

شناسایی عوامل قارچی همراه با سرخشیدگی و زوال درختان اقاچیا در شهر اردبیل

دریافت: ۹۶/۱۱/۲ بازنگری: ۹۸/۶/۱۵ پذیرش: ۹۹/۵/۲۹

مهدی داوری^۱، فاطمه علی‌حسین‌زاده مقدم^۲، ابوالفضل نرمانی^۳^۱ به ترتیب دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی (mdavari@uma.ac.ir) و پژوهشگر (کارشناس ارشد)، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی. ^۲ پژوهشگر پس‌دکتری، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.

چکیده

زوال درختان زینتی بیماری مهمی است که در کشورهای مختلف بسیاری از درختان زینتی و جنگلی از جمله زبان‌گنجشک، اقاچیا، افرا، نارون و نخل-های زینتی را همواره تهدید می‌کند. در تحقیق حاضر، به منظور شناسایی قارچ‌های همراه زوال درختان اقاچیا در شهر اردبیل، از درختان اقاچیی بیمار نمونه‌برداری انجام گرفت و با روش‌های متداول در بیماری‌شناسی گیاهی، تعداد ۱۵۰ جدایه قارچی جداسازی و خالص‌سازی شد. جدایه‌های قارچی بر اساس صفات ریخت‌شناختی و یا تلفیق داده‌های ریخت‌شناختی و داده‌های مولکولی بر اساس توالی ناحیه ITS-rDNA و یا ژن *TEF* مورد شناسایی قرار گرفتند. در این مطالعه، ۱۰ گونه قارچی شامل *Fusarium oxysporum*، *F. solani*، *Acremonium* sp.، *Cytospora chrysosperma*، *Sordaria macrospora* شناسایی شدند. به نظر می‌رسد که قارچ‌های *Cytospora chrysosperma* و *Camarosporidiella elongata* و گونه‌های قارچی *F. solani* و *F. oxysporum* می‌توانند در انسداد آوندی، سرخشیدگی و در نهایت زوال درختان اقاچیی فضای سبز شهر اردبیل دخیل باشند. این تحقیق، اولین مطالعه علمی زوال درختان اقاچیا در ایران محسوب می‌شود. همچنین قارچ *Ca. elongata* برای اولین بار از ایران گزارش می‌شود و گزارش قارچ‌های *Acremonium* sp. و *S. macrospora* از اقاچیا نیز برای دنیا جدید است.

کلمات کلیدی: سرخشیدگی، زوال اقاچیا، قارچ بیماری‌زا، ITS-rDNA، فضای سبز

Characterization of fungal agents associated with black locust dieback and decline in Ardabil city

Received: 22 Jan 2018

Revised: 6 Sep 2019

Accepted: 19 Aug 2020

Davari Mahdi¹ , Alihosseinzadeh-Moghaddam Fathemeh², Narmani Abolfazl³

^{1,2}Respectively, Associate Professor (mdavari@uma.ac.ir), Researcher (MSc), Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, P. O. Box: 179, Iran. ³Post Doctoral Researcher, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

Abstract

Ornamental trees decline is an important disease that threatens many ornamental and forest trees in the world, including ash, acacia, black locust, maple, elm and ornamental palms. In the present research, in order to characterize the fungal agents associated with black locust decline in Ardabil, samples were collected from black locust trees with typical dieback and canker symptoms from green spaces. 150 fungal isolates were isolated and purified using routine plant pathology methods. Identification of species was carried out using morphological and molecular sequence data of the ITS regions or *TEF* gene. In this study, 10 fungal species including *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Acremonium* sp., *Cytospora chrysosperma*, *Camarosporidiella elongata*, *Nigrospora* sp., *Alternaria alternata*, *Epicoccum nigrum*, *Chaetomium* sp. and *Sordaria macrospora* were identified. It seems that *Camarosporidiella elongata*, *Cytospora chrysosperma*, *Fusarium oxysporum* and *F. solani* are likely involved in the vascular obstruction, dieback and eventually black locust trees decline in green space of Ardabil. This is the first study on the occurrence of black locust decline in Iran. Among the identified isolates, *Ca. elongata* is reported for the first time in Iran. *Acremonium* sp. and *S. macrospora* are new reports on black locust host worldwide.

Keywords: Dieback, Black locust decline, Pathogenic fungus, ITS-rDNA, Green space.

How to cite:

Davari M, Alihosseinzadeh-Moghaddam F, Narmani A, 2020. Characterization of fungal agents associated with black locust dieback and decline in Ardabil city. *Journal of Applied Research in Plant Protection* 9(3): 47–57.

مقدمه

گیاهان و درختان موجود در فضای سبز شهرها نیز همانند سایر گیاهان به‌ویژه به‌دنبال عوامل مستعدساز، مورد حمله انواع آفات و بیماری‌ها قرار می‌گیرند و در صورت عدم شناسایی عوامل دخیل در ایجاد بیماری و کنترل به‌موقع آن‌ها ممکن است خسارت عمده به فضای سبز شهرها وارد شود. درخت اقااقیا (*Robinia pseudoacacia* L.) به دلیل سازگاری بالا در فضای سبز شهرها به‌فراوانی استفاده شده و نقش محوری در تأمین فضای سبز برخی شهرها دارند. خشکیدگی و زوال (decline) اقااقیا از مشکلات مهم این درخت مهم زینتی در برخی کشورها محسوب می‌شود. تاکنون در مناطق مختلف جهان، قارچ‌های متعددی به‌عنوان عوامل بیماری سرخشکیدگی و زوال اقااقیا گزارش شده است. به‌عنوان مثال، گونه‌های *F. Schldtli* و *oxysporum solani* به‌عنوان عامل ایجاد شانکر اقااقیای سیاه در چین معرفی شده است (Hong & Ji 1996). همچنین شیوع *F. sulphureum* و *F. lateritium* Nees. در مجارستان گزارش شده است (Halász 2002). برخی گونه‌های فوزاریوم از جمله *F. acuminatum* Ellis & *F. oxysporum* Everth., *F. proliferatum* (Matsush.) Nirenberg و *F. graminearum* Schwabe به‌عنوان عامل شانکر و پژمردگی برخی گونه‌های جنس *Acacia* که با *Robinia* در یک خانواده (Fabaceae) قرار می‌گیرند، شناخته شده‌اند (James 2004). در سال ۱۹۸۹ قارچ *Ceratocystis albifundus* M.J. Wingf., De Beer & M.J. Morris به‌عنوان مهم‌ترین بیمارگر درخت *Acacia meransii* De Wild. در آفریقای جنوبی گزارش شد و این قارچ در اوگاندا و کنیا نیز مشاهده گردید (Roux & Wingfield 2013). در اندونزی، گونه‌های *Ceratocystis manginecans* M. van Wyk, Al Adawi & M.J. Wingf. و *acaciivora* Tarigan & M. van Wyk به‌عنوان عامل پژمردگی آکاسیا (*A. mangium* Willd.) در نهالستان‌های این کشور معرفی گردید (Tarigan et al. 2011). در شمال یونان، از سرشاخه‌ها و شاخه‌های اقااقیای سیاه (*R. pseudoacacia*) مبتلا به سرخشکیدگی و نکروز، سه قارچ *Phomopsis oncostoma* و *Aglaospora profusa* (Fr.) De Not. (Thüm.) Traverso

(Fr.) Grev. *Cucurbitaria elongate* جداسازی و اثبات بیماری‌زایی شد (Michalopoulos-Skarmoutsos & Skarmoutsos 1999).

