

شناسایی قارچ‌های مرتبط با بیماری شانکر و سرخشکیدگی درختان نارون در کلان‌شهر تبریز

نرگس احمدی و مهدی ارزنلو*

به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی و استاد، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.

*مسئول مکاتبه: arzanlou@tabrizu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۲/۷ تاریخ پذیرش: ۹۸/۶/۲۳

چکیده

نارون (*Ulmus spp.*) از جمله مهمترین درختان زینتی در طراحی فضای سبز شهرها به شمار می‌رود. بیماری سرخشکیدگی و شانکر نارون طی سال‌های اخیر در فضای سبز تبریز و سایر شهرهای استان به طور گسترده شیوع پیدا کرده است. در تحقیق حاضر، به منظور شناسایی قارچ‌های همراه با سرخشکیدگی و شانکر درختان نارون در شهر تبریز، طی سال‌های ۱۳۹۴ و ۱۳۹۵ از درختان دارای علائم و سالم نمونه‌برداری انجام گرفت و تعداد ۲۰۸ جدایه‌ی قارچی از ۶۴ نمونه گیاهی، خالص‌سازی شد. شناسایی گونه‌ها بر اساس داده‌های ریخت‌شناختی و داده‌های توالی ناحیه ITS یا TEF (در مورد برخی گونه‌ها)، صورت پذیرفت. در این بررسی، ۱۶ گونه‌ی قارچی شامل *Ophiostoma novo-ulmi*, *Didymella C. chrysosperma*, *Cytospora rhodophila*, *Pestalotiopsis brassicae*, *F. tricinctum*, *F. proliferatum*, *Fusarium solani*, *Coniolaria*, *Seimatosporium*, *lichenicola*, *Clonostachys rosea*, *Ch. rectangulare*, *Chaetomium globosum*, *glomerata*, *Geosmithia sp.* و *Sordaria sp.*، *Pleurostomophora ochracea macrothecia* اصلی سالم و دارای علائم تغییر رنگ آوندی جداسازی گردید. در بین جدایه‌های شناسایی شده، جدایه‌های متعلق به جنس‌های *Fusarium* و *Chaetomium* از بیشترین فراوانی برخوردار بودند. گزارش گونه‌های *Ch. rectangulare*, *Ch. globosum*، *F. proliferatum*، *Ch. rectangulare*، *Ch. globosum*، *Geosmithia sp.*، *C. rhodophila*، *Pl. ochracea*، *Co. macrothecia*، *P. brassicae*، *S. lichenicola*، *D. glomerata* و *Cl. rosea* از روی میزبان نارون برای دنیا جدید می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: نارون، سرخشکیدگی، *Ophiostoma*، *Fusarium*، *Cytospora*، *Pestalotiopsis*.

مقدمه

مقاومت نسبی گونه‌های نارون در برابر تنش‌های محیطی از جمله تحمل به شوری و باد، رشد نسبتاً سریع در هر نوع خاک، چوب با ارزش، تحمل نسبت به جابه‌جایی و فشارهای فیزیکی و فشردگی خاک (Tubby and Webber, 2010)، این درخت در برابر طیف وسیعی از آفات و بیماری‌ها حساس می‌باشد. بیماری‌های شانکر و سرخشکیدگی از جمله بیماری‌های مخرب هستند که طیف گسترده‌ای از درختان و درختچه‌ها از جمله نارون را تحت تاثیر قرار می‌دهند. بیماری مرگ هلندی نارون مهمترین و مخربترین بیماری گونه‌های نارون در اروپا، امریکای شمالی و آسیا می‌باشد (Sinclair and Campana, 1981). علائم ظاهری ایجاد شده به صورت تنک شدن شاخ و برگ، پژمردگی و زرد شدن و در نهایت نکروزه شدن برگ‌ها و زوال عمومی تاج درخت مشاهده می‌شود. عامل این

نارون از جنس *Ulmus*، تیره *Ulmaceae*، راسته *Rosales* و از رده گیاهان دولپه‌ای، برگریز یا نیمه‌برگریز و با طول عمر ۳۰۰-۲۰۰ سال می‌باشد. این جنس اولین بار در دوره‌ی زمین‌شناسی میوسن در حدود ۲۰ میلیون سال پیش، در آسیای مرکزی امروزی ظاهر شد (Parker et al., 2002). نارون با داشتن تقریباً ۴۵ گونه، به طور گسترده در مناطق گرمسیری، نیمه‌گرمسیری و معتدل نیمکره‌ی شمالی توزیع شده است (Richens, 1983). گونه‌های نارون از جمله درختان جنگلی و زینتی با ارزش به شمار می‌آیند که با توجه به کاربردها و سازگاری آن‌ها با محیط آلوده‌ی شهرها، یکی از گونه‌های پرکاربرد در طراحی فضای سبز شهری به شمار می‌روند (Stripes and Campana, 1981). علی‌رغم

Pestalotioid از درختان دارای علایم شانکر و سرخشکیدگی جداسازی شده‌اند که وضعیت بیماری‌زایی آنها روی میزبان‌های درختی مشخص نمی‌باشد و یا به عنوان اندوفیت و یا اندوفیت-بیمارگر مطرح می‌باشند. مطابق پایگاه داده قارچ-میزبان گیاهی وزارت کشاورزی ایالات متحده امریکا (Farr and Rossman, 2019) گروه‌های قارچی متعلق به تیره‌های Botryosphaeriaceae، Diaporthaceae، Valsaceae، Ophiostomataceae، Togniniaceae و بازیومیسیت‌های پوساندهی چوب از گونه‌های نارون گزارش شده‌اند. مطالعات صورت گرفته در مورد بیماری‌های شانکر و سرخشکیدگی نارون در ایران محدود به شناسایی گونه‌های دخیل در بیماری مرگ هلندی نارون بر اساس داده‌های ریخت‌شناختی می‌باشد (Ershad, 2009).

در سال‌های اخیر، بیماری شانکر و سرخشکیدگی درختان نارون در شهرستان تبریز شیوع پیدا کرده و به شدت در حال گسترش در سطح فضای سبز شهری می‌باشد. مطالعه‌ی حاضر در راستای ردیابی و شناسایی قارچ‌های مرتبط با شانکر و سرخشکیدگی نارون در این منطقه می‌باشد. علی‌رغم اهمیت درختان نارون در کلان‌شهر تبریز و مشاهده‌ی تأثیرات بیماری سرخشکیدگی و شانکر در کیفیت فضای سبز، عوامل اصلی دخیل در ایجاد این بیماری در این ناحیه بررسی نشده و ناشناخته باقی مانده‌اند. بنابراین تحقیق هدف حاضر جداسازی و شناسایی عوامل قارچی دخیل در بیماری شانکر و سرخشکیدگی درختان نارون با استفاده از روش‌های ریخت‌شناختی و مولکولی در کلان‌شهر تبریز می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

به منظور نمونه‌برداری از درختان نارون، در سال‌های ۹۴ و ۹۵ از فضای سبز شهرستان تبریز بازدید به عمل آمد و درختان از نظر وضعیت سنی، علائم شانکر و سرخشکیدگی و همچنین آلودگی به آفات چوبخوار مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌برداری از

بیماری متعلق به شاخه Ascomycota، راسته Ophiostomatales، رده Sordariomycetes، تیره Ophiostomataceae و جنس *Ophiostoma* می‌باشد. در صد سال گذشته، همه‌گیری بیماری مرگ هلندی نارون در دو نوبت در اروپا و امریکای شمالی توسط دو گونه متفاوت از این جنس رخ داده است. همه‌گیری اول مربوط به گونه *Ophiostoma ulmi* (Buisman) Nannf. 1934 با شدت بیماری‌زایی کمتر و همه‌گیری دوم مربوط به گونه *Ophiostoma novo-ulmi* Braiser 1991 با شدت بیماری‌زایی بیشتر می‌باشد که خود به دو زیرگونه‌ی متمایز از نظر ویژگی‌های ریخت‌شناختی، اکولوژیکی و ژنتیکی، به نام‌های *O. novo-ulmi* sub sp. *novo-ulmi* Braiser 1991 و *O. novo-ulmi* sub sp. *americana* Braiser & Kirk 2001 تقسیم شده است (Braiser and kirk, 2001). هر دو زیر گونه *O. novo-ulmi* به میزان نسبی ۱۰ درصد در سال در هر مکان، به سرعت جایگزین گونه *O. ulmi* گردیده‌اند (Braiser, 1991)، فرآیندی که به نوبه خود یکی از قابل توجه‌ترین پیشرفت‌های تکاملی مشاهده شده در بین جمعیت‌های قارچی می‌باشد.

بیماری‌های شانکر و سرخشکیدگی معمولاً به عنوان بیماری‌های مرکب شناخته می‌شوند که در ایجاد آنها یک گروه قارچی به تنهایی، به همراه دیگر عوامل قارچی و یا حتی عوامل زنده و غیرزنده بسیاری ممکن است دخیل باشند. معمولاً گروه‌های قارچی متعددی در ایجاد بیماری‌های شانکر، سرخشکیدگی و تنه دخیل هستند. گروه‌های قارچی متعلق به تیره‌های Botryosphaeriaceae، Diaporthaceae، Valsaceae و Togniniaceae به عنوان عوامل اصلی مرتبط با بیماری‌های شانکر درختان میوه و جنگلی مطرح می‌باشند (Begoude et al., 2010; Heath et al., 2011; Varela et al., 2011; Mayorquin et al., 2012; Ligoixigakis et al., 2013; Deng et al., 2015; Stanosz et al., 2015).

علاوه بر گروه‌های قارچی فوق که به عنوان عوامل اصلی دخیل در بیماری‌های شانکر و سرخشکیدگی در سرتاسر دنیا شناخته شده‌اند، گروه‌های قارچی متنوعی از قبیل گونه‌های جنس‌هایی نظیر *Fusarium*، *Phoma*، *Acremonium* و وابستگان آن‌ها و قارچ‌های

شد. ویژگی‌های ماکروسکوپی جدایه‌ها شامل رنگ، نرخ رشد، نوع حاشیه‌ی پرگنه، تولید یا عدم تولید رنگدانه و دیگر خصوصیات، بررسی گردید. ویژگی‌های ریخت‌شناختی میکروسکوپی شامل تشکیل و یا عدم تشکیل کنیدیوماتا، نوع کنیدیوماتا، مکانیسم کنیدیوم‌زایی و اندازه‌ی کنیدیوم مورد مطالعه قرار گرفتند. پس از شناسایی جدایه‌های قارچی و در مرحله‌ی آخر، بر اساس نوع گروه قارچی، از محیط‌های کشت اختصاصی و شرایط توصیفی خاص هر قارچ، برای شناسایی دقیق ریخت‌شناختی جدایه‌های قارچی استفاده شد (Arsenijevic et al., 1999; Boerema et al., 1997; Leslie and Summerell., 2008; Rahnama and Iraqi., 2009; Mhmoud et al., 2010; Zare et al., 2010; Maharachchikumbura et al., 2014; Wang et al., 2016). جهت مشاهده و بررسی دقیق خصوصیات میکروسکوپی از روش کشت لام استفاده گردید. برای بیان اندازه‌ی کنیدیوم، طول و عرض کنیدیوم‌ها به تعداد ۳۰ عدد، اندازه‌گیری و ثبت گردید. به منظور بیان اندازه‌ی قطر پرگنه، از متوسط اندازه‌ی پرگنه در سه تکرار استفاده شد. جهت تهیه‌ی تصاویر میکروسکوپی از دوربین دیجیتال Olympus مدل DP 25 نصب شده روی میکروسکوپ Olympus-BX41 استفاده شد.

شناسایی مولکولی گونه‌ها

برای شناسایی مولکولی در مورد برخی آرایه‌ها شامل جدایه‌های جنس‌های *Fusarium*، *Cytospora* و *Ophiostoma*، استخراج DNA ژنومی با استفاده از روش مولر و همکاران (۱۹۹۲) انجام شد. در مورد جدایه‌های *Cytospora* و *Ophiostoma*، ناحیه ITS-rDNA و برای جدایه‌های *Fusarium* تجزیه و تحلیل ترادف‌های بخشی از ژن TEF صورت پذیرفت. جهت تکثیر این نواحی از آغازگرهای رفت و برگشت ذکر شده در جدول ۱ استفاده شد.

قسمت‌های تنه و شاخه‌های اصلی درختان نارون (اوجا)^۱ انجام شد. پس از ثبت تاریخ، محل نمونه‌برداری و کد نمونه، هر نمونه به صورت مجزا در داخل کیسه‌های پلاستیکی به آزمایشگاه انتقال داده شد. نمونه‌ها بعد از انتقال به آزمایشگاه، بلافاصله مورد بررسی قرار گرفتند.

جداسازی و خالص‌سازی

به منظور کشت نمونه‌ها، قطعاتی به اندازه‌های ۰/۵×۰/۵ سانتی‌متر از حفاصل بین بافت آلوده و سالم برش داده شد. پس از جداسازی پوست از قسمت چوب، قطعات پوست و چوب به طور جداگانه به مدت یک دقیقه در الکل ۷۰ درصد زیر هود لامینار و در مجاور شعله چراغ الکلی ضدعفونی سطحی شدند. سپس این قطعات ۳ مرتبه در آب مقطر استریل شستشو و به مدت چند دقیقه بر روی کاغذ صافی استریل، خشک شدند. برای کشت قطعات از محیط‌های کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار (PDA)^۲ یا عصاره‌ی مالت آگار دو درصد (MEA)^۳ حاوی اسیدلاکتیک ۲۰ درصد (۲ میلی لیتر بر لیتر) و آنتی‌بیوتیک استرپتوسین^۴ (۱۰۰ میلی گرم در لیتر) استفاده شد. به تعداد پنج قطعه از هر نمونه، در هر تشتک پتری، با رعایت شرایط استریل، کشت شدند. تشتک‌های پتری حاوی قطعات کشت شده به مدت ۷ الی ۱۰ روز به انکوباتور با شرایط تاریکی و دمای ۲۵±۱ درجه‌ی سانتی‌گراد منتقل شدند. پرگنه‌های قارچی رشد کرده به دو روش تک‌اسپور و یا نوک‌ریسه خالص‌سازی گردیدند. پس از رشد کافی قارچ‌های خالص‌سازی شده، قسمتی از قارچ به همراه محیط کشت در سه تکرار به میکروتیوپ‌های ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل و پس از رشد کافی، در یخچال با دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند.

بررسی ویژگی‌های ریخت‌شناختی

جهت شناسایی جدایه‌ها از منابع، کلیدها و توصیفات مقالات معتبر برای هر یک از جنس‌های قارچی استفاده

^۱ *Ulmus carpiniifolia* Borkh.

^۲ Potato Dextrose Agar

^۳ Malt Extract Agar

^۴ Streptomycin

جدول ۱- لیست آغازگرهای مورد استفاده جهت شناسایی مولکولی جدایه‌های قارچی.

