The University of Tehran Press

Iranian Journal of Plant Protection Science

Online ISNN: 2008-4781

Homepage: http://ijpps.ut.ac.ir/

Identification of fungal species associated with dieback of tropical fruit trees in Sistan and Baluchestan and Kerman provinces

Adel Pordel[1]✉, Amirreza Amirmijani [2], Mehdi Azadvar[3], Mousa Najafiniya[4]

1. Corresponding Author, Plant Protection Research Department, Baluchestan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Iranshahr, Iran. a_pordel@areeo.ac.ir
2. Department of Plant protection. Faculty of Agriculture, University of Jiroft, Jiroft. ar.amirmijani@ujiroft.ac.ir
3. Plant Protection Research Department, Kerman Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Kerman, Iran. m.azadehvar@areeo.ac.ir
4. Plant Diseases Research Department, Iranian Research Institute of Plant Protection, AREEO, Tehran, Iran. m.najafinia@areeo.ac.ir

Article Info

Article type:

Research Article

Article history:

Received: 18 August 2024

Revised: 11 January 2025

Accepted: 18 January 2025

Published online: Spring and Summer 2024

Keywords:

Southeast of Iran,

Sampling,

Morphology,

Phylogeny,

Tropical fruits,

Lasiodiplodia,

Neocosmospora.

ABSTRACT

The study aimed to isolate and identify fungi associated with die-back of some tropical fruit trees including Christ's thorn jujube, Chico, and Guava, having die-back symptoms in Sistan and Baluchistan and Kerman Province. During 2022 and 2023, fungal isolation was done using a single spore and hyphal tip method. Seventy-one isolates with die-back symptoms were obtained from 150 samples and identified by morphological criteria. Finally, five fungal isolates with distinct morphological characteristics were selected for DNA extraction and nucleotide homology determination. To confirm the morphological identification, the ITS1-5.8S-ITS2 (ITS) and Elongation factor1-α (*tef1-α*) genomic regions were sequenced. Maximum Parsimony method for *Lasiodiplodia* isolates (ITS and *tef-1α* gene regions) and *Neocosmospora* isolates (*tef1-α*) in phylogeny analysis was used. The identified species in most locations included *Neocosmospora solani* on Christ's thorn jujube, Chico and Guava, and *Lasiodiplodia theobromae* on Christ's thorn jujube, which is reported for the first time in Iran.

Cite this article: Pordel, A., Amirmijani, A. R., Azadvar, M. & Najafiniya, M. (2024). Identification of fungal species associated with dieback of tropical fruit trees in Sistan and Baluchestan and Kerman provinces. *Iranian Journal of Plant Protection Science*, 55 (1), 137-158. DOI: https://doi.org/10.22059/ijpps.2025.380854.1007064

© The Author(s).
Publisher: The University of Tehran Press.
DOI: https://doi.org/10.22059/ijpps.2025.380854.1007064

Extended Abstract

Introduction

The provinces of Sistan and Baluchistan, along with the southern region of Kerman, are recognized as significant areas for producing tropical fruits. The advantageous climatic conditions prevalent in the southern part of the country, particularly in the aforementioned provinces, have contributed to the expansion of cultivated land dedicated to valuable tropical species such as Christ's thorn jujube (*Ziziphus spina-christi* L.), Chico (*Manilkara zapota* L.), and Guava (*Psidium guajava* L.). In recent years, the provinces of Kerman and Sistan and Baluchestan have reported dieback disease, leading to considerable losses for cultivators. The disease initially manifests in the branches on one side of the trees and progressively spreads, ultimately

resulting in the tree's wilting. Given the absence of a comprehensive study addressing the factors contributing to these diseases in the affected regions, the current research aims to isolate and identify the fungi associated with the die-back disease of tropical fruit trees in Sistan and Baluchestan and southern Kerman provinces.

Materials and Methods

During 2022 and 2023, 150 samples were obtained from branches exhibiting die-back symptoms in Christ's thorn jujube, Chico, and Guava trees. Fungal isolation was done using a single spore and hyphal tip method on 2% water agar. These isolates were identified using morphological criteria. Five fungal isolates with distinct morphological characteristics were selected for DNA extraction and nucleotide homology determination. Sequencing of ITS1-5.8S-ITS2 (ITS), and Elongation factor-1α (*tef-1α*) genomic regions was conducted to confirm the morphological identification.

Results and Discussion

Seventy-one isolates were obtained, with 43 belonging to two fungal genera and 28 being non-spore-producing fungi. Phylogenetic analysis was performed using the Maximum Parsimony method for *Lasiodiplodia* isolates (ITS and *tef-1α* gene regions), and *Neocosmospora* isolates (*tef-1α*). The identified species in most locations included *Neocosmospora solani* on Christ's thorn jujube, Chico, and Guava, and *Lasiodiplodia theobromae* on Christ's thorn jujube, which was reported for the first time in Iran.

Conclusion

The study's findings encompass identifying the fungal species *Lasiodiplodia theobromae*, and *Neocosmospora solani* exhibiting die-back disease in the Sistan and Baluchestan, and the southern region of Kerman province. Based on our knowledge, the fungal isolates of the hosts of Christ's thorn jujube, Chico, and Guava in Iran have been reported for the first time. Management strategies to address the drying of tropical fruit trees include ensuring adequate nutrition, preventing water stress, pruning affected branches, and disposing of their remnants. Future research is recommended to assess integrated management approaches tailored to the regional conditions for effectively controlling the die-back disease affecting tropical fruit trees.

نشریه دانش گیاهپزشکی ایران، دوره ۵۵، شماره ۱

انتشارات دانشگاه تهران

شاپا الکترونیکی: ۷۸۶۸-۲۴۲۳

Homepage: http://ijpps.ut.ac.ir/

شناسایی قارچ‌های همراه خشکیدگی سرشاخه درختان میوه گرمسیری در استان‌های سیستان و بلوچستان و کرمان

عادل پردل[۱]✉| امیررضا امیرمیجانی[۲] | مهدی آزادوار[۳] | موسی نجفی‌نیا[۴]

۱. نویسنده مسؤل، بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی بلوچستان، ایرانشهر، ایران. رایانامه: a_pordel@areeo.ac.ir

۲. گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت، جیرفت، ایران. رایانامه: ar.amirmijani@ujiroft.ac.ir

۳. بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی کرمان، کرمان، ایران. رایانامه: m.azadehvar@areeo.ac.ir

۴. بخش تحقیقات بیماریهای گیاهی، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی، تهران، ایران. رایانامه: m.najafinia@areeo.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:

مقالهٔ پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۵/۲۸

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۱۰/۲۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۲۹

تاریخ انتشار: بهار و تابستان ۱۴۰۳

کلیدواژه‌ها:

جنوب شرق ایران، نمونه‌برداری، ریخت شناسی، تبارشناسی، Lasiodiplodia، Neocosmospora

