

شناسایی قارچ‌های همراه با بیماری‌های تنه درختان میوه هسته‌دار در استان‌های آذربایجان

شرقی و غربی

هاله دخانچی¹، مهدی ارزنلو^{2*} و اسدالله بابای اهری²

1- دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

2- دانشیار و استاد گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

*نویسنده مسئول: arzanlou@hotmail.com

تاریخ پذیرش: 92/12/23

تاریخ دریافت: 92/04/05

چکیده

بیماری‌های تنه به‌عنوان یک تهدید بالقوه برای تولید و کشت و پرورش درختان میوه هسته‌دار در دنیا مطرح می‌باشند. عوامل زنده مختلفی در ایجاد این بیماری‌ها دخالت دارند که در بین آن‌ها عوامل قارچی، سهم قابل توجهی را به‌خود اختصاص می‌دهند. علی‌رغم شیوع بیماری‌های تنه در باغ‌های درختان میوه هسته‌دار استان‌های آذربایجان شرقی و غربی، عوامل قارچی همراه با این بیماری‌ها ناشناخته باقی مانده‌اند. در این بررسی گروه‌های قارچی همراه با بیماری‌های تنه درختان میوه هسته‌دار در استان‌های آذربایجان شرقی و غربی بر اساس داده‌های ریخت‌شناختی و داده‌های توالی نوکلئوتیدی ناحیه ITS-rDNA مورد شناسایی قرار گرفت. از مجموع 128 نمونه تعداد 101 جدایه قارچی جداسازی و خالص‌سازی گردید. گونه‌های *Cytospora chrysosperma* با فراوانی 23/76 درصد، *Alternaria alternata* با فراوانی 13/86 درصد، *Paecilomyces variotii* با فراوانی 9/9 درصد و *Fusarium proliferatum* با فراوانی 8/91 درصد به‌عنوان گونه‌های غالب شناسایی شدند. در مورد جدایه‌های متعلق به جنس *آلترناریا* هویت گونه با استفاده از داده‌های توالی ژن *rpb2* مورد تایید قرار گرفت. همچنین گونه‌های *Phoma*، *Cladosporium cladosporioides*، *Epicoccum nigrum*، *F. acuminatum*، *Chaetomium globosum*، *Sarocladium strictum*، *Paraconiothyrium africanum*، *glomerata*، *Phaeoacremonium aleophilum*، *Botryosphaeria sarmentorum*، *C. pruinosa*، *Cytospora cincta*، *tricinatum*، *C. pruinosa*، *C. cincta*، *Cytospora chrysosperma* شده بین گونه‌های جداسازی‌شده *P. africanum* و *P. aleophilum*، *B. sarmentorum* به‌عنوان بیمارگرهای شناخته‌شده روی میزبان‌های چوبی به‌شمار می‌روند. با شناسایی گونه‌های قارچی همراه با بیماری‌های تنه درختان میوه هسته‌دار، اعمال راهکارهای مناسب برای مدیریت بیماری در آینده امکان‌پذیر خواهد شد.

واژه‌های کلیدی: بادام، زردآلو، شانکر، هلو، *Cytospora*، *Botryosphaeria*

مقدمه

همکاران 2010، گراماخه و همکاران 2012، ترویلاس و همکاران (2012). علاوه بر گونه‌های قارچی دخیل در بیماری‌های تنه، گروه‌های قارچی متعددی به عنوان عوامل همراه با علائم بیماری‌های تنه از شاخه‌ها و چوب‌های بیمار درختان میوه هسته‌دار جداسازی شده‌اند (آرنولد و همکاران، 2003). تحقیق‌های زیادی نشان داده‌اند که این قارچ‌ها نقش کلیدی در برهم‌کنش‌های میزبان-بیمارگر قبل از حمله عوامل بیماری‌زا ایفا می‌کنند. یکی از جنبه‌های مهم در برهم‌کنش میزبان-بیمارگر زندگی اندوفیتی برخی از قارچ‌های بیمارگر در بخشی از چرخه زندگی بیمارگر است (آرنولد و همکاران، 2003).

در ایران گروه‌های قارچی متعددی از درختان میوه هسته‌دار با علائم بیماری سرخشکیدگی و زوال گزارش شده‌اند که از این بین می‌توان به گونه‌های جنس *Rosellinia*, *Phytophthora*, *Botryosphaeria*, *Cytospora* و *Verticillium* اشاره کرد (ایرانی و همکاران 1382، رضوی و همکاران 1381، دیزجی و همکاران 1385، ارشاد 1388). با این وجود در استان‌های آذربایجان شرقی و غربی، توجه کمتری به بیماری‌های تنه و شاخه درختان میوه هسته‌دار شده و عوامل قارچی همراه با این بیماری‌ها عموماً ناشناخته باقی مانده‌اند. در این تحقیق تلاش‌گردید تا قارچ‌های همراه با بیماری‌های تنه درختان میوه هسته‌دار در استان‌های آذربایجان شرقی و غربی با استفاده از داده‌های ریخت‌شناسی و مولکولی شناسایی شوند.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری و جداسازی عوامل قارچی همراه با بیماری‌های تنه

طی این تحقیق، باغ‌های درختان میوه هسته‌دار در شهرستان‌های مختلف استان‌های آذربایجان شرقی و غربی در سال‌های 1389 و 90 مورد بازدید واقع شد و نمونه‌برداری از درختان دارای علائم بیماری‌های تنه صورت گرفت. نمونه‌ها با ثبت علائم خارجی، موقعیت-

درختان میوه هسته‌دار از مهم‌ترین درختان باغی ایران بوده و سهم عمده‌ای از صادرات غیرنفتی کشور را به خود اختصاص می‌دهند. مطابق آمارهای سازمان جهانی خواروبار و کشاورزی در سال 2010 میلادی، ایران در تولید 22 محصول مهم کشاورزی از جمله درختان میوه هسته‌دار، در بین هفت کشور نخست قرار دارد (فائو 2010). استان‌های آذربایجان شرقی و غربی از قطب‌های مهم تولید محصول‌های باغی ایران به‌شمار می‌روند.

بیماری‌های تنه به‌عنوان یک تهدید بالقوه در تولید محصول‌های باغی مناطق کشت‌وپرورش درختان میوه هسته‌دار در دنیا مطرح می‌باشند. عوامل مختلفی در ایجاد این بیماری‌ها دخالت دارند که در بین آن‌ها عوامل قارچی، سهم قابل توجهی را به خود اختصاص می‌دهند. بیماری‌های تنه، درختان میوه هسته‌دار را در تمامی مراحل رشد تحت تاثیر قرار می‌دهد (اسلیپر و همکاران 2007، دام و همکاران 2008، گراماخه و همکاران 2012). علائم بیماری بیشتر به‌صورت کاهش رشد و باروری، شانکر شاخه و تنه، سرخشکیدگی، درجات مختلفی از گرفتگی‌های آوندی و تغییر رنگ چوب محل آوندها، ضعف عمومی، ریزش برگ و پوسیدگی میوه ظاهر می‌شود که در نهایت منجر به مرگ تدریجی درخت یا زوال در طول سال‌های متمادی می‌شود (اسلیپر و همکاران 2007، گراماخه و همکاران، 2012، ترویلاس و همکاران 2012). عامل بیماری ممکن است منجر به مرگ سریع میزبان نیز شود که بیشتر در درختان جوان مشاهده می‌شود. گونه‌های متعددی از قارچ‌های جنس *Botryosphaeria* و آنامورف‌های مربوطه، *Phomopsis*، *Phaeoacremonium*، *Verticillium*، *Cytospora*، *Necteria* (برایتون و هندریکس 1986، آداسکاوچ و همکاران 1993، اسلیپر و همکاران 2007، دام و همکاران 2008، دیاگو و

بندی) مورد بررسی قرار گرفت. به منظور مطالعه ویژگی‌های میکروسکوپی جدایه‌ها شامل رنگ و قطر ریشه، ساختارهای اسپورزایی قارچ (کنیدیوفور و کنیدیوم) و خصوصیات میکروسکوپی دیگر از روش کشت لام استفاده گردید (موسترت و همکاران، 2006).

شناسایی مولکولی جدایه‌ها استخراج DNA ژنومی

جدایه‌های قارچی در تشتک‌های حاوی محیط کشت MEA دو درصد کشت شده و در تاریکی در دمای 25 درجه سانتی‌گراد به مدت هفت روز نگهداری گردیدند و پس از رشد کافی جهت استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفتند. استخراج DNA مطابق روش مولر و همکاران (1992) انجام شد. کمیت و کیفیت DNA به دست آمده به روش اسپکتروفتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت.

تکثیر نواحی ژنومی

دو ناحیه ژنومی شامل ناحیه فاصله‌انداز داخلی DNA ریپوزومی (ITS-rDNA) و زیر واحد بتا RNA پلی‌مراز II (*rpb2*) در تعدادی از جدایه‌ها تکثیر شد. توالی آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق در جدول شماره 1 آورده شده است.

