

شناسایی ریخت‌شناختی و مولکولی عوامل قارچی همراه با پوسیدگی میوه زیتون در استان زنجان

محسن تربتی¹، مهدی ارزنلو^{2*}، حسین جعفری³ و اسدالله بابای اهری²

¹ دانشجوی سابق کارشناسی ارشد رشته بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

² دانشیار و استاد، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

³ استادیار، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان زنجان

*مسئول مکاتبه: arzanlou@hotmail.com

تاریخ پذیرش: 92/07/19

تاریخ دریافت: 91/12/27

چکیده

پوسیدگی میوه یکی از مهم‌ترین بیماری‌های زیتون در استان زنجان به‌شمار می‌رود. علی‌رغم شیوع این بیماری در منطقه، عوامل قارچی مرتبط با این بیماری ناشناخته باقی مانده‌اند. این تحقیق با هدف شناسایی گونه‌های قارچی عوامل پوسیدگی میوه زیتون در استان زنجان با استفاده از داده‌های ریخت‌شناختی و مولکولی انجام شد. برای این منظور از باغ‌های زیتون منطقه طارم در استان طی ماه‌های مهر و آبان سال 1390 نمونه‌برداری صورت گرفت. پس از جداسازی قارچ‌های عامل بیماری، خالص‌سازی به روش تک‌اسپور و نوکریسه انجام شد. شناسایی جدایه‌های قارچی در سطح گونه با بررسی‌های ریخت‌شناختی و داده‌های توالی نوکلئوتیدی ناحیه ITS-rDNA صورت گرفت. نتایج این بررسی نشان داد گونه مرکب *Alternaria alternata* با فراوانی 37 درصد به‌عنوان گونه قارچی غالب در ایجاد بیماری پوسیدگی میوه در استان زنجان می‌باشد. در مورد جدایه‌های متعلق به جنس آلترناریا هویت گونه با استفاده از داده‌های توالی نوکلئوتیدی ناحیه ITS-rDNA و توالی ژن‌های *gpd* و *rpb2* مورد تایید قرار گرفت، تمامی جدایه‌ها در خوشه گونه مرکب *Alternaria alternata* قرار گرفتند. در درخت تبارزایی ترسیم‌شده بر اساس توالی *rpb2* برای این جنس، جدایه‌های زیتون همراه با جدایه‌های گونه مرکب *A. alternata* یک خوشه را به خود اختصاص دادند. دیگر گونه‌های قارچی جداسازی شده از میوه‌های زیتون با علایم پوسیدگی این منطقه شامل *Acremonium implicatum*، *Botrytis cinerea*، *Aureobasidium pullulans*، *Aspergillus ochraceus*، *Arthrimum phaeospermum*، *Trichoderma*، *Penicillium expansum*، *F. nygamai*، *F. proliferatum*، *Fusarium sp.*، *Epicoccum nigrum* و *harzianum* و *Truncatella angustata* بودند. گزارش اغلب گونه‌های قارچی از روی زیتون برای ایران جدید می‌باشد. با شناسایی گونه‌های قارچی همراه با بیماری پوسیدگی میوه زیتون، اعمال راه‌کارهای مناسب برای مدیریت بیماری در آینده امکان‌پذیر خواهد شد.

واژه‌های کلیدی: پوسیدگی میوه، تبارزایی، *Alternaria*، *Fusarium*، ITS-rDNA، *rpb2*

مقدمه

و دیگر کشورهای ناحیه مدیترانه کشت می‌شود (محمدی و وکیلی 1385، نورمحمدی و همکاران 2007). درخت زیتون از لحاظ ارزش غذایی و دارویی دارای پیشینه تاریخی طولانی است (محمدی و وکیلی 1385). میوه

زیتون (*Olea europaea* L.) درختی است همیشه سبز، بومی منطقه مدیترانه که در حال حاضر در دامنه وسیعی از کشورها از قبیل اسپانیا، ایتالیا، یونان، ترکیه

C. gloeosporioides (Penz.) Penz. و *Simmonda* Sacc. & عامل ایجاد بیماری آنتراکنوز زیتون می‌باشند در تحقیقات قبلی گونه *C. gloeosporioides* به‌عنوان عامل اولیه آنتراکنوز گزارش شده است. با این وجود بررسی‌های اخیر نشان داده است که *C. acutatum* گونه غالب در باغ‌های زیتون در اسپانیا و پرتغال می‌باشد و هر دو گونه در ایجاد بیماری دخالت دارند (مورال و همکاران، 2008). عامل بیماری علاوه بر میوه، شاخه‌های جوان و سرشاخه‌ها را نیز آلوده می‌کند. آلودگی گل‌ها معمولاً منجر به پوسیدگی میوه می‌شود (سرگوا و همکاران 2008). این بیماری در ایران توسط صانعی در سال 2005 از رودبار، استان گلستان و استان گیلان گزارش گردید (صانعی و رضوی 2012). از دیگر گروه‌های قارچی عامل بیماری پوسیدگی میوه زیتون می‌توان به *Diplodia seriata* De Not و گونه‌های دیگر این جنس، *Neofusicoccum luteum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & Phillips *Pseudocercospora* A.J.L. *Cladosporium* (Sacc.) U. Braun *Camarosporium dalmatica* (Thüm.) Berl. & Voglino و *Spilocaea oleagina* (Castagne) S. Hughes اشاره کرد (مورال و همکاران 2008، 2009، سرگوا و همکاران 2008). از قارچ‌های دیگری که باعث کاهش کیفیت محصول در زیتون می‌شوند می‌توان به قارچ‌های دوده‌ای اشاره کرد که گونه‌های جنس *Aureobasidium pullulans* (de Bary) *Alternaria* Prill. *Epicoccum nigrum* Link.G. Arnaud *Cladosporium* و *Capnodium elaeophilum* *herbarum* (Pers.) Link را شامل می‌شوند. رشد این قارچ‌ها روی عدسک‌های موجود بر روی شاخه‌ها، میوه‌ها و برگ‌ها باعث به‌وجود آمدن دوده قهوه‌ای و سیاه‌رنگی می‌شود که فعالیت‌های حیاتی برگ‌ها و میوه‌ها (فتوسنتز و تنفس) را مختل می‌سازد و در نهایت باعث ریزش آن‌ها می‌شود. درخت‌هایی که با این قارچ‌ها آلوده

