دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات حمایت و حفاظت جنگلها و مراتع ایران
جلد ۱۶ شماره ۱، صفحه ۱۲-۱، (۱۳۹۷)
شناسه دیجیتال (DOI):10.22092/ijfrpr.2018.110857.1276

بررسی بیماری زغالی بلوط در جنگل‌های بلوط دچار خشکیدگی استان ایلام

جواد اشرفی[1*]، احمد حسینی[2]، جعفر حسین‌زاده[3] و منصوره میرابوالفتحی[4]

۱*- نویسنده مسئول، کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان ایلام، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ایلام، ایران
پست الکترونیک: javad_ashrafi795@yahoo.com

۲- استادیار پژوهش، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان ایلام، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ایلام، ایران

۳- دانشیار پژوهش، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان ایلام، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ایلام، ایران

۴- استاد پژوهش، مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۳/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۲/۱۱

چکیده

در سال‌های گذشته خشکیدگی‌های درختان بلوط به‌طور گسترده‌ای در جنگل‌های زاگرس و به‌ویژه در استان ایلام روی داده است و بیماری زغالی بلوط طغیان کرده و موجب آسیب به درختان بلوط شده است. این تحقیق به‌منظور شناسایی قارچ‌های بیماری‌زا، اثبات بیماری‌زایی و بررسی رفتار بیماری‌زایی آنها طی سال‌های ۱۳۹۴-۱۳۹۱ در سطح جنگل‌های استان ایلام اجرا شد. پس از جنگل‌گردشی و بازدیدهای میدانی متعدد در سطح جنگل‌های استان، نمونه‌های متعددی از نسوج آلوده درختان بلوط ایرانی جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شد. سپس نمونه‌ها کشت شده و عوامل بیماری‌زا با استفاده از صفات مورفولوژیک و کلیدهای معتبر قارچ‌شناسی شناسایی شد. به‌منظور اثبات بیماری‌زایی قارچ‌های شناسایی‌شده، اقدام به مایه‌زنی آنها به نهال‌های دوساله بلوط گردید. در مرحله نهایی رفتار بیماری‌زایی قارچ‌ها بررسی شد. نتایج نشان داد که قارچ های عامل بیماری زغالی در جنگل‌های استان ایلام شامل *Biscogniauxia mediterranea* و *Obolarina persica* می‌باشند. قارچ‌های مذکور سبب بیماری نهال‌های بلوط مورد آزمایش و خشکیدگی قسمت‌های بالاتر از محل مایه زنی شدند. بررسی رفتار بیماری‌زایی این قارچ‌ها نشان داد که آلودگی آنها از محل مایه‌زنی شروع شده و انتشار آنها در چوب علاوه بر گسترش طولی، به‌صورت عرضی و شعاعی به سمت مغز چوب است، به‌طوری‌که آوندهای چوبی و آبکش را درگیر می‌کند. با توجه به اثبات بیماری‌زایی این قارچ‌ها و تأثیر آنها در ضعف و خشکیدگی درختان بلوط ایرانی، می‌توان با انجام عملیات آبخیزداری از وقوع تنش خشکی که زمینه‌ساز تهاجم این قارچ‌هاست، جلوگیری کرد و با حذف درختان کاملاً آلوده و خشک مانع گسترش عامل بیماری در منطقه شد.

واژه‌های کلیدی: بیماری زغالی، جنگل‌های ایلام، زوال بلوط

مقدمه

در دهه گذشته خشکسالی‌ها و تنش آبی سبب خشکیدن درختان بلوط در جنگل‌های زاگرس شده که موجب خسارت به درختان بلوط و بروز مشکلات دیگری همچون طغیان آفات و بیماری‌ها شده است. پدیده خشکیدگی درختان در استان‌هایی مانند ایلام، لرستان، کرمانشاه، کهگیلویه و بویراحمد و فارس گزارش شده است. در استان ایلام گونه غالب جنگل‌های منطقه را بلوط ایرانی

Archive of SID
www.SID.ir

(*Quercus brantii*) تشکیل می‌دهد. این گونه در واکنش به شرایط پیش‌آمده اخیر از حساس‌ترین گونه‌های درختی بوده و مرگ‌ومیر این درختان خسارت‌های شدیدی به جنگل‌های منطقه وارد کرده است (Hosseini *et al.*, 2012). گزارش‌های متعددی از بروز ضعف و مشکلات فیزیولوژیکی درختان بلوط در مناطقی از استان ایلام از قبیل شهرستان‌های ایلام، ملکشاهی، مهران، آبدانان، سیروان و ... از واحدهای اجرایی ارائه شده و نیز در بازدیدهای مکرر از مناطق مختلف استان مشاهده گردیده است (مشاهدات میدانی نگارندگان). از طرف دیگر گرم شدن هوا که یک پدیده جهانی و ناشی از افزایش ممتد گازهای گلخانه‌ای در اتمسفر است، از بین رفتن جنگل‌ها، چرای بی‌رویه مراتع، تغییر کاربری و برخی فعالیت‌های انسانی (Babaie-Kafaie, 2004)، موجب افزایش و شدت پدیده خشکیدگی شده است.

به دنبال وقوع خشکسالی‌ها و خشکیدگی درختان، قارچ‌های بیماری‌زا طغیان و خسارت‌های زیادی به درختان جنگلی وارد کرده‌اند. نخستین بار نشانه‌های بیماری زوال و زغالی درختان بلندمازو در توسکستان و پارک جنگلی قرق دیده شد و عامل آن قارچ *Biscogniauxia mediterranea* (De Not.) Kuntze معرفی گردید (Mirabolfathy *et al.*, 2011; Mirabolfathy, 2013a). قارچ *B. mediterranea* از تیره Xylariaceae بوده و به‌عنوان عامل بیماری شانکر زغالی در دنیا به‌خوبی شناخته شده است (Mirabolfathy *et al.*, 2011; Mirabolfathy, 2013a). این قارچ به‌عنوان عامل بیماری زغالی درختان بلوط در جنگل‌های زاگرس در مناطق ایلام، لرستان، فارس و کهگیلویه و بویراحمد گزارش شده که باعث بروز خسارت در درختان بلوط می‌شود (Mirabolfathy *et al.*, 2011; Mirabolfathy, 2013a). علایم این بیماری شامل ترشح شیره گیاهی در قسمت‌های آلوده، جدا شدن پوست درخت، تیره و سیاه شدن نسوج آبکش و چوب می‌باشد (Mirabolfathy, 2013a). در بررسی دیگر قارچ دیگری با نام *Obolarina persica* sp nov., به‌عنوان عامل ایجاد بیماری زغالی درختان بلوط معرفی شده است (Mirabolfathy *et al.*, 2013b). Safaee و همکاران (۲۰۱۶) بیماری‌زایی دو گونه قارچی فوق و ردیابی مولکولی همزمان آنها را بررسی کردند.

