Archive of SID

پژوهش‌های کاربردی در گیاه‌پزشکی ۹ (۳): ۵۷-۴۷ (۱۳۹۹)

شناسایی عوامل قارچی همراه با سرخشکیدگی و زوال درختان اقاقیا 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 و ۲] به ترتیب دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی (✉mdavari@uma.ac.ir) و پژوهشگر (کارشناس ارشد)، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی. [۳] پژوهشگر پسادکتری، 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، اقاقیا، افرا، نارون و نخل‌های زینتی را همواره تهدید می‌کند. در تحقیق حاضر، به منظور شناسایی قارچ‌های همراه زوال درختان اقاقیا در شهر اردبیل، از درختان اقاقیای 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*، *Camarosporidiella elongata*، *Nigrospora* sp.، *Epicoccum nigrum*، *Alternaria alternata*، *Chaetomium* sp. و *Sordaria macrospora* شناسایی شدند. به نظر می‌رسد که قارچ‌های *Camarosporidiella elongata* و *Cytospora chrysosperma* و گونه‌های قارچی *F. oxysporum* و *F. solani* می‌توانند در انسداد آوندی، سرخشکیدگی و در نهایت زوال درختان اقاقیای فضای سبز شهر اردبیل دخیل باشند. این تحقیق، اولین مطالعه علمی زوال درختان اقاقیا در ایران محسوب می‌شود. همچنین قارچ *Ca. elongata* برای اولین بار از ایران گزارش می‌شود و گزارش قارچ‌های *Acremonium* sp. و *S. macrospora* از اقاقیا نیز برای دنیا جدید است.

کلمات کلیدی: سرخشکیدگی، زوال اقاقیا، 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 Mahdi[1] ID ✉, Alihosseinzadeh-Moghaddam Fathemeh[2], Narmani Abolfazl[3]

[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. [3]Post 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.

www.SID.ir

Archive of SID

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 اقاقیا (*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) اقاقیا 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 اقاقیا گزارش شده است. به‌عنوان مثال، گونه‌های *F. oxysporum* Schltdl و *F. solani* به‌عنوان عامل ایجاد شانکر اقاقیای سیاه در چین معرفی شده است (Hong & Ji 1996). همچنین شیوع *F. lateritium* Nees. و *F. sulphureum* روی اقاقیای سیاه در مجارستان گزارش شده است (Halász 2002). برخی گونه‌های فوزاریوم از جمله *F. acuminatum* Ellis & Everth.، *F. oxysporum* (Matsush.) Nirenberg و *F. proliferatum* Schwabe *F. graminearum* به عنوان عامل شانکر و پژمردگی برخی گونه‌های جنس *Acacia* که با *Robinia* در یک خانواده (Fabaceae) قرار می‌گیرند، شناخته شده‌اند (James 2004, 2005). در سال ۱۹۸۹ قارچ *Ceratocystis albifundus* M.J. Wingf., De Beer & M.J. Morris به عنوان 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 *C. 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 اقاقیای سیاه (*R. pseudoacacia*) مبتلا به سرخشکیدگی و نکروز، سه قارچ *Phomopsis oncostoma* (Thüm.) Traverso، *Aglaospora profusa* (Fr.) De Not. و *Cucurbitaria elongate* (Fr.) Grev. جداسازی و اثبات بیماری‌زایی شد (Michalopoulos-Skarmoutsos & Skarmoutsos 1999).

گونه *Cytospora chrysosperma* (Pers.) Fr. به عنوان 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 Baghery *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 *Nattrassia mangiferae* (Syd. & P. Syd.) B. Sutton & Dyko و چند جدایه از *Cytospora* روی شاخه بریده بیماری‌زایی نشان دادند.

