شناسایی گونه‌های *Monilinia* مرتبط با پوسیدگی قهوه‌ای درختان میوه‌ی هسته‌دار در استان آذربایجان‌غربی بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی و مولکولی

مریم لقوانی[۱]، مهدی ارزنلو*[۲] و اسدالله بابای اهری[۲]

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.

۲- به‌ترتیب دانشیار و استاد گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.

*نویسنده مسئول: arzanlou@tabrizu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۴/۵/۲۱ تاریخ پذیرش : ۹۴/۸/۱۳

چکیده

تحقیق حاضر با هدف شناسایی گونه‌های *Monilinia* دخیل در بیماری پوسیدگی قهوه‌ای میوه‌ی درختان میوه هسته‌دار در استان آذربایجان‌غربی انجام شد. بدین منظور طی سالهای ۹۳-۱۳۹۲ از درختان میوه‌ی هسته‌دار با علایم بیماری پوسیدگی قهوه‌ای نمونه‌برداری شد. شناسایی جدایه‌های بدست‌آمده بر مبنای ویژگی‌های ریخت‌شناختی پرگنه و ویژگی‌های کنیدیوم روی محیط‌های کشت PDA، MEA و CHA صورت گرفت. در طی این تحقیق ۸۹ جدایه *Monilinia* از درختان میوه‌ی هسته‌دار جداسازی گردید. براساس نتایج حاصل از مقایسه‌ی داده‌های ریخت‌شناختی و مقایسه آنها با مشخصات جدایه‌های مرجع سه گونه‌ی *M. laxa*، *M. fructigena* و *M. fructicola*، تمامی جدایه‌های بررسی شده در این تحقیق *M. laxa* شناسایی شدند. هویت جدایه‌ها بر اساس توالی ناحیه‌ی ITS-rDNA جدایه‌ی منتخب تایید گردید. در تبارنمای ترسیم شده براساس داده‌های توالی ناحیه‌ی ITS جدایه‌ی منتخب همراه با توالی‌های جدایه‌های گونه‌ی *M. laxa* در یک خوشه قرارگرفت. تلاش‌های انجام‌گرفته جهت القاء مرحله‌ی جنسی و تولید آپوتسیوم در شرایط آزمایشگاه ناموفق بود.

واژه‌های کلیدی: سوختگی شکوفه و سرشاخه، مومیایی، گل‌سرخیان.

مقدمه

بیماری پوسیدگی قهوه‌ای میوه، یکی از بیماری‌های شایع درختان میوه می‌باشد و با گسترش و پراکندگی وسیع موجب خسارت سنگین روی اعضای تیره گل-سرخیان مثل هسته‌دارها و دانه‌دارها می‌شود (بانون و همکاران ۲۰۰۸، پتروزسکی ۲۰۰۹). این بیماری در بیشتر کشورهای میوه‌خیز جهان که گلدهی درختان و رسیدن میوه‌ها توام با آب و هوای بارانی باشد، شیوع دارد (باترا ۱۹۹۱، شولبرگ و کاپل ۲۰۰۸، هروستیک و همکاران ۲۰۱۲).

گونه‌های جنس *Monilinia* با فرم‌غیرجنسی *Monilia*، به عنوان عوامل ایجاد کننده‌ی بیماری پوسیدگی قهوه‌ای درختان میوه می‌باشند (کوت و همکاران ۲۰۰٤، هولب ۲۰۰۷، بانون و همکاران ۲۰۰۸، هروستیک و همکاران ۲۰۱۲). گونه‌های این جنس عموما موجب سوختگی شکوفه، سوختگی سیخک و پوسیدگی قهوه‌ای میوه طی فصل رویش و در انبار می‌شوند (امیری و همکاران ۲۰۰۹، هینریش-برگر و مولر ۲۰۱۰، هروستیک و همکاران ۲۰۱۲). شکوفه‌ها به رنگ قهوه‌ای روشن، صمغ‌دار و به حالت چسبیده به ساقه نمایان می‌شوند (ریتشیه ۲۰۰۰). علایم آلودگی روی ساقه و سیخک‌های آلوده‌شده توسط قارچ به-صورت شانکرهای بیضی، قهوه‌ای و فرورفته توسعه پیدا می‌کند و در شرایط مرطوب از لکه‌های روی شاخه‌ها صمغ بیرون می‌آید که منبعی برای آلودگی

میوه‌ها است. میوه‌های آلوده به‌طور مشخص چروکیده و سیاه‌رنگ تا قهوه‌ای شده و در نهایت به حالت مومیایی درمی‌آیند. میوه‌های مومیایی شده یا روی زمین می‌افتند یا روی درخت به‌صورت آویزان باقی می‌مانند و منبع اصلی مایه آلوده‌کننده زمستان‌گذران می‌باشند (تاکامورا و اوچیای ۱۹۸۹، میچایلیدس و اسپاتس ۱۹۹۰، بانون و همکاران ۲۰۰۸). وقتی شرایط میکروکلیمایی نامساعد باشد، آلودگی اولیه می‌تواند به‌صورت نهان تا زمانیکه شرایط برای پیشرفت بیماری مساعد گردد، باقی بماند (گل و همکاران ۲۰۰۸).

مرحله‌ی جنسی قارچ به‌صورت ساختارهای فنجانی شکل و ساقه‌دار که آپوتسیوم نامیده می‌شود، در طبیعت دیده می‌شود. این ساختارها در میوه‌های مومیایی افتاده در زمین یا میوه‌هایی که تا حدی در خاک مدفون هستند، تشکیل می‌گردند و مقادیر فراوانی از مایه‌ی آلوده‌کننده اولیه را تولید می‌کنند (هولتز و ۱۹۹۸). با این وجود، چرخه‌ی جنسی برای تمامی گونه‌های این جنس گزارش نشده است و اهمیت مرحله‌ی جنسی در چرخه‌ی بیماری ناشناخته باقی مانده است.

چهار گونه *Monilinia fructigena* (Aderhold and Ruhland) Honey، *M. fructicola* (G. Winter) Honey، *M. laxa* (Aderhold and Ruhland) Honey و *M. polystroma* G. Leeuwen به عنوان عوامل اصلی دخیل در ایجاد بیماری پوسیدگی قهوه‌ای روی درختان میوه شناخته شده‌اند (ون لیوون و همکاران ۲۰۰۲، امیری و همکاران ۲۰۰۹، هینریش‌برگر و مولر ۲۰۱۰، هروستیک و همکاران ۲۰۱۲). هر چند برخی از گونه‌ها براساس مرحله‌ی غیرجنسی توصیف شده و فاقد مرحله‌ی جنسی شناخته‌شده می باشند، ولی براساس قوانین جدید نامگذاری قارچ‌ها، *Monilinia* به عنوان اسم معتبر برای گونه‌های این جنس پذیرفته شده است (جانستون و همکاران ۲۰۱٤).

