Archive of SID

شانکر شاخه درختان فندق در اثر قارچ *Botryosphaeria dothidea* در ایران

حمید محمدی[1*] و منیژه جباری فیروزجاه[2]

۱- *نویسنده مسوول: دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران (hmohammadi@uk.ac.ir)

۲- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۵/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۸/۱۲

چکیده

Botryosphaeriaceae خانواده‌ای از قارچ‌ها است که دارای پراکندگی و دامنه میزبانی وسیعی می‌باشد. در بهار و تابستان سال ۱۳۹۵ مطالعه‌ای بر روی بیماری‌های شاخه و تنه درختان فندق در بابل (استان مازندران) انجام گردید که در آن نشانه‌های مشخصی مربوط به قارچ‌های خانواده Botryosphaeriaceae مانند شانکر و تغییر رنگ سکتور مانند بر روی برخی از درختان مشاهده گردید. بنابراین مطالعه حاضر با هدف شناسایی و تعیین بیماری‌زایی جدایه‌های Botryosphaeriaceae همراه با این علایم انجام شد. نمونه برداری از شاخه درختان بیمار انجام شد و جداسازی عوامل قارچی از بافت تغییر رنگ یافته چوب بر روی محیط PDA صورت گرفت. شناسایی جدایه‌ها بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و تجزیه و تحلیل ترادف‌های مربوط به ژن *tef-1α* انجام گردید. آزمون بیماری‌زایی برای جدایه‌های منتخب بر روی شاخه‌های بریده شده فندق صورت گرفت. در این مطالعه، ۳۱ جدایه با ویژگی‌های شبیه به Botryosphaeriaceae (رشد سریع و پرگنه‌های خاکستری تا تیره) از درختان فندق جداسازی گردید که بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و تجزیه و تحلیل تبارشناسی مبتنی بر ژن *tef1a* به عنوان *Botryosphaeria dothidea* تشخیص داده شدند. جدایه‌های انتخاب شده برای آزمون بیماری‌زایی بعد از گذشت ٤٥ روز باعث ایجاد تغییر رنگ بافت چوب بر روی شاخه‌های مایه‌زنی شده گردیدند. اگرچه برخی از گونه‌های Botryosphaeriaceae قبلا از درختان فندق با نشانه‌های زوال در دنیا گزارش شده‌اند، با این وجود این تحقیق اولین گزارش از وجود و بیماری‌زایی گونه *B. dothidea* بر روی درختان فندق در دنیا می باشد.

کلیدواژه‌ها: Botryosphaeriaceae، بیمارگرهای شاخه و تنه، استان مازندران، ایران، tef-1α

مقدمه

فندق با نام علمی *Corylus avellana* L. درختی از خانواده Betulaceae است که به عنوان یکی از خشکبارهای مهم دنیا شناخته می‌شود. فندق بعد از محصولاتی همچون بادام هندی، گردو، بادام، شاه بلوط و پسته بیشترین میزان تولید را به خود اختصاص داده است (FAO, 2014). بر اساس آمار ارائه شده توسط فائو ایران از نظر میزان تولید فندق در دنیا بعد از کشورهایی همچون ترکیه، ایتالیا، آمریکا، آذربایجان، گرجستان و چین قرار دارد. این درخت نیز مانند بسیاری از درختان میوه دیگر می‌تواند تحت تاثیر آفات و بیماری‌های مختلفی قرار گیرد. با رجوع به منابع مختلف داخلی و خارجی مشخص می‌گردد که در چند سال اخیر اهمیت ویژه‌ای به بیماری‌ها و بیمارگرهای شاخه و تنه درختان مختلف از درختان میوه گرفته تا درختان زینتی و جنگلی معطوف شده است. در طول این چند سال

www.SID.ir

Archive of SID

قارچ‌های مختلفی به عنوان بیمارگرهای شاخه و تنه درختان در دنیا شناسایی و معرفی شده‌اند که می‌توان به اعضای خانواده Botryosphaeriaceae (شاخه Asomycota و راسته Botryosphaerilaes) به عنوان یکی از خانواده‌های مهم در این زمینه اشاره نمود. اصولا شانکرهای[1] ایجاد شده توسط گونه‌های مختلف این خانواده به عنوان یکی از عوامل محدود کننده مهم کاهش محصولات درختان خشکباری از جمله پسته، بادام و گردو در دنیا شناخته می‌شوند (Moral et al., 2019). به طور کلی این بیمارگرها باعث آلودگی بافت چوب و با فراوانی کمتری نیز باعث آلودگی برگ‌ها، میوه‌ها و گل‌های درختان می‌شوند (Michailides and Morgan, 1992; Trapero et al., 2011; Phillips et al., 2013; Slippers et al., 2013). اعضای خانواده Botryosphaeriaceae با ایجاد بیماری‌های مهمی همچون سرخشکیدگی و شانکر شاخه و تنه در درختان به عنوان بیمارگرهای مهاجم درختان در دنیا شناخته می‌شوند (Slippers and Wingfield, 2007). امروزه درختان مختلفی از جمله درختان میوه هسته‌دار و دانه‌دار (Slippers et al., 2007; Phillips et al., 2013)، درختان خشکباری مهمی مانند پسته (Michailides, 1991)، گردو (Rumbos, 1987)، بادام (Michailides et al., 2018)، درختان زینتی (Zlatković et al., 2018) و همچنین درختان بومی (Pérez et al., 2008) و جنگلی (Lawrence et al., 2017) به عنوان میزبان این نوع بیمارگرها در دنیا شناخته می‌شوند. در راستای پیشرفت مطالعات در دنیا، در ایران نیز تحقیقاتی در خصوص نقش اعضای این خانواده در ایجاد بیماری‌های شاخه و تنه درختان مختلف شامل درختان میوه مانند انگور (Mohammadi et al., 2013)، درختان میوه دانه‌دار (Mohammadi and Sharifi, 2016) و هسته‌دار (Soltaninejad et al., 2017)، پسته (Mohammadi et al., 2015)، درختان زینتی در فضای سبز شهرهای مختلف (Hashemi and Mohammadi, 2016; Hashemi et al., 2017) و درختان جنگلی به ویژه در شمال کشور (Kazemzadeh Chakusary et al., 2017) انجام شده است که طی آن گونه‌های مختلفی نیز جداسازی و به روش‌های ریخت‌شناسی و مولکولی شناسایی و گزارش شده‌اند. به عنوان مثال دو گونه *Botryosphaeria dothidea* و *Neofusicoccum parvum* در سال ۲۰۱۴ از شاخه و تنه درختان سرو شیراز در استان کرمان جداسازی و شناسایی شدند (Mohammadi et al., 2014). با مطالعه‌ای که در همین سال بر روی درختان خرما در استان کرمان انجام شد نیز گونه *B. dothidea* به همراه *Diplodia mutila* از درختان بیمار جداسازی و بیماری‌زایی آنها نیز مورد بررسی قرار گرفت (Mohammadi, 2014). با تحقیقی که بر روی بیماری‌های شاخه و تنه درختان میوه هسته‌دار در ایران انجام شده است نیز گونه‌های مختلفی از این خانواده شامل *Diplodia seriata*، *D. mutila*، *N. parvum*، *B. dothidea*، *Dothiorella viticola* و *Lasiodiplodia theobromae* از درختان بیمار جداسازی و گزارش شده‌اند (Soltaninejad et al., 2017). در این راستا گونه‌های *D. seriata*، *L. theobromae*، *Neoscytalidium hyalinum*، *Dothiorella sarmentorum* و *Do. viticola* نیز به عنوان قارچ‌های بیمارگر شاخه و تنه درختان نارون، صنوبر و بید در فضای سبز دو شهر کرمان و شیراز جداسازی و شناسایی شده‌اند (Hashemi and Mohammadi, 2016; Hashemi et al., 2017). بررسی چنین منابع علمی موجود بیانگر اهمیت این گروه از قارچ‌ها به عنوان بیمارگرهای شناخته شده شاخه و تنه درختان در ایران و دنیا می‌باشد.

