

## بررسی تاکسونومیکي گونه مرکب *Valsa sordida*، عامل بیماری شانکر درختان\*

میژن آقاپور<sup>۱</sup>، خلیل بردی فتوحی فر<sup>۱\*</sup>، محمدعلی آقاجانی<sup>۲</sup> و محمد جوان نیک خواه<sup>۱</sup>

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۲/۲۱؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۵/۱۴)

### چکیده

جهت بررسی تاکسونومیکي گونه *Valsa sordida*، عامل بیماری شانکر درختان، تعداد ۱۲۵ نمونه گیاهی آلوده در طی سال ۱۳۸۷ از استان گلستان جمع‌آوری گردیدند. بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی، از بین ۴۹ جدایه قارچی به دست آمده، ۳۵ جدایه به گونه *V. sordida* تعلق داشتند. تعداد ۱۲ جدایه از لحاظ ویژگی‌های ریخت‌شناختی مرحله غیرجنسی تا حدودی به گونه *C. chrysosperma* شباهت داشتند و *Cytospora* sp.1 نامیده شدند. یک جدایه (از *Populus deltoides*) نیز به لحاظ ویژگی‌های ریخت‌شناختی تا حدودی به گونه *V. sordida* شباهت داشته و *Valsa* sp.1 نامیده شد. یک جدایه دیگر (از *Ficus elastica*) نیز به لحاظ ویژگی‌های ریخت‌شناختی از گونه *C. chrysosperma* متمایز و به گونه *Cytospora ribis* نزدیک بود و *Cytospora* sp.2 به آن اطلاق گردید. به منظور ارزیابی فیلوژنی جدایه‌های منتخب، نواحی ITS1-5.8S-ITS2 از rDNA هسته‌ای در ۱۴ جدایه (پنج جدایه متعلق به گونه *C. chrysosperma*، هفت جدایه متعلق به *Cytospora* sp.1، یک جدایه متعلق به *Valsa* sp.1 و یک جدایه متعلق به *Cytospora* sp.2)، تعیین توالی گردیدند و به همراه ۳۲ توالی مربوطه از بانک ژن مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج حاصل از بررسی مولکولی و گروه بندی جدایه‌های قارچی منتخب، با تنوع مشاهده شده در صفات ریخت‌شناختی منطبق بود.

کلیدواژه: قارچ، کنیدیوما، ریخت‌شناسی، تنوع زیستی، *Coelomycetes*

\* بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول ارایه شده به پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

\*\* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: fotowhi@ut.ac.ir

۱ - به ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشیار و استاد رشته بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج

۲- استادیار پژوهش بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان، گرگان، ایران

## Taxonomic study on *Valsa sordida* species complex, the causal agent of canker disease of trees\*

B. Aghapour<sup>1</sup>, KH. B. Fotouhifar<sup>1\*\*</sup>, M. A. Aghajani<sup>2</sup> and M. Javan Nik Khah<sup>1</sup>

(Received: 11.3.2014; Accepted: 5.8.2015)

### Abstract

In order to taxonomic investigation on *Valsa sordida*, the causal agent of canker disease on trees, 125 infected plant specimens were collected from Golestan Province. Based on morphological features, among obtained 49 fungal isolates, 35 isolates were identified as *V. sordida*. Moreover, asexual morphological characteristics of 12 isolates were nearly similar to *C. chrysosperma* and named as *Cytospora* sp.1. Also, morphological characteristics of an isolate (from *Populus deltoides*) was almost similar to *V. sordida* and named as *Valsa* sp.1. Finally, morphological characteristics of an isolate (from *Ficus elastica*) was different from *C. chrysosperma* and was near to *Cytospora ribis* and considered as *Cytospora* sp.2. To investigate the phylogeny of selected isolates, nucleotide sequence of ITS1-5.8S-ITS2 regions from nuclear ribosomal DNA (rDNA) were determined in 14 isolates (five isolates of *C. chrysosperma*, seven isolates of *Cytospora* sp.1, one isolate of *Valsa* sp.1 and one isolate of *Cytospora* sp.2), and were used along with 32 related sequences from GenBank (NCBI). The results of molecular grouping confirmed the morphological diversity in the isolates.

**Keywords:** Fungus, conidioma, morphology, biodiversity, *Coelomycetes*

\* Part of M.Sc. Thesis of The First Author Submitted to College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.

\*\* Corresponding author's E-mail: fotowhi@ut.ac.ir

1. Former M.Sc. Student, Associate Professor and Professor of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences & Engineering, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
2. Research Assistant Professor, Department of Plant Protection Research, Agricultural and Natural Resources Research Center, Golestan Province, Gorgan, Iran

## مقدمه

(Spielman 1985) در منوگراف خود به بررسی ویژگی‌های ریخت شناختی گونه *V. sordida* پرداخت. وی معتقد بود که در شکل آنامورفی، در جدایه‌های مختلف این گونه، ویژگی‌های دیسک و استروما بسیار متغیر بوده و همچنین برخی صفات قارچ به ضخامت پوست میزبان گیاهی و سن آن بستگی دارد. گوریتیشویلی (Gvritishvili 1982) ضمن مطالعه جامع ویژگی‌های ریخت شناختی گونه *C. chrysoesperma*، گونه‌هایی نظیر؛ *C. aurora* Mont. & Fr. را مترادف این گونه قرار داده است. هایووا و مینتر (Hayova & Minter 1998) ویژگی‌های ریخت شناختی گونه *V. sordida* را توصیف نموده‌اند. آنها نشان دادند که گونه *V. ambiens* علی‌رغم شباهت‌های ظاهری به گونه *V. sordida*، تفاوت‌هایی را نیز در اندازه آسک و آسکوسپور نشان می‌دهد. آدامز و همکاران (Adams et al. 2005)، نیز به توصیف ویژگی‌های ریخت شناختی جدایه‌هایی از این گونه روی گونه‌های مختلف اکالیپتوس پرداخته‌اند. آنها نمونه‌هایی را که قبلاً به عنوان گونه *C. australiae* Speg. تعیین نام شده بودند را، گونه *C. chrysoesperma* نامیدند. زیرا استروما در این نمونه‌ها از نوع cytosporoid بودند، در حالی که استروما در گونه *C. australiae* از نوع torselloid می‌باشند. همچنین آدامز و همکاران (Adams et al. 2006)، گونه *V. sordida* به دست آمده از آفریقای جنوبی را با استفاده از ویژگی‌های ریخت شناختی و توالی ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 از rDNA هسته‌ای بررسی نمودند. در تحقیق آنها چندین گونه از جنس *Cytospora* با مرحله جنسی نامشخص نظیر؛ *C. minuta* Thum، *C. hariotii* Briard، *C. triticum* Punith. و *C. eutypelloides* Sacc. در گروه *V. sordida* قرار گرفتند. این نتایج احتمالاً نشان دهنده تنوع ریخت شناختی و ژنتیکی زیاد درون جمعیت گونه *V.*

گونه *Valsa sordida* Nitschke و آنامورف آن، *Cytospora chrysoesperma* (Pers.) Fr. معمولاً روی گیاهانی از جنس‌های *Salix* و *Populus* دیده می‌شوند. اما این قارچ‌ها تنها محدود به میزبان‌هایی از این دو جنس گیاهی نبوده و از گیاهان مختلفی نظیر؛ گردو (*Juglans regia* L.)، هلو (*Persica vulgaris* Mill.)، توت (*Morus alba* L.)، چنار (*Platanus orientalis* L.) و غیره نیز تا کنون از ایران گزارش شده است (Fotouhifar 2007). شریمر (Schreiner 1931) تاکسونومی و زیست‌شناسی گونه *V. sordida*، را مورد مطالعه قرار داده است. گروو (Grove 1935) و گوتنر (Gutner 1935) به ترتیب در بریتانیا و اتحاد جماهیر شوروی سابق علاوه بر آنامورف گونه *V. sordida*، تعداد زیادی از گونه‌های مربوط به جنس *Cytospora* Ehrenb. را توصیف نموده‌اند. کریستنسن (Christensen 1940) نیز زیست‌شناسی گونه *V. sordida* و ارتباط ژنتیکی میان مرحله جنسی و غیر-جنسی را مطالعه نموده است. وی مشاهده نمود که برخی از جدایه‌های به دست آمده از مرحله جنسی و غیرجنسی قارچ، در محیط کشت تفاوت‌هایی را نشان می‌دهند، اما این تفاوت‌ها هیچ نوع گروه‌بندی را توجیه نمی‌کردند. اربان (Urban 1957) جنس *Valsa* Fr. را به سه بخش (section) تقسیم نمود و بر اساس ویژگی‌های ریخت شناختی گونه *V. sordida* را در بخش *Valsa* قرار داد. هوبس (Hubbes 1960) نیز بر اساس ویژگی‌های ریخت شناختی، گونه *V. sordida* را مترادف گونه *V. ambiens* (Pers.) Fr. قرار داد. کوبایاشی (Kobayashi 1970) جدایه‌هایی از این گونه را در ژاپن مورد بررسی قرار داده و شرح مفصل و مصوری از آن ارائه نمود. اسپیلمن

تاکسونومیکی در این گروه از قارچ‌ها به ویژه در مورد گونه *V. sordida* حل نشده باقی مانده است (Adams et al. 2006). لذا این تحقیق برای بررسی فیلوژنی گونه *V. sordida* با استفاده از صفات ریخت‌شناختی و توالی ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 از rDNA هسته ای انجام گرفته است.

