DOI: 10.22034/ijpp.2024.2021016.440

بیماری‌های گیاهی / جلد ۵۹ / شماره ۳/ سال ۱۴۰۲: ۲۵۱-۲۳۵

CC BY

مقاله پژوهشی

شناسایی و ارزیابی شیوع قارچ‌های همراه با بیماری ذغالی در جنگل‌های بلوط ایران

حسین گل افروز[۱]، ناصر صفایی[۲]**، سیده معصومه زمانی[۳]، داریوش صفائی[۴] و منصور کریمی جشنی[۵]

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۲۷ ، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۵/۲۶)

چکیده

گونه‌های جنس بلوط (*Quercus* spp.) مهم‌ترین درختان جنگلی در ایران و دنیا محسوب می‌شوند. در دهه گذشته، بیماری پوسیدگی ذغالی بلوط با توجه به شرایط اقلیمی پیش آمده، از جمله کاهش بارندگی و خشکسالی‌های متعدد به طرز چشمگیری در مناطق جنگلی زاگرس و همچنین هیرکانی افزایش یافته است. این بیماری منجر به نکروز موضعی یا سیستمیک، زوال و مرگ درختان آلوده طی یک یا چند سال می‌شود. بیماری ناشی از یک تعامل و رقابت پیچیده بین درختان با عوامل زنده و غیرزنده محیطی است. این تحقیق به منظور بررسی آخرین وضعیت ابتلای درختان بلوط به بیماری ذغالی در هفت استان کشور شامل کرمانشاه، ایلام، لرستان، کردستان، خوزستان، مرکزی و گلستان و شناسایی قارچ‌های همراه با این بیماری در طی سال‌های ۱۴۰۰ -۱۴۰۱ انجام گرفت. برای این منظور، پس از نمونه‌برداری از بافت‌های آلوده درختان بلوط (از تنه و شاخه‌ها)، جدایه‌های قارچی با استفاده از روش‌های معمول از بافت‌های چوبی آلوده استخراج و سپس عوامل بیمارگر جداسازی شده با استفاده از صفات ریخت شناسی و کلیدهای قارچ‌شناسی شناسایی شدند. شناسایی مرفولوژیکی جدایه‌های قارچی با استفاده از روش مولکولی و واکاوی تبارزایی بر اساس توالی ناحیه ITS-rDNA و *ß-tubulin* تأیید شد. دو گونه *Biscogniauxia mediterranea* و *Obolarina persica* به عنوان قارچ‌های همراه با بیماری شناسایی شدند. شیوع این قارچ‌ها در استان‌های مورد مطالعه متفاوت بود که بیشترین شیوع گونه *B. mediterranea* در استان لرستان و بیشترین شیوع قارچ *O. persica* در استان ایلام مشاهده شد. نتایج این تحقیق آخرین وضعیت بیماری ذغالی روی درختان بلوط و همچنین فراوانی دو گونه *B. mediterranea* و *O. persica* را در استان‌های مورد مطالعه نشان می‌دهد. بدین ترتیب نتایج این مطالعه تکمیل کننده داده‌های نسبتا محدود موجود در مورد شیوع هر یک از این بیمارگرهای قارچی در استان‌های مختلف و وضعیت فعلی آلودگی بلوط در هر یک از مناطق مورد مطالعه می‌باشد.

کلمات کلیدی: بلوط، پوسیدگی ذغالی، ریخت شناسی، جنگل، ITS-rDNA.

---

* بخشی از رساله دکتری تخصصی نگارنده اول ارائه شده به گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

** مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: nsafaie@modares.ac.ir

۱ دانشجوی دکتری، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

۲ دانشیار گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

۳ استادیار، موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

۴ استادیار، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ایران.

۵ استادیار، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

DOI: 10.22034/ijpp.2024.2021016.440

Research Article
Identification and evaluation of the prevalence of fungi associated with charcoal disease in oak forests of Iran

H. Golafrouz[1], N. Safaie[*2], S. M. Zamani[3], D. Safaee[4] and M. Karimi Jashni[5]**

(Received: 16.02.2024; Accepted: 16.08.2024)

Abstract

Oaks (*Quercus* spp.) are among the most important trees in the forests of Iran and worldwide. Over the last decade, oak charcoal disease (OCD) has become more common in numerous forest areas in the Zagros and Hyrcanian regions, largely due to reduced rainfall and drought stress. The oak charcoal disease causes local or systemic necrosis, wilting, and even death of infected oak trees. In addition, there is a complex interaction between trees and biotic and abiotic environmental factors. This study was conducted in 2021-2022 on oak trees in seven provinces of the country, including Khuzestan, Ilam, Lorestan, Kurdistan, Khuzestan, Isfahan and Golestan, to analyze and determine the current status of oak charcoal disease and associated fungal species. For this purpose, samples of diseased bark (from trunk and branches) of *Quercus* spp. trees were collected, and fungal isolates were recovered from infected wood tissues using the usual methods and then identified morphologically. Identification of the fungal isolates was confirmed by sequencing the fungal ITS-rDNA and ß-tubulin gene. The results showed that the most prevalent fungal isolates of OCD in the samples were *Biscogniauxia mediterranea* and *Obolarina persica*. The prevalence of these fungi in the studied provinces varied, with the highest prevalence of *B. mediterranea* in Lorestan and the highest prevalence of *O. persica* in Ilam. The results of this study complemented the relatively limited data on the prevalence of each fungal pathogen of OCD in different provinces. In addition, the current status of oak infection in each studied region was clarified.

Key words: Charcoal rot, forest, ITS-rDNA, morphology, Oak tree.

[*] A part of PhD thesis of the first author submitted to Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

[**] Corresponding author, E-mail: nsafaie@modares.ac.ir

1 PhD student, Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

2 Associate Prof., Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

3 Assistant Prof., Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.

4 Assistant Prof., Agricultural and Natural Resources Research Center of Kermanshah Province, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Iran.

