DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijwpr.2014.4929

فصلنامهٔ علمی – پژوهشی تحقیقات علوم چوب و کاغذ ایران
جلد ۲۹، شمارهٔ ۱، صفحهٔ ٥٦-٤٤، (۱۳۹۳)

شناسایی قارچ‌های عامل باختگی در چوب‌های وارداتی نوئل

صدیقه دادای قندی*[۱]، اصغر طارمیان[۲]، خلیل بردی فتوحی‌فر[۳] و علی‌اکبر عنایتی[٤]

۱*- نویسنده مسئول، کارشناس‌ارشد، علوم و صنایع چوب و کاغذ، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران
پست‌الکترونیک: daday@ut.ac.ir
۲- دانشیار گروه علوم و صنایع چوب و کاغذ، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران
۳- استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، دانشگاه تهران
٤- استاد گروه علوم و صنایع چوب و کاغذ، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۹۱ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۲

چکیده

چوب‌های وارداتی نوئل (*Picea abies* L.)، از کشور روسیه کاربردهای گوناگونی دارند. ولی به علت وجود عوامل قارچی در این چوب‌ها، مشکلاتی مانند محدودیت در استفاده از آنها وجود داشته، همچنین برخی از عوامل قارچی همراه چوب‌ها قادر به بیماری‌زایی در انسان نیز می‌باشند. برای بررسی این موضوع از چوب‌های وارد شده از روسیه، در شهر اسالم نمونه‌برداری شد. جداسازی و تهیه پرگنه‌های خالص قارچ‌های موجود بر روی قطعات چوب با استفاده از سوسپانسیون آسکوسپور و یا توده کنیدی و به روش تک اسپور انجام شد. سپس ویژگی‌های ریخت‌شناختی قارچ‌های رشد کرده روی قطعات چوب و محیط کشت با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی گردید. براساس نتایج، در مرحله جنسی قارچ *Ophiostoma piceae* و در مراحل غیرجنسی *Sporothrix* sp. و *Graphium* spp. مشاهده شدند. در محیط کشت دو نوع قارچ *Ophiostoma* sp. با مرحله غیرجنسی *Sporothrix* sp. و قارچ *Ceratocystis* sp. با مرحله غیرجنسی *Chalara* spp. شناسایی شدند. نتایج بررسی میکروسکوپیکی بافت چوب نشان داد که در مقاطع عرضی و مقاطع شعاعی به‌ترتیب ریسه‌های قارچی در محل کانال‌های رزینی، پارانشیم‌های عرضی (اشعه)، تراکئیدها، ناحیه کراس‌فیلد و پارانشیم‌های اشعه نفوذ کرده‌اند.

واژه‌های کلیدی: چوب‌های وارداتی، قارچ عامل باختگی، نفوذ ریسه قارچ، مطالعه میکروسکوپی.

مقدمه

قارچ‌های عامل کپک‌زدگی چوب و باختگی آن، دو نوع مهم از قارچ‌های صدمه زننده به چوب هستند. این قارچ‌ها معمولاً موجب تغییر رنگ چوب می‌شوند و دارای میسلیوم قهوه‌ای، سیاه و یا سبز رنگ بوده و می‌توانند ظاهر سیاه، سفید و یا آبی رنگ در چوب ایجاد کنند (Fengel & Wegener, 1984; Brisson, 1996). این رنگ‌ها ناشی از ملانین خالص و یا ملانین مرتبط با کربوهیدرات‌ها و اجزای پروتئینی روی گرانول‌های کوچک سطح بیرونی دیوار قارچ و محیط اطراف سلول‌هاست (Fengel, 1988; Wheeler, 1983; Eagen *et al.*, 1997; Zink &). معمولاً اغلب قارچ-

های تغییر دهنده رنگ چوب شبیه کپک‌های تغییر دهنده رنگ که معمولاً در سطح چوب رشد می‌کنند، نیستند و با برس زدن نمی‌توان آنها را از بین برد (Lu, Ren & 2006; Byrne, 2003). این قارچ‌ها عناصر اصلی چوب را مورد حمله قرار نمی‌دهند، بلکه منبع اصلی تغذیه آنها از کربوهیدرات‌ها، قندهای ساده و نشاسته موجود در سلول‌های پارانشیمی است. بنابراین تأثیر زیانباری بر خواص مقاومتی چوب نمی‌گذارند (Blanchette *et al.*, 1992). تحقیقات زیادی روی قارچ‌های عامل تغییر رنگ چوب از سال ۱۹۵۰ صورت گرفته که در این تحقیقات حدود ۱۱۰ گونه فقط از جنس‌های *Ceratocystis* و *Ophiostoma* منتشر شده و همچنان گونه‌های جدید از این قارچ‌ها در حال کشف است. این نوع قارچ‌ها عمدتاً متعلق به شاخه آسکومیکوتا بوده و در رطوبت چوب بالای ۲۵٪ و دمای بین چهار تا ۳۰ درجه سلسیوس، با توجه به نوع گونه گسترش می‌یابند (Kipkosgei, Kaarik, 1980; 2009; Tarmian & Karimi, 2010). عموماً درختان سوزنی‌برگ حساسیت بیشتری نسبت به قارچ‌های تغییر رنگ دارند. قارچ‌های عامل تغییر رنگ در درختان سوزنی‌برگ به‌ویژه در کاج، نوئل، نراد و لاریکس، در درختان پهن‌برگ مثل راش و توس فعالیت می‌کنند (Parsapajouh *et al.*, 2007). تأثیر اقتصادی عمده این قارچ‌ها به علت تغییر ایجاد شده در ظاهر و جلوه چوب است که می‌تواند ارزش چوب خام را کاهش دهد. چوب‌هایی که در این شرایط مورد حمله قارچ-های عامل تغییر رنگ و کپک قرار می‌گیرند، زمینه را برای حمله قارچ‌های عامل پوسیدگی فراهم می‌کنند. همچنین این چوب‌ها محل مناسبی برای زندگی لارو حشرات چوب‌خوار بوده و امکان انتقال این عوامل مخرب را فراهم می‌کنند (Karimi *et al.*, 2005؛ Ballard *et al.*, 1984 .(Parsapajouh *et al.*, 2007 نفوذ و رشد ریسه‌های قارچ عامل تغییر رنگ را در برون چوب کاج (*Pinus contorta*) بررسی کردند و گزارش کردند که ریسه‌های قارچ به راحتی به دیواره اولیه سلول‌های پارانشیمی نفوذ کرده و در دیواره بین سلولی اشعه‌ها رشد می‌کنند. سپس ریسه‌ها با نفوذ به دیواره اولیه سلول‌ها و منافذ نیمه هاله‌ای تراکئیدها وارد شده و در آنجا رشد می‌کنند و از مسیر منافذ هاله‌ای از یک تراکئید به تراکئید دیگر وارد می‌شوند. Apetorgbor *et al.*, 2004 به بررسی فعالیت قارچ‌های عامل تغییر رنگ در نواحی گرمسیری آفریقا پرداختند. برای این منظور، گرده‌بینه‌ها به مدت شش هفته درون کشتی طی فصول خشک و مرطوب قرار داده شدند و سطوح گرده‌بینه‌ها از لحاظ لکه و کپک پس از ۷، ۱۴، ۲۸ و ۴۲ روز نگه‌داری، مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج مطالعه آنها نشان داد که قارچ‌های *Fusarium solani* و *Penicillium citrinum* از کپک‌های غالب سطح نمونه‌های چوب بودند، در حالی که *Lasiodiplodia theobromae* و *Ceratocystis fagacearum* از قارچ‌های غالب عامل تغییر رنگ چوب بودند.

