

## ارتباط سرخشکیدگی بلوط ایرانی (*Quercus brantii*) با آلودگی آشکار و پنهان به *Biscogniauxia mediterranea* در جنگل‌های زاگرس\*

داریوش صفائی<sup>۱\*</sup>، سیداکبر خداپرست<sup>۲</sup>، منصوره میرابوالفتحی<sup>۳</sup> و صدیقه موسی‌نژاد<sup>۴</sup>

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۵/۱۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۰/۱۱)

### چکیده

در بررسی‌های میدانی بیماری زغالی بلوط با عامل *Biscogniauxia mediterranea* در ایران، فقط درختان دارای علامت بیماری به عنوان بیمار لحاظ شده‌اند در حالی که این بیماری آلودگی پنهان نیز دارد که نادیده گرفتن آن موجب خطای آماربرداری می‌شود. لذا، این پژوهش برای برآورد آلودگی پنهان و تخمین سرخشکیدگی همراه با بیماری زغالی انجام گرفت. بدین منظور در دو منطقه از جنگل‌های زاگرس از درختان بلوط به طور تصادفی نمونه برداری شد. ارتفاع محل، قطر در ارتفاع برابر با سینه، قطر تاج، وجود استرومای عامل بیماری زغالی، شدت سرخشکیدگی شاخه‌ها، شدت خسارت حشرات روی برگ، وجود خسارت حشرات پوست خوار و چوبخوار و صدمه آتش سوزی برای هر درخت یادداشت شد. جدایه‌های *B. mediterranea* با بررسی مورفولوژی تلئومورف و آنامورف و نیز توسط آغازگرهای اختصاصی (MED1-MED2) شناسایی شدند. نتایج نشان می‌دهند که ۱۲٪ از درختان فاقد علامت (۱۰٪ از کل درختان بررسی شده)، به طور پنهان مبتلا به بیماری زغالی هستند. از کل درختان بلوط ارزیابی شده، ۱۶٪ دارای علامت بیماری و در مجموع ۲۶٪ از آنها آلودگی آشکار و پنهان به بیماری زغالی دارند. بین وجود بیماری زغالی با شدت سرخشکیدگی، صدمه آتش سوزی، قطر در ارتفاع برابر با سینه، خسارت آفات برگخوار، وجود خسارت سوسک‌های پوستخوار و چوبخوار همبستگی مثبت و بین آن با ارتفاع محل و قطر تاج همبستگی منفی وجود دارد. شدت سرخشکیدگی در درختان آلوده به بیماری زغالی بیشتر از درختان غیر آلوده به این بیماری است و شدت آن در درختان دارای آلودگی آشکار، بیشتر از شدت آن در درختان دارای آلودگی پنهان می‌باشد.

**کلیدواژه:** بیماری زغالی، زوال بلوط، علامت، گسترش بیماری

\* بخشی از پایان‌نامه دکتری نگارنده اول که به دانشگاه گیلان ارائه خواهد شد.

\*\* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: [dasafae@yahoo.com](mailto:dasafae@yahoo.com)

۱. استادیار پژوهش، بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی کرمانشاه، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرمانشاه، ایران

۲. دانشیار گروه گیاه‌پزشکی دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان

۳. استاد پژوهش، مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

۴. استادیار گروه گیاه‌پزشکی دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان

## Relationship between dieback of Persian oak (*Quercus brantii*) and apparent and latent infection of *Biscogniauxia mediterranea* in Zagros forests\*

D. Safae<sup>1\*\*</sup>, S.A. Khodaparast<sup>2</sup>, M. Mirabolfathy<sup>3</sup>, and S. Mousanejad<sup>4</sup>

(Received: 31.7.2016; Accepted: 31.12.2016)

### Abstract

In field surveys of charcoal disease of Persian oak (CDO) trees caused by *Biscogniauxia mediterranea* in Iran, the fungal stroma-bearing (apparent infected) oaks have been regarded as infected trees. However, this disease has a latent phase that its ignoring leads to wrong estimations. Therefore, this research was performed to estimate percentage of latently infected oak trees and dieback related to the disease. Oak trees were sampled randomly to isolate fungi from inner bark in two regions of Zagros forests. Also altitude, diameter at breast height (DBH), crown diameter, CDO sign (fungal stroma), dieback severity (DS), severity of leaf loss by insects (SLLI), fire damage (FD), sign of damage by bark beetles (BB) and wood-boring insects (WBI) were recorded during sampling. The isolates of *B. mediterranea* were identified by characteristics of anamorph and teleomorph states and species specific primers (MED1-MED2). The results reveal that all oak trees have more or less dieback symptoms. Latent infection of causal agent of CDO occurs in 12% of sign free oaks equivalent to 10% of all examined oak trees. Approximately, 16.7% of evaluated oaks trees has sign of CDO. On the whole, 26.7% of oaks have latent or apparent infection of *B. mediterranea*. CDO correlates positively with DS, FD, DBH, SLLI, BB and WBI, and negatively with altitude and crown diameter. The dieback severity of infected oaks with *B. mediterranea* is more than that of non-infected ones. Moreover, dieback severity of oak trees having apparent infection is more than that with latent infection.

**Keywords:** Charcoal disease, oak decline, sign, disease progress

---

\* A Part of Ph.D. Thesis of The First Author that will be Submitted to Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

\*\* Corresponding author's E-mail: dasafae@Yahoo.com

1. Research Assistant professor, Plant Protection Research Department, Kermanshah Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Kermanshah, Iran.

2. Aso. Prof. of Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

3. Research professor, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.

4. Assis. Prof. of Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

## مقدمه

مذکور و مرتبط با خشکیدگی بلوط گزارش کرده‌اند. پدیده‌ی خشکیدگی درختان بلوط معمولاً به صورت سرخشکیدگی در یک یا چند شاخه نمایان می‌شود که در بعضی از درختان به تدریج با پیشرفت آن به قسمت‌های پایین‌تر شاخه‌ها و نیز ابتلاء دیگر شاخه‌ها، پس از چند سال درخت کاملاً خشک می‌شود. بعضی از درختان کاملاً خشک و یا در حال زوال دارای علامت بیماری زغالی می‌باشند. درختان دارای علامت بیماری گاهی به صورت لکه‌ای (چند درخت مبتلا در فواصل نسبتاً نزدیک به هم در کنار درختان فاقد علامت) و گاهی به طور بسیار پراکنده دیده می‌شوند (مشاهدات شخصی). تاکنون در بررسی‌های انجام شده در ایران برای برآورد میزان آلودگی و پراکنش درختان مبتلا به این بیماری، درختی که دارای علامت بیماری (آلودگی آشکار) باشد به عنوان درخت آلوده مد نظر قرار گرفته است (Anonymous 2012). در حالی که بر اساس تحقیقاتی که در خارج از کشور انجام شده، *B. mediterranea* در بافت برخی از درختان ظاهراً سالم و فاقد استروما، به صورت اندوفیت (دارای آلودگی پنهان) وجود دارد (Mazzaglia et al. 2001, Luchi et al. 2005).

بررسی‌های متعددی حاکی از ارتباط بین خشکسالی‌های ممتد و بیماری زغالی بلوط است (Vanini & Valentini 1994, Vannini et al. 2009, Thomas et al. 2002, Ragazzi et al. 2001, Linaldeddu et al. 1998, Hendry et al. 2011). همچنین به نقش تشدیدکننده‌ی خسارت آفات و صدمه‌های مکانیکی در شیوع بیشتر بیماری نیز اشاره شده است (Martin et al. 2005, Capretti & Battisti 2007).