1-Cankers

www.SID.ir

Archive of SID

فندق به عنوان یکی از مهمترین محصولات خشکباری در جهان شناخته می‌شود ولی تاکنون مطالعه چندانی در خصوص بیماری‌های شاخه و تنه این درخت در دنیا انجام نشده است. طی مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۳ در کشور شیلی انجام شد یک گونه از Botryosphaeriaceae به نام *Diplodia coryli* از شاخه درختان فندق با نشانه‌های شانکر جداسازی گردید (Guerrero and Pérez, 2013). در بررسی‌هایی که در سال ۲۰۱۶ بر روی بیماری‌های شاخه و تنه این درخت در کشور ایتالیا انجام شد، برخی از اعضای خانواده Diatrypaceae، Gnomoniaceae و همچنین گونه‌های خانواده شناخته شده‌ای مانند Botryosphaeriaceae شامل گونه‌های *Diplodia sapinea*، *D. seriata*، *Dothiorella iberiaca*، *Do. symphoricarposicola*، *Do. parva* و *Do. omnivore* از شاخه درختان بیمار جداسازی و شناسایی گردیدند که دو گونه آخر گونه‌های جدیدی بودند که برای این خانواده معرفی شدند (Linaldeddu et al., 2016). در ایران نیز گونه *Do. Parva* تنها از روی شاخه‌های این درخت جداسازی و گزارش شده است (Abdollahzadeh et al., 2014) که در این زمینه هیچ اطلاعی از بیماری‌زایی و اهمیت آن به عنوان بیمارگر بر روی درخت فندق و بافت چوب آن در دست نمی‌باشد. در طول بازدیدهایی که از برخی مناطق کشت فندق در بابل (استان مازندران) انجام شد نشانه‌هایی از بیماری به صورت شانکرهای متعدد شاخه بر روی برخی از درختان مشاهده گردید. بنابراین این مطالعه با هدف جداسازی، شناسایی ریخت‌شناسی و مولکولی و همچنین بیماری‌زایی قارچ‌های همراه با نشانه‌های گفته شده بر روی درختان فندق در این منطقه از کشور انجام گردید.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و جداسازی قارچ‌ها از شاخه درختان

در طول بازدیدهایی که در بهار و تابستان سال ۱۳۹۵ از درختان فندق در منطقه بند پی شرقی از توابع شهرستان بابل (استان مازندران) به عمل آمد نشانه‌هایی از بیماری به صورت شانکرهای شاخه بر روی برخی از درختان دیده شد. در برش عرضی از شاخه‌های بیمار نیز تغییر رنگ بافت چوب به شکل سکتور (وی شکل[1]) مانند که یکی از نشانه‌های مرتبط به قارچ‌های خانواده شناخته شده Botryosphaeriaceae است دیده شد. به طور معمول از هر درخت دو تا چهار شاخه با نشانه‌های گفته شده نمونه‌برداری گردید. نمونه‌ها پس از ثبت مشخصات مورد نیاز، جهت جداسازی عوامل قارچی به آزمایشگاه منتقل شدند. در آزمایشگاه با تهیه برش‌های عرضی و طولی از شاخه‌های نمونه برداری شده نوع نشانه‌های داخلی مورد ارزیابی قرار گرفت. عمل جداسازی قارچ‌ها نیز از حد فاصل ناحیه تغییر رنگ یافته و سالم بافت چوب انجام شد. برای این کار قطعاتی به اندازه سه تا پنج میلی متر از بافت چوب تهیه و بعد از ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم نیم درصد و دو مرتبه شستشو با آب سترون بر روی دستمال کاغذی در زیر هود خشک شدند. قطعات ضدعفونی شده بر روی محیط کشت عصاره سیب‌زمینی-دکستروز-آگار (PDA[2]) کشت و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. پرگنه‌های قارچی بدست آمده، خالص سازی و جهت انجام مراحل بعدی مطالعه در یخچال نگهداری گردیدند.

شناسایی جدایه‌ها بر اساس شاخص‌های ریخت‌شناسی

در طول این مطالعه جدایه‌هایی از درختان بیمار بدست آمدند که از سرعت رشد نسبتا بالایی برخوردار بودند و تنها به صورت ریسه‌ای (بدون تولید اسپور) رشد

1 -Wedge-shaped wood necrosis
2 -Potato-Dextrose Agar (PDA)

www.SID.ir

Archive of SID

می‌کردند که بر اساس ویژگی‌های محیط کشت و بررسی اسلایدهای میکروسکوپی و اطلاعات موجود به عنوان جدایه‌های Botryosphaeriaceae در نظر گرفته شدند. جهت تولید ساختار باردهی (پیکنیدیوم[1])، اسپورزایی و بررسی ویژگی‌های ریخت‌شناسی از جمله شکل، رنگ، تعداد سلول، اندازه طول و عرض سلول‌ها، جدایه‌های تحت بررسی به محیط کشت آب-آگار دو درصد[2] دارای برگ‌های سترون شده کاج منتقل و در زیر هود و شرایط نوری مداوم نگهداری شدند. بعد از گذشت ۱۵ تا ۲۵ روز، از پیکنیدیوم‌های تولید شده اسلایدهای میکروسکوپی تهیه و ویژگی‌های گفته شده مورد ارزیابی قرار گرفتند.

شناسایی مولکولی جدایه‌ها

استخراج DNA، PCR و تعیین ترادف جدایه‌ها

در این مطالعه ۱۶ جدایه به عنوان نماینده جدایه‌های بدست آمده در این تحقیق انتخاب و از نظر مولکولی به روش PCR مورد بررسی قرار گرفتند. جدایه‌های انتخاب شده بر روی محیط کشت PDA کشت و به مدت ۱۰ روز در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. عمل استخراج DNA از توده میسلیومی و با استفاده از کیت استخراج Peq Gold Fungal DNA mini Kit (شرکت رش[3]) طبق دستور شرکت سازنده انجام شد. شناسایی جدایه‌ها به روش PCR و تکثیر بخشی از ژن فاکتور تداوم ترجمه (*tef-1α*[4]) با استفاده از دو آغازگر EF1-728F و EF1-986R (Carbone and Kohn, 1999) انجام شد. ترکیب واکنش زنجیره-ای پلی مراز، در یک حجم ۲۵ میکرولیتری و بر اساس منابع موجود (Hashemi et al., 2016) انجام شد. محصول حاصل از PCR بر روی ژل آگاروز یک درصد (UltraPure™ Agarose, Invitrogen, USA) مشاهده و مورد ارزیابی قرار گرفت. یک نشانگر ۱۰۰ جفت بازی (Gene RulerTM DNA Ladder Mix, Fermentas, Lithuania) به عنوان نشانگر وزن مولکولی جهت ارزیابی اندازه قطعات تکثیر شده مورد استفاده قرار گرفت. محصول واکنش PCR جهت خالص‌سازی و تعیین ترادف به کشور کره جنوبی (Daejeon, South Korea) ارسال شد.