زیتون مهم‌ترین فراورده زیتون می‌باشد که بیشتر جهت مصارف کنسروی و روغن‌کشی مورد بهره‌برداری قرار می‌گیرد (پاتومی و همکاران 2003). در حال حاضر سطح زیر کشت این محصول در نیمه شمالی ایران در حدود 80000 هکتار می‌باشد (فائو 2012). استان‌های زنجان، گیلان و قزوین به‌عنوان مناطق عمده زیتون‌کاری ایران به‌شمار می‌روند (نورمحمدی و همکاران 2007). زیتون به دلیل شرایط خاص اقلیمی محل کاشت و همیشه‌سبز بودن، بستر مناسبی برای رشد و نمو آفات و عوامل بیماری‌زای گوناگون می‌باشد (محمدی و وکیلی 1385). بر اساس تحقیقات انجام‌گرفته، در حدود 255 گونه خسارت‌زا (قارچ، باکتری، نماتد و غیره) روی زیتون شناسایی شده است. با این وجود، تنها گروه کوچکی از این عوامل روی زیتون خسارت اقتصادی ایجاد می‌کنند (گیلبرت و میفسود 2007). بیماری‌های پژمردگی ورتیسیلیومی، پوسیدگی‌های ریشه، پوسیدگی‌های یقه و طوقه، سفیدک پودری، پژمردگی نکتریایی و پوسیدگی زغالی از بیماری‌های قارچی مهم روی درخت زیتون هستند (صانعی و رضوی 2012، بابیت و همکاران 2002، درویس و همکاران 2010، لویز-اسکودرو و مرکادو - بلانکو 2011). پوسیدگی‌های میوه از مهم‌ترین بیماری‌های زیتون به‌شمار می‌روند که سالانه خسارت قابل توجهی به محصول زیتون در مرحله قبل و بعد از برداشت وارد می‌کنند و باعث کاهش مقدار تولید و خواص کیفی روغن زیتون می‌شوند (سرگوا و همکاران 2008). گروه‌های قارچی متعددی در ایجاد بیماری پوسیدگی میوه زیتون دخیل هستند. بیماری پوسیدگی میوه که توسط گونه‌های جنس *Colletotrichum* Corda ایجاد می‌شود جزء بیماری‌های مخرب زیتون می‌باشد که از پراکنش وسیع در نواحی تحت کشت زیتون برخوردار است. این بیماری تحت عنوان بیماری آنتراکنوز زیتون شناخته شده است (مورال و همکاران 2008، 2009، سرگوا و همکاران 2008). دو گونه *Colletotrichum acutatum* J. H Simonds ex

شناسایی جدایه‌ها بر اساس صفات ریخت‌شناسی پس از شناسایی جدایه‌های قارچی در سطح جنس، بسته به گروه قارچی، از محیط‌های غذایی و شرایط ویژه توصیه‌شده در منابع برای شناسایی گونه‌ها استفاده شد. در این مورد جهت توصیف و شناسایی جدایه‌های قارچی، از روش‌های پیشنهادی سیمونز (2007)، کراوس و همکاران (2004)، ساتون (1980)، گرلاخ و نیرنبرگ (1982)، لزی و سامرل (2006)، دمش و همکاران (2007) و مقاله‌های معتبر، استفاده گردید.

شناسایی مولکولی جدایه‌ها

استخراج DNA ژنومی

جدایه‌های قارچی در تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار کشت شده و در تاریکی و دمای 25 درجه سانتی‌گراد به مدت هفت روز نگهداری گردید. سپس استخراج DNA مطابق روش مولر و همکاران (1992) انجام شد. کمیت و کیفیت DNA به دست آمده به روش اسپکتروفتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت.

تکثیر نواحی ژنومی

جهت تایید هویت گونه‌های شناسایی‌شده بر اساس داده‌های ریخت‌شناختی، ناحیه فاصله‌انداز داخلی DNA ریبوزومی² برای جدایه‌های نماینده هر یک از گونه‌های شناسایی‌شده تکثیر و توالی‌یابی گردید. در مورد جدایه‌های آلترناریا علاوه بر ناحیه ITS، بخش‌هایی از ژن‌های گلیسرآلدهید-3- فسفات دهیدروژناز (*gpd*) و زیر واحد بتا RNA پلی‌مراز II³ برای تعداد هشت جدایه تکثیر و توالی‌یابی شد. توالی آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق در جدول شماره 1 آورده شده است.

شوند میوه‌های مناسبی تولید نکرده و کیفیت روغن آن‌ها نیز مطلوب نخواهد بود (صانعی و رضوی 2012).

با توجه به اهمیت تولید زیتون در ایران به‌ویژه استان زنجان، شناسایی عوامل بیماری‌زای آن به‌خصوص عوامل دخیل در پوسیدگی میوه به‌منظور توسعه روش‌های مناسب مدیریتی و افزایش عملکرد در واحد سطح از اهمیت به‌سزایی برخوردار است. در این تحقیق تلاش گردید تا قارچ‌های همراه با پوسیدگی میوه و عامل آن در استان زنجان شناسایی شوند.

مواد و روش‌ها

جداسازی قارچ‌ها از میوه‌های آلوده

در ماه‌های خنک و مرطوب (مهر و آبان) سال 1390 که هم‌زمان با آغاز رسیدن فیزیولوژیکی میوه زیتون در منطقه می‌باشد، از باغ‌های زیتون برخی مناطق استان زنجان (مامالان، دستجرده، شیراب، گیلوان، ونسر، گیلان‌کشه، پاسار، مرکز تحقیقات زیتون، طارم و آب‌بر) بازدید و به صورت تصادفی از میوه‌های دارای علائم پوسیدگی نمونه‌برداری شد. به‌منظور جداسازی قارچ‌ها، میوه‌های دارای علائم پوسیدگی پس از شست‌وشو با آب، به‌وسیله الکل 70 درصد به مدت 25-20 ثانیه ضدعفونی گردیدند و پس از آب‌گیری با استفاده از کاغذ صافی استریل، به‌کمک اسکالپل استریل از قسمت‌های قهوه‌ای زیر پوست میوه قطعه‌های کوچکی تهیه و روی تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار¹ منتقل و کشت‌ها در دمای 25 درجه سانتی‌گراد در داخل انکوباتور نگهداری شدند. پس از ظهور پرگنه‌های قارچی، کشت‌های خالص با استفاده از روش تک‌اسپور و یا نوک‌ریسه ایجاد شدند. کشت‌های خالص در کلکسیون کشت‌های زنده دانشگاه تبریز واقع در گروه گیاه پزشکی (CCTU) نگهداری گردیدند.

¹ ITS-rDNA

² RPB2

³ PDA ; Fluka, Hamburg, Germany

جدول 1- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده جهت شناسایی مولکولی جدایه‌های قارچی مرتبط با پوسیدگی میوه زیتون در استان زنجان

آغازگر	توالی	هدف
ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	تکثیر ناحیه ITS-rDNA
ITS4	5'TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	تکثیر ناحیه ITS-rDNA
gpd1	5'-CAACGGCTTCGGTCGCATTG-3'	تکثیر ژن gpd
gpd2	5'-GCCAAGCAGTTGGTTGTGC-3'	تکثیر ژن gpd
5F2	5'-GGGGWGAYCAGAAGAAGGC-3'	تکثیر ژن rpb2
7cR	5'-CCCATRGCCTGYTTRCCCAT-3'	تکثیر ژن rpb2

گرا د را شامل گردید. چرخه‌های حرارتی اعمال شده برای تکثیر ژن *rpb2* شامل یک چرخه دمای 95 درجه سانتی-گرا د به مدت سه دقیقه؛ پنج چرخه دمایی 95 درجه سانتی-گرا د به مدت 45 ثانیه؛ 58 درجه سانتی-گرا د به مدت 45 ثانیه و 72 درجه سانتی-گرا د به مدت دو دقیقه؛ پنج چرخه دمایی 95 درجه سانتی-گرا د به مدت 45 ثانیه، 56 درجه سانتی-گرا د به مدت 45 ثانیه و 72 درجه سانتی-گرا د به مدت 2 دقیقه؛ 30 چرخه دمایی 95 درجه سانتی-گرا د به مدت 45 ثانیه؛ 52 درجه سانتی-گرا د به مدت 45 ثانیه و 72 درجه سانتی-گرا د به مدت دو دقیقه و یک چرخه دمای 72 درجه سانتی-گرا د به مدت هشت دقیقه بود.

