آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ۸۱، شماره ۲، اسفند ۱۳۹۲
Archive of SID

ردیابی و شناسائی عوامل قارچی مولد زوال مو بر اساس تکنیک پی سی آر در باغات انگور خراسان شمالی

محسن رجائیان[۱]، محمود رضا کریمی‌شهری[۲]✉، مهدی پیرنیا[۳]، ویدا دهواری[۴] و نگار قزل سفلو[۱]

۱- دانشکده‌کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان؛ ۲- مرکز تحقیقات کشاورزی ومنابع طبیعی استان خراسان رضوی بخش تحقیقات گیاهپزشکی؛ ۳- گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل؛ ۴- بیوتکنولوژی دانشگاه پیام نور، تهران

(تاریخ دریافت: دی ۱۳۹۱؛ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۹۲)

چکیده

یکی از مهم‌ترین و مخرب‌ترین بیماری‌های قارچی انگور بیماری اسکا یا زوال مو می‌باشد. این بیماری باعث کاهش رشد، کاهش محصول و در نهایت مرگ گیاه می‌گردد. در طی تابستان ۱۳۸۹ از تاکستان‌های شهرستان بجنورد و حومه‌ی آن نمونه‌های مختلفی از تنه شامل: قطعات تنه دارای علایم پوسیدگی سفید، دارای علایم پوسیدگی قهوه‌ای، دارای علایم نقاط قهوه‌ای رنگ و فاقد علایم ظاهری نمونه برداری شد. هدف از اجرای این تحقیق ردیابی عوامل قارچی مرتبط با بیماری اسکا در داخل تنه انگور با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و همچنین جداسازی آنها به روش کلاسیک و مقایسه آن با روش ملکولی بود. جهت ردیابی عوامل اسکا از آغازگرهای عمومی‌نواحی دی-ان-آ ریبوزومی و آغازگرهای اختصاصی استفاده شد. نتایج حاصل از PCR با آغازگرهای اختصاصی در این تحقیق به صورت مشاهده ی باندهای ۵۵۰bp، ۳۶۰bp و ۴۱۵bp به ترتیب برای قارچ‌های *F. mediterranea*، *Pa. chlamydospora* و *Phaeoacremonium* spp. بود. نتایج حاصله نشان داد که در مجموع گونه‌ی *Pa. chlamydospora* از فراوانی بیشتری برخوردار است و در اکثر نمونه‌های مورد بررسی این گونه با درصد بالاتری نسبت به سایر عوامل قارچی جداسازی و ردیابی گردید و کمترین فراوانی نیز مربوط به گونه‌ی *F. mediterranea* بود که فقط در چوب‌های دارای علایم پوسیدگی سفید ردیابی گردید. بنابراین آغازگرهای اختصاصی مورد مطالعه می‌تواند در سالم سازی خزانه‌های انگور عاری از بیماری اسکا مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: انگور، بیماری اسکا، ردیابی، دی-ان-آریبوزومی.

Detection and identification of some fungal agents causing grapevine decline in Northern Khorasan Province vineyards using PCR technique

M. RAJAIYAN[1], M. R. KARIMI SHAHRI[2]✉, M. PIRNIA[3], V. DEHVARI[4] and N. GHEZEL SEFLOO[1]

1- Islamic Azad University of Damghan, Dept. Plant Protection, Damghan, Iran; 2- Razavi Khorasan Agricultural and Natural Resources Research Center, Dept. Plant Protection, Mashhad, Iran; 3- Dept. Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Iran; 4- Agricultural Biotechnology of Tehran Payame - nour University, Iran

Abstract

One of the most significant and destructive grapevine diseases is Esca which is caused by several fungal species. Trunk disease causes stunted growth, reduced yield, and ultimately, vine death. For this reason, during the summer 2011, infected samples were collected from Bojnourd (North Khorasan province) vineyards. Infected trunk samples were acquired that they were showing white and brown rots, dark brown spots and also samples without apparent symptoms. The aims of this work were, firstly, to apply species –specific primers for detecting fungal agents associated with Esca disease of grapevine; and comparing this method to the classical ones, and secondly, to detect frequency of each pathogenic agent using molecular and classical methods. In molecular method, species-specific primers which designed based on ITs region of rDNA were used to detect fungal agents of the Esca disease. They yielded a single amplicon of 550 bp, 360bp and 415 bp for *F.mediterranea*, *Pa. chlamydospora* and *Phaeoacremonium* spp. respectively. Results showed that the maximum frequency of incidence was related to *P. chamydospora* and *Phaeoacremonium* spp was in second. The lowest incidence frequency rate was related to *F.mediterranea* which was observed only in sample with white rot symptoms. Primers defined here can be used in the nursery sanitation program to produce plant free of Esca disease.

Key words: ESCA, Detection, ITs region, Grapevine.