اهداف این پژوهش عبارتند از: ۱) تعیین میزان آلودگی پنهان به بیماری زغالی بلوط با عامل *B. mediterranea* است، تا برآورد آلودگی با دقت بیشتری انجام گیرد و

اغلب درختان مناطق جنگلی زاگرس از جنس بلوط (*Quercus L.*) هستند که به ترتیب گونه‌های بلوط ایرانی (*Q. brantii Lindl.*)، مازودار (*Q. infectoria Oliv.*) و ویول (*Q. libani Oliv.*) بیشترین جمعیت را دارند (Jazirehi & Ebrahimi Rostaghi 2003). طول جنگل‌های زاگرس در حدود هزار کیلومتر و عرض آن در مناطق مختلف از ۵۰ تا ۱۰۰ کیلومتر متغیر می‌باشد و با مساحتی در حدود چهار میلیون هکتار از شمال غرب تا قسمت‌هایی از جنوب غرب امتداد دارد (Sabeti 1994). بیماری زغالی در جنگل‌های بلوط اغلب مناطق دنیا به عنوان یکی از بیماری‌های مهم مورد توجه و بررسی قرار گرفته است (Vasilyeva et al. Jurc & Ogris 2006). نام بیماری برگرفته از علامت بارز این بیماری یعنی وجود استرومای سیاه رنگ و زغال مانند است که در بافت پوست درخت تشکیل شده و حاوی پریتسیوم‌های قارچ عامل می‌باشد. گونه‌هایی از جنس *Obolarina dryophila* و *Biscogniauxia Kuntze* (Tul. & C. Tul.) Pouzar به عنوان عوامل بیماری زغالی و یا اندوفیت در خارج از کشور روی گونه‌های مختلف بلوط معرفی شده‌اند (Collado et Boncaldo et al. 2007, Griffin et al. 1992, Gonthier et al. 2006, al. 2001, Okane et Jurc & Ogris 2006, Basset & Fenn 1984, Vasilyeva et al. Pažoutová et al. 2010, al. 2008, Whalley 1996, 2007). در دهه‌های اخیر، این بیماری در جنگل‌های زاگرس در حد قابل توجهی ظاهر شده است. در ایران، میرابوالفتحی (2013) Mirabolfathhy و همکاران (2013) Mirabolfathhy et al. گونه‌های *Biscogniauxia mediterranea* (De Not.) Kuntze و *Obolarina persica* Mirabolfathhy, Ju, و Hsieh & Rogers را به ترتیب به عنوان عامل بیماری

جدول ۱. مشخصات محل‌های آمار برداری و نمونه‌گیری از درختان بلوط در جنگل‌های زاگرس استان کرمانشاه

**Table 1. Characteristics of sampled and inventoried sites in Zagros oak forests in Kermansh province**

Site	County	Geographic position	Main woody species	Other woody species	Altitude (m)	Slope faced to	Mean annual precipitation (mm)*
Cheleh	Gilan-e Gharb	N:34 05.619 E:46 05.233	<i>Quercus brantii</i>	<i>Amygdalus</i> spp., <i>Acer monspessulanum</i> , <i>Pistacia</i> spp.	1200- 1450	Southwest	432.5
Bisuton protected region	Harsin	N:34 23.283 E:47 17.539	<i>Quercus brantii</i>	<i>Acer monspessulanum</i> , <i>Amygdalus</i> spp., <i>Cerasus microcarpa</i> , <i>Crataegus</i> spp., <i>Pistacia</i> spp.	1400- 1970	Southeast	400.6

\* میانگین بارندگی ۱۰ ساله مناطق چله و حفاظت شده بیستون به ترتیب براساس آمار ایستگاه هواشناسی گیلان غرب و سرارود (نزدیک‌ترین ایستگاه‌ها به مناطق مذکور) از سال ۱۳۸۲ تا ۱۳۹۲ .

\* Ten year(2003-20013)-mean annual precipitation of Cheleh and Bisuton protected region obtained from weather stations of Gilan-e Gharb and Sararood, the nearest stations to the sites, respectively.

درختان بلوط دیده شد و استرومای عامل دیگر بیماری زغالی (*O. persica*) مشاهده نگردید.

### آماربرداری و نمونه‌گیری

در آبان ماه سال ۱۳۹۳ عملیات آماربرداری و نمونه‌گیری انجام گرفت. در هر محل عملیات مذکور از پایین دامنه کوه شروع شد و با حرکت زیگزاگی در جهت شیب و به سمت بالا در هر ۱۰ متر یک درخت و در صورتی که در آن نقطه درختی وجود نداشت نزدیک‌ترین درخت به آن نقطه مورد بررسی و نمونه‌برداری قرار گرفت. در مجموع از ۳۰ درخت بلوط ایرانی (۱۵ درخت در هر محل) نمونه‌برداری شد. در مورد هر درخت نام محل، ارتفاع از سطح دریا، قطر تنه در ارتفاع برابر با سینه (diameter at breast height)، میانگین قطر تاج (crown diameter)، وجود استرومای قارچ عامل بیماری زغالی، شدت سرخشکیدگی شاخه‌ها (dieback)، شدت خسارت حشرات روی برگ، وجود خسارت حشرات پوست خوار و چوبخوار و صدمه حاصل از آتش سوزی یادداشت شد.

میزان خشکیدگی غیر مرتبط با بیماری مذکور نیز تخمین زده شود. بدیهی است این امر در اتخاذ تصمیم‌های مدیریتی برای کنترل بیماری بسیار حائز اهمیت است. (۲) وجود ارتباط بین این بیماری با ارتفاع از سطح دریا، صدمه آتش سوزی در جنگل، قطر تنه درخت در ارتفاع برابر با سینه، قطر تاج و خسارت حشرات برگخوار، پوستخوار و چوبخوار.

### مواد و روش‌های بررسی

#### محل‌های بررسی

با توجه به اهداف لازم بود محل‌هایی برای بررسی انتخاب شود که در آنها درصد درختان مبتلا به بیماری زغالی نسبتاً زیاد باشد. بر اساس نتایج آمار برداری‌های اولیه در مناطق مختلف جنگلی استان کرمانشاه مشخص شد که میزان آلودگی آشکار بیماری زغالی در مناطق چله و حفاظت شده بیستون بیشتر از سایر مناطق بود (منتشر نشده) لذا دو محل در این مناطق (جدول ۱) انتخاب شد. در این دو محل فقط استرومای *B. mediterranea* روی

جدول ۲. مقیاس‌های استفاده شده برای تخمین میزان سر خشکیدگی و خسارت حشرات برگ‌خوار روی درختان بلوط در محل‌های آماربرداری و نمونه‌گیری

**Table 2. Scales used for estimation of oak trees dieback, and leaf loss caused by insects in the sampled and inventoried sites.**

Percentage of crown dieback*	Rate of crown dieback*	Percentage of leaf loss caused by insects**	Rate of leaf loss caused by insects**
0	0	0	0
< 5	1	< 5	1
≥5 to 20	2	≥5 to 25	2
>20 to 50	3	>25 to 50	3
>50 to 80	4	>50 to 75	4
>80 to 100	5	>75 to 95	5
100	6	>95 to 100	6

\* بر اساس روش کریستس و فرنشلاگ (Kirists & Freinschlag 2012).

\*\* بر اساس روش هاسکینگ و هاجسون (Hosking & Hutcheson 1993).