فراورده‌های واکنش روی ژل آگارز یک درصد حاوی 0/1 میکروگرم بر میلی‌گرم اتیدیوم بروماید در بافر 1X TAE⁵ توسط دستگاه عکس‌برداری از ژل تحت نور ماوراء بنفش (طول موج 312 نانومتر) بررسی شدند.

توالی‌یابی و تبارزایی

محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از کیت تجاری بیگ‌دای مطابق دستورالعمل کارخانه سازنده توالی‌یابی شد و داده‌های خام توالی با استفاده از نرم‌افزار SeqMan (DNA Star, Lasergene Package) مورد بررسی قرار گرفت. پس از ویرایش داده‌های توالی نوکلئوتیدی، توالی‌های برآیند در فرمت فایل فاستا⁶ ذخیره شدند. داده‌های توالی، با استفاده از نرم‌افزار بلاست واقع در وب سایت (NCBI- Blast Search) با داده-های توالی نوکلئوتیدی موجود در بانک ژن مقایسه شدند. توالی‌های با درجه تشابه بالا از بانک ژن دریافت و به صورت فایل فاستا ذخیره گردیدند. زیرهم‌چینی داده‌های توالی ایجاد شده در این تحقیق با داده‌های توالی بانک ژن با استفاده از نرم‌افزار Mega5 انجام و الگوی هم‌ترازی چندگانه تعیین گردید. درخت تبارزایی به روش

مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای هر سه ناحیه ژنومی شامل 10-15 نانوگرم DNA ژنومی الگو، 1/25 میکرولیتر بافر واکنش 10X، 60 میکرومول dNTP یک میلی‌مولار، 0/2 پیکومول از هر آغازگر، میزان متغیر کلریدمنیزیم (به ترتیب 0/5، 1 و 1/5) میلی‌مول برای ناحیه ITS، ژن *gpd* و *rpb2* 0/5 میکرولیتر دی‌متیل-سولفوکسید⁴ 0/63 درصد و 0/5 واحد DNA پلی‌مراز (BioTaq DNA Polymerase) بود. حجم نهایی واکنش با آب مقطر دوبار تقطیر استریل به 12/5 میکرولیتر تنظیم شد. شرایط واکنش و چرخه‌های حرارتی اعمال شده برای تکثیر ناحیه ITS-rDNA و ژن *gpd* یک چرخه دمای 94 درجه سانتی-گرا د به مدت پنج دقیقه جهت واسرشت-سازی اولیه، 40 چرخه تکثیر شامل واسرشت‌سازی در دمای 94 درجه سانتی-گرا د به مدت 30 ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای 52 و 57 درجه سانتی-گرا د به مدت 30 ثانیه به ترتیب برای ناحیه ITS و *gpd* و بسط در 72 درجه سانتی-گرا د به مدت 60 ثانیه و بالاخره یک چرخه بسط نهایی به مدت هفت دقیقه در دمای 72 درجه سانتی-

⁵Tris acetate-EDTA

⁶FASTA

⁴ dimethylsulfoxide (DMSO)

های ریخت‌شناختی در جدول شماره 2 خلاصه شده است.

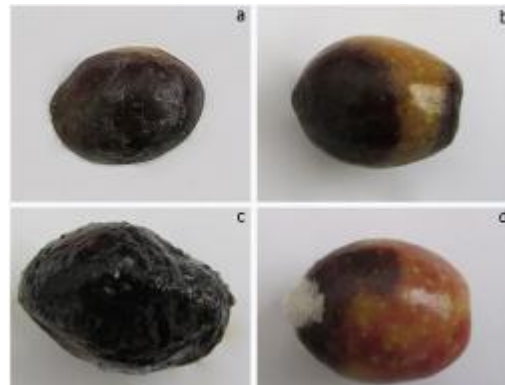
Alternaria alternata (Fries) Keissi. 1992. Beihefte Izum Botanischen Zentralblatt. 29: 433.

قطر پرگنه‌های هفت‌روزه بین چهار تا هشت سانتی-متر متغیر و حاشیه پرگنه‌ها صاف بود. ریشه‌ها در سطح و داخل محیط کشت توسعه پیدا کردند و در تعدادی از جدایه‌ها ریشه‌های هوایی قابل رویت بود. در اغلب جدایه‌ها تعداد چهار الی پنج دایره متحدالمرکز رویشی و کنیدی‌زایی مشخص پس از هفت روز ایجاد می‌شد. رنگ پرگنه از قهوه‌ای آجری تا خاکستری مایل به سبزی‌زیتونی متغیر بود. در برخی جدایه‌ها ترشح رنگ‌دانه توسط ریشه‌های غوطه‌ور در آگار به داخل محیط غذایی PCA مشهود بود. ریشه‌ها منشعب، نیمه‌شفاف، دارای دیواره عرضی و سطح آن‌ها صاف تا زگیل‌دار بود. قطر ریشه‌های غوطه‌ور در محیط کشت چهار تا نه میکرومتر و قطر ریشه‌های هوایی سه تا چهار میکرومتر بود. کنیدی‌برها ساده یا دارای یک انشعاب و یا یک یا چند خمیدگی زانو مانند، دارای سطح صاف و به‌طور کامل از ریشه‌های رویشی متمایز بودند. ابعاد کنیدی‌برها (5-)- 2-4 (3-)- \times (-89) 40-52 (25-)- میکرومتر بود. زنجیره کنیدی‌های بیضوی تا تخم‌مرغی روی کنیدی‌برها به-صورت منشعب ایجاد می‌شدند و دارای 20-25 کنیدی بودند. رنگ کنیدی‌ها قهوه‌ای تیره یا روشن و به اندازه (-16) 10-11/5 (6-)- \times (-39) 19/5-24/5 (-) 15 میکرومتر، 5-1 و گاهی شش دیواره عرضی، فاقد و یا دارای 1-4 دیواره طولی بودند. در بیشتر جدایه‌ها 1-2 کنیدی اول زنجیره حالتی کشیده داشتند. نوک کنیدیوم‌ها نیمه‌شفاف و بدون انشعاب و (-4/5) 3-4 (2-)- \times (-7) 2/5-5/5 (2-)- میکرومتر بود (شکل 3).

پیوست همسایه⁷ ترسیم و روابط خویشاوندی جدایه‌ها بررسی شد. جهت حصول اطمینان از گروه‌بندی ایجاد-شده، شاخص بوت استرپ⁸، با 1000 تکرار اعمال و ارزش عددی آن به‌صورت درصد در بالای گره‌ها ذکر گردید.

