

گونه‌های *Botryosphaeriaceae* همراه با سرخشکیدگی و شانکر در زیتون در ایران\*محبوبه سهرابی<sup>۱</sup>، حمید محمدی<sup>۲\*</sup> و ضیاءالدین بنی هاشمی<sup>۳</sup>

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۸/۲؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۱)

## چکیده

گونه‌های خانواده *Botryosphaeriaceae* دارای انتشار جهانی هستند و برخی از گونه‌های آن به عنوان بیمارگرهای مهم درختان شناخته می‌شوند. به منظور شناسایی گونه‌های *Botryosphaeriaceae* همراه با بیماری‌های شاخه و تنه درختان زیتون، یک بررسی روی این درختان در دو استان کرمان و مازندران انجام شد. نمونه‌برداری در سال ۱۳۹۵ و از شاخه و تنه درختان با نشانه‌های سرخشکیدگی و شانکر انجام گردید. عمل جداسازی از بافت‌های تغییر رنگ یافته بافت چوب و روی محیط کشت عصاره سیب زمینی-دکستروز-آگار (PDA) انجام شد. در این مطالعه ۵۶ جدایه *Botryosphaeriaceae* از درختان بیمار جداسازی گردید. شناسایی جدایه‌ها بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی و تکثیر و تعیین ترادف بخشی از ژن فاکتور بسط دهنده ترجمه (*tef-1a*) با دو آغازگر EF1-728F و EF1-986R صورت گرفت. بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی و مولکولی، پنج گونه *Botryosphaeria dothidea* (۱۱ جدایه)، *Diplodia seriata* (هشت جدایه)، *Dothiorella sarmentorum* (هشت جدایه)، *Lasiodiplodia theobromae* (هفت جدایه) و *Neoscytalidium hyalinum* (۲۲ جدایه) شناسایی شدند. آزمون بیماری‌زایی جدایه‌های انتخابی تحت شرایط گلخانه‌ای و روی شاخه‌های بریده شده زیتون انجام گردید. جدایه‌های *D. seriata* بر اساس طول لکه‌های ایجاد شده در بافت چوب، بیشترین بیماری‌زایی را نشان دادند. این مطالعه اولین گزارش از *D. seriata* و *L. theobromae* از درختان زیتون در ایران می‌باشد. علاوه بر این مطالعه انجام شده اولین گزارش از *Do. sarmentorum* همراه با شانکر و سرخشکیدگی درختان زیتون می‌باشد.

کلیدواژه: بیماری‌های شاخه و تنه، زوال، *Botryosphaeriales*, *tef-1a*

\* بخشی از رساله دکتری نگارنده اول، ارائه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان.

\*\* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: hmohammadi@uk.ac.ir

۱. دانشجوی دکتری بیماری شناسی گیاهی، بخش گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان.

۲. دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان.

۳. استاد گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز.

## ***Botryosphaeriaceae* species associated with the die-back and canker of olive trees in Iran\***

**M. Sohrabi<sup>1</sup>, H. Mohammadi<sup>2\*\*</sup>, and Z. Banihashemi<sup>3</sup>**

(Received: 24.10.2019; Accepted: 21.1.2020)

### **Abstract**

Species of the *Botryosphaeriaceae* have a worldwide distribution and some species of have been recognized as important pathogens on various trees worldwide. In order to identify the *Botryosphaeriaceae* species associated with olive trunk diseases, a survey was conducted on trees in Kerman and Mazandaran provinces. In 2016, wood samples were collected from trunk and branches of trees showing dieback and canker symptoms. Fungal isolations were performed from discolored wood tissues on potato dextrose agar (PDA). In this study 56 fungal isolates resembling *Botryosphaeriaceae* species in colony and culture were obtained from affected trees. All isolates were identified using morphological characteristics and partial sequences of the translation elongation factor 1- $\alpha$  gene (*tef-1 $\alpha$* ) with the primer pairs EF1-728F and EF1-986R. Based on morphological and molecular analysis five species of *Botryosphaeriaceae* namely, *Botryosphaeria dothidea* (11 isolates), *Diplodia seriata* (8 isolates), *Dothirella sarmentorum* (8 isolates), *Lasiodiplodia theobromae* (7 isolates) and *Neoscytalidium hyalinum* (22 isolates) were identified. A pathogenicity trial was performed on detached shoots of olive under greenhouse conditions. *Diplodia seriata* isolates were the most virulent species based on the length of wood necrosis. This study is the first report of *D. seriata* and *L. theobromae* from olive trees in Iran. In addition, this study is the first report of *Do. sarmentorum* associated with yellowing, canker and dieback symptoms of olive trees.

**Keywords:** Trunk diseases, decline, Botryosphaeriales, *tef-1 $\alpha$*

---

\* A Part of Ph.D. Thesis of the First Author, Submitted to college of Agric., Shahid Bahonar Univ. of Kerman, Kerman, Iran.

\*\*Corresponding author's E-mail: hmohammadi@uk.ac.ir

1. Ph.D. Student of Plant Pathol., Shahid Bahonar Univ. of Kerman, Kerman, Iran.

2. Assoc. Prof. of Plant Pathol., Shahid Bahonar Univ. of Kerman, Kerman, Iran.

3. Prof. of Plant Pathol., Shiraz Univ., Shiraz, Iran.

## مقدمه

دامنه میزبانی وسیعی می‌باشند و علاوه بر پوده رست بودن می‌توانند درون زیست و بیماری‌زای گیاهی نیز باشند. تحقیقات انجام شده روی این گروه از قارچ‌ها نشان می‌دهد که برخی از گونه‌ها باعث ایجاد شانکر و سرخشکیدگی‌های وسیعی روی میزبان‌های مختلف می‌شوند. گونه‌های مختلفی از این خانواده در ارتباط با شانکرهای شاخه از میزبان‌های مختلف گزارش شده‌اند، که می‌توان به انگور (Urbez-Torres et al. 2007)، درختان میوه دانه‌دار و هسته‌دار (Slippers et al. 2007; van Niekerk et al., 2011)، زیتون (Moral et al. 2010)، آووکادو (McDonald & Urbez-Torres et al. 2013)، و مرکبات (Eskalen 2011, Zea-Bonilla et al. 2007 Adesemoye & Eskalen 2011, Adesemoye et al. ) اشاره نمود. اخیراً بیماری‌های سرخشکیدگی، زوال و شانکر روی درخت زیتون اهمیت فوق‌العاده‌ای در جهان پیدا کرده است که برخی از اعضای خانواده *Botryosphaeriaceae* نیز در این رابطه گزارش شده‌اند (Moral et al. 2019) که البته عمدتاً با پوسیدگی‌های میوه روی این میزبان مرتبط هستند (Chattaoui et al. 2011, Moral et al. 2008, Phillips et al. 2005). گونه‌های مهمی که در این زمینه گزارش شده‌اند شامل *B. dothidea*, *Neof. Do. iberica*, *D. seriata*, *D. mutila* و *Neof. vitifusiforme*, *Neof. luteum*, *maditeraneum* در کالیفرنیا (Moral et al. 2010, 2017)، *L. theobromae* در اسپانیا (Urbez-Torres et al. 2013)، *B. ribis* در کروواسی (Romero et al. 2005)، *D. seriata* (Kaliterna et al. 2012) و *L. theobromae*, *D. mutila* (Triki et al. 2015) می‌باشند. در ایران خانواده *Botryosphaeriaceae* از میزبان‌های مختلفی مانند

زیتون با نام علمی *Olea europaea* L. از خانواده *Oleaceae* بومی آسیای صغیر، سوریه، لبنان، فلسطین و نواحی مدیترانه‌ای است و به عنوان درختی همیشه سبز و نیمه گرمسیری شناخته می‌شود. این درخت همراه با انجیر و خرما از گیاهان دنیای قدیم شناخته می‌شود که کشت و کار آن به ۳۵۰۰ سال قبل از میلاد بر می‌گردد. اهمیت اقتصادی زیتون به خاطر تولید روغن آن است (Therios 2009). کشورهای اسپانیا، یونان و ایتالیا به ترتیب رتبه اول تا سوم تولید زیتون را در دنیا دارند (FAO 2017). میزان تولید زیتون در ایران به طور تقریبی ۱۰۸ هزار تن می‌باشد و در ۲۶ استان این کشور از جمله در استان‌های زنجان، فارس، گیلان، گلستان، قزوین، یزد و کرمان کشت می‌شود (Hosseini Mazinani & Torkzaban 2013; Torkzaban et al. 2015).

