

نخستین گزارش از *Ramichloridium punctatum* در خاورمیانه و

جنس *Ramichloridium* در ایران

دریافت: ۱۴۰۲/۰۱/۱۵ / پذیرش: ۱۴۰۲/۰۳/۳۱

مونس بخشی✉: استادیار پژوهش بخش تحقیقات رستنی‌ها، مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران (mounesbakhshi@gmail.com)
مهدی ارزنلو: استاد گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

چکیده

طی شناسایی قارچ‌های همراه با علائم لکه‌برگی گیاهان مختلف در شمال کشور، جدایه‌ای از جنس *Ramichloridium* از لوبیای درختی چهارپر در استان گیلان به دست آمد. شناسایی این قارچ براساس ترکیب ویژگی‌های ریخت‌شناختی و داده‌های مولکولی با استفاده از توالی‌یابی سه ناحیه ژنومی LSU، ITS و *tef1* انجام گرفت. نتایج نشان داد، جدایه حاضر گونه‌ای از جنس *Ramichloridium* تحت عنوان *R. punctatum* می‌باشد. این مطالعه، نخستین گزارش از *Dissoconiaceae* و جنس *Ramichloridium* برای ایران و نخستین گزارش از گونه *R. punctatum* در خاورمیانه می‌باشد. به علاوه، گیاه *S. punicea* به عنوان میزبان جدیدی برای گونه *R. punctatum* در دنیا معرفی می‌شود.

واژه‌های کلیدی: آرایه‌بندی، بقولات، فیلوژنی، هیفومیست، *Dissoconiaceae*

First report of *Ramichloridium punctatum* in the Middle East and the first record of the genus *Ramichloridium* for Iran

Received: 04.04.2023 / Accepted: 21.06.2023

Mounes Bakhshi✉: Research Assistant Prof., Department of Botany, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran (mounesbakhshi@gmail.com)

Mahdi Arzanlou: Prof., Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

Summary

Ramichloridium is a genus of dematiaceous hyphomycetes which belongs to the family *Dissoconiaceae* in the order *Mycosphaerellales*. In a survey of fungi associated with leaf spot symptoms of various plants in the north of Iran, an isolate of the genus *Ramichloridium* was recovered from leaves of *Sesbania punicea* (Cav.) Benth. Integration of morphological characteristics and sequence data obtained from the LSU, ITS and *tef1* loci were applied to identify this isolate. The results revealed that the isolate belongs to a species of the genus *Ramichloridium*, namely, *R. punctatum*. This is the first report of *Dissoconiaceae* and genus *Ramichloridium* for funga of Iran and first record of the species *R. punctatum* for funga of the Middle East region. In addition, *S. punicea* represents first host record for the *R. punctatum* in the world.

Keywords: *Dissoconiaceae*, *Fabaceae*, hyphomycetes, phylogeny, taxonomy

مقدمه

در محیط کشت یافت شده است (Arzanlou et al. 2007). بسیاری از گونه‌های *Ramichloridium* بیشتر باعث بیماری لکه‌دوده‌ای و فضله مگسی (sooty blotch and flyspeck) (disease: SBFS) که روی لایه مومی اپی کوتیکول لکه ایجاد می‌کنند، به عنوان بیمارگرهای گیاهی و مهم اقتصادی شناخته می‌شوند (Li et al. 2012, Wang et al. 2014). گونه‌های *R. luteum* G.Y. Sun, H.Y. Li & Crous, *R. apiculatum* R. mali (G.Y. Sun, Z. Zhang & Rong Zhang) G.Y. Sun, H.Y. Li & Crous به عنوان عوامل بیماری لکه‌دوده‌ای و فضله مگسی روی اعضای تیره گل‌سرخ در چین (Li et al. 2012, Wang et al. 2014) و گونه‌های *R. cucurbitae* Mayfield, Batzer & Crous و *R. punctatum* Mayfield, Batzer & Crous به عنوان عوامل بیماری لکه‌دوده‌ای و فضله مگسی روی کدو (*Cucurbita maxima* Duchesne) در آمریکا شناخته شده‌اند (Li et al. 2012). دو گونه *R. cladoniicola* U. Braun & Heuchert و *R. tropicum* U. Braun & Diederich به عنوان گونه‌های گل‌سنگ‌زی در این جنس معرفی شده‌اند (Braun et al. 2017, Diederich et al. 2009). گونه *R. endophyticum* H. Zheng, Z.F. Yu, Castañeda-Ruiz & M. Qiao نیز به عنوان قارچ اندوفیت از *Potamogeton pectinatus* L. معرفی شده است (Zheng et al. 2020).

لوبیای درختی چهارپر با نام علمی *Sesbania punicea* Benth. (Cav.)، گیاهی درختچه‌ای با ارتفاع ۲-۴ متر متعلق به تیره بقولات است که با توجه به دارا بودن گل‌های نارنجی رنگ و زیبا می‌تواند به عنوان گیاه زینتی مورد استفاده قرار گیرد (Grzeża et al. 2021). طی مطالعه هیفومیست‌های همراه با برگ‌های گیاهان مختلف در استان گیلان، جدایه‌ای از جنس *Ramichloridium* از برگ گیاه مذکور، جداسازی و با استفاده از خصوصیات ریخت‌شناختی و مولکولی مورد شناسایی قرار گرفت.