نتایج

درجات مختلفی از پوسیدگی و قهوه‌ای‌شدن در میوه‌های زیتون روی درخت‌ها در مناطق نمونه‌برداری شده مشاهده گردید (شکل 1). نتایج بررسی، نشان‌گر تنوع عوامل قارچی همراه با پوسیدگی میوه زیتون بود، طوری که در مجموع، 210 جدایه قارچی به عنوان عوامل همراه با میوه زیتون در این بررسی جداسازی و خالص-سازی شدند که در بین قارچ‌های جداسازی شده گونه *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. از فراوانی بالاتری برخوردار بود و در مجموع 77 جدایه (38 درصد) به این گونه تعلق داشتند (شکل 2).

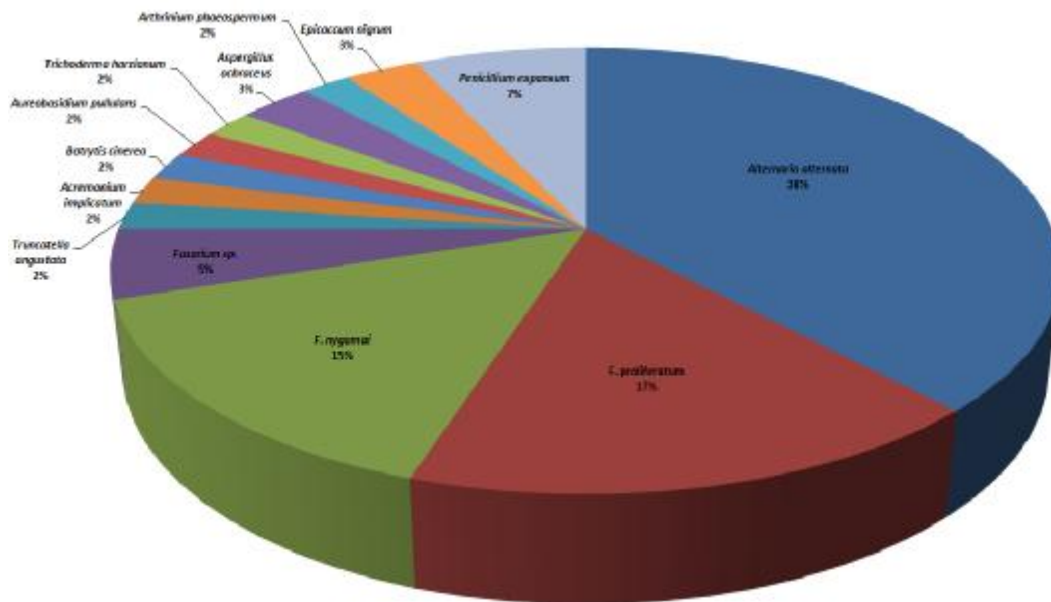


شکل 1- علائم پوسیدگی میوه ایجادشده توسط عوامل قارچی روی میوه‌های زیتون در شرایط طبیعی در باغات مناطق نمونه- برداری شده

ویژگی‌های ریخت‌شناختی گونه *A. alternata* به شرح زیر و در مورد سایر گونه‌های قارچی شناسایی شده ویژگی-

⁷Neighbor Joining

⁸Boot Strap



شکل 2- فراوانی (درصد) گروه‌های قارچی همراه با پوسیدگی میوه زیتون در استان زنجان



شکل 3- خصوصیات ریخت‌شناختی *Alternaria alternata*: a. پرگنه پنج‌روزه روی محیط سیب‌زمینی هویج آگار (PCA); b-e. کنیدیوفور، سلول‌های کنیدی‌زا و نحوه آرایش کنیدی‌ها روی سلول کنیدی‌زا، f: تراوه‌های ریشه روی محیط کشت PCA، مقیاس = 10 میکرومتر

جدول 2- خصوصیات ریخت‌شناختی عوامل قارچی همراه با پوسیدگی میوه زیتون در استان زنجان

نام جدایه قارچی	مشخصات پرگنه	مشخصات کنیدیوفور	کنیدی
<i>Penicillium expansum</i> Link 1809	مجتمع، کرک‌دار و سبزرنگ	ترور تیسلیت همراه با فیالید، رامی و متولا	تک‌سلولی، کروی و سبزرنگ
<i>Fusarium</i> sp.	سفید رنگ تا متمایل به صورتی	کنیدیوفورها شفاف و با سلول- های کنیدی‌زای فیالیدیک (مونوفیالید)	ماکروکنیدی‌ها 5-7 بندی و بدون میکروکنیدی و با کلامیدوسپوره‌های زنجیره‌ای
<i>F. proliferatum</i> (Matsush.) Nirenberg ex Gerlach & Nirenberg 1982	به رنگ بنفش و با میسلیم‌های هوایی فراوان	کنیدیوفورها شفاف و با سلول- های کنیدی‌زای فیالیدیک (مونو و پلی‌فیالید)	بدون ماکروکنیدی و کلامیدوسپور و تشکیل میکروکنیدی‌ها به صورت زنجیره- ای و یا در سرهای دروغین
<i>F. nygamai</i> Burgess & Trimboli	با میسلیم‌های متراکم و نمدی، به رنگ سفید و با رنگ‌دانه‌های صورتی	کنیدیوفورها شفاف و با سلول- های کنیدی‌زای فیالیدیک (مونو و پلی‌فیالید)	ماکروکنیدی‌ها 4-5 سلولی، میکروکنیدی‌ها در زنجیره‌های کوتاه و با کلامیدوسپوره‌های انتهایی تا زنجیره‌ای
<i>Epicoccum nigrum</i> (syn: <i>E.</i> <i>purpurascens</i> Ehrenb. 1818) Link 1815	نمدی، کرک‌دار و نارنجی‌رنگ	کوتاه، خوشه‌ای و تولید اسپوردوکیوم	کروی تا گلابی‌شکل و تیره
<i>Arthrimum phaeospermum</i> (Corda) M. B. Ellis 1965	سریع‌الرشد، سفیدرنگ و با میسلیم‌های هوایی فراوان	کاهش یافته، منشعب تا غیرمنشعب	تک‌سلولی، عدسی شکل و قهوه‌ای- رنگ
<i>Aspergillus ochraceus</i> K. Willh.	در کنارها سفید و در وسط زردرنگ	تولید وزیکول همراه با متولا و فیالید	تک‌سلولی کروی تا نیم‌کروی و زردرنگ
<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai 1969	سریع‌الرشد و ایجاد دوایر سبز و سفید	با انشعاب‌های فراهم، با سلول- های کنیدی‌زای فیالیدیک و آمپولی شکل	تک‌سلولی کروی تا تخم‌مرغی شکل
<i>Aureobasidium pullulans</i> (de Bary) G. Arnaud 1910	کندرشد و به حالت مخمری	کاهش یافته و شبیه دانه تسبیح	تک‌سلولی، بیضوی تا تخم‌مرغی
<i>Botrytis cinerea</i> Pers. 1794: Fr.	سریع‌الرشد، خاکستری‌رنگ و تولید میکرواسکرت در حاشیه پرگنه	منشعب با سلول‌های کنیدی‌زای پلی‌بلاستیک	تک‌سلولی، کروی تا تخم‌مرغی شکل
<i>Acremonium implicatum</i> (J. C. Gilman & E. V. Abbott) W. Gams	کندرشد، سفید تا صورتی‌رنگ	مفرد و ماکرونماتوس و همراه با فیالید	تک‌سلولی، استوانه‌ای تا هلالی شکل
<i>Truncatella angustata</i> (Pers.) S. Hughes	سفید تا قهوه‌ای‌رنگ، پنبه‌مانند و همراه با آسروول‌های سیاه‌رنگ در پرگنه	کنیدیوفور شفاف و با سلول‌های کنیدی‌زای آنلیدیک و استوانه‌ای شکل	دوکی شکل، با سه دیواره عرضی، سلول‌های میانی قهوه‌ای و سلول- های انتهایی و پایه نیمه‌شفاف، سلول‌های پایه بدون اپنیدیج

