مقاله پژوهشی

نشریه علمی تحقیقات حمایت و حفاظت جنگلها و مراتع ایران
جلد ۲۱ شماره ۱، صفحه ۱۳۴-۱۲۳ (۱۴۰۲)

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijfrpr.2023.354946.1497
شناسه دیجیتال (DOR): 20.1001.1.17350859.1402.21.1.7.8

بررسی و شناسایی قارچ‌های همراه عارضه زوال درختان اُرس

حسین جعفری[1*]، شمس‌الله نجفی[2]، ندا زند[2] و طه مجیدی[2]

۱*- نویسنده مسئول، استاد پژوهش، مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران،
پست‌الکترونیکی: hjafaryir@gmail.com

۲- محقق، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان زنجان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، زنجان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۹/۰۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۳/۲۸

چکیده

به‌منظور شناسایی عوامل قارچی همراه با درختان اُرس در ارتفاعات شهرستان طارم، نمونه‌هایی از بافت‌های مختلف درختان بیمار تهیه و با استفاده از روش‌های معمول نسبت به کشت و جداسازی آنها اقدام گردید. برای شناسایی گونه‌ها، از روش‌های بررسی ریخت‌شناسی و شناسایی مولکولی استفاده شد. برای این منظور، ضمن استخراج DNA کل از تعداد ۱۱ گونه از قارچ‌های جداسازی شده، ناحیه فاصله‌انداز داخلی DNA رایبوزومی آنها با استفاده از پرایمرهای عمومی (ITS-1 و ITS-4) تکثیر و بعد با توالی‌یابی آنها و مقایسه با توالی‌های موجود در بانک‌های اطلاعاتی شناسایی گونه‌ها انجام شد. درمجموع بیش از ۱۵۰ جدایه قارچی در مدت سه سال از نمونه‌های آلوده درختان اُرس جداسازی شد که بر اساس ویژگی‌های ظاهری و توالی‌یابی ناحیه ITS جدایه‌های قارچی، تعلق آنها به گونه‌های زیر تأیید گردید: *Nigrospora oryzae* (۳۱ جدایه)، *Penicillium* spp. (۹ جدایه)، *Aspergillus* spp. (۴ جدایه)، *Trichoderma* spp. (۵ جدایه)، *Aureobasidium pullulans* (۳۳ جدایه)، *Polyporus* sp. (۳ جدایه)، *Phoma* sp. (۱۴ جدایه)، *Phoma medicaginesis* (۳ جدایه)، *Alternaria alternata* (۵ جدایه)، *Alternaria* sp. (۹ جدایه)، *Alternaria consortialis* (۶ جدایه)، *Hormonema carpetanum* (۵ جدایه)، *Hormonema* sp. (۹ جدایه)، *Peyronellaea pinodella* (۴ جدایه)، *Kabatiella microsticta* (۳ جدایه) و *Microsphaeropsis* spp. (۸ جدایه). بیشتر گونه‌ها ساپروفیت یا عوامل بیماری‌زای فرصت‌طلب هستند که اولین بار در ایران از روی اُرس گزارش می‌شوند. این عوامل همزمان با ضعف میزبان در اثر ابتلا به گیاه انگل داروشک، تنش خشکی و آفات با حمله به آنها باعث تسریع زوال میزبان می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: زوال اُرس، بیماری‌های قارچی، آفات، شناسایی با استفاده از توالی ITS

مقدمه

درخت اُرس بعد از بنه بیشترین سطح پراکنش را در بین گونه‌های درختی ایران به خود اختصاص داده و به‌صورت خودرو و جنگلی در فلات کوهستانی ایران استقرار یافته است. با وجود خصوصیات منحصربه‌فرد این درخت، ازجمله سازگاری مطلوب با انواع مختلف آب‌وهوای سرد و مرطوب تا سرد و نیمه‌خشک، داشتن چوب محکم و دارا بودن خواص ضدسرطانی میوه آن، به‌دلیل مشکلات تکثیر، تولید