روش بررسی

- نمونه‌برداری، جداسازی و ریخت‌شناسی

طی جمع‌آوری، جداسازی و مطالعه هیفومیست‌های همراه با برگ‌های گیاهان مختلف در استان گیلان، نمونه‌ای از لوبیای درختی چهارپر با علائم لکه‌برگی، از شهرستان سیاهکل (استان گیلان) در مرداد ۱۳۹۷ جمع‌آوری و به آزمایشگاه بخش تحقیقات رستنی‌های مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور منتقل شد. لکه‌برگی‌ها به کمک استریومیکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفتند و کشت تک‌هاگ مطابق روش بخشی و همکاران (Bakhshi et al. 2021) تهیه شد. کشت زنده این قارچ در

جنس *Ramichloridium* Stahel ex de Hoog گروه قارچ‌های هیفومیست متعلق به *Dissoconiaceae* (*Mycosphaerellales*, *Dothideomycetes*) است (Arzanlou et al. 2007, Li et al. 2012, Abdollahzadeh et al. 2020). این جنس ابتدا در سال ۱۹۳۷ توسط استاهل (Stahel) براساس گونه *R. musae* Stahel به عنوان گونه تیپ معرفی شد. با این حال، با توجه به نبود توصیف لاتین، این جنس نامعتبر اعلام شد. سپس دهوخ در سال ۱۹۷۷ (de Hoog 1977) این جنس را معتبر و گونه *R. apiculatum* (J.H. Mill., Giddens & A.A. Foster) de Hoog را به عنوان گونه تیپ جدید معرفی نمود. مطابق توصیف دهوخ، جنس *Ramichloridium* آرایه‌هایی با کنیدیوم‌برهای تیره کم‌رنگ، کم و بیش متمایز و برافراشته، معمولاً غیرمنشعب، یاخته‌های کنیدیوم‌زای با گسترش هم‌پایه (سیمپودیال)، دارای ساقه‌های کوتاه (rachis) در راس و کنیدیوم‌های غالباً بدون بند را شامل می‌شد. ارزولو و همکاران در سال ۲۰۰۷، آرایه‌بندی جنس *Ramichloridium* را براساس تلفیق داده‌های مولکولی و ریخت‌شناختی بازنگری کردند. در این بازنگری، گونه تیپ جنس (*R. apiculatum*) در *Dissoconiaceae* (*Mycosphaerellales*, *Dothideomycetes*) قرار گرفت که به این ترتیب، سایر گونه‌های این جنس در رده‌های قارچی متنوع در شاخه آسکومیکوتا قرار گرفتند. بر این اساس، جنس *Ramichloridium* به گونه تیپ جنس و دیگر گونه‌های این جنس که در راسته *Mycosphaerellales* قرار می‌گرفتند، محدود و بقیه گونه‌ها در جنس‌های جدید قارچی توصیف شدند. در بررسی‌های بعدی مشخص شد جنس *Ramichloridium* در راسته *Mycosphaerellales* نیز چندنیایی است و برخی گونه‌های این جنس در جنس‌های جدید در این راسته شامل جنس‌های *Globoramichloridium* Y. Marín & Crous, *Pseudoramichloridium* Cheew. & Crous, *Pachyramichloridium* Videira & Crous و همچنین جنس *Zasmidium* Fr. توصیف شدند (Cheewangkoon et al. 2009, Videira et al. 2017, Marin-Felix et al. 2019).

گونه‌های جنس *Ramichloridium* از سبک‌های زندگی متنوعی از قبیل بیمارگر گیاهی، ساپروفیت، اندوفیت و گل‌سنگ‌زی برخوردارند (Arzanlou et al. 2007, Braun et al. 2009, Li et al. 2012, Crous et al. 2014, Zheng et al. 2020). گونه تیپ این جنس، *Ramichloridium apiculatum*، در اصل از مواد به شدت تخریب شده خاک و به عنوان آلودگی

استخراج شد. آغازگرهای LR0R (Rehner & Samuels 1994) و LR5 (Vilgalys & Hester 1990) برای تکثیر بخشی از ناحیه LSU و آغازگرهای V9G (de Hoog & Gerrits van den Ende 1998) و ITS4 (White *et al.* 1990) برای تکثیر بخشی از ناحیه ITS به کار رفتند. بخشی از ژن عامل تداوم ترجمه (*tefl*) با استفاده از آغازگرهای EF1-986R و EF1-728F (Carbone & Kohn 1999) تکثیر شد. اجزای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) و برنامه تکثیر برای دو ناحیه ژنومی LSU و ITS طبق روش بخشی و براون (Bakhshi & Braun 2022) و برای ناحیه ژنومی *tefl* طبق روش بخشی و ارزنلو (Bakhshi & Arzanlou 2017) انجام شد. واکنش توالی‌یابی با استفاده از آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن‌ها از طریق ارسال به شرکت توالی‌یابی Microsynth سوییس انجام گرفت. پس از دریافت توالی‌ها و ویرایش آن‌ها با استفاده از نرم‌افزار MEGA Ver. 6 (Tamura *et al.* 2013)، توالی‌ها با توالی‌های موجود در بانک ژن با استفاده از ابزار جستجوی BLAST (NCBI) مورد مقایسه قرار گرفتند. توالی‌های حاصل از این تحقیق به همراه توالی‌های مربوط به تمامی گونه‌های *Ramichloridium* اخذ شده از بانک ژن (جدول ۱) با استفاده از نرم‌افزار برخط MAFFT Ver. 7 (Kato *et al.* 2019)، رج‌بندی شدند. به منظور آماده‌سازی رج‌بندی چندژنی توالی‌ها، توالی‌های مربوط به ژن‌های انفرادی با استفاده از نرم‌افزار Mesquite Ver. 3.61 (Maddison & Maddison 2011) متصل شدند. بهترین مدل جایگزینی نوکلئوتیدی در هر ژن، با استفاده از نرم‌افزار Mr Modeltest Ver. 3.2.6 (Ronquist *et al.* 2012) ترسیم شد. توالی‌های جدید پژوهش حاضر به بانک ژن NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) ارسال و شماره‌های دسترسی برای آن‌ها دریافت گردید (جدول ۱).

کلکسیون ملی قارچ‌های زنده ایران واقع در مؤسسه مذکور نگهداری می‌شود.

