

فلور قارچی همراه با علائم داخلی بیماری زوال انگور در استان کرمان

مریم عرب نژاد^۱، حمید محمدی^{۲*}، حسین معصومی^۳، همایون فرهمند^۴^۱ دانش آموخته کارشناسی ارشد، بخش بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان^۲ استادیار، بخش بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان^۳ استاد، بخش بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان^۴ استادیار، بخش علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۲/۱۹، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۶/۱۶

چکیده

در طول بهار و تابستان سال ۱۳۹۱ برای شناسایی قارچ های بیمارگر و علائم بیماری همراه با زوال درختان انگور، از مناطق مختلف استان کرمان بازدید به عمل آمد و از شاخه و تنه درختان دارای علائم زوال، نمونه برداری شد. جداسازی عوامل قارچی از بافت های تغییر رنگ یافته چوب و با استفاده از محیط کشت عصاره مالت-آگار (Malt Extract Agar = MEA) حاوی ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر از سولفات استرپتومیسین (MEAS) انجام شد. جدایه های به دست آمده بر اساس ویژگی های ریخت شناختی و محیط کشت شناسایی شدند. شناسایی ریخت شناختی جدایه های *Phaeoacremonium* با تکثیر و تعیین ترادف بخشی از ژن بتا توبولین (β -tubulin gene) با استفاده از دو آغازگر T1 و Bt2b و شناسایی جدایه های *Botryosphaeria* با تکثیر و تعیین ترادف بخشی از ناحیه ITS (ITS1+ 5.8S+ ITS2) با استفاده از دو آغازگر ITS4 و ITS5 مورد تایید قرار گرفت. در این مطالعه، ۴۷۶ جدایه قارچی از درختان بیمار به دست آمد. دو گونه *Phaeoacremonium aleophilum* و *Phaeomoniella chlamydospora* به ترتیب با ۱۰۳ و ۵۰ جدایه دارای بیشترین فراوانی بودند. این نخستین گزارش از شناسایی مولکولی گونه های *Botryosphaeria dothidea* و *Pm. parasiticum*، *Pa. chlamydospora*، *Pm. aleophilum* همراه با علائم متنوع داخلی زوال انگور در استان کرمان می باشد.

کلمات کلیدی: بتا توبولین، *Vitis vinifera* ITS

مقدمه

درونی آن شامل ایجاد رگه های قهوه ای تا سیاه در بافت چوب، تغییر رنگ بافت آوندی و ایجاد نقاط سیاه قابل مشاهده است. معمولا گونه های مختلفی از *Phaeoacremonium* و *Pa. chlamydospora* همراه با این بیماری هستند (Mugnai et al., 1999; Edwards & Pascoe, 2004). گونه های *Botryosphaeria* Ces.&De Not. نیز به عنوان یکی از عوامل بیمارگر شاخه و تنه دارای دامنه میزبانی گسترده ای هستند و برخی از گونه های این جنس مولد بیماری های سرخشکیدگی و شانکر هستند (Michailides, 1994; Smith et al., 1991). اگر چه ممکن است گونه های مختلف *Botryosphaeria* از علائم متنوع داخلی جداسازی گردند ولی یکی از علائم ویژه آنها ایجاد نکروز گوه ای شکل است که در برش عرضی از شاخه و تنه درختان انگور بیمار به خوبی قابل مشاهده است (Larignon et al., 2001; Phillips, 2002). اولین گزارش از بیماری اسکای انگور در ایران مربوط به سال ۲۰۰۱ از خراسان شمالی (بجنورد) است. در این مطالعه دو گونه *F. punctata* و *Pa. chlamydospora* به عنوان عوامل بیمارگر از درختان انگور با علائم شبیه به بیماری اسکای جداسازی و شناسایی گردید (Karimi et al., 2001). اگر چه اخیرا مطالعاتی روی بیماری های زوال انگور در ایران صورت گرفته است ولی هیچ گونه اطلاع دقیقی از قارچ های همراه با علائم مختلف داخلی بیماری های شاخه و تنه

امروزه بیماری های شاخه و تنه درختان انگور از اهمیت خاصی در دنیا برخوردارند هر چند که در بسیاری از موارد جنبه های مختلف سبب شناسی، همه گیر شناسی و فیزیولوژی این گونه بیماری ها به دلیل پیچیده بودن آنها مشخص نیست (Surico et al., 2000). به طور کلی، بسته به نوع عامل بیماری ممکن است دامنه گسترده ای از علائم داخلی و خارجی در درختان بیمار مشاهده گردد. از مهمترین بیماری های شاخه و تنه انگور می توان به بیماری پتری، بیماری اسکا، شانکرهای حاصل از اعضای خانواده *Botryosphaeriaceae* و سرخشکیدگی های ناشی از (Pers. : Fr.) Tul. & C. Tul. اشاره نمود. از درختان انگور دارای علائم بیماری اسکا قارچ های مختلفی گزارش شده است در این میان بازیدیومیست هایی مانند *Fomitiporia mediterranea* M. Fischer (Fischer, 2006) پوسیدگی سفید معرفی شده اند (Fischer, 2006) در حالی که گونه های مختلف *Phaeoacremonium* W. Gams, Crous & M. Wingf. و *Phaeomoniella chlamydospora* (W. Gams, Crous, M.J. Wingf. & L. Crous & W. Gams) به عنوان دو هیفومیست مهم به طور عمده باعث تغییر رنگ بافت چوب و آوند می شوند (Surico et al., 2006). علائم هوایی بیماری پتری به صورت کاهش رشد، کوتاه شدن فاصله میانگره ها و لکه های زرد رنگ در نواحی بین رگبرگی (Sidoti et al., 2000) و علائم

مقطر سترون شستشو و پس از خشک کردن روی دستمال کاغذی، روی محیط کشت PDA (۳۹ گرم در لیتر، مرک آلمان) و محیط کشت MEA (۲۰ گرم در لیتر، مرک آلمان) حاوی تتراسایکلین (۱۰۰ میلی گرم در لیتر Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri) قرار داده شدند. تشک های پتری در تاریکی و در دمای ۲۵°C نگهداری شدند (Chicau et al., 2000; Rego et al., 2000). جدایه های به دست آمده به روش تک اسپور یا نوک ریشه کردن خالص و با استفاده از ویژگی های ریخت شناختی و میکروسکوپی مورد شناسایی قرار گرفتند.

شناسایی جدایه ها بر اساس ویژگی های ریخت شناختی

جدایه های به دست آمده ابتدا بر اساس ویژگی های ریخت شناختی پرگنه ها و ساختار اندام باردهی شناسایی شدند. گونه های *Phaeoacremonium* بر اساس ویژگی های محیط کشت، تولید و یا عدم تولید رنگ دانه در سه محیط کشت PDA، MEA و Oat Meal Agar (۳۰ گرم در لیتر، مرک، آلمان) شناسایی شدند. برای مطالعه و ارزیابی ویژگی های میکروسکوپی از قبیل اندازه و شکل کینیدیوم ها، اندازه و شکل فیالیدها، اندازه کینیدیوفورها و زگیل های روی ریشه از کشت های ۱۶ روزه جدایه ها روی محیط کشت MEA استفاده شد (Mostert et al., 2006). در این مورد، شناسایی جدایه های *Pa. chlamydospora* بر اساس

انگور در استان کرمان در دست نیست. بنابراین، هدف از این مطالعه جداسازی و شناسایی فلور قارچی همراه با بیماری زوال انگور با تاکید بر شناسایی مورفولوژیکی و مولکولی جدایه های *Phaeoacremonium* و *Botryosphaeria* و همچنین بررسی تنوع علائم داخلی و خارجی زوال انگور در استان کرمان می باشد.