✉ **Corresponding author: karimi_in@yahoo.com**

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

تاک (*Vitis vinifera*) از مهم‌ترین گونه‌های جنس Vitis می‌باشد که امروزه ۵۰۰۰ رقم از این گونه شناسایی شده است (Galet and Morton, 1998). دو مرکز مهم پرورش جنس ویتیس آمریکای شمالی و آسیای شرقی می‌باشد (Surico, 2000). یکی از مهم‌ترین مناطق انگور کاری ایران، استان خراسان شمالی است. بیماری اسکا که تحت عنوان سکته یا زوال مو[1] نیز نامیده می‌شود یکی از مهلک‌ترین بیماری‌های قارچی در تاکستان‌ها می‌باشد. این بیماری همراه کمپلکسی از قارچ‌های مختلف می‌باشد که موجب کاهش رشد، کاهش محصول و مرگ گیاه انگور می‌گردد (Mugnai *et al*. 1999). مدیریت بیماری اسکا و کنترل آن نیز منوط به شناسایی علایم و عوامل مؤثر در توسعه بیماری می‌باشد. بیشتر روش‌های کنترل اسکا پیشگیری کننده بوده و محدود به روش‌های سنتی باغبانی و بهداشتی است. قارچ‌کش مناسب و مؤثری در این زمینه نیز توصیه نشده است. علایم ظاهری اسکای مو شامل بافت مردگی‌های بین رگبرگی، خشکیدگی شاخه‌ها و لکه‌های کوچک روی میوه می‌باشد که می‌تواند در تمام یا بخشی از درخت ظاهر شود (Peros *et al*. 2008). در مقطع عرضی تنه علایم به صورت پوسیدگی سفید ناحیه‌ای از چوب مشاهده شده که به وسیله‌ی یک خط سیاه یا قهوه‌ای تیره احاطه می‌شود و همچنین علایم گاهی به صورت نقاط قهوه‌ای تیره تا سیاه می‌باشد. بیماری اسکا، در اواسط تابستان باعث پژمردگی سریع و مرگ ناگهانی[2] درختان مسن انگور می‌شود (Mugnai *et al*. 1999). قارچ‌هایی که همراه با بیماری اسکا می‌باشند شامل بازیدویومیست‌های *Fomitiporia mediterranea* و تا اندازه‌ای کمتر *Stereum hirsutum* و همچنین *Trametes hirsute* بوده که باعث پوسیدگی سفید چوب می‌شوند. همچنین قارچ‌های ناقص *Phaeomoniella chlamydospora* و چندین گونه از قارچ *Phaeoacremonium* spp. باعث ایجاد نقاط قهوه‌ای تیره تا سیاه در بافت چوب می‌شوند (Ari, 2000; Fischer, 2002). تشکیل اندام باردهٔ *F. mediterranea* در محیط کشت امکان نداشته و تنها در تاکستان و روی گیاه امکان پذیر است. بدون وجود اندام باردهٔ شناسایی این جنس بستگی به میسلیوم‌های تولید شده در محیط کشت داشته که شناسائی آن را با مشکل مواجه ساخته است. لذا استفاده از تکنیک‌های مولکولی برای تشخیص اینگونه قارچ‌ها که فقط دارای رشد رویشی هستند دارای اهمیت ویژه‌ای است (Cortesi *et al*. 2000; Fischer, 2002). همچنین قارچ‌های *Pa. chlamydospora* و *Phaeoacremonium* spp. روی محیط کشت دارای سرعت رشد بسیار پایینی بوده و غالباً بیش از ۲۰ روز زمان نیاز دارند تا در حد کمی رشد کنند. Aroca and Raposo (2007) گزارش کردند که تشخیص مرفولوژیکی این قارچ‌ها به دلیل شباهت‌های بسیار نزدیک آن، کار بسیار دشواری است و با کاربرد آغازگرهای اختصاصی مشخص شده است که اغلب تشخیص‌های صورت گرفته با روش مرفولوژیک نادرست بوده است. بیماری اسکای انگور برای اولین بار از ایران از استان خراسان شمالی (بجنورد)گزارش شد (Karimi *et al*. 2001). همچنین در مطالعات انجام شده در استان فارس *Phaeoacremonium aleophilum*، *Pa. chlamydospora*، *Fusarium* sp.، *Phoma* sp.، *Phaeoacremonium* sp. و *Natrasia* sp. از انگور دارای علایم زوال جدا سازی شده است (Mohammadi and Banihashemi, 2007). ضمناً آنها قارچ‌های *Pm. aleophilum* و *Pa. chlamydospora* و با فراوانی کمتر *Pm. parasiticum* و *Pm. inflatipes* را از روی انگور بر اساس خصوصیات مورفولوژی و مولکولی (PCR- RFLP و -βeta tubulin genes) شناسایی کرده‌اند (Banihashemi *et al*. 2009). ۶۴ جدایه قارچی نیز از باغات انگور استان خراسان شمالی شامل *Phaeoacremonium parasiticum* (= *Pm. parasiticum*)، *Pa. chlamydospora*، *F. mediterranea*، *Fusarium* sp. و *Phoma* sp. جداسازی و شناسایی گردیده است (Farashiani

۱- Grapevine decline

۲- Apoplexy

www.SID.ir

Archive of SID

et al. 2010). تنوع ژنتیکی قارچ‌های مرتبط با بیماری اسکا نیز در استان خراسان شمالی با استفاده از تکنیک RAPD- PCR انجام شده است. در این تحقیق قارچ‌های *Pm. parasiticum*، *Pa. chlamydospora*، *Pm. aleophilum* و *F. mediterranea* جداسازی گردیدند. جدایه‌هایی که بیشترین تنوع را در خصوصیات ریخت شناسی داشتند انتخاب شده و چند شکلی DNA جدایه‌ها با استفاده از ۱۰ آغازگر تصادفی RAPD-PCR مورد بررسی قرار گرفت (Bahrabadi *et al*. 2011).

Aroca and Raposo (2007) گزارش کردند که آغازگرهای طراحی شده بر اساس نواحی ITS به طور مؤثری در ردیابی عوامل اسکا کاربرد دارند. ردیابی قارچ‌های *F. mediterranea* و *F. punctata* در چوب انگور با استفاده از تکنیک PCR-RFLP به همراه آغازگرهای اختصاصی انجام شده است (Pilotti *et al*. 2010). دو گونه‌ی *Pm. angustius* و *Pm. viticola* که در نواحی ITS کاملاً مشابه می‌باشند با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (Pbr4-1+T1) و (Pbr8+T1) طراحی شده از ژن بتا- توبولین به ترتیب جهت شناسایی این دوگونه مورد استفاده قرار گرفت (Aroca *et al*. 2008).

Ciccarone *et al*. (2004) با استفاده از جفت آغازگر عمومی ITS4 و ITS5 تک باندی در محدوده‌ی ۷۴۰ bp برای *Fomitiporia* مشاهده کردند. Ridgway *et al*. (2002) توانست با استفاده از آغازگرهای اختصاصی PCH1 و PCH2 و تکنیک nested-PCR و مشاهده تک باندی در محدوده‌ی ۳۶۰bp قارچ *Pa. chlamydospora* را در تنه انگور ردیابی کند.

روش بررسی

جهت انجام این تحقیق، درطی تابستان ۱۳۸۹ از درختان دارای علایم و فاقد علایم تاکستان‌های شهرستان بجنورد و حومه‌ی آن واقع در استان خراسان شمالی نمونه برداری شد. مناطق نمونه برداری عبارت بودند از: مملجه، قراجه، بدرانلو، گلی، تیمورتاش، دراقانلو، قریکانلو، لنگر و قصرقجر. رقم انگور غالب دراین مناطق، رقم کلاهداری است. در این تحقیق چهار نوع نمونه از چوب تنه درختان انگور به شرح ذیل: نمونه‌های دارای پوسیدگی‌های سفید در برش عرضی تنه. نمونه‌های دارای علایم پوسیدگی قهوه‌ای رنگ در تنه. نمونه دارای علایم نقاط قهوه‌ای رنگ در تنه. نمونه‌های بدون علایم و به ظاهر سالم (شکل ۱) تهیه شد.

