

## ردیابی گونه *Biscogniauxia mediterranea*، عامل بیماری پوسیدگی ذغالی بلوط از جنگل‌های ارسباران و ارزیابی بیماری‌زایی آن روی بلوط در شرایط گلخانه\*

سعید قاسمی اسفهلان<sup>۱</sup>، مهدی ارزنلو<sup>۲\*</sup> و اسداله بابایی اهری<sup>۳</sup>

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۹/۲۳؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱/۲۲)

### چکیده

بیماری نوظهور پوسیدگی ذغالی بلوط به عنوان یک تهدید جدی جنگل‌های بلوط در ایران مطرح و گونه *Biscogniauxia mediterranea* به عنوان عامل بیماری در جنگل‌های منطقه زاگرس معرفی شده است. با این وجود اطلاعاتی در زمینه وقوع این بیماری در جنگل‌های منطقه ارسباران در دسترس نمی‌باشد. تحقیق حاضر با هدف ردیابی عامل بیماری در جنگل‌های بلوط منطقه ارسباران صورت پذیرفت. برای این منظور از تنه و شاخه درختان بلوط دارای علائم سرخشیدگی و زوال و همچنین درختان سالم بلوط در جنگل‌های منطقه حاتم بیگ مشگین شهر و منطقه کلپیر در طول فصل رشد سال ۱۳۹۳ نمونه برداری شد. در مجموع ۱۴ جدایه متعلق به جنس *Biscogniauxia* از درختان بلوط بیمار و سالم جداسازی گردید. هویت این جدایه‌ها با استفاده از آغازگرهای اختصاصی از قبل طراحی شده و همچنین داده‌های توالی ناحیه ITS-rDNA، گونه *B. mediterranea* تعیین گردید. روی محیط کشت عصاره مالت آگار در شرایط آزمایشگاهی ساختارهای غیر جنسی قارچ تشکیل شد. ساختارهای جنسی این گونه در شرایط طبیعی مشاهده نگردید و تلاش‌های انجام گرفته برای القاء مرحله جنسی این گونه در شرایط آزمایشگاه ناموفق بود. ارزیابی بیماری‌زایی جدایه‌های این گونه روی نهال‌های دو ساله بلوط سیاه (*Quercus macranthera*) در شرایط گلخانه نشان داد که تمامی جدایه‌ها روی این گونه از قدرت بیماری‌زایی برخوردار می‌باشند. تحقیق حاضر اولین مطالعه در زمینه ردیابی بیماری پوسیدگی ذغالی بلوط و شناسایی عامل بیماری در جنگل‌های ارسباران می‌باشد.

کلیدواژه: زوال، تشخیص مولکولی، بلوط سیاه، آغازگرهای اختصاصی، زاگرس، Xylariaceae

\* بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول ارائه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

\*\* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: arzanlou@hotmail.com

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز.

۲. دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز.

۳. استاد گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز.

## Detection of *Biscogniauxia mediterranea*, the causal agent of charcoal rot disease on oak trees in Arasbaran forests and evaluation of its pathogenicity on oak under glasshouse conditions\*

S. Ghasemi-Esfahlan<sup>1</sup>, M. Arzanlou<sup>2\*\*</sup> and A. Babai-Ahari<sup>3</sup>

(Received: 14.12.2015; Accepted: 10.3.2016)

### Abstract

The new emerging charcoal rot disease of oak is a serious threat for oak forests in Iran. *Biscogniauxia mediterranea* has been determined as the cause of charcoal rot disease on oak, in Zagros region. However, there is no data available on the incidence of this disease in Arasbaran forests. With this research, we aimed to detect the causal agent of charcoal disease in the Hatam-Baig and Kaleibar regions in Arasbaran forests, Iran. Towards this aim, samples were collected from trunk and branches of oak trees with dieback and decline symptoms as well as healthy oak trees in the region during June and September 2014. In total 14 isolates belonging to the genus *Biscogniauxia* were recovered from symptomatic and healthy oak trees. The isolates were identified as *B. mediterranea* using previously designed species-specific primer set for the ITS-rDNA region. Asexual morph of the species was developed on MEA culture medium. Sexual structures were not observed under natural conditions and efforts made to induce the sexual structures of the species in laboratory conditions were unsuccessful. The results of pathogenicity assay on two-years oak trees (*Quercus macranthera*), revealed that all of the isolates tested in this study were pathogenic under greenhouse conditions. This is first report on the detection of charcoal rot disease of oak trees and identification of the causal agent in Arasbaran forests.

**Keywords:** Decline, Molecular detection, *Quercus macranthera*, Specific primer, Xylariaceae

---

\* Part of MSc. Thesis of The First Author Submitted to Agriculture Faculty, University of Tabriz, Tabriz, Iran

\*\* Corresponding author's email: arzanlou@hotmail.com

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

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

3. Professor, Plant Protection Department, Agriculture Faculty, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

## مقدمه

بلوط (*Quercus* L.) با داشتن ۵۰۰ گونه یکی از فراوان‌ترین و به لحاظ اجتماعی، اقتصادی، و اکولوژیکی یکی از مهم‌ترین جنس‌های گیاهی در نیمکره شمالی است (Fortini et al. 2009). بیماری پوسیدگی ذغالی بلوط که توسط گونه *Biscogniauxia mediterranea* Kuntze (De Not.) ایجاد می‌شود، به عنوان یک تهدید جدی گونه‌های بلوط در دنیا مطرح می‌باشد (Ragazzi et al. 2012, Vannini and Scarascia 1991). گونه‌های مختلف بلوط شامل بلندمازو (*Q. castaneifolia* L.)، بلوط قرمز اروپایی (*Q. pubescens* Willd.) و بلوط مجاری (*Q. frainetto* Ten.) به این بیماری حساس می‌باشند (Jurc and Ogris 2005, Ragazzi et al. 2012, Vannini and Scarascia 1991). با این وجود خسارت بیماری روی بلوط چوب پنبه‌ای (*Quercus suber* L.) به مراتب بیشتر است و منجر به زوال و مرگ درختان آلوده در طول یک یا چند سال می‌گردد (Mazzaglia et al. 2001). بیماری پوسیدگی ذغالی درختان بلوط مسئله جدی در جنگل‌های پرتغال (Nugent et al. 2005) و اسلوونی (Helander et al. 2007) به شمار می‌رود و از آفریقا، آمریکای مرکزی، اروپا و روسیه نیز گزارش شده است (Ju et al. 1998, Manion and Griffin 1986, San Martin and Rogers, 1993). شیوع چشمگیر بیماری روی بلوط چوب پنبه‌ای (*Q. suber*) و بلوط همیشه سبز (*Q. ilex* L.) در آفریقا، اسپانیا، پرتغال، اسلوونی و ایتالیا گزارش شده است (Jurc et al. 2005). رشد وسیع استرومای قارچ *B. mediterranea* روی شاه بلوط (*Castanea sativa* Mill.) از بریتانیا نیز گزارش شده که سبب جدا شدن پوست در ناحیه وسیعی از تنه شده بود (Spooner 1986). حساسیت به این بیماری با وقوع دوره‌های بحرانی