بررسی‌های انجام‌گرفته در سایر کشورها نشان داده است که تغییر اقلیم، افزایش دما و کاهش نزولات جوی از عوامل گسترش و تشدید این بیماری محسوب می‌شوند (Ashrafi *et al.*, 2012). قارچ‌های خانواده Xylariacea که در درختان بلوط ایجاد علائم زغالی می‌کنند، در شرایطی که خشکی و دمای هوا بیش از حد معمول شود، به‌صورت مهاجم درمی‌آیند. به‌علاوه تأثیر مقدار آب موجود در بافت گیاه بر حضور قارچ اثبات شده و مشخص شده است که پیشرفت و افزایش آلودگی قارچ در مرحله اندوفیتی به کاهش میزان پتانسیل آب در میزبان بستگی دارد (Vannini *et al.*, 2009). Franceschini و همکاران (۲۰۰۴) با بررسی قارچ *B. mediterranea* در شمال غربی ساردینیای ایتالیا این قارچ را یکی از عوامل کلیدی مرگ‌ومیر و زوال درختان بلوط معرفی کرده و بیان داشتند که این قارچ توانایی آلوده‌سازی تمامی قسمت‌های درخت را به‌عنوان اندوفیت دارا بوده و با کلونیزه کردن بافت چوبی باعث جدا شدن پوست شاخه‌ها و بروز علائم شاخص زغالی روی تنه و شاخه‌ها می‌شود. Jurc و Orgis (۲۰۰۶) با تحقیق روی جنگل بلوط گونه *Q. cerris* عامل بیماری را قارچ *B. mediterranea* var. *microspora* معرفی کرده و اظهار داشتند که خشکی شدید هوا، کاهش رطوبت و افزایش ناگهانی دما از عوامل ایجاد علائم این قارچ بوده است. در تحقیقی Vannini و Valentini (۱۹۹۴) توسعه بیماری زغالی روی درخت بلوط را ناشی از خشکی هوا ذکر کرده‌اند. همچنین Vannini و همکاران (۱۹۹۶) گزارش دادند که حضور اندوفیتی قارچ در پوست زنده درخت، قارچ را قادر می‌سازد که به‌سرعت در بافت‌های تحت تنش میزبان رشد نموده و موجب تخریب آنها گردد.

Archive of SID

www.SID.ir

قارچ‌های اندوفیت به‌عنوان قارچ‌های فرصت‌طلب، در زمان ایجاد تنش ناشی از خشکی و کاهش رطوبت شدید در میزبان، موجب مرگ میزبان می‌شوند. در این میان قارچ *B. mediterranea* یکی از مهمترین عوامل بیماری در کشورهای حوزه مدیترانه بوده که قابلیت بیماری‌زایی گسترده‌ای دارد (Franceschini *et al*., 2004). قارچ *B. mediterranea* دارای مرحله اندوفیتی طولانی بوده و در این مرحله علائم آن قابل‌مشاهده نمی‌باشد (Collado *et al*., 2001; Mazzaglia *et al*., 2001). همچنین تحقیقات نشان داده است که تنش کم‌آبی باعث افزایش کلونیزاسیون به‌صورت اندوفیت به‌وسیله قارچ *B. mediterranea* می‌شود. قنبری و همکاران (۲۰۱۷) تأثیر تنش خشکی بر شدت بیماری‌زایی عوامل زغالی بلوط ایرانی را بررسی کردند (Ghanbary *et al*., 2017). Hosseini (۲۰۱۱) میزان آلودگی درختان بلوط ایرانی به سوسک‌های چوب‌خوار را بررسی نموده و اعلام کرد که تنش‌های مربوط به خشکسالی اخیر موجب ضعف فیزیولوژیک درختان بلوط و افزایش جمعیت سوسک‌های چوب‌خوار در جنگل‌های زاگرس شده است.

حشرات کامل Cerambycidae نقش مهمی در انتقال قارچ‌ها و دیگر عوامل بیماری‌زا دارند Ragazzi و Tiberi (۱۹۹۸) علاوه‌بر امکان انتقال قارچ‌ها توسط حشرات چوب‌خوار و پوست‌خوار، این حشرات می‌توانند با حفر دالان باعث ایجاد راه‌های ورودی برای نفوذ عوامل بیماری‌زا به داخل بافت درخت شوند. مثلاً دالان ایجاد شده توسط *Cerambyx cerdo* در درخت بلوط *Q. suber* می‌تواند باعث ایجاد آلودگی بعدی توسط قارچ *B. mediterranum* شود (Martin *et al*., 2005). Pazoutova و همکاران (۲۰۱۰) قارچ *O. dryophila* و اندوفیت گونه *Salix alba* را بررسی کرده و مشاهده کردند که آسکوسپور (Ascospore) این قارچ در پرزهای سوسک پوست‌خوار گونه *Gasterocercus depressirostris* وجود دارد که مبین وجود سیستم انتشار این قارچ توسط سوسک‌های پوست‌خوار است. نتایج بررسی در مورد ارتباط بین *Cerambyx* spp. از خانواده Cerambycidae و قارچ عامل بیماری زغالی *B. mediterranum* در درختان بلوط جنوب‌غربی اسپانیا نشان داده که بین سوراخ‌های خروجی حشرات کامل و وجود قارچ ارتباط مستقیم وجود داشته است(Jose *et al*., 2005). جالب توجه است که چوب‌خوارها بیشتر در شرایط تنش خشکی طغیان می‌کنند (Huberty & Denno, 2004) که این خود دلیلی بر ارتباط آنها با قارچ‌های بیماری‌زا و نقش آنها در توزیع قارچ‌ها می‌باشد که البته طغیان سوسک‌ها و قارچ‌ها هردو متأثر از شرایط خشکی و خشکسالی است در این زمینه در سطح جنگل‌های استان ایلام تاکنون مطالعاتی انجام نشده و یا به ندرت انجام شده است لذا به تحقیق گسترده‌تر در مورد عامل یا عوامل ایجادکننده ضعف و خشکیدگی درختان بلوط در این استان از جنبه بیماری‌های گیاهی نیاز است. این تحقیق با هدف بررسی و نمونه‌برداری سطوح وسیعی از جنگل‌های استان ایلام، شناسایی عوامل قارچی دخیل و رفتار بیماری‌زایی آنها انجام شد.