\* According to Kirists & Freinschlag 2012.

\*\* According to Hosking & Hutcheson 1993.

بین نمی‌روند و به طور سطحی صدمه می‌بینند در منطقه مورد بررسی تعدادی از درختان نمونه برداری شده چنین وضعیتی داشتند. صدمه آتش سوزی به دو حالت وجود یا عدم وجود علامت آتش سوزی در سطح پوست تنه درخت یادداشت شد. درختی که کاملاً سوخته و در اثر آتش سوزی از بین رفته بود، نمونه برداری نشد و از نزدیک ترین درخت مجاور آن که زنده بود نمونه تهیه گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها برای تعیین ضرایب همبستگی بین وجود بیماری زغالی بلوط و عوامل بررسی شده با استفاده از نرم افزار IBM SPSS Statics version 20 انجام گرفت. از هر درخت، نمونه‌هایی از تنه و شاخه برای جدا سازی قارچ به صورت ذیل تهیه شد. پایین ترین شاخه هر درخت به قطر حدود ۲-۳ سانتی‌متر قطع و قطعه‌ای از بُن آن به طول حدود ۱۰ سانتی‌متر جدا گردید. از تنه در ارتفاع حدود ۱۲۰ تا ۱۴۰ سانتی‌متر از سطح زمین، پس از برداشتن پوست خارجی (outer bark)، قطعه‌ای به ابعاد ۳×۲ سانتی‌متر مربع شامل پوست داخلی (inner bark) تا عمق حدود دو سانتی متری چوب تهیه شد. نمونه‌های

در یادداشت برداری‌ها هر درختی که استرومای عامل بیماری زغالی بلوط روی آن وجود داشت به عنوان درخت دارای آلودگی آشکار ثبت می‌شد. برای تعیین شدت سرخشکیدگی شاخه‌ها از روش کریستس و فرنشلاگ (Kirists & Freinschlag 2012) استفاده شد که مطابق آن، مقدار سرخشکیدگی هر درخت در یکی از هفت دامنه (range) از درصدهای سرخشکیدگی قرار می‌گیرد و به هر دامنه عددی از صفر (بدون سرخشکیدگی) تا شش (۱۰۰٪ سرخشکیدگی) اختصاص می‌یابد (جدول ۲). شدت خسارت حشرات برگ‌خوار بر حسب دامنه‌هایی از درصد برگهای خسارت دیده تعیین گردید و به هر دامنه اعداد صفر (بدون خسارت) تا شش (بیشتر از ۹۵٪ تا ۱۰۰٪ خسارت) داده شد (Hosking & Hutcheson 1993) (جدول ۲). هنگام وقوع آتش سوزی در جنگل‌های زاگرس در برخی از مناطق به دلیل فاصله نسبتاً زیاد بین درختان و نیز پوشش بسیار ضعیف گیاهان خشک کف جنگل، برخی از درختان که تنه قطورتری دارند و ضخامت پوست خارجی آنها زیاد است در اثر آتش سوزی کاملاً از

روش نوک ریشه، خالص شدند. برای تحریک اسپورزایی، همه جدایه ها روی سه محیط کشت MEA، OMA و CMA کشت شدند و در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی (ترکیب نور فلورسنت و nUV) در دمای  $25 \pm 1$  °C قرار داده شدند و سرعت رشد پرگنه‌ها نیز اندازه گیری شد.

### شناسایی عوامل بیماری زغالی بلوط

با مقایسه ویژگی‌های آنامورف جدایه‌ها با خصوصیات مندرج در کلیدهای شناسایی مربوطه (Ju & Rogers 2001, Ju et al. 1998, 1996)، جدایه‌های عامل بیماری زغالی شناسایی شد. همچنین به منظور تأیید شناسایی گونه از یک جفت آغازگر اختصاصی پیشرو (MED1: 5'GCTATAAGGGATCACCGCCTC (3) و پسرو (MED2: 5' TGCAGAAGCGAGAGTGTGG 3) که توسط مازاگلیا و همکاران (Mazzaglia et al. 2001) برای شناسایی *B. mediterranea* طراحی شده بود، استفاده گردید. این آغازگرها بر اساس توالی ناحیه rDNA-ITS هسته ای طراحی شده و یک قطعه ۳۷۷ bp را در گونه مذکور تکثیر می‌نماید (Mazzaglia et al. 2001).

برای شناسایی گونه در نمونه‌های استرومای تهیه شده از درختان بلوط دارای علامت بیماری زغالی، ویژگی‌های تلئومورف بررسی گردید و با کلیدهای شناسایی معتبر (Ju & Rogers 2001, Ju et al. 1998, 1996) مقایسه شد.

### استخراج دی ان ای (DNA)

استخراج دی ان ای جدایه‌ها با استفاده از چلکس ۱۰۰ (Chelex 100, BIO RAD, USA) و به روش هیرتا و تاکاماتسو (Hirata & Takamatsu 1996) به شرح ذیل

شاخه و تنه هر درخت جداگانه در پاکت کاغذی سترون قرار داده شد و شماره درخت مورد نظر روی آنها درج شد. قبل از نمونه برداری از درخت دیگر، وسایل نمونه برداری (اره و اسکنه) با اتانول و شعله ضدعفونی گردید.

### جداسازی و خالص سازی جدایه‌ها

برای جداسازی قارچ از بافت نمونه‌های شاخه، تلفیقی از روش لینالدو و همکاران (Linaldeddu et al. 2011) و سان و همکاران (Sun et al. 2012) استفاده شد. حدود دو سانتی متر از دو انتهای هر یک از نمونه‌های شاخه را قطع کرده و قسمت باقی مانده (به طول حدود پنج سانتی متر) در هیپوکلریت سدیم رقیق شده (حاوی نیم درصد کلر) و در اتانول ۷۵٪ به ترتیب به مدت سه دقیقه و ۳۰ ثانیه قرار داده شد. نمونه‌ها پس از شستن با آب مقطر سترون، بین دو لایه دستمال کاغذی سترون گذاشته شدند تا خشک شوند. سپس لایه پوست خارجی را با اسکالپل سترون برداشته و از پوست داخلی و بافت چوب جداگانه قطعاتی به ابعاد ۲-۴ میلی متر تهیه شد. این قطعات در عمق محیط کشت سیبزمینی، دکستروز-آگار (PDA) به ضخامت پنج میلیمتر حاوی سولفات استرپتومایسین به میزان ۱۶۰ mg/l قرار داده شدند.

نمونه‌های تنه نیز مانند شاخه ضدعفونی سطحی و کشت داده شدند با این تفاوت که در این حالت پس از ضدعفونی سطحی، حدود پنج میلی‌متر از حاشیه قطعه حذف و بقیه آن به قطعات کوچکتری تقسیم و در محیط کشت مذکور گذاشته شد. تشتک‌های پتری حاوی قطعات در انکوباتور با دمای  $25 \pm 1$  °C نگهداری شدند. از پرگنه‌های بدست آمده ابتدا روی محیط کشت (PDA) کشت مجدد بدست آمد و سپس آنهایی که اسپور تولید کردند به روش تک اسپور و آنهایی که فاقد اسپور بودند به

واسرشت سازی در  $95^{\circ}\text{C}$  به مدت ۴۰ ثانیه، چسبیدن آغازگرها در  $62^{\circ}\text{C}$  به مدت ۳۰ ثانیه، گسترش آغازگرها در  $72^{\circ}\text{C}$  به مدت ۳۰ ثانیه، دو چرخه واسرشت سازی در  $95^{\circ}\text{C}$  به مدت ۴۰ ثانیه، چسبیدن آغازگرها در  $61^{\circ}\text{C}$  به مدت ۳۰ ثانیه، گسترش آغازگرها در  $72^{\circ}\text{C}$  به مدت ۳۰ ثانیه و ۳۲ چرخه واسرشت سازی در  $95^{\circ}\text{C}$  به مدت ۴۰ ثانیه، چسبیدن آغازگرها  $60^{\circ}\text{C}$  به مدت ۳۰ ثانیه، گسترش آغازگرها در  $72^{\circ}\text{C}$  به مدت ۳۰ ثانیه اجرا شد. گسترش نهایی (final extention) در دمای  $72^{\circ}\text{C}$  به مدت پنج دقیقه تنظیم گردید.