خشکسالی و آتش سوزی در جنگل‌های بلوط مرتبط می‌باشد. گونه *B. mediterranea* در شرایطی که میزبان تحت تاثیر تنش‌های محیطی باشد، ایجاد بیماری می‌کند. وقتی میزبان تحت تنش کم آبی واقع می‌شود، عامل بیماری از طریق بافت‌های آوندی وارد شده و بافت‌های چوب و پوست را کلونیزه کرده که ممکن است منجر به مرگ میزبان در طول یک فصل رویشی شود (Vannini and Scarascia 1991, Vannini and Valentini 1994). این گونه بخشی از چرخه زندگی خود را به صورت اندوفیت در بافت‌های بلوط سپری می‌کند (Mazzaglia et al. 2001). عامل بیماری فاز اندوفیتی خود را در اندام‌های مختلف میزبان از قبیل چوب، پوست، جوانه، سرشاخه و برگ بدون ایجاد علایم روی میزبان سپری می‌کند (Anselmi et al. 2000). دارا بودن فاز اندوفیتی و بقا در میزبان سالم یک استراتژی مهم برای این بیمارگر به حساب می‌آید، به این ترتیب که به محض متاثر شدن میزبان از تنش‌های محیطی و تغییر فاز این گونه از اندوفیتی به بیمارگری، عامل بیماری به سرعت بافت‌های میزبان را کلونیزه کرده و تخریب می‌نماید (Anselmi et al. 2000). همزمان با مرگ شاخه‌ها و تنه، در زیر پوست بافت استرومایی بالشتکی شکل و تیره رنگ قارچ توسعه پیدا کرده که در اثر رشد آن و فشار ایجاد شده، پوست در محل بافت استرومایی ترک برمی‌دارد و به صورت نواری از تنه جدا می‌شود و بافت استرومایی در معرض دید واقع می‌شود که در داخل این بافت استرومایی پریسیوم‌های قارچ عامل بیماری تشکیل می‌شوند (Mazzaglia et al. 2001, Luchi et al. 2005, Mirabolfathi et al. 2013). آسکوسپوره‌های قارچ به عنوان مایه آلوده کننده اولیه در ایجاد آلودگی عمل می‌کنند (Mazzaglia et al. 2001). در سال‌های اخیر بیماری پوسیدگی ذغالی بلوط به

جدول ۱. فهرست جدایه‌های *Biscogniauxia mediterranea* بازیافت‌شده از درختان بلوط در مناطق کلیبر و مشگین شهر.

**Table 1. List of *Biscogniauxia mediterranea* isolates recovered from oak trees in the Kaleibar and Meshkinshahr regions.**

| منطقه نمونه برداری (Sampling site) | بافت (Tissue)                 | جدایه‌ها (Isolates) |
|------------------------------------|-------------------------------|---------------------|
| مشگین شهر (Meshkinshahr)           | تنه و شاخه (Trunk and branch) | CCTU135             |
| مشگین شهر (Meshkinshahr)           | تنه و شاخه (Trunk and branch) | CCTU 110            |
| کلیبر (Kaleibar)                   | تنه و شاخه (Trunk and branch) | CCTU 148            |
| کلیبر (Kaleibar)                   | پوست (Bark)                   | CCTU 111            |
| کلیبر (Kaleibar)                   | تنه و شاخه (Trunk and branch) | CCTU 112            |
| مشگین شهر (Meshkinshahr)           | پوست (Bark)                   | CCTU 114            |
| مشگین شهر (Meshkinshahr)           | تنه و شاخه (Trunk and branch) | CCTU 115            |
| کلیبر (Kaleibar)                   | تنه و شاخه (Trunk and branch) | CCTU 116            |
| کلیبر (Kaleibar)                   | پوست (Bark)                   | CCTU 141            |
| کلیبر (Kaleibar)                   | پوست (Bark)                   | CCTU 116            |
| کلیبر (Kaleibar)                   | تنه و شاخه (Trunk and branch) | CCTU 117            |
| کلیبر (Kaleibar)                   | پوست (Bark)                   | CCTU 147            |
| کلیبر (Kaleibar)                   | تنه و شاخه (Trunk and branch) | CCTU 118            |
| کلیبر (Kaleibar)                   | تنه و شاخه (Trunk and branch) | CCTU 144            |

## روش بررسی

### جمع‌آوری نمونه‌ها و جداسازی جدایه‌ها

جهت نمونه‌برداری بازدیدهایی از جنگل‌های حاتم‌بیگ مشگین‌شهر (استان اردبیل) و کلیبر (استان آذربایجان شرقی) طی مرداد و شهریور سال ۱۳۹۳ به عمل آمد. نمونه‌برداری از قسمت‌های تنه و شاخه درختان بلوط سالم و درختان دارای علایم زوال بصورت تصادفی انجام شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده، با درج تاریخ، محل جمع‌آوری، کد نمونه و مشخصات جغرافیایی، در داخل پاکت‌های کاغذی جداگانه به آزمایشگاه منتقل شدند. اطلاعات مربوط به جدایه‌های قارچی در جدول شماره ۱ ذکر شده است. جداسازی مطابق روش بلومنستین (Blumenstein 2010) انجام شد به این صورت که ابتدا با استفاده از اسکالپل یا چاقوی تیز استریل قطعاتی به اندازه ۵-۳

عنوان یک تهدید جدی جنگل‌های بلوط در ایران مطرح و گونه *Biscogniauxia mediterranea* به عنوان عامل بیماری در جنگل‌های منطقه زاگرس معرفی شده است (Mirabolfathi et al. 2011, 2013). با این وجود اطلاعات کافی در خصوص شیوع بیماری و پراکنش عامل بیماری در سایر مناطق جنگلی ایران در دسترس نمی‌باشد. از این رو در بررسی حاضر تلاش شد عامل بیماری پوسیدگی ذغالی بلوط (*B. mediterranea*) از درختان بلوط دارای علایم سرخشکیدگی و زوال و همچنین از درختان بلوط سالم در جنگل‌های ارسباران جداسازی و به دو روش مولکولی و بررسی صفات ریخت شناختی شناسایی و بیماری‌زا بودن جدایه‌ها روی نهال‌های دو ساله بلوط سیاه (*Quercus macranthera* Fish and Mey.) در شرایط گلخانه مورد ارزیابی قرار گیرد.

