




Molecular diagnostics of *Paecilomyces formosus* in Zagros forests using species-specific primers

Taha Rostami¹, and Samad Jamali²

1. Department of Plant Protection, College of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran. E-mail: tahamaksima@gmail.com

2. Corresponding author, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran. E-mail: Jamali454@yahoo.com

Article Info	ABSTRACT
Article type: Research Article	<p>Accurate identification of the host species is critically important for disease detection and informing appropriate disease management decisions. <i>Paecilomyces formosus</i>, a causal agent of dieback and decline of oak, is an emerging threat that may cause severe risk to the Zagros forests of Iran in the future. In this study, a nested PCR assay for the identification of <i>P. formosus</i> was developed with the species-specific primer pairs PaMF and PaMR designed from the comparisons of nucleotide sequences of the nuclear ribosomal DNA internal transcribed space regions (ITS) from <i>P. formosus</i> isolates and other closely related taxa. To accomplish this, we sampled forest trees with dieback symptoms in Kermanshah and Ilam provinces. The <i>Paecilomyces</i> isolates were identified based on morphological characteristics, acid production on keratin sucrose agar medium, and sequencing of the ITS-rDNA region and part of the beta tubulin gene. Nested PCR was successfully amplified a 441 bp product exclusively from <i>P. formosus</i> genomic DNA, and no cross-reactions were observed with any other species, and also <i>P. variotii</i>. The nested PCR method can detect 100 fg of <i>P. formosus</i> genomic DNA. Sixty of symptomatic forest trees from seven locations in Zagros forests were assayed, resulting in the discovery of <i>Amygdalus lycioides</i>, <i>Cerasus avium</i>, <i>Cerasus microcarpa</i>, <i>Quercus libani</i>, <i>Acer</i> spp., <i>Acer monspessulanum</i>, <i>Ficus carica</i>, <i>Ziziphus spina-christi</i>, <i>Tamarix ramosissima</i> and <i>Ziziphus spina-christi</i> as new host species, and all seven infested areas. To fulfill Koch's postulates, the experiments were carried out on detached branches and attached healthy branches of trees at the forests in Kermanshah and Ilam provinces, Iran. The PCR-based method developed here can be used for a fast and reliable diagnosis of <i>P. formosus</i>, monitoring the epidemics, and assessing management strategies in Zagros forests.</p>
Article history: Received: 5 May 2023 Revised: 5 June 2023 Accepted: 4 September 2023 Published online: 18 September 2023	
Keywords: host range study, <i>Paecilomyces maximus</i> , dieback, Zagros forests.	
Cite this article: Rostami, T., & Jamali, S. (2023). Molecular diagnostics of <i>Paecilomyces formosus</i> in Zagros forests using species-specific primers. <i>Iranian Journal of Plant Protection Science</i> , 54 (1), 115-127. DOI: http://doi.org/10.22059/IJPPS.2023.358063.1007028	
 © The Author(s). DOI: http://doi.org/10.22059/IJPPS.2023.358063.1007028 Publisher: The University of Tehran Press.	

Extended Abstract

Introduction

Accurate identification of the host species is critically important for disease detection and informing appropriate disease management decisions. *Paecilomyces formosus*, a causal agent of dieback and decline of oak, is an emerging threat that may cause severe risk to the Zagros forests of Iran in the future. The present study was aimed to develop a nested PCR assay for the identification of *P. formosus* with the species-specific primer pairs designed from the comparisons of nucleotide sequences of the nuclear ribosomal DNA internal transcribed space regions (ITS) from *P. formosus* isolates and other closely related taxa.

Materials and Methods

During 2020 to 2021, forest trees that exhibit branch dieback symptoms were sampled for fungal isolations from Ilam and Kermanshah provinces. The causal agent was isolated and purified using routine plant pathology methods. *Paecilomyces formosus* isolates were identified using a combination of morphological and sequence

data from ITS-rDNA region and beta tubulin gene. Sequence data of ITS-rDNA region for all of *Paecilomyces* were obtained from GenBank and aligned together with sequence data generated in this study. A pair of species-specific primer (PaMF and PaMR) with expected amplicon size of 441 bp was designed for *P. formosus*. Efficacy of this primer set was tested and verified on DNA extracted from *P. formosus* and other fungal species isolated from forest trees. To fulfill Koch's postulates, the experiments were carried out on detached branches and attached healthy branches of trees at the forests in Kermanshah and Ilam provinces, Iran.

Results and Discussion

Colony culture, micro-morphological and physiological characteristics of the fungal isolates recovered from forest trees with dieback symptoms matched description of *P. formosus*. Blast search analysis of the ITS, and β -tub sequence data obtained in this study against the sequence data in GenBank confirmed the identity of the isolates as *P. formosus*. The result of the multigene phylogenetic analysis was in accordance with the molecular identification based on DNA sequences in BLAST search, thus resolving the morphological identification. Nested PCR was successfully amplified a 441 bp product exclusively from *P. formosus* genomic DNA, and no cross-reactions were observed with any other species. The nested PCR method can detect 100 fg of *P. formosus* genomic DNA. Sixty of symptomatic forest trees from seven locations in Zagros forests were assayed, resulting in the discovery of *Amygdalus lycioides*, *Cerasus avium*, *Cerasus microcarpa*, *Quercus libani*, *Acer* spp., *Acer monspessulanum*, *Ficus carica*, *Ziziphus spina-christi*, *Tamarix ramosissima*, and *Ziziphus spina-christi*, as new host species, and all seven infested areas.

Conclusion

The PCR-based method developed here can be used for a fast and reliable diagnosis of *P. formosus*, monitoring the epidemics, and assessing management strategies in Zagros forests.



تشخیص مولکولی *Paecilomyces formosus* در جنگل های زاگرس با استفاده از آغازگرهای اختصاصی

طاها رستمی^۱ و صمد جمالی^۲ ✉۱. گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران. رایانامه: tahamaksima@gmail.com۲. نویسنده مسئول، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران. رایانامه: Jamali454@yahoo.com

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله:	شناسایی دقیق گونه‌های میزبان برای تشخیص بیماری و اتخاذ استراتژی صحیح مدیریت آن بسیار مهم است. گونه <i>Paecilomyces formosus</i> عامل سرخشکیدگی و زوال بلوط، تهدیدی نوظهور است که ممکن است در آینده جنگل‌های زاگرس ایران را در معرض خطر جدی قرار دهد. در این مطالعه از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تودرتو با جفت آغازگرهای اختصاصی PaMR و PaMF طراحی شده از مقایسه توالی‌های نوکلئوتیدی ناحیه نسخه برداری شده داخلی DNA ریبوزومی هسته‌ای (ITS) گونه <i>P. formosus</i> و سایر آرایه‌های نزدیک، برای تشخیص این گونه استفاده شد. برای این منظور نمونه‌برداری از درختان جنگلی با علائم سرخشکیدگی در دو استان کرمانشاه و ایلام صورت گرفت. جدایه‌های <i>Paecilomyces</i> با استفاده از ویژگی‌های ریخت‌شناختی، تولید اسید روی محیط کشت کراتین سوکروز آگار و توالی‌یابی ناحیه ITS-rDNA و قسمتی از ژن بتاتوبولین شناسایی گردیدند. با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تودرتو، باند ۴۴۱ جفت بازی منحصراً از DNA ژنومی <i>P. formosus</i> تکثیر شد و هیچ باندهایی برای سایر گونه‌ها و از جمله گونه <i>P. variotii</i> مشاهده نشد. روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تودرتو می‌تواند ۱۰۰ پیکوگرم از DNA ژنومی <i>P. formosus</i> را ردیابی کند. شصت درخت از هفت منطقه در جنگل‌های زاگرس با علائم سرخشکیدگی مورد ارزیابی قرار گرفت که گونه‌های گیاهی کرف (<i>Acer sp.</i>)، بلوط لبنانی (<i>Quercus libani</i>)، کبک (کرکو) (<i>Acer monspessulanum</i>) کنار (<i>Ziziphus spina-christi</i>)، انجیر (<i>Ficus carica</i>)، پلت (<i>Acer sp.</i>)، تنگس (<i>Amygdalus lycioides</i>)، گز (<i>Tamarix ramosissima</i>)، آلبالوی وحشی (<i>Cerasus microcarpa</i>) و گیلاس وحشی (<i>Cerasus avium</i>) برای اولین بار به‌عنوان میزبان‌های جدید برای <i>P. formosus</i> گزارش می‌شوند. تأیید بیماری‌زایی جدایه‌ها با مایه زنی روی شاخه‌های بریده و شاخه‌های سالم درختان انجام شد. آغازگرهای اختصاصی طراحی شده در این تحقیق می‌تواند برای ردیابی سریع و مطمئن <i>P. formosus</i> ، پایش همه‌گیری‌ها و اتخاذ استراتژی‌های صحیح مدیریتی در جنگل‌های زاگرس مورد استفاده قرار گیرد.
مقاله پژوهشی	
تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۲/۱۵	
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۳/۱۵	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۱۳	
تاریخ انتشار: ۱۴۰۲/۰۶/۲۷	
کلیدواژه‌ها:	
دامنه میزبانی، <i>Paecilomyces</i>	
سرخشکیدگی، <i>maximus</i>	
جنگل‌های بلوط.	

