

شناسایی قارچ‌های عامل سرخشکیدگی درختان کاج در کرمانشاه

نرگس کریمی^۱، صمد جمالی^{۲*} و روح‌الله شریفی^۲

۱ و ۲. دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۹/۱ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۲/۲۹)

چکیده

به منظور شناسایی عامل‌های قارچی دخیل در سرخشکیدگی درختان کاج در شهر کرمانشاه، در فصل‌های مختلف سال‌های ۱۳۹۴-۱۳۹۵ از درختان کاج دارای نشانه‌های بیماری، نمونه‌برداری و جداسازی قارچ‌ها صورت گرفت. در نتیجه ۱۶۹ جدایه قارچی شامل گونه‌های مختلف جنس *Aspergillus* با ۴۱ جدایه (فراوانی ۲۴/۲۶ درصد)، گونه‌های مختلف جنس *Penicilium* با ۲۵ جدایه (فراوانی ۱۴/۷۹ درصد)، *Microsphaeropsis olivacea* با ۱۶ جدایه (فراوانی ۹/۴۶ درصد)، *Trichoderma harzianum* با ۱۵ جدایه (فراوانی ۸/۸۷ درصد)، جنس *Rhizopus* با ۱۵ جدایه (فراوانی ۸/۸۷ درصد)، *Paecilomyces variotii* با ۹ جدایه (فراوانی ۵/۳۲ درصد)، *Microsphaeropsis protea* با ۸ جدایه (فراوانی ۴/۷۳ درصد)، *Neoscytalidium dimidiatum* با ۸ جدایه (فراوانی ۴/۷۳ درصد)، جنس *Eupenicillium* با ۸ جدایه (فراوانی ۴/۷۳ درصد)، *Kalmusia variispora* با ۷ جدایه (فراوانی ۴/۱۴ درصد)، *Cladosporium sphaerospermum* با ۷ جدایه (فراوانی ۴/۱۴ درصد)، *Pithomyces* sp. با ۶ جدایه (فراوانی ۳/۵۵ درصد) و *Alternaria* sp. با ۵ جدایه (فراوانی ۲/۹۵ درصد) به دست آمد. در بررسی آزمون بیماری‌زایی روی شاخه‌های بریده درختان کاج، در بین همه جدایه‌های قارچی تنها ۱۶ جدایه از *Microsphaeropsis olivacea*، ۸ جدایه از *Microsphaeropsis protea* و ۷ جدایه از *Kalmusia variispora* روی شاخه‌های بریده درختان کاج شانکر ایجاد کردند و بیماری‌زا بودن آنها به اثبات رسید. آزمون بیماری‌زایی در گلخانه روی نهال‌های دوساله درختان کاج نیز صورت گرفت که جدایه‌های این سه قارچ همگی قادر به ایجاد شانکر روی نهال‌ها بودند. از درختان مایه‌زنی شده که نشانه‌های بیماری داشتند دوباره قارچ جداسازی و شناسایی شد. درستی جدایه‌های شناسایی شده با توالی یابی ITS-rDNA تأیید شد.

واژه‌های کلیدی: بیماری‌زایی، توالی‌های جداکننده نسخه‌برداری شده داخلی، شناسایی مورفولوژیکی، *Microsphaeropsis*، *Kalmusia*

Identification of fungal causal agents of pine trees die back in Kermanshah province

Narges Karami¹, Samad Jamali^{2*} and Rouh-Allah Sharifi²

1, 2. M. Sc. Student and Assistant Professor, Faculty of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran

(Received: Nov. 22, 2017 - Accepted: May 19, 2018)

ABSTRACT

During, 2015-2016 a general survey was conducted in Kermanshah province (west of Iran) in order to identify the fungi implicated in the dieback of pine trees. A sum of 169 fungal isolates was obtained from pine trees showing dieback symptoms. The most frequent species associated with pine trees were different species of *Aspergillus* (41 isolates), different species of *Penicilium* (25 isolates), *Microsphaeropsis olivacea* (16 isolates), *Trichoderma harzianum* (15 isolates), *Rhizopus* (15 isolates), *Paecilomyces variotii* (nine isolates), *Microsphaeropsis protea* (eight isolates), *Neoscytalidium dimidiatum* (eight isolates), *Eupenicillium* (eight isolates), *Kalmusia variispora* (seven isolates), *Cladosporium sphaerospermum* (six isolates), *Pithomyces* sp. (six isolates) and *Alternaria* sp. (five isolates). Pathogenicity tests were carried out to determine the role of these species on detached. In pathogenicity tests under laboratory conditions, just isolates of *M. olivacea*, *M. protea* and *K. variispora* could infect inoculated branches at 25°C. Three isolates from each species were used for pathogenicity tests on two-year-old pine seedlings. A month after inoculation, symptoms developed as canker. Pathogens were re-isolated from all inoculated plants after observation of symptoms, thus completing Koch's postulates. This is the first report of *M. olivacea*, *M. protea* and *K. variispora* as the causal agents of pine decline in Iran.

Keywords: Internal transcribed spacer, *Kalmusia*, *Microsphaeropsis*, Morphological identification, Pathogenicity.

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

مقدمه

بیماری زوال درختان کاج نزدیک به صد سال است که در مناطق مختلف جهان وجود دارد و عامل‌های مختلفی برای آن گزارش شده است. در سال ۱۹۴۳ بررسی‌هایی روی خشکیدگی برگ‌های کاج صورت گرفت که جدایه‌های *Sphaeropsis sapinea* به‌عنوان عامل خشکیدگی برگ‌ها گزارش شدند (Waterman, 1943). در سال ۱۹۷۱ در نبرسکا، *Diplodia pinea* به‌عنوان عامل بیماری خشکیدگی برگ و شاخه درختان کاج گزارش شد (Brookhouser & Peterson, 1971). بیماری قهوه‌ای شدن برگ‌های سوزنی کاج با عامل *Cercoseptoria pini* که در آفریقا و آمریکای جنوبی گسترش دارد، نخستین بار توسط گیبسون از آسیا گزارش شد (Gibson, 1979). گونه قارچی *Cyclaneusma minus* نیز به‌عنوان عامل نکروز (بافت مردگی) شاخ و برگ‌های درختان کاج از آفریقا اروپا، جنوب آمریکا و نیوزیلند گزارش شده است (DiCosmo et al., 1983). این قارچ در آفریقای جنوبی به‌طور عمده به‌عنوان یک پوده زیست در سوزن‌های مرده گزارش شده که پیکنیدیوم و آپوتسیوم در شاخه و برگ‌های مرده تشکیل می‌شود (DiCosmo et al., 1983). Sinclair et al. (1987) در نتایج بررسی‌های خود گزارش کردند، بیش از بیست گونه از *Lophodermium* قادر به آلوده کردن سوزن‌های درختان کاج هستند، منتهی تنها گونه *L. seditiosum* را به‌عنوان بیمارگر اولیه معرفی کردند. در مناطق گرمسیری *Dothistroma septospora* به‌عنوان مهم‌ترین بیمارگر شاخ و برگ کاج‌های گرمسیری گزارش شده است (Ivory, 1987; Woods et al., 2005). افزون بر بیمارگرهای یادشده، تعدادی از بیمارگرهای قارچی و شبه‌قارچی از جمله *Fusarium circinatum*، *Phytophthora parasitica*، *Ph. cinnamomi* و *Ph. boehmeriae* نیز به‌عنوان بیمارگرهای گلخانه‌ای روی نهال‌های کاج گزارش شده‌اند (Linde et al., 1994; Dick & Dobbie, 2002). در کشور شیلی عامل زوال درختان کاج شبه قارچ *Phytophthora pinifolia* گزارش شده که این بیمارگر به همراه قارچ‌های فرصت‌طلبی همچون *Diplodia pinea* سرعت گسترش بیماری را افزایش می‌دهد (Durán et