چکیده

این پژوهش با هدف شناسایی قارچ های همراه با بیماری سرخشکیدگی برخی درختان میوه گرمسیری از قبیل چیکو، کنار و گواوا در استان‌های سیستان و بلوچستان و کرمان انجام شد. در طول سال‌های ۱۴۰۱ و ۱۴۰۲ از شاخه برخی درختان میوه گرمسیری دارای علائم خشکیدگی سرشاخه در استان‌های یادشده نمونه برداری‌های انجام گردید.. خالص‌سازی جدایه‌ها به روش تک اسپور و نوک ریسه انجام شد. در مجموع، ۷۱ جدایه از ۱۵۰ نمونه گیاهی از شاخه درختان دارای نشانه های سرخشکیدگی جدا سازی و براساس صفات ریخت شناختی، مورد شناسایی مقدماتی قرار گرفتند. در نهایت، پنج جدایه با ویژگی‌های ریخت‌شناختی متفاوت جهت استخراج دی ان ای (DNA) و تعیین ترادف نوکلئوتیدی انتخاب شـــدند. برای این منظور، ناحیه ITS (ITS1-5.8S- ITS2) و بخشـی از ژن فاکتور رونویسـی ۱-آلفا (*tef1-α*) تکثیر و ترادف‌یابی نوکلئوتیدی شـد. واکاوی‌های تبارزایی برای جدا یه های جنس *Lasiodiplodia* بر اســـاس نواحی ITS و *tef1-α* و برای جدا یه های *Neocosmospora* براساس ناحیه ژنی *tef1-α* انجام گردید. بر اساس نتایج به دست آمده، گونه *N. solani* از درختان کنار، چیکو و گواوا و گونه *L. theobromae* از درخت کنار برای اولین بار از ایران گزارش می‌شوند.

استناد: پردل، عادل؛ امیرمیجانی، امیررضا؛ آزادوار، مهدی و نجفی نیا، موسی (۱۴۰۳). شناسایی قارچ‌های همراه خشکیدگی سرشاخه درختان میوه گرمسیری در استان‌های سیستان و بلوچستان و کرمان. *نشریه دانش گیاهپزشکی ایران*، ۵۵ (۱)، ۱۵۸-۱۳۷. DOI: https://doi.org/10.22059/ijpps.2025.380854.1007064

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

© نویسندگان.

DOI: https://doi.org/10.22059/ijpps.2025.380854.1007064

مقدمه

استان سیستان و بلوچستان و جنوب استان کرمان از مهم‌ترین مناطق تولید کننده میوه‌های گرمسیری بوده و بخش وسیعی از کشت درختان میوه گرمسیری در این دو استان انجام می‌شود. شرایط مساعد آب و هوایی جنوب کشور به ویژه در استان‌های یادشده، منجر به افزایش سطح زیرکشت درختان گرمسیری با ارزش مانند کنار (*Ziziphus spina-christi* L.)، چیکو (*Manilkara zapota* L.) و گواوا (*Psidium guajava* L.) شده است. این میوه‌ها در کشور به صورت تازه‌خوری و یا فرآوری شده مورد استقبال مصرف کنندگان قرار گرفته‌اند (بی نام، ۱۴۰۱). سطح زیر کشت و میزان تولید در دو استان سیستان و بلوچستان و کرمان به میزان ۸۷۰ هکتار و ۶۴۱۵ تن متعلق به درختان کنار، ۱۳۴ هکتار و ۹۵۳ تن متعلق به درختان چیکو و ۵۴۳ هکتار و ۳۹۵۶ تن نیز متعلق به گواوا می‌باشد (بی نام، ۱۴۰۱). یکی از چالش‌های پیش روی باغ دارها در این مناطق، مواجه شدن با بیماری‌های نوظهور روی درختان میوه گرمسیری است که باعث کاهش میزان محصول و همچنین مرگ درختان می‌گردد.

در سال‌های اخیر در استان‌های کرمان و سیستان و بلوچستان علائمی از سرخشکیدگی که منجر به خسارت بالا می‌گردد، مشاهده شده است. علائم بیماری ابتدا در سرشاخه‌های یک طرف درختان شروع شده و به تدریج بخش زیادی از سرشاخه‌ها را درگیر می‌کند که در نهایت باعث مرگ کامل درخت می شود. علائم سرخشکیدگی تاکنون در شهرستان‌های قصرقند، سرباز، چابهار و کنارک در استان سیستان و بلوچستان و شهرستان‌های جنوب استان کرمان و روی درختان کنار، گواوا و چیکو مشاهده شده است (مشاهدات نویسنده مسئول). تحقیق حاضر با هدف جداسازی و شناسایی قارچ‌های همراه بیماری خشکیدگی سرشاخه درختان میوه گرمسیری در استان سیستان و بلوچستان و جنوب استان کرمان انجام شده است.

پیشینه پژوهش

سرخشکیدگی درختان میوه گرمسیری از مهم‌ترین عوامل خسارت‌زای این درختان است که کشت آنها را تحت تاثیر قرار داده است. در دنیا از شاخه‌های کنار، گواوا و چیکو دارای علائم سرخشکیدگی، تاکنون قارچ‌های *Ganoderma colossus* (Fr.) C.F. Baker، *Colletotrichum psidii* Curzi و *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl. گزارش شده است (Ismail *et al.*, 2013). قارچ‌های بیمارگری مانند *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. (عامل بیماری آنتراکنوز)، گونه های *Fusarium* (همراه بیماری پژمردگی)، *Cercospora* sp. (عامل بیماری لکه برگی) و *Phomopsis psidii* Nag Raj & Ponnappa (عامل پوسیدگی انتهایی سرشاخه) از بیمارگرهای مهم درختان گواوا محسوب می‌شوند (Shinde, 2020). گونه *Colletotrichum psidii* باعث بیماری آنتراکنوز در درختان گواوا و کاهش عملکرد کل درخت می‌شود. برگ‌های گیاه گواوا تحت تأثیر گونه‌های مختلف از جنس *Cercospora* قرار می‌گیرند. این قارچ‌ها علائم را به صورت لکه‌های نامنظم و قهوه‌ای در سطح پایین برگ ها و زرد رنگ مایل به خاکستری در سطح فوقانی برگ‌ها ایجاد می‌کنند (Shinde, 2020).

در سال‌های اخیر تحقیقات ارزشمندی در مورد بیماری‌های درختان گرمسیری در کشور انجام شده است. دهقانی و همکاران به بررسی عوامل ایجاد کننده لکه برگی روی درختان میوه گرمسیری به خصوص موز، انبه و گواوا در استان سیستان و بلوچستان و کرمان پرداخته‌اند و براساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی و داده‌های مولکولی، گونه‌های قارچی متنوعی را از درختان میوه گرمسیری جداسازی و شناسایی کردند (Dehghani *et al.*, 2022, 2024). روزانه و همکاران گونه‌های قارچی از جنس *Phaeoacremonium* را از درختان گواوا دارای علائم شانکر و خشکیدگی سرشاخه در استان سیستان و بلوچستان جداسازی کردند. براساس ویژگی‌های ریزساختاری، محیط کشت و توالی ژن بتاتوبولین، جدایه‌ها به دست‌آمده به عنوان *Phaeoacremonium parasiticum* (Ajello, Georg & C.J.K. Wang) W. Gams, Crous & M.J. Wingf. و *P. venezuelense* L. Mostert, Summerb. & Crous شناسایی شدند (Roozaneh *et al.*, 2022). اخیرا، گونه‌های *Stilbocrea banihashemiana* Bolboli, Tavakolian & Mostowfi. و *S. gracilipes* (Tul. & C. Tul.)