مواد و روش‌ها

موقعیت جغرافیایی مناطق مورد مطالعه

برای بررسی و شناسایی عوامل ایجادکننده بیماری زغالی بلوط، از مناطق جنگلی مختلف سطح استان ایلام که دارای علائم خشکیدگی و زوال بودند، بازدید و نمونه‌برداری انجام گرفت. این مناطق به شرح جدول ۱ انتخاب شد که بیشتر در شهرستان‌های ایلام، ایوان، سیروان، مهران، ملکشاهی و دهلران قرار داشتند.

نمونه‌برداری و شناسایی عوامل بیماری‌زا

نمونه‌ها پس از قراردادن در پاکت‌های کاغذی با درج تاریخ و محل جمع‌آوری به آزمایشگاه انتقال یافت. نمونه‌های آلوده پس از ضدعفونی سطحی توسط هیپوکلریت سدیم نیم درصد و سه بار شستشو در آب مقطر سترون، در محیط کشت‌های سیب‌زمینی دکستروز آگار (PDA) و مالت

Archive of SID

www.SID.ir

آگار (MA) کشت شد. عوامل قارچی به‌دست آمده به روش‌های نوک ریسه و تک اسپور، خالص‌سازی شد و براساس مشخصات مورفولوژیکی و با استفاده از کلیدهای معتبر شناسایی قارچ‌ها از جمله کلید قارچ‌های ناقص (Minasian & Alizadeh, 1989)، کلید مصور قارچ‌شناسی (آسکومیست‌ها)، (Falahati-Rasegar, 1990)، کلید جنس *Biscogniauxia* spp. (Ju *et al*., 1998; Ju & Rogers, 2001)، کلید برخی از جنس‌های خانواده Xylariaceae (Raei *et al*., 2014) و کلید گونه‌های جنس‌های *Biscogniauxia* spp. و *Obolarina* spp. در اروپای مرکزی (Pouzar, 1986) شناسایی گردید.

اثبات بیماری‌زایی

در این مرحله با استفاده از روش Vannini و Scarascia Mugnozza (۱۹۹۱) اقدام به اثبات بیماری‌زایی قارچ‌های شناسایی شده روی نهال‌های دو ساله بلوط ایرانی گردید. بدین منظور نهال‌های دو ساله بلوط ایرانی تهیه و در فاصله ۱۰ سانتی‌متر بالاتر از سطح خاک گلدان، در ساقه آنها زخم‌هایی به طول شش میلی‌متر ایجاد شد. سپس برای مایه‌زنی محل زخم ساقه، یک برش از کشت یک‌هفته‌ای قارچ‌های عامل بیماری روی محیط کشت PDA با استفاده از چوب‌پنبه سوراخ‌کن (Cork Borer) تهیه گردید. تیمار شاهد نیز با ایجاد زخم روی برخی نهال‌ها با مایه‌زنی محیط کشت PDA بدون قارچ انجام شد. پس از قراردادن قارچ در محل زخم ساقه، محل زخم با قطعه‌ای پنبه سترون و پارافیلم (Parafilm grafting tape) پوشانیده شد. رطوبت محل زخم به‌صورت روزانه با آب مقطر سترون تأمین گردید و در محل سایه‌روشن با دمای متوسط ۱±۲۲ درجه سلسیوس نگه‌داری شد. پس از گذشت دو ماه، پیشرفت زخم بررسی و از محل‌های مایه‌زنی شده نمونه تهیه شد. پس از ضدعفونی سطحی نمونه‌ها با هیپوکلریت سدیم نیم درصد، در محیط کشت عصاره سیب‌زمینی دکستروز آگار (PDA) کشت شدند و وجود و یا عدم وجود مرحله میتوسپوریک (Mitosporic fungi) قارچ‌های عامل بیماری در نمونه‌ها بررسی گردید.

بررسی رفتار بیماری‌زایی عوامل قارچی

پس از گذشت مدت نه ماه از زمان مایه‌زنی، برش‌های منظمی از محل تیمار شده ساقه به‌وسیله دستگاه میکروتوم تهیه شد. نمونه‌های تهیه شده به مدت ۴۰-۵۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم پنج درصد قرار داده شدند. آنگاه به مدت یک تا دو دقیقه با آب مقطر سترون شستشو گردیدند. سپس به مدت دو دقیقه در محلول رنگ‌آمیزی سافرانین قرار داده شدند. پس از شستشوی مجدد نمونه‌ها با آب مقطر سترون، به مدت ۱۰ دقیقه در محلول‌های الکل ۴۵، ۷۵ و ۹۶ درصد قرار داده شدند. در نهایت نمونه‌ها به مدت دو تا سه دقیقه در محلول گزیلول قرار داده شده و پس از خارج کردن آنها وجود یا عدم وجود ریسه قارچ در بافت نمونه‌ها با میکروسکوپ بررسی شد. به‌علاوه برش عرضی از ساقه نهال‌های مورد آزمایش در محل مشاهده علائم بیماری تهیه شد و نحوه نفوذ و رخنه قارچ عامل بیماری از قسمت پوست ساقه به سمت قسمت‌های داخلی و بافت چوبی ساقه بررسی شد.

نتایج

شناسایی قارچ‌های عامل بیماری

پس از انجام بازدیدهای متعدد از جنگل‌های استان ایلام، دو عامل بیماری‌زا از درختان بلوط دارای علائم بیماری زغالی شامل *B. mediterranea* و *O. persica* جدا و شناسایی شد. طبق نتایج حاصل از شناسایی نمونه‌های جمع‌آوری شده، چگونگی پراکنش جغرافیایی قارچ‌های بیماری‌زا و همراهی آن با حشرات چوب‌خوار مشخص گردید (جدول۱).