هدف از این تحقیق، شناسایی قارچ‌های عامل تغییر رنگ و بررسی خصوصیات مرفولوژیکی آنها در چوب وارداتی نوئل (*Picea abies* L.)، و همچنین بررسی نفوذ ریسه‌های قارچ در بافت چوب بود تا فرایند نفوذ هیف قارچی به بافت چوب مشخص شده و روند گسترش آن در برون چوب مشاهده شود.

مواد و روش‌ها

برای شناسایی قارچ‌های همراه چوب نوئل (*Picea abies* L.) وارد شده از کشور روسیه، در شهر اسالم استان گیلان، ۱۰ الوار به صورت تصادفی تهیه شد. سپس الوارها به تخته‌هایی به ابعاد ۱۰×۵×۵ سانتی‌متر بریده و در شرایط دمایی ۲۰ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۷۵ درصد نگه‌داری شدند تا قارچ‌های همراه تخته‌ها در آنها گسترش یابد. سپس برای شناسایی قارچ‌های توسعه یافته روی قطعات چوبی، قطعات چوب به آزمایشگاه گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه تهران (کرج) انتقال داده شدند.

جداسازی نمونه‌های قارچی

برای جداسازی نمونه‌های قارچی متعلق به جنس تلئومورفی، از سوسپانسیون آسکوسپور[1] استفاده شد. ابتدا سطح چوب‌های آلوده زیر دستگاه استریومیکروسکوپ الیمپوس (Olympus, SZH model Japan) بررسی شد. سپس یک میلی لیتر آب مقطر استریل در وسط لام شیشه‌ای ریخته شد. آنگاه به کمک سوزن کشت استریل پریتسیوم[2] منفرد قارچ را برداشته و روی آن قرار داده و با چند ضربه توسط سوزن کشت استریل آسکوسپورهای آن خارج شد. سپس محتویات به‌دست آمده در زیر میکروسکوپ نوری الیمپوس (Olympus, Japan) مدل BH2 مشاهده شد و در صورت مناسب بودن غلظت آسکوسپور، سوسپانسیون به درون ظرف شیشه‌ای درب‌دار کوچک حاوی ۱۰ میلی لیتر آب مقطر استریل ریخته شد. سپس با استفاده از پیپت مدرج یک میلی لیتر از سوسپانسیون حاصل در سطح تشتک پتری حاوی محیط کشت آب-آگار[3] و آنتی‌بیوتیک سولفات استرپتومایسین پخش گردید. پرگنه‌های خالص قارچ به روش تک اسپور[4] و یا نوک ریسه[5] و با انتقال یکی از آسکوسپورهای جوانه زده به تشتک پتری حاوی محیط کشت مالت-اکستراکت- آگار[6] حاوی آنتی‌بیوتیک سولفات استرپتومایسین، و پس از قرار دادن تشتک‌های پتری به مدت هفت تا۱۰ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس تهیه گردیدند. همچنین جداسازی از نمونه‌های متعلق به جنس‌های آنامورفی قارچ، نیز با تهیه سوسپانسون از توده کنیدی[7] و از اندام‌های غیرجنسی قارچ نظیر کنیدیوفور[8] و سینما به همین روش انجام شد. سپس برای تفکیک جدایه‌های جنس *Ceratocystis* از جنس *Ophiostoma* به محیط کشت مالت- اکستراکت- آگار قبل از ریختن در تشتک‌های پتری، ۰/۰۱۲ میلی‌گرم آنتی‌بیوتیک سیکلوهگزیمید (Wingfield & Vanwyk, 1993) و ۰/۰۲۵ میلی‌گرم آنتی‌بیوتیک سولفات استرپتومایسین افزوده شد. سپس یک قرص میسلیومی به قطر پنج میلی‌متر از حاشیه‌ی پرگنه در حال رشد قارچ برداشته شده و به روی این محیط کشت منتقل گردید. تشتک‌های پتری در دمای ۲۵±۲ درجه سلسیوس و به مدت ۱۰ روز نگه‌داری شدند. پرگنه‌هایی که از هر جدایه در این محیط کشت رشد کرده بودند، متعلق به جنس *Ophiostoma* و پرگنه‌هایی که قادر به رشد در این محیط کشت نبودند، متعلق به جنس *Ceratocystis* در نظر گرفته شدند.

1 - Ascospore
2 - Perithesia

3 - WA
4 - Single spore
5 - Hyphal tip
6 - MEA
7 - Conidia
8 - Conidiophore

بررسی ویژگی‌های مرفولوژیکی جدایه‌های قارچی

برای نام‌گذاری جدایه‌های قارچی، از ویژگی‌های مرفولوژیکی اندام‌های با رده جنسی و غیرجنسی موجود روی سطح چوب آلوده و محیط کشت استفاده شد. به‌منظور بررسی و اندازه‌گیری ابعاد کنیدی و سینمای مرحله غیرجنسی، یک قطره از محلول کاتن بلو- لاکتوفنول در مرکز لام شیشه‌ای تمیز قرار داده شد. سپس به کمک سوزن کشت سترون مقدار بسیار کمی از توده کنیدی و یا تعدادی سینمای موجود روی سطح چوب و همچنین محیط کشت به طور جداگانه برداشته و روی لام قرار داده و بعد سطح آن با لامل پوشانده شد. در نهایت اسلایدها توسط میکروسکوپ نوری بررسی شدند. به‌منظور بررسی و اندازه‌گیری شکل و ابعاد پریتس‌ها و آسکوسپورها در اشکال جنسی، به همین روش اسلایدهای میکروسکوپیکی آماده شد و در هر مورد بر حسب میزان دسترسی ۵۰ پریتسیوم و ۱۰۰ آسکوسپور در بیشترین طول و عرض اندازه‌گیری و میانگین اندازه آنها محاسبه شد. تصاویر موجود از اندام‌های قارچی و پرگنه‌های قارچ‌های مورد مطالعه در زیر میکروسکوپ و استریومیکروسکوپ با استفاده از دوربین دیجیتال سونی (Sony, Japan) مدل‌های F717 و DSC W55 تهیه شدند.