مواد و روش ها

بازدید و نمونه برداری از باغ های انگور

در طول بهار و تابستان سال ۱۳۹۱ از ۵۰ باغ و ۱۸۵ درخت (بوته) انگور مربوط به مناطق مختلف استان کرمان شامل: خانوک، محی آباد، قوام آباد، حمیدیه، ماهان، عرب آباد، سیرجان، سیرج، کرمان، بردسیر، جوپار، هوتک، چترود، گلباف، دلفارد و رابر بازدید به عمل آمد. از هر باغ حداقل سه تا پنج نمونه از شاخه ها و تنه اصلی درختان بیمار که دارای علائم هوایی بیماری شامل زردی برگ ها، کوتولگی و کاهش فاصله میانگره ها، ریزش برگ ها و کم برگی و علائم درونی شامل تغییر رنگ بافت چوب و آوندها به اشکال مختلف بودند، نمونه برداری و برای جداسازی عامل بیماری به آزمایشگاه منتقل شدند. سپس برش های عرضی و طولی از شاخه و تنه درختان آلوده تهیه و از نواحی تغییر رنگ یافته چوب و آوندها قطعاتی به اندازه چهار تا پنج میلی متر جدا و به مدت دو دقیقه در NaOCl نیم درصد، گندزدایی گردید. قطعات سترون شده سه مرحله و هر مرحله به مدت سه دقیقه با آب

استفاده از کیت Peq Gold Fungal DNA mini (Rosh, Germany) Kit و طبق دستور شرکت سازنده انجام شد. شناسایی مولکولی جدایه های *Phaeoacremonium* بر اساس روش PCR و تکثیر بخشی از ژن بتا توبولین، با استفاده از آغازگرهای T1 (O'Donnell & Cigelnik, 1997) و Bt2b (Glass & Donaldson, 1995) انجام شد. شناسایی مولکولی جدایه های *Botryosphaeria* نیز بر اساس روش PCR و تکثیر بخشی از ناحیه ITS1-ITS2 و با استفاده از آغازگرهای ITS4 و ITS5 (White et al., 1990) انجام گردید. واکنش زنجیره ای پلی مرز در حجم ۲۵ میکرو لیتر شامل ۲/۵ میکرو لیتر بافر واکنش X ۱۰، ۱/۸ میکرو لیتر کلرید منیزیم (MgCl₂)، ۱/۵ میکرو لیتر دزوکسی نوکلئوتید تری فسفات (dNTPs)، ۱/۲۵ میکرو لیتر از هر آغازگر، یک میکرو لیتر از DNA ژنومی (DNA template)، ۱/۲ میکرو لیتر آنزیم Taq DNA polymerase (سیناژن، ایران) و ۱۷/۵ میکرو لیتر آب استریل (Chromasolv Plus, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) بود که در دستگاه ترموسایکلر (Bio-Rad, USA) انجام شد. برنامه واکنش زنجیره ای پلی مرز شامل واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۴ °C به مدت سه دقیقه و ۳۵ چرخه شامل واسرشته سازی DNA در دمای ۹۴ °C به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها به رشته الگو در دمای ۵۹ °C به مدت ۴۵ ثانیه، گسترش رشته جدید در دمای ۷۲ °C به مدت یک

ساختار کینیدیوفور، تولید پیکنیدیوم روی محیط کشت آب-آگار ۲٪ حاوی برگ میخک و یا قطعات اتوکلاو شده شاخه های انگور و ویژگی های پرگنه ها روی محیط کشت PDA و MEA (Crous & Gams, 2000) شناسایی شدند. شناسایی جدایه های *Botryosphaeria* نیز بر اساس ویژگی های رنگ و بافت پرگنه ها روی محیط کشت PDA و همچنین شکل، رنگ و اندازه اسپورها انجام گرفت (Phillips, 2002; Van Niekerk et al., 2004). برای تولید پیکنیدیوم و افزایش اسپورزایی در جدایه های *Botryosphaeria* نخست جدایه ها به محیط کشت PDA حاوی قطعات اتوکلاو شده چوب انگور یا برگ کاج منتقل و در دمای ۲۵ °C (شرایط نوری مداوم) قرار گرفتند. میزان رشد جدایه ها نیز روی محیط کشت PDA و در سه دمای ۲۰، ۲۵ و ۳۰ °C و بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت ارزیابی شد.

شناسایی مولکولی

برای شناسایی مولکولی جدایه ها ابتدا کل DNA از توده میسلیمی جدایه ها استخراج گردید. برای تولید توده میسلیمی، ابتدا جدایه ها روی محیط کشت MEA کشت و به مدت ۲۰ روز (۱۰ روز برای جدایه های *Botryosphaeria*) در دمای ۲۵ °C نگهداری شدند. توده میسلیمی تولید شده از روی سطح محیط کشت خراشیده و استخراج DNA با

JX133243 و JX133244) و مترادف های انتخاب شده از بانک ژن با برنامه Clustal W هم‌رديف سازی و آنالیز فیلوژنی جدایه ها با استفاده از نرم افزار MEGA 5 (Tamura et al., 2011) انجام گرفت. درخت فیلوژنتیکی جدایه های مربوطه نیز به روش اتصال مجاور و با Bootstrap ۱۰۰۰ تکرار ترسیم گردید.

نتایج و بحث

نمونه برداری و نشانه های بیماری

در این مطالعه از ۵۰ باغ و ۱۸۵ درخت انگور نمونه برداری به عمل آمد. در بیشتر مناطق نمونه برداری شده، علائم هوایی در درختان بیمار به صورت سرخسکیدگی، کوچک بودن برگ ها، زرد شدن نواحی بین رگبرگی، کاهش رشد و در نهایت زوال مشاهده شد. چنین علائمی به عنوان علائم بیماری پتری در انگور گزارش شده است (Pascoe & Cottral, 2000; Sidoti et al., 2000). یکی از علائم هوایی که به ندرت در طول این بررسی مشاهده شد، وجود نقوش پوست بری (زرد و قرمز شدن نواحی بین رگبرگی) روی برگ ها بود که در دو منطقه محلی آباد و بردسیر مشاهده شد. چنین علائمی به عنوان یکی از مهمترین نشانه های بیماری اسکا در انگور شناخته می شود (Mugnai et al., 1999). یکی دیگر از علائم هوایی مشاهده شده، سبزخشک شدن تمام بخش های درختان انگور بود که در محلی آباد روی چند درخت انگور مسن مشاهده شد که چنین علائمی اصولاً به

دقیقه و در پایان گسترش نهایی در دمای ۷۲ °C به مدت ۷ دقیقه بود. محصول واکنش زنجیره ای پلی مرز، روی ژل آگاروز یک درصد (UltraPure™ Agarose, Invitrogen, USA) مشاهده گردید. یک نشانگر ۱۰۰ جفت بازی (GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Fermentas, Lithuania) به عنوان نشانگر وزن مولکولی مورد استفاده قرار گرفت. محصول واکنش زنجیره ای پلی مرز با کیت High Pure PCR Product Purification Kit (Bioneer, Germany) جهت تعیین مترادف به شرکت ماکروژن (Seoul, South Korea) ارسال شد.