Archive of SID
www.SID.ir

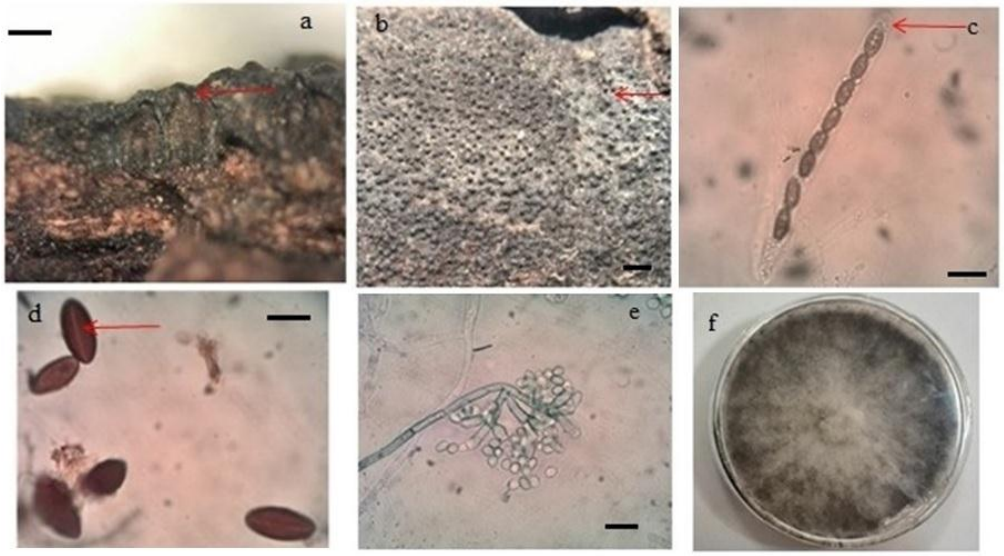
جدول۱- وضعیت پراکنش قارچ‌های بیماری‌زا در جنگل‌های استان ایلام

محل	شهرستان	*Biscogniauxia mediterranea*	*Obolarina persica*	همراهی با خسارت چوب‌خوارها
زرین آباد	دهلران	+	−	+
میمه	دهلران	−	+	+
گل گل	ملکشاهی	+	−	+
چغاسبز	ایلام	+	+	+
مله سیاه	ایلام	−	+	+
توه هَل	مهران	−	+	+
مانشت	سیروان	−	+	+
مله‌پنجاب	بدره	−	+	+
گردنه رنو	ایوان	+	−	+

مشخصات مرفولوژیکی قارچ‌های بیماری‌زا

۱- ***B. mediterranea***

این قارچ دارای استرومای نامسطح، سیاه، در اندازه متغیر، دارای ضخامت ۱-۰/۷ mm و بلافاصله در زیر سطح و در بین آن پریتیس‌ها قرار دارند. پریتیس‌ها استوانه‌ای و تخم‌مرغی شکل و دارای ۰/۱۸ mm-۰/۱۵ قطر و ۰/۵۶ mm- ۰/۵۱ طول می‌باشند. دهانه پریتیس بالاتر از سطح استروما قرار دارد. آسک استوانه‌ای شکل، دارای ۸ اسپور، ۱۷۴-۱۲۰×۱۲-۸ µm و دارای دهانه آمیلوئیدی می‌باشد. آسکوسپور قهوه‌ای روشن تا قهوه‌ای تیره، تک‌سلولی، بیضوی شکل، دارای ابعاد ۱۶ µm- ۱۲/۸×۷/۲-۵/۶ ، در دو انتها گرد و دارای خط تندش صاف بود (شکل ۱).



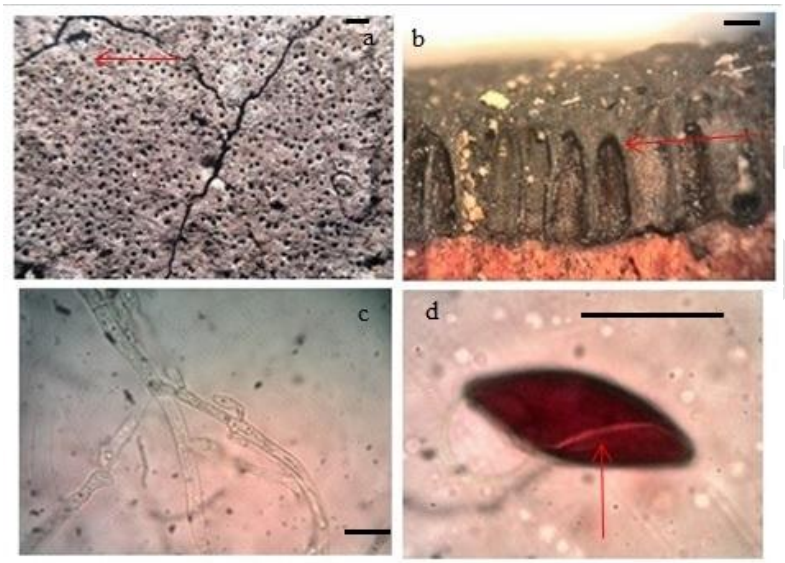
شکل ۱- مرفولوژی قارچ ***Biscogniauxia mediterranea*** **a**- نمای جانبی آسکوکارپ و دهانه آن **(Bar=200µm) b**- نمای سطحی استروما و دهانه برجسته آسکوکارپ **(Bar=500µm) c**-اسپور های ردیفی داخل آسک **(Bar=20µm) d**- اسپور به همراه خط تندش **(Bar=10µm) e**- نمای میکروسکوپی قارچ **(Bar=20µm) f**- منظره رویش ۱۴ روزه در محیط **PDA**

Archive of SID

www.SID.ir

۲- ***Obolarina persica***

این قارچ دارای استرومای نامسطح، سیاه، در اندازه متغیر، دارای ضخامت ۱ mm، سیاه و بلافاصله در زیر سطح و در بین آن پریتیس‌ها قرار دارند. آسکوکارپ استوانه‌ای شکل و دارای ۰/۱–۰/۵ mm قطر و ۱ mm طول می‌باشند. دهانه پریتیس پایین‌تر از سطح استروما قرار دارد. آسکوسپور قهوه‌ای روشن تا قهوه‌ای تیره، تک‌سلولی، بیضوی شکل، دارای ابعاد ۱۶–۱۲/۸×۷/۲–۵/۶ µm، در دو انتها نوک‌تیز و دارای خط تندش مورب و اس (S) شکل بوده که به دور بدنه اسپور ادامه یافته است (شکل ۲).