2008). در ایران اگرچه تاکنون بررسی جامعی درزمینه زوال درختان کاج صورت نگرفته است، اما گزارش‌هایی از بیمارگرهای مختلف روی درختان کاج در ایران وجود دارد. گونه‌های مختلف *Pythium* از جمله *P. vexans* و *P. oligandrum* به‌عنوان علل مرگ‌ومیر گیاهان جوان سوزنی‌برگ گزارش شده‌اند (Ershad, 2009). از دیگر قارچ‌های خاک‌زی، *Rhizoctonia solani* است که سبب مرگ کاج ایرانی در ناحیه دریای خزر شده است (Ershad, 2009). بررسی‌های صورت گرفته نشان می‌دهد، در مناطق مرطوب‌تر بعضی از قارچ‌های بازیدیومیست نیز ممکن است به سوزنی‌برگان حمله کنند، از جمله قارچ‌های *Fomes annosus* و *Collybia velutipes* روی گونه گیاهی *Pinus radiata* و گونه قارچی *Tremetes betulina* که از برخی نقاط کشور از روی کاج ایرانی گزارش شده‌اند (Ershad, 2009). در طول سال‌های ۱۹۹۱-۱۹۸۸ از گلخانه‌های سوزنی‌برگان گیلان و مازندران که در آن‌ها نهال سوزنی‌برگان دچار بوته‌میری شده بودند قارچ‌های *Phytophthora macrophomina phaseolina*، *Ph. citricola*، *Ph. citrophthora*، *Ph. cactorum*، *F. moniliforme*، *F. oxysporium*، *Fusarium solani*، *F. avenaceum*، *Rhizoctonia solani*، *Pythium* spp.، *Ph. drechsleri*، *Ph. nicotianae* var. *parasitica* و *Ph. cryptogea* و *Cylindrocarpon radiculicola* جداسازی و بیماری‌زایی گونه‌های *M. phaseolina* و *Fusarium* و *Phytophthora* روی نهال‌های کاج به اثبات رسیده است (Mirabolfathy & Ershad, 1996). پوسیدگی دانه و ریشه‌های کاج و سرو باعث تلفات سنگینی به نهالستان‌ها در استان فارس شده است و در بررسی که در سال ۲۰۱۱ صورت گرفت، از طوقه و ریشه سوزنی‌برگان مختلف مانند گونه‌هایی از کاج و سرو که نشانه‌هایی همچون کلروز (سبزروی)، نکروز، توقف رشد و پوسیدگی طوقه و ریشه داشتند قارچ‌های *Pythium*، *Rhizoctonia*، *Phytophthora* و *Fusarium* جداسازی شد، که بیماری‌زایی جدایه‌های قارچی *Pythium*، *Rhizoctonia* و *Phytophthora* در همه گونه‌های کاج اثبات شد. در این بررسی جدایه‌های *Phytophthora* و *Pythium* خطرناک‌ترین جدایه‌های قارچی بیماری‌زا

جداسازی عامل بیماری

نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه شستشو شدند و پس از عکس‌برداری از نشانه‌ها، قطعه‌های کوچک ۵-۲ میلی متری از حدفاصل بافت سالم و بیمار جدا و به مدت دو دقیقه با آب روان شستشو شدند. پس از ضدعفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد به مدت ۳۰ ثانیه، قطعه‌ها سه بار به مدت ۳۰ ثانیه با آب مقطر سترون شستشو شدند. پس از خشک شدن نمونه‌ها روی کاغذ صافی سترون، در محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار کشت شدند و به مدت ده روز درون انکوباتور (اتاقک رشد) با دمای ۲۵ درجه سلسیوس و تناوب نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی نگهداری و به‌طور مرتب بازدید شدند. پس از رشد قارچ‌ها، از حاشیه فعال نمونه‌ها یک بلوک به قطر ۵ میلی‌متر جدا و به محیط کشت آب آگار منتقل شد. جدایه‌ها به روش نوک ریشه خالص و برای انجام مراحل بعدی (شناسایی جدایه‌ها) روی محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار کشت و پس از رشد کافی در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند. برای پیکنیدیم‌زایی جدایه‌های قارچی از محیط کشت عصاره سیب‌زمینی دکستروز آگار خلال‌دندان و سوزن کاج استفاده شد (Crous et al., 2006).

گزارش شده و یک گونه از *Fusarium* که از دانه‌های کاج ایرانی جداسازی شده بود، تنها در سرو نقره‌ای و کاج ایرانی بیماری‌زا بوده و همچنین گونه *F. proliferatum* باعث پوسیدگی پیش از جوانه‌زنی بذر در کاج و سرو می‌شده است (Zakeri et al., 2011). در استان کرمانشاه تاکنون هیچ بررسی درزمینه شناسایی عامل‌های قارچی دخیل در سرخشکیدگی درختان کاج صورت نگرفته است و با توجه به اهمیت این درخت در استان کرمانشاه، شناسایی عامل‌های قارچی دخیل در سرخشکیدگی درختان کاج با اهمیت و ضرورت دارد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

در فروردین ۱۳۹۴ تا فروردین ۱۳۹۵ از درختان کاج ایرانی (*Pinus eldarica*) دارای نشانه‌های زردی و سرخشکیدگی نمونه‌برداری صورت گرفت. سرشاخه‌ها و شاخه‌های درختان بیمار پس از گردآوری با ثبت ویژگی‌های کامل، در پاکت‌های کاغذی نگهداری و به آزمایشگاه منتقل شدند. ویژگی‌های جغرافیایی مکان‌های مورد نظر شامل طول و عرض جغرافیایی و ارتفاع از سطح دریا با استفاده از نسخه ۸/۸ نرم‌افزار Handy GPS ثبت شد (جدول ۱).