شکل ۱- A. قطعات تنه با علایم پوسیدگی سفید B. قطعات تنه با علایم پوسیدگی قهوه‌ای C. مقطع عرضی سرشاخه با علایم نقاط قهوه‌ای

Fig. 1. A- Cross section of young grapevine showing large area decayed by white rot fungi B- Cross section of grapevine trunk with brown rot symptoms. C- Cross section of young grapevine showing dark spots and reddish brown necrotic wood.

الف- جدا سازی عوامل قارچی مولد اسکا از قطعات

چوبی تنه انگور: نمونه‌هایی به ابعاد کوچک از قطعات تنه دارای چهار نوع علایم ذکر شده تهیه گردید. این نمونه‌ها با ابعاد کوچک (۵mm-۴) از مرز بافت سالم و آلوده آماده شدند. نمونه‌های ضدعفونی شده توسط هیپوکلریت سدیم ۱۰٪ روی محیط کشت مالت آگار MEA (۲٪) و همچنین محیط PDA (سیب زمینی-دکستروز آگار) کشت داده شد و سپس به انکوباتور با دمای ۱±۲۵ درجه سلسیوس منتقل گردیدند. قارچ‌های رشد یافته به محیط MEA (۲٪) منتقل و پس از خالص سازی شناسایی شد. جهت تشخیص قارچ‌های جدا شده از تنه آلوده به بیماری اسکا از کلیدهای شناسایی استفاده شد (Crous *et al*. 1996; Crous and Gams, 2000; Mostert *et al*. 2005; Mostert *et al*. 2006).

ب- آماده کردن جدایه‌ها جهت استخراج DNA: به منظور آماده کردن جدایه‌ها جهت استخراج DNA، ابتدا محیط کشت مایع (PDB[1]) تهیه و سپس قطعه‌ای با قطر ۵ میلی‌متر از

۱- Potato Dextrose Broth

www.SID.ir

Archive of SID

میسلیوم هر جدایه به محیط مایع اضافه شد و به مدت ۴ روز روی شیکر با سرعت ملایم (۷۵ تکان در دقیقه) قرار گرفت، سپس در دمای ۱±۲۵ درجه به مدت ۲۰-۱۵ روز در تاریکی در شرایط سکون نگهداری شد. پس از این مدت میسلیوم‌های قارچ از محیط کشت مایع با استفاده از پارچه‌ی ململ عبور داده و آماده استخراج DNA گردید. استخراج DNA از میسلیوم قارچ مطابق روش‌های اصلاح شده (Murray and Thompson, 1980; Rogers *et al*. 1989; Kim *et al*. 1990) انجام شد. DNA استخراج شده از میسلیوم‌های قارچ به عنوان کنترل مثبت در واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت.

ج- جداسازی DNA از چوب تنه انگور: بطور جداگانه از هر تیپ علایم بیماری ذکر شده تعداد ده قطعه چوب تنه انتخاب گردید. قطعات به ضخامت ۵-۴ میلی‌متر تهیه و سپس حدود ۰/۷ گرم از هر نمونه توزین شد. سپس استخراج DNA مطابق روش (Dellaporta *et al*. 1983) انجام شد. به منظور مشاهده حضور یا عدم حضور DNA و تعیین کیفیت و یکپارچگی آن، از الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد استفاده شد.

د- ردیابی قارچ‌های مولد اسکا در چوب با استفاده از آغازگرهای اختصاصی

۱- ردیابی *F. mediterranea* : ده نمونه DNA استخراج شده از قطعات چوب تنه با علایم تیپیک پوسیدگی سفید ابتدا با استفاده از آغازگرهای عمومی ITS4+ITS5 تکثیر گردید (جدول ۱). سپس از محصول PCR اولیه با استفاده از آغازگرهای اختصاصی Fmed1+Fmed2 در واکنش nested-PCR مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۲). از این آغازگرهای اختصاصی جهت شناسایی *F. mediterranea* رشد کرده در محیط کشت نیز استفاده گردید. PCR در اولین واکنش در حجم کلی ۱۰۰ میکرولیتر شامل ۱۰ نانوگرم DNA، ۴ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۲۰۰ میکرو مول dNTP، ۰/۵ میلی مولار از هر آغازگر عمومی، ۴ واحد آنزیم *Taq* DNA Polymerase و ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR10X و آب مقطر ۷۶/۳ میکرولیتر در دستگاه ترموسایکلر با برنامه حرارتی ۲ دقیقه در ۹۵°C، سپس ۴۰ سیکل شامل ۱ دقیقه در ۹۵°C، ۱ دقیقه در ۴۷°C، ۴۵ ثانیه در ۷۲°C و مرحله تکثیر نهایی با ۷ دقیقه در ۷۲° C انجام شد. مرحله دوم PCR (nested-PCR) با استفاده از محصول PCR اولیه و کاربرد آغازگرهای اختصاصی Fmed1+Fmed2 در واکنش ۵۰ میکرولیتری انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۵ میکرولیتر بافر PCR10X، ۳ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۰/۴ میلی‌مولار dNTPs، ۲۵ پیکومولار هر آغازگر، ۱۰ نانوگرم DNA ژنومی و ۱/۶ واحد آنزیم تک پلیمراز و آب مقطر ۳۷/۴۴ میکرولیتر در دستگاه ترموسایکلر با برنامه حرارتی مطابق PCR اولیه انجام شد.

۲-ردیابی *Pa. chlamydospora* : جهت ردیابی *Pa. chlamydospora* در قطعات چوب انگور ابتدا DNA نمونه‌ها جهت تکثیر نواحی ITS از آغازگرهای عمومی ITS4+ITS5 (جدول ۱) در واکنش اولیه PCR استفاده گردید و سپس از محصول واکنش اولیه پس از رقیق سازی در واکنش دوم (nested-PCR) با کاربرد آغازگرهای اختصاصی PCH1+PCH2 استفاده گردید. اولین PCR در واکنش ۲۵ میکرولیتری شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR10X، ۱/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۰/۲ میلی‌مولار dNTPs، ۵ پیکومول از هر آغازگر عمومی، ۱۰ نانوگرم DNA و ۱/۲۵ واحد آنزیم تک پلیمراز و آب مقطر ۱۸/۵۹ میکرولیتر در دستگاه ترموسایکلر با برنامه حرارتی ۳ دقیقه در ۹۴°C، ۳۰ سیکل شامل ۳۰ ثانیه در ۹۴°C، ۳۰ ثانیه در ۵۰°C، ۳۰ ثانیه در ۷۲°C و مرحله تکثیر نهایی با ۷ دقیقه در ۷۲°C انجام شد. واکنش دوم PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر با مقادیر مشابه واکنش اول در دستگاه ترموسایکلر با برنامه حرارت ۳ دقیقه در ۹۵°C، ۳۵ سیکل شامل ۳۰ ثانیه در ۹۵°C، ۴۵ ثانیه در ۵۵°C، ۱ دقیقه در ۷۲° C و مرحله تکثیر نهایی با ۷ دقیقه در ۷۲°C انجام شد.