## مواد و روش‌های بررسی

### جدایه‌های قارچی

به منظور دستیابی به جدایه‌های گونه *V. sordida*، نمونه‌های گیاهی آلوده و حاوی اندام‌های بارده قارچ در طی سال ۱۳۸۷ از سرتاسر استان گلستان جمع‌آوری گردیدند. نمونه‌های مورد بررسی در این تحقیق در مجموعه قارچ‌شناسی گروه گیاه پزشکی دانشگاه تهران نگهداری می‌شوند. جداسازی قارچ از اندام‌های گیاهی آلوده به روش فتوحی فر و همکاران (۲۰۰۷) انجام گردید. برای نگهداری جدایه‌ها، از روش کاغذ صافی سترون استفاده شد. برای این منظور، قطعه‌ای از کاغذ صافی سترون به ابعاد تقریبی دو تا سه سانتی‌متر مربع روی محیط غذایی سیب‌زمینی-دکستروز-آگار (PDA) قرار داده شد و یک قرص میسلومی به ابعاد پنج میلی‌متر از حاشیه در حال رشد پرگنه قارچ برداشته شده و به روی کاغذ صافی منتقل گردید. تشتک‌های پتری در دمای  $25 \pm 2$  درجه سلسیوس و به مدت یک هفته نگهداری شدند. سپس کاغذهای صافی حاوی میسلوم قارچ از روی محیط کشت برداشته شد و در بین کاغذ خشک کن سترون به مدت ۴۸ ساعت در زیر هود استریل با دمای حدود ۳۵ درجه سلسیوس خشک گردید. سپس کاغذها به قطعات کوچک تر برش داده شدند و در لوله‌های پلاستیکی درب دار دو میلی‌لیتری و یا ظروف شیشه‌ای درب دار در دمای ۲۰-

*sordida* می‌باشد و بنا به شواهد ذکر شده از آن به عنوان گونه مرکب (species complex) نام برده‌اند.

فتوحی فر (۲۰۰۷) برای اولین بار در ایران گونه *V. sordida* را توصیف نمود و گیاه گردو (*Juglans regia*) را به عنوان میزبان جدیدی برای شکل جنسی و غیرجنسی این قارچ در دنیا گزارش کرد. وی نشان داد که گونه *V. sordida* به لحاظ دامنه میزبانی، وسیع الطیف بوده و بالغ بر ۲۱ گونه گیاهی را به عنوان میزبان برای آن در ایران شناسایی نمود. جوادی اصطهباناتی (Javadi Estahbanati 2008) نیز ضمن بررسی این گروه از قارچ‌ها در ایران، گونه *C. chrysosperma* را غالب آلوده کننده درختان گردو در ایران معرفی نموده است. عباسی (۲۰۱۰)، تنوع ژنتیکی و بیماری‌زایی جدایه‌هایی از گونه *C. chrysosperma* به دست آمده از درختان گردو در برخی از استان‌های غربی کشور را با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD و ISSR بررسی نموده است. نتایج وی حاکی از وجود تنوع ژنتیکی زیاد در جمعیت‌های این گونه می‌باشد.

اخیراً بخشی و همکاران (۲۰۱۲) گیاه انار (*Punica granatum L.*) و بزرگ منش و همکاران (۲۰۱۲) نیز گیاهان ختمی درختی (*Hibiscus syriacus L.*) و موچسب [ *Parthenocissus tricuspidata* (Siebold and Planch.) Zucc.] را به عنوان میزبان‌های جدید برای گونه *C. chrysosperma* در دنیا معرفی کرده‌اند.

تعیین حدود و ثغور گونه‌ها در جنس *Cytospora* و تلئومورف‌های وابسته به آنها به لحاظ تغییرپذیری صفات ریخت‌شناختی همواره بسیار دشوار بوده است (Fotouhifar et al. 2010). همچنین بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی در اشکال جنسی و به خصوص در اشکال غیرجنسی، روابط بین گونه‌ها و تعیین جایگاه دقیق

درجه سلسیوس نگهداری شدند.

### بررسی ریخت شناختی جدایه‌های قارچی

جهت بررسی ریخت شناختی جدایه‌های قارچی، از ویژگی‌های ریخت شناختی اندام‌های بارده جنسی و غیرجنسی موجود درون بافت‌های گیاهی آلوده استفاده گردید. در بررسی ماکروسکوپی از استریومیکروسکوپ الیمپوس (Olympus, Japan) و مدل SZH استفاده شد. ویژگی‌های ماکروسکوپیکی و مورفومتریک اندام‌های بارده قارچ در سطح و درون بافت میزبان گیاهی ارزیابی گردیدند. بدین جهت، به کمک دست و با استفاده از اسکالپل، برش‌های عرضی نازک از بافت گیاهی در محل تشکیل اندام‌های باردهی قارچ تهیه گردیدند. نحوه پراکنش اندام‌های باردهی قارچ، اندازه استرومای قارچ، وجود و یا عدم وجود کنسپتاکل، اندازه، شکل و رنگ دیسک، تعداد و اندازه قطر استیول‌ها، تعداد حجره‌ها، نحوه آرایش حجره‌ها، اندازه حجره‌ها و همچنین تعداد و نحوه آرایش پریسیوم‌ها در برش‌های حاصل بررسی شدند. در مطالعه میکروسکوپیکی از میکروسکوپ نوری الیمپوس و مدل BH2 استفاده شد. برای رویت و اندازه‌گیری ابعاد کنیدی‌ها، به کمک مرکب چین اسلاید هر نمونه آماده گردید (فتوحی فر و همکاران ۲۰۰۷). ویژگی‌های کنیدیفورها نظیر اندازه کنیدیفورها، نحوه انشعاب آنها و اندازه و شکل سلول‌های کنیدی‌زا در اسلایدهای میکروسکوپی تهیه شده بررسی شدند. به منظور بررسی شکل و ابعاد آسک‌ها و آسکوسپورها در اشکال جنسی، اسلاید هر نمونه در محلول لاکتوفنل، کاتن بلو-لاکتوفنل و هیدروکسید پتاسیم (KOH) سه درصد تهیه گردید. مطالعه ویژگی‌های مربوط به پرگنه جدایه‌های به دست آمده روی محیط کشت PDA، طبق روش توصیف شده توسط

فتوحی فر و همکاران (۲۰۰۷) انجام گردید. ویژگی‌های مربوط به پرگنه قارچ شامل؛ رنگ سطح و پشت، نوع بافت، نحوه رشد پرگنه و حاشیه آن و همچنین تشکیل اندام بارده مورد بررسی قرار گرفتند. عکسبرداری از اسلایدهای میکروسکوپی، نمونه‌های مورد مطالعه در زیر استریومیکروسکوپ و پرگنه قارچ، با استفاده از دوربین دیجیتال سونی (Sony, Japan) و مدل F717 و یا پرمیر (Premier, England) و مدل DS-8340 تهیه گردیدند. جهت تعیین نام جدایه‌های قارچی مورد بررسی در این تحقیق، از توصیفات ارایه شده توسط گروو (۱۹۳۵)، گوتنر (۱۹۳۵)، کوبایاشی (۱۹۷۰)، گوریتیشویلی (۱۹۸۲)، اسپیلمن (۱۹۸۵)، هایووا و میتتر (۱۹۹۸)، آدامز و همکاران (۲۰۰۶ و ۲۰۰۵) و فتوحی فر (۲۰۰۷) استفاده گردید.

### تعیین توالی ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 از rDNA هسته‌ای

در مورد ۱۴ جدایه قارچی، تعیین توالی نوکلئوتیدی ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 از rDNA هسته‌ای انجام گرفت (جدول ۱). به منظور تهیه توده میسلیم مورد نیاز جهت استخراج DNA ژنومی، از محیط غذایی مایع سیب زمینی-دکستروز (PDB: potato dextrose broth) که حاوی عصاره ۲۰۰ گرم سیب زمینی خرد شده و ۱۷ گرم دکستروز در یک لیتر آب مقطر بود، استفاده شد. بعد از رشد و تشکیل میسلیم قارچی، توده میسلیم به کمک قیف بوختر، کاغذ صافی سترون و با استفاده از پمپ خلا از محیط مایع جداسازی گردید و توسط دستگاه خشک‌کن با سرما (freeze dryer) خشک شدند. میسلیم‌های خشک شده در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. جهت استخراج DNA ژنومی کل از میسلیم‌های هر جدایه، از روش غضنفری (۲۰۱۰) چاپ نشده) استفاده شد. برای تکثیر ناحیه ITS1-5.8S-ITS2، از جفت آغازگرهای ITS1