Table 1. List of primers used for molecular identification of fungal isolates.

Primer (آغازگر)	Sequence (توالی)	Genomic region (ناحیه ژنومی)
ITS1	TCCGTAGTTGGACCTGCGG	ITS-rDNA
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	ITS-rDNA
EF1-728F	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG	ژن EF1- α
EF-2	GGARGTACCAGTSATCATGTT	ژن EF1- α

Ronquist and Huelsenbeck,) MrBayes v.3.2.2 (2003) انجام گرفت.

نتایج

در طی بازدیدهای به عمل آمده از فضای سبز سطح شهرستان تبریز، تعداد ۶۴ نمونه از تنه و شاخه‌ی درختان نارون با علائم شانکر و سرخشکیدگی و همچنین نمونه‌هایی از درختان سالم جمع‌آوری گردید. درختان با علائم ظاهری مانند زردی، سبزخشکیدگی، ضعف عمومی و سرخشکیدگی جهت نمونه‌برداری انتخاب شدند. علائم در برش عرضی عمدتاً به صورت گرفتگی آوندی توپر در ناحیه‌ی قلب چوب، تغییر گرفتگی آوندی و قهوه‌ای شدن در حلقه‌ی سالیانه و گرفتگی آوندی به صورت منقوط مشاهده و نمونه‌های مناسب جمع‌آوری شد (شکل ۲).

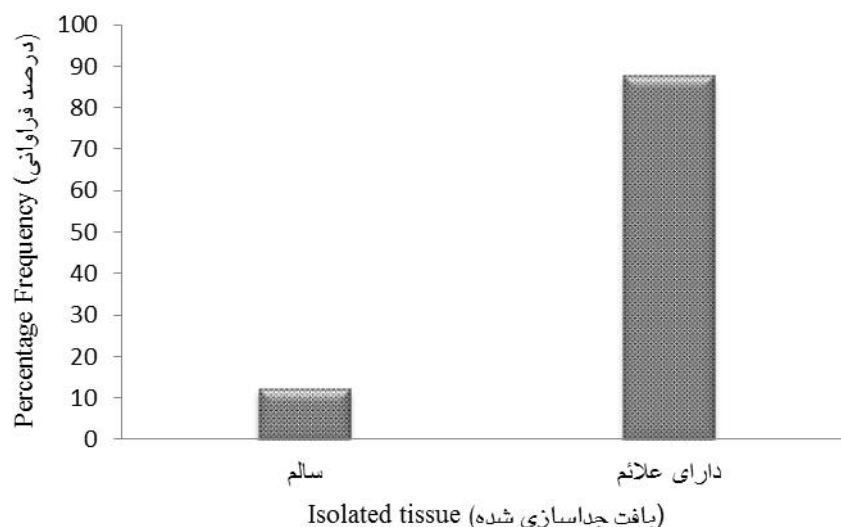
تعداد ۲۰۸ جدایه‌ی قارچی از ۶۴ نمونه‌ی گیاهی، جداسازی گردید که از این بین ۱۸۰ جدایه شناسایی شدند. شناسایی گونه‌ها بر اساس خصوصیات ریخت‌شناختی و مولکولی صورت پذیرفت. شناسایی مولکولی مبتنی بر یک ژن برای برخی جدایه‌ها کارایی مطلوبی نداشت، به همین منظور بررسی‌های ریخت‌شناختی دقیق بین گونه‌های گزارش شده در دنیا با گونه حاصل در این تحقیق انجام گردید. از بین جدایه‌های شناسایی شده در این مطالعه ۸۷/۷ درصد (۱۵۸ جدایه) از بافت دارای علائم و ۱۲/۲ درصد (۲۲ جدایه) از بافت نمونه‌های سالم جداسازی گردیده است (شکل ۱). گونه‌های *Geosmithia* sp. و *Ch. rectangulare*. *Chaetomium globosum* از بافت‌های سالم و گونه‌های *O. novo-ulmi*. *Fusarium* *Pestalotiopsis* *F. tricinatum* *F. proliferatum solani*

مخلوط تمامی واکنش‌ها حاوی ۱۰ میکرولیتر Taq DNA Pol 2x Master Mix، ۰/۸ پیکومول از هر کدام از آغازگرهای رفت و برگشت، ۱۵-۱۰ نانوگرم DNA ژنومی و ۱۲/۴ میکرولیتر آب دیونیزه استریل بود. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز جهت تکثیر نواحی ژنومی در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. تکثیر نواحی ژنومی مورد نظر با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Bio RAD-) (Mj Mini ۵۰) ITS-rDNA (درجه به مدت ۳۰ ثانیه)، TEF (درجه به مدت ۱ دقیقه)، صورت پذیرفت. دمای دستگاه پس از اتمام واکنش روی ۱۰ درجه برای مدت نامعلوم (برای جلوگیری از تخریب محصولات واکنش) تنظیم شد. فرآورده‌های واکنش‌های فوق بر روی ژل آگارز ۰/۱ میکروگرم بر میلی‌گرم گرم اتیدیوم بروماید در بافر 1x TAE توسط دستگاه عکس‌برداری از ژل، تحت نور ماوراء بنفش مشاهده و بررسی گردید.

واکنش ترادفیابی نوکلئوتیدی در موسسه‌ی تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران توسط دستگاه Genetic Analyzer ۳۱۳۰ ساخت کمپانی ABI آمریکا صورت گرفت. توالی‌های نوکلئوتیدی با نرم‌افزار (Lasergene) (package, SeqMan DNASTar, Madison, USA) بررسی و ویرایش شد و سپس با استفاده از نرم‌افزار برخط بلاست با توالی‌های موجود در بانک ژن مقایسه شدند (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). رج‌بندی توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار MEGA6 انجام شد (تامورا و همکاران، ۲۰۱۳). تعیین مدل و سپس ترسیم درختچه تبارزایی به ترتیب با استفاده از نرم‌افزارهای MrModeltest v.2.3 (Nylander, 2004) و

Sordaria و *Pleurostomophora ochracea macrothecia* sp. از بافت‌های دارای علائم بدست آمده است.

C. chrysosperma *Cytospora rhodophila brassicae* *Ch. rectangulare* *Ch. globosum* *Didymella glomerata* *Coniolaria* *Seimatosporium lichenicola* *Clonostachys rosea*



شکل ۱- فراوانی جدایه‌های قارچی جداسازی شده از بافت‌های سالم و دارای علائم سرخشیدگی و شانکر.

Figure 1. Frequency of the fungal isolates recovered from healthy tissues and with dieback and canker symptoms.

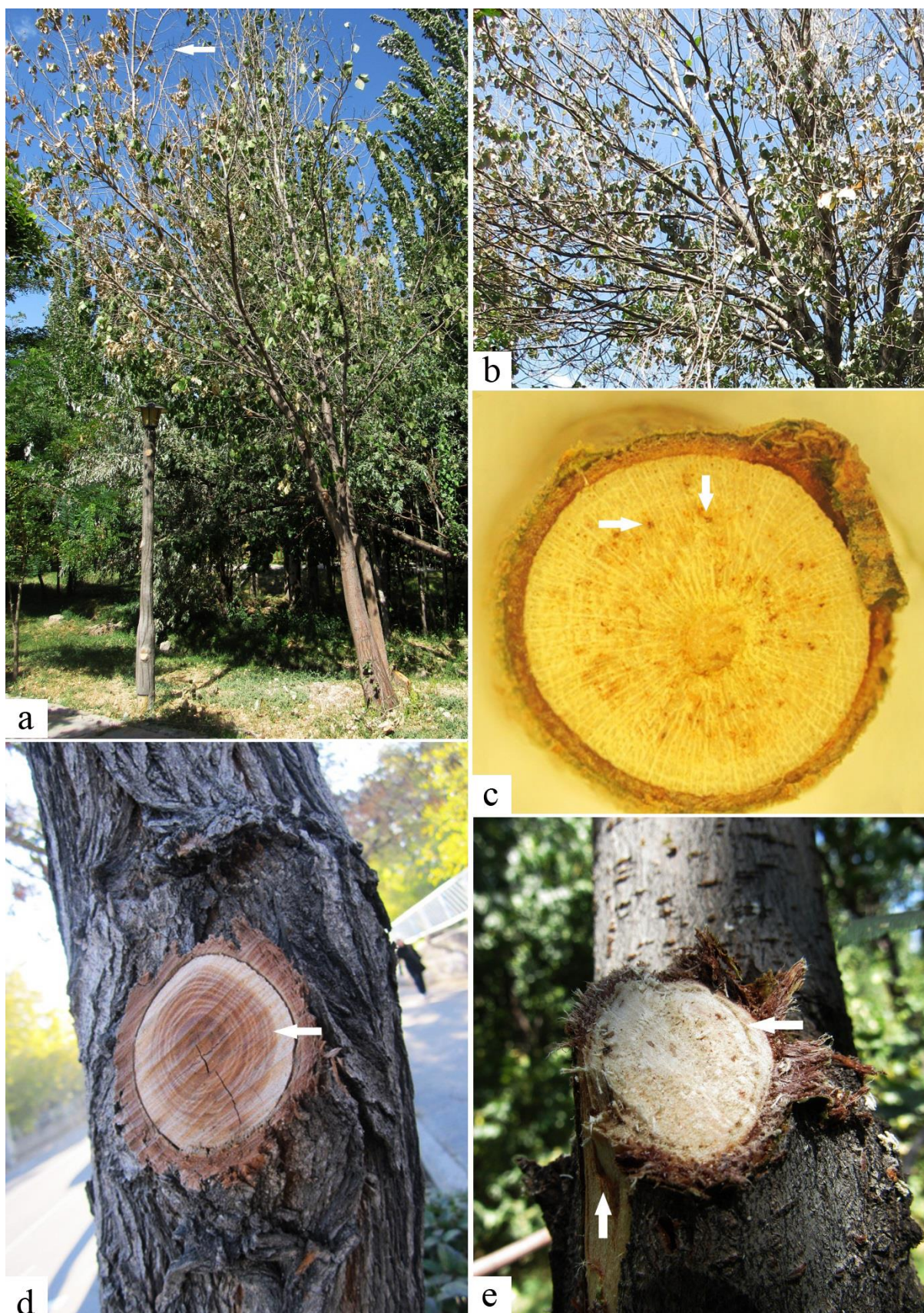
گونه‌های کمتر شناخته شده برای میکوبیوتای ایران ارایه شده است.

Ophiostoma novo-ulmi Brasier, *Mycopathologia* 115(3): 155 (1991)

قطر پرگنه روی محیط کشت MEA و دمای ۲۱ درجه‌ی سانتی‌گراد در شرایط تاریکی به شش میلی‌متر پس از سه روز و ۷۵ میلی‌متر پس از ۱۰ روز رسید. رنگ پرگنه سفید تا کرمی بود که با گذشت زمان، به تیرگی گرایید. رشد حاشیه‌ی پرگنه به صورت گلبرگی و ناصاف بود. کنیدیوم‌برها در مرحله *Sporothrix* این گونه به صورت میکرونماتوس، هولوبلاستیک و شفاف هستند. محل تجمع کنیدیوم‌ها در انتهای کنیدیوم‌بر می‌باشد که محل جداسازی کنیدیوم به صورت دندانه مشاهده شد. کنیدیوم‌برها به طول ۱۲۷/۵-۳۴/۵ و به عرض ۴/۵-۷/۵ میکرومتر بود. کنیدیوم‌ها شفافه تکسلولی، اشکی شکل و کشیده و به طول ۳-۸ و به عرض ۲-۳/۵ میکرومتر بودند. فرم سینماتادار این گونه پس از گذشت ۲۱ روز روی محیط

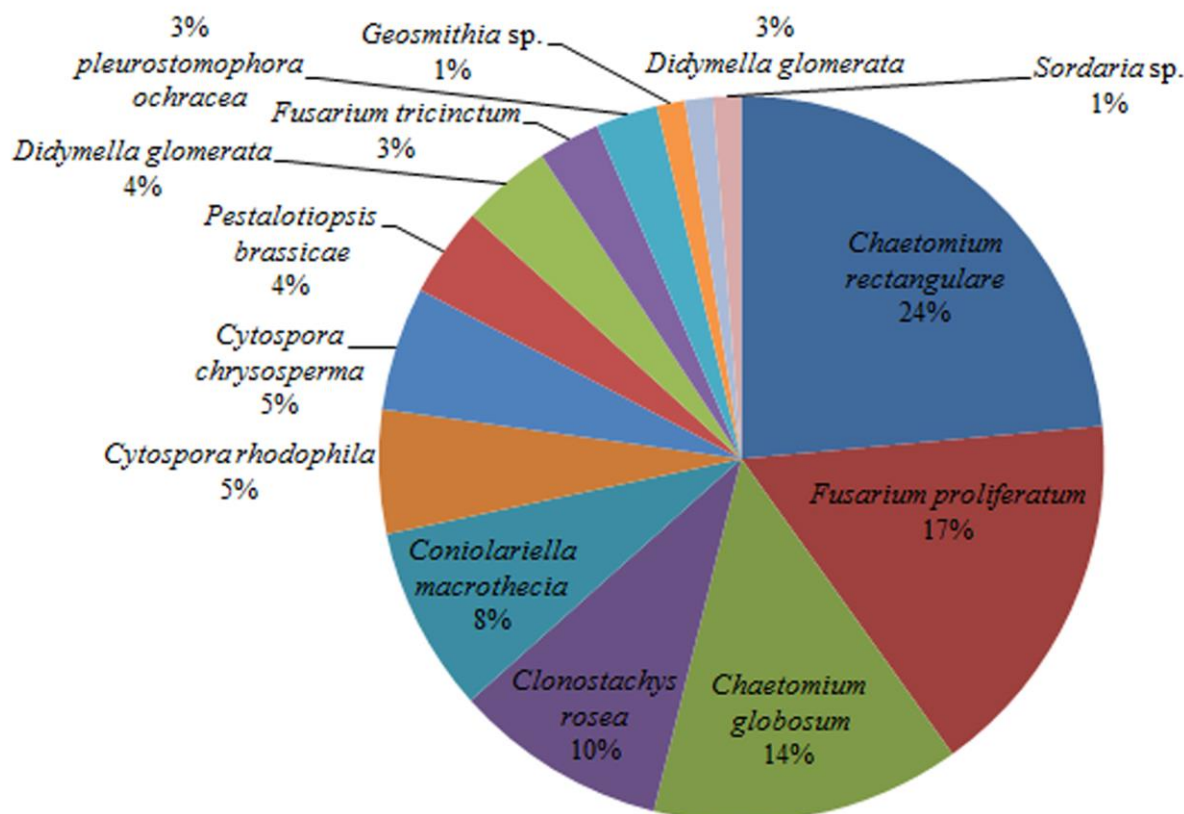
گونه‌های *F. proliferatum* *F. solani* *O. novo-ulmi* از نمونه‌های دارای علائم تغییر رنگ دایره‌مانند در ناحیه آوندی و گونه‌های *F. proliferatum* *Ch. rectangulare* *Ch. globosum* *P. brassicae* *Cl. rosea* *F. tricinctum* *F. solani* *C. chrysosperma* *D. glomerata* *Pl. ochracea* *Co. macrothecia* *Geosmithia* sp. و *Sordaria* sp. *C. rhodophila* علائم تغییر رنگ آوندی توپر در ناحیه‌ی قلب چوب در برش عرضی، جداسازی شدند. غالب‌ترین گونه‌های جداسازی شده در این تحقیق، گونه‌های *F. solani* به تعداد ۲۲ جدایه و *O. novo-ulmi* به تعداد ۱۹ جدایه می‌باشند که با استفاده از داده‌های ریخت‌شناختی و مولکولی شناسایی شدند. فراوانی گونه‌های شناسایی شده در نمودار زیر آمده است (شکل ۳).