۳- ردیابی جنس *Phaeoacremonium* spp. : جهت ردیابی قارچ *Phaeoacremonium* spp. از جفت آغازگرهای ITS1F+ITS4 و Pm1+Pm2 استفاده گردید. همچنین از جفت آغازگر Pm1+Pm3 به عنوان کنترل منفی استفاده شد (جدول ۱

www.SID.ir

Archive of SID

و ۲). اولین PCR در واکنش ۲۵ میکرولیتری شامل ۲ میکرولیتر بافر PCR10X، ۲میلی مولار $MgCl_2$، ۰/۲ میلی‌مولار dNTPs، ۰/۲ میکرومولار از هر آغازگر عمومی، ۱۰ نانوگرم DNA و ۰/۷۵ واحد آنزیم تک پلیمراز و آب مقطر ۱۹/۴۴ میکرولیتر در دستگاه ترموسایکلر با برنامه حرارتی ۲/۵ دقیقه در $94^{\circ}C$، ۳۵ سیکل با ۱۵ ثانیه در $94^{\circ}C$، ۳۰ ثانیه در $35^{\circ}C$، ۹۰ ثانیه در $72^{\circ}C$ و مرحله تکثیر نهایی با ۷ دقیقه در $72^{\circ}C$ انجام شد. محصول PCR اولیه به میزان ۱:۲۰۰ به وسیله‌ی آب دوبار تقطیر رقیق شده و سپس یک میکرولیتر از محصول رقیق شده در واکنش nested-PCR با جفت آغازگرهای اختصاصی این جنس Pm1+Pm2 جهت ردیابی *Phaeoacremonium* spp. مورد استفاده قرار گرفت. واکنش دوم PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR10X، ۴ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۰/۸ میلی‌مولار dNTPs، ۰/۵ میکرومولار از هر آغازگر اختصاصی، ۱۰ نانوگرم DNA و ۱/۲۵ واحد آنزیم تک پلیمراز و آب مقطر ۱۵/۸۴ میکرولیتر در دستگاه ترموسایکلر با برنامه حرارت ۵ دقیقه در $94^{\circ}C$، ۳۰ سیکل با ۳۰ ثانیه در $94^{\circ}C$، ۳۰ ثانیه در $57^{\circ}C$، ۵۰ ثانیه در $72^{\circ}C$ و مرحله تکثیر نهایی با ۷ دقیقه در $72^{\circ}C$ انجام شد.

محصولات نهایی nested-PCR با آغازگرهای اختصاصی هر گونه در ژل آگارز ۱/۵درصد الکتروفورز گردید. پس از آن ژل توسط محلول اتیدیوم بروماید (۰/۵ میلی گرم/لیتر) به مدت ۲۰ دقیقه رنگ آمیزی وسپس به مدت ۱۰ دقیقه در آب مقطر رنگ زدایی شد و با استفاده از دستگاه مستند ساز ژل در مقابل نور UV مرئی از آن عکس گرفته شد.

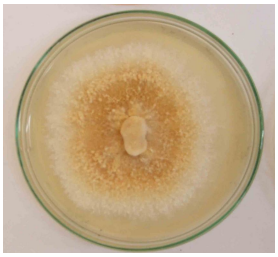
نتیجه و بحث

در بیماری اسکا طیفی از علایم در تنه و شاخه‌های فرعی، برگ‌ها، حبه‌ها و شاخه‌های جوان دیده می‌شود.

الف- نتایج جدا سازی عوامل قارچی مولد اسکا از قطعات چوب تنه انگور: در جدا سازی‌های انجام گرفته از ده قطعه چوب تنه دارای پوسیدگی سفید بازیدیومیست *F. mediterranea* به فراوانی جدا گردید. پرگنه قارچ در بافت چوب به رنگ زرد تا قهوه‌ای روشن قابل مشاهده بودند و بافت چوب کاملاً حالت نرم و اسفنجی داشت. بیشترین شدت آلودگی بیماری در منطقه‌ی مملجه بود به نحوی که در ناحیه‌ی وسیعی از تاکستان، تعداد زیادی از درختان انگور کاملاً خشک شده بودند. در این تحقیق بعد از کشت نمونه‌های دارای علایم پوسیدگی قهوه‌ای و نقاط قهوه‌ای رنگ قارچ‌های *Pa. chlamydospora* و *Phaeoacremonium* spp. جداسازی شد. از کشت نمونه‌های فاقد علایم نیز هیچ یک از عوامل مرتبط با اسکا جداسازی نگردید.

مشخصات ظاهری پرگنه‌های قارچ بر روی محیط کشت: مشخصات *F. mediterranea* دارای پرگنه‌های سریع رشد عسلی رنگ تیره با بافت نمدی که تنها دارای رشد رویشی می‌باشد و در محیط کشت تولید هیچ گونه اسپوری نمی‌کنند و ساختار متمایز کننده‌ای نیز ندارند. رشد شعاعی پر گنه پس از ۸ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و در تاریکی در محیط MEA حدود ۳۰-۲۰ میلی‌متر بود (شکل ۲).

***Phaeoacremonium iranianum*:** پرگنه‌های این جدایه روی محیط MEA (۲٪) به صورت مسطح نمدی با حاشیه فرو رفته می‌باشد. پس از ۱۶ روز سطح رویی و پشت آن به رنگ قهوه‌ای تا بژ مایل به خاکستری به سمت حاشیه مشاهده شد (شکل ۳). پرگنه‌ها روی محیط PDA، به صورت مسطح با حاشیه فرو رفته که پس از ۱۶ روز سطح رویی آن به رنگ قهوه‌ای و پشت آن به رنگ بور تیره بنظر می‌رسید.