شکل ۲– مرفولوژی قارچ *Obolarina persica* a– نمای سطحی استروما و دهانه فرورفته پریتیس (Bar=200µm) 2b– نمای جانبی پریتیس و دهانه آن (Bar=500µm) c– نمای میکروسکوپی قارچ (Bar=20µm) d– اسپور به همراه خط تندش (Bar=20µm)

اثبات بیماری‌زایی

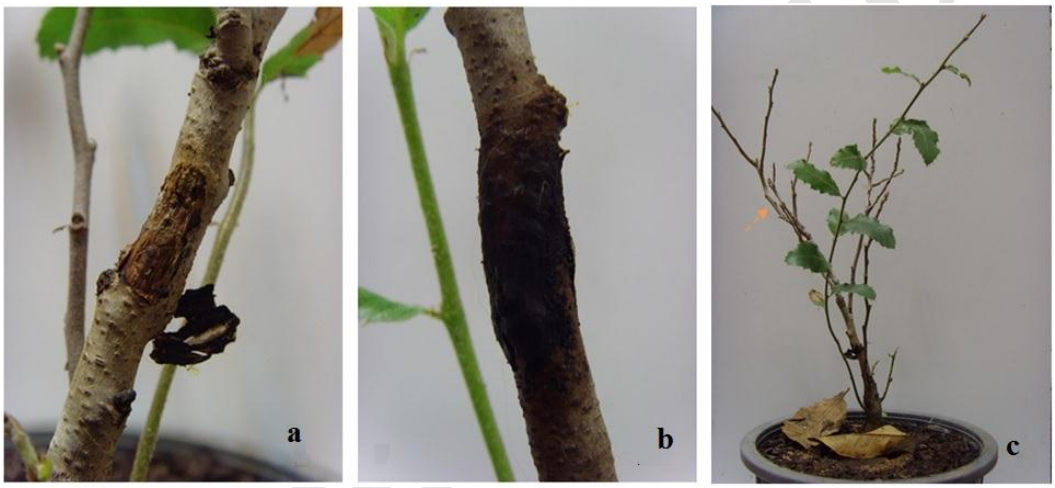
بعد از گذشت مدت دو ماه از زمان مایه‌زنی نهال‌ها، علائم پژمردگی و سپس خشکیدگی در شاخه‌های واقع در قسمت‌های بالاتر از محل تیمار شده (شکل ۳–a وc) با هر دو قارچ *B. mediterranea* و *O. persica.* و همچنین علائم بافت‌مردگی در پوست و بافت چوبی محل و اطراف محل تیمار شده مشاهده گردید (شکل ۴–a وb). در تیمار شاهد علائم نکروز، پژمردگی و خشکیدگی مشاهده نشد (شکل ۳–b). پس از نمونه‌برداری دوباره از محل مایه‌زنی شده ساقه نهال‌های مورد آزمایش و کشت آنها در محیط کشت PDA، مرحله میتوسپوریک قارچ عامل بیماری مشاهده گردید.

بررسی رفتار بیماری‌زایی قارچ‌های عامل بیماری‌زا

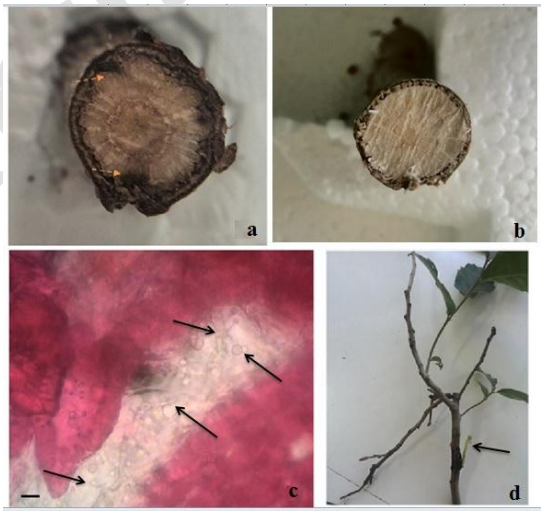
پس از گذشت حدود نه ماه از زمان مایه‌زنی، در فصل رویش جدید، نهال‌های آزمایشی دوباره بررسی شدند در برش‌های عرضی ساقه آن‌ها، تغییر رنگ در قسمت‌های پوست و برون‌چوب از حاشیه به سمت مرکز دیده شد. نفوذ ریسه‌های قارچ در محل آوندهای آبکش و چوب و بافت اطراف آنها نیز مشاهده گردید (شکل ۵–a). در صورتی‌که این علائم در برش عرضی ساقه نهال شاهد دیده نشد (شکل ۵–b). همچنین در برش‌های میکروسکوپی تهیه‌شده به‌وسیله دستگاه میکروتوم، ریسه قارچ در داخل بافت نهال‌های آلوده مشاهده گردید (شکل ۵–c). جالب توجه است که در یکی از نهال‌های مایه‌زنی شده با قارچ *B. mediterranea* علائم مقاومت گیاه به‌صورت ظهور شاخه جدید فرعی از قسمت زیر محل مایه‌زنی شده مشاهده شد (شکل ۵–d).

Archive of SID
www.SID.ir

شکل ۳- اثبات بیماری‌زایی روی نهال‌های ***Q. brantii*** a- ***B. mediterranea*** b- شاهد c- ***O. persica***



شکل ۴- a- علائم پیشرفت بیماری و بافت‌مردگی روی پوست، b- بافت‌مردگی بافت چوبی c- خشکیدگی اندام‌های بالاتر از قسمت تیمار شده



شکل ۵- a-پیشرفت تغییر رنگ آوندی از حاشیه به سمت مرکز b- شاهد c- هیف‌های قارچ ***B. mediterranea***

داخل بافت ساقه d (Bar=20µm) – ظهور شاخه جدید فرعی پایین‌تر از قسمت تیمار شده نهال ***Q. brantii***

www.SID.ir

بحث

بیماری زغالی نقش مهمی در پدیده مرگ و میر درختان جنگلی دارد و محققین متعددی در نتایج تحقیقات خود به این نتیجه رسیده‌اند (Mirabolfathy, 2013a; Mirabolfathy *et al.*, 2016). در تحقیق حاضر مشخص شد که دو عامل مولد بیماری زغالی بر روی درختان بلوط دچار خشکیدگی در سطح جنگل‌های استان ایلام *B. mediterranea* و *O. persica* هستند.