M. laxa در اغلب مناطق اصلی تولید میوه‌های دانه‌دار و هسته‌دار باعث ایجاد خسارت می شود و از گونه‌های رایج در اروپا و افریقای‌شمالی می باشد (لین ۲۰۰۲، ماری و همکاران ۲۰۱۲). محققان این گونه را اولین شکل اجدادی قارچ مولد پوسیدگی قهوه‌ای می‌دانند که موجب سوختگی سیخک و شکوفه در اجداد وحشی محصولات میوه‌ای در خاور دور می‌شود (ون لیوون و همکاران ۲۰۰۲). تنها گزارش موثق از وقوع گونه *M. laxa* در ایران مربوط به هاشمی بابا حیدری و همکاران (۱۳۸٦) روی گیلاس، آلو و هلو در استان گیلان می‌باشد. گونه *M. fructigena* پاتوژن اصلی میوه بوده و خسارت معنی‌داری در درختان دانه‌دار (سیب و گلابی در اروپا) و هسته‌دار ایجاد می‌کند (باترا ۱۹۹۱). این گونه برای اولین‌بار از اروپا گزارش شده است و درحال حاضر علاوه بر اروپا از آسیا، آفریقای شمالی و برخی قسمت‌های آمریکای جنوبی گزارش شده است و یک بیمارگر قرنطینه‌ای در آمریکای شمالی و استرالیا به‌حساب می‌آید (باترا ۱۹۹۱، بانون و همکاران ۲۰۰۸، شو و رابینسون ۲۰۰۰، هروستیک و مولر ۲۰۱۲). در ایران گونه‌ی *M. fructigena* از روی به، گلابی، ازگیل ژاپنی و ازگیل گزارش شده است (هاشمی بابا حیدری و همکاران ۱۳۸٦، ارشاد ۱۳۸۸). گونه‌ی *M. fructicola* پاتوژن شکوفه، سیخک و میوه می‌باشد و در درختان میوه‌ی هسته‌دار مخصوصا هلو و شلیل خسارت اقتصادی وارد می‌کند (اوگاوا و انگلیش ۱۹٦۰، ۲۰۰۰، هینریش-برگر و همکاران ۲۰۱۰، هروستیک و همکاران، ۲۰۱۲). این گونه به‌عنوان عامل پوسیدگی قهوه‌ای انگور از ژاپن گزارش شده است (ویساراتانونت و همکاران ۱۹۸۸). *M. fructicola* پاتوژن قرنطینه‌ای در کشورهای اروپایی و همچنین ایران به‌شمار می‌رود (او ای پی پی ۲۰۰۹)، اما اخیرا از باغات هلو در جنوب فرانسه و ایتالیا گزارش شده‌است (پیلیگرینو و همکاران ۲۰۰۹). گونه‌ی *M. polystroma* تحت عنوان عامل پوسیدگی قهوه‌ای آسیایی درختان میوه مطرح می‌باشد. این گونه برای اولین از روی سیب در ژاپن (ون لیوون و همکاران ۲۰۰۲) گزارش شد. این گونه از مجارستان (پتروزسکی ۲۰۰۹،

پتروزسکی و پالکوویک ۲۰۰۹) و اخیرا از چین (ژو و همکاران ۲۰۱۰) گزارش شده است. این گونه قبلا تحت عنوان جدایه ژاپنی *M. fructigena* شناخته می‌شد ولی براساس داده‌های مولکولی به عنوان یک گونه‌ی جدید معرفی گردید (ون لیوون و همکاران ۲۰۰۲). گزارشی مبنی بر وقوع این گونه در ایران وجود ندارد.

شناسایی گونه‌های *Monilinia* دخیل در ایجاد بیماری پوسیدگی قهوه‌ای روی درختان میوه براساس ترکیبی از داده‌های ریخت‌شناختی مرحله‌ی غیرجنسی از قبیل ویژگی‌های کشت شامل نرخ رشد پرگنه، رنگ پرگنه، شدت اسپورزایی و الگوی رشد پرگنه و ویژگی-های کنیدیوم شامل طول و تعداد لوله تندش، فاصله نخستین انشعاب از کنیدیوم صورت می‌گیرد (ون لیوون و همکاران ۲۰۰۲). با توجه به هم‌پوشانی صفات ریخت‌شناختی بین چهار گونه، بررسی صفات ریخت-شناختی مطابق شرایط استاندارد توصیه شده، جهت شناسایی صحیح گونه ها ضروری می‌باشد. با این وجود شناسایی *M. polystroma* از گونه‌ی *M. fructigena* با اتکا به داده‌های ریخت‌شناختی به تنهایی مقدور نمی‌باشد و استفاده از داده‌های مولکولی برای تفکیک این دو گونه ضروری می‌باشد (ون لیوون و همکاران ۲۰۰۲).

علیرغم اهمیت بیماری پوسیدگی قهوه‌ای در مناطق کشت و پرورش درختان میوه‌ی هسته‌دار و دانه‌دار در ایران، تحقیقات محدودی در زمینه شناسایی گونه‌های *Monilinia* دخیل در بیماری صورت گرفته است. تحقیق حاضر با هدف شناسایی گونه‌های *Monilinia* دخیل در بیماری پوسیدگی قهوه‌ای میوه در باغات درختان میوه‌ی هسته‌دار استان آذربایجان‌غربی، به-عنوان یکی از قطب‌های مهم محصولات باغی در ایران، بر اساس ترکیبی از مشخصات ریخت‌شناختی و داده-های توالی ناحیه ITS-rDNA انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و جداسازی عامل بیماری

نمونه‌برداری در زمان‌های مختلفی از اوایل بهار تا اوایل پاییز از شکوفه‌ها و سرشاخه‌های دارای علایم سوختگی، میوه‌های مومیایی‌شده روی درخت و پای درخت در درختان هسته‌دار در باغات استان آذربایجان‌غربی طی سالهای ۹۳ –۹۲ انجام گرفت. نمونه‌ها تا زمان جداسازی عوامل قارچی در یخچال با دمای چهار درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند. جهت جداسازی عوامل قارچی، اسپورها یا به‌طور مستقیم از روی اسپوردوکیوم‌های تشکیل شده روی سطح میوه-ها و اندام‌های آلوده به‌وسیله‌ی سوزن سترون در زیر استریومیکروسکوپ (مدل نیکون SMZ 1000) برداشته شده و در تشتک‌های پتری حاوی محیط غذایی PDA کشت گردید، و یا زیر هود میکروبیولوژیکی بوسیله چاقوی سترون قطعاتی به‌طول سه الی چهار سانتیمتر از فاصله‌ی بین بافت سالم و آلوده مواد گیاهی برداشته‌شد، پس از گندزدایی سطحی به‌مدت یک دقیقه در الکل ۷۰٪ و سپس به‌مدت دو دقیقه در هیپوکلریت سدیم یک درصد (مایع تجاری سفیدکننده پنج درصد) و سپس سه بار شستشو با آب مقطر سترون، با کاغذ صافی سترون خشک گردیدند (هاشمی باباحیدری و همکاران ۱۳۸۶). قطعات گیاهی روی محیط سیب‌زمینی دکستروز آگار (PDA) و یا عصاره‌ی مالت آگار (MEA: Merck, Hamburg, Germany) کشت گردیدند. تشتک‌های پتری در دمای ۱±۲۲ درجه‌ی سلسیوس درون انکوباتور در شرایط تاریکی نگهداری و روزانه بررسی شدند. نمونه‌های رشد کرده به محیط کشت جدید انتقال داده‌شد و به‌مدت ۵–۳ روز در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند.

شناسایی ریخت‌شناختی جدایه‌ها

بوسیله‌ی چوب‌پنبه‌بر سترون قطعاتی از حاشیه‌ی پرگنه هفت روزه بریده و در مرکز محیط کشت جدید PDA ومحیط کشت CHA حاوی ۲۰۰ میلی‌لیتر عصاره‌ی گیلاس (یک کیلوگرم گیلاس در یک لیتر آب)، ۱۵ گرم آگار و ۸۰۰ میلی‌لیتر آب (ون‌لیوون و همکاران

