

شناسایی و بررسی بیماری‌زایی قارچ‌های همراه با سرخشکیدگی و زوال درختان زبان گنجشک در شهرستان‌های اردبیل و نمین

زهرا پری‌پور^۱، مهدی داوری^۱✉، بیتا عسگری^۲

^۱ گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران. ^۲ بخش تحقیقات رستنی‌ها، موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران. ✉ mdavari@uma.ac.ir

دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۰۳ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۴/۲۷ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۵/۰۷

چکیده

درختان زبان گنجشک (*Fraxinus* spp.) یکی از مهم‌ترین درختان زینتی در فضای سبز شهرها هستند. به منظور شناسایی قارچ‌های همراه با زوال و سرخشکیدگی این درختان، از شاخه، تنه و ریشه دو گونه زبان گنجشک (زبان گنجشک اروپایی با نام علمی *F. excelsior* و درخت وَن با نام علمی *F. rotundifolia*) در شهرهای اردبیل و نمین، طی تابستان و پاییز ۱۳۹۷ و ۱۳۹۸ نمونه‌برداری به عمل آمد. در کل از ۶۰ نمونه جمع‌آوری شده، تعداد ۸۱ جدایه قارچی جداسازی شد. جدایه‌ها ابتدا بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی شناسایی و گروه‌بندی شدند. شناسایی برخی از گونه‌های جنس *Fusarium* و *Neocosmospora* با استفاده از داده‌های مولکولی به دست آمده از تکثیر ژن *tef-1a* و همچنین آغازگرهای اختصاصی گونه مورد تایید قرار گرفت. در مجموع، ۲۱ گونه قارچی از درختان بیمار جداسازی و شناسایی شد که از مهمترین آنها می‌توان به جنس‌های *Alternaria*، *Chaetomium*، *Clonostachys*، *Cytospora*، *Fusarium*، *Microascus*، *Microsphaeropsis*، *Neocosmospora*، *Peyronellaea* و *Phialophora* اشاره نمود. گونه‌های *Neocosmospora solani*، *Cytospora chrysosperma* و *F. oxysporum* به ترتیب بالاترین فراوانی را داشتند. آزمون بیماری‌زایی به روش شاخه بریده برای گونه‌های *F. oxysporum*، *F. equiseti*، *N. solani* روی شاخه‌های بریده و جوان زبان گنجشک و در مورد *C. chrysosperma* روی شاخه بریده و همچنین نهال دو ساله زبان گنجشک در گلخانه انجام شد. تمام گونه‌های مایه‌زنی شده (به غیر از *F. cerealis* و *F. equiseti*) بعد از گذشت یک ماه باعث تغییر رنگ بافت چوب در محل مایه‌زنی شدند. گزارش اغلب گونه‌های شناسایی شده در این پژوهش از روی زبان گنجشک برای دنیا و ایران جدید است. همچنین گونه *F. denticulatum* برای میکوبیوتای ایران جدید است.

کلمات کلیدی: آغازگر اختصاصی، فضای سبز، فیلوژنی، *Fusarium*، *Cytospora*

Characterization and pathogenicity of fungal species associated with dieback and decline of ash trees in Ardabil and Namin County (Iran)

Zahra Paripour¹, Mahdi Davari¹✉ and Bita Asgari²

¹Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Iran.

²Department of Botany, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran. ✉ Mdavari@uma.ac.ir

Received: 23 January 2022

Revised: 18 July 2022

Accepted: 29 July 2022

Abstract

Ash trees (*Fraxinus* spp.) are one of the most important ornamental trees in the green space of cities. To evaluate the fungi associated with decline and dieback of ash trees, the symptomatic samples from branches, trunks, and roots of two species of *Fraxinus* (European *Fraxinus*, *F. excelsior* and Van, *F. rotundifolia*) were collected from Ardabil and Namin during the summer and autumn of 2018–2019. From the 60 samples, 81 fungal isolates were recovered. Based on morphological features of all isolates together with sequence data of *tef-1a* gene and specific primers of some *Fusarium* and *Neocosmospora* species, 21 fungal species were identified, i.e., *Alternaria*, *Chaetomium*, *Clonostachys*, *Cytospora*, *Fusarium*, *Microascus*, *Microsphaeropsis*, *Neocosmospora*, *Peyronellaea* and *Phialophora*. *Neocosmospora solani*, *Cytospora chrysosperma* and *F. oxysporum* had the highest abundance, respectively. Pathogenicity test was performed by excised shoot for *F. cerealis*, *F. equiseti*, *F. oxysporum* and *N. solani* excised shoot method and for *C. chrysosperma* on excised shoot method and also on two years old ash saplings in greenhouse. Our results showed that all examined species except *F. cerealis* and *F. equiseti* cause discoloration of wood texture at the inoculation site. According to our knowledge, most of the fungal species identified in this study, are reported for the first time on ash trees worldwide. Besides, *F. denticulatum* is a new record to the Iranian mycobiota.

Keywords: Greenspace, Phylogeny, Specific Primer, *Cytospora*, *Fusarium*.

How to cite:

Paripour Z, Davari M, Asgari B, 2023. Characterization and pathogenicity of fungal species associated with dieback and decline of ash trees in Ardabil and Namin County (Iran). *Journal of Applied Research in Plant Protection* 12 (2): 123–142

مقدمه

فضای سبز که بخشی از سیمای شهر را تشکیل می‌دهد، از ملزومات مهم زندگی شهری محسوب می‌شود (Rahmani & Nazari 2016). فضای سبز شهری مانند پارک‌ها، زمین‌های بازی و همچنین فضای سبز مسکونی می‌تواند باعث تقویت روحی و جسمی انسان‌ها شود (Braubach et al. 2017). ساختار فضای سبز شهری عموماً شامل پارک‌ها و درختان حاشیه خیابان‌ها است که جزو سرمایه‌های طبیعی یک شهر محسوب می‌شوند. درختان زبان گنجشک (*Fraxinus* spp.) یکی از زیباترین و مهم‌ترین درختان زینتی فضای سبز شهرها هستند که علاوه بر جنبه زینتی و زیبا سازی فضای شهری، از نظر دارویی (Kostova & lossifova 2007) و تجاری و صنعتی (Çiçek & Yilmaz 2002) نیز اهمیت زیادی دارند. گونه *F. excelsior* L. یکی از متداول‌ترین گونه‌های جنس *Fraxinus* است. اصولاً بیماری‌های قارچی به عنوان یک تهدید جدی، سلامتی درختان زینتی در فضای سبز را تحت تاثیر قرار می‌دهند (Negahdar saber et al. 2003; Haque et al. 2013; Ahmadi & Arzanlou 2019; Davari et al. 2020).

یکی از بیماری‌های مهم قارچی درختان زبان گنجشک زوال زبان گنجشک (Ash dieback) است که برای اولین بار در دهه ۱۹۹۰ در لهستان مشاهده و گزارش گردید (et al. 2013). Pautasso و سپس در سال ۱۹۹۶ در لیتوانی دیده شد (McKinney et al. 2014) و به سرعت در اغلب کشورهای شرقی، مرکزی و شمالی اروپا گسترش یافت (et al. 2013). Pautasso. زوال زبان گنجشک در کشورهای اروپایی قدمت زیادی دارد، به‌طوری‌که گونه‌های زبان گنجشک را در این کشورها در خطر نابودی قرار داده و در کشورهای ایرلند، انگلیس، استرالیا، آلمان، دانمارک، فرانسه، نیوزلند، نروژ و چند کشور اروپایی دیگر مشاهده شده است (Kowalski & Holdenrieder 2009). عوامل قارچی متعددی باعث سرخشکیدگی و در نهایت، زوال درختان زبان گنجشک می‌شوند. به عنوان مثال *Cytospora Ehrenb.* و *Fusarium Link* از جنس‌های قارچی مهم هستند که از درختان زبان گنجشک با نشانه‌های سرخشکیدگی در لهستان جداسازی و گزارش شده‌اند (Kowalski & Holdenrieder 2009). در این زمینه، دو گونه *F. oxysporum* Schltdl. و *F. solani* = *Neocosmospora solani* (Mart.) L. Lombard (Mart.) Sacc. & Crous نیز از ریشه نهال‌های بیمار زبان گنجشک در لهستان جداسازی شده‌اند (Przybył 2002). علاوه بر این، قارچ‌های *Phoma* sp. و *Phomopsis* sp. در انگلستان (Griffith & boddy 1988) و *Phoma exigua* Desm. در نیوزلند (Chen

2012) به‌عنوان عوامل مهم سرخشکیدگی درختان زبان گنجشک گزارش شده‌اند. همچنین گزارش‌های متعددی از ایجاد بیماری زوال توسط جنس *Hymenoscyphus* Gray به عنوان یکی از قارچ‌های مهم در اکثر کشورهای اروپایی روی زبان گنجشک وجود دارد. در سال ۲۰۱۴ زوال درختان زبان گنجشک ناشی از *H. (T.Kowalski) Baral, Queloz & Hosoya* *fraxineus* در کره شمالی گزارش شد (Han et al. 2014). در کشور استونی (سواحل جنوبی خلیج فنلاند)، *Drenkhan et al.* (2015) گونه *H. fraxineus* را از درختان زبان گنجشک (*F. sogdiana* Bunge) جداسازی و این درختان را مستعد زوال توسط این جنس قارچی معرفی کردند. در پی مشاهده علائم بیماری زوال و سرخشکیدگی درختان زبان گنجشک (*F. excelsior*) در پارک‌های مونته‌نگرو، *H. fraxineus* برای اولین بار از این کشور نیز جداسازی شد (Milenković et al. 2017). در تحقیقی، آلودگی ناشی از *H. fraxineus* در دو گونه *F. angustifolia* Vahl و *excelsior* در جمهوری چک بررسی و مطالعه شده است (Papic et al. 2018). در جمهوری ایرلند نیز *H. fraxineus* به عنوان یک گونه قارچی مؤثر در زوال درختان زبان گنجشک جداسازی شده که می‌تواند از طریق منافذ شاخه وارد آوندهای درخت شود (Nemesio-Gorritz et al. 2019).

با وجود استفاده گسترده از درختان زبان گنجشک در فضای سبز شهرهای مختلف ایران، توجه کمتری به بیماری‌های مرتبط با زوال و سرخشکیدگی این درختان شده است. پس از مشاهده سرخشکیدگی و زوال درختان زبان گنجشک در مناطق مختلف فضای سبز شهرهای اردبیل و نمین، پژوهش حاضر با هدف شناسایی قارچ‌های همراه با این بیماری از جمله قارچ‌های دخیل در انسداد آوندی، پوسیدگی ریشه و سرخشکیدگی انجام شد. آگاهی از قارچ‌های همراه با بیماری‌های مهمی مانند خشکیدگی و زوال درختان در فضای سبز می‌تواند در ادامه تحقیقات از جمله اثبات بیماری‌زایی آنها و بررسی روش‌های پیشگیری و مدیریت این بیماری‌ها مفید واقع شود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

طی بازدیدهایی که در تابستان و پاییز ۹۸-۱۳۹۷ از درختان زبان گنجشک (زبان گنجشک اروپایی با نام علمی *F. excelsior* و درخت وَن با نام علمی *F. rotundifolia*) در فضای سبز شهرهای اردبیل و نمین انجام شد، نشانه‌هایی از بیماری به شکل سرخشکیدگی، تغییر رنگ بافت آوندی، پوسیدگی ریشه و در

Oatmeal Agar) و همچنین آب آگار (WA, Water Agar) دو درصد همراه با قطعات برگ کاج روی محیط کشت استفاده شد. اسلایدهای میکروسکوپی با استفاده از آب و یا محلول اسید لاکتیک تهیه شد. برای اندازه‌گیری ساختارهای قارچی، ۳۰ عدد از هر ساختار اندازه‌گیری و میانگین آن‌ها محاسبه شد. برای این کار از میکروسکوپ ZIESS Axiolab (Germany) مجهز به خط‌کش میکرومتری استفاده شد. به‌منظور تهیه تصاویر میکروسکوپی نیز از نرم‌افزار Dino Capture 2.0 تعبیه شده روی میکروسکوپ Olympus BH-2 (Japan) یا دوربین دیجیتال Canon 450D نصب شده روی میکروسکوپ Axiolab ZIESS استفاده شد. ترسیم نمودارهای فراوانی جنس‌ها و گونه‌های قارچی با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام گرفت. در نهایت، شناسایی جدایه‌ها در سطح جنس یا گونه با استفاده از منابع تاکسونومیکی معتبر مربوط به هر جنس انجام پذیرفت.

