

گونه‌های Botryosphaetiaceae همراه با سرخشکیدگی و شانکر دوده‌ای درختچه‌های خرزهره (*Nerium oleander L.*) در جزیره کیش

سمیه یگانه^۱، حمید محمدی^۱، مصیب شیرانی^۲، صالح پناهنده^{۱*}

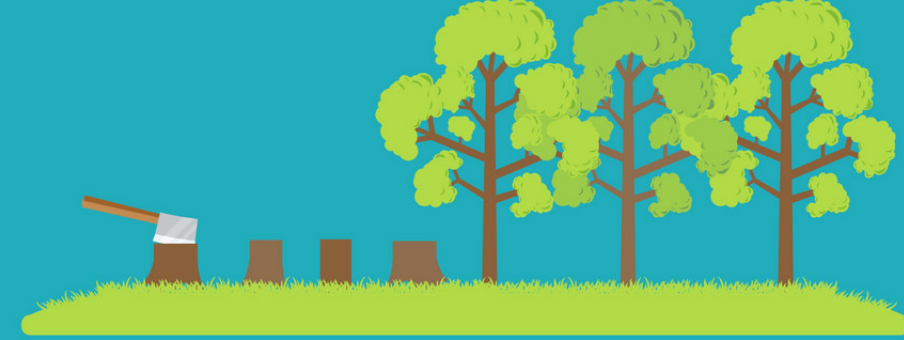
Email; hmohammadi@uk.ac.ir

۱ گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.
۲ سازمان منطقه آزاد کیش، معاونت عمرانی اداره محیط زیست، جزیره کیش، ایران.

چکیده



Stop Deforestation



Abstract

خرزهره (*Nerium oleander L.*) درختچه یا درختی کوچک و همیشه سبز از خانواده Apocynaceae است. در شهریور ماه ۱۳۹۵، یک زوال غیرمعمول روی گیاهان خرزهره در فضای سبز جزیره کیش مشاهده شد. نشانه‌های بیماری شامل جدا شدن پوست و وجود شانکرهای دوده‌ای روی شاخه‌ها، زردی، برگ‌ریزی، سرخشکیدگی و مرگ درختان بود. به منظور شناسایی قارچ‌های همراه با نشانه‌های بیماری، از شاخه‌های درختان بیمار نمونه برداری گردید. عمل جداسازی قارچ‌ها از بافت تغییر رنگ یافته چوب روی محیط کشت عصاره سیب زمینی-دکستروز-آگار (PDA) انجام شد. جداسازی قارچ‌ها از شاخه‌هایی که دارای نشانه‌های شانکر دوده‌ای بودند به طور مستقیم و انتقال توده اسپورهای تشکیل شده در زیر پوست شاخه‌ها به محیط کشت PDA انجام گردید. تست‌های پتری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری و پرگنه‌های رشد کرده از قطعات کشت داده شده به محیط کشت جدید PDA منتقل شدند. در این مطالعه ۵۷ جدایه قارچی شبیه به اعضای خانواده Botryosphaeriaceae از خرزهره جداسازی گردید. جدایه‌های منتخب (۱۵ جدایه) با استفاده از روش نوک ریسه کردن خالص و به منظور تحریک به تولید پیکنیدیوم روی محیط کشت آب-آگار حاوی برگ‌های سترون شده کاج قرار داده شدند. بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی و مقایسه توالی نواحی ژنی ITS و *tef1a*، جدایه‌های مورد مطالعه به‌عنوان *Diplodia sapinea* (هفت جدایه) و *Neoscytalidium dimidiatum* (هشت جدایه) شناسایی شدند. این مطالعه اولین گزارش از *D. sapinea* و *N. dimidiatum* همراه با شانکر دوده‌ای و سرخشکیدگی درختان خرزهره در دنیا می‌باشد.

Oleander (*Nerium oleander L.*) is an evergreen shrub or small tree in the family Apocynaceae. This species, commonly called oleander is cultivated as an ornamental plant in landscapes, parks, and along roadsides. In September 2016, an unusual decline was observed on oleander plants cultivated in landscapes of Kish Island (Hormozgan province). Disease symptoms consisted of peeled off bark and sooty cankers on branches, chlorosis and necrosis of leaves, defoliation and branch dieback and eventually tree death. Wood samples were collected from branches of affected trees to determine fungal species associated with disease symptoms. Fungal isolations were made from discolored wood tissues on potato dextrose agar (PDA). Isolations of fungi from branches showing typical sooty cankers were made directly from masses of dry black spores under the bark on PDA. Plates were incubated at 25 C and colonies emerging from the wood segments were transferred to fresh PDA media. In this study 57 fungal isolates resembling of the family Botryosphaeriaceae were recovered from oleander plants. Representative isolates (15 isolates) were purified using hyphal-tipping method and induced to produce pycnidia by plating them on %2 water agar containing sterilised pine needles. Based on morphological characteristics and DNA sequence comparisons of ITS and *tef1a* gene regions, isolates were identified as *Diplodia sapinea* (7 isolates) and *Neoscytalidium dimidiatum* (8 isolates). This study is the first report of *D. sapinea* and *N. dimidiatum* associated with sooty canker and dieback of oleander trees worldwide.