برای مشاهده قطعات تکثیر شده (amplicons)، محصول PCR از ژل آگارز (سیناکلون، ایران)  $1/5\%$  حاوی ماده‌ی رنگ آمیزی دی ان ای (سیناکلون، ایران DNA safe stain،) توسط الکتروفورز عبور داده شد. از نشانگر (ladder)  $100\text{ bp}$  (سیناکلون، ایران) برای مقایسه اندازه قطعات تکثیر شده استفاده گردید. پس از الکتروفورز، باندهای DNA در ژل آگارز با استفاده از دستگاه ژل داگ (UV-gel documentation system (UVITEC, France)) رؤیت و عکس برداری شدند.

### تخمین درصد درختان آلوده به عامل بیماری زغالی

پس از شناسایی گونه‌ی عامل بیماری زغالی جدا شده از بافت پوست داخلی هر درخت بلوط فاقد علامت بیماری زغالی (استرومای حاوی پریسیپوم‌های عامل بیماری)، آن درخت به عنوان درخت دارای آلودگی پنهان منظور شد. درختان بلوط دارای آلودگی آشکار (دارای استرومای قارچ عامل بیماری زغالی) پس از تشخیص گونه مولد استروما، شناسایی شدند. بدین صورت تعداد درختان دارای آلودگی پنهان، آشکار و فاقد بیماری زغالی در میان درختان بلوط نمونه‌برداری شده در هر دو محل به

انجام گرفت. مقداری به اندازه یک برداشت با نوک سوزن (حدود ۲۰ تا ۳۰ میلی گرم) از برگه هر جدایه را به میکروتیوب  $1/5$  میلی‌لیتری حاوی  $100$  میکرولیتر محلول چلکس پنج درصد اضافه کرده و حدود شش ساعت در  $56^{\circ}\text{C}$  نگهداری شد. پس از بهم زدن با ورتکس به مدت ۱۵ ثانیه، میکرو تیوب‌ها را در آب در حال جوشیدن به مدت هشت دقیقه قرار داده و مجدداً با ورتکس هم زده شدند. بعد از سانتریفیوژ با سرعت  $15000\text{ g}$  به مدت پنج دقیقه، محلول رویی (supernatant) حاوی دی ان ای استخراج شده، به میکروتیوب دیگری منتقل شد. غلظت دی ان ای با استفاده از اسپکتوفوتومتر (Epoch 2, BioTek, USA) اندازه گیری شد.

### واکنش زنجیره‌ای پلی مرز (PCR) و مشاهده محصول

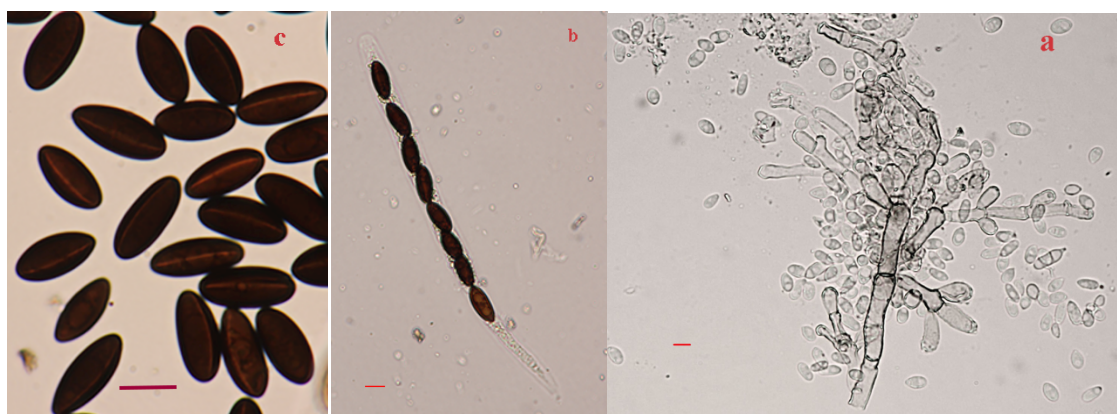
واکنش زنجیره‌ای پلی مرز در میکرو تیوب‌های  $200$  میکرولیتری حاوی  $25\ \mu\text{l}$  مخلوط واکنش انجام گرفت. مخلوط واکنش شامل بافر PCR (1x)،  $0/2\ \text{mM}$  از dNTPs،  $2\ \text{mM}$  از  $\text{MgCl}_2$ ،  $0/6\ \mu\text{M}$  از هریک از آغازگرهای MED1 و MED2،  $0/8$  واحد از آنزیم پلی مرز داغ آغاز (Hot start Taq DNA polymerase (Thermo Scientific, Lithuania)) و  $2\ \text{ng}$  از دی ان ای استخراج شده هر جدایه بود. در این آزمایش یک شاهد منفی (مخلوط واکنش بدون دی ان ای) و یک شاهد مثبت (با اضافه کردن دی ان ای یک جدایه به دست آمده از تک اسکوسپور گونه شناسایی شده B. mediterranea به مخلوط واکنش) نیز استفاده شد.

واکنش فوق در دستگاه ترموسایکلر (BIO-RAD, USA) انجام شد. برنامه حرارتی به صورت واسرشته‌سازی اولیه (initial denaturation) در دمای  $95^{\circ}\text{C}$  به مدت ۴ دقیقه، سپس ۳۶ چرخه شامل دو چرخه

جدول ۳. وضعیت آلودگی آشکار و پنهان درختان بلوط به *Biscogniauxia mediterranea* در محل‌های بررسی شده از جنگل‌های بلوط زاگرس واقع در استان کرمانشاه.

**Table 3. Status of apparent and latent infection of oak trees to *Biscogniauxia mediterranea* in the surveyed sites in Zagros oak forests in Kermanshah province, Iran.**

Site	County	Number of oak trees having stromata of <i>B. mediterranea</i>	Number of oak trees lacking stromata of <i>B. mediterranea</i>	
			Number of oak trees from which <i>B. mediterranea</i> was isolated	Number of oak trees from which <i>B. mediterranea</i> was not isolated
Cheleh	Gilan-e Gharb	3	2	10
Bisuton	Harsin	2	1	12
protected region				



شکل ۱. *Biscogniauxia mediterranea*: a: کنیدیوفور و کنیدی تشکیل شده روی محیط کشت آرد یولاف آگار (OMA)، خط مقیاس = چهار میکرومتر؛ b: آسک؛ c: آسکوسپورها، خط مقیاس در b و c = ۱۰ میکرومتر.