استناد: رستمی، طاها؛ و جمالی، صمد (۱۴۰۲). تشخیص مولکولی *Paecilomyces formosus* در جنگل های زاگرس با استفاده از آغازگرهای اختصاصی نشریه دانش گیاهپزشکی ایران، ۵۴ (۱)، ۱۱۷-۱۳۱. DOI: <http://doi.org/10.22059/IJPPS.2023.358063.1007028>



© نویسندگان.

DOI: <http://doi.org/10.22059/IJPPS.2023.358063.1007028>

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

مقدمه

جنس *Paecilomyces* Bainier یک قارچ هیفومیست با بیش از ۳۰ گونه توصیف شده است. اعضای این جنس از بستره های مختلفی از جمله خاک، محصولات غذایی، بقایای گیاهی، نماتودها، حشرات و همچنین هوای آلوده جداسازی و گزارش شده اند (Inglis and Tigano, 2006; Jamali & Banihashemi, 2011; Jamali & Banihashemi, 2013; Barker et al., 2014). بعضی از گونه‌های این جنس باعث آلودگی انسان و سایر مهره‌داران می‌شوند. تاکنون شش گونه از این جنس شامل *P. marquandii*، *P. tenuipes* (Peck) Samson، *P. farinosus* (Holmsk.) Brown & Smith Ershad, 2009; Jamali) و *P. variotii* Bainier و *fumosoroseus* (Wize) Brown & Smith (Jamali, 2013). گونه‌های *P. lilacinus* و *P. marquandii*، *P. tenuipes* به ترتیب به جنس‌های *Jsaria* و *Marquandomyces* منتقل شده‌اند. در ایران شناسایی گونه‌های این جنس اغلب بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی بوده است و گونه *P. variotii* به‌عنوان عامل بیمارگر بادام (*Amygdalus communis* L.)، پسته (*Pistacia vera* L.) و کنجد (*Sesamum indicum* L.) از مناطق مختلف کشور گزارش شده است (Aminaei & Ershad, 2014; Ghelichi et al., 2012; Mozaffari et al., 2005; Ershad, 1989). تمایز بین *P. variotii* و *P. formosus* بر اساس خصوصیات ریخت‌شناختی صورت می‌گیرد. اگرچه به‌واسطه همپوشانی در خصوصیات ریخت‌شناختی، تمایز بین گونه‌های با خصوصیات مورفولوژیکی مشابه دشوار است (Jiménez-Fernández et al., 2011; Saeedi & Jamali, 2021). مطالعات مولکولی اخیر نشان داده که عامل اصلی سرخشکیدگی پسته در ایران *P. formosus* است (Heidarian et al., 2019; Torabi et al., 2015). بر اساس تحقیقات قبلی، گونه مرکب *P. variotii* به پنج گونه مجزا تقسیم شده است که شامل *P. brunneolus*، *P. dactylethromorphus*، *P. divaricatus*، *P. formosus* و *P. variotii* می‌باشند (Samson et al., 2010; Houbraken et al., 2009). استفاده از نشانگرهای مولکولی برای شناسایی صحیح گونه‌های *Paecilomyces* ضروری است. علاوه بر نواحی یگانه نسخه‌برداری شده داخلی دی.ان.ای. ریبوزومی، ژن بتاتوبولین نیز برای تمایز بین گونه‌ها مفید تشخیص داده شده است (Jamali & Rostami, 2022; Sabernasab et al., 2019; Abbasi, 2022).

جنس *Paecilomyces* یک قارچ گرمادوست است (Houbraken et al., 2010). گرمایش جهانی و کاهش مخازن آب‌های زیرزمینی باعث ضعیف شدن درختان جنگلی و مستعد شدن آن‌ها در برابر حمله بیمارگرهای گیاهی می‌شود (Sabernasab et al., 2020). در دهه‌های اخیر، تغییرات آب و هوایی در جنگل‌های زاگرس اتفاق افتاده است که به احتمال زیاد باعث تضعیف و ابتلای درختان به آلودگی توسط این بیمارگرها خواهد شد. در یک بررسی مشخص شده است که گونه *P. variotii* در شرایط خشک باعث تغییر رنگ بافت چوبی بلوط می‌شود (Bauch et al., 199; Butin, 19951). با توجه به اهمیت این گونه و آسیب اقتصادی آن برای درختان، اطلاعات کاملی از پراکنش، دامنه میزبانی، زیست‌شناسی و نحوه انتقال این بیمارگر در جنگل‌های بلوط زاگرس در دسترس نمی‌باشد. هدف از این بررسی تشخیص و ردیابی گونه *P. formosus* بر اساس آغازگرهای اختصاصی گونه مبتنی بر ITS-rDNA با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تودرتو (Nested PCR) می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری

طی سال‌های ۱۳۹۹ تا ۱۴۰۱، از ۶۰ درخت مختلف در هفت منطقه از جنگل‌های زاگرس در استان‌های ایلام و کرمانشاه شامل بنه (*Pistacia atlantica*)، کرف (*Acer sp.*)، زالزالک (*Crataegus pontica*)، بیدرزد (*Salix acmophylla*)،

سیاه تلو (*Paliurus spina-christi*)، بلوط ایرانی (*Quercus brantii*)، پلت (*Acer sp.*)، ارژن (*Prunus scoparia*)، بلوط لبنانی (*Quercus libani*)، کیکم (*Acer monspessulanum*)، کنار (*Ziziphus spina-christi*)، گز (*Tamarix ramosissima*)، انجیر (*Ficus carica*)، گیلاس وحشی (*Cerasus avium*)، تنگس (*Amygdalus lycioides*) و آلبالوی وحشی (*Cerasus microcarpa*) که دارای علائم سرخشکیدگی بودند، نمونه برداری صورت گرفت. نمونه های درختان بیمار پس از جمع آوری با ثبت مشخصات کامل در کیسه های پلاستیکی نگهداری و به آزمایشگاه دانشگاه رازی منتقل شدند و تا زمان استفاده در یخچال در دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شدند. مشخصات جغرافیایی مکان های مورد نظر شامل طول و عرض جغرافیایی و ارتفاع از سطح دریا با استفاده از نسخه ۱۴ نرم افزار Mobile Topographer Pro ثبت گردید (جدول ۱).

جدول ۱. مکان و اطلاعات جغرافیایی جدایه های *Paecilomyces formosus* بدست آمده از درختان جنگلی در استان های ایلام و کرمانشاه