۲۰۰۲) قرار داده‌شد. سه تکرار برای هر جدایه درنظر گرفته شد. تشتک‌های پتری در شرایط تاریکی/ روشنایی (۱۲: ۱۲ ساعت) و در دمای ۲۳درجه‌ی سلسیوس نگهداری و روزانه بررسی شدند. ویژگی-های ریخت‌شناختی قارچ شامل رنگ (راینر ۱۹۷۰)، شکل، نرخ رشد و لوب‌دار بودن و یا نبودن حاشیه بعد از ۱۳ روز ثبت و با نمونه‌های استاندارد مقایسه شد. جهت اندازه‌گیری ویژگی‌های لوله تندش کنیدی‌ها (طول و تعداد لوله تندش و فاصله‌ی نخستین انشعاب از کنیدیوم)، سوسپانسیون اسپور تهیه گردید. اندازه‌ی کنیدی براساس کشت‌های خالص و همچنین کنیدی‌های تشکیل شده روی میوه‌های تلقیح شده محاسبه گردید (ون لیوون و همکاران، ۲۰۰۲). برای این منظور حدود هشت الی ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر حاوی سه قطره توئین ۲۰ به تشتک پتری چهار الی ۱۰ روزه اضافه گردید و اسپورها از سطح پرگنه بوسیله‌ی اسکالپل سترون با خراش‌دادن برداشته شدند. سوسپانسون بدست‌آمده، روی شیکر با ۱۵۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۳۰ ثانیه قرار داده شد. برای حذف میسلیوم‌های قارچی، سوسپانسیون از دولایه پشم‌شیشه عبور داده شد. تعداد کنیدی در هر میلی‌لیتر با استفاده از لام هماسیتومتر اندازه‌گیری شد. تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت با سوسپانسیون قارچی با غلظت مشخص مایه‌زنی شدند و به‌مدت ۱۸ ساعت در دمای۲۲ درجه‌ی سلسیوس در تاریکی نگهداری شدند. ویژگی‌های ریخت‌شناختی لوله‌ی تندش ۲۵ کنیدی از هر تشتک پتری اندازه‌گیری شد (ون لیوون و همکاران ۲۰۰۲).

شناسایی مولکولی

استخراج DNA جهت تکثیر ناحیه‌ی ITS-rDNA

به منظور تایید هویت گونه‌ی شناسایی‌شده براساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی، DNA جدایه‌ی منتخب با استفاده از روش مولر و همکاران (۱۹۹۰) استخراج گردید. ناحیه‌ی ITS-rDNA (شامل ITS1+5.8s +ITS2) با استفاده از آغازگرهای ITS1 و ITS4 (وایت و همکاران ۱۹۹۰) تکثیر شد. مخلوط واکنش حاوی ۱۵-۱۰ نانوگرم DNA، ۱/۲۵ میکرولیتر بافر واکنش 10X، ۱/۵ میلی‌مول کلرید منیزیم، ۲/. میلی‌مولار از هر یک از dNTPها، پنج پیکومول از هر یک از آغازگرها، ۵/. واحد آنزیم DNA پلی‌مراز بود. حجم واکنش با استفاده از آب مقطر دوبار سترون به ۱۲/۵ میکرولیتر رسانده‌شد. تکثیر ناحیه‌ی ITS-rDNA با اعمال چرخه‌های حرارتی با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Bio RAD– Mj Mini به‌قرار زیر انجام شد: یک چرخه دمایی ۹۵ درجه‌ی سلسیوس به مدت سه دقیقه جهت واسرشت‌سازی اولیه، ۳٦ چرخه تکثیر، شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹٤ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ۵۸ درجه‌ی سلسیوس به مدت ٤٥ ثانیه، بسط در ۷۲ درجه‌ی سلسیوس به مدت ٦۰ ثانیه و در نهایت یک چرخه بسط نهایی به مدت هفت دقیقه در دمای ۷۲ درجه‌ی سلسیوس. فرآورده‌های واکنش روی ژل آگارز یک درصد حاوی ۱/. میکروگرم بر میلی‌گرم اتیدیوم-بروماید در بافر 1X TAE توسط دستگاه عکس‌برداری از ژل (Gel documentation) تحت نور ماورا بنفش (طول موج ۳۱۲ نانومتر) مشاهده و بررسی شدند.

واکنش ترادف‌یابی نوکلئوتیدی بوسیله کیت تجارتی بیگ‌دای BigDye ® Terminator V301 Cycle Sequencing kit ساخت کارخانه Applied Biosystems کالیفرنیا (آمریکا) و مطابق دستورالعمل کارخانه صورت‌گرفت. تجزیه تحلیل نتایج با استفاده از دستگاه3700 ABI persim.® انجام شد. توالی نوکلئوتیدی با نرم‌افزار SeqMan (Lasergene package, DNAstar, Madison, USA) بررسی و ویرایش شد و با استفاده از نرم افزار بلاست (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) با توالی‌های موجود در بانک ژن مقایسه و توالی‌های با درصد همولوژی بالا از بانک ژن (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) دریافت گردیدند. هم‌ردیف‌سازی توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار MEGA-6 انجام شد (تامورا و همکاران ۲۰۱۳). درخت فیلوژنتیک نیز با نرم‌افزار MEGA6 و ترسیم درخت

فیلوژنتیکی به روش Neighbour-Joining و آزمون اعتبار سنجی به روش بوت استرپ با ۱۰۰۰ تکرار انجام‌شد (تامورا و همکاران ۲۰۱۳).

تلاش برای القاء تولید آپوتسیوم

طی ماه‌های اردیبهشت، تیر و مهر سال ۱۳۹۲ و خرداد سال ۱۳۹۳ از باغ‌های بخش‌های مرکزی استان آذربایجان‌غربی بازدید به‌عمل آمد و میوه‌های مومیایی شده در سطح خاک و نیمه‌مدفون در سایه انداز درختان میوه‌ی هسته‌دار با هدف مشاهده آپوتسیوم-های تولیدشده، بررسی شدند. در شرایط آزمایشگاه، میوه‌های مومیایی و استرومایی‌شده در داخل گلدان-های (به قطر دهانه‌ی ۲٤ سانتی‌متر) حاوی خاک در عمق یک تا چهار سانتی‌متری خاک قرار داده شدند. آزمایش با دو میوه مومیایی‌شده در دو عمق مختلف در هر گلدان و در سه تکرار انجام گرفت. گلدان‌ها به-مدت بیش از هشت هفته در دمای چهار درجه‌ی سلسیوس و رطوبت نسبی بالای ۹۷٪ و پس از آن به-مدت سه هفته در دمای ۲۵–۲۰ درجه‌ی سلسیوس با شرایط تاریکی/ روشنایی (۱۲: ۱۲ ساعت) نگهداری شده و تولید آپوتسیوم بررسی گردید (هولتز و همکاران ۱۹۹۸).

نتایج

در طی بازدید از باغات میوه در استان آذربایجان-غربی مشخص گردید که علایم بیماری پوسیدگی قهوه‌ای در اکثر باغات این استان روی درختان میوه هسته‌دار وجود دارد. شیوع این بیماری در باغات فاقد مراقبت نسبت به باغات تحت مراقبت بیشتر بود. علایم بیماری عموما بصورت سوختگی شکوفه و سیخک بود و شکوفه‌های سوخته، به رنگ قهوه‌ای روشن و صمغ-دار به ساقه چسبیده بودند. علایم روی شاخه‌ها به-صورت شانکرهای بیضی، قهوه‌ای و فرورفته بود و به شاخه‌های جوان محدود شده بودند (شکل ۱). شانکرهایی که دورتادور ساقه بودند، ساقه را از بین برده و رنگ برگها قهوه‌ای روشن شده‌بودند. میوه‌های آلوده به‌طور مشخص چروکیده، سیاه تا قهوه‌ای رنگ و مومیایی شده و بر روی زمین افتاده یا روی درخت مانده بودند.

شکل ۱- علایم بیماری *M. laxa* در باغات درختان میوه هسته‌دار: A- سوختگی شکوفه در زردآلو، B- شانکر روی شاخه آلبالو همراه با ترشح صمغ، C- سوختگی سرشاخه در آلبالو، D- میوه‌های آلوده درخت زردآلو، F و E- میوه‌های آلوده آلبالو.