Samuels & Seifert از روی درختان چیکو دارای علائم خشکیدگی سرشاخه در استان سیستان و بلوچستان، با استفاده از داده‌های ریخت شناختی و واکاوی ترادف نوکلئوتیدی نواحی ژنومی ITS-rDNA و بتاتوبولین شناسایی شده است (Roozaneh & Mohammadi, 2023).

روش‌شناسی پژوهش

نمونه‌برداری

طی سال‌های ۱۴۰۱ و ۱۴۰۲، نمونه برداری از شاخه‌های درختان کنار، گواوا و چیکو با نشانه‌های سرخشکیدگی در شهرستان‌های زرآباد و قصرقند در استان سیستان و بلوچستان و شهرستان جیرفت در جنوب استان کرمان انجام گردید. نمونه‌ها پس از جمع‌آوری، درون پاکت‌های کاغذی، به همراه ثبت مشخصات (محل جمع آوری و تاریخ) به آزمایشگاه منتقل و تا زمان جداسازی عوامل قارچی، در دمای ۴ ^{o}C نگهداری شدند.

جداسازی و خالص‌سازی عوامل قارچی

جهت جداسازی عوامل قارچی، از روش کشت مرطوب (Blotter method) در تشتک‌های پتری حاوی کاغذ صافی سترون و محیط‌های کشت سیب‌زمینی- دکستروز-آگار (PDA) و آب – آگار (Water agar) دو درصد استفاده شد. برای این منظور، قطعاتی از شاخه‌های آلوده به ابعاد یک در یک سانتی متر برش داده شد. سپس، ضد عفونی سطحی با محلول هیپوکلرید سدیم رقیق شده (دارای دو درصد ماده موثر) و سه بار شستشو با آب مقطر سترون انجام شد. پس از آب گیری با کاغذ صافی سترون، جهت خالص‌سازی از روش تک اسپور (برای جدایه‌های دارای اسپور) و انتقال به محیط آب آگار دو درصد و نوک ریسه (برای جدایه‌های فاقد اسپور) استفاده شد (Ho & Ko, 1997; Crous, 1998). پس از ۴۸ تا ۷۲ ساعت، اسپورهای جوانه‌زده روی محیط آب آگار دو درصد با استفاده از روش نوک هیف کردن به محیط کشت PDA منتقل شدند.

شناسایی براساس ویژگی‌های ریخت شناختی

شناسایی مقدماتی جدایه‌ها، با استفاده از صفات ریخت شناختی ظاهری مانند ویژگی های پرگنه، صفات میکروسکپی مانند شکل کنیدیوم و کنیدیوفور، وجود یا عدم وجود اسپورودوکیوم، با رجوع به منابع معتبر، انجام شد. جهت اسپورزایی گونه‌های قارچی و مشاهده خصوصیات پرگنه، از محیط‌های کشت و شرایط رشدی مخصوص هر جنس استفاده گردید (Crous *et al.*, 2007; Abdollahzadeh *et al.*, 2010; Gerlach & Nirenberg, 1982;). به منظور شناسایی جدایه‌های قارچی متعلق به جنس *Lasiodiplodia* از محیط کشت آب-آگار به همراه برگ کاج و برای جدایه‌های قارچی *Neocosmospora* از محیط کشت برگ میخک آگار (Leslie and Summerell, 2006) تحت شرایط ۱۲ ساعت نور نزدیک به UV (nearUV) و ۱۲ ساعت تاریکی و دمای ۲۵ ^{o}C استفاده شد (Dehghani et al., 2022).

واکاوی تبارزیابی جدایه ها

ابتدا DNA ژنومی با روش ژنگ و استفنسن (Zhong & Stephenson 2002) استخراج شد. از هشت جدایه قارچی انتخاب شده برای تعیین ترداف نوکلئوتیدی، تعداد هشت ترادف نوکلئوتیدی شامل سه ترادف نوکلئوتیدی مربوط به ناحیه ITS-rDNA هسته‌ای با آغازگرهای ITS (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') و ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al. 1990)، سه ترادف نوکلئوتیدی مربوط به بخشی از ژن *tef1-α* با آغازگرهای EF1-178 (5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3') و EF2 (5'-GGARGTACCAGTSATCATGTT-3') (O'Donnell et al. 1998) (برای گونه *L. theobromae*) و آغازگرهای EF1T (5'- ATGGGTAAGGAGGACAAGAC -3') و EF2T (5'-GGAAGTACCAGTGATCATGTT-3')

(Rehner, 2001) (برای گونه *N. solani*) بودند، جهت تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیکی انتخاب گردیدند. غلظت و مقادیر حجمی مواد به کار رفته در تهیه مخلوط PCR با حجم ۲۵ میکرولیتر شامل دو میکرولیتر از DNA رقیق شده جدایه مورد نظر (۱۰۰ ng)، دوازده میکرولیتر آب دیونیزه سترون، نه میکرولیتر مخلوط آماده PCR (ساخت شرکت AMPLIQON شامل dNTPs، Taq DNA Polymerase، $MgCl_2$ و بافر PCR) و یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرها با غلظت ۱۰pM در نظر گرفته شد. برنامه حرارتی PCR برای تکثیر نواحی ژنی ذکر شده به صورت یک چرخه واسرشت سازی اولیه در دمای ^{o}C ۹۵ به مدت دو دقیقه، ۳۵ چرخه شامل واسرشت سازی در دمای ^{o}C ۹۵ به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگرها به ناحیه هدف در دمای ^{o}C ۵۷ به مدت یک دقیقه و گسترش رشته در دمای ^{o}C ۷۲ به مدت یک دقیقه و یک چرخه گسترش نهایی رشته در دمای ^{o}C ۷۲ به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر تنظیم شد. برای مشاهده محصول PCR، الکتروفورز با ژل آگارز ۱٪ و با استفاده از نشانگر اندازه DNA با نام تجاری Gen Ruler^{TM} DNA Ladder Mix (Fermentas, Germany)، به مدت ۱/۵ ساعت با ولتاژ ۱۲۰–۱۰۰ ولت انجام گردید. خالص‌سازی و تعیین ترادف محصولات به دست آمده در واکنش زنجیره ای پلیمراز توسط شرکت کدون ژنتیک تهران انجام گردید. همردیف سازی ترداف‌های نوکلئوتیدی با برنامه MUSCLE در نرم افزار MEGA5.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, v 5.0) انجام شد (Edgar, 2004; Tamura *et al.*, 2011). روابط تبارزایی میان جدایه‌های بدست آمده همراه با توالی تعداد دیگری از جدایه‌ها از جمله جدایه های تیپ گرفته شده از بانک ژن (Genebank) به روش Maximum Parsimony مورد واکاوی قرار گرفت و تبارنمای مربوط به آنها رسم شد (Crous *et al.*, 2015). اعتبار شاخه‌ها با انجام اعتبارسنجی (Bootstrap) در ۱۰۰۰ تکرار مورد سنجش قرار گرفت و ارزش بیشتر از ۹۰ روی درخت تبارزایی نشان داده شد.

