



شناسایی گونه‌های قارچی مرتبط با بیماری‌های شاخه و تنه‌ی تاک در استان فارس

بنفشه صفایی فراهانی^{۱*} و اسماعیل راه‌خدایی^۲

- ۱- *نویسنده مسوول: استادیار، بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان فارس، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، ایران (b.safae@areeo.ac.ir)
- ۲- مربی، بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان فارس، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۰۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۲۰

چکیده

به منظور شناسایی گونه‌های قارچی عامل بیماری‌های تنه‌ی تاک در استان فارس، در ماه‌های اردیبهشت تا شهریور ۱۳۹۷ تا ۱۳۹۹ از درختچه‌های بالغ تاک که علائم کاهش رشد، زردی و سرخشیدگی را در بخش‌های هوایی و تغییر رنگ بافت چوبی را در برش تنه نشان می‌دادند نمونه‌برداری شد. قطعات کوچکی از مرز مناطق تغییر رنگ یافته و بافت نسبتاً سالم چوب جدا و پس از سترون‌سازی به تشک‌های حاوی محیط کشت منتقل شدند. جدایه‌های قارچی پس از رشد به روش نوک‌ریسه و یا تک اسپور خالص‌سازی شدند. شناسایی جدایه‌ها با استفاده از ویژگی‌های ریخت‌شناختی و توالی سنجی نواحی مختلف ژنی انجام شد. در مجموع ۱۶۶ جدایه‌ی قارچی شامل گونه‌های *Kalmusia Fomitiporia mediterranea*، *Cytospora chrysosperma*، *Botryosphaeria dothidea*، *Phaeoacremonium* و *Phaeoacremonium minimum*، *Macrophomina phaseolina* و *varispora parasiticum* شناسایی شد. گونه‌های *C. chrysosperma* و *P. minimum* با فراوانی ۵۴٪ و ۲۸/۳۱٪ به ترتیب کم‌ترین و بیش‌ترین فراوانی را در میان جدایه‌ها به خود اختصاص دادند. آزمون بیماری‌زایی روی نهال‌های یک ساله‌ی تاک در گلخانه نشان داد همه گونه‌ها قادر به ایجاد بیماری در گیاهان مایه‌زنی شده هستند. به منظور تکمیل اصول کخ، قارچ‌های عامل بیماری مجدداً از گیاهان مایه‌زنی شده جداسازی و با استفاده از خصوصیات ریخت-شناختی و مولکولی شناسایی شدند. تمامی گونه‌های فوق به استثنای *P. parasiticum* و *P. minimum* برای نخستین بار از تاک‌های آلوده به بیماری‌های تنه در استان فارس گزارش می‌شوند.

کلید واژه: انگور، مو، بیماری‌زایی، فیلوژنی، توالی‌سنجی

دبیر تخصصی: دکتر جعفر عبدالله‌زاده

Citation: Safaiefarahani, B., & Rahkhodaei, E. (2022). Identification of fungal causal agents of grapevine trunk diseases in Fars province. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, 44(4): 19-35. <https://doi.org/10.22055/ppr.2021.17130>

مقدمه

تاک با نام علمی *Vitis vinifera* L. گیاهی از خانواده‌ی Vitaceae است که محصول آن، انگور، یکی از مهم‌ترین محصولات باغی از نظر ارزش اقتصادی در سراسر دنیا است (Rombough, 2002). بیماری‌های مختلفی سبب بروز خسارت اقتصادی به تاک می‌شوند که از میان آن‌ها می‌توان به بیماری‌های تنه‌ی تاک اشاره کرد (Wilcox, Gubler, & Uyemoto, 2015; Gramaje, Úrbez-Torres, & Sosnowski, 2018; Hrycan, Hart, Bowen, Forge, & Úrbez-Torres, 2020). بیماری‌های تنه‌ی تاک تهدیدی جدی در اغلب کشورهای دنیا هستند و به علت کاهش کمیت و کیفیت محصول و افزایش هزینه‌های مدیریتی خسارت اقتصادی قابل توجهی به تاکستان‌ها وارد می‌کنند. علائم عمومی بیماری‌های تنه‌ی تاک شامل کاهش رشد، زردی و سرخشکیدگی در بخش‌های هوایی و تغییر رنگ آوندها و بافت چوبی تنه است. (Gramaje et al., 2018; Mondello, Songy, Battiston, Pinto, Coppi, Trotel-Aziz, Clément, Mugnai, & Fontaine, 2020; Hrycan et al., 2020). بیماری‌های تنه‌ی تاک بیماری‌های پیچیده و ترکیبی^۱ هستند که در اغلب موارد ترکیبی از قارچ‌های مختلف در وقوع آن‌ها نقش دارند (Moster, Groenewald, Summerbell, Gams, & Crous, 2006; Gramaje et al., 2018; Hrycan et al., 2020). از گیاهان آلوده به بیماری‌های تنه‌ی تاک بیش از ۱۳۰ گونه‌ی قارچی در سراسر دنیا جداسازی شده، اگرچه بیماری‌زایی برخی گونه‌ها روی تاک به اثبات نرسیده است (Gramaje et al., 2018). در میان معمول‌ترین بیماری‌های تنه‌ی تاک می‌توان به سرخشکیدگی یوتیپایی (اغلب ناشی از *Eutypa lata* (Pers.) Tul. & C. Tul. Amponsah, Jones, & Botryosphaeria spp. Ridgway, & Jaspers, 2011; Abreo, Martinez, Bettucci, & Lupo, 2013; Billones-Baaijens &

(Savocchia 2019)، سرخشکیدگی فوموپسیسی (اغلب ناشی از *Phomopsis viticola* (Sacc.) Sacc. (Úrbez-Torres, Peduto, Smith, & Gubler, 2013) و اسکا ناشی از *Phaeoacremonium* spp. (Gams, Crous, M.J. Wingf. & Mugnai) Crous & W. Mostert et al., 2006; *Fomitiporia* spp. و Gams Bruno & Sparapano, 2007; Essakhi, Mugnai, 2008) اشاره کرد. گونه‌هایی مانند *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. (Abed-Ashtiani, Narmani, & Arzanlou, 2018) *Kalmusia variispora* (Verkley, Göker & Stielow) Ariyaw. & K.D. (Abed-Ashtiani, Narmani, & Arzanlou, 2019) و *Cytospora chrysosperma* (Pers.) Fr. (Arzanlou & Narmani, 2015) نیز در سال‌های اخیر به عنوان عامل بیماری‌های تنه‌ی تاک گزارش شده‌اند.

مطابق آمارنامه وزارت جهاد کشاورزی در سال ۱۳۹۸، استان فارس با تولید بیش از ۵۰۰ هزار تن محصول، مهم‌ترین استان تولیدکننده‌ی انگور در کشور بوده است. بررسی‌های میدانی تاکستان‌های استان فارس در سال‌های ۱۳۹۷ تا ۱۳۹۹ نشان داد بیماری‌های تنه‌ی تاک از جمله عوامل مهم خسارت‌زا در تاکستان‌های این استان هستند. با توجه به نقش استان فارس در تولید انگور کشور و نظر به گسترش بیماری‌های تنه‌ی تاک در اغلب مناطق این استان و خسارت ناشی از آن‌ها، پژوهش حاضر با هدف شناسایی عوامل ایجادکننده‌ی بیماری‌های تنه‌ی تاک در استان فارس انجام شد.

مواد و روش‌ها

بررسی نمونه برداری، جداسازی و خالص‌سازی گونه‌های قارچی

نمونه‌برداری در ماه‌های اردیبهشت تا شهریور ۱۳۹۷ تا ۱۳۹۹ از تاکستان‌های شهرستان‌های مختلف استان فارس

پرگنه و ویژگی های کنیدیوم و کنیدیوفور مجدداً به گروه های کوچک تر تقسیم شدند.

به منظور بررسی تشکیل احتمالی پیکنیدیوم، جدایه ها در محیط کشت های پی دی ای، آب آگار (۱۵ گرم آگار، آب مقطر تا حجم یک لیتر)، برگ کاج-آب آگار (Crous, Slippers, Wingfield, Rheeder, Marasas, Philips, Alves, Burgess, Barber, & Groenewald 2006) و چوب تاک-آب آگار (Lawrence, Travadon, Pouzoulet, Rolshausen, Wilcox, & Baumgartner, 2017) کشت شده و در ۲۵ درجه ی سلسیوس نگهداری شدند. تشکیل پیکنیدیوم به صورت هفتگی و به مدت شش ماه مورد بررسی قرار گرفت. اندازه گیری اندام های میکروسکوپی جدایه ها با استفاده از ۵۰ تکرار و اندازه گیری رشد شعاعی پرگنه ها روی محیط کشت پی دی ای در ۲۵ درجه ی سلسیوس با استفاده از شش تکرار انجام شد.

