



مقاله پژوهشی

تشخیص گونه‌های *Cytospora* دخیل در بیماری مرکب زوال درختان انگور در شهرستان‌های میاندوآب و ملکان

زهرا محمودیان^{۱*}، عبدالله احمدپور^{۲**} و یوبرت قوستا^{۱**}

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۳/۲۵، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۵/۰۷)

چکیده

بیماری مرکب زوال درختان انگور یکی از معضلات مهم کشت انگور در جهان است که با کاهش عملکرد محصول در طی چند سال و افزایش مرگ و میر گیاهان و در نتیجه خسارت شدید اقتصادی به صنعت پرورش انگور مرتبط است. بیش از ۳۵ جنس قارچی در بیماری مرکب زوال دخیل هستند و جنس *Cytospora* نیز به عنوان یکی از جنس‌های ایجاد کننده بیماری گزارش شده است. هدف این مطالعه شناسایی گونه‌های جنس *Cytospora* دخیل در بیماری مرکب زوال درختان انگور در تاکستان‌های شهرستان‌های میاندوآب (استان آذربایجان غربی) و ملکان (استان آذربایجان شرقی) بود. برای این منظور، طی سال‌های ۱۴۰۰-۱۳۹۹ از شاخه‌ها و تنه درختان بیمار با نشانه‌های پژمردگی و سرخشکیدگی شاخه‌ها، تغییر رنگ بافت‌های پوست و چوب، تغییر رنگ قهوه‌ای تا سیاه در بافت‌های آوندی و شانکر چوب نمونه برداری انجام گرفت. جداسازی قارچ‌ها بر اساس روش‌های رایج بیماری‌شناسی گیاهی انجام شد و تعداد ۷۸ جدایه قارچی با ویژگی‌های معمول جنس *Cytospora* جداسازی و خالص‌سازی گردید. بر اساس تلفیق نتایج مطالعات ریخت‌شناختی و توالی‌های سه ناحیه ژنومی شامل *TUB2*، *ITS-rDNA* و *RPB2* چهار گونه شامل *C. chrysoasperma* (جدایه ۱۵)، *C. ershadii* (۲۴ جدایه)، *C. salicina* (۲۸ جدایه) و *C. viticola* (۱۱ جدایه) شناسایی شدند. گونه *C. viticola* به عنوان گونه جدید برای بیوتای قارچی ایران و انگور به عنوان میزبان جدید برای گونه *C. ershadii* در ایران و دنیا گزارش می‌شود. بیماری‌زایی جدایه‌های منتخب از گونه‌های شناسایی شده روی شاخه‌های انگور رقم سفید بی‌دانه و بر اساس اصول کخ به اثبات رسید. نتایج آزمون بیماری‌زایی نشان داد که همه جدایه‌ها روی شاخه‌ها بیماریزا بودند، هر چند جدایه‌های گونه‌های *Cytospora ershadii* و *C. chrysoasperma* بیشترین شدت بیماری‌زایی و جدایه‌های گونه *C. viticola* کمترین شدت بیماری‌زایی را داشتند. نتایج این مطالعه حضور گونه‌های جدید از جنس *Cytospora* را در ارتباط با بیماری مرکب زوال درختان انگور در مناطق مورد بررسی مشخص کرد و دانش ما را در مورد دامنه میزبانی گونه‌های جنس *Cytospora* افزایش داد. این اطلاعات می‌توانند در طراحی راهکارهای مؤثر مدیریتی بیماری مرکب زوال انگور مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: اصول کخ، تبارشناسی چندژنی، زوال انگور، شناسایی، *Cytoporaceae*

* بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول ارایه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
** مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: a.ahmadpour@urmia.ac.ir و y.ghoosta@urmia.ac.ir

۱ به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
۲ استادیار مرکز آموزش عالی شهید باکری میاندوآب، دانشگاه ارومیه، میاندوآب، ایران.



DOI: 10.22034/ijpp.2024.2021799.453

Research Article

Characterization of *Cytospora* species involved in grapevine decline disease complex in Miyandoab and Malekan Counties

Z. Mahmoudian^{1*}, A. Ahmadpour^{2**} and Y. Ghosta^{1**}

(Received: 14.06.2024; Accepted: 28.07.2024)

Abstract

Grapevine decline disease (GDD) complex is a major global viticulture problem associated with a multi-year decrease in plant productivity and an increase in vine mortality, resulting in important economic losses to the viticulture industry. More than 35 fungal genera have been involved in the GDD complex, and the genus *Cytospora* has also been reported as one of the genera included in the disease-causing complex. This study aimed to identify *Cytospora* species involved in GDD complex in the vineyards of Miyandoab (West Azarbaijan province) and Malekan (East Azarbaijan province) Counties. So, during the summer and autumn of 2020-2021, sampling was done from the diseased plants showing symptoms of shoot wilting and die-back, bark and wood discoloration, brown to black discoloration of vascular tissues, and wood canker. The fungal isolation was done based on common phytopathological methods, and 78 isolates with the common characteristics of the genus *Cytospora* were isolated and purified. Based on the results combining morphological characteristics and sequence data obtained from three genomic regions, ITS-rDNA, *TUB2*, and *RPB2*, four species viz., *C. chrysosperma* (15 isolates), *C. ershadii* (24 isolates), *C. salicina* (28 isolates), and *C. viticola* (11 isolates) were identified. *Cytospora viticola* is a new species for the fungal biota of Iran, and grapevine is reported as a new host (*matrix nova*) for *C. ershadii* in Iran and the world. Pathogenicity of the selected fungal isolates from the identified species was confirmed on shoots of the Thompson seedless cultivar based on Koch's postulates. The results of pathogenicity tests showed that all isolates were pathogenic, although *C. ershadii* and *C. chrysosperma* isolates had the highest and *C. viticola* isolates had the lowest virulence. The results of this study showed the presence of new species of *Cytospora* involved in the GDD complex in the studied area and increased our knowledge about the host range of *Cytospora* spp. This information can be used in devising effective strategies for managing GDD complex.

Keywords: Koch's postulates, multi-gene phylogeny, grapevine decline complex, morphology, Cytosporaceae

* A part of MSc. thesis of the first author submitted to the College of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

** Corresponding author's E-mail: a.ahmadpour@urmia.ac.ir and y.ghoosta@urmia.ac.ir

1. MSc. ex-student of Plant Pathology and Associate prof. of Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.

2 Assistant prof. of Higher Education Center Shahid Bakeri Miyandoab, Urmia University, Miyandoab, Iran.

مقدمه

عوامل بیماری‌زای گیاهی از ابتدای توسعه کشاورزی در سراسر دنیا به خصوص در کشورهای در حال توسعه، یک چالش بسیار مهم محسوب شده‌اند (Stukenbrock and McDonald 2008). اصطلاح زوال (decline) ابتدا در علوم جنگل و برای کاهش رشد و مرگ و میر درختان استفاده شد (Sinclair 1965; Hibben 1962). زوال دربرگیرنده یک گروه مرکب و کمتر شناخته شده از آغازگرها و ادامه‌دهنده‌های زنده و غیرزنده است که در کاهش رشد و توان درختان، تخریب شاخ و برگ و سیستم ریشه و در نهایت مرگ و میر درختان نقش دارند. بیمارگرهای گیاهی و آفات حشره‌ای به عنوان عوامل مرگ و میر همواره با زوال مرتبط بوده‌اند. این عوامل مرگ و میر، خود ممکن است به طور مستقیم با تغییرات اقلیمی و آب و هوایی و به طور غیرمستقیم از طریق پاسخ‌های درختان میزبان تحت تأثیر قرار گیرند و بنابراین گاهی اوقات مشخص کردن دقیق علل ایجاد زوال مشکل است (Haavik et al. 2015; Bois et al. 2017; Bettenfeld et al. 2020). کشت و تولید انگور نیز در طی سه دهه اخیر مشابه با صنعت جنگل‌داری، با پدیده زوال انگور مواجه شده است که به عنوان یک مشکل فزاینده و شایع در بسیاری از تاکستان‌های سرتاسر دنیا مطرح شده است (Scheck et al. 1998; Mugnai et al. 1999; Morton 2000; Gramaje et al. 2018; Fischer and Peighami Ashnaei 2019; Hrycan et al. 2020; Carbone et al. 2022; Kenfaoui et al. 2022; Akgül et al. 2023; Merot et al. 2023). از دهه ۱۹۸۰ به بعد، بیماری زوال انگور (grapevine trunk diseases = GTDs) نسبت داده شده است که در این میان، بیشترین مطالعات به بیماری‌های قارچی تنه درختان انگور اختصاص یافته است. بیماری‌های قارچی تنه درختان انگور شامل مجموعه‌ای از بیماری‌ها است که بر اساس سبب‌شناسی و

انگور با نام علمی *Vitis vinifera* L. متعلق به تیره تاک‌سانان (Vitaceae) و راسته Vitales است که برای مصارف مختلف از جمله تازه‌خوری، تولید کشمش و آب انگور کشت و پرورش داده می‌شود (Creasy and Creasy 2018). کشت انگور دست کم از ۷۰۰۰ سال پیش در خاور نزدیک شروع شده است و در طی این زمان، هزاران رقم برای اهداف خاص توسعه داده شده و گزینش شده‌اند (Alston and Sambucci 2019). بر طبق آمارهای سال ۲۰۲۲ سازمان غذا و کشاورزی ملل متحد (فائو)، سطح زیر کشت انگور در جهان تقریباً هفت میلیون هکتار بوده که پنج کشور اسپانیا، چین، فرانسه، ایتالیا و ترکیه با سطح زیر کشت ۳/۶ میلیون هکتار حدود نیمی از آن را به خود اختصاص داده‌اند. میزان محصول برداشت شده از این سطح کشت، ۷۸ میلیون تن به ارزش ۶۸ میلیارد دلار گزارش شده است که پنج کشور ذکر شده با تولید ۴۲/۲ میلیون تن، بیش از نیمی از کل محصول را تولید کرده‌اند (FAOSTAT 2024; Meza et al. 2024). ایران با ۱۵۸ هزار هکتار سطح زیر کشت و تولید حدود دو میلیون و سیصد هزار تن انگور در جایگاه هشتم تولیدکنندگان این محصول در جهان قرار دارد (FAOSTAT 2024). در ایران، استان‌های آذربایجان شرقی و آذربایجان غربی به ترتیب با سطح زیر کشت ۲۱ و ۱۷ هزار هکتار و میزان تولید ۲۶۰ و ۱۸۴ هزار تن، به ترتیب در رتبه‌های پنجم و هفتم کشت و تولید انگور قرار دارند (Anonymous 2021) و این محصول در اقتصاد کشاورزی این استان‌ها دارای اهمیت خاصی است. شهرستان میاندوآب در رتبه دوم تولید انگور در استان آذربایجان غربی و شهرستان ملکان در رتبه اول تولید این محصول در استان آذربایجان شرقی قرار دارند (Anonymous 2021).

بیمارگرها از میزبان‌های اولیه و نیز سازگار شدن آنها با میزبان‌های جدید را تسهیل می‌کند و منجر به ظهور گونه‌های جدید قارچی در ارتباط با بیماری زوال و یا بیماری‌های نوظهور می‌شود (Mohammadi et al. 2013; Testempasis et al. 2024). بررسی‌های کلی تاکستان‌ها در شهرستان‌های میاندوآب و ملکان در طی چند سال گذشته به وضوح وقوع و گسترش بیماری زوال و سرخشکیدگی انگور و در نتیجه خسارت اقتصادی شدید وارده به کشاورزان را نمایان ساخته است. شناسایی صحیح عوامل بیمارگر گیاهی، آگاهی از زیست‌شناسی و بوم‌شناسی آنها و تعیین مکانی آنها در مقیاس منطقه‌ای برای برنامه‌ریزی و اجرای شیوه‌های مؤثر مدیریت بیماری ضروری است. علاوه بر آن، برآورد صحیح مؤلفه‌های بیماری در مناطق متمایز انگورکاری می‌تواند اطلاعات ارزشمندی را در مورد سطوح حساسیت ژنوتیپ‌های کشت شده در سطح وسیع فراهم کند و بنابراین، مدیریت بیماری را از طریق ارزیابی خطر بهبود بخشد. با وجود مطالعات متعدد انجام شده در اغلب مناطق تحت کشت انگور دنیا و بخش‌هایی از کشور در زمینه شناسایی و تعیین تنوع گونه‌ای و الگوی پراکنش گونه‌های قارچی دخیل در این بیماری، مطالعات بسیار محدودی در این زمینه در تاکستان‌های شهرستان‌های میاندوآب و ملکان انجام گرفته است. هدف اصلی این مطالعه جداسازی و شناسایی گونه‌های متعلق به جنس *Cytospora* از درختان انگور با نشانه‌های زوال بر اساس ترکیبی از ویژگی‌های ریخت‌شناختی و توالی‌های نوکلئوتیدی ژن‌های نشانگر و نیز تعیین بیماری‌زایی جدایه‌های گونه‌های شناسایی شده در شرایط آزمایشگاهی روی شاخه‌های انگور است.

مواد و روش‌ها

نیز ماهیت‌های قارچی عامل آنها به اسامی مختلفی خوانده می‌شوند. مجموعه اسکا، سرخشکیدگی ائوتیپایی و بوتریوسفائریایی بازیگران اصلی این بیماری‌ها بوده و علاوه بر تاکستان‌های بالغ، تاکستان‌هایی را که از نو کاشته می‌شوند نیز تحت تأثیر قرار می‌دهند. سایر بیماری‌ها مانند بیماری پتری و سیاه‌شدگی آوندی (پا-سیاهی = Black-foot disease) بیماری‌های عمده‌ای هستند که روی تاکستان‌های جوان تأثیر می‌گذارند و بارآوری، کیفیت محصول و طول عمر گیاهان را کاهش می‌دهند و خسارت‌های قابل توجهی را سبب می‌شوند (Phillips et al. 2002; Van Niekerk 2004, 2005; Giménez-Jaime et al. 2006; Luque et al. 2006; Guerin-Dubrana et al. 2019; Darriaut et al. 2023; Meza et al. 2024). در ارزیابی‌های اخیر انجام شده در مناطق مختلف جهان، چندین گونه کمتر شناخته شده و یا گونه‌های جدیدی در ارتباط با بیماری‌های قارچی تنه انگور مشخص و توصیف شده‌اند که در مجموع، بیش از ۱۴۰ گونه متعلق به ۳۵ جنس در ارتباط با این بیماری را شامل می‌شوند (Raimondo et al. 2019; Bahmani et al. 2021; Bustamante et al. 2022; Kanetis et al. 2022; Úrbez-Torres et al. 2023; Testempasis et al. 2024).

افزایش شیوع جهانی این بیماری‌ها به عوامل متعددی از جمله خارج شدن مواد شیمیایی مؤثر (مانند آرسنات سدیم و قارچ‌کش‌های گروه بنزیمیدازول‌ها) از چرخه مصرف، تغییرات در شیوه‌های کشت، جهانی شدن انتشار مواد گیاهی آلوده به عوامل بیماری‌زای نهفته، و تغییرات آب و هوایی، به خصوص گرمایش کره زمین نسبت داده می‌شود که می‌تواند تنش در گیاه را افزایش داده و درختان را در برابر بیمارگرهای زنده آسیب‌پذیر سازند (Hyrca et al. 2020; Guarnaccia et al. 2022). همچنین، تغییرات سریع در چرخه‌های خیس و خشک شدن همراه با دماهای بسیار کم یا زیاد که در نتیجه تغییر اقلیم رخ می‌دهند انتشار

Cytospora، قطعات کوچکی از حاشیه برگ‌های رشد کرده از بافت‌های گیاهی برداشته شد و به محیط کشت آب-آگار دو درصد (WA 2%) منتقل گردید و عمل خالص‌سازی با برداشتن نوک ریشه انجام گرفت. در مواردی که روی بافت‌های گیاهی کشت شده، اندام‌های باردهی پیکنیدیومی تشکیل شده بود، پیکنیدیوم‌ها با کمک سوزن ظریف سترون برداشته شدند و سوسپانسیون اسپوری آنها در داخل یک قطره آب مقطر سترون تهیه شد و خالص‌سازی جدایه‌ها با کشت سوسپانسیون رقیق اسپوری روی محیط کشت PDA و برداشتن تک اسپورهای جوانه‌زده انجام گرفت. نگهداری جدایه‌ها روی قطعات کاغذ صافی سترون و نیز لوله‌های آزمایش حاوی محیط کشت PDA انجام گرفت.