جدول 1- لیست آغازگرهای مورد استفاده جهت شناسایی مولکولی جدایه‌های قارچی همراه با بیماری‌های تنه درختان میوه هسته‌دار در استان‌های آذربایجان شرقی و غربی

آغازگر	توالی	هدف
ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	تکثیر ناحیه ITS-rDNA
ITS4	5'TCCTCCGCTTATGATATGC-3'	تکثیر ناحیه ITS-rDNA
5F2	5'-GGGGWGAYCAGAAGAAGGC-3'	تکثیر ژن <i>rpb2</i>
7cR	5'-CCCATRGGCTTYTTRCCCAT-3'	تکثیر ژن <i>rpb2</i>

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز جهت تکثیر ناحیه ITS-rDNA در حجم نهایی 12/5 میکرولیتر انجام شد. مخلوط-

جغرافیایی و اطلاعات باغ مورد نمونه‌برداری و گرفتن عکس از درختان آلوده جمع‌آوری و در داخل پاکت‌های کاغذی جداگانه به آزمایشگاه منتقل شدند. برای آماده‌سازی نمونه جهت کشت، قطعه‌هایی به طول حدود سه تا چهار سانتی‌متر از بخش‌های آلوده بریده شده و در محلول هیپوکلریت سدیم نیم الی یک درصد به مدت سه دقیقه غوطه‌ور شدند و سپس با آب مقطر سترون شسته شده و با کاغذهای صافی استریل خشک شدند. سپس قطعه‌هایی کوچکی به ابعاد تقریبی 0/5×0/5×0/5 سانتی‌متر از بخش‌های میانی نواحی تغییر رنگ‌یافته و سالم بافت، برش داده شدند. قطعه‌ها زیر هود میکروبیولوژیکی به مدت 30 ثانیه در محلول هیپوکلریت-سدیم (نیم‌درصد) و یا اتانول 70 درصد، ضدعفونی گردیدند و پس از سه بار شست‌وشو در آب مقطر استریل با کاغذ صافی استریل خشک شدند (ترویلاس و گوبلر، 2010) و روی محیط کشت عصاره مالت آگار دو درصد اسیدی شده (دو میلی‌لیتر اسید لاکتیک 20 درصد در یک لیتر محیط کشت) کشت شدند. تشتک‌های پتری در تاریکی و در دمای 25 درجه سانتی‌گراد نگهداری و روزانه مورد بررسی قرار گرفتند (موسترت و همکاران، 2006). پرگنه‌های قارچی رشد کرده در آن‌ها به روش ترقیق سوسپانسیون اسپور و یا نوک ریشه خالص سازی گردیدند. کشت‌های خالص در کلکسیون کشت‌های زنده دانشگاه تبریز واقع در گروه گیاه‌پزشکی (CCTU) نگهداری گردید.

شناسایی جدایه‌ها بر اساس صفات ریخت‌شناسی

شناسایی جدایه‌های مورد نظر با استفاده از منابع و کلیدهای استاندارد قارچ‌شناسی و توصیف‌های موجود در منابع، انجام گرفت. ویژگی‌های ماکروسکوپی جدایه‌ها شامل رنگ و نرخ رشد پرگنه، شکل پرگنه و تولید یا عدم تولید رنگ‌دانه یادداشت شد. ویژگی‌های ریخت‌شناسی میکروسکوپی، شامل تشکیل و یا عدم تشکیل کنیدیوم، مکانیسم کنیدیوم‌زایی و کنیدیوم (رنگ، شکل، دیواره-

فرآورده‌های واکنش روی ژل آگارز یک درصد حاوی 0/1 میکروگرم بر میلی‌گرم اتیدیوم بروماید در بافر 1X TAE توسط دستگاه عکس‌برداری از ژل تحت نور ماوراءبنفش (طول موج 312 نانومتر) مشاهده و بررسی شدند.

توالی‌یابی و تبارزایی

واکنش ترادف‌یابی نوکلئوتیدی بوسیله کیت تجارتي بیگ‌دای BigDye® Terminator V301 Cycle Sequencing kit ساخت کارخانه Applied Biosystems کالیفرنیا ایالت متحده آمریکا و مطابق دستورالعمل کارخانه صورت‌گرفت. تجزیه‌تحلیل نتایج با استفاده از دستگاه ABI persim.® 3700 انجام شد. توالی‌های نوکلئوتیدی با استفاده از نرم‌افزار SeqMan (Lasergene package, DNASTAR, Madison, USA) بررسی و ویرایش شدند و سپس با توالی‌های موجود در بانک ژن مقایسه شدند (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). زیر هم‌چینی جدایه‌ها با استفاده از نرم‌افزار Mega5 انجام شد (تامورا و همکاران، 2011). درخت فیلوژنتیک نیز با نرم‌افزار Mega5 و به روش پیوست‌همسایه² ترسیم و روابط خویشاوندی جدایه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. جهت حصول اطمینان از گروه‌بندی ایجادشده، شاخص بوت‌استرپ³ با 1000 تکرار اعمال و ارزش عددی آن به صورت درصد در بالای گروه‌ها ذکر گردید.

نتایج

طی بازدید از باغ‌های میوه استان‌های آذربایجان-شرقی و غربی، مشخص‌گردید که علائم بیماری‌های تنه، در بیشتر باغ‌های این دو استان شیوع دارند. شیوع این بیماری‌ها در باغ‌های مسن و فاقد مراقبت به مراتب نسبت به باغ‌های مسن تحت‌مراقبت و باغ‌های جوان بیشتر بود. علائم بیماری بیشتر به صورت کاهش رشد و باروری، شانکر شاخه و تنه، سرخشکیگی، ضعف

واکنش حاوی 10-15 نانوگرم DNA ژنومی الگو، 1/25 میکرولیتر بافر واکنش 10X، 1/5 میلی‌مول کلریدمنیزیم، 0/2 میلی‌مول از هر یک از dNTPها، پنج پیکومول از هر یک از آغازگرها، 0/5 واحد آنزیم DNA پلی‌مراز¹ و آب دوبار تقطیر استریل بود. تکثیر ناحیه ITS- rDNA با اعمال چرخه‌های حرارتی به قرار زیر انجام شد: یک چرخه دمایی 95 درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه جهت واسرشت‌سازی اولیه، 36 چرخه تکثیر، شامل واسرشت‌سازی در دمای 94 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای 52 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 ثانیه و بسط در 72 درجه سانتی‌گراد به مدت 60 ثانیه؛ و در نهایت یک چرخه بسط نهایی به مدت هفت دقیقه در دمای 72 درجه سانتی‌گراد.

مخلوط واکنش تکثیر ژن *rpb2* حاوی 10-15 نانوگرم DNA ژنومی الگو، 5/1 میلی‌مول کلریدمنیزیم، 0/5 میکرولیتر دی‌متیل‌سولفوکسید 0/63 درصد، 1/25 میکرولیتر بافر واکنش 10X، 60 میکرومول dNTP یک میلی‌مولار، 0/2 پیکومول از هر آغازگر و 0/5 واحد DNA پلی‌مراز بود و حجم نهایی واکنش با آب دوبار تقطیر استریل به 12/5 میکرولیتر تنظیم شد. چرخه‌های حرارتی اعمال‌شده برای تکثیر ژن *rpb2* به قرار زیر انجام شد: یک چرخه دمایی 95 درجه سانتی‌گراد به مدت سه دقیقه؛ پنج چرخه دمایی 95 درجه سانتی‌گراد به مدت 45 دقیقه، دمای 58 درجه سانتی‌گراد به مدت 45 ثانیه و دمای 72 درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه؛ پنج چرخه دمایی 95 درجه سانتی‌گراد به مدت 45 ثانیه، دمای 56 درجه سانتی‌گراد به مدت 45 ثانیه و دمای 72 درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه؛ 30 چرخه دمایی 95 درجه سانتی‌گراد به مدت 45 ثانیه، دمای 52 درجه سانتی‌گراد به مدت 45 ثانیه و دمای 72 درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه و یک چرخه دمایی 72 درجه سانتی‌گراد به مدت هشت دقیقه.

¹Neighbor Joining

²Boot Strap

³Bio Taq DNA Polymerase

از هفت روز به 31 میلی‌متر و بعد از 14 روز به 35 میلی‌متر می‌رسید، رنگ پرگنه روی این محیط کشت سیاه مایل به خاکستری بود. تشکیل پیکنیدیوم در هیچ-یک از محیط کشت‌های مورد بررسی و حتی در روی محیط کشت PNA و مایه‌زنی روی میزبان جداسازی‌شده مشاهده‌نشد. شناسایی این گونه بر اساس داده‌های مولکولی میسرشد. توالی نوکلئوتیدی ناحیه ITS جدایه‌های این گونه با توالی‌های موجود برای *Botryosphaeria sarmentorum* در بانک ژن 100 درصد مشابهت نشان داد.