در مجموع از ۱۱۱ نمونه‌ی جمع‌آوری شده، تعداد ۸۹ جدایه قارچی مشابه با قارچ *Monilinia* بر اساس مشخصات ریخت‌شناختی خالص‌سازی شد. دیگر گروه‌های قارچی جداسازی شده *Aspergillus*، *Penicillium*، *Wilsonomyces*، *Tricothecium*،

Alternaria و *Fusarium* را شامل می شدند که شناسایی آنها در سطح جنس صورت پذیرفت.

با استفاده از ترکیب اطلاعات ریخت‌شناختی و ویژگی‌های مربوط به کشت و مقایسه آنها با ویژگی-های جدایه‌های مرجع سه گونه‌ی *M. laxa*، *M. fructigena* و *M. fructicola*، تمامی جدایه‌های *Monilinia* بررسی شده در این تحقیق به گونه‌ی *M. laxa* تعلق داشتند.

***Monilinia laxa* (Aderhold and Ruhland) Honey 1936**

میانگین رشد قطری پرگنه روی محیط‌های مختلف در دمای ۱±۲۳ درجه‌ی سلسیوس در دو شرایط تاریکی و تناوب تاریکی/ روشنایی (۱۲:۱۲ ساعت) زیر نور ماوراءبنفش نزدیک[1] (nUV) به‌ترتیب برابر ۵/۹ و ۶/۰۱ بود (جدول ۱). پرگنه‌ها در محیط PDA لوب‌دار گاهی با لوب‌های بسیار عمیق، لایه‌های میسلیومی از سطح بالایی پتری به‌صورت طبقه‌طبقه (روزته) و در برخی جدایه‌ها به شکل گل رز مشاهده شد (شکل ۲). برخی جدایه‌ها دارای قوس‌های قهوه‌ای یا سیاه بریده بریده بودند که از پشت تشتک پتری به‌خوبی قابل مشاهده بود. در برخی جدایه‌ها در سطح پایینی تشتک پتری هلال‌ها یا دوایر سیاه‌رنگی به حالت طبقه‌طبقه مشاهده شد (شکل۳). رنگ بافت اسپورزایی در شرایط تاریکی، خاکستری تا قهوه‌ای روشن و در شرایط تاریکی/روشنایی خاکستری، قهوه‌ای – زیتونی روشن تا فندقی بود. در شرایط تاریکی/ روشنایی بافت استرومایی به‌صورت نقاط سفید – خاکستری روی پرگنه قارچی مشاهده شد (شکل ٤). براساس مقایسه ویژگی‌های ریخت شناختی جدایه‌های بررسی شده در این تحقیق با نمونه‌های استاندارد (شکل ۵)، جدایه‌های بررسی شده در این تحقیق گونه‌ی *M. laxa* شناسایی گردیدند (شکل ۲).

مشخصات میکروسکوپی (کنیدی، کنیدیوفور، لوله تندش): کنیدی‌ها بلاستیک، شیزولیتیک، بیضی، تخم-مرغی، مستطیلی یا لیمویی‌شکل اغلب با انتهای کوتاه بودند. دیواره‌ی کنیدی‌ها نازک و شفاف وگاهی اوقات آرتریک، بصورت زنجیری (آکروپتال) (شکل ٦). رنگ بافت اسپورزایی روی میوه‌های آلوده خاکستری تا فندقی بود (شکل ۱). میانگین اندازه‌ی کنیدی‌های بدست‌آمده از محیط کشت در شرایط تاریکی/ روشنایی و دمای ۱±۲۳ درجه‌ی سلسیوس ۱٦/۵ – ۷/۵ میکرومتر، اندازه کنیدی روی ساختارهای تشکیل شده روی میوه‌های آلوده ۱۷ – ۱۰/۵میکرومتر، کنیدیوفور منشعب، شفاف، سلول کنیدی‌زا مونوبلاستیک یا سیمپودیال، شفاف، طول لوله تندش در این جدایه‌ها ۱٦۳/۵میکرومتر، فاصله اولین انشعاب تا کنیدیوم ٦۳/۵ میکرومتر و تعداد لوله تندش در هر کنیدیوم یک به‌ندرت دو عدد بودند (شکل ٦). حالت‌هایی از میکروکنیدی (اسپرماسی فیالیدیک) مشاهده نگردید.

شناسایی مولکولی جدایه‌ها

در تبارنمای ترسیم شده جدایه بررسی شده در این تحقیق به‌همراه دیگر توالی‌های مربوط به گونه‌ی *M. laxa* دریافت شده از بانک ژن در یک کلاد قرارگرفت (شکل ۹). توالی‌های سه گونه‌ی دیگر در سه کلاد مجزا قرار گرفتند. بنابراین هویت جدایه‌های *Monilinia*که در این تحقیق بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی، *M. laxa* شناسایی شده بودند، براساس داده های مولکولی نیز تایید گردید.

تولید آپوتسیوم در شرایط طبیعی و آزمایشگاهی

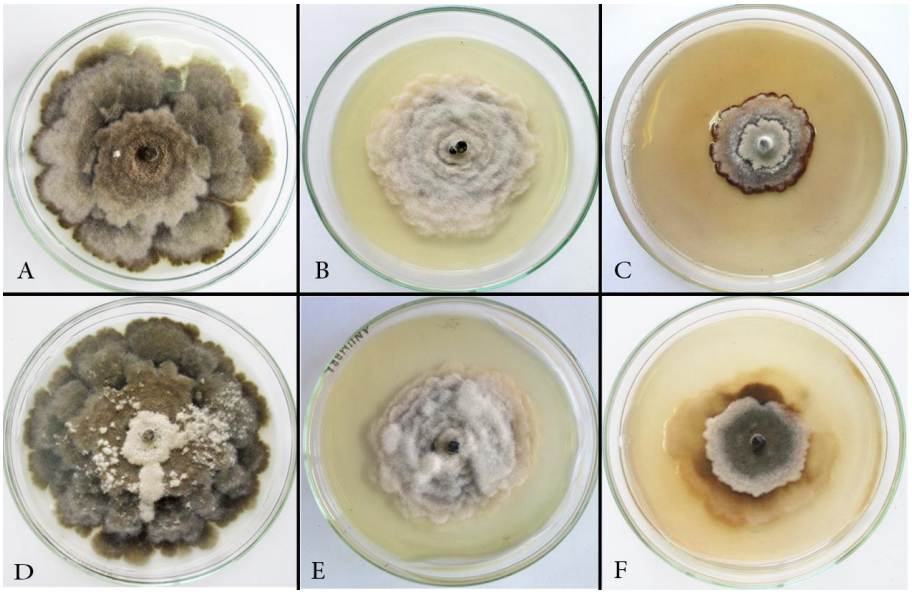
در این تحقیق با بررسی‌های به‌عمل‌آمده در شرایط طبیعی باغ و شرایط آزمایشگاهی تولید آپوتسیوم *M. laxa* مشاهده نگردید. اغلب میوه‌های واقع در سطح باغ و نیمه‌مدفون در نتیجه‌ی رشد عوامل ساپروفیت به‌طور کامل پوسیده شده بودند و فقط هسته‌ی میوه قابل مشاهده بود. نگهداری میوه‌های مومیایی شده در داخل

[1]Near Ultra Violet

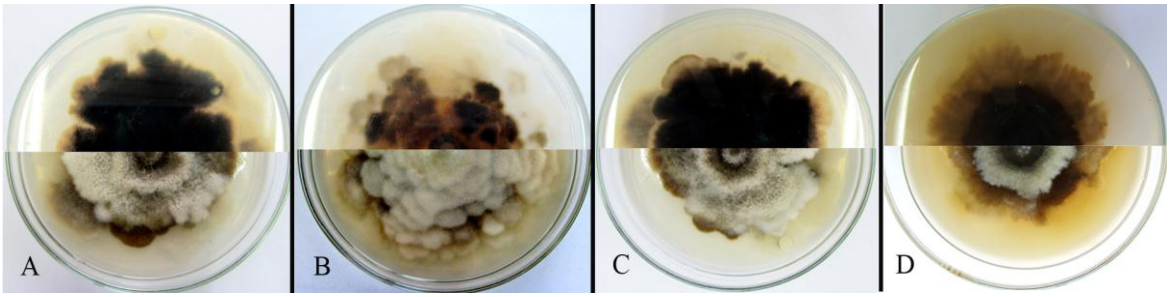
گلدان‌های حاوی خاک منجر به تشکیل آپوتسیوم نگردید. در شرایط آزمایشگاهی نیز بدلیل حمله‌ی عوامل ثانویه، میوه‌های مدفون‌شده در خاک دچار پوسیدگی شده و بافت میوه متلاشی گردیده‌بودند.

