

ردیابی و شناسایی مولکولی گونه‌های *Colletotrichum* عامل بیماری آنتراکنوز برخی گیاهان در استان خوزستان*

دریافت: ۱۳۹۷/۰۴/۰۳ / پذیرش: ۱۳۹۷/۰۵/۳۰

کبری حیدری: دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران
رضا فرخی‌نژاد: استاد گروه بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران
مهدی مهربانی کوشکی ✉: استادیار گروه بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران؛ گروه بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی و علوم زیستی، دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران
 (mhdmhrb@scu.ac.ir; mhdmhrb@gmail.com)

چکیده

تحقیق حاضر به منظور شناسایی گونه‌های *Colletotrichum* همراه علائم آنتراکنوز در برخی گیاهان در استان خوزستان، با استفاده از روش‌های مبتنی بر ریخت‌شناسی و تجزیه و تحلیل مولکولی انجام شد. طی سال‌های ۹۶-۱۳۹۵، ۴۰ نمونه برگ و میوه دارای علائم آنتراکنوز از گیاهان توت‌فرنگی، پرتقال، لیموترش، موز، یونجه و نارنج جمع‌آوری شد که براساس بررسی‌های ریخت‌شناسی، ۱۲ جدایه آن‌ها، از جنس *Colletotrichum* بودند. از این جدایه‌ها، زیست‌توده میسلیومی در محیط PDB تهیه و خشک‌انجمادی انجام شد. استخراج DNA با استفاده از یک روش آلی مبتنی بر فنل و کلروفورم انجام شد و سپس، ناحیه ITS و بخش‌هایی از نواحی 28S-D1/D2 و *Tub2* با استفاده از آغازگرهای عمومی و اختصاصی تکثیر و توالی‌یابی شدند. توالی‌های حاصله با توالی‌های مربوط به استرین‌های تیپ در بانک ژن با استفاده از الگوریتم BLASTn و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی (الگوریتم درست‌نمایی بیشینه) مورد مقایسه قرار گرفتند. گونه‌های *Colletotrichum gloeosporioides*، *C. karstii*، *C. musae*، *C. nymphaeae* و *C. truncatum* شناسایی و ریخت‌شناسی آن‌ها بررسی شد. در درخت فیلوژنتیکی مبتنی بر توالی‌های ترکیبی، دو ناحیه ژنی ITS و *Tub2* جدایه‌های *Colletotrichum* تحت مطالعه با استرین‌های معتبر از هر گونه خوشه‌بندی شدند و کلادهایی معتبر با ارزش بوت‌استراپ ۹۶-۹۹ درصد ایجاد کردند.

واژه‌های کلیدی: ایران، تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی، توالی‌یابی، ریخت‌شناسی، کلتوتریکوم

Detection and molecular identification of *Colletotrichum* species causing anthracnose disease of some plants in Khuzestan province (Iran)

Received: 24.06.2018 / Accepted: 21.08.2018

Kobra Heidari: MSc Student of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Reza Farokhinejad: Prof. of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Mehdi Mehrabi-Koushki ✉: Assistant Prof. of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran; Biotechnology and Bioscience Research Center, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran (mhdmhrb@scu.ac.ir; mhdmhrb@gmail.com)

Summary

Anthracnose is a general term for sunken lesions and blights on stems, leaves and fruits which causes economic damage to agricultural products. This study, conducted to identify *Colletotrichum* species associated with anthracnose symptoms on some plants in Khuzestan province (Iran) using morphological and molecular methods. During 2016–17, 40 leaf and fruit samples showing anthracnose symptoms (from alfalfa, banana, sour lemon, orange and strawberry) were collected and surveyed for morphological study. Accordingly, 12 isolates of the genus *Colletotrichum* were obtained. Mycelial biomass of the isolates were produced in PDB and freeze-dried. DNA was extracted using an organic method based on phenol and chloroform. The ITS and partial regions of the 28S-D1/D2 and *Tub2* were amplified using universal and specific primers and sequenced. Obtained sequences were compared with index sequences belonging to the type strains in GenBank by BLASTn algorithm and phylogenetic analysis (maximum likelihood algorithm). The species of *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. karstii*, *C. musae*, *C. nymphaeae*, and *C. truncatum* were identified along with their morphological study. In phylogenetic tree constructed based on the ITS and *Tub2* combined dataset, *Colletotrichum* isolates under study were clustered with type strain of each species and formed monophyletic clades with 96–99% bootstrap support.

Keywords: Morphology, phylogenetic analysis, sequences, strains

* بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول به راهنمایی دکتر رضا فرخی‌نژاد و دکتر مهدی مهربانی کوشکی ارائه شده به دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران

مقدمه

برخلاف *Colletotrichum* که عامل ایجاد بیماری و خسارت روی میزبان زنده است، مرحله جنسی آن که *Glomerella* می‌باشد، بیشتر روی میزبان غیرزنده گسترش و فعالیت می‌کند (Sutton 1992). بنابراین، از آنجایی که اعضای این جنس در طبیعت بیشتر به فرم غیرجنسی دیده می‌شوند، شناسایی و مطالعه فرم غیرجنسی آن از اهمیت بیشتری برخوردار می‌باشد. مرحله جنسی این قارچ نخستین بار توسط استونمن (Stoneman 1898) مورد مطالعه قرار گرفت و تحت عنوان *Gnomoniopsis stoneman* نام‌گذاری گردید. براساس بررسی‌های کانن و همکاران (۲۰۱۲)، جنس *Gnomoniopsis* ارتباط نزدیکی با بیماری آنتراکنوز ندارد و به همین خاطر نام *Glomerella* را برای مرحله جنسی گونه‌های ایجاد کننده آنتراکنوز پیشنهاد کردند.

با توجه به عدم وجود مطالعه جامع در خصوص بیماری‌های آنتراکنوز در استان خوزستان، این تحقیق به جداسازی و شناسایی مبتنی بر ریخت‌شناسی و فیلوژنی مولکولی گونه‌های *Colletotrichum* از روی برخی گیاهان در استان خوزستان پرداخته است.

روش بررسی

– جمع‌آوری و جداسازی نمونه‌های گیاهی

در بازدیدهایی که از مناطق مختلف استان خوزستان از جمله اهواز، دزفول، شوش، رامهرمز و باغملک در طول سال‌های ۱۳۹۵ و ۱۳۹۶ به عمل آمد از گیاهان علفی و چوبی دارای علائم آنتراکنوز (اعم از مثمر، غیرمثمر و زینتی) و محصولات عرضه شده به بازار که دارای علائم خاص آنتراکنوز روی اندام‌های مختلف گیاهی بودند نمونه‌برداری شد (جدول ۱). نمونه‌های گیاهی تا انجام مراحل جداسازی در شرایط یخچال نگهداری شدند. قطعات گیاهی از اندام‌های مختلف آلوده به اندازه ۱-۵ سانتی‌متر از حاشیه بین بافت آلوده و سالم تهیه و بعد از ضدعفونی سطحی با استفاده از هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به مدت دو دقیقه، سه بار شستشو با آب مقطر سترون و خشک شدن به وسیله کاغذ صافی سترون روی محیط غذایی سیب‌زمینی-دکستروز-آگار (PDA) محتوی ۵۰-۳۰ میلی‌گرم در لیتر سولفات استرپتومایسین قرار داده شدند. پنج تا ده روز پس از نگهداری تشک‌های پتری در انکوباتور در دمای ۲۸ درجه سلسیوس و تاریکی مطلق، پرگنه‌های ظاهر شده *Colletotrichum* به محیط کشت جدید منتقل و جدایه‌ها به روش تک‌اسپور کردن خالص‌سازی شدند. جدایه‌های مورد مطالعه در کلکسیون قارچ‌های زنده گروه گیاه‌پزشکی ذخیره شدند.

آنتراکنوز (لکه تیره فرورفته)، بیماری شاخه، برگ، تنه یا میوه بوده که اغلب به صورت لکه‌ها و سوختگی‌های سیاه و زخم‌های گود با لبه‌های برآمده بروز می‌کند. با توجه به این که برخی آنتراکنوزها موجب سرخشکیدگی شاخه‌ها می‌شوند، بیشتر در اواخر دوره رویشی مخصوصا هنگام برداشت و عرضه به بازار باعث فساد میوه شده و یک مرحله طولانی آلودگی تا ظهور علائم دارند. در تعدادی از درختان میوه، لکه‌های آنتراکنوزی برآمده و سطح آن‌ها چوب‌پنبه‌ای است. آنتراکنوز میوه‌ها اغلب به ریزش و پوسیدگی آن‌ها می‌انجامد (Agrios 2005).

