نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۲، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۷، ص. ۳۱۴-۳۰۷

Journal of Plant Protection
Vol. 32, No. 3, Fall 2018, P. 307-314

مطالعه وضعیت باروری جنسی گونه‌های *Venturia inaequalis* و *Venturia pyrina* در شرایط آزمایشگاهی

لیلا ابراهیمی[۱]- خلیل بردی فتوحی فر[۲*]- محمد جوان نیک‌خواه[۳]- محمدرضا نقوی[۴]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۰۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۴/۲۰

چکیده

در این مطالعه، گونه‌های آنامورفی مختلف مرتبط با جنس *Venturia* از مناطق مختلف ایران جمع‌آوری و شناسایی شدند. از بین گونه‌های بدست آمده، گونه *Venturia inaequalis* به عنوان گونه غالب در ایران شناسایی شد. تعداد ۱۰ جدایه از هر یک از گونه‌های *V. inaequalis* و *V. pyrina* در شرایط آزمایشگاهی دو به دو با یکدیگر تلاقی داده شدند. همچنین، جهت بررسی هموتال و هتروتال بودن جدایه‌ها، تعدادی از جدایه‌ها به صورت تک‌جدایه کشت شدند. برخی از جدایه‌های دو گونه نیز به صورت تصادفی با یکدیگر جهت بررسی مفهوم گونه بیولوژیکی تلاقی داده شدند. از این بین، هفت تلاقی بارور بین جدایه‌های گونه *V. inaequalis* و پنج تلاقی بارور بین جدایه‌های گونه *V. pyrina* به دست آمد. در کشت‌های تک‌جدایه نیز هیچ تلاقی صورت نگرفت که تائیدی بر هتروتال بودن جدایه‌های مربوط به هر دو گونه می‌باشد. بین جدایه‌های دو گونه هیچ تلاقی مشاهده نشد که این نتیجه نیز بیانگر دو گونه بیولوژیکی متمایز می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: سیب، گلابی، لکه سیاه، مرحله جنسی، *Venturia*

مقدمه

جنس *Venturia* Sacc. یکی از بزرگترین جنس‌های خانواده *Venturiaceae* E. Müll. & Arx ex M.E. Barr می‌باشد. اغلب گونه‌های این قارچ، بیمارگر گیاهان هستند (۱۸). گونه‌های مهم این جنس، *V. inaequalis* (Cooke) G. Winter و *V. pyrina* Aderh. هستند که عوامل بیماری لکه سیاه، به ترتیب روی سیب و گلابی می‌باشند که این بیماری‌ها، از نظر اقتصادی مهم‌ترین بیماری قارچی این درختان محسوب می‌شوند (۱۶) و سالیانه باعث اپیدمی‌هایی در نقاط مختلف دنیا شده (۲۱) و به خصوص در مناطقی که در طی فصول بهار و اوایل تابستان هوا خنک و مرطوب باشد، خسارت بیماری شدید خواهد بود (۱). اسفندیاری در سال ۱۳۲۵، این دو گونه را برای اولین بار از ایران گزارش کرد (۵). این گروه از قارچ‌ها، همی‌بیوتروف هستند که به صورت سودوتسیوم‌های نابالغ در میوه‌ها و عمدتاً برگ‌های آلوده ریخته شده در پای درخت و نیز در مناطق معتدل در شاخه‌ها و جوانه‌ها به صورت فرم غیرجنسی، زمستانگذرانی می‌کنند (۳).

اعضای خانواده *Venturiaceae* سودوتسیوم‌های کروی شکل و یا آسکوستروما‌ی چندحجره‌ای تولید می‌کنند. معمولاً در اطراف اُستیول خارهای قهوه‌ای رنگ مشخصی تشکیل می‌شوند. آسکوسپورها دو سولی، بی‌رنگ و یا به رنگ‌های سبز زیتونی تا قهوه‌ای هستند و در بسیاری از گونه‌ها دو سلول آسکوسپور هم‌اندازه نیستند. آنامورف این خانواده قارچی از گروه هیفومیست‌ها می‌باشد که کنیدی‌زایی آن‌ها به صورت آنلیدیک و یا سیمپودیال است (۲۰).

تولیدمثل جنسی با تولید اسپورهای جنسی هوازاد در انتشار بیماری و بخصوص در ابتدای فصل بهار در شروع بیماری نقش مهمی ایفا می‌کند. بنابراین آگاهی در مورد چرخه تولیدمثل جنسی در قارچ‌های بیمارگر گیاهی جهت مدیریت بیماری و پیش‌بینی پتانسیل وقوع ژنوتیپ‌های جدید در جمعیت بیمارگر حائز اهمیت می‌باشد. پتانسیل تغییرپذیری بیمارگر از عوامل مهم موثر بر شکسته شدن مقاومت و بی اثر شدن سموم شیمیایی بر بیمارگر می‌باشد. بیمارگرهایی که از پتانسیل تغییرپذیری بیشتری برخوردار باشند، توانایی بیشتری جهت شکستن مقاومت میزبان و بی اثر شدن سموم شیمیایی دارند. نوع سیستم تولیدمثلی از جمله عوامل تاثیرگذار بر

۱- استادیار گروه حشره‌شناسی و بیماری‌های گیاهی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران و دانش آموخته دکتری دانشکدهٔ علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج
۲ و ۳- دانشیار و استاد گروه گیاهپزشکی، دانشکدهٔ علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران
(*- نویسنده مسئول: Email: fotowhi@ut.ac.ir)
۴- استاد گروه بیوتکنولوژی، دانشکدهٔ علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
DOI: 10.22067/jpp.v32i3.62310

ساختار ژنتیک جمعیت بیمارگرها می‌باشد. به عنوان مثال، بیمارگرهای دارای سیستم تولیدمثلی مختلط (جنسی و غیرجنسی) از امتیازات بیشتری در جهت تکامل برخوردار می‌باشند (۶). دو گونه قارچی *V. inaequalis* و *V. pyrina* دارای سیستم آمیزشی هتروتالیک هستند. تولیدمثل جنسی در این گونه‌ها، بقای قارچ را در شرایط نامساعد فصل زمستان تضمین می‌کند. همچنین تولیدمثل جنسی با ایجاد پتانسیل تغییرپذیری زیاد طی تقسیم میوز، امکان بقای قارچ را در برابر ارقام مقاوم و سموم شیمیایی افزایش می‌دهد. از طرفی، تولیدمثل غیرجنسی مکرر در طی فصل‌های بهار و تابستان، باعث افزایش تغییرپذیری و تنوع قارچ می‌گردد. به همین دلیل در مطالعات مربوط به ژنتیک جمعیت و تنوع ژنتیکی در این گونه‌های قارچی، تنوع ژنتیکی زیادی به خصوص در داخل جمعیت‌ها مشاهده می‌شود و این امر کنترل بیماری را اغلب با مشکل مواجه می‌کند.