شناسایی جدایه ها با استفاده از ویژگی های مولکولی

به منظور شناسایی دقیق گونه ها، از هریک از گروه های شناسایی شده بر اساس ویژگی های ریختی، چهار جدایه برای شناسایی مولکولی انتخاب شد.

استخراج دی ان ای

قطعاتی به قطر تقریبی پنج میلی متر از حاشیه ی جوان پرگنه ها جدا و به فلاسک های ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۵۰ میلی لیتر عصاره ی سترون شده ی سیب زمینی (عصاره ی ۲۵۰ گرم سیب زمینی، آب مقطر تا حجم یک لیتر) منتقل شد. فلاسک ها به مدت پنج تا ۲۰ روز در تاریکی و ۲۵ درجه ی سلسیوس نگهداری شد. سپس محتویات هر فلاسک در ظروف پتری سترون خالی و میسلیم ها داخل ریزلوله های ۱/۵ میلی لیتری قرار گرفت و پس از یخ زدن به کمک نیتروژن مایع، به مدت ۲۴ ساعت سرماخشک شد. به منظور به دست آوردن عصاره ی سلولی به پنج میلی گرم از میسلیم سرما خشک شده ی هر جدایه مقدار

(جدول ۱) از درختچه های بالغ که علائم کاهش رشد، زردی و سرخشکیدگی را در بخش های هوایی و تغییر رنگ بافت چوبی را در برش تنه نشان می دادند انجام شد. در اغلب گیاهانی که علائم فوق را نشان دادند تغییر رنگ بافت چوبی علاوه بر تنه در شاخه های نسبتاً مسن نیز مشاهده می شد. بنابراین هم تنه و هم شاخه های این گیاهان برای نمونه برداری به کار رفتند. بدین منظور پس از برش طولی و عرضی تنه و شاخه های آلوده، قطعاتی به طول چهار تا پنج میلی متر از مرز مناطق تغییر رنگ یافته و بافت نسبتاً سالم چوب جدا شد و با استفاده از هیوکلیت سدیم ۰/۵٪ به مدت چهار دقیقه سترون سازی و سپس سه بار و هربار به مدت سه دقیقه با آب-مقطر سترون شسته شدند. قطعات پس از خشک شدن روی کاغذ صافی سترون، به تشتک های پتری حاوی محیط کشت پی دی ای^۱ (مرک، آلمان) و ام ای ای^۲ (مرک، آلمان) منتقل شدند. به هر یک از محیط کشت ها ۱۰۰ میلی گرم در لیتر تراسایکلین اضافه شده بود. تشتک های پتری تا زمان رشد پرگنه ها در ۲۵ درجه ی سلسیوس و تاریکی نگهداری شدند. خالص سازی جدایه ها به روش نوک ریس و یا تک اسپور انجام شد.

شناسایی جدایه ها با استفاده از ویژگی های ریخت شناختی

شناسایی اولیه ی جدایه ها بر اساس ویژگی های ریخت شناختی پرگنه ها و ساختار اندام باردهی و با استفاده از کلیدهای موجود (Barnett & Hunter, 1998; Hanlin, 1998; Seifert, Morgan-Jones, Gams, & Kendrick, 2011) انجام شد. پس از شناسایی اولیه، جدایه ها بر اساس خصوصیات ریخت-شناختی مهم شامل رنگ، شکل و سرعت رشد پرگنه و نیز ویژگی های کنیدیوماتا، کنیدیوفور، کنیدیوم و ریشه گروه بندی شدند. گروه های اصلی شامل جدایه های فاقد اسپور در محیط کشت، جدایه های دارای پیکنیدیوم و جدایه های دارای کنیدیوم و کنیدیوفور بودند. جدایه های هر گروه بر اساس شکل، سرعت رشد

2- MEA= Malt extract Agar

1- PDA= Potato dextrose agar

جدول ۱- منشأ جغرافیایی و تعداد جدایه‌های قارچی به دست آمده از تاک‌های بیمار در استان فارس طی سال‌های ۱۳۹۷ تا ۱۳۹۹.
Table 1. Geographical origin and number of the fungal isolates recovered from diseased grapevines in Fars province (Iran) during 2018-2020.

Fungal species	Region	Number of isolates	
		From each region	Total and percentages (%)
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	Doshman Ziari	10	15 (9.03%)
	Kavar	5	
<i>Cytospora chrysosperma</i>	Bavanat	3	9 (5.42%)
	Doshman Ziari	6	
<i>Fomitiporia mediterranea</i>	Bavanat	5	21 (12.65%)
	Doshman Ziari	12	
	Kavar	4	
<i>Kalmusia variispora</i>	Bavanat	5	33 (19.87%)
	Doshman Ziari	15	
	Kavar	7	
	Zarghan	6	
<i>Macrophomina phaseolina</i>	Doshman Ziari	8	12 (7.22%)
	Zarghan	4	
<i>Phaeoacremonium minimum</i>	Bavanat	8	47 (28.31%)
	Doshman Ziari	16	
	Kavar	10	
	Shiraz	6	
	Zarghan	7	
<i>Phaeoacremonium parasiticum</i>	Bavanat	5	29 (17.46%)
	Doshman Ziari	10	
	Kavar	3	
	Shiraz	7	
	Zarghan	4	

قطعات دی‌ان‌ای زیر پرتو فرابنفش بررسی شد. خالص‌سازی و توالی‌سنجی قطعات دی‌ان‌ای حاصل، توسط شرکت ژنتیک کدون ایران انجام شد.

ویرایش و هم‌ردیف‌سازی توالی دی‌ان‌ای و برآورد درخت فیلوژنتیکی

ویرایش و هم‌ردیف‌سازی توالی‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار Geneious 7.1.4 و به روش دستی انجام شد. با مقایسه‌ی نسخه‌ی مستقیم و معکوس شده، رشته‌ی برآیند به دست آمد و پس از ثبت در بانک ژن^۳ رس‌شمار آن‌ها اخذ (جدول ۳) و با توالی‌های معتبر موجود در بانک ژن مقایسه شد. به منظور بررسی موقعیت فیلوژنتیکی جدایه‌ها در مقایسه با گونه‌های خویشاوند، توالی‌های معتبر گونه‌های قارچی از بانک ژن اخذ و پس از هم‌ردیف‌سازی توالی‌ها، درخت فیلوژنتیکی با رهیافت بیسی با استفاده از نرم افزار MrBayes v3.1 و مطابق

۵۰۰ میکرولیتر بافر تب^۱ حاوی ۰/۲ درصد پروتیناز کی^۲ افزوده و میسلیم با استفاده از هموژنایزر و چند دانه ماسه‌ی سترون به خوبی ساییده شد. عصاره‌ی به دست آمده به مدت یک ساعت در ۶۵ درجه‌ی سلسیوس قرار گرفته، سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور سانتیفریژ و مایع رویی برداشته شد (Mostowfizadeh-Ghalamfarsa & Mirsoleimani, 2013). استخراج دی‌ان‌ای از عصاره‌ی یاخته‌ای با استفاده از کیت تجاری شرکت دنازیست و مطابق روش پیشنهادی شرکت سازنده انجام شد.

فزون‌سازی، خالص‌سازی و توالی‌سنجی دی‌ان‌ای

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای مناسب برای هر آرایه و مطابق با شرایطی که پیش از این برای هر آغازگر گزارش شده بود (جدول ۲) انجام شد. نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با الکتروفورز در ژل یک درصد آگارز حاوی ۰/۰۵٪ اتیدیوم بروماید تأیید و

3- GenBank, NCBI, USA; [Online]
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

1- CTAB
 2- Proteinase K

جدول ۲- آغازگرهای به کار رفته در این پژوهش.

Table 2. Primers used in this study

Target DNA	Fungal species	Primer name	Primer sequence (5'→3')	Reference
ITS	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White et al. 1990
	<i>Cytospora chrysosperma</i>			
	<i>Fomitiporia mediterranea</i>			
	<i>Kalmusia variispora</i>			
β-tubulin	<i>Macrophomina phaseolina</i>	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	Glass and Donaldson 1995
	<i>Phaeoacremonium minimum</i>			
	<i>Phaeoacremonium parasiticum</i>			
	<i>Kalmusia variispora</i>	Bt2A	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	
β-tubulin	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	Bt2B	AACCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	O'Donnell and Cigelnik 1997
	<i>Cytospora chrysosperma</i>			
	<i>Macrophomina phaseolina</i>	T1	AACATGCGTGAGATTGTAAGT	
	<i>Phaeoacremonium minimum</i>			
Actin	<i>Phaeoacremonium minimum</i>	Bt2B	AACCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	Glass and Donaldson 1995
	<i>Phaeoacremonium parasiticum</i>			
Actin	<i>Phaeoacremonium minimum</i>	ACT-512F	ATGTGCAAGGCCGTTTCGC	Carbone and Kohn 1999
	<i>Phaeoacremonium parasiticum</i>	ACT-783R	TACGAGTCCTTCTGGCCCAT	

منظور حفظ رطوبت، روی حفره پنبه‌ی مرطوب سترون قرار گرفت و محل زخم با استفاده از نوار پارافیلیم بسته شد. گیاهان شاهد با قطعات محیط کشت فاقد قارچ مایه‌زنی شدند. علائم پیشرفت بیماری پس از ۱۴ ماه مورد بررسی قرار گرفت و عامل بیماری از بافت‌های آلوده مجدداً جداسازی و بر اساس خصوصیات ریخت‌شناختی شناسایی شد. در مواردی که شناسایی دقیق جدایه‌ها بر اساس خصوصیات ریخت‌شناختی به دلیل عدم تولید ساختارهای تولیدمثلی امکان‌پذیر نبود از توالی سنجی ناحیه‌ی آی‌تی‌اس^۲ برای شناسایی جدایه‌ها استفاده شد.