شناسایی ریخت‌شناختی جدایه‌های جنس *Cytospora*

برای شناسایی گونه‌ها در جدایه‌های به دست آمده بر مبنای ویژگی‌های ریخت‌شناختی، ابتدا جدایه‌ها روی محیط کشت PDA کشت شدند و در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس و تاریکی به مدت یک ماه نگهداری شدند. ویژگی‌های ظاهری مانند رنگ، بافت و قطر رشدی پرگنه‌های قارچی پس از گذشت ۳، ۱۵ و ۳۰ روز بررسی گردید. رنگ پرگنه جدایه‌های مورد مطالعه بر مبنای نگاره‌های رنگی رایتر (Rayner 1970) مشخص شد. برای تحریک تشکیل اندام‌های باردهی پیکنیدیومی، از محیط کشت PDA حاوی قطعات سترون شده از سوزن‌های کاج یا برش‌های ساقه‌های دو ساله انگور استفاده شد و پس از کشت جدایه‌ها، تشتک‌های پتری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و زیر نور فرابنفش نزدیک (دوره نوری/تاریکی ۱۲ ساعته) به مدت یک ماه نگهداری گردیدند. برش‌های طولی و عرضی با استفاده از اسکالپل یا تیغ از اندام‌های باردهی پیکنیدیومی تهیه و برش‌ها در محلول‌های لاکتیک اسید، کاتن‌بلو یا آب مقطر قرار گرفتند. ویژگی‌های

نمونه‌برداری، جداسازی، خالص‌سازی و نگهداری جدایه‌های قارچی

به منظور جمع‌آوری و جداسازی جدایه‌های قارچی مرتبط با نشانه‌های بیماری مرکب زوال انگور در شهرستان‌های میاندوآب (استان آذربایجان غربی) و ملکان (استان آذربایجان شرقی)، بازدیدهای متعددی از تاکستان‌های انگور در طول تابستان و پاییز سال‌های ۱۳۹۹-۱۴۰۰ انجام گرفت و نمونه‌هایی از شاخه‌ها و تنه درختان انگور با نشانه‌های پژمردگی و خشکیدگی سرشاخه‌ها، تغییر رنگ پوست، تغییر رنگ بافت چوب در برش عرضی و شانکر جمع‌آوری شدند (شکل ۱). هر نمونه در داخل کیسه پلاستیکی تمیز و جداگانه قرار گرفت و پس از ثبت مشخصات مربوطه و نیز عکس‌برداری از نشانه‌های بیماری، به آزمایشگاه منتقل شد. فرآیند جداسازی قارچ‌ها بلافاصله پس از جمع‌آوری نمونه‌ها و یا حداکثر تا مدت ۷۲ ساعت پس از جمع‌آوری و نگهداری نمونه‌ها در یخچال با دمای چهار درجه سلسیوس انجام گرفت. برای جداسازی قارچ‌ها، نمونه‌های جمع‌آوری شده ابتدا به طور کامل زیر آب جاری شیر شسته شدند. قطعاتی به طول پنج تا ۱۰ میلی‌متر از مرز بین بافت‌های سالم و آلوده بریده شدند و به مدت سه تا چهار دقیقه با محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد ضدعفونی سطحی گردیدند. نمونه‌های ضدعفونی شده سه بار با آب مقطر سترون آبکشی شدند و بین لایه‌های دستمال کاغذی سترون خشک و در محیط کشت سیب‌زمینی-دکستروز-آگار (PDA، شرکت Merck، ۳۹ گرم در یک لیتر آب مقطر) حاوی ۱۰۰ پی‌پی‌ام از آنتی‌بیوتیک‌های سولفات استرپتومایسین و پنی‌سیلین جی کشت شدند. تشتک‌های پتری در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی نگهداری و به طور منظم تا ۲۱ روز بررسی شدند. با ظهور پرگنه‌های قارچی با مشخصات جنس

جدایه‌ها و برای گروه‌بندی دقیق‌تر جدایه‌ها، انگشت‌نگاری DNA بر اساس روش ISSR-PCR و با استفاده از آغازگر ISSR5 برای همه جدایه‌ها انجام گرفت. مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در حجم ۱۰ میکرولیتر شامل یک میکرولیتر از آغازگر (۰/۵ پیکومول)، چهار میکرولیتر مسترمیکس آماده (Taq 2X Master Mix Red 2 mM, Ampliqon company, Denmark)، حدود ۱۰ نانوگرم DNA جدایه قارچی و چهار میکرولیتر آب غیر یونیزه سترون تهیه شد. واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر مدل (SimpliAmp, Applied Biosystems, USA) و با چرخه دمایی شامل واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، و به دنبال آن ۳۵ چرخه شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ۴۳ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه و در نهایت یک مرحله گسترش نهایی به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس انجام شد. محصولات تکثیر یافته روی ژل آگارز یک درصد همراه با نشانگر اندازه‌ای DNA (Exel Band DNA Ladder 100bp+3 kb شماره DM2300) الکتروفورز شدند و با استفاده از دستگاه Documentation (مدل Glit، تایوان) عکسبرداری انجام گرفت. وجود یا عدم وجود باندها در جدایه‌ها بر اساس مقیاس‌های ۱ و ۰ مشخص شد و از نرم‌افزار NTSYSpc-2.02e برای گروه‌بندی جدایه‌ها استفاده شد. جدایه‌هایی که دارای الگوی باندهای ISSR و ویژگی‌های ریخت‌شناختی مشابهی بودند به عنوان یک گونه در نظر گرفته شدند (Ahmadpour et al. 2021; Azizi et al. 2024) و از جدایه‌های به دست آمده، تعداد ۲۰ جدایه برای مطالعات تبارشناسی چندژنی انتخاب شد (جدول ۲).

برای مطالعات تبارشناسی چندژنی، ناحیه ITS-rDNA و بخشی از ژن‌های *RPB2* و *TUB2* تکثیر و توالی‌یابی

میکروسکوپی مانند قطر ریشه‌ها، قطر پیکنیدیوم‌ها، قطر و رنگ دیسک‌ها، قطر روزنه، وجود یا عدم وجود کنسپتاکل (conceptacle)، الگوی حجره‌بندی، ابعاد سلول‌های کنیدیوم‌ها/کنیدیوفورها و نیز کنیدیوم‌ها در زیر میکروسکوپ (المپیوس، مدل CH2) بررسی شدند. از هر کدام از ساختارهای مذکور، تعداد ۳۰-۵۰ مورد بررسی و اندازه‌گیری شد (Lawrence et al. 2018; Azizi et al. 2020; 2024; Fan et al. 2020). شناسایی گونه‌ها بر اساس کلیدهای معتبر شناسایی گونه‌های جنس *Cytospora* و مقایسه با توصیف گونه‌های شرح داده شده در منابع انجام گرفت (Adams et al. 2006; Fan et al. 2015; 2020; Lawrence et al. 2017; 2018; Zhu et al. 2020; Pan et al. 2021b; Ilyukhin et al. 2023; Li et al. 2024a; 2024b). عکسبرداری از اندام‌های قارچی با استفاده از میکروسکوپ المپیوس مدل AX71 مجهز به سیستم نومارسکی انجام گرفت و از نرم‌افزار Adobe Photoshop ver. 19.1.9.27702 برای ویرایش عکس‌ها استفاده شد. جدایه‌های منتخب از گونه‌های شناسایی شده در کلکسیون قارچ‌های مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور (تهران) (IRAN) و تمامی جدایه‌ها در کلکسیون قارچ‌شناسی گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه ارومیه (FCCUU) نگهداری می‌شوند.

مطالعات مولکولی

استخراج DNA و تکثیر نواحی ژنومی

جدایه‌های قارچی روی محیط کشت PDA کشت و به مدت ۱۰-۷ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی نگهداری شدند. میسلیوم‌ها از سطح محیط کشت با استفاده از اسکالپل سترون خراش داده شدند و استخراج DNA ژنومی بر اساس روش احمدپور و همکاران (Ahmadpour et al. 2021) انجام گرفت. با توجه به شباهت‌های زیاد در برخی ویژگی‌های ریخت‌شناختی

تعیین توالی محصولات تکثیر یافته توسط شرکت BGI (Beijing Genomics Institute, China) انجام گرفت.

تجزیه و تحلیل‌های تبارشناختی

پس از دریافت فایل‌های مربوط به توالی‌یابی نواحی ژنومی جدایه‌ها، توالی‌های حاصله به صورت جداگانه با استفاده از نرم‌افزار Chromas Pro ver. 1.7 (http://www.technelysium.com.au) (Tamura *et al.* 2007) مشاهده و در صورت لزوم به صورت دستی ویرایش شدند و جهت انجام تجزیه و تحلیل‌های تبارشناسی به فرمت FASTA ذخیره گردیدند. برای بررسی میزان شباهت توالی‌های مورد مطالعه با توالی‌های ذخیره شده در پایگاه داده‌های ژنی NCBI (National Center for Biotechnology Information)، از ابزار جستجوی BLASTn (Altschul *et al.* 1997) استفاده شد. توالی‌های مربوط به جدایه‌های تیپ و یا جدایه‌های معتبر گونه‌های مختلف جنس *Cytospora* از پایگاه داده‌های ژن NCBI اخذ شد. توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار برخط MAFFT version 7 (https://mafft.cbrc.jp/alignment/server) هم‌ردیف شدند (Kato *et al.* 2019) و بهترین مدل جایگزینی MrModeltest v. 2.2 (Nylander 2004) تعیین گردید. تبارنماها با استفاده از روش‌های حداکثر احتمال (Maximum Likelihood)،

شدند. از جفت آغازگرهای ITS1 و ITS4 برای تکثیر ناحیه ITS-rDNA، آغازگرهای RPB2-5F2 و RPB2-7c- R برای تکثیر بخشی از ژن *RPB2* و آغازگرهای BT2a و BT2b برای تکثیر بخشی از ژن *TUB2* در جدایه‌های منتخب استفاده شد. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۱ درج شده است و آغازگرها از شرکت متابیون (Metabion Corp.) آلمان تهیه شدند. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم نهایی ۳۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس آماده (Taq 2X Master Mix Red 2 mM, Ampliqon company, Denmark)، یک میکرولیتر از هر کدام از آغازگرها (۰/۵ پیکومول)، دو میکرولیتر DNA قارچ و ۱۶ میکرولیتر آب مقطر سترون انجام گرفت. چرخه دمایی برای تکثیر ژن‌های ITS، *RPB2* و *TUB2* با اعمال دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه جهت واسرشت سازی اولیه، سپس هشت چرخه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای ۶۱ درجه سلسیوس (نیم درجه سلسیوس کاهش به ازای هر چرخه) به مدت ۴۵ ثانیه و گسترش در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵۰ ثانیه، و به دنبال آن ۳۰ چرخه شامل دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۷ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵۰ ثانیه و در نهایت یک چرخه گسترش نهایی با دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت هفت دقیقه انجام گرفت. مشاهده تکثیر موفق نواحی و ژن‌های مورد بررسی، مانند روش ذکر شده در بالا انجام گرفت و خالص‌سازی و

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای استفاده شده در این مطالعه

Table 1. Characteristics of the primers used in this study

Locus	Primer name	Primer sequences (5'→3')	References
ITS	ITS1	CTGGTCATTAGAGGAAGTAA	White <i>et al.</i> 1990
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
<i>RPB2</i>	RPB2-5F2	GAYGAYMGWGATCAITTYGG	Liu <i>et al.</i> 1999; Sung <i>et al.</i> 2007
	RPB2-7cR	CCCATWGCYTGTTCMCCCAT	
<i>TUB2</i>	BT2a	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	Glass and Donaldson 1995
	BT2b	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGCC	
ISSR	ISSR5	GAGAGAGAGAYC	Nabi <i>et al.</i> 2018

۲- جزئیات جدایه‌ها و توالی‌های استفاده شده در تجزیه و تحلیل‌های تبارشناختی در این مطالعه.

Table 2. Details of isolates and sequences used in phylogenetic analyses in this study.

Species	Strain ¹	Host	Origin	GenBank accession numbers		
				ITS	RPB2	TUB2
<i>Cytospora ailanthicola</i>	CFCC 89970 ^T	<i>Ailanthus altissima</i>	Ningxia, China	MH933618	MH933592	MH933565
<i>C. azerbaijanica</i>	IRAN 4201C ^T	<i>Malus domestica</i>	Urmia, Iran	MW295526	MW824360	–
<i>C. azerbaijanica</i>	IRAN 4627C	<i>Malus domestica</i>	Miandoab, Iran	OM368650	–	–
<i>C. beilinensis</i>	CFCC 50493 ^T	<i>Pinus armandii</i>	Beijing, China	MH933619	–	MH933561
<i>C. beilinensis</i>	CFCC 50494	<i>Pinus armandii</i>	Beijing, China	MH933620	–	MH933562
<i>C. bungeana</i>	CFCC 50495 ^T	<i>Pinus bungeana</i>	Shanxi, China	MH933621	MH933593	MH933563
<i>C. bungeana</i>	CFCC 50496	<i>Pinus bungeana</i>	Shanxi, China	MH933622	MH933594	MH933564
<i>C. chrysosperma</i>	CFCC 89981	<i>Populus alba</i> subsp. <i>pyramidalis</i>	Gansu, China	MH933625	MH933597	MH933568
<i>C. chrysosperma</i>	CFCC 89982	<i>Ulmus pumila</i>	Tibet, China	KP281261	–	KP310818
<i>C. chrysosperma</i>	CFCC 89629	<i>Salix psammophila</i>	Shaanxi, China	KF765673	KF765705	–
<i>C. chrysosperma</i>	MG8=IRAN 4760C	<i>Vitis vinifera</i>	Iran	PP913911	PP914060	–
<i>C. chrysosperma</i>	MG4	<i>Vitis vinifera</i>	Iran	PP913912	PP914061	–
<i>C. chrysosperma</i>	MG5	<i>Vitis vinifera</i>	Iran	PP913913	PP914062	–
<i>C. chrysosperma</i>	MG6	<i>Vitis vinifera</i>	Iran	PP913914	PP914063	–
<i>C. chrysosperma</i>	MGL10	<i>Vitis vinifera</i>	Iran	PP913915	PP914064	–
<i>C. cinnamomea</i>	CFCC 53178 ^T	<i>Prunus armeniaca</i>	Xinjiang, China	MK673054	–	MK672970
<i>C. donglingensis</i>	CFCC 53159 ^T	<i>Platycladus orientalis</i>	Beijing, China	MW418412	MW422915	MW422939
<i>C. donglingensis</i>	CFCC 54371	<i>Platycladus orientalis</i>	Beijing, China	MW418413	MW422916	MW422940
<i>C. elaeagnicola</i>	CFCC 52882 ^T	<i>Elaeagnus angustifolia</i>	China	MK732341	MK732347	–
<i>C. elaeagnicola</i>	CFCC 52883	<i>Elaeagnus angustifolia</i>	China	MK732342	MK732348	–
<i>C. ershadii</i>	IRAN 4197C	<i>Malus domestica</i>	Nahavand, Iran	MW295510	–	–
<i>C. ershadii</i>	IRAN 4198C ^T	<i>Malus domestica</i>	Arak, Iran	MW295523	MW824357	–
<i>C. ershadii</i>	MG30=IRAN 4762C	<i>Vitis vinifera</i>	Iran	PP913916	PP914065	PP919153
<i>C. ershadii</i>	MG39	<i>Vitis vinifera</i>	Iran	PP913917	PP914066	PP919154
<i>C. ershadii</i>	MG41	<i>Vitis vinifera</i>	Iran	PP913918	PP914067	PP919155
<i>C. ershadii</i>	MG58	<i>Vitis vinifera</i>	Iran	PP913919	PP914068	PP919156
<i>C. ershadii</i>	MG59	<i>Vitis vinifera</i>	Iran	PP913920	PP914069	PP919157
<i>C. euonymina</i>	CFCC 89993 ^T	<i>Euonymus kiautschovicus</i>	Shanxi, China	MH933630	MH933600	MH933590
<i>C. germanica</i>	CXY 1322	<i>Elaeagnus oxycarpa</i>	China	JQ086563	–	–
<i>C. globosa</i>	MFLU 16-2054 ^T	<i>Abies alba</i>	Italy	MT177935	MT432212	–
<i>C. joaquinensis</i>	CBS 144235 ^T	<i>Populus deltoides</i>	California, USA	MG971895	–	MG971761
<i>C. kantschavelii</i>	CXY 1386	<i>Populus maximowiczii</i>	Chongqing, China	KM034867	–	–
<i>C. longiostiolata</i>	MFLUCC 16-0628 ^T	<i>Salix × fragilis</i>	Russia	KY417734	KY417802	–
<i>C. melnikii</i>	MFLUCC 16-0635	<i>Populus nigra</i> var. <i>italica</i>	Russia	KY417736	KY417804	–
<i>C. melnikii</i>	MFLUCC 15-0851 ^T	<i>Malus domestica</i>	Russia	KY417735	KY417803	–
<i>C. paracinnamomea</i>	CFCC 55452	<i>Salix matsudana</i>	Gansu, China	MZ702593	OK303514	OK303642
<i>C. paracinnamomea</i>	CFCC 55453 ^T	<i>Salix matsudana</i>	Gansu, China	MZ702594	OK303515	OK303643
<i>C. parakantschavelii</i>	MFLUCC 15-0857 ^T	<i>Populus × sibirica</i>	Russia	KY417738	KY417806	–
<i>C. parasitica</i>	MFLUCC 15-0507 ^T	<i>Malus domestica</i>	Russia	KY417740	KY417808	–
<i>C. parasitica</i>	XJAU 2542-1	<i>Malus</i> sp.	Xinjiang, China	MH798884	–	–
<i>C. piceae</i>	CFCC 52841 ^T	<i>Picea crassifolia</i>	Xinjiang, China	MH820398	MH820395	MH820387
<i>C. piceae</i>	CFCC 52842	<i>Picea crassifolia</i>	Xinjiang, China	MH820399	MH820396	MH820388
<i>C. populicola</i>	CBS 144240 ^T	<i>Populus deltoides</i>	California, USA	MG971891	–	MG971757
<i>C. rostrata</i>	CFCC 89909 ^T	<i>Salix cupularis</i>	Gansu, China	KR045643	KU710974	KR045684
<i>C. rostrata</i>	CFCC 89910	<i>Salix cupularis</i>	Gansu, China	KR045644	KU710975	–
<i>C. salicacearum</i>	MFLUCC 15-0861	<i>Salix × fragilis</i>	Russia	KY417745	KY417813	–
<i>C. salicacearum</i>	MFLUCC 15-0509 ^T	<i>Salix alba</i>	Russia	KY417746	KY417814	–
<i>C. salicicola</i>	MFLUCC 14-1052 ^T	<i>Salix alba</i>	Russia	KU982636	–	–
<i>C. salicina</i>	MFLUCC 15-0862 ^T	<i>Salix alba</i>	Russia	KY417750	KY417818	–
<i>C. salicina</i>	MFLUCC 16-0637	<i>Salix × fragilis</i>	Russia	KY417751	KY417819	–
<i>C. salicina</i>	MG3=IRAN 4759C	<i>Vitis vinifera</i>	Iran	PP913906	PP914055	–
<i>C. salicina</i>	MG12	<i>Vitis vinifera</i>	Iran	PP913907	PP914056	–
<i>C. salicina</i>	MG13	<i>Vitis vinifera</i>	Iran	PP913908	PP914057	–
<i>C. salicina</i>	MG35	<i>Vitis vinifera</i>	Iran	PP913909	PP914058	–
<i>C. salicina</i>	MG36	<i>Vitis vinifera</i>	Iran	PP913910	PP914059	–
<i>C. schulzeri</i>	CFCC 50040	<i>Malus domestica</i>	Ningxia, China	KR045649	KU710980	KR045690
<i>C. schulzeri</i>	CFCC 50042	<i>Malus pumila</i>	Gansu, China	KR045650	KU710981	KR045691
<i>C. spiraeae</i>	CFCC 50049 ^T	<i>Spiraea salicifolia</i>	Gansu, China	MG707859	MG707643	MG708196
<i>C. spiraeae</i>	CFCC 50050	<i>Spiraea salicifolia</i>	Gansu, China	MG707860	MG707644	MG708197
<i>C. spheriopsis</i>	CFCC 89600 ^T	<i>Styphnolobium japonicum</i>	Gansu, China	KR045623	KU710951	KP310817
<i>C. spiraeicola</i>	CFCC 53138 ^T	<i>Spiraea salicifolia</i>	Beijing, China	MN854448	MN850749	MN861118
<i>C. spiraeicola</i>	CFCC 53139	<i>Tilia nobilis</i>	Beijing, China	MN854449	MN850750	MN861119
<i>C. verrucosa</i>	CFCC 53157 ^T	<i>Platycladus orientalis</i>	Beijing, China	MW418408	MW422911	MW422935