جدول ۱- میانگین رشد قطری پرگنه‌های قارچ *M. laxa* ۱۳ روز پس از نگهداری در شرایط فیزیولوژیکی مختلف (برحسب سانتی‌متر).

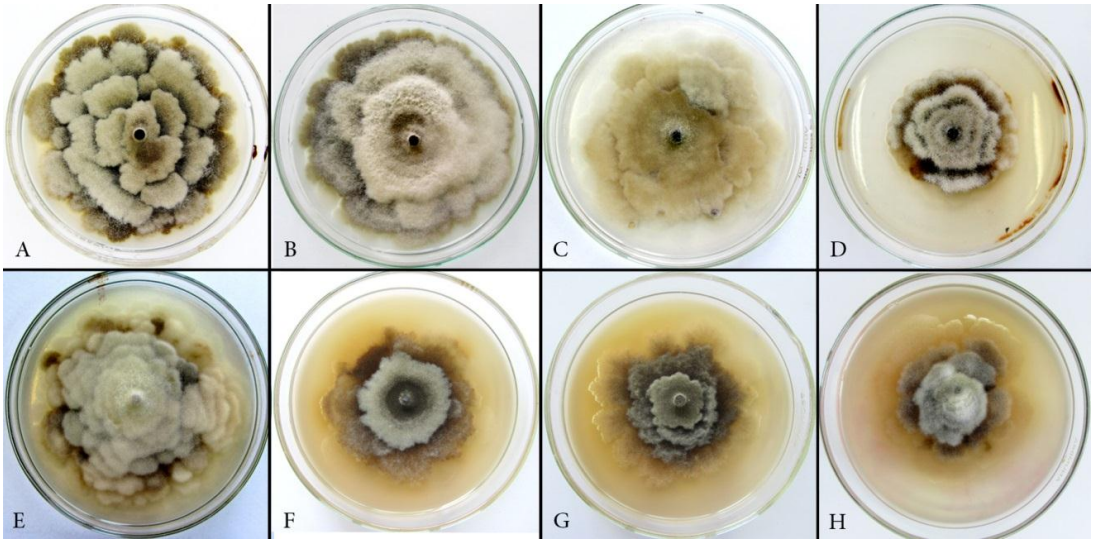
میانگین رشد قطری پرگنه در تناوب ۱۲ ساعت تاریکی/روشنایی زیر nUV			میانگین رشد قطری پرگنه در شرایط تاریکی		
محیط کشت‌های مورد استفاده			محیط کشت‌های مورد استفاده		
PDA	CHA	MEA	PDA	CHA	MEA
٦/٣٩	٥/٦	٦/٠٥	٦/٤	٦	٥/٣



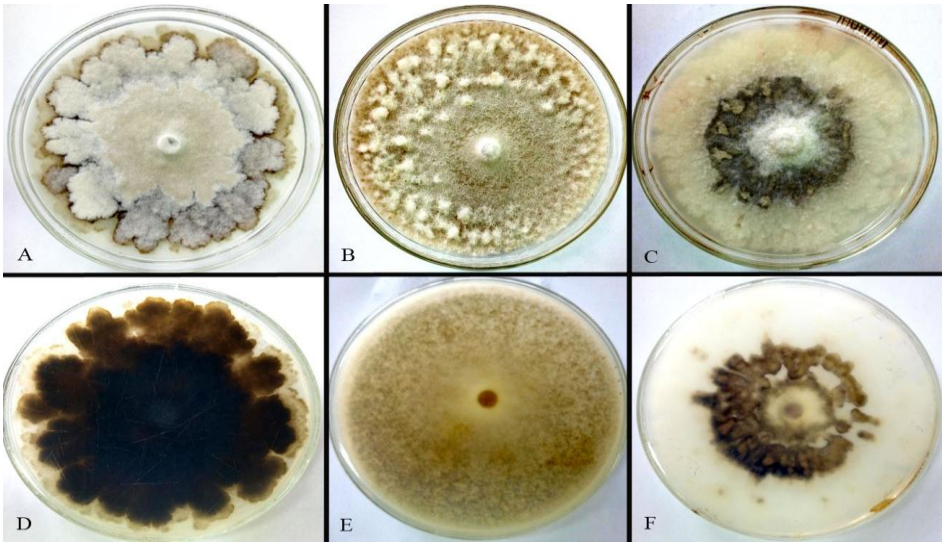
شکل ۲- ریخت‌شناختی پرگنه *M. laxa* در سه نوع محیط کشت PDA (A و D)، CHA (B و E) و MEA (C و F) در دمای ۱±۲۳ درجه‌ی سلسیوس و زیر نور nUV پس از ۱۳ روز. در شکل D نیز تشکیل استروما نشان داده شده است.



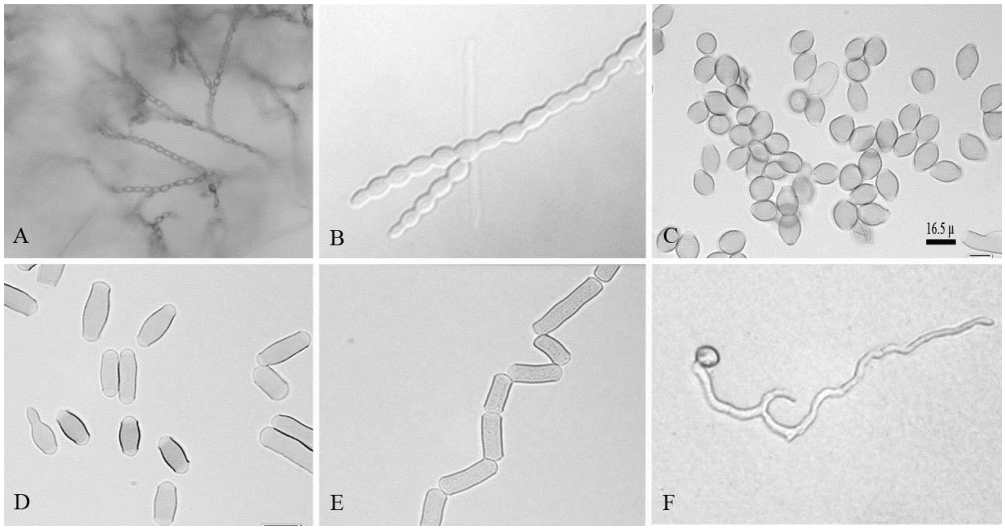
شکل ۳- ریخت‌شناختی پرگنه *M. laxa* از سطح رویی و پشتی پرگنه (به ترتیب نیمه‌های بالایی و پایینی هر شکل) در محیط کشت PDA در دمای ۱±۲۳ درجه‌ی سلسیوس و زیر nUV بعد از۱۳ روز جهت بررسی ویژگی طبقه‌طبقه بودن پرگنه.