نتایج

نمونه‌برداری و علائم بیماری

در این مطالعه از ۸۲ درختچه‌ی تاک با علائم کاهش رشد، زردی و سرخشکیدی در بخش‌های هوایی (شکل ۱) و تغییر رنگ بافت چوبی نمونه‌برداری شد. در برش عرضی تنه و شاخه‌های درختچه‌های

الگوریتم به کار رفته توسط Jung and Burgess (2009) رسم و احتمال پس‌آیند بیسی بر اساس ۱۰۰۰۱ درخت محاسبه شد. ویرایش و نمایش درخت‌های فیلوژنتیکی به دست آمده با نرم افزار (ATV Zmasek & Eddy, 2001) انجام شد. مناسب‌ترین مدل جایگزینی نوکلئوتیدی^۱ نیز با استفاده از نرم افزار jModeltest (Posada, 2008) مورد بررسی قرار گرفت.

آزمون بیماری‌زایی

به منظور اثبات بیماری‌زایی گونه‌های قارچی جدا شده از درختچه‌های بیمار، آزمون بیماری‌زایی برای هر یک از گونه‌ها در گلخانه و روی نهال‌های یک‌ساله‌ی تاک انجام شد. پس از سترون‌سازی تنه‌ی نهال‌ها با استفاده از اتانول ۷۰ درصد، حفره‌ای به قطر شش و عمق چهار میلی‌متر با استفاده از مته‌ی سترون در تنه‌ی نهال ایجاد شد. سپس یک قطعه‌ی پنج میلی‌متری از حاشیه‌ی جوان پُرگنه‌ی قارچ مورد آزمون روی محیط کشت پی‌دی‌ای در حفره‌ی ایجاد شده قرار گرفت. به

2- ITS: Internal transcribed spacer rDNA

1-Nucleotide substitution model

Georg & C.J.K. Wang) W. Gams, (Ajello, *Fomitiporia*، Crous & M.J. Wingf. *K. C. chrysosperma mediterranea* M. Fisch و *variispora* از تاک‌های آلوده جداسازی و شناسایی شد (جدول ۱). علاوه بر گونه‌های فوق، جدایه‌هایی از جنس‌های آسپرگیلوس، آلترناریا، پنسیلیوم و فوزاریوم نیز جداسازی شدند که در این پژوهش مورد بررسی قرار نگرفتند.

آلوده، انواع مختلفی از علائم شامل پوسیدگی سفید، نکروز مرکزی، نکروز گوه‌ای، نکروز نامنظم، نقطه‌های سیاه‌رنگ و رگه‌های سیاه‌رنگ مشاهده شد (شکل ۲).

جداسازی و شناسایی بیمارگرها

در مجموع ۱۶۶ جدایه‌ی قارچی شامل گونه‌های *Botryosphaeria dothidea* (Moug.) Ces. & De *Phaeoacremonium minimum* (Tul. & C. No *Phaeoacremonium parasiticum*، Tul.) Gramaje

جدول ۳. جدایه‌های توالی‌سنجی شده و به کار رفته برای بررسی فیلوژنتیکی.

Table 3. Isolates sequenced and used for phylogenetic study.

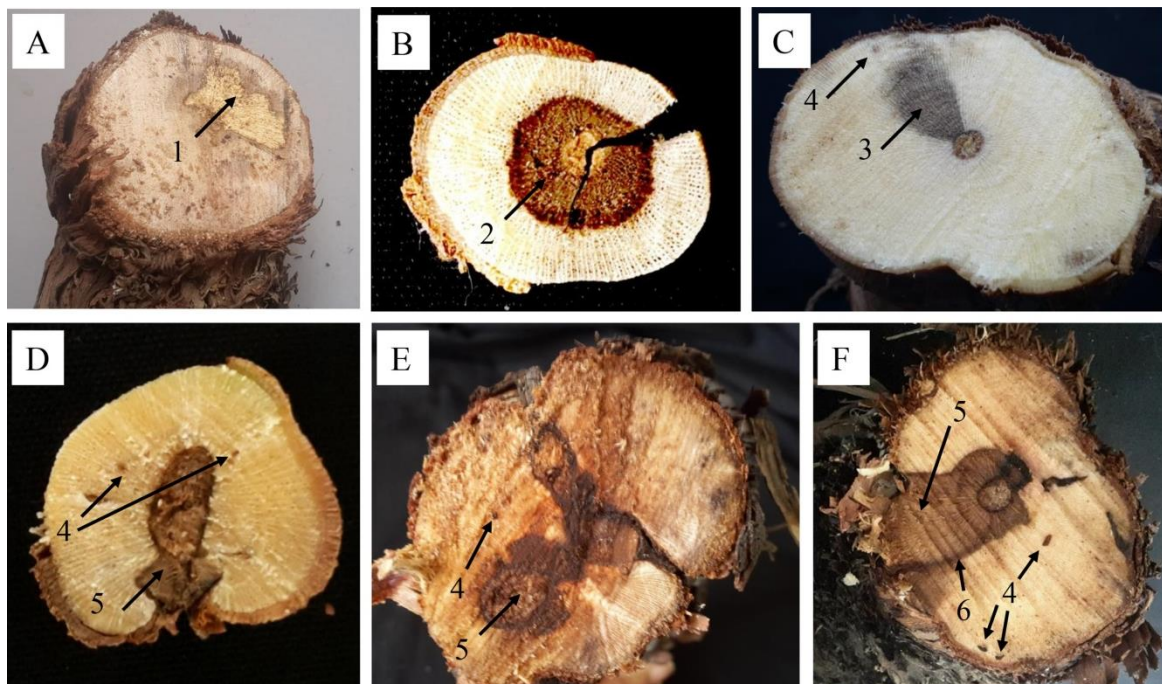
Species	Isolate	GenBank accession number		
		ITS	Beta-tubulin	Actin
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	EGD312	MZ489519	MZ491788	N.P
	EGD313	MZ489520	MZ491789	N.P
	EGD314	MZ489521	MZ491790	N.P
	EGD315	MZ489522	MZ491791	N.P
<i>Cytospora chrysosperma</i>	EGD812	MZ489523	MZ491792	N.P
	EGD813	MZ489524	MZ491793	N.P
	EGD814	MZ489525	MZ491794	N.P
	EGD815	MZ489526	MZ491795	N.P
<i>Fomitiporia mediterranea</i>	EGD412	MZ489527	N.P	N.P
	EGD413	MZ489528	N.P	N.P
	EGD414	MZ489529	N.P	N.P
	EGD415	MZ489530	N.P	N.P
<i>Kalmusia variispora</i>	EGD112	MZ489531	MZ491796	N.P
	EGD113	MZ489532	MZ491797	N.P
	EGD114	MZ489533	MZ491798	N.P
	EGD115	MZ489534	MZ491799	N.P
<i>Macrophomina phaseolina</i>	EGD712	MZ489535	MZ491800	N.P
	EGD713	MZ489536	MZ491801	N.P
	EGD714	MZ489537	MZ491802	N.P
	EGD715	MZ489538	MZ491803	N.P
<i>Phaeoacremonium minimum</i>	EGD512	MZ489539	MZ491804	MZ491812
	EGD513	MZ489540	MZ491805	MZ491813
	EGD514	MZ489541	MZ491806	MZ491814
	EGD515	MZ489542	MZ491807	MZ491815
<i>Phaeoacremonium parasiticum</i>	EGD612	MZ489543	MZ491808	MZ491816
	EGD613	MZ489544	MZ491809	MZ491817
	EGD614	MZ489545	MZ491810	MZ491818
	EGD615	MZ489546	MZ491811	MZ491819

N.P: Not performed.



شکل ۱- علائم بیماری‌های تنه‌ی تاک مشاهده شده در استان فارس: (A) و (B) کاهش رشد، زردی و سرخشیدگی؛ (C) و (D) زردی و نکروز برگ.

Figure 1. Symptoms of grapevine trunk diseases observed in Fars province: (A) and (B) stunted growth, yellowing, branches dieback; (C) and (D) leaf chlorosis and necrosis.