## شناسایی مولکولی جدایه‌ها با استفاده از آغازگرهای اختصاصی گونه

برای شناسایی مولکولی *B. mediterranea* از دیگر گونه‌های این جنس از جفت آغازگر پیشرو (BmF: 5'GGTCGTGGTGTGTAGCGTGA3') و پس‌رو (BmR: 5' GCTGCAGAAGCGAGAGTGTG 3') که توسط ارزنلو و همکاران (Arzanlou et al. in press, 2016) بر مبنای توالی ناحیه ITS-rDNA طراحی شده‌اند، استفاده گردید. این جفت آغازگر قطعه‌ای به طول ۴۰۰ جفت باز را به صورت اختصاصی از جدایه‌های *B. mediterranea* تکثیر می‌نماید. مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ۲/۵ میکرولیتر بافر واکنش (1X PCR buffer)، ۱/۵ میلی‌مول کلریدمنیزیم، ۰/۲ میلی‌مول از هر dNTP، پنج پیکومول از هر آغازگر، ۰/۵ واحد آنزیم پلی‌مراز (*Taq* DNA polymerase) و ۱۰ الی ۱۵ نانوگرم از DNA الگو را شامل می‌شد. حجم واکنش با استفاده از آب دیونیزه استریل به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. تکثیر نواحی ژنومی مورد نظر با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (GenAmp PCR System 9700) و با اعمال حرارت  $95^{\circ}\text{C}$  به مدت پنج دقیقه جهت واسرشت سازی اولیه و به دنبال آن  $36^{\circ}\text{C}$  چرخه شامل  $94^{\circ}\text{C}$  به مدت ۳۰ ثانیه،  $56^{\circ}\text{C}$  به مدت ۳۰ ثانیه و  $72^{\circ}\text{C}$  به مدت ۷۲ به مدت ۶۰ ثانیه و در نهایت یک چرخه  $72^{\circ}\text{C}$  به مدت هفت دقیقه جهت گسترش نهایی انجام شد. درجه حرارت دستگاه پس از انجام واکنش روی  $10^{\circ}\text{C}$  برای مدت نامعلوم، جهت جلوگیری از تجزیه و تخریب محصول PCR تنظیم گردید. الکتروفورز محصول واکنش PCR روی ژل آگارز ۱ درصد حاوی اتیدیم بروماید در بافر  $1\times\text{TAE}$  (1mM EDTA (PH=8)، 20 mM Tris base، mM acetic acid) و عکس‌برداری با

سانتی‌متر از بافت‌های چوب و پوست جداسازی شد. نمونه‌ها به مدت ۳۰ ثانیه در اتانول ۷۵ درصد غوطه‌ور شدند، بعد از آن بلافاصله در هیپوکلریت‌سدیم ۴ درصد (تجاری) به مدت پنج دقیقه قرار داده شده و بعد از این مرحله نمونه‌ها به مدت ۱۵ ثانیه با استفاده از اتانول ۷۵ درصد ضدعفونی شدند. نمونه‌ها سپس با استفاده از آب مقطر استریل سه بار شست‌شو داده شدند و به مدت پنج دقیقه با استفاده از کاغذ صافی استریل خشک آب‌گیری شدند. سپس قطعات در تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت عصاره مالت آگار دو درصد (MEA؛ ساخت کارخانه مرک، کشور آلمان) کشت داده شدند. برای ممانعت از رشد باکتری‌ها به میزان صد میلی‌گرم بر لیتر کلرامفنیکل به محیط کشت اضافه شد. تشتک‌های پتری در انکوباتور با دمای  $25^{\circ}\text{C}$  نگهداری و جدایه‌های قارچی رشد کرده پس از ثبت ویژگی‌های ظاهری به روش نوک ریشه کردن خالص‌سازی شدند. ویژگی‌های ریخت‌شناختی جدایه‌ها روی محیط کشت MEA در دمای  $25^{\circ}\text{C}$  و تحت شرایط تاریکی بررسی گردید. قارچ‌های خالص شده در لوله‌های دو میلی‌لیتری حاوی محیط کشت سیب‌زمینی هویج آگار (PCA؛ ۲۰ گرم سیب‌زمینی، ۲۰ گرم هویج، ۲۰ گرم آگار، ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  نگهداری شدند.

## استخراج DNA

برای این منظور، جدایه‌ها روی محیط کشت MEA به مدت ۱۰ روز در دمای  $25^{\circ}\text{C}$  و در تاریکی رشد داده شدند و DNA ژنومی با استفاده از روش مولر و همکاران (Moller et al. 1992) استخراج گردید. کمیت و کیفیت DNA به دست آمده به روش اسپکتروفتومتری مورد بررسی قرار گرفت.

## تلاش برای القاء مرحله جنسی

تلافی جدایه‌ها روی محیط کشت ساقه بلوط-آب آگار (OWA) حاوی قطعات اتوکلاو شده بلوط صورت پذیرفت. برای این منظور قطعاتی به اندازه تقریبی سه الی پنج سانتی متر مربع از ساقه‌های چند ساله درخت بلوط تهیه گردید و قطعات در داخل بطری‌های درپنج‌دار شیشه-ای نیم لیتری دو بار و در دو روز متوالی با استفاده از اتوکلاو در دمای  $121^{\circ}\text{C}$  و فشار  $1/5$  اتمسفر به مدت ۳۰ دقیقه استریل گردیدند و تعداد هشت الی ۱۰ قطعه چوب اتوکلاو شده به داخل تشتک پتری حاوی آگار دو درصد منتقل شدند. تعداد پنج جدایه *B. mediterranea* روی محیط کشت MEA کشت داده شدند و به مدت دو هفته به منظور اسپورزایی در داخل انکوباتور در دمای  $25^{\circ}\text{C}$  نگهداری شدند. سپس بلوک قارچی به قطر پنج میلی متر با استفاده از چوب‌پنبه سوراخ کن استریل از پرگنه هر یک از جدایه‌ها تهیه گردید و به صورت دو به دو روی محیط کشت ساقه بلوط-آب آگار (OWA) قرار داده شدند. کشت‌ها در دمای  $25^{\circ}\text{C}$  زیر نور near UV ممتد به مدت ۳ ماه نگه داری شدند.

## آزمون بیماری‌زایی جدایه‌ها

آزمون بیماری‌زایی با استفاده از سه جدایه *B. mediterranea* جدا شده از بافت‌های تنه و شاخه درختان بلوط مطابق روش ارزنلو و همکاران (Arzanlou et al. 2013) انجام گردید. برای این منظور ابتدا نهال‌های دوساله بلوط سیاه بعد از برگ‌ریزی پاییزه به گلخانه منتقل شدند و در گلدان‌های پلاستیکی به قطر دهانه بیست سانتی متر، حاوی خاک ماسه‌ای کاشته شدند. در طول دوره آزمایش آبیاری گلدان‌ها به صورت منظم (هر هفته یکبار) انجام

استفاده از دستگاه تصویربرداری از ژل (Gel documentation) انجام شد.

## تکثیر ناحیه ITS-rDNA و آنالیز فیلوژنتیک

در مورد تعدادی از جدایه‌های قارچی، ناحیه ITS-rDNA با استفاده از جفت آغازگر ITS1/ITS4 (White et al. 1990) تکثیر گردید. این جفت آغازگر، قطعه‌ای به طول ۶۵۰ تا ۷۰۰ جفت باز را تکثیر می‌نماید. مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و چرخه‌های دمایی اعمال شده مشابه شرایط تکثیر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی بود.

