

مقایسه بیماری‌زایی بیماری‌گرهای عامل سرخشیدگی و زوال درختان بلوط در استان کرمانشاه

محمد صابرنسب^۱، صمد جمالی^{۲*}، علیرضا معرفت^۳ و سعید عباسی^۴

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه رازی کرمانشاه

۲، ۳ و ۴ به ترتیب، استادیار و دانشیاران گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه رازی کرمانشاه

(تاریخ دریافت: ۹۸/۰۹/۱۷ - تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۲/۰۸)

چکیده

بیماری زوال و خشکیدگی سرشاخه‌های درختان بلوط یک بیماری مهم در جنگل‌های زاگرس ایران محسوب می‌شود. وجود *Neoscytalidium novaehollandiae* و *Biscogniauxia mediterranea* و *Paecilomyces formosus* سرخشیدگی درختان بلوط در جنگل‌های استان کرمانشاه، ویژگی‌های مولکولی و مقایسه بیماری‌زایی بیماری‌گرها بررسی شد. در بررسی مولکولی با استفاده از ابزار جستجوی بلاست، هر سه بیماری‌گر همپوشانی و همولوژی ۱۰۰ درصدی با گونه‌های مذکور موجود در بانک ژن نشان دادند. در ارزیابی بیماری‌زایی مشخص شد که تمام جدایه‌های این سه بیماری‌گر قادر به ایجاد شانکر روی شاخه‌های بریده و نهال‌های مایه‌زنی شده درختان بلوط هستند. در اثبات بیماری‌زایی روی شاخه بریده سایر درختان جنگلی نیز هر سه گونه قادر به ایجاد علایم شانکر بودند. در مقایسه بیماری‌زایی روی نهال‌های دوساله تحت تنش خشکی، از نظر سرعت پیشرفت علایم بیماری اختلاف معنی‌داری بین این سه گونه وجود داشت، به طوری که گونه *B. mediterranea* در زمان کوتاه‌تری روی نهال‌های مایه‌زنی شده در شرایط تنش خشکی علایم ایجاد کرد. گونه *P. formosus* نسبت به دو گونه دیگر با سرعت کمتری روی نهال‌های مایه‌زنی شده علایم ایجاد کرد. علایم روی نهال‌های بلوط مایه‌زنی شده با این بیماری‌گرها به صورت شانکر ایجاد شد که به سمت بالا و پایین ناحیه مایه‌زنی شده پیشروی مشاهده شد. جهت تکمیل اصول کبج، جداسازی مجدد انجام شد. بررسی تأثیر دما بر رشد شعاعی گونه‌های بیماری‌گر نشان داد که هر سه گونه گرمادوست بوده و احتمال ارتباط این بیماری‌گرها با پدیده خشک‌سالی و گرمایش جهانی وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: *Biscogniauxia mediterranea*، شناسایی مولکولی، بلوط، ایران.

Pathogenicity evaluation of the pathogenic fungi causing oak tree dieback in Kermanshah province

Mohammad Saber Nasab¹, Samad Jamali^{2*}, Alireza Maaref³ and Saeed Abbasi⁴1. Master student of the Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Razi University, Kermanshah
2, 3 and 4, respectively Assistant Professor and Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Razi University, Kermanshah

(Received: December 8, 2019 - Accepted: February 27, 2020)

Oak dieback is one of the most important diseases that presently affects the Zagros oak forests (Northwest to Southeast of Iran). The presence of *Paecilomyces formosus*, *Biscogniauxia mediterranea*, and *Neoscytalidium novaehollandiae* associated with oak trees that show dieback and declining symptoms in the forests of Kermanshah province and the molecular and pathogenic characteristics of these pathogenic isolates were investigated. In the molecular analysis using blast search tools, all three pathogens showed homology of 100% with the species mentioned in the GenBank. Pathogenicity tests revealed that all isolates of these three pathogens were capable of producing cankers on detached branches and inoculated seedlings of oak trees. Our results showed that all three species obtained from oak trees could produce cankers on excised branches of other trees. In comparison with pathogenicity on two-year-old seedlings under drought stress, there was a significant difference between the three species in terms of the rate of disease progression, so that *B. mediterranea* caused symptoms on seedlings inoculated under drought stress in a shorter time. *Paecilomyces formosus* caused symptoms in a longer period on the inoculated seedlings than the other two species. After inoculation, all cankers that extended upward and downward from the point of inoculation were evident on stems of all inoculated seedlings. Re-isolation was performed, and isolates were compared to original cultures providing evidence for fulfilling Koch's postulates. Investigation of the effect of temperature on the radial growth of pathogenic species showed that all three species are thermophilic fungi, which may be related to warming and drought.

Keywords: *Biscogniauxia mediterranea*, molecular identification, oak, Iran.

* Corresponding author E-mail: jamali454@yahoo.com

مقدمه

بلوط با نام علمی *Quercus* از خانواده *Fagaceae*، دارای بیش از شش صد گونه است (Coombs, 1999). جنس بلوط در سرتاسر نیمکره شمالی یعنی آسیا، آمریکای شمالی، اروپا و آفریقا گسترش داشته و تا نزدیکی‌های خط استوا پیش می‌رود (Axelrod, 1983; Crepet & Nixon, 1989). در غرب ایران سه گونه اصلی و مهم بلوط شامل بلوط ایرانی *Quercus persica* (*Q. brantii*)، *Q. libani* و *Q. infectoria* وجود دارد (Jazirehi & Rostaghi, 2003) که این گونه‌های درختی حدود ۷۰ درصد از مساحت جنگل‌های استان کرمانشاه را پوشش داده است. جنگل‌های زاگرس به‌عنوان دومین زیست‌بوم جنگلی طبیعی کشور، نقش بسیار ارزنده‌ای در تأمین منابع آب و تعادل اقلیمی کشور دارد (HosseinZadeh et al., 2015)، و به‌عنوان سد دفاعی، ساکنان غرب کشور را از گزند ریزگردها در امان نگه می‌دارد. همچنین به‌واسطه وجود تانن در میوه اهمیت پزشکی دارد (Heaey et al., 2007). بلوط به‌عنوان تغذیه جایگزین در زمستان به مصرف دام‌ها می‌رسد (Rajablou, 2009) و همچنین از جمله مقاصد زیبا برای جلب گردشگران داخلی و خارجی است که ارائه خدمات رفاهی به گردشگران، اشتغال و درآمدزایی را برای افراد محلی به همراه دارد. از سال ۱۳۸۸، جنگل‌های زاگرس دچار بحران جدی شده به طوری که بیش از یک میلیون و سیصد هزار هکتار از این عرصه‌های جنگلی در معرض خشکیدگی قرار گرفته‌اند. در پی تغییرات اقلیمی و به دنبال آن ضعف فیزیولوژیک درختان بلوط، شرایط برای فعالیت تعدادی از آفات و بیماری‌های فرصت‌طلب مساعد شده (Guarín & Taylor, 2005) که نتیجه آن خشکیدگی و زوال درختان بلوط در جنگل‌های غرب کشور است. از جمله بیمارگرهایی که در سال‌های اخیر از بیش‌تر مناطق جنگلی در دنیا و ایران به‌عنوان یک بیمارگر عامل زوال درختان بلوط گزارش شده است، گونه قارچی *Biscogniauxia mediterranea* است (Jurc & Ogris, 2006; Ju et al., 1998; Manion et al., 1986; San Martín González & Rogers, 1993; Mirabolfathy et al., 2011; Tavakolee & Perozee,