شناسایی جدایه‌های قارچی

به‌منظور تعیین نام نمونه‌های قارچی مورد بررسی در این تحقیق، بر حسب شکل جنسی و غیرجنسی قارچ، ویژگی‌های مؤثر در تفکیک گونه‌های جنس‌های *Ophiostoma* و *Ceratocystis* و جنس‌های آنامورفی وابسته به آنها مورد استفاده قرار گرفت. برای تعیین نام اشکال جنسی و غیرجنسی قارچ از توصیفات و کلید شناسایی ارائه شده توسط Wingfield *et al.*, 1993 استفاده گردید.

مطالعه میکروسکوپیکی بافت چوب آلوده به قارچ

برای مطالعه میکروسکوپیکی بافت چوب آلوده به قارچ، قطعاتی از چوب مورد نظر به ابعاد ۱×۱×۱ سانتی‌متر مکعب بریده شد و برای برش‌گیری با میکروتوم به مدت یک هفته در آب خیسانده شد. سپس برش‌های میکروسکوپیکی با ضخامت ۱۰ تا ۱۵ میکرومتر از مقاطع عرضی، شعاعی و مماسی قطعات چوب با استفاده از میکروتوم ساخت شرکت Schenkung Dapples سوئیس، سری NR.0003 به روش Parsapajouh ، 2008 تهیه شد. پس از تهیه برش‌ها، رنگ‌آمیزی نمونه‌ها با محلول سفرانین به غلظت یک درصد انجام گردید. سپس نمونه‌ها با الکل ۵۰، ۷۵، ۹۶ و ۱۰۰ درصد آب‌شویی شدند. پس از تثبیت کردن نمونه‌ها توسط چسب روی لام، با استفاده از میکروسکوپ نوری مسیر حرکت میسلیوم‌ها در ساختمان چوب بررسی گردید.

نتایج

خصوصیات مرفولوژیکی و شناسایی قارچ

خصوصیات مرفولوژیکی قارچ‌های شناسایی شده روی چوب

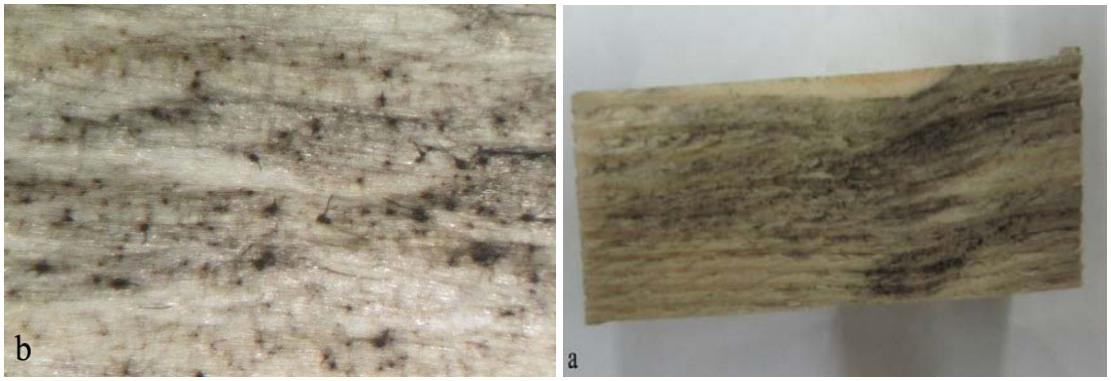
در این مطالعه چهار جدایه قارچی، از خانواده *Ophiostomataceae* از چوب نوئل شناسایی شد (جدول ۱، شکل ۱). جدایه اول گونه *Ophiostoma piceae* بود که روی چوب مشاهده شد. این گونه دارای پریتسیومی با قاعده متورم و سیاه رنگ به قطر (۲۰۱/۵) ۲۸۰-۱۴۰ میکرومتر بود (شکل ۲، a). در این

گونه، گردن پریتسیوم‌ها بلند و اندازه طول و عرض آنها به‌ترتیب (۵۸۷/۵)۱۲۰۰-۶۰۰ و (۱۰)۱۵-۱۰ میکرومتر بود. در انتهای گردن پریتسیوم‌ها بجز در یک مورد، هیف‌های بی‌رنگ وجود نداشتند (شکل ۲، b). آسکوسپورها در این گونه، بی‌رنگ، تک‌سلولی و بدون غلاف و خمیده بودند. اندازه طول و عرض آسکوسپورها به‌ترتیب (۳/۵) ۴-۳ و (۱/۵۵) ۱/۸-۰/۵ میکرومتر بود (شکل ۲، c).

جدایه دوم، مربوط به مرحله غیرجنسی قارچ و یکی از انواع آنامورف‌های جنس *Ophiostoma* به نام *Sporothrix* sp.1 بود. در این نمونه، کنیدیوفور منشعب بود. انتهای هر انشعاب دارای برجستگی‌های تولیدکننده کنیدی است (Hoog, 1993). در این نمونه، کنیدی‌ها بی‌رنگ بوده و چماقی شکل هستند. طول و عرض کنیدی‌ها به‌ترتیب (۵/۴۲) ۹-۴ و (۱/۲۵) ۲-۱ میکرومتر بود (شکل ۲، d).

جدایه سوم نیز مربوط به مرحله غیرجنسی قارچ و یکی از انواع آنامورف‌های جنس *Ophiostoma* به نام *Graphium* sp.1 بود. در این نمونه، اندامی بنام سینما دیده شد. سینما سیاه رنگ بوده و ارتفاع آنها (۵۷۶) ۸۵۰-۳۰۰ میکرومتر و عرض آنها (۲۶/۶۶)۴۰-۲۰ میکرومتر بود. در انتهای سینما، کنیدیوفورهای بی‌رنگ و منشعب قابل مشاهده بودند. کنیدی‌ها در این نمونه، بی‌رنگ بوده و چماقی شکل دیده شدند. طول و عرض کنیدی‌ها به‌ترتیب (۴/۵۸)۶-۳ و (۱/۴)۲-۱ میکرومتر بود (شکل ۲، e).

جدایه چهارم نیز مربوط به مرحله غیرجنسی قارچ و یکی از انواع آنامورف‌های جنس *Ophiostoma* به نام *Graphium* sp.2 بود که برخلاف جدایه سوم، دارای سینمایی به رنگ قهوه‌ای روشن و یا متمایل به تیره بود. ارتفاع این نوع سینماها، (۴۶۲/۷۲)۶۵۰-۳۰۰ میکرومتر و عرض آنها (۳۹/۵۴)۵۰-۲۰ میکرومتر بود. در انتهای سینما، کنیدیوفورهای بی‌رنگ و منشعب قابل مشاهده بودند. کنیدی‌ها در این نمونه، بی‌رنگ بوده و چماقی شکل دیده شدند. طول و عرض کنیدی‌ها به‌ترتیب (۴/۷۲)۱۰-۳ و (۱/۵۲)۲-۱/۲ میکرومتر بود (شکل ۲، f).