Species	Strain ¹	Host	Origin	GenBank accession numbers		
				ITS	RPB2	TUB2
<i>C. verrucosa</i>	CFCC 53158	<i>Platyclusus orientalis</i>	Beijing, China	MW418410	MW422913	MW422937
<i>C. viticola</i>	Cyt2	<i>Vitis interspecific hybrid 'Frontenac'</i>	USA	KX256238	–	KX256217
<i>C. viticola</i>	CBS 141586 ^T	<i>Vitis vinifera</i> 'Cabernet Franc'	USA	KX256239	–	KX256218
<i>C. viticola</i>	Kern504	<i>Vitis vinifera</i>	USA	OM976604	ON045095	ON086752
<i>C. viticola</i>	Ben901	<i>Vitis vinifera</i>	USA	OM976601	ON045092	ON086749
<i>C. viticola</i>	MG84B=IRAN 4761C	<i>Vitis vinifera</i>	Iran	PP913921	PP914070	PP919158
<i>C. viticola</i>	MG51	<i>Vitis vinifera</i>	Iran	PP913922	PP914071	PP919159
<i>C. viticola</i>	MG52	<i>Vitis vinifera</i>	Iran	PP913923	PP914072	PP919160
<i>C. viticola</i>	MG53	<i>Vitis vinifera</i>	Iran	PP913924	PP914073	PP919161
<i>C. viticola</i>	MG55	<i>Vitis vinifera</i>	Iran	PP913925	PP914074	PP919162
<i>C. yakimana</i>	Bent902	<i>Vitis vinifera</i>	USA	OM976602	ON045093	ON086750
<i>C. yakimana</i>	Bent903	<i>Vitis vinifera</i>	USA	OM976603	ON045094	ON086751
<i>Diaporthe eres</i>	CBS 145040	<i>Lactuca sativa</i>	Netherlands	MK442579	MK442663	MK442731
<i>Diaporthe vaccinii</i>	CBS 160.32	<i>Vaccinium macrocarpon</i>	USA	KC343228	–	KC344196

¹ All the new isolates used in this study are in bold and the type materials are marked with ^T.

از هر هزار نسل، یک تبارنما ذخیره گردید. در نهایت پس از تکمیل تجزیه و تحلیل‌های مربوطه، ۲۵ درصد اولیه تبارنماهای ذخیره شده سوزانده شد و تبارنماهای ایجاد شده با استفاده از نرم‌افزار FigTree v. 1.4.4 (Rambaut 2019) مشاهده شدند. ویرایش تبارنما توسط نرم‌افزار Adobe Illustrator ver. 24.2.3.521 انجام گرفت. توالی‌های مربوط به جدایه‌های مختلف از گونه‌های توالی‌یابی شده در پایگاه داده‌های ژن NCBI ثبت و شماره دستیابی آنها اخذ گردید (جدول ۲).

بررسی بیماری‌زایی جدایه‌های گونه‌های شناسایی شده روی شاخه‌های بریده انگور رقم سفید بی‌دانه در شرایط آزمایشگاه

آزمون‌های بیماری‌زایی جدایه‌های منتخب از گونه‌های شناسایی شده روی شاخه‌های بریده انگور رقم سفید بی‌دانه در شرایط آزمایشگاه انجام گرفت (Lawrence et al. 2017). برای این منظور، شاخه‌های سالم به طول ۲۰ سانتی‌متر از یکی از باغات انگور شهرستان میاندوآب تهیه و به آزمایشگاه منتقل شدند. شاخه‌ها ابتدا زیر آب جاری شیر کاملاً شسته شدند. سپس ضدعفونی سطحی آنها با استفاده از اتانول ۷۰ درصد انجام گرفت و شاخه‌ها ما بین صفحات دستمال کاغذی در شرایط سترون به مدت نیم ساعت نگهداری شدند تا سطح آنها خشک شود. سپس در بخش مرکزی قسمت میانی بین دو میان‌گره هر شاخه،

حداکثر صرفه‌جویی (Maximum Parsimony) و روش بیژین (Bayesian) ترسیم شدند. برای ترسیم تبارنما به روش حداکثر احتمال از نرم‌افزار RAxML v. 8.0.0 (Stamatakis 2014) استفاده شد و برای اطمینان از ثبات شاخه‌های موجود در تبارنما، شاخص اعتبارسنجی (bootstrap) با ۱۰۰۰ تکرار محاسبه گردید. کلیه صفات مورد بررسی به عنوان صفات نامرتب (unordered) و با وزن برابر و مکان‌های خالی در توالی‌ها به عنوان اطلاعات از دست رفته (Missing data) در نظر گرفته شدند. در طی بررسی‌های تبارشناسی، هیچ یک از صفات حذف نگردید. در روش حداکثر صرفه‌جویی، تبارنما با نرم‌افزار PAUP 4.0b10 (Swofford 2002) ترسیم شد. مقدار اعتبارسنجی (Bootstrap) با ۱۰۰۰ تکرار محاسبه و شاخص‌های طول شجره (TL)، مقیاس استحکام (CI)، هماهنگی شجره (HI) و بازداری (RI) در نرم‌افزار مذکور اندازه‌گیری شدند. در ترسیم تبارنما به روش بیژین از نرم‌افزار MrBayes v. 3.2.5 (Ronquist et al. 2012) استفاده شد و تجزیه و تحلیل‌های بیژین با استفاده از الگوریتم MCMC (Markov Chain Monte Carlo) برای چهار زنجیره به طور همزمان از یک تبارنمای تصادفی اولیه و پارامتر گرمایی ۰/۱۵ با استفاده از احتمالات پیش‌فرض راه‌اندازی گردید. برای هر ماتریس دو اجرای جداگانه به منظور دستیابی به نمونه‌های دقیق از توزیع احتمال پسین (Posterior Probabilities) اجرا شد و

مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۱). در مجموع تعداد ۷۸ جدایه متعلق به جنس *Cytospora* جداسازی و خالص‌سازی گردید. جدایه‌ها بر اساس الگوی بانندی نشانگر مولکولی ISSR و ویژگی‌های ریخت‌شناختی به چهار گروه اصلی گروه‌بندی شدند. بر اساس تلفیق نتایج مطالعات ریخت‌شناختی و توالی‌های ناحیه ITS-rDNA و بخش‌هایی از ژن‌های *TUB2* و *RPB2* (شکل ۲)، چهار گونه شامل *Cytospora chrysosperma* (۱۵ جدایه)، *C. ershadii* (۲۴ جدایه)، *C. salicina* (۲۸ جدایه) و *C. viticola* (۱۱ جدایه) شناسایی شدند. در بین گونه‌های شناسایی شده، گونه‌ی *C. salicina* با تعداد ۲۸ جدایه، بیشترین فراوانی (۳۶ درصد) و گونه‌ی *C. viticola* با تعداد ۱۱ جدایه، کمترین فراوانی (۱۴ درصد) را به خود اختصاص دادند. گونه *C. viticola* گونه جدیدی برای بیوتای قارچی ایران است. به غیر از گونه‌های *C. viticola*، *C. salicina*، *C. chrysosperma* که در منابع از درختان انگور جداسازی و گزارش شده‌اند، انگور میزبان جدیدی برای گونه *C. ershadii* در ایران و دنیا گزارش می‌شود. نتایج این مطالعه حضور گونه‌های جدیدی از جنس *Cytospora* دخیل در مجموعه بیماری زوال درختان انگور را نشان می‌دهد.

شناسایی مولکولی

تکثیر نواحی ژنومی در جدایه‌های مورد مطالعه موجب تشکیل قطعاتی به طول‌های ۵۳۷-۵۱۵، ۴۷۱-۴۵۸ و ۸۸۲-۸۲۰ جفت باز به ترتیب از ناحیه ITS-rDNA و بخش‌هایی از ژن‌های *TUB2* و *RPB2* گردید. تجزیه و تحلیل تبارشناسی بر اساس تلفیقی از مجموعه داده‌های توالی‌های ITS-rDNA، *TUB2* و *RPB2* انجام گرفت. تجزیه و تحلیل چندژنی شامل ۷۵‌استرین درون‌گروهی (مربوط به ۳۲ گونه *Cytospora*) و دو‌استرین به عنوان برون‌گروه (مربوط به دو گونه *Diaporthe*)، با مجموع ۱۶۶۱ صفت شامل مکان‌های خالی بود که از آنها، ۱۰۹۷

پوست با استفاده از چوب‌پنبه سوراخ‌کن به قطر پنج میلی‌متر برداشته شد و توسط یک حلقه از محیط کشت حاوی میسلیم‌های در حال رشد فعال جدایه مورد نظر مایه‌زنی شد. یک قطعه از پنبه سترون خیس شده با آب مقطر سترون روی حلقه قارچی قرار گرفت و مجموعه توسط پارافیلیم برای حفظ رطوبت پوشانده شد. شاخه‌های مایه‌زنی شده در داخل ظروف پلاستیکی تمیز و حاوی یک لایه دستمال کاغذی سترون مرطوب قرار گرفتند و در دمای آزمایشگاه نگهداری شدند. در تیمارهای شاهد، از محیط کشت فاقد قارچ برای مایه‌زنی استفاده شد. پس از گذشت ۱۴ روز، شاخه‌های مایه‌زنی شده مورد بررسی قرار گرفتند و طول ناحیه تغییر رنگ‌یافته پوست و چوب در اطراف محل مایه‌زنی شده اندازه‌گیری و ثبت شد. هر تیمار دارای پنج تکرار بود و همه آزمایشات یک بار دیگر تکرار شدند. عمل جداسازی مجدد قارچ‌های مایه‌زنی شده از شاخه‌ها پس از ضدعفونی سطحی آنها انجام گرفت و قارچ‌های جداسازی شده مانند روش ذکر شده در بالا مورد مطالعه ریخت‌شناختی قرار گرفتند. داده‌های به دست آمده برای بررسی شدت بیماری‌زایی جدایه‌های گونه‌های مختلف با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. آزمون نرمال بودن داده‌ها با نرم‌افزار مذکور بررسی گردید. تجزیه و تحلیل واریانس داده‌ها با استفاده از آزمون ANOVA و مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال آماری پنج درصد انجام گرفت.