برای بررسی ویژگی‌های میکروسکوپی، خصوصیات ریخت‌شناختی قارچ روی محیط کشت نوترینت ضعیف مصنوعی (SNA; Synthetic Nutrient-poor Agar; Crous *et al.* 2009) بعد از نگاه‌داری در اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجه سلسیوس در تاریکی، به مدت ۱۵-۷ روز، مورد مطالعه قرار گرفت. برای تهیه اسلایدهای میکروسکوپی، ساختارهای قارچی به کمک استریومیکروسکوپ با استفاده از یک سوزن ظریف از سطح محیط کشت برداشته و روی لام حاوی اسید لاکتیک قرار داده و یا از روش نوارچسب (Bensch *et al.* 2012) استفاده گردید. اندازه، رنگ و شکل ساختارهای قارچ از قبیل دسته‌های کنیدیوم‌بر، یاخته‌های کنیدیوم‌زا، محل‌های کنیدیوم‌زایی و کنیدیوم‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری المپوس مدل BX 51 در بزرگنمایی ۱۰۰۰× ثبت شد. برای هر ساختار، ۳۰ نمونه اندازه‌گیری و درجه اطمینان ۹۵٪ برای اندازه‌ها و نیز کمینه و بیشینه اندازه‌ها داخل پرانتز ثبت شد. تصاویر میکروسکوپی به کمک دوربین دیجیتال المپوس مدل DP 25 متصل به میکروسکوپ مذکور (Olympus-BX 51) تهیه شد. تصاویر تهیه شده با استفاده از نرم‌افزار فتوشاپ نسخه CS5 و ویرایش و فتوپلیت تهیه گردید. ویژگی‌های پرگنه و نرخ رشد قارچ روی تشتک‌های پتری شش سانتی‌متری حاوی محیط کشت عصاره مالت-آگار (MEA; Malt Extract Agar) بعد از نگاه‌داری در اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجه سلسیوس در تاریکی، به مدت ۱۵ روز، در دو تکرار مورد بررسی قرار گرفت.

- شناسایی مولکولی

برای شناسایی مولکولی، DNA ژنومی جدایه خالص‌شده، پس از رشد روی محیط کشت MEA، به مدت ۱۵ روز در اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجه سلسیوس در تاریکی طبق روش مولر و همکاران (Möller *et al.* 1992)

جدول ۱- آرایه‌های استفاده شده در ترسیم تبارنما و رس‌شمارهای بانک ژن آن‌ها (توالی‌های تحقیق حاضر پیرنگ نمایش داده شده‌اند).

Table 1. Taxa used in the phylogenetic analyses and Genbank accession numbers (Newly generated sequences are shown in bold.)

Taxa	Previous <i>Ramichloridium</i> name (if different)	Isolate	GenBank accession No.			Reference
			LSU	ITS	<i>tefl</i>	
<i>Globoramichloridium indicum</i>	<i>R. indicum</i>	CBS 171.96 (T)	EU041 856	EU041 799	–	Arzanlou <i>et al.</i> 2007, Marin-Felix <i>et al.</i> 2019
<i>Myrmecridium flexuosum</i>	<i>R. schulzeri</i> var. <i>flexuosum</i>	CBS 398.76 (T)	EU041 825	EU041 768	–	Arzanlou <i>et al.</i> 2007
<i>M. schulzeri</i>	<i>R. schulzeri</i>	CBS 100.54	EU041 826	EU041 769	–	Arzanlou <i>et al.</i> 2007
<i>Pachyramichloridium pini</i>	<i>R. pini</i>	CBS 461.82 (T)	EU041 859	EU041 802	–	Arzanlou <i>et al.</i> 2007, Videira <i>et al.</i> 2017
<i>Pleurothecium obovoideum</i>	<i>R. obovoideum</i>	CBS 209.95 (T)	EU041 841	EU041 784	–	Arzanlou <i>et al.</i> 2007
<i>Pseudoramichloridium brasilianum</i>	<i>R. brasilianum</i>	CBS 283.92 (T)	EU041 854	EU041 797	–	Arzanlou <i>et al.</i> 2007
<i>Radulidium epichloës</i>	<i>R. epichloës</i>	CBS 361.63 (T)	EU041 842	EU041 785	–	Arzanlou <i>et al.</i> 2007
<i>Rad. subulatum</i>	<i>R. subulatum</i>	CBS 405.76 (T)	EU041 845	EU041 788	–	Arzanlou <i>et al.</i> 2007
<i>Ramichloridium apiculatum</i>	–	CBS 156.59 (T)	EU041 848	EU041 791	–	Arzanlou <i>et al.</i> 2007
<i>R. bicellularipes</i>	–	CBS 122096 (T)	EU559 604	–	–	Kirschner & Chen 2010
<i>R. cucurbitae</i>	–	CBS 132087 (T)	JQ6220 95	JQ6220 87	JQ6221 12	Li <i>et al.</i> 2012
<i>R. endophyticum</i>	–	YMF 1.05584 (T)	MK836 098	MK836 099	MN307 070	Zheng <i>et al.</i> 2020
<i>R. eucleae</i>	–	CBS 138000 (T)	KJ8692 12	KJ8691 55	–	Crous <i>et al.</i> 2014
<i>R. luteum</i>	–	CBS 132088 (T)	JQ6220 99	EU329 730	JQ6221 16	Li <i>et al.</i> 2012
<i>R. mali</i>	–	LQ73 (T)	–	EF6274 52	–	Zhang <i>et al.</i> 2007
<i>R. punctatum</i>	–	CBS 132090 (T)	JQ6220 94	JQ6220 86	JQ6221 11	Li <i>et al.</i> 2012
<i>R. punctatum</i>	–	IRAN 4789C	OQ625 942	OQ625 988	OQ632 794	This study
<i>Rhinocladiella anceps</i>	<i>R. anceps</i>	CBS 181.65 (T)	EU041 862	EU041 805	–	Arzanlou <i>et al.</i> 2007
<i>Rh. basitona</i>	<i>R. basitonum</i>	CBS 101460 (T)	EU041 863	EU041 806	EF5515 46	Arzanlou <i>et al.</i> 2007
<i>Rh. fasciculata</i>	<i>R. fasciculatum</i>	CBS 132.86 (T)	EU041 864	EU041 807	–	Arzanlou <i>et al.</i> 2007
<i>Rh. mackenziei</i>	<i>R. mackenziei</i>	CBS 367.92	EU041 865	EU041 808	–	Arzanlou <i>et al.</i> 2007
<i>Thysanorea papuana</i>	<i>R. lignicola</i>	CBS 212.96 (T)	EU041 871	EU041 814	–	Arzanlou <i>et al.</i> 2007
<i>Th. papuana</i>	–	GUFCC 18020	KR259 882	KR259 881	–	Pratibha & Prabhugaonkar 2015
<i>Th. papuana</i>	–	MFLUCC 15-0966	MG922 576	MG922 572	–	Dong <i>et al.</i> 2018, Wang <i>et al.</i> 2019
<i>Th. papuana</i>	–	MFLUCC 17-2315	MH532 969	MH532 972	–	Wang <i>et al.</i> 2019
<i>Zasmidium biverticillatum</i>	<i>R. biverticillatum</i>	CBS 335.36	EU041 853	EU041 796	–	Arzanlou <i>et al.</i> 2007
<i>Z. cerophilum</i>	<i>R. cerophilum</i>	CBS 103.59 (T)	EU041 855	EU041 798	–	Arzanlou <i>et al.</i> 2007, Videira <i>et al.</i> 2017
<i>Z. ducassei</i>	<i>R. ducassei</i>	BRIP 53367 (T)	–	HQ149 687	–	Shivas <i>et al.</i> 2011
<i>Z. ducassei</i>	–	CPC 32929	MK540 041	MK539 971	MK540 167	Marin-Felix <i>et al.</i> 2019
<i>Z. musae-banksii</i>	<i>R. australiense</i>	CBS 121710 (T)	EU041 852	EU041 795	–	Arzanlou <i>et al.</i> 2007, Videira <i>et al.</i> 2017
<i>Z. musigenum</i>	<i>R. musae</i>	CBS 365.36 (T)	EU041 858	EU041 801	–	Arzanlou <i>et al.</i> 2007, Videira <i>et al.</i> 2017
<i>Z. strelitziae</i>	<i>R. strelitziae</i>	CBS 121711 (T)	EU041 860	EU041 803	–	Arzanlou <i>et al.</i> 2007, Videira <i>et al.</i> 2017