شکل ۱- چوب‌های آلوده به قارچ عامل تغییر رنگ؛ (a) ماکروسکوپی و (b) میکروسکوپی (استریومیکروسکوپ).

جدول ۱- خصوصیات مرفولوژیکی قارچ‌های شناسایی شده روی چوب نوئل

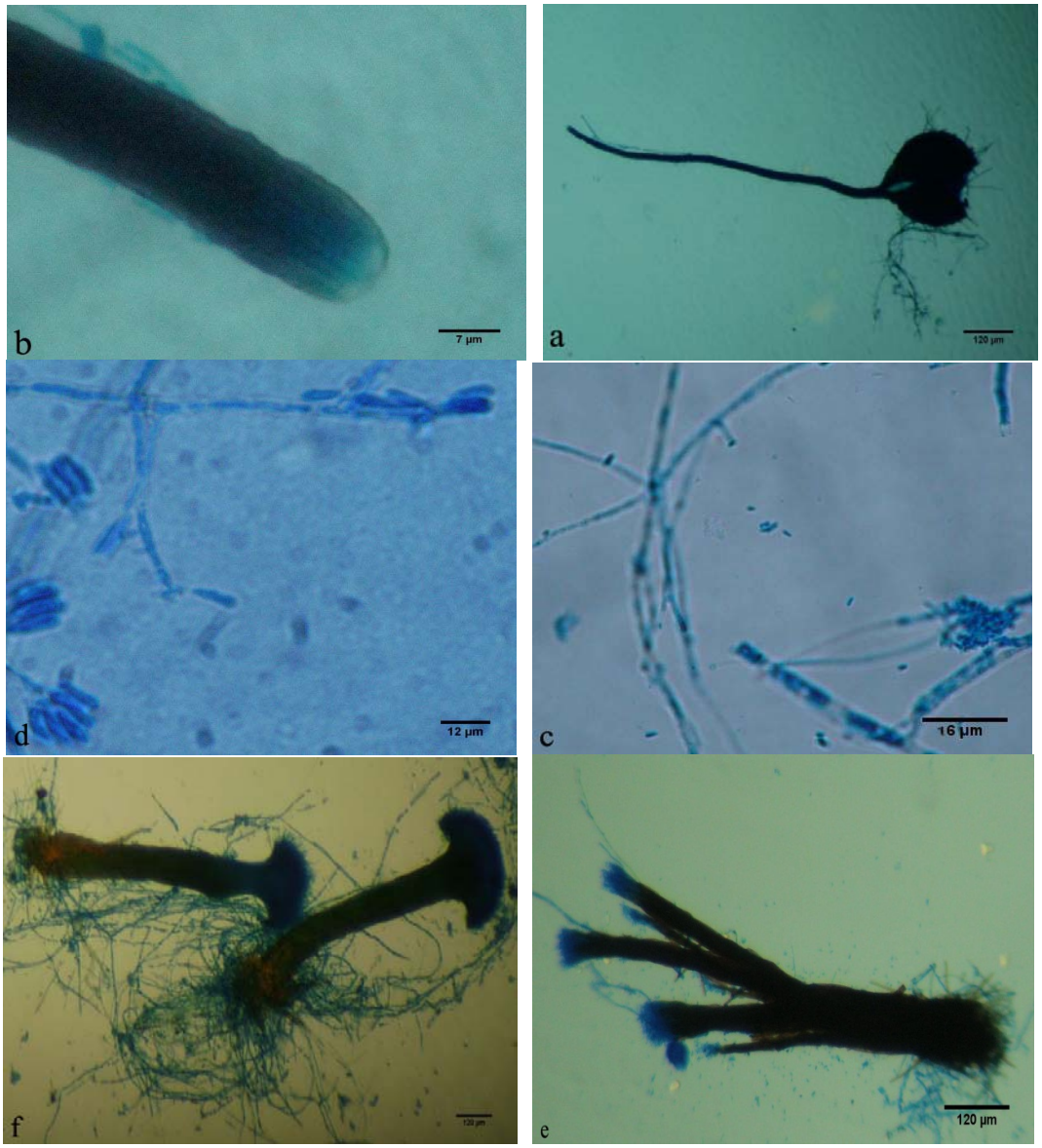
خصوصیات (میکرومتر)	مرحله جنسی		مرحله غیرجنسی	
	Ophiostoma piceae	*Sporothrix sp.1*	*Graphium* sp.1	*Graphium* sp.2
شکل پریتسیوم	سیاه رنگ	_	_	_
طول گردن	۶۰۰-۱۲۰۰(۵۸۷/۵)	_	_	_
عرض گردن	۱۰-۱۵(۱۰)	_	_	_
قطر قاعده	۱۴۰-۲۸۰(۲۰۱/۵)	_	_	_
شکل آسکوسپور	تک سلولی، بی‌رنگ و خمیده	_	_	_
طول	۳-۴(۳/۵)	_	_	_
عرض	۰/۵-۱/۸(۱/۵۵)	_	_	_
رنگ سینما	_	_	سیاه	قهوه‌ای روشن و یا تیره
طول	_	_	۳۰۰-۸۵۰(۵۷۶)	۳۰۰-۶۵۰(۴۶۲/۷۲)
عرض	_	_	۲۰-۴۰(۲۶/۶۶)	۲۰-۵۰(۳۹/۵۴)
شکل کنیدی	_	چماقی	چماقی	چماقی
طول	_	۴-۹(۵/۴۲)	۳-۶(۴/۵۸)	۳-۱۰(۴/۷۲)
عرض	_	۱-۲(۱/۲۵)	۱-۲(۱/۴)	۱/۲-۲(۱/۵۲)

خصوصیات مرفولوژیکی قارچ‌های شناسایی شده در محیط کشت

در این مطالعه سه جدایه قارچی، یک جدایه از خانواده *Ophiostomataceae* و دو جدایه دیگر از خانواده *Ceratocystidaceae* به‌دست آمدند (جدول ۲).

جدایه اول مربوط به مرحله غیرجنسی از جنس *Ophiostoma*، به نام *Sporothrix* sp.2 بود. پرگنه در این جدایه روی محیط کشت MEA به صورت یکنواخت رشد نمود و رنگ پرگنه سبز زیتونی بود. در سطح پرگنه هیف‌هایی به رنگ تقریباً خاکستری روشن وجود داشت. رنگ پرگنه در پشت تشتک پتری سیاه بود. در این جدایه کنیدیوفور منشعب و بی‌رنگ بوده و در انتهای هر انشعاب برجستگی‌های تولید کننده کنیدی دیده شد. کنیدی‌ها بی‌رنگ و چماقی شکل بودند. طول و عرض کنیدی‌ها به‌ترتیب (۴/۵۳) ۷-۳ و (۱/۰۳)۱/۲-۱ میکرومتر بود (شکلهای ۳، a و ۴، a).