5 Assistant Prof., Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

مقدمه

گونه‌های جنس بلوط (*Quercus* spp.) متعلق به خانواده Fagaceae و از مهم‌ترین درختان جنگلی در دنیا می‌باشند و با بیش از ۴۰۰ الی ۵۰۰ گونه، جنگل‌های وسیعی را در کشورهای مختلف شامل می‌شوند (Fortini *et al*. 2009). در کشور ایران بلوط به عنوان یکی از مهم‌ترین و فراوان‌ترین درختان غرب کشور، به ویژه منطقه زاگرس شناخته می‌شود (Mirabolfathy *et al*. 2011). گونه‌های مهم جنس بلوط در جنگل‌های زاگرس عبارتند از بلوط ایرانی یا برودار (*Quercus persica* یا *Q. brantii*)، مازودار (*Q. infectoria*) و وی‌ول (*Q. libani*). پراکنش این گونه‌ها در ارتفاعات زاگرس، از استان آذربایجان غربی شروع و در استان‌های کردستان، کرمانشاه، ایلام، لرستان، خوزستان، چهارمحال و بختیاری، کهگیلویه و بویراحمد، فارس، اصفهان و همدان انتشار دارد (Jazireii & Ebrahimi 2003). جنگل‌های زاگرس به وسعت ۵/۵ میلیون هکتار با داشتن تنوع زیستی جانوری و گیاهی بالا، نقش مهمی در حفاظت از خاک، آب و محیط زیست ایران دارند (Farashi *et al*. 2017). اعتقاد بر این است که تضعیف درختان در سال‌های اخیر به دلیل خشکسالی‌های پی در پی منجر به افزایش حساسیت آنها به آفات و بیماری‌ها در این مناطق شده است (Safaee *et al*. 2017a). اثرات تغییر اقلیم در زیست‌بوم جنگلی به سرعت در حال افزایش است (Santini *et al*. 2013) و تغییرات غیر قابل پیش‌بینی اقتصادی و زیست محیطی را در تنوع و رقابت بین گونه‌ای عوامل زنده (عوامل بیمارگر و آفات) ایجاد کرده است (Lovett *et al*. 2016). پیش‌بینی می‌شود تغییرات اقلیمی پیش‌رو در آینده می‌تواند با تغییر تعادل بین میزبان، بیمارگر و شرایط محیطی (مثلث بیماری)، بر توسعه بیمارگرهای فعلی جنگل تأثیر بگذارد (Zamani *et al*., 2023)؛ بطوریکه تغییرات تدریجی یا شدید آب‌وهوا مانند خشکسالی، امواج گرما، تگرگ، سیل و یخبندان، برهم‌کنش‌های میزبان و بیمارگر را تغییر خواهد داد و نتیجتاً موجب ایجاد بیماری‌های ناشی از بیمارگرهای بومی یا غیربومی یا حتی ارگانیسم‌های بی‌ضرر می‌شود، مانند قارچ درون‌رست *Biscogniauxia mediterranea* و *Obolarina persica* (Mirabolfathy *et al*. 2013) که در درختان تحت استرس، بیماری‌زا می‌شود و بیماری شانکر زغالی را در میزبان ایجاد می‌کند. از سوی دیگر، تغییر شرایط آب‌وهوایی، می‌تواند از طریق حذف محدودکننده‌های زیستی (عوامل بیوکنترل) و غیرزیستی که پیش‌ازاین برای توزیع جغرافیایی قارچ‌های بیماری‌زا محدودیت ایجاد می‌کردند، معرفی بیماری‌های جدید را افزایش دهد (Zamani *et al*. 2023). در حال حاضر بیماری پوسیدگی ذغالی درختان بلوط یکی از مشکل‌های اصلی بلوط در جنگل‌هایی با آب و هوای مدیترانه‌ای و نیمه مدیترانه‌ای در کشورهای آمریکای مرکزی، ایالات متحده آمریکا، آفریقا، ایتالیا، اسپانیا، پرتغال، بوسنی هرزگوین، اسلوونی، روسیه، ترکیه می‌باشد، که در نهایت منجر به نکروز موضعی یا سیستمیک، زوال و مرگ درختان آلوده طی یک یا چند سال می‌شود (Desprez *et al*. 2017). مرگ درختان میزبان در زیست بوم جنگل‌های معتدل با شاخص‌های درجه حرارت بالا، کاهش بارندگی و تنش خشکی ارتباط دارد و بررسی‌های متعدد نشان می‌دهند که قارچ عامل بیماری ابتدا دارای مرحله درون رستی طولانی در اندام‌های مختلف میزبان از قبیل، پوست، چوب، جوانه، و برگ است که در این مرحله نشانه‌ای از بیماری دیده نمی‌شود (Anselmi *et al*. 2000). با مرگ بافت شاخه‌ها و تنه، در زیر پوست، استرومای قارچ همراه با پریتسیوم‌های تیره رنگ توسعه پیدا می‌کند و با ایجاد فشار، پوست شکافته شده و بافت استرومایی همراه با شیرابه در معرض محیط

بیرون قرار می‌گیرد. قارچ برای پراکنش، میزان فراوانی از اسپور (آسکوسپور و کنیدی) تولید می‌کند که با هوا و حشرات منتقل می‌شوند (Linaldeddu *et al*. 2011). مرگ درختان بلوط به طور قابل توجهی در رویشگاهای قدیمی‌تر بیشتر است (Hansen & Delatour 1999).

در ایران نیز همسو با سایر نقاط دنیا، از میان تمام عوامل تاثیرگذار، بیماگرهای قارچی *Biscogniauxia mediterranea* و *Obolarina persica* به عنوان عوامل اصلی بیماری ذغالی درختان بلوط گزارش شده‌اند (Ghanbary *et al*. 2020, Mirabolfathy *et al*. 2013). قارچ *B. mediterranea* اولین بار در سال ۱۳۹۰ از جنگل‌های زاگرس و بعد روی گونه بلوط بلندمازو (*Q. castaneifolia*) و آزاد (*Zelkova carpinifolia*) در استان گلستان و همچنین استان‌های لرستان، ایلام، کهگیلویه و بویراحمد و فارس گزارش شده است (Mirabolfathy *et al*. 2011, Ashrafi *et al*. 2018). خسارت بالای بیماری به طور وسیع در قریب به اتفاق مناطق جنگلی مورد بازدید در ایران مشاهده شده است و به نظر می‌رسد بیماری از سال‌های پیش در منطقه وقوع و شیوع داشته است (Mirabolfathy 2013, Mirabolfathy *et al*. 2013). در سال‌های اخیر با توجه به شرایط اقلیمی پیش آمده مانند کاهش میزان بارندگی، خشکسالی‌های متعدد و تنش رطوبتی، زمینه مناسبی برای طغیان این بیماری فراهم شده است (Mirabolfathy *et al*. 2013). این بیماری به طرز چشمگیری در برخی مناطق جنگلی زاگرس افزایش یافته است و بر هر سه گونه بلوط تأثیرگذار بوده است (Safaee *et al*. 2017a). بعلاوه، جدایه هایی از گونه *B. mediterranea* در جنگل‌های ارسباران از گونه‌های بلوط اوری (*Q. macranthera*) و بلوط سفید (*Q. petraea*) بعنوان عامل بیماری پوسیدگی ذغالی جداسازی و گزارش شده است (Ghasemi Esfahlan *et al*. 2016). علاوه بر گونه فوق، میرابوالفتحی و همکاران (۲۰۱۳b) قارچ درون‌زی دیگری با نام *O. persica* را نیز به عنوان عامل ایجاد بیماری ذغالی درختان بلوط در ایران گزارش نمودند. همچنین قارچ *B. mediterranea* به عنوان بیمارگر شاخه و تنه همراه با نشانه‌های داخلی نکروز در برخی از درختان جنگلی استان گیلان جداسازی شده است (Kazemzadeh-Chakusary *et al*. 2020).

همانگونه که ذکر شد، مطالعات نشان داده است که تغییر اقلیم، افزایش دما و کاهش بارش‌های جوی از عوامل گسترش و تشدید بیماری به این قارچ درون‌زی نیز محسوب می‌شوند (Ashrafi *et al*. 2018). تاکنون روش کارآمدی برای کنترل این بیماری به جزء هرس شاخه‌های آلوده، قطع درختان خشکیده و خارج کردن آنها از جنگل گزارش نشده است (Balbalian & Henn 2014, Vannini *et al*. 2009). بنابراین موثرترین روش مدیریت آن جلوگیری از ایجاد تنش‌های مختلف به درختان ذکر شده است (Campanile *et al*. 2007). اخیراً یانگوی و همکاران (Yangui *et al*. 2020) گونه *Trichoderma harzianum* را در مهارزیستی جدایه‌های *B. mediterranea*، عامل بیماری شانکر ذغالی بلوط چوب پنبه‌ای (*Q. suber*) موثر دانسته‌اند؛ اگرچه شدت این تاثیر در میان جدایه‌های مختلف متفاوت است. بروز این بیماری و خسارت بالای آن روی درختان بلوط ضرورت برنامه‌ریزی و تدوین راهبردهای مناسب برای مبارزه با این بیماری را ایجاب می‌کند. اتخاذ واکنش و پاسخ مناسب به تهدیدهای ناشی از عوامل بیمارگر در گرو داشتن آگاهی کافی از ماهیت بیمارگرهایی است که با آنها مواجه هستیم و این مسئله ما را در تنظیم سازوکارهای کنترل کارآمدتر، بویژه در بکارگیری عوامل مهارزیستی علیه این بیمارگرها، توانا می سازد. این تحقیق با هدف بررسی وضعیت کنونی ابتلای درختان بلوط به بیماری ذغالی در برخی جنگل‌های ایران، و نیز شناسایی و برآورد فراوانی قارچ‌های همراه با این بیماری در استان‌های مورد بررسی انجام گرفت.