جنس *Colletotrichum* Corda متعلق به تیره *Glomerellaceae* از راسته *Glomerellales* در سال ۱۸۳۱ معرفی شد (Réblová et al. 2011, Maharachchikumbura et al. 2015, 2016). گونه‌های این جنس اغلب بیمارگر گیاهان و اندوفیت و یا ساپروفیت هستند (Cannon et al. 2012, Hyde et al. 2014, 2016). زمانی که فون آرکس برای نخستین بار مونوگراف رسمی جنس *Colletotrichum* را ارائه کرد، حدود ۷۵۰ گونه برای *Colletotrichum* وجود داشت (Cannon et al. 2012). وی این جنس را براساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی به ۱۱ آرایه کاهش داد. ساتن در سال ۱۹۸۰ (Sutton 1980)، ۲۲ گونه از این جنس را پذیرفت در حالی که متعاقبا، این تعداد را به ۳۹ گونه افزایش داد (Sutton 1992). هاید و همکاران (Hyde et al. 2009) نخستین مرور جامع جنس *Colletotrichum* را با پذیرفتن ۶۶ گونه معتبر و ۱۹ گونه مشکوک ارائه کردند و اذعان داشتند که این جنس می‌بایست براساس مطالعات مولکولی اصلاح شود. این مطالعه باعث اصلاح جنس براساس توالی نوکلئوتیدی چندین ناحیه ژنومی شد و باعث روشن شدن گونه‌های کمپلکس و معرفی تعدادی گونه جدید گردید (Damm et al. 2009, 2012a, b, 2013, 2014, Crouch et al. 2009, 2014, Cannon et al. 2012, Weir et al. 2012, Hyde et al. 2014, Liu et al. 2015).

در پایگاه اطلاعاتی Index Fungorum، ۸۲۰ گزارش از *Colletotrichum* ثبت شده (www.indexfungorum.org; accesses 7th August 2016)، اما در حال حاضر کمتر از ۲۰۰ گونه پذیرفته شده است (Hyde et al. 2014). محققان در سال ۲۰۰۹ توصیه کردند که یک رویکرد چند مرحله‌ای، شامل تجزیه و تحلیل داده‌های جغرافیایی، اکولوژیکی، ریخت‌شناسی و ژنتیکی برای ایجاد یک سیستم طبقه‌بندی طبیعی برای این جنس ایجاد شود (Cai et al. 2009).

زیست‌توده میسیلیومی از هر جدایه در محیط مایع سیب‌زمینی دکستروز (PDB) تهیه و در دستگاه فریز-درایر (Freeze Dryer, Alpha 1-2 LDplus, Christ) خشک‌انجمادی شد. استخراج DNA با استفاده از یک روش ارگانیک مبتنی بر فنل و کلروفرم (Raeder & Broda 1985) با اندکی تغییرات انجام شد (Ahmadpour *et al.* 2017). برای تکثیر حدود ۱۲۰۰ جفت باز از نواحی ITS1، ITS2، 5.8S، ITS1، 18S و 28S-D1/D2 مربوط به rDNA هسته‌ای، از جفت‌آغازگر عمومی ITS1-F و NL4-R (White *et al.* 1990, O'Donnell 1993) و برای تکثیر حدود ۴۵۰ و ۷۰۰ جفت‌باز از ژن *Tub2* از جفت‌آغازگر اختصاصی T1/Bt-2b و BTub2Fd/BTub4Rd (Woudenberg *et al.* 2009) (Glass & Donaldson 1995, O'Donnell & Cigelnik 1997) استفاده شد. مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس در حجم‌های ۵۰ میکرولیتر با استفاده از ۵ میکرولیتر بافر 10 x Taq buffer، غلظت ۳ میلی‌مول از $MgCl_2$ ، ۲ میکرولیتر از آغازگر مستقیم (۱۰ میکرومول)، ۲ میکرولیتر از آغازگر معکوس (۱۰ میکرومول)، ۱ میکرولیتر از dNTP (از هر یک ۲/۵ میکرومول)، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم (۵ واحد بر میکرولیتر) Taq DNA Polymerase، ۲ میکرولیتر از DNA الگو (حدود ۲۰۰ نانوگرم) و آب مقطر دوبار تقطیر شده میلی‌کیور تا حجم ۵۰ میکرولیتر تهیه و تکثیر با برنامه حرارتی زیر در دستگاه ترموسایکلر مدل MJ Mini™ Gradient Thermal Cycler انجام شد:

مدت زمان (ثانیه)	درجه حرارت (°C)	تعداد چرخه	نوع چرخه
۱۸۰	۹۴	۱	واسرشت‌سازی اولیه
۳۰	۹۴	۳۵	چرخه‌های اصلی
	اتصال آغازگرهای ITS1/NL4، ۵۲		
	اتصال آغازگرهای T1/Bt-2b، ۵۰		
۳۰	اتصال آغازگرهای BTub2Fd/ BTub4Rd، ۵۶	-	-
۹۰	گسترش آغازگرها، ۷۲		
۳۰۰	۷۲	۱	گسترش نهایی

گردید. توالی‌یابی توسط شرکت ماکروژن (Humanizing Genomics, Macrogen, South Korea) انجام شد. توالی‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار BioEdit ver. 4.0.6.2 (Hall 1999) ویراستاری شد. خوانش‌های مستقیم و معکوس هر ژن برای هر جدایه با استفاده از نرم‌افزار DNABaser ver. 3.5.0 (www.dnabaser.com) تلفیق و در بانک ژن ذخیره گردید

- بررسی‌های ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی دیسک‌هایی به قطر یک سانتی‌متر از حاشیه پرگنه‌های در حال رشد فعال هر جدایه به مرکز تشک‌های پتری حاوی محیط غذایی PDA منتقل شدند. هر جدایه از هر تیمار در سه تکرار کشت شد. تشک‌های پتری به داخل انکوباتورها با دمای 28 ± 0.5 و تناوب نوری ۱۲ ساعته منتقل گردید. کشت روی اسلاید نیز براساس روش بینک و روگرز (Beneke & Rogers 1996) انجام گرفت. شکل ظاهری پرگنه و رنگ آن، ویژگی‌های رشدی، نحوه کنیدیوم‌زایی، ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی اندام‌های تولیدمثلی و کنیدیوم‌ها، شکل، اندازه و سایر ویژگی‌های آسروول و کنیدیوم‌ها جهت شناسایی و ارایه شرح گونه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. برای به دست آوردن میانگین، حداقل و حداکثر اندازه‌ها از هر یک از اندام‌های ذکر شده، ۵۰ نمونه مورد اندازه‌گیری قرار گرفتند. بررسی مشخصات ریخت‌شناسی در مقیاس میکروسکوپی، با قرار دادن نمونه‌ها در داخل یک قطره رنگ آبی پنبه یا لاکتوفنل روی لام و مشاهده آن‌ها با میکروسکوپ نوری صورت گرفت. اندازه‌گیری‌ها با میکروسکوپ نوری لایتز مجهز به عدسی مدرج با بزرگ‌نمایی ۱۰۰X، ۴۰۰X و ۱۰۰۰X انجام شد. برای شناسایی اولیه و تطبیق خصوصیات جدایه‌ها با توصیف این گونه‌ها، ترجیحا از توصیف اصلی این گونه‌ها در محل انتشار و در صورت عدم دسترسی از توصیف غیررسمی در بانک قارچ‌ها استفاده شد. - استخراج DNA و تکثیر بخش‌هایی از نواحی ITS و *Tub2*

- توالی‌یابی و تجزیه و تحلیل توالی‌ها با انجام عملیات جستجوی BLASTn و فیلوژنی مولکولی قطعات تکثیری روی ژل آگاروز جداسازی و باندهای هدف جداسازی شد و سپس با استفاده از کیت استخراج از ژل GF-1 AmbiClean Kit (Vivantis, Malaysia) خالص‌سازی

نرم‌افزار MEGA ver6.0 (Tamura et al. 2013) انجام شد. برای ریشه‌دار کردن درخت فیلوژنتیک، یک استرین از گونه *Monilochaetes infuscans* به عنوان آرایه خارج از گروه (outgroup) استفاده شد. ارزیابی بهترین مدل برای رسم درخت فیلوژنتیکی با استفاده از همین نرم‌افزار انجام شد.