گونه *Cytospora chrysosperma* (Pers.) Fr. به‌عنوان عامل شانکر از روی میزبان‌های چوبی مختلف از جمله درختان گردو در ۱۲ استان کشور (Abbasi et al. 2012)، درختان میوه هسته‌دار در آذربایجان شرقی و غربی (Dokhanchi et al. 2013)، درختان بادام در آذربایجان شرقی (Baradaran Bagheri et al. 2014) و درختان نارون در تبریز (Ahmadi & Arzanlou 2019) گزارش شده است. (Ahmadi & Arzanlou 2019) با بررسی قارچ‌های مرتبط با شانکر و سرخشکیدگی درختان نارون شهر تبریز، ۱۶ گونه قارچی را شناسایی نمودند که جدایه‌های متعلق به جنس *Fusarium* و *Chaetomium* از بیشترین فراوانی برخوردار بودند. (Jamali & Banihashemi 2012) ده جنس قارچی را از ۴۱ درخت چنار دارای علایم زوال و خشکیدگی شیراز جداسازی کردند که در بین آن‌ها فقط *Natrassia mangiferae* (Syd. & P. Syd.) B. Sutton & Dyko و چند جدایه از *Cytospora* روی شاخه بریده بیماری‌زایی نشان دادند.

در چند سال اخیر، درختان اقااقیای کاشته شده در شهر اردبیل دچار بیماری سرخشکیدگی (dieback) شده و با سبزخشک شدن برگ‌ها از بالا به پایین و به‌صورت یک‌طرفه خشکیده و در نهایت، دچار زوال و مرگ می‌شوند. با توجه به اهمیت درختان اقااقیا در فضای سبز اردبیل و گسترش روزافزون بیماری در شهر و احتمال وقوع این بیماری در شهرهای دیگر، این تحقیق با هدف بررسی قارچ‌های همراه با ریشه و شاخه درختان بیمار و برآورد اولیه عوامل قارچی همراه زوال درختان اقااقیای شهر اردبیل انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه، جداسازی و شناسایی ریخت‌شناختی جدایه‌ها در طول فصل تابستان ۱۳۹۲ و ۱۳۹۳ از مناطق مختلف شهر اردبیل بازدید به عمل آمد و از قسمت‌های مختلف درختان بیمار اقااقیا به‌ویژه شاخه‌های در حال خشکیدن نمونه‌برداری و به آزمایشگاه منتقل شدند. قطعاتی از آوند ساقه و ریشه پس از ضدعفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم ۱٪ رقیق شده دارای نیم

جدایه ها با استفاده از روش Moller *et al.* (1992) استخراج گردید و کمیت و کیفیت DNA به دست آمده به روش اسپکتروفتومتری مورد بررسی قرار گرفت.

در این بررسی، بخش هایی از دو ناحیه ژنومی شامل ژن عامل تداوم ترجمه (*TEF-1α*) و ناحیه فاصله انداز داخلی DNA ریپوزومی (*ITS-rDNA*) به ترتیب در جدایه های منتخب متعلق به *Fusarium* و سایر قارچ ها تکثیر شد. تکثیر و توالی یابی ژن *TEF1-α* و ناحیه *ITS-rDNA* به ترتیب با استفاده از آغازگرهای EF1-fus (5'-ATGGGTAAGGAGGACAAGAC-3') و EF2-fus (5'-GGAAGTACCAGTGATCATGTT-3') (Geiser *et al.* 2004) و ITS1 و ITS4 (5'TCCGTAGTTGGACCTGCGG3') و (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') (White *et al.* 1990; Chung *et al.* 2008) انجام شد. واکنش زنجیره ای پلی مرز در حجم ۱۲/۵ میکرولیتر با شرایط واکنش و دمایی ذکر شده در Davari *et al.* (2008) انجام شد. محصولات واکنش PCR از ژل آگارز یک درصد حاوی اتیدیوم بروماید در بافر TAE 1X (1mM EDTA (PH = 8, 20 mM acetic acid, 40 mM Tris base) عبور داده شد و عکسبرداری با استفاده از دستگاه ژل داک (Gel Documentation) انجام شد. واکنش توالی یابی با استفاده از کیت توالی یابی ABI prism BigDye™ terminator cycle (Applied Biosystems, Foster City, USA) و در یک توالی یاب اتوماتیک ABI 3730XL و مطابق دستورالعمل ارایه شده توسط شرکت سازنده انجام شد. اطلاعات توالی به دست آمده با استفاده از نرم افزار SeqMan ویرایش شدند (DNASTAR, Madison, WI, USA). توالی های به دست آمده با استفاده از نرم افزار BLAST با توالی های موجود در بانک ژن مقایسه شدند و جدایه های مرجع با بیشترین مشابهت برای تعیین دقیق هویت و تایید مولکولی گونه های قارچی مد نظر قرار گرفتند.

نتایج

در طی بازدید از مناطق مختلف شهر اردبیل مشخص گردید که علایم بیماری زوال افاقا در اکثر مناطق شهر اردبیل وجود دارد. علایم بیماری به صورت سرخشیدگی شاخه ها در درختان افاقای کنار خیابان ها و وسط بلوارهای نقاط مختلف شهر مشاهده