کیلیان (۱۱) برای اولین بار جزئیات تولیدمثل جنسی را در گونه *V. inaequalis* مورد بررسی قرار داد. در این مطالعه، نحوه رشد و تلاقی آسکوگونیوم و آنتریدیوم و نحوه تشکیل آسکوکارپ روی سطح برگ مورد بررسی قرار داده شد. بر اساس این مطالعه چون روی سطح برگ هیف‌های اولیه تشکیل دهنده آسکوگونیوم و آنتریدیوم کاملاً مجزا از هم رشد می‌کردند و جدا از هم بودند، وی این گونه را به عنوان یک قارچ هتروتال معرفی کرد. کیت (۹) جدایه‌های مختلف گونه *V. inaequalis* را برای اولین بار در شرایط آزمایشگاهی به صورت تک‌جدایه و دو به دو با یکدیگر تلاقی داد و نتایج حاصل نشان دادند که جدایه‌های مختلف در تلاقی با یکدیگر به صورت هتروتالیک قادر به تولید سودوتسیوم‌های بارور هستند. لانگفورد و کیت (۱۲) جدایه‌های گونه *V. pyrina* را به لحاظ هتروتالیسم در شرایط آزمایشگاهی مورد مطالعه قرار دادند و مشاهده کردند که جدایه‌های این گونه به صورت هرمافرودیت و دگربارور هستند. بر این اساس، گونه *V. pyrina* را به عنوان یک گونه هتروتال معرفی کردند.

این مطالعات به عنوان مقدمه‌ای برای مطالعات و تجزیه و تحلیل‌های ژنتیکی و همچنین مدیریت بیماری‌های گیاهی محسوب می‌شوند. در این مرحله جدایه‌های دارای دو تیپ آمیزشی متفاوت (در افراد هتروتال) مشخص می‌شوند که به سهولت می‌توانند جهت ردیابی و بررسی مولکولی الل‌های MAT مورد استفاده قرار گیرند. ژن‌های *MAT* همراه با چندین ژن دیگر، سازگاری با شرایط محیطی مورد نیاز جهت تولیدمثل جنسی، آمیزش، تشکیل اندام‌های باردهی و تولید آسکوسپورها را کنترل می‌کنند. در طی این مسیر، الل‌های MAT کنترل آمیزش بین دو جدایه دارای تیپ‌های آمیزشی مجزا را در افراد هتروتال بر عهده دارند. فقدان هر یک از این ژن‌های تنظیمی می‌تواند منجر به عدم تولیدمثل جنسی در قارچ‌ها گردد (۴). شناسایی مولکولی ژن‌های *MAT* اولین بار توسط استل و همکاران در سال ۱۹۸۱ در مخمر *Saccharomyces cerevisiae* انجام شد و بعد از آن در قارچ‌های رشته‌ای مورد مطالعه قرار گرفت (۷). الل‌های MAT گونه‌های مختلف جنس *Venturia* تاکنون به لحاظ مولکولی در دنیا مورد مطالعه قرار نگرفته است. در این مطالعه، با انجام آمیزش تصادفی بین جدایه‌ها، جدایه‌های دارای دو تیپ آمیزشی متفاوت تعیین می‌گردند. در ادامه، با طراحی آغازگرهای اختصاصی، این جدایه‌ها جهت ردیابی الل‌های MAT آن‌ها، مورد استفاده قرار خواهند گرفت.

با وجود اهمیت این بیماری در مناطق مختلف ایران و به خصوص مناطق کشت سیب و گلابی، هیچ پژوهش جامعی در زمینه مطالعه این گروه از قارچ‌ها صورت نگرفته است. هدف این مطالعه بررسی پراکنش بیماری لکه سیاه سیب و گلابی در ایران و همچنین ارزیابی باروری جنسی جدایه‌های دو گونه *V. inaequalis* و *V. pyrina* در شرایط آزمایشگاهی جهت ارزیابی اولیه از تیپ‌های آمیزشی مختلف بوده است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری، جداسازی و شناسایی نمونه‌های قارچی

نمونه‌های آلوده گیاهی شامل برگ، میوه و سرشاخه‌ها که دارای علائم بیماری و حاوی اندام‌های باردهی قارچ بودند، از میزبان‌های مختلف گیاهی شامل درختان، درختچه‌ها و گیاهان یکساله و یا چندساله جمع‌آوری شدند. نمونه‌برداری از مناطق مختلف کشور که دارای آب و هوای خنک و مرطوب و مساعد بیماری بودند، انجام شد. نمونه‌برداری از اواخر فصل زمستان شروع و تا اوایل فصل پاییز سال آینده طی سال‌های ۱۳۹۲ و ۱۳۹۳ انجام گرفت. جمع‌آوری نمونه از باغات به صورت تصادفی بوده و نمونه‌های مربوط به هر گیاه به عنوان یک نمونه مجزا در نظر گرفته شدند. نمونه‌های گیاهی به صورت جداگانه در داخل پاکت‌های کاغذی قرار گرفته و به آزمایشگاه منتقل شدند.