2- *Cytospora chrysosperma* (Pers.) Fr. (fide Donk 1964)

مشخصات کشت: سطح پرگنه روی محیط کشت PDA سفید مایل به زرد، خاکستری مایل به زرد تا خاکستری کم‌رنگ مایل به قهوه‌ای زرد، رنگ پرگنه از پشت پتری معمولاً مشابه رنگ سطح بود اما گاهی زرد-تیره با شعاع‌هایی به رنگ قهوه‌ای مایل به زردتیره مشاهده گردید. رشد قطری پرگنه بعد از هفت روز، 36 میلی‌متر بود. پیکنیدیوم‌ها روی محیط کشت PNA بعد از 14 روز تشکیل شدند که همراه با ترشح فتیله‌های زرد تا نارنجی بودند.

عمومی، قهوه‌ای شدن آوندها و ناحیه چوب در برش عرضی از محل آوندها، لکه برگی، ریزش برگ و پوسیدگی میوه مشاهده گردید.

در این تحقیق، 101 جدایه قارچی از 128 نمونه بیمار (شاخه‌های چندساله، یک‌ساله و تنه) جداسازی گردید. با بررسی ویژگی‌های پرگنه بر حسب گروه قارچی روی محیط‌های کشت از قبیل ⁴MEA، ⁵PDA، ⁶SNA، ⁷PNA و ⁸OA و نیز مقایسه‌ی ویژگی‌های ریخت‌شناسی آن‌ها با کلیدها و منابع معتبر و در مورد برخی جدایه‌ها با استفاده از اطلاعات مولکولی، جدایه‌های قارچی در سطح گونه مورد شناسایی قرار گرفتند. در بین قارچ‌های جداسازی شده گونه‌های جنس *Cytospora* با فراوانی 28/71 درصد، گونه‌های جنس *Fusarium* با فراوانی 13/86 درصد، *Alternaria alternata* با فراوانی 13/86 درصد و *Paecilomyces variotii* با 13/81 درصد فراوانی‌نسبی بیشتری نسبت به سایر گروه‌ها داشتند (شکل 1). دیگر گروه‌های قارچی که با فراوانی کمتری جداسازی شدند در شکل 1 نشان داده شده است.

توصیف گونه‌های شناسایی‌شده به ترتیب حروف الفبا به قرار زیر می‌باشد:

1- *Botryosphaeria sarmentorum* (Fr.) A.J.L. Phillips, Alves & Luque

مشخصات کشت: قطر پرگنه روی محیط کشت PDA بعد از هفت روز به 26 میلی‌متر و بعد از 14 روز به 30 میلی‌متر می‌رسید، رنگ پرگنه در این محیط سبززیتونی با حالت سفیدپشمنی بود. رشد پرگنه روی محیط کشت MEA بعد از هفت روز به 32 میلی‌متر و بعد از 14 روز به 36 میلی‌متر می‌رسید، رنگ پرگنه در این محیط سبز مایل به سیاه بود. رشد پرگنه روی محیط کشت OA بعد

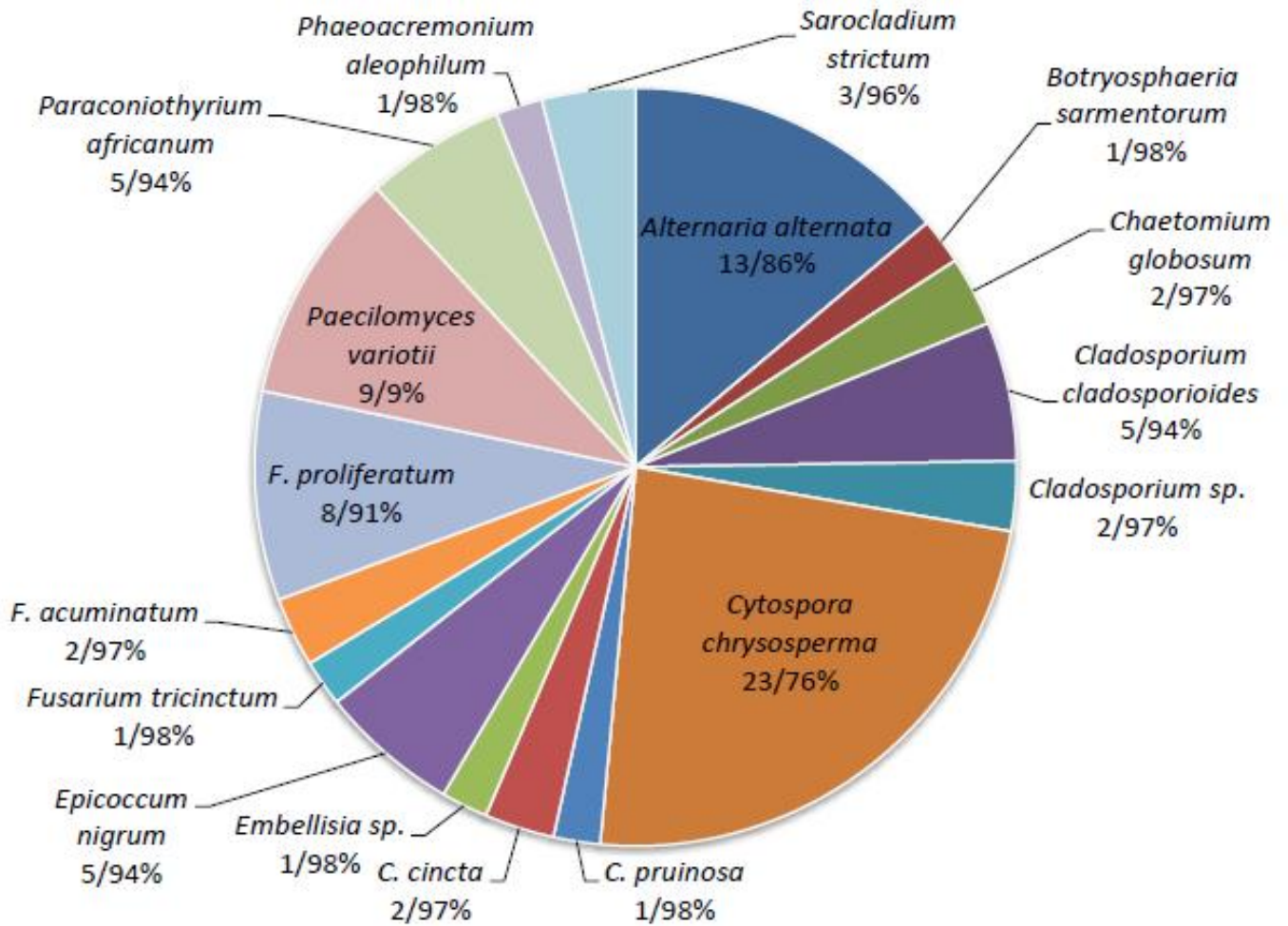
⁴ Malt extract agar

⁵ Potato dextrose agar

⁶ Synthetic nutrient agar

⁷ Pine needle agar

⁸ Oatmeal agar



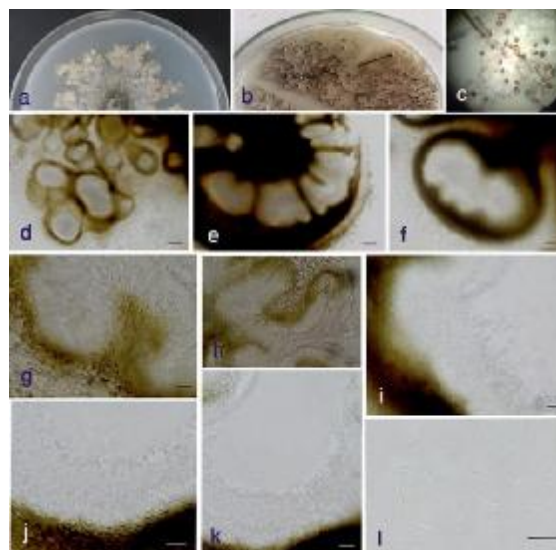
شکل 1- درصد فراوانی گروه‌های قارچی همراه با بیماری‌های تنه درختان میوه هسته‌دار در استان‌های آذربایجان شرقی و غربی.

3- *Cytospora pruinosa* (Fr.) Sacc.

مشخصات کشت: پرگنه روی PDA سفید مایل به کرمی، رنگ پرگنه از پشت صورتی-کمرنگ بود. حاشیه پرگنه نامنظم بود که در نزدیکی مرکز پرگنه بعد از 14 روز پیکنیدیوم‌هایی درشت همراه با تراوه‌های زردرنگ مایل به نارنجی در دهانه قابل مشاهده بودند. قطر پرگنه بعد از هفت روز 25 میلی‌متر بود. پیکنیدیوم‌ها روی محیط PNA نیز بعد از 14 روز تشکیل شدند که همراه با تراوه‌هایی در دهانه پیکنیدیوم قابل‌رویت بود.