شکل ۲- علائم داخلی بیماری‌های تنه‌ی تاک مشاهده شده در استان فارس: (A) پوسیدگی سفید (۱); (B) نکروز مرکزی (۲); (C) بروز هم‌زمان نکروز گوه‌ای (۳) و نقطه‌های سیاه‌رنگ (۴); (D) و (E) بروز هم‌زمان نقطه‌های سیاه‌رنگ (۴) و نکروز نامنظم (۵); (F) بروز هم‌زمان نقطه‌های سیاه‌رنگ (۴)، نکروز نامنظم (۵) و رگه‌ی سیاه‌رنگ (۶).

Figure 2. Internal symptoms of grapevine trunk diseases observed in Fars province: (A) White rot (1); (B) Central necrosis (2); (C) Co-occurrence of wedge-shape necrosis (3) and black spots (4); (D) and (E) Co-occurrence of black spots (4) and irregular wood necrosis (5); (F) Co-occurrence of black spots (4), irregular wood necrosis (5) and black streaking (6).

واکاوی‌های فیلوژنتیکی

پس از ویرایش توالی‌ها، هم‌ردیف‌سازی نهایی^۱ برای ناحیه‌ی آی‌تی‌اس در جدایه‌های بازیدیومیستی ۷۶۰ جفت باز و در جدایه‌های آسکومیستی ۶۱۰ جفت باز، برای ناحیه‌ی بتاتوبولین ۴۵۰ جفت باز، برای ناحیه‌ی اکتین ۲۵۰ جفت باز و برای برآیند نواحی آی‌تی‌اس و بتاتوبولین در جدایه‌های آسکومیستی ۱۰۵۰ جفت باز بود. در تمام موارد، شکاف‌ها نیز در شمارش تعداد جفت بازها محاسبه شدند.

برای رسم درخت‌های فیلوژنتیکی بر اساس رهیافت بیسی از هم‌ردیف‌سازی توالی‌های به دست آمده در این پژوهش و توالی‌های گونه‌های معتبر موجود در بانک ژن برای ناحیه‌ی آی‌تی‌اس در جدایه‌های بازیدیومیستی و برآیند نواحی آی‌تی‌اس و بتاتوبولین در جدایه‌های آسکومیستی استفاده شد. مناسب‌ترین مدل جایگزینی نوکلئوتیدی برای توالی‌های آی‌تی‌اس در جدایه‌های بازیدیومیستی مدل HKY+I+G و برای برآیند نواحی آی‌تی‌اس و بتاتوبولین در جدایه‌های آسکومیستی مدل GTR+I+G تشخیص داده شد.

در درخت‌های فیلوژنتیکی رسم شده بر اساس توالی ناحیه‌ی آی‌تی‌اس در جدایه‌های بازیدیومیستی (شکل ۳) و برآیند نواحی آی‌تی‌اس و بتاتوبولین در جدایه‌های آسکومیستی (شکل ۴) تمامی گونه‌های جداسازی شده در این پژوهش همراه با گونه‌های مشابه معتبر موجود در بانک ژن در گروه‌های تک‌نیا قرار گرفتند. احتمال پس‌آیند بیسی در این گروه‌های تک‌نیا در تمام موارد به استثنای *F. mediterranea*، یک بود (شکل ۳ و ۴).

در درخت‌های فیلوژنتیکی که به صورت مجزا برای هر یک از جنس‌ها با استفاده از داده‌های به دست آمده در این پژوهش و توالی‌های گونه‌های معتبر موجود در بانک ژن بر اساس توالی ناحیه آی‌تی‌اس، بتاتوبولین و اکتین رسم شد نیز تمامی گونه‌های جداسازی شده در این پژوهش همراه با گونه‌های مشابه معتبر موجود در بانک ژن

در گروه‌های تک‌نیا قرار گرفتند. احتمال پس‌آیند بیسی در این گروه‌های تک‌نیا بین ۰/۸۰ تا یک بود (داده‌ها نشان داده نشده است).

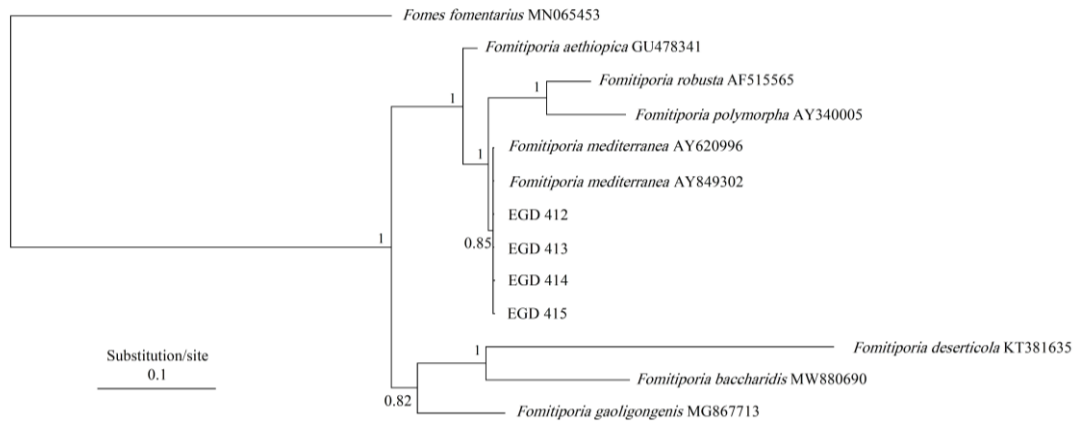
آزمون بیماری‌زایی

بررسی نهال‌ها چهارده ماه پس از مایه‌زنی نشان داد کلیه گونه‌ها روی نهال‌های تاک بیماری‌زا هستند. در میان گونه‌های مورد بررسی در این پژوهش، گونه *F. mediterranea* باعث بروز پوسیدگی سفید و سایر گونه‌ها باعث بروز نکروز قهوه‌ای رنگ در گیاهان مایه زنی شده گردیدند. علائم آلودگی از محل مایه‌زنی آغاز شده و در بافت تنه‌ی نهال‌ها گسترش یافته بود. در گیاهان شاهد علائم آلودگی مشاهده نشد (شکل ۵). به منظور تکمیل اصول کخ، عامل بیماری مجدداً از گیاهان آلوده جداسازی و بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی و توالی سنجی ناحیه‌ی آی‌تی‌اس شناسایی شد.

بحث

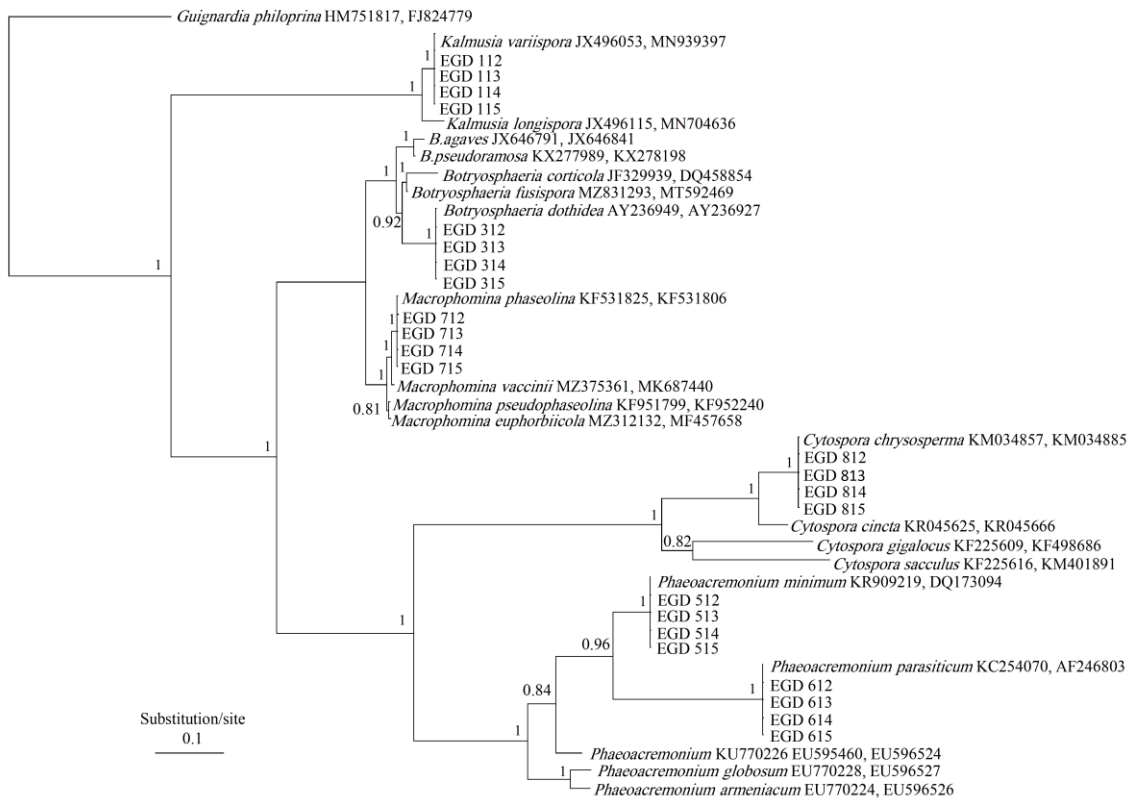
یافته‌های این پژوهش نشان داد گونه‌های *B. dothidea*، *K. F. mediterranea*، *C. chrysosperma*، *P. minimum*، *M. phaseolina*، *variispora parasiticum* عوامل ایجادکننده‌ی بیماری‌های تنه‌ی تاک در مناطق مورد بررسی در استان فارس هستند. گونه *P. minimum* با فراوانی ۲۸/۳۱٪ و گونه *C. chrysosperma* با فراوانی ۵/۴۲٪ به ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین تعداد جدایه‌ها را به خود اختصاص دادند.