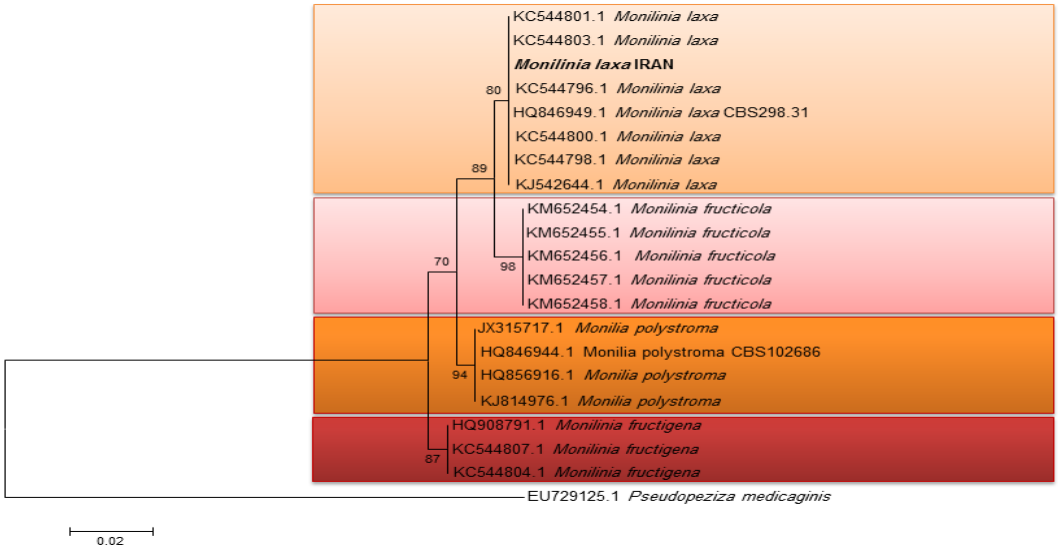
شکل ٤- تنوع ریخت‌شناختی پرگنه *M. laxa* در سه نوع محیط کشت PDA (A، B و C)، MEA (D و E) و CHA (F، G و H) در دمای ۱±۲۳ درجه‌ی سلسیوس و در تاریکی بعد از ۱۳ روز.



شکل ٥- ریخت‌شناختی پرگنه جدایه‌های مرجع گونه‌های *Monilinia* در محیط کشت PDA از سطح رویی و پشتی تشتک پتری در دمای۱±۲۳ درجه‌ی سلسیوس و زیر نور nUV بعد از ۱۳ روز: A و D- *M. laxa*؛ B و E- *M. fructigena* ؛ C و F- *M. fructicola*



شکل ٦- ویژگی‌های میکروسکوپی *M. laxa*: A و B - زنجیره کنیدیومی به‌همراه کنیدیوفور؛ C- کنیدی‌های لیمویی شکل؛ D- کنیدی‌های مستطیلی و کنیدیوفور؛ E- آرتروسپر؛ F- لوله تندش به‌همراه کنیدی.



شکل ۷- تبارنمای ترسیم شده بر اساس توالی‌های نوکلئوتیدی ناحیه‌ی ITS-rDNA گونه‌های *Monilinia* به روش نزدیکترین پیوست همسایه مقیاس نشان دهنده ۰/۰۲ تغییر در اسیدهای نوکلئیک در ناحیه‌ی ITS-rDNA بین جدایه‌های مختلف می‌باشد. گونه‌ی *Pseudopeziza medicaginis* (EU729125.1) به عنوان گروه خارجی استفاده شده‌است. توالی ایجاد شده در این تحقیق به صورت بولد نشان داده شده‌است.

بحث

بیماری پوسیدگی قهوه‌ای میوه، یکی از مهمترین بیماری‌های قبل و بعد از برداشت میوه در درختان میوه‌ی هسته‌دار می‌باشد و سالانه خسارت‌های قابل توجهی را به اقتصادی‌ترین بخش کشاورزی ایران وارد می‌کند (بانون و همکاران ۲۰۰۸، پتروزسکی و پالکوویک ۲۰۰۹). بدین‌منظور برای بررسی دقیق بیماری، بازدیدهایی از مناطق مشکوک به بیماری، به‌عمل آمد. نمونه‌برداری از درختان مناطق مختلف این استان و بررسی نتایج حاصل از شناسایی ریخت-شناختی و مولکولی، اولا حضور این عامل را در اکثر

باغات مسن و جوان ثابت کرد، ثانیا بررسی‌ها نشان داد که علایم بیماری روی درخت به‌صورت سوختگی شکوفه، نکروز سیخک و ساقه‌های جوان همراه با ترشح صمغ و مومیایی شدن میوه همراه است (شکل۱).

در مجموع از ۱۱۱ نمونه‌ی جمع‌آوری شده، تعداد ۸۹ جدایه قارچی مشابه با قارچ *Monilinia* بر اساس مشخصات ریخت‌شناختی خالص‌سازی شد. نتایج این بررسی نشان داد که *M. laxa* به عنوان تنها گونه‌ی عامل دخیل در بیماری پوسیدگی قهوه‌ای درختان میوه‌ی هسته‌دار در استان آذربایجان غربی می‌باشد. این گونه از پراکنش جهانی برخوردار می‌باشد و اغلب باعث ایجاد سوختگی شکوفه و پوسیدگی میوه می‌گردد. در سالهایی که دوره‌ی گلدهی درختان میوه‌ی هسته‌دار توام با بارندگی‌های بهاره و هوای ابری باشد، در مناطق پست و کم‌ارتفاع سوختگی شکوفه روی برخی میزبان‌ها از قبیل آلبالو به سطح اپیدمی می‌رسد و میزان خسارت بیماری بالای ۷۰ درصد نیز می‌رسد (ارزنلو، داده‌های چاپ نشده).

دو گونه‌ی *M. laxa* و *M. fructicola* به‌عنوان عامل پوسیدگی قهوه‌ای میوه‌های دانه‌دار و هسته‌دار از شهرستان‌های مختلف استان گیلان گزارش شده است (هاشمی‌باباحیدری و همکاران ۱۳۸٦). ویژگی‌های جدایه‌های *M. laxa* بدست‌آمده در این تحقیق با ویژگی‌های جدایه‌های استان گیلان هم‌خوانی دارد. با این وجود تولید استروما در جدایه‌های استان گیلان گزارش نگردیده است، در حالیکه جدایه‌های بدست آمده در این تحقیق روی محیط کشت MEA تولید نقاط استرومایی سفید تا شیری (در شرایط تاریکی/ روشنایی و دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس) نمودند (شکل ۲).

فرم جنسی و غیرجنسی *M. laxa* از استان آذربایجان‌غربی توسط ایرانی و ارومچی (۱۳۸۳) گزارش گردیده است. ایرانی و ارومچی در گزارش خود پرگنه‌ی سفید پنبه‌ای، تولید سختینه‌های سیاه با مغز سفید، اندازه‌ی کنیدیوم‌های تشکیل شده روی میوه‌های مومیایی شده به ابعاد ۱۲/۹ -۱٤ × ٦/۷ -٥/٤، اندازه‌ی آسک ۱۱۳ -٥۳ و اندازه‌ی آسکوسپور ۱۰ -۷ میکرومتر را به‌عنوان ویژگی‌های این گونه معرفی کردند. ویژگی‌های گزارش شده توسط نامبردگان برای *M. laxa* از استان آذربایجان‌غربی از نظر رنگ پرگنه و تولید سختینه در محیط کشت با ویژگی‌های معرفی‌شده برای *M. laxa* در سایر منابع (بیرد و ویلتس، ۱۹۷۷، لین ۲۰۰۲، هارادا و همکاران، ۲۰۰٤) هم‌خوانی ندارد. همچنین در گزارش ایرانی و ارومچی به لوب‌دار بودن پرگنه و مشخصات لوله‌ی تندش کنیدی قارچ که از ویژگی‌های مهم این گونه است، اشاره نشده است (بیرد و همکاران، ۱۹۷۷). با توجه به اینکه کشت‌های زنده جدایه‌های بررسی شده توسط ایرانی و ارومچی در دسترس نبود، امکان مقایسه‌ی جدایه‌ها فراهم نگردید.