جدول ۱. مکان، زمان و موقعیت جغرافیایی مناطق نمونه‌برداری شده

Table 1. Sources, date of collection and GPS information in this study

Collection date	Location	Latitude	Longitude	Elevation (m)	Pathogenic fungi		
					<i>K. variispora</i>	<i>M. protea</i>	<i>M. olivaceae</i>
14/1/1394	North park	78°06'38"	67°63'69"	1331	+	+	+
15/2/1394	Besat park	08°98'37"	01°08'69"	1436	+	-	+
15/2/1394	Delgoshah	71°96'37"	09°94'68"	1439	-	+	+
10/3/1394	Beheshte zahra	27°99'37"	10°20'69"	1362	-	+	+
8/4/1394	Laleh park	94°96'37"	93°91'68"	1446	-	-	+
26/5/1394	Shahed park	13°03'38"	48°39'69"	1314	+	+	+
15/6/1394	West park	16°07'38"	26°56'69"	1337	-	-	+
2/7/1394	Emam-khomeini avenue	36°00'38"	34°27'69"	1337	+	-	+
17/7/1394	Azadegan	56°96'37"	66°78'69"	1469	+	+	+
17/7/1394	Kamarbandi	67°96'37"	69°68'64"	1488	-	-	+
23/8/1394	Bisetun	87°03'38"	48°78'69"	1326	-	-	+
11/9/1394	Shahrdari	08°98'37"	14°08'69"	1423	-	-	+
2/10/1394	Razi University	27°07'38"	58°43'69"	1345	+	+	+
26/11/1394	Shirin park	58°98'37"	03°96'68"	1426	-	+	+
19/12/1394	Terminale kaveh	88°03'38"	01°62'69"	1323	+	+	+

شناسایی ریخت‌شناختی و مولکولی جدایه‌ها

از کشت‌های خالص برای شناسایی قارچ‌ها استفاده شد. شناسایی بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی (مورفولوژیک) قارچ‌ها در محیط‌های کشت، مانند ساختارهای تولیدمثلی و ویژگی‌های اسپور مانند رنگ، شکل، اندازه و تزئینات سطح اسپور با استفاده از کلیدهای تاکسونومیکی (رده‌بندی) معتبر قارچ‌شناسی صورت گرفت. برای تأیید جدایه‌هایی که از نظر تاکسونومیکی با توجه به منابع جدید قارچ‌شناسی مورد بحث بودند از روش شناسایی مولکولی استفاده شد.

در بررسی‌های مولکولی به منظور تشکیل توده میسلیومی از محیط کشت جامد عصاره سیب‌زمینی دکستروز آگار استفاده شد. استخراج دی.ان.ای. با روش سی‌تب (CTAB) صورت گرفت (Gardes *et al.*, 1991). نواحی ITS1-5.8S-ITS2 از دی.ان.ای. ریبوزومی هسته‌ای با استفاده از ترکیب آغازگرهای عمومی ITS1 (5-TCCGTAGGTGAACCTGCGC-3) به همراه (5-TCCTCCGCTTATGATATGC-3) ITS4 به ترتیب به‌عنوان آغازگرهای پیشرو و پسرو توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز فزون‌سازی شد (White *et al.*, 1990). مواد مورد استفاده در هر واکنش ۱۰ نانوگرم از دی.ان.ای. قالب، ۱ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرها، ۱۰۰ میکرولیتر از $MgCl_2$ ، ۲/۵ میکرولیتر از بافر PCR (۲۰۰ میلی‌مول بافر Tris-HCL با $PH=8$ ، ۵۰۰ میلی‌مول KCL) و ۱۰۰ میکرومول BSA در یک حجم ۲۵ میکرولیتری از واکنش بود. چرخه دمایی و میزان دما بنابر گزارش طراح آغازگر تنظیم شد (White *et al.*, 1990). قطعه‌های فزون‌سازی شده برای توالی‌سنجی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شد و از یک سو به صورت مستقیم با استفاده از آغازگر ITS1 توالی‌سنجی شد. توالی‌های به دست آمده به روش دستی و با استفاده از نسخه ۷.۱ نرم‌افزار Bioedit (Hall, 1999) ویرایش شدند. توالی‌های ویرایش شده با استفاده از نرم‌افزار BankIt (GenBank, NCBI, USA; [Online] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BankIt/>) به بانک ژن (GenBank, NCBI, USA; [Online] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ارائه و شماره

دسترسی برای بررسی‌های بعدی دریافت شد. ردیف‌سازی آغازین توالی‌های ویرایش شده با نرم‌افزار ClustalW (Thompson *et al.*, 1997) انجام شد، پس از آن به صورت دستی در نرم‌افزار BioEdit تنظیم‌هایی روی آن صورت گرفت و درخت‌های فیلوژنتیکی (تبارزایی) با استفاده از نرم‌افزار MEGA5 ترسیم شد. پایداری انشعاب‌های شجره به دست آمده با آزمون اعتبارسنجی با ۱۰۰۰ تکرار ارزیابی شد.

آزمون بیماری‌زایی

آزمون بیماری‌زایی در آزمایشگاه

برای آزمون بیماری‌زایی در آزمایشگاه یک زخم در شاخه‌های سالم درخت کاج (به طول ۲۰ و عرض ۴ سانتی‌متر) ایجاد و یک قرص از پرگنه در حال رشد و فعال جدایه‌های قارچی مورد آزمایش به قطر ۳-۴ میلی‌متر در آن قرار داده شد و برای جلوگیری از خشک شدن آن، ابتدا یک پنبه مرطوب روی محل مایه‌زنی قرار داده و سپس محل مایه‌زنی با پارافیلیم پوشانده شد. سه تکرار برای هر جدایه در نظر گرفته شد. در گیاه شاهد نیز از یک قرص محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار بدون قارچ استفاده شد. سپس شاخه‌ها در نایلون گذاشته شدند تا خشک نشوند و در انکوباتور در دمای ۲۵-۲۲ درجه سلسیوس نگهداری شدند. پس از ۴۵ روز شاخه‌ها برای مشاهده نشانه‌های شانکر بررسی و با شاهد مقایسه شدند. جدایه‌ها بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد از لحاظ قطر شانکر ایجاد شده با استفاده از نرم‌افزار SAS دسته‌بندی شدند. از قارچ‌هایی که روی شاخه‌های بریده شده نشانه ایجاد کردند برای اثبات بیماری‌زایی در گلخانه انتخاب شدند.

آزمون بیماری‌زایی در گلخانه

پس از اثبات بیماری‌زایی جدایه‌های قارچی روی شاخه‌های بریده شده، سه جدایه از قارچ‌های بیمارگر هر کدام روی سه نهال دو ساله کاج که ارتفاع ۲۰-۱۰ و قطر ساقه ۱/۵-۱ سانتی‌متر داشتند، مایه‌زنی شدند. برای این منظور ابتدا محل مایه‌زنی با الکل ۷۰ درصد ضدعفونی و پس از ایجاد شکاف روی نهال به طول ۱ سانتی‌متر با چاقو یک قرص از قارچ روی آن گذاشته

با هفت جدایه (فراوانی ۴/۱۴ درصد)، *Cladosporium* ۳/۵۵ (فراوانی ۳/۵۵ درصد)، *Pithomyces* با شش جدایه (فراوانی ۳/۵۵ درصد) و *Alternaria* با پنج جدایه (فراوانی ۲/۹۵ درصد) بود.