خانواده *Botryosphaeriaceae* گروه متنوعی از قارچ‌ها را در بر می‌گیرد که به صورت بیمارگر، پوده‌رست و درون‌رست، عمدتاً روی گیاهان چوبی دیده می‌شوند. اعضای این خانواده در تمام مناطق جغرافیایی جهان وجود دارند. این گروه از قارچ‌ها آسکومیست‌هایی هستند که به عنوان مولد شانکر، سرخشکیدگی و زوال تدریجی در گیاهان مختلف دولپه‌ای، تک‌لپه‌ای و حتی درختان بازدانه شناخته می‌شوند (Phillips et al. 2013). این خانواده دارای چندین شکل غیرجنسی است که از مهمترین آنها می‌توان به جنس‌هایی مانند *Dothiorella*, *Diplodia* Fr. Sacc., *Lasiodiplodia* Ellis & Everh., *Neofusicoccum* Crous, Slippers & A.J.L. Phillips اشاره نمود. در ابتدا تصور می‌شد که اعضای خانواده *Botryosphaeriaceae* پوده‌رست می‌باشند ولی مطالعات نشان داده است که این گروه از قارچ‌ها دارای انتشار و

درختان هر باغ و منطقه با ثبت زمان و محل نمونه‌برداری و نوع نشانه‌های خارجی جهت جداسازی عوامل قارچی به آزمایشگاه منتقل شدند. در آزمایشگاه ابتدا قطعات ۲۰-۳۰ سانتی‌متری از نمونه‌های جمع‌آوری شده شاخه و تنه تهیه گردید. برای بررسی و مشاهده نشانه‌های داخلی بیماری که به صورت تغییر رنگ بافت چوب بروز می‌کنند برش‌هایی عرضی و طولی از نمونه‌های مورد نظر تهیه و بر اساس منابع موجود (Van Niekerk et al. 2011) شکل بافت نکروز شده مورد ارزیابی قرار گرفت و ثبت گردید. در مرحله بعد نمونه‌هایی که دارای نشانه‌های داخلی مطلوب بودند انتخاب و برای جداسازی عوامل قارچی کد گذاری شدند. سپس از نمونه‌های جمع‌آوری شده قطعات ۸-۶ سانتی‌متری تهیه و به صورت طولی و عرضی برش داده شدند. از حد واسط بین بافت سالم و آلوده قطعاتی به اندازه ۵×۵ میلی‌متر جدا و به مدت دو دقیقه در هیپوکلریت سدیم (NaOCl) نیم درصد گندزدایی شدند. قطعات گندزدایی شده دو مرحله با آب مقطر سترون شستشو و پس از خشک کردن روی دستمال کاغذی (در زیر هود لامینار) روی محیط کشت عصاره سیب زمینی- دکستروز-آگار (Potato Dextrose Agar=PDA) حاوی سولفات استرپتومایسین (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) قرار داده شدند. تشک‌های پتری در تاریکی و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس تا ظهور پرگنه‌های قارچی نگهداری شدند. پرگنه‌های رشد یافته از طریق نوک ریشه خالص و برای انجام مراحل بعدی کار به لوله‌های آزمایش حاوی محیط کشت PDA منتقل و در یخچال نگهداری شدند.

#### شناسایی ریخت شناسی جدایه‌های قارچی

شناسایی اولیه جدایه‌ها بر اساس ویژگی‌های پرگنه روی محیط کشت PDA انجام گرفت و همه جدایه‌ها با

مرکبات (Abdollahzadeh et al. 2009, 2010)، انگور (Arabnezhad & Mohammadi 2012; Mohammadi et al. 2013)، پسته (Mohammadi et al. 2015) و گردو (Abdollahzadeh et al. 2010) و برخی از درختان جنگلی (Kazemzadeh Chakusary et al. 2019) گزارش شده است. بر اساس مطالعات انجام شده در ایران گونه‌های *L. hormozganensis* و *Barriopsis iraniana* (Abdollahzadeh et al. 2009, 2010)، *Neoscytalidium hyalinum* و *Macrophomina phaseolina* (Sanei & Razavi 2012)، *Botryosphaeria dothidea* (Abdollahzadeh et al. 2013) و *Do. iranica* (Abdollahzadeh et al. 2014) از زیتون گزارش شده‌اند. اما بیشتر گونه‌های گزارش شده از ایران معمولاً از پیکنیدیوم‌های تشکیل شده بر روی چوب‌های دارای علائم جداسازی شده‌اند. بنابراین این تحقیق با هدف جداسازی و شناسایی گونه‌های *Botryosphaeriaceae* همراه با بیماری‌های شاخه و تنه درختان زیتون در برخی از نواحی کشت این محصول در دو استان کرمان و مازندران انجام گردید.

#### مواد و روش‌های بررسی

##### نمونه‌برداری و جداسازی قارچ‌ها

به منظور مطالعه بیماری‌های شاخه و تنه درختان زیتون از برخی مناطق کشت این محصول در استان‌های کرمان و مازندران در طول فصول بهار و تابستان سال‌های ۱۳۹۵ بازدید به عمل آمد. نمونه‌برداری از شاخه و تنه درختان بیمار که دارای نشانه‌های خارجی شامل زردی، سرخشکیدگی و شانکرهای شاخه و تنه و نشانه‌های داخلی به صورت تغییر رنگ بافت چوب و آوند به اشکال مختلف بودند، انجام شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده از

از روی محیط کشت خراشیده و در هاون با استفاده از ازت مایع به طور کامل پودر گردید. استخراج DNA از توده میسلیمی با استفاده از روش CTAB انجام شد (Doyle & Doyle 1990). DNA استخراج شده با استفاده از رنگ اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و روی ژل آگاروز ۱ درصد مشاهده گردید. نمونه‌های DNA جهت انجام مراحل بعدی کار در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

شناسایی ملکولی جدایه‌ها با تکثیر و تعیین ترادف ژن *Translation elongation factor 1 alpha (tef-1α)* با استفاده از آغازگرهای EF1-986R و EF1-728F (Carbone and Kohn, 1999) انجام شد. محصول واکنش زنجیره پلیمرز جهت خالص سازی و تعیین ترادف به کره جنوبی (Daejeon, South Korea) فرستاده شد. ویرایش داده‌های مربوط به تعیین ترادف‌ها با استفاده از نرم افزار BioEdit انجام گردید. مقایسه ترادف‌های بدست آمده جهت شناسایی اولیه نیز از طریق آزمون مشابهت یابی (BLAST) انجام شد و میزان شباهت هر جدایه با گونه‌های موجود در بانک ژن مورد ارزیابی قرار گرفت. توالی *tef-1α* مربوط به ۳۹ جدایه از خانواده *Botryosphaeriaceae* بدست آمده از این مطالعه (جدول ۱) با توالی گونه‌های مختلف *Botryosphaeriaceae* موجود در بانک ژن مورد بررسی قرار گرفتند. دو جدایه *Pseudofusicoccum stromaticum* Mohali, Slippers. and M.J. Wingf. (CBS117448 و CBS117449) به عنوان آرایه خارج از گروه (Outgroup) انتخاب شدند (جدول ۲). همدریف سازی و واکاوی تبارشناسی ترادف‌ها با استفاده از نرم افزار MEGA X (Kumar et al. 2018) انجام گردید و درخت تبارشناسی به روش MP (Maximum Parsimony) و درجه اعتبارسنجی

توجه به تفاوت ساختار و رنگ پرگنه‌ها گروهبندی شدند. بررسی‌های انجام شده بر روی اعضای خانواده *Botryosphaeriaceae* نشان داده است که شکل، رنگ، تعداد سلول و اندازه اسپورها به عنوان یکی از صفات کلیدی در شناسایی اولیه آنها محسوب می‌شوند. با توجه به اینکه اعضای خانواده *Botryosphaeriaceae* در ابتدا تنها به صورت ریشه‌ای روی محیط کشت رشد می‌کنند پس لازم است برای شناسایی اولیه بر اساس ویژگی‌های اسپور به گونه‌ای تحریک به اسپورزایی شوند. بنابراین جهت تولید پیکنیدیوم و افزایش اسپورزایی، ابتدا جدایه‌ها به محیط کشت آب-آگار (WA) دو درصد حاوی قطعات اتوکلاو شده برگ کاج منتقل و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و تحت شرایط نوری مداوم (نور مهتابی) قرار گرفتند (Smith et al. 1996; Van Niekerk et al. 2004). پس از گذشت ۲۰ تا ۲۵ روز و تولید پیکنیدیوم ویژگی‌های گفته شده با میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت.

### شناسایی ملکولی و واکاوی تبارشناسی جدایه‌های قارچی

با توجه به ویژگی‌های ریخت شناختی همپوشان در برخی از جنس‌ها و گونه‌ها لازم است که شناسایی دقیق آنها بر اساس مولکولی نیز مورد بررسی قرار گیرد تا شناسایی بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی مورد تأیید قرار گیرد. در این تحقیق برای شناسایی مولکولی جدایه‌های گفته شده ابتدا DNA کل از توده میسلیمی جدایه‌ها استخراج گردید. بدین منظور ۳۸ جدایه مورد نظر روی محیط کشت PDA کشت و برای تولید توده میسلیمی به مدت ۱۰ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. در مرحله بعد توده میسلیمی تولید شده

جدول ۱. جدایه‌های *Botryosphaeriaceae* و سایر جدایه‌های قارچی همراه با نشانه‌های مختلف بیرونی و داخلی بیماری روی درختان زیتون

**Table 1. *Botryosphaeriaceae* and other fungal isolates associated with different external and internal disease symptoms of olive trees.**