نتایج بررسی مولکولی

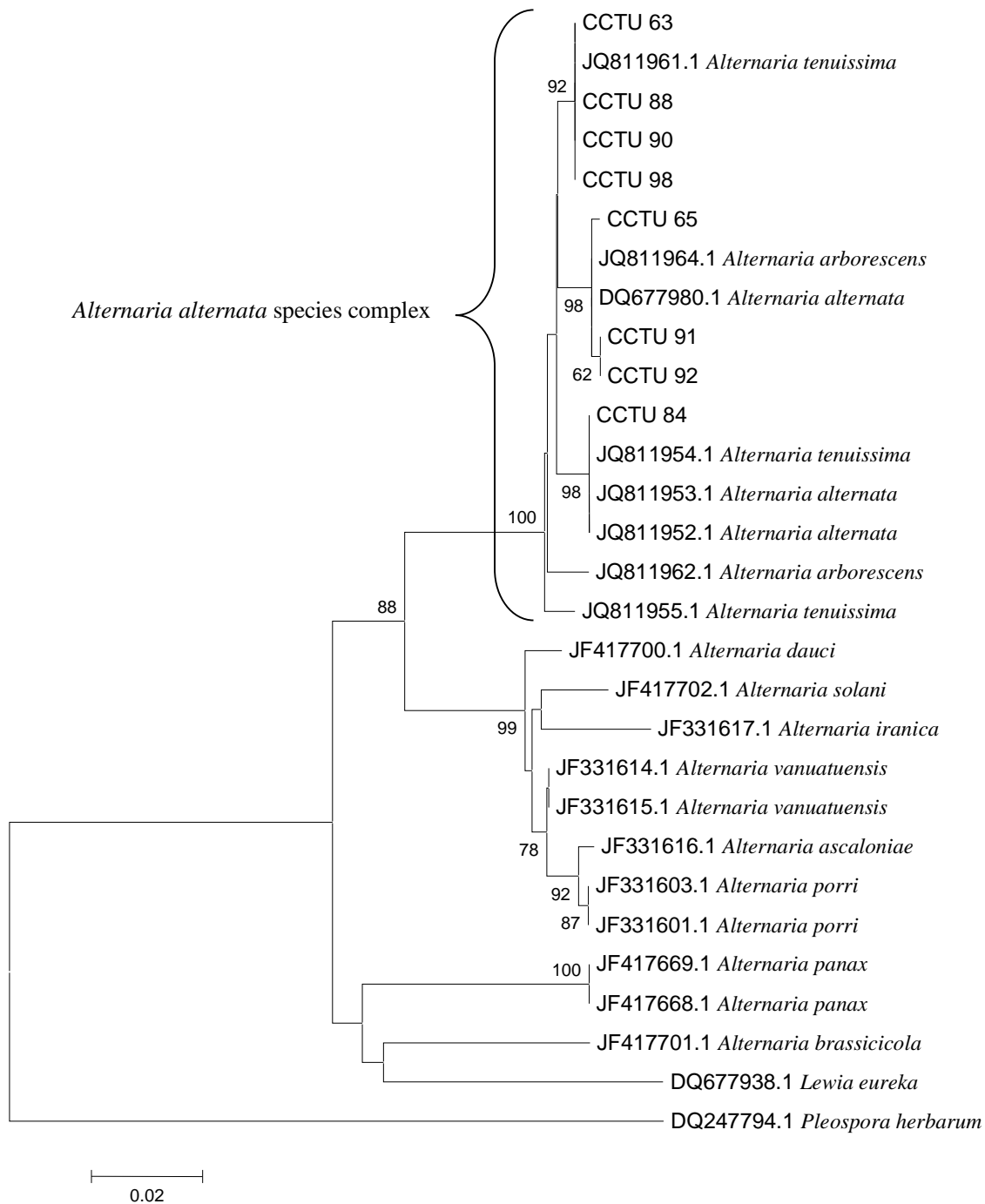
در مطالعه حاضر علاوه بر بررسی صفات ریخت-شناختی از تعیین توالی نوکلئوتیدی ناحیه ITS-rDNA و ژن‌های *gpd* و *rpb2* جدایه‌های منتخب و مقایسه آن با توالی‌های موجود در بانک ژن نیز برای تشخیص هویت جدایه‌ها استفاده شد. آغازگرهای ذکر شده در جدول 1 طی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس برای ناحیه ITS و ژن‌های *rpb2* و *gpd* به‌ترتیب قطعاتی را با طول تقریبی 570، 950 و 650 جفت‌باز تکثیر نمودند. نتایج حاصل از مقایسه توالی ناحیه ITS و ژن *gpd* جدایه‌های *Alternaria* مورد مطالعه در این تحقیق با توالی‌های موجود در بانک ژن نشان داد که توالی این دو ناحیه ژنومی قادر به تفکیک گونه‌های ریزاسپور *Alternaria* از هم‌دیگر نمی‌باشند (نتایج نشان داده نشده است). مقایسه توالی‌های نوکلئوتیدی ایجادشده برای ژن *rpb2* با توالی‌های موجود در بانک ژن نشان داد که تنوع قابل-توجهی در توالی این ناحیه بین جدایه‌های مورد بررسی در این تحقیق وجود دارد. نتایج حاصل از ترسیم درخت تبارزایی بر اساس توالی این ژن، جدایه‌های زیتون را در سه زیرخوشه در داخل خوشه مربوط به گروه گونه‌ای *Alternaria* با حمایت بوت استرب بالا گروه‌بندی نمود (شکل 4).