مواد و روش‌های بررسی

بازدید و نمونه‌برداری

برای شناسایی و تعیین فراوانی عوامل قاچی همراه با بیماری ذغالی بلوط، نمونه‌برداری به صورت تصادفی از درختان بلوط در تابستان ۱۴۰۰ و ۱۴۰۱ انجام شد. نمونه‌برداری از رویشگاه‌هایی از بلوط در استان‌های ایلام، خوزستان، کردستان، کرمانشاه، لرستان، مرکزی و گلستان از درختانی که نشانه‌هایی از زوال و پوسیدگی ذغالی (شامل وجود استرومای قارچ عامل بیماری، بدشکلی و تغییر رنگ برگ، شیرابه و سرخشکیدگی سرشاخه) در آنها وجود داشت، صورت گرفت (شکل۱ و جدول ۱). بمنظور امکان مقایسه آماری و بررسی وضعیت ابتلا و فراوانی عوامل بیماری‌زای همراه با بیماری پوسیدگی ذغالی، از هر منطقه حداقل ۱۰ پایه درخت با فاصله ۵۰ تا ۱۰۰ متر از یکدیگر مورد نمونه برداری قرار گرفت.

جداسازی و ریخت‌شناسی جدایه‌ها

جداسازی قارچ ها از نمونه‌های جمع‌آوری شده (بافت شاخه و پوست تنه) با استفاده از روش بلومنستین (Blumenstein 2010) و سان و همکاران (Sun *et al.* 2012) انجام شد. نمونه‌های آلوده پس از ضدعفونی سطحی با الکل هفتاد درصد در آب مقطر سترون دو بار شستشو داده شدند و بعد از خشک شدن روی کاغذ صافی روی محیط کشت‌های سیب زمینی- دکستروز- آگار (PDA) و مالت-آگار (MA) کشت شدند. ساختارهای قارچی مانند استروما، پریتسیوم و آسکوسپورها در شرایط طبیعی روی پوست و چوب نمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. عوامل قارچی بدست آمده به روش‌های نوک ریسه و تک اسپور خالص‌سازی و سپس با استفاده از کلیدهای شناسایی معتبر، کلید برخی جنس‌های

جدول ۱. موقعیت جغرافیایی مناطق مورد مطالعه بیماری ذغالی بلوط در هفت استان ایلام، خوزستان، کردستان، کرمانشاه، لرستان، مرکزی و گلستان

Table 1. The geographical location of the studied sites of oak charcoal disease in seven provinces of Iran: Ilam, Khuzestan, Kurdistan, Kermanshah, Lorestan, Markazi and Golestan.

Areas	City-Province	Elevation (Meter)	Geographic coordinates (Northern Latitude)
Visian Chegini	Lorestan-Khorramabad	1120	N33° 31.885' E47° 59.833'
Shourab	Lorestan-Khorramabad	1627	N33° 20.264' E48° 14.391'
Mele Shabanan	Lorestan-Khorramabad	1409	N33° 30.962' E48° 11.323'
Gardan Tagh	Khuzestan-Izeh	966	N32° 03.521' E49° 44.270'
Seydun	Khuzestan-Izeh	1533	N32° 07.375' E49° 44.212'
Dalahoo	Ilam	1556	N33° 41.970' E46° 24.262'
Manesht	Ilam	1934	N33° 40.588' E46° 27.736'
Bisotun	Kermanshah	1815	N34° 23.221' E47° 17.437'
Darbadam	Kermanshah	1730	N34° 01.447' E46° 25.870'
Sarpol-e Zahab	Kermanshah	1645	N34° 48.508' E45° 98.376'
Javanrud	Kermanshah	1790	N34° 81.293' E46° 50.519'
Kale Zard	Kermanshah	1400	N33° 85.189' E46° 98.101'
Marivan	Kurdistan	1300	N35° 47.050' E46° 11.214'
Shazand	Markazi-Arak	1015	N33° 83.695' E49° 34.693'
Golestan	Golestan	1376	N37° 18.427' E55° 40.290'

شکل ۱. تصاویری از مناطق نمونه‌برداری و وقوع بیماری ذغالی در جنگل‌های بلوط ایران

Figure 1. Images of sampling sites and the occurrence of oak charcoal disease in oak forests of Iran

خانواده Xylariaceae و کلید گونه‌های *Obolarina* spp. و *Biscogniauxia* spp. شناسایی شدند (Ju & Rogers 1996, 2001). برای مشاهده استرومای قارچی از استریوسکوپ SZH10 Olympus استفاده شد. بررسی و تصویربرداری از اسپورها و پریتسیوم‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری مدل OlympusBX51 مجهز به دید نمارسکی و دوربین دیجیتال DP72 انجام گرفت.

شناسایی مولکولی جدایه‌ها

استخراج DNA از بافت جدایه‌ها با تهیه توده ریسه‌ای از طریق انتقال چند قرص میسلیومی از کشت‌های جوان در فلاسک‌های حاوی ۷۵ میلی لیتر محیط کشت مایع عصاره سیب‌زمینی (PDB) و به روش صفایی و همکاران (Safaei *et al*. 2005) صورت گرفت. پس از استخراج DNA از پرگنه جدایه‌های قارچی، شناسایی مولکولی جدایه‌ها به روش PCR با جفت آغازگرهای ITS1 و ITS4 (Collado *et al*. 2001) و تکثیر بخشی از ژن *ß-tubulin* با آغازگرهای Bt2a5 و Bt2b5 انجام شد (Glass & Donaldson 1995). برنامه تکثیر ناحیه ITS شامل واسرشت اولیه در دمای 95 درجه سلسیوس به مدت هفت دقیقه، سپس ۳۰ تا ۳۵ سیکل بصورت دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه، ۵۸ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه، ۷۲ درجه سلسیوس به مدت دو دقیقه و بسط نهایی در ۶۸ درجه به مدت هفت دقیقه انجام شد. برنامه تکثیر بخشی از ژن *ß-tubulin* مانند آنچه که برای ناحیه ITS بود انجام شد با این تفاوت که برای تکثیر ناحیه ژنی *ß-tubulin* از دمای اتصال ۵۲ درجه سلسیوس استفاده گردید. بعد از تعیین توالی قطعات مورد نظر، ابتدا توالی‌ها با استفاده از برنامه Chromas مورد بررسی قرار گرفتند. سپس توالی‌های بدست آمده با انجام آزمون جستجوی بلست (Basic Local Alignment Search Tool :BLAST) با توالی‌های نوکلئوتیدی سایر گونه‌های موجود در پایگاه NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) مورد مقایسه قرار گرفتند. توالی‌های انتخاب شده از پایگاه‌های اطلاعاتی ذکرشده به همراه توالی‌های جدید توسط برنامه ClustalX2 همردیف سازی گردید و برای ویرایش دستی از نرم افزار MEGA استفاده شد. علاوه بر این از نرم افزار MAFF و روش‌های ویرایش اتوکات با استفاده از وبگاه GBlocks (https://www.biologiaevolutiva.org/jcastresana) نیز برای این منظور استفاده شد. ترسیم درخت اولیه آزمایشی با نرم افزار MEGA7 صورت گرفت (Tamura *et al.* 2013). مدل‌های تکاملی مربوطه با استفاده از نرم‌افزارهای PAUP و MrModeltest انتخاب و ترسیم درخت‌های فیلوژنی نهایی با نرم افزار MrBayes انجام شد (Ronquist and Huelsenbeck, 2003).

ارزیابی فراوانی قارچ‌های همراه با پوسیدگی ذغالی بلوط

برای ارزیابی فراوانی قارچ‌های جداسازی شده در هر منطقه از معادله DI (%) = n/N × 100 استفاده شد، که در آن n تعداد درختانی است که نشانه‌های بیماری ذغالی را نشان می‌دهد و N تعداد کل درختان بررسی شده (۱۰ درخت از هر منطقه) است (Getachew *et al*. 2014).