گونه *B. dothidea* گونه‌ی تپ جنس *Botryosphaeria* بوده، به راسته‌ی *Botryosphaeriales* و خانواده‌ی *Botryosphaeriaceae* تعلق دارد. گونه‌های این راسته از مهم‌ترین بیمارگرهای عامل شانکر، نکروز چوب و خشکیدگی سر شاخه‌ی درختان در تمام جهان هستند (Marsberg, Kemler, Jami, Nagel, Postma-) Smidt, Naidoo, Wingfield, Crous, Spatafora, & (Robbertse, 2017).



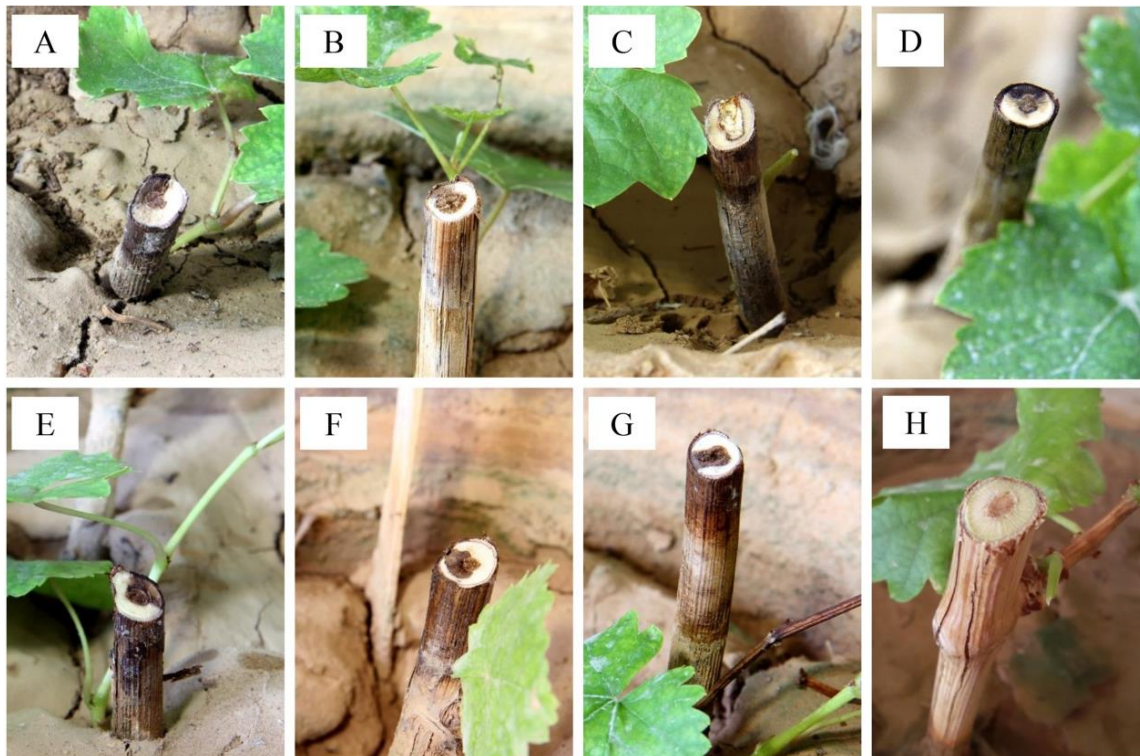
شکل ۳- روابط فیلوژنتیکی جدایه‌های بازیدیومیستی به دست آمده در این پژوهش و گونه‌های معتبر اخذ شده از بانک ژن بر اساس فاصله‌ی ترانویسی شده‌ی داخلی دی‌ان‌ای ریپوزومی (آی‌تی‌اس). احتمال پس‌آیند بیسی نزدیک محل انشعاب هر شاخه نشان داده شده است.

Figure 3. Phylogenetic relationship of Basidiomycetes isolates derived in this study with confirmed species from GenBank based on internal transcribed spacers (ITS) in Ascomycete isolates. Bayesian posterior probabilities are shown next to the branch points.



شکل ۴- روابط فیلوژنتیکی جدایه‌های آسکومیستی به دست آمده در این پژوهش و گونه‌های معتبر اخذ شده از بانک ژن بر مبنای برآیند نواحی آی‌تی‌اس و بتاتوبولین. احتمال پس‌آیند بیسی نزدیک محل انشعاب هر شاخه نشان داده شده است.

Figure 4. Phylogenetic relationship of Ascomycete isolates derived in this study with confirmed species from GenBank based on combined ITS and β -tubulin regions. Bayesian posterior probabilities are shown next to the branch points.



شکل ۵- آزمون بیماری‌زایی *Botryosphaeria dothidea* (A); *Cytospora chrysosperma* (B); *Fomitiporia mediterranea* (C); *Kalmusia variispora* (D); *Macrophomina phaseolina* (E); *Phaeoacremonium minimum* (F); *Phaeoacremonium parasiticum* (G) و شاهد (H) با استفاده از نهال‌های یک ساله‌ی تاک در گلخانه.

Figure 5. Pathogenicity test of *Botryosphaeria dothidea* (A); *Cytospora chrysosperma* (B); *Fomitiporia mediterranea* (C); *Kalmusia variispora* (D); *Macrophomina phaseolina* (E); *Phaeoacremonium minimum* (F); *Phaeoacremonium parasiticum* (G) and control (H) using one year old grape seedlings in glasshouse

Farahmand, 2014) گزارش شده است. مطالعه‌ی حاضر نشان داد *B. dothidea* علاوه بر استان‌های مذکور در استان فارس نیز سبب زرد شدن برگ‌ها، توقف رشد، مرگ سرشاخه و نکروز چوب در درختچه‌های تاک می‌شود. اگرچه پیش از این گزارش شده بود که جدایه‌های *B. dothidea* قادر به تولید پیکنیدیوم در محیط کشت هستند (Marsberg et al., 2017; Billones-Baijens & Savocchia, 2019)، در جدایه‌های مورد آزمون در این پژوهش پس از گذشت شش ماه، در هیچ یک از محیط کشت‌های مورد بررسی پیکنیدیوم تشکیل نشد. دلیل عدم تشکیل پیکنیدیوم در جدایه‌های مذکور مشخص نیست اما گزارش شده که عواملی مانند کشت مکرر جدایه‌های *Botryosphaeria* spp. سبب از بین رفتن خاصیت هاگ‌زایی آن‌ها می‌شود (Amponsah, Jones, &

تنش‌های ناشی از عوامل غیر زنده مانند تغییرات آب و هوایی، آسیب‌های فیزیکی و خشکی سبب افزایش خسارت ناشی از *B. dothidea* در مناطق مختلف جهان شده است (Jami, Slippers, Wingfield, Loots, & Gryzenhout, 2015; Marsberg et al., 2017). *B. dothidea* تا کنون از بیش از ۲۰ میزبان از جمله تاک در مناطق مختلف جهان جداسازی شده است (Torres, Leavitt, Voegel, & Gubler, 2006; Akgul, Savas, & Eskalen 2014; Marsberg et al., 2017). در ایران نیز این گونه پیش از این از تاک‌هایی با علائم توقف رشد، مرگ سرشاخه و نکروز چوب در استان‌های آذربایجان شرقی و غربی (Arzanlou, Moshari, Bakhshi, & Khodaie, 2012) و کرمان (Arabnezhad, Mohammadi, Massumi, &

گونه‌ی *F. mediterranea* تا کنون از تاک‌های مبتلا به پوسیدگی سفید در استان‌های خراسان شمالی (Farashiani, Mousavi Jorf, & Karimi 2012; Rajaiyan, Karimi Shahri, Pirmia, Dehvari, and Amarloo, 2013) و خراسان رضوی (Ghezelsefloo, 2013) (Mohammadi, Mahdian, & Ghanbary 2020) جداسازی شده است. مطالعه‌ی حاضر، نخستین گزارش از پوسیدگی سفید تاک ناشی از *F. mediterranea* در استان فارس است.