ویژگی‌های ریخت‌شناختی قارچ‌های بیماری‌زا (Verkley, Göker & Stielow) Ariyawansa & K.D. Hyde, (2014) *Kalmusia variispora*

رشد شعاعی پرگنه قارچ در محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار پس از گذشت پنج روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و تناوب نوری ۱۲ ساعت روشنایی ۱۲ ساعت تاریکی ۲/۳ سانتی‌متر بود. رنگ پرگنه روی محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار سفید و باگذشت زمان تیره می‌شد (شکل ۳-A). پس از گذشت یک هفته پیکنیدیومها به صورت نقاط سیاه در محیط کشت مشخص بودند. ریشه‌ها به رنگ روشن، سطح ریشه‌ها صاف، پیکنیدیومها تک حفره‌ای، کروی تا نیمه کروی و روزنه داشتند (شکل ۳-B). پیکنیدیوسپورها به شکل بیضوی، تک‌یاخته‌ای (سلولی) و به رنگ روشن و به ابعاد $(1/5-2) \times (1/9) \times (3/08-4/52)$ میکرومتر بودند (شکل ۳-C).

Microsphaeropsis olivacea (Bonord.) Höhn., Hedwigia (1917)

رشد شعاعی پرگنه قارچ در محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار پس از گذشت پنج روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و تناوب نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی ۲/۲ سانتی‌متر بود. رنگ پرگنه در محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار سفید و باگذشت زمان تیره می‌شد (شکل ۳-D). ریشه‌ها به رنگ روشن، سطح ریشه‌ها صاف، پیکنیدیومها تک حفره‌ای، کروی تا نیمه کروی و روزنه داشتند (شکل ۳-E). پیکنیدیوسپورها به اشکال مختلف کروی، نیمه کروی و بیضوی تا تخم‌مرغی شکل، تک‌سلولی، به رنگ قهوه‌ای روشن و به ابعاد $(4/2-6/58) \times (4/94)$ میکرومتر بودند (شکل ۳-F). کلایدسپورها به رنگ قهوه‌ای روشن و به صورت بین سلولی و زنجیری تشکیل شدند.

و با پارافیلیم پوشانده شد. گیاهان مایه‌زنی‌شده حدود ۵-۶ ماه پس از مایه‌زنی، از نظر ظهور نشانه‌های بیماری بررسی شدند.

تعیین دامنه میزبانی

برای تعیین دامنه میزبانی، از هر قارچ بیمارگر، یک جدایه با سه تکرار روی شاخه‌های بریده زبان‌گنجشک، بید مجنون، سرو و افرا که در مناطق مختلف شهر کرمانشاه در کنار درختان کاج رشد می‌کنند مایه‌زنی شده و پس از گذشت ۴۵ روز، برای مشاهده نشانه‌های شانکر بازرسی شدند.

نتایج

با بازدید از ۱۵ منطقه در شهر کرمانشاه که درختان کاج بیشتری کاشته شده بود مشخص شد، بیماری سرخشکیدیگی و درختان کاج در همه مناطق مورد بازدید وجود دارد. بارزترین نشانه‌های قابل مشاهده در همه مناطق خشکیدگی جوانه‌ها، برگ‌ها و شاخه‌ها بود. در میان مناطق نمونه‌برداری شده بیشترین جمعیت درختان کاج بیمار و دارای نشانه‌های یادشده در پارک شیرین و بزرگراه و کمترین تعداد درخت آلوده در منطقه کمربندی غربی بود.

شناسایی قارچ‌های جداسازی شده از درختان کاج

در این بررسی ۱۶۹ جدایه قارچ از نمونه‌های بیمار و از نقاط مختلف جداسازی و شناسایی شد که شامل گونه‌های مختلف جنس *Aspergillus* با ۴۱ جدایه (فراوانی ۲۴/۲۶ درصد)، گونه‌های مختلف جنس *Penicillium* با ۲۵ جدایه (فراوانی ۱۴/۷۹ درصد)، *Microsphaeropsis olivacea* با ۱۶ جدایه (فراوانی ۹/۴۶ درصد)، *Trichoderma harzianum* با ۱۵ جدایه (فراوانی ۸/۸۷ درصد)، جنس *Rhizopus* با ۱۵ جدایه (فراوانی ۸/۸۷ درصد)، *Paecilomyces variotii* با نه جدایه (فراوانی ۵/۳۲ درصد)، *Microsphaeropsis protea* با هشت جدایه (فراوانی ۴/۷۳ درصد)، *Neoscytalidium dimidiatum* با هشت جدایه (فراوانی ۴/۷۳ درصد)، جنس *Eupenicillium* با هشت جدایه (فراوانی ۴/۷۳ درصد)، *Kalmusia variispora*

آزمون بیماری‌زایی

همه جدایه‌های به‌دست‌آمده از درختان کاج بیمار دارای نشانه‌هایی سرخشکیدگی، روی شاخه‌های بریده‌شده درخت کاج مایه‌زنی شدند که همه جدایه‌های *M. olivacea* (۱۶ جدایه)، *M. protea* (هشت جدایه) و *K. variispora* (هفت جدایه) قادر به ایجاد شانکر روی شاخه‌های بریده‌شده بودند (شکل ۱). قطر شانکرها اندازه‌گیری و با شاهد مقایسه شد. جدایه‌ها بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد از لحاظ قطر شانکر ایجادشده دسته‌بندی شدند. نتایج تجزیه واریانس نشان داد، تفاوت معنی‌داری از نظر قطر شانکر ایجادشده وجود دارد، به طوری که بیشترین قطر شانکر ایجادشده مربوط به جدایه ۱ از قارچ *K. variispora* بود (مقدار $CV=4/89$ ، $F=19/84$ ، جدول تجزیه واریانس در مقاله قرار نگرفته) (شکل ۱). از شاخه‌های مایه‌زنی‌شده دارای شانکر قارچ‌های بیمارگر دوباره جداسازی و اصول کخ تأیید شد. در این بررسی افزون بر قارچ‌های ساپروفیت (پوده‌زی) جداسازی‌شده از درختان کاج دارای نشانه‌های سرخشکیدگی، قارچ *Neoscytalidium dimidiatum* نیز قادر به ایجاد شانکر روی شاخه‌های بریده‌شده کاج نبود.