با توجه به اینکه برای اغلب گونه‌های قارچی شناسایی شده در این تحقیق، شرح گونه‌ها و توصیف در منابع موجود می‌باشد، در این نوشتار توصیف



شکل ۲- a-b- علائم سرخشکیدگی و شانکر درختان نارون. c- گرفتگی آوندی به شکل منقوط. d- گرفتگی آوندی توپر در ناحیه قلب چوب. e- گرفتگی آوندی و قهوه‌ای شدن در حلقه‌ی سالیانه‌ی بهاری و درقسمت زیر پوست.

Figure 2. a-b- Dieback and canker symptoms on elm trees, C-Dotted vascular obstruction, d- Filled-shape obstruction in heartwood, e-Obstruction and necrosis in annual ring and cambium underneath the bark.



شکل ۳- درصد فراوانی گونه‌های قارچی مرتبط با بیماری شانکر و سرخشیدگی نارون در کلان‌شهر تبریز.

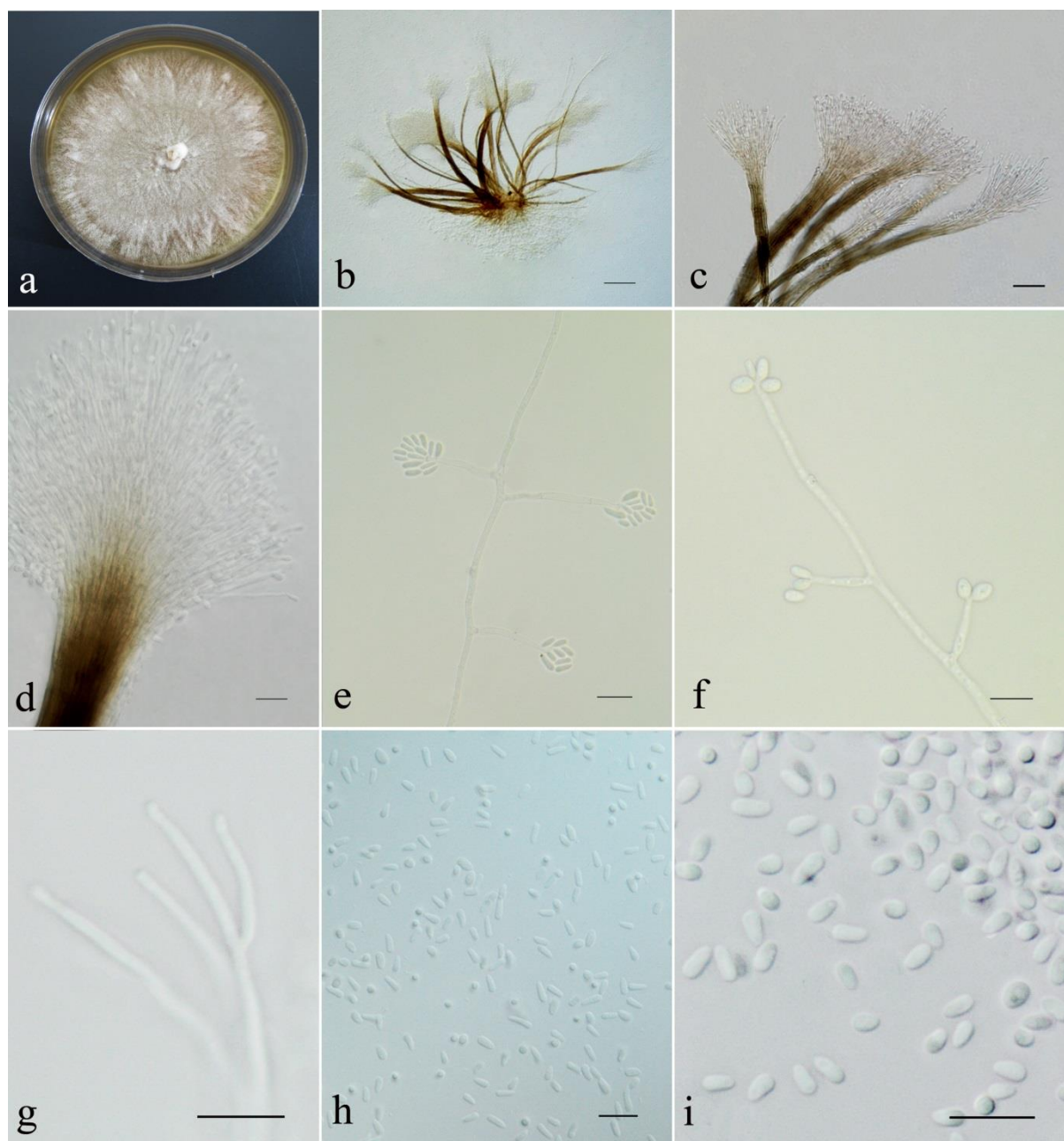
Figure 3. Percentage frequency of fungal isolates associated with elm tree canker and dieback disease in Tabriz metropolis.

چمنی، سفیدرنگ با رشد روزانه ضعیف، رشد در دمای ۲۸ درجه‌ی سانتی‌گراد، طول گردن پریتسیوم ۲۷۳-۲۹۰ میکرومتر، عرض پریتسیوم ۲۰۰ میکرومتر و حداکثر دمای قابل تحمل ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، قابل تفکیک است که در این تحقیق خصوصیات یاد شده برای تعیین گونه بررسی شدند. ویژگی‌های این گونه با توصیف گونه جداسازی شده در سال ۲۰۰۰ توسط رهنما و همکاران از مناطق جنگلی ارسباران در آذربایجان شرقی و اردبیل مطابقت داشت (Rahnama and Iraqi, 2009). به تعداد ۱۹ جدایه از این گونه در این بررسی بدست آمده است. پس از شناسایی و گروه‌بندی ریخت‌شناختی جدایه‌ها، دو جدایه منتخب برای توالی‌یابی ناحیه ITS-DNA ارسال

گشت به صورت تکی و به صورت پراکنده به طول ۶۰۰-۳۳۳/۳ و به عرض ۱۰-۴۰ میکرومتر تشکیل شد. در این فرم، کنیدیوم‌ها کوچکتر، تخم‌مرغی شکل و به طول ۶-۴/۵ و عرض ۳-۲/۲۵ میکرومتر بود (شکل ۴).

گونه *O. novo-ulmi* بر اساس ویژگی‌هایی مانند نرخ رشد متوسط ۳/۶ میلی‌متر در روز، شکل حاشیه‌ی پرگنه ناصاف و گلبرگ مانند و فرم پرگنه نواری، فیبری و ناصاف، رشد در دمای بهینه ۲۱ درجه‌ی سانتی‌گراد، طول گردن پریتسیوم اغلب کوتاه‌تر از ۲۹۰-۶۴۰ میکرومتر، عرض پایه پریتسیوم ۲۰۳ میکرومتر و حداکثر دمای قابل تحمل ۳۳ درجه‌ی سانتی‌گراد از گونه *O. ulmi* با نرخ رشد روزانه متوسط ۲/۵ میلی‌متر در روز، پرگنه با حاشیه‌ی صاف و فرم پرگنه صاف، نرم تا

شد، با این وجود امکان تفکیک دو گونه *O. ulmi* و *O. novo-ulmi* براساس داده های توالی ناحیه ITS میسر نگردید.



شکل ۴- *Ophiostoma novo-ulmi* -a پرگنه ی ۱۰ روزه. b-d- سینماتا. e و f- کنیدیوم و کنیدیومبرهای فرم *Sporothrix*. g- سلولهای کنیدیومزایی فرم سینماتا. h و i- کنیدیومهای فرم سینماتا. مقیاس: c و b = ۱۰۰ میکرومتر. d-i = ۱۰ میکرومتر.

Figure 4. *Ophiostoma novo-ulmi*. a- 10-day-old culture, b-d- Synnemata, e-f- Conidia and conidiophores in *Sporothrix* form, Conidiogenous cells in synnemata form. Bar- b-c=100. d-i- 10.

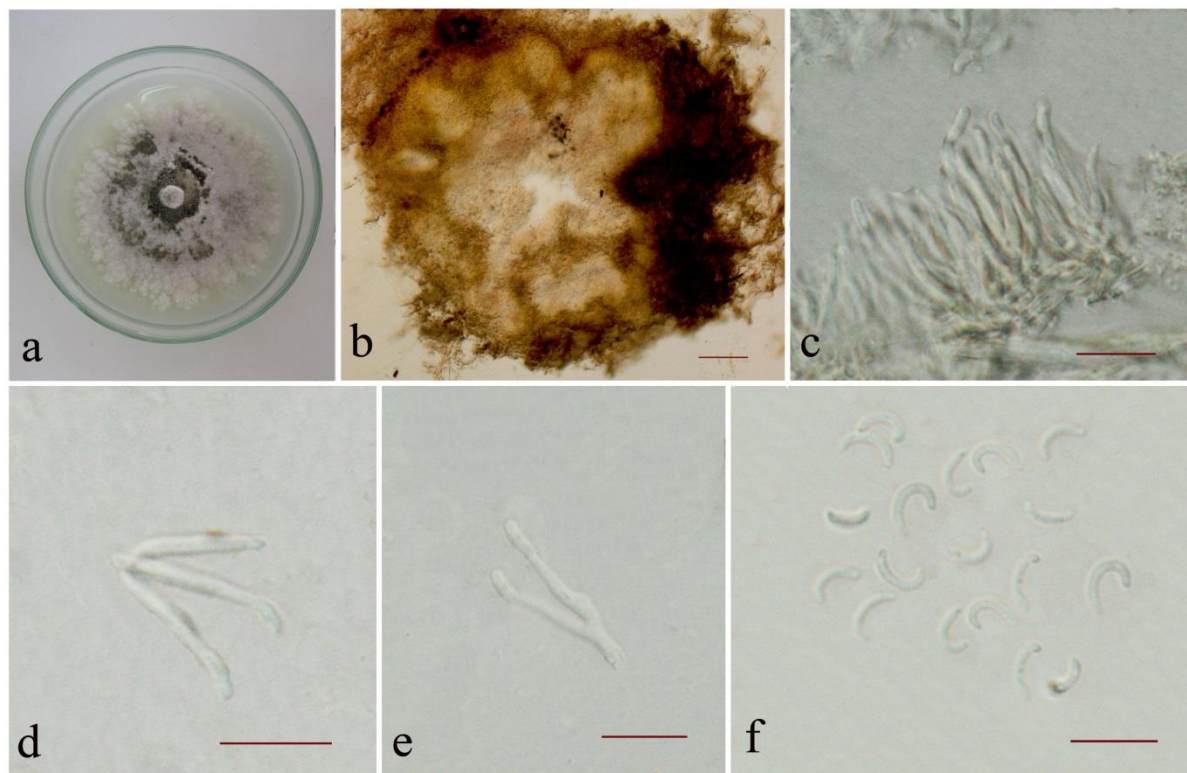
میلی متر رسید. پیکنیدیومها پس از ۲۱-۱۴ روز به صورت منفرد و پراکنده و تا حدودی فرورفته در محیط و با متوسط قطر ۴۵۰ × ۴۵۰ میکرومتر مشاهده شدند.

Cytospora rhodophila Sacc. 1884

پرگنه روی محیط کشت PDA و دمای ۲۵ درجه ی سانتی گراد و شرایط تاریکی، سفید و خاکستری با حاشیه ی گلبرگ مانند بود و قطر آن پس از ۷ روز به ۵۵

سلولی، دارای انحنا و در اندازه‌های $۱۱ - ۵/۳ \times ۲ - ۱/۳$ میکرومتری بودند (شکل ۵).

پیکنیدیوم‌ها دارای حجره‌های متعدد با استیول واحد بودند. کنیدیوم‌برها فیالیدیک، شفاف، منشعب و غیرمنشعب می‌باشند. کنیدیوم‌ها الانتوئید، شفاف، تک



شکل ۵- *Cytospora rhodophila*. a- پرگنه ۱۴ روزه بر روی محیط PDA. b- برش عرضی از پیکنیدیوم. c-e- کنیدیوم‌بر ساده و منشعب و سلول کنیدیوم‌زایی. f- کنیدیوم. مقیاس: b=۱۰۰ میکرومتر. c-f=۱۰ میکرومتر.

Figure 5. *Cytospora rhodophila*. a- 14-day-old culture on PDA, b-cross-section of pycnidium, c-e- Simple and branched conidiophore and conidiogenous cell, f-Conidia. Barr- b=100. C-f=10.

خارجی به کار گرفته شد. تجزیه و تحلیل بیژین، منتهی به ۸۳۶ تبارنما گردید. بعد از حذف ۲۵ درصد از تبارنماهای جمع‌آوری شده برای مرحله burn-in تبارنمای اجمالی و توزیع احتمال پسین خوشه‌ها از ۶۲۷ تبارنمای باقی‌مانده محاسبه شد. بر اساس نتایج به دست آمده، جدایه‌های مورد مطالعه با اعتبار سنجی بالایی به همراه سایر جدایه‌های اخذ شده از بانک ژن گروه‌بندی شدند (شکل ۶).