2011; Ghasem Esfahlan et al., 2016). اخیراً گونه *obolarina persica* نیز به‌عنوان عامل زوال درختان بلوط در ایران گزارش شده است (Mirabolfathy et al., 2013). علاوه بر این، گونه‌های قارچی زیادی به‌عنوان عامل زوال درختان بلوط گزارش شده‌اند که تعدادی از آن‌ها عبارت‌اند از *Fusicoccum quercus*، *Paecilomyces formosus*، *Obolarina persica*، *Diplodia mutila*، *Ophiostoma querci*، *Stereum rugosum*، *Apiognomonina quercina*، *Ceratocystis*، *Pezicula cinnamomea*، *Coryneum*، *Botryosphaeria* spp.، *fagacearum* و *Phaeoacremonium* spp. *depressum* (Butin, 1995; Schmidt, 2006; Simonin et al., 1994; Halliwell, 1966; Braithwaite et al., 2007; Lynch et al., 2013). گرمایش جهانی و کم شدن ذخیره آب‌های زیرزمینی باعث ضعیف شدن درختان و در نتیجه حساس شدن آن‌ها به بیمارگرهای قارچی می‌شود (Guarín & Taylor, 2005; Allen et al., 2010). در طی دهه‌های اخیر تغییرات آب‌وهوایی از جمله افزایش دما و کاهش آب خاک در جنگل‌های زاگرس اتفاق افتاده که موجب مستعد شدن درختان بلوط به بیمارگرهای قارچی بخصوص قارچ‌هایی که گرمادوست هستند شده است. هدف این پژوهش مقایسه بیماری‌زایی قارچ‌های بیمارگر جداسازی شده از درختان بلوط در استان کرمانشاه است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و جداسازی

نمونه‌برداری از جنگل‌های اسلام‌آباد و گیلان غرب از فروردین ۱۳۹۴ تا فروردین ۱۳۹۵ از درختان بلوط و همچنین سایر گونه‌های درختان جنگلی از جمله پسته وحشی، زالزالک، انجیر، کیکم، زغال‌اخته و بادام‌کوهی که علائم سرخشکیدگی داشتند انجام شد. مشخصات جغرافیایی مکان‌های موردنظر شامل طول و عرض جغرافیایی و ارتفاع از سطح دریا با استفاده از نسخه ۸٫۸ نرم‌افزار Handy GPS ثبت شد. نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه شستشو شدند و پس از

ژن (جدول ۱) با نرم‌افزار ClustalW انجام شد، متعاقباً به صورت دستی در نرم‌افزار BioEdit تنظیماتی روی آن صورت گرفت و درخت‌های تبارزایی با استفاده از نرم‌افزار MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011) استفاده از نرم‌افزار ClustalW انجام شد، متعاقباً به صورت دستی در نرم‌افزار BioEdit تنظیماتی روی آن صورت گرفت و درخت‌های تبارزایی با استفاده از نرم‌افزار MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011) ترسیم شد. پایداری انشعابات شجره حاصل به وسیله آزمون اعتبار سنجی با ۱۰۰۰ تکرار ارزیابی شد.

اثبات بیماری‌زایی در آزمایشگاه

برای اثبات بیماری‌زایی در آزمایشگاه از شاخه‌های بلوط سالم (طول ۲۰ و قطر ۴ سانتی‌متر) استفاده شد. شاخه‌ها با الکل ۷۰ درصد ضدعفونی سطحی شدند و پس از ایجاد سوراخی به قطر ۱ سانتی‌متر، یک بلوک از پرگنه در حال رشد و فعال قارچ روی حفره قرار داده و با پارافیلیم پوشانده شد. برای شاهد نیز تمام مراحل بدون وجود قارچ و تنها با یک بلوک از محیط کشت PDA مایه‌زنی شد. از تمام جدایه‌ها (۴۴ جدایه از *Paecilomyces formosus*، ۲۰ جدایه از *Biscogniauxia mediterranea* و ۱۶ جدایه از *Neoscytalidium novaehollandiae*) برای اثبات بیماری‌زایی روی شاخه‌های بریده بلوط در آزمایشگاه در دو تکرار استفاده شد. برای جلوگیری از خشک شدن، شاخه‌ها در نایلون گذاشته شدند و در انکوباتور در دمای ۲۵-۲۲ درجه سلسیوس نگهداری شدند. پس از ۴۵ روز شاخه‌ها برای مشاهده علائم شانکر بررسی و با شاهد مقایسه شدند.

اثبات بیماری‌زایی در گلخانه

پس از اثبات بیماری‌زایی جدایه‌ها روی شاخه‌های بریده‌شده، برای بررسی و مقایسه وضعیت بیماری‌زایی جدایه‌ها روی نهال‌ها در شرایط تنش آبی (آبیاری نهال‌ها هر دو هفته یک‌بار) و بدون تنش (آبیاری بر اساس ظرفیت مزرعه‌گلدان‌ها) هر جدایه در سه تکرار روی نهال‌های دوساله بلوط (ارتفاع ۲۰ سانتی‌متر و قطر ۱ سانتی‌متر) مایه‌زنی شدند. پس از ضدعفونی سطحی با الکل ۷۰ درصد یک شکاف به طول یک سانتی‌متر با چاقو روی نهال ایجاد و یک بلوک از قارچ روی آن گذاشته و با پارافیلیم پوشانده شد. پس از بروز

عکس‌برداری، قطعات کوچک ۵-۲ میلی‌متری از حدفصل بافت سالم و بیمار جدا و پس از ضدعفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد، سه بار با آب مقطر سترون شستشو شدند. نمونه‌ها در محیط کشت سیب‌زمینی-دکستروز-آگار (PDA) کشت و به مدت ۱۰ روز درون انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس و تناوب نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی نگهداری و به‌طور مرتب بازدید شدند.

شناسایی جدایه‌ها

شناسایی با استفاده از خصوصیات ریخت‌شناختی از کشت‌های خالص برای شناسایی جدایه‌ها استفاده شد. شناسایی بر اساس خصوصیات ریخت‌شناختی جدایه‌ها در محیط‌های کشت، مانند ساختارهای تولیدمثلی و خصوصیات کنیدیوم مانند رنگ، شکل، اندازه و تزینات سطح کنیدیوم با استفاده از کلیدهای تاکسونومیکی (رده‌بندی) معتبر قارچ‌شناسی انجام شد (Burnett & Hunter, 1987; Samson, 1974).

شناسایی مولکولی و تجزیه و تحلیل تبارزایی

در بررسی‌های مولکولی، استخراج DNA جدایه‌ها با استفاده از روش Cetyl trimethyl (CTAB) ammonium bromide انجام شد (Gardes and Bruns, 1993). ناحیه ITS ژنوم rDNA جدایه‌ها، با استفاده از ترکیب آغازگرهای عمومی ITS و ITS4 (White *et al.*, 1990) به ترتیب به‌عنوان آغازگرهای پیشرو و پس‌رو توسط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز با استفاده از دستگاه PCR (T-personal, Biometra) تکثیر شد. قطعات تکثیرشده برای توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال و از یک جهت به صورت مستقیم با استفاده از آغازگر ITS1 توالی‌یابی شدند. توالی‌های به‌دست‌آمده به روش دستی و با استفاده از نسخه ۷,۱ نرم‌افزار Bioedit (Hall, 1999) ویرایش شدند. توالی‌های ویرایش‌شده با استفاده از نرم‌افزار Bankit به بانک ژن ارایه و شماره دسترسی برای پژوهش‌های بعدی اخذ شد. ردیف‌سازی ابتدایی توالی‌های ویرایش‌شده به همراه سایر توالی‌های معتبر از بانک

DNA ژنومی، ناحیه توالی‌های یگانه نسخه‌برداری شده داخلی با استفاده از آغازگرهای ITS1 و ITS4 تکثیر شد که طول این ناحیه برای جدایه‌ها بین ۵۰۰ تا ۶۰۰ جفت باز بود. با استفاده از ابزار جستجوی بلاست جدایه‌های به‌دست‌آمده در این پژوهش با گونه‌های *N. novaehollandiae* موجود در بانک ژن گزارش شده از کشورهای مختلف ۹۹-۱۰۰ درصد تشابه داشتند. جدایه‌ها با شماره دسترسی‌های KX061193 و KX061192 برای *B. mediterrane* و MH567069 تا MH567073 برای *P. formosus* و MH883627 تا MH883623 برای *N. novaehollandiae* در بانک ژن ثبت شدند. در واکاوای تبارزایشی مبتنی بر ناحیه ITS جدایه‌های *N. novaehollandiae* از ایران با ضریب اطمینان ۹۷ درصد در یک گروه مونوفیلیتیک با گونه معتبر *N. novaehollandiae* از سایر کشورها قرار گرفتند (شکل ۲). جدایه‌های ایرانی *P. formosus* با ضریب اطمینان ۹۴ درصد در گروه مونوفیلیتیک با گونه‌های معتبر *P. formosus* از بانک ژن و جدایه‌های ایرانی *B. mediterrane* با ضریب اطمینان ۹۹ درصد با گونه‌های معتبر *B. mediterrane* از سایر کشورها در یک گروه مونوفیلیتیک قرار گرفتند. نتایج تبارزایشی صحت شناسایی مولکولی گونه‌ها را تایید کرد (شکل ۲). علاوه بر جدایه‌های مذکور، از بیش‌تر درختان بلوط دارای علائم سرخشکیدگی قارچ‌های *Penicillium* با *Trichoderma* ۸۴ جدایه (فروانی ۳۲ درصد)، *Aspergillus* sp. با ۴۶ جدایه (فروانی ۲۰/۹۹ درصد)، و گونه *Cunninghamella* sp. با پنج جدایه (فروانی ۵/۱۷ درصد) و گونه *N. novaehollandiae* با ۹۱/۱ درصد) به دست آمد. بررسی‌ها نشان دادند ۶۰ درصد مناطق نمونه‌برداری شده آلوده به قارچ *P. formosus*، ۳۰ درصد آلوده به قارچ *B. mediterrane* و ۱۳ درصد آلوده به قارچ *N. novaehollandiae* هستند. از سایر درختان جنگلی به‌استثنای *Penicillium*، *Trichoderma* sp. درختان بلوط نیز جدایه‌های *Aspergillus* sp. و *Penicillium* sp. به دست آمد.