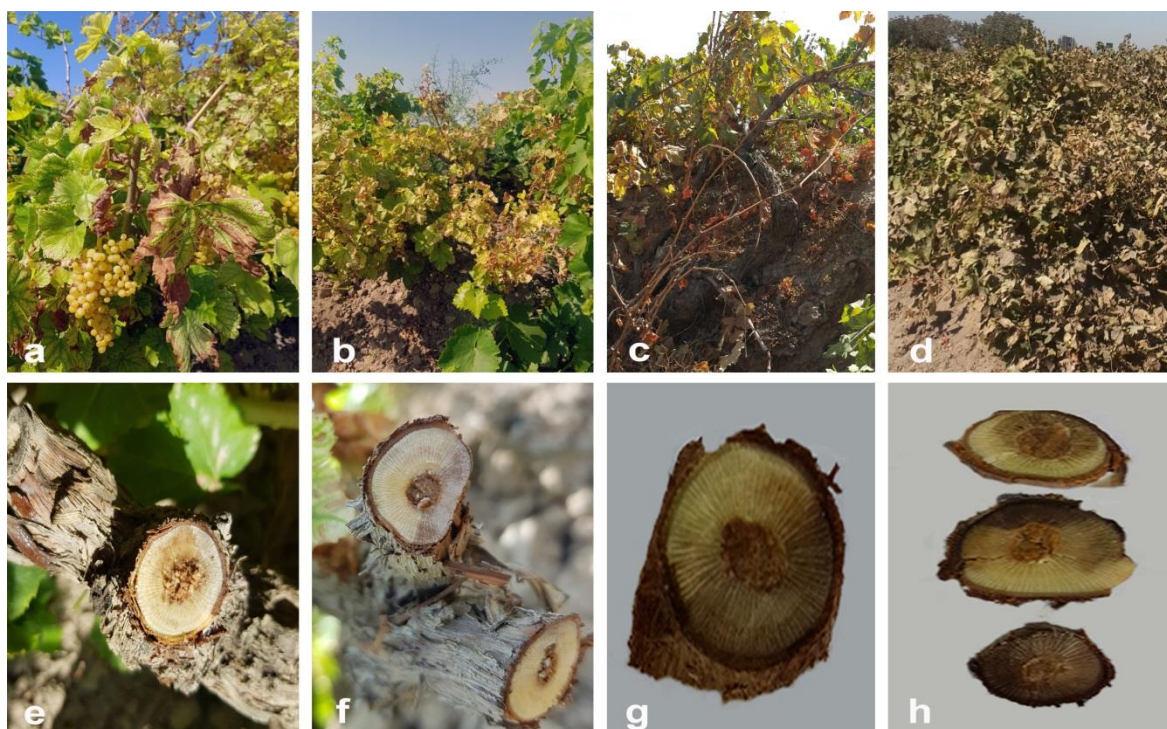
نتایج

جداسازی قارچ‌ها

در این مطالعه، ۱۸۵ نمونه گیاهی به صورت تصادفی از درختان انگور با نشانه‌های زوال، سرخشکیدگی و شانکر در طول تابستان و پاییز سال‌های ۱۳۹۹-۱۴۰۰، از باغات مختلف در شهرستان‌های میاندوآب و ملکان جمع‌آوری و

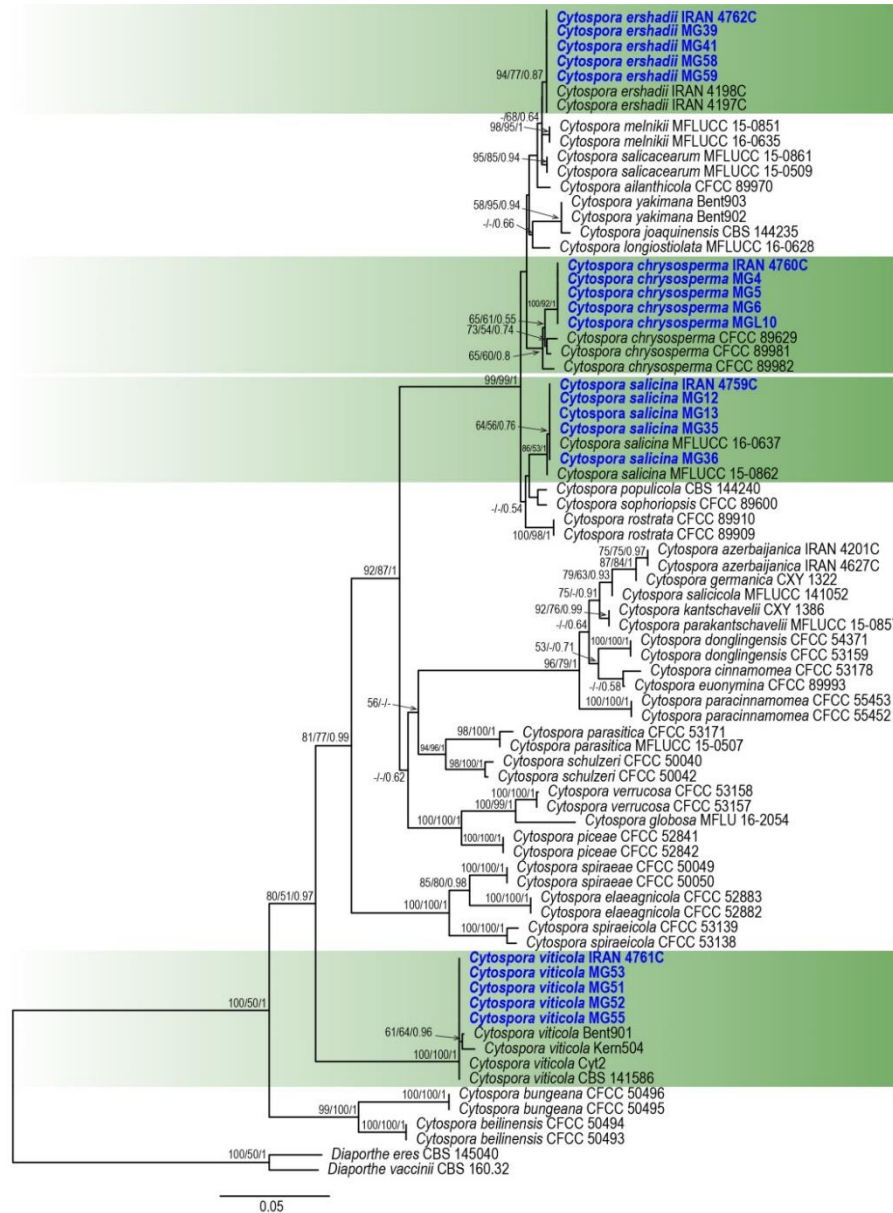
۸۴۳۱/۷۳۵۲۱۱- بود. نتایج تجزیه و تحلیل‌های حداکثر احتمال، حداکثر صرفه‌جویی و روش بیشترین تبارنمایی با ساختارهای مشابه را ایجاد کرد و تبارنمای حاصل از روش حداکثر احتمال به عنوان مبنا قرار گرفت (شکل ۲). در تبارنمای ترسیم شده، ۲۰ جدایه از جنس *Cytospora* در چهار دودمان جداگانه متعلق به گونه‌های *Cytospora viticola* و *C. salicina*، *C. ershadii*، *chrysosperma* به ترتیب با مقادیر اعتبارسنجی حداکثر احتمال/حداکثر صرفه‌جویی/احتمال پسین ۰/۸۷/۷۷/۹۴، ۰/۸۰/۶۰/۶۵، ۰/۵۳/۸۶ و ۱/۱۰۰/۱۰۰ قرار گرفتند (شکل ۲).

صفت ثابت، ۷۲ صفت متغیر غیرآموزنده از نظر پارسیمونی (parsimony-uninformative) و ۴۹۲ صفت متغیرآموزنده از نظر پارسیمونی (parsimony-informative) بودند. شاخص‌های CI، TL، HI و RI به ترتیب ۰/۶۲۶، ۰/۳۷۴ و ۰/۸۸۲ محاسبه شدند. برای تجزیه و تحلیل‌های بیشترین، مدل‌های SYM+I+G، HKY+I+G و GTR+I+G به ترتیب به عنوان بهترین مدل‌های جایگزینی نوکلئوتیدی ژن‌ها برای ITS-rDNA، *TUB2* و *RPB2* با استفاده از نرم‌افزار MrModeltest v. 2.2 مشخص شدند. در تجزیه و تحلیل حداکثر احتمال، مقدار احتمال نهایی بهینه‌سازی بهترین تبارنمای RAxML برابر با



شکل ۱: بیماری مرکب زوال درختان انگور. (a-d)، نشانه‌های زردی و سوختگی برگ‌ها، پژمردگی، کم‌رشدی و سرخشکیدگی شاخه‌ها، (e-h)، تغییر رنگ پوست و چوب در برش عرضی شاخه‌های دارای نشانه.

Fig 1: Grapevine decline disease complex. a-d), Symptoms showing yellowing and leaf scorch, wilting, stunted growth, and dieback of canes and cordons. e-h), Bark and wood discoloration in cross-section of symptomatic shoots.



شکل ۲- تبارنامی گونه‌های جنس *Cytospora* بر اساس تلفیق توالی‌های ناحیه ITS-rDNA و بخش‌هایی از ژن‌های *TUB* و *RPB2* با استفاده از روش حداکثر احتمال (ML). گونه‌های *Diaporthe vaccinii* CBS 160.32 و *Diaporthe eres* CBS 145040 به عنوان آرایه‌های خارجی انتخاب شده‌اند. جدایه‌های توالی‌یابی شده در این تحقیق به رنگ آبی مشخص شده‌اند. اعداد بالای هر شاخه به ترتیب مقدار اعتبارسنجی ML/MP (بیشتر یا مساوی ۵۰ درصد) و مقدار احتمال پسین (PP) در تجزیه و تحلیل بیژین را نشان می‌دهند (ML/MP/PP).

Fig 2. Phylogram of maximum likelihood analysis of *Cytospora* spp. based on combined sequences of ITS region, and parts of TUB, and RPB2 genes. *Diaporthe vaccinii* CBS 160.32 and *Diaporthe eres* CBS 145040 were used as out-group taxa. Numbers above the branches indicate ML/MP bootstrap values ($\geq 50\%$) and Posterior Probability (PP) values in Bayesian analysis, respectively (ML/MP/PP).

توصیف گونه‌ها

Cytospora chrysosperma (Pers.) Fr., *Systema Mycologicum* 2: 542 (1823)

قطر رشدی پرگنه جدایه‌های این گونه در محیط کشت PDA پس از گذشت سه روز ۳۵ میلی‌متر است. بافت پرگنه به صورت نمد مانند و حاشیه رشدی پرگنه به صورت متقارن و منظم است. رنگ پرگنه در جدایه‌های این گونه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی روی محیط کشت PDA ابتدا سفید رنگ بوده و با گذشت زمان (پس از گذشت هفت روز) متمایل به کرم کم‌رنگ و سپس (پس از گذشت ۳۰ روز) به رنگ زرد تغییر می‌یابد. رنگ پرگنه از سطح زیرین تشک پتری در مرکز به رنگ زرد پر رنگ و در حاشیه به رنگ زرد روشن است. پس از گذشت ۱۵ روز، اندام‌های باردهی غیرجنسی (پیکنیدیوم‌ها) به صورت پراکنده در سطح محیط کشت تولید شدند. همچنین اندام‌های باردهی غیرجنسی به فراوانی در سطح سوزن‌های کاج و بافت شاخه‌های میزبان تشکیل شدند. پیکنیدیوم‌های تشکیل شده در سوزن‌های کاج یا شاخه‌های میزبان به حالت پراکنده، نسبتاً فرورفته در بافت میزبان، برآمده، چند حجره‌ای، گرد و به قطر ۱۴۵۵-۲۱۱۵ میکرومتر می‌باشند. حجره‌ها چند خانه‌ای بوده و با پیچ خوردگی فراوان به خانه‌های کوچک‌تر تقسیم می‌شوند. استروما از نوع cytosporoid است. دیسک به رنگ قهوه‌ای متمایل به خاکستری با یک عدد روزنه، با روزنه گرد یا بیضی شکل، به قطر ۴۸۸-۱۴۹ میکرومتر است. کنیدیوفورها بدون انشعاب، سلول‌های کنیدیوم‌زا انتروبلاستیک، از نوع فیالیدی (معمولاً بطری شکل و دارای یک بخش گردنی باریک)، نیمه استوانه‌ای، بی‌رنگ، با دیواره‌ی صاف و به ابعاد $1-1/2 \times 14-18/5$ میکرومتر هستند. کنیدیوم‌ها بی‌رنگ، خمیده، یک سلولی، بدون قطرات چربی، و به ابعاد $1 \times 4/7-3/8$ میکرومتر می‌باشند. فرم جنسی برای این قارچ مشاهده نشد (شکل ۳).

نمونه‌های بررسی شده: آذربایجان شرقی، شهرستان ملکان،

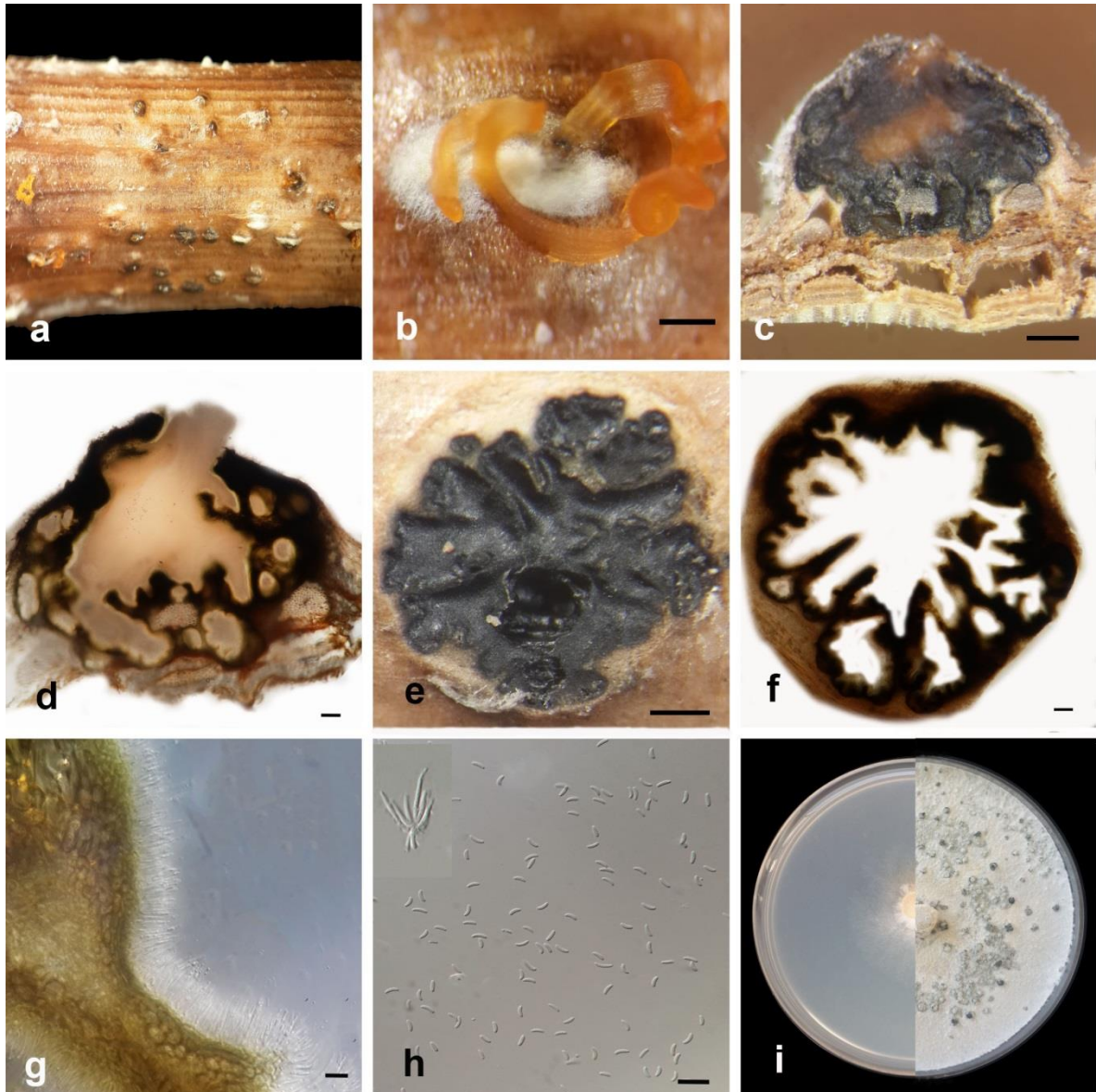
روستای قره‌چال (جدایه‌های MGL9، MGL8، MGL7، MG6 و MGL10)، روستای قلی‌کندی (جدایه‌های MG8، MGL3، MG14، MGL15 و MG31)، روستای قوریجان (جدایه‌های MGL9 و MGL11)، روستای تازه‌قلعه (جدایه MG40)؛ استان آذربایجان غربی، شهرستان میاندوآب، روستای شیلو (جدایه‌های MG4 و MG5)؛ جمع‌آوری کننده: زهرا محمودیان و عبدالله احمدپور، شهریور و مهر ماه ۱۴۰۰.

گونه *C. chrysosperma* در سال ۱۸۲۳ به عنوان گونه تپ جنس *Cytospora* توسط فریز گزارش شده است. همچنین فرم جنسی آن به نام *Valsa sordida* نامگذاری شده بود (Hayova and Minter 1998). این گونه همه جا زی در آسیا، اروپا، استرالیا، آمریکای شمالی و آمریکای جنوبی انتشار داشته و دارای دامنه میزبانی وسیعی است (Adams et al. 2006) و به عنوان اندوفیت (Gonzalez and Tello 2011) و بیماریزا (Arzanlou and Narmani 2015) از درختان انگور گزارش شده است.