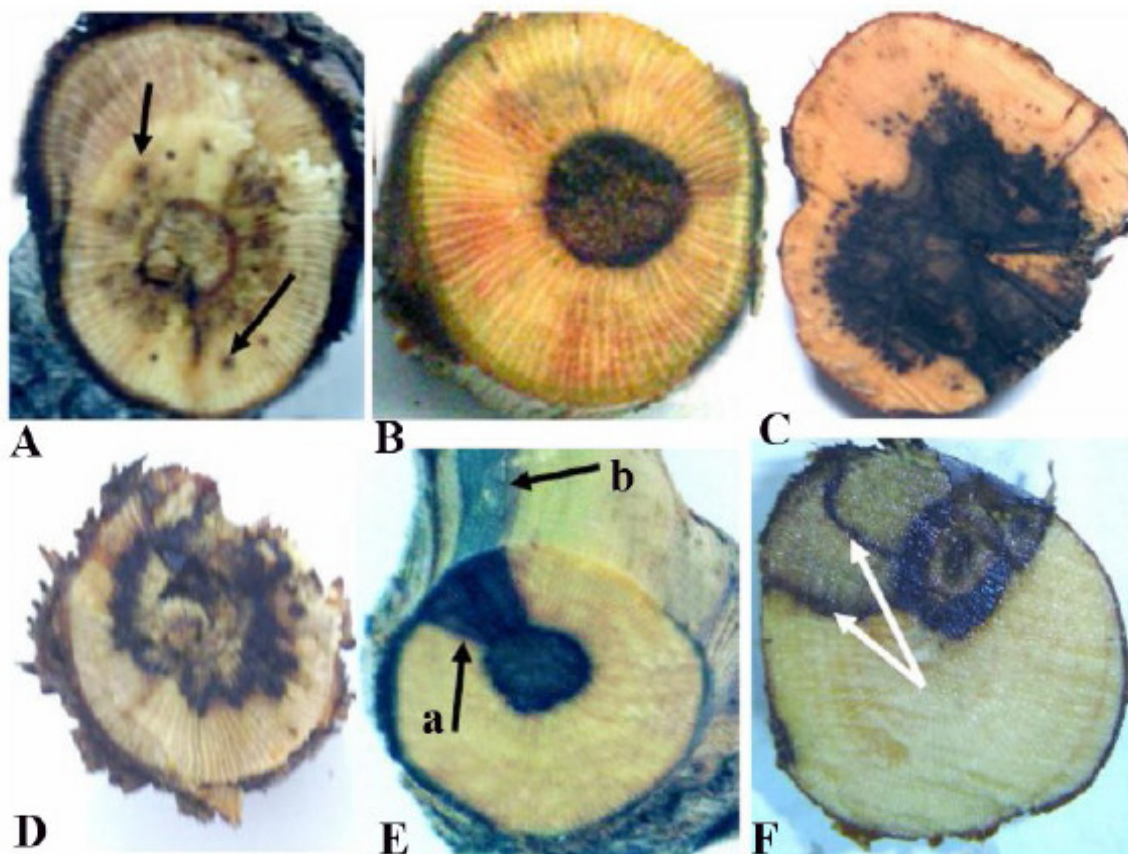
مقایسه توالی نوکلئوتیدی و آنالیز فیلوژنی

جدایه های *Phaeoacremonium*

برای مقایسه توالی های به دست آمده از جدایه های *Pm. aleophilum* و *Pm. parasiticum* در آغاز مترادف های بدست آمده با برنامه Bioedit بررسی شدند و سپس با مترادف های مشابه موجود در بانک ژن در شبکه NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) و جستجوی بلاست مقایسه و میزان شباهت هر جدایه با گونه های موجود در بانک ژن، تعیین گردید. مترادف های مربوط به ژن بتاتوبولین جدایه های KERPAL1، KERPAL2 و KERPAL3 از *Pm. aleophilum* (به ترتیب با شماره دسترسی JX133240، JX133241 و JX133242)، جدایه های KERP1 و KERP2 از *Pm. parasiticum* (به ترتیب با شماره دسترسی

عنوان نشانه های بیماری سکتة مو (آپوپلکسی) گزارش شده است (Mugnai *et al.*, 1999). مطالعات نشان داده است که شرایط مختلف آب و هوایی می تواند در بروز علائم بیماری اسکا موثر باشد. معمولا در فصول گرم و خشک سال، علائم مشخصه بیماری اسکا به صورت نهفته (اسکای نهفته) باقی می ماند (Marchi *et al.*, 2006) و از آنجایی که استان کرمان به عنوان یکی از استان های جنوب کشور دارای آب و هوایی نسبتا گرم و خشک است نادر بودن چنین علائمی دور از انتظار نیست. در طول این مطالعه، با برش عرضی از شاخه های درختان بیمار، اشکال مختلفی از تغییر رنگ بافت چوب به صورت نکروز گوه ای شکل، نقاط سیاه رنگ، نکروز مرکزی، پوسیدگی سفید چوب در ناحیه مرکزی، ایجاد رگه های قهوه ای و سیاه رنگ در چوب و نکروز به صورت نامنظم مشاهده شد (شکل ۱). بر اساس مطالعات انجام شده؛ شش نوع از علائم متداول داخلی بافت چوب شامل رگه های قهوه ای، رگه های سیاه، نکروز گوه ای شکل، نکروز آبسوخته در بافت، پوسیدگی نرم بافت و نکروز داخلی بافت چوب همراه با بیماری های شاخه و تنه در انگور و همچنین درختان میوه دانه دار از جمله سیب و گلابی گزارش شده است (Van Niekerk *et al.*, 2006).

2011). به طور کلی، نشانه های درونی مانند تغییر رنگ بافت آوندی، وجود نقاط سیاه رنگ و رگه های قهوه ای تا سیاه رنگ بیشتر در بیماری پتری انگور مشاهده می شود هر چند که اخیرا در اسپانیا، نکروز گوه ای شکل، نکروز مرکزی و نقاط سیاه رنگ در درختان دارای علائم بیماری اسکا و حتی آپوپلکسی نیز مشاهده شده است (Luque *et al.*, 2009). اصولا تغییر رنگ بافت آوندها و ایجاد نقاط سیاه رنگ در بافت چوب به دلیل واکنش میزبان به وجود عامل بیمارگر و در نتیجه تولید تیلوز، ترشح صمغ و ترکیبات فنولی است (Mugnai *et al.*, 1999; Del Rio *et al.*, 2001). یکی از نکات قابل توجه در مطالعه حاضر، مشاهده چندین نوع نشانه های درونی به صورت همزمان در یک شاخه و یا تنه آلوده بود که نتایج مشابه از سایر کشورها از جمله اسپانیا نیز گزارش شده است (Luque *et al.*, 2009; Kuntzmann *et al.*, 2010). چنین حالتی ممکن است به دلیل آلوده شدن همزمان محل هرس توسط چندین گونه باشد و از آنجایی که بیشتر قارچ های بیمارگر شاخه و تنه انگور هوازاد هستند این امر به خوبی صورت می گیرد (Mugnai *et al.*, 1999; Surico *et al.*, 2006; Van Niekerk *et al.*, 2006).



شکل ۱- علائم داخلی بیماری های شاخه و تنه انگور مشاهده شده در استان کرمان A: لکه های سیاه رنگ B: نکروز مرکزی C: بروز همزمان نکروز نامنظم و لکه های سیاه رنگ D: پوسیدگی چوب و تغییر رنگ بافت چوب E: نکروز گوه ای شکل در برش عرضی (a) و خط سیاه رنگ بر روی سطح چوب در زیر پوست (b) F: وجود رگه های سیاه رنگ.