جداسازی و شناسایی قارچ‌های به‌دست‌آمده از

سایر درختان جنگلی

از سایر درختان جنگلی دارای علائم سرخشکیدگی نمونه‌برداری شده از جمله ون، زالزالک، کیکم، زغال‌اخته، انجیر و بادام‌کوهی ۳۵ جدایه قارچی جداسازی شد. قارچ‌های جداسازی شده عبارت بودند از چهار جدایه *P. formosus* از درختان ون (*Pistacia atlantica*) چهار جدایه *P. formosus* از درختان زالزالک (*Crataegus aronia*) و ۱۲ جدایه *Penicillium* sp. و پنج جدایه *Trichoderma*، ۱۰ جدایه *Aspergillus* sp. از مابقی درختان جداسازی شد.

علائم بیماری روی نهال‌های مایه‌زنی شده، اقدام به‌اندازه‌گیری شانکرها و مقایسه با شاهد شد.

اثر دما بر رشد شعاعی جدایه‌ها

رشد شعاعی جدایه‌ها در محیط غذایی PDA و دماهای ۵، ۱۰ و ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۴۰ درجه سلسیوس مطالعه شد. دیسک‌هایی به قطر ۵ میلی‌متر از حاشیه پُرگنه‌های در حال رشد فعال که به مدت یک روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگه داشته شده بودند در مرکز تشتک‌های پتری حاوی محیط PDA، به‌صورت وارونه قرار داده شدند. هر جدایه از هر تیمار در سه تکرار کشت گردید. قطر پُرگنه قارچ در دو جهت عمود بر هم هرروز یک‌بار و تا یک هفته اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

داده‌های حاصل از قطر شانکرهای ایجادشده روی نهال‌های بلوط توسط جدایه‌های قارچی، بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از نسخه ۹ نرم‌افزار SAS دسته‌بندی شدند.

نتایج

نمونه‌برداری و شناسایی جدایه‌های قارچی

علائم سرخشکیدگی در تمام مناطق موردبررسی از جنگل‌های بلوط اسلام‌آباد و گیلان غرب مشاهده شد. خشکیدگی سرشاخه‌ها در مناطق چشمه اتاولا و کوه کانی شمامه از جنگل‌های گیلان غرب و کوه گرزه قیو از جنگل‌های اسلام‌آباد غرب دارای شدت بیشتری نسبت به سایر مناطق بود. از ۹۷ نمونه درخت بلوط دارای علائم سرخشکیدگی ۲۶۲ جدایه قارچی جداسازی شد. قارچ‌های بیمارگر جداسازی شده از درختان بلوط بر اساس خصوصیات ریخت‌شناختی عبارت بودند از *P. formosus* با ۳۶ جدایه (فروانی ۱۳/۷ درصد)، *B. mediterrane* با ۲۰ جدایه (فروانی ۷/۶ درصد) و *N. novaehollandiae* با ۱۶ جدایه (فروانی ۶/۱ درصد) (شکل ۱). برای تایید شناسایی ریخت‌شناختی، شناسایی مولکولی نیز انجام شد. پس از استخراج

P. novaehollandiae خیلی سریع‌تر از گونه *P. formosus* انجام شد. در اثبات بیماری‌زایی روی شاخه‌های بریده بلوط، تمام جدایه‌های *P. formosus* ایجاد شانکر قهوه‌ای به شکل بیضوی و کشیده کردند. روی سطح شانکرها هیچ‌گونه اثری از وجود قارچ در سطح چوب مشاهده نشد. دو گونه *B. mediterrane* و *N. novaehollandiae* روی چوب‌های بریده‌شده علایم شانکر دوده‌ای ایجاد کردند که دوده‌ها نشانه‌های هر دو گونه قارچی بودند (شکل ۳). سایر قارچ‌ها هیچ‌گونه علایمی ایجاد نکردند. پس از مایه‌زنی جدایه‌های قارچی مذکور روی شاخه‌های بریده و ایجاد علایم، جداسازی مجدد برای اثبات اصول کخ انجام شد.

تعیین بیماری‌زایی جدایه‌های به‌دست‌آمده از درختان بلوط و سایر درختان جنگلی

در این پژوهش به‌منظور تعیین بیماری‌گری جدایه‌های قارچی به‌دست‌آمده از درختان بلوط از روش شاخه‌های بریده استفاده شد. در آزمون بیماری‌زایی تمام جدایه‌های قارچی (۲۶۲ جدایه) بررسی شدند. تنها جدایه‌های متعلق به سه گونه قارچی *P. formosus* (۳۶ جدایه) به‌دست‌آمده از درختان بلوط و هشت جدایه از درختان ون و زالزالک، *B. mediterrane* (۲۰ جدایه) و *N. novaehollandiae* (۱۶ جدایه) قادر به ایجاد شانکر و بیماری‌زایی روی شاخه‌های یک‌ساله بلوط بودند. سرعت رشد و ایجاد علایم در دو گونه *B. mediterrane* و *N.*

جدول ۱. شماره دسترسی گونه‌های پژوهش حاضر و گونه‌های اخذشده از پایگاه اطلاعاتی بانک ژن

Table. 1. Isolates and NCBI GenBank accession numbers of species used in this study

Species	Isolate No.	Location	ITS
<i>Neoscytalidium novaehollandiae</i>	NeNo3	Iran	MH883623
<i>Neoscytalidium novaehollandiae</i>	NeNo4	Iran	MH883624
<i>Neoscytalidium novaehollandiae</i>	NeNo5	Iran	MH883625
<i>Neoscytalidium novaehollandiae</i>	NeNo6	Iran	MH883626
<i>Neoscytalidium novaehollandiae</i>	NeNo7	Iran	MH883627
<i>Neoscytalidium novaehollandiae</i>	FF9	Iran	MF055692
<i>Neoscytalidium novaehollandiae</i>	GRSH80	Iran	KY788097
<i>Neoscytalidium novaehollandiae</i>	KHDS2-3	Iran	MF288738
<i>Neoscytalidium novaehollandiae</i>	NAB1	India	MH428006
<i>Neoscytalidium novaehollandiae</i>	CBS 122071	Netherlands	MH863173
<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>	Arp2-D	Turkey	MK813852
<i>Paecilomyces formosus</i>	RUF-PF1	Iran	MH567069
<i>Paecilomyces formosus</i>	RUF-PF2	Iran	MH567070
<i>Paecilomyces formosus</i>	RUF-PF3	Iran	MH567071
<i>Paecilomyces formosus</i>	RUF-PF4	Iran	MH567072
<i>Paecilomyces formosus</i>	RUF-PF5	Iran	MH567073
<i>Paecilomyces variotii</i>	DTO 63E7	Netherlands	GU968668
<i>Paecilomyces formosus</i>	LHL10	South Korea	HQ444388
<i>Paecilomyces formosus</i>	CGMCC 3.19066	China	MH459158
<i>Paecilomyces formosus</i>	IG03	Brasil	KT781078
<i>Paecilomyces formosus</i>	y-017	China	MN192158
<i>Biscogniauxia mediterranea</i>	BiMe1	Iran	KX061192
<i>Biscogniauxia mediterranea</i>	BiMe2	Iran	KX061193
<i>Biscogniauxia mediterranea</i>	Bm1	Croatia	MK110498
<i>Biscogniauxia atropunctata</i>	-	Spain	AJ390411
<i>Biscogniauxia mediterranea</i>	bs	Iran	MH298852
<i>Biscogniauxia mediterranea</i>	147	Taiwan	EF026134
<i>Biscogniauxia mediterranea</i>	Bx85	Italy	KT253503
<i>Biscogniauxia mediterranea</i>	Bx70	Italy	KT253502