آزمون بیماری‌زایی در گلخانه

آزمون بیماری‌زایی در گلخانه روی نهال‌های دوساله درخت کاج صورت گرفت. هر سه جدایه انتخاب‌شده از *M. protea* (*Miol1*, *Miol2*, *Miol3*) و *M. olivacea* (*CaVa1*, *CaVa2*, *CaVa3*) و *K. variispora* (*MiPr1*, *MiPr2*, *MiPr3*) در محل مایه‌زنی، نشانه‌های شانکر ایجاد کردند. پیشروی شانکر روی نهال‌های کاج از محل مایه‌زنی شده به سمت بالا و پائین ساقه کاج مشاهده شد (شکل ۲).

تعیین دامنه میزبانی

در تعیین دامنه میزبانی، گونه‌های *M. olivacea*، *M. protea* و *K. variispora* روی شاخه‌های بریده زبان‌گنجشک، بید مجنون، سرو و افرا که در مناطق مختلف شهر کرمانشاه در کنار درختان کاج رشد می‌کنند مایه‌زنی شدند که پس از گذشت ۴۵ روز نشانه‌های شانکر در محل مایه‌زنی شده مشاهده شد.

(Crous & Denman, 2011) *Crous & Denman, (2011) Microsphaeropsis protea*

رشد شعاعی پرگنه قارچ در محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار پس از گذشت پنج روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و تناوب نوری ۱۲ ساعت روشنایی ۱۲ ساعت تاریکی ۲/۳ سانتی‌متر بود. رنگ پرگنه در محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار سفید و باگذشت زمان تیره می‌شد (شکل ۳-G). ریشه‌ها به رنگ روشن، سطح ریشه‌ها صاف، پیکنیدیوم‌ها تک حفره‌ای، کروی تا نیمه کروی و روزنه داشتند (شکل ۳-H). پیکنیدیوسپورها به اشکال مختلف کروی، نیمه‌کروی و بیضوی تا تخم‌مرغی شکل، تک‌سلولی، به رنگ قهوه‌ای روشن و به ابعاد $(۴/۱-۶) \times ۴/۶$ (۵/۱۱-۸/۴۶) میکرومتر بودند (شکل ۳-I). کلامیدسپورها به رنگ قهوه‌ای روشن و به‌صورت بین سلولی و زنجیری تشکیل شدند.

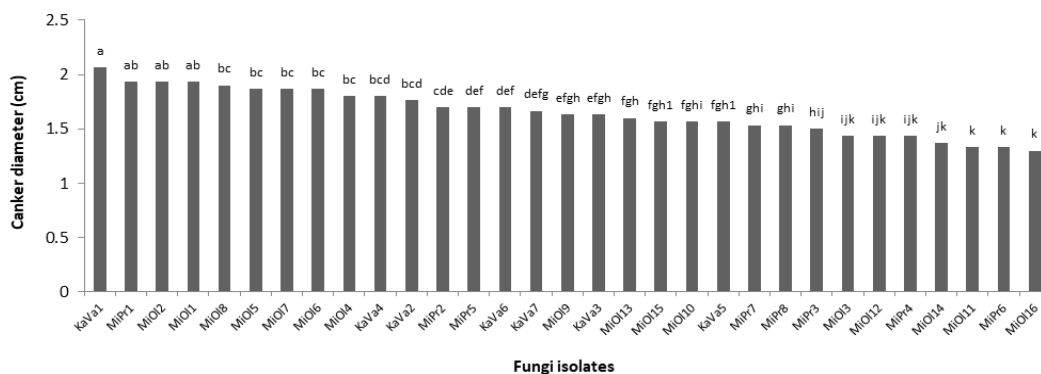
بررسی‌های مولکولی

پس از استخراج دی.ان.ای. ژنگانی (ژنومی)، ناحیه توالی‌های نسخه‌برداری‌شده درونی با استفاده از آغازگرهای ITS1 و ITS4 تکثیر شد که طول این ناحیه برای جدایه‌های مورد بررسی بین ۵۰۰ تا ۵۸۰ جفت باز بود. با استفاده از ابزار جستجوی بلاست هشت جدایه با دو جدایه از *M. olivacea* (KP641139, JN712495) *M. protea* (KX611000)، یک جدایه با *M. protea* (JN712495) و یک جدایه با *K. variispora* (KY783414) موجود در بانک ژن به ترتیب ۱۰۰، ۹۹ و ۹۹ درصد تشابه و درصد همپوشانی بالایی داشتند. جدایه‌ها در بانک ژن ثبت و شماره‌های دسترسی دریافت شد (جدول ۲). در واکاوی فیلوژنیکی مبتنی بر ناحیه آی.تی.اس، جدایه‌های *M. olivacea* از ایران با ضریب اطمینان ۹۷ درصد در یک گروه مونوفیلیتیک (تک‌تبار) با گونه معتبر *M. olivacea* از مؤسسه CBS قرار گرفتند (شکل ۳). جدایه ایرانی *M. protea* با ضریب اطمینان ۹۹ درصد در گروه مونوفیلیتیک با گونه معتبر *M. olivacea* از بانک ژن و جدایه ایرانی *K. variispora* با ضریب اطمینان ۱۰۰ درصد با گونه معتبر *K. variispora* از مؤسسه CBS هلند در یک گروه مونوفیلیتیک قرار گرفتند. نتایج فیلوژنیکی درستی شناسایی مولکولی گونه‌ها را تأیید کرد (شکل ۴).

جدول ۲. نتایج بلاست جدایه‌های قارچی بیمارگر

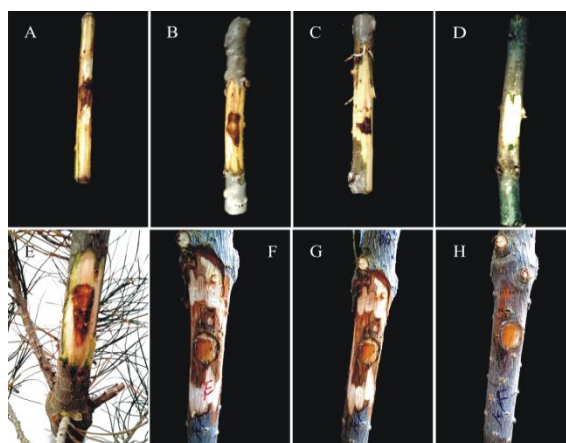
Table 2. Blast results of pathogenic fungi of pine trees in this study