Fungal isolates		Number	Symptoms		Location
Species	Code		External	Internal	
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	IRNKB212-1	6	Dieback, Canker	Irregular wood necrosis	Ramsar, Mazandaran province
	IRNKB212-2				
	IRNKB212-3	2	Canker	V-shaped necrosis	Jebal Barez Kerman province
	IRNKB212-4				
	IRNKB212-5				
	IRNKB212-6				
	IRNKB212-7				
	IRNKB212-8				
<i>Diplodia seriata</i>	IRNKB214-1	6	Dieback, Canker	Central necrosis	Qaem Shahr, Mazandaran province
	IRNKB214-2				
	IRNKB214-3				
	IRNKB214-4				
	IRNKB214-5				
	IRNKB214-6				
<i>Dothiorella sarmentorium</i>	IRNKB108-1	3	Dieback, Canker	V-shaped necrosis	Ramsar, Mazandaran province
	IRNKB108-2				
	IRNKB108-3				
<i>Dothiorella sarmentorium</i>	IRNKB108-4	3	Dieback, Canker	Brown to black streaking	Khanook, Kerman province
	IRNKB108-5				
	IRNKB108-6				
	IRNKB108-6				
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	IRNKB219-1	5	Dieback	Irregular wood necrosis	Jebal Barez Kerman province
	IRNKB219-2				
	IRNKB219-3				
	IRNKB219-4				
	IRNKB219-5				
<i>Neoscytalidium hyalinum</i>	IRNBot-1	2	Yellowing	Central necrosis	Khanook Kerman province
	IRNBot-2				
<i>Neoscytalidium hyalinum</i>	IRNBot-3	6	Dieback, Yellowing	Central necrosis, Irregular wood necrosis	Akbar Abad Kerman province
	IRNBot-4				
	IRNBot-5				
	IRNBot-6				
	IRNBot-7				
	IRNBot-8				
	IRNBot-9				
IRNBot-10	6	Dieback, Canker	Irregular wood necrosis, Brown to black streaking	Jebal Barez Kerman province	
IRNBot-11					
IRNBot-12					
IRNBot-13					
IRNBot-14					
<i>Alternaria</i> sp.		8	Dieback, Canker	Combination of symptoms	Khanook, Jebal Barez Kerman province
<i>Phoma</i> sp.		9	Dieback, Canker	Combination of symptoms	Akbar Abad, Khanook Kerman province
<i>Paecilomyces</i> sp.		46	Dieback, Canker, Yellowing	Combination of symptoms	Akbar Abad, Khanook, Jebal Barez Kerman province
Other fungi		40	Dieback, Yellowing	Combination of symptoms	Akbar Abad, Khanook, Jebal Barez Kerman province

جدول ۲. جدایه‌های *Botryosphaeriaceae* برگرفته از بانک ژن که در درخت تبارشناسی مورد استفاده قرار گرفته‌اند (نمونه‌های تیپ با علامت \* مشخص شده‌اند).  
**Table 2. *Botryosphaeriaceae* isolates from GenBank used in the phylogenetic analyses (the type specimens are marked as \*).**

Isolates	Code	Location	Host	Collector	GenBank accession number
Species					<i>teF1a</i>
<i>Botryosphaeria agaves</i> *	CBS133992	Thailand	Agave sp.	R. Phookamsak (2010)	JX646856
<i>Botryosphaeria agaves</i>	MFLUCC 10-0051	Thailand	Agave sp.	R. Phookamsak (2010)	JX646855
<i>Botryosphaeria corticis</i> *	CBS 119047	New Jersey	<i>Vaccinium corymbosum</i>	P. V. Oudemans (2005)	EU017539
<i>Botryosphaeria corticis</i>	ATCC 22927	USA	<i>Vaccinium</i> sp.	Unknown	EU673291
<i>Botryosphaeria dothidea</i> *	CBS 115476	Switzerland	<i>Prunus</i> sp.	B. Slipers (2004)	AY236898
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	CBS 110302	Portugal	<i>Vitis vinifera</i>	A. J. L. Phillips (2005)	AY573218
<i>Botryosphaeria fábicerciana</i> *	CBS 127193	China	<i>Euca lyptus</i> sp.	M. J. Wingfield (2007)	HQ332213
<i>Botryosphaeria fábicerciana</i>	CMW 27108	China	<i>Euca lyptus</i> sp.	M. J. Wingfield (2007)	HQ332216
<i>Botryosphaeria fusispora</i>	MFLUCC 10-0098	Thailand	<i>Entada</i> sp.	Liu et al. (2009)	JX646854
<i>Botryosphaeria scharifii</i> *	CBS124703	Iran	<i>Mangifera indica</i>	J. Abdollahzadeh (2013)	JQ772057
<i>Botryosphaeria scharifii</i>	CBS124702	Iran	<i>Mangifera indica</i>	J. Abdollahzadeh & A. Javadi (2013)	JQ772056
<i>Botryosphaeria ramosa</i> *	CBS 122069	Western Australia	<i>Euca lyptus camaldulensis</i>	T. I. Burgess & M. J. Wingfield (2013)	EU144070
<i>Diplodia alatafructa</i> *	CBS 124931	South Africa	<i>Pterocarpus angolensis</i>	J. W. M. Mehl (2011)	FJ888444
<i>Diplodia corticola</i> *	CBS 112549	Portugal	<i>Quercus suber</i>	A. Alves (2004)	AY573227
<i>Diplodia crataegicola</i> *	MFLU 15-1311	Forli-Cesena	<i>Tilia</i> sp.	E. Camporesi (2015)	KT290248
<i>Diplodia cupressi</i> *	CBS 168.87	Israel	<i>Cupressus sempervirens</i>	Z. Solel (1987)	DQ458878
<i>Diplodia guayanensis</i> *	CBS 129750	Venezuela	<i>Acacia mangium</i>	F. Castro-Medina & S. Mohali (2010)	JX545128
<i>Diplodia intermedia</i> *	CBS 124462	Portugal	<i>Malus sylvestris</i>	A. J. L. Phillips (2006)	GQ923826
<i>Diplodia malorum</i> *	CBS 124130	Portugal	<i>Malus sylvestris</i>	A. J. L. Phillips (2012)	GQ923833
<i>Diplodia mutila</i> *	CBS 112553	Portugal	<i>Vitis vinifera</i>	A. J. L. Phillips (1997)	AY573219
<i>Diplodia pseudoseriata</i> *	CBS 124906	Uruguay	<i>Blepharocalyx salicifolius</i>	C. Perez (2006)	EU863181
<i>Diplodia sapinea</i> *	CBS 393.84	Netherlands	<i>Pinus nigra</i>	H. A. van der Aa (1984)	DQ458880
<i>Diplodia scrobiculata</i> *	CBS 118110	USA	<i>Pinus banksiana</i>	M. van Zyl (2003)	AY624253
<i>Diplodia seriata</i> *	CBS 112555	Portugal	<i>Vitis vinifera</i>	A. J. L. Phillips (1997)	AY573220
<i>Diplodia seriata</i>	CBS 119049	Italy	<i>Vitis vinifera</i>	A. J. L. Phillips (2002)	DQ458874
<i>Dothiorella americana</i> *	CBS 128309	USA	<i>Vitis vinifera</i>	K. Striegler & G. M. Leavitt (2011)	HQ288262
<i>Dothiorella citricola</i> *	ICMP16827	New Zealand	<i>Citrus sinensis</i>	S. R. Pennycook & P. R. Johnston (2008)	EU673289
<i>Dothiorella magnifera</i> *	CBS 124727	Iran	<i>Mangifera indica</i>	J. Abdollahzadeh & A. Javadi (2007)	KC898204
<i>Dothiorella parva</i> *	CBS 124720	Iran	<i>Corylus avellana</i>	J. Abdollahzadeh & A. Javadi (2007)	KC898217
<i>Dothiorella plurivora</i> *	CBS 124724	Iran	<i>Citrus</i> sp.	J. Abdollahzadeh & A. Javadi (2006)	KC898208
<i>Dothiorella sarmentorum</i> *	IMI 63581b	England	<i>Ulmus</i> sp.	E. A. Ellis (2005)	AY573235
<i>Dothiorella sarmentorum</i>	CBS 115038	Netherlands	<i>Malus pumila</i>	A. J. L. Phillips (2003)	AY573223
<i>Dothiorella sempervirentis</i> *	CBS 124718	Iran	<i>Citrus sempervirens</i>	M. A. Aghajani (2003)	KC898219

جدول ۲. ادامه  
Table 2. Continued.