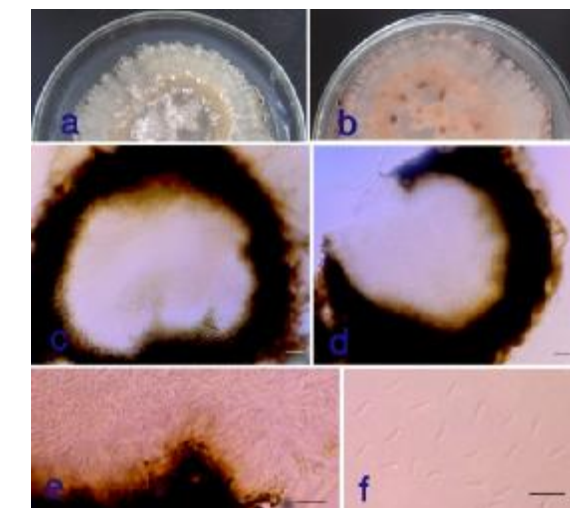
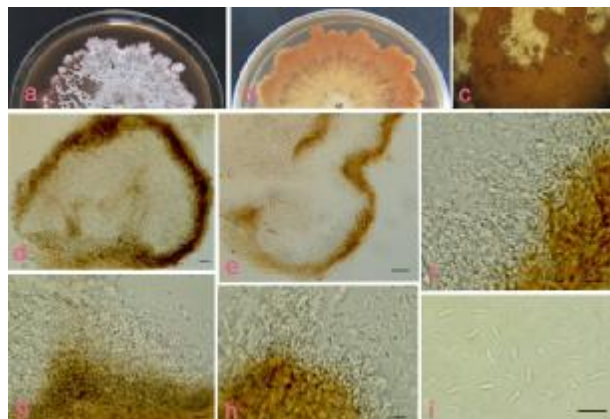
مشخصات ساختارهای هوایی: پیکنیدیوم‌ها دسته‌ای، سیتوفوموئید (مشابه *Cytophoma*)، سیاه، تک‌حفره‌ای، با دیواره ضخیم با چندین لایه، قهوه‌ای‌تیره بودند. دیسک‌ها خاکستری‌تیره، تخت، گرد و دارای قطر 100-150 میکرومتر بود. دارای استیول متمایز و واضح، به رنگ خاکستری‌تیره و در نهایت خاکستری‌روشن بودند. حفره‌ها ساده و تک‌خانه‌ای بودند. کنیدیوفورها شفاف، منشعب در پایه یا کمی بالاتر از پایه، $1/5 \times 20-25$ میکرومتر، در یک توده ممتد ژلاتینی جا گرفته بودند. سلول‌های کنیدیوم‌زا انتروبلاستیک، فیالییدی، نیمه-استوانه‌ای با گردن کوتاه که به یک نوک باریک منتهی می‌شدند. کنیدیوم‌ها سوسیسی شکل (آلانتوئید)، شفاف، تک سلولی $1 \times 5-7$ میکرومتر بودند (شکل 3). هویت جدایه‌های این گونه با استفاده از داده‌های توالی ناحیه ITS تایید گردید.

مشخصات ساختارهای هوایی: پیکنیدیوم‌ها (استروماها) به صورت پراکنده در محیط کشت تشکیل شدند، در برش عرضی قاعده استروما، حجره‌ها در تعداد و اشکال متغیر و به صورت پیچ در پیچ و با آرایش شعاعی نامنظم قابل مشاهده بودند، حجره‌ها دارای دیواره کاذب مشترک بودند. کنیدیوفورها بی‌رنگ، واجد و یا فاقد دیواره عرضی، کنیدیوفورهای دارای دیواره عرضی منشعب و کنیدیوفورهای بدون دیواره عرضی غیر منشعب، ارتفاع کنیدیوفورها 70-13 میکرومتر بود. سلول‌های کنیدیوم‌زا انتروبلاستیک، فیالییدی با گردن کوتاه که به یک نوک باریک منتهی می‌شدند و $(-1/5)$ 1 (-9) $(-7/5)$ میکرومتر بودند. کنیدیوم‌ها شفاف، تک‌سلولی، سوسیسی شکل (آلانتوئید)، بدون قطرات چربی و $1 \times (-4/5)$ 4 $(-3/5)$ میکرومتر بودند (شکل 2). هویت جدایه‌های این گونه با استفاده از داده‌های توالی ناحیه ITS تایید گردید.



شکل 2- *Cytospora chrysosperma*: a: پرگنه هفت روزه در محیط کشت PDA. b-c: پرگنه 14 روزه در محیط کشت PNA. d-f: پیکنیدیوم. مقیاس = 100 میکرومتر. g-k: سلول کنیدیوم‌زا. i: کنیدیوم‌ها. مقیاس = 10 میکرومتر.

در قسمت نوک باریک و فیالییدی بودند. کنیدیوم‌ها $(-1/75) \times (1-1/32-1/4) \times (-7) \times (5/5-6)$ میکرومتر، دوکی تا بیضوی خمیده در توده‌های زرد یا سبز کم‌رنگ، تکی و شفاف بودند (شکل 4). هویت جدایه‌های این گونه با استفاده از داده‌های توالی ناحیه ITS تایید گردید.



شکل 3- *Cytospora pruinosa*: a-b: پرگنه 14 روزه در محیط کشت PDA. c-d: پیکنیدیوم. مقیاس = 20 میکرومتر. e: سلول کنیدی‌زا. f: کنیدیوم. مقیاس = 10 میکرومتر.

شکل 4- *Cytospora cincta*: a-b: پرگنه 14 روزه در محیط کشت PDA. c: تشکیل پیکنیدیوم روی محیط کشت PNA. d: پیکنیدیوم. مقیاس = 20 میکرومتر. e: پیکنیدیوم. مقیاس = 50 میکرومتر. f-h: سلول کنیدیوم‌زا. i: کنیدیوم. مقیاس = 10 میکرومتر.

Cytospora cincta Sacc. -4

مشخصات کشت: سطح پرگنه روی محیط کشت PDA سفید مایل به زرد تا زرد کم‌رنگ مایل به قهوه‌ای-زرد، رنگ پرگنه از پشت زرد مایل به نارنجی بود. حاشیه‌ی پرگنه نامنظم بوده که در سطح پرگنه بعد از 14 روز پیکنیدیوم‌های ریز همراه با تراوه‌های زرد مایل به نارنجی در دهانه قابل مشاهده بودند. قطر پرگنه بعد از هفت روز به 28 میلی‌متر رسید. پیکنیدیوم‌ها روی محیط PNA نیز بعد از 14 روز تشکیل می‌شدند که همراه با تراوه‌های نارنجی‌رنگ بود.

مشخصات ساختارهای هوایی: پیکنیدیوم‌ها 450-250 \times 330-630 میکرومتر، منفرد، قهوه‌ای مایل به طلایی، با دیواره ضخیم با چندین لایه و به رنگ قهوه‌ای-تیره بودند. دیسک‌ها قهوه‌ای‌روشن، تخت و گرد بودند. دارای استیول متمایز و واضح، دیواره خارجی به رنگ قهوه‌ای‌روشن و در نهایت قهوه‌ای‌تیره بودند. حجره‌ها بزرگ، به تعداد اندک، با آرایش شعاعی منظم و دارای دیواره کاذب مشترک بودند. دیواره پیکنیدیوم 43(-60)-35 (22/5-) میکرومتر بود. کنیدیوفورها شفاف بودند. سلول‌های کنیدیوم‌زا 70-35 میکرومتر نیمه‌استوانه‌ای که

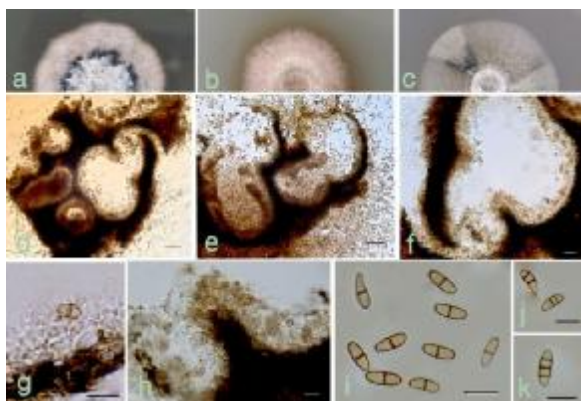
Embellisia sp.-5

مشخصات کشت: پرگنه در محیط کشت MEA به رنگ خاکستری مایل به قهوه‌ای یا خاکستری مایل به سبز زیتونی با هاله‌ی صورتی بود. قطر پرگنه در این محیط بعد از هفت روز به 15 میلی‌متر و بعد از 14 روز 25 میلی‌متر می‌رسید. پرگنه در محیط کشت PDA به رنگ سبز مایل به خاکستری یا سبز زیتونی بود. رشد قطر پرگنه در روی این محیط بعد از هفت روز 10 میلی‌متر و بعد از 14 روز 17 میلی‌متر بود.