Table 1. Examined fungal isolates

Accession No.	Collection Date	Location	Host	Isolate	Species
شماره	تاریخ	محل	میزبان	جدایه	گونه
دستیابی	جمع‌آوری	جمع‌آوری			
-	2008	Golestan – Bandar Gaz	<i>Salix sp.</i>	G32-T	<i>Valsa sordida</i>
-	2008	Golestan – Kordkuy	<i>Salix triandra</i>	G38-T	<i>Valsa sordida</i>
-	2008	Golestan – Gorgan	<i>Salix excelsa</i>	G113-T	<i>Valsa sordida</i>
-	2008	Golestan – Kordkuy	<i>Salix alba</i>	G26	<i>Cytospora chrysosperma</i>
-	2008	Golestan – Kordkuy	<i>Salix sp.</i>	G27	<i>Cytospora chrysosperma</i>
-	2008	Golestan – Bandar Gaz	<i>Salix babylonica</i>	G32	<i>Cytospora chrysosperma</i>
-	2008	Golestan – Kordkuy	<i>Salix triandra</i>	G38	<i>Cytospora chrysosperma</i>
-	2008	Golestan – Bandar Gaz	<i>Salix fedtschenkoi</i>	G61	<i>Cytospora chrysosperma</i>
-	2008	Golestan – Bandar Gaz	<i>Salix excelsa</i>	G71	<i>Cytospora chrysosperma</i>
-	2008	Golestan – Maraveh Tapeh	<i>Populus nigra</i>	G77	<i>Cytospora chrysosperma</i>
-	2008	Golestan – Maraveh Tapeh	<i>Salix babylonica</i>	G78	<i>Cytospora chrysosperma</i>
HQ420238	2008	Golestan – Maraveh Tapeh	<i>Populus nigra</i>	G79	<i>Cytospora chrysosperma</i>
-	2008	Golestan – Maraveh Tapeh	<i>Salix babylonica</i>	G81	<i>Cytospora chrysosperma</i>
-	2008	Golestan – Kalaleh	<i>Populus deltoides</i>	G82	<i>Cytospora chrysosperma</i>
-	2008	Golestan – Kalaleh	<i>Populus deltoides</i>	G83-red	<i>Cytospora chrysosperma</i>
-	2008	Golestan – Gorgan	<i>Populus nigra</i>	G87	<i>Cytospora chrysosperma</i>
-	2008	Golestan – Kordkuy	<i>Salix triandra</i>	G88	<i>Cytospora chrysosperma</i>
-	2008	Golestan – Kordkuy	<i>Populus deltoides</i>	G89	<i>Cytospora chrysosperma</i>
-	2008	Golestan – Gorgan	<i>Populus nigra</i>	G91	<i>Cytospora chrysosperma</i>
HQ420237	2008	Golestan – Anbar Olom	<i>Eucalyptus sp.</i>	G95	<i>Cytospora chrysosperma</i>
-	2008	Golestan – Anbar Olom	<i>Eucalyptus sp.</i>	G95-b	<i>Cytospora chrysosperma</i>
HQ420236	2008	Golestan – Gorgan	<i>Ficus elastica</i>	G96	<i>Cytospora chrysosperma</i>
-	2008	Golestan – Minoodasht	<i>Salix babylonica</i>	G104	<i>Cytospora chrysosperma</i>
-	2008	Golestan – Ramian	<i>Populus deltoides</i>	G105-red	<i>Cytospora chrysosperma</i>
-	2008	Golestan – Gorgan	<i>Populus nigra</i>	G108	<i>Cytospora chrysosperma</i>
-	2008	Golestan – Khanbebin	<i>Populus deltoides</i>	G109	<i>Cytospora chrysosperma</i>
HQ420240	2008	Golestan – Gorgan	<i>Salix babylonica</i>	G110	<i>Cytospora chrysosperma</i>
-	2008	Golestan – Kordkuy	<i>Salix babylonica</i>	G111	<i>Cytospora chrysosperma</i>
-	2008	Golestan – Kordkuy	<i>Salix excelsa</i>	G112	<i>Cytospora chrysosperma</i>
-	2008	Golestan – Bandar Gaz	<i>Salix babylonica</i>	G113	<i>Cytospora chrysosperma</i>
-	2008	Golestan – Kordkuy	<i>Salix excelsa</i>	G114	<i>Cytospora chrysosperma</i>
HQ420239	2008	Golestan – Kordkuy	<i>Populus deltoides</i>	G115-red	<i>Cytospora chrysosperma</i>
-	2008	Golestan – Kordkuy	<i>Populus deltoides</i>	G117	<i>Cytospora chrysosperma</i>
-	2008	Golestan – Maraveh Tapeh	<i>Populus nigra</i>	G124	<i>Cytospora chrysosperma</i>
-	2009	Golestan – Gorgan	<i>Populus nigra</i>	G125-red	<i>Cytospora chrysosperma</i>
HQ420243	2008	Golestan – Aliabad e Katul	<i>Populus deltoides</i>	G107-T	<i>Valsa sp.1</i>
-	2008	Golestan – Aliabad e Katul	<i>Populus deltoides</i>	G54	<i>Cytospora sp.1</i>
HQ420246	2008	Golestan – Gorgan	<i>Populus deltoides</i>	G59	<i>Cytospora sp.1</i>
HQ420241	2008	Golestan – Bandar Gaz	<i>Populus deltoides</i>	G72	<i>Cytospora sp.1</i>
-	2008	Golestan – Kalaleh	<i>Populus deltoides</i>	G83-yell	<i>Cytospora sp.1</i>
HQ420247	2008	Golestan – Gonbad e Kavus	<i>Populus deltoides</i>	G85	<i>Cytospora sp.1</i>
-	2008	Golestan – Anbar Olom	<i>Populus deltoides</i>	G94	<i>Cytospora sp.1</i>
-	2008	Golestan – Ramian	<i>Populus deltoides</i>	G105-yell	<i>Cytospora sp.1</i>
HQ420242	2008	Golestan – Aliabad e Katul	<i>Populus deltoides</i>	G107	<i>Cytospora sp.1</i>
HQ420244	2008	Golestan – Kordkuy	<i>Populus deltoides</i>	G115-yell	<i>Cytospora sp.1</i>
HQ420245	2008	Golestan – Nowkandeh	<i>Populus deltoides</i>	G116	<i>Cytospora sp.1</i>
-	2008	Golestan – Kordkuy	<i>Populus deltoides</i>	G117-yell	<i>Cytospora sp.1</i>
HQ420248	2009	Golestan – Gorgan	<i>Populus nigra</i>	G125	<i>Cytospora sp.1</i>
HQ420249	2008	Golestan – Gorgan	<i>Ficus elastica</i>	G97	<i>Cytospora sp.2</i>

کشور سوئیس (Tchnische Hoshchule, ETH Zurich) فرستاده شدند. پس از دریافت توالی‌های نوکلئوتیدی برای اطمینان از کیفیت و صحت آنها، هر یک از توالی‌ها با استفاده از ابزار جستجوی BLAST (biological local alignment search tool) (Altschul *et al.* 1997)، با توالی‌های موجود در بانک ژن مقایسه و متعاقباً توسط نرم افزار DNASTAR نسخه 6.13 اصلاح شدند. کلیه توالی‌های مورد بررسی، مربوط به ۴۸ جدایه شامل؛ ۱۴ توالی جدید مربوط به جدایه‌های ایرانی مورد بررسی در این تحقیق (جدول ۱)، به همراه ۳۲ توالی مربوط به این گروه از قارچ‌ها و توالی دو جدایه از گونه *Phomopsis vaccinii* (Shear, N.E. Stevens & H.F. Bain از بانک ژن (جدول ۲) به عنوان گروه خارجی (outgroup)، با استفاده از نرم افزار CLUSTAL X نسخه 2.0.12 تحت سیستم عامل ویندوز مرتب شدند (Thompson *et al.* 1997). برای ترسیم شجره‌های فیلوژنتیکی، از نرم افزار MEGA 4.0 (molecular evolutionary genetics analysis) تحت سیستم عامل ویندوز استفاده شد (Tamura *et al.* 2007). در ارزیابی توالی‌های مرتب شده از دو روش maximum-parsimony (Eck & Dayhoff 1966) و neighbor-joining (Saitou & Nei 1987) استفاده گردید. شجره فیلوژنتیکی، maximum-parsimony با الگوریتم neighbor-interchange algorithm (Nei & Kumar 2000) و با استفاده از الگوی از پیش تعیین شده (default) در نرم افزار MEGA4.0 ترسیم گردید. فاصله‌های ایجاد شده (gaps) در طی مرتب سازی توالی‌ها، به عنوان اطلاعات از دست رفته (missing data) در نظر گرفته شدند. در ارزیابی توالی‌ها به روش neighbor-joining برای تخمین فواصل بین توالی‌ها از روش maximum composite likelihood (Tamura *et al.* 2004)، و الگوی

(5'-ITS4 و 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') استفاده شد (White *et al.* 1990). حجم مخلوط واکنش در هر لوله PCR، ۲۵ میکرولیتر بود. مخلوط واکنش PCR شامل؛ ۱۸/۲۵ میکرولیتر آب دیونیزه استریل، ۲/۵ میکرولیتر 10X PCR Buffer، ۱/۵ میلی مول  $MgCl_2$ ، ۶۰ میکرومول dNTPs، ۰/۴ میکرومول از هر آغازگر، ۰/۲ میکرولیتر (یک واحد) *Taq DNA* پلیمرز و حدود ۲۰ نانوگرم DNA الگو بود. واکنش زنجیره ای پلیمرز در دستگاه ترموسایکلر Corbett Palm cycler CG1-96 (thermal cycler) (Research, Australia Adams *et al.* 2002) با اندکی تغییرات انجام شد. واسرشت سازی اولیه (primary denaturation) به مدت دو دقیقه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس انجام شد. تکثیر در ۳۵ چرخه که هر چرخه شامل؛ واسرشت سازی به مدت یک دقیقه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، اتصال (annealing) به مدت ۷۰ ثانیه در دمای ۵۰ درجه سلسیوس و بسط (extension) به مدت ۹۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس بود، انجام گرفت. بسط نهایی به مدت هفت دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس انجام شد. خالص سازی محصول حاصل از تکثیر ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 با استفاده از کیت AccuPrep® PCR & Gel Purification Kit (Bioneer, South Korea) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. محصول تصفیه شده PCR جهت تعیین توالی نوکلئوتیدی به آزمایشگاه بیولوژی مولکولی (molecular biology)، بخش ژنتیک اکولوژی گیاهی (Department of Plant Ecological Genetics) از انستیتو زیست شناسی تلفیقی (Institute of Integrative Biology, IBZ) وابسته به دانشگاه فدرال پلی تکنیک زوریخ (Eidgenossische

جدول ۲. توالی های نوکلئوتیدی اخذ شده از بانک ژن (NCBI)

Table 2. Nucleotide sequences obtained from Genbank (NCBI)