گونه‌های جنس فوزاریوم در مجموع با 77 جدایه و فراوانی 37 درصد در رده دوم قرار گرفتند (شکل 2). شناسایی جدایه‌های این جنس مطابق روش کار گِراخ و نیرنبرگ (1982) و لزی و سامرل (2006) صورت گرفت. در مجموع سه گونه شامل *Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg با فراوانی 17 درصد، *Fusarium nygamai* L.W. Burgess & Trimboli با فراوانی 15 درصد و *Fusarium* sp. با فراوانی پنج درصد از میوه‌های زیتون با علائم پوسیدگی جداسازی شد. هویت گونه‌های شناسایی‌شده با استفاده از داده‌های توالی نوکلئوتیدی ناحیه ITS تایید گردید. در توالی ناحیه ITS، جدایه‌های *Fusarium* sp. بیشترین شباهت

را با جدایه‌های ناشناخته فوزاریوم و جدایه‌های مرکب گونه‌ای *Fusarium equiseti-incarnatum* موجود در بانک ژن نشان دادند. مشخصات ریخت‌شناختی گونه‌ها در جدول شماره 2 ذکر شده است. دیگر گروه‌های قارچی جداسازی شده از میوه‌های زیتون با علائم پوسیدگی در این تحقیق *Aspergillus ochraceus* *Penicillium expansum* *Truncatella angustata* *Arthrinium* *Botrytis cinerea* *Aureobasidium pullulans* *Epicoccum nigrum* *Acremonium implicatum* و *Trichoderma harzianum* را شامل گردید که در مجموع 25 درصد جدایه‌های قارچی را به خود اختصاص دادند. مشخصات ریخت‌شناختی این گونه‌ها در جدول شماره 2 خلاصه شده‌اند. این گونه‌های قارچی اغلب به‌صورت پوده‌رست در خاک و یا همراه مواد گیاهی یافت می‌شوند. برخی گونه‌ها مانند *Botrytis cinerea* و *Truncatella angustata* به عنوان عوامل-بیماری‌زای گیاهی نیز شناخته شده‌اند. مقایسه داده‌های توالی نوکلئوتیدی ناحیه ITS جدایه‌های منتخب این گونه‌ها، نتایج داده‌های ریخت‌شناختی را تایید کرد.

بحث

در این بررسی گروه‌های قارچی متعددی از میوه-های زیتون با علائم پوسیدگی جداسازی شدند. گونه *A. alternata* با فراوانی 38 درصد به عنوان غالب‌ترین عامل قارچی همراه با پوسیدگی میوه زیتون در استان زنجان شناسایی شد. گونه‌های مختلفی از جنس *Alternaria* روی قسمت‌های مختلف درخت زیتون از جمله میوه به‌عنوان عامل پوسیدگی میوه از کشورهای مختلفی از جمله تونس، استرالیا (حمدی و همکاران 2011)، و در ایران از شهرستان‌های رودبار و گرگان گزارش شده‌اند (ارشاد 1388).



شکل 4- درخت تبارزایی ترسیم شده بر اساس توالی‌های نوکلئوتیدی ژن *rpb2* جدایه‌های آلترناریا به روش پیوست همسایه. مقیاس نشان دهنده 0/02 تغییر در اسیدهای نوکلئیک در ژن *rpb2* بین جدایه‌های مختلف می‌باشد. جدایه‌ها به پیشوند CCTU مربوط به این بررسی می‌باشند

های گونه *A. alternata* بوده و یا حدود بین گونه‌ای داخل این مجموعه را نشان می‌دهد، نیازمند مقایسه توالی جدایه‌های تیپ هر یک از گونه‌های ریزاسپور *Alternaria* است.

در این تحقیق جنس فوزاریوم با فراوانی 37 درصد و 77 جدایه، به‌عنوان دومین گروه قارچی غالب همراه با بیماری پوسیدگی زیتون در استان زنجان شناخته شد. گونه‌های این جنس به‌عنوان عوامل بیماری‌زا روی گیاهان، انسان و حیوانات مطرح می‌باشند. اعضای این جنس به‌صورت اندوفیت و یا عوامل بیماری‌زا تقریباً روی اعضای تمام تیره‌های گیاهی حضور دارند (لزلی و سامرل 2006). در تحقیق حاضر گونه‌های مختلفی از فوزاریوم شامل *F. proliferatum* با فراوانی 17 درصد، *F. nygamai* با فراوانی 15 درصد و *Fusarium sp.* با فراوانی پنج درصد از روی میوه‌های زیتون با علایم پوسیدگی میوه جداسازی شدند که دو گونه *F. proliferatum* و *F. nygamai* برای اولین بار از میوه زیتون در دنیا معرفی می‌شوند. هویت این دو گونه با استفاده از داده‌های توالی ناحیه ITS تایید گردید. جدایه‌های این دو گونه با توالی‌های موجود در بانک ژن 99 الی 100 درصد شباهت نشان دادند. در مورد جدایه‌های *Fusarium sp.* مقایسه توالی ناحیه ITS با توالی‌های موجود در بانک ژن بیشترین شباهت را با جدایه‌های ناشناخته فوزاریوم و مجموعه گونه‌ای *F. equesiti-incarnatum* نشان داد. شناسایی این جدایه‌ها در سطح گونه نیاز به استفاده از داده‌های توالی چندژنی دارد.

سایر گونه‌های قارچی که با فراوانی کمتر از میوه‌های زیتون با علایم پوسیدگی از باغات زیتون استان زنجان جداسازی شدند شامل *Penicillium ochraceous* *Aspergillus* *Arthriniun phaeospermum expansum* *Aureobasidium Truncatella angustata* *Acremonium Botrytis cinerea pullulans*

در ایران این قارچ از شاخه‌های دوساله زیتون با علایم شانکر جداسازی شده است (صانعی و رضوی 2012). با وجود این‌که آلترناریا به صورت رایج یکی از گروه‌های قارچی همراه با بیماری پوسیدگی میوه زیتون می‌باشد، تاکنون امکان آلودگی فرآورده‌های زیتون از قبیل کنسرو و روغن زیتون با زهرابه‌های این قارچ بررسی نشده است.

شناسایی گونه‌های جنس آلترناریا، مخصوصاً گونه‌های ریزاسپور این جنس، بر اساس داده‌های ریخت‌شناختی به راحتی امکان پذیر نمی‌باشد. در اصل این امر ناشی از تنوع قابل‌توجه موجود در شکل‌شناسی هر گونه و نیز در یک پرگنه واحد، همپوشانی صفات کنیدیوم در بین گونه‌های نزدیک به هم، وابستگی بسیار بالای صفات ریخت‌شناختی به شرایط محیطی (هنگ و همکاران 2006) و عدم ثبات در شکل و ابعاد کنیدیوم‌ها با گذشت زمان (سوبرس و دوپنیک 1972) بوده است. در دو دهه اخیر، نشان‌گرهای مولکولی به طور وسیعی در بیماری‌شناسی گیاهی استفاده شده‌اند (بنالی و همکاران 2011). در بررسی اخیر، از مقایسه توالی ناحیه ITS-rDNA و ژن‌های *gpd* و *rpb2* برای شناسایی و بررسی روابط خویشاوندی جدایه‌های *Alternaria* استفاده شد. تجزیه‌تحلیل توالی ITS و *gpd* جدایه‌های منتخب *Alternaria* یک گروه تک‌نیایی را ایجاد کرد. در مطالعه‌های پیشین نیز بررسی ترادف نوکلئوتیدی ناحیه ITS rDNA هسته‌ای، SSU rDNA میتوکندریایی (چو و یو 2000)، rDNA-LSU میتوکندریایی، بتاتوبولین، اکتین، کالمودولین، کیتین‌ستتاز، *gpd* *tef-a* و 1، 3، 8-تری هیدروکسی نفتالین ردوکتاز (پیور و همکاران 2004)، روابط خویشاوندی بین جدایه‌های ریزاسپور را آشکار نکرده است. تجزیه‌تحلیل روابط خویشاوندی بر اساس توالی ژن *rpb2* جدایه‌های زیتون را در سه زیرخوشه در داخل خوشه مربوط به گروه گونه‌ای آلترناتا با حمایت بوت‌استرب بالا گروه‌بندی نمود (شکل 4). این‌که تنوع ژنتیکی مشاهده‌شده مربوط به جمعیت-

گونه‌های *Aureobasidium* گونه *A. pullulans* از نظر تولید پولان و پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی و توانایی کنترل زیستی عوامل بیماری‌زای قارچی گیاهان مطرح است (سینگ و همکاران 2008، زالار و همکاران 2008). در طی این تحقیق گونه *A. pullulans* به‌عنوان عامل همراه پوسیدگی میوه از زیتون جداسازی و خالص‌سازی شد.