تجاری آن چندان مورد توجه قرار نگرفته است (Khoshnevis *et al*., 2008). بی‌شک حفظ عرصه‌های طبیعی درختان جنگلی اُرس به‌عنوان یکی از ذخایر حیاتی اکوسیستم‌های طبیعی، ضامن پایداری آن و تأمین آب‌وهوای پاک و کشاورزی پایدار خواهد بود. حفظ خاک و کمک به نفوذ نزولات آسمانی در زمین یکی از مهمترین دلایل حفظ این گونه‌ها می‌باشد. خشک شدن تدریجی درختان اُرس در اثر آفات و عوامل بیماری‌زای مختلف باعث کاهش سطح این درخت مهم جنگلی شده و مشکلات عدیده‌ای را به‌دنبال خواهد داشت. بنابراین، شناسایی عوامل زیستی محدودکننده توسعه جنگل‌های اُرس می‌تواند گام مهمی در جهت بقای نسل و حفظ و حراست از این منابع باارزش طبیعی باشد. جنگل اُرس در استان زنجان در شهرستان‌های طارم، زنجان، ماهنشان و سلطانیه وجود دارد. حدود ۵۱ درصد جنگل‌های اُرس استان تنک هستند، باوجوداین بیشترین پوشش جنگل استان زنجان را در میان همه تیپ‌های جنگلی تشکیل می‌دهد. گونه اُرس موجود در استان زنجان، گونه *Juniperus excelsa M. Bieb* از خانواده Cupressaceae است و از معدود گونه‌های سوزنی‌برگ بومی ایران است. به‌طورکُلی، جنگل‌های اُرس ایران در گروه جنگل‌های حفاظت‌شده قرار دارند و بهره‌برداری از آنها تحت هر شرایطی ممنوع است (Majidi *et al*., 2014).

در حال حاضر اطلاعات بسیار اندکی در مورد عوامل بیماری‌زای درختان اُرس در ایران وجود دارد. تعداد عوامل بیماری‌زایی که تاکنون از گونه‌های مختلف اُرس گزارش شده است به نسبت سایر گیاهان بسیار محدود است و تعدادی از آنها نیز اهمیت اقتصادی و دامنه پراکنش گسترده‌ای ندارند. بررسی منابع مختلف نشان می‌دهد، بیشتر عوامل بیماری‌زای گیاهی گزارش‌شده از درخت اُرس تنها در دو گروه قارچ‌ها و نماتدها قرار دارند و تاکنون هیچ‌گونه عامل بیماری‌زای ویروسی، باکتریایی و مایکوپلاسمایی از این درختان گزارش نشده است. از گروه نماتدها، نماتد مولد زخم (*Pratylenchus vulnus*) در نهالستان‌ها و پارک‌های تازه تأسیس گزارش شده است (Anonymous, 2012a). قارچ عامل سوختگی جوانه اُرس با نام *Diplodia juniperi* فقط از چین گزارش شده است (Chen, 2009). مهمترین بیماری شناخته‌شده اُرس در ایران و جهان، بیماری زنگ دو میزبانه سیب- سرو (Cedar-Apple Rust) می‌باشد که در سیب اهمیت بیشتری دارد و در مناطق مرطوب شمال کشور گزارش شده است؛ عامل بیماری قارچ *Gymnosporangium juniper-virginianae* می‌باشد. بعد از زنگ مهمترین عوامل بیماری‌زای درختان اُرس، عوامل سوختگی (بلایت) اُرس هستند که در منابع مختلف سه قارچ با علائمی شبیه به هم معرفی شده است. هر چند برخی از این منابع قدیمی هستند ولی در تحقیقات اخیر نیز قارچ جدیدی به این لیست اضافه نشده است. با توجه به اینکه آمریکا، یکی از مهمترین مناطق رویشی اُرس در جهان است، بیشترین تحقیقات هم در این کشور انجام شده است. Coziahr و Wysong (۱۹۸۷) ضمن مطالعه عوامل مختلف بیماری‌زای برگ در سایر گونه‌های سرو و اُرس، ازجمله سرو قرمز غربی (*Juniperus virginiana*)، گونه اسکوپولاروم (*J. scopulorum*) و سایر گونه‌های سرو معمولی در ایالت نبراسکای (Nebraska) آمریکا نشان دادند که سه عامل بیماری‌زای مهم به اندام‌های هوایی سرو در منطقه مورد مطالعه خسارت می‌زند. آنان گونه *Lophodermium juniperinum* را به‌عنوان یک قارچ پارازیت ضعیف، که در مواردی روی بافت‌های مرده سروها فعالیت می‌کند، به‌عنوان عامل ثانویه در گسترش بیماری معرفی کردند (Anonymous, 2012b). Peterson (۱۹۷۷) که تحقیقات متعددی روی بیماری‌های سرو اُرس انجام داده است، معتقد است که قارچ *Cercospora sequoia* var. *juniperi* عامل اصلی سوختگی سرکوسپورایی درختان اُرس است و گونه *C. juniperova* از اهمیت کمتری برخوردار است. از سوی دیگر، در گزارش سال ۲۰۱۱ مؤسسه حفاظت سلامت جنگلهای آمریکا (USDA) که معتبرترین مؤسسه تحقیقاتی درختان جنگلی جهان است، عامل بیماری بلایت سرکوسپورایی سروها با نام علمی *Pseudo-cercospora juniper* (*Cercospora sequoia var. juniperi*) معرفی شده است (Anonymous, 2012b). از بیماری‌های طوقه و ریشه درختان اُرس نیز تاکنون دو گونه قارچ فیتوفتورا گزارش شده