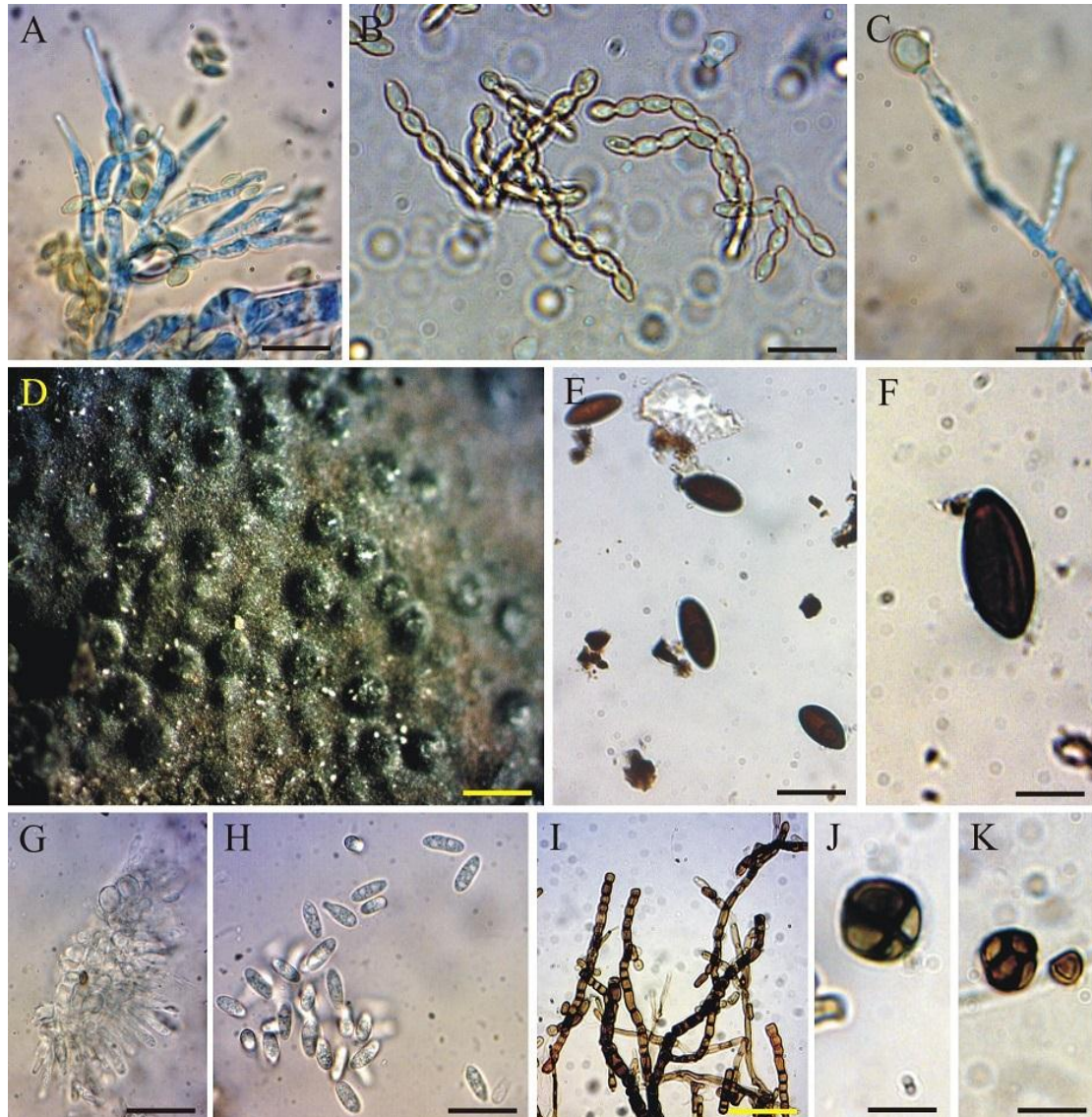
روز خشک شدند و در شرایط بدون تنش بعد از گذشت تقریباً ۷۰ روز خشک شد. در مایه‌زنی با *B. mediterrane* نهال‌هایی که تحت تنش قرار داشتند بعد از ۲۷ روز خشک شدند و نهال‌هایی که در شرایط بدون تنش بودند بعد از گذشت تقریباً ۵۵ روز خشک

آزمون بیماری‌زایی در گلخانه

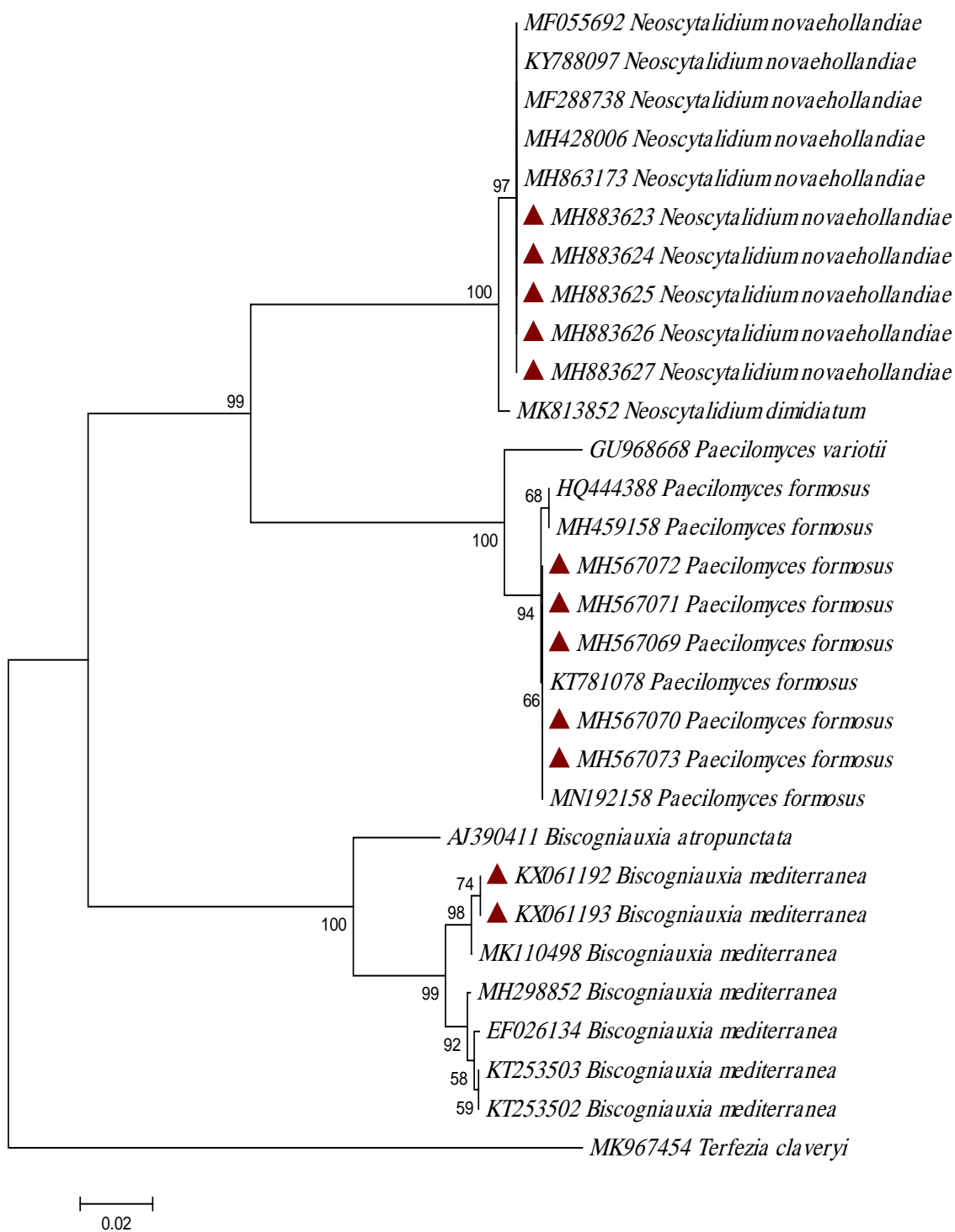
آزمون بیماری‌زایی در گلخانه روی نهال‌ها در شرایط تنش خشکی و بدون تنش انجام شد. در مایه‌زنی نهال‌ها با *P. formosus* نتایج مایه‌زنی به این صورت بود که نهال‌های که تحت تنش قرار داشتند بعد از ۴۰

گسترش پیدا کرده بود (شکل ۳). در برش عرضی ساقه نیز علایم قهوه‌ای و تیره شدن نسوج آوندی مشاهده شد. برای تکمیل اصول کخ اقدام به کشت مجدد شانکرها شد که جدایه بیمارگر از نهال‌های مایه‌زنی شده دارای شانکر مجدد جداسازی شد.