در چند سال اخیر، درختان اقاقیای 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 اقاقیا 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 اقاقیای 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 اقاقیا به ویژه 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

www.SID.ir

Archive of SID

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 محیط‌های کشت سیب‌زمینی دکستروزآگار (PDA, Merck, Germany)، عصاره مالت آگار (MEA, Merck, Germany) و محیط کشت نیمه‌انتخابی اصلاح شده نش و اسنایدر (Nash-Snyder medium) کشت داده شدند. تشتک‌های 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، تشتک‌های پتری به‌طور روزانه مورد بررسی قرار گرفتند و در صورت مشاهده رشد قارچ در اطراف قطعات کشت شده، از خارجی‌ترین قسمت پرگنه، مقداری از قارچ به همراه محیط کشت با اسکالپل سترون برداشته و به محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار جدید منتقل شدند. خالص‌سازی جدایه‌ها با روش تک‌اسپور کردن انجام گرفت. به منظور مطالعه ریخت‌شناختی جدایه‌های جنس *Fusarium* از محیط کشت آگار تغذیه‌ای سنتزی (Synthetic Nutrient-poor Agar) و محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار (Seifert 1996) استفاده شد و از طریق مقایسه مشخصات ریخت‌شناختی با استفاده از کلیدهای تشخیص معتبر ارایه شده توسط Gerlach & Nirenberg (1982)، Nelson *et al.* (1983) و Leslie & Summerell (2006) مورد شناسایی اولیه قرار گرفتند. سایر قارچ‌ها با استفاده از خصوصیات ریخت‌شناختی و کلیدهای شناسایی معتبر از جمله Barnett & Hunter (1998)، Boerema *et al.* (2004) و Simmons (2007) بررسی و شناسایی شدند و عکس‌برداری با استفاده از میکروسکوپ مدل Ziess و دوربین Canon انجام شد. کلیه جدایه‌ها در کلکسیون قارچ‌شناسی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه محقق اردبیلی با کد اختصاری FCUMA (Fungal Collection of University of Mohahegh Ardabili) ثبت و نگهداری شدند.

استخراج و تکثیر DNA ژنومی جدایه‌ها و توالی‌یابی

در مورد برخی گونه‌های قارچی، جهت شناسایی مولکولی از توالی‌یابی DNA استفاده شد. برای این منظور، جدایه‌های مورد نظر در محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار کشت داده شدند و به مدت ۱۰-۷ روز در دمای ۲۵°C نگهداری شدند و DNA جدایه‌ها 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، بخش‌هایی از دو ناحیه ژنومی شامل ژن عامل تداوم ترجمه (*TEF-1α*) و ناحیه فاصله‌انداز داخلی DNA ریبوزومی (ITS -rDNA) به ترتیب در جدایه‌های منتخب متعلق به *Fusarium* و سایر قارچها تکثیر شد. تکثیر و توالی‌یابی 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 ('5TCCGTAGTTGGACCTGCGG3') و ITS4 ('5TCCTCCGCTTATTGATATGC3') (White *et al.* 1990; Chung *et al.* 2008) انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز 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 توالی‌یابی با استفاده از کیت توالی‌یابی (Applied ABI prism BigDye^{TM} terminator cycle Biosystems, Foster City, USA) و در یک توالی‌یاب اتوماتیک ABI 3730XL و مطابق دستورالعمل ارایه شده توسط شرکت سازنده انجام شد. اطلاعات توالی به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SeqMan ویرایش شدند (DNASTAR, Madison, WI, USA). توالی‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار برخط BLAST با توالی‌های موجود در بانک ژن مقایسه شدند و جدایه‌های مرجع با بیشترین مشابهت برای تعیین دقیق هویت و تایید مولکولی گونه‌های قارچی مد نظر قرار گرفتند.