Accession No. شماره دستیابی	Reference منبع	Location مکان	Host میزبان	Species گونه
EF447320	Fotouhifar et al. (2010)	Iran, Lorestan	<i>Ligustrum latifolium</i>	<i>Cytospora chrysosperma</i>
EF447310	Fotouhifar et al. (2010)	Iran, West Azarbaijan	<i>Salix aegyptiaca</i>	<i>Cytospora chrysosperma</i>
EF447325	Fotouhifar et al. (2010)	Iran, Kordistan	<i>Salix excelsa</i>	<i>Cytospora chrysosperma</i>
EF447339	Fotouhifar et al. (2010)	Iran, Fars	<i>Ficus carica</i>	<i>Cytospora chrysosperma</i>
EF447316	Fotouhifar et al. (2010)	Iran, Kuhkiluyeh & Boyer ah.	<i>Prunus domestica</i>	<i>Cytospora chrysosperma</i>
EF447322	Fotouhifar et al. (2010)	Iran, Lorestan	<i>Robinia pseudoacacia</i>	<i>Cytospora chrysosperma</i>
EF447315	Fotouhifar et al. (2010)	Iran, Tehran	<i>Platanus orientalis</i>	<i>Cytospora chrysosperma</i>
EF447313	Fotouhifar et al. (2010)	Iran, Charmaha. & Bakhtiari	<i>Populus alba</i>	<i>Cytospora chrysosperma</i>
EF447329	Fotouhifar et al. (2010)	Iran, Hamadan	<i>Populus deltoides</i>	<i>Cytospora chrysosperma</i>
EF447331	Fotouhifar et al. (2010)	Iran, Hamadan	<i>Malus pumila</i>	<i>Cytospora chrysosperma</i>
EF447333	Fotouhifar et al. (2010)	Iran, Semnan	<i>Populus nigra</i>	<i>Cytospora chrysosperma</i>
EF447335	Fotouhifar et al. (2010)	Iran, Razavi Khorasan	<i>Populus nigra</i>	<i>Cytospora chrysosperma</i>
EF447340	Fotouhifar et al. (2010)	Iran, Tehran	<i>Salix excelsa</i>	<i>Cytospora chrysosperma</i>
EF447365	Fotouhifar et al. (2010)	Iran, Lorestan	<i>Platanus orientalis</i>	<i>Cytospora gutnerae</i>
EF447366	Fotouhifar et al. (2010)	Iran, Fars	<i>Quercus brantii</i>	<i>Cytospora intermedia</i>
EF447382	Fotouhifar et al. (2010)	Iran, Markazi	<i>Elaeagnus angustifolia</i>	<i>Cytospora ribis</i>
EF447383	Fotouhifar et al. (2010)	Iran, Lorestan	<i>Platanus orientalis</i>	<i>Cytospora ribis</i>
DQ243810	Adams et al. (2005)	Netherlands	<i>Ribes rubrum</i>	<i>Cytospora ribis</i>
EF447402	Fotouhifar et al. (2010)	Iran, Lorestan	<i>Pistachia khinjuk</i>	<i>Cytospora terebinthi</i>
EF447308	Fotouhifar et al. (2010)	Iran, Fars	<i>Ulmus minor</i>	<i>Cytospora carbonacea</i>
EF447387	Fotouhifar et al. (2010)	Iran, Lorestan	<i>Rosa canina</i>	<i>Cytospora rosarum</i>
EF447396	Fotouhifar et al. (2010)	Iran, Lorestan	<i>Malus pumila</i>	<i>Cytospora schulzeri</i>
EF447399	Fotouhifar et al. (2010)	Iran, Razavi Khorasan	<i>Thuja orientalis</i>	<i>Cytospora schulzeri</i>
EF447371	Fotouhifar et al. (2010)	Iran, Hamadan	<i>Robinia pseudoacacia</i>	<i>Cytospora leucosperma</i>
EF447368	Fotouhifar et al. (2010)	Iran, Lorestan	<i>Platanus orientalis</i>	<i>Cytospora leucosperma</i>
AF317579	Castlebury & Farr (2000)	USA	<i>Vaccinium macrocarpon</i>	<i>Phomopsis vaccinii</i>
AF317578	Castlebury & Farr (2000)	USA	<i>Vaccinium macrocarpon</i>	<i>Phomopsis vaccinii</i>
EF447417	Fotouhifar et al. (2010)	Iran, Kordistan	<i>Salix excelsa</i>	<i>Valsa salicina</i>
AY347323	Adams et al. (2005)	Switzerland	<i>Salix sp.</i>	<i>Valsa salicina</i>
EF447418	Fotouhifar et al. (2010)	Iran, West Azarbaijan	<i>Salix aegyptiaca</i>	<i>Valsa sordida</i>
EF447421	Fotouhifar et al. (2010)	Iran, Razavi Khorasan	<i>Populus alba</i>	<i>Valsa sordida</i>
AY347322	Adams et al. (2005)	United Kingdom	<i>Populus tremula</i>	<i>Valsa sordida</i>
DQ243802	Adams et al. (2005)	USA	<i>Malus domestica</i>	<i>Valsa malicola</i>
EF447416	Fotouhifar et al. (2010)	Iran, Kordistan	<i>Malus pumila</i>	<i>Valsa malicola</i>

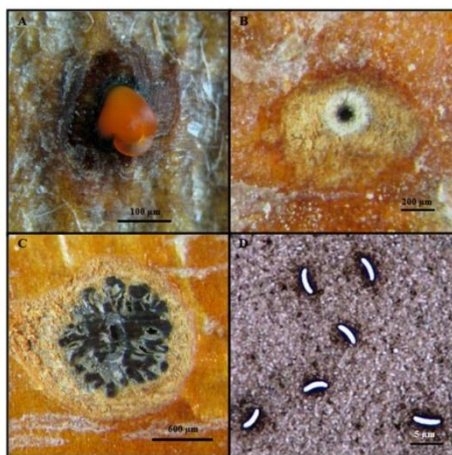
### نتایج

#### بررسی ریخت شناختی جدایه های قارچی

از مجموع ۱۲۵ نمونه گیاهی حاوی اندام های بارده قارچ، ۴۹ جدایه قارچی به دست آمد (جدول ۱). جدایه های قارچی بر اساس خصوصیات ریخت شناختی مرحله غیرجنسی و جنسی گونه *V. sordida* با آنامورف Gvritshvili 1982, ) *C. chrysosperma* شناسایی شدند (, Spielman 1985, Hayova & Minter 1998, Adams et al. 2005, 2006, Fotouhifar 2007). بر اساس نتایج،

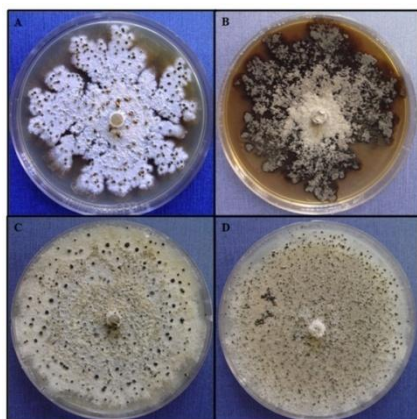
از پیش تعیین شده (default) نرم افزار MEGA4.0 استفاده شد. برای اطمینان از ثبات شاخه های موجود در شجره های حاصل، از آزمون اعتبارسنجی (bootstrap) با ۱۰۰۰ تکرار استفاده گردید (Felsenstein 1985). توالی های مربوط به جدایه های مورد بررسی به بانک اطلاعاتی NCBI ارسال و شماره دستیابی از HQ420236 تا HQ420249 اخذ گردید (جدول ۱).





شکل ۱- گونه *Cytospora chrysosperma* جدایه G104: A) توده کنیدی ها، B) دیسک و استیول، C) کنیدیوما و D) کنیدی-ها.

**Fig. 1.** *Cytospora chrysosperma*, isolate G104: A) conidial mass, B) disc and ostiole, C) conidioma and D) conidia.



شکل ۲- پرگنه گونه *Cytospora chrysosperma* پس از ۳۰ روز روی محیط کشت PDA: A) جدایه G32، B) جدایه G96، C) جدایه G95 و D) جدایه G110.

**Fig. 2.** Colony of *Cytospora chrysosperma* after 30 days on PDA: A) G32, B) G96, C) G95 and D) G110.

خاکستری تا قهوه‌ای با بافت مخملی و متراکم بودند (شکل ۶). اندازه کنیدی‌های تشکیل شده در محیط کشت PDA پس از ۳۰ روز نگهداری در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نیز نشان داد که جدایه‌های گروه اول دارای اندازه کنیدی کوچکتری نسبت به جدایه‌های گروه دوم هستند. از طرفی

جدایه‌ها در مقیاس ماکروسکوپیکی به دو گروه عمده تقسیم گردیدند. جدایه‌های متعلق به گروه اول دارای توده کنیدی‌هایی به رنگ نارنجی متمایل به قرمز روشن و جدایه‌های متعلق به گروه دوم دارای توده کنیدی‌هایی به رنگ زرد متمایل به کرم بودند. اعضای گروه اول دارای تنوع میزبانی بوده و روی میزبان‌های گیاهی مختلفی نظیر؛ بید (*Salix spp.*)، صنوبر (*Populus deltoides*)، فیکوس (*Ficus elastica*) و اکالیپتوس (*Eucalyptus sp.*) مشاهده گردیدند، در حالی که اعضای گروه دوم تنها روی گیاهان صنوبر دیده شدند. اعضای گروه اول معمولاً دارای یک استیول منفرد و مرکزی در هر دیسک بودند، اما در اعضای گروه دوم به ندرت دو استیول در هر دیسک نیز دیده می‌شد. استیول در جدایه‌های گروه اول نسبتاً فراخ بود و شکلی نامنظم تر نسبت به استیول جدایه‌های گروه دوم داشت. قطر استیول در جدایه‌های گروه اول (۱۵۰)۱۰۰- (۳۰)۵۰ میکرومتر و در جدایه‌های گروه دوم (۹۰)۶۵- (۲۰)۴۰ میکرومتر بود. در جدایه‌های گروه اول دیسک به رنگ سفید و یا خاکستری روشن تا خاکستری تیره بود (شکل ۱)، در حالی که در جدایه‌های گروه دوم دیسک به رنگ خاکستری تا خاکستری تیره دیده شد (شکل ۲). اندازه کنیدی‌ها در جدایه‌های گروه اول  $(1/1) \times (0/9) \times (6/7) - (3/5) \times (3/5)$  میکرومتر و در جدایه‌های گروه دوم  $1/1 - 7 \times 1 - 5(4)$  میکرومتر بود. تقریباً همه اعضای گروه اول علاوه بر کنیدیوفورهای منشعب، دارای کنیدیوفورهایی با ارتفاع بسیار زیاد (تا ۱۱۰ میکرومتر) بودند. در صورتی که اعضای گروه دوم به جز در جدایه G107، بقیه فاقد این خصوصیت بودند.