واکنش توالی‌یابی نوکلئوتیدی بوسیله کیت تجارتي بیگ دای BigDye<sup>®</sup> Terminator V301 Cycle Sequencing kit ساخت کارخانه Applied Biosystems کالیفرنیا آمریکا و مطابق دستورالعمل کارخانه صورت گرفت. تجزیه و تحلیل نتایج با استفاده از دستگاه ABI persim<sup>®</sup> 3700 انجام شد. توالی نوکلئوتیدی با نرم‌افزار SeqMan (Lasergene package, DNASTar, Madison, USA) بررسی و ویرایش شد و با استفاده از نرم افزار برخط بلاست (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) با توالی‌های موجود در بانک ژن مقایسه و توالی‌های با درصد مشابهت بالا از بانک ژن (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) دریافت گردیدند. رج-بندی توالی‌ها با استفاده از نرم افزار MEGA 6 انجام شد (Tamura et al. 2013). ترسیم تبارنما با روش بیشترین با استفاده از نرم افزار MrBayes v. 3.2.2 انجام شد (Ronquist and Huelsenbeck, 2003). آزمون اعتبار سنجی به روش احتمال پسین انجام شد و تعیین مدل بر اساس نتایج نرم افزار مستر مدل تست انجام شد (Nylander, 2004).

گردید. بعد از رشد مجدد نهال‌ها در شرایط گلخانه (دمای  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) آزمون بیماری‌زایی بر روی این نهال‌ها انجام شد. بدین صورت که ابتدا سطح ساقه‌های لیگنینی شده دوساله بلوط، بوسیله اتانول ۷۰ درصد ضدعفونی سطحی شدند و سپس بر روی این ساقه‌ها (از ۱۰ سانتی متر بالای اولین میان گره) توسط اسکالپل استریل زخمی به قطر پنج میلی‌متر تا رسیدن به آوند چوبی ایجاد شد. هر ساقه با یک جدایه مایه زنی شد. برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد. بلوک قارچ (به قطر پنج میلی‌متر) بدست آمده از حاشیه پرگنه هفت روزه، روی زخم ایجاد شده قرار داده شد، بطوریکه میسلیم‌های قارچ رو به سمت زخم قرار گرفتند و سپس زخم توسط پارافیلیم پوشانده شد. گیاهان شاهد نیز با بلوک MEA سترون بدون قارچ مایه‌زنی شدند. سه ماه بعد از مایه‌زنی، طول زخم‌های آوندی داخلی و ناحیه نکروزه، با برداشتن پوست ساقه در جهت بالا و پایین محل مایه‌زنی اندازه‌گیری و ثبت شد. طول زخم و نکروز ایجاد شده به عنوان شاخص بیماری‌زایی مورد استفاده قرار گرفت. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم افزار Statistical Package for the Social Sciences (SPSS Version 18.2) و مقایسه میانگین‌ها با شاخص LSD (Least Significant Difference) انجام گردید.

## نتیجه و بحث

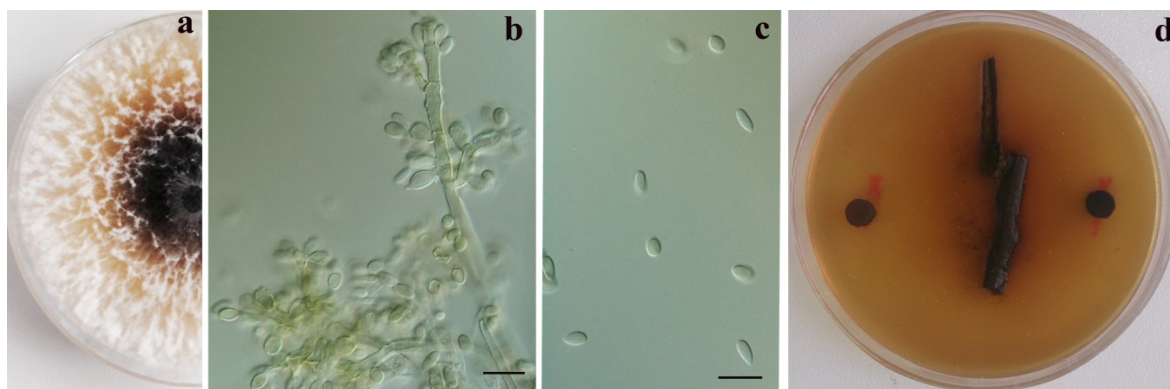
### شناسایی ریخت شناختی جدایه‌ها

در این بررسی تعداد ۱۴ جدایه *Biscogniauxia* از درختان بلوط با علایم بیماری زوال بلوط و از درختان سالم جداسازی گردید (جدول ۱). مشخصات میکروسکوپی جدایه‌های به دست آمده با مشخصات ذکر شده برای مرحله غیر جنسی این قارچ (*Periconiella*)

(like) مطابقت داشت. در جدایه‌های به‌دست آمده قطر پرگنه بعد از هفت روز نگهداری روی محیط کشت MEA ۹۰ میلی‌متر بود. پرگنه گرد، دارای بافت نرمی، سفید مایل به خاکستری، سطح پشتی پرگنه سیاه رنگ بود و بعد از ۱۰ روز ریشه‌های سفید روی پرگنه مشاهده شدند. میسلیم متشکل از ریشه‌های هوایی، بی رنگ تا قهوه‌ای رنگ، منشعب، دیواره‌دار و به قطر ۳-۷ میکرومتر بود. کنیدیوفورها کم رنگ تا رنگی، منشعب، دارای ۱-۲ انشعاب در قسمت پایه، با تعداد انشعابات متغیر در قسمت انتهایی که به ۲-۵ سلول کنیدی‌زا در انتها منتهی شده و به اندازه ۳-۴ × ۵-۸۵ میکرومتر بودند. سلول‌های کنیدی‌زا بصورت پلی بلاستیک، استوانه‌ای شکل، شفاف، صاف تا زبر و دارای خمیدگی‌های زانویی شکل در محل کنیدی‌زایی و به اندازه ۳-۴ × ۷(۱۰)-۶(۴) میکرومتر بودند. کنیدیوم‌ها شفاف، منفرد، تک سلولی و به اندازه ۲-۳ × ۴(۵)-۳(۴) میکرومتر (شکل ۱). مرحله جنسی عامل بیماری در طبیعت و کشت‌های خالص قارچ در شرایط آزمایشگاه مشاهده نشد.

### القای مرحله جنسی

تلاش‌های انجام شده برای القای مرحله جنسی با استفاده از پنج جدایه منجر به تشکیل ساختار جنسی نگردید. طی مطالعات قبلی سیستم آمیزشی هتروثال دو قطبی برای گونه *B. mediterranea* پیشنهاد شده است (Vannini et al. 1999). هویت تیپ‌های آمیزشی پنج جدایه استفاده شده برای آزمون تلاقی در این بررسی مشخص نبود، لذا احتمال اینکه تمامی پنج جدایه دارای تیپ آمیزشی یکسان باشند وجود دارد. علاوه براین، در صورت حضور دو والد با تیپ آمیزشی متفاوت، فاکتورهای محیطی مختلفی در القاء مرحله جنسی در



شکل ۱. *Biscogniauxia mediterranea*. a: پرگنه هفت روزه روی محیط کشت MEA. b: کنیدیوفورها و سلول‌های کنیدی‌زا. c: کنیدی‌ها؛ d: تلاقی جدایه‌ها روی محیط آب آگار ساقه بلوط. مقیاس = ۱۰ میکرومتر.