(جدول ۱). توالی‌های به دست آمده از تکثیر نواحی ITS و *Tub2* با توالی‌های مربوط به استرین‌های تیپ یا معتبر با استفاده از الگوریتم جستجوی BLASTn و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی مقایسه و مورد ارزیابی قرار گرفتند. تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی مبتنی بر ترکیب دو ناحیه ITS و *Tub2* با استفاده از الگوریتم درست‌نمایی بیشینه (maximum likelihood) و با کمک

جدول ۱- مکان نمونه‌برداری و میزبان جدایه‌های مطالعه شده

نام جدایه	نام عمومی	میزبان		مکان نمونه‌برداری	شماره دسترسی توالی‌ها در بانک ژن		
		نام علمی	اندام گیاهی		ITS1	28S	<i>Tub2</i>
<i>Colletotrichum truncatum</i> SCUA-Hey-H	یونجه	<i>Medicago sativa</i>	برگ	رامهرمز	MG846732	-	MG846758
<i>C. karstii</i> SCUA-Hey-2	پرتقال	<i>Citrus sinensis</i>	برگ	دزفول	MG846724	MG846742	MG846753
<i>C. karstii</i> SCUA-Hey-7	پرتقال	<i>C. sinensis</i>	برگ	باغملک	MF171151	MF171158	MG846754
<i>C. karstii</i> SCUA-Hey-J	پرتقال	<i>C. sinensis</i>	برگ	دزفول	MG846733	-	MG846759
<i>C. gloeosporioides</i> SCUA-Hey-1	پرتقال	<i>C. sinensis</i>	میوه	اهواز	MG846721	-	MG846750
<i>C. karstii</i> SCUA-Hey-L	لیموترش	<i>C. limon</i>	برگ	دزفول	MG846735	-	MG846760
<i>C. karstii</i> SCUA-Hey-O	نارنج	<i>C. aurantium</i>	برگ	شوش	MG846736	-	MG846761
<i>C. nymphaeae</i> SCUA-Hey-10	نارنج	<i>C. aurantium</i>	برگ	دزفول	MG846722	MG846740	MG846751
<i>C. nymphaeae</i> SCUA-Hey-11	توت‌فرنگی	<i>Fragaria ananassa</i>	میوه	اهواز	MG846723	MG846741	MG846752
<i>C. musae</i> SCUA-Hey-12	موز	<i>Musa sapientum</i>	میوه	اهواز	MF171154	MF171157	MG846757
<i>C. musae</i> SCUA-Hey-8	موز	<i>M. sapientum</i>	میوه	اهواز	MF171152	MF171155	MG846755
<i>C. musae</i> SCUA-Hey-9	موز	<i>M. sapientum</i>	میوه	اهواز	MF171153	MF171156	MG846756

ولی برای جدایه‌های *C. karstii* SCUA-Hey-J، *C. karstii* SCUA-Hey-L، *C. gloeosporioides* SCUA-Hey-1 و *C. karstii* SCUA-Hey-O فقط با استفاده از جفت آغازگر T1/Bt-2b تکثیر شدند. در این بررسی، ۱۰۶ توالی از ۵۳ آرایه (که پوشش‌دهنده تقریباً تمام گونه‌های معتبر *Colletotrichum* نزدیک به گونه‌های مورد بررسی می‌باشد)، در تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی با استفاده از الگوریتم درست‌نمایی بیشینه استفاده شدند. مجموع طول توالی ترکیبی هم‌ردیف شده چهار ناحیه مورد بررسی با احتساب گپ‌های داخلی ۱۰۱۹ سایت نوکلئوتیدی (شامل ۵۱۸ و ۵۰۱ سایت نوکلئوتیدی به ترتیب از نواحی ITS و *Tub2*) بود. از این تعداد سایت نوکلئوتیدی با شامل کردن آرایه غریبه، ۵۷۹ سایت محافظت شده (شامل ۳۵۰ و ۲۲۹ سایت نوکلئوتیدی به ترتیب از نواحی ITS و *Tub2*)، ۱۳۲ سایت متغیر و عاری از اطلاعات متمایزکننده آرایه‌ها (Parsimony-uninformative) (شامل ۶۱ و ۷۱ سایت نوکلئوتیدی به ترتیب از نواحی ITS و *Tub2*) و ۲۹۳ سایت متغیر و حاوی اطلاعات متمایزکننده آرایه‌ها (Parsimony-informative)

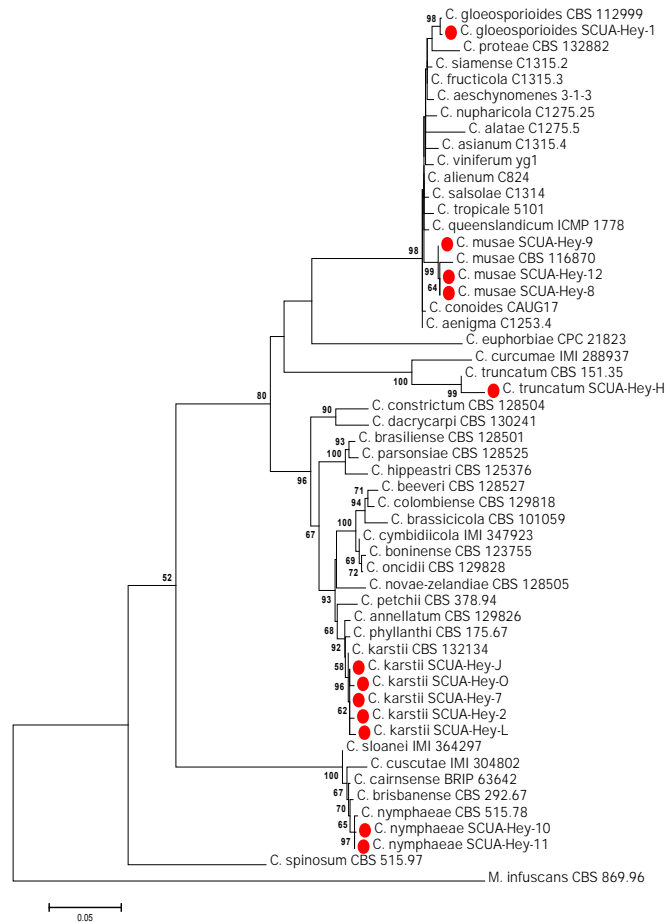
نتیجه و بحث

در این پژوهش، تعداد ۴۰ نمونه از گیاهان دارای علائم بیماری آنتراکنوز جمع‌آوری گردید که از آن ۱۲ جدایه *Colletotrichum* به دست آمد. جدایه‌ها پس از خالص‌سازی با استفاده از ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی و همچنین تجزیه و تحلیل مولکولی براساس دو ناحیه ITS و *Tub2* در سطح گونه شناسایی گردیدند و از هر گونه یک جدایه توصیف شد. بر این اساس، جدایه‌های این تحقیق گونه‌های *Colletotrichum truncatum*، *C. gloeosporioides*، *C. karstii*، *C. musae* و *C. nymphaeae* را شامل شدند.

- توالی‌یابی نواحی ITS و *Tub2* و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی ناحیه *Tub2* برای جدایه‌های *C. karstii* SCUA-Hey-2، *C. musae* SCUA-Hey-8، *C. karstii* SCUA-Hey-7، *C. nymphaeae* SCUA-Hey-10، *C. musae* SCUA-Hey-9، *C. musae* SCUA-Hey-12 و *C. nymphaeae* SCUA-Hey-11 با استفاده از هر دو جفت آغازگر مورد استفاده تکثیر شد،

فیلوژنتیکی دولوکوسه مبتنی بر دو ناحیه ITS و *Tub2*، تمام جدایه‌ها با استرین‌های مرجع گونه خود خوشه‌بندی شدند و کلادهایی با ارزش و معتبر ایجاد کردند که جزئیات آن زیر شرح هر گونه آورده شده است (شکل ۱).