**Fig 1. *Biscogniauxia mediterranea*; a: Conidiophore and conidia produced on oat meal agar (OMA) culture, Scale bar = 4 µm; b: Ascus; c: Ascospores, Scale bars for b and c = 10 µm.**

جو و همکاران (Ju et al. 1998) توصیف شده است، مطابقت داشت (شکل ۱). آغازگرهای اختصاصی برای شناسایی گونه *B. mediterranea* (MED1 و MED2) توانستند برای هر سه جدایه مذکور آمپلیکون‌هایی به اندازه ۳۷۷ bp تولید نمایند و لذا شناسایی مورفولوژیک آنها از نظر مولکولی تأیید شد.

در میان درختان بلوط نمونه برداری شده، روی پنج درخت بلوط استرومای سیاه رنگی مشاهده شد که پس از شناسایی قارچ مولد آن بر اساس تلمومورف، مشخص شد گونه آن *B. mediterranea* است (جدول ۳).

دست آمد و با توجه به تعداد کل درختان نمونه برداری شده (جدول ۳) درصد آلودگی آشکار و پنهان بیماری زغالی محاسبه شد.

## نتایج

### شناسایی جدایه‌های عامل بیماری زغالی

در مجموع ۳۱ جدایه قارچ از بافت پوست داخلی درختان بلوط فاقد علامت بیماری زغالی جدا شد. در میان آنها آنامورف سه جدایه از نوع *Periconiella*-like بود که با ساختار غیر جنسی گونه *B. mediterranea* که توسط



جدول ۴: ضرایب همبستگی بین وجود بیماری زغالی بلوط و عوامل بررسی شده در محل‌های آماربرداری و نمونه‌گیری (چله و منطقه حفاظت شده بیستون)

**Table 4. Correlation coefficients between oak charcoal disease incidence and surveyed factors in the sampled and inventoried sites, Cheleh and Bisuton protected region**

	Dieback severity	Fire damage	Sign of bark beetles loss	Sign of wood-boring insects	Leaf loss caused by insects	Diameter at breast height	Crown diameter	Altitude
Oak charcoal disease incidence	0.33*	0.34*	0.28	0.19	0.09	0.06	-0.21	-0.15

\* فقط ضرایب همبستگی شدت سرخشکیدگی و آتش سوزی به ترتیب در سطح ۰/۰۵ و ۰/۱ معنی دار می‌باشند.

\*Only correlation coefficients of dieback severity and fire damage are significant at the 0.05 and 0.1 level, respectively.

فقط در مورد سرخشکیدگی و صدمه آتش سوزی به ترتیب در سطح  $\alpha=0/05$  و  $\alpha=0/1$  معنی دار بود (جدول ۴).

همه درختان بلوط کم و بیش دارای سرخشکیدگی بودند. شدت سرخشکیدگی در درختان بلوط آلوده به بیماری زغالی بیشتر از درختان غیر آلوده بود به طوری که ۶۲/۵٪ و ۲۵٪ از درختان بلوط آلوده به بیماری زغالی به ترتیب دارای سرخشکیدگی شدید و کم (مطابق مقیاس جدول ۵) بودند اما در میان درختان غیر آلوده، ۲۷/۳٪ و ۵۹/۱٪ از آنها به ترتیب سرخشکیدگی شدید و کم داشتند. شدت سرخشکیدگی در درختان دارای آلودگی آشکار، بیشتر از شدت آن در درختان داری آلودگی پنهان بود. تعداد ۷۳/۳٪ درختان فاقد بیماری زغالی بودند که ۴۱٪ از آنها سرخشکیدگی متوسط تا شدید داشتند (جدول ۵).

### بحث

نتایج تحقیقات متعددی نشان می‌دهد که تغییر حالت قارچ‌های عامل بیماری زغالی از حالت کمون به بیماریزا در اثر تنش خشکی است (Vanini & Valentini 1994, Vannini & Scaracia Mugnozza 1991, Vannini et al. 2009, Ragazzi et al. 2001, Linaldeddu et al. 2011,

### تخمین آلودگی آشکار و پنهان بیماری زغالی

پس از شناسایی جدایه‌های *B. mediterranea* در درختان فاقد علامت بیماری، مشخص شد که از ۲۵ درخت فاقد علامت بیماری در میان ۳۰ درخت بلوط نمونه برداری شده، در سه درخت عامل بیماری زغالی به صورت پنهان وجود داشت. از طرفی پنج درخت دارای علامت بیماری بود (جدول ۳) بنابر این براساس بررسی به عمل آمده در هر دو منطقه مشخص شد که در ۱۲٪ از درختان بلوط فاقد علامت بیماری زغالی (معادل ۱۰٪ از کل درختان بررسی شده)، قارچ عامل این بیماری به صورت پنهان وجود دارد. از کل درختان بلوط، ۱۶/۷٪ دارای علامت بیماری و در مجموع ۲۶/۷٪ از آنها به صورت آشکار و پنهان به بیماری زغالی مبتلا بودند (جدول ۳).

نتایج حاصل از تجزیه همبستگی نشان داد که بین وجود بیماری زغالی با سرخشکیدگی، صدمه ناشی از آتش سوزی، قطر تنه در ارتفاع برابر با سینه، خسارت آفات برگ‌خوار، وجود خسارت سوسک‌های پوست‌خوار و چوب‌خوار همبستگی مثبت و بین آن با ارتفاع از سطح دریا و قطر تاج همبستگی منفی وجود داشت اما از لحاظ آماری

جدول 5. میزان سرخشکیدگی در درختان بلوط آلوده به بیماری زغالی و درختان غیر آلوده در محل‌های بررسی شده

**Table 5. Dieback severity among oak trees infected by charcoal disease and non-infected ones in the surveyed sites**

Site	Infection state	Dieback severity (0-6)		
		Low* (0-2)	Medium (3)	High (4-6)
Bisuton protected region	Infected to <i>B. mediterranea</i>	(1)**	1	1
	Non- infected to <i>B. mediterranea</i>	9	1	2
Cheleh	Infected to <i>B. mediterranea</i>	(1)	0	3+(1)
	Non- infected to <i>B. mediterranea</i>	4	2	4

\*سطح بندی شدت سرخشکیدگی (کم، متوسط و شدید) براساس مقیاس شدت سرخشکیدگی (۰ تا ۶) کریستس و فرنشلاگ ( Kirisits & Freinschlag 2012) می‌باشد.

\*\*اعداد داخل جدول تعداد درختان بلوط است و آنهایی که در پرانتز قرار دارند تعداد درختان بلوط دارای آلودگی پنهان می‌باشد.

\*Categories (low, medium and high) are based on dieback severity scale (0-6) (Kirisits & Freinschlag 2012).

\*\*Numbers inside the table are the number of oak trees and those in brackets are the number of oak trees having the latent infection.

لینالدو و همکاران (Linaldeddu et al. 2011) در ایتالیا با اعمال تنش خشکی به درختان بلوط چوب پنبه (*Q. suber* L.) و جداسازی قارچ‌های اندوفیت از آنها در مقایسه با درختان بدون تنش خشکی دریافتند که در میان گونه‌های اندوفیت جداشده، *B. mediterranea* بیشترین فراوانی را داشت و فراوانی آن در درختان در حال زوال تحت تنش خشکی نسبت به بدون تنش به طور معنی داری بیشتر بود. آنها ابراز داشتند که به نظر می‌رسد تنش خشکی موجب کاهش تنوع گونه‌های اندوفیت در بلوط چوب پنبه شده و این امر باعث مساعد شدن شرایط برای فعالیت اندوفیت‌هایی می‌گردد که به طور بالقوه توانایی ایجاد بیماری دارند.