نتایج

شناسایی جدایه‌ها

با بررسی عوامل بیمارگر مولد پوسیدگی ذغالی، دو بیمارگر قارچی *Biscogniauxia mediterranea* و *Obolarina persica* از درختان بلوط دارای علایم زوال و و پوسیدگی ذغالی شناسایی شدند. در جدول ۲ تعداد جدایه‌های بدست آمده از این قارچ‌ها به تفکیک مناطق مختلف نمونه‌برداری ارائه شده است. بر این اساس از ۱۵۰ نمونه جمع‌آوری شده از درختان بلوط، تعداد ۳۳ جدایه از قارچ *B. mediterranea* و تعداد ۱۷ جدایه از قارچ *O. persica* جداسازی شد. چگونگی پراکنش جغرافیایی دو قارچ بیمارگر و فراوانی هر گونه قارچی به تفکیک و برای هر منطقه نمونه‌برداری مشخص گردید (جدول ۲). در استان لرستان هر دو گونه قارچ جداسازی شدند و در این استان فراوانی قارچ *B. mediterranea* بالاتر بود. در استان خوزستان فقط گونه *B. mediterranea* جداسازی شد. در

استان ایلام هر دو گونه قارچ جداسازی شدند اما در این استان قارچ *O. persica* با فراوانی بالاتری جداسازی شد. وضعیت جداسازی گونه‌های قارچی و فراوانی آنها در استان کرمانشاه همانند استان لرستان بود با این تفاوت که درصد فراوانی درختان مبتلا به بیماری ذغالی بلوط در استان لرستان بالاتر از کرمانشاه بود. در استان‌های کردستان، اراک و گلستان فقط گونه *B. mediterranea* جداسازی شد. در استان‌های لرستان و ایلام درصد فراوانی درختان مبتلا به بیماری ذغالی بلوط بالاتر از سایر استان‌های مورد مطالعه بود. در استان لرستان گونه *B. mediterranea* بعنوان فراوان‌ترین قارچ عامل بیماری و در استان ایلام *O. persica* بعنوان فراوان‌ترین قارچ ایجاد کننده پوسیدگی ذغالی شناخته شد (جدول ۲).

جدول۲. فراوانی درختان مبتلا به بیماری ذغالی بلوط و نرخ جداسازی قارچ‌های همراه *Biscogniauxia mediterranea* و *Obolarina persica* از درختان بلوط رویشگاه‌های مورد مطالعه

Table 2. Frequency of trees affected by oak charcoal disease and isolation rate of *Biscogniauxia mediterranea* and *Obolarina persica* as associated fungi from oak trees in the studied sites

			Biscogniauxia mediterranea		*Obolarina persica*	
Province	City	Host	Frequency Total n=(10)	Incidence (%)	Frequency Total n=(10)	Incidence (%)
Lorestan	Visian Chegini	*Quercus brantii*	6	60	0	0
Lorestan	Shourab	*Quercus brantii*	0	0	2	20
Lorestan	Mella Shabanan	*Quercus brantii*	8	80	0	0
Khuzestan	Gardan Tagh	*Quercus brantii*	2	20	0	0
Khuzestan	Siedun	*Quercus brantii*	1	10	0	0
Ilam	Dalahoo	*Quercus brantii*	2	20	7	70
Ilam	Manesht	*Quercus brantii*	3	30	0	0
Kermanshah	Bisotun	*Quercus brantii* *Quercus infectoria*	2	20	0	0
Kermanshah	Darbadam	*Quercus brantii* *Quercus infectoria*	0	0	4	40
Kermanshah	Sarpol Zahab	*Quercus brantii*	1	10	0	0
Kermanshah	Javanrud	*Quercus brantii*	3	30	0	0
Kermanshah	Kale Zard	*Quercus brantii*	1	10	0	0
Kurdistan	Marivan	*Quercus brantii* *Quercus infectoria*	3	30	0	0
Markazi	Shazand	*Quercus brantii*	1	10	0	0
Golestan	Golestan	*Quercus*	1	10	0	0

مشخصات ریخت‌شناسی جدایه‌ها

Biscogniauxia mediterranea

این قارچ دارای استرومای تیره و نامسطح و پریتسیوم‌های استوانه‌ای و تخم‌مرغی شکل است که در سطح زیرین بافت استروما قرار دارند و سطح استروما به علت قرارگیری دهانه پریتسیوم بالاتر از آن حالت برجسته دارد. آسک‌ها استوانه‌ای شکل، دارای دهانه آمیلوئیدی است. آسکوسپورها قهوه‌ای تیره و روشن، تک سلولی، بیضوی شکل، دارای ابعاد ۵–۷ × ۱۰– ۱۷ µm و دارای یک شکاف تندش صاف است (شکل۲).

Obolarina persica

این قارچ دارای استرومای تیره و نامسطح و پریتسیوم‌های استوانه‌ای شکل است که در سطح زیرین بافت استروما قرار دارند و سطح استروما به علت

قرارگیری دهانه پریتسیوم پایین‌تر از آن حالت فرو رفته دارد. آسک‌ها استوانه‌ای شکل و آسکوسپورها قهوه‌ای تیره و روشن، تک سلولی، بیضوی شکل در دو انتها نوک تیز (آلانتوئید)، دارای ابعاد µm ۱۰-۱۵ × ۴۰- ۱۷ و دارای یک شکاف تندش سیگموئید است (شکل۳).