در بازدیدهای به عمل آمده از مناطق جنگلی مشاهده شد که بیماری زغالی بیشتر روی درختان بلوط خشکیده یا درحال خشکیدن وجود داشت و به نظر رسید که این بیماری در پژمردگی و خشکیدن آنها مؤثر باشد. درک این مطلب از طریق انجام آزمایش روی نهال‌های دوساله بلوط محقق شد. چرا که نتایج این بررسی نشان داد که نهال‌های آلوده شده به قارچ‌های مولد بیماری زغالی پس از حدود دو ماه علائم پژمردگی و پس از آن خشکیدگی و ریزش برگ‌ها و خشکیدگی اندام‌های بالاتر از محل مایه‌زنی را نشان دادند. براین اساس می‌توان گفت که این قارچ‌ها اثر مشهودی در ضعف و پژمردگی تاج و حتی در غالب موارد مرگ درختان بلوط ایرانی دارند، که این یافته با گزارش‌های Mirabolfathy و دیگران (۲۰۱۱،۲۰۱۶) و Mirabolfathy (a2013) مطابقت دارد. نتایج تحقیقات برخی محققین (Vannini & Scarascia Mugnozza, 1991; Franceschini *et al.*, 2004; Safaee *et al.*, 2016) نیز ضمن تأیید این یافته نشان داده است که عوامل ایجادکننده بیماری زغالی در شرایط ضعف درخت قادر به از بین‌بردن و مرگ قسمت‌های آلوده بالاتر از محل ایجاد اندام زایشی هستند که این مهم در بازدیدهای صحرایی در این پژوهش روی درختان بلوط آلوده مشاهده شد.

در برش‌های عرضی صورت گرفته از قسمت مایه‌زنی شده نهال‌ها با قارچ *B. mediterranea* مشخص شد که به‌غیراز محل مایه‌زنی شده، در نواحی دیگر ساقه نیز علائم رخنه و پیشرفت اندام قارچی به سمت داخل چوب وجود دارد که علاوه بر مطابقت با مشاهده‌های Vannini و Scarascia Mugnozza (۱۹۹۱)، نحوه رفتار قارچ *B. mediterranea* را نیز تا حدودی روشن می‌نماید. با توجه به مشاهدات انجام‌گرفته، احتمالاً قارچ به بافت‌های اطراف محل تیمار شده ساقه نهال و سپس به آوندها رخنه کرده و موجب قطع جریان آوندی و پژمردگی سریع اندام‌های فوقانی نهال شده و این پدیده موجب فعال شدن جوانه‌های موجود در قسمت پایین‌تر از محل مایه‌زنی می‌گردد. چرا که پس از گذشت حدود نه ماه از زمان مایه‌زنی، مشاهده گردید که شاخه فرعی در قسمت زیر محل تیمار شده نهال‌های مورد آزمایش به وجود آمد. جالب توجه است که در درختان آلوده سطح جنگل که دارای خشکیدگی شدید تاجی و یا حتی تنه‌ای بودند، شاخه‌ها یا جست‌هایی در قسمت‌های تحتانی و پایین‌تر از محل‌های آلودگی به بیماری زغالی ایجاد شده که گواهی بر مطلب فوق می باشد و به نظر می‌رسد که پدیده یکسانی در نهال‌ها و دیگر درختان آلوده اتفاق می‌افتد. البته این پدیده در نهال‌های تیمار شده با قارچ *O. persica* مشاهده نگردید که نشان‌دهنده تفاوت در نحوه رفتار بیماری‌زایی این دو عامل قارچی می‌باشد.

در مشاهدات انجام گرفته از درختان آلوده که دارای استرومای بالغ و تکامل‌یافته بودند (شکل ۶- a، b وc)، پس از جدا نمودن پوست اطراف استروما تا فاصله ۲۰-۱۵ سانتی‌متری از حاشیه استروما علائم خسارت و پیشرفت قارچ عامل بیماری به‌وضوح مشاهده گردید، که این امر با نتایج حاصل‌از نهال‌های آزمایشی همخوانی دارد. در مشاهداتی دیگر از درختان آلوده که هنوز استرومای قارچی در محل مورد نظر تشکیل نگردیده و یا در حال تشکیل بود، اما آثار خسارت و علائم بیماری قابل‌مشاهده بود، تجمع آب در قسمت‌های به نسبت پایین‌تر و یا در اطراف ناحیه آلوده دیده شد که احتمالاً به دلیل کندی یا قطع جریان شیره نباتی و وارد شدن خسارت به آوندهای چوب و بافت اطراف آن و نشت شیره خام می‌باشد و گاهی نیز با بروز علائم ایجاد ترک و نشت مایع در پوست تنه درخت همراه می‌شود. در صورت آلودگی در محل تنه، چنانچه استرومای

Archive of SID
www.SID.ir

سیاه‌رنگ قارچ در یک طرف تنه درخت ایجاد گردد (شکل ۶-d)، کلیه اندام‌های بالاتر از محل آلودگی و حتی تا قسمت بالایی تاج که مسیر جریان آوندی آنها با قسمت آلوده مرتبط می‌باشد، دچار پژمردگی و در نهایت پس از یک سال دچار خشکیدگی می‌شوند و حالت پژمردگی یک‌طرفه در نمای ظاهری درخت به‌آسانی قابل مشاهده می‌باشد که گاهی در اواخر فصل رویش، پژمردگی سریع و بدون ریختن برگ‌ها اتفاق می‌افتد و پس از فصل خزان در مقایسه با درختان سالم که به موقع خزان نموده‌اند، به‌خوبی قابل‌مشاهده می‌باشد. این پدیده نیز خود گواهی بر توسعه سریع هیف قارچ در قسمت‌های آوندی و مسدود شدن آنها می‌باشد.