شامل ۹۴ و ۱۹۹ سایت نوکلئوتیدی به ترتیب از نواحی ITS و *Tub2* بود. براساس تجزیه و تحلیل نرم‌افزار MEGA6، بهترین مدل جانیشینی نوکلئوتیدی برای رسم درخت فیلوژنتیکی مدل Kimura 2-parameter (K2+G) پیشنهاد شد. در درخت



شکل ۱- درخت فیلوژنتیکی جدایه‌های *Colletotrichum* که در تجزیه و تحلیل درست‌نمایی بیشینه براساس هم‌ردیفی توالی‌های ترکیبی دو ناحیه ITS و *Tub2* با استفاده از مدل K2+G به دست آمده است. درصد تکرار کلادها در ۵۰۰ بار نمونه‌گیری کاذب (بوت‌استراپ) در محل ریشه کلادها درج شده است. درخت با استفاده از گونه *Monilochaetes infuscans* ریشه‌دار شده است.

Fig. 6. Phylogenetic tree constructed from a maximum likelihood analysis based on a concatenated alignment from ITS and *Tub2* sequences of *Colletotrichum* isolates under K2+G model. Bootstrap values greater than 50% (expressed as percentages of 500 replications) are shown at the node. The tree was rooted with *Monilochaetes infuscans*.

پرگنه روی محیط کشت PDA کرم رنگ، میسلیوم‌ها به صورت فرورفته رشد یافته، حلقه‌های تولید آسروول در اطراف مرکز پرگنه به صورت دایره متحدالمرکز و در حاشیه به صورت پراکنده؛ ریشه‌ها بی‌رنگ، منشعب و به صورت سطحی یا فرورفته در محیط غذایی، قطر ریشه‌ها در پرگنه‌های ۱۴ روزه به ابعاد ۲/۳۴ - ۴/ ۹۴(۵/۲) میکرومتر؛ تولید آپرسوریوم در محیط کشت

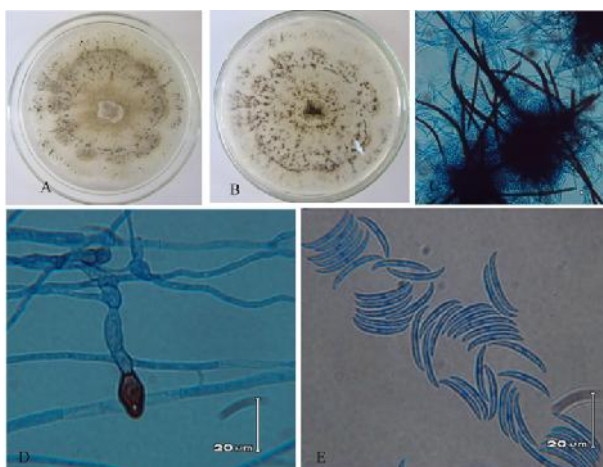
- بررسی ریخت‌شناسی و مولکولی گونه‌های شناسایی شده
Colletotrichum truncatum (Schwein.) Andrus & W.D. -۱
 Moore, Phytopathology 25: 121 (1935) (شکل ۲)
 نمونه بررسی شده: یک جدایه از برگ یونجه (*Medicago sativa*)، جدایه *C. truncatum* SCUA-Hey-H، استان خوزستان، شهرستان رامهرمز، ۹۶/۲/۱۵

۹۷ درصد شباهت نوکلئوتیدی با استرین تیپ *C. truncatum* CBS 151.35 نشان دادند.

این بیمارگر که به کمپلکس گونه‌ای *C. truncatum* تعلق دارد، نخستین بار توسط آندرس و مور (Andrus & Moore 1935) توصیف و در جنس *Glomerella* طبقه‌بندی شد. این گونه در طیف وسیعی از تیره‌های گیاهی از جمله *Rosaceae*، *Poaceae*، *Fabaceae* و *Solanaceae* ایجاد بیماری می‌کند (Damm et al. 2009, De Silva et al. 2016, He et al. 2016, Wang et al. 2016). این گونه در ایران، در استان زنجان و همدان روی یونجه گزارش شده است (Zafari & Tarah- 2007) و در این مطالعه برای نخستین بار از استان خوزستان گزارش می‌شود.

نیز قابل مشاهده بود؛ کنیدیوماتا از نوع آسروول و عمدتاً به صورت انفرادی یا تجمع‌های زنجیره مانند در سطح یا به صورت فرورفته در محیط، دارای خارهایی (ستا) به ابعاد $7/8-4/6 \times 308-130$ میکرومتر؛ کنیدیوم‌ها بی‌رنگ، دارای دیواره ظریف و صاف و داسی، بدون دیواره و تک‌سلولی به ابعاد $2/6-2/34(1/2) \times 18/2-28/6$ (۱۵/۶۹) میکرومتر (شکل ۲).

در درخت فیلوژنتیکی ترسیمی (شکل ۱)، جدایه *C. truncatum* SCUA-Hey-H با استرین شناخته شده *C. truncatum* CBS 151.35 خوشه‌بندی شد و یک کلاد معتبر با ارزش بوت‌استرپ ۹۹ درصد ایجاد کرد. در الگوریتم جستجوی BLASTn، توالی‌های ITS و *Tub2* این جدایه به ترتیب ۱۰۰ و



شکل ۲- ریخت‌شناسی جدایه *Colletotrichum truncatum* SCUA-Hey-H. A و B. پرگنه ۱۴ روزه روی محیط غذایی PDA. C. آسروول‌ها و خارها تشکیل شده روی محیط PDA، D. ریشه‌ها و آپرسوریوم، E. کنیدیوم‌ها.

Fig. 2. *Colletotrichum truncatum* SCUA-Hey-H: A & B. 14-days colonies on PDA, C. Acervuli and seta formed on PDA, D. Hyphae and appressoria, E. Conidia.

۲- *Colletotrichum musae* (Berk. & M.A. Curtis) Arx, -

(شکل ۳) (1957) 446 (4): 29 *Phytopathologische Zeitschrift*

نمونه بررسی شده: سه جدایه از میوه موز (*Musa sapientum*)، جدایه‌های *C. musae* SCUA-Hey-8، *C. musae* SCUA-Hey-9 و *C. musae* SCUA-Hey-12، استان خوزستان، شهرستان اهواز، ۹۵/۹/۳۰، ۹۵/۱۰/۲ و ۹۶/۱۰/۶

پرگنه روی محیط کشت PDA نارنجی رنگ، میسلیوم‌ها به صورت فرورفته رشد یافته و حلقه‌های تولید آسروول در اطراف مرکز پرگنه به صورت دایره متحدالمركز و در حاشیه به صورت پراکنده، ریشه‌ها به صورت سطحی یا فرورفته در محیط، قطر ریشه در پرگنه‌های ۱۴ روزه به ابعاد $3/03-1/5$

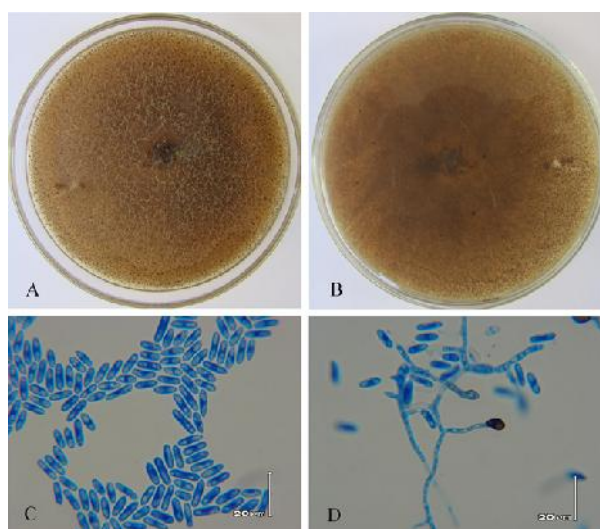
میکرومتر، تولید آپرسوریوم در محیط کشت نیز قابل مشاهده بود؛ کنیدیوم‌ها بی‌رنگ، دارای دیواره ظریف و صاف و سیلندری، بدون دیواره و تک‌سلولی به ابعاد $5/05-4/04(3/03) \times 7/57-16/09$ میکرومتر.

