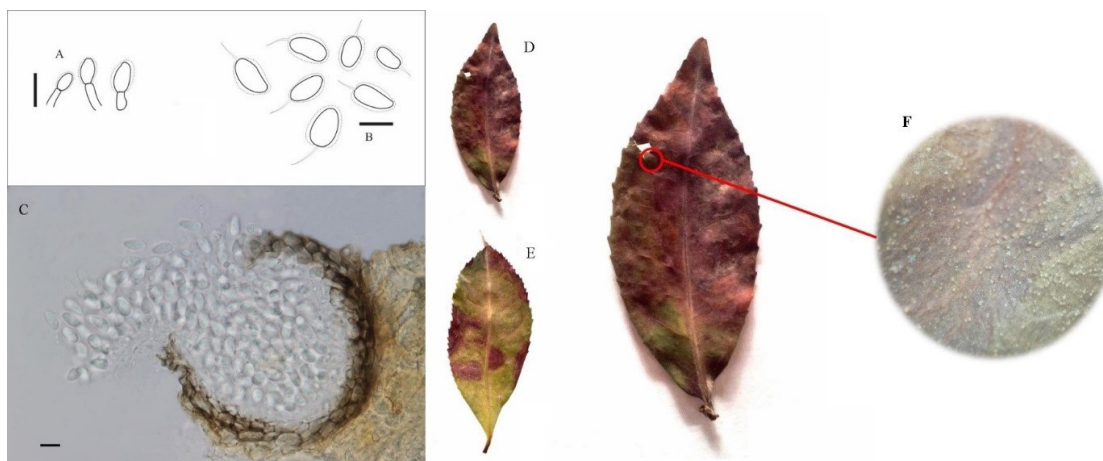
شکل ۳- *Phyllosticta* sp. on *Camellia japonica*: A. علائم روی برگ، B. کنیدیوم‌های قارچ روی محیط کشت PNA (مقیاس = ۱۰ میکرومتر).
 Fig. 3. *Phyllosticta* sp. on *Camellia japonica*: A. A symptomatic leaf of host, B. Conidia on PNA (Bar = 10 μ m).

۴/۵-۶/۵ سانتی‌متر و قطر حاشیه میسلیومی ۰/۵-۲ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. پیکنیدیوم‌های کشیده و طولیل‌شده پس از چهار هفته به وضوح در حاشیه پرگنه دیده می‌شوند. نمونه بررسی شده: استان گیلان، امیرکلا، روی *Camellia sinensis* (چای)، ۹۳/۵/۲۱، حمیده دارسرایی (GUMC209). با توجه به بازبینی گونه‌های شرح داده شده در جنس *Phyllostictina* (van der Aa 1973)، این جدایه به گونه *Phyllosticta theacearum* Aa تعلق دارد.

مقایسه این جدایه با *P. capitalensis* نشان داد که این جدایه پیکنیدیوم کوچک‌تر و زائده فوقانی کوتاه‌تر نسبت به آن دارد، همچنین، دارای محدوده متفاوتی در ابعاد کنیدیوم‌ها می‌باشد (۱۰-۱۳ در برابر ۸-۱۵)، در این جدایه هیچ کنیدیومی کوتاه‌تر از ۱۰ میکرومتر و بلندتر از ۱۳ میکرومتر مشاهده نشد. علاوه بر تفاوت در ریخت‌شناسی، این جدایه از نظر مولکولی نیز در گروه دیگری نسبت به *P. capitalensis* قرار می‌گیرد و در ژنگاه مذکور دارای باز G می‌باشد.

Phyllosticta theacearum Aa, Stud. Mycol. 5: 97 (1973)
 علائم به صورت لکه‌های نکروتیک قرمز-قهوه‌ای تا قهوه‌ای تیره است که از حاشیه برگ شروع می‌شوند و ممکن است به هم پیوسته و تمام سطح برگ را بپوشانند. پیکنیدیوم‌ها در سطح بالایی برگ تشکیل می‌شوند، کروی بوده و در بالا تخت شده‌اند، قطر آن‌ها ۸۰-۱۲۰ میکرومتر است و دارای دهانه‌ای به قطر ۱۱-۱۵ میکرومتر هستند. دیواره دارای ۲-۳ لایه سلولی به ضخامت ۱۰-۱۷ میکرومتر است و از سلول‌های فشرده قهوه‌ای با اشکال نامنظم تشکیل شده که در اطراف دهانه کم و بیش روشن‌تر می‌شوند. سلول‌های کنیدیوم‌ها استوانه‌ای کوتاه به ابعاد $2-3 \times 5-6$ میکرومتر هستند. کنیدیوم‌ها یک‌سلولی، بی‌رنگ، واژتخم‌مرغی و بیضوی و به ابعاد $6-7 \times 10-13$ میکرومتر هستند و توسط یک غلاف ژلاتینی احاطه می‌شوند، ظاهر دانه‌دانه داشته یا دارای چندین قطره چربی هستند، یک زائده فوقانی به طول ۶-۷ میکرومتر نیز روی کنیدیوم دیده می‌شود (شکل ۴).

پرگنه روی محیط کشت PDA لوب‌دار سبز تیره با حاشیه‌های سبز زیتونی بوده، قطر پرگنه پس از ۱۴ روز



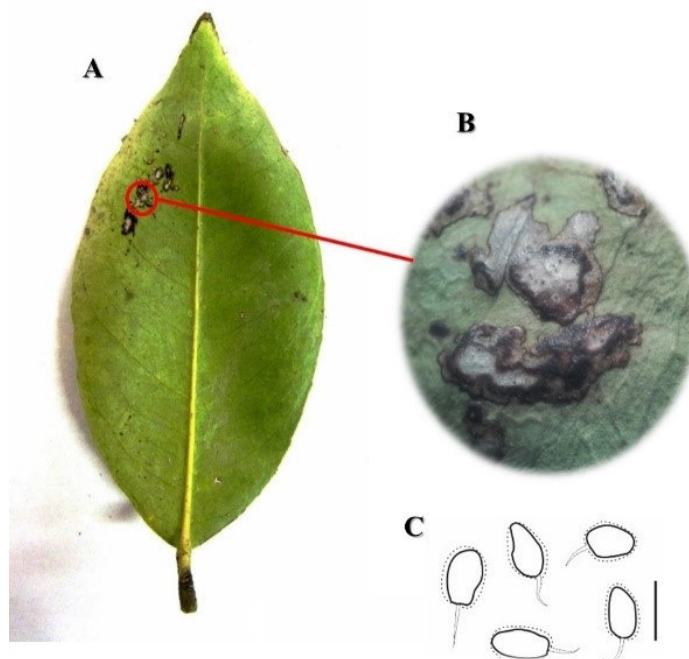
شکل ۴- *Phyllosticta theacearum*: A. سلول کنیدیوم‌زا، B. کنیدیوم‌ها، C. برش عرضی پیکنیدیوم (مقیاس = ۱۰ میکرومتر)، D و E. علائم روی میزبان، F. پیکنیدیوم‌های قارچ روی برگ چای.

Fig. 4. *Phyllosticta theacearum*: A. Conidiogenous cell, B. Conidia, C. Cross section through pycnidium (Bars = 10 μ m), D and E. Symptomatic leaves of *Camellia sinensis*, F. Close-up of pycnidium on leaf.

Phyllosticta* sp. on *Citrus limetta

PNA، ۱۲-۹ \times ۵/۵-۷/۵ میکرومتر و طول زائیده فوقانی ۱۰-۵ میکرومتر اندازه‌گیری شد (شکل ۵).
 نمونه بررسی شده: استان گیلان، حویق، روی *Citrus limetta* (لیموشیرین)، ۹۳/۸/۲۲، حمیده دارسرای (GUMC212).
 این جدایه در ژنگاه مورد نظر دارای باز T بوده و در گروه A و در کنار جدایه تیپ *P. capitalensis* قرار می‌گیرد.