تجزیه و تحلیل تبارشناسی جدایه‌ها

توالی‌های بدست آمده از جدایه‌های تعیین ترادف شده ابتدا با برنامه BioEdit ارزیابی و ویرایش شدند. ترادف‌های نهایی با ترادف‌های مشابه موجود در بانک ژن از طریق شبکه NCBI (nlm. nih. http://ncbi gov/Blast) و جستجوی بلاست مقایسه و میزان تشابه جدایه‌ها با گونه‌های ثبت شده در بانک ژن مورد ارزیابی قرار گرفتند. در مرحله بعد ترادف‌های جدایه‌های بدست آمده با ترادف‌های انتخاب شده تعدادی از گونه‌های جنس *Botryosphaeria* برگرفته از بانک ژن با برنامه Clustal W همردیف سازی گردید. تجزیه‌وتحلیل و ترسیم درخت تبارشناسی جدایه‌های مورد نظر با استفاده از نرم افزار MEGA6 (Tamura et al. 2013) و با استفاده از الگوریتم Maximum Likelihood انجام گردید. این کار بر اساس ۳۰۰ جفت باز توالی‌یابی شده برای بخشی از ژن *tef-1α* صورت گرفت. برای تجزیه و تحلیل تبارشناسی جدایه‌ها، سویه تیپ *Diplodia seriata* (Phillips et al., 2005; CBS 112555) به عنوان آرایه خارج از گروه (Outgroup) انتخاب و در درخت تبارشناسی مورد استفاده قرار گرفت.

آزمون بیماری‌زایی

آزمون بیماری‌زایی با ۱۰ جدایه‌ی بدست‌آمده بر روی شاخه درختان فندق انجام شد. برای این کار ابتدا جدایه‌های مورد نظر به محیط کشت PDA منتقل و به مدت ۱۰ در روز در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. عمل مایه‌زنی بر روی شاخه‌های بریده شده از درختان سالم در اندازه‌های ۳۰ تا ۳۵ سانتی‌متر (به قطر ۲-۱/۵ سانتی‌متر)

1 -Pycnidium
2 -Water Agar (WA)
3 - Roche
4 - Translation elongation factor 1α (T*ef-1α*)

www.SID.ir

Archive of SID

انجام گردید. قبل از انجام کار، محل مایه‌زنی با الکل اتیلیک ۹۶ درصد ضدعفونی و سپس در میانگره بالایی هر شاخه یک زخم به کمک یک کرک بورر سترون (به قطر پنج میلی متر) ایجاد شد. سپس یک قرص میسلیومی پنج میلی متری از هر جدایه در محل زخم شده قرار داده شد به گونه‌ای که توده میسلیومی بر روی زخم قرار گرفت. در مرحله بعد یک پنبه مرطوب بر روی قرص میسلیومی قرار گرفت و ناحیه مایه‌زنی شده با یک نوار پارافیلم به طور کامل پوشش داده شد. برای تیمار شاهد به جای قرص میسلیومی از قرص‌های پنج میلی متری محیط کشت PDA بدون قارچ استفاده گردید. این آزمون با پنج تکرار برای هر تیمار انجام و بعد از ۴۵ روز نیز محل مایه‌زنی شده باز و میزان پیشرفت تغییر رنگ بافت چوب در بالا و پایین محل مایه‌زنی شده اندازه گیری گردید. مقایسه میانگین طول لکه‌ها نیز با نرم افزار SAS در سطح ۵ درصد انجام شد. جهت تکمیل آزمون کخ عمل جداسازی مجدد جدایه‌های مایه‌زنی شده از نواحی حاشیه‌ای لکه‌های ایجاد شده بر روی محیط کشت PDA جداسازی و بعد از شناسایی، درصد جداسازی نیز ارزیابی گردید.

نتایج

نشانه‌های بیماری

در طول این بررسی وجود شانکرهای متعدد شاخه به عنوان یکی نشانه‌های اصلی بیماری‌های شاخه و تنه در درختان فندق ارزیابی و ثبت گردید. در برش عرضی از نمونه‌های جمع‌آوری شده نیز تغییر رنگ بافت چوب به صورت سکتور مشاهده گردید که بیانگر شروع و پیشرفت این نوع نشانه‌ها از محل ایجاد شانکر بود (شکل ۱).

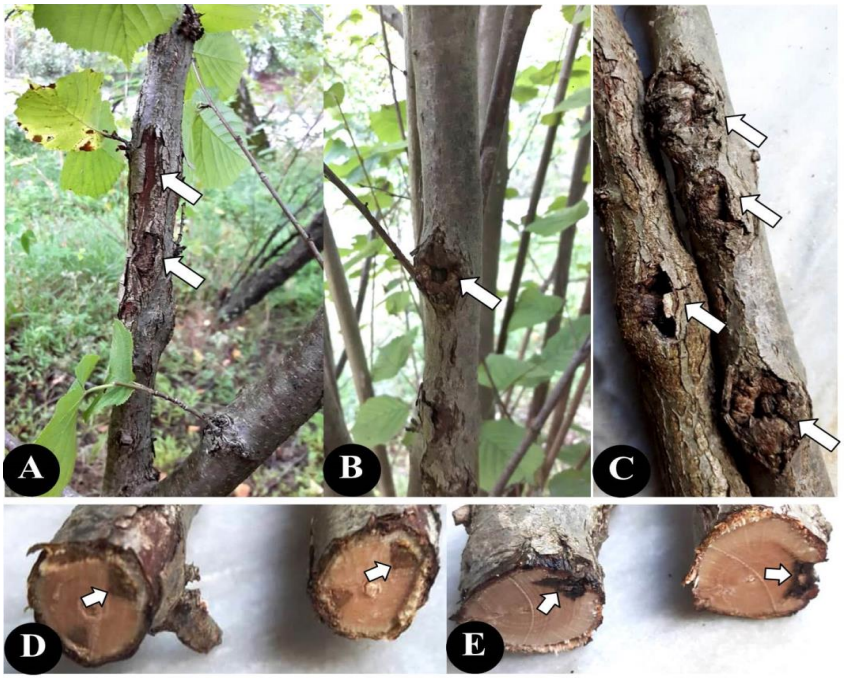
اصولا نشانه‌های خارجی و داخلی همراه با بیماری‌های شاخه و تنه درختان از تنوع زیادی برخوردار هستند و در این بین شانکرهای شاخه و تنه با تغییر رنگ بافت چوب به صورت سکتور مانند به عنوان یکی از شاخص‌ترین نشانه‌های بیماری‌های شاخه و تنه درختان در دنیا (Cloete et al., 2011; Van Niekerk et al., 2011) مشاهده و گزارش شده است. در ایران نیز چنین نشانه‌هایی بر روی درختان مختلف از انگور (Mohammadi et al., 2013) گرفته تا درختان میوه هسته‌دار (Soltaninejad et al., 2017)، دانه‌دار (Sami et al., 2014) و همچنین درختان زینتی (Hashemi and Mohammadi, 2016; Hashemi et al., 2017) و جنگلی (Kazemzadeh Chakusary et al., 2017, 2019) گزارش شده است.