یافته‌های پژوهش

شناسایی ریخت‌شناختی و مولکولی جدایه‌ها

بیشترین میزان پراکندگی بیماری خشکیدگی سرشاخه درختان میوه گرمسیری از چیکو، گواوا و کنار متعلق به جنوب استان سیستان و بلوچستان بود. تعداد ۷۱ جدایه (از ۳۸ جدایه متعلق به دو جنس *Lasiodiplodia* و *Neocosmospora* و ۳۳ جدایه قادر به اسپورزایی نبودند) از درختان دارای علائم سرخشکیدگی جداسازی شد که بیشترین درصد فراوانی جدایه‌های جدا شده از درختان میوه گرمسیری متعلق به گونه *L. theobromae* با ۲۵/۷۱ درصد (۱۸ جدایه) (۵۵ درصد از استان کرمان و ۴۵ درصد از استان سیستان و بلوچستان)، *N. solani* با ۲۲/۸۵ درصد (۱۶ جدایه) (از استان سیستان و بلوچستان)، و *Neopestalotiopsis* sp. با ۱۱/۴۲ درصد (پنج جدایه) (از استان سیستان و بلوچستان) بود. علاوه بر این، ۴۰ درصد جدایه‌ها قادر به اسپورزایی نبودند. پس از گروه‌بندی براساس مطالعات ریخت‌شناختی، تعداد پنج جدایه از دو گونه قارچی شامل *L. theobromae* و *N. solani* بدست آمده از درختان کنار، چیکو و گواوا برای مطالعات مولکولی انتخاب گردید.

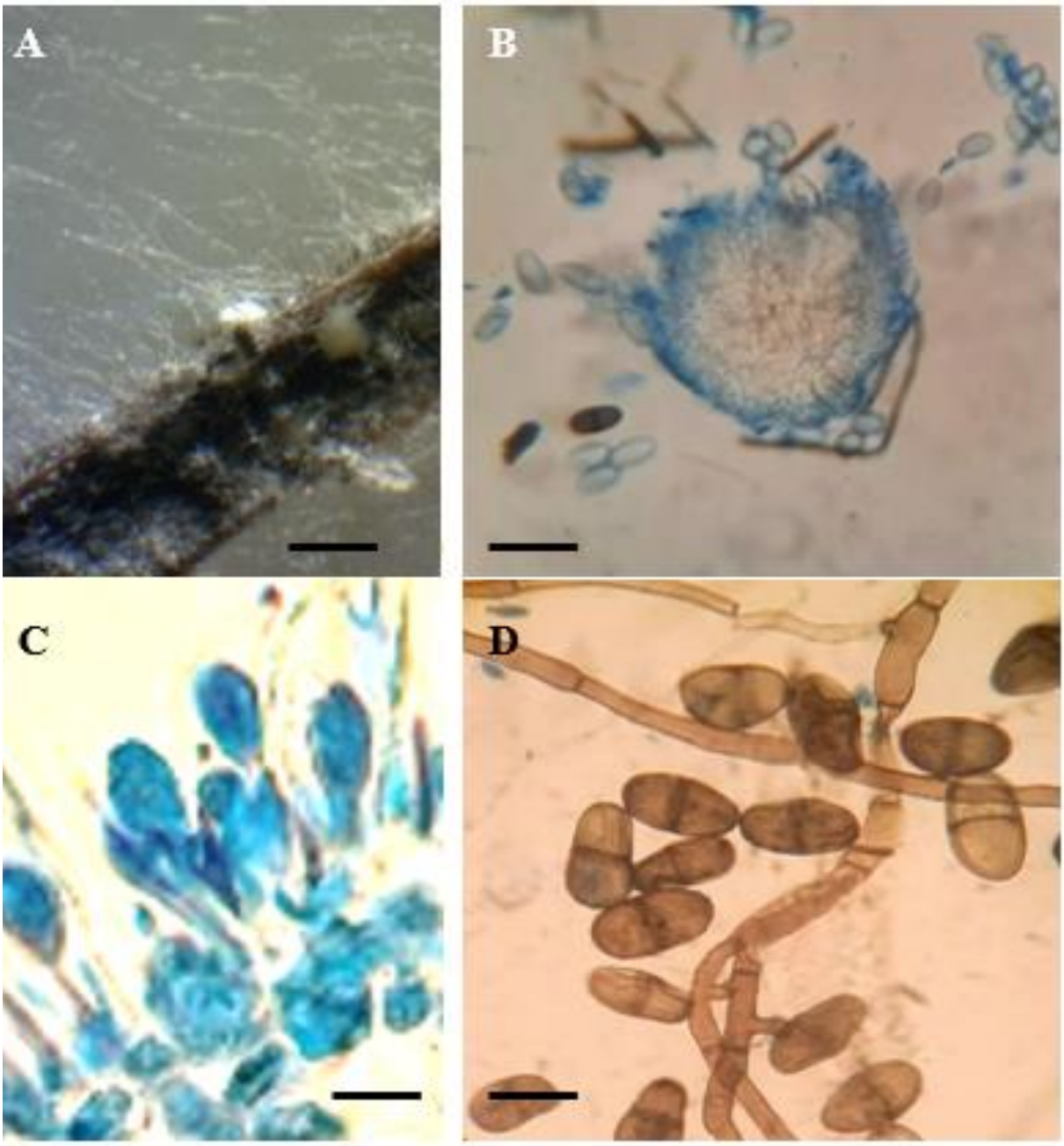
جدول ۱. جدایه‌های منتخب برای تعیین ترداف نوکلئوتیدی، بدست آمده از درختان کنار، گواوا و چیکو.

نام گونه	جدایه	میزبان	محل جمع آوری	ITS	*tef1-α*
Lasiodiplodia theobromae	A98	کنار	سیستان و بلوچستان(نیکشهر)	PQ847885	PQ863258
Lasiodiplodia theobromae	A100	کنار	سیستان و بلوچستان (زرآباد))	PQ847886	PQ863259
Lasiodiplodia theobromae	BKK62	کنار	کرمان (جیرفت)	PQ179757	PQ863257
Neocosmospora solani	A61	چیکو	سیستان و بلوچستان (زرآباد)	-	PQ863260
Neocosmospora solani	A70	گواوا	سیستان و بلوچستان (کنارک)	-	PQ863261