شدند. در مایه‌زنی با *N. novaehollandiae* نهال‌هایی که تحت تنش قرار داشتند بعد از ۲۹ روز خشک شدند و نهالی که در شرایط بدون تنش بود بعد از گذشت تقریباً ۵۰ روز خشک شد. در تمام موارد در محل مایه‌زنی جدایه‌های قارچی مذکور، علایم شانکر ایجاد شد که به سمت بالا و پایین از محل مایه‌زنی

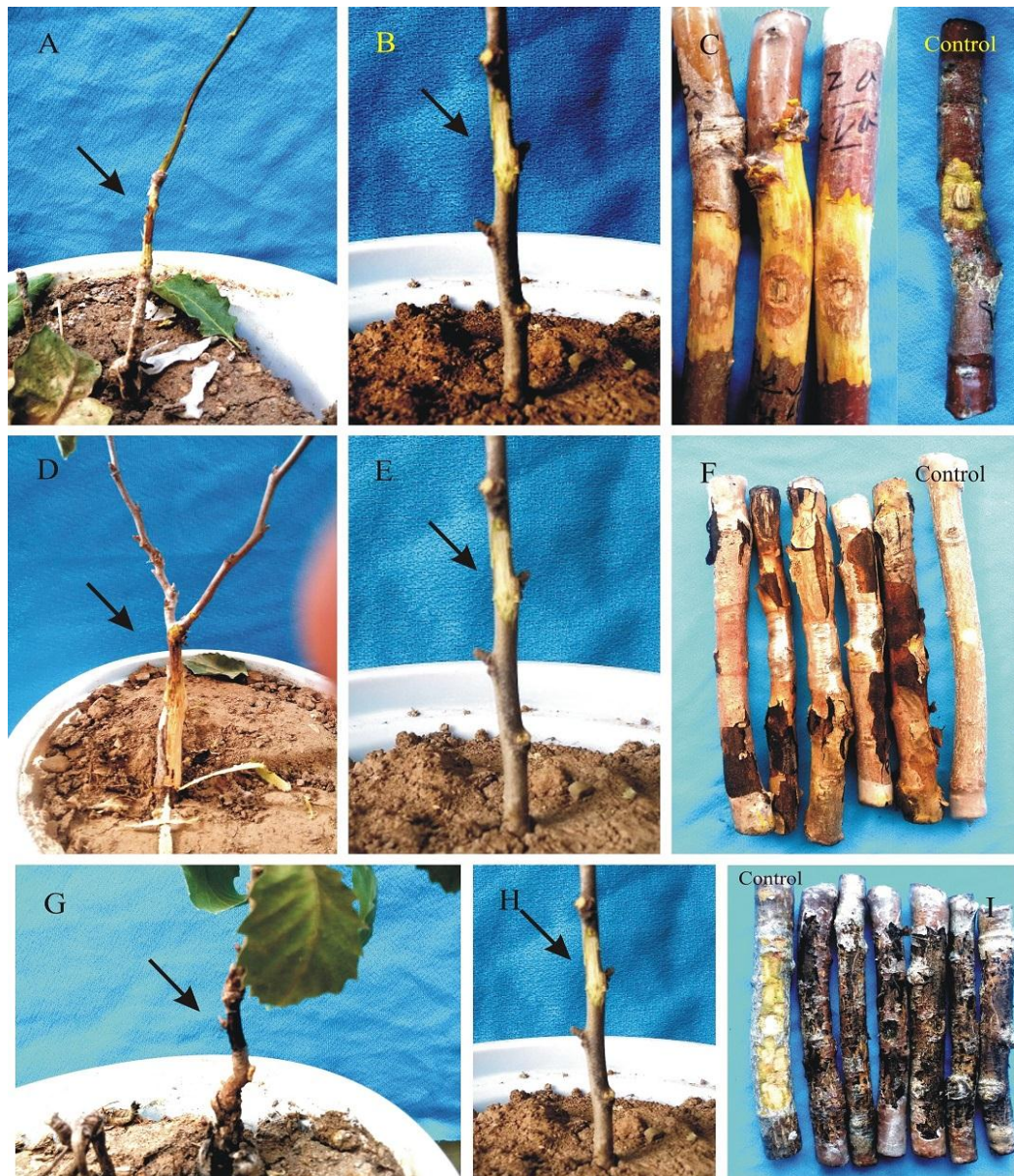


شکل ۱. ریخت‌شناسی قارچ‌های جداسازی شده از درختان بلوط بیمار. *Paecilomyces formosus*: کنیدیوفور و فیالید (A)، کنیدیوم‌ها (B)، کلامیدوسپور (C)، *Biscogniauxia mediterranea*: استرومای سطحی (D)، آسکوسپورها (E, F). *Neoscytalidium novaehollandiae*: سلول‌های کنیدیوم‌زا (G)، کنیدیوم نابالغ (H)، آرتروسپور (I)، کنیدیوم‌های توتی شکل (J, K). (I, K).
Figure 1. Morphological features of pathogenic fungi isolated from diseased Persian oak trees: *Paecilomyces formosus*: A. Conodiophore and phialide, B. Conodia, C. Chlamydospore; *Biscogniauxia mediterranea*: D. Superficial stroma, Ascospores; *Neoscytalidium novaehollandiae*: G. Conidiogenous cells with developing conidia, H. Immature Conidia, I. Arthrospores, J, K. Moriform conidia. E-F. Chlamydospore, G. Conidia (Bars: A, B, C, E, F, G, H, I, J and K= 16.7 μ m, D = 5 mm).



شکل ۲. فیلوگرام ایجادشده با نرم‌افزار مگا بر اساس مقایسه ۲۹ توالی نوکلئوتیدی ناحیه ITS فارچهای بیمارگر به‌دست‌آمده از درختان بلوط به روش الحاق مجاور و مدل P-distance و با حذف کامل فاصله‌های بین نوکلئوتیدها با تکرار ۱۰۰۰ بار. مثلث‌های قرمز جدایه‌های این پژوهش هستند.

Figure 2. Neighbor-joining phylogram generated in Mega from the alignment of 29 combined ITS1, 5.8S subunit, and ITS2 regions of the genomic ribosomal RNA sequences of the pathogenic fungi obtained from oak trees, using the P-distance model with complete deletion gap handling and 1000-replication bootstrapping. Red triangles refer to isolates from Iran.



شکل ۳. آزمون بیماری‌زایی قارچ‌های جداسازی شده از درختان بلوط دارای علائم سرخشکیدگی و زوال. علائم شانکر ناشی از *Paecilomyces formosus* روی نهال‌های مایه‌زنی شده (A)، شاهد (B)، علائم شانکر روی شاخه‌های بریده ناشی از *Paecilomyces formosus* (C)، علائم شانکر ناشی از *Neoscytalidium novaholandiae* روی نهال‌های مایه‌زنی شده (D)، شاهد (E)، علائم شانکر روی شاخه‌های بریده ناشی از *Neoscytalidium novaholandiae* (F)، علائم شانکر ناشی از *Biscogniauxia mediterranea* روی نهاله (G)، شاهد (H)، علائم شانکر روی شاخه‌های بریده ناشی از *Biscogniauxia mediterranea* (I)

Figure 3. Pathogenicity tests of recovered fungi from declining Persian oak trees under laboratory and greenhouse conditions: A. Vascular extent of necrotic tissue on oak seedlings inoculated with *Paecilomyces formosus*, B. Control, C. Canker caused by *Paecilomyces formosus* isolates on oak detached stem of oak, D. Vascular extent of necrotic tissue on oak seedlings inoculated with *Neoscytalidium novaholandiae*, E. Control, F. Canker caused by *Neoscytalidium novaholandiae* isolates on oak detached stem of oak, G. Vascular extent of necrotic tissue on oak seedlings inoculated with *Biscogniauxia mediterranea*, H. Control, F. Canker caused by *Biscogniauxia mediterranea* isolates on oak detached stem of oak.