تا یک درصد ماده فعال به مدت ۳۰ ثانیه تا یک دقیقه بر حسب ضخامت بافت یا اتانول ۷۰ درجه و سه بار شستشو با آب مقطر سترون و خشک کردن با کاغذ صافی سترون روی محیط های کشت سیب زمینی دکستروز آگار (PDA, Merck, Germany)، عصاره مالت آگار (MEA, Merck, Germany) و محیط کشت نیمه انتخابی اصلاح شده نش و اسنایدر (Nash-Snyder medium) کشت داده شدند. تشک های پتری حاوی قطعات کشت شده در داخل انکوباتور با دمای ۲۵°C و دوره نوری ۱۲ ساعت تاریکی و روشنایی قرار داده شدند و پس از ۴۸ ساعت، تشک های پتری به طور روزانه مورد بررسی قرار گرفتند و در صورت مشاهده رشد قارچ در اطراف قطعات کشت شده، از خارجی ترین قسمت پرگنه، مقداری از قارچ به همراه محیط کشت با اسکالپل سترون برداشته و به محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار جدید منتقل شدند. خالص سازی جدایه ها با روش تک اسپور کردن انجام گرفت. به منظور مطالعه ریخت شناسی جدایه های جنس *Fusarium* محیط کشت آگار تغذیه ای سنتزی (Synthetic Nutrient-poor Agar) و محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار (Seifert 1996) استفاده شد و از طریق مقایسه مشخصات ریخت شناسی با استفاده از کلیدهای تشخیص معتبر ارایه شده توسط Gerlach (1982) و Nirenberg (1983)، و Nelson *et al.* (1983) و Leslie & Summerell (2006) مورد شناسایی اولیه قرار گرفتند. سایر قارچ ها با استفاده از خصوصیات ریخت شناسی و کلیدهای شناسایی معتبر از جمله Barnett & Hunter (1998)، Boerema *et al.* (2004) و Simmons (2007) بررسی و شناسایی شدند و عکس برداری با استفاده از میکروسکوپ مدل Ziess و دوربین Canon انجام شد. کلیه جدایه ها در کلکسیون قارچ شناسی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه محقق اردبیلی با کد اختصاری Fungal Collection of University of Mohahegh (FCUMA) (Ardabili) ثبت و نگهداری شدند.

استخراج و تکثیر DNA ژنومی جدایه ها و توالی یابی

در مورد برخی گونه های قارچی، جهت شناسایی مولکولی از توالی یابی DNA استفاده شد. برای این منظور، جدایه های مورد نظر در محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار کشت داده شدند و به مدت ۷-۱۰ روز در دمای ۲۵°C نگهداری شدند و DNA

نیز انسداد آوندی با تغییر رنگ مشخص بود. همزمان با بارش اولین برف پاییزی به دلیل سنگین بودن برف و نیز خزان نکردن برگ‌های شاخه‌ها، شکستن شدید شاخ و برگ افاقیا مشاهده می‌شد و در این بین، شکستن شاخه‌های بیمار به دلیل ضعف و خشکیدگی، بیشتر مشهود بود و قهوه‌ای شدن آوندی در شاخه‌های شکسته نیز به خوبی نمایان بود.

می‌شد. بدین ترتیب که برگ‌های مربوط به شاخه‌ای در یک طرف درخت کمرنگ و به سرعت قهوه‌ای شده و کاملاً خشک می‌شدند و در صورت عدم هرس به موقع و حذف سرشاخه آلوده، این عارضه به تدریج به بقیه شاخه‌ها نیز سرایت کرده و باعث زوال و خشکیدگی کامل درخت می‌شد. این علایم اغلب در افاقیا چتری (توپ) دیده می‌شد و در افاقای نرک (پیوندی) به ندرت قابل مشاهده بود. در برش عرضی تنه درختان، قهوه‌ای شدن آوندی به وضوح قابل رویت بود که نشان دهنده انسداد آوندی درختان بیمار بود (شکل ۱). در شاخه‌های مبتلا به سرخشکیدگی



شکل ۱. علایم زوال درختان افاقیا در سطح شهر اردبیل. a-b. سرخشکیدگی در شاخه‌ها، c. زوال و مرگ درخت، d-e. قهوه‌ای‌شدگی آوندی در مقطع عرضی تنه و شاخه‌ها.

Figure 1. Symptoms of decline in Black locust trees in Ardabil city, a-b. Dieback on twigs, c. Decline and death of infected tree, e-d. Vascular browning in the cross section of the trunk and branches.

شدند. همچنین با مقایسه توالی‌های *TEF-1a* (در مورد *Fusarium*) و ناحیه ITS (سایر جنس‌های قارچی) با توالی‌های مرجع موجود در بانک ژن، هویت گونه‌ها با داده‌های مولکولی نیز مورد تایید قرار گرفت. ویژگی‌های ریخت‌شناختی و مشخصات برخی از گونه‌ها به قرار زیر می‌باشد:

گونه‌های قارچی شناسایی شده

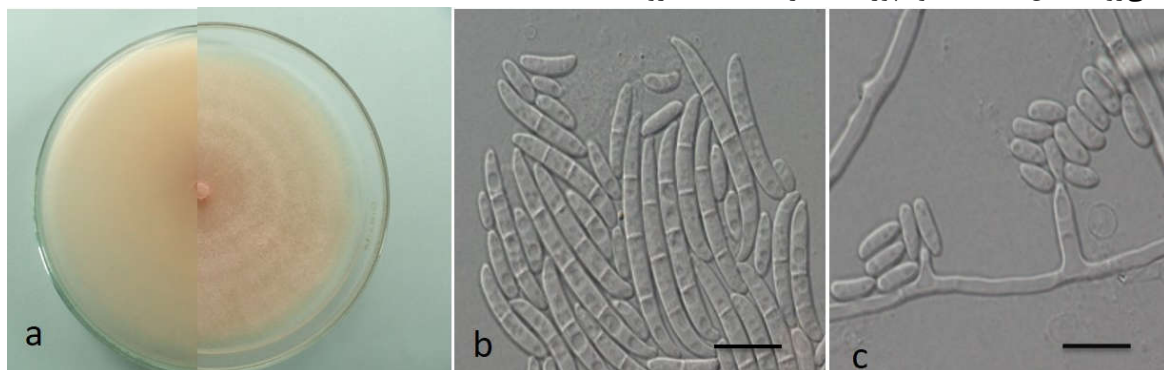
طی این تحقیق، با مطالعه ویژگی‌های ریخت‌شناختی و مقایسه با کلیدهای معتبر قارچ‌شناسی، گونه‌های قارچی *F. oxysporum*, *Ca. C. chrysosperma*, *Acremonium* sp., *F. solani*, *E. nigrum*, *Alternaria alternata*, *Nigrospora* sp., *elongata* شناسایی *Sordaria macrospora* Auersw و *Chaetomium* sp.

Fusarium oxysporum Schltdl. - ۱

SNA به صورت انفرادی یا دوتایی و گاهی زنجیری یا خوشه ای در میسلیم های هوایی یا سطح آگار تشکیل شدند. در تحقیق حاضر، گونه *F. oxysporum* از بافت های آوندی درختان دچار سرخشیدگی جداسازی شد و مشخصات ریخت شناختی با توصیف Gerlach & Nirenberg (1982) مطابقت داشت و نتایج توالی یابی ژن *TEF* نیز هویت گونه را تایید نمود.