ویژگی‌های ریخت‌شناختی جدایه‌های بدست آمده در این تحقیق با ویژگی‌های جدایه‌ی مرجع این گونه هم‌خوانی کامل داشت. با این وجود، شناسایی گونه‌های *Monilinia* براساس صفات ریخت‌شناختی با توجه به هم‌پوشانی بین برخی ویژگیهای ریخت‌شناختی بین گونه‌های مختلف و تنوع داخل گونه‌ای قابل اعتماد نمی‌باشد. به‌عنوان مثال، تشخیص گونه‌ی *M. polystroma* براساس داده‌های ریخت‌شناختی از گونه‌ی *M. fructigena* عملا امکان‌پذیر نمی‌باشد (هو و همکاران ۲۰۱۱). اخیرا علاوه بر چهار گونه‌ی رایج *Monilinia*، دو گونه‌ی دیگر به نام‌های Y. Harada, Y. Sasaki and Sano *M. mumecola* و M.J. Hu & C.X. Luo *M. yunnanensis* به‌عنوان عوامل پوسیدگی قهوه‌ای هلو از کشور چین گزارش شده‌اند (هو و همکاران ۲۰۱۱). ویژگی‌های پرگنه‌ی *M. mumecola* با گونه‌ی *M. laxa* هم‌پوشانی دارد. با توجه به اهمیت اقتصادی بیماری پوسیدگی قهوه‌ای و لزوم شناسایی سریع و

دقیق گونه‌های دخیل در بیماری از یک طرف و قرارگرفتن تعدادی از این گونه‌ها در لیست قرنطینه‌ی کشورهای تولید کننده محصولات باغی از طرف دیگر، در سال‌های اخیر توجه ویژه‌ای به استفاده از داده‌های مولکولی در راستای شناسایی گونه‌های این جنس معطوف گردیده است (هو و همکاران ۲۰۱۱). در این تحقیق داده‌های توالی ناحیه‌ی ITS جهت تایید هویت گونه‌ی *M. laxa* مورد استفاده قرارگرفت (شکل ۷). علاوه‌بر داده‌های توالی ناحیه ITS از داده‌های توالی دیگر نواحی ژنی مانند گلیسرول-۳- فسفات‌دی-هیدروژناز (*G3PDH*) و بتاتوبولین (*β-tubulin*) برای شناسایی گونه‌ها و معرفی گونه‌های جدید استفاده می-شود (هو و همکاران ۲۰۱۱). در این راستا آغازگرهای اختصاصی برای شناسایی هریک از گونه‌ها با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز طراحی شده‌اند (ایوس و فری ۲۰۰۰، بوهم و همکاران ۲۰۰۱، کوت و همکاران ۲۰۰٤، گل و همکاران ۲۰۰۸، هو و همکاران ۲۰۱۱).

در این تحقیق تلاش‌های انجام گرفته برای مشاهده ساختارهای جنسی *M. laxa* در شرایط طبیعی و القا مرحله‌ی جنسی در شرایط آزمایشگاه ناموفق بود. شرایط آب و هوایی در تشکیل آپوتسیوم اهمیت زیادی دارند و فاکتورهای دما، میزان رطوبت خاک و میوه-های مومیایی شده، رطوبت هوا، نوع و شدت نور و عمق قرارگرفتن میوه‌های مومیایی شده در خاک، تشکیل و تمایز آسکوکارپ را تحت تاثیر قرار می‌دهند. نقش نور در تولید آپوتسیوم، تحریک قارچ به تولید دیسک است. در شرایط تاریکی کامل، پایه آپوتسیوم تولید می‌شود ولی دیسک آپوتسیوم تمایز نمی‌یابد (بیرد و همکاران، ۱۹۷۷). هاشمی باباحیدری و همکاران (۱۳۸۹) نیز در بررسی‌های خود در استان گیلان موفق به القا مرحله‌ی جنسی گونه‌ی *M. laxa* در شرایط طبیعی، کرت‌های آزمایشی و آزمایشگاه نشدند. این محققین کنیدی‌های تشکیل شده روی میوه‌های مومیایی باقی مانده روی درختان را به عنوان منبع اصلی مایه‌ی تلقیح در منطقه مورد بررسی ذکر کرده-اند. اگرچه ایرانی و ارومچی به مرحله‌ی جنسی قارچ اشاره داشته‌اند، اما تفاوت‌های عمده بین ابعاد ذکر شده برای آسک و اسکوسپور با آنچه در منابع در ارتباط با این گونه آمده است، دیده می‌شود (بیرد و همکاران، ۱۹۷۷). بررسی‌های تکمیلی در زمینه زیست شناسی گونه‌ی *M. laxa* در استان آذربایجان غربی و امکان تشکیل و همچنین القا مرحله‌ی جنسی آن در شرایط گلخانه و آزمایشگاه ضروری به‌نظر می‌رسد.

به‌طورخلاصه نتایج این بررسی نشان داد که گونه‌ی *M. laxa* به‌عنوان تنها گونه‌ی جنس *Monilinia* در ایجاد بیماری پوسیدگی قهوه‌ای در درختان میوه‌ی هسته‌دار استان آذربایجان‌غربی دخیل می‌باشد. بنابراین بررسی‌های تکمیلی در خصوص شناسایی عامل بیماری پوسیدگی قهوه‌ای درختان میوه‌ی هسته-دار در استان‌های مجاور و همچنین شناسایی گونه‌های *Monilinia* دخیل در بیماری پوسیدگی قهوه‌ای میزبان-های دانه‌دار در منطقه با استفاده توام از داده‌های ریخت‌شناختی و مولکولی ضروری به‌نظر می‌رسد. مطالعه‌ی جنبه‌های مختلف زیست‌شناسی عامل بیماری جهت مدیریت موثر این بیماری مهم و اقتصادی در منطقه موضوع مطالعات بعدی می‌باشد.

منابع

ارشاد ج، ۱۳۸۸، قارچ‌های ایران. ویراست سوم. انتشارات موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، تهران، ایران ۵۳۱ صفحه.

ایرانی ح، ارومچی س، ۱۳۸۳. جداسازی و شناسایی عامل بیماری پوسیدگی قهوه‌ای میوه درختان میوه هسته‌دار زردآلو، هلو و آلو در استان آذربایجان‌غربی. خلاصه مقالات شانزدهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران. جلد ۲، بیماریهای گیاهی و علفهای هرز،۱۱-۷ شهریور، دانشگاه تبریز. صفحه ٤٢٦.

هاشمی باباحیدری س ع، خداپرست س ا و بنی‌هاشمی ض، ۱۳۸٦. شناسایی گونه‌های *Monilinia* همراه با پوسیدگی قهوه‌ای میوه‌های دانه‌دار و هسته‌دار در گیلان. مجله بیماریهای گیاهی ایران، جلد ٤٣ شماره ۳. صفحه‌های ۳۱۲ الی ۳۲٤.

هاشمی باباحیدری س ع، خداپرست س ا و بنی‌هاشمی ض، ۱۳۸۹. مطالعه جنبه‌هایی از زیست‌شناسی قارچ *Monilinia laxa*، عامل بیماری پوسیدگی قهوه‌ای گیلاس در استان گیلان. مجله دانش گیاهپزشکی ایران جلد ٤١ شماره یک. صفحه‌های ۱۱۳ الی۱۱۸.

Amiri A, Holb IJ and Schnabel G, 2009. A new selective medium for the recovery andenumeration of *Monilinia fructicola, M. fructigena*, and *M. laxa* from stone fruits. Phytopathology 99(10): 1199 – 1208.