جداسازی و شناسایی ریخت‌شناسی جدایه‌ها

در این تحقیق ۳۱ جدایه قارچی از بافت چوب درختان بیمار جداسازی گردید. جدایه‌های بدست آمده از سرعت رشد نسبتا بالایی برخوردار بودند و پرگنه آنها بر روی محیط کشت PDA در ابتدا سفید و بعد از گذشت سه تا چهار روز تغییر رنگی از سفید به خاکستری و تیره از وسط پرگنه‌ها شروع و به سمت حاشیه‌ها دیده شد. این تغییر رنگ به گونه‌ای بود که بعد از حدود هفت تا هشت روز کل پرگنه‌ها به صورت تیره رنگ دیده شدند. تهیه اسلاید و بررسی‌های میکروسکوپی نشان داد که جدایه‌های بدست آمده تنها به صورت ریسه‌ای بوده و اسپوری بر روی پرگنه‌ها مشاهده نگردید. بر اساس ویژگی‌های گفته شده همه جدایه‌های گفته شده به عنوان اعضای خانواده Botryosphaeiaceae در نظر گرفته شدند. این جدایه‌ها بعد از گذشت ۲۰ تا ۲۵ روز بر روی برگ‌های سترون شده کاج بر روی محیط کشت آب-آگار تولید پیکنیدیوم کردند. بر اساس بررسی‌های میکروسکوپی اسپورهای این جدایه‌ها روشن، یک سلولی، باریک و دوکی شکل تا دوکی نامنظم بودند. میانگین طول و عرض کنیدیم‌ها در جدایه‌های بدست آمده در این مطالعه ۰/۸ ± ۴/۹ × ۱/۹ ± ۲۳/۱ میکرومتر و نسبت طول به عرض آنها نیز ۴/۷ ارزیابی گردید. در برخی از

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱. علائم بیماری‌های شانکر شاخه و تنه بر روی درختان فندق در ایران. A تا C: علامت شانکر بر روی شاخه‌ها، D و E: برش عرضی از شانکرها با نشانه‌هایی از تغییر رنگ بافت چوب به شکل سکتورمانند.

Figure 1. Trunk canker symptoms detected on hazelnut trees in Iran. A-C: canker symptoms on the branches, D and E: cross section of cankers showing the wedge-shaped necrotic sectors.

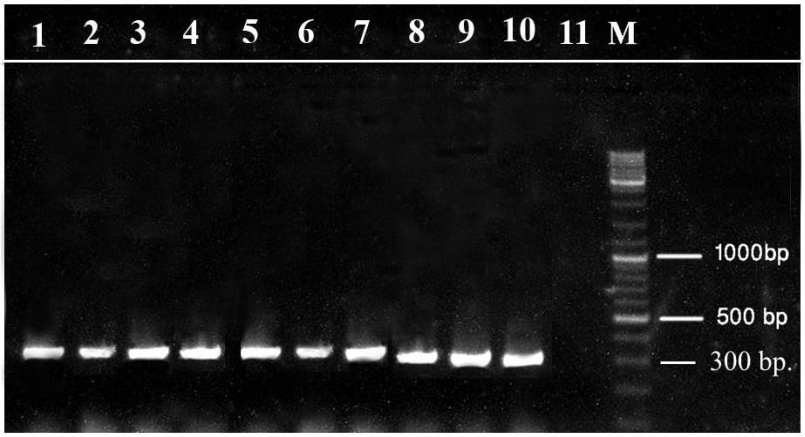
جدایه‌ها نیز با افزایش سن پرگنه‌ها کنیدیوم‌هایی با یک دیواره عرضی مشاهده گردید. طبق منابع موجود (Phillips et al., 2013) همه جدایه‌های بررسی شده در ابتدا به عنوان *Neofusicoccum* sp. و یا *Fusicoccum* sp. گروهبندی شدند. بسیاری از مطالعات جدید نشان داده است که کارایی ویژگی‌های ریخت‌شناسی روشی مطمئن و دقیقی برای شناسایی گونه‌های خانواده Botryosphaeriaceae نیستند. به همین دلیل ۱۶ جدایه از کل جدایه‌های بدست آمده انتخاب و به روش مولکولی نیز مورد ارزیابی و شناسایی نهایی قرار گرفتند.

مطالعات مولکولی و تجزیه و تحلیل تبارشناسی جدایه‌ها

با استفاده از دو آغازگر EF1-728F و EF1-986R و تکثیر بخشی از ژن *tef-1α* قطعاتی در حدود ۳۰۰ جفت باز برای جدایه‌های انتخاب شده بدست آمد (شکل ۲). قطعات تکثیرشده تعیین تراداف، تصحیح و در نهایت میزان شباهت آنها از طریق برنامه جستجوی BLAST در بانک ژن مورد ارزیابی قرار گرفت. بررسی‌های اولیه نشان داد که همه جدایه‌های مورد مطالعه ۹۹ تا ۱۰۰ درصد با گونه *Botryosphaeria dothidea* (جدایه تیپ CBS 115476) هومولوژی نشان می‌دهند. نتایج حاصل از رسم درخت فیلوژنی نیز نشان داد که جدایه‌های ایرانی بدست‌آمده از شاخه درختان فندق با درجه اعتبار سنجی ۹۹ (در آزمون بوت استرپ) در یک گروه گونه‌ای شامل سویه‌های شناخته‌شده *B.auasmontanum*، *B. dothidea*، *B. minutispermatia* قرار می‌گیرند (شکل ۳). بدین طریق شناسایی این جدایه‌ها به عنوان *B. dothidea* با این خوشه‌بندی تبارشناسی و مقایسه ریخت‌شناسی این سه گونه خویشاوند مورد تایید قرار گرفت. همه ۱۶ جدایه ایرانی به همراه شماره دسترسی آنها در بانک ژن در شکل ۳ به رنگ قرمز مشخص شده‌اند.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲. قطعات تکثیری ۳۰۰ جفت بازی حاصل از تکثیر ژن *tef-1α* برای ۱۰ جدایه منتخب از *Botryosphaetria dothidea* با استفاده از آغازگرهای EF1-728F و EF1-986R بر روی ژل آگاروز یک درصد. M: نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی، چاهک‌های یک تا ۱۰: جدایه‌های *B. dothidea* و چاهک ۱۱: کنترل منفی.

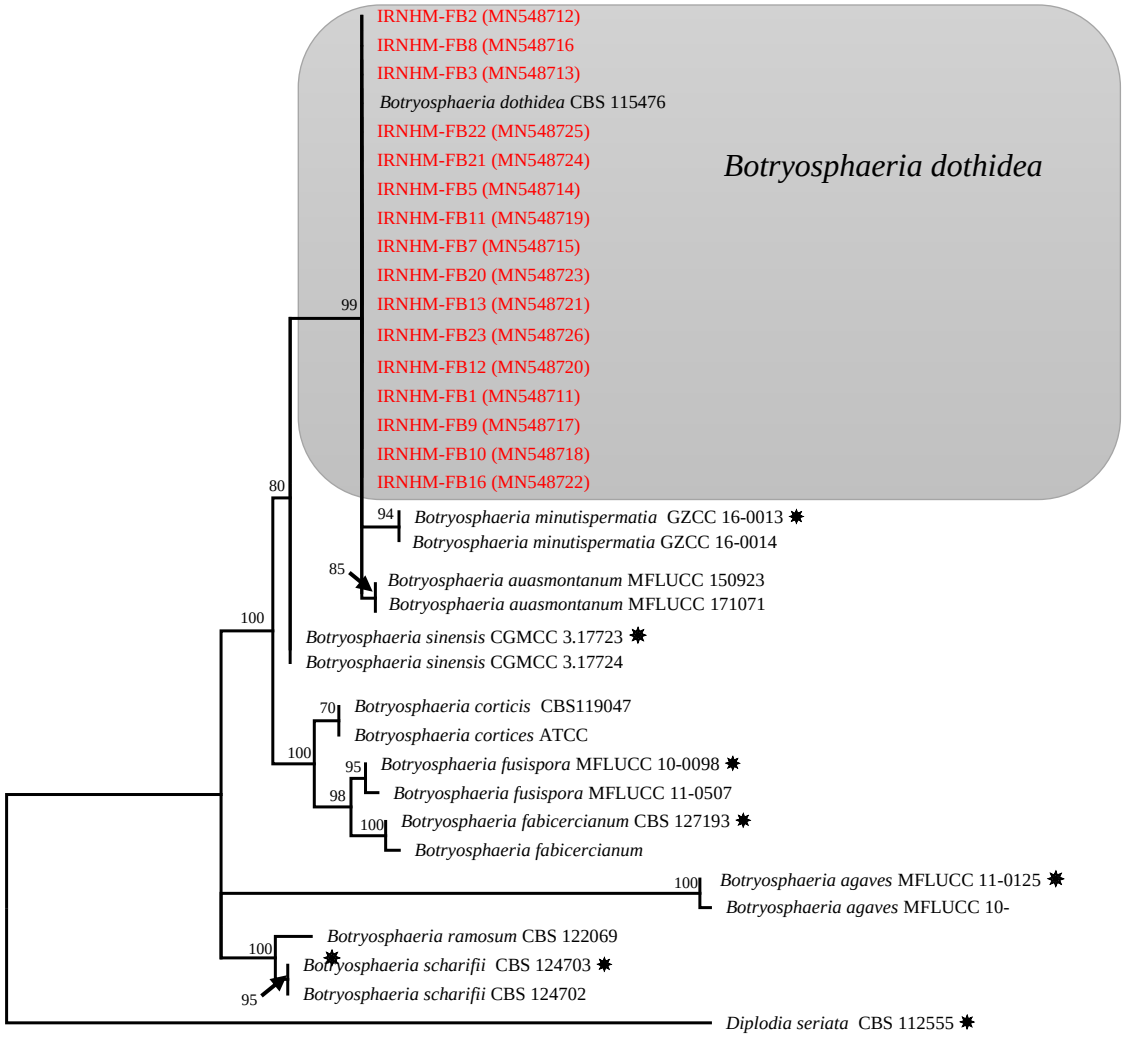
Figure 2. Amplified fragments of the 300 bp size from *tef-1α* gene of 10 representative isolates of *Botryosphaeria dothidea* using EF1-728F and EF1-986R primers on 1% agarose gel: M: DNA marker, 100 bp, lanes 1 to 10: *B. dothidea* isolates, lane 11: negative control.