Species	Code	Accession number	Acc. no other author	Max score	Total score	Query cover (%)	E-value	Identity (%)
<i>Microsphaeropsis olivacea</i>	MiOI1	KY463687	KP641139.1	900	900	99	0.0	100
<i>Microsphaeropsis olivacea</i>	MiOI2	KY463688	KP641139.1	850	850	99	0.0	100
<i>Microsphaeropsis olivacea</i>	MiOI4	KY463689	KX611000.1	888	888	96	0.0	100
<i>Microsphaeropsis olivacea</i>	MiOI5	KY463690	KP641139.1	852	852	99	0.0	100
<i>Microsphaeropsis olivacea</i>	MiOI6	KY463691	KP641139.1	860	860	84	0.0	100
<i>Microsphaeropsis olivacea</i>	MiOI7	KY463692	KP641139.1	887	887	82	0.0	100
<i>Microsphaeropsis olivacea</i>	MiOI8	KY463693	KP641139.1	891	891	99	0.0	100
<i>Microsphaeropsis protea</i>	MiPr1	KY463694	JN712495.1	791	791	85	0.0	99
<i>Kalmusia variispora</i>	CaVa1	MF627603	KY783414.1	972	972	85	0.0	99



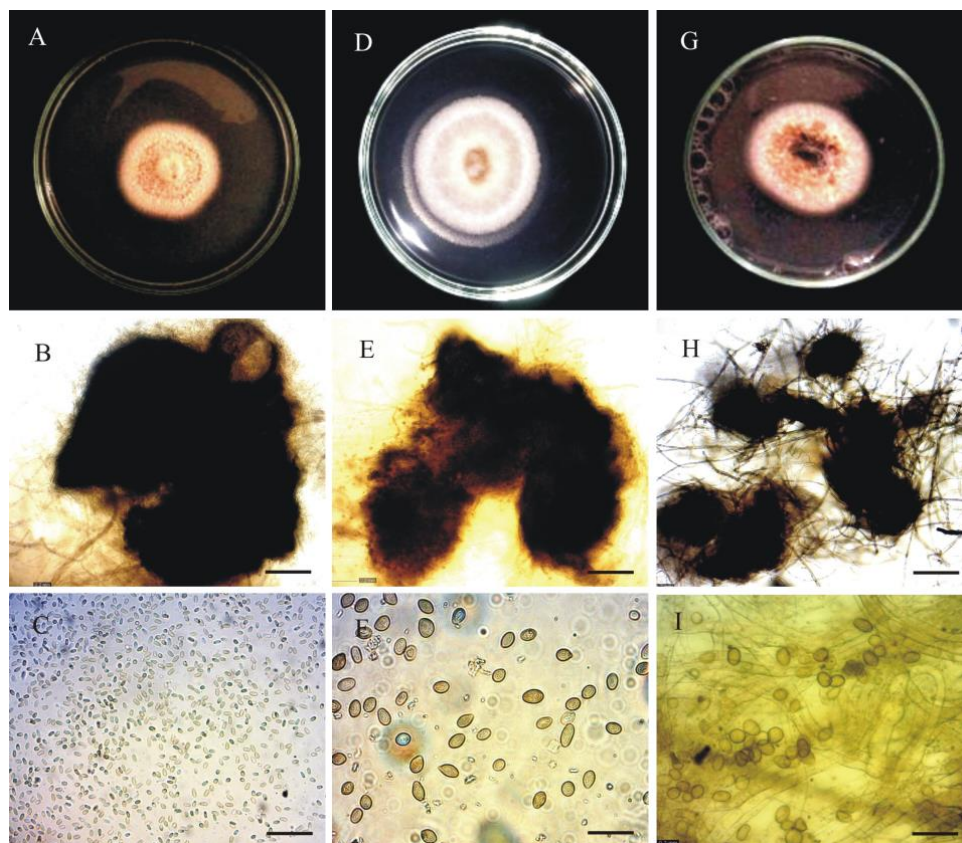
شکل ۱. گروه‌بندی جدایه‌های سه گونه *Microsphaeropsis olivacea* (MiOI)، *Microsphaeropsis protea* (MiPr) و *Kalmusia variispora* (KaVa) برحسب میانگین قطر شانکر ایجادشده روی شاخه‌های بریده کاج مایه‌زنی شده با یک پلاگ میسلیمی از هر جدایه

Figure 1. Grouping of isolates of *Microsphaeropsis olivacea* (MiOI), *Microsphaeropsis protea* (MiPr) and *Kalmusia variispora* (KaVa), based on the average of canker diameter created on pine detached branch, with a mycelium plug of each isolate



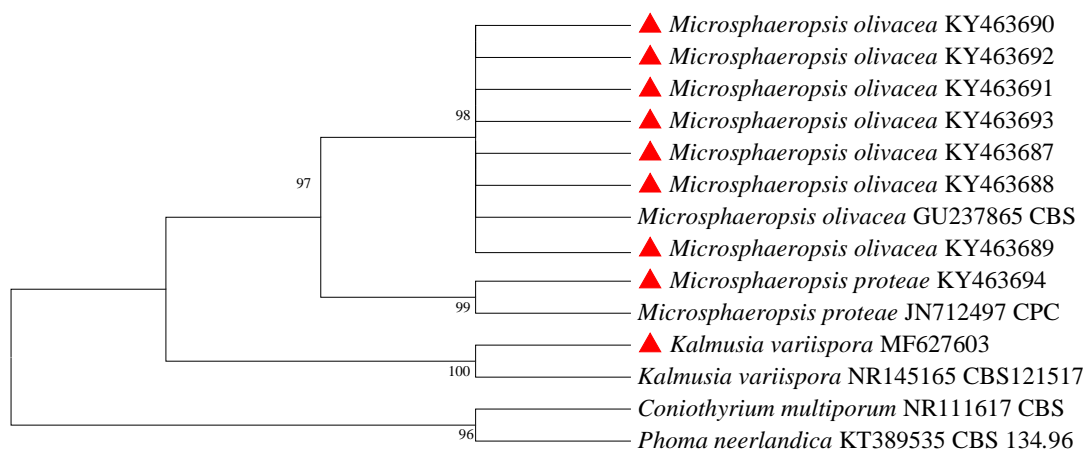
شکل ۲. نشانه‌های شانکر ناشی از *Kalmusia variispora* روی شاخه‌های بریده (A)، نشانه‌های شانکر ناشی از *Microsphaeropsis olivacea* روی شاخه‌های بریده (B)، نشانه‌های شانکر ناشی از *Microsphaeropsis protea* روی شاخه‌های بریده (C)، شاهد مایه‌زنی شده با یک بلوک از محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار (D)، نشانه‌های شانکر ناشی از *Microsphaeropsis olivacea* روی نهال دو ساله کاج (E)، نشانه‌های شانکر ناشی از *Kalmusia variispora* روی نهال دو ساله کاج (F)، نشانه‌های شانکر ناشی از *Microsphaeropsis protea* روی نهال دو ساله کاج (G)، گیاه شاهد مایه‌زنی شده با یک بلوک از محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار (H).

Figure 2. Canker caused by *Kalmusia variispora* on pine detached stem (A), canker caused by *Microsphaeropsis olivacea* on pine detached stem (B), canker caused by *Microsphaeropsis protea* on pine detached stem (C), control (D), canker caused by *Microsphaeropsis olivacea* on two years old pine seedlings after 3 month (E), Canker caused by *Kalmusia variispora* on two years old pine seedlings after 3 month (F), canker caused by *Microsphaeropsis protea* on two years old pine seedlings after 3 month (G), control (H).