قارچ‌های عامل بیماری زغالی دارای فاز اندوفیتی می‌باشند (Collado *et al.*, 2001; Mazzaglia *et al.*, 2001; Franceschini *et al.*, 2004; Vannini *et al.*, 2009; Pazoutova *et al.*, 2010). تحقیقات نشان داده است که قارچ‌های اندوفیت معمولاً در زمان خشکی هوا و نیز در زمانی که بافت گیاه دچار کمبود آب و مواد غذایی می‌باشد، از رطوبت و مواد غذایی اندک میان بافتی استفاده کرده و براساس شیب غلظت، سبب نشت بیشتر مواد غذایی در فضای میان سلول‌ها می‌شوند و بدین‌صورت به حیات خویش ادامه می‌دهند و تا زمانی که سلامت گیاه برقرار باشد، در حالت اندوفیتی باقی خواهند ماند (Bony *et al.*, 2001). فعالیت قارچ‌های عامل بیماری زغالی در شرایط کاهش میزان نزولات آسمانی و افزایش گرما و کمبود رطوبت هوا و خاک ناشی از آن، افزایش یافته، طغیان کرده و ایجاد خسارت می‌کنند (Vannini *et al.*, 1996; Vannini & Valentini, 1994). البته سوسک‌های چوب‌خوار در انتشار بیماری زغالی و انتقال قارچ‌ها نقش دارند (Franceschini *et al.*, 2004). جالب توجه است که فعالیت و طغیان سوسک‌های چوب‌خوار و قارچ‌های عامل بیماری زغالی در شرایط خشکی و گرمای هوا تشدید می‌شود که این امر بیانگر نقش عوامل اقلیمی در حضور و فعالیت آنها است (Jozeyan *et al.*, 2016; Mirabolfathy, 2013a; Mirabolfathy *et al.*, 2016). همچنین در خشکیدگی‌های درختی اخیر و به دنبال خشکسالی‌های شدید آثار این دو عامل بر روی اکثر درختان سرخشکیده یا خشکیده مشاهده و گزارش شده است (Hosseini *et al.*, 2012; Mirabolfathy, 2013a; Mirabolfathy *et al.*, 2016; jozeyan *et al.*, 2016). هم‌زمانی خسارت قارچ‌های عامل بیماری زغالی و سوسک‌های چوب‌خوار و نیز مشاهده حضور هم‌زمان آنها در درختان آلوده و اثبات وجود قارچ‌های عامل بیماری در دهانه سوراخ‌های خروجی و درون دالان‌های ایجاد شده آنها (Jozeyan *et al.*, 2016) می‌تواند گویای ارتباط دو عامل نام‌برده با خشکیدگی تاج و تنه درختان بلوط باشد.

شکل۶: a، b و c- شانکر زغالی روی تنه و شاخه درخت بلوط d- خشکیدگی یک‌طرفه درخت

Archive of SID

www.SID.ir

سپاسگزاری

از کلیه همکاران در مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی ایلام به‌خاطر یاری در اجرای تحقیق و از کلیه اساتید و کارکنان گروه‌های گیاه‌پزشکی و مهندسی چوب و کاغذ دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان برای ارائه راهنمایی‌های ارزنده و نیز استفاده از تجهیزات آزمایشگاه و عکس‌برداری میکروسکوپی قدردانی به‌عمل می‌آید.

References

- Ashrafi, J., Beigi, S. and Bahmani, Z. 2012. Outbreak of oak Charcoal disease in Ilam. The community of Iran forestry, National Conference on Zagros forests, challenges, threats and opportunities, Shiraz, Iran (In Persian).
- Babaie-Kafaie, S. 2004. Forests and rangelands role in absorbing greenhouse gas emissions and offer ways to reduce emissions. The third regional conference and the first International Conference on Climate Change, Isfahan, 323-328.
- Bony, S., Pichon, N., Ravel, C., Durix, A., Balfourier, F. and Guillaumin, J.J. 2001. The relationship between mycotoxin synthesis and isolate morphology in fungal endophytes of *Lolium perenne*. New Phytologist, 152:125.
- Collado, J., Platas, G. and Palaez, F. 2001. Identification of an endophytic *Nodulosporium* sp. from *Quercus ilex* in central Spain as the anamorph of *Biscogniauxia mediterrane*a by rDNA sequence analysis and effect of different ecological factors on distribution of the fungus. Mycologia, 93:886-875.
- Falahati-Rasegar, M. 1990. Illustrated key Mycology (Ascomycetes). Mashhad Press, Mashhad, 263p (In Persian).
- Franceschini, A., Linaldeddu, B.T., Pisanu, P. and Pisanu, S. 2004. Effects of water stress on endophytic incidence of *Biscogniauxia mediterranea* in cork oak trees. Journal of Plant Pathology, 86(4): 319-320.
- Ghanbary, E., Tabari Kouchaksaraei, M., Mirabolfathy, M., Modarres Sanavi, S.M.A., and Rahaei, M. 2017. Growth and physiological responses of *Quercus brantii* seedlings inoculated with *Biscogniauxia mediterranea* and *Obolarina persica* under drought stress. Forest Pathology, 48: DOI: 10.1111/efp.12353.
- Hosseini, A. 2011. Infestation of forest trees to the borer beetle and its relation to habitat conditions in the Persian oak (*Quercus brantii)* in Ilam province. Iranian Journal of Forests and Rangelands Protection Research, 9(1): 53-66 (In Persian).
- Hosseini, A., Hosseini, S.M., Rahmani, A. and Azadfar, D. 2012. Effect of tree mortality on structure of Brant's oak (Quercus brantii) forests of Ilam province of Iran. Iranian Journal of Forest and Poplar Research. 20(4): 565-577 (In Persian).
- Huberty, A.F. and Denno, R.F. 2004. Plant water stress and its consequences for herbivorous insects: a new synthesis. Ecology, 85: 1383–1398.
- Jose, M., Jose, C., Teresa, B. and Daniel, P. 2005. The relationship between *Cerambyx* spp damage and subsequent *Biscogniauxia mediterranum* infection on *Quercus suber* forests. Forest Ecology and Management, 216: 166–174.
- Jozeyan, A., Vafaei.Shoshtari, R. and Askari, H. 2016. Investigation of Oak Woodpecker Beetles and Their Natural Enemies in the Forests of Ilam Province. Iranian Journal of Forest and Range Protection Rsearch, 14: 107-121 (In Persian).
- Ju, Y.M., Rogers, J.D., Martin, F.S. and Granmo, A. 1998. The Genus *Biscogniauxia*. Mycotaxon, LXVI, 1-98.
- Ju, Y.M. and Rogers, J.D. 2001. New and interesting *Biscogniauxia* taxa, with a key to the world species. Mycological Research, 105(9): 1123-1133.
- Jurc, D. and Ogris, N. 2006. First reported outbreak of charcoal disease caused by *Biscogniauxia mediterranea* on Turkey oak in Slovenia. Plant Pathology, 55: 299.
- Martin, J., Cabezas, J., Buyolo, T. and Pato´n, D. 2005. The relationship between *Cerambyx* spp. damage and subsequent *Biscogniauxia mediterranea* infection on *Quercus suber* forests. Forest Ecology and Management, 216: 166–174.
- Mazzaglia, A., Anselmi, N., Gasbarr, A. and Vannini, A. 2001. Development of a Polymerase Chain Reaction (PCR) assay for the specific detection of *Biscogniauxia mediterranea* living as an endophyte in oak tissues. Mycological Reearchs, 105(8): 952-956.
- Minasian, V. and Alizadeh, A. 1989. Imperfect fungi. Shahid Chamran Press, Ahvaz, 457p (In Persian).
- Mirabolfathy, M., Groenewald , J.Z. and Crous, P.W. 2011. The Occurrence of Charcoal Disease Caused by *Biscogniauxia mediterranea* on Chestnut- Leaved Oak (*Quercus castaneifolia*) in the Golestan Forests of Iran. Plant Disease, 95(7): 876.
- Mirabolfathy, M. 2013a. Outbreak of charcoal disease on *Quercus* spp and *Zelkova carpinifolia* trees through Zagros and Alborz montains forests in Iran, Iran Journal of Plant Pathology, 49: 257- 263 (In Persian).