مکان	میزبان	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	ارتفاع از سطح دریا (متر)
کرمانشاه-کلاه دراز علیا	<i>Amygdalus scoparia</i>	۴۶° ۰۰' ۵۷٫۹۹" E	۳۴° ۰۶' ۵٫۷۷" N	۳۳۵۷
ایلام-بانکول	<i>Amygdalus scoparia</i>	۴۶° ۱۹' ۱۲٫۷۱" E	۳۴° ۴۹' ۵۷٫۵۵" N	۱۳۲۲
ایلام-بانکول	<i>Pistacia atlantica</i>	۴۶° ۱۹' ۱۷٫۶۳" E	۳۳° ۵۰' ۰۶٫۸۳" N	۱۴۱۲
کرمانشاه-بان میدان سفلی	<i>Salix acmophylla</i>	۴۶° ۰۰' ۵۵٫۱۸" E	۳۴° ۰۶' ۳٫۷۹" N	۳۳۶۱
ایلام-ایوان	<i>Prunus avium</i>	۴۶° ۰۷' ۳۳٫۱۲" E	۳۳° ۵۵' ۲۰٫۳۱" N	۱۰۵۶
ایلام-بانکول	<i>Crataegus pontica</i>	۴۶° ۱۹' ۱۳٫۷۸" E	۳۳° ۴۹' ۵۷٫۸۴" N	۱۳۱۷
کرمانشاه-گیلانغرب	<i>Paliurus spina-christi</i>	۴۶° ۰۰' ۵۳٫۲۳" E	۳۴° ۰۶' ۰۲٫۹۷" N	۳۳۴۱
کرمانشاه-ملاکبود	<i>Prunus avium</i>	۴۶° ۰۷' ۳۳٫۸۱" E	۳۴° ۵۵' ۱۶٫۳۳" N	۱۰۴۸
ایلام-مهران	<i>Ziziphus spina-christi</i>	۴۶° ۱۵' ۳۳٫۷۱" E	۳۳° ۲۴' ۴۹٫۱۲" N	۵۲۶
ایلام-مهران	<i>Ziziphus spina-christi</i>	۴۶° ۱۶' ۳۵٫۹۳" E	۳۳° ۲۳' ۲۱٫۱۵" N	۴۶۳
ایلام-شورابه خوران	<i>Acer monspessulanum</i>	۴۶° ۰۷' ۳۱٫۰۸" E	۳۳° ۵۵' ۲۲٫۶۶" N	۱۰۶۱
کرمانشاه-هرسین	<i>Tamarix ramosissima</i>	۴۷° ۲۴' ۱۸٫۸۹" E	۳۴° ۱۳' ۴۴٫۴۲" N	۱۲۶۸
ایلام-بانکول	<i>Prunus avium</i>	۴۶° ۱۹' ۱۵٫۷۳" E	۳۳° ۵۰' ۰۷٫۲۶" N	۱۳۹۲
کرمانشاه-هرسین	<i>Tamarix ramosissima</i>	۴۷° ۲۵' ۳۱٫۳۹" E	۳۴° ۱۶' ۲۴٫۵۲" N	۱۲۴۸
کرمانشاه-بان میدان سفلی	<i>Quercus libani</i>	۴۶° ۰۰' ۵۵٫۵۵" E	۳۴° ۰۶' ۰۳٫۴۶" N	۹۹۴
کرمانشاه-بان میدان علیا	<i>Quercus libani</i>	۴۶° ۰۰' ۵۵٫۲۰" E	۳۴° ۰۶' ۰۴٫۰۰" N	۹۸۸
کرمانشاه-بان میدان علیا	<i>Amygdalus lycioides</i>	۴۶° ۰۰' ۵۸٫۵۰" E	۳۴° ۰۶' ۰۲٫۷۰" N	۱۰۰۰
کرمانشاه-بان میدان علیا	<i>Amygdalus lycioides</i>	۴۶° ۰۰' ۵۲٫۷۰" E	۳۴° ۰۶' ۰۴٫۹۰" N	۱۰۰۲
ایلام-ایوان	<i>Cerasus microcarpa</i>	۴۶° ۱۹' ۲۲٫۴۰" E	۳۳° ۵۰' ۱۲٫۹۰" N	۴۷۹۶
ایلام-چهل غازی	<i>Ficus carica</i>	۴۶° ۰۵' ۳۶٫۳۰" E	۳۳° ۵۶' ۳۶٫۲۰" N	۴۱۴۳
کرمانشاه-بان میدان علیا	<i>Amygdalus scoparia</i>	۴۶° ۰۰' ۵۸٫۰۰" E	۳۴° ۰۶' ۰۵٫۸۰" N	۳۳۵۷
ایلام-چهل غازی	<i>Amygdalus scoparia</i>	۴۶° ۰۵' ۳۸٫۴۰" E	۳۳° ۵۶' ۲۶٫۲۰" N	۴۱۲۰
ایلام-ایوان	<i>Amygdalus scoparia</i>	۴۶° ۱۹' ۲۴٫۹۰" E	۳۳° ۵۰' ۱۶٫۷۰" N	۴۸۴۲
کرمانشاه-چهار زبر علیا	<i>Quercus brantii</i>	۴۶° ۴۰' ۲۴٫۸۰" E	۳۴° ۱۳' ۰۳٫۰۰" N	۱۶۵۱
ایلام-شورابه خوران	<i>Quercus brantii</i>	۴۶° ۰۵' ۴۲٫۶۰" E	۳۳° ۵۶' ۲۴٫۱۰" N	۴۱۳۶
ایلام-چهل غازی	<i>Pistacia atlantica</i>	۴۶° ۰۵' ۳۷٫۵۰" E	۳۳° ۵۶' ۲۷٫۴۰" N	۴۱۲۰
کرمانشاه-بان میدان علیا	<i>Salix acmophylla</i>	۴۶° ۰۰' ۵۵٫۲۰" E	۳۴° ۰۶' ۰۳٫۸۰" N	۳۳۶۱
کرمانشاه-چهار زبر علیا	<i>Crataegus pontica</i>	۴۶° ۴۰' ۲۴٫۰۰" E	۳۴° ۱۳' ۰۳٫۱۰" N	۱۶۵۱
ایلام-چهل غازی	<i>Crataegus pontica</i>	۴۶° ۰۵' ۴۱٫۰۰" E	۳۳° ۵۶' ۳۴٫۴۰" N	۴۱۳۳
ایلام-چهل غازی	<i>Crataegus pontica</i>	۴۶° ۰۵' ۳۷٫۲۰" E	۳۳° ۵۶' ۲۶٫۸۰" N	۴۱۳۰
کرمانشاه-بان میدان علیا	<i>Paliurus spina-christi</i>	۴۶° ۰۰' ۵۳٫۲۰" E	۳۴° ۰۶' ۰۳٫۰۰" N	۳۳۴۱

جداسازی و شناسایی عامل بیماری

جهت جداسازی عامل بیماری، قطعات کوچک ۵-۲ میلی‌متری از حد فاصل بافت سالم و بیمار با استفاده از قیچی باغبانی جدا و با آب روان شستشو شدند. قطعات پس از ضدعفونی سطحی به مدت ۳۰ ثانیه با هیپوکلریت سدیم نیم درصد، برای ۳۰ ثانیه دیگر در الکل طبی ۷۰ درصد قرار داده شدند و در نهایت شستشوی نمونه با آب مقطر سترون انجام شد. بافت‌های ضدعفونی شده پس از خشک شدن روی کاغذ صافی سترون، در محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار کشت و تا ظاهر شدن پرگنه‌های قارچی داخل انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. پس از رشد قارچ‌ها، از حاشیه فعال نمونه‌ها یک قرص به قطر پنج میلی‌متر جدا و به محیط کشت آب آگار منتقل شد. جدایه‌ها به روش نوک ریس خالص و جهت انجام مراحل بعدی (شناسایی جدایه‌ها) روی محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار کشت و پس از رشد کافی در دمای ۴ درجه سلسیوس نگه‌داری شدند. از کشت‌های خالص برای شناسایی قارچ‌ها استفاده شد. شناسایی بر اساس خصوصیات ماکرو-میکرومورفولوژیکی قارچ‌ها در محیط کشت عصاره سیب‌زمینی-دکستروز-آگار، مانند ویژگی‌های پرگنه و خصوصیات کنیدیوفور، فیالیدها و رنگ، شکل، اندازه و تزئینات سطح اسپور صورت گرفت (Samson et al., 2009).

شناسایی مولکولی جدایه‌ها

به‌منظور استخراج DNA از کشت‌های خالص، توده میسیلیومی از محیط کشت جامد عصاره سیب‌زمینی دکستروز آگار برداشته و استخراج DNA انجام شد (Lekgari, 2010). سپس غلظت DNA با استفاده از دستگاه نانودراپ اندازه‌گیری گردید. ناحیه ITS-rDNA با استفاده از آغازگرهای عمومی (5-TCCGTAGGTGAACCTGCGC-3) ITS1 و ITS4 (5-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3) و ژن بتاتوبولین با استفاده از آغازگرهای (GGTAA CCA AAT Bt2a) (CGG TGC TGCTTTC) Bt2b و (ACCCT CAG TGT AGT GAC CCTTGGC) توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز فزون‌سازی شد (White et al., 1990; Glass & Donaldson, 1995). مواد مورد استفاده در هر واکنش برای هر دو ناحیه ITS-rDNA و بتاتوبولین شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس (Taq DNA polymerase 2x Master Mix (Sinaclon) (RED)، ۱۰ نانوگرم از دی.ان.ای. قالب و ۱۰ پیکومول از هر یک از آغازگرها بود که حجم نهایی مخلوط واکنش با استفاده از آب سترون دیونیزه (Sinaclon) به حجم ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. تکثیر نواحی ژنومی مورد نظر با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Biometra, Germany) و با اعمال حرارت ۹۵ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه جهت واسرشت اولیه و به دنبال آن ۳۰ چرخه شامل ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه و در نهایت یک چرخه ۷۲ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه جهت گسترش نهایی انجام گرفت. محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز روی ژل آگارز ۱/۲ درصد حاوی ۱۰ میکرولیتر بر لیتر DNA safe green (Sinaclon) در بافر 1xTAE (DenaZist Asia) توسط دستگاه عکس‌برداری از ژل تحت نور فرابنفش مشاهده و بررسی شدند. قطعات فزون‌سازی شده برای توالی‌سنجی به شرکت توپازژن کاوش، نماینده شرکت میکروسینس سوئیس ارسال و از یک جهت به صورت مستقیم با استفاده از آغازگرهای معکوس توالی‌سنجی شدند. ترادف نمونه‌ها به روش دستی و با استفاده از نسخه ۷,۱ نرم‌افزار BioEdit ویرایش، با استفاده از سرور آنلاین [Online] (GenBank, NCBI, USA; [Online] BankIt) در پایگاه داده NCBI ثبت و شماره دسترسی دریافت شد. ردیف‌سازی ابتدایی توالی‌های ویرایش شده با نرم‌افزار ClustalW (Thompson et al., 1994) انجام شد، متعاقباً به صورت دستی در نرم‌افزار BioEdit تنظیماتی روی آن صورت گرفت و درخت فیلوژنتیکی نمونه‌های توالی‌یابی شده با استفاده از نرم‌افزار MEGA 7 (Kumar et al., 2016) و با دو روش بیشترین بهینگی (Maximum parsimony) و بیشینه احتمال (Maximum likelihood) انجام شد.