Figure 1- Internal symptoms of grapevine trunk diseases observed in Kerman province: (A)- Black spots, B-Central necrosis, C- Co-occurrence of irregular necrosis and black spots, D-wood decay and wood discoloration, E-Wedge-shaped necrosis in cross section (a) and a dark stripe on the wood surface just below the bark (b), F- Black wood streaking.

طوری که از بیشتر مناطق نمونه برداری جداسازی شدند. این جدایه ها روی محیط کشت PDA، در ابتدا به رنگ سفید و پس از ۱۶ روز به صورت قهوه ای کم رنگ با بافتی متراکم مشاهده شدند. جدایه های یاد شده در محیط کشت PDA، MEA و OA رنگدانه زرد مشخصی تولید می-کردند. بر اساس ویژگی های ریخت شناختی

جداسازی و شناسایی جدایه ها بر اساس خصوصیات ریخت شناختی و مولکولی جدایه های *Pm. parasiticum* و *Pm. aleophilum* در این مطالعه؛ ۱۳۳ جدایه *Phaeoacremonium* از درختان انگور بیمار جداسازی شد (جدول ۱). از این تعداد، ۱۰۳ جدایه از پراکندگی بیشتری برخوردار بودند به

با گونه *Pm. aleophilum* موجود در بانک ژن (JF275876, Martin *et al.*, 2012) و دو جدایه *Pm. KERPR1* و *KERPR2* نیز با *Pm. parasiticum* موجود در بانک ژن (GQ144702, Sun & Ju, 2011) ۱۰۰٪ شباهت نشان دادند. با توجه به نتایج به دست آمده از رسم درخت فیلوژنی سه جدایه *Pm. aleophilum* (*KERPAL1-3* با شماره های دسترسی 2-JX133240) که در این مطالعه جداسازی و شناسایی شده بودند، با جدایه های *Pm. aleophilum* مربوط به بانک ژن شامل جدایه های SO-KD-5 (از کشور ترکیه و با شماره دسترسی HM245325)، Y86-15-1x و Pal-184 (از کشور اسپانیا به ترتیب با شماره های دسترسی JQ044516 و JF275876) و P49 (از کشور الجزایر و با شماره دسترسی HQ605024) با Bootstrap ۱۰۰ در یک گروه قرار گرفتند. در این رابطه، دو جدایه *Pm. parasiticum* (*KERPR1* با شماره دسترسی JX133243 و *KERPR2* با شماره دسترسی JX133244) نیز با جدایه های *Pm. parasiticum* برگرفته از بانک ژن شامل جدایه های MCCF66.07 (از کشور تایوان و با شماره دسترسی GQ144702)، CBS101007 (از آفریقای جنوبی و با شماره دسترسی AF246804) و P46 (از کشور الجزایر و با شماره دسترسی HQ605022) با Bootstrap ۱۰۰ نیز در یک گروه قرار گرفتند (شکل ۴).

مشاهده شده و با کارگیری کلیدهای شناسایی موجود (Mostert *et al.*, 2006)، جدایه های یاد شده *Pm. aleophilum* تشخیص داده شدند. ۳۰ جدایه *Phaeoacremonium* باقی مانده نیز که از درختان انگور بیمار در ماهان، بردسیر، عرب آباد و سیرجان به دست آمده بودند روی محیط کشت PDA، ریشه های هوایی برجسته و بلند تولید کردند و فاقد رنگدانه زرد رنگ روی محیط کشت های به کار رفته بودند. از نظر ویژگی های میکروسکوپی بر روی ریشه ها زگیل های بزرگ مشاهده می شد که قطری بیش از سه میکرون داشتند. کیندیوفورهای این جدایه ها بلند و منشعب بود و بر اساس ویژگی های گفته شده و با کارگیری کلیدهای شناسایی موجود (Mostert *et al.*, 2006) این جدایه ها *Pm. parasiticum* تشخیص داده شدند. از بین جدایه های *Phaeoacremonium* بدست آمده، سه جدایه *Pm. aleophilum* (جدایه های *KERPAL1*, *KERPAL2*, *KERPAL3*) و دو جدایه از *Pm. parasiticum* (جدایه های *KERPR1* و *KERPR2*) انتخاب و جهت تایید شناسایی با استفاده از روش PCR مورد بررسی قرار گرفتند. بر اساس نتایج به دست آمده، آغازگرهای T1 و Bt2b بانندی حدود ۷۵۰ جفت باز را برای هر پنج جدایه *Phaeoacremonium* تکثیر کردند (شکل ۲). با تعیین ترادف قطعات ژنومی به دست آمده و جستجو در بانک ژن، سه جدایه *KERPAL1*, *KERPAL2* و *KERPAL3*

جدول ۱- تعداد و فراوانی قارچ های جداسازی شده از علائم مختلف داخلی درختان انگور بیمار در استان کرمان.

Table 1- Number and frequency of fungi isolated from symptomatic tissues showing of diseased grapevines in Kerman province.

گونه های قارچی Fungal species	تعداد و فراوانی Number and frequency	علائم داخلی Internal symptoms					نکروز نامنظم داخلی Irregular internal necrosis	محل Location
		شکل V-shaped necrosis	نقاط سیاه رنگ Black spots	نکروز مرکزی Central necrosis	پوسیدگی چوب Wood decay	رگه های قهوه ای تا سیاه رنگ Brown to black streaking		
<i>Phaeoacremonium aleophilum</i>	103 (21.6%)	34	10	7	5	28	19	تمام مناطق بازدید شده، All visited locations
<i>Phaeoacremonium parasiticum</i>	30 (6.30%)	7	9	0	0	14	0	ماهان، عرب آباد، بردسیر، سیرجان، Mahan, Arab Abad, Bardsir, Sirjan
<i>Phaeoniella chlamydospora</i>	55 (11.6%)	15	6	0	15	19	0	جوار، رابر، محی آباد، بردسیر، عرب آباد، ماهان، کرمان، Jupar, Rabor, Mahan, Kerman
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	2 (4.0%)	2	0	0	0	0	0	ماهان، Mohy Abad, Bardsir, Arab Abad, Mahan, Kerman
<i>Phoma</i> sp.	40 (8.4%)	32	0	0	0	8	0	ماهان، دلفارد، سیرجان، قوام آباد، جوار، گلدف، چترود، Mahan, Dalfard, Sirjan, Ghavam Abad, Jupar, Golbaf, Chatrud
<i>Nattrassia mangifera</i>	3 (0.63%)	0	0	0	0	0	2	ماهان، Mahan
<i>Conyothrium</i> sp.	15 (3.2%)	0	0	13			0	ماهان، Mahan
<i>Fusarium</i> sp.	41 (8.6%)	3	3	12	8	0	15	ماهان، کرمان، بردسیر، حمیدیه، جوار، قوام آباد، Mahan, Kerman, Bardsir, Hamidieh, Jupar, Ghavam Abad
<i>Penicillium</i> sp.	31 (6.3%)	1	3	4	7	5	11	ماهان، بردسیر، جوار، قوام آباد، حمیدیه، عرب آباد، سیرجان، Mahan, Bardsir, Jupar, Ghavam Abad, Hamidieh, Arab Abad, Sirjan,
<i>Paecilomyces variotii</i>	30 (6.3%)	1	7	9	0	4	9	ماهان، بردسیر، محی آباد، رابر، Mahan, Bardsir, Mohy Abad, Rabor
<i>Aspergillus</i> sp.	38 (8.0%)	8	2	4	0	5	19	ماهان، دلفارد، سیرجان، قوام آباد، Mahan, Dalfard, Sirjan, Ghavam Abad
<i>Aspergillus terreus</i>	10 (2.1%)	0	0	3			4	ماهان، بردسیر، جوار، قوام آباد، Mahan, Bardsir, Jupar, Ghavam Abad
<i>Alternaria</i> sp.	25 (5.3%)	0	0	8	8	2	7	سیرج، حمیدیه، عرب آباد، سیرجان، رابر، جوار، Sirch, Hamidieh, Arab Abad, Sirjan, Rabor, Jupar
Other phthalidic fungi	82 (17.2%)							