مطالعات مولکولی جدایه‌های قارچی

به‌منظور شناسایی مولکولی فراوان‌ترین گونه‌های جنس *Fusarium* (شامل *Neocosmospora*) به دست آمده در این پژوهش، اغلب از آغازگرهای اختصاصی گونه (جدول ۱) و در برخی موارد از تکثیر و توالی‌یابی ژن *tef-1α* (Translation elongation factor-1 alpha) با استفاده از آغازگرهای EF1-fus (5'-EF1-fus و 5'-ATGGGTAAGGAGGACAAGAC) (Geiser et al. 2004). برای این منظور، جدایه‌های مورد نظر روی محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار کشت داده شدند و به مدت ۷-۱۰ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. کل DNA جدایه‌ها با استفاده از روش Moller et al. (1992) استخراج گردید. برای ارزیابی کیفیت و کمیت DNA استخراج شده، از الکتروفورز روی ژل آگاروز یک درصد و دستگاه نانودراپ (مدل NanodropOne_C- AZY1706749, USA) استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس (ساخت شرکت سیناژن)، نه میکرولیتر آب دو بار تقطیر، پنج پیکومول از هر کدام از آغازگرهای مستقیم و معکوس (جدول ۱) و ۱۵-۱۰ نانوگرم DNA ژنومی در دستگاه ترموسایکلر BioRad طبق برنامه دمایی (جدول ۱) برای هریک از آغازگرهای اختصاصی انجام شد. به‌منظور تکثیر ناحیه ژنی *tef-1α* نیز این واکنش مطابق شرایط ذکر شده در مطالعات قبلی (Davari et al. 2013a,b) انجام شد. خالص‌سازی و توالی‌یابی فرآورده‌های PCR

نهایت، زوال مشاهده و ثبت گردید. در کل از ۱۴ منطقه بازدید شد و در هر منطقه نیز دو تا چهار درخت بیمار به طور تصادفی انتخاب و از بخش‌های مختلف درختان شامل شاخه، ریشه و تنه نمونه‌برداری شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده پس از ثبت تاریخ، مشخصات جغرافیایی و محل جمع‌آوری، در پاکت‌های کاغذی جداگانه به آزمایشگاه منتقل شدند.

جداسازی و خالص‌سازی

در آزمایشگاه، بافت‌های آلوده زیر جریان ملایم شیر آب شست و شو داده شدند و نمونه‌ها با استفاده از تیغ اسکالپل به قطعات ۵/۰ سانتی‌متری برش داده شدند. پس از آن، نمونه‌های بافت ریشه، تنه و شاخه به مدت دو دقیقه با هیپوکلریت سدیم نیم درصد ضدعفونی و پس از سه مرتبه شستشو با آب مقطر سترون و خشک نمودن روی کاغذ صافی سترون، در تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار (PDA, Merck, Germany) حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر از هر یک از آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین کشت و به مدت یک هفته در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند. خالص‌سازی جدایه‌ها پس از رشد پرگنه و با روش تک‌اسپور کردن در زیر استریومیکروسکوپ (Lieca Zoom, Germany 2000) انجام شد. همه جدایه‌های این پژوهش به کلکسیون قارچ‌شناسی دانشگاه محقق اردبیلی و تعدادی به کلکسیون ملی قارچ‌های زنده ایران (IRAN) واقع در مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور (تهران) تحویل و کد کلکسیونی دریافت گردید.

شناسایی جدایه‌های قارچی براساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی

برای این منظور، ویژگی‌های ماکروسکوپی هر کدام از گروه‌های قارچی شامل رنگ، شکل و نوع میسلیم (مثل هوایی، خوابیده، پنبه‌ای، مخملی، حاشیه مضرّس و ...)، نرخ رشد، تولید یا عدم تولید اندام و رنگدانه روی محیط کشت PDA در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و ویژگی‌های میکروسکوپی شامل مکانیسم کنیدیوم‌زایی، تشکیل یا عدم تشکیل کنیدیوماتا، اندازه و شکل کنیدیوم و تشکیل اندام‌های باردهی روی شاخه‌های خشکیده درختان مورد بررسی قرار گرفت. به منظور تحریک اسپورزایی گونه‌های *Fusarium* و *Neocosmospora* از محیط کشت SNA (Synthetic Nutrient Poor-Agar)، *Cytospora* از MEA (Malt Extract Agar)، *Alternaria* از PCA (Potato Carrots) و *Diplodia* و *Microascus nigrospora* از OA (Agar)

درخت تبارزایی با نرم‌افزار JModeltest v. 2.1.10 (Darriba et al. 2012) تعیین شد. تبارنمای نهایی با استفاده از روش بیژین بر مبنای داده‌های توالی ژن *tef-1a* مربوط به جدایه‌های مورد مطالعه در این پژوهش و جدایه‌های تیپ برخی گونه‌های نماینده جنس‌های *Fusarium* و *Neocosmospora* (Crous et al. 2021) و با استفاده از نرم‌افزار MrBayes v. 3.2.7 (Ronquist et al. 2012) ترسیم شد. آزمون اعتبارسنجی به روش احتمال پسین (posterior probability) انجام شد. تجزیه و تحلیل اعتبارسنجی (bootstrap) با ۱۰۰۰ تکرار انجام شد.

جدول ۱. نام و توالی آغازگرهای اختصاصی و چرخه حرارتی PCR برای گونه‌های جنس *Fusarium* و *Neocosmospora*.

Table 1. Name and sequence of specific primers and PCR thermal cycling for species of *Fusarium* and *Neocosmospora*.

Species-Specificity	Primers	Primer sequence	Source & PCR Program
<i>Fusarium oxysporum</i>	Clox1-F	5' -CAGCAAAGCATCAGACCACTATAACT -3'	94°C for 5min, 35 (94°C for 50s, 60°C for 50s, 72°C for 1min), 72°C for 7min (Mule et al. 2004)
	Clox2-R	5' - CTTGTCTAGTAAGTGGACGTTGGTACT -3'	
<i>F. acuminatum</i>	FAC-F	5' -GGGATATCGGGCCTCA -3'	95°C for 3min, 38 (95°C for 30, 62°C for the 20s, 72 for 45s), 72°C for 5min (Doohan et al. 1998)
	FAC-R	5' -GGGATATCGGCAAGATCG -3'	
<i>F. equiseti</i>	FEF1	5' - CATACCTATACGTTGCCTCG -3'	94°C for 1min, 25 (94°C for 1min, 58°C for 30s, 72°C for 1min), 72°C for 7min (Mishra et al. 2003)
	FER1	5' - TTACCAGTAACGAGGTGTATG -3	
<i>Neocosmospora solani</i>	Ffuso1	5' - ATCGGCCACGTCGACTCT -3'	94°C for 5min, 40 (94°C for 1min, 58°C for 1min, 72°C for 2min), 72°C for 7min (Arif et al. 2012)
	rfuso2	5' - GCGTCTGTTGATTGTTAGC -3'	

در هر دو روش از قرص محیط کشت PDA فاقد قارچ به عنوان تیمار شاهد استفاده گردید. در مورد شاخه بریده پس از یک ماه و در مورد نهال‌ها سه ماه بعد از مایه‌زنی، نتایج آزمایش بررسی شد. همچنین اندام‌های گیاهی بیمار پس از تقسیم شدن به قطعات کوچک و ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم نیم درصد و سه مرتبه آبگیری با آب مقطر سترون و خشک نمودن روی کاغذ صافی سترون، در تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت PDA قرار داده شدند.

نتایج

بازدید و علایم بیماری

بازدید از درختان زبان گنجشک در شش نوبت از موقعیت‌های تصادفی در فضای سبز شهرهای اردبیل و نمین انجام گرفت. درختان بیمار به دقت بررسی شدند و علایم بیماری در درختان زبان گنجشک به شکل سرخشکیدگی و زوال (شکل ۱)، پوسیدگی ریشه، تغییر رنگ بافت چوب و زوال مشاهده گردید.

توسط شرکت میکروسینت (Microsynth Company, Switzerland) انجام شد.

توالی‌های نوکلئوتیدی به دست آمده، با استفاده از نرم‌افزار SeqMan (DNASTAR, Madison, WI, USA) بررسی و ویرایش شد و سپس با استفاده از ابزار جستجوی بلاست (BLAST search tool; Altschul et al. 1990) با توالی‌های مرجع موجود در بانک ژن جهانی (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) مورد مقایسه قرار گرفت. زیر هم‌چینی توالی‌های نوکلئوتیدی با استفاده از نرم‌افزار MAFFT v. 7 (Kato et al. 2019) انجام شد. بهترین مدل برای رسم

آزمون بیماری‌زایی

آزمون بیماری‌زایی سه گونه غالب *F. N. solani*، *F. oxysporum* و *C. chrysosperma* به همراه دو گونه *F. equiseti* و *F. cerealis* روی شاخه‌های بریده شده به طول ۱۰ تا ۲۰ سانتی‌متر و قطر ۱/۵-۱ سانتی‌متر (Abbasi et al. 2012) و برای گونه *C. chrysosperma* روی نهال‌های دوساله گونه *F. excelsior* در گلخانه (Arzanlou et al. 2014) انجام شد. برای مایه‌زنی، ابتدا محل مورد نظر با الکل ۷۰ درصد ضدعفونی و پس از خشک شدن، پوست نازکی از مرکز شاخه‌ها به وسیله تیغ جراحی سترون کنار زده شد. سپس یک زخم جهت تسهیل نفوذ قارچ در زیر پوست ایجاد شد (در مورد نهال، محل زخم ۱۰ سانتی‌متر بالای اولین میان‌گره بود). در محل زخم، قرص میسلیمومی به قطر ۵/۰ سانتی‌متر از پرگنه هفت روزه جدایه مورد نظر قرار داده شد، به طوری که میسلیموم‌های قارچی رو به سمت زخم قرار گرفتند. محل‌های مایه‌زنی و همچنین دو انتهای شاخه‌های بریده تیمار شده جهت حفظ رطوبت با پارافیلیم مسدود شدند. آزمون بیماری‌زایی با سه تکرار برای هر جدایه انجام شد.



شکل ۱. علایم بیماری زوال روی درختان زبان گنجشگ. a-c. سرخشیدگی d. زوال درختان زبان گنجشک در فضای سبز شهرهای اردبیل و نمین.

Figure 1. Decline symptom on ash trees. a-c. Dieback; d. decline of ash trees in the green space of Ardabil and Namin cities.