likelihood) ترسیم شد. در آخر ارزیابی پایداری انشعابات شجره حاصل به وسیله آزمون اعتبار سنجی با ۱۰۰۰ تکرار انجام گرفت..

طراحی آغازگر اختصاصی

برای طراحی آغازگر اختصاصی گونه *P. formosus*، ابتدا ترادف‌های معتبر ثبت شده ناحیه ITS-rDNA گونه‌های *Paecilomyces* از بانک ژن دریافت و ذخیره شدند. پس از رجبندی چندگانه ترادف‌های این مطالعه با سایر ترادف‌های دریافت شده از بانک ژن (جدول ۲)، یک جفت آغازگر اختصاصی با استفاده از نرم افزار MEGA7، طراحی گردید. جهت حصول اطمینان از کارایی جفت آغازگر طراحی شده در شناسایی جدایه‌های *P. formosus*، توالی برآیند از ترادف‌ها ایجاد و موقعیت جفت آغازگر طراحی شده روی توالی برآیند ارزیابی شد. ویژگی‌های جفت آغازگر شامل امکان تشکیل ساختار سنجاق سری، تشکیل پرایمر دایمر، دمای ذوب و درصد سیتوزین گوانین با استفاده از نرم افزار برخط Oligo Analyzer بررسی شد. به‌منظور ارزیابی کارایی جفت آغازگر طراحی شده در تکثیر اختصاصی گونه *P. formosus*، ابتدا DNA نمونه‌ها بر اساس داده‌های ترادف ناحیه ITS تکثیر شدند. راست آزمایی آغازگر طراحی شده از طریق تکثیر DNA جدایه‌های گونه مورد نظر و تعدادی از گونه‌های نزدیک از جمله *P. variotii* و دیگر بیمارگر گیاهی جداسازی شده از درختان بلوط ارزیابی گردید. برای این منظور DNA استخراج شده از قارچ‌های مختلف جداسازی شده از درختان بلوط همراه DNA جدایه‌های *P. formosus* با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی طراحی شده تکثیر گردید.

اثبات بیماری‌زایی

برای اثبات بیماری‌زایی در آزمایشگاه از شاخه‌های سالم درختان جنگلی (طول ۲۰-۳۰ و قطر سه سانتی متر) استفاده شد. شاخه‌ها با الکل ۷۰ درصد ضدعفونی سطحی شدند و پس از ایجاد سوراخی به قطر یک سانتی‌متر، یک بلوک از پرگنه در حال رشد و فعال قارچ روی حفره قرار داده و با پارافیلیم پوشانده شد. برای شاهد نیز تمام مراحل بدون وجود قارچ و تنها با یک بلوک از محیط کشت سیب زمینی-دکستروز-آگار مایه‌زنی شد. برای هر جدایه سه تکرار استفاده شد. برای جلوگیری از خشک شدن، شاخه‌ها در نایلون گذاشته و در انکوباتور در دمای 22-25 °C نگهداری شدند (Jamali 2020). پس از ۳۰ روز شاخه‌ها برای مشاهده علائم شانکر مورد بررسی و با شاهد مقایسه شدند. با توجه به نبود نهال برای تمام درختان جنگلی، با هماهنگی سازمان جنگل‌ها، بیماری‌زایی تعدادی از جدایه‌ها روی شاخه سالم شماری از درختان جنگلی به روش شاخه‌های بریده در جنگل صورت گرفت. پس از ظهور علائم، شاخه‌ها از درختان جدا و با احتیاط برای ثبت علائم به آزمایشگاه گیاهپزشکی دانشگاه رازی منتقل شدند.

نتایج

جداسازی

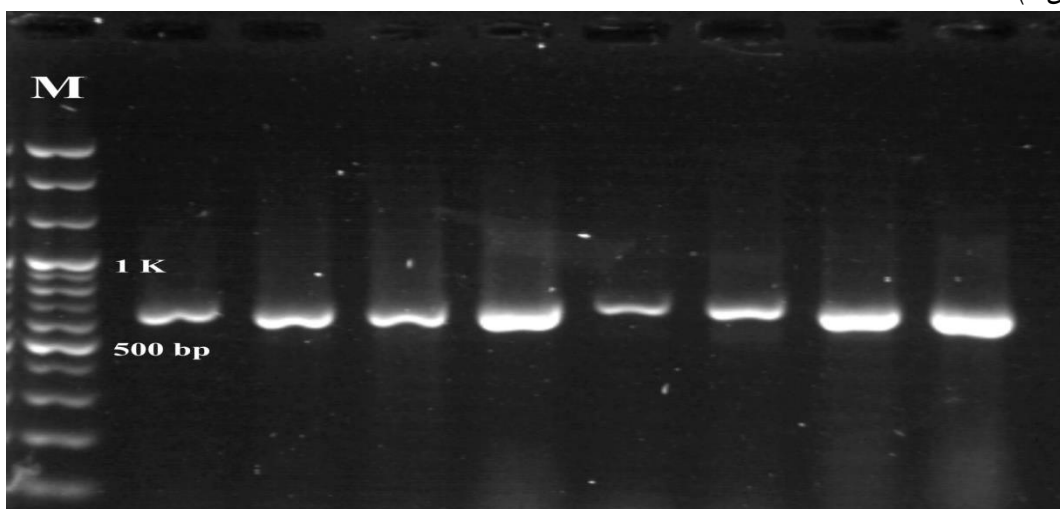
در این بررسی از تمام شصت درخت جنگلی دارای علائم سرخشکیدگی، شانکر و تغییر رنگ بافت آوندی قارچ *Paecilomyces* جداسازی شد. علاوه بر این قارچ، تعدادی جدایه از جنس‌های *Alternaria*، *Penicillium*، *Aspergillus* از شماری از درختان جنگلی و همچنین گونه *Neoscytalidium dimidiatum* از چند درخت بلوط بدست آمد که در اثبات بیماری‌زایی روی شاخه‌های بریده، تنها *N. dimidiatum* قادر به ایجاد شانکر روی شاخه‌های بریده در آزمایشگاه بود.