در درخت فیلوژنتیکی ترسیمی (شکل ۱)، جدایه‌های *C. musae* SCUA-Hey-8، *C. musae* SCUA-Hey-9 و *C. musae* SCUA-Hey-12 با استرین تیپ *C. musae* CBS 116870 خوشه‌بندی شدند و یک کلاد معتبر با ارزش بوت‌استرپ ۹۹ درصد ایجاد کرد. در الگوریتم جستجوی

است (Tao et al. 2013). ویر و همکاران (Weir et al. 2012) گزارش کردند که توالی ITS می‌تواند گونه *C. musae* را از سایر گونه‌ها جدا کند. این گونه در ایران، نخستین بار در سال ۱۳۸۰، توسط امانی (Amani 2010) از میوه‌های موز در استان سیستان و بلوچستان گزارش شد. علیزاده و همکاران (Alizadeh et al. 2015) این گونه را از روی موز و پرتقال در استان‌های گلستان، مازندران و گیلان گزارش کردند که گزارش آن از روی پرتقال برای نخستین بار بود.

BLASTn، توالی‌های ITS و *Tub2* این جدایه‌ها به ترتیب ۹۹ و ۱۰۰ درصد شباهت نوکلئوتیدی با استرین تیپ *C. musae* CBS 116870 نشان دادند.

گونه *C. musae* که به کمپلکس گونه‌ای *C. gloeosporioides* تعلق دارد، نخستین بار از کارولینای شمالی گزارش شده است (Berkeley 1874). این گونه بیمارگر موز در سراسر جهان می‌باشد (Sutton 1980, Su et al. 2011, Weir et al. 2012) و به عنوان اندوفیت *Musa acuminata* در تایلند شناسایی شده



شکل ۳- ریخت‌شناسی جدایه *Colletotrichum musae* SCUA-Hey-8: A و B. پرگنه ۱۴ روزه روی PDA. C. کنیدیوم‌ها، D. ریشه‌ها و آپرسوریوم.

Fig. 3. Morphology of the isolate *Colletotrichum musae* SCUA-Hey-8: A & B. 14-days colony on PDA, C. Conidia, D. Hyphae and appressoria.

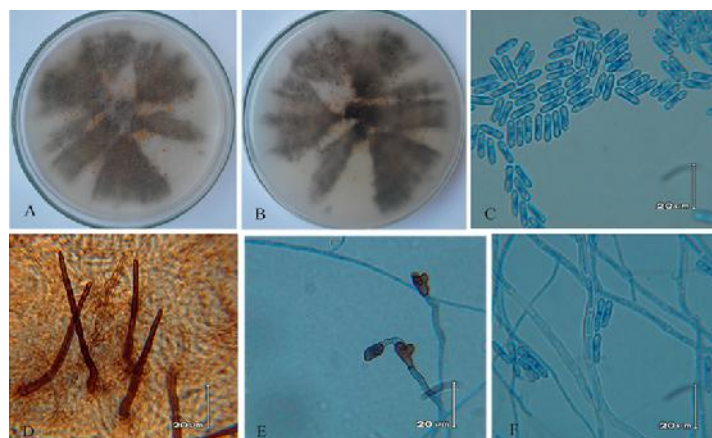
آسروول و عمدتا به صورت انفرادی یا تجمع‌های زنجیره مانند در سطح یا به صورت فرورفته در محیط و دارای خارهایی به ابعاد $۲/۹-۴/۰۴ \times ۳۰/۳-۵۵/۵$ میکرومتر، کنیدیوم‌ها بی‌رنگ، دارای دیواره ظریف و صاف و سیلندری شکل، بدون دیواره و تک‌سلولی به ابعاد $۶/۲-۵/۲۱ \times ۷/۸-۱۵/۶(۱۷/۶۸)$ میکرومتر.

در درخت فیلوژنتیکی ترسیمی (شکل ۱)، جدایه *C. gloeosporioides* SCUA-Hey-1 با استرین تیپ *C. gloeosporioides* CBS 112999 خوشه‌بندی شد و یک کلاد معتبر با ارزش بوت‌استرپ کافی ۹۸ درصد ایجاد کرد. در الگوریتم جستجوی BLASTn، توالی‌های ITS و *Tub2* این جدایه به ترتیب ۹۹ و ۹۹ درصد شباهت نوکلئوتیدی با استرین *C. gloeosporioides* CBS 112999 نشان دادند.

۳- *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc.,

(شکل ۴) (۴) Atti dell'Istituto Veneto Scienze 2: 670 (1884) نمونه بررسی شده: یک جدایه از میوه پرتقال (*Citrus sinensis*), جدایه *C. gloeosporioides* SCUA-Hey-1، استان خوزستان، شهرستان اهواز، ۹۵/۱۱/۲۶

پرگنه روی محیط کشت PDA سفید مایل به خاکستری و دارای توده کنیدیوم نارنجی در مرکز تشک پتری، میسیلیوم‌ها به صورت کرکی رشد یافته و حلقه‌های تولید آسروول در اطراف مرکز پرگنه به صورت دواير متحدالمرکز و در حاشیه به صورت پراکنده، ریشه‌ها بی‌رنگ، منشعب و به صورت کرکی در محیط غذایی، قطر ریشه‌ها در پرگنه‌های ۱۴ روزه به ابعاد $۲/۳۴-۶/۵$ میکرومتر، تولید آپرسوریوم در محیط کشت نیز قابل مشاهده بود؛ کنیدیوماتا از نوع



شکل ۴- ریخت‌شناسی جدایه *Colletotrichum gloeosporioides* SCUA-Hey-1: A و B. پرگنه ۱۴ روزه روی PDA، C. کنیدیوم‌ها، D. خارها، E. آپرسوریوم، F. ریشه‌ها و کنیدیوم‌ها.

Fig. 4. *Colletotrichum gloeosporioides* SCUA-Hey-1: A & B. 14-day colony on PDA, C. Conidia, D. Setae, E. Appressoria, F. Hyphae and conidia.

جدایه‌های *Colletotrichum nymphaeae* SCUA-Hey-10 و *C. nymphaeae* SCUA-Hey-11، استان خوزستان، شهرستان دزفول و اهواز، ۹۵/۸/۳، ۹۶/۸/۶

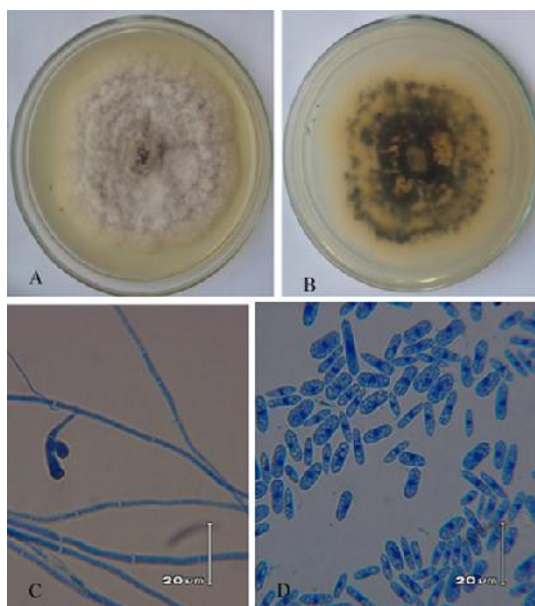
پرگنه روی محیط کشت PDA نارنجی با حاشیه کرم و دارای توده کنیدیوم نارنجی در مرکز، میسیلیوم‌ها به صورت کرکی، ریشه‌ها بی‌رنگ منشعب و به صورت کرکی، قطر ریشه‌ها در پرگنه‌های ۱۴ روزه به ابعاد ۴/۹۴-۱/۸۲ میکرومتر، تولید آپرسوریوم در محیط کشت نیز قابل مشاهده بود؛ کنیدیوم‌ها بی‌رنگ، دارای دیواره ظریف و صاف و سیلندری، بدون دیواره و تک‌سلولی به ابعاد ۵/۲-۲۰/۸ × ۲/۳۴-۵/۲ میکرومتر.