گونه‌های مختلف جنس *Botrytis* به‌خصوص گونه *B. cinerea* دارای گسترش جهانی هستند. در ایران این گروه از قارچ‌ها، در مکان‌های مرطوب و نیمه‌گرمسیری بر روی گونه‌های گیاهی خانواده پنیرک¹⁰ و دیگر گونه‌های گیاهی گزارش شده‌اند (ارشاد 1388). طی این بررسی گونه *B. cinerea* از روی میوه‌های آلوده زیتون با علایم پوسیدگی جداسازی و خالص‌سازی شد. جنس *Acremonium* شامل تعدادی از قارچ‌های آنامورفیک رشته‌ای با ساختارهای کنیدی‌زایی ساده است (سامرل و همکاران 2011). در ایران گونه‌های مختلف این جنس روی خانواده‌های مختلفی مثل ویتاسه¹¹ گزارش شده‌اند (ارشاد 1388). در این بررسی گونه *A. implicatum* از روی میوه‌های آلوده زیتون دارای علایم پوسیدگی جداسازی و خالص‌سازی شد.

گونه *Trichoderma harzianum* از بستره‌های مختلف از قبیل خاک‌های کشاورزی، جنگلی، ریزوسفر گیاهانی مثل سیب‌زمینی، چغندرقد، گندم و چمن و نیز از قارچ خوراکی *Agaricus bisporous* و اسکرت‌های *Athelia rolfsii* جداسازی شده است. این گونه اغلب به‌صورت عامل کنترل زیستی عوامل بیماری‌زای قارچی روی گیاهان گزارش شده است (دمش و همکاران 2007). در این تحقیق *T. harzianum* از روی میوه‌های آلوده زیتون با علایم پوسیدگی جداسازی گردید.

گونه *Epicoccum nigrum* دارای انتشار جهانی بوده و از خاک، هوا، حشرات، پوست، بزاق انسان و

Trichoderma و *Epicoccum nigrum implicatum* *harzianum* هستند. اعضای دو جنس *Aspergillus* و *Penicillium* کپک‌های رایج و همه‌جازی را شامل می‌شوند که اغلب توانایی رشد در محیط‌های کم‌آب و همچنین در محیط‌هایی با دمای بالا و پایین را دارا هستند (هوبراکن و همکاران 2011). اعضای این دو جنس کلونیزه‌کننده‌های رایج مواد گیاهی به‌شمار می‌روند و به‌واسطه تولید متابولیت‌های ثانویه سمی روی محصولات کشاورزی سلامت مصرف‌کنندگان را به خطر می‌اندازند (سامسون و همکاران 2010). در طی این تحقیق دو گونه *A. ochraceus* و *P. expansum* از میوه‌های زیتون با علایم پوسیدگی جداسازی شدند.

گونه‌های جنس *Arthrrium* از پراکنش جهانی برخوردار می‌باشند و بیشتر گونه‌های این جنس از بافت‌های گیاهی به‌خصوص اعضای خانواده گرمینه گزارش شده‌اند. در اروپا، گونه‌ای از این جنس از مناطق باتلاقی و همچنین با فراوانی کمتر از خاک جداسازی و خالص‌سازی شد (رامبلی و همکاران 2009). در ایران گونه‌های مختلف این جنس روی خانواده پواسه⁹ گزارش شده است (ارشاد 1388).

قارچ‌های *Pestalotioid* از جمله *Truncatella* به‌عنوان عوامل بیماری‌زا، اندوفیت و یا پوده‌رست روی میزبان‌های گیاهی مختلف مطرح می‌باشند (ارزنلو و همکاران 2012). گونه *T. angustata* برای اولین بار در دنیا و ایران به‌عنوان عامل پوسیدگی میوه از زیتون گزارش گردیده است (ارزنلو و همکاران 2012).

جنس *Aureobasidium* متعلق به مخمرهای سیاه می‌باشد. گونه‌های این جنس به شکل‌های مخمری و میسلیمی رشد می‌کنند و در بوم‌سامانه‌های مناطق مرطوب و استوایی از روی مواد مختلف از جمله بافت‌های گیاهی (اسلپکی و استرامر 2009)، به‌عنوان ساپروفیت، اندوفیت، بیمارگر گیاهان و بیمارگر انسان (اسلپکی و استرامر 2009) گزارش شده است. در بین

¹⁰ Malvaceae¹¹ Vitaceae⁹ Poaceae

عوامل پوسیدگی میوه زیتون و بررسی امکان آلودگی فراورده‌های زیتون به‌ویژه روغن زیتون با متابولیت‌های قارچی می‌باشد.

سیاس‌گذاری

نویسندگان مقاله مراتب قدردانی خود را از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تبریز به خاطر تامین بودجه لازم برای انجام این پژوهش ابراز می‌نمایند.

پارچه جدا شده است و اغلب پوده‌رست و گاهی میکوپارازیت می‌باشد. این گونه باعث آلودگی در پوست انسان نیز می‌گردد (دمش و همکاران 2007). در این بررسی گونه *Epicoccum nigrum* از روی میوه‌های آلوده زیتون با علایم پوسیدگی جداسازی گردید. نتایج تحقیق حاضر نقطه شروعی برای بررسی‌های بعدی درباره شناسایی عوامل قارچی دخیل در پوسیدگی میوه زیتون در مناطق دیگر، بررسی دامنه میزبانی این عوامل، ارزیابی میزان مقاومت ارقام زیتون در مقابل