نتیجه و بحث

Ramichloridium punctatum Mayfield, Batzer & Crous, Persoonia 28: 122 (2012)

- توصیف روی محیط کشت SNA

میسلیوم شامل ریشه‌های صاف، بی‌رنگ تا قهوه‌ای کم‌رنگ، بنددار، منشعب، با عرض ۲/۵-۱/۵ میکرومتر. کنیدیوم‌برها برافراشته، به صورت انشعابات جانبی روی ریشه‌های سطحی، مستقیم، بدون انشعاب، نیمه‌استوانه‌ای، با سطح صاف، قهوه‌ای، به سمت انتها کم‌رنگ‌تر، دارای (۵-۳-۱) بند عرضی، به ابعاد ۲/۵-۲ × (۹۶-۶۴-۳۷-۱۰) میکرومتر. یاخته‌های کنیدیوم‌زا انتهای، نیمه‌استوانه‌ای، قهوه‌ای کم‌رنگ، دارای ردیفی از تورم‌های نامنظم زگیل مانند در طول یاخته کنیدیوم‌زا، به ابعاد (۴-۳-۲/۵) × (۴۰-۳۴-۲۸-۱۰) میکرومتر، با گسترش هم‌پایه، دارای ساقه‌های کوتاه (rachis) با محل‌های کنیدیوم‌زایی نسبتاً ضخیم، تیره و به نسبت برجسته. کنیدیوم‌ها منفرد، بی‌رنگ تا قهوه‌ای بسیار کم‌رنگ، با سطح صاف تا نسبتاً زبر، دارای قطره‌های روغنی ریز، بیضوی تا واژتخم‌مرغی، فاقد بند عرضی، با نوک گرد و پایه تخت تا نیمه‌تیز، به ابعاد (۵-۴-۳) × (۱۰-۷-۵-۴) میکرومتر؛ هیلوم مشخص و ۱ میکرومتر (شکل ۲).