است که گونه *Phytophthora cinnamomi* گسترده‌تر از گونه *P. parasitica* می‌باشد. این عوامل بیماری‌زا از پارک‌های جنگلی تازه تأسیس و نهالستان‌ها گزارش شده است و در حال حاضر تحقیقات برای یافتن ارقام مقاوم به این بیماری در حال انجام است (Anonymous, 2012a). بنا به گزارش منتشرشده توسط سامانه ترویج مشارکتی آلاباما وابسته به دانشگاه آلاباما و اوبرن (Hagan *et al*., 2004)، قارچ *Kabatina juniper* در عرصه‌های جنگلی باعث از بین رفتن درختان اُرس می‌شود. علائم آلودگی به این قارچ در اوایل بهار دیده می‌شود. از علائم آن تغییر رنگ شاخه‌های سال قبل به طول ۵ تا ۱۵سانتی‌متر است. در این گزارش همچنین از قارچ *Botryosphaeria stevensii* نام‌برده شده که زرد یا قهوه‌ای شدن ناگهانی یک یا چند شاخه از نشانه‌های آن است. در اثر این بیماری شانکرهای کشیده و تا حدی فرورفته در قاعده شاخه‌های آلوده ایجاد می‌شود. سطح شانکر شکاف برداشته و از قسمت‌های اطراف خود پررنگ‌تر است. واریته‌های Tamariscifolia و Broadmoor از گونه *Juniperus sabina* در مقابل قارچ *Phomopsis juniperovora* به‌ترتیب بسیار حساس و حساس به قارچ گزارش شده‌اند. در مقابل، گونه *Juniperus communis* نسبت به این قارچ و بیماری مربوط مقاوم معرفی شده است (Hagan *et al*., 2004). از دیگر قارچ‌های رایج گزارش‌شده از روی گونه *Juniperus excelsa*، قارچ *Antrodia juniperina* است که دامنه پراکنش آن روی این گونه قابل توجه است (Gilbertson & Ryvarden, 1987). علاوه بر قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی، درختان اُرس میزبان سایر عوامل بیماری‌زا ازجمله گیاهان انگل و نیمه‌انگل نیز هستند که در این میان گونه‌های مختلف داروشک دارای اهمیت بسیار زیادی است. داروشک (ارس واش) نوعی گیاه نیمه‌انگل از گروه داروش‌های کوتاه Dwarf mistletoes از خانواده Viscaceae و با نام علمی *Arceuthobium oxycedri* می‌باشد. این گیاه نیمه‌انگل خاص مخروطیان است که حیات آنها را با تهدید جدی روبه‌رو می‌کند. این پارازیت میزان بذردهی، میزان رشد و کیفیت چوب را کاهش داده و توان درختان بیمار را برای تحمل سایر تنش‌های زیستی و غیرزیستی (کم‌آبی، آفات و شانکر قارچی) کاهش می‌دهد (Hawksworth & Wiens, 1996; Hawksworth *et al*., 2002).

در سال‌های اخیر گزارش‌های متعددی در مورد خشک‌شدن و زوال تدریجی عرصه جنگل‌های طبیعی اُرس منتشر شده است که در آنها به روند سریع تخریب این رویشگاه‌ها در مناطق مختلف کشور و به‌طور خاص در استان زنجان و شهرستان طارم تأکید شده است. هرچند نتایج بررسی‌های اولیه از نقش مستقیم گیاه انگل داروشک و تغییر اقلیم (کاهش نزولات آسمانی و گرمایش جهانی) در این زوال حکایت دارد، اما مشاهده علائم متعدد سوختگی (بلایت) سرشاخه‌های انتهایی درختان ارس مشکوک به بیماری‌های قارچی در درختانی که دچار زوال تدریجی شده بودند سبب شد تا در این پروژه تحقیقاتی سه ساله، ضمن بررسی نقش عوامل مختلف در زوال درختان اُرس ارتفاعات شهرستان طارم، عوامل قارچی خسارت‌زای مرتبط با زوال درختان اُرس هم مطالعه شود و نقش احتمالی عوامل مختلف قارچی در توسعه زوال این درختان مشخص گردد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری، جداسازی و خالص‌سازی عوامل قارچی