خصوصیات ریخت‌شناختی جدایه‌های *Paecilomyces*

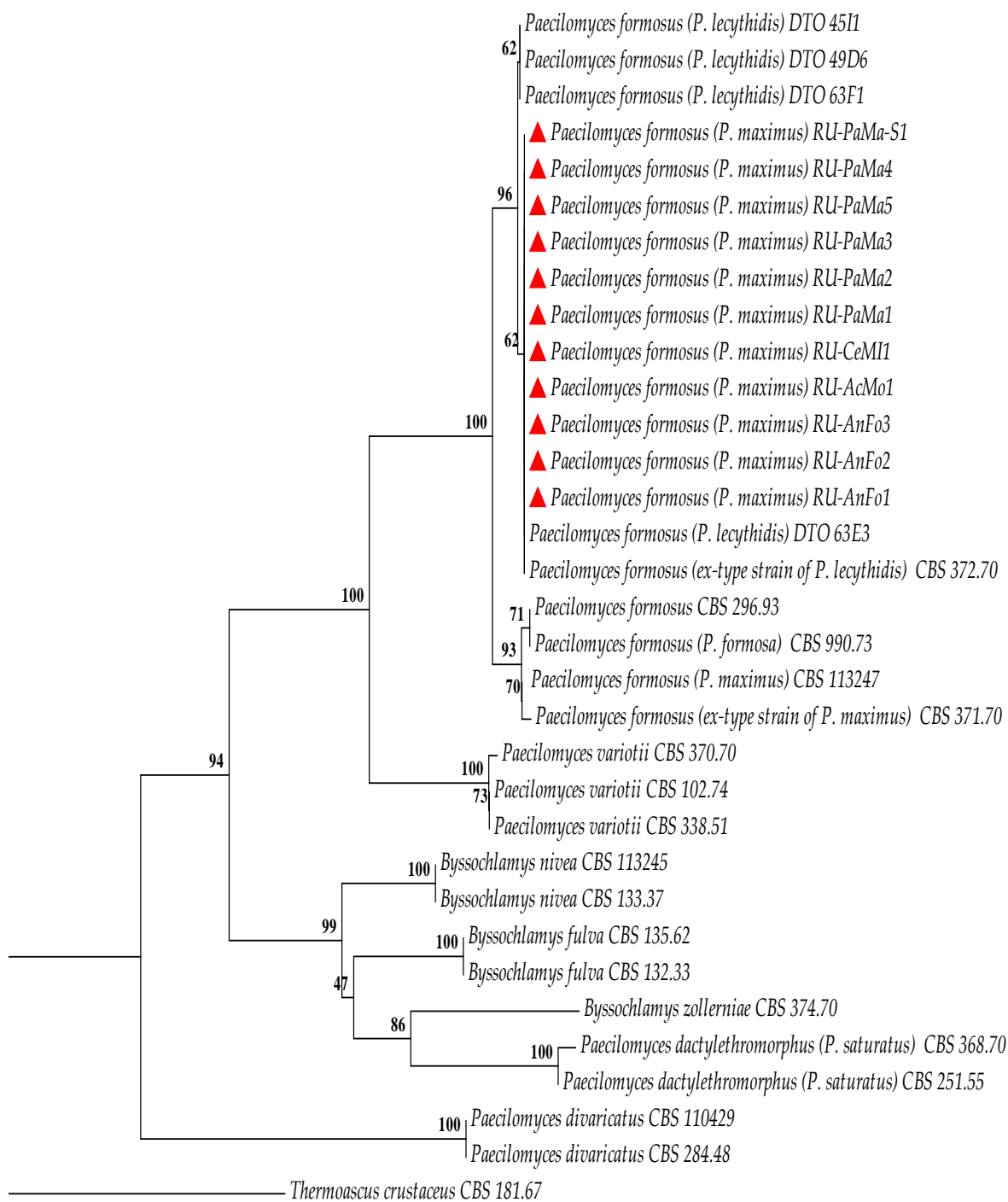
رنگ پرگنه قارچ در محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار در جدایه‌ها زرد نخودی تا خرمایی بود. رشد شعاعی پرگنه در محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار بعد از پنج روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و تناوب نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی ۲،۲۵ سانتی‌متر بود. کنیدیفور قارچ به طور نامنظم منشعب شده و از هر کنیدیفور یک یا چند فیالید منشعب می‌گردید. فیالیدها در قسمت قاعده پهن و به سمت نوک فیالید باریک می‌شدند و ابعاد فیالید (۲،۲۸) × ۲،۶۰-۲،۰۱ × (۱۶،۳) میکرومتر بود. کنیدیوم-ها لیمویی، بیضوی و سیلندری شکل و دارای رنگ زرد خرمایی بودند. کنیدیوم‌ها در زنجیره و به ابعاد (۲،۷۵) × ۳،۸۰-۲،۰۱ × (۴،۷۸) میکرومتر بودند. جدایه‌ها در محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار کلامیدسپور کروی شکل با دیواره ضخیم و به ابعاد (۴،۲۴) × ۵،۱۸-۳،۹۴ × (۵،۴۳) میکرومتر تشکیل دادند. ویژگی‌های ریخت‌شناختی جدایه‌ها با توصیف ارائه شده برای *P. formosus* توسط سایر محققان مطابقت داشت (Samson et al., 2009; Sabernasab et al., 2019; Heidarian et al., 2018; Torabi et al., 2019). بیماری در محیط کشت مشاهده نشد. تمام جدایه‌ها روی محیط کشت کراتین سوکروز آگار هاله زرد ایجاد کردند که دلیل بر توانایی برای تجزیه کراتین بود. این ویژگی جدایه‌ها را از گونه مشابه از نظر خصوصیات مورفولوژیک (*P. variotii*) تفکیک و متمایز می‌نماید (Samson et al., 2009).

شناسایی مولکولی جدایه‌ها

برای تایید شناسایی جدایه‌های شناسایی شده بر اساس خصوصیات ریخت‌شناختی، تعدادی از جدایه‌های بدست آمده از درختان مختلف (۱۱ جدایه) به صورت تصادفی به‌عنوان نماینده جهت شناسایی مولکولی انتخاب شدند. پس از استخراج DNA ژنومی، ناحیه ITS-rDNA با استفاده از آغازگرهای ITS1 و ITS4 و ژن بتاتوبولین با استفاده از آغازگرهای Bt2a و Bt2b تکثیر شد که طول باند برای ناحیه ITS جدایه‌ها بین ۵۵۰-۶۵۰ (شکل ۱) و برای ژن بتاتوبولین تقریباً ۵۰۰ جفت باز بود. با استفاده از ابزار جستجوی بلاست تمام جدایه‌ها با گونه *P. formosus* موجود در بانک ژن گزارش شده از سایر کشورها ۹۹ تا ۱۰۰ درصد تشابه (۱۰۰ درصد همپوشانی) داشتند (Houbkrken et al., 2010; Barker et al., 2014; Martin-Sanchez et al., 2016). *Paecilomyces* گونه‌های ITS-rDNA، با ضریب اطمینان بالا در گروه‌های مرتبط از سایر کشورها قرار گرفتند (شکل ۲). جدایه‌های *P. formosus* در بانک ژن ثبت شدند (جدول ۲).



شکل ۱. ژل الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ناحیه ITS گونه *Paecilomyces formosus* با آغازگرهای ITS1/ITS4. M: نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی. خطوط دیگر: جدایه‌های *P. formosus*



شکل ۲. فیلوگرام ترسیم شده با روش بیشینه احتمال و مدل کیمورا با استفاده از نرم افزار MEGA X بر اساس ردیف چینی توالی ناحیه ITS جدایه های *Paecilomyces formosus* مطالعه حاضر همراه با توالی های اخذ شده از بانک ژن. ضریب اطمینان ۱۰۰۰ تکرار در نظر گرفته شد. توالی قارچ *Thermoascus crustaceus* CBS 181.67 به عنوان گروه خارجی در نظر گرفته شد. مثلث های قرمز اشاره به نمونه های حاضر در این مطالعه دارد.

جدول ۲. جدایه‌های مطالعه حاضر، میزبان‌ها و شماره دسترسی ناحیه ITS و ژن بتاتوبولین