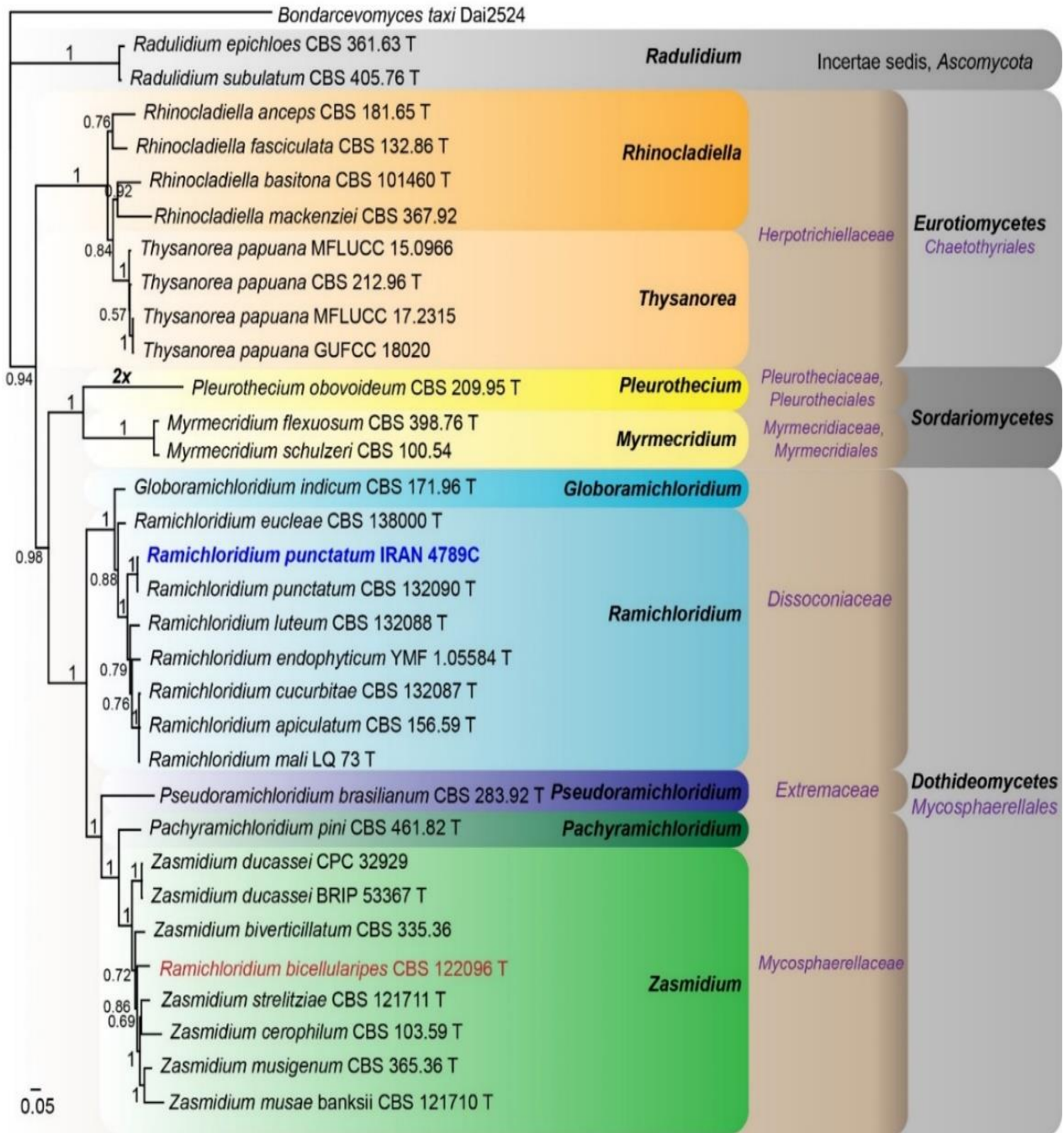
- مشخصات پرگنه روی محیط کشت MEA

قطر رشد پرگنه‌ها بعد از گذشت ۱۵ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس در شرایط تاریکی برابر با ۱۳ میلی‌متر؛ سطح پرگنه تخت برآمده با کناره‌های نابرابر و لبه‌دار و میسلیوم هوایی کم؛ رنگ پرگنه‌ها خاکستری مایل به زیتونی، از سطح زیرین تشنگ پتری به رنگ خاکستری آهنی. نمونه بررسی شده: استان گیلان، سیاهکل، "۵۸' ۱۱' ۳۷° N، "۲۰' ۵۵' ۴۹° E، ۲۰ متر، روی برگ‌های لوبیای درختی چهارپر (*S. punicea*)، ۹۷/۵/۲۴، مونس بخشی (جدایه IRAN 4789C).