Pestalotiopsis brassicae (Guba) Maharachch, K. D. Hyde & Crous, comb. nov. MycoBank MB809734

پرگنه روی محیط کشت PDA و دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد در تاریکی، به رنگ سفید بوده و پس از

در تحقیق حاضر دو گونه از جنس *Cytospora* از درختان نارون در کلان‌شهر تبریز جداسازی و شناسایی شد که تعداد چهار جدایه از هر کدام از گونه‌های *C. rhodophila* و *C. chrysosperma* را شامل گردید. پس از شناسایی و گروه‌بندی ریخت‌شناختی جدایه‌ها، دو جدایه منتخب از هر گروه برای توالی‌یابی ناحیه ITS-rDNA ارسال شد. تبارنما با استفاده از نرم‌افزار بیژین برای جدایه‌های *Cytospora* در این تحقیق و جدایه‌های موجود در بانک ژن ترسیم گردید. فایل رج‌بندی شده نهایی شامل ۲۶ آرایه داخلی، ۵۲۲ کاراکتر و ۹۷ الگوی مکانی منحصربه‌فرد بود و بر اساس نتایج نرم‌افزار مدل تست، بهترین مدل جایگزینی SYM+I+G بود. گونه *Phomopsis vacciniae* GeneBank accession AF317579 نیز به عنوان آرایه‌ی

این گونه با توصیفات بوئرما و همکاران (Boerma et al., 1997) مطابقت داشت. ۳ جدایه از این گونه در این بررسی بدست آمده است.

***Chaetomium rectangulare* Asgari & Zare, Mycologia 103(4): 872 (2011)**

پرگنه روی محیط کشت MEA در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و شرایط تاریکی به رنگ خاکستری تیره بوده و قطر پرگنه بعد از هفت روز به ۷۵ میلی‌متر رسید. میسلیم‌ها به رنگ سفید تا خاکستری و تقریباً به صورت هوایی در سطح محیط کشت رشد کردند. آسکوکارپ‌های تیره به صورت سطحی تا نیمه فرورفته در محیط کشت به صورت پراکنده تشکیل شدند. آسکوکارپ‌ها پس از گذشت ۱۰ روز به بلوغ رسیدند. آسکوکارپ‌ها گرد تا کمی کشیده به اندازه‌های ۲۸۷/۵-۲۳۷/۵ × ۳۰۰-۲۰۰ میکرومتر بودند. زوائد مو مانند در قسمت بالایی آسکوکارپ، دیواره‌دار، زگیل‌دار، بلند، در قاعده راست و در انتها منشعب و به قطر ۵ میکرومتر بودند. موهای جانبی به صورت راست و کوتاه، زگیل‌دار، دیواره‌دار، بدون انشعاب و به قطر ۵ میکرومتر بودند. آسک‌ها گریزی‌شکل، پایه‌دار و دارای ۸ آسکوسپور بودند. ارتفاع آسک ۳۵-۲۵ و ارتفاع پایه ۶۵-۶۰ میکرومتر بود. آسکوسپورها گرد تا لیمویی و به رنگ سبز لجنی و به اندازه‌های حداقل ۸ × ۱۰ و حداکثر ۹/۵ × ۱۲ میکرومتر بود (شکل ۹). توصیف این گونه با توصیف وانگ و همکاران (Wang et al., 2016) مطابقت دارد. در این مطالعه به ترتیب به تعداد ۱۰ و ۱۷ جدایه از گونه‌های *Ch. globosum* و *Ch. rectangulare* جداسازی شدند. پس از شناسایی و گروه‌بندی ریخت‌شناختی جدایه‌ها، دو جدایه به انتخاب برای توالی‌یابی ناحیه ITS-rDNA ارسال شد.

***Seimatosporium lichenicola* (Corda) Shomaker & E. Müll. 1964**

قطر پرگنه روی محیط کشت PDA و دمای ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و شرایط تاریکی، پس از ۱۴ روز به ۵۳ میلی‌متر رسید. پرگنه قارچی به رنگ سبز تیره بوده و در مرکز دارای میسلیم‌های سفید رنگ بود. کنیدیوماتا به صورت آسروول، کروی تا کشیده، به رنگ سیاه و در

گذشت ۷ روز به قطر ۲۰ میلی‌متر رسید. پر شدن تشک پتری توسط پرگنه نیز ۲۱ روز به طول انجامید. کنیدیوم‌ها روی کنیدیوم‌برهای کاهش یافته به سلول کنیدیوم‌زایی فلاسکی شکل با متوسط طول شش و عرض چهار میکرومتر در ساختار آسروول و به صورت قطرات تیره رنگ روی محیط کشت PNA^۱ مشاهده شد. کنیدیوم‌ها به طول ۳۰-۲۰ و عرض ۸-۶/۵ میکرومتر، کشیده، دارای چهار دیواره، سه سلول میانی به رنگ سبز متمایل به قهوه‌ای و سلول‌های پایه و انتهایی شفاف و بدون رنگ بودند. سلول‌های پایه دارای یک اپنیدیج به طول (۱۵)-۷/۵-(۳/۳) و سلول انتهایی دارای ۲-۵ اپنیدیج به طول (۴۰)-۲۵/۳-(۲۰) میکرومتر بود (شکل ۷). ویژگی‌های این گونه با توصیفات ماهاراج چیکومبورا و همکاران (Maharachchikumbura et al., 2014) مطابقت داشت. تعداد سه جدایه از این گونه در این بررسی جداسازی شد.

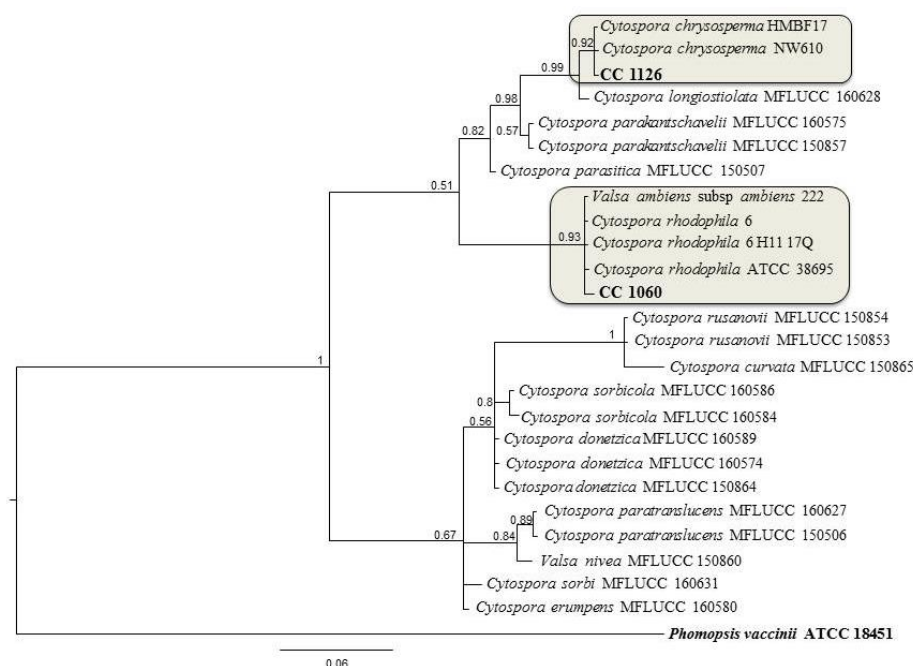
***Didymella glomerata* (Corda) Qian Chen & L. Cai, in Chen, Jiang, Zhang, Cai & Crous, Stud. Mycol. 82: 176 (2015)**

پرگنه روی محیط کشت OA در ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد در تناوب نوری ۱۳ ساعت روشنایی با نور nUV و ۱۱ ساعت تاریکی پس از گذشت ۲۱ روز به قطر ۷۵ میلی‌متر رسید و به رنگ قهوه‌ای متمایل به خاکستری بود. ساختارهای پیکنیدیوم به صورت پراکنده یا مجتمع بر روی محیط کشت در اشکال گرد تا نیمه‌گرد مشاهده شدند. فیالیدها شفاف، گرد تا نیمه‌گرد و فلاسکی‌شکل و به طول ۱۱-۵ و عرض ۱۱-۴ میکرومتر بودند. کنیدیوم‌ها بیضوی، استوانه‌ای و یا قلوهای شکل، تک سلولی و شفاف و با متوسط اندازه ۷/۷ × ۱/۵ میکرومتر بودند. دیکتیوکلامیدوسپورها مشابه اسپورهای گونه *Alternaria alternata* بوده و به طول و عرض حداکثر ۹۱×۴۱ میکرومتر و با دیواره‌های طولی و عرضی فراوان مشاهده گردیدند. تست NaOH بر روی پرگنه روی محیط کشت MEA منفی بود. همچنین، هیچ نوع کریستالی در پرگنه مشاهده نشد (شکل ۸). توصیف

^۱ Pine Needle Agar

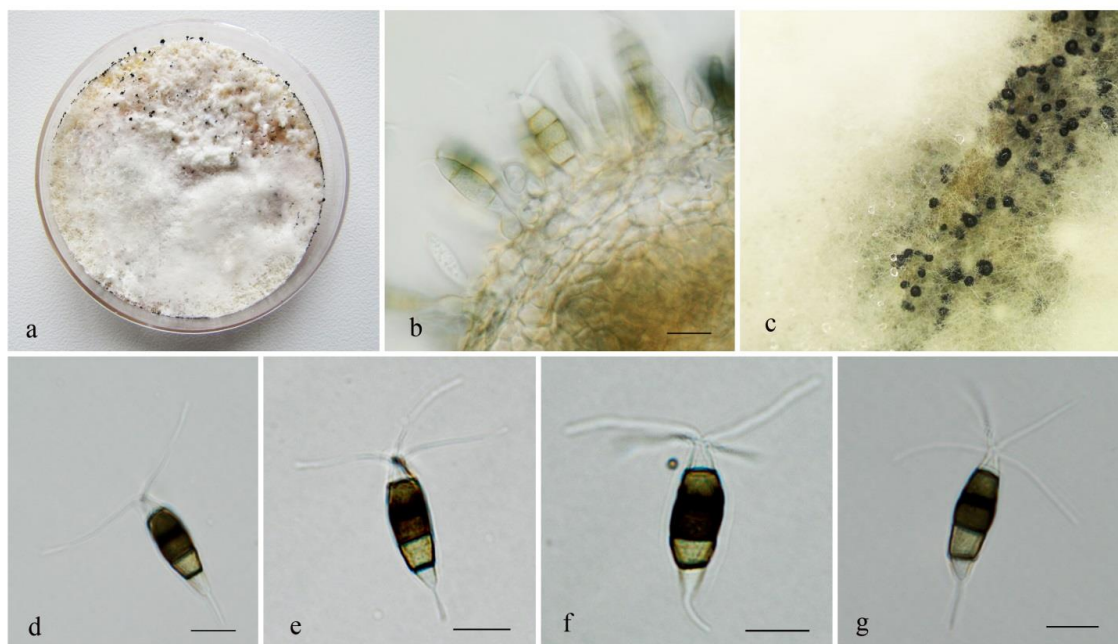
صورت نیمه‌استوانه‌ای و خوشه‌ای و شفاف مشاهده شدند. سلول‌های کنیدیوم‌زایی هولوبلاستیک و شفاف بودند. کنیدیوم‌ها $4/5-6/5 \times 20-9$ میکرومتر و دارای

اندازه‌های $150-200 \times 100-150$ میکرومتر بود و به صورت سطحی، کل محیط کشت را پوشاند. حداکثر طول و عرض کنیدیوم‌ها 28×4 میکرومتر است و به



شکل ۶- تبارنمای ترسیم شده بر اساس توالی‌های نوکلئوتیدی ناحیه ITS به روش بیژین. گونه *Phomopsis vaccinii* به عنوان آرایه خارجی استفاده شده است.

Figure 6. Phylogenetic tree based on nucleotide sequences of ITS region by Bayesian method. *Phomopsis vaccinii* is used as outgroup.

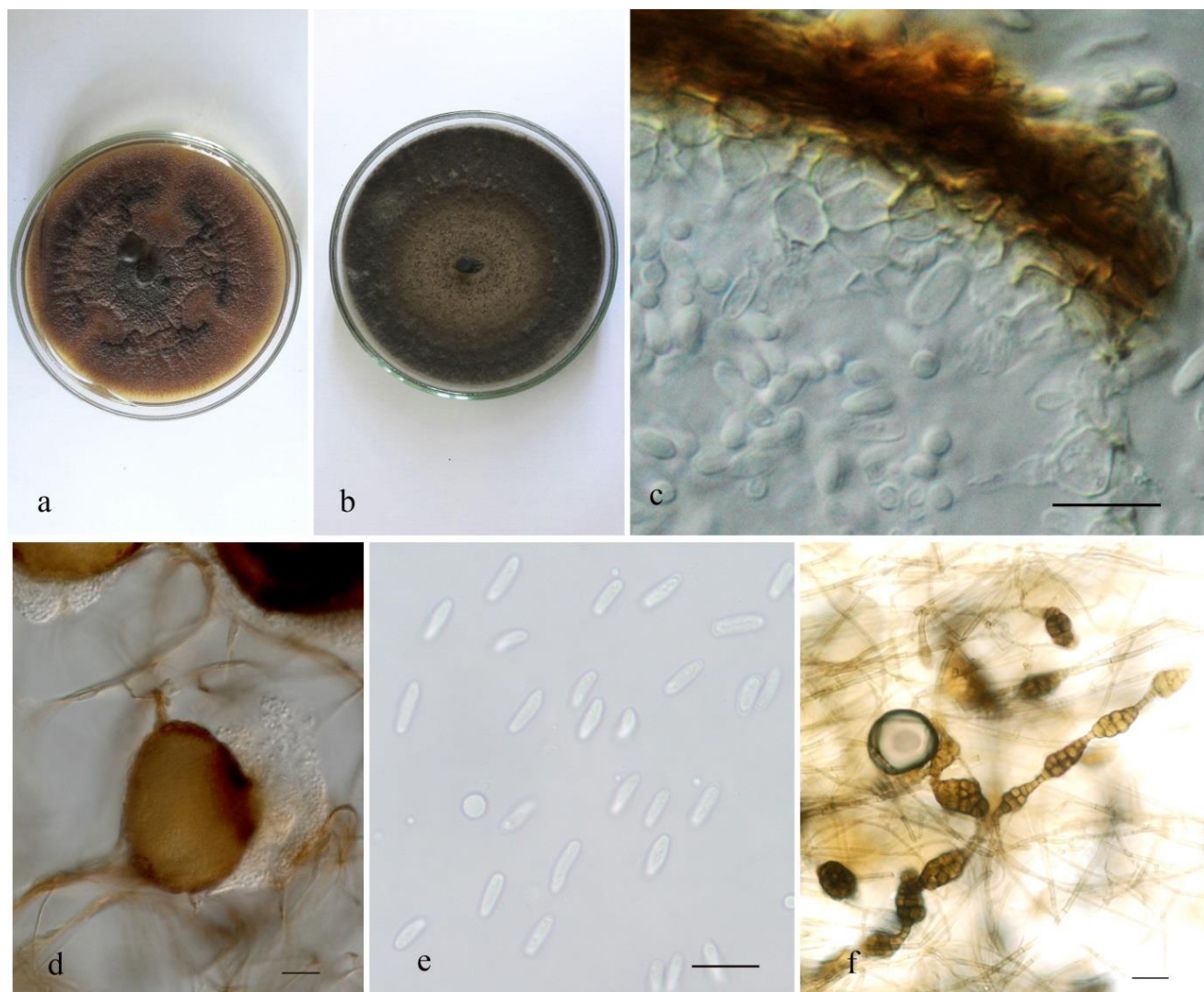


شکل ۷- *Pestalotiopsis brassicae*. a- پرگنه ۲۱ روزه. b- کنیدیوم‌پر. c- ساختارهای آسروول. d-g- کنیدیوم‌ها با اپندیک‌های ۲-۵ تایی. مقیاس = ۱۰ میکرومتر.