جدایه‌های گروه اول اغلب دارای پرگنه‌ای به رنگ سفید تا خاکستری با بافت پنبه‌ای شل بودند (شکل ۲)، در حالی که همه اعضای گروه دوم دارای پرگنه‌ای به رنگ

برخی جدایه های گروه اول که دارای توده کنیدی به رنگ نارنجی تا قرمز روشن بودند، روی محیط کشت توده های کنیدیایی به رنگ نارنجی و یا زرد متمایل به نارنجی تولید نمودند (شکل ۳).

در صورتی که همه جدایه های گروه دوم که روی میزبان های گیاهی خود توده کنیدی به رنگ زرد تولید می نمودند، روی محیط کشت PDA نیز توده کنیدی آنها به رنگ زرد دیده شد (شکل ۷). اعضای این دو گروه در سایر ویژگی های ریخت شناختی مورد بررسی به خصوص از لحاظ آرایش حجره ها شباهت نسبتاً زیادی به یکدیگر داشتند. ویژگی های اعضای گروه اول (تعداد ۳۲ جدایه) به میزان بیشتری با توصیفات سایر محققین از گونه *C. chrysosperma* مطابقت داشته و به عنوان جدایه های تپیک متعلق به این گونه مورد تایید قرار گرفتند (Schreiner 1931, Grove 1935, Gutner 1935, Gilman et al. 1957, Kobayashi 1970, Gvritishvili 1982, Spielman 1985, Hayova & Minter 1998, Adams et al. 2005, 2006, Fotouhifar 2007).

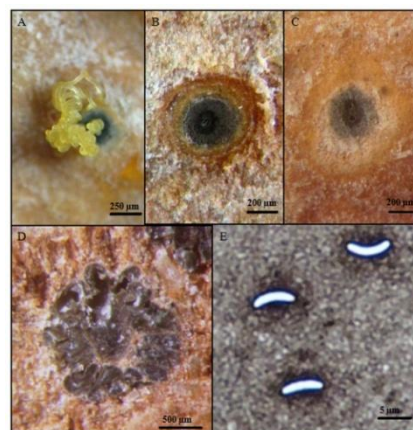
اعضای گروه دوم (تعداد ۱۲ جدایه) نیز با وجود ویژگی های متمایز ذکر شده با اعضای گروه اول، همچنان در محدوده تعریف گونه *C. chrysosperma* قرار داشته و استرین *Cytospora* sp.1 نامیده شدند (شکل ۴).

شکل جنسی در سه جدایه از گروه اول و یک جدایه از گروه دوم شناسایی شدند. ویژگی های ریخت شناختی اشکال جنسی اعضای این دو گروه تفاوت نسبتاً آشکاری با یکدیگر نداشتند. اندازه آسکوسپورها در جدایه های گروه اول نسبتاً کوچکتر از آسکوسپورهای جدایه های گروه دوم بود. اندازه آسکوسپورها در اعضای گروه اول (۲/۲) - ۱×(۱۳) - ۷ میکرومتر و اندازه آسکوسپورها در تک جدایه از گروه دوم (۴) - ۳/۵ - ۲×(۱/۸) - ۱۴(۱۶) - ۱۰(۷/۵) میکرومتر بود.



شکل ۳- کنیدیوماها و توده کنیدی روی محیط کشت PDA در گونه *Cytospora chrysosperma* (A) توده کنیدی به رنگ زرد متمایل به نارنجی در جدایه G91، (B) توده کنیدی به رنگ زرد متمایل به نارنجی در جدایه G95، (C) توده کنیدی به رنگ نارنجی در جدایه G32 و (D) کنیدیوما و حجره ها در جدایه G95

Fig. 3. Conidiomata and conidial mass of *Cytospora chrysosperma* isolates on PDA: A and B) yellow-orange conidial mass of isolates G91 and G95 respectively, C) orange conidial mass of isolate G32 and D) locoules arrangement of isolate G95.

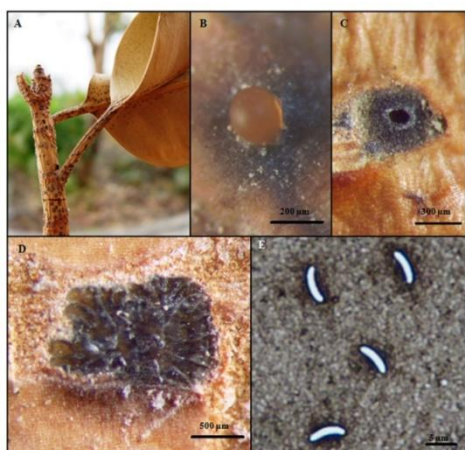


شکل ۴- *Cytospora* sp.1 (A) توده کنیدی ها در جدایه G116، (B) دیسک واجد یک استیول در جدایه G115-yell، (C) دیسک واجد دو استیول در جدایه G59، (D) کنیدیوما و حجره ها در جدایه G59 (E) کنیدی ها در جدایه G116.

Fig. 4. *Cytospora* sp.1: A) conidial mass of isolate G116, B) disc with a ostiole in isolate G115-yell, C) disc with two ostioles in isolate G59, D) conidioma and locules of isolate G59 and E) conidia of isolate G116.

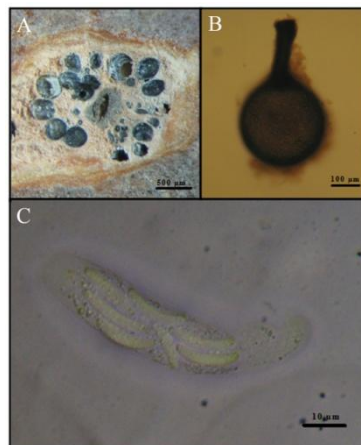


شکل ۷- کنیدیوماها و توده کنیدی در محیط کشت PDA در  
 استرین *Cytospora* sp.1 (A) استیول در جدایه G107 (B)  
 کنیدیوما و حجره‌ها در جدایه G107-T (C و D) کنیدیوماها و  
 توده های کنیدی به رنگ زرد متمایل به کرم در جدایه G107-T.  
**Fig. 7. Conidioma and conidial mass of *Cytospora* sp.1  
 on PDA: A) ostiole in isolate G107, B) conidioma and  
 locules in isolate G107-T and, C and D) conidiomata  
 and yellow to cream conidial mass in isolate G107-T.**

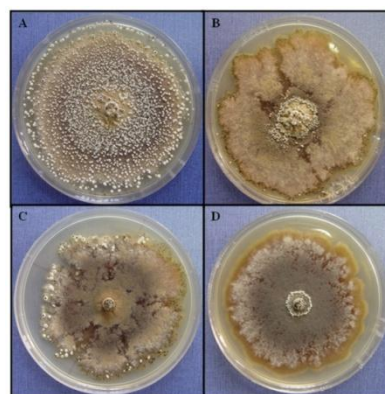


شکل ۸- استرین *Cytospora* sp.2، جدایه G97: (A) کنیدیوماها  
 کنیدیوماهای تشکیل شده روی شاخه، دم‌برگ و برگ‌های گیاه  
 فیکوس، (B) توده کنیدی‌ها، (C) دیسک واجد یک استیول، (D)  
 کنیدیوما و حجره‌ها و (E) کنیدی‌ها.  
**Fig. 8. *Cytospora* sp.2, isolate G97: A) conidiomata on  
 leaf, petiole and branch of *Ficus elastica*, B) conidial  
 mass, C) disc with one ostiole, D) conidioma and  
 locules and E) conidia.**

نیز با وجود ویژگی‌های نسبتاً متمایز ذکر شده با اعضای  
 گروه اول، همچنان در محدوده تعریف گونه *V. sordid*



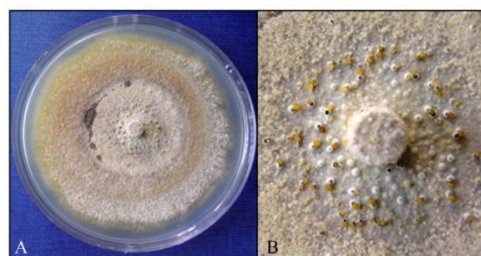
شکل ۵- *Valsa* sp.1 جدایه G107-T: (A) استروما و پریتسیوم  
 ها، (B) پریتسیوم و (C) آسک حاوی آسکوسپورها.  
**Fig. 5. *Valsa* sp.1, isolate G107-T: A) stroma and  
 perithecia, B) perithecium and C) ascus and  
 ascospores.**



شکل ۶- پرگنه استرین های *Valsa* sp.1 و *Cytospora* sp.1 پس  
 از ۳۰ روز روی محیط کشت PDA: (A) جدایه G107-T، (B)  
 جدایه G116، (C) جدایه G72 و (D) جدایه G105-yell.  
**Fig. 6. Colony of *Valsa* sp.1 and *Cytospora* sp.1 after  
 30 days on PDA: A) G107-T, B) G116, C) G72 and D)  
 G105-yell.**

در اشکال جنسی نیز ویژگی‌های اعضای گروه اول  
 (تعداد سه جدایه) به میزان بیشتری با توصیفات سایر  
 محققین در مورد گونه *V. sordida* مطابقت داشته و به  
 عنوان جدایه‌های تیپیک مورد تایید قرار گرفتند  
 (Gvritishvili 1982, Spielman 1985, Hayova & )  
 Minter 1998, Adams *et al.* 2005, 2006, Fotouhifar  
 (2007). تک جدایه متعلق به گروه دوم (جدایه G107-T)