Isolates	Code	Location	Host	Collector	GenBank accession number
<i>Dothiorella vidmadera</i> *	DAR78992	USA	<i>Vitis vinifera</i>	K. Striegler & G. M. Leavitt (2007)	EU768881
<i>Dothiorella viticola</i> *	CBS 117009	Spain	<i>Vitis vinifera</i>	B. Slippers.(2004)	AY905559
<i>Lasiodiplodia brasiliense</i> *	CMM 4015	Brazil	<i>Magnifera indica</i>	M. W. Marques (2014)	JX464049
<i>Lasiodiplodia caatinguensis</i> *	CMM 1325	Brazil	<i>Citrus sinensis</i>	Unknown	KT008006
<i>Lasiodiplodia exigua</i> *	CBS 137785	Tunisia	<i>Quercus ilex</i>	B. T. Linaldeddu (2012)	KJ638336
<i>Lasiodiplodia iraniensis</i> *	CBS 124710	Iran	<i>Salvadora persica</i>	J. Abdollahzadeh & A. Javadi (2007)	GU945334
<i>Lasiodiplodia jatrophiicola</i> *	CMM 3610	Brazil	<i>Jatropha curcas</i>	Machado et al. (2013)	KF226690
<i>Lasiodiplodia mahajangana</i> *	CBS 124927	Madagascar	<i>Terminalia catappa</i>	J. Roux (2009)	FJ900643
<i>Lasiodiplodia mahajangana</i>	CBS 124925	Madagascar	<i>Terminalia catappa</i>	J. Roux (2009)	FJ900641
<i>Lasiodiplodia missouriana</i> *	CBS 128311	USA	<i>Vitis vinifera</i>	J. R. Urbez-Torres (2011)	HQ288267
<i>Lasiodiplodia theobromae</i> *	CBS 164.96	Papua New Guinea	coral reef coast	A. Apitroot (1995)	AY640258
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	CBS 111530	Unknown	Unknown	Unknown	AY622054
<i>Lasiodiplodia vitis</i> *	CBS 124060	Italy	<i>Vitis vinifera</i>	S. Burruano (1909)	KX464642
<i>Lasiodiplodia viticola</i> *	UCD 2604MO	USA	<i>Vitis</i> sp.	Urbez-Torres et al. (2010)	HQ288269
<i>Neofusicoccum brasiliense</i> *	CMM 1338	Brazil	<i>Mangifera indica</i>	M.W. Marques (2012)	JX513610
<i>Neofusicoccum cordaticola</i> *	CBS 123634	South Africa	<i>Syzygium cordatum</i>	D. Pavlic (2009)	EU821868
<i>Neofusicoccum occultatum</i> *	CBS 128008	Australia	<i>Eucalyptus grandis</i> ,hybrid	T. I. Burgess (2002)	EU339509
<i>Neofusicoccum parvum</i> *	CMW 9081	NewZealand	<i>Actinidia delictosa</i>	S. R. Pennycook & G. J. Samuels (2003)	AY236888
<i>Neofusicoccum ribis</i> *	CBS 115475	USA	<i>Ribes</i> sp.	B. Slippers & G. Hudler (2000)	AY236877
<i>Neoscytalidium dimidiatum</i> *	CBS 145.78	UK	Human skin and nails	C. K. Campbell (1973)	KF531795
<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>	CBS 499.66	Mali	<i>Mangifera indica</i>	J. Brun (2013)	KF531798
<i>Pseudofusicoccum stromaticum</i>	CBS 117448	Venezuela	<i>Eucalyptus hybrid</i>	Slippers et al. (2006)	AY693975
<i>Pseudofusicoccum stromaticum</i>	CBS 117449	Venezuela	<i>Eucalyptus hybrid</i>	Mohali et al. (2006)	DQ436936



(Bootstrap) ۱۰۰۰ تکرار رسم گردید.

## آزمون بیماری‌زایی

در این مطالعه ۱۰ جدایه (دو جدایه از هر گونه) برای انجام آزمون بیماری‌زایی انتخاب گردید. برای انجام این آزمون، ابتدا جدایه‌های خالص مورد نظر بر روی محیط کشت PDA کشت و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و تاریکی نگهداری شدند. عمل مایه‌زنی روی شاخه‌های زیتون به طول ۳۰-۵۰ سانتی‌متر و قطر حدود ۳-۱/۵ سانتی‌متر که از باغ‌های اطراف استان کرمان جمع‌آوری شده بودند انجام شد. جهت حذف عوامل پوده‌رست، ابتدا سطح هر کدام از شاخه‌ها با الکل اتیلیک ۹۵ درصد اسپری شد. سپس روی سطح شاخه‌ها یک زخم به قطر چهار میلی‌متر با استفاده از چوب پنبه سوراخ‌کن به گونه‌ای ایجاد گردید تا پوست به طور کامل برداشته شود و بافت چوب مشخص گردد. در مرحله بعد یک قرص میسلومیوم چهار میلی‌متری از پرگنه ۱۰ روزه هر جدایه برداشته شد و در محل زخم قرار داده شد. برای جلوگیری از خشک شدن محل مایه‌زنی، مقداری پنبه مرطوب شده با آب سترون روی قرص میسلومیوم قرار گرفت و پس از آن محل مایه‌زنی شده با پارافیلیم به طور کامل پوشانده شد. در تیمارهای شاهد از یک قرص میسلومیوم محیط کشت PDA بدون قارچ استفاده گردید. شاخه‌های مایه‌زنی شده در گلدان‌هایی به قطر ۳۵ سانتی‌متر و حاوی حدود سه لیتر آب سترون قرار داده شدند. برای جلوگیری از تبخیر آب، روی هر گلدان یک پوشش پلاستیکی قرار داده شد. این آزمون در یک طرح کاملاً تصادفی و با پنج تکرار برای هر تیمار انجام شد. پس از ۴۰ روز، محل مایه‌زنی باز و میزان تغییر رنگ بافت چوب در محل مایه‌زنی شده اندازه‌گیری شد. برای انجام آزمون کخ از نواحی تغییر رنگ

یافته چوب، حد واسط بین بافت سالم و آلوده، ۱۵ قطعه به اندازه چهار تا پنج میلی‌متر جدا و مانند آنچه در قبل گفته شد ضد عفونی و سپس روی محیط کشت PDA قرار داده شدند. تشتک‌های پتری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری و قارچ‌های جداسازی شده از نظر ریخت‌شناسی مورد بررسی و شناسایی قرار گرفتند.

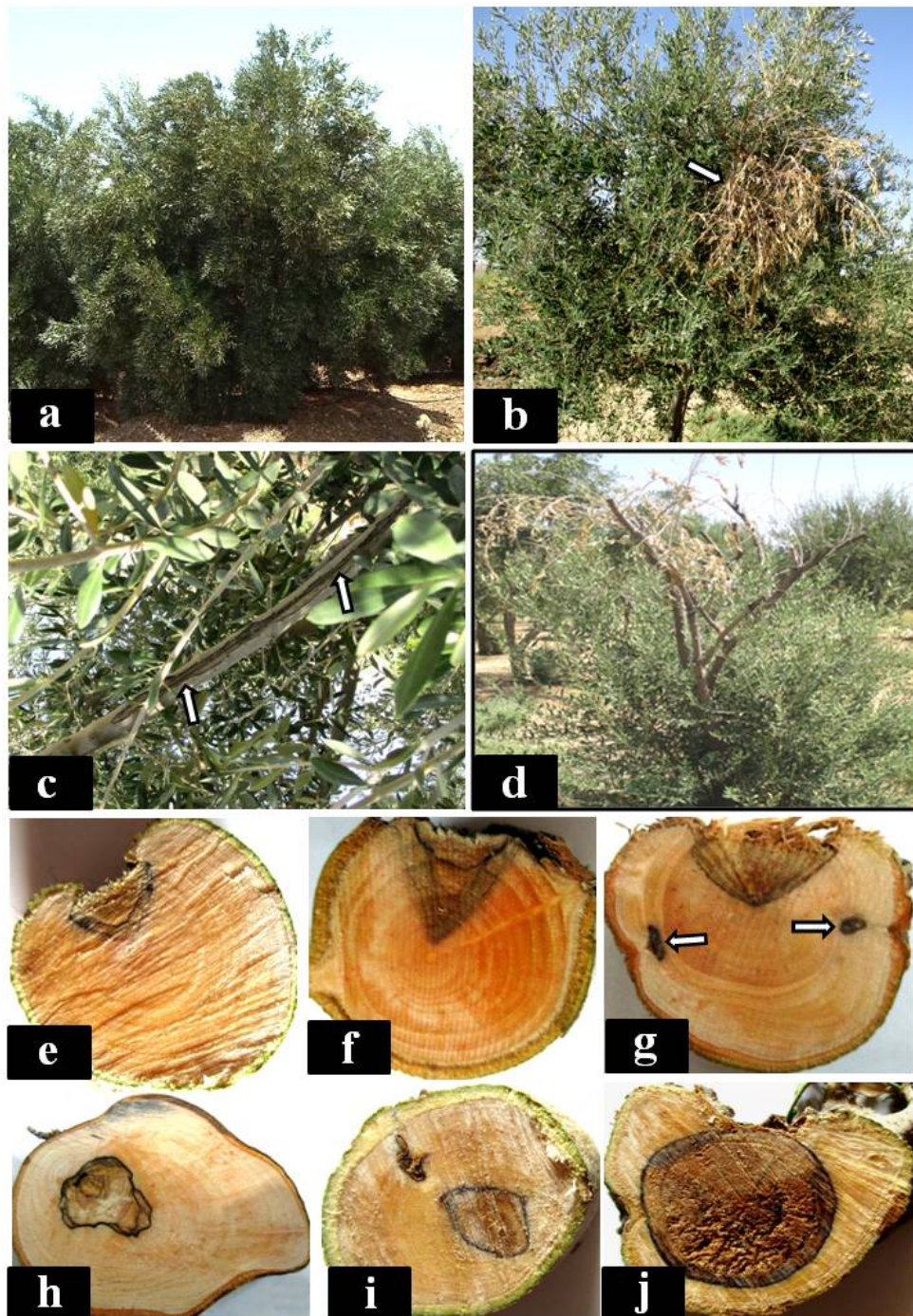
## نتایج

### ارزیابی و جمع‌آوری نمونه‌ها

در این مطالعه از ۱۲ باغ و ۷۱ درخت زیتون در استان‌های کرمان (۱۰ باغ و ۶۴ درخت) و مازندران (دو باغ و هفت درخت) در طول بهار و تابستان نمونه‌برداری صورت گرفت (جدول ۱). مهمترین نشانه‌های خارجی زردی، سرخشکیدگی و شانکرهای شاخه و تنه (شکل ۱، a تا d) و پس از تهیه برش‌های عرضی مهمترین نشانه‌های داخلی مشاهده شده که شامل بافت مردگی نامنظم، بافت مردگی منظم، بافت مردگی گوه‌ای شکل و رگه‌های قهوه‌ای تا سیاه رنگ بودند (شکل ۱، e تا j).