سیاه و براق شبیه به پیکنیدیوم های *Phoma* تولید کردند. با توجه به کلیدهای شناسایی (Crous & Gams, 2000)، این جدایه ها *Pa. chlamydospora* تشخیص داده شدند. گونه *Pa. chlamydospora* در ابتدا به عنوان *Phaeoacremonium chlamydosporum* معرفی و توصیف گردید در حالیکه مطالعات بعدی نشان داد که بر خلاف سایر گونه های *Phaeoacremonium*، این گونه قادر به تولید پیکنیدیوم و همچنین ساختارهای کلامیدوسپور

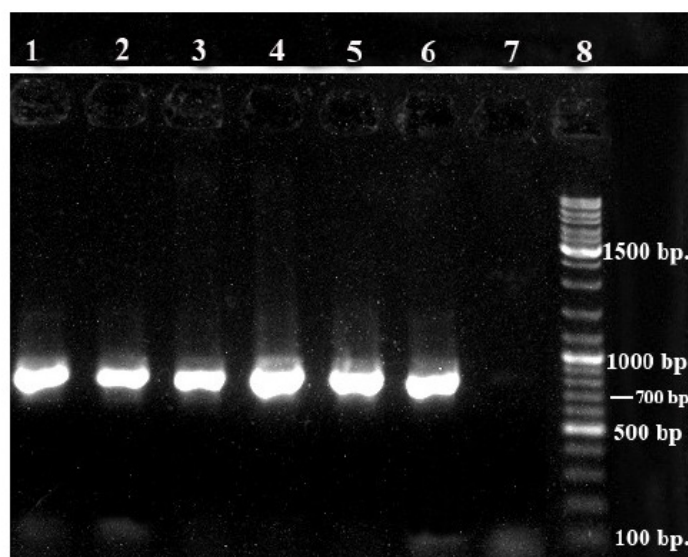
جدایه های *Phaeoniella chlamydospora* در بررسی انجام شده، ۵۵ جدایه (۱۱/۶) درصد کل جدایه ها) از درختان بیمار با علائم سرخشکیدگی و نقوش پوست ببری روی برگ در برخی از مناطق نمونه برداری به دست آمد (جدول ۱). جدایه های یاد شده روی محیط کشت آب- آگار ۲٪، ساختارهایی کلامیدوسپور مانند و روی محیط کشت آب- آگار دو درصد حاوی قطعات برگ میخک و چوب انگور اتوکلاو شده پس از حدود یک ماه، پیکنیدیوم های

عدم تولید اسپور روی محیط کشت، در ابتدا به عنوان *Botryosphaeria* sp. در نظر گرفته شدند. هر دو جدایه پس از حدود ۱۰ روز روی محیط کشت PDA حاوی قطعات چوب سترون شده انگور و برگ کاج، تولید پیکنیدیوم نمودند. با برش پیکنیدیوم ها، اسپورها به رنگ روشن، یک سلولی و کمی کشیده مشاهده شدند. با توجه به کلیدهای موجود و بر اساس شکل، اندازه و رنگ اسپورها هر دو جدایه به عنوان *B. dothidea* تشخیص داده شد.

مانند است که در مراحل بعد با بررسی های مولکولی و ریخت شناختی به جنس جدید *Phaeomoniella* منتقل و به عنوان گونه *Pa. chlamydospora* معرفی گردید (Crous & Gams, 2000).

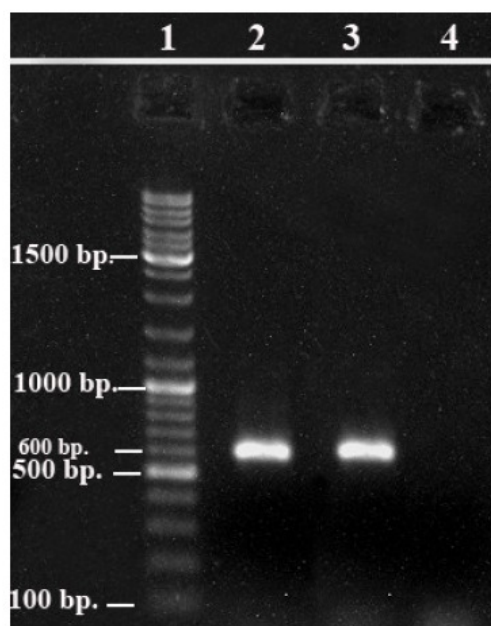
جدایه های *Botryosphaeria dothidea*

از یک درخت انگور بیمار با علائم سرخشکیدگی در ماهان؛ دو جدایه قارچی به دست آمد که با توجه به سرعت رشد بسیار بالا و



شکل ۲- قطعه ۷۵۰ جفت بازی تکثیر شده از ژن بتا توبولین در جدایه های *Phaeoacremonium* با استفاده از دو آغازگر T1 و Bt2b روی ژل آگاروز ۱ درصد: ۱ تا ۳- جدایه های *Pm. aleophilum*، ۴ تا ۶- جدایه های *Pm. parasiticum*، ۷- کنترل منفی، ۸- نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی.

Figure 2- A 750 bp amplified fragment from beta tubulin gene of *Phaeoacremonium* isolates using T1 and Bt2b primers on 1% agarose gel: lanes 1 to 3- *Pm. aleophilum* isolates, lanes 4 to 6- *Pm. parasiticum* isolates, lane 7- negative control, lane 8- DNA marker (100 bp).



شکل ۳- قطعه ۶۰۰ جفت بازی تکثیر شده از ناحیه ITS در جدایه های *Botryosphaeria dothidea* با استفاده از دو آغازگر ITS4 و ITS5 روی ژل آگاروز ۱ درصد: ۱- نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی، ۲ و ۳- جدایه های *Botryosphaeria dothidea*، ۴ - کنترل منفی.

Figure 3- A 600 bp amplified fragment from ITS region of *Botryosphaeria dothidea* isolates using ITS4 and ITS5 primers on 1% agarose gel: lane 1- DNA marker (100 bp), lanes 2 and 3- *Botryosphaeria dothidea* isolates, lane 4- negative control.