گونه *F. oxysporum* در بین گونه های فوزاریوم از پراکنش وسیعی برخوردار است و به عنوان یک بیمارگر مهم باعث پژمردگی آوندی، گیاهچه میری و پوسیدگی طوقه بسیاری از گونه های گیاهی در تمام دنیا شناخته شده است و همچنین به- عنوان یک قارچ گندروی رایج در اکثر خاک ها یافت می شود. این گونه با دارا بودن طیف میزبانی بسیار وسیع و خسارت چشمگیر در گیاهان از مهم ترین گونه های فوزاریوم در کشاورزی محسوب می شود (Leslie & Summerell 2006).

ریخت شناسی پرگنه روی محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار در جدایه های مختلف بسیار متنوع بود. در جدایه های به دست آمده در این تحقیق، میسلیم های سفید مایل به نارنجی به صورت خوابیده مشاهده شدند و میسلیم هوایی مشاهده نشد. قطر پرگنه بعد از سه روز به $\frac{3}{5}$ سانتی متر و بعد از ۱۰ روز به ۱۰ سانتی متر رسید. اسپورودوکیوم های نارنجی کم رنگ فراوان روی محیط کشت SNA مشاهده شدند. ماکروکنیدیوم های سه بندی فراوان با طول کوتاه تا متوسط، مستقیم تا حدی خمیده، نسبتاً باریک و با دیواره نازک روی اسپورودوکیوم یا میسلیم ها مشاهده شد که در آن ها سلول پایه پاشنه ای شکل و سلول انتهایی نوک- تیز و انحنادار و گاهی با قلاب (Hook) کوچک مشاهده شد. در این گونه، میکروکنیدیوم های تخم مرغی، بیضوی یا قلوه ای شکل و معمولاً یک سلولی روی سرهای لزج (slimy heads) با منوفالیدهای کوتاه تولید شدند که از ویژگی های متمایز این گونه به شمار می رود (شکل ۲). کلامیدوسپورها بعد از ۴-۲ هفته روی



شکل ۲. *Fusarium oxysporum*. a. سطح رویی و پشتی پرگنه روی PDA پس از هفت روز، b. ماکروکنیدیوم ها، c. میکروکنیدیوم ها. مقیاس = ۱۰ میکرومتر.

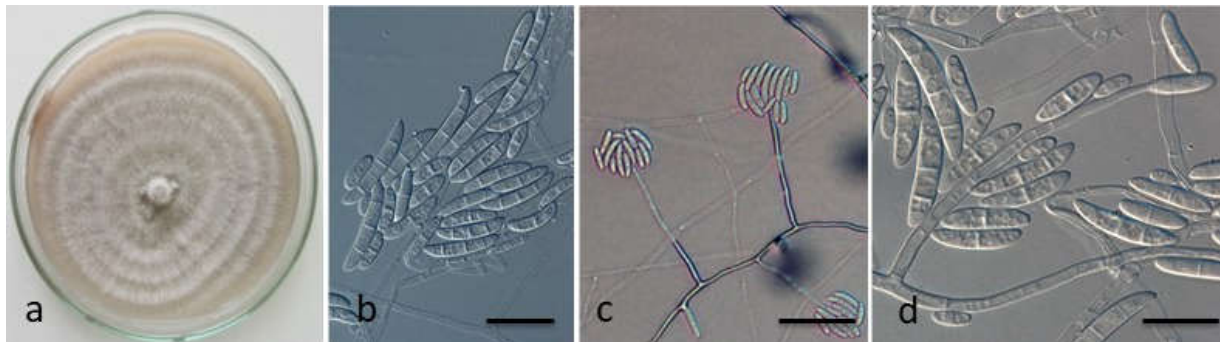
Figure 2. *Fusarium oxysporum*. a. The surface and reverse of colony on PDA after seven days, b. Macroconidia, c. Microconidia (Bar = 10 μ m).

صورت سرهای لزج در منوفالیدهای بلند مشاهده شد (شکل ۳). کلامیدوسپورهای کروی تا تخم مرغی با دیواره صاف یا زبر به فراوانی اغلب به صورت جفتی و گاهی انفرادی یا زنجیری کوتاه در میسلیم ها و در داخل آگار تولید شدند. تعدادی از جدایه های فوزاریوم به دست آمده از ریشه درختان بیمار با استفاده از توصیف توسط Gerlach & Nirenberg (1982)، Nelson et al. (1983) و Leslie & Summerell (2006) و نیز توالی یابی ژن *TEF*، *F. solani* تشخیص داده شدند.

Fusarium solani (Mart.) Sacc. - ۲

در محیط کشت PDA، پرگنه این گونه سفید تا کرم رنگ با میسلیم های هوایی کم و بدون رنگدانه ای و در برخی موارد با رنگدانه بنفش یا قهوه ای مشاهده شد. ماکروکنیدیوم ها نسبتاً کلفت راست تا کمی خمیده، ۳-۷ بندی با سلول پایه پاشنه ای- شکل و سلول انتهایی گرد و به فراوانی در اسپورودوکیوم های کرم رنگ و گاهی آبی یا سبز رنگ مشاهده شدند. میکروکنیدیوم- های تخم مرغی، سوسپسی یا قلوه ای شکل یک یا دو سلولی به

حجره‌ها متغیر بود. حجره‌ها پیچ خورده و با آرایش شعاعی نامنظم و دارای دیواره کاذب مشترک بودند. کنیدیوم‌ها بی‌رنگ و غیرمنشعب و یا گاهی منشعب دیده می‌شدند. ارتفاع این کنیدیوم‌ها زیاد بوده و به اندازه ۳۵-۱۵ میکرومتر مشاهده شد. سلول‌های کنیدیوم‌ها بی‌رنگ، باریک، کشیده و از نوع فیالییدی بودند. کنیدیوم‌ها بی‌رنگ، کوچک، تک‌سلولی و خمیده (آلانتوئید) بودند. اندازه کنیدیوم‌ها (۷-) ۵/۵-۱۱/۷۵ (۴-) $\times$ (۱/۲-) بودند. اندازه کنیدیوم‌ها (۷-) ۱/۱-۰/۱۰۷ (۹-) میکرومتر مشاهده شد. کنیدیوم‌ها پس از خروج از استروما به رنگ نارنجی مشاهده شدند (شکل ۴). مشخصات ریخت‌شناختی این جدایه‌ها با مشخصات ارایه شده توسط Adams et al. (2005) برای این گونه مطابقت داشت.



شکل ۳. *Fusarium solani*. a. پرگنه روی PDA. b. ماکروکنیدیوم‌ها و میکروکنیدیوم‌ها. c. سرهای دروغین روی منوفیالیدهای بلند. d. منوفیالیید بلند. مقیاس = ۱۰ میکرومتر.