برای شناسایی مولکولی جدایه *Ramichloridium*

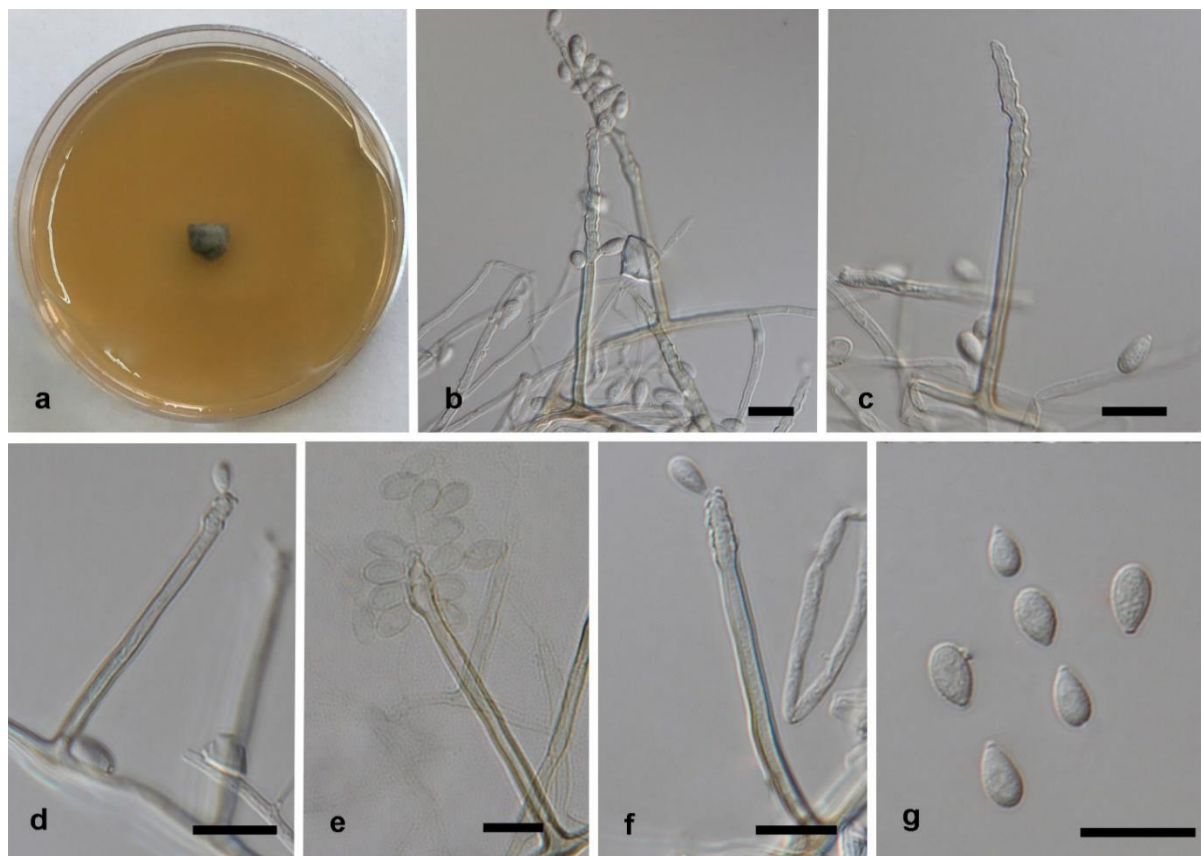
به دست آمده در این پژوهش، تبارنما با استفاده از سه ناحیه ژنومی LSU، ITS و *tefl* برای تمامی گونه‌های *Ramichloridium sensu lato* (شامل گونه‌هایی که در گذشته در این جنس قرار داشتند و داده‌های مولکولی برای آن‌ها موجود است)، ترسیم شد. رج‌بندی چندگانه شامل ۳۲ آراییه داخلی (۳۱ جدایه از NCBI و یک جدایه در این تحقیق) بود و *Bondarcevomyces taxi* (Bondartsev) Parmasto (جدایه Dai2524) به عنوان آراییه خارجی استفاده شد. رج‌بندی نهایی شامل ۲۱۷۱ کاراکتر شامل شکاف‌های رج‌بندی (gap) بود و مرز ژن‌ها به ترتیب ۱-۹۱۰ کاراکتر برای LSU، ۱۶۲۸-۹۱۱ کاراکتر برای ITS و ۲۱۷۱-۱۶۲۹ کاراکتر برای *tefl* بود. با توجه به نتایج نرم‌افزار تست مدل، مدل HKY با نرخ توزیع گامای معکوس برای نواحی ژنی ITS و LSU و مدل GTR با نرخ توزیع گاما برای ناحیه ژنومی *tefl* استفاده شدند. هر سه ناحیه ژنومی فراوانی dirichlet base داشتند. از بین ۲۱۷۱ کاراکتری که برای استنتاج بی‌زین استفاده شد، ۱۰۹۳ الگوی مکانی منحصر به فرد وجود داشت که به ترتیب ۴۰۰، ۴۷۴ و ۲۱۹ نوکلئوتید مربوط به نواحی ژنی ITS، LSU و *tefl* بود. تجزیه و تحلیل بی‌زین منتهی به ۶۵۵۰۰۰ نسل و ۱۳۱۲ درخت شد. بعد از حذف ۲۵٪ اولیه درخت‌های جمع‌آوری شده برای مرحله burn-in، درخت اجمالی و توزیع احتمال پسین خوشه‌ها از ۹۸۴ درخت باقی‌مانده محاسبه شد (شکل ۱).

براساس نتایج تبارنمای سه ژنی مشخص شد جدایه *Ramichloridium* به دست آمده از لوبیای درختی چهارپر با جدایه تیپ گونه *R. punctatum* (CBS 132090) در یک شاخه قرار گرفت.



شکل ۱- تبارنمای حاصل از استنتاج بی‌زین (Bayesian) با استفاده از ترکیب توالی سه ناحیه ژنومی LSU، ITS و *tef1* جنس *Ramichloridium* و آرایه‌های مشابه. این درخت نسبت به گونه *Bondarcevomyces taxi* (جدایه Dai2524) ریشه‌یابی شده است.

Fig. 1. Consensus phylogram of *Ramichloridium*-like isolates, resulting from a Bayesian analysis of the combined 3-locus (LSU, ITS, and *tef1*) sequence alignment. The tree was rooted to *Bondarcevomyces taxi* (Dai2524).



شکل ۲- *Ramichloridium punctatum*: a. پرگنه هفت روزه قارچ روی محیط کشت MEA، b-g. کنیدیوم‌برها، یاخته‌های کنیدیوم‌زا و کنیدیوم‌ها (مقیاس = ۱۰ میکرومتر).

Fig. 2. *Ramichloridium punctatum*: a. Seven-day-old culture on MEA, b-g. Conidiophores, conidiogenous cells and conidia (Bars = 10 μ m).

از زمان معرفی جنس *Ramichloridium* ۴۱ نام گونه برای این جنس در پایگاه‌های میکوبانک (Crous et al. 2004:) و اینسـدکس فانگسـاروم (www.mycobank.org) به ثبت رسیده است (تاریخ دسترسی ۱۴/۰۱/۱۴۰۲). با این حال، داده‌های مولکولی نشان داده‌اند که جنس *Ramichloridium* چندنیایی بوده و ۱۹ گونه به جنس‌های دیگر شامل *Globoramichloridium* (*Extremaceae*) *Pseudoramichloridium*، (*Dissoconiaceae*) *Zasmidium* و *Pachyramichloridium* (*Mycosphaerellaceae*) از رده *Dothideomycetes*، راسته *Mycosphaerellales* جنس‌های *Myrmecridium* Arzanlou, W. Gams & Crous (*Myrmecridiaceae*, *Myrmecridiales*) و *Pleurothecium* (*Pleurotheciaceae*, *Pleurotheciales*) Höhn. از رده *Sordariomycetes* جنس‌های *Rhinochadiella* Nannf. و *Thysanorea* Arzanlou, W. Gams & Crous (*Herpotrichiellaceae*) از رده *Erotiomyces*، راسته *Chaetothyriales* و جنس *Radulidium* Arzanlou, W. Gams