شکل ۳. ویژگی‌های ریخت‌شناختی بیمارگرها: *Kalmusia variispora*: پرگنه (A)، پیکنیدیوم (B)، اسپورها (C)؛ *Microsphaeropsis olivacea*: پرگنه (D-F)، پیکنیدیوم (E)، اسپورها (F)؛ *Microsphaeropsis protea*: پرگنه (G-I)، پیکنیدیوم (H)، اسپورها (I). خط مقیاس در همه اشکال ۱۰ میکرومتر است.

Figure 3. Morphological characteristics of pathogens: *Kalmusia variispora*: Colony on PDA after one week (A), Pycnidium (B), Pycnidiospores (C), *Microsphaeropsis olivacea*: Colony on PDA after one week (D), Pycnidium (E), Pycnidiospores (F), *Microsphaeropsis protea*: Colony on PDA after one week (G), Pycnidium (H), Pycnidiospores (I). Scale= 10 μm



شکل ۴. درخت فیلوژنیک گونیه‌های قارچی بیمارگر به‌دست‌آمده از درختان کاج بر اساس مقایسه توالی نوکلئوتیدی نواحی ITS2، 5.8S و ITS1 از توالی‌های ژنومیک RNA ریبوسومی ترکیبی از ۱۲ گونه قارچی بیمارگر به‌دست‌آمده از درختان کاج بر اساس مقایسه توالی نوکلئوتیدی نواحی آی.تی.اس. با استفاده از روش الحاق مجاور و با تکرار ۵۰۰ بار. گونه *Coniothyrium multiporum* و *Phoma neerlandica* به‌عنوان گروه خارجی در نظر گرفته شده است. مثلث‌های قرمز جدایه‌های این بررسی هستند.

Figure 4. Neighbor joining phylogram generated in Mega from the alignment of 12 combined ITS1, 5.8S subunit, and ITS2 regions of the genomic ribosomal RNA sequences of the pathogenic fungi obtained from pine trees, using the Kimura 2 parameter model with complete deletion gap handling and 1000-replication bootstrapping. The shapes refer to the isolates from Iran.

بحث

(Lupo *et al.*, 2001; Bettucci & Saravay, 1993). در سال ۲۰۰۱ این گونه به‌عنوان یک بیمارگر انسانی و آلوده‌کننده چشم و پوست گزارش شده است (Guarro *et al.*, 1999; Shah *et al.*, 2001). در ایران این گونه در سال ۲۰۱۵ از ضایعات نکتروتیک (بافت مردگی) گیاه خارشتر (*Alhagi maurorum*) در استان کرمانشاه جداسازی و گزارش شده است (Razaghi & Zafari, 2016). قارچ دیگری که در این پژوهش به‌عنوان بیمارگر شناسایی شد، قارچ *M. protea* با هشت جدایه بود. در تاکسونومی جدید این قارچ در خانواده *Microsphaeropsidaceae* قرار گرفته است (Chen *et al.*, 2015). قارچ *M. protea* پیکنیدیوم‌هایی به رنگ قهوه‌ای تیره دارد که اندازه آن‌ها تا ۴۰۰ میکرومتر است، کنیدیوم‌های آن فیالییدیک و در هنگام بلوغ قهوه‌ای‌رنگ و بیضوی است (Crous *et al.*, 2011a). نتایج موجود در این تحقیق نزدیک بودن رابطه *Microsphaeropsis* و *Phoma* را نشان می‌دهد. بررسی‌های ریخت‌شناختی در هر دو جنس نشان می‌دهد که سلول کنیدی‌زا در هر دو مشابه است ولی کنیدیوم‌ها در *Microsphaeropsis* تیره‌رنگ است و دیواره آن دولایه است اگرچه رنگ تنها پس از جدایی کنیدیوم‌ها مشخص می‌شود بنابراین پیکنیدیوم نابالغ *Microsphaeropsis* با پیکنیدیوم *Phoma* ممکن است اشتباه گرفته شود (Boerema, 2004; De Gruyter *et al.*, 2013). این گونه قارچی در افراد دچار نقص ایمنی به‌عنوان عامل‌های عفونت‌زا شناسایی شده است (Yatsunenکو *et al.*, 2012). قارچ *K. variispora* نیز با هفت جدایه، قارچ دیگری بود که در این پژوهش بیمارگر بودن آن ثابت شد. در میان جدایه‌های قارچی جدایه‌هایی که مربوط به گونه‌های *M. olivacea* و گونه *M. protea* بودند قدرت بیمارگری کمتری داشتند و گونه *K. variispora* قدرت بیمارگری بیشتری داشت. با توجه به شرایط نامساعد محیط‌های شهری از جمله وجود آلاینده‌ها، عدم آبیاری مناسب، سفت بودن خاک پای درختان و عدم تهویه خاک، شرایط برای بیماری‌زایی قارچ‌های فرصت‌طلب و در مواردی بیمارگر شدن قارچ‌های اندوفیت فراهم می‌شود (Oono *et al.*, 2015).

در بررسی‌های صورت گرفته در هنگام نمونه‌برداری از درختان کاج، نشانه‌ها روی درختان به‌صورت خشکیدگی و زردی برگ‌ها و خشک شدن شاخه‌های درختان کاج بود، که به‌مرور این خشکیدگی به سمت درون تاج گیاه گسترش و در درازمدت باعث خشکیدگی قسمت بزرگی از درخت می‌شود. در حال حاضر بررسی‌های زیادی روی بیماری‌های درختان کاج در نقاط مختلف جهان صورت گرفته است و عامل‌های مختلف قارچی به‌عنوان عامل بیماری جداسازی شده‌اند. نتایج این بررسی نشان داد، بیماری سرخشکیدگی درختان کاج در غالب نقاط شهر کرمانشاه وجود دارد و در حال پیشرفت است. در جداسازی عامل بیماری‌زا از درختان کاج دارای نشانه‌های بیماری، قارچ‌های مختلفی مانند *Colletotrichum acutatum*, *Diplodia pinea*, *Hendersonula*, *Cytospora kunzei* (Brown 1968), *Necteria haematococca soruloidea* (Piron, 1960), *Polyporus schweinitzii*, *Stereum abietiman* (Wean, 1937)، جداسازی و گزارش شده است. در این بررسی بنابر داده‌های ریخت‌شناختی و مولکولی، گروه‌های قارچی چندی از درختان کاج با نشانه‌های بیماری سرخشکیدگی جداسازی شد. شناسایی جدایه‌های قارچی، با استفاده از ویژگی‌های ریخت‌شناختی جدایه‌ها صورت گرفت، ولی به دلیل همپوشانی ویژگی‌های ریخت‌شناختی در بین گونه‌های برخی از جنس‌های قارچی، شناسایی با اتکا بر داده‌های ریخت‌شناختی کارایی لازم را نداشت. به همین منظور در مورد تعدادی از گونه‌های قارچی داده‌های توالی DNA برای تأیید هویت گونه استفاده شد. در این تحقیق در مجموع ۱۶۹ جدایه قارچی از درختان کاج دارای نشانه‌های به‌دست آمد که بیشترین فراوانی قارچ بیمارگر مربوط به *Microsphaeropsis olivacea* بود. این قارچ در سال ۱۹۹۸ از درخت کاج (*Pinus sylvestris*) جداسازی شده است (Petrini & Fisher, 1988). در جزیره شیلی از ساقه، پوست و زایلوم درخت اکالیپتوس جداسازی و به‌عنوان یک قارچ اندوفیت (درون‌رست) گزارش شده است