Bannon F, Gort G, van Leewen G, Holb I and Jeger M, 2008. Diurnal patterns in dispersal of *Monilinia fructigena* conidia in an apple orchard in relation to weather factors. Agricultural and Forest Metorology 149: 518 – 525.

Batra LR, 1991. World species of *Monilinia* (Fungi): their ecology, biosystematic and control. Mycologia Memoirs: 16. J. Cramer Berlin.

Boehm EWA, Ma Z and Michailides TJ, 2001. Species – specific detection of *Monilinia fructicola* from california stone fruits and flowers. Phytopathology 91: 428 – 439.

Byrde RJW and Willetts HJ, 1977. The brown rot fungi of fruit: their biology and control. Pergamon Press, Oxford, UK.

Cote M - J, Meldrum AJ and Tardif M-C, 2004. Identification of *Monilinia fructigena*, *Monilinia fructicola*, *Monilinia laxa* and *Monilinia polystroma* on inoculated and naturally infected fruit using multiplex PCR. Plant Disease 88: 1219 – 1225.

Gell I, De Cal A, Torres R, Usall J and Melgarejo, 2008. Relationship between the incidence of latent infections caused by *Monilinia* spp. and the incidence of brown rot of peach fruit: factors affecting latent infection. Plant Pathology 121: 487 – 498.

Harada Y, Nakao S, Sasaki M, Sasaki Y, Ichihashi Y and Sano T, 2004. *Monilinia* mumecola, a new brown rot fungus on *Prunus mumein* Japan. Journal of General Plant Pathology 70: 297 – 307.

Hinrichs-Berger J and Muller G, 2010. First record of *Monilia fructicola* on blackberry fruits. Journal of Plant Diseases and Protection 117 (3): 110 – 111.

Holb IJ, 2007. Monitoring conidial density of *Monilinia fructigena* in the air in relation to brown rot development in integrated and organic apple orchards. European Journal of Plant Pathology 120: 397 – 408.

Holtz BA, Michailides TJ and Hong CX, 1998. Development of apothecia from stone frui infected and stromatized by *Monilinia fructicola* in California. Plant Disease 82: 1375 – 1380.

Hrustic J, Mihajlovic M, Grahovec M, Delibasic G, Bulajic A, Krstic B and Tanovic B, 2012. Genus *Monilinia* on pome and stone fruit species. Pesticides and Phytomedicine 27 (4): 283 – 297.

Hu M-J, Cox KD, Schnabel G and Luo C-X, 2011. *Monilinia* species causing brown rot of Peach in China. PLoS ONE, 6(9): e24990.

Ioos R and Frey P, 2000. Genomic variation within *Monilinia laxa*, *M. fructigena* and *M. fructicola*, and application to species identification by PCR. European Journal of Plant Pathology 106: 373 – 378.

Johnston PR, Seifert KA, Stone JK, Rossman AY and Marvanova L, 2014. Recommendations on generic names competing for use in Leotiomycetes (Ascomycota). IMA Fungus 5: 91–120.

Lane CR. 2002. A synoptic key for differentation of *Monilina frucicola, M. fructigena* and *M.laxa*, based on examinationof cultural characters. Central Science Laboratory: 489 – 493.

Mari M, Martini C, Guidarelli M and Neri F, 2012. Postharvest biocontrol of *Monilinia laxa*, *Monilinia fructicola* and *Monilinia fructigena* on stone fruit by two *Aureobasidium pullulans* strains. Biological Control 60 (2): 132 – 140.

Michailides TJ and Spotts RA, 1990. Transmission of mucor piriformis to fruit of *prunus persica* by *Carpophilus* spp. and *Drosophila melanogaster*. Plant Disease 74: 287 – 291.

Moller EM, Bahnweg G and Geiger HH, 1992.A simple and efficient protocol for isolation of highmolecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. Nucleic Acids Research 20: 6115–6116.

Ogawa JM and English WH, 1960. Relative pathogencity of two brown rot fungi, *Sclerotinia fructicola*, on twigs and blossom. Phytopathology 550 – 558.

OEPP/EPPO, 2009. EPPO A2 List of pests recommended for regulation as quarantine pests. http://www.eppo.org/QUARANTINE/listA2.htm.

Pellegrino C, Gullino ML, Garibaldi A and Spadaro D, 2009. First report of brown rot of stone fruit caused by *Monilinia fructicola* in Italy. Plant Disease 93: 668.

Petroczy MH, 2009. Appearance of *Monilinia* and *Monilia polystroma* in Hungary and newer possibility of the protection. PhD thesis, Corvinus Univercity, Budapset, Hungary, 1 – 15.

Petróczy M and Palkovics L, 2009. First report of *Monilia polystroma* on apple in Hungary. Plant Pathology 125: 343 – 347.

Ritchie DF. 2000. Brown rot of stone fruits. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2000-1025-01.

Rayner RW, 1970. A Mycological Colour Chart. CMI and British Mycological Society, Kew, Surrey, England, 34 pp.

Sholberg AP and kappel F. 2008. Integrated Management of Stone Fruit Diseases. Pp. 3 – 25 In: Sholberg AP and kappel F (eds.), Integrated Management of Disease Caused by Fungi, Phytoplasma and Bacteria. Springer, The Netherlands.

Takamura N and Ochiai M, 1989. Control of brown rot of peaches by bitertanol. Annual Report of the Society of Plant Protection of North Japan 40: 77–80.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A and Kumar S, 2013. MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Molecular Biology and Evolution 30: 2725–2729.

van Leeuwen GCM, Baayen RP, Holb IJ and Jeger MJ, 2002. Distinction of the Asiatic brown rot fungus *Monilia polystroma* spp. nov. from *M. fructigena*. Mycological Research 106 (4): 444 – 451.

Visarathanonth N, Kakishima M and Harada Y, 1988. Brown rot of grape berry caused by *Monilinia fructicola*. Annals of the Phytopathological Society of Japon 54: 238 – 241.

White T J, Bruns T, Lee S and Taylor J, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315–322 In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds.), PCR Protocols : A Guide to Methods and Applications Academic Press, New York, USA.

Xu XM and Robinson JD, 2000. Epidemiology of brown rot (*Monilinia fructigena*) on apple: infection of fruits conidia. Plant Pathology, 49: 201 – 206.

Zhu X Q and Guo LY, 2010. First report of brown rot on plum caused by *Monilia polystromain* China. Plant Disease 94: 478.

Identification of *Monilinia* Species Associated with Brown Rot Disease of Stone Fruit Trees in West Azarbaijan Province of Iran, Based on Morphological and Molecular Characteristics

M Leghvani[1], M Arzanlou[2*] and A Babai-Ahari[2]

[1]Former MSc Student, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[2]Associate Professor and Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
*Corresponding author: **arzanlou@tabrizu.ac.ir**

Received:12 Agu 2015 Accepted: 4 Nov 2015

Abstract

This study was aimed to characterize the *Monilinia* species associated with brown rot disease of stone fruit trees in West Azarbaijan province, Iran. For this purpose, during the 2013-2014 growing seasons, samples were collected from stone fruit trees showing blossom and twig blight, rotten and mummified fruits symptoms. *Monilinia* isolates were identified based on cultural characteristics and morphological features of conidia on PDA, MEA and CHA culture media. A total number of 89 *Monilinia* isolates were recovered from symptomatic tissues. Based on the comparison of cultural and morphological characteristics of the isolates obtained in this study with those of reference isolates for *M. laxa*, *M. fructicola* and *M. fructigena*, all of the isolates were identified as *M. laxa*. The identity of our isolates was further confirmed using sequence data of ITS-rDNA region for the representative isolate. A phylogeny inferred based on the sequence data from ITS region, clustered our isolate in *M. laxa* clade together with other sequences retrieved from GenBank for this species. All of the attempts made for the induction of sexual stage under laboratory conditions were unsuccessful.

Keywords: Blossom and twig blight, Iran, Mummified, Rosaceae.