### شناسایی ریخت‌شناسی جدایه‌ها

در کل تعداد ۱۵۹ جدایه قارچی از بافت‌های تغییر رنگ یافته چوب جداسازی گردید که از این تعداد ۵۶ جدایه (۳۵/۲۲ درصد) متعلق به خانواده *Botryosphaeriaceae* بودند. این جدایه‌ها روی محیط کشت PDA دارای رشد سریع بودند و در ابتدا به صورت ریشه‌ای و سفید رنگ رشد می‌کردند ولی با گذشت زمان از بخش‌های مرکزی به سمت حاشیه پرگنه‌ها رنگ آنها از سفید به خاکستری تغییر کرد. این تغییر رنگ به گونه‌ای بود که بعد از چند روز تمام پرگنه به رنگ تیره درآمد. بر اساس منابع موجود تمام جدایه‌هایی که دارای این نوع ویژگی‌ها بودند در ابتدا به



شکل ۱. مهمترین نشانه‌های خارجی (a تا d) و داخلی (e تا j) بیماری بر روی درختان زیتون، a: یک درخت کاملاً سالم، b: سرخشکیدگی شاخه، c: شانکر شاخه، d: یک درخت با نشانه‌های شدید زوال، e و f: بافت مردگی گوشتی، g: وقوع نشانه‌های بافت مردگی گوشتی با شکل نامنظم و بافت مردگی به شکل نامنظم (با فلش نشان داده شده‌اند) بر روی یک شاخه، h: بافت مردگی به شکل نامنظم با رگه‌های سیاه پیرامونی، i: بافت مردگی به شکل نامنظم، j: بافت مردگی منظم بافت چوب به صورت پیشرفته.

Fig. 1. Main external (a to d) and internal wood (e-j) disease symptoms on olive trees. a: a healthy tree, b: branch dieback, c: branch canker, d: a tree showing severe decline symptoms, e and f: wedge-shaped necrosis, g: co-occurrence of wedge-shaped necrosis and irregular wood necrosis (indicated by arrows), h: irregular wood necrosis surrounded by black wood streaking, i: irregular wood necrosis, j: extensive central necrosis.

جدایه‌های آخرین گروه پرگنه‌های خاکستری تا خاکستری تیره با ریشه‌های هوایی تولید می‌کردند. این جدایه‌ها زنجیره‌ای از آرتروکنیدیوم‌های قهوه‌ای و پودری شکل روی محیط کشت تولید می‌کردند که از ویژگی‌های بارز گونه‌های جنس *Neoscytalidium* spp. می‌باشد. کنیدیوم‌ها در این جنس دوکی شکل، یک سلولی و شفاف بودند و در برخی از موارد نیز به صورت سه سلولی دیده شدند. علاوه بر جدایه‌های گفته شده در بالا، جدایه‌های دیگری از جنس‌های *Phoma*, *Alternaria*, *Paecilomyces* و سایر قارچ‌ها نیز از شاخه درختان زیتون بیمار جداسازی گردید که در این تحقیق مد نظر قرار نگرفتند.

#### شناسایی ملکولی و واکاوی تبارشناسی جدایه‌ها

جستجوی اولیه بلاست در بانک ژن نشان داد که توالی‌های *tef-1α* جدایه‌های انتخاب شده *Botryosphaeriaceae* از این مطالعه ۹۹/۵-۱۰۰ درصد با جدایه‌های *Botryosphaeria dothidea* (GenBank KY393188)، *Diplodia seriata* (GenBank KY312608)، *Dothiorella sarmentorum* (GenBank MF398948)، *Lasiodiplodia theobromae* (GenBank MK051100) و *Neoscytalidium hyalinum* (GenBank KF531795) شباهت داشتند.

در کل تعداد کل نوکلوتیدها با احتساب gap‌ها در همدیف سازی توالی مربوط به ژن *tef-1α* جدایه‌ها شامل ۳۹۹ ویژگی بود، که ۱۳۱ ویژگی حفاظت شده، ۲۶۴ ویژگی متغیر و *uninformative parsimony* و ۱۹۷ ویژگی *informative parsimony* بودند (TL= 630، CI= 0.611، RI= 0.93). یکی از درختان رسم شده بر اساس MP در شکل ۲ با شاخص اعتبار سنجی ۱۰۰۰ تکرار در

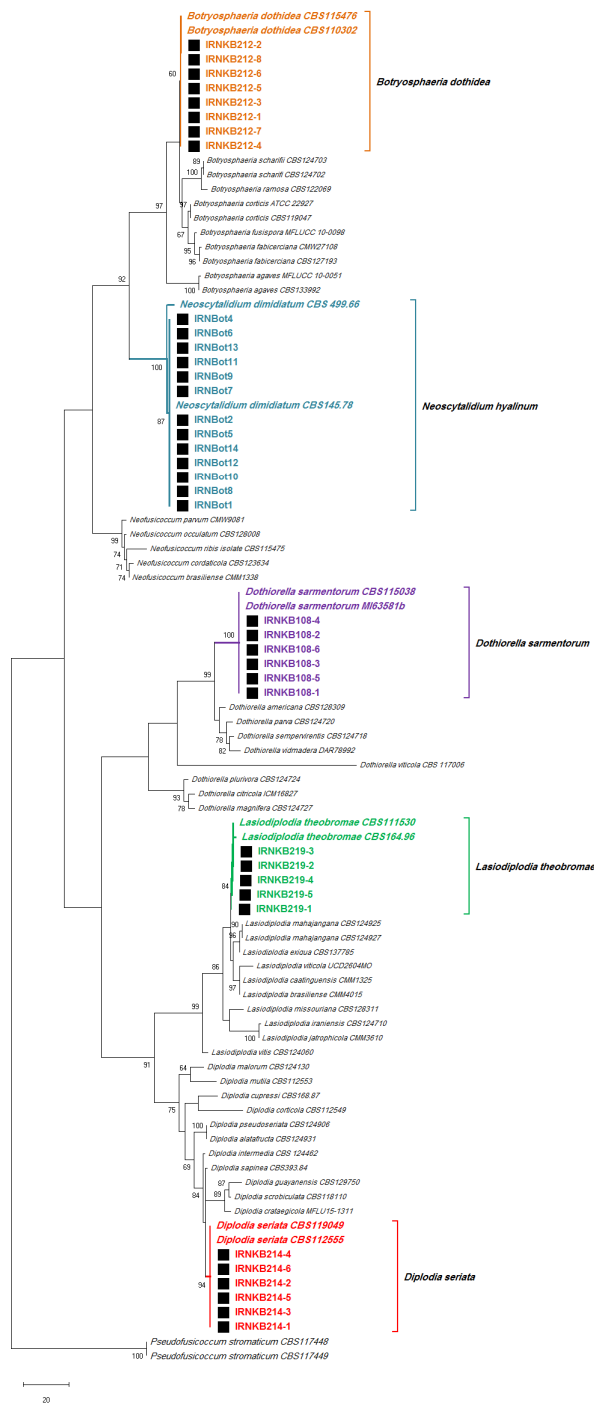
عنوان اعضای خانواده *Botryosphaeriaceae* در نظر گرفته شدند (Slippers et al. 2007; Phillips et al. 2013). جدایه‌های بدست آمده بعد از گذشت ۲۵-۱۵ روز روی برگ‌های کاج تولید پیکنیدیوم کردند. با تهیه اسلاید میکروسکوپی از پیکنیدیوم‌های تشکیل شده، جدایه‌ها از نظر ویژگی‌های محیط کشت و کنیدیوم‌ها به پنج گروه تقسیم شدند.

گروه اول روی محیط کشت PDA دارای میسلیم‌های هوایی زیاد و شفاف بودند و در روز هفتم پرگنه قارچ کاملاً تیره گردید. کنیدیوم‌های این گروه شفاف، باریک، دوکی شکل و کشیده بودند. بر اساس ویژگی‌های ارزیابی شده اعضای این گروه به عنوان *Botryosphaeria* spp. در نظر گرفته شدند.

جدایه‌های گروه دوم دارای کنیدیوم‌هایی سلولی که شفاف بودند و با گذشت زمان و با خارج شدن از پکنیدیوم یک یا دو سلولی و تیره دیده می‌شدند. این جدایه‌ها به عنوان *Diplodia* spp. شناسایی شدند.