نتایج

در طی بازدید از مناطق مختلف شهر اردبیل مشخص گردید که علایم بیماری زوال اقاقیا در اکثر مناطق شهر اردبیل وجود دارد. علایم بیماری به صورت سرخشکیدگی شاخه‌ها در درختان اقاقیای کنار خیابان‌ها و وسط بلوارهای نقاط مختلف شهر مشاهده

www.SID.ir

Archive of SID

می‌شد. بدین‌ترتیب که برگ‌های مربوط به شاخه‌ای در یک طرف درخت کمرنگ و به سرعت قهوه‌ای شده و کاملاً خشک می‌شدند و در صورت عدم هرس به‌موقع و حذف سرشاخه آلوده، این عارضه به‌تدریج به بقیه شاخه‌ها نیز سرایت کرده و باعث زوال و خشکیدگی کامل درخت می‌شد. این علایم اغلب در اقاقیای چتری (توپی) دیده می‌شد و در اقاقیای 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 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 اقاقیا 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.

شکل ۱. علایم زوال درختان اقاقیا 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.

گونه‌های قارچی شناسایی شده

طی این تحقیق، با مطالعه ویژگی‌های ریخت‌شناختی و مقایسه با کلیدهای معتبر قارچ‌شناسی، گونه‌های قارچی *F. oxysporum*، *Acremonium* sp.، *F. solani*، *C. chrysosperma*، *Ca. elongata*، *Nigrospora* sp.، *Alternaria alternata*، *E. nigrum*، *Chaetomium* sp. و Auersw *Sordaria macrospora* شناسایی شدند. همچنین با مقایسه توالی‌های *TEF-1α* (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:

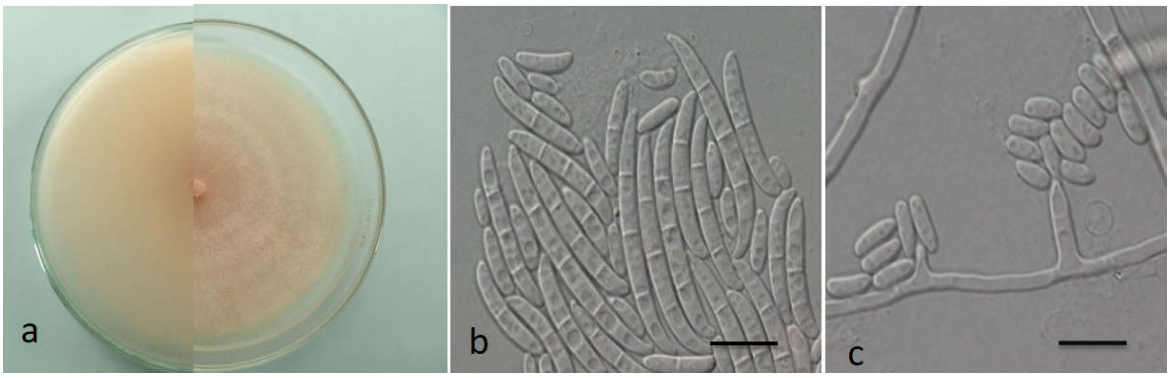
www.SID.ir

Archive of SID

۱- *Fusarium oxysporum* Schltdl.

ریخت‌شناسی پرگنه روی محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار در جدایه‌های مختلف بسیار متنوع بود. در جدایه‌های به دست آمده در این تحقیق، میسلیوم‌های سفید مایل به نارنجی به صورت خوابیده مشاهد شدند و میسلیوم هوایی مشاهده نشد. قطر پرگنه بعد از سه روز به ۳/۵ سانتی‌متر و بعد از ۱۰ روز به ۱۰ سانتی‌متر رسید. اسپورودوکیوم‌های نارنجی کم‌رنگ فراوان روی محیط کشت SNA مشاهده شدند. ماکروکنیدیوم‌های سه‌بندی فراوان با طول کوتاه تا متوسط، مستقیم تا حدی خمیده، نسبتاً باریک و با دیواره نازک روی اسپورودوکیوم یا میسلیوم‌ها مشاهده شد که در آن‌ها سلول پایه پاشنه‌ای شکل و سلول انتهایی نوک-تیز و انحنادار و گاهی با قلاب (Hook) کوچک مشاهده شد. در این گونه، میکروکنیدیوم‌های تخم‌مرغی، بیضوی یا قلوه‌ای‌شکل و معمولاً یک‌سلولی روی سرهای لزج (slimy heads) با منوفیالیدهای کوتاه تولید شدند که از ویژگی‌های متمایز این گونه به شمار می‌رود (شکل۲). کلامیدوسپورها بعد از ۴-۲ هفته روی SNA به صورت انفرادی یا دوتایی و گاهی زنجیری یا خوشه‌ای در میسلیوم‌های هوایی یا سطح آگار تشکیل شدند. در تحقیق حاضر، گونه *F. oxysporum* از بافت‌های آوندی درختان دچار سرخشکیدگی جداسازی شد و مشخصات ریخت‌شناختی با توصیف Gerlach & Nirenberg (1982) مطابقت داشت و نتایج توالی‌یابی ژن *TEF* نیز هویت گونه را تایید نمود.