Cytospora ershadii S. Hanifeh, D. Zafari, M. J. Soleimani, M. Arzanlou, *Fungal Biology* 1: 68 (2022)

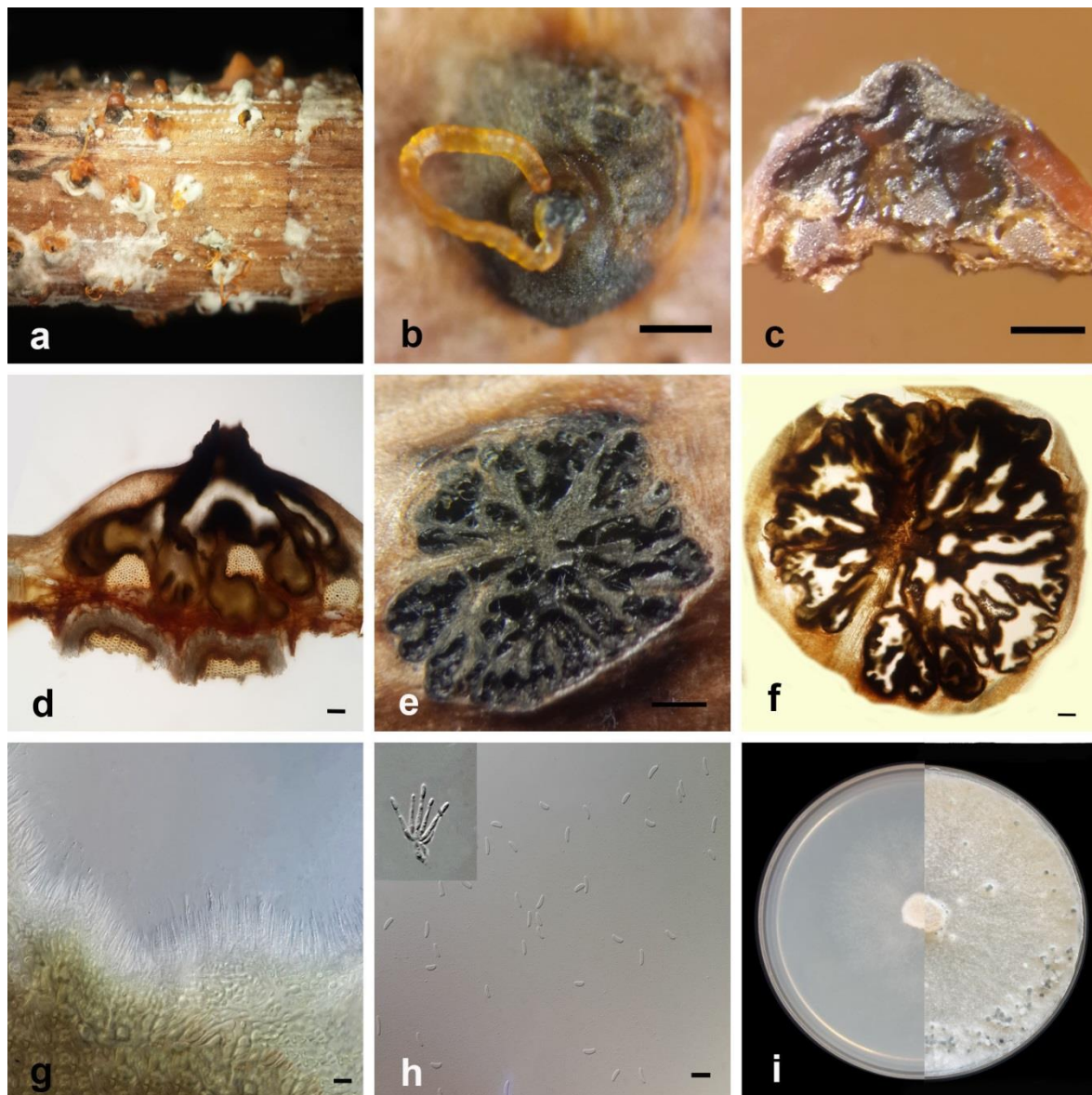
قطر رشدی پرگنه جدایه‌های این گونه روی محیط کشت PDA در دمای ۲۵ درجه سلسیوس پس از گذشت سه روز برابر با ۴۵-۴۰ میلی‌متر است. پرگنه به رنگ سفید با میسلیم هوایی پراکنده و با حاشیه نامنظم است که با گذشت زمان (۱۵ روز) به رنگ کرمی مایل به سفید تغییر می‌یابد و پیکنیدیوم‌ها به فراوانی در سطح محیط کشت PDA و نیز روی سوزن‌های کاج و شاخه‌های انگور تشکیل می‌شوند. پیکنیدیوم‌ها به صورت منفرد یا توده‌ای، چند حجره‌ای، گرد و به قطر ۳۱۴۰-۱۰۷۰ میکرومتر هستند. دیسک به رنگ سفید مایل به خاکستری روشن با بخش مرکزی تیره و با یک روزنه گرد بوده و قطر آن ۵۱۰-۱۵۰ میکرومتر است. کنیدیوفورها بدون انشعاب، با سلول‌های کنیدیوم‌زای از نوع فیالیدی، بی‌رنگ، با دیواره‌ی صاف، باریک شده در انتها و به

ابعاد $1/1-1/9 \times 15-9$ میکرومتر هستند. کنیدیوم‌ها بی‌رنگ، یک سلولی، سوسپسی شکل، بدون قطرات چربی و به ابعاد $1/1-5/8 \times 4/5-6$ میکرومتر می‌باشند. فرم جنسی برای این قارچ مشاهده نشد (شکل ۴).



شکل ۳- گونه‌ی *Cytospora chrysosperma*: (a) تشکیل پیکنیدیوم‌ها روی شاخه انگور، (b) روزنه پیکنیدیوم همراه با خروج توده کنیدیوم‌ها، (c-d) برش طولی پیکنیدیوم، (e-f) برش عرضی پیکنیدیوم، (g) لایه هیمنیومی، (h) کنیدیوم‌ها و سلول‌های کنیدیوم‌زا، (i) پرگنه روی محیط کشت PDA پس از گذشت سه روز (نیمه سمت چپ) و ۱۵ روز (نیمه سمت راست). مقیاس‌ها: b, c, e = ۲۵۰؛ d, f = ۱۰۰؛ g-h = ۱۰ میکرومتر.

Fig 3. *Cytospora chrysosperma*: a) Pycnidia formation on grapevine shoots, b) Ostiole with conidia oozing as a cirrhus, c-d) Longitudinal section of pycnidium, e-f) Cross section of pycnidium, g) Hymenial layer, h) Conidia and conidiogenous cells, i) Colony on PDA medium after 3 days (left half) and 15 days (right half). Scale bars: b, c, e = 250; d, f = 100; g-h = 10 μ m.



شکل ۴- گونه *Cytospora ershadii*: (a) تشکیل پیکنیدیوم‌ها روی شاخه انگور، (b) روزنه پیکنیدیوم همراه با خروج توده کنیدیوم‌ها، (c-d) برش طولی پیکنیدیوم، (e-f) برش عرضی پیکنیدیوم، (g) لایه هیمنیومی، (h) کنیدیوم‌ها و سلول‌های کنیدیوم‌زا، (i) پرگنه روی محیط کشت PDA پس از گذشت سه روز (نیمه سمت چپ) و ۱۵ روز (نیمه سمت راست). مقیاس‌ها: b, c, e = ۲۵۰، d, f = ۱۰۰، g-h = ۱۰ میکرومتر.

Fig 4. *Cytospora ershadii*: a) Pycnidia formation on grapevine shoots, b) Ostiole with conidia oozing as a cirrus, c-d) Longitudinal section of pycnidium, e-f) Cross section of pycnidium, g) Hymenial layer, h) Conidia and conidiogenous cells, i) Colony on PDA medium after 3 days (left half) and 15 days (right half). Scale bars: b, c, e = 250; d, f = 100; g-h = 10 μ m.

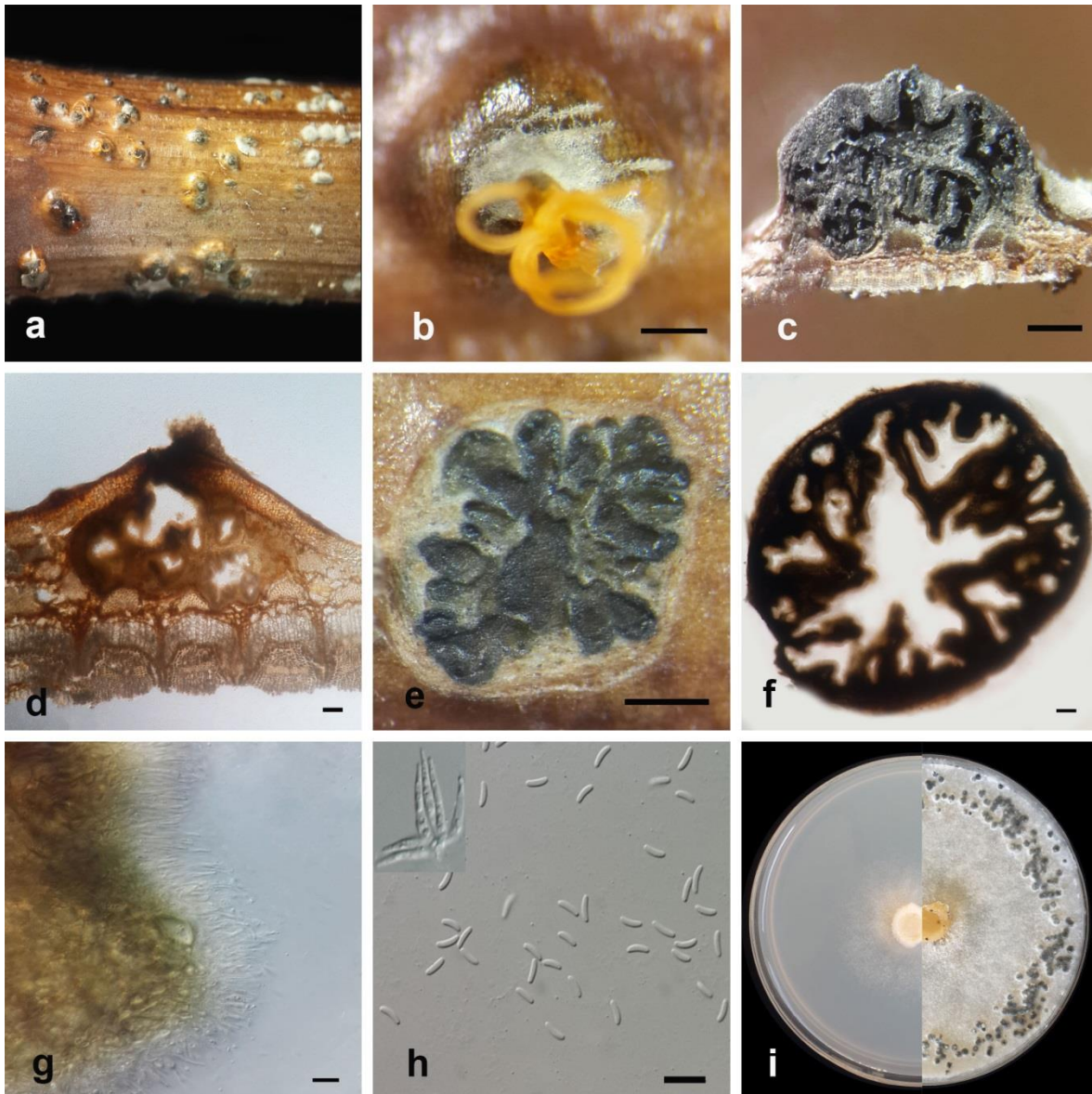
قطر رشدی پرگنه جدایه‌های این گونه روی محیط کشت PDA در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و پس از گذشت سه روز برابر با ۳۰ میلی‌متر است. پرگنه در ابتدا به رنگ سفید کرمی در بخش حاشیه‌ها و زرد مایل به نخودی در بخش مرکزی است که با گذشت زمان (۱۵ روز) به رنگ سفید تغییر می‌یابد. حاشیه پرگنه منظم و متقارن است. پیکنیدیوم‌ها به فراوانی در سطح محیط کشت PDA و نیز روی سوزن‌های کاج و شاخه‌های میزبان تشکیل می‌شوند. پیکنیدیوم‌ها به صورت منفرد یا توده‌ای، فرورفته در بافت میزبان، چند حجره‌ای، گرد و به قطر ۱۸۵۰-۱۳۴۰ میکرومتر هستند. دیسک به رنگ سفید کرمی با بخش مرکزی قهوه‌ای تیره، با یک روزنه گرد یا بیضی شکل و قطر آن ۱۸۰-۱۳۶ میکرومتر است. کنیدیوفورها غیرمنشعب و سلول‌های کنیدیوم‌ها از نوع فیالیدی، بی‌رنگ، با دیواره‌ی صاف، باریک شده در انتها و به ابعاد $1-2 \times 14-18/8$ میکرومتر هستند. کنیدیوم‌ها بی‌رنگ، قله‌ای شکل، سوسپسی شکل خمیده، بدون قطرات چربی و به ابعاد $1 \times 4/4-5/6$ میکرومتر هستند. فرم جنسی برای این قارچ مشاهده نشد (شکل ۵).

نمونه‌های بررسی شده: استان آذربایجان شرقی، شهرستان ملکان، روستای قوریجان (جدایه‌های MG32، MG36، MG48 و MG64)، روستای بایقوت (جدایه‌های MG11، MG16، MG22، MG33، MG37، MG38، MG57، MG70 و MG126)، روستای قره چال (جدایه‌های MG12، MG35، MG69 و MG125)؛ استان آذربایجان غربی، شهرستان میاندوآب، روستای قجلو (جدایه‌های MG1، MG3، MG13، MG17، MG18، MG20، MG22، MG29، MG102، MG127 و MG128)؛ جمع‌آوری کننده: زهرا محمودیان و عبدالله احمدپور، شهریور و مهر ماه ۱۳۹۹.

نمونه‌های بررسی شده: استان آذربایجان شرقی، شهرستان ملکان، روستای گدکلو، (جدایه‌های MG2، MG25، MG26، MG34، MG42A، MG49، MG59، MG67 و MG68)؛ استان آذربایجان غربی، شهرستان میاندوآب، روستای شیلو (جدایه‌های MG10، MG18، MG30، MG39، MG41 و MG58)، روستای تورچی (جدایه‌های MG7، MG9، MG23، MG24، MG63، MG65 و MG105)؛ جمع‌آوری کننده: زهرا محمودیان و عبدالله احمدپور، شهریور و مهر ماه ۱۳۹۹.

این گونه اخیراً به عنوان یک گونه جدید در جنس *Cytospora* از درختان سیب در استان آذربایجان غربی گزارش و بیماری‌زایی آن روی این درختان به اثبات رسیده است (Hanifeh et al. 2022). در تبارنمای ترسیم شده (شکل ۲)، این گونه ارتباط خویشاوندی نزدیکی با گونه‌های *C. salicacearum* و *C. melniki* نشان می‌دهد. این گونه به دلیل داشتن کنیدیوم‌ها و پیکنیدیوم‌های بزرگتر (کنیدیوم‌هایی به ابعاد $1/8-1/5 \times 4/5-6/5$ میکرومتر و قطر پیکنیدیوم ۳۱۴۰-۱۰۷۰ میکرومتر) از گونه‌های *C. melnikii* (کنیدیوم‌های به ابعاد $1-1/2 \times 4/5-5$ میکرومتر و پیکنیدیوم‌های به قطر ۵۲۰-۴۷۰ میکرومتر) و گونه‌ی *C. salicacearum* (کنیدیوم‌های به ابعاد $1-1/9 \times 4/9-6/4$ میکرومتر و پیکنیدیوم‌های به قطر ۷۵۰-۵۷۰ میکرومتر) (Norphanphoun et al. 2017) متمایز می‌شود. در این مطالعه، این گونه از گیاهان انگور دارای نشانه‌های زوال جداسازی و بیماری‌زایی آن به اثبات رسید و بنابراین انگور به عنوان میزبان جدیدی برای این گونه معرفی می‌شود.

***Cytospora salicina* Norphanphoun, Bulgakov, T.C. Wen and K.D. Hyde, Mycosphere 8 (1): 80 (2017)**



شکل ۵- گونه *Cytospora salicina* (a) تشکیل پیکنیدیوم‌ها روی شاخه انگور، (b) خروج توده‌های کنیدیومی از روزنه پیکنیدیوم، (c-d) برش طولی پیکنیدیوم، (e-f) برش عرضی پیکنیدیوم، (g) لایه هیمنیومی، (h) کنیدیوم‌ها و سلول‌های کنیدیوم‌زا، (i) پرگنه روی محیط کشت PDA پس از گذشت سه روز (نیمه سمت چپ) و ۱۵ روز (نیمه سمت راست). مقیاس‌ها: b, c, e = ۲۵۰، d, f = ۱۰۰، g-h = ۱۰ میکرومتر.

Fig 5. *Cytospora salicina*: a) Pycnidia formation on grapevine shoots, b) Ostiole with conidia oozing as a cirrus, c-d) Longitudinal section of pycnidium, e-f) Cross section of pycnidium, g) Hymenial layer, h) Conidia and conidiogenous cells, i) Colony on PDA medium after 3 days (left half) and 15 days (right half). Scale bars: b, c, e = 250; d, f = 100; g-h = 10 μ m.