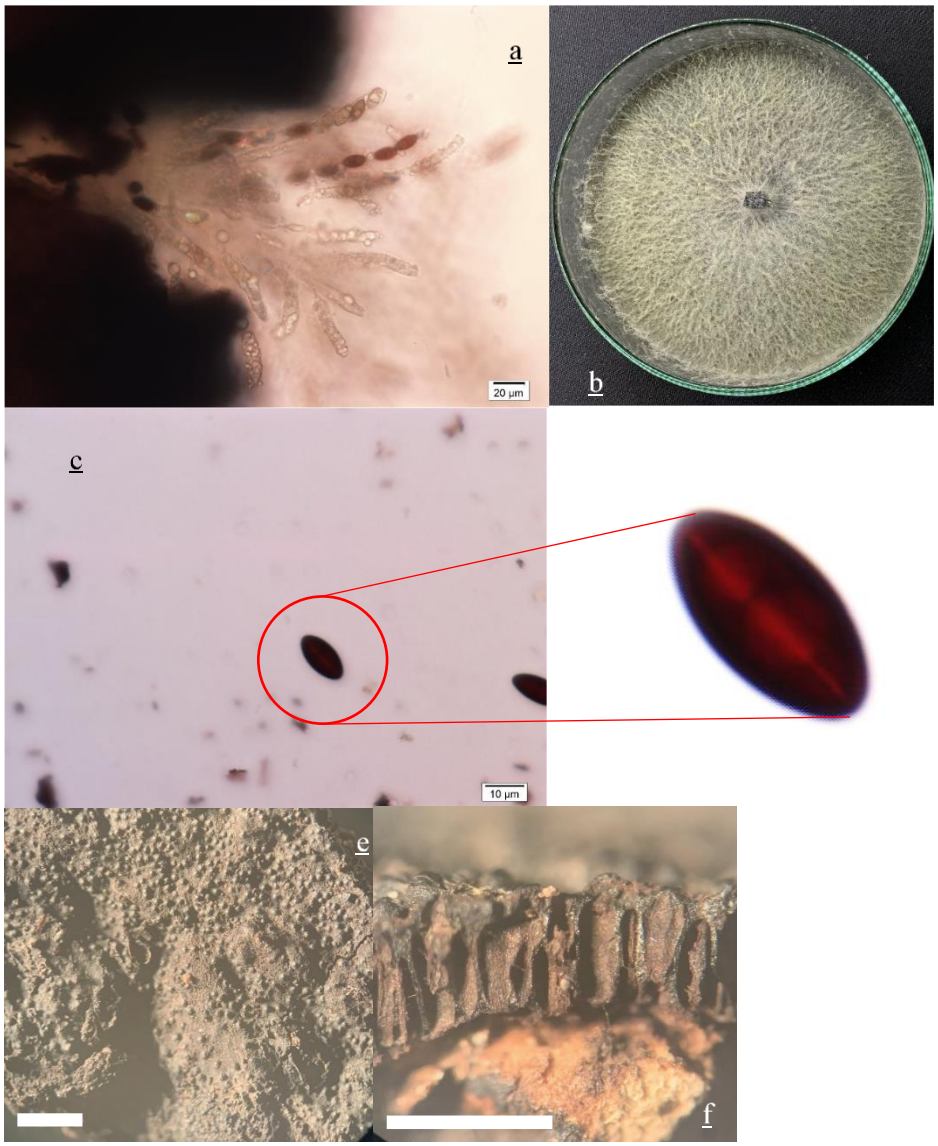
واکاوی تبارزایی جدایه‌ها

نتایج حاصل از مقایسه توالی‌های بدست آمده از جدایه قارچ‌های *B. mediterranea* و *O. persica* با توالی‌ها موجود در بانک ژن نشان داد که توالی جدایه‌های قارچی با توالی‌های موجود در بانک ژن ۹۸ تا ۱۰۰ درصد همسانی دارند. درخت تبارشناسی گونه‌های جنس *Biscogniauxia* بر اساس الگوریتم بیسین و مبتنی بر ناحیه ITS رسم شد و بهترین مدل جایگزینی بر اساس برنامه مستر مدل تست، مدل (*HKY+I+G*) بود. دوگونه *Xylaria longipes* و *Annulohypoxylon squamulosum* به عنوان آرایه‌های خارج از گروه در نظر گرفته شدند. در درخت تبارزایی ترسیم شده گونه‌های *Biscogniauxia*، جدایه *Biscogniauxia mediterranea* G8 از استان گلستان با گونه *B. mediterranea* از بانک ژن (با کد دسترسی KP641152) در یک کلاد با احتمال پسین ۰/۸۱ قرار گرفتند (شکل۴). درخت تبارشناسی گونه‌های *Obolarina* بر اساس الگوریتم بیسین و مبتنی بر ترکیب داده‌های مربوط به ناحیه ITS و *ß-tubulin* رسم شد و بهترین مدل جایگزینی بر اساس برنامه مستر مدل تست، مدل (*HKY+I+G*) بود. در درخت تبارشناسی گونه‌های *O. persica* جدایه *Obolarina persica* D401 از دالاهو استان کرمانشاه در یک کلاد همراه گونه‌های *O. persica* و *Obolarina* sp. با احتمال پسین ۰/۹۸ قرار گرفت (شکل۵).

بحث

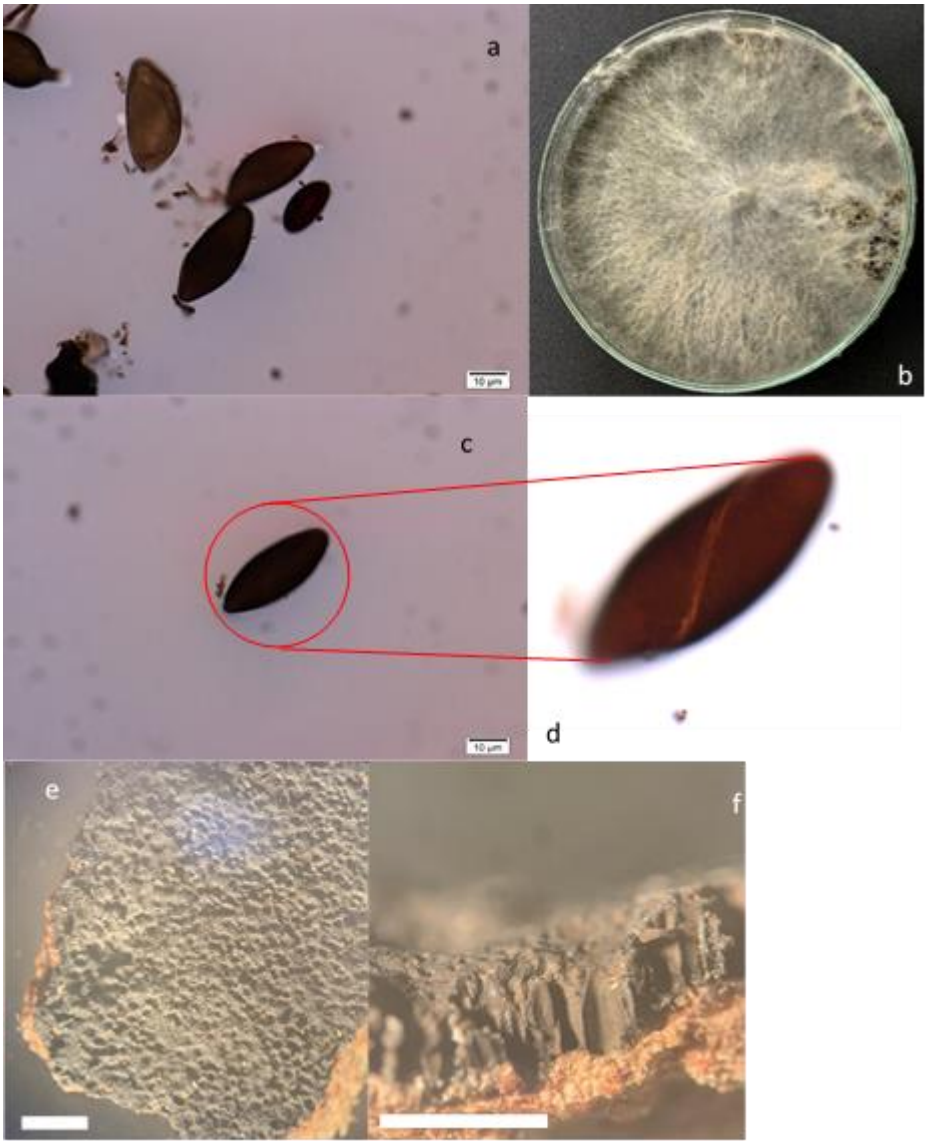
بیماری پوسیدگی ذغالی درختان بلوط از مشکلات اصلی در حال گسترش این گونه گیاهی در بسیاری از رویشگاه‌های آن در ایران و جهان شناخته می‌شود (Desprez-Loustau *et al*. 2007, Mazzaglia *et al*. 2001, Mirabolfathy 2013). بررسی‌های ریخت‌شناسی، مولکولی و بیماری‌زایی متعددی نشان می‌دهد، که گونه‌های *B. mediterranea* و *O. persica* از گونه‌های مختلف بلوط در مناطق مختلف جنگلی ایران مانند زاگرس، ارسباران و هیرکانی جداسازی شده است و از عوامل زوال و مرگ این درختان شناخته می‌شوند (Ashrafi *et al*. 2018, Mirabolfathy *et al*. 2011, Safaee *et al*. 2017a, b). همسو با نتایج پژوهش‌های ذکر شده، در این پژوهش نیز دو گونه *B. mediterranea* و *O. persica* از درختان دارای نشانه‌های زوال جداسازی و شناسایی گردید. بر اساس مطالعات انجام شده دو گونه *B. mediterranea* و *O. persica* عامل بیماری ذغالی در درختان بلوط جنگل‌های ایران هستند (Mirabolfathy 2013, Mirabolfathy *et al*. 2013). بررسی‌های پیشین در زمینه همه‌گیر شناسی بیماری ذغالی بلوط در جنگل‌های غرب کشور (Mirabolfathy 2013, Mirabolfathy *et al*. 2013) در استان‌های لرستان، کرمانشاه، ایلام، کهگیلویه و بویراحمد، همدان، کردستان و فارس نشان می‌دهد که میزان آلودگی به بیماری ذغالی بلوط در مناطق مورد بررسی و بسته به استان‌های مختلف بین دو و حداکثر ۱۴ درصد متفاوت می‌باشد. در بررسی حاضر میزان آلودگی در برخی از استان‌ها از جمله لرستان و کرمانشاه بسیار بالاتر از مطالعات پیشین می‌باشد. این مسئله ممکن است حاکی از تشدید شرایط نامساعد محیطی (خشکسالی، گرم شدن دمای سالانه هوا، افزایش بروز ریزگردها و غیره) و بالتبع آن بروز بالاتر این بیماری نسبت به گذشته باشد.

در این بررسی علاوه بر آنکه شیوع بیماری ذغالی بلوط در استان‌های مختلف مقایسه شد و مشخص گردید بیماری در استان‌های مختلف شدت متفاوتی دارد؛ برای اولین بار در کشور نشان داده شد فراوانی گونه‌های قارچی غالب همراه بیماری (یعنی دو گونه *B. mediterranea* و *O. persica*) نیز در مناطق جنگلی استان‌های مختلف با یکدیگر متفاوت است.