شناسایی قارچ‌ها
در این پژوهش، ۸۱ جدایه قارچی به دست آمد که بر اساس مطالعات ریخت‌شناختی و مولکولی (داده‌های مولکولی شامل نتایج آغازگرهای اختصاصی و یا داده‌های توالی ژن *tef-1a* در مورد جدایه‌های منتخب متعلق به جنس‌های *Fusarium* و *Neocosmospora* (در ۳۱ گونه قارچی (۲۱ گونه مشخص و مابقی به‌عنوان گونه نامشخص) متعلق به ۱۶ جنس شناسایی شدند. جنس‌های شناسایی شده در این پژوهش شامل

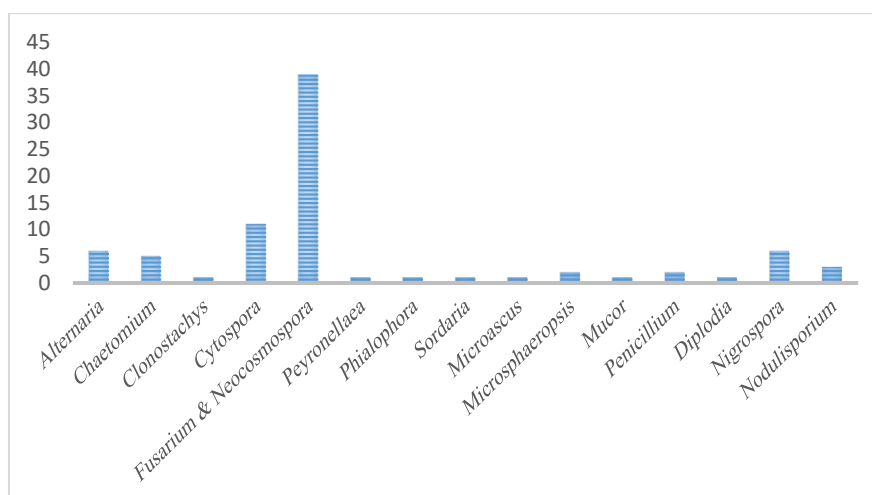
تعداد و فراوانی گونه‌های قارچی
در این پژوهش، دو جنس قارچی *Fusarium* (شامل *Cytospora* و *Neocosmospora*) به ترتیب با فراوانی ۴۸/۱ و ۱۳/۵ درصد، جنس‌های غالب و *N. solani*، *C. chrysosperma* و *F. oxysporum* به ترتیب با ۱۶، ۱۳/۵ و ۹/۸۷ درصد، سه گونه غالب شناسایی شدند. همچنین تعداد ۵۱ جدایه از ریشه (۶۳ درصد)، ۲۶ جدایه از شاخه (۳۲ درصد) و چهار جدایه از تنه (۵ درصد) جداسازی شد که بیشترین جدایه قارچی مربوط به ریشه زبان گنجشک بود.

شناسایی قارچ‌ها
در این پژوهش، ۸۱ جدایه قارچی به دست آمد که بر اساس مطالعات ریخت‌شناختی و مولکولی (داده‌های مولکولی شامل نتایج آغازگرهای اختصاصی و یا داده‌های توالی ژن *tef-1a* در مورد جدایه‌های منتخب متعلق به جنس‌های *Fusarium* و *Neocosmospora* (در ۳۱ گونه قارچی (۲۱ گونه مشخص و مابقی به‌عنوان گونه نامشخص) متعلق به ۱۶ جنس شناسایی شدند. جنس‌های شناسایی شده در این پژوهش شامل *Clonostachys*, *Chaetomium* Kunze, *Alternaria* Nees, *Fusarium*, *Diplodia* Fr., *Cytospora* Ehrenb., *Corda*, *Microsphaeropsis* Syd. & P., *Microascus* Zukal, Link, *Neocosmospora* E.F. Sm., *Mucor* Fresen., Syd., *Penicillium*, *Nodulisporium* Preuss, *Nigrospora* Zimm.

جدول ۲. فراوانی و محل جداسازی جدایه‌های شناسایی شده از زبان گنجشک دو شهر اردبیل و نمین.

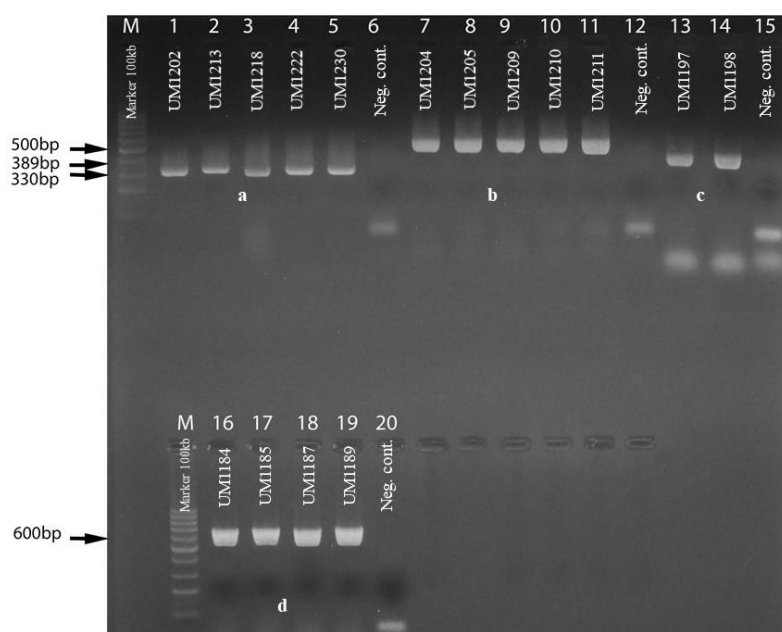
Table 2. Frequency and geographical origin of isolates identified from ash trees in Ardabil and Namin cities.

Taxon	Number of isolates	Frequency (%)	Source	Origin	UMA code (Representative code)	IRAN code
<i>Alternaria alternata</i>	1	1.23	Branch of <i>Fraxinus excelsior</i>	Ardabil	UM1075	-
<i>A. infectoria</i>	1	1.23	Root of <i>F. excelsior</i>	Ardabil	UM1085	-
<i>Alternaria</i> sp.	4	4.93	Branch and root of <i>F. excelsior</i> and <i>F. rotundifolia</i>	Ardabil	UM1086	-
<i>Chaetomium fimeti</i>	3	3.7	Branch and root of <i>F. excelsior</i> and <i>F. rotundifolia</i>	Ardabil	UM1145	IRAN 3759C and IRAN 3760C
<i>C. megalocarpum</i>	1	1.23	Root of <i>F. excelsior</i>	Namin	UM1148	IRAN 3761C
<i>Chaetomium</i> sp.	1	1.23	Branch of <i>F. excelsior</i>	Ardabil	UM1149	IRAN 3860C
<i>Clonostachys rosea</i>	1	1.23	Root of <i>F. excelsior</i>	Ardabil	UM1162	-
<i>Cytospora chrysosperma</i>	11	13.5	<i>F. excelsior</i> and <i>F. rotundifolia</i>	Ardabil	UM1163	IRAN 3858C, IRAN 3863C
<i>Diplodia</i> sp.	1	1.23	Branch of <i>F. excelsior</i>	Ardabil	UM1175	-
<i>Fusarium acutatum</i>	2	2.46	Root of <i>F. excelsior</i>	Ardabil	UM1181	IRAN 3904C
<i>F. acuminatum</i>	4	4.93	Root of <i>F. excelsior</i> and <i>F. rotundifolia</i>	Ardabil	UM1184	-
<i>F. cerealis</i>	4	4.93	Root of <i>F. excelsior</i>	Ardabil	UM1193	-
<i>F. denticulatum</i>	1	1.23	Root of <i>F. excelsior</i>	Ardabil	UM1196	IRAN 3901C
<i>F. equiseti</i>	3	3.7	Root of <i>F. excelsior</i>	Ardabil	UM1197	IRAN 3899C
<i>F. oxysporum</i>	8	9.87	Root and trunk of <i>F. excelsior</i> and <i>F. rotundifolia</i>	Ardabil, Namin	UM1209	IRAN 4472C
<i>F. redolens</i>	1	1.23	Root of <i>F. excelsior</i>	Ardabil	UM1204	IRAN 3897C
<i>F. subglutinans</i>	1	1.23	<i>F. rotundifolia</i>	Ardabil	UM1232	IRAN 3900C
<i>F. thapsinum</i>	1	1.23	<i>F. rotundifolia</i>	Ardabil	UM1233	IRAN 3903C
<i>F. verticillioides</i>	1	1.23	<i>F. excelsior</i>	Ardabil	UM1234	IRAN 3902C
<i>Microascus</i> sp.	1	1.23	<i>F. excelsior</i>	Namin	UM1267	IRAN 3857C
<i>Microsphaeropsis</i> cf. <i>olivacea</i>	1	1.23	<i>F. excelsior</i>	Ardabil	UM1268	-
<i>Microsphaeropsis</i> sp.	1	1.23	<i>F. rotundifolia</i>	Ardabil	UM1269	-
<i>Mucor</i> sp.	1	1.23	<i>F. excelsior</i>	Namin	UM1270	-
<i>Neocosmospora solani</i>	13	16	<i>F. excelsior</i> and <i>F. rotundifolia</i>	Ardabil, Namin	UM1218	IRAN 4471C
<i>Nigrospora oryzae</i>	6	7.4	Branch and root of <i>F. excelsior</i> and <i>F. rotundifolia</i>	Ardabil	UM1238	-
<i>Nodulisporium</i> sp.	3	3.7	<i>F. excelsior</i>	Ardabil, Namin	UM1245	IRAN 3757C
<i>Penicillium</i> sp.1	1	1.23	<i>F. excelsior</i>	Namin	UM1250	-
<i>Penicillium</i> sp.2	1	1.23	<i>F. excelsior</i>	Ardabil	UM1251	-
<i>Peyronellaea</i> sp.	1	1.23	<i>F. excelsior</i>	Ardabil	UM1252	IRAN 3862C
<i>Phialophora cinerescens</i>	1	1.23	<i>F. excelsior</i>	Ardabil	UM1253	IRAN 3765C
<i>Sordaria fimicola</i>	1	1.23	<i>F. excelsior</i>	Namin	UM1256	-



شکل ۲. فراوانی جنس‌های قارچی جداسازی و شناسایی شده از درختان زبان گنجشک.

Figure 2. Frequency of isolated and identified fungal genera from ash trees.



شکل ۳. نتایج شناسایی مولکولی گونه‌های جنس فوزاریوم با استفاده از آغازگرهای اختصاصی. **a.** تکثیر قطعه ۳۳۰ جفت‌بازی مربوط به جدایه‌های *Neocosmospora solani* با استفاده از آغازگرهای Ffuso1/Rfuso2 روی ژل آگاروز یک درصد؛ **b.** تکثیر قطعه ۵۰۰ جفت‌بازی مربوط به جدایه‌های *F. oxysporum* با استفاده از آغازگرهای Clox1-F/Clox2-R؛ **c.** تکثیر قطعه ۳۸۹ جفت‌بازی مربوط به جدایه‌های *F. equiseti* با استفاده از آغازگرهای FEF1/FER1؛ **d.** تکثیر قطعه ۶۰۰ جفت‌بازی مربوط به جدایه‌های *F. acuminatum* با استفاده از آغازگرهای FAC-F/FAC-R.

Figure 3. Molecular identification of *Fusarium* spp. using species-specific primers. **a.** A 330 bp fragment band obtained from amplification of *Neocosmospora solani* isolates using Ffuso1/Ffuso2 primers on 1% Agarose gel; **b.** A 500 bp fragment amplified from *F. oxysporum* isolates using Clox1-F/Clox2-R primers; **c.** A 389 bp fragment amplified from *F. equiseti* isolates using FEF1/FER1 primers; **d.** A 600 bp fragment amplified from *F. acuminatum* isolates using FAC-F/FAC-R primers.

(Arif et al. 2012; Jahedi et al. 2018, Unpublished data)

مورد استفاده قرار گرفت و بر این اساس، قطعه ۳۳۰ جفت‌بازی مربوط به جدایه‌های متعلق به *N. solani* با استفاده از آغازگرهای

مطالعات مولکولی

در شناسایی مولکولی برخی گونه‌های *Fusarium*، آغازگرهای اختصاصی گونه که در تحقیقات قبلی، کارآیی و عملکرد اختصاصی آنها ثابت شده است (Mishra et al. 2003;

فعلا در اینجا تحت گونه *N. solani* معرفی می‌گردند. لازم به توضیح است نتایج به‌دست آمده از تکثیر DNA جدایه‌های IRAN 3898C و IRAN 4471C با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (شکل ۳)، تایید کننده شناسایی آن‌ها تحت گونه *N. solani* می‌باشد.