REFERENCES

1. Bettucci, L. & Saravay, M. (1993). Endophytic fungi of Eucalyptus globulus: a preliminary study. *Mycological Research*, 97, 679-682.
2. Boerema, G. H. (2004). *Phoma* identification manual: differentiation of specific and infra-specific taxa in culture. CABI.
3. Brookhouser, L. & Peterson, G. W. (1971). Infection of Austrian, Scots, and ponderosa pines by *Diplodia pinea*. *Phytopathology*, 61, 409-414.
4. Chen, Q., Jiang, J., Zhang, G., Cai, L. & Crous, P. W. (2015). Resolving the *Phoma* enigma. *Studies in Mycology*, 82, 137-217.
5. Crous, P., Summerell, B., Shivas, R., Romberg, M., Melnik, V., Verkley, G. & Groenewald, J. (2011a). Fungal Planet description sheets: 92-106. *Persoonia*, 27, 130.
6. Crous, P., Summerell, B., Swart, L., Denman, S., Taylor, J., Bezuidenhout, C., Palm, M., Marincowitz, S. & Groenewald, J. (2011b). Fungal pathogens of Proteaceae. *Persoonia*, 27, 20.
7. Crous, P. W., Slippers, B., Wingfield, M. J., Rheeder, J., Marasas, W. F., Phillips, A. J., Alves, A., Burgess, T., Barber, P. & Groenewald, J. Z. (2006). Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Studies in Mycology*, 55, 235-253.
8. De Gruyter, J., Woudenberg, J., Aveskamp, M., Verkley, G., Groenewald, J. & Crous, P., (2013). Redisposition of *Phoma*-like anamorphs in Pleosporales. *Studies in Mycology*, 75, 1-36.
9. Dick, M. & Dobbie, K. (2002). Species of *Fusarium* on *Pinus radiata* in New Zealand. *New Zealand Plant Protection*, 58-62.
10. DiCosmo, F., Peredo, H. & Minter, D. (1984). *Cyclaneusma* gen. nov., *Naemacyclus* and *Lasiostictis*, a nomenclatural problem resolved. *Forest Pathology*, 13, 206-212.
11. Durán, A., Gryzenhout, M., Slippers, B., Ahumada, R., Rotella, A., Flores, F., Wingfield, B. D. & Wingfield, M. J. (2008). *Phytophthora pinifolia* sp. nov. associated with a serious needle disease of *Pinus radiata* in Chile. *Plant Pathology*, 57, 715-727.
12. Gardes, M., White, T. J., Fortin, J. A., Bruns, T. D. & Taylor, J. W. (1991). Identification of Indigenous and Introduced Symbiotic Fungi in Ectomycorrhizae by Amplification of Nuclear and Mitochondrial Ribosomal DNA. *Canadian Journal of Botany*, 69, 180-190.
13. Gibson, I. (1979). *Diseases of forest trees widely planted as exotics in the tropics and southern hemisphere*. Part 11. The Genus *Pinus*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, and Commonwealth Forestry Institute. Kew and Commonwealth Forestry Institute, University of Oxford.
14. Guarro, J., Mayayo, E., Tapiol, J., Aguilar, C. & Cano, J. (1999). *Microsphaeropsis olivacea* as an etiological agent of human skin infection. *Medical Mycology*, 37, 133-137.
15. Ivory, M. (1967). A new variety of *Dothistroma pini* in Kenya. *Transactions of the British Mycological Society*, 50, 289IN284-297.
16. Ivory, M. (1986). First report of *Mycosphaerella gibsonii* in South Africa. *Phytophylactica*, 18, 51-54.
17. Ivory, M. (1987). Diseases and disorders of pines in the tropics: a field and laboratory manual.
18. Linde, C., Kemp, G. & Wingfield, M. (1994). *Pythium* and *Phytophthora* species associated with eucalypts and pines in South Africa. *Forest Pathology*, 24, 345-356.
19. Lupo, S., Tiscornia, S. & Bettucci, L. (2001). Endophytic fungi from flowers, capsules and seeds of Eucalyptus globulus. *Revista Iberoamericana de Micología*, 18(1), 38-41.
20. Mirabolfathy, M. & Ershad, D. (1996). Studies on the conifer damping-off in the forest nurseries of northern and central Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 32.
21. Oono, R., Lefèvre, E., Simha, A. & Lutzoni, F. (2015). A comparison of the community diversity of foliar fungal endophytes between seedling and adult loblolly pines (*Pinus taeda*). *Fungal Biology*, 119, 917-928.
22. Petrini, O. & Fisher, P. (1988). A comparative study of fungal endophytes in xylem and whole stem of *Pinus sylvestris* and *Fagus sylvatica*. *Transactions of the British Mycological Society*, 91, 233-238.
23. Razaghi, P. & Zafari, D. (2016). First report of *Microsphaeropsis olivacea* causing brown spine rot on *Alhagi maurorum* in Iran. *Journal of Plant Pathology*, 98.
24. Shah, C. V., Jones, D. B. & Holz, E. R. (2001). *Microsphaeropsis olivacea* keratitis and consecutive endophthalmitis. *American Journal of Ophthalmology*, 131, 142-143.
25. Sinclair, W. A., Lyon, H. H. & Johnson, W. T. (1987). Diseases of trees and shrubs. Cornell University Press.
26. Waterman, A. M. (1943). *Diplodia pinea* the cause of a disease of hard Pines. *Phytopathology*, 33, 1018-1031.
27. Woods, A., Coates, K. D. & Hamann, A. (2005). Is an unprecedented Dothistroma needle blight epidemic related to climate change. *AIBS Bulletin*, 55, 761-769.

28. Yatsunenko, T., Rey, F. E., Manary, M. J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M. G., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Baldassano, R. N. & Anokhin, A. P. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*, 486, 222.
29. Zakeri, A., Hamzeharghani, H., Banihashemi, Z. & Saadati, S. (2011). Pathogenic fungi associated with pre- and post- emergence seedling blight of pine and cypress in Fars Province, Iran. *Forest Pathology*, 41, 438-443.