به دلیل نارس بودن اندام باردهی روی برگ، ویژگی‌های این جدایه روی محیط کشت‌های مختلف بررسی شد. پرگنه روی محیط کشت PDA لوب‌دار سبز تیره با حاشیه سبز متمایل به خاکستری بوده و قطر پرگنه پس از ۱۴ روز ۵/۵-۵ سانتی‌متر و قطر حاشیه میسلیمی ۱-۲ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. پیکنیدیوم‌های کشیده و طولیل شده پس از چهار هفته در حاشیه پرگنه دیده می‌شوند. ابعاد کنیدیوم روی محیط کشت



شکل ۵- *Phyllosticta* sp. on *Citrus limetta*: A. لکه همراه با قارچ روی لیموشیرین، B. تصویر استریومیکروسکوپی پیکنیدیوم‌ها در پشت برگ، C. کنیدیوم‌های قارچ روی محیط کشت PNA (مقیاس = ۱۰ میکرومتر).

Fig. 5. *Phyllosticta* sp. on *Citrus limetta*: A. A symptomatic leaf of host, B. Close-up of pycnidium on back of the leaf, C. Conidia on PNA (Bar = 10 μ m).

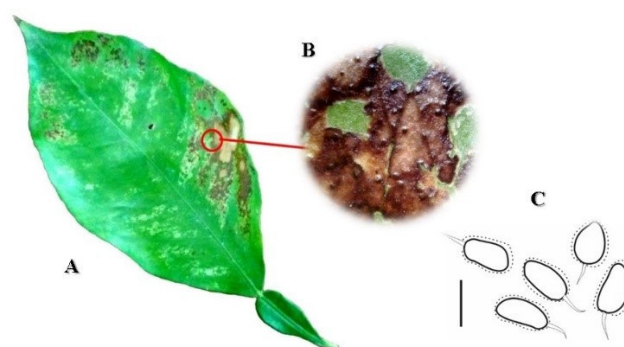
Phyllosticta* sp. on *Citrus sinensis

میکرومتر، اسپرماتی ۷-۵ × ۱/۵-۱ میکرومتر، آسک‌ها در حدود ۸۹-۶۸ × ۱۱-۱۰ و آسکوسپور ۱۰-۵/۵ میکرومتر اندازه‌گیری شد (شکل ۶).

نمونه بررسی شده: استان گیلان، لنگرود، پرش کوه، روی *Citrus sinensis* (پرتقال)، ۹۳/۶/۲۶، حمیده دارسرایی (GUMC206).

این جدایه در ژنگاه مورد نظر دارای باز G بوده و در گروه B قرار می‌گیرد.

با توجه به نارس و اندک بودن اندام‌های باردهی روی برگ، مشخصات این جدایه روی محیط کشت‌های مختلف بررسی شد. پرگنه روی محیط کشت PDA، لوب‌دار سبز تیره با حاشیه سبز متمایل به سیاه بوده، قطر پرگنه پس از ۱۴ روز ۳/۵-۴/۵ سانتی‌متر و قطر حاشیه میسلومی ۱-۰/۵ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. ابعاد پیکنیدیوم روی محیط کشت PNA، ۱۰۰-۷۵ میکرومتر، کنیدیوم ۱۲-۷ × ۶-۵ میکرومتر، طول زایده فوقانی (۱۳) ۱۰-۵(۳) میکرومتر، سلول اسپرماتی‌زا ۱۲-۸ × ۴-۵



شکل ۶- *Phyllosticta* sp. on *Citrus sinensis*: A و B. تغییر بافت برگ همراه با قارچ در پرتقال، C. کنیدیوم‌های قارچ روی محیط کشت PNA (مقیاس = ۱۰ میکرومتر).

Fig. 6. *Phyllosticta* sp. on *Citrus sinensis*: A and B. A symptomatic leaf of host, C. Conidia on PNA (Bar = 10 μ m).

Phyllosticta* sp. on *Danae racemosa

فرم جنسی قارچ نیز از روی برگ زنده در آبان ماه مشاهده شد. در این مرحله، آسکوکارپ‌ها بیضوی و به ابعاد ۱۱۳-۷۵ × ۱۳۸-۱۰۵ میکرومتر هستند. دیواره دارای ۲-۳ لایه سلولی، ضخیم و به رنگ قهوه‌ای تیره است که در ناحیه داخلی به رنگ قهوه‌ای روشن بوده و متشکل از سلول‌هایی با اشکال نامنظم می‌باشد. آسک‌ها دوجداره، چماقی شکل، با پایه تخت شده هستند که در قسمت بالایی کاملاً مدور هستند و یک ساقه پایه‌ای دارند و ابعاد آن‌ها نیز ۱۵-۱۳ × ۵۸-۲۵ میکرومتر است. آسکوسپورها یک‌سلولی، بی‌رنگ، گاهی با ظاهر دانه‌دانه، گلابی شکل، تخم‌مرغی تا کم و بیش بیضوی و به ابعاد ۹-۵ × ۱۷-۱۱ (۸) میکرومتر هستند (شکل ۷).

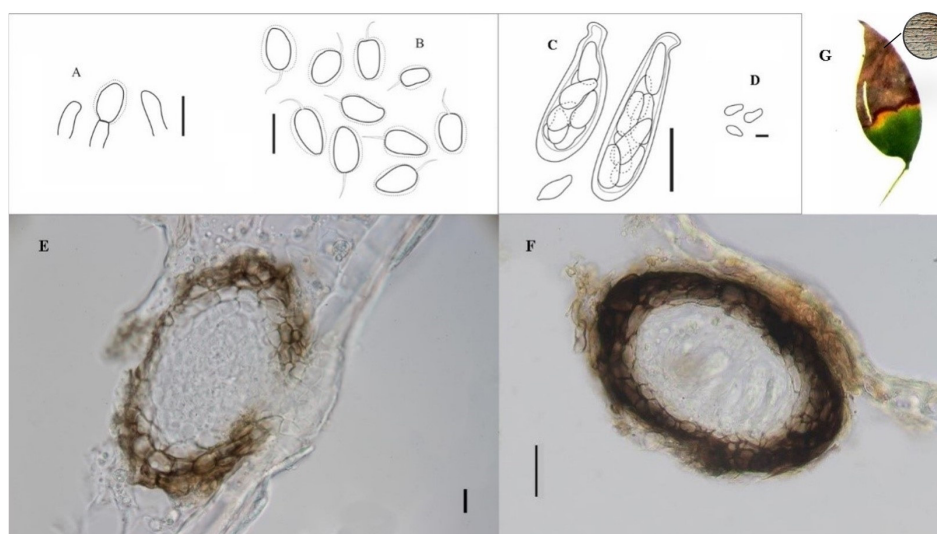
رنگ پرگنه روی محیط کشت PDA مشابه ایزوله‌های جدا شده از روی چای بوده، اما حاشیه آن کمی تیره‌تر است. قطر پرگنه بعد از دو هفته ۶-۴/۵ سانتی‌متر و قطر حاشیه میسلومی آن ۱-۰/۵ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. در این مورد نیز پیکنیدیوم‌های کشیده و طویل شده پس از چهار هفته به خوبی در حاشیه پرگنه دیده می‌شوند.