جهت جداسازی قارچ عامل بیماری، با استفاده از یک سوزن کشت سترون کنیدی‌های قارچ از سطح لکه‌های موجود روی اندام گیاهی آلوده برداشته شدند و با استفاده از میله خمیده روی محیط کشت آب-آگار دو درصد (water agar 2%) پخش گردیدند و به مدت یک روز در دمای ۱۸ درجه سلسیوس، جهت جوانه‌زنی کنیدی‌ها، نگهداری شدند. سپس به روش تک کنیدی (single spore) و در زیر میکروسکوپ، کنیدی‌های جوانه زده انتخاب و به محیط‌کشت PDA (potato dextrose agar) منتقل شدند. پرگنه‌های قارچی، در دمای ۱۸ درجه سلسیوس، پس از ۱۰ تا ۱۲ روز روی محیط کشت ظاهر شدند.

جهت شناسایی ریخت‌شناختی جدایه‌های قارچی، از محل لکه‌های روی بافت گیاه میزبان، برش‌های نازک عمودی به کمک

دست تهیه شدند. با استفاده از برش‌های حاصل اسلایدهای میکروسکوپی با استفاده از محلول‌های لاکتوفنل و یا لاکتوفنل‌کاتن‌بلو تهیه گردیدند و سپس به لحاظ ویژگی‌های مختلف ریخت‌شناختی، جدایه‌های قارچی مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای شناسایی در سطح گونه از تک‌نگاره نوشته شده توسط شوبرت و همکاران (۱۷) استفاده شد. ویژگی‌های مربوط به هر جدایه شامل آرایش کنیدیوفورها (منفرد، مجتمع و یا روی اسپورودوکیوم)، شکل، اندازه و دیواره عرضی کنیدیوفورها، سلول‌های کنیدی‌زا (انتهایی، زائده‌ای، کنیدیوفورهای تقلیل یافته به سلول‌های کنیدی‌زا؛ دارای رشد محدود و یا رشد متوالی، سیمپودیال؛ عرض جایگاه کنیدی‌زایی)، کنیدی‌ها (منفرد و یا زنجیری؛ شکل، اندازه، دیواره عرضی، دیواره صاف و یا دارای زائده کنیدی) ارزیابی شدند. در هر جدایه، برای ارزیابی هر اندام قارچی (طول و عرض کنیدی و کنیدیوفور، عرض هیلوم کنیدی، عرض جایگاه کنیدی‌زایی، عرض تورم پایه کنیدیوفور) ۵۰ مورد اندازه‌گیری صورت گرفت.

بررسی امکان تولیدمثل جنسی در جدایه‌های قارچی در شرایط آزمایشگاهی

بررسی امکان تولیدمثل جنسی در گونه‌های قارچی به دست آمده در شرایط آزمایشگاهی، مطابق روش راس و هملین (۱۵) انجام شد (جدایه‌های منتخب در جدول ۱ آورده شده‌اند). طبق این روش، برگ‌های بالغ و سالم میزبان مورد نظر به منظور زدودن گرد و غبار، زیر جریان آب به مدت ده دقیقه شسته شدند و سپس به قطعاتی با ابعاد ۲×۲ سانتی‌متر بریده شدند. قطعات برگ درون دستگاه اتوکلاو سترون شدند و سپس درون هر تشتک پتری حاوی محیط کشت WA، یک قطعه برگ قرار داده شد. یک قرص میسلیومی از حاشیه پرگنه در حال رشد هر جدایه قارچی برداشته شد و روی قطعه برگ به صورت کشت متقابل قرار داده شد. تشتک‌های پتری در دمای اتاق تحت شرایط ۱۲ ساعت نور / ۱۲ ساعت تاریکی برای مدت ۱۴ روز نگهداری شدند. سپس در شرایط تاریکی مداوم و دمای هشت درجه سلسیوس قرار داده شدند. تلاقی‌ها بعد از حدود شش ماه برای تولید سودوتسیوم مورد بررسی قرار گرفتند.

جدول ۱- جدایه‌های مورد استفاده جهت بررسی تولیدمثل جنسی در شرایط آزمایشگاهی

Table 1- Isolates that have been used to study on sexual reproduction *in Vitro*.

گونه Species	جدایه Isolate	منبع Source	سال Year	گونه Species	جدایه Isolate	منبع Source	سال Year
V. inaequalis	VI1	Alborz, Moroud	2013	*V. pyrina*	VP48	Alborz, Jey	2013
	VI2	Alborz, Moroud	2013		VP49	Alborz, Jey	2013
	VI17	Alborz, Moroud	2013		VP50	Alborz, Jey	2013
	VI63	East Azarbayjan, Mianeh	2013		VP51	Alborz, Jey	2013
	VI77	East Azarbayjan, Mianeh	2013		VP53	Alborz, Jey	2013
	VI79	East Azarbayjan, Mianeh	2013		VP55	Alborz, Arangeh	2013
	VI111	East Azarbayjan, Maragheh	2013		3A	Alborz, Jey	2014
	VI258	Lorestan, Khorram-Abad	2013		3B	Alborz, Jey	2014
	VI259	Lorestan, Khorram-Abad	2013		VP1-1	Alborz, Jey	2014
	VI263	Lorestan, Khorram-Abad	2013		VP1-3	Alborz, Jey	2014

نتیجه و بحث

در مرحله جمع‌آوری نمونه‌های آلوده گیاهی در طی سال‌های ۱۳۹۲ و ۱۳۹۳، بر حسب شرایط آب و هوایی، ۱۸ استان از ایران مورد بازدید قرار گرفتند و ۸۲۰ نمونه آلوده گیاهی با علائم مشکوک به این گروه از قارچ‌ها جمع‌آوری گردیدند. تعداد ۶۰۴ نمونه آلوده به قارچ *Venturia/Fusicladium* بودند. نمونه‌ها شامل: ۵۴۰ نمونه برگ و میوه سیب آلوده به قارچ (*F. pomi* (Fr.) Lind.) *V. inaequalis* از ۱۸ استان (آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی، اردبیل، البرز، اصفهان، تهران، خراسان رضوی، خراسان شمالی، زنجان، قزوین، گلستان، گیلان، کردستان، کرمانشاه، لرستان، مازندران، مرکزی و همدان) ۴۳ نمونه برگ و میوه گلابی آلوده به قارچ *V. pyrina* (*F. pyrorum* (Lib.) Fuckel) از استان‌های البرز، قزوین، گیلان و مازندران، ده نمونه برگ ازگیل آلوده به گونه *F. eriobotryae* (Cavara) Sacc. از استان‌های گیلان و مازندران، پنج نمونه برگ زبان گنجشک آلوده به گونه *F. fraxini* Aderh. از دو استان گلستان و گیلان، پنج نمونه برگ زیتون آلوده به گونه *F. oleagineum* (Castagne) Ritschel & U. Braun از دو استان گیلان و مازندران، یک نمونه میوه شلیل آلوده به گونه *F. carpophilum* (Thüm.) Oudem. از استان مازندران بودند. بر اساس این نتایج، قارچ *V. inaequalis* به عنوان