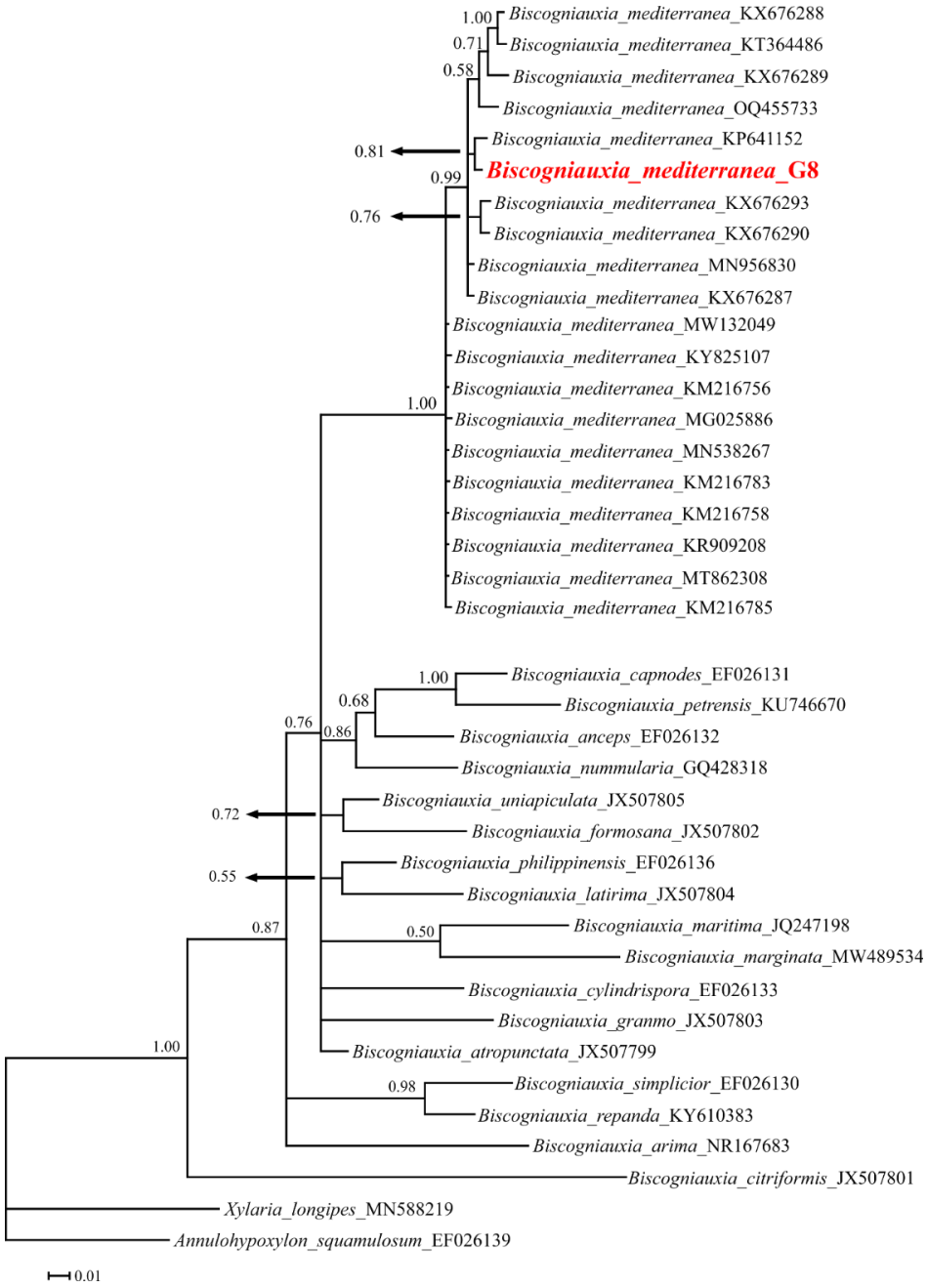
شکل ۲. *Biscogniauxia mediterranea* ، a- آسک و آسکوسپورها b- پرگنه یک هفته‌ای قارچ روی محیط کشت PDA- c- آسکوسپور d- خط تندش آسکوسپور e- سطح استروما و دهانه برجسته پریتسیوم (Bar: 1mm) f- نمای جانبی از پریتسیوم (Bar: 1mm).

Fig 2. *Biscogniauxia mediterranea*, a-Ascus and ascospores, b-Seven-days colony of fungus on PDA, c-Ascospore, d- Ascospore with straight germ slit, e-Stroma surface and prominent ostioles of perithecia (Bar: 1mm), f-Lateral view of perithecia (Bar: 1mm).



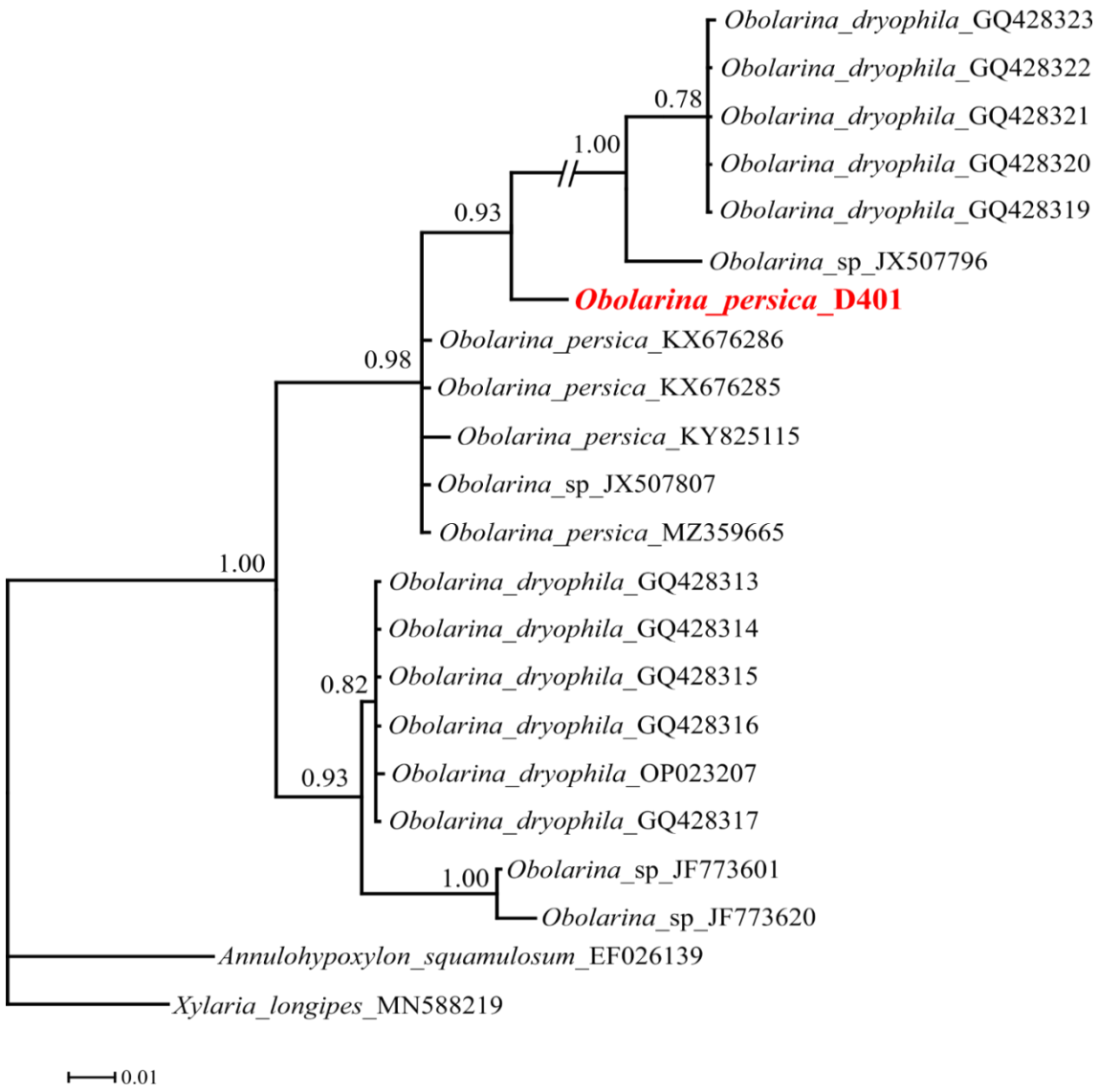
شکل ۳. ***Obolarina persica***، **a**- آسکوسپور ***Biscogniauxia mediterranea*** در کنار ***Obolarina persica*** **b**- رشد یک هفته‌ای قارچ روی محیط کشت **PDA c**- آسکوسپور **d**- آسکوسپور با شکاف تندش سیگموئید **e**- سطح استروما و دهانه فرورفته پریتسیوم (**Bar: 1mm**) **f**- نمای جانبی از پریتسیوم (**Bar: 1mm**).