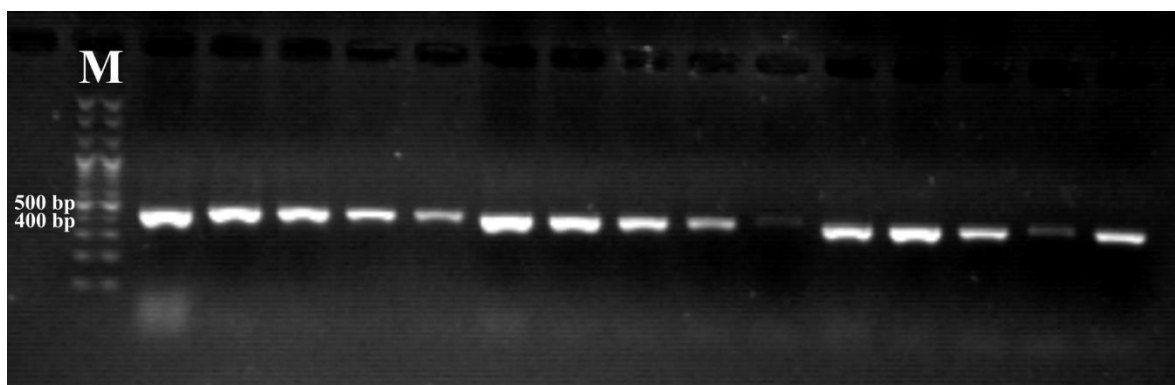
گونه	شماره جدایه-ها	کشور	بستره	رأس شماره		مولف
				ITS	β -tubulin	
<i>Byssochlamys fulva</i>	CBS 135.62	سوئیس	آب میوه	FJ389943	FJ389989	Samson et al. 2009
<i>Byssochlamys fulva</i>	CBS 132.33	انگلستان	کنسرو میوه	FJ389939	FJ389988	Samson et al. 2009
<i>Byssochlamys nivea</i>	CBS 113245	سوئیس	آب میوه	FJ389936	FJ389998	Samson et al. 2009
<i>Byssochlamys nivea</i>	CBS 133.37	آمریکا	شیر	FJ389935	FJ390000	Samson et al. 2009
<i>Byssochlamys spectabilis</i>	CBS 338.51	سوئیس	آی میوه	MH856886	FJ390007	Samson et al. 2009
<i>Byssochlamys spectabilis</i>	CBS 102.74		نامشخص	EU037055	EU037073	Samson et al. 2009
<i>Byssochlamys zollerniae</i>	CBS 374.70	برزیل	<i>Zollernia ilicifolia</i> and <i>Protium heptaphyllum</i>	FJ389933	FJ390008	Samson et al. 2009
<i>Paecilomyces formosus</i> (<i>P. maximus</i>)	RU-AnFo1	ایران	<i>Anagyris foetidae</i>	MZ848629	MZ852017	مطالعه حاضر
<i>Paecilomyces formosus</i> (<i>P. maximus</i>)	RU- AnFo 2	ایران	<i>Anagyris foetidae</i>	MZ848630	MZ852018	مطالعه حاضر
<i>Paecilomyces formosus</i> (<i>P. maximus</i>)	RU- AnFo 3	ایران	<i>Anagyris foetidae</i>	MZ848631	MZ852019	مطالعه حاضر
<i>Paecilomyces formosus</i> (<i>P. maximus</i>)	RU-AcMo1	ایران	<i>Acer monspessulanum</i>	OQ787066	OQ803252	مطالعه حاضر
<i>Paecilomyces formosus</i> (<i>P. maximus</i>)	RU-CeMI1	ایران	<i>Cerasus microcarpa</i>	OQ787067	OQ803253	مطالعه حاضر
<i>Paecilomyces formosus</i> (<i>P. maximus</i>)	RU-PaMa1	ایران	<i>Paliurus spina-christi</i>	OL797970	OL800693	مطالعه حاضر
<i>Paecilomyces formosus</i> (<i>P. maximus</i>)	RU-PaMa2	ایران	<i>Paliurus spina-christi</i>	OL797971	OL800694	مطالعه حاضر
<i>Paecilomyces formosus</i> (<i>P. maximus</i>)	RU-PaMa-S1	ایران	<i>Salix acmophylla</i>	OL891502	OL944475	مطالعه حاضر
<i>Paecilomyces formosus</i> (<i>P. maximus</i>)	RU-PaMa3	ایران	<i>Paliurus spina-christi</i>	OL797972	OL800695	مطالعه حاضر
<i>Paecilomyces formosus</i> (<i>P. maximus</i>)	RU-PaMa4	ایران	<i>Paliurus spina-christi</i>	OL797973	OL800696	مطالعه حاضر
<i>Paecilomyces formosus</i> (<i>P. maximus</i>)	RU-PaMa5	ایران	<i>Paliurus spina-christi</i>	OL797974	OL800697	مطالعه حاضر
<i>Paecilomyces formosus</i> (<i>P. formosa</i>)	CBS 296.93	ازبکستان	استخوان انسان	FJ389928	FJ389994	Samson et al. 2009
<i>Paecilomyces formosus</i> (<i>P. formosa</i>)	CBS 990.73	-	نامشخص	FJ389929	FJ389993	Samson et al. 2009
<i>Paecilomyces formosus</i> (<i>ex-type strain of P. lecythidis</i>)	CBS 372.70	برزیل	<i>Lecythis unситata</i>	FJ389926	FJ389990	Samson et al. 2009
<i>Paecilomyces formosus</i> (<i>P. lecythidis</i>)	DTO 63F1	هلند	خلط انسان	GU968670	GU968686	Houbraken et al. 2010
<i>Paecilomyces formosus</i> (<i>P. lecythidis</i>)	DTO 63E3	هلند	انسان	GU968664	GU968678	Houbraken et al. 2010
<i>Paecilomyces formosus</i> (<i>P. lecythidis</i>)	DTO 49D6	انگلستان	مغز انسان	GU968655	GU968691	Houbraken et al. 2010
<i>Paecilomyces formosus</i> (<i>P. lecythidis</i>)	DTO 45I1	انگلستان	بیمارستان	GU968651	GU968684	Houbraken et al. 2010
<i>P. formosus</i> (<i>P. maximus</i>)	CBS 113247	تایلند	خاک	FJ389921	FJ390009	Samson et al. 2009
<i>Paecilomyces formosus</i> (<i>ex-type strain of P. maximus</i>)	CBS 371.70	برزیل	<i>Annona squamosa</i>	FJ389920	FJ389982	Samson et al. 2009
<i>Paecilomyces variotii</i>	CBS 370.70	کانادا	شیر	EU037050	EU037068	Samson et al. 2009
<i>Paecilomyces divaricatus</i>	CBS 110429	مکزیک	پکتین	FJ389932	FJ389991	Samson et al. 2009
<i>Paecilomyces divaricatus</i>	CBS 284.48	آمریکا	موسیلاژ	FJ389931	FJ389992	Samson et al. 2009
<i>Paecilomyces dactylethromorphus</i> (<i>P. saturatus</i>)	CBS 368.70	انگلستان	بیمارستان	FJ389948	FJ390001	Samson et al. 2009
<i>Paecilomyces dactylethromorphus</i> (<i>P. saturatus</i>)	CBS 251.55	برزیل	استیک اسید	FJ389951.1	FJ390002.1	Samson et al. 2009
<i>Thermoascus crustaceus</i>	CBS 181.67	آمریکا	<i>Parthenium argentatum</i>	FJ389925.1	FJ389981.1	Samson et al. 2009

طراحی آغازگر اختصاصی برای شناسایی *Paecilomyces formosus*

ردیف‌چینی داده‌های توالی هم‌تراز ناحیه ITS-rDNA گونه‌های جنس *Paecilomyces* امکان طراحی آغازگر اختصاصی برای گونه *P. formosus* را فراهم ساخت. یک جفت آغازگر شامل آغازگر رفت (PaMF=5'-3' CCCATCCGTGTTGAACTACACC) با موقعیت نوکلئوتیدی ۲۵-۴۶ و آغازگر برگشت (PaMR=5'-3' GGCCGACCCTACCAGAGCG) با موقعیت نوکلئوتیدی ۴۴۷-۴۶۵ که طول قطعه مورد انتظار تکثیر حدود ۴۴۱ جفت باز بود، طراحی شد. برای اطمینان از تکثیر قطعه مورد نظر در جدایه‌های *P. formosus* توسط جفت آغازگر طراحی شده، با استفاده از نرم‌افزار BioEdit یک فایل برآیند از داده‌های توالی این گونه ایجاد و قابلیت تکثیر از قطعه هدف، برای تمامی نمونه‌های این گونه تأیید گردید. ویژگی‌های جفت آغازگر شامل امکان تشکیل سنجاق سری، تشکیل پرایمر دایمر، درصد گوانین سیتوزین و دمای ذوب در جدول ۳ آورده شده است. ارزیابی الگوی بانندی تکثیر یافته طی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز روی ژل آگارز نشان داد که جفت آغازگر طراحی شده از کارایی لازم در شناسایی گونه هدف برخوردار می‌باشد. توضیح اینکه قطعه ۴۴۱ جفت بازی از DNA نمونه‌های تأیید شده گونه *P. formosus* بر اساس داده‌های توالی ناحیه ITS تکثیر گردید (شکل ۳).