Pouzoulet, in Lawrence, Travadon, Pouzoulet, Rolshausen, Wilcox & Baumgartner, Pl. Path.

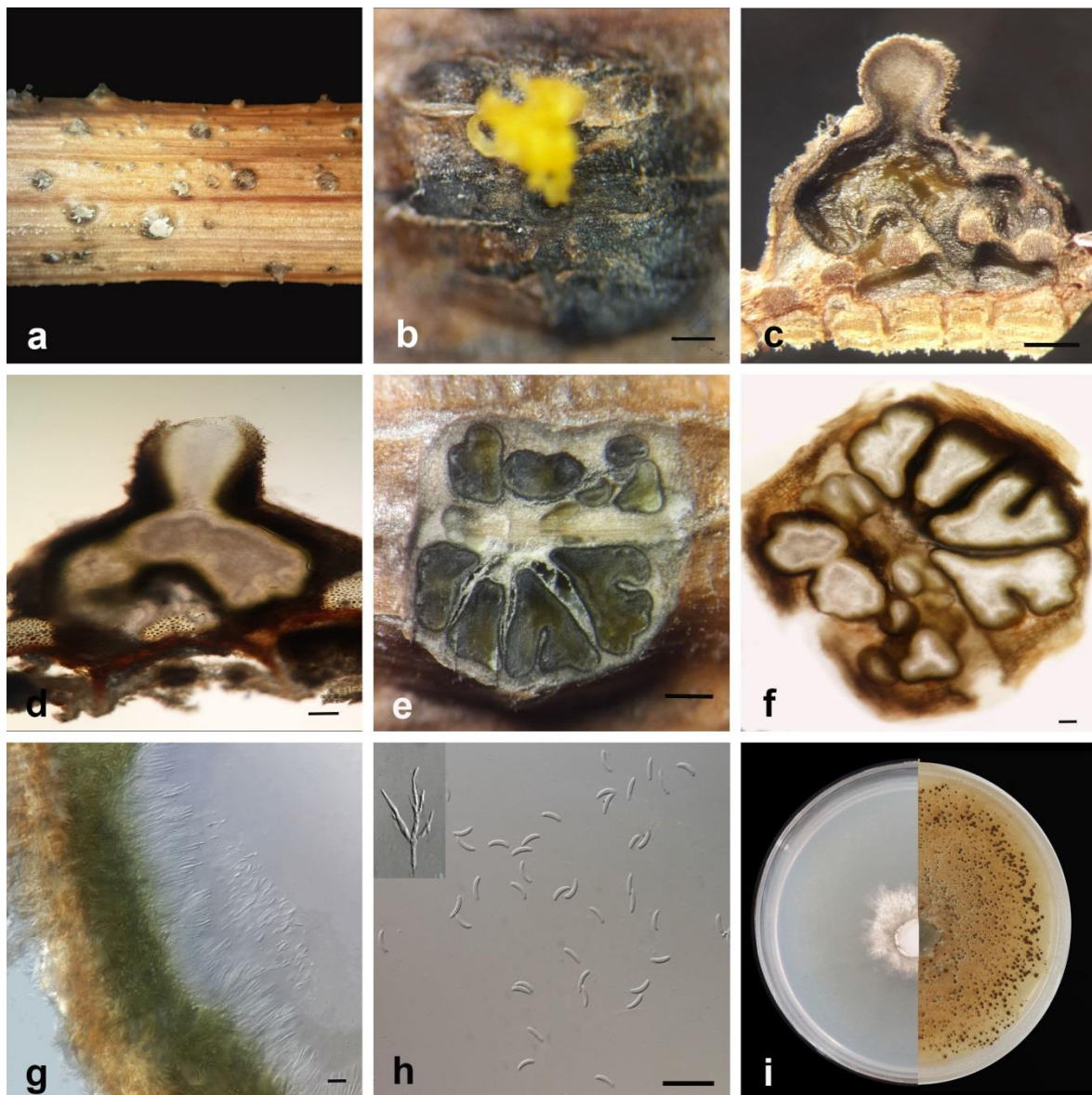
66(5): 718 (2017)

قطر رشدی پرگنه در جدایه‌های این گونه روی محیط کشت PDA در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و پس از گذشت سه روز برابر با ۳۰-۲۵ میلی‌متر است. پرگنه سه روزه به رنگ سفید کرمی در حاشیه و گلی در بخش مرکزی است که با گذشت زمان (پس از ۱۵ روز) به رنگ قهوه‌ای روشن با مرکز قهوه‌ای تغییر می‌یابد. پرگنه کند رشد بوده و حاشیه‌ها نامنظم هستند. پیکنیدیوم‌ها به فراوانی در سطح محیط کشت PDA و نیز روی سوزن‌های کاج و شاخه‌های میزبان تشکیل می‌شوند. پیکنیدیوم‌ها به صورت پراکنده، فرورفته در بافت، برآمده، چند حجره‌ای، گرد و به قطر ۱۰۰۰-۱۶۴۰ میکرومتر هستند. دیسک به رنگ سفید مایل به خاکستری روشن با بخش مرکزی تیره، با یک روزنه گرد و به قطر ۲۴۰-۱۸۵ میکرومتر است. کنیدیوفورها غیر منشعب، سلول‌های کنیدیوم‌زا از نوع فیالییدی، بی‌رنگ، با دیواره‌ی صاف، باریک شده در انتها و به ابعاد ۱-۱/۲ × ۱۵-۲۹ میکرومتر هستند. کنیدیوم‌ها بی‌رنگ، کشیده، کمی خمیده، و به ابعاد ۱-۱/۵ × ۴/۵-۶/۵ میکرومتر می‌باشند. فرم جنسی برای این قارچ مشاهده نشد (شکل ۶).

نمونه‌های بررسی شده: استان آذربایجان شرقی، شهرستان ملکان، روستای لیلان (جدایه‌های MG62A، MG62B، MG84B، MG106 و MG107)، روستای قوریجان (جدایه‌های MG51، MG52، MG53 و MG84A)؛ استان آذربایجان غربی، شهرستان میاندوآب، روستای قجلو (جدایه‌های MG50 و MG55)؛ جمع‌آوری کننده: زهرا محمودیان و عبدالله احمدپور، شهریور و مهر ماه ۱۴۰۰.

این گونه برای اولین بار در سال ۲۰۱۷ از شاخه‌های متعلق به جنس *Salix* جداسازی و گزارش شده است (Norphanphoun et al. 2017). در تبارنمای ترسیم شده (شکل ۲)، این گونه ارتباط خویشاوندی نزدیکی با گونه‌های *C. populicola*، *C. sophoriopsis* و *C. rostrata* دارد، اما از گونه *C. sophoriopsis* به دلیل داشتن روزنه عریض پیکنیدیومی (قطر ۱۸۰-۱۳۶ میکرومتر در برابر ۴۰-۲۰ میکرومتر در *C. sophoriopsis*) و قطر بیشتر پیکنیدیوم (۱۸۵۰-۱۳۴۰ میکرومتر در برابر ۵۷۰-۸۱۰ میکرومتر در *C. sophoriopsis*) (Fan et al. 2020)، از گونه *C. populicola* به دلیل داشتن کنیدیوم‌های کوچکتر (۱ × ۴/۶-۴/۵ میکرومتر در برابر ۱-۱/۵ × ۴/۵-۵/۵ میکرومتر در *C. populicola*) و پیکنیدیوم‌های کوچکتر (۱۸۵۰-۱۳۴۰ میکرومتر در برابر ۱۰۱۵-۲۷۳۵ میکرومتر در *C. populicola*) (Lawrence et al. 2018) و از گونه *C. rostrata* به دلیل نداشتن گردن پیکنیدیومی (در *C. rostrata* گردن دراز پیکنیدیومی به طول ۱/۲-۰/۹ میلی‌متر وجود دارد)، کنیدیوم‌های باریک‌تر (به عرض یک میکرومتر در مقابل ۱-۱/۶ میکرومتر در *C. rostrata*)، پیکنیدیوم‌های چندحجره‌ای نسبت به پیکنیدیوم‌های یک حجره‌ای در *C. rostrata* و قطر بیشتر پیکنیدیوم‌ها (۱۸۵۰-۱۳۴۰ میکرومتر در برابر ۸۵۱-۴۵۵ میکرومتر در *C. rostrata*) (Fan et al. 2014) متمایز می‌شود. این گونه از درختان شفت یا آل قرمز (*Cornus sanguinea*) (Senanayake et al. 2017)، انگور (DeKrey et al. 2022) و به عنوان عامل شانکر درختان سیب (Azizi et al. 2020) گزارش شده است. انگور به عنوان میزبان جدید برای این گونه در ایران گزارش می‌شود.

Cytospora viticola D.P. Lawr., Travadon &



شکل ۶- گونه *Cytospora viticola* (a) تشکیل پیکنیدیوم‌ها روی شاخه انگور، (b) خروج توده‌های کنیدیوم‌ها از روزنه پیکنیدیوم، (c-d) برش طولی پیکنیدیوم، (e-f) برش عرضی پیکنیدیوم، (g) لایه هیمنیومی، (h) کنیدیوم‌ها و سلول‌های کنیدیوم‌زا، (i) پرگنه روی محیط کشت PDA پس از گذشت سه روز (نیمه سمت چپ) و ۱۵ روز (نیمه سمت راست). مقیاس‌ها: b, c, e = ۲۵۰، d, f = ۱۰۰، g-h = ۱۰ میکرومتر.

Fig 6. *Cytospora viticola*: a) Pycnidia formation on grapevine shoots, b) Ostiole with conidia oozing as a cirrus, c-d) Longitudinal section of pycnidium, e-f) Cross section of pycnidium, g) Hymenial layer, h) Conidia and conidiogenous cells, i) Colony on PDA medium after 3 days (left half) and 15 days (right half). Scale bars: b, c, e = 250; d, f = 100; g-h = 10 μ m.

جدایه‌های مایه‌زنی شده بیماری‌زا بوده و توانستند نشانه‌های تغییر رنگ بافت پوست و چوب در اطراف محل مایه‌زنی شده را ایجاد کنند، هر چند شدت بیماری‌زایی جدایه‌ها (بر حسب طول ناحیه تغییر رنگ یافته اطراف محل مایه‌زنی شده) در بین جدایه‌های گونه‌های مختلف متفاوت بود. جداسازی مجدد قارچ‌های مایه‌زنی شده از شاخه‌های دارای نشانه‌های بیماری و مطابقت ریخت‌شناختی کامل آنها با جدایه‌های مایه‌زنی شده اصول کخ را اثبات کرد (شکل ۷). هیچ‌گونه تغییر رنگ یا نشانه دیگری از آلودگی در تیمارهای شاهد مشاهده نگردید و جداسازی قارچ‌ها از این شاخه‌ها انجام نگرفت. نتایج تجزیه و تحلیل واریانس داده‌های آزمون بیماری‌زایی جدایه‌ها نشان داد که تفاوت معنی‌دار آماری بین شدت بیماری‌زایی گونه‌ها و جدایه‌ها ($P \leq 0.05$) وجود دارد (شکل‌های ۸ و ۹). جدایه‌های گونه‌های *Cytospora ershadii* و *C. chrysosperma* بیشترین و جدایه‌های گونه *C. viticola* کمترین شدت بیماری‌زایی را روی شاخه‌های انگور ایجاد نمودند (شکل ۸) و جدایه‌های گونه *C. salicina* از نظر شدت بیماری‌زایی بین گونه‌های مذکور قرار گرفتند. بیشترین شدت بیماری‌زایی در جدایه‌ی MG3 از گونه *C. salicina* روی شاخه‌های انگور مشاهده گردید (شکل ۹). همچنین، بیشترین شدت بیماری‌زایی توسط جدایه‌های MG53 از گونه *C. viticola* جدایه MG39 از گونه *C. ershadii* و جدایه‌های MG8 و MG5 از گونه *C. chrysosperma* ثبت گردید و کمترین شدت بیماری‌زایی نیز در جدایه MG51 از گونه *C. viticola*، جدایه MG58 از گونه *C. ershadii*، جدایه‌های MG12 و MG13 از گونه *C. salicina* و جدایه MG4 از گونه *C. chrysosperma* مشاهده شد (شکل ۹). رابطه مشخصی بین شدت بیماری‌زایی جدایه‌های گونه‌های *Cytospora* و نرخ رشد جدایه‌ها (قطر رشدی پرگنه) مشاهده نگردید.

گونه *C. viticola* برای اولین بار از درختان انگور دارای نشانه‌های شانکر و زوال در آمریکای شمالی جداسازی و بیماری‌زایی آن به اثبات رسیده است (Lawrence et al. 2017). پس از آن، این گونه از درختان انگور دارای نشانه‌های زوال (شامل خشکیدگی شاخه‌ها، زردی برگ‌ها همراه با حاشیه بافت‌مرده و تغییر رنگ قهوه‌ای بخش چوب) در کشور ترکیه جداسازی و بیماری‌زایی آن به اثبات رسیده است (Oksal et al. 2020). در بررسی‌های ریخت‌شناسی مقایسه‌ای، تنها تفاوت ریخت‌شناسی جدایه‌های مورد بررسی با توصیف گونه تیپ، در داشتن پیکنیدیوم‌های چندحجره‌ای است که پیکنیدیوم‌ها در گونه تیپ به عنوان یک حجره‌ای توصیف شده‌اند. با وجود این، در تبارنمای ترسیم شده (شکل ۲)، جدایه‌های مورد مطالعه در یک دودمان متمایز با مقادیر اعتبارسنجی ۱۰۰ درصدی در کنار جدایه تیپ و سایر جدایه‌های شاخص این گونه قرار گرفتند و لذا شناسایی ریخت‌شناختی آن تأیید گردید. در تبارنمای ترسیم شده، این گونه با گونه‌های *C. beiliensis* و *C. bungeanae* ارتباط خویشاوندی نزدیکی دارد اما می‌تواند از گونه *C. beiliensis* به دلیل داشتن پیکنیدیوم‌های بزرگتر (۱۶۴۰-۱۰۰۰ میکرومتر نسبت به ۸۶۰-۶۰۰ میکرومتر در *C. beiliensis*) و از گونه *C. bungeanae* به دلیل قطر بیشتر منفذ پیکنیدیوم (قطر ۱۸۵-۲۴۰ میکرومتر نسبت به ۸۵-۴۰ میکرومتر در *C. bungeanae*) و کنیدیوم‌های درازتر (۴/۵-۶/۵ در مقایسه با ۵-۴/۵ میکرومتر در *C. bungeanae*) (Fan et al. 2020) متمایز شود. در مطالعه حاضر، این گونه برای اولین بار به عنوان عامل زوال درختان انگور در ایران و به عنوان گونه جدید برای بیوتای قارچی ایران معرفی می‌شود.