برای انجام این تحقیق، ابتدا محدوده پراکنش درختان اُرس در شهرستان طارم از طریق اداره کل منابع طبیعی استان برآورد و رویشگاه‌های عمده آن مشخص گردید. براساس اطلاعات حاصل از بازدیدها و گزارش‌های کارشناسان منابع طبیعی، پهنه‌هایی از رویشگاه‌های اُرس با میزان خشکیدگی و زوال بیشتر در ارتفاعات تقریبی ۲۰۰۰ متری در کوهستان‌های شمالی شهرستان طارم انتخاب شد. در طول سه سال اجرای طرح در سه مقطع در طول بهار، تابستان و پاییز از مناطق آلوده بازدید به عمل آمد و درمجموع ۴۶ نمونه مختلف از تنه، شاخه و سرشاخه با علائم مختلف مشکوک به بیماری‌های قارچی تهیه و برای کشت و جداسازی عوامل بیماری‌زای قارچی احتمالی به آزمایشگاه منتقل شد. در این بازدیدها وضعیت درختان در

حال خشک‌شدن و درصد زوال آنها یادداشت‌برداری شد. برای بررسی وضعیت زوال درختان، تعداد ۱۰۰ اصله درخت بررسی گردید و براساس مشاهدات میدانی و بر حسب علائم ظاهری و درصد سرخشکیدگی و مرگ سرشاخه‌ها، درختان آلوده به سه گروه تقسیم شدند.

الف- درختانی که بیش از ۵۰ درصد زوال و خشکیدگی داشتند و شاخه‌ها و سرشاخه‌های بخش‌های انتهایی و تاج این درختان آلوده کاملاً خالی از برگ بودند؛

ب- درختانی که بین ۲۰ تا ۵۰ درصد خشکی داشته و ریزش برگ‌ها و خشکی سرشاخه‌های کمتری نسبت به گروه اول داشتند؛

ج- درختانی که کمتر از ۲۰ درصد زوال داشتند و علائم سرخشکیدگی منحصر به سرشاخه‌های انتهایی در بخش‌های میانی و پایینی تاج درختان بود.

برای مطالعه عوامل قارچی مرتبط با زوال درختان ارس از برگ، شاخه، ساقه و ریشه دارای هر گونه علائم مشکوک به بیماری و از آفات (حشرات زیان‌آور) قابل مشاهده در درختان اُرس دارای علائم خشکیدگی نمونه‌برداری شد. نمونه‌های تهیه‌شده به آزمایشگاه منتقل شد. پس از انتقال نمونه‌های آلوده به آزمایشگاه، نسبت به کشت و جداسازی عوامل بیماری‌زای احتمالی اقدام شد و بعد با استفاده از روش‌های مرسوم، نسبت به خالص‌سازی و نگهداری نمونه‌های جداشده در محیط‌های کشت و نگهداری قارچ‌ها اقدام گردید.

شناسایی ظاهری نمونه‌های قارچی و استخراج DNA کل

برای شناسایی مرفولوژیک عوامل قارچی جداسازی‌شده، از کلیدهای معتبر موجود و از مشخصات ظاهری آنها مانند رنگ پرگنه قارچ در روی محیط کشت، شکل و نحوه اسپورزایی، اندام‌های تولیدمثل جنسی و غیرجنسی و سایر مشخصات ظاهری استفاده شد. برای شناسایی مولکولی عوامل قارچی جدایه‌های مربوط به جدایه‌های قارچی به‌دست‌آمده که فراوانی بیشتری داشتند، یا شناسایی آنها تنها براساس مشخصات مرفولوژیکی مقدور نبود از توالی نوکلئوتیدی ناحیه ITS-rDNA استفاده شد. برای این منظور، DNA این قارچ‌ها استخراج شد و طی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، قطعات تکثیرشده ژنوم قارچ‌ها برای توالی‌یابی به شرکت تکاپوزیست ارسال شده و داده‌های خام توالی با استفاده از نرم‌افزار FinchTV ویرایش شد. برای این کار، ابتدا جدایه‌های قارچی در پتری‌های حاوی محیط کشت PDA کشت شده و در تاریکی و دمای ۲۴ درجه سلسیوس به مدت هفت روز نگهداری شدند. سپس استخراج DNA با روش CTAB (Novaes *et al*., 2009) با اندکی تغییرات انجام شد.

تعیین کمیت و کیفیت DNA

کیفیت DNA استخراج‌شده با استفاده از سیستم الکتروفورز افقی روی ژل آگارز و کمیت آن با استفاده از دستگاه نانودراپ و تعیین نسبت جذب در ناحیه طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر تعیین گردید. همچنین، جذب در طول موج ۲۳۰ نانومتر به‌عنوان نتیجه آلودگی‌های دیگر نیز بررسی و نسبت A260/A230 محاسبه گردید. نسبت A260/A280 که برآوردی از نسبت اسید های نوکلئیک به پروتئین‌ها در نمونه است باید بین ۱/۸-۲ باشد. نسبت A260/A23نیز نسبت آلودگی‌های فنلی و الکلی را نشان می‌دهد که مقدار مناسب برای آن حدود ۲ تا ۲/۲ می‌باشد (William *et al*., 1997).