مشخصات ساختارهای هوایی: ریشه‌ها منشعب، نیمه شفاف، واجد دیواره عرضی، دارای سطح صاف تا زگیل‌دار بودند. قطر هیف $(-7) \times (3-5)$ میکرومتر بود. کنیدیوفورها $(-8) \times (4-4/9-5/8) \times (-17) \times (10/5-13)$ (-6-) میکرومتر، ساده یا منشعب، دارای سطح صاف بودند.

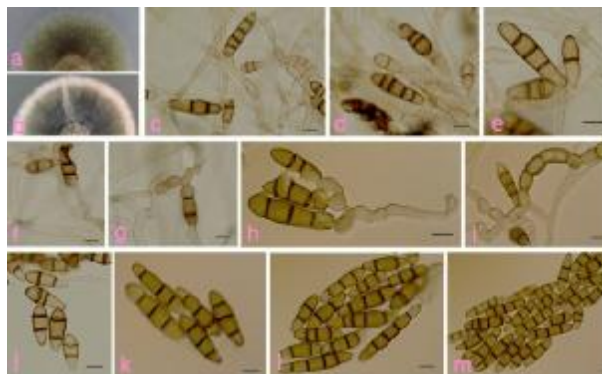
هاله نارنجی مایل به قهوه‌ای بود که پیکنیدیوم در این محیط تشکیل نمی‌شدند. تشکیل پیکنیدیوم در روی محیط PNA بعد از دو هفته مورد بررسی قرار گرفت.

مشخصات ساختارهای هوایی: پیکنیدیوم‌ها آمپولی-شکل یا تخت، منفرد، قهوه‌ای، به قطر 140-312 میکرومتر، نیمه‌فرورفته، فرورفته تا سطحی، یک تا دو حفره‌ای، با استیول مرکزی که حاوی چهار تا ده‌لایه به رنگ قهوه‌ای تیره بود که به طرف بیرون پیکنیدیوم به رنگ قهوه‌ای کم‌رنگ تا شفاف بود. طول دیواره پیکنیدیوم 15-30 میکرومتر بود. سلول‌کنیدیوم‌ها شفاف تا قهوه‌ای-کم‌رنگ، آمپولی‌شکل یا استوانه‌ای، فیالییدی با رشد-پرکارنت، $2-6 \times 3-8$ میکرومتر بود. کنیدیوم‌ها در ابتدا دوسلولی و به رنگ قهوه‌ای روشن، کنیدیوم‌های بالغ به رنگ قهوه‌ای متوسط، سیلندری تا دوکی‌شکل، معمولاً در دو انتهای گرد و گاهی یکی از دو انتهای تخت بود. کنیدیوم‌ها $(-5) 3/5-4$ $(-3) \times (-12) 7/3-9/5$ (-4) معمولاً یک تا دوسلولی و به‌ندرت سه تا چهارسلولی با دیواره تیره و ضخیم بودند (شکل 6). هویت جدایه‌های این گونه با استفاده از داده‌های توالی ناحیه ITS تایید گردید.



شکل 6- *Paraconiothyrium africanum*: a: پرگنه 16 روزه در محیط کشت PDA. b: پرگنه 16 روزه در محیط کشت MEA. c: پرگنه 16 روزه در محیط کشت OA. d-e: پیکنیدیوم. مقیاس = 50 میکرومتر. f: پیکنیدیوم. مقیاس = 20 میکرومتر. g-h: سلول کنیدیوم‌ها. i-k: کنیدیوم. مقیاس = 10 میکرومتر.

کنیدی‌ها بیضوی تا استوانه‌ای کشیده، به رنگ قهوه‌ای روشن، دارای سطح صاف و 5-1 دیواره عرضی، فاقد دیواره طولی یا دارای یک دیواره طولی بودند. کنیدی‌ها (55-) 31-38 (-20) میکرومتر بودند (شکل 5). ویژگی‌های ریخت‌شناختی این گونه با خصوصیات ریخت‌شناختی گونه‌های توصیف شده از این جنس مطابقت نداشت، لذا شناسایی جدایه‌های این گونه در سطح گونه امکان پذیر نشد.

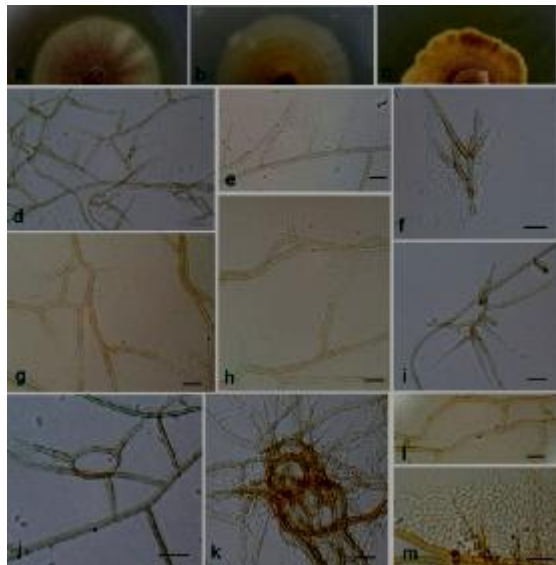


شکل 5- *Embellisia* sp.: a: پرگنه هفت روزه در روی محیط PDA. b: پرگنه هفت روزه در محیط کشت MEA. c-m: کنیدیوفور و کنیدی‌ها. مقیاس = 10 میکرومتر.

6- *Paraconiothyrium africanum* Damm, Verkly & Crous

مشخصات کشت: رشد قطری پرگنه روی محیط کشت OA بعد از هفت روز شش میلی‌متر و بعد از 14 روز به 15 میلی‌متر رسید. پرگنه تخت، با حاشیه کم‌رنگ، به رنگ سفید با رگه‌هایی به رنگ سبزی‌تونی، دارای میسلیم‌هوایی بود. قطر پرگنه در روی محیط کشت MEA بعد از هفت روز، سه تا چهار میلی‌متر و بعد از 14 روز هشت تا نه میلی‌متر بود. پرگنه در این محیط تخت با حاشیه منظم، دارای کرک‌های پشمی در نزدیکی مرکز، میسلیم‌های هوایی سفید و پیکنیدیوم‌های سیاه در نزدیکی مرکز پرگنه قابل مشاهده بودند. رشد پرگنه در روی محیط کشت PDA بعد از هفت روز سه میلی‌متر و بعد از 14 روز به پنج تا شش میلی‌متر می‌رسید. پرگنه در این محیط تخت و به رنگ صورتی مایل به نارنجی با

زگیل‌دار بودند. کنیدیوم‌ها اغلب بیضوی تا استوانه‌ای تا تخم‌مرغی وارونه، زرد تا شفاف و به اندازه $(-2) 1-1/5$ × $2/15-3$ (2-) میکرومتر بودند (شکل 7).



شکل 7- *Phaeoacremonium aleophilum*: a: پرگنه 16 روزه در محیط کشت OA. b: پرگنه 16 روزه در محیط کشت PDA. c: پرگنه 16 روزه در محیط کشت MEA. d-h: فیالید. i-k: پیچ میسلیمی. l: آناستوموز. m: کنیدیوم. مقیاس = 10 میکرومتر.

8- *Fusarium tricinctum* (Corda) Sacc. 1886

مشخصات ساختارهای هوایی: اسپورودوکئیوم‌های مایل به صورتی روی کاغذ استریل قرار گرفته در سطح محیط کشت SNA تشکیل شدند. ماکروکنیدی‌ها کوتاه تا متوسط و سه تا پنج بندی، خمیده تا هلالی یا داسی‌شکل، باریک با سلول انتهایی خمیده و سلول پایه پاشنه‌ای شکل بود. برخی ماکروکنیدی‌ها در دو انتها نوک‌تیز بودند. میکروکنیدی‌های فراوان یک یا دو سلولی، (4-) $(1/5-2/1-2/6) \times (1/5-3/3-4/4(-7/5))$ میکرومتر، به شکل‌های مختلف تخم‌مرغی، شلجمی، گلابی و لیمویی تولید شدند. میکروکنیدی‌ها معمولاً در سرهای مرطوب⁹ شبیه خوشه انگور روی منوفیالیدها تشکیل شدند.