شانکر استفاده شد). هر سه گونه از نظر طول شانکر ایجادشده تفاوت معنی‌داری در سطح پنج درصد داشتند (جدول ۲، شکل ۴). از نظر مدت‌زمان ایجاد شانکر نیز اختلاف معنی‌داری بین هر سه گونه وجود داشت به طوری که *B. mediterrane* پس از گذشت ۲۷ روز و در زمان کوتاه‌تری نسبت به دو گونه دیگر علایم ایجاد کرد و برای *P. formosus* مدت‌زمان بیشتری حدود ۴۰ روز طول کشید تا علایم ایجاد شود (جدول ۳، شکل ۵).

ارزیابی قدرت بیماری‌زایی قارچ‌های بیمارگر بلوط در شرایط تنش خشکی

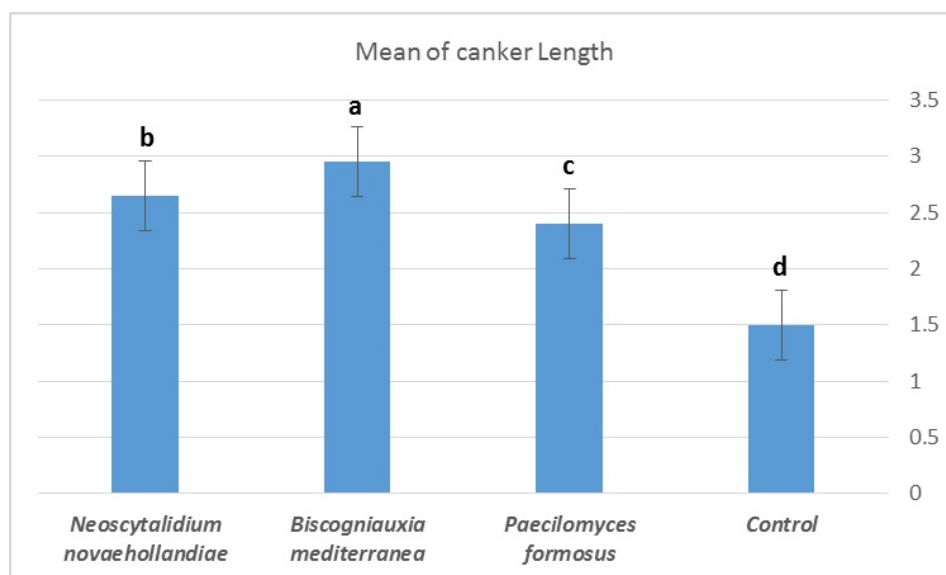
برای ارزیابی قدرت بیماری‌زایی قارچ‌های *P. formosus* و *B. mediterrane* روی نهال‌های بلوط در شرایط تنش خشکی از طول شانکرهای ایجادشده روی ساقه نهال‌های تحت تنش و همچنین از مدت‌زمان محاسبه‌شده‌ای که نهال‌های تحت تنش دچار خشکیدگی شدند استفاده شد (برای نهال‌های شاهد از طول لکه‌ای که در هنگام مایه‌زنی با محیط کشت PDA روی ساقه نهال‌ها ایجاد شد به‌عنوان طول

جدول ۲. تجزیه واریانس ارزیابی قدرت بیماری‌زایی جدایه‌های *Paecilomyces formosus*، *Biscogniauxia mediterrane* و *Neoscytalidium novaehollandiae* بر اساس طول شانکرهای ایجادشده روی ساقه نهال‌ها در شرایط تنش خشکی.

Table 2. Analysis of variance of pathogenicity of *Paecilomyces formosus*, *Biscogniauxia mediterrane*, and *Neoscytalidium novaehollandiae* isolates based on canker length on seedling stem under drought stress.

	df	SS	MS	F	P
Treatment	3	2.345	0.782	312.367 *	0.00001
Error	4	0.010	0.003		
Total	7	2.355			

CV= 24.4*



شکل ۴. گروه‌بندی جدایه‌های قارچی *Paecilomyces variotii*، *Biscogniauxia mediterranea* و *Neoscytalidium novaehollandiae* برحسب میانگین طول شانکر ایجادشده روی نهال‌های بلوط در شرایط تنش خشکی با استفاده از آزمون دانکن در سطح پنج درصد.

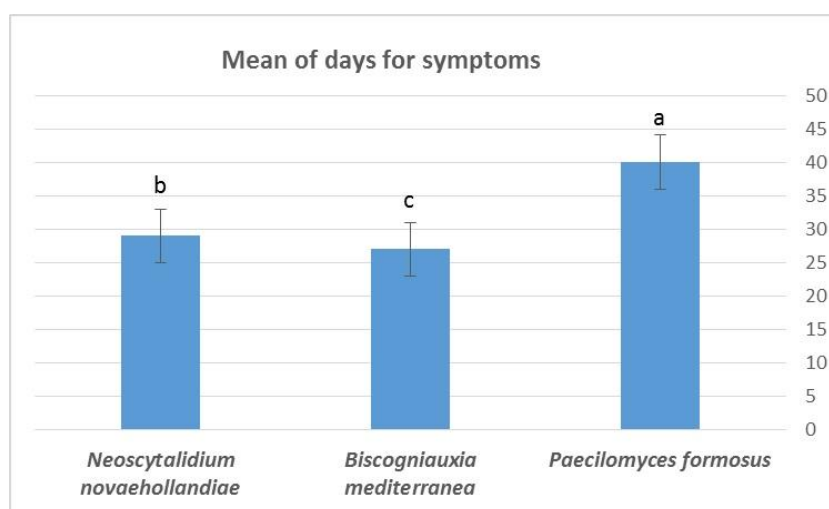
Figure 4. Grouping of *Paecilomyces formosus*, *Biscogniauxia mediterranea*, and *Neoscytalidium novahollandiae* isolates based on average of canker diameter created on oak seedling plants under drought stress using Duncan's test at 5 % level.

جدول ۳- تجزیه واریانس ارزیابی قدرت بیماری‌زایی جدایه‌های *Paecilomyces formosus*, *Biscogniauxia mediterranea* و *Neoscytalidium novaehollandiae* بر اساس مدت‌زمان محاسبه‌شده برای خشکیدگی نهال‌های بلوط تحت تنش.

Table 3. Analysis of variance of pathogenicity of isolates of *Paecilomyces formosus*, *Biscogniauxia mediterranea*, and *Neoscytalidium novaehollandiae* based on calculated days for drying oak seedlings under stress.

	df	SS	MS	F	P
Treatment	2	190.333	95.167	571	0.00001
Error	3	0.500	0.167		
Total	5	190.833			

CV= 19.2*



شکل ۵. گروه‌بندی جدایه‌های قارچی *Paecilomyces formosus*, *Biscogniauxia mediterranea* و *Neoscytalidium novaehollandiae* برحسب میانگین مدت‌زمان محاسبه‌شده برای خشکیدگی نهال‌های بلوط مایه‌زنی شده در شرایط تنش خشکی با استفاده از آزمون دانکن در سطح پنج درصد.

Fig. 5. Grouping of *Paecilomyces formosus*, *Biscogniauxia mediterranea*, and *Neoscytalidium novaehollandiae* isolates based on average of days calculated for drying oak seedling plants under drought stress using Duncan's test at 5 % level.