مواد و روش‌ها



با بررسی‌هایی که در شهریور ماه ۱۳۹۵ روی بیماریه‌های شاخه و تنه درختان زینتی در فضای سبز جزیره کیش (استان هرمزگان) انجام شده یک زوال غیرمعمول روی گیاهان خرزهره مشاهده شد. نشانه‌های بیماری شامل جدا شدن پوست از شاخه‌ها و وجود شانکرهای دوده‌ای روی شاخه‌ها، زرد و قهوه‌ای شدن برگ‌ها، برگ‌ریزی و سرخشکیدگی شاخه‌ها بود که در نهایت باعث مرگ درختان می‌شد (شکل ۱). جهت جداسازی قارچ‌های همراه با این نوع نشانه‌ها، از شاخه‌های درختان بیمار نمونه برداری و به آزمایشگاه منتقل شدند. عمل جداسازی از بافت آلوده چوب و توده اسپورهای زیر پوست شاخه‌ها انجام شد. برای جداسازی قارچ‌ها از بافت آلوده چوب، ابتدا قطعاتی کوچک از بافت‌های تغییر رنگ داده بافت چوب شاخه‌ها بریده شد و سپس به مدت یک دقیقه در هیپوکلریت سدیم نیم درصد ضدعفونی و سه مرتبه با آب سترون شستشو داده شدند. قطعات ضدعفونی شده روی محیط کشت عصاره سیب زمینی-دکستروز-آگار (PDA) حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر از سولفات استرپتومایسین کشت و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و تاریکی نگهداری شدند. علاوه بر این روش به کمک یک سوزن سترون شده کمی از توده اسپورهای تولید شده در زیر پوست شاخه‌های آلوده نیز به طور مستقیم به محیط کشت PDA منتقل شدند. پرگنه‌های حاوی کشت داده شده چوب و با توده اسپورها رشد کردند به محیط کشت جدید PDA منتقل و به روش نوک ریسه کردن خالص سازی شدند. جدایه‌های بدست آمده ابتدا بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی مورد مطالعه قرار گرفتند. برای تولید پیکنیدیوم و اسپورزایی جدایه‌های مورد نظر به محیط کشت آب-آگار دو درصد حاوی برگ‌های سترون شده کاج منتقل و در شرایط نوری مداوم قرار گرفتند. بعد از اسپورزایی ویژگی‌های مربوط به اسپورها مورد بررسی قرار گرفت (۶). در مرحله بعد کل DNA از توده میسلیومی جدایه‌های انتخاب شده استخراج و دو ناحیه ژنومی یعنی ITS و *tef1a* به ترتیب با آغازگرهای ITS۱/ITS۴ و EF۱/EF۲ (۷) و EF۱/EF۲ (۸) و به روش PCR تکثیر و تعیین ترادف گردید تا شناسایی ریخت‌شناختی جدایه‌ها مورد تایید قرار گیرد. ترادف‌های بدست آمده با نرم افزارهای موجود تصحیح و سپس با گونه‌های موجود در بانک ژن مقایسه شدند.