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



شکل ۲. *Fusarium oxysporum*. **a.** سطح رویی و پشتی پرگنه روی PDA پس از هفت روز، **b.** ماکروکنیدیوم‌ها، **c.** میکروکنیدیوم‌ها. 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 µm).

۲- *Fusarium solani* (Mart.) Sacc.

در محیط کشت PDA، پرگنه این گونه سفید تا کرم‌رنگ با میسلیوم‌های هوایی کم و بدون رنگدانه‌ای و در برخی موارد با رنگدانه بنفش یا قهوه‌ای مشاهده شد. ماکروکنیدیوم‌ها نسبتاً کلفت راست تا کمی خمیده، ۷-۳ بندی با سلول پایه پاشنه‌ای-شکل و سلول انتهایی گرد و به فراوانی در اسپورودوکیوم‌های کرم‌رنگ و گاهی آبی یا سبز رنگ مشاهده شدند. میکروکنیدیوم-های تخم‌مرغی، سوسیسی یا قلوه‌ای‌شکل یک یا دو سلولی به صورت سرهای لزج در منوفیالیدهای بلند مشاهده شد (شکل ۳). کلامیدوسپورهای کروی تا تخم‌مرغی با دیواره صاف یا زبر به فراوانی اغلب به صورت جفتی و گاهی انفرادی یا زنجیری کوتاه در میسلیوم‌ها و در داخل آگار تولید شدند. تعدادی از جدایه‌های فوزاریوم به‌دست آمده از ریشه درختان بیمار با استفاده از توصیف توسط Gerlach & Nirenberg (1982)، Nelson *et al.* (1983) و Leslie & Summerell (2006) و نیز توالی‌یابی ژن *TEF*، *F. solani* تشخیص داده شدند.

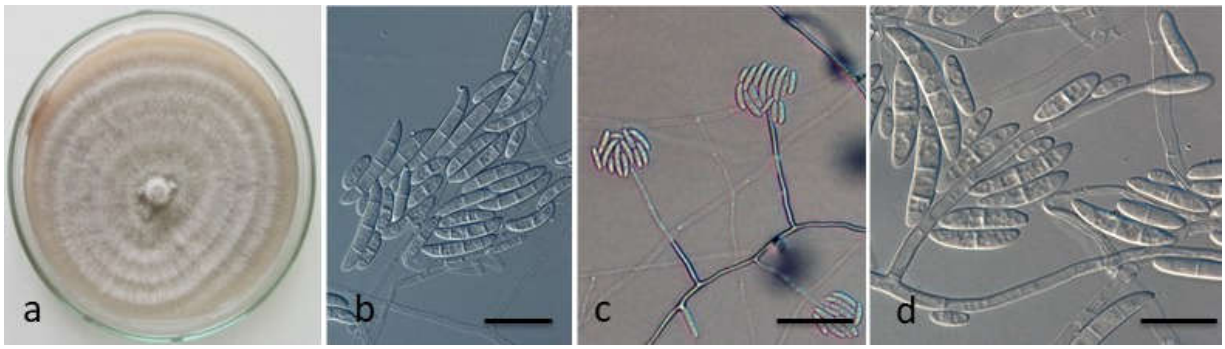
www.SID.ir

Archive of SID

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 Don1964)