زوال و سرخشکیدگی بلوط، بیماری معمول در سرتاسر جنگل‌های بلوط است. در این بررسی ۲۶۲ جدایه قارچی از قسمت‌های مختلف ۹۷ درخت دارای علائم زوال از جمله شاخه، ساقه و تنه به دست آمد. بیشترین فراوانی مربوط به جنس *Paecilomyces* با ۳۶ جدایه بود که غالباً از سرشاخه‌ها جداسازی شدند. جنس *Biscogniauxia* با ۲۰ جدایه در رده دوم از نظر فراوانی قرار گرفت که جدایه‌های این بیمارگر همگی از تنه و قسمت‌های پایین گیاه نزدیک به طوقه جداسازی شدند. جدایه‌های این بیمارگر، هیچ‌کدام از سرشاخه جداسازی نشدند. نتایج این پژوهش نشان دادند که بیماری در جنگل‌های بلوط را می‌توان به دو صورت

اثر دما بر رشد شعاعی جدایه‌ها

رشد شعاعی جدایه‌ها در محیط غذایی PDA و دماهای ۵، ۱۰ و ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۴۰ درجه سلسیوس بررسی شد. دمای بهینه برای رشد تمام جدایه‌های هر سه گونه بین ۲۵ تا ۳۰ درجه سلسیوس بود. هر سه گونه در دمای بالاتر از ۳۵ درجه سلسیوس قادر به رشد بودند و در دمای ۴۰ درجه سلسیوس رشد آن‌ها متوقف شد.

بحث

در این پژوهش جنگل‌های بلوط زاگرس طی سال‌های ۱۳۹۳ تا ۱۳۹۵ بررسی شدند و مشخص شد که پدیده

با استفاده از ابزار جستجوی بلاست شباهت ۱۰۰ درصدی با توالی‌های *B. mediterranea* و *N. novahollandiae* و *P. formosus* موجود در بانک ژن نشان دادند. بازسازی تبارزایی با استفاده از این ناحیه ژنی که برای شناسایی گونه‌های قارچی استفاده می‌شود می‌تواند در تعداد زیادی از قارچ‌ها به خوبی باعث تعیین حدود و ثغور گونه‌های در داخل گروه‌های تک‌نیایی شود (Van de Peer & De Wachter, 1997; Buckingham, 2011).

در بررسی بیماری‌زایی تمام ۷۲ جدایه روی شاخه‌های بریده ایجاد شانکر کردند. تمام جدایه‌ها برای اثبات اصول کخ مجدد از شانکرها جداسازی شدند. بیماری‌زایی گونه‌های مذکور قبلاً روی سایر گیاهان گزارش شده بود (Heidarian et al. 2017; Jamali 2017; Safae et al., 2017). در این بررسی نیز بیماری‌زایی هر سه گونه روی نهال‌های بلوط انجام گرفت که همگی پس از گذشت ۴۵ روز ایجاد شانکر روی نهال‌های مایه‌زنی شده کردند. در بررسی مقایسه بیماری‌زایی روی نهال‌های تحت تنش مشخص شد که *B. mediterranea* سریع‌تر از دو گونه دیگر روی گیاه توسعه می‌یابد و باعث خشک شدن گیاه می‌شود. در طبیعت نیز درختانی که تحت تنش خشکی و کم‌آبی قرار گرفته‌اند این گونه قارچی خیلی سریع این درختان را کلونیزه می‌کند و تمام درخت با استرومای قارچ پوشش داده می‌شود (Sousa et al., 2007; Khouja et al., 2010; Mirabolfathy, 2013). گونه *P. formosus* با سرعت کمتری نسبت به دو گونه دیگر ایجاد شانکر روی نهال‌ها کرد. در طبیعت نیز غالباً این قارچ از سرشاخه درختان جداسازی می‌شود و به‌ندرت این گونه به سمت تنه اصلی حرکت می‌کند که نشان از سرعت رشد کمتر نسبت به *B. mediterranea* است. گونه *N. novahollandiae* نیز از تعدادی از درختان بلوط جداسازی شد. با توجه به اینکه بیشترین میزان جداسازی بیمارگرها در فصل‌های گرم سال به‌ویژه در بهار و تابستان انجام شد و همچنین با توجه به نتایج حاصل از دمای رشد شعاعی مشخص شد که این گونه و دو گونه دیگر

زوال و خشکیدگی سرشاخه تقسیم کرد که عامل اصلی سرخشکیدگی درختان بلوط در مناطق موردبررسی در این مطالعه *Paecilomyces* بود. با توجه به اینکه *Biscogniauxia* از درختان دارای علایم زوال جداسازی شد و از درختان دارای علایم سرخشکیدگی جداسازی نشد، می‌توان بیان کرد که این بیمارگر پارازیت ضعیف است که در مراحل آخر ضعف درخت بلوط به آن حمله می‌کند و با توجه به سرعت رشد بالا در نهایت کل درخت را کلونیزه می‌کند. جنس *Neoscytalidium* با ۱۶ جدایه در رده سوم از نظر فراوانی قرار گرفت. این جنس هم از سرشاخه و هم از تنه درختان دارای علایم زوال جداسازی شد. علاوه بر بیمارگرهای مذکور، گونه‌های قارچی دیگری از جنس‌های *Trichoderma*، *Aspergillus*، *Cunninghamella* و *Penicillium* از درختان بلوط در حال زوال به دست آمدند که در بررسی بیماری‌زایی هیچ‌کدام قادر به ایجاد بیماری نبودند. این گونه‌های ساپروفیت غالباً از درختان در حال زوال جداسازی شدند. شناسایی بیمارگرهای قارچی برای اتخاذ راه‌برد مدیریت صحیح لازم است. در این مطالعه شناسایی بیمارگرها در سطح جنس با استفاده از کلیدهای رده‌بندی معتبر صورت گرفت. استفاده از ویژگی‌های ریخت‌شناختی برای شناسایی گونه‌هایی که شباهت ریخت‌شناختی زیادی دارند ممکن است منجر به شناسایی اشتباه بیمارگر شود (Jimenez-Fernandez et al., 2011; Samson et al., 2009). ضمن اینکه تعدادی از قارچ‌ها از جمله *P. formosus* و *N. novahollandiae* علاوه بر گیاهان، از نظر پزشکی نیز حایز اهمیت هستند و باعث بیماری‌های مختلفی در انسان می‌شوند (Rinaldi et al., 2000; Salle et al., 2005; Houbraken et al., 2010) که شناسایی دقیق آن‌ها در درمان و اتخاذ راه‌برد صحیح مدیریت لازم و ضروری است. همچنین در سال‌های اخیر رده‌بندی تعدادی از قارچ‌ها تغییر یافته و به همین دلیل استفاده از روش‌های مولکولی برای شناسایی قارچ‌ها، غیرقابل اجتناب است. در این بررسی از تکثیر ناحیه ITS برای شناسایی بیمارگرها استفاده شد. جدایه‌های به‌دست‌آمده در این پژوهش

گردو زیاد صورت می‌گیرد و از طرفی این درخت به این بیمارگر بسیار حساس است، بنابراین مجاورت درختان میوه با درختان جنگل مشکلات زیادی می‌تواند ایجاد کند. در این بررسی نتایج ما نشان دادند که زوال درختان بلوط یک بیماری پیچیده با بیمارگرهای متفاوت هست که این بیمارگرها همگی گرمادوست بوده و ارتباط تنگاتنگی با گرمایش جهانی و شرایط کم‌آبی دارند. بنابراین با توجه به اهمیت درختان جنگلی و خصوصاً درختان بلوط باید پژوهش‌ها در خصوص ناقلین احتمالی و نحوه گسترش این بیمارگرها نیز در آینده برای مدیریت و حفاظت از زیست‌بوم جنگلی انجام شود.