توصیف گونه‌های مهم شناسایی شده

با توجه به اینکه جنس‌های *Fusarium* (شامل *Neocosmospora*) و *Cytospora* دو جنس غالب این پژوهش هستند و طبق گزارشات رسمی منتشر شده در دنیا (Kowalski et al. 2016; Chen 2012) با بیماری زوال و سرخشکیدگی درختان زبان گنجشک ارتباط احتمالی دارند، در اینجا صرفا به توصیف گونه‌های مهم این جنس‌ها و گونه‌های جدید برای مایکوبیوتای ایران پرداخته می‌شود. لازم به ذکر است که ویژگی‌های ریخت‌شناختی گونه‌های *Fusarium* شناسایی شده در اینجا با توصیف‌های موجود در منابع معتبر همخوانی داشت (Booth 1971; Gerlach & Nirenberg 1982; Summerell et al. 2003; Leslie & Summerell 2006). سایر جنس‌های قارچی در این پژوهش نیز با مطالعه و تطبیق ویژگی‌های مورد نظر با منابع مختلف مربوط به هر جنس از جمله Afshari et al. 2016; Cole 1973; Hemmati 2017; Sandoval- Morgan-Jones 1974; Lazzizera et al. 2008; Denis et al. 2016; Seifert et al. 2011; Simmons 2007; Wang et al. 2017; Wang et al. 2016; Sutton 1980; Woudenberg et al. 2017 شناسایی شدند.

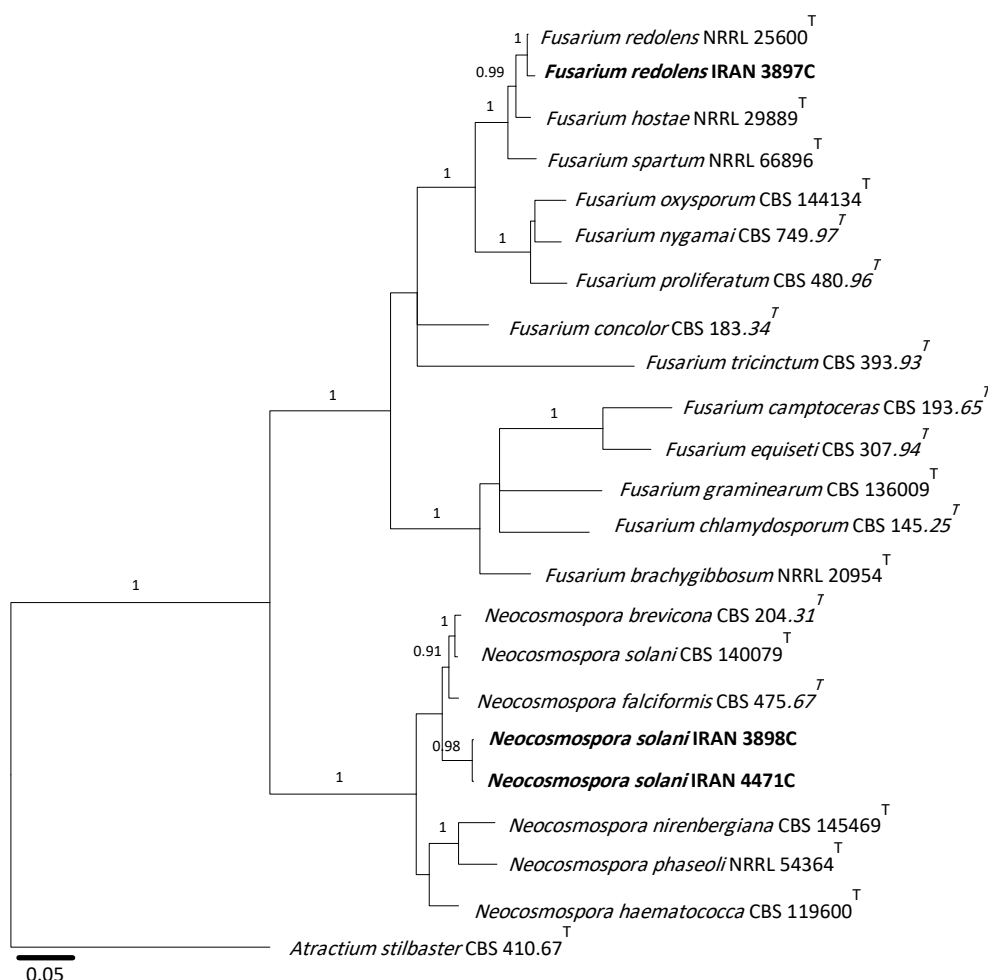
Neocosmospora solani (Mart.) L. Lombard & Crous, Studies in Mycology 80: 228 (2015)

پراگنده‌ها در محیط کشت PDA، میسلیم‌های پنبه‌ای به رنگ سفید تا کرم با سطح پشتی کرم مایل به زرد تولید کردند. قطر پراگنده پس از گذشت هفت روز به هفت سانتی‌متر می‌رسید. ماکروکنیدیوم‌ها در محیط کشت SNA به شکل مستقیم و نسبتاً عریض دارای پنج بند با یاخته انتهایی خمیده و گرد و یاخته پایه پاشنه‌ای ضعیف و یا فرورفته بودند. اندازه ماکروکنیدیوم‌ها ۴-۵ × ۳۸-۱۹ میکرومتر بود. میکروکنیدیوم‌ها به فراوانی به اشکال تخم‌مرغی کشیده و دوکی‌شکل و صفر تا یک بندی به صورت توده‌های لزج روی مونوفیالیدهای بلند و کشیده تشکیل شدند (شکل ۵). اندازه میکروکنیدیوم‌ها ۲-۳ × ۷-۱۰ میکرومتر بود. کلامیدوسپورها به شکل کروی و به صورت تکی و دوتایی، بین ریشه‌ای یا انتهایی بودند. این گونه قبلا از *F. excelsior* در دنیا گزارش شده است (Kowalski et al. 2016; Orlikowski et al. 2011; Przybył 2002) اما گزارش آن از روی *F. rotundifolia*

Ffuso1/Rfuso2 تکثیر شد. همچنین تکثیر قطعه ۵۰۰ جفت-بازی مربوط به *F. oxysporum* با استفاده از آغازگرهای Clox1-Clox2-R، تکثیر قطعه ۳۸۹ جفت‌بازی مربوط به *F. equiseti* با استفاده از آغازگرهای FEF1/FER1 و تکثیر قطعه ۶۰۰ جفت-بازی مربوط به *F. acuminatum* با استفاده از آغازگرهای FAC-FAC-R انجام شد. نتایج به‌دست آمده از این آزمایشات (شکل ۳) شناسایی ریخت‌شناختی کلیه گونه‌های ذکر شده در بالا را تایید نمود.

مجموعه بررسی شده در واکاوی تبارشناختی توالی‌های ژن *tef-1a* با استنتاج بیژین شامل توالی‌های ۲۲ آرایه گروه داخلی و یک آرایه، *Atractium stilbaster* CBS 410.67 (KM231920) به‌عنوان گروه خارجی بود. با استفاده از نرم‌افزار جی مدل تست، مناسب‌ترین مدل جایگزینی GTR+I+G تشخیص داده شد. در واکاوی تبارشناختی (شکل ۴) جدایه IRAN 3897C (UM1204) با پشتیبانی پسین بالا (1.00) با جدایه تیپ گونه *F. redolens* (NRRL 25600) در یک خوشه قرار گرفت، در حالی که جدایه‌های IRAN 3898C (UM1201) و IRAN 4471C (UM1218) با پشتیبانی آماری کم با جدایه‌های تیپ گونه‌های *N. brevicola* (CBS 204.31)، *N. falciformis* (CBS 140079) و *N. solani* (CBS 475.67) جستجوی بلاست، توالی ژن *tef-1a* جدایه UM1204 دارای ۱۰۰٪ شباهت با توالی جدایه‌های معتبر متعلق به گونه *F. redolens* از قبیل NRRL 25123 (JF740748.1) و NRRL 52814 (GU250585.1) بود. جدایه‌های IRAN 3898C و IRAN 4471C هم در جستجوی بلاست به ترتیب دارای ۹۹٪/۸۳ (۵۷۶/۵۷۷) و ۹۹٪/۸۴ (۶۳۲/۶۳۳) شباهت با توالی جدایه‌های معتبر متعلق به گونه *N. solani* (KY128333.1) و KX094913 بودند. بر اساس مطالعات ریخت‌شناختی، جدایه UM1204 دارای ویژگی‌های منطبق با گونه *F. redolens* (Gerlach & Nirenberg 1982) و جدایه‌های IRAN 3898C و IRAN 4471C دارای ویژگی‌های منطبق با گونه *N. solani* (Crous et al. 2021) بودند. بنابراین جدایه IRAN 3897C بر اساس انطباق کامل داده‌های مولکولی و ریخت‌شناختی تحت گونه *F. redolens* شناسایی شد. جدایه‌های IRAN 3898C و IRAN 4471C بر اساس توالی‌های ژن *tef-1a* احتمالا گونه جدیدی از جنس *Neocosmospora* می‌باشند، اما با توجه به اینکه در پژوهش حاضر تنها یک ناحیه ژنی از این جدایه‌ها توالی‌یابی شده است و از طرف دیگر، این جدایه‌ها دارای ویژگی‌های ریخت‌شناختی منطبق با گونه *N. solani* می‌باشند،

برای دنیا جدید می‌باشد. همچنین گزارش این قارچ از هر دو گونه زبان گنجشک در ایران جدید می‌باشد.



شکل ۴. تبارنامه ترسیم شده جدایه‌های *Fusarium* و *Neocosmospora* به روش بیژین بر اساس توالی قسمتی از ژن *tef-1α* که با استفاده از گونه *Atractium stilbaster* (CBS 410.67) به عنوان آرایه خارج از گروه ریشه‌دار شده است. آرایه‌های بولد شده، مربوط به جدایه‌های این مطالعه است. اعداد روی محل انشعاب شاخه‌ها نشان دهنده مقدار احتمال پسین بزرگتر و یا مساوی ۰/۹۰ است. مقیاس، ۰/۰۵ تغییر مورد انتظار در هر مکان را مشخص می‌کند. علامت ^T نشان دهنده جدایه تیپ است.

Figure 4. Phylogenetic tree constructed by Bayesian analysis based on partial *tef-1α* sequences of *Fusarium* and *Neocosmospora* isolates. The tree is rooted in *Atractium stilbaster* CBS 410.67^T. Highlighted taxa represent isolates of this study. Numbers above the branches represent posterior probabilities values (equal to or greater 0.90). The scale bar shows 0.05 expected changes per site. ^T = ex-type strain.

و کمی انحنادار و یاخته پایه پاشنه‌ای شکل بودند. اندازه ماکروکنیدیوم‌ها ۲-۴ × ۵۰-۱۷ میکرومتر بود. میکروکنیدیوم‌ها تخم‌مرغی شکل، بیضوی، بدون بند و روی مونوفیالیدهای کوتاه به صورت توده‌های لزج تشکیل شدند (شکل ۶). کلامیدوسپورها پس از گذشت دو هفته به صورت منفرد و یا خوشه‌ای تولید شدند. گزارش این گونه از *F. excelsior* برای ایران و دنیا جدید می‌باشد.

Fusarium redolens Wollenw., Phytopathology 3 (1): 29 (1913)

پرگنه در محیط کشت PDA، میسلیم‌های پنبه‌ای به رنگ سفید تا بنفش کمرنگ تولید کرد. از سطح پشتی پرگنه نیز دوایر متحدالمرکز سفید-صورتی و کرم-صورتی دیده می‌شد. قطر پرگنه پس از گذشت هفت روز به هشت سانتی‌متر رسید. ماکروکنیدیوم‌ها با طول متوسط تا بلند، معمولاً سه بندی، مستقیم تا حدی انحنادار و نسبتاً باریک با یاخته انتهایی نوک‌تیز



شکل ۵. *Neocosmospora solani*. a-b. سطح رویی و پشتی پرگنه هفت روزه روی محیط کشت PDA؛ c. مونوفیالیدهای بلند به همراه توده‌های لزج میکروکنیدیومی؛ d-e. ماکروکنیدیوم‌ها؛ f. کلامیدوسپورها؛ g. میکروکنیدیوم‌ها. مقیاس c و f= ۲۰ میکرومتر؛ مقیاس: d-e, g= ۱۰ میکرومتر.