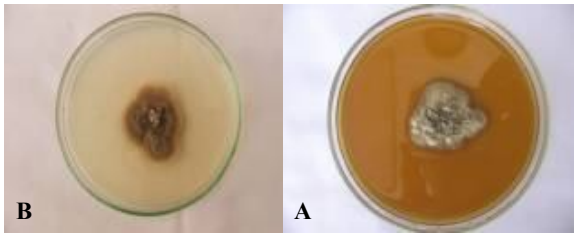


شکل ۲- پرگنه *Fomitiporia mediterranea* روی محیط MEA(۲٪) پس از ۱۶ روز

Fig. 2. *Fomitiporia mediterranea* : 16 –day old colony on 2% MEA

www.SID.ir

Archive of SID

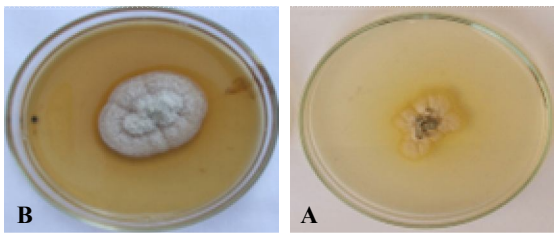


شکل ۳- پرگنه *Phaeoacremonium iranianum* (A: روی محیط کشت MEA (۲٪) و B:روی محیط کشت PDA پس از ۱۶ روز

Fig. 3. A: *Phaeoacremonium iranianum* 16 –day old colony on 2% MEA, B: *Phaeoacremonium iranianum*: 16 –day old colony on PDA

***Phaeoacremonium aleophilum*:** پرگنه‌های این جدایه روی محیط MEA (۲٪) به صورت مسطح، نمدی با حاشیه فرو رفته می‌باشد پس از ۱۶ روز سطح رویی آن به رنگ زرد روشن یا خاکستری و پشت آن به رنگ زرد روشن یا قهوه‌ای مشاهده شد (شکل ۴-B). پرگنه‌ها روی محیط PDA به صورت مسطح نمدی یا پشمی با حاشیه فرو رفته پس از ۱۶ روز سطح رویی آن به رنگ بور تیره تا خاکستری مایل به قهوه‌ای در حاشیه و پشت پتری به رنگ قهوه‌ای کم رنگ تا قهوه‌ای تیره و اطراف کلنی به رنگ زرد مشاهده شد (شکل ۴-A).

***Pa. chlamydospora*:** پرگنه‌های این جدایه روی محیط کشت دارای رشد مخمری بوده، که باعث تمایز آن از جنس *Phaeoacremonium* می‌شود. پرگنه‌ها روی محیط MEA (۲٪) به رنگ سبز زیتونی تا سبز تیره و مایل به سیاه بودند (شکل۵).



شکل ٤- پرگنه *Phaeoacremonium aleophilum* (A: روی محیط کشت PDA و B : روی محیط کشتMEA (۲٪)) پس از ۱۶ روز

Fig. 4. A: *Phaeoacremonium aleophilum*: 16 –day old colony on PDA, B: *Phaeoacremonium aleophilum*: 16 –day old colony on 2% MEA

شکل ۵- پرگنه *Phaeomoniella chlamydospora* روی MEA (۲٪) پس از ۱۶ روز

Fig. 5. *Phaeomoniella chlamydospora:* 16 –day old colony on 2% MEA

ب- نتایج حاصل از تکثیر DNA در قطعات چوب تنه انگورآلوده به بیماری اسکا

۱- *F. mediterranea*: واکنش nested-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی Fmed1+Fmed2 روی محصولات حاصل از تکثیر نواحی ITS ریبوزومی با آغازگرهای عمومی قارچی (ITS4+ITS5) در اولین واکنش PCR منجر به تشکیل باند ۵۵۰bp گردید (شکل ۶). با توجه به گزارش سایر محققین مانند (Fischer, 2002; Jamaux-Despreaux&Peros, 2003) مشاهده باند در محدوده‌ی ۵۵۰bp گویای حضور قارچ *F. mediterranea* می‌باشد.

۲- *Pa. chlamydospora*: پس از تکثیر نواحی ITS ریبوزومی با استفاده از آغازگرهای عمومیITS4+ITS5 در مرحله‌ی بعدی از جفت آغازگر اختصاصی PCH1+PCH2 در واکنش nested-PCR برای ردیابی استفاده گردید. ناحیه تکثیر شده به صورت تک باندی در محدوده‌ی ۳۶۰bp مشاهده شد (شکل ۷). با استناد به گزارش‌های سایر محققین مانند Ridgway *et al*. (2003) مشاهده این باند نشانه‌ی حضور قارچ *Pa. chlamydospora* می‌باشد.

۳- *Phaeoacremonium* spp.: جهت ردیابی جنس *Phaeoacremonium* در مجموع ۴۰ قطعه چوب تنه تهیه شده از دو جفت آغازگر استفاده شد. به این ترتیب که اولین واکنش PCR با استفاده از جفت آغازگر عمومی ITS1F+ITS4 انجام گرفته و سپس محصول این واکنش در رقت ۱:۲۰۰ جهت انجام دومین PCR (nested-PCR)، با کاربرد جفت

www.SID.ir

Archive of SID

آغازگر اختصاصی این جنس (Pm1+Pm2) استفاده گردید. محصول بدست آمده از nested-PCR در ژل آگارز ۱/۵٪ الکترفورز شد و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید تک باندی در ناحیه‌ی ۴۱۵bp مشاهده شد (شکل ۸).

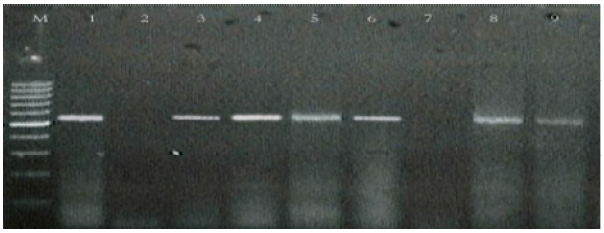
Aroca *et al*. (2007) نیز گزارش کردند که حضور تک باند در ناحیه ۴۱۵bp نشانه‌ی حضور *Phaeoacremonium* spp می‌باشد.

نتایج حاصل از بررسی قطعات تنه دارای علایم

پوسیدگی سفید: نتایج نشان داد که در تمامی نمونه‌های دارای علایم پوسیدگی سفید به هر دو روش قارچ *F. mediterranea* جداسازی و ردیابی گردید و علاوه بر آن فقط در سه نمونه دارای علایم پوسیدگی سفید قارچ *Pa. chlamydospora* در محیط کشت جداسازی شد ولی قارچ *Phaeoacremonium* spp. در محیط کشت جدا سازی نگردید. در حالیکه با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (روش ملکولی) در نه مورد از ده نمونه، قارچ *Pa. chlamydospora* علاوه بر قارچ *F. mediterranea* ردیابی شد. همچنین در یک مورد قارچ *Phaeoacremonium* spp. نیز ردیابی گردید.