7- *Phaeoacremonium aleophilum* W. Gams, Crous, M.J. Wingf. & Mugnai

مشخصات کشت: قطر پرگنه روی محیط کشت PDA بعد از هشت روز به شش میلی‌متر و بعد از 16 روز به 14 میلی‌متر می‌رسید. پرگنه گرد، صاف، دارای بافت-نمدی، به رنگ کرمی مایل به قهوه‌ای یا نارنجی‌خاکستری و در حاشیه کم‌رنگ و روشن‌تر بود. رنگ پرگنه از پشت زردکم‌رنگ تا سبزجانی بود. روی محیط کشت OA قطر پرگنه بعد از هشت روز به شش میلی‌متر و بعد از 16 روز به نه میلی‌متر می‌رسید. پرگنه به رنگ قهوه‌ای-کم‌رنگ بود و هاله زرد در حاشیه پرگنه روی محیط کشت تشکیل شد. قطر پرگنه روی محیط کشت MEA بعد از هشت روز پنج میلی‌متر و بعد از 16 روز هشت میلی‌متر بود. پرگنه به رنگ کرمی مایل به قهوه‌ای و با رنگ‌دانه زرد و رنگ پرگنه از پشت به رنگ سبززیتونی تا خاکستری بود.

مشخصات ساختارهای هوایی: میسلیم منشعب و دیواره‌دار، اغلب منفرد و یا در دسته‌های چندتایی (تا 15 تایی)، دارای بافت صاف، به رنگ قهوه‌ای روشن بود. کنیدیوفورها به اندازه $(-2/5) 2 \times (-9) 5/4-7$ (3-) میکرومتر، اغلب کوتاه و منشعب به‌ندرت بلند و غیر-منشعب، اغلب به شکل راست و در قاعده باریک‌شده، به رنگ قهوه‌ای روشن تا زرد و در انتها شفاف بودند. فیالیدها جانبی یا انتهایی، اغلب مونوفیالیدیک، صاف و به رنگ قهوه‌ای کم‌رنگ تا شفاف بودند. فیالید نوع II و III غالب، فیالید نوع I به اندازه‌ی $(-2/5) 1/5-1/70 \times (-12)$ 8-10 (4-) میکرومتر، استوانه‌ای شکل و گاهی در پایه عریض‌تر بود. فیالید نوع II به اندازه‌ی $2 (-1/5) \times (-18)$ 12/5-14/5 (7-) میکرومتر، آمپولی شکل طویل تا استوانه‌ای که در قاعده منقبض و حالت شعله در برخی فیالیدها دیده می‌شدند. فیالید نوع III به اندازه‌ی (3-) $2-2/3 (-1/5) \times (-30) 19/5-23$ (15-) میکرومتر، آمپولی طویل تا نوک‌تیز که در قاعده مقداری باریک می‌شدند، دارای گردن، به رنگ قهوه‌ای کم‌رنگ تا شفاف و

⁹Slimy heads

مشخصات ساختارهای هوایی: ماکروکنیدی در اسپورودوکیوم‌های نارنجی‌کم‌رنگ تشکیل شدند. ماکروکنیدی‌ها باریک، خمیده تا راست، سه تا پنج‌بندی و با سلول پایه کمتر توسعه‌یافته و سلول انتهایی خمیده بود. میکروکنیدی‌ها چماقی شکل با پایه تخت یا گلابی-شکل بود که به‌صورت زنجیری و در سرهای کاذب روی منوفیالیدها و پلی‌فیالیدها تشکیل شدند. پلی‌فیالیدها منشعب بودند. این گونه فاقد کلامیدوسپور بود.

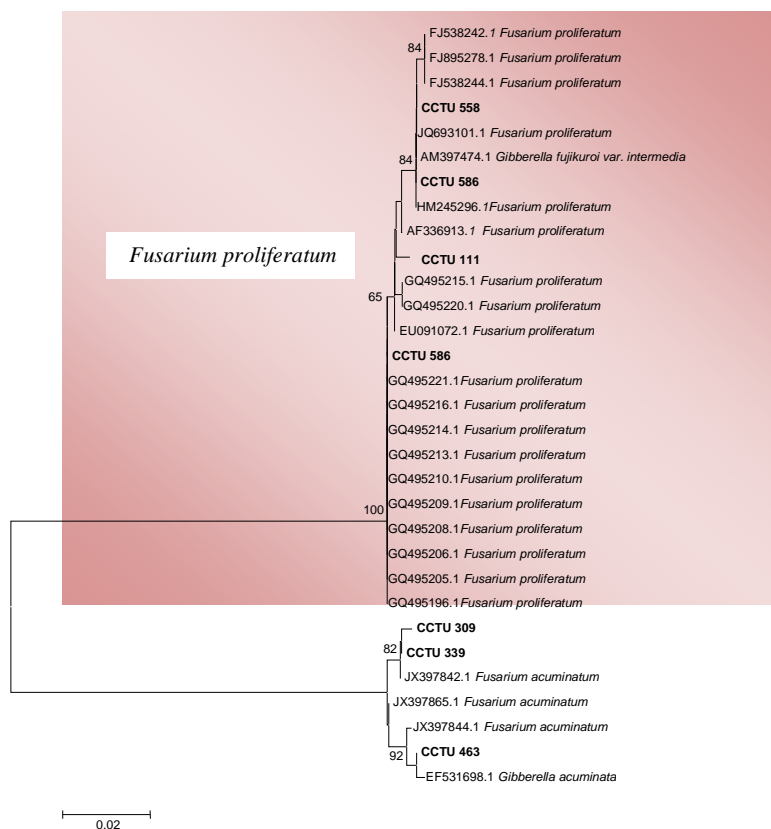
نتایج حاصل از ترسیم درخت تبارزایی براساس توالی‌های نوکلئوتیدی ناحیه ITS، جدایه‌های بدست‌آمده در این بررسی را با توالی‌های ناحیه ITS جدایه‌های گونه *F. proliferatum* موجود در بانک ژن، در یک خوشه گروه‌بندی کرد (شکل 8).

کلامیدوسپوره‌های انفرادی یا زنجیری روی میسلیم‌ها به‌ندرت تشکیل شدند.

***Fusarium acuminatum* Ellis & Everh. 1895 -9**

مشخصات ساختارهای هوایی: اسپورودوکیوم در مرکز پرگنه در یک توده اسپور مرکزی کوچک، نارنجی-کم‌رنگ تا قهوه‌ای‌تیره تشکیل شدند. رنگ‌دانه‌های قرمز تا قهوه‌ای در داخل آگار تولید شدند. ماکروکنیدی‌ها پنج-بندی و گاهی سه تا چهاربندی دارای انحنا ملایم و یکنواخت و با دیواره ضخیم بودند و سلول پایه پاشنه‌ای شکل و سلول انتهایی باریک و کشیده بودند. هویت جدایه‌های این گونه با استفاده از داده‌های توالی ناحیه ITS نیز تایید گردید (شکل 8)

***Fusarium proliferatum* (Matsush.) Nirenberg -10**



شکل 8- درخت فیلوژنتیک ترسیم‌شده بر اساس توالی‌های نوکلئوتیدی ناحیه ITS جدایه‌ها به‌روش پیوست‌همسایه.

بحث

23/76 درصد، *C. cincta* با تعداد سه جدایه و فراوانی 2/97 درصد و *C. pruinosa* با تعداد دو جدایه و فراوانی 1/98 درصد از درختان میوه هسته‌دار با علائم شانکر و زوال جداسازی گردیدند. با توجه به این‌که بیشترین فراوانی در این بررسی مربوط به این جنس می‌باشد می‌توان گفت که گونه‌های این جنس در مناطق مورد مطالعه شیوع بیشتری دارند و مطالعات تکمیلی جهت بررسی بیماری‌زایی این جدایه‌ها روی درختان میوه هسته دار ضروری می‌باشد.

گونه *Cytospora chrysosperma* از روی درختان اکالیپتوس با علائم شانکر، به‌همراه گونه *Botryosphaeria dothidea* گزارش شده‌است (آدامز و همکاران، 2005). در تحقیقی که برای تعیین گونه‌های اندوفیت کولتیوارهای مختلف مو انجام گرفته‌است این گونه به‌عنوان یک اندوفیت در روی مو گزارش شده‌است (گونزالز و تلو، 2011). این گونه در ایران از روی میزبان‌های متنوعی از قبیل آلو، هلو، گردو، سپیدار، شالک، توت، انجیر و سیب گزارش شده‌است (ارشاد، 1388، فتوحی‌فر و همکاران 2010). در این تحقیق گونه *Cytospora chrysosperma* از نمونه‌های با علائم شانکر از باغ‌های زردآلو (منطقه خوی)، بادام (منطقه شبستر)، هلو (مرد، مراغه و روستای آفیل از توابع شهرستان اهر)، آلبالو (مرد و تسوج)، گیلاس (منطقه بناب) شناسایی شدند. گزارش این گونه از روی آلبالو، بادام و گیلاس برای ایران جدید می‌باشد. با توجه به تشابه و همپوشانی ویژگی‌های ریخت-شناسی جدایه‌های این گونه با دیگر گونه‌های این جنس، هویت این گونه با استفاده از داده‌های توالی ناحیه ITS مورد تایید قرار گرفت.