جدول ۳. ویژگی‌های جفت آغازگر طراحی شده در این مطالعه جهت تشخیص گونه *Paecilomyces formosus*

آغازگر	جهت	درصد GC	ذوب	دمای (جفت) (°C)	طول (باز)	تشکیل دایمر	تشکیل ساختار ثانویه
PaMF	رفت	۵۴/۵۵	۶۱/۱۹	۶۱/۱۹	۲۲	وجود ندارد	وجود ندارد
PaMR	برگشت	۷۳/۶۸	۶۴/۶۵	۶۴/۶۵	۱۹	وجود ندارد	وجود ندارد

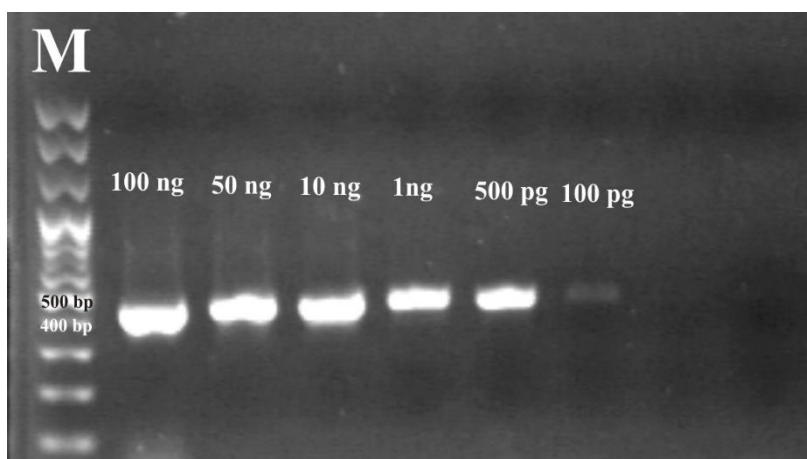


شکل ۳. تصویر باندهای حاصل از تکثیر ناحیه ITS با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده PaMF/PaMR و روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز. لاین M نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی، بقیه لاین‌ها جدایه‌های *P. formosus*

راست‌آزمایی و ارزیابی حساسیت

نتایج حاصل از راست‌آزمایی آغازگرهای طراحی شده نشان داد که جفت آغازگر طراحی شده به‌طور اختصاصی قطعه ۴۴۱ جفت بازی را از نمونه‌های گونه *P. formosus* تکثیر می‌نماید و تکثیری از DNA دیگر گونه‌های بیمارگر جداسازی شده از درختان بلوط که در این بررسی مورد مطالعه قرار گرفت صورت نگرفت. حساسیت جفت آغازگر طراحی شده نیز با غلظت‌های مختلفی از DNA ژنومی *P. formosus* در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تودرتو بررسی شد. در مرحله اول، واکنش زنجیره‌ای

پلیمرز استاندارد با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده PaMF/PaMR صورت گرفت. آنالیز محصول واکنش زنجیره ای پلیمرز نشان داد که حد پایین برای ردیابی *P. formosus* ۵۰ نانوگرم در مخلوط ۲۵ میکرولیتری از واکنش زنجیره ای پلیمرز بود. برای افزایش حساسیت واکنش زنجیره ای پلیمرز تودرتو با استفاده از آغازگرهای عمومی ITS1/ITS4 و آغازگرهای طراحی شده PaMF/PaMR استفاده شد. این روش باعث افزایش حساسیت و ردیابی *P. formosus* تا حدود ۱۰۰ پیکوگرم شد. بنابراین واکنش زنجیره ای پلیمرز تودرتو حد پایین ردیابی DNA ژنومی را از ۵۰ نانوگرم به ۱۰۰ پیکوگرم افزایش داد (شکل ۴).



شکل ۴. آزمون حساسیت با آغازگرهای اختصاصی طراحی شده PaMF/PaMR با استفاده از غلظت های مختلف DNA گونه *Paecilomyces formosus*: M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی.

بحث

در این پژوهش از اکثر درختان جنگلی در دو استان ایلام و کرمانشاه که دارای علائم سرخشکیدگی بودند، قارچ *Paecilomyces* جداسازی شد. در آزمون بیماریزایی روی شاخه های بریده درختان جنگلی، تمام جدایه ها شانکر ایجاد کردند. جدایه های منتخب از این گونه پس از گذشت دو ماه روی شاخه های سالم تعدادی از درختان جنگلی مایه زنی شده نیز علائم ایجاد کردند. شناسایی دقیق این بیمارگر در اتخاذ استراتژی صحیح مدیریتی در جنگل از اهمیت ویژه ای برخوردار است. در ایران، برای اولین بار گونه *P. variotii* به عنوان عامل سرخشکیدگی درختان پسته از کرمان گزارش شد (Aminaei & Ershad, 1989). شناسایی بیمارگرها در ایران غالباً بر اساس ویژگی های ریخت شناختی بوده است که به دلیل همپوشانی در این خصوصیات، وجود گونه های نهفته و تحت تاثیر محیط بودن این صفات، از دقت کافی برای شناسایی گونه های نزدیک به هم برخوردار نیستند. حیدریان با استفاده از خصوصیات ریخت شناختی، فیزیولوژیکی و فیلوژنی مولکولی مشخص نمود که عامل بیماری سرخشکیدگی درختان پسته *P. formosus* است (Heidarian et al., 2015). بنابراین استفاده از ویژگی های مورفولوژیکی برای شناسایی گونه هایی که شباهت مورفولوژیکی زیادی دارند ممکن است منجر به شناسایی اشتباه بیمارگر شود (Jimenez-Fernandez et al., 2011; Saeedi & Jamali, 2021; Samson et al., 2009). ضمن اینکه تعدادی از قارچ ها از جمله *P. variotii* و *P. formosus* علاوه بر گیاهان، از نظر پزشکی نیز حائز اهمیت هستند و باعث بیماری های مختلفی در انسان می شوند (Houbraken et al., 2010). بنابراین استفاده از روش های مولکولی بر پایه دی.ان.ای. ژنومی، روشی قابل اعتمادتر برای شناسایی آنهاست. هدف از این پژوهش طراحی آغازگرهای اختصاصی جهت شناسایی دقیق و سریع *P. formosus* عامل بیماری سرخشکیدگی درختان در جنگل های زاگرس در دو استان ایلام و کرمانشاه با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمرز و بررسی کارایی این آغازگرها در تکثیر DNA گونه مورد نظر بود. در این بررسی ابتدا هویت تمام

جدایه های بدست آمده از درختان جنگلی بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و توالی ناحیه آی. تی. اس. و ژن بتاتوبولین تایید شد. این نواحی ژنومی برای تفکیک گونه های زیادی از قارچ ها مورد استفاده قرار گرفته اند (Sabernasab et al., 2019; Torabi et al., 2019). مقایسه داده های توالی ناحیه ITS-rDNA با سایر گونه های این جنس، طراحی یک جفت آغازگر اختصاصی (PaMF/PaMR) برای تشخیص اختصاصی این گونه را فراهم ساخت. تا کنون آغازگر اختصاصی برای این گونه طراحی نشده بود. نتایج حاصل از راست آزمایی جفت آغازگر اختصاصی طراحی شده نشان داد که این آغازگر به طور اختصاصی قطعه ۴۴۱ جفت بازی را برای تمام جدایه های مورد مطالعه تکثیر می نماید. علاوه بر جدایه های *P. formosus*، جفت آغازگر روی گونه های قارچی دیگر بخصوص *P. variotii* مورد آزمایش قرار گرفت و اختصاصی بودن این جفت آغازگر تایید شد. در ایران قارچ *P. formosus* در سال ۲۰۱۵ به عنوان عامل سرخشکیدگی پسته گزارش شد. همچنین بر اساس ویژگی های مولکولی، *P. formosus* عامل اصلی سرخشکیدگی درختان بادام (*Amygdalus scoparia*)، پسته وحشی (*Pistacia atlantica*)، زالزالک (*Crataegus pontica*)، زیتون تلخ (*Azadirachta indica*) و بلوط ایرانی در ایران گزارش شده است (Mohammadi & Sharifi, 2016; Sabernasab et al., 2019; Mirabdollahi Shamsi et al., 2019; Ghasemi-Sardareh & Mohammadi, 2020). علاوه بر درختان مذکور این بیمارگر از درختان بنه (*Pistacia mutica*) انار (*Punica granatum*)، بادام اهلی (*Prunus amygdalus*)، ابریشم مصری (*Caesalpinia gilliesii*)، خرزهره (*Tamarix aphylla*)، درخت گز (*Nerium oleander*)، درختچه شوره گز (*Tamarix hispida*)، درخت تاغ (*Haloxylon sp.*)، درخت سیب (*Malus domestica*)، درخت قره-تاج (*Anagyris foetida*)، بید (*Salix acmophylla*) و سیاه تلو (*Paliurus spina-christi* Mill) از استانهای کرمان، سمنان، خراسان جنوبی، خراسان رضوی، اصفهان، مرکزی، قزوین، تهران، کرمانشاه و یزد گزارش شده است (Heidarian et al., 2018; Azizi et al. 2020; Rostami & Jamali, 2022, 2023; Jamali & Abbasi, 2022). نیز به اثبات رسیده است. در این تحقیق با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمرز تودرتو، گونه های گیاهی کرف، پلت، بلوط لبنانی (*Quercus libani*)، کیکم (کرکو) (*Acer monspessulanum*)، کنار (*Ziziphus spina-christi*)، انجیر (*Ficus carica*)، تنگس (*Amygdalus lycioides*)، گز (*Tamarix ramosissima*)، آلبالوی وحشی (*Cerasus microcarpa*) و گیلاس وحشی (*Cerasus avium*) برای اولین بار به عنوان میزبان های جدید برای این گونه گزارش می شوند.