تکثیر ناحیه ITS و تعیین توالی نوکلئوتیدی قطعات تکثیرشده

برای شناسایی دقیق‌تر گونه قارچ‌های جداسازی‌شده، تکثیر ITS-rDNA با استفاده از آغازگرهای ITS1 (5- TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3) و ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3) انجام شد (Schneider *et al*., 1997). هر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR: Polymerase chain reaction) در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر از مخلوط آماده (Master Mix) شرکت تکاپوزیست، ۲ میکرولیتر از هر آغازگر ITS1 و ITS4 با غلظت ۱۰ پیکومول و ۴ میکرولیتر از DNA

قارچ است. برای اطمینان از درستی انجام واکنش، فراورده‌های واکنش PCR بر روی ژل آگارز (یک درصد) بارگذاری شدند. عمل الکتروفورز با شدت ولتاژ ۸۰V در مدت زمان یک ساعت انجام شد. قطعه تکثیرشده به طول تقریبی ۶۰۰ bp برای تعیین توالی به شرکت تکاپوزیست ارسال گردید. توالی‌های نوکلئوتیدی با استفاده از نرم‌افزار FinchTV بررسی و ویرایش شد و بعد با توالی‌های موجود در بانک ژن NCBI (National Center for Biotechnology Information) با استفاده از BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) مقایسه شدند.

نتایج

نتایج بررسی علائم ظاهری زوال درختان اُرس

تمامی درختانی که در گروه الف قرار داشتند و درصد خشکیدگی تاج و سرشاخه‌های آنها بیش از ۵۰ درصد بود به گیاه انگل داروآشک آلوده بودند (شکل ۱). از مجموع درختان بررسی‌شده در این طرح، در حدود ۵۹ درصد (۵۹ اصله درخت از ۱۰۰ اصله درخت بررسی‌شده) به‌طور گسترده به گیاه انگل داروآشک آلوده شده بودند (شکل ۲). حدود ۳۸ درصد از درختان اُرس دارای علائم سرخشکیدگی متوسط و زوال زیر ۵۰ درصد بوده و در گروه ب قرار گرفتند. در این گروه از درختان، آلودگی موضعی به انگل داروآشک مشاهده شد و آلودگی نسبتاً زیاد به آفات مختلف نیز مشاهده گردید. فعالیت همزمان آفات و تعدادی از عوامل بیماری‌زا در این گروه بروز بیشتری داشت. سه درصد (سه اصله درخت ارس) از درختان اُرس با کمتر از ۲۰ درصد علائم سرخشکیدگی، آلودگی به تعدادی از آفات و لکه برگی‌های قارچی (شکل ۳) داشتند. در این درختان سرخشکیدگی عمدتاً در سرشاخه‌های پایینی و حد میانی بود و عموماً سرشاخه‌های انتهایی این شاخه‌ها خشک شده بودند و تاج درختان عمدتاً سالم و بدون علائم سرخشکیدگی بود.

شکل ۱- جنگل اُرس و درختان در حال زوال در ارتفاعات شهرستان طارم استان زنجان

Figur 1- Decline of juniper trees in Tarom region, Zanjan province.

گونه‌های قارچی جداسازی‌شده

بیش از ۱۵۰ جدایه قارچی مختلف در چندین مرحله نمونه‌برداری و جداسازی گردید. طبقه‌بندی و شناسایی جدایه‌ها که براساس مشخصه‌های ظاهری، اندام‌های باردهی و نحوه اسپورزایی و نیز استفاده از روش‌های مولکولی انجام شد، تعلق این جدایه‌ها را به ۱۷ گونه قارچی مشخص کرد. از مجموع ۱۷ گونه جداسازی‌شده قارچی، تعداد ۱۱ گونه از طریق بررسی همزمان مشخصات ریخت‌شناسی و تکثیر ناحیه ITS شد و تعداد ۶ گونه متعلق به جنس‌های آسپرژیلوس، پنی‌سیلیوم و تریکودرما تنها از طریق بررسی مشخصات ریخت‌شناسی شناسایی شدند (جدول ۱ و شکل ۴).

جدول ۱- گونه‌های قارچی جداسازی‌شده از روی درختان اُرس در منطقه طارم

Table 1- Funji species isolated from juniper trees in Tarom region

Row	Fungi	N. Isolate	Plant organ	Morphology	Molecular confirmation
1	*Aureobasidium pullulans*	33	head branch	❊	❊
2	*Nigrospora oryzae*	31	Sub branch to main	❊	❊
3	*Phoma* sp.	14	small branch	❊	❊
4	*Hormonema* sp.	9	head branch	❊	❊
5	*Alternaria* sp.	9	head branch, leaf	❊	–
6	*Penicillium* spp.	9	Different organs	❊	–
7	*Microsphaeropsis* spp.	8	Sub branch to main	❊	❊
8	*Alternaria consortialis*	6	head branch, leaf	❊	❊
9	*Trichoderma* spp.	5	Tree trunk and crown	❊	–
10	*Alternaria alternata*	5	head branch, small branch	❊	❊
11	*Hormonema carpetanum*	5	Sub branch to main	❊	❊
12	*Aspergillus spp.*	4	Different organ	❊	–
13	*Peyronellaea pinodella*	4	small branch	❊	❊
14	*Phoma medicaginesis*	3	Sub branch to main	❊	❊