فراوانی بودند. همچنین جدایه هایی از *Pa. chlamydospora*، *Pm. parasiticum*، *Coniothyrium* sp.، *Paecilomyces variotii*، *Aspergillus* sp.، *Natrassia mangiferae*، *Alternaria* sp.، *Phoma* sp.، *Penicillium* sp.، و *Fusarium* sp. از قطعات بافت آلوده کشت داده شده، جداسازی گردیدند (جدول ۱). با توجه به نتایج به دست آمده، دو گونه *Pm. aleophilum* و *Pa. chlamydospora* به ترتیب با ۲۱/۶ و ۱۱/۶ درصد بیشترین فراوانی را نشان دادند و *Pm. aleophilum* نسبت به *Pa. chlamydospora* از پراکندگی بیشتری برخوردار بود. نتایج مشابهی پیش از این از ایران

با استفاده از آغازگرهای ITS4 و ITS5، بانندی در حدود ۶۰۰ جفت باز برای هر دو جدایه *Botryosphaeria* به دست آمد (شکل ۳). با تعیین مترادف قطعات ژنومی به دست آمده و جستجو در بانک ژن، هر دو جدایه BDGR1 و BDGR2 با جدایه ای از *B. dothidea* (AY786322, Phillips et al., 2005) که پیش از این در بانک ژن ثبت شده بود، ۱۰۰٪ شباهت نشان دادند. به طور کلی در این مطالعه، ۴۷۶ جدایه قارچ جداسازی و شناسایی گردید (جدول ۱). از کل جدایه های بدست آمده، *Pm. aleophilum* با ۲۱/۶٪ و *B. dothidea* با ۴٪ کل جدایه ها به ترتیب دارای بیشترین و کمترین

aleophilum از پراکندگی کمتری برخوردار بود و از علائم درونی نکروز گوه ای شکل (۱۵ جدایه)، نقاط سیاه رنگ (۶ جدایه)، رگه های قهوه ای تا سیاه رنگ (۲۵ جدایه) و پوسیدگی سفید (۱۵ جدایه) جداسازی گردید. تعداد و فراوانی قارچ های همراه با علائم داخلی چوب، در کشورهای مختلف متفاوت گزارش شده است. در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۹ در شمال اسپانیا برای بررسی تنوع علائم داخلی و قارچ های همراه با زوال انگور انجام شد، تعداد ۱۸ جدایه *Pm.* *aleophilum* از تمام علائم داخلی مشاهده شده در شاخه های آلوده شامل نکروز گوه ای شکل (۲ جدایه)، نکروز مرکزی (۱۱ جدایه)، نقاط سیاه رنگ (۴ جدایه) و پوسیدگی سفید (یک جدایه) جداسازی گردید. در حالی که *Pa.* *chlamydospora* با فراوانی بیشتر (۹۵ جدایه) از نقاط سیاه رنگ (۶۱ جدایه)، نکروز گوه ای شکل (۱۱ جدایه)، نکروز مرکزی (۱۹ جدایه) و پوسیدگی سفید (۴ جدایه) بدست آمده است (Luque et al., 2009). در مطالعه ای مشابه در فرانسه، گونه *Pm. aleophiulum* به تعداد اندکی و تنها از علائم داخلی به صورت نکروز مرکزی جداسازی شده است در حالیکه *Pa.* *chlamydospora* از بیشتر علائم داخلی قابل جداسازی بوده است (Kuntzmann et al., 2010). در کشور الجزایر *Pm. aleophilum* به عنوان گونه غالب همراه با زوال انگور از علائم داخلی نکروز گوه ای شکل جداسازی و گزارش

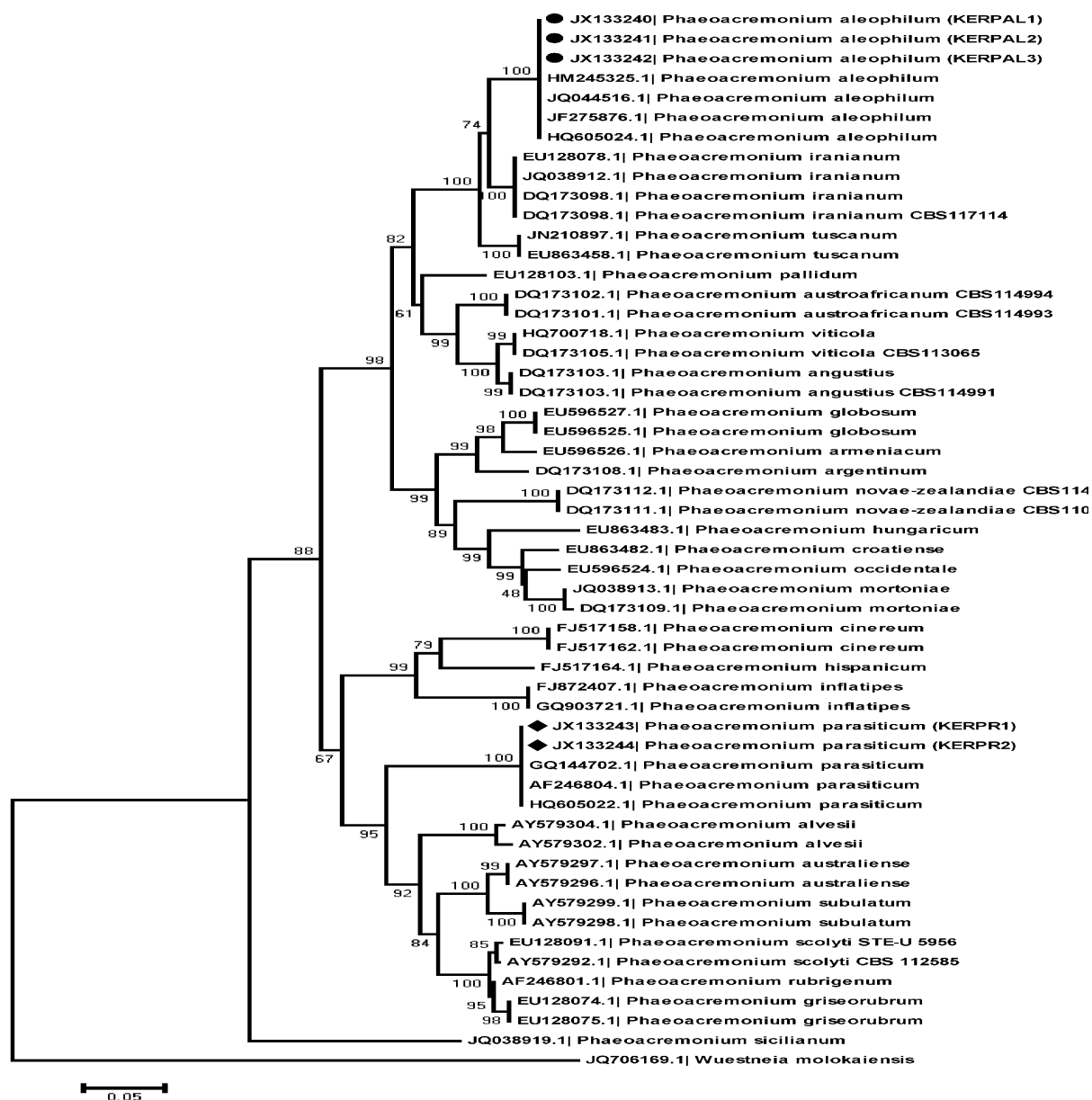
(Mohammadi et al., 2013) اسپانیا (Armengol et al., 2001)، آرژانتین (Dupont et al., 2002)، استرالیا (Pascoe & Cottral, 2000)، ایتالیا (Mugnai et al.; 1999) و آفریقای جنوبی (Groenewald et al., 2001) گزارش شده است. در آرژانتین گونه *Pa. chlamydospra* با فراوانی بیشتری از انگوره های جوان با علائم زوال جداسازی و گزارش شده است (Gatica et al., 2004) در حالیکه در کالیفرنیا *Pa. chlamydospora* به طور غالب از انگوره های بیمار با علائم بیماری پتری و *Pm. aleophilum* و سایر گونه های *Phaeoacremonium* بیشتر همراه با علائم بیماری اسکا دیده شده است (Eskalen et al., 2004). بر اساس یافته های این پژوهش *Pm. aleophilum* از پراکندگی زیادی برخوردار بود به طوری که از همه مناطق نمونه برداری و از درختان بیمار با علائم سرخشکیدگی، زوال، نقوش پوست ببری بر روی برگ، زردی و کوتولگی برگ ها و حتی آپولکسی، جداسازی گردیدند. جدایه های یاد شده از بخش های داخلی آلوده چوب با علائم مختلف نکروز نامنظم (۱۹ جدایه)، رگه های قهوه ای تا سیاه رنگ (۲۸ جدایه)، پوسیدگی سفید چوب (۵ جدایه)، نکروز منظم مرکزی (۷ جدایه)، نقاط سیاه رنگ (۱۰ جدایه) و نکروز گوه ای شکل (۳۴ جدایه) جداسازی و شناسایی شدند (جدول ۱). گونه *Pa. chlamydospora* نسبت به *Pm.*