گونه‌ی *K. variispora* به خانواده Montagnulaceae و راسته Pleosporale تعلق دارد. اعضای این جنس اغلب به عنوان بیمارگرهای ضعیفی شناخته می‌شوند که دامنه‌ی میزبانی وسیعی دارند (Alidadi, Javan-Nikkhah, Kowsari, Karami, & Ebrahimi Rastaghi, 2018; Verkley, Dukik, Renfurm, Göker, & Stielow, 2014; Zhang, Zhang, Wang, Fournier, Crous, Zhang, Li, & Ariyawansa, & Hyde, 2014). گونه *K. variispora* پیش از این از تاک‌های مبتلا به زوال و پوسیدگی چوب در استان‌های اردبیل و آذربایجان شرقی گزارش شده است (Abed-Ashtiani et al., 2019). مطالعه‌ی حاضر نشان داد *K. variispora* علاوه بر استان‌های اردبیل و آذربایجان شرقی در استان فارس نیز از عوامل ایجاد کننده‌ی بیماری‌های تنه‌ی تاک است.

گونه‌ی *M. phaseolina* به خانواده Botryosphaeriales و راسته Botryosphaeriaceae تعلق دارد. این گونه یکی از بیمارگرهای مهم گیاهی است که دامنه‌ی میزبانی وسیعی داشته سبب بروز شانکر و نکروز در گیاهان مختلف می‌شود (Su, Suh, Schneider, & Russin, 2001; Kaur, Dhillon, Brar, Vallad, & Chand, & Chauhan, 2012). گونه‌ی *M. phaseolina* تا کنون از تاک‌های بیمار در مناطق مختلف جهان گزارش شده است (González & Tello, 2011; Nouri, Zhuang, Culumber, & Trouillas, 2018).

(Ridgway, & Jaspers, 2008). بنابراین احتمال دارد جدایه‌های مورد آزمون، خارج از شرایط آزمایشگاه و هنگام آلودگی درختچه‌های تاک قادر به تشکیل پیکنیدیوم بوده و کشت مکرر آن‌ها در شرایط آزمایشگاهی باعث از بین رفتن توان هاگ‌زایی آن‌ها شده باشد.

گونه *C. chrysosperma* به خانواده Valsaceae و راسته Diaporthales تعلق دارد. گونه‌های این جنس اغلب به عنوان عامل شانکر، نکروز چوب و خشکیدگی سرشاخه در میزبان‌های چوبی شناخته می‌شوند (Adams, Roux, & Wingfield, 2006). تا کنون گیاهان چوبی مختلفی به عنوان میزبان حساس به شانکر سیتوسپورایی معرفی شده‌اند (Sinclair, Lyon, & Johnson, 1987; Norphanphoun, Doilom, Daranagama, Phookamsak, Wen, Bulgakov, & Hyde, 2017) اما اطلاعات چندانی درباره‌ی نقش گونه‌های سیتوسپورا در بیماری‌های تنه تاک در دنیا وجود ندارد. ارزنلو و نرمانی این قارچ را به عنوان عامل زوال و نکروز چوب تاک در استان‌های آذربایجان شرقی و غربی ایران گزارش کردند (Arzanlou & Narmani, 2015). مطالعه‌ی حاضر نشان داد گونه‌ی *C. chrysosperma* علاوه بر استان‌های آذربایجان شرقی و غربی در استان فارس نیز از عوامل ایجاد کننده‌ی بیماری‌های تنه‌ی تاک است.

گونه‌ی *F. mediterranea* به خانواده Hymenochaetales و راسته Hymenochaetaceae تعلق دارد و عامل پوسیدگی سفید چوب در درختان مختلف است (Fischer 2002; Pilotti, Gervasi, & Brunetti, 2005; Pilotti, Tizzani, Brunetti, & Gervasi, Di Lernia, & Lumia, 2010). این گونه یکی از مهم‌ترین بیمارگرهای تاک در بسیاری از مناطق جهان و یکی از عوامل ایجاد کننده‌ی بیماری اسکا است که با ایجاد پوسیدگی سفید، خسارت زیادی به این محصول وارد می‌کند (Fischer, 2002; Ciccarone, Graniti, & Schiaffino, & Marras, 2004; Fischer, 2006).

Arabnezhad et al., 2020)، کرمان (Amarloo et al., 2020) و فارس (Mohammadi & Banihashemi, 2014; Mohammadi, Banihashemi, Gramaje, & Armengol, 2013b) گزارش شده است. گونه‌های *P. minimum* و *P. parasiticum* پیش از این از درختچه‌های تاک در استان فارس جداسازی شده بودند (Mohammadi & Banihashemi, 2007; Mohammadi et al., 2013b). مطالعه‌ی حاضر با تأیید نتایج مطالعات پیشین نشان داد این گونه‌ها از عوامل ایجاد کننده بیماری تنه‌ی تاک در استان فارس هستند. در مطالعاتی که پیش از این در استان فارس صورت گرفته است گونه‌های *Phaeoacremonium mortoniae* (Crous & Gams, 2007) و *Phaeoacremonium inflatipes* (Crous & M.J. Wingfield, 2007; Mohammadi & Banihashemi, 2011; Mohammadi et al., 2013b)، *Phaeoacremonium chlamydospora* (MacDon. & Butler, 2009) و *Diplodia seriata* (De Not, 1939) (با فرم جنسی *Botryosphaeria obtusa* (Pennycook & Samuels), 2006) (با فرم جنسی *Botryosphaeria parva*) (Mohammadi, Gramaje, Banihashemi, & Armengol, 2013a) به عنوان عوامل ایجاد کننده‌ی بیماری‌های تنه‌ی تاک در این استان گزارش شدند. با توجه به سطح زیاد تاکستان‌ها در استان فارس که بیش از ۶۰ هزار هکتار است (آمارنامه کشاورزی سال ۱۳۹۸) تفاوت گونه‌های جداسازی شده در پژوهش حاضر و پژوهش‌های فوق ممکن است ناشی از تفاوت در مناطق نمونه‌برداری یا کافی نبودن تعداد نمونه‌برداری‌ها باشد. اگرچه این احتمال نیز وجود دارد که گونه‌های مهم ایجاد کننده‌ی بیماری‌های تنه‌ی تاک در استان فارس و یا فراوانی آن‌ها از زمان نمونه‌برداری در مطالعات

در ایران نیز این گونه از تاک‌های مبتلا به زوال و پوسیدگی چوب در استان آذربایجان شرقی جداسازی شده است (Abed-Ashtiani et al., 2018). مطالعه‌ی حاضر، نخستین گزارش از بیماری تنه‌ی تاک ناشی از *M. phaseolina* در استان فارس است. پیش از این گزارش شده است که جدایه‌های *M. phaseolina* اغلب در شرایط درون زیوه‌ای قادر به تولید پیکنیدیوم نیستند (Kaur et al., 2012; Abed-Ashtiani et al., 2018). این موضوع احتمالاً ناشی از فراهم نبودن شرایط مناسب تولید پیکنیدیوم در آزمایشگاه است. در جدایه‌های *M. phaseolina* بررسی شده در پژوهش حاضر نیز پس از گذشت شش ماه، در هیچ یک از محیط کشت‌های مورد بررسی پیکنیدیوم تشکیل نشد.

گونه‌های *P. minimum* و *P. parasiticum* به خانواده Togniniaceae و راسته Togniniales تعلق دارد. گونه‌های این جنس از گیاهان مختلفی جداسازی شده‌اند، اما تاک یکی از مهم‌ترین میزبان‌های این جنس است (Gramaje, Mostert, Groenewald, & Crous, 2015). گونه *P. minimum* معمول‌ترین گونه‌ی جنس *Phaeoacremonium* روی تاک است (Gramaje et al., 2015; Gramaje et al., 2018) و تا کنون از مناطق مختلف جهان جداسازی شده است (Gramaje et al., 2015; Ye, Jia, Manawasinghe, Li, Zhang, Mugna, Wu, Hyde, & Yan, 2021). این گونه تا کنون از استان‌های آذربایجان شرقی و غربی (Arzanlou, Moshari, Salari, & Badali, 2013) و فارس (Amarloo et al., 2020) (Mohammadi & Banihashemi, 2007; Mohammadi et al., 2013) گزارش شده است. گونه *P. parasiticum* نیز از گونه‌های مهم ایجاد کننده‌ی بیماری در درختچه‌های تاک در نقاط مختلف جهان است (Dupont, Magnin, Ce'sari, & Gatica, 2002; Mostert et al., 2006; Gramaje et al., 2015). در ایران این گونه تا کنون از استان‌های خراسان شمالی (Farashiani et al., 2012) و خراسان رضوی

ترکیبات شیمیایی و طبیعی که قادر به کاهش خسارت ناشی از گونه‌های مختلف قارچی عامل بیماری‌های تنه تاک در تاکستان‌های کشور باشند مورد نیاز است.

سپاس‌گزاری

نویسندگان از سازمان جهاد کشاورزی استان فارس و مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور برای حمایت از این پژوهش با شماره پروژه ۹۷۱۳۶۲-۹۷۱۳۹-۱۶-۵۰-۲۴ تشکر و قدرانی می‌نمایند.