Figure 7. *Pestalotiopsis brassicae*. a-21-day-old culture, b-Conidiophore, c-Acervuli, d-g-conidia with 2-5 appendages. Bar=10.

۵- دیواره رنگی تیره، کشیده و با سلول پایه‌ای شفاف و سلول انتهایی گرد و رنگی می‌باشد (شکل ۱۰). توصیف این گونه با توصیفات آرسنیجویک و همکاران

(Arsenijevic et al., 1999) مطابقت دارد. یک جدایه از این گونه در این تحقیق بدست آمده است.



شکل ۸- *Didymella glomerata* a-b- پرگنه ۲۱ روزه به ترتیب بر روی محیط MEA و OA. c- سلول کنیدیوم‌زایی. d- پیکنیدیوم نابالغ. e- کنیدیوم‌ها. f- کلأمیدوسپور. مقیاس: d و f = ۱۰۰ میکرومتر. c و e = ۱۰ میکرومتر.

Figure 8. *Didymella glomerata*. a-b-21-day-old cultures on MEA and OA respectively, c-Conidiogenous cell, d-Immature picnidium, e-Conidia, f-Chlamydospor. Bar- d-f=100. c-e=10.

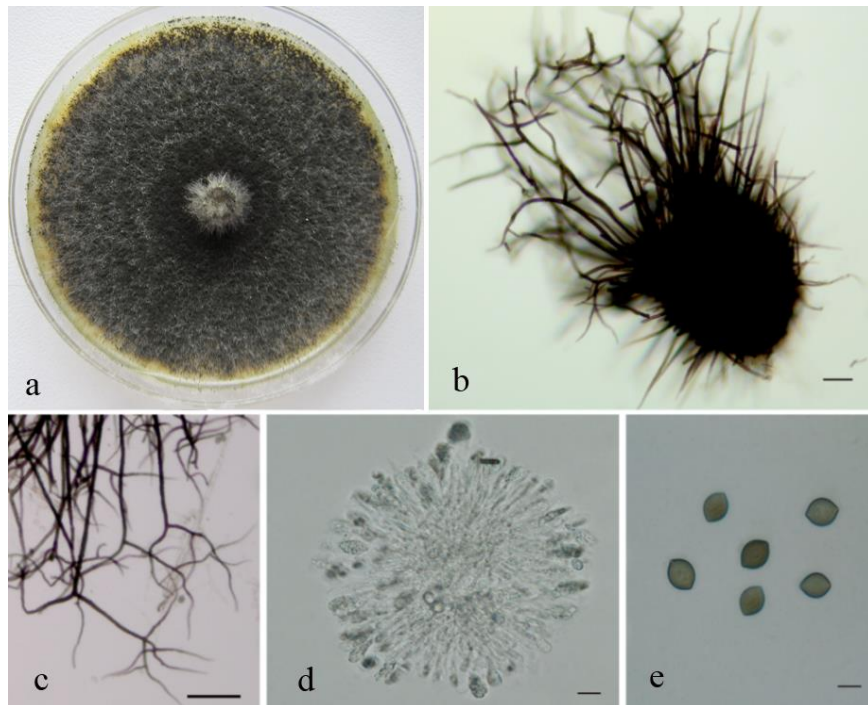
رشد هوایی اندک بودند. آسکوکارپ کروی شکل، خاکستری تیره تا سیاه، دارای موهای سطحی تیره و در اندازه‌ی حداکثر ۱/۵ میلی‌متر به صورت سطحی، منفرد یا مجتمع بر روی محیط کشت تشکیل شد و پس از گذشت چهار هفته به بلوغ رسید. آسکوکارپ‌ها در ابتدای تشکیل به صورت میسلیم‌های در هم تنیده سفید رنگ

Coniolaria macrothecia Zare, Asgari & W. Gams, *Mycologia* 102(6): 1383 (2010)

پرگنه روی محیط کشت PDA با میسلیم‌های سفید رشد یافته روی محیط دیده شد که با گذشت زمان، خاکستری رنگ شدند. رنگ پرگنه از پشت تشنگ پتری سفید متمایل به صورتی بود. میسلیم‌ها دیواره‌دار و با

عدد در آسک‌های تک جداره قرارداشتند (شکل ۱۱). ویژگی‌های این گونه با توصیفات زارع و همکاران (Zare et al., 2010) مطابقت دارد. تعداد ۶ جدایه از این گونه جداسازی و توالی ناحیه ITS-rDNA برای جدایه منتخب حاصل شد.

روی محیط کشت مشاهده شدند. آسکوسپورها به صورت بیضوی و در دو انتها کشیده، دارای شیار طولی، به طول ۱۸-۳۳/۱۵ و عرض ۶-۸ میکرومتر، در ابتدا شفاف و بدون رنگ و پس از بلوغ به رنگ سبز زیتونی تیره و در نهایت متمایل به سیاه به تعداد هشت



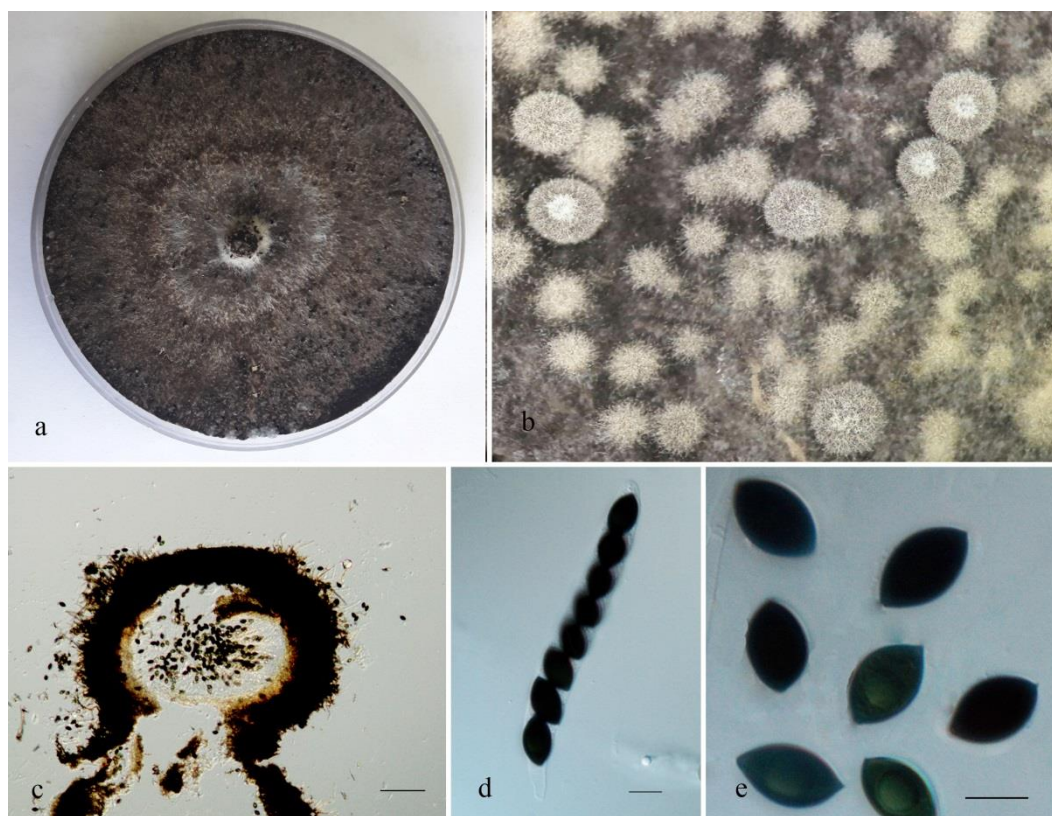
شکل ۹- *Chaetomium rectangularare*. a - پرگنه ۷ روزه روی محیط کشت MEA. b - آسکوکارپ. c - زواید آسکوکارپ. d - آسک‌ها. e - آسکوسپورها. مقیاس: c=۵۰ میکرومتر. d=۱۰ میکرومتر. e=۲۰ میکرومتر. f=۱۰ میکرومتر.

Figure 9. *Chaetomium rectangularare*. a-7-day-old culture on MEA, b-Ascocarp, c-Appendages on ascocarp, d-Asci, e-Ascospores. Bar- c=50. d=10. e=20. f=100.



شکل ۱۰- *Seimatosporium lichenicola*. a-b-14-day-old culture. c-Conidiophores, d-conidia. Bar=10.

Figure 10. *Seimatosporium lichenicola*. a-b-14-day-old culture. c-Conidiophores, d-conidia. Bar=10.



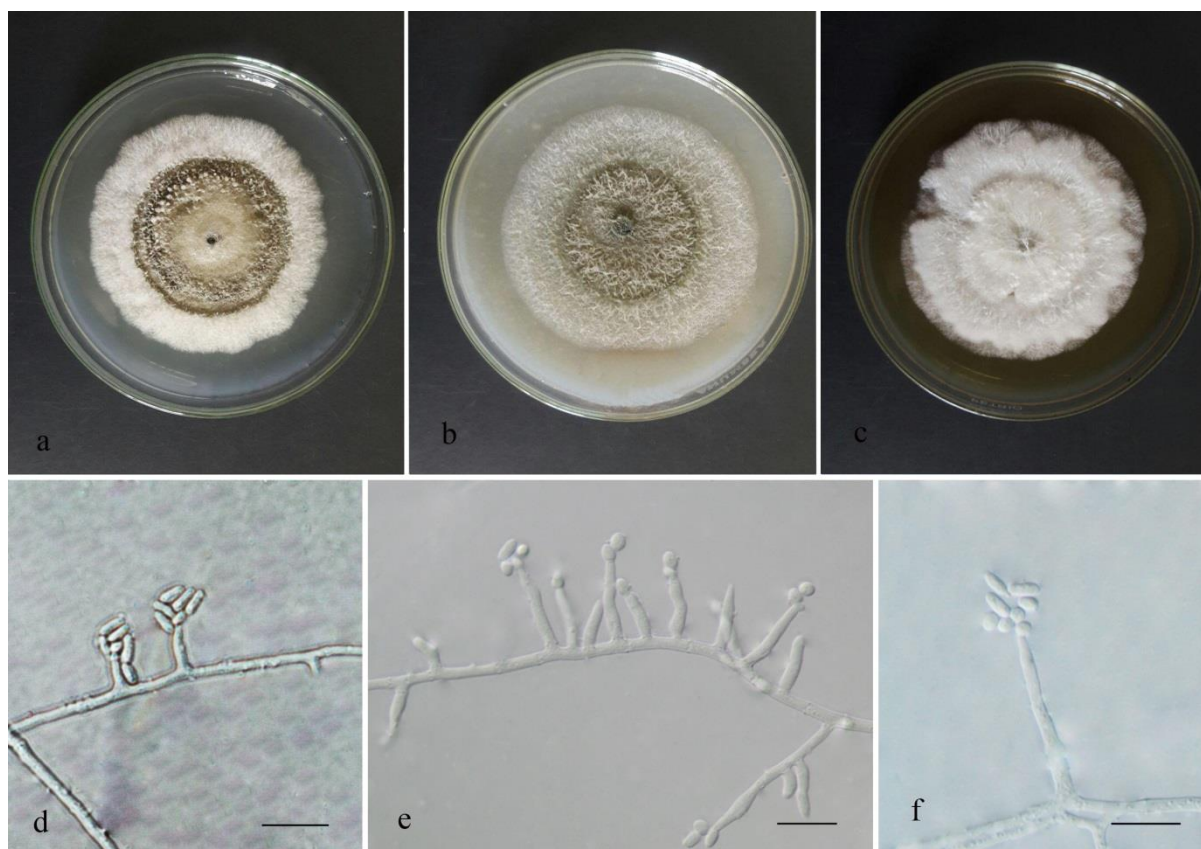
شکل ۱۱- *Coniolaria macrothecia*. a- پرگنه ۲۱ روزه. b- آسکوکارپها. c- برش طولی آسکوکارپ. d- آسک. e- آسکوسپورها. مقیاس: d=۱۰۰ میکرومتر. e-f=۱۰ میکرومتر.

Figure 11. *Coniolaria macrothecia*. a-21-day-old culture, b-Ascocarps, c-Longitudinal section of ascocarp, d-Ascus, e-Ascospores. Bar- d=100. e-f=10.

سه تیپ مشاهده شد. کنیدیوم بر تیپ اول از نوع آدولوفالید و بدون دیواره در قسمت پایه با حداکثر اندازه $2 \times 6/6$ میکرومتر بود. کنیدیوم بر تیپ دو آمپولی فرم با متوسط اندازه $3/3 \times 13$ میکرومتر و تیپ سه استوانه‌ای تا آمپولی فرم و با حداکثر طول $2 \times 26/6$ بود. کنیدیوم‌ها شفاف بوده و به صورت مجتمع بر روی فیالیدها مشاهده شدند. دو نوع متفاوت کنیدیومی مشاهده شد که نوع اول، کروی تا بیضوی با متوسط اندازه $3/3 \times 3/3$ میکرومتر و نوع دوم بزرگتر از نوع اول و کشیده تا الانتوئید با متوسط اندازه $5 \times 1/5$ میکرومتر بود (شکل ۱۲). ویژگی‌های این گونه با توصیفات محمود و همکاران (Mhmoud et al., 2010) مطابقت داشت. دو جدایه از این گونه در تحقیق حاضر بدست آمده است.

Pleurostomophora ochracea Mhmoud, Abd. Ahmed, Fahal, de Hoog & Sande, in Mhmoud, Ahmed, Fahal, Hoog, Gerrits van den Ende & Sande, J. Clin. Microbiol. 50(9): 2990 (2012)

پرگنه روی محیط کشت MEA در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد در شرایط تاریکی پس از گذشت ۲۱ روز به قطر ۵۳ میلی‌متر و به رنگ سفید و پنبه‌ای با حاشیه‌های نامنظم و رنگ پشت پرگنه صورتی متمایل به نارنجی بود. پرگنه روی محیط OA و PDA تحت همین شرایط به ترتیب به قطر ۵۵ و ۵۳ میلی‌متر رسید. پرگنه در محیط OA به رنگ سبز زیتونی روشن در مرکز و به رنگ سفید در کناره‌های پرگنه با حاشیه منظم دیده شد. روی محیط PDA پرگنه در مرکز به رنگ قهوه‌ای روشن و در کناره‌ها به رنگ سفید با حاشیه منظم بود. کنیدیوم‌برها شفاف، مونوفیالیدیک، منشعب یا ساده در



شکل ۱۲- *Pleurostomophora ochracea* -a-c پرگنه ۲۱ روزه به ترتیب بر روی PDA، OA و MEA. d-f- تیپ‌های مختلف کنیدیوم و کنیدیوم‌بر. مقیاس: g-i = ۱۰۰ میکرومتر.