(accession numbers) مشخص شده اند. طول توالی نوکلئوتیدی ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 در بین جدایه های مورد بررسی تقریباً یکسان بود و در جدایه های گونه *C. chrysosperma* 542 نوکلئوتید، در جدایه های متعلق به *Cytospora* sp.1 و *Valsa* sp.1 540 نوکلئوتید و در جدایه های *Cytospora* sp.2 534 نوکلئوتید بود. در مرحله مرتب سازی، با وارد شدن فاصله ها (gaps)، طول نهایی توالی ها به ۵۷۰ نوکلئوتید رسید. در تمام روش های تجزیه و تحلیل از کل داده ها استفاده شده است و اطلاعاتی حذف نگردید. نتایج هر دو شجره حاصل از روش های neighbor-joining و maximum-parsimony با ویژگی های ریخت شناختی جدایه های مورد بررسی، مطابقت داشت. اما شجره maximum-parsimony مبنای قرار داده شد و گروه های مختلف جدایه ها بر اساس نحوه انشعاب شاخه ها، به ترتیب از بالا به پایین در شجره نامگذاری گردیدند. در شجره maximum-parsimony پنج گروه اصلی قابل شناسایی بودند (شکل ۱۰). گروه ۱ شامل جدایه های G115-red و G110، G96، G95، G79 می باشد که به ترتیب از تبریزی (*Populus nigra*)، اکالیپتوس، فیکوس، بید مجنون (*Salix alba*) و صنوبر جداسازی شده اند. این گروه بزرگترین گروه موجود در شجره می باشد که دارای حمایت اعتبارسنجی ۹۵ درصد است. این گروه شامل؛ جدایه های گونه *V. sordida* و جدایه های متعلق به شکل غیرجنسی وابسته به آن می باشد. جدایه های مورد بررسی در گروه ۲ همگی از دو گونه میزبان گیاهی صنوبر و تبریزی جداسازی شده اند. این گروه شامل؛ جدایه های متعلق به *Valsa* sp.1 و *Cytospora* sp.1 و دارای حمایت اعتبارسنجی ۹۰ درصد است. گروه ۳ شامل جدایه های متعلق به *V. malicola* Z. Urb. و شکل غیرجنسی وابسته به آنها، گونه



شکل ۹- پرگنه *Cytospora* sp.2 (جدایه G97) پس از ۳۰ روز روی محیط کشت PDA: (A) پرگنه قارچ و (B) کنیدیوماهای حاوی توده کنیدی به رنگ زرد عسلی.

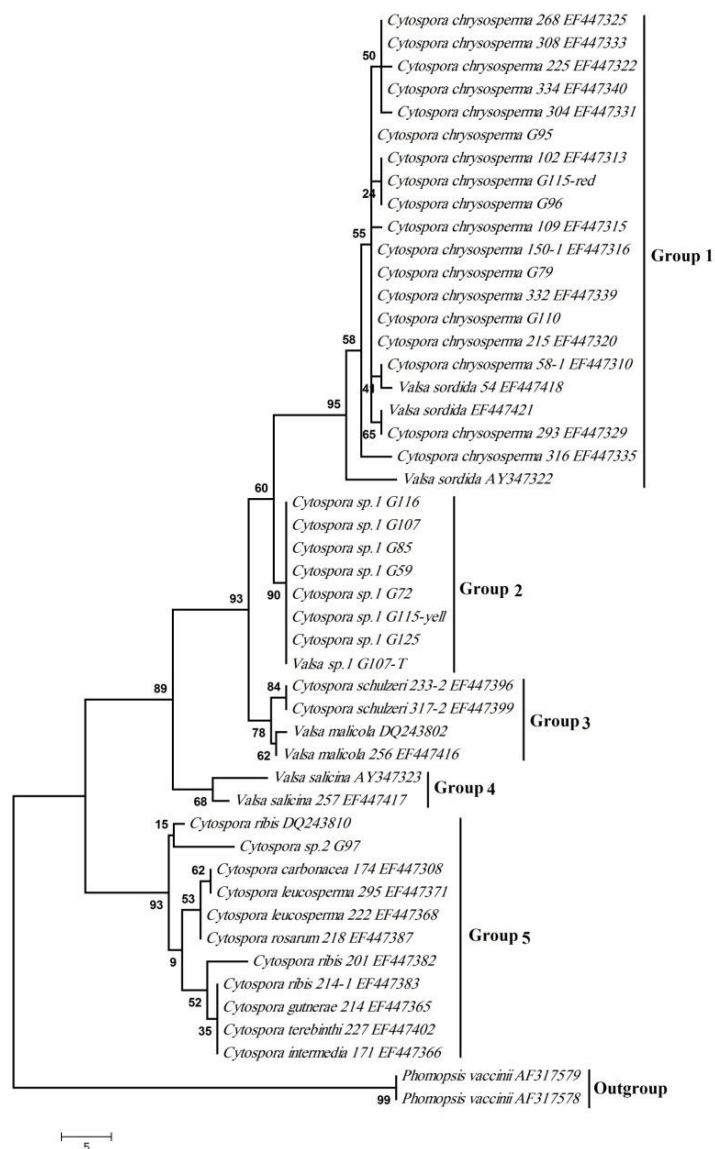
**Fig. 9.** Colony of *Cytospora* sp.2 (G97) after 30 days on PDA: A) colony and B) yellow honey conidial mass.

بوده و استرین *Valsa* sp.1 نامیده شد (شکل ۵).

ویژگی های ریخت شناختی جدایه G97، به دست آمده از گیاه فیکوس (*Ficus elastic* Roxb.) نیز تا حد زیادی از ویژگی های ریخت شناختی ذکر شده برای جدایه های این دو گروه به ویژه گروه اول نظیر تعداد و آرایش حجره ها، اندازه کنیدیوفور و ویژگی های پرگنه متفاوت بود. تنها از لحاظ ویژگی هایی نظیر؛ رنگ توده کنیدی و اندازه کنیدی تا حدودی شبیه به اعضای گروه دوم بود. ویژگی های ریخت شناختی این جدایه با هیچ یک از گونه های مورد بررسی مطابقت نداشته و به عنوان استرین *Cytospora* sp.2 نامیده شد (شکل های ۸ و ۹).

تعیین توالی نوکلئوتیدی نواحی ITS1-5.8S-ITS2 از rDNA هسته ای

ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 از rDNA هسته ای در ۱۴ جدایه شامل؛ پنج جدایه از گونه *C. chrysosperma*، هفت جدایه از *Cytospora* sp.1، یک جدایه از *Valsa* sp.1 و یک جدایه از *Cytospora* sp.2 تعیین توالی گردید (جدول ۱) و به همراه ۳۲ توالی معتبر مربوطه از بانک ژن، مورد ارزیابی فیلوژنتیکی قرار گرفتند (جدول ۲). توالی های اخذ شده از بانک ژن، در شجره حاصل، با شماره های دستیابی



شکل ۱۰- شجره فیلوژنتیکی ترسیم شده به روش *maximum parsimony* با استفاده از توالی نوکلئوتیدی ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 در ۴۶ جدایه مربوط به گونه های جنس های *Valsa* و *Cytospora* در نرم افزار *MEGA4.0*. اعداد بالای هر شاخه مقدار آزمون اعتبارسنجی از ۱۰۰۰ تکرار را نشان می دهند. طول شاخه ها با تعداد تغییرات نوکلئوتیدی که به صورت مقیاس نشان داده شده است، متناسب می باشد. دو جدایه از گونه *Phomopsis vaccinii* نیز به عنوان گروه خارجی انتخاب شده است. جدایه های ایرانی مورد مطالعه با اسم جدایه و یا با اسم جدایه به همراه شماره دستیابی مشخص شده اند.

**Fig. 10.** One of the 100 most parsimonious trees obtained using sequences of ITS1-5.8S-ITS2 region in 46 isolates of *Valsa* and *Cytospora* species in *MEGA4.0*. The numbers on the branches indicate the bootstrap values of 1000 replicates. The length of branches is proportional to the number of nucleotide changes, indicated by the scale. Two isolates of *Phomopsis vaccinii* were used as outgroups.

متعلق به گونه *V. salicina* (Pers.) Fr. و دارای حمایت اعتبارسنجی ۶۸ درصد می باشد. در گروه ۵ استرین *C. schulzeri* Sacc. & P. Syd. بوده که دارای حمایت اعتبارسنجی ۷۸ درصد است. گروه ۴ شامل دو جدایه

هایی به رنگ زرد تولید می‌نمایند. فتوحی‌فر (۲۰۰۷) نیز با بررسی جدایه‌های ایرانی گونه *C. chrysosperma* روی میزبان‌های مختلف گیاهی، معتقد است که اغلب جدایه‌های این گونه دارای توده کنیدی به رنگ نارنجی تا قرمز روشن می‌باشند و تنها در کنیدیوماهای مسن که حاوی توده کنیدی ناچیزی هستند، توده کنیدی به رنگ متمایل به زرد و یا عسلی دیده می‌شود. با توجه به نتایج این تحقیق و مطالعات سایر محققین به نظر می‌رسد که رنگ توده کنیدی اغلب جدایه‌های متعلق به *C. chrysosperma* روی میزبان‌های گیاهی مختلف به رنگ نارنجی تا قرمز روشن باشد و به نظر می‌رسد یک تجدید نظر کلی در مورد جدایه‌های متعلق به گونه *C. chrysosperma* دارای توده دیسک در اغلب نوشته‌ها یک عدد ذکر شده است (Hayova & Minter 1998, Fotouhifar 2007). اما در برخی توصیفات دو عدد استیول نیز در هر دیسک دیده شده است (Spielman 1985). نتایج این تحقیق نیز حاکی از وجود یک استیول در هر دیسک می‌باشد و در بررسی نمونه‌های واجد بیش از یک استیول در جدایه‌های متعلق به گونه *C. chrysosperma* دقت بیشتری باید صورت گیرد. دیسک در اغلب نوشته‌ها به رنگ خاکستری تا سیاه دیده می‌شود (Grove 1935, Gilman et al. 1957, Spielman 1985, Hayova & Minter 1998, Fotouhifar 2007). اما برخی دیگر از محققین رنگ دیسک را سفید تا خاکستری روشن ذکر نموده‌اند (Gutner 1935, Adams et al. 2006). نتایج تحقیق حاضر نیز بیانگر رنگ سفید تا خاکستری روشن برای دیسک‌ها در جدایه‌های متعلق به گونه *C. chrysosperma* می‌باشد. اندازه کنیدی‌ها در گونه *C. chrysosperma* متنوع بوده و ابعاد آنها  $1/5-7 \times 0/75$  - ۳ میکرومتر بیان شده‌اند (Spielman 1985, Fotouhifar 2007).