توصیف ریخت شناختی و تبارزایی گونه ها

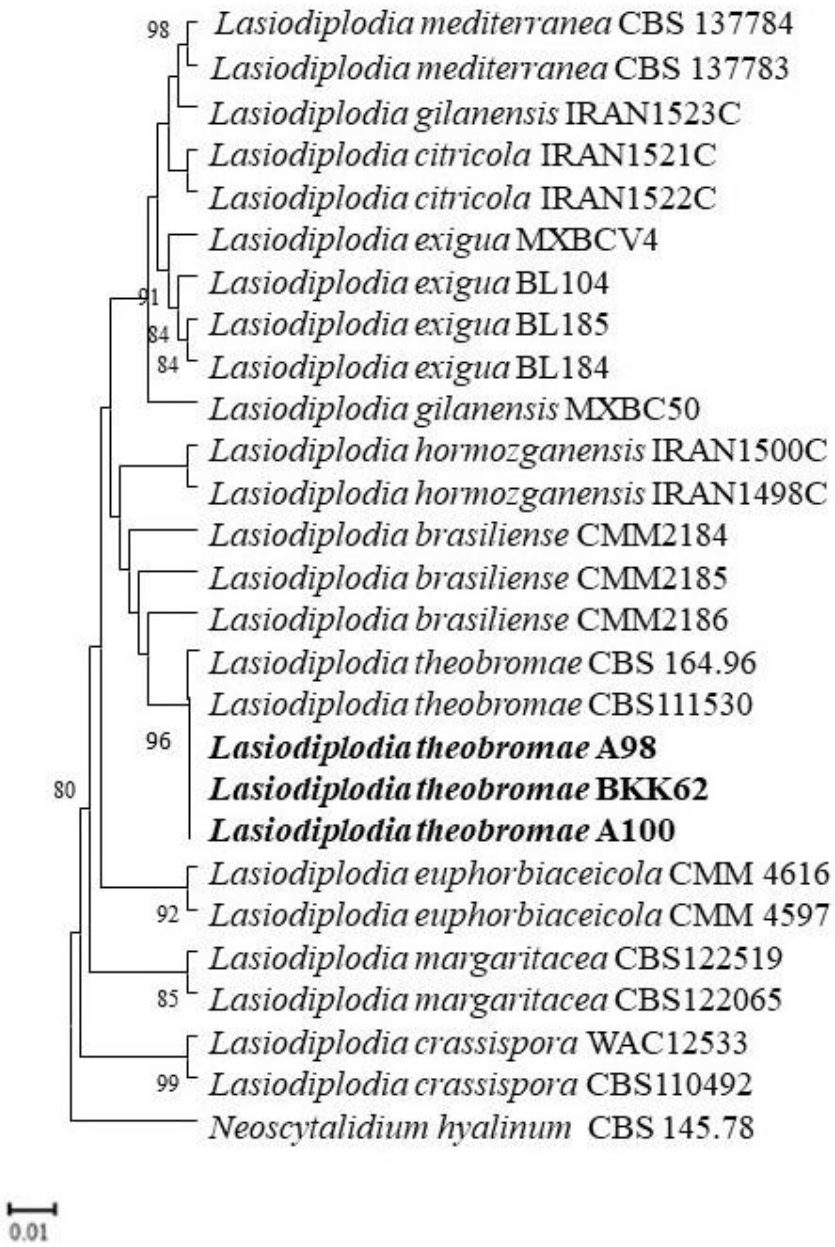
Lasiodiplodia theobromae

جدایه‌های بررسی شده: A98- A99- A100- A101- A102- A103- A104- A105- BKK62- BKK63- BKK64- BKK65- BKK66- BKK67- BKK68- BKK69- BKK70 و BKK71. میزبان: کنار و گواوا، محل جمع آوری: (کد A) از شهرستان‌های نیکشهر، کنارک و زرآباد استان سیستان و بلوچستان و (کد BBK) از شهرستان جیرفت استان کرمان، تاریخ جمع آوری: اردیبهشت، آبان و مهرماه ۱۴۰۱.



شکل ۱. گونه *Lasiodiplodia theobromae*، A: پیپکنیدوم تشکیل شده روی محیط اگار-برگ کاج، B: تشکیل پیکنیدیوم ها روی برگ کاج و اسپور تک سلولی، C: سلول کنیدیوم‌زا، D، کنیدیوم‌های دو سلولی، (مقیاس: ۱۰میکرومتر).

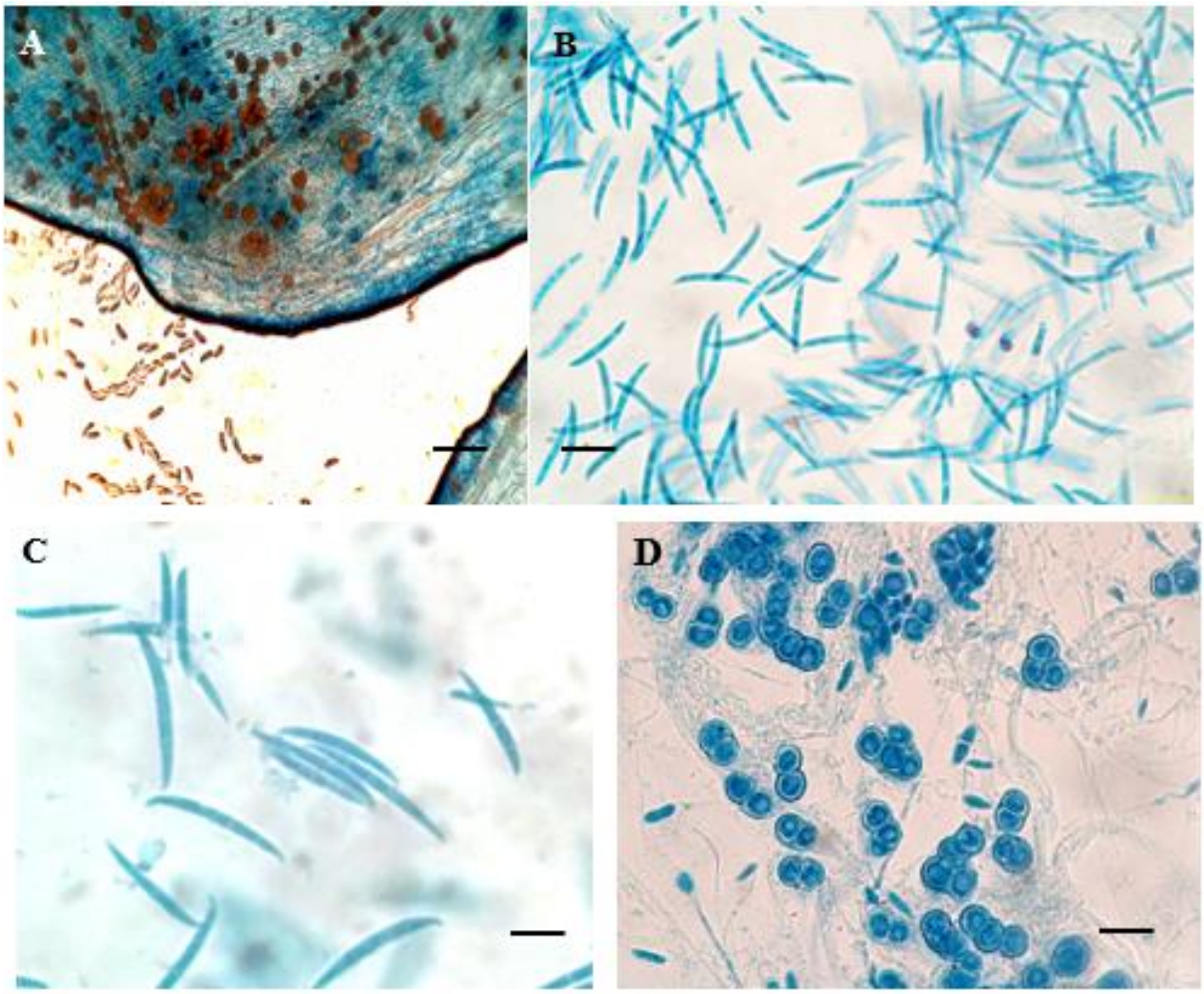
نتایج حاصل از واکاوی تبارزایی ترادف‌های نوکلئوتیدی ناحیه ITS-rDNA و بخشی از ژن *tef1-α* با استفاده از روش Maximum Parsimony نشان داد که اطلاعات بدست آمده از ترکیب ترداف‌های این نواحی با مقادیر اعتبار سنجی بالایی قادر به تفکیک گونه‌های *Lasiodiplodia* می‌باشد. بر اساس تجزیه و تحلیل انجام شده، جدایه‌های *Lasiodiplodia* به دست آمده از کنار و گواوا با اعتبار سنجی ۹۶ درصد در گروه *L. theobromae* قرار گرفتند (شکل ۲).