گونه غالب در ایران شناسایی شد که در مناطق مورد نمونه‌برداری این بیماری با شدت زیاد و در سطح خسارتزا دیده شد.

از بین نمونه‌های جمع‌آوری شده، ۳۲۵ جدایه از گونه *V. inaequalis* و ۴۰ جدایه از گونه *V. pyrina* و یک جدایه از گونه *F. oleagineum* جداسازی شدند.

زمستانگذرانی دو گونه *V. inaequalis* و *V. pyrina* اغلب به صورت فرم جنسی در طبیعت رخ می‌دهد. همچنین در مناطق معتدل در طی فصل زمستان، قارچ قادر به زمستانگذرانی به صورت فرم غیرجنسی (میسلیوم و کنیدی) در محل زخم‌های روی شاخه‌ها و همچنین جوانه‌ها می‌باشد (۳). در طبیعت، گرمای نسبی هوا در طی اواسط مهر ماه تا اواسط آذر ماه، رشد قارچ را در برگ‌های آلوده ریخته شده در پای درخت تحریک می‌کند. میسلیوم قارچ در بافت برگ رشد کرده و ساختار ابتدایی سودوتسیوم شکل می‌گیرد که زمستانگذرانی قارچ از طریق این اندام‌ها انجام می‌شود. در طی فصل زمستان و اوایل فصل بهار ساختار سودوتسیوم‌های سیاه رنگ و کوزه‌ای شکل کامل می‌شوند. در داخل هر سودوتسیوم، ۵۰ تا ۱۰۰ آسک بوجود می‌آیند که هر آسک حاوی هشت آسکوسپور می‌باشد. دمای هوا و بارش باران در فصل بهار شرایط بلوغ سودوتسیوم‌ها و آسکوسپورها را فراهم می‌کند. بارش باران باعث آزاد شدن آسکوسپورها می‌شود و آسکوسپورها توسط باد و جریان هوا روی میزبان قرار گرفته و بیماری آغاز می‌شود (۲).

در شرایط آب و هوایی ایران نیز زمستانگذرانی این قارچ بخصوص در مناطق سردسیر اغلب به صورت فرم جنسی رخ می‌دهد. در این مطالعه، نمونه‌بردای مرحله جنسی دو گونه *V. inaequalis* و *V. pyrina* از اواسط بهمن ماه تا اواسط اردیبهشت ماه در طی سال‌های ۱۳۹۱ لغایت ۱۳۹۳ در دو استان آذربایجان شرقی و البرز انجام شد و مشاهده شد که بلوغ و آزادسازی آسکوسپورهای این قارچ از اواسط اردیبهشت ماه شروع می‌شود که در واقع زمان شروع بیماری می‌باشد.

محیط کشت (مواد غذایی)، شرایط دمایی و نور، عوامل موثر در تشکیل مرحله تلئومورفی قارچها می‌باشند. این شرایط برای گروه‌های مختلف قارچی (جنس و یا گونه)، متفاوت می‌باشد. تشکیل سودوتسیوم در گونه‌های *V. inaequalis* و *V. pyrina* در دماهای محیطی پایین در طی فصل پاییز و زمستان روی بقایای گیاهی ریخته شده روی زمین اتفاق می‌افتد. جهت تولیدمثل جنسی قارچها در شرایط آزمایشگاهی، فراهم کردن شرایط مشابه طبیعت از جمله عوامل مهم و موثر می‌باشد. در روش مورد استفاده در این مطالعه، محیط کشت WA جهت تامین رطوبت و قطعات برگ گیاه میزبان جهت فراهم کردن مواد غذایی مورد استفاده قرار گرفت. بعد از کشت جدایه‌ها روی این محیط کشت، پرگنه‌ها به مدت ۱۴ روز در دمای اتاق و تناوب نوری جهت توسعه قارچ روی بافت برگ نگهداری شدند. سپس جهت تحریک قارچ برای ورود به فاز تولیدمثل جنسی و توسعه آن، کشت‌ها به دمای هشت درجه سلسیوس منتقل شدند و تا تشکیل سودوتسیوم بارور در این شرایط نگهداری شدند.

در این مطالعه، ده جدایه از هر کدام از دو گونه *V. inaequalis* (جدایه‌های VI1، VI2، VI17، VI63، VI77، VI79، VI111، VI258، VI259 و VI263) و *V. pyrina* (جدایه‌های VP48، VP49، VP50، VP51، VP53، VP55، 3A، 3B، VP1-1 و VP1-3) به دست آمده از مناطق مختلف جهت بررسی امکان تولیدمثل جنسی در شرایط آزمایشگاهی انتخاب گردیدند. همه جدایه‌های مربوط به هر گونه دو به دو با یکدیگر (۴۵ تلاقی برای جدایه‌های هر گونه در دو تکرار) تلاقی داده شدند. جهت بررسی هموتال و یا هتروتال بودن قارچ، تعدادی از تلاقی‌ها به صورت تک‌جدایه کشت شدند. همچنین، جهت بررسی مفهوم گونه بیولوژیکی چند جدایه نیز از دو گونه به صورت تصادفی با یکدیگر تلاقی داده شدند. تلاقی‌ها پس از شش تا هشت ماه جهت تولید سودوتسیوم مورد بررسی قرار گرفتند. هفت تلاقی بارور بین جدایه‌های مربوط به گونه *V. inaequalis* (VI63-VI2، VI2-VI79، VI258-VI77، VI258-VI79، VI111-VI79، VI259-VI111 و VI263-VI111) و پنج تلاقی بارور بین جدایه‌های مربوط به گونه *V. pyrina* (VP50-VP48، VP53-VP50، VP1-1-VP1-3، 3A-3B و 3B-VP1-1) بدست آمد. تلاقی‌ها بین دو جدایه مختلف صورت گرفت و در تلاقی‌های تک‌جدایه‌ها، هیچ اندام جنسی باروری مشاهده نشد، که تائید کننده هتروتال بودن هر دو گونه قارچی بود.