آمریکا، برزیل و آفریقای جنوبی گزارش شده است (Phillips, 2002; Phillips, 1998; Crous et al., 2001; Milholland, 1991; Urbez-Torres et al., 2007). این گونه اخیراً از درختان انگور بیمار در آذربایجان غربی و شرقی در ایران نیز گزارش شده است (Arzanlou et al., 2012). بر اساس اطلاعات موجود، این نخستین گزارش از جداسازی و شناسایی مولکولی قارچ های همراه با علائم مختلف درونی زوال انگور در استان کرمان می باشد. تاکنون هشت گونه از جنس *Phaeoacremonium* و سه گونه از خانواده *Botryosphaeriaceae* از درختان انگور در ایران گزارش شده است و از آنجایی که استان کرمان به عنوان پهناورترین استان کشور دارای آب و هوای متنوعی است، بررسی های بیشتر از مناطق مختلف برای جداسازی عوامل قارچی همراه با شاخه و تنه انگور لازم و ضروری به نظر می رسد.

سپاسگزاری

این تحقیق به عنوان بخشی از طرح پژوهشی به شماره ۹۰۰۰۱۲۶۲ می باشد که توسط صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (Iran National Science Foundation: INSF) حمایت مالی شده است که بدین وسیله صمیمانه قدردانی می گردد.

شده است (Berraf-Tebbal et al., 2012). در پژوهش حاضر، جدایه های *Pm. parasiticum* از درختان بیمار با علائم هوایی سرخشکیدگی و زوال و از بافت های تغییر رنگ یافته داخلی چوب به صورت رگه های قهوه ای تا سیاهرنگ (۱۴ جدایه)، نقاط سیاهرنگ (۹ جدایه) و نکروز گوه ای شکل (۷ جدایه) جداسازی شدند. این گونه نیز از علائم مختلف داخلی در انگور از جمله نکروز گوه ای شکل، نکروز مرکزی، لکه های سیاه رنگ و حتی نواحی پوسیده چوب جداسازی شده است (Berraf-Tebbal et al., 2012). در این مطالعه، علائم هوایی همراه با *B. dothidea* به صورت سرخشکیدگی مشاهده گردیده است. با ایجاد برش عرضی از شاخه نمونه های بیمار، علائم درونی به صورت تغییر رنگ بافت چوب به صورت گوه ای شکل دیده شد که در ناحیه آلوده با برداشتن پوست شاخه در جهت طولی رگه هایی به شکل قهوه ای و سیاهرنگ مشاهده گردید (شکل ۱). یکی از علائم ناشی از گونه های *Botryosphaeria* تشکیل رگه های سیاه درست در زیر پوست شاخه های آلوده گزارش شده است (Larignon & Dubos, 2001)، از طرفی تغییر رنگ بافت چوب به صورت گوه ای شکل نیز یکی از علائم مشخصه اعضای *Botryosphaeriaceae* شناخته می شود (Mugnai et al., 1999). *B. dothidea* تاکنون از کشورهای مختلفی از جمله پرتغال،



شکل ۴- درخت فیلوژنی رسم شده با استفاده از توالی نوکلئوتیدی ژن بتاتوبولین جدایه های ایرانی *Phaeoacremonium aleophilum* و *Phaeoacremonium parasiticum* و گونه های مختلف *Phaeoacremonium* گرفته شده از بانک ژن با استفاده از نرم افزار MEGA 5. *Wuestneia molokaiensis* به عنوان Outgroup انتخاب شده است.

Figure 4- Phylogenetic tree based on the comparison of β -tubulin gene sequences between the *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeoacremonium parasiticum* isolates from Iran and the other isolates of *Phaeoacremonium* species from GenBank using MEGA 5 software. *Wuestneia molokaiensis* was used as outgroup.

منابع

- Armengol J, Vicent A, Torné L, Garcia-Figueres F, Garcia-Jimenez J (2001). Fungi associated with esca and grapevine declines in Spain: a three-year survey. *Phytopathologia Mediterranea* 40: 325–329.
- Arzanlou M, Moshari S, Khodaie S (2012). *Botryosphaeria dothidea* associated with grapevine decline disease in Iran. *Australasian Plant Disease Notes* 7: 197–200.
- Berraf-Tebbal A, Bouznad Z, Santos JM, Coelho MA, Peros JP, Phillips AJL (2012). *Phaeoacremonium* species associated with Eutypa dieback and esca of grapevines in Algeria. *Phytopathologia Mediterranea* 50: S86–97.
- Chicau G, Aboim-inglez M, Cabral S, Cabral JPS (2000). *Phaeoacremonium chlamydosporum* and *Phaeoacremonium angustius* associated with esca and grapevine decline of Vinho Verde grapevines in northwest Portugal. *Phytopathologia Mediterranea* 39: 80–86.
- Crous PW, Gams W (2000). *Phaeomoniella chlamydospora* gen. et comb. nov., a causal organism of Petri grapevine decline and esca. *Phytopathologia Mediterranea* 39: 112–118.
- Crous PW, Kang J-C, Braun U (2001). A phylogenetic redefinition of anamorph genera in *Mycosphaerella* based on ITS rDNA sequence and morphology. *Mycologia* 93: 1081–1101.
- Del Rio JA, Gonzalez A, Fuster MD, Botia J.M, Gomez P, Frias V, Ortuna A (2001). Tylose formation and changes in phenolic compounds of grape roots infected with *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium* species. *Phytopathologia Mediterranea* 40: S394–S399.
- Dupont J, Magnin S, Desari C, Gatiga M (2002). ITS and β - tubulin markers help delineate *Phaeoacremonium* species, and the occurrence of *Pm. parasiticum* in grapevine disease in Argentina. *Mycological Research* 106: 1143–1150.
- Edwards J, Pascoe L (2004). Occurrence of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* associated with Petri disease and esca in Australian grapevines. *Australasian Plant Pathology* 33: 273–279.
- Eskalen A, Latham SR, Gubler WD (2004). Spore release of *Phaeomoniella chlamydospora* associated with grapevine cordons in California. *Phytopathology* 94: S28.
- Fischer M (2006). Biodiversity and geographic distribution of Basidiomycetes causing esca-associated white rot in grapevine: a worldwide perspective. *Phytopathologia Mediterranea* 45: S30–S42.
- Gatica M, Cesari C, Escoriaza G (2004). *Phellinus* species inducing hoja de malvon symptoms on leaves and wood decay on standing grapevine. *Phytopathologia Mediterranea* 43: 59–65.
- Glass NL, Donaldson GC (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 1323–1330.
- Groenewald M, Kang J-C, Crous PW, Gams W (2001). ITS and β -tubulin phylogeny of *Phaeoacremonium* and *Phaeomoniella* species. *Mycological Research* 105: 651–657.
- Karimi MR, Mahmoodi B, Kazemiyani M (2001). First report of esca of grapevine in Iran. *Phytopathologia Mediterranea* 40: 481.
- Kuntzmann P, Villaum S, Larignon P, Bertsch C (2010). Esca, BDA and eutypiosis: foliar symptoms, trunk lesions and fungi observed in diseased vinestocks in two vineyards in Alsace. *Vitis* 49: 71–76.
- Larignon P, Dubos B (2001). The villainy of Black dead arm. *Wines and Vines* 3: 86–89.