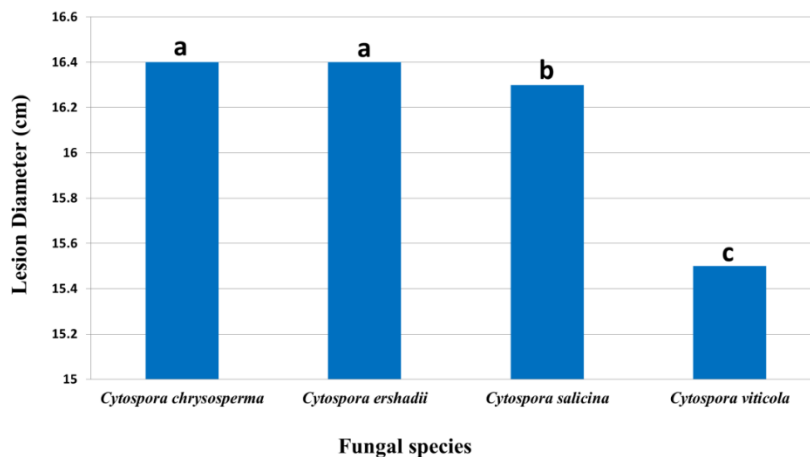
بیماری‌زایی جدایه‌های گونه‌های *Cytospora* روی شاخه‌های انگور رقم سفید بی‌دانه

نتایج آزمون بیماری‌زایی که با استفاده از پنج جدایه منتخب از هر گونه شناسایی شده روی شاخه‌های انگور رقم سفید بی‌دانه صورت گرفت، نشان داد که همه



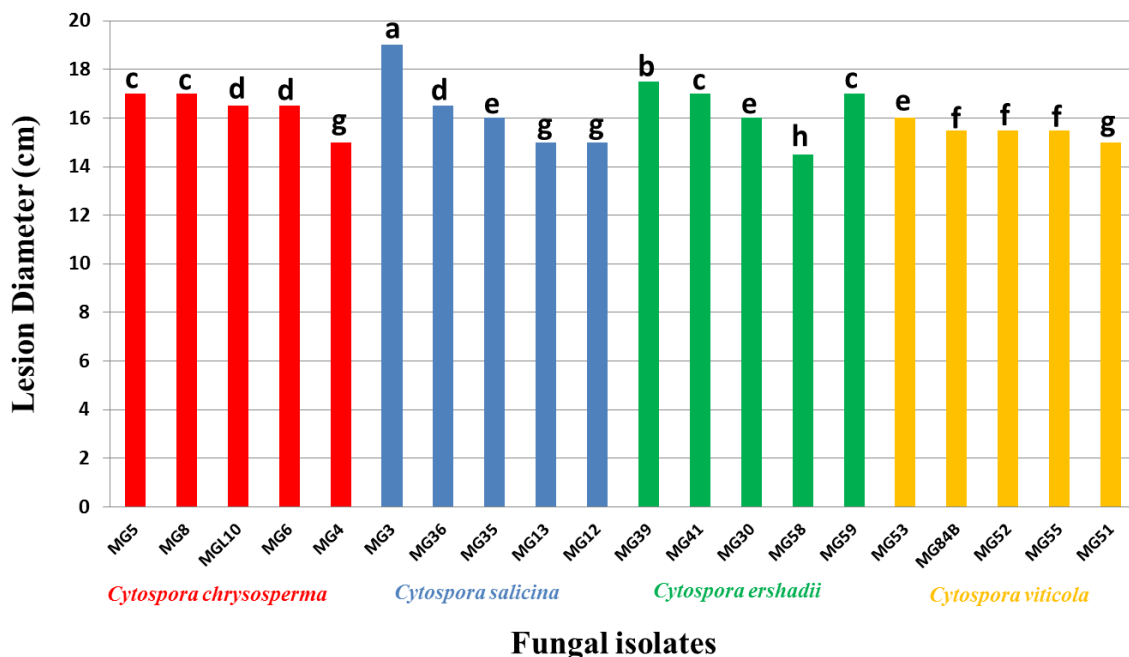
شکل ۷- نتایج آزمون بیماریزای جدایه‌های منتخب از گونه‌های *C. chrysosperma*، *C. ershadii*، *C. salicina* و *C. viticola* روی شاخه‌های انگور رقم سفید بی‌دانه پس از گذشت ۱۴ روز.

Fig 7. Results of pathogenicity assays of the selected isolates of *C. chrysosperma*, *C. ershadii*, *C. salicina* and *C. viticola* on the shoots of Thompson seedless grape after 14 days.



شکل ۸- مقایسه میانگین شاخص بیماری‌زایی گونه‌های جنس *Cytospora* (بر اساس طول ناحیه تغییر رنگ یافته) روی شاخه‌های انگور رقم سفید بی‌دانه (حروف غیرمشابه نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین گونه‌ها در سطح احتمال آماری ۵٪ است).

Fig. 8. Comparison of the mean pathogenicity index of *Cytospora* species (based on the length of the discolored area) on the shoots of the Thompson seedless cultivar (dissimilar letters indicate a significant difference between the species at $P \leq 0.05$).



شکل ۹- مقایسه میانگین طول ناحیه تغییر رنگ یافته در شاخه‌های مایه‌زنی شده انگور رقم سفید بی‌دانه به تفکیک جدایه‌ها در گونه‌های جنس *Cytospora* (حروف غیر مشابه نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین جدایه‌ها در سطح احتمال آماری ۵٪ است).

Fig. 9. Comparison of the mean length of the discolored area in the inoculated branches of Thompson seedless grapes according to the isolates of *Cytospora* species (dissimilar letters indicate a significant difference between the isolates at $P \leq 0.05$).

بحث

جنس گردید. هر چند توالی‌های ناحیه ITS-rDNA در شناسایی و تمایز برخی از گونه‌ها کمک کننده بود اما مطالعات بعدی مشخص کرد که این ناحیه ژنومی برای تمایز تعداد بیشتر گونه‌ها در این جنس و حتی تعداد زیادی از جنس‌های قارچی دیگر کارایی لازم را ندارد و بنابراین در مطالعات اخیر از ترکیبی از ویژگی‌های ریخت‌شناختی و مطالعات مولکولی بر مبنای توالی‌های شش ناحیه ژنومی (*ACT*, *JEF1*, *RBP2*, *LSU*, *ITS*) و (*TUB2*) برای شناسایی صحیح گونه‌های جنس *Cytospora* استفاده شده و مبنای عمل قرار گرفته است (Lawrence et al. 2017; 2018; Pan et al. 2021a;) نتایج این مطالعات منجر به معرفی تعداد زیادی از گونه‌های جدید گردید و به وضوح مرزهای گونه‌ها و روابط صحیح خویشاوندی آنها را مشخص کرد. همچنین مشخص شد که برخی از ویژگی‌های ریخت‌شناختی و یا روابط میزبانی که در آرایه‌بندی سنتی این جنس زیاد مورد تأکید قرار می‌گرفتند فاقد اعتبار آرایه‌بندی بوده و به عنوان صفات همساخت‌نما (*homoplasy*) در نظر گرفته شده‌اند (Adams et al. 2005; 2006; Lawrence et al. 2017;) در این مطالعه نیز که (Fan et al. 2020; Li et al. 2024b) با هدف شناسایی گونه‌های مختلف جنس *Cytospora* مرتبط با بیماری زوال درختان انگور انجام گرفت، چهار گونه متمایز از این جنس بر اساس تلفیق ویژگی‌های ریخت‌شناختی و توالی‌های مبتنی بر سه ناحیه نشانگر ژنومی شناسایی شدند. در تبارنمای ترسیم شده، ارتباط خویشاوندی جدایه‌های این مطالعه با جدایه‌های تپ و یا شاخص گونه‌های شناسایی شده مورد تأیید قرار گرفت. در این مطالعه از تعداد ۱۸۵ نمونه گیاهی دارای نشانه‌های زوال، در ۷۸ مورد (۴۲ درصد نمونه‌ها) جدایه‌های این جنس قارچی جداسازی شدند و نمایانگر اهمیت این جنس قارچی در ایجاد مجموعه زوال درختان انگور در

جنس *Cytospora* یک جنس غنی از گونه است که در سال ۱۸۱۸ توسط Ehrenberg پیشنهاد شد و بعداً گونه *C. chrysosperma* به عنوان لکتوتیپ برای این جنس انتخاب گردید (Donk 1964). گونه‌های این جنس دارای شیوه‌های زندگی متفاوتی بوده و شامل اندوفیت‌های ظاهراً بی‌ضرر جدا شده از پوست، آوندهای چوبی و برگ‌های گیاهان چوبی بدون نشانه، ساپروفیت‌های کلنیزه‌کننده و تجزیه‌کننده چوب درختان در حال مرگ یا مرده و بیمارگرهای بسیار مخرب عامل شانکر و سرخشکیدگی در بیش از ۱۰۰ گونه از گیاهان چوبی و سوزنی‌برگان هستند و در مجموع خسارت‌های شدید اقتصادی و بوم‌شناختی را در سرتاسر دنیا سبب می‌شوند (Bills et al. 1996; Adams et al. 2005; 2006; Fan et al. 2015; Lawrence et al. 2018; Zhang et al. 2019; Azizi et al. 2020; Zhu et al. 2020). اگر چه گونه‌های این جنس اغلب شاخه‌ها را آلوده می‌کنند اما آنها می‌توانند آلودگی‌های مخرب‌تری روی تنه‌ها و شاخه‌های بزرگ‌تر نیز ایجاد کنند و طول عمر و بارآوری باغات میوه را به شدت محدود کنند (Chang et al. 1991; Lawrence et al. 2018; Fan et al. 2020). شناسایی سنتی گونه‌ها در این جنس بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی و ارتباطات میزبانی استوار بوده است که به دلیل همپوشانی زیاد ویژگی‌های ریخت‌شناختی و شناسایی تعداد زیادی از گونه‌ها روی میزبان‌های مختلف، اهمیت این صفات در تمایز گونه‌ها محدود شده است (Adams et al. 2005; Wang et al. 2011; Fan et al. 2015). با ابداع و استفاده رایج از روش‌های مولکولی در علوم مختلف از جمله قارچ‌شناسی، مطالعات زیادی روی ناحیه ژنومی ITS-rDNA با هدف تشخیص و تمایز گونه‌های این جنس انجام گرفت و منجر به وضوح بیشتر مرزهای گونه‌ای و روابط تبارشناسی در گونه‌های این

آذربایجان غربی (Azizi et al. 2020) و گونه *C. ershadii* که تا کنون فقط از درختان سیب در استان آذربایجان غربی (Hanifeh et al. 2022) جداسازی و گزارش شده بودند، در مطالعه حاضر از درختان انگور با نشانه‌های زوال جداسازی و بیماریزایی آنها روی این درختان به اثبات رسید. نتایج این مطالعه نشان داد که دامنه میزبانی برخی گونه‌ها محدود به میزبان توصیف شده از آن نبوده و در صورت انجام مطالعات گسترده‌تر، در مکان‌ها و روی میزبان‌های مختلف، طیف میزبانی آنها مشخص خواهد شد. همچنین در بررسی منابع، چند گونه دیگر شامل *C. C. piceae*، *C. mali*، *C. macropycnidia*، *vinacea*، *rhodophila* و *yakimana* نیز از درختان انگور جداسازی و شناسایی شده است (Holland et al. 2015; Lawrence et al. 2017; DeKrey et al. 2022; Travadon et al. 2022). در ایران گونه‌های *C. cincta* و *C. leucostoma* از چوب بیمار یا مرده درختان انگور جداسازی و شناسایی شده‌اند هر چند بیماریزایی آنها مورد بررسی قرار نگرفته است (Fotouhifar et al. 2010). علاوه بر آن، گونه *C. punicae* به عنوان قارچ اندوفیت از درختان سالم انگور و بدون نشانه‌های بیماری در ایران گزارش شده است (Hergholi et al. 2015). نتایج تحقیق حاضر نشان داد که درختان انگور میزبان گونه‌های مختلفی از جنس *Cytospora* در مناطق مختلف می‌باشند و نتایج آزمون بیماری‌زایی جدایه‌های منتخب از گونه‌های شناسایی شده روی شاخه‌های بریده انگور بیماریزایی این جدایه‌ها را نشان داد، هر چند شدت بیماریزایی جدایه‌های مختلف متعلق به یک گونه و نیز در گونه‌های مختلف با هم متفاوت بودند (شکل‌های ۸ و ۹).

گونه‌های جنس *Cytospora* به عنوان بیمارگرهای مهم و خسارت‌زای مولد شانکر و سرخشکیدگی بسیاری از درختان ذکر شده‌اند. با این حال، عقیده بر این است که آنها بیمارگرهای فرصت‌طلب گیاهان بوده و در گیاهان

منطقه مورد مطالعه می‌باشد. در بین گونه‌های شناسایی شده، گونه *C. chrysosperma* دارای دامنه میزبانی بسیار وسیعی است و از بیش از ۲۶۵ میزبان مختلف، به ویژه گیاهان تیره *Salicaceae*، در سرتاسر دنیا گزارش شده است. در مطالعه‌ای این گونه از درختان انگور در استان‌های آذربایجان غربی و شرقی، هر چند بدون ذکر مناطق نمونه‌برداری شده، جداسازی و بیماریزایی آن روی شاخه‌های انگور به اثبات رسیده است (Arzanlou and Narmani 2015). نتایج این تحقیق نیز بیانگر حضور و بیماریزایی جدایه‌های این گونه در مناطق مورد مطالعه در ارتباط با بیماری زوال انگور است. در این مطالعه، گونه *C. viticola* برای اولین بار از درختان انگور با نشانه‌های زوال در ایران (شهرستان‌های میان‌دوآب و ملکان) جداسازی و شناسایی گردید و بیماریزایی آن روی شاخه‌های انگور به اثبات رسید که نمایانگر گسترش محدوده جغرافیایی آن در سایر مناطق تحت کشت انگور در دنیا است. این گونه ابتدا از آمریکای شمالی روی درختان انگور دارای نشانه‌های سرخشکیدگی و شانکر تنه (Lawrence et al. 2017) و سپس طی دو مطالعه جداگانه از باغات انگور در کشور ترکیه جداسازی و بیماری‌زایی آن روی نهال‌های انگور به اثبات رسیده است (Oksal et al. 2020; Akgül et al. 2023). در بررسی بیماری‌زایی جدایه‌های گونه‌های *C. viticola* و *C. vinacea* که در شرایط گلخانه‌ای انجام گرفت، نتایج نشان داد که جدایه‌های گونه *C. viticola* بیشترین شدت بیماریزایی را بر اساس طول لکه‌ها در فاصله ۱۲ ماه پس از مایه‌زنی دارا بودند (Lawrence et al. 2017).

گونه *C. salicina*، که از گیاهان میزبان جنس‌های *Salix* و *Cornus* در روسیه (Norphanphoun et al. 2017)، درختان انگور در ایالات متحده، ولی بدون مطالعه بیماری‌زایی روی انگور و تحت نام *Valsa salicina* (DeKrey et al. 2022) و درختان سیب در استان

بیماری مؤثر باشد. از طرف دیگر، گونه‌های این جنس به سهولت از طریق مواد تکثیری آلوده گیاهی (به خصوص نهال‌ها و قلمه‌ها) گسترش می‌یابند و به دلیل جابجایی گسترده و سریع مواد گیاهی بین نواحی تحت کشت انگور، مطالعات بیشتری برای بررسی تنوع گونه‌ای قارچ‌های این جنس در ارتباط با مجموعه زوال درختان انگور در سایر مناطق مهم تولید انگور مورد نیاز است. علاوه بر آن، مطالعات متمرکزی باید در مورد راهکارهای جامع و مؤثر مدیریتی این بیمارگرها انجام گیرد.

سپاسگزاری

نگارندگان بر خود لازم می‌دانند مراتب سپاس خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه به خاطر فراهم آوردن امکانات، هزینه و تجهیزات آزمایشگاهی اعلام دارند.