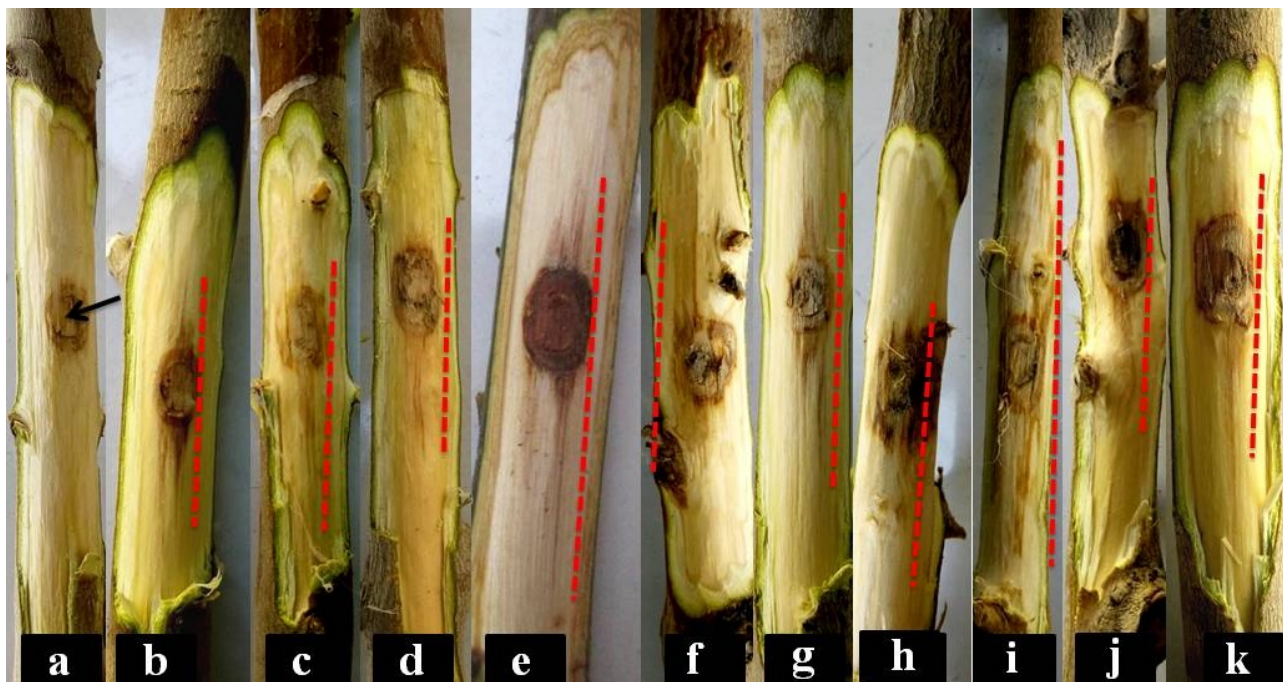
اعضای گروه سوم در ابتدا دارای کنیدیوم‌های شفاف و بدون دیواره عرضی بودند که بعداً در حالی که هنوز به سلول مولد کنیدیوم متصل بودند به صورت قهوه‌ای روشن تا تیره با یک دیواره عرضی دیده می‌شدند. کنیدیوم‌ها تخم مرغی تا بیضی شکل و دارای نوک‌های گرد بودند. بر اساس این خصوصیات این گروه به عنوان *Dothiorella* spp. در نظر گرفته شدند.

کنیدیوم‌ها در جدایه‌های گروه چهارم در ابتدا به صورت تک سلولی و شفاف بودند و هنگام خارج شدن از پیکنیدیوم تیره و دارای یک دیواره عرضی می‌شدند. روی کنیدیوم‌های این گروه خطوط طولی نیز دیده می‌شد. اعضای این گروه به عنوان *Lasiodiplodia* spp. شناسایی شدند.



شکل ۲. درخت تبارشناسی بدست آمده برای گونه‌های *Botryosphaeriaceae* بر اساس ترادف ژن *tef-1α* و روش Maximum parsimony. درجه اعتبار سنجی بر اساس ۱۰۰۰ تکرار در قسمت گره‌ها نشان داده شده است. دو جدایه از *Pseudofusicoccum stromaticum* (CBS 117448, CBS 117449) به عنوان آرایه‌های خارج از گروه (Outgroup) در نظر گرفته شده است و جدایه‌های ایرانی نیز به صورت رنگی نشان داده شده است.

Fig. 2. A parsimonious tree for species of *Botryosphaeriaceae* obtained from *tef-1α* sequence data. MP bootstrap values based on 1000 replicates are given at the nodes. Two isolates of *Pseudofusicoccum stromaticum* (CBS 117448, CBS 117449) was used as out-group and Iranian isolates obtained in this study shown in color.



شکل ۳. آزمون‌های بیماری‌زایی گونه‌های *Botryosphaeriaceae* بر روی شاخه‌های بریده شده درخت زیتون (۴۰ روز بعد از مایه‌زنی). a: تیمار شاهد b و c: *Botryosphaeria dothidea* (جدایه‌های IRNKB212-1 و IRNKB212-2)، d و e: *Diplodia seriata* (جدایه‌های IRNKB214-1 و IRNKB214-2)، f و g: *Dothiorella sarmentorum* (جدایه‌های IRNKB108-1 و IRNKB108-2)، h و i: *Lasiodiplodia theobromae* (جدایه‌های IRNKB2019-1 و IRNKB2019-2)، j و k: *Neoscytalidium hyalinum* (جدایه‌های IRNBot1 و IRNBot2).

**Fig. 3.** Pathogenicity tests of *Botryosphaeriaceae* species inoculated onto detached shoots of olive tree (45 days after inoculation); a: control, b and c: *Botryosphaeria dothidea* (IRNKM-KB212-1 and IRNKB212-2), d and e: *Diplodia seriata* (IRNKB214-1 and IRNKB214-2), f and g: *Dothiorella sarmentorum* (IRNKB108-1 and IRNKB108-2), h and i: *Lasiodiplodia theobromae* (IRNKB219-1 and IRNKB219-2), j and k: *Neoscytalidium hyalinum* (IRNBot1 and IRNBot2).

جدایه‌های مایه‌زنی شده روی شاخه‌های درخت زیتون بعد از گذشت ۴۰ روز باعث تغییر رنگ بافت چوب در بخش‌های بالایی و پایینی محل مایه‌زنی شدند (شکل ۳). مقایسه میانگین کل طول لکه‌های ایجاد شده روی شاخه‌های مایه‌زنی شده نشان داد که همه جدایه‌های مورد استفاده به جز دو جدایه *N. hyalinum* دارای تفاوت معنی‌داری (در سطح احتمال ۰.۵٪) با تیمار شاهد هستند (جدول ۳). در این زمینه بیشترین و کمترین طول لکه ایجاد شده به ترتیب مربوط به جدایه‌های *D. seriata* و *N. hyalinum* بود. در بین تمام جدایه‌های مایه‌زنی شده

محل گره‌ها نشان داده شده است. بر اساس واکاوی تبارشناسی، جدایه‌های *Botryosphaeriaceae* بدست آمده در این مطالعه در پنج گروه تبارشناسی قرار گرفتند که به عنوان *B. dothidea* (۱۱ جدایه)، *D. seriata* (هشت جدایه)، *Do. sarmentorum* (هشت جدایه)، *L. theobromae* (هفت جدایه) و *N. hyalinum* (۲۲ جدایه) شناسایی شدند.

### آزمون بیماری‌زایی

بر اساس نتایج بدست آمده از آزمون بیماری‌زایی،

جدول ۳. میانگین طول لکه و درصد جداسازی مجدد گونه‌های *Botryosphaeriaceae* مایه زنی شده بر روی شاخه درختان زیتون، ۴۰ روز بعد از عمل مایه زنی.

**Table 3. Mean lesion length and re-isolation frequencies of *Botryosphaeriaceae* species inoculated onto detached shoot of olive trees 40 days after inoculation.**

Isolates	Species	Code	Mean lesion length (mm) <sup>®</sup>			Re-isolation frequency (%)
			Up	Down	Total	
	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	IRNKB212-1	10.600 <sup>bc</sup>	17.200 <sup>ab</sup>	27.60 <sup>b</sup>	64
	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	IRNKB212-2	10.600 <sup>bc</sup>	16.200 <sup>ab</sup>	26.80 <sup>b</sup>	86
	<i>Diplodia seriata</i>	IRNKB214-1	11.000 <sup>bc</sup>	25.600 <sup>ab</sup>	36.60 <sup>ab</sup>	86
	<i>Diplodia seriata</i>	IRNKB214-2	28.200 <sup>a</sup>	28.600 <sup>a</sup>	56.80 <sup>a</sup>	93
	<i>Dothiorella sarmentorum</i>	IRNKB108-1	12.800 <sup>bc</sup>	17.800 <sup>ab</sup>	30.60 <sup>b</sup>	64
	<i>Dothiorella sarmentorum</i>	IRNKB108-2	12.800 <sup>bc</sup>	16.600 <sup>ab</sup>	29.40 <sup>b</sup>	64
	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	IRNKB219-1	11.600 <sup>bc</sup>	18.200 <sup>ab</sup>	29.80 <sup>b</sup>	100
	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	IRNKB219-2	18.400 <sup>ab</sup>	19.600 <sup>ab</sup>	38.00 <sup>ab</sup>	100
	<i>Neoscytalidium hyalinum</i>	IRNBot1	10.400 <sup>bc</sup>	15.800 <sup>b</sup>	26.20 <sup>bc</sup>	85
	<i>Neoscytalidium hyalinum</i>	IRNBot2	9.000 <sup>bc</sup>	17.200 <sup>ab</sup>	25.30 <sup>bc</sup>	93
	PDA plug		1.400 <sup>c</sup>	2.000 <sup>c</sup>	3.40 <sup>c</sup>	0
	LSD (P<0.005)		12.297	12.297	23.124	

طول لکه‌هایی که دارای حروف مشترک هستند اختلاف معنی داری در سطح احتمال ۰.۵ ندارند.

\*: Lesion lengths followed by the same letter were not significantly different (P≤0.05).