شکل ۲. درخت تبارزایی استنباط شده از ترادف‌های ناحیه ITS-rDNA/*tef-1α* برای جدایه‌های *Lasiodiplodia* با روش Maximum Parsimony با نرم افزار MEGA v 5.0. اعداد بالای هر شاخه مقدار اعتبارسنجی از ۱۰۰۰ تکرار را نشان می‌دهد. گونه *Neoscytalidium hyalinum* CBS 145.78 به عنوان برون گروه انتخاب شده است.

Neocosmospora solani

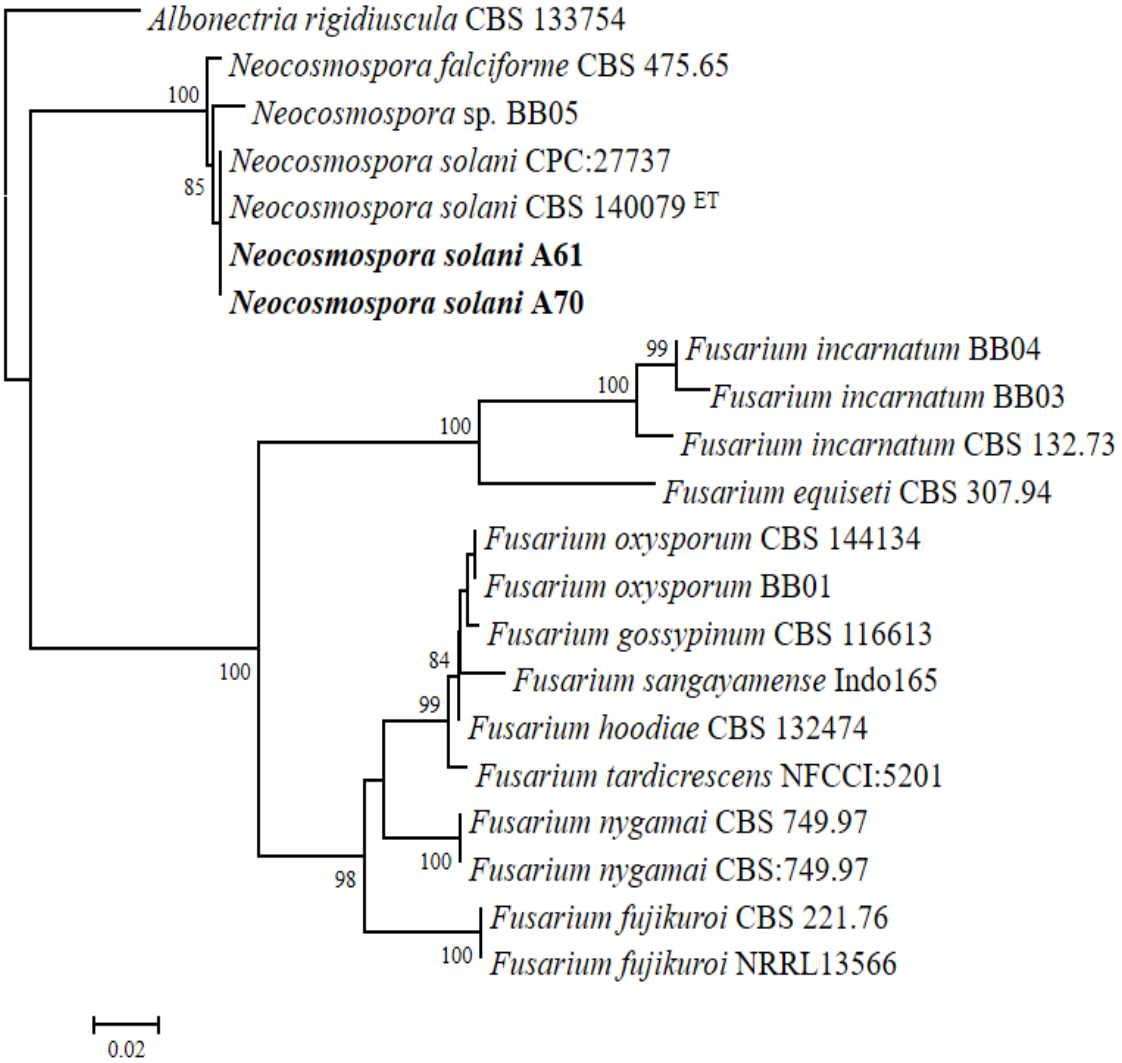
جدایه‌های بررسی شده: A55– A56– A57– A58– A59– A60– A61– A62– A63– A64– A65– A66– A67– A68– A69 و A70. میزبان: چیکو، گواوا و کنار، محل جمع‌آوری: زرآباد استان سیستان و بلوچستان، تاریخ جمع‌آوری: مهر و دی ماه ۱۴۰۱ (شکل ۳).



شکل ۳. گونه *Neocosmospora solani*، A: اسپورودوکیوم تشکیل شده روی محیط برگ میخک-آگار (Carnation leaf –Agar)، B: اسپوردوکیوم، C-D: ماکروکنیدیوم، E: کلامیدوسپور (مقیاس: ۱۰میکرومتر).

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیکی ترادف‌های نوکلئوتیدی ناحیه *tef1-α* با استفاده از روش Maximum Parsimony نشان داد که اطلاعات بدست آمده از ترداف‌های این ناحیه ژنومی با مقادیر اعتبار سنجی بالایی قادر به تفکیک گونه‌های جنس *Fusarium* می‌باشد. بر اساس تجزیه و تحلیل انجام شده، دو جدایه *Neocosmospora* به دست آمده از چیکو و گواوا با اعتبار سنجی ۱۰۰، در گروه *Neocosmospora solani* قرار گرفتند (شکل ۴).

+



شکل ٤. درخت فیلوژنتیکی استنباط شده از ترکیب ترادف‌های ناحیه *tef -1α* برای جدایه‌های *Neocosmospora* با روش Maximum Parsimony با نرم افزار MEGA v 5.0. اعداد بالای هر شاخه مقدار اعتبارسنجی از ۱۰۰۰ تکرار را نشان می‌دهد. گونه *Albonecteria rigidiuscula* CBS 133754 به عنوان برون گروه انتخاب شده است.

بحث

با توجه به نتایج بدست آمده از این بررسی، شناسایی جدایه‌های بدست آمده از میزبان‌های مختلف براساس داده‌های ریخت‌شناختی و مولکولی انجام پذیرفت که در نهایت دو گونه *Lasiodiplodia theobromae* و *Neocosmospora solani* شناسایی شدند. در بین گونه‌های شناسایی شده بیشترین فراوانی به ترتیب متعلق به گونه *L. theobromae* و *N. solani* بود که *L. theobromae* از میزبان‌های کنار و گواوا و گونه *N. solani* از میزبان‌های چیکو، گواوا و کنار جداسازی شد. واکاوی‌های فیلوژنتیکی با استفاده از ناحیه ITS-rDNA و بخشی از ژن‌های *tef1-α* حسب مورد گونه‌های شناسایی شده براساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی و با اطلاعات به دست‌آمده منابع علمی معتبر صورت پذیرفت.