تحت تنش (خشکی یا یخبندان) نشانه‌های بیماری را القا می‌کنند (Lawrence *et al.* 2017; Travadon *et al.* 2022; Ilyukhin *et al.* 2023). زخم‌های ناشی از حشرات و هرس نامناسب، مکان‌های آلودگی را برای این قارچ‌ها فراهم می‌کنند. تغییرات اقلیمی رخ داده در سال‌های اخیر به ویژه تنش خشکی و افزایش دما از عوامل مهم ایجاد تنش در گیاهان محسوب می‌شوند که در نواحی مورد مطالعه نیز به وضوح رخ می‌دهند. این می‌تواند شرایط مطلوبی را برای فعالیت گونه‌های *Cytospora* تأمین کند و بنابراین حضور گونه‌های جدید در ارتباط با انگور و تشدید بیماری‌های ناشی از آنها در اغلب مناطق دیده می‌شود. وجود میزبان‌های مختلف برای یک گونه، امکان بقای قارچ را روی میزبان‌های مختلف تسهیل کرده و مایه آلوده کننده اولیه را برای آلودگی گیاهان مختلف در آن ناحیه تأمین می‌کند. بنابراین، آگاهی از دامنه میزبانی یک بیمارگر، می‌تواند در ارائه راهکارهای مناسب مدیریت

منابع

References

- Adams, G.C., Roux, J. and Wingfield, M.J. 2006. *Cytospora* species (Ascomycota, Diaporthales, Valsaceae): introduced and native pathogens of trees in South Africa. *Australasian Plant Pathology* 35: 521–548.
- Adams, G.C., Wingfield, M.J., Common, R. and Roux, J. 2005. Phylogenetic relationships and morphology of *Cytospora* species and related teleomorphs (Ascomycota, Diaporthales, Valsaceae) from *Eucalyptus*. *Studies in Mycology* 52: 1–144.
- Ahmadpour, A., Ghosta, Y. and Poursafar, A. 2021. Novel species of *Alternaria* section *Nimbya* from Iran as revealed by morphological and molecular data. *Mycologia* 113: 1073–1088.
- Akgül, D.S., Güngör Savaş, N., Yildiz, M., Bülbül, İ. and Özarslandan, M. 2023. Current status of grapevine trunk disease pathogens on asymptomatic nursery-produced grapevines in Türkiye. *Phytopathologia Mediterranea* 62: 151–163.
- Alston, J.M. and Sambucci, O. 2019. Grapes in the world economy. pp. 1–24. In: Cantu, D. and Walker, M.A. (eds). *The Grape Genome, Compendium of Plant Genomes*. Springer Nature Switzerland, AG.
- Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Miller W. and Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389–3402.
- Anonymous. 2021. Agricultural statistics of 2019. Third volume: horticultural products. Ministry of Agricultural Jihad, Planning and Economic Deputy, Information and Communication Technology Center. 164 pages.
- Arzanlou, M. and 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: 117–125.
- Azizi, R., Ghosta, Y. and Ahmadpour, A. 2020. Morphological and molecular characterization of *Cytospora*

- species involved in apple decline in Iran. *Mycologia Iranica* 7: 205–218.
- Azizi, R., Ghosta, Y. and Ahmadpour, A. 2024. Apple crown and collar canker and necrosis caused by *Cytospora balanejica* sp. nov. in Iran. *Scientific Reports* 14: 6629.
- Bahmani, Z., Abdollahzadeh, J., Amini, J. and Evidente, A. 2021. *Biscogniauxia rosacearum* the charcoal canker agent as a pathogen associated with grapevine trunk diseases in Zagros region of Iran. *Scientific Reports* 11: 14098.
- Bettenfeld, P., Fontaine, F., Trouvelot, S., Fernandez, O. and Courty, P.E. 2020. Woody plant declines. what's wrong with the microbiome? *Trends in Plant Science* 25(4): 381–394.
- Bills, G.F. 1996. Isolation and analysis of endophytic fungal communities from woody plants. pp. 31–65. In: Redlin, S.C. and Carris, L.M. (eds). *Endophytic fungi in grasses and woody plants: systematics, ecology, and evolution*. American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- Bois, B., Zito, S. and Calonne, A. 2017. Climate vs grapevine pests and diseases worldwide: the first results of a global survey. *OENO one* 51(2-3): 133–139.
- Burgess, T.I., Barber, P.A. and Hardy, G.E. 2005. *Botryosphaeria* spp. associated with eucalypts in Western Australia, including the description of *Fusicoccum macroclavatum* sp. nov. *Australasian Plant Pathology* 34: 557–567.
- Bustamante, M.I., Elfar, K., Smith, R.J., Bettiga, L.J., Tian, T., Torres, G.A. and Eskalen, A. 2022. First report of *Fusarium annulatum* associated with young vine decline in California. *Plant Disease* 106: 2752.
- Carbone, I. and Kohn, L.M. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91: 553–556.
- Carbone, M.J., Gelabert, M., Moreira, V., Mondino, P. and Alaniz, S. 2022. Grapevine nursery propagation material as source of fungal trunk disease pathogens in Uruguay. *Frontiers in Fungal Biology* 3: 958466.
- Chang, L.S., Iezzoni, A.F., Adams, G.C. and Ewers, F.W. 1991. Hydraulic conductance in susceptible versus tolerant peach seedlings infected with *Leucostoma persoonii*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 116: 831–834.
- Creasy, G.L. and Creasy, L.L. 2018. *Grapes*. 2nd ed. CABI International, Wallingford, UK. 396 p.
- Darriaut, R., Tran, J., Martins, G., Ollat, N., Masneuf-Pomarède, I. and Lauvergeat, V. 2023. In grapevine decline, microbiomes are affected differently in symptomatic and asymptomatic soils. *Applied Soil Ecology* 183: 104767.
- DeKrey, D.H., Klodd, A.E., Clark, M.D. and Blanchette, R.A. 2022. Grapevine trunk diseases of cold-hardy varieties grown in northern Midwest vineyards coincide with canker fungi and winter injury. *PLoS One* 17: e0269555.
- Donk, M.A. 1964. Nomina conservanda proposita 1. Proposals in fungi. Deuteromycetes. *Regnum Vegetabile* 34: 7–15.
- Fan, X., Hyde, K.D., Liu, M., Liang, Y. and Tian, C. 2015. *Cytospora* species associated with walnut canker disease in China, with description of a new species *C. gicalocus*. *Fungal Biology* 119: 310–319.
- Fan, X.L., Bezerra, J.D.P., Tian, C.M. and Crous, P.W. 2020. *Cytospora* (Diaporthales) in China. *Persoonia* 45: 1–45.
- Fan, X.L., Tian, C.M., Yang, Q., Liang, Y.M., You, C.J. and Zhang, Y.B. 2014. *Cytospora* from *Salix* in Northern China. *Mycotaxon* 129: 303–315.
- FAOSTAT. 2024. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Retrieved from <http://faostat.fao.org>, Accessed June 10, 2024.
- Fischer, M. and Peighami Ashnaei, S. 2019. Grapevine, esca complex, and environment: the disease triangle. *Phytopathologia Mediterranea* 58: 17–37.
- Fotouhifar, K.B., Hedjaroude, Gh.A. and Leuchtman, A. 2010. ITS rDNA phylogeny of Iranian strains of *Cytospora* and associated teleomorphs. *Mycologia* 102: 1369–1382.
- Giménez-Jaime, A., Aroca, A., Raposo, R., García-Jiménez, J. and Armengol, J. 2006. Occurrence of fungal pathogens associated with grapevine nurseries and the decline of young vines in Spain. *Journal of Phytopathology* 154: 598–602.
- Glass, N.L. and 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: 1323–1330.
- Gonzalez, V. and Tello, M.L. 2011. The endophytic mycota associated with *Vitis vinifera* in central Spain. *Fungal Diversity* 47: 29–42.
- Gramaje, D., Úrbez-Torres, J.R. and Sosnowski, M.R. 2018. Managing grapevine trunk diseases with respect to etiology and epidemiology: Current strategies and future prospects. *Plant Disease* 102: 12–39.
- Guarnaccia, V., Kraus, C., Markakis, E., Alves, E., Armengol, J., Eichmeier, A., Compant, S. and Gramaje, D. 2022. Fungal trunk diseases of fruit trees in Europe: pathogens, spread and future directions. *Phytopathologia Mediterranea* 61: 563–599.
- Guerin-Dubrana, L., Fontaine, F. and Mugnai, L. 2019. Grapevine trunk disease in European and Mediterranean vineyards: occurrence, distribution and associated disease-affecting cultural factors. *Phytopathologia Mediterranea* 58: 49–71.
- Haavik, L.J., Billings, S.A., Guldin, J.M. and Stephen, F.M. 2015. Emergent insects, pathogens and drought shape changing patterns in oak decline in North America and Europe. *Forest Ecology and Management* 354: 190–205.
- Hanifeh, S., Zafari, D., Soleimani, M.J. and Arzanlou, M. 2022. Multigene phylogeny, morphology, and pathogenicity trials reveal novel *Cytospora* species involved in perennial canker disease of apple trees in Iran. *Fungal Biology* 126: 707–726.
- Hayova, V.P. and Minter, D.V. 1998. *Leucostoma personii*. IMI Descriptions of Fungi and Bacteria. Set 137, No. 1367, CAB International, UK.
- Hergholi, N., Ghosta, Y., Javan-Nikkhah, M., Campisano, A. and Pancher, M. 2015. New species of endophytic fungi from grapevine (*Vitis vinifera*) in Iran. *Rostaniha* 16: 17–35.
- Hibben, C.R. 1962. Investigations of sugar maple decline in New York woodlands. Ph.D. Thesis, Cornell University. 301 p.
- Holland, L., Grove, G.G. and Glawe, D.A. 2015. Washington grapevine trunk disease survey. *Viticulture and Enology Extension News* 2015: 4.
- Hrycan, J., Hart, M., Bowen, P., Forge, T. and Úrbez-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: 395–424.
- Ilyukhin, E., Nguyen, H.D.T., Castle, A.J. and Ellouze, W. 2023. *Cytospora parapleurivora* sp. nov. isolated from orchards with fruit tree decline syndrome in Ontario, Canada. *PLoS ONE* 18(1): e0279490.
- Kanetis, L., Taliadoros, D., Makris, G. and Christoforou, M. 2022. A novel *Seimatosporium* and other Sporocadaceae species associated with grapevine trunk diseases in Cyprus. *Plants* 11: 2733.
- Katoh, K., Rozewicki, J. and Yamada, K.D. 2019. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics* 108: 1–7.
- Kenfaoui, J., Radouane, N., Mennani, M., Tahiri, A., El Ghadraoui, L., Belabess, Z., Fontaine, F., El Hamss, H., Amiri, S., Lahlali, R. and Barka, E.A. 2022. A panoramic view on grapevine trunk diseases threats: case of *Eutypa dieback*, *Botryosphaeria dieback*, and *Esca* disease. *Journal of Fungi* 8: 595.
- Lawrence, D.P., Holland, L.A., Nouri, M.T., Travadon, R., Abramians, A., Michailides, T.J. and Trouillas, F.P. 2018. Molecular phylogeny of *Cytospora* species associated with canker diseases of fruit and nut crops in California, with the descriptions of ten new species and one new combination. *IMA Fungus* 9: 330–370.
- Lawrence, D.P., Travadon, R., Pouzoulet, J., Rolshausen, P.E., Willcox, W.F. and 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: 713–725.
- Li, J.R., Li, J.T. and Jiang, N. 2024b. Morphology and phylogeny of *Cytospora* (Cytosporaceae, Diaporthales) species associated with plant cankers in Tibet, China. *MycKeys*, 104: 51–70.
- Li, J.T., Li, J.R. and Jiang, N. 2024a. Identification of *Cytospora* species isolated from branch canker diseases of woody plants in Tibet, China. *Forests* 15: 121.
- Liu, Y.J., Whelen, S. and Hall, B.D. 1999. Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an

- RNA polymerase II subunit. *Molecular Biology and Evolution* 16: 1799–1808.
- Luque, J.D., Sierra, E., Torres, E. and Garcia, F. 2006. *Cryptovalsa ampelina* on grapevines in N.E. Spain: identification and pathogenicity. *Phytopathologia Mediterranea* 45: 101–109.
- Merot, A., Coulouma, G., Smits, N., Robelot, E., Gary, C., Dubrana, L.G., Poulmarch, J., Burgun, X., Pellegrino, A. and Fermaud, M. 2023. A systemic approach to grapevine decline diagnosed using three key indicators: plant mortality, yield loss and vigor decrease. *OENO One* 57: 133–149.
- Meza, L., Deyett, E., Vallance, J., Gendre, L., Garcia, J.F., Cantu, D., Rey, P., Lecomte, P. and Rolshausen, P.E. 2024. Grapevine pruning strategy affects trunk disease symptoms, wood pathobiome and mycobiome. *Phytopathologia Mediterranea* 63: 91–102.
- Mohammadi, H., Banihashemi, Z., Gramaje, D. and Armengol, J. 2013. Fungal pathogens associated with grapevine trunk diseases in Iran. *Journal of Agricultural Science and Technology* 15: 137–150.
- Morton, L. 2000. Viticulture and grapevine declines: lessons of black goo. *Phytopathologia Mediterranea* 39: 59–67.
- Mugnai, L., Graniti, A. and Surico, G. 1999. Esca (black measles) and brown wood-streaking: two old and elusive diseases of grapevines. *Plant Disease* 83: 404–418.
- Nabi, A., Shah, M.U.D., Padder, B.A. and Ahmad, M. 2018. Morpho-cultural, pathological and molecular variability in *Thyrostroma carpophilum* causing shot hole of stone fruits in India. *European Journal of Plant Pathology* 151: 613–627.
- Norphanphoun, C., Doilom, M., Daranagama, D.A., Phookamsak, R., Wen, T.C., Bulgakov, T.S. and Hyde, K.D. 2017. Revisiting the genus *Cytospora* and allied species. *Mycosphere* 8: 51–97.
- Nylander, J.A.A. 2004. MrModeltest v2.0. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, Uppsala, Sweden.
- Oksal, E., Çelik, Y. and Özer, G. 2020. First report of canker and dieback caused by *Cytospora viticola* on grapevine in Turkey. *Journal of Plant Pathology* 102: 239.
- Pan, M., Zhu, H., Liang, L., Tian, C. and Fan, X. 2021a. Studies of canker and dieback of oak tree in China, with two *Cytospora* species described. *Plant Pathology* 70: 2005–2015.
- Pan, M., Zhu, H., Tian, C., Huang, M. and Fan, X. 2021b. Assessment of *Cytospora* isolates from conifer cankers in China, with the descriptions of four new *Cytospora* species. *Frontiers in Plant Sciences* 12: 636460.
- Phillips, A.J.L. 2002. *Botryosphaeria* species associated with diseases of grapevines in Portugal. *Phytopathologia Mediterranea* 41: 3–18.
- Raimondo, M.L., Carlucci, A., Ciccarone, C., Sadallah, A. and Lops, F. 2019. Identification and pathogenicity of lignicolous fungi associated with grapevine trunk diseases in Southern Italy. *Phytopathologia Mediterranea* 58: 639–662.
- Rambaut, A. 2019. FigTree, a graphical viewer of phylogenetic trees. Available from: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>.
- Rayner, R.W. 1970. *A Mycological Colour Chart*. Kew: Commonwealth Mycological Institute, UK.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A. and Huelsenbeck, J.P. 2012. MrBayes 3: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61: 539–542.
- Scheck, H.J., Vasquez, S.J. and Gubler, W.D. 1998. First report of three *Phaeoacremonium* spp. causing grapevine decline in California. *Plant Disease* 8: 590.
- Senanayake, I.C., Crous, P.W., Groenewald, J.Z., Maharachchikumbura, S.S., Jeewon, R., Phillips, A.J., Bhat, J.D., Perera, R.H., Li, Q.R., Li, W.J. and Tangthirasunun, N. 2017. Families of Diaporthales based on morphological and phylogenetic evidence. *Studies in Mycology* 86: 217–296.
- Sinclair, W.A. 1965. Comparisons of recent declines of white ash, oaks, and sugar maple in northeastern woodlands. *Cornell Plant* 20: 62–67.
- Stamatakis, A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30: 1312–1313.
- Stukenbrock, E.V. and Mc Donald, B.A. 2008. The origin of plant pathogen in agro-ecosystems. *Annual*

- Review of Phytopathology 46: 75–100.
- Sung, G.H., Sung, J.M., Hywel-Jones, N.L. and Spatafora, J.W. 2007. A multi-gene phylogeny of Clavicipitaceae (Ascomycota, Fungi): Identification of localized incongruence using a combinational bootstrap approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44: 1204–1223.
- Swofford, D.L. 2003. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. 2007. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596–1599.
- Testempasis, S.I., Markakis, E.A., Tavlaki, G.I., Soutatos, S.K., Tsoukas, C., Gkizi, D., Tzima, A.K., Paplomatas, E. and Karaoglanidis, G.S. 2024. Grapevine trunk diseases in Greece: disease incidence and fungi involved in discrete geographical zones and varieties. *Journal of Fungi* 10: 2.
- Travadon, R., Lawrence, D.P., Moyer, M., Fujiyoshi, P.T. and Baumgartner, K. 2022. Fungal species associated with grapevine trunk diseases in Washington wine grapes and California table grapes, with novelties in the genera *Cadophora*, *Cytospora*, and *Sporocadus*. *Frontiers in Fungal Biology*, 3: 1018140.
- Úrbez-Torres, J.R., Boulé, J., Hrycan, J. and O’Gorman, D.T. 2023. Potential role of *Fusarium* spp. in grapevine decline. *Phytopathologia Mediterranea* 62: 269–281.
- Van Niekerk, J.M., Crous, P.W., Groenewald, J.Z., Fourie, P.H. and Halleen, F. 2004. DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevines. *Mycologia* 96: 781–798.
- Van Niekerk, J.M., Groenewald, J.Z., Farr, D.F., Fourie, P., Hallen, H.F. and Crous, P.W. 2005. Reassessment of *Phomopsis* species on grapevines. *Australasian Plant Pathology* 34: 27–39.
- Wang, X.L., Kang, Z.S., Huang, L.L. and Wei, J. 2011. Re-evaluation of pathogens causing Valsa canker on apple in China. *Mycologia* 103: 317–324.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S.J.W.T. and Taylor, J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315–322. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. (eds.)– PCR protocols: a guide to methods and applications. New York: Academic Press.
- Zhu, H., Pan, M., Bezerra, J.D.P., Tian, C. and Fan, X. 2020. Discovery of *Cytospora* species associated with canker disease of tree hosts from Mount Dongling of China. *Mycology* 62: 97–121.