Figure 1. *Biscogniauxia mediterranea*. a: seven-days old colony on MEA. b: conidiophores and conidiogenous cells. c: conidia. d: crossing of isolates on oak twig water agar (OWA). Scale bars = 10 µm.

روی بافت‌های میزبان تشکیل می‌شوند (Hsieh et al. 2005)، استفاده از راهکارهای مولکولی برای شناسایی گونه‌های این خانواده ضروری به نظر می‌رسد. امروزه با استفاده از روش‌های مبتنی بر PCR شناسایی عوامل بیماری‌زای گیاهی به راحتی امکان پذیر است (Arzanlou and Narmani 2014). لوچی و همکاران (Luchi et al. 2005) نیز گونه *B. mediterranea* را با استفاده از تکنیک Real-time PCR از درختان بلوط بدون علائم ردیابی کرده‌اند. شناسایی دیگر گونه‌های این جنس با استفاده از تکنیک Real-time PCR نیز انجام شده است که از این بین می‌توان به ردیابی گونه (Fr.) Pouzar *B. nummularia* از درختان راش (*Fagus sylvestris*) بدون علائم بیماری اشاره کرد (Luchi et al. 2006).

#### آنالیز فیلوژنتیک

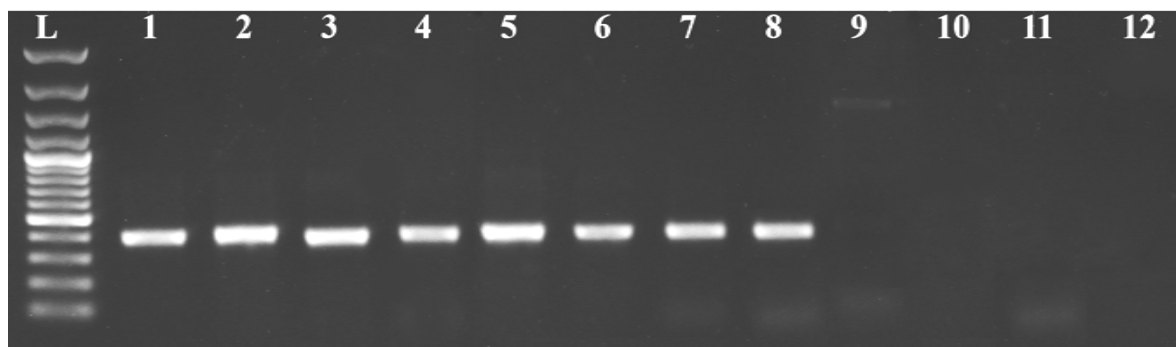
تکثیر ناحیه ITS-rDNA با استفاده از جفت آغازگر ITS1 و ITS4 قطعه‌ای به طول تقریبی ۵۵۰ جفت باز از جدایه‌های قارچی با ویژگی‌های مشابه گونه‌های جنس *Biscogniauxia* تکثیر نمود. داده‌های خام توالی محصول

گونه‌های قارچی موثر می‌باشند که بایستی مورد توجه واقع شوند. معمولاً قارچ‌ها زمانی وارد چرخه جنسی می‌شوند که تحت استرس واقع شوند. این استرس‌ها می‌تواند شامل کمبود منبع غذا، شرایط محیطی (نور، دما، رطوبت ...) و ترکیبات شیمیایی مانند قارچ کش‌ها باشد (Arzanlou et al. 2000, Bakhshi et al. 2011, 2013, Narmani et al. 2014, 2015).

#### شناسایی مولکولی جدایه‌ها با آغازگرهای اختصاصی

##### گونه *Biscogniauxia mediterranea*

نتایج حاصل از بررسی محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز روی ژل آگارز نشان داد که جفت آغازگر BmF / BmR قطعه‌ای به اندازه ۴۰۰ جفت باز فقط از جدایه‌های *B. mediterranea* تکثیر نمود (شکل ۲). به این ترتیب هویت جدایه‌های *B. mediterranea* لیست شده در جدول ۱ با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی این گونه تایید گردید. با توجه به اینکه شناسایی اعضای خانواده Xylariaceae بر پایه ویژگی‌های ساختارهای جنسی شامل شکل بافت استروما، پریتسیوم، آسک و آسکوسپور استوار می‌باشد و این ساختارها در مراحل پیشرفته توسعه بیماری



شکل ۲. شناسایی مولکولی جدایه‌های مختلف *Biscogniauxia mediterranea* با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی گونه (Bmf / Bmr). L: نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت باز. ۱: شاهد مثبت توالی‌یابی شده *B. mediterranea* (منطقه ایلام). ۲-۸: جدایه‌های مختلف *B. mediterranea* از منطقه ارسباران. ۹: *Daldinia* sp. ۱۰: *Penicillium commune*. ۱۱: *Nigrospora oryzae*. ۱۲: شاهد منفی. (اندازه باندها = ۴۰۰ جفت باز).

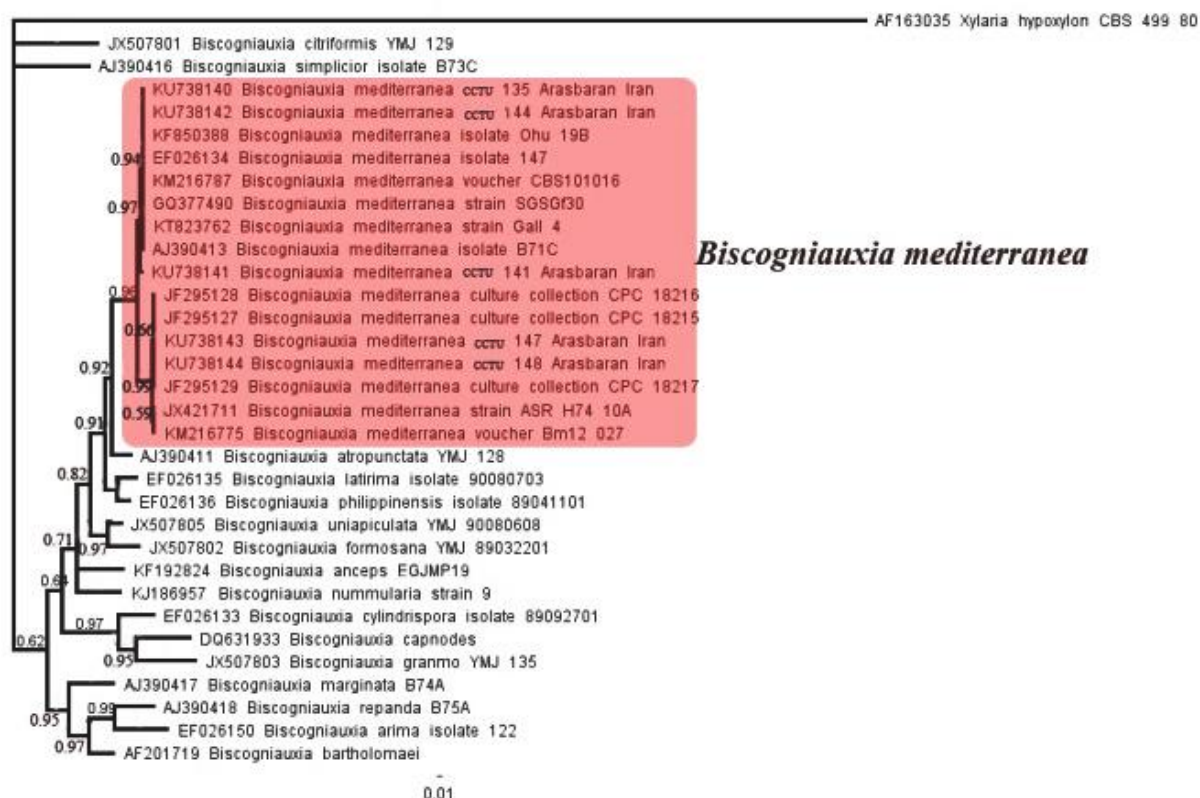
Figure 2. Molecular identification of *Biscogniauxia mediterranea* isolates using species-specific primer set (Bmf / Bmr). L: Ladder. 1: Positive control (Ilam region), 2-8: *B. mediterranea* isolates from Arasbaran region, 9: *Daldinia* sp., 10: *Penicillium commune*, 11: *Nigrospora oryzae* and 12: Negative controls without DNA. (band size= 400bp).