*Cytospora* sp.2 قرار دارد که از گیاه فیکوس جداسازی شده است. این گروه ناهمگن‌ترین گروه به شمار می‌رود. چرا که شامل جدایه‌هایی از گونه‌های متعدد جنس *Cytospora* بود. در این گروه جدایه‌های مربوط به گونه‌های *C. gutnerae* Gvrit., *C. carbonacea* Fr., *C. leucosperma* (Pers.) Fr. *intermedia* Sacc., *C. terebinthi* Bres., *C. rosarum* Grev. *arabis* Ehrenb. و استرین *Cytospora* sp.2 قرار داشتند. این گروه دارای حمایت آزمون اعتبارسنجی ۹۳ درصد است.

## بحث

در برخی از نوشته‌ها از گونه *C. chrysosperma* به عنوان گونه مرکب نام برده شده است (Adams et al. 2006). از ابتدای تاکسونومی این گروه از قارچ‌ها ارزش صفاتی نظیر؛ رنگ توده کنیدی همواره مورد بحث بوده است. در توصیفات محققین مختلف درباره گونه *C. chrysosperma* دو نوع رنگ توده کنیدی ذکر گردیده است. در برخی نوشته‌ها توده کنیدی به رنگ زرد تا زرد طلایی بیان شده است (Grove 1935, Gilman et al. 1957, Hayova & Minter 1998, Christensen 1940). در برخی نوشته‌های دیگر نیز رنگ توده کنیدی این گونه به رنگ نارنجی تا قرمز روشن توصیف شده است (Schreiner 1931, Kobayashi 1970). کریستنسن (۱۹۴۰) توده کنیدی را در جدایه‌های این گونه به رنگ زرد توصیف نموده، ولی در برخی جدایه‌ها به رنگ قرمز نیز اشاره نموده است. وی معتقد است که توده کنیدی‌های تازه به رنگ زرد می‌باشند و این تغییر رنگ تابع شرایط محیطی بوده و جدایه‌های این گونه که دارای توده کنیدی به رنگ قرمز هستند نیز روی محیط کشت توده کنیدی-

(۱۹۷۰)، گوریتیشویلی (۱۹۸۲)، اسپیلمن (۱۹۸۵)، هایو و میتسر (۱۹۹۸) و فتوحی فر (۲۰۰۷) موید تنوع صفات ریخت شناختی در اشکال جنسی است. بنابراین جهت ارزیابی تنوع صفات ریخت شناختی مشاهده شده در جدایه‌های گونه *C. chrysosperma* و استرین‌های وابسته مورد بررسی در این تحقیق، نواحی ITS1-5.8S-ITS2 از rDNA هسته‌ای در ۱۴ جدایه (جدول ۱) به همراه ۳۲ توالی مربوط به این گروه از قارچ‌ها موجود در بانک ژن (جدول ۲)، مورد ارزیابی فیلوژنتیکی قرار گرفتند. در شجره حاصل، پنج کلاد اصلی شناسایی گردید. برای سهولت امر، این دودمان‌های تکاملی به گروه (group) تعبیر گردیدند. ویژگی‌های ریخت شناختی اعضای گروه اول (group 1) با گونه *C. chrysosperma* مطابقت کامل دارد. این گروه، یکی از گروه‌های منوفلیتیک قابل شناسایی در شجره حاصل از روش maximum-parsimony است. این گروه‌بندی با نتایج سایر محققین نیز مطابقت دارد (Adams et al. 2005, 2006, Fotouhifar et al. 2010). در اعضای گروه دوم (group 2)، آسکوما در *Valsa* sp.1 مشابه با گونه‌های *V. sordida*، *V. malicola* و *V. salicina* از نوع euvalsoid و در *Cytospora* sp.1 نیز استروما همانند جدایه‌های گونه *C. chrysosperma* و *C. schulzeri* از نوع cytosporoid می باشد. توده کنیدی در جدایه‌های *Cytospora* sp.1 به رنگ زرد متمایل به کرم می باشد که از این جهت با جدایه‌های گونه *C. schulzeri* شباهت دارد، ولی به لحاظ وجود تنها یک استیول در هر دیسک، از آن به راحتی متمایز می گردد. آسکوسپورها در *Valsa* sp.1 نسبتاً کوچکتر از جدایه‌های *V. malicola* می باشد. همچنین از لحاظ تعداد آسکوسپورها در هر آسک نیز به راحتی از جدایه‌های گونه *V. salicina* متمایز می گردد. جدایه‌های متعلق به *Valsa* sp.1 و *Cytospora*

(Gvritishvili 1982, 2007). اما در اغلب نوشته‌ها اندازه کنیدی‌ها ۱-۸/۵×۰/۳ میکرومتر ذکر شده است (Schreiner 1931, Grove 1935, Gutner 1935, Gilman et al. 1957, Kobayashi 1970, Adams et al. 2005, 2006). نتایج این تحقیق نیز وجود دامنه محدودتری از اندازه کنیدی‌ها را نشان می دهد. گوریتیشویلی (۱۹۸۲)، هایو و میتسر (۱۹۹۸) و فتوحی فر (۲۰۰۷) کنیدیوفورهای بلند را در این گونه شناسایی و اندازه این اندام‌ها را ۷۰ الی ۱۰۰ میکرومتر بیان نموده‌اند. در برخی نوشته‌ها این اندام‌ها به نام رشته‌های عقیم ذکر شده‌اند (Kobayashi 1970, Adams et al. 2005). آدامز و همکاران (۲۰۰۵) وجود این رشته‌های عقیم را صفتی ثابت در گونه نمی دانند، که این با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. ویژگی‌های پرگنه جدایه‌های این گونه *C. chrysosperma* روی محیط کشت PDA اغلب ثابت بوده و به رنگ سفید و دارای بافت شل و پنبه‌ای هستند (Fotouhifar 2007). نتایج تحقیق حاضر نیز موید این مطلب بوده و نشان می دهد که نمونه‌های دارای رنگ و بافت‌های متفاوت از این باید با دقت بیشتری مورد بررسی قرار گیرند. البته باید توجه داشت که، برخی از صفات مذکور نظیر؛ رنگ توده کنیدی، رنگ دیسک و استروما و حتی پرگنه این گروه از قارچ در اغلب موارد تا حدودی متغیر می باشند. در واقع به نظر می رسد در صورت بروز چنین تغییراتی، برای تشخیص دقیق‌تر، مجموع صفات ریخت شناختی باید مد نظر قرار گیرد. اما بر خلاف معمول، به دلیل تنوع صفات ریخت شناختی اشکال جنسی این گروه از قارچ‌ها، تمایز ریخت شناختی اشکال جنسی نیز با مشکل مواجه است. به طوری که بسیاری از صفات ریخت شناختی اشکال جنسی در گونه‌های مختلف متغیر بوده و همپوشانی دارند. بررسی‌های انجام شده نظیر توصیفات شرینر (۱۹۳۱)، کوبایاشی

جدایه‌های گونه *C. chrysosperma* اغلب قرمز متمایل به نارنجی روشن می‌باشد. این گروه‌بندی با نتایج سایر محققین نیز مطابقت دارد (Adams et al. 2005, 2006, Fotouhifar et al. 2010). جدایه‌های واقع در گروه چهارم (group 4) از بانک ژن دریافت شده‌اند. آسکوما در گونه *V. salicina* از نوع euvalsoid است. از ویژگی‌های ریخت شناختی بارز افراد این گروه وجود چهار آسکوسپور نسبتاً بزرگ در هر آسک می‌باشد که علی‌رغم آسکومای مشابه با گونه‌های *V. malicola*, *V. sordida* و استرین *Valsa sp.1*، به راحتی از آنها قابل تفکیک می‌باشد. جدایه‌های گونه *V. salicina* اغلب روی گیاهان جنس بید دیده می‌شوند که با توجه به ویژگی‌های ذکر شده به راحتی از جدایه‌های گونه *C. chrysosperma* روی گیاهان بید قابل تفکیک می‌باشند. این گروه‌بندی با نتایج سایر محققین نیز مطابقت دارد (Adams et al. 2005, 2006, Fotouhifar et al. 2010). گروه پنجم (group 5) ناهمگن بوده و شامل جدایه‌هایی از گونه‌های متعدد جنس *Cytospora* است. به دلیل تنوع گونه‌ای، این گروه بسیار نامتجانس است و اعضای آن به لحاظ ریخت شناختی، واجد محدود ویژگی‌های مشترک می‌باشند. اعضای این گروه، دارای استرومایی از نوع cytosporoid بوده و دارای کنیدی‌های نسبتاً بزرگ هستند که پس از خروج از دهانه استیول به رنگ کرم تا زرد روشن دیده می‌شوند. تعداد استیول در اعضای این گروه از یک تا چهار عدد در هر دیسک متغیر می‌باشد. اعضای این گروه به لحاظ ریخت شناختی از یکدیگر قابل تفکیک می‌باشند. گوریتیشویلی (۱۹۸۲) تعدادی از این گونه‌ها را همنام (synonym) یکدیگر قرار داده است. ویژگی‌های استرین *Cytospora sp.2* تا حدودی با اعضای این گروه مطابقت دارد. استروما در استرین *Cytospora sp.2* از نوع cytosporoid بوده و