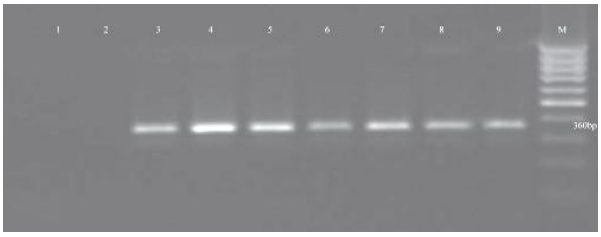
نتایج حاصل از بررسی نمونه‌های دارای پوسیدگی

قهوه‌ای: نتایج حاصل از ده قطعه چوب تنه دارای پوسیدگی قهوه‌ای روی محیط MEA نشان داد که فقط در ۸ نمونه قارچ *Pa. chlamydospora* و در ۴ نمونه نیز قارچ *Phaeoacremonium* spp. جداسازی گردید. در ۳ قطعه هر دو قارچ به صورت توام جداسازی و در یک نمونه هیچگونه قارچی جداسازی نشد. همچنین *F.mediterranea* نیز از هیچ کدام از نمونه‌های دارای علایم جداسازی نشد. نتایج بدست آمده با کاربرد آغازگرهای اختصاصی بدین صورت بود که *F. mediterranea* در هیچ یک از نمونه‌های دارای پوسیدگی قهوه‌ای ردیابی نگردید. قارچ *Pa. chlamydospora* در تمامی ده قطعه چوب و *Phaeoacremonium* spp. نیز در شش مورد ردیابی شد.



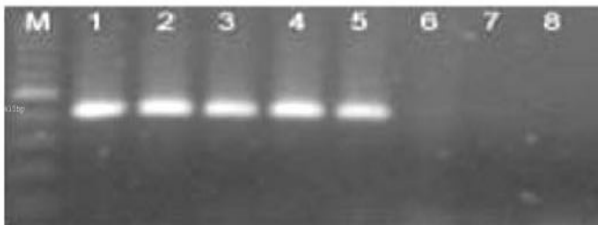
شکل ۶- باند ۵۵۰bp حاصل از واکنش nested-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی Fmed1+Fmed2 . (چاهک‌های ۱ و ۲ به ترتیب کنترل مثبت و کنترل منفی،M مارکرbp ۱۰۰)

Fig. 6. Nested PCR amplification of a 550bp rDNA fragment using specific primers Fmed1+Fmed2. Lanes M: molecular size markers (100 bp), 1: positive control, 2: negative control



شکل ۷- باند ۳۶۰bp حاصل از واکنش nested-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصیPch1+Pch2. (چاهک‌های ۲ و ۹ به ترتیب کنترل منفی و کنترل مثبت، M مارکرbp ۱۰۰)

Fig. 7. Nested PCR amplification of a 360bp rDNA fragment using specific primers PCH1+PCH2. Lanes M: molecular size markers (100 bp), 2: negative control, 9: positive control



شکل ۸- باند ۴۱۵bp حاصل از واکنش nested-PCR با استفاده ازآغازگرهای اختصاصی(Pm1+Pm2) (چاهک‌های ۱ و ۶ به ترتیب کنترل مثبت و کنترل منفی، M مارکرbp ۱۰۰)

Fig. 8. Nested PCR amplification of a 415bp rDNA fragment using specific primers Pm1+Pm2. Lanes M: molecular size markers (100 bp), 1: positive control, 6: negative control

نتایج حاصل از بررسی نمونه‌های دارای علایم نقاط

قهوه‌ای: نتایج حاصل از کشت قطعات چوب داری علایم نقاط قهوه‌ای بر روی محیط MEA به این ترتیب بود که از سه

www.SID.ir

Archive of SID

قطعه چوب قارچ *Pa. chlamydospora* و از دو قطعه نیز *Phaeoacremonium* spp. به تنهایی جداسازی شدند و از دو نمونه نیز هیچ یک از این قارچ‌ها جداسازی نگردید. علاوه بر آن از سه قطعه چوب دارای نقاط قهوه‌ای رنگ قارچ‌های *Pa. chlamydospora* و *Phaeoacremonium* spp. توأماً جداسازی شدند. *F. mediterranea* نیز از هیچ یک از قطعات کشت داده شده جدا سازی نگردید. نتایج ردیابی مولکولی نشان داد که در ۹ نمونه *Pa. chlamydospora* و در ۷ نمونه نیز *Phaeoacremonium* spp. ردیابی گردید. ضمناً در شش نمونه حضور هر دو قارچ *Pa. chlamydospora* و *Phaeoacremonium* spp. توأماً و از یک نمونه نیز فقط *Phaeoacremonium* spp. ردیابی شد. همچنین *F. mediterranea* در هیچ یک از قطعات چوب دارای علایم پوسیدگی قهوه‌ای و نقاط قهوه ای رنگ ردیابی نشد.

نتایج حاصل از بررسی چوب‌های بدون علایم: از کشت قطعات بدون علایم بر روی محیط MEA هیچ یک از عوامل مرتبط با بیماری اسکا جداسازی نگردید.

جدول ۱- توالی آغازگرهای نواحی ریبوزومی (ITs) مورد استفاده در این تحقیق

Table 1. Sequences of ITS Primers used in this study

نام آغازگر Primer name	گونه قارچی Fungal species	توالی آغازگر Primer sequence
ITS4	*F. mediterranea*	5́ – TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC – 3́
ITS5	*F. mediterranea* *Pa. chlamydospora*	5́ – GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G – 3́
ITS1F	*Phaeoacremonium*	5́ – CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A – 3́
ITS4	*Phaeoacremonium* *Pa. chlamydospora*	5́ – TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC – 3́

جدول ۲- توالی آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده در تحقیق

Table 2. Sequences of specific primers used in this study

نام آغازگر Primer name	قارچ مورد ردیابی Fungal species	توالی آغازگر Primer sequence
Fmed1	*F. mediterranea*	5́ – GCA GTA GTA ATA ATA ACA ATC – 3́
Fmed2	*F. mediterranea*	5́ – GGT CAA AGG AGT CAA ATG GT – 3́
PCH1	*Pa. chlamydospora*	5́ – CTC CAA CCC TTT GTT TAT C – 3́
PCH2	*Pa. chlamydospora*	5́ – TGA AAG TTG ATA TGG ACC C – 3́
Pm1	*Phaeoacremonium*	5́ – CTC CAA ACC CTT TGT GAA CAT – 3́
Pm2	*Phaeoacremonium*	5́ – CGA GCC CGC CAC TGA CTT – 3́
Pm3	*Phaeoacremonium*	5́ – GCG AGC CCG CCA CTG ACT TT – 3́