باقی مانده محاسبه گردید. بر اساس نتایج به دست آمده، جدایه‌های مورد مطالعه با اعتبار سنجی بالایی (۰/۹۶) به همراه سایر جدایه‌های اخذ شده از بانک ژن (شکل ۳) گروه بندی شدند. با این حال تنوع قابل توجهی در توالی نوکلئوتیدی ناحیه ITS-rDNA بین جدایه‌های *B. mediterranea* در بانک ژن مشاهده گردید (شکل ۳). اینکه تنوع نوکلئوتیدی مشاهده شده در ناحیه ITS-rDNA نمایانگر گونه‌های مخفی در این خوشه می‌باشد، نیاز به مقایسه داده‌های توالی دیگر ژن‌ها دارد.

### ارزیابی بیماری‌زایی

نتایج ارزیابی بیماری‌زایی جدایه‌های مورد آزمایش، به صورت بروز نشانه‌های تغییر رنگ بافت‌های چوب در محل مایه‌زنی، پیشرفت نکروز در دو جهت بالا و پایین ساقه پس از سه ماه در گلخانه بر روی نهال‌های بلوط دو ساله بلوط سیاه قابل مشاهده بود (شکل‌های ۴، ۵). آنالیز داده‌ها با آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد نشان داد

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس با استفاده از نرم افزار SeqMan ویرایش گردید. نتایج حاصل از مقایسه داده‌های توالی ایجاد شده با داده‌های توالی موجود در بانک ژن نشان داد که توالی‌های ایجاد شده در این بررسی با توالی‌های موجود برای گونه *B. mediterranea* در بانک ژن ۹۹ الی ۱۰۰ درصد مشابهت دارند. تبارنما با استفاده از الگوریتم بیشین بر مبنای ناحیه ژنی ITS برای جدایه‌های مورد مطالعه در این تحقیق و دیگر گونه‌های این جنس در بانک ژن ترسیم شد. فایل رج بندی شده نهایی شامل ۳۲ آرایه داخلی، ۵۹۰ کاراکتر و ۳۶۶ الگوی مکانی منحصربفرد بود. بر اساس نتایج نرم افزار مدل تست، بهترین مدل جایگزینی GTR+I+G بود. تمامی ژن‌ها فراوانی dirichlet base داشتند. گونه *Xylaria hypoxylon* CBS 499.80 به عنوان آرایه خارجی به کار گرفته شد. تجزیه و تحلیل بیشین، منتهی به ۲۰۷۲ تبارنما گردید. بعد از حذف ۲۵ درصد از تبارنماهای حاصل شده برای مرحله burn-in تبارنمای اجمالی و توزیع احتمال پسین خوشه‌ها از ۱۵۵۴ تبارنمای



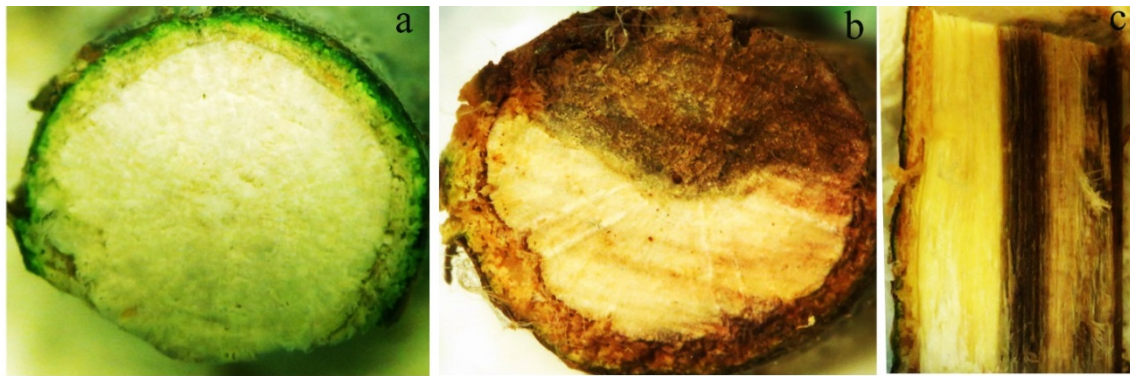
شکل ۳. تبارنمای اجمالی برآیند حاصل از استنتاج بیژین رجبندی گونه‌های *Biscogniauxia* با استفاده از نرم افزار MrBayes v. 3.2.2 بر اساس توالی ناحیه ITS-rDNA. گونه *Xylaria hypoxylon* به عنوان آرایه خارجی در نظر گرفته شده است. مقیاس، ۰/۰۱ مورد انتظار جایگزینی در هر مکان را نشان می‌دهد. توالی جدایه‌های با کد CCTU در این بررسی ایجاد شده‌اند.

Figure 3. Bayesian inference phylogenetic tree of *Biscogniauxia* spp. using sequence data from ITS-rDNA region. The tree was rooted to *Xylaria hypoxylon*. Bar indicates number of expected changes per site. Sequence data for the isolates with CCTU code were generated in the present study.