از زمان معرفی جنس *Ramichloridium* ۴۱ نام گونه برای این جنس در پایگاه‌های میکوبانک (Crous et al. 2004:) و اینسـدکس فانگسـاروم (www.mycobank.org) به ثبت رسیده است (تاریخ دسترسی ۱۴/۰۱/۱۴۰۲). با این حال، داده‌های مولکولی نشان داده‌اند که جنس *Ramichloridium* چندنیایی بوده و ۱۹ گونه به جنس‌های دیگر شامل *Globoramichloridium* (*Extremaceae*) *Pseudoramichloridium*، (*Dissoconiaceae*) *Zasmidium* و *Pachyramichloridium* (*Mycosphaerellaceae*) از رده *Dothideomycetes*، راسته *Mycosphaerellales* جنس‌های *Myrmecridium* Arzanlou, W. Gams & Crous (*Myrmecridiaceae*, *Myrmecridiales*) و *Pleurothecium* (*Pleurotheciaceae*, *Pleurotheciales*) Höhn. از رده *Sordariomycetes* جنس‌های *Rhinochadiella* Nannf. و *Thysanorea* Arzanlou, W. Gams & Crous (*Herpotrichiellaceae*) از رده *Erotiomyces*، راسته *Chaetothyriales* و جنس *Radulidium* Arzanlou, W. Gams

(Chi et al. 2019). در پژوهش حاضر، این گونه نادر، برای نخستین بار از ایران و نیز خاورمیانه شناسایی می‌شود. همچنین، گیاه *S. punicea*، برای نخستین بار در دنیا به عنوان میزبان این گونه قارچی معرفی می‌شود. گونه مورد نظر از روی برگ‌های دارای علائم لکه‌برگی این گیاه جداسازی شد، اما با توجه به این که لکه‌ها هم‌زمان آلوده به گونه‌ای از جنس *Cercospora* نیز بودند، تایید بیماری‌زا بودن و نقش گونه *R. punctatum* در ایجاد علائم لکه‌برگی و یا حتی نقش آن به عنوان قارچ قارچی، مستلزم انجام آزمون بیماری‌زایی است.

سیاسگزاری

نگارندگان از سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور به خاطر حمایت مالی پژوهش حاضر تشکر می‌نمایند.

References

- Abdollahzadeh, J., Groenewald, J.Z., Coetzee, M.P.A., Wingfield, M.J. & Crous, P.W. 2020. Evolution of lifestyles in *Capnodiales*. *Studies in Mycology* 95(1): 381–414.
- Arzanlou, M., Groenewald, J.Z., Gams, W., Braun, U., Shin, H.D. & Crous, P.W. 2007. Phylogenetic and morphotaxonomic revision of *Ramichloridium* and allied genera. *Studies in Mycology* 58(1): 57–93.
- Bakhshi, M. & Arzanlou, M. 2017. Multigene phylogeny reveals a new species and novel records and hosts in the genus *Ramularia* from Iran. *Mycological Progress* 16(7): 703–712.
- Bakhshi, M. & Braun, U. 2022. *Acericercospora hyrcanica* gen. et sp. nov. (Mycosphaerellaceae) and *Paramycocentrospora acericola* gen. et sp. nov. (Dothidotthiaceae) on maple trees in Hyrcanian forests. *Mycological Progress* 21(8): 1–15.
- R. bicellularipes* R. Kirschner, *R. apiculatum* R. eucleae Crous & *R. endophyticum* *R. cucurbitae* *R. punctatum* و *R. mali* *R. luteum* van der Linde داده‌های مولکولی وجود دارد (جدول ۱). براساس تبارنمای ترسیم شده در این پژوهش، به نظر می‌رسد گونه *R. bicellularipes* نیز بایستی به جنس *Zasmidium* منتقل شود (شکل ۱). در حال حاضر، تنها توالی ناحیه LSU جدایه تیپ این گونه (CBS 122096) موجود می‌باشد و برای تصمیم‌گیری قطعی در این زمینه نیاز است توالی نواحی دیگر نیز فراهم شود.
- پژوهش حاضر، نخستین گزارش از *Dissoconiaceae* و جنس *Ramichloridium* از ایران می‌باشد (Bakhshi et al. 2022). گونه *R. punctatum* نخستین بار در سال ۲۰۱۲ براساس جدایه تیپ (CBS 132090 = CPC 18974) (= BHE35b1) که از سطح میوه کدو (*Cucurbita maxima*) در آمریکا جداسازی شده بود، معرفی گردید (Li et al. 2012). تنها گزارش دیگر این گونه از برگ‌های *Acanthus ilicifolius* var. *xiamenensis* از کشور تایوان است
- Bakhshi, M., Zare, R. & Ershad, D. 2022. A detailed account on the statistics of the fungi and fungus-like taxa of Iran. *Mycologia Iranica* 9(2): 1–96.
- Bakhshi, M., Zare, R., Jafary, H., Arzanlou, M. & Rabbani-nasab, H. 2021. Phylogeny of three *Ramularia* species occurring on medicinal plants of the Lamiaceae. *Mycological Progress* 20(1): 27–38.
- Bensch, K., Braun, U., Groenewald, J.Z. & Crous, P.W. 2012. The genus *Cladosporium*. *Studies in Mycology* 72: 1–401.
- Braun, U., Heuchert, B. & Diederich, P. 2009. Two new and another interesting lichenicolous hyphomycete. *Herzogia* 22: 165–171.
- Carbone, I. & Kohn, L.M. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91: 553–556.
- Cheewangkoon, R., Groenewald, J.Z., Summerell, B.A., Hyde, K.D., To-anun, C. & Crous, P.W. 2009. Myrtaceae, a cache of fungal biodiversity. *Persoonia* 23: 55–85.