علایم به صورت لکه‌های نکروتیک است که از نوک برگ شرع شده و به تدریج به سمت حاشیه و مرکز رشد می‌کند و قسمت وسیعی از سطح برگ را در بر می‌گیرد. پیکنیدیوم‌ها روی سطح بالایی یا روی هر دو سطح برگ تشکیل می‌شوند، بیضوی یا نیمه‌کروی، به عرض (۱۲۵) ۸۵-۱۱۰ و ارتفاع ۶۰-۷۵ میکرومتر بوده که در بالا تخت شده و دهانه‌ای به قطر ۵/۵-۷ میکرومتر دارند. دیواره دارای ۲-۳ لایه سلولی به ضخامت ۸-۱۳ میکرومتر است و از سلول‌های قهوه‌ای روشن با اشکال نامنظم تشکیل شده که در نزدیکی دهانه بیشتر فشرده می‌شوند و در ناحیه کنیدیوم‌زایی روشن هستند. سلول‌های کنیدیوم‌زا استوانه‌ای کوتاه، ۳-۲ × ۸-۷ میکرومتر می‌باشند. کنیدیوم‌ها یک‌سلولی، بی‌رنگ، بیضوی، واژتخم‌مرغی تا حدودی کلیه‌ای شکل و به ابعاد ۸-۶ × ۱۳-۱۱ میکرومتر هستند که ظاهری دانه‌دانه داشته یا قطره چربی بزرگ در مرکز دارند، توسط یک لایه زلاتینی نازک احاطه شده و دارای زایده فوقانی به طول ۷-۵ میکرومتر هستند.

غیرجنسی و در نمونه برداری آبان ماه، فرم جنسی قارچ روی برگ زنده مشاهده شد.

شکل و ابعاد پیکنیدیوم، طول سلول کنیدیوم‌زا و ابعاد کنیدیوم و زایده فوقانی جدایه مورد نظر با *P. capitalensis* تفاوت دارد. همچنین، این جدایه از نظر مولکولی نیز در گروه B قرار گرفته و دارای باز G در ژنگاه مذکور است. به نظر می‌رسد، این گونه به دلیل ویژگی‌های خاص پیکنیدیوم، از سایر گونه‌های جنس *Phyllosticta* متفاوت بوده و احتمالاً یک گونه جدید است. با وجود این برای نهایی شدن این نتیجه حداقل دستیابی به توالی برخی از ژن‌ها ضرورت دارد.

نمونه بررسی شده: استان گیلان، لاهیجان، روی *Danae racemosa* (همیشک)، ۹۳/۶/۳۰ برای مرحله غیرجنسی و ۹۳/۸/۲۸ برای مرحله جنسی، حمیده دارسرای (GUMC202). تاکنون، تنها دو گزارش با عنوان *Phyllosticta* sp. از روی این میزبان، یکی از هلند و دیگری از ایتالیا، به ثبت رسیده است که هیچ‌کدام از آن‌ها شرحی به همراه ندارد. در هر دو مورد، قارچ از روی برگ‌های ریخته در حاشیه جاده و برگ‌های مرده جدا شده، در حالی که گونه حاضر هنگامی که برگ روی بوته بوده جدا شده است. در نمونه برداری شهریور ماه، فرم



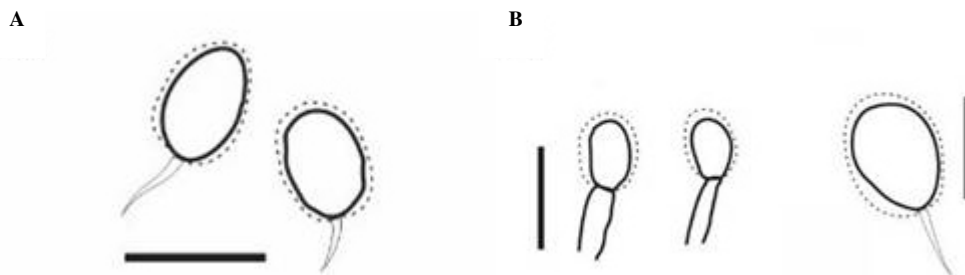
شکل ۷- *Phyllosticta* sp. on *Danae racemosa*: A. Conidiogeous cell, B. Conidia, C. Ascii and ascospore, D. Ascospores, E. برش عرضی پیکنیدیوم، F. برش عرضی آسکوکارپ، G. علائم احتمالی روی میزبان (بزرگنمایی A، B، C، E و F = 100X، بزرگنمایی D = 40X، مقیاس برای A، B، D، E و F = ۱۰ میکرومتر و برای C = ۲۰ میکرومتر).

Fig. 7. *Phyllosticta* sp. on *Danae racemosa*: A. Conidiogeous cell, B. Conidia, C. Ascii and ascospore, D. Ascospores, E. Cross section through pycnidium, F. Cross section through ascomata, G. A symptomatic leaf of host (Bars for A, B, D, E and F = 10 μ m and for C = 20 μ m).

Phyllosticta sp. on *Diospiros kaki*

این جدایه، از روی میوه خرمالو جداسازی شد. رنگ برگه روی محیط کشت PDA مانند ایزوله جداسازی شده از روی چای بود. قطر برگه پس از ۱۴ روز ۴/۵-۵ سانتی‌متر و قطر حاشیه میسلیمی ۱-۲ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. قطر پیکنیدیوم‌ها روی محیط کشت PNA، ۷۵-۱۲۵ میکرومتر، ابعاد کنیدیوم ۱۰-۱۳ × ۶-۸ میکرومتر و طول زایده A و در کنار جدایه تیپ *P. capitalensis* قرار می‌گیرد.

این جدایه، از روی میوه خرمالو جداسازی شد. رنگ برگه روی محیط کشت PDA مانند ایزوله جداسازی شده از روی چای بود. قطر برگه پس از ۱۴ روز ۴/۵-۵ سانتی‌متر و قطر حاشیه میسلیمی ۱-۲ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. قطر پیکنیدیوم‌ها روی محیط کشت PNA، ۷۵-۱۲۵ میکرومتر، ابعاد کنیدیوم ۱۰-۱۳ × ۶-۸ میکرومتر و طول زایده



شکل ۸- A: *Phyllosticta* sp. on *Diospyros* sp. کنیدیوم‌های قارچ روی محیط کشت PNA، B: *Phyllosticta* cf. *citricarpa* سلول کنیدیوم‌زا و کنیدیوم (مقیاس = ۱۰ میکرومتر).

Fig. 8. *Phyllosticta* sp. on *Diospyros* sp.: A. Conidia on PNA, B. *Phyllosticta* cf. *citricarpa* on *Citrus* sp.: Conidiogenous cell and conidia (Bars = 10 μ m).

Phyllosticta sp. on *Ginkgo biloba*

شرح اولیه *Phyllosticta ginkgo* که توسط بروناد نوشته شده بود (Brunaud 1886)، به یک گونه *Phoma*-مانند با هاگ‌هایی به ابعاد $2 \times 3-8/5$ میکرومتر اشاره دارد. از طرف دیگر، در کلید ریخت‌شناسی که توسط ون‌درآ (۱۹۷۳) نوشته شده، هیچ گونه‌ای از روی پیش‌پیدازادان آوندی (perphanerogames) شرح داده نشده است. همچنین، *P. ginkgo* در بازبینی ون‌درآ و وانف (۲۰۰۲) از *Phyllosticta* s. str. خارج شده است، زیرا در نمونه‌برداری مجددی که وی از برگ‌های افتاده جینکو در کشور هلند انجام داد، یک نمونه تپیک از *Phoma macrostoma* Montagne var. *macrostoma* جداسازی شد که هاگ‌های بزرگ‌تری نسبت به آنچه که بروناد از برگ‌های افتاده در فرانسه گزارش کرده بود، داشت.