جدول ۳- مقایسه فراوانی عوامل قارچی مولد اسکای مو با کاربرد دو روش کلاسیک و مولکولی

Table 3. Frequency comparison using classical and molecular methods of fungi associated with esca disease of grapevine

جدایه‌ها Isolates	ردیابی مولکولی با آغازگرهای اختصاصی Molecular detection with specific primers	جداسازی در محیط کشت Classical isolation by media
F. mediterranea	25%	25%
Pa. chlamydospora	82.5%	42.5%
Phaeoacremonium spp	45%	22.5%

www.SID.ir

Archive of SID

اما در بررسی‌های مولکولی و کاربرد آغازگرهای اختصاصی از ۵ نمونه قارچ *Pa. chlamydospora* و از ۴ نمونه قارچ *Phaeoacremonium* spp. ردیابی گردیدند. با توجه به نتایج گرفته شده در مجموع قارچ *Pa. chlamydospora* از فراوانی بیشتری برخوردار بوده (۸۲/۵٪) و در اکثر نمونه‌های موجود با درصد بالاتری نسبت به سایر عوامل جداسازی و ردیابی گردید. قارچ *Phaeoacremoniu*m spp. با فراوانی ۴۵٪ در جایگاه بعدی و سپس در رتبه‌ی سوم قارچ *F. mediterranea* با فراوانی۲۵٪ قرار گرفت.

Aroca and Rapose (2007) گزارش کردند که بسیاری از تشخیص‌هایی که با روش مرفولوژیک انجام گرفته اشتباه بوده و عامل مربوط به گونه‌ی دیگری می‌باشد. Romanazzi *et al*. (2009) در بررسی درختان مبتلا به اسکا با روش کلاسیک *Pa. chlamydospora*، *Pm. aleophilum*، *F. mediterranea* و *Botryosphaeria* را در ۶۸ نمونه‌ی مورد بررسی به ترتیب در ۲۵٪، ۷/۳٪، ۸/۸٪ و ۳۰/۸٪ از درختان دارای علایم جداسازی کردند و با روش مولکولی نیز این عوامل را در ۲۷ نمونه‌ی مورد بررسی به ترتیب در ۵۸/۳٪، ۰٪، ۷/۴٪ و ۷/۴٪ از نمونه‌ها ردیابی کردند. Aroca and Rapose (2007) در بررسی ۹ درخت انگور مبتلا به اسکا با روش کلاسیک جنس *Phaeoacremonium* را در ۵۵/۵٪ از نمونه‌های کشت داده شده روی محیط MEA جداسازی نمودند در حالی که آن‌ها با روش مولکولی این جنس را در ۸۸/۸٪ از نمونه ردیابی کردند. Romanazzi *et al*. (2009) از تاکستان‌های قسمت مرکزی شرق ایتالیا با کاربرد آغازگرهای اختصاصی *F. mediterranea* را در اکثر چوب‌های دارای علایم پوسیدگی سفید و همچنین *Pa. chlamydospora* را در ۸۴/۶٪ از نمونه‌ها ردیابی کردند در صورتیکه با روش کلاسیک توانستند *F. mediterranea* را از تمامی‌نمونه‌ها و *Pa. chlamydospora* را تنها در ۳۸/۴٪ از نمونه‌ها جداسازی نمایند. همچنین قارچ *Pm. aleophilum* با هیچ یک از این دو روش جداسازی و یا ردیابی نگردید که این نتایج مشابه نتایج به دست آمده از بررسی قطعات چوب با علایم پوسیدگی سفید در تحقیق حاضر می‌باشد. Zanzotto *et al*. (2007) گزارش کرد که از قطعات چوب دارای پوسیدگی قهوه‌ای قارچ‌های *Phaeoacremonium* spp. و *Pa. chlamydospora* که به ترتیب با فراوانی ۷۸٪ و ۴۲٪ جداسازی شد.

Peros *et al*. (2008) نیز از چوب‌های واجد این علایم عوامل فوق را به ترتیب در ۳۰/۲٪ و ۳۷/۱٪ از نمونه‌ها جداسازی کردند، آنها همچنین قارچ *F. mediterranea* را در ۲/۳٪ از این نمونه‌ها جداسازی نمودند. همچنین با روش کلاسیک از قطعات چوب دارای علایم نقاط قهوه‌ای تنها قارچ *Pa. chlamydospora* را در ۳۶/۱٪ از نمونه‌ها جداسازی و این عامل را مرتبط با این نوع علایم گزارش کرده اند. با توجه به نتایج بدست آمده از نمونه‌های واجد علایم نقاط قهوه‌ای تنه در باغات انگور آلوده استان خراسان شمالی حدود ۶۰٪ از قطعات قارچ *Pa. chlamydospora* جداسازی و قارچ *Phaeoacremonium* spp. نیز در ۵۰٪ از قطعات چوب جدا گردید. نتایج حاصل از کاربرد دو روش به روشنی گویای این مطلب است که روش مولکولی دارای حساسیت بسیار بیشتری در مقایسه با روش کلاسیک بوده و در مدت زمان کوتاهی (در مدت چند ساعت) می‌توان حضور عوامل قارچی بیماری اسکا را در درون تنه انگور ردیابی کرد. در حالی که جداسازی این عوامل با روش سنتی محیط کشت نیازمند زمان بسیار طولانی (کمینه ۲۰ روز) می‌باشد. با در نظر داشتن این نکته که یکی از راه‌های گسترش بیماری از طریق قلمه‌های آلوده می‌باشد. بنابراین قبل از قلمه گیری با انجام یک تست PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی می‌توان قارچ‌های مولد اسکا را در تنه پایه مادری ردیابی کرد. در نتیجه با تشخیص آلودگی نهفته‌ی این عوامل در گیاه مادری و انتخاب قلمه‌های سالم و عاری از پاتوژن می‌توان تا حد زیادی این بیماری را مدیریت کرد.

سپاسگزاری

از تمامی پرسنل بخش تحقیقات گیاهپزشکی مرکز تحقیقات کشاوری و منابع طبیعی خراسان رضوی تشکر و قدردانی می‌نماییم.

www.SID.ir

Archive of SID

References

ARI, M. E. 2000. A general approach for esca disease in the vineyard of Turkey. Phytopathologia Mediterranea, 39: 35-37.

AROCA, A. and R. RAPOSO, 2007. A PCR- based strategy to detect and identify species of *Phaeoacremonium* causing grapevine declines. Microbiology, 80: 2911-2918.