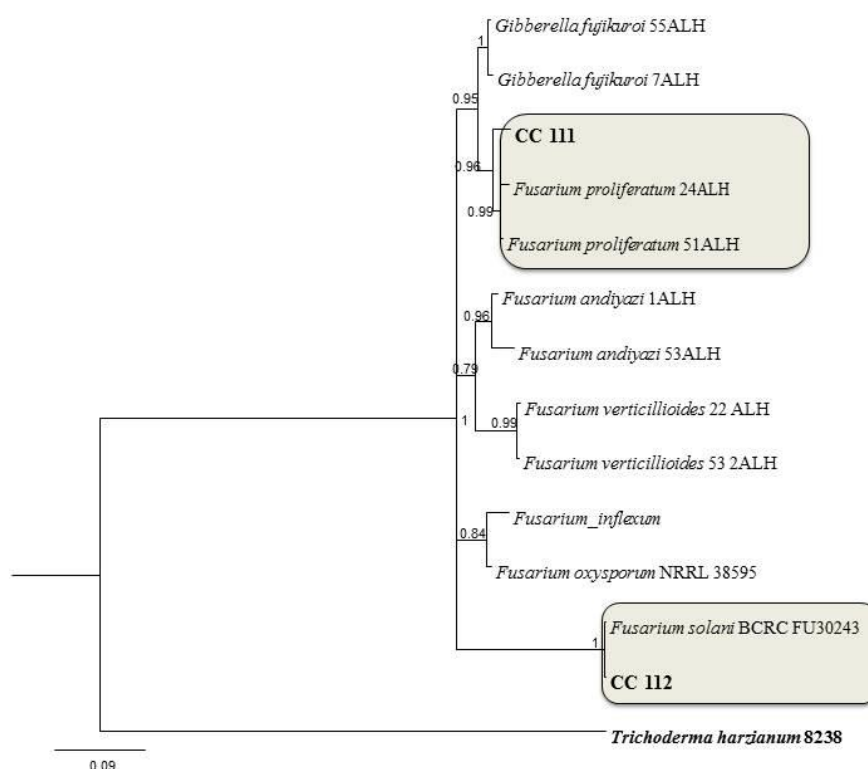
Figure 12. *Pleurostomophora ochracea*. a-c-21-day-culture on PDA, OA and MEA respectively, d-f- Different types of conidia and conidiophores. Bar=100.

محاسبه گردید. بر اساس نتایج به دست آمده، جدایه‌های مورد مطالعه با اعتبارسنجی بالایی به همراه سایر جدایه‌های اخذ شده از بانک ژن گروه‌بندی شدند (شکل ۱۳).

بحث

تحقیق حاضر در راستای ردیابی و شناسایی قارچ‌های مرتبط با شانکر و سرخشیدگی نارون صورت پذیرفت. طی بازدیدهای به عمل آمده از فضای سبز شهری شهر تبریز، درختان نارون با علائم شانکر، ضعف عمومی و سرخشیدگی شناسایی و نمونه‌برداری شدند. جهت مقایسه قارچ‌های همراه با عوامل شانکر، نمونه‌برداری از درختان سالم نیز صورت پذیرفت. علائم مشاهده شده در برش عرضی عمدتاً به دو صورت

در تحقیق حاضر به ترتیب به تعداد ۲۲ و ۱۲ جدایه از گونه‌های *F. solani* و *F. proliferatum* جداسازی گردید که از این بین دو جدایه منتخب برای توالی‌یابی ناحیه TEF ارسال شدند. تبارنمای اجمالی با استفاده از نرم‌افزار بیژین بر مبنای ژن TEF برای جدایه‌های مورد مطالعه در این تحقیق و جدایه‌های موجود در بانک ژن ترسیم شد. فایل رج‌بندی شده نهایی شامل ۱۴ آرایه داخلی، ۴۵۲ کاراکتر و ۱۴۷ الگوی مکانی منحصربه‌فرد بود. بر اساس نتایج نرم‌افزار مدل تست، بهترین مدل جایگزینی GTR+G بود. گونه *Trichoderma harzianum* KF454871 نیز به عنوان آرایه خارجی به کار گرفته شد. تجزیه و تحلیل بیژین، منتهی به ۷۱۲ تبارنما گردید. بعد از حذف ۲۵ درصد از تبارنماهای جمع‌آوری شده برای مرحله burn-in تبارنمای اجمالی و توزیع احتمال پسین خوشه‌ها از ۵۳۴ تبارنمای باقی‌مانده



شکل ۱۳- تبارنمای ترسیم شده بر اساس توالی‌های نوکلئوتیدی ژن TEF به روش بیژین برای گونه‌های *F. proliferatum* و *F. solani* گونه *Trichoderma harzianum* به عنوان آرایه خارجی در نظر گرفته شده است.

Figure 13. Phylogenetic tree based on nucleotide sequences of TEF region by Bayesian method for *F. solani* and *F. proliferatum* species. *Trichoderma harzianum* is used as outgroup.

به کشت ردیفی نارون در کنار خیابان و پارک‌ها و در مجاورت یکدیگر در این مطالعه شناخته شد. در این روش، مایه تلقیح به صورت مستقیم وارد میزبان شده و توسط جریان شیره آوندی انتقال یافته و باعث بروز علائم در کل درخت می‌شود (Stripes and Campana, 1981; stripes, 2000). مرگ هلندی نارون برای اولین بار در ایران در سال ۱۳۳۸ از جنگل‌های گلستان و ارتفاعات پایینی کنفکتر و کندسکوی روی درختان اوجا و ملج مشاهده شد (Afsharpour and Adeli, 1974). این بیماری تاکنون از روی درختان اوجا و ملج جنگل‌های آستارا، جنگل‌های اسالم گیلان و چاچکام مازندران و از مناطق جنگلی ارسباران گزارش گردیده است (Rahnama and Iraqi, 2009). این بیماری همچنین از روی گونه

گرفتگی آوندی توپر در ناحیه قلب و گرفتگی آوندی در حلقه‌های سالیانه و در یک مورد به صورت منقوط بود. با استناد به مشاهدات و نتایج این مطالعه، علامت مشخصه برای تشخیص وجود عامل مرگ هلندی نارون، علاوه بر سرخشیدگی و پرچی شدن شاخه‌ها عمدتاً به صورت گرفتگی آوندی و قهوه‌ای شدن آوندهای چوبی در حلقه‌های رشد سالانه شاخه‌های آلوده و همچنین بروز رگه‌های قهوه‌ای در قسمت زیر پوست، مشاهده گردید؛ تغییر رنگ ایجاد شده به دلیل تیلوز تولید شده توسط میزبان در واکنش به عفونت قارچی می‌باشد. راه‌های مختلفی برای انتقال این بیمارگر گزارش گردیده است، با این حال پیوند ریشه‌ای بین ریشه‌های دو درخت مجاور موثرترین راه برای انتقال عامل بیماری، با توجه

جدول ۲- خصوصیات ریخت‌شناختی سایر گونه‌های قارچی شناسایی شده مرتبط با شانکر و سرخشکیدگی درختان نارون در کلان‌شهر تبریز.

Table 2. Morphological features of other identified fungal species associated with canker and dieback of elm trees in Tabriz metropolis.

نام جدایه قارچی	ویژگی‌های پرگنه	ویژگی‌های کنیدیوم‌بر	ویژگی‌های کنیدیوم	کلید شناسایی
Fungal isolate name	Culture features	Conidiophore features	Conidium features	Identification key
<i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc., Michelia 2(no. 7): 296 (1881)	پرگنه به رنگ زرد نخودی با میسلیم‌های هوایی فراوان و رنگ پرگنه از پشت تشتک پتری به رنگ صورتی مایل به نارنجی	فیالیدها از نوع مونوفیالیدهای بلند	ماکروکنیدیوم‌ها به صورت مجتمع در اسپورودوکیم، میکروکنیدیوم‌ها تخم‌مرغی، بیضوی و قلوهای، بدون دیواره به صورت سرهای دروغین روی فیالیدها	Leslie and Summerell, 2008
<i>Fusarium proliferatum</i>	پرگنه به رنگ سفید و با میسلیم‌های هوایی فراوان و رنگ پرگنه از پشت تشتک پتری به رنگ عسلی روشن	فیالیدها به صورت مونوفیالید و پلی‌فیالید	میکروکنیدیوم‌ها تخم‌مرغی کشیده با پایه کوتاه شده به صورت زنجیره‌ای یا مجتمع در سرهای دروغین	Leslie and Summerell, 2008
<i>Fusarium tricinctum</i>	پرگنه صورتی رنگ با میسلیم‌های هوایی	فیالیدها به صورت مونوفیالید و منشعب	ماکروکنیدیوم‌ها صاف تا خمیده با سلول پایه پاشنه‌ای و سلول انتهایی خمیده، میکروکنیدیوم‌ها ۱-۲ سلولی و به اشکال مختلف تخم‌مرغی کشیده و شلجمی	Leslie and Summerell, 2008
<i>Cytospora chrysosperma</i>	پرگنه به رنگ سفید	کنیدیوم‌برها شفاف، منشعب یا غیرمنشعب	کنیدیوم‌ها تک سلولی، شفاف، الاتوئید و کشیده	

ادامه جدول ۲- خصوصیات ریخت‌شناختی سایر گونه‌های قارچی شناسایی شده مرتبط با شانکر و سرخشکیدگی درختان نارون در کلان‌شهر تبریز.

Table 2. Morphological features of other identified fungal species associated with canker and dieback of elm trees in Tabriz metropolis.

نام جدایه قارچی	ویژگی‌های پرگنه	ویژگی‌های کنیدیوم‌بر	ویژگی‌های کنیدیوم	کلید شناسایی
Fungal isolate name	Culture features	Conidiophore features	Conidium features	Identification key
		آسکوکارپ‌های تیره به صورت سطحی تا نیمه فرورفته در محیط کشت به صورت پراکنده، گرد تا کمی کشیده. زوائد موم‌مانند در قسمت بالایی آسکوکارپ، موجدار، بدون انشعاب، دیواره‌دار، زگیل‌دار و بلند. موهای جانبی به صورت ساده و زگیل‌دار، دیواره‌دار، بدون انشعاب و کوتاه	آسک‌ها گریزی شکل، پایه‌دار و دارای ۸ آسکوسپور. آسکوسپورها لیمویی شکل و به رنگ سبز زیتونی	Wang et al., 2016
<i>Chaetomium globosum</i>	پرگنه به رنگ زیتونی تا خاکستری تیره			
		کنیدیوم‌برها به دو نوع Verticillate و Penicillate	کنیدیوم‌ها به اشکال گرد، بیضی و تخم مرغی	Toledo et al., 2006
<i>Clonostachys rosea</i>	پرگنه به رنگ زرد لیمویی تا نارنجی			
		کنیدیوم‌برها Penicillate، شفاف، اغلب از نوع Terverticillate و ندر تا Quaterverticillate، متقارن و نامتقارن	کنیدیوم‌ها استوانه‌ای تا بیضوی، زنجیره‌ای	
<i>Geosmithia</i> sp.	پرگنه به رنگ سفید، دارای میسلیم‌های مسطح و متراکم و به صورت ناهموار			
		آسکوکارپ از نوع پریسیوم، به صورت انفرادی و مجتمع، شکل پریسیوم از تخم مرغی تا گلابی شکل و دارای گردن کوتاه	آسک‌ها دارای هشت آسکوسپور، استوانه‌ای شکل، آسکوسپورها به رنگ سبز تیره، بیضی شکل، با دیواره صاف، فاقد غلاف ژلاتینی	
<i>Sordaria</i> sp.	پرگنه به رنگ خاکستری تیره و دارای ریشه‌های هوایی تیره			

میزبان‌های مختلفی چون سیب‌زمینی و مرکبات می‌باشد. در نتیجه مطالعات انجام شده بر روی بیماری‌های صنوبر (*Populus deltoids*)، گونه *F. solani* به عنوان عامل شانکر روی این میزبان گزارش گردید (Boyer, 1961). این گونه همچنین از زخم‌های روی تنه درخت مرداب جداسازی و به عنوان عامل شانکر این میزبان گزارش شده است (Toole, 1961). گزارش این گونه برای میزبان نارون برای دنیا جدید بوده و اولین گزارش از وقوع این عامل بر روی درختان نارون در ایران مربوط به این پژوهش است.

گونه‌های جنس *Cytospora*، بیمارگرهای بالقوه روی میزبان‌های چوبی می‌باشند و به صورت اندوفیت-بیمارگر در این میزبان‌ها به سر می‌برند. برخی گونه‌های این جنس دارای میزبان اختصاصی هستند، این در حالیست که برخی گونه‌ها قابلیت ایجاد بیماری روی میزبان‌های مختلف را دارند. این قارچ به درختان یا قسمت‌هایی از درختان که زخمی شده‌اند و یا در شرایط ضعف و تنش به سر می‌برند، حمله می‌کند (Adams et al., 2005). در مواردی، قارچ بدون ایجاد شانکر و سایر علائم باعث انهدام شاخه و یا کل درخت می‌شود. گونه‌های *C. chrysosperma*، *C. carbonacea*، *C. ambiens*، *C. leucostoma*، *C. pulchella*، *C. pruinosopsis* و *C. ribis* از روی میزبان نارون در دنیا گزارش شده‌اند. گونه *C. rhodophila* برای اولین بار در سال ۱۹۸۳ از روی درختچه رز گزارش شده است (Fotouhifar et al., 2010). هویت این گونه‌ها بر اساس داده توالی ناحیه ITS-rDNA، در این مطالعه مورد تایید قرار گرفت. گزارش گونه *C. rhodophila* بر روی میزبان نارون برای دنیا جدید می‌باشد.