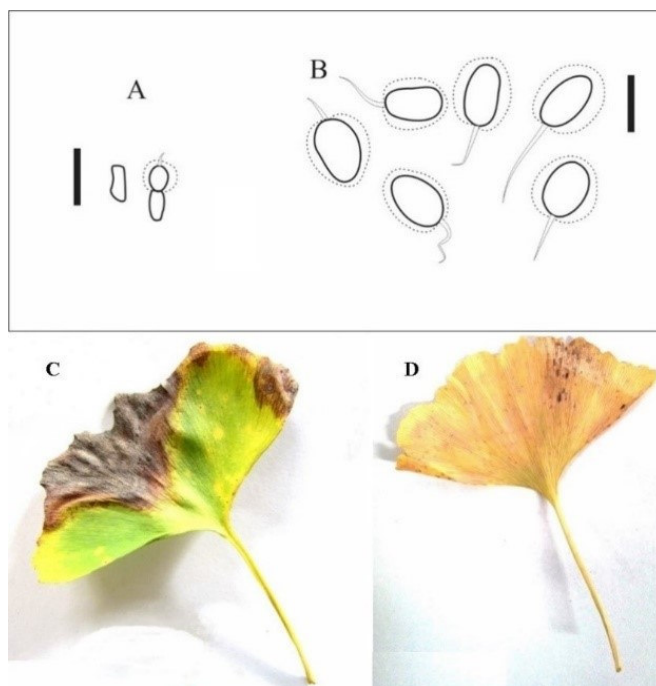
ابعاد پیکنیدیوم و سلول کنیدیوم‌زای این قارچ (جدایه رشت) نسبت به آنچه در شرح *P. capitalensis* آمده است، متفاوت است. این جدایه، از نظر فیلوژنتیکی در گروه A و در کنار جدایه تیپ *P. capitalensis* (دارای باز T)، قرار دارد. اما نکته قابل توجه این است که نمونه دیگری که در این مطالعه از گیاه مذکور جدا شد (جدایه لاهیجان)، در گروه B (دارای باز G) قرار گرفته است. جدایه رشت، از برگ‌های افتاده پای درخت پس از تغییر رنگ پاییزی جمع‌آوری شد، در حالی که نمونه لاهیجان، از برگ‌های افتاده‌ای جدا شد که دارای لکه و فاقد اندام باردهی قابل بررسی بودند.

تاکنون، یک گزارش مربوط به *P. capitalensis* s. str. از روی *Ginkgo biloba* به ثبت رسیده است. این گزارش به کمک فیلوژنی مبتنی بر توالی ITS، 18S و 28S rDNA در سال ۲۰۰۹ و از کشور ژاپن بوده است (Motohashi et al. 2009).

پیکنیدیوم‌ها در سطح زیرین برگ تشکیل می‌شوند، کروی، نیمه‌کروی، گاهی بیضوی، به قطر ۹۰-۱۳۵ (۸۰) میکرومتر بوده و دهانه‌ای به قطر ۶-۹ میکرومتر دارند. دیواره دارای ۲-۳ لایه سلولی به ضخامت ۱۱-۱۵ میکرومتر و متشکل از سلول‌هایی با اشکال نامنظم یا گاهی تخت است. سلول‌های کنیدیوم‌زا استوانه‌ای کوتاه، $1/5 \times 6-7$ میکرومتر هستند. کنیدیوم‌ها یک‌سلولی، بی‌رنگ، بیضوی، واژتخم‌مرغی، گلابی شکل و معمولاً دارای یک قطره چربی مرکزی مشخص هستند، گاهی ظاهر دانه‌دانه دارند، ابعاد آن‌ها $5-7 \times 9-12$ (۱۳) میکرومتر است، توسط یک لایه ژلاتینی احاطه شده و دارای زائده فوقانی، معمولاً به اندازه طول کنیدیوم یا گاهی کوتاه‌تر، به طول (۱۱) ۷-۱۰ (۶) میکرومتر می‌باشند (شکل ۹).

رنگ پرگنه جدایه رشت روی محیط کشت PDA مانند ایزوله جدا شده از روی چای بود. قطر پرگنه بعد از ۱۴ روز ۴-۵ سانتی‌متر و قطر حاشیه میسلیمی آن ۱-۲ میلی‌متر اندازه‌گیری شد، در حالی که پرگنه جدایه لاهیجان که از نظر مولکولی نیز با جدایه رشت تفاوت دارد (در ادامه به این موضوع پرداخته خواهد شد)، لوب‌دار سبز مایل به سیاه با حاشیه‌ای به همین رنگ است. قطر پرگنه پس از ۱۴ روز، ۶ سانتی‌متر و قطر حاشیه میسلیمی، یک میلی‌متر اندازه‌گیری شد.

نمونه‌های بررسی شده: استان گیلان، رشت، روی *Ginkgo biloba* (جینکو)، ۹۳/۹، سید اکبر خداپرست (GUMC201)؛ لاهیجان، روی *Ginkgo biloba* (جینکو)، ۹۳/۹، حمیده دارسرای (GUMC200).



شکل ۹- *Phyllosticta* sp. on *Ginkgo biloba*: A. سلول کنیدیوم‌زا و B. کنیدیوم، C و D. علائم احتمالی قارچ روی برگ‌های جینکو (مقیاس برای A و B = ۱۰ میکرومتر).

Fig. 9. *Phyllosticta* sp. on *Ginkgo biloba*: A. Conidiogenous cell, B. Conidia, C and D. Symptomatic leaves of host (Bars = 10 μ m).

است، به طوری که در مورد این جدایه، پیکنیدیوم‌ها بیشتر به شکل دواپر متحدالمرکز در محیط تشکیل می‌شوند، اما ممکن است به صورت پراکنده نیز شکل بگیرند.

نمونه بررسی شده: استان گیلان، لاهیجان، روی *Magnolia soulangeana* (مگنولیای بنفش)، ۹۳/۶/۳۰، حمیده دارسرایی (GUMC204).

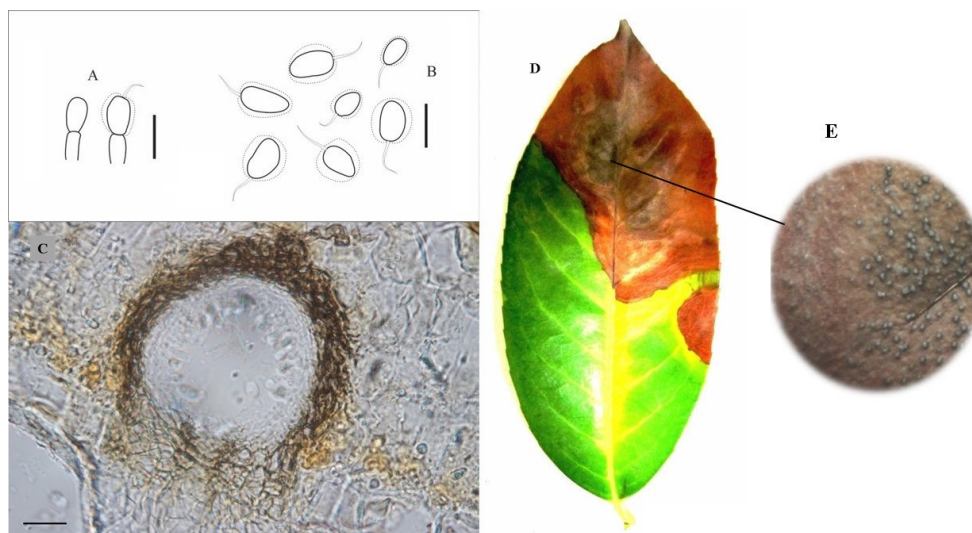
تمام گونه‌هایی که از این میزبان گزارش شده‌اند در *(P. magnoliae, P. magnoliae var. cookei, P. yulan)* بازبینی ون‌درآ و وانف (van der Aa & Vanev 2002) از *Phyllosticta s. str.* خارج شده‌اند. این جدایه شباهت‌هایی به گونه *P. concentrica* دارد، اما برخلاف آن، اپرسوریوم روی برگ دیده نشد.