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 اندازه گیری شد. در برش عرضی و قاعده استروما حجره‌ها قابل تشخیص بودند و تعداد و شکل حجره‌ها متغیر بود. حجره‌ها پیچ خورده و با آرایش شعاعی نامنظم و دارای دیواره کاذب مشترک بودند. کنیدیوم‌برها بی‌رنگ و غیرمنشعب و یا گاهی منشعب دیده می‌شدند. ارتفاع این کنیدیوم‌برها زیاد بوده و به اندازه ۳۵-۱۵ میکرومتر مشاهده شد. سلول‌های کنیدیوم‌زا بی‌رنگ، باریک، کشیده و از نوع فیالیدی بودند. کنیدیوم‌ها بی‌رنگ، کوچک، تک‌سلولی و خمیده (آلانتوئید) بودند. اندازه کنیدیوم‌ها (۷-) ۵/۵-۱۱/۷۵ (-۴) × (۱/۲-) ۱/۱-۰۱/۰۷ (-۰/۹) 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.



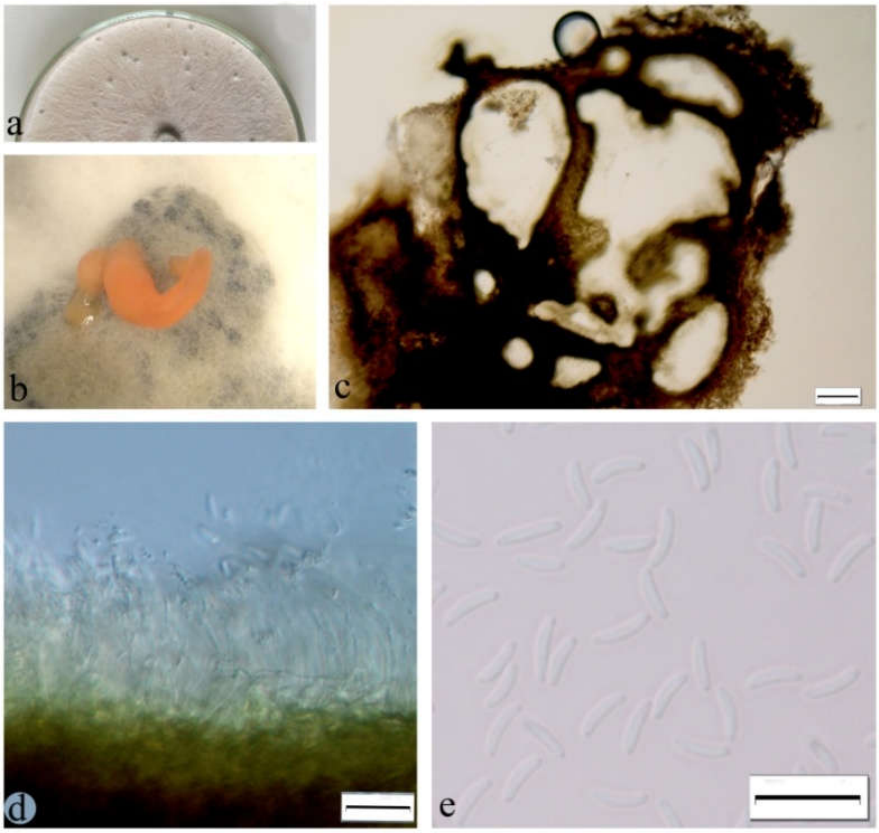
شکل ۳. *Fusarium solani*. **a.** پرگنه رویPDA. **b.** ماکروکنیدیوم‌ها و میکروکنیدیوم‌ها. **c.** سرهای دروغین روی منوفیالیدهای بلند. **d.** منوفیالید بلند. مقیاس= ۱۰ میکرومتر.

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 µm).