شکل ۲- گیاه نیمه‌انگلی داروشک (*Arceuthobium oxycedri*)

Figure 2- Semi-parasite plant species, *Arceuthobium oxycedri*

شکل ۳- علائم لکه‌برگی روی شاخ و برگ درختان اُرس در اثر عوامل قارچی

Figure 3- Symptoms of Fungal infection on Leaves and branches of juniper trees.

Phoma sp.

Pleurotus sp.

Alternaria consortialis

Hormonema carpetanum

Hormonema sp.

Peyronellaea pinodella

Microsphaeropsis spp.

Hormonema sp.

Aureobasidium pullulans

Kabatiella microsticta

Aureobasidium pullulans

Aureobasidium pullulans

شکل ۴– پرگنه‌شماری از جدایه‌های قارچی بر روی محیط کشت PDA

Figure 4- Colonies of some plant pathogenic fungi on PDA

بحث

مرگ درختان یکی از پدیده‌های طبیعی در تمام مناطق جنگلی دنیا محسوب می‌شود. این پدیده تحت تأثیر عوامل مختلف است و بیشتر به‌صورت خیلی آهسته بروز می‌یابد و در کوتاه‌مدت خسارت‌های محسوس و معنی‌داری در سطح بوم‌شناختی و اقتصادی ایجاد نمی‌کند (Jimenez *et al*., 1987). مرگ درختان در سطح انبوه بیشتر در اثر عوامل طبیعی مانند زلزله، رانش زمین، طوفان و عوامل دیگر ایجاد می‌شود. بااین‌حال، مشاهدات سال‌های اخیر نشان می‌دهد، مرگ انبوه درختان جنگلی بیشتر در مناطقی اتفاق می‌افتد که ارتباطی با عوامل قهری و طبیعی مذکور ندارد (McDowell *et al*., 2018). عوامل تنش غیرزنده مانند رطوبت، یا خشکی، یا دماهای بسیار بالا و پایین به همراه عوامل تنش زنده مانند آفات و عوامل بیماری‌زا از دلایل اصلی مرگ درختان جنگلی در سطح وسیع محسوب می‌شوند (McDowell *et al*., 2018). از سال‌ها پیش همراهی و مشارکت عوامل زنده و غیرزنده در مرگ‌ومیر وسیع درختان جنگلی شناسایی و گزارش شده است (Franklin *et al*., 1987). بنابراین می‌توان انتظار داشت که مجموعه‌ای از عوامل تنش زنده و غیرزنده در همکاری با هم باعث افزایش گزارش‌هایی از تعداد مرگ درختان جنگلی در سطح انبوه شده باشد (Stephenson *et al*., 2019).

هر چند عوامل بیماری‌زا و آفات از دیرباز به‌عنوان عوامل مشکل‌ساز در جنگل‌ها شناخته شده‌اند، ولی شواهد مختلف نشان می‌دهد در حال حاضر شدت و توالی بروز شرایط آب‌وهوایی نامتعارف (گرما و خشکی شدید) باعث هم‌افزایی بیشتر تنش‌های زنده و غیرزنده شده و منجر به تشدید زوال درختان جنگلی در نقاط مختلف دنیا شده است. به تازگی، گزارش‌هایی از زوال درختان جنگلی در اثر خشکی و گرمای شدید ارائه شده است که در تعدادی از آنها نقش تنش‌های زنده مانند آفات، عوامل بیماری‌زا و گیاهان

انگل در همراهی با تنش‌های غیرزنده به اثبات رسیده است (Teshome *et al*., 2020). به نظر می‌رسد در آینده نیز با تشدید تغییرات اقلیمی اثرهای این همراهی در مرگ درختان جنگلی در سطح وسیع‌تری نمایان شود (Roy *et al*., 2014).