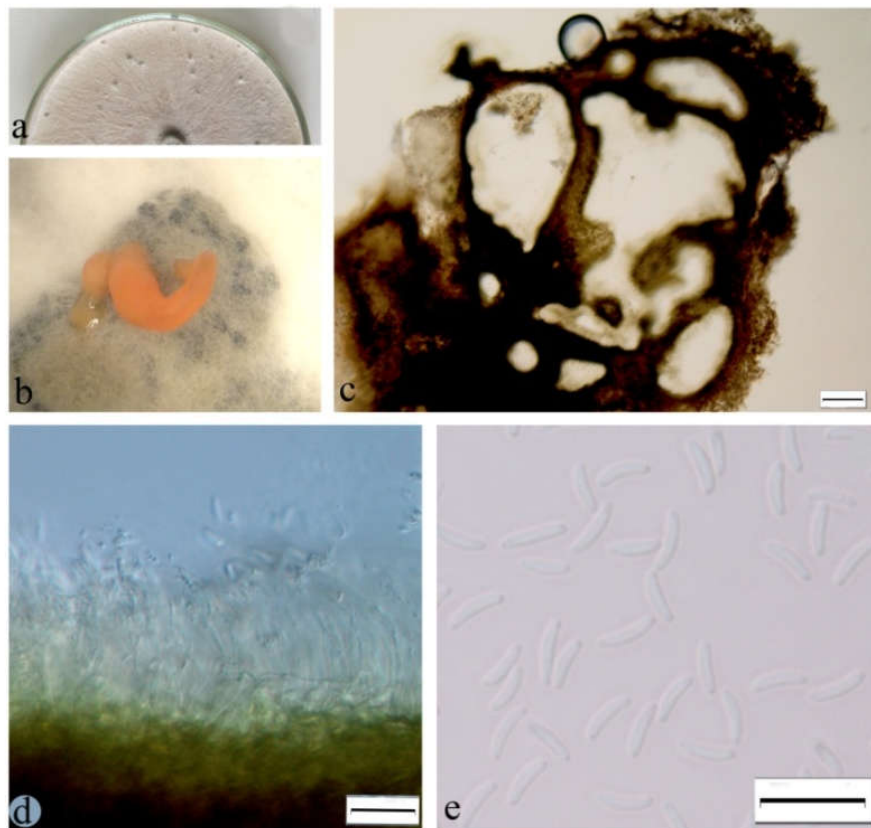
Figure 3. *Fusarium solani*. a. Colony on PDA after seven days, b. Macroconidia and Microconidia, c. Shimy heads on long monophialides, d. Long monophialides (Bar = 10 μ m).

است (Fotouhifar et al. 2007). همچنین گونه *C. chrysosperma* توسط Fotouhifar et al. (2010) از روی *R. pseudoacacia* نیز گزارش شده است. بیماری شانکر سیتوسپورایی در درختان هلو و درختان میوه هسته‌دار دیگر نیز شایع است و از بیماری‌های مهم در اروپا روی هلو و زردآلو بوده و به بیماری سخته مشهور می‌باشد (Pokharel & Larsen 2008). این گونه از هسته‌داران دارای علایم شانکر استان‌های آذربایجان- شرقی و غربی نیز گزارش شده است (Dokhanchi et al. 2013). در این بررسی، گونه *C. chrysosperma* به عنوان یکی از عوامل قارچی همراه با زوال درختان اقاقیای مبتلا به زوال اردبیل جداسازی شد.

گونه *F. solani* انتشار جهانی دارد و به صورت رایج از انواع مختلف خاک بازیافت شده است. این گونه به عنوان بیمارگر بر روی دامنه وسیعی از گیاهان از جمله لوبیا، مرکبات، انواع نخود و فلفل، سیب‌زمینی و کدو ثبت شده است و در شانکر و سرخشکیدگی درختان نیز دخیل است (Nelson et al. 1981).

۳- *Cytospora chrysosperma* (Pers.) Fr. (Fide Don 1964) روی محیط کشت PDA، سطح پرگنه، سفید مایل به زرد بود و بعد از دو هفته، پیکنیدیوم‌ها همراه با ترشحات فتیله‌ای نارنجی-رنگ بر روی آن تشکیل شد. قطر استروما در روی محیط کشت PDA، ۰/۶ الی ۱/۶ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. در برش عرضی و قاعده استروما حجره‌ها قابل تشخیص بودند و تعداد و شکل

گونه‌های این جنس، بیمارگرهای شناخته شده روی تعداد زیادی از گیاهان و میزبان‌های چوبی به‌شمار می‌روند (Fotouhifar et al. 2010). پوسیدگی‌های ایجاد شده توسط گونه‌های سیتوسپورا در بافت‌های سطحی شاخه باعث کاهش مقاومت گیاه در برابر سایر بیمارگرها می‌شود. شانکر سیتوسپورایی باعث ایجاد بیماری روی بیش از ۸۵ گونه مختلف میزبانان چوبی می‌شود (Eriksson et al. 2001). *Valsa sordida* Nitschke (anamorph: *C. chrysosperma*) توسط Minter & Hayova 1998 توصیف شد. این گونه قارچی قبلاً از روی میزبان‌های مختلفی از قبیل *Malus*، *Prunus domestica* L.، *Amygdalus communis* L.، *Olea* Hoffmanns. & Link، *Juglans regia* L.، *pumila* Mill. و از روی دیگر درختان غیر مثمر در ایران گزارش شده



شکل ۴. *Cytospora chrysosperma*. **a.** پرگنه روی PDA، **b.** پیکنیدیوم با توده کنیدیوم های نارنجی رنگ، **c.** برش طولی پیکنیدیوم چندحجره ای با حجره های نامنظم، **d.** کنیدیوفورها، **e.** کنیدیوم ها. مقیاس c = ۱۰۰ میکرومتر، مقیاس d و e = ۱۰ میکرومتر.

Figure 4. *Cytospora chrysosperma*. **a.** Colony on PDA, **b.** Pycnidium with orange conodia mass, **c.** Longitudinal section of multilocular pycnidium with irregular locules, **d.** Chlamydospores, **e.** Conidia (Bar: c= 100 μm, d-e= 10 μm).

می باشد (Wijayawardene *et al.* 2014). قبلا این گونه تحت عنوان *Camarosporium robiniae* (Westend.) Sacc. شناخته می شد که امروزه این گونه تحت عنوان *Ca. elongate* شناخته می شود (Wanasinghe *et al.* 2017). جنس *Camarosporidiella* از خانواده Camarosporidiellaceae، راسته Pleosporales و رده Dothideomycetes می باشد. گونه *Ca. elongata* از نظر مشخصات ریخت شناختی مرحله جنسی خیلی شبیه گونه *Ca. Wanas., Camporesi & K. D. Hyde eufemiana* می باشد، ولی با این حال، گونه *Ca. elongata* با داشتن آسک های بلندتر با پایه بلند از گونه مذکور قابل تمییز است. نتایج توالی یابی ناحیه ITS-rDNA نیز هویت گونه را تایید نمود.