منابع

- ارشاد ج، 1388. قارچ‌های ایران. ویراست سوم. انتشارات موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور.
- محمدی ح و وکیلی د، 1385. زیتون (کاشت، داشت، برداشت و فرآوری)، جلد 1، انتشارات ندای سبز شمال.
- Arzanlou M, Torbati M and Jafary H, 2012. Fruit rot of olive (*Olea europaea*) caused by *Truncatella angustata*. Plant Pathology & Quarantine 2: 117-123.
- Babbitt S, Gally M, Perez BA and Barreto D, 2002. First report of *Nectria haematococca* causing wilt of olive plants in Argentina. Plant Disease 86: 326.
- Benali S, Mohamed B, Eddine HJ and Neema C, 2011. Advances of molecular markers application in plant pathology research. European Journal of Scientific Research 50: 110-123.
- Cho HS and Yu SH, 2000. Three *Alternaria* species pathogenic to sunflower. The Plant Pathology Journal 16: 331-334.
- Crous PW, Gams W, Stalpers JA, Robert V and Stegehuis G, 2004. MycoBank: an online initiative to launch mycology into the 21st century. Studies in Mycology 50: 19-22.
- Dervis S, Mercado-Blanco J, Erten L, Valverde-Corredor A and Pérez-Artés E, 2010. Verticillium wilt of olive in Turkey: a survey on disease importance, pathogen diversity and susceptibility of relevant olive cultivars. European Journal of Plant Pathology 127: 287-301.
- Domsch KH, Gams W and Anderson TH, 2007. Compendium of soil fungi, IHW-Verlagsbuchhandlung.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2012. FAO statistical databases. Available at <http://www.fao.org/>. (Accessed on 12/7/2013).
- Gilbert H and Mifsud D, 2007. Pests and diseases associated with olive trees in the Maltese Islands (Central Mediterranean). The Central Mediterranean Naturalist 4: 142-161.
- Gerlach W and Nirenberg H I, 1982. The genus *Fusarium* – a pictorial atlas. Mitt Biol Bundesanst Land Forstwirtschaft Berlin Dahlem.
- Hamdi B-MN, Souli M, Ben Salem I, Selmi S and Romdhani ME, 2011. Screening of fungi implicated in the dieback of olive trees (*Olea europaea* L.) in Chebika's area. Research in Plant Biology 1: 33-38.
- Hong SG, Maccaroni M, Figuli PJ, Pryor BM and Belisario A, 2006. Polyphasic classification of *Alternaria* isolated from hazelnut and walnut fruit in Europe. Mycological Research 110: 1290-1300.
- Houbraken J and Samson RA, 2011. Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of Trichocomaceae into three families. Studies in Mycology 70: 1-51.
- Leslie JF and Summerell BA, 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell.
- Lopez-Escudero FJ and Mercado-Blanco J, 2011. Verticillium wilt of olive: a case study to implement an integrated strategy to control a soil-borne pathogen. Plant Soil 344: 1-50.

- Moller EM, Bahnweg G and Geiger HH, 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nuclear Acid Research* 20: 6115-6116.
- Moral J, De La Rosa R, Leon L, Barranco D, Michailides TJ and Trapero A, 2008. High susceptibility of olive cultivar FS-17 to *Alternaria alternata* in Southern Spain. *Plant Disease* 92: 1252.
- Moral J, Oliveira R and Trapero A, 2009. Elucidation of the disease cycle of olive anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum*. *Phytopathology* 99: 548-556.
- Noormohammadi Z, Hosseini-Mazinani M, Trujillo I, Rallo L, Belaj A and Sadeghizadeh M, 2007. Identification and classification of main Iranian olive cultivars using microsatellite markers. *HortScience* 42: 1545-1550.
- Patumi M, Terenziani S, Ridolfi M and Fontanazza G, 2003. Effect of fruit stoning on olive oil quality. *Jaocs* 80: 249-255.
- Peever TL, Su G, Carpenter-Boggs L and Timmer LW, 2004. Molecular systematics of citrus-associated *Alternaria* species. *Mycologia* 96: 119-134.
- Rambelli A, Venturella G and Ciccarone C, 2009. More dematiaceous hyphomycetes from *Pantelleria mediterranean* maquis litter. *Flora Mediterranea* 19: 81-113.
- Samson RA, Houbraken J, Thrane U, Frisvad JC and Andersen B, 2010. Food and indoor fungi. CBS Laboratory Manual Series 2, CBS-Fungal Biodiversity Centre, Utrecht.
- Sanei SJ and Razavi SE, 2012. Survey of olive fungal disease in north of Iran. *Annual Review & Research in Biology* 2: 27-36.
- Sergeeva V, Spooner-Hart R and Nair NG, 2008. First report of *Pseudocercospora cladosporioides* on olive (*Olea europaea* L.) berries in Australia. *Australian Plant Disease Notes* 3: 24.
- Simmons EG, 2007. *Alternaria: An identification manual*. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Center.
- Singh RS, Saini GK and Kennedy JF, 2008. Pullulan: microbial sources, production and applications. *Carbohydrate Polymers* 73: 515-531.
- Slepecky RA, and Starmer WT, 2009. Phenotypic plasticity in fungi: a review with observations on *Aureobasidium pullulans*. *Mycologia* 101: 823-832.
- Sobres EK and Douplik BJR, 1972. Stabilization of conidium morphology in cultures of *Alternaria longipes*. *Phytopathology* 63: 191-192.
- Summerbell RC, Gueidan C, Schroers HJ, de Hoog GS, Starink M, Arocha Rosete Y, Guarro J and Scott JA, 2011. *Acremonium* phylogenetic overview and revision of *Gliomastix*, *Sarocladium* and *Trichothecium*. *Studies in Mycology*. 68: 139-162.
- Sutton BC, 1980. The Coelomycetes. Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata. Commonwealth Mycological Institute, Kew.
- Zalar P, Gostinčar C, Hoog GS de, Uršič V, Sudhadham M and Gunde-Cimerman N, 2008. Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. *Studies in Mycology* 61: 21-38.

Morphological and Molecular Characterization of Fungal Species Associated with Olive Fruit Rot Disease in Zanjan Province, Iran

M Torbati¹, M Arzanlou^{2*}, H Jafary³ and A Babai-Ahari²

¹Former MSc Student, Dept of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

²Associate Professor and Professor, Dept of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

³Assistant Professor, Agricultural and Natural Resources Research Center of Zanjan Province, Iran

* Corresponding author: arzanlou@hotmail.com

Received: 17 March 2013

Accepted: 11 October 2013

Abstract

Fruit rots are among the most important diseases of olive in Zanjan province, Iran. Despite the incidence of the disease in the region, the fungal species involved in occurrence of the disease largely remain unknown. The aim of present study is to characterize fungal species associated with olive fruit rot in Zanjan province based on morphological and molecular data. For this purpose, olive fruit samples showing fruit rot symptoms were collected from olive orchards in Zanjan province, during the September and October 2011. Pure cultures were established using a single spore technique. Fungal isolates were identified using morphological characteristics as well as sequence data of ITS-rDNA region. The results revealed *Alternaria alternata* species complex as the dominant species amongst the fungal groups involved in olive fruit rot in this region with a frequency of 37 percent. The identity of *Alternaria* isolates were further analysed based on sequence data from the *rpb2* and *gpd* genes. The phylogeny inferred using sequence data from *rpb2* gene cultured olive isolates in *A. alternata* species complex clade. The other fungal species identified in this study include *Acremonium implicatum*, *Arthrinium phaeospermum*, *Aspergillus ochraceus*, *Aureobasidium pullulans*, *Botrytis cinerea*, *Epicoccum nigrum*, *Fusarium* sp., *F. nygamai*, *F. proliferatum*, *Penicillium expansum*, *Trichoderma harzianum* and *Truncatella angustata*. Most of the species represent new records for Iran. With the identification of fungal species associated with olive fruit rot, it will be possible to practice suitable management strategies for this disease.

Keywords: fruit rot, ITS-rDNA, phylogeny, *Alternaria*, *Fusarium*, *rpb2*