اعضای خانواده Botryosphaeriaceae دارای میزبان‌ها و مناطق جغرافیایی گسترده‌ای هستند. در اصل جنس *Botryosphaeria* در سال ۱۸۶۳ با گونه تیپ *B. dothidea* معرفی گردید (Barr, 1972) و در حال حاضر گونه‌های مختلفی از این خانواده به عنوان عامل شانکر بر روی درختان مختلف شناسایی شده اند (Beckman et al., 2003; Van Niekerk et al., 2004; Espinoza et al., 2009). در این میان گونه *B. dothidea* به عنوان عامل شانکر بر روی بسیاری از درختان در نواحی معتدل و گرمسیری جهان گزارش شده است (Marsberg et al., 2017).

با در نظر گرفتن بررسی‌های انجام شده بر روی بیماری‌های شاخه و تنه درختان، گونه *B. dothidea* به عنوان عامل شانکر و سرخشکیدگی درختان گوناگونی مانند درخت بید دم گربه ای (Ko et al., 2003)، آکاسیا و کاج (Gezahgne et al., 2004)، اکالیپتوس (Mohali et al., 2007)، انبه (Slippers et al., 2005)، صنوبر، درختان میوه هسته‌دار (Slippers et al., 2004) و پسته (Wunderlich et al., 2012) در مناطق مختلف دنیا معرفی شده است. در کالیفرنیا *B. dothidea* به عنوان یکی از گونه‌های Botryosphaeriaceae همراه با شانکر پوستی تنه و همچنین عامل شانکر شاخه و تنه درختان بادام گزارش شده است (Inderbitzin et al., 2010). به طور کلی گونه *B. dothidea* به عنوان یکی از بیمارگرهای مهم شاخه و تنه و عامل شانکر درختان در کشورهای مختلف دنیا مورد توجه می‌باشد (مراجعه شود به Marsberg et al., 2017). به عنوان مثال تحقیقات در کشور چین نشان داده است که این گونه باعث ایجاد شانکر بر روی دامنه گسترده‌ای از درختان می‌شود (Tai, 1979; Wei, 1979; Zhuang, 2005; Li et al., 2010; Zhu et al., 2018). بررسی‌ها در ایران نیز نشان می‌دهد که این گونه از بافت آلوده شاخه درختان مختلفی جداسازی شده است که می‌توان به درختان خرما (Mohammadi, 2014)، سرو شیراز (Mohammadi et al., 2014)، درختان پسته (Mohammadi et al., 2015)، درختان میوه هسته‌دار (Soltaninejad et al., 2017) و همچنین درختان جنگلی در شمال کشور (Kazemzadeh Chakusary et al., 2019) اشاره نمود.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳. درخت تبارشناسی بدست آمده از ترادف‌های ناحیه ژنی *tef-1α* برای ۱۶ جدایه *Botryosphaeria dothidea*. درجه اعتبار سنجی (درصد بوت‌استراپ بر اساس ۱۰۰۰ تکرار) در محل گره‌ها قرار داده شده است. ترادف *Diplodia seriata* (جدایه CBS 112555) به عنوان آرایه خارج از گروه استفاده شده است. جدایه‌های تیپ با علامت ستاره نشان داده شده‌اند و جدایه‌های ایرانی همراه شماره های دسترسی آنها در بانک ژن نیز با رنگ قرمز نشان داده شده‌اند.

Figure 3. Phylogenetic tree obtained from *tef-1α* region sequences of 16 isolates of *Botryosphaeria dothidea*. MP bootstrap values based on 1,000 pseudoreplicates are given at the nodes. Sequence of *Diplodia seriata* (CBS 112555) were added as outgroup. Ex-type isolates are indicated by asterisk symbol and Iranian isolates with their accession numbres in GenBank are also indicated by red color.

نتایج حاصل از آزمون بیماری‌زایی بر روی شاخه‌های درخت فندق نشان داد که نه جدایه از ۱۰ جدایه مورد بررسی بر روی شاخه‌های مایه‌زنی شده بیماری‌زا بوده و باعث تغییر رنگ بافت چوب در محل مایه‌زنی شده گردیدند (جدول ۱ و شکل ۴). در بین جدایه‌های استفاده شده نیز از نظر میزان بیماری‌زایی تفاوت‌هایی مشاهده گردید. بر اساس داده‌های جدول ۱، جدایه‌های IRNHM-BF8 و IRNHM-BF13 به ترتیب با میانگین طول لکه برابر با ۵۸/۸ و ۶/۲ میلی‌متر بیشترین و کمترین بیماری‌زایی را بر روی شاخه‌های مایه‌زنی شده داشتند. در این زمینه جدایه IRNHM-BF8 اختلاف معنی‌داری را نسبت به سایر جدایه‌ها نشان داد ولی جدایه IRNHM-BF13 با وجودیکه نسبت به تیمار شاهد (با میانگین ۴/۴ میلی متر) از میانگین بیشتری