جدایه دوم، مربوط به مرحله غیرجنسی از جنس *Ceratocystis*، به نام *Chalara* sp.1 بود. پرگنه این جدایه روی محیط کشت MEA به صورت دوایر متحدالمرکز دیده می‌شود. رنگ پرگنه در مرکز به رنگ خاکستری روشن بوده و به طرف حاشیه پرگنه به‌ترتیب به رنگ‌های خاکستری تیره، سیاه و قهوه‌ای روشن با نقطه‌های سفید رنگ دیده می‌شود.



شکل ۲- خصوصیات مرفولوژیکی مرحله تلئومورف و آنامورف قارچ شناسایی شده روی چوب؛ (a) پریتسیوم، (b) انتهای گردن پریتسیوم بدون هیف، (c) آسکوسپور، (d) کنیدی و کنیدیوفور *Sporothrix* sp.1، (e) سینمای سیاه رنگ *Graphium* sp.1 و (f) سینمای قهوه‌ای رنگ *Graphium* sp.2.

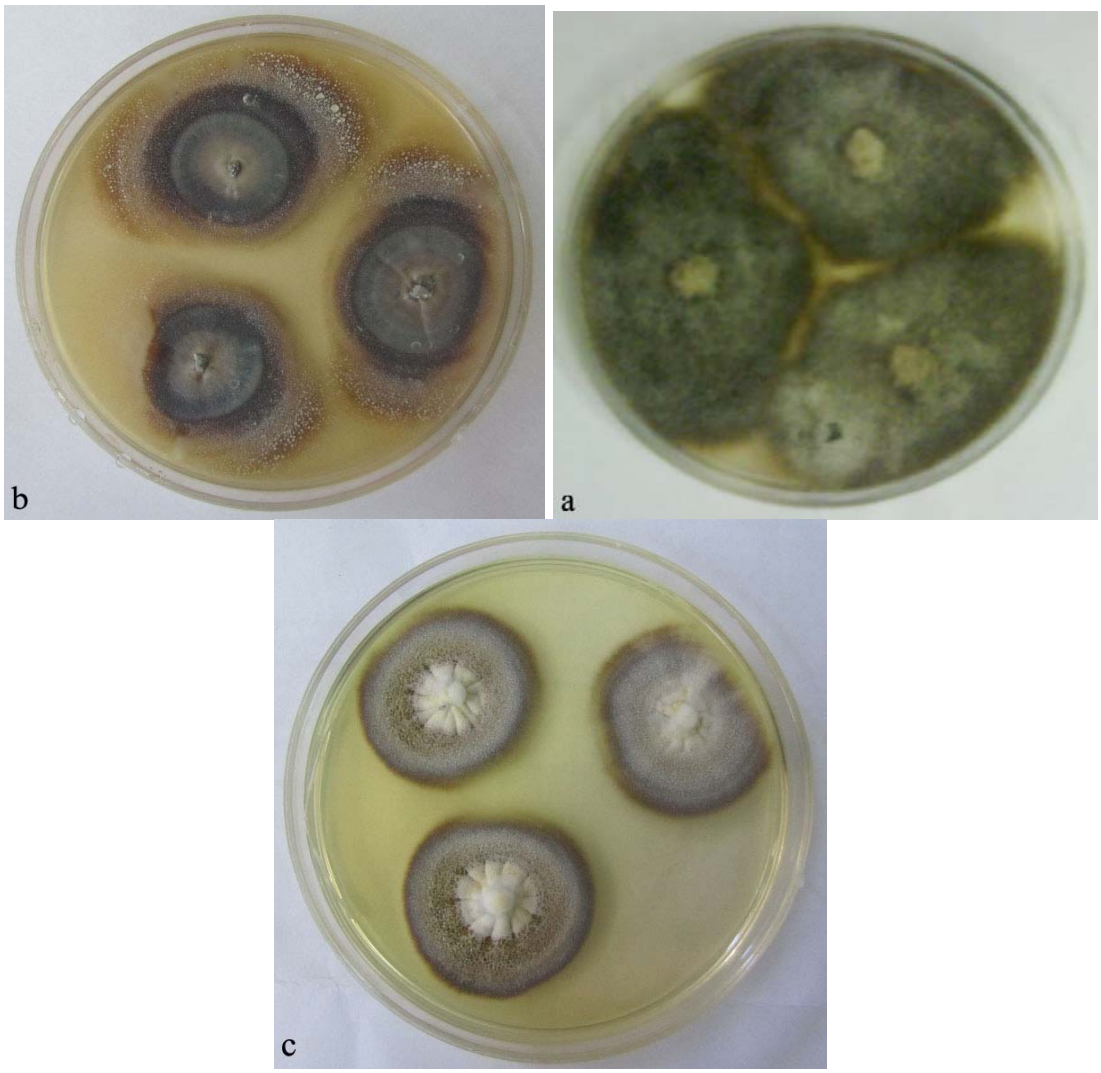
رنگ پرگنه در پشت تشتک پتری قهوه‌ای تیره بود. این جدایه دارای اندوکنیدی[1] شفاف، استوانه‌ای، صاف و تک‌سلولی که گاهی با زنجیره‌هایی با طول متغیر بوده و آلوریوکنیدی[2] نیز تک‌سلولی و شفاف با دیواره ضخیم که به صورت تنهایی و یا در زنجیره‌های کوتاه بود (شکلهای ۳، b و ٤، b، c).