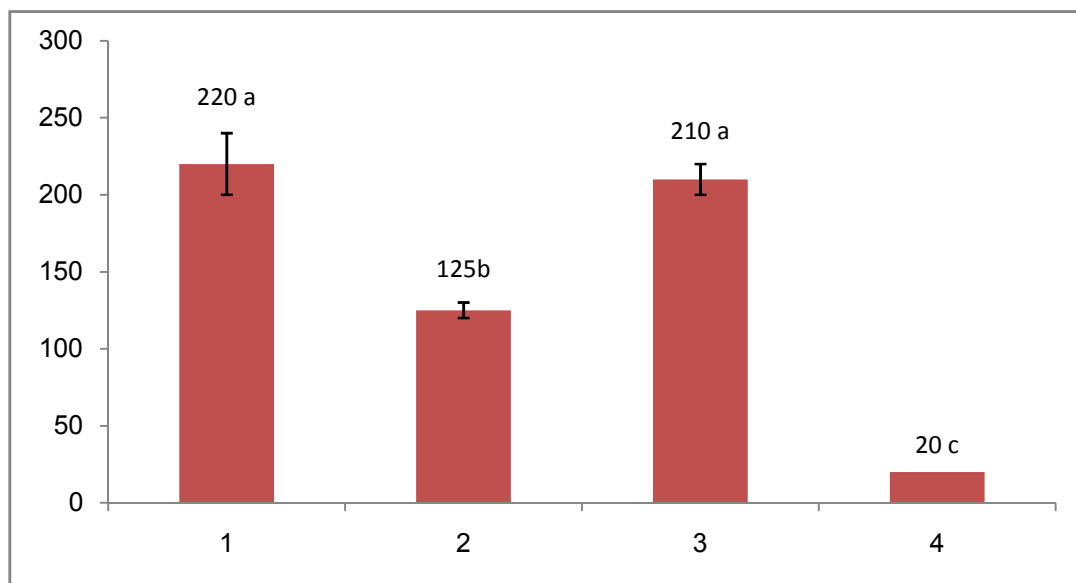
شکل ۴. مایه‌زنی نهال‌های بلوط سیاه (*Quercus macranthera*) با جدایه‌های *Biscogniauxia mediterranea*: a: نهال‌های دو ساله بلوط سیاه قبل از مایه زنی. b: برش پوست ساقه با اسکالپل. c: قرار دادن بلوک قارچ بر روی زخم ایجاد شده. d: پوشاندن محل تلقیح با پارافیلیم.

Figure 4. Inoculation of black oak saplings (*Quercus macranthera*) with *Biscogniauxia mediterranea*: a: two years old oak saplings before inoculation. b: cutting of bark with scalpel. c: placing fungal block on the wound. d: covering lesion with parafilm.



شکل ۵. نکروز آوندی و تغییر رنگ چوب درختان بلوط (*Quercus macranthera*) سه ماه بعد از مایه‌زنی با *Biscogniauxia mediterranea*. a: بیمار شاهد (بدون علائم). b: برش عرضی ساقه بلوط بیمار شده با *B. mediterranea*. c: برش طولی ساقه بلوط بیمار شده با قارچ *B. mediterranea*.

Figure 5. Vascular necrosis and discoloration of the wood in oak trees (*Quercus macranthera*) three months after inoculation with *Biscogniauxia mediterranea* isolates. a: control test (no symptom). b: cross section through wood at inoculation point. c: longitudinal section through wood.



شکل ۶. مقایسه طول زخم ایجاد شده توسط سه جدایه *Biscogniauxia mediterranea* (1= CCTU 135; 2= CCTU 148; 3= CCTU 147; 4= control) در نهال‌های بلوط (*Quercus macranthera*) سه ماه بعد از تلقیح. متوسط طول زخم بر مبنای سه تکرار برای هر تیمار محاسبه شده است. میانگین‌های با حروف مشابه در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار نمی‌باشند. بار خطای استاندارد میانگین‌ها را برای هر تیمار نشان می‌دهد.

Figure 6. Comparison of the mean lesion length caused by three *Biscogniauxia mediterranea* isolates (1= CCTU 135; 2= CCTU 148; 3= CCTU 147; 4= control) on oak trees (*Quercus macranthera*), three months after inoculation. Mean lesion length is based on three replicates per isolate. Means followed by the same letter are not significantly different ( $P < 0.05$ ). Bars represent standard error of the mean.

که بین جدایه شماره یک (CCTU 135) جدا شده از منطقه مشگین شهر، با میانگین طول زخم ۲۲۰ میلی‌متر و جدایه شماره سه (CCTU 147) جدا شده از منطقه کلیبر، با میانگین طول زخم ۲۱۰ میلی‌متر اختلاف معنی‌داری وجود نداشت و جدایه شماره دو (CCTU 148) جدا شده از منطقه کلیبر، با میانگین طول زخم ۱۲۵ میلی‌متر نسبت به جدایه‌های یک و دو اختلاف معنی‌داری داشت و کم‌ترین طول زخم را ایجاد کرده است. همچنین هر سه جدایه نسبت به شاهد با میانگین طول زخم ۲۰ میلی‌متر، دارای اختلاف معنی‌دار بودند (شکل ۴). عامل بیماری مجدداً از بافت‌های تلقیح بازیافت گردید، در حالیکه نتایج حاصل از کشت نمونه‌های شاهد منفی بود.

به طور کلی نتایج این بررسی نشان می‌دهد که بیماری پوسیدگی ذغالی بلوط به عنوان یک تهدید بالقوه برای جنگل‌های بلوط منطقه ارسباران مطرح می‌باشد. در سال‌های اخیر، بیماری پوسیدگی ذغالی بلوط در جنگل‌های منطقه زاگرس حالت همه‌گیری پیدا کرده و در حال گسترش به پهنه‌های جغرافیایی جدید می‌باشد. اینکه علیرغم حضور عامل بیماری در جنگل‌های منطقه ارسباران، بیماری پوسیدگی ذغالی بلوط در این منطقه از شیوع قابل توجهی نمی‌باشد، جالب توجه می‌باشد و فرضیه‌های مختلفی در این زمینه قابل طرح می‌باشند. دو گونه رایج بلوط در منطقه ارسباران بلوط سیاه و بلوط سفید (*Q. petraea*) می‌باشند ولی در منطقه زاگرس گونه-

های اصلی بلوط شامل بلوط ایرانی (*Q. brantii*)، بلوط لبنانی (*Q. libani*) و بلوط حلبی (*Q. infectoria*) می‌باشند (Jazireii and Ebrahimi, 2003). تفاوت‌های احتمالی موجود بین گونه‌های مختلف بلوط از نظر مقاومت به عامل بیماری به عنوان یکی از فرضیه‌ها مطرح می‌باشد. در حالت کلی زوال بلوط یک عارضه پیچیده می‌باشد و فاکتورهای مختلفی در این بیماری دخیل می‌باشند. بر اساس تئوری مانیون (Manion, 1991)، عوامل مختلفی در زوال و نابودی درختان بلوط نقش دارند که این عوامل به سه دسته عوامل مستعدکننده (predisposing)، عوامل تحریک کننده (inciting) و عوامل کمک کننده و موثر (contributing) تقسیم می‌شوند. تفاوت‌های موجود در این عوامل بین منطقه زاگرس و منطقه ارسباران ممکن است در شیوع بیماری در منطقه زاگرس نقش داشته باشند. با توجه به اینکه چرخه جنسی عامل بیماری در منطقه زاگرس فعال می‌باشد (Mirabolfathi et al. 2011, 2013)، لذا ممکن است نوترکیبی جنسی منجر به ایجاد جمعیت‌هایی با درجه پرازاری بالا شده باشد. اثبات و یا رد فرضیه‌های مطرح شده نیاز به بررسی‌های تکمیلی دارند.

### سیاسگزاری

نویسندگان مقاله مراتب قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه تبریز به خاطر تامین بودجه لازم برای انجام تحقیق ابزار می‌دارند.