www.SID.ir

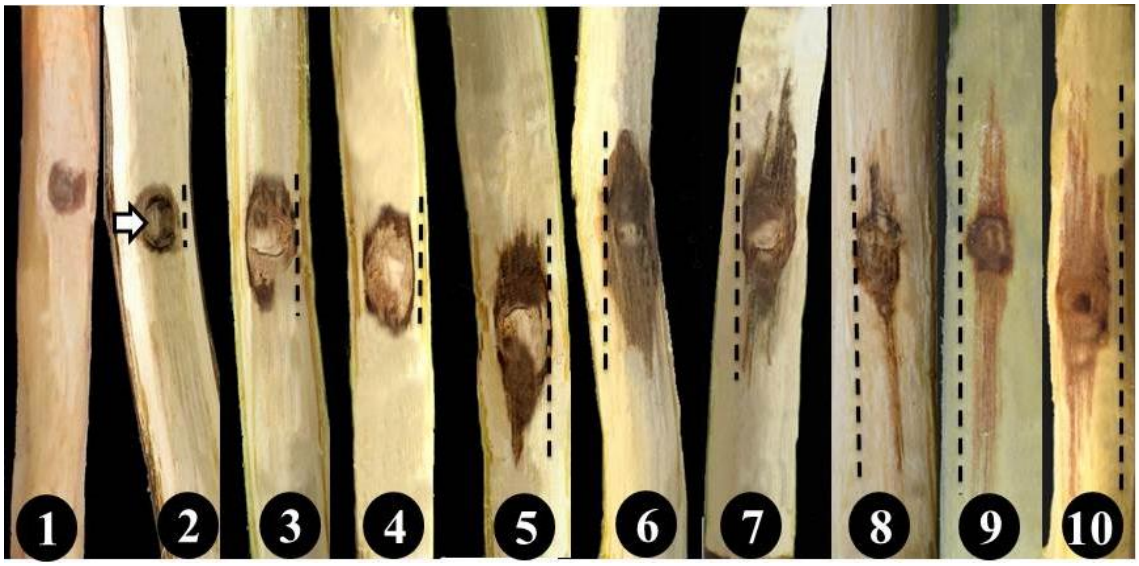
Archive of SID

جدول ۱. میانگین (±SE) طول لکه و درصد جداسازی مجدد برخی از جدایه‌های *Botryosphaeria dothidea* مایه‌زنی شده بر روی شاخه‌های درخت فندق (بعد از ٤٥ روز) در آزمون بیماری‌زایی.

Table 1. Mean (±SE) lesion length and re-isolation frequencies of some isolates of *Botryosphaeria dothidea* inoculated onto hazelnut branches (after 45 days) in pathogenicity test.

Re-isolation frequency %	Mean lesion length (mm)	Isolates code
41.67	35.000 ± 1.62 C	IRNHM-BF1
83.33	49.200 ± 1.24 B	IRNHM-BF2
58.33	16.600 ±1.28 F	IRNHM-BF4
100	32.800 ± 1.72 CD	IRNHM-BF5
83.33	21.400 ± 0.67 E	IRNHM-BF7
100	58.800 ± 1.86 A	IRNHM-BF8
33.33	12.400 ± 0.73 G	IRNHM-BF10
50.00	21.400 ± 0.83 E	IRNHM-BF11
33.33	6.200 ± 0.65 H	IRNHM-BF13
75.00	30.200 ± 1.75 D	IRNHM-BF14
0	4.400 ± 0.40 H	control

*Means with the same letter are not significantly different at the 0.05 level.



شکل ٤. آزمون بیماری‌زایی جدایه‌های *Botryosphaeria dothidea* مایه‌زنی شده روی شاخه‌های درخت فندق (بعد از ٤٥ روز). 1: تیمار شاهد، 2 تا 10: جدایه‌های مایه‌زنی شده 2: IRNHM-BF13، 3: IRNHM-BF10، 4: IRNHM-BF4، 5: IRNHM-BF11، 6: IRNHM-BF7، 7: IRNHM-BF14، 8: IRNHM-BF2، 9: IRNHM-BF8 و 10: IRNHM-BF1 (خطوط نقطه چین نشان دهنده طول لکه‌های ایجاد شده توسط هر جدایه می باشد).

Figure 4. Pathogenicity test of *Botryosphaeria dothidea* isolates inoculated onto hazelnut branches (after 45 days). 1: control, 2-10 inoculated isolates including, 2: IRNHM-BF13, 3: IRNHM-BF10, 4: IRNHM-BF4, 5: IRNHM-BF11, 6: IRNHM-BF7, 7: IRNHM-BF14, 8: IRNHM-BF2, 9: IRNHM-BF8 and 10: IRNHM-BF1. (The black dashed lines indicate lesion length caused by each isolate).

www.SID.ir

Archive of SID

برخوردار بود ولی این اختلاف در سطح ۵ درصد معنی‌دار نبود. بنابراین بر اساس نتایج بدست آمده جدایه IRNHM-BF13 را نمی‌توان به عنوان یک بیمارگر بر روی شاخه‌های درخت فندق در نظر گرفت. درصد جداسازی مجدد جدایه‌ها از شاخه‌های مایه‌زنی شده نیز بین ۳۳/۳۳ درصد (جدایه‌های IRNHM-BF10 و IRNHM-BF13) تا ۱۰۰ درصد (جدایه‌های IRNHM-BF5 و IRNHM-BF8) متغیر بود و از تیمارهای شاهد نیز هیچ گونه قارچی جداسازی نگردید. به طور کلی نتایج حاصل از آزمون بیماری‌زایی در مطالعه حاضر نشان داد که جدایه‌های مورد استفاده دارای درجات مختلفی از بیماری‌زایی بر روی شاخه‌های درخت فندق می‌باشند. نتایجی مشابه نیز توسط محققین دیگر بر روی درختان مختلف گزارش شده است به عنوان مثال نتایج حاصل از آزمون بیماری‌زایی ۱۴ روزه گونه *B. dothidea* بر روی شاخه درختان پسته در استرالیا نشان داده است که طول لکه‌های ایجاد شده در اثر شش جدایه این گونه از ۵ تا ۴۰ میلی متر متغیر بود (Wunderlich et al., 2012). در آمریکا گونه *B. dothidea* به عنوان یک بیمارگر مهاجم بر روی درختان میوه و پسته گزارش شده است (Michailide, 1992; Ma et al., 2001, 2004) در حالی که در کشور آفریقای جنوبی این گونه به عنوان یک بیمارگر ضعیف بر روی درختانی همچون انگور و اکالیپتوس شناخته می‌شود (Van Niekerk et al., 2004; Slippers et al., 2007). چنین تفاوت‌هایی در مورد سایر گونه‌های Botryosphaeriaceae نیز گزارش شده است.

اصولا تفاوت در بیماری‌زایی جدایه‌ها می‌تواند ناشی از شاخص‌های مختلف مانند نوع میزبان و درجه حساسیت آن، درجه بیماری‌زایی جدایه‌ها، شرایط محیطی، روش مایه‌زنی و حتی زمان در نظر گرفته شده برای آزمون بیماری‌زایی باشد (Úrbez-Torres et al., 2008). انجام آزمون‌های بیماری‌زایی در ایران نیز نشان داده است که گونه *B. dothidea* بر روی شاخه درختان سرو (Mohammadi et al., 2014) درختان پسته (Mohammadi et al., 2015)، هلو، زردآلو، گیلاس، گوجه سبز، آلبالو (Soltaninejad et al., 2017) و درختان جنگلی (Kazemzadeh Chakusary et al., 2019) بیماری‌زا می‌باشد.

تحقیقات قبلی روی بیماری‌های شاخه و تنه درختان فندق نشان می‌دهد که برخی از گونه‌های شناخته‌شده در خانواده Botryosphaeriaceae مانند *Diplodia coryli*، *Diplodia sapinea*، *D. seriata*، *Dothiorella iberiaca*، *Do. symphoricarposicola*، *Do. parva* و *Do. omnivora* قادر به آلوده کردن بافت چوب این میزبان می‌باشند (Guerrero and Pérez, 2013; Linaldeddu et al., 2016). بنابراین مطالعه حاضر اولین گزارش از وجود و بیماریزایی *B. dothidea* بر روی درختان فندق در دنیا محسوب می‌گردد.

به طور کلی گونه *B. dothidea* مانند بسیاری از گونه‌های دیگر خانواده Botryosphaeriaceae تخصص میزبانی چندانی ندارد. بنابراین با توجه به اینکه این گونه قبلا از درختان دیگر در ایران نیز جداسازی و شناسایی گردیده است خطر انتقال آن از درختان فندق به سایر درختان میوه را باید مد نظر قرار داد. بر این اساس بررسی‌ها و نمونه برداری‌های بیشتری لازم است که بتوان به طور دقیق تر نقش و اهمیت اعضای خانواده Botryosphaeriaceae را در ایجاد بیماری‌های شاخه و تنه درختان فندق در ایران و سایر نقاط دنیا روشن نمود.