گونه‌های این جنس، بیمارگرهای شناخته شده روی تعداد زیادی از گیاهان و میزبان‌های چوبی به‌شمارمی‌روند (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 قبلا از روی میزبان‌های مختلفی از قبیل *Amygdalus communis* L.، *Prunus domestica* L.، *Malus pumila* Mill.، *Juglans regia* L. Hoffmanns. & Link، *Olea sativa* و از روی دیگر درختان غیر مثمر در ایران گزارش شده 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 سکته 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.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۴. *Cytospora chrysosperma*. **a.** پرگنه روی PDA، **b.** پیکنیدیوم با توده کنیدیوم‌های نارنجی‌رنگ، **c.** برش طولی پیکنیدیوم چندحجره‌ای با حجره‌های نامنظم، **d.** کنیدیوفورها، **e.** کنیدیوم‌ها. 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).

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

پیکنیدیوم‌های تک‌حفره‌ای، کروی، سیاه و صاف و گاها دارای برآمدگی ریسه‌ای مومانند در روی پیکنیدیوم بودند. پیکنیدیوم‌ها دارای استیول کاملا مشخص، پاپیل‌مانند و کوچک بودند. قطر پیکنیدیوم‌ها ۱۹۰-۱۵۰ میکرومتر اندازه‌گیری شدند، کنیدیوم‌بر مشاهده نشد و سلول‌های کنیدیوم‌زا نیز به راحتی قابل مشاهده نبودند و از سلولهای داخلی دیواره پیکنیدیوم منشا گرفته‌اند، کنیدیوم‌ها استوانه‌ای و بیضوی، در دو انتها گرد، طلایی‌رنگ تا قهوه‌ای تیره با ۴-۳ دیواره عرضی بودند و دو سلول کنیدیوم با دیواره‌های طولی اغلب مورب دیده می‌شدند (شکل ۵). اندازه کنیدیوم‌ها (۱۹-) ۷۹/۹۳-۱۳/۱۵ (-۱۰) × (۹-) ۴۵/۹۴-۷/۷ (-۷) میکرومتر مشاهد شد. فرم جنسی این گونه *Cu. elongata* می‌باشد (Wijayawardene *et al.* 2014). قبلا این گونه تحت عنوان *Camarosporium robiniae* (Westend.) Sacc. شناخته می‌شد که امروزه این گونه تحت عنوان *Ca. elongate* شناخته می‌شود (Wanasinghe *et al.* 2017). جنس *Camarosporidiella* از خانواده Camarosporidiellaceae، راسته Pleosporales و رده Dothideomycetes می‌باشد. گونه *Ca. elongata* از نظر مشخصات ریخت‌شناختی مرحله جنسی خیلی شبیه گونه *Ca.* Wanas., Camporesi & K. D. Hyde *eufemiana* می‌باشد، ولی با این حال، گونه *Ca. elongata* با داشتن آسک‌های بلندتر با پایه بلند از گونه مذکور قابل تمییز است. نتایج توالی‌یابی ناحیه ITS-rDNA نیز هویت گونه را تایید نمود.