### منابع

- Anselmi N., Mazzaglia A. and Vannini A. 2000. The role of endophytes in oak decline. pp: 131-144. In: A. Ragazzi and I. Dellavalle (Eds). Decline of oak species in Italy, Accademia Italiana de Scienze Forestali, Firenze, Italy.
- Arzanlou M., Ghasemi Esfahlan S., Khodaei S., Tavakoli M. and Babai-ahari A. 2016. Molecular diagnostics of *Biscogniauxia mediterranea*, the causal agent of charcoal rot disease on oak using species-specific primers. Applied Research in Plant Protection (in press).

- Arzanlou M. and 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.
- Arzanlou M., Moshari S., Salari M. and Badali H. 2013. Molecular characterization and pathogenicity of *Phaeoacremonium* spp. associated with esca disease of grapevine in Northern Iran. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 46: 375-388.
- Arzanlou M., Hedjaroude GH. and Okhovat M. 2000. First report for occurrence of teleomorph of *Rhizoctonia solani* (AG-4) sugar beet isolate in Iran. *Iranian Journal of Phytopathology* 35: 179-180.
- Bakhshi M., Arzanlou M. and Babai-Ahari A. 2013. Determining of mating type alleles in *Cercospora beticola*, the causal agent of cercospora leaf spot on sugarbeet using specific primers and study on the induction of sexual state under laboratory condition. *Applied Research in Plant Protection* 1: 15-27.
- Bakhshi M., Arzanlou M. and Babai-Ahari A. 2011. Uneven distribution of mating type alleles in Iranian populations of *Cercospora beticola*, the causal agent of Cercospora leaf spot disease of sugar beet. *Phytopathologia Mediterranea* 50: 101-109.
- Blumenstein K. 2010. Characterization of endophytic fungi in the genus *Ulmus*: putative agents for the biocontrol of Dutch elm disease (DED). Diploma thesis, University of Kassel, Germany.
- Jazireii M. H. and Ebrahimi M. 2003. Zagros Forest Ecology. The University of Tehran Press 558pp.
- Fortini P., Viscosi V., Maiuro L., Fineschi S. and Vendramin G.G. 2009. Comparative leaf surface morphology and molecular data of five oaks of subgenus *Quercus oerst* (Fagaceae). *Plant Biosystems* 143: 543-554.
- Helander M., Ahlholm J., Sieber T.N., Hinneri S. and Saikkonen K. 2007. Fragmented environment affects birch leaf endophytes. *New Phytologist* 175: 547-553.
- Hsieh H.M., Ju Y.M. and Rogers J.D. 2005. Molecular phylogeny of *Hypoxylon* and closely related genera. *Mycologia* 97(4): 844-865.
- Ju Y.M., Rogers J.D., san Martin F. and Granmo A. 1998. The genus *Biscogniauxia*. *Mycotaxon* 66: 1-98.
- Jurc D. and Ogris N. 2005. First reported outbreak of charcoal disease caused by *Biscogniauxia mediterranea* on Turkey oak in Slovenia. *New Disease Reports* 11: 42.
- Luchi N., Capretti P., Pinzani P., Orlando C. and Pazzagli M. 2005. Real-time PCR detection of *Biscogniauxia mediterranea* in symptomless oak tissue. *Letters in Applied Microbiology* 41: 61-68.
- Luchi N., Capretti P., Vettraino A.M., Vannini A., Pinzani P., Pazzagli M. 2006. Early detection of *Biscogniauxia nummularia* in symptomless European beech (*Fagus sylvatica* L.) by TaqMan TM quantitative real-time PCR. *Letters in Applied Microbiology* 43: 33-38.
- Manion P.D. 1991. Tree disease concepts. 2<sup>nd</sup> edition. Prentice-Hall. Englewood Cliffs, New Jersey. 402 pp.
- Manion P.D. and Griffin D.H. 1986. Sixty-five years of research on *Hypoxylon* canker of aspen. *Plant Disease* 70: 803-808.
- Mazzaglia A., Anselmi N., Gasbarri A. and Vannini A. 2001. Development of a Polymerase Chain Reaction (PCR) assay for the specific detection of *Biscogniauxia mediterranea* living as an endophyte in oak tissues. *Mycological Research* 105 (8): 952-956.
- Mirabolfathi M. 2013. Outbreak of charchoal disease on *Quercus* spp and *Zelkova carpinifolia* trees in forests of Zagros and Alborz mountains in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathotology* 49: 77-79.
- Mirabolfathi M., Groenewald J.Z. and Crous P.W. 2011. The occurrence of charcoal disease caused by *Biscogniauxia mediterranea* on chestnut-leaved oak (*Quercus castaneifolia*) in the Golestan forests of Iran. *Plant Disease* 95(7): 876.
- Moller E. M., Bahnweg G., Sanderman H. and Geiger H. H. 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.
- Narmani A., Arzanlou M. and Babai-Ahari A. 2016. Uneven distribution of mating type alleles among *Togninia minima* isolates, one of the causal agents of leaf stripe disease on grapevines in northwest Iran. *Journal of Phytopathology* 164: 441-447.
- Narmani A., Arzanlou M. and Bababi-ahari A. 2014. Induction of sexual reproduction and determination of mating types in *Phaeoacremonium aleophilum*, the causal agent of esca disease of grapevine in East Azarbaijan province. *Iranian Journal of Phytopathology* 50 (3): 281-289.

- Nugent L. K., Sihanonth P., Thienhirun S. and Whalley A. J. S. 2005. *Biscogniauxia*: a genus of latent invaders. *Mycologist* 19: 40–43.
- Nylander J.A.A. 2004. MrModeltest v. 2.0. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, Uppsala, Sweden.
- Ragazzi A., Ginetti B. and Moricca S. 2012. First report of *Biscogniauxia mediterranea* on English Ash in Italy. *Plant Disease* 96: 1694.
- Ronquist F. and Huelsenbeck J.P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572–1574.
- San Martin G. F. and Rogers J. D. 1993. *Biscogniauxia* and *Camillea* in Mexico. *Mycotaxon* 47: 229–258.
- Spooner B. M. 1986. New or rare British microfungi from Esher Common. *surrey Transactions of British Mycological Society* 86: 401–408.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A. and Kumar S. 2013. MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725–2729.
- Vannini A. and Scarascia Mugnozza G. 1991. Water stress: a predisposing factor in the athogenesis of *Hypoxylon mediterraneum* on *Quercus cerris*. *European Journal of Forest Pathology* 21: 193–202.
- Vannini A. and Valentini R. 1994. Influence of water relations in *Quercus cerris*-*Hypoxylon mediterraneum* interaction: a model of drought induced susceptibility to a weakness parasite. *Tree Physiology* 14: 129–139.
- Vannini A., Mazzaglia A. and Anselmi N. 1999. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) for detection of genetic variation and proof of the heterothallic mating system in *Hypoxylon mediterraneum*. *European Journal of Forest Pathology* 29: 209–218.
- White T.J., Bruns T., Lee S., and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315–322 In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds.). *PCR Protocols : A guide to Methods and Applications* Academic Press, New York, USA.