1 - Endoconidia

2 - Aleurioconidia

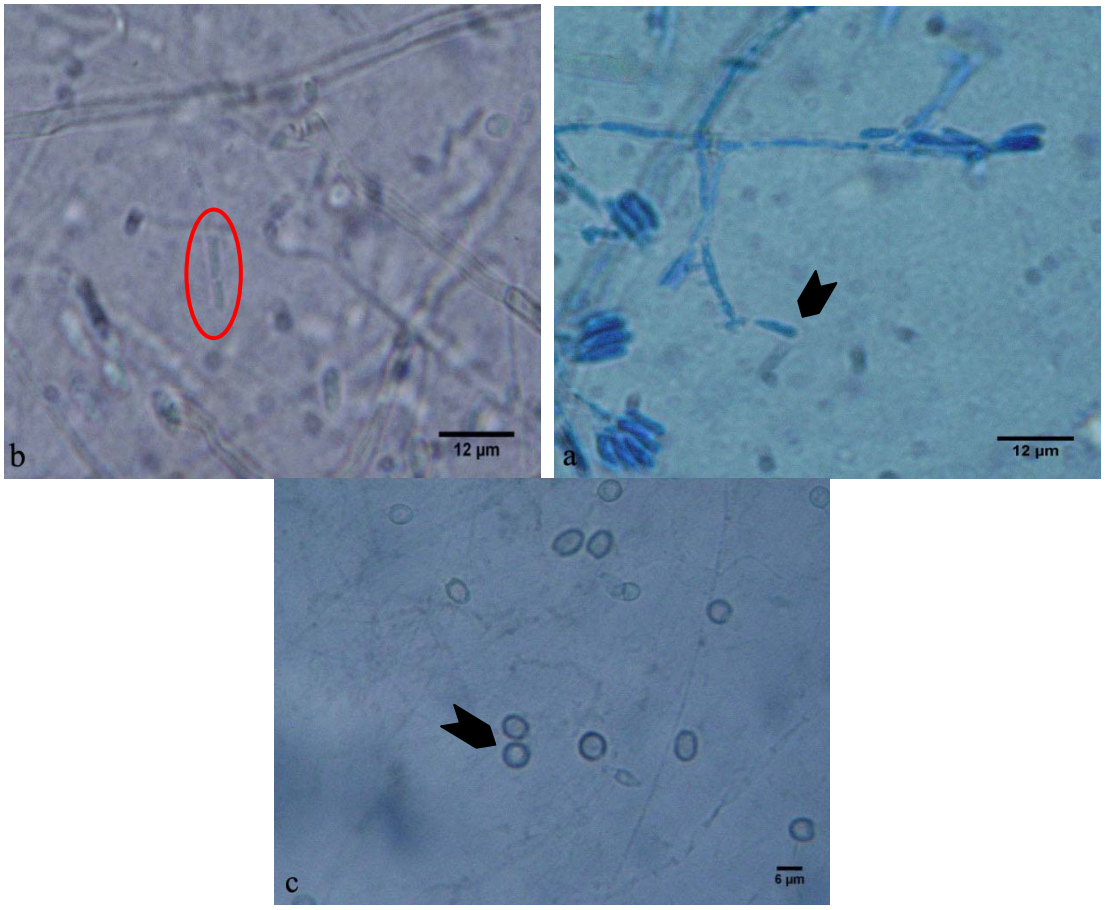
جدول ۲- خصوصیات مرفولوژیکی قارچ‌های شناسایی شده روی محیط کشت

خصوصیات کنیدی	*Ophiostoma* sp.	*Ceratocystis* sp.	
(میکرومتر)	*Sporothrix* sp.2	*Chalara* sp.1	*Chalara* sp.2
اندوکنیدی	_	دارد	دارد
آلوریوکنیدی	_	دارد	ندارد
شکل کنیدی	چماقی	–	–
طول	۳–۷(٤/٥٣)	–	–
عرض	۱–۱/۲(۱/۰۳)	–	–



شکل ۳- پرگنه جدایه‌های قارچی روی محیط کشت MEA؛ (a) جدایه *Sporothrix* sp.2 ، (b) جدایه *Chalara* sp.1 و (c) جدایه *Chalara* sp.2.

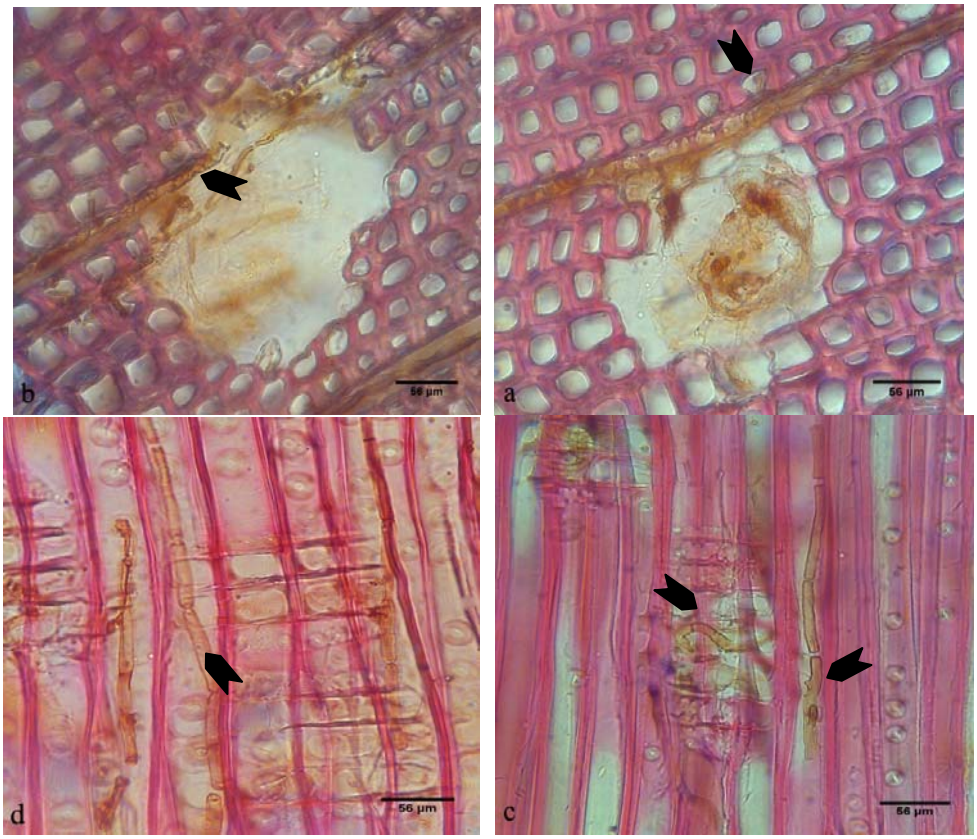
جدایه سوم، مربوط به مرحله غیرجنسی از جنس *Ceratocystis*، به نام *Chalara* sp.2 بود. پرگنه در این جدایه روی محیط کشت MEA به صورت دوایر متحدالمرکز رشد نمود. رنگ پرگنه در مرکز به رنگ سفید بود و به طرف حاشیه پرگنه به‌ترتیب به رنگ‌های قهوه‌ای روشن و قهوه‌ای تیره با هاله‌ای سفید دیده شد. رنگ پرگنه در پشت تشتک پتری سیاه بود. این جدایه دارای اندوکنیدی شفاف، استوانه‌ای، صاف و تک‌سلولی که گاهی با زنجیره‌هایی با طول متغیر و فاقد آلوریوکنیدی بود (شکل ۳، c)



شکل ٤- خصوصیات مرفولوژیکی قارچ‌های شناسایی شده روی محیط کشت MEA؛ (a) کنیدی *Sporothrix* sp.2، (b) اندوکنیدی *Chalara* sp.1 و (c) آلوریوکنیدی *Chalara* sp.1.

مطالعه میکروسکوپیکی بافت چوب آلوده به قارچ

مطالعه میکروسکوپیکی مقاطع عرضی نمونه‌های چوب نوئل آلوده به قارچ نشان داد که ریسه‌های قارچ در محل کانال‌های رزینی و پارانشیم‌های اشعه نفوذ کرده‌اند (شکل ۵، a و b). همچنین مطالعه میکروسکوپیکی مقاطع شعاعی حکایت از نفوذ ریسه‌ها در تراکئیدها، ناحیه کراس فیلد و پارانشیم‌های اشعه (عرضی) داشت (شکل ۵، c و d).