تفاوت ریخت‌شناسی بین این جدایه و *P. capitalensis* در ابعاد پیکنیدیوم و سلول کنیدیوم‌زا است؛ اما از نظر مولکولی، این جدایه نیز مانند جدایه تیپ *P. capitalensis* دارای باز T بوده و در گروه A قرار گرفته است. تاکنون گزارشی از *P. capitalensis* از روی این میزبان به ثبت نرسیده است.

Phyllosticta sp. on *Magnolia soulangeana*

علائم به صورت لکه‌های نکروتیک قرمز-قهوه‌ای است که از نوک یا حاشیه برگ شروع شده و به تدریج گسترش می‌یابد و بخش وسیعی از سطح برگ را فرا می‌گیرد. پیکنیدیوم‌ها روی سطح بالایی برگ تشکیل می‌شوند، کروی هستند و کم و بیش در بالا تخت شده‌اند، قطر آن‌ها ۸۰-۱۱۵ میکرومتر و قطر دهانه آن‌ها ۱۰-۱۲ میکرومتر است. دیواره دارای ۲-۴ لایه سلولی و ضخامت ۱۰-۲۰ میکرومتر بوده و از سلول‌هایی با اشکال نامنظم و گاهی تخت تشکیل شده است. سلول‌های کنیدیوم‌زا استوانه‌ای و به ابعاد ۲-۳ × ۷-۱۰ میکرومتر هستند. کنیدیوم‌ها یک‌سلولی، بی‌رنگ، واژتخم‌مرغی، بیضوی، گاهی گلابی شکل و به ابعاد ۵-۷ × ۱۰-۱۲ (۹) میکرومتر بوده که توسط غلاف ژلاتینی احاطه می‌شوند و یک زایده به طول ۵-۷ میکرومتر در قسمت فوقانی دارند. این زایده در نمونه‌های قدیمی به تدریج ناپدید می‌شود (شکل ۱۰).

رنگ پرگنه روی محیط کشت PDA مانند ایزوله جدا شده از روی چای بود. قطر پرگنه پس از ۱۴ روز ۴/۵-۵/۵ و قطر حاشیه میسلیومی ۱-۲ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. به طور کلی، آرایش اندام‌های باردهی روی محیط کشت PDA فاقد پایداری



شکل ۱۰- *Phyllosticta* sp. on *Magnolia soulangeana*: A. سلول کنیدیومزا، B. کنیدیومها، C. برش عرضی پیکنیدیوم (مقیاس برای A و B = ۱۰ میکرومتر و برای C = ۲۰ میکرومتر)، D. علائم احتمالی روی میزبان، E. تصویر استریومیکروسکوپی پیکنیدیومهای قارچ روی برگ میزبان.

Fig. 10. *Phyllosticta* sp. on *Magnolia soulangeana*: A. Conidiogenous cell, B. Conidia, C. Cross section through pycnidium (Bars for A and B = 10 μ m and for C = 20 μ m), D. A symptomatic leaf of host, E. Close-up of pycnidium on leaf.

Phyllosticta sp. on *Prunus laurocerasus*

نمونه بررسی شده: استان گیلان، لاهیجان، روی *Prunus laurocerasus* (جل، غار گیلان)، ۹۳/۷/۱۰، حمیده دارسرای (GUMC205).

هر سه گونه ثبت شده از این میزبان (*P. circumscissa*، *P. serotina* و *P. laurocerasi*) از *Phyllosticta* s. str. خارج شده‌اند، بنابراین در این مورد به مقایسه گونه‌های گزارش شده از تیره *Rosaceae* با جدایه مورد نظر پرداخته شد. در مورد گونه‌های گزارش شده از این تیره، اختصاصیت میزبانی شدیدی وجود دارد، چنان‌که در مورد سه گونه *P. solitaria*، *P. congesta* و *P. carpogena* گفته شده ممکن است از نظر ریخت‌شناسی خیلی نزدیک به هم یا حتی غیرقابل تمایز باشند، ولی تنها به این دلیل که فقط قادر به بیماری‌زایی روی میزبان خاصی هستند، از یکدیگر تفکیک شده‌اند. بنابراین، در مقایسه گونه‌ها با جدایه مورد نظر، تفاوت میزبانی نیز ذکر شده است (van der Aa & Vanev 2002).

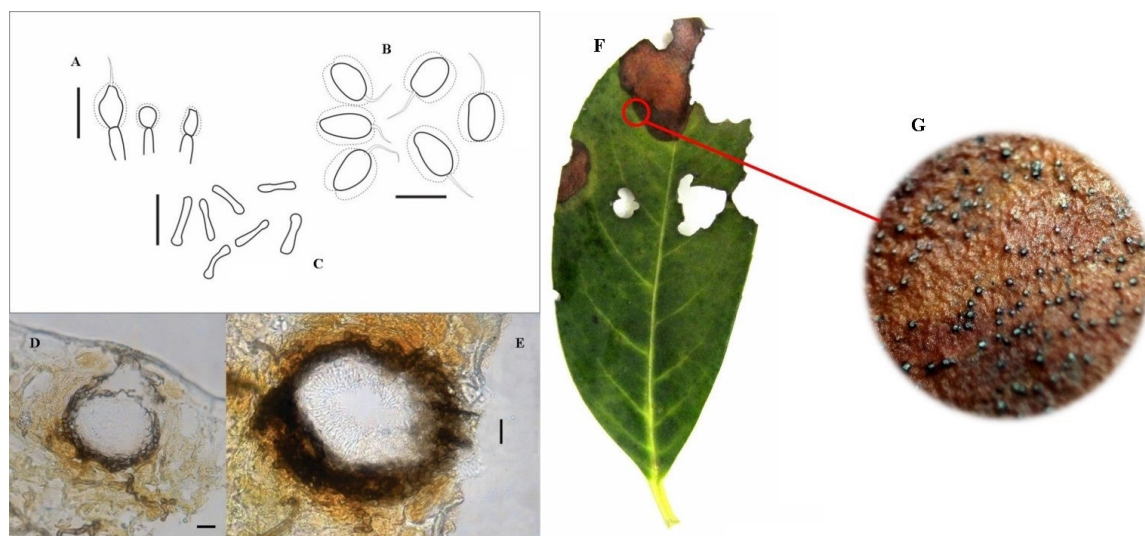
P. erratica با این گونه از نظر ابعاد پیکنیدیوم، شکل و ابعاد کنیدیوم، طول زائده و میزبان متفاوت است. *P. indianensis* دارای ابعاد متفاوت کنیدیومی، همچنین فاقد زائده فوقانی است. میزبان نیز در این مورد متفاوت است. *P. minima* از نظر ابعاد پیکنیدیوم، سلول کنیدیومزا، طول زائده و میزبان متفاوت است. در مورد *P. pennsylvanica* نیز شباهت

رنگ لکه‌ها قهوه‌ای است و پس از رشد قارچ، دور لکه یک مرز مشخص ایجاد می‌شود و لکه از برگ جدا می‌شود (حالت غربالی یا shot hole). پیکنیدیومها روی سطح بالایی برگ تشکیل می‌شوند، تک‌حفره‌ای هستند و در بالا تخت شده‌اند، قطر پیکنیدیوم ۹۰-۱۳۸ میکرومتر و قطر دهانه پیکنیدیوم ۳۰-۶۰ میکرومتر است. دیواره دارای ۲-۳ لایه سلولی و ضخامت ۷-۲۳ میکرومتر است و از سلول‌هایی با اشکال نامنظم، به رنگ قهوه‌ای تشکیل شده که در ناحیه کنیدیومزایی کمی روشن‌تر و در نزدیکی دهانه کمی فشرده‌تر می‌باشند. سلول‌های کنیدیومزا استوانه‌ای و به ابعاد $2-1/5 \times 7-10$ میکرومتر هستند. کنیدیومها یک‌سلولی، بی‌رنگ، واژتخم‌مرغی، گلابی شکل و بیضوی و به ابعاد $5-7 \times 10-13$ میکرومتر بوده و دارای غلاف ژلاتینی مشخص و ضخیم هستند. زائده‌ای به طول (۸) ۵-۶ (۴) میکرومتر یا به اندازه طول کنیدیوم نیز روی آن دیده می‌شود که به تدریج از بین می‌رود (شکل ۱۱).