Figure 3. *Obolarina persica*, a- Ascospore of *Biscogniauxia mediterranea* next to *Obolarina persica* b- Seven -days colony of the fungus on PDA c- Ascospore d- ascospore with sigmoid germ slit e- Stroma surface and sunken ostioles of perithecium (Bar: 1mm) f- Lateral view of perithecia (Bar: 1mm).



شکل ۴. درخت تبارزایی بیسین مبتنی بر همردیفی توالی ناحیه **ITS-rDNA** و به کمک نرم افزار **MrBayes** حاصل از مقایسه توالی نمونه ***Biscogniauxia mediterranea*** از ایران و توالی‌های موجود در **NCBI**. مقیاس ۰/۰۱ جایگزینی مورد انتظار نوکلئوتیدها را نشان می‌دهد و گونه‌های ***Xylaria longipes*** و ***Annulohypoxylon squamulosum*** بعنوان آرایه خارج گروه در نظر گرفته شد.

Figure 4. Bayesian phylogeny tree based on the sequence alignment of the ITS-rDNA region and constructed with MrBayes software resulting from comparing the sequence of *Biscogniauxia mediterranea* sample from Iran and the sequences deposited in NCBI. The scale of 0.01 shows the expected substitution of nucleotides and the tree is rooted using *Xylaria longipes* and *Annulohypoxylon squamulosum* species.



شکل ۵. درخت تبارزایی بیسین مبتنی بر همردیفی توالی ناحیه **ITS-rDNA** و ***tub2*** به کمک نرم افـزار **MrBayes** حاصـل از مقایسـه توالی نمونه ***Obolarina persica*** از ایران و توالی‌های موجود در **NCBI**. مقیاس ۰/۰۱ جایگزینی مـورد انتظـار نوکلئوتیـدها را نشـان می‌دهد و گونه‌های ***Xylaria longipes*** و ***Annulohypoxylon squamulosum*** بعنوان آرایه خارج گروه در نظر گرفته شد.

Figure 5. Bayesian phylogeny tree based on the sequence alignment of the ITS-rDNA region and *tub2* constructed with MrBayes software resulting from comparing the sequence of *Obolarina persica* sample from Iran and the sequences deposited in NCBI. The scale of 0.01 shows the expected substitution of nucleotides and the tree is rooted using *Xylaria longipes* and *Annulohypoxylon squamulosum* species.

بطوریکه، بیماری ذغالی بلوط در استان‌های لرستان و ایلام بالاترین فراوانی را داشت؛ اما در لرستان قارچ *B. mediterranea* بعنوان فراوان‌ترین قارچ همراه بیماری ذغالی و در استان ایلام قارچ *O. persica* با فراوانی بیشتر از *B. mediterranea* همراه این بیماری مشاهده شد. در استان‌های اراک، گلستان، کردستان و خوزستان تنها قارچ *B. mediterranea* از درختان نمونه برداری شده جدا شد. بر اساس مطالعات انجام شده، میزان رشد، تکثیر، تنوع و ترکیب جمعیت قارچ‌های درون‌زی بستگی زیادی به گونه میزبان و عوامل زنده و غیر زنده محیطی دارد (Li *et al*. 2012). در این مطالعه گونه بلوط بعنوان میزبان قارچ در استان‌های مختلف تفاوت چندانی نداشت؛ از اینرو تفاوت در شیوع قارچ‌های درون‌زی عامل همراه با بیماری ذغالی را باید مرتبط با تنش‌های غیرزیستی (بطور مثال وجود نرخ متفاوتی از تنش‌های محیطی) و زیستی (بطور مثال وجود عوامل مهارزیستی محدود کننده) متفاوت در مناطق مورد مطالعه دانست. بیماری ذغالی بلوط در اغلب مطالعات پیشین با عامل قارچی *B. mediterranea* شناخته شده است (Ghasemi-Esfahlan *et al*. 2016, Safaee *et al*. 2017a, Ghanbary *et al*. 2020). شواهد نشان دهنده گسترش بیماری در استان‌های ایلام، کرمانشاه و لرستان با عامل *O. persica* و حتی در بعضی از رویشگاه‌ها با نسبت بیشتر از *B. mediterranea*، ممکن است به جایگزین شدن *O. persica* به عنوان عامل اولیه بیماری پوسیدگی ذغالی نسبت به قارچ *B. mediterranea* اشاره داشته باشد. عوامل و شرایط مختلفی مانند تنش خشکی، تهاجم حشرات و عوامل غیرزیستی مختلف در تضعیف درختان بلوط و افزایش آلودگی آنها به قارچ‌های عامل شانکر نقش دارند و تحلیل میزان تاثیرگذاری هرکدام از این عوامل دشوار و دارای پیچیدگی‌هایی است. در بررسی لینالددو و همکاران (Linaldeddu *et al*. 2011) شیوع قارچ‌های بیمارگر در درختان تحت تنش آبی نشان داد، جمعیت قارچ‌های درون‌زی جداسازی شده از این درختان به طور معنی‌داری بیشتر از درختان دیگر (شاهد) است و عمده جمعیت قارچی را گونه *B. mediterranea* به خود اختصاص داده است. در سایر مطالعات نیز خشکیدن درختان بلوط به دنبال خشکسالی‌های شدید، بروز عوامل بیماری ذغالی و حشرات چوبخوار روی اکثر درختان تحت تنش گزارش شده است (Jozeyan *et al*. 2016). بررسی کاپرتی و باتیستی (Capretti & Battisti 2007) نشان داد که همبستگی معنی‌داری بین افزایش زوال و مرگ نهال‌های آلوده به قارچ *B. mediterranea* و پروانه ابریشم‌باف ناجور (*Lymantria dispar*) تحت تنش آبی وجود دارد. مطالعه روی بلوط چوب پنبه‌ای نشان دهنده افزایش میزان پراکندگی بیماری، وجود نشانه‌های غیر معمول و زوال در حال گسترش در درختان جوان‌تر است (Henriques *et al*. 2014) که علت آن مربوط به تطبیق قارچ با تغییر شرایط آب و هوایی، تنوع ژنتیکی، وجود ریسه‌های سازگار و سیستم هتروتالیسم دوقطبی با تیپ‌های آمیزشی مختلف می‌باشد و تمام این موارد باعث تشدید و تغییر همه‌گیری این بیماری در رویشگاه‌های بلوط شده است (La Porta *et al*. 2008, Vannini *et al*. 1999). چرخه جنسی عامل بیماری در منطقه زاگرس فعال می‌باشد، بنابراین امکان اینکه نوترکیبی جنسی منجر به تنوع ژنتیکی و ایجاد جمعیت‌هایی با درجه پرآزاری بالا شده باشد، وجود دارد (Mirabolfathy *et al*. 2011).