Archive of SID

www.SID.ir

querce in Italia. Monti e Boschi, 49: 25-28.

–Safaee, D., Khodaparast, S.A., Mirabolfathy, M. and Mousanejad, S. 2016. A multiplex PCR-based technique for identification of *Biscogniauxia mediterranea* and *Obolarina persica* causing charcoal disease of oak trees in Zagros forests. Forest pathology, 47(3) DOI: 10.1111/efp.12330.

-Vannini, A., Lucero, G., Anselmi, N. and Vettraino, A.M. 2009. Response of endophytic *Biscogniauxia mediterranea* to variation in leaf water potential of *Quercus cerris*. Forest Pathology, 39: 8–14.

-Vannini, A., Luisi, N. and Valentini, R. 1996. Impact of drought and *Hypoxylon mediterraneum* on oak decline in the Mediterranean region. Annals of Forest Science, 53: 753–760.

-Vannini, A. and Scarascia Mugnozza, G. 1991. Water stress: a predisposing factor in the pathogenesis of *Hypoxylon mediterraneum* on *Quercus cerris*. European Journal of Forest Pathology, 21: 193–201.

-Vannini, A. and Valentini, R. 1994. Influence of water relations in *Quercus cerris* –*Hypoxylon mediterraneum* interaction: a model of drought induced susceptibility to a weakness parasite. Tree Physiology, 14: 129–139.

–Mirabolfathy, M., Ju, Y., Hsieh, H. and Rogers, J.D. 2013b. *Obolarina persica* sp. nov., associated with dying Quercus in Iran. Mycoscience, 54(5): 315-320.

–Mirabolfathy, M., Ashrafi, J., Azadbakht, N., Nasrolahi, M., Safaee, D., Arjomandian, A. and Keshavarz, K. 2016. The study on epidemiology of oak charcoal disease throughout west forest of Iran and the possibility of its control using useful methods in pilot Agricultural, Research, Education and Extension Organization. Final report of research project, No 50114, 128P (In Persian).

-Pazoutova, S., Srutka, P., Holusa, J., Chudickova, M. and Kolarik, M. 2010. The phylogenetic position of *Obolarina dryop*hila (Xylariales). Mycological Progress, 9:501–507.

-Pouzar, Z. 1986. A key and conspectus of Central European species of Biscogniauxia and Obolarina (Pyrenomycetes). Ceska Mykologi, 40: 1-10.

– Raei, S., Khodaparast, S.A. and Abasi, M. 2014. More records of Xylariaceous fungi from North of Iran. Rostaniha, 15: 110-121 (In Persian).

-Ragazzi, A. and Tiberi, R. 1998. Ruolo degli insetti fitofagi e dei patogeni fungini nel deperimento delle

Archive of SID

www.SID.ir

Investigation on oak charcoal disease in dieback affected forests of Ilam province

J. Ashrafi[1*], A. Hosseini[2], J. Hosseinzadeh[2] and M. Mirabolfathi[3]

1*- Corresponding author, Research Center of Agriculture and Natural Resource of Ilam, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Ilam, Iran E-mail: ashrafi795@yahoo.com
2- Research Center of Agriculture and Natural Resource of Ilam, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Ilam, Iran
3-Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

Received: 31/05/2017 Accepted: 02/03/2018

Abstract

In recent years, widespread tree dieback simultaneously with charcoal oak disease have occurred in Zagros forest especially in Ilam province. They dramatically caused damage to oak trees. This research was carried out to identify pathogenic fungi, to prove the pathogenicity and to investigate their pathogenic behavior during 2012-2015 in the forests of Ilam province. After several field observations across the forests of Ilam province, several samples were collected from infected parts of Persian Oak trees and transferred to the laboratory. Then, the samples were cultured to screen the pathogenic agents identified using morphological traits and validated by fungi keys. In order to prove the pathogenicity of the identified fungi, they were inoculated on two-year-old oak seedlings. In the final stage, the pathogenic behavior of fungi was studied. The results showed that fungi causing charcoal diseases in the forests of Ilam province were *Biscogniauxia mediterranea* and *Obolarina persica*. Furthermore, the fungi caused the disease on oak seedlings with dieback symptoms on the sections areas above the inoculum site. The study of the pathogenicity behavior of these fungi showed that their contamination began from inoculation site and developed in the wood, in addition to longitudinal extension, the hyphae colonized in transverse and radial directions towards the heartwood, so that it affects the xylem and phloem vessels. Considering the pathogenicity prove of these fungi and their contribution to the weakness and dieback of Persian oak trees, it would be possible to reduce the oak losses by eradicating the dead trees to prevent fungal spore spreading in the region.

Key words: Charcoal Disease, Ilam forests, oak decline.

Archive of SID

www.SID.ir