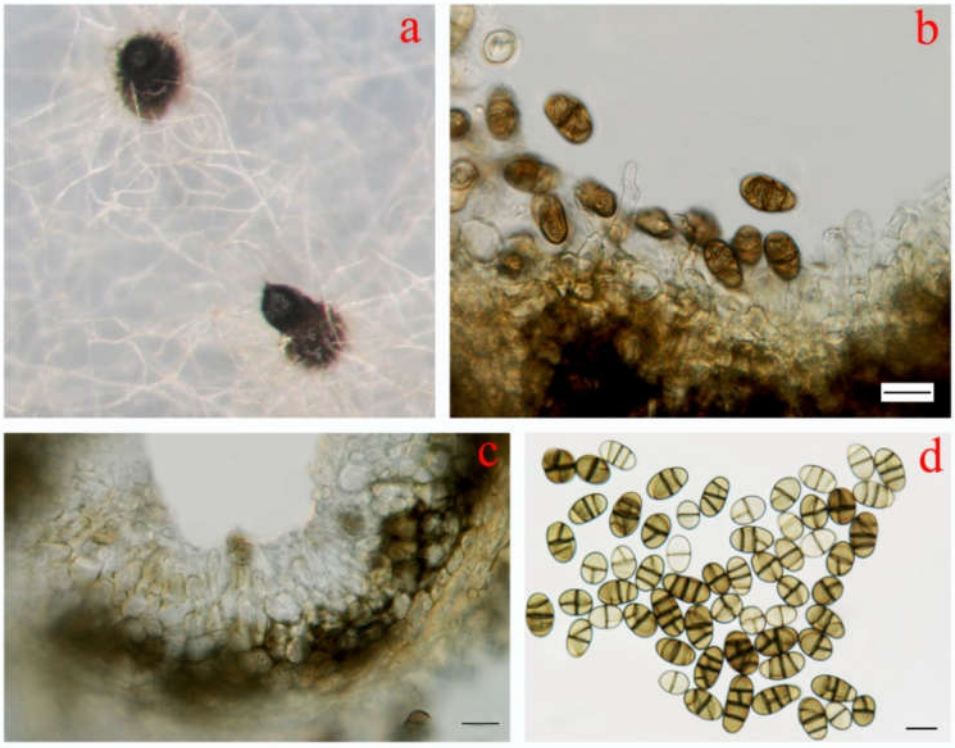
www.SID.ir

Archive of SID

جنس *Camarosporium* اولین بار توسط Schulzer بـا گونـه تیپ *C. quaternatum* (Hazsl.) Schulz. گزارش شده و تـاکنون بـیش از ۵۰۰ گونـه در ایـن جـنس در پایگـاه داده‌ای اینـدکس فانگاروم (http://www.indexfungorum.org/) معرفی شده است. تاکنون چندین گونه از این جـنس بـه عنـوان بیمارگرهـای مهـم گیاهی با پراکنش جهانی گزارش شده‌اند. گونه *C. robiniae* (*Ca. elongata*) در برخی کشـورها از جملـه یونـان، ایتالیـا، لهسـتان، اکراین، کانادا و آمریکا از اقاقیـا جداسـازی و گـزارش شـده اسـت (Mułenko *et al.* 2008; Wanasinghe *et al.* 2017).

بحث

تعداد قابل توجهی از درختان اقاقیای واقع در فضای سبز شهر اردبیل در چند سال اخیـر، دچـار بیمـاری سرخشـکیدگی و زوال شده و در نهایت از بین می‌روند. بـا توجـه بـه شـیوع بـالای ایـن 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 باعلایم گرفتگی آوندی جداسازی و بـا روش‌هـای ریخـت-شناختی و مولکولی شناسایی شدند.



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).

طی این تحقیق، حدود ۱۰ گونه قارچی متعلق به گـروه‌هـای مختلف قارچی از آوند و ریشه اقاقیای در حـال زوال و مبـتلا بـه سرخشـکیدگی جداسـازی شـد. بـا در نظـر گـرفتن خصوصـیات بیماری‌زایی این قارچها و سابقه بیماری‌زایی آن‌ها که به دفعات از میزبان‌های مختلف گزارش شـده‌انـد و نیـز جداسـازی در دفعـات مختلف نمونـه‌بـرداری، گونـه *F. oxysporum* کـه از محـل آونـد شاخه‌های بیمار و گونه *F. solani* که از ریشه و شاخه‌های بیمـار اقاقیا جداسازی شدند، به احتمال زیاد بـه عنـوان عوامـل قـارچی