- Chi, W.C., Chen, W., He, C.C., Guo, S.Y., Cha, H.J., Tsang, L.M., Ho, T.W. & Pang, K.L. 2019. A highly diverse fungal community associated with leaves of the mangrove plant *Acanthus ilicifolius* var. *xiamenensis* revealed by isolation and metabarcoding analyses. *PeerJ* 7: 1–24.
- Crous, P.W., Gams, W., Stalpers, J.A., Robert, V. & Stegehuis, G. 2004. MycoBank: an online initiative to launch mycology into the 21st century. *Studies in Mycology* 50: 19–22.
- Crous, P.W., Shivas, R.G., Quaedvlieg, W.V., Van der Bank, M., Zhang, Y., Summerell, B.A., Guarro, J., Wingfield, M.J., Wood, A.R., Alfenas, A.C. & Braun, U. 2014. Fungal Planet description sheets: 214–280. *Persoonia* 32(1): 184–306.
- Crous, P.W., Verkley, G.J.M., Groenewald, J.Z. & Samson, R.A. 2009. Fungal Biodiversity. CBS Laboratory Manual Series 1: 1–269. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Netherlands.
- de Hoog, C.S.D. 1977. *Rhinochlaediella* and allied genera. *Studies in Mycology* 15: 93–95.
- de Hoog, G.S.D. & Gerrits, van den Ende A.H.G. 1998. Molecular diagnostics of clinical strains of filamentous Basidiomycetes. *Mycoses* 41: 183–189.
- Diederich, P., Lücking, R., Aptroot, A., Sipman, H.J., Braun, U., Ahti, T. & Ertz, D. 2017. New species and new records of lichens and lichenicolous fungi from the Seychelles. *Herzogia* 30(1): 182–236.
- Dong, W., Hyde, K.D., Bhat, D.J. & Zhang, H. 2018. Introducing *Aculeata aquatica* gen. et sp. nov., *Minimelanolocus thailandensis* sp. nov. and *Thysanorea aquatica* sp. nov. (Herpotrichiellaceae, Chaetothyriales) from freshwater in northern Thailand. *Mycological Progress* 17: 617–629.
- Grzeża, G.T., Winhelmann, M.C., Emer, A.A., Tedesco, M., Lazarotto, M. & Schafer, G. 2021. Biometry and maturation of *Sesbania punicea* (Cav.) Benth. seeds. *Acta Iguazu* 10: 91–100.
- Katoh, K., Rozewicki, J. & Yamada, K.D. 2019. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics* 20(4): 1160–1166.
- Kirschner, R. & Chen, C.J. 2010. Two new species of *Ramichloridium*-like hyphomycetes from senescent leaves of night-scented lily (*Alocasia odora*) in Taiwan. *Fungal Diversity* 40: 41–50.
- Li, H.Y., Sun, G.Y., Zhai, X.R., Batzer, J.C., Mayfield, D.A., Crous, P.W., Groenewald, J.Z. & Gleason, M.L. 2012. Dissoconiaceae associated with sooty blotch and flyspeck on fruits in China and the United States. *Persoonia* 28(1): 113–125.
- Maddison, W.P. & Maddison, D.R. 2011. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.75. <http://mesquiteproject.org>.
- Marin-Felix, Y., Hernández-Restrepo, M., Iturrieta-González, I., García, D., Gené, J., Groenewald, J.Z., Cai, L., Chen, Q., Quaedvlieg, W., Schumacher, R.K. & Taylor, P.W.J. 2019. Genera of phytopathogenic fungi: GOPHY 3. *Studies in Mycology* 94: 1–124.
- Möller, E.M., Bahnweg, G., Sandermann, H. & Geiger, H. 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acids Research* 20: 6115–6116.
- Nylander, J.A.A. 2004. MrModeltest Ver. 2.0. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, Uppsala, Sweden.
- Pratibha, J. & Prabhugaonkar, A. 2015. New record of *Thysanorea papuana* from India. *Mycosphere* 6: 480–485.
- Rehner, S.A. & Samuels, G.J. 1994. Taxonomy and phylogeny of *Gliocladium* analysed from nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycological Research* 98: 625–634.

- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A. & Huelsenbeck, J.P. 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61: 539–542.
- Shivas, R.G., Grice, K.R. & Young, A.J. 2011. *Ramichloridium* spp. on Musa in northern Queensland: introducing *Ramichloridium ducassei* sp. nov. on leaf streaks of Ducasse banana. *Australasian Plant Pathology* 40(1): 61–65. Doi: 10.1007/s13313-010-0014-x.
- Stahel, G. 1937. The banana leaf speckle in Surinam caused by *Chloridium musae* nov. spec. and another related banana disease. *Tropical Agriculture* 14: 42–44.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Ver. 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30(12): 2725–2729.
- Videira, S.I.R., Groenewald, J.Z., Nakashima, C., Braun, U., Barreto, R.W., de Wit, P.J. & Crous, P.W. 2017. Mycosphaerellaceae-chaos or clarity? *Studies in Mycology* 87: 257–421.
- Vilgalys, R., Hester, M. 1990. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology* 172: 4238–4246.
- Wang, G.N., Yu, X.D., Dong, W., Bhat, D.J., Boonmee, S., Zhang, D. & Zhang, H. 2019. Freshwater hyphomycetes in Eurotiomycetes: a new species of *Minimelanolocus* and a new collection of *Thysanorea papuana* (Herpotrichiellaceae). *Mycological Progress* 18: 511–522.
- Wang, L., Du, Y., Ju, L., Zhao, Y., Zhang, R., Sun, G. & Gleason, M.L. 2014. *Ramichloridium apiculatum*, a new record for China, causing sooty blotch and flyspeck. *Mycotaxon* 127(1): 121–127.
- White, T.J., Bruns, T. & Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315–322. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. & White, J.W. (eds), *A Guide to Molecular Methods and Applications*. Academic Press, New York.
- Zheng, H., Yu, Z., Xu, J., Castaneda-Ruiz, R.F. & Qiao, M. 2020. *Ramichloridium endophyticum* sp. nov., a novel species of endophytic fungus from *Potamogeton pectinatus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 70(5): 3433–3439.