- Larignon P, Fulchie R, Cere L, Dubos B (2001). Observations on black dead arm in French vineyards. *Phytopathologia Mediterranea* 40: S336–S342.
- Luque J, Martos S, Aroca A, Raposo R, Garcia-Figueres F (2009). Symptoms and fungi associated with declining mature grapevine plants in northeast Spain. *Journal of Plant Pathology* 91: 381–390.
- Marchi G, Peduto F, Mugnai L, Di Marco S, Calzarano F, Surico G (2006). Some observations on the relationship of manifest and hidden esca to rainfall. *Phytopathologia Mediterranea* 45: 117–126.
- Martin MT, Cobos R, Martin L, Lopez-Enriquez L (2012). Real-Time PCR Detection of *Phaeoconiella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum*. *Applied and Environmental Microbiology* 78: 3985–3991.
- Michailides TJ (1991). Pathogenicity, distribution, sources of inoculum, and infection courts of *Botryosphaeria dothidea* on pistachio. *Phytopathology* 81: 566–573.
- Milholland RD (1991). Muscadine grapes: Some important diseases and their control. *Plant Disease* 75: 113–117.
- Mohammadi H, Banihashemi Z, Gramaje D, Armengol J (2013). Fungal pathogens associated with grapevine trunk diseases in Iran. *Journal of Agricultural Science and Technology* 15: 137–150.
- Mostert L, Groenewald JZ, Summerbell RC, Gams W, Crous PW (2006). Taxonomy and pathology of *Togninia* (Diaporthales) and its *Phaeoacremonium* anamorphs. *Studies in Mycology* 54: 1–115.
- Mugnai L, Graniti A, Surico G (1999). Esca (black measles) and crown wood-streaking: Two old and elusive diseases of grapevines. *Plant Disease* 83:404–418.
- O'Donnell K, Cigelnik E (1997). Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Molecular and Phylogenetic Evolution* 7: 103–116.
- Pascoe I, Cottral E (2000). Developments in grapevine trunk diseases research in Australia. *Phytopathologia Mediterranea* 39: 68–75.
- Phillips AJL (2002). *Botryosphaeria* species associated with diseases of grapevines in Portugal. *Phytopathologia Mediterranea* 41: 3–18.
- Phillips AJL (1998). *Botryosphaeria dothidea* and other fungi associated with excoriosis and dieback of grapevines in Portugal. *Journal of Phytopathology* 146: 327–332.
- Phillips AJL, Alves A, Correia A, Luque J (2005). Two new species of *Botryosphaeria* with brown, 1-septate ascospores and *Dothiorella* anamorphs. *Mycologia* 97: 513–529.
- Rego MC, Oliveira H, Carvalho A, Phillips A (2000). Involvement of *Phaeoacremonium* spp. and *Cylindrocarpon destructans* with grapevine decline in Portugal. *Phytopathologia Mediterranea* 39: 76–79.
- Sidoti A, Buonocore E, Serges T, Mugnai L (2000). Decline of young grapevines associated with *Phaeoacremonium chlamydosporum* in Sicily (Italy). *Phytopathologia Mediterranea* 39: 87–91.
- Smith H, Kemp GHJ, Wingfield MJ (1994). Canker and die-back of *Eucalyptus* in South Africa caused by *Botryosphaeria dothidea*. *Plant Pathology* 43: 1031–1034.
- Sun P-L, Ju Y-M (2011). Onychomycosis caused by *Phaeoacremonium parasiticum*: first case report. *Mycoses* 54: 172–174.
- Surico G, Marchi G, Ferrandino FJ, Braccini P, Mugnai L (2000). Analysis of the spatial spread of esca in some Tuscan vineyards (Italy). *Phytopathologia Mediterranea* 39: 211–224.

- Surico G, Mugnai L, Marchi G (2006). Older and more recent observations on esca: a critical overview. *Phytopathologia Mediterranea* 45: S68–S86.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731–2739.
- Úrbez-Torres JR, Leavitt GM, Guerrero JC, Guevara J, Striegler K, Allen A, Gubler WD (2007). Identification of fungal pathogens associated with grapevine cankers in the main grape-growing areas of the United States and Mexico. *Phytopathologia Mediterranea* 46: 109–110.
- Van Niekerk JM, Fourie PH, Halleen F, Crous PW (2006). *Botryosphaeria* spp. as grapevine trunk disease pathogens *Phytopathologia Mediterranea* 45: S43–S54.
- Van Niekerk JM, Bester W, Halleen F, Crous PW, Fourie PH (2011). The distribution and symptomatology of grapevine trunk disease pathogens are influenced by climate. *Phytopathologia Mediterranea* 50: S98–S111.
- Van Niekerk JM, Crous PW, Groenewald JZ, Fourie PH, Halleen F (2004). DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevines. *Mycologia* 96: 781–798.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JH, White TJ (eds.), *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*. San Diego, California: Academic Press pp. 315–322.

Fungal flora associated with internal symptoms of grapevine decline in Kerman province

Arabnezhad M. ¹, Mohammadi H. ^{*2}, Massumi H. ³, Farahmand H. ⁴

¹ M.Sc. student, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

² Assistant professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

³ Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

⁴ Assistant professor, Department of Horticulture, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

Abstract

To study of fungi and symptoms associated with vine trunk diseases, various vineyards in Kerman province were inspected during spring and summer of 2012. Samples showing decline symptoms were collected from trunk and branches of vines. Fungal isolation from affected tissues were done on malt extract agar medium (MEA) supplemented with 1 g l⁻¹ streptomycin sulphate (MEAS). A total of 476 fungal isolates from diseased grapevines were obtained. Fungal isolates were identified based on their morphological and molecular characteristics. Morphological identifications of *Phaeoacremonium* spp. were confirmed by sequence analysis of partial β -tubulin gene (BT) sequences amplification using primers T1 and Bt2b. *Botryosphaeria* isolates were also confirmed by amplification and sequence of the internal transcribed spacer (ITS) region using the primers ITS4 and ITS5. The most common fungi isolated from vineyards were *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeomoniella chlamydospora* with 103 and 30 isolates, respectively. This is the first report of molecular identification of *Pm. aleophilum*, *Pa. chlamydospora*, *Pm. parasiticum* and *Botryosphaeria dothidea* associated with different internal symptoms of vine decline in Kerman province.

Key words: *Beta tubulin*, *ITS*, *Vitis vinifera*.

* Corresponding Author: Mohammadi H.

Tel: 09173041735

E-mail: hmohammadi@uk.ac.ir