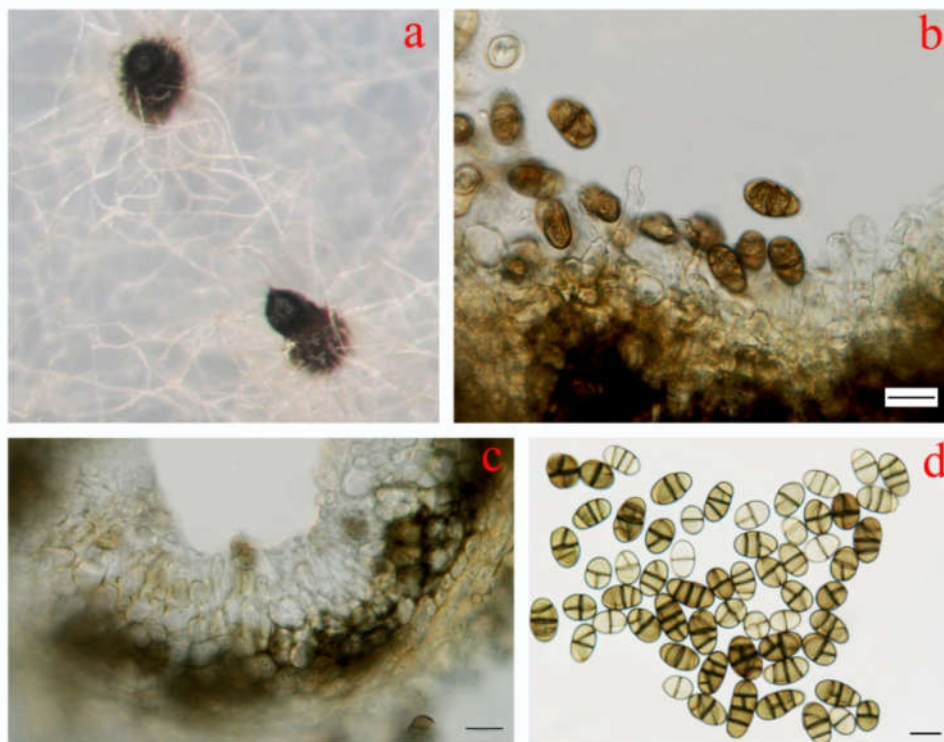
۴- *Camarosporidiella elongata* (Fr.) Wanas., Wijayaw. & K.D. Hyde

پیکنیدیوم های تک حفره ای، کروی، سیاه و صاف و گاهی دارای برآمدگی ریشه ای موم مانند در روی پیکنیدیوم بودند. پیکنیدیوم ها دارای استیول کاملا مشخص، پاپیل مانند و کوچک بودند. قطر پیکنیدیوم ها ۱۵۰-۱۹۰ میکرومتر اندازه گیری شدند، کنیدیوم بر مشاهده نشد و سلول های کنیدیوم را نیز به راحتی قابل مشاهده نبودند و از سلول های داخلی دیواره پیکنیدیوم منشأ گرفته اند، کنیدیوم ها استوانه ای و بیضوی، در دو انتها گرد، طلایی رنگ تا قهوه ای تیره با ۳-۴ دیواره عرضی بودند و دو سلول کنیدیوم با دیواره های طولی اغلب مورب دیده می شدند (شکل ۵). اندازه کنیدیوم ها ۱۳/۱۵-۷۹/۹۳ (-۱۹) × (۱۰-) ۷/۷-۴۵/۹۴ (-۹) میکرومتر مشاهده شد. فرم جنسی این گونه *Cu. elongata*

بحث

تعداد قابل توجهی از درختان افاقیای واقع در فضای سبز شهر اردبیل در چند سال اخیر، دچار بیماری سرخشکیدگی و زوال شده و در نهایت از بین می‌روند. با توجه به شیوع بالای این عارضه در اردبیل و برخی مشاهدات در شهرهای دیگر، در تحقیق حاضر، طی بازدید از مناطق مختلف شهری اردبیل و نمونه‌برداری، عوامل قارچی همراه ریشه‌ها و شاخه‌های آلوده و به‌ویژه قارچ‌های مرتبط با علایم گرفتگی آوندی جداسازی و با روش‌های ریخت-شناختی و مولکولی شناسایی شدند.

جنس *Camarosporium* اولین بار توسط Schulzer با گونه تیپ *C. quaternatum* (Hanzl.) Schulz. گزارش شده و تاکنون بیش از ۵۰۰ گونه در این جنس در پایگاه داده‌ای ایندکس فانگروم (<http://www.indexfungorum.org/>) معرفی شده است. تاکنون چندین گونه از این جنس به عنوان بیمارگرهای مهم گیاهی با پراکنش جهانی گزارش شده‌اند. گونه *C. robiniae* (Ca.) *elongata* در برخی کشورها از جمله یونان، ایتالیا، لهستان، اکراین، کانادا و آمریکا از افاقیا جداسازی و گزارش شده است (Mutenko et al. 2008; Wanasinghe et al. 2017).



شکل ۵. *Camarosporidiella elongata*. a. پیکنیدیوم، b-c. دیواره پیکنیدیوم و سلول‌های کنیدیوم‌زا، d. کنیدیوم‌ها با دیواره‌های عرضی و طولی. مقیاس: ۱۰ میکرومتر.

Figure 5. *Camarosporidiella elongate*. a. Pycnidium, b-c. Pycnidium wall and conidiogenous cells, d. Conidia with lateral and longitudinal walls (Bar= 10 µm).

میزبان‌های مختلف گزارش شده‌اند و نیز جداسازی در دفعات مختلف نمونه‌برداری، گونه *F. oxysporum* که از محل آوند شاخه‌های بیمار و گونه *F. solani* که از ریشه و شاخه‌های بیمار افاقیا جداسازی شدند، به احتمال زیاد به عنوان عوامل قارچی

طی این تحقیق، حدود ۱۰ گونه قارچی متعلق به گروه‌های مختلف قارچی از آوند و ریشه افاقیای در حال زوال و مبتلا به سرخشکیدگی جداسازی شد. با در نظر گرفتن خصوصیات بیماری‌زایی این قارچ‌ها و سابقه بیماری‌زایی آن‌ها که به دفعات از