گونه *Cytospora cincta* از پاتوژن‌های مهم و عامل زوال درختان گیلاس و هلو در بسیاری از نقاط دنیا می‌باشد (برکت و جانسون، 1997). مرحله تلمومورف این گونه *L. cinctum* می‌باشد. فتوحی‌فر و همکاران (2010) این گونه را از روی آلو، گیلاس، زردآلو، بادام و دیگر میزبان‌های چوبی گزارش کرده‌اند. در تحقیق حاضر، سه

در این بررسی بر اساس داده‌های ریخت‌شناختی و مولکولی، گروه‌های قارچی متعددی از درختان میوه هسته‌دار با علائم بیماری زوال و سرخشکیدگی جداسازی گردیدند. شناسایی جدایه‌های قارچی در سطح گونه، با استفاده از مشخصات ریخت‌شناسی جدایه‌ها صورت‌گرفت. ولی به‌علت همپوشانی خصوصیات ریخت‌شناسی در بین گونه‌های برخی از جنس‌های قارچی، شناسایی با اتکا بر داده‌های ریخت‌شناسی از کارایی لازم برخوردار نبود. به‌همین منظور در مورد تعدادی از گونه‌های قارچی داده‌های توالی DNA جهت تایید هویت گونه مورد استفاده قرار گرفت.

در این بررسی گونه‌های جنس *سیتوسپورا* بیشترین فراوانی را به‌خود اختصاص دادند. گونه‌های این جنس بیمارگرهای شناخته‌شده روی تعداد زیادی از گیاهان میزبان‌چوبی به‌شمار می‌روند (آدامز و همکاران، 2005، فتوحی‌فر و همکاران 2010). پوسیدگی‌های ایجادشده توسط گونه‌های *سیتوسپورا* در بافت‌های سطحی شاخه باعث تضعیف مقاومت گیاه در برابر سایر بیمارگرها می‌شود؛ پوسیدگی‌های داخل آوندی هم می‌توانند با اختلال در انتقال آب و مواد غذایی باعث تضعیف عمومی گیاه شده و علائم مربوط به زوال را توسعه‌دهند. یکی از فرضیه‌هایی که در مورد تعامل گونه‌های *سیتوسپورا* با میزبان‌های گیاهی مطرح می‌باشد این است که گونه‌های این جنس به‌عنوان یک اندوفیت-بیمارگر فرصت‌طلب عمل کرده و با تضعیف گیاه بنا به هر دلیلی قدرت بیماری‌زایی را روی میزبان پیدا می‌کند (آدامز و همکاران، 2005). شیوع بیماری شانکر *سیتوسپورایی* در درختان هلو و دیگر درختان میوه هسته‌دار بسیار شدید می‌باشد. این بیماری از بیماری‌های مهم در اروپا روی هلو و زردآلو بوده و به بیماری سخته مشهور می‌باشد (پوکارل و لارسن، 2008). در این بررسی گونه‌های *Cytospora chrysosperma* با تعداد 24 جدایه و فراوانی

مشخص نشده است، اما بر اساس داده‌های مولکولی در جنس *Paraphaeosphaeria* واقع شده است (دام و همکاران، 2010). تعدادی از گونه‌های *Paraconiothyrium* از روی درختان میوه هسته‌دار جداسازی شده‌اند. گونه *P. africanum* از درختان هلو از آفریقای جنوبی توسط دام و همکاران (2010) توصیف گردیده است. در این بررسی تعداد شش جدایه *P. africanum* از میزبان آلو (منطقه مراغه) جداسازی گردید. هویت این گونه با استفاده از داده‌های توالی ITS تایید گردید. گزارش این جنس و گونه برای ایران جدید می‌باشد.

گونه‌های جنس *Phaeoacremonium* از میزبان‌های چوبی با علایم بیماری زوال جداسازی شده‌اند. گونه‌های این جنس، عامل بیماری پتری و اسکا در روی مو می‌باشند. تاکنون 36 گونه از جنس *Phaeoacremonium* از طیف وسیعی از میزبان‌ها از قبیل مو، هلو، شفتالو، کیوی، گیلاس، سیب، گلابی، زردآلو و بادام، انسان و لاروهای حشرات شناسایی شده است (موسترت و همکاران، 2006، گراماخه و همکاران، 2012). گونه *Pm. aleophilum* برای اولین بار توسط کراوس و همکاران (1996) از درختان مو با علایم بیماری زوال توصیف گردید و به‌عنوان مهم‌ترین عامل ایجاد بیماری اسکا در روی مو در دنیا شناخته شده است (موسترت و همکاران، 2006). ارزنلو و همکاران (2013) این گونه را از روی مو، سیب و زردآلو در استان‌های آذربایجان غربی و شرقی گزارش نموده‌اند. گونه‌های این جنس از کشورهای همسایه ایران، پاکستان و ترکیه، نیز گزارش شده است (دگیرمنسی و اوزبن، 2011). در این بررسی، دو جدایه *Phaeoacremonium* از درختان آلو و گوجه سبز (منطقه مراغه) جداسازی گردید. ویژگی‌های ریخت شناختی این دو جدایه با توصیف گونه *Pm. aleophilum* مطابقت داشت.

از سایر گروه قارچی که با فراوانی بالا از درختان میوه هسته‌دار با علایم همراه با بیماری‌های تنه از باغ‌های استان‌های آذربایجان شرقی و غربی جداسازی

جدایه از گونه *Cytospora cincta* از نمونه‌های آلوده به شانکر درختان بادام شهرستان ارومیه جداسازی شد. هویت این جدایه‌های این گونه به کمک ناحیه‌ی ITS به اثبات رسید.

گونه *Cytospora pruinosa* از درختان زیتون از آفریقای جنوبی گزارش شده است. در ایران این گونه از روی زبان گنجشگ و توت گزارش شده است (فتوحی فر و همکاران 2010). در این بررسی دو جدایه از گونه *Cytospora pruinosa* از نمونه‌های آلوده به شانکر از درختان هلوی باغ‌های آلوده‌ی سلماس در آذربایجان-غربی جداسازی شد. هویت این گونه با استفاده از توالی ناحیه‌ی ITS مورد تایید قرار گرفت. گزارش این گونه از روی هلو برای ایران جدید می‌باشد.

بیمارگرهای گروه بوتریوسفریا اغلب با زخم‌های V شکل، رگه‌های قهوه‌ای‌طویل در بافت چوب و توقف رشد در اوایل فصل در شاخه‌ها، شناسایی می‌شوند. آنامورف‌های جنس *Botrosphaeria* بیمارگرهای بالقوه درختان میوه هسته‌دار در سراسر دنیا هستند. در بررسی حاضر دو جدایه از *B. sarmentorum* از روی علایم آوندی منظم (V شکل و نامنظم) جداسازی شدند. این جدایه‌ها از درختان آلبالو جمع آوری شده از منطقه هوراند جداسازی شدند. مرحله آنامورف این گونه *Dothiorella sarmentorum* می‌باشد. این گونه از درختان زردآلو و گلابی و *Ulmus sp.* مورد شناسایی قرار گرفته است (فیلیس و همکاران، 2005). گزارش این گونه برای ایران جدید می‌باشد.

جنس *Paraconiothyrium* از قارچ‌های *Coniothyrium*-like بوده که به‌عنوان عامل کنترل‌زیستی، دارا بودن توانایی زیست‌پالایی¹⁰ و تولیدکننده متابولیت‌های ممانعت‌کننده از تکثیر ویروس آنفولانزا و ترکیبات دارای فعالیت ضدسرطانی مشهور می‌باشد (ورکلی و همکاران 2004، دام و همکاران، 2008). این جنس توسط ورکلی و همکاران (2004) توصیف گردید. مرحله جنسی آن هنوز

¹⁰ Bioremediators

به‌طور کلی نتایج این بررسی نشان‌داد که گروه‌های قارچی متنوعی روی درختان میوه هسته‌دار همراه با علایم زوال و سرخشیدگی حضور دارند که بررسی نقش هر یک از گروه‌ها در ایجاد بیماری نیاز به اجرای آزمون‌های بیماری‌زایی دارد. با شناسایی گونه‌های قارچی بیماری‌زا، امکان اعمال راهکارهای مناسب برای مدیریت بیماری‌های تنه درختان میوه هسته‌دار فراهم خواهد گردید.

سپاس‌گزاری

نویسندگان مقاله مراتب سپاس و قدردانی خود را از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تبریز به خاطر تامین بودجه لازم برای انجام این پژوهش ابراز می‌نمایند.

شدند، جدایه‌های گونه *A. alternata* را شامل می‌شد. *A. alternata* یک گونه قارچی پوده‌رست یا بیمارگر ضعیف تلقی می‌شود (هودک و روهاکیک، 2002)، از این گونه 14 جدایه با فراوانی 13/86 درصد از هلو و زردآلو (منطقه سلماس)، بادام (منطقه شبستر)، هلو(روستای آفیل از توابع شهرستان اهر) جداسازی گردید. هویت این گونه با کمک توالی ژن *rpb2* تاییدگردید. همچنین گونه *Paecilomyces variotii* با فراوانی 9,9 درصد و گونه *Fusarium proliferatum* با فراوانی 8,91 درصد به‌عنوان گونه‌های غالب شناسایی شدند.