با توجه به عدم آگاهی از فراوانی و پراکنش تیپ‌های آمیزشی، در گونه *V. inaequalis* جدایه‌ها به صورت تصادفی از مناطق جغرافیایی یکسان و مختلف جهت تلاقی انتخاب شدند و تلاقی بارور بین جدایه‌هایی از مناطق مختلف اتفاق افتاد. این در واقع نشان دهنده سازگاری ژنتیکی بین جدایه‌های مناطق مختلف می‌باشد که بر این اساس می‌توان گفت این جدایه‌ها به احتمال زیاد دارای منشاء یکسانی می‌باشند که توسط عوامل مختلف در مناطق مختلف کشور گسترش یافته‌اند. در ادامه می‌توان با مطالعه ساختار ژنتیکی جمعیت‌های مناطق مختلف به منشاء بیماری و سطح تنوع آن در مناطق مختلف پی برد و بر این اساس، روش‌های مدیریت و کنترل آن را توسعه داد.

جدایه‌های بارور مربوط به گونه *V. pyrina* به یک منطقه جغرافیایی تعلق داشتند و جداسازی جدایه‌های قارچی از نمونه‌های آنامورفی (کنیدی) و تلئومورفی (آسکوسپور) انجام شده بود که تلاقی بارور بین آن‌ها مشاهده شد. جدایه‌های 3A و 3B جدایه‌های آسکوسپوری حاصل از یک آسک بودند که تلاقی بارور بین آن‌ها بوجود آمد. جهت تعیین تیپ‌های آمیزشی مختلف، استفاده از هشت جدایه آسکوسپوری حاصل از یک آسک که نیمی از آن‌ها دارای یک تیپ آمیزشی و نیمی دیگر دارای تیپ آمیزشی دیگر هستند، مناسب‌تر

و راحت‌تر می‌باشد و نیازی به تلاقی تعداد زیادی از جدایه‌ها به صورت تصادفی نمی‌باشد. در این مطالعه به دلیل در دسترس نبودن جدایه‌های آسکوسپوری در گونه‌های مورد بررسی از جدایه‌های آنامورفی استفاده شد.

جنس *Venturia* دارای گونه‌های با سیستم آمیزشی هموتالیک (*V. inopina*) و هتروتالیک (*V. inaequalis* و *V. pyrina*) می‌باشد. نیوکومب (۱۴) تولیدمثل جنسی گونه *V. inopina* به دست آمده از گیاه *Populus trichocarpa* را در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار داد. در این آزمایش، جدایه‌ها دو به دو با یکدیگر روی محیط کشت PDA تلاقی داده شدند. قرص‌های آگار حاوی میسلیوم قارچ با فاصله یک سانتی‌متری از یکدیگر قرار داده شدند و به مدت هفت روز در دمای ۲۰ درجه سلسیوس و سپس تحت شرایط ۱۲ ساعت نور / ۱۲ ساعت تاریکی در دمای شش درجه سلسیوس نگهداری شدند. پس از گذشت چهار ماه سودوتسیوم‌های بارور به صورت هموتالیک تولید شدند. آسکوسپورهای حاصل از کشت، مشابه آسکوسپورهای تشکیل شده در طبیعت بودند و فقط اندازه آن‌ها کمی بزرگتر بودند. زمستانگذرانی این گونه نیز به صورت فرم جنسی در طبیعت رخ می‌دهد.

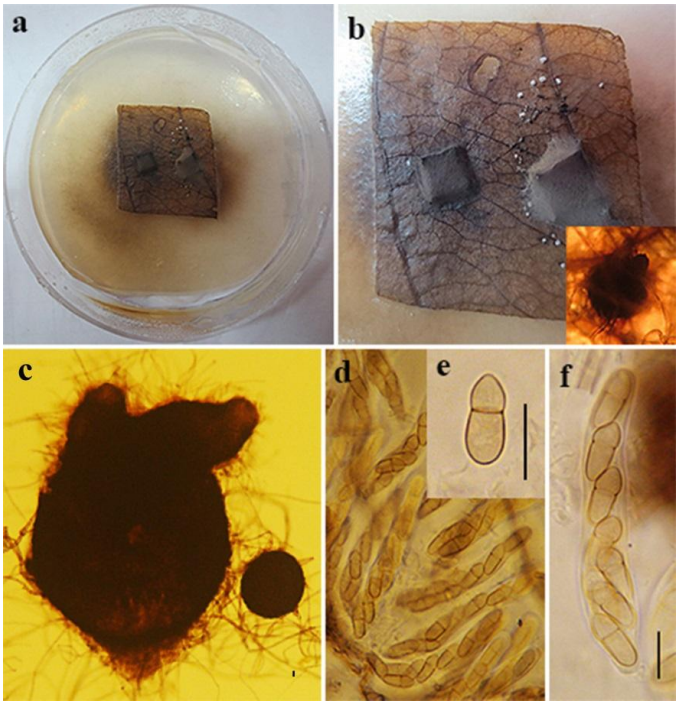
در قارچ‌های هتروتال، آمیزش جنسی در تلاقی دو استرین با تیپ آمیزشی مختلف اتفاق می‌افتد. تیپ آمیزشی در آسکومیست‌های هتروتال بوسیله یک ژنگاه تیپ آمیزشی با دو الل (MAT1 و MAT2) کنترل می‌شود. جهت انجام تولیدمثل جنسی در جمعیت باید هر دو تیپ آمیزشی با فراوانی مناسب وجود داشته باشند (۱۰). جهت بررسی فراوانی الل‌های MAT در سطح جمعیت، به دلیل زمانبر و پرهزینه بودن تلاقی بین همه افراد جمعیت در آزمایشگاه، می‌توان از روش‌های مبتنی بر PCR استفاده کرد. بر این اساس می‌توان نحوه زمستانگذرانی گونه‌های قارچی را در مناطق مختلف مشخص کرد که از عوامل مهم در روش‌های مدیریتی و کنترل بیماری می‌باشد.