Figure 5. *Neocosmospora solani*. a-b. The surface and reverse of colony on PDA after seven days; c. Long monophialieds; d-e. Macroconidia; f. Chlamydospores; g. Microconidia (Bars c, f= 20 μ m, d-e, g= 10 μ m).



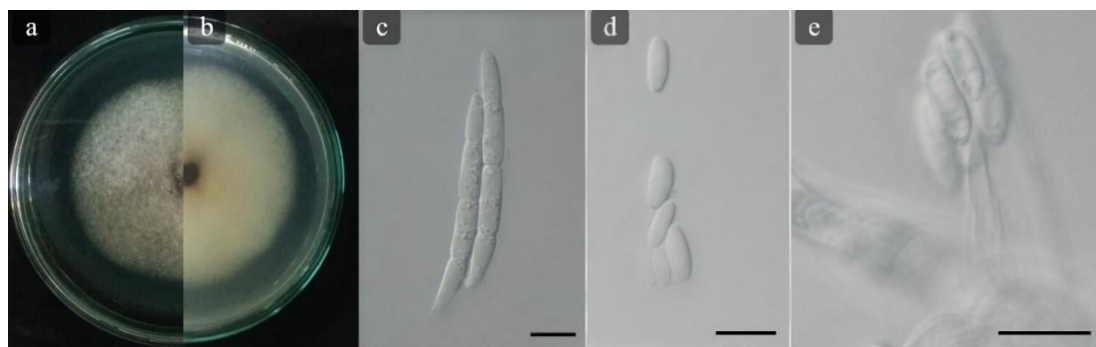
شکل ۶. *Fusarium redolens*. a-b. سطح رویی و پشتی پرگنه هفت روزه روی محیط کشت PDA؛ c. مونوفیالید کوتاه به همراه توده لزج؛ d. ماکروکنیدیوم؛ e. میکروکنیدیوم‌ها. مقیاس = ۱۰ میکرومتر.

Figure 6. *Fusarium redolens*. a-b. The surface and reverse of colony on PDA after seven days; c. Short monophialide bearing false head; d. Macroconidium; e. Microconidia (Bars = 10 μ m).

تخم‌مرغی شکل، بدون جداره و به شکل توده‌های لزج روی مونوفیالیدهای کوتاه دیده شدند (شکل ۷). کلامیدوسپورها پس از دو هفته به صورت منفرد و یا خوشه‌ای تولید شدند. تشخیص این گونه علاوه بر ویژگی‌های ریخت‌شناختی، با آغازگر اختصاصی هم تایید شد (شکل ۳). این گونه قبلاً از *F. excelsior* در دنیا گزارش شده است (Chen 2012; Udayanga et al. 2014)، ولی گزارش آن از *F. rotundifolia* برای دنیا جدید می‌باشد. همچنین گزارش این گونه از روی هر دو گونه زبان گنجشک برای ایران جدید می‌باشد.

Fusarium oxysporum Schltdl., Flora Berolinensis, Pars secunda: Cryptogamia: 139 (1824)

پرگنه‌ها پس از رشد روی محیط کشت PDA، میسلیم‌های هوایی و پنبه‌ای شکل به رنگ سفید مایل به صورتی تولید کردند. سطح پشتی پرگنه نیز سفید تا کرم دیده می‌شد. قطر پرگنه پس از گذشت هفت روز به هفت سانتی‌متر رسید. ماکروکنیدیوم‌ها دارای سه بند و نسبتاً باریک بودند. طول آن‌ها متوسط تا بلند و یاخته انتهای نوک‌تیز و یاخته پایه پاشنه‌ای شکل داشتند. اندازه ماکروکنیدیوم‌ها ۲-۴ × ۱۸-۵۰ میکرومتر بود. میکروکنیدیوم‌ها



شکل ۷. *Fusarium oxysporum*. a-b. سطح رویی و پشتی پرگنه هفت روزه روی محیط کشت PDA؛ c. میکروکنیدیوم‌ها؛ d. میکروکنیدیوم‌ها؛ e. مونوفیالید کوتاه به همراه توده لزج. مقیاس c-d = ۲۰ میکرومتر، مقیاس e = ۱۰ میکرومتر.

Figure 7. *Fusarium oxysporum*. a-b. The surface and reverse of colony on PDA after seven days; c. Macroconidia; d. Microconidia; e. Short monophialide bearing false head (Bars c-d= 20 μ m, e= 10 μ m).

باریک، ۳-۵ بندی با یاخته انتهایی طویل و باریک و یاخته پایه پاشنه‌ای شکل بودند. میکروکنیدیوم‌ها تشکیل نشدند. کلامیدوسپورها به فراوانی و طی دو هفته به صورت زنجیره یا خوشه‌ای تشکیل شدند (شکل ۸). تشخیص ریخت‌شناختی این گونه با آغازگر اختصاصی هم تایید شد (شکل ۳). گزارش *F. acuminatum* از روی دو گونه زبان گنجشک (*F. excelsior* و *F. rotundifolia*) برای ایران و دنیا جدید می‌باشد.

Fusarium acuminatum Ellis & Everth., Proceeding of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia 47:441 (1895)

پرگنه‌ها روی محیط کشت PDA سفید تا کرم‌رنگ بودند. قطر آن پس از گذشت یک هفته به هشت سانتی‌متر رسید. پس از مدتی، اسپورودوکیوم‌های نارنجی مایل به زرد در مرکز کشت توسعه یافتند. سطح پشتی پرگنه نیز به رنگ کرم مایل به زرد روشن دیده می‌شد. میکروکنیدیوم‌ها به تعداد فراوان، انحنادار،



شکل ۸. *Fusarium acuminatum*. a-b. سطح رویی و پشتی پرگنه هفت روزه روی محیط کشت PDA؛ c. میکروکنیدیوم؛ d. کلامیدوسپور؛ e-f. میکروکنیدیوم‌های تشکیل شده روی پلی‌فیالیدها. مقیاس = ۱۰ میکرومتر.

Figure 8. *Fusarium acuminatum*. a-b. The surface and reverse of colony on PDA after seven days; c. Macroconidia; d. Chlamydospores; e-f. Macroconidia formed on polyphialides (Bars = 10 μ m).

انحنادار، کشیده و شلاقی شکل و یاخته پایه پاشنه‌ای شکل بود. در این گونه، میکروکنیدیوم تشکیل نشد، کلامیدوسپورها نیز به فراوانی به صورت دوتایی، زنجیره‌ای یا خوشه‌ای تشکیل شدند (شکل ۹). این گونه علاوه بر ویژگی‌های ریخت‌شناختی، با آغازگر اختصاصی نیز مورد تایید قرار گرفت (شکل ۳). گزارش این گونه از روی زبان گنجشک (*F. excelsior*) برای ایران و دنیا جدید می‌باشد.

Fusarium equiseti (Corda) Sacc., Sylloge Fungorum 4: 707 (1886)

پرگنه‌ها روی محیط کشت PDA، میسلیم‌های پنبه‌ای و سفید رنگ با حاشیه مضرّس و به رنگ کرم مایل به گل‌بهی تولید کردند. سطح پشتی پرگنه به رنگ گل‌بهی تا نارنجی دیده می‌شد. قطر پرگنه پس از یک هفته به چهار سانتی‌متر رسید. میکروکنیدیوم‌ها معمولاً پنج بندی، طویل، باریک و دارای انحنای پشتی و شکمی بودند. یاخته انتهایی میکروکنیدیوم‌ها باریک،



شکل ۹. *Fusarium equiseti*. a-b. سطح رویی و پشتی پرگنه هفت روزه روی محیط کشت PDA؛ c-d. ماکروکنیدیوم‌ها؛ e. کلامیدوسپورها. مقیاس = ۱۰ میکرومتر.

Figure 9. *Fusarium equiseti*. a-b. The surface and reverse of colony on PDA after seven days; c-d. Macroconidia; e. Chlamydospores (Bars = 10 µm).

میکروکنیدیوم‌ها بلند، تخم‌مرغی شکل، بدون بند یا با یک بند و مزوکنیدیوم‌ها دوکی شکل و سه بندی بودند. یاخته کنیدیوم‌زا، مونوفیالید یا پلی‌فیالید با فیالیدهای دندان‌های مشخص (انگشت شکل) بود. این دهانه کنیدیوم‌زای شبه دندان‌های، منحصر به این گونه است. کلامیدوسپورها حضور نداشتند یا به صورت محدود بین ریشه‌ای تولید شدند (شکل ۱۰). این گونه برای اولین بار از *F. excelsior* در ایران و دنیا گزارش می‌شود. همچنین گزارش این گونه برای میکوبیوتای ایران جدید است.

Fusarium denticulatum Nirenberg & O'Donnell, Mycologia 90: 445 (1998)

پرگنه در محیط کشت PDA سفید تا کرم رنگ و دارای میسلیم هوایی بود. سطح پشتی پرگنه، سفید مایل به زرد با مرکز تیره‌تر دیده می‌شد. قطر پرگنه پس از گذشت یک هفته به نه سانتی‌متر می‌رسید. ماکروکنیدیوم‌ها معمولا صاف، نسبتا لاغر و کشیده، با ۳-۵ بند (اغلب پنج بندی)، دارای سلول انتهایی منقاری شکل و سلول پایه پاشنه‌ای شکل و سطح شکمی تقریبا خمیده بودند. اندازه ماکروکنیدیوم‌ها $3-5 \times 9-21$ میکرومتر بود.



شکل ۱۰. *Fusarium denticulatum*. a-b. سطح رویی و پشتی پرگنه هفت روزه روی محیط کشت PDA؛ c. ماکروکنیدیوم؛ d. فیالید دندان‌دار؛ e. میکروکنیدیوم؛ f. کلامیدوسپورها؛ g. یاخته کنیدیوم‌زای پلی‌فیالید. مقیاس = ۱۰ میکرومتر.

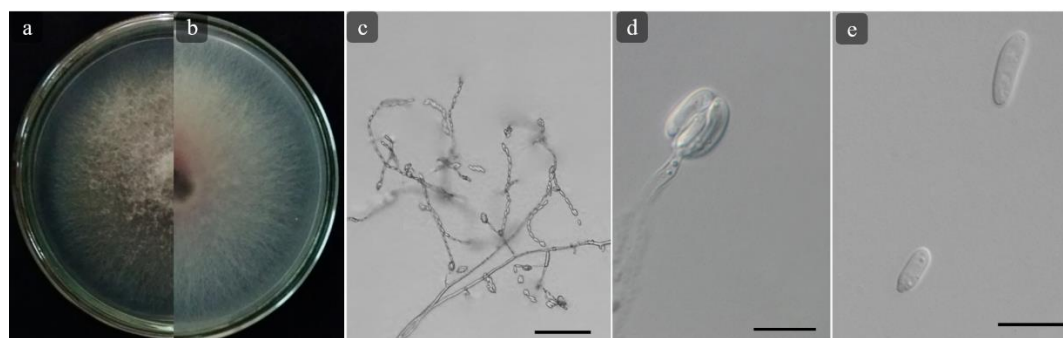
Figure 10. *Fusarium denticulatum*. a-b. The surface and reverse of colony on PDA after seven days; c. Macroconidia, d. Denticulate phialide; e. A Microconidium; f. Chlamydospores; g. Polyphialidic conidiogenous cell (Bars = 10 µm).