*L. Do. sarmentorum*, *D. seriata*, *B. dothidea* و *N. hyalinum* شناسایی شدند. در این مطالعه مهمترین نشانه‌های خارجی مشاهده شده شامل شانکر و سرخشکیدگی بودند. در سال ۲۰۰۵، Romero و همکاران سرخشکیدگی ایجاد شده توسط گونه‌های *Botryosphaeriaceae* روی زیتون را توصیف کردند (Romero et al. 2005). در سایر مطالعات انجام شده روی زیتون نیز نشانه‌های خارجی شامل شانکر و سرخشکیدگی گزارش شده است (Moral et al. 2010, Carlucci et al. 2013, 2017). در سال‌های اخیر گونه‌های مختلفی از خانواده *Botryosphaeriaceae* از درختان مختلف در ایران جداسازی و گزارش شده است که می‌توان به درختان جنگلی (Kazemzadeh Chakusary et al. 2019)، پسته (Mohammadi et al. 2015)، درختان میوه هسته‌دار (Soltaninejad et al. 2017)، مرکبات (Abdollahzadeh et al., 2009, 2010) و حتی برخی از درختان بومی مانند درخت جم (Panahandeh et al.

بیشترین طول لکه‌ها مربوط به جدایه IRNKB214-2 (از گونه *D. seriata*) و کمترین طول لکه نیز مربوط به جدایه IRNBot2 (از گونه *N. hyalinum*) بود. نتایج نسبتاً مشابهی نیز در مورد طول لکه‌های بالا و پایین محل مایه‌زنی شده ثبت گردید با این تفاوت که در ارزیابی طول لکه‌های ایجاد شده در بخش پایینی محل مایه‌زنی شده همه جدایه‌ها تفاوت معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد نشان دادند. درصد جداسازی مجدد قارچ‌های مایه‌زنی شده نیز بین ۶۴ تا ۱۰۰ درصد متغیر بود.

## بحث

این مطالعه به منظور شناسایی اعضای خانواده *Botryosphaeriaceae* همراه با بیماری‌های شاخه و تنه درختان زیتون در استان‌های کرمان و مازندران انجام شد. پنج گونه از این خانواده از بافت تغییررنگ یافته چوب باغ‌های زیتون جداسازی و شناسایی گردید که در نهایت بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و مولکولی به عنوان

به عنوان عامل پوسیدگی میوه زیتون از اسپانیا گزارش گردید (Moral et al. 2007) و در سال ۲۰۱۲ به عنوان عامل سرخشکیدگی درختان زیتون از کروواسی نیز گزارش شد (Kaliterna et al. 2012). گونه Do. sarmentorum نیز به عنوان یکی دیگر از اعضای خانواده Botryosphaeriaceae دارای انتشار جهانی است و از درختان میوه مختلفی از جمله جنس‌های *Malus*، *Prunus* و *Pyrus* جداسازی شده است (Phillips et al. 2013). طی مطالعه‌ای در کشور ایتالیا این گونه از پنج میزبان مختلف جداسازی گردید (Dissanayake et al. 2016) ولی تاکنون گزارشی از آن روی درختان زیتون نشده است. آخرین گونه‌ای که در این مطالعه از درختان زیتون جداسازی گردید گونه *L. theobromae* بود. این گونه در سال ۲۰۱۳ از درختان زیتون از کالیفرنیا جداسازی و شناسایی گردید (Urbez-Torres et al. 2013) و تاکنون از میزبان‌های زیادی در دنیا نیز گزارش گردیده است. در ایران گونه *L. theobromae* از درختان میوه هسته‌دار، انبه و درختان جنگلی گزارش شده است (Abdollahzadeh et al., 2010; Hashemi and Mohammadi, 2016; Soltaninejad et al., 2017). در یک جمع‌بندی کلی، در زیتون گونه‌های Botryosphaeriaceae در ابتدا به عنوان عامل پوسیدگی میوه معرفی شدند (Phillips et al. 2005, Lazzizzera et al. 2008, Moral et al. 2008, Chattaoui et al. 2011)، اما در برخی موارد گزارش‌هایی از همراهی برخی از گونه‌ها با سرخشکیدگی، شانکر و سوختگی سرشاخه‌ها نیز دیده می‌شود (Taylor et al. 2001, Romero et al. 2005, Moral et al. 2010, Kaliterna et al. 2012). تاکنون نه گونه از این خانواده به عنوان عامل سرخشکیدگی شاخه‌های زیتون از کالیفرنیا، ایتالیا و تونس گزارش شده‌اند که شامل *D. dothidea*، *D. mutila*، *D.*

(2019) اشاره نمود. در این مطالعه فراوان‌ترین گونه‌ای که جداسازی گردید مربوط به *N. hyalinum* (۳۹/۲۸ درصد از کل جدایه‌های Botryosphaeriaceae) بود. این گونه قارچی بیشتر در کشورهای گرمسیر دیده می‌شود و تاکنون از تعداد زیادی از گیاهان چوبی گزارش شده است (Phillips et al. 2013). گونه *B. dothidea* به عنوان یک عامل بیماری‌زا در مناطق معتدل در دنیا شناخته شده است و باعث شانکر، سرخشکیدگی و پوسیدگی میوه می‌شود (Ma et al. 2001). در ابتدا این قارچ به عنوان عامل بیماری پوسیدگی میوه زیتون همراه با لکه‌های گرد تا بیضوی (بیماری دالماتیان (Dalmatian)) معرفی گردید (Thümen 1883). این گونه از میزبان‌های متعددی شامل درختان بادام (Inderbitzin et al., 2010)، درختان پسته (Chen et al. 2014a, Mohammadi et al. 2015)، درختان گردو (Chen et al. 2014b, Li et al. 2016) و درختان زیتون (Urbez-Torres et al. 2013, Abdollahzadeh et al. 2013) گزارش شده است. در سال ۲۰۱۰، Moral و همکاران این قارچ را به عنوان عامل شانکر و سوختگی سرشاخه‌های زیتون در کالیفرنیا معرفی کردند و گزارش کردند که در اسپانیا نیز از تمام میوه‌های زیتون با نشانه‌های بیماری دالماتیان قابل جداسازی است (Moral et al. 2010). گونه *B. dothidea* به عنوان مهمترین گونه همراه با میوه‌های پوسیده شده زیتون در ایتالیا شناخته می‌شود (Lazzizzera et al. 2008). در مطالعه حاضر، گونه *B. dothidea* از شاخه‌های دارای شانکر و سرخشکیدگی جداسازی گردید. گونه‌های *Diplodia* انتشار جهانی دارند و به عنوان عوامل بیماری‌زا، درون‌رست و عوامل بیماری‌زای پنهان شناخته می‌شوند (Slippers & Wingfield 2007). گونه *D. seriata* به عنوان یکی از گونه‌های معروف این جنس برای اولین بار

Larignon et al. 2001) در حالیکه بررسی‌های مشابه در استرالیا بیانگر غیر بیمارگر بودن این گونه روی این میزبان می‌باشد (Taylor et al. 2005). اصولاً تفاوت در بیماری‌زایی یک گونه می‌تواند در اثر تفاوت در ژنتیک بیماری‌زایی آن، روش مایه‌زنی، نوع میزبان و میزان حساسیت آن و شرایط مایه‌زنی و مدت زمان آن باشد (Úrbez-Torres et al. 2008). اگرچه تاکنون گونه‌های مختلفی از *Botryosphaeriaceae* از درختان زیتون در دنیا و ایران جداسازی و گزارش شده است ولی باید به این نکته نیز توجه نمود که بیشتر گونه‌های گزارش شده از برخی از کشورها و به ویژه ایران معمولاً از پیکنیدیوم‌های تشکیل شده بر روی چوب جداسازی شده‌اند و اطلاع دقیقی از بیماری‌زایی آنها نیز در دست نمی‌باشد. بر اساس منابع موجود این بررسی اولین گزارش از *D. seriata* و *L. theobromae* از درختان زیتون در ایران می‌باشد. همچنین این مطالعه اولین گزارش از *Do. sarmentorum* همراه با شانکر و سرخشکیدگی درختان زیتون در دنیا محسوب می‌گردد. بررسی‌های بیشتر روی بیماری‌های شاخه و تنه درختان زیتون در مناطق مختلف کشور نقش و اهمیت گونه‌های خانواده *Botryosphaeriaceae* را در زوال این درختان مشخص خواهد نمود.

*Neof. L. theobromae*, *Do. iberica*, *seriata*, *Neof. Neof. luteum*, *Neof. parvum*, *maditeraneum* Moral et al. 2010, 2017, ) می‌باشند (*vitifusiforme* Chattaoui et al. 2012, Carlucci et al. 2013, Kaliterna et al. 2012, Úrbez-Torres et al. 2013). از ایران نیز گونه‌های *L. hormozganensis*, *B. iraniana* (Abdollahzadeh et al. 2009, 2010), *M. N. hyalinum*, *B. dothidea* (Sanei & Razavi 2012), *phaseolina* (Abdollahzadeh et al. 2013) و *Do. iranica* (Abdollahzadeh et al. 2014) از زیتون گزارش شده‌اند. در این بررسی نتایج بدست آمده از آزمون بیماری‌زایی نشان داد که جدایه‌های *D. seriata* از قدرت بیماری‌زایی بیشتری نسبت به سایر گونه‌ها برخوردار هستند. به طور کلی در بیشتر موارد نتایج متفاوتی از بیماری‌زایی گونه‌های *Botryosphaeriaceae* روی میزبان‌های مختلف در کشورهای گوناگون گزارش شده است که در برخی از مواد نیز نتایج چندان همسو نبوده است. یکی از گونه‌های مورد بحث *D. seriata* است که بیماری‌زایی آن روی میزبان‌های مختلف با نتایج ضد و نقیضی همراه می‌باشد. به عنوان مثال بررسی‌های انجام شده در آفریقای جنوبی، شیلی و فرانسه نشان داده است که این گونه یک بیمارگر مهم بر روی انگور می‌باشد (Auger et al. 2004; )

## منابع

- Abdollahzadeh J., Mohammadi Goltapeh E., Javadi A., Shams-Bakhsh M., Zare R. and Phillips A. J. L. 2009. *Barriopsis iraniana* and *Phaeobotryon cupressi*: two new species of the *Botryosphaeriaceae* from trees in Iran. *Persoonia* 23:1-8.
- Abdollahzadeh J., Javadi A., Mohammadi Goltapeh E., Zare R. and Phillips A. J. L. 2010. Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. *Persoonia* 25:1-10.
- Abdollahzadeh J., Zare R. and Phillips A. J. L. 2013. Phylogeny and taxonomy of *Botryosphaeria* and *Neofusicoccum* species in Iran, with description of *Botryosphaeria scharifii* sp. nov. *Mycologia* 105:210-220.
- Abdollahzadeh J., Javadi A., Mohammadi Goltapeh E., 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.