اندام‌های تلئومورفی تشکیل شده به لحاظ ویژگی‌های ریخت‌شناختی (شکل و اندازه سودوتسیوم، آسک‌ها و آسکوسپورها) بررسی شدند و با نمونه‌های جمع‌آوری شده از طبیعت (جدایه‌های VI612 و VI613) که حاوی اندام‌های جنسی بودند مورد مقایسه قرار گرفتند. سودوتسیوم‌های حاصل از تلاقی بین جدایه‌های گونه *V. inaequalis* روی برگ‌ها به اشکال گرد تا کوزه‌ای بوده و به صورت منفرد و پراکنده تشکیل شده بودند. این سودوتسیوم‌ها به رنگ قهوه‌ای تیره تا سیاه و به ابعاد (۳۳۰)۴۶۰-۲۰۰×(۷۰۰)۱۲۰۰-۲۰۰ میکرومتر بودند. سودوتسیوم‌ها دارای اُستیول واجد پاپیل مشخص و بلند بوده و همچنین خارهایی در دهانه اُستیول وجود داشتند. داخل سودوتسیوم‌ها آسک‌های فراوانی تولید شده بودند. آسک‌ها کشیده تا چماقی شکل بوده و دارای پایه نازک و کوتاه و یا فاقد آن بودند. اندازه آسک‌ها (۱۲)۱۶-۸×(۶۷)۸۴-۶۰ میکرومتر بود. داخل هر آسک هشت آسکوسپور تشکیل شده بودند. آسکوسپورها دارای یک دیواره عرضی و همچنین یک فرورفتگی در محل دیواره عرضی بودند. آسکوسپورها طوری داخل آسک قرار گرفته بودند که سلول بالایی کوچکتر از سلول پایینی بود. آسکوسپورها تقریباً بیضوی شکل و با دو انتهای گرد بوده و به رنگ قهوه‌ای روشن دیده می‌شدند. آسکوسپورها دارای سطحی صاف هستند و ابعاد آن‌ها (۶)۷-۵×(۱۴/۵)۱۶-۱۳ میکرومتر بودند (شکل ۱). اندازه سودوتسیوم‌های تشکیل شده در مقایسه با آسکوکارپ‌های جمع‌آوری شده از طبیعت [(۱۶۲/۵)۲۴۰-۸۵×(۱۵۰)۲۳۰-۷۰ میکرومتر)] تفاوت چشمگیری را نشان دادند. همچنین سودوتسیوم‌های تشکیل شده در شرایط آزمایشگاهی دارای پاپیل‌های بلندتر و مشخص بودند. سایر ویژگی‌ها بین اندام‌های تشکیل شده در شرایط آزمایشگاهی و اندام‌های جمع‌آوری شده از طبیعت مشابه یکدیگر بودند. ویژگی‌های ریخت‌شناختی جدایه‌های مورد بررسی با توصیف گونه *V. inaequalis* ارائه شده توسط سیوانسان (۱۷) مطابقت داشت.

در تلاقی بین جدایه‌های گونه *V. pyrina* روی برگ‌ها سودوتسیوم‌های تقریباً گرد تا کوزه‌ای شکل به صورت انفرادی و پراکنده تشکیل شدند. سودوتسیوم‌ها به رنگ قهوه‌ای تیره تا سیاه و به ابعاد (۳۰۵)۳۸۰-۲۳۰×(۴۸۵)۵۳۰-۴۴۰ میکرومتر بوده، دارای اُستیول واجد پاپیل مشخص و بلند و خارهایی در دهانه اُستیول بودند. داخل سودوتسیوم‌ها آسک‌های فراوان کشیده تشکیل شدند. این آسک‌ها دارای یک پدیسل نازک و کوتاه و یا فاقد آن بودند و ابعاد آن‌ها (۱۱)۱۲-۱۰×(۹۶/۵)۱۲۰-۷۳ میکرومتر بود. داخل هر آسک هشت آسکوسپور بیضی شکل با دو انتهای گرد طوری قرار گرفته بودند که سلول پایینی کوچکتر از سلول بالایی بود. آسکوسپورها به رنگ قهوه‌ای متوسط با دیواره ضخیم و تیره بوده و یک دیواره عرضی داشتند. آسکوسپورها دارای سطح صاف و به ابعاد (۶)۷-۵×(۱۷)۲۰-۱۴ میکرومتر بودند (شکل ۲). سودوتسیوم‌ها و آسکوسپورهای تشکیل شده در مقایسه با اندام‌های جمع‌آوری شده از طبیعت (جدایه‌های VP276، VP277، VP278 و VP279) [به ترتیب (۱۵۰)۲۲۰-۸۰×(۱۳۲/۵)۱۹۰-۷۵ میکرومتر و (۵/۵)۶-۵×(۱۵)۱۷-۱۳ میکرومتر)] کمی بزرگتر بودند. سایر ویژگی‌ها بین اندام‌های تشکیل شده در شرایط آزمایشگاهی و اندام‌های جمع‌آوری شده از طبیعت مشابه یکدیگر بودند. ویژگی‌های ریخت‌شناختی جدایه‌های مورد بررسی با توصیف گونه *V. pyrina* ارائه شده توسط سیوانسان (۱۷) مطابقت داشت.