سایر گونه‌های قارچی که با فراوانی کمتر در این بررسی جداسازی شدند شامل *Aureobasidium pullulans*، *Chaetomium*، *Epicoccum nigrum*، *Phoma glomerata*، *Sarocladium*، *F. tricinctum*، *F. acuminatum*، *globosum*، *C. cladosporioides*، *Cladosporium* spp.، *strictum*، *Pyrenochaeta* sp. و *Embellisia* sp. می‌باشند.

منابع

- ارشاد ج، 1388. قارچ‌های ایران. ویراست سوم. انتشارات موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، 531 صفحه.
- ایرانی ح، امتی ف، کیومرثی ش و ارشاد ج، 1382. مطالعه عوامل قارچی زوال درختان میوه هسته‌دار در استان‌های آذربایجان غربی، سمنان و کرمان. بیماری‌های گیاهی، جلد 39، شماره‌های 1 و 2. صفحه‌های 57 تا 72.
- دیزجی ا، ناگر م، اسمعیل زاده حسینی س ع، حیدریان ا و ارشاد ج، 1385. عوامل قارچی همراه ریشه و طوقه درختان بادام رو به زوال در استان‌های آذربایجان شرقی، سمنان، یزد و چهارمحال و بختیاری. پژوهش کشاورزی آب، خاک و گیاه در کشاورزی، جلد ششم، شماره 1. صفحه‌های 1 تا 14.
- رضوی س، رهنما ک، علی زاده عمرانی ر و مقصودلو ع ن، 1381. مطالعه علل زوال گیلاس در منطقه لاریجان آمل. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی. سال نهم، جلد اول. صفحه‌های 3 تا 14.
- Adams GC, Wingfield MJ, Common R, and Roux J, 2005. Phylogenetic relationships and morphology of *Cytospora* species and related teleomorphs (Ascomycota, Diaporthales, Valsaceae) from Eucalyptus. *Studies in Mycology* 52: 1-142.
- Adaskaveg JE, Miller RW, and Gilbertson R, 1993. Wood decay, lignicolous fungi, and decline of peach trees in South Carolina. *Plant Disease* 77: 707-711.
- Arnold AE, Meji'a LC, Kylo D, Rojas EI, Maynard Z, Robbins N, and Herre EA. 2003. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100: 15649-15654.
- Arzanlou M, Narmani A, Moshari S, and Khodaei S, 2013. Pome and stone fruit trees as possible reservoir hosts for *Phaeoacremonium* spp., the causal agents of grapevine esca disease, in Iran. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* DOI:10.1080/03235408.2013.820387.
- Barakat RM, and Johnson DA, 1997. Expansion of cankers caused by *Leucostoma cincta* on sweet cherry trees. *Plant Disease* 81:1391-1394.
- Britton KO, and Hendrix FF, 1986. Population dynamics of *Botryosphaeria* spp. in peach gummosis canker. *Plant Disease* 70: 134-136.
- Crous PW, Gams W, Wingfield MJ, and Van Wyk PS, 1996. *Phaeoacremonium* gen. nov. associated with wilt and decline diseases of woody hosts and human infection. *Mycologia* 88: 786-796.
- Damm U, Mostert L, Crous PW, and Fourie PH, 2008. Novel *Phaeoacremonium* species associated with necrotic wood of *Prunus* trees. *Persoonia* 20: 87-102.
- Damm U, Fourie PH and Crous PW, 2010. *Coniochaeta (Lecythophora)*, *Collophora* gen. nov. and *Phaeomoniella* species associated with wood necroses of *Prunus* trees. *Persoonia* 24: 60-80.
- Degirmenci K, and Ozben S, 2011. Detection of *Phaeoacremonium aleophilum* directly from wood tissue of grapevine and culture medium by PCR and DNA sequencing, *Current Opinion in Biotechnology* 22:15-52.
- Diogo ELF, Santos JM and Phillips AJL, 2010. Phylogeny, morphology and pathogenicity of *Diaporthe* and *Phomopsis* species on almond in Portugal. *Fungal Diversity* 44: 107-115.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (2010). FAO Statistical Databases. {Hyperlink <http://www.fao.org/>}.
- Fotouhifar KhB, Hedjaroude GA, and Leuchtmann A, 2010. ITS rDNA phylogeny of Iranian strains of *Cytospora* and associated teleomorphs. *Mycologia* 102(6):1369-1382.
- Gramaje D, Agustí-Brisach C, Pérez-Sierra A, Moralejo E, Olmo D, Mostert L, Damm U, and Armengol J, 2012. Fungal trunk pathogens associated with wood decay of almond trees on Mallorca (Spain). *Persoonia* 28: 1-13.
- González V, and Tello ML, 2011. The endophytic mycota associated with *Vitis vinifera* in central Spain. *Fungal Diversity* 47: 29-42.

- Hudec K, and Rohacik T, 2002. *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler – new pathogen on sugar beet leaf spot in Slovakia. Plant Protection Science 38: 81-82.
- Moller EM, Bahnweg G, and Geiger HH, 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. Nuclear Acid Research 20: 6115-6116.
- Mostert L, Groenewald JZ, Summerbell RC, Gams W, and Crous PW, 2006. Taxonomy and pathology of *Togninia* (*Diaporthales*) and its *Phaeoacremonium* anamorphs. Studies in Mycology 54: 1-115.
- Phillips AJL, Alves A, Correia A, and Luque J, 2005. Two new species of *Botryosphaeria* with brown, 1-septate ascospores and *Dothiorella* anamorphs. Mycologia 97: 513-529.
- Pokharel RR, and Larsen HJ, 2008. Incidence, severity and management of Cytospora canker in stone Phytopathology 98: 126-148.
- Slippers B, Smit WA, Crous PW, Coutinho TA, Wingfield BD, and Wingfield MJ, 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.
- Tamura K, Nei M, and Kumar S, 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution 28: 2731-2739.
- Truillas FP, and Gubler WD, 2010. Pathogenicity of *Diatrypaceae* species in grapevines in California. Plant Disease 94: 867-872.
- Trouillas FP, Peduto F, Lorber JD, Sosnowski MR, Grant J, Coates WW, Anderson KK, Caprile J, and Gubler WD, 2012. Calosphaeria canker of sweet cherry caused by *Calosphaeria pulchella* in California and South Australia. Plant Disease 96:648-658.
- Verkley GJM, da Silva M, Wicklow DT, and Crous PW, 2004. *Paraconiothyrium*, a new genus to accommodate the mycoparasite *Coniothyrium minitans*, anamorphs of *Paraphaeosphaeria*, and four new species. Studies in Mycology 50: 323-335.

Identification of the fungal species associated with trunk diseases of stone fruit trees in East and West Azerbaijan provinces

Haleh Dokhanchi¹, Mahdi Arzanlou^{2*} and Asadollah Babai-Ahari²

¹ MSc Student, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz.

² Associate Professor and Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz,

* Corresponding author: arzanlou@hotmail.com

Received: 26 Jun 2013

Accepted: 14 Mar 2014

Trunk diseases are considered as a potential threat for the cultivation and production of stone fruit trees all over the world. Various biotic agents are involved in trunk diseases, of those fungal groups are the most common ones playing prominent role in these diseases. Given the incidence of the trunk diseases on stone fruit trees in the orchards of East and West Azerbaijan provinces, the identity of fungal species associated with disease symptoms mainly remain unknown. In the present study the fungal species associated with the trunk diseases symptoms on stone fruit trees in this region were characterized using morphological and molecular data. A total number of 101 fungal isolates were isolated from 128 diseased samples. Our results revealed that *Cytospora chrysosperma* with the isolation frequency on 23.76 % represented the most dominant species followed by *Alternaria alternata* (13.86 %), *Paecilomyces variotti* (9.9 %) and *Fusarium proliferatum* (8.91 %). The identity of *Alternaria* isolates was confirmed using sequence data of *rpb2* gene. The other fungal species which were isolated with lower frequencies included *Epicoccum nigrum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Phoma glomerata*, *Paraconiothyrium africanum*, *Sarocladium strictum*, *Chaetomium globosum*, *F. acuminatum*, *F. tricinctum*, *C. cincta*, *C. pruinosa*, *Botryosphaeria sarmentorum* and *Phaeoacremonium aleophilum*. Among the fungal species isolated in this study *Cytospora chrysosperma*, *C. cincta*, *C. pruinosa*, *B. sarmentorum*, *P. aleophilum* and *P. africanum* have been reported as the causal agents of trunk diseases on stone fruit trees. With the identification of fungal species associated with trunk diseases on stone fruit trees, it will be possible to practice suitable management strategies for these diseases.

Keywords: Almond, apricot, canker, peach, *Botryosphaeria*, *Cytospora*