شکل ۵- نمای میکروسکوپی از مقاطع عرضی و شعاعی چوب نوئل؛ (a و b) مسیر حرکت ریسه قارچ در پارانشیم اشعه و کانال‌های رزینی و (c و d) مسیر حرکت ریسه قارچ در تراکئیدها، ناحیه کراس فیلد و پارانشیم اشعه.

بحث

تعدادی از چوب‌های نوئل (*Picea abies* L.)، وارد شده از کشور روسیه به علت وجود عوامل قارچی، مشکلاتی مانند گسترش یک گونه قارچی و محدودیت در استفاده از چوب ایجاد کرده و همچنین برخی از عوامل قارچی همراه چوب‌ها قادر به بیماری‌زایی در انسان نیز می‌باشند. این قارچ‌ها با رنگ‌دانه‌های تیره به جا مانده در برون چوب باعث تغییر در ظاهر و جلوه چوب می‌شود که می‌تواند ارزش چوب خام را کاهش دهد. بررسی میکروسکوپی بافت چوب که دارای آلودگی بود، نشان داد که قارچ‌های آلوده کننده از گروه قارچ‌های آسکومیستی بوده و همگی از نوع قارچ‌های رنگ کننده چوب می‌باشند. یکی از قارچ‌های شناسایی شده در مرحله جنسی، گونه *Ophiostoma piceae* بود و به عنوان آرایه جدیدی برای فلور قارچ‌های ایران گزارش می‌شود. جدایه‌های غیرجنسی از جنس‌های *Sporothrix* sp. و *Graphium* spp. بودند و همگی روی محیط کشت MEA حاوی آنتی‌بیوتیک سیکلوهگزیمید رشد کردند. گونه‌های جنس *Ophiostoma* در مراحل غیرجنسی دارای آنامورف‌های متنوع در جنس‌های مختلف شامل *Leptographium*، *Pesotum*، *Graphium*، *Sporothrix* و *Hyalorhinocladiella* می‌باشند که می‌توانند آنتی‌بیوتیک سیکلوهگزیمید را تحمل کنند. همچنین این آنامورف‌ها روی کنیدیوفور، کنیدی‌ها را تولید می‌نمایند

Harrington *et al.*,1993; Seifert, 1993; Wingfield *et al.*, 2001). گونه *Ophiostoma piceae* از فنلاند، روسیه، نیوزلند و شیلی در چندین مطالعات جدید گزارش شده است (Potlajczuk & Schekunova, 1985). این گونه در ابتدا توسط Munch در سال ۱۹۰۷ به‌عنوان قارچ تغییر دهنده رنگ در نوئل و کاج توصیف شد و هم اکنون شناسایی گونه‌های آنامورفی وابسته به جنس *Ophiostoma*، وابسته به رنگ‌دانه و خصوصیات سینمای آنها می‌باشد (Harrington *et al.*, 2001). گونه *Ophiostoma piceae* به‌عنوان قارچ عامل تغییر رنگ می‌تواند ظاهر سیاه مایل به آبی و یا سیاه رنگ در چوب ایجاد کند (Schirp *et al.*,2003).

همچنین قارچ *Ceratocystis* sp. با مرحله غیرجنسی *Chalara* spp. نیز شناسایی شد، ولی این قارچ نتوانست در محیط کشت MEA دارای آنتی‌بیوتیک سیکلوهگزیمید رشد کند. گونه‌های جنس *Ceratocystis* دارای شکل‌های غیرجنسی *Chalara*، *Chalaropsis* و *Thielaviopsis* می‌باشند و حساس به آنتی‌بیوتیک سیکلوهگزیمید هستند. همچنین این آنامورف‌ها دارای اندوکنیدی و یا آلوریوکنیدی نیز می‌باشند (Paulin-Mahady *et al.*, 2002; Engelbrecht & Harrington, 2005; Wingfield, 1988).

البته در بررسی ریسه‌های قارچ، ریسه‌های قهوه‌ای رنگ قارچ در مقطع عرضی به پارانشیم‌های اشعه و کانال‌های رزینی نفوذ کرده بودند. همچنین در مقطع شعاعی این ریسه‌ها بین منافذ تراکئیدها و کراس فیلد به راحتی قابل مشاهده بودند. Ballard و همکاران (۱۹۸۲) گسترش ریسه قارچ‌های عامل تغییر رنگ را در چوب کاج توسط میکروسکوپ نوری بررسی کردند و گزارش نمودند که ریسه‌ها در پارانشیم اشعه چوبی، تراکئید و حتی کانال رزینی، پرگنه تشکیل می‌دهند و ریسه‌ها از مسیر منافذ هاله‌ای از یک تراکئید به تراکئید دیگر وارد می‌شوند. همچنین Fares و همکاران (۱۹۸۰) الگویی برای رشد ریسه‌های قارچ عامل تغییر رنگ در درخت کاج بیان کردند. آنها پیشنهاد کردند که ریسه‌ها نخست به منافذ تراکئیدها نفوذ کرده و راه آنها را مسدود می‌کنند و درثانی با نفوذ به کانال رزینی باعث تراوش رزین به اطراف بافت می‌شوند.

براساس این نتایج به طور کلی وجود عوامل قارچی همراه چوب‌های وارداتی از سایر کشورها، می‌تواند برای اکوسیستم‌های جنگل و حتی باغ‌های کشور بسیار خطرناک باشد. قارچ‌های شناسایی شده در این تحقیق به‌عنوان بیمارگرهای مخرب، به‌خصوص در درختان جنگلی شناخته می‌شوند و با توجه به دامنه میزبانی نسبتاً وسیع آنها، در صورت وجود شرایط مناسب برای این دسته از قارچ‌ها، امکان بروز اپیدمی بیماری در کشور وارد کننده وجود خواهد داشت. بدیهی است که وضع قوانین قرنطینه در کشور و اجرای دقیق و به موقع آن می‌تواند در جلوگیری از انتشار چنین عوامل خطرناکی در کشور بسیار مؤثر باشد.

منابع مورد استفاده

-Apetorgbor. M.M., Darkwa, N.A., Frimpong, O. and Agyeman, V.K., 2004. Biodeteriorating agents associated with three tropical timber species. Forest Ecology and Management, 195: 311-323.

-Ballard, R.G., Walsh, M.A. and Cole, W.E., 1982. Blue-stain fungi in xylem of lodge pole pine: a light microscope study on extent of hyphal distribution. Canadian Journal of Botany, 60(11): 2334–2341.

-Ballard, R.G., Walsh, M.A. and Cole, W.E., 1984. The penetration and growth of blue-stain fungi in the sapwood of lodge pole pine attacked by mountain pine beetle. Canadian Journal of Botany, 62(8): 1724–1729.

-Blanchette, R.A., Farrel, R.L., Burnes, T.A., Wendler, P.A., Zimmerman, W., Brush, T.S. and Snyder, R.A., 1992. Biological control of pitch in pulp and paper production by *Ophiostoma piliferum*. Tappi Journal, 75: 102-106.