از جنس *Lasiodiplodia* گونه‌های *L. citricola* Abdollahzadeh, Javadi & A.J.L. Phillips، *L. gilanensis* Abdollahzadeh, Javadi & A.J.L. Phillips، *L. hormozganensis* Abdollahzadeh, Javadi & A.J.L. Phillips و *L. iraniensis* Abdollahzadeh, Javadi & A.J.L. Phillips از استان‌های مازندران، گیلان و هرمزگان جداسازی شده است (Abdollahzadeh *et al.*, 2010). گونه *L. theobromae* تاکنون از میزبان‌های چای (Mirhoseini & Fathii, 1993 Moghadam)، بادام، گردو، رز (Ershad, 2009) و خرما (استان سیستان و بلوچستان و کرمان، پردل، ۱۴۰۱) گزاش شده است. گونه *Neopestalotiopsis clavispora* (G.F. Atk.) Maharachch., K.D. Hyde & Crous از نخل خرما در استان مازندران گزارش شده است (Basavand *et al.*, 2020). گونه *Neocosmospora solani* (*Fusarium solani*) نیز از نخل خرما در استان فارس به عنوان عامل زردی تاج نخل خرما و جدایه‌هایی از جنس *Neocosmospora* به عنوان پژمردگی بوته‌های موز گزارش شده است (Mansoori & Kord, 2006; Pordel *et al.*, 2023). گونه *Neopestalotiopsis iranensis* Ayoubi & Soleimani تاکنون از توت فرنگی (Ayoubi & Soleimani 2015) از استان کردستان گزارش شده است. سابکی (۱۳۹۷) به بررسی بیماری بدشکلی گل‌آذین درختان انبه پرداخت. نتایج بررسی نشان داد عامل بیماری قارچ *Fusarium subglutinans* (Wollenw. & Reinking) P.E. Nelson, Toussoun & Marasas می‌باشد که سالانه بخش زیادی از این محصول را در مناطق کشت انبه از بین می‌برد. شکاری اسفهلان و همکاران (۱۳۹۹) به بررسی نقش عوامل قارچی در عارضه خشکیدگی برگ خرما پرداخته‌اند. در تحقیق آنها تعداد ۱۶ جنس قارچی شامل جنس‌های *Alternaria* (خوزستان، بوشهر و هرمزگان)، *Aspergillus* (خوزستان)، *Aureobasidium* (بوشهر، خوزستان و هرمزگان)، *Cladosporium* (خوزستان)، *Comoclathris* (خوزستان)، *Coniochaeta* (بوشهر و خراسان جنوبی)، *Epicoccum* (خوزستان و خراسان جنوبی)، *Fasciatispora* (بوشهر)، *Fusarium* (سیستان و بلوچستان و خوزستان)، *Nigrospora* (خوزستان و بوشهر)، *Paecilomyces* (خوزستان)، *Phaeoacremonium* (بوشهر)، *Preussia* (بوشهر)، *Stemphylium* (خوزستان)، *Subramaniula* (خراسان جنوبی) و *Trichothecium* (بوشهر و خوزستان) شناسایی شدند که عبارت بودند از *Alternaria alternata*، *A. tenuissima* (Kunze) Wiltshire، *Aspergillus terreus* Thom، *Aureobasidium iranianum* Arzanlou & Khodaei، *Epicoccum nigrum* Link، *Fusarium proliferatum* (Matsush.) Nirenberg، *Nigrospora oryzae* (Berk. & Broome) Petch، *Nigrospora zimmermanii* Crous، *Preussia* (W. Phillips & Plowr.) Kruys، *Preussia similis* (R.S. Khan & Cain) Arenal، *Stemphylium solani* G. F. Weber و *Trichothecium roseum* (Pers.) Link (شکاری اسفهلان و همکاران، ۱۳۹۹). گودرزی و مصلحی (۲۰۲۰) به بررسی پراکنش بیماری شانکر و خشکیدگی سرشاخه درختان حرا (*Avicennia marina* (Forssk) Vierh) و چندل (*Rhizophora mucronata* Lam.) در جنوب ایران پرداختند. آنها قارچ *Neoscytalidium dimidiatum* را به عنوان عامل بیمارگر روی این درختان گزارش کردند (Goudarzi & Moslehi, 2020). مجیدی و همکان (۲۰۲۰) به بررسی عامل بیماری بلایت برگ و میوه و خشکیدگی سرشاخه درختان انبه پرداختند. با بررسی اندام‌های دارای علائم، مخمر *Aureobasidium melanogenum* (Herm.-Nijh.) Zalar, Gostinčar & Gunde-Cim. جداسازی و به لحاظ ریخت‌شناختی و مولکولی شناسایی گردید (Majidi *et al.*, 2020).

نتیجه‌گیری و پیشنهادها

یافته‌های حاصل از تحقیق حاضر، شامل جداسازی و شناسایی گونه‌های قارچی *Lasiodiplodia theobromae* و *Neocosmospora solani* از درختان چیکو، گواوا و کنار دارای علائم خشکیدگی سرشاخه در استان سیستان و بلوچستان و جنوب استان کرمان است. براساس بررسی منابع موجود، گونه‌های *Neocosmospora solani* و *Lasiodiplodia*

theobromae شناسایی شده برای اولین بار از میزبان‌های کنار، چیکو و گواوا در ایران گزارش می‌شوند. اقداماتی نظیر تغذیه مناسب، عدم تنش آبی، هرس سرشاخه‌های دارای علائم و از بین بردن بقایای آنها از جمله راه‌کارهای مدیریت خشکیدگی سرشاخه درختان میوه به شمار می‌روند. پیشنهاد می‌شود که در مطالعات بعدی، بررسی روشهای مدیریتی تلفیقی مناسب با شرایط منطقه به منظور مدیریت بیماری خشکیدگی سرشاخه درختان میوه گرمسیری مورد ارزیابی قرار گیرد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی بلوچستان و بنیاد ملی نخبگان ایران جهت تامین منابع مالی برای انجام این تحقیق، تشکر و قدردانی می‌شود. مقاله حاضر از نتایج پروژه تحقیقاتی به شماره مصوب " ۰۱۰۲۵۹-۰۲۶-۱۶-۶۵-۰" بدست آمده است.

منابع

بی نام (۱۴۰۱). محصولات باغی، وزارت جهاد کشاورزی، معاونت برنامه‌ریزی و اقتصادی، مرکز فناوری اطلاعات و ارتباطات، تهران.

پردل، عادل (۱۴۰۱). بررسی نقش عوامل قارچی در زوال ناگهانی نخل خرما در جنوب شرق ایران. پروژه پژوهشی، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور.

شکاری اسفهلان، اعظم.، میرزائی، محمدرضا.، گودرزی، آزاده.، اصلاحی، محمدرضا.، کرم‌پور، فرزاد.، ضرغامی، سارا (۱۳۹۹). بررسی نقش عوامل قارچی در عارضه خشکیدگی برگ خرما. پروژه پژوهشی، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور.

REFERENCES

Abdollahzadeh, J., Javadi, A., Mohammadi Goltapeh, E., Zare, R., & Phillips, A. J. L. (2010). Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. *Persoonia*, *25*, 1–10.