سپاس‌گزاری

بدین وسیله از حمایت‌های مالی معاونت پژوهشی دانشگاه باهنر کرمان تشکر و قدردانی می‌گردد.

www.SID.ir

Archive of SID

REFERENCES

Abdollahzadeh, J., Javadi, A., Zare, R., and Phillips, A. J. L. 2014. A phylogenetic study of *Dothiorella* and *Spencermartinsia* species associated with woody plants in Iran, New Zealand, Portugal and Spain. Persoonia, 32: 1–12.

Barr, M. E. 1972. Preliminary studies on the *Dothideales* in temperate North America. Contributions from the University of Michigan Herbarium, 9: 523–638.

Beckman, T. G., Pusey, P. L., and Bertrand, P. F. 2003. Impact of fungal gummosis on peach trees. HortScience, 38: 1141–1143.

Carbone, I., and Kohn, L. M. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. Mycologia, 91: 553–556.

Cloete, M., Fourie, P. H., Damm, U., Crous, P. W., and Mostert, L. 2011. Fungi associated with die–back symptoms of apple and pear trees, a possible inoculum source of grapevine trunk disease pathogens. Phytopathologia Mediterranea, 50: S176–S190.

Espinoza, J. G., Briceño, E. X., Chávez, E.R., Úrbez-Torres, J. R., and Latorre, B. A. 2009. *Neofusicoccum* spp. associated with stem canker and dieback of blueberry in Chile. Plant Disease, 93: 1187–1194.

FAO, 2014. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Statistical Databases. Available at http://www.fao.org.

Gezahgne, A., Roux, J., Slippers, B., and Wingfield, M. J. 2004. Identification of the causal agent of Botryosphaeria stem canker in Ethiopian Eucalyptus plantations. South African Journal of Botany, 70: 241–248.

Guerrero, J. A., and Pérez, S. M. 2013. First report of shoot blight and canker caused by *Diplodia coryli* in hazelnut trees in Chile. Plant Disease, 97: 144.

Hashemi, H., and Mohammadi, H. 2016. Identification and characterization of fungi associated with internal wood lesions and decline disease of willow and poplar trees in Iran. Forest Pathology, 46: 341–352.

Hashemi, H., Mohammadi, H., and Abdollahzadeh, J. 2017. Symptoms and fungi associated with elm trees decline in Iran. European Journal of Forest Research, 136: 857–879.

Inderbitzin, P., Bostock, R. M., Trouillas, F. P., and Michailides, T. J. 2010. A six locus phylogeny reveals high species diversity in Botryosphaeriaceae from California almond. Mycologia, 102: 1350–1368.

Kazemzadeh Chakusary, M., Mohammadi, H., and Khodaparast, A. 2017. Decline-associated *Phaeoacremonium* spp. occurring on forest trees in the north of Iran. Forest Pathology, 47(6): e12368. https ://doi. org/10.1111/efp.12368.

www.SID.ir

Archive of SID

Kazemzadeh Chakusary, M., Mohammadi, H., and Khodaparast, A. 2019. Diversity and pathogenicity of Botryosphaeriaceae species on forest trees in the north of Iran. European Journal of Forest Research, 138: 685–704.

Ko, Y., Sun, S.K., and Lan, C. C. 2003. Stem canker of cat tail-willow caused by *Botryosphaeria dothidea* in Taiwan. Plant Pathology Bulletin, 12: 269–272.

Lawrence, D. P., Hand, F. P., Gubler, W. D., and Trouillas, F. P. 2017. Botryosphaeriaceae species associated with dieback and canker disease of bay laurel in northern California with the description of *Dothiorella californica* sp. nov. Fungal Biology, 121: 347–360.

Li, X., Yan, J., Kong, F., Qiao, G., Zhang, Z., and Wang, Z. 2010. *Botryosphaeria dothidea* causing canker of grapevine newly reported in China. Plant Pathology, 59: 1170.

Linaldeddu, B. T., Maddau, L., and Franceschini, A. 2016. First report of *Diplodia corticola* causing canker and dieback of *Quercus ilex*, *Q. petraea*, and *Q. suber* in Corsica (France). Plant Disease, 101: 256–256.

Ma, Z., Lou, Y., and Michailides, T. J. 2004. Spatiotemporal changes in the population structure of *Botryosphaeria dothidea* from California pistachio orchards. Phytopathology, 94: 326–332.

Ma, Z., Morgan, D. P., and Michailides, T. J. 2001. Effects of water stress on Botryosphaeria blight of pistachio caused by *Botryosphaeria dothidea*. Plant Disease, 85: 745–749.

Marsberg, A., Kemler, M., Jami, F. Nagel, J. H., Postma-Smidt, A., Naidoo, S., Wingfield, M. J., Crous, P. W., Spatafora, J. W., Hesse, C. N., Robbertse, B., and Slippers, B. 2017. *Botryosphaeria dothidea*: a latent pathogen of global importance to woody plant health. Molecular Plant Pathology, 18: 477–488.

Michailides, T. J. 1991. Pathogenicity, distribution, sources of inoculum, and infection courts of *Botryosphaeria dothidea* on pistachio. Phytopathology, 81: 566–573.

Michailides, T.J., Inderbitzin, P., Connell, J.H., Luo, Y.G., Morgan, D.P., and Puckett, R.D. 2018. Understanding band canker of almond caused by Botryosphaeriaceae fungi and attempts to control the disease in California. Acta Horticulturae, 1219: 303–310.

Michailides, T. J., and Morgan, D. P. 1992. Effects of temperature and wetness duration on infection of pistachio by *Botryosphaeria dothidea* and management of disease by reducing duration of irrigation. Phytopathology, 82: 1399–1406.

Mohali, S., Slippers, B., and Wingfield, M. J. 2007. Identification of Botryosphaeriaceae from Eucalyptus, *Acacia* and *Pinus* in Venezuela. Fungal Diversity, 25: 103–125.

www.SID.ir

Archive of SID

Mohammadi, H. 2014. *Phaeoacremonium* spp. and Botryosphaeriaceae spp. associated with date palm (*Phoenix dactylifera* L.) decline in Iran. Journal of Phytopathology, 162: 575–581.

Mohammadi, H., Banihashemi, Z., Gramaje, D., and Armengol, J. 2013. Characterization of *Diplodia seriata* and *Neofusicoccum parvum* associated with grapevine decline in Iran. Journal of Agricultural Science and Technology, 15: 603–616.

Mohammadi, H., Kazemi, S., and Farahmand, H. 2014. *Phaeoacremonium* and Botryosphaeriaceae species associated with cypress (*Cupressus sempervirens* L.) decline in Kerman province (Iran). Phytopathologia Mediterranea, 53(1): 27–39.

Mohammadi, H., Sarcheshmehpour, M., and Mafi, E. 2015. Fungal trunk pathogens associated with wood decay of pistachio trees in Iran. Spanish Journal of Agricultural Research, 13(2): 1007. https ://doi.org/10.5424/sjar/20151 32–6560.

Mohammadi, H., and Sharifi, S. 2016. Association of Botryosphaeriaceae and *Phaeoacremonium* species with insect-damaged quince shoots. Journal of Plant Pathology, 98(1): 31–38.

Moral, J., Morgan, D., Trapero, A., and Michailides, T. J. 2019. Ecology and epidemiology of diseases of nut crops and olives caused by Botryosphaeriaceae fungi in California and Spain. Plant Disease, 103(8): 1–19. https://doi.org/10.1094/PDIS-03-19-0622-FE.