منابع

- امینایی، محمد مهدی و ارشاد، جعفر (۱۳۶۸). بیماری سرخشکیدگی پسته در استان کرمان. نهمین کنگره گیاهپزشکی، مشهد، ایران. ص ۸۲.
- قلیچی، مریم؛ محمدی، امیرحسین؛ حقدل، معصومه و اسکندری، محمد (۱۳۹۳). بررسی بیماریزایی *Paecilomyces variotii*. *Stemphylium sp.* و *Natrassia mangifera* و تعیین بهینه درجه حرارت برای هر گونه. اولین کنگره پسته، کرمان، ایران. ص ۱۱۲.
- حیدریان، رضا؛ فتوحی فر، خلیل؛ نیکخواه، محمدجوان، دبت، آلفونس و آن، دوور (۱۳۹۴). فیلوژنی جنس پسیلومیسس، عامل سرخشکیدگی درختان پسته در ایران. دومین کنگره قارچ شناسی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. ص ۳۰.
- جمالی، صمد و بنی هاشیمی، ضیالالدین (۱۳۹۰). اولین گزارش از *Byssoschlamys spectabilis* بعنوان فرم جنسی *Paecilomyces variotii* از ایران. رستنیها، (۲) ۱۲، ۱۹۱-۱۹۲.

REFERENCES

- Aminaei, M.M. & Ershad, D. (1989). *Pistachio dieback disease in Kerman province*. P. 82 in Proceedings of 9th Iranian Plant Protection Congress, September 8-13, Mashhad, Iran (In Persian).
- Azizi, R., Ghosta, Y. & Ahmadpour, A. (2020). New fungal canker pathogens of apple trees in

- Iran. *Journal of Crop Protection*, 9(4), 669-681.
- Barker, A.P., Horan, J.L. Slechta, E.S. Alexander, B.D. & Hanson, K.E. (2014). Complexities associated with the molecular and proteomic identification of *Paecilomyces* species in the clinical mycology laboratory. *Medical Mycology*, 52(5), 537-45.
- Bauch, J., v. Hundt, H., Weissmann, G., Lange, W., & Kubel, H. (1991). On the causes of yellow discolorations of oak heartwood (*Quercus Sect. Robur*) during drying. *Holzforsch*, 45, 79-85.
- Butin, H. (1995). *Tree diseases and disorders. Causes, biology and control in forest and amenity trees*. Oxford University Press, Oxford. 252 p.
- Ghasemi-Sardareh, R., & Mohammadi, H. (2020). Characterization and pathogenicity of fungal trunk pathogens associated with declining of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) trees in Iran. *Journal of Plant Pathology*, 102, 1159-1171.
- Ghelichi, M., Mohammadi, A., Haghdel, M., & Eskandari, A. (2012). Distribution of pistachio die-back in Khorasan-Razavi province and application of some fungicides for the disease control. *Journal of Nuts*, 3(02, 01), 23-28.
- Ghelichi, M, Mohammadi, A.H., Haghdel, M. & Eskandari, A. (2014). *Investigation of pathogenicity of Paecilomyces variotii, Stemphylium sp. and Natrassia mangifera and optimal growth temperature associated with each species*. P. 112 in Proceedings of the 1st Congress of Pistachio, August 28-30, Kerman, Iran (In Persian).
- Heidarian, R., Fotouhifar, K. Mohammadi, A., Javan-Nikkhah, M., Debets F. & Aanen, D. (2015). *Phylogeny of genus Paecilomyces sp., the causal agent of pistachio die-back disease in Iran*. P. 30 in Proceedings of 2nd Iranian Mycological Congress, August 23-25, University of Tehran, Karaj, Iran (In Persian).
- Heidarian, R., Fotouhifar, K. B., Debets, A. J., & Aanen, D. K. (2018). Phylogeny of *Paecilomyces*, the causal agent of pistachio and some other trees dieback disease in Iran. *PloS one*, 13(7), e0200794.
- Houbraken J, Verweij, P.E. Rijs, A.J., Borman, A.M. & Samson, R.A. (2010). Identification of *Paecilomyces variotii* in clinical samples and settings. *Journal of Clinical Microbiology*, 48, 2754-2761.
- Inglis, P.W. & Tigano, M.S. (2006). Identification and taxonomy of some entomopathogenic *Paecilomyces* spp. (Ascomycota) isolates using rDNA-ITS sequences. *Genetic and Molecular Biology*, 29(1), 132-6.
- Jamali, S. & Banihashemi, Z. (2011). First report of *Byssoschlamys spectabilis* as a teleomorph of *Paecilomyces variotii* from Iran. *Rostaniha*, 12(2), 191-192. (In Persian).
- Jamali, S. & Banihashemi, Z. (2013). First report of *Paecilomyces marquandii* from Iran. *Rostaniha*, 13(2), 207-10. (In Persian).
- Jamali, S. (2020). First report of *Paraconiothyrium fuckelii* (Didymosphaeriaceae, Pleosporales), causing stem canker in *Rosa hybrida*, from Iran. *Czech Mycology*, 72, 71-82.
- Jamali, S. & Abbasi, S. (2022). First report of stinking bean trefoil (*Anagyris foetida* L.) dieback disease caused by *Paecilomyces formosus* in Iran. *Journal of Plant Pathology*, 105(1), 371-371.
- Jiménez-Fernández, D., Navas-Cortés, J. A., Montes-Borrego, M., Jiménez-Díaz, R. M., & Landa, B. B. (2011). Molecular and pathogenic characterization of *Fusarium redolens*, a new causal agent of Fusarium yellows in chickpea. *Plant Disease*, 95(7), 860-870.
- Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. (2016). MEGA7, molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, 33(7), 1870-1874.
- Lekgari, L. (2010). *Extraction of nucleic acids (DNA and RNA) from plant tissues*. Available at, <https://www.biotecharticles.com/Biotech-Research-Article/Extraction-of-Nucleic-Acids-DNA-and-RNA-From-Plant-Tissues-329.html> . Accessed March 15, 2019.
- Martin-Sanchez, P. M., Gorbushina, A. A., Kunte, H. J., & Toepel, J. (2016). A novel qPCR protocol for the specific detection and quantification of the fuel-deteriorating fungus *Hormoconis resinae*. *Biofouling*, 32(6), 635-644.
- Mirabdollahi Shamsi, M., Akbarinia, M., Mirabolfathy, M., Manzari, S., & Ahmadikhah, A. (2019).

- Dieback and decline of wild almond (*Amygdalus scoparia* Spach) in the Harat protected forest of Yazd Province, Iran. *Forest Pathology*, 49(5), e12538.
- Mohammadi, H., & Sharifi, S. (2016). Association of Botryosphaeriaceae and *Phaeoacremonium* species with insect-damaged quince shoots. *Journal of Plant Pathology*, 35-42.
- Mozaffari, V., Malakuti, M., Khaldbarin, B., & Bybordi, M. (2005). Review several agents of pistachio dieback and control with optimal nutrition. *Journal of Soil Science*, 19(2), 154-164.
- Rostami, T., & Jamali, S. (2022). First report of dieback of *Salix acmophylla* caused by *Paecilomyces formosus* in Iran. *Plant Disease*, 106(9), 2518.
- Rostami, T., & Jamali, S. (2023). Characterization, pathogenicity and host range studies of *Paecilomyces formosus* associated with dieback of Christ's thorn trees (*Paliurus spina-christi* Mill.) in Iran. *Forest Pathology*, e12790.
- Saedi, S., & Jamali, S. (2021). Molecular characterization and distribution of *Fusarium* isolates from uncultivated soils and chickpea plants in Iran with special reference to *Fusarium redolens*. *Journal of Plant Pathology*, 103, 167-183.
- Sabernasab, M., Jamali, S., Marefat, A., & Abbasi, S. (2019). Molecular and pathogenic characteristics of *Paecilomyces formosus*, a new causal agent of oak tree dieback in Iran. *Forest Science*, 65(6), 743-750.
- Sabernasab, M., Jamali, S., Marefat, A., & Abbasi, S. (2020). Pathogenicity evaluation of pathogenic fungi causing of oak tree dieback in Kermanshah province. *Iranian Journal of Plant Protection Science*, 51(1), 79-92.
- Samson, R. A., Houbraken, J., Varga, J., & Frisvad, J. C. (2009). Polyphasic taxonomy of the heat resistant ascomycete genus *Byssochlamys* and its *Paecilomyces* anamorphs. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 22(1), 14-27.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W, improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673-4680.
- Torabi, A., Bonjar, G.H. Abdolshahi, R, Pournamdari, M., Saadoun, I. & Barka, E.A. (2019). Biological control of *Paecilomyces formosus*, the causal agent of dieback and canker diseases of pistachio by two strains of *Streptomyces misionensis*. *Biological Control*, 137,104029.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*, 18, 315-322.