رنگ پرگنه روی محیط کشت PDA شبیه ایزوله جدا شده از روی همیشه بود. قطر پرگنه بعد از ۱۴ روز ۴/۵-۵ سانتی‌متر و قطر حاشیه میسلیمی ۲-۳ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. پس از چهار هفته، کم و بیش پیکنیدیومهای کشیده و طویل شده در حاشیه دیده می‌شوند.

لازم به ذکر است که پیش از این، باکتری *Pseudomonas* و قارچ *Wilsonomyces carpophilus* به عنوان عوامل ایجاد کننده بیماری غربالی از روی این میزبان گزارش شده‌اند (De Boer 1980). در مورد *Phyllosticta*، ایجاد حالت غربالی یکی از علائمی است که می‌تواند روی میزبان ایجاد شود. در مورد جدایه مذکور، تمام درختی که این جدایه از آن جداسازی شد، به شدت دچار حالت غربالی بود، اما به دلیل وجود آلودگی مخلوط، نمی‌توان این علائم را با اطمینان به *Phyllosticta* نسبت داد.

ریخت‌شناسی فراوانی به *P. congesta* وجود دارد، اما به دلیل اختصاصیت میزبانی از هم تفکیک شده‌اند. *P. solitaria* نیز به نمایندگی از سه گونه مشابه انتخاب و با جدایه مورد نظر مقایسه شد. در این مورد نیز تفاوت در ابعاد کنیدیوم، سلول کنیدیوم‌زا و طول زائده وجود دارد. همچنین، *P. solitaria* روی میوه استروما تشکیل می‌دهد. تفاوت در میزبان نیز وجود دارد. این جدایه، از نظر مولکولی در گروه A قرار می‌گیرد، اما تفاوت‌های ریخت‌شناسی با *P. capitalensis* دارد. این تفاوت‌ها در ابعاد پیکنیدیوم، سلول کنیدیوم‌زا و طول زائده فوقانی هستند.



شکل ۱۱- *Phyllosticta* sp. on *Prunus laurocerasus*: A. سلول کنیدیوم‌زا، B. کنیدیوم، C. اسپرماتی، D. برش عرضی پیکنیدیوم، E. برش عرضی اسپرموگونیم (مقیاس برای A و B و C = ۱۰ میکرومتر و برای D و E = ۲۰ میکرومتر)، F و G. تصویر استریومیکروسکوپی پیکنیدیوم‌ها به همراه حالت غربالی روی برگ.

Fig. 11. *Phyllosticta* sp. on *Prunus laurocerasus*: A. Conidiogenous cell, B. Conidia, C. Spermatia, D. Cross section through pycnidium, E. Cross section through spermogonia (Bars for A, B and C = 10 μ m and for D and E = 20 μ m), F. and G. Symptomatic leaf of host.

روی محیط کشت PNA، ابعاد پیکنیدیوم ۱۰۰-۱۳۸، کنیدیوم ۹-۱۲ \times ۵-۷ میکرومتر و طول زائده فوقانی ۵-۱۱ میکرومتر اندازه‌گیری شد. در کشت‌های کهنه، ساختارهای کلامیدوسپوری تشکیل می‌شود (شکل ۱۲). نمونه بررسی شده: استان گیلان، رشت، روی *Rosa* sp. (رز صورتی)، ۹۳/۱۰، حمیده دارسرای (GUMC210). این جدایه از نظر ژنگاه مورد نظر دارای باز T بوده و به همراه جدایه تیپ *P. capitalensis* در گروه A قرار می‌گیرد.

Phyllosticta sp. on *Rosa* sp.

با توجه به نارس و ناقص بودن اندام‌های باردهی روی برگ، ویژگی‌های جدایه روی محیط کشت‌های مختلف بررسی شد: رنگ پرگنه و تشکیل پیکنیدیوم‌های کشیده و طویل‌شده روی محیط کشت PDA مشابه ایزوله جداسازی شده از روی چای بود، قطر پرگنه پس از ۱۴ روز ۴-۶ سانتی‌متر و قطر حاشیه میسلیمی ۱-۲ میلی‌متر اندازه‌گیری شد.



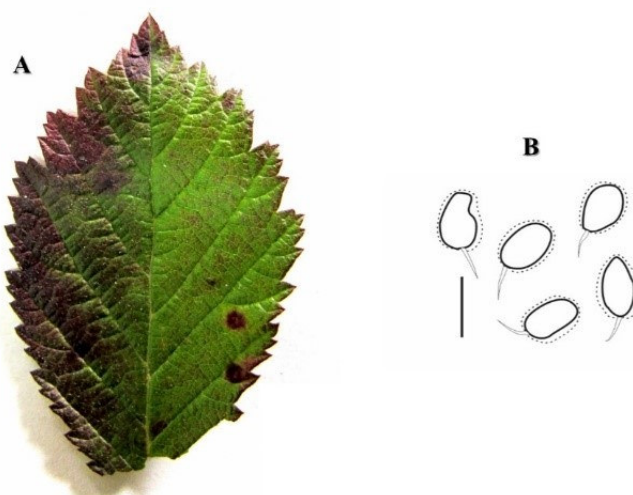
شکل ۱۲- *Phyllosticta* sp. on *Rosa* sp.: A. کنیدیوم‌های قارچ روی محیط کشت PNA (مقیاس = ۱۰ میکرومتر)، B و C. علائم احتمالی قارچ روی برگ‌های میزبان.

Fig. 12. *Phyllosticta* sp. on *Rosa* sp.: A. Conidia on PNA (Bar = 10 μ m), B and C. Symptomatic leaves of host.

Phyllosticta sp. on *Rubus* sp.

نمونه بررسی شده: استان گیلان، شارم، روی *Rubus* sp. (تمشک وحشی)، ۹۳/۸/۲۲، حمیده دارسرای (GUMC203).
ژنگه مورد نظر در این جدایه دارای باز T است، در نتیجه این جدایه در کنار جدایه تیپ *P. capitalensis*، در گروه A قرار می‌گیرد.

اندام‌های باردهی روی برگ ناقص بود، از این رو، مشخصات پرگنه روی محیط کشت‌های متفاوت بررسی شد: پرگنه روی محیط کشت PDA مانند ایزوله جدا شده از روی همیشه بود. قطر پرگنه پس از ۱۴ روز ۵/۵-۶ سانتی‌متر و قطر حاشیه میسلیمی ۱-۵ میلی‌متر اندازه‌گیری شد.
روی محیط کشت PNA، پیکنیدیوم ۷۵-۱۱۳ میکرومتر، ابعاد کنیدیوم ۹-۱۱ × ۵-۶ میکرومتر و طول زائده فوقانی ۷-۱۱ میکرومتر اندازه‌گیری شد (شکل ۱۳).