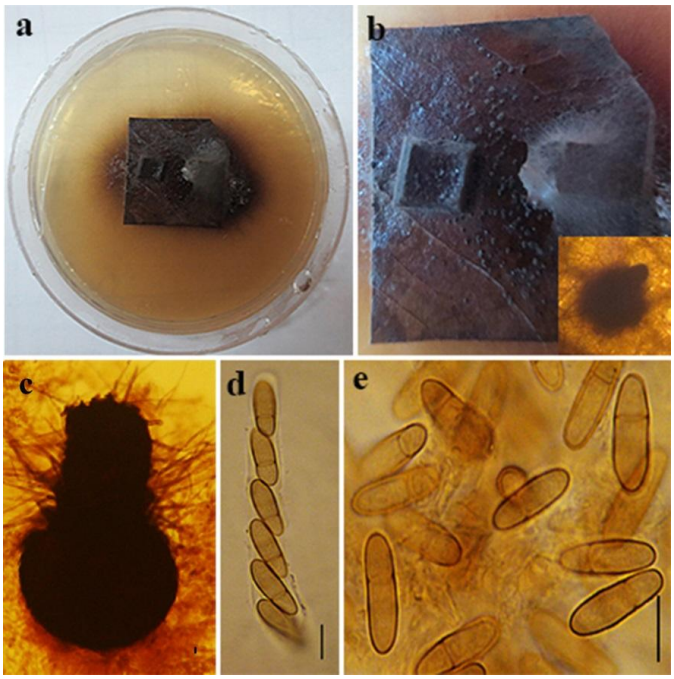
در تلاقی بین جدایه‌های دو گونه *V. inaequalis* و *V. pyrina* در این مطالعه، باروری جنسی مشاهده نشد که نشان دهنده ماهیت دو گونه بیولوژیکی مجزا می‌باشد. له‌کم و همکاران (۱۳) نیز دو گونه *V. inaequalis* و *S. pyracanthae* (به ترتیب به دست آمده از سیب و

پیراکانتا) را به لحاظ روابط ژنتیکی (بر اساس ناحیه ITS)، تولیدمثل جنسی و بیماری‌زایی روی میزبان‌ها (سیب و پیراکانتا) مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از مطالعات مولکولی یک شباهت کلی بین این دو گونه را نشان دادند.



شکل ۱- گونه *V. inaequalis*: a. تلاقی دو جدایه VI2 و VI79، b. سودوتسیوم‌های تشکیل شده روی قطعه برگ، c. سودوتسیوم و d-f. آسک‌ها و آسکوسپورها (مقیاس = ۱۰ میکرومتر)

Fig. 1- *V. inaequalis*: a. cross between VI2 and VI79, b. pseudothecia on leaf segment, c. pseudothecium and d-f. asci and ascospores (Bar = 10 µm)

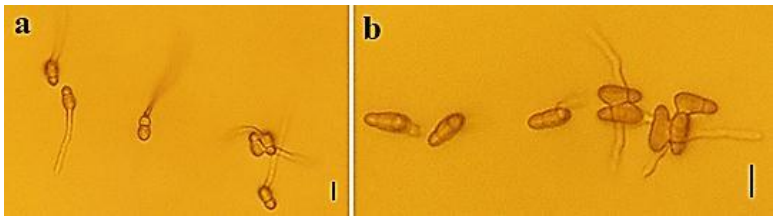


شکل ۲- گونه *V. pyrina*: a. تلاقی دو جدایه VP1-1 و VP1-3، b. سودوتسیوم‌های تشکیل شده روی قطعه برگ، c. سودوتسیوم، d. آسک و e. آسکوسپورها (مقیاس = ۱۰ میکرومتر)

Fig. 2- *V. pyrina*: a. cross between VP1-1 and VP1-3, b. pseudothecia on leaf segment, c. pseudothecium, d. asci and e. ascospores (Bar = 10 µm)

بررسی امکان تولیدمثل جنسی در شرایط آزمایشگاهی نشان داد که این دو جدایه در آمیزش با یکدیگر قادر به تولید سودوتسیوم‌های بارور هستند. به لحاظ بیماری‌زایی، هر دو جدایه یک اختصاصیت میزبانی نسبت به میزبان خود نشان دادند و قادر به آلوده کردن میزبان دیگر نبودند. بر اساس اطلاعات حاصل از این مطالعه، این دو گونه در نهایت به عنوان دو فرم اختصاصی (forma specialis) در گونه *V. inaequalis* معرفی شدند.

آسکوسپورهای تشکیل شده در تلاقی جدایه‌های مربوط به هر دو گونه جهت بررسی بارور و بالغ بودن روی محیط کشت WA کشت و در دمای ۱۸ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی مداوم نگهداری شدند. بعد از ۲۴ ساعت، همه آسکوسپورهای حاصل از یک آسک جوانه زدند (شکل ۳). آسکوسپورها به روش تک آسکوسپور به روی محیط کشت PDA منتقل شدند و در دمای ۱۸ درجه سلسیوس جهت رشد پرگنه‌ها نگهداری شدند.



شکل ۳- جوانه‌زنی آسکوسپورهای یک آسک در نسل اول به دست آمده از تلاقی‌های هر یک از دو گونه: a. در گونه *V. inaequalis* حاصل از تلاقی بین دو جدایه VI2 و VI79 و b. در گونه *V. pyrina* حاصل از تلاقی بین دو جدایه VP1-1 و VP1-3 (مقیاس = ۱۰ میکرومتر)

Fig. 3- Germination of ascospores of an ascus in first generation obtained from crossing in each of the two species: a. in *V. inaequalis* from cross between VI2 and VI79 and b. in *V. pyrina* from cross between VP1-1 and VP1-3 (Bar = 10 µm)

توسعه روش‌های معتبر تولیدمثل جنسی در شرایط آزمایشگاهی، می‌تواند به عنوان ابزار آزمایشگاهی ارزشمندی در جهت توسعه طیف وسیعی از مطالعات از جمله تجزیه و تحلیل‌های ژنتیکی کلاسیک، اصلاح استرین‌ها و همچنین به عنوان یک مکمل برای دستکاری‌های ژنتیکی مدرن (۷) و تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیکی و تکاملی (۸) باشد. تورگون (۱۹) ادعا کرد که ژن‌های *MAT* در گونه‌های قارچ *Cochliobolus* دارای تکامل سریعتری نسبت به برخی دیگر از توالی‌های DNA می‌باشند و این ناحیه ژنی دارای تنوع کمی درون گونه‌های این جنس قارچی می‌باشد. اما تنوع آن بین گونه‌ها زیاد است. بنابراین این محقق اظهار کرد که این ناحیه ژنی می‌تواند مانند سایر نواحی مورد استفاده از جمله ITS، جهت تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیکی مورد استفاده قرار گیرد.