www.SID.ir

Archive of SID

دخیل در ایجاد این عارضه باشند. قارچ *F. oxysporum* معمولا با گرم شدن هوا در آوندها فعالیت خود را بهتر نشان می‌دهد و مشاهده علایم و شروع سرخشکیدگی اقاقیا در اردبیل نیز با گرم شدن هوا و حدود خردادماه شروع می‌شود ولی جهت اثبات بیماری‌زایی هر یک از جدایه‌ها باید آزمون‌های 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 هاوائی 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 علایم پژمردگی و شانکر پوست، گونه‌های مختلفی از *Fusarium* شامل *F. avenaceum* (Fr.) Sacc.، *F. lateritium* Berk. & Rav.، *F. semitectum* و *F. solani* و *F. sulphureum* (syn.: *F. sambucinum*) را جداسازی کردند و نشان دادند که گونه‌های *F. avenaceum* و *F. sulphureum* بدون وجود اثرات یخبندان هم قادر به ایجاد شانکر روی ساقه و شاخه‌های کوچک می‌باشند. شانکر فوزاریومی در اقاقیای سیاه در کشورهای دیگر نیز سابقه زیادی دارد. به عنوان مثال، دو گونه *F. oxysporum* و *F. solani* عامل ایجاد شانکر اقاقیای 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 بیماری‌زایی جدایه‌های 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 می‌کند. در یک بررسی برای تعیین عامل سرخشکیدگی آکاسیا در منطقه مائونالوآی پارک ملی هاوایی آمریکا، قارچ *F. oxysporum* f. sp. *koae* را از شاخه‌های درختان دارای علایم جداسازی کردند (Anderson & Gardner 1998). گونه *Ca. robiniae* نیز در برخی کشورها به‌عنوان عامل سرخشکیدگی درختان اقاقیا (*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 سرشاخه‌ها و شاخه‌های اقاقیای مبتلا به سرخشکیدگی و نکروز جداسازی و بیماری‌زایی 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 اقاقیا برای انسداد آوندی توسط گونه‌های فوزاریوم نقش دارند ولی جهت اظهار نظر نهایی، باید نقش هر یک از این عوامل به صورت جداگانه و همراه باهم در بیماریزایی روی درختان اقاقیا مورد ارزیابی دقیق قرار گیرد. در ایران در خصوص سرخشکیدگی و زوال اقاقیا مطالعه منسجمی صورت نگرفته و تاکنون گزارش علمی چندانی در منابع معتبر وجود ندارد. مطالعات مرتبط با زوال اقاقیا تنها به گزارش Nazerian *et al.* (2015) محدود می‌شود که در آن، گونه قارچی *Neofusicoccum mangiferae* (Syd. and P. Syd.) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips از اقاقیای سیاه مبتلا به پژمردگی و مرگ در شهرستان محلات با روش ریخت‌شناختی و توالی‌یابی ناحیه ژنی ITS شناسایی و گزارش شده است. همچنین طی گزارشی کوتاه، Babaeizad & Fazli (2014) قارچ *Phomopsis* sp. را از شاخه‌های آلوده به پژمردگی و مرگ ناگهانی اقاقیا در شمال کشور جداسازی کردند. با شناسایی عوامل قارچی همراه با خشکیدگی و زوال اقاقیا، اجرای تحقیقات تکمیلی و اعمال راهکارهای مناسب برای مدیریت بیماری در آینده امکان‌پذیر خواهد شد.

در این تحقیق، گزارش قارچ *Camarosporidiella elongata* و *S. macrospora* از ایران جدید است. همچنین گونه‌های قارچی *F. oxysporum*، *F. solani*، *Ca. elongata*، *A. alternata* و *E. nigrum* برای اولین بار از روی اقاقیا در ایران گزارش می‌شوند. ضمناً *Acremonium* sp. و *S. macrospora* برای اولین بار از روی *R. pseudoacacia* در دنیا گزارش می‌شود.

سپاسگزاری

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

www.SID.ir

Archive of SID

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, diaporthales, 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 Hawai: 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 Baghery M, Arzanlou M, Babai-Ahari A, 2015. Identification of the fungal agents associated with Almond trunk diseases in East Azerbeijan 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 Infraspecific 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 gramineamrum* 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- Mycocent 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-Forstwirtsch, 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).

www.SID.ir

Archive of SID

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*. *Annuals 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, Ruszkiewicz-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 phylognetics. 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.

www.SID.ir