- Adesemoye A. O. and Eskalen A. 2011. First report of *Spencermartinsia viticola*, *Neofusicoccum australe*, and *N. parvum* causing branch canker of citrus in California. *Plant Disease* 95:770.
- Adesemoye A. O., Mayorquin J. S., Wang D. H., Twizeyimana M., Lynch S. C. and *et al.* 2014. Identification of species of *Botryosphaeriaceae* causing bot gummosis in citrus in California. *Plant Disease* 98:55-61.
- Arabnezhad M. and Mohammadi H. 2012. Study of esca and petri disease of grapevine in kerman province. *Iranian Journal of Plant Pathology* 48:277-283.
- Auger J., Esterio M., Ricke G. and Pérez I. 2004. Black dead arm and basal canker of *Vitis vinifera* cv. Red Globe caused by *Botryosphaeria obtusa* in Chile. *Plant Disease* 88:1286.
- Carbone I. and Kohn L. M. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91:553-556.
- Carlucci A., Raimondo M. L., Cibelli F., Phillips A. J. L. and Lops F. 2013. *Pleurostomophora richardsiae*, *Neofusicoccum parvum* and *Phaeoacremonium aleophilum* associated with a decline of olives in southern Italy. *Phytopathologia Mediterranea* 52:517-527.
- Chattaoui M., Rhouma A., Krid S., Ali Triki M., Moral J., Msallem M. and Trapero A. 2011. First report of fruit rot of olives caused by *Botryosphaeria dothidea* in Tunisia. *Plant Disease* 95:770.
- Chen S. F., Morgan D. P. and Michailides T. J. 2014a. *Botryosphaeriaceae* and *Diaporthaceae* associated with panicle and shoot blight pistachio in California, USA. *Fungal Diversity* 67:157-179.
- Chen S. F., Morgan D. P., Hasey J. K., Anderson K. and Michailides T. J. 2014b. Phylogeny, morphology, distribution, and pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* and *Diaporthaceae* from English walnut in California. *Plant Disease* 98:636-652.
- Dissanayake A. J., Camporesi E., Hyde K. D., Phillips A. J. L., Fu C. Y., Yan J. Y. and Li X. 2016. *Dothiorella* species associated with woody hosts in Italy. *Mycosphere* 7:51-63.
- Doyle J. J. and Doyle J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, v.12, p.13-15.
- FAOSTAT 2017. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/faostat/es/#dat>.
- 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.
- Hosseini-Mazinani M. and Torkzaban B. 2013. Iranian olive catalogue "Morphological and molecular characterization of Iranian olive germplasm". National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB). Tehran. 210 p.
- 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.
- Kaliterna K., Ivic I., Bencic D. and Mesic A. 2012. First report of *Diplodia seriata* as causal agent of olive dieback in Croatia. *Plant Disease* 96:290.
- Kazemzadeh Chakusary M., Mohammadi H., 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.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz Ch. and Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35: 1547-1549.
- Li G. Q., Liu F. F., Li J. Q., Liu Q. L. and Chen S. F. 2016. Characterization of *Botryosphaeria dothidea* and *Lasiodiplodia pseudotheobromae* from English Walnut in China. *Journal of Phytopathology* 164:348-353.
- Larignon P., Fulchic R., Cere L. and Dubos B. 2001. Observations of black dead arm in French vineyards. *Phytopathologia Mediterranea* 40:336-342.
- Lazzizzera C., Frisullo S., Alves A. and Phillips, A. J. L. 2008. Morphology, phylogeny and pathogenicity of *Botryosphaeria* and *Neofusicoccum* species associated with drupe rot of olives in Southern Italy. *Plant Pathology* 57:948-956.
- Ma Z., Boehm E. W. A., Luo Y. and Michailides T. J. 2001. Population structure of *Botryosphaeria dothidea* from pistachio and other hosts in California. *Phytopathology* 91:665-672.
- McDonald V. and Eskalen A. 2011. *Botryosphaeriaceae* species associated with avocado branch cankers in California. *Plant Disease* 95:1465-1473.
- 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., Sarcheshmehpour M. and Mafi E. 2015. Fungal trunk pathogens associated with wood decay of pistachio trees in Iran. Spanish Journal of Agricultural Research 13:1-10.
- Moral J., Luque F. and Trapero A. 2007. First report of *Diplodia seriata*, the anamorph of "*Botryosphaeria*" *obtusata*, causing fruit rot of olive in Spain. Plant Disease 92:311.
- Moral J., Muñoz-Díez C., González N., Michailides T. J. and Trapero A. 2008. Genetic, morphological, and pathogenic diversity of *Botryosphaeriaceae* species from olive in Spain and California. Page 57 in: Abstracts of VI International Symposium on Olive Growing. Evora, Portugal.
- Moral J., Muñoz-Díez C., González N., Trapero A. and Michailides T. J. 2010. Characterization and Pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* species collected from olive and other hosts in Spain and California. Phytopathology 100:1340-1351.
- Moral J., Agustí-Brisach C., Pérez-Rodríguez M., Xavier C., Raya-Ortega M. C. Rhouma A., and Traper A. 2017. Identification of fungal species associated with branch dieback of olive and resistance of table cultivars to *Neofusicoccum mediterraneum* and *Botryosphaeria dothidea*. Plant Disease 101:306-316.
- 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 103:1809-1827.
- Panahandeh S., Mohammadi, H. and Gramaje, D. 2019. Trunk disease fungi associated with *Syzygium cumini* in Iran. Plant Disease 103:711-720.
- Phillips A. J. L., Rumbos I. C., Alves A., and Correia A. 2005. Morphology and phylogeny of *Botryosphaeria dothidea* causing fruit rot of olives. Mycopathologia 159:433-439.
- 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.
- Romero M. A., Sánchez M. E. and Trapero A. 2005. First report of *Botryosphaeria ribis* as a branch dieback pathogen of olive trees in Spain. Plant Disease published on-line as DOI:10.1094/PD-89-0208A.
- Sanei S. J. and Razavi S. E. 2012. Survey of olive fungal disease in north of Iran. Annual Review and Research in Biology 2:27-36.
- 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.
- 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.
- Smith H., Wingfield M. J., Crous P. W. and Coutinho T.A. 1996. *Sphaeropsis sapinea* and *Botryosphaeria dothidea* endophytic in *Pinus* spp. and *Eucalyptus* spp. in South Africa. South African Journal of Botany 62: 86-88.
- 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: 571-581.
- Taylor R. K., Hale C. N. and Hartill W. F. T. 2001. A stem canker disease of olive (*Olea europaea*) in New Zealand. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Sciences 29:219-228.
- Taylor A., Hardy G. E. St. J., Wood P. and Burgess T. 2005. Identification and pathogenicity of *Botryosphaeria* species associated with grapevine decline in Western Australia. Australasian Plant Pathology 34:187-195.
- Therios I. 2009. Olives, (Crop production science in horticulture;18). CABI International, www.cabi.org, 426p.
- Thümen F. 1883. Die Pilze des Oelbaumes. Boll. Soc. Adriat. Science Trieste 8:215-244.
- Torkzaban B., KayvanJoo A. H., Ardalan A., Mousavi S., Marriotti R., Baldoni L., Ebrahimie E., Ebrahimi M. and Hosseini-Mazinani M. 2015. Machine learning based classification of microsatellite variation: an effective approach for phylogeographic characterization of olive populations. PLoS One 11:e0143465.
- Triki M. A., HadjTaieb S. K., Cheffi M., Gharbi Y. and Rhouma A. 2015. First report of dieback of olive trees caused by *Neofusicoccum australe* in Tunisia. Journal of Plant Pathology 97:212-212.
- Úrbez-Torres J. R., Gubler W. D. and Luque J. 2007. First report of *Botryosphaeria iberica* and *B. viticola* associated with grapevine decline in California. Plant Disease 91:772.
- 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.
- Úrbez-Torres J. R., Peduto F., Vossen P. M., Krueger W. H. and Gubler W. D. 2013. Olive twig and branch dieback: etiology, incidence, and distribution in California. *Plant Disease* 97:231-244.
- 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.
- 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* 50:98-111.
- Zea-Bonilla T., González-Sánchez P. M., Martín-Sánchez P. M., Pérez-Jiménez R. M. 2007. Avocado dieback caused by *Neofusicoccum parvum* in the Andalusia region, Spain. *Plant Disease* 91:1052.