پیشین (سال‌های ۱۳۸۳ تا ۱۳۸۶) تا زمان نمونه‌برداری در مطالعه‌ی حاضر (سال‌های ۱۳۹۷ تا ۱۳۹۹) تغییر کرده باشند. یافته‌های پژوهش حاضر برای نخستین بار نشان داد گونه‌های *F. C. chrysosperma*، *B. dothidea*، *M. phaseolina* و *K. variispora mediterranea* از عوامل ایجاد کننده‌ی بیماری‌های تنه‌ی تاک در استان فارس هستند. مطالعات بیشتری برای شناسایی عوامل ایجاد کننده‌ی بیماری‌های تنه‌ی تاک در مناطقی از کشور که تاکنون مورد بررسی قرار نگرفته است و نیز شناسایی

References

- Abed-Ashtiani, F., Narmani, A., & Arzanlou, M. (2018). *Macrophomina phaseolina* associated with grapevine decline in Iran. *Phytopathologia Mediterranea*, 57(1), 107-111.
- Abed-Ashtiani, F., Narmani, A., & Arzanlou, M. (2019). Analysis of *Kalmusia variispora* associated with grapevine decline in Iran. *European Journal of Plant Pathology*, 154(3), 787-799.
- Abreo, E., Martinez, S., Bettucci, L., & Lupo, S. (2013). Characterization of *Botryosphaeriaceae* species associated with grapevines in Uruguay. *Australasian Plant Pathology*, 42(3), 241-249.
- Adams, G. C., Roux, J., & Wingfield, M. J. (2006). Cytospora species (Ascomycota, Diaporthales, Valsaceae): introduced and native pathogens of trees in South Africa. *Australasian Plant Pathology*, 35(5), 521-548.
- Akgul, D. S., Savas, N. G., & Eskalen, A. (2014). First report of wood canker caused by *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata*, *Neofusicoccum parvum*, and *Lasiodiplodia theobromae* on grapevine in Turkey. *Plant Disease*, 98(4), 568.
- Alidadi, A., Javan-Nikkhah, M., Kowsari, M., Karami, S., & Ebrahimi Rastaghi, M. (2018). Some species of fungi associated with declined Persian oak trees in Ilam province with emphasis on new records to mycobiota of Iran. *Rostaniha*, 19(2), 75-91. (In Farsi with English Summary).
- Amarloo, O. A., Mohammadi, H., Mahdian, S. A., & Ghanbary, T. (2020). Identification and pathogenicity of fungal species associated with grapevine trunk diseases in Khorasan-Razavi province, Iran. *Mycologia Iranica*, 7(1), 83-94.
- Amponsah, N. T., Jones, E. E., Ridgway, H. J., & Jaspers, M. V. (2008). Production of *Botryosphaeria* species conidia using grapevine green shoots. *New Zealand Plant Protection*, 61(3), 301-305.
- ArabNezhad, M., Mohammadi, H., Masoumi, H., & Farahmand, H. (2014). Fungal flora associated with internal symptoms of grapevine decline in Kerman province. *Agricultural Biotechnology Journal*, 6(2), 115-132. (In Farsi with English Summary).

- Arzanlou, M., & Narmani, A. (2015). ITS sequence data and morphology differentiate *Cytospora chrysosperma* associated with trunk disease of grapevine in northern Iran. *Journal of Plant Protection Research*, 55(2), 117.
- Arzanlou, M., Moshari, S., Bakhshi, M., & Khodaie, S. (2012). *Botryosphaeria dothidea* associated with grapevine decline disease in Iran. *Australasian Plant Disease Notes*, 7(1), 197-200.
- Arzanlou, M., Moshari, S., Salari, M., & Badali, H. (2013). Molecular characterisation and pathogenicity of *Phaeoacremonium* spp. associated with esca disease of grapevine in Northern Iran. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 46(4), 375-388.
- Barnett, H. L., & Hunter, B. B. (1998). Illustrated genera of imperfect fungi. The American Phytopathological Society. *US Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Washington State University, Pullman. APS Press. USA. St. Paul, Minnesota USA. 218p.*
- Billones-Baaijens, R., & Savocchia, S. (2019). A review of Botryosphaeriaceae species associated with grapevine trunk diseases in Australia and New Zealand. *Australasian Plant Pathology*, 48(1), 3-18.
- Bruno, G., & Sparapano, L. (2007). Effects of three esca-associated fungi on *Vitis vinifera* L.: V. Changes in the chemical and biological profile of xylem sap from diseased cv. Sangiovese vines. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 71(4), 210-229.
- Carbone, I., & Kohn, L. M. (1999). A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 91(3), 553-556.
- Ciccarone, C., Graniti, A., Schiaffino, A., & Marras, F. (2004). Molecular analysis of *Fomitiporia mediterranea* isolates from esca-affected grapevines in southern Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, 43(2), 268-272.
- Crous, P.W., Slippers, B., Wingfield, M.J., Rheeder, J., Marasas, W.F., Philips, A.J., Alves, A., Burgess, T., Barber, P. & Groenewald, J.Z. (2006). Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Studies in mycology*, 55(2), 235-253.
- Dupont, J., Magnin, S., Cesari, C., & Gatica, M. (2002). ITS and β -tubulin markers help delineate *Phaeoacremonium* species, and the occurrence of *P. parasiticum* in grapevine disease in Argentina. *Mycological Research*, 106(10), 1143-1150.
- Essakhi, S., Mugnai, L., Crous, P. W., Groenewald, J. Z., & Surico, G. (2008). Molecular and phenotypic characterisation of novel *Phaeoacremonium* species isolated from esca diseased grapevines. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 21, 119-134.
- Farashiani, A., Mousavi Jorf, S. A., & Karimi, M. R. (2012). Study of esca disease of grapevine in Bojnourd. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 48(2), 143-153. (In Farsi with English Summary).
- Fischer, M. (2002). A new wood-decaying basidiomycete species associated with esca of grapevine: *Fomitiporia mediterranea* (Hymenochaetales). *Mycological Progress*, 1(3), 315-324.

- Fischer, M. (2006). Biodiversity and geographic distribution of basidiomycetes causing esca-associated white rot in grapevine: a worldwide perspective. *Phytopathologia Mediterranea*, 45(1): 30-42.
- Glass, N. L., & Donaldson, G. C. (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and environmental microbiology*, 61(4), 1323-1330.
- Gramaje, D., Mostert, L., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2015). *Phaeoacremonium*: from esca disease to phaeohyphomycosis. *Fungal biology*, 119(9), 759-783.
- Gramaje, D., Urbez-Torres, J. R., & Sosnowski, M. R. (2018). Managing grapevine trunk diseases with respect to etiology and epidemiology: current strategies and future prospects. *Plant disease*, 102(1), 12-39.
- Hanlin, R. T. (1998). *Combined keys to illustrated genera of ascomycetes: Volumes 1 & 2*. American Phytopathological Society (APS Press).
- Hrycan, J., Hart, M., Bowen, P., Forge, T., & Urbez-Torres, J. R. (2020). Grapevine trunk disease fungi: their roles as latent pathogens and stress factors that favour disease development and symptom expression. *Phytopathologia Mediterranea*, 59(3), 395-424.
- Jami, F., Slippers, B., Wingfield, M. J., Loots, M. T., & Gryzenhout, M. (2015). Temporal and spatial variation of *Botryosphaeriaceae* associated with *Acacia karroo* in South Africa. *Fungal Ecology*, 15(1), 51-62.
- Jung, T., & Burgess, T. I. (2009). Re-evaluation of *Phytophthora citricola* isolates from multiple woody hosts in Europe and North America reveals a new species, *Phytophthora plurivora* sp. nov. *Persoonia*, 22(1), 95-110.
- Kaur, S., Dhillon, G. S., Brar, S. K., Vallad, G. E., Chand, R., & Chauhan, V. B. (2012). Emerging phytopathogen *Macrophomina phaseolina*: biology, economic importance and current diagnostic trends. *Critical Reviews in Microbiology*, 38(2), 136-151.
- Lawrence, D. P., Travadon, R., Pouzoulet, J., Rolshausen, P. E., Wilcox, W. F., & Baumgartner, K. (2017). Characterization of *Cytospora* isolates from wood cankers of declining grapevine in North America, with the descriptions of two new *Cytospora* species. *Plant Pathology*, 66(5), 713-725.
- Marsberg, A., Kemler, M., Jami, F., Nagel, J.H., Postma-Smidt, A., Naidoo, S., Wingfield, M.J., Crous, P.W., Spatafora, J.W., Hesse, C.N. and Robbertse, B. (2017). *Botryosphaeria dothidea*: a latent pathogen of global importance to woody plant health. *Molecular plant pathology*, 18(4), 477-488.
- Mohammadi, H. (2011). First report of *Phaeoacremonium mertoniae* associated with grapevine decline in Iran. *Plant disease*, 95(8), 1034-1034.
- Mohammadi, H., Alaniz, S., Banihashemi, Z., & Armengol, J. (2009). Characterization of *Cylindrocarpon liriodendri* associated with black foot disease of grapevine in Iran. *Journal of Phytopathology*, 157(10), 642-645.
- Mohammadi, H., & Banihashemi, Z. (2007). Grapevine decline in Fars Province of Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 43 (2), 249-311 (In Farsi with English Summary).