در درخت فیلوژنتیکی ترسیمی (شکل ۱)، جدایه‌های *C. nymphaeae* SCUA-Hey-10 و *C. nymphaeae* SCUA-Hey-11 با استرین تیپ *C. nymphaeae* CBS 515.78 خوشه‌بندی شدند و یک کلاد معتبر با ارزش بوت‌استرپ نسبتاً کافی ۹۷ درصد ایجاد کردند. در الگوریتم جستجوی BLASTn، توالی‌های ITS و *Tub2* این جدایه‌ها به ترتیب ۹۹ و ۱۰۰ درصد شباهت نوکلئوتیدی با استرین تیپ *C. nymphaeae* CBS 515.78 نشان دادند.

گونه *C. gloeosporioides* که به همراه تعدادی از گونه‌های دیگر *Colletotrichum* کمپلکس گونه‌ای *C. gloeosporioides* را تشکیل می‌دهند، در ابتدا به وسیله پنزیگ (Penzig 1882) به عنوان *Vermicularia gloeosporioides* از روی مرکبات گزارش و توصیف شد، ولی در سال ۱۸۸۸ به *C. gloeosporioides* تغییر نام یافت (Burger 1921). در ایران، این گونه از بسیاری از گیاهان علفی و چوبی گزارش شده است (Farr et al. 1989, Ershad et al. 2009, Davarian et al. 2006). (Babri et al. 2009, Taheri et al. 2016). نخستین بار عامل بیماری خشکیدگی سرشاخه‌های مرکبات در سال ۱۳۲۲ از سواحل دریای خزر توسط پتراک و اسفندیاری و سپس در سال ۱۳۷۴ توسط ارشاد از فارس، خوزستان و میناب گزارش شد (Ershad et al. 2009). ویژگی‌های ریخت‌شناختی و بیماری‌زایی جدایه‌های این بیمارگر در استان گلستان توسط داوریان و همکاران (Davarian et al. 2006) بررسی شده است.

Colletotrichum nymphaeae (Pass.) Aa, Netherlands -۴ (شکل ۵) Journal of Plant Pathology 84: 110 (1978)

نمونه‌های بررسی شده: دو جدایه از میوه توت‌فرنگی (*Fragaria ananassa*) و نارنج (*Citrus aurantium*).



شکل ۵- ریخت‌شناسی جدایه *Colletotrichum nymphaeae* SCUA-Hey-10: A و B. پرگنه ۱۴ روزه روی PDA، C. ریشه‌ها و آپرسوریوم، D. کنیدیوم‌ها.

Fig. 5. *Colletotrichum nymphaeae* SCUA-Hey-10: A & B. 14-days colony on PDA, C. Hyphae and appressoria, D. Conidia.

شهرستان دزفول، شوش و باغملک، ۹۵/۸/۲۷ برای سه جدایه اول، ۹۶/۱/۱۳ برای جدایه چهارم و ۹۵/۸/۱۴ برای جدایه پنجم پرگنه روی محیط کشت PDA سفید با حاشیه کرم و از پشت پتری کرم با حاشیه خاکستری با افزایش سن سفید مایل به خاکستری، پرگنه‌ها دارای توده کنیدیوم نارنجی در مرکز پتری، میسیلیوم‌ها به صورت کرکی رشد یافته و حلقه‌های تولید آسروول در اطراف مرکز پرگنه به صورت دایره متحدالمرکز و در حاشیه به صورت پراکنده، ریشه‌ها بی‌رنگ، منشعب و به صورت کرکی، قطر ریشه‌ها در پرگنه‌های ۱۴ روزه به ابعاد $۵/۷۲(۶/۵)$ - $۲/۹$ میکرومتر، تولید آپرسوریوم در محیط کشت نیز قابل مشاهده بود؛ کنیدیوماتا از نوع آسروول و عمدتاً به صورت انفرادی یا تجمع‌های زنجیره مانند در سطح یا به صورت فرورفته در محیط و دارای خارهایی به ابعاد $۲/۹-۴/۰۴$ - $۳۰/۳-۵۵/۵$ میکرومتر، بی‌رنگ، دارای دیواره ظریف و صاف و سیلندری، بدون دیواره و تک‌سلولی به ابعاد $۷/۸-۱۳$ - $۳/۱۲-۵/۲(۶/۵)$ میکرومتر.

در درخت فیلوژنتیکی ترسیمی (شکل ۱)، جدایه‌های این گونه با استرین تیپ *C. karstii* CBS 132134 خوشه‌بندی شدند و یک کلاد با ارزش بوت‌استرپ پایین ۹۶ درصد ایجاد کرد. در الگوریتم جستجوی BLASTn، توالی‌های ITS و *Tub2*

گونه *C. nymphaeae* که به کمپلکس گونه‌ای *C. acutatum* تعلق دارد به عنوان بیمارگر از روی آنمون در ایتالیا، اسرائیل و هلند، فلفل قرمز در اندونزی و زیمبابوه، توت‌فرنگی در کانادا، آمریکا، ایتالیا، فرانسه، بلغارستان، آفریقای جنوبی، هلند، اسپانیا، سوئیس و بریتانیا، سوبابل در مکزیک، سیب در اروگوئه، تایلند و برزیل و نیلوفر آبی زرد و سفید در هلند، زیتون در پرتغال، شمعدانی در هند، سه رنگ در بریتانیا، لوبیا در هلند و انگور در چین گزارش شده است (Damm et al. 2012, Velho et al. 2014, 2015, Baroncelli et al. 2015, Talhinas et al. 2015, Liu et al. 2016). این بیمارگر در ایران روی توت‌فرنگی توسط کریمی و همکاران (Karimi et al. 2017) گزارش شده است. در تحقیق حاضر، این قارچ برای نخستین بار در ایران از روی مرکبات گزارش می‌شود.

۵- *Colletotrichum karstii* Y.L. Yang, Zuo Y. Liu, K.D. Hyde & L. Cai, Cryptogamie Mycologie 32 (3): 241 (2011) (شکل ۶)

نمونه‌های بررسی شده: پنج جدایه از میوه نارنج (*Citrus aurantium*)، جدایه‌های SCUA-Hey-2. *C. karstii*. SCUA-Hey-L. *C. karstii* SCUA-Hey-J. *C. karstii* Hey-7 و *C. karstii* SCUA-Hey-O، استان خوزستان،

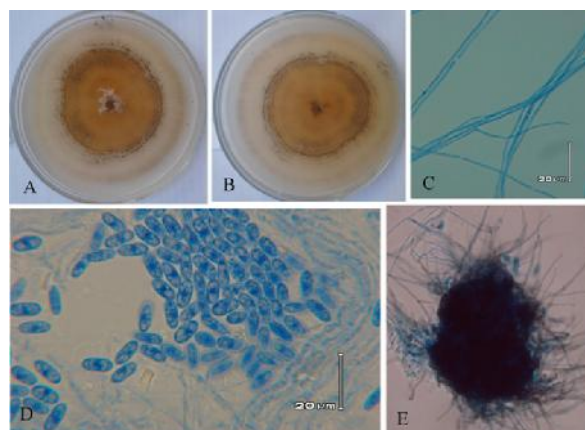
طاهری و همکاران (Taheri et al. 2016) برای نخستین بار این گونه را از روی مرکبات در مازندران گزارش کردند. علیزاده و همکاران (Alizadeh et al. 2015) گزارش کردند که جمعیت‌های مختلف گونه *Colletotrichum karstii* از نظر ریخت‌شناسی متنوع هستند و استرین‌های این گونه به طور معنی‌داری از نظر اندازه کنیدیوم و کنیدیوماتا متفاوت هستند. در این تحقیق، گونه فوق برای نخستین بار از خوزستان گزارش می‌شود.

سیاسگزاری

به این وسیله، از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به جهت پوشش مالی این تحقیق قدردانی می‌شود.

این جدایه‌ها به ترتیب ۹۹ و ۱۰۰-۹۹ درصد شباهت نوکلئوتیدی با استرین تیپ *C. karstii* CBS 132134 نشان دادند.