سرخشکیدگی درختان اقاچیا (*R. pseudoacacia*) شناسایی شده است و در تحقیق حاضر نیز از درختان دچار زوال جداسازی گردید. (Michalopoulos-Skarmoutsos & Skarmoutsos 1999) قارچ *Cu. elongate* (فرم جنسی *C. robiniae*) را از سرشاخه ها و شاخه های اقاچایی مبتلا به سرخشکیدگی و نکروز جداسازی و بیماری زایی آنها را اثبات نموده است. نقش گونه *C. chrysosperma* نیز در ایجاد سرخشکیدگی و تضعیف درختان مختلف مشخص شده است (Adams et al. 2005). به نظر می رسد دو قارچ اخیر در مستعد ساختن درختان اقاچیا برای انسداد آوندی توسط گونه های فوزاریوم نقش دارند ولی جهت اظهار نظر نهایی، باید نقش هر یک از این عوامل به صورت جداگانه و همراه باهم در بیماری زایی روی درختان اقاچیا مورد ارزیابی دقیق قرار گیرد. در ایران در خصوص سرخشکیدگی و زوال اقاچیا مطالعه منسجمی صورت نگرفته و تاکنون گزارش علمی چندانی در منابع معتبر وجود ندارد. مطالعات مرتبط با زوال اقاچیا تنها به گزارش Nazerian et al. (2015) محدود می شود که در آن، گونه قارچی *Neofusicoccum mangiferae* (Syd. and P. Syd.) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips از اقاچایی سیاه مبتلا به پژمردگی و مرگ در شهرستان محلات با روش ریخت شناختی و توالی یابی ناحیه ژنی ITS شناسایی و گزارش شده است. همچنین طی گزارشی کوتاه، (Babaeizad & Fazli 2014) قارچ *Phomopsis* sp. را از شاخه های آلوده به پژمردگی و مرگ ناگهانی اقاچیا در شمال کشور جداسازی کردند. با شناسایی عوامل قارچی همراه با خشکیدگی و زوال اقاچیا، اجرای تحقیقات تکمیلی و اعمال راهکارهای مناسب برای مدیریت بیماری در آینده امکان پذیر خواهد شد.

در این تحقیق، گزارش قارچ *Camarosporidiella elongata* و *S. macrospora* از ایران جدید است. همچنین گونه های قارچی *E. A. alternata*, *Ca. elongata*, *F. solani*, *F. oxysporum* و *nigrum* برای اولین بار از روی اقاچیا در ایران گزارش می شوند. ضمناً *Acremonium* sp. و *S. macrospora* برای اولین بار از روی *R. pseudoacacia* در دنیا گزارش می شود.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله مراتب قدردانی خود را از سازمان پارک ها و فضای سبز شهرداری اردبیل به خاطر تامین بودجه لازم و همکاری در انجام این پژوهش ابراز می نمایند.

دخیل در ایجاد این عارضه باشند. قارچ *F. oxysporum* معمولاً با گرم شدن هوا در آوندها فعالیت خود را بهتر نشان می دهد و مشاهده علائم و شروع سرخشکیدگی اقاچیا در اردبیل نیز با گرم شدن هوا و حدود خردادماه شروع می شود ولی جهت اثبات بیماری زایی هر یک از جدایه ها باید آزمون های بیماری زایی روی نهال انجام پذیرد. (Anderson et al. 2002) طی مطالعه ویژگی های اکولوژیکی و پاتولوژیکی عارضه سرخشکیدگی درخت آکاسیا با نام علمی *A. koa* ضمن جداسازی قارچ *F. oxysporum* f. sp. *koae* از ریشه و شاخه درختان آکاسیای مبتلا به سرخشکیدگی در هاوایی و اثبات نقش مهم این قارچ در این بیماری، اظهار داشتند که فعالیت بیمارگر تحت تاثیر نوسانات دمایی، میزان رطوبت، نوع خاک و تعامل با سایر موجودات زنده خاک است. به عنوان مثال، آنها دریافتند که خاک درختان بیمار در مقایسه با خاک درختان سالم، ظرفیت آبی و اسیدیته بالاتری دارد. (Halász 2002) در مجارستان از گونه درختی *R. pseudoacacia* دارای علائم پژمردگی و شانکر پوست، گونه های مختلفی از *Fusarium* شامل *F. lateritium*, *F. avenaceum* (Fr.) Sacc. و *F. sulphureum* و *F. solani semitectum* Berk. & Rav. را جداسازی کردند و نشان دادند که گونه های *F. solani* و *F. avenaceum* بدون وجود اثرات یخبندان هم قادر به ایجاد شانکر روی ساقه و شاخه های کوچک می باشند. شانکر فوزاریومی در اقاچایی سیاه در کشورهای دیگر نیز سابقه زیادی دارد. به عنوان مثال، دو گونه *F. oxysporum* و *F. solani* عامل ایجاد شانکر اقاچایی سیاه در چین معرفی شده است (Hong & Ji 1996). در ژاپن، گونه *F. solani* f. sp. *robiniae* عامل بلایت شاخه *R. pseudoacacia* شناخته شده است (Matuo & Sakurai 1965). (James et al. 2007) با بررسی تنوع ژنتیکی و میزان بیماری زایی جدایه های مختلف دو گونه *F. oxysporum* و *F. solani* جداسازی شده از ریشه، ساقه و شاخه های آکاسیا (*A. koa*) مبتلا به پژمردگی و سرخشکیدگی در هاوایی دریافتند که *F. oxysporum* به احتمال قوی نقش مهمی را در این بیماری ایفا می کند. در یک بررسی برای تعیین عامل سرخشکیدگی آکاسیا در منطقه مائونالوآی پارک ملی هاوایی آمریکا، قارچ *F. oxysporum* f. sp. *koae* را از شاخه های درختان دارای علائم جداسازی کردند (Anderson & Gardner 1998). گونه *Ca. robiniae* نیز در برخی کشورها به عنوان عامل