گرمادوست بوده و در شرایط کم‌آبی می‌تواند زنگ خطری برای درختان بلوط در صورت ادامه روند گرمایش جهانی و کاهش آب‌های زیرزمینی باشند. رشد در دمای بالا توسط سایر پژوهش‌گران نیز گزارش شده است (Alizadeh *et al.*, 1999; De Hoog *et al.*, 2000; Jamali & Banihashemi, 2012; Houbraken *et al.*, 2010). گونه *N. novahollandiae* به درختان مثمر و غیر مثمر حمله می‌کند و خسارت زیادی در سال‌های اخیر ایجاد کرده است (Punithalingam & Waterston, 1970; Sutton & Dyko, 1989, Farr *et al.*, 2004 Jamali & Banihashemi, 2010; Pavlic *et al.*, 2008). در استان کرمانشاه با توجه به اینکه تخریب جنگل و تأسیس باغ میوه و خصوصاً درخت

REFERENCES

1. Alizadeh, A., Alaei, H. & Ershad, J. (1999). Review etiology of dieback of pistachio trees in Rafsanjan. *Journal of Modares Agricultural Science*, 1(2), 53–63.
2. Allen, C.D., Macalady, A.K., Chenchouni, H. Bachelet, D., McDowell, N., Vennetier, M., Kitzberger, T. & et al. (2010). A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests. *Forest Ecology Management*, 259, 660–684.
3. Axelrod, D.I. (1983). *Biogeography of oaks in the Arcto-Tertiary province*. Annals of the Missouri Botanical Garden, 629-657.
4. Burnett, H. & Hunter, B.B., (1987). *Illustrated genera of imperfect fungi*. Burgess Publishing Company: Minneapolis, MN, USA.
5. Braithwaite, M., Inglis, C., Dick, M.A., Ramsfield, T.D., Waipara, N.W., Beever, R.E., Pay, J.M. & Hill, C.F. (2007). Investigation of oak tree decline in the Auckland region. *New Zealand Plant Protection Society (Inc.)* www.nzpps.org .
6. Butin, H. (1995). *Tree diseases and disorders. Causes, biology and control in forest and amenity tress*. Oxford University Press, Oxford.
7. Coombs, A.J. (1999). *Trees*. Dorlins kindersly Book, London.
8. Crepet, W.L. & Nixon, K.C. (1989). Extinct transitional Fagaceae from the Oligocene and their phylogenetic implications. *American Journal of Botany*, 1493-1505.
9. De Hoog, G.S., Guarro, J. Gene, J. & Figueras, M.J. (2000). *Atlas of clinical fungi*. 2nd ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures/ Universitat Rovira i Virgili, Utrecht. 1126 p.
10. Gardes, M. & Bruns, T.D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes: application to identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2:113–118.
11. Guarín, A. & Taylor, A.H. (2005). Drought triggered tree mortality in mixed conifer forests in Yosemite National Park, California, USA. *Forest Ecology Management*, 218, 229–244.
12. Halliwell, R.S. (1996). Association of *Cephalosporium* with a decline of oak in Texas. *Plant Disease Reporter*, 50, 75-78.
13. Heaey, A., Haidari, R. Pakbaz, B. & Aghazadeh, M. (2007). Measurement of tannins in four genotypes of *Quercus infectoria* olive and oak gall powder in wound healing. *Medical Aromatic Plant Research of Iran*, 21, 433–441.
14. Heidarian, R., Fotouhifar, Kh., Mohammadi, A. & Javan-Nikkhah, M. 2017. Identification of mating type idiomorphs in *Paecilomyces formosus*, the causal agent of die-back disease in pistachio and some other hosts and investigation on the possibility of in vitro sexual reproduction. *Iranian Journal of Plant Protection Science*, 48 (2), 295-305.

15. HosseinZadeh, G., Aazame, A. & Mohammadpur, M. (2015). Investigate the factors associated with the spread of oak decline ups and downs in the Black Forest Ham attack. *Iranian Journal of Forest and Poplar Research*, 1, 190-197.
16. Houbraken, J., Verweij, P.E., Rijs, A.J., Borman, A.M. & Samson, R.A. (2010). Identification of *Paecilomyces variotii* in clinical samples and settings. *Journal of Clinical Microbiology*, 48, 2754–2761.
17. Jamali, S. & Banihashemi, Z. (2010). The pathological and physiological study of *Nattrassia mangiferae* the cause of shade trees decline in Shiraz city. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 46, 35-36.
18. Jamali, S. 2017. First record of *Neoscytalidium novaehollandiae* on ash and maple trees in Iran. in: Proceedings of 3rd Iranian Mycological Congress, 26-28 Aug, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran, p. 111.
19. Jazirehi, M. & Rostaghi, M.E. (2003). *Forest of the Zagros, Tehran University Press, Iran*. 222 p.
20. Jimenez-Fernández, D., Navas-Cortés, J.A., Montes-Borrego, M., Jiménez-Díaz, R.M. & Landa, B.B. (2011). Molecular and pathogenic characterization of *Fusarium redolens*, a new causal agent of *Fusarium* yellows in chickpea. *Plant Disease*, 95(7), 860–870.
21. Khouja, M.L., Ben Jamaa, M.L., Franceschini, A., Khaldi, A., Nouri, N., Sellemi, H. & Hamrouni, L. (2010). Observations on tree decline of different cork oak (*Quercus suber* L.) provenances in the experimental site of Tebaba, North-western Tunisia. *IOBC/wprs Bulletin*, 57, 53-59.
22. Lynch, S.C., Eskalen, A., Zambino, P.J. & Mayorquin, J.S. (2013). Identification and pathogenicity of Botryosphaeriaceae species associated with coast live oak (*Quercus agrifolia*) decline in southern California. *Mycologia*, 105(1), 125–140 .
23. Mirabolfathy, M., Groenewald, J.Z. & 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, 876.
24. Mirabolfathy, M. (2013). Outbreak of charcoal disease on *Quercus* spp. and *Zelkova carpinifolia* trees in forest of Zagros and Alborz mountains in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 49, 77-79.
25. Moore, M. K. (1988). Morphological and physiological studies of isolates of *Hendersonula toruloidea* Nattrass cultured from human skin and nail samples. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 26, 25-39.
26. Pavlic, D., Wingfield, M.J., Barber, P., Slippers, B., Hardy, G.E.S.J. & Burgess, T.I. (2008). Seven new species of the Botryosphaeriaceae from baobab and other native trees in Western Australia. *Mycologia*, 100, 851–866.
27. Rajablou, M. (2009). Using acorn-fed animals. *Internal newsletter Agricultural Organization of Golestan province*, 7, 4.
28. Rinaldi, S., Fiscarelli, E. & Rizzoni, G. (2000). *Paecilomyces variotii* peritonitis in an infant on automated peritoneal dialysis. *Pediatric Nephrology*, 14, 365–366.
29. Safaei, D., Khodaparast, S.A., Mirabolfathy, M. & Sheikholeslami, M. 2017. Some aspects of biology and host range of *Biscogniauxia mediterranea*, one of the causal agent of oak charcoal disease. *Mycologia Iranica*, 4(2), 121 – 129.
30. Salle, V., Lecuyer, E. Chouaki, T. Lescure, F.X. Smail, A. A. Vaidie, Dayen, C., Schmit, J.L., Ducroix, J.P. & Douadi, Y. (2005). *Paecilomyces variotii* fungemia in a patient with multiple myeloma: Case report and literature review. *Journal of Infection*, 51, 93–95.
31. Samson, R.A. (1974). *Paecilomyces* and some allied hyphomycetes. *Studies in Mycology*, 6, 119 p.
32. Samson, R.A., Houbraken, J., Varga, J. & Frisvad, J.C. (2009). Polyphasic taxonomy of the heat resistant ascomycete genus *Byssochlamys* and its *Paecilomyces* anamorphs. *Persoonia*, 22, 14–27.
33. Schmith, O. (2006). *Wood and tree biology, damage, protection and use*. Springer-Verlag, Berlin. 336 p.
34. Simonin, G., Cochard, H., Delatour, C., Granier, A. & Dreyer, E. (1994). Vulnerability of young oak seedlings (*Quercus robur* L) to embolism: responses to drought and to an inoculation with *Ophiostoma quercii* (Georgevitch) Nannf. *Annals of Forest Science*, 51, 493-504.
35. Sousa, E., Santos, M.N., Varela, M.C. & Henriques, J. (2007). Perda do vigor dos montados de sobre

- e azinho: análise da situação e perspectivas (Documento síntese). MADRP; DGRF; INRB, I.P., 80 pp.
36. Sutton, B.C. & Dyko, B.J. (1989). Revision of *Hendersonula*. *Mycological Research*, 93 (4), 466-488.
37. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28, 2731-2739.
38. Van de Peer, Y. & De Wachter, R. (1997). Evolutionary relationships among the eukaryotic crown taxa taking into account site-to-site rate variation in 18S rRNA. *Journal of Molecular Evolution*, 45(6), 619-30.
39. White, T.J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. (1990). *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. In: Gelfland DH, Innis M.A., Sninsky J.J., 35. White T.J. (eds) *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, pp, 315–322.