بررسی تولیدمثل جنسی دو گونه قارچی *V. inaequalis* و *V. pyrina* در شرایط آزمایشگاهی در ایران تاکنون مورد بررسی قرار نگرفته است و این پژوهش، اولین مطالعه وضعیت باروری جنسی در این دو گونه قارچی می‌باشد. بر اساس این مطالعه، جدایه‌های دارای تیپ‌های آمیزشی متفاوت در دو گونه *V. inaequalis* و *V. pyrina* مشخص گردیدند. با شناسایی و آگاهی از حضور دو تیپ آمیزشی مجزا در این قارچها می‌توان جهت سهولت شناسایی و ردیابی جدایه‌های قارچی حامل الل‌های تیپ آمیزشی متفاوت، در مطالعات بعدی الل‌های مربوط به هر یک از این تیپ‌های آمیزشی را با طراحی آغازگرهای اختصاصی مورد شناسایی قرار داد. چرا که روش‌های مبتنی بر PCR می‌توانند جهت بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت قارچها، فیلوژنی، اپیدمیولوژی بیماری‌ها و همچنین مطالعات بیولوژی جمعیت (نحوه زمستانگذرانی گونه‌های قارچی در یک منطقه بر اساس فراوانی تیپ‌های آمیزشی و نسبت آن‌ها) به سهولت مورد استفاده قرار گیرند.

منابع

1- Ashkan S. M. 2012. A textbook of fruit crops diseases in Iran. Aeeizh, 472 pp, Tehran, Iran. (In Persian).
2- Babadoost M. 1997. Apple and crabapple scab. Report on plant disease. Department of Crop Science, University of Illinois. 803 pp.
3- Boehm E. W. A., Freeman S., Shabi E. and Michailides T. J. 2003. Microsatellite primers indicate the presence of asexual populations of *Venturia inaequalis* in coastal Israeli apple orchards, Phytoparasitica, 31: 236-251.
4- Dyer P. S. and Ogorman C. M. 2012. Sexual development and cryptic sexuality in fungi: insights from *Aspergillus* species, FEMS Microbiology Reviews, 36: 165-192.
5- Ershad D. 2009. Fungi of Iran. Iranian Research Institute of Plant Protection, 531 pp, Tehran, Iran. (In Persian).

6- Hemmati R. 2009. Study on genetic structure of Iranian populations of the fungus *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Barly, the causal agent of white stem rot of Canola, by using SSR, identification of mycelial compatibility groups & survey on their pathogenicity. Ph.D. thesis, University of Tehran, Karaj, Iran, 136 pp. (In Persian).
7- Houbraken J. and Dyer P. S. 2015. Induction of the sexual cycle in filamentous Ascomycetes. Pp. 23-46. *In*: M.A. van den Berg and K. Maruthachalam (eds.), Genetic Transformation Systems in Fungi. Vol.2, Fungal Biology.
8- Hsiang T., Chen F. and Goodwin P. H. 2003. Detection and phylogenetic analysis of mating type genes of *Ophiosphaerella korrae,* Canadian Journal of Botany, 81: 307-315.
9- Keitt G. W. 1952. Inheritance of pathogenicity in *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. The University of Chicago Press for the American Society of Naturalists, 86 (831): 373-390.
10- Khodaparast S. A. 2010. Fungal Kingdom. University of Guilan Press, 811 pp, Guilan, Iran. (In Persian).
11- Killian K. 1917. Uber die sexualitat von *Venturia inaequalis* (Cooke), Ad. Zeitschr. Bot., 9: 353-398.
12- Langford M. H. and Keitt G. W. 1940. Heterothallism in *Venturia pirina*, Phytopathology, 30: 452.
13- Le Cam B., Parisi L. and Arene L. 2002. Evidence of two formae speciales in *Venturia inaequalis*, responsible for apple and pyracantha scab, Phytopathology, 92: 314-320.
14- Newcombe G. 2003. Native *Venturia inopina* sp. nov., specific to *Populus trichocarpa* and its hybrids, Mycological Research, 107: 108-116.
15- Ross R. G. and Hamlin S. A. 1965. Influence of nutrients on perithecial production of *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint., Canadian Journal of Botany, 43: 959-965.
16- Ruszkiewicz-Michalska M. and Połeć E. 2006. The genus *Fusicladium* (Hyphomycetes) in Poland, Acta Mycologica, 41 (2): 285-298.
17- Sivanesan A. 1984. The bitunicate Ascomycetes and their anamorphs. Strauss & Cramer GmbH, Hirschberg, 701 pp, Germany.
18- Schubert K., Ritschel A. and Braun U. 2003. A monograph of *Fusicladium* s. lat. (Hyphomycetes), Schlechtendalia, 9: 1-132.
19- Turgeon B. G., Bohlmann H., Ciuffetti L. M., Christiansen S. K., Yang G., Schafer W. and Yoder O. C. 1993. Cloning and analysis of the mating-type genes from *Cochliobolus heterostrophus*, Molecular and General Genetics, 238: 270-284.
20- Zhang Y., Crous P. W., Schoch C. L., Bahkali A. H., Gao L. and Hyde K. D. 2011. A molecular, morphological and ecological re-appraisal of *Venturiales*—a new order of *Dothideomycetes*, Fungal Diversity, 51: 249-277.
21- Xu X., Roberts T., Barbara D., Harvey N. G., Gao L. and Sargent D. J. 2009. A genetic linkage map of *Venturia inaequalis*, the causal agent of apple scab, BMC Research Notes, 2: 163. Doi: 10.1186/1756-0500-2-163.