-Brisson, A., Gharibian, S., Eagen, R., Leclerc, D.F. and Breuil, C., 1996. Localization and characterization of the melanin granules produced by the sap-staining fungus *Ophiostoma piceae*. Material und Organismen., 30: 23-32.

-Byrne, T., 2003. Characterizing the properties of wood containing beetle-transmitted blue stain: background, material collection, and summary of findings. Forintek Canada Corp report, p 8.

-Eagen, R., Brisson, A. and Breuil, C., 1997. The sap-staining fungus *Ophiostoma piceae* synthesizes different types of melanin in different growth media. Canadian journal of Microbiol., 43: 592–595.

-Engelbrecht, Ch.J.B and Harrington, T.C., 2005. Intersterility, morphology and taxonomy of Ceratocystis fimbriata on sweet potato, cacao and sycamore. Mycologia, vol. 97 no. 1 57-69.

-Fares, Y., Goeschl, J.D. and Sharpe, P.J.H., 1980. Dynamics of bark beetle- fungus symbiosis. I. Pine tree anatomy and fungus growth pattern. Proceedings on modeling southern pine beetle populations. U.S. Dep. Agric. Tech. Bull., No. 1630.

-Fengel, D. and Wegener, G., 1989. Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions,2ndedn. De Gruyter, Berlin.

-Harrington, T.C., McNew D., Steimel, J., Hofstra, D. and Farrell, R., 2001. Phylogeny and taxonomy of the *Ophiostoma piceae* complex and the Dutch elm disease fungi. Mycologia, 93:111-136.

-Hoog, G.S., 1993. Sporothrix-like anamorphs of Ophiostoma spe-cies and other fungi. In: Wingfield MJ, Seifert KA, Web-ber JF, eds. Ceratocystis and Ophiostoma: taxonomy, ecology and pathogenicity. St. Paul, Minnesota: American Phytopathological Society Press, p 53-60.

-Kaarik, A., 1980. Fungi causing sap stain in wood. IRG/WP 199, The International Research group on wood preservation, IRG secretariat, Stockholm, Sweden.

-Karimi, A.N, Fathollahzadeh, A. and Cameli A., 2005. Selection and use of treated wood. (translation), Aeij publications, Tehran, 155 pp.

-Kipkosgei Sirmah, P., 2009. Towards valorisation of *Prosopis juliflora* as an alternative to the declining wood resource in Kenya. Nancy universite, Thesis.

-Munch E. 1907. Die blaufaule des nadelholzes. I-II. Natur-wiss Z Forst-Landw , 5:531-573.

-Parsapajouh, d., 2008. Atlas wood north of Iran (as described species of microscopic diagnostics) (translation). Tehran University publications, Tehran, 136 pp.

-Parsapajouh, d., Faezipour, M., and Tagheyari, h., 2007. Industrial wood preservation. (translation). Tehran University publications, Tehran, 657 pp.

-Paulin-Mahady, A.E., Harrington, T.C. and McNew, D., 2002. Phylogenetic and taxonomic evaluation of *Chalara, Chalaropsis,* and *Thielaviopsis* anamorphs associated with *Ceratocystis.* Mycologia, 94: 62-72.

-Potlajczuk, V.I. and Schekunova, E.G., 1985. The distribution of species from the genus Ceratocystis Ell. et Halst. emend. Bakshi in the USSR. Novosti Sistematiki nizsich rastienij. “Nauka” Akademia Nauk SSSR, 22: 148–156.

-Ren, H.Q and Lu, J., 2006. Characterising the properties of blue stained lodge pole pine wood of British Columbia, Canada. Chinese Academy of Forestry, Beijing, p 39.

-Schirp, A., Farrell, R.L. and Kreber, B., 2003. Effects of New Zealand sapstaining fungi on structural integrity of unseasoned radiate pine. Holz Roh-Werkst, 61:369-376.

-Seifert, K.A., 1993. Sapstain of commercial lumber by species of *Ophiostoma* and *Ceratocystis*. In: Winfield, M. J., Seifert, K. A. and Webber, J. F. (eds.), *Ceratocystis* and *Ophiostoma*: taxonomy, ecology, and pathogenicity. American Phytopathological Society, St. Paul, P. 141–151.

-Tarmian, A., and Karimi, A.N., 2010. Conservation of wood Artifacts. (translation),Tehran University publications, Tehran 802 pp.

-Wheeler, M.H., 1983. Comparisons of fungal melanin synthesis in ascomycetous, imperfect and basidiomycetous fungi. Trans. Br. Mycol. Soc, 81: 29–36.

-Wingfield, M.J. and Van Wyk, P.S., 1993. A new species of Ophiostoma from Protea infructescences South Africa. Mycological Research. 97 (6): 709-716.

-Wingfield, M.J., Seifert, K.A. and Webber, J.F., 1993. *Ceratocystis* and *ophiostoma* Taxonomy, Ecology, and Pathogenicity, The American Phytopathological Society press. St. Paul, USA. P 293.

-Wingfield, M.J.. Van Wyk, P.S. and Marasas, W.F.O., 1988. *Ceratocystiopsis proteae* sp. nov. with a new anamorph genus. Mycologia 80, 23-30.

-Zink, P. and Fengel, D., 1988. Studies on the colouring matter of blue stain fungi. I. General characterization and the associated compounds. Holzforschung, 42: 217–220.

Identification of staining fungi in imported Norway spruce lumber

Daday Ghandi, S[1*], Tarmian, A.[2], Fotouhifar, Kh. B.[3] and Enayati, A.A.[4]

1*- Corresponding author, M.Sc, Wood and Paper Science and Technology, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Email: daday@ut.ac.ir
2-Associate Professor, Department of Wood and Paper Science and Technology, Faculty of Natural Resources, University of Tehran
3-Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Science and Engineering, University of Tehran
4-Professor, Department of Wood and Paper Science and Technology, Faculty of Natural Resources, University of Tehran

Received: Dec., 2012 Accepted: Feb., 2014

Abstract

Imported lumber of Norway spruce called European spruce (*Picea abies* L.) from Russia have a variety of applications. However, the presence of fungal agents in this wood, their application is limited. In addition, some the fungi associated with these woods are able to cause disease in human. In order to identify the presence of such fungi in the imported woods from Russia, samples were collected from Asalem region. Isolation and preparation of pure colonies of fungi grown on woods was done using ascosporic or conidial mass suspensions and single spore method. The morphological characteristics of fungi grown on wood pieces and on culture media were studied using light microscope. The results showed that *Ophiostoma piceae* in sexual phase and *Sporothrix* sp. and *Graphium* spp. in asexual phase are present in these woods. In the culture, *Ophiostoma* sp. with asexual stage of *Sporothrix* sp. and *Ceratocystis* sp. with asexual stage of *Chalara* spp. was identified. The results of microscopic examination of woods in cross and radial sections showed that fungal hypha penetrated the resin canals, the ray parenchyma, tracheids, and cross-field areas.

Key words: Stain fungi, imported woods, fungal hypha, microscopic studies.