تولید می‌کرد و به تدریج، با تولید رنگدانه، رنگ پرگنه بنفش می‌شد که تقریبا در عرض یک هفته یک تشک پتری نه سانتی-متری را پر می‌کرد. سطح پشتی پرگنه سفید تا صورتی دیده

Fusarium verticillioides (Sacc.) Nirenberg, Mitteilungen der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft 169: 26 (1976)

پرگنه روی محیط کشت PDA، در ابتدا میسلیم سفید رنگ

شکل، با قاعده پهن و فاقد بند و صورت زنجیره‌های طویل تشکیل شدند. اندازه میکروکنیدیوم‌ها $3-13 \times 2-3$ میکرومتر بود، کلامیدوسپورها تولید نشدند (شکل ۱۱). گزارش این گونه از *F. excelsior* برای ایران و دنیا جدید می‌باشد.



شکل ۱۱. *Fusarium verticillioides*. a-b. سطح رویی و پشتی پرگنه هفت روزه روی محیط کشت PDA؛ c. زنجیره‌های میکروکنیدیومی؛ d. توده لزج؛ e. میکروکنیدیوم‌ها. مقیاس c= ۵۰ میکرومتر، d-e= ۱۰ میکرومتر.

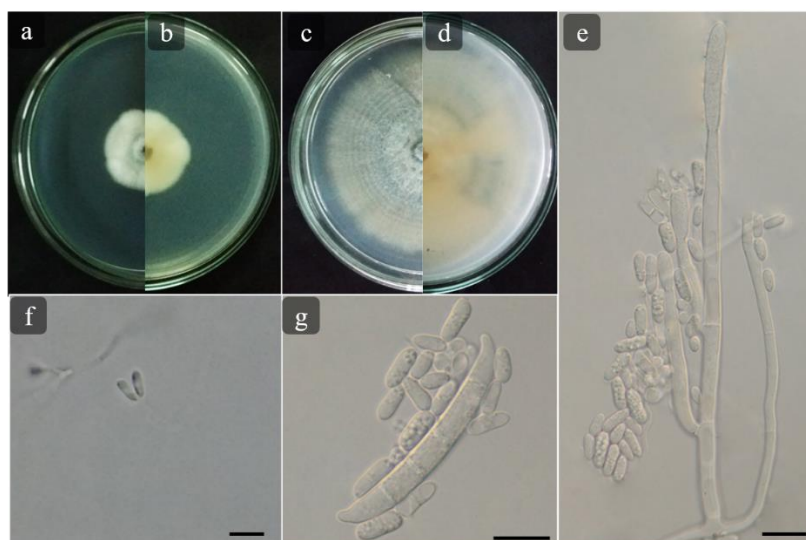
Figure 11. *Fusarium verticillioides*. a-b. The surface and reverse of colony on PDA after seven days; c. Microconidial chains; d. False head; e. Microconidia (Bars c= 50 μ m, d-e= 10 μ m).

پرگنه‌ها روی محیط کشت PDA، سفید مایل به زرد تا قهوه‌ای زرد و از سطح پشتی قهوه‌ای مایل به زرد تیره بودند. قطر آن‌ها پس از هفت روز روی این محیط کشت، شش سانتی‌متر و روی محیط کشت MEA، پنج سانتی‌متر بود. پیکنیدیوم‌ها استرومایی، فرو رفته در بافت میزبان، گرد تا تخم‌مرغی شکل، خاکستری‌رنگ، ۵۰۰-۸۰۰ میکرومتر و دارای حجره چندخانه‌ای بزرگ بودند. حجره‌های چندخانه‌ای با پیچ‌خوردگی‌هایی به خانه‌های کوچک تقسیم می‌شدند. خانه‌ها نامنظم و دارای دهانه‌های مجزا به رنگ خاکستری و به شکل نیم‌کره بودند. کنیدیوفورها بی‌رنگ، دارای بند و فاقد آن، غیر منشعب و یا در برخی موارد در پایه منشعب بودند. سلول‌های کنیدیوم‌ها از نوع انتروپلاستیک و شامل فیالیدی با گردن کوتاه بودند که به یک نوک باریک منتهی می‌شد و اندازه آن‌ها $7-9 \times 0.8-1.5$ میکرومتر بود (Sutton 1980). کنیدیوم‌ها بی‌رنگ، تک سلولی، سوسپسی شکل و کشیده و به اندازه $3/5-4/5 \times 1$ میکرومتر بودند (شکل ۱۳). گونه *C. chrysosperma* از روی *F. excelsior* در ایران گزارش شده است (Fotouhifar et al. 2010)، اما گزارش آن از روی *F. rotundifolia* برای ایران و دنیا جدید است.

Fusarium subglutinans (Wollenw. & Reinking) P.E. Nelson, Toussoun & Marasas, 135 (1983)

پرگنه قارچ در محیط کشت PDA، میسلیم‌های پنبه‌ای سفید رنگ تولید کردند که پس از یک هفته فقط دو سانتی‌متر از تشتک پتری را پر کرده بودند. سطح پشتی پرگنه در مراحل اولیه رشد سفید بود که با افزایش سن به سفید تا بنفش تبدیل شد. اسکروت‌های آبی-سیاه و اسپورودوکیوم‌های کرم‌رنگ نیز در سطح پرگنه تولید شدند. میکروکنیدیوم‌ها که در محیط کشت SNA به ندرت تشکیل شدند، نسبتاً باریک، تا حدی هلالی شکل، معمولاً سه بندی با یاخته انتهایی انحادار و یاخته پایه به صورت ضعیف توسعه یافته بودند. میکروکنیدیوم‌ها تخم‌مرغی شکل، دوکی شکل و معمولاً بدون بند بودند. میکروکنیدیوم‌ها به فراوانی در توده‌های لزج از مونو- و پلی‌فیالیدها تولید شدند و روی برخی از فیالیدها به حالت دوتایی و گوش خرگوشی دیده می‌شدند. اندازه میکروکنیدیوم‌ها $3 \times 6-10$ میکرومتر و میکروکنیدیوم‌ها 5×45 میکرومتر بود و کلامیدوسپورها حضور نداشتند (شکل ۱۲). این گونه از روی زبان گنجشک تاکنون گزارش نشده و گزارش آن از *F. rotundifolia* برای ایران و دنیا جدید می‌باشد.

Cytospora chrysosperma (Pers.) Fr., Systema Mycologicum 2: 542 (1823)



شکل ۱۲. *Fusarium subglutinans*. a-b. سطح رویی و پشتی پرگنه هفت روزه روی محیط کشت PDA؛ c-d. سطح رویی و پشتی پرگنه ۲۵ روزه قارچ روی محیط کشت PDA؛ e. فیالیدهای منشعب و میکروکنیدیوم‌ها؛ f. میکروکنیدیوم‌های گوش خرگوشی؛ g. ماکروکنیدیوم و میکروکنیدیوم‌ها. مقیاس = ۱۰ میکرومتر.

Figure 12. *Fusarium subglutinans*. a-b. The surface and reverse of colony on PDA after seven days; c-d. The surface and reverse of colony on PDA after 25 days; e. Branched phialides and microconidia; f. "Rabbit ear" microconidia; g. Macroconidium and microconidia (Bars = 10 μ m).



شکل ۱۳. *Cytospora chrysosperma*. a-b. سطح رویی و پشتی پرگنه بیست روزه روی محیط کشت MEA؛ c-d. سطح رویی و پشتی پرگنه هفت روزه قارچ روی محیط کشت PDA؛ e. پیکنیدیوم‌ها روی بافت میزبان (*F. excelsior*)؛ f. پیکنیدیوم‌ها در سطح محیط کشت PDA؛ g. پیکنیدیوم؛ h. پیکنیدیوم چند حجره‌ای؛ i. کنیدیوفورها؛ j. کنیدیوسپورها. مقیاس f-h = ۱۰۰ میکرومتر؛ i-j = ۱۰ میکرومتر.

Figure 13. *Cytospora chrysosperma*. a-b. The surface and reverse of colony on MEA after 20 days; c-d. The surface and reverse of colony on PDA after seven days; e. Pycnidia on host (*F. excelsior*) tissue; f. Pycnidia formed on PDA medium; g. Pycnidium; h. Multilocular pycnidium; i. Conidiophores; j. Pycnidiospores (Bars f-g= 100 μ m, i-j= 10 μ m).

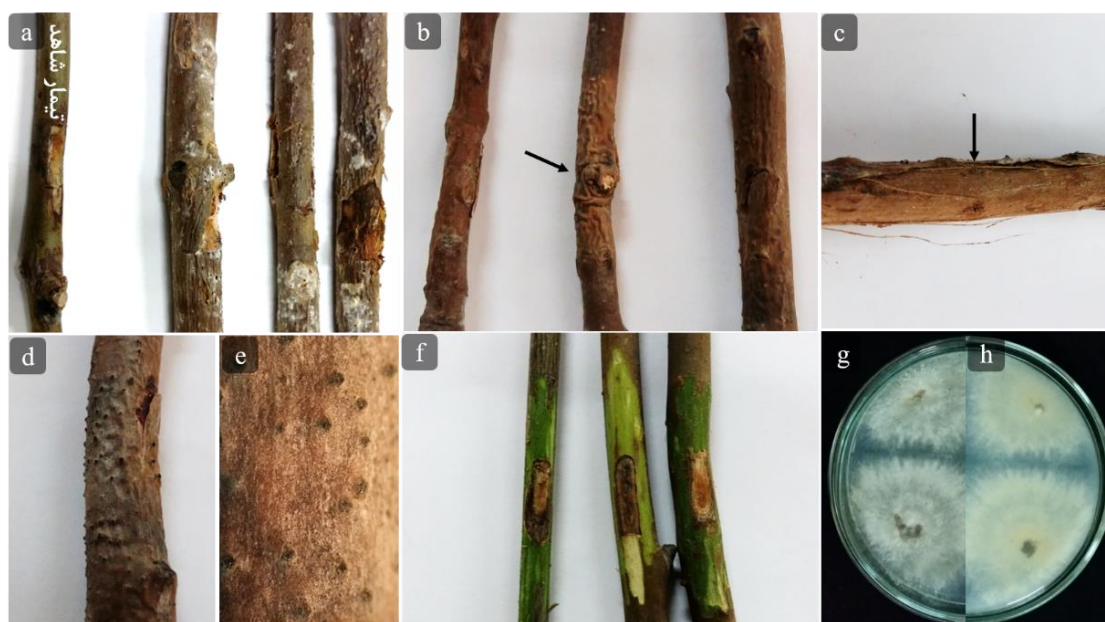
پوست شاخه‌های تیمار شده و ایجاد پیکنیدیوم روی سطح شاخه‌های بریده زبان گنجشک شد (شکل ۱۴). گونه‌های *F. equiseti* و *F. cerealis* علایمی روی شاخه بریده ایجاد نکردند. علایمی نظیر آنچه که توسط *C. chrysosperma* روی شاخه‌های بریده زبان گنجشک ایجاد شده بود، روی نهال‌های دو ساله زبان گنجشک نیز در شرایط گلخانه پس از سه ماه (شکل

آزمون بیماری زایی

نتایج آزمون بیماری زایی برای سه گونه غالب در این پژوهش (*C. chrysosperma* و *F. oxysporum*، *N. solani*) در روش شاخه بریده با ایجاد تغییر رنگ بافت چوب در محل مایه‌زنی و پیشروی نکروز در دو جهت محل تلقیح قارچ همراه بود. همچنین گونه *C. chrysosperma* باعث قهوه‌ای شدن و چروکیده شدن

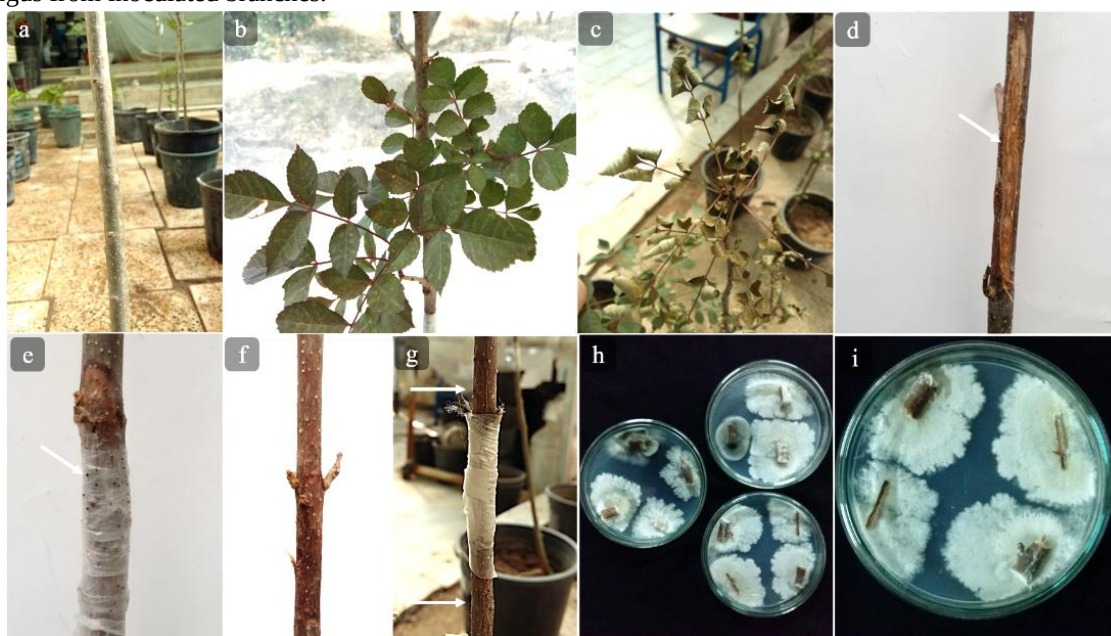
عنوان شاهد با بلوک PDA فاقد قارچ تیمار شده بودند، مشاهده نشد.