این گونه که به کمپلکس گونه‌ای *C. boninense* تعلق دارد، نخستین بار در چین روی گیاه *Vanda* sp. از تیره ارکیده گزارش شده و همچنین از روی میزبان‌های گیاهی دیگر مانند فلفل، پاپایا، گل خورشیدی، خربزه، خرمالوی استرالیایی، اکالیپتوس گرندیس، سیب، زیتون، پسته، انبه و درخت کاکائو گزارش شده است (Damm et al. 2012, Yang et al. 2011, Peng et al. 2012, Tao et al. 2013, Afanador-Kafuri et al. 2014, Schena et al. 2014, Velho et al. 2015, Wang et al. 2016). این گونه در ایران، برای نخستین بار از روی شمشاد رسمی، یاس هلندی، برگ بو، اوپارسلام، میوه گل‌ساعتی و فیکوس بنجامین گزارش شده است (Alizadeh et al. 2015).



شکل ۶- ریخت‌شناسی جدایه *Colletotrichum karstii* SCUA-Hey-7: A و B. پرگنه ۱۴ روزه روی PDA. C. ریشه‌ها، D. کنیدیوم‌ها، E. آسروول.

Fig. 6. *Colletotrichum karstii* SCUA-Hey-7: A & B. 14-days colony on PDA, C. Hyphae, D. Conidia, E. Acervuli.

References

- Afanador-Kafuri, L., González, A., Gañán, L., Mejía, J.F., Cardona, N. & Alvarez, E. 2014. Characterization of the *Colletotrichum* species causing anthracnose in Andean blackberry in Colombia. *Plant Disease* 98(11): 1503–1513.
- Ahmadpour, S.A., Mehrabi-Koushki, M. & Farokhinejad, R. 2017. *Neodidymelliopsis farokhinejadii*, a new fungal species from dead branches of trees in Iran. *Sydowia* 69:171–182.
- Agrios, G.N. 2005. *Plant Pathology* 5th. Elsevier Academic Press 922 pp.
- Alizadeh, A., Javan-Nikkhah, M., Zare, R., Fotouhifar, B.Kh., Damm, U. & Stukenbrock, E.H. 2015. New records of *Colletotrichum* species for the mycobiota of Iran. *Mycologia Iranica* 2(2): 95–109.
- Amani, M. 2010. Identification of fungal pathogens on Banana (*Musa acuminata* L.) in Sistan & Bluchestan province. *Plant Protection Journal* 3(2): 147–160.

- Andrus, C.F. & Moore, W.D. 1935. *Colletotrichum truncatum* (Schw.), n. comb., on garden and lima beans. *Phytopathology* 25: 121–125.
- Babri, M., Javan Nikkhab, M., Taheri, H. & Alian, Y. 2009. Comparing Virulence of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates the Causal Agent of Citrus Anthracnose in Mazandaran province, Iran. *Journal of Agricultural Science* 40(2): 27–34.
- Baroncelli, R., Zapparata, A., Sarrocco, S., Sukno, S.A., Lane, C.R., Thon, M.R., Vannacci, G., Holub, E. & Sreenivasaprasad, S. 2015. Molecular diversity of anthracnose pathogen populations associated with UK strawberry production suggests multiple introductions of three different *Colletotrichum* species. *PLoS One* 10 (6): e0129140.
- Beneke, E.S. & Rogers, A.L. 1996. *Medical mycology and human mycoses*. Star Publishing Company, Belmont, 239 pp.
- Berkeley, M.J. 1874. Notices of North American fungi. *Grevillea* 3: 1–17.
- Burgar, O.F. 1921. Variations in *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal of Agricultural Research* 20: 723–736.
- Cai, L., Hyde, K.D., Taylor, P.W.J., Weir, B., Waller, J.M., Abang, M.M., Zang, J.C., Yang, Y.L., Phouliyong, S., Prihastuti, Z.Y., Shivas, R.G., McKenzie, E.H.C. & Johnston, P.R. 2009. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. *Fungal Diversity* 39: 183–204.
- Cannon, P.F., Damm, U., Johnston, P.R. & Weir, B.S. 2012. *Colletotrichum* current status and future directions. *Studies in Mycology* 73: 181–213.
- Crouch, J.A., Clarke, B.B., White, J.F.J.r. & Hillman, B.I. 2009. Systematic analysis of the falcate-spored gramminicolous *Colletotrichum* and a description of six new species from warm-season grasses. *Mycologia* 101: 717–732.
- Crouch, J.A. 2014. *Colletotrichum caudatum* s.l. is a species complex. *IMA Fungus* 5: 1–30.
- Damm, U., Woudenberg, J.H.C., Cannon, P.F. & Crous, P.W. 2009. *Colletotrichum* species with curved conidia from herbaceous hosts. *Fungal Diversity* 39: 45–87.
- Damm, U., Cannon, P.F., Woudenberg, J.H.C., Johnston, P.R., Wei, B.S., Tan, Y.P., Shivas, R.G. & Crous, P.W. 2012a. The *Colletotrichum boninense* species complex. *Studies in Mycology* 73: 1–36.
- Damm, U., Cannon, P.F., Woudenberg, J.H.C. & Crous, P.W. 2012b. The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Studies in Mycology* 73: 37–113.
- Damm, U., Cannon, P.F., Liu, F., Barreto, R.W., Guatimosim, E. & Crous, P.W. 2013. The *Colletotrichum orbiculare* species complex: important pathogens of field and weeds. *Fungal Diversity* 61: 29–59.
- Damm, U., O'Connell, R.J., Groenewald, J.Z. & Crous, P.W. 2014. The *Colletotrichum destructivum* species complex - hemibiotrophic pathogens of forage and field crops. *Studies in Mycology* 79: 49–84.
- Davarian, T., Taheri, A. & Razavi, S.I. 2006. Study on morphological and pathological characteristics of *Colletotrichum gloeosporioides* the causal agent of citrus anthracnose. *Journal of Agricultural Sciences and National Resources* 13(1): 1–9.
- De Silva, D.D., Ades, P.K., Crous, P.W. & Taylor, P.W.J. 2017. *Colletotrichum* species associated with chili anthracnose in Australia. *Plant Pathology* 66(2): 254–267.
- Ershad, J. 2009. *Fungi of Iran*. Iranian Research Institute of Plant Protection Press.
- Farr, D., Bills, G.F., Chamuris, G.P. & Rossman, A.Y. 1989. *Fungi, on plants and plant products in the United States*. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Glass, N.L. & Donaldson, G. 1995. Development of primer sets designed for use with PCR to amplify conserved genes from filamentous *ascomycetes*.