sp.1 از لحاظ ویژگی‌های ریخت شناختی تا حدود نسبتاً زیادی به جدایه‌های گونه *V. sordida* و شکل غیرجنسی وابسته به آن، گونه *C. chrysosperma* شباهت دارند. اندازه آسکوسپورها در جدایه‌های متعلق به *Valsa sp.1* کمی بزرگتر از جدایه‌های گونه *V. sordida* است. آرایش حجره‌ها در جدایه‌های *Cytospora sp.1* همانند گونه *C. chrysosperma* بسیار نامنظم می‌باشند. اما از لحاظ ویژگی‌هایی نظیر رنگ دیسک، اندازه و شکل منفذ استیول، اندازه کنیدی، رنگ توده کنیدی و شکل و رنگ پرگنه، از گونه *C. chrysosperma* تا حدودی قابل تفکیک می‌باشد. اعضای این گروه در شجره حاصل از روش maximum-parsimony در یک گروه مجزا و به عنوان گروه خواهری گروه (۱) قرار گرفتند. با توجه به نتایج بررسی ریخت شناختی و گروه‌بندی‌های ایجاد شده در شجره‌ها، احتمالاً اعضای گروه‌های (۱) و (۲) متعلق به دو گونه مجزا می‌باشند. جدایه‌های واقع در گروه سوم (group 3) از بانک ژن دریافت گردیده‌اند. آسکوما در *V. malicola* همانند گونه *V. sordida* و استرین *Valsa sp.1* از نوع euvalsoid می‌باشد. اما به واسطه آسکوسپورهای بزرگتر از این گونه‌ها قابل تفکیک می‌باشد. استروما در جدایه‌های گونه *C. schulzeri* همانند جدایه‌های گونه *C. chrysosperma* و استرین *Cytospora sp.1* از نوع cytosporoid است. با این تفاوت که تعداد استیول‌ها در این گونه بیش از یک عدد بوده و آرایش حجره‌ها نیز برخلاف گونه *C. chrysosperma* و استرین *Cytospora sp.1* تا حدودی منظم می‌باشند. همچنین اندازه کنیدی‌ها نیز در گونه *C. schulzeri* تا حدودی بزرگتر از گونه *C. chrysosperma* و استرین *Cytospora sp.1* می‌باشد. توده کنیدی نیز در جدایه‌های گونه *C. schulzeri* مشابه استرین *Cytospora sp.1* به رنگ زرد می‌باشد. در صورتی که توده کنیدی در



*chrysoesperma* متمایز می‌گردند. البته ویژگی‌های ریخت شناختی شکل جنسی *Valsa sp.1* از ویژگی‌های ریخت شناختی جدایه‌های متعلق به گونه *V. sordida* خیلی متمایز نمی‌باشد. به منظور ارزیابی تفاوت‌های ریخت شناختی ذکر شده برای استرین‌های *Valsa sp.1* و آنامورف مرتبط با آن، *Cytophora sp.1* با جدایه‌های تیپیک از گونه *V. sordida* و آنامورف آن، *C. chrysoesperma* توالی نوکلئوتیدی نواحی ITS1-5.8S-ITS2 از rDNA هسته‌ای این دو گروه با هم مقایسه گردید، که نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی توالی نوکلئوتیدی این نواحی، تفاوت‌های ریخت شناختی ذکر شده را به خوبی تایید نمود.

تحقیق حاضر یک بررسی مقدماتی برای شناخت بهتر از تنوع ریخت شناختی و مولکولی موجود در گونه *Valsa sordida* می‌باشد. بدیهی است برای شناخت بیشتر تنوع موجود، مطالعه نمونه‌های قارچی بیشتر که از میزبان‌های گیاهی متنوع به دست آمده باشند، استفاده از نمونه‌های تیپ بخصوص نمونه‌های هلوتیپ قابل دسترس از این گونه، جمع آوری نمونه‌های قارچی بیشتر و همچنین استفاده از توالی نوکلئوتیدی برخی نواحی ژنومی دیگر، می‌تواند نتایج ارزشمندی را در جهت تعیین دقیق حدود و ثغورگونه فراهم نماید.

توده کنیدی آن نیز همانند دیگر اعضای این گروه به رنگ زرد متمایل به کرم می‌باشد. تفاوت‌های ریخت شناختی بارز استرین *Cytophora sp.2* با دیگر اعضای این گروه در رنگ دیسک، تعداد استیول، وجود دو نوع کنیدیوفور در استروما و اندازه کنیدی بود که با هیچ یک از گونه‌های واقع در این گروه از جمله گونه *Cytophora ribis* سازگاری کامل نداشت. این جدایه بر خلاف گونه *Cytophora ribis* که معمولاً دارای یک و یا دو استیول برجسته است، فقط واجد یک استیول در هر دیسک بوده، دیسک در آن به رنگ سیاه بوده و کنیدی‌های نسبتاً کوچک‌تر از سایر اعضای این گروه دارند. بر این اساس به نظر می‌رسد که استرین *Cytophora sp.2* گونه جدیدی باشد. لذا ارزیابی‌های بیشتر بخصوص استفاده از نمونه‌های قارچی بیشتر لازم می‌باشد. با این گروه‌بندی با نتایج تحقیق فتوحی‌فر و همکاران (۲۰۱۰) مطابقت دارد. بر اساس نتایج حاصل از بررسی تنوع ریخت شناختی و ژنتیکی گونه *V. sordida* و آنامورف آن ( *C. chrysoesperma*) در استان گلستان، جدایه‌هایی متعلق به این گونه با نام *Valsa sp.1* و آنامورف مرتبط با آن *Cytophora sp.1* شناسایی گردیدند. این استرین‌ها با ویژگی‌هایی نظیر؛ رنگ توده کنیدی، رنگ دیسک، اندازه کنیدی‌ها و شکل پرگنه از جدایه‌های گونه *C.*

## منابع

- Abbasi K. 2010. Study on genetic diversity of *Cytophora chrysoesperma* isolates obtained from walnut trees using molecular markers. M.Sc. thesis, Kurdistan University, Sanandaj, Iran, Pp. 110.
- Adams G. C., Surve-Iyer R. S. and Iezzoni A. 2002. Ribosomal DNA sequence divergence and group I introns within *Leucostoma* species, *L. cinctum*, *L. persoonii* and *L. parapersonii* sp. nov., ascomycetes that cause *Cytophora* canker of fruit trees. *Mycologia* 94: 947-967.
- Adams G. C., Wingfield M. J., Common R. and Roux J. 2005. Phylogenetic relationships and morphology of *Cytophora* species and related teleomorphs (*Ascomycota*, *Diaporthales*, *Valsaceae*) from *Eucalyptus*. *Studies in Mycology* 52: 11-44.
- Adams G. C., Roux J. and Wingfield M. J. 2006. *Cytophora* species (*Ascomycota*, *Diaporthales*, *Valsaceae*): introduced and native pathogens of tree in South Africa. *Australasian Plant Pathology* 35: 521-548.

- Altschul S. F., Madden T. L., Schaffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. and Lipman D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25(17):3 389–3402.
- Bakhshi S., Fotouhifar Kh. -B., Alizadeh A. R. and Komaki A. M. 2012. First report of some *Cytospora* species on pomegranate in Iran. 20<sup>th</sup> Iranian Plant Protection Congress, Shiraz, Iran, P. 419.
- Bozorgmanesh S., Fotouhifar Kh. -B. and Heidarian R. 2012. Introduction of some new host plants for *Cytospora chrysosperma*. 20<sup>th</sup> Iranian Plant Protection Congress, Shiraz, Iran, P. 455.
- Christensen C. M. 1940. Studies on the biology of *Valsa sordida* and *Cytospora chrysosperma*. *Phytopathology* 30: 459–475.
- Eck R. V. and Dayhoff M. O. 1966. Atlas of protein sequence and structure. National Biomedical Research Foundation, Silver Springs, Maryland, USA.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783–791.
- Fotouhifar Kh. -B. 2007. Taxonomic research on Iranian form-species of form-genus *Cytospora* Ehrenberg. Ph.D. thesis, University of Tehran, Tehran, Iran, Pp. 183.
- Fotouhifar Kh. -B., Hedjaroude G. A. and Leuchtmann A. 2010. ITS rDNA phylogeny of Iranian strains of *Cytospora* and associated teleomorphs. *Mycologia* 102(6): 1369–1382.
- Gilman J. C., Tiffany L. H. and Lewis R. M. 1957. Iowa *Ascomycetes*, II. *Diaporthaceae: Valsaceae*. *Iowa State College Journal of Science* 31: 623–647.
- Grove W. B. 1935. British Stem- and Leaf-Fungi. Volume 1, *Sphaeropsidales*. Cambridge University Press, UK, Pp. 488.
- Gutner L. S. 1935. Contributions to a monograph of the genus *Cytospora*. *Trudy Botanicheskogo Instituta Akademii Nauk SSSR, Ser. 2, Sporovye Rasteniya* 2: 411–484.
- Gvritshvili M. N. 1982. The fungal genus *Cytospora* in the USSR. *Izdatelstve Sabchota Sakarstvelo, Tbilici, Russia* (In Russian language).
- Hayova V. P. and Minter D. W. 1998. *Valsa sordida*. *IMI Descriptions of Fungi and Bacteria*. Set 137, No. 1370, CAB International, UK.
- Hubbes M. 1960. Systematisches und physiologische Untersuchungen an Valséen auf Weiden. *Phytopathologische Zeitschrift* 39: 65–93.
- Javadi Estahbanati A. R. 2008. New records of *Cytospora* species on walnut trees in Iran. 18<sup>th</sup> Iranian Plant Protection Congress, Hamedan, Iran, P. 639.
- Kobayashi T. 1970. Taxonomic studies of Japanese *Diaporthaceae* with special reference to their life histories. *Bulletin No. 226, Government Forest Research Experiment Station, Japan*.
- Nei M. and Kumar S. 2000. *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press, New York, USA, Pp. 333.
- Saitou N. and Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406–425.
- Schreiner E. J. 1931. Two species of *Valsa* causing disease in *Populus*. *American Journal of Botany* 18: 1–29.
- Spielman L. J. 1985. A monograph of *Valsa* on hardwood in North America. *Canadian journal of Botany* 63: 1355–1387.
- Tamura K., Nei M. and Kumar S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 101: 11030–11035.
- Tamura K., Dudley J., Nei M. and Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596–1599.
- Thompson J. D., Gibson T. J., Plewniak F., Jeanmougin F. and Higgins D. G. 1997. Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 24: 4876–4882.
- Urban Z. 1957. Vorläufige Mitteilung der Ergebnisse einer Revision der Gattungen *Valsa* and *Valsella*. *Preslia* 29: 394–395.
- White T. J., Bruns T. D., Lee S. B. and Taylor J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, pp. 315–322. In: M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White (Eds). *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, New York, USA.