گونه‌های مختلف جنس *Pestalotiopsis* از روی میزبان‌های بازدانه از مناطق مختلف جهان جداسازی شده‌اند. علائم بر روی میزبان‌های مختلف به طرق مختلفی بروز می‌کند، ولی به طور عمده شامل شانکر در شاخه‌های انتهایی و ظهور ساختار قارچی در قسمت‌های دارای علائم می‌باشد. گونه‌های این جنس، طیف مختلفی از بیماری‌ها را شامل شانکر، شانکر سرشاخه، لکه برگی و بلایت برگ و ساقه ایجاد می‌کنند (Espinoza et al., 2008). گونه‌های این جنس، غالب در زیست‌بوم‌های

آزاددار یا سیاهدار از تیره Ulmaceae نیز گزارش شده است. گونه‌ی *O. novo-ulmi* بر اساس ویژگی‌هایی مانند نرخ رشد روزانه بیشتر، شکل حاشیه پرگنه ناصاف و گلبرگ مانند و رشد در دماهای پایین‌تر از گونه *O. ulmi* با نرخ رشد روزانه کمتر، پرگنه با حاشیه صاف و رشد در دماهای بالاتر قابل تمیز است (Braiser and kirk, 2001). پراکنش این بیماری در سطح شهر تبریز محدود به مناطق بکر و مناطقی می‌باشد که کمتر دستخوش دخالت‌های انسانی بوده است. گونه‌ی *O. novo-ulmi*، ۱۶ درصد (۱۹ جدایه) از کل جدایه‌ها در این مطالعه را به خود اختصاص داده است.

سی درصد (۳۶ جدایه) از کل جدایه‌های شناسایی شده در این تحقیق مربوط به جنس *Fusarium* می‌باشند. گونه‌های *F. solani*، *F. proliferatum* و *F. tricinctum* با استفاده از داده‌های ریخت‌شناختی و مولکولی شناسایی شدند. گونه‌ی *F. solani* از روی تعدادی از میزبان‌های چوبی مانند گونه‌ی *Dalbergia sissoo* Roxb. از پنجاب (Bajwa et al., 2003)، عنب (Zizipbus jujube) از خراسان جنوبی (Mirzaee et al., 2011)، افرا در نیوجرسی آمریکا (Pirone, 1978)، ساج (*Tectona grandis*) در تانزانیا (Hocking, 1968)، شاهتوت (Schreiber and Docinger, 1967)، درخت لاله (*Liriodendron tulipifera*) (Dochinger and Seliskar, 1962)، صنوبر شرقی (Boyer, 1961)، درخت کبوده (*Populus alba*) (Maini and Dance, 1965)، گردوی ایرانی (Chen and Stewart, 2000)، بلوط قرمز شمالی (Toole, 1962)، گونه‌های مرکبات (Fawcett, 1936) و شالک یا تبریزی (*Populus nigra*) (Barbee, 1962) گزارش شده است. هویت این گونه بر اساس توالی ناحیه TEF تایید گردید. گونه‌ی *F. proliferatum* از روی میزبان اقاکیا از آفریقای جنوبی (Roux and Wingfield, 1997) و از روی کاج قندی (*Pinus lambertiana*) از کالیفرنیا گزارش شده است (Stewart et al., 2016). در سال ۱۹۹۹ این گونه توسط موسوی جرف و همکاران از روی میزبان خرما از استان خوزستان و کاج ایرانی یا *Pinus eldarica* به عنوان میزبان این گونه از استان فارس گزارش گردیده است (به نقل از ارشاد، ۲۰۰۹). گونه‌ی *F. solani* بیمارگر روی

al., 2011). این گونه به عنوان عامل سرخشکیدگی از روی میزبان به چینی یا به ژاپنی از کشور چین گزارش شده است (Norin and Rumpunen, 2003). بیماری Mal secco بیماری آوندی شایع بر روی مرکبات در مراکز کلیدی پرورش مرکبات می باشد. علائم این بیماری به صورت سرخشکیدگی و شانکر در سرشاخه ها، پژمردگی و زردی برگ ها، گرفتگی و تغییر رنگ آوندی می باشد. عامل این بیماری *Ph. tracheiphila* شناسایی شده است (Liberato et al., 2007). گونه ی جدیدی از جنس *Phoma* به عنوان عامل شانکر سرشاخه درختان زیتون در کشور تونس در سال ۲۰۱۰ گزارش گردید (Rhouma et al., 2010). همچنین عامل این بیماری در کشور ایتالیا *Ph. incompta* شناسایی شده است (Tosi and Zazzerini, 1994). گونه *Ph. exigua var. heteromorpha* عامل شانکر خرزهره در اسپانیا شناخته شده است (Lahoz et al., 2009). گزارش گونه *D. glomerata* از روی میزبان نارون برای دنیا جدید می باشد.

گونه ی *Pl. ochracea* از رده Sordarimycetes، راسته Calosphaeriales و تیره Pleurostomataceae می باشد. در این تیره، چهار گونه از جنس *Pleurostomophora* با مرحله ی جنسی *Pleurostoma* حضور دارند (Reblova et al., 2004). شناسایی این گونه بر اساس ویژگی های پراکنه بر روی سه محیط کشت MEA، PDA و OA و حضور سه تیپ فیالیدی به همراه کنیدیوم ها با اندازه های مشخص انجام پذیرفت و نزدیکترین گونه به ویژگی های این جدایه، گونه *Pl. ochracea* بود. گونه مشابه *Pl. richardsiae* از درختان زیتون با علائم شانکر و همینطور بیماری های تنه از جنوب ایتالیا گزارش شده است (Carlucci et al., 2013, 2015). گزارش این گونه از روی میزبان نارون برای دنیا جدید می باشد.

قارچ های جنس *Seimatosporium* به عنوان بیمارگر از تیره های مختلف گیاهی شناخته می شوند و روی بافت های متفاوت از جنس های *Rosa*، *Rubus*، *Prunus*، *Salix*، *Cornus*، *Ledum*، *Rhododendron* و *Hypericum* ایجاد بیماری می کنند (Shoemaker and Muller, 1964; Pirozyński and Shoemaker, 1970; Sutton, 1975; Jaime et al., 1988; Okane et al., 1996).

گرمسیری و معتدل بوده (Bate-Smith and Metcalfe, 1957) و به صورت بیمارگر (Das et al., 2010)، اندوفیت (Liu et al., 2006; Wei et al., 2007; Wu et al., 2010) و ساپروفیت (Watanabe et al., 1982; Agarwal and Chauhan, 1988; Yanna Ho and Hyde, 1988; Hu et al., 2007; Liu et al., 2008) جداسازی می شوند. این جنس به سبب تولید متابولیت های ثانویه مهم، مورد توجه است (Strobel et al., 1996, 2002; ding et al., 2008; Aly et al., 2010; Xu et al., 2010). گونه های این جنس موجب بروز بیماری هایی با علائم انواع شانکر، زخم، سرخشکیدگی، لکه برگی، انواع بلایت، زردی و پوسیدگی میوه می شوند (Pirone, 1978; Kwee and Chong, 1990; Xu et al., 1999; Tagne and Mathur, 2001; Sousa et al., 2004; Espinoza et al., 2008). گونه های *P. funerea* و *P. sydowiana* موجب بروز بیماری سرخشکیدگی روی گروه مخروط داران می شوند که موجب قهوه ای شدن و در نهایت سرخشکیدگی در شاخه ها شده و ساختارهای قارچی سیاه رنگ در بافت آلوده مشاهده می شوند (Madar et al., 1991; Markovskaja et al., 2006). گونه های این جنس همچنین باعث بیماری تنه و پوسیدگی پس از برداشت در درختچه مو می شوند (Arzanlou et al., 2013; Jayawardene et al., 2015). پرتعداد پس از گونه های *Botryosphaeria* spp. جداسازی شده از شانکر مو در تگزاس می باشند (Úrbez-Torres et al., 2011). گزارش جنس *Pestalotiopsis* بر روی میزبان نارون برای ایران و دنیا جدید می باشد.

گونه های مختلف گروه *Phoma* بیمارگرهای مهمی می باشند و خسارات فراوانی به همراه دارند. از جمله گونه های گزارش شده جنس *Phoma* از روی میزبان نارون می توان به *Ph. cincta* از روی برگ *U. americana* از کارولینای جنوبی و *Paraboeremia putaminum* از کشور هلند اشاره کرد (De Gruyter and Noordeloos, 1992; Aveskamp et al., 2010). در مطالعه انجام شده در یونان، گونه ی *D. glomerata* به عنوان عامل شانکر سرشاخه روی میزبان هلو گزارش گردید (Thomidis et al., 2010).

نتیجه گرفت که بسته به منطقه جغرافیایی، عوامل شانکر و سرخشکیدگی، می‌توانند شامل گونه‌های قارچی مختلفی باشند. همچنین، می‌توان چنین برداشت کرد که علائم گرفتگی و تغییر رنگ در برش‌های عرضی، می‌توانند مربوط به گونه‌های مختلفی از گروه‌های قارچی باشند و در واقع درختان می‌توانند با چندین گونه مختلف قارچی، به صورت همزمان آلوده شده باشند.

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.

گونه‌های قارچی *Ch. rectangulare*, *Ch. globosum*, *F. proliferatum*, *C. rhodophila*, *S. Co. macrothecia*, *Cl. rosea* و *D. glomerata* برای اولین بار از روی میزبان نارون در این مطالعه گزارش می‌شوند. گونه‌ی *S. macrospermum* از روی نارون از کشورهای انگلیس و فرانسه گزارش گردیده است (Sutton, 1980; Nag Raj, 1993). گونه‌های *C. rhodophila* و *Pl. ochracea* برای میکوبیوتای ایران جدید هستند.

این مطالعه گزارشی از جداسازی و شناسایی ریخت‌شناختی و مولکولی قارچ‌های همراه با عوامل شانکر و سرخشکیدگی روی درخت نارون می‌باشد. با توجه به مطالعات قبلی انجام شده روی درخت نارون و سایر درختان جنگلی و زینتی در ایران (Hashemi et al., 2017)، و همچنین از نتایج این تحقیق می‌توان چنین

منابع مورد استفاده

- 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.
- Afsharpour F and Adeli E, 1974. Dutch elm disease *Ceratocystis ulmi* (Buisman) Moreau in Iran. *Research Institute of Forest and Rangelands* 16: 27.
- Agarwal AK and Chauhan S, 1988. A new species of the genus *Pestalotiopsis* from Indian soil. *Indian Phytopathology* 41: 625–627.
- Aly AH, Debbab A, Kjer J and Proksch P, 2010. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. *Fungal Diversity* 41(1): 1–16.
- Arsenijevic M, Boric B, Draganic M, Spica G and Aleksic G, 1999. Cultural characteristics and pathogenicity of *Seimatosporium lichenicola* (Corda) Shoemaker et Müller isolated from blackberry (*Rubus fruticosus* L.) plants in Yugoslavia. *Journal of Plant Diseases and Protection* 353–362.
- Arzanlou M, Narmani A, Moshari S, Khodaei S and BabaiAhari A, 2013. *Truncatella angustata* associated with grapevine trunk disease in northern Iran. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 46: 1168–1181.
- Aveskamp M, de Gruyter H, Woudenberg J, Verkley G and Crous PW. 2010. Highlights of the Didymellaceae: A polyphasic approach to characterise *Phoma* and related pleosporalean genera. *Studies in Mycology*. 65: 1–64.
- Bajwa R, Javid A and Shah MBM, 2003. Extent of shisham (*Dalbergia sissoo* Roxb.) decline in Sialkot, Gujranwala, Lahore and Sargodha districts. *Mycopathologia* 1: 1–5.
- Barbee JG, 1962. Development of *Fusarium* canker of black poplars. (Abst.) *Phytopathology* 52: 724.
- Bate-Smith EC and Metcalfe CR. 1957. Leucanthocyanins .3. The nature and systematic distribution of tannin in dicotyledonous plants. *Botanical Journal of the Linnean Society* 55:669–705.
- Begoude BAD, Slippers B, Wingfield MJ and Roux J, 2010. Botryosphaeriaceae associated with *Terminalia catappa* in Cameroon, South Africa and Madagascar. *Mycological Progress* 9(1) : 101–123.

- Boerema GH, De Gruyter J and Noordeloos ME, 1997. Contributions towards a monograph of *Phoma* (Coelomycetes)—IV. Section Heterospora: Taxa with large sized conidial dimorphs, in vivo sometimes as *Stagonosporopsis* synanamorphs. *Persoonia* 16(3): 335–371.
- Boyer MG, 1961. A *FUSARIUM* CANKER DISEASE OF *POPULUS DELTOIDES* MARSH. *Canadian Journal of Botany* 39(5): 1195–1204.
- Braiser CM, 1991. *Ophiostoma novo-ulmi*. sp., causation agent of the Dutch Elm Disease pandemics. *Mycopathologia* 115: 151–61.
- Braiser CM and Kirk SA, 2001. Designation of the EAN and NAN races of *Ophiostoma novo-ulmi* as subspecies. *Mycological Research* 105 (5): 547–554.
- Carlucci A, Cibelli F, Lops F, Phillips AJ, Ciccarone C and Raimundo ML, 2015. *Pleurostomophora richardsiae* associated with trunk diseases of grapevines in southern Italy. *Phytopathologia Mediterranea*: 109–123.
- Carlucci A, Raimondo ML, Cibelli F, Phillips AJ and Lops F, 2013. *Pleurostomophora richardsiae*, *Neofusicoccum parvum* and *Phaeoacremonium aleophilum* associated with a decline of olives in southern Italy. *Phytopathologia Mediterranea* 52(3) :517–527.
- Chen W and Stewart WJ, 2000. First report of stem canker of English walnut caused by *Fusarium solani* in South Africa. *Plant Disease* 84: 592.
- Das Ranjana, Chutia M, Das K and Jha DK, 2010. Factors affecting sporulation of *Pestalotiopsis disseminata* causing grey blight disease of *Persea bombycina* Kost., the primary food plant of muga silkworm. *Crop Protection* 29: 963–968.
- De Gruyter J and Noordeloos ME. 1992. Contributions towards a monograph of *Phoma* (Coelomycetes) - I. 1. Section *Phoma*: taxa with very small conidia in vitro. *Persoonia* 15: 71–92. (8559).
- Deng TJ, Li QL, Chen XL, Huang SP, Guo TX, Mo JY, Wei JM and Hsiang T. 2015. First report of *Lasiodiplodia theobromae* associated with stem canker of *Cassia fistula* in Guangxi, South China. *Plant Disease* 99(2): 288–288.
- Ding G, Liu S, Guo L, Zhou Y and Che Y, 2008. Antifungal metabolites from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis foedan*. *Journal of Natural Products* 71(4):615–618.
- Dochinger LS and Seliskar CE, 1962. *Fusarium* canker found on yellow poplar. *Journal of Forestry* 60: 331–333.
- Ershad D, 2009. *Fungi of Iran*. 3rd ed. Agricultural Research. Education & Extension Organization, Publication. No. 10, Tehran, 531.
- Espinoza JG, Briceno EX, Keith LM and Latorre BA, 2008. Canker and Twig Dieback of blueberry caused by *Pestalotiopsis* spp. and a *Truncatella* sp. in Chile. *Plant Diseases* 92:1407–1414.
- Farr DF and Rossman AY, 2019. *Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA*. Available online at <https://nt.ars-grin.gov/fungal-databases>.
- Fawcett SH, 1936. *Citrus diseases and their control*. (Mc Graw-Hill Book Company Inc.: New York).
- Fotouhifar KB, Hedjaroude GA and Leuchtmann A, 2010. ITS rDNA phylogeny of Iranian strains of *Cytospora* and associated teleomorphs. *Mycologia* 102(6):1369–1382.
- Hashemi H, Mohammadi H and Abdollahzadeh J, 2017. Symptoms and fungi associated with elm trees decline in Iran. *European Journal of Forest Research* 136(5-6): 857–879.
- Heath RN, Roux J, Slippers B, Drenth A, Pennycook SR, Wingfield BD and Wingfield MJ, 2011. Occurrence and pathogenicity of *Neofusicoccum parvum* and *N. mangiferae* on ornamental *Tibouchina* species. *Forest Pathology* 41:48–51.
- Hocking D, 1968. Stem canker and pink stain of Teak in Tanzania associated with *Fusarium solani*. *Plant Disease Reporter* 52: 628–629.