شکل ۱۳- *Phyllosticta* sp. on *Rubus* sp.: A. علائم احتمالی قارچ روی میزبان، B. کنیدیوم‌های قارچ روی محیط کشت PNA (مقیاس = ۱۰ میکرومتر).

Fig. 13. *Phyllosticta* sp. on *Rubus* sp.: A. A symptomatic leaf of host, B. Conidia on PNA (Bar = 10 μ m).

***Phyllosticta* sp. on *Schefflera* sp.**

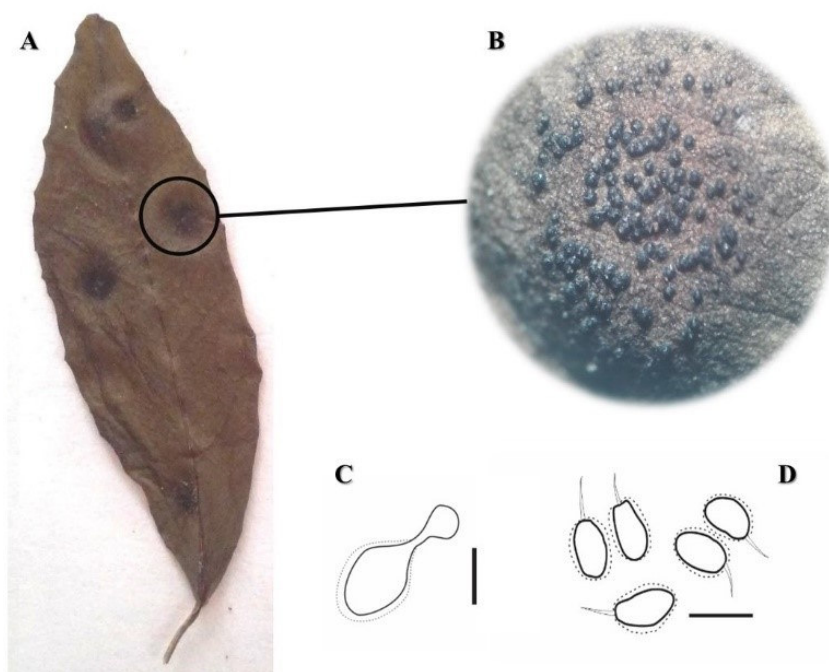
و ابعاد آسکوسپور ۱۱-۱۶ × ۶-۵ (۴/۵) میکرومتر اندازه‌گیری شد. غلاف ژلاتینی اطراف کنیدیوم در اغلب موارد بسیار باریک است. آسک‌ها چماقی یا دوکی شکل بوده و ۱-۲ ردیف (به ندرت ۳ ردیف) آسکوسپور دارند. آسکوسپورها فاقد کلاهک بوده و ظاهری دانه‌دانه دارند. این جدایه روی محیط کشت PNA اپرسوریوم تشکیل می‌دهد (شکل ۱۴).

نمونه بررسی شده: استان گیلان، رشت، روی *Schefflera* sp. (شفلرا)، ۹۳/۱۱، عابدی (GUMC208).

این جدایه نیز به دلیل دارا بودن باز T در ژنگاه مورد نظر، در گروه A و در کنار جدایه تیپ گونه *P. capitalensis* قرار می‌گیرد.

پیکنیدیوم‌ها در سطح رویی و زیرین برگ به شکل دوایر متحدالمرکز وجود داشتند، اما نارس بودند، در نتیجه ویژگی‌های پرگنه روی محیط کشت‌های مختلف بررسی شد. روی محیط کشت PDA، پرگنه لوبدار سبز تیره با حاشیه سبز مایل به قهوه‌ای، قطر پرگنه پس از ۱۴ روز ۴/۵-۵ سانتی‌متر و قطر حاشیه میسلیمی ۰/۵-۱/۵ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. در مورد این جدایه نیز پیکنیدیوم‌های کشیده و طولیل شده پس از چهار هفته به فراوانی در حاشیه پرگنه دیده می‌شوند.

روی محیط کشت PNA، ابعاد کنیدیوم ۵-۷ × ۹-۱۵ میکرومتر، طول زایده فوقانی ۲۰-۷ میکرومتر، طول زایده فوقانی ۲۰-۷ میکرومتر، ابعاد اسپرماتی ۱۲-۶ × ۲-۱ میکرومتر، ابعاد آسک ۸۹-۵۱ × ۱۵-۱۰ میکرومتر



شکل ۱۴- *Phyllosticta* sp. on *Schefflera* sp.: A و B. تصویر استریومیکروسکوپی از آلودگی پشت برگ شفلرا، C. اپرسوریوم روی محیط کشت PNA، D. کنیدیوم‌های قارچ روی محیط کشت PNA (مقیاس برای C و D = ۱۰ میکرومتر).

Fig. 14. *Phyllosticta* sp. on *Schefflera* sp.: A and B. Close-up of pycnidium on back of leaf, C. Appressorium on PNA, D. Conidia on PNA (Bars for C and D = 10 μ m).

Phyllosticta cf. *citricarpa*

پیکنیدیوم‌ها کروی تا نیمه‌کروی هستند که در بالا تخت شده‌اند، در هر دو سطح برگ تشکیل می‌شوند، اما بیشتر در سطح رویی برگ دیده می‌شوند، منفرد یا خوشه‌ای بوده و قطر آن‌ها ۱۵۳-۱۰۳ میکرومتر است. دیواره دارای ۲-۳ لایه سلولی به ضخامت ۱۷-۱۱ میکرومتر است و از سلول‌های تخت، زاویه‌دار یا با اشکال نامنظم تشکیل شده است. سلول‌های کنیدیوم‌ها استوانه‌ای بلند و به ابعاد $2-1/5 \times 10-7$ میکرومتر هستند. کنیدیوم‌ها یک‌سلولی، بی‌رنگ، واژتخم‌مرغی و بیضوی هستند، قطرات چربی مشخص و مرکزی دارند و به ابعاد ۶-۵ × ۱۲-۹ میکرومتر دیده می‌شوند و زائده‌ای به طول ۱۰-۷ میکرومتر در بالای کنیدیوم وجود دارد (شکل ۸).

نمونه بررسی شده: استان گیلان، رشت، روی *Citrus* sp. (مرکبات)، ۳۰/۱۰/۹۳، سید اکبر خداپرست (GUM1331).

در بین گونه‌هایی که از *Citrus* spp. گزارش شده‌اند و امروزه در جنس *Phyllosticta* پذیرفته شده‌اند (van der Aa & Vanev 2002)، *P. arecae* پیکنیدیوم کوچک‌تر و دیواره پیکنیدیومی ضخیم‌تری دارد؛ *P. erratica* پیکنیدیوم بزرگ‌تر و زائده فوقانی طولی‌تری دارد؛ *P. capitalensis* پیکنیدیوم بزرگ‌تر و سلول کنیدیوم‌زای کوتاه‌تری دارد؛ ویژگی‌های ریخت‌شناسی *P. citricarpa* جز در ابعاد سلول کنیدیوم‌زا ($5/3-2 \times 8-4$) با جدایه مورد بررسی هم‌پوشانی دارد. با توجه به ماهیت اندوفیتی این جدایه (چون از برگ‌های زخم شده مرکبات که در محیط مرطوب تیمار شده بودند، جدا شد)، قرنطینه بودن *P. citricarpa* و فقدان کشت زنده و توالی DNA، این جدایه فعلاً به صورت *Phyllosticta* cf. *citricarpa* تعیین نام شد و برای تشخیص دقیق‌تر لازم است ژن‌های دیگر از این گونه توالی‌یابی شوند.