مقدمه

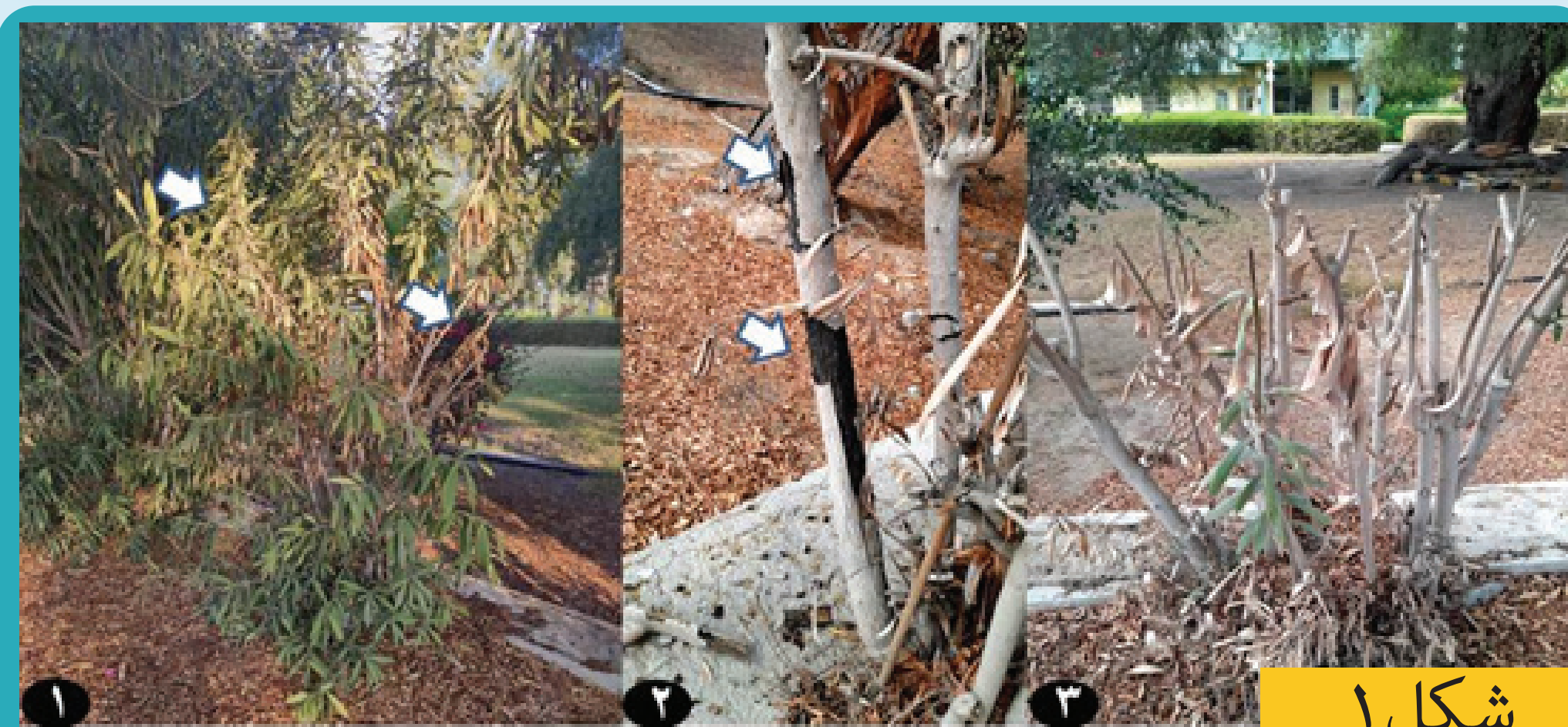


خرزهره (*Nerium oleander L.*) یک درختچه یا درخت کوچک همیشه سبز از خانواده Apocynaceae است که به عنوان یک گیاه زینتی در فضای سبز، پارک‌ها و همچنین در اطراف راه‌های ورودی و خروجی شهرها مورد استفاده قرار می‌گیرد. خرزهره در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری به خوبی رشد می‌کند و به شرایط نامساعد از جمله خشکی مقاوم است و حتی دماهای پایین‌تر از حد معمول را نیز تحمل می‌کند. بیماری‌های مختلفی ممکن است گیاه خرزهره را تحت تاثیر قرار دهند که می‌توان به بیماری آنتراکنوز در اثر *Colletotrichum acutatum* (۱)، لکه‌برگی در اثر *Septoria oleandricola* (۲) و لکه‌برگی و سرخشکیدگی در اثر *Boeremia exigua var heteromorpha* (۳) اشاره نمود. اخیراً با مطالعه‌ای که روی قارچ‌های درون‌زی درختچه خرزهره انجام شده است آرایه‌های مختلفی از قارچ‌ها از جمله *Lasiodiplodia theobromae* و *Fusarium semitectum* نیز از گل‌ها و ساقه‌های خرزهره جداسازی و گزارش شده است (۴). در ایران نیز قارچی مانند *Fusarium brachygibbosum* از درختان خرزهره با نشانه‌های لکه‌برگی جداسازی و گزارش شده است (۵). با توجه به اینکه تاکنون مطالعه مشخصی روی بیماریه‌های شاخه و تنه درختان خرزهره در فضای سبز شهری انجام نشده است این بررسی با هدف جداسازی و شناسایی عوامل قارچی همراه با شانکر دوده‌ای و سرخشکیدگی این گیاه در جزیره کیش انجام گردید.