- Hu HL, Jeewon R, Zhou DQ, Zhou TX and Hyde KD, 2007. Phylogenetic diversity of endophytic *Pestalotiopsis* species in *Pinus armandii* and *Ribes* spp.: evidence from rDNA and β -tubulin gene phylogenies. *Fungal Diversity* 24: 1–22.
- Jaime R, Montealegre A, Nancy M and Andrade S, 1988. *Seimatosporium lichenicola* (Cda.) Shoemaker et Muller: nuevo patogeno del frambueso (*Rubus idaeus* L.), en la x region de Chile. *Agricultural Technology*. 48 3: 252–254.
- Jayawardene RS, Zhang W, Liu M, Maharachchikumbura SSN, Zhou Y, Huang JB, Nilthong S, Wang ZY, Li XH, Yan JY and Hyde KD, 2015. Identification and characterization of *Pestalotiopsis*-likefungi related to grapevinediseases in China. *Fungal Biology* 119(5): 348–61.
- Kwee LT and Chong KK, 1990. Guava in Malaysia: production, pests and diseases. Tropical Press SDN. BHD, Kuala Lumpur.
- Lahoz E, Caiazza R, Carella A, Porrone F and Porrone F, 2009. *Colletotrichum acutatum* Simmonds as agent of anthracnose and stem blight on Nerium oleander in Italy. *Floriculture Ornamental Biotechnol* 3: 62–66.
- Leslie JF and Summerell BA, 2008. The *Fusarium* laboratory manual. John Wiley & Sons.
- Liberato JR, Cacciola SO and Magnano di San Lio G, 2007. Mal secco disease of citrus (*Phoma tracheiphila*). *Pest Disease Image Library* 11(01): 2007.
- Ligoxigakis EK, Markakis EA, Papaioannou IA and Typas MA, 2013. First report of palm rot of *Phoenix* spp. caused by *Neodeightonia phoenicum* in Greece. *Plant Disease* 97:286.
- Liu AR, Wu XP, Xu T, Guo LD and Wei JG, 2006. Notes on endophytic *Pestalotiopsis* from Hainan, China. *Mycosystema* 25: 389–397.
- Liu L, Liu S, Jiang L, Chen X, Guo L and Che Y, 2008. Chloropupekeananin, the first chlorinated pupukeanane derivative, and its precursors from *Pestalotiopsis fici*. *Organic Letters* 10: 1397–1400.
- Madar Z, Solel Z and Kimchi M, 1991. Pestalotiopsis canker of cypress in Israel. *Phytoparasitica* 19(1): 79–81.
- Maharachchikumbura SS, Hyde KD, Groenewald JZ, Xu J and Crous PW, 2014. revisited. *Studies in Mycology* 79:121–186.
- Parker AG, Goudie AS, Anderson DE, Robinson MA and Bonsall C, 2002. A review of the mid-Holocene elm decline in the British Isles. *Progress in Physical Geography* 26(1):.1–45.
- Maini JS and Dance BW, 1965. Temperature relationships of a blight attributed to *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. on trembling aspen suckersCanada, Department of Forestry, Forest Entomology and Pathology Branch, Bi-monthly Progress Report 21(2).
- Markovskaja S, Kačergius A, Davydenko K and Fraser S, 2016. First record of *Neocatenulostroma germanicum* on pines in Lithuania and Ukraine and its co-occurrence with *Dothistroma* spp. and other pathogens. *Forest pathology* 46(5):.522–533.
- Mayorquin JS, Eskalen A, Downer AJ, Hodel DR and Liu A, 2012. First report of multiple species of the Botryosphaeriaceae causing bot canker disease of Indian laurel-leaf fig in California. *Plant Disease* 96:459.
- Mhmoud NA, Ahmed SA, Fahal AH, de Hoog GS, van den Ende AG and van de Sande WW, 2012. *Pleurostomophora ochracea*, a novel agent of human eumycetoma with yellow grains. *Journal of Clinical Microbiology* 50(9): 2987–2994.
- Mirzaee MR, Jahani M, Mahmoudi H and Ghos K, 2011. First report of jujube dieback caused by *Fusarium solani*. *Journal of Plant Pathology* 93:4.

- Moller EM, Bahnweg G, Sanderman H 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. *Nucleic Acids Research* 20: 6115–6116.
- Nag Raj TR, 1993. Coelomycetous anamorphs with appendage-bearing conidia. Mycologue Publications, Waterloo, Ontario, 1–1101.
- Norin I and Rumpunen K, 2003. Pathogens on Japanese quince (*Chaenomeles japonica*) plants.
- Nylander JAA. 2004. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Okane I, Nakagiri A and Ito T, 1996. *Discostroma tricellulare*, a new endophytic ascomycete with a *Seimatosporium* anamorph isolated from *Rhododendron*. *Canadian Journal of Botany* 74: 1338–1344.
- Pirone PP, 1978. Diseases and pests of ornamental plants. Wiley Interscience. New York.
- Pirozyński H and Shoemaker RA, 1970. *Seimatosporium* leaf spot of *Ledum* and *Rhododendron*. *Canadian Journal of Botany* 48: 2199–2203.
- Rahnama K and Iraqi MM, 2009. Study on two species of *Ophiostoma* in relation with Dutch elm disease in Iran. *Rostaniha* 10(2):147.
- Ronquist F and Huelsenbeck JP. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572-1574.
- Reblova M, Mostert L, Gams W and Crous PW, 2004. New genera in Calosphaeriales: *Togniniella* and its anamorph *Phaeocrella*, and *Calosphaeriophora* as anamorph of *Calosphaeria*. *Studies in Mycology* 50: 533–550.
- Rhouma A, Triki MA, Krid S, Tuset JJ and Msallem M, 2010. First report of a branch dieback of olive trees in Tunisia caused by a *Phoma* sp. *Plant disease* 94(5): 636–636.
- Richens R H, 1983. Elm. Cambridge University Press.
- Roux J and Wingfield MJ, 1997. Survey and virulence of fungi occurring on diseased *Acacia mearnsii* in South Africa. *Forest ecology and management* 99(3): 327–336.
- Schreiber LR and Docinger LS, 1967. *Fusarium* canker on paper mulberry (*Broussonetia papyrifera*). *Plant Disease Reporter* 51: 531–532.
- Shoemaker RA and Muller E, 1964. Generic correlation and concepts: *Clathridium* (= *Griphosphaeria*) and *Seimatosporium* (= *Sporocadus*). *Canadian Journal of Botany* 42: 403–411.
- Sinclair WA and Campana RJ. 1978. Dutch Elm Disease. Perspectives after 60 years. *Search Agriculture* 8(5): 52.
- Espinoza JG, Briceno EX, Keith LM and Latorre BA. 2008. Canker and Twig Dieback of blueberry caused by *Pestalotiopsis* spp. and a *Truncatella* sp. in Chile. *Plant Diseases* 92:1407–1414.
- Sinclair WA, Lyon HH and Johnson WT, 1987. Diseases of trees and shrubs. (Cornell University Press: Ithaca, NY).
- Sousa MF, Tavares RM, Geros H and Lino-Neto T, 2004. First report of *Hakea sericea* leaf infection caused by *Pestalotiopsis funerea* in Portugal. *Plant Pathology* 53: 535.
- Stanosz G, Smith D, LaPhillip P and Daughtrey ML, 2015. Leyland cypress shoot blight and canker caused by *Diplodia cupressi* on Long Island, New York. *Plant Disease* 99:726.
- Stewart JE, Otto K, Cline GA, Dumroese RK, Klopfenstein NB and Kim MS, 2016. First Report of *Fusarium proliferatum* Causing *Fusarium* Root Disease on Sugar Pine (*Pinus lambertiana*) in a Forest Container Nursery in California. *Plant Disease* 100(12): 2534–2534.
- Stipes RJ and Campana RJ, 1981. Compendium of elm diseases. American Phytopathological Society.

- Stipes RJ. 2000. The Management of Dutch elm disease. In: Dunn CP, ed. The elms - Breeding, Conservation and Disease Management. Boston, USA: Kluwer Academic Publishers 157–172.
- Strobel G, Ford E, Worapong J, Harper JK, Arif AM, Grant DM, Fung PC and Chau MW, 2002. Isopestacin, an isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, possessing antifungal and antioxidant activities. *Phytochemistry* 60: 179–183.
- Strobel G, Yang XS, Sears J, Kramer R, Sidhu RS and Hess WM, 1996. Taxol from *Pestalotiopsis microspora* of *Taxus wallachiana*. *Microbiology* 142:435–440.
- Sutton BC, 1975. Diploceras, another synonym of *Seimatosporium*. *Transactions of the British Mycological Society* 64(3): 483–487.
- Sutton BC, 1980. The Coelomycetes. fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, 696.
- Tagne A and Mathur SB, 2001. First report of chlorotic spot of maize caused by *Pestalotiopsis neglecta*. *Plant Pathology* 50:79.
- Thomidis T, Michailides TJ and Exadaktylou E, 2011. *Phoma glomerata* (Corda) Wollenw. & Hochapfel a new threat causing cankers on shoots of peach trees in Greece. *European journal of plant pathology* 131(2): 171.
- Toole ER, 1961. New diseases of swamp tupelo. *Phytopathology* 51: 646.
- Toole ER, 1962. Tupelo lesion caused by *Fusarium solani*. *Plant Disease Reporter* 46: 732–733.
- Tosi L and Zizzerini A, 1994. *Phoma incompta* a new olive parasite in Italy. *Petria* 4: 161–170.
- Tubby KV and Webber JF, 2010. Pests and diseases threatening urban trees under a changing climate. *Forestry* 83:451–459.
- Toledo LF, Britto FB, Araújo OG, Giasson LM and Haddad CF. 2006. The occurrence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Brazil and the inclusion of 17 new cases of infection. *South American Journal of Herpetology* 1(3):.185–192.
- Úrbez-Torres JR, Peduto F, Striegler k, Rupe JC, Cartwright RD and Gubler WD, 2011. Characterization of fungal pathogens associated with grapevine trunk diseases in Arkansas and Missouri. *Fungal Diversity* 52, 169–189.
- Varela PC, Redondo Fernández V, Mansilla Va'zquez JP and Agui'n Casal O, 2011. First report of dieback on hybrid Rhododendrons caused by *Neofusicoccum luteum* and *N. parvum* in Spain. *Plant Disease* 95:221.
- Wang XW, Lombard L, Groenewald J.Z, Li J, Videira SIR, Samson RA, Liu XZ and Crous PW, 2016. Phylogenetic reassessment of the *Chaetomium globosum* species complex. *Persoonia*36: 83.
- Watanabe K, Motohashi K and Ono Y, 2010. Description of *Pestalotiopsis pallidotheae*: a new species from Japan. *Mycoscience* 51: 182–188.
- Wei JG, Xu T, Guo LD, Liu AR, Zhang Y and Pan XH, 2007. Endophytic *Pestalotiopsis* species associated with plants of Podocarpaceae, Theaceae and Taxaceae in southern China. *Fungal Diversity* 24:.55– 74.
- Wu CG, Tseng HY and Chen ZC, 1982. Fungi inhabiting on *Schoenoplectus triqueter* (L.) Palla (I). *Taiwania* 27:35–38.
- Xu J, Ebada SS and Proksch P, 2010. *Pestalotiopsis* a highly creative genus: chemistry and bioactivity of secondary metabolites. *Fungal Diversity* 44(1): 15–31.
- Xu L, Kusakari S, Hosomi A, Toyoda H and Ouchi A, 1999. Postharvest disease of grape caused by *Pestalotiopsis* species. *Japanese Journal of Phytopathology* 65(3):305–311.

Yanna Ho WH and Hyde KD, 2002. Fungal succession on fronds of *Phoenix hanceana* in Hong Kong. Fungal Diversity 10: 185–211.

Zare R, Asgari B and Gams W. 2010. The species of *Coniolarrella*. Mycologia 102(6): 1383–1388.

Identification of Fungal Species Associated with Dieback and Canker Disease of Elm Trees in Tabriz Metropolis

N Ahmadi¹ and M Arzanlou^{1*}

¹ Former MSc Student and Professor of Plant Pathology and Mycology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

*Corresponding author: arzanlou@tabrizu.ac.ir

Received: 26 February 2019

Accepted: 14 September 2019

Abstract

Elm is one of the most important ornamental trees and is used extensively in design of urban green space. Dieback and canker disease of elm has been widespread in Tabriz green space and other cities in province in recent years. In order to identify the factors involved in dieback and canker of elm trees in Tabriz city, symptomatic and healthy samples were taken and 208 fungal isolates from 64 plant samples were purified. Identification of species was carried out using morphological and sequence data of the ITS or TEF regions for some species. In this study, 16 species of fungi including, *Ophiostoma novo-ulmi*, *Fusarium solani*, *F. proliferatum*, *F. tricinctum*, *Pestalotiopsis brassicae*, *Cytospora rhodophila*, *C. chrysosperma*, *Didymella glomerata*, *Chaetomium globosum*, *Ch. rectangulare*, *Clonostachys rosea*, *Seimatosporium lichenicola*, *Coniophora macrothecia*, *Pleurostomophora ochracea*, *Sordaria* sp. and *Geosmithia* sp were isolated from sapwood and wood parts of trunk and main branches with vascular discoloration and healthy trees. Among the identified isolates, *Fusarium* and *Chaetomium* were the most abundant taxa. *Chaetomium globosum*, *Ch. rectangulare*, *F. proliferatum*, *S. lichenicola*, *P. brassicae*, *Co. macrothecia*, *Pl. ochracea*, *C. rhodophila*, *Geosmithia* sp., *Cl. rosea* and *D. glomerata* are new reports on elm host worldwide.

Keywords: Elm, Dieback, *Pestalotiopsis*, *Cytospora*, *Fusarium*, *Ophiostoma*.