بحث

جنس *Phyllosticta* از جنس‌هایی است که تشخیص گونه‌های آن با مشکلات فراوانی همراه است. هنوز روش قابل اطمینانی برای تشخیص گونه‌ها در دسترس نیست. استفاده از کلید ریخت‌شناسی موجود هیچ کمکی به تشخیص نمی‌کند؛

عدم تشخیص جدایه‌های مورد بررسی در این تحقیق، شاهدی بر این مدعاست. دلیل این ناکارآمدی، ممکن است استفاده از صفاتی در کلید باشد که در تاکسونومی حقیقی اعضای این جنس نقشی ندارند. تنها صفات موجود در کلید، صفات مربوط به پیکنیدیوم و کنیدیوم و میزبان است و در آن از دو فرم دیگر زندگی این قارچ، هیچ سخنی به میان نیامده است. شاید ابعاد کنیدیوم و زائده فوقانی، صفاتی نباشند که باید به آن‌ها توجه کرد. ممکن است نیاز به بررسی کنیدیوم‌ها با میکروسکوپ الکترونی وجود داشته باشد، یا صفت دیگری در پیکنیدیوم‌ها باید مورد توجه قرار بگیرد، شاید مانند برخی قارچ‌ها، گونه‌های این جنس از نظر ریخت‌شناسی قابل تفکیک نباشند و یا شاید گیاه میزبان نقشی در تشخیص گونه نداشته باشد، این احتمال نیز وجود دارد که اگر روزی ثابت شود که این گونه‌ها همگی میزبان اختصاصی هستند، با دانستن میزبان، علی‌رغم وجود شباهت‌های ریخت‌شناسی، بتوان با اطمینان گونه را تعیین کرد.

شناسایی گونه‌ها با استفاده از توالی DNA نیز خالی از اشکال نیست. علی‌رغم توجه روزافزونی که به استفاده از روش مولکولی در شناسایی قارچ‌ها وجود دارد، اتکا به یک توالی از یک ناحیه ژنی مشکلی را حل نمی‌کند. نخستین نکته قابل توجه این است که با وجود توالی‌های فراوان ثبت شده در بانک ژن، هنوز توالی بسیاری از گونه‌ها در این پایگاه داده وجود ندارد، ضمن اینکه توالی گونه‌های تیپ نیز در بسیاری از اوقات ناموجود است و این به دلیل عدم وجود نمونه تیبی است که بتوان از آن DNA استخراج نمود. همچنین، همان‌گونه که در بخش‌های قبلی ذکر شد، آنالیز فیلوژنتیکی که به منظور شناسایی گونه‌های *Phyllosticta* انجام می‌گیرد، باید حداقل مبتنی بر دو ژن و در مورد گونه‌های نزدیک به *P. capitalensis*، مبتنی بر پنج ژن باشد. اگر چنین مسایلی را در کنار این موضوع قرار دهیم که بسیاری از گونه‌های *Phyllosticta* از برگ‌های فاقد علائم جدا می‌شوند و تنها راه تشخیص آن‌ها استفاده از روش‌های مولکولی است، شاید تمایل برای تشخیص گونه این قارچ در افراد مبتدی از بین برود و هرگز روشی برای تشخیص گونه‌های *Phyllosticta* ابداع نشود. بنابراین، چنین چالش بزرگی، به قارچ‌شناسان علاقه‌مند به علم قارچ‌شناسی نیاز دارد تا بتوانند با تلاش و پشتکار، این سد پیش‌رو را مرتفع نمایند.

References

- Aa, H.A. van der. 1973. Studies in *Phyllosticta*. Studies in Mycology 5: 1–110.
- Aa, H.A. van der & Vanev, S. 2002. A revision of the species described in *Phyllosticta*. CBS, Utrecht, The Netherlands.
- Brunaud, P. 1886. Liste des sphaeropsidées trouvées á Saintes et dans les environs. Actes de la Société Linnéenne de Bordeaux 40: 61–116.
- De Boer, S.H. 1980. Leaf spot of cherry laurel caused by *Pseudomonas syringae*. Canadian Journal of Plant Pathology 2: 235–238.
- Ershad, D. 2009. Fungi of Iran. Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, Iran. Pp. 531.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 39: 783–791.
- Glienke, C., Pereira, O.L., Stringari, D., Fabris, J., Kava-Cordeiro, V., Galli-Terasawa, L., Cunningham, J., Shivas, R.G., Groenewald, J.Z. & Crous, P.W. 2011. Endophytic and pathogenic *Phyllosticta* species, with reference to those associated with Citrus Black Spot. Persoonia 26: 47–56.
- Hirata, T. & Takamatsu, S. 1996. Nucleotide sequence diversity of rDNA internal transcribed spacers extracted from conidia and cleistothecia of several powdery mildew fungi. Mycoscience 37(3): 283–288.
- Khodaparast, S.A., Takamatsu, S., Harada, M., Abbasi, M. & Samadi, S. 2012. Additional rDNA ITS sequences and its phylogenetic consequences for the genus *Leveillula* with emphasis on conidium morphology. Mycological Progress 11: 741–752.
- 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.
- Motohashi, K., Inaba, S., Anzai, K., Takamatsu, S. & Nakashima, C. 2009. Phylogenetic analyses of Japanese species of *Phyllosticta* sensu stricto. Mycoscience 50: 291–302.
- Nicholas, K.B. & Nicholas, H.B. Jr. 1997. GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignment. Distributed by the author.
- Saccardo, P.A. 1878. Fungi Veneti novi vel critici vel mycologiae Venetae addendi. Series VII. Michelia 1(2): 133–221.
- Saccardo, P.A. 1884. Sylloge fungorum omnium hucusque cognitorum 3: 1–860.
- Slippers, B., Boissin, E., Phillips, A.J.L., Groenewald, J.Z., Lombard, L., Wingfield, M.J., Postma, A., Burgess, T. & Crous, P.W. 2013. Phylogenetic lineages in the *Botryosphaerales*: a systematic and evolutionary framework. Studies in Mycology 76: 31–49.
- Su, Y.Y. & Cai, L. 2012. Polyphasic characterisation of three new *Phyllosticta* spp. Persoonia 28: 76–84.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution 28: 2731–2739.
- Walsh, P.S., Metzger, D.A. & Higuchi, R. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. BioTechniques 10(4): 506–513.
- Wikee, S., Lombard, L., Nakashima, C., Motohashi, K., Chukeatirote, E., Cheewangkoon, R., McKenzie, E.H.C., Hyde, K.D. & Crous, P.W. 2013a. A phylogenetic re-evaluation of *Phyllosticta* (*Botryosphaerales*). Studies in Mycology 76: 1–29.
- Wikee, S., Lombard, L., Crous, P.W., Nakashima, Ch., Motohashi, K., Chukeatirote, E., Alias, S.A., McKenzie, E.H.C. & Hyde, K.D. 2013b. "*Phyllosticta capitalensis*, a widespread endophyte of plants. Fungal Diversity 60: 91–105.
- Wikee, S., Udayanga, D., Crous, P.W., Chukeatirote, E., McKenzie, E.H.C., Bahkali, A.H., Dai, D.Q. & Hyde, K.D. 2011. *Phyllosticta*- an overview of current status of species recognition. Fungal Diversity 51: 43–61.
- Wulandari, N.F., Bhat, D.J. & To-anun, C. 2013. A modern account of the genus *Phyllosticta*. Plant Pathology & Quarantine 3(2): 145–159.