نتایج و بحث

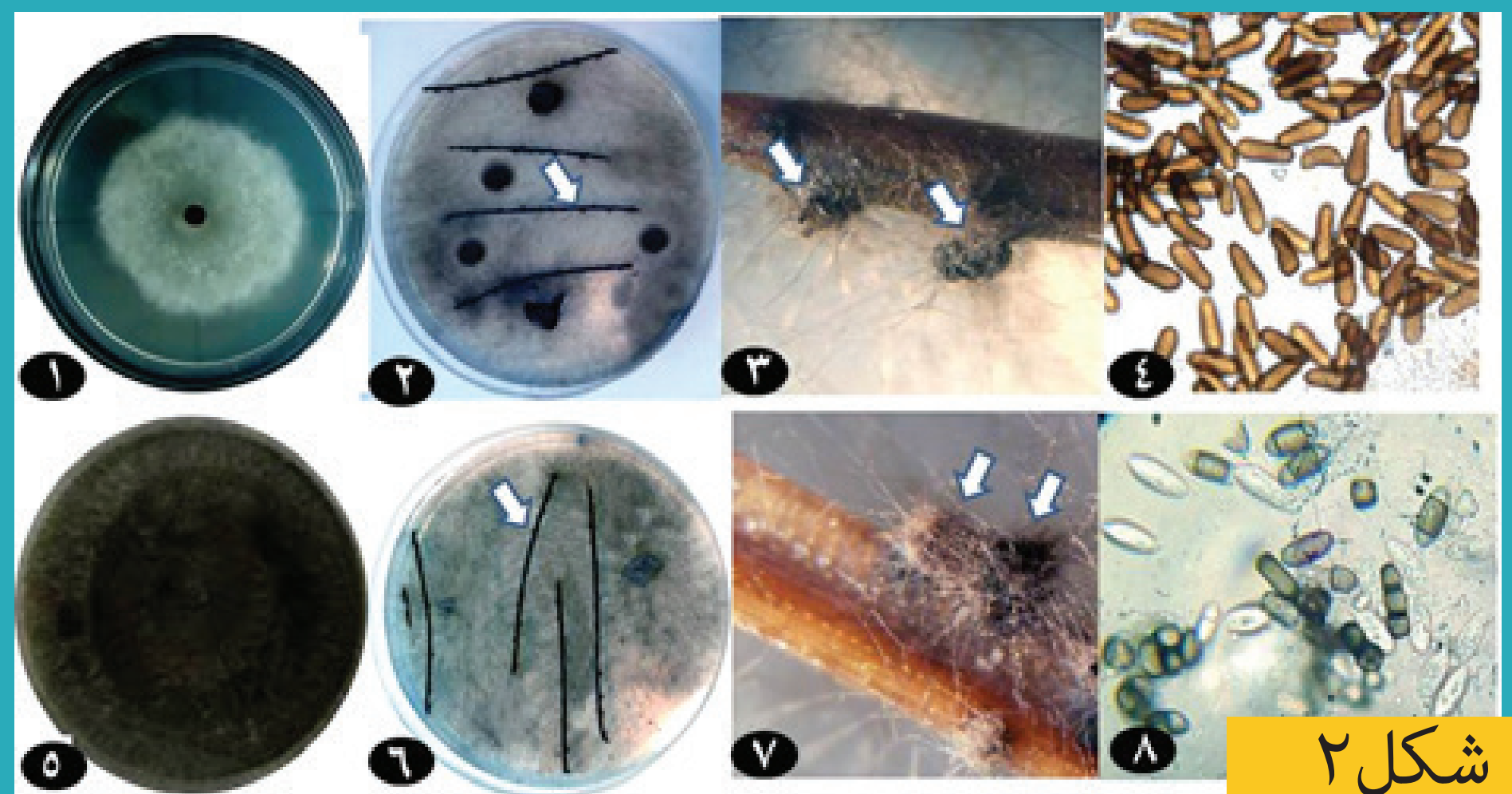


در این مطالعه ۵۷ جدایه قارچی از شاخه درختان خرزهره با نشانه‌های بیماری جداسازی گردید. جدایه‌ها از نظر ظاهری و رشد روی محیط کشت به اعضای خانواده Botryosphaeriaceae شباهت داشتند، یعنی سرعت رشد نسبتاً بالایی داشتند و در ابتدا دارای پرگنه‌های سفید رنگ بودند ولی با مرور زمان از بخش‌های میانی به حاشیه‌ها تغییر رنگی از سفید به خاکستری تا سیاه‌رنگ مشاهده شد. بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی و به ویژه خصوصیت‌های اسپورها، جدایه‌ها ابتدا در دو گروه *Diplodia sp.* و *Neoscytalidium sp.* قرار گرفتند. نتایج حاصل از بلاست ترادف نواحی ژنومی تکثیر شده نشان داد که جدایه‌های بدست آمده متعلق به دو گونه *Diplodia sapinea* و *Neoscytalidium dimidiatum* می‌باشند که با گونه‌های معتبر موجود در بانک ژن ۹۹ تا ۱۰۰ درصد همولوژی نشان دادند (شکل ۲). این مطالعه نشان داد که حداقل دو گونه از اعضای خانواده Botryosphaeriaceae یعنی *D. sapinea* و *N. dimidiatum* از شاخه درختان خرزهره با نشانه‌های بیماری قابل جداسازی می‌باشند. اعضای این خانواده به عنوان بیمارگرهای شاخه و تنه در درختان مختلف شناخته می‌شوند که از دامنه میزبانی وسیع و گسترده جغرافیایی پهناوری برخوردار می‌باشند (۶). بررسی منابع نشان می‌دهد که گونه‌های دیگر از خانواده Botryosphaeriaceae یعنی *Lasiodiplodia theobromae* قبلاً به عنوان یک قارچ درون‌زی از گل‌های خرزهره جداسازی و گزارش شده است (۴). بنابراین این مطالعه اولین گزارش دو گونه *D. sapinea* و *N. dimidiatum* همراه با سرخشکیدگی و شانکر دوده‌ای در درختان خرزهره در دنیا می‌باشد.



شکل ۱

نشانه‌های بیماری روی درختچه‌های خرزهره در فضای سبز جزیره کیش. ۱- زردی و سرخشکیدگی، ۲- جدا شدن پوست از شاخه‌ها و وجود توده سیاه‌رنگ اسپورها در زیر پوست، ۳- زوال کامل و مرگ درختچه.



شکل ۲

ویژگی‌های محیط کشت و میکروسکوپی در قارچ‌های *Diplodia sapinea* (۱ تا ۴) و *Neoscytalidium dimidiatum* (۵ تا ۸).