نتایج بررسی‌های انجام‌شده در این تحقیق نشان داد، گونه‌های متعدد قارچی ممکن است روی اندام‌های مختلف درختان اُرس فعالیت نمایند. در این تحقیق تعدادی از این گونه‌ها برای اولین بار در کشور از روی این میزبان جداسازی و معرفی شد. براساس منابع علمی و گزارش‌های موجود، قارچ‌های جداسازی‌شده بیشتر ساپروفیت یا قارچ‌های بیماری‌زای فرصت‌طلب (Facultative parasite) هستند که بیشتر روی میزبان‌های ضعیف که در معرض تنش‌های مختلف زیستی و غیرزیستی قرار دارند، به‌عنوان قارچ‌های بیماری‌زا ظاهر می‌شوند (Gildemacher *et al*., 2004; Deshpande *et al*., 1992). قارچ *Microsphaeropsis* spp. پیشتر به‌عنوان یکی از قارچ‌های مرتبط در سرخشکیدگی درختان کاج از کرمانشاه گزارش شده است. فراوانی دو گونه گزارش‌شده از این جنس مجموعاً ۱۶ درصد جدایه‌های به‌دست‌آمده در این مطالعه بوده است (Karami *et al*., 2018).

با توجه به اینکه درختان اُرس منطقه مورد بررسی، به‌دلیل آلودگی به گیاه نیمه‌انگلی داروآشک (*Arceuthobium oxycedri*) و آفات مختلف تحت تنش قرار دارند، به نظر می‌رسد که قارچ‌های جداسازی‌شده در این طرح، بیشتر در تکمیل فرایند زوال و خشکی درختان آلوده نقش داشته و بر روی درختان سالم به‌صورت اپی‌فیت و غیربیماری‌زا حضور دارند.

آلودگی درختان اُرس به گیاه نیمه‌انگلی داروآشک (*Arceuthobium oxycedri*) و همزمان بروز خشکی و افزایش دما در ارتفاعات منطقه طارم باعث تشدید و توسعه عارضه زوال این درختان شده است. شدت بالای بیماری زوال در عرصه‌های جنوبی جنگل‌های اُرس (که بیشتر در معرض تنش خشکی هستند) در مقایسه با عرصه‌های شمالی نشان می‌دهد، ارتباط مستقیمی بین عوامل تنش زنده مانند قارچ‌های عامل بیماری‌زا و تنش خشکی و دمای بالا وجود دارد.

تغییرات اقلیمی ازجمله بالا رفتن دما در ارتفاعات جنگلی و نیز کاهش بارش‌های جوی ممکن است یکی از زمینه‌های بروز این مشکل باشد. در کنار اثرهای مستقیم مؤلفه‌های مربوط به اقلیم، ممکن است تغییرات اقلیمی تأثیر غیرمستقیمی روی جمعیت آفات و سایر دشمنان طبیعی این درختان دیرپا داشته باشد، به‌نحوی‌که باعث توسعه بعضی از عوامل خسارت‌زایی گردد که در گذشته آفات مهمی محسوب نمی‌شدند. بنابراین به نظر می‌رسد مجموعه تنش‌های زیستی و غیرزیستی در کنار یکدیگر در حال مشارکت برای حذف یکی از مقاوم‌ترین گونه‌های درختان جنگلی ایران هستند و لازم است تدابیر ویژه‌ای برای جلوگیری از این بحران اندیشیده شود.

منابع مورد استفاده

-Anonymous, 2012a. available from http://harvest.cals.ncsu.edu
-Anonymous, 2012b. available from www.USDA.com
-Coziahr, L.V. and Wysong, D.S., 1987. Juniper Blight Diseases. University of Nebraska-Lincoln Extension. 1264. Available from http://digitalcommons.unl.edu/extensionhist/1264
-Chen, L., 2009. Shoot blight of *Juniperus rigida*. Forest Pest and Diseases Congress. Viale delle Termme di Caracella, Rome, Italy, p 121.
-Deshpande, M.S., Rale, V.B. and Lynch, J.M., 1992. Aureobasidium pullulans in applied microbiology: A status report. Enzyme and Microbial Technology, 14: 514-527.
-Franklin, J.F., Shugart, H.H. and Harmon, M.E., 1987. Tree death as an ecological process. Bioscience 37: 550-556.
-Gilbertson RL, Ryvarden L .1987. North American Polypores. In: Fungiflora, Oslo, Norway 2:437-885.
-Gildemacher, P.R., Heijne, B., Houbraken, J., Vromans T., Hoekstra E.S. and Boekhout, T., 2004. Canphyllosphere yeasts explain the effect of scab fungicides on russeting of Elstar apples?. European Journal of Plant Pathology, 110: 929-937.
-Hagan, A., Allen, T. and Shelton, J., 2004. Common diseases of juniper in Alabama, ANR 1173. University of Alabama A & M and Auburn

-Novaes, R.M.L., Rodrigues, J.G. and Lovato, M.B., 2009. An efficient protocol for tissue sampling and DNA isolation from the stem bark of Leguminosae trees. Genetics and Molecular Research, 8: 86-96.

-Peterson, G.W., 1977. Control of juniper blight caused by *Cercospora sequoia juniper*. American Nurseryman. 145(12): 13: 50-51.