برای تغییر حالت از اندوفیت به بیماریزا ممکن است بیش از یک عامل غیر زنده (محیطی) و یا زنده نقش داشته باشند (Collado et al. 2001). وانینی و ساکارسیاماگنوزا (Vannini & Scarascia Mugnozza 1991) نشان دادند که رشد *B. mediterranea* با کاهش پتانسیل آب محیط کشت، زیاد می‌شود به طوری که رشد آن در پتانسیل آب

(Hendry et al. 1998). در چند دهه اخیر تغییرات اقلیمی تأثیر مخربی بر جنگل‌های اروپا داشته است به طوری که خشکسالی تابستانه با تضعیف درختان و مساعد نمودن شرایط برای حمله آفات و بیماری‌های گیاهی، یکی از عوامل اصلی شیوع زوال بلوط در اروپا محسوب می‌شود (Thomas et al. 2002). کاپرتی و باتیستی (Capretti & Battisti 2007) در تحقیقات خود در مورد تأثیر تنش خشکی، تغذیه لارو ابریشم باف ناجور (*Lymantria dispar* Linnaeus) از برگ و تلفیق آنها بر فعالیت قارچ *B. mediterranea* روی نهال‌های بلوط ترکیه‌ای (*Quercus cerri* L.) به این نتیجه رسیدند که اثر استرس خشکی بسیار مهم می‌باشد به طوری که قارچ مایه زنی شده فقط از نهال‌های تحت تنش خشکی جدا سازی شد و از نهال‌هایی که تحت تیمار لارو و اسپور قارچ در شرایط عدم تنش خشکی بودند، این قارچ جدا نشد. البته این محققین خاطر نشان کردند که فراوانی قارچ جدا شده از نهال‌های تحت تنش که مورد خسارت لارو نیز قرار گرفته بودند بیشتر از آنهایی بود که فقط در شرایط تنش بودند.

خسارت این بیماری میزان آلودگی پنهان مورد توجه قرار گیرد. همچنین با توجه به این نتایج روشن است که قطع و سوزاندن درختان دارای آلودگی آشکار باعث حذف (eradication) عامل بیماری نمی‌شود از طرف دیگر در محل‌های بررسی، تعداد  $\frac{73}{3}\%$  درختان، به بیماری زغالی مبتلا نبودند و از این تعداد،  $41\%$  آنها سرخشکیدگی قابل توجهی (متوسط تا شدید) داشتند (جدول ۵) که مطالعه‌ی علت شناسی (etiology) آنها به طور جامع انجام نشده است لذا قطع و سوزاندن درختان خشک و یا دارای علامت بیماری که بر اساس دستورالعمل سازمان جنگل‌ها برای مهار عامل بیماری زغالی و به طور کلی برای مهار پدیده خشکیدگی بلوط در بخش‌هایی از جنگل‌های زاگرس اعمال گردیده است و هم اکنون نیز ادامه دارد (Anonymous 2012). روش مناسبی به نظر نمی‌رسد. ضمناً این روش معایب جانبی متعددی نیز دارد مانند کاهش مواد آلی خاک جنگل و مواردی که در صورت عدم رعایت نکات ظریف فنی پیش می‌آید مانند افتادن و خرد شدن توده‌های استرومای روی درخت در کف جنگل که معمولاً هنگام کشیدن درختان قطع شده تا محل آتش زدن، رخ می‌هد و حتی موجب انتشار بیشتر آسکوسپورها می‌شود. همچنین این امر موجب شده افراد فرصت طلب برای رسیدن به اهداف شخصی به بهانه‌ی قطع درختان بیمار، درختان سالم مجاور را نیز قطع کنند (مشاهدات شخصی).

علاوه بر تنش خشکی، عوامل زنده و غیر زنده دیگر با تضعیف درخت یا تشدید اثر تنش خشکی موجب فراهم شدن شرایط مناسب برای حمله عوامل بیماریزای فرصت طلب می‌شوند (Thomas et al. 2002, Hendry et al. 2002). برخی از آنها هم زمان بیش از یک نقش دارند مانند برخی از آفات که علاوه بر ایجاد خسارت در انتشار

به اندازه  $2\text{ Mpa}$  - بیشتر از رشد آن در  $0/3\text{ Mpa}$  - است که این امر حاکی از رشد بهتر قارچ در شرایط کم آبی است. مشخص شده است که افزایش تنش خشکی باعث افزایش رشد و فعالیت (*Hypoxyton mammatum* (Wahl.) Miller در صنوبر (*Populus tremuloides* Michx.) می‌شود که یکی از علل آن را به خاطر آزاد کردن اسید آمینه پرولین توسط گیاه تحت تنش خشکی ذکر کرده‌اند (Griffin et al. 1986, Be'linger et al. 1990). همچنین نتایج مشابهی در خصوص *B. mediterranea* در بلوط ترکیه‌ای به دست آمده و بر نقش پرولین در تسریع رشد قارچ مذکور اشاره شده است (Capretti & Battisti 2007). از طرفی کمبود آب در گیاه باعث کاهش ترکیبات فنلی می‌شود که این امر شرایط را برای حمله قارچ مساعد می‌کند (Thomas et al. 2002). هندری و همکاران (Hendry et al. 2002) معتقدند که ممکن است تأثیر مقدار آب بافت بر رشد قارچ‌های اندوفیت به این دلیل باشد که مسیر انتشار گاز در داخل بافت توسط آب پر شود و آنگاه میزان اکسیژن مورد نیاز رشد قارچ کاهش یافته و نیز دی اکسی کربن حاصل از تنفس قارچ خارج نشود که پدید آمدن این وضعیت موجب تضعیف رشد اندوفیتی می‌گردد. با توجه به نتایج تحقیقات متعددی که به برخی از آنها اشاره شد به نظر می‌رسد تنش خشکی نقش بسیار تعیین کننده‌ای در شیوع بیماری زغالی دارد. از طرفی با توجه به نتایج تحقیق حاضر در مناطق بررسی شده حداقل در  $12\%$  از درختان فاقد علامت بیماری، عامل بیماری به حالت کمون (پنهان) وجود دارد که در صورت استمرار خشکسالی و اثر افزایش آن بر فعالیت عامل بیماری زغالی ممکن است روند مرگ درختان به همین میزان ( $12\%$ ) نسبت به حالتی که فقط آلودگی آشکار در نظر گرفته شود، افزایش یابد. بنابراین این ضروریست در برآورد میزان

ممکن است به دلیل وارد آمدن آسیب به بافت‌های آوندی باشد که تضعیف درخت و مساعد شدن شرایط برای افزایش فعالیت عامل بیماری را در پی داشته است.

با افزایش ارتفاع از سطح دریا تعداد درختان مبتلا به بیماری زغالی کاهش یافت اما میزان همبستگی مقدار کاهش آن با افزایش ارتفاع از لحاظ آماری معنی دار نبود (جدول ۴). با توجه به گرما دوست بودن قارچ عامل بیماری زغالی (Vannini & Scaracia Mugnozsa 1991) به دلیل نسبت معکوس بین ارتفاع و دما، ممکن است کاهش دما در ارتفاعات باعث کاهش فعالیت قارچ شده باشد. همچنین باید در نظر داشت که کاهش دما باعث کاهش تنش خشکی نیز می‌شود.