۱ و ۵: رشد پرگنه‌های روی محیط کشت PDA، ۲ و ۶: تولید اندام‌های باردهی (پیکنیدیوم‌ها) روی برگ‌های کاج در محیط کشت آب-آگار دو درصد، ۳ و ۷: تشکیل پیکنیدیوم‌ها روی برگ‌های سترون شده کاج و ۴ و ۸: کینیدیوم‌ها.

فهرست منابع



- Lahoz, E., Caiazza, R., Carella, A., Porrone, F. (2009). *Colletotrichum acutatum* Simmonds as agent of anthracnose and stem blight on *Nerium oleander* in Italy. Floric Ornamental Biotechnol 62-66 :3.
- Hüseyin, E. Selcuk, F. (2002). *Septoria oleandricola* sp. nov., a new species from *Nerium oleander* in Turkey. Mycological Progress :2(1) 145-143.
- Henricot, B. (2012). Occurrence of *Boeremia exigua* var *heteromorpha* on *Nerium oleander* in the United Kingdom. New Disease Reports 26 20 :1).
- Gioia, L., d'Errico, G., Sinno, M., Ranese, M., Lois Woo, N., Vinale, F. (2020). A Survey of endophytic fungi associated with high-risk plants imported for ornamental purposes. Agriculture 643, 10; doi:10.3390/agriculture10120643.
- Mirhosseini, H.A., Babaeizad, V., Hashemi, L. (2014). first report of *Fusarium brachygibbosum* causing leaf spot on oleander in Iran. Journal of Plant Pathology, 431, (2) 96.
- Phillips, A.J.L., Alves, A., Abdollahzadeh, J., Slippers, B., Wingfield, M.J., Groenewald, J. Z., Crous, P.W. (2013). The Botryosphaeriaceae: Genera and species known from culture. Studies in Mycology 167-51 :76.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S.J., W.T., Taylor, J.L. (1990). Amplified and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenies. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, & T. J. White (Eds.), PCR protocols: A guide to methods and applications (pp. 322-315). San Diego: Academic
- Carbone, I., Kohn, L.M. (1999). A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. Mycologia 91 556-553.