References

- Abbasi Kh, Abbasi S, Fotouhifar KB, 2012. Identification of *Cytospora* species from walnut trees in Iran. *Plant Protection* 35 (3): 59–68 (in Persian with English abstract).
- Adams GC, Wingfield MJ, Common R, Roux J, 2005. Phylogenetic relationships and morphology of *Cytospora* species and related teleomorphs (Ascomycota, diaportheales, Valsaceae) from Eucalyptus. *Studies in Mycology* 52: 1–142.
- Ahmadi N, Arzanlou M, 2019. Identification of fungal species associated with dieback and canker disease of Elm trees in Tabriz metropolis. *Journal of Applied Research in Plant Protection* 8 (3): 25–51 (in Persian with English abstract).
- Anderson RC, Gardner DE, 1998. Investigations of koa (*Acacia koa*) decline in Hawaiian forests. In: Secretariat for Conservation Biology (Ed.), *Proceedings of the Hawaii Conservation Conference*, Honolulu, HI, July 30–31. P. 15.
- Anderson, RC, Gardner DE, Daehler CC, Meinzer FC, 2002. Dieback of *Acacia koa* in Hawaii: Ecological and pathological characteristics of affected stands. *Forest Ecology and Management* 162: 273–286.
- Babaeizad V, Fazli A, 2014. The occurrence of wilting and decline of acacia trees caused by *Phomopsis* sp. in north of Iran. *21th Iranian Plant Protection Congress*, 23-26 August, Urmia University, Urmia, Iran. P. 207.
- Baradaran Bagheri M, Arzanlou M, Babai-Ahari A, 2015. Identification of the fungal agents associated with Almond trunk diseases in East Azerbaijan Province. *Applied Research in Plant Protection* 4 (1): 13–27 (in Persian with English abstract).
- Barnett HL and Hunter BB, 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi, 4th Edition. APS Press, St. Paul Minnesota, USA. 234 pp.
- Boerema GH, De Gruyter J, Noordeloos ME, Hamers MEC, 2004. *Phoma* Identification Manual. Differentiation of Specific and Intraspecific Taxa in Culture. CABI Publishing, United Kingdom. 478 pp.
- Chung WH, Ishii H, Nishimura K, Ohshima M, Iwama T, *et al.*, 2008. Genetic analysis and PCR-based identification of major *Fusarium* species causing head blight on wheat in Japan. *Journal of General Plant Pathology* 74: 364–374
- Davari M, Wei SH, Babai-Ahari A, Arzanlou M, Waalwijk C, *et al.*, 2013. Geographic differences in trichothecene chemotypes of *Fusarium graminearum* in the Northwest and North of Iran. *World Mycotoxin Journal* 6: 137–150.
- Dokhanchi H, Arzanlou M, Babai-Ahari A, 2013. Identification of the fungal species associated with trunk diseases of stone fruit trees in East and West Azerbaijan provinces. *Journal of Applied Research in Plant Protection* 2 (2): 29–45 (in Persian with English abstract).
- Eriksson OE, Baral HO, Currah RS, Hansen K, Kurtzman CP, *et al.*, 2001. Outline of Ascomycota- Mycoent 7: 1–88.
- Fotouhifar KB, Hedjaroude GA, Ershad D, Moussavi SM, Okhovvat SM, *et al.*, 2007. New information on the form-genus *Cytospora* in Iran I. *Rostaniha* 8: 129–149.
- Fotouhifar KB, Hejaroude GA, Leuchtmann A, 2010. ITS rDNA phylogeny of Iranian strains of *Cytospora* and associated teleomorphs. *Mycologia* 102: 1369–1382.
- Gerlach W, Nirenberg H, 1982. The genus *Fusarium* a pictorial Atlas. Mitt Biol Bundesanst Land-Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem. 406 Pp.
- Halász G, 2002. Canker and Wilt of Black Locust (*Robinia Pseudoacacia* L.) caused by *Fusarium* species. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 49: 249–260.
- Hayova VP, Minter DW, 1998. *Valsa sordida*. IMI descriptions of fungi and bacteria. Set 137, No. 1370.
- Hong R, Ji Y, 1996. Studies on pathogenic fungus of canker of black locust. *Forest Research* 616–619.
- Index Fungorum (2019) Index Fungorum. <http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp>. [accessed on 15 October 2019].
- Jamali S, Banihashemi Z, 2012. The pathological study of plane trees decline in Shiraz city. *Iranian Journal of Plant Pathology* 48 (1): 123–128 (in Persian with English abstract).

- James RL, 2004. *Fusarium* colonization of seeds, seedpods, and diseased seedlings of *Acacia koa* from Hawaii. *Nursery Disease Notes* No. 159.
- James RL, 2005. Pathogenic comparison of *Fusarium* isolates from diseased Hawaiian *Acacia koa*. *Nursery Disease Notes* No. 164.
- James RL, Dudley NS, Yeh A. 2007. Colonization of diseased *Acacia koa* trees with *Fusarium* species. *Forest Health Protection*. 07–06.
- Leslie JF, Summerell BA, 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Professional, Ames, Iowa, USA. 388 pp.
- Matuo T, Sakurai Y, 1965. *Fusarium solani* f. sp. *robiniae* one of the casual Fusaria of the twig blight of *Robinia pseudoacacia*. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 30: 31–36.
- Michalopoulos-Skarmoutsos H, Skarmoutsos G, 1999. Pathogenicity of fungi affecting Black Locust (*Robinia pseudoacacia*) in Greece. *Phytoparasitica* 27(3): 239–240.
- Moller EM, Bahnweg G, Geiger HH, 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nuclear Acid Research* 20: 6115–6116.
- Mułenko W, Majewski T, Ruskiewicz-Michalska M, 2008. A Preliminary Checklist of Micromycetes in Poland. W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences. 752 pp.
- Nazerian E, Naji HR, Abdul-Hamid H, Moradi M, (2015). Phenotypic and Molecular Characterization of *Neofusicoccum mangiferae*, the Causal Agent of Black Locust Decline. *Journal of Plant Pathology & Microbiology* 6: 250. doi:10.4172/2157-7471.1000250
- Nelson PE, Toussoun TA, Cook J. eds. 1981. *Fusarium: Diseases Biology and Taxonomy*. Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania.
- Nelson PE, Toussoun TA, Marasas WFO, 1983. *Fusarium* species: an illustrated Manual for Identification. The Pennsylvania State University Press. University Park. 193 pp.
- Pokharel RR, Larsen HJ, 2008. Incidence, severity and management of *Cytospora* canker in stone fruits. *Phytopathology* 98: S126.
- Roux J, Wingfield MJ, 2013. *Ceratocystis* species on the African continent, with particular reference to *C. albifundus*, an African species in the *C. fimbriata sensu lato* species complex. In: The Ophiostomatoid Fungi: Expanding Frontiers. Seifert KA, de Beer ZW, Wingfield MJ (eds). CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands. Pp. 131-140.
- Seifert K, 1996. FusKey. *Fusarium* interactive key. Agriculture and Agri-Food Canada. 65 pp.
- Simmons EG, 2007. *Alternaria: An Identification Manual*. CBS Fungal Biodiversity Center, Utrecht, The Netherlands 775 pp.
- Tarigan M, Roux J, Van Wyk M, Tjahjono B, Wingfield MJ, 2011. A new wilt and die-back disease of *Acacia mangium* associated with *Ceratocystis manginecans* and *C. acaciivora* sp. nov. in Indonesia. *South African Journal of Botany* 77: 292–304.
- White TJ, Bruns T, Taylor J, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White JW (eds). *A Guide to Molecular Methods and Applications*. Academic Press, New York. Pp. 315–322.
- Wijayawardene NN, Bhat DJ, Hyde KD, Camporesi E, Chethana KWT, et al., 2014. *Camarosporium* sensu stricto in Pleosporinae, Pleosporales with two new species. *Phytotaxa* 183 (1): 16–26.
- Wanasinghe DN, Hyde KD, Jeewon R, Crous PW, Wijayawardene NN, et al., 2017. Phylogenetic revision of *Camarosporium* (Pleosporineae, Dothideomycetes) and allied genera. *Studies in Mycology* 87: 207–256.