AROCA, A., R. RAPOSO and P. LUNELLO, 2008. A biomarker for the identification of four *Phaeoacremonium* species using the β-tubulin gene as the target sequence. Microbiology Biotechnologia, 80: 1131-1140.

BAHRABADI, M., M. R. KARIMI, M. HASHEMI, 2012. Study on genetic variability in fungi associated with esca disease in North Khorasan province vineyards with RAPD-PCR. Journal of Plant Protection, 26: 92-100. (in Farsi with English summery).

BANIHASHEMI, Z., H. MOHAMMADI and J. ARMENGOL, 2009. Prevalence of esca and Petri disease of grapevine in Iran. Phytopathology, 99(6):S8.

CICCARONE, C., A. GRANITI, A. SCHIAFFINO and F. MARRAS, 2004. Molecular analysis of *Fomitiporia mediterranea* isolates from esca-affected grapevines in southern Italy. Phytopathologia Mediterranea,43: 268-272.

CORTESI, P., M. FISCHER and M. MILGROOM, 2000. Identification and spread of *Fomitiporia punctata* associated with wood decay of grapevine showing symptoms of esca disease. Phytopathology, 90: 967-972.

CROUS, P. W. and W. GAMS, 2000. *Phaeomoniella chlamydospora* gen. et comb. nov., a causal organism of Petri grapevine decline and Esca. Phytopathologia Mediterranea, 39: 112-118.

CROUS, P. W., W. GAMS, M. J. WINGFILD and P. S. WYK VAN, 1996. *Phaeoacremonium* gen. nov. associated with wilt and decline disease of woody hosts and human infections. Mycologia, 88: 786-796.

DELLAPORTA, S. L., J. WOOD and J. B. HICKS, 1983. A plant DNA Minipreparation version 2. Plant Molecular Biology Reporter, 1: 19-22

FARASHIYANI, A., S. A. MOUSAVI, M. R. KARIMI, 2010. Study of esca disease of grapevine in Bojnourd. Phytopathology. 48: 143-153.(in Farsi with English summery).

FISCHER, M. 2002. A new wood-decaying basidiomycete species associated with Esca grapevine: *Fomitiporia mediterranea* (hymenochaetales). Mycological Progress, 1: 315-324.

FISCHER, M. 2006. Biodiversity and geographic distribution of basidiomycetes causing Esca-associated white rot in grapevine: a worldwide perspective. Phytopathologia Mediterranea, 45(supplement): S30-S42.

GALET, P., and L. T. MORTON, 1998. Compendium of Grape Disease. APS Press. USA. 93 P.

JAMAUX-DESPREAUX, I., and J. P. PEROS, 2003. Genetic structure in populations of the fungus *Fomitiporia punctata* associated with the Esca syndrome in grapevine. Vitis, 42: 43-51.

KARIMI, M. R., B. MAHMOODI and M. KAZEMIYAN, 2001. First report of Esca of grapevine in Iran. Phytopathologia Mediteranea, 40 (supplement): S481.

KIM, W. K., W. MAUTHE, G. HAUSNER and G. R. KLASSEN, 1990. Isolation of high molecular weight DNA and double stranded RNAs from fungi. Canadian Journal of Botany, 68: 1898-1902.

MOHAMMADI, H. and Z. BANIHASHEMI, 2007. Grapevine decline in Fars province. Phytopathology, 43: 294-311.(in Farsi with English summery)

MOSTERT, L., F. HALLEN, P. FOURIE and P. W. CROUS, 2006b. A review of *Phaeoacremonium* species involved in Petri disease and Esca of grapevines. Phytopathologia Mediterranea, 45 (supplement): S12-S20.

MOSTERT, L., J. Z. GROENEWALD, R. C. SUMMERBELL, W. GAMS and P. W. CROUS, 2006 a. Taxonomy and pathology of *Togninia* (*Diaporthales*) and its *Phaeoacremonium* anamorphs. Studies in Mycology, 54: 115 pp.

MOSTRERT, L., J. Z. GROENEWALD, R. C. SUMMERBELL, V. ROBERT, D. A. SUTTON, A. A. PADHYE and P. W. CROUS, 2005. Species of

www.SID.ir

Archive of SID

Phaeoacremonum associated with infections in humans and environmental reservoirs infected woody plants. Journal of Clinical Microbiology, 43: 1752-1767.

MUGNAI, L., L. GRANITI and G. SURICO, 1999. Esca (black measles) and brown wood- streaking: two old and elusive disease of grapevine. Plant Disease, 83: 404-418.

MURRAY, H. G. and W. F. THOMPSON, 1980. Rapid isolation of high molecular weight DNA. Nucleic Acid Research, 8: 4321- 4325.

PEROS, J. P., G. BERGER, and I. JAMAUX-DESPREAUX, 2008. Symptoms, Wood lesions and fungi associated with esca in organic vineyards in Languedoc-roussillon (France). Journal Phytopathology, 156:297-303.

PILOTTI, M., L. TIZZANI, A. BRUNETTI, F. GERVASI, G. DILERNIA and V. LUMIA, 2010. Molecular identification of *Fomitiporia mediterranea* on declining and decayed hazelnut. Journal of Plant Pathology, 92: 115-129.

RIDGWAY, H. J., B. E. SLEIGHT and A. STEWART, 2002. Molecular evidence for the presence *Phaeomoniella chlamydospora* in new Zealand nurseries, and its detection in rootstock mother vines using species-specific PCR. Australasian Plant Pathology, 31: 267-271.

RIDGWAY, H. J., B. E. SLEIGHT and A. STEWART, 2003. Molecular diagnostics for industry: sources of Petri disease in grapevine nurseries. Phytopathologia Mediterranea, 43: 152 (abstract).

ROGERS, S. O., S. REHNER, C. BLEDSOE, G. J. MULLER and J. F. AMMIRATI, 1989. Extraction of DNA from Basidiomycetes for ribosomal DNA hybridization. Canadian Journal of Botany, 67: 1235-1243.

ROMANAZZI, G., S. MUROLO, L. PIZZICHINI and S. NARDI, 2009. Esca in young and mature vineyards, and molecular diagnosis of the associated fungi. European Journal of Plant Pathology, 125: 277-290.

SURICO, G. 2000. The grapevine and wine production through the ages. Phytopathologia Mediterranea, 39: 3-10.

ZANZOTTO, A., F. AUTIERO, D. BELLOTTO, G. D. CORTIVO, G. LUCCETTA and M. BORGO, 2007. Occurrence of *Phaeoacremonium* spp. and *Phaeomoniella chlamydospora* in grape propagation materials and young grapevines. European Journal of Plant Pathology, 119: 183-192.

www.SID.ir