از ۳۱ جدایه قارچ جدا شده از بافت درختان بلوط، آنامورف (کنیدیوم و کنیدیوفور) مربوط به گونه‌ی عامل بیماری زغالی در سه جدایه از آنها روی محیط کشت OMA تشکیل شد. بقیه جدایه‌ها یا دارای آنامورف متفاوت با *Biscogniauxia* spp. بودند و یا آنامورف آنها تشکیل نشد. با توجه به این که روی محیط کشت OMA آنامورف جدایه‌های *Biscogniauxia* spp. به راحتی تشکیل می‌شود (Mirabolfathy et al. 2013, Ju et al. 1998) لذا به نظر رسید جدایه‌هایی که فاقد آنامورف بودند عامل بیماری زغالی نمی‌باشند. برای تأیید این موضوع از آغازگرهای اختصاصی گونه *B. mediterranea* استفاده شد که این آغازگرها در هیچ کدام از جدایه‌های مذکور قطعه‌ای از دی ان ای را تکثیر نکرد (شکل ۲).

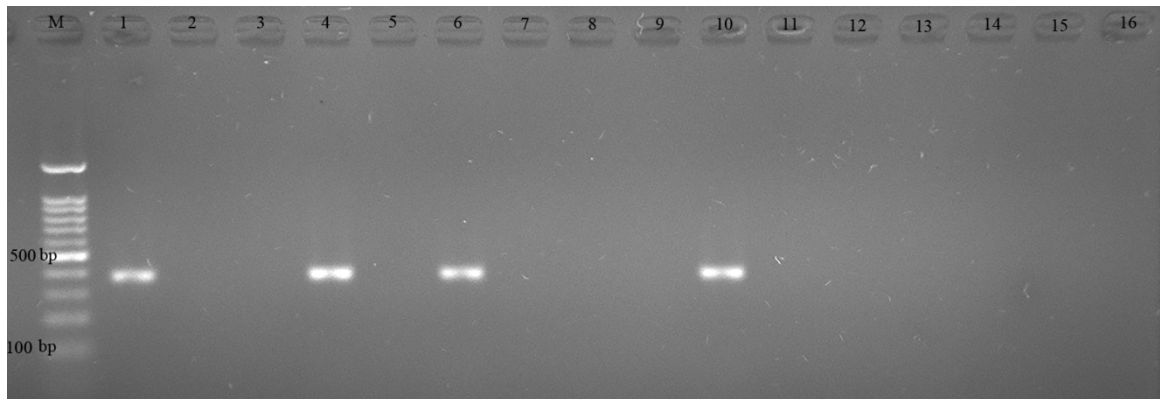
### سپاسگزاری

از آقای دکتر مصطفی نعمتی به خاطر شناسایی جنس و گونه درختان جنگلی صمیمانه سپاسگزاری می‌کنیم.

عوامل بیماریزا نیز نقش دارند. مارتین و همکاران (Martin et al. 2005) با بررسی رابطه بین عملیات اشتباه برداشت چوب پنبه و سوراخ‌های ایجاد شده توسط سوسک‌ها و آلودگی *Biscogniauxia* در جنگل‌های بلوط چوب پنبه در اسپانیا دریافتند که همبستگی شدیدی بین عملیات اشتباه برداشت چوب پنبه و سوراخ‌های ایجاد شده بوسیله سوسک‌های جنس *Cerambyx* L. و بین خسارت سوسک‌ها و آلودگی *Biscogniauxia* وجود دارد. بلحسین و همکاران (Belhoucine et al. 2011) با جدا سازی *B. mediterranea* از میکانژیای حشره بالغ، از روده حشره ماده و لارو سوسک *Platypus cylindrus* Herbst و نیز از دالان‌های ایجاد شده توسط آنها در جنگل‌های بلوط چوب پنبه در الجزیره به احتمال انتشار این قارچ به وسیله سوسک مذکور به عنوان یکی از راه‌های انتقال آن اشاره نموده‌اند. در تحقیق حاضر نیز مشخص شد که خسارت آفات برگ‌خوار، سوسک‌های پوستخوار و حشرات چوبخوار با وجود بیماری همبستگی مثبت دارد که بیانگر تأثیر آنها در افزایش بیماری است اگر چه این تأثیرها از لحاظ آماری معنی دار نبودند.

سرخشکیدگی درختان در اثر عوامل زنده و یا غیر زنده متعددی پدید می‌آید (Ciesla & Donaubaue 1994). با توجه به این که این علامت از علائم بارز تنش خشکی است لذا به نظر می‌رسد همبستگی مثبت بین آن با بیماری زغالی (جدول ۳) ضمن تأییدی دیگر بر ارتباط تنش خشکی با ظهور و گسترش این بیماری، حاکی از اثر تشدید کنندگی آنها نیز می‌باشد. به عبارت دیگر ممکن است درختان بلوط در اثر تنش کم آبی دچار سرخشکیدگی و زوال تدریجی شوند اما اگر عامل بیماری زغالی در آنها وجود داشته باشد روند مرگ و میر آنها تسریع یابد.

همبستگی مثبت بین بیماری زغالی با آتش سوزی



شکل ۲. واکنش آغازگرهای اختصاصی (MED1&MED2) گونه *Biscogniauxia mediterranea* با دی ان ای استخراج شده از ۱۴ جدایه قارچ به دست آمده از پوست داخلی بلوط شامل سه جدایه دارای آنامورف (کنیدیوفور و کنیدیوم) *B. mediterranea* (چاهک‌های ۴، ۶، ۱۰، دارای باند ۳۷۷ bp)، هفت جدایه دارای آنامورف متفاوت با گونه مذکور (چاهک‌های ۲، ۳، ۵، ۷، ۸، ۹، ۱۱) و چهار جدایه فاقد توانایی تشکیل آنامورف روی محیط کشت OMA (چاهک‌های ۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۵)؛ چاهک ۱ و ۱۶ به ترتیب شاهد مثبت (دی ان ای جدایه شناخته شده *B. mediterranea* دارای باند ۳۷۷bp) و منفی؛ M نشانگر وزن مولکولی (۱۰۰ bp).

**Fig 2.** Reaction of species-specific primers (MED1&MED2) of *Biscogniauxia mediterranea* against DNA extracts from 14 isolates of fungi isolated from oak inner bark including three isolates having anamorph (Conidiophore and conidium) of *B. mediterranea* (Lanes 4, 6, 10 with 377bp band), seven isolates having different anamorph from that of *B. mediterranea* (Lanes 2, 3, 5, 7, 8, 9, 11), and four isolates lacking anamorph on OMA (Lanes 12, 13, 14, 15); Lanes 1 & 16 are positive (DNA extract of a known isolate of *B. mediterranea* with 377 bp band) and negative controls respectively; Molecular weight marker of 100 bp (M).