-Roy, B.A., Alexander, H.M., Davidson, J., Campbell, F.T., Burdon, J.J. and Sniezko, R., 2014. Increasing forest loss worldwide from invasive pests requires new trade regulations. Front. Ecol. Manag. 12: 457-465.

-Schneider, J.H.M., Salazar, O., Rubio, V. and Keijer, J., 1997. Identification of Rhizoctonia solani associated with field grown tulips using ITS rDNA polymorphism and pectic zymograms. European Journal of Plant Pathology, 103:607-622.

-Stephenson, N.L., Das, A.J., Ampersee, N.J., Bulaon, B.M. and Yee, J.L., 2019. Which trees die during drought? The key role of insect host-tree selection. Journal of Ecol., 107: 2383-2401.

-Teshome, D.T, Zharare, G.E. and Naidoo, S., 2020. The Threat of the Combined Effect of Biotic and Abiotic Stress Factors in Forestry Under a Changing Climate. Front. Plant Science. 11:601009.

-William, W.W., Mackey P. and Chomczynski, P., 1997. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. Biotechniques, 22: 474-481.

Universities, USA, p 74.

-Hawksworth, F.G. and Wiens, D., 1996. Dwarf mistletoes: biology, pathology and systematics. Agriculture Handbook, 709. USDA Forest Service, Washington D.C. 410 p.

-Hawksworth, F.G., Wiens, D. and Gils, B.W., 2002. Arceuthobium in North America. USDA 13-Forest Service Gen. Tech. Rep. RMRS-GTR-98. Ch. 4: 29-56.

-Jimenez, J.A., Lugo, A.E. and Cintron, G., 1987. Tree mortality in mangrove forests. Biotropica 17: 177-185.

-Karami, N., Jamal, S. and Sharifi, R., 2018. Identification of fungal causal agents of pine trees die back in Kermanshah province. Iranian Journal of Plant Protection Science, 49(1): 11-21.

-Khoshnevis, M., Korori, S.A.A., Teimouri, M., Matinizadeh, M., Rahmani, A., and Shirvany, A., 2008. The effect of different treatments on rooting of *Juniperus excelsa* cutting. Iranian Journal of Forest and Poplar Research, 16(1): 158-167.

-Majidi, T., Heidary, A., Khalafi, A. and Maani, M., 2014. Atlas of Natural Forests of Zanjan Province, General Department of Natural Resources and Watershed Management of Zanjan Province Report, 46 p.

-McDowell, N., Allen, C. D., Anderson-Teixeira, K., Brando, P., Brienen, R. andChambers, J., 2018. Drivers and mechanisms of tree mortality in moist tropical forests. New Phytologist, 219: 851-869.

Investigation and identification of fungi associated with juniper tree decline

H. Jafary[1*], Sh. Najafi[2], N. Zand[2] and T. Majidi[2]

1*- Corresponding Author, Prof., Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran, E-mail: hjafaryir@gmail.com

2- Researcher, Zanjan Agricultureal and Natural Resources Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Zanjan, Iran

Received: 26.11.2022 Accepted: 18.06.2023

Abstract

In order to identify fungal agents associated with juniper trees in the highlands of Tarm County, samples of various tissues from affected trees were collected and subjected to cultivation and isolation using conventional methods. For species identification, both morphological and molecular methods were employed. To achieve this, DNA was extracted from 11 fungal species isolated. The internal transcribed spacer (ITS) region of their ribosomal DNA was amplified using universal primers (ITS-1 and ITS-4). Subsequently, their sequences were determined and compared to sequences available in databases to confirm the identification of species. In total, more than 150 fungal isolates were separated from diseased juniper trees over a span of three years. Based on morphological characteristics and ITS sequence analysis, the following fungal species were confirmed: *Nigrospora oryzae* (31 isolates), *Penicillium* spp. (9 isolates), *Aspergillus* spp. (4 isolates), *Trichoderma* spp. (5 isolates), *Aureobasidium pullulans* (33 isolates), *Polyporus* sp. (3 isolates), *Phoma* sp. (14 isolates), *Phoma medicaginesis* (3 isolates), *Alternaria alternata* (5 isolates), *Alternaria* sp. (9 isolates), *Alternaria consortialis* (6 isolates), *Hormonema carpetanum* (5 isolates), *Hormonema* sp. (9 isolates), *Peyronellaea pinodella* (4 isolates), *Kabatiella microsticta* (3 isolates), and *Microsphaeropsis* spp. (8 isolates). Most of these species are opportunistic pathogens, reported for the first time on juniper trees in Iran. These agents, in conjunction with host vulnerability due to infestations by phytophagous insects, drought stress, and pest attacks, accelerate the decline of the host trees.

Keywords: Juniper Decline, Fungal disease, Pests, ITS