Pérez, C. A., Altier, N., Simeto, S., Wingfield, M. J., Slippers, B., and Blanchette, R. A. 2008. Botryosphaeriaceae from Eucalyptus and native *Myrtaceae* in Uruguay. Agrociencia, 12: 19–30.

Phillips, A., Alves, A., Correia, A., and Luque, J. 2005. Two new species of *Botryosphaeria* with brown, 1-septate ascospores and *Dothiorella* anamorphs. Mycologia, 97: 513–529.

Phillips, A. J. L., Alves, A., Abdollahzadeh, J., Slippers, B., Wingfield, M. J., Groenewald, J. Z., and Crous, P. W. 2013. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. Studies in Mycology, 76: 51–167.

Rumbos, I. C. 1987. Twig and branch dieback of walnut trees induced by *Botryosphaeria ribis*. Plant Pathology, 36: 602–605.

Sami, S., Mohammadi, H., and Heydarnejad, J. 2014. *Phaeoacremonium* species associated with necrotic wood of pome fruit trees in Iran. Journal of Plant Pathology, 96: 487–495.

Slippers, B., Boissin, E., Phillips, A. J. L., Groenewald, J. Z., Lombard, L., Wingfield, M. J., Postma, A., Burgess, T., and Crous, P.W. 2013. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriales: a systematic and evolutionary framework. Studies in Mycology, 76: 31–49.

www.SID.ir

Archive of SID

Slippers, B., Fourie, G., Crous, P. W., Coutinho, T. A., Wingfield, B. D., Carnegie, A. J., and Wingfield, M.J. 2004. Speciation and distribution of *Botryosphaeria* spp. on native and introduced *Eucalyptus* trees in Australia and South Africa. Studies in Mycology, 50: 343–358.

Slippers, B., Johnson, G. I., Crous, P. W., Coutinho, T.A., Wingfield, B. D., Wingfield, M. J. 2005. Phylogenetic and morphological re-evaluation of the *Botryosphaeria* species causing diseases of *Mangifera indica*. Mycologia, 97: 99–110.

Slippers, B., Smit, W. A., Crous, P. W., Coutinho, T. A., Wingfield, B. D., and Wingfield, M. J. 2007. Taxonomy, phylogeny and identification of Botryosphaeriaceae associated with pome and stone fruit trees in South Africa and other regions of the world. Plant Pathology, 56: 128–139.

Slippers, B., and Wingfield, M. J. 2007. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. Fungal Biology Reviews, 21: 90–106.

Soltaninejad, N., Mohammadi, H., and Massumi, H. 2017. Isolation, identification and pathogenicity of Botryosphaeriaceae and *Phaeoacremonium* species associated with decline of *Prunus* species in Iran. Journal of Plant Pathology, 99(3): 571–581.

Tai, F.L. 1979. Sylloge Fungorum Sinicorum, Beijing, China.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution, 30: 2725–2729.

Trapero, A., Roca, L. F., Trapero, C., Lopez-Escudero, F. J., and Moral, J. 2011. Diseases and their control. Culture and Knowledge Inspired by Olive Oil (J. Humanes, J. Villar, M. Fialho, P. Higueras, eds.). GEA Westfalia Separator Iberica SA, Ubeda-Jaen, Spain. pp. 89–135.

Úrbez-Torres, J. R., Leavitt, G. M., Guerrero, J.C., Guevara, J., and Gubler, W. D. 2008. Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Diplodia seriata*, the causal agents of bot canker disease of grapevines in Mexico. Plant Disease, 92: 519–529.

Van Niekerk, J. M., Bester, W., Halleen, F., Crous, P. W., and Fourie, P. H. 2011. The distribution and symptomatology of grapevine trunk disease pathogens are influenced by climate. Phytopathologia Mediterranea, 50: S98–S111.

Van Niekerk, J. M., Crous, P. W., Groenewald, J. Z., Fourie, P. H., and Halleen, F. 2004. DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevines. Mycologia, 96: 781–798.

Wei, J. C. 1979. Identification of fungus handbook, Shanghai, China. [in Chinese].

www.SID.ir

Archive of SID

Wunderlich, N., Costa, S. S., Tpoi, R. P., and Ash, G. J. 2012. First report of *Botryosphaeria dothidea* causing shoot blight and cankers of pistachio in Australia. Australasian Plant Disease Notes, 7: 47–49.

Zhu, H. Y., Tian, C. M., and Fan, X. L. 2018. Studies of botryosphaerialean fungi associated with canker and dieback of tree hosts in Dongling Mountain of China. Phytotaxa, 348(2): 63–76.

Zhuang, W.Y. 2005. Fungi of northwestern China. Ithaca, New York.

Zlatković, M., Wingfield, M. J., Jami, F., and Slippers, B. 2018. Host specificity of co-infecting Botryosphaeriaceae on ornamental and forest trees in the Western Balkans. Forest Pathology, 48(2): e12410. https ://doi.org/10.1111/efp.12410.

© 2019 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

www.SID.ir

Archive of SID

Branch canker of hazelnut trees caused by *Botryosphaeria dothidea* in Iran

H. Mohammadi[1*] and M. Jabbari Firoozjah[2]

1. ***Corresponding Author:** Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran (hmohammadi@uk.ac.ir)
2. Former M.Sc. student, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

(DOI): 10.22055/ppr.2019.14923

Received: 6 August 2018 Accepted: 3 November 2019

Abstract

Background and Objectives

Botryosphaeriaceae (Botryosphaeriales, Ascomycetes) is a family of fungi that have a cosmopolitan distribution and occur on a wide range of woody plants. A field survey was conducted on trunk diseases of hazelnut (*Corylus avellana* L.) trees in Babol (Mazandaran province) during spring and summer of 2016. Symptoms typical of infection by the Botryosphaeriaceae species such as canker and wedge-shaped wood necrosis have been recorded in some trees. Therefore, the objectives of this study were to identify pathogenicity of the Botryosphaeriaceae isolates associated with wood necrosis of hazelnut trees in this region of Iran.

Materials and Methods

Wood samples were collected from branches of trees showing canker and wood necrosis symptoms. Fungal isolation was made from the margin between healthy and necrotic wood tissues. Wood pieces were cut from the affected tissues, surface-disinfected for 1 min in a 0.5 % sodium hypochlorite solution, and washed twice with sterile distilled water. Wood segments were plated on potato dextrose agar (PDA), and incubated at 25 °C in the dark. Single spore cultures were derived from all isolate prior to morphological and molecular identification. Fungal isolates were identified based on morphology, culture characteristics and sequence analysis of the translation elongation factor 1-alpha (*tef-1α*) region. Pathogenicity test was conducted for representative isolates on detached shoots of hazelnut under greenhouse conditions.

Results

In this study 31 isolates resembling Botryosphaeriaceae in colony and culture (fast growing, greyish to dark cultures) were obtained. According to morphological characters, as well as phylogenetic analyses of *tef-1α* gene, all isolated were identified as *Botryosphaeria dothidea*. Selected isolates used in pathogenicity test caused wood discoloration on inoculated branches after 45 days. Our results showed a variation in wood lesion lengths and re-isolation frequencies of inoculated isolates.

www.SID.ir

Archive of SID

Discussion

This study represents the first attempt to identify and test the pathogenicity of Botryosphaeriaceae associated with canker disease of hazelnut trees in Iran. Some species of Botryosphaeriaceae had previously been found in declining hazelnut trees. However, this is the first report of occurrence and pathogenicity of *B. dothidea* on hazelnut in the world.

Keywords: Botryosphaeriaceae, Trunk fungal pathogens, Mazandaran province, Iran, tef-1α

www.SID.ir