- Applied and Environmental Microbiology 61: 1323–1330.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Paper presented at the Nucleic Acids Symposium Series.
- He, Y., Chen, Q., Shu, C., Yang, M. & Zhou, E. 2016. *Colletotrichum truncatum*, a new cause of anthracnose on Chinese flowering cabbage (*Brassica parachinensis*) in China. Tropical Plant Pathology 41(3): 183–192.
- Hyde, K.D., Cai, L., Cannon, P.F., Crouch, J.A., Crous, P.W., Damm, U., Goodwin, P.H., Chen, H., Johnston, P.R., Jones, E.B.G., Liu, Z.Y., McKenzie, E.H.C., Moriwaki, J., Noireung, P., Pennycook, S.R., Pfenning, L.H., Prihastuti, H., Sato, T., Shivas, R.G., Tan, Y.P., Taylor, P.W.J., Weir, B.S., Yang, Y.L. & Zhang, J.Z. 2009. *Colletotrichum*-names in current use. Fungal Diversity 39: 147–182.
- Hyde, K.D., Nilsson, R.H., Alias, S.A., Ariyawansa, H.A., Blair, J.E., Cai, L., De Cock, A.W.A.M., Dissanayake, A.J., Glockling, S.L., Goonasekara, I.D., Gorczak, M., Hahn, M., Jayawardena, R.S., Van Kan, J.A.L., Laurence, M.H., Lévesque, C.A., Li, X.H., Liu, J.K., Maharachchikumbura, S.S.N., Manamgoda, D.S., Martin, F.N., McKenzie, E.H.C., McTaggart, A.R., Mortimer, P.E., Nair, P.V.R., Pawłowska, J., Rintoul, T.L., Shivas, R.G., Spies, C.F.J., Summerell, B.A., Taylor, P.W.J., Terhem, R.B., Udayanga, D., Vaghefi, N., Walther, G., Wilk, M., Wrzosek, M., Xu, J.C., Yan, J.Y. & Zhou, N. 2014-One stop shop: backbone trees for important phytopathogenic genera: I. Fungal Diversity 67: 21–125.
- Index Fungorum, 2016. <http://www.indexfungorum.org/names/names.asp>.
- Jayawardena, R.S., Hyde, K.D., Jeewon, R., Liu, X.H., Liu, M. & Yan, J.Y. 2016. Why it is important to correctly name *Colletotrichum* species? Mycosphere 7: 1076–1092.
- Karimi, K., Ahari, A.B., Arzanlou, M., Amini, J., Pertot, I. & Rota-Stabelli, O. 2017. Application of the consolidated species concept to identify the causal agent of strawberry anthracnose in Iran and initial molecular dating of the *Colletotrichum acutatum* species complex. European Journal of Plant Pathology 147(2): 375–387.
- Khansari, A.M., Javan, N.M., Khodaparast, S.A., Babri, M. & Ghazanfari, K. 2010. A study on sexual fertility and a determination of vegetative compatibility groups among *Glomerella cingulata* isolates from citrus trees in Mazandaran province, Iran 41(1): 71–79.
- Liu, F., Weir, B.S., Damm, U., Crous, P.W., Wang, Y., Liu, B., Wang, M., Zhang, M. & Cai, L. 2015. Unraveling *Colletotrichum* species associated with Camellia: employing ApMat and GS loci to resolve species in the *C. gloeosporioides* complex. Persoonia 35: 63–86.
- Liu, F., Wang, M., Damm, U., Crous, P.W. & Cai, L. 2016. Species boundaries in plant pathogenic fungi: a *Colletotrichum* case study. BMC Evolutionary Biology 16, Article 81. Trees in Mazandaran province, Iran 41(1): 71–79.
- Maharachchikumbura, S.S.N., Hyde, K.D., Jones, E.B.G., McKenzie, E.H.C., Huang, S.K., Abdel-Wahab, M.A., Daranagama, D.A., Dayarathne, M., Dsouza, M.J., Goonasekara, I.D., Hongsanan, S., Jayawardena, R.S., Kirk, P.M., Konta, S., Liu, J.K., Liu, Z.Y., Norphanphoun, C., Shenoy, B.D., Xiao, Y., Bahkali, A.H., Kang, J., Somrothipol, S., Suetrong, S., Wen, T. & Xu, J. 2015. Towards a natural classification and backbone tree for Sodiariomycetes. Fungal Diversity 72: 199–301.
- Maharachchikumbura, S.S.N., Hyde, K.D., Jones, E.B.G., McKenzie, E.H.C., Bhat, J.D., Dayarathne, M.C., Huang, S.K., Norphanphoun, C., Senanayake, I.C., Perera, R.H., Shang, Q.J.,

- Xiao, Y., D'souza, M.J., Hongsanan, S., Jayawardena, R.S., Daranagama, D.A., Konta, S., Goonasekara, I.D., Zhuang, W.Y., Jeewon, R., Phillips, A.J.L., Abdel-Wahab, M.A., Al-Sadi, A.M., Bahkali, A.h., Boonmee, S., Boonyuen, N., Cheewangkoon, R., Dissanayake, A.J., Kang, J., Li, Q.R., Liu, J.K., Liu, X.Z., Liu, Z.Y., Luangsa-ard, J.J., Pang, K.L., Phookamsak, R., Promputtha, I., Suetrong, S., Stadler, M., Wen, T. & Wijayawardene, N.N. 2016. Families of *Sordariomycetes*. *Fungal Diversity* 79: 1–317.
- O'Donnell, K. 1993. *Fusarium* and ITS near relatives. Pp. 225–233. In: *The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics* (Reynolds, D.R. & Taylor, J.W., eds). Wallingford, UK: CAB International.
- O'Donnell, K. & Cigelnik, E. 1997. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 7: 103–116.
- Peng, L.J., Yang, Y.L., Hyde, K.D., Bahkali, A.H. & Liu, Z.Y. 2012. *Colletotrichum* species on Citrus leaves in Guizhou and Yunnan provinces, China. *Cryptogamie Mycologie* 33: 267–283.
- Penzig, A.G.O. 1882. Fungi agrumicoli. Contribuzione allo studio dei funghi parassiti degli agrumi. *Michelia* 2: 385–508.
- Raeder, U. & Broda, P. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology* 1: 17–20.
- Réblová, M., Gams, W. & Seifert, K.A. 2011. *Monilochaetes* and allied genera of the *Glomerellales*, and a reconsideration of families in the *Microascales*. *Studies in Mycology* 68: 163–191.
- Schena, L., Mosca, S., Cacciola, S.O., Faedda, R., Sanzani, S.M., Agosteo, G.E., Sergeeva, V. & Magnano di San Lio, G. 2014. Species of the *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. boninense* complexes associated with olive anthracnose. *Plant Pathology* 63: 437–446.
- Su, Y.Y., Noireung, P., Liu, F., Hyde, K.D., Moslem, M.A., Bahkali, A.H., Abd-Elsalam, K.A. & Cai, L. 2011. Epitypification of *Colletotrichum musae*, the causative agent of banana anthracnose. *Mycoscience* 52: 376–382.
- Sutton, B.C. 1980. *The Coelomycetes*. Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acervuli & Stromata. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England 1–696.
- Sutton, B.C. 1992. The genuse *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. 1–26.
- Stoneman, B. 1898. A comparative study of the development of some anthracnoses. *Botanical Gazette Chicago* 26: 69–120.
- Taheri, H., Javan-Nikkhah, M., Elahinia, S.A., Khodaparast, S.A. & Golmohammadi, M. 2016. Species of *Colletotrichum* associated with citrus trees in Iran. *Mycologia Iranica* 3(1): 1–14.
- Talhinhas, P., Gonçalves, E., Sreenivasaprasad, S. & Oliveira, H. 2015. Virulence diversity of anthracnose pathogens (*Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* species complexes) on eight olive cultivars commonly grown in Portugal. *European Journal of Plant Pathology* 142: 73–83.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30(12): 2725–2729.
- Tao, G., Liu, Z.Y., Liu, F., Gao, Y.H. & Cai, L. 2013. Endophytic *Colletotrichum* species from *Bletilla ochracea* (*Orchidaceae*), with descriptions of seven new species. *Fungal Diversity* 61(1): 139–164.
- Arx, J.A. von. 1957a. Revision der zu *Gloeosporium* gestellten Pilze. *Verhandlungen des Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen, Afd. Natuurkunde*, 2, Ver. 51. 153 pp.

- Arx, J.A. von. 1957b. Die Arten der Gattung *Colletotrichum* Cda. Phytopathologische Zeitschrift 29: 413–468.
- Velho, A.C., Stadnik, M.J., Casanova, L., Mondino, P. & Alaniz, S. 2014. First report of *Colletotrichum nymphaeae* causing apple bitter rot in southern Brazil. Plant Disease 98(4): 567–567.
- Velho, A.C., Alaniz, S., Casanova, L., Mondino, P. & Stadnik, M.J. 2015. New insights into the characterization of *Colletotrichum* species associated with apple diseases in southern Brazil and Uruguay. Fungal Biology 119(4): 229–244.
- Wang, Y.C., Hao, X.Y., Wang, L., Xiao, B., Wang, X.C. & Yang, Y.J. 2016. Diverse *Colletotrichum* species cause anthracnose of tea plants [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] in China. Scientific Report: 6, Article: 35287.
- Weir, B.S., Johnston, P.R. & Damm, U. 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. Studies in Mycology 73: 115–180.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315–322. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Shinsky, J.J. & White, T.J. (eds). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, New York, USA.
- Woudenberg, J.H.C., Aveskamp, M.M., De Gruyter, J., Spiers, A.G. & Crous, P.W. 2009. Multiple *Didymella* teleomorphs are linked to the *Phoma clematidina* morphotype. Persoonia 22: 56–62.
- Yang, Y.L., Cai, L., Yu, Z.N., Liu, Z.Y. & Hyde, K.D. 2011. *Colletotrichum* species on orchids in southwest China. Cryptogamie Mycologie 32(3): 229–25.
- Zafari, D. & Tarah-Hamadani, S. 2007. Characterization of *Colletotrichum* species from legumes crop plants in Iran. Journal of Plant Pests and Diseases 77(1): 57–14.