## منابع

- Anonymous. 2012. Sustainable management of forest in Zagros forest ecosystems for prophylaxis and control of oak decline. Forest, Ranges and Watershed Organization of Iran. 60 pp. (In Persian).
- Bassett E. N. and Fenn P. 1984. Latent colonization and pathogenicity of *Hypoxyton atropunctatum* on oaks. Plant Diseases 68: 317-319.
- Be' langer R. R., Manion P. D., Griffin D. H. 1990. Amino acid content of water-stressed plantlets of *Populus tremuloides* clones in relation to clonal susceptibility to *Hypoxyton mammatum* in vitro. Canadian Journal of Botany 68: 26-29.
- Belhoucine L., Bouhraoual R.T., Meijer M., Houbraken J., Harrak M. J., Samson R. A., Equihua-Martinez A. and Pujade-Villar J. 2011. Mycobiota associated with *Platypus cylindrus* (Coleoptera: Curculionidae, Platypodidae) in cork oakstands of North West Algeria, Africa. African Journal of Microbiology Research 5: 4411-4423.
- Boncaldo E., Sicoli G., Mannerucci F. and Luisi N. 2007. Fungal endophytic communities detected in deciduous oak trees from southern Italy. Journal of Plant Pathology 89: (Supplementary) 33-33.
- Capretti P. and A. Battisti. 2007. Water stress and insect defoliation promote the colonization of *Quercus cerris* by the fungus *Biscogniauxia mediterranea*. Forest Pathology, 37: 129-135.
- Ciesla W.M. and Donaubaueer E. 1994. Decline and dieback of trees and forests. FAO Forest Paper 120, 90 P.
- Collado J., Gonzalo P. and Fernando P. 2001. Identification of an endophytic *Nodulisporium* sp. from *Quercus ilex* in central Spain as the anamorph of *Biscogniauxia mediterranea* by rDNA sequence analysis and effect of different ecological factors on distribution of the fungus. Mycologia, 93: 875-886.
- Gonthier P., Gennaro M. and Nicolotti G. 2006. Effects of water stress on the endophytic mycota of *Quercus robur*. Fungal Diversity 21: 69-80.
- Griffin D. H., Quinn K., McMillen B. 1986. Regulation of hyphal growth rate of *Hypoxyton mammatum* by amino

- acids: stimulation by proline. *Experimental Mycology*. 10: 307–314.
- Griffin D. H., Quinn K. E., Gilbert G. S., Wang C. J. K. and Rosemarin S. 1992. The role of Ascospores and conidia as propagules in the disease cycle of *Hypoxylon mammatum*. *Phytopathology* 82: 114-119.
- Hendry S.J., Lonsdale D. and Boddy L. 1998. Strip-cankering of beech (*Fagus sylvatica*): pathology and distribution of symptomatic trees. *New Phytologist*, 140: 549–565.
- Hendry S.J., Boddy L., Lonsdale D. 2002. Abiotic variables effect differential expression of latent infections in beech (*Fagussylvatica*). *New Phytologist* 155: 449–460.
- Hirata T. and Takamatsu S. 1996. Nucleotide sequence diversity of rDNA internal transcribed spacers extracted from conidia and cleistothecia of several powdery mildew fungi. *Mycoscience* 37: 283–288.
- Hosking G. and Hutcheson J. 1993. Pohutukawa (*Metrosideros excels*) health and phenology in relation to possums (*Trichosurus vulpecu*) and other damaging agents. *New Zealand Journal of Forestry Science* 23: 49-61.
- Jazirehi M. H. and Ebrahimi Rostaghi M. 2003. *Silviculture in Zagros*. University of Tehran press. 560 p.
- Ju Y. M. and Rogers J. D. 1996. A revision of the genus *Hypoxylon*. APS Press, St. Paul, MN, USA. 365 p.
- Ju Y. M., Rogers J. D., San Martin F. and Granmo A. 1998. The genus *Biscogniauxia*. *Mycotaxon* 66: 1-98.
- Ju Y. M. and Rogers J. D. 2001. New and interesting *Biscogniauxia* taxa, with a key to the world species. *Mycological Research* 105: 1123-1133.
- Jurc D. and Ogris N. 2006. First reported outbreak of charcoal disease caused by *Biscogniauxia mediterranea* on Turkey oak in Slovenia. *Plant Pathology* 55: 299-299.
- Kirisits T. and Freinschlag C. 2012. Ash dieback caused by *Hymenoscyphus pseudoalbidus* in a seed plantation of *Fraxinus excelsior* in Austria. *Journal of Agricultural Extension and Rural Development* 4: 184-191.
- Linaldeddu B. T., Sirca C., Spano D. and Franceschini A. 2011. Variation of endophytic cork oak-associated fungal communities in relation to plant health and water stress. *Forest Pathology* 41: 193–201.
- 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.
- Martín J., Cabezas J., Buyolo T., Pato'n D. 2005. The relationship between *Cerambyx* spp. damage and subsequent *Biscogniauxia mediterranea* infection on *Quercus suber* forests. *Forest Ecology and Management* 216: 166–174.
- Mazzaglia A., Anselmi N., Gasbarri A., Vannini A. 2001. Development of a Polymerase Chain Reaction (PCR) assay for the specific detection of *Biscogniauxia mediterranea* living as an endophyte in oak tissue. *Mycological Research* 105: 952–956.
- Mirabolfathy M. 2013. Outbreak of charcoal disease on *Quercus* spp. and *Zelkova carpinifolia* trees in forests of Zagros and Alborz mountains in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology* 49: 77-79 (in Persian with English Summary)
- Mirabolfathy M, Ju Y. M., Hsieh H. M. and Rogers J. D. 2013. *Obolarina persica* sp. nov., associated with dying *Quercus* in Iran. *Mycoscience* 1-6.
- Okane I., Srikitikulchai P., Toyama K., Læssøe T., Sivichai S., Hywel-Jones N., Nakagiri A., Potacharoen W. and Suzuki K. 2008. Study of endophytic Xylariaceae in Thailand: diversity and taxonomy inferred from rDNA sequence analyses with saprobes forming fruit bodies in the field. *Mycoscience* 49:359–372.
- Pažoutová S., Šrůtka P., Holuša J., Chudíčková M. and Kolařík M. 2010. The phylogenetic position of *Obolarina dryophila* (Xylariales). *Mycological Progress* (2010) 9:501–507.
- Ragazzi A., Moricca S., Capretti P., Dellavall I., Mancini F. and Turco E. 2001. Endophytic fungi in *Quercus cerris*: isolation frequency in relation to phenological phase, tree health and the organ affected. *Phytopathologia Mediterranea*, 40: 165–171.
- Sabeti H. 1994. *Forest, trees and shrubs of Iran*. 2<sup>nd</sup> ed., University of science and technology press, Iran. 810 P.
- Sun X., Ding Q., Hyde K.D., Guo L.D. 2012. Community structure and preference of endophytic fungi of three woody plants in a mixed forest. *Fungal Ecology* 1-9.
- Thomas, F. M., R. Blank and G. Hartmann. 2002. Abiotic and biotic factors and their interactions as causes of oak decline in Central Europe. *Forest Pathology*. 32: 277–307.
- Vannini A., Lucero G., Anselmi N. and Vetraino A. M. 2009. Response of endophytic *Biscogniauxia mediterranea* to variation in leaf water potential of *Quercus cerris*. *Forest Pathology*, 39: 8–14.

- Vannini A. and Scaracia Mugnozza G. 1991. Water stress: a predisposing factor in the pathogenesis of *Hypoxyton mediterraneum* on *Quercus cerris*. Eurpean Jouranl of Forest Pathology 21: 193-201.
- Vanini A. and Valentini.R. 1994. Influence of water relations on *Quercus cerris-Hypoxyton mediterraneum* interaction: a model of drought-induced susceptibility to a weakness parasite. Tree Physiology, 14: 129-139.
- Vasilyeva L.N., Stephenson S. L. and Miller A. N. 2007. Pyrenomycetes of the Great smoky mountains national park. IV. *Biscogniauxia*, *Camaropella*, *Camarops*, *Camillea*, *Peridoxylon* and *Whalleya*. Fungal Diversity 25: 219-231.
- Whalley A. J. S. 1996. The xylariaceous way of life. Mycological Research 100: 897-922.