۱۵ دیده شد، به طوری که شاخه‌های نهال‌های تیمار شده خشکیده و پوشیده از پیکنیدیوم بودند. لازم به ذکر است در هر دو روش، هیچ نوع علائم و تغییری در تکرارهای شاهد که به



شکل ۱۴. آزمون بیماری‌زایی *Cytospora chrysosperma* روی شاخه‌های بریده شده درخت زبان گنجشک (*Fraxinus excelsior*). a-c. بروز علائم در سه تکرار تیمار تلقیح شده، d-e. تشکیل پیکنیدیوم‌ها روی شاخه‌ها، f. تیمار شاهد، g-h. جداسازی مجدد قارچ مایه‌زنی شده از شاخه‌های تلقیح شده.

Figure 14. Pathogenicity test of *Cytospora chrysosperma* using the excised shoot method. a-c. Incidence of symptoms in three inoculated treatment replications, d-e. Formation of pycnidia on the branches, f. The control sample, g-h. Recovery of fungus from inoculated branches.



شکل ۱۵. آزمون بیماری‌زایی *Cytospora chrysosperma* روی نهال‌های دوساله زبان گنجشک (*Fraxinus excelsior*). a-b. شاهد، c. خشکیده شدن برگ‌های نهال تلقیح شده در قسمت بالای محل مایه‌زنی، d. تغییر رنگ بافت چوب در نهال تلقیح شده، e-g. تشکیل پیکنیدیوم‌ها در محل مایه‌زنی، h-i. بازیابی مجدد قارچ از شاخه‌های تلقیح شده.

Figure 15. Pathogenicity test for *Cytospora chrysosperma* on the two years ash saplings. a-b. The control sample, c. Drying of leaves of inoculated seedlings in the upper part of the inoculation site, d. Discoloration of wood texture in the inoculated seedlings, e-g. Formation of pycnidia at the inoculation site, h-i. Recovery of fungus from inoculated branches.

بحث

به دنبال نمونه برداری از درختان زبان گنجشک دارای علائم زوال و خشکیدگی در مناطق مختلف فضای سبز اردبیل و نمین و جداسازی قارچ‌های همراه با این علائم از ریشه، تنه و شاخه درختان، بر اساس مطالعات ریخت‌شناختی، ۳۱ گونه متعلق به ۱۶ جنس شناسایی شدند. شناسایی دو گونه *N. solani* و *F. redolens* با توالی‌یابی نوکلئوتیدی و گونه‌های *F. acuminatum*، *F. equiseti*، *F. oxysporum* و *N. solani* با آغازگرهای اختصاصی گونه تایید شد. تاکنون پژوهش‌های متعددی برای تایید گونه‌های مختلف قارچی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی انجام شده است. گونه‌های جنس *Fusarium* شامل *F. culmorum* (Wm.G. Sm.)، *F. avenaceum* (Fr.) Sacc.، *F. subglutinans*، *F. crookwellens*، Sacc.، *F. proliferatum* (Matsush.) Nirenberg ex *F. redolens* Gerlach & Nirenberg و *F. solani* که از پیاز جداسازی شده بودند، توسط (Jahedi et al. 2018) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی شناسایی مولکولی شدند. در پژوهشی دیگر در کانادا، شناسایی گونه‌های مختلف جنس *Fusarium* که از گندم، جو، ذرت و چاودار جداسازی شده بودند، با آغازگرهای اختصاصی تایید شد (Demeke et al. 2005).

در این پژوهش، جنس‌های قارچی *Fusarium* (شامل *Neocosmospora*) و *Cytospora*، دو جنس غالب و *N. solani*، *C. chrysosperma* و *F. oxysporum* به عنوان سه گونه غالب شناسایی شدند. در حال حاضر، *Neocosmospora solani* species complex، *Fusarium*= *Neocosmospora solani* species complex، (NSSC= FSSC) به عنوان یک گونه مرکب در نظر گرفته می‌شود و حداقل دارای ۶۰ گونه مجزای فیلوژنتیکی می‌باشد. گونه‌های مرکب *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC) و *F. oxysporum* (FOSC) نیز به ترتیب شامل بیش از ۳۰ و ۲۱ گونه فیلوژنتیکی هستند.

گونه *N. solani* به عنوان عامل زوال درختان جنگلی و بادام در ایران (Negahdar saber et al. 2003; Dizaji et al. 2006)، درختان سیب و هلو در تایوان و تونس (Adesemoye et al. 2012; Mannai et al. 2018)، درختان *Erythrina variegata* (فردوسی هندی) در جزایر جنوبی ژاپن گزارش شده است (Kuroda et al. 2017). در سال ۲۰۲۰ طی بررسی قارچ‌های عامل پوسیدگی ریشه در زبان گنجشک (*F. angustifolia*) در کشور کرواسی، گونه *N. solani* به عنوان یکی از قارچ‌های عامل

سرخشکیدگی معرفی شد (Orlović et al. 2020). در این پژوهش، گزارش گونه *N. solani* از روی هر دو گونه زبان گنجشک برای ایران جدید می‌باشد. این گونه قبلاً از درختان زبان گنجشک (*F. excelsior*) در دنیا گزارش شده است (Kowalski et al. 2016; Orlikowski et al. 2011; Przybył 2002)، اما گزارش آن از روی گونه *F. rotundifolia* برای دنیا جدید می‌باشد. همچنین گونه *F. oxysporum* نیز به عنوان عامل اصلی پژمردگی آوندی در درختان موز در استرالیا (Pegg et al. 2019)، پژمردگی گیاه جوجوبا در فلسطین اشغالی (Maymon et al. 2021)، زوال درختان هلو در تونس (Mannai et al. 2018) و زوال درختان زبان گنجشک اروپایی در نیوزلند گزارش شده است (Udayanga et al. 2014). در پژوهشی، (2017) Hasanpour et al. گونه‌های *N. solani*، *Fusarium* spp. و *Cytospora pruinosa* (Fr.) Sacc. را از درختان زبان گنجشک با نشانه‌های سرخشکیدگی در شهرستان‌های واقع در مناطق شمالی استان آذربایجان شرقی جداسازی کردند. گزارش گونه *F. oxysporum* از روی هر دو گونه زبان گنجشک برای ایران جدید می‌باشد. این گونه قبلاً از *F. excelsior* در دنیا گزارش شده است (Chen 2012; Udayanga et al. 2014)، اما گزارش آن از *F. rotundifolia* برای دنیا جدید می‌باشد.

گونه *C. chrysosperma* تنها گونه جداسازی شده متعلق به جنس *Cytospora* در این پژوهش بود. این گونه تاکنون به عنوان عامل شانکر درختان تبریزی در فلسطین اشغالی (Madar et al. 2004)، درختان گردو در ایران (Abbasi et al. 2012) و چین (Fan et al. 2015)، درختان میوه هسته‌دار در آذربایجان شرقی و غربی (Dokhanchi et al. 2013)، درختان بادام در آذربایجان شرقی (Baradaran Bagheri et al. 2014) و درختان نارون در تبریز (Ahmadi & Arzanlou 2019) گزارش شده است. گونه *C. chrysosperma* از روی *F. excelsior* در ایران (Fotouhifar et al. 2010) گزارش شده است، اما تاکنون گزارشی از این گونه روی *F. rotundifolia* ثبت نشده است. بنابراین این مطالعه، اولین گزارش از گونه *C. chrysosperma* روی *F. rotundifolia* می‌باشد.

همچنین در این پژوهش، گزارش گونه‌های *Chaetomium*، *Nigrospora oryzae* و *F. acuminatum megalocarpum* روی هر دو گونه زبان گنجشک (*F. excelsior* و *F. rotundifolia*) برای ایران و دنیا جدید می‌باشد. گزارش *F. cerealis*، *F. acutatum*، *Clonostachys rosea* و *F. verticillioides*، *F. reolens*، *F. equiseti*، *denticulatum*

قارچ‌های همراه با سرخشکیدگی و زوال درختان فضای سبز راه را برای تکمیل تحقیقات از جمله اتخاذ روش‌های مدیریت این بیماری‌ها هموار می‌سازد.

سپاسگزاری

نگارندگان مراتب سپاس خود را به آقایان دکتر مهدی ارزنلو، دکتر ابوالفضل نرمانی و مهندس حسین هاتف به دلیل همکاری در تهیه برخی تصاویر میکروسکوپی و تهیه برخی داده‌های مورد استفاده در این پژوهش ابراز می‌دارند.

References

- Abbasi Kh, Abbasi S, Fotouhifar KB, 2012. Identification of *Cytospora* species identified from walnut trees in Iran. *Plant Protection* 35(3): 59–69 (In Persian with English abstract).
- Adesemoye A, Ben Faber AE, Bender G, O'Donnell N, Kallsen C, Shea T, 2012. Current knowledge on *Fusarium* dry rot of citrus. *Citrograph* 2(7): 29–33.
- Afshari N, Hemmati R, 2017. First report of the occurrence and pathogenicity of *Clonostachys rosea* on faba bean. *Australasian Plant Pathology* 46: 231–234.
- Ahmadi N, Arzanlou M, 2019. Identification of fungal species associated with dieback and canker disease of elm trees in Tabriz Metropolis. *Journal of Applied Research in Plant Protection* 8(3): 25–51 (In Persian with English abstract).
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ, 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403–410.
- Arif M, Chawla S, Zaidi N, Rayar J, Variar M, et al. 2012. Development of specific primers for genus *Fusarium* and *F. solani* using rDNA sub-unit and transcription elongation factor (*tef-1α*) gene. *African Journal of Biotechnology* 11: 444–447.
- Arzanlou M, Narmani A, 2014. Multiplex PCR for specific identification and determination of mating type in *Togninia minima* (anamorph *Phaeoacremonium aleophilum*), a causal agent of esca disease of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea* 53: 240–249.
- Baradaran Bagheri M, Arzanlou M, Babai-Ahari AA, 2014. Identification of the fungal agents associated with almond trunk diseases in East Azerbaijan province. *Journal of Applied Research in Plant Protection* 4(1): 13–27 (In Persian with English abstract).
- Booth C, 1971. The Genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, UK 237 pp.
- Braubach M, Egorov A, Mudu P, Wolf T, Thompson CW, et al. 2017. Effect of urban green space on environmental health, equity and resilience. *Nature-Based Solutions to Climate Change Adaptation in Urban Areas* 11: 187–205.
- Chen J, 2012. Fungal community survey of *Fraxinus excelsior* in New Zealand. *Biology and Application Forestry Science, Forest as Natural Resource – Master Programme (Uppsala)*, 33 pp.
- Çiçek E, Yilmaz M, 2002. The importance of *Fraxinus angustifolia* subsp. *oxycarpa* as a fast-growing tree for Turkey. *Management of Fast-Growing Plantation, Izmit, Turkey* 192–200.
- Cole GT, 1973. Taxonomic Studies of *Phialophora*. *Mycological Society of America* 65 (3): 661–688.
- Crous PW, Lombard L, Sandoval-Denis M, et al. 2021. *Fusarium*: more than a node or a foot-shaped basal cell. *Studies in Mycology* 98: 100116.
- Haque A, Galea V, Goulted K, Klinken RDV, 2013. Botryosphaeriaceae fungi as a potential mycoherbicide for prickly acacia. *Plant Pathogen Interactions Session 7B*, 91.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada, D, 2012. jModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9: 772.
- Davari M, Babaye-Ahari A, Arzanlou M, Zare R, Van Diepeningen AD, et al. 2013a. Morphological and molecular characterization of three new *Fusarium* species associated with inflorescence of wild grasses for Iran Plants. *Rostaniha* 2(14): 124–134 (In Persian with English abstract).