- Mohammadi, H., Gramaje, D., Banihashemi, Z., & Armengol, J. (2013a). Characterization of *Diplodia seriata* and *Neofusicoccum parvum* associated with grapevine decline in Iran. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 15(3), 603-616.
- Mohammadi, H., Banihashemi, Z., Gramaje, D., & Armengol, J. (2013b). Fungal pathogens associated with grapevine trunk diseases in Iran. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 15(1), 137-150.
- Mondello, V., Songy, A., Battiston, E., Pinto, C., Coppi, C., Trotel-Aziz, P., Clément, C., Mugnai, L., and Fontaine, F. (2018). Grapevine trunk diseases: a review of fifteen years of trials for their control with chemicals and biocontrol agents. *Plant Disease*, 102(7), 1189-1217.
- Mostert, L., Groenewald, J. Z., Summerbell, R. C., Gams, W., & Crous, P. W. (2006). Taxonomy and pathology of *Togninia* (Diaporthales) and its *Phaeoacremonium* anamorphs. *Studies in Mycology*, 54(1), 1-113.
- Mostowfizadeh-Ghalamfarsa, R., & Mirsoleimani, Z. (2013). Species-specific identification and detection of *Phytophthora pistaciae*, the causal agent of pistachio gummosis. *Phytopathologia Mediterranea*, 52(1), 30-45.
- Norphanphoun, C., Doilom, M., Daranagama, D. A., Phookamsak, R., Wen, T. C., Bulgakov, T. S., & Hyde, K. D. (2017). Revisiting the genus *Cytospora* and allied species. *Mycosphere*, 8(1), 7-7.
- Nouri, M. T., Zhuang, G., Culumber, C. M., & Trouillas, F. P. (2018). First Report of *Macrophomina phaseolina* Causing trunk and cordon canker disease of grapevine in the United States. *Plant Disease*, 103(5), 579.
- O'Donnell, K., & Cigelnik, E. (1997). Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Molecular phylogenetics and evolution*, 7(1), 103-116.
- Posada, D. (2008). jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25(7), 1253-1256.
- Pilotti, M., Gervasi, F., & Brunetti, A. (2005). Molecular identification of *Fomitiporia mediterranea* and *Eutypa lata*/*Libertella blepharis* in *Platanus* × *acerifolia*. *Journal of Phytopathology*, 153(4), 193-202.
- Pilotti, M., Tizzani, L., Brunetti, A., Gervasi, F., Di Lernia, G., & Lumia, V. (2010). Molecular identification of *Fomitiporia mediterranea* on declining and decayed hazelnut. *Journal of Plant Pathology*, 92(2), 115-129.
- Rajaiyan, M., Karimi Shahri, M.R., Pirnia, M., Dehvari V., and Ghezelsefloo, N. (2013). Detection and identification of some fungal agents causing grapevine decline in Northern Khorasan province vineyards using PCR technique. *Applied Entomology and Phytopathology*, 81(1), 167-177.
- Rombough, L. (2002). *The grape grower: A guide to organic viticulture*. Chelsea Green Publishing. USA. 283 p.
- Seifert, K., Morgan-Jones, G., Gams, W., & Kendrick, B. (2011). *The genera of Hyphomycetes*: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre. USA. 997 p.

- Sinclair, W.A., Lyon, H.H., & Johnson, W.T. (1987). Diseases of Trees and Shrubs. Cornell University Press Ithaca. USA 680 p.
- Su, G., Suh, S. O., Schneider, R. W., & Russin, J. S. (2001). Host specialization in the charcoal rot fungus, *Macrophomina phaseolina*. *Phytopathology*, 91(2), 120-126.
- Úrbez-Torres, J. R., Leavitt, G. M., Voegel, T. M., & Gubler, W. D. (2006). Identification and distribution of *Botryosphaeria* spp. associated with grapevine cankers in California. *Plant Disease*, 90(12), 1490-1503.
- Úrbez-Torres, J. R., Peduto, F., Smith, R. J., & Gubler, W. D. (2013). Phomopsis dieback: A grapevine trunk disease caused by *Phomopsis viticola* in California. *Plant disease*, 97(12), 1571-1579.
- Verkley, G.J.M., Dukik, K., Renfurm, R., Göker, M., & Stielow, J.B. (2014). Novel genera and species of coniothyrium-like fungi in *Montagnulaceae* (Ascomycota). *Persoonia*, 32(1), 25-51
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322.
- Wilcox, W.F., Gubler, W.D., & Uyemoto, J.K. (2015). Compendium of Grape Diseases, Disorders, and Pests. APS Press. USA. 232 p.
- Ye, Q., Jia, J., Manawasinghe, I.S., Li, X., Zhang, W., Mugna, L., Wu, X., Hyde, K.D., & Yan, J. (2021). *Fomitiporia punicata* and *Phaeoacremonium minimum* associated with Esca complex of grapevine in China. *Phytopathology Research*, 3(1), 1-17.
- Zmasek, C. M., & Eddy, S. R. (2001). ATV: display and manipulation of annotated phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17(4), 383-384.
- Zhang, Y., Zhang, J., Wang, Z., Fournier, J., Crous, P.W., Zhang, X., Li, W., Ariyawansa, H.A., & Hyde, K.D. (2014). *Neotypification* and phylogeny of *Kalmusia*. *Phytotaxa*, 176(1), 164-173.



© 2022 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).



Identification of fungal causal agents of grapevine trunk diseases in Fars province

B. Safaiefarahani¹ and E. Rahkhodaei²

1. ***Corresponding Author:** Assistant Professor, Plant Protection Research Department, Fars Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Shiraz, Iran (b.safae@areeo.ac.ir)
2. Instructor, Field and Horticultural Crops Research Department, Fars Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Shiraz, Iran

Received: 11 August 2021

Accepted: 24 October 2021

Abstract

Background and Objectives

Grapevine trunk diseases are destructive fungal diseases that have considerably increased in the recent decades worldwide. More than 130 fungal species were associated with grapevine trunk diseases worldwide; however, the pathogenicity tests have not been conducted for some fungal species. From 2018 to 2020, grapevines with stunted growth, yellowing, branch dieback, and discoloration of the wood tissues symptoms were observed during field observation in the Fars province of Iran. This study aims to isolate, identify and characterize the fungal agents that cause these diseases using a combination of the morphological and molecular approaches.

Materials and Methods

Grapevines with stunted growth, yellowing, branch dieback, and discoloration of the wood tissues symptoms were used for the isolation of fungal strains. Small pieces of infected wood tissues taken from the margin of symptomatic and approximately healthy parts were surface sterilized and plated onto potato dextrose agar and malt extract agar media amended with ampicillin. Fungal colonies were purified using single spore and hyphal tip methods. Isolates were identified using morphological characteristics as well as sequencing of different gene regions. The pathogenicity of the isolates was tested in greenhouse conditions using one-year-old seedlings of grapevine. To complete Koch's Postulates, fungal agents were re-isolated from inoculated plants and identified.

Results

166 fungal isolates were obtained and identified using the morphological characteristics as well as sequencing of different gene regions. The isolates were identified as *Botryosphaeria dothidea*, *Cytospora chrysosperma*, *Fomitiporia mediterranea*, *Kalmusia variispora*, *Macrophomina phaseolina*, *Phaeoacremonium minimum*, and *Phaeoacremonium parasiticum*. Among the species, *P. minimum* (28.31%) and *C. chrysosperma* (5.42%) had the most and least frequency, respectively. Pathogenicity tests using one-year-old seedlings in glasshouse showed all tested isolates can cause grapevine trunk diseases and produced white rot (in *F. mediterranea*) or wood necrosis (in other species) on inoculated tissue, developing from the point of inoculation.

Discussion

This study's results showed that grapevines in Fars province are infected with fungi causing trunk diseases, which were previously reported from other provinces of Iran and other countries. According to our knowledge, it is the first report of all species, except *P. minimum* and *P. parasiticum*, causing grapevine trunk diseases in Fars province. More studies are required to better understand the causal agents of grapevine trunk diseases in other parts of Iran and introduce chemical or natural components that can reduce the economic losses caused by grapevine trunk diseases.

Keywords: *grape, Vitis vinifera, pathogenicity, phylogeny, sequencing*

Associate editor: J. Abdollahzadeh (Ph.D.)

Citation: Safaiefarahani, B., & Rahkhodaei, E. (2022). Identification of fungal causal agents of grapevine trunk diseases in Fars province. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, 44(4): 19-35. <https://doi.org/10.22055/ppr.2021.17130>