Alymanesh, M., Falahatirastegar, M., Jafarpour, B., & Mehdikhani Moghadam, E. (2006). Detection of *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* race 1 in cucurbits plants of Khorasan Razavi, Northern Khorasan and Fars Provinces. Proceedings of the 17th Iranian Plant Protection Congress, vol. II, 2–5 Sept., Karaj, Iran: 203.

Ayoubi, N., & Soleimani, MJ. (2015). Strawberry fruit rot caused by *Neopestalotiopsis iranensis* sp. nov., and *N. mesopotamica*. *Current Microbiology*, *72*, 329–336.

Basavand, E., Pakdin-Parizi, A., & Mirhosseini, H. A. et al. (2020). Occurrence of leaf spot disease on date palm caused by *Neopestalotiopsis clavispora* in Iran. *Journal Plant Pathology*, *102*, 959.

Boerema, G. H. (2004). Phoma identification manual: differentiation of specific and infra-specific taxa in culture. CABI.

Chen, Q., Jiang, J., Zhang, G., Cai, L., & Crous, P. W. (2015). Resolving the Phoma enigma. *Studies in Mycology*, *82*, 137–217.

Crous, P. W. (1998). *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs associated with leaf spot diseases of *Eucalyptus*. *Mycologia Memoir*, *21*, 1−170.

Crous, P. W., Carris, L. M., Giraldo, A., Groenewald, J. Z., Hawksworth, D. L., Hemández-Restrepo, M., Jaklitsch, W. M., Lebrun, M.-H., Schumacher, R. K., & Stielow, J. B. (2015). The genera of fungi-fixing the application of the type species of generic names-G 2: Allantophomopsis, Latorua, Macrodiplodiopsis, Macrohilum, Milospium, Protostegia, Pyricularia, Robillarda, Rotula, Septoriella, Torula, and Wojnowicia. *IMA fungus*, *61*, 163–198.

Crous, P. W., Wingfield, M. J., Guarro, J., Cheewangkoon, R., Van der Bank, M., Swart, W., Stchigel, A., Cano-Lira, J., Roux, J., & Madrid, H. (2013). Fungal Planet description sheets: 154–213. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, *311*, 188–296.

Crous, P., Braun, U., Schubert, K., & Groenewald, J. (2007). Delimiting *Cladosporium* from morphologically similar genera. *Studies in Mycology*, *581*, 33–56.

Daengsuwan, W., Wonglom, P., Arikit, S., & Sunpapao, A. (2021). Morphological and molecular identification of *Neopestalotiopsis clavispora* causing flower blight on *Anthurium andraeanum* in Thailand. *Horticultural Plant Journal*, *7*, 573–578.

Dehghani, K., Amirmijani, A. R., & Pordel, A. (2022). Fungal species associated with leaf spot of mango trees in Iran. *Mycologia Iranica*, *9*, 75–83.

Dehghani, K., Amirmijani, A., & Pordel, A. (2024). Identification and pathogenicity of fungal species associated with leaf spot of mango trees in the south of Iran. *Journal of Advances in Plant Protection*, *1*, 1–8.

Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics*, *5*, 113

Ershad, Dj. (2009). Fungi of Iran. Ministry of Jihad-e-Agriculture Agricultural Research, Education and Extension Organization Iranian Research Institute of Plant Protection. Pp. 558.

Leslie, J., & Summerell, B. (2006). The *Fusarium* Laboratory Manual Blackwell Publishing Professional. *Ames, IA, USA*.

Félix-Gastélum, R., Herrera-Rodríguez, G., Martínez-Valenzuela, C., Longoria-Espinoza, R. M., Gerardo-Lugo S. S., Tovar-Pedraza, J. M., Maharachchikumbura, S. S. N., Apodaca-Sánchez, M. A., Correia, K. M., Sauceda-Acosta, K. C., Camacho-Tapia, M., Hyde, K. H., Marraiki, N., Elgorban, A. M., & Beltrán-Peña, H. (2020). Characterization of *Neopestalotiopsis* species associated with mango grey leaf spot disease in Sinaloa, Mexico. *Pathogens, 9(10),* 788.

Gerlach, W., & Nirenberg, H. (1982). The genus *Fusarium*–a pictorial atlas. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land-und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem, 209. Germany: Kommissionsverlag Paul Parey.

Goudarzi, A., & Moslehi, M. (2020). Distribution of a devastating fungal pathogen in mangrove forests of southern Iran. *Crop Protection*, *128*, 104987.

O'Donnell, K., Kistler, H. C., Cigelnik, E., & Ploetz, R. C. (1998). Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*(5), 2044-2049.

Ho, W.C. & W.H. Ko. (1997). A simple method for obtaining single-spore isolates of fungi. *Botanical Bulletin of Academia Sinica, 38,* 41−44.

Ismail, A., Cirvilleri, G., Lombard, L., Crous, P., Groenewald, J., & Polizzi, G. (2013). Characterisation of *Neofusicoccum* species causing mango dieback in Italy. *Journal of Plant Pathology, 955*, 549–557.

Mansoori, B., & Kord, M. (2006). Yellow death: a disease of date palm in Iran caused by Fusarium solani. *Journal of Phytopathology, 154 (2),* 125–127.

Majidi, Z., Goudarzi, A., Shamili, M., Bagheri, A., & Seyahooei-Akbari, M. (2021). High distribution rate of an emerging fungal pathogen on mango: A case study from southern Iran. *Crop Protection*, *139*, 105342.

Mirhoseini Moghadam, S. A. & Fathi, J. (1993). Crown rot and shoot die back of imported tea stocks from Japan. Proceedings of the 11th Iranian Plant Protection Congress. 28 Aug.–2 Sept., Rasht, Iran:173.

Pordel, A. Dehghani, K. Amirmijani, A. R., & Miri, K. (2023). Identification and pathogenicity of *Fusarium* sensu lato species causing wilting and leaf spot of banana in South of Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology*, *58*, 96–108.

Rehner S. (2001). Primers for Elongation Factor 1-α (*EF1-α*). http://ocid.NACSE.ORG/research/deephyphae/EF_primer.pdf.

Roozaneh, F. Mohammadi, H. Sohrabi, M. (2022). *Phaeoacremonium* species associated with canker and dieback of guava (*Psidium guajava* L.) trees in Iran. 24th Iranian Plant Protection Congress. 3-6 Sep. 2022, IRIPP, Tehran. 642-643.

Roozaneh, F. Mohammadi, H. (2023). Isolation and identification of *Stilbocrea banihashemiana* and *Stilbocrea gracilipes* from chico (*Manilkara zapota*) trees showing dieback symptoms in Sistan

and Baluchestan province. 5th Iranian Mycological Congress., August 2023. Tabriz, 163.

Shinde, H. P. (2020). Studies on some pathogenic fungal spores and disease incidence over guava fruit orchard at Nasik, M.S. *Plant Archives*, *20*, 2613–2617.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*, *28*, 2731–2739.

Zhong, S., & Stefenson, B. J. (2001). Virulence and molecular diversity in *Cochliobolus sativus*. *Phytopathology*, *91*, 469–476.

White T. J., Bruns T. D., Lee S. and Taylor S. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics pp: 315–322 In: M.A. Innis D.H., Gelfand J.J. Sninsky, and T.J. White (Eds). PCR - Protocols and Applications - A Laboratory Manual, Academic Press, New York, USA. . https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1