- Davari M, Wei S, Babay-Ahari A, Arzanlou M, Waalwijk C, *et al.* 2013b. Geographic differences in trichothecene chemotypes of *Fusarium graminearum* in the Northwest and North of Iran. *World Mycotoxin Journal* 6: 137–150.
- Davari M, Alihosseinzadeh-Moghaddam F, Narmani A, 2020. Characterization of fungal agents associated with black locust dieback and decline in Ardabil city. *Journal of Applied Research in Plant Protection* 9 (3): 47–57.
- Demeke T, Clear RM, Patrick SK, Gaba D, 2005. Species-specific PCR-based assays for the detection of *Fusarium* species and a comparison with the whole seed agar plate method and trichothecene analysis. *Food Microbiology* 103: 271–284.
- Dizaji A, Zaker M, Ismailzadeh SA, Heidarian A, Ershad J, 2006. Fungal agents associated with root and crown rot of almond trees decline in East Azarbaijan, Semnan, Yazd and Chaharmahal-Va-Bakhtiari provinces. *Agricultural Research on Water, Soil and Plants in Agriculture* 6(1): 1–14 (In Persian with English abstract).
- Dokhanchi H, Arzanlou M, Babai-Ahari AA, 2013. Identification of the fungal species associated with trunk diseases of stone fruit trees in East and West Azerbaijan provinces. *Journal of Applied Research in Plant Protection* 2(2): 29–45 (In Persian with English abstract).
- Doohan M, Parry DW, Jenkinson P, Nicholson P, 1998. The use of species -specific PCR based assays to analyze earblight of wheat. *Plant Pathology* 47: 197–205.
- Drenkhan R, Adamson K, Hanso M, 2015. *Fraxinus sogdiana*, a Central Asian ash species, is susceptible to *Hymenoscyphus fraxineus*. *Plant Protection Science* 51 (3): 150–152.
- Fan X, Hyde KD, Liu M, Liyang Y, 2015. *Cytospora* species associated with walnut canker disease in China, with description of a new species *C. gigalocus*. *Fungal Biology* 119(5): 310–319.
- Fotouhifar KB, Hejaroud GA, Leuchtmann A, 2010. ITS rDNA phylogeny of Iranian strains of *Cytospora* and associated teleomorphs. *Mycologia* 102(6): 1369–1382.
- Geiser DM, Jiménez-Gasc M, Kang S, Makalowska I, Veeraraghavan N, *et al.* 2004. FUSARIUM-ID v.1.0: a DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology* 110: 473–479.
- Gerlach W, Nirenberg HI, 1982. The Genus *Fusarium* - A pictorialatales. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt fur Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem 209: 1–406.
- Griffith GS, Boddy L, 1988. Fungal communities in attached ash (*Fraxinus excelsior*) twigs. *Transactions of the British Mycological Society* 91(4): 599–606.
- Han JG, Bhushan S, Hosoya T, Lee KH, Sung GH, Shin HD, 2014. First report of the ash dieback pathogen *Hymenoscyphus fraxineus* in Korea. *Mycobiology* 42: 391–396.
- Hasanpour NA, Arzanlou M, Gams W, 2017. Identification of the fungal species associated with dieback and decline disease of ash trees in the Northern parts of East Azarbaijan province. Master Thesis, University of Tabriz, 133 pp.
- Ivanova H, Pristas P, Ondruskova E, 2016. Comparison of two *Coniochaeta* species (*C. ligniaria* and *C. malacotricha*) with a new pathogen of black pine needles – *Sordaria macrospora*. *Plant Protection Science* 52(1): 18–25.
- Jahedi A, Mohammadi Gol Tapeh A, Safaie N, 2018. The first report of *F. culmorum* and *F. subglutinans* in onion from West and East Azarbaijan provinces. *Plant Protection Science* 49 (1): 1–9 (In Persian with English abstract).
- Kostova I, Iossifova T, 2007. Chemical components of *Fraxinus* species. *Fitoterapia* 78: 85–106.
- Kowalski T, Holdenrieder O, 2009. The teleomorph of *Chalara fraxinea*, the causal agent of ash dieback. *Forest Pathology* 39: 304–308.
- Kowalski T, Bilanski P, Kraj W, 2016. Pathogenicity of fungi associated with ash dieback toward *Fraxinus excelsior*. *Plant Pathology* 66(8): 1228–1238.
- Katoh K, Rozewicki J, Yamada KD. 2019. MAFFT online service: Multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics* 20: 1160–1166.
- Kuroda K, Chuma I, Kihara T, Murakami T, Takashina K, *et al.* 2017. First report of *Fusarium solani* species complex as a causal agent of *Erythrina variegata* decline and death after gall formation by *Quadrastichus erythrinae* on Okinawa Island, Japan.

- Journal of Plant Pathology* 83: 344–357.
- Lazzizzera C, Frisullo S, Alves A, Lopes J, Phillips AJL, 2008. Phylogeny and morphology of *Diplodia* species on olives in Southern Italy and description of *Diplodia olivarum* sp. nov. *Fungal Diversity* 31: 63–71.
- Leslie JF, Summerell BA, 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing Asia, USA. 399 pp.
- Madar Z, Solel Z, Kimchi M, 2004. First report of *Cytospora* canker caused by *Cytospora chrysosperma* on white poplar in Israel. *Plant Disease* 88(2): 220.
- Mannai S, Benfradj N, Horrigue-Raouani N, Boughalleb-M'Hamdi N, 2018. Prevalence of *Fusarium* species associated with peach decline in Tunisian nurseries. *Microbiology Research Journal International* 23(4): 1–16.
- Maymon M, Sharma G, Hazanovsky M, Erlich O, Pessach Sh, et al. 2021. Characterization of *Fusarium* population associated with wilt of jojoba in Israel. *Plant Pathology* 70(4): 793–803.
- McKinney LV, Nielsena, LR, Collinge DB, Thomsen IM, Hansena JK, et al. 2014. The ash dieback crisis: genetic variation in resistance can prove a long-term solution. *Plant Pathology* 63: 485–499.
- Milenković I, Jung T, Stanivuković Z, Karadžić D, 2017. First report of *Hymenoscyphus fraxineus* on *Fraxinus excelsior* in Montenegro. *Forest Pathology* 47(5): 4.
- Mishra PK, Fox RTV, Culham A, 2003. Development of a PCR-based assay for rapid and reliable identification of pathogenic Fusaria. *FEMS Microbiology Letters* 218: 329–332.
- Morgan-Jones G, 1974. Concerning some species of *Microsphaeropsis*. *Canadian Journal of Botany* 52: 2575–2579.
- Mulè G, Susca A, Stea G, Moretti A, 2004. Species detection of the toxigenic species *Fusarium proliferatum* and *F. oxysporum* from asparagus plants using primers based on calmodulin gene sequences. *FEMS Microbiology Letters* 230: 235–240.
- Negahdar saber MR, Mortazavi Jahromi SM, Almansour H, Nejbat M, 2003. Investigation on seedling selection of 29 *Juglans regia* genotypes for further forest plantation trial on degraded forest lands of Kurdistan. *Iranian Forest and Poplar Research* 11(3): 391–408 (In Persian with English abstract).
- Nemesio-Gorriz M, McGuinness B, Grant J, Dowd L, Douglas GC, 2019. Lenticel infection in *Fraxinus excelsior* shoots in the context of ash dieback. *Forest, Biogeosciences and Forestry* 12:160-165.
- Orlikowski LB, Ptaszek M, Rodziejewicz A, Nechwatalm J, Thinggaard K, et al. 2011. Phytophthora root and collar rot of mature *Fraxinus excelsior* in forest stands in Poland and Denmark. *Forest Pathology* 41: 510-519.
- Orlović JK, Moro M, Diminić D, 2020. Role of root and stem base fungi in *Fraxinus angustifolia* (Vahl) dieback in Croatian Floodplain Forests. *Forests* 11 (607): 14 pp.
- Papic S, Burianek V, Longauer R, Kudlacek T, Rozsypalek J, 2018. Phenotypic variability of *Fraxinus excelsior* L. and *Fraxinus angustifolia* Vahl under the ash dieback disease in the Czech Republic. *Forest Science* 64 (6): 279–288.
- Pautasso M, Aas G, Queloz V, Holdenrieder O, 2013. European ash (*Fraxinus excelsior*) dieback – A conservation biology challenge. *Biological Conservation* 158: 37–49.
- Pegg KG, Coates LM, O'Neill WT, Turner DW, 2019. The Epidemiology of *Fusarium* wilt of banana. *Frontiers in Plant Science* 10: 1395.
- Przybył K, 2002. Mycobiota of thin roots showing decay of *Fraxinus excelsior* L. young trees. *Dendrobiology* 48: 65–69.
- Rahmani A, Nazari VA, 2016. Your role in improving the quality assessment of urban green urban living (Case study: Takestan city). *Social Research Quarterly* 8(30): 87–105 (In Persian with English abstract).
- Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP, 2012. Mrbayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61: 539–542.
- Sandoval-Denis M, Gené G, Sutton DA, Cano-Lira JF, De Hoog GS, et al. 2016. Redefining *Microascus*, *Scopulariopsis* and allied genera. *Persoonia* 36: 1–36.

- Seifert KA, Morgan-Jones G, Gams W, Kendrick, B, 2011. The genera of hyphomycetes. Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre. 997 pp.
- Simmons EG 2007. *Alternaria* an identification manual. CBS fungal Biodiversity center, 775 pp.
- Summerell BA, Salleh B, Leslie JF, 2003. A utilitarian approach to *Fusarium* identification. *Plant Disease* 87(2): 117–118.
- Sutton BC, 1980. The Coelomycetes, fungi imperfecti with pycnidia and acervuli and stromata. Commonwealth Mycological Institute under the authority of the Executive Council, Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, Slough England 696 pp.
- Udayanga D, Castlebury LA, Rossman AY, Chukeatirote E, Hyde KV, 2014. Insights into the genus *Diaporthe*: phylogenetic species delimitation in the *D. eres* species complex. *Fungal Diversity* 67: 203–229.
- Wang XW, Lombard L, Groenewald JZ, Li J, Videira SIR, et al. 2016. Phylogenetic reassessment of the *Chaetomium globosum* species complex. *Persoonia* 36: 83–133.
- Wang M, Liu F, Crous PW, Cai L, 2017. Phylogenetic reassessment of *Nigrospora*: Ubiquitous endophytes, plant and human pathogens. *Persoonia* 39: 118–142.
- Woudenberg JHC, Meijer M, Houbraken J, Samson RA, 2017. *Scopulariopsis* and *scopulariopsis*-like species from indoor environments. *Studies in Mycology* 88: 1–35.



This is an open access article under the CC BY NC license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/>)