نتایج این مطالعه تکمیل کننده داده‌های محدود موجود در مورد شیوع این بیمارگرهای قارچی در استان‌های مختلف و وضعیت فعلی آلودگی بلوط در هر یک از مناطق مورد مطالعه به این قارچ‌ها می‌باشد. مسلماً اتخاذ ساز و کارهای کنترلی مناسب در برابر عوامل بیمارگر در گرو داشتن شناخت ماهیت بیمارگری است که با آن مواجه هستیم. در پژوهش حاضر، سعی بر آن شد تا یک ارزیابی جامع بر شیوع فعلی بیماری ذغالی بلوط و قارچ‌های همراه

با آن در مناطق مختلف جنگلی از چندین استان صورت گیرد تا بینش جدیدی برای مطالعه‌های پیش رو در زمینه کنترل بیماری، بویژه در مبحث کاربرد عوامل مهارزیستی برای مدیریت بیمارگرها حاصل شود.

منابع

References

Anselmi N., Mazzaglia A. & Vannini A. 2000. The role of endophytes in oak decline. In, A. Ragazzi and I. Dellavalle (Eds). Decline of oak species in Italy, Accademia Italiana de Scienze Forestali, Firenze. Italy, 131-144.

Ashrafi J., Hosseini A., Hosseinzadeh J. and Mirabolfathy M. 2018. Investigation on oak charcoal disease in dieback affected forests of Ilam province. Iranian Journal of Forest and Range Protection Research 16(1): 1-12, In Persian with English Summary.

Balbalian C. and Henn A. 2014. The Plant Doctor, *Biscogniauxia (Hypoxylon)* Dieback of Oaks. Mississippi State University Extension Service. Available at, https//extension.msstate.edu/publications/information-sheets/. the-plant-doctor-biscogniauxia hypoxylon-dieback-oaks.

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.

Campanile G., Ruscelli A. and Luisi N. 2007. Antagonistic activity of endophytic fungi towards *Diplodia corticola* was assessed in vitro and in planta tests. European Journal of Plant Pathology 117: 237-246.

Capretti P. and Battisti A. 2007. Water stress and insect defoliation promote the colonization of *Quercus cerris* by the fungus *Biscogniauxia mediterranea*. Forest Pathology 37: 129-135.

Collado J., Platas G., Pelaez F. 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: 875e886.

Desprez-Loustau M., Robin C., Reynaud G., Deque M., Badeau V., Piou D., Husson, C. and Marcais B. 2007. Simulating the effects of a climate-change scenario on the geographical range and activity of forest-pathogenic fungi. Canadian Journal of Plant Pathology 29 (2): 101-120.

Farashi A., Shariati M. and Hosseini M. 2017. Identifying biodiversity hotspots for threatened mammal species in Iran. Mammalian Biology 87: 71-88.

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.

Getachew G., Tesfaye A. and Kassahun T. 2014. Evaluation of disease incidence and severity and yield loss of finger millet varieties and mycelial growth inhibition of *Pyricularia grisea* isolates using biological antagonists and fungicides in vitro condition. Journal of Applied Biosciences 73: 5883-5901.

Ghanbary E., Kouchaksaraeia M. T., Zarafsharb M., Baderc K.M., Mirabolfathy M. and Ziaei M. 2020. Differential physiological and biochemical responses of *Quercus infectoria* and *Q. libani* to drought and charcoal disease. Physiologia Plantarum 168(4):876-892.

Ghasemi-Esfahlan S., Arzanlou M., and Babai-Ahari A. 2016. 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. Iranian Journal of Plant Pathology 52 (2): 217-230. In Persian with English Summary.

Glass N.L. and Donaldson G.C. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. Applied and Environmental Microbiology 61(4): 1323-30. doi: 10.1128/aem.61.4.1323-1330.1995.

Hansen E. and Delatour C. 1999. *Phytophthora* species in oak forests of north-east France. Annals of Forest Science 56: 539-547.

Henriques J., Nóbrega F., Sousa E. and Lima A. 2014. Diversity of *Biscogniauxia mediterranea* within single stromata on cork oak. Journal of Mycology volume 2014: 1-5.

Jazireii M. H. and Ebrahimi M. 2003. Zagros Forest Ecology. The University of Tehran Press, 558pp.

Jozeyan A., Vafaei Shoshtari R. and Askari H. 2016. Investigation of oak woodpecker beetles and their natural enemies in the forests of Ilam province. Iranian Journal of Forest and Range Protection Research 14: 107-121.

Ju Y. M. and Rogers J. D. 1996. A revision of the genus *Hypoxylon*. APS Press, St. Paul, MN, USA. 365p.

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.

Kazemzadeh-Chakusary M., Mohammadi H. and Sohrabi M. 2020. Occurrence and pathogenicity of *Jattaea algeriensis* (Calosphaeriales, Calosphaeriaceae) and *Biscogniauxia mediterranea* on forest trees in Guilan Province (Iran). Journal of Phytopathology 2020: 1–10.

La Porta N., Capretti P., Thomsen I. M., Kasanen R., Hietala A. M. and Von Weissenberg K. 2008. Forest pathogens with higher damage potential due to climate change in Europe. Canadian Journal of Plant Pathology 30 (2): 177-195.

Li H.Y., Wei D.Q., Shen M. and Zhou J.P. 2012. Endophytes and their role in phytoremediation. Fungal Diversity 54:11–18.

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(3): 193-201.

Lovett G.M., Weiss M., Liebhold A.M., Holmes T.P., Leung B., Lambert K.F., Orwig D.A. 2016. Nonnative forest insects and pathogens in the United States, Impacts and policy options. Ecological Applications 26: 1437-1455.

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.

Mirabolfathy 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, North of Iran. Plant Disease Journal 95(7): 876-876.

Mirabolfathy M., Ju Y.M., Hsieh H.M., Rogers J.D. 2013. *Obolarina persica* sp. nov., associated with dying *Quercus* in Iran. Mycoscience 54: 315-320.

Ronquist F. and Huelsenbeck J.P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics 19: 1572–1574.

Safaee D., Khodaparast S. A., Mirabolfathy M., Sheikholeslami M. 2017a. Some aspects of biology and host range of *Biscogniauxia mediterranea*, one of the causal agent of oak charcoal disease. Mycologia Iranica 4 (2): 121–129.

Safaee D., Khodaparast S.A., Mirabolfathy M., Mousanejad S. 2017b. A multiplex PCR-based technique for identification of *Biscogniauxia mediterranea* and *Obolarina persica* causing charcoal disease of oak trees in Zagros forests. Forest Pathology 47: e12330.

Safaee D., Khodaparast S.A., Mirabolfathy M. and Mousanejad S. 2016. Relationship between dieback of Persian oak (*Quercus brantii*) and apparent and latent infection of *Biscogniauxia mediterranea* in Zagros forests. Iranian Journal of Plant Pathology 52 (4): 535-549. In Persian with English Summary.

Safaei N., Alizadeh A. Saidi, A. Rahimian, H. and Adam G. 2005. Molecular diagnosis and investigation of the genetic diversity of the Iranian population of *Fusarium graminearum*, the cause of wheat spike blight. Iranian Journal of Plant Pathology 41: 171-189. In Persian with English Summary.

Santini A., Ghelardini L., De Pace C., Desprez Loustau M.L., Capretti P., Chandelier A., Cech T. 2013. Biogeographical patterns and determinants of invasion by forest pathogens in Europe. New Phytologist 197: 238–250.

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 5 (5): 624-632.

Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A. and Kumar S. 2013. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution 30(12): 2725–2729.

Vannini A., Lucero G., Anselmi N. and Vettraino A.M. 2009. Response of endophytic *Biscogniauxia mediterranea* to variation in leaf water potential of *Quercus cerris*. Forest Pathology 39 (1): 8-14.

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 (3): 209-218.

Yangui I., Zouaoui Boutiti M., Ben Jamaâ M. L., Vettraino A. M., Vannini A., and Messaoud C. 2020. *Trichoderma* biocontrol of *Biscogniauxia mediterranea*: Variation in responses among genetically diverse isolates. Integrated Protection in Oak Forests IOBC/WPRS Bulletin 152: 154-157.

Zamani M., Mirabolfathy M. and Alizadeh Aliabadi A. 2023. Epidemic of emerging diseases in forest ecosystems: Requirements and challenges to deal with them. *Iran Nature 8*(4): 39-47. doi: 10.22092/irn.2023.129989.